

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКОПЯН АРТУР АРТАВАЗДОВИЧ

УСИЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО СИГНАЛА
ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО БИОСЕНСОРА ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМИ
ЛИГАНДАМИ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук по специальности
01.04.10 – Физика полупроводников

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
доцент Е.Ш.МАМАСАХЛИСОВ

ЕРЕВАН – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Литературный обзор	
1.1. Использование биологических молекул в молекулярной электронике.....	7
1.2. Биологические сенсоры на основе полевых транзисторов	9
1.3. Стабильность двунитевой ДНК и гибридизация	17
1.4. Взаимодействие ДНК с низкомолекулярными соединениями	28
1.4.1. Интеркаляционное связывание лигандов с ДНК	33
Глава 2.	
Влияние электро-нейтральных лигандов на чувствительность и избирательность ДНК-сенсоров на основе полевых устройств	37
2.1. Гибридизация в отсутствие конкуренции	48
2.2. Конкурентная гибридизация на поверхности	55
2.3. Гибридизация на поверхности затвора полевого транзистора и сигнал ДНК- сенсора	61
Глава 3.	
Стабильность нуклеиновых кислот и ориентационный порядок	65
Глава 4.	
Эффект заряженных лигандов и функционирование ДНК сенсоров на базе полевых устройств	74
4.1. Неконкурентная гибридизация при наличии лигандов	77
Заключение	88
Выводы	90
Литература.....	91

Введение

Актуальность работы. Создание датчиков (сенсоров) различных химических соединений является одной из важных задач физики полупроводников. Одной из основных платформ, используемых при создании сенсоров являются устройства с полевым эффектом, включая транзисторы и конденсаторы. На их основе, в частности, реализуются электрохимические сенсоры, рассматриваемые в настоящей работе.

Электрохимические ДНК-сенсоры являются одним из наиболее многообещающих инструментов в различных областях, таких как медицинская диагностика, мониторинг загрязнения окружающей среды, защита от биологического оружия. Несмотря на то, что ДНК-сенсоры уже широко используются на практике, они имеют перспективу дальнейшего улучшения функциональности и эффективности. Одним из важных направлений является повышение избирательности и чувствительности сенсора за счет усиления сигнала и повышения стабильности комплекса зонд-мишень в устройствах с полевым эффектом.

Для достижения этих результатов необходимым является определение физических закономерностей увеличения электрического заряда на поверхности электродов в полевых устройствах при обнаружении ДНК-мишеней и их связь с процессами, протекающими в анализируемом образце. Общеизвестно, что реакция гибридизации является ключевым элементом межмолекулярного узнавания ДНК и РНК. В связи с этим важным является определение основных факторов и закономерностей, влияющих на гибридизацию и стабильность нуклеиновых кислот на поверхности раздела электролит-твердое тело. Одним из таких факторов является влияние различных низкомолекулярных соединений (лигандов) на структуру и конформационные переходы в нуклеиновых кислотах. Исследование термодинамики гибридизации нуклеиновых кислот представляет существенный

интерес для создания биологических сенсоров и способствует определению оптимальных условий работы подобного рода устройств.

В свете изложенного, актуальность настоящей работы определяется разработкой новых подходов к исследованию эффекта низкомолекулярных соединений на изменения электрического заряда на границе раздела электролит – затвор устройства с полевым эффектом при обнаружении в исследуемом образце соответствующих молекул ДНК-мишеней.

Целью работы является:

1. Построение теории, описывающей образование заряда на поверхности затвора полупроводниковых устройств с полевым эффектом, включая конденсаторы электролит–диэлектрик–полупроводник и полевые транзисторы, используемые в качестве ДНК-сенсоров.
2. Сравнительный анализ влияния шумов, вызванных конкурентной гибридизацией и взаимодействием ДНК-лиганд на эффективность работы затвора ДНК - сенсора с полевым эффектом.
3. Расчет равновесных характеристик гибридизации зондов, иммобилизованных на границе раздела электролит – твердое тело с мишенями с учетом эффекта низкомолекулярных соединений.
4. Оценка различных факторов стабилизации гибридов зонд-мишень на границе раздела электролит-твердое тело.
5. Изучение эффекта заряженных и электро – нейтральных интеркалирующих лигандов на чувствительность и избирательность ДНК-сенсора.

Научная новизна заключается в построении модели, описывающей связывание ДНК-мишеней в исследуемом с помощью ДНК-сенсора образце электролита с учетом эффекта шумов, вызванных паразитным связыванием с частично комплементарными молекулами ДНК и низкомолекулярными

соединениями. Для различных концентраций низкомолекулярных соединений получены изотермы гибридизации, демонстрирующие зависимость доли связанных зондов на поверхности затвора полевого устройства от концентрации мишеней в растворе электролита. Исследовано поведение доли неправильно связанных зондов на поверхности сенсора в зависимости от концентрации мишеней и низкомолекулярных соединений в электролите. Рассчитана величина поверхностного заряда, образующегося в процессе регистрации событий связывания мишеней в электролите с зондами на поверхности ДНК-сенсора. Показана связь между зарядом низкомолекулярных соединений и сигналом ДНК-сенсора в зависимости от их валентности.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Взаимодействие между ДНК-зондами, иммобилизованными на затворе полупроводникового устройства с низкомолекулярными соединениями существенным образом модифицируют заряд ДНК, образующийся в процессе регистрации ДНК-мишеней, растворенных в образце.
2. Сторонние сигналы (шумы), вызванные связыванием частично комплементарных молекул ДНК и зондов на поверхности биосенсора понижают долю корректно образованных комплексов зонд-мишень.
3. Влияние сторонних сигналов (шумов), связанных со связыванием интеркалирующих лигандов с гибридами зонд-мишень на поверхности биосенсора на выходной сигнал устройств с полевым эффектом зависит от заряда лиганда.
4. Интеркалирующие электронейтральные лиганды повышают чувствительность и избирательность ДНК-сенсора за счет связывания с нативными участками гибридизованных ДНК на поверхности раздела твердое тело-раствор, увеличивая при этом как количество гибридов зонд-мишень, так и заряд на поверхности затвора ДНК-сенсора.
5. Интеркалирующие моно- и бивалентные лиганды с одной стороны увеличивают долю связанных зондов на поверхности затвора полевого

устройства, а с другой стороны, существенно уменьшают абсолютное значение заряда поверхностного слоя и, как следствие понижают уровень сигнала ДНК-сенсора.

Научная и практическая ценность работы обусловлена существенным значением, которое играют термодинамические и кинетические эффекты при работе ДНК-сенсоров. В этой связи, теоретическое исследование эффектов взаимодействия между низкомолекулярными соединениями и ДНК-зондами, иммобилизованными на поверхности затвора сенсора имеет важное значение для создания и совершенствования ДНК-сенсоров. В частности, полученные результаты несомненно будут полезны при разработке оптимальных режимов работы ДНК-сенсоров.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на научных семинарах теоретической группы кафедры молекулярной физики ЕГУ. Материалы диссертации также были представлены и докладывались на научной конференции: “International Workshop and Young Scientist School on Critical Phenomena and Phase Transition”, 20/09-24/09, 2017, Yerevan, Armenia.

Публикации.

По теме диссертации опубликованы 5 научных работ.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Использование биологических молекул в молекулярной электронике

В последнее десятилетие множество исследовательских работ было сосредоточено на использовании электрических свойства таких самоорганизующихся биологических молекул, как ДНК [1-7]. В частности, транспорт электрических зарядов в ДНК получил большое внимание из-за возможности изготовления биомолекулярных устройств. Вопрос, являются ли цепи ДНК проводящими сами по себе, или нет продолжает оставаться спорным. Получен ряд результатов, которые показывают, что молекулы ДНК как действуют как изоляторы, широкозонные полупроводники, и даже как сверхпроводники [8-10].

ДНК – это двойная спираль, по сути являющаяся наноразмерным объектом, обладающих диаметром 2 нм и шагом спирали – 3.4 (10.5 пар оснований). Учитывая этот миниатюрный масштаб длины, вместе с замечательной способностью ДНК к программируемому межмолекулярному узнаванию и большой доступный запас последовательностей ДНК представляется подходящим материалом для изготовления нано – материалов. Симэн [11-13], который считается основателем использования ДНК в сфере нанотехнологий, предложил использовать ДНК в качестве конструкционного материала для самосборки нано – структур в 1982. Многие ДНК - содержащие наноструктуры в одном, двух и трех измерениях были изготовлены в последние двадцать семь лет. Они нашли свое применение в наноэлектронике, разработке биосенсоров и т.п. [12-16].

Способность ДНК к самосборке в молекулярные агрегаты в настоящее время активно используется для создания наноструктур [17-20]. Так, П. Ротемунд предложил методику укладки длинных одноцепочечных ДНК в произвольные двумерные формы [19]. М. Уорнер и др. предложили использовать наночастицы, стабилизируемые электростатически связанными

лигандами для связи с ДНК, в результате чего возникают различные архитектуры (такие как линии, ленты и ветви) [21]. Такие молекулярные строительные леса могут служить основой для создания наноразмерных структур (показано на рисунке 2.1 [21]). Большой интерес также представляют исследования программируемой самосборки ДНК специфичной к последовательности оснований, которая в конечном итоге позволит в дальнейшем использовать литографические методы проектирования ДНК-электроники [22,23,13,24-26].

Использование подобных структур в молекулярной электронике в конечном счете тесно связано с процессом переноса заряда и проводимостью ДНК в различных экспериментальных условиях. В частности, были исследованы проводимость пучка ДНК [27, 28], одиночной молекулы ДНК [29, 30] и ДНК с известной последовательностью нуклеотидов [28, 29] в сухих [27, 29] и жидких средах [31, 32]. Браун и др. использовали ДНК в качестве матрицы для изготовления нанопроволок [2, 3]. ДНК была закреплена между двумя тонкопленочными золотыми электродами с использованием тиольного крепления. Ионы серебра осаждались через эту ДНК-матрицу с использованием метода химического осаждения. Это исследование показало, что ДНК ведет себя как полупроводник до осаждения серебра на ДНК и как проводник — после осаждения.

1.2. Биологические сенсоры на основе полевых транзисторов

Если описанные выше наноустройства в настоящее время все еще находятся в исследовательской стадии, электрические свойства ДНК уже активно используются при разработке таких аналитических устройств, как биосенсоры. Биосенсоры представляют собой хорошо зарекомендовавшую себя область, привлекающую большие инвестиции в исследования и промышленность, где портативные биосенсоры сегодня успешно становятся бытовыми устройствами для контроля за состоянием здоровья. Подобные разработки ориентированы на обнаружение специфических молекул ДНК и/или РНК, что имеет важное значение в различных областях, таких как идентификация патогенов, скрининг лекарственных препаратов и диагностика генетических заболеваний [33-35]. Среди множества платформ, используемых при создании биосенсоров в последние годы особенно широкое распространение получили полевые устройства (FED). В частности, использование полевых транзисторов (FET) представляет собой один из наиболее интересных подходов к обнаружению и характеристике ДНК по ее электрическим свойствам, имеющий сразу несколько преимуществ: небольшие размеры, быстрая реакция, интеграция в массивы и возможность недорогого массового производства. Одновременный анализ различных ДНК / РНК — мишеней в миниатюризированных аналитических системах позволил разработать комплексные аналитические платформы - lab-on-chip [35,36]. Такой пример представляет собой интегрированное полупроводниковое устройство, обеспечивающее неоптическое секвенирование генома, которое было впоследствии превращено в коммерчески доступное оборудование для секвенирования ДНК - IonTorrent [37,38].

Датчики на основе полевых транзисторов используются в качестве преобразователя событий узнавания биологических молекул (ДНК / РНК гибридизация), главным образом, по двум основным схемам: (1) конденсатор

металл-диэлектрик-полупроводник (MIS); (2) полупроводниковый полевой транзистор (MOSFET), слегка модифицированный для решения задач интеграции биологических реакций с электронными устройствами [39,40].

Конденсатор MIS является одним из самых простых и полезных устройств при изучении электронных схем, структура представляет собой интерфейс полупроводника-диэлектрика, который служит моделью для разработки чувствительных слоев и материалов. Конденсатор электролита-изолятора-полупроводника (EIS) является одним из этих модифицированных и широко применяется при разработке биосенсоров. Структура EIS идентична структуре MIS конденсатор, но электрод затвора заменяется электролитом и эталонным электродом. Изолятор, обычно оксид, поэтому непосредственно подвергается воздействию электролита, поэтому изменения в растворе могут влиять на оксидный поверхностный потенциал и модулировать реакцию устройства (рис. 1А, В).

Подобно тому, как это имеет место для пары MIS — EIS, структура и функция ион-чувствительного полевого транзистора (ISFET) соотносятся с его электронным аналогом, MOSFET. Опять же, заменив электрод затвора с электролитом и опорным электродом, диэлектрик затвора непосредственно подвергается воздействию электролита и происходящих в нем изменений [41]. Первоначально эта конструкция применялась для электрофизиологических измерений, позволяя обнаружение и количественное определение ионов, H^+ и OH^- [42]. В дальнейшем, эти разработки привели к появлению первого миниатюрного химического датчика на основе кремния.

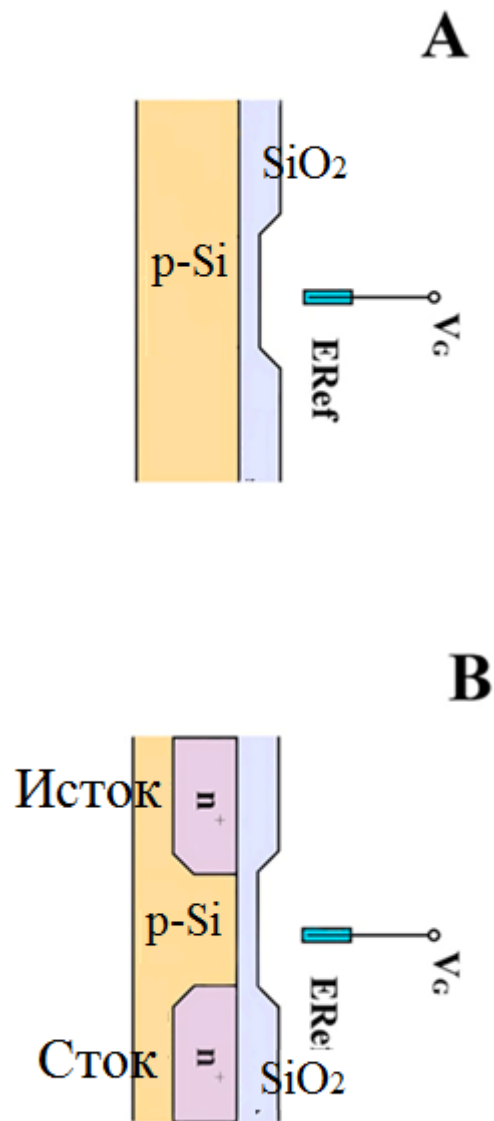


Рис. 1.1. Схематическое представление структуры устройства: (А) EIS— электролит-изолятор-полупроводник; (В) ISFET- полевой транзистор чувствительный к ионам. E_{ref} - электрод сравнения; V_G -напряжение на затворе.

Полевые транзисторы могут быть описаны как трехэлектродные устройства, где ток между электродом — истоком и электродом — стоком может модулироваться путем изменения потенциала, приложенного к электродам затвора и истока [41,42]. Полупроводниковый слой отделен от электрода затвора слоем изолятора, который предотвращает протекание тока между ними. Управления током осуществляется за счет электрического поля генерируемого напряжением, приложенным к затвору [42]. Ток осуществляется одним типом носителей (электронов или дырок) в зависимости от типа полупроводника (n-type или p-type). В случае полупроводника p-типа, когда применяется положительное напряжение затвора, электроны отталкиваются от границы раздела полупроводник-изолятор создавая слой истощения, который действует как изолятор и, следовательно, подавляет ток между истоком и стоком. Приложение отрицательного напряжения затвора притягивает электроны к поверхности полупроводника и тогда в этой области накапливается достаточно высокая концентрация электронов, а проводящий канал созданный на стыке полупроводник-изолятор, позволяет протекать току между истоком и стоком.

Противоположный эффект возникает в полупроводниках n-типа [41]. Напряжение затвора модулирует проводимость канала и полевой транзистор можно переключить с того, что условно называется OFF в положение ON. В состоянии ON ток утечки в источник изменяется как с напряжением затвора, так и с напряжением стока. В зависимости от значения напряжения стока можно различать два режима работы: линейный и насыщенный. Передаточные характеристики позволяют определять электрические параметры, характеризующие эти режимы. Например, пороговое напряжение, подвижность носителей, отношение тока включения / выключения) [40]. В ISFET наиболее важным параметром является пороговое напряжение, так как на него влияет напряжение плоских зон на конденсаторе затвор/полупроводник/изолятор. В неидеальном устройстве напряжение плоских зон обычно не равно нулю, и на

его значение влияет: существование зарядов оксида; разность функций работы между полупроводником и раствором электролита; потенциал контрольного электрода; поверхностно-дипольный потенциал раствора и потенциал границы раздела электролит/изолятор, который зависит от концентрации ионов в растворе [39].

FED может быть сконфигурирован как биосенсор, за счет модификации терминала затвора молекулярными рецепторами или ионоселективными слоями для представляющего интерес вещества. Связывание заряженной биомолекулы (например, ДНК) приводит к истощению или накопления носителей заряда в полупроводника за счет изменения электрического заряда на клемме затвора. Зависимость проводимости канала от напряжении затвора делает FEDы хорошими кандидатами для использования в качестве электрических биосенсоров, поскольку электрическое поле, генерируемое при связывания биомолекулы, аналогично приложению напряжения к затвору [40]. Более того, FED могут быть миниатюризированы без потери отношения сигнал / шум, поскольку ток в канале FET пропорционален отношению ширины / длины канала и не связан с площадью устройства. Поэтому FEDы идеально подходят для применения в малогабаритных, высокоплотных и многофункциональных микроматричных датчиках.

Независимо от используемой архитектуры одним из наиболее распространенных подходов в применении устройств с полевыми эффектами в качестве биосенсоров является замена электрода затвора электролитом. Изолятор, обычно оксид, таким образом, непосредственно подвергается воздействию электролита, поэтому изменения в растворе и / или на границе раздела раствор — диэлектрик может влиять на потенциал поверхности оксида и модулировать реакцию устройства. Связь между потенциалом, приложенным к датчику с полевым эффектом, и накопленным на поверхности раздела зарядом на поверхности раздела определяется двумя факторами: (1)

электростатическим потенциалом ионов в растворе, определяемый электрохимическим двойным слоем, и (2) образованием заряда из-за химических реакций, происходящих на поверхности оксида, как это описывается моделью связывания [43].

В ISFETs потенциал на границе раздела оксид - электролит может модулировать пороговое напряжение. Разница в приложенном потенциале распределяется между различными компонентами: (1) потенциалом границы раздела электролит — оксид, обусловленного наличием электрохимического двойного слоя (модель Гуи-Чепмена-Штерна); (2) потенциалом поверхности оксида (модель связывания); падением потенциала в диэлектрике; (3) падением потенциала из-за истощения заряда в полупроводнике и (4) падением потенциала из-за сродства электронов между электролитом и полупроводником. Кроме того, на поверхности электролита и/или оксида могут возникать химические процессы, влияющие на полупроводниковый потенциал поверхности и, таким образом, модулировать реакцию устройств. Связь между потенциалом границы раздела оксид — электролит и pH среды (следовательно, чувствительность к pH) в основном определяется внутренней емкостью буфера оксидной поверхности [35,40].

Заряды накапливаются с обеих сторон границы раздела электрод - электролит. Модель, описывающая распределения потенциала на стороне электролита предполагает, что приложенный потенциал и концентрация электролита влияет на емкость двойного слоя [35,43]. При этом, потенциал экспоненциально убывает с расстоянием от электрода. Характерная длина затухания совпадает с длиной Дебая, которая может быть описана как расстояние, на котором электрическое поле экранируется мобильными носителями заряда, такими как электроны или ионы в растворе. На расстояниях, больших этого, заряды в растворе уравниваются противоположными, что приводит к нулевому общему заряду. Для целей биоизложения это расстояние очень важно, поскольку мы можем

регистрировать только те события, которые происходят на расстоянии порядка дебаевской длины от поверхности датчика. В частности, так называемый Дебаевский эффект экранирования тесно связан с ионной силой буферного раствора, поскольку поверхностные заряды биомолекулы в буферном растворе экранированы противоположно заряженными ионами в буфере (рис. 1. 2) [40].

Модель связывания описывает несколько причин падения потенциала, возникающего из-за химических процессов на поверхности изолятора.

Изоляционные материалы, которые используются в качестве чувствительных слоев для полевых датчиков, как правило, представляют собой оксиды (например, SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5). Поверхность этих оксидов содержит большое количество активных центров. Эти поверхностные участки амфотерны, что означает, что они могут действовать как доноры, или акцепторы протонов. Химические процессы, происходящие на границе раздела между электролитом и оксидом, приводят к изменению потенциала на границе раздела электролит — изолятор, тем самым модулируя реакцию устройства. Эти химические реакции происходят в пределах внешней плоскости Гельмгольца (ОНР), поскольку химические явления ограничены молекулярными расстояниями. Единственным видом ионов, которые могут проникать в ОНР, являются водород и ионы гидроксидов, в силу их малых размеров и отсутствия сольватационной оболочки [40,44]. Связь между этим потенциалом границы раздела и рН в основном определяется внутренней буферной емкостью поверхности оксида.

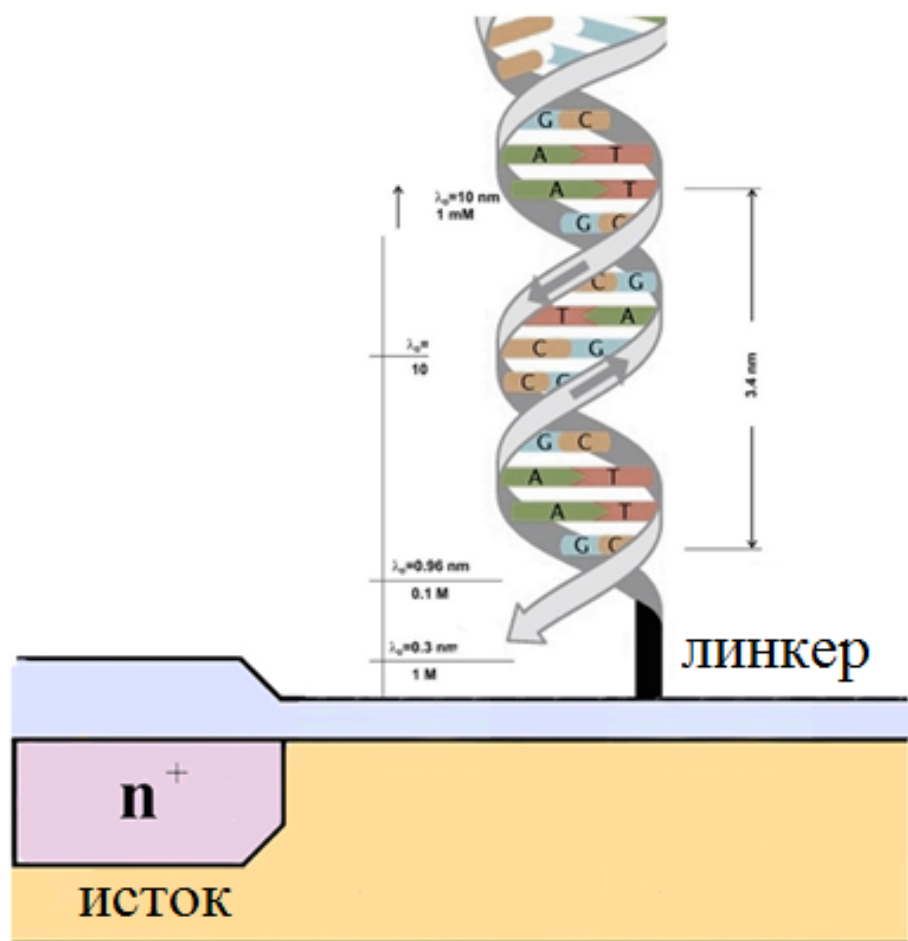


Рис. 1.2. Схематическое представление молекулы ДНК, ковалентно связанной с поверхностью сенсора и длина экранирования Дебая (r_D) в элвктролите с различными ионными силами. Понижение ионной силы буфера позволяет выявлять эффекты на большем расстоянии он поверхности сенсора.

1.3. Стабильность двунитовой ДНК и гибридизация

В этом разделе мы поговорим об общих механизмах плавления ДНК и экспериментальных результатах плавления, которые представлены в обзоре [45]. Как было сказано в предыдущем разделе, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) состоит из двух полинуклеотидных нитей. Они скручены в двойную спираль как показано на рис. 1.3. Эти две нити полностью комплементарны. В ДНК нуклеотиды аденин и тимин связываются между собой двумя водородными связями, а нуклеотиды гуанин и цитозин – тремя водородными связями. Диаметр ДНК примерно равен 20\AA . Расстояние между двумя соседними повторяющимися единицами приблизительно равно 3.4\AA . Число нуклеотидов, составляющих один виток спирали ДНК, колеблется от десяти до двенадцати повторяющихся единиц и зависит от формы ДНК (A, B, Z). Разделив 360° на число нуклеотидов в одном витке, мы получим угол поворота из расчета на одну повторяющуюся единицу.

Один из самых фундаментальных термодинамических процессов происходящих в ДНК это плавление. Это явление также называют переходом спираль – клубок. Схема плавления ДНК представлена на рис. 1.4. Во время этого процесса водородные связи между азотистыми основаниями начинают разрушаться и, в конце концов, мы получаем две отдельные цепочки ДНК, которые могут быть рассмотрены как Гауссовы клубки.

Переход спираль – клубок является обратимым процессом, то есть снижение температуры ведет к ренатурации ДНК. Но если ДНК полностью расплавлена, то вероятность восстановления спиральной структуры практически нулевая. Это является следствием очень большого влияния кинетических факторов. Теперь поговорим об экспериментальных данных касающихся плавления ДНК.

