

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Damir Vurnek

**Manning kondenzacija na DNK fragmentima sa
monovalentnim i divalentnim protuionima**

Diplomski rad

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

SMJER: DIPL. INŽ. FIZIKE

Damir Vurnek

Diplomski rad

**Manning kondenzacija na DNK fragmentima sa
monovalentnim i divalentnim protuionima**

Voditelj diplomskog rada: Dr. sc. Tomislav Vuletić

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Zagreb, 2012.

Hvala vam mama i tata.

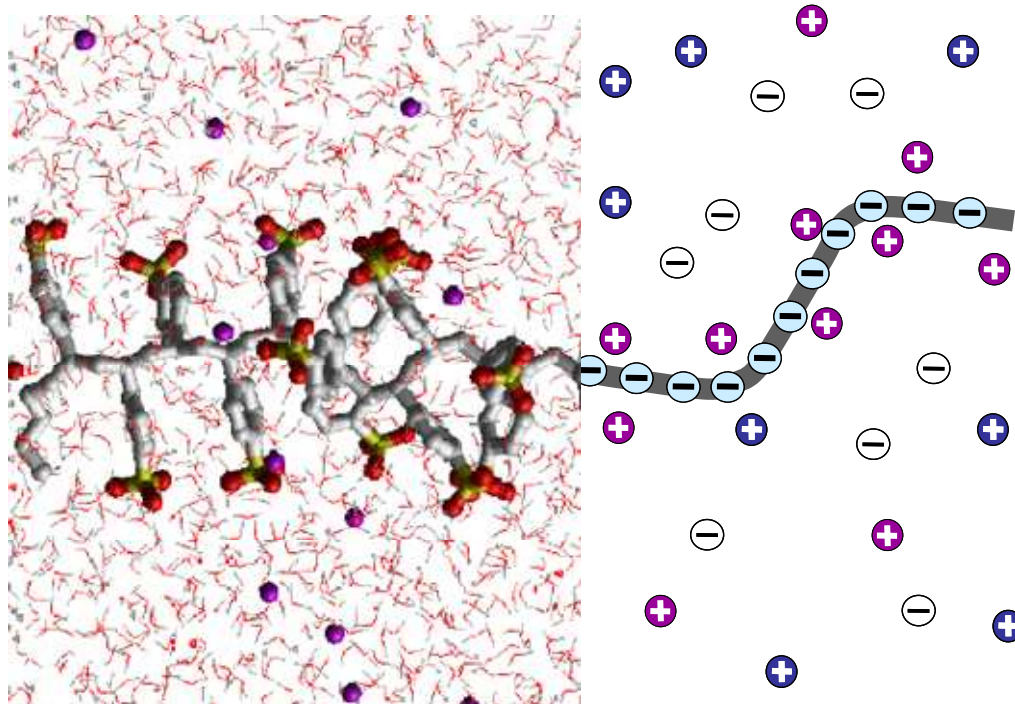
Sadržaj

1. Uvod u polielektrolite	4
2. Karakteristične duljine u otopinama polielektrolita.....	5
2.1. Duljina konture (L_c) i veličina lanca (R)	5
2.2. Duljina ustrajnosti (L_p)	5
2.3. Koncentracija preklapanja (c^*).....	6
3. Raspodjela naboja i električni transport u otopini	9
3.1. Bjerrumova duljina (l_B).....	9
3.2. Manning – Oosawa kondenzacija i model linearnog polielektrolita	9
3.3. Vodljivost polielektrolitnih otopina.....	12
3.4. Ekvivalentna vodljivost poliiona (λ_p).....	14
3.5. Difuzijski koeficijent poliiona (D_p)	14
4. Materijali i metode.....	16
4.1. Monodisperznost uzoraka DNK	16
4.2. Dijaliza i priprava otopina DNK.....	16
4.3. UV - spektrofotometrija.....	17
4.4. Konduktometrija	17
5. Rezultati	19
5.1. Mjerenja vodljivosti vodenih otopina Na-DNK i Mg-DNK.....	19
5.2. Mjerenja vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK u 1mM solima	19
5.3. Usporedba ekvivalentnih vodljivosti vodenih i slanih otopina DNK.....	20
6. Diskusija	22
6.1. Difuzijski koeficijent poliiona	22
6.2. Račun slobodnih protuiona za slane otopine DNK.....	22
6.3. Račun slobodnih protuiona u vodenim otopinama Na-DNK.....	24
7. Zaključak	27
8. Dodatak.....	28
9. Popis literature	30

1. Uvod u polielektrolite

Mnoge makromolekule, polimeri od biološkog značenja (deoksiribonukleinska kiselina - DNK, proteini, polisaharidi), su polielektroliti. Razumijevanje ponašanja takvih molekula u otopini (u stanici) ključ je i za razumijevanje ponašanja živog organizma. Polielektrolit je otopina u kojoj je polimer otopljen u polarnom otapalu tako da disocira na jako nabijeni polion (ion velike valencije) i mnogo protuiona malih valencija [1],[2],[3]. Otopina kuhinjske soli u vodi je primjer jednostavnog elektrolita sa homogenom raspodjelom iona u otopini. Kako je polion snažno nabijen kod otapanja polielektrolita postoji kompeticija između dugodosežnih elektrostatskih sila i entropije koja pokušava homogenizirati sistem. Protuioni u otopini neće biti homogeno raspoređeni oko poliona pa raspodjela pozitivnih i negativnih naboja u otopini neće biti jednolika. Takva otopina može poprimiti puno različitiije fizikalne konfiguracije nego što je konfiguracija otopine kuhinjske soli.

 poliion  protuion  dodana sol



Slika 1.1 Model polielektrolita u otopini sa dodanom soli.

2. Karakteristične duljine u otopinama polielektrolita

Razmatranje otopina polielektrolita izvodi se identifikacijom raznih skala duljine kojima opisujemo te sustave. Takvim skalama može se opisati konformacija poliiona i raspodjela protuiona. Interakcije koje moramo uzeti u obzir u polielektrolitnim otopinama su elektrostatske interakcije uzduž naboja poliiona, interakcije sa okolnim poliionima i interakcije sa protuionima u otopini. Odnosi doprinosa tih interakcija imaju odlučujuću ulogu u tome kakvu će konformaciju u otopini poliioni zauzimati, a uz konformaciju je usko vezana i njihova funkcija.

2.1. Duljina konture (L_c) i veličina lanca (R)

Maksimalnu duljinu rastegnutog lanca polimera označavamo sa L_c i zovemo *duljinom konture lanca* (eng. *contour length*):

$$L_c = N \cdot a \quad 2.1$$

N je ovdje stupanj polimerizacije (broj segmenata na lancu), dok je a veličina jednog segmenta lanca (monomera).

Općenito veličina poliiona u otopini ne zauzima dimenziju koja je na jednostavan način određena samo veličinom naslaganih monomera. Karakteristična duljina koja opisuje poliione u otopinama – R (Slika 2.1a) – uglavnom je manja od ukupne duljine njihove konture. Takva veličina naziva se *veličinom lanca*.

2.2. Duljina ustrajnosti (L_p)

Kako bismo razumjeli i opisali lance polimera i polielektrolita koristi se veličina koja opisuje koliko je molekula u otopini podložna savijanju. Ta se karakteristična duljina zove *duljina ustrajnosti* (eng. *persistence length*, L_p). Uz pomoć takve veličine možemo razlikovati lance polimera kao krute i savitljive. Krutost polimera davat će nam naznake o konformaciji koju on zauzima. Konformacija u otopini ovisi o dva faktora. O građi molekule i o okolini u koju smo tu molekulu stavili.

Duljina ustrajnosti molekule mora biti ovisna o građi same molekule, jer različite kemijske veze imaju različitu krutost. Strukturni doprinos duljini ustrajnosti označavamo sa L_o .

No, postoji i elektrostatski doprinos duljini ustrajnosti – koji dolazi od interakcija naboja na poliionu sa nabojem u okolini, njega označavamo sa L_e .

Ukupna duljina ustrajnosti je:

$$L_p = L_o + L_e \quad 2.2$$

Elektrostatski doprinos posljedica je međusobnog odbijanja naboja na poliiionu, što ukrućuje poliiion. Taj doprinos obrnuto je proporcionalan ionskoj jakosti otopine:

$$L_e \propto I^{-1} \quad 2.3$$

Obrnuta proporcionalnost je posljedica pojave zasjenjenja naboja na poliiionu ionima dodane soli. Ioni dodane soli raspodijele se oko poliiiona na takav način da efektivno smanje naboj na monomerima. Tada se monomeri slabije odbijaju i poliiionu se smanjuje krutost. Kako pada elektrostatski doprinos (L_e) ukupna duljina ustrajnosti (L_p) pada i približava se strukturnoj vrijednosti (L_o).

