



Lichtstreuung

Vorlesung: Strukturaufklärung von Biomolekülen
SS 05

- Einführung
- Lichtstreuverfahren
- Statische Lichtstreuung
 - Theorie
 - Geräteaufbau
 - Anwendung
- Dynamische Lichtstreuung
 - Theorie
 - Geräteaufbau
 - Anwendung

Lichtstreuung – ein alltägliches Phänomen

Bsp.: Lichtstreuung an Nebeltröpfchen



<http://www.meteoros.de/streu/streue.htm>

Lichtstreuung – ein alltägliches Phänomen

Bsp.: Blauer Himmel (wenn wolkenlos)



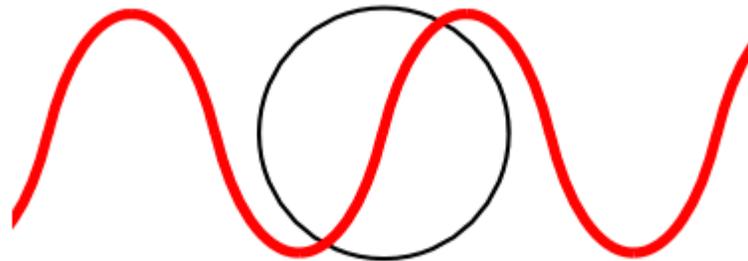
Raleigh-Streuung

- Lord Rayleigh, 1871 „Warum ist der Himmel blau?“
- Licht regt Elektronen zum Oszillieren an
(induzierter Hertz-Dipol)

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E}$$

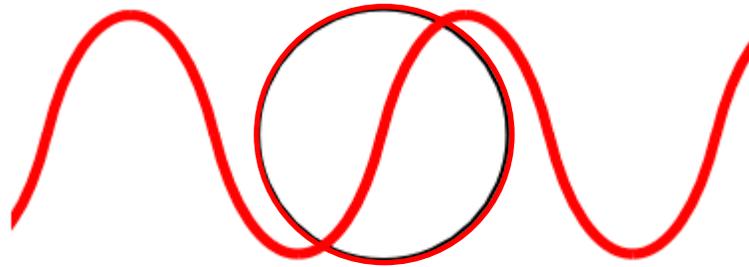
$\vec{\mu}$ = Ind. Dipolmoment

α = Polarisierbarkeit,
 \vec{E} = elektr. Feldstärkevektor
des Lichts



Raleigh-Streuung

- Für Teilchen mit $d \ll \text{Wellenlänge des Lichts}$ sog. Punktdipol oszillieren alle Elektronen mit gleicher Phase
 - Bewegte elektr. Ladung sendet EM-Strahlung aus
- d.h. Teilchen strahlt Licht in alle Richtungen wieder ab



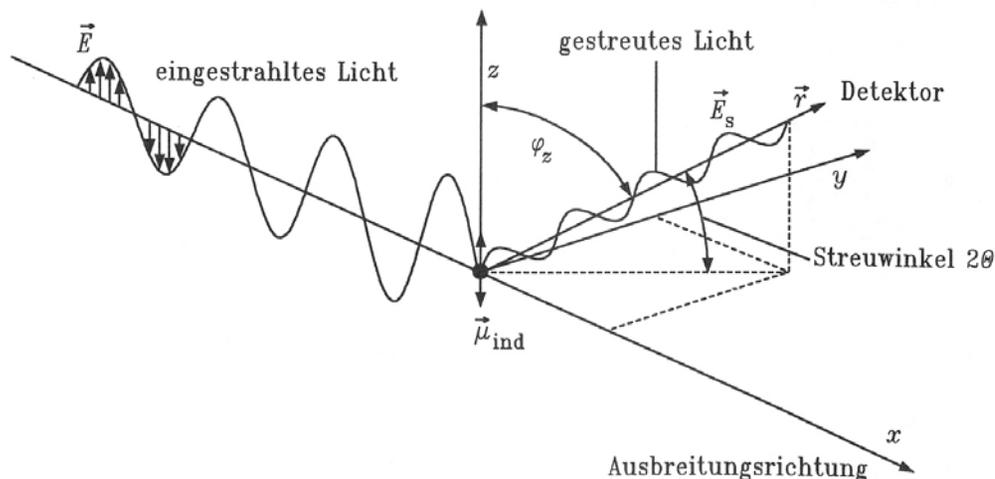
Raleigh-Streuung

- Für linear polarisiertes Licht (z.B. Laser) gilt:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{\alpha^2 \cdot \pi^2 \cdot \sin^2 \varphi_z}{\epsilon_0^2 \cdot r^2 \cdot \lambda^4}$$



