

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀԱԿՈՔՅԱՆ ԱՐԹՈՒՐ ԱՐՏԱՎԱԶԴԻ

ԿԻՍԱՀԱՂՈՐԴՉԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱՍԵՆՍՈՐԻ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԱԶԴԱՆՇԱՆԻ  
ՈՒԺԵՂԱՑՈՒՄԸ ԻՆՏԵՐԿԱԼԱՑՎՈՂ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐՈՎ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2018

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКОПЯН АРТУР АРТАВАЗДОВИЧ

УСИЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО СИГНАЛА  
ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО БИОСЕНСОРА ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМИ  
ЛИГАНДАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН 2018

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ռադիոֆիզիկայի և  
Էլեկտրոնիկայի ինստիտուտում

Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, դոցենտ  
Ե.Շ. Մամասախլիսով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Հ.Ա.Սարգսյան  
Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Վ.Բ.Առաքելյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի պետական համալսարան


Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2018թ. հունիսի 16-ին  
Ժամը 12<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՂ-ի Ֆիզիկայի 049  
մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան 1, ԵՊՀ,  
ֆիզիկայի ֆակուլտետ):

Ատենախոսությունը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի  
գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2018թ. մայիսի 15-ին:

049 (Ս.04.10) մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

 Կ.Ս. Ղամբարյան

Тема диссертации утверждена в Институте Радиофизики и Электроники НАН РА

Научный руководитель:

доктор физ.-мат. наук, доцент  
Е.Ш. Мамасахлисов

Официальные оппоненты:

доктор физ.-мат. наук, профессор  
А.А.Саргсян  
доктор физ.-мат. наук, профессор  
В.Б.Аракелян

Ведущая организация:

Ереванский государственный  
университет

Защита диссертации состоится 16-го июня 2018г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании  
Специализированного совета 049 по физике ВАК РА при Ереванском государственном  
университете (0025, Ереван, Алека Манукяна 1, ЕГУ, факультет физики).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного  
университета.

Автореферат диссертации разослан 15-го мая 2018г.

Ученый секретарь Специализированного совета 049 (Ս.04.10),

доктор физ.-мат. наук, професор

 К.М. Гамбарян

## 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, вызванные связыванием частично комплементарных молекул ДНК и зондов на поверхности биосенсора понижают долю корректно образованных комплексов зонд-мишень.
3. Влияние сторонних сигналов, 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 электро-нейтральные 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.

### Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, насчитывающего 142 наименований. Диссертация изложена на 104 страницах, включает 30 рисунков.

Во **Введении** сформулирована цель работы, показана научная новизна и практическая значимость результатов, перечисляются основные положения представленные к защите. **Первая глава** посвящена обзору создания различных наноструктур на основе нуклеиновых кислот, описанию физических принципов создания биологических сенсоров на основе устройств с полевым эффектом, а также описанию структуры, термодинамики и биологических свойств нуклеиновых кислот. Представлены основные свойства ставших классическими моделей ДНК. Также, литературный обзор содержит описание таких полевых устройств, как конденсаторы электролит – диэлектрик – полупроводник и ДНК – транзисторов с полевым эффектом. Кроме того, во **Введении** рассматриваются основные механизмы связывания низкомолекулярных соединений с нуклеиновыми кислотами. **Вторая глава** посвящена модели, описывающей влияние электро – нейтральных низкомолекулярных соединений, связывающихся с дунитевой ДНК, на чувствительность и избирательность биосенсоров, работающих на платформе устройств с полевым эффектом. В рамках этой модели рассчитаны изотермы гибридизации и заряд поверхностного слоя на затворе полевого сенсора. **Третья глава** диссертационной работы посвящена взаимному влиянию ориентационного порядка, возникающего на поверхности биосенсора и стабильности дуплекса ДНК. Изучен механизм стабилизации структуры двойной спирали ДНК при достаточно плотном покрытии поверхности биосенсора зондами. **Четвертая глава** посвящена гибридизации мишеней ДНК с ДНК – зондами, иммобилизованными на границе раздела твердое тело – раствор. В ней представлены результаты, описывающие влияние интеркалирующих заряженных лигандов на чувствительность ДНК – сенсоров. Работа завершается **Выводами**.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

В первой главе представлены обзор свойств различных наноструктур, создаваемых на основе нуклеиновых кислот, описание физических принципов функционирования биологических сенсоров на основе устройств с полевым эффектом, а также описание структуры, термодинамики и биологических свойств нуклеиновых кислот. Также, литературный обзор содержит описание основных механизмов связывания низкомолекулярных соединений с нуклеиновыми кислотами и эффекта, оказываемого ими на стабильность дуплетных ДНК.

