

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ ԱԼԵՔՍԱՆԴՐ ԵՎԳԵՆԻ

ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ԵՒ ԿԻՍԱՀԱՂՈՐԴԻՉՆԵՐԻ ՆԱՆՈՄԱՍՆԻԿՆԵՐԻ
ՓՈԽԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՄԱԿՐՈՍՈՒԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ՀԵՏ
ԼՈՒԾՈՒՅԹՈՒՄ

Ա.04.10 - «Կիսահաղորդիչների ֆիզիկա»
մասնագիտությամբ ֆիզիկամաթեմատիկական
գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2020

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МАМАСАХЛИСОВ АЛЕКСАНДР ЕВГЕНЬЕВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ПОЛУПРОВОДНИКОВ С
БИОЛОГИЧЕСКИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ В РАСТВОРЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук по специальности
01.04.10 - «Физика полупроводников»

ЕРЕВАН 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Հայ Ռուսական Համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր
Է.Մ. Ղազարյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.Մ. Ղամբարյան, ֆ.-մ. գ.դ.,
պրոֆեսոր
Ա.Հ. Պողոսյան, ֆ.-մ. գ.դ., դոցենտ

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2020թ. օգոստոսի 28-ին ժամը 12-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի ֆիզիկայի 049 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան 1, ԵՊՀ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2020թ. հուլիսի 18-ին :

049 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, ֆ.-մ. գ. թ., դոցենտ



Վ. Պ. Քալանթարյան

Тема диссертации утверждена в

Российско – Армянском университете

Научный руководитель:

доктор физ.-мат. наук, профессор
Э.М. Казарян

Официальные оппоненты:

К.М. Гамбарян, д.ф.-м.н.,
профессор
А.Г. Погосян, д.ф.-м.н.,
доцент

Ведущая организация:

ИНСТИТУТ ФИЗИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ НАН
РА

Защита диссертации состоится 28-го августа 2020г. В 12:00 часов на заседании Специализированного совета 049 по физике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, Алека Манукяна 1, ЕГУ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 18-го июля 2020г.

Ученый секретарь Специализированного совета 049,

к.ф.-м.н., доцент



Վ. Պ. Կալանթարյան

Введение

Актуальность работы. Взаимодействие металлических и полупроводниковых наночастиц и в том числе квантовых точек с биологическими молекулами играет важную роль в создании различных биологических датчиков (сенсоров) и представляет собой одну из крайне недостаточно изученных проблем физики полупроводников.

Комплексы ДНК с квантовыми точками могут стать ключевым элементом биологических сенсоров в таких областях, как медицинская диагностика, мониторинг загрязнения окружающей среды, защита от биологического оружия. Хотя ДНК-сенсоры уже нашли широкое применение в реальной жизни, они имеют перспективу повышения функциональности и эффективности. Одним из возможных направлений является повышение избирательности и чувствительности сенсора.

Для достижения этих целей нужно исследовать множество факторов влияющих на такие физические характеристики, как проводимость чувствительного слоя ДНК - сенсора, стабильность ДНК – гибридов, характерные времена их образования и т.д. При этом, особенно важным является сопоставление этих характеристик как в объеме, так и на поверхности ДНК - сенсора. Особый интерес в данном контексте представляет влияние различных низкомолекулярных соединений (лигандов) на структурные и электронные свойства нуклеиновых кислот, а именно ДНК и РНК.

С учетом приведенных выше факторов, актуальность данной работы определяется исследованием эффекта низкомолекулярных соединений на проводимость чувствительного слоя биосенсора на границе раздела электролит – подложка при наличии в исследуемом образце ДНК – мишеней, комплементарных молекулам ДНК – зондов.

Целью работы является:

1. Построение теоретической модели, описывающей проводимость чувствительного слоя, образуемого комплексами ДНК – квантовая точка на поверхности ДНК-сенсора в присутствии низкомолекулярных соединений в условиях возникновения фототока.
2. Расчет кинетики гибридизации ДНК – зондов, иммобилизованных на границе раздела электролит – твердое тело с ДНК – мишенями с учетом эффекта низкомолекулярных соединений.
3. Оценка факторов стабильности ДНК – дуплексов и кооперативности их образования в присутствии низкомолекулярных соединений, образующих комплексы с нативной формой ДНК.
4. Оценка влияние интеркалирующих лигандов на функциональные свойства ДНК – сенсора при образовании комплексов ДНК – квантовая точка.

Научная новизна заключается в построении модели, описывающей электрические, структурные и кинетические свойства комплексов ДНК с квантовыми точками и лигандами – интеркаляторами в растворе и на поверхности ДНК-сенсора. В частности, для различных концентраций низкомолекулярных соединений получены кинетические кривые гибридизации ДНК и адсорбции лигандов на ДНК – дуплексы для различных концентраций мишеней в анализируемом растворе. В работе также показано, что лиганды – интеркаляторы повышают проводимость монослоя комплексов ДНК с квантовыми точками на на поверхности ДНК-сенсора в условиях возникновения фототока.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Образование комплексов между квантовыми точками и ДНК-дуплексами на поверхности ДНК – сенсора в процессе гибридизации создает эффективный механизм регистрации ДНК – мишеней в растворе и регулируется низкомолекулярными веществами, растворенными в исследуемом образце.
2. Стабильность и флукуационные свойства ДНК – дуплексов существенным образом зависят от концентрации низкомолекулярных веществ в растворе и механизмов их связывания с ДНК.
3. Кинетика гибридизации ДНК на поверхности ДНК – сенсора определяется соотношением между константами скорости диссоциации ДНК – дуплекса и десорбции низкомолекулярного соединения с ДНК – дуплекса.
4. Проводимость монослоя, образованного комплексами ДНК – квантовая точка существенным образом зависит от заряда лигандов – интеркаляторов, связывающихся с нативной формой ДНК. При этом, проводимость монослоя при наличии заряженных лигандов существенно выше, чем в присутствии электронейтральных.