I_s = Streuintensität, I_0 = Intensität des einfallenden Lichts
 α = Polarisierbarkeit, φ_z = Winkel zur z-Achse, ϵ = dielektrische Konstante,
 λ = Wellenlänge des Lichts, r = Abstand Probe-Detektor



Raleigh-Streuung

- Für linear polarisiertes Licht (z.B. Laser) gilt:

$$\frac{I_s}{I_o} = \frac{\alpha^2 \pi^2 \cdot \sin^2 \varphi_z}{\epsilon_o^2 \cdot r^2 \cdot \lambda^4}$$

Polarisierbarkeit sagt wie gut Elektronen bewegt werden können



Raleigh-Streuung

- Für linear polarisiertes Licht (z.B. Laser) gilt:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{\alpha^2 \cdot \pi^2 \cdot \sin^2 \varphi_z}{\epsilon_0^2 \cdot r^2 \cdot \lambda^4}$$



Keine Lichtstreuung in z-Richtung

Raleigh-Streuung

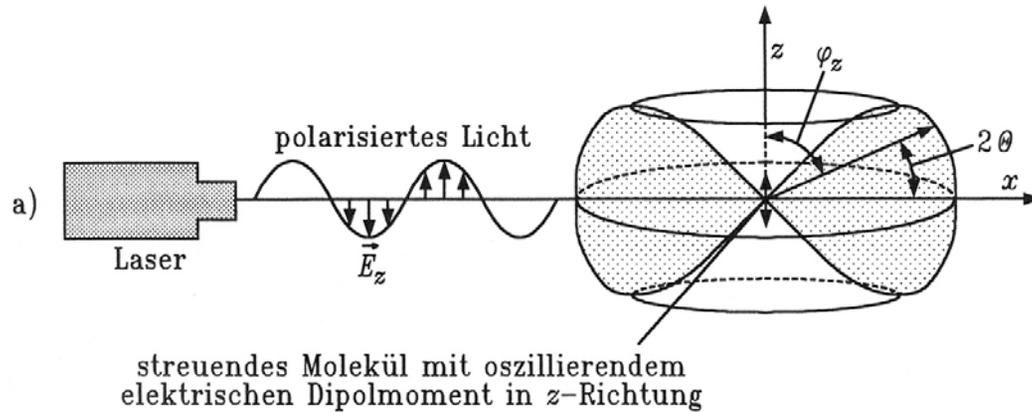
- Für linear polarisiertes Licht (z.B. Laser) gilt:

$$\frac{I_s}{I_o} = \frac{\alpha^2 \cdot \pi^2 \cdot \sin^2 \varphi_z}{\epsilon_o^2 \cdot r^2 \cdot \lambda^4}$$