Во второй главе диссертационной работы представлен подход к описанию гибридизации ДНК – мишеней на поверхности затвора ДНК – сенсора на базе устройств с полевым эффектом, таких как, например, ионо-чувствительный полевой транзистор (Рис. 1).

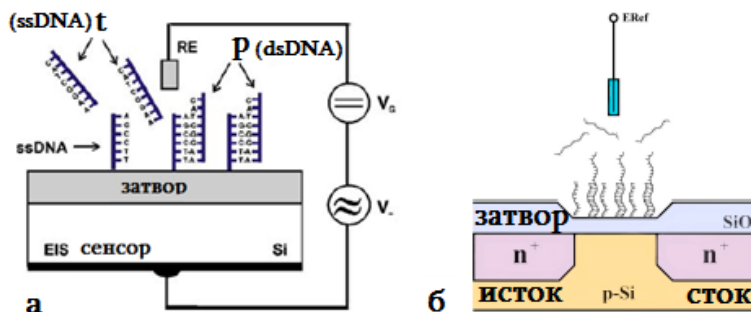


Рис. 1. (а) Схема работы ДНК-сенсора электролит-изолятор-полупроводник (EIS). (б) Схема работы ДНК-сенсора на базе ионо-чувствительного полевого транзистора (ISFET)

Рассмотрена равновесная изотерма гибридизации для идеализированной, но экспериментально доступной ситуации, когда ДНК-датчик погружен в раствор, содержащий интеркалирующие лиганды и только один тип одноцепочечной мишени (рис.1). Мы считаем, что длина всех зондов и мишеней одинакова и равна  $N$ .

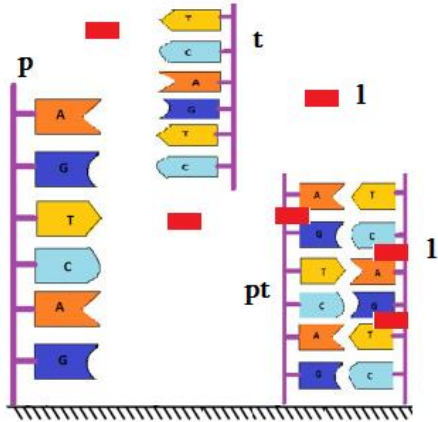
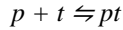
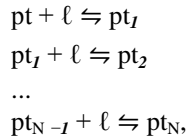


Рис. 2. Схема гибридизации на поверхности без конкуренции в присутствии интеркалирующих лигандов. См. пояснения в тексте.

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 (Рис. 2). 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  $pt_j$  гибрид, связанный с  $i$  лигандами  $l$ .

Равновесное состояние для реакций связыванию зондов, мишеней и лигандов определяется условиями

$$\mu_{pt} = \mu_p + \mu_t \quad (1)$$

$$\mu_l = \mu_b \quad (2)$$

где  $\mu_{pt}$  – химический потенциал гибридного зонда  $pt$ ,  $\mu_t$  – химический потенциал мишени,  $\mu_p$  – химический потенциал зонда,  $\mu_b$  и  $\mu_\ell$  – химические потенциалы связанного и свободно лигандов, соответственно. Была рассчитана свободная энергия слоя зондов с учетом адсорбции лигандов на двунитевые участки ДНК. Предполагается, что доступное количество центров связывания на дуплексе  $pt$  совпадает с его длиной в нуклеотидах,  $N$ . Свободная энергия слоя зондов записывается как функция независимых переменных  $N_{pt}$ , числа гибридных зондов и  $Nb = mN_{pt}$ , число связанных лигандов.

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

$$\Delta\mu_{pt} = \Delta\mu_{pt}^0 + N \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma} + k_B T \ln \frac{x}{1-x} + k_B T \ln(1-r) \quad (3)$$

где  $r = \frac{Nb}{NN_{pt}}$  – это степень адсорбции лигандов  $\ell$  на дцДНК. Плотность электростатической свободной энергии  $\gamma_{el}$  рассматривается как функция поверхностной плотности заряда  $\sigma$ . В то же время, химический потенциал связанного лиганда

$$\mu_b = \mu_b^0 + k_B T \ln \frac{r}{1-r} \quad (4)$$

Полученная изотерма гибридизации имеет вид

$$\frac{x(1-r)^N}{c_t(1-x)} = K_t \exp\left(-\frac{N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right) \quad (5)$$

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  $\ell$  между связанным и свободным состояниями описывается изотермой адсорбции

$$\frac{r}{c_t(1-r)} = K_l, \quad (6)$$

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

Плотность электростатической свободной энергии слоя зондов,  $\gamma_{el}$  была оценена в работе в приближении двухкомпонентного ящика. При высокой концентрации солей экранирование заряженного слоя определяется вкладом соли и имеет вид

$$\frac{\gamma_{el}}{k_B T} = 4\pi\sigma^2 l_B \frac{r_D^2}{H} \quad (7)$$

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

$$\sigma = \sigma_0(1+x) \quad (8)$$

С учетом полученных выражений была получена изотерма гибридизации представленная на Рис. 3.

