

ИЗМЕНЕНИЕ ВЫХОДНОГО СИГНАЛА ДНК-БИОСЕНСОРА, ИНДУЦИРОВАННОГО АДСОРБЦИЕЙ ЛИГАНДОВ НА ДУПЛЕКСЫ ДНК В ФЛУКТУИРУЮЩЕЙ СРЕДЕ

© 2020 г. В.Б. Аракелян*, А.П. Антонян**, М.А. Парсаданян**,
М.А. Шагинян**, П.О. Вардеванян**

*Факультет физики Ереванского государственного университета, ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения

**Факультет биологии Ереванского государственного университета, ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения

E-mail: v.arakelyan@ysu.am

Поступила в редакцию 25.11.2019 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Исследовано связывание лигандов с ДНК-дуплексами в ДНК-биосенсоре, когда под воздействием флуктуаций среды (внешнего шума) флуктуирует количество лигандов в растворе. Для случая малого заполнения получено стохастическое дифференциальное уравнение мультипликативного типа, описывающее изменение во времени числа адсорбированных лигандов на ДНК-дуплексах. Вычислены средняя величина и время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленные адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы в флуктуирующей среде. Показано, что мультипликативный шум уменьшает среднюю величину выходного сигнала ДНК-биосенсора. Уменьшение сигнала имеет пороговый характер — при некотором соотношении между параметрами адсорбции и интенсивностью внешнего шума не происходит уменьшение сигнала. Показано, что с увеличением интенсивности внешнего шума увеличивается время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора.

Ключевые слова: адсорбция лигандов, флуктуация среды, мультипликативный шум, ДНК-биосенсоры.

DOI: 10.31857/S0006302920040067

В настоящее время широко используются аналитические устройства нового поколения — биосенсоры. Наиболее важными и актуальными из всех видов биосенсоров являются ДНК-биосенсоры, которые применяются как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных областях — в медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды и т. д. [1–5]. Следует отметить, что, в отличие от традиционных аналитических устройств, ДНК-биосенсоры обладают высокой избирательностью и огромной чувствительностью [6]. Принцип работы ДНК-биосенсора чрезвычайно прост — в основе всех ДНК-биосенсоров лежит регистрация высокоспецифического распознавания последовательностей распределения нуклеиновых кислот [7]. Конструкция ДНК-биосенсора такова, что одноцепочная молекула ДНК иммобилизована на подложке и образует слой для распознавания. Если в растворе есть одноцепочные ДНК, комплементарные иммобилизованной ДНК, то при их гибридизации образуются дуплексы ДНК. Образование дуплекса активизирует сигнал, который передается регистрирующему устройству. Величи-

на выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу ДНК-дуплексов.

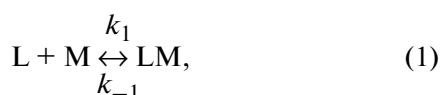
Проблеме гибридизации ДНК посвящено большое число работ и имеются впечатляющие успехи [8–11]. Исследования в области термодинамики [8] и кинетики гибридизации ДНК [9] представляют большой практический интерес, поскольку их результаты используются на практике при изготовлении и использовании ДНК-сенсоров. Следует отметить важную работу [10], где показано, что методы статистической физики позволяют исследовать фундаментальную проблему биологии — регуляцию генетической экспрессии. Теоретически разработан подход, описывающий процесс гибридизации ДНК на микрочипах [11], который служит основой не только для анализа многочисленных экспериментальных данных по гибридизации ДНК, но и для практики изготовления микрочипов.

В подавляющем большинстве случаев ДНК-биосенсор «работает» в среде, содержащей большое количество разнообразных лигандов, которые могут адсорбироваться как на дуплексы ДНК, так и на одиночные иммобилизованные