Научная и практическая ценность работы обусловлена тем огромным значением, которое имеют физико – химические закономерности функционирования ДНК-сенсоров. Именно из – за этого, теоретическое исследование эффектов взаимодействия между квантовыми точками, лигандами - интеркаляторами и молекулами ДНК имеет столь важное значение для создания и улучшения ДНК – сенсоров. В частности, полученные результаты несомненно будут полезны при разработке оптимальных режимов работы ДНК-сенсоров.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на научных семинарах кафедры биофизики ЕГУ. Материалы диссертации также были представлены и докладывались на годичных научных конференциях РАУ, а также на научной конференции: ANAM2019 Young Scientist School”, 25/09-29/09, 2019, Yerevan, Armenia.

Публикации.

По теме диссертации опубликованы 5 научных работ.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, насчитывающего 120 наименований. Диссертация изложена на 105 страницах, включает 29 рисунков

Во **Введении** сформулирована цель работы, показаны научная новизна и практическая значимость результатов, перечисляются основные положения представленные к защите. **Первая глава** посвящена обзору исследований свойств наночастиц с ДНК, стабильности двунитевой ДНК, взаимодействию ДНК с низкомолекулярными соединениями. **Вторая глава** посвящена изучению проводимости монослоя комплексов дуплексной ДНК с квантовыми точками, а также изотермы гибридизации ДНК на поверхности в присутствии интеркалирующих лигандов, которые связываются с участками дцДНК. Несмотря на то, что при использовании ДНК – сенсоры погружаются в исследуемый раствор на относительно короткий промежуток времени,

когда кинетика гибридизации играет важную роль, понимание равновесных свойств также необходимо для сравнительной оценки важности кинетических и термодинамических факторов для эффективности ДНК – сенсоров. **Третья глава** диссертационной работы посвящена флуктуациям при переходе порядок – беспорядок в комплексах ДНК – лиганд, использующих различные механизмы связывания и исследованию теории плавления комплексов ДНК – лиганд. **Четвертая глава** посвящена исследованию кинетики гибридизации фрагментов ДНК в присутствии лигандов-интеркаляторов, зависимости кинетики гибридизации и адсорбции от констант равновесия и эффекту характерных времен релаксации. Работа завершается **Выводами**.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель диссертационной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор исследований свойств наночастиц с ДНК, стабильности дунитевой ДНК, взаимодействию ДНК с низкомолекулярными соединениями.

Во второй главе диссертационной работы исследована проводимость монослоя комплексов ДНК – квантовая точка в присутствии интеркалирующих лигандов. Быстрое, специфическое обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот имеет большое практическое значение благодаря возможному применению в различных областях, от обнаружения патогенов до диагностики генетических заболеваний. Среди различных методов обнаружения, фотоэлектрохимические методы по-прежнему привлекают значительный интерес, в силу их чувствительности, простоты и дешевизны. При этом, квантовые точки (КТ) с их уникальными флуоресцентными и фотоэлектрохимическими свойствами являются фотоактивными материалами, крайне перспективными для разработки сенсоров нуклеиновых кислот (далее, ДНК - чипов).

Повышение чувствительности ДНК – сенсора, в частности может быть достигнуто с помощью электрохимически активных соединений с более высоким сродством к дуплексной форме ДНК, чем к оцДНК. Взаимодействие подобных веществ с ДНК может существенно повысить стабильность двухцепочечных участков и в то же время амплитуду генерируемого сигнала, что, в свою очередь, повысит чувствительность ДНК - сенсора. В число таких лигандов входят так называемые интеркаляторы, молекулы с плоской гетероциклической структурой, которые умещаются между азотистыми основаниями и меняют локальную структуру двухцепочечной ДНК.

Для распознавания комплементарных ДНК мишеней на поверхности электрода ДНК – чипа создается чувствительная поверхность с иммобилизованными на ней ДНК – зондами. В качестве мишеней используется оцДНК с привитыми к ним КТ (например, CdS), используемых в качестве меток. В процессе гибридизации комплементарных оцДНК образуется монослой, состоящий из комплексов дцДНК – КТ и оцДНК – зондов (см. рис. 1). При взаимодействии электро – магнитного излучения с монослоем имеет место фотовозбуждение КТ, с последующим возникновением свободных носителей заряда (электрон – дырочной пары) и, как следствие, фототока в монослое, на основании измерения которого определяется концентрация ДНК – мишени в растворе. Для улучшения чувствительности используются окислительно – восстановительные лиганд – интеркаляторы, связывающиеся с дцДНК, такие как $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, доксорубицин, метиленовый синий и т.д.

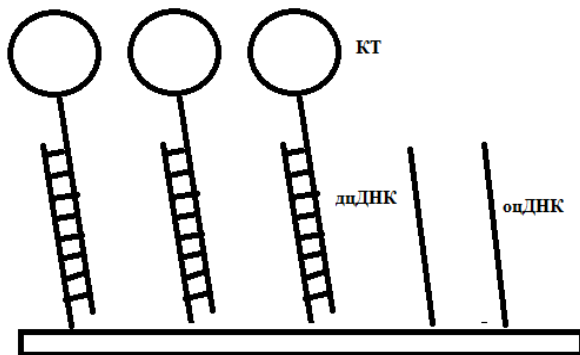


Рис. 1. Схематическое изображение комплексов дцДНК – КТ и оцДНК – зондов, иммобилизованных на поверхности электрода

Существующие данные скорее свидетельствуют о том, что перенос заряда через ДНК лучше всего может быть описан как механизм множественных, частично когерентных перескоков между делокализованными участками содержащим основания с плотным стэкингом (O'Neill and Barton, 2004; Xiang et al., 2015). Эти области оснований с π – стэкингом между основаниями возникают за счет конформационных изменений в основаниях. Когерентный суперобмен может возникать вдоль областей с π – стэкингом, содержащих в среднем около трех пар оснований. Т.о., перенос заряда в ДНК можно рассматривать как перескоки между смежными областями с π – стэкингом.

