

# Tekočerkristalne faze DNK

Miha Ravnik

Mentor: prof. dr. Slobodan Žumer

September 2006

## Povzetek

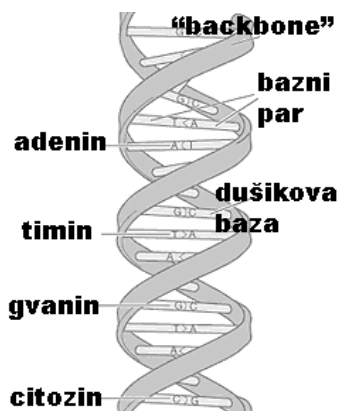
Raztopina molekul deoksiribonukleinske kisline (DNK) se pri različnih zunanjih pogojih obnaša kot liotropni tekoči kristal, saj koncentracija molekul določa njihovo pozicijsko in orientacijsko urejanje. Predstavljene so osnovne lastnosti liotropnih tekočih kristalov. Opisane so tri glavne interakcije, ki določajo tekočerkristalno obnašanje raztopin DNK: fluktuacijska interakcija polimernega tekočega kristala, senčena elektrostatska interakcija in hidracijska interakcija. Komentirano je tudi urejanje DNK molekul v mikrokanalih.

## 1 Uvod

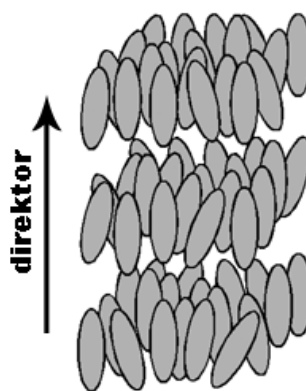
Deoksiribonukleinska kislina (DNK) je molekula, v katero živi organizmi kodirajo svoj dedni zapis. Kemijsko gledano je DNK nerazvejan polimer sestavljen iz osnovnih gradnikov nukleotidov, od katerih pa je vsak nadalje zgrajen iz dušikovih baz, sladkorja in fosfatne skupine. V živih organizmih ima DNK obliko dvojne vijačnice, kar je shematsko prikazano na Sliki 1. Velika anizotropnost oblike molekule, ki si jo lahko v grobem predstavljamo kar kot usmerjen podolgovat valj ali elipsoid, povzroči, da se DNK pri primernih pogojih (koncentracija, pH vrednost) orientacijsko oziroma pozicijsko uredi in tvori tekočerkristalne mezofaze.

Osnovna lastnost tekočih kristalov (TK) -tekočerkristalnih mezofaz- je prav orientacijski oziroma pozicijski (po plasteh) red sestavnih anizotropnih molekul, ki se lahko pojavi pri določeni temperaturi (termotropni TK) ali pa koncentraciji (liotropni TK) vzorca [1]. Raztopina molekul DNK je liotropni tekoči kristal, kar pomeni, da lahko s spreminjanjem koncentracije DNK molekul prehajamo med različnimi tekočerkristalnimi mezofazami. Orientacijsko urejanje tako liotropnih kot tudi termotropnih TK se tipično opiše z enotskim vektorskim poljem, direktorjem, ki kaže v preferenčni smeri orientacije molekul, pozicijski red pa s poljem normale na tekočerkristalne (smektične) plasti. Na Sliki 2 je shematsko prikazan primer hkratnega orientacijskega in pozicijskega urejanje molekul v smektično A tekočerkristalno mezofazo.

Poznavanje lastnosti molekule DNK in njenega urejanja je zanimivo tako s stališča biologije, biofizike in biotehnologije, kot tudi "klasične" polimerne fizike. V bioloških sistemih so tekočerkristalne lastnosti DNK-ja pomembne pri podvajanju in prepisovanju DNK-ja [3], pri pakiranju le-tega v celično jedro oziroma kromatin [2] ter pri uporabi DNK-kationsko lipidnih struktur ob "nevirusni genski presaditvi" (nonviral gene transfeccion) [4]. Kot negativno nabit polielektrolit z dvojno vijačno strukturo pa



Slika 1: Shematska slika molekule DNK. Prikazane so štiri osnovne dušikove baze, ki tvorijo bazne pare. Bazni pari so med seboj povezani z "opornico" (backbone), ki opiše dvojno vijačnico.



Slika 2: Shematska slika smektične A tekočokristalne mezofaze. Molekule so hkrati urejene po plasteh, njihove dolge osi pa kažejo preferenčno vzdolž normale na plasti.

je DNK zanimiva tudi kot polimer, saj mu lahko s spreminjanjem zunanjih pogojev (npr. gostote naboja topila, surfaktanta) spreminjaš mehanske in biokemične lastnosti [5][6].

V nadaljevanju so v drugem oddelku opisane osnovne lastnosti liotropnih tekočih kristalov s poudarkom na amfifilnih molekulah. V tretjem oddelku preidemo na lastnosti molekul DNK in ločeno predstavimo tri osnovne interakcije, ki določajo tekočokristalno obnašanje DNK-ja. Z njimi nato konstruiramo enačbo stanja molekul DNK v raztopini soli ter opišemo zaporedje tekočokristalnih mezofaz, v katerih se DNK lahko nahaja. Kot zanimivost in kot ena od možnih perspektiv študija DNK molekul je na koncu podan opis eksperimenta urejanja molekul DNK v mikrokanalu.

## 2 Liotropni tekoči kristali

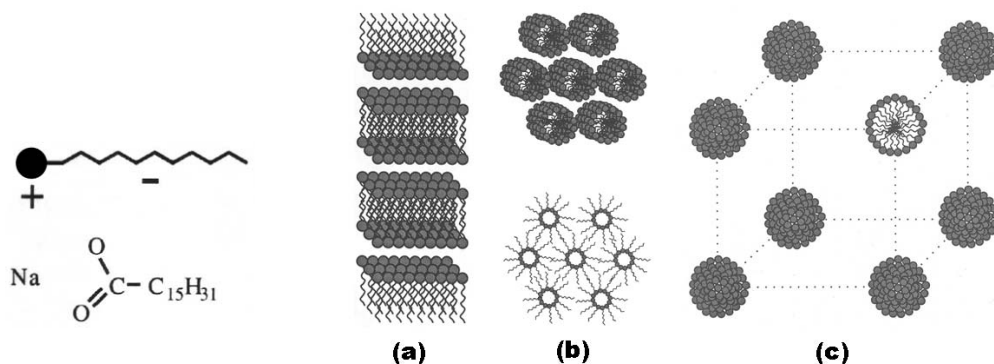
Liotropne tekočokristalne faze se pojavijo tipično v raztopinah velikih molekul (npr. DNA) v vodi ali organskem topilu. Za tvorbo liotropnih faz je ključna različna topnost posameznih delov raztopljenih amfifilnih molekul. Bolj topni deli molekul tako ščitijo manj topne, kar se odraža v pozicijskem in orientacijskem urejanju molekul. V vodi kot polarnem topilu se tako na primer amfifilne molekule urejajo s polarnimi hidrofilnimi glavami proti vodi, saj s tem ščitijo hidrofobne repe. Znane so tudi obrnjene liotropne faze, kjer je topilo nepolarno in tako nepolarne repi amfifilnih molekul ščitijo polarne glave. Primer amfifilne molekule mila  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COONa}$  je prikazan na Sliki 3. Osnovni trije razredi liotropnih tekočokristalnih faz [7] so lamelarna [8], heksagonalna [9] in kubična [10].

