

KANDIDAATINTUTKIELMA

# DNA-molekyylin sähkönjohtavuusmittaukset

Teemu Parviainen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO  
Fysiikan laitos  
Maaliskuu 2012



# Sisältö

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Lähtökohdat</b>	<b>2</b>
2.1	DNA-molekyylin rakenne . . . . .	3
2.1.1	Yksijuosteinen DNA (ssDNA) . . . . .	3
2.1.2	DNA-kaksoisjuoste (dsDNA) . . . . .	3
2.1.3	Muut juosterakenteet . . . . .	5
<b>3</b>	<b>Sähkönjohtavuusmittaukset</b>	<b>7</b>
3.1	Epäsuorat mittaukset . . . . .	7
3.2	Suorat mittaukset . . . . .	15
<b>4</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>28</b>



# 1 Johdanto

DNA-molekyylien sähkönjohtavuus on askarruttanut tutkijoita jo usean vuosikymmenen ajan. Periaatteessa DNA-molekyylin sähköiset mittaukset eivät eroa mitenkään minkä tahansa sähkökomponenttien mittauksesta. Useat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että hyvin monet parametrit mittausjärjestelyissä vaikuttavat saatuihin tuloksiin merkittävästi, joten mitään yksiselitteistä vastausta DNA:n sähkönjohtavuuteen ei ole saatu. Tämä opinnäyte keskittyykin näissä erityyppisissä mittauksissa käytettyjen mittausjärjestelyjen tarkasteluun ja saatuihin tuloksiin.

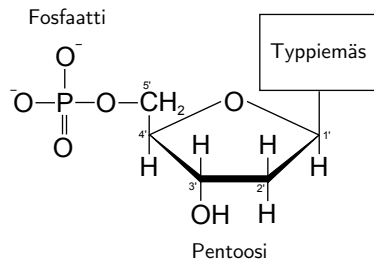
## 2 Lähtökohdat

Motivaatio DNA-molekyylien sähkönjohtavuuden tutkimiselle voidaan johtaa ainakin puolijohdeteollisuuden tarpeista. Mikropiirien kehitys on ollut valtavaa siitä lähtien, kun niitä alettiin käyttää. Tätä kehitystä voidaan kuvata niin sanotun Mooren lain avulla, jonka mukaan kaupallisten mikropiirien sisältämien transistorien määrä kaksinkertaistuu kahdessa vuodessa. Suorittimien prosessointiteho ja muistiyksiköiden kapasiteetti ovat suoraan verrannollisia tähän kehitykseen, ja kuluttajien saataville onkin tullut entistä huokeampia, suorituskykyisempiä ja pienempiä laitteita, joihin jonkinasteinen mikropiiri on sisäänrakennettuna.

Tähän mennessä puolijohdeteollisuuden käyttämä tekniikka komponenttien valmistamiseen on pohjautunut optiseen litografiaan, missä valotukseen käytetyn valon aallonpituus vaikuttaa suuresti pienimpään mahdolliseen piirteiden viivanleveyteen. Tällä hetkellä käytettäessä valotuksessa 193 nm:n ultravioletivaloa päästään viivanleveydessä hieman alle 50 nm:n kokoluokkaan. Aallonpituutta ei voida kuitenkaan loputtomiin pienentää, sillä pienet aallonpituudet absorboituvat hyvin voimakkaasti väliaineeseen. Joitakin parannuksia, joilla viivanleveyttä voitaisiin vieläkin kaventaa, on kehitteillä [1], mutta on eri asia, saadaanko nämä tekniikat tarpeeksi luotettaviksi ja kustannustehokkaiksi teollisuuden tarpeisiin. Optisen litografian rajat ovat siis joka tapauksessa jo näkyvissä, joten motivaatio vaihtoehtoisten tekniikoiden kehittämiseksi on suuri.

Eräs ehdotus mikropiirien piirteiden pienentämiseksi perustuisi hiilinanoputkien käyttämiseen. Hiilinanoputken sähköiset ominaisuudet kuitenkin vaihtelevat suuresti riippuen sen niin sanotusta kierteisyydestä. Tätä ominaisuutta ei ole vielä valmistusprosesseissa kyetty hallitsemaan tarpeeksi hyvin ainakaan laajasti, joten suhteellisen helposti ja varmasti valmistettavat DNA-rakenteet olisivat erinomainen vaihtoehto nanokomponenttien perustaksi. DNA:n suurenä etuna olisi nimittäin sen itsejärjestyvyys, mikä mahdollistaisi hyvinkin monimutkaisten komponenttien luotettavan valmistamisen myös teollisuuden vaatimassa laajuudessa. Selvittämättä yhä kuitenkin on, soveltuuko DNA-ketju sähkönjohtavuutensa puolesta elektronisten komponenttien valmistukseen.

Vaikka tutkimusta DNA-molekyylin sähkönjohtavuuden saralla on tehty jo useita vuosikymmeniä, tuloksista on kyetty tekemään hyvin vähän varmoja johtopäätöksiä. Tuloksia on saatu laidasta laitaan, sillä niin eristeille, puolijohdeille kuin johteillekin tyypillistä käyttäytymistä on havaittu. Mittausasetelmat ja käytettyjen DNA-molekyylien rakenne ovat kuitenkin vaihdelleet, joten erot selittyvät näillä parametreilla. Tässä tutkielmassa pyritään esittelemään teh-



**Kuva 2.1.** Yksittäinen nukleotidi koostuu fosfaatti-, sokeri- sekä emäsosasta. DNA:n tapauksessa sokeriosa on 2'-deoksi-D-riboosi, kun taas RNA:ssa sokerina on D-riboosi. Erona esitettyyn kuvaan D-riboosissa on 2'-hiileen sitoutuneen alaspäin osoittavan H-atomin tilalla sitoutuneena reaktiivinen OH-ryhmä. Tämä on syy siihen, miksi DNA-molekyyli on huomattavasti vakaampi rakenne RNA-molekyyliin verrattuna.

tyjä mittauksia sekä vertaamaan saatuja tuloksia keskenään.

## 2.1 DNA-molekyylin rakenne

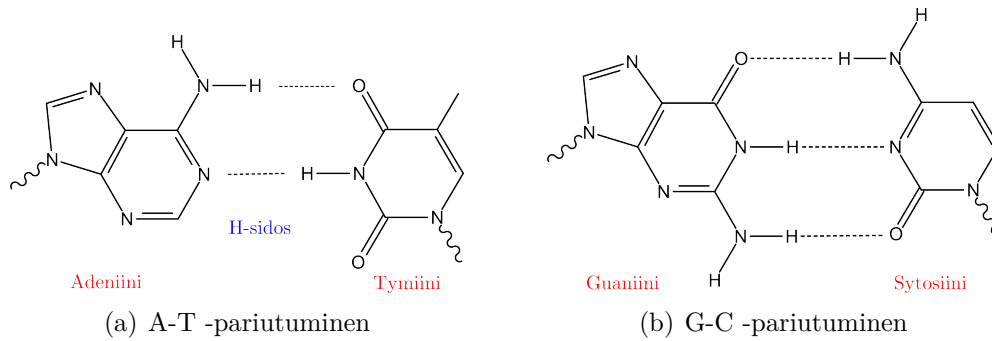
### 2.1.1 Yksijuosteinen DNA (ssDNA)

DNA eli deoksiribonukleiinihappo on yksi elämän peruselementeistä, joka sisältää kaikkien eliöiden sekä joidenkin virusten proteiinien tuottamiseen tarvittavan informaation. Tämä tieto on varastoituneena yksittäisten rakennuspalikoiden tiettyyn järjestykseen DNA-juosteessa. Nämä rakennuspalikat ovat nimeltään nukleotidejä. Kunkin nukleotidin rungon muodostavat syklinen 2'-deoksi-D-riboosisokeri sekä fosfaattiryhmä  $\text{PO}_4^{2-}$ . Sokeriosan 3'-hiilen OH-ryhmä voi muodostaa fosforiesterisidoksen reagoimalla toisen nukleotidin fosfaattiryhmän kanssa, jolloin muodostuu yksijuosteisen DNA:n runko. Koska fosfaattiryhmä on kiinnittynyt sokeriosan 5'-hiileen, voidaan juosteen päät erottaa toisistaan puhumalla 3'- ja 5'-päistä. Yksittäisen nukleotidin rakenne on esitetty kuvassa 2.1.

Kunkin nukleotidin sokeriin on kovalenttisesti sitoutunut lisäksi myös aromaattinen typpiämäsosa, joita on DNA:sta puhuttaessa neljä erilaista: puriinit adeniini (A) ja guaniini (G) sekä pyrimidiinit tymiini (T) ja sytosiini (C). Juuri näiden emäsosien järjestykseen yksijuosteisessa DNA-ketjussa on koodattuna tieto proteiinien rakenteesta. Tämä järjestys muodostaa DNA-molekyylin primäärisen rakenteen.

### 2.1.2 DNA-kaksoisjuoste (dsDNA)

DNA-molekyylin toiminnan kannalta ratkaisevaa on, että nukleotidien emäsosat pystyvät muodostamaan keskenään vetysidoksia. Emäkset eivät kuitenkaan pariudu sattumanvaraisesti, vaan adeniini pariutuu aina tymiinin kanssa ja vastaavasti guaniini sytosiinin kanssa kuvien 2.2(a) ja 2.2(b) mukaisesti. Tätä kutsutaan löytäjiensä mukaan Watson–Crick-pariutumiseksi [2]. DNA ei



**Kuva 2.2.** Emäsparien väliset vetysidokset ovat keskeisimmät DNA-molekyylin sisäiset vuorovaikutukset. G-C -pariutuminen sisältää kolme vetysidosta kun taas A-T pariutuminen vain kaksi, joten se on näistä kahdesta voimakkaampi.

yleensä esiinnykään eliöissä yksijuosteisena, vaan juosteen kanssa pariutuneena on sen vastinjuoste, jonka suunta on päinvastainen alkuperäiseen juosteeseen nähden. Siten DNA-molekyylin koostuu itse asiassa kahdesta erillisestä polymeeriketjusta. Koska juosteiden väliset vetysidokset ovat suhteellisen helposti purettavissa, voidaan juosteet erottaa solussa toisistaan helposti emäsjärjestyksen lukua ja proteiinien tuottamista varten.

Nukleotidien välillä vaikuttaa vetysidosten lisäksi toinenkin DNA-molekyylin rakenteeseen vaikuttava voima. Emäsosat ajautuvat nimittäin mahdollisimman lähelle toisiaan  $\pi$ - $\pi$ -pinoutumisvuorovaikutuksen seurauksena, mikä on tyypillinen attraktiivinen voima aromaattisille renkailla. Emäsosien vuorovaikutukset ympäröivän liuottimenä toimivan aineen kanssa pyrkivät minimoitumaan, jolloin emäkset pinoutuvat kahden juosteen keskelle ja muodostuu helikaalinen rakenne. Riippuen ympäristön olosuhteista ja eri nukleinihappoemästen lukumäärien keskinäisistä suhteista kaksoisjuosteen kierteen ominaisuudet voivat kuitenkin vaihdella. Kuvassa 2.3 on esitetty A-, B- ja Z-DNA-konformaatiot, jotka ovat kolme parhaiten tunnettua muotoa. Näistä B- ja Z-muotoja on havaittu elävissä organismeissa, ja näistä B-muoto on yleisin. Näitä muotoja erottavat mm. kierteen kulma keskiakseliin nähden, leveys sekä emästen etäisyys toisistaan. [2]

### 2.1.3 Muut juosterakenteet

Pelkästään juosteen emässekvenssistä riippuvaisia rakenteita on useita. Esimerkiksi mikäli juosteessa on monen adeniinin ketju, tulee juosteeseen taipuma. Ns. palindromisekvenssit voivat puolestaan muodostaa eräänlaisen ristimäisen rakenteen keskelle kaksijuosteista DNA:ta kuvan 2.4 mukaisesti. Solussa nämä rakenteet voivat toimia mm. proteiinien kiinnittymiskohtina eliön toimintojen säätelyä varten. [2]

DNA-rakenteet voivat koostua myös joissain tapauksissa useammastikin kuin kahdesta ss-DNA-juosteesta. Puriinit (A- ja G-emäkset) voivat nimittäin





muodostaa normaalin Watson–Crick-sidoksen lisäksi ns. Hoogsteenin emäsparin. Esimerkiksi T-A-pariin voi sitoutua joko ylimääräinen A- tai T-emäs, jolloin muodostuneista tripleteistä voidaan käyttää merkintöjä TA\*A ja TA\*T. Samoin tripletit CG\*G sekä CG\*C<sup>+</sup>, missä ylimääräinen C-emäs on protonoituneena, ovat mahdollisia. Näin voi muodostua kolmesta DNA-juosteesta koostuva helikaalinen rakenne, kun ylimääräinen juoste pariutuu ds-DNA:n kanssa. Jopa neljästä juosteesta koostuvat rakenteet ovat mahdollisia, mikäli juosteet sisältävät paljon G-nukleotidejä. Metallikationeiden (esim. K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> tai Mg<sup>2+</sup>) läsnä ollessa tällaiset G-tetrapleksit voivat muodostaa hyvinkin vakaita ja pitkiä superrakenteita, joita kutsutaan G-johdoiksi.

