

УДК 577.213.44

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭЛОНГАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ КАК МНОГОСТАДИЙНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

© 2023 г. А. В. Луковенков^а, В. И. Быков^{а, б}, С. Д. Варфоломеев^{а, б, с}

^аФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

^бФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ).

Институт физико-химических основ функционирования сетей нейронов и искусственного интеллекта,
Ломоносовский просп., 27, корп. 1, оф. Е801-Е804, А818, Москва, 119192 Россия

^сФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет,
кафедра химической энзимологии, ул. Колмогорова, 1, стр. 11б, Москва, 119192 Россия

*e-mail: luks.mipt@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 08.11.2022 г.

Изучена кинетика элонгации нуклеиновых кислот как многостадийной последовательной реакции, замыкающейся в цикл. Приведено математически строгое доказательство эмпирических формул, используемых для оценки времени элонгации в зависимости от длины нуклеотидной цепи. Предложены оценки характерного времени элонгации для типичных длин цепи, в т.ч. для нового коронавируса (SARS-CoV-2). Исследована устойчивость кинетики элонгации и выявлено появление при типичных длинах цепи наряду с основной экспоненциальной компонентой решения неустойчивых осциллирующих компонент с растущей амплитудой.

Ключевые слова: элонгация нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция, кинетика последовательных реакций, многостадийные реакции, устойчивость в химической кинетике

DOI: 10.31857/S0453881123020041, **EDN:** GNEEBJ

ВВЕДЕНИЕ

Удвоение молекул нуклеиновых кислот – важнейший биохимический процесс. Осуществляясь *in vivo*, он создает копию генетического материала, необходимую для деления живой клетки. Аналогом репликации *in vitro* является созданный Кэри Муллисом метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) [1]: фрагменты ДНК размножаются в реакторе (амплификаторе) при посредстве ДНК-полимеразы. Увеличение концентрации нужного фрагмента ДНК методом ПЦР широко используется в фундаментальных и прикладных исследованиях и в медицинской практике [2, 3], в том числе на переднем крае борьбы с охватившей мир пандемией нового коронавируса (SARS-CoV-2), где данная методика позволила получить полный генетический код вируса [4] и выявить гены, которые могли бы послужить мишенями для воздействия на него.

Изучение кинетических характеристик ПЦР *in vivo* и *in vitro* представляет важный практический интерес [5, 6]. Так, знание времени удвое-

ния генома *in vivo* могло бы помочь оценить снизу время деления клетки (удвоения вирусной частицы), которое крайне важно для анализа любых процессов, связанных с ростом клеточных популяций эукариот (например, опухолей) или популяций микроорганизмов. Однако характерное время удвоения генома *in vivo* позволяет оценить время деления всей клетки (удвоения вирусной частицы) лишь очень грубо. При делении значительное время тратится на формирование прочих необходимых при делении компонентов (транскрипция и трансляция, образование структурных белков и формирование органелл, клеточной мембраны или вирусного капсида, деление цитоплазмы вместе со структурными элементами и т.п. [7]). Более точные оценки для времени удвоения фрагмента нуклеиновой кислоты могут быть получены, когда процесс представляет собой один ПЦР-цикл *in vitro*. Широкое использование амплификаторов, позволяющих повысить концентрацию фрагмента ДНК посредством множественных циклов ПЦР, поставило вопрос об установлении зависимости между длительностью процедуры и длиной исходного фрагмента. Типичные значения длины фрагмента ДНК при этом лежат

Сокращения и обозначения: ПЦР – полимеразная цепная реакция.

в диапазоне от 300 до 3000 пар оснований (300 base pairs, bp, или 3 kilobase pairs, kbp), хотя некоторые современные технологии позволяют увеличить это значение до 40 kbp [8].