При реализации ДНК-сенсора на базе ионо-чувствительного полевого транзистора основной измеримой величиной является электрический ток стока



$I_D$ , типичное поведение которого в зависимости от напряжения на затворе показано на Рис. 4

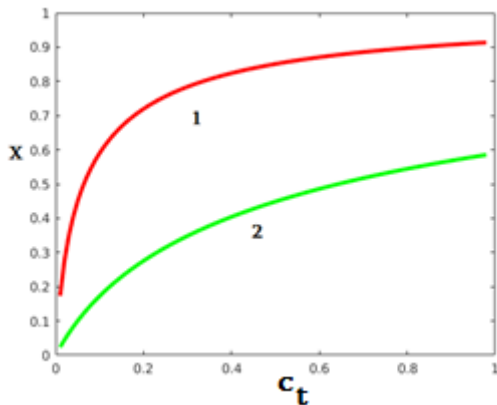


Рис.3. Изотерма гибридизации: без лигандов (кривая 2); с лигандами (кривая 1). Степень гибридизации  $x$  в зависимости от  $c_t$

Поскольку, характеристика ионо-чувствительного полевого транзистора в линейной области описывается как

$$I_D = \mu C_i \frac{W}{L} \left[ (V_G - V_T) V_D - \frac{V_D^2}{2} \right] \quad (9)$$

где  $W$  и  $L$  – это ширина и длина канала, соответственно;  $C_i$  – электроемкость изолятора и  $\mu$  – подвижность носителя заряда, одним из наиболее важных параметров ионо-чувствительного транзистора является пороговое напряжение  $V_T$ . Его значение определяется: зарядом оксида ( $Q_{ox}$ ), разницей функции работы между полупроводником и раствором ( $\Phi_{Sc}$ ), потенциалом контрольного электрода ( $E_{Ref}$ ), дипольным потенциалом поверхности раствора ( $\chi_{sol}$ ) и потенциалом на границе раздела электролит-изолятор ( $\psi_0$ ), который зависит от концентрации ионов в раствор как

$$V_T = E_{ref} + \chi_{sol} - \psi_0 - \Phi_{Sc} - \frac{Q_{ox}}{C_i} \quad (10)$$

Как известно (Dzyadevych, et al. 2006) потенциал  $\psi_0$  линейно зависит от плотности поверхностного заряда. Т.о., при изменении заряда при гибридизации на поверхности затвора меняется вольт-амперная характеристика  $V_G$ - $I_D$  (Рис. 4).

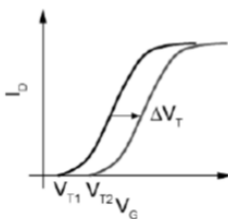


Рис.4. Схематическое изображение эффекта гибридизации ДНК на поверхности электрода затвора и сдвиг зависимости  $V_G$ - $I_D$ , вызванный изменением порогового напряжение  $V_T$  за счет гибридизации ДНК

**В третьей главе** рассмотрено влияние плотного покрытия поверхности затвора устройства с полевым эффектом на стабильность гибрида зонд-мишень. Чтобы сделать первый шаг к механизму влияния конденсации и ориентационного порядка на стабильность гибридов зонд - мишень, была рассмотрена модельная система, содержащая 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 оценивается в рамках теории Майера – Заупе и модели Флори – Хаггинса. Была рассмотрена смесь жестких стержнеобразных коротких молекул дцДНК и гибкого полимера. Устойчивость двойной спирали ДНК определяется температурой, ионной силой и другими условиями (Веденов, Дыхне и Франк-Каменецкий, 1972; Karapetian et al., 1990, 1996, 2015). Здесь мы предполагали условия среды, соответствующие области плавления дцДНК, где двойная спираль переходит в неупорядоченное спиральное состояние. Хорошо известно (Веденов, Дыхне и Франк-Каменецкий, 1972), 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» (Sneppen & Zocchi 2005). 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.