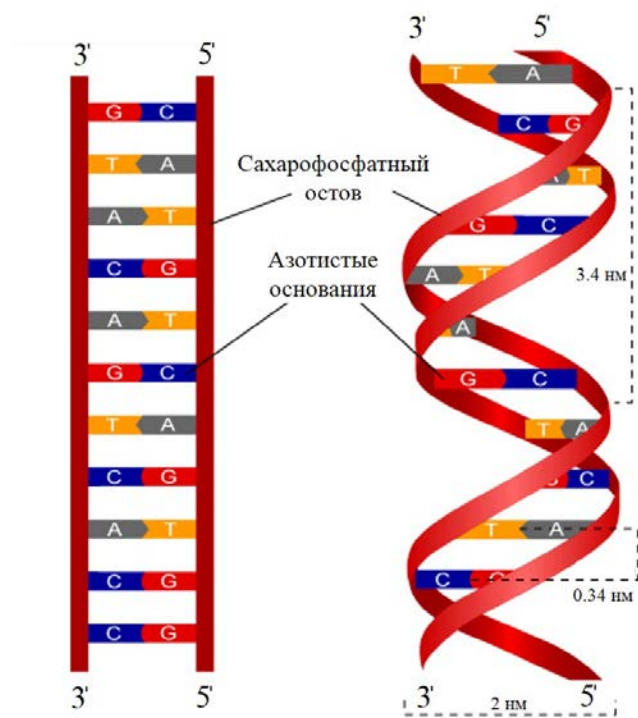


Рис. 1.3. Двойная спираль ДНК

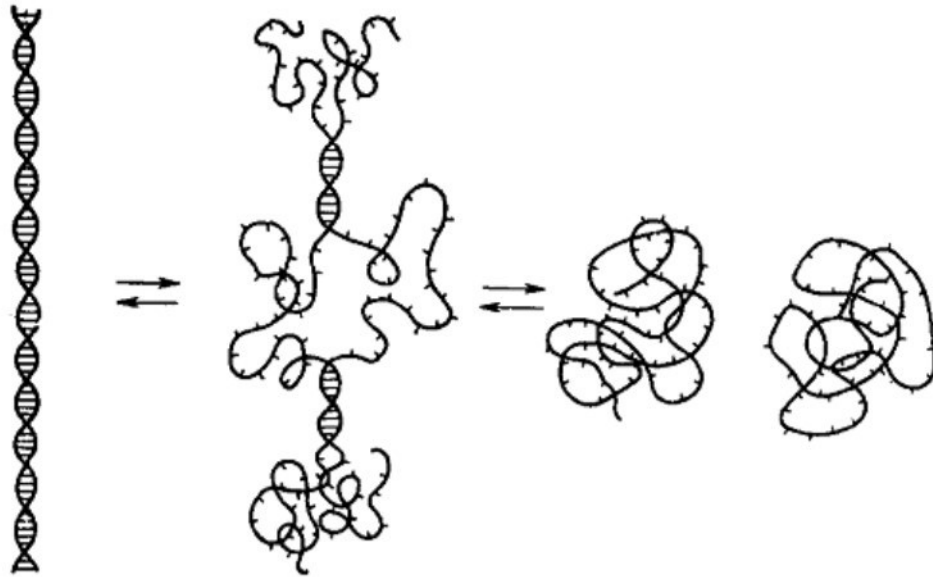


Рис. 1.4. Схематическое изображение перехода спираль – клубок в ДНК [45]

Существует целый ряд методов позволяющих экспериментально исследовать переходы спираль – клубок в ДНК. Один из них основан на поглощении ультрафиолетового излучения раствором ДНК. Метод основан на зависимости степени поглощения от структуры ДНК. То есть, поглощения для нуклеотидов в спиральных и нуклеотидов в клубках отличаются [46]. Причиной является отсутствие стэкинг взаимодействия в клубке в отличие от спирали. Степень денатурации описывается величиной $(D - D_{min}) / (D_{max} - D_{min})$, где D – оптическая плотность раствора, а D_{min} и D_{max} – оптические плотности спиральной и клубковой структур, соответственно. На рис. 1.5 показана температурная зависимость оптической плотности для двухнитевого гомополинуклеотида (кривая плавления). Кривая плавления двухнитевого гомополинуклеотида хорошо изучена в [47]. Кривую плавления можно охарактеризовать двумя параметрами: температурой плавления (T_m) и температурным интервалом плавления (ΔT). Ширина интервала плавления вычисляется с помощью формулы

$$\Delta T = 1 / \left| \frac{\partial \theta}{\partial T} \right|_{max}, \quad (1.1)$$

где θ - степень спиральности ДНК. На рис. 1.6 показана связь температуры плавления T_m и интервала плавления для ДНК тимуса теленка, которая была изучена в [48,49].

Одной из главных характеристик кривой плавления ДНК является ГЦ-состав. Зависимость температуры плавления от ГЦ-состава показана на рис. 1.7.

Как показано на рис. 1.7 зависимость T_m от ГЦ-состава линейная.

Температура плавления ДНК существенным образом зависит от состава растворителя. Наличие двойной спирали ДНК возможно только в среде с достаточной концентрацией положительных ионов, таких как ионы натрия или калия. Зависимость температуры плавления от логарифма концентрации ионов натрия показана на рис. 1.8 [50]. Температура плавления довольно низкая при $pH < 5$ и $pH > 9$. Для этих ДНК ширина интервала плавления приблизительно

равна 3° . Для гомополинуклеотида этот параметр равен $0,5^\circ$. Главная часть исследования сделана для стандартных условия ($\text{pH} = 7$, $[\text{Na}^+] = 0,196 \text{ M}$).

Вещества, которые могут связываться с ДНК, известные как лиганды, имеют очень большой вклад в кривые плавления. Например, лигандами являются ионы тяжелых металлов (Cu, Fe,...). Влияние органических лигандов на кривую плавления можно увидеть на рис. 1.9, где показана зависимость интервала плавления от концентрации белков рибонуклеазы (величина D – молярная концентрация белков рибонуклеазы в растворе, величина P – молярная концентрация повторяющихся единиц в ДНК). Обычно $D \ll P$. Надо отметить, что в ходе эксперимента эти лиганды перераспределяются на ДНК. При данной температуре они принимают термодинамически наиболее выгодное положение. Эксперименты проводились для линейных, незамкнутых, двухцепочных ДНК. В случае с кольцевыми, замкнутыми ДНК, экспериментальные результаты другие. Характеристики кривых плавления для таких ДНК изучены в статье [52]. Температура плавления кольцевых ДНК на 20° больше, чем температура плавления линейных ДНК (рис. 1.10). Расплавленные цепи в кольцевых ДНК остаются скручены друг вокруг друга, что и становится причиной более высокой температуры плавления. Как следствие, энтропия плавленного состояния более низкая, чем для плавленного состояния линейных ДНК. Кроме того, ширина интервала плавления для кольцевых ДНК в 2-3 раза больше, чем для линейных ДНК.

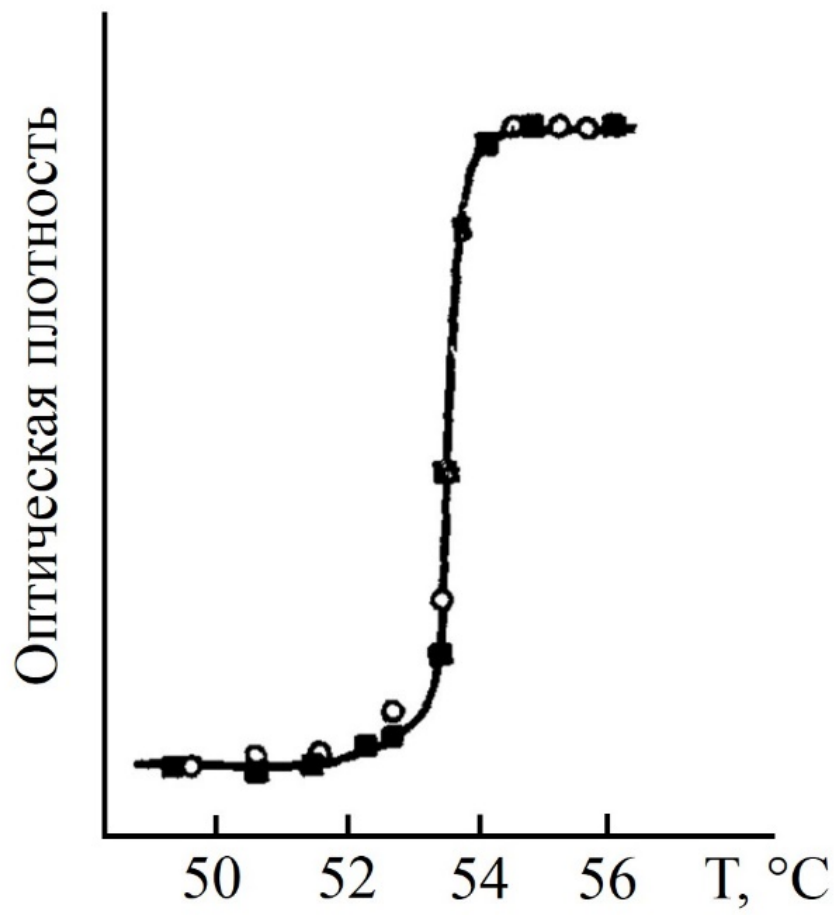


Рис. 1.5. Кривая плавления гомополинуклеотида.

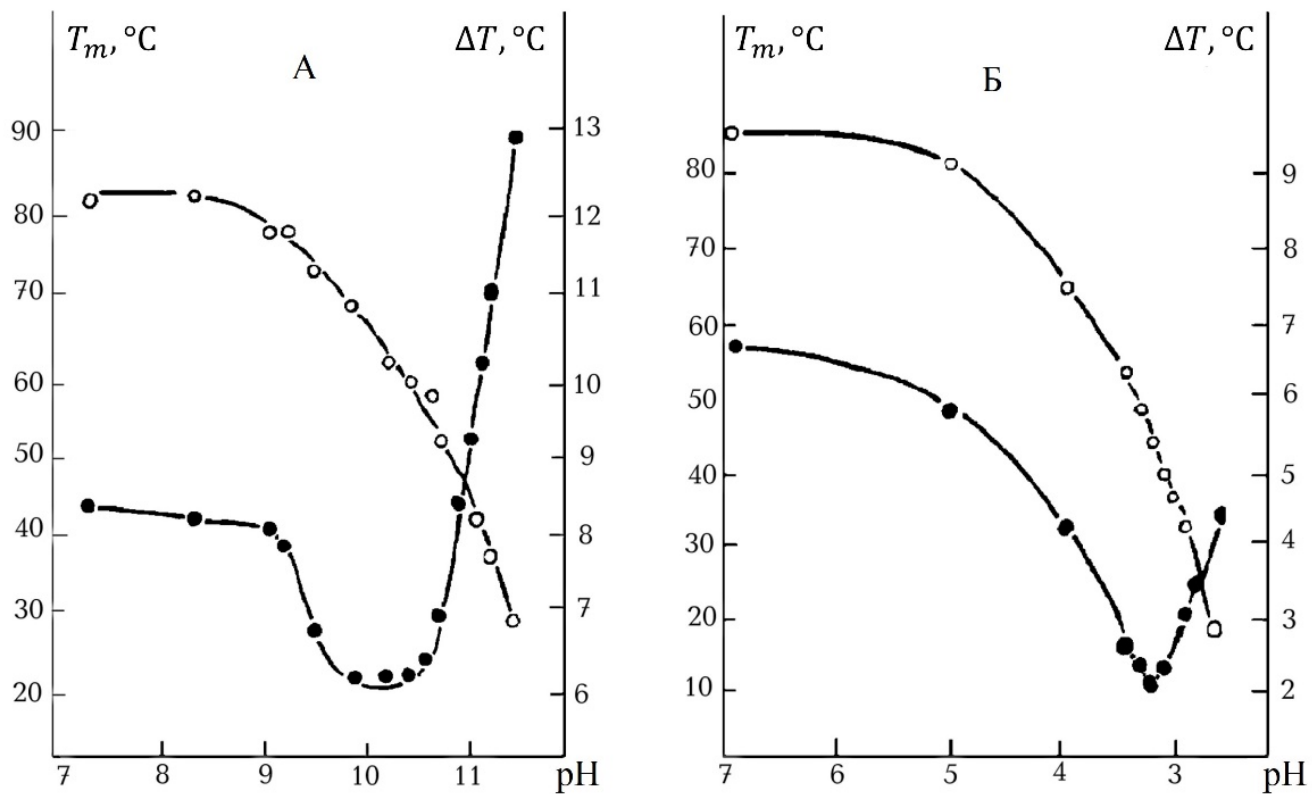


Рис. 1.6. Связь температуры плавления T_m (○) и интервала плавления ΔT (●) для ДНК тимуса теленка [48, 49].

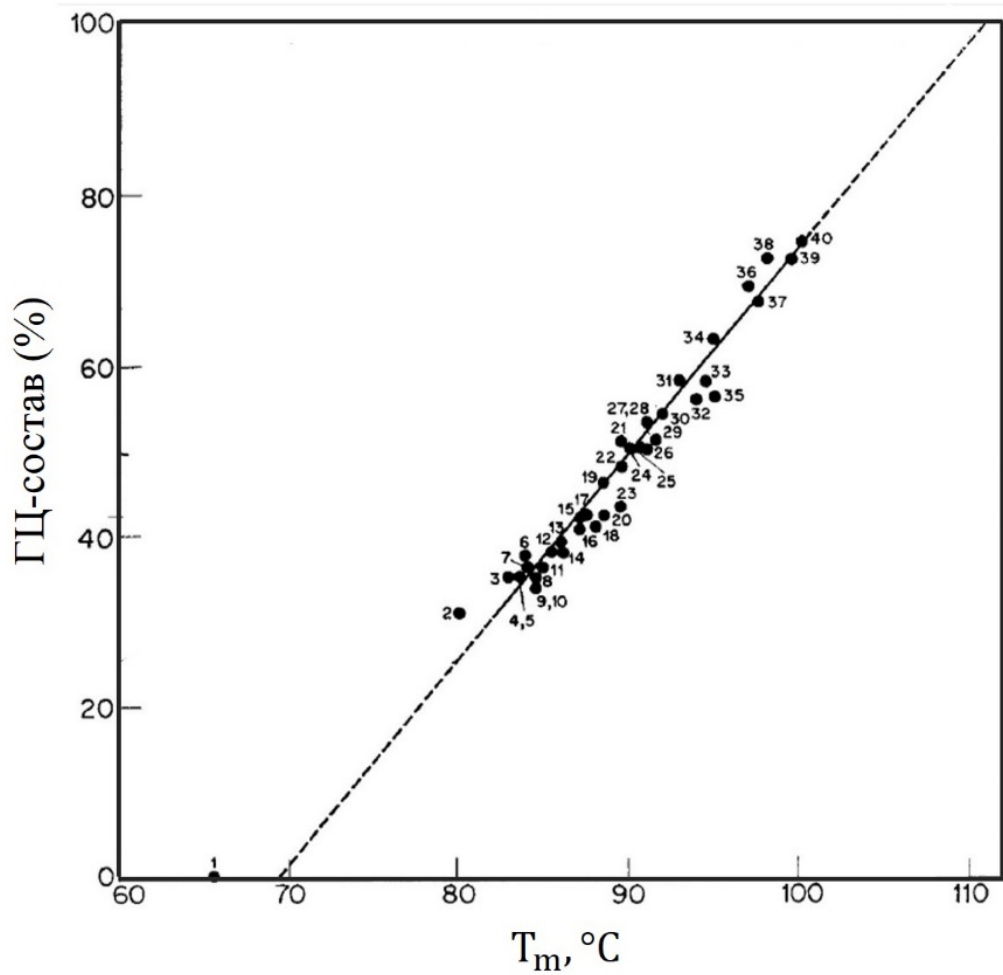


Рис. 1.7. Зависимость температуры плавления от ГЦ-состава.

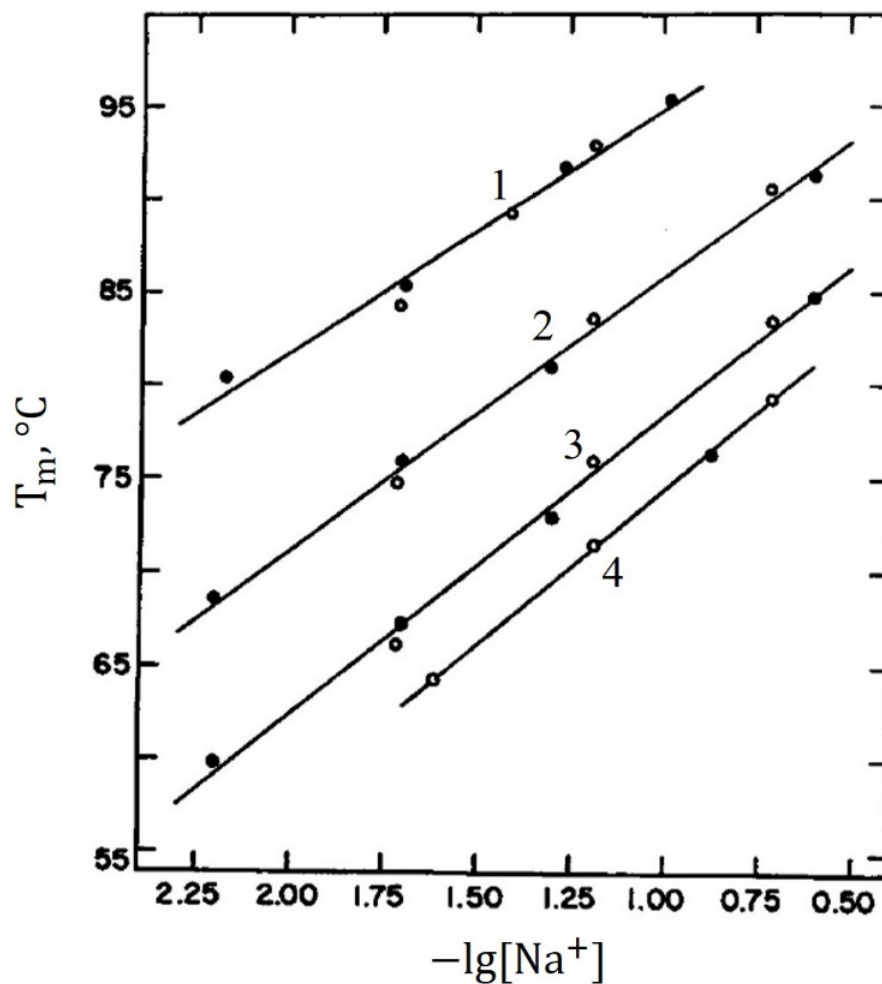


Рис. 1.8. Связь между температурой плавления и концентрацией ионов натрия в растворе. Линия 1 получена для *M. lysodeikticus* ($x_0=0.72$), линия 2 – *E. coli* ($x_0=0.5$), линия 3 - *S. saprophyticus* ($x_0 = 0.33$), линия 4 - *M. mycoides* var. *capri* ($x_0 = 0.24$) [50].

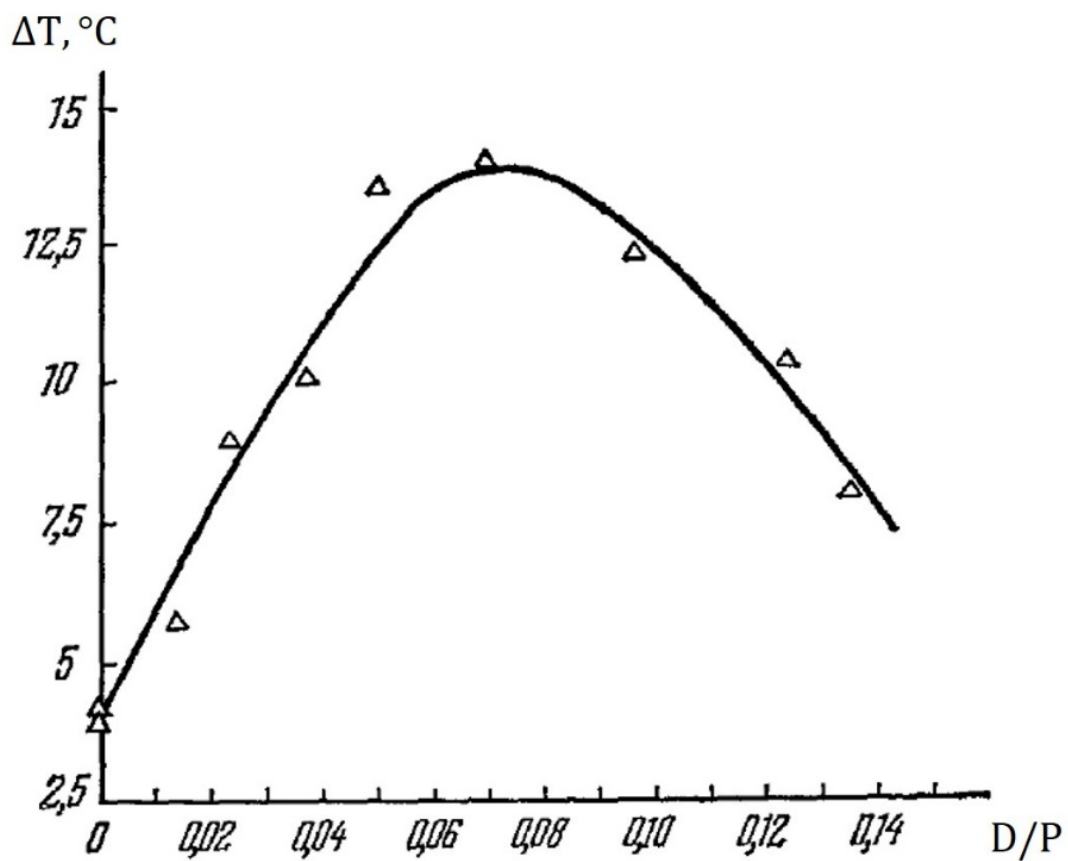


Рис. 1.9. Зависимость интервала плавления ДНК от концентрации рибонуклеазы в растворе [51].

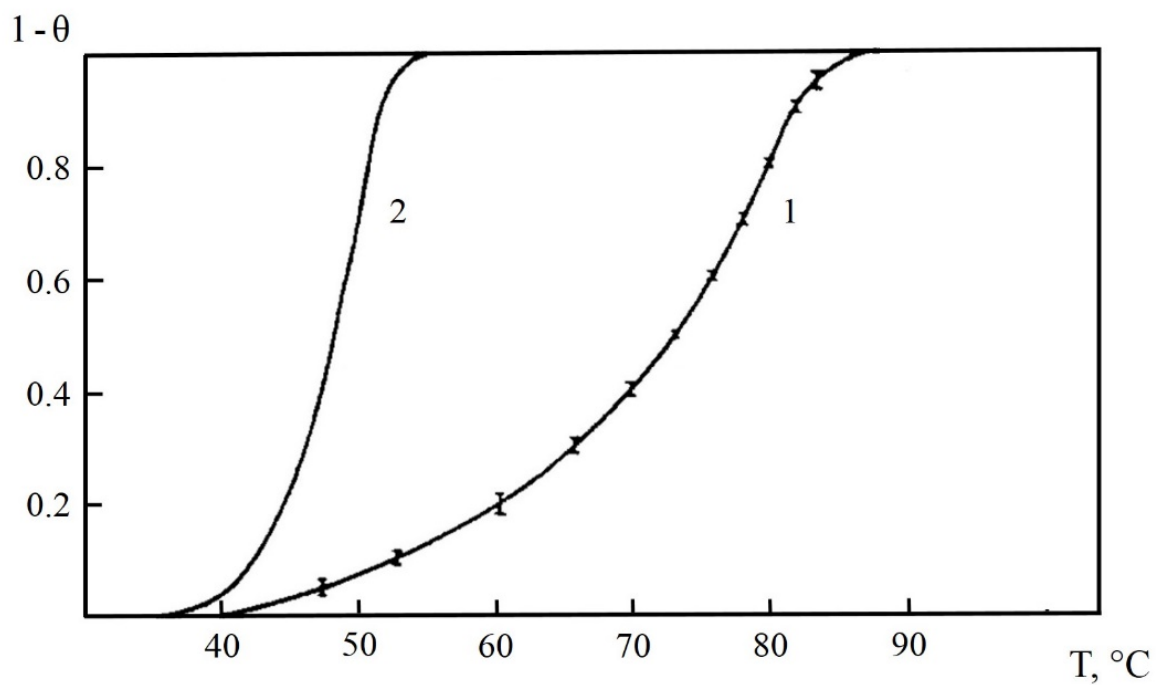


Рис. 1.10. Кривые плавления кольцевой, замкнутой ДНК полиомы (1) и для той же ДНК с разрывом в одной из нитей (2) в 7.2 М-ном растворе NaClO_4 .

1.4. Взаимодействие ДНК с низкомолекулярными соединениями

Взаимодействие различных низкомолекулярных веществ с нуклеиновыми кислотами - НК (ДНК и РНК) является объектом интенсивного исследования уже более пятидесяти лет. Интерес к этим исследованиям связан с тем, что НК в клетке окружены множеством различных соединений, в том числе – макромолекулами (белками и другими молекулами НК), низкомолекулярными соединениями органической и неорганической природы, различными ионами металлов и др. [53].

Известно, что живые организмы содержат уникальную программу самостоятельного воспроизводства, которая закодирована в молекуле ДНК, что дает право назвать ее важнейшей молекулой жизни [54]. При этом, находясь в окружении различных веществ, она реализует свои структурные и функциональные свойства посредством образования комплексов с ними. С ДНК непосредственно могут связываться также проникшие извне натуральные или синтетические вещества, благодаря ее уникальной структуре, которая является линейной молекулой, состоящей из двух завитых друг на друга нитей (двухцепочечная структура) [55].