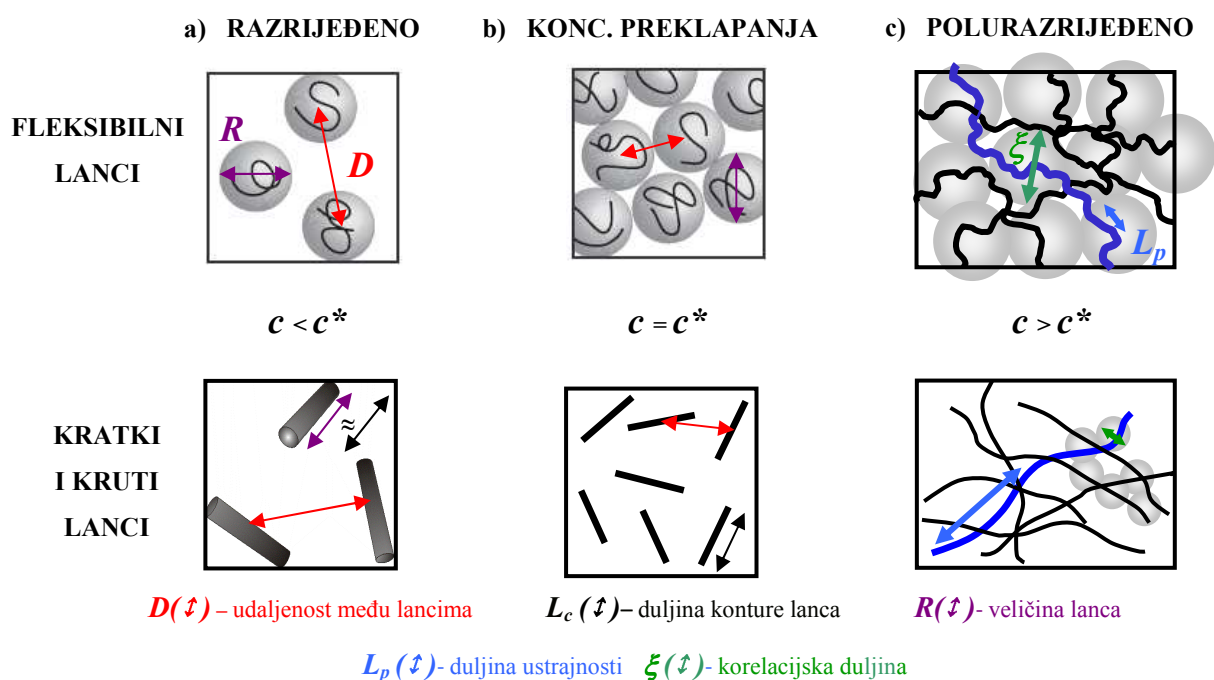
Potrebno je spomenuti dvije karakteristične granice koje susrećemo u razmatranju polimera u otopini ovisno o ukupnoj duljini konture (L_c).

- 1) za $L_c \gg L_p$ lanac polimera na dijelovima dužim od duljine ustrajnosti ima nasumičan raspored u prostoru tj. dijelovi lanca koji su međusobno udaljeni više od karakteristične duljine ustrajnosti nisu međusobno korelirani
- 2) za $L_c \ll L_p$ srednja duljina lanca (prosječna veličina lanca) jednaka je ukupnoj veličini konture, $R \approx L_c$, i polimer je ispravno promatrati kao krutu, štapičastu tvorevinu

2.3. Koncentracija preklapanja (c^*)

U ovisnosti o koncentraciji otopine polielektrolita možemo podijeliti na razrijeđene i polurazrijeđene. *Razrijeđene otopine* polielektrolita podrazumijevaju velike udaljenosti između poliiiona. Pri tome je *prosječna udaljenost između lanaca* (D) veća od *srednje duljine* (R) koju u otopini zauzima pojedini poliiion (Slika 2.1a).

U gušćim otopinama dolazi do preklapanja poliiiona. Koncentracija otopine na kojoj dolazi do preklapanja polielektrolitskih lanaca se zove *koncentracija preklapanja*, c^* (Slika 2.1b) [12],[13]. Vrijednost c^* definira se kao ona koncentracija pri kojoj polimeri ispunjavaju cijeli volumen otopine, ali svaki od lanaca još uvijek leži u svojem djeliću volumena V bez preklapanja sa drugim lancima (Slika 2.1b). Pri toj koncentraciji srednja duljina jednog lanca podudara se sa međusobnom udaljenosti lanaca ($D = R$). Daljnjim povećavanjem koncentracije lanci u otopini se počinju preklapati (Slika 2.1c). Otopine čije su koncentracije veće od koncentracije preklapanja nazivaju se *polurazrijeđenim otopinama*. Takve otopine opisuje *korelacijska duljina*, (ξ) duljina izvan koje pojedini segmenti lanca nisu više u korelaciji.



Slika 2.1 Shematski prikaz polielektrolitskih lanaca u razrijeđenoj/polurazrijeđenoj otopini, ovisno o koncentraciji polielektrolita.

Za većinu polielektrolita srednja duljina lanca ne podudara se sa njihovom duljinom konture. Kako mi radimo sa fragmentima DNK koji su kratki i kruti njihova srednja duljina jednaka je duljini konture lanca, $R = L_c$ (Slika 2.1a, drugi red). Uzrok tome je činjenica da su naši uzorci DNK toliko kratki da je njihova duljina konture usporediva sa strukturnom duljinom ustrajnosti, $L_c \approx L_o$. Takvi DNA fragmenti u otopini zauzimaju štapičasti oblik neovisno o elektrostatskim interakcijama kojima mogu biti izloženi, tj. neovisno o doprinosu L_e ukupnoj duljini ustrajnosti (L_p). Njihov se oblik ne mijenja pri povećanju/smanjenju koncentracije polielektrolita. Volumen koji takav uzorak DNK zauzima u otopini skalira zbog toga uvijek sa trećom potencijom duljine konture:

$$V \approx L_c^3 = (N \cdot a)^3 \quad 2.4$$

Na koncentraciji preklapanja (c^*) cijeli je volumen otopine ispunjen lancima. Kako jedan lanac zauzima volumen V , ako izračunamo koncentraciju unutar tog volumena istovremeno smo izračunali i koncentraciju cijele otopine. Unutar volumena V nalazi se masa jednog polimera. Tj:

$$c^* \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_{\text{jednog polimera}}}{V_{\text{koji pol. zauzima}}} \approx \frac{N \cdot m_{\text{mon}}}{L_c^3} = \frac{N \cdot m_{\text{mon}}}{(N \cdot a)^3} = \frac{m_{\text{mon}}}{N^2 a^3} = \frac{M_{r(\text{mon})}}{N_A \cdot N^2 a^3} \quad 2.5$$

gdje je N broj monomera u lancu, a je duljina monomera u metrima dok je molarna masa monomera $M_{r(mon)}$ u jedinicama kg/mol . Ako uzmemo N od 146 parova baza dsDNK ima vrijednost koncentracije preklapanja $c^* \sim 2$ g/L. Za ssDNK ta vrijednost je $c^* \sim 0.3$ g/L (vrijednosti korištene u računu – Tabela 8.1).

3. Raspodjela naboja i električni transport u otopini

U otopinama polielektrolita ioni koji nastaju disocijacijom odgovorni su za istosmjernu električnu vodljivost. Mjera koju uvodimo da bi karakterizirali disocijaciju polielektrolita zove se Bjerrumova duljina.

3.1. Bjerrumova duljina (l_B)

Protuione smatramo disociranim kada je energija elektrostatskog privlačenja između poliiiona i protuiona usporediva sa toplinskom energijom.

$$kT = \frac{z_i Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot l} \quad 3.1$$

l je ovdje udaljenost između protuiona i poliiiona koji imaju pripadne valencije z_i i Z_j .

Bjerrumova duljina, l_B , uvodi se kao mjera odnosa jakosti elektrostatskog međudjelovanja i toplinskih pobuđenja u nekom otapalu (dielektričnom mediju). l_B definiramo kao duljinu na kojoj dva elementarna naboja (dakle $z_i = Z_j = 1$) u otopini interagiraju istom energijom koju imaju i toplinska pobuđenja. Kada je udaljenost između iona veća od ove duljine za monovalentne ione smatramo da su otpušteni, disocirani, s kemijske skupine na kojoj su bili vezani.

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r kT} \quad 3.2$$

u vodi na temperaturi $T = 25^\circ\text{C}$ relativne permitivnosti $\epsilon = 78.65$ Bjerrumova duljina je $l_B = 0.72\text{nm}$.

3.2. Manning – Oosawa kondenzacija i model linearnog polielektrolita

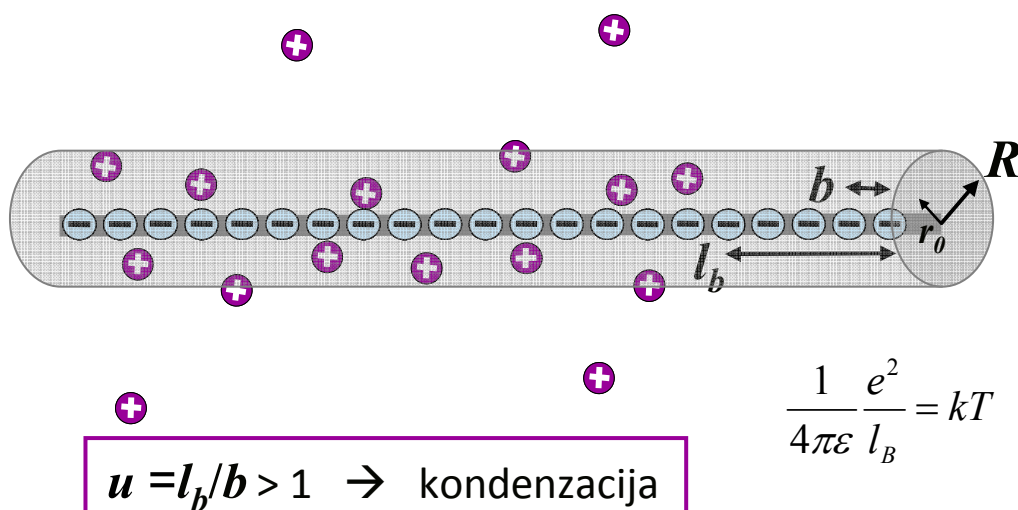
Kod otapanja polielektrolita javlja se elektrostatsko privlačenje između poliiionskih lanaca i protuiona koji su otpušteni u otopinu. Kod jako nabijenih polielektrolita privlačenje može biti dovoljno veliko da rezultira zadržavanjem dijela protuiona u blizini lanaca (Slika 3.1); iako takvi protuioni nisu više kemijski vezani na poliiion. Ti protuioni zaklanjaju naboje na poliiionu, tj. efektivna linearna gustoća naboja poliiiona je tada smanjena. Ovu pojavu su teorijski objasnili Manning i, neovisno, Oosawa. (Prvi su kondenzaciju kao pojam uveli Imai i Onishi [4].)