Была рассмотрена 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

$$F = F_{helix} + F_{mix} + F_{nem} , \quad (11)$$

где  $F_{helix} = N_r F_{zip}$  это свободная энергия  $N_r$  дцДНК в смеси,  $F_{mix}$  - это свободная энергия смешения дцДНК и гибкоцепного полимера и  $F_{nem}$  - свободная энергия нематического упорядочения. При этом,  $F_{zip}$  – свободная энергия дцДНК в приближении «застежка-молния». Жесткость дцДНК зависит от числа пар оснований в спиральном состоянии, поскольку расплавленные области дцДНК содержат две гибкие цепи. Степень спиральности определяется как

$$\theta = \frac{\langle n_{bp} \rangle}{n_r} = \frac{\partial \ln Z_{zip}(n_r, s, \sigma)}{n_r \partial \ln s} , \quad (12)$$

где  $\langle \dots \rangle$  означает термодинамическое среднее.

Изотропная часть свободной энергии  $F_{mix}$  не отвечает за ориентационный порядок в плотно упакованной системе дцДНК и,

поэтому, мы рассматривали только анизотропную часть свободной энергии  $f = \frac{F_{nem} + F_{helix}}{Nk_B T}$ , которая имеет вид

$$\frac{n_r f}{\phi_r} = \frac{1}{2} \theta \Gamma S^2 - \ln I_0(\theta \Gamma S) - \ln Z_{zip}(n_r, \tilde{s}, \sigma), \quad (13)$$

где  $S$  – параметр Майера-Заупе,  $\tilde{s}$  и  $\sigma$  – статистические веса пары оснований и зародыша двойной спирали, соответственно,  $I_0(\alpha) = \int_0^1 dx \exp(\alpha P_2(x))$ ,  $P_2(x) = \frac{3}{2}(x^2 - 1/3)$ ,  $\Gamma = n_r \phi_r (\chi_a + 5/4)$ ,  $\chi_a$  анизотропный параметр притяжения между сегментами дцДНК и  $\phi_r$  – объемная доля жесткоцепного полимера.

Минимизация анизотропной свободной энергии (13) по параметру Майера – Заупе  $S$  дает зависимость параметра нематического порядка  $S$  от статистического веса, представленную на Рис. 5. На Рис. 5 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.

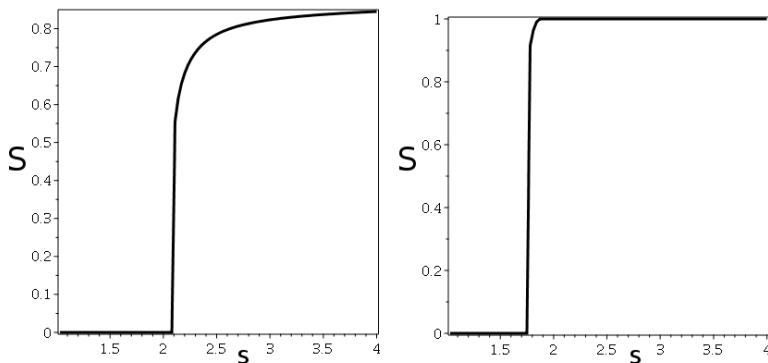


Рис. 5. Зависимость параметра Майера - Заупе  $S$  от статистического веса  $s$  при  $\Gamma = 4.56$  слева и при  $\Gamma = 7.6$  справа.

Нематический порядок фрагментов дцДНК в конденсированном состоянии описан в многочисленных публикациях, например. (Kornyshev, Lee, Leikin, & Wynveen, 2007; Podgornik, et al., 1996; Strey, Podgornik, Rau, & Parsegian, 1998). На Рис. 6 показана зависимость степени спиральности  $\theta$  от статистического веса  $s$ . Увеличение параметра  $\Gamma$  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  $\Gamma$  может быть увеличено за счет увеличения притяжения ( $\chi_a$ ) между молекулами dsDNA. Таким образом, плотная упаковка при высокой плотности покрытия поверхности сенсора молекулами дцДНК влияет на стабильность двойной спирали через нематический порядок. Т.о. 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.

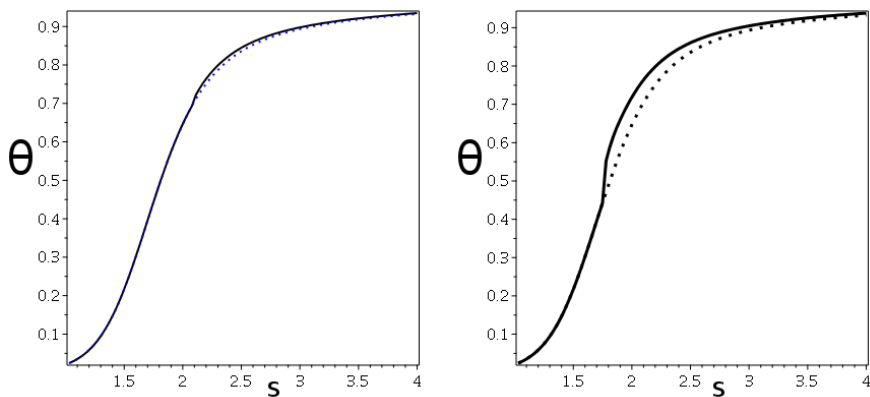


Рис. 6. Зависимость степени спиральности  $\theta$  от статистического веса  $s$  при  $\Gamma = 4.56$  слева и при  $\Gamma = 7.6$  справа.