Одна из целей настоящей работы — дать математически точное описание главной стадии полимеразной цепной реакции: элонгации ДНК и строго обосновать существующее представление о линейной зависимости продолжительности этой стадии от длины реплицируемого фрагмента. Еще одной целью является исследование особенностей, возникающих из точного решения уравнений для стадии элонгации, связанных с неустойчивым (в смысле Ляпунова) поведением компонент решения.

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДУЕМОЙ РЕАКЦИИ

Один цикл ПЦР включает три последовательных стадии: денатурацию, отжиг и элонгацию (иногда нужна также и предварительная нулевая стадия инициации термостабильной ДНК-полимеразы путем нагрева до 94–96°C в течение 1–9 мин). На первой стадии (денатурации) нагрев реакционной смеси до 94–98°C в течение 20–30 с [9, 10] вызывает разрушение водородных связей между цепочками нуклеотидов (плавление ДНК). На втором этапе (отжиг) температура падает на 20–40 с до 50–65°C [9, 10], способствуя связыванию праймера с реплицируемым фрагментом ДНК. На третьей стадии (элонгация) в результате последовательного присоединения нуклеотидов для каждой из образовавшихся на первом этапе одиночных молекул ДНК достраивается комплиментарная цепь. Продолжительность этой стадии существенно зависит от длины n реплицируемого фрагмента. Типичная рекомендация: использовать линейную зависимость, добавляя по 1 мин на каждую тысячу пар оснований длины реплицируемого фрагмента [9, 10].

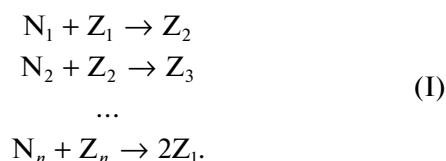
В работе [8] описана кинетика репликации фрагмента ДНК, состоящего из 150 пар оснований (продолжительность стадии элонгации — 15 с или около 1.66 мин на kbp). Авторы [8] рассматривали все описанные выше этапы этого процесса, чтобы теоретически вывести уравнение кинетической кривой процесса: зависимость выхода конечного продукта от времени реакции. В то же время точного объяснения линейного характера зависимости продолжительности стадии элонгации от длины исходного фрагмента в [8] не давалось: этот факт кажется авторам самоочевидным. Вдобавок, данная стадия интерпретировалась как одна каталитическая реакция, происходящая в соответствии с классической кинетической схемой Михаэлиса–Ментен. В действительности реакция должна быть представлена как цепь из $n - 1$ ферментативных реакций, последовательно выстраивающих комплиментарную цепочку ДНК.

Элонгация начинается с одной молекулы (фрагмента) ДНК с соответствующими прайме-

рами на обеих ее концах. К ней последовательно присоединяются нуклеотиды, достраивающие ее до димера. В финале процесса происходит распад димера на две независимые комплиментарные молекулы ДНК. Характерное время всей стадии элонгации зависит, разумеется, не только от длины реплицируемого фрагмента n , но также от констант скорости k_i всех элементарных стадий присоединения нуклеотидов. Однако каждая такая стадия есть обычная ферментативная реакция, а значит, можно считать ее подчиненной схеме Михаэлиса–Ментен. Как следует из данных [8], константа Михаэлиса для всякой стадии много больше произведения концентраций нуклеотида и соответствующего субстрата (незавершенная цепь ДНК). Поэтому можно полагать, что на каждой такой стадии в знаменателе правой части уравнения Михаэлиса–Ментен можно пренебречь переменным членом и считать кинетику элементарного акта присоединения одного нуклеотида линейной по концентрации субстрата (незавершенной цепи ДНК).

КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Рассмотрим цепочку последовательных реакций, замкнутую в цикл, где последний субстрат совпадает с начальным, но в каждой итерации цикла его концентрация удваивается:



Полагая концентрации N_i ($i = 1, \dots, n$) свободных нуклеотидов N_i постоянными (т.е. что реакция идет в условиях большого избытка всех N_i), перепишем (I) как:



Пусть Z_i есть концентрации реагентов Z_i в (II), и k_i есть константа скорости i -й стадии реакции (включающая как множитель концентрацию соответствующего нуклеотида N_i , рассматриваемую как константу, т.е. $k_i = k_{\text{cat}i} E_0 N_i / K_{M_i}$ в терминах уравнения Михаэлиса–Ментен, где k_{cat} и K_M — константы каталитическая и Михаэлиса, E_0 — начальная концентрация фермента). Тогда (II) соответствует кинетической модели:

$$\begin{cases} \frac{dZ_1}{dt} = -k_1Z_1 + 2k_nZ_n \\ \frac{dZ_2}{dt} = k_1Z_1 - k_2Z_2 \\ \dots \\ \frac{dZ_n}{dt} = k_{n-1}Z_{n-1} - k_nZ_n \end{cases} \quad (1)$$

Система кинетических уравнений (1) дополняется начальными условиями:

$$Z_i(0) = Z_i^0, i = 1, \dots, n. \quad (2)$$

Наиболее важным специальным случаем (2) является

$$Z_1(0) = 1, Z_i(0) = 0, i = 2, \dots, n, \quad (3)$$

соответствующий начальным условиям реальной ПЦР (при $t = 0$ концентрация нуклеиновой кислоты равна 1, а все промежуточные вещества полностью отсутствуют).

Система (1) при начальных условиях (3) задает постановку задачи Коши для системы обыкновенных дифференциальных уравнений: решения $Z_i(t) \geq 0$ должны быть найдены в области $t > 0$. Из (1) получается (после сложения всех уравнений системы)

$$\frac{d}{dt} \left(\sum_{i=1}^n Z_i \right) = k_n Z_n,$$

т.е. общая скорость прироста массы системы (исходная ДНК + интермедиаты) пропорциональна константе скорости репликации цепи и концентрации вещества Z_n .

Теория дифференциальных уравнений дает решение задачи Коши в виде

$$Z_i(t) = \sum_{j=1}^n \alpha_j e^{\lambda_j t}, i, j = 1, \dots, n, \text{ где } \lambda_j \text{ — собственные числа матрицы Якоби } K \text{ системы (1), а } \alpha_{ij} \text{ — разложение вектора начальных условий (3) по собственным векторам матрицы } K:$$

$$K = \begin{pmatrix} -k_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 2k_n \\ k_1 & -k_2 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_2 & -k_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & k_{n-1} & -k_n \end{pmatrix}.$$

Собственные числа λ_j матрицы K выводятся из уравнения $|K - \lambda E| = 0$ (E — единичная матрица).

ОБЩЕЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Рассмотрим общую проблему для произвольного числа стадий n . Из предыдущих результатов

можно предположить, что собственные числа должны удовлетворять уравнению

$$\prod_{i=1}^n (k_i + \lambda) = 2 \prod_{i=1}^n (k_i). \quad (4)$$

Для доказательства гипотезы используем формулу вычисления “ленточного” определителя, где ненулевыми являются только элементы главной диагонали и расположенные под ними элементы:

$$\begin{vmatrix} a_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ b_1 & a_2 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & b_2 & a_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & b_{n-1} & a_n \end{vmatrix} = \prod_{i=1}^n (a_i).$$

Лемму легко доказать индукцией по числу n строк (столбцов) матрицы. Для $n = 1$ (базис индукции) утверждение тривиально:

$$|a_1| = a_1 = \prod_{i=1}^1 (a_i).$$

Положим его справедливым для $n = l - 1$ и для $n = l$ получим (индукционный переход):

$$\begin{vmatrix} a_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ b_1 & a_2 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & b_2 & a_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & b_{l-1} & a_l \end{vmatrix} = a_1 \begin{vmatrix} a_2 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ b_2 & a_3 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & b_3 & a_4 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & b_{l-1} & a_l \end{vmatrix} = a_1 \prod_{i=2}^l (a_i) = \prod_{i=1}^l (a_i).$$