При этом, между двумя цепочками ДНК действуют связи двух типов – горизонтальная и перпендикулярная. Горизонтальные связи образуются между азотистыми основаниями нуклеотидов, входящих в состав каждой полимерной цепочки ДНК. Эти связи реализуются атомами водорода (водородные связи) - между адениновыми (А) и тиминовыми (Т) основаниями образуются две, гуаниновыми (Г) и цитозиновыми (Ц) основаниями – три связи. Перпендикулярные взаимодействия образуются между плоскостями пар азотистых оснований ДНК (стекинг взаимодействия) (рис. 1.11) [55].

За счет линейного расположения нуклеотидов вдоль полимерной цепи ДНК и формируется генетический код. Необходимо отметить, что этот код, с одной стороны, является постоянным, вследствие двухцепочечного строения

ДНК, с другой стороны, он изменчив, поскольку всегда подвергается влиянию различных физических или химических факторов [56]. В образовании структуры ДНК существенную роль играют различные (вышеуказанные) соединения, которые можно называть биологически активными веществами (БАВ) [57].

Некоторые из них в клетке могут содержаться или проникать извне в малых количествах, однако, связываясь с ДНК, они нарушают процессы репликации, транскрипции и др., т.е. нарушают передачу генетической информации. В большинстве случаев БАВ являются токсическими, а также могут вызывать мутации или приводить к опухолеобразованию [57]. Несмотря на это, такие вещества могут служить основой для синтеза лекарственных препаратов противомикробного, противовирусного или противоопухолевого действия.

Одной из особенностей БАВ является их специфичность к определенным участкам ДНК, что повышает интерес к ним и в настоящее время лежит в основе стратегии создания новых подходов для анализа аномалий в структуре ДНК и создания относительно безвредных лекарственных веществ [53,56,58].

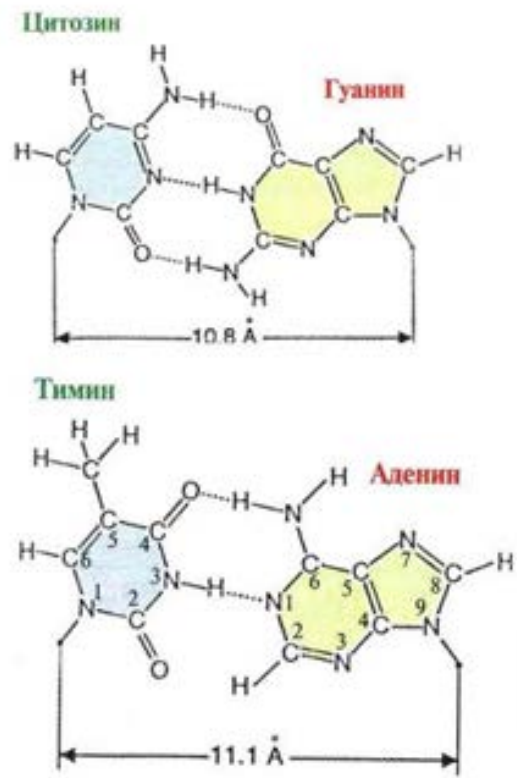
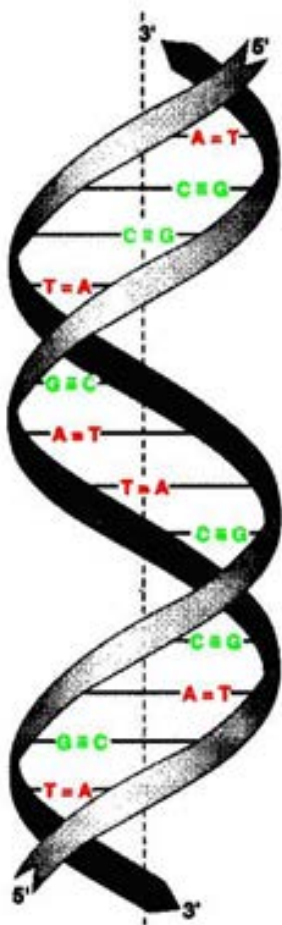
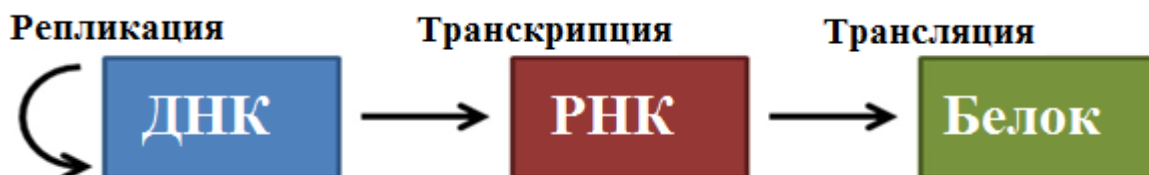


Рис. 1.11. Двойная спираль ДНК.

После выяснения структуры и функций ДНК стало очевидным, что центральная догма молекулярной биологии в простейшем виде описывает передачу информации из последовательности ДНК к РНК, из РНК к белку по следующей схеме:



Таким образом, в виде двойной спирали, ДНК сохраняет генетический материал для всех живых организмов, в процессе транскрипции генетическую информацию передает к РНК, которая вследствие трансляции превращается в протеины. С помощью этих реакций ДНК диктует и с высокой точностью контролирует практически все клеточные процессы [54,59].

Каждая клетка в основном имеет всего одну копию из каждой молекулы ДНК в геноме (в виде гомологичных хромосом), поэтому контроль генной экспрессии с помощью малых молекул (лигандов), специфичных к определенным последовательностям, может иметь важное значение при лечении различных заболеваний. Если определена генетическая мишень (специфическая последовательность ДНК), то, с помощью конкретного лиганда (и идентичных ему лекарств), можно лечить многие болезни.

Этот подход можно противопоставить протеиновой терапии, поскольку в этом случае необходимо синтезировать и идентифицировать большое число лекарственных веществ, которые ингибируют определенные протеины, учитывая также то, что многие из них в клетке существуют во множественных копиях [60].

Теоретически ДНК является мишенью для многих лигандов, однако до сих пор не получены такие соединения, которые обладают специфичностью к определенным последовательностям ДНК и одновременно используются клинически, в целях ингибирования транскрипции [61].

ДНК является конформационно гибкой макромолекулой и обладает структурной изменчивостью, что позволяет ей приспосабливаться к связыванию других соединений (лигандов, протеинов) в ее большом или малом желобке, при встраивании в плоскость между парами оснований, при связывании с внешней стороны, или при реализации этих способов одновременно [62].

Низкомолекулярные вещества с ДНК могут связываться ковалентно, например, *cis*-DDP (цис-диаминдихлороплатина(II)) и нековалентно, с различными механизмами [63-68].

Нековалентное связывание лигандов может происходить за счет непосредственного химического взаимодействия с ДНК, или лиганд может вызывать повреждения в ней опосредованно [69]. Обратимое связывание лигандов с двухцепочечной (дц-) ДНК можно представить несколькими типами:

- электростатическое связывание с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК;
- связывание с большим желобком;
- связывание с малым желобком;
- интеркаляция молекулы лиганда в плоскость между парами оснований в большом желобке ДНК;
- интеркаляция молекулы лиганда в плоскость между парами оснований в малом желобке ДНК;
- ступенчатая интеркаляция (полиинтеркаляция).

В зависимости от структуры как ДНК, так и молекулы лиганда, последние могут связываться с ней более чем одним из этих способов. По основному

механизму взаимодействия в настоящее время лиганды подразделяются на два больших класса – интеркаляторы и желобково связывающиеся соединения [69].

1.4.1. Интеркаляционное связывание лигандов с ДНК

Интеркаляторы представляют класс соединений, содержащих группу ароматических колец, большинство из них носят положительные заряды или непосредственно в ароматических кольцах, или выступающих цепях (рис. 1.12) [69,70]. Типичными представителями являются акридиновые вещества, в том числе - профлавин (ПФ), акридиновый оранжевый (АО), актиномицин Д (АМД), метиленовый синий (МС) и др. (рис. 1.12), фенантридиновые соединения, в частности бромистый этидий (БЭ), пропидий иодид (ПИ) и др (рис. 1.12). Плоская группа ароматических колец вступает в перпендикулярное взаимодействие с плоскостями пар оснований, образуя интеркаляционный комплекс с ними. Интеркаляция происходит без водородных связей, по принципу модели исключенных мест связывания (см. [69]). Когда ДНК насыщена молекулами интеркалятора, каждое второе потенциальное место для интеркаляции становится недоступным. Интеркаляция стабилизируется за счет гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных связей, а также перераспределением заряда [71]. Многие интеркаляторы могут проявить специфичность к АТ или ГЦ последовательностям, что указывает на то, что и другие факторы способствуют интеркаляции.

Термодинамические параметры связывания должны определяться для каждого интеркалятора, так как взаимоотношения вкладов энтальпии и энтропии не всегда ясны, и даже в том случае, когда лиганды схожи структурно и имеют близкие значения K , эти взаимоотношения будут иметь различные значения. В случае некоторых интеркаляторов предпочтительнее вклад энтальпии в связывание, в случае других – энтропии. В частности, доксорубицин и даунорубицин (дауномицин) (рис. 1.12) являются

изоэнтальпическими, но не изоэнергетическими, поскольку в случае доксорубина и энталпия, и энтропия имеют предпочтительный вклад, в то время как в случае дауномицина обнаруживается нежелательный энтропийный вклад (рис. 1.13) [72].

Для понимания деталей интеркаляционного механизма удобным является кинетика связывания, однако, если равновесную константу диссоциации или ассоциации можно экспериментально измерить, то точные детали многостадийного процесса интеркаляции/деинтеркаляции все еще остаются неясными. Тем не менее, недавние исследования молекулярно-динамическим методом (МДМ) проливают свет на пока что не вполне ясное понимание динамики связывания некоторых простых интеркаляторов. В частности, с помощью моноинтеркалятора профлавина (ПФ) исследована интеркаляция (а также деинтеркаляция) через большой или малый желобок с использованием метадинамической симуляции (МС) [73]. Был обнаружен быстрый переход ПФ из раствора в прединтеркаляционный участок связывания. Затем следуют небольшие изменения для интеркаляции через большой желобок. Деинтеркаляция также имеет место через большой желобок, однако этот процесс замедлен из-за большого энергетического барьера, необходимого для перегруппировки назад в связанное состояние в желобке.

Было проведено также исследование по связыванию дауномицина с ДНК с помощью метадинамического моделирования и USM (umbrella sampling method) [74]. Опять же, дауномицин быстро накапливается в малом желобке. Гораздо медленнее перемещение с метастабильным промежуточным состоянием обнаружено, когда дауномицин вклинивается в плоскость между парами оснований в малом желобке и искривляет спираль ДНК вдали от интеркаляционного участка, как это выявлено в случае природных протеинов, связывающихся в малом желобке. Небольшой энергетический барьер позволяет полному интеркаляционному переходу через малый желобок. Аналогичное исследование методами молекулярного моделирования (ММ) и силовыми полями (СП)

АМВЕР проведены для анализа связывания доксорубицина [75]. Как и в предыдущих случаях, интеркалятор быстрее связывается в малом желобке с последующей небольшой перегруппировкой в состояние, когда интеркалятор удаляет друг от друга основания посредством интеркаляции через малый желобок. Во всех этих исследованиях рассчитанное значение изменения свободной энергии было в соответствии с экспериментально измеренными величинами (порядка 11.7 – 14.8 ккал/моль) [62]. На основании этих данных можно заключить, что интеркаляция через малый или большой желобок зависит от типа интеркалятора. Однако, на примере моноинтеркалятора YOPO и бис-интеркалятора YOYO недавно было показано, что их интеркаляции предшествует связывание без интеркалирования. Было заключено, что “не интеркалирование” не означает “не связывание”. Более того, и связывание, и интеркаляция вместе в целом противоположные процессы и имеют различные временные шкалы [76].

Эти исследования находятся в качественном соответствии с МДМ изучениями. Другое заключение состоит в том, что интеркаляторы вызывают изменения в структуре ДНК для вклинивания в плоскость между парами оснований, в противоположность той общепринятой гипотезе, согласно которой ДНК меняет свою структуру таким образом, чтобы молекула лиганда смогла интеркалировать в ДНК (см. [77]). Деинтеркаляция же является замедленным процессом, поскольку энергетический барьер не позволяет молекуле лиганда вернуться в желобково-связанное состояние после полной диссоциации [62].

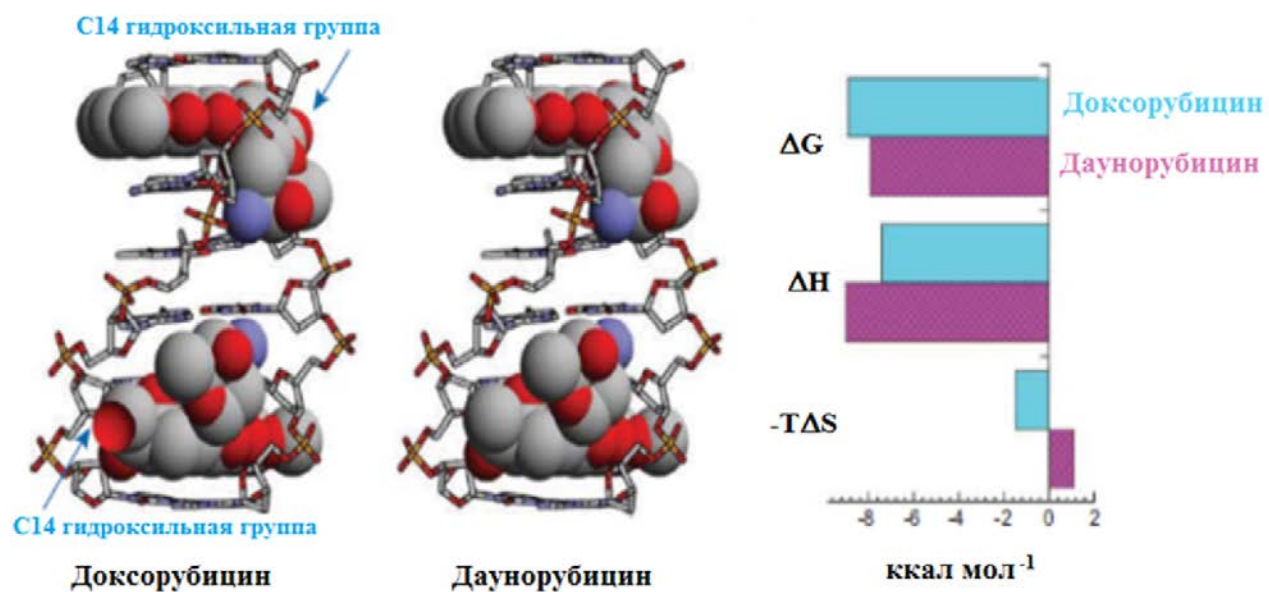


Рис. 1.12. Интеркаляция доксорубина и даунорубина (дауномицин) в ДНК. Общая свободная энергия (ΔG) показана графически для обоих интеркаляторов вместе с изменениями энтальпии и энтропии. Несмотря на то, что эти интеркаляторы схожи структурно, взаимоотношение вкладов энтальпии и энтропии при их связывании качественно различны [72].

Глава 2.

Влияние электро – нейтральных лигандов на чувствительность и избирательность ДНК – сенсоров на основе полевых устройств

В данной главе рассмотрен случай неконкурентной гибридизации. Задача мотивирована применением ДНК - полевых транзисторов в таких областях, как медицинская диагностика, анализ загрязнения окружающей среды, защита от биологического оружия и т.д. Поскольку, эффективность ДНК – сенсора зависит от точного определения параметров, ответственных за термостабильность дуплекса ДНК и время его образования, проанализированы факторы, влияющие на термодинамику гибридизации и стабильность комплексов ДН-ДНК и ДНК-РНК. Показано, что интеркалирующие лиганды эффективно повышают константу связывания с мишенями и тем самым, повышают чувствительность ДНК - сенсора.

ДНК – сенсоры на платформе полевых устройств обычно представляют собой либо конденсатор, либо полевой транзистор, полевой эффект в котором возникает из-за парциальных зарядов молекул ДНК. Затвор транзистора/конденсатора реализуется как слой иммобилизованных на поверхности одноцепочечных молекул ДНК (оцДНК), которые действуют как поверхностные рецепторы (см. рис. 2.1 и 2.2). В дальнейшем мы их будем называть ДНК-зондами (или зондами). Когда комплементарные нити оцДНК в растворе (в дальнейшем ДНК-мишени, или просто мишени) гибридизуются с ДНК — зондами, поверхностный заряд изменяется, что, в свою очередь, модулирует перенос тока через полупроводниковый преобразователь. ДНК - сенсоры являются одним из перспективных инструментов с очень разнообразными областями применения, такими как медицинская диагностика, мониторинг загрязняющих веществ, защита биологического оружия и т. д. [78, 79].

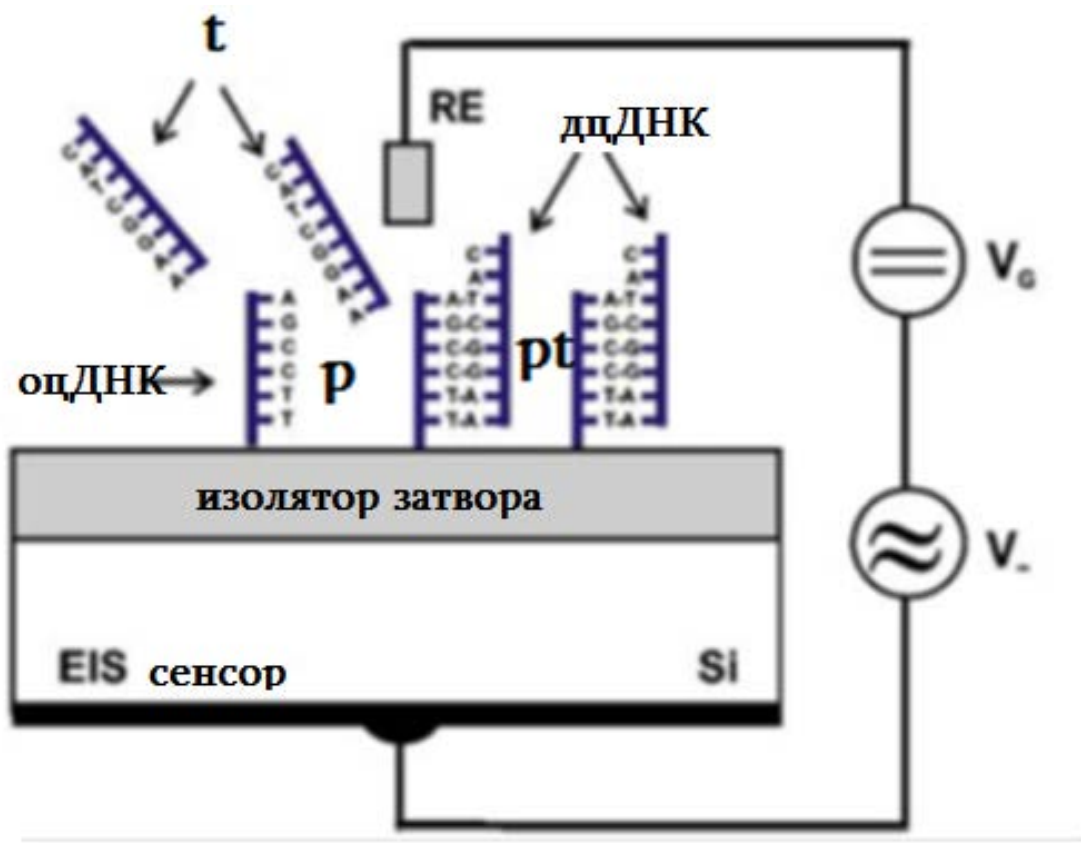


Рис. 2.1. Схема EIS – ДНК – сенсора.

Одним из важных направлений улучшения ДНК – сенсоров является повышение чувствительности и избирательности, в частности, за счет усиления электрического сигнала и повышения устойчивости ДНК — гибрида [80].

Одним из ключевых факторов, определяющих чувствительность ДНК сенсора на полевой платформе является потенциал на поверхности раздела электролит – изолятор, возникающий, когда оксид подвергается воздействию электролита. Зависимость потенциала на поверхности раздела от состава раствора, является самым важным параметром при применении устройств с полевым эффектом в качестве биосенсоров.

Связь между потенциалом, приложенным, например, к конденсатору EIS, и накопленным зарядом на электрохимической поверхности раздела можно разделить на два компонента: (1) электростатический потенциал ионов и/или макроионов в растворе, определяемый электрохимическим двойным слоем, и (2) образование заряда из-за химических реакций, происходящих на поверхности оксида, как это описывается моделью связывания с активными центрами оксида. В дальнейшем, мы сосредоточимся на первой компоненте.

Согласно модели Гуи – Чэпмена - Штерна, электрохимический двойной слой состоит из компактного ионного слоя ближе к поверхности электрода, за которым следует диффузный слой, распространяющийся на основную часть раствора (рис. 2.3). Плоскость разделения между этими двумя областями называется внешней плоскостью Гельмгольца (ОНР). Это расстояние включает сольватирующую оболочку, которая обычно образуется вокруг ионов в водном растворе и, таким образом, больше ионного радиуса. В области внутри ОНР имеется недостаток ионных зарядов, поэтому разделение заряда дает постоянную емкость, известную как емкость Штерна.

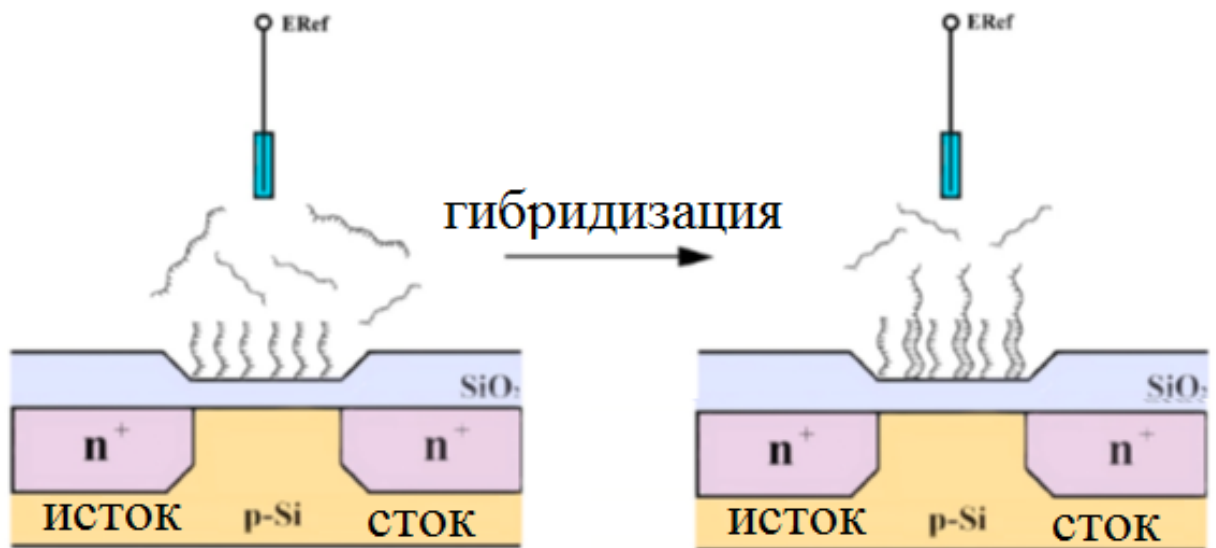


Рис. 2.2. Схема работы ДНК – сенсора на базе ионо-чувствительного полевого транзистора (ISFET). Изменение количества ДНК, вызванное гибридизацией приводит к локальному изменению заряда и перестройке ионов вблизи поверхности сенсора, модулируя тем самым его отклик.

Вне ОНП падение потенциала будет следовать уравнению Пуассона-Больцмана. Это эквивалентно двум последовательно расположенным конденсаторам: C_{Stern} представляет собой емкость компактного слоя, а C_{GC} представляет собой емкость диффузного слоя Гуи – Чепмена (Gouy-Charman). Суммарную емкость двойного слоя на единицу площади (C_{dl}) можно определить как [35]

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_{Stern}} + \frac{1}{C_{GC}} \quad (2.1)$$

Другие вклады в общее падение электростатического потенциала на электрохимической поверхности раздела могут возникнуть из-за поляризации растворителя, комплексообразования, неспецифической и специфической адсорбции на поверхность тех ионов, которые находятся к поверхности ближе, чем ОНР, благодаря освобождению их от сольватной оболочки, определяя, таким образом, внутреннюю плоскость Гельмгольца (ИНР). Тем не менее эти эффекты обычно малы и ими обычно можно пренебречь [35].

Устройства с полевым эффектом могут служить для измерения поверхностного заряда. Поскольку молекулы ДНК представляют собой полианионы, при гибридизации зондов с мишенями эффективно изменяется заряд на затворе полевого устройства и, таким образом, модулируется напряжение и / или емкость датчика EIS. Однако, измеримый вклад в сигнал будет определяться только изменениями плотности заряда, происходящими в пределах длины экранирования Дебая от поверхности раздела изолятор – электролит. Как известно, радиус Дебая определяется выражением

$$\Gamma_D = \left(\frac{\epsilon \epsilon_0 k_B T}{2 N_A I q^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.2)$$

где ϵ - диэлектрическая проницаемость электролита, N_A – число Авогадро и I – ионная сила раствора. Таким образом, с ростом ионной силы, доля заряда ДНК, непосредственно влияющего на характеристики устройства будет уменьшаться.

В физиологических условиях, где $r_D \approx 0.8$ нм [36], большая часть заряда ДНК будет экранирована от поверхности. В то же время, при низких ионных силах непосредственно обнаружение заряда ДНК остается возможным.

