

# انحلال DNA در سامانه‌ی میسلی معکوس زیست سازگار فسفولیپیدی

شهریار عصفوری

بوشهر، دانشگاه خلیج فارس، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی

علی حق طلب\*<sup>+</sup>

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، بخش مهندسی شیمی، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵

پیر لوئیجی لویزی

سوئیس، زوریخ، انستیتو تحقیقات فدرال سوئیس، بخش مواد

**چکیده:** میسل های معکوس لیپیدی سامانه‌هایی هستند که می‌توانند در غشاءهای سلولی وجود داشته باشند، لذا می‌توان از این سامانه‌ها برای مطالعه و مدل‌سازی بسیاری از برهم‌کنش‌های موجود بین اجزای درون سلولی در خارج از بدن و در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد. در این تحقیق انحلال DNA در سامانه میسلی معکوس زیست سازگار فسفولیپیدی مورد مطالعه قرار گرفت و ملاحظه شد که در شرایط ویژه‌ی آزمایشگاهی DNA می‌تواند در سامانه ذکر شده حل شود. نتیجه‌های حاصل از طیف سیرکولار دیکرویزم نشان داد که DNA در این سامانه به صورت فوق‌العاده متراکم و در صورت بندی Z است. همچنین نتیجه‌های به دست آمده از دستگاه تفرق دینامیکی نور مبین شکل‌گیری میسل های معکوس غول پیکر با ابعاد بیش از ۷۰۰ نانومتر از میسل های معکوس خالی ۲ نانومتر است.

**واژه‌های کلیدی:** میسل معکوس، تراکم، سیرکولار دیکرویزم، تفرق دینامیکی، DNA، فسفولیپید.

**KEY WORDS:** Reverse micelle, Condensation, Circular dichroism, Dynamic light scattering, DNA, Phospholipid.

## مقدمه

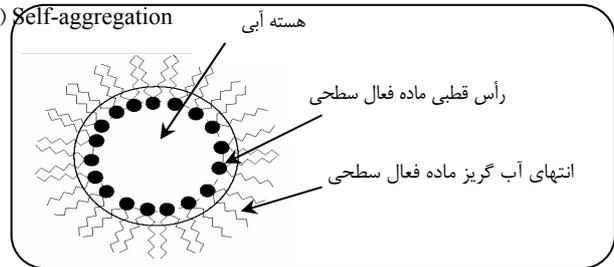
محلول های میسلی معکوس به لحاظ ریز ساختار<sup>(۱)</sup> شامل لخته‌هایی است که بی‌درنگ بر اثر خود سامانگی<sup>(۲)</sup> مولکول های ماده فعال سطحی در حلال های آلی شکل می‌گیرند. به‌طور کلی لخته‌های شکل گرفته از مخلوط‌های سه‌تایی ماده فعال سطحی - آب - روغن، دارای یک شکل کروی بوده و میسل معکوس نامیده می‌شوند (شکل ۱).

این لخته‌ها به واسطه دارا بودن هسته آبی قادر به انحلال مولکول‌های آب دوست در توده فاز آلی هستند. در دو دهه اخیر از سامانه‌های میسلی معکوس برای هدف‌های متعددی از جمله: جداسازی گزینشی<sup>(۳)</sup> پروتئین از مخلوط های پروتئینی [۱]، جداسازی پیوسته<sup>(۴)</sup> آنزیم ها از محیط کشت [۲]، ایزوله کردن پروتئین های درون سلولی از سلول های باکتریایی [۳]، انحلال و

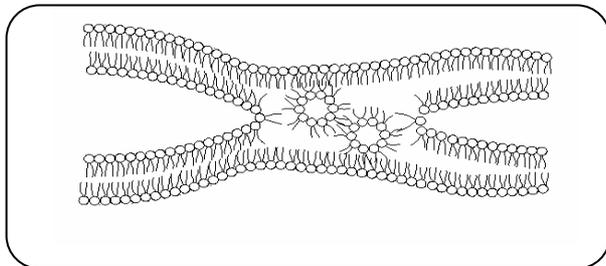
+E-mail: haghtala@modares.ac.ir

(۱) Microstructure

(۲) Self-aggregation



شکل ۱- نمایی از یک میسل معکوس شامل هسته آبی، رأس قطبی و انتهای آب گریز ماده فعال سطحی.