Итак, лемма верна для $n = 1$ и из справедливости ее для $n = l - 1$ следует справедливость и для $n = l$. Значит, лемма верна для любого натурального n . В свою очередь, это дает

$$\begin{vmatrix} a_1 & b_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & a_2 & b_2 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & a_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & a_n \end{vmatrix} = \prod_{i=1}^n (a_i).$$

Разумеется,

$$\begin{vmatrix} a_1 & b_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & a_2 & b_2 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & a_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & a_n \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} a_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ b_1 & a_2 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & b_2 & a_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & b_{n-1} & a_n \end{vmatrix}^T.$$

Определитель при транспонировании матрицы не меняется, так что в уравнении, приведенном выше, определители слева и справа равны. Однако последний детерминант равен произведению диагональных элементов согласно лемме.

Чтобы решить систему (1), составим характеристическое уравнение и найдем собственные числа λ_i :

$$\begin{aligned}
 0 &= |K - \lambda E| = \\
 &= \begin{vmatrix} -k_1 - \lambda & 0 & 0 & \dots & 0 & 2k_n \\ k_1 & -k_2 - \lambda & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_2 & -k_3 - \lambda & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & k_{n-1} & k_n - \lambda \end{vmatrix} = \\
 &= (-1)^{n-1} 2k_n \begin{vmatrix} k_1 & -k_2 - \lambda & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_2 & -k_3 - \lambda & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_3 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & k_{n-1} \end{vmatrix} = \\
 &= (-1)^{n-1} \begin{vmatrix} -k_2 - \lambda & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ k_2 & -k_3 - \lambda & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 - \lambda & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & k_{n-1} & -k_n - \lambda \end{vmatrix} = \\
 &= (-1)^{n-1} \left(2k_1 \prod_{i=2}^n (k_i) - (k_1 + \lambda) \prod_{i=2}^n (k_i + \lambda) \right) = \\
 &= (-1)^{n-1} \left(2 \prod_{i=1}^n (k_i) - \prod_{i=1}^n (k_i + \lambda) \right),
 \end{aligned}$$

так что (4) есть окончательная форма характеристического уравнения. В частном случае, когда все константы имеют одинаковые значения $k_i = k$, $i = 1, \dots, n$ (что близко к истине для последовательных стадий роста последовательности нуклеиновых кислот, см., например, [11, 12]), (4) превращается в $(k + \lambda)^n = 2k^n$, откуда

$$\lambda = (\sqrt[n]{2} - 1)k. \quad (5)$$

Формула (5) дает n комплексных корней, распределенных по вершинам правильного n -угольника, вписанного в круг с центром в точке $(-k; 0)$ радиуса $k \sqrt[n]{2}$. Одна из вершин лежит на действительной оси в ее положительной части, поскольку неравенство $\sqrt[n]{2} > 1$ верно для всякого натурального n . Следовательно, решение системы (1) неустойчиво (есть как минимум одно решение с положительной действительной частью). Разумеется, это почти очевидно, т.к. реакция приводит к увеличению числа частиц Z_1 .

Для многостадийных реакций с удвоением частиц исходного субстрата, в частности, для удвоения нуклеиновых кислот, интересно асимптотическое поведение действительной части решения (5) при больших значениях n . В этих случаях в расчете характерного времени полной реакции арифметический корень n -й степени из двух умножается на константу скорости элементарной реакции $\lambda = 1/\tau$, где τ — характерное время элементарной стадии реакции. Расчеты показывают, что увеличение характерного времени на 1, 2 и 3 порядка (в сравнении со временем элементарной стадии) возникает, соответственно, для числа стадий $n = 7, 67$ и 661 . При больших значениях n ($1/n$ мало) можно использовать следующую формулу для оценки характерного времени реакции (время возрастания концентрации Z в e раз):

$$\tau = \frac{1}{k \left(e^{\frac{\ln 2}{n}} - 1 \right)} \sim \frac{1}{k \left(1 + \frac{\ln 2}{n} - 1 \right)} = \frac{n}{k \ln 2}. \quad (6)$$