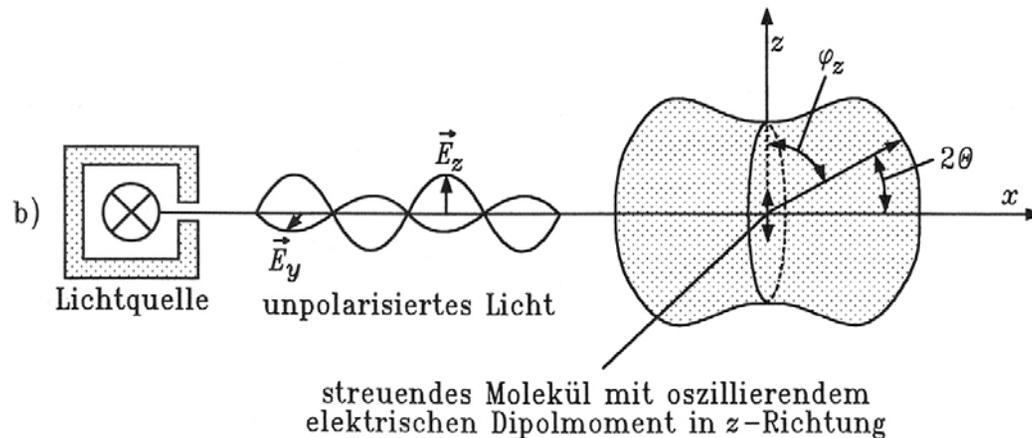


Lichtstreuung sehr stark abhängig von der Wellenlänge des Lichts

Richtungsabhängigkeit der Rayleigh-Streuung



In xy -Ebene keine Winkelabhängigkeit

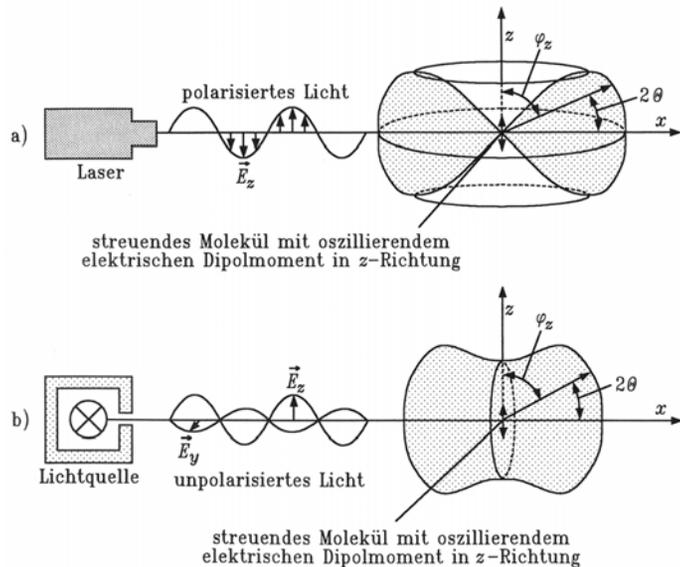


In xy -Ebene gibt es Winkelabhängigkeit

Rayleigh-Verhältnis

- Rayleigh-Verhältnis wird definiert als:

$$R_{\theta} = \frac{I_s \cdot r^2}{I_o} = \frac{\pi^2 \cdot \alpha^2}{\lambda^4 \cdot \epsilon_0^2}$$



Rayleigh-Streuung durch Teilchen mit $d < \lambda/20$ in Lösung (Rayleigh-Debye-Gans-Theorie)

- Lichtstreuung durch zeitliche Änderungen der Polarisierbarkeit $\delta\alpha$

$$\delta\alpha = 2 \cdot \varepsilon_0 \cdot n_{LM} \cdot \left(\frac{dn_L}{dc_m} \right) \cdot \frac{M}{N_A}$$

$$R_\theta = K \cdot c \cdot M$$

$$K = \frac{2\pi^2 \cdot n_{LM}^2}{\lambda^4 \cdot N_A} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2 \cdot B \cdot c$$