Чувствительный слой ДНК – чипа образован одно- и двухцепочечными ДНК, иммобилизованными на поверхности электрода. При этом, оцДНК обладает намного большим сопротивлением (R_{ss}), чем дцДНК (R_{ds}): $R_{ss} \gg R_{ds}$. Предполагается, что дцДНК содержат некоторое количество интеркалирующих лигандов, усиливающих фототок в чувствительном слое ДНК – чипа. В диссертационной работе, в частности, показано, что несмотря на то, что молекула ДНК является гетрополимером, электростатические эффекты в ней, возникающие в ограниченном объеме можно рассматривать как гомополимерные. Доля оцДНК, гибридованных с ДНК – мишенями и количество лигандов, связанных с дцДНК на поверхности были оценены для неконкурентной гибридизации как (Y.Sh. Mamasakhlisov, A.P. Antonyan, A.A. Nakobyan, 2017)

$$\frac{x(1-r)^N}{1-x} = c_t K_t \exp[-\Gamma(1+x-zrx)]$$

$$\frac{r}{1-r} = c_l K_l \exp\left[\frac{\Gamma}{N}(1+x-zrx)\right], \quad (1)$$

где введены следующие обозначения: x - доля гибридованных оцДНК – мишеней на поверхности электрода; r - степень заполнения дцДНК лигандом – интеркалятором; N - число пар оснований в дцДНК на поверхности; z - заряд лиганда; c_t и c_l - концентрации оцДНК – мишеней и лигандов в растворе, соответственно; K_t и K_l - константы

связывания оцДНК – мишеней и лигандов в растворе, соответственно; $\Gamma = 8\pi N\sigma_0 l_B \frac{r_D^2}{H}$ и $\sigma_0 = \frac{NN_0}{A}$, где N_0 - общее число оцДНК – зондов на поверхности, A - площадь поверхности электрода, l_B - длина Бьоррума, r_D - радиус экранирования Дебая, H - толщина поверхностного слоя. Зависимость доли x от концентрации оцДНК – мишеней в растворе называется изотермой гибридизации и представлена на Рис. 2.

Сопrotивление монослоя дцДНК, показанного на Рис. 1 соответствует параллельному подключению xN_0 сопротивлений R_{ds} . Следовательно, общее сопротивление монослоя оценивается как

$$R = \frac{R_{ds}}{xN_0} \quad (2)$$

Сопrotивление ДНК как правило увеличивается линейно с длиной, что характерно для механизма некогерентных перескоков. Однако для последовательностей ДНК со стэкингом GC – пар, на линейную зависимость длины накладывается периодическое колебание, указывающее на частичную когерентность транспорта. Здесь мы для простоты будем предполагать малое содержание GC – пар и предполагать высокое сродство интеркалирующих лигандов к GC – парам. Оценим сопротивление субцепи из n пар оснований между двумя ближайшими интеркаляторами как

$$R(n) = a(T, \omega) \left[\frac{2}{e^{2k_l}} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) + \frac{n-1}{e^{2k}} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) \right], \quad (3)$$

где ω – циклическая частота падающего на КТ излучения, T - температура, k_l - скорость переноса заряд от лиганда к соседней паре оснований, k - скорость переноса заряда между соседними парами оснований и E_a - энергия активации, описанная выше. Если γ - степень заполнения дцДНК лигандом – интеркалятором, то среднее число лигандов в дуплексной ДНК оценивается как $m = Nr$, а средняя длина цепи дцДНК между соседними интеркалированными лигандами как $n = \frac{1}{r}$. Тогда сопротивления одного комплекса дцДНК – КТ можно оценить как

$$R_{ds} = a(T, \omega) \frac{\exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)}{e^2} \left[\frac{2Nr+1}{k_l} + \frac{1}{k_{QD}} + \frac{N(1-r)+1/r-1}{k} \right] \quad (4)$$

Здесь k_{QD} - это константа скорости переноса электрона от ДНК к фотовозбужденной КТ. Поскольку, общее число комплексов дцДНК – КТ оценивается как $N_{pt} = xN_0$, то общее сопротивление монослоя будет равно

$$R = \frac{R_{ds}}{xN_0} \quad (5)$$

Зависимость общего сопротивления монослоя от приведенной концентрации оцДНК – мишеней в растворе приведена на Рис. 3.

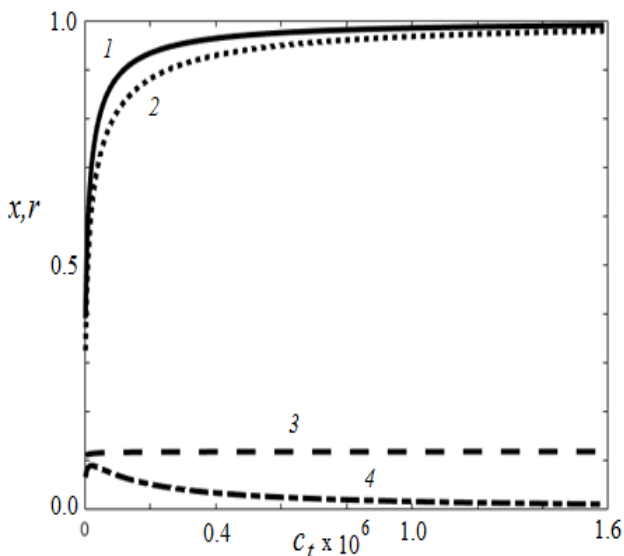


Рис. 2. Изотермы гибридизации для моновалентного положительного заряженного лиганда (1), для незаряженных лигандов (2), степень заполнения гибридов зонд-мишень для моновалентных лигандов (3), сдвиг изотермы гибридизации от случая незаряженного лиганда к заряженному (4). Кривые получены для следующих значений параметров: $l_B \approx 7 \text{ \AA}$, $r_D \approx 3 \text{ \AA}$, $N = 16$, $K_t = 10^9 \text{ M}^{-1}$.

В третьей главе исследованы флуктуации при переходе порядок – беспорядок в комплексах ДНК – лиганд, использующих различные механизмы связывания и рассмотрена теория перехода порядок – беспорядок в комплексах ДНК – лиганд.

Для учета влияния лигандов – интеркаляторов, описанных выше, были рассчитаны степень спиральности и корреляционная длина. Здесь мы сосредоточились на влиянии лигандов, имеющих большее сродство к нативной ДНК нежели к расплавленной. Если полная концентрация лигандов в растворе сопоставима с концентрацией фосфатных групп, $\frac{2D}{P} - 1$ и $PK'_1, PK'_2, PK''_1, PK''_2$, то комплексы ДНК – лиганд демонстрируют как высоко- так и низко – температурную денатурацию в сочетании с широким «окном» стабильности двойной спирали ДНК, совпадающим с областью перехода спираль – клубок чистой ДНК (см. Рис. 4, кривая 1). В этом случае, ключевым моментом является более высокое сродство лигандов к нативной ДНК, чем к денатурированной. При этом, высоко – температурная денатурация комплексов ДНК – лиганд существенно сдвигается в область высоких температур по – сравнению с чистой ДНК (Рис. 4).