Соответственно, время удвоения концентрации исходного $\tau_d = n/k$. О точности приближения по формуле (6) можно сказать, что она всегда приближает k с недостатком, а τ — с избытком. Расчет показывает, что уже для $n = 50$ относительная ошибка приближения k и τ по формуле (6) в сравнении с точной формулой (5) составляет менее 1%. Таким образом, употребляемая в реальных ПЦР-протоколах [13, 14] линейная формула для определения длительности стадии элонгации в зависимости от длины фрагмента математически вполне оправдана.

Для иллюстрации формулы (6) проведем по ней вычисления для реальных геномов, чьи размеры известны или типичны для определенных видов организмов. При этом полагается, что реплицируемые геномы представляют собой одну цепь, репликация начинается с одного репликационного центра, и средняя скорость работы ДНК-полимеразы составляет 60 нуклеотидов в секунду (т.е. $k \approx 100 \text{ с}^{-1}$). Результаты приведены в табл. 1

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭЛОНГАЦИИ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ ДНК

При исследовании кинетики элонгации длинноцепочечных ДНК особый интерес представляет чувствительность решений (кинетических кривых) к малым изменениям начальных условий, т.е. устойчивость решения по Ляпунову. Комплексные собственные числа (5) включают мнимую $\text{Im}(\lambda)$ и действительную $\text{Re}(\lambda)$ части, соответствующие осциллирующей части решения (мнимая часть) и росту (положительная действительная часть) или, напротив, уменьшению (отрицательная действительная часть) амплитуды этих осцилляций. Определим условия, при которых возможно неустойчивое поведение решения с

Таблица 1. Характерные времена удвоения ДНК для некоторых вирусов и прокариот

Виды	Размер генома, bp	Время удвоения, с	Комментарий
<i>Circovirus</i>	1.8×10^3	18	Минимальный вирусный геном [15]
Типичный вирус	10^4	100	1 мин 40 с
<i>SARS-CoV-2</i>	3×10^4	300	5 мин [4]
<i>Hodgkinia cicadicola</i>	1.44×10^5	1440	Минимальный геном прокариот, 24 мин [16]
<i>Mimivirus</i>	1.2×10^6	12000	Максимальный вирусный геном, 3 ч 20 мин [17]
Типичная бактерия	2×10^6	20000	5.5 ч
<i>Sorangium cellulosum</i>	1.3×10^7	130000	Максимальный геном прокариот, 36 ч [18]

ростом амплитуды осцилляций, т. е. возникают собственные числа с положительной действительной частью. На комплексной плоскости (рис. 1) условие $\text{Re}(\lambda) > 0$ отвечает положительной абсциссе точки B . $\angle BAC$ есть угол правильного n -угольника, т. е. его величина равна $2\pi/n$. Для прямоугольного $\triangle ABC$ найдем катет AC :

$$AC = AB \cos\left(\frac{2\pi}{n}\right) = \sqrt[n]{2} \cos\left(\frac{2\pi}{n}\right),$$

откуда $\text{Re}(\lambda) = AC - 1 > 0$ если и только если

$$\sqrt[n]{2} \cos\left(\frac{2\pi}{n}\right) > 1. \tag{7}$$

В этом случае в силу симметрии рисунка относительно оси абсцисс имеем на комплексной