شکل ۲- نمایی از میسل های معکوس فشرده درون غشایی.

آزمایشگاهی آنها قادر به تشکیل میسل معکوس<sup>(۳)</sup> هستند [۱۱]. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی آزمایش های انجماد - شکست<sup>(۴)</sup> روی مخلوط های متفاوت لیپیدی صورت گرفته و نشان می دهد که میسل های معکوس می توانند در جدار دو لایه غشاءها وجود داشته باشند [۱۰-۱۲]. در این حالت میسل های معکوس به صورت فشرده بین دو لایه غشاء وجود دارند.

شکل ۲ نمایی از این میسل های معکوس درون غشایی را نشان می دهد. در مطالعه های بسیاری نشان داده شده که تبادل لیپید بین غشاء و میسل معکوس فشرده بسیار سریع صورت می گیرد [۱۳]، به طوری که محققان تصور می کنند که پروتئین می تواند با وارد شدن به این میسل معکوس از یک سمت غشاء به سمت دیگر انتقال پیدا کند [۱۴]. تاکنون مطالعات چندانی برای شناختن سامانه های میسلی معکوس لیپیدی به عمل نیامده است [۱۵-۱۹]. بیشتر مطالعات انجام شده محدود به فسفولیپیدهایی است که از زرده ی تخم مرغ<sup>(۵)</sup> [۲۰-۲۲] یا دانه ی سویا<sup>(۶)</sup> [۲۳] به دست آمده و شامل ترکیب های لیپیدی با شاخه های هیدروکربنی متفاوت هستند. میسل های تشکیل شده از این ترکیب ها به طور معمول دارای ابعاد بسیار کوچک و در مقیاس آنگسترم است.

تاکنون مطالعات اندکی روی انحلال مولکول های زیستی و به ویژه DNA در سامانه های میسلی معکوس انجام گرفته است. باتیستل و همکاران برای نخستین بار در سال ۱۹۸۸ فرایند انحلال DNA در سامانه میسلی معکوس کاتیونی<sup>(۷)</sup> CTAB را مورد

متراکم کردن DNA<sup>(۱)</sup> [۴] و واکنش آنزیمی آنتی بادی ها [۵] استفاده شده است. در سال های اخیر با افزایش توجه محققان به توسعه علوم نانو تکنولوژی به دلیل کاربردهای فوق العاده ی مواد مافوق ریز<sup>(۲)</sup>، تحقیقات متعددی در خصوص تولید ترکیب های مواد مافوق ریزی چون کادمیم، مس و طلا در سامانه های میسلی معکوس به عمل آمده است [۶-۹].

استفاده از مواد فعال سطحی زیستی برای تشکیل سامانه های میسلی معکوس می تواند بر مطالعه کاربرد زیستی این گونه سامانه ها بیافزاید. امروزه ثابت شده است که غشاء های زیستی از گونه های متفاوت لیپید تشکیل شده که به صورت لخته هایی در پیکره موجودات زنده ظاهر می شود. تنوع شیمیایی غشاء های لیپیدی از تعداد اسیدهای آمینه یا کربوهیدرات ها نیز بیشتر است [۱۰]. این مولکول ها با تشکیل موانعی باعث جدا کردن سلول های زنده از محیط اطرافشان شده و در حفظ استحکام و یکپارچگی موجودات زنده اعم از گیاهی و حیوانی نقش حیاتی ایفا می کنند. فسفولیپیدها گونه های لیپیدی هستند که در تمام ارگانیسم های زنده به وفور یافت می شوند. این مولکول ها در سلول های گیاهان و حیوانات ذخیره می شوند تا در خلال فرایندهای رشد و مرمت سلولی مورد استفاده قرار گیرند. تشکیل لخته های کوچک، لیپو پروتئین، و انتقال سریع بین سلولی این لخته ها از ویژگی های دیگر این مولکول ها است. این ماده ی حیاتی بخش عمده وزن خشک ماده ی سفید مغز، ستون فقرات و عصب ها را نیز تشکیل می دهد. فسفولیپیدها ویژگی های فعالیت سطحی داشته و تمایل بسیار زیادی دارند تا لخته هایی با ساختارهای متفاوت تشکیل دهند، به طوری که در شرایط ویژه ی