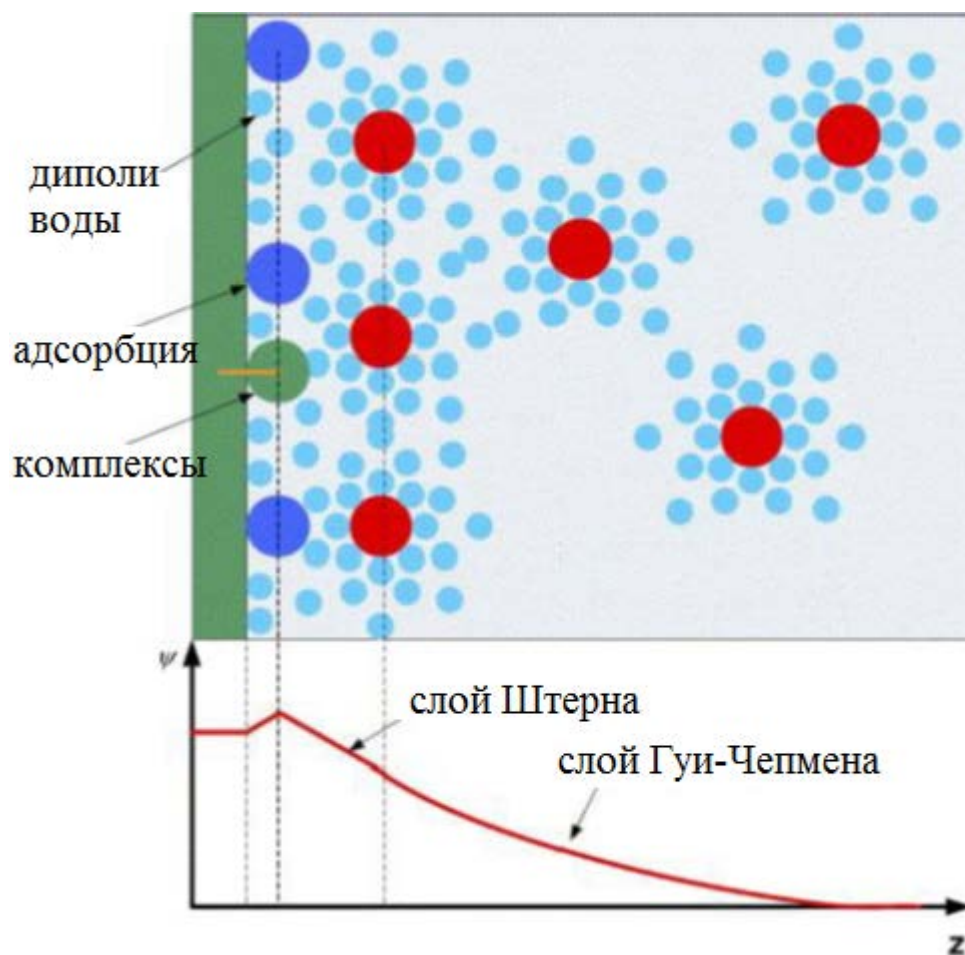


Рис. 2.3. Схематическое представление модели Гуи – Чэпмена - Штерна

Поскольку молекулы дцДНК и оцДНК отрицательно заряжены, то они притягивают катионы (например, H^+) из испытуемого образца и отталкивают анионы. Таким образом, заряд ДНК эффективно компенсируется окружающими небольшими противоионами. Это приводит к локальному перераспределению концентрации ионов в пределах межмолекулярного пространства (увеличение концентрации катионов и уменьшение концентрации анионов), которые могут существенно отличаться от концентрации в исследуемом образце. Поскольку при гибридизации, заряд дцДНК почти удваивается, должно установиться новое распределение электростатического потенциала и ионов внутри межмолекулярного пространства. Таким образом, индуцированное гибридизацией перераспределение концентрации ионов может быть обнаружено чувствительным к ионам устройством с полевым эффектом.

Помимо свойств электрохимической поверхности раздела на термодинамику гибридизации влияют некоторые следующие факторы, в частности: плотность одноцепочечных ДНК-зондов (длина 25-49 нуклеотидов), иммобилизованных на поверхности; наличие конкурирующей гибридизации; и некоторые другие факторы. Понимание физико-химических механизмов гибридизации ДНК и РНК на поверхности электрического преобразователя имеет значение для улучшения эффективности и изготовления датчиков ДНК [81]. Как было указано в Гл.1, устойчивость дуплекса ДНК строго зависит от условий растворителя, включая рН, ионную силу, наличие в растворе низкомолекулярных соединений (лигандов), взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами и другими веществами.

Повышение избирательности и чувствительности ПТДНК и других ДНК-сенсоров может быть достигнуто с использованием электрохимически активных соединений с более высоким сродством к дцДНК, чем к оцДНК. Этот вид соединений может существенно повысить стабильность дцДНК и в то же время амплитуду генерируемого сигнала, что увеличивает чувствительность

ДНК-датчика. Среди этого типа лиганды — интеркаляторы (см. Гл. 1), молекулы с плоской гетероциклической структурой, которые встраиваются между азотистыми основаниями и изменяют локальную структуру дцДНК [82,83]. Существует значительное число интеркаляторов, которые можно разделить на классические и не классические. Классическими интеркаляторами являются БЭ, ПФ, которые первыми были описаны и исследованы. Выявлены многие аспекты их интеркаляции в ДНК [53].

Процес интеркаляции впервые описал Лерман (см [53]), который обнаружил, что добавление этих лигандов вызывает изменения в структуре ДНК – она удлиняется и раскручивается. Дальнейшие исследования выявили, что интеркаляция сопровождается большим изменением энтропии, без изменения энтальпии.

Интеркаляторы подразделяются на различные подклассы: антрацены, акридины, антрахиноны, фенантридины, фенантролины, эллиптицины, нафталены (НФ) и нафтален диимиды (НФД) (рис. 2.4) [84]. Многие интеркаляторы, например антрациклины (дауномицин, адриамицин и др.) ингибируют синтез ДНК и РНК. Эти интеркаляторы являются наиболее распространенными химиотерапевтическими агентами при лечении некоторых форм опухолей, в частности при лейкемии [53]. Однако многие из них не предназначены для применения в терапевтических целях, поскольку имеют разрушающий побочный эффект из-за недостатка специфичности к определенным участкам ДНК [85].

Ступенчатые интеркаляторы имеют субъединицы, которые одновременно связываются в малом и большом желобках ДНК, и эти интеркаляторы, имеющие мульти-интеркалирующие единицы, называются полиинтеркаляторами, характеризуются высокой специфичностью и сродством к определенным последовательностям ДНК [62].

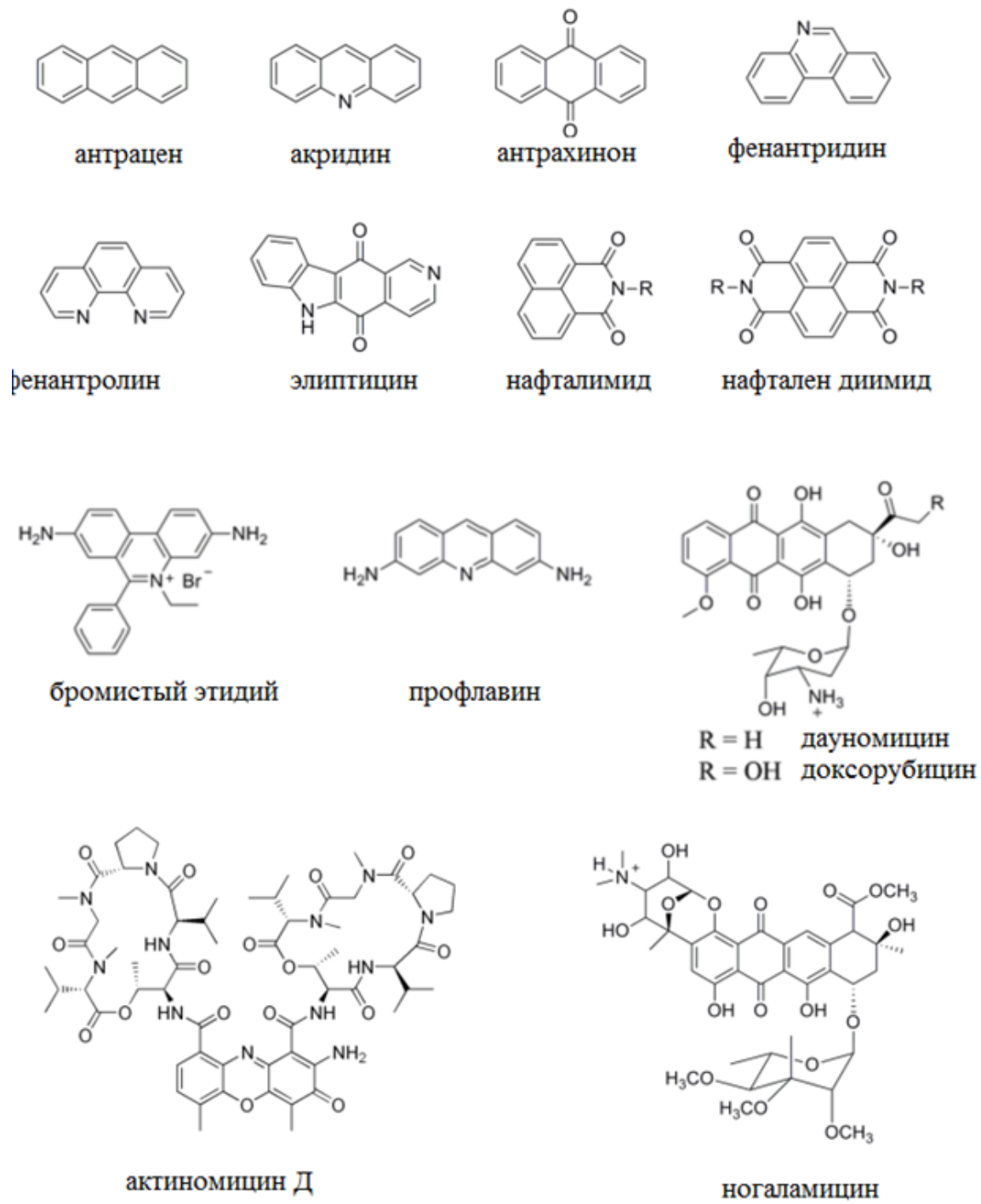


Рис. 2.4. Химическая структура некоторых интеркаляторов.

Узнавание геометрии ДНК-интеркалятор комплексов имеет важное значение для выяснения термодинамических особенностей механизмов связывания и для определения движущих сил комплексообразования. При этом, количественное определение термодинамических характеристик образовавшихся комплексов может стать основой для конструирования новых препаратов и повышения их селективности к определенным участкам ДНК.

Процесс интеркаляции начинается с переноса молекулы лиганда из водного окружения в плоскость между парами оснований ДНК. Интеркаляционный сайт гидрофобный по отношению к водному окружению свободного лиганда. Этот процесс можно представить как благоприятный гидрофобный перенос, поскольку вывод неполярной молекулы лиганда из воды приводит к разрушению упорядоченной гидратной оболочки лиганда, что является энтропийно выгодным [53,86-88]. При интеркаляции лиганда в ДНК происходят определенные конформационные изменения для образования интеркаляционного участка: пары оснований вдоль длины ДНК расходятся примерно на $3,4\text{\AA}$ для вставки молекулы лиганда в плоскость между ними. Это, в свою очередь, приводит к раскручиванию сахаро-фосфатного остова относительно главной оси спирали, за счет чего образуется интеркаляционная полость [84-86]. При этом происходит локальное раскручивание последующих друг за другом пар оснований по соседству с интеркаляционным участком, за счет чего увеличивается расстояние между фосфатными группами сахарофосфатного остова каждой цепи. Эти изменения приводят также к уменьшению локальной плотности заряда и облегчают высвобождение конденсированных на ДНК ионов Na^+ . Вследствие этого происходит перенос молекул лиганда из водной среды в интеркаляционную полость в случае неполярных интеркаляторов [86-88]. В случае катионных интеркаляторов (уже адсорбированных на ДНК), увеличивается концентрация противоионов в участке связывания, т. е. для интеркаляции этих лигандов определенную роль

играет также эффект полиэлектролита [53,86-88]. Как только лиганд вклинивается в плоскость между парами оснований, энергия системы оптимизируется с помощью нековалентных связей до стабилизации образовавшихся комплексов. Движущими силами этих нековалентных взаимодействий являются гидрофобные, ван-дер-Ваальсовы силы, эффект полиэлектролита, стеклинг взаимодействия, а также водородные связи в случае некоторых интеркаляторов [53,86-88].

Термодинамика и кинетика гибридизации как в объеме [89, 90], так и на поверхности [86, 91-97] были широко изучены в последние годы. Спектр рассмотренных проблем включает, например, кинетика гибридизации на поверхности [93, 95], влияние солей в растворе на гибридизацию ДНК в объеме [90], изотермы гибридизации на поверхности [81] и т. д. В то же время взаимодействие ДНК-лиганд также было рассмотренных в огромном количестве работ, посвященных, в частности, интеркалирующим лигандам [65, 66, 82, 83] и многим другим их видам. Однако, насколько нам известно, эффект взаимодействий ДНК-лиганда на термодинамику и кинетику гибридизации никогда ранее не рассматривалось. В контексте развития ДНК-биосенсоров необходим теоретический анализ влияния интеркалирующих лигандов на гибридизацию ДНК на поверхности.

В данной главе рассматривается изотерма гибридизации ДНК на поверхности в присутствии лигандов, связывающейся с двухцепочечными областями ДНК. На практике чипы ДНК погружаются в раствор в течение относительно короткого времени и кинетика гибридизации играет решающую роль. Однако понимание равновесного состояния также необходимо для определения сравнительной важности кинетического и термодинамического контроля характеристик ДНК-сенсоров.

2.1. Гибридизация в отсутствие конкуренции

Свободная энергия

Рассмотрим равновесную изотерму гибридизации для идеализированной, но экспериментально доступной ситуации, где ДНК-датчик погружен в раствор, содержащий интеркалирующие лиганды и только один тип одноцепочечной мишени (рис.2.5). Мы считаем, что длина всех зондов и мишеней одинакова и составляет N нуклеотидов.

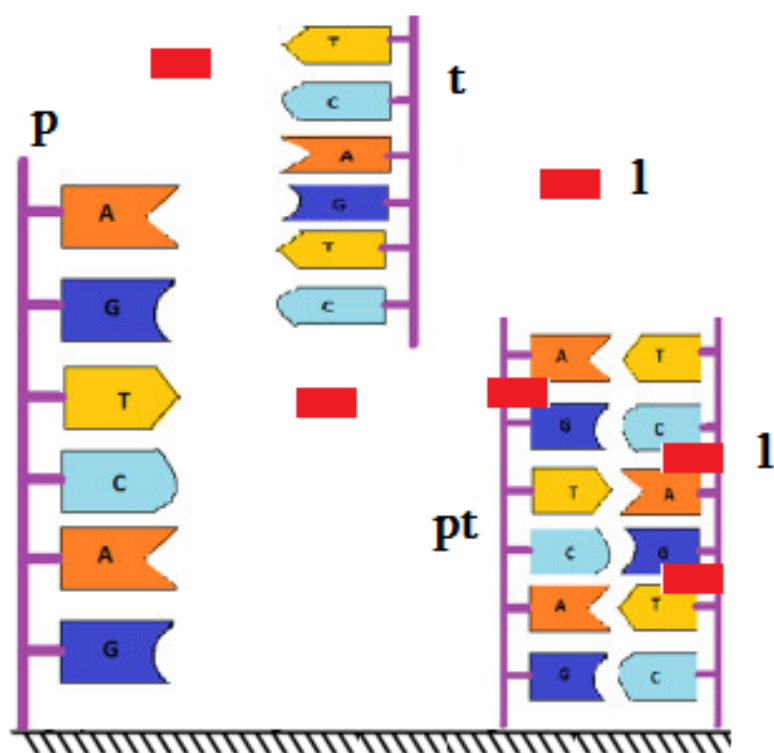


Рис. 2.5. Схема гибридизации на поверхности без конкуренции.

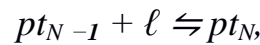
Рассмотрим систему из N_0 ДНК — зондов (p), где N_{pt} из них гибридизуются с мишенями (t), иммобилизованными на поверхности. Гибридизация p и t создает на поверхности двухцепочечный олигонуклеотид pt . В простейшем случае, когда в растворе есть всего один вид мишеней оцДНК, поверхность будет покрыта только свободными зондами p и гибридизованными pt . В этом случае имеет место единственная реакция



и не происходит реакций конкурентной гибридизации. Зависимость степени гибридизации, $x = \frac{N_{pt}}{N_0}$ от концентрации мишеней, c_t , описывается изотермой гибридизации. Для интеркалирующих лигандов ℓ реакции связывания могут быть записаны как



...



где pt – это свободный (от лигандов) гибрид зонд-мишень, а pt_i гибрид, связанный с i лигандами ℓ . Свободная энергия слоя зондов без лигандов записывается как [92]

$$G = G_0 + N_{pt}\mu_{pt}^0 + (N_0 - N_{pt})\mu_p^0 + N_0\Sigma Y_{el.} + k_B T \left[N_{pt} \ln \left(\frac{N_{pt}}{N_0} \right) + (N_0 - N_{pt}) \ln \left(\frac{N_0 - N_{pt}}{N_0} \right) \right], \quad (2.3)$$

где Σ - площадь поверхности из расчета на одну пробу, G_0 - свободная энергия в контрольном состоянии, μ_{pt}^0 и μ_p^0 химические потенциалы гибридов pt и зондов p в контрольном состоянии и $\gamma_{el.}$ - плотность электростатической свободной энергии слоя зондов.

Если интеркаляция является единственным механизмом связывания лигандов, формирование комплекса ДНК-лиганда будет ограничиваться только двухцепочечными областями, а свободная энергия слоя зондов дает

$$G_L = G + N_{pt} \left\{ m\mu_b^0 + k_B T \left[m \ln \frac{m}{N} + (N - m) \ln \frac{N - m}{N} \right] \right\}, \quad (2.4)$$

где m - число связанных лигандов из расчета на один гибридизованный зонд pt и μ_b^0 - химический потенциал связанного лиганда в контрольном состоянии. Предполагается, что доступное количество центров связывания на дуплексе pt совпадает с его длиной в нуклеотидах, N . Таким образом, свободная энергия слоя зондов записывается как функция независимых переменных N_{pt} , числа гибридизованных зондов и $N_b = mN_{pt}$, число связанных лигандов как

$$G_L(N_{pt}, N_b) = G(N_{pt}) + \mu_b^0 N_b + k_B T \left[N_b \ln \frac{N_b}{NN_{pt}} + (NN_{pt} - N_b) \ln \frac{NN_{pt} - N_b}{NN_{pt}} \right]. \quad (2.5)$$

Изотермы адсорбции и гибридизации

Равновесное состояние для реакций (2.1) и (2.2) определяется условиями

$$\mu_{pt} = \mu_p + \mu_t, \quad (2.6)$$

$$\mu_l = \mu_b, \quad (2.7)$$

где μ_{pt} - химический потенциал гибридизованного зонда pt , μ_t - химический потенциал мишени, μ_p - химический потенциал зонда, μ_b и μ_l - химические потенциалы связанного и свободно лигандов, соответственно [98].

Обменный химический потенциал гибридизованного зонда, $\Delta\mu_{pt} = \mu_p - \mu_t$ записывается как

$$\Delta\mu_{pt} = \frac{\partial G_L}{\partial N_{pt}} = \Delta\mu_{pt}^0 + N \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma} + k_B T \ln \frac{x}{1-x} + k_B T \ln(1-r), \quad (2.8)$$

где $r = \frac{N_b}{NN_{pt}}$ - это степень адсорбции лигандов l на дцДНК. Плотность электростатической свободной энергии γ_{el} рассматривается как функция поверхностной плотности заряда σ . В то же время, химический потенциал связанного лиганда [98]

$$\mu_b = \frac{\partial G_L}{\partial N_b} = \mu_b^0 + k_B T \ln \frac{r}{1-r}. \quad (2.9)$$

В приближении слабого раствора, химический потенциал мишеней в объеме раствора определяется выражением

$$\mu_t = \mu_t^0 + k_B T \ln c_t, \quad (2.10)$$

а химический потенциал лиганда в растворе

$$\mu_l = \mu_l^0 + k_B T \ln c_l, \quad (2.11)$$

где c_t и c_l концентрации в растворе мишеней и лигандов, соответственно. С учетом выражений (2.6)-(2.11) изотерма гибридизации будет иметь вид

$$\frac{x(1-r)^N}{c_t(1-x)} = K_t \exp\left(\frac{-N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right), \quad (2.12)$$

где $K_t = \exp\left(\frac{-\Delta G^0}{k_B T}\right)$ и $\Delta G^0 = \mu_{pt}^0 - \mu_t^0$. Равновесное распределение лигандов l

между связанным и свободным состояниями описывается изотермой адсорбции

$$\frac{r}{c_l(1-r)} = K_l, \quad (2.13)$$

где $K_l = \exp\left(\frac{-\Delta g^0}{k_B T}\right)$ и $\Delta g^0 = \mu_b^0 - \mu_l^0$.

Результаты и обсуждение

Изменение свободной энергии при интеркаляции лигандов в ДНК из себя представляет сумму следующих составляющих:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{конф}} + \Delta G_{\text{т+р}} + \Delta G_{\text{гид}} + \Delta G_{\text{пэ}} + \Delta G_{\text{мол}}, \quad (2.14)$$

где ΔG - экспериментальное значение свободной энергии при образовании ДНК-интеркалятор комплексов и определяется с помощью равновесной константы связывания ($K_{\text{инт}}$) по уравнению:

$$K_{\text{инт}} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right), \quad (2.15)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. $\Delta G_{\text{конф}}$ соответствует изменению свободной энергии конформационных изменений, имеющих место вследствие интеркаляции, $\Delta G_{\text{т+р}}$ соответствует изменению свободной энергии, имеющей место вследствие уменьшения трансляционной и ротационной свободы, $\Delta G_{\text{гид}}$ - изменение свободной энергии при гидрофобных взаимодействиях (этот фактор является основным), $\Delta G_{\text{пэ}}$ – вклад эффекта

полиэлектролита, $\Delta G_{\text{мол}}$ – вклад изменения свободной энергии нековалентных молекулярных взаимодействий между лигандом и ДНК [53,86-88]. К тому же, изменение свободной энергии при связывании лигандов с ДНК зависит от вклада обоих – энтропийных и энтальпийных составляющих:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (2.16)$$

Основной преградой при связывании интеркаляторов с ДНК является отрицательная энтропия, которая вызывает невыгодное изменение $\Delta G_{\text{конф}}$. С другой стороны, $\Delta G_{\text{гид}}$, $\Delta G_{\text{пэ}}$ и $\Delta G_{\text{мол}}$ имеют благоприятный вклад в изменении свободной энергии, что компенсирует нежелательный вклад $\Delta G_{\text{конф}}$. При этом наибольший вклад имеют $\Delta G_{\text{гид}}$ и десольватация, поскольку гидрофобный лиганд экранируется от воды при встраивании в плоскость между парами оснований. Вклад эффекта полиэлектролита намного меньше в ΔG , однако, опять же предпочтительнее, благодаря энтропийной природе. Когда интеркалятор связывается, отрицательно заряженные фосфатные группы расходятся вследствие раскручивания и удлинения спирали. Помимо этого, противоионы, связанные с фосфатами ДНК, освобождаются и переходят в раствор, поскольку вышеуказанные изменения спирали приводят к уменьшению плотности заряда и эффекта экранирования этими противоионами. Более того, многие интеркаляторы положительно заряжены, что также способствует дальнейшему уменьшению конденсации катионов вдоль сахаро-фосфатного остова ДНК [53,74].

$\Delta G_{\text{мол}}$ имеет энтальпийный вклад, что включает все предпочтительные молекулярные взаимодействия между ДНК и интеркалятором – водородные связи, ван-дер-Ваальсовы, электростатические взаимодействия [77]. Способность интеркалятора распределяться между центрами связывания наиболее часто принимается как специфическое связывание, поскольку другие составляющие свободной энергии считаются неспецифическими.

Изотерма гибридизации мишеней в отсутствие лигандов $x_0(c_l)$ [92] воспроизводится при подстановке $r = 0$ в выражение (2.12). Для сравнения степени гибридизации со случаем без лигандов рассмотрим сдвиг изотермы гибридизации, $\delta x = x - x_0$. Равновесная степень адсорбции r^* имеет вид

$$r^* = \frac{c_l K_l}{c_l K_l + 1}. \quad (2.17)$$

Таким образом, эффект адсорбции интеркалирующих лигандов сводится ко введению эффективной константы связывания K_t как

$$\bar{K}_t = K_t \exp(-N \ln(1 - r^*)). \quad (2.18)$$

Плотность электростатической свободной энергии слоя зондов, γ_{el} , была оценена в работе [92] в приближении двухкомпонентного ящика [99–102]. В этом приближении, предположение о ступенчатом профиле концентрации и мономеров позволяет рассматривать систему как непрерывную область с однородной расмазанной плотностью заряда. При высокой концентрации солей экранирование заряженного слоя определяется вкладом соли и имеет вид

$$\frac{\gamma_{el}}{k_B T} = 4\pi\sigma^2 l_B \frac{r_D^2}{H}, \quad (2.19)$$

где $l_B = \frac{e^2}{\epsilon k_B T}$ - длина Бьоррума, ϵ - диэлектрическая проницаемость, r_D - длина экранирования Дебая. Здесь H - это толщина слоя, по которому равномерно распределены заряды. Поскольку каждая цепь несет заряд $-eN$, поверхностная плотность заряда σ зависит от степени гибридизации x как

$$\sigma = \sigma_0(1 + x) \quad (2.20)$$

С учетом выражений (2.12), (2.14), (2.15) и (2.17) построены изотермы гибридизации, представленные на рис. 2.6.