Shematsko je lamelarna ( $L_\alpha$ ) tekočokristalna faza predstavljena na Sliki 4a. Zanj je značilno pozicijsko in orientacijsko urejanje amfifilnih molekul v dvojne plasti, med posameznima dvojnima plastema pa se formira plast topila. V vodnih raztopinah je tipična debelina dvojne plasti za 10 – 30% krajša kot je dvojna dolžina raztopljenih

molekul, debelina plasti vode pa je tipično od 1 nm – 10 nm. Lamelarna faza se praviloma pojavi pri koncentracijah topljenca (amfifilnih molekul) nad 50%. Za lamelarno fazo je značilna tudi relativno nizka viskoznost, saj dvojne plasti lahko drsijo druga ob drugi.

Heksagonalna liotropna TK faza (Slika 4b) se tipično pojavi pri koncentracijah topljenca od 40% – 70%. V tej fazi amfifilne molekule tvorijo “micelarne valje” (micellar cylinders), ki so urejeni v heksagonalno mrežo. Razmik med micelarnimi valji je močno odvisen od koncentracije topljenca in je tipično med 1 nm – 5 nm. Heksagonalna liotropna TK faza je navkljub relativno velikemu deležu vode zelo viskozna.

Kubična liotropna faza (Slika 4c) pa se pojavi, če je koncentracija topljenca še nižja kot pri heksagonalni liotropni fazi, torej pod  $\sim 30\%$ . Znanih je več podfaz ( $I_1, I_2, V_1, V_2$ ), ki se razlikujejo po strukturi micelarnih objektov. Osnovna značilnost kubične liotropne faze je, da je zaradi kubične simetrije optično izotropna, zaradi majhnega števila “strižnih ravnin” (shear plane) pa tudi močno viskozna.

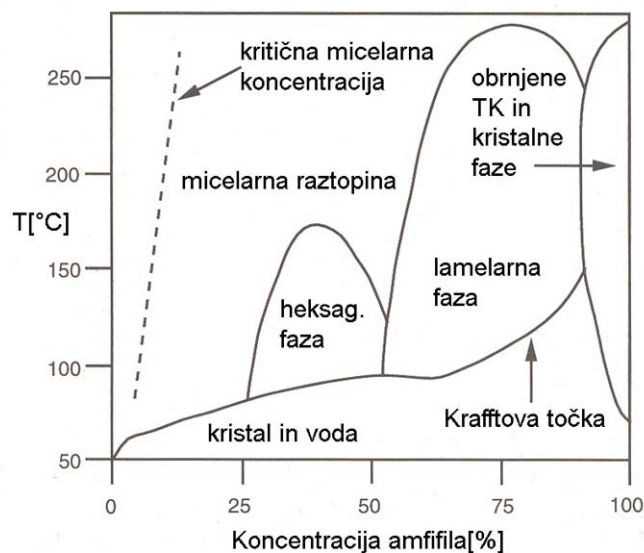


Slika 3: Shematska slika in kemijska strukturna formula amfifilne molekule mila.

Slika 4: Primeri razredov liotropnih tekočerkristalnih faz: (a) lamelarna faza z značilno ureditvijo v dvojne plasti, med katerimi je voda, (b) heksagonalna in obrnjena heksagonalna faza, ko se micelarni valji uredijo v heksagonalno mrežo, (c) kubična faza z miceli, ki imajo kubično pozicijsko ureditev [7].

Obnašanje amfifilnega materiala se prikaže v temperaturno-koncentracijskem faznem diagramu. Za vse fazne digrame je značilen pojav kritične micelarne koncentracije in Krafftove točke (krivulje). Pri koncentracijah nižjih od kritične micelarne koncentracije se v micelarni raztopini ne tvorijo niti miceli, torej ni več opaznega liotropnega urejanja. Podobno ni več liotropnega urejanja tudi pri temperaturah nižjih od Krafftove točke, saj kristal amfifilnih molekul ni več topen v topilu (npr. vodi). Za molekulo mila  $C_{15}H_{31}COONa$  je fazni diagram prikazan na Sliki 5. Opazimo značilno (“rule of thumb”) obnašanje materiala, saj pri izbrani temperaturi (npr.  $\sim 100^\circ C$ ) z večanjem koncentracije amfifila vzorec prehaja iz micelarne preko heksagonalne v lamelarno fazo in nato v obrnjeno tekočerkristalno oziroma kristalno fazo.

Omenimo, da poleg organskih (amfifilnih) liotropnih tekočih kristalov avtorji poročajo tudi o anorganskih liotropnih TK [11]. Planarne ploščate molekule kislin  $H_nM_nZ_2O_{3n+5}$ , kjer je npr.  $M = Sb, Z = P$  in  $n = 1, 3$ , se namreč v vodni raztopini uredijo v lame-



Slika 5: Fazni diagram temperature  $T$  v odvisnosti od koncentracije amfifila za molekulo mila [7]. Z večanjem koncentracije pri izbrani temperaturi je opazno značilno prehajanje iz micelarne preko heksagonalne v lamelarno fazo in naprej v obrnjeno tekočerkristalno oziroma kristalno fazo.

larne tekočerkristalne faze. Velika robustnost na spremembo zunanjih pogojev, kot je temperatura ali pH vrednost, jih kaže kot zelo zanimiv gostiteljski medij pri določanju struktur biomelekul z jedrsko magnetno resonanco.

Zanimiva je tudi povezava liotropnih tekočih kristalov s koloidnimi inkluzijami. Iwashita in Tanaka [8] na primer poročata o optični manipulaciji defektov v liotropni lamelarni fazi, ki jih ustvarita s sferičnim koloidnim delcem. Ker je tipični upogibni relaksacijski čas liotropnega TK veliko večji ( $\sim 10$  s) kot je relaksacijski čas popravljanja linijskega defekta (hitrost tipično  $\sim 10 \mu\text{m}$ ), lahko deluje defektna struktura, ustvarjena z optično pinceto in koloidom, kot "spominska enota" za trajektorijo koloida.

### 3 DNK

Mikroskopsko je molekula DNK s svojo dvojno vijačnico ter malim in velikim jarkom veliko bolj zapletena od npr. amfifilnih molekul, kot tipičnih gradnikov liotropnih tekočih kristalov. DNK nima preprosto dveh delov, od katerih je en bolj polaren in drugi manj, pač pa se porazdelitev naboja spreminja zaradi vijačne strukture (perioda 3.4 nm) periodično vzdolž celotne molekule. Zaradi vijačne strukture se ob tekočerkristalnem urejanju pojavijo tudi kotne frustracije med molekulami, ki so posledica lokalne polarizacije DNK-ja pravokotno na vijačno os. Izkaže se, da prav kotne frustracije pomembno vplivajo na izbiro tekočerkristalne faze, v kateri se konkretna DNK raztopina nahaja [12].