плоскости одну или несколько пар сопряженных комплексных собственных чисел с положительной действительной частью. Если таких пар больше одной (скажем, m), то пара с минимальным $\text{Re}(\lambda)$ соответствует $\angle BAC = 2\pi m/n$, а условие (7) дает

$$\sqrt[n]{2} \cos\left(\frac{2\pi m}{n}\right) > 1. \tag{8}$$

Предельным случаем (8) является равенство

$$\sqrt[n]{2} \cos\left(\frac{2\pi m}{n}\right) = 1,$$

$$m(n) = \frac{n}{2\pi} \arccos\left(\frac{1}{\sqrt[n]{2}}\right).$$

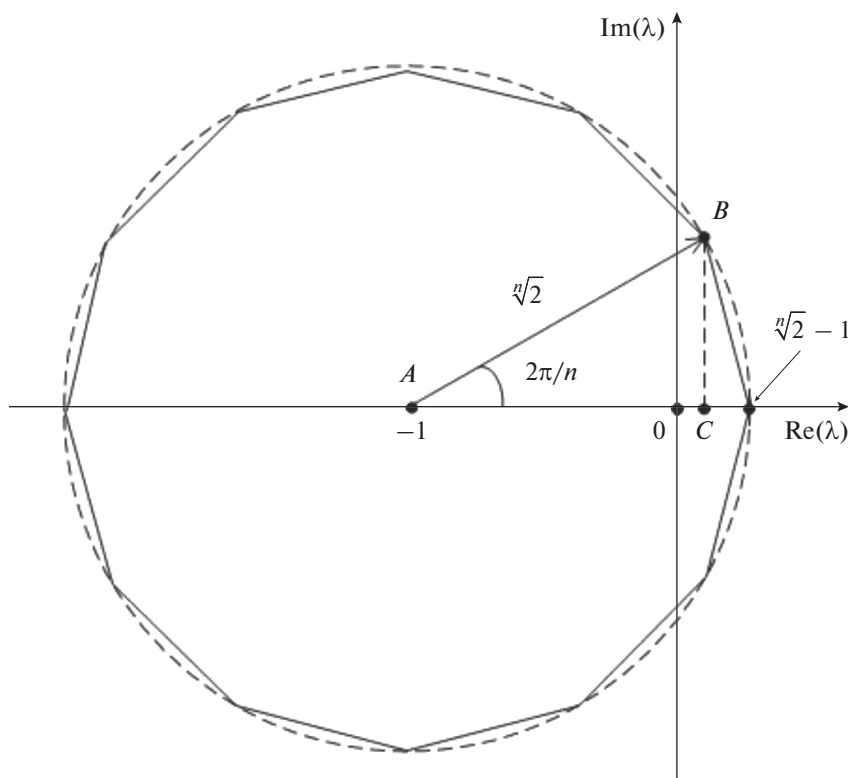


Рис. 1. Расположение собственных чисел на комплексной плоскости.

Таблица 2. Табуляция зависимости $m(n)$ для длины n фрагмента ДНК от 10 bp до 10 kbp

n	m	τ_0	Отношение амплитуд		Отношение периодов (τ/τ_0)	
			минимальное	максимальное	минимальное	максимальное
29	1	41	0.01011	0.01011	0.10987	0.10987
115	2	165	0.00747	0.75168	0.05510	0.11004
257	3	370	0.00183	0.88905	0.03676	0.11018
456	4	657	0.00028	0.93750	0.02757	0.11024
713	5	1028	0.00116	0.96004	0.02206	0.11027
1026	6	1480	0.00056	0.97223	0.01838	0.11028
1396	7	2014	0.00026	0.97960	0.01576	0.11029
1823	8	2630	0.00011	0.98438	0.01379	0.11030
2307	9	3328	0.00003	0.98765	0.01226	0.11030
2848	10	4108	0.00000	0.99000	0.01103	0.11030
3447	11	4972	0.00028	0.99174	0.01003	0.11031
4102	12	5917	0.00024	0.99306	0.00919	0.11031
4813	13	6943	0.00001	0.99408	0.00849	0.11031
5582	14	8053	0.00003	0.99490	0.00788	0.11031
6408	15	9244	0.00005	0.99556	0.00735	0.11031
7291	16	10518	0.00007	0.99609	0.00689	0.11031
8231	17	11874	0.00009	0.99654	0.00649	0.11031
9227	18	13311	0.00000	0.99691	0.00613	0.11031