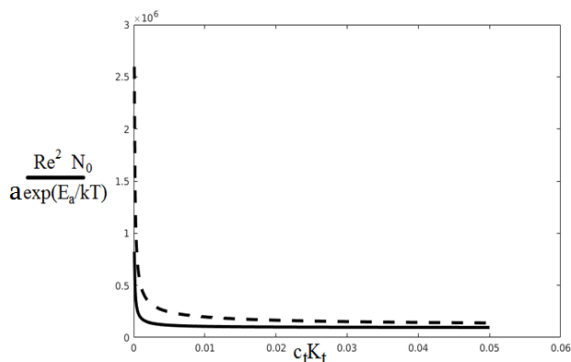


Рис. 3. Зависимость сопротивления монослоя дцДНК – КТ от приведенной концентрации оцДНК – мишеней в растворе. Сплошной линией представлено сопротивление в присутствии моновалентных положительно заряженных лигандов, пунктирной – лигандов без заряда. Кривые получены для следующих значений параметров: $l_B \approx 7 \text{ \AA}$, $r_D \approx 3 \text{ \AA}$, $N = 16$, $K_t = 10^9 \text{ M}^{-1}$.

В то же время, при температурах, когда чистая ДНК остается денатурированной, комплексы ДНК – лиганд находятся в нативном состоянии. При понижении температуры, комплекс ДНК – лиганд претерпевает «холодовую» денатурацию, в то время как чистая ДНК становится спиральной (Рис. 4, кривая 2).

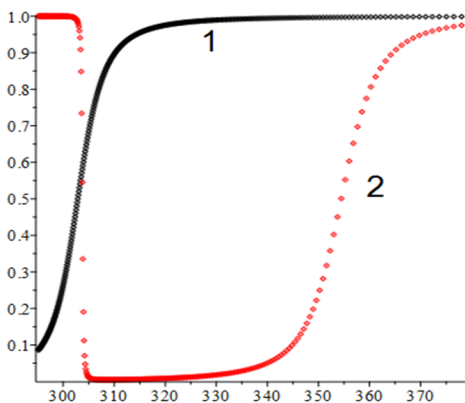


Рис. 4. Зависимость степени денатурации $1 - \vartheta$ от температуры. Кривая 1 есть кривая денатурации для чистой ДНК. Кривая 2 есть кривая денатурации комплекса ДНК –

лиганд для параметров связывания: $r_1' = 2, r_1'' = 2,$
 $r_2' = 4, r_2'' = 4, K_1' = 2.9 \times 10^4 M^{-1}, K_1'' = 10^2 M^{-1}, K_2' = 9.6 \times 10^5 M^{-1}, K_2'' = 10^7 M^{-1}.$

«Холодовая» денатурация ранее наблюдалась экспериментально для белков и нуклеиновых кислот. «Холодовая» денатурация комплексов ДНК – лиганд сопровождается перераспределением лигандов, связанных с расплавленными областями ДНК (см. рис. 5, кривая 3). В то же время, концентрация лигандов, связанных с нативными областями c_2^{α} остается постоянной при тепловой и холодной денатурации, а концентрация лигандов, связанных с расплавленными участками резко понижается в области холодной денатурации. Т.о., стабилизация расплавленной фазы происходит из-за лигандов, связывающихся с денатурированной ДНК.

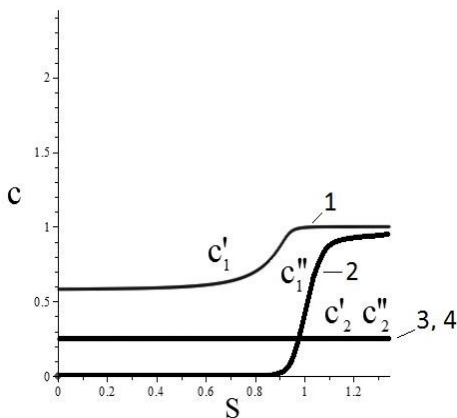


Рис. 5. Зависимость концентрации лигандов c_i^{α} от параметра роста спирали S . Кривые 1,2, 3 и 4 описывают поведение концентраций c_1', c_1'', c_2', c_2'' , соответственно. Результаты получены для значений параметров: $r_1' = 2, r_1'' = 2, r_2' = 4, r_2'' = 4, K_1' = 2.9 \times 10^4 M^{-1}, K_1'' = 10^2 M^{-1}, K_2' = 9.6 \times 10^5 M^{-1}, K_2'' = 10^7 M^{-1}.$

Корреляционная длина является основной характеристикой, описывающей флуктуации в системе. Как видно на Рис. 6, температурная зависимость корреляционной длины комплекса ДНК – лиганд характеризуется двумя пиками, соответствующими холодной и тепловой денатурации. Высоко – температурный пик при этом сдвинут в сторону высоких температур по – сравнению с чистой ДНК. Кооперативность перехода определяется максимальным значением корреляционной длины и слабо различается для чистой ДНК и для комплексов ДНК – лиганд в областях как холодной, так и тепловой денатурации.

При этом, температурные интервалы для обычной, тепловой денатурации практически одинаковы для чистой ДНК и комплексов ДНК – лиганд. В то же время, интервал перехода для холодной денатурации комплексов ДНК – лиганд является существенно более узким, чем таковой для чистой ДНК. Таким образом, температурный интервал перехода не является адекватным показателем кооперативности плавления в ДНК.