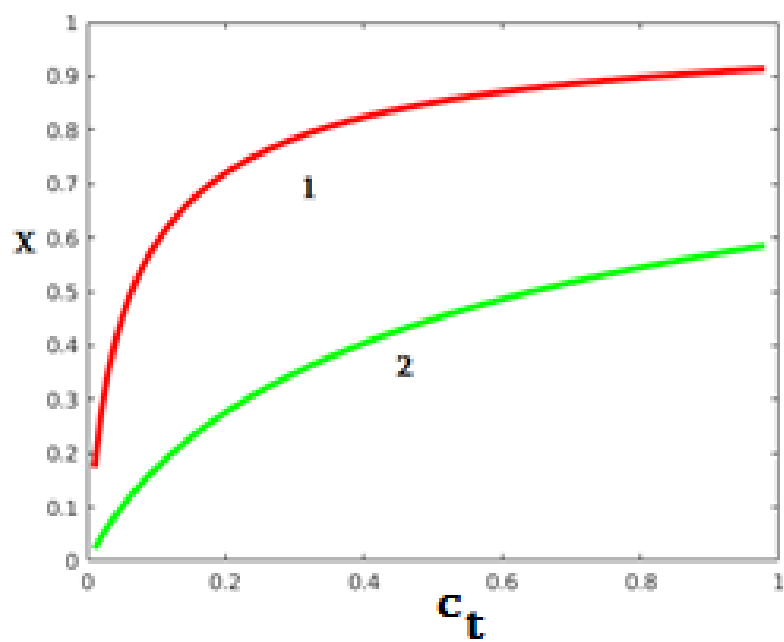


Рис. 2.6. Изотерма гибридизации: без лигандов (2); с лигандами (1).

2.2. Конкурентная гибридизация на поверхности

Рассмотрим второй сценарий, в котором растворитель содержит мишени двух различных типов t и m , которые не гибридизуются в объеме, но оба способны к гибридизации с одним и тем же зондом p на поверхности (рис.2.7). Здесь t является последовательностью полностью комплементарной к зонду p , а m является несогласованной последовательностью только частично комплементарной к зонду p . Предполагается, что доступное количество мест связывания для интеркалированных лигандов на дуплексе pm равно M , где $M < N$.

Свободная энергия слоя с зондами зависит от числа полностью комплементарно гибридизированных зондов N_{pt} , числа не полностью комплементарно гибридизированных зондов N_{pm} и количеств лигандов связанных с дуплексами pt и pm (N_1 и N_2 соответственно). Здесь $N_1 = nN_{pt}$ и $N_2 = mN_{pm}$.

$$G_{CL}(N_{pt}, N_{pm}, N_1, N_2) = G_c(N_{pt}, N_{pm}) + (N_1 + N_2)\mu_b^0 + k_B T \left[N_1 \ln \left(\frac{N_1}{NN_{pt}} \right) + (NN_{pt} - N_1) \ln \left(\frac{NN_{pt} - N_1}{NN_{pt}} \right) \right] + k_B T \left[N_2 \ln \left(\frac{N_2}{MN_{pm}} \right) + (MN_{pm} - N_2) \ln \left(\frac{MN_{pm} - N_2}{MN_{pm}} \right) \right]. \quad (2.21)$$

Химический потенциал лигандов связанных с комплементарным дуплексом pt будет иметь следующий вид:

$$\mu_b^1 = \frac{\partial G_{CL}}{\partial N_1} = \mu_b^0 + k_B T \ln \frac{r_1}{1-r_1}, \quad (2.22)$$

где величина $r_1 = \frac{N_1}{NN_{pt}}$ характеризует степень адсорбции лигандов на дуплексе

pt .

Химический потенциал лигандов связанных с частично комплементарным дуплексом pt будет

$$\mu_b^2 = \frac{\partial G_{CL}}{\partial N_2} = \mu_b^0 + k_B T \ln \frac{r_2}{1-r_2}, \quad (2.23)$$

где $r_2 = \frac{N_2}{NN_{pt}}$.

В то же время химические потенциалы обмена гибридизованных зондов pt и pm будут иметь следующий вид:

$$\Delta\mu_{pt} = \Delta\mu_{pt}^0 + N \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma} + k_B T \ln \frac{x}{1-x-y} + Nk_B T \ln(1-r_1), \quad (2.24)$$

$$\Delta\mu_{pm} = \Delta\mu_{pm}^0 + N \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma} + k_B T \ln \frac{y}{1-x-y} + Nk_B T \ln(1-r_2),$$

где $y = \frac{N_{pm}}{N_0}$.

Равновесное состояние между лигандами, мишенями, несовместимыми последовательностями в растворе и гибридизованными зондами будет описываться следующими условиями:

$$\mu_b^1 = \mu_l$$

$$\mu_b^2 = \mu_l$$

$$\Delta\mu_{pt} = \mu_t$$

$$\Delta\mu_{pm} = \mu_m, \quad (2.25)$$

где μ_m является потенциалом свободных несовместимых последовательностей m . В приближении слабого раствора величину μ_m можно оценить как $\mu_m = \mu_m^0 + k_B T \ln c_m$, где величина c_m является концентрацией последовательностей m .

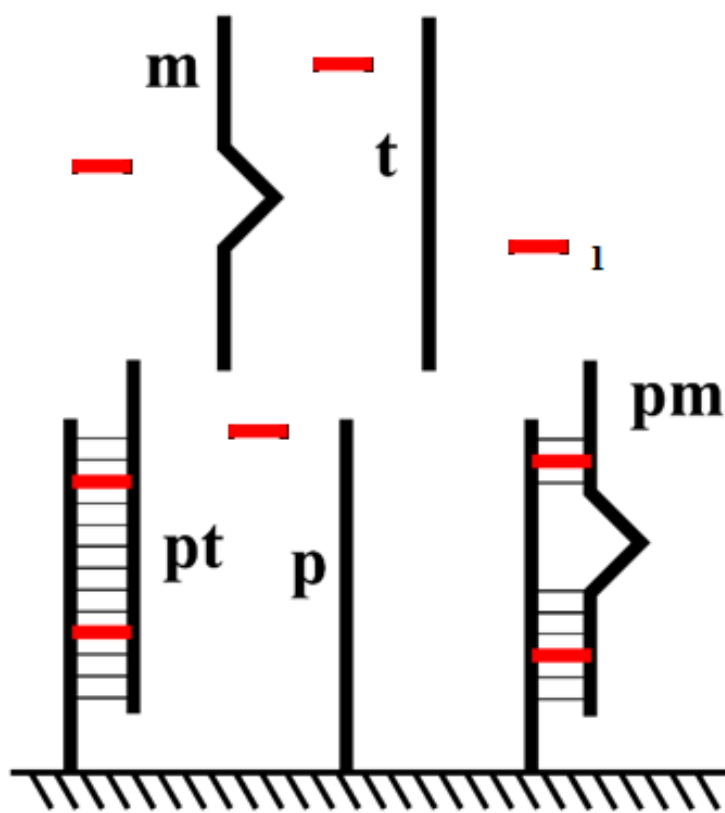


Рис.2.7. Схема конкурентной гибридизации на поверхности в присутствии лигандов.

Результаты

Одним из важных параметров, ответственных за чувствительность ДНК-чипа является концентрация мишеней, которая приводит к половинной гибридизации, c_{50}^t [86, 92]. Сдвиг концентрации c_{50}^t по сравнению со случаем без лигандов δc_{50}^t :

$$\delta c_{50}^t = \frac{e^{a\Gamma/2}}{K_t} \left[\left(\frac{c_l K_l}{c_l K_l + 1} \right)^N - 1 \right], \quad (2.26)$$

где $\Gamma = 8\pi N\sigma_0 l_B \frac{r_D^2}{H}$. Таким образом, сдвиг концентраций для половинной гибридизации δc_{50}^t зависит от концентрации лигандов l .

Таким образом, интеркалирующие лиганды связанные с гибридизированными зондами pt существенно снижают концентрацию половинная гибридизация, а затем влияют на чувствительность ДНК-чипа в случае неконкурентной гибридизации.

Из системы уравнений (2.22) получаем изотерму гибридизации в случае конкурентной гибридизации на поверхности:

$$\begin{aligned} \frac{x}{1-x-y} &= c_t \widetilde{K}_t \exp\left(-\frac{N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right), \\ \frac{y}{1-x-y} &= c_m \widetilde{K}_m \exp\left(-\frac{N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right), \end{aligned} \quad (2.27)$$

где $\widetilde{K}_t = K_t(1 - r_1^*)^{-N}$ и $\widetilde{K}_m = K_m(1 - r_2^*)^{-M}$ являются перенормированными константами связывания аналогичными результатам, полученным для случай без лигандов [92]:

$$\begin{aligned} K_t &= \exp\left(-\frac{\mu_{pt}^0 - \mu_p^0 - \mu_t^0}{k_B T}\right), \\ K_m &= \exp\left(-\frac{\mu_{pm}^0 - \mu_p^0 - \mu_m^0}{k_B T}\right). \end{aligned} \quad (2.28)$$

Если химический потенциал связанных лигандов μ_B^0 в исходном состоянии один и тот же для дуплексов pt и pm , то равновесная степень спиральности будет $r_1^* = r_2^*$ и получим, что

$$r^* = \frac{c_l K_l}{c_l K_l + 1}, \quad (2.29)$$

где константа связывания лигандов

$$K_l = \exp\left(-\frac{\mu_b^0 - \mu_l^0}{k_B T}\right). \quad (2.30)$$

Таким образом, в случае конкурентной гибридизации на поверхности интеркаляция лигандов значительно увеличивают константы связывания мишеней и несовместимых последовательностей, вследствие чего повышается чувствительность ДНК-чипа.

Что касается избирательности ДНК-сенсора, то ее основной характеристикой является доля несовместимых последовательностей m , гибридизованных на поверхности

$$P_m = \frac{y}{x+y} \quad (2.31)$$

Зависимость P_m от концентрации мишеней в растворе приведена на рис. 2.8.

На рис. 2.8. ясно видно, что электро – нейтральные лиганды-интеркаляторы существенно повышают избирательность ДНК-сенсора, поскольку в присутствие лигандов доля несовместимых гибридизованных оцДНК существенно ниже, чем без лигандов. Таким образом, электро – нейтральные лиганды существенно повышают не только чувствительность, но и избирательность ДНК-сенсора.

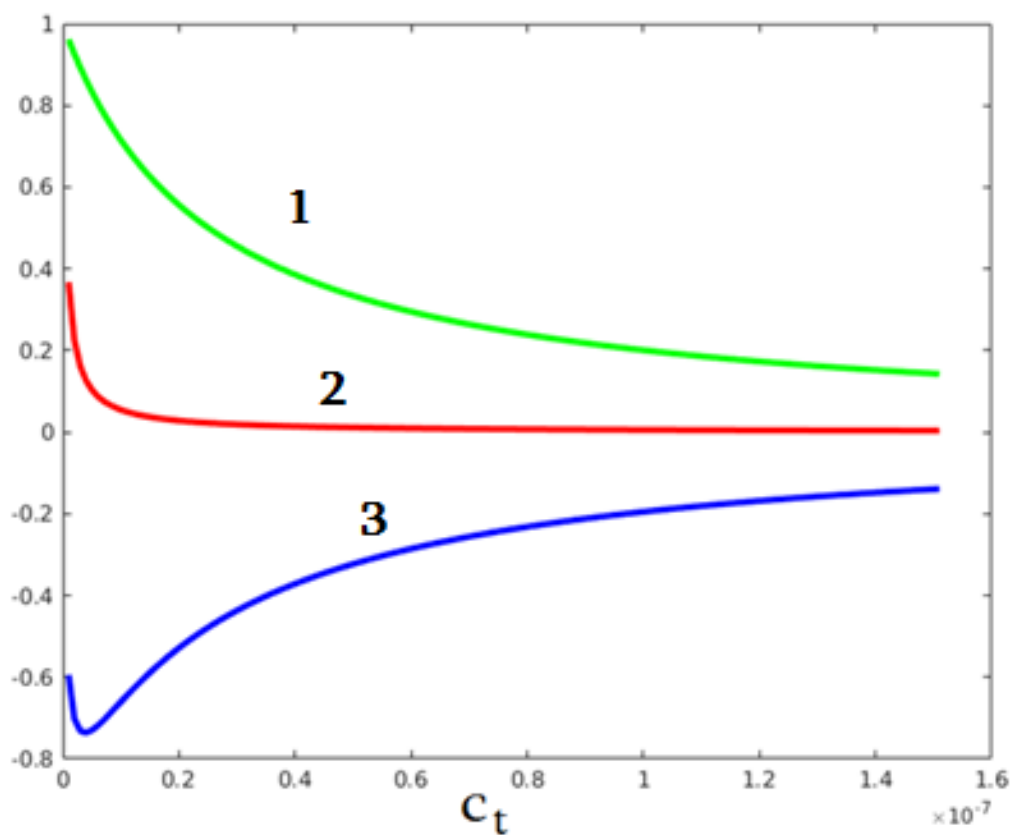


Рис. 2.8. Зависимость P_m от концентрации ДНК-мишеней: кривая (1) – с лигандов, кривая (2) – без лигандов, кривая (3) – сдвиг кривой под действием лигандов.

2.3. Гибридизация на поверхности затвора полевого транзистора и сигнал ДНК-сенсора

Типичная зависимость тока через сток I_D в зависимости от напряжения на затворе представлена на Рис. 2.9. Для ДНК-сенсора на базе полевого транзистора, гибридизация происходит на поверхности затвора, когда в образце (в растворе) содержатся молекулы ДНК, комплементарные зондам сенсора. Поскольку молекулы ДНК в водном растворе заряжены отрицательно, то гибридизация приводит к изменению электрических характеристик полевого транзистора, таким как сдвиг порогового напряжения V_T , или напряжения плоских зон, V_{FB} , или зависимости V_G-I_D (см. Рис. 2.9).

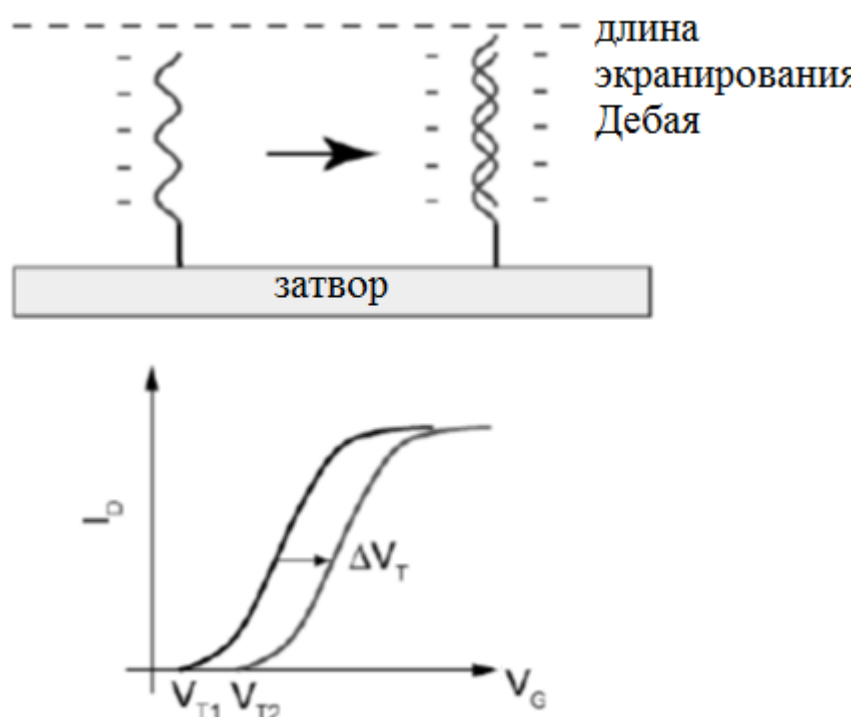


Рис. 2.9. Схематическое изображение эффекта гибридизации ДНК на поверхности электрода затвора и сдвиг зависимости $I_D(V_G)$ вызванный изменением порогового напряжения V_T за счет гибридизации ДНК.

Так, например, при гибридизации, характеристика V_G-I_D ДНК-сенсора на базе полевого транзистора сдвигается в положительном направлении вдоль оси напряжения затвора V_G .

Как известно, пороговое напряжение V_T – это напряжение, необходимое для генерации проводящего канала. При $V > V_T$ увеличивается накопленный заряд, что приводит к повышению проводимости канала и усилению тока стока (I_D). Т.о., напряжение на затворе модулирует проводимость канала таким образом, что полевое устройство может переключаться из состояния ВЫКЛ ($V_G < V_T$) в состояние ВКЛ ($V_G > V_T$). В зависимости от напряжения на стоке, можно выделить два режима работы: линейный и режим насыщения.

Линейный режим наблюдается при $V_D < (V_G - V_T)$, и ток I_D описывается выражением:

$$I_D = \mu C_i \frac{W}{L} \left[(V_G - V_T) V_D - \frac{V_D^2}{2} \right] \quad (2.32)$$

где W и L – это ширина и длина канала, соответственно; C_i – электроемкость изолятора и μ - подвижность носителя заряда. При $V_D > (V_G - V_T)$, имеет место насыщение I_D и ток стока перестает зависеть от V_D , и зависит только от V_G :

$$I_D = \mu C_i \frac{W}{2L} [(V_G - V_T)^2]. \quad (2.33)$$

Одним из наиболее важных параметров ISFETs является пороговое напряжение V_T . Его значение определяется: зарядом оксида (Q_{ox}), разницей работы выхода электронов из полупроводника и раствора (ϕ_{sc}), потенциалом электрода сравнения (E_{ref}), дипольным потенциалом поверхности раствора (χ_{sol}) и потенциалом на границе раздела электролит-изолятор (ψ_0), который зависит от концентрации ионов в растворе как [103]:

$$V_T = E_{ref} + \chi_{sol} - \psi_0 - \phi_{sc} - \frac{Q_{ox}}{C_i}. \quad (2.34)$$

Таким образом, потенциал на границе раздела электролит-изолятор (ψ_0) является ключевым параметром, определяющим чувствительность ДНК-сенсора.

Если Q – заряд на затворе, то с учетом электроотрицательности заряда ДНК, иммобилизованной на поверхности затвора, потенциал ψ_0 зависит от заряда на поверхности раздела электролит-изолятор как

$$\psi_0 \approx \frac{Q}{c_{dl}} = - \frac{\sigma}{c_{dl}}, \quad (2.35)$$

где c_{dl} - удельная емкость двойного слоя. Рассматривая $\gamma_{el} = \frac{\sigma^2}{2c_{dl}}$ как поверхностную плотность энергии конденсатора и используя выражение (2.16) легко показать, что

$$c_{dl} = \frac{h}{8\pi k_B T l_{ED}^2}. \quad (2.36)$$

Таким образом, из выражений (2.31)-(2.33) следует, что пороговое напряжение V_T линейно зависит от плотности заряда на поверхности затвора как

$$V_T = V_T^* + \frac{\sigma}{c_{dl}}, \quad (2.37)$$

где $V_T^* = E_{ref} + \chi_{sol} - \phi_S - \frac{Q_{ox}}{c_i}$ мы считаем не зависящей от поверхностной плотности заряда σ .

Обозначим пороговое напряжение для затвора с нулевой степенью гибридизации $x=0$ как

$$V_T^0 = V_T^* + \frac{\sigma_0}{c_{dl}}, \quad (2.38)$$

в то время, как пороговое напряжение для ненулевой степени гибридизации имеет вид

$$V_T = V_T^* + \frac{\sigma_0(1+x)}{c_{dl}} \quad (2.39)$$

Для количественной оценки чувствительности полевого ДНК-сенсора рассмотрим изменение тока стока полевого транзистора в линейной области, происходящее за счет образования гибридов зонд-мишень на поверхности затвора

$$\Delta I_D = I_D - I_D^0 \quad (2.40)$$

С учетом выражения (2.32) изменение тока стока за счет гибридизации имеет вид

$$\Delta I_D = -\mu \frac{c_i}{c_{dl}} \frac{W}{L} \sigma_0 x. \quad (2.41)$$

Отношение изменения тока ΔI_D к степени гибридизации (x) следует рассматривать в качестве критерия чувствительности ДНК-сенсора.

С другой стороны, целью работы ДНК-сенсора является именно определение концентрации ДНК-мишеней c_t в растворе. Таким образом, в качестве наблюдаемой величины можно рассматривать не степень гибридизации, а концентрацию c_t . В этом случае, концентрацию мишеней можно выразить через степень гибридизации, используя выражения (2.12), (2.13).

Глава 3.

Стабильность нуклеиновых кислот и ориентационный порядок

Показано, что плотно упакованные дцДНК демонстрируют переход из изотропной в ориентационно – упорядоченную фазу. В свою очередь, ориентационный порядок стабилизирует двойную спираль ДНК, что вносит положительный вклад в стабильность дцДНК при достаточно плотном заполнении поверхности ДНК- сенсора.

Стабильность дцДНК существенным образом влияет на гибридизацию ДНК на поверхности. В то же время, пространственная организация ДНК на поверхности влияет на стабильность гибридов зонд - мишень, особенно при высокой плотности покрытия поверхности ДНК — зондами. В данной Главе мы рассматриваем эффект ориентационного порядка жесткоцепных гибридов зонд — мишень на их стабильность. С нашей точки зрения он особенно важен при высокой степени гибридизации.

Связь между ориентационным порядком и стабильностью дцДНК крайне сложно исследовать на поверхности. При этом, естественно ожидать, что влияние ориентационного порядка не должно зависеть от того, каким именно образом произведена плотная упаковка молекул дцДНК. Для исследования плотной упаковки дцДНК существует множество методов, использующих, в частности, синтетические агенты, связывающиеся с последовательностью, такие как триплет-образующие олигонуклеотиды [104], белки цинкового пальца [105] и синтетические полиамиды [106]. Кроме того, используются неспецифические ДНК-связывающие агенты, такие как дендримеры [107] и полиамины [108]. Все эти агенты способствуют конденсации ДНК [107,109].

Наиболее типичными методами конденсации ДНК являются либо осмотический стресс, создаваемый нейтральными полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ) плюс Na^+ , или поливалентные противоионы (лиганды), такие как ионы трехвалентного металла и неорганические катионы,

такие как $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, встречающиеся в природе полиамины и аналоги протаминов и т. д.

Чтобы сделать первый шаг к механизму влияния конденсации и ориентационного порядка на стабильность гибридов зонд - мишень, рассмотрим модельную систему, содержащую короткие дцДНК, смешанные с гибким полимером, как в случае осмотического стресса. Настоящая Глава в основном сосредоточена на связи между ориентационным порядком и стабильностью дцДНК.

Свободная энергия смеси дцДНК - полимер

Рассмотрим смесь жестких стержнеобразных коротких молекул дцДНК и гибкого полимера. Устойчивость двойной спирали ДНК определяется температурой, ионной силой и другими условиями [45,110-112]. Здесь мы предполагаем условия среды, соответствующие области плавления дцДНК, где двойная спираль переходит в неупорядоченное спиральное состояние. Хорошо известно [45], что плавление дцДНК является кооперативным процессом, а переход от спирального состояния к расплавленному происходит в длинных кусках, сравнимых с характерной длиной жесткости дцДНК. Таким образом, разумно рассмотреть модель «застежка-молния» (см., [113]). Это упрощенная модель, когда дцДНК плавится только с одной точки и формировать только один зародыш спирали. Таким образом, не допускается образование петель. Пусть длина дцДНК будет равна n_r . Тогда возможные состояния системы могут быть описаны числом Уотсон-Криковских пар оснований, образующихся между комплементарными оцДНК. Если s - статистический вес пары оснований и σ является статистическим весом зародыша спирали, то статистическая сумма записывается как

$$Z_{\text{zip}}(n_r, s, \sigma) = 1 + \frac{\sigma s^2}{(s-1)^2} \left[s^{n_r} - 1 + n_r \left(\frac{1}{s} - 1 \right) \right], \quad (3.1)$$

где $s = \exp\left(\frac{-\Delta H - T\Delta S}{RT}\right)$, R - универсальная газовая постоянная, ΔH -

энтальпия, ΔS - энтропия образования пары оснований и $\sigma = \exp\left(\frac{-\Delta F}{RT}\right)$, где

ΔF - свободная энергия инициализации двойной спирали ДНК. Свободная

энергия фрагмента дцДНК, состоящего из n_r пар оснований записывается

как

$$F_{zip} = -k_B T \ln Z_{zip}(n_r, s, \sigma). \quad (3.2)$$

Жесткость дцДНК зависит от числа пар оснований в спиральном состоянии, поскольку расплавленные области дцДНК содержат две гибкие цепи.

Степень спиральности определяется как

$$\theta = \frac{\langle n_{bp} \rangle}{n_r} = \frac{\partial \ln Z_{zip}(n_r, s, \sigma)}{\partial \ln s}, \quad (3.3)$$

Где символом $\langle \dots \rangle$ обозначено термодинамическое среднее.

Рассмотрим смесь из N_r молекул дцДНК с мономером линейного размера a , и N_p молекул гибкоцепного полимера, содержащих n_p мономеров того же размера. Свободная энергия системы определяется суммой трех членов

$$F = F_{helix} + F_{mix} + F_{nem}, \quad (3.4)$$

где $F_{helix} = N_r F_{zip}$ - свободная энергия N_r дцДНК в смеси, F_{mix} - свободная энергия смешения дцДНК и гибкоцепного полимера и F_{nem} - свободная энергия нематического упорядочения. В приближении Флори - Хаггина приведенная свободная энергия смешения F_{mix} записывается как

$$\frac{\Delta F_{mix}}{Nk_B T} = \frac{\phi_p}{n_p} \ln \phi_p + \frac{\phi_r}{n_r} \ln \phi_r + \chi \phi_p, \quad (3.5)$$

где V - объем системы, $\phi_p = \frac{a^3 N_p n_p}{V}$ - объемная доля гибкоцепного

полимера, $\phi_r = \frac{a^3 N_r n_r}{V}$ - объемная доля дцДНК, $N = N_p n_p + N_r n_r$ - общее

число полимерных сегментов в смеси, и χ - параметр взаимодействия

Флори -Хаггинса между разными молекулами при изотропном смешении

[114]. Первые два члена в уравнении (3.5) описывают энтропию смешения

полимера и стержнеобразных молекул дцДНК, а третий член – изотропное

взаимодействие между дсДНК и гибкоцепным полимером. Нематическая

свободная энергия F_{nem} оценивается как [115-121]

$$\frac{F_{nem}}{Nk_B T} = \frac{1}{2} (\chi_a + 5/4) \phi_r^2 S^2 - \frac{\phi_r}{n_r} \ln I_0(\Gamma S), \quad (3.6)$$

где χ_a анизотропный параметр притяжения между сегментами дцДНК,

$\Gamma = n_r \phi_r (\chi_a + 5/4)$, $S = \langle P_2(\cos\vartheta) \rangle$ - параметр порядка Майера – Заупе

[122], $P_2(x) = \frac{3}{2}(x^2 - 1/3)$ - полином Лежандра второго порядка и

$I_m(\alpha) = \int_0^1 dx \exp(\alpha P_2(x)) P_2(x)^m$. Нематический порядок жестких

молекул описывается их предпочтительной ориентацией [122]

определяемой углом ϑ между молекулой (дцДНК в данном случае) и

вектором “директор”, характеризующем направление в нематической фазе.