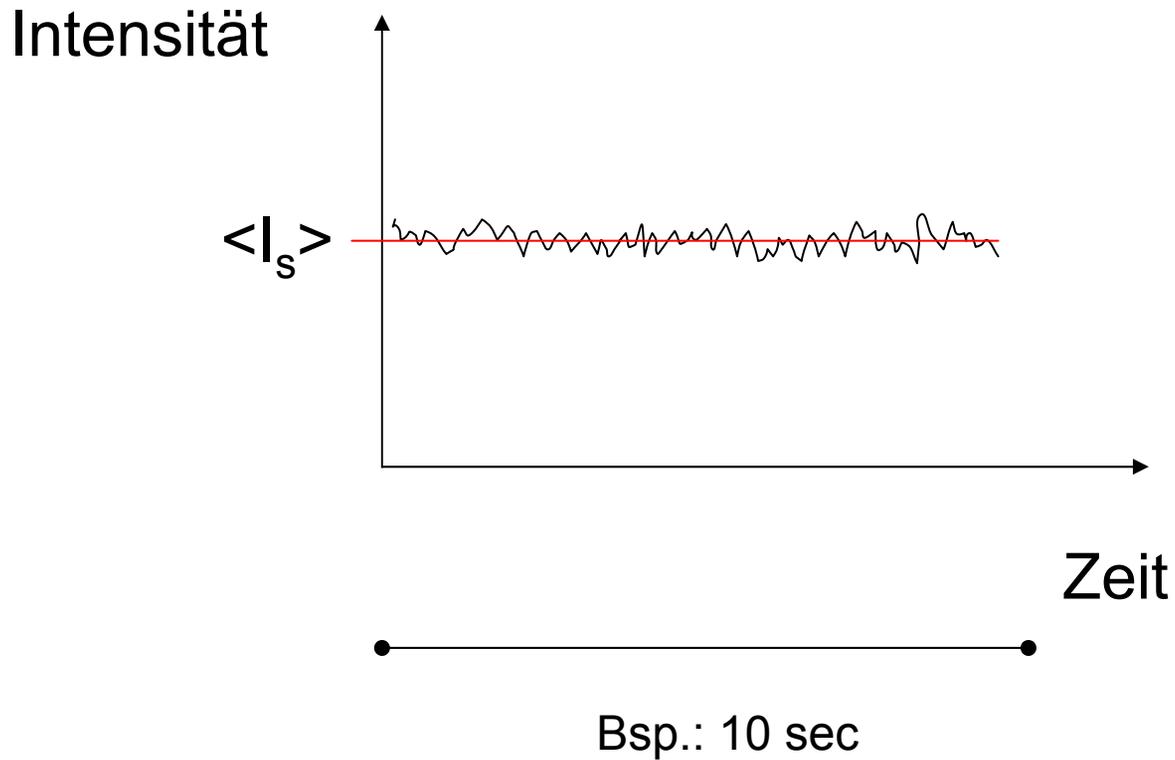
Lichtstreuung

Statische Lichtstreuung (SLS)