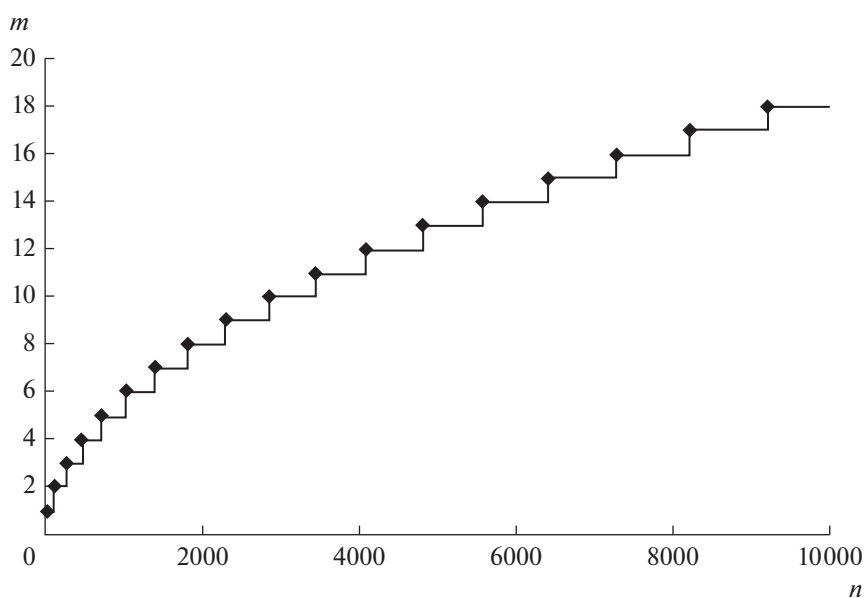
Примечание. Полужирным шрифтом выделены отношения амплитуд и периодов при наиболее типичных длинах реплицируемого фрагмента (300–3000 нуклеотидов).

Полагая, что m целое и функция $\text{floor}(x)$ дает наибольшее целое, не превышающее своего аргумента x , получим в итоге зависимость m от n в виде:

$$m(n) = \text{floor}\left(\frac{n}{2\pi} \arccos\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\right)\right). \quad (9)$$

Итоги численного расчета по зависимости (9) приведены в табл. 2 и на графике рис. 2.

Как видно из таблицы, при наиболее типичных длинах реплицируемого фрагмента (300–3000 нуклеотидов) имеется от 4 до 10 пар компонентов решения, проявляющих неустойчивое поведение.

**Рис. 2.** Зависимость $m(n)$ для длины фрагмента от 10 bp до 10 kbp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный в работе математически строгий вывод зависимости длительности стадии элонгации от длины нуклеотидной цепи ранее публиковался только в виде результата в [19]. Полное доказательство справедливости линейного приближения (6), по-видимому, впервые приводится в настоящей статье. Как видно из расчетов по приближенной формуле, она способна давать адекватные оценки времени удвоения нуклеотидной цепи. Если учесть, что удвоение генома — необходимый акт клеточного деления или размножения вируса, то эти оценки можно положить в основу расчетов скорости развития инфекционных процессов, принимая, однако, во внимание, что время репликации генома лишь грубо оценивает минимальное время, потребное на размножение вируса или бактерии.