U pojednostavljenom modelu polielektrolitske otopine pretpostavljamo da je otapalo homogeno, relativne permitivnosti ϵ_r , te da postoji jednolika raspodjela točkastih naboja. Tijelo polionskog lanca nosi kontinuiranu linearnu gustoću naboja:

$$\lambda = \frac{e}{b} \quad 3.3$$

gdje je b prosječna udaljenost između susjednih elementarnih naboja tijela poliona kad se izuzmu svi protuioni. (Npr. linearna gustoća naboja dsDNK iznosi $\lambda = 2e/0.34 \text{ nm}$ – dvije jednovalentne fosfatne skupine po baznom paru duljine 0.34 nm – iz čega proizlazi da je prosječna udaljenost između dva susjedna elementarna naboja dsDNK $b = 0.17 \text{ nm}$.) Polion u ovakvom jednostavnom modelu opisujemo cilindrom beskonačne duljine (Slika 3.1).

Manning - Oosawa kondenzacija protuiona



Slika 3.1 Model poliona sa linearnom raspodjelom naboja. Unutar polumjera R protuioni su kondenzirani i gibaju se u otopini zajedno sa polionom. Polumjer tijela poliona je r_0

Iz Gaussovog teorema dobivamo izraz za elektrostatski potencijal beskonačne linearne gustoće naboja e/b :

$$\varphi(r) = \frac{2e}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r b} \ln r \quad 3.4$$

U izrazu (3.4) r je udaljenost protuiona od lanca za koju vrijedi: $r_0 \leq r \leq R$. Tijelo poliona ima radijalnu dimenziju r_0 . Sporo opadanje elektrostatskog potencijala (s logaritamskom funkcijom) ukazuje na to da ioni osjećaju elektrostatski potencijal i na većim udaljenostima,

što dovodi do pojave kondenzacije iona. Pretpostavit ćemo da kondenzirani protuioni nose valenciju z_i , tj. naboj $z_i e$, i da se nalaze unutar udaljenosti R od tijela poliiona. Kako bismo razmotrili energiju sistema, izračunat ćemo particijsku funkciju.

$$\Omega = \int_{r_0}^R e^{-z_i e \varphi(r)/kT} 2\pi r dr \quad 3.5$$

Integriranjem kutnih koordinata, o kojima ne ovisi energija sistema, dobivamo faktor $2\pi r$. Uvrštavanjem (3.4) u (3.5) slijedi:

$$\Omega = \int_{r_0}^R r^{-2z_i e^2 / 4\pi\epsilon_0\epsilon_r b kT} 2\pi r dr = 2\pi \int_{r_0}^R r^{1-2z_i e^2 / 4\pi\epsilon_0\epsilon_r b kT} dr = 2\pi \int_{r_0}^R r^{1-2u} dr \quad 3.6$$

l_B je ovdje Bjerrumova duljina, a b prosječna udaljenost između susjednih elementarnih naboja na tijelu poliiona. Parametar u je Manning-Oosawa parametar gustoće naboja:

$$u = \frac{z_i e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r kT \cdot b} = \frac{z_i l_B}{b} \quad 3.7$$

Važno je primijetiti, kako particijska funkcija sistema nije fizikalna (negativna je) kada je eksponent integrala (u 3.6) manji od -1, dakle za parametar $u = z_i l_B / b > 1$. Za poliione kojima je linearna gustoća ionskih skupina takva da vrijedi $u > 1$, protuioni se u otopini zadržavaju (M-O kondenziraju) u blizini lanca i tako zaklanjaju, tj. efektivno neutraliziraju, dio nabijenih skupina na poliionu. U tom slučaju efektivna udaljenost (b_{ef}) nezaklonjenih jediničnih naboja duž poliiona u otopini poprima iznos $z_i l_B$ (vrijednost umnoška Bjerrum duljine i valencije protuiona). Ta je vrijednost (b_{ef}) veća od udaljenosti jediničnih naboja na golom tijelu poliiona (b) upravo za Manning-Oosawa faktor (u):

$$b_{ef} = z_i l_B = ub \quad 3.8$$

Dakle, proces M-O kondenzacije, ima kao posljedicu manju efektivnu linearnu gustoću naboja (λ_{ef}) poliiona u otopini, od one koja se nalazi na samom tijelu poliiona (λ):

$$\lambda_{ef} = \frac{e}{b_{ef}} = \frac{e}{ub} = \frac{1}{u} \cdot \lambda \quad 3.9$$

$1/u$ je ovdje faktor koji nam govori koliki je efektivni udio nezaklonjenih naboja ostao na poliionu. Jednaki takav udio imaju tada i naboji koji uz poliion nisu kondenzirani – slobodni protuioni u ostatku otopine. Udio slobodnih protuiona u otopini nazivamo θ i definiramo:

$$\theta = \frac{1}{u} \quad 3.10$$

Smatra se da je gibanje kondenziranih protuiona prostorno ograničeno duž polielektrolita dok se gibanje slobodnih protuiona ne mijenja pojavom kondenzacije (Slika 3.1). Kondenzacija je karakteristična za cilindrično simetrične sisteme, zbog njihove logaritamske ovisnosti elektrostatskog potencijala. Tabela 8.1 sadrži vrijednosti koje su nam potrebne da (uvrštavanjem u jedn. 3.7 i 3.10) spomenuti model primijenimo na DNK u konformaciji dvostruke uzvojnice:

$$u_{ds}(Na^+) = 4.2 \text{ tj. } \theta_{ds}(Na^+) = 0.24 \quad u_{ds}(Mg^{++}) = 8.4 \text{ tj. } \theta_{ds}(Mg^{++}) = 0.12 \quad 3.11$$

Taj model se isto tako može primijeniti i na molekule DNK u konformaciji jednog lanca:

$$u_{ss}(Na^+) = 1.7 \text{ tj. } \theta_{ss}(Na^+) = 0.60 \quad u_{ss}(Mg^{++}) = 3.4 \text{ tj. } \theta_{ss}(Mg^{++}) = 0.30 \quad 3.12$$

Vidi se da, iz relacije 3.10, dobivamo udio nekondenziranih **jednovalentnih** protuiona u dsDNK otopinama koji iznosi $\theta_{ds}(x^+) = 0.24$. To znači da su u prosjeku tri fosfatne skupine, od ukupno četiri, neutralizirane protuionima. Na takav način nastaje oko dvostruke uzvojnice kondenzirani sloj u kojem su (lokalno) koncentracije protuiona puno više nego što je koncentracija protuiona u ostatku otopine. Za ssDNK (i jednovalentne protuione) udio nekondenziranih protuiona iznosi $\theta_{ss}(x^+) = 0.6$, tj. 40% protuiona neutralizira DNK kad je u konformaciji jednog lanca.

Rezultati mjerenja raspršenja X-zraka pod malim kutovima (SAXS) na jednovalentnim solima DNK potvrđuju pojavu kondenzacije [10]. Pojava kondenzacije potvrđuje se i mjerenjima osmotskog tlaka u otopini [18].

Nedavno, protuionska kondenzacija proučavana je i mjerenjima vodljivosti otopina [24]. Mjerenjima vodljivosti otopina raznih koncentracija DNK s **jednovalentnim** protuionom Na^+ određivan je udio slobodnih protuiona. Dobiveni su iznosi $\theta_{ds}(Na^+) = 0.24$ za DNA u konformaciji dvostruke uzvojnice.

U ovom radu takav pristup provjeren je na otopinama DNA s **dvovalentnim** Mg^{++} protuionima. Prema Manning-Oosawinom modelu udio nekondenziranih dvovalentnih protuiona u DNK otopinama je $\theta_{ds}(x^{++}) = 0.12$ za konformaciju dvostruke uzvojnice i $\theta_{ss}(x^{++}) = 0.3$ za jednostruki lanac.

3.3. Vodljivost polielektrolitnih otopina

Općenito, specifična vodljivost otopine produkt je tri faktora koji karakteriziraju nosioce naboja: brojne koncentracije (n_i), naboja ($z_i e$), i električne pokretljivosti (μ_i). (Pokretljivost

je omjer brzine nosilaca i primijenjenog električnog polja). Nakon što sumiramo po svim tipovima nosilaca u sistemu

$$\sigma = \sum_i (|z_i|e)n_i\mu_i \quad 3.13$$

uz $n_i=c_iN_A$, $N_A=F/e$ i $\mu_i=\lambda_i/F$ (F je Faradayeva, a N_A je Avogadrova konstanta) specifična vodljivost se može zapisati kao suma ekvivalentnih vodljivosti nosilaca (λ_i) prisutnih u otopini pomnoženih sa njihovom valencijom (z_i) i koncentracijom (c_i):

$$\sigma = \sum_i |z_i|c_i\lambda_i \quad 3.14$$

Ako promatramo monodisperzni polielektrolit bez dodanih soli imamo samo dvije različite ionske vrste. Poliion, veliku molekulu relativno male koncentracije (C_p) i proporcionalno velikog naboja (Z_p) ekvivalentne vodljivosti (λ_p) i pripadne protuione u njegovoj okolini:

$$\sigma = Z_p C_p \lambda_p + z_i c_i \lambda_i \quad 3.15$$

konačna koncentracija protuiona (c_i) koji disociraju nakon otapanja polielektrolita proporcionalna je koncentraciji monomera (c) koji tvore poliion. Kako je koncentracija monomera $c = C_p \cdot N$, a valencija monomera $z = Z_p/N$, vrijedi:

$$z c = Z_p C_p = z_i c_i \quad 3.16$$

zaključujemo da vodljivost otopine ovisi o koncentraciji monomera i pripadnim ekvivalentnim vodljivostima poliiona i protuiona

$$\sigma = z c (\lambda_p + \lambda_i) \quad 3.17$$

Zbog kondenzacije protuiona na poliionu naboj poliiona je efektivno reduciran, $Z_p = \theta z N$. Smanjen je i udio slobodnih protuiona u otopini pa tako samo θc_i protuiona sudjeluje u električnom transportu. Zbog toga imamo:

$$\sigma = \theta z c (\lambda_p + \lambda_i) \quad 3.18$$

Mjerenjima specifične vodljivosti otopine (σ), poznate koncentracije (c) možemo pomoću relacije 3.18 odrediti i udio kondenziranih protuiona (θ). Vrijednosti ekvivalentnih vodljivosti protuiona su tabelirane. Ekvivalentna vodljivost poliiona je kompleksniji problem; λ_p ovisi o naboju poliiona i difuzijskom koeficijentu poliiona.