молекулы ДНК. Наибольший интерес представляет случай, когда изменение выходного сигнала происходит в результате обратимой адсорбции лигандов на ДНК-дуплексы. Адсорбированные лиганды неизбежно приводят к изменению величины выходного сигнала ДНК-биосенсора. Рассмотрим более естественный случай малости константы скорости диссоциации ДНК-дуплекса, когда относительно быстрая адсорбция и десорбция лигандов происходит в условиях постоянства числа ДНК-дуплексов. Отметим, что параметры среды, в которой «работает» ДНК-биосенсор, как правило, не строго постоянны, а случайно флуктуируют. Эти случайные флуктуации среды (внешний шум) влияют на процесс формирования выходного сигнала ДНК-биосенсора. Внешние флуктуации не имеют микроскопического происхождения и избавиться от них практически невозможно. В работе [12] были определены характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора, когда под воздействием флуктуаций среды флуктуировало число адсорбционных центров (фактически сродство) на ДНК-дуплексе. Было показано, что шум выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленный адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы, является ланжевеновским. В данной работе рассмотрен случай, когда под воздействием флуктуаций среды флуктуирует число лигандов в растворе. В этом случае шум, связанный с адсорбцией и десорбцией лигандов на ДНК-дуплексы, оказывается мультипликативным. Определены характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленные адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Чтобы исследовать «работу» ДНК-биосенсора в флуктуирующей среде, исключим влияние осложняющих факторов. Для этой цели примем, во-первых, что ДНК-биосенсор работает в пространственно-однородной системе, т.е. нет диффузионных ограничений в кинетике связывания лиганда с ДНК; во-вторых, что ДНК-биосенсор работает в макроскопически большой системе, такой, что можно пренебречь внутренними флуктуациями, интенсивность которых уменьшается с увеличением размеров системы. Квазихимическая реакция, описывающая связывание лиганда с адсорбционным центром на ДНК-дуплексе, будет иметь вид



где LM — комплекс лиганда с адсорбционным центром на ДНК-дуплексе, k_1 и k_{-1} — константы скоростей образования и распада комплекса ли-

ганда с ДНК-дуплексом. ДНК-дуплекс представим в виде одномерного кристалла с числом адсорбционных центров N , а лиганд, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает n подряд расположенных центров адсорбции на ДНК-дуплексе. Если принять, что число адсорбированных лигандов равно x , для случая малого заполнения уравнение, описывающее изменение во времени числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов, будет иметь следующий вид [12, 13]:

$$dx/dt = k_1 c_f (N - (2n - 1)x), \quad (2)$$

где c_f — число свободных лигандов в растворе. Заметим, что при $n = 1$ уравнение (2) описывает адсорбцию при произвольном заполнении. Чтобы в дальнейшем при переходе к концентрациям не вводить новые обозначения, будем считать, что адсорбция происходит в единичном объеме. Рассмотрим случай, когда флуктуирует число свободных лигандов в растворе c_f . Чтобы анализ результатов сделать однозначным, оставим значения других параметров на уровне их средних значений. В подавляющем большинстве случаев причиной флуктуации является действие не одного выделенного фактора, а действуют множество независимых факторов. В этом случае, как известно, их суммарное воздействие, согласно центральной предельной теореме, имеет гауссово распределение, $c_f(t)$ можно представить в виде суммы среднего $\overline{c_f}$ и гауссового шума $\xi(t)$, среднее значение которого равно нулю, т.е. $\overline{\xi(t)} = 0$:

$$c_f(t) = \overline{c_f} + \sigma_c^2 \cdot \xi(t), \quad (3)$$

где σ_c^2 — интенсивность шума. Примем, что интенсивность шума не зависит от t , т.е. имеем стационарный шум. Принимаем, что время корреляции флуктуаций внешней среды намного меньше характерного времени изменения переменной в системе, так что, согласно работе [14], в выражении (3) можно перейти к пределу гауссового белого шума. Таким образом, принимаем, что имеем гауссов белый шум с характеристиками: $\overline{\xi(t)} = 0$, $\xi(0) \cdot \xi(t) = \delta(t)$, где $\delta(t)$ — дельта-функция. Подставив выражение (3) в выражение (2), получим

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f_c(x) + \sigma_c \cdot g(x) \cdot \xi(t), \\ f_c(x) &= \overline{c_f} (N - (2n - 1)x) - k_{-1}x, \\ g(x) &= k_1 (N - (2n - 1)x). \end{aligned} \quad (4)$$

Чтобы не вводить новых обозначений в уравнении (4) и далее, знак черты усреднения над параметрами опущен, оставлен лишь у параметра, флуктуирующего под воздействием внешнего шума. Поскольку, как это видно из уравнения (4),

случайная функция умножается на переменную x , то уравнение (4) относят к классу мультипликативных стохастических дифференциальных уравнений. Процедура решения уравнения (4) следующая. Вначале для уравнения (4) выписывается соответствующее уравнение Фоккера–Планка, а затем, используя это уравнение, получают урав-