Система предполагается несжимаемой: $\phi_p + \phi_r = 1$.

Нематический порядок и стабильность дцДНК

Нематический порядок жестких спиральных молекул влияет на стабильность спирали, которая может быть учтена в приближении среднего поля в терминах эффективного статистического веса пары оснований [123]

$$\bar{s} = s \int \frac{d\hat{u}}{4\pi} f(\hat{u}), \quad (3.7)$$

где $f(\hat{u}) \propto \exp\left[\frac{\Gamma}{n_r} SP_2(\cos\vartheta)\right]$ - плотность функции распределения по ориентациям дцДНК, \hat{u} - единичный вектор приписанный к молекуле дцДНК и интеграл в (3.7) берется по полному телесному углу. Фактически, ориентационный порядок вводит дополнительное молекулярное поле, равное $-k_B T \Gamma SP_2(\cos\vartheta)$, приложенное к каждой паре оснований в нематической фазе. Таким образом, спиральная часть свободной энергии записывается как

$$\frac{F_{helix}}{Nk_B T} = -\frac{\phi_r}{n_r} \ln Z_{zip}(n_r, \bar{s}, \sigma), \quad (3.8)$$

где статистический вес пары оснований в спиральном состоянии имеет вид

$$(3.9)$$

Связь между стабильностью двойной спирали и нематическим порядком устанавливается с помощью эффективного статистического веса пары оснований (3.7), которая зависит от параметра порядка Майера – Заупе S . Мы предполагаем, что частичное плавление дцДНК не влияет на свободную энергию смешения (3.5), но эффективно уменьшает длину жесткого сегмента дцДНК, содержащего n_r пар оснований, до значения $n_r \theta$, где θ - степень спиральности. Изотропная часть свободной энергии F_{mix} не отвечает за нематический порядок и, следовательно, для устойчивости дцДНК ниже мы рассмотрим только анизотропную часть свободной энергии $f = \frac{F_{nem} + F_{helix}}{Nk_B T}$, которая имеет вид

$$\frac{n_r f}{\phi_r} = \frac{1}{2} \theta \Gamma S^2 - \ln I_0(\theta \Gamma S) - \ln Z_{\text{zip}}(n_r, \bar{s}, \sigma). \quad (3.10)$$

Результаты и обсуждение

На рисунке 3.1 показана анизотропная часть свободной энергии (уравнение (3.10)), построенная в зависимости от параметра порядка S при различных значениях параметра Γ . При более низких значениях $\Gamma < \Gamma^*(= 4,49)$ свободная энергия имеет единственный минимум при $S = 0$, что соответствует изотропной фазе. Когда Γ превышает определенное критическое значение Γ^* появляется другой минимум при положительном значении S , что соответствует метастабильной нематической фазе. Фазовый переход первого рода из изотропной нематической фазы имеет место при $\Gamma = \Gamma^{**}(= 4.55)$, где свободная энергия изотропной фазы становится равной свободной энергии нематической фазы. Ниже мы рассмотрим поведение системы для больших значений $\Gamma > \Gamma^{**}$. Анизотропная свободная энергия f в области плавления дцДНК зависит от статистического веса спирали \bar{s} . Минимизация анизотропной свободной энергии (3.10) по параметру Майера – Заупе S дает зависимость параметра нематического порядка S от статистического веса \bar{s} , представленную на рис. 3.2.

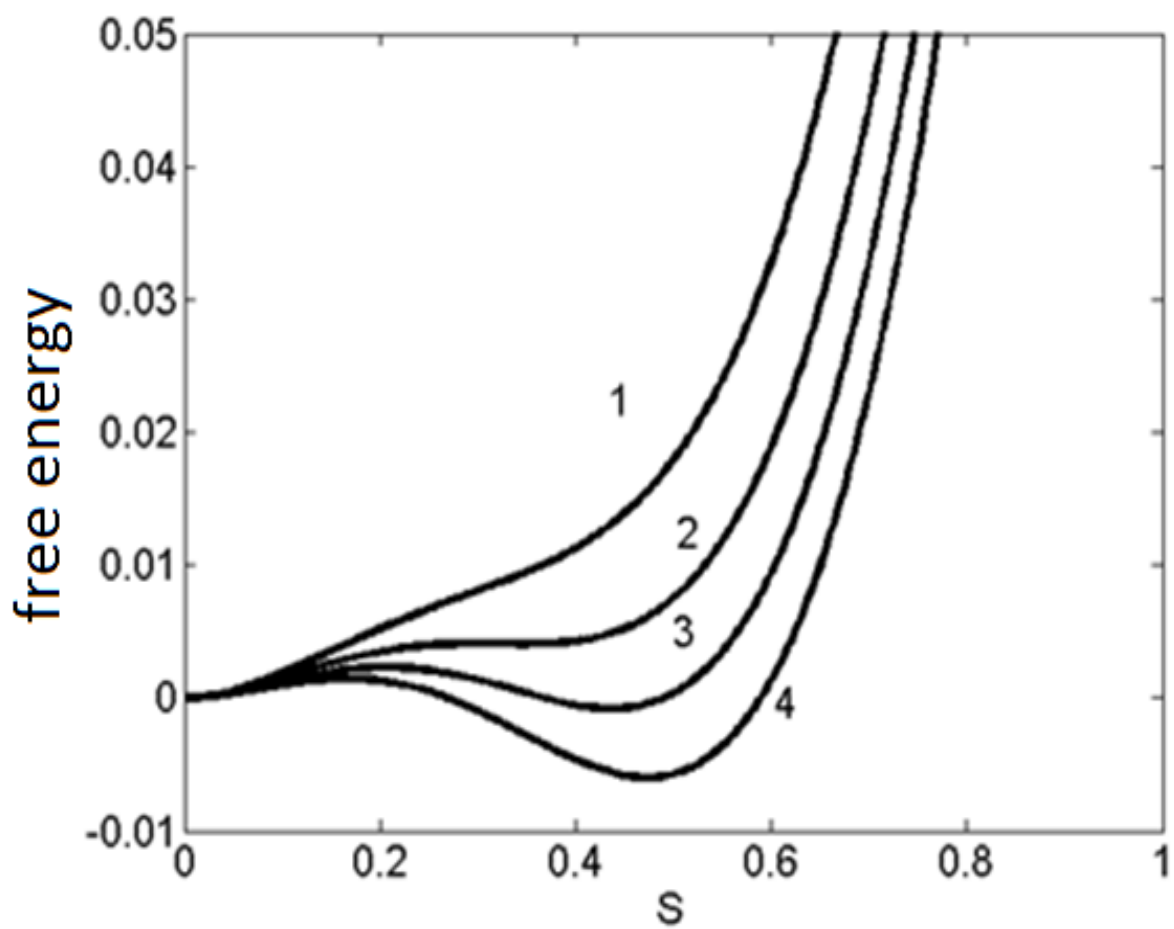


Рис. 3.1. Анизотропная часть свободной энергии в зависимости от параметра Майера - Заупе S . Кривые: (1) $\Gamma < \Gamma^*$, (2) $\Gamma = \Gamma^*$, (3) $\Gamma = \Gamma^{**}$, (4) $\Gamma > \Gamma^{**}$.

На рис. 3.2 показан фазовый переход первого порядка при определенном значении параметра $s = s^*$, сопровождаемого резким изменением параметра Майера - Заупе S . Таким образом, степень спиральности и нематический порядок молекул дцДНК в смеси с гибким полимером являются взаимозависимыми. Нематический порядок стабилизирует структуру двойной спирали ДНК, в то время как жесткая структура дцДНК способствует нематическому упорядочению.

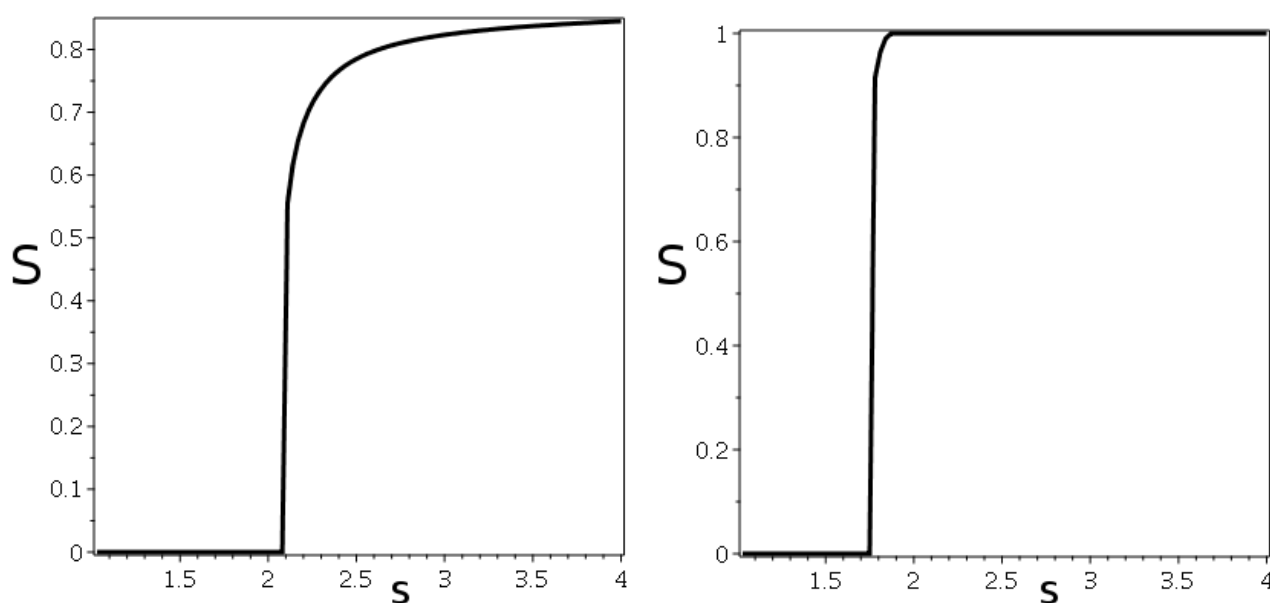


Рис. 3.2. Зависимость параметра Майера - Заупе S от статистического веса s при $\Gamma = 4.56$ слева и при $\Gamma = 7.6$ справа.

Жидко-кристаллический порядок фрагментов дцДНК в конденсированном состоянии – довольно распространенное явление, исследованное ранее в множестве работ [124-142]. На Рис. 3.3 показана зависимость степени спиральности θ от статистического веса s . Увеличение параметра Γ приводит к смещению степени спиральности к высокотемпературной области, что соответствует стабилизации двойной спирали. Конденсированное состояние дцДНК предполагает притяжение между жесткими фрагментами дцДНК. В то же время значение параметра Γ может быть увеличено за счет увеличения притяжения (χ_a) между молекулами дцДНК. Таким образом, плотная упаковка при высокой плотности покрытия поверхности сенсора молекулами дцДНК влияет на стабильность двойной спирали через нематический порядок. Таким образом, при высокой поверхностной плотности покрытия сенсора ДНК – зондами возникает дополнительный механизм стабилизации гибрида зонд – мишень за счет ориентационного порядка жесткоцепной дцДНК на поверхности сенсора. Такая дополнительная стабилизация повышает чувствительность сенсора.

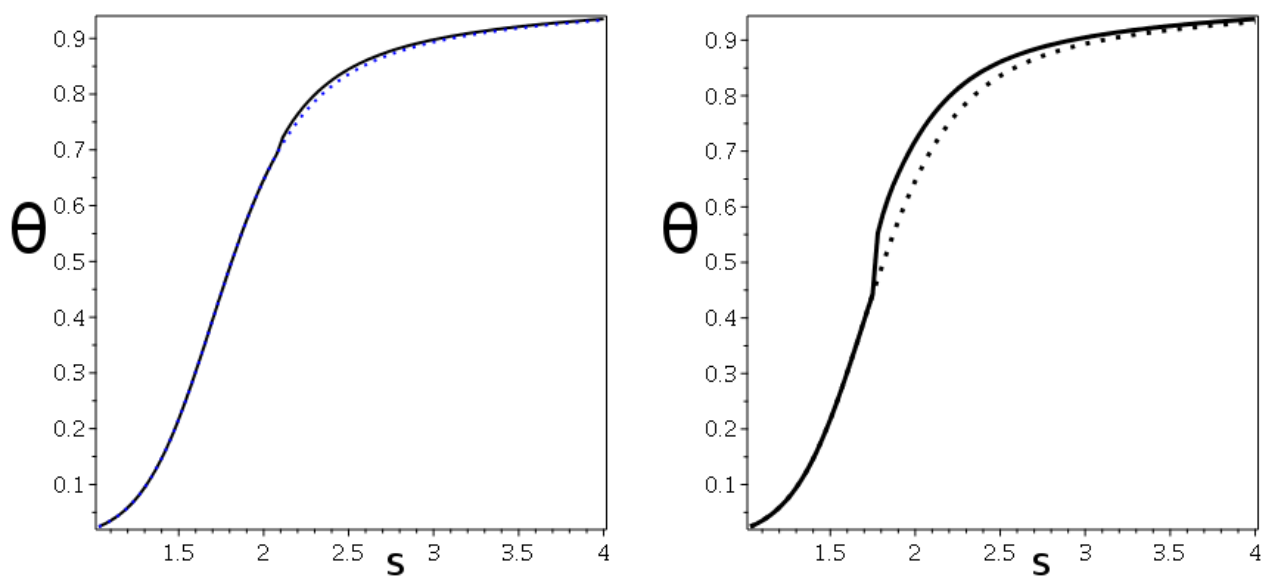


Рис. 3.3. Зависимость степени спиральности θ от статистического веса s при $\Gamma = 4.56$ слева и при $\Gamma = 7.6$ справа. Пунктиром показано поведение степени спиральности без учета эффектов ориентационного порядка. Сплошной линией показана степень спиральности с учетом нематического порядка.

Глава 4.

Эффект заряженных лигандов и функционирование ДНК сенсоров на базе полевых устройств

В данной главе проанализированы факторы, влияющие как на термодинамику гибридизации, так и на стабильность дуплексов ДНК–ДНК. В данной главе исследованы случаи неконкурентной гибридизации ДНК при наличии в растворе моно- и бивалентных положительно заряженных лигандов и проведено сопоставление со случаем незаряженных лигандов. Показано, что заряженные лиганды усиливают степень гибридизации ДНК-чипов по сравнению с незаряженными, но при этом, подавляют сигнал сенсора.

ДНК-чипы являются одним из перспективных инструментов с большим разнообразием областей применения, таких как медицинская диагностика, мониторинг загрязнителей окружающей среды, защиты от биологического оружия и т. д. Одним из важных направлений разработки ДНК-чипов является повышение их чувствительности за счет усиления электрического сигнала и стабильности целевого зонда гибридизации. Эффективность таких устройств, как ДНК-датчики и ДНК-чипы зависит от точности предсказания экспериментальных параметров, отвечающих за термостабильность дуплексов нуклеиновых кислот и время формирования дуплексов ДНК. Некоторые из факторов влияют на термодинамику гибридизации, в частности, на поверхностную плотность одноцепочечных ДНК (длина 25–49 нуклеотидов), иммобилизованных на поверхности, и наличие конкурирующей гибридизации. Стабильность дуплексов ДНК–ДНК и ДНК–РНК определяется двумя ключевыми факторами: последовательностью и внешними факторами (такими, как рН, ионная сила, концентрация низкомолекулярных соединений (лигандов), наличие межфазных границ, геометрических ограничений и т. д.). Лучшее понимание физико-химических процессов, лежащих в основе гибридизации

ДНК и РНК на поверхности электрического преобразователя имеет важное значение для улучшения эффективности ДНК-чипов и их изготовления.

Одним из основных требований, предъявляемых к ДНК-сенсорам является высокая чувствительность, которая, в свою очередь, требует максимальной эффективности гибридизации на границе раздела твердой и жидкой фаз. Гибридизация нуклеиновых кислот в значительной степени зависит от температуры, концентрации солей, вязкости, GC-состава и других физико-химических характеристик.

Повышение чувствительности ДНК-датчиков может быть достигнуто с помощью электрохимически активных соединений с более высоким сродством к двухцепочечной ДНК, чем к одноцепочечной. Этот вид соединений может существенно повысить стабильность двухцепочечных участков и в то же время амплитуду генерируемого сигнала, что, в свою очередь, повысит чувствительность ДНК-датчика. Такими лигандами являются, например, интеркаляторы, молекулы с плоской гетероциклической структурой, которые помещаются между азотистыми основаниями и меняют локальную структуру двухцепочечной ДНК. При этом, многие из этих лигандов являются положительно заряженными. Эффект именно таких лигандов и рассматривается в этой главе.

Термодинамика и кинетика гибридизации как в объеме так и на поверхности была тщательно изучена в последние годы. Спектр рассматриваемых проблем включает в себя, например, кинетику гибридизации на поверхности, влияние солей на гибридизацию ДНК в объеме, изотермы гибридизации на поверхности и т. д. В то же время взаимодействия ДНК–лиганд также были рассмотрены в большом количестве работ, посвященных интеркаляции и связыванию лигандов в малой бороздке, их кросс-докингу и т.д. Однако, насколько нам известно, влияние взаимодействия ДНК–лиганд на термодинамику и кинетику гибридизации никогда не было рассмотрено ранее. В контексте развития ДНК-биосенсоров, теоретический анализ влияния

интеркаляции лигандов на гибридизацию ДНК на поверхности становится необходимым.

Данная глава посвящена изучению изотермы гибридизации ДНК на поверхности в присутствии положительно заряженных лигандов, которые связываются с нативными участками ДНК. Хотя при практическом использовании ДНК-чипы погружаются в целевой раствор на относительно короткий промежуток, где кинетика гибридизации играет важную роль. Понимание равновесных свойств также необходимо для сравнительной оценки важности кинетических и термодинамических факторов для производительности ДНК-чипов.

4.1. Неконкурентная гибридизация при наличии лигандов

Свободная энергия

Получим равновесную изотерму гибридизации для идеализированной, но экспериментально доступной ситуации, когда ДНК-чип погружаем в раствор, содержащий интеркалирующие лиганды и только один тип одноцепочечной мишени (рис. 4.1). При этом, лиганды являются носителями положительного заряда $+ze$. Заряд зонда и комплементарной ему мишени является отрицательным и равен $-eN$. Соответственно, при гибридизации зонда и мишени заряд их комплекса становится равным $-2eN$.

Аналогично тому, как это было сделано для незаряженных лигандов, рассмотрим совокупность N_0 однопитевых пробных молекул ДНК p , где N_{pt} из них гибридизованы с мишенью t . Гибридизация p и t создает на поверхности двухцепочечный олигонуклеотид pt . В простейшем случае для одного вида мишени, состоящей из одноцепочечной ДНК, поверхность будет покрыта только свободными зондами p и гибридизированными олигонуклеотидами pt . В этом случае реакции конкурентной гибридизации, описанной в Гл. 2 отсутствуют. Зависимость степени гибридизации $x = N_{pt}/N_0$ от концентрации мишеней c_t описывается с помощью изотермы гибридизации. Реакции связывания будут иметь следующий вид аналогичный (2.1) и (2.2), с той разницей, что комплекс pt_n , образующийся в результате реакций (2.1), (2.2) будет носителем заряда $-2eN+zen$.

Плотность электростатической свободной энергии слоя $Y_{el.}$ с зондами была оценена в Гл. 2 в приближении двухкомпонентного ящика. С учетом заряда лигандов плотность электростатической свободной энергии $Y_{el.}$ будет определяться тем же выражением (2.16), но с плотностью заряда σ вида

$$\sigma = \frac{NN_0 + NN_{pt} - zN_b}{A}, \quad (4.1)$$

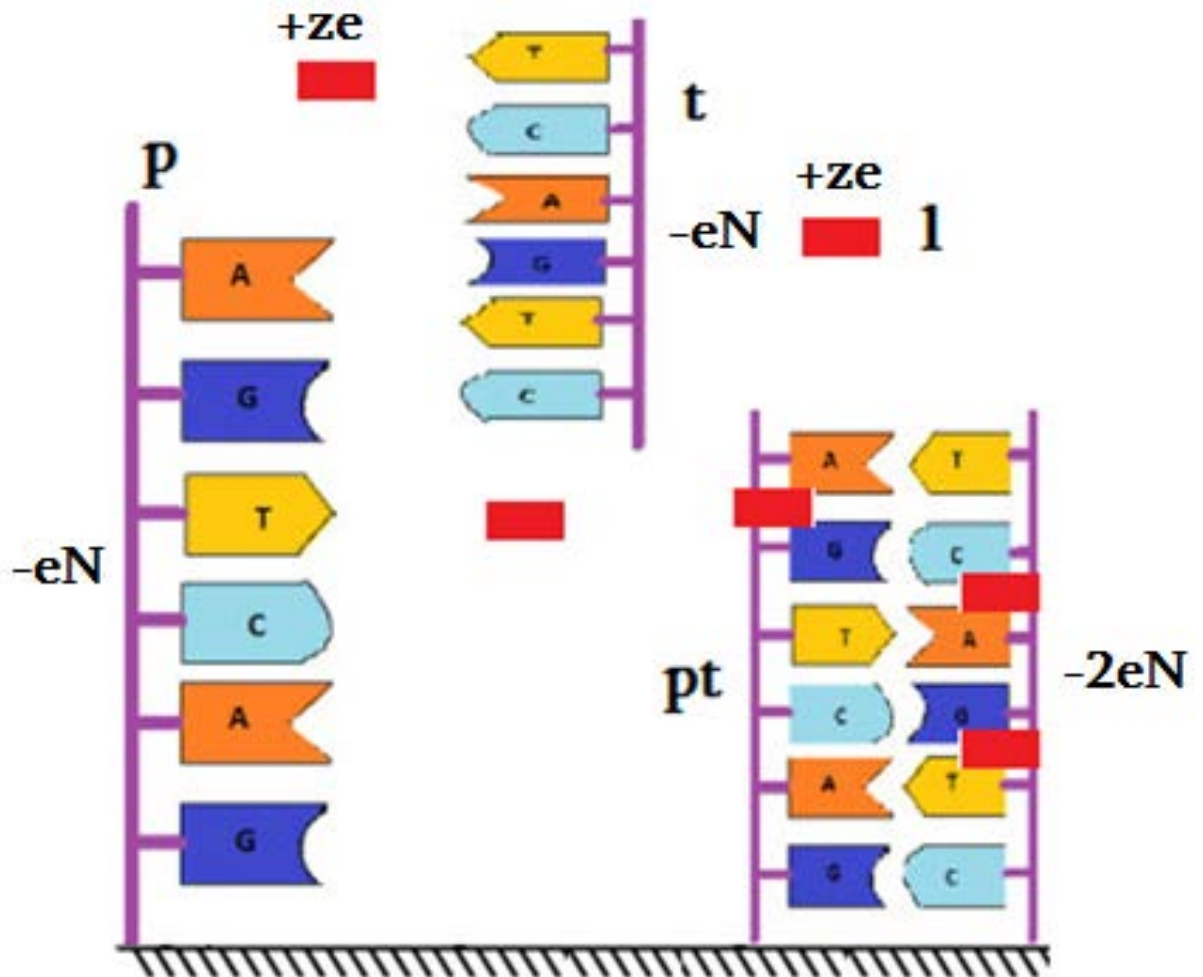


Рис. 4.1. Схема неконкурентной гибридизации на поверхности в присутствии заряженных лигандов валентности z .

где A – это площадь поверхности сенсора и z – это валентность положительно заряженного лиганда.

В отсутствие лигандов свободная энергия слоя с зондами (G) определяется выражением (2.3). Если подобно случаю, рассмотренному в Гл. 2, интеркаляция является единственным механизмом связывания лигандов, то свободная энергия слоя с зондами (G_L) определяется выражением (2.4).

Изотермы адсорбции и гибридизации

Состояние равновесия для реакций (2.1) и (2.2) по-прежнему определяется условиями (2.6) и (2.7).