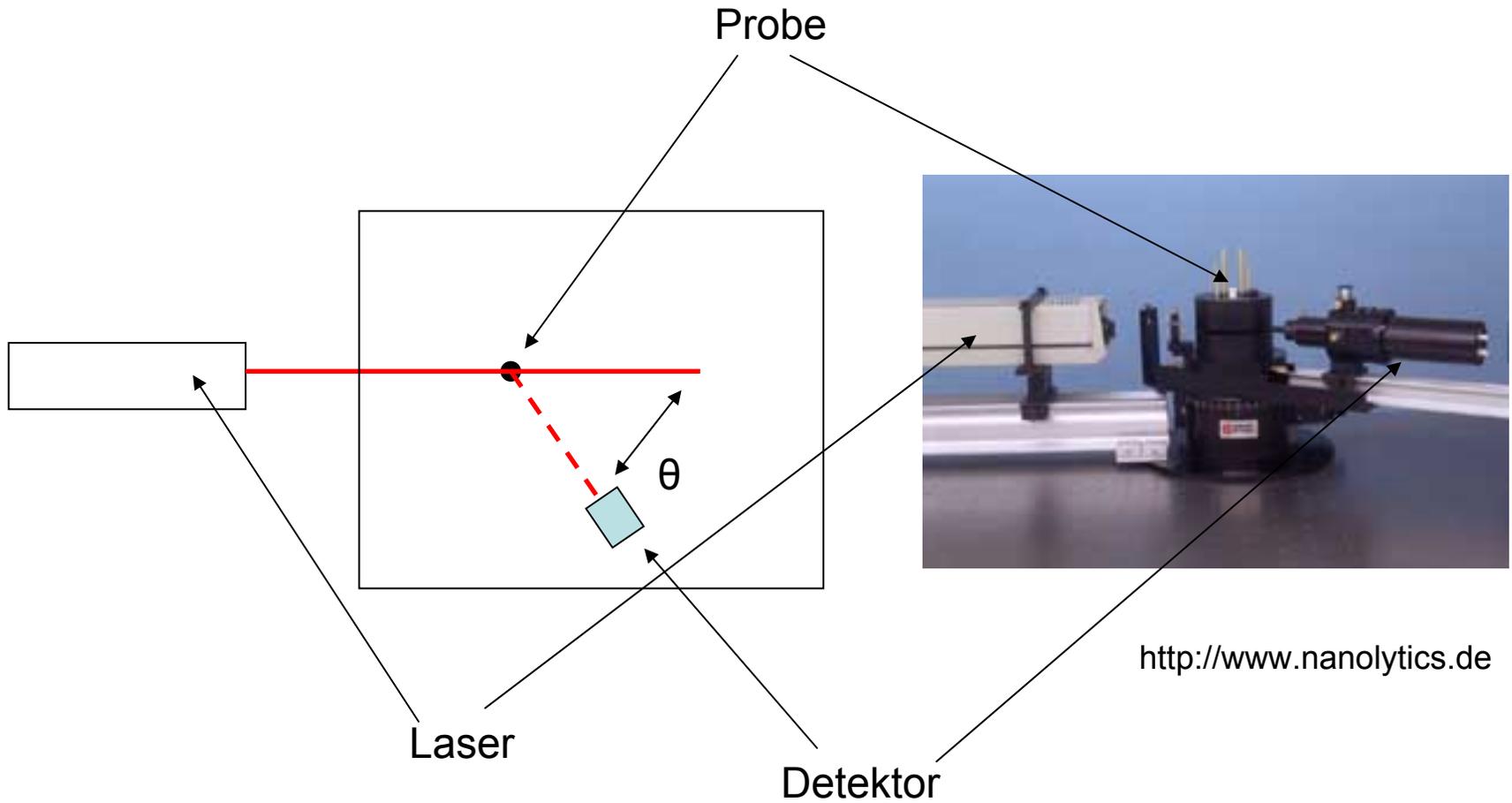
Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Statische Lichtstreuung (SLS)