بررسی قرار دادند [۲۴]. در سال ۱۹۹۰ هانلی و همکاران با استفاده از

ماده فعال سطحی آنیونی<sup>(۸)</sup> AOT با غلظت ۱۰۰ میلی مولار

(۱) Deoxyribonucleic acid

و  $w_0=6$ <sup>(۱)</sup> (نسبت مولی آب به ماده فعال سطحی) DNA را در فاز

میسلی معکوس حل کردند [۲۵]. آنها همچنین نشان دادند که

می توان این فرایند را با ماده فعال سطحی تری تون<sup>(۲)</sup> B نیز انجام

داد [۲۶]. اخیراً برخی از محققین فرایند انحلال DNA را در

سامانه های میسلی معکوس AOT [۲۷] و CTAB [۲۸] دوباره

مورد بررسی قرار داده اند.

اگرچه تحقیقات اندکی روی انحلال DNA در سامانه های

میسلی معکوس شیمیایی انجام شده، لیکن با آخرین اطلاعات

به دست آمده به نظر می رسد تا کنون هیچ مطالعه ای در خصوص

انحلال DNA در سامانه های میسلی زیست سازگار که جنبه

واقعی تری دارند به عمل نیامده است. افزون بر این از آنجا که

سامانه های میسلی معکوس فسفولیپیدی برای مطالعه پروتئین های

متصل شده به غشاء سلولی، مدل بسیار مناسبی هستند، لذا در این

تحقیق برهم کنش بین DNA و میسل معکوس فسفولیپیدی مورد

بررسی قرار گرفت. برای این منظور لازم است به چندین پرسش

مهم پاسخ داده شود. نخستین پرسش در خصوص انحلال

مولکول DNA در فاز میسلی معکوس لیپیدی است. پرسش دیگر

در خصوص اثر برهم کنش میسل معکوس بر صورت بندی DNA

حل شده در این فاز بوده و نکته دیگری که می بایست برای آن

پاسخ مناسبی یافت، اثر انحلال DNA بر اندازه ی میسل معکوس

لیپیدی است. برای پاسخ به پرسش های مطرح شده می توان به

ترتیب از آزمایش های طیف سنجی UV، سیرکولار دیکرویزم

(CD)<sup>(۳)</sup> و تفرق دینامیکی نور (DLS)<sup>(۴)</sup> استفاده کرد.

## مواد و روش ها

ماده شیمیایی دی والرویل فسفات دیلکالین<sup>(۵)</sup> (DVPC) از

شرکت آواتی - پلار - لیپید (آمریکا) خریداری شد. لامبدا DNA،

ایزواکتان و ۱- هگزانول از شرکت فلوکا (سوئیس) سفارش داده

شد. فاز آبی حاوی DNA و فاز میسلی معکوس حاوی ۱- هگزانول

و فسفولیپید DVPC به ترتیب با غلظت های ۴ میلی گرم بر

میلی لیتر، ۱۰ درصد حجمی و ۵۰ میلی مولار تهیه شد. ناخالصی ها

در سامانه ی میسلی معکوس اولیه مانند ذره های معلق جامد و

غبار<sup>(۶)</sup> با استفاده از صافی میلی پور<sup>(۷)</sup> خارج شد.

در این تحقیق برای انحلال DNA در سامانه میسلی معکوس

از روش تزریق مستقیم فاز آبی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد استفاده شد. همچنین اندازه گیری غلظت DNA در سامانه ی میسلی معکوس به وسیله ی دستگاه UV واریان مدل Cary 1E در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از سل کوارتز با طول مسیر ۱ سانتی متر انجام شد. حالت مرجع در تمام آزمایش ها سامانه بدون DNA بوده که به دقت مشابه سامانه های مورد آزمایش است. پس از معین کردن وجود DNA در فاز میسلی معکوس لازم است که برهم کنش بین میسل های معکوس و مولکول های DNA مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور از دستگاه سیرکولار دیکرویزم JASCO J-6۰۰ استفاده شد. برای اندازه گیری شعاع هیدرودینامیکی میسل های معکوس دستگاه تفرق دینامیکی نور با مشخصات: لیزر هلیوم - نئون ۲۵ میلی وات، زاویه سنج ۵۰۰۰-ALV DLS/SLS، دو عدد تقویت کننده نور فتودیود SPCM-AQR ساخت شرکت پرکین المر و دیجیتال Autocorrelator مدل ۵۰۰۰-ALV مورد استفاده قرار گرفت.