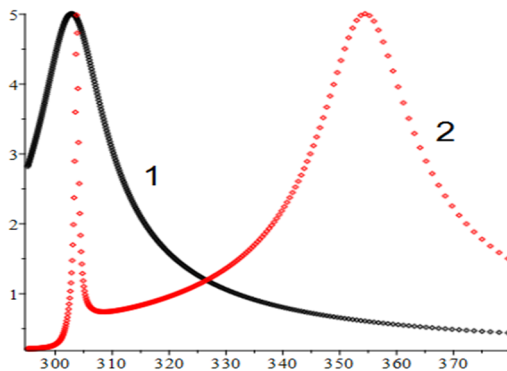


Рис. 6. Зависимость корреляционной длины от температуры. Кривая 1 – температурная зависимость степени денатурации чистой ДНК. Кривая 2 – температурная зависимость степени денатурации для параметров связывания: $r_1' = 2, r_1'' = 2, r_2' = 4, r_2'' = 4, K_1' = 2.9 \times 10^4 M^{-1}, K_1'' = 10^2 M^{-1}, K_2' = 9.6 \times 10^5 M^{-1}, K_2'' = 10^7 M^{-1}$.

Кроме того, в третьей главе рассмотрена связь между структурными свойствами дцДНК и проблемой делокализации электронного возбуждения в рамках полуклассической модели с гамильтонианом вида

$$H = H_E + H_L, \quad (6)$$

где $H_E = \sum_{n=1}^N \epsilon_n(u) B_n^+ B_n + \sum_{n=1}^N J_n(u) (B_{n+1}^+ B_n + B_n^+ B_{n+1})$ и $H_L = \sum_{n=1}^N \left(\frac{p_n^2}{2M} + \frac{\alpha}{2} (u_{n+1} - u_n)^2 + \frac{\beta}{2} (u_{n+1} - u_n)^4 \right)$. Здесь H_E описывает распространение экситона по дцДНК при ее заданной динамической конфигурации, а H_L – это гамильтониан решетки. B_n^+ и B_n – операторы рождения и уничтожения, соответственно. В рамках данной модели, в частности оценивается так называемый коэффициент участия, характеризующий делокализацию электронного возбуждения в оцДНК (см. рис. 7). Полная локализация соответствует значению $\Pi = 0$, в то время как полная делокализация – значению $\Pi = N - 1$.

Четвертая глава посвящена исследованию кинетики гибридизации фрагментов ДНК, зависимости кинетики гибридизации и адсорбции от констант равновесия и эффекту характерных времен релаксации в присутствии лигандов-интеркаляторов.

Однонитиевые фрагменты ДНК в растворе, именуемые мишенью, обозначаются символом T , а комплементарный ей иммобилизованный на подложке фрагмент, именуемый зондом – символом P . При связывании мишени с зондом образуется дуплекс ДНК, обозначаемый символом TP . Далее на этот дуплекс ДНК адсорбируется лиганд, образуя комплекс, состоящий из лиганда и ДНК-дуплекса. Для того чтобы исследовать кинетику образования дуплексов ДНК в ”чистом” виде, исключаются возможные осложняющие факторы.

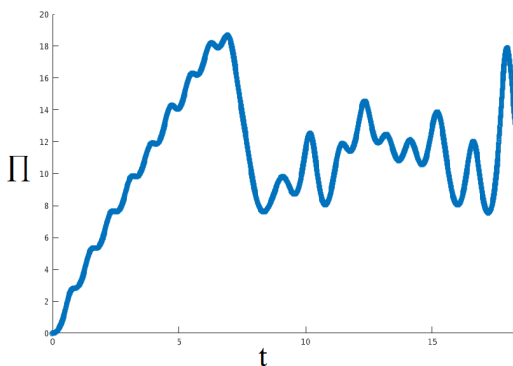


Рис. 7. Временная зависимость коэффициента участия Π от времени t .

Во-первых, предполагается, что образование дуплексов происходит в макроскопически большой системе. Это позволит исключить флуктуации числа ДНК-дуплексов и комплексов ДНК – лиганд, обусловленные случайным характером их образования и распада. Этот тип флуктуаций относят к внутренним флуктуациям и, как хорошо известно, в этом случае относительные флуктуации уменьшаются с увеличением размеров системы. И во-вторых, рассматривается часто реализующийся случай медленного, по-сравнению с переносом вещества, связывания мишени с зондом, т.е. наша система является пространственно – однородной. При сделанных выше допущениях, связывание мишени T с зондом P и распад дуплекса (TP) могут быть представлены в виде квазихимической реакции



где k_h и k_d - константы скоростей образования и распада дуплекса ДНК, соответственно. Квазихимическую реакцию образования комплекса лиганда (L) с ДНК-дуплексом (M) и его распад можно представить в виде



Если x - это степень гибридизации, определяемая как доля зондов, связанных с мишенями, а y - число лигандов, связанных с ДНК из расчета на один нуклеотид зонда, то кинетика адсорбции и гибридизации, описываемая уравнениями (7, 8) приводит к следующим решениям:

$$x(\tau) = (1 - \tau_t)[1 - \exp(-\tau/\tau_t)], \quad (9)$$

где $\tau_t = \frac{1}{1+c_t k_t}$ - время релаксации мишеней, гибридизующихся на поверхности ДНК – сенсора и

$$y(\tau) = (1 - \tau_t)(1 - k\tau_l) \left[1 - \exp(-\tau/\tau_l) + \frac{\exp(-\tau/\tau_l) - \exp(-\tau/\tau_t)}{1 - \tau_l/\tau_t} \right], \quad (10)$$

где $\tau_l = \frac{k_d/k_{-a}}{1+K_l c_l}$ - характерное время релаксации лигандов на зонде и $k = \frac{k_{-a}}{k_d}$. Здесь мы предполагаем, что интеркалирующие лиганды связываются только с нативной ДНК. Тогда экспериментально измеримой величиной является число лигандов, приходящихся на пару оснований дуплексной ДНК, определяемое отношением

$$r(\tau) = \frac{y(\tau)}{x(\tau)} \quad (11)$$

В стационарном состоянии изотермы образования дуплексов на подложке и связывания лигандов с дуплексами ДНК имеют лэнгмюровский вид

$$n = \frac{N_0 K_t c_t}{1 + K_t c_t} \quad (12)$$

$$m = \frac{N_0 N K_l c_l K_t c_t}{(1 + K_l c_l)(1 + K_t c_t)} \quad (13)$$

Кинетика заполнения подложки дуплексами ДНК имеет экспоненциальный вид и представлена на рис. 8. На малых временах $x(\tau) \cong K_t c_t \tau$ и скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами пропорциональна как константе равновесия K_t квазихимической реакции, так и концентрации мономеров ДНК в растворе c_t .