нение для моментов. Поскольку флуктуирующий параметр аппроксимирован гауссовым белым шумом, то, согласно работе [14], в этом случае стохастическое дифференциальное уравнение (4) интерпретируется в смысле Стратановича и соответствующее уравнение Фоккера–Планка для него, как показано в работе [14], имеет вид

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} \left(\left(f_c(x) + \frac{\sigma_c^2}{2} g(x)g'(x) \right) P(x,t) \right) + \frac{\sigma_c^2}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} (g^2(x)P(x,t)), \quad (5)$$

где $P(x,t)$ – вероятность того, что в системе в момент времени t имеется ровно x адсорбированных на

ДНК-дуплексе лигандов. Для получения уравнения для моментов перепишем уравнение (5) в виде

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(x,t)}{\partial t} &= -\frac{\partial}{\partial x} (A(x)P(x,t)) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} (B(x)P(x,t)), \\ A(x) &= f_c(x) + \frac{\sigma_c^2}{2} g(x)g'(x), \\ B(x) &= \sigma_c^2 g^2(x). \end{aligned} \quad (6)$$

В работе [15] приводится подробный вывод уравнений для моментов произвольного порядка. Следуя работе [15], легко получить дифференциальное уравнение для $\bar{x}$, которое имеет вид

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = \overline{A(x)}. \quad (7)$$

Подставив в уравнение (7) значение $A(x)$ из уравнения (6) с учетом явных выражений для $f_c(x)$ и $g(x)$, получим следующее окончательное уравнение, описывающее изменение во времени среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $\bar{x}$ в виде

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{x}}{dt} &= -\alpha \bar{x} + \beta, \\ \alpha &= k_{-1} + (2n-1)k_1 \bar{c}_f - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)^2, \\ \beta &= k_1 \bar{c}_f N - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)N. \end{aligned} \quad (8)$$

Принимаем, что в начальный момент времени на ДНК-дуплексе не было лигандов, т.е. при начальном условии $x(0) = 0$. Из решения уравнения (8) получим следующее выражение для среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов:

$$\bar{x}(t) = \frac{\beta}{\alpha} (1 - \exp(-\alpha t)). \quad (9)$$

Для случая малого шума, когда можно принять $\alpha > 0$, из уравнения (9) при стремлении времени к бесконечности получим стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $(\bar{x})_{st}$ в виде

$$(\bar{x})_{st} = \frac{k_1 \bar{c}_f N - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)N}{k_{-1} + (2n-1)k_1 \bar{c}_f - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)^2}. \quad (10)$$

Принимаем, что выходной сигнал ДНК-биосенсора через единицу площади биосенсора $I(t)$, обусловленный адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексе, пропорционален числу адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $x(t)$, т.е. $I(t) = \gamma x(t)$, где γ – коэффициент пропорциональности. В этом случае среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора равно $\overline{I(t)} = \gamma \bar{x}(t)$, т.е.

$$\overline{I(t)} = \gamma \frac{\beta}{\alpha} (1 - \exp(-\alpha t)) \quad (11)$$

а стационарное значение сигнала равно

$$(\overline{I})_{st} = \gamma \frac{k_1 \bar{c}_f N - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)N}{k_{-1} + (2n-1)k_1 \bar{c}_f - \frac{\sigma_c^2}{2} k_1^2 (2n-1)^2}. \quad (12)$$

Важной характеристикой выходного сигнала ДНК-биосенсора является время релаксации сигнала. Из формулы (11) следует, что время ре-

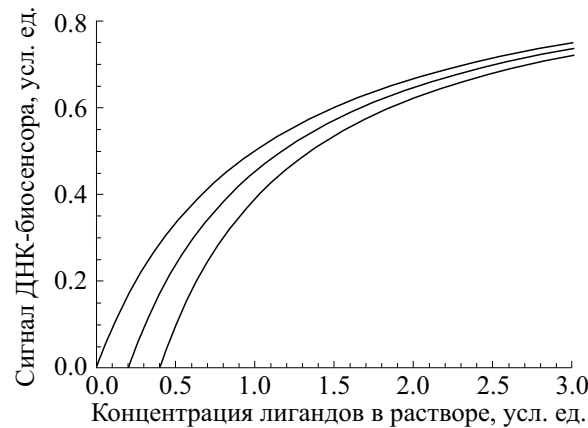


Рис. 1. Зависимости сигнала ДНК-биосенсора Y от концентрации лигандов в растворе X . Графики рассчитаны по формуле (15) при $n = 1$. Верхняя кривая соответствует детерминированному случаю, когда отсутствует внешний шум ($\sigma_c = 0$). Средняя кривая соответствует случаю, когда $C = D = 0.2$, нижняя кривая когда $C = D = 0.4$.

лаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора равно

$$\tau = \left(k_{-1} + (2n-1)k_1\bar{c}_f - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)^2 \right)^{-1}. \quad (13)$$

Из уравнения (13) видно, что с увеличением концентрации лигандов в растворе время релаксации сигнала уменьшается.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и следовало ожидать, при отсутствии внешнего шума, т.е. при условии $\sigma_c = 0$, стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов (10) в точности совпадает с соответствующим решением детерминированного уравнения (2) (для определения стационарного значения адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов следует приравнять правую часть уравнения (2) к нулю и найти x_{st}). Как следует из уравнений (10) и (11), стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов и среднее значение сигнала зависят от интенсивности внешнего шума σ_c^2 , что является прямым следствием мультипликативности шума [14]. Заметим, что в случае аддитивного ланжевеновского шума это не так — стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов не зависит от интенсивности внешнего шума [12]. Из уравнения (11) видно, что зависимость среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленного адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексе, от интенсивности внешнего шума имеет пороговый характер. Анализ уравнения (11) показывает, что при заданном уровне интенсивности внешнего

шума сигнал отсутствует, когда число лигандов в растворе меньше некоторого определенного значения, которое определяется из условия равенства нулю числителя в выражении (12). Это значение равно

$$\bar{c}_f^* = \frac{\sigma_c^2 k_1 (2n-1)}{2}. \quad (14)$$

Для удобства построения графиков и анализа результатов, перепишем выражение (12) в безразмерном виде:

$$Y = \frac{X - C}{1 + (2n-1)X - D},$$

$$Y = (\bar{I})_{st} / (N\gamma), \quad X = K\bar{c}_f, \quad K = k_1 / k_{-1}, \quad (15)$$

$$C = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2}(2n-1), \quad D = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2}(2n-1)^2,$$

где Y — безразмерный сигнал ДНК-биосенсора, X — безразмерная концентрация лигандов в растворе, K — константа равновесия квазихимической реакции (1). Графики зависимостей (15) представлены на рис. 1. Кривые построены при $n = 1$ (при других значениях n кривые качественно не отличаются от случая $n = 1$). Из рис. 1 видно, что наличие внешнего мультипликативного шума приводит к уменьшению сигнала ДНК-биосенсора, обусловленного адсорбцией и десорбцией лигандов на ДНК-дуплексы. Из рис. 1 также видно, что если интенсивность внешнего шума отлична от нуля, то существует область малых чисел лигандов в растворе $\bar{c}_f$ (малых концентраций), при которых отсутствует сигнал ДНК-биосенсора. Из выражения (12) также следует, что с увеличением как интенсивности внешнего шума, так и k_1 эта область расширяется.

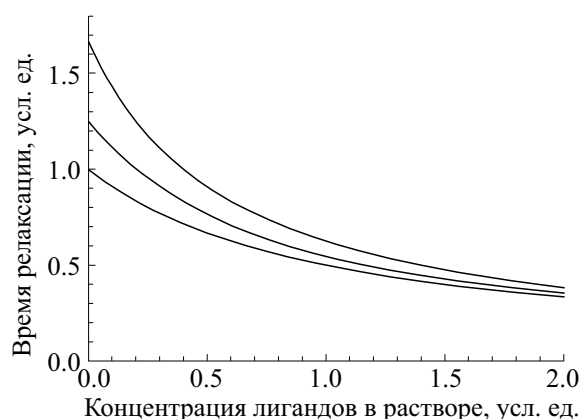


Рис. 2. Зависимости времени релаксации от концентрации лигандов в растворе. Графики рассчитаны по формуле (16) при $n = 1$. Нижняя кривая соответствует детерминированному случаю, когда отсутствует внешний шум ($\sigma_c = 0$). Средняя кривая соответствует случаю, когда $C = D = 0.2$, верхняя кривая — $C = D = 0.4$.