## نتیجه ها و بحث

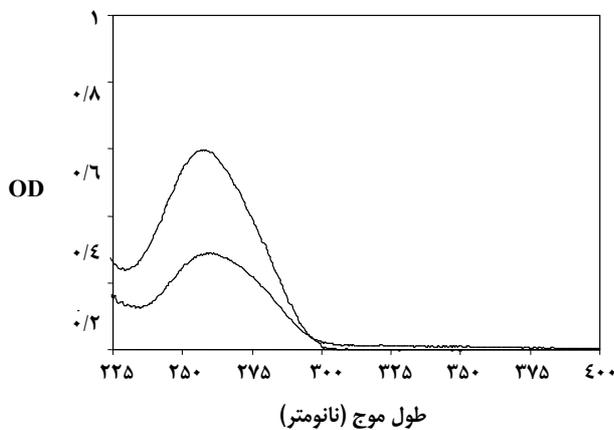
برای اثبات وجود مولکول DNA در میکرو فاز آبی درون میسل معکوس یا به عبارت دیگر انحلال آن در فاز میسلی معکوس، مشاهده اوج طیف جذبی UV محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر الزامی است، زیرا مولکول DNA یک مولکول آب دوست بوده و در صورت وجود در فاز آبی دناتوره شده و باعث کدورت محلول می شود که این پدیده در غلظت های بیش از ۴ میلی گرم بر میلی لیتر DNA مشاهده شد.

شکل ۳ مقدار جذب UV برای DNA در  $w_0$  های ۵ و ۱۰ در فاز میسلی معکوس را نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می شود نقطه اوج طیف UV در طول موج ۲۶۰ نانومتر قابل رؤیت است. از آنجا که تنها موقعیت موجود برای وجود آب در محلول

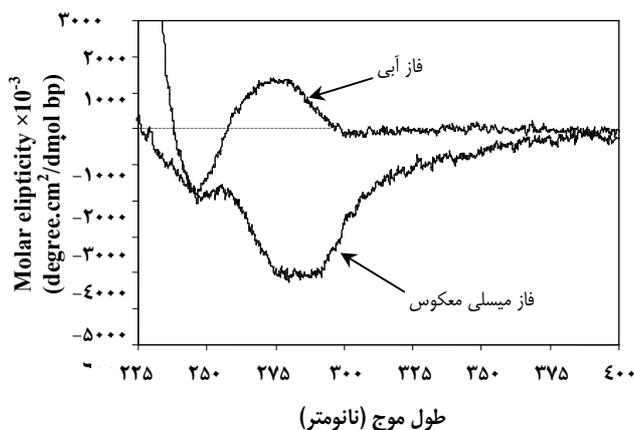
- (۱)  $w_0 = [\text{moles of water}] / [\text{moles of surfactant}]$
- (۲) Triton B
- (۳) Circular Dichroism
- (۴) Dynamic Light Scattering

حالت در میسل معکوس صورت‌بندی DNA از خانواده Z است که این نوع طیف در پیش برای اثر ترکیب‌های پلاتین بر ساختار DNA گزارش شده است [۳۲].

شکل ۵ نتیجه‌های حاصل از آزمایش سیرکولار دیکرویزم برای  $w_0 = 10$  را نشان می‌دهد. ملاحظه می‌شود که در این حالت



شکل ۳- نمودار UV برای DNA در فاز میسلی معکوس در  $w_0$  های ۱۰ و ۵.