Кинетика заполнения ДНК-дуплексов интеркалирующими лигандами представлена на рис.9. На рис.9 видно, что время выхода числа ДНК – дуплексов на подложке на стационарный уровень уменьшается с увеличением как константы равновесия K_t квазихимической реакции, так и концентрации мономеров ДНК в растворе c_t . На рис. 9 видно, что вид кривой зависит от соотношения между коэффициентами диссоциации ДНК – дуплекса и коэффициентами диссоциации комплекса ДНК – дуплекса с лигандом. Чем меньше отношение коэффициента диссоциации ДНК – дуплекса к коэффициенту диссоциации комплекса ДНК – дуплекса с лигандом, тем ближе форма кривой к экспоненте. Если же это отношение близко к 1, то на малых временах кривая имеет вид параболы.

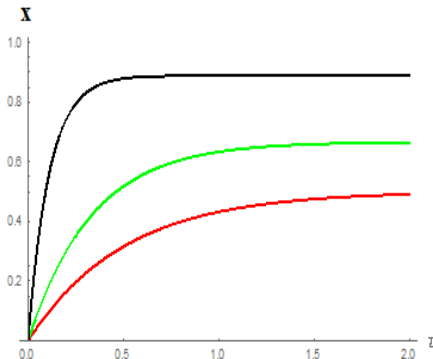


Рис.8. Кинетика заполнения подложки ДНК-дуплексам в безразмерных координатах ($\tau = k_d t$ - безразмерное время, $x = n/N_0$ - степень гибридизации). Параметром на кривых является безразмерная концентрация, $K_t c_t$ равна 8, 2, 1 сверху вниз.

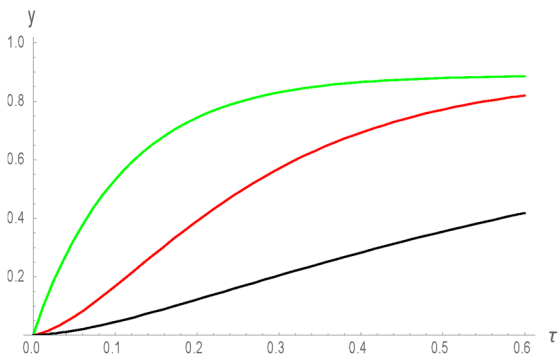


Рис. 9. Кинетика заполнения ДНК-дуплексов лигандами в безразмерных координатах ($\tau = k_d t$ - безразмерное время, $y = \frac{m}{NN_0}$ - степень адсорбции лигандов). Параметром на кривых является k_d/k_{-a} , равна 0.1, 1.6, 7 сверху вниз. На всех кривых $K_l c_l = K_t c_t = 8$.

Сравним кинетику гибридизации и кинетику связывания лигандов с ДНК-дуплексами, представленные на рис. 10. Средняя кривая описывает кинетику образования дуплексов и совпадает со средней кривой на рис. 8. Из рис. 10 следует, что если в ДНК-дуплексы интеркалируются такие лиганды для которых $k_d/k_{-a} < 1$, то это приводит к быстрой кинетике адсорбции лигандов, если же, $k_d/k_{-a} > 1$, то замедляется.

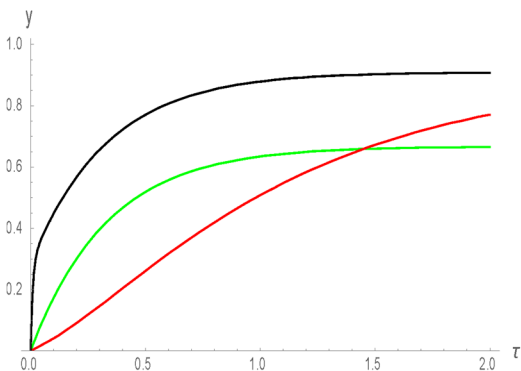


Рис. 10. Сопоставление кинетика заполнения ДНК-дуплексов лигандами (верхняя и нижняя кривые) в безразмерных координатах ($\tau = k_d t$ - безразмерное время, $y = \frac{m}{NN_0}$ - заполнение подложки) с кинетикой образования дуплексов (средняя кривая). На верхней

кривой $k_d/k_{-a}=0.1$ на нижней кривой $k_d/k_{-a}=10$. На верхней и нижней кривой $K_t c_t=2$, $K_l c_l=10$. Средняя кривая совпадает со средней кривой на рис.8.

Заметим, что по-видимому константа скорости диссоциации лиганда с ДНК – дуплексом много больше, чем константа скорости диссоциации ДНК – дуплекса, поскольку раскручивание ДНК – дуплекса, состоящего как правило из 20-30 пар оснований кинетически более затруднительно, чем десорбция малой молекулы лиганда. Так что в подавляюще большинстве случаев на практике реализуется случай $k > 1$.

На Рис. 11 представлены зависимости степени заполнения дуплексной ДНК в зависимости от безразмерного времени $\tau = k_d t$. Ясно видно, что в зависимости от соотношения между константой скорости диссоциации лиганда k_{-a} и константой скорости распада ДНК дуплекса, k_d реализуются два качественно различных сценария. Так, если $k > 1$ (см. рис. 11), рост характерного времени релаксации лигандов на ДНК дуплексе (τ_l) приводит к существенному понижению равновесного значения степени заполнения r_{eq} . Это по-видимому связано с тем, что при $k > 1$ все большее и большее количество лигандов успевает диссоциировать с дуплексной ДНК по мере повышения характерного времени релаксации лигандов τ_l .