Обнаруженные кинетические особенности процесса элонгации, проявляющиеся в наличии неустойчивых осциллирующих компонент, могут быть экспериментально обнаружены, в том числе в обычных ПЦР-исследованиях при типичных значениях длины фрагмента. Для экспериментального обнаружения осцилляций необходимо останавливать процесс элонгации несколько раньше или, напротив, чуть позже расчетного времени. В этом случае осциллирующие компоненты решения проявят себя в виде значительных колебаний концентрации конечного продукта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mullis K.B., Smith M. The Polymerase Chain Reaction / Stockholm: Nobel media AB. Nobel Lecture. December 8, 1993. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. V. 230. P. 1350.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. V. 239. № 4839. P. 487.
- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3>.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR Analysis. Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions // *Biotechnology*. 1993. № 11. P. 1025.
- Goidin D., Mamessier A., Staquet M.J., Schmitt D., Berthier-Vergnes O. Ribosomal ¹⁸S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations // *Analyt. Biochem.* 2001. V. 295. № 1. P. 17.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402.
- Gevertz J.L., Dunn S.M., Roth Ch.M. Mathematical Model of Real-Time PCR Kinetics // *Biotechnol. Bioengineering*. 2005. V. 92. № 3. P. 346.
- Cheng S., Fockler C., Barnes W.M., Higuchi R. Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. V. 91. № 12. P. 5695.
- Sharkey D.J., Scalice E.R., Christy K.G., Atwood S.M., Daiss J.L. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction // *Biotechnology*. 1994. V. 12. № 5. P. 506.
- Flory P.J. Principles of Polymer Chemistry. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1953. 688 p.
- Constales D., Yablonsky G.S., Xi Y., Marin G.B. Egalitarian Kinetic Models: Concepts and Results // *Energies*. 2021. V. 14. P. 7230.
- A Basic Polymerase Chain Reaction Protocol. Integrated DNA Technologies. https://demo.topologic.in/demo_tulasi_live/uploaded_files/pear/act_ZID-FgwrWpkJB4RRcgmFD.pdf
- PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273). New England Biolabs, Inc. <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273>
- Chen F., Pan Y., Liao Ch., Zhou Q., Zhang X., Song Y., Bi Y. Complete Genome Sequence of Porcine Circovirus 2d Strain GDYX // *J. Virol.* 2012. V. 22. № 86. P. 12457.
- McCutcheon J.P., McDonald B.R., Moran N.A. Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont // *PLoS Genetics*. 2009. V. 5. № 7. P. 1.
- Xiao Ch., Rossmann M.G. Structures of giant icosahedral eukaryotic dsDNA viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2011. V. 1. № 2. P. 101.
- Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M.O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E., Bode H.B., Bolten C.J., Choudhuri J.V., Doss S., Elnakady Y.A. et al. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 11. P. 1281.
- Быков В.И., Луковенков А.В., Варфоломеев С.Д. Кинетика элонгации ДНК. // Докл. АН. 2017. Т. 474. № 3. С. 370.

Kinetic Peculiarities of Nucleic Acid Elongation as a Multistage Consequent Enzymatic Reaction

A. V. Lukovenkov^{1, *}, V. I. Bykov^{1, 2}, and S. D. Varfolomeev^{1, 2, 3}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina str., 4, Moscow, 119334 Russia

² Lomonosov Moscow State University, Institute of Physicochemical Foundations of the Functioning of Neural Network and Artificial Intelligence, Lomonosovsky avenue, 27/1, of. E801-E804, A818, Moscow, 119192 Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, Kolmogorova str., 1, building 11b, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: luks.mipt@gmail.com

The article investigates kinetics of nucleic acid elongation as a multistage consequent reaction curling up to cycle. There is represented a mathematically precise proof of empiric formulae used to estimate elongation time depending on nucleotide chain length. There are given some estimations of characteristic elongation time for typical chain lengths, for example for new coronavirus (SARS-nCoV-2). There is also investigated stability of elongation kinetics and at typical chain lengths is shown an existence of instable oscillating solution component in addition to main exponential component.

Keywords: nucleic acid elongation, polymerase chain reaction, kinetics of consequent reactions, multistage reactions, stability in chemical kinetics