## 3 Sähkönjohtavuusmittaukset

Idea DNA-molekyylin käyttämisestä johteena on suhteellisen vanha, sillä jo pitkään on arveltu juostetta pitkin kulkevien varauksenkuljettajien osallistuvan DNA:n korjausmekanismeihin tavalla tai toisella [3]. Jo vuonna 1962 Eley ja Spivey tekivät mittauksia neljällä eri DNA-näytteellä ja yhdellä RNA-näytteellä puristettuina platinaelektrodien väliin. Ominaisvastukseksi näissä mittauksissa saatiin  $5 \cdot 10^{11} \Omega\text{cm}$  ja energia-aukon suuruudeksi  $2,42 \pm 0,05 \text{ eV}$ , mitkä eivät juurikaan vaihdelleet näytteiden välillä. Mittausten ja DNA:n rakenteen tuntemuksen perusteella heidän mielestään oli perusteltua väittää, että DNA kykenee siirtämään varauksia nukleotidien emästen muodostamien  $\pi$ -sidosten kautta [3]. Tätä väitettä ei kuitenkaan pystytty pitävästi osoittamaan, joten lisää mittauksia ja erilaisia koejärjestelyjä tarvittiin.

Kuten todettua, DNA-molekyylin sähkönjohtavuusmittauksia on tehty runsaasti ja niiden tulokset ovat vaihdelleet laidasta laitaan. Edellisen luvun perusteella voitaneen todeta, että eroja tuloksiin aiheuttavat tutkittavan DNA:n rakenne ja siten sen emäsjärjestys ja ympäristön olosuhteet. Lisäksi mittauksissa on käytetty hyvin paljon erilaisia menetelmiä ja lähestymistapoja.

Molekyylin sähkönjohtavuuden tutkimiseen on kaksi eri lähestymistapaa. Molekyylit voidaan pyrkiä asettamaan kahden elektrodin väliin tavalla tai toisella, jolloin mittaamalla sähkövirtaa jännitteen funktiona voidaan määrittää vastus näytteelle, joka voi olla jopa yksittäinen molekyyli. Tällaiset mittaukset ovat suoran lähestymistavan mittauksia. Epäsuorissa mittauksissa molekyylin kyky siirtää varauksia pyritään selvittämään spektroskopian keinoin, joten yksittäistä molekyyliä ei käytännössä tarkastella. Tässä luvussa esitellään eniten huomiota saaneita erityyppisiä mittauksia ja niiden tuloksia kronologisessa järjestyksessä.

### 3.1 Epäsuorat mittaukset

DNA-molekyylin sähkönjohtavuusmittaukset tehtiin aluksi epäsuorilla menetelmillä. Niissä DNA-heliksiin pyritään aluksi kiinnittämään varauksen luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylit. Molekyylin pitää luonnollisesti tunnistaa ja sitoutua nukleinihappoon esimerkiksi sen emäsosaan. Molekyylit voivat esimerkiksi tunnistaa tietyn sekvenssin tai rakenteen DNA-juosteesta ja kiinnittyä siihen. Ne sisältävät usein vastaavanlaisia aromaattisia ryhmiä, joita nukleotidien emäksetkin sisältävät, jolloin molekyyli pyrkii tunkeutumaan (interkaloitumaan) ainakin osittain DNA-heliksin sisälle osaksi  $\pi$ -pinoumaa. Myös kova-

lenttisesti DNA-pääketjuun sitoutuvia molekyyliä on käytetty. Joka tapauksessa luovuttajamolekyyliltä voidaan irrottaa sähkömagneettisella säteilyllä fotoelektroni, joka puolestaan kulkeutuu sen vastaanottajalle oletettavasti DNA-juostetta pitkin. Tämän hapetus–pelkistys-reaktion seurauksena vastaanottajamolekyylillä virittyy ja purkautuva vitystila voidaan havaita spektroskopisin keinoin. Keskeisin kysymys mittauksissa ja niiden tulosten luotettavuudessa liittyy varauksen siirtymismekanismiin ja sen kulkemaan reittiin.

Edellä esitellyn Eley'n ja Spivey'n mittauksen jälkeen mittauksia ei juurikaan tehty ennen 1980-luvun loppua, sillä menetelmät eivät olleet kehittyneet tarpeeksi eikä riittävää teoreettista pohjaa varauksen siirtymistehokkuuden määrittämiselle suurien biologisten molekyylien sisällä ja niiden välillä ollut. Rudolph A. Marcuksen kehittämä teoria elektronin siirtymisreaktioiden nopeuksille vuodelta 1956 laajentui vuonna 1985 koskemaan myös juuri tällaisia järjestelmiä, mikä loi kaivattua pohjaa myös DNA-mittauksille [4]. Tämän teorian mukaan varauksen siirtymisen tehokkuudesta kertova siirtymisvakio  $k_{CT}$  on verrannollinen tekijään  $e^{-\beta d}$ , missä  $d$  on elektronin luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylin välinen etäisyys ja  $\beta$  on vakio, joka kertoo molekyylien elektroniorbitaalien kytkeytymisestä ja siten varauksenkuljettajien siirtymisen tehokkuudesta. Siten vakiolle  $k_{CT}$  saadaan yksinkertainen esitys

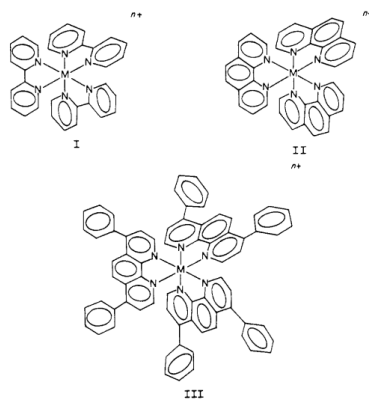
$$(3.1) \quad k_{CT} = Ae^{-\beta d}.$$

Teoreettisesti arvon  $\beta$  arvioitiin olevan DNA-molekyylin tapauksessa välillä  $0,85 - 2,5 \text{ \AA}^{-1}$  [5].

Eräs runsaasti epäsuoria DNA:n johtavuusmittauksia tehnyt ryhmä on Jacqueline Bartonin tutkimusryhmä. Eräs varhaisimmista mittauksista on jo vuodelta 1986 [6]. Siinä he käyttivät elektronin luovuttaja- ja vastaanottajamolekyyleinä Ru(II)- ja Co(III)-komplekseja, jotka ovat kuvan 3.1 mukaisia aromaattisten typpiyhdisteiden ympäröimiä metalliradikaaleja. Rutenium-kompleksit toimivat varauksen luovuttajina ja vastaavasti koboltti-kompleksit niiden vastaanottajina. Ryhmä päätyi käyttämään juuri näitä komplekseja, sillä niiden sitoutumista DNA-molekyyliin oli jo tutkittu [7]. Lisäksi koboltti-kompleksien oli osoitettu sammuttavan rutenium-kompleksien fluoresenssin hyvin tehokkaasti elektronin siirtymisen kautta.

Bartonin ryhmän käyttämä näyte sisälsi ihmisestä eristettyä dsDNA:ta vesipohjaisessa liuoksessa (pH 7.2, 5 mM tris-puskuri ja 50 mM NaCl). Näissä olosuhteissa dsDNA on pääasiassa B-muodossa. Tähän liuokseen he sekoittivat luovuttaja- ja vastaanottajakomplekseja. Näytettä eksitoitiin valolla, jonka aallonpituus oli 450 nm, mikä vastaa Ru(II)-kompleksin absorbaatiospektrin huippua. Vastaavasti koboltti-kompleksin emissiospektrin maksimi vastaa aallonpituutta 600 nm, joten yksittäisfotonilaskentamenetelmällä tarkkailtiin tätä aallonpituutta ja saaduista spektreistä voitiin määrittää elektronien siirtymistehokkuus.

Verrattuna kontrollinäytteeseen, joka ei sisältänyt DNA-molekyylejä, fluoresenssin elinajat pienenevät, mistä voitiin päätellä DNA:n avustavan elekt-



**Kuva 3.1.** Kuvassa esitellyt metallikationi–fenyylimolekyylikompleksit ovat esimerkkejä molekyyleistä, jotka sitoutuvat DNA-kaksoisjuosteeseen hyvin suurella affiniteetillä. Lisäksi ne ovat fluoresoivia ja sopivasti valittujen kompleksien välillä tapahtuu elektronien siirtymistä luovuttajamolekyyliltä vastaanottajalle eksitoitaessa vastaanottajamolekyylejä valolla, jonka aallonpituus on sopiva. Kirjaimella M on merkitty metallikationia, jonka varauksen suuruus on  $n$ . Varaus on positiivinen, koska negatiivinen varaus hylkisi niinkään negatiivisesti varutunutta DNA-juostetta. Merkinnot I, II ja III vastaavat lyhenteissä käytettyjä merkintöjä (I=bpy=bipyridiini, II=phen=fenantroliniini ja III=difenyylifenantroliniini=DIP). Tutkimuksissa, joissa tällaisia molekyylejä käytetään, tutkitaan itse asiassa elektroniaukon siirtymistä DNA-ketjun sisällä. Lähde [6].

ronien siirtymisessä luovuttajamolekyyliltä vastaanottajamolekyylille. Elektronien siirtymisnopeudet olivat noin kaksi kertaluokkaa suurempia kontrollinäytteeseen verrattuna. Käytetyn mittausasetelman avulla ei voitu kuitenkaan suoraan päätellä elektronin siirtymismekanismia, vaan se jäi tulevien tutkimusten selvitettäväksi. Barton ryhmineen kuitenkin ehdotti, että makromolekyyliden, kuten DNA:n, pinnat voivat nopeuttaa molekyyliden ja elektronien diffuusiota. He spekuloidivat myös, että ainakin osa varauksista voisi siirtyä dsDNA:n  $\pi$ -sidosten välillä tunneleutumalla, joten elektronien siirtymisnopeuksien kasvaminen saattoivat selittyä molempien mekanismien yhteisvaikutuksen avulla. Tarkkaan ei nimittäin tiedetty, kuinka käytetyt metallikationikompleksit sitoutuivat DNA-ketjuun, ja ei voitu sanoa, että pelkät elektronit siirtyisivät juostetta pitkin.

Vuoteen 1991 mennessä oli osoitettu Ru(II)-kompleksien sitoutuvan kahdella ei-kovalenttisella tavalla DNA-ketjuun [8]. Yksinkertaisesti se voi adsorboitua toisen ssDNA-juosteen pinnalle tai osittain sitoutua dsDNA:n sisään emästen  $\pi$ -sidosten väliin. Tätä tietoa käytettiin hyväksi vuonna 1991 julkaisussa tutkimuksessa (G. Orellana, A. K. Mesmaeker, J. K. Barton & N. J. Turro), jonka tulokset olivat hyvin samankaltaisia verrattuna Bartonin ryhmän aikaisempaan mittaukseen [8]. Lisäksi artikkelissa esitettiin analyyttinen tulos, jonka mukaan elektronien siirtyminen ei voi selittyä ainakaan merkittävässä määrin molekyyliden nopeammalla diffuusiolla DNA-kaksoisjuosteen ympärillä tai sen sisällä, joten elektronin voitiin päätellä siirtyvän pitkin DNA-juostetta

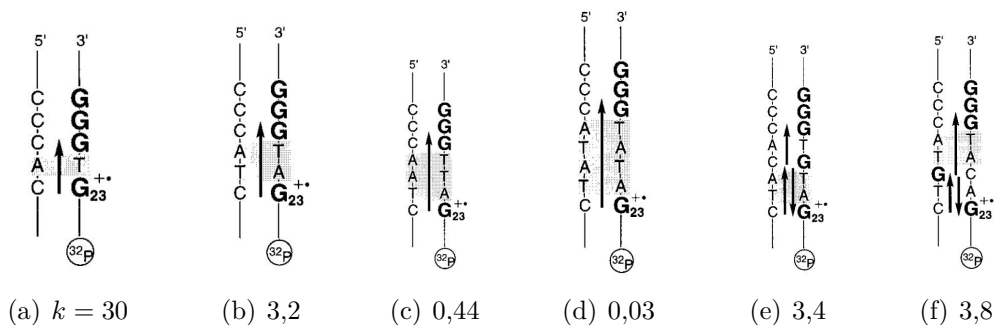
tavalla tai toisella. Luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylien välisen etäisyyden vaikutus elektronien siirtymisnopeuteen jäi tulevien tutkimusten selvitettäväksi.

A. Brun ja A. Harriman julkaisivat vuonna 1992 tutkimuksen, jossa tutkittiin etäisyyden vaikutusta elektronien siirtymisnopeuteen [9]. Mittauksissa kyettiin erottamaan elektronin siirtyminen DNA:han sitoutuneiden molekyylien välillä, joten vapaana olevat molekyylit voitiin jättää huomiotta. Varauksen luovuttajamolekyyleinä käytettiin etidiumbromidia ( $EB^+$ ) ja akridiinijohdannaisista (AO) sekä vastaanottajamolekyylinä  $N,N'$ -dimetyyli-2,7-diaatsopyreeni dikloridia ( $DAP^{2+}$ ). Niiden konsentraatiota säätelemällä voitiin säädellä dsDNA-juosteeseen sidottujen molekyylien keskimääräistä etäisyyttä toisistaan. Etäisyyttä vaihdeltiin välillä 10 – 18 Å.