Как было отмечено в Гл. 2 (см. выражения (2.31-33)), пороговое напряжение ДНК- сенсора на базе полевого транзистора линейно зависит от поверхностной плотности заряда σ на затворе транзистора (см. рис. 4.2. и выражение (4.1)). С учетом зависимости поверхностной плотности электростатической свободной энергии (2.16) от числа гибридизованных проб, N_{pt} и общего числа связанных лигандов N_b , определяемой выражением (4.1) обменный химический потенциал гибридизованного зонда ($\Delta\mu_{pt} = \mu_p - \mu_t$) снова записывается в виде (2.8), в то время как химический потенциал связанных лигандов

$$\mu_b = \frac{\partial G_L}{\partial N_b} = \mu_b^0 + N_0 \Sigma \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial N_b} + k_B T \ln \frac{r}{1-r} \quad (4.2)$$

Химические потенциалы мишеней (μ_t) и лигандов (μ_l) определяются выражениями (2.10) и (2.11), соответственно, что соответствует приближению слабых растворов. потенциал свободных лигандов в растворе. Учитывая уравнения (2.6), (2.7), (4.1), (4.2), получим изотерму гибридизации

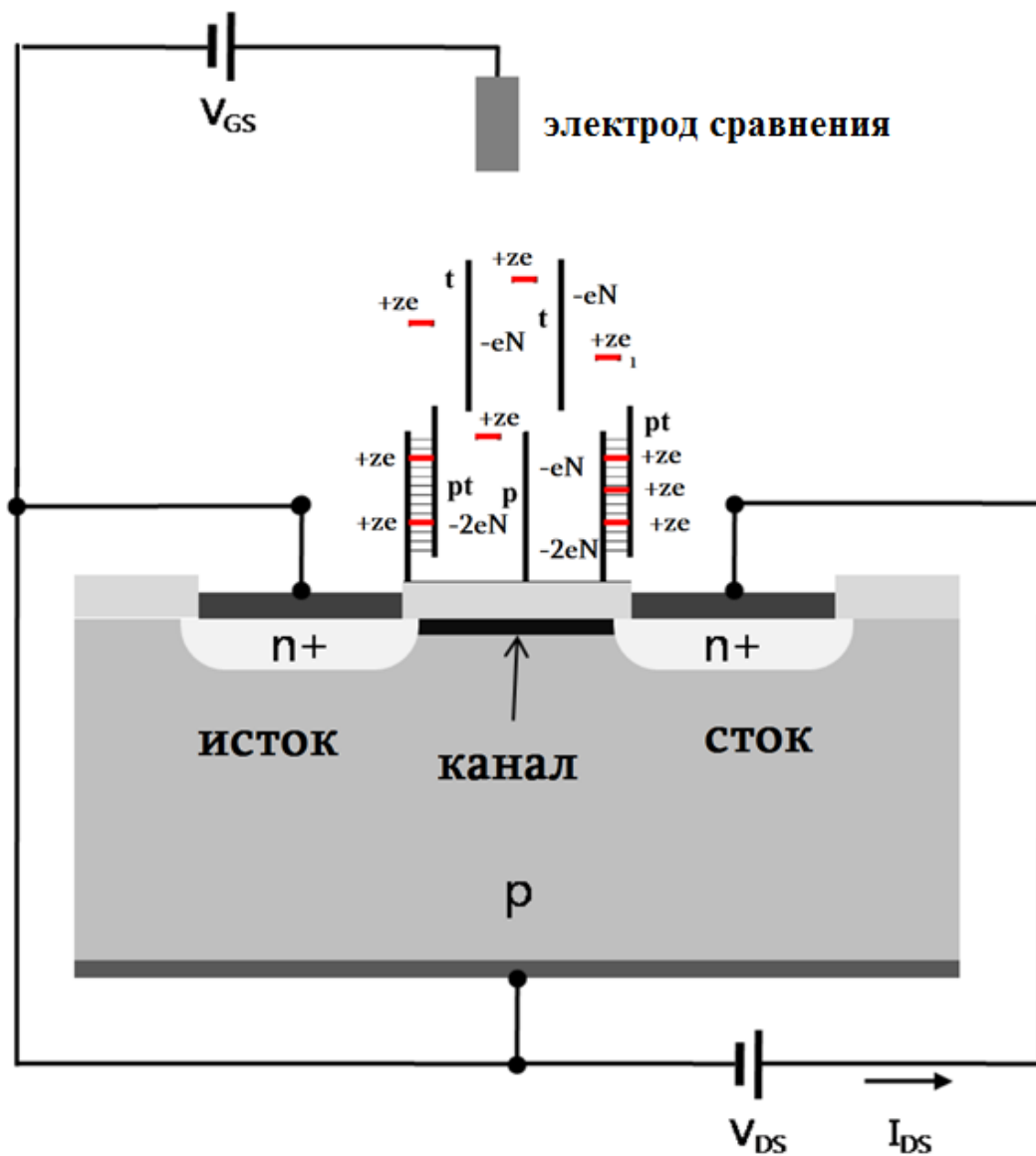


Рис. 4.2. Гибридизация и плотность заряда, локализованного на поверхности затвора полевого ДНК-сенсора.

$$\frac{x(1-r)^N}{c_l(1-x)} = K_l \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial N_{pl}}\right), \quad (4.3)$$

где $K_l = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{k_B T}\right)$ и $\Delta G^0 = \mu_{pl}^0 - \mu_p^0 - \mu_l^0$. Равновесное распределение лигандов l между связанными и свободными состояниями будет описываться изотермой адсорбции

$$\frac{r}{c_l(1-r)} = K_l \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial N_b}\right), \quad (4.4)$$

где $K_l = \exp\left(-\frac{\Delta g^0}{k_B T}\right)$ и $\Delta g^0 = \mu_b^0 - \mu_l^0$. Система уравнений (4.3), (4.4) преобразуется

как

$$\begin{aligned} \frac{x(1-r)^N}{1-x} &= c_l K_l \exp[-\Gamma(1+x-zrx)] \\ \frac{r}{1-r} &= c_l K_l \exp\left[\frac{\Gamma}{N}(1+x-zrx)\right], \end{aligned} \quad (4.5)$$

где $\Gamma = 8\pi N \sigma_0 l_B \frac{r_D^2}{H}$ и $\sigma_0 = \frac{NN_0}{A}$.

Результаты

Изотермы адсорбции и гибридизации при наличии моновалентных лигандов

Численное решение системы уравнений (4.5) для моновалентных лигандов, $z=1$ дает изотермы гибридизации и адсорбции, приведенные на рис. 4.3. Изотермы гибридизации для незаряженных лигандов были получены в Гл. 2, где было показано, что изотерма гибридизации для незаряженных лигандов имеет вид

$$\frac{x}{1-x} = c_t \tilde{K}_t e^{-\Gamma(1+x)}, \quad (4.6)$$

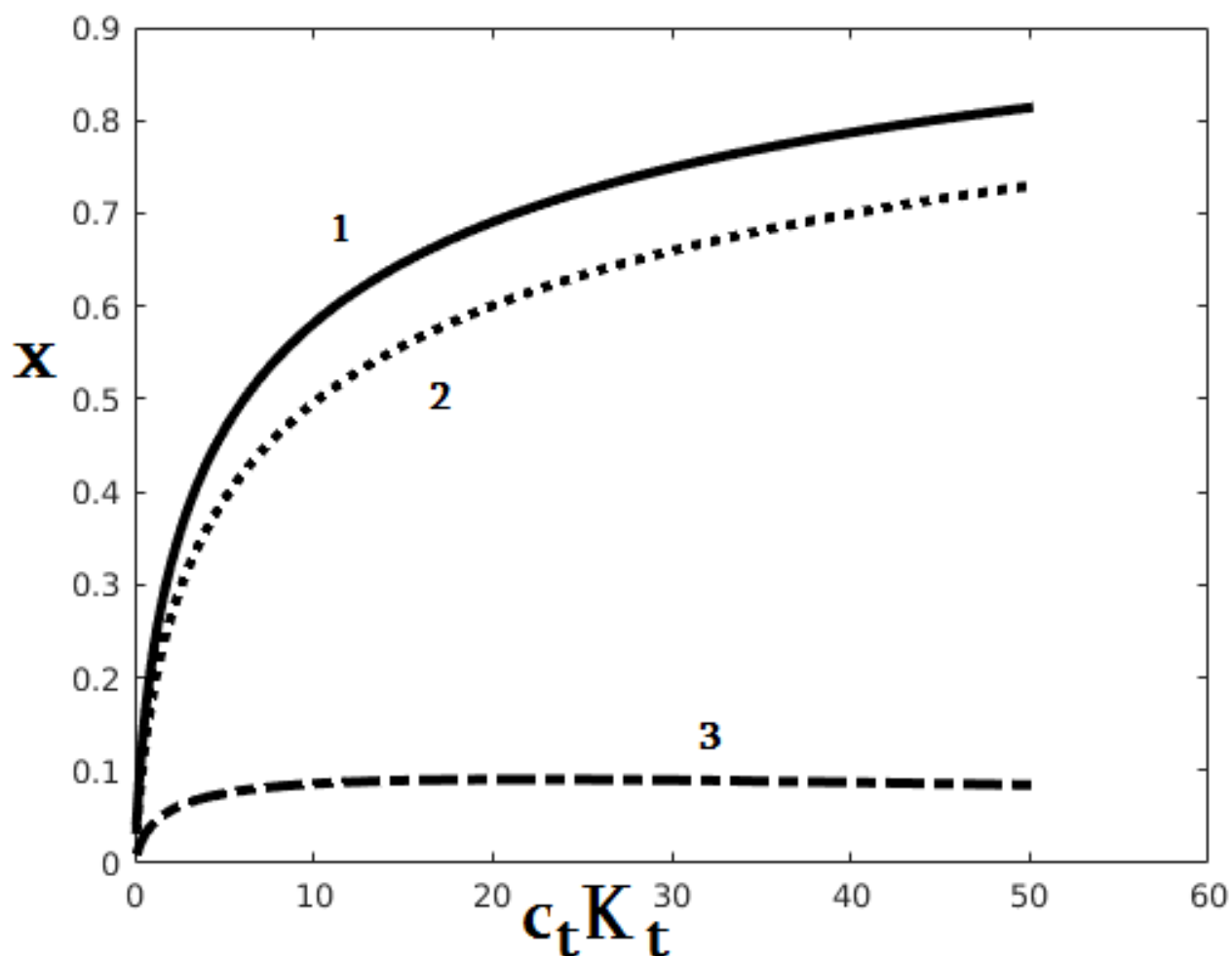


Рис. 4.3. Изотермы гибридизации (степень гибридизации x в зависимости от $c_t K_t$) для моновалентного положительного заряженного лиганда (1), для незаряженных лигандов (2), сдвиг изотермы гибридизации от случая незаряженного лиганда к заряженному (3). Кривые получены для следующих значений параметров: $l_B \approx 7 \text{ \AA}$, $r_B \approx 3 \text{ \AA}$, $N = 16$, $K_t = 10^{7.5} \text{ M}^{-1}$, $\Gamma \approx 2.57$.

где $\tilde{K}_l = K_l e^{-N \ln(1-r^*)}$ и $r^* = \frac{c_l K_l}{c_l K_l + 1}$ – равновесная степень адсорбции. Изотерма гибридизации для незаряженных лигандов также приведена на Рис. 4.3, откуда видно, что степень адсорбции заряженных лигандов слабо зависит от концентрации ДНК-мишеней в растворе. В то же время наличие заряда заметно усиливает гибридизацию мишень – зонд на поверхности сенсора при малых концентрациях мишеней. Эффект, возможно, обусловлен частичной нейтрализацией заряда поверхностного слоя.

Изотермы адсорбции и гибридизации при наличии бивалентных лигандов

Гибридизация зонд – мишень на поверхности ДНК-сенсора при наличии бивалентных лигандов описывается системой уравнений (4.5), соответствующей $z=2$. Степень заполнения определяется уравнением

$$r(1-r) = c_l K_l (c_l K_l)^{\frac{2}{N}} \left(\frac{1}{x} - 1 \right)^{\frac{2}{N}}. \quad (4.7)$$

Таким образом, решение для степени заполнения $r = r(x)$ в зависимости от степени гибридизации имеет две ветви, $r \geq 1/2$ и $r \leq 1/2$. Из уравнения (4.18) очевидным образом следует, что степень гибридизации удовлетворяет условию

$$\frac{(4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l}{1 + (4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l} \leq x \leq 1. \quad (4.8)$$

Таким образом, при наличии двухвалентных лигандов степень гибридизации не может быть ниже значения $x_{\min} = \frac{(4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l}{1 + (4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l}$. При $z=2$ численное решение системы уравнений (4.14) дает изотермы гибридизации и адсорбции представленные на рис. 4.4 и рис. 4.5. Решение $r \leq 1/2$ реализуется при малых концентрациях лиганда в растворе и представлено на рис. 4.4.

На рис. 4.4. ясно видно, что несмотря на увеличение степени гибридизации по-сравнению с моновалентным случаем (см. рис. 4.3) практически нет увеличения заряда ДНК по-сравнению с негибридизованным случаем, несмотря на высокую степень гибридизации.

Решение $r \geq 1/2$ реализуется при высоких концентрациях лиганда в растворе и представлено на рис. 4.5. На рис. 4.5. видно, что несмотря на увеличение степени гибридизации по-сравнению с моновалентным случаем (см. рис. 4.3) заряда ДНК на поверхности сенсора даже немного по-сравнению с негибридизованным случаем, несмотря на то, что степень гибридизации гибридизации даже выше, чем с случае низких концентраций лиганда.

Как было указано в Гл. 2, поверхностный заряд имеет критически важное значение для порогового напряжения ДНК-сенсора, реализуемого на базе полевого транзистора, а значит, и для его чувствительности. Сопоставим поведение поверхностного заряда сенсора для заряженных и нейтральных лигандов. На рис. 4.6 красным цветом показана изотерма гибридизации с моновалентными лигандами, синим – изотерма гибридизации с нейтральными лигандами, фиолетовым – степень заполнения, желтым - заряд ДНК из расчета на один нуклеотид зонда с заряженными лигандами и зеленым – заряд ДНК с нейтральными лигандами. Видно, что хотя степень гибридизации с заряженными лигандами и выше, чем с нейтральными, заряд с нейтральными лигандами существенно больше по абсолютному значению.

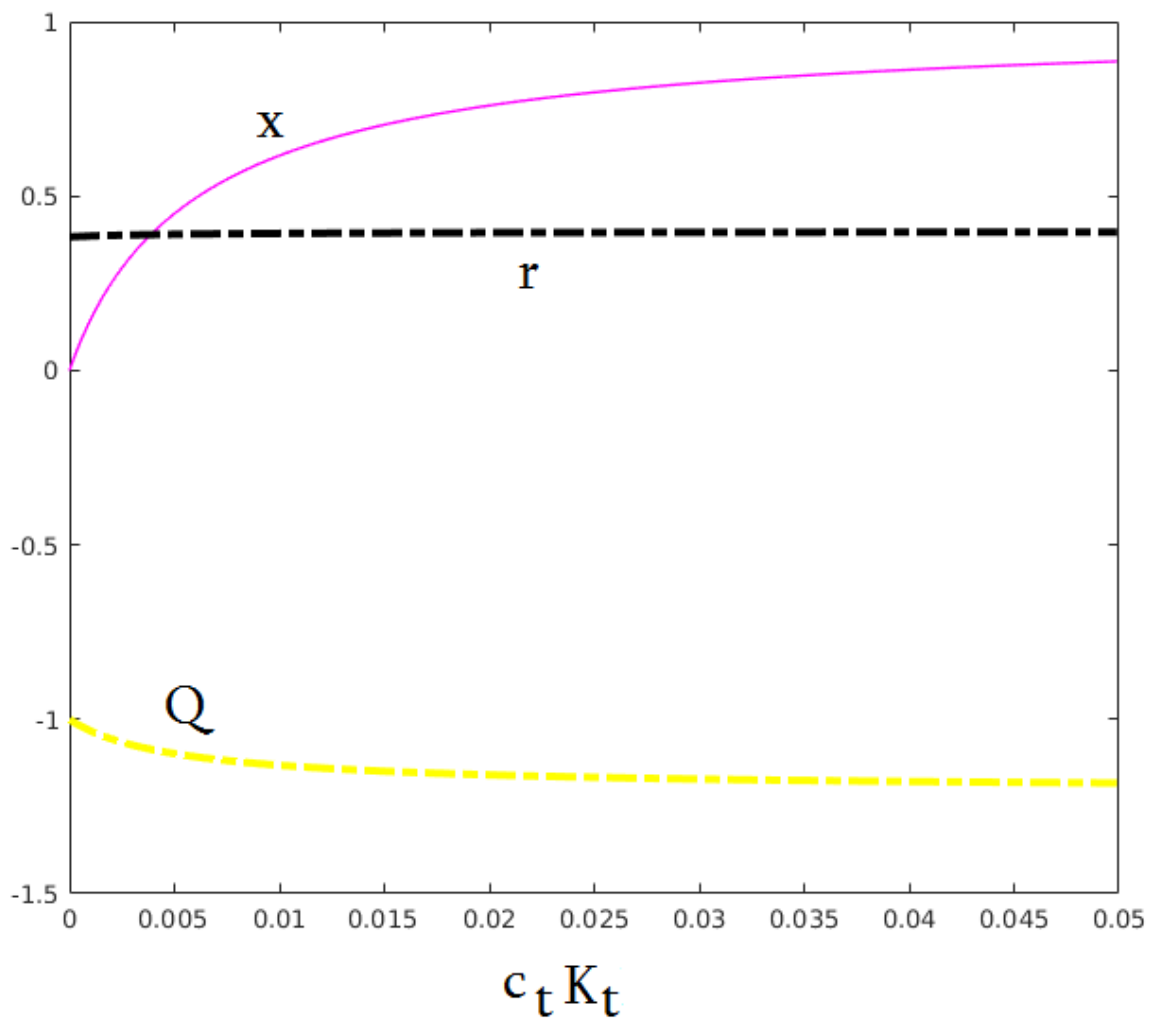


Рис. 4.4. Изотерма гибридизации для бивалентного положительного заряженного лиганда в области малых концентраций лиганда (x); степень заполнения (r) и заряд из расчета на один нуклеотид зонда (Q).

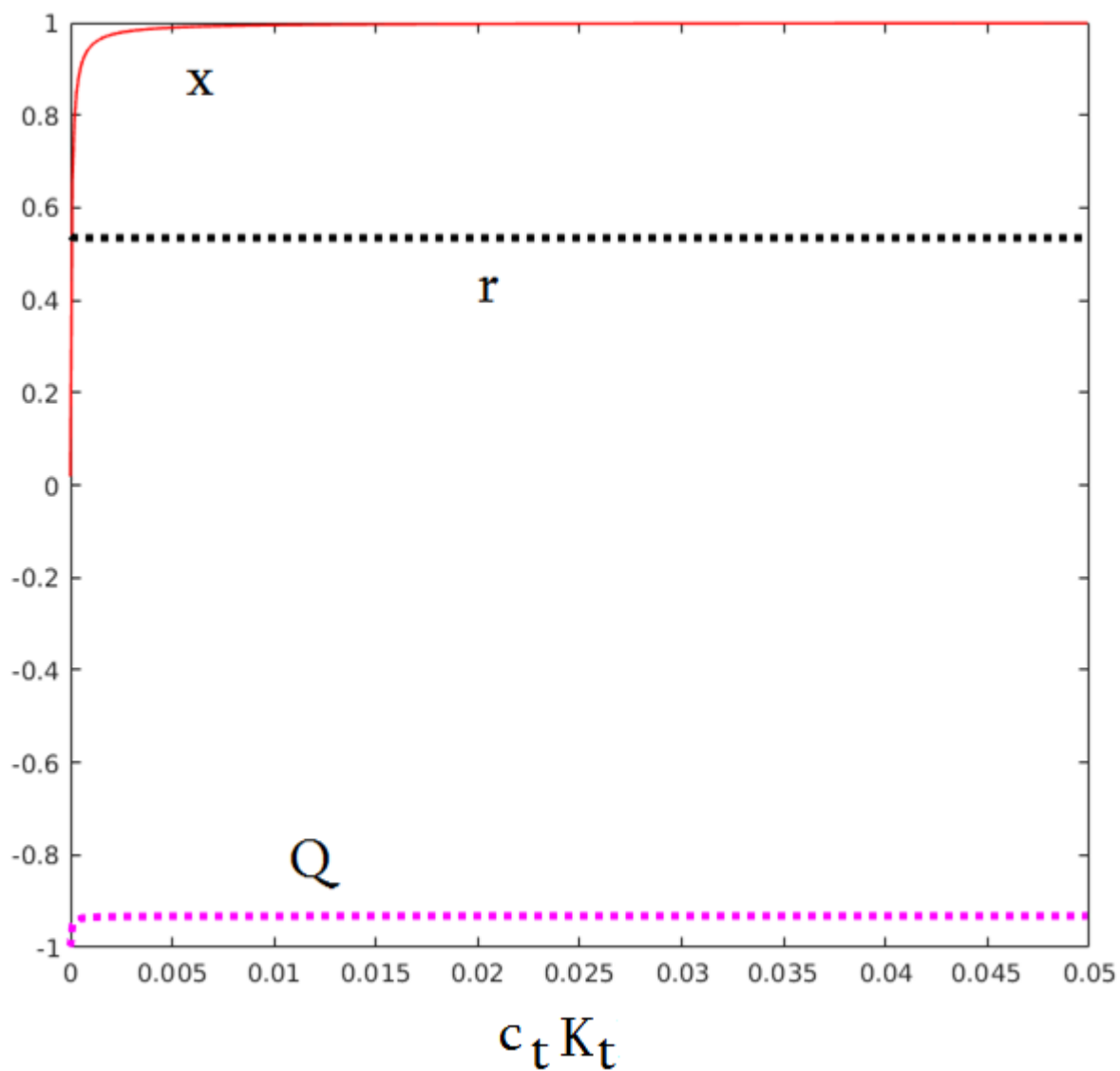


Рис. 4.5. Изотерма гибридизации для бивалентного положительного заряженного лиганда в области высоких концентраций лиганда (x); степень заполнения (r) и заряд из расчета на один нуклеотид зонда (Q).

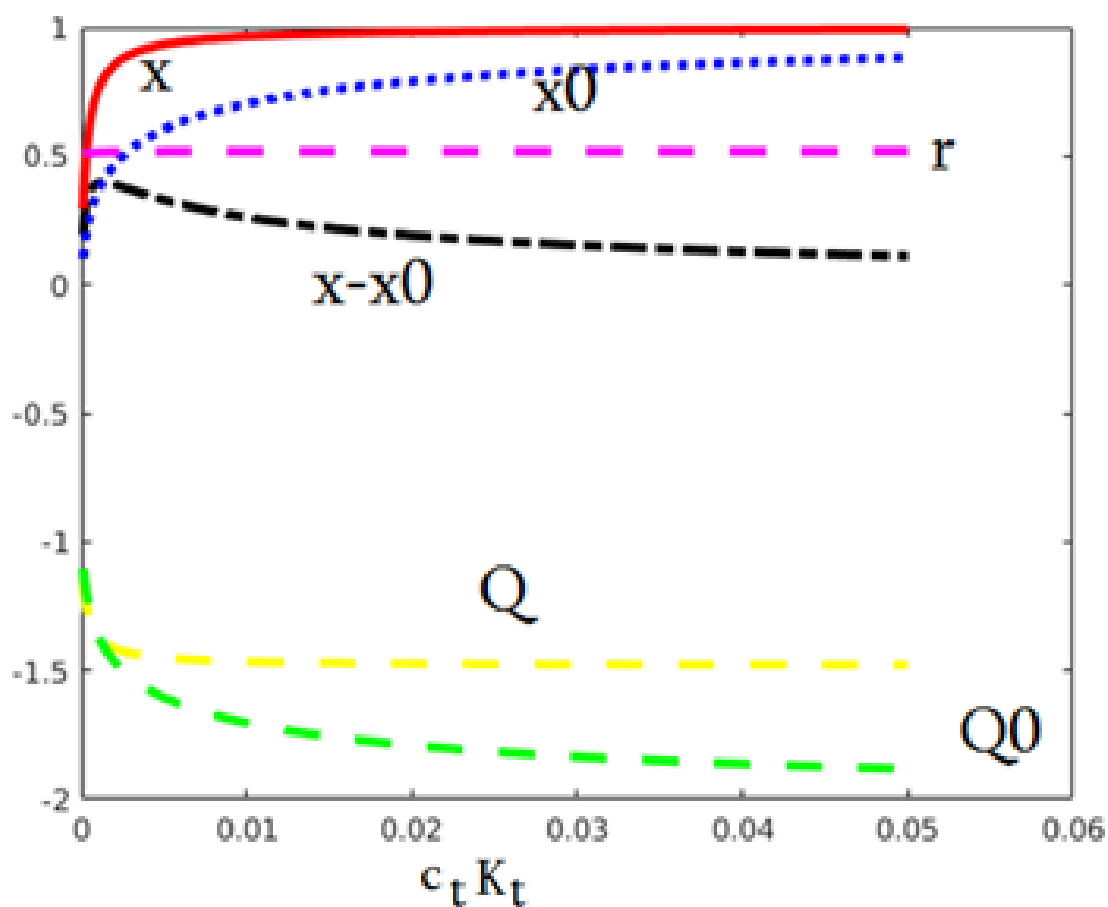


Рис. 4.6. Изотерма гибридизации для моновалентного положительного заряженного лиганда в области высоких концентраций лиганда (x) и для электронейтрального (x_0); степень заполнения для моновалентного (r); заряд из расчета на один нуклеотид зонда (Q) для заряженного моновалентного лиганда и заряд из расчета на один нуклеотид зонда (Q_0) для электронейтрального лиганда.

Заключение

В данной Главе исследованы термодинамические свойства поверхности ДНК-сенсора с полевым эффектом с привитыми к нему ДНК-зондами, взаимодействующие с ДНК-мишенями и лигандами в растворе. Проанализированы некоторые факторы, влияющие на термодинамику гибридизации ДНК на границе раздела твердое тело – раствор. Для случаев неконкурентной гибридизации ДНК на поверхности исследованы такие термодинамические характеристики системы, как, изотермы гибридизации ДНК-мишеней с ДНК-зондами и изотермы адсорбции интеркалирующих лигандов на комплексы зонд–мишень. Проведенный анализ показывает, что связывание с заряженными интеркалирующими лигандами приводит к росту степени гибридизации ДНК-сенсоров, но с эффективным понижению поверхностного заряда на поверхности затвора полевого транзистора. Это, в свою очередь означает понижение чувствительности сенсора за счет изменения порогового напряжения V_T . Общее выражение для порогового напряжения V_T имеет вид (2.37). При наличии заряженных лигандов, поверхностная плотность заряда определяется выражением

$$\frac{Q}{A} = -\sigma_0 (1 + x - zxr), \quad (4.9)$$

где x – степень гибридизации, а r – степень заполнения ДНК лигандами. С учетом последнего выражения пороговое напряжение (2.37) преобразуется как

$$V_T = V_T^* + \frac{\sigma_0(1+x-zxr)}{C_{dl}} \quad (4.10)$$

В Гл. 2 в качестве меры чувствительности полевого ДНК-сенсора было предложено изменение тока стока полевого транзистора в линейной области, происходящее за счет образования гибридов зонд-мишень на поверхности затвора ΔI_D (см. (2.40)).

С учетом выражения (4.10) изменение тока стока за счет гибридизации имеет вид

$$\Delta I_D = -\mu \frac{c_i W}{c_{dl} L} \sigma_0 (x - zxr). \quad (4.11)$$

Отношение изменения тока ΔI_D к степени гибридизации (x) следует рассматривать в качестве критерия (коэффициента) чувствительности ДНК-сенсора. Обозначив его как χ имеем

$$\chi = \frac{\Delta I_D}{x} = -\mu \frac{c_i W}{c_{dl} L} \sigma_0 (1 - zr) \quad (4.12)$$

Выражение (4.12) показывает, что если для моновалентных интеркалирующих лигандов с положительным зарядом коэффициент чувствительности и отличен от нуля, то для бивалентных он заведомо равен нулю при степенях заполнения $r \geq 0.5$.