3.4. Ekvivalentna vodljivost poliiona (λ_p)

Pokretljivost mikroskopskih čestica (u našem slučaju protuiona i poliiona) vezana je uz makroskopsku pojavu difuzije. Pomoću Einstein-Smoluchowski jednadžbe:

$$\mu_p = Z_p \frac{e}{kT} D_p \quad 3.19$$

i relacije $\mu_p = \lambda_p / F$ (F – Faradayeva konst.) dobivamo relaciju koja povezuje ekvivalentnu vodljivost poliiona (λ_p) sa njegovim nabojem ($Z_p e$) i difuzijskim koeficijentom (D_p):

$$\lambda_p = Z_p \frac{Fe}{kT} D_p \quad 3.20$$

Naboj poliiona je zasjenjen u otopini tako da vrijedi $Z_p \rightarrow \theta Z_p$. Izlazi da ekvivalentna vodljivost poliiona ovisi o difuzijskom koeficijentu poliiona i udjelu kondenziranih protuiona.

$$\lambda_p = \theta Z_p \frac{Fe}{kT} D_p \quad 3.21$$

Uvrštavanjem (3.21) u relaciju (3.18) dobivamo:

$$\sigma = \theta z c \left(\theta Z_p \frac{Fe}{kT} D_p + \lambda_i \right) \quad 3.22$$

Ukupna vodljivost monodisperznog polielektrolita (bez dodane soli) je određena difuzijskim koeficijentom poliiona (D_p) i udjelom slobodnih protuiona (θ). Važno je primijetiti da je vodljivost različita za otopine sačinjene od različitih vrsta poliiona. Za dsDNK ukupni iznos naboja na poliionu je zN dok je za ssDNK iznos naboja na poliionu dvostruko manji:

$$Z_p(dsDNK) = zN \quad Z_p(ssDNK) = \frac{zN}{2} \quad 3.23$$

3.5. Difuzijski koeficijent poliiona (D_p)

Flexibilne nenabijene polimere u otopini, zbog nasumičnog rasporeda dijelova polimera koji su udaljeni za više od duljine ustrajnosti, možemo zamisliti kao kuglice čija je difuzija opisana Stokes-Einsteinovom jednadžbom:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta d} \quad 3.24$$

Iz izraza (3.24) možemo vidjeti da je konstanta difuzije (D) proporcionalna sa temperaturom (T), a obrnuto proporcionalna sa polumjerom kuglice (d) i viskoznošću fluida (η).

3.24 vrijedi za difuziju kuglica kroz fluid sa niskim Reynoldsovim brojem ($R_E < 0.1$). (Reynoldsov broj je definiran kao omjer inercijalne i viskozne sile u fluidu.):

$$R_E = \left(\frac{\rho v^2 d^2}{\eta v d} \right) = \frac{\rho v d}{\eta} \quad 3.25$$

U izrazu 3.25 ρ je gustoća fluida, a v srednja brzina kuglice. Za naš slučaj natrijevih i magnezijevih protuiona, koje promatramo kao kuglice, Reynoldsov broj je bitno manji od 0.1 pa i njihov difuzijski koeficijent možemo računati prema izrazu (3.24).

Za fragmente DNK duljine 20-100 parova baza hidrodinamičko ponašanje se podudara sa ponašanjem ravnih štapića, cilindara. U vodenim otopinama, zbog elektrostatskog odbijanja nabijenih grupa koje izravna lanac, to vrijedi i do nekoliko stotina parova baza [14]. Osnovni parametri koji opisuju hidrodinamiku takvog cilindra su duljina čestice (L_c) i njen promjer (d). Difuzijski koeficijent dan je tada izrazom 3.26. U tom izrazu ν je parametar korekcije koji opisuje utjecaj krajeva molekule tj. rubnu situaciju kada molekula postaje prekratka [14].

$$D_p = \frac{kT}{3\pi\eta} \frac{[\ln(L_c/d) + \nu]}{L_c} \quad 3.26$$

Kada ne bi bilo parametra ν , u situaciji kada je duljina konture jednaka promjeru, zbog logaritamske ovisnosti omjera duljine i promjera cilindra (L_c/d) difuzijski koeficijent bio bi jednak nuli. Takva situacija nije fizikalna te zbog toga uvodimo empirijski korekcijski parametar. Njegova je vrijednost $\nu = 0.312$.

4. Materijali i metode

Istraživanje smo provodili na natrijevim i magnezijevim solima deoksiribonukleinske kiseline; Na-DNK i Mg-DNK. Uzorci DNK korišteni u eksperimentu su monodisperzni i kratki (50nm tj. 146 parova baza). Na vodenim otopinama raznih koncentracija DNK rađena su mjerenja vodljivosti (konduktometrijska mjerenja). Za otapanje korištena je millipore voda vodljivosti $1\mu\text{S}/\text{cm}$. Na osnovnim otopinama dobivenim dijalizom – majkama otopinama – vršena su mjerenja apsorbcije svjetlosti prije razrjeđivanja. Nakon razrjeđivanja rađena su i kontrolna mjerenja apsorbcije. Mjerenja vodljivosti rađena su pomoću komore za dielektričnu spektroskopiju kućne izrade i analizatora impedancije Agilent 4294A. Mjerenja apsorbcija otopina rađena su UV-spektrofotometrom.

4.1. *Monodisperznost uzoraka DNK*

DNK je u stanici pakirana u kromosome namatanjem u vrlo komplicirane strukture bazirane na proteinima tzv. histonima. Osnovna proteinska struktura je nukleosom, proteinski cilindar (disk) na čijem obodu se nalaze dva namotaja DNK – dugačka upravo 146 parova baza. Enzimi razlažu samo slobodnu DNK na spojevima između susjednih nukleosoma. Genomski pripravci DNK teleće žlijezde timusa su enzimima razloženi na fragmente od 146 pb i na taj način osigurana je monodisperznost. Gel elektroforezom pokazano je kako je efektivna DNA veličina u uzorku 150 ± 20 parova baza te da ima tragova dinukleosomnih fragmenata veličine ~ 300 parova baza.

4.2. *Dijaliza i priprava otopina DNK*

Majke otopine pripravljene su otapanjem suhih DNK uzoraka u puferu (TrisHCl 10mM) i dijalizom u tri koraka. Da bi izbjegli dodatnu sol koja je mogla zaostati iz tehnološkog procesa (i da bi izbacili TrisHCl) pripravljene puferske otopine prvo su dijalizirane prema 200mM solima NaCl i MgCl_2 , a zatim u zadnja dva koraka prema 1mM solima i prema čistoj vodi. Korištena je millipore voda vodljivosti od $1\mu\text{S}/\text{cm}$. Majke otopine izdvojene su nakon predzadnjeg i zadnjeg koraka dijalize. Dobivene su 4 majke otopine: Na i Mg-DNK otopine u pripadnim 1mM solima te Na i Mg-DNK otopine u čistoj vodi. Iz majki otopina pripremljene su otopine u rasponu koncentracija DNK od 0.02 do 5.5 g/L (0.03 – 8.25 mM) razrjeđivanjem 1mM slanim otopinama NaCl i MgCl_2 ili čistom millipore vodom. Da bi minimizirali pogreške pipetiranja prilikom pripreve uzoraka različitih koncentracija svaki od

uzoraka DNK, i voda (ili slana 1mM otopina) kojom su majke otopine razrijeđivane, pojedinačno su vagani i sa tim podacima izračunata je nominalna koncentracija otopina.

4.3. UV - spektrofotometrija

Jedna od najčešćih metoda za otkrivanje nukleinskih kiselina je mjerenje apsorbancije otopine na 260 nm, zbog činjenice da nukleinske kiseline imaju apsorpcijski maksimum u UV dijelu spektra. Ova metoda je jednostavna i brza. Mjerenje apsorbancije se temelji na Beer-Lambertovom zakonu:

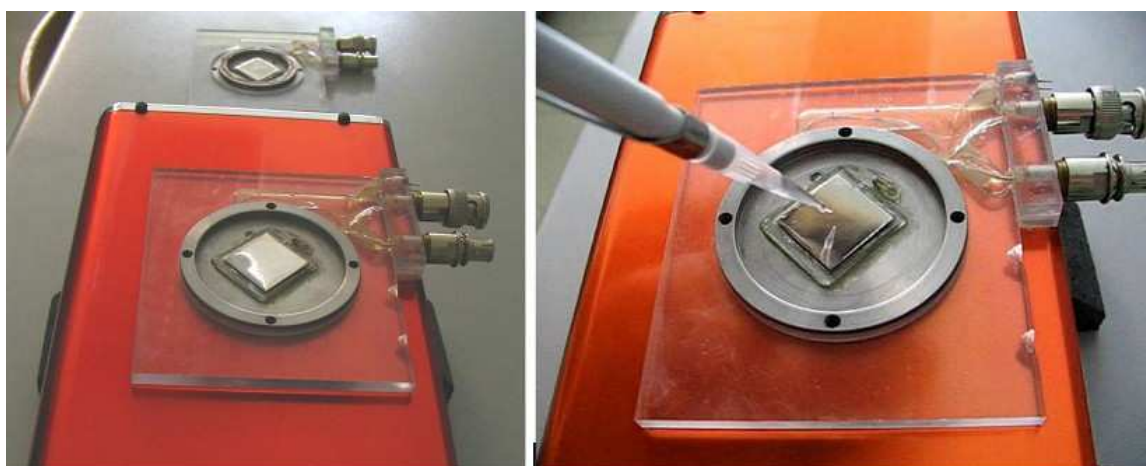
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad 4.1$$

U gornjem izrazu A je apsorbancija (bezdimezionalna optička gustoća) uzorka, c je masena koncentracija, l je optički put UV-zrake kroz uzorak, ε je ekstincijski koeficijent. ε je ovisan o vrsti mjerene tvari, npr. za dvostruku uzvojnica DNK je $\varepsilon = 20$ L/g·cm, dok je za jednostruki lanac DNK $\varepsilon = 28$ L/g·cm. Uobičajeno, otopina se nalazi u posudici (kiveti) koja je načinjena od kvarcnog stakla te zbog toga propušta UV svjetlost. U našem slučaju, mjerenja apsorbancije dvostruke uzvojnice DNK, koncentracije su podešene tako da apsorbancija (A) bude u rasponu od 0.1-1, jer je u tom koncentracijskom području ovisnost koncentracije o apsorbanciji linearna.