Bartonin aikaisempia mittauksia vastaavin keinoin voitiin määrittää elektronien siirtymisnopeus sekä Marcuksen teorian mukainen parametri  $\beta$ . Esimerkiksi etäisyydellä 10 Å siirtymisnopeusvakioksi  $k_{CT}$  saatiin  $(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ . Tutkimuksessa määritettiin myös vastakkaiseen suuntaan kulkeutuvien elektronien siirtymisvakio, joka oli  $(5,0 \pm 0,8) \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Käyttäen Marcuksen teorian yhtälöä 3.1 saatiin vakiolle  $\beta$  keskimääräinen arvo  $(0,88 \pm 0,08) \text{ Å}^{-1}$ , joka oli sopusoinnussa analyytisesti arvioituun vaihteluväliin. Tämän vakion lukuarvon kerrottiin vastaavan elektronin tunneloitumista emäsparien kautta paremmin kuin elektronin kulkeutumista juosteen rungon fosfaattiryhmien kautta. Joka tapauksessa tutkimuksessa osoitettiin, että elektronin kulkeutuminen DNA-matriksissa on mahdollista myös pitkillä ( $>10 \text{ Å}$ ) matkoilla.

Vuonna 1993 C. J. Murphy työryhmineen teki mittauksen [10], joka saavutti paljon huomiota. Varauksen luovuttajamolekyylinä toimi  $Ru(\text{phen})_2\text{dppz}^{2+}$ , joka on  $Ru(II)$ -kompleksista johdettu korvaamalla yksi fenantroliiniryhmä dipyridofenatsiinilla. Vastaavasti vastaanottajamolekyylinä toimi  $Ru(\text{phen}_2\text{dppz})^{2+}$ -molekyylillä. Molekyylien sitotumiskohtaa DNA-kaksoisjuosteessa kyettiin kontrolloimaan ja ne saatiin sitoutumaan hyvin spesifisesti DNA-juosteen 5'-päähen. Näin pystyttiin tutkimaan elektronin siirtymistä yli 40 Å matkan ylitse, mikä oli suurin siihen mennessä saavutettu etäisyys. Ryhmä käytti 15 emäsparin mittaisia dsDNA-heliksejä. Liian pitkien juosteiden käyttö olisi johtanut siihen, että samaan juosteeseen sidotut luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylit olisivat saattaneet päästä törmäilemään toisiinsa juosteen taipumisen vuoksi. 15 emäsparin ketju on kuitenkin tarpeeksi jäykkä, jotta näitä törmäyksiä ei syntyisi.

Murphy ryhmän mittauksen tulokset olivat yllättäviä. Fluoresenssin sammumisen nopeusvakio  $k_{fet}$  oli luokkaa  $10^9$ - $10^{10} \text{ s}^{-1}$  ja sovittamalla mittaustuloksiin Marcuksen teorian mukainen yhtälö saatiin vakion  $\beta$  ylärajaksi  $0,2 \text{ Å}^{-1}$ . Näytteellä, jossa luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylit ovat kovalenttisesti kiinni toisissaan, päädytään vastaavaan tulokseen, joten elektronin siirtymishokkuus DNA-heliksissä oli mittauksen mukaan huomattavan suuri. Tässä vaiheessa oli myös jo selvää se, että varauksen täytyi siirtyä nimenomaan DNA-juosteen emästen muodostamien  $\pi$ -sidosten kautta tavalla tai toisella. Mittauksen tulos herätti mielenkiintoa monissa tutkijoissa, ja se käynnisti aktiivisen



**Kuva 3.2.** Kuvassa on esitetty Meggersin ym. tutkimuksessa [13] vuodelta 1998 käytetyt emässekvenssit, joille varauksen siirtymisnopeusvakiot  $k_{CT}$  määritettiin. Suhteelliset siirtymisnopeudet on ilmoitettu kuvien alla. Kuten kuvista **a-d** huomataan, varauksen siirtymisnopeus radikaalisen G-emaskationin ja GGG-yksikön välillä pienenee noin kertaluvun verran yhtä välissä olevaa AT-emäsparia kohden. Tilanne kuitenkin muuttuu, mikäli yksi AT-pari korvataan GC-parilla, mikä nähdään sekvenssien **e** ja **f** nopeusvakioista. Rajoittava tekijä siirtymisnopeudessa on siis lähinnä AT-emäsparien lukumäärä hapettavan ja hapettuvan molekyylin välillä eikä suoraan niiden välinen etäisyys, joten Marcuksen teoriaa ei voida suoraan soveltaa DNA-molekyylin varauksenkuljetuksen tapauksessa ottamatta huomioon sen emässekvenssiä.

kokeellisen ja teoreettisen tutkimuksen aiheen parissa.

Seuraavat mittaukset keskittyivät varauksen siirtymismekanismiin yksityiskohtaisempaan tarkasteluun. Varsinkin emäsjärjestyksen vaikutus juosteessa alkoi osoittautua tulevien mittausten myötä merkittäväksi tekijäksi. Esimerkiksi artikkelissa [11] vuodelta 1996 tutkittiin emäsjärjestyksen vaikutusta jo aiemmin tutkitussa mittaussäilytyksessä, jossa käytettiin Rh(III)-vastaanottajamolekyyliä. Fluoresenssin sammumisnopeusvakio oli tuttua luokkaa  $10^{10} \text{ s}^{-1}$ , mutta emäsjärjestyksellä havaittiin olevan vaikutusta. Tämä oli merkki siitä, että DNA:n varauksenkuljetuskykyä ei voi käsitellä samalla tavalla kuin muissa biomolekyyleissä, joten Marcuksen teoriaa ja varsinkaan sen vakiota  $\beta$  ei voi suoraan käyttää kuvaamaan varauksen siirtymistehokkuutta.

Toisena esimerkkinä emäsjärjestyksen vaikutuksesta voisi ottaa Naturessa vuonna 1996 julkaistun tutkimuksen [12], jossa valmistettiin DNA-molekyyli, jonka toiseen päähän kovalenttisesti kiinnitettiin rhodium-kompleksi. Lisäksi johonkin kohtaan ssDNA juostetta sijoitettiin GG-emäsdupletti, jota eroittamaan rhodium-kompleksista sijoitettiin vaihteleva määrä AT-emäspareja. Tällaisessa järjestelmässä eksitoituneen rhodium-kompleksin fotoelektroni hapettaa spesifisesti GG-dupletin 5'-päähän G-emäksen, jolloin siihen muodostuu elektroniaukko. Tämä hapettuminen havaittiin jopa lähes 40 Å:n etäisyydeltä, mikä osoitti, että etäinen molekyyli voi indusoida elektroniaukon muodostumisen. Tällä on merkitystä biologisissa järjestelmissä. Ehkäpä tärkeämpi huomio oli kuitenkin, ettei rhodium-kompleksin ja GG-dupletin etäisyydellä ollut merkitystä hapettuneiden G-emästen määrään.

Viimeistään vuonna 1998 julkaistu tutkimus [13] (E. Meggers ym.) osoitti

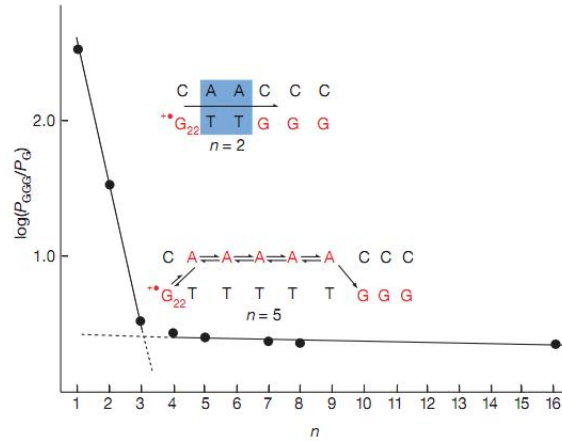
sen, ettei varauksen kulkeutumista pitkin DNA-juostetta voitu kuvata Marcuksen teorian vakiolla  $\beta$  samalla tavoin kuin muissa molekyylijärjestelmissä. Tutkimuksessa käytettiin varauksen luovuttajamolekyylinä G-radikaalikationia, jonka paikkaa suhteessa GGG-emästriplettiin vaihdeltiin. Tällaisessa ketjussa radikaalikationi  $G^{+\cdot}$  hapettaa spesifisesti juuri GGG-tripletin emäksiä. Hapettuneiden emästen määrä suhteessa radikaalikationeiden määrään pystyttiin määrittämään fluoresenssien intensiteettejä vertailemalla. Tästä pystyttiin määrittämään varauksen siirtymisen nopeusvakio  $k_{CT}$ .

Kuvissa 3.2(a)-3.2(f) on esitetty Meggersin tutkimuksessa käytetyt emäsekvenssit ja niistä määritetyt suhteelliset nopeusvakiot. Tapauksista **a-d** nähdään, että nopeusvakion arvo pienenee kertaluokan lisättäessä yksi TA-emäspari  $G^{+\cdot}$ -radikaalin ja GGG-tripletin väliin, joten Marcuksen vakion arvoksi voidaan määrittää arvo  $\beta \approx 0,7 \text{ \AA}^{-1}$ . Tilanne kuitenkin muuttuu tapauksissa **e** ja **f**, joissa yksi TA-pari on korvattu GC-parilla. Vaikka varauksen luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylin etäisyys oli vähintään neljän emäksen verran, vastasi varauksen siirtymisen tehokkuus kuvassa **b** esitettyä tilannetta, jossa niiden välillä oli vain kaksi TA-paria. Lisäksi vaikka radikaalin ja GGG-tripletin välille syntetisoitiin 15 emäksen ketju, varauksen siirtymisen intentiseetin määräsi pääasiassa pisimmän yhtenäisen AT-emäsekvenssin pituus. Tuloksien perusteella elektroni siis siirtyy vain G-emästen välillä jättäen muut emäkset väliin. Kokonaisuutena varauksenkuljetusprosessia voidaan kuvata siis monivaiheisena ”hyppimisprosessina”. Mekanismi voidaan selittää G-emästen alhaisimmalla hapettumispotentiaalilla, joten muiden emästen hapettumisen aikaskaala on liian pitkä, jotta hapettumista tapahtuisi muilla kuin G-emäksillä.

S. Kelley ja J. K. Barton suorittivat vuonna 1999 julkaistuun artikkeliin [14] hyvin samankaltaisia mittauksia verrattuna edellä esiteltyyn Meggersin ym. tutkimukseen. Varauksen vastaanottajamolekyylinä toimi modifoitu fluoresoiva G-emäs, joka oli sijoitettu vaihteleville etäisyyksille elektronin vastaanottajamolekyylistä. Etäisyyttä muokattiin lisäämällä AT-emäspareja juosteeseen. Hapettava molekyyli oli kovalenttisesti hiilivetyketjun välityksellä DNA-ketjun päähän kiinnitetty etidium-molekyyli, joka interkaloitui spesifisesti pääasias- sa toisen ja kolmannen emäksen väliin lukien DNA-ketjun päästä. Mittaukset suoritettiin kuitenkin yksittäisfotonilaskennan keinoin, joten tutkimuksessa saatiin tietoa myös varauksen siirtymisen absoluuttisesta aikaskaalasta. Vaihtelemalla mittausten aikaskaalaa voitiin varauksen siirtymistä kuvata kahdella aikavakiolla 5 ps ja 75 ps, jotka olivat riippumattomia etäisyydestä, jota vaihdeltiin välillä 10 – 17 Å. Sen sijaan varauksen siirtymisen tehokkuus riippui etäisyydestä voimakkaasti, mikä oli siis osoitettu jo aikaisemmissa tutkimuk- sissa. Tulosten perusteella ryhmä väitti nopeamman aikavakion kertovan suoraan varauksen siirtymisen nopeudesta kun taas hitaampi aikavakion liittyisi etidium-molekyylin elektronin vastaanottamiseen sopivan konfiguraation etsimiseen. Tämä tuki käsitystä siitä, että varaus hyppii juuri G-emästen välillä tunneloituen muiden emästen lävitse.

Tässä vaiheessa oli siis yleisesti hyväksytty, että varaus kulkeutuu DNA-juostetta pitkin ns. ”G-hyppy”-prosessin kautta. Tämä ei selittänyt kuitenkaan



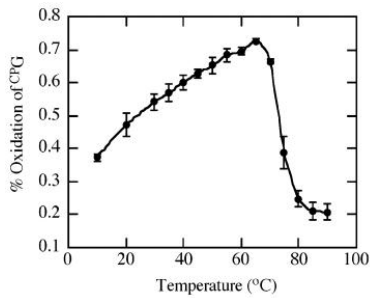


**Kuva 3.3.** Kuvassa on esitetty Giesen ym. vuodelta 2001 olevat tulokset artikkelista [16], jossa varauksen vastaanottaja- ja luovuttajaemäksen välille syntetisoitiin 1-16 AT-emäsparia dsDNA-ketjuun. Kun G-emästen välillä on 1-3 AT-paria, varauksen siirtymistä voidaan kuvata tunnelloitumisreaktiona AT-parien lävitse. Pidemmällä välimatkoilla varaus kulkee puolestaan ns. termisesti indusoitujen A-hyppyjen kautta. Kuvajasssa y-akselin arvo kuvaa hapettuneiden vastaanottavien G-emästen määrän suhdetta  $G^{++}$ -radikaaleihin.