**Четвертая глава** диссертационной работы посвящена изучению чувствительности ДНК-сенсоров на базе устройств с полевым эффектом за счет усиления электрического сигнала и стабильности гибрида зонд-мишень на поверхности затвора ДНК-сенсора в присутствии интеркалирующих положительно заряженных моно- и бивалентных лигандов. Гибридизация нуклеиновых кислот в значительной степени зависит от температуры, концентрации солей, вязкости, GC-состава и других физико-химических характеристик.

В **четвертой главе** в частности, получена изотерма гибридизации ДНК на поверхности в присутствии лигандов, которые связываются с дцДНК. В отсутствие конкурентной гибридизации (Рис. 2) рассмотрены равновесные изотермы гибридизации, а также рассчитаны поверхностные заряды для нейтральных и заряженных интеркалирующих лигандов.

При наличии заряженных лигандов поверхностная плотность заряда в выражении (7) оценивается как

$$\sigma = \frac{NN_0 + NN_{pt} - zN_b}{A}, \quad (14)$$

где  $A$  – это площадь поверхности сенсора и  $z$  – это валентность положительно заряженного лиганда. С учетом поверхностной плотности заряда (14), получаем изотерму гибридизации

$$\frac{x(1-r)^N}{c_l(1-x)} = K_l \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma \partial \gamma_{el}}{k_B T \partial N_{pl}}\right), \quad (15)$$

Равновесное распределение лигандов  $l$  между связанными и свободными состояниями будет описываться изотермой адсорбции

$$\frac{r}{c_l(1-r)} = K_l \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma \partial \gamma_{el}}{k_B T \partial N_b}\right), \quad (16)$$

Уравнения (15, 16) преобразуется как

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

$$\frac{r}{1-r} = c_l K_l \exp\left[\frac{\Gamma}{N}(1+x-zrx)\right], \quad (17)$$

где  $\Gamma = 8\pi N \sigma_0 l \frac{r_D^2}{H}$  и  $\sigma_0 = \frac{NN_0}{A}$ . Для этого случая, были получены изотермы гибридизации, приведенные на Рис. 7, 8 и 9. Так, при низких концентрациях бивалентных лигандов ( $z=2$ ), степень заполнения ДНК лигандами меньше половины. На Рис. 7,  $x$  - это изотерма гибридизации,  $r$ , показанная пунктиром – степень заполнения лигандами и  $Q$  – заряд ДНК из расчета на один нуклеотид зонда. Видно, что практически нет увеличения заряда ДНК по-сравнению с негибридизованным случаем, несмотря на высокую степень гибридизации.

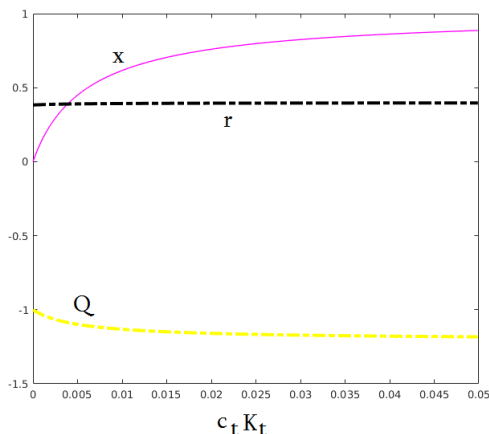


Рис.7. Степень гибридизации, степень заполнения и поверхностный заряд из расчета на один нуклеотид зонда (см. пояснения в тексте).

При более высоких концентрациях лиганда степень заполнения становится больше  $r > 1/2$ .

На Рис. 8  $x$  - это изотерма гибридизации,  $r$ , показанная пунктиром – степень заполнения лигандами и  $Q$  – заряд ДНК из расчета на один нуклеотид зонда. Видно, что практически заряд становится даже меньше заряда ДНК по сравнению с негибридизованным случаем, несмотря на высокую степень гибридизации.

Таким образом, бивалентные лиганды обеспечивают высокую степень гибридизации, но практически полностью подавляют полезный сигнал сенсора.

В присутствии моновалентных лигандов ( $z=1$ ), изотерма гибридизации и изотерма адсорбции лигандов приведены на Рис. 9. В частности, показано, что моновалентные лиганды существенно повышают степень гибридизации по сравнению с таковой для электронейтральными.