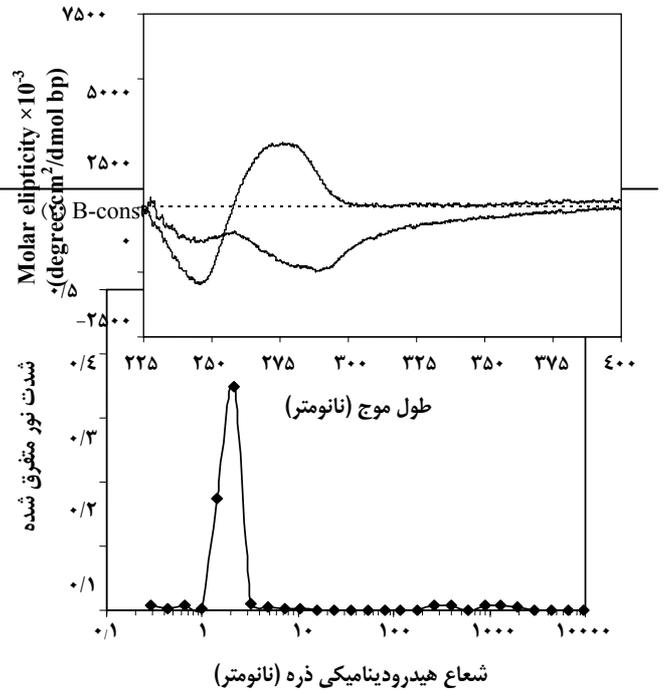


میسلی معکوس، هسته آبی *1,3-bis(3-dimethylammonio)propane* (۵) استفاده از نتیجه‌های اخیر می‌توان دریافت که مولکول DNA به درون میسل‌های معکوس راه یافته است. ملاحظه می‌شود در حالت  $w_0 = 5$  و در طول موج‌های بالاتر از ۳۰۰ نانومتر مقدار جذب سامانه‌ی میسلی معکوس به‌طور کامل بر محور افقی منطبق نمی‌شود که این پدیده می‌تواند به علت متراکم شدن DNA در ریز محفظه<sup>(۸)</sup> میسلی معکوس باشد [۳۳].

پس از اثبات وجود DNA در میسل‌های معکوس، لازم است اثرهای برهم‌کنشی میسل معکوس بر مولکول DNA استخراج شده در فاز میسلی معکوس مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور از آزمایش طیف سنجی سیرکولار دیکرویزم استفاده شد. این طیف‌سنجی یک فناوری ایده‌آل برای مطالعه ساختار مولکول‌هایی است که از خود فعالیت نوری نشان می‌دهند، به طوری که این روش نوری به‌طور منحصر نسبت به مولکول‌های نامتقارن حساس بوده و استفاده از آن در سامانه‌های زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای مقایسه طیف‌های سیرکولار دیکرویزم DNA در فازهای میسلی معکوس و آبی می‌بایست به موازات تزریق فاز آبی حاوی DNA به حجم معینی از فاز میسلی معکوس، همین مقدار را نیز به حجم یکسان از فاز آبی خالص (بدون DNA) تزریق کرد. تا به غلظت‌های برابر DNA در هر دو فاز دسترسی پیدا کرد. شکل ۴ نتیجه‌های حاصل از آزمایش مذکور را در  $w_0 = 5$  نشان می‌دهد. برای مقایسه‌ی نتیجه‌ها، داده‌های طیف فاز آبی با غلظت یکسان DNA نسبت به فاز آبی نیز نشان داده شده است. مولکول DNA دارای صورت‌بندی‌های متفاوتی مانند A، B و ... است که کانزرواسیون<sup>(۹)</sup> "B" رایج‌ترین شکل بوده و به لحاظ ترمودینامیکی دارای پایدارترین وضعیت است.

در طیف سیرکولار دیکرویزم صورت‌بندی "B" مولکول DNA، یک نقطه اوج و یک نقطه حداقل به ترتیب در طول موج‌های نزدیک به ۲۷۵ نانومتر و ۲۴۵ نانومتر مشاهده می‌شود [۲۹-۳۱]. چنانچه تحت شرایط خاص محیطی، مولکول DNA متراکم شود صورت‌بندی آن تغییر می‌کند. صورت‌بندی Z از جمله صورت‌بندی‌هایی است که مولکول متراکم شده‌ی DNA می‌تواند به آن تبدیل شود. ویژگی این صورت‌بندی در طیف سیرکولار دیکرویزم وجود یک نقطه‌ی حداقل در طول موج ۲۸۰ نانومتر تا ۲۹۰ نانومتر و یک نقطه اوج در حوالی طول موج ۲۶۰ نانومتر است. با توجه به شکل ۴ ملاحظه می‌شود که در شرایط طبیعی DNA در محلول آبی دارای صورت‌بندی کانزرواسیون "B" بوده در صورتی که در این

شکل ۴ - نتیجه‌های آزمایش سیرکولار دیکرویزم در حالت  $w_0=5$  برای فازهای آبی و میسلی معکوس.