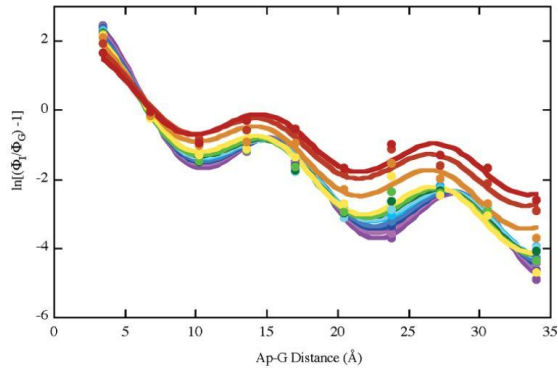
täydellisesti kaikkia tuloksia, sillä teorian mukaan havaittavaa hapettumisreaktiota ei pitäisi tapahtua, mikäli G-emästen välillä on useita AT-emäspareja. Tunneloitumisen todennäköisyys pienenee nimittäin eksponentiaalisesti etäisyyden funktiona. Esimerkiksi artikkelissa [15] (Williams, Odon & Barton, 2000) kuitenkin todetaan, että hapettumista ja siten varauksen siirtymistä tapahtuu ainakin 10 AT-parin päähän ketjussa. Lisäksi hapettumisen tehokkuuden näytettiin riippuvan vain vähän välillä olevien AT-parien määrästä, joten varauksen siirtymisessä voitiin olettaa olevan toinenkin mekanismi G-hyppyjen lisäksi.

Varauksen siirtymismekanismia AT-parien lävitse tarkasteltiin systemaattisesti esimerkiksi tutkimuksessa [16], jossa todettiin G-hyppyjen tapahtuvan vain G-emästen välillä, joiden välillä ei ollut enempää kuin kolme AT-paria. Mikäli AT-parien määrä oli neljä tai suurempi, varauksen kulkeutumista kuvasi paremmin malli, jossa myös A-emäkset osallistuvan varauksenkuljetukseen. Tämä selittyy eri reaktioiden aikaskaaloja vertaamalla. A-emäkset voivat nimittäin myös hapettua merkittävästi, mikäli G-hyppy-reaktion aikavakio ylittää A-emäksen hapettumisreaktion aikavakion. Kuvasta 3.3, jossa on esitetty Giesen ym. tutkimuksen tulokset, nähdään pääasiallisen varauksenkuljetusmekanismin muuttuvan kolmannen AT-parin lisäyksen jälkeen. Lisäksi varauksen siirtymistehokkuus ei juurikaan vaihdellut AT-parien lukumäärän funktiona. Varauksen voitiin siis sanoa kulkeutuvan AT-parien kautta jokaisen A-emäksen hapettuessa vuorotellen.

Tutkimuksessa [17] (Takada ym., 2004) kyettiin varauksen siirtymisen luonnetta seuraamaan entistä tarkemmin yli 100 Å:n matkalta. Syntetisoidun DNA-molekyylin 5'-päihin liitettiin elektroniaukon luovuttajamolekyyliksi naftaali-



(a)



(b)

**Kuva 3.4.** Kuvassa **a** on esitetty tutkimuksen [18] hapettuneiden G-emästen suhteellinen määrä varauksen luovuttajamolekyylin määrään verrattuna. Kuvaaajan mittauspisteet vastaavat kolmesta erillisestä mittauksesta laskettuja keskiarvoja sekvenssille ApAAAG. Kuten kuvaaajan käyttäytymisestä huomataan, varauksen siirtymistehokkuus kasvaa tasaisesti lämpötilaan 60 °C saakka, mikä kertoo A-hyppyjen roolista DNA-ketjun varauksenkuljetuksessa. Kuvassa **b** on puolestaan esitetty varauksen kulkeutumisen etäisyysriippuvuus lämpötilavälillä 0 – 55 °C. Y-akselille on laskettu mittauksista arvo  $\ln[\Phi_T/\Phi_G - 1]$ , missä arvot  $\Phi$  ovat fluoresenssin intensiteettejä. Varauksen kulkeutumisen tehokkuus vaihtelee noin 10 Å välein, mikä vastaa noin 3 emäksen pituutta. Tämän tuloksen perusteella varauksenkuljetuksen etäisyysriippuvuus on huomattavasti monimutkaisempi kuin aiemmin oli ajateltu.

imidi-molekyylillä (NI) ja vastaavasti vastaanottajamolekyyliksi fenotiatsiini-molekyylillä (PTZ). Syntetisoitu dsDNA-molekyylillä oli muotoa NI-A<sub>6</sub>-(GT)<sub>n</sub>-PTZ, eli elektroniaukko joutui kulkeutumaan aluksi kuuden A-emäksen kautta päästäkseen lähimmälle G-emäkselle. Elektroniaukko ajautui oletettavasti PTZ-molekyylille G-hyppyjen kautta. GT-jaksojen määrää vaihdeltiin välillä 2–12 ja tutkimukset suoritettiin myös ketjuilla, joissa GT-jaksot oli vaihdettu GA-jaksoihin.

DNA-kehtun alussa olleiden kuuden A-emäksen tarkoituksena oli varauksen siirtymisen aikaskaalan pidentäminen. Syntetisoidussa ketjussa elektroniaukon kulkeutuminen tapahtui aikaskaalalla mikrosekunneista millisekuntiin, mikä mahdollisti varauksen siirtymisen seuraamisen absorptiospektroskopian keinoin. Riippuen GA- ja GT- jaksojen pituudesta, varauksen siirtymisen nopeusvakiot olivat välillä  $1,2 \cdot 10^4 - 5,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Nopeusvakioiden etäisyysriippuvuus vastasi mallia, jossa varaus kulkeutuu satunnaiskävelyn tavoin NI-molekyylillä lähinnä olevalta G-emäkseltä PTZ-molekyylille. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että juosteen sisältäessä GA-jaksoja varauksen siirtymisnopeus oli noin 50 kertaa suurempi kuin GT-jaksoja sisältävässä juosteessa.

Tutkimuksessa [18] (O'Neill & Barton, 2004) tarkasteltiin erityisesti varauksen kulkeutumista A-hyppyjen välityksellä. Ensimmäistä kertaa myös varauksen kulkeutumisen lämpötilariippuvuutta tutkittiin. Tutkittava DNA-sekvenssi oli muotoa Ap(A)<sub>n</sub>G, missä  $n = 0-9$  ja Ap-molekyylillä oli fluoresoiva 2-aminopyriini,

jonka fluoresenssin sammuttajana toimi G-emäs. Lämpötilaa vaihdeltiin välillä  $\approx 10 - 80$  °C. Varauksen siirtymisen tehokkuudesta kertova kuvaaja mittausten tuloksista eräällä tutkimuksessa käytetyllä sekvenssillä on esitetty kuvassa 3.4(a). Kuten huomataan, tehokkuus kasvaa tasaisesti lämpötilaa nostettaessa alle 60 °C:n lämpötiloilla. Tämän rajan yli mentäessä tehokkuus romahtaa, sillä dsDNA:n juosteet erkaantuvat toisistaan. Lämpötilariippuvuus osoittaa termisesti aktivoituvien A-hyppyjen roolin varauksen kulkeutumisessa DNA-juostetta pitkin. Tämä ei kuitenkaan ollut tutkimuksen pääasiallinen tulos.

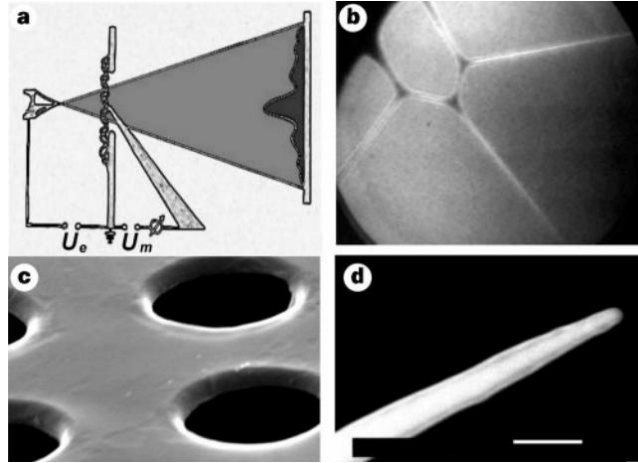
Kuvaajassa 3.4(b) on esitetty O’Neillin ja Bartonin tutkimuksen tulokset, jotka herättivät eniten huomiota. Kuten kuvaajan käyttäytymisestä huomataan, varauksen siirtymistehokkuudessa havaitaan jaksollisuutta noin kolmen A-emäksen välein kaikilla alle 60 °C:n lämpötiloilla. Tiedyt A-jaksojen pituudet toimivat siis paremmin varauksenkuljetuksessa kuin muut, joten DNA-juosteen emäksiä ei voida yksinkertaisesti tarkastella yksittäisinä molekyyleinä, vaan varauksenkuljetuksen tehokkuuteen vaikuttaa emästen muodostaman  $\pi$ - $\pi$ -kasauman kokonaisuus. Jokainen emäs vaikuttaa muiden emästen konfiguraatioon, joten on ymmärrettävää, että tietyt emästen lukumäärät muodostavat varauksenkuljetuksen kannalta tehokkaamman kokonaisuuden kuin muut.

Tähän mennessä suorien mittausten menetelmät olivat kehittyneet tarpeeksi, jotta mittauksia koskien DNA-molekyylin tasavirtajohtavuutta voitiin suorittaa. Epäsuorat mittaukset olivat kuitenkin osoittaneet, että varauksenkuljetus pitkienkin matkojen välillä DNA-molekyyllissä oli mahdollista. Lisäksi mittaukset olivat toisaalta vastanneet moniin johtavuuden parantamista koskeviin kysymyksiin DNA-juosteessa ja toisaalta herättäneet kysymyksiä varauksen siirtymisen mekanismeista. Tutkimusten tulokset voivat auttaa mm. ymmärtämään, kuinka solun DNA-korjaus- ja muokkausmekanismit sekä niihin liittyvät proteiinit tarkalleen toimivat.

## 3.2 Suorat mittaukset

Suorat DNA-molekyylin sähkönjohtavuusmittaukset ovat pääasiassa teknisesti huomattavasti vaikeampia toteuttaa kuin epäsuorat mittaukset. Ehkäpä suurimmat epävarmuustekijät liittyvät elektrodien ja molekyylin välisiin liitoksiin. Lisäksi DNA-molekyylin ympäristön olosuhteet vaikuttavat huomattavasti.

Erez Braun työryhmineen käynnisti vuonna 1998 suorat sähkönjohtavuusmittaukset tutkimuksella [19], jossa käytettiin DNA-juosteita nanojohtimien valmistamiseen, vaikkakaan tutkimuksen tarkoituksena ei ollut mitata itse DNA-molekyylin johtavuutta. 12 emäksestä koostuvat oligonukleotidit, joiden 3’-päähän oli modifioitu disulfaattiryhmä, kiinnitettiin kultaelektrodeihin rikki-kulta-sidoksin. Elektrodit olivat valmistettu siten, että niiden välinen etäisyys oli 12-16  $\mu\text{m}$ . Elektrodit yhdistettiin tämän jälkeen yksijuosteisella DNA:lla, jonka molemmissa päissä oli oligonukleotideja vastaavat komplementaariset emäsekvenssit. Tämän juosteen ympärille tuotiin hopeananopartikkeleita, jotka kiinnittyivät juosteeseen muodostaen johtimen kultaelektrodien välille. Säh-



**Kuva 3.5.** Kuvassa on esitetty Hans-Werner Finkin ja Christian Schönenbergerin tutkimuksessa vuodelta 1999 käytetty mittaussjärjestely [21]. Kyseessä on alhaisen energian pistelähde-elektronimikroskoopi (LEEPS). DNA-molekyylit levitetään kuvassa **c** esitellynlaiselle alustalle, jossa on halkaisijaltaan  $2\ \mu\text{m}$  olevia reikiä. Alusta DNA-ketjuineen asetetaan nollapotentiaaliin kun taas potentiaalissa  $U_m$  oleva kärki pyritään asettamaan DNA-ketjulle siten, ettei se kosketa alustaan. DNA-ketjun kautta menevä virta voidaan näin mitata jännitteen  $U_m$  funktiona. Jännitteellä  $U_e$  synnytetty elektronisuihku siroaa reiässä olevista molekyyleistä ja kärjestä luoden korkearesoluutioisen kuvan ilmaisimelle.

könjohtavuusmittaukset osoittivat, että tällä tavalla DNA:n itsejärjestäytyvyysominaisuuksia pystytään käyttämään hyväksi nanoteknologiassa, joskaan sähköjohtavuus ei ollut aivan sitä, mitä odotettiin. Kontrollimittauksena työryhmä suoritti mittauksen pelkällä DNA:lla, jonka ympärille ei ollut kiinnitetty hopeapartikkeleita. Resistanssi oli  $10^{13}\ \Omega$ , joten tämän perusteella DNA:n voitiin sanoa olevan eriste mutta on huomioitava, että kyseessä oli ssDNA-juoste.