4.4. Konduktometrija

Konduktometrijska mjerenja su sastavni dio mjerenja niskofrekventnom dielektričnom spektroskopijom koja se izvodi pomoću kapacitivne komore kućne izrade priključene na precizni mjerač impedancije Agilent 4294A, kojim se mjeri u rasponu frekvencija od $\omega = 100$ Hz do 100 MHz. Volumen uzorka je 100 μ L. Kapacitivna komora (Slika 4.1) omogućava mjerenje kompleksne vodljivosti s reproducibilnošću od 0.5% [17], u mjerivom rasponu specifične vodljivosti od 1.5–2000 μ S/cm. Komora za dielektrična mjerenja se sastoji od dvodijelnog polikarbonatnog kućišta u koje je utisnuto čelično tijelo. Unutar čeličnog tijela na podlozi od stakla nalaze se platinske elektrode. Kad su obje polovice kućišta zatvorene, platinske elektrode formiraju kondenzator unutar kojeg se nalazi uzorak. Po obodu s unutarnje strane tijela nalazi se brtva čija je svrha smanjenje hlapljenja otopine. Unutar tijela nalazi se još i Pt-100 termometar. Koaksijalnim vodičem povezane su platinske elektrode s BNC konektorom. Vodičem je povezan i Pt-100 termometar s konektorom na kućištu. Male ac amplitude od 50 mV su korištene za istraživanje odgovora DNK u linearnom režimu nakon što smo se uvjerali da su rezultati podjednaki za ac pobudu u rasponu od 20–500 mV. Najniže ac amplitude su izbjegavane zbog prevelikog šuma što bi

imalo za posljedicu preveliko (nepraktično dugotrajno) usrednjavanje. Konstanta komore je $l/S = 0.1042 \pm 0.0008 \text{ cm}^{-1}$ gdje je $S = 0.98 \text{ cm}^2$ efektivna kontaktna površina elektrode koja odgovara uzorku volumena $100 \mu\text{L}$, $l = 0.1021 \pm 0.0001 \text{ cm}$ je udaljenost među elektrodama. Konstanta komore određena je mjerenjem realnog dijela vodljivosti G na 100 kHz standardnih uzorka KCl-a od 0.01M i 0.0005M (nabavljenih od tvrtke Mettler-Toledo). Dodatna provjera je bilo i mjerenje kapaciteta komore kada je prazna i kada sadrži kapljicu od $100 \mu\text{L}$ čiste vode. Iz razlike kapaciteta pune i prazne komore i poznate vrijednosti relativne permitivnosti čiste vode $\epsilon_w = 78.65$ dobiven je rezultat za konstantu komore koji odgovara gornjoj vrijednosti dobivenoj mjerenjem vodljivosti. Za širi raspon koncentracija otopina vodljivost je neovisna o utjecaju artefakata komore i dielektričnih modova uzorka oko frekvencije 100 kHz . Na toj frekvenciji su najmanji efekti polarizacije elektroda i rezonantne frekvencije mjernog postava, te smatramo da vodljivost izmjerena u tom području najbolje odgovara vodljivosti otopine.

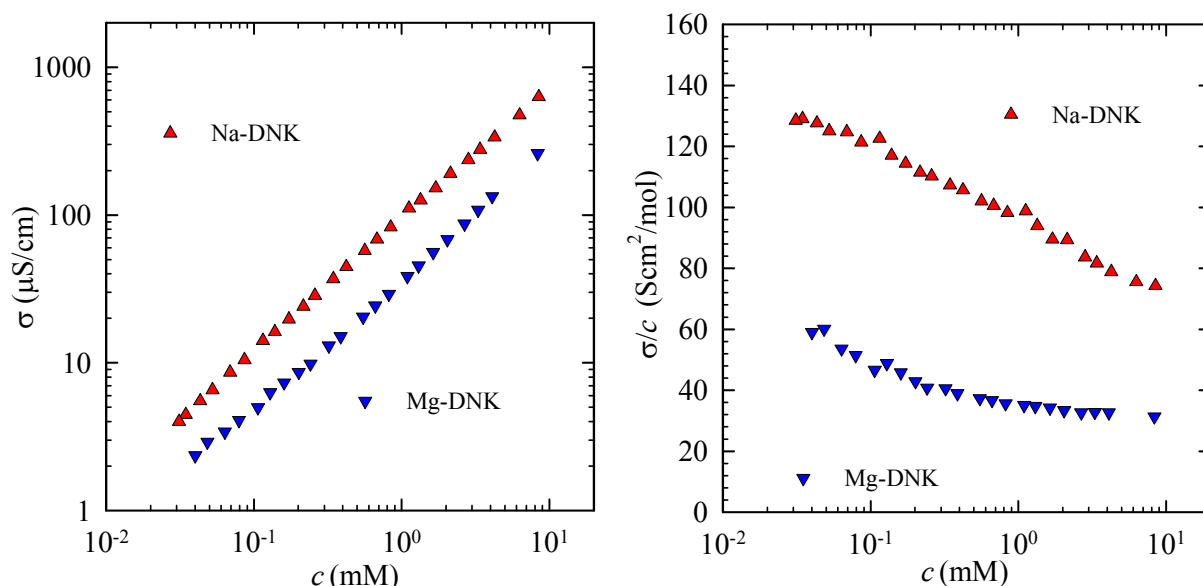


Slika 4.1 Komora za mjerenje vodljivosti uzoraka

5. Rezultati

5.1. Mjerenja vodljivosti vodenih otopina Na-DNK i Mg-DNK

Slika 5.1 prikazuje mjerenja otopina Na-DNK i Mg-DNK u vodi. Mjerenja su provedena preko tri dekade koncentracija monomera. Koncentracija monomera bila je od 0.03 do 8.25 mM (od 0.02 do 5.5 g/L). Vrijednosti specifične vodljivosti za Na-DNK kretale su se u rasponu 4.5 – 630 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Za Mg-DNK te su vrijednosti 2.3 – 250 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Vodljivosti otopina Na-DNK u prosjeku su 2.5 puta veće od vodljivosti mjerenih za Mg-DNK.



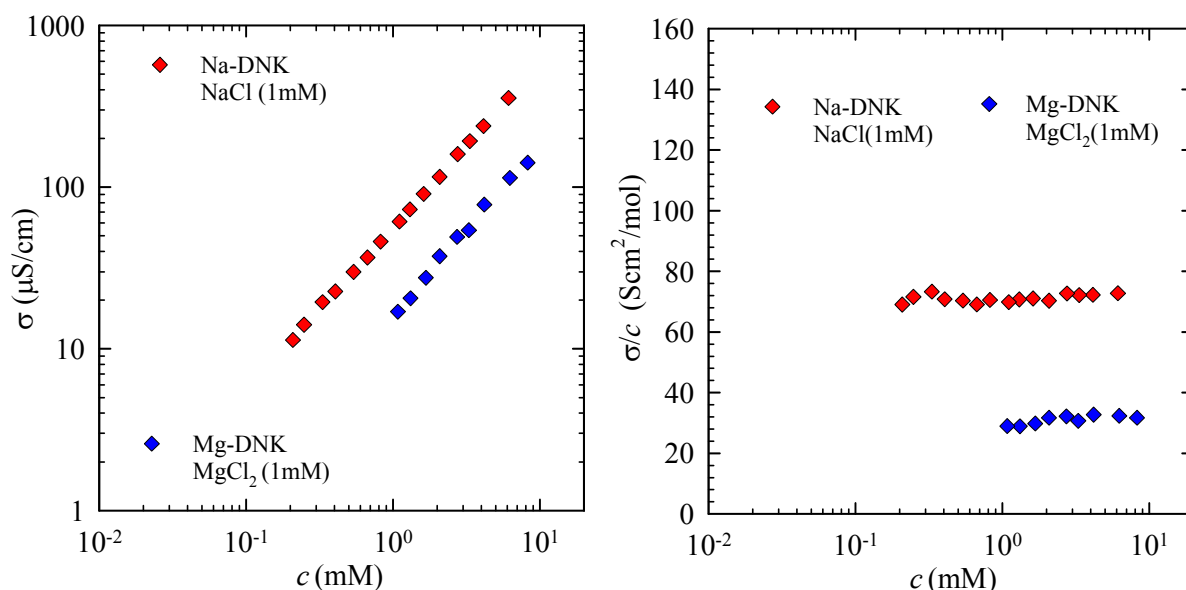
Slika 5.1 Lijevo: Specifične vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK uzoraka u čistoj vodi ($1 \mu\text{S}/\text{cm}$). Desno: Ekvivalentne vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK u čistoj vodi.

Specifične vodljivosti koje su dobivene mjerenjem dijeljene su sa pripadnim koncentracijama dobivenim vaganjem uzoraka. Tako izračunata ekvivalentna vodljivost prikazana je desno (Slika 5.1).