Ker so mikroskopske lastnosti in interakcije med posameznimi tekočerkristalnimi

molekulami kot npr. DNK praviloma zapletene in težko opisljive, se opis prevede na makroskopsko kontinuumsko sliko, kjer obnašanje molekul opisujejo krajevno odvisna skalarna (npr. gostota) in vektorska/tenzorska polja (npr. direktor), mikroskopski detajli pa se “skrijejo” v velikosti različnih materialnih konstant. V nadaljevanju bodo ločeno predstavljeni opisi pojavov, ki vplivajo na urejanje DNK molekul. Polimerna nematska teorija je povzeta po [2] in [13], elektrostatska interakcija med poli-ionoma po [14] in [15], hidracijska interakcija pa po [17].

### 3.1 Enačba stanja polimernega tekočega kristala [2] [13]

Omejimo se na obravnavo nematskega tekočega kristala, katerega osnovni gradniki so lahko dolge toge polimerne molekule ali pa le njihovi togi deli. Vse molekule naj bodo preferenčno orientirane vzdolž smeri  $z$ , tako da lahko enotsko krajevno odvisno direktorsko polje  $\mathbf{n}(\mathbf{r})$  zapišemo kot  $\mathbf{n} = (n_x, n_y, 1)$  in je  $n_x, n_y \ll 1$ . Predpostavimo tudi, da k interakciji med polimernimi molekulami prispevajo le fluktuacije v njihovi orientaciji  $\delta\mathbf{n} = (\delta n_x, \delta n_y, 0)$ , tako da je elastična prosta energija polimernih nematskih molekul enaka:

$$F_N = \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{r}_\perp dz [K_1(\nabla_\perp \cdot \delta\mathbf{n})^2 + K_2(\nabla_\perp \times \delta\mathbf{n})^2 + K_3(\partial_z \delta\mathbf{n})^2] \quad , \quad (1)$$

kjer so  $K_1, K_2$  in  $K_3$  tekočokristalne elastične konstante, indeks  $\perp$  pa pomeni količino v  $xy$  ravnini.

V polimernih nematskih TK so fluktuacije ravninske koncentracije polimernih verig  $\delta\rho$  sklopljene z orientacijskimi fluktuacijami  $\delta\mathbf{n}$ . Za neskončno dolge in toge polimere je sklopitev določena s kontinuumsko enačbo:

$$\partial_z \delta\rho + \rho_0 \nabla_\perp \cdot \delta\mathbf{n} = 0 \quad , \quad (2)$$

kjer je  $\rho_0$  ravnovesna ravninska koncentracija. V realnosti pa so seveda polimeri končno dolgi, togi pa so tudi le na skali persistence dolžine polimera  $l$ . Sklopitev med gostotnimi in orientacijskimi fluktuacijami v Enačbi 2 se zato dopolni in se ji določi njeno “moč”, kar se naredi z uvedbo dodatne sklopitvene konstante  $G$ . Pomembna lastnost polimernih nematskih TK je tudi njihova stisljivost  $\mathcal{B}$ , saj določa raztezanje materiala in posledično ravnovesne razdalje med molekulami.

Če se upošteva vse tri glavne pojave, ki določajo obnašanje polimernega nematika, torej elastičnost orientacijskih fluktuacij, sklopitev orientacijskega reda z gostoto in stisljivost materiala, se lahko zapiše celotni mezoskopski Hamiltonjan  $\mathcal{H}$  kot:

$$\mathcal{H} = F_0 + F_N + \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{r}_\perp dz \left( \mathcal{B} \left( \frac{\delta\rho}{\rho_0} \right)^2 + G(\partial_z \delta\rho + \rho_0 \nabla_\perp \cdot \delta\mathbf{n})^2 \right) \quad , \quad (3)$$

kjer je  $G$  oblike:

$$G = \frac{k_B T l}{2\rho_0} \quad , \quad (4)$$

in je  $F_0$  konstanta. Komentirajmo, da je v Enačbi 3 orientacijska elastična energija  $F_N$  konstruirana fenomenološko iz skalarnih invariant direktorskega polja. Vsaka izmed elastičnih konstat predstavlja svoj tip elastične deformacije: pahljačo ( $K_1$ ), zasuk

( $K_2$ ) in upogib ( $K_3$ ). Člen  $\mathcal{B}(\delta\rho/\rho_0)^2$  opisuje v najnižjem redu (kvadratnem) upiranje materiala spremembi gostote. Podobno je preko kvadratne forme (konstanta  $G$ ) podana sklopitev med orientacijskimi in gostotnimi fluktuacijami.

Hamiltonjan v Enačbi 3 se nadalje uporabi za izračun proste energije polimernih nematskih molekul kot funkcije zunanjih parametrov, predvsem ravninske koncentracije  $\rho$  oziroma razmika med sosednjimi molekulami  $d$ . Najprej se  $\mathcal{H}$  prepíše v recipročni prostor valovnega vektorja  $\mathbf{q}$  z uporabo Fourierove transformacije nad  $\mathbf{r}$  in  $\rho$ . Nadalje pa je potrebno izračunati fazno vsoto s Hamiltonjanom v recipročnem prostoru preko funkcionalnega integrala direktorskega polja kot funkcije valovnega vektorja. Ko to izvedeš ob predpostavki zelo togih polimerov ( $G \rightarrow \infty$ ) in ko zanemariš člene, ki niso sklopljeni z gostotnimi fluktuacijami, dobiš prosto energijo polimernih nematskih tekočih kristalov  $F$ :

$$F = \frac{1}{2}k_B T \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^2 q_{\perp} dq_z}{(2\pi)^3} \ln(K_1 q_{\perp}^2 q_z^2 + K_3 q_z^4 + \mathcal{B} q_{\perp}^2) \quad , \quad (5)$$

kjer je  $q_z$  komponenta valovnega vektorja vzdolž verig in  $q_{\perp}$  pravokotno na verige. Dobljena prosta energija je integrabilna po  $q_z$ , medtem ko pa integral po  $q_{\perp}$  divergira. To je tipičen problem, na katerega se naleti ob računu fluktuacijske proste energije, saj je število nihajnih prostostnih stopenj v računu "načeloma neskončno" in posledično tudi prosta energija divergira. Prava fizikalna slika pa je seveda drugačna, saj v naravi ne morejo obstajati nihanja z valovnimi dolžinami manjšimi od velikosti gradnikov, kar pomeni, da se v računu mora uvesti mejno vrednost valovne dolžine (najmanjša možna) oziroma valovnega vektorja  $q_{\perp max}$  (največji možni). Integral v Enačbi 5 se tako lahko izvede, vendar pa je analitično izračunljiv le v limitah majhne ( $q_{\perp max} \ll 2\sqrt{\mathcal{B}K_3/K_1^2}$ ) in velike ( $q_{\perp max} \gg 2\sqrt{\mathcal{B}K_3/K_1^2}$ ) koncentracije polimernih molekul:

$$F = \begin{cases} \frac{k_B TV}{5 \cdot 2^{3/2} \pi} \sqrt[4]{\frac{\mathcal{B}}{K_3}} q_{\perp max}^{5/2} + \dots, & q_{\perp max} \ll 2\sqrt{\mathcal{B}K_3/K_1^2} \\ \frac{k_B TV}{16\pi} \sqrt{\frac{\mathcal{B}}{K_1}} q_{\perp max}^2 + \dots, & q_{\perp max} \gg 2\sqrt{\mathcal{B}K_3/K_1^2} \end{cases} \quad . \quad (6)$$