Samana vuonna Okahata ym. [20] raportoivat mittauksesta, jossa he käyttivät lohesta eristettyjä DNA-juosteita, joiden  $\text{Na}^+$ -vastaionit oli korvattu orgaanisilla TTA-ioneilla. Juosteista he valmistivat eräänlaisen joustavan ja ohuen DNA-kalvon, jossa juosteet osoittivat samaan suuntaan. DNA-ketjut olivat verrattaen pitkiä, noin 2000 emäsparin pituisia. Ominaisvastukseksi saatiin tällaiselle kalvolle  $10^5\ \Omega\text{cm}$ , kun molekyylien suunta oli elektrodien suuntainen, ja  $10^9\ \Omega\text{cm}$ , kun ketjut oli asetettu kohtisuoraan elektrodeihin nähden. Lisäksi mittausympäristön paineella ei havaittu olevan vaikutusta tuloksiin. DNA:n johtavuus oli siis tämän perusteella hyvän puolijohteen luokkaa. Huomattavaa kuitenkin on, että yksittäiset DNA-ketjut olivat lyhyempiä kuin metallielektrodien välinen etäisyys, joten varaustenkuljettajien ajateltiin hyppivän molekyyliltä toiselle. Myöhemmässä tutkimuksessa ryhmä käytti samaa mittaussjärjestelyä mutta käytti pidempiä DNA-ketjuja, mistä kerrotaan enemmän edellä.

Seuraavana vuonna Fink ym. [21] julkaisivat tutkimuksen, jonka perusteella he väittivät DNA:n olevan verrattaen hyvä johde, mikä herätti paljon keskustelua. Kuvassa 3.5 on esitetty heidän käyttämä mittaussjärjestely. Kyseessä on

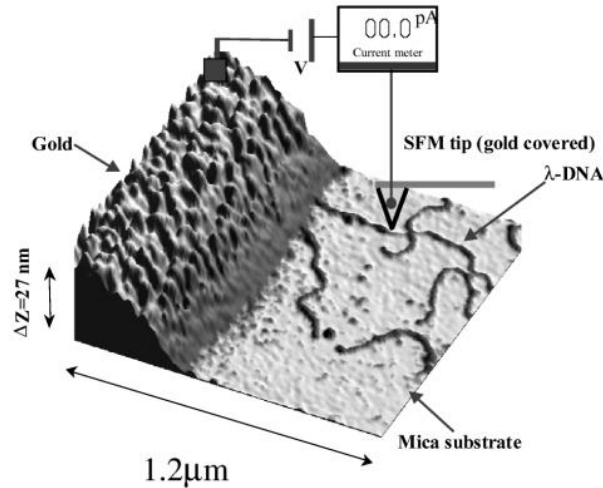
modifioitu LEEPS (Low energy electron point-source) -mikroskooppi, jolla pystyttiin määrittämään noin 600 – 900 nm pitkien DNA-ketjujen johtavuuksia. Tutkittava näyte oli eristetty bakteriofagin genomista ja se koostui kaksijuosteisesta DNA:sta satunnaisin emäsjärjestyksin. Näytealusta, johon DNA-liuosta laitettiin, oli päällystetty kultakerroksella. Lisäksi kaikki sähkönjohtavuusmittaukset tehtiin hyvin pienessä paineessa  $10^{-7}$  mbar.

Virra käyttäytyi jännitteen funktiona varsin lineaarisesti välillä  $\pm 20$  mV, minkä ulkopuolella virra käyttäytyi epämääräisemmin. Vastukseksi 600 nm pitkälle DNA-ketjulle saatiin noin  $2,5 \text{ M}\Omega$  ja 900 nm pitkälle ketjulle  $3,3 \text{ M}\Omega$ . Ominaisvastus näiden mittausten perusteella oli siis suuruusluokkaa  $1 \text{ m}\Omega\text{cm}$  olettaen DNA-ketju halkaisijaltaan 2 nm olevaksi sylinteriksi. Nämä olivat luonnollisesti ylärajoja DNA-ketjujen vastuksille, sillä kahden kontaktipisteen resistanssit on otettava huomioon. Näiden resistanssien suuruusluokkaa ei kuitenkaan pystytty luonnollisesti määrittämään. Huomioitavaa myös on, että välittömästi, kun Tungsten-kärki irrotettiin DNA-ketjusta, virran arvo tipahti noltaan. Tämä osoitti sen, että virra todella kulki DNA-ketjun kautta. Lisäksi vaikka kuvaukseen käytetty elektronisuihku sammutettiin, virran käyttäytyminen pysyi samana, joten matalaenerginen elektronisuihku ei vaikuttanut työryhmän mielestä itse mittauksiin.

Koska mittaukset tehtiin tyhjiössä, ioninen sähkönjohtavuus ei voinut selittää tuloksia, sillä käytännössä kaikki vesi DNA-ketjun ympäriltä oli haihtunut. Tämä tosin tarkoitti sitä, että dsDNA ei ollut normaalissa B-muodossa vaan luultavasti pääasiassa A-muodossa. Muiden DNA-ketjun ympärille mahdollisesti sitoutuneiden tuntemattomien molekyylien osuutta sähkönjohtavuuteen ei luonnollisestikaan pystytty sulkemaan pois. Esimerkiksi molekyylien vibraatiotoilla sanottiin voivan olla jotain osuutta johtavuuteen, joten lisämittauksia tarvittiin ja varsinkin johtavuuden lämpötilariippuvuutta tuli tutkia.

Finkin ja Schönenbergerin mittaustulokset joutuivat luonnollisesti tarkastelun kohteeksi ja jo seuraavana vuonna osoitettiin, että matalaenerginen elektronisuihku todellakin vaikutti tuloksiin merkittävästi, joten käytetty LEEPS-mittausjärjestely ei ollut sopiva sähkönjohtavuusmittauksiin. De Pablo ym. esittivät artikkelissaan [22] vuodelta 2000 sekä laskennallisia että kokeellisia tuloksia  $\lambda$ -DNA-ketjun johtavuudesta ja tulivat lopputulokseen, että DNA toimii erittäin hyvänä eristeenä. He käyttivät kokeellisissa mittauksissa tekniikkaa, jossa DNA-liuos levitetään kiillesirulle, minkä jälkeen sirulle höyrystetään kultaelektrodi. DNA-ketjut, jotka olivat kontaktissa elektrodiin, etsittiin atomivoimamikroskoopilla. Itse johtavuusmittaukset pystyttiin tekemään käyttämällä kultapäällysteistä AFM-kärkeä ja vaihtelemalla sen jännitettä kultaelektrodiin nähden. Mittausjärjestely on esitetty kuvassa 3.6.

De Pablo ym. olivat tehneet vastaavanlaisia sähkönjohtavuusmittauksia jo aikaisemmin hiilinanoputkille [23]. Näiden mittausten antama tulos vastukselle oli luokkaa  $(0,5-10) \cdot 10^4 \Omega$ , joten tämän perusteella tekniikan voitiin sanoa toimivan odotetunlaisesti. DNA-molekyylien tapauksessa elektrodin ja AFM-kärjen välillä mennyt virra oli joka kerralla kuitenkin niin pieni, että sitä ei pystytty mittaamaan. Tästä tehtiin johtopäätös, että molekyylin vastus oli vä-

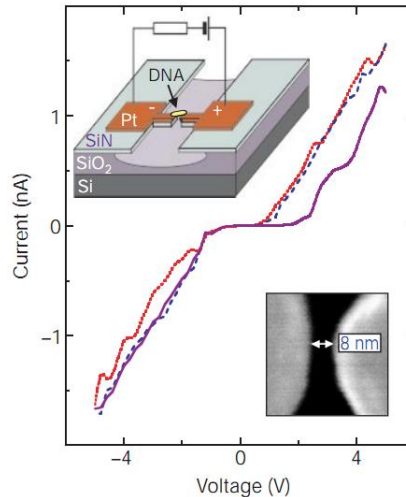


**Kuva 3.6.** Kuvassa on esitetty vuonna 2000 de Pablon ym. [22] käyttämä mittausrjestely. Kiillesirulle levitettiin  $\lambda$ -DNA-liuosta, minkä jälkeen siru kuivattiin ylimääräisestä kosteudesta. Lopuksi sirulle höyrystettiin kultaelektrodi. Kullalla päällystetty SFM-kärki saatettiin kontaktiin DNA-molekyylin, mikä mahdollisti sähkönjohtavuusmittauksien tekemisen yksittäiselle DNA-ketjulle.

hintään suuruusluokkaa  $10^{12} \Omega$  ja vastaavasti ominaisvastus  $\rho \approx 10^6 \Omega\text{cm}$ , kun mittaustarkkuudet otettiin huomioon. Tilanne kuitenkin muuttui, kun ennen sähkönjohtavuusmittausta näyte altistettiin energialtaan alhaiselle (100 eV) elektronisuihkulle tyhjiössä. Noin kymmenen minuutin jälkeen vastus oli pudonnut luokkaan  $2 \cdot 10^8 \Omega$ , joten selkeästi elektronisuihku aiheutti muutoksia DNA-ketjun rakenteeseen tai vaihtoehtoisesti DNA-ketjun ympärille kerääntynyt kontaminaatiokerros oli pääasiallinen sähkönjohtavuuden aiheuttaja.

Eräs epävarmuustekijä de Pablon ym. mittauksissa liittyy kontaktipintoihin. Koska elektrodit höyrystettiin suoraan DNA-ketjujen päälle, on mahdollista, että tämä olisi saattanut aiheuttaa molekyylin sisäiseen rakenteeseen muutoksia. Tämän mahdollisuus kyettiin kuitenkin osoittamaan pieneksi, sillä höyrystysprosessissa näytteen lämpötila ei noussut korkeammaksi kuin 310 K, mikä on ds-DNA-ketjun hajoamislämpötilaa alhaisempi. Vaikutusta voi olla myös sillä, että DNA-ketjut olivat suorassa kontaktissa kiillesirun kanssa, mikä on luultavasti vaikuttanut niiden rakenteeseen oleellisestikin.

Tässä vaiheessa tulokset olivat olleet niin ristiriitaisia, että tarkempia tietoja koskien varauksen siirtymismekanismia DNA-ketjussa tarvittiin. Porath ym. julkaisivat vuonna 2000 tutkimuksen [24], jossa tarkasteltiin yksittäisten poly(dG) · poly(dC)-dsDNA-molekyylien johtavuutta sekä ilmakehässä että  $10^{-9}$  bar paineessa. Kuten edellisessä kappaleessa 3.1 todettiin, tämä emäsekvenssi oli osoittautunut niin kokeellisesti kuin teoreettisesti sähkönjohtavuuden kannalta lupaavimmaksi sekvenssiksi. Yksittäiset molekyylit he vangitsivat platinaelektrodien, joiden välillä oli 8 nm aukko, väliin käyttäen 5 V:n jännitettä elektrodien välillä. Mittausjärjestely ja yhteenvedo tuloksista on esitetty kuvassa 3.7. Mittausten jälkeen näytteet käsiteltiin DNA-katkaisuentsyymillä ja

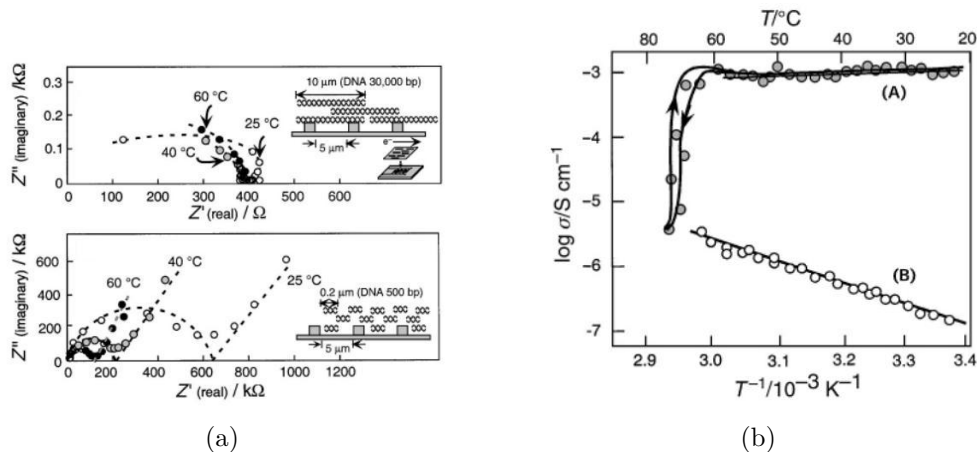


**Kuva 3.7.** Kuvassa on esitetty vuonna 2000 Porath ym. käyttämä mittausjärjestely, jossa kahden platinaelektrodin väliin vangittiin elektrostaattisesti yksittäisiä kaksijuosteisia ja jaksollisia poly(dG) · poly(dC)-molekyylejä. Etuvas- tuksena mittauksissa käytettiin  $2 \text{ G}\Omega$  vastusta.

määritettiin sähkönjohtavuus uudelleen, millä voitiin varmistua, että mitattu sähkönjohtavuus on peräisin juuri vangitusta DNA-molekyylistä.