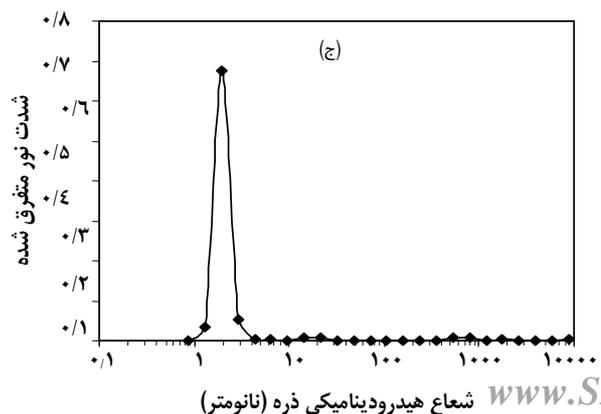
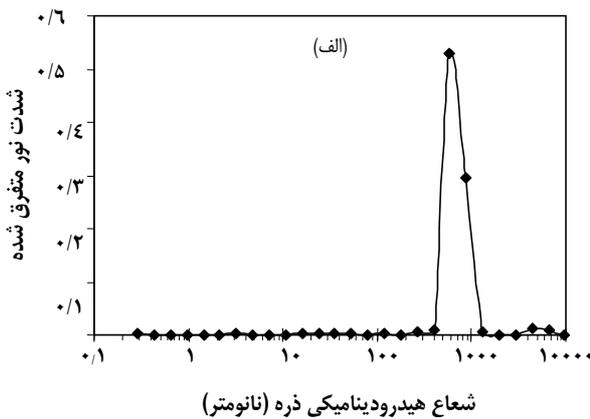


شکل ۵ - نتیجه‌های آزمایش سیرکولار دیکرویزم در حالت  $w_0=10$  برای فازهای آبی و میسلی معکوس.

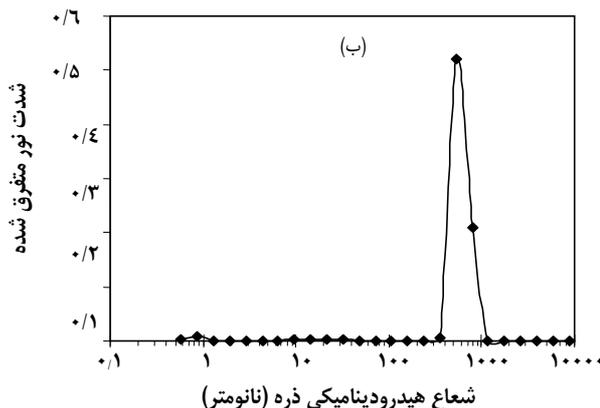
(۱) Microcompartment

شکل ۶ - طیف تفرق دینامیکی نور سامانه‌ی میسلی معکوس خالی با  $w_0=5$  تحت زاویه‌های: الف) ۶۰ درجه ب) ۹۰ درجه ج) ۱۲۰ درجه.

عمق یا گودی طیف مربوط به DNA در میسل معکوس نسبت به حالت قبل ( $w_0=5$ ) کمتر شده و این نشان دهنده‌ی تراکم بیشتر DNA در حالت  $w_0=5$  نسبت به این حالت است. نتیجه‌های آزمایشگاهی حاصل از طیف سنجی سیرکولار دیکرویزم نشان داد که با افزایش  $w_0$  از ۱۰ به ۱۵، طیف DNA در میسل معکوس به حالت طبیعی آن نزدیک می‌شود، به طوری که در  $w_0=30$  تفاوتی



علمی، پژوهشی - کاربردی



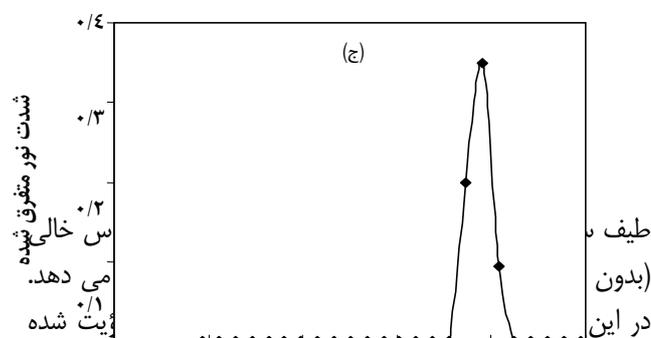
شکل ۷- طیف تفرق دینامیکی نور سامانه میسلی معکوس حاوی DNA با  $w_0=5$  تحت زاویه‌های: الف) ۶۰ درجه ب) ۹۰ درجه ج) ۱۲۰ درجه.