5.2. Mjerenja vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK u 1mM solima

Na istom rasponu koncentracija monomera mjerenja su provedena i za slane otopine DNK. Raspon koncentracija ponovo se kretao od 0.03mM do 8.25mM, ali otopine Na-DNK razrjeđivane su 1mM NaCl-om dok su otopine Mg-DNK razrjeđivane 1mM MgCl₂-om. Njihove specifične i ekvivalentne vodljivosti prikazuje Slika 5.2. Iako su i slane otopine

DNK bile pripremljene u istom rasponu koncentracija kao i vodene otopine zbog velikog doprinosa



Slika 5.2 Lijevo: *Specifične vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK uzoraka u pripadnim 1mM solima (NaCl; MgCl_2).*
Desno: *Ekvivalentne vodljivosti Na-DNK i Mg-DNK u 1mM solima.*

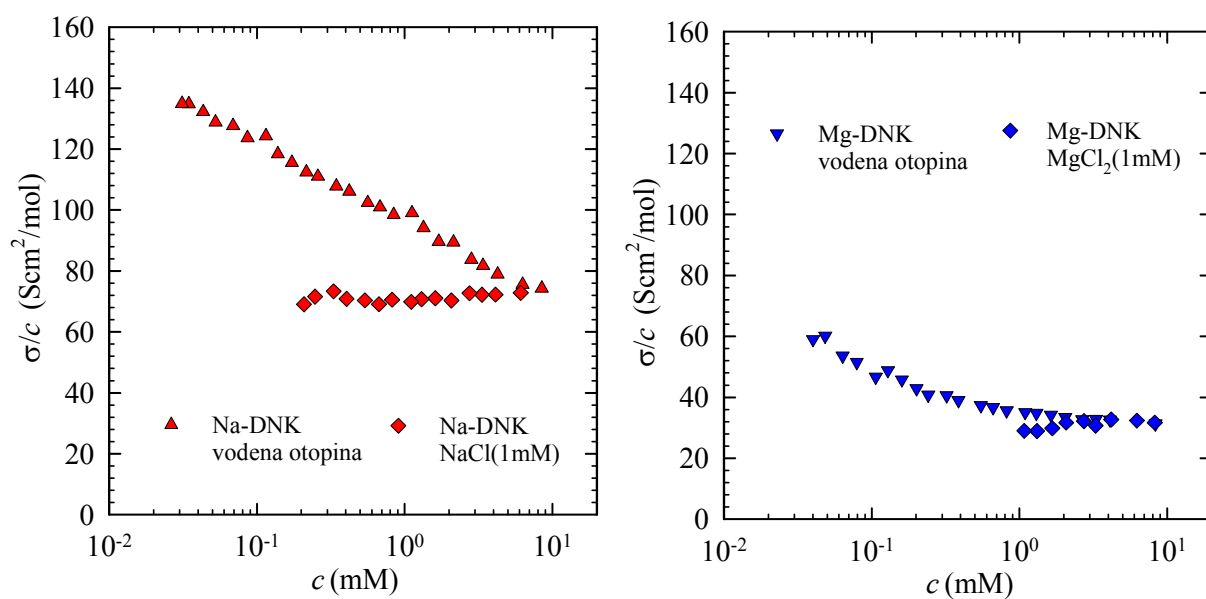
pozadinske vodljivosti, koji je dolazio od otapanja u 1mM solima, vodljivost DNK na najnižim koncentracijama nije se mogla razlučiti. Za Na-DNK(1mM NaCl) ekvivalentna vodljivost je konstantna na mjerenom rasponu koncentracija i iznosi $\sim 70\text{Scm}^2/\text{mol}$.

Mg-DNK(1mM MgCl_2) ima također konstantnu ekvivalentnu vodljivost od $\sim 30\text{Scm}^2/\text{mol}$. Vidimo da su u prosjeku ekvivalentne vodljivosti Na-DNK(1mM NaCl) veće 2.5 puta od otopina Mg-DNK u magnezijevoj soli - isto kao što je to bio slučaj i sa otopinama u čistoj (millipore) vodi.

5.3. ***Usporedba ekvivalentnih vodljivosti vodenih i slanih otopina DNK***

Slika 5.3 prikazuje odnose ekvivalentnih vodljivosti za dva uzorka; Na-DNK i Mg-DNK otopljenih u vodi i otopljenih u pripadnim 1mM solima. Za vodene otopine postoji pad ekvivalentnih vodljivosti, za oba uzorka, kako se pomičemo prema većim vrijednostima koncentracije DNK. Za slane otopine ekvivalentna vodljivost se sa promjenom koncentracije ne mijenja kroz sve mjerene koncentracije DNK. Na najvišim koncentracijama vrijednosti ekvivalentnih vodljivosti vodenih otopina (za oba uzorka) približavaju se vrijednostima za slane otopine. Preklapanje vrijednosti ekvivalentnih vodljivosti događa se za Na-DNK na

koncentraciji monomera od $\sim 5\text{mM}$ DNK. Za Mg-DNK preklapanje počinje već na koncentraciji monomera od $\sim 2\text{mM}$ DNK.



Slika 5.3 Lijevo: Odnosi ekvivalentnih vodljivosti Na-DNK otopljene u vodi i Na-DNK otopljene u 1mM NaCl.

Desno: Odnosi ekvivalentnih vodljivosti Mg-DNK otopljene u vodi i Mg-DNK otopljene u 1mM MgCl₂

6. Diskusija

6.1. *Difuzijski koeficijent poliiona*

Za račun udjela slobodnih protuiona u otopinama DNK potreban je difuzijski koeficijent poliiona. Teorijski ga dobivamo ga iz relacije 3.26. Duljina konture DNK sa 146pb je: $L_c = 50\text{nm}$, a promjer DNK u otopini: $d = 2.6\text{nm}$ (Tabela 8.1). Uvrštavanjem dobivamo:

$$D_{DNK}(\text{teorija}) = 3.20 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 / \text{s} \quad 6.1$$

Teorijski račun difuzijskog koeficijenta [14] daje rezultat koji se poklapa sa vrijednostima mjerenim od strane Vuletića et.al. [24]. Ta su mjerenja rađena na uzorcima DNK istog broja parova baza (146pb) u puferu (10mM Tris-HCl) i poprimaju vrijednosti od $(3.20 \pm 0.05) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ u rasponu koncentracija od 0.01-10mM DNK. Puferske otopine stabiliziraju dvostruku uzvojnica DNK i sprečavaju njeno razmotavanje u jednostruke lance. Fizikalno ista situacija pri sobnim temperaturama dobiva se za DNK u slanoj otopini [16],[17],[26]. Kako je okolina od 1mM soli dovoljna za stabilizaciju DNK pri sobnoj temperaturi u daljnjem računu slobodnih protuiona slanah otopina uzimamo za difuzijski koeficijent vrijednost danu u jednadžbi 6.1.

U mjerenjima bez dodane soli (millipore voda) difuzijski koeficijent DNK 8% je niži od teorijske vrijednosti. Prema [24] u rasponu koncentracija od 0.01-10mM DNK iznosi:

$$D_{DNK}(\text{millipore voda}) = (2.95 \pm 0.05) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 / \text{s} \quad 6.2$$

no, i ta je mjerena vrijednost konstantna preko cijelog područja koncentracija koje se razmatraju u ovom radu (od 0.03 - 8.5 mM DNK). Vrijednost danu u jednadžbi 6.2 zbog toga uzimamo prilikom računa slobodnih protuiona u vodenim otopinama DNK.

6.2. *Račun slobodnih protuiona za slane otopine DNK*

Mjerenja specifične vodljivosti i poznavanje koeficijenta difuzije dovoljne su za izračun udjela slobodnih protuiona. Jednadžbu 3.22 prepisat ćemo u obliku:

$$Z_p D_p \frac{Fe}{kT} \theta^2 + \lambda_i \theta - \frac{\sigma}{zc} = 0 \quad 6.3$$

Pomoću jednadžbe 3.23 i uz zamjenu $\gamma = NFe / kT$ možemo napisati tu relaciju za dsDNK polioione. Jednadžbu 6.3 pišemo dalje kao:

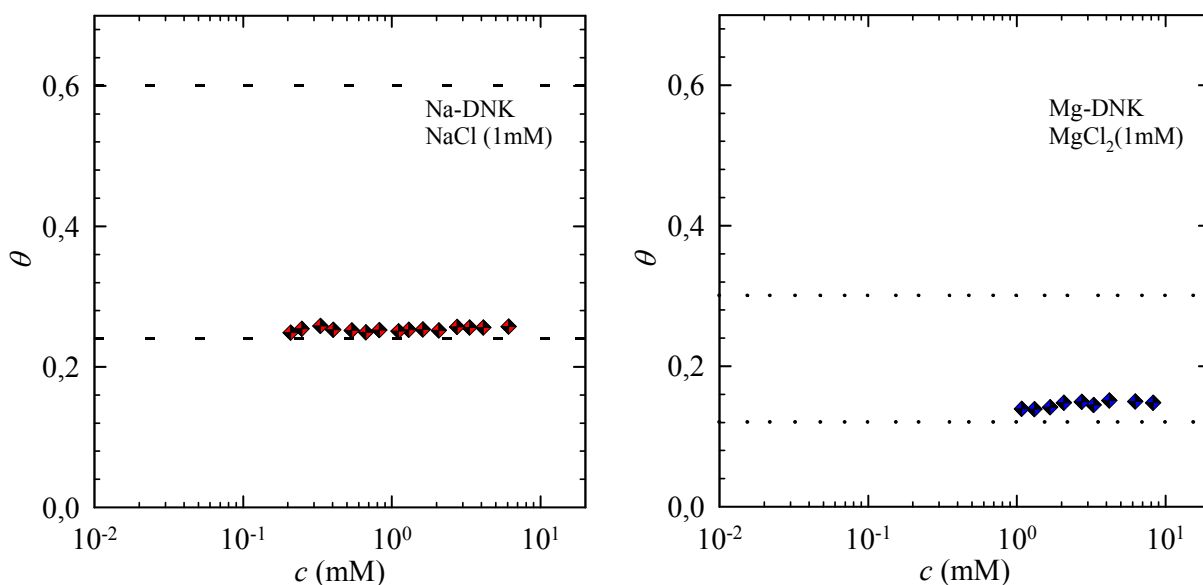
$$z\gamma D_{p,ds} \theta_{ds}^2 + \lambda_i \theta_{ds} - \frac{\sigma_{dsDNK}}{z c} = 0 \quad 6.4$$

ovo je kvadratna jednadžba za $\theta(c)$. Uz poznavanje difuzijskog koeficijenta na promatranom rasponu koncentracija možemo riješiti jednadžbu pojedinačno za svaku mjerenu ekvivalentnu vodljivost (σ/c) i dobiti udio slobodnih protuiona pojedinačno za svaku od mjerenih koncentracija. U slanim otopinama na 25°C nema razmotavanja na jednostruke lance [16],[17],[26] pa određivanjem udjela slobodnih protuiona određujemo eksperimentalne vrijednosti M-O kondenzacije za Na-DNK i Mg-DNK u konformaciji dvostruke uzvojnice.