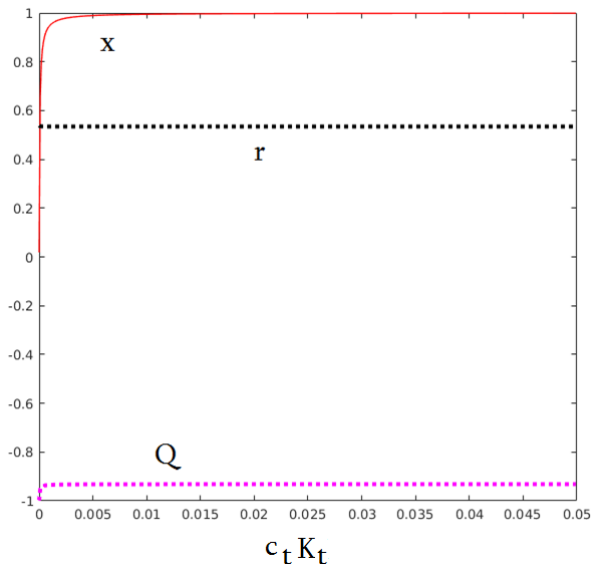


Рис.8. Степень гибридизации, степень заполнения и поверхностный заряд из расчета на один нуклеотид зонда (см. пояснения в тексте).

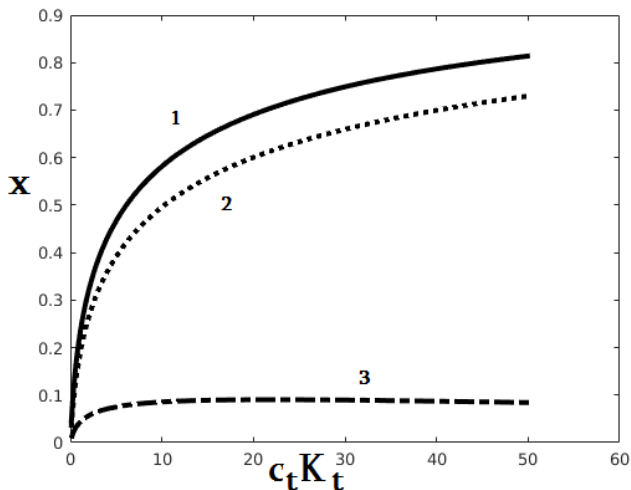


Рис.9. Изотермы гибридизации (степень гибридизации  $x$  в зависимости от  $c_t K_t$ ) для моновалентного положительного заряженного лиганда (1), для незаряженных лигандов (2), сдвиг изотермы гибридизации от случая незаряженного лиганда к заряженному (3). Кривые получены для следующих значений параметров:  $l_B \approx 7\text{\AA}$ ,  $r_B \approx 3\text{\AA}$ ,  $N = 16$ ,  $K_t = 10^{7.5} M^{-1}$ ,  $\Gamma \approx 2.57$ .

На Рис. 10 приведены результаты, полученные для моновалентных лигандов. На Рис. 10  $x$  – это изотерма гибридизации с моновалентными лигандами,  $x_0$  – изотерма гибридизации с нейтральными лигандами,  $r$  – степень заполнения,  $Q$  – заряд ДНК из расчета на один нуклеотид зонда с заряженными лигандами и  $Q_0$  – 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.

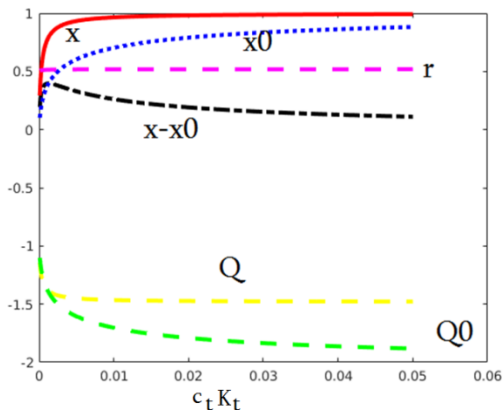


Рис. 10. Степень гибридизации, степень заполнения и поверхностный заряд из расчета на один нуклеотид зонда (см. пояснения в тексте).

Т.о., в работе 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 эффективному понижению поверхностного заряда на поверхности затвора полевого транзистора. Это, в свою очередь означает понижение чувствительности сенсора за счет изменения порогового напряжения  $V_T$ .