بین این دو طیف مشاهده نشد. شایان ذکر است که برای ارتقای کیفیت نتیجه‌های طیف سنج سیرکولاردیکرویزم، در این تحقیق هر یک از داده‌های آزمایشگاهی به دست آمده میانگین ۹ بار تکرار متوالی آزمایش‌ها می‌باشد [۳۳].

در مرحله‌ی بعد ابعاد میسل معکوس قبل و بعد از انحلال DNA مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۶ نتیجه‌های حاصل از

### نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق برای نخستین بار سامانه میسلی معکوس زیست سازگار فسفولیپیدی برای انحلال DNA مورد مطالعه قرار گرفت و از دستگاه طیف سنج سیرکولاردیکرویزم برای تعیین اثر ریز محفظه‌سازی DNA استفاده شد. همچنین با استفاده از دستگاه شناساگر تفرق دینامیکی نور اندازه‌ی میسل‌های معکوس قبل و بعد از انحلال DNA ثبت شد. ملاحظه گردید که در شرایط خاص آزمایشگاهی DNA می‌تواند در سامانه‌ی ذکر شده حل شود. نتیجه‌های حاصل از طیف سیرکولاردیکرویزم نشان داد که DNA در این سامانه به صورت فوق العاده متراکم و در صورت بندی Z است. نکته حائز اهمیت دیگر که از داده‌های دستگاه تفرق دینامیکی نور حاصل شد افزایش تقریبی ۳۵۰ برابری اندازه‌ی میسل معکوس بعد از انحلال DNA و به وجود آمدن میسل‌های معکوس غول پیکر است. شکل‌گیری این میسل‌های معکوس غول پیکر می‌تواند به دلیل تعادل میسل‌های معکوس کوچک با مونومرهای ماده‌ی فعال سطحی فسفولیپیدی و همچنین برهم‌کنش این مونومرها با مولکول DNA باشد.



بر خنثی‌سازی واحد نانومتر بوده،  $R$ ، و محور عمودی نیز شدت نور متفرق شده است. هر کدام از داده‌های طیف سنج تفرق دینامیکی نور متوسط ۱۰ بار تکرار در هر آزمایش است. مشاهده شد که در  $w_0$  های ۵، ۱۰، ۱۸/۵ و ۳۰ شعاع هیدرودینامیکی میسل‌های معکوس خالی به ترتیب به‌طور تقریب ۲/۱ نانومتر، ۲/۵ نانومتر، ۴/۸ نانومتر و ۷/۱ نانومتر هستند. شکل ۷ طیف تفرق دینامیکی نور تحت سه زاویه‌ی متفاوت برای سامانه‌ی میسلی معکوس در حالت  $w_0=5$  بعد از انحلال DNA را نشان می‌دهد.

با مقایسه شکل‌های ۶ و ۷ ملاحظه می‌شود که بعد از انحلال DNA هیچ اثری از میسل‌های خالی دیده نمی‌شود، ولی در عوض نقطه اوج طیف که مبین شعاع هیدرودینامیکی میسل‌های معکوس حاوی DNA است، به حوالی ۷۰۰ نانومتر انتقال می‌یابد. آزمایش‌های متعدد نشان داد که افزایش  $w_0$  از ۵ به ۱۰ اثر قابل ملاحظه‌ای بر شعاع هیدرودینامیکی میسل‌های حاوی پروتئین ندارد.