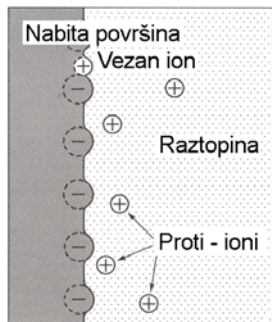
Ravninska koncentracija polimernih molekul oziroma razmik med njimi v Enačbi 6 eksplicitno ne nastopa, pač pa se skriva v volumnu in predvsem v  $q_{\perp max}$ . Če razumemo  $d$  kot efektivno razdaljo med polimernimi molekulami, velja namreč za volumen so-razmernost  $V \propto L \cdot d^2$  ( $L$  je dolžina vzorca), medtem ko pa je  $q_{\perp max} \simeq \pi/d$ . Ko nadalje upoštevaš, da je stisljivost  $\mathcal{B} = V \partial^2 F / \partial V^2$  in da je glavno obnašanje elastične konstante  $K_3$  oblike  $K_3 \sim k_B T (l_{pers} \rho_0 + 1/a_{jed.})$ , kjer je  $l_{pers.}$  peristenčna dolžina polimera in  $a_{jed.}$  velikost togega jedra polimera lahko določiš odvisnost fluktuacijske proste energije od razmika med molekulami:

$$F \sim \begin{cases} d^{-2/3}, & \text{majhna koncentracija} \\ d^{-2}, & \text{velika koncentracija} \end{cases} \quad . \quad (7)$$

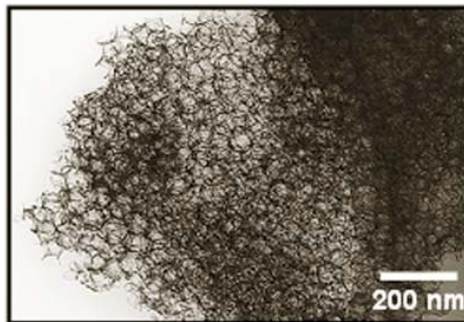
### 3.2 Elektrostatska interakcija med cilindričnima poli-ionoma [14][15]

Na površini, makromolekuli ali delcu, ki se nahaja v tekočini, se lahko pojavi naboj zaradi ionizacije oziroma disociacije površinskih skupin (npr.,  $-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- +$

$H^+$ ) ali pa zaradi adsorpcije ionov iz raztopine na predhodno nenabito površino/makromolekulo (npr., vezava  $Ca^+$ ). Vendar pa je ta površinski naboj vedno uravnotežen z območjem enako velikega vendar nasprotno predznačenega “proti-naboja” v okoliški raztopini ne glede na način nabitja površine. Proti-naboji v raztopini so lahko vezani na površino ali pa se hitro termično gibljejo v plasti blizu površine, imenovani električna dvojna plast (glej Sliki 6 in 7).



Slika 6: Shematska slika nabite površine z vezanimi in nevezanimi proti-ioni [15].



Slika 7: TEM slika poroznega ogljika (“colloidal-crystal-templated porous carbon”) [16]. Če se ta porozni ogljik nahaja v žvepleni (VI) kislino  $H_2SO_4$ , se zaradi velike površine ogljika tvori tudi velika električna dvojna plast, kar dela ta material kot izredno zanimiv v proizvodnji kondenzatorjev.

Za opis takega sistema je potrebno uvesti volumsko koncentracijo naboja  $\rho_{el}$  in elektrostatski potencial  $\psi$ , ki ga povzročajo krajevno ločeni nasprotno-značni naboji. Potencial  $\psi$  in gostota naboja  $\rho_{el}$  sta povezana preko Boltzmanove porazdelitve ter Poissonove enačbe. Za ione z valenco  $Z$  velja:

$$\rho_{el} = \rho_{el.0} e^{-Ze_0\psi/k_B T} \quad (8)$$

$$\epsilon\epsilon_0 \nabla^2 \psi + Ze_0 \rho_{el} = 0 \quad , \quad (9)$$

kjer je  $\rho_{el.0}$  volumska gostota naboja v območjih, kjer je  $\psi = 0$ , in je  $\epsilon$  dielektrična konstanta. Enačbi 8 in 9 lahko združiš in dobiš t.i. Poisson-Boltzmanovo (PB) enačbo, ki predstavlja osnovo za obravnavo nabitih raztopin delcev, makromolekul:

$$\nabla^2 \psi = - \frac{Ze_0 \rho_{el.0}}{\epsilon\epsilon_0} e^{-Ze_0\psi/k_B T} \quad . \quad (10)$$

Rešitev PB enačbe z ustreznimi robnimi pogoji (npr. elektronevtralnost vzorca) da ravnovesno prostorsko odvisnost potenciala  $\psi$  in gostote naboja  $\rho_{el}$ . Če ocenimo električno polje v bližini nabite ravne plošče, ki jo obliva voda ( $\epsilon = 80$ ), dobimo za popolnoma ionizirano površino s površinsko gostoto naboja  $\sigma \sim 0.3 \text{ C/m}^2$  preko preproste zveze  $E = \sigma/2\epsilon\epsilon_0$  vrednost  $E \sim 2 \times 10^8 \text{ V/m}$ . Komentirajmo, da se Enačbo 10, ki velja za raztopino ionov ene vrste, lahko hitro posploši tudi za raztopino večih vrst ionov  $i$ , za kar je potrebno volumsko gostoto naboja zapisati kot:

$$\rho_{el} = \sum_i Z_i e_0 \rho_{el. i} \quad , \quad (11)$$

kjer je  $Z_i$  valenca posamezne vrste ionov in  $\rho_{el. i}$  volumnska gostota naboja posamezne vrste ionov.

Rešitve PB enačbe dajo kvantitativno dobre rezultate na skalah (npr. razmik med mejami vzorca), kjer se prispevki posameznih ionov že izpovprečijo, kar je tipično pri skalah več od nekaj  $nm$ . Na manjših skalah pa je potrebno upoštevati dodatne efekte kot so: korelacije med ioni (ion-correlation) in njihova končna velikost, “sile slik nabojev” (image forces), diskretnost površinskih nabojev in “solvacijske sile” (solvation forces).

Značilna lastnost nabitih koloidnih sistemov je njihova Debyeova dolžina  $\kappa_D$ , saj predstavlja debelino električne dvojne plasti oziroma skalo, na kateri so površinski elektrostatski efekti pomembni. Za raztopino posameznih ionov se Debyeova dolžina zapiše kot:

$$\kappa_D = \left( \frac{\epsilon\epsilon_0 k_B T}{(Z e_0)^2 \rho_{el.0}} \right)^{1/2} . \quad (12)$$

Debyeova dolžina je odvisna le od lastnosti gostiteljske tekočine (volumnska koncentracija naboja, valenca, dielektričnost), ne pa tudi od lastnosti površine. Za raztopino NaCl v vodi pri sobni temperaturi z  $\rho_{el.0} = 6 \times 10^{22}/m^3$  je  $\kappa_D \sim 10 \text{ nm}$ , v destilirani vodi s pH 7 pa je  $\kappa_D \sim 1 \text{ }\mu\text{m}$  (disociacija  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$ ).

Za “majhne” moči potenciala  $\psi$  ( $Z e_0 \psi \ll k_B T$ ;  $\psi$  pod  $\sim 25 \text{ mV}$  pri sobni temperaturi) pa Debyeova dolžina tudi eksplicitno vstopi v rešitve za potencial, saj se lahko PB enačbo (Enačba 10) linearizira s  $\kappa_D$  kot tipično krajevno skalo:

$$\nabla^2 \psi = \frac{1}{\kappa_D^2} \psi \quad (13)$$

Linearizirana PB enačba je znana tudi kot Debye-Hückelova enačba/model z rešitvijo za  $\psi$  v treh dimenzijah:

$$\psi(r) \propto \frac{1}{r} e^{-r/\kappa_D} , \quad (14)$$

kjer je  $r$  dolžina radij vektorja v obravnavanem vzorcu. Yukavin tip potenciala v Enačbi 14 je značilen rezultat za sisteme s senčeno Coulombsko interakcijo (npr. nabiti koloidi, plazma).

Pridobljeno znanje o obnašanju nabitih razopin lahko v nadaljevanju uporabimo za opis elektrostatskega odboja med negativnimi naboji vzdolž DNK molekule. Če si DNK zamislimo kot enakomerno nabito palčko z radijem  $a$  in linijsko gostoto naboja  $\nu_h$ , ki se nahaja v določeni raztopini (npr. raztopini soli), lahko iz PB enačbe določimo električni potencial okrog molekule (palčke) kot:

$$\psi = \frac{\nu_h}{2\pi\epsilon\epsilon_0} K_0(r/\kappa_D) , \quad (15)$$

kjer je  $K_0$  modificirana Besselova funkcija ničtega reda. Efektivna dolžinska gostota naboja molekule je praviloma v eksperimentu slabše znan parameter, zato se jo lahko pri pogojih veljavnosti linearizacije PB enačbe poveže s površinsko gostoto naboja na molekuli-palčki  $\sigma$  z zvezo:

$$\nu_h = \frac{2\pi\sigma\kappa_D}{K_1(a/\kappa_D)} , \quad (16)$$



kjer je  $K_1$  modificirana Besselova funkcija prvega reda.

Elektrostatsko silo oziroma energijo med dvema vzporednima molekulama “1” in “2”, ki sta na razdalji  $d$ , lahko zapišemo kot produkt naboja prve in električnega polja druge na mestu prve ter obratno. Dobimo silo  $\mathcal{F}$ :

$$\mathcal{F}(d) = \frac{\nu_{h1}\nu_{h2}}{2\pi\epsilon\epsilon_0\kappa_D} K_1(d/\kappa_D) \quad , \quad (17)$$

oziroma interakcijsko dielektrično potencialno energijo  $F_{el.}$ :

$$F_{el.}(d) = \frac{\nu_{h1}\nu_{h2}}{2\pi\epsilon\epsilon_0} K_0(d/\kappa_D) \quad . \quad (18)$$

Za večje razmike med molekulami ( $d/\kappa_D \gg 1$ ) se lahko funkcije  $K_0(d/\kappa_D)$  in  $K_1(d/\kappa_D)$  razvije v asimptotsko vrsto kot:

$$K_0(d/\kappa_D) = \sqrt{\pi/2} \frac{e^{-d/\kappa_D}}{\sqrt{d/\kappa_D}} \left( 1 - \frac{1}{8(d/\kappa_D)} + \dots \right) \quad (19)$$

$$K_1(d/\kappa_D) = \sqrt{\pi/2} \frac{e^{-d/\kappa_D}}{\sqrt{d/\kappa_D}} \left( 1 + \frac{3}{8(d/\kappa_D)} + \dots \right) \quad . \quad (20)$$

V primeru, ko je razdalja med DNK molekulami  $d$  večja od Debyeve dolžine  $\kappa_D$ , kar je v eksperimentih tipično izpolnjeno, lahko torej odbojno električno potencialno energijo med DNK molekulami v izbranem topilu zapišemo kot:

$$F_{el.} = \frac{1}{\sqrt{8\pi}} \frac{\nu_{h1}\nu_{h2}}{\epsilon\epsilon_0} \frac{e^{-d/\kappa_D}}{\sqrt{d/\kappa_D}} \quad . \quad (21)$$

Za dobljeno interakcijsko energijo (Enačba 21) opozorimo, da eksponentno pojema z razdaljo med molekulami (senčen Coulombski potencial), da pa je sorazmerna z nabojem obeh molekul. Kot tipična dolžina v interakciji, kot smo komentirali že prej, nastopa Debyeova dolžina  $\kappa_D$ .

### 3.3 Hidracijski odboj v vodi [17]

Poleg elektrostatskega odboja med molekulami DNK delujejo tudi odbojne hidracijske sile (“hydration forces”), ki so posledica delnega urejanja vodnih molekul ob površini DNK molekul. Hidracijska sila izvira iz neposredne interakcije med DNK molekulami in okoliško vodo ter postane pomembna pri razmikih med molekulami od 1 do 2 nm.

V “modelu ureditvenega parametra” (Order parameter model) je reorganizacija topila okrog polarnih mest, npr. molekule DNK, opisana z ureditvenim parametrom  $\eta$  z ničelno vrednostjo v nemotenem delu - “telesnini” - (bulk) topila in z določeno vrednostjo v motenem delu vzorca, npr. med dvema polarnima površinama. Nadalje se v tem modelu konstruira prosto energijo hidracije  $F_{hidr.}$ , ki se v vodilnih členih zapiše kot:

$$F_{hidr.} = \int (\eta^2 + (\nabla\eta)^2) dV \quad , \quad (22)$$

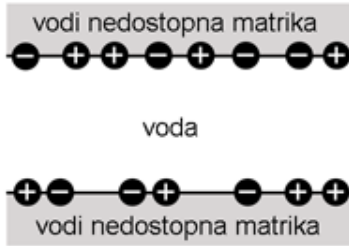
kjer integral poteka po celotnem volumnu vzorca. Tako konstruirana  $F_{hydr.}$  vsebuje najosnovnejše člene po  $\eta$ , ki dajo odboj med polarnima površinama:  $\eta^2$  namreč penalizira “motenost” vorca, medtem ko pa gradientni člen favorizira gladko prostorsko spreminjanje ureditvenega parametra.

Formalizem ureditvenega parametra je matematično ekvivalenten Debye-Hücklovi teoriji električne dvojne plasti, torej linearizirani PB enačbi, zato ima tudi hidracijski potencial enako funkcijsko odvisnost od razmika med npr. dvema paličastima nabitima molekulama DNK, vendar z drugačno tipično dolžino. Hidracijsko prosto energijo DNK molekul  $F_{hydr.}$  se tako lahko zapiše kot:

$$F_{hydr.} = A \sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{e^{-d/\kappa_H}}{\sqrt{d/\kappa_H}} \quad , \quad (23)$$

kjer  $A$  meri “moč” hidracije in je  $\kappa_H$  hidracijska dolžina.

Komentirajmo, da poleg modela ureditvenega parametra, obstaja še več drugih modelov, ki opisujejo hidracijske sile, kot npr. model povprečnega polja (“Mean Field



Slika 8: Shematska slika hidracijske interakcije med dvema nevtralnima polarnima površinama. Polarne vezi se modelira kot hidracijske naboje, ki med seboj interagirajo preko solvacijskih sil - kombinacija električne polarizacije in motene ureditve vodikovih vezi v vodi.

Model - MFM”). V MFM modelu se podobno kot v modelu ureditvenega parametra tudi uvede ureditveni parameter, ki opiše povprečne solvacijske sile. Kot model polarnih skupin pa se uvede t.i. “hidracijski naboj” (hydration charge) oziroma njegova površinska gostota  $\sigma_{hydr.}$ , kar je shematsko predstavljeno na Sliki 8. Nadalje se površino in njeno morebitno periodičnost opiše s strukturnim faktorjem  $S(Q)$ :

$$S(\mathbf{Q}) = \int d\mathbf{R} \langle \sigma_{hydr.}(\mathbf{r} + \mathbf{R}) \sigma_{hydr.}(\mathbf{r}) \rangle e^{-i\mathbf{Q}\mathbf{R}} \quad , \quad (24)$$

kjer je  $\mathbf{Q}$  poljubni valovni vektor,  $\mathbf{R}$  teče po površini,  $\langle \rangle$  pa predstavlja ansambelsko ali pa  $\mathbf{r}$ -povprečje po interagirajoči površini.

Iz enačbe za strukturni faktor (En. 24) lahko izračunamo hidracijski tlak  $P_{hydr.}$  oziroma silo med dvema identičnima površinoma z nič neto hidracijskega naboja kot:

$$P_{hydr.} = \frac{\alpha}{4\pi^2} \int d\mathbf{Q} \frac{S(\mathbf{Q})}{\sinh^2[L_H(\kappa_H^{-2} + Q^2)^{1/2}]} \quad , \quad (25)$$

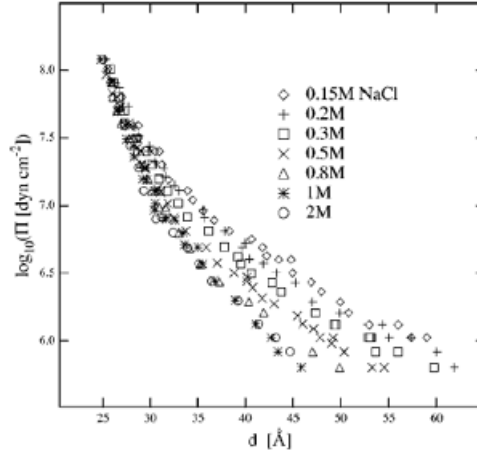
kjer integracija poteka po vseh valovnih vektorjih  $\mathbf{Q}$ ,  $L_H$  je razmik med ploščama, parameter  $\alpha$  pa določa moč reorganizacije vodnih molekul zaradi polarnih skupin. Tlak med dvema urejenima površinama s periodo  $a_{hidr.}$  je tako:

$$P_{hidr.} = \frac{\alpha \langle \sigma_{hidr.}^2 \rangle}{\sinh^2 L_H [\kappa_H^{-2} + (2\pi/a_{hidr.})^2]^{1/2}} \quad , \quad (26)$$

kjer je  $\langle \sigma_{hidr.}^2 \rangle$  povprečna vrednost kvadrata površinske gostote hidracijskega naboja.

### 3.4 Enačba stanja DNK [2]

Naj zdaj povzamemo vse pomembne interakcije med molekulami DNK v raztopini monovalentne soli: fluktuacijska interakcija polimernega tekočega kristala, senčena elektrostatska interakcija in hidracijska interakcija delno urejenih vodnih molekul. Druge sile, kot npr. van der Waalsove ali pa korelacijske sile med nasprotnimi ioni, pa so v eksperimentih tipično zanemarljive.



Slika 9: Enačba stanja - logaritem osmotskega tlaka kot funkcija razmika med molekulami - za raztopino dolgih DNK molekul v vodi pri različnih molskih koncentracijah NaCl [2].

Po Enačbah 6, 21 in 23 lahko zdaj zapišemo celotno prosto energijo raztopine DNK molekul  $F_{tot.}$  kot:

$$F_{tot.} = F + F_{el.} + F_{hidr.} \quad , \quad (27)$$

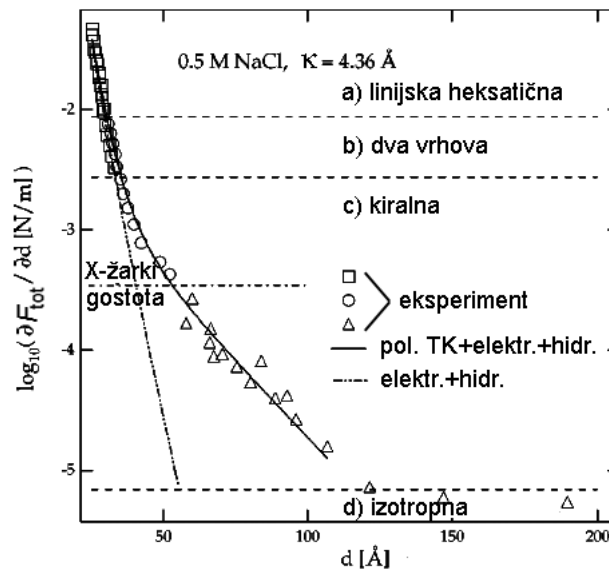
kar nam da "efektivni" potencial, ki deluje na molekule DNK. Za primerjavo z eksperimenti pa se prosto energijo v Enačbi 27 tipično preračuna v odvisnost osmotskega tlaka  $\Pi$  kot funkcije zunanjih parametrov. Velja:

$$\frac{\partial F_{tot.}}{\partial d} = \sqrt{3}\Pi d \quad , \quad (28)$$

kjer opozorimo, da je  $\Pi = \Pi(d, T, \kappa_D, \kappa_H, \dots)$ .

Na Sliki 9 je predstavljena izmerjena enačba stanja raztopine molekul DNK v vodi za različne koncentracije NaCl. Pri velikih osmotskih tlakih se za vse ionske moči odvisnosti združijo v eno krivuljo, medtem ko pa se pri nižjih  $\Pi$  odvisnosti razcepijo. Odboj pri velikih osmotskih tlakih je posledica hidrationskih sil, s tipično dolžino  $\kappa_H \sim 0.3 \text{ nm}$ , pri nižjih osmotskih tlakih pa postaneta pomembna tudi elektrostatski odboj in fluktuacijski TK prispevek k interakciji.

Skupaj z odvisnostjo osmotskega tlaka  $\Pi$  od efektivnega razmika med molekulami  $d$  so na Sliki 10 za raztopino DNK-ja pri 0.5 M koncentraciji NaCl predstavljene tudi fazne meje med različnimi tekočerkristalnimi mezofazami, v katerih se nahaja DNK. Pri zelo velikih osmotskih tlakih so molekule DNK v kristalni fazi, ki pa se z nižanjem osmotskega tlaka stali v linijsko heksatično fazo (enako kot heksagonalna kolumnarna). Zanj je značilno orientacijsko urejanje v neki preferenčni smeri smeri, pozicijsko pa se molekule uredijo v ravnini pravokotno na smer urejanja. Opozorimo, da se v tej fazi pri urejanju kot pomemba pokaže kotna frustracija med posameznimi DNK molekulami. Na prehodu med kristalno in linijsko heksatično se namreč lahko pojavi še “motena heksatična faza” (distorted hexatic phase), ki ima zaradi kotnih frustracij zlomljeno šestštevno rotacijsko simetrijo v ravnini pravokotno na smer urejanja [12].

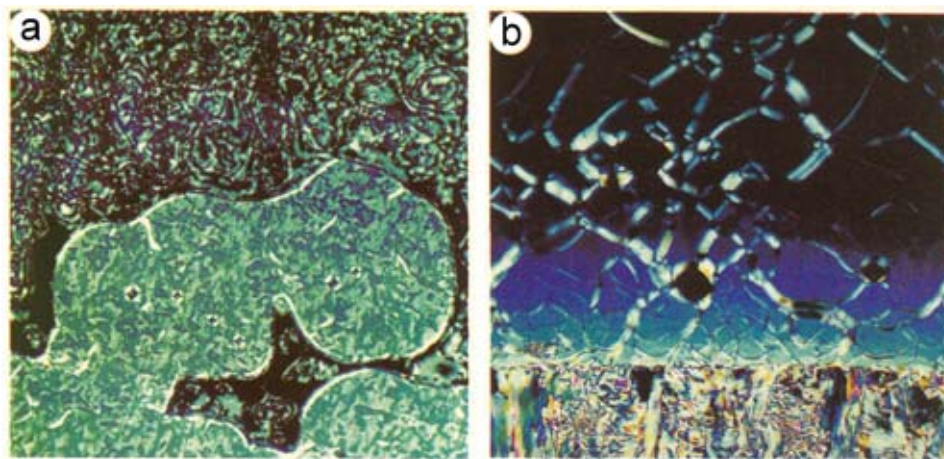


Slika 10: Enačba stanja - logaritem osmotskega tlaka kot funkcija razmika med molekulami - za raztopino dolgih DNK molekul v vodi pri različnih molskih koncentracijah NaCl [2]. Polna črta kaže fit eksperimentalnih rezultatov s celotno prostro energijo  $F_{tot}$  (En. 27), prekinjena črta pa kaže fit eksperimenta le s senčeno elektrostatsko in hidrationsko interakcijo.

Ob nadaljnjem nižanju osmotskega tlaka linijska heksatična faza preide v kiralni fazi, holesterično in nadalje modro, dokler se pri dovolj majhnem osmotskem tlaku tekočerkristalni red ne podre in raztopina DNK postane izotropna. Za holesterični

fazi je zanimiv vpliv ionske moči (koncentracija soli v raztopini DNK) na “periodo vijačnice” (pitch), saj se zanimivo ob zmanjšanju ionske moči perioda vijačnice poveča [18]. Pričakovali bi namreč, da bo kiralnost samih molekul DNK dodatno prispevala k makroskopski kiralnosti vzorca, torej krajši periodi vijačnice, saj zmanjšanje ionske moči vendar povzroči, da so elektrostatski detajli DNK-ja bolj izraženi. Stanley et al. razlagajo ta efekt z dejstvom, da povečanje interakcije med posameznimi DNK molekulami zabriše njihovo vijačno kiralno naravo.

Pomemben parameter, ki določa tekočekristalno obnašanje raztopine DNK je tudi dolžina molekul. Vsi do sedaj predstavljeni rezultati so veljali za dolge DNK molekule, dolžine tipično od  $\sim 100\text{ nm}$  do  $\sim 1\text{ mm}$ , za kratke molekule DNK, npr. 146 baznih parov, kar ustreza  $\sim 50\text{ nm}$ , pa je zaporedje faz drugačno [19][20]. Velja, da izotropna raztopina preide v holesterično, ta naprej v linijsko heksatično in na koncu v heksagonalno. Na Sliki 11 sta predstavljeni fotografiji iz [20] kratkih molekul DNK v holesterični, “pred-holesterični” in “kot-smektični”(heksagonalni) fazi.

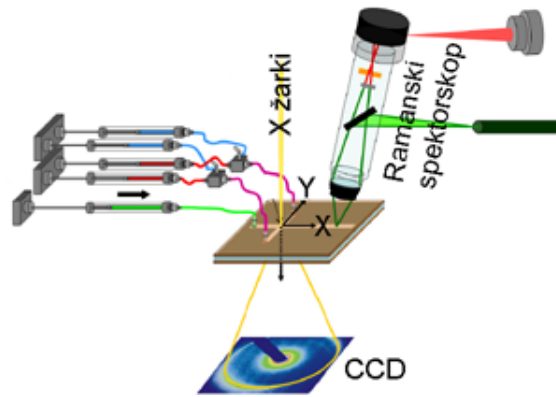


Slika 11: Polarizacijska mikrografa  $100\text{ mg/ml}$  raztopine kratkih molekul DNK (146 baznih parov) v  $0.25\text{ M}$  amonijevem acetatu [20]. a) Območja prehoda med “pred-holesteričnimi” (spodaj) in holesteričnimi domenami (zgoraj), b) območja prehoda med holesteričnimi (spodaj) in “kot-smektičnimi” (heksagonalnimi) domenami (zgoraj).

### 3.5 Urejanje DNK molekul v mikrokanalih [3]

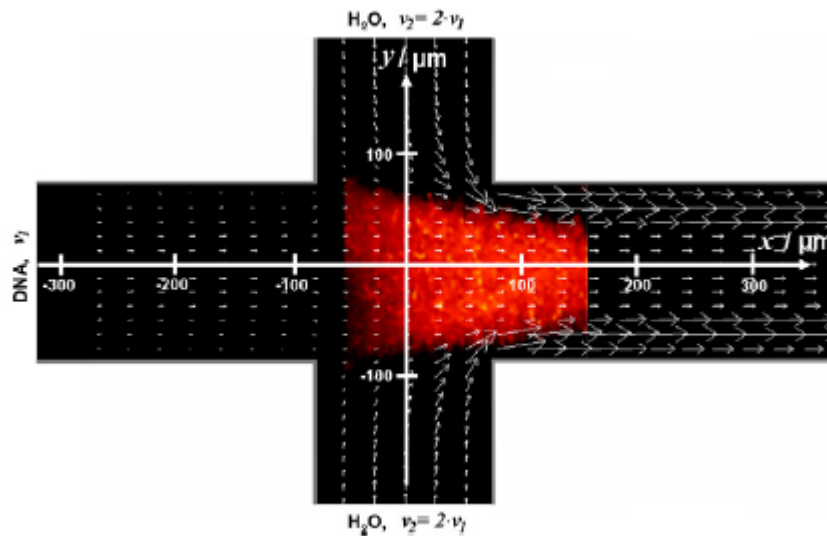
Kombinacija mikrofluidike, Ramanske spektroskopije in slikanja z X žarki se kaže kot ena od novih zanimivih metod za študij urejanja DNK molekul, saj so eksperimenti pri stalnem laminarnem “mikro-toku” praviloma zelo neinvazivni do preučevanih molekul, poleg tega pa se lahko pri teh eksperimentih opazuje tudi vpliv zunanjih mehanskih napetosti na DNK molekule. Shematsko je primer postavitve takega eksperimenta predstavljen na Sliki 12, rezultati eksperimenta pa na Sliki 13.

Ramanska mikroskopija (RM) je specializirana optična mikroskopija s prostorsko resolucijo blizu mikrona. Pri RM se vzorec osvetli z monokromatsko (lasersko) svet-



Slika 12: Shematska slika eksperimentalne postavitve študije urejanja DNK molekul v mikrokanalih z Ramansko mikroskopijo in X žarki [3].

lobo, nato pa se študira njen neelastično sipan del (premik v frekvenci). Le majhen del vpadne svetlobe se dejansko neelastično sipa, vendar pa prav ta nosi informacijo o lastnostih študirane snovi, kot so njena kemijska zgradba, možne notranje mehanske napetosti, orientacija in temperatura. S spreminjanjem mesta vpada monokromatske svetlobe (X,Y,Z) v vzorec se tako lahko študira prostorsko odvisnost različnih parametrov v snovi.



Slika 13: Konfokalna Ramanska slika hidrodinamično fokusiranega curka DNK pri fiksnem valovnem vektorju (frekvenci) in simulirano hitrostno polje v mikrokanalih [3].

Hidrodinamsko fokusiranje DNK-ja se doseže z laminarnim tokovnim profilom, ki ga določata prekrížana mikrokanala (glej Sliko 13). V sredini curka doseže DNK gostoto  $10 \text{ mg/ml}$ , giba pa se s tipično hitrostjo  $250 \text{ }\mu\text{m/s}$ . Ramanski spekter je

izmerjen pri valovnem vektorju  $k_{Ram.} = 1576 \text{ cm}^{-1}$ , kar ustreza vrhu v spektru, ki je posledica vibracij baz gvanina in adenina.

Rezultati na Sliki 13 pa so le predpriprava za eksperiment, ko skozi navpični kanal ne dodajaš le vode, pač pa raztopino izbranega dendrimera v vodi (konkretno polypropyleneimine dotriacontaamine dendrimer, generacija 4 - G4 dendrimer). Izkaže se, da v tem primeru pride namreč do kondenzacije DNK-ja kot posledice elektrostatske interakcije med DNK-jem in G4 dendrimerom. Ramanski spekter tako doživi izrazit padec v intenziteti fosfatnih skupin DNK-ja, kar pomeni, da so se na njih zaradi elektrostatske interakcije "vezale" amino - skupine G4 dendrimerov.

## 4 Zaključek

Opisali smo osnovne lastnosti molekul DNK kot liotropnega tekočega kristala. Po teoriji fluktuacij polimernega tekočega kristala smo določili fluktuacijsko interakcijsko energijo med dvema DNK molekulama. Uvedli smo Poisson-Boltzmanovo enačbo, ki smo jo linearizirali in nato uporabili za izračun dielektrične interakcije med dvema vzporednima nabitima paličicama v raztopini monovalentnih ionov. Za opis hidracije smo predstavili model ureditvenega parametra in model povprečnega polja, ki orientacijo vodnih molekul v bližini molekule DNK opišeta s fenomenološko konstrukcijo proste energije po ureditvenem parametru in uvedbo hidratijskega naboja. Iz vseh treh osnovnih interakcij smo konstruirali celotno prosto energijo raztopine DNK in komentirali zaporedje tekočerkristalnih faz, ki jih DNK tvori. Kot zanimivost smo na koncu opisali urejanje DNK molekul v laminarnem toku znotraj  $\sim 100 \mu\text{m}$  debelega mikrokanala.

Kondenzacija oziroma pakiranje DNK-ja je eden izmed najpomembnejših procesih v naravi, saj v živo omogoča procesa kot sta mitoza in mejoza. Nadalje, kondenzacija DNK-ja obljublja terapevtske metode za pripravo in prenos ustreznih genov v ciljne celice in, malo futuristično, "gojenje novih organov". Iz bolj fizikalnega pogleda pa kondenzacija DNK-ja predstavlja zapleten problem faznih prehodov, tekočerkristalnega obnašanja in interakcije med polielektroliti.

## Literatura

- [1] P. G. de Gennes, J. Prost, *The Physics of Liquid Crystals*, 2nd Edition, Oxford University Press, 1993
- [2] H. H. Strey, V. A. Parsegian, and R. Podgornik, *Phys. Rev. E* **59**, 999-1008 (1999)
- [3] R. Dootz, A. Otten, S. Koester, B. Struth and T. Pfohl, *J. Phys.: Condens. Matter* **18**, S639-S652 (2006)
- [4] L. Cui and L. Zhu, *Langmuir* **22**, 5982-5985 (2006)
- [5] S. Zhou and B. Chu, *Adv. Mater.* **12**, 545-556 (2000)

- [6] W. J. Macknight, E. A. Ponomarenko, and D. A. Tirell, *Acc. Chem. Res.* **31**, 781-788 (1998)
- [7] P. J. Collins and M. Hird, *Introduction to Liquid Crystal Chemistry and Physics*, Taylor&Francis Ltd, 1997
- [8] Y. Iwashita and H. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 045501 (2003)
- [9] G. S. Attard, P. N. Bartlett, N. R. B. Coleman, J. M. Elliot, J. R. Owen, J. H. Wang, *Science* **278**, 838-840 (1997)
- [10] U. S. Schwarz and G. Gompper, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 1472 (2000)
- [11] J-C. P. Gabriel, F. Camerel, B. J. Lemaire, H. Desvaux, P. Davidson, and P. Batail, *Nature* **413**, 504-508 (2001)
- [12] V. Lorman, R. Podgornik, and B. Žekš, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 218101 (2001)
- [13] H. H. Strey, V. A. Parsegian, and R. Podgornik, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 895 (1997)
- [14] S. L. Brenner and V. A. Parsegian, *Biophys. J.* **14**, 327 (1974)
- [15] J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd Ed., Academic Press Inc., 1992
- [16] I. Moriguchi, F. Nakahara, H. Furukawa, H. Yamamda and T. Kudo, *Electrochem. Solid. St.* **7**, A221-A223 (2004)
- [17] S. Leikin, V. A. Parsegian, D. C. Rau, R. P. Rand, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 369 (1993)
- [18] C. B. Stanley, H. Hong, and H. H. Strey, *Biophys. J.* **89**, 2552 (2005)
- [19] R. Podgornik, H. H. Strey, K. Garwisch, D. C. Rau, A. Ruprecht, and V. A. Parsegian, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 4261 (1996)
- [20] T. E. Strzelecka, M. W. Davidson, and R. L. Rill, *Nature* **331**, 457 (1988)