- Misst die zeitlich gemittelte Intensität des gestreuten Lichts (daher statisch)



Aufbau einer Apparatur zur statischen Lichtstreuung

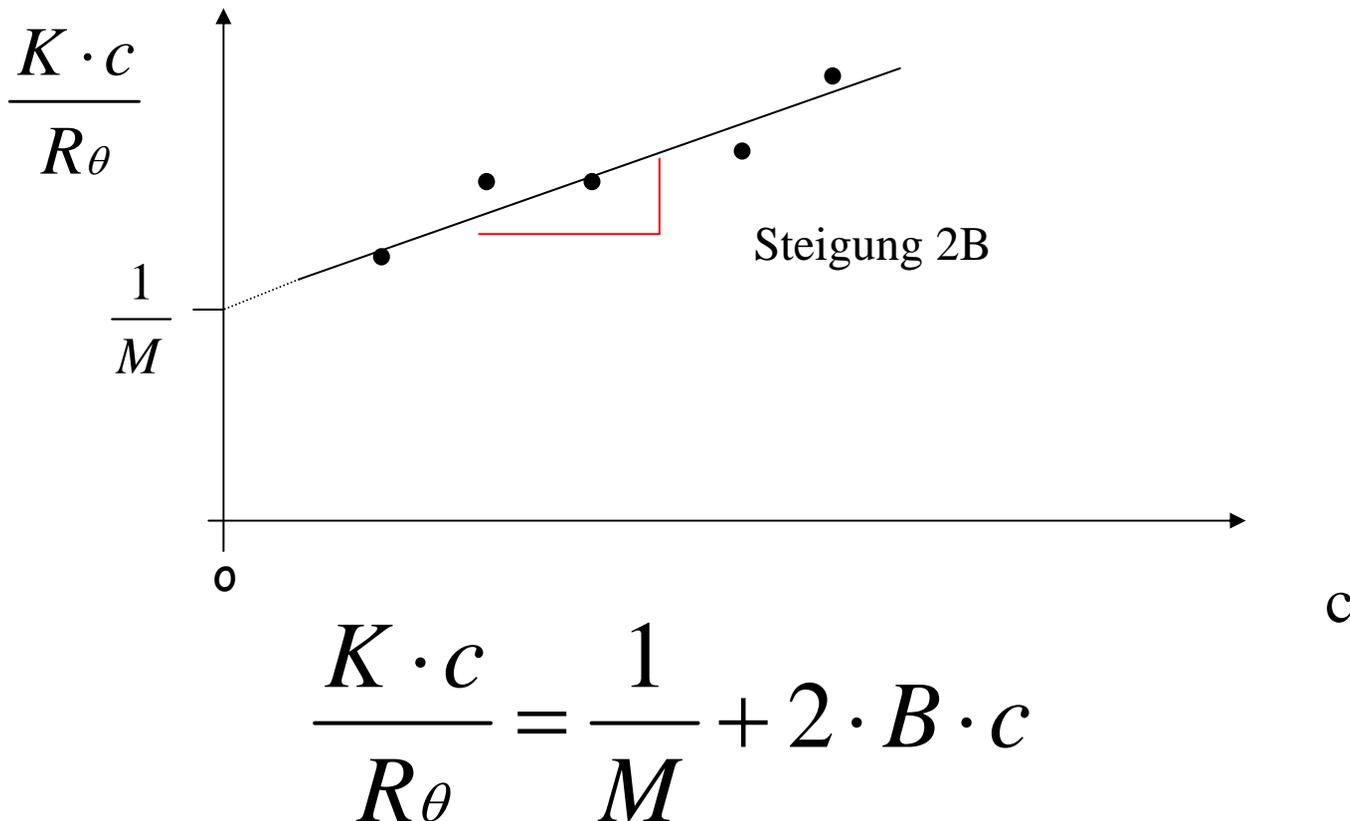


Praktische Durchführung einer SLS-Messung

- Messung der Streuintensität eines Standards (z.B. Toluol) mit bekanntem Rayleigh-Verhältnis.
- Messung der Streuintensität des Lösungsmittels (z.B. Wasser od. Puffer)
- Messung der Streuintensität der Probe für verschiedene Probenkonzentrationen (typisch: 0,2 – 1 mg/ml)
- dn/dc muss bekannt sein
- Brechungsindex muss bekannt sein

Debye-Diagramm

- Bestimmung des Molekulargewichts einer Substanz
- Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten B (Wechselwirkungen)
- **Debye plot:**



Debye-Diagramm

- Molekulargewicht ist gewichtsgemittelt!

Direkte Bestimmung, keine Kalibrierung nötig!

Ideal auch als Detektion in HPLC oder FPLC !

$$M_w = \frac{\sum_i n_i \cdot M_i^2}{\sum_i M_i}$$

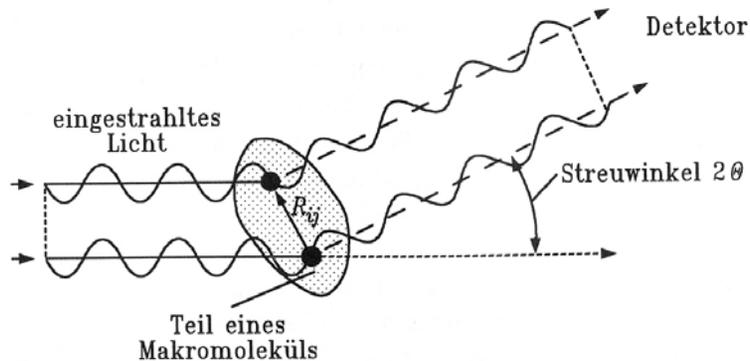
- Zweiter Virialkoeffizient B :
- B<0: gutes Lösungsmittel für Substanz
- B=0: Lösungsmittel ist sog. Theta-Lösungsmittel
- B>0: schlechtes Lösungsmittel für Substanz

Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen

- Messung bei nur einer Konzentration
- Voraussetzung: bekanntes dn/dc und geringe Konzentration
- Zweiter Virialkoeffizient spielt nur geringe Rolle
- Bsp.: 0,1 mg/ml Lysozym

Lichtstreuung durch große Teilchen

Lichtstreuung an verschiedenen Stellen eines Teilchens (Makromoleküls) führt zu Richtungsabhängigkeit der Intensität (sog. Debye-Streuung)



$$\frac{K \cdot c}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M} + 2 \cdot B \cdot c \right) \cdot \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \cdot \langle R_g^2 \rangle \cdot \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right)$$

$$\theta \rightarrow 0$$

$$\frac{K \cdot c}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2B \cdot c$$