تاریخ دریافت: ۱۳/۶/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴/۶/۱۷

## مراجع

- [1] Gaikar, V. G. and Kulkarni, M. S., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **76**, 729 (2001).
- [2] Jarudilokkul, S. and Stuckey, D. C., *Sep. Sci. Technol.*, **36**, 657 (2001).
- [3] Stefan, A., Palazzo, G., Ceglie, A., Panzavolta, E. and Hochkoepler, A., *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 323 (2003).
- [4] Airoidi, M., Boicelli, C. A., Gennaro, G., Giomini, M., Giuliani, A. M., Giustini, M. and Scibetta, L., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 3859 (2002).
- [5] Franqueville, E., Loutrari, H., Mellou, F., Stamatis, H., Friboulet, A. and Kolisis, F. N., *J. Molecular Catalysis: Enzymatic*, **21**, 15 (2003).
- [6] Kim, D. G., Teratani, N. and Nakayama, M., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, 5064 (2002).
- [7] Vitulli, G., Bernini, M., Bertozzi, S., Pitzalis, E., Salvadori, P., Coluccia, S. and Martra, G., *Chem. Mater.*, **14**, 1183 (2002).
- [8] Khomutov, G. B. and Gubin, S. P., *Materials Science and Engineering C*, **22**, 41 (2002).
- [9] Curri, M. L., Agostiano, A., Mavelli, F. and Monica, M.D., *Materials Science and Engineering C*, **22**, 423 (2002).
- [10] deKruiff, B., Cullis, P. R., Verkleij, A. J., Hope, M. J., Van Echteld, C. J. A. and Taraschi, T. F., "Enzymes of Biological Membrane", Martonosi, A., ed., Plenum Press, New York, pp. 131-204 (1958).
- [11] Cullis, P. R., Hope, M. J. and Tilcock, C. P. S., *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 127 (1986).
- [12] deKruiff, B., Verkleij, A. J., Van Echteld, C. J. A., Gerritsen, W. J., Mommers, C., Noordam, P. C. and deGier, J., *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 200 (1979).
- [13] Van Venetie, R. and Verkleij, A. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **645**, 262 (1981).
- [14] deKruiff, B. and Cullis, P. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 477 (1980).
- [15] Morita, S., Narita, H., Matoba, T. and Kito, M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1571 (1984).
- [16] Kumar, V. V., Raghunathan, P. and Kumar, C., *J. Coll. Interface Sci.*, **99**, 315 (1984).
- [17] Kumar, V. V. and Raghunathan, P., *Chem. Phys. Lipids*, **4**, 159 (1986).
- [18] Barclay, L. R. C., MacNeil, J. M., Vankessel, J., Forrest, B. J., Porter, N. A., Lehman, S., Smith, K. S. and Ellington, J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6740 (1984).
- [19] Maeda, Y. and Hayashi, M., *Coll. Surface*, **24**, 353 (1987).
- [20] Elworthy, P. H., *J. Chem. Soc.*, p. 813 (1959).
- [21] Kumar, V. V., Monaharan, P. T. and Raghunathan, P., *J. Biosci.*, **4**, 449 (1982).
- [22] Poon, P. H. and Wells, M. A., *Biochemistry*, **13**, 4928 (1974).
- [23] Ramakrishnan, V. R., Darszon, A. and Montal, M., *J. Biol. Chem.*, **258**, 4857 (1983).
- [24] Battistella, E., Imre, E. V. and Luisi, P. L., "Controlled Release of Drugs: polymers and Aggregate systems", VCH, New York, pp. 255-276 (1988).
- [25] Hanley, A. B., Grinfeld, E. and Baxter, R. L., *Biocatalysis*, **3**, 253 (1990).

- [26] Hanley, A. B., Furniss, C. S. M., Kwiatkowska, C. A. and Mackie, A. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1074**, 40 (1991).
- [27] Pietrini, A. V. and Luisi, P. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1562**, 57 (2002).
- [28] Airoidi, M., Boicelli, C. A., Gennaro, G., Giomini, M., Giuliani, A. M., Giustini, M. and Scibetta, L., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 3859 (2002).
- [29] Jaumot, J., Escaja, N., Gargallo, R., Gonzalez, C. and Pedroso, E., *Nucleic Acids Research*, **30**, 92 (2002).
- [30] Zhang, Z., Huang, W., Tang, J., Wang, E. and Dong, S., *Biophys. Chem.*, **97**, 7 (2002).
- [31] McGregor, T. D., Bousfield, W., Qu, Y. and Farrell, N., *J. Inorganic Biochemistry*, **91**, 212 (2002).
- [32] McGregor T. D., Balcarova, Z., Qu, Y., Tran, M., Zaludova, R., Brabec, V. and Farrell, N., *J. Inorganic Biochemistry*, **77**, 43 (1999).
- [33] Gore, M. G., "Spectrophotometry and Spectrofluorimetry", Oxford University Press, New York, pp. 99-139 (2000).