Для удобства построения графиков и анализа результатов перепишем уравнение (13) в безразмерном виде:

$$Y = (1 + (2n - 1)X - D)^{-1} \quad (16)$$

$$Y = \tau k_{-1}, \quad X = Kc_f, \quad K = k_1 / k_{-1}, \quad D = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2} (2n - 1)^2,$$

где Y — безразмерное время релаксации сигнала, X — безразмерная концентрация лигандов в растворе, K — константа равновесия квазихимической реакции (1). На рис. 2 представлена зависимость времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе. Кривые построены при $n = 1$ (при других значениях n кривые качественно не отличаются от случая $n = 1$). Из рис. 2 видно, что с увеличением интенсивности как внешнего шума, так и k_1 увеличивается время релаксации, причем при малых концентрациях лигандов это увеличение проявляется более значительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе в условиях, когда под воздействием внешнего шума флуктуирует число лигандов в растворе, вычислены среднее число лигандов, адсорбированных на ДНК-дуплексе, а также средняя величина сигнала ДНК-биосенсора, обусловленная адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексах ДНК-биосенсора. Определены некоторые характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. K. Metkar and K. Girigoswami, *Biocatalysis and Agricultural Biotech.* **17**, 271 (2019).
2. M. S. Mufamadi and P. R. Sekhejane, in *Nanotechnology. An Agricultural Paradigm* (Springer, Singapore, 2017), pp. 263–278.
3. T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. Barton, *Nature Biotechnol.* **21** (10), 1192 (2003).
4. J. Wang, *Anal. Chem. Acta* **469**, 63 (2002).
5. E. Palecek, M. Fojta, and F. Jelen, *Bioelectrochemistry* **56**, 85 (2002).
6. Ю. А. Ахапкин и др., *Биотехника — новое направление компьютеризации* (Наука, М., 1990).
7. V. Kavita, *J. Bioengineer. Biomed. Sci.* **7** (2), 222 (2017).
8. A. Halperin, A. Buhot, and E. B. Zhulina, *J. Phys. Condens. Matter* **18**, S463 (2006).
9. B. A. Baker and V.T. Milam, *Nucl. Acids Res.* **39** (15), e99 (2011).
10. М. В. Головкин, Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Биофизика* **54** (4), 581 (2009).
11. Ю. Д. Нечипуренко, в кн. *Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах*, под ред. Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубина (Институт

- компьютерных исследований, М.-Ижевск, 2017), сс. 522–530.
12. А. Т. Карапетян, Г. А. Аветисян и В. Б. Аракелян, Докл. НАН РА **110** (4), 376 (2010).
13. V. Arakelyan, Y. Babayan, and G. Potikyan, J. Biomol. Struct. Dyn. **18**, 231 (2000).
14. В. Хорстхемке и Р. Лефевр, *Индукцированные шумом переходы. Теория и применение в физике, химии и биологии* (Мир, М., 1987).
15. С. А. Ахманов, Ю. Е. Дьяков и А. С. Чиркин, *Введение в статистическую радиофизику и оптику* (Наука, М., 1981).

Adsorption of Ligands on DNA Duplexes under the Influence of the Fluctuating Medium Causes a Change in DNA-Biosensor Output Signal

V.B. Arakelyan*, A.P. Antonyan**, M.A. Parsadanyan**, M.A. Shahinyan**, and P.O. Vardevanyan**

*Faculty of Physics, Yerevan State University, ul. A. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia

**Faculty of Biology, Yerevan State University, ul. A. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia

In this study we report on ligand binding to DNA-duplexes in DNA-biosensor when the number of ligands in the solution fluctuates under the influence of the fluctuating medium (external noise). A multiplicative stochastic differential equation, which takes into account the time-dependent change in the number of bound ligands to DNA-duplexes is obtained for a system with small amounts of the studying samples. DNA-biosensor output signal average value and relaxation time that depend on adsorption of ligands on DNA-duplexes in fluctuating medium have been calculated. It is shown that multiplicative noise decreases the average value of DNA-biosensor output signal. The deterioration in the signal has its threshold level – at a certain ratio between the adsorption parameters and the intensity of external noise no deterioration in the signal occurs. It is shown that the relaxation time of the output signal of DNA-biosensor increases along with increasing external noise intensity.

Keywords: adsorption of ligands, medium fluctuation, multiplicative noise, DNA-biosensors