Porathin ym. mittausten tulosten perusteella jaksollinen dG · dC-DNA-kaksoisjuoste toimi sähköneristeenä molemmissa tutkimuksessa käytetyissä ympäristöissä selvän  $\approx 2 \text{ V}$ :n suuruisen jänniteaukon perusteella. Lisäksi he tarkas- telivat johtavuuden lämpötilariippuvuutta huoneenlämpötilan ja  $4 \text{ K}$ :n välillä. Näitä tuloksia käsiteltiin kolmen eri johtavuusmekanismin valossa. Ensimmäi- sen mallin mukaan elektroni tunneloituu yhden energiavallin lävitse, toisen mu- kaan elektroni joutuu tunneloitumaan usean peräkkäisen pienemmän potenti- aalivallin lävitse ja kolmannen mallin mukaan elektronit kulkeutuvat yksittäis- ten monomeerien muodostaman yhteisen johtavuusvyön kautta, joista viimek- si mainittu sopi saatuihin tuloksiin parhaiten. Mallin mukaan DNA-juosteen emästen  $\pi$ -orbitaalit limittyvät niin, että elektronit ovat delokalisoituneet koko ketjun matkalle. DNA-molekyylin ja elektrodin välistä kontaktia tutkimuksessa kuvattiin yksinkertaisena potentiaalivallina.

Ristiriitaisille tulosten takia myös DNA:n ympäristöön alettiin kiinnittä- mään entistä enemmän huomiota. Esimerkiksi Storm ym. [25] käyttivät kah- ta eri substraattia, piidioksidia ja kiillettä, ja tutkivat dsDNA-kaksoisketjun pituuden vaikutusta vastukseen. Tässäkin mittauksessa käytettiin jaksollista poly(dG) · poly(dC)-sekvenssiä ja lisäksi satunnaista  $\lambda$ -DNA-sekvenssiä. Sub- straatile höyrystettiin aluksi  $40 - 500 \text{ nm}$  etäisyydellä toisistaan olevia elekt- rodeja. DNA-juosteet olivat muokattuja siten, että niiden päissä oli tioli-ryhmät ( $-SH$ ), sillä näin ne saatiin kiinnittymään kemiallisesti platina- ja kultaelekt- rodeihin. Kaikki mittaukset suoritettiin huonelämpötilassa ja ilmakehän pai- neessa, ja tulosten perusteella molempien sekvenssien vastukset olivat suuruus- luokkaa  $10 \text{ T}\Omega$ , joten ne käyttäytyivät sähköneristeen tavoin ja johtavuusvyötä



**Kuva 3.8.** Kuvassa on esitetty Nakayaman ym. [26] mittaustulokset vuodelta 2001. Tutkimuksessa valmistettiin kaksi erilaista DNA-kalvoa, joiden tekemiseen oli käytetty sekä pitkiä (30000 emäsparia) että lyhyitä (500 emäsparia) dsDNA-ketjuja. Lyhyet ketjut eivät yltäneet yhdistämään kahta metallielektrodiä. Kuvassa **a** on esitetty tulokset impedanssimittauksista kolmessa eri lämpötilassa. Kuten huomataan, pitkistä ketjuista valmistetulla kalvolla impedanssilla lämpötilariippuvuutta ei juurikaan ole kun taas lyhyiden ketjujen tapauksessa riippuvuus on huomattava. Kuvassa **b** johtavuus on esitetty lämpötilan funktiona.

emästen välillä ei näissä olosuhteissa muodostunut.

Tässä vaiheessa Okahata ym. toistivat edellä mainitun mittauksen [20] DNA-kalvoilla käyttäen tällä kertaa sekä huomattavasti pidempiä (30 000 emäsparia) että lyhyempiä (500 emäsparia) dsDNA-ketjuja [26]. Ajatuksena oli, että pidemmät ketjut olisivat tarpeeksi pitkiä yltääkseen yhdistämään metallielektrodit. Myös johtavuuden impedanssimittauksen lämpötilariippuvuutta tarkasteltiin käyttäen taajuuksia 10 Hz–10 MHz ja nämä tulokset on esitetty kuvissa 3.8(a) ja 3.8(b).

Tulosten perusteella molekyylien suuntainen resistiivisyys pitkien DNA-ketjujen tapauksessa oli luokkaa  $10^3 \Omega\text{cm}$  ja impedanssin lämpötilariippuvuus oli hyvin pieni lämpötilavälillä 20 – 60 °C. Kalvolla, jonka tekemiseen oli käytetty lyhyempiä DNA-ketjuja, vastaava resistiivisyys oli  $10^6 \Omega\text{cm}$ . Lisäksi impedanssi riippui voimakkaasti lämpötilasta, mikä viittasi sähkönjohtavuuden olevan peräisin lähinnä ionisesta johtavuudesta, jossa varauksenkuljettajina toimii DNA-näytteiden liuoksessa olevat vastaionit. Siten edellä esitettyjen mittausten tulos selittyy juurikin ionisella johtavuudella. Toisaalta huomattavan suuri johtavuus pitkienkin DNA-ketjujen tapauksessa saattoi selittyä DNA-ketjujen ympärille kasautuneiden vastinien liikkeistä. Kuitenkin lämmitettäessä näyttää johtavuus romahtaa selvästi lämpötilan  $\approx 70$  °C:n kohdalla ja vieläpä palautuu ennalleen viilennyksessä, joten elektrodien välillä olevilla DNA-ketjuilla oli selvästi vaikutusta johtavuuteen.

DNA-puskuriliuoksen koostumuksen vaikutusta ryhdyttiin tutkimaan ja Zhang ym. raportoivat vuonna 2002 [27] aikaisemmissa mittauksissa yleisesti käyte-

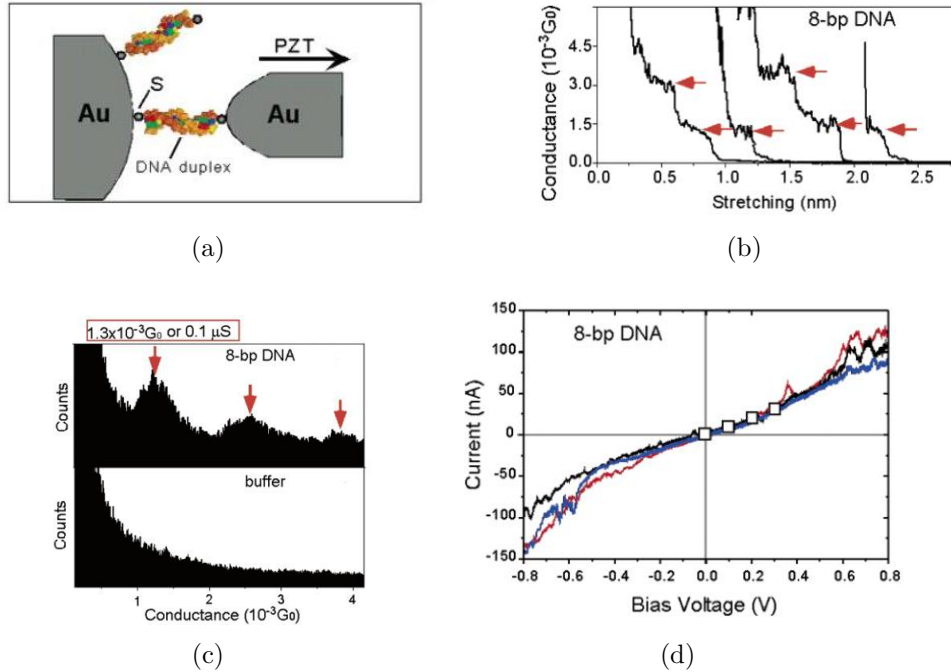


tyn TE-puskurin (10 M Tris-HCl, 1mM EDTA, NaCl) vaikuttavan sähkönjohtavuuteen jonkin verran. He mittasivat tioli- $\lambda$ -DNA:n sähkönjohtavuutta kultaelektrodeilla, joiden välinen välimatka oli 4  $\mu\text{m}$ . Erona aikaisempiin tutkimuksiin he käyttivät 5mM ammonium-asetaatiliuosta huuhtelevaan näytteestä pois jäänteet TE-puskurista. Varsinaiset mittaukset suoritettiin tyhjiössä ( $\approx 10^{-10}$  bar). Havaittavaa virta-jännite-käyttäytymistä ei havaittu 10 pA:n mitaustarkkuuden rajoissa, kun taas kontrollinäytteellä, joka ei sisältänyt DNA-juosteita ja jota ei oltu käsitelty ammonium-asetaatilla, (I,V)-käyrässä havaittiin hystereesiä ja 50 pA:n virta kulki jännitteellä 10 V. Puskuriliuoksen suolajäänteiden voitiin siis sanoa muodostavan johtavan reitin elektrodien välille vaikka mittaukset tehtäisiinkin tyhjiössä. Toki johtavuus ei ollut iso ja ei voitu sanoa, etteikö ammonium-asetaatikäsittely olisi vaikuttanut DNA-juosteen rakenteeseen tai sen muodostamiin kontakteihin elektrodien kanssa.

Myös ympäröivän ilmakehän vaikutusta tutkittiin ja esimerkiksi vuonna 2005 julkaistu tutkimus [28] (Terawaki ym.) osoitti, että kosteus vaikutti tuloksiin merkittävästi ainakin heidän käyttämällään mittausten menetelmällä. He valmistivat poly(dG) · poly(dC)-juosteista kiillepinnalle verkkomaisia rakenteita, joiden päälle höyrystettiin kultaelektrodi. DNA-rakenteiden johtavuus määritettiin mittaamalla virtaa AFM-kärjen ja elektrodin välillä eri kosteusolosuhteissa, kun kärjen ja elektrodin välinen matka oli noin 100 nm. Suhteellisen ilmakehän ollessa 0 % johtavuus oli samaa luokkaa kuin kontrollinäytteellä, jossa ei ollut DNA-rakenteita. Ilmakehän ollessa puolestaan 60 % DNA-verkkojen johtavuus oli noin 50 % suurempi kuin pelkän kiillepinnan johtavuus, minkä voitiin tulkita tarkoittavan sitä, että vesimolekyylien adsorptio DNA-molekyylien ympärille loi ionisesti johtavan kanavan.

Tähän mennessä kaikki esitellyt suorat mittaukset oli tehty kuivattamalla DNA-näytteen puskuriliuos pois ennen sähkönjohtavuusmittauksia. Tämä toi mukanaan huomattavan määrän epävarmuustekijöitä, sillä kuten todettua, DNA-molekyylin rakenne riippuu hyvin suuresti ympäristön olosuhteista. Ulkoiset tekijät kuten molekyylin ympärille adsorptoituneet vesimolekyylit ja kontaminaatiopartikkelit sekä puskuriliuoksen jäänteet substraattilla ja DNA-ketjun ympärillä olivat osoittautuneet todennäköisimmiksi pääasiallisiksi varausten johtamiskanaviksi myös niissä mittauksissa, missä DNA oli todettu ainakin jollain tasolla johtavaksi. Myös kontaktipinnat DNA-molekyylien ja elektrodien välillä eivät välttämättä olleet täydellisiä useissa mittauksissa ja tämän vaikutusta voitiin vain arvailla. Yleisesti oli kuitenkin hyväksytty tässä vaiheessa, että satunnainen  $\lambda$ -DNA toimii eristeenä ja jatkossa toiveet DNA-molekyylin käyttämisestä sähkönjohtimena kohdistuivatkin erilaisiin emässeksensseihin ja niiden mahdollisesti erilaisiin johtavuusmekanismeihin.