## 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

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Tonoyan Sh., Andriasyan A., Hakobyan A., Morozov V., Mamasakhlov Y., Constrained annealing approach for order – disorder transitions in heterogeneous macromolecular systems, Intl. Workshop and Young Scientist School on Critical Phenomena and Phase Transition, 20-24 September 2017, A.I. Alikhanyan National Science Laboratory, Yerevan, Armenia, p.20-21.
2. Ye. Sh. Mamasakhlov, A. P. Antonyan, A. A. Hakobyan, Effect of Ligand Binding on Functionality of DNA Field-Effect Transistor, Proceedings of the Yerevan State University, 2017, 51(1), p.66–70.
3. A. Hakobyan, The isotherm of hybridization for the DNA field-effect transistor in presence of monovalent charged ligands, Armenian Journal of Physics, 2017, 10, issue 4, p. 206-211.
4. Ш.А. Тоноян, А.А. Акобян, А.К. Андреасян, В.Ф. Морозов, Е.Ш. Мамасахлисов, Чувствительность ДНК сенсоров при наличии заряженных лигандов, Известия НАН Армении, Физика, 2018, т.53, №2, с.236–245.
5. Yevgeni Mamasakhlov, Hakob Sngryan, Shushanik Tonoyan, Artur Hakobyan & Poghos Vardevanyan, The double – stranded DNA stability in presence of a flexible polymer, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: 10.1080/07391102.2018.1459320 (2018).

## ՀԱԿՈՒՅՑԱՆ ԱՐԹՈՒՐ ԱՐՏԱՎԱԶՐԻ

ԿԻՍԱՀԱՂՈՐԴՉԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱՍԵՆՍՈՐԻ ԷԼԵԿՏՐՈՍՏԱՏՍԻԿ ԱԶԴԱՆՇԱՆԻ  
ՈՒԺԵՂԱՅՈՒՄԸ ԻՆՏԵՐԿԱԼԱՅՎՈՂ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐՈՎ

### ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Հանգուցային բառեր. Կենսասենսոր, դաշտային տրանզիստոր, կոնդենսատոր, ԴՆԹ, լիզանդ

Աշխատանքը նվիրված է դաշտային էֆեկտով սարքավորումների հիման վրա ԴՆԹ-սենսորի ազդանշանի ուժեղացման մեխանիզմների հետազոտությանը՝ ի հաշիվ ԴՆԹ-ի և ցածրամոլեկուլային միացությունների՝ լիզանդների միջև փոխազդեցությանը: Աշխատանքի գիտական նորույթը որոշվում է լուծույթում ԴՆԹ-թիրախների հիբրիդացումը նկարագրող մոդելի կառուցմամբ, որոնք հպվում են դաշտային էֆեկտով սարքավորումների եզրային մակերեսին և հաշվի է առնվում ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցությունը: Առաջին անգամ դիտարկվել են ԴՆԹ-սենսորի ազդանշանի վրա ազդեցություններ, որոնք պայմանավորված են վերլուծվող լուծույթում էլեկտրաչեզոք և լիցքավորված լիզանդների առկայությամբ: Աշխատանքում նաև դիտարկվել է սենսորի մակերեսին ԴՆԹ-ի փաթեթավորման ազդեցությունը նիշ-թիրախ հիբրիդի կայունության վրա:

Աշխատանքում մշակվել է լուծույթում լիզանդների և թիրախների և սենսորի մակերեսին իմոբիլիզացված նիշերի միջև փուլային հավասարակշռությունը նկարագրող անալիտիկ տեսություն: Դիտարկվել են մոնո- և երկվալենտ դրական լիցքավորված ինտերկալացվող լիզանդներ: ԴՆԹ-սենսորի եզրի մակերևութային շերտի համար հաշվարկված Գիբսի ազատ էներգիայի հիման վրա ստացվել է, այսպես կոչված, հիբրիդացման իզոթերմը՝ ԴՆԹ-թիրախների հետ կապված նիշերի մասնաբաժնի կախվածությունը լուծույթում ԴՆԹ-թիրախների կոնցենտրացիայից:

Հիբրիդացման իզոթերմի վարքի վրա ազդում են լուծույթում լիզանդների կոնցենտրացիան, էլեկտրոլիտում Դեբայի էկրանացման երկարությունը և նատիվ ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման հաստատունները: Ցույց է տրվել, որ էլեկտրաչեզոք լիզանդների՝ ինտերկալատորների հետ կապումը բարձրացնում է ԴՆԹ-սենսորի ընտրողականությունն ու զգայունությունը՝ շնորհիվ նպատակային թիրախների հիբրիդացման աստիճանի բարձրացման և ոչ ճիշտ կապված թիրախների մասնաբաժնի նվազման: Ընդ որում, դաշտային ԴՆԹ-սենսորի զգայունությունը ավելանում է սարքավորման եզրի մակերեսին հիբրիդացման դեպքում շեմային լարվածության փոփոխության հաշվին:

ԴՆԹ-սենսորի եզրին նիշերով պատման բարձր մակերևութային խտության դեպքում հաշվարկվել են կենսասենսորի մակերեսին նիշ-թիրախ հիբրիդների կայունության պարամետրերը: Ցույց է տրվել, որ փաթեթավորումը նպաստում է կոշտ շղթա ունեցող եշ-ԴՆԹ-ի կողմնորոշիչ կարգի առաջացմանը, ինչն իր հերթին, մեծացնում է դուպլեքսի կայունությունը:

Միևնույն ժամանակ, նիշ-թիրախ հիբրիդների հետ լիցքավորված լիզանդների կապումը մեծացնում է հիբրիդացման աստիճանը չլիցքավորված լիզանդների համար նույն մեծության համեմատ: Ընդ որում, հիբրիդացման արդյունավետությունն աճում է ինտերկալացվող լիզանդի լիցքի աճին զուգահեռ: Միևնույն ժամանակ սենսորի մակերեսին հիբրիդացված ԴՆԹ-ի բացասական լիցքը մասնակի չեզոքանում է արդեն միավալենտ լիզանդներով՝ ինտերկալատորներով: Երկվալենտ լիզանդների կիրառման դեպքում կենսասենսորի եզրային մակերեսին մակերևութային լիցքը չեզոքանում է գրեթե ամբողջությամբ: Մեծ լիցքով դրական լիցքավորված լիզանդների համար ակնկալվում է լիցքի ինվերսիա՝ կենսասենսորի եզրի մակերևութային շերտի վրա:

Քննարկվել է կենսասենսորի ելքային ազդանշանի մեծության և լիզանդների լիցքի միջև կապը: Մասնավորապես, ցույց է տրվել, որ լիցքավորված լիզանդները փաստացիորեն ճնշում են սենսորի ազդանշանը՝ բարձրացնելով հիբրիդացման արդյունավետությունը: Քննարկվել է այս էֆեկտի ազդեցությունը ԴՆԹ-սենսորների աշխատանքի վրա: Աշխատանքում ձևակերպումներ են տրվել ԴՆԹ-սենսորների աշխատանքի բարձրացմանը:

STRENGTHENING OF ELECTROSTATIC SIGNAL OF SEMI-CONDUCTOR  
BIOSENSOR BY INTERCALATING LIGANDS

SUMMARY

Keywords: Biosensor, field transistor, condenser, DNA, ligand

The work is devoted to the study of DNA-sensor signal strengthening mechanisms based on the field effect equipment at the account of the interaction between DNA and low-molecular compounds, ligands.

The scientific novelty of the work is determined by construction of a model, describing the hybridization of DNA-targets in the solution that contact with gate surface of the equipment with field effect and DNA-ligand interaction is taken into account. It was the first time, when the effects on DNA-sensor signal have been observed that were conditioned by the presence of electro-neutral and charged ligands in the analyzing solution. In this work on the sensor surface the DNA twisting effect on probe-target hybrid stability was also observed.

In this work an analytical theory, describing the phase equilibrium between ligands and targets in the solution and immobilized probes on the sensor surface was elaborated. Mono- and bivalent positively charged intercalating ligands were observed. By the virtue of Gibbs free energy, calculated for DNA-sensor gate surface layer, the so called hybridization isotherm – dependence of portion of probes connected with DNA-targets on concentration of DNA-targets in the solution was obtained.

Concentration of ligands in the solution, Debye screening length in electrolyte and binding constants of ligands with DNA affect the hybridization isotherm behavior. The binding with electro-neutral ligands – intercalators was shown to enhance the selectivity and sensitivity of DNA-sensor due to increasing of hybridization degree of goal targets and decreasing of portion of incorrectly bound targets. Meanwhile, the field DNA-sensor sensitivity rises due to the threshold tension change in the case of hybridization on the equipment gate surface.

In the case of high surface density of probe coverage on DNA-sensor gate the stability parameters of probe-target hybrids on biosensor surface were calculated. The twisting was shown to contribute to orientation order formation of ds-DNA with rigid chain, which in turn, enhances the duplex stability.

At the same time the binding of charged ligands with probe-target hybrids enhances the hybridization degree as compared to the same value for non-charged ligands. Though, the hybridization efficacy increases along with intercalating ligand charge enhancement. At the same time, the hybridized DNA negative charge on the

sensor surface is neutralized by monovalent ligands – intercalators. In the case of application of bivalent ligands the surface charge on the biosensor gate surface is neutralized almost entirely.

The charge inversion on the biosensor gate surface layer is expected for positively charged ligands having big charge. Connection between the biosensor output signal value and charge of ligands was discussed. Particularly, the charged ligands were shown to suppress the sensor signal, enhancing the hybridization efficacy. This effect on DNA-sensor work was discussed. In the work the formulations for DNA-sensor work enhancement were given.

