

Fakulteta za matematiko in fiziko  
Oddelek za fiziko  
Mehka snov 2005/06

# **Določitev strukture DNK z uklonom rentgenskih žarkov**

Marko Viršek

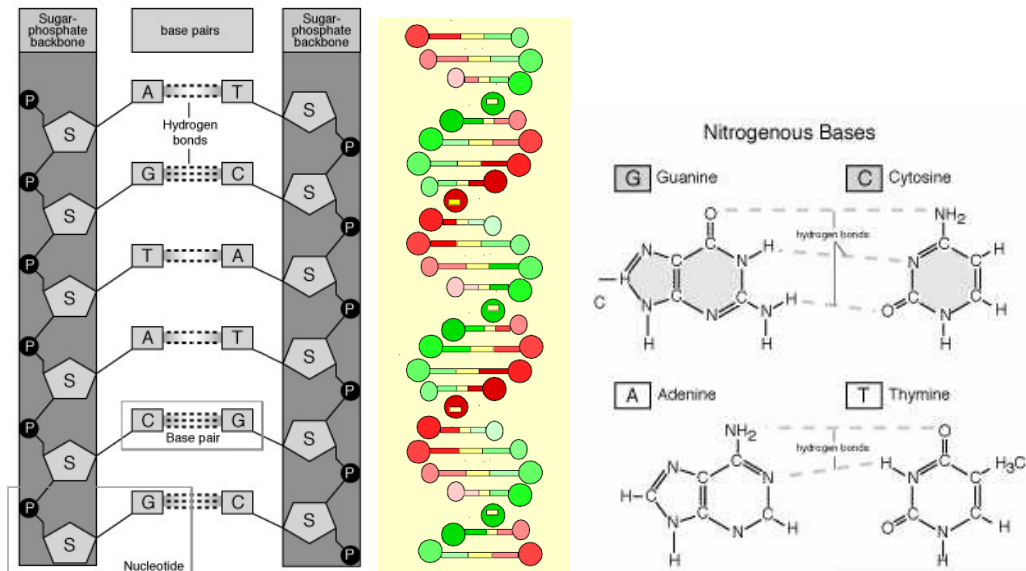
## **Povzetek:**

Watson in Crick sta leta 1952 na podlagi meritev Franklinove in Goslinga ter uklonske teorije CCV predlagala strukturo DNK, ki je danes splošno sprejeta. DNK je dvojna vijačnica, sestavljena iz dveh nasprotno vzporednih koaksialnih vijačnic, premaknjenih za  $3/8$  zavoja. Posamičen zavoje vijačnice meri 3,4 nm in vsebuje 10 baznih parov. Radij vijačnice na mestu fosfatnih skupin meri 1 nm. Bazni pari na nasprotnih vijačnicah se med seboj povezujejo z vodikovimi vezmi po Watson-Crickovem pravilu baznih parov.

## **1. Uvod**

Deoksiribonukleinska kislina (DNK) je nerazvejan polimer, sestavljen iz zaporedja osnovnih enot, nukleotidov. Nukleotid je sestavljen iz sladkorja (deoksiriboze), ene izmed štirih dušikovih baz (adenina, citozina, gvanina ali timina) in fosfatne skupine. Nukleotidi so vezani v polinukleotid s 3'5' fosfodiestrskimi vezmi, v katerih fosfatna skupina oblikuje mostiček med C<sub>3</sub> enega sladkorja in C<sub>5</sub> naslednjega. Štiri različne baze določajo štiri različne nukleotide, ki z danim zaporedjem v dvojni vijačnici DNK v celoti kodirajo dedni zapis. DNK je nosilka genetske informacije v večini organizmov z izjemo nekaterih virusov, kjer to nalogo prevzame RNK. RNK je podobna DNK, le da ima drugačen sladkor, namesto timina nastopa uracil, molekula pa je sestavljena le iz enojne vijačnice. Osnovna delitev živih bitij na prokariote in evkariote se med drugim izraža tudi po obliki DNK. DNK se pri prokariotih nahaja v celotni celičnini in je krožno oblikovana. Pri evkariotih je lokalizirana v celičnem jedru, povezana je na histone, je linearno oblikovana ter se na različnih skalah urejeno zлага; na največji skali v kromosome. Poleg tega je DNK evkariotov prisotna tudi v nekaterih celičnih organelih (v matriksu mitohondrija pri rastlinskih in živalskih celicah ter v stromi kloroplastov pri rastlinskih celicah).

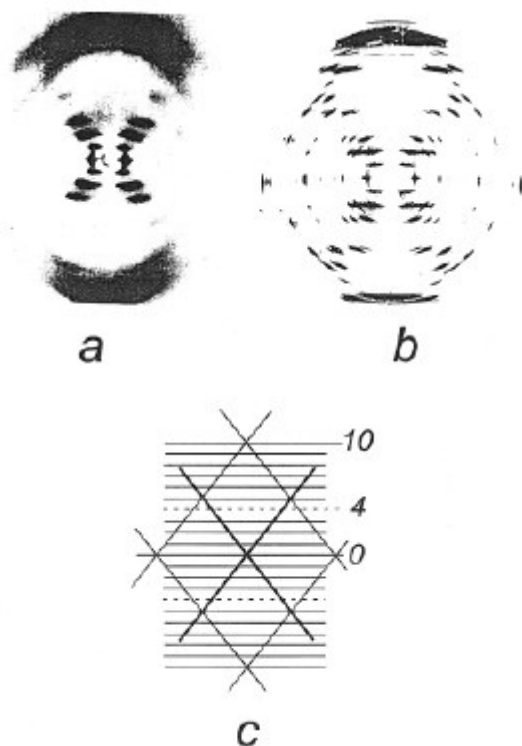
Leta 1952 sta James Watson in Francis Crick objavila odkritje strukture DNK [1]. Razkrila sta, da se DNK nahaja v obliki dvojne vijačnice (slika 1). Vijačnici sta nasprotno vzporedni, imata skupno os in sta medsebojno zamaknjeni za  $3/8$  zavoja. Fosfatne skupine se nahajajo na zunanji strani vijačnice, po dve sta vezani na sladkor, ta pa na dušikovo bazo znotraj vijačnice, ki se z dušikovo bazo nasprotne vijačnice pari po Watson-Crickovem pravilu baznih parov. Adenin se preko dveh vodikovih vezi vedno pari s timinom, citozin pa preko treh vodikovih vezi vedno z gvaninom. Na en zavoje vijačnice pride deset baznih parov.



**Slika 1: Levo:** Struktura razvite DNK. P predstavlja fosfatno skupino, S sladkor, A, T, G in C so dušikove baze, črtkane črte pa vodikove vezi. **Sredina:** DNK je dvojna vijačnica. **Desno:** Struktura dušikovih baz.

## 2. Eksperimentalna pot do odkritja

Watson in Crick sta prišla do odkritja na podlagi uklona rentgenskih žarkov na DNK (slika 2a), ki sta jih Rosalind Franklin in njen študent Raymond Gosling objavila v isti številki revije Nature, kot je bil objavljen članek o odkritju strukture Watsona in Cricka [2].



**Slika 2: (a)** Uklonski vzorec rentgenskih žarkov semikristalinične oblike B-DNK v raztopini natrijeve soli, ki sta jo posnela Franklinova in Gosling [2]. **(b)** Uklon rentgenskih žarkov na polikristalinični obliki B-DNK v raztopini litijeve soli, avtorjev Langridge et al. [4]. **(c)** Shematični prikaz, ki poudarja štiri glavne značilnosti slik (a) in (b): vzporedne uklonske črte, Andrejev križ, diamantni vzorec in manjkajoča četrta uklonska črta.

Pred omenjenimi odkritji je bilo znano, da vzorci DNK kondenzirajo v različnih (poli)kristaliničnih ali semikristaliničnih oblikah, odvisno od vsebnosti vode, dolžine verig DNK, zaporedja baznih parov, tipa in koncentracije kationov v raztopini itd [6, 7]. Franklinova in Gosling sta odkrila, da se dve taki konformaciji, imenovani A in B-DNK, reverzibilno transformirata ena v drugo ob spreminjanju količine vode v vlaknu. B oblika je posebej zanimiva, saj nastopa v živih celicah. Vzorec uporabljen v uklonskih eksperimentih je vlakno iz DNK, v katerem so posamične podolgovate molekule usmerjene vzdolž vlakna. Vzorec je polikristaliničen, če je sestavljen iz mikrokristalov, v katerih so molekule popolnoma urejene v smeri pravokotno na os vlakna in imajo konstanten kot okoli osi vlakna. Sosednji mikrokristali so v smeri osi urejeni, imajo pa različen zasuk okoli osi. Vzorec je semikristaliničen, če sta orientacija posamičnih molekul okoli vzdolžne osi in razporeditev vzdolž osi naključna, obstaja pa še delna urejenost pravokotno na os. Slika 2a prikazuje uklonsko sliko Franklinove in Goslinga na semikristaliničnem vzorcu B-DNK, pripravljenim z Na kationi [2]. Slika 2b pa prikazuje uklon na polikristalinični B-DNK z Li kationi [4]. Slika 2c prikazuje glavne karakteristike obeh posnetkov. Uklonska slika je v glavnem posledica sipanja na najmočnejšem sipalcu rentgenskih žarkov v strukturi DNK, to je sladkorno-fosfatni skupini, posebej na atomih fosforja. Atomi fosforja (P) vsaj štirikratno bolj sipajo rentgenske žarke kot ostali prisotni atomi (C, N, O in H). Fosforjevo vrstno število je namreč 15, kisikovo 8, presek za sipanje pa je sorazmeren kvadratu vrstnega števila.

Glavne značilnosti uklonskih slik so vzporedne uklonske črte, Andrejev križ, diamantni vzorec in manjkajoča četrta uklonska črta. Izvor teh značilnosti dobro opiše CCV teorija [3], ki jo obravnava naslednje poglavje, vendar si strnjeno razlago pogledimo na tem mestu. Sama teorija CCV še ni dovolj za določitev strukture. Watson in Crick sta morala narediti še nekaj dodatnih premislekov, ključno pa je bilo pravilo o parjenju baz, ki je v soglasju z dvojno vijačnico, katere sestavna dela sta zamaknjena in nasprotno orientirana.

Uklonske pike so urejene v ravnih vzporednih črtah, ki so pravokotne na os vlakna. Struktura vzporednih črt je značilnost linearnih, periodičnih polimerov, in razkriva, da ima DNK v smeri vlakna osnovno celico velikosti 3,4 nm. To je z  $2\pi$  pomnožena obratna vrednost razdalje med sosednjima uklonskima črtama. Vzporedne črte namreč predstavljajo projekcijo Fourierove transformacije linearnega polimera (sama transformacija je serija vzporednih ravnin) na dvodimenzionalni film.

Urejenost najmočnejših pik v obliki Andrejevega križa CCV teorija napoveduje za nezvezno vijačnico, torej sipalce urejene v vijačnico. Zavoj vijačnice mora torej meriti 3,4 nm. Iz kota med črtama Andrejevega križa (približno  $60^\circ$ ), CCV teorija napoveduje radij vijačnice, ki znaša 1 nm, kar je torej razdalja fosforjevih atomov od središča vijačnice. Dodatni dokaz se skriva na ničti uklonski črti in nam še enkrat razkrije radij vijačnice. Drugi uklonski maksimum na tej črti (prvi je v izhodišču), je od sredinskega oddaljen za približno dvakratno razdaljo med uklonskimi črtami. Na tej črti ima uklonska slika po CCV teoriji obliko Besslove funkcije  $J_0^2$  in ko položaj drugega maksimuma izrazimo z znano vrednostjo za velikost zavoja, za radij vijačnice spet dobimo vrednost 1 nm.

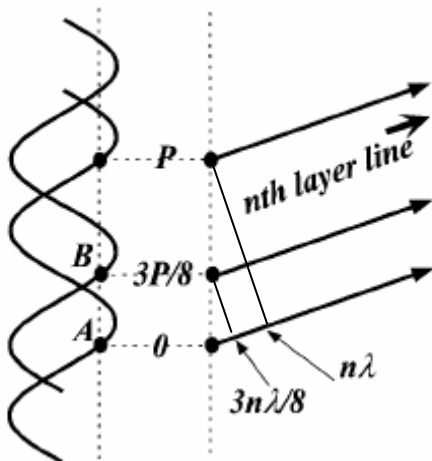
Veliki packi na zgornji in spodnji strani uklonske slike se nahajata na oglišču dveh diamantno oblikovanih področij, katerih drugo oglišče v navpični smeri se nahaja v centru slike. Navpični diagonali diamantnih področij segata preko desetih vzporednih črt.

CCV teorija napoveduje, da se centralni Andrejev križ ponovi po vsakih  $N$  črtah, kjer je  $N$  število atomov (sipalcev) na zavoj vijačnice. Torej mora DNK vsebovati 10 fosfatnih skupin na zavoj vijačnice. Razdalja na uklonski sliki, ki ustreza vertikali Andrejevega križa je obratna vrednost razdalje med baznimi pari. Tako dobimo za razdaljo med baznimi pari vrednost 0,34 nm.

Vse to še ne pojasni, kako so na fosfatno-sladkorne skupine pripete baze. Več dejstev je govorilo v prid temu, da sta dve vijačnici zaviti ena okoli druge v nasprotnih smereh. Veliki uklonski packi na vrhu in dnu slike imata visoko intenziteto, kar se da pojasniti z konstruktivno interferenco žarkov izhajajočih iz dušikovih baz. Uklonski sliki se najbolj prilega model, v katerem sta bazi iz sosednjih verig pripeti ena na drugo z vodikovimi vezmi, tako relativno togo urejene baze pa predstavljajo serijo uklonskih rež. Baze torej poleg fosforjev prispevajo k uklonu in sicer na deseti uklonski črti. Nasprotna orientiranost vijačnic je bila potrjena z eksperimentom Franklinove, v katerem je izmerila uklon na A-DNK. Na podlagi tega eksperimenta je ugotovila, da mora imeti struktura DNK dvoštevno zrcalno os, pravokotno na vzdolžno os molekule. Torej se pri vrtenju za  $180^\circ$  ena vijačnica preslika v drugo (glej sliko 1 levo), pri čemer mislimo le na fosfatne skupine, torej glavne sipalce.

Zadnja značilnost uklonskih slik je manjkajoča četrta uklonska črta. Ta se da razložiti s prisotnostjo dveh nasprotno usmerjenih vijačnic, ki sta zamaknjena za  $3/8$  zavoja. V teoriji CCV lahko pokažemo, da ravno na ta način sistematično izgine četrta uklonska črta. Menjavanje oslabitev in ojačitev posamičnih uklonskih črt sicer lahko opazujemo v kristaliničnih vzorcih v odvisnosti od orientacije molekul glede na vzdolžno os. Vendar se taki prispevki v polikristaliničnih vzorcih izpovprečijo. Vsa ta dejstva so skupaj s podatki o velikostih posamičnih skupin in njihovi sterokemiji Watsona in Cricka pripeljala do modela DNK.

Manjkajočo četrto uklonsko črto lahko brez CCV teorije pojasnimo tudi z uporabo pogojev za interferenco. Na sliki 3 sta dve koaksialni sinusni krivulji, ki predstavljata pravokotni projekciji nasprotno usmerjenih vijačnic, razmaknjenih za  $3P/8$ , kjer je  $P$  dolžina zavoja. Če primerjamo prispevek k sipalni amplitudi dveh ekvivalentnih atomov na sosednjih vijačnicah (A in B), ugotovimo da sta sipana valova, ki potujeta proti  $n$ -ti uklonski črti, premaknjena za  $(3/8)n\lambda$ . Za  $n = 4$  sta prispevka ravno v nasprotni fazi in izpolnjen je pogoj za destruktivno interferenco.



**Slika 3:** Planarna projekcija dvojne koaksialne vijačnice, katere dela sta medsebojno zamaknjena za  $3/8$  zavoja  $P$ . A in B sta ekvivalentni točki na sosednjih delih vijačnice. Sipanje, ki na opazovalni zaslon potuje proti  $n$ -ti uklonski črti iz teh dveh točk, je medsebojno zamaknjeno za  $3n\lambda/8$ .

### 3. Teorija CCV

#### 3.1. Siplni vektor, strukturni faktor

Teoretično podlago za določitev strukture DNK je dala teorija Cochran, Cricka in Vanda [3]. CCV teorija pojasni uklonski vzorec rentgenskih žarkov na enoatomni krožni vijačnici, kar povzemamo po referenci [5].

Rentgenski žarki imajo valovne dolžine med 0,01 in 10 nm in nosijo energijo 10 keV ali več. Valovne dolžine so torej ravno prave za določitev kristalne strukture na osnovi uklonskih pojavov, saj so osnovne celice kristalov nanometerskega reda velikosti. Na vzorec naj padajo monokromatski (idealizacija) rentgenski žarki, ki se ob interakciji z vzorcem sipljejo. Siplnim žarkom z detektorjem določimo intenziteto pri različnih kotih glede na smer vpadnega snopa, ali pa ti padajo na film postavljen za vzorcem, ki ga počrtnijo v sorazmerju z intenziteto žarkov. V izpeljavi predpostavimo idealno translacijsko simetrijo brez defektov, atomi v vzorcu naj mirujejo ( $T = 0K$ ).

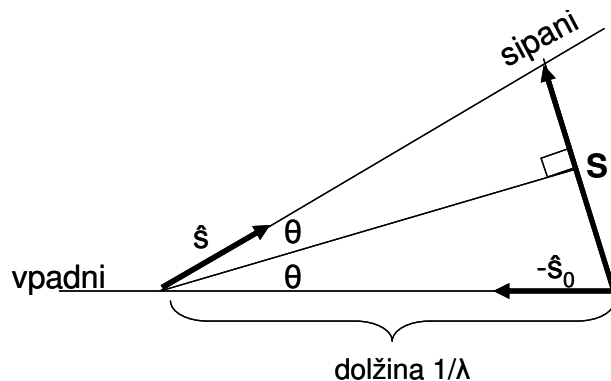
Intenziteta siplanih žarkov je odvisna od orientacije vzorca glede na smer vpadnega žarka. Siplni vektor definiramo kot razliko med vpadnim in siplnim žarkom:

$$\mathbf{S} = \frac{\hat{s}}{\lambda} - \frac{\hat{s}_0}{\lambda} \quad (1)$$

Pravokotnica na siplni vektor  $\mathbf{S}$  razpolavlja kot med vpadnim žarkom  $\hat{s}_0$  in siplnim žarkom  $\hat{s}$  (slika 4). Ponekod se siplni vektor definira še s faktorjem  $2\pi$ , ki ga bomo tukaj morali v Fourierovih transformacijah dopisati. Dolžina siplnega vektorja je odvisna od siplnega kota  $\theta$  (včasih lahko definiran kot  $\theta/2$ ), ki je definiran kot polovični kot med vpadnim in siplnim žarkom:

$$|\mathbf{S}| = 2 |\sin \theta| / \lambda \quad (2)$$

Za sipanje naprej je torej  $S = 0$  in  $\theta = 0^\circ$ , pri sipanju nazaj pa ima  $S$  največjo vrednost  $S = 2/\lambda$  in  $\theta = 90^\circ$ .



**Slika 4:** Geometrija sipanja: Siplni vektor  $\mathbf{S}$  je z valovno dolžino deljena vektorska razlika siplnega žarka  $\hat{s}$  in vpadnega žarka  $\hat{s}_0$ .

Definirajmo strukturni faktor  $F(\mathbf{S})$ , ki je funkcija sipalnega vektorja (in s tem položaja na filmu) in nam pove razmerje med jakostjo električnega polja, ki ga siplje dan vzorec in jakostjo polja, ki bi ga sipal elektron v izhodišču izbranega koordinatnega sistema. Če je razmerje med oddaljenostjo detektorja od vzorca in velikostjo vzorca dovolj veliko, je sipalni kot svetlobe sipane iz različnih delov vzorca na dano točko filma skoraj enak. Razlika je zaradi majhne odvisnosti od velikosti sipalnega vektorja na strukturni faktor zanemarljiva. Edina pomembna razlika v strukturnem faktorju je tako posledica razlike v fazi valovanja, izhajajočega iz različnih točk na vzorcu. Če predpostavimo zvezno elektronsko gostoto, je strukturni faktor enak:

$$F(\mathbf{S}) = \int \rho(\mathbf{r}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (3)$$

Pri tem je  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$  ravno razlika v fazi med elektronom v izhodišču in tistem na mestu  $\mathbf{r}$ . Strukturni faktor je sorazmeren elektronski gostoti, integriramo pa po celotnem vzorcu ali pa le po osnovni celici vzorca. Iz strukture enačbe vidimo, da je strukturni faktor Fourierova transformacija elektronske gostote. Tako lahko iz strukturnega faktorja izrazimo elektronsko gostoto z obratno transformacijo:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int F(\mathbf{S}) \text{Exp}(-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{S} \quad (4)$$

V praksi tega računa ponavadi ne moremo izvesti, saj je strukturni faktor zaradi vpliva faze kompleksna količina, meritve pa so na fazo neobčutljive. Eksperimentalno izmerimo le intenziteto sipanega valovanja  $I(\mathbf{S})$  pri kotu  $2\theta$  glede na vpadno valovanje (kar ustreza sipalnemu kotu  $\theta$ ), in s tem absolutno vrednost strukturnega faktorja:

$$I(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) F^*(\mathbf{S}) = |F|^2 \quad (5)$$

Pri tem velja, da je  $I(\mathbf{S}) = I(-\mathbf{S})$ , kar je posledica dejstva, da je  $\rho(\mathbf{r})$  realna količina. Strukturni faktor, ki je posledica sipanja iz enega samega atoma v izhodišču, imenujemo atomski strukturni faktor. Če privzamemo, da je elektronska gostota v atomu Gaussove oblike,  $\rho(\mathbf{r}) \propto Z \text{Exp}(-k r^2)$ , pri čemer je  $k$  konstanta,  $Z$  pa vrstno število, je tudi atomski strukturni faktor Gaussova funkcija:

$$f(S) = Z \text{Exp}(-\pi^2 S^2 / k) \quad (6)$$

V tem izrazu nastopa le velikost  $S$ , kar je posledica izbire radialno simetrične elektronske gostote. Čeprav je primer poenostavljen, lahko vidimo, da intenziteta sipanega valovanja precej hitro pada z velikostjo sipalnega vektorja. Kot bomo videli, je splošno sipanje konvolucija več prispevkov, vendar atomski strukturni faktor vedno povzroči, da intenziteta uklonskih maksimumov pada z oddaljevanjem od naprej sipanega žarka. Strukturni faktorji atomov se seštevajo, kar je enakovredno superpoziciji jakosti električnega polja. Tako dobimo bodisi molekularni strukturni faktor, strukturni faktor

osnovne celice ali druge ustrezne enote kar z vsoto po N sipalcih, pri čemer vsakemu pripišemo ustrezno fazo, glede na njegovo koordinato  $\mathbf{r}_n$ :

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{n=1}^N f_n(\mathbf{S}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n) \quad (7)$$

V primeru, da ima opazovana struktura center inverzije, prispevajo atomi na položajih  $\mathbf{r}_n$  enak prispevek kot tisti pri  $-\mathbf{r}_n$ . Tedaj lahko namesto eksponentne funkcije zapišemo le kosinus, strukturni faktor pa postane realen in je možno z obratno transformacijo izračunati elektronsko gostoto.

### 3.2. Uklon na enodimenzionalni verigi

Izračunajmo sedaj uklonski vzorec rentgenskih žarkov na enodimenzionalni verigi  $2N + 1$  identičnih atomov, ki je podana z vektorjem translacije  $\mathbf{a}$ . V enačbi (7) seštevamo od  $-N$  do  $N$ , za vse atome enak atomski strukturni faktor pa postavimo pred vsoto. Ko geometrijsko vrsto seštejemo, dobimo:

$$F_{2N+1}(\mathbf{S}) = f(\mathbf{S}) \frac{\sin[(2N+1)\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}]}{\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})} \quad (8)$$

Intenziteto sipanih žarkov izračunamo po enačbi (5) in je enaka:

$$I_{2N+1}(\mathbf{S}) = [f(\mathbf{S})]^2 \left( \frac{\sin[(2N+1)\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}]}{\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})} \right)^2 \quad (9)$$

Ko število atomov  $N$  postane veliko, gre intenziteta proti nič povsod, razen v točkah, kjer je skalarni produkt  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$  celo število. To se vidi iz razvoja za majhne vrednosti argumenta sinusov, saj je v okolici celoštevilčnega skalarnega produkta  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$  vrednost sinusa blizu nič. Če v razvoju vzamemo le linearni člen se v obeh sinusih v ulomku okrajša vse, razen člena  $2N + 1$  v števcu, ta pa je zelo velik. Člen  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$  je mera za relativno orientacijo med vzorcem in detektorjem. Najvišji je uklonski vrh pri  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$ , ko je  $\mathbf{S}$  v ravnini, pravokotni na smer verige atomov. Intenziteta uklonskih vrhovi pada z oddaljenostjo od osrednjega maksimuma.

Pogoj za ojačitev je torej:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h \quad (10)$$

Pri tem je  $h$  celo število. Primer  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 1$  npr. pomeni, da projekcija vektorja  $\mathbf{S}$  na  $\mathbf{a}$  znaša  $1/a$ . Izraz (10) torej definira množico med seboj vzporednih ravnin, medsebojno razmaknjenih za  $1/a$  in pravokotnih na vektor  $\mathbf{a}$ . Te ravnine v recipročnem prostoru definirajo vse možne sipalne vektorje  $\mathbf{S}$ , pri katerih lahko dobimo merljivo intenziteto.



Dodatno omejitev dobimo, ko vnaprej določimo še vpadni vektor  $\mathbf{s}_0$ . Ker gre za elastično sipanje ( $s = s_0$ ), se možni sipalni vektorji  $\mathbf{S}$  nahajajo na krogelni lupini (von Lauejeva krogla) z radijem  $1/\lambda$  (enačba 1), izhajajoč iz dane točke na koncu vektorja  $\mathbf{s}_0$ . Ob združitvi obeh pogojev vidimo, da se možni sipalni vektorji  $\mathbf{S}$  nahajajo na črtah, ki so presečišče vzporednih ravnin (10) in krogelne lupine z radijem  $1/\lambda$ . Oblika teh črt je odvisna od medsebojne orientacije  $\mathbf{s}_0$  in  $\mathbf{a}$ : če sta vektorja vzporedna ali pravokotna, dobimo krožnice, sicer pa elipse.

### 3.2. Uklon v treh dimenzijah

Obravnavo enostavno posplošimo v dve ali tri dimenzije. V treh dimenzijah imejmo osnovno celico definirano z vektorji  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ , in  $\mathbf{c}$ . Veljajo enačbe:

$$\begin{aligned} \mathbf{S} \cdot \mathbf{a} &= h \\ \mathbf{S} \cdot \mathbf{b} &= k \\ \mathbf{S} \cdot \mathbf{c} &= l \end{aligned} \tag{11}$$

Izraz (11) definira mrežo točk v recipročnem prostoru, pri katerih lahko dobimo uklonske ojačitve. Merljive intenzitete se nahajajo pri sipalnih vektorjih, ki jih dobimo kot presek von Lauejeve krogle s točkami recipročnega prostora. Enačba za strukturni faktor se v treh dimenzijah glasi:

$$F(\mathbf{S}) = \sum_x \sum_y \sum_z f(S) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot (x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c})) \tag{12}$$

Pri tem so  $x$ ,  $y$  in  $z$  cela števila, ki celoten prostor zapolnijo s ponavljajočo se strukturo osnovne celice. Če v enačbo (12) vstavimo pogoj (11), sledi:

$$F(h, k, l) = \sum_x \sum_y \sum_z f(S) \text{Exp}(2\pi i (hx + ky + lz)) \tag{13}$$

Možni sipalni vektorji so sedaj karakterizirani s trojico  $hkl$ , ki jim rečemo tudi Millerjevi indeksi. Ti predstavljajo tudi množico vzporednih mrežnih ravnin, ki sekajo osi pri vsakem celoštevilčnem večkratniku  $\mathbf{a}/h$ ,  $\mathbf{b}/k$  in  $\mathbf{c}/l$ . V primeru sipanja na identičnih atomih se enačba (13) poenostavi v:

$$F(h, k, l) = N f(S) \tag{14}$$

Strukturni faktor je torej kar sorazmeren številu atomov v vzorcu. Pri tem seveda ne smemo pozabiti, da so  $h$ ,  $k$ ,  $l$  celoštevilčni in da še vedno velja tudi omejitev glede na presek možnih recipročnih točk s von Lauejevo kroglo.

### 3.3. Uporaba konvolucije pri uklonu

Konvolucija funkcij  $f(\mathbf{r})$  in  $g(\mathbf{r})$  je definirana s predpisom:

$$\overline{f g}(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{r}) g(\mathbf{u} - \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (15)$$

Črta nad funkcijama je znak za konvolucijo. Če je  $g(\mathbf{r})$  npr. Diracova delta funkcija  $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{a})$ , je rezultat konvolucije premik funkcije  $f$  za vektor  $\mathbf{a}$ :

$$\overline{f \delta}(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{r}) \delta(\mathbf{u} - (\mathbf{r} - \mathbf{a})) d\mathbf{r} = f(\mathbf{u} + \mathbf{a}) \quad (16)$$

Tako lahko elektronsko gostoto v kristalu zapišemo kot konvolucijo vsote delta funkcij, ki predstavljajo mrežne točke kristala, in elektronske gostote  $\rho(\mathbf{r})$  ene osnovne celice:

$$\overline{L\rho}(\mathbf{u}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} \rho(\mathbf{u} + n\mathbf{a} + m\mathbf{b} + p\mathbf{c}) \quad (17)$$

Pri tem je z  $L(\mathbf{r})$  podana kristalna mreža:

$$L(\mathbf{r}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{r} - n\mathbf{a} - m\mathbf{b} - p\mathbf{c}) \quad (18)$$

Poglejmo si lastnosti Fourierove transformacije konvolucije, ki so posebej pomembne za opis uklona. Naj bosta  $F(\mathbf{S})$  in  $G(\mathbf{S})$  Fourierovi transformiranki:

$$F(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{r}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (19)$$

$$G(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\mathbf{r}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

$f(\mathbf{r})$  in  $g(\mathbf{r})$  pa njuni obratni transformiranki:

$$f(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{S}) \text{Exp}(-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{S} \quad (20)$$

$$g(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\mathbf{S}) \text{Exp}(-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{S}$$

Iz enačb (15, 19, 20) se da pokazati, da je obratna Fourierova transformacija produkta dveh funkcij enaka konvoluciji obratnih Fourierovih transformirank teh dveh funkcij:

$$\overline{f g}(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{S})G(\mathbf{S}) \text{Exp}(-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}) d\mathbf{S} \quad (21)$$

Velja pa tudi, da je Fourierova transformacija konvolucije dveh funkcij enaka produktu Fourierovih transformirank teh dveh funkcij:

$$F(\mathbf{S})G(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} \overline{f g}(\mathbf{u}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}) d\mathbf{r} \quad (22)$$

Veljata tudi podobni enačbi, pri katerih sta operaciji konvolucije in produkta ravno zamenjani. Definirajmo sedaj strukturni faktor ene same osnovne celice  $F_m$  na podlagi enačbe 3, pri čemer integriramo le po volumnu osnovne celice:

$$F_m(\mathbf{S}) = \int \rho_m(\mathbf{r}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (23)$$

Celotno elektronsko gostoto kristala generiramo s konvolucijo  $\overline{L\rho}(\mathbf{u})$ , pri čemer je  $L(\mathbf{r})$  definirana z enačbo (18),  $\rho(\mathbf{r})$  pa z obratno Fourierovo transformacijo enačbe (23), glej tudi enačbo (4). Sedaj lahko zapišemo  $F_{tot}$ , strukturni faktor celotnega kristala:

$$F_{tot}(\mathbf{S}) = \int \overline{L\rho}(\mathbf{u}) \text{Exp}(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}) d\mathbf{u} \quad (24)$$

Ker imamo opravka s Fourierovo transformacijo konvolucije, lahko po enačbi (22) presodimo:

$$F_{tot}(\mathbf{S}) = F_m(\mathbf{S})F_L(\mathbf{S}) = F_m(\mathbf{S}) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \text{Exp}(2\pi i n \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}) \quad (25)$$

Pri tem je  $F_m(\mathbf{S})$  strukturni faktor, ki pripada osnovni celici (Fourierova transformacija elektronske gostote),  $F_L(\mathbf{S})$  pa strukturni faktor kristalne rešetke (Fourierova transformacija kristalne rešetke). Rezultat je podoben kot v enačbi (7), le da velja splošno za molekulske kristale. V treh dimenzijah enačba (25) pridobi še člena z baznima vektorjem  $b$  in  $c$ . Ob upoštevanju von Lauejevih pogojev (11) identično kot v enačbah (12)-(14), pridemo do rezultata:

$$F_{tot}(h, k, l) = N F_m(\mathbf{S}) \quad (26)$$

$N$  predstavlja število osnovnih celic v kristalu,  $F_m(\mathbf{S})$  pa strukturni faktor osnovne celice, ki se ob upoštevanju enačbe (11) glasi:

$$F_m(h, k, l) = \sum_j f_j(S) \text{Exp}(2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)) \quad (27)$$

Tukaj so  $x_j$ ,  $y_j$  in  $z_j$  števila med 0 in 1 ter predstavljajo pozicije sipalcev v osnovni celici.

### 3.4. Uklon rentgenskih žarkov na vlaknih: zvezna vijačnica

Vlakno B-DNA v eksperimentu Franklinove in Goslinga je semikristalinično, v eksperimentu Langridga in sodelavcev pa polikristalinično. Z mehanskim raztegovanjem se vzorec v obeh primerih delno uredi tako, da imajo vsi mikrokristali ali vse molekule skupno dolgo os, okoli te osi pa so enote naključno orientirane. Za  $F_{\text{tot}}$  posamične enojne vijačnice velja enačba (25), izmerjena intenziteta pa ustreza :

$$\langle I(\mathbf{S}) \rangle = \langle |F_{\text{tot}}|^2 \rangle = \langle |F_m(\mathbf{S})F_L(\mathbf{S})|^2 \rangle \quad (28)$$

kar je mišljeno kot povprečje preko vseh kotov glede na glavno os.

Najprej obravnavajmo eno samo nezvezno enoatomno vijačnico. Strukturni faktor za ta primer je enak:

$$F_{\text{tot}}(\mathbf{S}) = f(\mathbf{S})F_1(\mathbf{S}) \quad (29)$$

Pri tem je  $f(\mathbf{S})$  kar atomski strukturni faktor, npr. iz enačbe (6),  $F_1(\mathbf{S})$  pa Fourierova transformacija vijačno razporejenih točk, ki jo moramo še izračunati. Vijačno mrežo formuliramo s produktom zvezne vijačnice in družine ravnin, katerih presek z vijačnico predstavlja atome. Fourierova transformacija produkta je enaka konvoluciji Fourierovih transformacij obeh komponent, torej:

$$F_l(\mathbf{S}) = \overline{F_c(\mathbf{S})F_u(\mathbf{S})} \quad (30)$$

Z  $F_c(\mathbf{S})$  smo označili Fourierovo transformacijo zvezne vijačnice, z  $F_u(\mathbf{S})$  pa transformacijo družine vzporednih ekvidistančnih ravnin. V bolj realističnem primeru, ko nimamo v vijačnico razporejenih enakih atomov, ampak večje enote (npr. molekule), moramo upoštevati strukturni faktor take enote  $F_R(\mathbf{S})$ :

$$F_{\text{tot}}(\mathbf{S}) = F_R(\mathbf{S})F_l(\mathbf{S}) \quad (31)$$

Najprej po enačbi (3) izračunajmo strukturni faktor zvezne vijačnice. Koordinate cilindričnega koordinatnega sistema označimo kot  $r, \varphi, z$  v realnem prostoru in  $R, \psi, Z$  v recipročnem prostoru. Skalarni produkt  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$ , ki nastopa v eksponentu, izrazimo z kartezičnimi enotskimi vektorji  $\hat{\mathbf{x}}, \hat{\mathbf{y}}, \hat{\mathbf{z}}$  in  $\hat{\mathbf{X}}, \hat{\mathbf{Y}}, \hat{\mathbf{Z}}$  v realnem oziroma recipročnem prostoru, pri čemer sta ustrezna para enotskih vektorjev vzporedna:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = (\hat{\mathbf{x}}S_x + \hat{\mathbf{y}}S_y + \hat{\mathbf{z}}S_z) \cdot \mathbf{r} = (\hat{\mathbf{x}} \cdot \mathbf{r})(\hat{\mathbf{X}} \cdot \mathbf{S}) + (\hat{\mathbf{y}} \cdot \mathbf{r})(\hat{\mathbf{Y}} \cdot \mathbf{S}) + (\hat{\mathbf{z}} \cdot \mathbf{r})(\hat{\mathbf{Z}} \cdot \mathbf{S}) \quad (32)$$

Prepoznamo lahko naslednje zveze:  $\hat{\mathbf{z}} \cdot \mathbf{r} = z$ ,  $\hat{\mathbf{Z}} \cdot \mathbf{S} = Z$ ,  $\hat{\mathbf{x}} \cdot \mathbf{r} = r \cos \phi$ ,  $\hat{\mathbf{X}} \cdot \mathbf{S} = R \cos \psi$ ,  $\hat{\mathbf{y}} \cdot \mathbf{r} = r \sin \phi$ ,  $\hat{\mathbf{Y}} \cdot \mathbf{S} = R \sin \psi$ . Enačbo (3) lahko prepisemo v:

$$F_c(R, \psi, Z) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\infty}^{\infty} dz \text{Exp}(2\pi i (r_h R \cos(\phi - \psi) + z Z)) \quad (33)$$

Pri tem smo uporabili adicijski izrek in integrirali po  $r$ . V našem modelu velja, da je elektronska gostota neničelna le pri  $r = r_h$  (polmer vijačnice), tako da smo za elektronsko gostoto lahko vstavili Diracovo delta  $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_h)$ .

Vijačnica je periodična v smeri osi  $z$ , s periodo  $P$ , ki predstavlja en zavoje vijačnice. Ker ima vsaka točka na vijačnici periodo  $P$  velja, da dani točki iz realnega prostora (upoštevajoč vse ekvivalentne točke) v recipročnem prostoru ustreza družina vzporednih ravnin pri  $Z = n / P$ , kjer je  $n$  celo število. Vijačnica se pomakne v smeri  $z$  za  $P$ , ko se za  $2\pi$  zavrtimo okoli osi. Torej velja  $z = P \phi / 2\pi$ . Če to zvezo vstavimo v enačbo (33), preostane le še integral po kotu  $\phi$ :

$$F_c(R, \psi, n/P) = \int_0^{2\pi} \text{Exp}(2\pi i r_h R \cos(\phi - \psi) + in\phi) d\phi \quad (34)$$

Ta integral je Besslova funkcija prvega reda:

$$F_c(R, \psi, n/P) = J_n(2\pi r_h R) \text{Exp}(in(\psi + \pi/2)) \quad (35)$$

Strukturni faktor zvezne vijačnice radia  $r_h$  in periode  $P$  je torej družina Besslovih funkcij, ki so definirane oz. različne od 0 na črtah  $Z = n/P$  v recipročnem prostoru. Siplna amplituda na dani črti je radialno simetrična, radialna odvisnost nastopa le v fazi.

Ko je vzorec ena sama zvezna vijačnica, je intenziteta po enačbi (5) enaka:

$$I_c(R, n/P) = F_c^* F_c = J_n^2(2\pi r_h R) \quad (36)$$

Poleg radialne simetrije velja še  $J_{-n}^2 = J_n^2$  in so uklonske črte simetrične glede na os ničte uklonske črte. Pri eksperimentu je ponavadi os  $Z$  vertikalna, os  $R$  pa horizontalna. Takrat je rezultat uklona družina ekvidistančnih horizontalnih vzporednih črt, ki so razmaknjene za  $1/P$ , kar omogoča meritev periode  $P$ . Iz eksperimenta je določena vrednost 3,4 nm za velikost zavoja vijačnice. Poleg tega na vsaki  $n$ -ti črti pričakujemo serijo uklonskih pik, ki pripadajo maksimumom  $n$ -te Besslove funkcije. Lastnost Besslovih funkcij je, da intenziteta vrhov pri dani funkciji z večanjem  $R$  pada in da se položaj prvega vrha pojavlja pri čedalje večjem  $R$ , ko se večja  $n$ . Rezultat je uklonski vzorec v obliki črke  $x$ , za kot med krakoma, ko gre  $n \rightarrow \infty$  pa velja:

$$\delta = \arctg(P / 2\pi r_h) \quad (37)$$

Iz izmerjenega kota  $\delta$  in znane periode  $P$  lahko torej določimo radij vijačnice  $r_h$ , ki pri DNK znaša 1 nm in se seveda nanaša na fosfatne skupine kot glavnega sipalca rentgenskih žarkov.

### 3.5. Uklonski vzorec nezvezne vijačnice

Sedaj moramo določiti še strukturni faktor  $F_u$ , torej družine vzporednih ravnin pravokotnih na  $z$  in razmaknjenih za  $h$ . Ker je Fourierova transformacija enodimenzionalne mreže točk enaka družini ravnin velja tudi obratno, transformacija ravnin je družina točk v smeri osi  $Z$ , razmaknjenih za  $1/h$ :

$$F_u(Z) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \delta(Z - m/h) \quad (38)$$

Izrazimo konvolucijo  $\overline{F_c F_u}$  iz enačbe (30) in dobimo strukturni faktor nezvezne vijačnice:

$$F_l(R, \psi, Z) = \overline{F_c F_u} = \sum_n J_n(2\pi r_h R) \text{Exp}(i n(\psi + \pi/2)) \quad (39)$$

Pogoj za  $Z$  izhaja iz obeh funkcij v konvoluciji in sicer velja:

$$Z = m/h + n/P \quad (40)$$

To je posledica konvolucije, ki pri vsaki vrednosti  $m/h$  dovoli vse celoštevilčne  $n$ . Tako je pri vsakem dovoljenem  $Z$ , tudi vsota v enačbi (39) omejena na tiste  $n$ , ki ustrezajo enačbi (40).

Če ima vijačnica celo število enot na zavoj:  $k = P/h$ , je uklonski vzorec relativno enostaven. Če pogoj za  $k$  vstavimo v enačbo (40) namreč dobimo:

$$Z = (1/P)(mk + n) = l/P \quad (41)$$

Ker so  $m$ ,  $k$  in  $n$  cela števila, je tudi  $l$  celo število. Pri danem  $l$  in  $k$  moramo iz enačbe (39) odbrati le tiste  $n$ , ki ustrezajo zvezi  $l = m k + n$ . Uklonski vzorec se pojavi na istih črtah kot pri zvezni vijačnici, le da se na vsakih  $k$  črt ponovi. To ugotovimo, če v pogoj za  $l$  vstavimo  $M k$ , torej večkratnik števila  $k$ . Tako dobimo pogoj  $n = k(M - m)$ . Ker je  $m$  poljubno celo število, je tudi  $M - m$  poljubno celo število, saj je  $M$  dano celo število. Torej je za poljuben  $M$  (in s tem večkratnik števila  $k$ ), izbor števil  $n$  vedno enak večkratnikom števila  $k$ , kar res pripelje do ponovitve črt. Ponovitev uklonskega vzorca na vsakih  $k$  črt nam omogoči določitev števila  $k$ , v našem primeru torej število fosfatnih skupin na zavoj vijačnice. V eksperimentu Franklinove se je dalo razbrati, da je to število enako 10.

Hkrati pa obratna vrednost razdalje do k-te (desete) črte od središča pomeni obratno vrednost razdalje med fosfatnimi skupinami. V primeru DNK je ta razdalja 0,34 nm.

V primeru necelega števila enot na zavoj vijačnice lahko ponavadi rečemo, da se v  $V$  zavojih nahaja  $k$  enot. Tedaj se struktura ponovi na razdalji  $d = V/P$ , posamezne enote pa so med seboj oddaljene za  $h = VP/k$ . Če to vstavimo v enačbo (40), dobimo pogoj:

$$\begin{aligned} Z &= (mk + Vn)/VP = l/VP \\ n &= (l - mk)/V \end{aligned} \quad (42)$$

Ugotovimo lahko, da je  $l$  spet katerikoli celo število. Pri danem  $k$  in  $V$  lahko izberemo le tako kombinacijo  $l$  in  $m$ , da je  $n$  celo število. Uklonske črte so sedaj bolj goste, razdalja med njimi je  $1/VP$ , uklonski vzorec pa se spet ponovi na vsakih  $k$  črt.

Sedaj še iz strukturnega faktorja po enačbi (5) izračunajmo intenziteto uklonskega vzorca točkaste vijačnice z necelim številom enot na zavoj:

$$I(R, \psi; Z = l/VP) = \sum_n \sum_{n'} J_n(2\pi r_h R) J_{n'}(2\pi r_h R) \text{Exp}(i(n - n')(\psi + \pi/2)) \quad (43)$$

Pri tem moramo za vsako dovoljeno uklonsko črto  $l$  upoštevati pogoj za  $n$  iz enačbe (42). Spet se spomnimo na naključno orientacijo vijačnic po kotu  $\varphi$ . Tako moramo tudi v recipročnem prostoru izraz integrirati po vseh možnih  $\psi$ , torej od 0 do  $2\pi$ . Ta integral nam da kar Diracov delta  $\delta(n - n')$ , tako da na koncu dobimo rezultat:

$$\langle I(R, Z = l/VP) \rangle = \sum_n J_n^2(2\pi r_h R) \quad (44)$$

Po obliki je to podoben rezultat kot v enačbi (36) za zvezno vijačnico, le da tu pri vsakem dovoljenem  $l$  seštevamo po vseh dovoljenih  $n$ .

### 3.6. Dvojna vijačnica

V nadaljevanju bolj natančno obravnavajmo primer s celim številom atomom na zavoj vijačnice. Predstavljajmo si sedaj dvojno vijačnico, iz dveh koaksialno postavljenih vijačnic, ki sta za del zavoja  $f$  premaknjeni med seboj. Vijačnici morata biti zamaknjeni zaradi steričnih razlogov. Strukturni faktor dvojne vijačnice dobimo z množenjem strukturnega faktorja enojne vijačnice  $F_1(\mathbf{S})$  iz enačbe (39), z izrazom:

$$G(f) = 1 + \text{Exp}(2\pi i f l) \quad (45)$$

Enica predstavlja prvo vijačnico, v eksponentnem delu pa drugi vijačnici pripada ustrezna fazna razlika. Ko je produkt  $f l = n + 1/2$ , je  $G(f)$  enak 0, če je  $n$  celo število. Za ustrezne vrednosti  $f$  lahko dobimo tak  $l$ , da bo ustrezna uklonska črta izginila. Da bi izginila četrta črta, kar je vidno v eksperimentu, v gornji izraz torej vstavimo  $l = 4$ . Dobimo torej pogoj:

$$f = 2n + 1 / 8 \quad (46)$$

Zaradi steričnih razlogov lahko izločimo rešitev  $f = 1/8$ . Ostane nam rešitev  $f = 3/8$  ali ekvivalentno  $f = 5/8$ . To pomeni, da sta koaksialni vijačnici v DNK medsebojno zamaknjeni za  $3/8$  zavoja.

Izmed vseh značilnosti na uklonski sliki 2 smo le pri manjkajoči četrti črti morali upoštevati dvojno vijačnico. Možno je pregledati še vse druge kombinacije, to je različno število vijačnic različno zamaknjenih med seboj. Izkaže se, da je Watson-Crickov model najbolj uspešen. V primeru monokristala je intenziteta uklonjene svetlobe tudi močno odvisna od kota rotacije okoli vzdolžne osi. Tedaj ob vrtenju nekatere črte periodično spreminjajo intenziteto, vendar se rezultati še vedno ujemajo z istim modelom.

## 4. Zaključek

Watson in Crick sta na podlagi meritev Franklinove in Goslinga, CCV teorije in svojih dodatnih razmislekov, predlagala strukturo DNK, ki je danes splošno sprejeta. DNK je dvojna vijačnica, sestavljena iz dveh nasprotno vzporednih koaksialnih vijačnic, premaknjenih za  $3/8$  zavoja. En zavoje vijačnice meri 3,4 nm in vsebuje 10 baznih parov, ki se medsebojno pari po Watson-Crickovem pravilu. Fosfatne skupine so od osi vijačnice oddaljene 1 nm. Odkritje strukture DNK je bilo izjemno odkritje znanosti dvajsetega stoletja, na podlagi katerega se biokemijske vede še danes razvijajo v smeri genetskih tehnologij. V podrobnostih so bili pojasnjeni procesi prepisovanja genov. Znanstveniki so razvili metode za branje sekvenc DNK, ki je omogočila odkritja genomov višjih živali in rastlin, vključno s človeškim genomom v projektu Human Genome Project.

### Literatura:

- [1] Watson J. D. and Crick F. H. C., Nature 171, 737, 1953
- [2] Franklin R. E. and Gosling R. G., Nature 171, 740, 1953
- [3] Cochran W., Crick F. H. C. and Vand V., Acta Crystallogr. 5, 581, 1952
- [4] Pauling L., Corey R. J., J Am Chem Soc 72, 5349, 1950
- [5] Charles R. Cantor and Paul R. Schimmel: Biophysical Chemistry, Part II, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980
- [6] A. A. Lucas, P. Lambin, J. F. Colomer, "Diffraction of X-rays and of Electrons by Helical Molecules" [www.phys.waseda.ac.jp/surface/lucas\\_paper.pdf](http://www.phys.waseda.ac.jp/surface/lucas_paper.pdf)
- [7] A. A. Lucas, Int Jour Quant Chem, Vol 90, 1491-1504, 2002