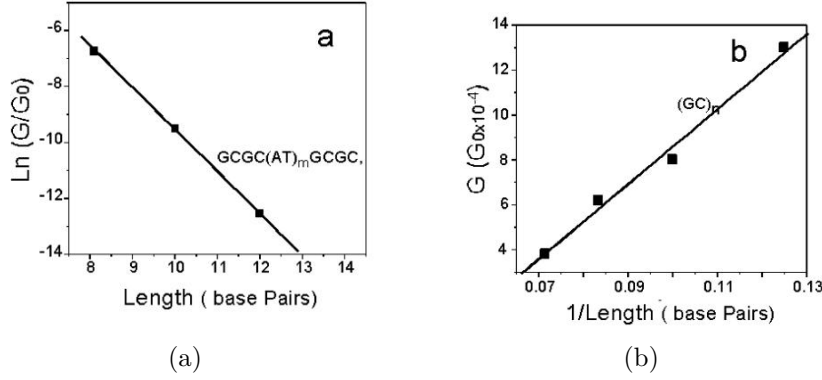
Xun ym. [29] vuonna 2004 julkaistussa tutkimuksessa eliminoitiin sekä DNA-molekyylin eri konformaatioiden että kontaktipintojen epämääräisyyksien vaikutukset sähkönjohtavuuteen. Kaikki mittaukset tehtiin puskuriliuoksessa, joten voitiin olla varmoja, että suurin osa dsDNA-ketjuista esiintyi natiivissa B-konformaatiossa. Mittausjärjestely on esitetty kuvassa 3.9(a). Toisena elektrodina toimi piisubstraattille höyrystetty kultaelektrodi, minkä päälle ti-



**Kuva 3.9.** Kuvassa **a** on esitetty mittausjärjestely, jota käytettiin tutkimuksessa [29] (Xu ym. 2004). Piisirulle höyrytetyn kultaelektrodin päälle tiputettiin tiolimuokattuja dsDNA-juosteita sisältävää liuosta, minkä jälkeen kulta-päällysteinen AFM-kärki saatettiin kontaktiin elektrodin kanssa. Kärkeä nostettiin ja elektrodin ja kärjen välillä kulkevaa virtaa mitattiin. Oletuksena tioliryhmät sitoutuivat kovalenttisesti elektrodin ja AFM-kärkeen. Kuvassa **b** nähdään diskreetit askeleet johtavuudessa kärjen korkeuden funktiona. Askeleet näkyvät, sillä elektrodin ja kärjen välillä saattoi olla sitoutuneena useampia DNA-ketjuja. Kuvan **c** ylempi histogrammi on muodostettu kuvan **b** käyrien datapisteistä jättämällä huomiotta elektrodin ja kärjen välinen etäisyys. Histogrammista nähdään selvästi diskreetit piikit, joista ensimmäinen vastaa yhden molekyylin johtavuutta, toinen kahden ja niin edelleen. Yksittäisen 8-bp DNA-molekyylin johtavuuden voidaan sanoa siten olevan noin  $1,3 \cdot 10^{-3} G_0$ . Alemmassa kuvassa on esitetty sama histogrammi pelkälle puskuriluokselle. Kuvassa **d** on esitetty kolme eri (I,V)-käyrää yksittäiselle DNA-ketjulle.

putettiin dsDNA-ketjuja sisältävää liuosta. Tiolimuokattuja DNA-sekvenssejä oli kahdenlaisia,  $5'-(GC)_n-3'$  ja  $5'-CGCG(AT)_mCGCG-3'$ , joilla tutkittiin sekä toistuvien GC- että AT-emäsjaksojen pituuden vaikutusta johtavuuteen. Ketjut olivat hyvin lyhyitä, 8-14 emäsparia pitkiä, joten niiden rakenne oli luultavasti hyvin stabiili.

Tässäkin mittauksessa käytettiin toisena elektrodina kultapäällystettyä AFM-kärkeä, joka oli eristetty terävintä kärkeä lukuun ottamatta vuotovirran eliminoinniseksi. Johtavuus  $G$  määritettiin useita kertoja kärjen korkeuden  $r$  funktiona, mikä on esitetty kuvassa 3.9(b). Kuten  $(r,G)$ -käyristä nähdään, johtavuudessa havaittiin diskreettejä askelia, sillä kärkeä nostettaessa alkutilanteessa saattoi elektrodin ja kärjen välillä olla kiinnittyneenä useampi kuin yksi molekyyli. Johtavuusaskleet ilmenivät aina samoilla johtavuuden arvoilla, joten



**Kuva 3.10.** Kuvassa on esitetty Xun ym. [29] havaitsemat DNA-molekyylin johtavuuden riippuvuudet sen sisältämien AT- ja GC- jaksojen pituuksiin. Kuten kuvaajasta **a** havaitaan,  $\text{CGCG(AT)}_m\text{CGCG}$ -3' sekvenssin johtavuus vähenee eksponentiaalisesti sekvenssin pituuden funktiona kun taas sekvenssin 5'-(GC) $_n$ -3' vastaava riippuvuus on muotoa  $G = a \cdot \frac{1}{L}$ . Erilaiset riippuvuudet eri sekvensseille viittaavat siihen, että varaus kulkee juurikin emäsparien muodostamien  $\pi$ -sidosten kautta.

voitiin sanoa, että ne eivät johdu molekyylin sisäisestä rikkoontumisesta vaan juuri molekyylin ja elektrodien välisten sidosten katkeamisesta. Kaikkien yksittäisten mittausten, joita tehtiin yli 500 näytettä kohden, tulokset johtavuudelle kerättiin kuvassa 3.9(c) esitellyn kaltaiseen histogrammiin, josta voitiin lukea yksittäisen DNA-ketjun johtavuus ensimmäisestä piikistä. Tekemällä tilastollisesti merkittävä määrä mittauksia pystyttiin siis määrittämään varsin luotettavasti yksittäisen molekyylin johtavuus eri sekvensseille.

Lopulliset Xun ym. tutkimuksen tulokset on esitetty kuvissa 3.10(a) ja 3.10(b). Kuten kuvasta 3.10(a) nähdään, AT-sekvenssien lisääminen  $\text{CGCG}$ -sekvenssien keskelle vähentää johtavuutta eksponentiaalisesti yhtälön  $G = Ae^{-\beta L}$  mukaisesti, missä vaimenemiskerroin  $\beta \approx 0,43 \text{ \AA}^{-1}$ . Pelkkiä GC-pareja sisältävän juosteen johtavuus puolestaan on pituuden funktiona muotoa  $G = a \cdot \frac{1}{L}$ , mikä tukee ajatusta siitä, että varauksenkuljetusmekanismi AT- ja GC-emäsparien lävitse on erilainen. Toisaalta havaittu ero viittaa myös siihen, että varaus kulkee nimenomaan emäsparien muodostamien  $\pi$ -sidosten kautta. Eksponentiaalinen riippuvuus AT-parien kohdalla vahvistaa myös käsitystä siitä, että varauksenkuljetus AT-parien lävitse tapahtuu tunneloitumalla. Myös ionisen johtavuuden osuuden voidaan sanoa olevan tulosten pohjalta merkityksetön. Havaintojen perusteella johtavuus pienenee molekyylin pituuden funktiona varsin hitaasti molemmissa tapauksissa, kun verrataan eksponentiaalista vaimenemiskerrointia  $\beta$  muihin biopolymeereihin, joille yleisesti  $\beta \approx 0,8\text{-}0,9 \text{ \AA}^{-1}$ . Erilaisten kuljetusmekanismien selvittäminen suoran mittauksen keinoin oli tutkimuksen tärkein tulos.

Vuonna 2004 julkaistu tutkimus (Kasumov ym. [30]) osoitti ratkaisevasti myös substraatin vaikutuksen DNA-molekyylin sähkönjohtavuuteen ainakin, jos DNA levitetään suoraan alustalle ja mittaukset suoritetaan molekyylin ollessa suorassa kontaktissa siihen. Tämä oli toki odotettua mutta DNA-

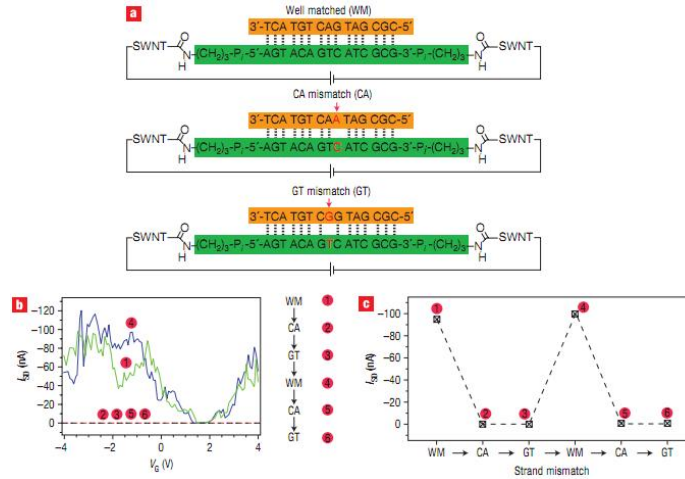
molekyylin konformaatiomuutokset olivat tutkimuksen mukaan yllättävänkin suuria epäsuotuisalla alustalla. Tämä selitti monien muiden tutkimusten tulokset, joiden mukaan DNA käyttäytyy eristeen tavoin, sillä positiivisia  $\text{NH}_3^+$ -ioneja sisältävällä kalvolla päällystetyllä alustalla tutkitut  $\lambda$ -DNA-ketjut käyttäytyivät johdemaisesti vastuksen ollessa vain luokkaa 55 k $\Omega$  ketjua kohden huoneenlämmössä. Ilman  $\text{NH}_3^+$ -kalvoa molekyylit toimivat puolestaan eristeenä.

Erot johtavuuksissa johtuivat tutkimuksen mukaan siitä, että pelkällä kiillesubstraatilla dsDNA-ketjut ikäänkuin litistyivät 1 nm verran, eli niiden korkeus oli vain puolet B-DNA-ketjujen halkaisijasta liuoksessa. Kalvolla käsitellylle substraatille levitetyillä ketjuilla vastaavaa konformaatiomuutosta ei havaittu. Johtavuusmittaukset tehtiin myös alhaisissa lämpötiloissa (4 K), missä  $\lambda$ -DNA-ketjut olivat edelleen johdemaisia vastuksen ollessa noin 95 k $\Omega$  molekyylia kohden, joten ioninen varauksenkuljetus ei voinut selittää tuloksia. Eräs huomattava tulos oli myös se, että suorat ketjut olivat selvästi johtavampia kuin mutkia sisältävät ketjut, mikä osaltaan myös selitti aikaisempia ristiriitaisia tuloksia tutkimuksissa, joissa tätä asiaa ei ollut huomioitu riittävästi. Toisaalta tämä myös tarkoitti sitä, että tapoja saada elektrodien ja DNA-ketjujen liitokset paremmiksi sekä itse DNA-ketjut käyttäytymään vakaammin eri olosuhteissa tuli kehittää, jotta niiden integroiminen osaksi virtapiirejä olisi mahdollista.

Vuonna 2008 Guo ym. esittelivät uudenlaisen tavan liittää DNA osaksi virtapiiriä [31]. DNA saatiin liittymään kovalenttisesti hiilinanoputken keskelle plasmaioni-etsauksella tehtyyn 6 nm aukkoon. Aukon tekeminen hiilinanoputkeen jätti jäljelle jääneiden putkien kärjet hapettuneeseen tilaan, joten tiolimuokattujen DNA-ketjun liittäminen niiden väliin oli huomattavan helppoa ja toistettavaa. Vakaiden liitosten ansiosta luotettavia mittauksia voitiin tehdä liuoksessa, missä DNA säilytti natiivin konformaationsa.

Ryhmä suoritti mittauksia monilla eri emäsekvensseillä – sekä täysin pariutuneilla juosteilla että juosteilla, joissa yksi emäs oli vaihdettu ”väärään” emäkseen komplementaariseen ssDNA-juosteeseen nähden. Täysin pariutuneiden juosteiden resistanssit olivat luokkaa 1-10 M $\Omega$  kun taas yhden emäsmuutoksen sisältävien juosteiden resistanssit olivat noin 300 kertaa suurempia. Kaikki mittaustulokset varmistettiin käsittelemällä näytteet DNA-katkaisuentensyymillä ja varmistamalla, ettei tämän jälkeen hiilinanoputkien välillä kulkenut lainkaan virtaa. Tutkimuksen tulosten osoittama sähkönjohtavuuden suuri herkkyys pieniin muutoksiin juosteessa tarkoitti sitä, että DNA ei normaalissa dsDNA-muodossa sovellu laajasti tulevaisuuden elektroniikan komponenttien perustaksi. Toisaalta tulokset auttavat ymmärtämään, kuinka DNA-vaurioiden tunnistus saattaa soluissa tapahtua.

Vaihtoehtosten DNA-rakenteiden tutkimus on viime aikoina lisääntynyt osaltaan edellä esitettyjen tulosten vaikutuksesta. Tällä hetkellä ylivoimaisesti lupaavin ja mielenkiintoisin tällainen rakenne on G4-johto, jonka on osoitettu olevan erityisen vakaa rakenne hyvin monenlaisissa ympäristön olosuhteissa [32], [33]. Sähkönjohtavuusmittauksia G4-johdoille on ehditty tekemään vain muutamia, joista yhtenä mainittakoon Liun ym. vuonna 2010 tekemä mit-



**Kuva 3.11.** Kuvassa on esitetty Guon ym. [31] vuonna 2008 käyttämä mitausjärjestely, missä ssDNA liitettiin kahden hiilinanoputken väliin johtavuusmittauksia varten. Toinen joko täysin komplementaarinen tai yhden emäsmuutoksen sisältämä ssDNA-juoste pariutettiin nanoputkien väliin kiinnitettyyn juosteeseen, jolloin voitiin tutkia yksittäisten emäsmuutosten vaikutusta dsDNA-juosteeseen vastukseen. Kuvassa **a** on esitetty esimerkkejä näistä emäsmuutoksista. Kuvassa **b** on puolestaan esitetty eri dsDNA-juosteille lähteen ja nielun välillä kulkeva virta hilajännitteen  $V_G$  funktiona lähde-nielu-jännitteen ollessa vakio 50 mV. Kuvassa **c** on esitetty virta hilajännitteen arvolla 3 V, mistä nähdään, että emäsmuutokset vaikuttavat selvästi juosteiden lävitse kulkevan virran suuruuteen.

taus [34], missä G4-johdot kiinnitettiin kovalenttisesti mekaanisesti kontrolloitavan murtumaliitoksen välille. Liitoksen elektrodien välistä etäisyyttä voitiin siis muuttaa ja saada siten tietoa G4-johtojen johtavuuden muutoksista sitä venytettäessä. Lisäksi kovalenttinen sidos G4-johdon ja elektrodien välille tehtiin käyttämällä molekyylin päissä muokattuja tyymiini-emäksiä, jotka muodostivat kovalenttisen sidoksen metallielektrodien kanssa. Varauskulki siis oletettavasti miltei esteettä G4-johdon  $\pi$ - $\pi$ -sidosten kautta. Muutettaessa murtumaliitoksen suuruutta välillä 0,5 – 2,5 nm kytkennän resistanssi pysyi lähes vakiona, mikä tarkoitti G4-johdon johtavuuden olevan riippumaton sen venymään. Lisäksi vaikka molekyyliä venytettiin toistuvasti, olivat mittaustulokset yhteneviä, joten G4-johdon rakenteeseen ei tullut merkittäviä palautumattomia muutoksia ulkoisen voiman kohdistamisesta huolimatta.