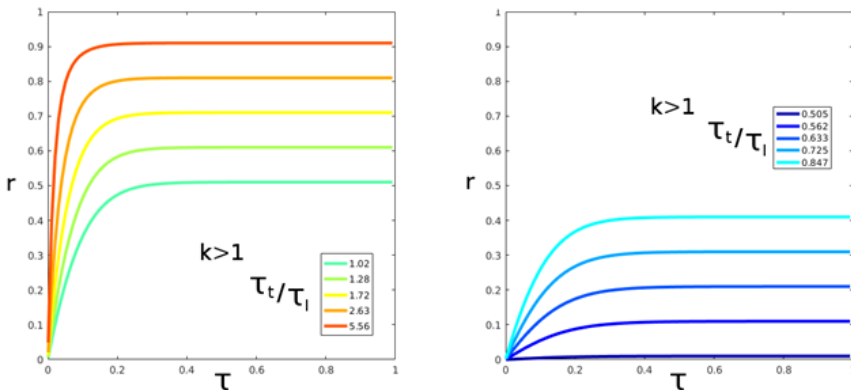


Рис.11. Сопоставление кинетики заполнения ДНК – дуплексов лигандами в зависимости от характерных времен реакции τ_t и τ_l для случая $k = 10$. На рисунке слева представлена зависимость степени заполнения r дуплексной ДНК лигандами от безразмерного времени $\tau = k_d t$ для $\tau_t/\tau_l > 1$, а на рисунке справа – для $\tau_t/\tau_l < 1$.

ВЫВОДЫ

1. Проводимость монослоя комплексов, образующихся между ДНК-дуплексами на поверхности ДНК – сенсора и квантовыми точками возрастает с увеличением концентрации ДНК – мишеней в растворе и, таким образом создает эффективный механизм регистрации ДНК – мишеней в растворе и регулируется низкомолекулярными веществами, растворенными в исследуемом образце.
2. Стабильность и флуктуационные свойства ДНК – дуплексов определяются концентрацией низкомолекулярных веществ в растворе и механизмами их связывания с ДНК.
3. Кинетика гибридизации ДНК на поверхности ДНК – сенсора в основном определяется соотношением между константами скорости диссоциации ДНК – дуплекса и десорбции низкомолекулярного соединения с ДНК – дуплекса.
4. Для положительно заряженных и электронейтральных лигандов проводимость монослоя, образованного комплексами ДНК – квантовая точка существенным образом зависит от заряда лигандов – интеркаляторов, связывающихся с нативной формой ДНК. При этом, проводимость монослоя при наличии заряженных лигандов существенно выше, чем в присутствии электронейтральных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Y. Sh. Mamasakhlisov, A. P. Antonyan, A. Y. Mamasakhlisov, Sh. A. Tonoyan & P. H. Vardevanyan. Fluctuations in order–disorder transitions in the DNA–ligand complexes with various binding mechanisms. *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)* volume 52, pages173–179(2017)
2. A.Y. Mamasakhlisow, Short-range disorder in polyelectrolytes: replicas and constrained annealing comparison, *Proceedings of the YSU, Physical and Mathematical Sciences*, 2019, Volume 53, Issue 1, 47–52.
3. A.Y. Mamasakhlisov, Y. Sh. Mamasakhlisov. The conductivity of the monolayer of complexes of DNA with quantum dots in the presence of intercalating ligands. *Proceedings of the YSU, Physical and Mathematical Sciences*, 2019, Volume 53, Issue 3, Pages 203–207.
4. A.Y. Mamasakhlisov, E. M. Kazaryan, S. A. Tonoyan, V. F. Morozov, and Y. S. Mamasakhlisov. The Conductivity of the Monolayer of DNA – Quantum Dot Complexes in the Presence of Intercalating Charged Ligands. *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2020, Vol. 55, No. 1, pp. 87–93
5. Valeri B. Arakelyan, Aleksandr Y. Mamasakhlisov, Eduard M. Kazaryan, Marine A. Parsadanyan & Poghos O. Vardevanyan. Hybridization kinetics of DNA fragments in the presence of ligands intercalating into DNA-duplexes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI: 10.1080/07391102.2020.1739559

INTERACTION OF METAL AND SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES WITH
BIOLOGICAL MACROMOLECULES IN SOLUTION

SUMMARY

Keywords: Quantum dot, DNA, biosensor, conductivity, ligand

The photoelectrochemical methods still attract a lot of interest among different detection methods due to their simplicity, sensitivity, and cheapness. That said, quantum dots are photoactive materials that are very promising for the development of DNA-sensors. One of the possible ways of improving the DNA-sensors is the increasing of their effectiveness using the appropriate environmental conditions.

The DNA targets recognizing layer is formed by DNA-probes immobilized on the surface of DNA-sensor. Single-stranded DNAs with quantum dots (for example CdS) attached to them are used as targets. The quantum dots also could be grafted to the probes. Thus, quantum dots are used as markers. During the process of hybridization of the complementary single-stranded DNAs, a sensitive monolayer is formed. As a result of the interaction of electromagnetic radiation with the monolayer the photoexcitation of the quantum dots occurs with the subsequent occurrence of free charge carriers.

This work is devoted to the interactions of DNA molecules with metal and semiconductor nanoparticles in a solution. These DNA-quantum dots complexes play a very important role in creating different biological sensors and do not well investigated in semiconductor physics. A theoretical model has been developed, which describes the conductivity of the sensitive layer, consisting of DNA-quantum dot complexes.

The scientific novelty of this work is determined by a model built to describe the electric, structural and kinetic properties of DNA complexes with quantum dots. The effect of intercalating ligands in a solution and on the surface of a DNA-sensor is taken into account. In particular, the hybridization curves were obtained for the DNA probes, immobilized on the surface of DNA-sensor and target dissolved in the solution for different low molecular weight compounds. The adsorption curves of ligands on DNA-duplexes for different concentrations of targets in solution are also obtained. It is also shown that intercalating ligands increase the conductivity of the monolayer of the DNA-quantum dot complexes on the surface of the DNA-sensor in conditions of photocurrent.

The kinetics of hybridization of DNA-probes, immobilized on the electrolyte-surface interface with DNA-targets taking into account the influence of low molecular weight compounds has been addressed. The main parameters responsible for the kinetics of hybridization have been identified.

An assessment has been made of the factors of stability of DNA-duplexes and the cooperation of their formation in the presence of low molecular weight compounds, that form complexes with the native form of the DNA. On the basis of these factors, we estimated the effect of intercalating ligands on the functional properties of the DNA-sensor during the formation of the DNA-quantum dot complexes.