Slika 6.1 prikazuje vrijednosti koje su posljedica M-O kondenzacije protuiona u slanim otopinama. Dobiveni su udjeli slobodnih protuiona:

$$\theta_{ds}(Na^+) = 0.25 \pm 0.01 \quad \theta_{ds}(Mg^{++}) = 0.14 \pm 0.01 \quad 6.5$$

Mjerene vrijednosti poklapaju se sa teorijskim vrijednostima izračunatim iz M-O teorije (relacije 3.11). Za slučaj natrijevih protuiona poklapanje je unutar jedne standardne devijacije, za slučaj magnezijevih protuiona unutar dvije standardne devijacije.

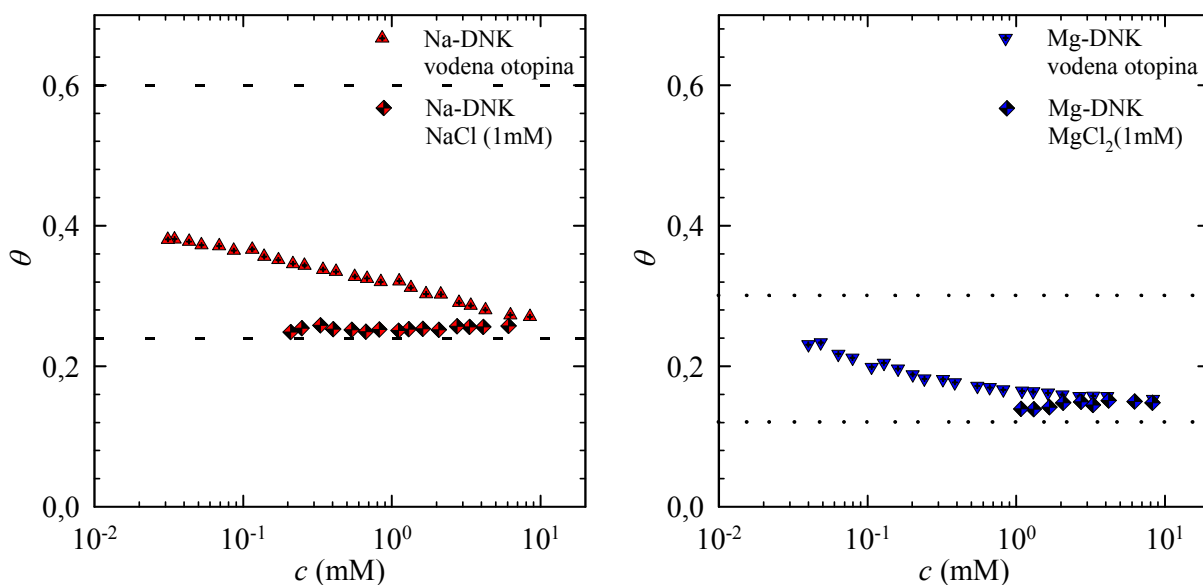


Slika 6.1 Udio kondenziranih protuiona u slanim 1mM otopinama; horizontalne oznake su teorijske vrijednosti M-O kondenzacije za ss i dsDNK **Lijevo:** Na-DNK u 1mM NaCl, mjereni udio slobodnih protuiona je $\theta_{ds}(Na^+) = 0.25 \pm 0.01$ na zabilježenom rasponu koncentracija. **Desno:** Mg-DNK u 1mM MgCl₂; pripadni udio slobodnih protuiona je $\theta_{ds}(Mg^{++}) = 0.14 \pm 0.01$

Prikazana mjerenja ukazuju na ispravnost teoretskog modela kondenzacije. Uz to, dvije otopine koje se ne razlikuju ni po vrsti ni po koncentraciji poliiona imat će i jednak ukupan disocirani naboj. No, iako je naboj otpušten u otopinu isti u apsolutnom iznosu, slobodnog naboja u Mg-DNK je efektivno dvostruko manje – zato je i dvostruko manja vodljivost tih otopina. Dvostruko veći naboj Mg^{++} protuiona stvarno ima za posljedicu jače „vezanje“ za poliion. Na udaljenosti od dvije Bjerrumove duljine ($\sim 14 \text{ \AA}$) nalaze se, na samim lancima DNK poliiona, dva nezaklonjena naboja u slučaju kad je protuionska okolina sačinjena od Na^+ protuiona, ali samo jedan nezaklonjen naboj u slučaju Mg^{++} protuiona.

6.3. Račun slobodnih protuiona u vodenim otopinama Na-DNK

Pomoću jednadžbe 6.4 i difuzijskog koeficijenta (relacija 6.2) možemo odrediti i udio slobodnih protuiona u vodenim otopinama DNK. Slika 6.2 daje izračun za vodene otopine DNK prikazane u usporedbi sa otopinama u 1mM solima.

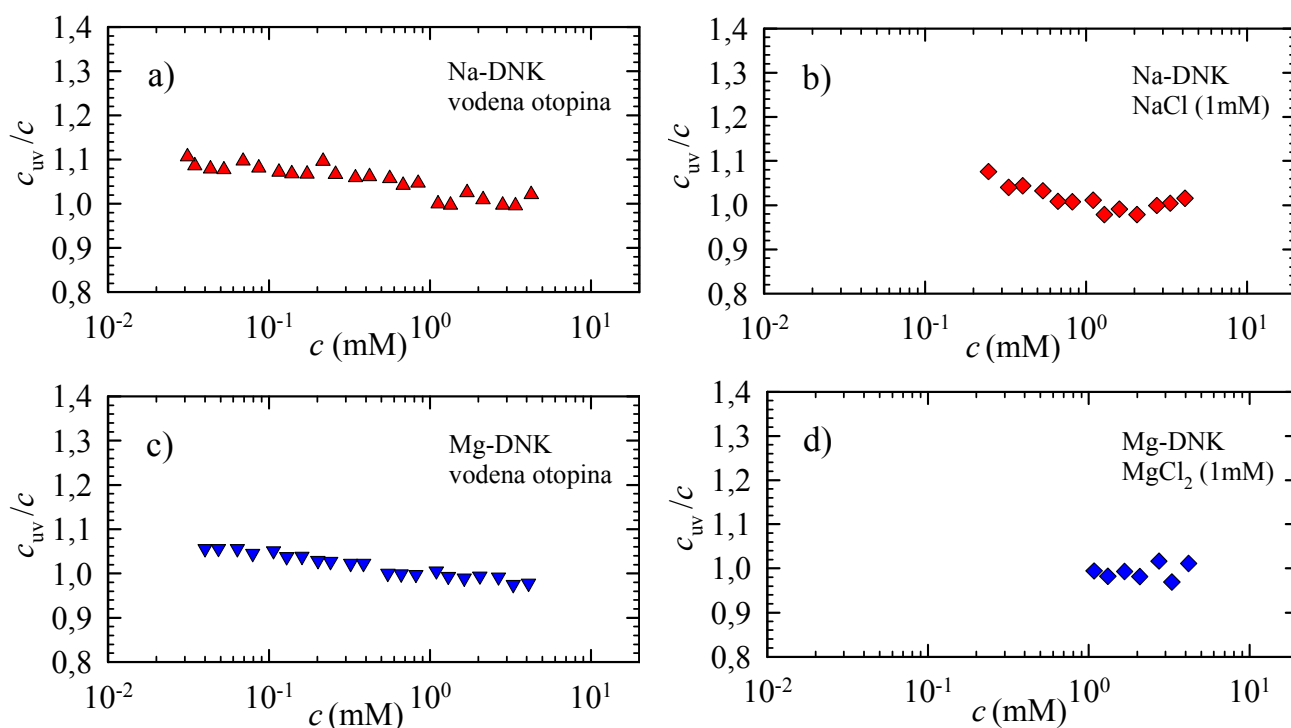


Slika 6.2 Udio slobodnih protuiona u vodenim otopinama DNK. Desno: Na-DNK Lijevo: Mg-DNK

Da bi objasnili porast ekvivalentne vodljivosti sa sniženjem koncentracije DNK (Slika 5.1), a s time i promjenu udjela slobodnih protuiona (Slika 6.2) prvo ćemo razmotriti razmotavanje dvostrukih uzvojnica [24]. Proces razmotavanja, potaknut sniženjem koncentracije, imao bi kao rezultat pojavu i određenog udjela jednostrukih lanaca u otopini. Oni u apsolutnom iznosu nose 2x manji naboj od dvostrukih uzvojnica, ali u otopini (prema M-O teoriji kondenzacije) slabije nabijeni lanci imaju manje kondenziranih protuiona – pa je naboj slabije nabijenog ssDNK poliiona u otopini efektivno 25% veći od naboja dsDNK i zbog

toga ssDNK poliiion daje veći doprinos vodljivosti. Manja kondenzacija u okolini lanaca znači istovremeno i više slobodnih protuiona, što dodatno povećava vodljivost. Gornje razmatranje pokazuje da razmatanje uzvojnica povećava vodljivost otopina; kada bi razmotavanje bilo prisutno prilikom snižavanja koncentracije DNA povećavala bi se i ekvivalentna vodljivost tj. povećao bi se i udio slobodnih protuiona.