Таким образом, для бивалентных лигандов значение тока стока полевого транзистора I_D практически не отличается от такового для раствора, не содержащего в растворе ДНК-мишени.

Выводы

1. Связывание частично комплементарных молекул ДНК и зондов на поверхности биосенсора с полевым эффектом понижают долю корректно образованных комплексов зонд-мишень.
2. Интеркалирующие электро - нейтральные лиганды повышают чувствительность и избирательность ДНК – сенсора за счет связывания с нативными участками гибридизованных ДНК на поверхности раздела твердое тело – раствор, увеличивая заряд на поверхности затвора ДНК-сенсора.
3. Моновалентные лиганды понижают полезный сигнал сенсора на базе полевого транзистора при увеличении степени гибридизации мишеней за счет изменения порогового напряжения,
4. Бивалентные лиганды почти полностью подавляют уровень сигнала ДНК-сенсора за счет изменения порогового напряжения, существенно увеличивая при этом степень гибридизации зондов биосенсора.
5. Незаряженные электро-нейтральные лиганды являются оптимальным способом повышения чувствительности и избирательности ДНК – сенсора по-сравнению с другими низкомолекулярными соединениями.

Литература

1. Y. A. Berlin, A. L. Burin, and M. A. Ratner, DNA as molecular wire, *Super Lattices and Microstructures* **25**, 241-252 (2000).
2. E. Braun et al., DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire, *Nature* **391**, 775-778 (1998).
3. E. Braun, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph, In 24th Int. Conf. Physics of Semiconductors, 269 (1998).
4. J. Richter et al., Construction of highly conductive nanowires on a DNA template, *Appl. Phys. Lett.* **78**, 536 (2001).
5. D. Wibowo, DNA molecular wire based nanoelectronics: new insight and high frequency AC electrical characterization, M. S. thesis, Bioeng., SDSU, San Diego, CA (2014).
6. P. Gomes et al., UV degradation of deoxyribonucleic acid, *Polym. Degrad. and Stab* **94**, 2134-2141 (2009).
7. A. Csaki et al., DNA-based construction for nanoelectronics [Online] (2004, June 13-16). Available: http://www.phantomsnet.net/files/abstracts/LITHO2004/LITHO_Oral_CsakiA.pdf.
8. H. W. Fink and C. Schonberger, Electrical conduction through DNA molecules, *Nature* **398**, 407-410 (1999).
9. D. Porath et al., Direct measurement of electrical transport through DNA molecules, *Nature* **403**, 635-638 (2000).
10. P. J. Pablo et al., Absence of DC conductivity in λ -DNA, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 4992 (2000).
11. Seeman, N. C., Nucleic acid junctions and lattices, *J. Theor. Biol.* **99**, 237-247 (1982).
12. Seeman, N. C., DNA in a material world, *Nature* **421** (6921), 427-431 (2003).

13. Seeman, N. C., An Overview of Structural DNA Nanotechnology, *Mol. Biotechnol.* **37** (3), 246-257 (2007).
14. Aldaye, F. A., Palmer, A. L., and Sleiman, H. F., Assembling materials with DNA as the guide, *Science* **321** (5897), 1795-1799 (2008).
15. Gothelf, K. V., and LaBean, DNA-programmed assembly of nanostructures, T. H., *Org. Biomol. Chem.* **3** (22), 4023-4037 (2005).
16. LaBean, T. H., and Li, H., Constructing novel materials with DNA, *Nano Today* **2**, 26-35 (2007).
17. C. A. Mirkin et al., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature* **382**, 607-609 (1996).
18. H. McNally et al., Self-assembly of micro- and nano-scale particles using bio-inspired events, *Appl. Surface Sci.* **214**, 109-119 (2003).
19. W. K. P. Rothemund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature* **440**, 297-302 (2006).
20. J. Chen and N. C. Seeman, Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube, *Nature* **350**, 631-633 (1991).
21. G. M. Warner and J. E. Hutchison, Linear assemblies of nanoparticles electrostatically organized on DNA scaffolds, *Nature Mater.* **2**, 272-277 (2003).
22. W. M. Shih, J. D. Quispe, and G. F. Joyce, "A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron, *Nature* **427**, 618-621 (2004).
23. M. Norton, A. Barhoumi, and D. Neff, Templates for sequential assembly of DNA based nanostructures," In 5th IEEE Conf. Nanotechnology, 77-79 (2005).
24. K. V. Gothelf and T. H. LaBean, DNA programmed assembly of nanostructures, *Organ. and Biomol. Chem.* **3**, 4023-4037 (2005).
25. M. Cook, P. W. K. Rothemund and E. Winfree, Self-assembled circuit patterns, *Data Comput.* **2943**, 91-107 (2004).
26. M. Norton, A. Barhoumi and D. Neff, Toward large nanostructures, *IEEE-NANO* **1.1**, 436 (2003).

27. Z. Kutnjak et al., Electrical conduction in native deoxyribonucleic acid: hole hopping transfer mechanism?, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 1-4 (2003).
28. S. M. Iqbal et al., Direct current electrical characterization of ds-DNA in nanogap junctions, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 1-3 (2005).
29. K. H. Yoo et al., “Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 198102 (2001).
30. H. Zalinge, et al., Variable-temperature measurements of the single-molecule conductance of double-stranded DNA, *Angew. Chem. Int. Edn.* **45**, 5499-5502 (2006).
31. T. Kubar, and M. Elstner, What governs charge transfer in DNA? The role of DNA conformation and environment, *J. Phys. Chem.* **112**, 8788-8798 (2008).
32. R. Gutierrez, S. Mandal, and G. Cuniberti, Dissipative effects in the electronic transport through DNA molecular wires, *Phys. Rev. Lett.* **71**, 1-10 (2005).
33. T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotech.* **21**, 1192–1199 (2003).
34. W. McKinnon, D. Landheer, G. Aers, Sensitivity of field-effect biosensors to charge, pH, and ion concentration in a membrane model, *J. Appl. Phys.* **104**, 124701 (2008).
35. M.W. Shinwari, M.J. Deen, D. Landheer, Study of the electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor (EISFET) with applications in biosensor design, *Microelectron. Reliab.* **47**, 2025–2057 (2007).
36. Schöning, M., Poghossian, A., Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). *Analyst* **127**, 1137–1151 (2002).
37. IonTorrent, Life Technologies. Available online: <http://www.iontorrent.com/welcome>
38. Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**, 348–352 (2011).

39. Dzyadevych, S., Soldatkin, A., El'skaya, A., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors, *Anal. Chim. Acta* **568**, 248–258 (2006).
40. Branquinho, R. Label-Free Detection of Biomolecules with Ta₂O₅-Based Field Effect Devices, Ph.D. Thesis, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal (2012).
41. Sze, S.M., Ng, K.K., *Physics of Semiconductor Devices*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey (2006).
42. Bergveld, P., Thirty years of ISFETOLOGY : What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years, *Sens. Actuators B Chem.* **88**, 1–20 (2003).
43. Brett, C.M.A., Brett, A.M.O., *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press: New York, NY, USA (1993).
44. Yates, D.E., Levine, S., Healy, T.W., Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **70**, 1807–1818 (1974).
45. Vedenov A.A., Dykhne A.M., and Frank-Kamenetskii M.D., The helix-coil transition in DNA, *Sov. Phys. Usp.* **14**, 715-736 (1972).
46. Yu. S. Lazurkin. *Physical Methods of Studying Proteins and Nucleic Acids*. Nauka (1967).
47. M. J. Chamberlin, Comparative properties of DNA, RNA, and hybrid homopolymer pairs, *Fed. Proc.* **24**,1446-1457 (1965).
48. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Aslanian V.M., Lando D.Yu., and Akhrem A.A., A new method for detemining the relative effect of ligand on at- and gc-base pairs in DNA: application to metal ions, protons and two amino acids, *Nucl. Acids Res.* **18**, 6413-6417 (1990).
49. Lando D.Yu., Haroutiunian S.G., Kulba A.M., Dalyan Y.B., Orioli P., Mangani R., and Akhrem A.A., Theoretical and experimental study of DNA helix-coil

- transition in acidic and alkaline medium, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **12**, 355-366 (1994).
50. R. J. Owen, L. R. Hill, and S. P. Lapage, Determination of DNA base compositions from melting profiles in dilute buffers, *Biopolymers* **7**, 503-516 (1969).
 51. Yu. N. Kosaganov, Yu. S. Lazurkin, and N. V. Sidorenko, *Molekulyarnaya Biologiya* **1**, 352 (1967).
 52. J. Vinograd, J. Lebowitz, and R. Watson, Early and late helix-coil transitions in closed circular DNA, The number of superhelical turns in polyoma DNA, *J. Mol. Biol.* **33**, 173-197 (1968).
 53. Graves D.E., Velea L.M., Intercalative binding of small molecules to Nucleic Acids, *Curr. Org. Chem.* **4**, 915–929 (2001).
 54. Франк-Каменецкий М.Д., *Самая главная молекула. (От структуры ДНК к биомедицине XXI века)*, Москва, Альпина нон-фикшн, 336 (2017).
 55. Вардеванян П.О., Структурные переходы в ДНК и ДНК-белковых комплексах при различных функциональных состояниях генома, Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Ереван, с. 246 (1990).
 56. Зенгер В., *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот*, М.: Мир, с. 584 (1987).
 57. Благой Ю.П., Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами, Соросовский образовательный журнал **10**, 18-24 (1998).
 58. Hess K. L., Andorko J. I., Tostanoski L. H., Jewell Ch. M., Polyplexes assembled from self-peptides and regulatory nucleic acids blunt toll-like receptor signaling to combat autoimmunity, *Biomaterials* doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.052 (2016).
 59. Morange M., The Central Dogma of molecular biology, *Reson.* **14**, 236–247 (2009).
 60. Jayaram B., Singh T., Fenley M., DNA-Drug Interactions. *In Methods for*

- Studying Nucleic Acid/Drug Interactions*, M. Wanunu and T. Yitzhak, eds. (Boca Raton: CRC Press), 315–336 (2011).
61. Leung C.H., Chan D.S.H., Ma V.P.Y., Ma D.L., DNA-Binding Small Molecules as Inhibitors of Transcription Factors, *Med. Res. Rev.*, **33**, 823–846 (2013).
 62. Amy Rhoden Smith, B.S., *Advances in DNA Binding by Threading Polyintercalation*. Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School of The University of Texas at Austin in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy The University of Texas at Austin, 188 p.p. (2013).
 63. Monaco R.R., A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **25**, 119-125 (2007).
 64. Костюков В.В., Милосердова Ю.Г., Шрам О.А., Рубинсон М.А., Евстигнеев М.П., Энергетика димеризации лигандов, связывающихся в малый желобок ДНК. Атомы и молекулы, *Укр. Физ. Журнал* **59**, 461-473 (2014).
 65. Nafisi Sh., Saboury A. A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A., Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue, *Journal of Molecular Structure* **827**, 35-43 (2007).
 66. Hossain M., Giri P., Kumar G.S., DNA Intercalation by Quinacrine and Methylene blue: A Comparative Binding and Thermodynamic Characterization Study, *DNA and Cell Biology* **27**, 81-90 (2008).
 67. Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J.J., Chen H.Y., Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin, *Anal. Chim. Acta* **394**, 337–344 (1999).
 68. Rohs R., Sklenar H., Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: Minor groove binding is favored over intercalation. *J. Biomol. Struct. & Dyn.* **21**, 699-711 (2004).

69. Strekowski L., Wilson B., Noncovalent interactions with DNA: An overview, *Mutation Research* **623**, 3-13 (2007).
70. Wilson W.D. in E. Kool (Ed.), DNA and RNA intercalators, DNA and aspects of molecular biology, in: D. Barton, K. Nakamishi, (eds.), *Comprehensive Natural products Chemistry*, **7** (1998).
71. Martinez R., Chacon-Garcia L., The search of DNA-intercalators as an antitumoral drugs: What it worked and what did not work, *Current Medicinal Chemistry* **12**, 127-151 (2005).
72. Chaires J.B., Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design, *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 135–151 (2008).
73. Sasikala W.D., Mukherjee A., Intercalation and de-intercalation pathway of proflavine through the minor and major grooves of DNA: roles of water and entropy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 6446–6455 (2013).
74. Wilhelm M., Mukherjee A., Bouvier B., Zakrzewska K., Hynes J.T., Lavery R., Multistep Drug Intercalation: Molecular Dynamics and Free Energy Studies of the Binding of Daunomycin to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8588–8596 (2012).
75. Lei H., Wang X., Wu C., Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations, *J. Mol. Graphics Model* **38**, 279–289 (2012).
76. Paik D.H., Perkins T.T., Dynamics and Multiple Stable Binding Modes of DNA Intercalators Revealed by Single-Molecule Force Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 1811–1815 (2012).
77. Chaires J.B., Energetics of drug–DNA interactions, *Biopolymers* **44**, 201–215 (1997).
78. D. Ivnitski et al., Biosensors for detection of pathogenic bacteria, *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 599-624 (1999).

79. J. Labuda et al., Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **82**, 1161-1187 (2010).
80. J.H. Watterson, P.A.E. Piunno, U.J. Krull, Towards the optimization of an optical DNA sensor: control of selectivity coefficients and relative surface affinities, *Anal.Chim.Acta* **457**, 29-38 (2002).
81. A. Halperin, A. Buhot, and E. B. Zhulina, On the hybridization isotherms of DNA microarrays: the Langmuir model and its extensions, *J. Phys.: Condens. Matter* **18**, S463 (2006).
82. G. Ananyan, A. Avetisyan, L. Aloyan, Y. Dalyan, The stability of DNA–porphyrin complexes in the presence of Mn(II) ions, *Biophys. Chem.* **156**, 96-101 (2011).
83. A.A.Ghazaryan, Y.B.Dalyan, S.G.Haroutiunian, A.Tikhomirova, T.V.Chalikian, Thermodynamics of Interactions of Water-Soluble Porphyrins with RNA Duplexes, *J. Amer. Chem. Soc.* **128**, 1914-1921 (2006).
84. Wheate N.J., Brodie C.R., Collins J.G., Kemp S., Aldrich-Wright J.R., DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis, *Mini Rev. Med. Chem.* **7**, 627–648 (2007).
85. Boer D.R., Canals A., Col M., DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes, *Dalton Trans.* 399–414 (2008).
86. Chaires J.B., A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **453**, 26-31 (2006).
87. Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., B. De Pascual-Tereza, Ramos A., Intercalators as anticancer drugs, *Current Pharmaceutical Design* **7**, 1745-1780 (2001).
88. Ihmels H., Faulhaber K., Wedaldi D., Dall Acqua F., Viola G., Interaction of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: The annelated quinolizinium ion as a structural motif in DNA intercalators, *Photochemistry and Photobiology* **81**, 1107-1115 (2005).

89. D. M. Hinckley, G. S. Freeman, J. K. Whitmer, and J. J. de Pablo, An experimentally-informed coarse-grained 3-Site-Per-Nucleotide model of DNA: structure, thermodynamics, and dynamics of hybridization., *J. Chem. Phys.* **139**, 144903 (2013).
90. D. M. Hinckley, J. P. Lequieu, and J. J. de Pablo, Coarse-grained modeling of DNA oligomer hybridization: length, sequence, and salt effects, *J. Chem. Phys.* **141**, 035102 (2014).
91. A. W. Peterson, R. J. Heaton and R. M. Georgiadis, The effect of surface probe density on DNA hybridization, *Nucl. Acids Res.* **29**, 5163-5168 (2001).
92. A. Halperin, A. Buhot, and E. B. Zhulina, Sensitivity, Specificity, and the Hybridization Isotherms of DNA Chips, *Biophys. J.* **86**, 718-730 (2004).
93. Hagan M.F., Chakraborty A.K., Hybridization dynamics of surface immobilized DNA, *J. Chem. Phys.* **120**, 4958-4968 (2004).
94. Seckar M.M.A., Bloch W., John P.M.S., Comparative Study of Sequence-Dependent Hybridization Kinetics in Solution and on Microspheres, *Nucleic Acids Res.* **33**, 366-375 (2005).
95. N. V. Sorokin, et al., Effects of External Transport on Discrimination Between Perfect and Mismatch Duplexes on Gel-Based Oligonucleotide Microchips, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **24**, 571-578 (2006).
96. D. Irving, P. Gong, and R. Levicky, DNA Surface Hybridization: Comparison of Theory and Experiment, *J. Phys. Chem. B* **114**, 7631-7640 (2010).
97. T. J. Schmitt and T. A. Knotts IV, Thermodynamics of DNA Hybridization on Surfaces, *J. Chem. Phys.* **134**, 205105 (2011).
98. Ricci C.G., Netz P.A., Docking Studies on DNA-Ligand Interactions: Building and Application of a Protocol to Identify the Binding Mode, *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 1925–2935 (2009).
99. Tanford C. Chemical Potential of Bound Ligand, an Important Parameter for Free Energy Transduction, *Proceed. Nat. Acad. USA* **78**, 270–273 (1981).

100. Pincus P. Colloid Stabilization with Grafted Polyelectrolytes, *Macromolecules* **24**, 2912–2919 (1991).
101. Wittmer J., Joanny J.F., Charged Diblock Copolymers at Interfaces, *Macromolecules*, **26**, 2691–2697 (1993).
102. Borisov O.V., Zhulina E.B., Birshtein T.M., Diagram of the States of a Grafted Polyelectrolyte Layer, *Macromolecules* **27**, 4795–4803 (1994).
103. Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors, *Analytica Chimica Acta* **568**(1-2), 248-258 (2006).
104. Ghosh, M. K., Katyal, A., Chandra, R., & Brahmachari, V., Targeted Activation of Transcription In Vivo through Hairpin-Triplex Forming Oligonucleotide in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biochemistry* **278**, 147–155. DOI: 10.1007/s11010-005-7283-7 (2005).
105. Bednarski, D., & Firestone, S. M., Regulation of Transcription by Synthetic DNA-Bending Agents, *ChemBioChem* **7**, 1715–1721 (2006). DOI:10.1002/cbic.200600141
106. Lai, Y. M., Fukuda, N., Ueno, T., Matsuda, H., Saito, S., Matsumoto, K., ... Serie, H., Synthetic Pyrrole-Imidazole Polyamide Inhibits Expression of the Human Transforming Growth Factor-Beta 1 Gene, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **315**, 571–575 (2005).. doi.org/10.1124/jpet.105.089086
107. Ainalem, M.-L., & Nylander, T., DNA condensation using cationic dendrimers morphology and supramolecular structure of formed aggregates, *Soft Matter* **7**, 4577–4594. DOI: 10.1039/C0SM01171A (2011).
108. Yoshikawa, Y., Umezawa, N., Imamura, Y., Kanbe, T., Kato, N., Yoshikawa, ... Higuchi, T., Effective Chiral Discrimination of Tetravalent Polyamines on the Compaction of Single DNA Molecules, *Angewandte Chemie-International Edition*, **52**, 3712–3716. DOI: 10.1002/anie.201209144 (2013).

109. Ainalem, M.-L., Bartles, A., Muck, J., Dias, R. S., Carnerup, A. M., Zink, D., & Nylander, T., DNA Compaction Induced by a Cationic Polymer or Surfactant Impact Gene Expression and DNA Degradation. *PLOS ONE*, **9**, e92692. doi.org/10.1371/journal.pone.0092692 (2014).
110. Karapetian, A. T., Grigoryan, Z. A., Mamasakhlisov, Y. Sh., Minasyants, M. V., & Vardevanian, P. O., Theoretical treatment of helix-coil transition of complexes DNA with two different ligands having different binding parameters, *Biomol. Struct. & Dyn.*, **34**, 198-202. doi.org/10.1080/07391102.2015.1010584 (2015).
111. Karapetian, A. T., Mehrabian, N. M., Terzikian, G. A., Vardevanian, P. O., Antonian, A. P., Borisova, O. F., & Frank-Kamenetskii, M. D., Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *Biomol. Struct. & Dyn.*, **14**, 275–283. DOI: 10.1080/07391102.1996.10508118 (1996).
112. Karapetian, A. T., Vardevanian, P. O., Terzikian, G. A., & Frank-Kamenetskii, M. D., Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: the effect to two types of interaction of ligand on the parameters of transition, *Biomol. Struct. & Dyn.* **8**, 123-130 (1990).
113. Sneppen, K., & Zocchi, G., *Physics in Molecular Biology*, Cambridge: University Press (2005).
114. de Gennes, P.-G., *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Ithaca and London: Cornell University Press. DOI: 10.1002/actp.1981.010320517 (1979).
115. Matsuyama, A., Thermodynamics of Flexible and Rigid Polymer Blends. In A. I. Isayev (Ed.), *Encyclopedia of Polymer Blends. Volume 1: Fundamentals* (pp. 145–100). Weinheim: WILEY-VCH (2010).
116. A. Matsuyama and T. Kato, Theory of binary mixtures of a flexible polymer and a liquid crystal, *J. Chem. Phys.* **105**, 1654-1660 (1996).
117. A. Matsuyama and T. Kato, Nematic ordering-induced volume phase transitions of liquid crystalline gels, *J. Chem. Phys.* **116**, 8175 (2002).

118. A. Matsuyama and T. Kato, Volume phase transitions of nematic gels under an external field, *J. Chem. Phys.* **114**, 3817 (2001).
119. A. Matsuyama and T. Kato, Phase diagrams of polymer dispersed liquid crystals, *J. Chem. Phys.* **108**, 2067 (1998).
120. A. Matsuyama, Conformational transitions of a semiflexible polymer in nematic solvents, *Phys. Rev. E* **67**, 042701(1-4) (2003).
121. A. Matsuyama, Nematic ordering in mixtures of polymers and liquid crystals, *Res. Rep. Fac. Eng. Mie Univ.* **27**, 9-22 (2002).
122. deGennes, P.-G., & Prost, J., *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford: Clarendon Press. DOI: 10.1063/1.2808028 (1993).
123. Kim, Y. H., & Pincus, P., Nematic Polymers: Excluded-Volume Effects. *Biopolymers* **18**, 2315-2322. DOI: 10.1002/bip.1979.360180918 (1979).
124. Kornyshev, A. A., Lee, D. J., Leikin, S. & Wynveen, A. (2007). Structure and interactions of biological helices. *Reviews of Modern Physics* **79**, 943 – 996. DOI:<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.79.943>
125. Podgornik, R., Strey, H. H., Gawrisch, K., Rau, D. C., Rupprecht, A., & Parsegian, V.A. Bond orientational order, molecular motion, and free energy of high density DNA mesophases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4261-4266 (1996).
126. Strey, H. H., Podgornik, R., Rau, D. C., & Parsegian, V. A. DNA-DNA interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 309–313 (1998).
127. Prabir K. Mukherjee, Simple Landau model of the isotropic-nematic-columnar phases of DNA solutions, *J. Molecular Liq.* **219**, 1095-1099 (2016).
128. G. Zanchetta, F. Giavazzi, M. Nakata, M. Buscaglia, R. Cerbino, N. A. Clark, and T. Bellini, Right-handed double-helix ultrashort DNA yields chiral nematic phases with both right- and left-handed director twist, *PNAS* **107**, 17497-17502 (2010).
129. Martin Čopič, Nematic phase of achiral dimers spontaneously bends and twists, *PNAS* **110**, 15855-15856 (2013).

130. M. Salamonczyk, J. Zhang, G. Portale, C. Zhu, E. Kentzinger, J. T. Gleeson, A. Jakli, C. De Michele, J. K. G. Dhont, S. Sprunt & E. Stiakakis, Smectic phase in suspensions of gapped DNA duplexes, *Nature Communications* **7**, 13358 (2016).
131. S. Dussi & M. Dijkstra, Entropy-driven formation of chiral nematic phases by computer simulations, *Nature Communications* **7**, 11175 (2016).
132. T. E. Strzelecka, M. W. Davidson, and R. L. Rill, Multiple Liquid Crystal Phases of DNA at High Concentrations, *Nature* **331**, 457-460 (1988).
133. D. Svenšek, G. Veble, and R. Podgornik, Confined nematic polymers: Order and packing in a nematic drop, *Confined nematic polymers: Order and packing in a nematic drop*, *Phys. Rev. E* **82**, 011708 (2010).
134. Y. M. Yevdokimov, V.I. Salyanov, S.V. Semenov, S.G. Skuridin, *DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions*, CRC Press, p. 304 (2011).
135. A. J. Spakowitz and Z.-G. Wang. Semiflexible polymer solutions. I. phase behavior and single- chain statistics. *J. Chem. Phys.* **119**, 13113–13128 (2003).
136. A. J. Spakowitz and Z.-G. Wang. Exact results for a semiflexible polymer chain in an aligning field. *Macromolecules* **37**, 5814–5823 (2004).
137. A. J. Spakowitz and Z.-G. Wang. Semiflexible polymer confined to a spherical surface. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 166102 (2003).
138. A. J. Spakowitz and Z.-G. Wang. Free expansion of elastic filaments, *Phys. Rev. E* **64**, 061802, (2001).
139. S. G. Skuridin, F. V. Vereshchagin, V. I. Salyanov, D. P. Chulkov, O. N. Kompanets, Yu. M. Yevdokimov, Ordering of double-stranded DNA molecules in a cholesteric liquid-crystalline phase and in dispersion particles of this phase, *Mol. Biol.* **50**, 783–79 (2016).
140. D. Marenduzzo, Computer simulations of DNA packing inside bacteriophages: Elasticity, electrostatics and entropy, *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **9**, 317–325 (2008).

141. N. Dan, Formation of Ordered Domains in Membrane-Bound DNA, *Biophys. J.* **71**, 1267-1272 (1996).
142. A. Colin and D. Roux, Incorporating DNA in a lamellar phase: A Flory model, *Eur. Phys. J. E* **8**, 499-506 (2002).