G4-johtojen perustana olevien DNA-sekvessien itsejärjestyvyys mahdollistaa yksinkertaisten johteiden lisäksi myös monimutkaisempien rakenteiden luomisen. Esimerkiksi artikkelissa [35] (Lubitz & Kotlyar 2011) demonstroidaan G4-DNA-hopeananopartikkelien valmistaminen. Valmistetut partikkelit koostuivat kahdesta tai kolmesta G4-DNA:n avulla yhteenliitetystä Ag-nanopartikkelista. Artikkelissa esitetään, että hopeananopartikkelit molekyylin päissä voisivat luoda erinomaisen kontaktin metallielektrodien kanssa, joten tällaisten molekyylien liittäminen osaksi virtapiiriä saattaisi olla erittäin helppoa. Yhteenvetona voidaan siis sanoa, että stabiilisuus ja varauksenkuljetuskyky it-

sejärjestyvyyden ohella tekevät G4-johdosta erittäin potentiaalisen kandidaatin tulevaisuuden nanoelektronikan komponenttien perustaksi.

## 4 Yhteenveto

Nykyisten mikropiirien valmistusmenetelmien kokoskaalojen rajat ovat lähestymässä, joten piirien tehojen kasvattamiseksi myös tulevaisuudessa vaihtoehtoisten menetelmien kehittämistä vaaditaan. Nanoteknologia tarjonnee ratkaisun tähän haasteeseen. Eräs erittäin mielenkiintoinen tulevaisuuden komponenttien perusta olisi DNA-molekyyli, jonka muokattavuus ja ylivoimaiset itsejärjestyvyysominaisuudet tarjoaisivat erittäin monipuolisen rakennuspalikan monenlaisiin käytännön sovelluksiin.

DNA-ketjujen sähköisten ominaisuuksien mittausten tulokset ovat vaihdelleet laidasta laitaan riippuen käytetyistä tutkimusasetelmista ja tämä on hidastanut käytännön sovellusten kehittämistä. Epäsuorat mittaustavat, jotka keskittyvät DNA-liuosten spektroskopisten ominaisuuksien tutkimiseen, ovat antaneet tietoa mm. varauksen siirtymisprosessin tehokkuudesta, siihen liittyvistä aikaskaaloista sekä eri emäsekvenssien vaikutuksesta varauksenkuljetukseen. Tulokset ovat nostaneet kysymyksiä varauksenkuljetukseen liittyvistä mekanismeista mutta yleisesti hyväksytyin ja helpoiten ymmärrettävä lienee malli, jossa DNA-ketjuun indusoitu elektroniaukko kulkeutuu lähinnä ns. ”G-hyppyjen” kautta, mikäli G-emästen välillä olevien A- ja T- emästen määrä on pieni. Jos G-emästen välillä on useita AT-emäksiä, voi myös A-emäs hahpettua, jolloin varaus kulkeutuu termisten ”A-hyppyjen” kautta seuraavalle G-emäkselle. Todellisuudessa tilanne ei kuitenkaan ole aivan näin yksinkertainen, vaan DNA-juosteen emäksien muodostamaa  $\pi$ -pinoumaa täytyy tarkastella kokonaisuutena varauksen siirtymisen tehokkuuden kannalta.

Epäsuorien mittausten tuloksista ei voida tehdä suoria johtopäätöksiä DNA-ketjun tasavirtajohtavuudesta. Mittaukset ovat kuitenkin osoittaneet DNA-molekyylin kykenevän johtamaan sähköä muodossa tai toisessa, mikä on vauhdittanut suoran lähestymistavan mittausten ja siten DNA-molekyylin kontrolloimiseen tarkoitettujen menetelmien kehitystä. Ongelmana nimittäin on ollut DNA-ketjun luotettava asetteleminen kahden elektrodin väliin johtavuusmittausten suorittamiseksi. Nykypäivään mennessä menetelmät ovat kuitenkin kehittyneet huomasti, ja nykyään DNA-ketju voidaankin esimerkiksi asetella kahden hiilinanoputken tai metallielektrodin väliin käyttämällä sähkökenttiä. DNA-molekyylin ja elektrodien väliset rajapinnat olisi kuitenkin saatava mahdollisimman täydellisiksi, mihin liittyykin edelleen pieni epävarmuustekijä. Toistettavia tasavirtamittauksia on saatu tästä huolimatta suoritettua. Tuloksien mukaan DNA-molekyyli on ainakin perusmuodossaan erittäin herkkä ympäristön olosuhteiden muutoksille, ja tätä tekijää ei ole osattukaan aikai-

semmissä mittauksissa ottaa tarpeeksi hyvin huomioon, mistä johtuu tulosten suuri hajonta.

Suurin osa tähän mennessä tehdyistä mittauksista on suoritettu tavallilla kaksijuosteisilla DNA-ketjuilla, mutta aivan viime aikoina valmistusmenetelmien luotettavuuden paraneminen on mahdollistanut myös huomattavasti monimutkaisempien rakenteiden tuottamisen. Eräs erittäin mielenkiintoinen DNA-rakenne on G-johto, joka koostuu neljästä yhteen liittyneestä, pääasiassa G-emäksiä sisältävästä ssDNA-ketjusta. G-emäksen alhainen hapettumispotentiaali voisi mahdollistaa tällaisten rakenteiden erittäin hyvän sähkönjohtavuuden. Lisäksi G-johtojen on osoitettu olevan erittäin vakaita rakenteita vaihtelevissa ympäristön olosuhteissa, joten niiden käyttö käytännön sovelluksissa voisi olla hyvinkin mahdollista.



# Lähdeluettelo

- [1] V. Bakshi, 2009 EUVL Workshop Summary, Sheraton Waikiki, Hawaii, July 13-17, (2009)
- [2] David L. Nelson & Michael M. Cox (2008): *Lehninger's Principles of Biochemistry*, 5th, W.H. Freeman and company
- [3] D.D. Eley & D.I. Spivey. (1962): *Semiconductivity of organic substances - Part 9. Nucleic acid in the dry state*", Trans. Faraday Soc., 58, 1962, 411.
- [4] R.A. Marcus & Norman Sutin. (1985): *"Electron transfers in chemistry and biology"*, Biochimica et Biophysica Acta, 811, (1985), 265-322
- [5] Masateru Taniguchi & Tomoji Kawai (2006): *"DNA electronics"*, Physica E, 33, (2006), 1-12
- [6] J.K. Barton, C.V. Kumar & N.J. Turro (1986): *"DNA-Mediated Photoelectron transfer reactions"*, J. Am. Chem. SOC., 1986, 108, 6391-6393
- [7] K.A.M. Creber & J.K.S. Wan: *Electron spin resonance-high-performance liquid chromatography study of organometallic free radical reactions: separation and characterization of the rhenium carbonyl-o-quinone radical complex*, J. Am. Chem. SOC. 1981, 103, 2101-2102
- [8] G. Orellana, A.K. Mesmaeker, J.K. Barton & N.J. Turro: *"Photoinduced electron transfer quenching of excited Ru(II) polypyridyls bound to DNA: The role of nucleic acid double helix"* P & P Vol. 54, No 4, pp. 499-509, 1991
- [9] Anne M. Brun & Anthony Harriman *"Dynamics of Electron Transfer between Intercalated Polycyclic Molecules: Effect of Interspersed Bases"*, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 3656-3660
- [10] C.J. Murphy, M.R. Arkin, Y. Jenkins, N.D. Ghatlia, S.H. Bossmann, N.J. Turro, J.K. Barton: *"Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix"*, Science, New series, vol. 262, 5136, (1993), 1025-1029
- [11] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson & P. F. Barbara: *"Rates of DNA-Mediated Electron Transfer Between Metallointercalators"*, Science (1996), Vol. 273. no. 5274, pp. 475 - 480
- [12] Daniel B. Hall, R. Erik Holmlin & Jacqueline K. Barton: *"Oxidative DNA damage through long-range electron transfer"*, Nature 382, 731 - 735

- [13] Eric Meggers, Maria E. Michel-Beyerle & Bernd Giese: "*Sequence dependent long range hole transport in DNA*", J. Am. Chem. Soc. (1998), 120, 12950-12955
- [14] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. R. Treadway, J. K. Barton & A. H. Zewail: "*Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 6014-6019, (1999)
- [15] Tashica T. Williams, Duncan T. Odom & Jacqueline K. Barton: "*Variations in DNA Charge Transport with Nucleotide Composition and Sequence*", J. Am. Chem. Soc., 122, 9048-9049, (2000)
- [16] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Kohler, M. Spormann & S. Wessely: "*Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling*", Nature, vol 412, 318-320, (2001)
- [17] T. Takada, K. Kawai, M. Fujitsuka & T. Majima: "*Direct observation of hole transfer through double-helical DNA over 100 Å*", PNAS, vol 101, no. 39, 14002-14006, (2004)
- [18] Melanie A. O'Neill & Jacqueline K. Barton: "*DNA Charge Transport: Conformationally Gated Hopping through Stacked Domains*", J. AM. CHEM. SOC., 126, 11471-11483, (2004)
- [19] Erez Braun, Yoav Eichen, Uri Sivan & Gdalyahu Ben-Yoseph: "*DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire*", Nature, (1998), vol 391, 775-778
- [20] Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka & M. Shimomura: "*Anisotropic Electric Conductivity in an Aligned DNA Cast Film*", J. Am. Chem. Soc. (1998), 120, 6165-6166
- [21] Hans-Werner Fink & Christian Schönenberger: "*Electrical conduction through DNA molecules*", Nature, (1999), vol 398, 407-410
- [22] P.J. de Pablo et al: "*Absence of dc-Conductivity in l-DNA*", Physical review letters, (2000), Vol. 85, 23, 4992-4995
- [23] P. J. de Pablo, M. T. Martínez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, W.K. Maser, A.M. Benito, E. Muñoz, and A.M. Baró, Adv. Mater. 12, 573 (2000)
- [24] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries & C. Dekker: "*Direct measurement of electrical transport through DNA molecules*", Nature, vol 403, (2000)
- [25] A. J. Storm, J. van Noort, S. de Vries, and C. Dekker: "*Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale*", Applied Physics Letters, Vol 79, 23, (2001)
- [26] H. Nakayama, H. Ohnob & Y. Okahata: "*Intramolecular electron conduction along DNA strands and their temperature dependency in a DNA-aligned cast film*", Chem. Commun., 2300-2301, (2001)

- [27] Y. Zhang, R. H. Austin, J. Kraeft, E.C. Cox & N. P. Ong: "*Insulating Behavior of  $\lambda$ -DNA on the Micron Scale*", Physical Review Letters, Vol 89, 19, (2002)
- [28] A. Terawaki, Y. Otsuka, H. Lee, T. Matsumoto, H. Tanaka & T. Kawai: "*Conductance measurement of a DNA network in nanoscale by point contact current imaging atomic force microscopy*", Applied Physics Letters 86, 113901, (2005)
- [29] B. Xu, P. Zhang, X. Li & N. Tao: "*Direct Conductance Measurement of Single DNA Molecules in Aqueous Solution*", Nano Letters, Vol. 4, No. 6, 1105-1108, (2004)
- [30] A. Yu. Kasumov, D. V. Klinov, P.-E. Roche, S. Guéron & H. Bouchiat: "*Thickness and low-temperature conductivity of DNA molecules*", Applied Physics Letters 84, 6, (2004)
- [31] X. Guo, A. Gorodetsky, J. Honez, J. Barton & C. Nuckolls: "*Conductivity of a single DNA duplex bridging a carbon nanotube gap*", Nature, vol 3, (2008)
- [32] A. B. Kotlyar, N. Borovok, T. Molotsky, H. Cohen, E. Shapir & D. Porath: "*Long, Monomolecular Guanine-Based Nanowires*", Adv. Mater. (2005), 17, 1901-1905
- [33] J. T. Davis & G. P. Spada: "*Supramolecular architectures generated by self-assembly of guanosine derivatives*", Chem. Soc. Rev., 36, 296-313, (2007)
- [34] S.-P. Liu, S. Weisbrod, Z. Tang, A. Marx, E. Scheer & A. Erbe: "*Direct Measurement of Electrical Transport Through G-Quadruplex*", Angew. Chem. Int., 49, 3313-3316, (2010)
- [35] I. Lubitz, A. Kotlyar: "*Self-Assembled G4-DNA-Silver Nanoparticle Structures*", Bioconjugate Chem. 22, 482-487, (2011)