Mjerenja UV-spektrofotometrije ne podržavaju ovakav model. Slika 6.3 prikazuje kontrolna mjerenja koncentracije provedena UV-spektrofotometrijom. Eksperimentalni podaci ne ukazuju na razmotavanje dvostrukih uzvojnica u slanim otopinama, ali niti u vodenim otopinama DNK što je u suprotnosti sa prijašnjim mjerenjima [17].



Slika 6.3 Usporedba vrijednosti koncentracija mjerenih UV-spektrofotometrijom i koncentracija dobivenih vaganjem - za otopine Na i Mg-DNK. Vodene otopine: grafovi a) i c). Otopine u 1mM solima: grafovi b) i d).

Denaturacija DNK i razmotavanje dvostrukih uzvojnica daje porast UV-apsorbancije otopina od 40% [26]. U našem slučaju omjer koncentracija dobivenih UV-om i koncentracija dobivenih vaganjem penjao bi se, prilikom snižavanja koncentracije, prema vrijednosti $c_{uv}/c = 1.4$, međutim, mjerenja koncentracije UV-apsorbancijom ne pokazuju porast veći od 10% u slučaju Na-DNK. U slučaju Mg-DNK taj je porast tek 8%.

Da ovdje nije riječ o parcijalnoj denaturaciji nego o pogrešci u radu instrumenta može nam potvrditi i Slika 6.3 b) koja pokazuje mjereni porast koncentracije od 10% prilikom

snižavanja koncentracije Na-DNK u slanoj 1mM otopini NaCl-a. Takav je porast koncentracije u slanim otopinama u suprotnosti sa mjerenjima stabilnosti DNK [17],[26].

Uz to, ako pretpostavimo raspad u vodenim otopinama, tada bi prema analizi udjela slobodnih protuiona (Slika 6.2) morali zaključiti da za slobodne Na^+ protuione u Na-DNK dobivamo porast koji je usporediv sa, i relativno manji, od porasta udjela slobodnih protuiona koji se opaža za Mg-DNK. Analiza bi navodila na činjenicu da je denaturacija u magneziju više izražena i da magnezijevi protuioni slabije stabiliziraju dvostruku uzvojniju. I to je, također, u suprotnosti sa mjerenjima [28].

Prema mjerenim podacima model koji bi bolje opisivao porast ekvivalentne vodljivosti je smanjenje M-O kondenzacije zbog porasta entropije koja se događa prilikom razrjeđenja otopina ispod koncentracije preklapanja c^* . Takav model se zove „model dvije zone“ i primijenili su ga na krute štapičaste poliione Deshkovski et.al. [27]. Prva je zona cilindrična, fiksne veličine, i sadržava protuione koji su kondenzirani uz poliion, radijus je takvog cilindra $R \approx L/2$ gdje je L duljina konture poliiona (u našem slučaju 50nm). Karakteristična zona koju mogu popuniti slobodni protuioni sfernog je oblika i ovisna je o količini poliiona u otopini – povećava se sa sniženjem koncentracije poliiona. U tom modelu se pokazuje da je disociranim protuionima, koji su na višim koncentracijama kondenzirani oko tijela poliiona, na niskim koncentracijama energetski povoljnije napustiti njegovu okolinu jer je gubitak na elektrostatskoj energiji kompenziran velikim dobitkom zbog povećanja entropije u sistemu. Na taj način povećava se udio slobodnih protuiona koji mogu sudjelovati u transportu, a njih možemo detektirati promjenom ekvivalentne vodljivosti otopina.

7. Zaključak

U ovom radu proučavane su otopine monodisperznih fragmenata DNK duljine $N = 146$ parova baza tj. konturne duljine $L_c \approx 50$ nm. Sa ciljem određivanja utjecaja naboja protuiona na količinu Manning-Oosawa kondenzacije mjerene su vodljivosti i UV-apsorbancija serija otopina sa rasponima koncentracija DNK monomera od 0.03 do 8.5 mM. Ispitivane su otopine sa Na^+ i Mg^{++} protuionima u čistoj vodi i pripadnim 1mM solima NaCl i MgCl_2 .

Za slane otopine Na i Mg-DNK reproducirane su teorijske Manning-Oosawa vrijednosti udjela slobodnih / kondenziranih protuiona. Diskutirana je vodljivost i UV-apsorbancija otopina u čistoj vodi i pretpostavka [24] da se na sobnim temperaturama fragmenti dsDNK raspadaju na jednostruke lance. Predložena je proširena teorija koja pretpostavlja smanjenje Manning-Oosawa kondenzacije prilikom snižavanja koncentracije u otopinama čiste vode zbog rastućeg utjecaja entropije.

8. Dodatak

Tabela 8.1 *Tablica konstanti i vrijednosti korištenih u radu*

duljina monomera DNK u konformaciji dvostruke uzvojnice	$a(\text{dsDNK}) = 3.4 \text{ \AA}$
duljina monomera DNK u konformaciji jednostrukog lanca	$a(\text{ssDNK}) = 4.3 \text{ \AA}$
relativna molekulska masa DNK u konformaciji dvostruke uzvojnice	$M_r(\text{dsDNK}) = 666 \text{ g/mol}$
relativna molekulska masa DNK u konformaciji jednostrukog lanca	$M_r(\text{ssDNK}) = 333 \text{ g/mol}$
Avogadrova konstanta	$N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
dielektrična konstanta vode	$\epsilon(\text{H}_2\text{O}, 25^\circ\text{C}) = 78.65$
Bjerrumova duljina	$l_B(\text{H}_2\text{O}, 25^\circ\text{C}) = 0.72 \text{ nm} = 7.2 \text{ \AA}$
prosječna udaljenost između susjednih elementarnih naboja na dsDNK	$b(\text{dsDNK}) = 0.17 \text{ nm} = 1.7 \text{ \AA}$
prosječna udaljenost između susjednih elementarnih naboja na ssDNK	$b(\text{ssDNK}) = 0.43 \text{ nm} = 4.3 \text{ \AA}$
promjer dsDNK cilindra u otopini	$d(\text{dsDNK}) = 2.6 \text{ nm}$
konturna duljina dsDNK za $N = 146 \text{ bp}$	$L_c = 50 \text{ nm}$

Boltzmannova konstanta

$$k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$$

elementarni naboj

$$e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$$

Faradayeva konstanta

$$F = 96\,485 \text{ C/mol}$$

permitivnost vakuumu

$$\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ Nm}^2/\text{C}^2$$

9. Popis literature

- [1] Polyelectrolytes, edited by M. Hara (Marcel Dekker, New York, 1993).
- [2] Macroions in Solution and Colloidal Suspension, edited by K. Schmitz (VCH, New York, 1993).
- [3] C. Wandrey and D. Hunkeler, Handbook of Polyelectrolytes and their Applications (American Scientific, Stevenson Ranch, CA, 2002), pp. 147-172.
- [4] N. Imai and T. Onishi, *J. Chem. Phys.* 30, 1115 (1959).
- [5] F. Oosawa, Polyelectrolyte (Dekker, New York, 1971).
- [6] G. S. Manning, *J. Chem. Phys.* 51, 924-934, (1969).
- [7] M. Mandel and T. Odijk, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 35, 75 (1984).
- [8] C. F. Anderson and M. T. Record, Jr., *Annu. Rev. Phys. Chem.* 33, 191 (1982).
- [9] F. Bordi, C. Cametti, T. Gili, *Phys. Rev. E* 66, 021803 (2002).
- [10] R. Das, T.T.Mills, L.W.Kwok, G.S.Maskel, I.S.Millett, S.Doniach, K.D. Finkelstein, D.Herschlag i L.Pollack, *Phys.Rev.Lett.* 90, 188103, (2003).
- [11] M. B. Jackson, *Molecular and Cellular Biophysics*, (Cambridge University Press, New York, 2006).
- [12] P. G. de Gennes, P. Pincus, R. M. Velasco and F. Brochard, *J. Phys. (Paris)* 37, 1461 (1976).
- [13] A. V. Dobrynin, R. H. Colby and M. Rubinstein, *Macromolecules*, 28, 1859 (1995).
- [14] M. Mercedes Tirado, Carmen Lopez Martinez, Jose Garcia de la Torre, *J. Chem. Phys.* 81, 2047-2051, (1984).
- [15] Stellwagen E., Yongjun Lu, Nancy C. Stellwagen, *Biochemistry*, 42, 11745-11750, (2003).
- [16] M. Thomas Record, JR., *Biopolymers*, 14, 2137-2158. (1975).
- [17] Sanja Dolanski Babić, Električna i dielektrična svojstva vodenih otopina genomske deoksiribonukleinske kiseline, Doktorska disertacija (PMF Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2008).
- [18] E. Raspaud, M. da Conceição, F. Livolant, *Phys.Rev.Lett.* 84, 2533-2536, (2000)
- [19] M. Thomas Record, JR., Charles P. Woodbury, Timothy M. Lohan, *Biopolymers*, 15, 893-915. (1976).

- [20] S. Fischer, A. Naji, R. Netz, *Phys. Rev. Lett.* 101, 176103 (2008).
- [21] Johner et. al *Progr. Colloid. Polym Sci.*, 97, 35-39, (1994).
- [22] Kohzo Ito, Akira Yagi, Norio Ookubo, Reinosuke Hayakawa, *Macromolecules*, 23,857-862, (1990).
- [23] G. Natta, P. Corradini, I. W. Bassi, *Suppl. Nuovo Cimento* 15, 68-82 (1960).
- [24] T. Vuletic et.al. *Phy. Rev. E* 83, 041803 (2011)
- [25] Handbook of Chemistry and Phisics
- [26] W. F. Dove, N. Davidson, *J. Mol. Biol.* (1962) 5, 467-478
- [27] A. Deshkovski, S. Obukhov, M. Rubinstein, *Phys. Rev. Lett.* 86, 2341 (2001).
- [28] Thomas, R. (1954). *Biochim. biophys. Acta*, 14, 231.