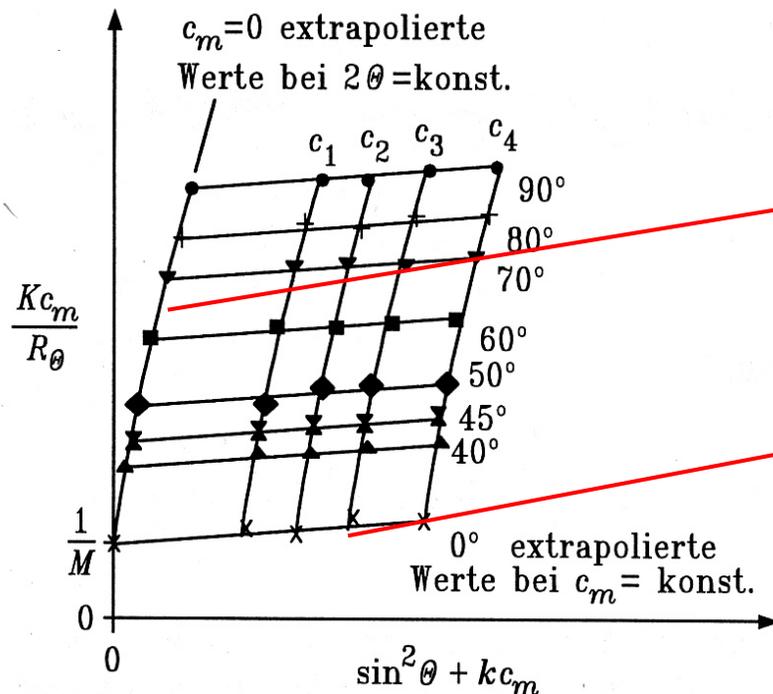
$$c \rightarrow 0$$

$$\frac{K \cdot c}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2 \cdot \langle R_g^2 \rangle}{3M\lambda^2} \cdot \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Zimm-Diagramm



- Graphische Auswertung von Lichtstreuendaten in Abhängigkeit von Streuwinkel und Teilchenkonzentration
- Extrapolation der Messwerte auf $c=0$ liefert Gyrationradius R_g
- Extrapolation der Messwerte auf $\theta=0$ liefert zweiten Virialkoeffizienten B
- Achsenabschnitt mit y-Achse liefert M_w
- wichtig: nur für monodisperse Proben geeignet, nicht z.B. für aggregierende Proteine usw.



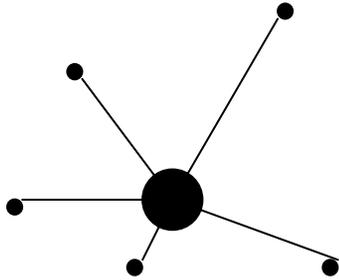
Steigung liefert Gyrationradius

Steigung liefert zweiten Virialkoeffizienten B

Gyrationsradius R_g

(Trägheitsradius oder Streumassenradius)

Beispiele:



$$\langle R_g \rangle^2 = \frac{\sum_i r_i \cdot m_i^2}{\sum_i m_i}$$

Teilchen	M (kDa)	Rg [nm]
BSA	67	2,98
Myosin	493	46,8
DNA	4000	117,0
Tabakmosaik-virus	39000	92,4

Gyrationsradius sagt nichts über die Teilchenform!

Geometrie	Definition der Parameter	Streumassenradius
Zufallsknäuel	$\overline{h^2}$: mittlerer quadratischer End-zu-End-Abstand	$R_G^2 = \overline{h^2} / 6$
Kugel	R : Kugelradius	$R_G^2 = (3/5)R^2$
Langer Stab	L : Stablänge	$R_G^2 = L^2 / 12$
Zylindrische Scheibe	R : Scheibenradius	$R_G^2 = R^2 / 2$
Ellipsoid	a, b, c : Halbachsen	$R_G^2 = (a^2 + b^2 + c^2) / 5$

Bei bekannter Teilchenform ist Teilchendimension aus Rg abschätzbar!

Welche Informationen liefert die SLS?