The key point of our consideration is the calculation of the conductivity of the monolayer of DNA-quantum dot complexes used as a sensitive layer of the DNA-sensor. We have shown that for the low GC-contents and for the intercalating ligand with higher affinity to the GC base pairs the conductivity is mainly described by the hopping mechanism and gives the linear dependence of resistance on the length of the chain. The conductivity of the sensitive layer is estimated using the isotherms of hybridization, adsorption, and the model of conductivity.

ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ ԱԼԵՔՍԱՆԴԻ ԵՎԳԵՆԻԻ

ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ և ԿԻՍԱՀԱՂՈՐԴԻՉՆԵՐԻ ՆԱՆՈՍԱՄԱՆԻԿՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՄԱԿՐՈՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ՀԵՏ ԼՈՒԾՈՒՅԹՈՒՄ

ԱՄՓՈՓ

Հանգուցային բառեր: Քվանտային կետ, ԴՆԹ, բիոսենսոր, հաղորդունակություն, լիզանդ

Ֆոտոէլեկտրաքիմիական մեթոդները դեռևս մեծ հետաքրքրություն են առաջացնում տարբեր մեթոդների շրջանում նրանց պարզության, զգայունության և էժանության պատճառով: Քվանտային կետերը ֆոտոակտիվ նյութեր են, որոնք շատ հեռանկարային են ԴՆԹ-սենսորների զարգացման համար: ԴՆԹ-սենսորների բարելավման հնարավոր եղանակներից մեկը դրանց արդյունավետության բարձրացումն է՝ համապատասխան շրջակա միջավայրի պայմանների կիրառմամբ:

ԴՆԹ-ի թիրախները ճանաչող շերտը ձևավորվում է ԴՆԹ- սենսորի մակերևույթի վրա անշարժացված ԴՆԹ-գոնդերով: Որպես թիրախ օգտագործվում են միաթելանի ԴՆԹ-ներ, որոնց միացված են քվանտային կետերը (օրինակ՝ CdS): Քվանտային կետերը նույնպես կարող են միացվել գոնդերին: Այսպիսով, քվանտային կետերը օգտագործվում են որպես մարկերներ: Կոմպլեքսնատար միաթելանի ԴՆԹ-ների հիբրիդացման գործընթացի ընթացքում ձևավորվում է զգայուն շերտ: Շերտի հետ էլեկտրամագնիսական ճառագայթման փոխազդեցության արդյունքում, քվանտային կետերի լուսազրգովածության պատճառով տեղի է ունենում ազատ լիցքավորող կրիչների հետագա առաջացումը:

Այս աշխատանքը նվիրված է լուծույթում տեղի ունեցող, ԴՆԹ մոլեկուլների փոխազդեցությանը մետաղի և կիսահաղորդչային նանոմասնիկների հետ: ԴՆԹ-քվանտային կետերի այս կոմպլեքսները շատ կարևոր դեր են խաղում տարբեր կենսաբանական սենսորների ստեղծման գործում և բավարար չափով չեն ուսումնասիրված կիսահաղորդչային ֆիզիկայի մեջ: Մշակվել է տեսական մոդել, որը նկարագրում է զգայուն շերտի հաղորդունակությունը, որը բաղկացած է ԴՆԹ-քվանտային կետերի կոմպլեքսներից:

Այս աշխատանքի գիտական նորությունը որոշվում է տեսական մոդելով, որը նկարագրում է ԴՆԹ-ի և քվանտային կետերի կոմպլեքսների էլեկտրական, կառուցվածքային և կինետիկ հատկությունները: Հաշվի է առնվում լուծույթի և ԴՆԹ-սենսորների մակերեսի վրա փոխկապակցող լիզանդների ազդեցությունը: Մասնավորապես, հիբրիդացման կորերը ստացվել են ԴՆԹ-ի թիրախների և գոնդերի

համար, որոնք անշարժացվել են ԴԼԹ- սենսորների մակերևույթի վրա, տարբեր ցածր մոլեկուլային քաշ ունեցող միացությունների առկայությամբ: Նույնպես, ստացվում են լուծույթում թիրախների տարբեր կոնցենտրացիաների համար ԴԼԹ- դուալլեքսների վրա լիգանդների կլանման կորերը: Ֆույց է տրվում նաև, որ փոխկապակցող լիգանդերը մեծացնում են ԴԼԹ-քվանտային կետի կոմպլեքսների զգայուն շերտի հաղորդունակությունը ԴԼԹ-սենսորի մակերևույթի վրա` Ֆոտո հոսանքի պայմաններում: ԴԼԹ- սենսորի մակերևույթի վրա ԴԼԹ-թիրախների հիբրիդացման կինետիկան դիտարկվել է, հաշվի առնելով ցածր մոլեկուլային քաշի միացությունների ազդեցությունը: Հայտնաբերվել են հիբրիդիզացիայի կինետիկայի համար պատասխանատու հիմնական պարամետրերը:

Կատարվել է գնահատական ԴԼԹ-դուալլեքսների կայունության գործոնների և դրանց ձևավորման համագործակցության մասին, ցածր մոլեկուլային քաշի ունեցող միացությունների առկայության դեպքում, որոնք բարդություն են ստեղծում ԴԼԹ-ի բնօրինական տեսակի հետ: Այս գործոնների հիման վրա մենք գնահատեցինք փոխկապակցվող լիգանդների ազդեցությունը ԴԼԹ-սենսորի ֆունկցիոնալ հատկությունների վրա ԴԼԹ-քվանտային կետ կոմպլեքսների ձևավորման ընթացքում:

Մեր դիտարկման հիմնական կետը ԴԼԹ-քվանտային կետ կոմպլեքսների զգայուն շերտի հաղորդունակության հաշվարկն է, որն օգտագործվում է որպես ԴԼԹ-սենսորի զգայուն շերտ: Մենք ցույց ենք տվել, որ ցածր GC- պարունակության և GC զույգերի նկատմամբ ավելի մեծ կապ ունեցող փոխկապակցող լիգանդի համար հաղորդունակությունը հիմնականում նկարագրվում է թռիչքաձև մեխանիզմով և տալիս է դիմադրության գծային կախվածություն շղթայի երկարությունից: Զգայուն շերտի հաղորդունակությունը գնահատվում է `օգտագործելով հիբրիդացման և ներծծման իզոտերները և հաղորդունակության մոդելը: