SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Danijel Grgičin

DINAMIKA I STRUKTURA OTOPINA SOLI DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE: UTJECAJ VALENCIJE PROTUIONA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PHYSICS

Danijel Grgičin

DYNAMICS AND STRUCUTRE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SALT SOLUTIONS: INFLUENCE OF COUNTERION VALENCY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Danijel Grgičin

DINAMIKA I STRUKTURA OTOPINA SOLI DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE: UTJECAJ VALENCIJE PROTUIONA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Tomislav Vuletić

Zagreb, 2015.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PHYSICS

Danijel Grgičin

DYNAMICS AND STRUCUTRE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SALT SOLUTIONS: INFLUENCE OF COUNTERION VALENCY

DOCTORAL THESIS

Supervisor: dr. sc. Tomislav Vuletić

Zagreb, 2015

DINAMIKA I STRUKTURA OTOPINA SOLI DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE: UTJECAJ VALENCIJE PROTUIONA

Danijel Grgičin, dipl. ing. fizike

Institut za fiziku, Zagreb

Mentor: Dr. sc. Tomislav Vuletić, Institut za fiziku

Sažetak: Problem raspodjele protuiona u blizini poliiona je u fizici polielektrolita (PE) uočen još 1950-tih godina. Protuioni su podijeljeni u slobodne i Manning kondenzirane, a teorije uglavnom pokušavaju interpretirati mjerenja osmotskog tlaka. U svome radu koristio sam konduktometriju, dielektričnu spektroskopiju (DS) i raspršenje X-zraka u male kutove (engl. SAXS) kako bih istražio strukturu i dinamiku, pa tako i raspodjelu protuiona jakog PE, deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i slabog PE, hijaluronske kiseline (HA) u rasponu koncentracija c=0.01-10 mM. U čistim vodenim otopinama PE, mjerenja DS daju κ širinu potencijalne jame poliiona – tj. prostorno protezanje atmosfere protuiona koje je 2π puta manje nego SAXSom određena udaljenost između poliiona. Drugim riječima, povećanjem koncentracije PE širina potencijalne jame κ se smanjuje. S dodanom soli širina jame ovisi pak o ionskoj jakosti otopine. Stoga smo zaključili i kako je promjena za čiste vodene otopine uzrokovana promjenom koncentracije protuiona, a ne promjenom razmaka poliiona. Nadalje, konduktometrijom je uočen porast ekvivalentne vodljivosti Λ sa sniženjem c, i za razrijeđene DNA i za polurazrijeđene DNA i HA otopine što interpretiramo smanjenjem udjela protuiona u blizini poliiona, što efektivno povećava naboj poliiona pa stoga i Λ. Naime, slabi kondenziranje Manning protuiona zbog pojačanog utjecaja entropije na niskim c. I κ i Λ bi trebali ovisiti o valenciji protuiona, što smo i potvrdili mjerenjima s Na^+ i Mg^{2+} protuionima. Manning teorija za HA ne predviđa kondenzaciju protuiona (za razliku od DNA) pa ne bi trebalo biti uočenog efekta na Λ. Moguće je da entropija pri niskim koncentracijama mijenja i efektivni naboj HA. Trenutni teorijski modeli pokrivaju samo razrijeđene otopine, ali se kvalitativno slažu s našim rezultatima.

(119 stranica, 61 slika, 3 tablice, 119 literarnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Ključne riječi: polielektroliti, raspodjela protuiona, osmotski koeficijent, Manning kondenzirani protuioni, širina protuionske atmosfere, električna vodljivost polielektrolita
Datum obrane: 14. srpanj 2015.
Povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Mario Basletić (Predsjednik povjerenstva), PMF Zagrebu
2. Dr. sc. Tomislav Vuletić, v. zn. suradnik (Mentor), IF Zagrebu
3. Izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin, PMF Zagrebu

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Bijenička cesta 32.

DYNAMICS AND STRUCUTRE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SALT SOLUTIONS: INFLUENCE OF COUNTERION VALENCY

Danijel Grgičin, dipl. ing. fizike

Institute of Physics, Zagreb

Supervisor: Dr. sc. Tomislav Vuletić, Institute of Physics

Abstract: The counterion distribution problem in vicinity of poliions are recognized in polyelectrolyte (PE) physics since 1950's. Theories mainly interpret osmotic measurement. In this work I have used conductometry, dielectric spectrometry (DS) and small angle X-ray scattering (SAXS) in order to probe structure and dynamics, as well as counterion distribution around strong PE, deoxyribonucleic acid (DNA) and weak PE, hyaluronic acid (HA) in the concentration interval $c = 0.01 - 10\ mM$. For no added salt PE solutions DS measurements provide the size of the counterion atmosphere κ, i.e. spatial extension of counterion atmosphere which is 2π times shorter than distance between polyions determined from SAXS. In other words, by increasing PE concentration the size of the counterion atmosphere κ shrinks. In added salt solutions κ depends on solution ionic strength. On that basis we conclude that for no added salt solution the change is also caused by variations of counterion concentration and not by distance between poliions. In conductometry we observed increase in equivalent conductivity Λ by decreasing c for dilute DNA and for semidilute DNA and HA solutions which we interpreted with decrease of number of counterions in polyion vicinity which effectively increase polyion charge, i.e. Λ. Shortly, there are less Manning condensed counterions due to entropy at those low concentracion. Both κ and Λ should depend on counterion valency which we shown with Na^+ and Mg^{2+} counterions. Manning theory does not predict counterion condensation for HA (as opposed to DNA), i. e. the observed effect on Λ should not appear. Maybe entropy on low concentration changes effective charge on HA. The current theoretical models for dilute solutions qualitatively agrees with our results.

(119 pages, 61 figures, 3 tables, 119 references, original in: Croatian)

Keywords: polyelectrolytes, counterion distribution, osmotic coefficient, Manning condensed counterions, size of counterion atmosphere, electrical conductivity of polyelectrolytes
Date of thesis defense: 14th of July 2015.
Thesis committee:

1. Izv. prof. dr. sc. Mario Basletić (Committee Chair), PMF Zagreb
2. Dr. sc. Tomislav Vuletić, v. zn. suradnik (Mentor), IF Zagreb
3. Izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin, PMF Zagreb

Thesis is deposited in Central Physics Library, Faculty of Science, Physics Department, Bijenička cesta 32.

Doktorski rad je izrađen na Institutu za fiziku u Zagrebu u Laboratoriju za fiziku meke tvari pod mentorstvom dr. sc. Tomislava Vuletića.

Zahvale

Najveću zahvalu upućujem svojem mentoru, dr. sc. Tomislavu Vuletiću, što se prihvatio zahtjevnog posla da u kratkom roku dogotovimo moj doktorat. Osim toga hvala mu na njegovom iskustvu koje mi je bilo dragocjeno posebno prilikom interpretacije eksperimentalnih rezultata.

Zahvalu upućujem i svim članovima grupe posebno stoga što su uspostavili metodu te sam tako mogao koristiti plodove njihovog rada.

Zahvaljujem se i komisiji za ocjenu doktorata što je prihvatila da u jako skučenom vremenskom okviru čita moj doktorat.

Posebnu zahvalu upućujem i svojoj supruzi. Njezin doprinos ovom radu je bio svakodnevan. Naime, puno se lakše koncentrirati nakon finog jela.

Velika zahvala ide i N. N. koji je izumio kotač, te petrokemijskoj industriji koja mi je omogućila da svakodnevno dolazim na posao u svim vremenskim nepogodama.

Hvala i svim New Yorčanima koji su smiksali salsu u kojoj uživam, koja me opušta, uveseljava i pomaže da upoznam samog sebe. Također hvala i svim prijateljima uz koje zajedno uživam u salsi.

Hvala i svim ostalim prijateljima.

Želim se zahvaliti i teti Marini iz referade što mi je pomogla broditi u moru papira.

I na kraju hvala svim ljudima dobre volje.

Sadržaj

1 Uvod **1**
1.1 Pregled . . . 1
1.2 Biopolimeri su polielektroliti . . . 5
1.2.1 Deoksiribonukleinska kiselina: struktura i elektrostatika . . 7
1.2.1.1 Denaturacija DNA . . . 9
1.2.1.2 Kondenzacija DNA . . . 12
1.3 Fizika polimera - konformacije poliiona . . . 13
1.3.1 Model idealnog lanca . . . 13
1.3.2 Model Kuhnovog lanca . . . 15
1.3.3 Crvoliki lanac . . . 16
1.3.4 Granična koncentracija otopine polimera . . . 19
1.4 Fizika protuionske atmosfere . . . 20
1.4.1 Poisson-Boltzmann jednadžba . . . 20
1.4.1.1 Bjerrumova duljina . . . 21
1.4.2 Ćelijski modeli polielektrolita . . . 22
1.4.2.1 Lifson-Katchalsky model . . . 22
1.4.3 Osmotski tlak . . . 24
1.4.4 Manning model kondenzacije . . . 25
1.4.4.1 Dvostanjski Manning-Oosawin model kondenzacije 28
1.4.5 Usporedba LK(rješenje PB-a) i MO modela . . . 32
1.5 Vodljivost otopina DNA . . . 34
1.5.1 Vodljivosti polielektrolita bez dodane soli . . . 34
1.5.1.1 Skalirajući model za polurazrijeđene otopine . . . 37
1.5.2 Eksperimentalno određene vodljivosti . . . 38
1.6 Istraživanje protuionske atmosfere dielektričnom spektroskopijom . 42
1.6.1 Istraživanje atmosfere DNA dielektrično spektroskopijom . 46
1.7 Ostale metode istraživanje protuionske atmosfere . . . 48

2 Materijali i metode **53**
2.1 Priprema vodenih otopina DNA . . . 53
2.2 Mjerne tehnike . . . 55
2.2.1 Komora za dielektrična mjerenja . . . 56
2.2.2 Mjerač admitancije Agilent 4294A . . . 57
2.2.3 Temperaturna stabilnost . . . 58
2.2.4 Uzroci netočnosti mjerenih veličina . . . 58
2.3 Od izmjerenih veličina do kompleksne dielektrične funkcije . . . 59
2.4 Prilagodba na izmjerene veličine . . . 63
2.5 Dielektrična funkcija i relaksacijski procesi . . . 64

2.5.1 Analize podataka dielektričnog odgovora 67

3 Rezultati i diskusija **71**
3.1 Protežnost protuionske atmosfere 71
3.1.1 Jednovalentni protuioni 71
3.1.2 DS mjerenja DNA s dvovalentnim protuionima 78
3.1.3 Karakteristične skale otopina DNA s dodanom soli 82
3.1.4 Inducirani dipol i struktura otopine PE 82
3.2 Raspodjela protuiona: udio slobodnih i kondenziranih 86
3.2.1 Mjerenje vodljivosti razrijeđene, monodisperzne DNA . . . 86
3.2.1.1 Jednovalentni protuioni 86
3.2.1.2 Dvovalentni ioni i dodana sol 90
3.2.2 Mjerenje vodljivosti polurazrijeđene, polidisperzne DNA . . 94
3.3 Osmotska mjerenja SAXS pristupom 99

4 Zaključak **105**

Literatura **108**

Životopis **117**

Popis objavljenih znanstvenih radova **119**

Popis slika

1.1 Stanični cenzus za bakteriju E. Coli 5
1.2 Kondenzacija F-aktina 6
1.3 Tekući kristal i kondenzacija DNA 7
1.4 B-forma DNA 8
1.5 Struktura monomera DNA 9
1.6 Komplementarne baze DNA 10
1.7 Detekcija denaturacije UV apsorpcijom 10
1.8 Ovisnost denaturacije o koncetraciji DNA 11
1.9 Ovisnost denaturacije o koncetraciji magnezija 11
1.10 Kompaktifikacija kromosomske DNA 12
1.11 Model idealnog lanca 14
1.12 Kontinuirani model lanca 17
1.13 Vrste polielektrolita s obzirom na koncentraciju 20
1.14 Ilustracija odabira ćelije u Lifson-Katchalsky modelu 22
1.15 Osmotski koeficijent poliakrilne kiseline 24
1.16 Usporedba osmotskog koeficijenta s Manningovim predviđanjem . 28
1.17 Oosawin dvostanjski model kondenzacije. 29
1.18 Ovisnost MO kondenziranih protuiona o gustoći naboja 31
1.19 Usporedba slobodnih energija dobivenih LK i MO teorijama 33
1.20 Ovisnost vodljivosti DNA o koncentraciji izmjerena 1960. g. 39
1.21 Ovisnost vodljivosti PSS-a o koncentraciji 40
1.22 Ovisnost ekvivalentne vodljivosti polielektrolita o koncentraciji . . 41
1.23 Normirana vodljivost 146bp DNA 42
1.24 Dielektrični spektar NaPSS-a izmjerene 1990. g. 43
1.25 Ovisnost karakterističnog vremena PSS-a određena DSom 44
1.26 Manning interpretacija relaksacije induciranog dipola 45
1.27 Rezultati grupe dr. Tomić objavljeni 2007. g. 47
1.28 Rezultati grupe dr. Tomić objavljeni 2008. g. 49
1.29 Ovisnost vrste kondenzata o koncentraciji natrija 51
1.30 Shematski prikaz ionske atmosfere nukleinske kiseline 52

2.1 Agarozni gel 53
2.2 Protokoli priprave uzoraka 54
2.3 Mjerna komora 56
2.4 Efekt polarizacije elektroda 58
2.5 Shematski prikaz realnog dijela dielektrične funkcije 62
2.6 Od izmjerenih vrijednosti do spektara 63
2.7 Prilagodba CC krivulja na spektre 66

2.8 Koncentracijska ovisnost parametara prilagodbe 67
2.9 Koncentracijska ovisnost L za NaHA 68

3.1 Usporedba L za NaHA i NaDNA 72
3.2 Koncentracijska ovisnost 3 seta NaDNA 74
3.3 DS i UVS ukazuju na denaturacija genomske NaDNA 76
3.4 Usporedba SAXS i DS karakteristične duljine 77
3.5 Protežnost atmosfere ili korelacijska duljina? 78
3.6 DS i UVS MgDNA upućuju na povećanu otpornost na denaturaciju 80
3.7 Usporedba L za jednovalentne i dvovalentne protuione 81
3.8 L otopine s dodanom soli 83
3.9 Skica udaljenosti poliiona, veličine atmosfere i širine DNA 85
3.10 Vodljivost 146 bp DNA 87
3.11 Difuzijski koeficijent 146bp DNA 90
3.12 Koncentracijska ovisnst f od 146bp DNA 91
3.13 Usporedba f s podacima iz literature 92
3.14 f slanih i čistih vodenih otopina Na- i MgDNA 93
3.15 Vodljivost 3 seta genomske nativne i denaturirane NaDNA 95
3.16 Vodljivost i UVS genomske MgDNA 97
3.17 Vodljivost vodenih i slanih, genomski i 146bp Na i MgDNA 98
3.18 Vodljivost čiste vodene i otopine NaHA s dodanom soli 99
3.19 Osmotski tlak vodene i slane DNA koncentracije od 1 mM do 1 M 100
3.20 Usporedba efektivnih koncentracija dvojne otopine NaDNA i NaHA 102
3.21 Jednadžba stanja DNA, HA i PSS-a 103
3.22 Predviđanje osmotskog koeficijenta modela Antypova i suradnika . 104

Popis tablica

1.1 f za ss NaDNA, ds NaDNA, ds MgDNA i HA 32
1.2 Ovisnost skale o karakterističnom vremenu 46
1.3 Predloženi mehanizmi relaksacije otopina DNA 46

Popis simbola

L	duljina konture polimera
N	broj monomera u polimeru
$\vec{l}_i$	duljina monomera
$\vec{h}$	udaljenost krajeva lanca
R	radijus nasumičnog lanca
P_N	vjerojatnost udaljenosti krajeva Gaussova lanca sastavljenog od N monomera
S	entropija
k	Boltzmannova konstanta
F	slobodna energija
U	unutarnja energija
T	apsolutna temperatura
κ_b	konstanta savitljivosti
L_p	duljina ustrajnosti
N_k	Kuhnov monomer
l_k	duljina Kuhnova monomera
c	koncentracija
c^*	granična koncentracija
ψ	elektrostatski potencijal
ϕ	renormalizirani elektrostatski potencijal
ρ	gustoća naboja
ε_0	permitivnost vakuuma
ε_r	relativna permitivnost sredstva
e	elementarni naboj
z	valencija naboja
N_A	Avogadrova konstanta
α	omjer visine i radijusa valjka u optimiziranom LK modelu
A	udaljenost projekcije naboja na os DNA, apsorbancija
l_B	Bjerrumova duljina
b	veličina monomera
π	osmotski tlak

o	osmotski koeficijent
ρ_0	gustoća naboja poliiona
f	udio slobodnih (eng. free) protuiona
ξ	de Gennesova korelacijska duljina
L	karakteristična skala relaksacije
D	difuzijska konstanta protuiona
I_s	ionska jakost otopine
κ^{-1}	Debye-Hückelova (DH) duljina zasjenjenja
η	Manningov parametar gustoće naboja
n	brojčana koncentracija monomera poliiona
σ	električna vodljivost
μ	mobilnost
f_E	elektroforetski koeficijent
Λ	ekvivalentna vodljivost polielektrolita
λ_i , λ_p	ekvivalentna vodljivost protuiona, poliiona
Q_p	naboj poliiona
F	Faradayeva konstanta
ε	dielektrična funkcija/ekstinkcijski koeficijent

1

Uvod

1.1 Pregled

Polielektroliti (PE) su polimeri koji se sastoje od monomera s ionizabilnim grupama. Kada su otopljeni u polarnom otapalu polielektroliti disociraju u poliion koji može nositi i preko 10^6 naboja i mnoštvo protuiona male mase i valencije. Prostorno uređenje tih sustava (struktura PE otopine) ovisi o strukturi poliiona, valenciji protuiona i o vrsti dodanog elektrolita. Značajni napori se ulažu u istraživanja PE zbog raznovrsnih tehničkih primjena (genska terapija, genski čipovi, sekvenciranje DNA, biokompatibilni materijali) [1–7] koje se mogu dalje razviti na osnovi novih bazičnih spoznaja. Dugodosežnost Coulombovog međudjelovanja isprepliće utjecaje konformacije poliiona i raspodjele protuiona što rezultira mnogim efektima koji određuju PE bitno različitima od neutralnih PE. Naime, istraživanje jednog od podsustava, npr. atmosfere protuiona, neizostavno uključuje poznavanje konformacije poliiona. S druge strane, rješavanje konformacije poliiona uvelike ovisi i o poznavanju parametara protuionske atmosfere. Supstancijalna razlika ovih dvaju pristupa je sljedeća: istraživanja dinamike sustava pružaju ponajviše informacija o atmosferi, dok strukturna istraživanja najviše govore o konformaciji poliiona. Primarni aspekt ovoga rada je istraživanje dinamike atmosfere, uz učinjenu usporedbu s rezultatima strukturnih istraživanja koje nalazimo u literaturi.

Fizika polimera razvila je modele koji opisuju konformacije polimera, koje ćemo iskoristiti kao uvod u fiziku poliiona. U modelu idealnog lanca polimer se sastoji od N monomera međusobno povezanih $N-1$ vezom čija usmjerenost u prostoru je nasumična. Kuhnov model uključuje kratkodosežne interakcije monomera i drži lanac lokalno rigidnim te je stoga svakako bliži realnim poliionima. U modelu crvolikog lanca fleksibilnost se mjeri duljinom ustrajnosti L_p koja je jednaka uda-

ljenosti između dva najbliža monomera čija prostorna orijentacija nije korelirana. Ovo su modeli koji proučavaju konformaciju pojedingog lanca bez uzimanja u obzir utjecaja ostalih lanaca. Međutim i oni utječu na koformaciju pojedinog lanca. Za niske koncentracije poliiona karakteristične duljinske skale poliiona su manje od udaljenosti između susjednih poliiona te stoga poliioni nisu u kontaktu već svaki zauzima svoj određen volumen. Takva otopina se naziva razrijeđena. Povećanjem koncentracije se poliioni počinju međusobno ispreplitati. Takvu otopinu nazivamo polurazrijeđenom, a njenu koncentraciju graničnom c^*. Koncentracija poliiona ne utječe samo na njegovu konformaciju nego i na njegov potencijal. Opis potencijala, tj. raspodjele protuiona - gustoće protuionske atmosfere pripada u domenu fizike polielektrolita. U njoj postoje dva glavna različita pristupa. Povijesno prvi, iz 1951. godine se temelji na rješenju Poissonove jednadžbe uz uzimanje u obzir Boltzmannove statistike protuiona. Kako je egzaktno rješenje Poisson-Boltzmannove (PB) jednadžbe bilo dobiveno samo za jedan posebni slučaj, noviji pristup, iz 1969. godine, bio je utemeljen na fizikalno motiviranim pretpostavkama [8,9] proizašlim prvenstveno iz eksperimentalnih saznanja o PE.

Osmotski tlak polielektrolita se počinje mjeriti još 30.-tih godina prošlog stoljeća [10]. Osmotski tlak je određivan različitim tehnikama i dobivene vrijednosti su u jednome svakako međusobno konzistentne [11–13]. Naime, izmjereni osmotski tlak je očekivano reguliran koncentracijom protuiona, ali je manji nego za jednostavne elektrolite odgovarajuće ionske jakosti. To se protumačilo na način da poliion zarobljava dio protuina u svojoj blizini te su ovi efektivno osmotski neaktivni. 1950.-tih godina rješavanjem PB jednadžbe Lifson i Katchalski (LK) [14,15] pokušavaju teorijski predvidjeti potencijal polielektrolita te iz njega dobiti taj umanjeni osmotski tlak. Oni određuju egzaktno rješenje PB jednadžbe za beskonačno dugi štap u cilindričnom potencijalu, s rubnim uvjetom nule gradijenta potencijala između susjednih, paralelnih poliiona. LK rješenje opisuje poliionsku atmosferu čija gustoća opada udaljavanjem od poliiona što i je njena glavna karakteristika. No, rješenja PB jednadžbe u aproksimaciji srednjeg polja naboje uzimaju kao točke i ne mogu uzeti u obzir njihovu valenciju kao ni korelacije između protuiona. Stoga je 1969. Manning uveo dvozonski model koji se sastoji od volumena kojeg okupira poliion s pripadnim protuionima te vanjskog volumena [8]. Uvažavajući Oosawino viđenje [9,16] Manning je umjesto beskonačno tankog modela uveo poliion konačnih dimenzija [17]. Jako nabijeni poliioni kondenziraju protuione u svojoj blizini, te oni ne doprinose osmotskom tlaku dok preostali slobodni protuioni doprinose. Udio tih (ne)kondenziranih iona ovisi samo o gustoći naboja poliiona. Ovaj je model u stanju objasniti začuđujuće velik raspon eksperimentalnih podataka. Jedan problem s MO (Manning-Oosawa) modelom je što udio kondenziranih protuiona ovisi samo o linearnoj gustoći naboja poliiona dok mnogi eksperimentalni rezultati pronalaze i ovisnost o koncentraciji poliiona [18,19].

Daljnji razvoj PB teorija počinje pristupom numeričkog rješavanja nelinearne

PB jednadžbe, s najintenzivnijom aktivnošću krajem 1990.-ih, početkom 2000.-tih godina. S ciljem opisivanja i razrijeđenih otopina dvostanjski model su 2001. razvili Deshkovski i suradnici [20]. Nakon toga su 2006. Antypov i suradnici [21] razvili optimizirani LK model koristeći postupak minimiziranja slobodne energije sustava. Netz je 2003. unaprijedio Manningov model te ugradio u model i ovisnost udjela kondenziranih protuiona o koncentraciji poliiona [22,23] što su rezultati koje je potvrdio i računalnim simulacijama molekularne dinamike.

Modeli su u većini slučajeva orijentirani na područje viših koncentracije PE čime prate mogućnosti glavnine eksperimentalnih tehnika, primarno osmometrije i raspršenja X-zraka (SAXS - small-angle X-ray scattering). U području koncentracija ispod 10 mM tehnike kojima raspolažemo u laboratoriju na Institutu za fiziku, konduktometrija i dielektrične spektroskopije (DS) mogu dati značajan doprinos stvaranju sveobuhvatne slike PE u različitim režimima. DS omogućava proučavanje protežnosti protuionske atmosfere. Specifično, relaksacije u sustavu PE koje se uočavaju u MHz području se povezuje s gibanjem protuionske atmosfere, međutim istraživači se ne slažu oko skale na kojoj dolazi do relaksacije niti oko relaksacijskog entiteta, tj. upitno je da li je gibanje protuionske atmosfere u smjeru duž ili okomito na poliion kao i da li u njemu sudjeluju Manning kondenzirani ili slobodni protuioni. Značajno je što se iz karakterističnog vremena relaksacije može odrediti karakteristična duljinska skala relaksacijskog entiteta. Naime, to je inducirani dipol koji nastaje izmještanjem ionske atmosfere u odnosu na poliion pod utjecajem vanjske pobude i difuzno kretanje iona koji čine taj dipol odvija se prema Einsteinovoj difuzijskoj jednadžbi [24]. Dakle, DS daje karakterističnu skalu toga dipola, a time i širinu potencijalne jame oko poliiona [25].

Istraživanja na kojima se bazira ovaj rad započeta su na otopinama DNA s natrijevim protuionima. Prvi radovi su se fokusirali na određivanje karakteristične duljine poliiona [26–28]. Za polurazrijeđenu otopinu NaDNA pronađene su dvije relaksacije, a ovisno o koncentraciji (monomera) DNA $0.01\ mM < c < 5\ mM$ njihovo karakteristično vrijeme je u rasponu $5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-6} s$, odnosno za visokofrekventu relaksaciju $10^{-6} - 10^{-8} s$. Karakteristično vrijeme visokofrekventne relaksacije odgovara karakterističnoj duljini $3\ nm < L < 50\ nm$. Ovisnost te duljine o koncentraciji $L \propto c^{-0.5}$ povezala je L s ξ, de Gennesovom korelacijskom duljinom [29] koja mjeri udaljenost između poliiona. Isti sustav je istraživan i SAXS tehnikom te je izmjerena karakteristična duljina koja je 2π puta veća od one dobivene DS-om [30]. Najjači signal u SAXS će dati ona struktura koja ima neku pravilnost u sustavu, a najjači raspršivač je atom s najvećim atomskim brojem, što je u tom sustav fosfor iz fosfatne grupe s DNA. Stoga je najrazumnije pretpostaviti da karakteristična skala izmjerena SAXSom predstavlja udaljenost između DNA poliiona, tj. korelacijsku duljinu. Dakle udaljenost među poliionima je 2π puta veća od protežnosti potencijalne jame, tj. protuionske atmosfere oko poliiona. No, iznos širine potencijalne jame je u jako dobrom kvantitativnom

slaganju s Debye-Huckelovom (DH) duljinom zasjenjenja. Ovi koncepti su provjereni i mjerenjima na DNA otopinama s dvovalentnim protuionima. Naime, kako DH duljinu zasjenjenja definiraju samo nekondenzirani, Manning slobodni ioni, protežnost atmosfere će biti drukčija dok korelacijska duljina ostaje ista za iste koncentracije - što smo i eksperimentalno pokazali za dvovalentne magnezijeve i manganove ione. Ovom usporedbom Na^+ i Mg^{2+} sustava su potvrđene i Manningove vrijednosti udjela slobodnih i kondenziranih protuiona.

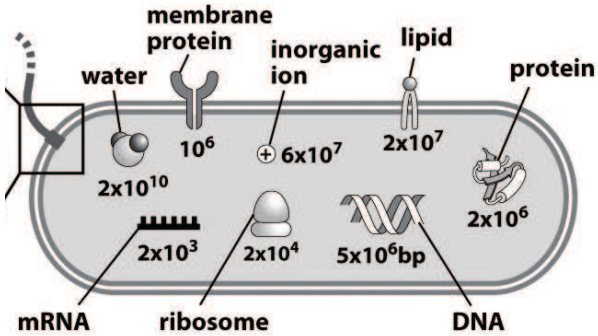
Manning udjele smo izravnije proučavali konduktometrijom PE - ta mjerenja zapravo proizlaze iz DS rezultata - jer se uzima vrijednost impedancije otopine na samo jednoj frekvenciji (negdje između 10 kHz -1 MHz). Vodljivost polielektrolita je usko vezana s podjelom protuiona na kondenzirane i slobodne [31] jer se u prisustvu električnog polja kondenzirani protuioni gibaju zajedno s DNA poliionom te ne sudjeluju u vodljivosti - slično kao pri mjerenju osmotskog tlaka. Stoga mjerenje vodljivosti može doprinijeti razumijevanju raspodjele protuiona i efekta kondenzacije. U najosnovnijem modelu vodljivost je proporcionalna koncentraciji slobodnih naboja i njihovoj pokretljivosti u otopini. Prvi naš rezultat dobiven konduktometrijom jest neovisnost vodljivosti o stupnju polimerizacije DNA, tj. polidisperzni i monodisperzni uzorci pokazali su istu molarnu vodljivost. Postoji i teorijski rad, Manningov model [32] koji predviđa neovisnost vodljivost o stupnju polimerizacije. Zamijetili smo i opadanje ekvivalentne vodljivosti za 20% pri smanjenju koncentracije za red veličine, za oba sustava, i polidisperzni, polurazrijeđeni i monodisperzni, razrijeđeni, pa čak i za sustav s jednovalentnim natrijevim i dvovalentnim magnezijevim protuionima. Primijećeni pad se donekle kvantitativno slaže s Netzovim modelom [22, 23] prema kojem se očekuje smanjenje udjela kondenziranih protuiona na nižim koncentracijama na kojima je entropski povoljnije udaljavanje kondenziranih protuiona od poliiona, uprkos elektrostatskom privlačenju. Intrigantno je kako je isti pad vodljivosti primijećen i za hijaluronsku kiselinu koja je slabo nabijeni PE kod kojeg se ne javlja kondenzacija protuiona [33] - pa ne može doći niti do dekondenzacije i povećanog doprinosa dekondenziranih protuiona vodljivosti PE sistema.

Na kraju primjetimo kako se DNA od većine polielektrolita izdvaja svojom strukturom dvostruke komplementarne uzvojnice. Ta struktura omogućuje DNA da, ovisno o vanjskim uvjetima, bude ili u strukturi dvostruke uzvojnice (ds) ili u strukturi jednostruke uzvojnice (ss). Prijelaz iz ds u ss strukturu se naziva denaturacija. Važnost denaturacije DNA je u činjenici da se kopiranje DNA i njeno prevođene u svrhu koda za izradu proteina može odvijati samo na ssDNA dok se genetska informacija štiti od mutacija u dsDNA obliku. Zbog toga živa stanica ima mehanizme koji reverzibilno denaturiraju i "naturiraju" DNA [34]. Denaturacija DNA se u našim NaDNA otopinama bez dodane soli manifestira i u karakterističnoj duljini, koja je za takvu DNA manja, i u vodljivosti, koja je veća. Ta dva efekta su međusobno povezani. Naime, ssDNA ima manju linearnu

gustoću naboja što uzrokuje više slobodnih iona u odnosu na dsDNA te je stoga duljina zasjenjenja kraća, a izmjerena vodljivost veća. Koncentracijska ovisnost udjela ssDNA u ukupnoj otopini navodi nas i na model denaturacije. Snižavanjem koncentracije DNA u otopinama bez dodane soli duljina zasjenjenja se povećava te stoga Coulombovo odbijanje nabijenih, fosfatnih grupa dvaju lanaca DNA raste. Kada energija tog odbijanja postaje jača od energije veze dvaju lanaca (vodikove veze između parova baza i efekt slaganja baza) javlja se denaturacija. Smanjenje zasjenjenja se javlja smanjivanjem koncentracije dodane soli ili smanjenjem koncentracije same DNA. Naš eksperimentalni pristup detektira i (očekivani) izostanak denaturacije za DNA otopine s protuionima koji su dvovalentni. Ovi rezultati demonstriraju kako je DS metoda koja istovremeno istražuje oba podsistema polielektrolita, dinamiku protuiona, a neizravno i strukturu - konformaciju poliiona i protežnost poliionske atmosfere, te naboj koji poliion nosi.

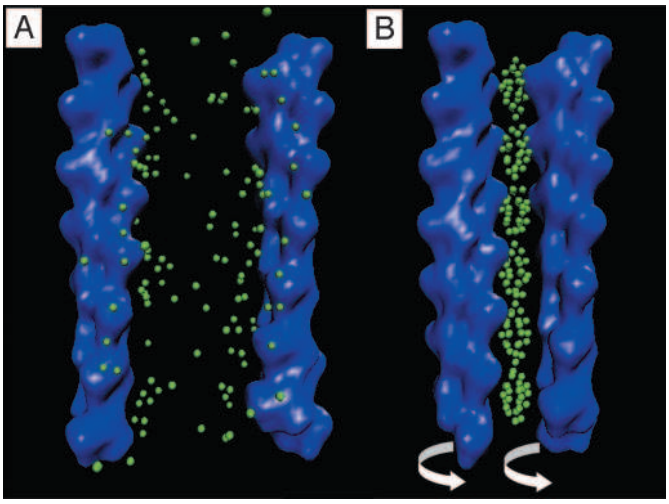
1.2 Biopolimeri su polielektroliti

Biopolimeri ili biomakromolekule se dijele na 3 grupe: nukleinske kiseline, proteine te polisaharide (ugljikohidrati). Nukleinske kiseline primarno bilježe i prenose genetski kod. Proteini su katalizatori biokemijskih reakcija (enzimi), zaduženi su za strukturu i mehaničku funkciju stanica te prijenos signala unutar stanice. Strukturne komponente biljaka se primarno sastoje od polisaharaida (celuloza). Bakterije pak izlučuju polisaharide u svrhu adhezije na podlogu i za izbjegavanje dehidracije. Postoje i iznimke od ove podjele, kao npr. ekstracelularni glikoproteini (kombinacija proteina i ugljikohidrata) s ulogom u imunom odgovoru ili adheziji tkiva. Iznimka je i ribosom (kombinacija proteina i ribonukleinske kiseline) koji čita genetski kod i prenosi ga u slijed aminokiselina - sintetizira protein. Na slici 1.1 prikazana je zastupljenost biopolimera u bakteriji E. Coli veličine oko 1 μm. Nukleinske kiseline, većina proteina i neki polisaharidi

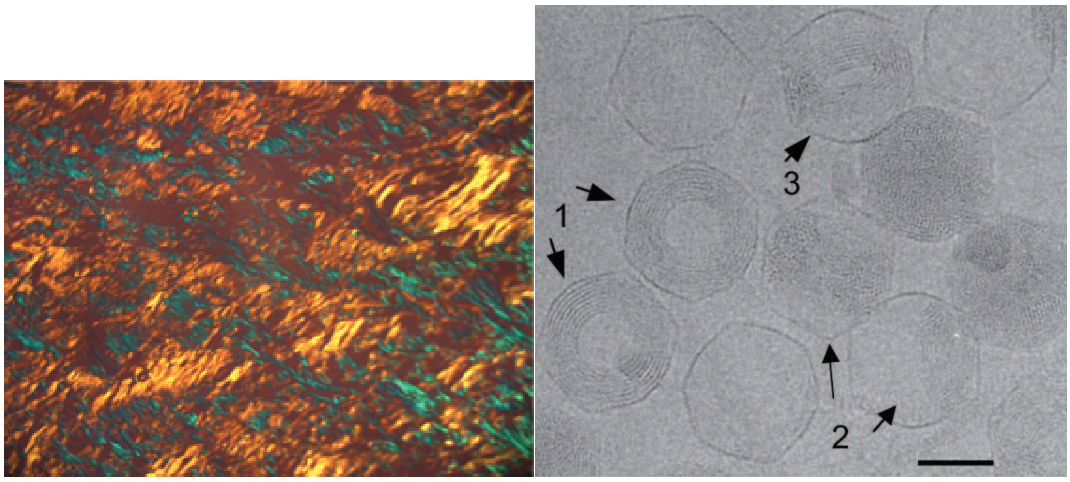


Slika 1.1: Stanični cenzus za bakteriju E. Coli. Slika preuzeta iz [34].

nisu neutralni polimeri. U otopini su nabijeni, ponašaju se kao poliioni (linearna simetrija makromolekule) ili makroioni (sferna simetrija makromolekule) i okruženi su malim ionima koji ih neutraliziraju. U biološki relevantnim situacijama naboji biopolimera su zasjenjeni i s dielektričnim odgovorom molekula vode i zbog preraspodjele protuiona kao i koiona poteklih iz prisutnih jednostavnih soli. Entropija ovih protuiona može rezultirati iznenađujuće jakim vezama između nabijenih objekata u vodi uprkos vrlo malim duljinama zasjenjenja, preko sprege osmotskih i elektrostatskih interakcija. Dobitak slobodne energije vezanjem 2 makroiona je proporcionalan umnošku kT s brojem otpuštenih protuiona. Taj dobitak može biti velik, iako je elektrostatska interakcija u tipičnim uvjetima mnogo manja. Na ponašanja cijelog sustava utječu i druge veličine, kao npr. naboj, veličina, hidratacija, koncentracija iona. Prisustvo Coulombovog fluida (otapalo s protuionima) može značajno izmjeniti elektrostatsku interakciju nabijenih (susjednih) površina. Brojni eksperimenti i teorijska istraživanja [35,36] testiraju našu intuiciju po pitanju razumijevanja elektrostatskih efekata. To najbolje demonstrira elektrostatska privlačnost između istoimeno nabijenih površina, koja se javlja u prisutnosti viševalentnih protuiona. Primjeri nastajanja velikih agregata istoimeno nabijenih molekula su mikrotubuli [37] i F-aktin [38, 39], Sl. 1.2, kao i nastajanje tekućih kristala i kondenzata DNA u otopini te unutar kapsida virusa [40], Sl. 1.3. Fizika nabijenih biopolimera je bogato područje s često kontraintuitivnim fenomenima te iznova motivira istraživanja, kako eksperimentalna tako i teorijska.



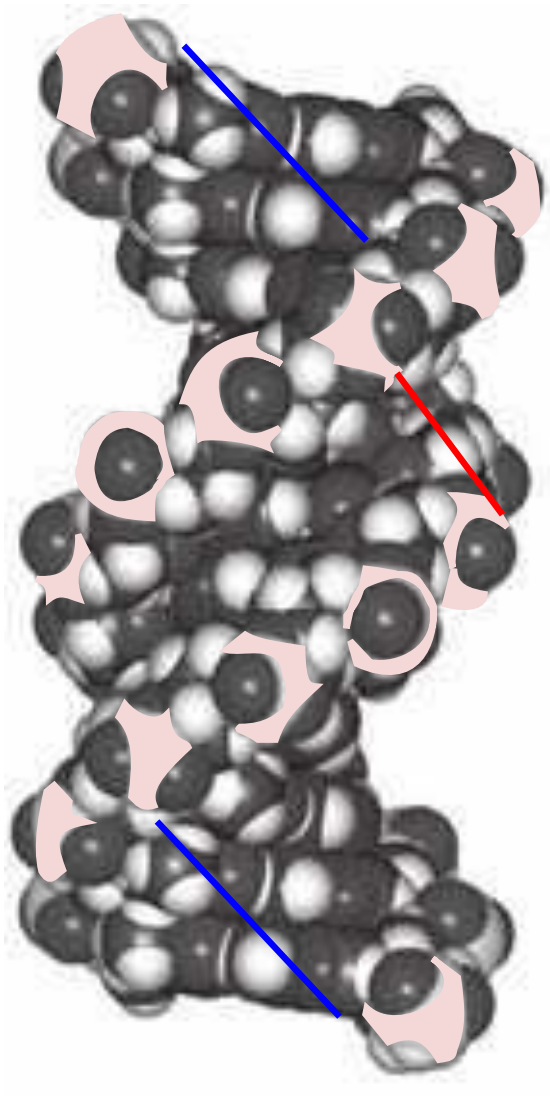
Slika 1.2: Prikaz nekondenziranog i kondenziranog F-aktina. (A) U otopini niske ionske jakosti dva filamenta F-aktina zadržavaju svoju nativnu simetriju i nisu vezani. (B) U otopini visoke koncentracije viševalentnih protuiona oni formiraju val gustoće naboja i povezuju filamente F-aktina. Slike preuzeta iz [38].



Slika 1.3: Lijevo. Tekući kristal formiran od 40 g/L DNA otopine pomiješane s otopinom koncentracije 40 g/L hijaluronske kiseline (HA) snimljen polarizacijskim mikroskopom. Crvene boje predstavljaju DNA a ostale boje predstavljaju HA. Slika preuzeta iz [41]. Desno. Krioelektronskom mikroskopijom dobivena mikrografija bakteriofaga T5. Mogu se vidjeti pune te djelomično ili uopće ne popunjene kapside s kondenziranom DNA i to snimljene odozgo (1), postrance (2) i pod kutem (3). Slika preuzeta iz [40].

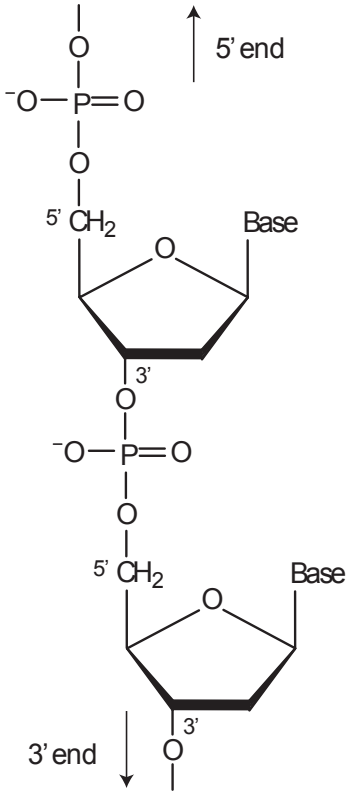
1.2.1 Deoksiribonukleinska kiselina: struktura i elektrostatika

Posebice je deoksiribonukleinska kiselina (hrv. DNK, eng. DNA) važan modelni sistem u istraživanju polielektrolita. Početak istraživanja strukture DNA datira u 50-e godine prošlog stoljeća. Watson i Crick su 1953. godine predložili spiralni model DNA sa specifičnim uparivanjem baza. Upravo to specifično uparivanje baza omogućuje prenošenje genetske informacije. Istovremeno s razumijevanjem strukture primijećena je i važnost denaturacije DNA [42], tj. razdvajanja dvostruke uzvojnice. DNA je polimerni lanac čiji monomeri su kovalentno povezani fosfodiesternom vezom 1.5. DNA monomer (nukleotid) se sastoji od fosfatne grupe i od nukleozida - kombinacije šećera (2'-deoksiriboze) i pirimidinske, timin (T) i citozin (C) odnosno purinske, adenin (A) i gvanin (G) baze. Fosfatna grupa potječe od jake kiseline s pK_a oko 1. Stoga će u fiziološkim uvjetima svaki fosfat biti negativno nabijen i dobiti ćemo snažno nabijeni poliion. Baze nisu električki nabijene, ali između komplementarnih parova baza (pb, eng. base pair bp) se formiraju vodikove veze zbog čega nastaje dvostruki lanac DNA. Osim vodikovih veza, postoje i disperzijske sile koreliranih elektronskih fluktuacija slaganja baza (eng. base stacking), tj. na istom lancu DNA π-orbitale susjednih nukleotida se



Slika 1.4: Prikaz oblika dvostrukog heliksa DNA, tzv. B-forme, u prostorno ispunjenoj reprezentaciji. Ružičastom bojom su obilježeni fosfati, a crvenom i plavim crtama su naznačeni mali odnosno veliki utor.

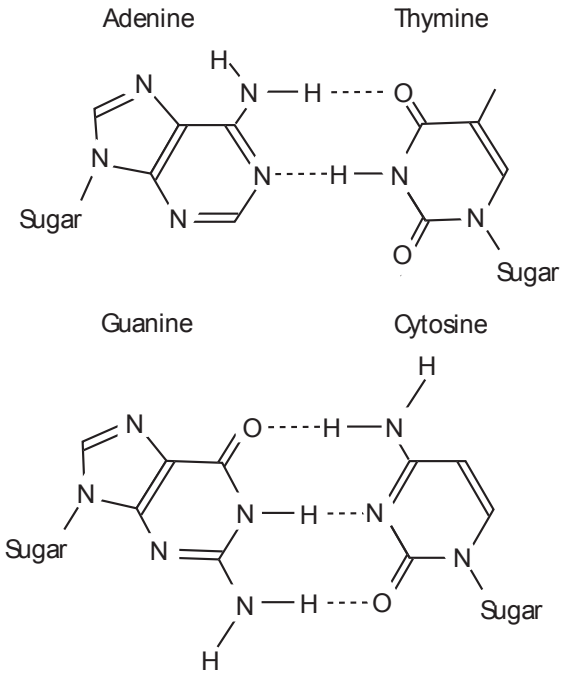
preklapaju. Ovo slaganje baza vodi na formiranje karakteristične strukture uzvojnice za DNA dvostruki lanac. Sama dvolančana DNA, tj. ako nije kompleksirala s proteinima, ponaša se poput nabijenog polimera - ima konformaciju nasumičnog namotaja (eng. random coil). Tako pakirana DNA se nalazi samo kod nekih bakteriofaga. Kompleksniji organizmi su, kako bi "spakirali" veću količinu genetske informacije, dakle dulju DNA, morali pronaći daljnje načine kompaktiranja koji su ilustrirani na slici 1.10.



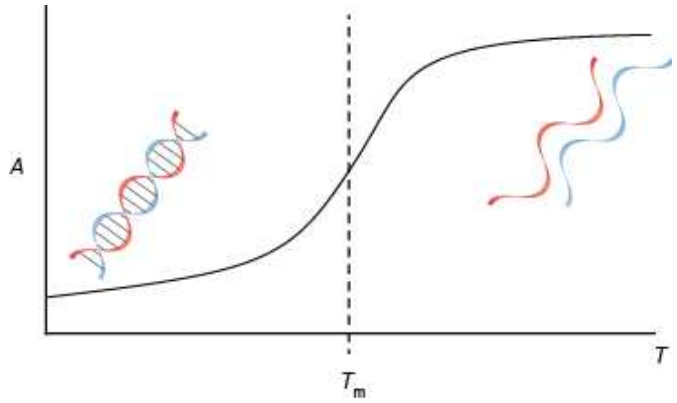
Slika 1.5: Shematski su prikazane fosfatne grupe i šećerni prsten od 5 ugljikovih atoma.

1.2.1.1 Denaturacija DNA

Za razumijevanje pakiranja i kompaktifikacije DNA važno je razumjeti i mehanizam stabilizacije same sekundarne strukture DNA koji se ne bazira na kemijskim (kovalentnim) vezama. Dakle, mehanizam denaturacije (i renaturacije) DNA, razdvajanje (i ponovno vezanje) dvolančane uzvojnice se najbolje opisuje fizikalnim konceptima. I prije Watson/Crick/Franklin proboja uočeno je postojanje sekundarne strukture. Naime, nukleinske kiseline imaju karakteristični apsorpcijski spektar s maksimumom blizu 260 nm i minumumom blizu 230 nm. Godine 1950. se otkrilo da je UV-apsorpcija monomera (nukleotida), tj. hidrolizirane, depolimerizirane DNA jača nego nativne DNA [42]. Još je važnije što se apsorpcija povećava (hiperkromatski efekt) i pod relativno blagim utjecajima koji čuvaju polimersku bit molekule (dakle fosfodiesterske veze duž lanaca) - npr. smanjenje pH, povećanje temperature, smanjenje koncentracije DNA ili smanjenje koncentracije dodane sol ali očito na neki način mijenjaju strukturu. Inače, sama metoda UV-apsorpcije sada je rutinska metoda određivanja sekundarne strukture DNA - određivanja konformacije jedno ili dvolančane uzvojnice.

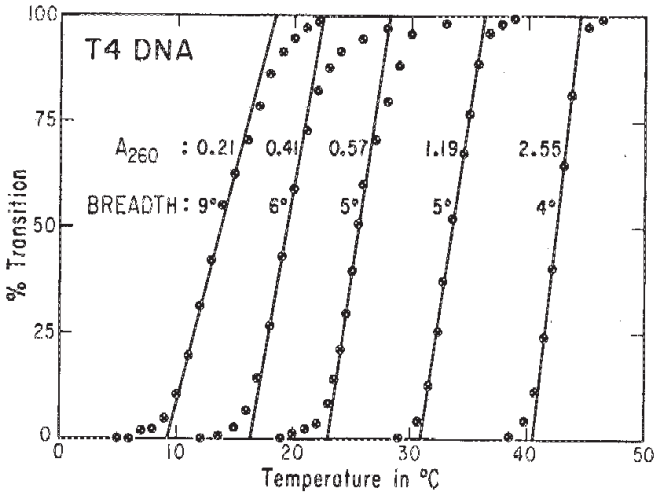


Slika 1.6: Detaljan kemijski prikaz komplementarnih baza s naznačenim vodikovim vezama između njih.

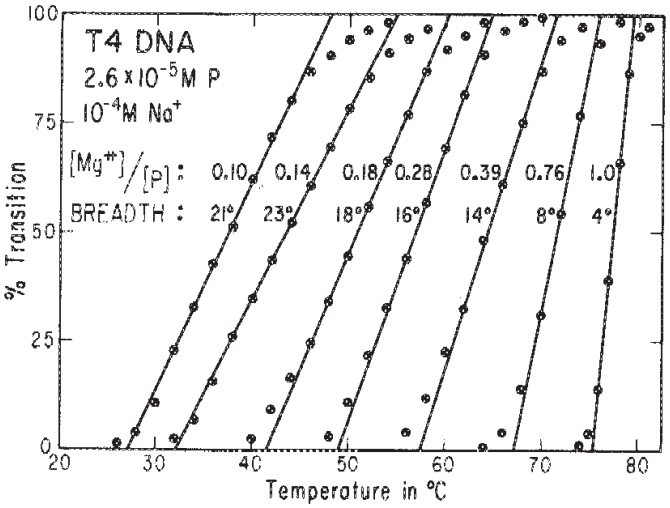


Slika 1.7: Grijanje uzrokuje denaturaciju dsDNA u ssDNA. Tipičan prikaz UV apsorpcije u funkciji temperature, gdje se za temperaturu denaturacije dvolančane u jednolančanu DNA T_m proglašava ona na polovici iznosa porasta apsorpcije.

Record [43] je 1975 napravio detaljnu studiju UV-apsorpcije gdje je pokazao na važnost elektrostatskih efekata za stabilnost DNA. Pratio je utjecaj koncentracije DNA, koncentracije Na^+ protuiuona, udjela Mg^{2+} protuiona u odnosu na Na^+ na temperaturu prijelaza (denaturacije) dvolančane u jednolančanu DNA, Sl. 1.8. Ustanovio je da se prijelaz sužava, a temperatura prijelaza povećava kako se po-

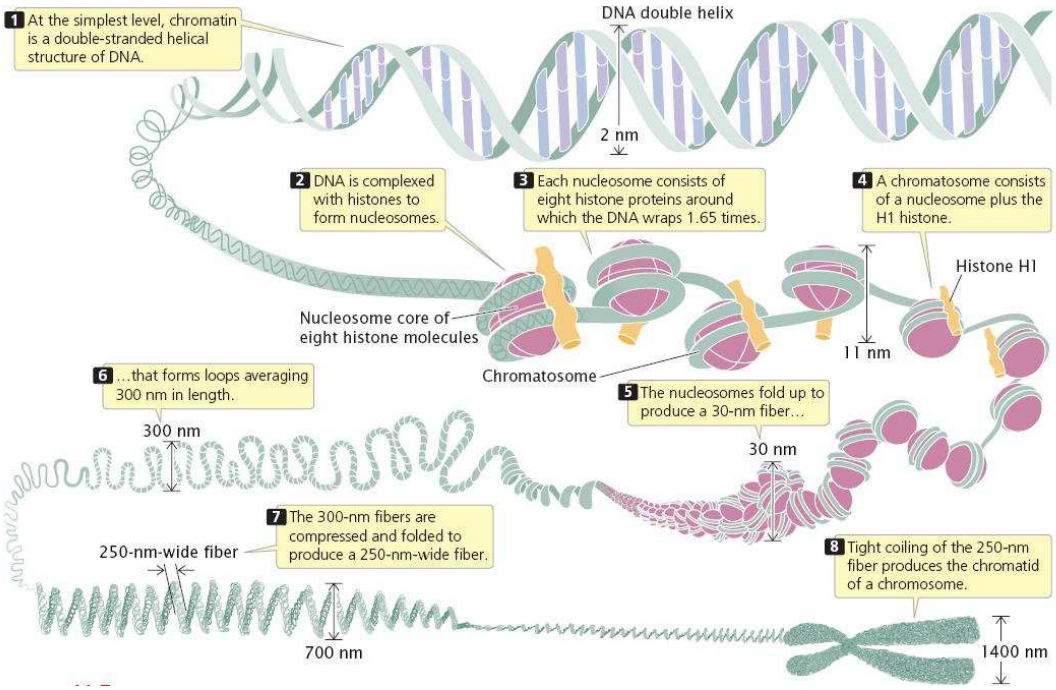


Slika 1.8: Krivulje prijelaza (dane kao postotak prijelaza) T4 DNA u funkciji koncentracije DNA (ujedno je to jednako i koncentraciji intrinsičnih Na^+ iona). Očitana apsorpcija na 260 nm je uz uzorke a odmah ispod je naznačen nagib prijelaza očitan na temperaturi prijelaza.



Slika 1.9: Krivulje prijelaza T4 DNA ($2.6 \cdot 10^{-5} M$ DNA fosfata, $10^{-4} M$ Na^+) za različiti omjer dodatnih Mg^{2+} naspram fosfata DNA (Mg^{2+}/P). Omjer je naznačen uz uzorke a odmah ispod je naznačen nagib prijelaza očitan na temperaturi prijelaza.

većava koncentracija DNA, pa time i Na^+ protuiona. Ustanovio je i kako dodani magnezijevi ioni stabiliziraju DNA, Sl. 1.9. Tu je naravno uvijek očuvana neutralnost sustava, ali ono što se mijenja je da dvovalentni (i više valentni) protuioni



Slika 1.10: Kromosomska DNA je upakirana unutar mikroskopski malene stanične jezgre uz pomoć histona. To su pozitivno nabijeni proteini koji jako prijanjaju za negativno nabijenu DNA te čine kompleks naziva nukleosom. Nukleosom čini do 2 namotaja DNA oko 8 histonskih proteina. Nukleosomi formiraju 30 nanometarsko kromatinsko vlakno koje formira petlje prosječne visine 300 nanometara. Ta 300 nanometarska vlakna su komprimirana i namotana u 250 nm široka vlakna koja su snažno namotana u kromatid kromosoma. Slika preuzeta iz [44].

prilaze bliže lancima DNA i istiskuju jednovalentne, a pri tome bolje zasjenjuju sami naboj fosfatnih skupina na lancima. Pri tome se i smanjuje odbijanje dvaju lanaca i povećava stabilnost sekundarne strukture.

1.2.1.2 Kondenzacija DNA

Sveprisutna je situacija u biološkom okruženju [45] gdje atmosfera viševalentnih protuiona efektivno inducira privlačnu interakciju između istonabijenih molekula DNA što vodi do formiranja toroidalnih agregata, koji su preferirani oblik kondenzirane DNA [46]. U stvari, većina spolnih stanica sisavaca sadrži toroidalno kondenziranu DNA. Čini se da je kondenzirana DNA značajna i za pakiranje gena bakteriofaga i za umjetnu dostavu gena. Sigurno je u osnovi kondenzacije DNA elektrostatska interakcija, ali kondenzacija se ne može objasniti Poisson-Boltzmannovom teorijom srednjeg polja [47]. Da bi se razumjela promjena elek-

trostatskog međudjelovanja iz odbojnog u privlačno između jednakih naboja potrebno je značajnije preoblikovanje teorije elektrostatske interakcije bazirano na konceptu "jakog sprezanja" (eng. strong coupling) između DNA lanca i viševalentnih protuiona [48]. Ipak svi viševalentni ioni nemaju jednaki utjecaj na kondenzaciju DNA, tj. osim jednovalentnih i neki dvovalentni ioni (isključujući prijelazne metale kao npr. Mn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}) ne kondenziraju dvolančanu dsDNA čak niti kada su prisutni u velikim koncentracijama dok gotovo svi dvovalentni kationi kondenziraju jednolančanu (ss) DNA (Mg^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}) [49, 50]. Najistaknutiji odabir za kondenzaciju DNA su Mn^{2+}, Cd^{2+}, $Co(NH_3)^{3+}$, poliamini kao npr. spermidin^{3+} i spermin^{4+}, polilizin^{+} [45]. Dakle, elektrostatika sigurno ima glavnu ulogu u kondenziranju DNA, ali ona nije jedini uključeni čimbenik, jer npr. $Co(NH_3)^{3+}$ je efikasniji u kondenzaciji nego spermidin^{3+} iako su oboje trovalentni. Čini se da je najefikasniji onaj kondenzirajući protuion koji se koordinira u nekom od utora DNA. Zbog toga proučavanje dinamike tih protuiona može dati dodatnu informaciju. Spomenimo i kako smo u odjeljku o denaturaciji naveli kako međudjelovanje alkalijskih dvovalentnih iona stabilizira dvostruku uzvojnicu DNA smanjanjem njihove odbojnosti, međutim destabilizaciju DNA mogu proizvesti dvovalentni prijelazni metali koji se primarno vežu na baze DNA i poništavaju efekte vertikalnog slaganja baza [51].

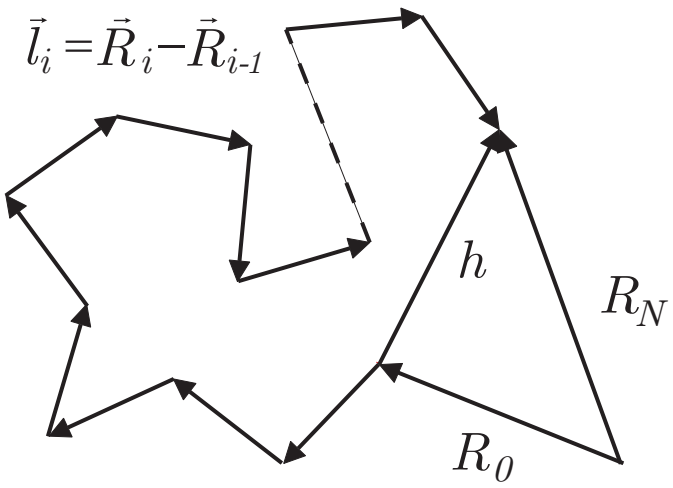
1.3 Fizika polimera - konformacije poliiona

Dosad sam dao naglasak na utjecaj elektrostatskih međudjelovanja protuiona i poliiona na funkciju biopolimera. No, svakako je potrebno uvesti i neke koncepte iz fizike (nenabijenih) polimera i time omogućiti da se u proučavanju funkcije polielektrolita uzme u obzir i konformacija lanaca poliiona. Naime, važno je primijetiti - ovisno u uvjetima u otopini poliion može pokazati ponašanje od skoro idealnog fleksiblinog lanca do štapićaste strukture [52].

1.3.1 Model idealnog lanca

Svaki polimer se sastoji od jedinica - monomera. Prvo ću iznijeti najjednostavniji mogući model; model idealnog lanca, koji je prikazan na slici 1.11 a sastoji se od $N+1$ karika i N veza između njih. U modelu idealnog lanca vektor veze između susjednih monomera $\vec{l_i} = \vec{R_i} - \vec{R_{i-1}}$ opisan je nasumičnim hodom koraka duljine $l = |\vec{l_i}|$ kroz prostor (broj veza je N). Pretpostavka je da su orijentacije veza nekorelirane i da ne postoje nikakve interakcije između segmenata lanca (nema dugodosežnih volumnih interakcija). Ukupna duljina konture lanca koji se sastoji od N veza jednaka je sumi duljine svake pojedine veze

$$L = N|\vec{l_i}| = Nl \tag{1.1}$$



Slika 1.11: Model nasumičnog lanca od N+1 karike i N veza među njima.

a vektor udaljenosti krajeva lanca $\vec{h}$ glasi

$$\vec{h} = \vec{R}_N - \vec{R}_0 = \sum_{i=1}^{N} \vec{l}_i \tag{1.2}$$

Za procjenu prostorne veličine lanca korisno je raspisati izraz za prosječnu kvadratnu udaljenost krajeva lanca (PKUKL)

$$\left\langle h^2 \right\rangle = \left\langle \vec{h} \cdot \vec{h} \right\rangle \tag{1.3}$$

gdje zagrada označava prosjek po svim mogućim konfiguracijama. Ako krenemo od izraza 1.2 uz korištenje slijedećih jednakosti

$$\left\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_i \right\rangle = l^2 \tag{1.4}$$

$$\left\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \right\rangle = l^2 \left\langle \cos\theta_{ij} \right\rangle \tag{1.5}$$

dolazimo do slijedećeg izraza za PKUKL

$$\begin{aligned} \left\langle h^2 \right\rangle = \left\langle \vec{h} \cdot \vec{h} \right\rangle = \left\langle \sum_{i=1}^{N} \vec{l}_i \cdot \sum_{i=1}^{N} \vec{l}_j \right\rangle = \sum_{i=1}^{N} \left\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_i \right\rangle + \\ 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j}}^{N} \left\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \right\rangle = N l^2 + 2 l^2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j}}^{N} \left\langle \cos\theta_{ij} \right\rangle \end{aligned} \tag{1.6}$$

Faktor 2 dolazi uslijed izbjegavanja sumacije za indekse $j > i$ koja je jednaka sumaciji za indekse $j < i$. Za nasumični model poveznice su ne korelirane te zbog toga vrijedi $\left\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \right\rangle = \left\langle \vec{l}_i \right\rangle \cdot \left\langle \vec{l}_j \right\rangle = 0$ a to povlači $\langle \cos\theta_{ij} \rangle = 0$. To pojednostavljuje izraz za PKUKL

$$\left\langle h^2 \right\rangle = Nl^2 \tag{1.7}$$

Tipični radijus nasumičnog lanca je istog reda veličine kao i kvadratni korijen PKUKL-a

$$R \approx \left\langle h^2 \right\rangle^{1/2} \approx N^{1/2} l \tag{1.8}$$

Radijus nasumičnog lanca je proporcionalan korijenu broja njegovih veza dok je kontura proporcionalna broju veza. Zbog toga je za dugačke lance radijus nasumičnog lanca mnogo manji nego duljina njegove konture.

1.3.2 Model Kuhnovog lanca

U modelu idealnog lanca zanemarena je orijentacijska korelacija između njegovih segmenata. Sada ćemo izložiti model u kojem su uključene korelacije za međusobno bliske segmente lanca; Kuhnov model lanca. Neovisno o orijentacijskim korelacijama PKUKL je dan izrazom 1.8

$$\left\langle h^2 \right\rangle = l^2 \left[N + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j}}^{N} \langle \cos\theta_{ij} \rangle \right] \tag{1.9}$$

Sada ćemo proučiti kako kratkodosežne orijentacijske korelacije između segmenata, opisane dvostrukom sumom kosinusa kutova u izrazu 1.9 modificira karakterističnu duljinu polimernog lanca.

Model Kuhnovog lanca počiva na dvije pretpostavke

1. Korelacije duž konture lanca su kratkodosežne. Pretpostavlja se da segmenti izgube orijentacijsku korelaciju već nakon male udaljenosti po konturi, recimo nakon s monomera, tj. $\langle \cos\theta_{ij} \rangle = 0$ za $j - i > s$. Stoga sumi u izrazu 1.9 doprinose samo parovi koji zadovoljavaju sljedeći uvjet

$$\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j}}^{N} \langle \cos\theta_{ij} \rangle \approx \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j<i+s}}^{N} \langle \cos\theta_{ij} \rangle \tag{1.10}$$

2. Lanac je homogen i utjecaj krajeva lanca je zanemariv. S tom pretpostavkom, suma po indeksu j će u rasponu $i < j < i + s$ dati identične vrijednosti

za svaku vrijednosti i. Budući da sumiramo po N monomera možemo pisati

$$\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j<i+s}}^{N} \langle \cos\theta_{ij} \rangle \approx N \sum_{j=2}^{s} \langle \cos\theta_{ij} \rangle \tag{1.11}$$

Izraz 1.11 možemo uklopiti u izraz 1.9 te za Kuhnov lanac (u koji su uključene kratkodosežne orijentacijske korelacije) dobijemo izraz

$$\left\langle h^2 \right\rangle = Nl^2\sigma \tag{1.12}$$

gdje smo uveli pokratu

$$\sigma = 1 + 2\sum_{j=2}^{s} \langle \cos\theta_{1j} \rangle \tag{1.13}$$

Primijetimo da uključivanje kratkodosežnih korelacija modificira PKUKL samo za faktor σ, tj. PKUKL i dalje ostaje proporcionalan broju karika lanca N. To pak znači da je Kuhnov lanac nasumični lanac samo s duljim monomerom od nasumičnog lanca. Stoga možemo umjesto N segmenata duljine l modelirati lanac s $N_k = N/\sigma$ Kuhnovih segmenata s Kuhnovom duljinom $l_k = l\sigma$ tako da je duljina konture lanca očuvana

$$L = Nl = N_k l_k \tag{1.14}$$

S navedenim renormalizacijama PKUKL iznosi

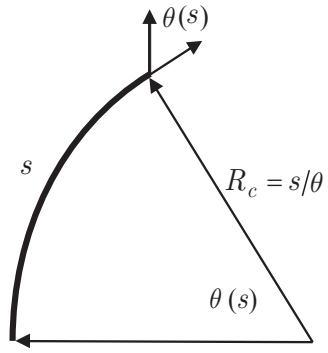
$$\left\langle h^2 \right\rangle = Nl^2\sigma = N_k l_k^2 \tag{1.15}$$

Naglasimo još jednom da s renormaliziranom veličinom monomera izraz za PKUKL, dan izrazom 1.15, ima isti oblik kao i za idealni lanac, izraz 1.7. Drugim riječima veličina monomera je renormalizirana na način da kratkodosežne korelacije u Kuhnovom modelu "pospremi" u njegovu povećanu duljinu.

1.3.3 Crvoliki lanac

I u modelu idealnog i u modelu Kuhnovog lanca, najvažnija osobina polimera, njegova fleksibilnost je koncentrirana u spojnoj točci karika. Razmotrimo kako to izgleda na primjeru od našeg interesa- DNA. Kuhnova duljina za DNA iznosi 100 nm, a veličina DNA monomera je 0.34 nm. To znači da su u Kuhnovu modelu 300 monomera jednako orijentirani te se sva promjena u orijentaciji događa nakon 300 monomera i ona je nasumična. Budući da realna situacija nije baš takva postoje i drugi modeli polimera. Jedan od njih je crvoliki lanac u kojem je polimer tanak

elastični filament koji u granici malih deformacija zadovoljava Hookov zakon. Za razliku od Kuhnovog modela koji je previše diskretan, crvoliki model je previše kontinuirani s obzir na realni polimer. Naime u crvolikom modelu veličinu karike lanca l puštamo u nulu a broj segmenata lanca N u beskonačnost na način da je duljina konture polimera $L = Nl$ konstantna. Razmotrimo elastični filament duljine s s konstantnom zakrivljenošću θ/s (radijus zakrivljenosti $R_c = s/\theta$, pogledaj sliku 1.12). Prema Hookovu zakonu energija savijanja je ekstenzivno svojstvo



Slika 1.12: Elastični filament duljine s i zakrivljenosti θ/s.

proporcionalno duljini filamenta s i kvadratu zakrivljenosti

$$\Delta U = \frac{1}{2} s \kappa_b \left(\frac{\theta}{s}\right)^2 \tag{1.16}$$

gdje je κ_b savitljivosti. Prosječni kvadrat kuta savijanja se može izračunati kao prosjek po svim konfiguracijama

$$\left\langle \theta^2 \right\rangle = 2 \frac{\int e^{(-\Delta U/kT)} \theta^2 d\theta}{\int e^{(-\Delta U/kT)} \theta} = 2 \frac{s}{\kappa_b} kT \tag{1.17}$$

gdje se faktor 2 pojavio jer se filament može savijati neovisno u dva smjera. Orijentacijska korelacija crvolikog lanca $\langle \cos\theta(s) \rangle$ je eksponencijalna

$$\langle \cos\theta(s) \rangle = e^{|s|/L_p} \tag{1.18}$$

gdje je L_p duljina ustrajnosti. Duljina ustrajnosti je tipična duljina na kojoj se orijentacijske korelacije polimera izgube. Sa svrhom povezivanja duljine ustrajnosti s konstantom savitljivosti, razmotriti ćemo kratki filament u granici štapićastih duljina, tj. $s \ll L_p$. Za tako kratke duljine kosinus iz izraz 1.18 možemo rastaviti u red te zaključno s drugim članom u razvoju po $\theta(s)$ dobivamo

$$\langle \cos\theta \rangle = 1 - \frac{1}{2} \left\langle \theta^2(s) \right\rangle + \cdots \tag{1.19}$$

Slično možemo rastaviti i eksponencijalnu funkciju i zadržati ćemo se samo na prvom članu u razvoju

$$e^{-|s|/L_p} = 1 - \frac{s}{L_p} + \cdots \tag{1.20}$$

i kombiniranjem prijašnja dva izraza dobivamo

$$\left\langle \theta^2(s) \right\rangle = 2\frac{s}{L_p} \tag{1.21}$$

Već prije smo izračunali prosjek kvadrata kuta savijanja uz pomoć Hookovog zakona 1.17 a kada ga usporedimo s izrazom 1.21 dobijemo

$$L_p = \frac{\kappa_b}{kT} \tag{1.22}$$

Iz toga vidimo da je duljina ustrajnosti polimera u stvari njegova otpornost na savijanje u jedinicama kT.

Za crvoliki lanac u kontinuiranoj aproksimaciji, udaljenost krajeva $\vec{h}$ se može zapisati na način

$$\vec{h} = \int_0^L \vec{l}(s)ds \tag{1.23}$$

gdje je $\vec{l}(s) = \partial\vec{r}/\partial s$ tangenta na jedinični vektor smjera lanca na udaljenosti s mjerena po konturi lanca. Po analogiji na izraz 1.3 PKUKL u crvolikom modelu glasi

$$\begin{aligned} \left\langle h^2 \right\rangle &= \int_0^L ds \int_0^s ds' \left\langle l(\vec{s}) \cdot l(\vec{s'}) \right\rangle = \\ 2\int_0^L ds \int_0^{L-s} dt \left\langle \cos\theta(t) \right\rangle, &\quad t = s' - s \end{aligned} \tag{1.24}$$

Za riješiti dvostruki integral pomoći ćemo si izrazom 1.18 tako da za PKUKL dobivamo

$$\left\langle h^2 \right\rangle = 2L_p^2 \left[\frac{L}{L_p} - 1 + e^{-L/L_p} \right] \tag{1.25}$$

dva granična slučaja su

$$\left\langle h^2 \right\rangle = L^2 \qquad L \ll L_p \quad (\text{štapić}) \tag{1.26}$$

$$\left\langle h^2 \right\rangle = 2LL_p \qquad L \gg L_p \;\; (namotaji) \tag{1.27}$$

U slučaju $L \ll L_p$ lanac je kruti štapić dok se za $L \gg L_p$ u PKUKL ponovo dobija Gausoov lanac. Za Kuhnov lanac smo dobili $\langle h^2 \rangle = N_k l_k^2 = L l_k$, izraz 1.15. Iz usporedbe s izrazom za crvoliki lanac, izraz 1.27 slijedi

$$l_k = 2L_p \tag{1.28}$$

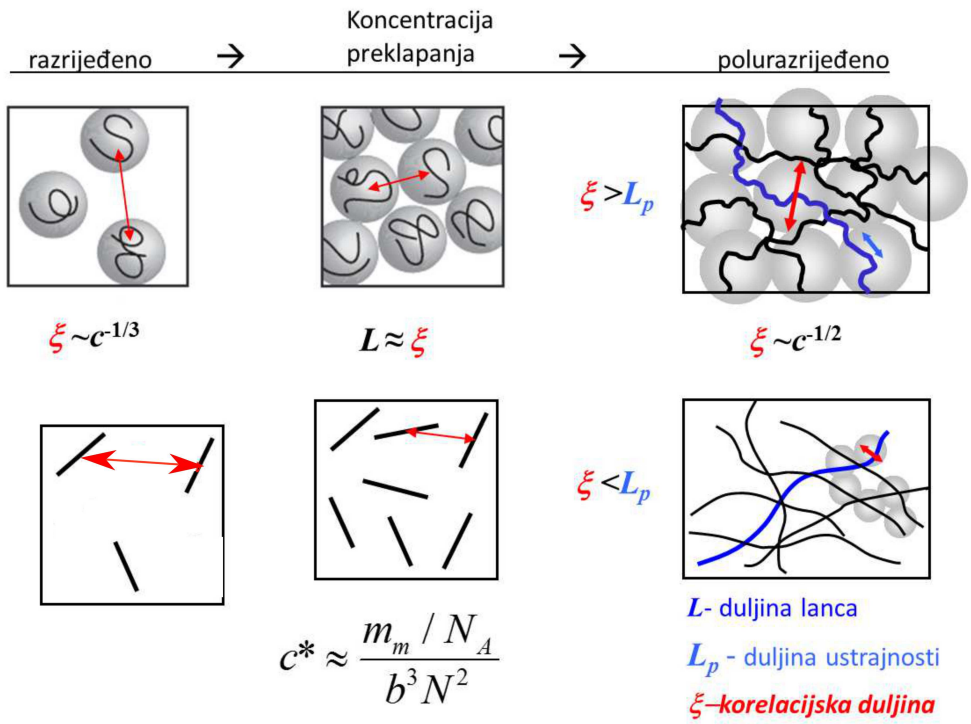
Ovime smo pokazali da je Kuhnova duljina točno dvostruko dulja od duljine ustrajnosti, a budući da je Kuhnova duljina odabrana tako da između njenih segmenata nema orijentacijskih korelacija vidimo da se korelacija gubi za duljine dvostruko dulje od duljine ustrajnosti. Napomenimo još jednom da Kuhnova duljina za DNA iznosi 100 nm, a duljina ustrajnosti 50 nm.

1.3.4 Granična koncentracija otopine polimera

Konformacija polimera osim od njegove fleksibilnosti ovisi i o međudjelovanju s drugim polimerima. Za male koncentracije će polimeri međusobno biti udaljeni i neće međudjelovati. Međudjelovanje započinje na graničnoj koncentraciji na kojoj su volumeni pridruženi polimerima u međusobnom kontaktu. Za još veće koncentracije polimeri se međusobno prožimaju. Otopine jako niske koncentracije polimera se nazivaju razrijeđenima. Svojstveno takvim otopinama je da su poliioni međusobno udaljeni više od svoje duljine konture $L < \xi$, vidi sliku 1.13. Stoga se svakom polimeru može pridjeliti sfera dijametra jednakog udaljenosti između susjednih polimera. Povećanjem koncentracije se dolazi do otopine u kojoj je $L = \xi$ i ta koncentracija se naziva graničnom. Iznos granične koncentracije se može procjeniti na način da se svaki poliion smjesti u volumenu koji je jednak kubu njegove duljine [29].

$$c^* \approx \frac{N m_m}{(Nb)^3} = \frac{m_m}{b^3 N^2} \tag{1.29}$$

gdje je m_m masa monomera. Važno je zapamtiti da granična koncentracija ovisi o broju monomera poliiona $c^* \approx N^{-2}$. To znači da će kraći poliioni imati veći iznos granične koncentracije. Uostalom, to je slučaj i s DNA koju smo mi istraživali [19, 53]. Istraživanje smo vršili u rasponu koncentracija 0.01 mM – 10 mM. U tom rasponu 146 bp DNA čini razrijeđenu, a genomska (polidisperzna 2k - 20k bp) čini polurazrijeđenu otopinu.



Slika 1.13: Skica razrijeđenog, graničnog i polurazrijeđenog polielektrolita za fleksibilni $L > L_p$ i kruti $L < L_p$ polimer.

1.4 Fizika protuionske atmosfere

Razumijevanje polielektrolita podrazumijeva i poznavanje raspodjele protuiona. Dok se konformacija poliiona može opisivati alatima fizike polimera, za opis protuionske atmosfere trebamo osnovnu jednadžbu elektrostatike - Poissonovu jednadžbu. Statistika nabijenih čestica u potencijalu poliiona svakako je Boltzmannova. Zato svi opisi protuionske atmosfere kreću od tzv. Poisson-Boltzmann jednadžbe.

1.4.1 Poisson-Boltzmann jednadžba

U termostatiranim sustavima raspodjela protuiona, koju možemo izraziti preko koncentracije $c(r)$ je Boltzmannova

$$c(r) = c_0 e^{-e\psi/kT} \tag{1.30}$$

gdje je c_0 koncentracija u nekoj dalekoj točci u kojoj potencijal idealno iznosi nula. Iz toga proizlazi da uz poznavanje elektrostatskog potencijala ψ možemo izračunati raspodjelu protuiona. Primijetimo odmah da je prirodno elektrostatski potencijal ψ promatrati u odnosu na apsolutnu temperaturu kT, tj. uvesti renormalizaciju $\phi \equiv e\psi/kT$. Veza nabijenih čestica i potencijala je dana Poissonovom jednadžbom

$$\nabla^2\psi = -\rho/\varepsilon_0\varepsilon_r \tag{1.31}$$

gdje je ρ gustoća naboja, ε_0 permitivnost vakuuma, a ε_r relativna permitivnost sredstva.

Uvrštavanjem Boltzmannovog izraza, 1.30, u Poissonovu jednadžbu, izraz 1.31, dobijemo Poisson Boltzmann (PB) jednadžbu

$$\nabla^2\psi = -\frac{e}{\varepsilon_0\varepsilon_r}\sum_i z_i c_i(0)e^{-z\phi} \tag{1.32}$$

gdje smo iskoristili vezu gustoće naboja i njegove koncentracije $\rho = \sum_i c_i z_i e$. Primijetimo da PB jednadžba nije linearna. Međutim, Debye i Hückel (DH) su za male elektrostatske energije $ze\psi \ll kT$ eksponencijalnu funkciju razvili u red i zadržali se na vodećem članu te dobili linearnu jednadžbu

$$\nabla^2\psi = -\kappa^2\psi \tag{1.33}$$

gdje smo uveli pokratu $\kappa^{-1} = (8\pi l_B)^{1/2} I_S^{-1/2}$ u kojoj je l_B Bjerrumova duljina, a $I_S = 1/2\sum_i c_i z_i^2$ je ionska jakost otopine. Činjenica da pokrata κ^{-1} ima dimenziju dužine i da se linearizirana PB jednadžba (1.33) može zapisati bez parametara ako se ψ zapiše u skali κ^{-1} govori nam da je κ^{-1} fundamentalna duljina. κ^{-1} naziva se Debyeva duljina a ukazuje na zasjenjenje naboja u otopini za dužine veće od κ^{-1}. Drugim riječima, doseg Coulombovog potencijala je konačan u otopini.

1.4.1.1 Bjerrumova duljina

U vakuumu je doseg elektrostatske interakcije beskonačna a u otapalu je duljine l_b. Bjerrumova duljina je dana kao udaljenost na kojoj su izjednačene elektrostatska energija jednovalentnih naboja i njihova kinetička energija.

$$k_B T = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r}\frac{e^2}{l_B} \tag{1.34}$$

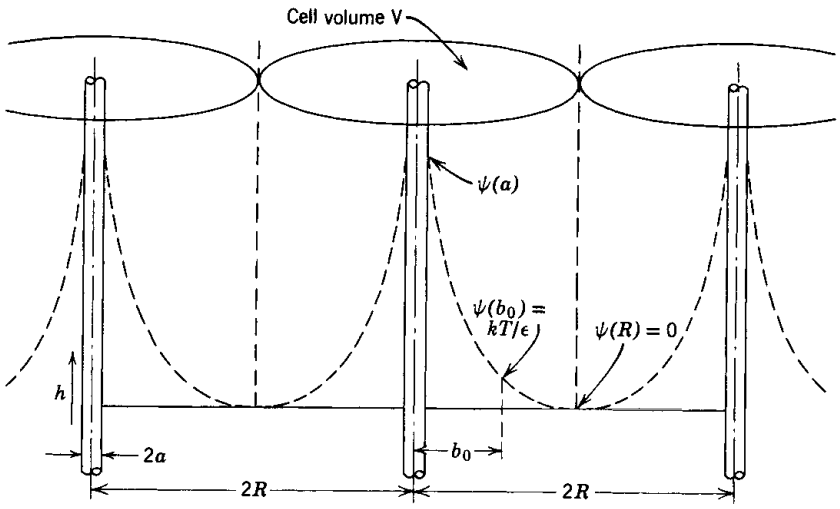
gdje se l_B možemo izraziti kao:

$$l_B = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r}\frac{e^2}{k_B T} \tag{1.35}$$

Bjerrumova dužina na određenoj temperaturi ovisi samo o otapalu, tj. o ε_r. Za jednovalentne ione na 25°C uz relativnu permitivnost čiste vode (ε_r = 78.65) [54] Bjerrumova duljina iznosi 0.72 nm.

1.4.2 Ćelijski modeli polielektrolita

Osnovna premisa ćelijskih modela je raspodjela polielektrolita u ćelije jednakog potencijala te određivanje potencijala te ćelije iz kojeg onda lako konstruiramo potencijal cijelog polielektrolita. Preduvjet za odabir ćelije je da one međusobno ne međudjeluju. To je moguće ako se za plohe ćelije odabere ploha minimalnog



Slika 1.14: Ilustracija odabira ćelije u Lifson-Katchalsky modelu

potencijala jer na njoj električno polje iščezava te su nabijene čestice na njoj slobodne te se međudjelovanje ne prenosi s jedne na drugu stranu takve plohe. Znači odabirom plohe koja se podudara s minimumom potencijala može se polielektrolit podjeliti u međusobno nedjelujuće ćelije. Izazov je što ekvipotencijalne plohe nisu identične za otopine niske i visoke koncentracije. Tako će za polurazrijeđene otopine taj volumen imati simetriju poliiona, tj. biti će cilindričan, kao na slici 1.14, dok će za razrijeđene otopine ekvipotencijale biti sfere, koje prate simetriju otopine.

1.4.2.1 Lifson-Katchalsky model

Debye-Hückel teorija je primjenjiva za opis jednostavnih elektrolita na niskim koncentracijama. Njeno glavno ograničenje je primjenjivost za elektrostatske energije mnogo manje od kT. U slučaju polielektrolita (posebno u odsustvu dodane soli)

nalazimo veliku koncentraciju naboja u malom prostoru. U blizini takvih višestrukih naboja, potencijalna energija protuiona je nekoliko puta veća od kT. Model [14] koji su 1951. predložili Lifson i Katchalsky (LK) je riješenje PB jednadžbe beskonačnog izoliranog štapićastog poliiona u prisustvu elektrostatski ekvivalentnog broja protuiona, tj. bez dodatka soli, vidi sliku 1.14. Stoga se može očekivati da će takav model dobro opisivati polurazrijeđene otopine. Budući su štapići beskonačno dugi molarna koncentracija poliiona c je zadana jedino udaljenošću između poliiona $2R$

$$c = 1000/\pi b R^2 N_A \tag{1.36}$$

b je udaljenost naboja na poliionu, a N_A je Avogadrova konstanta. U LK modelu efekti krajeva lanca su zanemareni, tj. pretpostavka je da je polimer mnogo dulji od udaljenost između polimera. Električni potencijal ima cilindričnu simetriju te opada s udaljenošću od polimera i svoj minimum dostiže na polovini udaljenosti između polimera R,

$$(\partial\psi/\partial r)_{r=R} = 0 \tag{1.37}$$

Drugi rubni uvjet se odnosi na naboj na polimeru

$$(\partial\psi/\partial r)_{r=a} = \sigma/\varepsilon_0\varepsilon_r \tag{1.38}$$

Uz ta dva rubna uvjeta rješenje PB jednadžbe glasi

$$\psi(r) = \frac{kT}{e} ln\left[\frac{2\eta}{B^2}\frac{r^2}{R^2 - a^2}\sinh^2(B\ln(Ar))\right] \tag{1.39}$$

A i B su konstante integracije ovisne o bezdimenzionalnom parametru naboja polimera η, te polumjeru polimera a i udaljenosti između polimera R.

$$\eta = \frac{e^2}{\varepsilon_0\varepsilon_r bkT} \tag{1.40}$$

$$\eta = \frac{1 - B^2}{1 + B\coth\left[B\ln(R/a)\right]} \tag{1.41}$$

$$B\ln A = -B\ln R - arctanh\ B \tag{1.42}$$

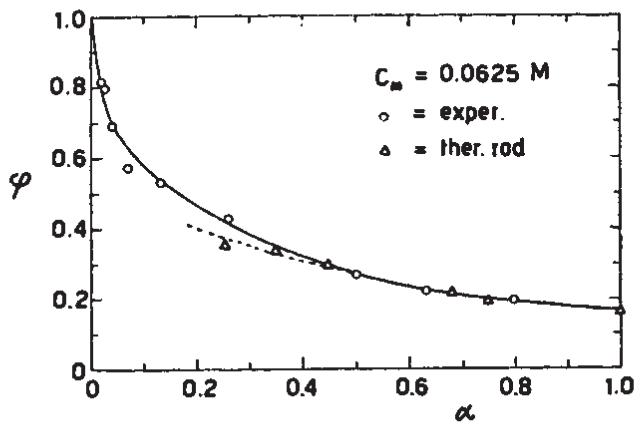
U gornjim jednadžbama se nalazi veličina R/a koja je određena koncentracijom polimera, tj. iz izraza 1.36 proizlazi

$$R/a = (1000/\pi b a^2 c N_A)^{1/2} \tag{1.43}$$

Eksperimentalno nije moguće mjeriti elektrostatski potencijal polielektrolita stoga su LK 1954. godine [15] proširili teoriju. Iz određenog potencijala može se odrediti unutarnja energija sustava $U = D/8\pi \int_V (\nabla\psi)^2 dV$ koja je povezana sa slobodnom energijom iz koje se može dobiti osmotski tlak $\Pi = \Pi_i - \partial(N_p F_e)/\partial V$.

$$\Pi = \frac{1 - B^2}{2\eta} - \frac{1}{(R^2/a^2) - 1} \approxeq \frac{1 - B^2}{2\eta} \tag{1.44}$$

LK su motivaciju za rad imali u Kernovim [10] mjerenjima osmotskog tlaka poliakrilne kiseline koja je napravio i direktno i krioskopski. Pronašao je da je tlak mnogo manji nego za nepoliionske elektrolite. Sniženje osmotskog tlaka protuiona se pripisuje snažnom elektrostatskom privlačenju protuiona od strane poliiona. Za poliione velikog stupnja ionizacije to polje izdužuje makromolekulu tako da je ona štapićasta te je za nju primjenjiv LK model, što je prikazano na slici 1.15. Primijetimo da je slaganje to bolje što je stupanj ionizacije poliakrilne kiseline veći.



Slika 1.15: Provjera predviđanja osmotskog koeficijenta Katchalskove teorije s eksperimentalni vrijednostima poliakrilne kiseline u funkciji njenog stupnja ionizacije α. Preuzeto iz [55].

1.4.3 Osmotski tlak

Osmotski koeficijent o govori koliko se izmjereni tlak razlikuje od idealnog $\Pi_{id} = ckT$

$$o = \frac{\Pi}{\Pi_{id}} \tag{1.45}$$

Nakon Kerna osmotski koeficijent je određivan i drugim metodama od strane Nagasawe i Kagawe [11] te Alexandrowicza [12]. Različite metode određivanja pokazale su prilično konzistentne vrijednosti što čini *o* jednim od najbolje karakteriziranih parametara polielektrolita. Za dovoljno veliki broj polielektrolita nađena je neovisnost osmotskog koeficijenta o molekularnoj masi poliiona, tj. duljini poliiona. Još više iznenađujuća je samo blaga ovisnost o koncentraciji. Primarni utjecaj na osmotski tlak ima gustoća naboja poliiona čijim povećanjem osmotski tlak opada. Spomenimo da osmotski koeficijent za potpuno ioniziranu poliakrilnu kiselinu padne na iznos 0.12–0.15, što znači da je samo 12-15 % protuiona osmotski aktivno. Za jako nabijene poliione osmotski tlak je u prvoj aproksimaciji obrnuto proporcionalan gustoći naboja poliiona, a to je uključeno i u LK model, vidi izraz 1.44. Sada ćemo pokazati da i Manningova teorija koja objašnjava rezultate osmotskog koeficijenta predviđa istu ovisnost.

1.4.4 Manning model kondenzacije

Za razliku od jednostavnih elektrolita za koje postoji teorija za koju se vjeruje da je egzaktna (DH granični zakon) za polielektrolite ne postoji takva teorija. Stoga se za elektrolite sva mjerenja na konačnim koncentracijama mogu ekstrapolirati u razrijeđeni režim i ona koja odskaču se pripišu nekom efektu koji nije uzet u obzir u graničnom zakonu, kao npr. kratkodosežno međudjelovanje iona, molekularna narav otapala. Teorija kondenzacije je pokušaj da se takav zakon izvede i za polielektrolite jer PB teorija je matematički kompleksna i ispostavilo se da aproksimacija srednjeg polja ne opisuje prikladno fluktuacije iona što je važno za male viševalentne ione.

Velika gustoća naboja poliiona implicira da će se mnogo protuiona nalaziti u njegovoj blizini čak i za razrijeđene otopine. Manning je 1969. godine [8] izveo teoriju koligativnih svojstava polielektrolitskih otopina na osnovi 5 pretpostavki. Uzor teoriji je DH granični zakon za elektrolite, tj. ona je izvedena za otopine male koncentracije i broj parametara u njoj je sveden na minimum. Nadalje, vrijednost parametara je zadana pretpostavkama i ne ovisi o empiričkim rezultatima. Namjena teorije je slična namjeri DH teorije za elektrolite a to je da razlikuje efekte koji dominiraju na niskim od onih koji dominiraju na visokim koncentracijama.

Striktno govoreći DH teorija je primjenjiva i na polielektrolite ali na one "dovoljno male koncentracije". Ali proizlazi da su "dovoljno male koncentracije" niže od onih koje se mogu eksperimentalno obrađivati s dovoljnom preciznošću. Za duge, jako nabijene poliione (polifosfat, poliakrilat, DNA) DH granična vrijednost nije nikada izmjerena niti na najnižim eksperimentalno dostupnim koncentracijama.

Takvo ponašanje nije neočekivano ako se uzme da je međudjelovanje protuiona s poliionom primarno vođeno nabijenim grupama na relativno kratkom segmentu

poliiona i da je doprinos udaljenih grupa zanemaren zbog zasjenjenja. Zbog toga je moguće poliion zamisliti kao beskonačno dug, barem što se međudjelovanja s protuionima tiče. Dapače, lokalno će segment poliiona imati strukturu određenu elektrostatskim odbijanjem svojih nabijenih grupa te je stoga opravdana aproksimacija štapićastog poliiona s cilindričnom simetrijom. Budući da su protuioni pridruženi jednom segmentu zasjenjeni od utjecaja grupa drugih segmenata za cijeli poliion (beskonačno dug) se može smatrati da ima konformaciju maksimalne izduženosti. Stoga je razumljivo pretpostaviti da će međudjelovanje poliiona s protuionima primarno ovisiti o ukupnoj gustoći naboja poliiona, dok će diskretnost nabijenih grupa biti manje važna. Stoga je za poliion duljine konture L (udaljenost krajeva u konformaciji maksimalne izduženosti poliiona) koji ima N nabijenih grupa valencije z, gustoća naboja dana izrazom

$$\rho = ze/A \tag{1.46}$$

gdje je

$$A = L/N \tag{1.47}$$

Stoga gornja argumentacija vodi do prve od 5 pretpostavki:

1) Realni poliion se zamjenjuje s linijskom beskonačnom gustoćom naboja ρ zadanom izrazima 1.46 i 1.47.

Kada je koncentracija 1:1 soli, npr. natrij klorida veća od ekvivalentne koncentracije poliiona međudjelovanje poliiona se može zanemariti u usporedbi s međudjelovanjem poliiona s protuionima iz njegove blizine, što ne mora biti točno i u otopinama bez dodane soli. Ipak pretpostavlja se da su lokalno dijelovi poliiona zasjenjeni od ostalih dijelova poliiona ili od drugih poliiona.

2) Međudjelovanje dva ili više poliiona je zanemareno neovisno o udjelu dodane soli.

Otapalo će se smatrati kontinuumom s dielektričnom konstantom ε

3) Vrijednost dielektrične konstante otopine je aproksimirana vrijednošću čistog otapala.

Preostale dvije pretpostavke su kompliciranije te zahtjevaju detaljniju argumentaciju. Ako b označava udaljenost između naboja poliiona, elektrostatska energija protuiona (pretpostavka je da su naboji točkasti) valencije z za dovoljno male vrijednosti $b \leq b_0$ je dana nezasjenjenom Culombovom interakcijom

$$u_{ip} = -z_i e(2\rho/\varepsilon) lnb, \quad b \leq b_0 \tag{1.48}$$

Doprinos faznom integralu područja polioona, od kojih je protuion i udaljen za manje od b_0, dok su svi ostali protuioni na udaljenosti većoj od b_0, te je stoga njihov doprinos konačnog iznosa $f(p_0)$, je dan s

$$
\begin{aligned}
U_i(b_0) &= f(p_0)\int_0^{\rho_0} exp\left(-\frac{u_{ip}(b)}{kT}\right)2\pi b db \\
&= 2\pi f(p_0)\int_0^{\rho_0} b^{1+2z_i z_p \eta} db
\end{aligned}
\tag{1.49}
$$

Integral će divergirati za sve vrijednosti za koje je

$$\eta \geq |z_i z_p|^{-1} \tag{1.50}$$

Sada ćemo ograničiti našu diskusiju na jednovalentne nabijene monomere i protuione tako da izraz prelazi u

$$\eta \geq 1 \tag{1.51}$$

Granična vrijednost $\eta = 1$ se može prepoznati kao Bjerrumova duljina iz klasične teorije jednostavnih otopina elektrolita, tj. kritična udaljenost naboja je stoga jednaka Bjerrumovoj duljini. Fizikalna interpretacija divergencije faznog integrala za vrijednosti η veće od 1 je da je sistem nestabilan: protuioni će se "kondenzirati" na poliion da smanje η na vrijednost neznatno manju od 1.

4) Za razrijeđene otopine dovoljno mnogo protuiona će se "kondenzirati" na poliion da smanje parametar gustoće naboja η na vrijednost 1.

Nekondenzirani protuioni nisu slobodni nego osjećaju elektrostatski utjecaj poliiona jer nakon kondenzacije gustoća naboja poliiona nije nula; ako je vrijednost η prije kondenzacije veća od 1 nakon kondenzacije ona će biti 1, a ako je manja od 1 do kondenzacije neće niti doći. Ipak protuioni su pod utjecajem preostalog nekompenziranog dijela naboja poliiona.

5) Nekondenzirani protuioni se mogu tretirati u DH aproksimaciji.

Analogija zadnje dvije Manningove pretpostavke s Bjerrumovom teorijom jednostavnih elektrolita je zapanjujuća. Sva razmimoilaženja od DH ponašanja se pripisuju kondenzaciji proutiona (u teoriji elektrolita se pripisuju ionskim parovima). Bjerrum je količinu uparivanja iona izračunao iz particijske funkcije ionskih parova; količinu kondenzacije Manning je također izračunao iz particijske funkcije (faznog integrala). Zapravo Bjerrumova duljina je ključna za obje teorije.

U svom radu Katchalsky [15] je izračunao osmotski koeficijent o za polielektrolite bez dodane soli iz egzaktno riješene PB jednadžbe. Njegov rezultat u granici beskonačno razrijeđenog polielektrolita iznosi

$$\lim_{c\to\infty} o = 1 - \frac{1}{2}\eta \quad , \qquad \eta < 1 \tag{1.52}$$

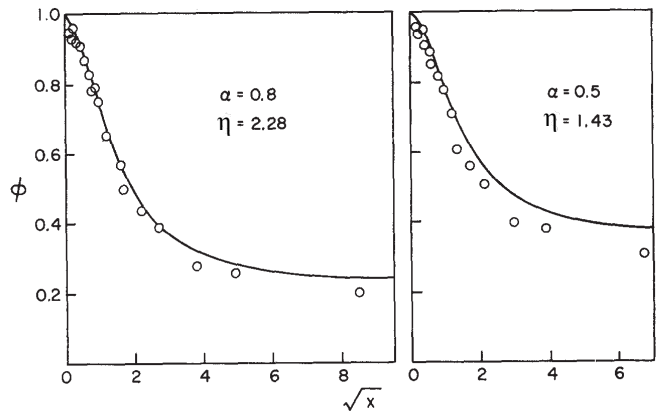
$$= (2\eta)^{-1} \quad , \qquad \eta > 1 \tag{1.53}$$

što je identičan rezultat kojeg je i Manning dobio

$$o = 1 - \frac{1}{2}\eta, \quad \eta < 1 \tag{1.54}$$

$$= 1/(2\eta^{-1}X + 2)/(X + 2), \quad \eta > 1 \tag{1.55}$$

gdje je X omjer koncentracije dodane soli naspram koncentracije intrinsičnih protuiona. Na slici 1.16 vidimo da se osmotski koeficijent jako nabijenih polimera



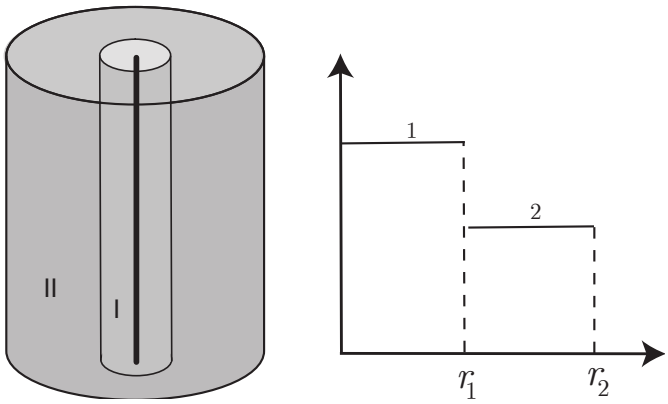
Slika 1.16: Usporedba ovisnosti osmotskog koeficijenta o korijenu omjera koncentracija dodanih naspram intrinsičnih protuiona iz eksperimenta [12] i Manningove teorije. Preuzeto iz [8].

dobiven Manningovom teorijom dobro slaže s mjerenjima koja su u to vrijeme bila dostupna.

1.4.4.1 Dvostanjski Manning-Oosawin model kondenzacije

Manning je poliion modelirao kao linijsku (beskonačno tanku) raspodjelu naboja. U slučaju veće gustoće od jednog naboja po Bjerrumovoj duljini linijska gustoća naboja se smanjuje na jedan po Bjerrumovoj duljini, a efekt se naziva kondenzacija naboja. Za razliku od Manningovog beskonačnog tankog (linijskog) kondenzacijskog prostora Oosawa [9] je kondenzaciju smjestio u bliski volumen oko poliiona. Oko poliiona su modelirana dva koaksijalna cilindra, unutarnji gdje se kondenziraju protuioni, označen na slici 1.17 kao područje I radijusa r_1 i vanjski radijusa

r_2 u kojem se nalaze preostali slobodni protuioni. Strukturna gustoća naboja koja



Slika 1.17: Oosawin dvostanjski model kondenzacije.

se nalazi na osi unutarnjeg cilindra je dana izrazom

$$\rho_0 = \frac{e}{A} \tag{1.56}$$

Koncentracija protuiona u području I neka iznosi c_1 a u području II c_2 (ukupna koncentacija je c). f je udio protuiona u području II (slobodnih protuina) a v volumni udio područja 1. Tada vrijedi:

$$\frac{c_1}{c} = \frac{1-f}{v} \ , \ \frac{c_2}{c} = \frac{f}{1-v} \tag{1.57}$$

Sada ćemo pretpostaviti da je potencijal radijalno od poliiona stepeničasta funkcija[1], sa ψ_1 i ψ_2 vrijednosti potencijala u području 1 odnosno 2. Valja primijetiti da smo dio te pretpostavke već ranije unijeli preko koncentracija za koje smo rekli da su unutar područja konstantne. Koncentracije područja su međusobno vezane Boltzmannovom distribucijom

$$c_1 = c_2 e^{-e\Delta\psi/kT} \tag{1.58}$$

gdje je $\Delta\psi = \psi_1 - \psi_2$. Pomoću izraza 1.57 možemo izraz 1.58 prepisati kao

$$\frac{1-f}{v} = \frac{f}{1-v} e^{-e\Delta\psi/kT} \tag{1.59}$$

a logaritmiranjem dobijemo

$$ln\left(\frac{1-f}{v}\right) = \ln\left(\frac{f}{1-v}\right) - \frac{e\Delta\psi}{kT} \tag{1.60}$$

[1]U realnosti potencijal monotono opada s udaljenošću od poliiona.

Potencijal beskonačnog cilindra je logaritamski

$$\psi(r) = \frac{\rho}{2\pi\varepsilon} lnr \tag{1.61}$$

gustoća naboja polimera je jednaka

$$\rho = fe/A = f\rho_0 \tag{1.62}$$

te stoga razliku potencijala dva područja možemo pisati na način

$$\Delta\psi = \psi_1 - \psi_2 = \frac{fe}{2\pi\varepsilon A} ln(r_1/_2) \tag{1.63}$$

Za jako razrijeđene otopine za koje vrijedi $r_1/r_2 \ll 1$ kombiniranjem izraza 1.60 i 1.63 dobijemo

$$\frac{\ln((1-f)f)}{1-f\eta} = \ln(r_1/r_2) \tag{1.64}$$

gdje smo za parametar gustoće naboja uveli pokratu

$$\eta = \frac{l_B}{A} \tag{1.65}$$

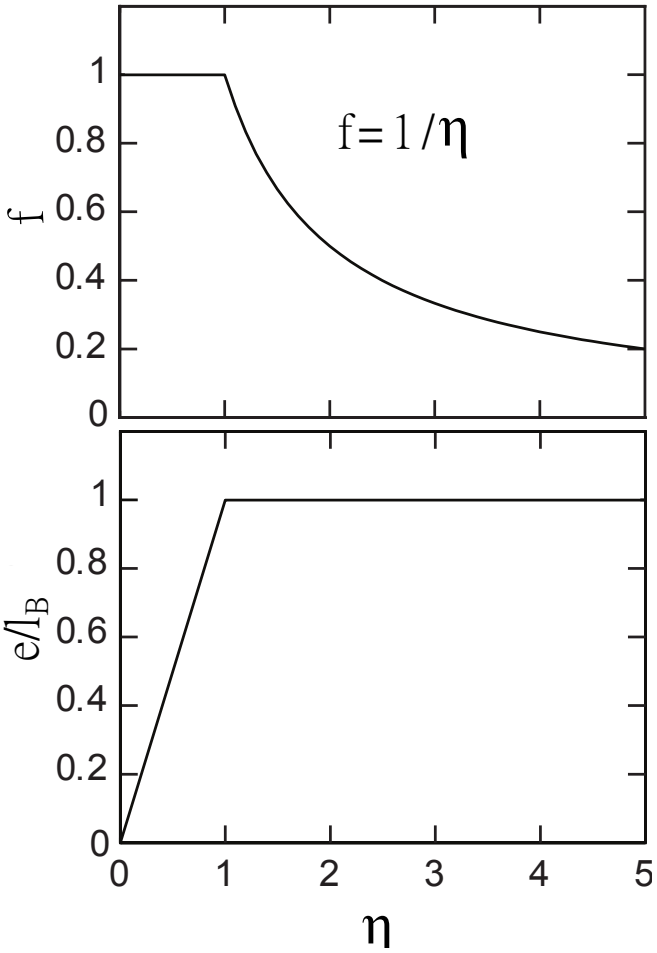
Udio slobodnih protuiona f, koja je jednaka renormalizaciji naboja polimera prema izrazu 1.62, možemo odrediti iz izraza 1.64 za jako razrijeđene polielektrolite $r_1/r_2 \ll 1$. Iako izraz 1.64 nema analitičko rješenje, za dvije krajnje vrijednosti parametra gustoće naboja η može se lako izračunati, a ta rješenja su prikazana na slici 1.18

- *Mala gustoća naboja* $\eta < 1$ Za malu gustoću naboja vrijedi $1 - f\eta$ a $\ln((1-f)f)/(1-f\eta)$ teži u beskonačnost samo ako $f = 1$. U tom području η strukturna udaljenost između naboja je veća od Bjerrumove dužine $A > l_B$ te stoga nema protuiona u području I (svi protuioni su slobodni) i efektivna gustoća naboja poliiona je jednaka strukturnoj

$$\rho = \rho_0 = \frac{e}{A} \quad (A > l_B) \tag{1.66}$$

- *Velika gustoća naboja* $\eta > 1$. U tom režimu izraz 1.64 divergira u $-\infty$ za $f = 1/\eta$. Zbog toga se linearna gustoća naboja renormalizira

$$\rho = \frac{\rho_0}{\eta} = \frac{e}{l_B} \quad (A < l_B) \tag{1.67}$$



Slika 1.18: Udio slobodnih protuiona (gornji) i efektivne linearne gustoće naboja (donji) u funkciji parametra gustoće naboja l_B/A poliiona u granici beskonačnog razrjeđenja.

uslijed kondenzacije čiji je udio dan izrazom.

$$1 - 1/\eta, \tag{1.68}$$

tj. $1/\eta$ je udio nekondenziranih iona. MO teorija kaže da ako je linearna gustoća naboja poliiona veća od jednog naboja na 0.72 nm protuioni iz otopine će se nakupljati u blizini poliiona dok mu efektivno ne smanje gustoću naboja na jedan naboj na 0.72 nm. Sada ćemo predviđanje MO modela ilustrirati na primjeru DNA. Linearna gustoća naboja B oblika dsDNA iznosi $A = 0.171$ nm (polovina udaljenosti između susjednih parova baza), što za parametar gustoća naboja daje $\eta = 4.2$. Za takve gustoće naboja ($\eta > 1$) MO teorija predviđa efektivnu renormalizaciju

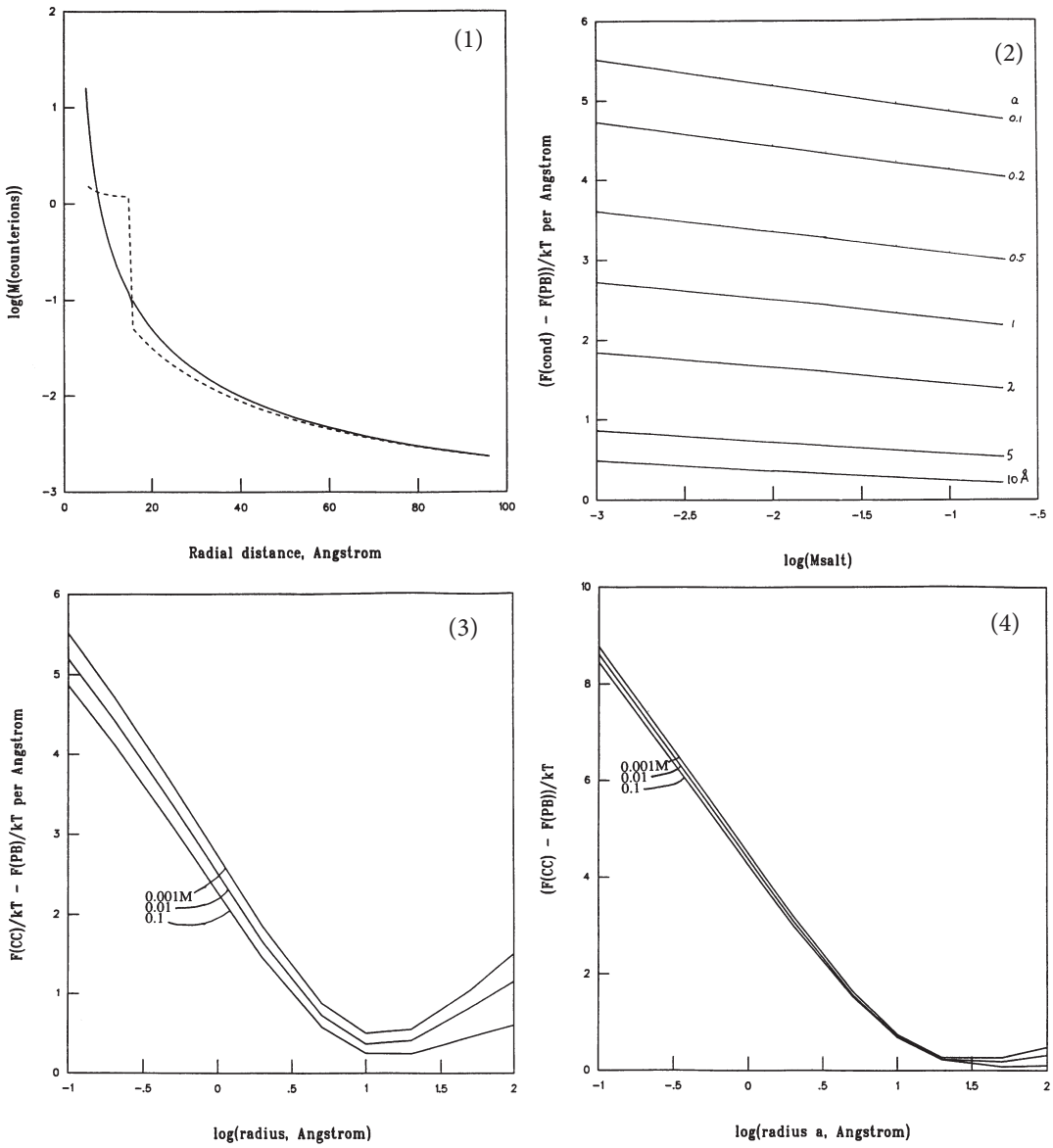
naboja na jedan naboj po l_B [8,56], što se postiže kondenzacijom $1-1/\eta = 0.76$ naboja zbog čega slobodnih, nekondenziranih naboja preostaje samo 0.24. U tablici 1.1 su dani udjeli slobodnih protuiona za ssDNA i za dsDNA s jednovalentnim i dvovalentnim protuionima. Oosawin model je Manning upotpunio na način da je samo konzistentno odredio volumen kondenziranog područja i argumentirao zašto se kondenzirani protuioni unutar svog volumena mogu slobodno kretati [17,56]

Tablica 1.1: Udio slobodnih protuiona f za ds MgDNA, ds NaDNA, ss NaDNA te hijaluronsku kiselinu.

	$b(e^-/nm)$	$\eta = z \cdot l_b/b$	$f = 1/\eta$
ds MgDNA	1.7	8.4	0.12
ds NaDNA	1.7	4.2	0.24
ss NaDNA	4.3	1.6	0.62
HA	10	<1	nema kondenzacije

1.4.5 Usporedba LK(rješenje PB-a) i MO modela

Pri usporedbi navednih modela služiti ću se Stigterovim radom iz 1995. godine [57]. Budući da teorije koje uspoređujemo obrađuju istu pojavu postavlja se pitanje koja je "točnija". Stigter je kao bolju proglasio onu teoriju u kojoj distribucija protuiona ima manju slobodnu energiju. Opravdanost tako uzete mjere ovdje nećemo istraživati. Na slici 1.19 (1) uspoređena je distribucija protuiona za PB i MO model za štap debljine 5 Å i za koncentraciju dodane soli $M = 0.01\ M$. Vidljivo je da razlika postoji u blizi poliiona ali ne i za vanjski dio protuionske atmosfere. Na slici (2) prikazana je razlika slobodnih energija u funkciji koncentracije dodane soli za različite radijuse nabijenog štapa. Vidimo da za određenu debljinu štapa razlika slobodnih energija opada povećanjem koncentracije. Isto tako vidimo da je razlika to manja što je radijus štapa veći. Na slici (3) su prikazani isti podaci samo za dodanu sol u funkciji debljine štapa. Vidimo da je razlika najveća za štapove najmanjeg radijusa, tj. za beskonačan tanak štap, koji odgovara Manningovom modelu iz 1969. godine. Za fizikalno realne debljine štapova vidimo da slobodna energija opada povećanjem debljine. Glavni razlog je što za konstantnu gustoću naboja tanji štapovi imaju veću površinsku gustoću naboja pa samim time i veću elektrostatsku slobodnu energiju. I slike (2) i (3) pokazuju da MO model ima veću slobodnu energiju od PB modela. Nema razloga da se to promjeni niti za koncentraciju dodane soli manje od 1 mM. Za veći radijus štapa, oko 1 nm razlike slobodne enrgije imaju minimum. Na slici (4) su prikazani jednaki podaci kao na slici (3) samo za 2:2 elektrolit. Kvantitativno ponašanje krivulja je isto jedino je polažaj minimuma pomaknut prema većim vrijednostima širine štapa.



Slika 1.19: (1) Koncentracija protuiona u funkciji radijalne udaljenosti beskonačno dugog štapa radijusa 5 Å i linearnog naboja koji odgovara B-formi DNA ($\eta = 4.2$) u 10 mM 1:1 elektrolitu. Puna crta predstavlja PB, a isprekidana MO model. Razlika slobodnih energija između MO i PB modela za (2) različite radijuse nabijnog štapa u funkciji koncentracije 1:1 elektrolita, za (3) različite koncentracije 1:1 elektrolita u funkciji radijusa štapa, (4) isto kao u (3) samo za 2:2 elektrolit.

Prvo moramo ponovo navesti da se Manningova teorija razvila kao odgovor na komplicirani matematički aparat korišten u LK modelu. Druga činjenica koja je

pomogla da Manningova teorija zaživi pored već naširoko korištene PB teorije je činjenica da se spoznalo da aproksimacija srednjeg polja koja se koristi u PB nije prikladna za opis fluktuacija iona. I PB i MO teorije se temelje na istim fizikalnim pretpostavkama: kontinuirani dielektrik i točkasti naboji u cijelom sustavu. Čini se da stepenasta raspodjela protuiona MO teorije unosi umjetno ograničenje na Boltzmannovu raspodjelu te da to vodi na veće slobodne enrgije, tj. PB teorija jedinstveno određuje raspodjelu protuiona dok se čini kako MO teorija ne može svugdje zadovoljiti i Poissonov i Boltzmannov zakon. Dva parametra MO teorije su efektivni naboj (1 naboj po Bjerrumovoj duljini) i vanjski radijus kondenziranog područja. U mnogim primjenama efektivni naboj i vanjski radijus se uopće ne koriste. Postavlja se pitanje zašto se onda MO teorija tako često slaže s eksperimentalnim podacima. Dvije značajke električnog dvosloja mogu to objasniti. Prvo, vanjski dio ionskog sloja je **uvelike određen dodanom soli, tj. Debyevom duljinom zasjenjenja** κ^{-1}. Kao što je prikazano na slici (1) rep raspodjele protuiona se jako dobro slaže s onim dobivenim PB teorijom. Stoga za svojstva koja ovise uglavnom o udaljenim dijelovima distribucije protuiona očekuju se jednaka predviđanja obje teorije, kao npr. distribucija soli Donnanove ravnoteže. Drugo, neka svojstva više ovise o sveobuhvatnoj elektroneutralnosti nego o posebnoj strukturi raspodjele protuiona, kao npr. vezanje liganada na poliion i posebno ovisnost takvog vezanja o ionskoj jakosti otopine.

1.5 Vodljivost otopina DNA

1.5.1 Vodljivosti polielektrolita bez dodane soli

Manningov model vodljivosti je predviđen za štapićaste molekule u niskoj koncentraciji [32, 58–60]. Značenja Manningovog rezultata je što on potpuno teorijski opisuje ekvivalentnu vodljivost Λ polielektrolita proizvoljne valencije protuiona. Izraz koji se koristi za ekvivalentnu vodljivost otopine polielektrolita bez dodane soli glasi

$$\Lambda = f(\lambda_i + \lambda_p) \tag{1.69}$$

gdje je λ_i ekvivalenta vodljivost protuiona u čistom otapalu (bez prisustva poliiona) a λ_p je ekvivalentna vodljivost poliiona u otopini. Iz elektrokemijskog kuta gledanja lako se primijeti da iz izraza 1.69 slijedi pretpostavka da je $1 - f$ udio protuiona vezano na poliion dok je samo f protuiona slobodno (nije pod utjecajem poliiona). Ipak polielektrolitske teorije upućuju da je takav pogled pogrešan, jer iako je dio protuiona vezan za poliion, preostali dio protuiona osjeća nekompenzirani naboj na poliion te stoga ne može biti "slobodan". Izraz 1.69 se može fenomenološki izvesti, ali tada se a priori koristi pretpostavka vezanja protuiona

na poliion, i tada se dobije

$$f = D_c/D_c^0 \tag{1.70}$$

gdje je D_c difuzijska konstanta protuiona u polielektrolitu, a D_c^0 je odgovarajuća vrijednost u čistom otapalu. Izraz 1.69 se može dobiti iz molekularne teorije, koja potvrđuje točnost vrijednosti izraza 1.70, ali daje njegov opis iz molekulskih svojstava. Teorija pokazuje da je međudjelovanje poliiona i protuiona u potpunosti određeno DH atmosferom za uvjet $\eta < |z_c|^{-1}$ dok se u granici $\eta > |z_c|^{-1}$ protuioni kondenziraju sve dok ne bude $\eta = |z_c|^{-1}$, dok se preostali protuioni nalaze u DH atmosferi. Tada vrijedi

$$f = 0.866|z_c|^{-1}\eta^{-1} \quad , \eta > |z_c|^{-1} \tag{1.71}$$

Slijedom iznesenog teorijski opis desne strane izraza 1.69 je sveden na potragu za teorijskim opisom λ_p.

Ekvivalentna vodljivost poliiona se može izraziti kao omjer ukupnog naboja poliiona $Q_p = zefN$ i ukupnog elektroforetskog koeficijenta f_{Etot}.

$$\lambda_p = F\mu_p = F\frac{Q_p}{f_{Etot}}, \tag{1.72}$$

gdje je F Faradayev broj. Poliion u razrijeđenoj otopini je okružen sa suprotno nabijenim protuionima čija prostorna distribucija je izobličena i postaje asimetrična u prisustvu vanjskog polja. Zbog toga se u računu elektroforetskog koeficijenta mora uračunati i efekt asimetričnog polja. Prema Manningovom izvodu ekvivalentna vodljivost korigirana za efekt asimetričnog polja glasi

$$\lambda_p = \left(FQ_p\frac{D_c}{D_0}\right)\left[f_E + \frac{Q_p}{\mu_c^0}\left(1 - \frac{D_c}{D_0}\right)\right]^{-1}, \tag{1.73}$$

gdje je μ_c^0 mobilnost protuiona u vodi (bez prisustva poliiona). Da bi mogli izračunati f_E trebamo koristiti neki od modela poliiona. Mi ćemo se koristiti Kirkwoodovim modelom [61, 62] u kojem se poliion sastoji od N_B jednostavnih, sfernih, strukturnih, jedinica radijusa R_B i hidrodinamičko međudjelovanje je uzeto u obzir. Elektroforetski koeficijent se može pisati na način

$$f_E = \frac{N_B\zeta_B}{1 + (\zeta_B/6\pi\eta N_B)\sum_i^{N_B}\sum_{j\neq i}^{N_B}\left\langle r_{ij}^{-1}\right\rangle} \tag{1.74}$$

gdje je $\zeta_B = 6\pi\eta R_B$ koeficijent trenja, u kojem je η viskoznost vode a, r_{ij} udaljenost strukturnih jedinica u navedenoj konformaciji. U Manningovoj slici, strukturne jedinice su nabijeni monomeri (s uračunatim efektom kondenzacije). Hidrodinamičko međudjelovanje monomera je modelirano elektrostatskim međudjelovanjem

monomera s protuionskom atmosferom, koja pod utjecajem vanjskog polja, vuče otapalo u suprotnom smjeru od smjera gibanja poliiona. U ovoj slici hidrodinamička interakcija između jedinica koje su udaljenije od Debyeve duljine κ^{-1} su zasjenjene i lanac je na duljinama usporedivim s κ^{-1} rastegnut. S pretpostavkom eksponencijalnog reza $e^{-r_{ij}\kappa}$ dvostruka suma u nazivniku se može jednostavno izvrjedniti

$$f_E = \frac{N_B \zeta_B}{1 + (\zeta_B/3\pi\eta B)|ln(B\kappa)|} \approx \frac{3\pi\eta N_B B}{|ln(\kappa B)|} \tag{1.75}$$

Konačni izraz za električnu vodljivost otopina bez dodane soli u prisustvu kondenzacije protuiona, unutar Manningovog modela glasi

$$\sigma = fc\frac{D_c}{D_0}\left\{\lambda_i + \left(Fzef N\frac{D_c}{D_0}\right)\left[\frac{zefN}{\mu_0}\left(1 - \frac{D_c}{D_0}\right) + \frac{3\pi\eta N_B B}{|ln(\kappa B)|}\right]^{-1}\right\} \tag{1.76}$$

Htjeli bi sve varijable u izrazu 1.76 izraziti preko konstanti. Jedine dvije koje nisu izražene preko konstanti su veličina strukturne jedinice B i njihov broj N_B. Njihova ovisnost o ostalim veličinama je slijedeća [63]

$$N_B B \propto Nb(l_b/b)^{2/7} f^{4/7} \tag{1.77}$$

$$N_B \propto N(l_b/b)^{5/7} f^{10/7} \tag{1.78}$$

Međutim iako Bordi i suradnici navode da su prilikom izvoda vodljivosti koristili Manningov izvod važno je primjetiti da se njihova elektroforetska mobilnost poliiona razlikuje od Manningove. Naime Manningova elektroforetska mobilnost poliiona ne ovisi niti o molekularnoj masi N niti o Manningovom udjelu slobodnih protuiona f. Ovisnosti o ta dva parametra, koja se može vidjeti u izrazu 1.76 je ušla preko izraza 1.72. Naime, u njemu srednji izraz u jednakosti, ako se uzme Manningov izraz, ne ovisi o ta dva parametra, dok lijevi izraz, kojeg su uveli Bordi i suradnici ovisi o ta dva parametra. Osim toga budući da je jednak udio poliiona neutraliziran protuionima kao i udio protuiona neutraliziranih s poliionom, što je u biti zahtjev elektroneutralnosti, očekivali bi da ekvivalentne vodljivosti protuiona λ_i i poliiona λ_p imaju identičnu ovisnost o istoj. Međutim u izrazu 1.76 vidimo da je ekvivalenta vodljivost protuiona neovisna o f, dok ekvivalenta vodljivost poliiona na kompliciran način ovisi o f, ali i o koncentraciji, kroz κ^{-1}.

Budući da je struktura razrijeđenih otopina bitno različita od strukture polurazrijeđenih, model vodljivosti razrijeđenih otopina nije primjenjiv na polurazrijeđene otopine.

1.5.1.1 Skalirajući model za polurazrijeđene otopine

Nedavno je Manningov model proširen, za fleksibilne polielektrolite u odsustvu dodane soli, na sisteme s konačnim koncentracijama (razrijeđenim i polurazrijeđenim) u okviru skalirajuće slike konformacije polielektrolita u otopinama [64–67]. Skalirajući koncept, koji se uspješno koristio za nenabijene polimere, je uzet za opis konformacije polielektrolita u raznim koncentracijskim područjima od strane de Gennesa [29] i Odijka [68] te nedavno od Rubinsteina i suradnika [64–67]. U toj slici poliion se modelira lancem "elektrostatskih volumena" sa statistikom lanca unutar volumena određenom s termodinamičkom interakcijom između nenabijenog polimera i otapala. Broj monomera i broj kondenziranih protuiona unutar volumena je određen s ravnotežom između polimer-otapalo i elektrostatske interakcije unutar volumena [64–67]. Na jako niskim koncentracijama, u razrijeđenom režimu bez dodane soli, κ^{-1} je mnogo veći od udaljenosti između poliiona i naboji međudjeluju ne zasjenjenom Coulombovom interakcijom. Polimer je predstavljen jako izduženom konformacijom od N/g_e elektrostatskih volumena veličine ξ_e. Svaki volumen sadrži g_e monomera i efektivan naboj iznosa $zefg_e$.

Slijedeći Manningov izvod, ali uz uvjet da je elementarna jedinica koja doprinosi koeficijentu trenja elektrostatski volumen koeficijent trenja iznosi

$$f_E = \frac{3\pi\eta N\xi_e}{g_e \ln(N/g_e)} \tag{1.79}$$

što je isti rezultat dobiven od strane Manninga (izraz 1.75) samo što je ovdje strukturna jedinca elektrostatski volumen a ne pojedini monomer. Stoga je i puni izraz za vodljivost razrijeđenih otopina isti (usporedi s izrazom 1.76).

$$\sigma = fc\frac{D_c}{D_0}\left\{\lambda_i + \left(Fzef N\frac{D_c}{D_0}\right)\left[\frac{zefN}{\mu_0}\left(1-\frac{D_c}{D_0}\right)+\frac{3\pi\eta N\xi_e}{g_e\ln(N/g_e)}\right]^{-1}\right\} \tag{1.80}$$

Sada ćemo izvesti izraz za vodljivost polurazrijeđenih otopina u skalirajućoj slici. Poliion u polurazrijeđenoj otopini modeliramo nasumičnim hodom N/g korelacijskih volumena veličine ξ od kojih svaki sadrži g monomera. Svaki korelacijski volumen duljine konture $L = N\xi/g$ sadrži $zefg$ jediničnih naboja dok cijeli poliion sadrži $Q_p = zefN$ naboja. Zbog jakih elektrostatskih interakcija unutar korelacijskog volumena, poliion je lanac izduženih elektrostatskih volumena unutar korelacijskog volumena (za $r < \xi$). Za $r > \xi$ elektrostatska i hidrodinamička interakcija je zasjenjena te je poliion nasumični hod korelacijskih volumena veličine ξ. Strukturna jedinica koja se treba koristiti za računanje koeficijenta trenja je korelacijski volumen. Uzimanjem u obzir i asimetričnost polja koeficijent trenja nasumičnog hoda N/g statističkih jedinica duljine ξ je dan s

$$f_E = \frac{N\zeta_\xi/g}{1 + \frac{8}{3}\sqrt{N/g}(\zeta_\xi/\sqrt{6\pi^3}\eta\xi)} \tag{1.81}$$

gdje se koeficijent trenja pojedinog korelacijskog volumena ζ_ξ jednostavno izračuna po analogiji s izrazom 1.79

$$\zeta_\xi = \frac{3\pi\eta\xi}{\ln(g/g_e)} \tag{1.82}$$

budući da je poliion unutar korelacijskog volumena izdužena konfiguracija g/g_e elektrostatskih volumena veličine $\xi_e = \xi/(g/g_e)$ ekvivalentna vodljivost se može dobiti kombinacijom izraza 1.72 i 1.81

$$\lambda_p = \left(FzefN\frac{D_c}{D_0}\right)\left[\frac{zefN}{\mu_0}\left(1 - \frac{D_c}{D_0}\right) + \frac{N\zeta_\xi/g}{1 + \frac{8}{3}\sqrt{N/g}(\zeta_\xi/\sqrt{6\pi^3}\eta\xi)}\right]^{-1} \tag{1.83}$$

Stoga u slučaju dobrog otapala potpuni izraz za električnu vodljivost polurazrijeđenih polielektrolita glasi

$$\sigma = fc\frac{D_c}{D_0}\left\{\lambda_i + \left(FzefN\frac{D_c}{D_0}\right)\left[\frac{zefN}{\mu_0}\left(1 - \frac{D_c}{D_0}\right) + \frac{N\zeta_\xi/g}{1 + \frac{8}{3}\sqrt{N/g}(\zeta_\xi/\sqrt{6\pi^3}\eta\xi)}\right]^{-1}\right\} \tag{1.84}$$

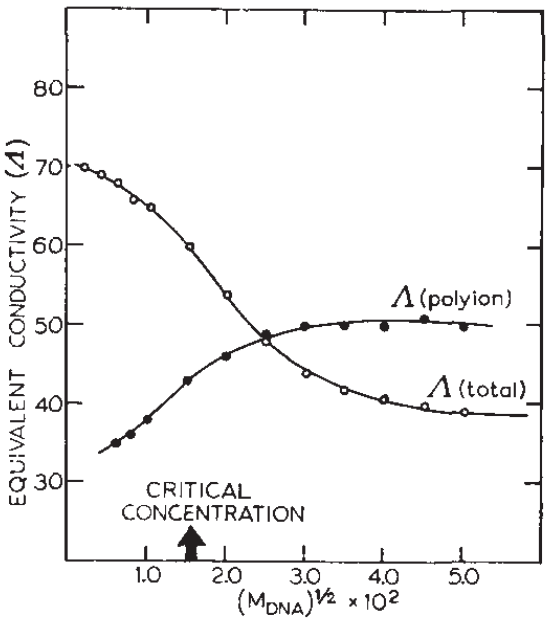
Kao i za razrijeđene otopine tako bi i varijable vodljivosti polurazrijeđenih otopina htjeli izraziti preko konstanti [63]

$$\begin{aligned} \xi &\propto Nb(l_b b)^{2/7} f^{4/7} \\ N/g &\propto Nb^{3/2}c^{1/2}(l_b/b)^{3/7} f^{6/7} \\ g/g_e &\propto b^{-3/2}c^{-2/7} f^{4/7} \end{aligned} \tag{1.85}$$

Slično kao i kod vodljivosti razrijeđenih otopina i za vodljivost polurazrijeđenih otopina, izraz 1.84, moramo primjetiti različitu ovisnost ekvivalentne vodljivosti protuiona i ekvivalentne vodljivosti poliiona o udjelu slobodnih protuiona f.

1.5.2 Eksperimentalno određene vodljivosti

1960.-e godine R. B. Inman i D. O. Jordan [69] su odredili ekvivalentnu vodljivosti otopine DNA te pripadnu vodljivost DNA poliiona. Ekvivalentna vodljivost



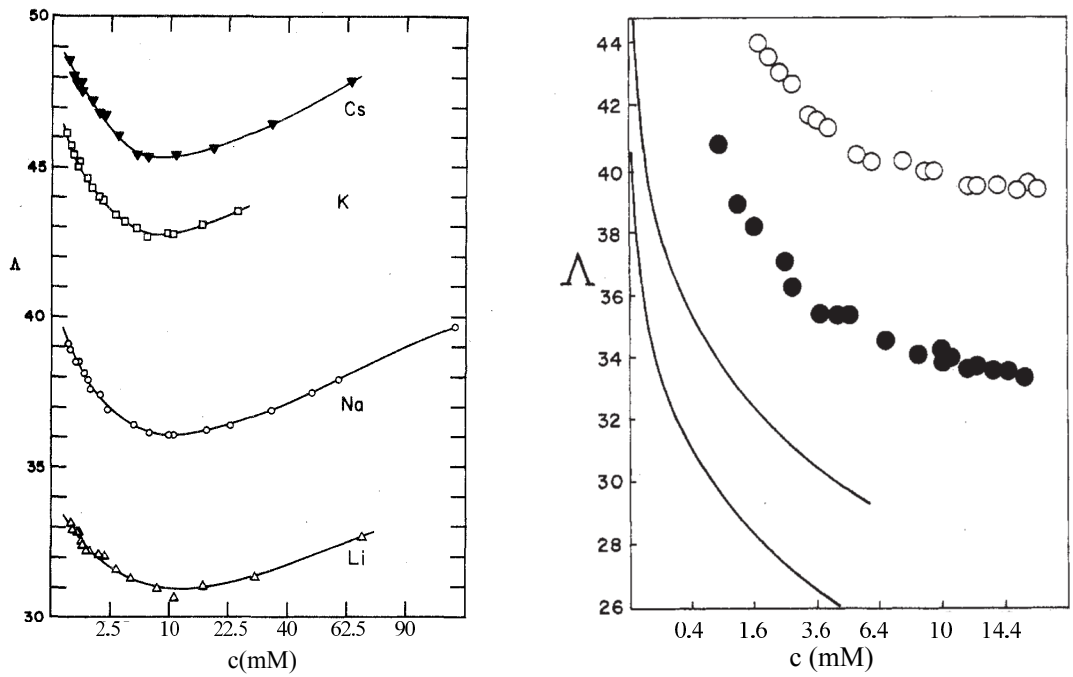
Slika 1.20: Ovisnost ekvivalentne vodljivosti vodene otopine NaDNA o koncentraciji DNA. Preuzeto iz [69].

se računa po izrazu

$$\Lambda = \frac{Q - Q_0}{c} \tag{1.86}$$

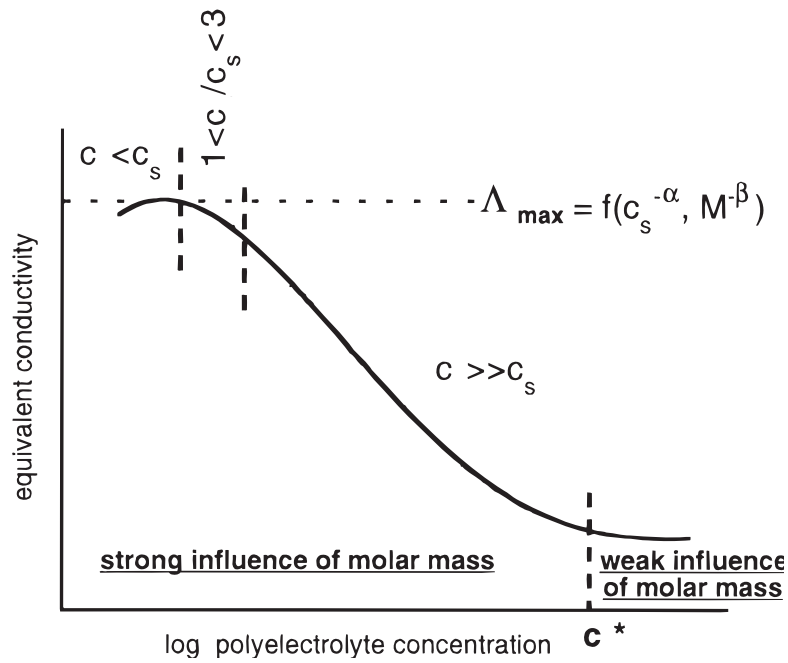
gdje su Q i Q_0 specifične vodljivost otopine i otapala. Poučeni teorijskim predviđanjima iz prošlog poglavlja 1.76, 1.84 očekivali bi da ekvivalentna vodljivost ne ovisi o koncentraciji. Međutim, na slici 1.20 vidimo porast ekvivialentne vodljivosti sa snižavanjem koncentracije DNA koji je najstrmiji u rasponu koncentracija 0.2-0.3 mM. Budući se znalo da se denaturacija DNA događa smanjenjem ionske jakosti otopine i snižavanjem koncentracije DNA, a budući da je u istom rasponu koncentracija UV spektrofotometrijom utvrđeno da se DNA denaturira, Inman je zaključio da se to možda očituje i u vodljivosti. To nisu bili jedini rezultati koji su upućivali na ovisnost ekvivalentne vodljivosti o koncentraciji poliiona [70, 71].

Na slici 1.21 vidimo opadanje ekvivalentne vodljivosti za $1 < c < 10\ mM$ te potom rast sve do krajnjih eksperimentalno mjerenih koncentracija od 60 mM. Primijetimo da neovisno o vrsti protuiona sve krivulje imaju sličan oblik samo se razlikuju u apsolutnom iznosu. C. Wandrey [13] sa suradnicima se nadovezala na ova mjerenja na način da je ona mjerila vodljivost na nižim koncentracijama. Njezina mjerenja nisu istraživala ovisnost vodljivosti o vrsti protuiona već o molekularnoj masi poliiona. Koncentracije otopina koje je istraživala se nalaze na granici polurazrijeđeno-razrijeđeno i protežu se u razrijeđene otopine. Izmjerena



Slika 1.21: Lijevo. Ovisnost ekvivalentne vodljivosti Λ ($cm^2 equiv^{-1} ohm^{-1}$) o koncentraciji poliiona za otopina PSS-a s litijevim (△), natrijevim (○), kalijevim (□) i cezijevim (▼) protuionima izmjerena na 25°. Desno. Ovisnost ekvivalentne vodljivosti Λ o koncentraciji poliiona za otopina PSS-a s litijevim (●) i natrijevim (○) protuionima izmjerena na 25°. Preuzeto iz [70, 71].

ekvivalentna vodljivost u čistoj vodenoj otopini ovisi o molekularnoj masi poliiona dok je rad Manninga [59] predviđao neovisnost, ali za otopine s dodanom soli. Sa slike 1.22 vidimo da su prisutna tri područja različite ovisnosti ekvivalentne vodljivosti o koncentraciji. U polurazrijeđenom području, iznad c^*, ekvivalentna vodljivost slabo ovisi o koncentraciji polimera. U razrijeđenom području ekvivalentna vodljivost jako ovisi o koncentraciji sve dok je dodane soli puno manje od intrinsične koncentracije naboja poliiona $c \gg c_s$. Kada je dodane soli podjednako kao i intrinsičnih naboja $1 < c/c_s < 3$ linearni porast Λ s koncentracijom prestaje. Ta otkrića su značajna jer teorijski pristupi nisu predviđali niti ovisnost ekvivalentne vodljivosti o stupnju polimerizacije, što nije prikazano na ovom shematskom prikazu, a niti o koncentraciji poliiona. Autorica je stoga napravila istraživanje i s drugom vrstom poliiona, vinilbenziltrialkilamonij [18]. Sličnu ovisnost je primjetila i za njega stoga bi se moglo zaključiti da je to generalno svojstvo razrijeđenih poliiona. Autorica je svoj nalaz pokušala objasniti na slijedeći način [18]:"Na velikim razrjeđenjima lokalna koncentracija oko poliiona nadmaši primijenjenu eksperimentalnu koncentraciju za približno 3-6 redova veličina. To



Slika 1.22: Generalna ovisnost ekvivalentne vodljivosti o koncentraciji polielektrolita za polimere udaljenosti naboja manje od Bjerrumove duljine ($b < l_b$). Eksperimentalni uvjeti: $5 \cdot 10^{-7} M < c < 10^{-2} M$; $10^{-6} M < c_s < 10^{-4} M$. Preuzeto iz [13].

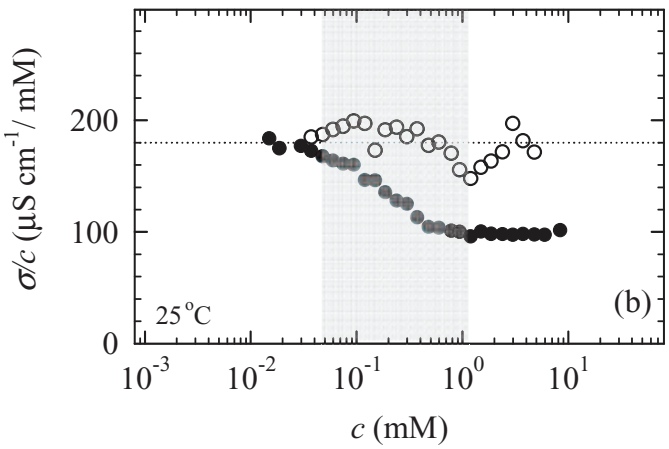
rezultira velikim difuzijskim potencijalom vezanih protuiona." To se slaže s Manningovim viđenjem [56] a posljedica toga viđenja bi bila da se s razrjeđenjem dio vezanih protuiona udalji od poliiona. To se može protumačiti na način da dio kondenziranih protuiona prestaje biti kondenziran, tj. postaje slobodniji. Međutim, osim pitanja zašto ekvivalentna vodljivost ovisi o koncentraciji pitanje koje je nama zanimljivije i na koje ćemo u ovom radu probati dati odgovor je da li je oblik krivulje koji je isti kao i za Inmanova [69] mjerenja na DNA generalan za polielektrolite kao što tvrdi Wandrey. To bi značilo da Inmanova interpretacija uzroka takve krivulje u denaturaciji DNA nije točna. Prvi korak u tom smjeru su mjerenja napravljena 2011. godine na Institutu za fiziku [19] koja su prikazana na slici 1.23. U tom radu je reproduciran oblik krivulje vodljivosti koju je dobio Inman, ali za kratku 146 bp DNA. Taj rezultat je bio povodom daljnjih istraživanja koja će biti iznesena u poglavlju 3 ovog rada.

1.6 Istraživanje protuionske atmosfere dielektričnom spektroskopijom

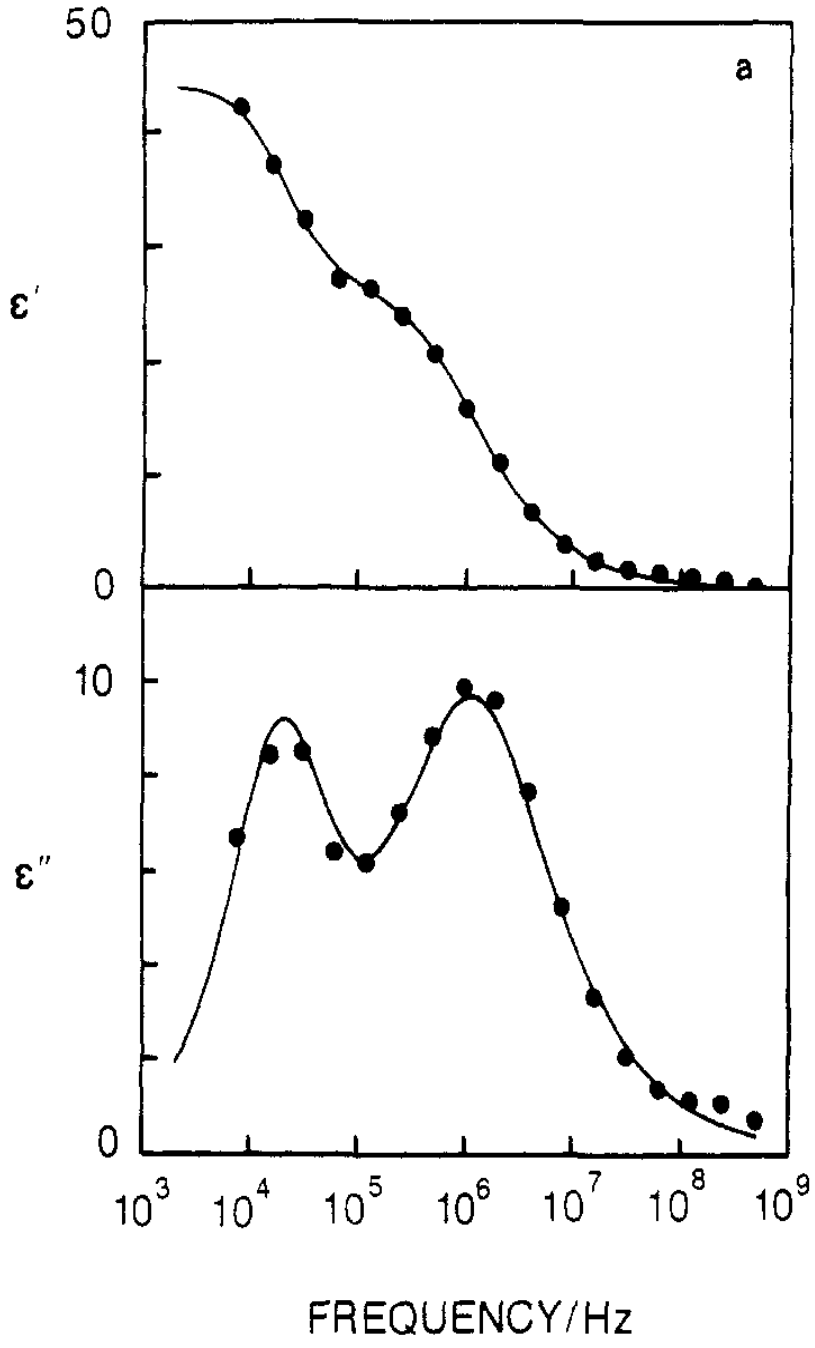
Istraživanjem vodljivosti se istražuje sastav ionske atmosfere a dielektričnom spektroskopijom se istražuje protežnost ionske atmosfere. Proučavanje DNA dielektričnom spektroskopijom započinje 1970.-tih godina. Četvero kontaktnom metodom je nađena relaksacija na 10 Hz koja je interpretirana kao posljedica rotacije cijele molekule DNA [72]. Nakon toga dvokontaktnom metodom na višim frekvencijama, od nekoliko kHz do 100 MHz, su detektirane dvije relaksacije [73]. Već od prije je bila poznata relaksacija vode na frekvenciji iznad 1 GHz. Stoga je 1984. napravljen rad u kojem se gleda utjecaj DNA na tu relaksaciju [74] i zaključeno je da je njen utjecaj unutar 1%. Primijetimo, to su bila prva mjerenja koja nisu bila napravljena na širokom spektru koncentracija DNA. Sintetske polielektrolite kao npr., natrij polistiren sulfonat (Na-PSS) je bilo moguće proizvesti u većim količinama te su stoga 1990. godine napravljena obuhvatnija mjerenja na Na-PSS-u koja su omogućila proučavanje relaksacijskih parametara u funkciji koncentracije poliiona [25]. Tipičan spektar koji je dobiven je prikazana na slici 1.24. Spektri su prilagođeni na izraze oblika Havrilka-Negami s ciljem kvantificiranja parametara relaksacije.

$$\varepsilon = \frac{\Delta\varepsilon_L}{[1+(i\omega\tau_L)^{\beta_L}]^{\alpha_L}} + \frac{\Delta\varepsilon}{[1+(i\omega\tau)^{\beta}]^{\alpha}} \tag{1.87}$$

Indikativno je da, iako su opazili dvije relaksacije, odlučili su analizirati samo onu na višoj frekvenciji. Primijetimo da pojedinu relaksaciju opisuju s 4 parametra.



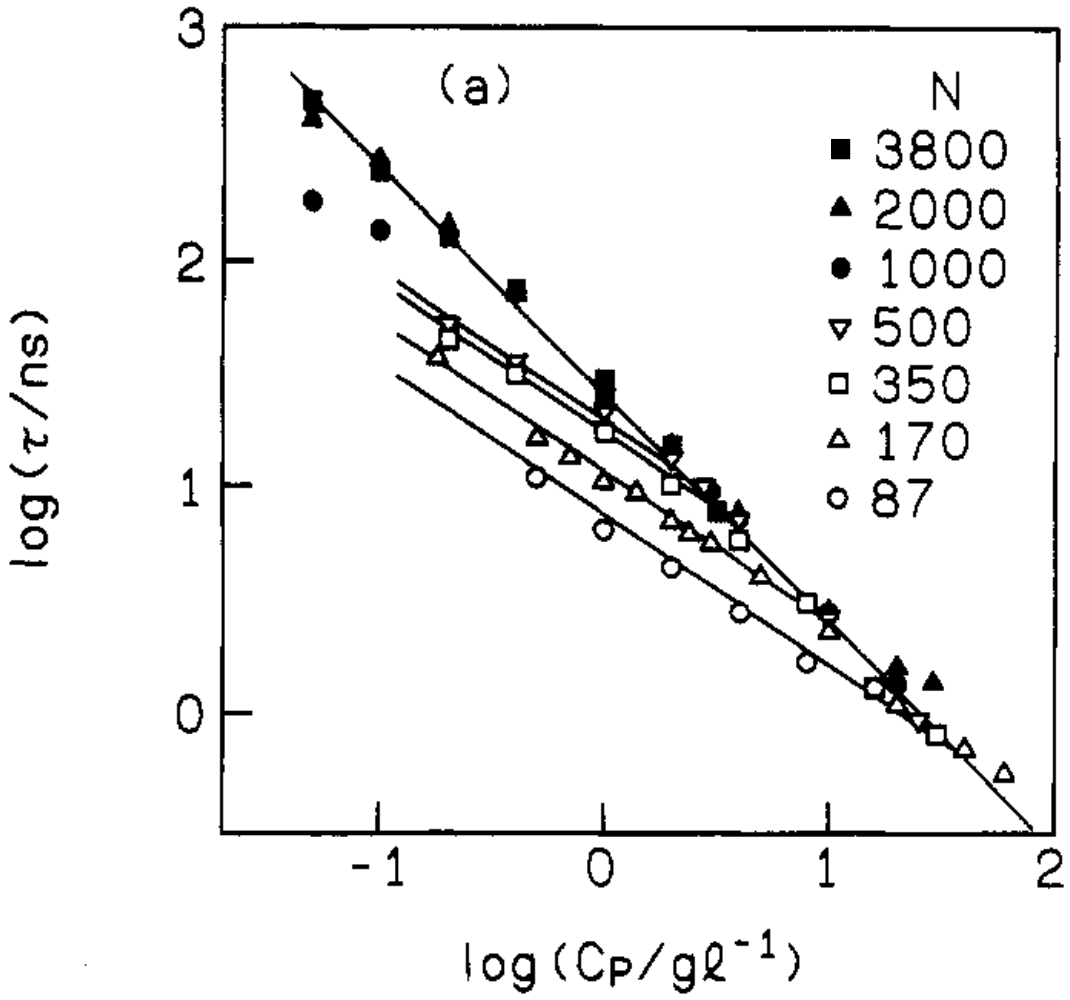
Slika 1.23: Vodljivost normirana koncentracijom DNA u funkciji koncentracije DNA za 146 bp dugu DNA. Preuzeto iz [19].



Slika 1.24: Realni ε' i imaginarni ε'' dio kompleksne dielektrične funkcije otopine NaPSS-a koncentracije 0.4 g/L. Preuzeto iz [25]

Na slici 1.25 je prikazana ovisnost jednog od ta tri parametra, karakterističnog

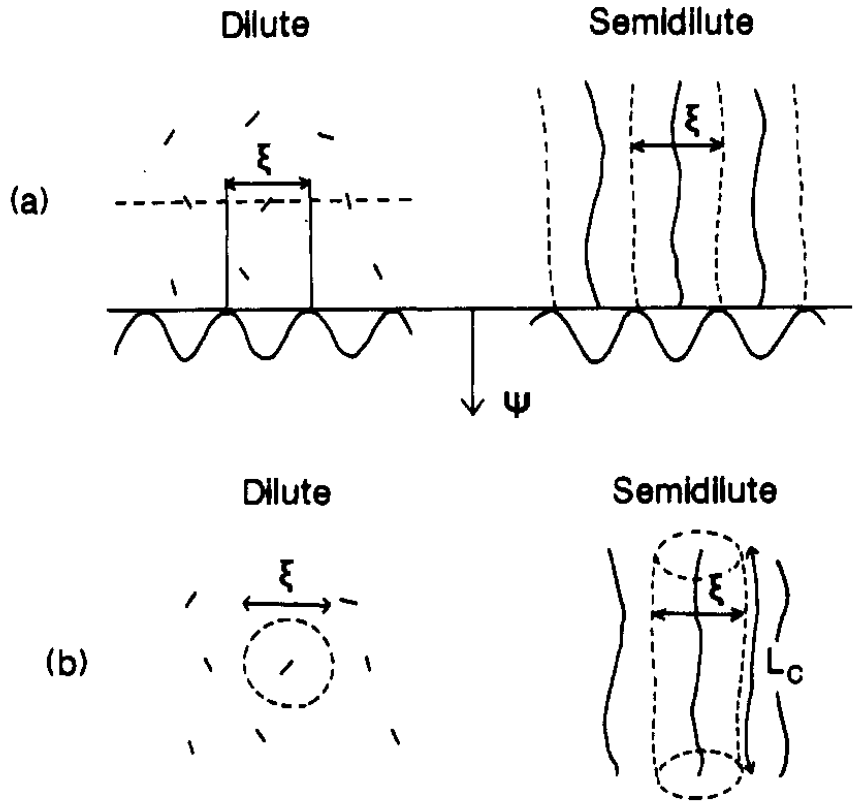
vremena relaksacije o koncentraciji monomera za poliione različitog stupnja polimerizacije.



Slika 1.25: Ovisnost karakterističnog vremena relaksacije τ o monomernoj koncentraciji NaPSS-a u dvostrukom logaritamskom prikazu za poliione različitog stupnja polimerizacije. Pune linije imaju nagibe -1 i $-2/3$. Preuzeto iz [25].

Kako protumačiti dobivene rezultate? Zašto karakteristično vrijeme opada s koncentracijom polimera? Kako protumačiti različite nagibe te činjenicu da koncentracija na kojoj dolazi do promjene nagiba ovisi o stupnju polimerizacije polimera? Probajmo po redu odgovoriti na zadana pitanja. Karakteristično vrijeme je mjera koliko dugo su protuioni sudjelovali u relaksaciji. Prirodno je pretpostaviti da što je ono kraće da su protuioni prevalili kraći put u relaksaciji. Da bi protuioni sudjelovali u relaksaciji oni se moraju nalaziti u nehomogenom električnosm

potencijalu poliiona. To je naznačeno na slici 1.26, a protezanje potencijala je to manje što su poliioni međusobno bliže uslijed povećanja njihove koncentracije. Kako bismo odgovorili na pitanje zašto su nagibi τ vs. c različiti pogledajmo ovis-



Slika 1.26: Udaljenost poliiona u razrijeđenoj i polurazrijeđenoj otopini s prosječnom udaljenošću danom korelacijskom duljinom ξ. (a) Za profil elektrostatskog potencijala ψ se smatra da se u oba slučaja ponaša periodično s periodom ξ. (b) Ćelijski model poliiona sa sfernom ćelijom u razrijeđenim i cilindričnom u polurazrijeđenim otopinama. Preuzeto iz [25].

nost udaljenosti poliiona o njihovoj koncentraciji, u razrijeđenoj i polurazrijeđenoj otopini. U ćelijskom modelu, ćelija opisana svakom poliionu iz razrijeđene otopine je sfera a polurazrijeđene valjak.

Udaljenost od poliiona do ruba njegove ćelije ξ je u razrijeđenoj otopini $\xi \propto c^{-1/3}$ a u polurazrijeđenoj $\xi \propto c^{-1/2}$ [29]. Protuioni se kreću difuzno te je veza njihovog karakterističnog vremena i karakterističnog puta $L \propto \sqrt{D\tau}$, D difuzijska konstanta protuiona [24]. To na kraju daje $\tau \approx \xi^2 \approx c^{-2/3}$ za razrijeđenu i $\tau \approx \xi^2 \approx c^{-1}$ za polurazrijeđenu otopinu. Ovaj izvod je pregledno prikazan u tablici 1.2.

Tablica 1.2: Ocjene ovisnosti karakterističnog vremena relaksacije o koncentraciji polielektrolita.

razrijeđene otopine	polurazrijeđene otopine
$V \approx \xi^3$	$V \approx \xi^2$
$\xi \propto V^{-1} \propto c^{-1/3}$	$\xi \propto V^{-1} \propto c^{-1/2}$
$\tau \approx \xi^2 \approx c^{-2/3}$	$\tau \approx \xi^2 \approx c^{-1}$

Stoga promjenu nagiba s -1 na $-2/3$ na slici možemo interpretirati kao promjenu razrijeđene otopine u polurazrijeđenu a koncentraciju na kojoj se ta promjena događa graničnom.

Još preostaje odgovoriti na posljednje pitanje zašto granična koncentracija ovisi o stupnju polimerizacije N. Trebamo se prisjetiti formule 1.29 i ovisnosti granične koncentracije o stupnju polimerizacije $c^* \approx N^{-2}$ što je prikazani rad i potvrdio.

1.6.1 Istraživanje atmosfere DNA dielektrično spektroskopijom

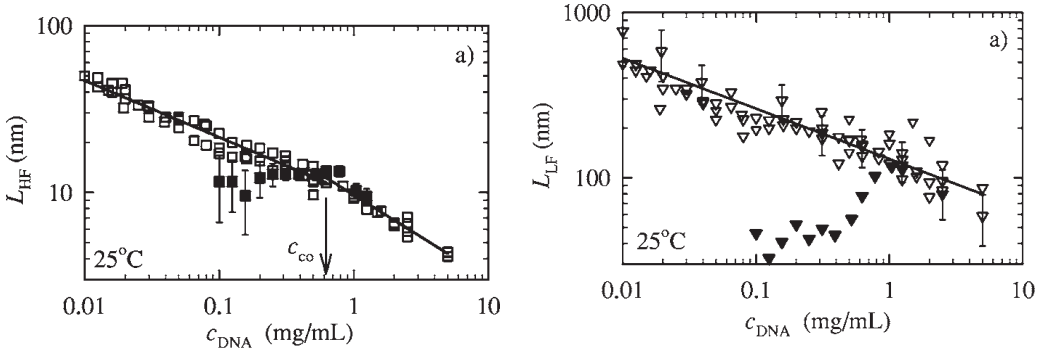
Kao što smo već naveli istraživanja otopina DNA dielektričnom sprektroskopijom započinju 1970.-tih godina i traju sve do danas [53, 72–81]. Uzrok tako dugo nedovršenim istraživanjima su neslaganja autora oko interpretacije izmjerenih rezultata. Naime, ne slažu se svi autori s Itovim viđenjem mehanizma relaksacije protuiona. Osim Itovog viđenja fluktuacije protuiona okomito na smjer poliiona, javljaju se i interpretacije fluktuacije paralelno sa smjerom poliiona. Nadalje, autori se razilaze i po pogledu vrste protuiona koji sudjeluju u relaksaciji. Stoga sam za odabrane radove pregledno u tablici 1.3 označio interpretaciju koju autori sugeriraju.

Tablica 1.3: Predloženi mehanizmi relaksacije otopina DNA

autor	smjer	vrsta
Saif [75]	paralelno	kondenzirani
Bone [76]	paralelno	kondenzirani
Bakewell [78]	paralelno	slobodni
Omori [79]	paralelno	-
Katsumoto [80]	okomito	slobodni
Grgičin [53]	okomito	slobodni
Ermilova [81]	paralelno	slobodni

Vidimo da je prevladavajuće mišljenje da je relaksacija protuiona paralelna smjeru poliiona, dok su o vrsti protuiona podjeljena mišljenja. U poglavlju 3 mi

ćemo iznijeti naše rezultate koji upućuju da je smjer relaksacije protuiona suprotan prevladavajućem mišljenju. Polielektroliti se na Institutu za fiziku proučavaju od 2003. godine. To je rezultiralo prvom publikacijom 2006. godine [26] u kojoj se izvještava o koncentracijskoj ovisnosti karakterističnih skala polurazrijeđenih otopina genomske DNA bez i s dodanom soli. U frekventnom rasponu od 100 Hz--100 MHz opažene su dvije relaksacije; niskofrekventna (LF) u rasponu 0.5 kHz--70 kHz i visokofrekventna (HF)u rasponu 0.1 $MHz-15$ MHz. Sljedeće godine publiciran je i opsežniji rad [27]. Sažetak glavnog rezultata tog rada se nalazi na



Slika 1.27: Karakteristična skala HF relaksacije čistih vodenih otopina (otvoreni kvadrati) i s dodatkom natrij klorida ionske jakosti $I_s = 1$ mM (puni kvadrati). Pune linije su prilagodbe na zakon pontencije $L_{HF} \propto c_{DNA}^{-0.33}$ i $c_{DNA}^{-0.5}$ za koncentracije manje i veće od $c_{co} \approx 0.6$ mg/mL. Karakteristična skala LF relaksacije čistih vodenih otopina (otvoreni trokuti) i s dodatkom natrij klorida ionske jakosti $I_s = 1$ mM (puni trokuti). Pune linije su prilagodbe na zakon potencije $L_{LF} \propto c_{DNA}^{-0.29\pm0.04}$. Preuzeto iz [27].

slici 1.27. Promjena ovisnosti L_{HF} u čistim vodenim otopinama s potencije -0.5 na visokim koncentracijama na -0.33 na niskim koncentracijama je interpretirana na slijedeći način. L_{HF} na visokim koncentracijama mjeri korelacijsku duljinu. Snižavanjem koncentracije dvostruka uzvojnica DNA postaje nestabilnija te hidrofobna nutrina DNA postane djelomično dostupna za otapalo, te to uzrokuje promjenu ovisnosti. Rezultati dobiveni na slanim otopina također ne pokazuju monotonu ovisnost o koncentraciji. Na visokim koncentracijama DNA, na kojima je više intrinsičnih protuiona s DNA nego iona dodanih soli, karakteristična skala se poklapa s onom u čistim vodenim otopinama. Međutim snižavanjem koncentracije DNA prevladaju ioni dodane soli te tada duljina koja se mjeri postaje Debyeva κ^{-1} duljina zasjenjenja. Debyeva duljina zasjenjenja je najkraća duljina za koju ion otopinu osjeća neutralnom a računa se po slijedećem izrazu

$$\kappa^2 = \frac{2e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT} I_S \tag{1.88}$$

gdje je ionska jakost otopine dana izrazom

$$I_S\left[1/m^3\right] = 1/2\sum z_i^2 c_i\left[1/m^3\right] \tag{1.89}$$

gdje je c_i koncentracija a z_i valencija protuiona. Sad još preostaje za komentirati karakterističnu skalu niskofrekventne relaksacije. U cijelom mjerenom području koncentracija ona ima monotono ponašanje koje unutar pogreške mjerenja ovisi s -0.25 potencijom koncentracije. U poglavlju 1.3.1 smo pokazali da udaljenost krajeva Gaussova lanca ovisi o umnošku korijena broja karika i duljini karike lanca. U polurazrijeđenim otopinama karika lanca je dana korelacijskim volumenom radijusa ξ unutar kojeg se nalazi $c\xi^3$ monomera poliiona ako pretpostavimo potpunu ispunjenost prostora korelacijskim volumenima. Iz toga možemo izračunati da takav lanac ima $N/(c\xi^3)$ karika duljine ξ čija udaljenost krajeva je jednaka

$$R = \left(\frac{N}{c\xi^3}\right)^{1/2}\cdot\xi = \left(\frac{N}{c\xi}\right)^{1/2} \propto \left(Nc^{-1/2}\right)^{1/2} \propto c^{-1/4} \tag{1.90}$$

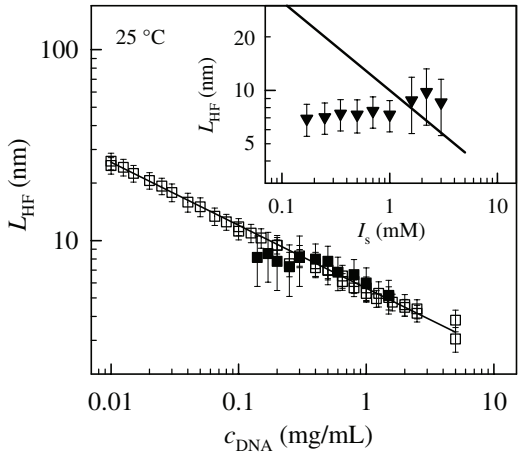
Stoga postoji podloga za tvrdnju da niskofrekventna relaksacija mjeri udaljenost krajeva poliiona polurazrijeđe otopine.

Slane otopine nemaju monotono ponašanje. Na koncentracijama na kojima ima više intrinsičnih protuiona karakteristična duljina je jednakog iznosa kao i za vodene otopine. Međutim smanjenjem koncentracije DNA prevlada utjecaj dodane soli na koncentraciji od oko 0.6 mg/mL te se skala koja se mjeri zaravna na iznos od 50 nm što je upravo strukturna duljina ustrajnosti DNA, o čemu smo pisali u poglavlju 1.3.3.

Nakon tih rezultata na polurazrijeđenim otopinama genomske DNA stupnja polimerizacije 2 $kbp - 20$ kbp sljedeće godine su objavljeni rezultati za razrijeđenu otopinu 146 bp DNA [28]. U čistim vodenih otopinama $L_{HF} \propto c^{-0.33}$. Budući da su to razrijeđene otopine udaljenost između poliiona u njima ima upravo takvu ovisnost o koncentraciji. Otopine s dodanom soli unutar pogreške pokazuju isto ponašanje iako se može spekulirati da na koncentracijama nižima od $c_{DNA} < 0.3$ mg/mL počinju pokazivati različito ponašanje i postaju neovisni o koncentraciji DNA s iznosom koji odgovara Debyevoj duljini zasjenjenja za 1 mM NaCl.

1.7 Ostale metode istraživanje protuionske atmosfere

Manning i Oosawa dali su [8, 9, 82, 83] MO koncept ionske atmosfere koji je dobra osnova za razmatranje raspodjele iona. Ipak teorija kondenzacije koristi pojednostavljenja u modeliranju poliiona i protuionske atmosfere [84]. PB teorija opisuje elektrostatski potencijal oko poliiona i kako se taj potencijal mijenja uslijed



Slika 1.28: Glavni panel: Karakteristična skala HF relaksacije čistih vodenih otopina (otvoreni kvadrati) i s dodatkom natrij klorida ionske jakosti I_s = 1 mM (puni kvadrati). Puna linija je prilagodba na zakon potencije $L_{HF} \propto c_{DNA}^{-0.33}$. Umetak: L_{HF} otopine koncentracije c_{DNA} = 0.5 mg/mL u funkciji ionske jakosti dodanog natrij klorida I_s. Puna crta označava Debyevu duljinu zasjenjenja za istraživanu količinu dodane soli. Preuzeto iz [28].

prisustva iona različitih vrsta i koncentracija i time daje više detalja. Aproksimacija srednjeg polja i korištenje kontinuiranog modela za otapalo čine PB teoriju konceptualno jednostavnom i računalno slijedivom. Postojanje numeričkih modela za rješavanje nelinearne PB jednadžbe za kompleksne biološke sisteme su dovele do još veće uporabe PB teorije. Ipak PB teorija ima svoja ograničenja. Ioni su tretirani kao točkasti naboji bez volumena. Stoga, svojstva bazirana na nedostupnom volumenu, volumenu u koji ne mogu ioni prodrijeti jer taj volumen zauzimaju drugi, su nedostupna PB teorijom. Nadalje PB daje Boltzmannovu raspodjelu iona za svaku udaljenost. Ova usrednjena gustoća iona ne uzima u obzir očekivane korelacije uslijed utjecaja pozicije pojedinog iona na ostale u atmosferi. Iako su poznata upravo nabrojana ograničenja teorijskih radova još nisu dostupni eksperimentalni rezultati za usporedbu. Većina fundamentalnih eksperimentalnih podataka ne omogućava kompletni termodinamički opis atmosfere. Postoji nekoliko eksperimentalnih radova koji ocjenjuju sastav atmosfere, međutim svaki od njih ima značajna ograničenja. Širenje linija $^{23}Na^+$ NMR je posljedica međudjelovanja Na^+ iona s DNA [85], ali ne postoji direktna poveznica između širenja linija i termodinamičkog vezanja Na^+ u atmosferi koje je potrebno za testirati postojeće modele. Anomalno raspršenje X-zraka [86–92] omogućava informaciju o raspodjeli iona u neposrednoj blizini DNA, ali je ograničena kvantificiranjem vezanih iona i skupoćom mjerenja. Vezanje iona na DNA se može izučavati uravnoteženjem koncentracije istraživane otopine prema puferu u kojem se koncentracija puferske

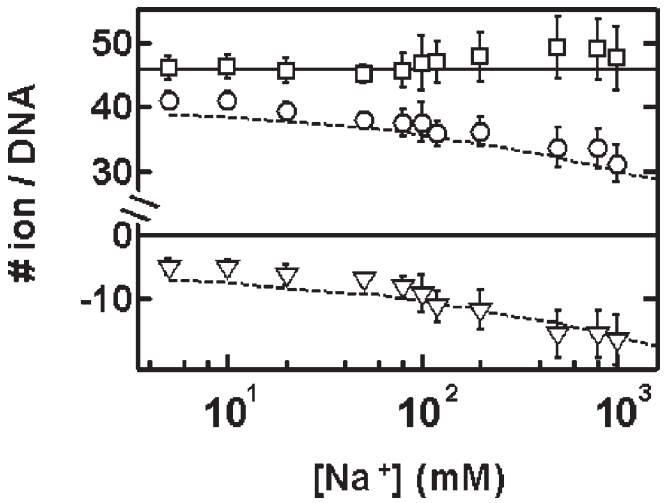
i istraživane otopine određuje atomskom emisijskom spektroskopijom [50]. Ova metoda omogućava termodinamičku mjeru vezanja iona, ali ima značajno raspršenje rezultata prilikom mjerenja atomske emisije.

Dvovalentni protuioni se natječu s jednovalentnim u zasjenjenju DNA [93]. Promjene vezanja ^{23}Na u prisustvu drugih iona se mogu istraživati NMR-om. NMR mjerenjem primjećen je različit utjecaj Mn^{2+} na vezanje natrija u odnosu na druge dvovalentne ione (Ni^{2+}, Mg^{2+} i Co^{2+}). To upućuje da Mn^{2+} za razliku od Mg^{2+}, Co^{2+} i Ni^{2+} drugačije mijenja poliionsku površinu te samim time i protuionsku atmosferu [94–98]. Važno je istaknuti i da je primjećena singularnost ponašanja mangana u istraživanju termalne denaturacije koja pokazuje destabilizaciju dvostruke zavojnice inducirane Co^{2+} i Ni^{2+} u suprotnosti sa stabilizirajućim efektom primjećenim za Mn^{2+} te još više za Mg^{2+} [49].

Mjerenjem anomalnog raspršenja X-zraka (A-SAXS) u male kuteve može se odrediti vrsta međudjelovanja DNA poliiona [89]. Izmjereni intenzitet raspršenja $I(Q)$ se sastoji od dvije komponente: form faktor $P(Q)$ koji potječe od pojedine DNA i strukturni faktor $S(Q)$ koji govori o međudjelovanju DNA, tj. strukturi otopine. Za DNA koncentracije $0.05 < c < 1\ mM$ bez dodane soli je primijećeno značajno strukturno uređenje uslijed jake odbojnosti između DNA, a prosječna udaljenost između molekula u razrijeđenoj otopini očekivano ovisi kao $c^{-1/3}$. Dodavanjem NaCl-a do koncentracije 400 mM međudjelovanje između DNA lanaca je još uvijek odbojno međutim dodavanjem samo 8.3 mM Mg^{2+} međudjelovanje postane privlačno.

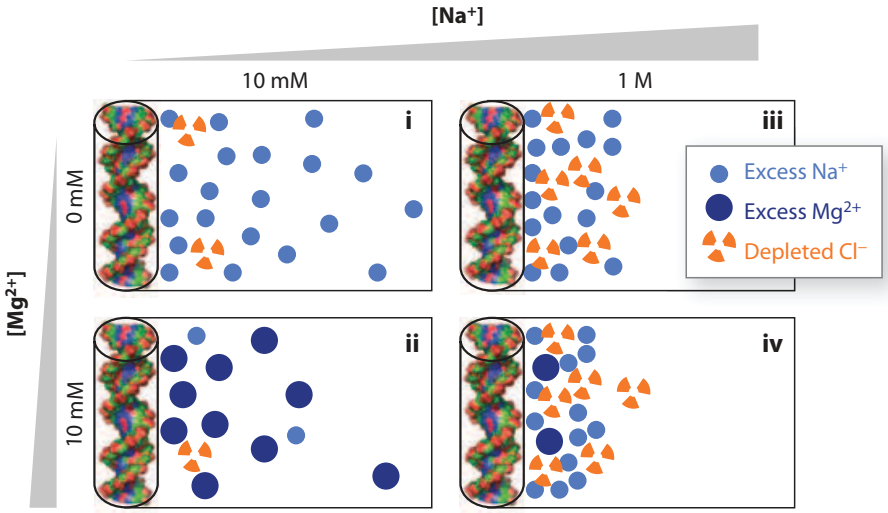
Bolje razumijevanje strukture i energetike protuionske atmosfere zahtjeva eksperimentalni pristup koji direktno i precizno mjeri kompletni sastav atmosfere. Brzo skupljanje podataka je važno jer omogućava usporedbu atmosfera za različite vrste iona i molekula te pod različitim uvjetima. Metoda koja odgovara gornjem opisu je puferima ostvarena ravnoteža a atomskom emisijkom spektroskopijom određen sastav otopine.

Ovisnost vrste iona koji neutraliziraju DNA o koncentraciji dodanih natrija je prikzana na slici 1.29. Rezultati pokazuju sistematsko opadanje broja vezanih natrijevih iona s povećanjem koncentracije istih u otopini. Ovaj trend je i teorijski reproduciran kao rješenje PB jedandžbe a možemo ga razumijeti na slijedeći način. Potencijal DNA se manje proteže u otopinu kada je koncentracija iona veća. To povlači dvije posljedice: asocirani kationi koji su privučeni ovim potencijalom su locirani u manjem volumenu oko DNA, te je stoga njihova koncentracija lokalno povećana. Druga posljedica smanjenja veličine tog područja povećane koncentracije je strmiji koncentracijski gradijent između asociranih i slobodnih (eng. bulk) iona. Stoga je porast entropije (porast koncentracijskog gradijenta) značajniji za asocijaciju kationa nego osiromašenje aniona. Slobodna energija stoga favorizira osiromašenje aniona naspram akumulacije kationa u neutralizaciji naboja DNA na visokim slanostima [50]. Unatoč velikom terorijskom i eksperimentalnom ulo-



Slika 1.29: Neutralizacija 24bp DNA (-46 naboja) asocijacijom Na^+ (○) i osiromašenjem aniona (▽). Asocirani natrijevi ioni uvećani za istisnute anione daju ukupni naboj ionske atmosfere (□, puna linija +46). Rezultati su uspoređeni s predviđanjem PB teorije za jednovalentne ione (isprekidane crte). Preuzeto iz [50].

ženom naporu, posebno u posljednjih 10 godina, svojstva polielektrolita potiču daljnja istraživanja. Istraživanja različitih polielektrolita različitim eksperimentalnim metodama često vode na kontroverzne zaključke i obično su nepouzdanosti izmjerenih podataka velike što onemogućava jedinstvene slike strukture i dinamike polielektrolita. Stoga je još uvijek važno dati odgovor na naizgled jednostavna pitanja o udjelu kondenziranih protuiona i protežnosti protuionske atmosfere.



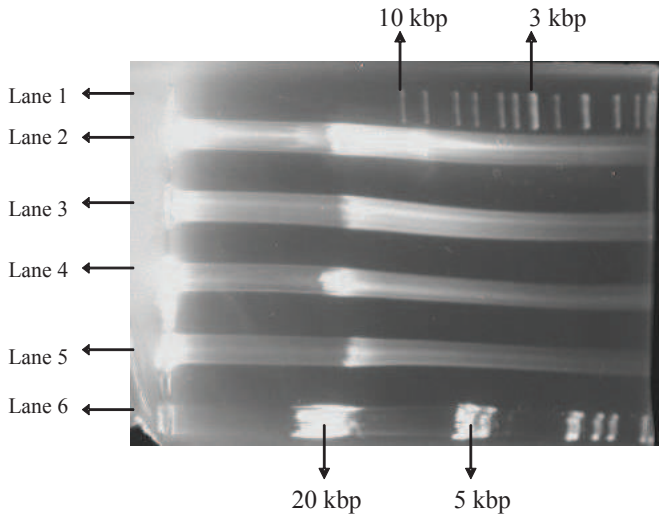
Slika 1.30: Shematski prikaz ionske atmosfere nukleinske kiseline. Kružići predstavljaju suvišak protuiona a trokutići osiromašenje koiona u atmosferi kada ih usporedimo s otopinama iste nominalne koncentracije. Prikaz nije samo shematski nego je i kvantitativan na način da svaki simbol označava 2 iona. Iz prikaza možemo uočiti nekoliko trendova: (i) Veća ukupna ionska jakost povećava osiromašenje koionima; (ii) atmosfera s dominantnim dvovalentnim protuionima uzrokuje uži volumen asociranja iona okolo DNA poliiona. (iii) za podjednaku koncentraciju jedno i dvovalentnih protuiona u atmosferi se dominantno nalaze dvovalentni. (iv) čak i u jakom suvišku jednovalentnih iona određeni udio divalentnih će biti asociran s nukleinskom kiselinom. Preuzeto iz [99].

2

Materijali i metode

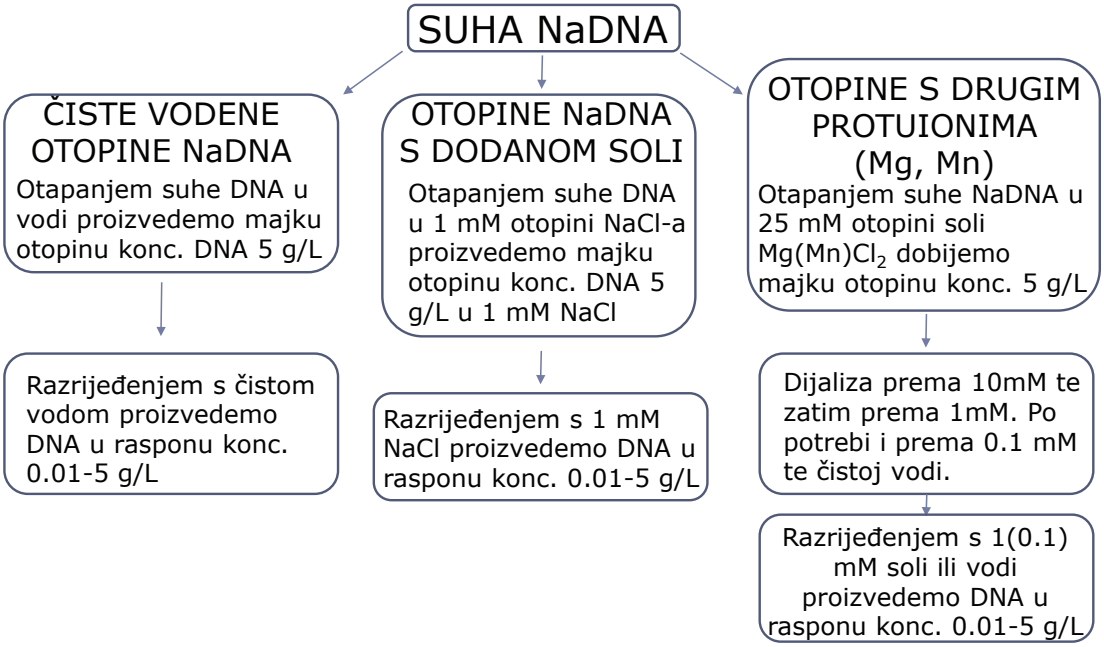
2.1 Priprema vodenih otopina DNA

Liofilizirani suhi končići NaDNA su nabavljeni od Sigma-Aldrich (D1626). Karakterizaciju otopina u smislu određivanja stupnja polimerizacije uzoraka smo radili na gel elektroforezi a rezultati su prikazani na slici 2.1. Vanjsko električno polja uzrokuje gibanje DNA s lijevog prema desnom rubu gela.



Slika 2.1: Slika agaroznog gela. Slijed uzoraka odozgo prema dolje je slijedeći: linija 1- komercijalni marker veličine DNA O'GeneRuler Ladder Mix (100 do 10 000 bp); linije 2 i 3- DNA otopina koncentracije 0.33 g/L; linije 4 i 5- DNA otopine koncentracije 0.2 g/L; linija 6- komercijalni marker veličina DNA Lambda DNA od 125 do 21226 bp. Preuzeto iz [100].

Uz pomoć markera poznatih stupnjeva polimerizacije procjenjuje se stupanj polimerazcije uzorka od interesa. Za DNA koju smo koristili vidimo da je polidisperzna s većinom fragmenata između 2 000- 20 000 bp što odgovara prosječnoj duljina fragmenta 4 μm. S obzirom na vrstu uzoraka koju želimo pripremiti razlikuju



Slika 2.2: Shematski prikaz priprave otopina koji se može podjeliti na tri protokola. Lijevi za pripremu čistih vodenih otopina NaDNA, srednji za pripremu vodenih otopina NaDNA s dodanim NaCl-om te desni za pripravu otopina DNA s dvovalentnim metalnim protuionima u čistim vodenim i u otopinama s dodanom soli.

se protokoli priprave uzoraka. Najjednostvaniji je protokol pripreme čistih vodenih uzoraka NaDNA. Naime, budući da su nabavljeni uzorci suhi končići NaDNA (Sigma D1626), samo ih je potrebno otopiti u odgovarajućem volumenu demineralizirane vodene (Millipore) s ciljem dobivanja majke otopine koncentracije 5 g/L. Nakon toga dodavanjem vode se pripremi cijeli set otopina u rasponu od 0.01-5 g/L. Nešto složeniji protokol koristimo prilikom priprave vodenih otopina NaDNA s NaCl-om. Tada suhe končiće otapamo u vodenoj otopini NaCl-a koncentracije 1 mM s ciljem dobivanja majke otopine koncentracije 5 g/L DNA. Takvu majku otopinu razrijeđujemo s 1 mM NaCl-om da bi proizveli cijeli set u rasponu 0.01-5 g/L s dodanih 1 mM NaCl-a. Najsloženiji protokol koristimo prilikom priprave DNA s nekom drugom vrstom protuiona. Naime, tada je prvo potrebno natrijeve protuione iz suhih končića DNA zamjeniti s ciljanim protuionima. Protuioni kojima smo mi zamjenjivali natrijeve su magnezij i mangan. Afinitet DNA prema

njima je veći nego za natrij. Stoga izmjenu vršimo otapanjem NaDNA u 25 mM soli ($MgCl_2$ ili $MnCl_2$). Tim postupkom smo izvršili izmjenu natrijevih iona s dvovalentnima metalnima iz kondenzirane atmosfere oko DNA. Još je potrebno natrijeve protuioone odstraniti iz otopine, a to se vrši dijalizom prema otopinama soli dvovalentnih metala ($MgCl_2$ ili $MnCl_2$). Dijaliza se vrši 48 sati prema 10 mM otopini soli s zamjenom nakon 24 sata u omjeru volumena 1:1000, te se nakon toga ponovi postupak prema 1 mM otopini soli [53]. Nakon toga ako želimo uzorke s dodanim 1 mM soli takvu majku otopinu koncentracije 5 g/L razrijeđujemo s 1 mM otopinom da bi proizveli cijeli set u rasponu 0.01-5 g/L otopine DNA. Međutim ako pripremamo otopine s nižom koncentracijom dodane soli ili čiste vodene otopine onda dodatnim dijalizama odstranjujemo suvišak iona iz otopine te tek tada tu majku otopinu razrijeđujemo s ciljem dobivanja cijelog seta otopina.

Koncentracija prijelaza iz razrijeđene u polurazrijeđenu otopinu ovisi o stupnju polimerizacije poliiona te je veća što je stupanj polimerizacije manji, vidi izraz 1.29. Koncentracija prijelaza za uzorke duljine 2 000 bp iznosi 0.007 g/L dok je za duže uzorke još i manja. Zato sa sigurnošću možemo reći da su uzorci u rasponu koncentracija 0.01-5 g/L koje smo mi proučavali, u polurazrijeđenom režimu.

Koncentraciju iona u otopini izražavamo u $mM \equiv mmol/L$ dok koncentraciju DNA izražavamo u g/L. Međutim često trebamo usporediti koncentraciju fosfata DNA s koncentracijom iona u otopini, te stoga trebamo izračunati molarnu koncentraciju parova baza DNA:

$$\begin{aligned} c\left[\frac{g}{L}\right]/m_m &= c\left[\frac{g}{L}\right]/666\left[\frac{g}{mol}\right] = c[M] \\ c[mM] &\approx c\left[\frac{g}{L}\right]\cdot 1.5\frac{\mu mol}{mg} \end{aligned} \tag{2.1}$$

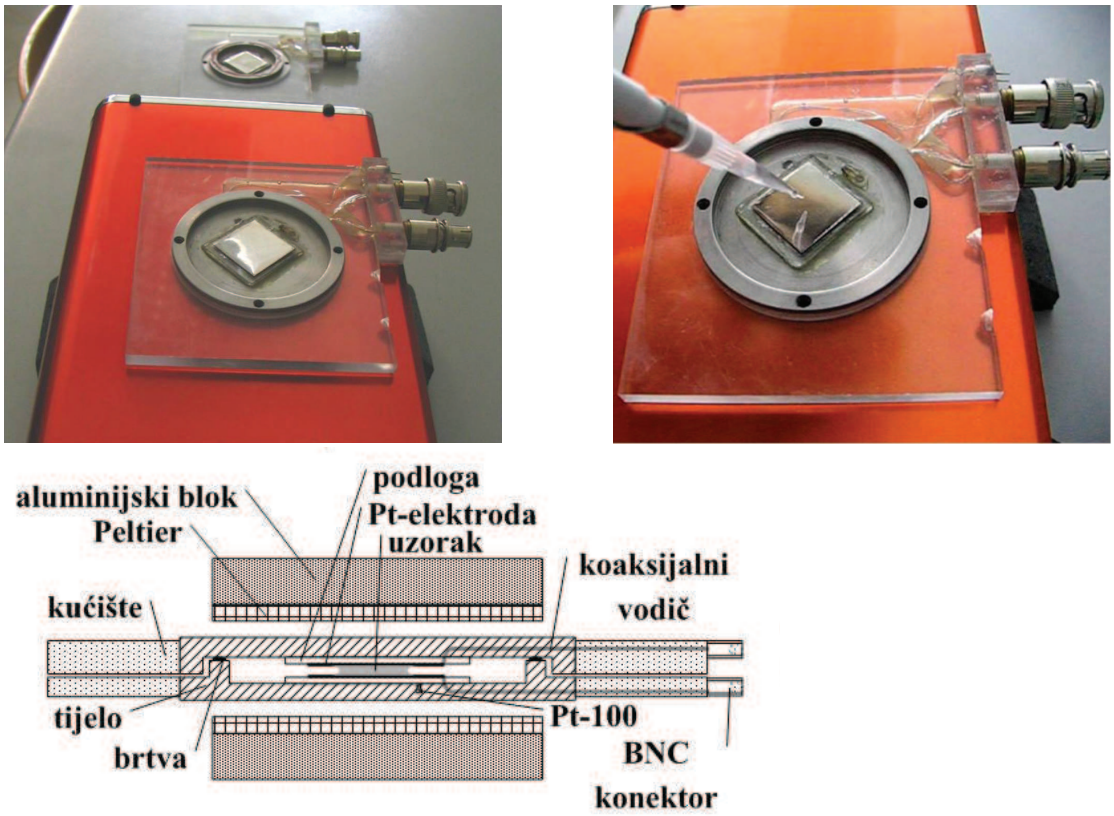
gdje je m_m molarna masa para baza monomera DNA koja iznosi 666 g/mol. Međutim ako želimo uspoređivati koncentraciju fosfata DNA i iona u otopini onda se trebamo prisjetiti da par baza DNA nosi 2 fosfata.

2.2 Mjerne tehnike

Niskofrekventnom dielektričnom spektroskopijom dobivaju se podatci o električnoj vodljivosti i o kompleksnoj dielektričnoj funkciji otopine. Mjerni postav pomoću kojeg dobivamo te podatke sastoji se od mjerne komore u koju stavljamo uzorak, mjerača admitancije Agilent 4294A i temperaturnog kontrolera.

2.2.1 Komora za dielektrična mjerenja

Komora za dielektrična mjerenja se sastoji od dvodijelnog pleksiglasnog kućišta u koje je utisnuto čelično tijelo. Unutar čeličnog tijela na podlozi od stakla[1] 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[2]. Funkcija čeličnog tijela je smanjenje hlapljenja otopine, eliminacija utjecaja električnih smetnji na mjerenje[3], te smanjenje temperaturnih oscilacija zbog mase kućišta. Raspon volumena mjerene otopine može biti u inter-



Slika 2.3: Slika redom prikazuje: rasklopljenu komoru na kojoj se u pozadini vidi druga polovica tijela, stavljanje otopine u komoru i shematski prikaz presjeka sklopljene komore s Peltier elementima.

[1]Svrha podloge je da električki izolira platinske elektrode od čeličnog kućišta.
[2]Na slici 2.3 se konektor termometra vidi iza dva BNC konektora.
[3]Tijelo je u biti Faradayev kavez.

valu 50 – 200 μL, no mi radimo s uzorcima veličine 100 μL. Komora omogućuje mjerenje kompleksne vodljivosti s ponovljivošću od 0.5%[4] u rasponu specifične vodljivosti od 1.5 – 2000 $\mu S/cm$. Konstanta komore određena je mjerenjem na frekvenciji 100 kHz specifične vodljivost standardnih uzoraka KCl-a molarne koncentracije 10 mM(kataloški broj 51300138) i 0.5 mM(kataloški broj 51302153) kupljenih od tvrtke Mettler-Toledo. Na toj frekvenciji se mjeri i vodljivost otopine. Dodatna provjera bila je mjerenje kapaciteta komore kada nema otopine i kada je uzorak 100 μL čiste vode. Iz razlike kapaciteta i poznate vrijednosti permitivnosti čiste vode $\varepsilon_{H_2O} = 78.65$ dobiven je rezultat za konstantu komore koji odgovara gornjoj vrijednosti dobivenoj mjerenjem specifične vodljivosti standardnih uzoraka. Konstanta komore iznosi $l/S = 0.1042 \pm 0.0006\ cm^{-1}$ gdje je efektivna kontaktna površina elektrode i otopine volumena 100 μL jednaka $S = 0.98\ cm^2$, a udaljenost platinskih elektroda iznosi $l = 0.1021 \pm 0.0001\ cm$. Više o mjernom postavu se može naći u [100].

2.2.2 Mjerač admitancije Agilent 4294A

Agilent 4294A je korišten za određivanje kompleksne admitancije vodenih otopina u području 40 $Hz \leq \nu \leq 110\ MHz$. S ciljem skraćenja vremena mjerenja, a budući da nam područje ispod 100 Hz nije fizikalno značajno mi mjerenja vršimo u intervalu frekvencija 100 $Hz \leq \nu \leq 110\ MHz$. U tom intervalu frekvencija izvršimo 201 mjerenje, tj. 29 mjerenja po dekadi frekvencije, a mjerne veličine su vodljivost $G_{exp}(\omega = 2\pi\nu)$ i kapacitet $C_{exp}(\omega)$[5]. Prilikom mjerenja admitancije amplituda je iznosila 50 mV pri kojoj je šum zanemariv, a odgovor linearan. To je potvrđeno mjerenjima u rasponu amplituda pobude od 20 – 500 mV. Budući je udaljenost elektroda približno 1 mm jakost primijenjenog električnog polja za amplitudu od 50 mV je 50 V/m. Uređaj je korišten u režimu postavke BW=5 što znači da se nakon relativno dugog čekanja da se ustali sinusna modulacija vrši mjerenje na pojedinoj frekvenciji. Prednost takvog mjerenja je manji šum iako ono traje duže nego mjerenje s postavkom BW=1. Tri uzastopna prolaska kroz cijeli raspon frekvencija su rađena da bi se usrednjio eventualni utjecaj varijacije temperature otopine na izmjerene veličine. Cijela opisana procedura mjerenja iznosi 2 minute.

[4] 0.1% otpada na netočnost u razmaku elektrodi koja iznosi do 1 μm na razmaku elektrodi od 1 mm, netočnost pipetiranja iznosi 0.2% te netočnost u položaju otopine na elektrodi utječe na mjerene rezultate do 0.2%.

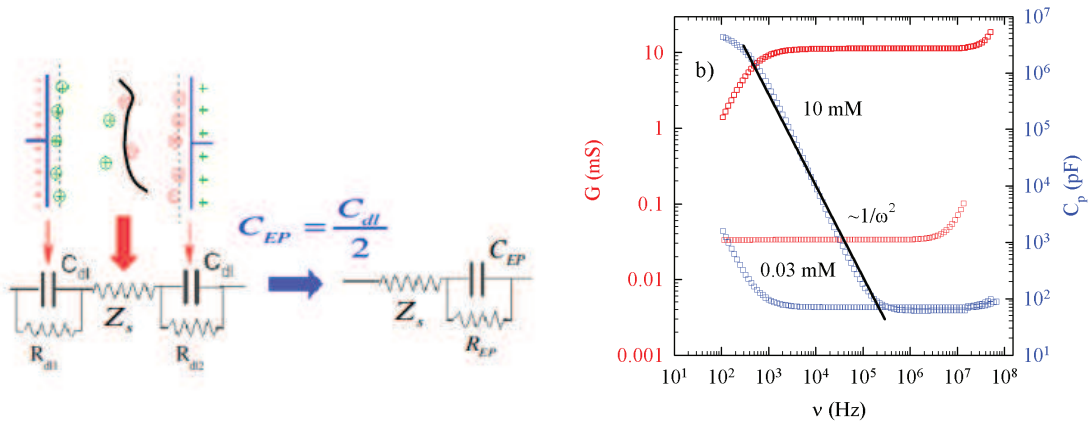
[5] Izmjerena vodljivost i kapacitet su sastavnice admitancije $Y_{exp}(\omega) = G_{exp}(\omega) + i\omega C_{exp}(\omega)$, te zato u tekstu govorimo da mjerimo admitanciju.

2.2.3 Temperaturna stabilnost

Za održavanje konstantne temperature otopine unutar komore za dielektrična mjerenja služe nam Peltierovi elementi koje stavljamo s vanjske strane kućišta, Pt-100 termometar koji se nalazi unutar kućišta te mjeri temperaturu otopine i temperaturni kontroler QC-PC-OS-21 G proizvođača Kuepper Gmbh. Nabrojani uređaji rade na slijedeći način. Peltierov element se nalazi na aluminijskom bloku te se takav sklop prilikom vršenja mjerenja stavlja s gornje i donje strane tijela komore. Stabilizacija temperature koju postižemo s navedenom aparaturom je reda 10 mK.

2.2.4 Uzroci netočnosti mjerenih veličina

U procesu mjerenja imamo više izvora netočnosti. Značajan izvor netočnosti može biti vještina pripravljanja otopine, tj. netočnost pri mjerenju mase i određivanju volumena otopine, dakle koncentracije otopine. S iskustvom ta netočnost se lako ukloni. Ipak, najveći problem koji nam unosi netočnost u mjerenje je polarizacija elektroda. Naime, u blizini elektroda koje nam služe i za pobudu i za mjerenje nakupljaju se naboji iz otopine.



Slika 2.4: Skica polarizacije elektroda s električnom shemom, te ekvivalentnom pojednostavljenom shemom prikazana je na a) slici. C_{dl} i R_{dl} označuju kapacitet i otpor polarizacijskog efekta na elektrodi i oni se mogu prikazati kao paralelni spoj kondenzatora i otpora C_{EP}, R_{EP}. Z_s je oznaka za impedanciju mjerene otopine. Na b) slici su prikazani izmjereni kapacitet i vodljivost za pozadinu koncentracije soli 0.03 mM i 10 mM. Veličine obojano crveno označavaju vodljivost, a veličine obojane plavo kapacitet. Crna crta predstavlja pravac proporcionalan s $\propto 1/\omega^2$.

Stoga prilikom mjerenja, admitancija otopine je uvećana za admitanciju efekta

polarizacije elektroda, vidi sliku 2.4:

$$C = C_s + \frac{1}{\omega^2 R^2 C_{EP}} \tag{2.2}$$

$$R = R_s + R_{EP} + R_s \omega^2 R^2 C^2, \tag{2.3}$$

gdje su C_s i R_s kapacitet i otpor otopine, a C_{EP} i R_{EP} kapacitet i otpor efekta polarizacije elektrodi [101]. Iz izraza (2.2) i (2.3) se može iščitati, a sa slike 2.4 b) se vidi da je utjecaj polarizacije elektroda veći na nižim frekvencijama, te da raste s koncentracijom protuiona u otopini. Upravo zbog toga kod mjerenja na visokim koncentracijama i niskim frekvencijama doprinos polarizacije elektroda nam je veći od doprinosa LF moda polielektrolitske otopine. Za koncentracije veće od $c = 5\ mg/mL$ nismo uspjevali na potpuno zadovoljajući način odrediti parametre prilagodne dielektričnog odgovora pa podatke električne vodljivosti analiziramo samo do te koncentracije. Sa slike 2.4 b) možemo vidjeti razlog zašto je odabrana upravo frekvencija $\nu = 100\ kHz$ za očitanje podatka električne vodljivosti. Za određenu koncentraciju otopine oko te frekvencije vodljivost je konstantna. 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.

2.3 Od izmjerenih veličina do kompleksne dielektrične funkcije

Tehniku kojom se služimo nazivamo niskofrekventnom dielektričnom spektroskopijom. Budući iz izmjerenih veličina vodljivosti i kapaciteta računamo dielektričnu funkciju veza impedancije i dielektrične funkcije se može pokazati pomoću Maxwellove jednadžbe

$$\nabla \times \vec{H}(t) = \sigma_0 \vec{E}(t) + \frac{\partial \vec{D}(t)}{\partial t} \tag{2.4}$$

gdje je $\vec{H}(t)$ vektor magnetskog polja, σ_0 je specifična vodljivost slobodnih nosilaca naboja, $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 e^{i\omega t}$ je vektor vanjskog električnog polja kojim pobuđujemo uzorak a $\vec{D}(t) = \vec{D}_0 e^{i\omega t}$ je vektor dielektričnog pomaka polielektrolitske otopine za kojeg smo pretpostavili da je u fazi s pobudom $\vec{E}(t)$, tj. da je odgovor polielektrolitske otopine na pobudu trenutan. Izraz (2.4) možemo napisati u prostoru frekvencija na način

$$
\begin{aligned}
\int \nabla \times \vec{H}(t)dt &= \int \sigma_0 \vec{E}(t)dt + \int \frac{\partial \vec{D}(t)}{\partial t}dt \\
\nabla \times \int \vec{H}_0 e^{i\omega t}dt &= \sigma_0 \int \vec{E}_0 e^{i\omega t}dt + \int \frac{\partial \vec{D}_0 e^{i\omega t}}{\partial t}dt \\
\nabla \times \vec{H}(\omega) &= \sigma_0 \vec{E}(\omega) + \int \left(\underbrace{\frac{\partial \vec{D}_0}{\partial t}}_{=0} + i\omega \vec{D}_0 \right) e^{i\omega t}dt \\
\nabla \times \vec{H}(\omega) &= \sigma_0 \vec{E}(\omega) + i\omega \int \vec{D}_0 e^{i\omega t}dt \\
\nabla \times \vec{H}(\omega) &= \sigma_0 \vec{E}(\omega) + i\omega \vec{D}(\omega) \\
\nabla \times \vec{H}(\omega) &= [\sigma_0(\omega) + i\omega\varepsilon_0\varepsilon(\omega)]\vec{E}(\omega)
\end{aligned}
\tag{2.5}
$$

gdje smo u zadnjoj jednakosti iskoristili vezu dielektričnog pomaka i električnog polja u frekventnom prostoru $\vec{D}(\omega) = \varepsilon_0\varepsilon(\omega)\vec{E}(\omega)$. Budući da vrijedi Ampèrov i Ohmov zakon za ukupnu struju

$$
\begin{aligned}
\vec{j}_{ukupno}(\omega) &= \nabla \times \vec{H}(\omega) \\
\vec{j}_{ukupno}(\omega) &= \sigma(\omega)\vec{E}(\omega)
\end{aligned}
\tag{2.6}
$$

te usporedbom izraza (2.5) i izraza (2.6) dolazimo do traženog izraza koji povezuje specifičnu vodljivosti i dielektričnu funkciju u prostoru frekvencija

$$\sigma(\omega) = \sigma_0(\omega) + i\omega\varepsilon_0\varepsilon(\omega) \tag{2.7}$$

Prilikom mjerenja mi izmjerimo vodljivost uzorka, ali i parazitske doprinose

$$\sigma_{exp}(\omega) = \sigma_p(\omega) + \sigma_0(\omega) + i\omega\varepsilon_0\varepsilon_{exp}(\omega) \tag{2.8}$$

gdje je σ_p doprinos specifičnoj vodljivost parazitskih otpora mjernog postava[6]. Kada je parazitski otpor našeg mjernog postava manji od ostalih vrijednosti u izrazu (2.8) pretpostavka da on linearno ulazi u izraz (2.8) je opravdana. Da bi odredili doprinos dielektričnoj funkciji moramo izmjeriti specifičnu vodljivost otopine bez poliiona. Tu vodljivost zovemo vodljivost pozadine.

[6]Najveći dio tog doprinosa je uzrokovan efektom polarizacije elektroda koji je objašnjen u poglavlju 2.2.4.

$$\sigma_{po}(\omega) = \sigma_p(\omega) + \sigma_{0_{po}}(\omega) + i\omega\varepsilon_0\varepsilon_{po}(\omega) \tag{2.9}$$

Dielektričnu funkciju polielektrolitske otopine $\varepsilon_{exp}(\omega)$ možemo razumjeti kao struju polarizacije proučavanog sistema $\delta\varepsilon(\omega)$ uvećanu za ostale doprinose kojima su rezonantne frekvencije iznad nama eksperimentalno uočljivih[7], pogledati sliku 2.5

$$\varepsilon_{exp}(\omega) = \delta\varepsilon(\omega) + \varepsilon_{HF} \tag{2.10}$$

gdje smo s $\delta\varepsilon(\omega)$ obilježili sistem koji proučavamo. Poanta izraza (2.10) je vizualizirana na slici 2.5. Oduzimanjem izraza (2.9) od izraza (2.8) uz uvrštavanje izraza (2.10) u izraz (2.8) dobijemo

$$[\sigma_{exp}(\omega) - \sigma_{po}(\omega)] - [\sigma_0(\omega) - \sigma_{0_{po}}(\omega)] = i\omega\varepsilon_0[\delta\varepsilon(\omega) + \varepsilon_{HF} - \varepsilon_{po}] \tag{2.11}$$

Vodljivost pozadine σ_{po} je dobivena mjerenjem vodljivosti vodene otopine NaCl. Vodljivost pozadine ima dvije komponente: jedna je vodljivost iona Na^+ i Cl^- $\sigma_{0_{po}}$, a druga proizlazi iz ostalih doprinosa kojima su rezonantne frekvencije iznad nama eksperimentalno uočljivih. Ta druga komponenta dielektrične funkcije je upravo jednaka komponenti dielektrične funkcije polielektrolitske otopine kojoj su frekvencije iznad nama eksperimentalno uočljivih, tj. $\varepsilon_{HF} = \varepsilon_{po}$. To je prikazano i na slici 2.5. S dobrim odabirom koncentracije pozadine može se postići $\sigma_{0_{po}}(\omega) = \sigma_0(\omega)$. Uz tu jednakost i maloprije iznesenu činjenicu o jednakosti $\varepsilon_{HF} = \varepsilon_{po}$ izraz 2.11 glasi

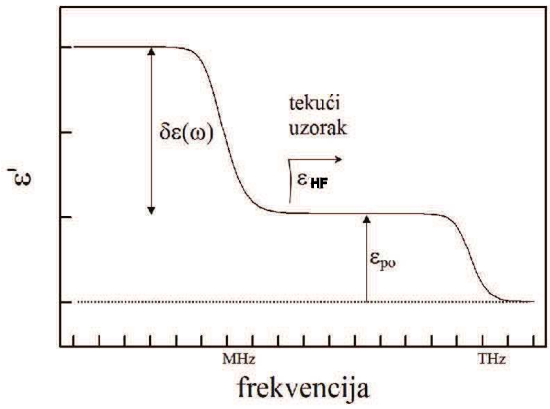
$$[\sigma_{exp}(\omega) - \sigma_{po}(\omega)] = i\omega\varepsilon_0[\delta\varepsilon(\omega)] \tag{2.12}$$

Pošto mi ne mjerimo $\sigma_{exp}(\omega)$ i $\sigma_{po}(\omega)$ ostalo nam je još te veličine izraziti preko direktno mjerenih veličina $G_{exp}(\omega)$, $C_{exp}(\omega)$, $G_{po}(\omega)$ i $C_{po}(\omega)$. Kompleksna specifična vodljivost σ je definirana kao produkt konstante komore i admitancije

$$\begin{aligned} \sigma_{exp}(\omega) &= \frac{l}{S}Y_{exp}(\omega) \\ \sigma_{po}(\omega) &= \frac{l}{S}Y_{po}(\omega) \end{aligned} \tag{2.13}$$

a admitanciju $Y(\omega)$ čine nama direktno mjerljive veličine $G(\omega)$ i $C(\omega)$ na način

[7] Gornja granica nama eksperimentalno dostupne frekvencije je 110 MHz.



Slika 2.5: Puna crta prikazuje vrijednost realnog dijela dielektrične funkcije uzorka ε_{exp}. Točkasta crta prikazuje vrijednost dielektrične konstante vakuuma, tj. vrijednost 1. Vrijednost dielektrične funkcije istraživanog uzorka $\delta\varepsilon(\omega)$ i vrijednost dielektrične funkcije za frekvencije veće od eksperimentalno uočljivih ε_{HF} su obilježene na slici.

$$\begin{aligned} Y_{exp}(\omega) &= G_{exp}(\omega) + i\omega C_{exp}(\omega) \\ Y_{po}(\omega) &= G_{po}(\omega) + i\omega C_{po}(\omega) \end{aligned} \tag{2.14}$$

Oduzimanjem specifične vodljivosti pozadine od specifične vodljivosti polielektrolitske otopina na način da je uvršten izraza za admitancije (2.14) u izraz za kompleksnu specifičnu vodljivost (2.13) dobivamo

$$\sigma_{exp}(\omega) - \sigma_{po}(\omega) = \frac{l}{S}[G_{exp}(\omega) - G_{po}(\omega)] + i\frac{l}{S}\omega[C_{exp}(\omega) - C_{po}(\omega)] \tag{2.15}$$

Usporedba izraza (2.15) s izrazom (2.12) te izjednačavanjem realnih i imaginarnih dijelova dobivamo:

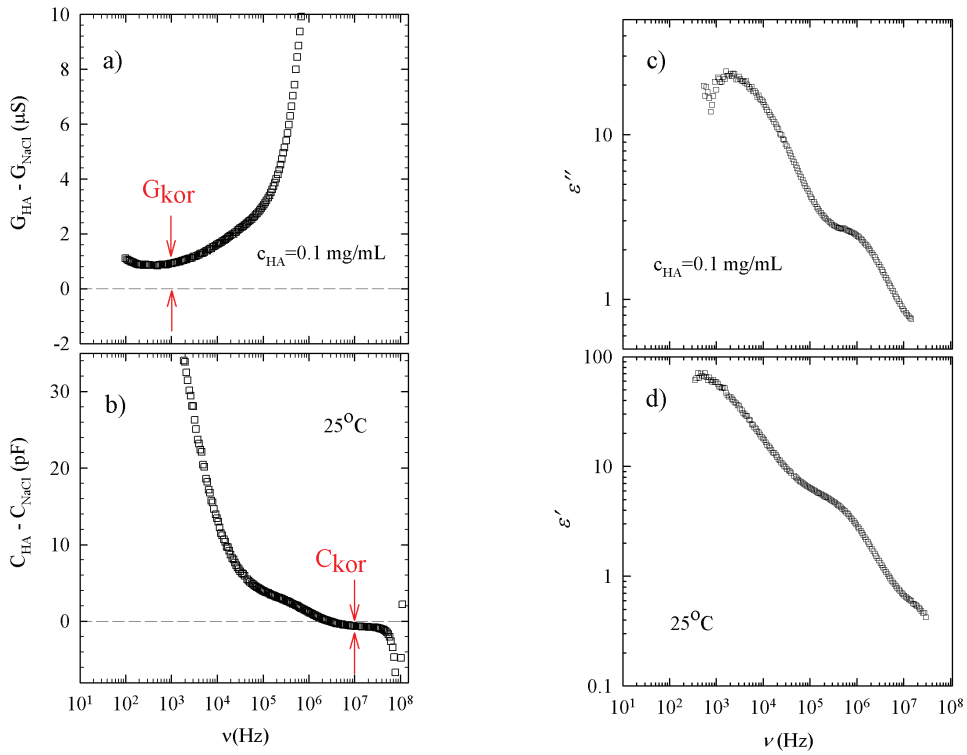
$$\begin{aligned} \delta\varepsilon'(\omega) &= \frac{l}{S} \cdot \frac{C_{exp}(\omega) - C_{po}(\omega)}{\varepsilon_0} \\ \delta\varepsilon''(\omega) &= \frac{l}{S} \cdot \frac{G_{exp}(\omega) - G_{po}(\omega)}{\omega \cdot \varepsilon_0} \end{aligned}$$

(2.16)

gdje smo kompleksnu dielektričnu funkciju zapisali na način $\delta\varepsilon = \delta\varepsilon' - \delta\varepsilon''$ gdje je $\delta\varepsilon'$ realni a $\delta\varepsilon''$ imaginarni dio dielektrične funkcije.

2.4 Prilagodba na izmjerene veličine

Oduzimanje pozadine nije moguće napraviti sa savršenom točnošću, tj. nije moguće napraviti uzorak i pozadinu sa savršeno istim koncentracijama. Ta razlika u koncentraciji se kod prilagodbe očituje u neuklonjenim iznosima vodljivosti G_{kor} na niskim frekvencijama, prikazano na slici 2.6 a), i kapaciteta C_{kor} na visokim frekvencijama, prikazano na slici 2.6 b). (Koristimo primjer pruzet iz [102]). Te neuklonjene vrijednosti, očitane sa slika 2.6 a) i b), unosimo u naš model. Neuk-



Slika 2.6: Frekventna ovisnost izmjerenih veličina vodljivosti i kapaciteta nakon oduzimanja izmjerenih veličina pozadine od izmjerenih veličina polielektrolitske otopine nalazi se na slikama a) i b). Na slikama a) i b) su označeni neuklonjeni dijelovi mjernih veličina G_{kor} i C_{kor}. Prikaz c) i d) je frekventna ovisnost kompleksne dielektrične funkcije čiji su izmjereni podatci obrađeni na način izraza (2.17).

lonjeni doprinos dielektričnoj funkciji C_{kor} unosimo u model kao parametar oblika $b = \frac{l}{S}\frac{C_{kor}}{\varepsilon_0}$ a neuklonjeni dio G_{kor} unosimo u tom obliku u model. Uz te korekcije vezu izmjerenih veličina i kompleksne dielektrične funkcije (2.16) zapisujemo u obliku

$$\begin{aligned}
\delta\varepsilon'(\omega) &= \frac{l}{S}\cdot\frac{C_{exp}(\omega)-C_{po}(\omega)}{\varepsilon_0} \rightarrow \frac{l}{S}\cdot\frac{C_{exp}(\omega)-C_{po}(\omega)}{\varepsilon_0} - b \\
\delta\varepsilon''(\omega) &= \frac{l}{S}\cdot\frac{G_{exp}(\omega)-G_{po}(\omega)}{\omega\cdot\varepsilon_0} \rightarrow \frac{l}{S}\cdot\frac{[G_{exp}(\omega)-G_{po}(\omega)]-G_{kor}}{\omega\cdot\varepsilon_0}
\end{aligned} \tag{2.17}$$

2.5 Dielektrična funkcija i relaksacijski procesi

Protuioni su vezani za poliion, te oscilacijom oko poliiona uzrokuju polarizaciju $\vec{P}(\omega) = e\rho_0\vec{x}(\omega)$. $\vec{x}(\omega)$ je vektor pomaka protuiona iz ravnotežnog položaja a ρ_0 je gustoća protuiona. Ta polarizacija inducirana titranjem protuiona oko poliiona stvara relaksacijski doprinos dielektričnoj funkciji poliiona $\delta\varepsilon(\omega)$. Protuione opisujemo jednadžbom gušenog, tjeranog harmonijskog oscilatora čije gušenje dolazi od sudara protuiona s molekulama vode

$$m^*\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = eE_0e^{i\omega t} \tag{2.18}$$

gdje je m^* efektivna masa, $\gamma = m^*/\tau$ je konstanta gušenja, τ je vremenska konstanta gušenja a k je konstanta elastičnosti koja opisuje vezu protuiona Na^+ na poliion u vodenoj otopini. Uvrštavanjem stacionarnog rješenja[8] $\vec{x}(\omega) = \vec{x}_0(\omega)e^{i\omega t}$ u izraz (2.18) u svrhu određivanja koeficijent $\vec{x}_0(\omega)$ dobivamo

$$\vec{x}(\omega) = \frac{e\vec{E}_0}{m^*}\cdot\frac{1}{(\omega_0^2-\omega^2)+i\frac{\omega}{\tau}}e^{i\omega t} \tag{2.19}$$

gdje je $\omega_0^2 \equiv k/m^*$. Veza dielektričnog pomaka $D(\omega)$, električnog polja $E(\omega)$ i polarizacije $P(\omega)$ je

$$\vec{D}(\omega) = \varepsilon_0\vec{E}(\omega) + \vec{P}(\omega) \tag{2.20}$$

Budući da je $D(\omega) = \varepsilon_0\varepsilon(\omega)E(\omega)$ iz izraza (2.20) proizlazi izraz za dielektričnu funkciju

[8] Homogeno rješenje jednadžbe (2.18) ne razmatramo pošto je ono prijelazno i eksponencijalno trne u vremenu a mi smo kod mjerenja koristili Agilent postavku BW=5, koja znači mjerenje nakon što pobuda već dugo traje.

$$\varepsilon(\omega) - 1 = \frac{\vec{P}(\omega)}{\varepsilon_0 \vec{E}(\omega)} = \frac{e\rho_0 \vec{x}(\omega)}{\varepsilon_0 \vec{E}(\omega)} \tag{2.21}$$

Uvrštavanjem izraza (2.19) u izraz (2.21) dobivamo

$$\varepsilon - 1 = \frac{e^2\rho_0}{\varepsilon_0 m^*} \cdot \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) + i\frac{\omega}{\tau}} = \frac{e^2\rho_0}{\varepsilon_0 m^* \omega_0^2} \cdot \frac{1}{\left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right) + i\frac{\omega}{\omega_0^2 \tau}} \tag{2.22}$$

Konstanta gušenja našeg eksperimentalnog sustava je velika te zbog toga vrijedi $\omega \ll \omega_0$. Ta činjenica uz jednakosti

$$\begin{aligned} \Delta\varepsilon &= \frac{e^2\rho_0}{\varepsilon_0 m^* \omega_0^2} \\ \tau_0 &= \frac{1}{\omega_0^2 \tau} \end{aligned} \tag{2.23}$$

nam omogućava da izraz (2.22) možemo zapisati u obliku Debyeve funkcije

$$\varepsilon - 1 = \Delta\varepsilon \frac{1}{1 + i\omega\tau_0} \tag{2.24}$$

Međutim zbog nereda u sistemu dolazi do širenja relaksacijskih procesa oko srednje vrijednosti. Da bi u izrazu za prilagodbu mogli uključiti parametar distribucije karakterističnog vremena oko srednjeg karakterističnog vremena τ_0 moramo poopćiti Debyevu funkciju, izraz (2.24)

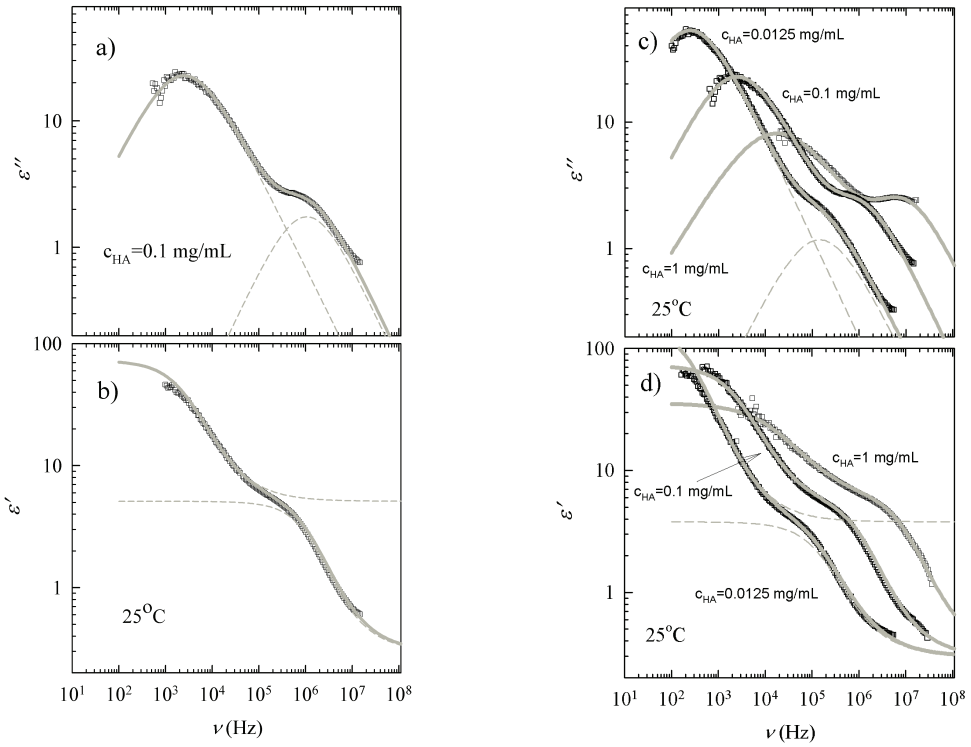
$$\delta\varepsilon = \Delta\varepsilon \frac{1}{(1 + i\omega\tau_0)^{1-\alpha}} \tag{2.25}$$

Znači izraz koji prilagođujemo na jedan relaksacijski proces je izraz (2.25). On je poopćena Debyeva funkcija koju nazivamo Cole-Cole funkcija (skraćeno CC funkcija). CC funkcija ima tri parametra koja mi određujemo tako da napravimo najbolju prilagodbu na izmjereni spektar. To su jačina relaksacijskog procesa $\Delta\varepsilon$, srednje vrijeme relaksacije τ_0 i širenje relaksacijskog procesa oko srednjeg vremena relaksacije $(1 - \alpha)$.

Impedancijske spektre obradimo na način opisan u izrazu 2.17 i konvertiramo ih u dielektrične spektre, lako je uvidjeti je li odziv jednostruk ili u mjerenom intervalu frekvencija imam višestruke relaksacije. Ovdje dalje ću koristiti primjer iz svog rada na NaHA koji ima 2 moda kao i DNA. Zbog toga na te izmjerene podatke prilagođujemo zbroj dviju CC funkcija. Relaksacijski proces na nižoj frekvenciji nazivamo niskofrekventni mod, a parametre koji opisuju taj mod obilježavamo

indeksom LF. Relaksacijski proces na višoj frekvenciji nazivamo visokofrekventni mod, a parametre koji opisuju taj mod obilježavamo indeksom HF. Oblik prilagodnih funkcija koje prilagođujemo izmjerenim podatcima eksperimenta su dane izrazom (2.26), a parametri prilagodbe su slijedeći: $\Delta\varepsilon_{LF}$, $\tau_{0_{LF}}$, $1-\alpha_{LF}$, $\Delta\varepsilon_{HF}$, $\tau_{0_{HF}}$, $1-\alpha_{HF}$, b, G_{kor}

$$\begin{aligned} Im\left(\frac{\Delta\varepsilon_{LF}}{1+(i\omega\tau_{0_{LF}})^{1-\alpha_{LF}}}\right)+Im\left(\frac{\Delta\varepsilon_{HF}}{1+(i\omega\tau_{0_{HF}})^{1-\alpha_{HF}}}\right)&=\frac{l}{S}\cdot\frac{[G_{exp}(\omega)-G_{po}(\omega)]-G_{kor}}{\omega\cdot\varepsilon_0}\\ Re\left(\frac{\Delta\varepsilon_{LF}}{1+(i\omega\tau_{0_{LF}})^{1-\alpha_{LF}}}\right)+Re\left(\frac{\Delta\varepsilon_{HF}}{1+(i\omega\tau_{0_{HF}})^{1-\alpha_{HF}}}\right)+b&=\frac{l}{S}\cdot\frac{C_{exp}(\omega)-C_{po}(\omega)}{\varepsilon_0} \end{aligned} \tag{2.26}$$

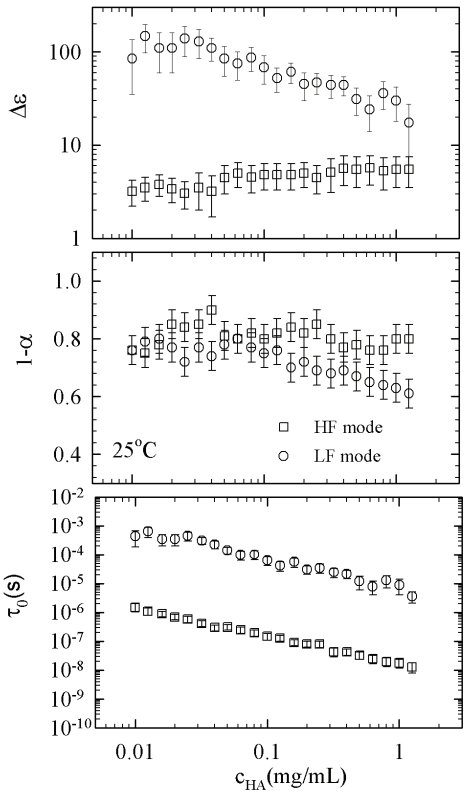


Slika 2.7: Prilagođena kompleksna dielektrična funkcija na način izraza (2.26) je prikazana sivom crtom, dok su pojedini prilagođeni modovi relaksacije prikazani isprekidanom crtom. Podatci na koje je vršena prilagodba su prikazani kvadratićima. (c) i (d) Prikazana je i prilagodba vršena na izmjerenim spektrima koncentracija c_{HA} = 1 mg/mL, c_{HA} = 0.1 mg/mL, c_{HA} = 0.0125 mg/mL.

2.5.1 Analize podataka dielektričnog odgovora

Na slici 2.6 c) i d) su pokazani izmjereni podaci obrađeni po uzoru na izraz (2.17). Na tako obrađene podatke prilagođujemo funkcije na način naznačen izrazom (2.26).

Na slici 2.7 a) i b) je prikaz tako prilagođenih funkcija na obrađene podatke slike 2.6 c) i d). Na slici 2.7 c) i d) je zbirni prikaz prilagodnih funkcija na obrađene podatke tri uzorka koncentracija: c_{HA} = 1 mg/mL, c_{HA} = 0.1 mg/mL, c_{HA} = 0.0125 mg/mL. Nakon što smo prilagodili funkcije na sve izmjerene uzorke, koji su obično u rasponu koncentracija 0.01 – 5 g/L, prikazujemo njihove parametre u funkciji koncentracije, što smo prikazali na slici 2.8. Iz tako određenih

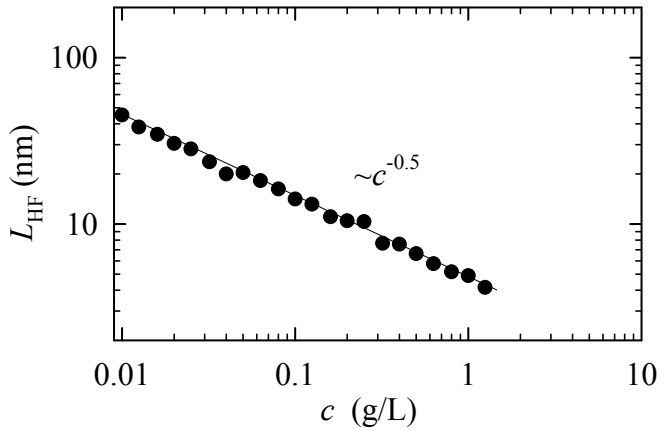


Slika 2.8: Kružići predstavljaju vrijednosti parametara prilagodbe LF moda, dok kvadratići predstavljaju vrijednosti parametara prilagodbe HF moda za raspon koncentracija 0.01 mg/mL – 1.25 mg/mL vodenih otopina hijaluronske kiseline. Redom od gore prema dolje paneli prikazuje parametre: dielektrična jakost relaksacijskog procesa($\Delta\varepsilon$), širina relaksacijskog procesa $(1-\alpha)$ i relaksacijsko vrijeme (τ_0).

parametara obično odredimo karakterističnu duljinu i broj sudionika relaksacije. Sada ćemo iznijeti detalje vezane za određivanje karakteristične duljine a nakon toga za broj sudionika relaksacije. Iako su protuioni polielektrolita podvrgnuti i tjeranim i gušenim procesima njihovo gibanje u otopini je određeno zakonima difuzije. Protuioni tjerani vanjskim električnim poljem prevaljuju udaljenost L koja je povezana s karakterističnim vremenom τ_0 Einstein-Smoluchowski jednadžbom.

$$L \propto \sqrt{\tau_0 D} \tag{2.27}$$

gdje je $D = 1.33 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ konstanta difuzije protuiona. Zanimljivost na-



Slika 2.9: Koncentracijska ovisnost karakteristične skale NaHA [102]. Pune crte predstavljaju najbolju prilagodbu na iznos karakteristične skale čija je ovisnost o koncentracije $L \propto c^{-0.5}$.

šeg eksperimentalnog postava je da nam konstanta proporcionalnosti Einstein-Smoluchowski jednadžbe (2.27) iznosi reda veličine 1, što je provjereno na više eksperimenata, od kojih su neki objavljeni u [27]. Karakteristična skala opisuje pomak protuiona a dielektrična jakost relaksacije je povezana s polarizabilnosti uzrokovanom pomakom protuiona. Gibanje protuiona je difuzno a ako je i nekorelirano srednja fluktuacija broja protuiona pomaknutih iz položaja ravnoteže biti će reda veličine korijena broja protuiona $\sqrt{N}$. Dielektrična jakost je po fluktuacijsko-disipacijskom teoremu proporcionana kvadratu dipola L te stoga dobivamo [23,60]

$$\Delta\varepsilon \propto c(\sqrt{(N)}L)^2 \tag{2.28}$$

Preuređenje izraza 2.28 za broj sudionika u relaksaciji dobijemo

$$N \propto \Delta\varepsilon / c(L)^2 \tag{2.29}$$

Primjetimo da sve potrebne parametre možemo odrediti iz parametara prilagodbe na spektar relaksacije. Osim broja sudionika u relaksaciji iz parametara relaksacije možemo odrediti i karakterističnu duljinu relaksacije. Karakteristična skala polurazrijeđenih otopina NaHA je prikazana na slici 2.9. Njen iznos se nalazi u rasponu $3\ nm < L < 50\ nm$ i ovisna je o koncentraciji $L \propto c^{-0.5}$

3

Rezultati i diskusija

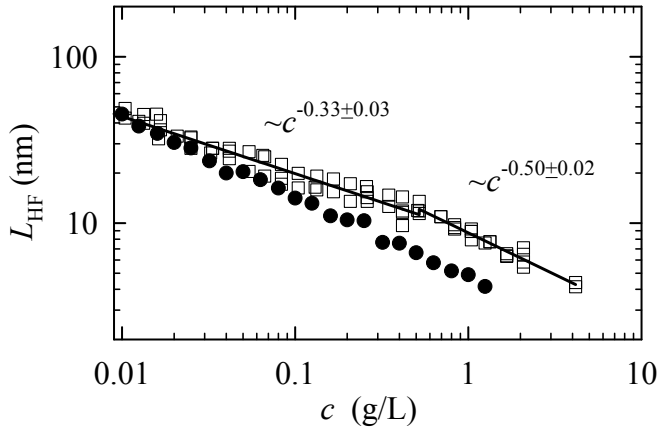
3.1 Protežnost protuionske atmosfere

3.1.1 Jednovalentni protuioni

Karakteristične frekvencije relaksacijskih modova kolektivne protuionske dinamike nalaze se u području od 0.1 kHz do 0.1 GHz. U tom području frekvencija i u našim sustavima smo pronašli relaksacije koje su direktno povezane s gibanjem protuiona oko poliiona. S ciljem interpretacije tih relaksacija koristimo se konceptom induciranog dipola. Inducirani dipol formiraju protuioni oko poliiona, a njihova relaksacijska frekvencija je povezana s njihovim pomakom od ravnotežnog položaja. U iznesenim rezultatima kao i u rezultatima drugih autora javljaju se 2 dielektrična moda, u sustavima kao što su polurigidni bioPE, DNA ili sintetski, fleksibilni PE, kao što je polistirensulfonat (PSS), Ref. [25, 27]. U ovom radu sam se usredotočio na analizu i interpretaciju visokofrekventne (HF) relaksacije-HF moda, budući da je pripadajuće parametre (HF relaksacijsko vrijeme i karakterističnu duljinu) moguće utemeljeno povezati s drugim dobivenim rezultatima npr. konduktometrijom, SAXS-om, osmometrijom, a koje nalazimo i u literaturi. Primarno je bilo to što se HF mod regularno može povezati s de Gennes korelacijskom duljinom. I drugi autori su često analizirali taj HF mod, iako su registrirali i još jedan na nižim frekvencijama.

PSS i DNA su jako nabijeni, linearna gustoća naboja im je iznad Manning kriterija za pojavu kondenzacije. Stoga je početni korak u mojim istraživanjima bila studija jednostavnijeg PE-hijaluronska kiselina (HA, hyaluronic acid) koji je slabo nabijen te se stoga za njega ne javlja pojava kondenzacije. On je polisaharid, koji po monomeru duljine 1 nm, dakle duljine veće od Bjerrumove nosi jedan naboj a nije istraživan DSom. Dakle, u HA sustavu ne bi se trebala javljati Manning kon-

denzacija. HA je također fleksibilnija od DNA, s duljinom ustrajnosti ne većom od 10 nm. No, kako intrinsična, strukturna duljina ustrajnosti, L_p biva uvećanom za elektrostatski doprinos L_e u otopinama male ionske jakosti [103–106] u kojima vršim mjerenja, može se pretpostaviti podjednaka rigidnost HA sustava kao i za DNA L_p = 50nm ili PSS L_p = 1nm, budući da je $L_e >> L_p$. Drugo pojednostavljenje



Slika 3.1: Koncentracijska ovisnost karakteristične skale DNA (otvoreni simboli) [27] i HA (puni simboli) [102]. Pune crte predstavljaju najbolju prilagodbu na DNA rezultate ispod i iznad koncentracije c = 0.5 g/L s naznačenom ovisnošću o koncentraciji na slici. Ovisnost o zakonu potencija za HA, s eksponentom 0.50, vrijedi preko cijelog raspona koncentracija.

u odnosu na DNA je u jednostavnijoj strukturi koja se ne mijenja s koncentracijom. Na slici 3.1 uspoređena je karakteristična skala HF moda za HA s onom za DNA (u oba PE protuion je Na^+). Karakteristična skala HA u cijelom prikazanom rasponu koncentracija ima istu ovisnost o koncentraciji i jednostavno je interpretirana kao de Gennesova korelacijska duljina na osnovi ovisnosti $L \propto c^{-0.5}$. Za DNA ovisnost mijenja eksponent oko c = 0.5 g/L i javlja se $L \propto c^{-0.33}$. Grupa dr. Tomić je ovaj rezultat za niže koncentracije interpretirala kao posljedicu dinamičke i lokalne denaturacije DNA. Primijetimo kako je HA možda i prikladniji modelni sistem za PE, budući da se ne javlja strukturna promjena preko cijelog raspona istraživanih koncentracija. Istovremeno, intrigantna je mogućnost praćenja strukturne promjene DNA pomoću mjerenja dinamike sustava, tj. DS metode. Kako je u rezultatima iz Ref. [27] vidljiv veći rasap vrijednosti L_{HF} odlučili smo mjerenja ponoviti više puta kako bismo provjerili ovu interpretaciju strukturne promjene DNA. Naime eksponent $L \propto c^{-0.33}$ se javlja za vrlo fleksibilne, slabije nabijene sustave (sintetski polimeri s jednim nabojem na svakih 3-10 monomera), Ref. [107] koji su stoga izrazito hidrofobnog karaktera, tj. voda više nije dobro otapalo i dolazi do nastanka konformacije biserne ogrlice (hidrofobni, nenabijeni

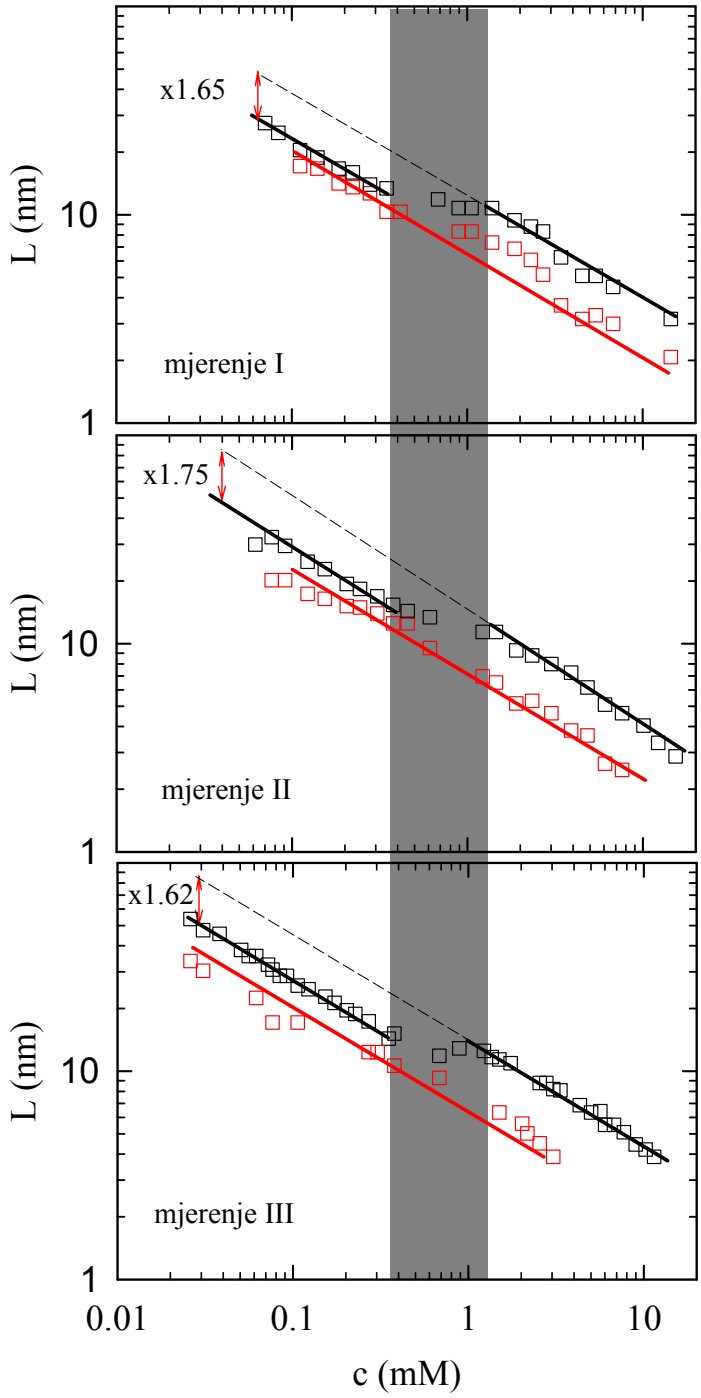
segmenti se namotaju dok između njih preostaju ispruženi elektrostatski ukrućeni nabijeni segmenti). Dok je za takav sustav eksponent zaista $L \propto c^{-0.33}$, upitno je može li se DNA tako opisati. Naime, kod DNA se denaturacijom zaista povećava hidrofobnost, budući da otapalu postaju dostupne nenabijene dušične baze, no nije vjerojatna konformacija biserne ogrlice.

Dodatni je važan korak bio priprema i mjerenje DSa na denaturiranim NaDNA uzorcima - znači uzorcima gdje su lanci razdvojeni. Denaturacija tih uzoraka je provedena na način da su uzorci grijani 20 minuta na 97°C, kako bi se dvolančana DNA odmotala i pokidale vodikove veze lanaca te su uzorci odmah potom uronjeni u smjesu vode i leda, kako bi se zadržala denaturirana, jednolančana struktura DNA. Nakon toga su mjereni na 25°C jednako kao i nativni uzorci. Ovisnost karakterističnih duljina nativnih i denaturiranih NaDNA otopina u čistoj vodi o koncentraciji za 3 različita seta dana je na slici 3.2. Razlika u odnosu na prije objavljene rezultate je ponašanje karakteristične duljine nativnih uzoraka na način $L \propto c^{-0.5}$ na svim koncentracijama osim u intervalu $0.4\ mM < c < 1.3\ mM$. Dakle više se ne uočava područje $L \propto c^{-0.33}$, već ga raspoznajemo kao prijelazni interval i za područje niskih koncentracija se opet dobiva uobičajeno ponašanje HF moda $L \propto c^{-0.5}$. Interesantno je kako je karakteristična skala nativne DNA na niskim koncentracijama pomaknuta za faktor $1.62 - 1.75$ u odnosu na skalu na visokim koncentracijama.

Rezultati za denaturirane uzorake pokazuju veći rasap nego rezultati nativnih uzoraka. To pripisujemo problemu stabilnosti uzoraka nakon pripreme - denaturacije. Ipak je moguće da na rezultate utječe djelomična renaturacija. Ipak i iz takvih rezultata denaturiranih uzoraka razvidno je kako karakteristična duljina u cijelom mjerenom intervalu koncentracija pokazuje ovisnost $L \propto c^{-0.5}$ te kako je veličina karakteristične skale za denaturiranu DNA neznatno manja od skale za nativne uzorake u području nižih koncentracija, $c < 0.4\ mM$.

U prijašnjim radovima [25, 27] karakteristične duljine relaksacija HF moda interpretirane su kao mjera korelacijske duljine ξ. Ako zadržimo takvu interpretaciju karakteristične duljine onda prikazane rezultate za NaDNA u čistim vodenim otopinama možemo razumjeti na slijedeći način. Na višim koncentracijama, $c > 1.3\ mM$ DNA se nalazi u obliku dvostruke uzvojnice i detektiramo de Gennes duljinu ξ dvolančane DNA koja se očekivano ponaša kao $L \propto c^{-0.5}$. Na koncentracijama između $0.4\ mM < c < 1.3\ mM$ se događa prijelaz-denaturacija, i ponašanje karakteristične skale je nedefinirano. Na kraju, na koncentracijama manjim od $c < 0.4\ mM$ sva DNA denaturira i nalazi se u obliku jednog lanca. Jednolančana DNA je fleksibilni bioPE, donekle sličan HA pa se i za nju ponašanje $L \propto c^{-0.5}$ koje uočavamo u području $c < 0.4\ mM$ može objasniti kao ponašanje korelacijske duljine, no ovaj puta za drugi bioPE - jednolančanu DNA.

Pitanje je da li je ta konformacija lanca koja se javlja za nativnu DNA na niskim koncentracijama jednaka konformaciji dobivenoj procedurom termičke denatura-



Slika 3.2: Koncentracijska ovisnost karakteristične skale nativnih (crni kvadrati) i denaturiranih (crveni kvadrati) čistih vodenih otopina. Sve crte prikazuju ovisnost $L \propto c^{-0.5}$, a međusobna udaljenost crnih crta je naznačena na slici.

cije DNA jer vidimo da se karakteristične skale na koncentracijama manjima od $c < 0.4\ mM$ ne poklapaju. Svakako, s obzirom na kompleksnost procesa denaturacije i mogućnost djelomične renaturacije DNA, ne očekujemo od DS metode potpuno kvantitativno poklapanje rezultata. No, moguće je pokazati kako se dobiveni faktor razlike 1.62 – 1.75 između dva režima nativne DNA poklapa s gore iznesenom interpretacijom. Korelacijska duljina ξ je mjera za udaljenost poliiona u otopini i ona je dana izrazom $\xi \propto (bc)^{-1/2}$ [29]. Prilikom denaturacije broj poliiona se udvostruči (dvostruka uzvojnica → dva lanca), a k tome su i monomeri kod jednolančane DNA izduženi s 3.4 nm na 4.3 nm. Stoga je omjer karakterističnih skala

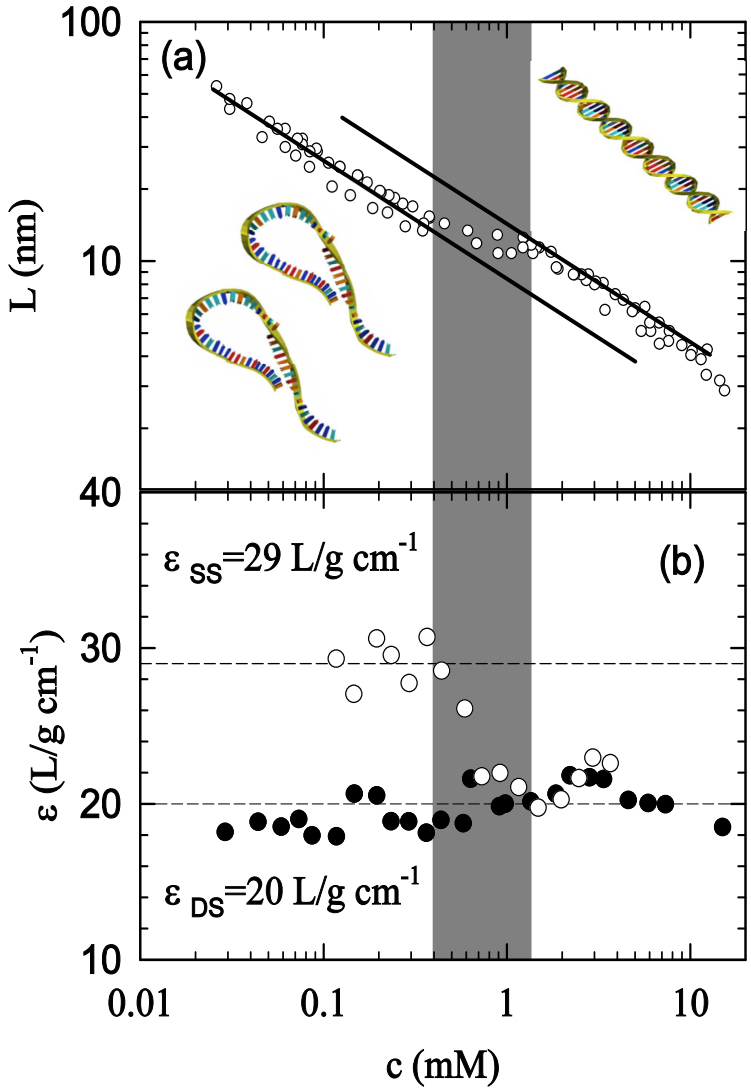
$$\frac{L_{ds}}{L_{ss}} = \left(\frac{b_{ds}}{b_{ss}}\frac{c_{ds}}{c_{ss}}\right)^{-1/2} = \left(\frac{0.34nm}{0.43nm}\frac{1}{2}\right)^{-1/2} = 1.6 \tag{3.1}$$

Teorijski omjer korelacijskih duljina ssDNA i dsDNA je vrlo blizu eksperimentalno određenom uz pomoć DS-a i stoga se lako može ustvrditi pojava denaturacije snižavanjem koncentracije DNA otopljene u čistoj vodi i zaključiti kako je mjerenje dinamike DSom dalo pristup strukturnoj informaciji. Ipak, primijetimo, rutinska metoda za studiju denaturacije DNA je UV spektrofotometrija (UVS). UVS se temelji na Beer-Lambertovom zakonu koji kaže da je apsorpcija A elektromagnetskog zračenja proporcionalna koncentraciji otopljene tvari c i duljini puta zrake kroz uzorak l, a konstanta proporcionalnosti ϵ[1] se naziva ekstinkcijski koeficijent. Napomenimo pri tome kako je apsorpcija eksponent, s kojim opada intenzitet zračenja pri prolazu kroz otopinu (pad je eksponencijalan, $e^{-\epsilon cl}$). Zbog te eksponencijalne apsorbcije mjerenja apsorpcije se mogu izvesti u relativno uskom rasponu koncentracija oko A=1. Određeno proširenje koncentracijskog raspona se postiže promjenom duljine uzorka - puta svjetlosti kroz uzorak.

Vrlo rano je ustanovljeno kako dvolančana DNA ima oko 40% manji ekstinkcijski koeficijent od jednolančane iste masene koncentracije [42]. Stoga se, u principu, iz izmjerene apsorpcije uzorka poznate koncentracije može odrediti konformacija DNA. Originalna mjerenja apsorpcije Na- i MgDNA [43] pratila su denaturaciju promjenom temperature te ovisnost denaturacijskog prijelaza o koncentraciji DNA i dodane soli.

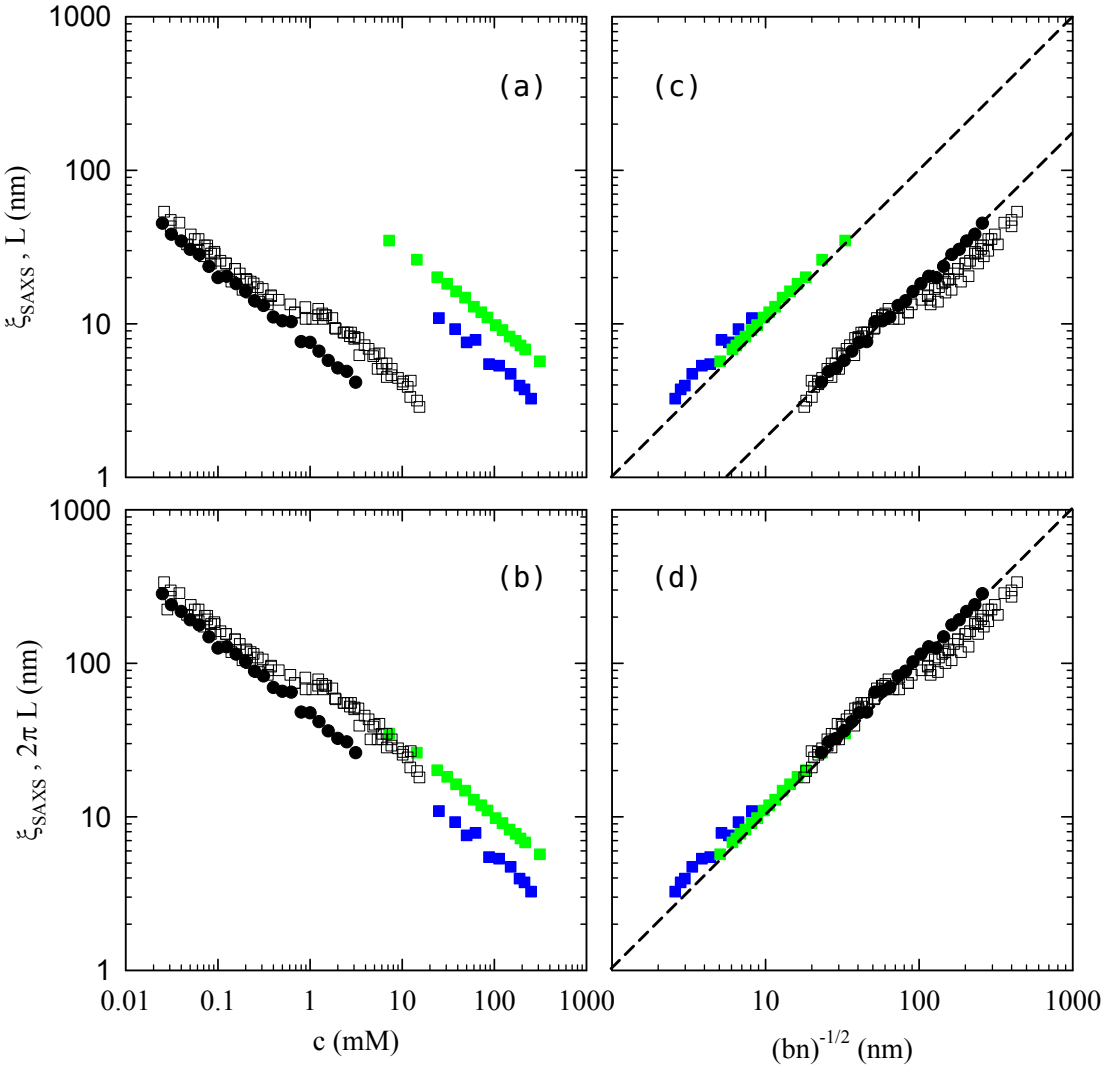
Na slici 3.3 prikazana su naša mjerenja ovisnosti ekstinkcijskog koeficijenta o koncentraciji za DNA uzorke otopljene u 1 mM soli (za koje se stoga zna da su u dvolančanoj konformaciji) i za DNA uzorke u čistoj vodi - koji odgovaraju uzorcima na kojima je primijećena promjena u ovisnosti karakteristične skale dobivene DS mjerenjima. Kao što smo rekli, ova mjerenja bi trebala ukazati na pojavu denaturirane DNA na niskim koncentracijama tako što bi detektirala povećani ekstinkcijski koeficijent ϵ.

[1] ova veličina nije povezana s dielektričnom konstantom osim što se uvriježilo korištenje istog simbola.



Slika 3.3: Koncentracijska ovisnost L (a) i ekstinkcijskog koeficijenta (b) NaDNA otopina u čistoj vodi (otvoreni simboli) i u otopini s dodatkom 1mM NaCl-a (puni simboli). Na nižim koncentracijama NaDNA u čistim vodenim otopinama je u ss, a na višim koncentracijama u ds obliku što je i shematski prikazano.

Dobiveni rezultati za ϵ imaju relativno veliki rasap i po našem iskustvu proizlazi kako je to intrinsično svojstvo tehnike. Naime, svaka prikazana vrijednost $\varepsilon(c)$ za otopine u 1mM soli dobivena je kao prosječna vrijednosti od 100 mjerenja (mjerenjem 10 setova otopina cjelokupnog raspona koncentracija, od kojih je svaka otopina mjerena po 10 puta). Stoga ni ne čudi da mjerenja za čiste vodene otopine pokazuju još veći rasap, budući da se ovdje još javlja i problem renaturacije - dakle nestabilnosti uzorka. Ipak se može u istom koncentracijskom rasponu



Slika 3.4: Koncentracijska ovisnost L za čiste vodene otopine NaDNA (otvoreni simboli) i Na-HA (crne točke) [102] te korelacijske duljine određene SAXS-om [30] za NaDNA (zeleni kvadrati) i Na-HA (plavi kvadrati). (a), (b) koncentracijska ovisnost je izražena u mM naboja poliiona a (c), (d) kao veličina mreže poliiona.

koji nalazimo i u DS mjerenjima očitati promjena ekstinkcijskog koeficijenta od 40% - upravo vrijednost koja se očekuje za promjenu DNA iz ds u ss oblik - korespondencija je to koju smatramo potvrdom naše interpretacije rezultata DS za NaDNA.

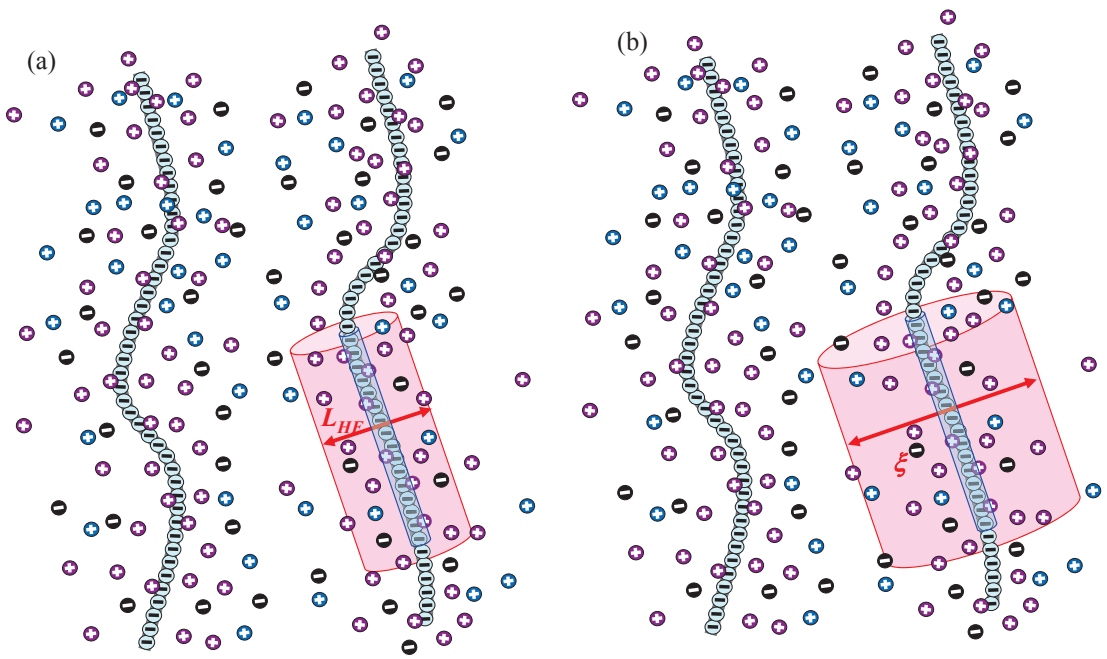
Kako se HF relaksacija povezuje s de Gennes korelacijskom duljinom ξ to nalazim L_{HF} potrebnim usporediti s eksperimentalno dobivenim vrijednostima ξ, koja se uobičajeno dobivaju metodom raspršenja X-zraka u male kutove (SAXS)

Ref. [108]. Na slici 3.4 (a) su dani sirovi podaci. Točke označene sa SAXS predstavljaju korelacijsku duljinu [30] dobivenu kao $2\pi/q*$, gdje je $q*$ maksimu u SAXS intenzitetu, koji je poznat kao polielektrolitski vrh i smatra se izravnom mjerom de Gennes duljine ξ.

Prirodna skala za prikaz ovih rezultata je veličina PE mreže, tj. skala prosječne udaljenosti poliionskih lanaca $(bn)^{-1/2}$. Prikazom na ovoj skali vidim kako rezultati za različite PE, tj. NaHA i NaDNA podaci padaju na jedinstveni pravac, 3.4 (c). Uočimo i kako su pravci za SAXS i DS rezultate različiti: razlika između DS rezultata za L_{HF} i SAXS rezultata za ξ iznosi 2π, tj. uključenjem predfaktora 2π u L_{HF} dvije veličine se preklope i za NaDNA i za NaHA, slika 3.4 (d). Ako se upotrijebi samo taj predfaktor, bez korištenja skale mreže preklapanja rezultat nema, slika 3.4 (b). Mogućnost uvođenja predfaktora 2π proizlazi iz prirode difuzijskog gibanja protuiona, tj. Einsteinova relacija između karakterističnog vremena i skale može sadržavati predfaktor reda veličine 1.

Iz iznesenog se može zaključiti kako DS metoda mjerenjem dinamike PE sustava pruža osnovnu informaciju o strukturi PE sistema - korelacijsku duljinu.

3.1.2 DS mjerenja DNA s dvovalentnim protuionima

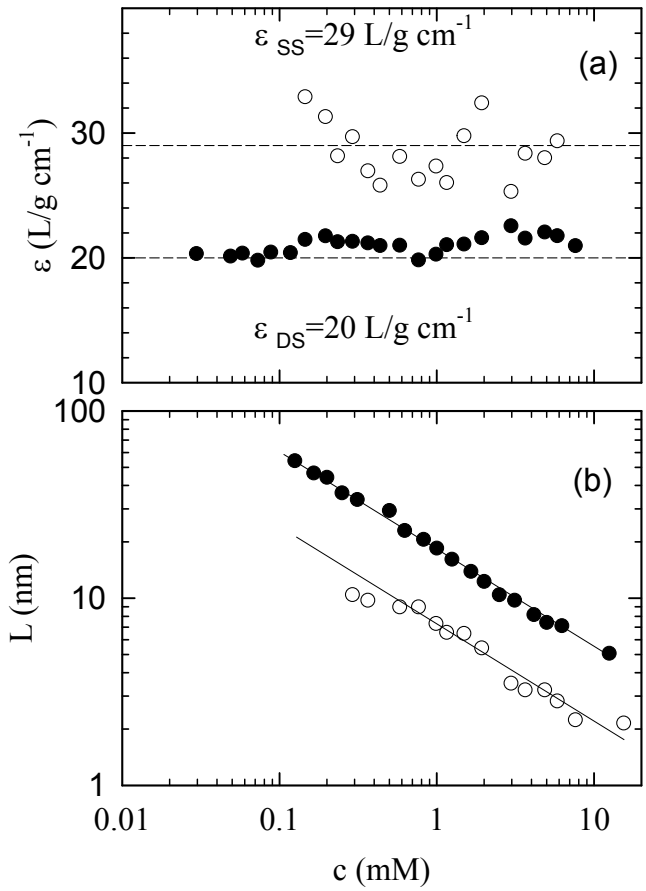


Slika 3.5: Uslijed promjene sastava otopine, npr. dodavanjem soli (plavi i crni ioni) mijenja se protežnost atmosfere (a) ali se ne mijenja korelacijska duljina ξ (b).

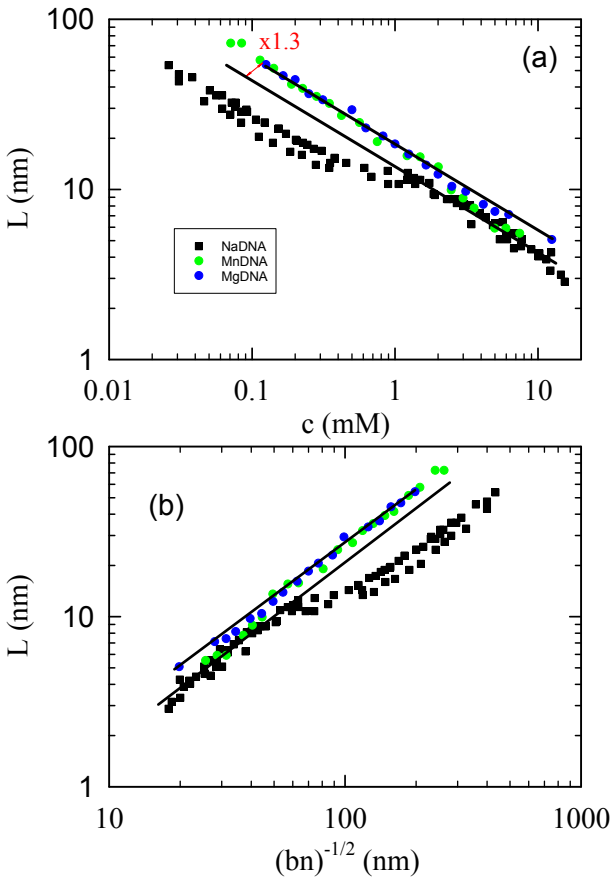
Značajno pitanje koje se dalje postavlja jest mjeri li DS metoda protežnost protuionske atmosfere kao L_{HF}, koji zatim samo trebamo reskalirati kako bismo dobili korelacijsku duljinu ξ ili zaista u Einsteinovoj jednadžbi treba upotrijebiti predfaktor 2π, tj. $L^2 = 2\pi D\tau$, gdje je onda protežnost protuionske atmosfere $\xi = 2\pi L_{HF}$. U dosadašnjoj primjeni DSa ovo pitanje nije postavljeno i autori su se zadovoljavali dobivanjem zakona potencije koji odgovara sustavu i modelu koji su istraživali, dakle, istraživali su zakone skaliranja, ali ne i apsolutne vrijednosti parametara koji opisuju PE sustav. Kako bismo istražili protežnost poliionske atmosfere potrebno je utjecati na parametre koji ju mijenjaju - a to je ionski sastav. Drugim riječima, zadržimo li poliionsku mrežu, a promijenimo sastav okolne protuionske atmosfere mogli bismo DS metodom detektirati promjenu protežnosti ako DS mjeri samo L_{HF} (slika 3.5 (a)), ili detektirati kako promjene nema, ako DS mjeri ξ (slika 3.5 (b)). Uzorci DNA s promijenjenim protuionima (Mg^{2+} umjesto Na^+) te NaDNA u NaCl ili MgDNA u $MgCl_2$ dodanoj soli pripremljeni su kako je opisano u Poglavlju 2. Na slici 3.6 (a) nativni uzorci MgDNA pokazuju $\varepsilon = 20\ L/g\ cm^{-1}$ što znači da su u ds obliku dok denaturirani uzorci MgDNA imaju $\varepsilon = 29\ L/g\ cm^{-1}$ što je vrijednost koja odgovara ss obliku DNA. Stoga zaključujemo da je nativna MgDNA u ds konformaciji u koncentracijskom intervalu u kojem smo mi vršili istraživanje - ne javlja se denaturacija snižavanjem koncentracije kao za NaDNA. DS metodom identificirali smo dva moda kao i u drugim sustavima te dalje analiziramo samo visokofrekventni mod. Karakteristična skala L nativnih uzoraka MgDNA u cijelom studiranom intervalu zadržava ovisnost o koncentraciji po zakonu potencije $L \propto c^{-0.5}$. Dakle, nativna, tj. netretirana MgDNA ne mijenja svoju konformaciju. Na slici je prikazana karakteristična skala HF moda i za termički denaturiranu MgDNA, koja također pokazuje zakon potencije $L \propto c^{-0.5}$, ali i nižu vrijednost skale na istoj koncentraciji te zaključujemo da je potonja zaista u ss obliku, a netretirana, nativna u ds obliku i na najnižim koncentracijama. Dakle MgDNA je stabilnija na denaturaciju od NaDNA, što je rezultat koji je poznat iz klasičnih istraživanja temperaturne ovisnosti ekstinkcijskog koeficijenta, Ref. [43]. Uz MgDNA studirali smo DS metodom i Mn-DNA, koji je također dvovalentan protuion, ali je poznato iz literature da snažnije asocira s DNA lancima i mijenja parametre denaturacije i stabilnost dvolančane DNA na drugačiji način od dvovalentnog Mg protuiona - dakle postoji i specifična asocijacije protuiona uz DNA lanac, uz očekivano Coulombsko vezanje inherentno Manning kondenzaciji [94–98]. Na slici 3.7 (a) smo usporedili L čistih vodenih otopina DNA s jednovalentnim natrijevim s karakterističnom skalom za DNA u atmosferi dvovalentnih magnezijevih ili manganovih protuiona. Nalazimo kako je iznos karakteristične skale, dobivene iz HF moda, u prisustvu dvovalentnih protuiona (neovisno o vrsti!) veći u odnosu na HF mod skalu DNA u prisustvu jednovalentnog Na - naravno, u relevantnom području koncentracija iznad 1 mM gdje se NaDNA može smatrati dvolančanom te se stoga može uspoređivati s dvolančanom MgDNA. U literaturi postoji istraži-

vanje koje je pratilo promjenu skale, ali dodavanjem magnezijevih iona u otopinu NaDNA i njihovo povećanje skale je u skladu s našim rezultatom [109].

Slika 3.7 (b) prikazuje ovisnost duljinske skale o de Gennes korelacijskoj duljini, tj. veličini mreže koja odgovara rasponu koncentracija DNA na panelu (a). Izraz za veličinu mreže $\xi \sim (bc)^{-1/2}$ ne uzima u obzir vrstu/naboju protuiona, veličina mreže mjeri udaljenost između poliiona te stoga ovisi samo o koncentraciji poliiona. Ovaj rezultat, ovisnost o valenciji protuiona značajno ukazuje da karakteristična duljina koja se dobiva DS metodom predstavlja širinu/protežnost potencijalne jame - tj. debljinu protuionske atmosfere oko poliiona. Dakle, ako prihvatimo interpretaciju skale HF moda kao protežnost atmosfere onda proizlazi kako je protuionska atmosfera proširena za slučaj dvovalentnih u odnosu na jednovalentne protuione, dok je za jednolančanu DNA sužena (komprimirana) u



Slika 3.6: Koncentracijska ovisnost ekstinkcijskog koeficijenta (a) i L_{HF} (b) nativne (puni simboli) i denaturirane (otvoreni simboli) čiste vodene otopine Mg-DNA.



Slika 3.7: Usporedba koncentracijske ovisnosti karakteristične skale tri seta NaDNA sa slike 3.2 (crni kvadrati) s MgDNA (plave točkice) i MnDNA (zelene točkice) u ovisnosti o koncentraciji (a) i u ovisnosti o korelacijskoj duljini (b).

odnosu na dvolančanu DNA za danu koncentraciju baza, tj. fosfatnih grupa i njima pripadajućeg protunaboja. Parametar koji se mijenja između ova tri sistema jest jakost Manning kondenzacije. Za jednolančanu DNA Manning faktor je 2.5 puta veći nego za dvolančanu, dakle, 2.5 puta više protuiona je slobodno i formira protuionsku atmosferu. Za dvovalentne protuione, situacija je obrnuta, kondenzacija je jača i 2 puta manje iona je slobodno. Okvirno, protežnost atmosfere dana je Debye-Hückel duljinom κ^{-1} koja skalira obrnuto proporcionalno korijenu koncentracije slobodnih iona u otopini: $\kappa^{-1} \propto c^{-1/2}$. Sukladno tome, gore navedeni faktori promjene udjela slobodnih naboja: povećanje od 2.5 za ssDNA te smanjenje za 2 za MgDNA (ili MnDNA) vode na promjene veličine κ^{-1} za $1/\sqrt{2.5} \approx 1.6$ i $1/\sqrt{0.5} \approx 1/1.4$, dok su faktori koje uočavamo za promjene skale HF moda vrlo bliski: 1.65 i 1/1.3.

3.1.3 Karakteristične skale otopina DNA s dodanom soli

No, kako u otopinama bez dodane soli Debye-Hückelova duljina nije dobro definirana (nema koiona, slobodnih iona suprotnog predznaka) to je ovaj izračun samo kvalitativne prirode. Stoga je slijedeći korak istražiti DNA u otopinama s minimalnom količinom dodane soli čime se postiže situacija gdje je protežnost atmosfere definirana na ekstrinsičan način. Tu se onda može izračunati Debye-Hückelova duljina i usporediti s karakterističnom skalom HF moda. Minimalne količine dodane soli su korištene kako bi tako definirane skale ostale usporedive sa skalama za DNA u čistoj vodi. Na Sl.3.8 (a) dana je usporedba karakterističnih skala čistih vodenih NaDNA i MgDNA otopina (predstavljene kao linije) sa skalama dobivenim za otopine varijabilne koncentracije DNA i stalne koncentracije dodane soli (točke). Na x-osi je skala koncentracije naboja DNA c tako da je ova usporedba zapravo usporedba skale za DNA s i bez dodane soli. Karakteristične skale slanih NaDNA i MgDNA otopina se poklapaju s vodenima kada je udio dodane soli u odnosu na intrinsičnu koncentraciju protuiona zanemariv. No, snižavanjem DNA koncentracije, koncentracija dodane soli postaje dominantna te je tada karakteristična skala zadana ionskom jakosti dodane soli. Ovo se na Sl. 3.8 (a) iskazuje kao zaravnjenje krivulja - nestaje ovisnost o koncentraciji DNA, a koncentracija soli je stalna. Eksperimentalne točke su uspoređene s teorijskim vrijednostima DH duljine za navedene soli i koncentracije.

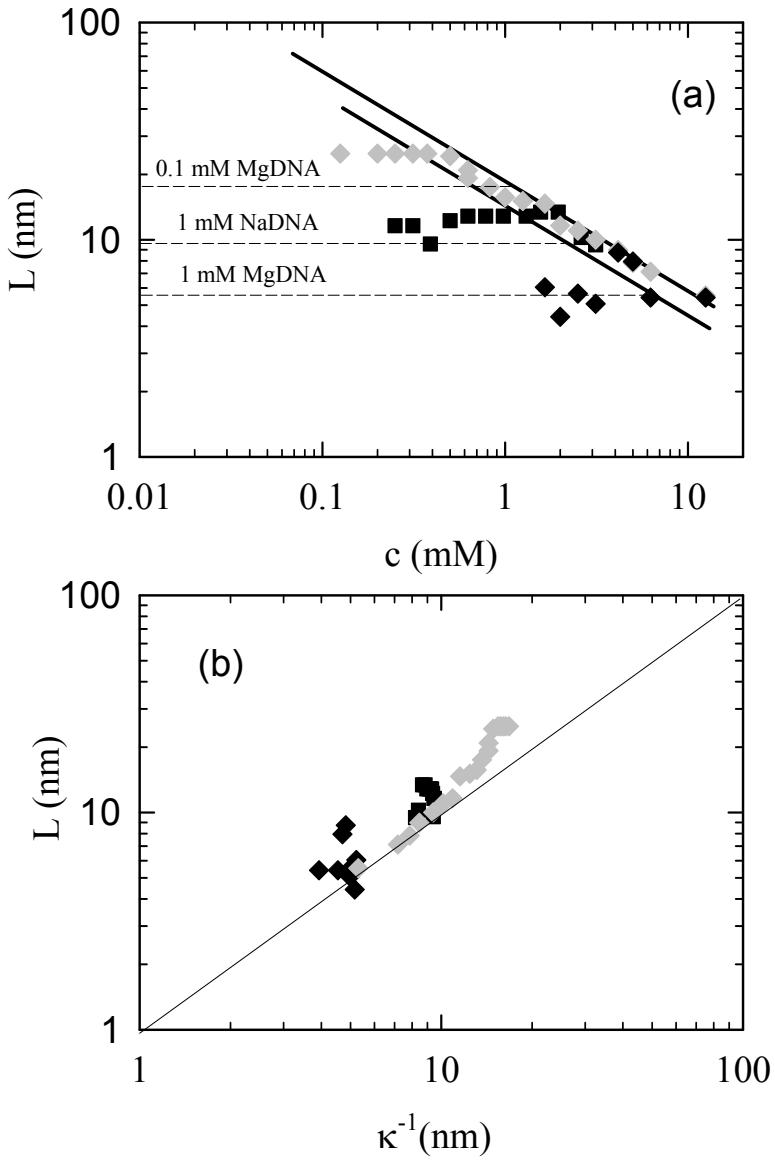
Shodno gore navedenom, prirodna skala za prikaz rezultata za HF mod bila bi DH duljina pojedine otopine $\kappa^{-1} \propto I_{tot}^{-1/2}$, definirana ukupnom količinom intrinsičnih protuiona i dodane soli $I_{tot} = 2c_i z_i^2/2 + I_s$, gdje je c_i koncentracija, a z_i valencija protuiona, a I_s ionska jakost dodane soli (NaCl ili $MgCl_2$).

Upravo je ta skala predstavljena na Sl. 3.8 (b) gdje vidimo kako 3 seta podataka (iz panela (a)) padaju na zajednički pravac - skala HF moda odgovara DH duljini pojedine otopine, s konstantom proporcionalnosti bliskom 1.

Konstanta proporcionalnosti nije identično jednaka jedan jer nije uračunat efekt nehomogene raspodjele dodane soli u otopini. Koncentracija dodane soli je najviša, čak i viša od nominalno dodane, u blizini poliiona te opada s udaljenošću od poliiona. Stoga veća odstupanja izmjerene skale od DH iznosa očekujemo za relaksacije veće protežnosti što je i eksperimentalno izmjereno. Na slici 3.8 (a) odstupanja se redom povećavaju od relaksacije za 1 mM $MgCl_2$, preko relaksacije za 1 mM NaCl do relaksacije za 0.1 mM $MgCl_2$ kako se i karakteristična skala relaksacije povećava.

3.1.4 Inducirani dipol i struktura otopine PE

Ito et al. [25] su dali interpretaciju kako DS metoda detektira relaksacije s kojima se može povezati skala udaljenosti poliiona, tj. skicirali su periodični po-



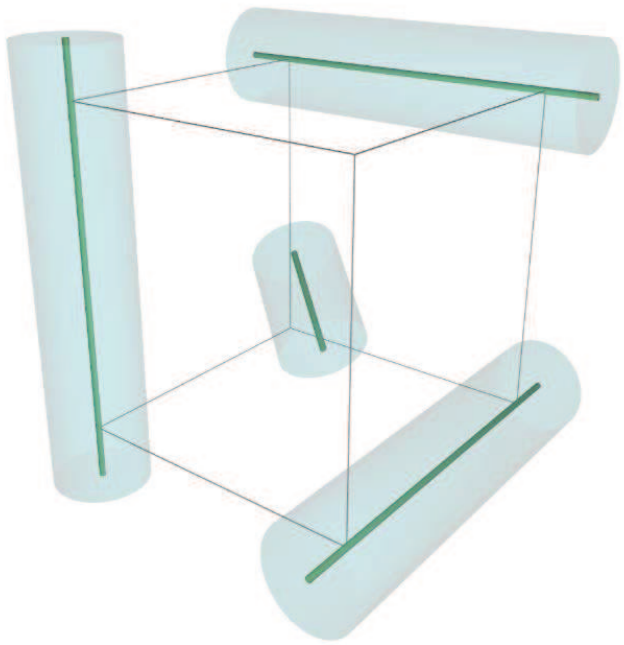
Slika 3.8: Ovisnost o (a) koncentraciji karakterističnih skala otopina MgDNA u 0.1 mM $MgCl_2$ (sivi rombovi), MgDNA u 1 mM $MgCl_2$ (crni rombovi) i NaDNA u 1 mM NaCl-a (crni kvadrati) [27]. Pravci pokazuju ponašanje vodenih otopina, vidi sliku 3.7. Isprekidane crte predstavljaju iznos Debyeve duljine zasjenjenja za 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM NaCl i 1 mM $MgCl_2$. Panel (b) Prikaz istih podataka u odnosu prema DH duljini koja prizlazi iz ionske jakosti dodane soli i koncentracije protuiona za pojedinu DNA otopinu. Pravac na kojem se nalaze eksperimentalne točke ukazuje na to kako skala HF moda odgovara DH duljini, s faktorom proporcionalnosti bliskim 1.

tencijal koji se proteže do polovine udaljenosti između susjednih poliiona. To je zapravo skala veličine mreže poliiona, koju detektira SAXS i koja se povezuje s de Gennesovom korelacijskom dužinom [29]. Drugi autori dali su i interpretaciju kako se protuionska atmosfera preuređuje paralelno s poliionom DNA. Predložili su kako se inducirani dipol formira na skali nekog elementa koji se ponavlja u strukturi DNA (duljina ustrajnosti, Kuhnova duljina) ili preko segmenta lanca koji se nalaze između kontakta lanca s drugim DNA poliionima [75–79, 81]. Primijetimo da i ovo potonje ima veličinu de Gennesove korelacijske duljine što je ista duljina kao i u Itovoj interpretaciji. Raniji radovi napravljeni na Institutu za fiziku [27, 28, 53, 102], a i nekih drugih autora [80] sugeriraju Itovo okomito gibanje na poliion za HF mod u MHz području, ali i dalje prevladava slika paralelnog gibanja protuiona. Dapače čak i nedavni rad, iz 2014. godine preferira takvu sliku [81]. Stoga je od interesa za područje polielektrolita, a ne samo DNA, ovdje iznesena studija dielektrične spektroskopije u MHz području.

Naša studija je ukazala na sljedeće: Ovisnost karakterističnih skala otopina DNA s dodanom soli je jedinstvena funkcija ionske jakosti, u računu koje se, uz dodanu sol, uzimaju samo slobodni protuioni - dakle samo oni i sudjeluju u relaksaciji. Metoda DS detektira karakteristično vrijeme relaksacije induciranog dipola koji formiraju ti slobodni ioni. Dipol je okomit na poliion, a veličina, L_{HF} mu se može odrediti korištenjem Einsteinove difuzijske jednadžbe, u kojoj je predfaktor reda veličine 1. Iako L_{HF} skalira s koncentracijom PE s eksponentom 0.5, kao i de Gennes korelacijska dužine ξ za polurazrijeđene otopine, L_{HF} u fizikalnom smislu nije ξ budući da se te dvije skale razlikuju za iznos 2π. Uzimanje u obzir ovog faktora bi zahtijevalo unošenje u Einsteinovu jednadžbu predfaktora reda $4\pi^2$, što nije vjerojatno. No, čvršći argument je ponašanje L_{HF} u uvjetima kad se promjeni protuion iz jedno u dvovalentne ili kada se doda sol. Skala L_{HF} se pri tome ne bi trebala promijeniti kada bi ona zaista reflektirala strukturu otopine, kako je predložio Ito - no tome nije slučaj. Iz ovih mjerenja izlazi kako je relevantna skala za razumijevanje moda u MHz području koji se javlja za različite PE zapravo DH duljina, tj. inducirani dipol je veličine DH duljine, i bitno je manji od razmaka između poliiona - dijametar protuionske atmosfere je manji od razmaka poliiona, Sl. 3.9. Ova slika je potvrđena i istraživanjem difuzije fluorescentno obilježenih čestica kroz mrežu koju formiraju lanci DNA ili HA [30]. Naime obilježena, ali i električno nabijena čestica (dsDNA fragment duljine 35 nm) počinje slobodno difundirati kroz PE mrežu tek kad veličina mreže postane 150 nm. Naime, u toj situaciji se protuionska atmosfera probne čestice više ne preklapa s atmosferama susjednih poliiona - što znači da se atmosfere ne šire preko cijelog slobodnog volumena. Općenito onda vrijedi kako bi u većini volumena između poliiona potencijal poliiona trebao biti zanemariv, a gustoća protuiona oko nule.

Ipak, ovdje je na mjestu primjedba kako za razrijeđene otopine L_{HF} skalira s koncentracijom PE s eksponentom 1/3. Vidljivo je to u rezultatima Ito-a, gdje se

eksponent 1/3 javlja za sintetski polimer, kao i u radu grupe dr. Tomić [28] gdje se javlja za monodisperznu DNA. Isti eksponent vrijedi i za prosječnu udaljenost poliiona u razrijeđenim otopinama. Kako bi i inducirani dipol skalirao s istim eksponentom, potencijal poliiona bi se morao protezati od jednog do drugog. Drugim riječima, "informacija" o prisustvu susjednih poliiona, postojanje koje proizlazi iz eksponenta 1/3, može proizaći samo ako su poliioni u kontaktu, dakle ako im je potencijal protegnut preko cijelog volumena. Jedino u tome slučaju bi veličina induciranog dipola skalirala s eksponentom 1/3. Međutim, iako potencijal poliiona ispunjava cijeli prostor, apsolutni iznost karakteristične skale relaksacije, veličina protežnosti protuionske atmosfere je ograničena na područje gdje je potencijal poliiona veći od kT i očito je to područje 10 puta manje od udaljenosti između poliiona.



Slika 3.9: Odnos udaljenosti između poliiona, širine potencijalne jame poliiona i promjera DNA - u ovom primjeru 150 nm, 25-30 nm te 2.5nm, tim slijedom. Slobodni ioni se većinom nalaze unutar potencijalne jame, dok se kondenzirani zadržavaju u najvećoj blizini DNA, unutar dijametra 2.5-3 nm.

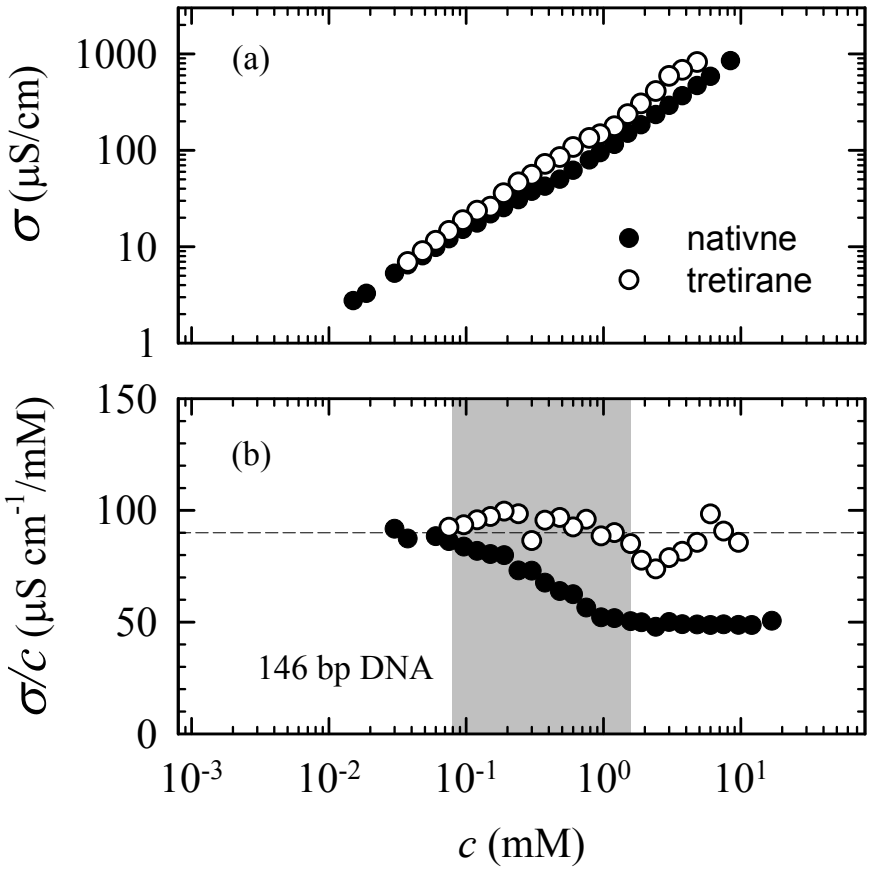
3.2 Raspodjela protuiona: udio slobodnih i kondenziranih

U diskusiji rezultata DS metode koristili smo osnovni koncept iz Manningove teorije, podjelu protuiona na kondenzirane i slobodne. Kako bismo analizirali eksperimentalne rezultate DS metode modelirali smo protežnost protuionske atmosfere prema Debye-Hückelovoj duljini, za određivanje koje smo uzimali u obzir samo slobodne protuione. Za DNA s jednovalentnim protuionima udio slobodnog naboja po Manningu je $f = 0.24$, a s dvovalentnim protuionima $f = 0.12$. Konduktometrija bi trebala izravno pružiti informaciju o udjelu slobodnih protuiona, tj. udio protuiona koji sudjeluje u vodljivosti, pa tako i u dielektričnom odzivu. Podsjećamo, DS metoda je u biti mjerenje vodljivosti u ovisnosti o frekvenciji, dok je konduktometrija zapravo samo analiza podataka mjerenja dobivenih na jednoj frekvenciji. Za očekivati je kako analizom mjerenja vodljivosti možemo kvantificirati Manningov model i odrediti udio iona koji sudjeluju u vodljivosti pa tako i u relaksaciji induciranih dipola. Osnovni korak u ovome istraživanju je bilo određivanje vodljivosti monodisperznog uzorka DNA kao modelnog sistema za koji je moguće odrediti i ekvivalentne vodljivosti i difuzijske koeficijente pojedine ionske vrste. Daljnji je korak bila provjera modela kroz parametar valencije, tj. usporedba rezultata za DNA s jedno i s dvovalentnim protuionima.

3.2.1 Mjerenje vodljivosti razrijeđene, monodisperzne DNA

3.2.1.1 Jednovalentni protuioni

Koncentracijska ovisnost nativne i tretirane (denaturirane) 146bp NaDNA u čistoj vodenoj otopini je dana na (a) panelu slike 3.10. Vidljiv je linearan porast vodljivosti s koncentracijom što je i očekivano. Na nižim koncentracijama se vodljivost tretiranih i nativnih uzoraka poklapaju, a nakon $c = 0.05\ mM$ veći iznos vodljivosti imaju tretirani uzorci. Informativniji oblik za analizu je vodljivost normirana na koncentraciju, panel (b). Unatoč rasapu izmjerenih vrijednosti možemo prepoznati kako je normirana vodljivost denaturiranih uzoraka neovisna o koncentraciji. Vjerojatno je ovaj posljedica nestabilnosti i nehomogenosti denaturiranih uzoraka, gdje vjerojatno dolazi do renaturacije i nasumičnog povezivanja jednolančane DNA, što smo spomenuli i pri analizi DS rezultata. Normirana vodljivost se za nativne uzorke povećava smanjenjem koncentracije. Sve do $c = 1\ mM$ ona je dvostruko manja u odnosu na vrijednost denaturiranih uzoraka dok se za niže koncentracije njena vrijednost približava vrijednosti denaturiranih uzorka i za $c < 0.05\ mM$ vrijednosti su jednake. Udio slobodnih iona jednolančane DNA je veći od udjela slobodnih iona za dvolančanu DNA i povećana vodljivost jed-



Slika 3.10: Rezultati konduktometrije NaDNA 146pb u čistoj vodi prije (puni simboli) i poslije denaturacije na 97°C (otvoreni simboli). (a) Vodljivost otopine u ovisnosti o koncentraciji naboja DNA (b) Vodljivost normirana koncentracijom u ovisnosti o koncentraciji naboja DNA. Crtkana crta označava prosječnu vrijednost za denaturirane otopine. Ovim vrijednostima se, na najnižim koncentracijama, približavaju vrijednosti za nativne uzorke. Slike preuzete iz [19].

nolančane DNA ne iznenađuje. No, upravo zato porast vodljivosti za dvolančanu možemo prepoznati kao uzrokovanu denaturacijom DNA. U nastavku ću analizirati kako vodljivost monodisperznog, razrijeđenog PE ovisi o udjelu slobodnih iona. Početi ću od izraza 1.69 za vodljivost danog u Uvodu

$$\sigma = f z_p c(\lambda_p + \lambda_i) \tag{3.2}$$

gdje su f Manning udio slobodnih naboja, z_p i c naboj i koncentracija monomera, a λ označava ekvivalentne vodljivosti poliiona i protuiona. Podsjećam, ekvivalentna vodljivost jest vodljivost množine od jednog mola naboja koji se nalazi na određenoj ionskoj vrsti. Npr., za dvovalentni ion to je onda vodljivost 0.5 mola

toga iona, jer on nosi 1 mol naboja. Ekvivalentne vodljivosti jednostavnih, malih iona su tabelirane, no nepoznanica je ovdje vodljivost poliiona koja proizlazi iz μ_p, mobilnosti poliiona, tj. $\lambda_P = F\mu_p$ (F- Faradayeva konstanta). Mobilnost je povezana sa samodifuzijskim koeficijentom poliiona D_p i njegovim nabojem Q_p prema Einsteinovom izrazu [24]

$$D_p = \frac{kT\mu_p}{\mathrm{e}Q_p} \tag{3.3}$$

te stoga

$$\lambda_p = FQ_p\mathrm{e}\frac{D_p}{kT} \tag{3.4}$$

Uvrštenjem izraza 3.4 u izraz 3.2 dobije se

$$\sigma = fz_pc(FfNz_p\mathrm{e}\frac{D_p}{kT} + \lambda_i) \tag{3.5}$$

Ako normaliziramo vodljivost s koncentracijom dobiti ćemo relevantniju veličinu, tj. normalizirana vodljivost je povezana s molarnom vodljivošću Na^+ protuiona $\lambda_i = \lambda_{Na^+}$ i DNA poliiona λ_p:

$$\frac{\sigma}{c} = 2f(\lambda_{\mathrm{Na}^+} + \lambda_p) \tag{3.6}$$

gdje faktor 2 označava broj naboja po monomeru dsDNA. Stoga ćemo za poliion u izrazu 3.4 uvrstiti $Q_p = 2fN$ te dobijemo

$$\lambda_p = F2fN\mathrm{e}\frac{D_p}{kT} \tag{3.7}$$

Uvrštavanjem izraza 3.7 u izraz 3.6 za vodljivost DNA, dobivamo

$$\frac{\sigma(c)}{c} = 2f\lambda_{\mathrm{Na}^+} + 4f^2ND_p(c)\frac{F\mathrm{e}}{kT} \tag{3.8}$$

Ovo je kvadratna jednadžba za $f(c)$ u kojoj su parametri $D_p(c)$ i $\sigma(c)$

$$f(c)^2 + \frac{\lambda_{\mathrm{Na}^+}}{D_p(c)\cdot cte.}f(c) - \frac{\sigma(c)}{c}\frac{1}{2D_p(c)\cdot cte.} = 0 \tag{3.9}$$

Prijašnji izračun nije uzeo u obzir asimetričnost polja kojoj je uzrok deformacija atmosfere protuiona oko poliiona kada je polielektrolit podvrgnut vanjskom električnom polju [8, 13, 59]. Originalni Manningov rad je revidiran od strane Bordija i suradnika [60] i iznesen u formi koju ću ovdje predstaviti. Efekt asimetričnosti polja se može uvažiti na način da se napravi korekcija na f [13, 110] za faktor $B = 0.866$. Tu vrijednost je izračunao Manning i ona potječe od razlike difuzijskih

koeficijenata protuiona u granici beskonačne razrijeđenosti i u blizini poliiona. Asimetričnost polja utječe i na molarnu vodljivost poliiona λ_p. Stoga prvo treba popraviti izraz za efektivni naboj poliiona

$$\lambda'_p = 2fBND'_p \frac{Fe}{kT} \tag{3.10}$$

Drugo, treba popraviti difuzijski koeficijent poliiona

$$D'_p = D_p \frac{1}{1 + \frac{ND_p}{D_{\mathrm{Na}^+}} \cdot 2fB \cdot \frac{1-B}{B}} \tag{3.11}$$

Kombiniranjem gornjih izraza dovodi do promjene izraza 3.6

$$\frac{\sigma}{c} = 2fB(\lambda_{\mathrm{Na}^+} + \lambda'_p) \tag{3.12}$$

Umetanjem izraza 3.10 i 3.11 u izraz 3.12 dobijemo izraz koji se može iskoristiti za dobivanje udjela slobodnih protuiona

$$\frac{\sigma}{c \cdot \lambda_{\mathrm{Na}^+}} = 2fB \cdot \left(1 + 2fB \frac{ND_p}{D_{\mathrm{Na}^+}} \frac{1}{1 + \frac{ND_p}{D_{\mathrm{Na}^+}} \cdot \frac{1-B}{B} \cdot 2fB}\right) \tag{3.13}$$

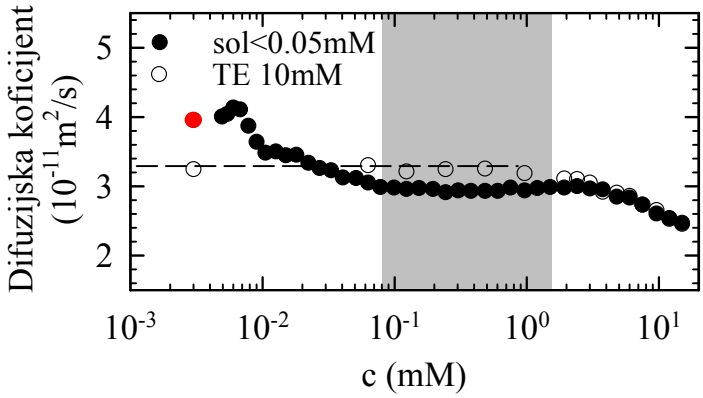
Prema analogiji s izrazom 3.9 ovaj izraz ćemo prepisati u kvadratnoj formi

$$M/Bx(c)^2 + \left(1 - AM\frac{1-B}{B}\right)x(c) - A = 0 \tag{3.14}$$

gdje M predstavlja $\frac{ND_p}{D_{\mathrm{Na}^+}}$ a A $\frac{\sigma}{c\lambda_{\mathrm{Na}^+}}$. A smo odredili eksperimentalno. Da bi mogli riješiti jednadžbu za svaku pojedinu vrijednost c s ciljem dobivanja $x(c)$, za koji ćemo uzeti samo pozitivne vrijednosti koje su fizikalne, trebamo eksperimentalno odrediti M kao funkciju od c.

U ovoj analizi važno je ponovo primijetiti kako radimo s monodisperznom 146bp DNA za koju postoji dobro definiran difuzijski koeficijent i koji je mjeren fluorescencijskom korelacijskom spektroskopijom (FCS) [19]. Difuzijski koeficijent opada kako koncentracija DNA raste. Za $0.05\ mM < c < 2\ mM$ difuzijski koeficijent ne ovisi o koncentraciji dok za više koncentracije opada. Ovaj pad koincidira s prijelazom u polurazrijeđenu otopinu, dakle fragmenti DNA u stalnom su kontaktu i počinju zauzimati značajan udio volumena dostupnog za difuziju njih samih - upravo se samodifuzijski koeficijent stoga smanjuje.

Iz eksperimentalno određenih A i M sada možemo izračunati koncentracijsku ovisnost udjela slobodnih protuiona, vidi sliku 3.12 Ovisno da li smo prilikom računanja f uzeli u obzir asimetričnost polja (izraz 3.13) ili ne (izraz 3.9) iznos je nešto veći ili manji. No, neovisno o uključenju asimetričnosti polja na nižim



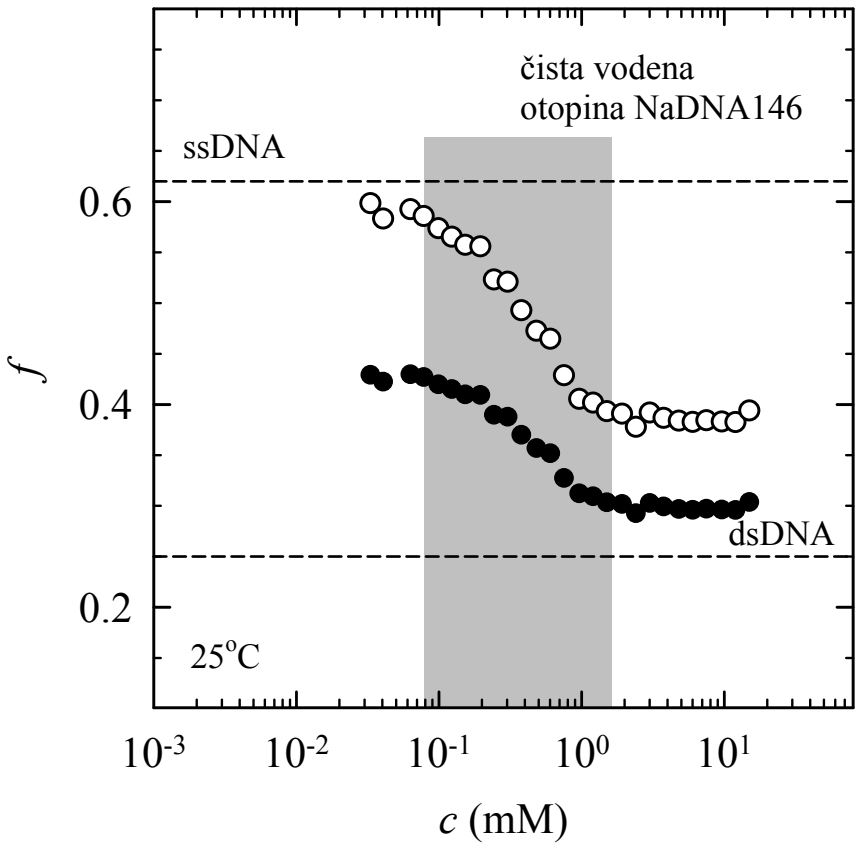
Slika 3.11: Koncentracijska ovisnost difuzijskog koeficijenta za 146 bp DNA poliion izmjerena fluorescencijskom korelacijskom spektroskopijom (FCS). Puni simboli predstavljaju mjerenje u čistoj vodenoj otopini, otvoreni simboli u 10 mM puferu a crveni simbol je mjerenje za ss 146 bp DNA.

koncentracijama iznos f je bliže teorijskoj vrijednosti f = 0.62 za jednolančanu DNA, a na višim koncentracijama za dvolančanu, f = 0.24. Svakako, promjena režima odvija se u području 0.05 $mM < c < 1$ mM. Na slici 3.13 smo usporedili naše vrijednosti s vrijednostima dobivenima osmometrijom za polidisperzne, polurazrijeđene DNA [111]. Poklapanje osmometrije je bolje s našim vrijednostima bez uključenog efekta asimetričnog polja.

3.2.1.2 Dvovalentni ioni i dodana sol

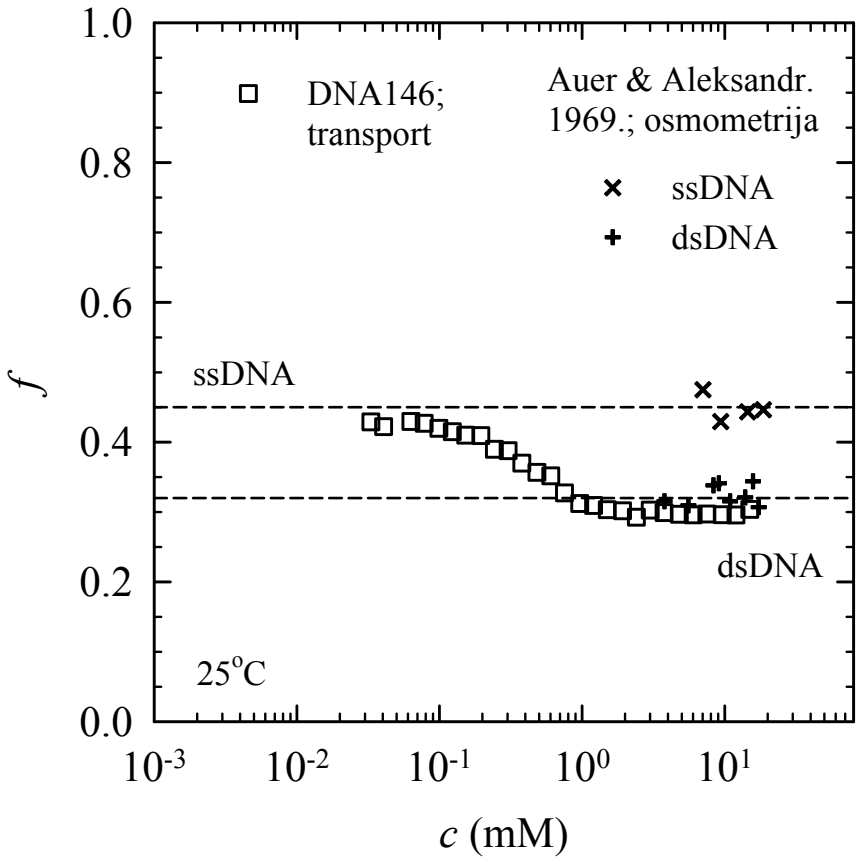
Gore izneseni modeli postavljaju Manningov parametar f u središte analize. Izravna provjera bila bi konduktomerija DNA 146bp s dvovalentnim protuionima, budući da je parametar f obrnuto proporcionalan valenciji protuiona. Stoga smo izveli konduktometriju uzoraka DNA 146bp (set koncentracija 0.03-10 mM) u vodenoj otopini bez dodane soli, NaDNA i MgDNA te također setova uzoraka u otopini s dodanom soli, 1 mM NaCl za NaDNA uzorak i 1 mM $MgCl_2$ za MgDNA. Također smo usporedili i vodljivost NaDNA za dva seta otopina različite pripreme, s i bez prethodne dijalize uzorka. Sve rezultate vodljivosti smo izravno preračunali u udjele slobodnih iona f prema modelu iznesenom u prethodnom poglavlju i prikazali ih na slici 3.14. Za DNA otopine s dodanom soli, iz rezultata vodljivosti je jednostavno oduzeta vodljivost otopine soli, 126 μS/cm za 1 mM NaCl i 242 μS/cm za 1 mM $MgCl_2$ i zatim je provedena gornja analiza.

Odmah je uočljivo kako je udio slobodnih iona za MgDNA u čistoj vodi i u otopini s dodanom soli, okvirno dvostruko manji nego za odgovarajuće NaDNA otopine. Izravna je to i kvantitativna potvrda validnosti Manningova modela. Posebice je značajno što se u otopinama s dodanom soli ne javlja ovisnost f o



Slika 3.12: Ovisnost udjela slobodnih protuiona f o koncentraciji monmera, za 146bp DNA. Puni simboli predstavljaju $f(c)$ izračunat prema izrazu 3.9 dok otvoreni simboli predstavljaju $f'(c)$ izračunat po izrazu 3.13 u kojeg je uključen efekt asimetričnosti polja. Crtkane linije su teorijske vrijednosti f = 0.24 za dsDNA i f = 0.62 za ssDNA.

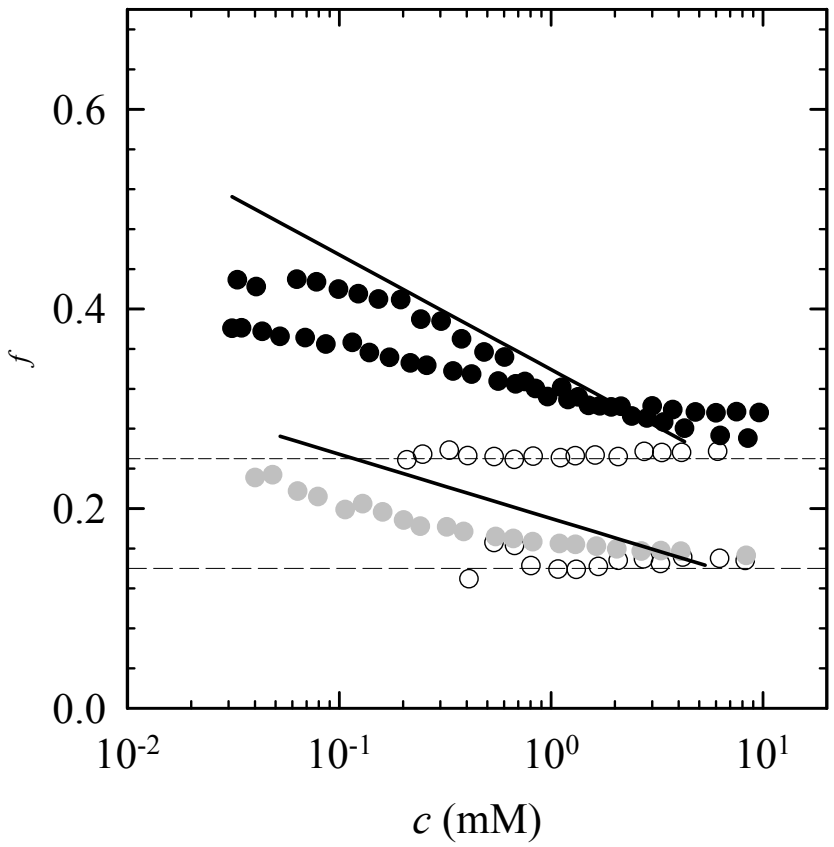
koncentraciji PE, a omjer 1:2 je još jasnije definiran. Neovisnost udjela slobodnih iona u Manning teoriji predviđena je zapravo za otopine bez dodane soli (za kakve je teorija i izrađena), a naši rezultati pokazuju kako za otopine bez dodane soli dolazi do dekondenzacije, tj. povećanja koeficijenta f, sa sniženjem koncentracije poliiona. Dok smo u prethodnom poglavlju ovaj proces pripisali denaturaciji koja se javlja sa snižavanjem koncentracije DNA u okolišu bez dodane soli, sada porast koeficijenta f nalazimo i kod MgDNA. Za MgDNA smo već naveli kako ju Mg protuion stabilizira i kako ona ne denaturira niti u okolišu bez dodane soli. No, još smo u uvodu naveli kako su i ekvivalentne vodljivosti monodisperznih sintetskih poliiona [13, 18] ovisne o koncentraciji što zajedno potvrđuje f kao veličinu ovisnu o koncentraciji PE. Kvalitativno, porast f se može objasniti preko koncepta



Slika 3.13: Ovisnost udjela slobodnih protuiona f o koncentraciji monomera, za 146bp DNA. Podaci za f (kvadrati) su dobiveni iz konduktometrije, bez uzimanja u obzir efekta asimetrije polja. Križići predstavljaju vrijednosti izmjerene osmomoterijom [111].

difuzijskog potencijala kojeg je razvio Manning [56]. Naime, lokalna koncentracija kondenziranih protuiona oko poliiona je reda 1 M, a u otopini je za redove veličina njihova koncentracija niža te se može definirati difuzijski potencijal kondenziranih protuiona. Drugim riječima, entropija protuiona se suprotstavlja elektrostatskom efektu, kondenzaciji. Za očekivati bi bilo kako je difuzijski potencijal veći u otopini bez dodane soli nego u otopini s dodanom soli, ali je interesantno kako već 1 mM dodane soli stabilizira efekt kondenzacije za PE. Drugim riječima, u slobodnoj energiji polielektrolita postoji i entropski doprinos od miješanja protuiona i taj doprinos postaje zanemariv čim u PE otopini postoji i minimalna količina dodane soli.

Manning je modelirao poliion kao beskonačno dugu i tanku liniju s točkastim nabojima međusobno udaljenima za duljinu b. Kada se uračuna odbijanje između



Slika 3.14: Ovisnost udjela slobodnih protuiona f o koncentraciji monomera, za 146bp DNA. Predstavljeni su rezultati za DNA u otopini bez dodane soli, NaDNA s crnim, a MgDNA sivim točkama. Za NaDNA prikazana su 2 seta, s i bez koraka dijalize u sklopu pripreme uzoraka (set podataka S-oblika, bez dijalize, je već bio prikazan na prethodnim slikama). Otvoreni simboli prikazuju ovisnost f za DNA 146 bp u otopinama s dodanom soli: NaDNA u 1 mM NaCl i MgDNA u 1 mM $MgCl_2$. Crtkane linije prosječna su vrijednost f dobivena za DNA u slanoj otopini i bliske su teorijskim vrijednostima: 0.25 vs. 0.24 te 0.14 vs. 0.12.

svih naboja preostalih (nesakrivenih) nakon kondenzacije, a pri tome zasjenjenih na udaljenostima većim od DH duljine, dobiva se doprinos slobodnoj energiji po molu naboja u jedinicama kT

$$g_{el} = -(1 - zf)^2 \eta ln(1 - e^{-\kappa b}) \tag{3.15}$$

Netz [22, 23] je drugačije modelirao poliion - kao dugački, šuplji kondenzator što je i jedina razlika u odnosu na Manningov model. Elektrostatska energija, po jedinici duljine, beskonačno dugog cilindričnog kondenzatora unutarnjeg radijusa

a i vanjskog radijusa L, s linearnom gustoćom naboja $q/2a$, u jedinicama kT glasi

$$g_{el} = (1 - zf)^2 \eta \ln(L/a)/4a \tag{3.16}$$

Ove različite početne postavke u računu za slobodnu energiju vode na to da Manningov f ne ovisi o koncentraciji

$$f = \frac{1}{\eta} \tag{3.17}$$

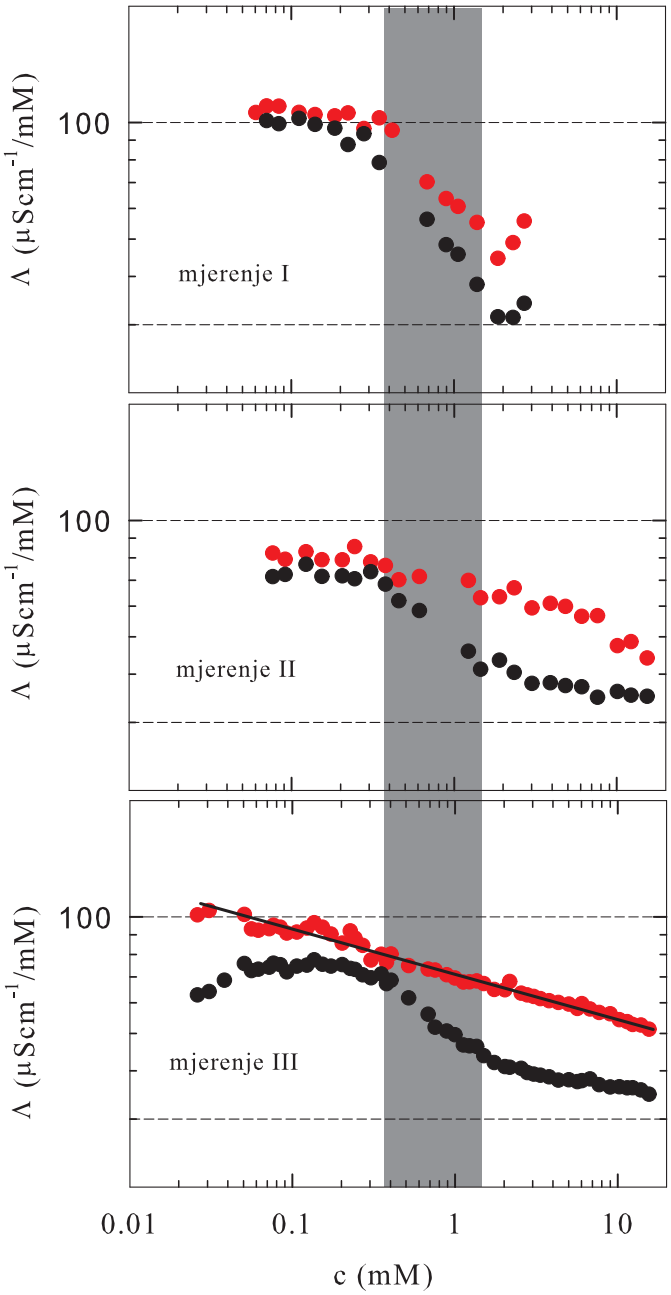
a u Netzovu modelu se javlja logaritamska ovisnost - porast udjela slobodnih iona ka nižim koncentracijama u sustavu bez dodane soli.

$$f = \frac{1}{\eta}\left(1 - \frac{\ln(c/c^*)}{\ln(L/a)}\right) \tag{3.18}$$

Na slici 3.14 uneseni su teorijski pravci na bazi gore iznesenog modela. Ishodišna točka je Manningov $f = 1/\eta$ (0.24 za Na i 0.12 za Mg) koji vrijedi oko i ispod granične koncentracije između nerazrijeđenih i razrijeđenih otopina - u slučaju DNA 146 bp to je 5 mM. Dakle, porast vodljivosti za MgDNA bi bio posljedica dekondenzacije, a ne denaturacije. Analogan porast (pa i oblikom krivulje) javlja se i za jedan od NaDNA setova. Za drugi set (S-oblika, prikazan i u prethodnom poglavlju) javlja se i doprinos vodljivosti koji jest posljedica denaturacije - koja također povećava udio slobodnih protuiona. Zapravo, podsjetio bih kako je denaturacija u osnovi uzrokovana dekondenzacijom -jer ova slabi zasjenjenje naboja između sparenih DNA lanaca koji se stoga počinju sve jače odbijati i dolazi do kidanja vodikovih veza, razdvajanja lanaca - denaturacije - koja onda vodi na daljnju dekondenzaciju. Ovdje je primjetna činjenica kako f dvaju setova uzoraka NaDNA u vodenoj otopini pokazuje različitu ovisnost o koncentraciji, kao i različitu završnu vrijednost na najnižoj mjerenoj koncentraciji. Radi pojašnjenja najjednostavnije je ukazati na moguću nesavršenost pripreme uzoraka. Ako je u setu NaDNA uzoraka koji nije pokazao denaturaciju već samo dekondenzaciju preostala prilikom dijalize neka manja količina ($< 5\%$) dvo ili viševalentnih protuiona ovi će mjerljivo odgoditi denaturaciju. Pri tome će i dalje većina prisutnih (i kondenziranih i slobodnih) protuiona biti Na^+, koji će i dalje definirati vodljivost i koji će se i dalje dekondenzirati, kako je modelirao Netz.

3.2.2 Mjerenje vodljivosti polurazrijeđene, polidisperzne DNA

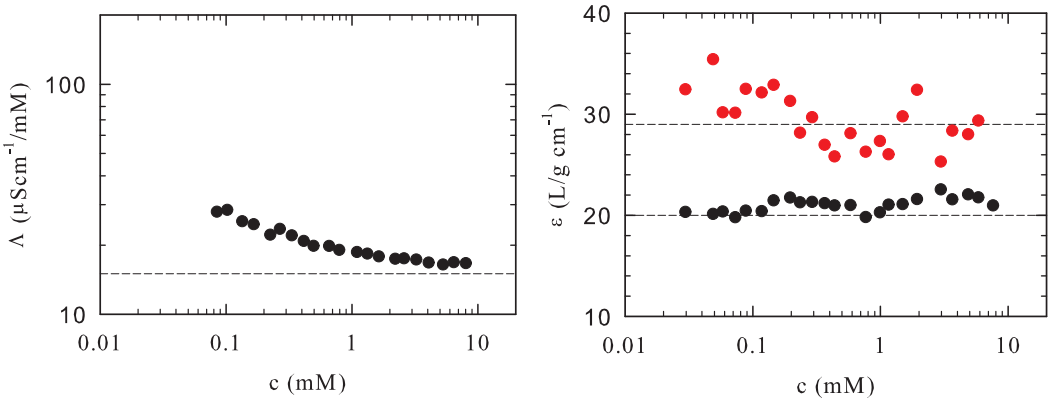
Mjerenja DS metodom i konduktometrijom jesu istraživanja dinamike, koja neizravno daju informaciju o strukturi poliiona ili PE otopine. Glavnina naših rezultata DS metodom je nastala na polidisperznim uzorcima DNA i HA, u po-



Slika 3.15: Prikaz ekvivalentne vodljivosti (vodljivosti normirane na koncentraciju fosfata DNA), u ovisnosti o koncentraciji fosfata DNA za nativne (crni kvadrati) i denaturirane (crveni kvadrati) otopine NaDNA u čistoj vodi. Isprekidane crte na vrijednostima 30 $\mu Scm^{-1}/mM$ i 100 $\mu Scm^{-1}/mM$ su dane kako bi se olakšala usporedba tri seta mjerenja.

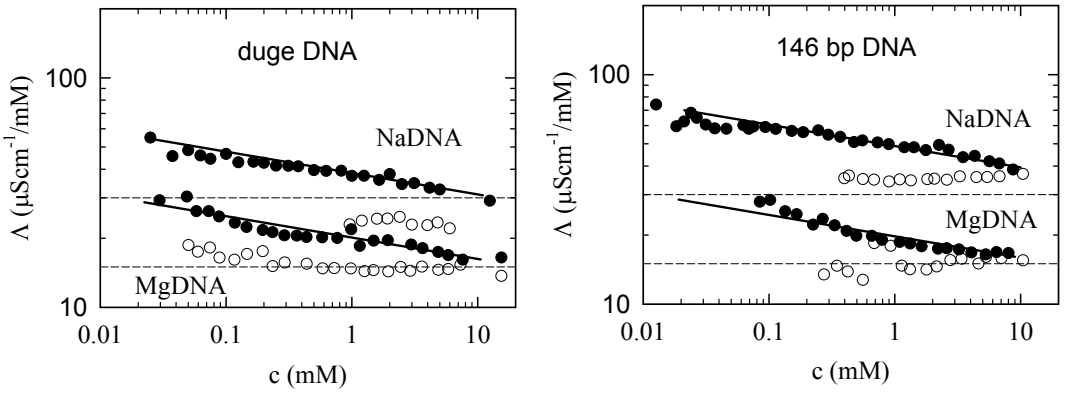
lurazrijeđenim otopinama. Istražio sam i koliko konduktometrija takvih sustava može pridonijeti dosad prikazanome. U principu, budući da je DNA polidisperzna i kako postoji preklapanje lanaca, ne postoji dobro definiran difuzijski koeficijent za poliione u takvom sustavu, pa tako niti jasan oblik ekvivalentne vodljivosti za te poliione. U uvodu smo prikazali postojanje modela koji problem vodljivosti poliiona u polurazrijeđenoj otopini svode na problem nezavisnih entiteta, korelacijskih volumena, koji su također i monodisperzni. Na slici 3.15 prikazana je ovisnost ekvivalentne vodljivosti NaDNA, u vodenoj otopini bez dodane soli, o koncentraciji fosfatnih grupa, Λ *vs* c. Ekvivalentna vodljivost je dobivena normiranjem izmjerene vodljivosti s ukupnom koncentracijom naboja u otopini, a koja je dana koncentracijom fosfatnih grupa. Također je prikazana ovisnost i za termički tretiranu, denaturiranu DNA. Naime, u pitanju su isti setovi uzoraka na kojima je izvedeno mjerenje DS metodom, a ovdje navedene vodljivosti su zapravo vrijednosti vodljivosti na 100 kHz zabilježene u impedancijskim spektrima. Ekvivalentna vodljivost nativnih, netretiranih NaDNA uzoraka se povećava smanjenjem koncentracije. Početna vrijednost je stabilnih 35 $\mu Scm^{-1}/mM$ dok vrijednost na najnižim koncentracijama varira između 75 – 100 $\mu Scm^{-1}/mM$. Kako prema niskim koncentracijama očekujemo da DNA mijenja oblik iz dvolančanog u jednolančani, na što upućuju i DS i UVS eksperimenti na ovim istim uzorcima, to je ta varijabilnost posljedica nestabilnosti sastava takve DNA na granici denaturacije. Ukratko, snižavanjem koncentracije ekvivalentna vodljivost poraste između 2 i 3 puta. Za denaturirane uzorke nestabilnost sastava je povećana pa tako i varijabilnost rezultata vodljivosti, no i ovdje se javlja porast vodljivosti snižavanjem koncentracije, u rasponu od 50 $\mu Scm^{-1}/mM$ do 100 $\mu Scm^{-1}/mM$. Razlika ekvivalentne vodljivosti iznad 0.3 mM za nativne i tretirane (denaturirane) DNA morala bi biti posljedica razlike u broju slobodnih iona za jedno i dvolančanu DNA. Ispod 0.3 mM tretirani i netretirani setovi uzoraka daju istovjetna ponašanja i vrijednosti ekvivalentne vodljivosti te zaključujemo kako su DNA uzorci u tom području većinom u denaturiranom stanju. No, kontinuirani porast ekvivalentne vodljivosti snižavanjem koncentracije za već denaturiranu DNA može biti posljedica i promjene koncentracije naboja u sustavu zbog dekondenzacije - povećanja udjela slobodnih iona (što smo opisali za monodisperzne DNA) i promjene difuzijskog koeficijenta promjenom konformacije poliiona, tj. strukture otopine pri razrjeđivanju (odgovarajući modeli predstavljeni su u Uvodu). Kako bismo razdvojili ove utjecaje mjerili smo još nekoliko polidisperznih, polurazrijeđenih PE sustava. Na slici 3.16, lijevo prikazana je ekvivalentna vodljivost za MgDNA, tj. DNA s Mg protuionima. Kao i u slučaju monodisperzne, razrijeđene MgDNA 146bp ne javlja se denaturacija snižavanjem koncentracije DNA u otopini bez dodane soli, što je razvidno i iz mjerenja ekstinkcijskog koeficijenta, koji pokazuje standardnu vrijednost za dvolančanu DNA preko cijelog koncentracijskog raspona. Nadalje, ekvivalentna vodljivost MgDNA upravo je dvostruko manja od vodljivosti NaDNA što smo ta-

kođer prije uočili kod DNA 146bp i interpretirali kao posljedicu smanjenja broja slobodnih naboja, tj. dvostruko manjeg f za dvovalentni sustav. Ni kod MgDNA



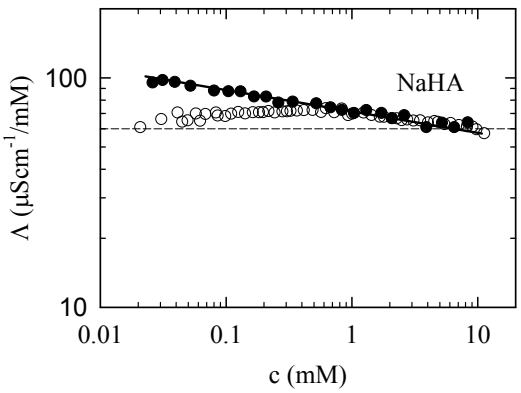
Slika 3.16: Lijevo. Koncentracijska ovisnost Λ čiste vodene otopine MgDNA. Isprekidana crta označava vrijednost od Λ = 15 $\mu Scm^{-1}/mM$.(desno) Koncentracijska ovisnost ekstinkcijskog koeficijenta nativne (crne točke) i denaturirane (crvene točke) čiste vodene otopine MgDNA. Isprekidane crte označavaju iznos ekstinkcijskog koeficijenta ds i ss oblika DNA.

nije moguće razlikovati doprinos kondenzacije od doprinosa konformacije ukupnom porastu vodljivosti ka nižim koncentracijama. Ipak, značajno je primijetiti kako su rasponi promjene ekvivalentne vodljivosti isti za polidisperzne, polurazrijeđene kao i za monodisperzne, razrijeđene sustave NaDNA i MgDNA. Dakle, iako samo potonji imaju dobro definiran i koncentracijski neovisan difuzijski koeficijent poliiona, moglo bi se zaključiti kako isto vrijedi i za prvonavedene sustave. Ovakva situacija bi bila moguća ako se zaista vodljivost nasumičnog namotaja, koji čini dugačka DNA u otopini, može predstaviti kao vodljivost niza slobodno povezanih segmenata, korelacijskih ili elektrostatskih volumena, a koji ne mijenjaju veličinu promjenom koncentracije PE. K tome bi taj volumen trebao imati difuzijski koeficijent blizak onome za DNA 146pb, kako bi vodljivosti pri istim koncentracijama bile podjednake. Ovakav scenarij nije nemoguć, budući da je DNA 146bp fragment dugačak 50 nm - što je upravo duljina ustrajnosti DNA. Dakle, gibanje dugačkog namotaja DNA pod utjecajem vanjskog električnog polja mogli bismo razumjeti kao gibanje mnoštva slobodnih Kuhnovih segmenata (duljina im je 100 nm) kakvima se u jednostavnom modelu opisuje polimere. U takvom scenariju, promjena vodljivosti bi dolazila od promjene naboja, od dekondenzacije, a ne od promjene konformacije. Za DNA 146bp mjerenja u dodanoj soli su nam potvrdila utjecaj dekondenzacije na vodljivost pa sam ih proveo i za MgDNA, uz minimalnu koncentraciju dodane soli od 0.033 mM. Minimalna koncentracija je korištena kako bih što lakše oduzeo taj doprinos vodljivosti sustava pri računu Λ. Kao i za DNA 146pb u



Slika 3.17: (Lijevo) Koncentracijska ovisnost ekvivalentne vodljivosti Λ čistih vodenih (puni krugovi) te 0.033 mM $MgCl_2$ (prazni krugovi) otopina MgDNA i čistih vodenih (puni krugovi) te 1 mM NaCl (prazni krugovi) otopina NaDNA. (desno) Koncentracijska ovisnost Λ čistih vodenih (puni krugovi) te 1 mM $MgCl_2$ (prazni krugovi) otopina MgDNA 146bp te čistih vodenih (puni krugovi) i 1 mM NaCl (prazni krugovi) otopina NaDNA 146bp [112]. Radi usporedbe, isprekidane crte su povučene na istoj vrijednosti i za kratke i duge MgDNA i NaDNA. Sve pune crte su identičnog nagiba koji iznosi 20% po dekadi.

ovakvom sustavu ne javlja se više ovisnost ekvivalentne vodljivosti o koncentraciji - dodana sol potiskuje dekondenzaciju. Zaključili bismo onda kako je promjena vodljivosti s koncentracijom zaista posljedica samo promjene udjela slobodnog naboja u PE sustavima, dok varijacija konformacije nema utjecaja. Također bismo zaključili i kako je doprinos vodljivosti poliionskog podsustava podjednak kao i za monodisperzni poliion DNA 146pb. Na slici 3.17 lijevo prikazane su ekvivalentne vodljivosti polidisperznih, polurazrijeđenih NaDNA i MgDNA s i bez dodane soli. Na slici desno su odgovarajući podaci za DNA 146pb. Kvalitativno i kvantitativno rezultati odgovarajućih dugih i kratkih (polurazrijeđenih i razrijeđenih) DNA su sukladni i potvrđuju gornje zaključke: u prisustvu dodane soli ne javlja se dekondenzacija i ekvivalentna vodljivost je konstantna. Drugim riječima, konformacija ne utječe na promjenu vodljivosti dugačkih DNA, a svakako niti na vodljivost kratkih štapićastih 146bp DNA. Jedini utjecaj konformacije na vodljivost jest utjecaj denaturacije. No ni pri denaturaciji nije ključna promjena difuzijskog koeficijenta već naglo slabljenje Manning kondenzacije i povećanje broja slobodnih naboja u sustavu. Na kraju, dekondenzacija kao opće svojstvo PE bez dodane soli je pretpostavljena u Netzovom modelu predstavljenom u prošlom odjeljku. Pune linije prikazane na svim panelima u slici 3.17 imaju isti nagib i to je nagib koji odgovara Netzovom modelu za dvovalenetne protuione. Dodatno sam izmjerio i vodljivost Na-HA u vodenoj otopini bez i s (0.1 mM NaCl) dodanom soli, slika 3.18. I ovdje se ovisnost o koncentraciji gubi s dodavanjem soli, što bi ponovo navelo na zaklju-



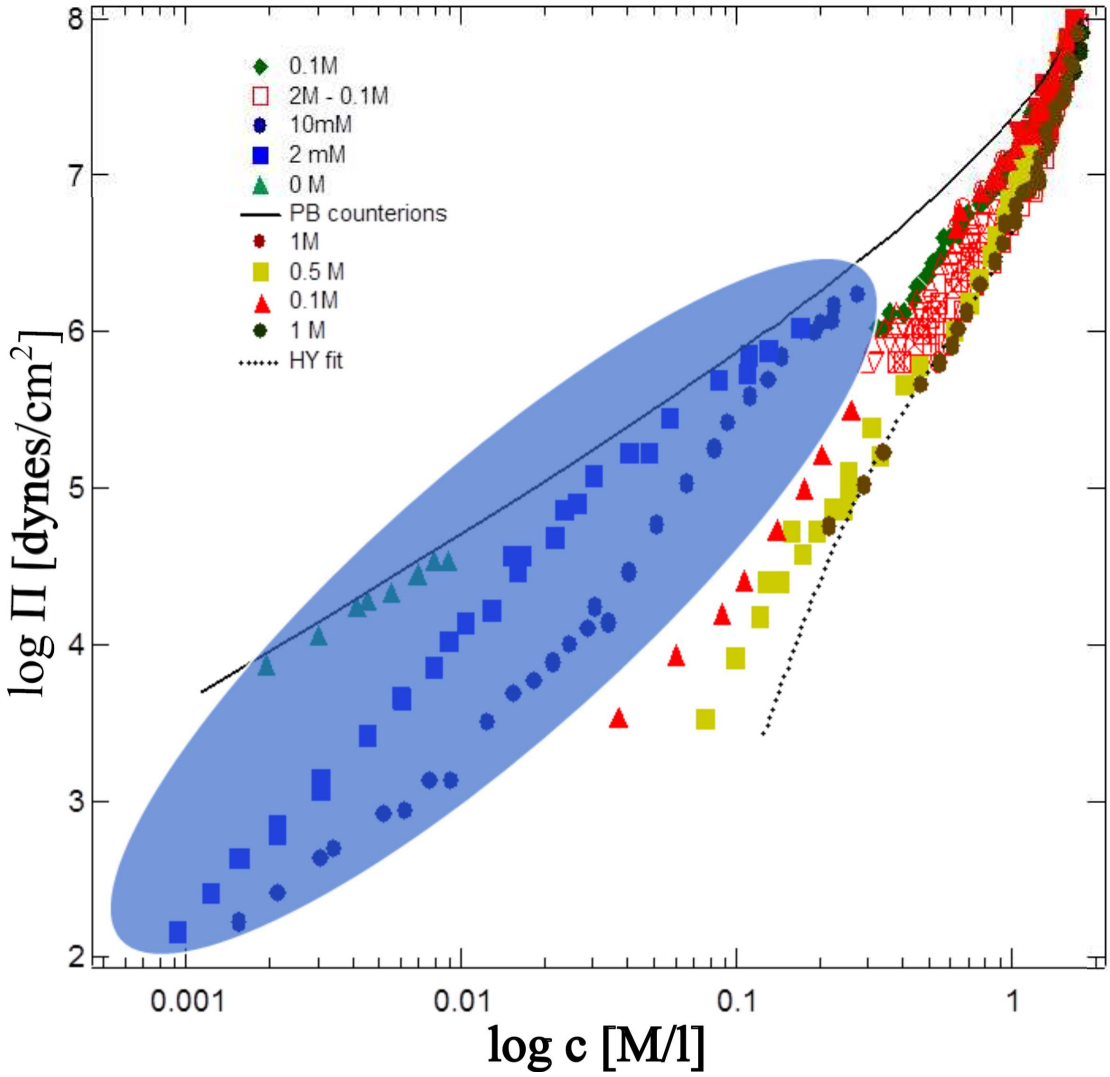
Slika 3.18: Koncentracijska ovisnost ekvivalentne vodljivosti Λ čistih vodenih (puni krugovi) te 0.1 mM NaCl (prazni krugovi) otopina NaDNA. Radi usporedbe dana je puna crta jednakog nagiba kao i za sve DNA uzorke nagiba koji iznosi 20% za promijenu koncentracije za faktor 10.

čak kako dodavanje soli potiskuje dekondenzaciju. No, HA je slabo nabijeni PE, linearne gustoće naboja niže od Manning kriterija za kondenzaciju, pa se koncept dekondenzacije ne bi trebao moći koristiti. Kao predmet diskusije ostaje pitanje javlja li se i kod slabih PE neka preraspodjela naboja koja mijenja udio protuiona koji sudjeluju u električnom transportu.

3.3 Osmotska mjerenja SAXS pristupom

Teorijski modeli koji opisuju potencijal poliiona i raspodjelu protuionske atmosfere [15, 20, 21, 56, 113, 114] uglavnom kao eksperimentalni test predviđaju ponašanje i iznos osmotskog tlaka. Odgovarajuće eksperimentalne studije usmjerene su na područje viših koncentracija od 1 mM, sve do 1 M. Na slici 3.19 prikazana je jednadžba stanja DNA, tj. ovisnost osmotskog tlaka o koncentraciji monomera te u ovisnosti o dodanoj soli. Jednadžba stanja DNA je dobro modelirana od strane Hansena i koautora [113] koji su rješavali nelinearnu PB jednadžbu za šuplji cilindrični poliion, konačnog radijusa (za razliku od Manning modela gdje je r=0) u osnovi, unaprijedili su Lifson-Katchalsky model i koristili mogućnosti dobivanja numeričkih rješenja.

Na koncentracijama višim od 0.5 M i poliion značajno doprinosi osmotskom tlaku [115], što se vidi i na slici 3.19 kao povećanje nagiba Π vs. c krivulja, prema ovisnosti Π $c^{9/4}$ koja se inače uočava za nenabijene polimere. Na nižim koncentracijama (rezultati označeni plavom elipsom na slici 3.19), doprinos poliiona je zanemariv te osmotski tlak reguliraju protuioni. Ovisnost osmotskog tlaka DNA u otopinama bez dodane soli je $\Pi \propto c^{9/8}$. Ovaj eksponent donekle iznena-



Slika 3.19: Ovisnost logaritma osmotskog tlaka o koncentraciji DNA, za različite ionske jakosti otopine. Podaci preuzeti iz [111, 116–118]

đuje budući da se u modelima koji studiraju Manning kondenzaciju ili općenito raspodjelu protuiona i predlažu test modela kroz mjerenja osmotskog tlaka, pretpostavlja uobičajena linearna ovisnost tlaka i broja slobodnih iona, kao, uostalom, i za vodljivost. Rezultate osmometrije i konduktometrije povezuje odnos između udjela slobodnih protuiona f, koji daje konduktometrija i osmotskog koeficijenta o. Veza ova dva parametra nažalost proizlazi samo iz različitih modela, pregled kojih možemo naći u radu Wandrey et al. [18]. Razlike unutar modela su zapravo unutar greške mjerenja obaju metoda i zasad nije moguće odrediti koji bi bio ispravan. Stoga smo slobodni koristiti vrijednost koju je dao Manning, dakle

$f = 2o$.

Naša istraživanja DS metodom i konduktometrijom usmjerena na koncentracije PE manje od 10 mM svakako su komplementarna studijama osmotskog tlaka, jer konduktometrijom smo istražili udio slobodnih protuiona do najnižih koncentracija, 0.01 mM.

No, odlučili smo izvesti i istraživanje u području viših koncentracija od 10 mM do 1M. Istraživali smo dvojnu otopinu NaDNA i Na-HA. Pronađeno je kako se DNA i HA komponente međusobno ne miješaju nego svaka vrsta poliiona zauzme svoj volumen prostora ($V = V^{\star}_{DNA} + V^{\star}_{HA}$) unutar kojeg je definirana odgovarajuća efektivna koncentracija $c^{\star}_{DNA}$, $c^{\star}_{HA}$. Eksperimentalni pristup je bio nekonvencionalan, tlak nismo mjerili već smo SAXS tehnikom dobivali veličine mreže PE te iz toga određivali lokalne koncentracije u HA i DNA poddomenama. Dakle, zapravo uspoređivali smo osmotski tlak dvaju PE u osmotskoj ravnoteži.

U cijelom istraživanom intervalu nominalnih koncentracija DNA i HA, pronađena je linearna veza efektivnih koncentracija poddomena tih dvaju pomiješanih PE:

$$c^{\star}_{HA} = \Gamma \times c^{\star}_{DNA} \tag{3.19}$$

gdje smo dobili $\Gamma = 0.85 \pm 0.04$. Na slici 3.20 su prikazane $c^{\star}_{HA}$ efektivne koncentracije HA poddomena u ovisnosti o $c^{\star}_{DNA}$ koncentraciji DNA poddomena koje su s njima bile u ravnoteži.

Dakle, osmotski tlakovi dvaju PE su u ravnoteži, a njihove koncentracije su proporcionalne. Nadalje, za jake polielektrolite, pa tako i DNA je već pokazana veza $\Pi/(RT) \propto c^{9/8}$ [113, 116, 119]. Iz ovih polazišnih pretpostavki možemo doći do jednadžbe stanja za HA, tj. ovisnosti $\Pi^{\star}_{HA}$ osmotskog tlaka o koncentraciji za ovaj slabi elektrolit:

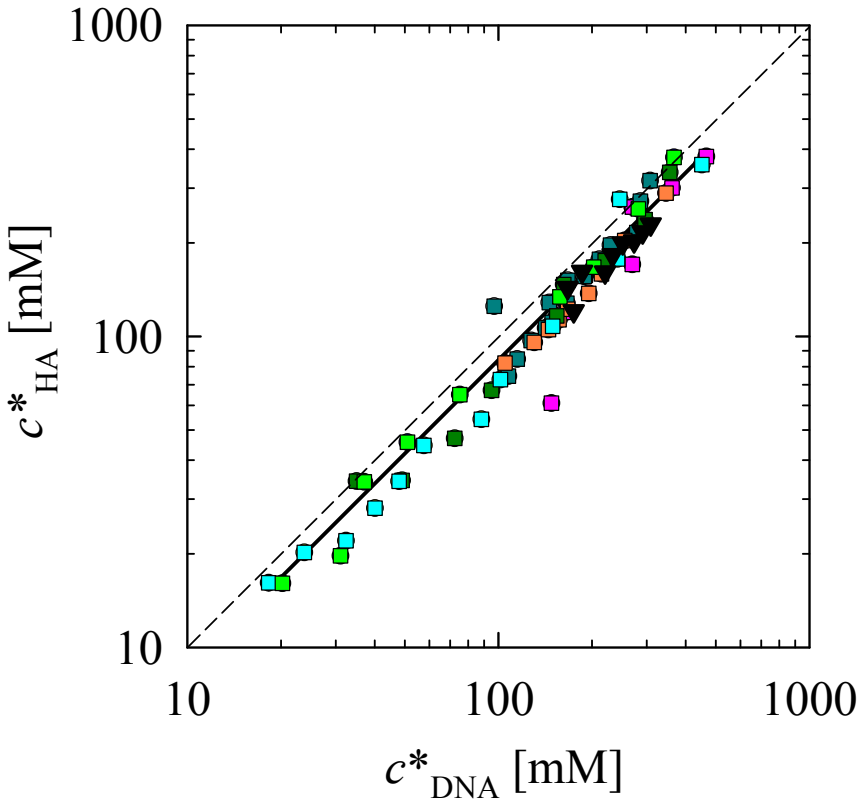
$$\Pi^{\star}_{DNA}/RT \propto (o_{DNA} 2c^{\star}_{DNA})^{9/8} \tag{3.20}$$

$$\Pi^{\star}_{HA}/RT \propto (o_{HA} c^{\star}_{HA})^{9/8} \tag{3.21}$$

iz čega dolazimo do omjera osmotskih koeficijenata dvaju PE

$$o_{DNA} = 0.42 o_{HA} \tag{3.22}$$

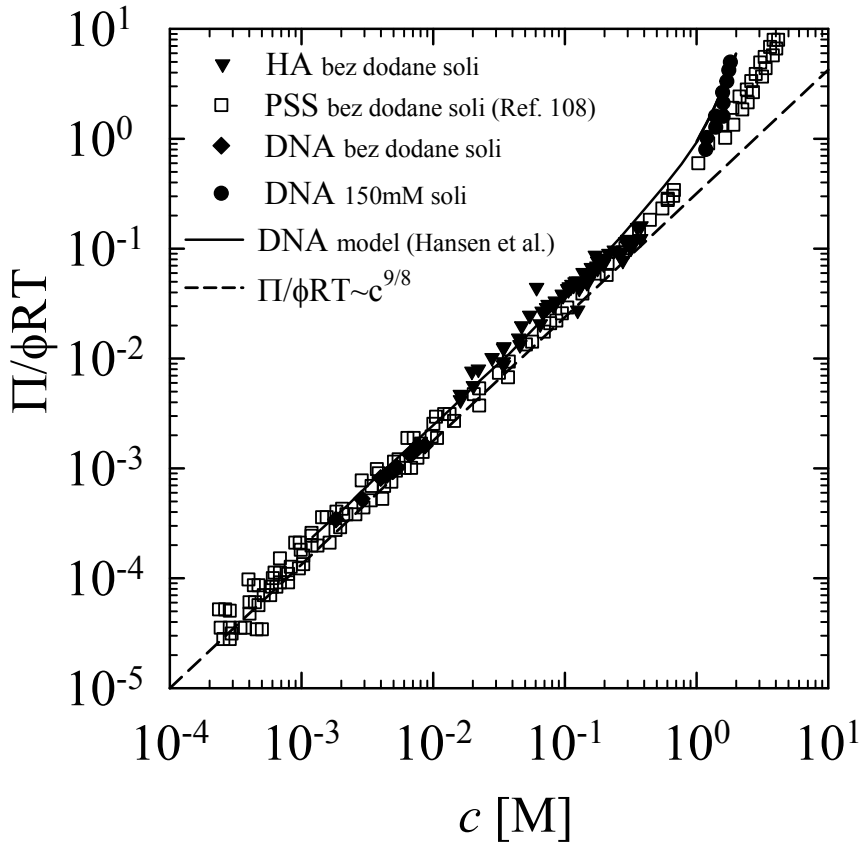
gdje smo koristili $c^{\star}_{DNA}/c^{\star}_{HA} = \Gamma = 0.85 \pm 0.04$. Za slabo nabijeni poliion kao što je HA, i LK model [15] i Manningov model [56] predviđaju slijedeći izraz za osmotski koeficijent $o_{HA} = 1 - 0.5\eta_{HA} = 0.64$. Iz toga slijedi $o_{DNA} = 0.28$ što je dvostruko veća vrijednost od one koju predviđa Manning $o_{DNA} = (2\eta)^{-1} = 0.12$ i vrlo blizu vrijednosti pronađene u radu Raspaud i suradnika $o_{DNA} = 0.22 - 0.24$. Upotrijebimo li ovakav udvostručeni osmotski koeficijent možemo, koristeći na slici 3.19 prikazane rezultate za DNA i rezultate za PSS iz rada [115] te naše rezultate



Slika 3.20: Usporedba efektivnih koncentracija monomera HA i DNA poddomena u njihovoj dvojnoj otopinu. Vidi Sl. 1.3 u Uvodu za prikaz otopine u polarizacijskoj mikroskopiji.

za HA, ustanoviti kako ista jednadžba stanja vrijedi za sva tri PE, slika 3.21. Ovime se dodatno utvrđuje dvostruka (u odnosu na Manning teoriju) vrijednost o za jake PE.

Na ovome mjestu važno je podsjetiti kako se u većini teorijskih razmatranja PE uzima da osmotski tlak skalira s eksponentom 9/8, tj. $\Pi \propto oc^{9/8}$, što i jest pokazano eksperimentalno. Istovremeno, konstatira se kako ovo skaliranje vrijedi u režimu gdje osmotski tlak reguliraju slobodni naboji - gdje bi onda skaliranje trebalo biti jednostavno, linearno $\Pi \propto o(c)c$. Komponenta $c^{1/8}$ dakle može ući u sklop koncentracijske ovisnosti osmotskog koeficijenta o(c). Kao primjer možemo uzeti rad Antypova i suradnika [21]. Oni su u sklopu jednog modela pokušali prikazati raspon od razrijeđenih do polurazrijeđenih PE. Ti autori su krenuli od uobičajenog koncepta gdje je ekvipotencijalna ploha razrijeđenih otopina sfera, a polurazrijeđenih valjak. Stoga će za otopine blizu granične koncentracije ekvipotencijalna ploha biti slična valjku. Optimizirani LK model Antypova i suradnika minimizacijom

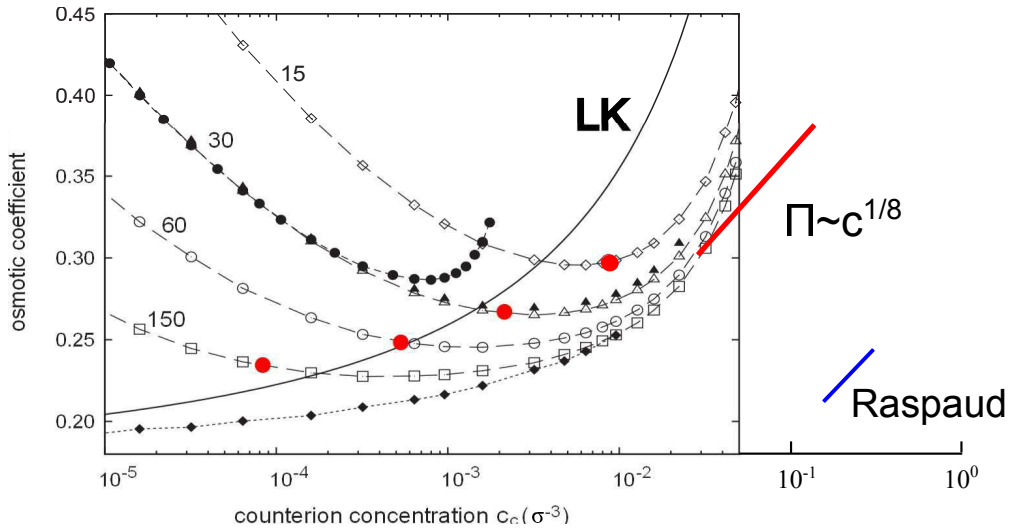


Slika 3.21: Jednadžba stanja za DNA, HA i PSS. Osmotski tlak je reskaliran osmotskim koeficijentom za dani PE, gdje je osmotski koeficijent jakih PE (DNA, PSS) dan s η^{-1}, tj. uzeta vrijednost je dvostruko veća od one predviđene Manningovom teorijom a za HA je uzeta vrijednost $1 - 0.5\eta$ [56], (η je Manningov parametar za PE).

slobodne energije pokušava odrediti optimalni radijus i visinu valjku. Time dolaze do modela ovisnosti osmotskog koeficijenta o veličini poliiona i koncentraciji.

U njihov prikaz, slika 3.22 sam unio i ponašanje osmotskog koeficijenta koje bi se baziralo na eksponentu 1/8. Iznos varira od 0.28 do 0.38, što je otprilike dvostruko od Manning koeficijenta 0.167 koji vrijedi za poliion koji su autori modelirali. Vidimo kako naše, iz eksperimenta izvedeno ponašanje s eksponentom 1/8, kvantitativno odgovara ponašanju koeficijenta o koje su autori teorijski predvidjeli. Također sam unio i vrijednosti koeficijenta o za DNA kojeg su eksperimentalno odredili Raspaud i suradnici [116], u relativno uskom području koncentracija. Taj koeficijent je, podsjećamo, dvostruko veći od Manning teorijske vrijednosti. Objašnjenje bi moglo biti u tome da su eksperimenti izvedeni na višim koncentracijama

za koje su Antypov i suradnici predvidjeli porast o iznad Manning vrijednosti. U ovome kontekstu, i naši rezultati za osmotski koeficijent DNA, također izvedeni na višim koncentracijama, a koji daju dvostruku vrijednost od Manningove, vjerojatno predstavljaju eksperimentalnu naznaku uspješnosti modela Antypova i suradnika, modela za konačne koncentracije, za razrijeđeni i polurazrijeđeni režim. Na kraju, primijetimo, koeficijenti koje smo mi dobili konduktometrijom bliski su Manningovim u blizini granične koncentracije, a sniženjem koncentracije rastu, što je također iskazano u modelu Antypov et al.



Slika 3.22: Koncentracijska ovisnost osmotskog koeficijenta jakog polielektrolita. Koncentracija protuiona je izražena u broju protuiona u volumenu. Otvoreni simboli su rezultat MC simulacije optimiziranog LK modela za polimere različite duljine $15 \leq N \leq 150$. Puni krugovi su rezultat simulacije sfernog ćelijskog modela za $N = 30$, a puni trokuti su rezultat MD simulacije. Puni dijamanti su rezultat MD simulacije beskonačno dugog poliiona, a puna crta je predikcija beskonačnog poliiona LK modela. Preuzeto iz [21]. Također sam dodao eksperimentalno prepoznatu ovisnost osmotskog koeficijenta s eksponentom 1/8 (crvena linija). Plava linija označava eksperimentalne vrijednosti osmotskog koeficijenta za DNA koje su dobili Raspaud et al.

4

Zaključak

Izvedena je studija dinamike polielektrolita, prvenstveno zasnovana na metodi dielektrične spektroskopije te na konduktometriji. Neki zaključci su izvedeni i iz mjerenja difuzijskog koeficijenta makroiona fluorescencijskom korelacijskom spektroskopijom (FCS) i mjerenjem raspršenja X-zraka u male kuteve (SAXS) kako bi se dobila veličina polielektrolitske mreže, tzv. de Gennes korelacijska duljina ξ. Modelni sustav bila je DNA, kratkih, monodisperznih fragmenata i dugačkih polidisperznih, u razrijeđenom i polurazrijeđenom režimu, s jednovalentnim Na^+ i dvovalentnim Mg^{2+} protuionima i s ili bez dodane jednostavne soli kao što je NaCl ili $MgCl_2$. Dielektričnom spektroskopijom (DS) smo pratili relaksaciju induciranog dipola oko poliiona u DNA polielektrolitu. Dipol se formira preraspodjelom protuionske atmosfere unutar onog područja u kojem protuioni osjećaju potencijal poliiona veći od kT (veći od "šuma" pozadine). DS metoda određuje relaksacijsko vrijeme dipola, koje preko Einsteinove difuzijske jednadžbe povezujemo s karakterističnom veličinom dipola. Time dobivamo izravnu informaciju o protežnosti protuionske atmosfere. Jedna je pretpostavka bila da se atmosfera proteže do polovice udaljenosti susjednih protuiona, te bi veličina dipola bila usporediva s veličinom poliionske mreže, zapravo de Gennes korelacijskom duljinom ξ. Druga je mogućnost bila kako se atmosfera proteže samo do Debye-Hückelove (DH) duljine zasjenjenja, κ^{-1}.

Primijetili smo da su vrijednosti dobivene DS metodom 2π puta manje od korelacijske duljine koja se određuje SAXS-om te posumnjali u najrašireniju interpretaciju. Međutim tek pomoću DS mjerenja DNA s dvovalentnim protuionima i u otopinama s dodanom soli smo mogli zaključiti da je karakteristična skala koju detektiramo DSom upravo veličina protuionske atmosfere koja je regulirana DH duljinom zasjenjenja κ^{-1}, a samo posredno korelacijskom duljinom. Naime, u uvjetima kada nije mijenjana koncentracija poliiona - bez promjene korelacijske duljine ξ, ali uz promjenu protuiona ili koncentracije dodane soli mijenjala

se je veličina karakteristične skalu koju detektiramo DSom. U polurazrijeđenim otopinama DNA bez dodane soli κ^{-1} i ξ imaju jednaku ovisnost o koncentraciji $\kappa \propto \xi \propto c^{-1/2}$, no κ^{-1} je 2π puta manja što ostavlja relativno veliki volumen PE otopine gdje je potencijal poliiona zanemariv iako ne isključuje mogućnost postojanja rezidualne koncentracije protuiona. Naime mjerenja DS metodom na razrijeđenim DNA otopinama daju skalu koja o koncentraciji PE ovisi s eksponentom 1/3, istovjetnim eksponentom koji se javlja u SAXS mjerenjima korelacijske duljine za razrijeđene otopine. Dakle, korelacijska duljina na neki način regulira protežnost protuionske atmosfere i za razrijeđene PE, iako je ta protežnost desetak puta manja od prosječnog razmaka poliiona, tj. karakteristična skala dobivena DS metodom je desetak puta manja od prosječne udaljenosti poliiona, koja se može dobiti sa SAXSom.

Ukratko, DS metoda mjeri protežnost protuionske atmosfere, koja se u polurazrijeđenim otopinama poklapa s DH duljinom κ^{-1}, dok je u razrijeđenim otopinama regulirana prosječnom udaljenošću poliiona.

Metodu konduktometrije smo iskoristili kako bismo istražili udio Manning slobodnih i kondenziranih poliiona u polielektrolitima. Istraživali smo i jako (DNA) i slabo (HA) nabijene PE (sa i bez Manning kondenzacije) te razrijeđene, monodisperzne (DNA) i polurazrijeđene, polidisperzne sustave (DNA, HA). Kod svih sustava bez dodane soli smo primijetili rast ekvivalentne vodljivosti Λ sa smanjenjem PE koncentracije c, dok je u sustavima s dodanom soli (različite, vrlo male koncentracije od 0.033-1 mM) Λ imala konstantnu vrijednost. Dakle, porast vodljivosti morao bi biti posljedica porasta udjela slobodnih naboja u otopini, a nije posljedica promjene konformacije (koja bi se mogla očekivati za dugačke, polidisperzne poliione).

Iz apsolutnog iznosa Λ, koji je za polielektrolite s dvovalentnim protuionima bio dvostruko manji, potvrdili smo valjanost primjene Manningovog modela, tj. kako samo slobodni naboji sudjeluju u vodljivosti. Naravno, sudjeluju i poliioni, ali naboja umanjenog za udio kondenziranih protuiona. Apsolutne vrijednosti udjela slobodnih naboja bile su vrlo bliske teorijskim predviđanjima, $f = 0.24$ za DNA s jednovalentnim protuionima i $f = 0.12$ za dvovalentne protuione. Ovdje je vrijedno napomenuti i kako je pri računanju DH duljine radi interpretacije rezultata DS metode korišten upravo ovdje potvrđeni model, tj. računali smo s teorijskim, a ovdje eksperimentalno potvrđenim vrijednostima. Upitno je u ovoj interpretaciji izvedenoj za DNA što se efekt porasta vodljivosti registrira i za HA u otopini bez dodane soli, iako je to sustav u kojem ne bi trebalo biti pojave (de)kondenzacije.

Osim u slučaju vodljivosti i u našim istraživanjima osmotskog tlaka primijetili smo da se slabo nabijeni poliion (HA) ponaša analogno kao i jako nabijeni (DNA), tj. jedna je moguća interpretacija uočenih svojstava bila promjena udjela slobodnih protuiona koji sudjeluju u stvaranju osmotskog tlaka (kao što su u gore navedenim scenarijima sudjelovali u vodljivosti sustava). Naime, pri istraživanju

dvojne otopine DNA i HA primijetili smo da im osmotski tlakovi Π jednako ovise o koncentraciji. Kako je za DNA, a i za polistiren sulfonat (još jedan jaki polielektrolit) prije ustanovljena ovisnost osmotskog tlaka $\Pi \propto c^{9/8}$ izlazi kako to onda vrijedi i za slabi PE, HA. Ovu je ovisnost fizikalno prihvatljivo interpretirati kao koncentracijski ovisan osmotski koeficijent $\Pi/c = \phi c^{1/8} = \phi(c)$. No, koncentracijska ovisnost osmotskog koeficijenta ukazuje na varijaciju udjela slobodnih protuiona - što je naravno upitno za HA, slabi PE, gdje bi svi naboji nominalno trebali biti slobodni.

Na kraju, naglasio bih kako smo u studiji DS metodom i konduktometrijom NaDNA uzoraka primijetili potpis denaturacije DNA - dakle studijom dinamike sustava smo dobili informacije i o strukturi makromolekule. Ovime smo bolje razumjeli mehanizam denaturacije snižavanjem koncentracije DNA. Snižavanjem koncentracije dolazi do dekondenzacije protuiona, a to znači da su odbojne interakcije fosfatnih skupina na DNA lancima slabije zasjenjene - povećava se Coulombsko odbijanje i elektrostatski doprinos slobodnoj energiji. Posljedično dolazi do razdvajanja lanaca DNA, a energija novonastaloga sustava dodatno opada jer je linearna gustoća jednolančane DNA više nego dvostruko niža u usporedbi s dvolančanom te dolazi i do daljnje dekondenzacije protuiona.

Ukratko, istraživanjima dinamike polielektrolita pružili smo nova saznanja o elementima strukture tih sustava: protežnosti protuionske atmosfere, raspodjeli slobodnih i Manning kondenziranih naboja, mehanizmu i uvjetima denaturacije (razdvajanja) dvolančane DNA.

Literatura

[1] S. A. Sukhishvili, E. Kharlampieva, V. Izumrudov *Macromolecules*, **39**, 8873-8881. (2006)

[2] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, J. A. Schloss *Nature Biotechnology*, **26**, 1146-1153. (2008)

[3] A. Buxboim, S. S. Daube, R. Bar-Ziv *Nano Lett.*, **9**, 909-913. (2009)

[4] D. Bracha, E. Karzbruna, G. Shemera, P. A. Pincus, R. Bar-Ziv *PNAS*, **110**, 4534-8. (2013)

[5] K. K. Ewert, A. Zidovska, A. Ahmad, N. F. Bouxsein, H. M. Evans, C. S. McAllister, C. E. Samuel, C. R. Safinya *Top Curr. Chem.*, **296**, 191. (2010)

[6] B. Jinhao, B. Sebastian, T. S. Yein, T. Dieter *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **3**, 1665-1674. (2011)

[7] C. A. Merchant, M. Drndić *Methods Mol. Biol.*, **870**, 211. (2012)

[8] G. S. Manning, *The Journal of Chemical Physics*, **51**, 924 (1969)

[9] F. Oosawa, *Polyelectrolytes*, Marcel Dekker, New York (1971)

[10] W. Kern, *Z. Physik. Chemie.*, **A181**, 249 (1938); W. Kern, *Z. Physik. Chemie.*, **A184**, 197 (1939)

[11] M. Nagasawa, I. Kagawa, *J. Polymer Sci.* **25**, 61, (1957)

[12] Z. Alexandrowicz, *J. Polymer Sci.*, **40**, 91, (1959); Z. Alexandrowicz, *J. Polymer Sci.*, **43**, 337, (1960)

[13] C. Wandrey, *Langmuir*, **15**, 4069 (1999)

[14] R.M. Fuoss, A. Katchalsky, S. Lifson *Chemistry*, **37**, 579-589. (1951)

[15] S. Lifson, A. Katchalsky *Journal of Polymer Science*, **13**, 43-55. (1954)

[16] F. Oosawa, *J. Polym. Sci.*, **23**, 421, (1957)

[17] G. S. Manning, *Biophysical Chemistry*, **7**, 95, (1977)

[18] C. Wandrey, D. Hunkeler, U. Wendler, W. Jaeger, *Macromolecules*, **33**, 7136, (2000)

[19] T. Vuletić, S. Dolanski Babić, D. Grgičin, D. Aumiler, J. Radler, F. Livolant, S. Tomić, *Phys. Rev. E*, **83**, 041803, (2011)

[20] A. Deshkovski, S. Obukhov, M. Rubinstein, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 2341, (2001)

[21] D. Antypov, C. Holm, *Phys. Rev. Lett.*, **96**, 0883021, (2006)

[22] R. R. Netz, *J. Phys. Chem. B*, bf 107, 8208 (2003)

[23] S. Fischer, R.R. Netz, *Eur. Phys. J. E*, bf 36, 117 (2013)

[24] A. Einstein, *Annalen der Physik*, **17**, 549, (1905)

[25] K. Ito, A. Yagi, N. Ookubo, R. Hayakawa, *Macromolecules*, **23**, 857, (1990)

[26] S. Tomić, T. Vuletić, S. Dolanski Babić, S. Krča, D. Ivanković, L. Griparić, R. Podgornik, *Physical Review Letters*, **97** 098303 (2006)

[27] S. Tomić, S. Dolanski Babić, S. Krča, D. Ivanković, L. Griparić, R. Podgornik, *Physical Review E*, **75**, 021905 (2007)

[28] S. Tomić, S. Dolanski Babić, T. Ivek, T. Vuletić, S. Krča, F. Livolant, R. Podgornik, *Europhysics Letters*, **81** 68003 (2008)

[29] P. de Gennes, P. Pincus, R. M. Velasco, F. Brochard, *Journal de Physique*, **37**, 1461 (1976)

[30] K. Salamon, D. Aumiler, G. Pabst, T. Vuletić, *Macromolecules*, **46**, 1107 (2013)

[31] A. V.Dobrynin, M. Rubinstein *Prog. Polym. Sci.*, **30**, 1049-1118. (2005)

[32] G. S. Manning, *J. Phys. Chem.*, **79**, 262, (1975)

[33] D. Grgičin, *Električna vodljivost vodenih otopina natrijeve soli hijaluronske kiseline*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, (2009)

[34] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot, H. Garcia *Physical Biology of the Cell*, Garland Science, New York (2012)

[35] W. C. K. Poon, D. Andelman, *Soft Condensed Matter Physics in Molecular and Cell Biology*, Taylor & Francis, Ney York, London, (2006)

[36] G. C. L. Wong, L. Pollack, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **61**, 171 (2010)

[37] D. J. Needleman, M. A. Ojeda-Lopez, U. Raviv, H. P. Miller, L. Wilson, C. R. Safina, *PNAS*, **101**, 16099, (2004)

[38] T. E. Angelini, H. Liang, W. Wriggers, G. C. L. Wong, *PNAS*, **100**, 8634, (2003)

[39] G. H Lai i suradnici, *Phys. Rev. Lett.*, **101**, 218303 (2008)

[40] A. Leforestier, F. Livolant, *PNAS*, **109**, 9157, (2009)

[41] Ida Delač Marion, D. Grgičin, K. Salamon, S. Bernstorff, T. Vuletić, *Macromolecules*, **48**, 2286, (2015)

[42] R. Thomas, *Trans. Faraday Soc.*, **50**, 304, (1954)

[43] M. T. Record, *Biopolymers*, **14**, 2137 (1975)

[44] B. A. Pierce, *Genetics. A Conceptual Approach*, Freeman & Company, drugo izdanje (2004)

[45] E. Raspaud, I. Chaperon, A. Leforestier, F. Livolant, *Biophysical Journal*, **77**, 1547, (1999)

[46] N. V. Hud, I. D. Vilfan, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 295, (2005)

[47] A. Naji, M. Kanduč, R. R. Netz, R. Podgornik u *Understanding Soft Condensed Matter via Modeling and Computation*, editori W. B. Hu, A. C. Shi, World Scientific, Singapore, (2010)

[48] R. Zhang, B. I. Shklovski, *Physica A*, **352**, 216 (2005)

[49] F. Cesare Marincola, M. Casu, G. Saba, C. Manetti, A. Lai, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**, 2425, (2000)

[50] Y. Bai, M. Greenfeld, K. J. Travers, V. B. Chu, J. Lipfert, S. Doniach, Daniel Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14981, (2007)

[51] V.A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Jr. Tinocco *Nucleic Acids*, University Science Books, Sausalito (2000)

[52] J.R.C. van der Maarel *Introduction to biopolymer physics*, World Scientific, Singapore (2007)

[53] D. Grgičin, S. Dolanski Babić, T. Ivek, S. Tomić, *Phys. Rev. E* bf 88, 052703 (2013)

[54] D. R. Lide, **CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88 edition** CRC Press, Boca Raton (2007).

[55] A. Katchalsky *Biophysics and other topics*, Academic Press, New York, (1976)

[56] G. S. Manning, *Quarterly reviews of biophysics*, **11** 179, (1978)

[57] D. Stigter, *Biophysical Journal*, **69**, 380, (1995)

[58] A. Schmitt, J. P. Meullenet, R. Varoqui, *Biopolymers*, **17**, 413, (1978)

[59] G. S. Manning, *J. Phys. Chem.*, **85**, 1506, (1981)

[60] F. Bordi, C. Cametti, R. H. Colby, *J. Phys.: Condens. Matter*, **16** R1423, (2004)

[61] J. K. Kirkwood, J. Riesman, *J. Chem. Phys.*, **16**, 565, (1948)

[62] J. G. Kirkwood, *J. Polymer. Sci.*, **12**, 1 (1954)

[63] C. Cametti, *Polymers*, **6**, 1207, (2014)

[64] A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, *Macromolecules*, **34** (1964)

[65] M. Rubinstein, R. H. Colby, A. V. Dobrynin *Phys. Rev. Lett.*, **73** 2776 (1994)

[66] A. V. Dobrynin, R. H. Colby, M. Rubinstein, *Macromolecules*, **28**, 1859 (1995);

[67] A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, *Macromolecules*, **32**, 915 (1999)

[68] T. Odijk, *Macromolecules*, **12**, 688, (1979)

[69] R. B. Inman, D. O. Jordan, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 421, (1960)

[70] J. Szymczak, P. Holyk, P. Ander, *J. Phys. Chem.*, **79**, 269, (1975)

[71] J. C. T. Kwak R.C. Hayes, *J. Phys. Chem.*, **79**, 265, (1975)

[72] M. Sakamoto, H. Kanada, R. Hayakawa, Y. Wada, *Biopolymers*, **15**, 879 (1976)

[73] T. Vreugdenhil, F. van der Touw, M. Mandel, *Biophysical chemistry*, **10**, 67, (1979)

[74] S. Takashima, C. Gabriel, R. J. Sheppard, E. H. Grant, *Biophys. J.*, **46**, 29, (1984)

[75] B. Saif, R. K. Mohr, C. J. Montrose, T. A. litovitz, *Biopolymers*, **31**, 1171 (1991)

[76] R. S. Lee, S. Bone, *Biochimica et Biophysics Acta*, bf 1397, 316, (1998)

[77] C. Gabriel, E. Grant, *Bioelectromagnetics*, **20**, 40, (1999)

[78] D. J. Bakewell, I. Ermolina, H. Morgan, J. Milner, Y. Feldman, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1493**, 151, (2000)

[79] S. Omori, Y. Katsumoto, A. Yasuda, K. Asami, *Physical Review E*, **73**, 0509011, (2006)

[80] Y. Katsumoto, S. Omori, D. Yamamoto, A. Yasudu, *Physical Review E*, **75**, 011911, (2007)

[81] E. Ermilova, F. F. Bier, R. Hölzel, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 11256, (2014)

[82] G. S. Manning, J. Ray, *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, **16**, 461, (1998)

[83] J. Ray, G.S. Manning, *Macromolecules*, **32**, 4588 (1999)

[84] M. Quesada-Pérez, E. González-Tovar, A. Martín-Molina, M. Lozada-Cassou, R. Hidalgo-Álvarez, *ChemPhysChem*, **4**, 234, (2003)

[85] C. F. Anderson, M. T. Record, P. A. Hart, *Biophysical Chemistry*, **7**, 301 (1978)

[86] R. Das, T. T. Mills, L. W. Kwok, G. S. Maskel, I. S. Millett, S Doniach, K. D. Finkelstein, D. Herschlag, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **90**, 188103, (2003)

[87] K. Andresen, R. Das, H.Y. Park, H. Smith, L. W. Kwok, J. S. Lamb, E. J. Kirkland, D. Herschlag, K. D. Finkelstein, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 248103, (2004)

[88] K. Andresen et al, *Physical Review Letter*, **93**, 2481031 (2004)

[89] X. Qui, L. W. Kwok, H. Yoon Park, J. S. Lamb, K. Andresen, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **96**, 138101, (2006)

[90] X. Qui, K. Andresen, L. W. Kwok, J. S. Lamb, H. Yoon Park, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **99**, 038104, (2007)

[91] X. Qui, K. Andresen, J. S. Lamb, L. W. Kwok, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **101**, 228101, (2008)

[92] L.L. Suzette, A. Pabit, S. P. Meisburger, L. Pollack, *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 108101, (2011)

[93] R. Das, K. J. Travers, Y. Bai, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8272, (2005)

[94] P. Spegt, G. Weill, *Biophys. Chem.*, **4**, 143, (1976)

[95] C. F. Anderson, M. T. Record, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 423, (1990)

[96] J. Skerjanc, U. P. Strauss, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3081, (1968)

[97] J. Reuben, M. Shporer, E. J. Gabbay, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 245, (1975)

[98] D. Pörschke, *Biophysical Chemistry*, bf 4, 383, (1976)

[99] J. Lipfert, S. Doniach, R. Das, D. Herschlag, *Annu. Rev. Biochem*, **83**, 19.1, (2014)

[100] Sanja Dolanski Babić, **Električna i dielektrična svojstva vodenih otopina genomske deoksiribonukleinske kiseline**, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2008)

[101] J. Baker-Jarvis, C. A. Jones, B. Riddle, **Electrical Propertis and Dielectric Relaxation of DNA in Solution**, NIST Technical Note 1509 (NIST, Boulder, Colorado, 1998.)

[102] T. Vuletić, S. Dolanski Babić, T. Ivek, D. Grgičin, S. Tomić, R. Podgornik, *Phys. Rev. E*, **82**, 011922, (2010)

[103] T. Odijk, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **15**, 477 (1977)

[104] J. Skolnick, M. Fixman, *Macromolecules*, **10**, 944 (1977)

[105] G. S. Manning, *Soft Matter*, **10**, 3738, (2014)

[106] A. Brunet, C. Tardin, L. Salome, P. Rousseau, N. Destainville, M. Manghi, *Macromolecules*, **48**, 3641, (2015)

[107] D. Baigl, R. Ober, D. Qu, A. Fery, C. E. Williams, *Europhys. Lett.*, **62**, 588, (2003)

[108] L. Wang, V. A. Bloomfield, *Macromolecules*, **23**, 804, (1990)

[109] A. Bonincontro, E. Bultrini, G. Onori, G. Risuleo, *Journal of Non-Crstalline Solids*, **307-310**, 863, (2002)

[110] N. Yoshida, *J. Chem. Phys.*, **69**, 4867 (1978), N. Yoshida, *Chemical Physical Letters*, **90**, 207, (1982)

[111] H. E. Auer, Z. Alexandrowicz, *Biopolymers*, **8**, 1, (1969)

[112] D. Vurnek, **Manning kondenzacija na DNK fragmentima sa monovalentnim i divalentnim protuionima**, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu (2012)

[113] P. L. Hansen, R. Podgornik, V. A. Parsegian, *Phys. Rev. E*, **64**, 0219071, (2001)

[114] Q. Liao, A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, *Macromolecules*, **36**, 3399, (2003)

[115] L. Wang, V. A. Bloomfield, *Macromolecules*, **24**, 5791, (1991)

[116] E. Raspaud, M. de Conceicao, F. Livolant, *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 2533, (2000)

[117] H. H. Strey, V. A. Parsegian, R. Podgornik, *Phys. Rev. E*, **59**, 999, (1999)

[118] R. Podgornik, D. C. Rau, V. A. Parsegian, *Macromolecules 1989*, **22**, 1780, (1989)

[119] W. Essafi, F. Lafuma, D. Baigl, C. E. Williams, *Eur. Phys. Lett.*, **71**, 938, (2005)

Životopis

Danijel Grgičin rođen je 1985. godine u Zagrebu. Završio je prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Lucijan Vranjanin“ u Zagrebu te 2003. godine upisao inženjerski smjer fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pod mentorstvom dr. sc. Silvije Tomić diplomirao je 2009. godine na temu "Električna vodljivost vodenih otopina natrijeve soli hijaluronske kiseline". Od 2010. godine radi kao znanstveni novak na Institutu za fiziku u Zagrebu a 2011. godine je upisao doktorski studij biofizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, na kojem je i sudjelovao u nastavi na kolegijima Napredni fizički praktikum 1 i Napredni fizički praktikum 2. Kao autor ili koautor objavio je 6 radova u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents, te usmeno ili u obliku postera izvještavao na desetak konferencija.

Popis objavljenih zananstvanih radova

7. I. Delač Marion, D. Grgičin, K. Salamon, S. Bernstorff, T. Vuletić,
   Polyelectrolyte Composite: Hyaluronic Acid Mixture with DNA,
   Macromolecules, **48**, 2286, (2015)

6. D. Grgičin, S. Dolanski Babić, T. Ivek, S. Tomić,
   Effect of magnesium ions on dielectric relaxation in semidilute DNA aqueous solutions,
   Phys. Rev. E., **88**, 052703, (2013)

5. S. Tomić, D. Grgičin, T. Ivek, T. Vuletić, S. Dolanski Babić, R. Podgornik,
   Dynamics and structure of biopolyelectrolytes in repulsion regime characterized by dielectric spectroscopy,
   Physica B: Condensed matter, **407**, 1958, (2013)

4. S. Tomić, D. Grgičin, T. Vuletić, S. Dolanski Babić, T. Ivek, R. Podgornik,
   DNA in Aqueous Solutions with Repulsive Interactions : Structure Determined on the Basis of Dielectric Spectroscopy Measurements
   Bioinformatics and biological physics : proceedings of the scientific meeting / urednik:V. Paar, Zagreb : Croatian Academy of Sciences and Arts, 159, (2013)

3. S. Tomić, D. Grgičin, T. Ivek, S. Dolanski Babić, T. Vuletić, G. Pabst, R. Podgornik,
   Dynamics and Structure of Biopolyelectrolytes Characterized by Dielectric Spectroscopy,
   Macromol. Symp., **305**, 43, (2011)

2. T. Vuletić, S. Dolanski Babić, D. Grgičin, D. Aumiler, J. Rädler, F. Livolant, S. Tomić,
   Manning free counterion fraction for a rodlike polyion: Aqueous solutions of short DNA fragments in presence of very low added salt,
   Phys. Rev. E, **83**, 041803, (2011)

1. T. Vuletić, S. Dolanski Babić, T. Ivek, D. Grgičin, S. Tomić,
   Structure and dynamics of hyaluronic acid semidilute solutions: A dielectric spectroscopy study,
   Phys. Rev. E., **82**, 011922 (2010)