- Molekulargewicht
- Gyrationradius
- Zweiter Virialkoeffizient

Lichtstreuung durch sehr große Teilchen $d \approx \lambda$

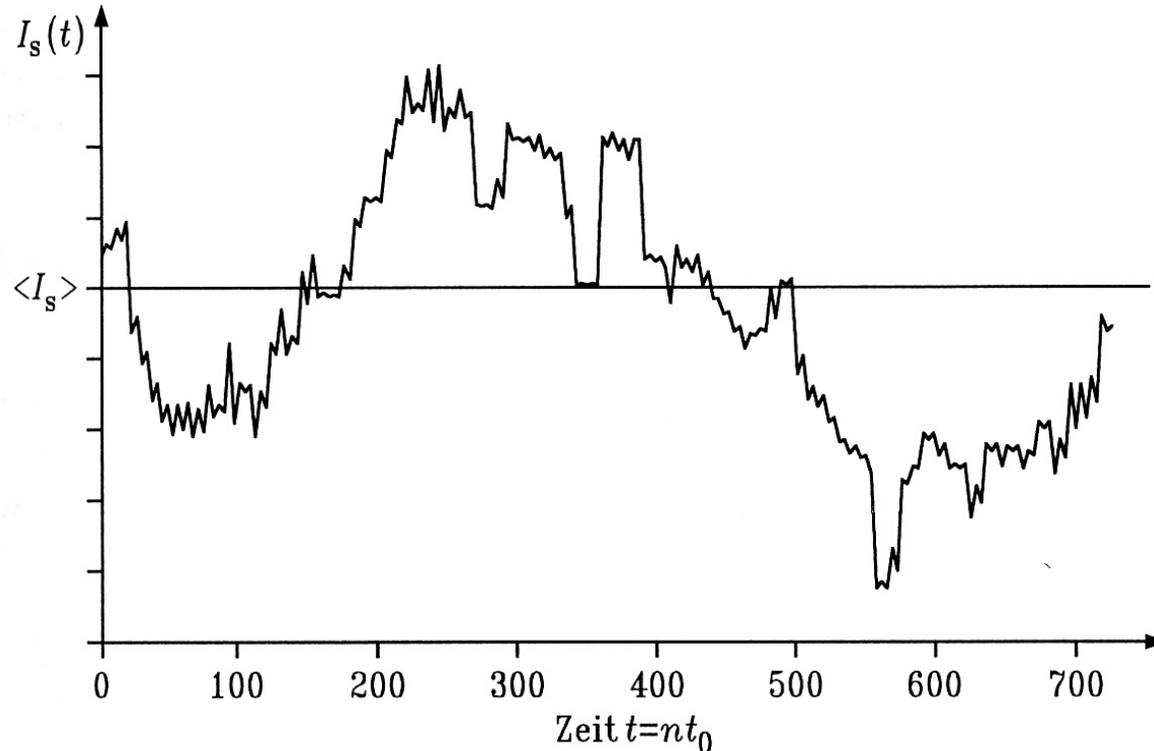
- Keine Rayleigh-Streuung, sondern sog. Mie-Streuung
- Mie-Theorie sehr kompliziert!
- Teilchen streuen vor allem nach vorn.
- Bsp. Für Mie-Streuung: Wolken



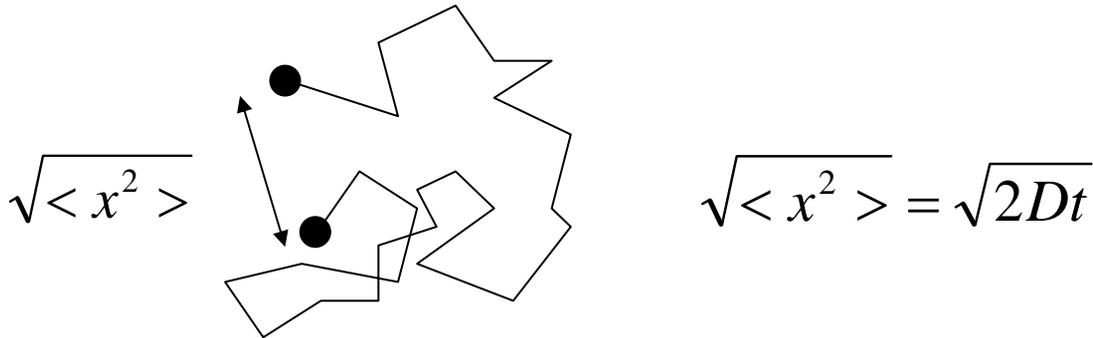
Dynamische Lichtstreuung (DLS)

(Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS))

Misst Zeit abhängige Intensitätsfluktuationen des gestreuten Lichts



Brownsche Molekularbewegung



Stokes-Einstein-Gleichung

D= Diffusionskoeffizient

K= Boltzmann-Konstante, T= thermod. Temperatur

η =dyn. Viskosität, R_s =Stokes-Radius

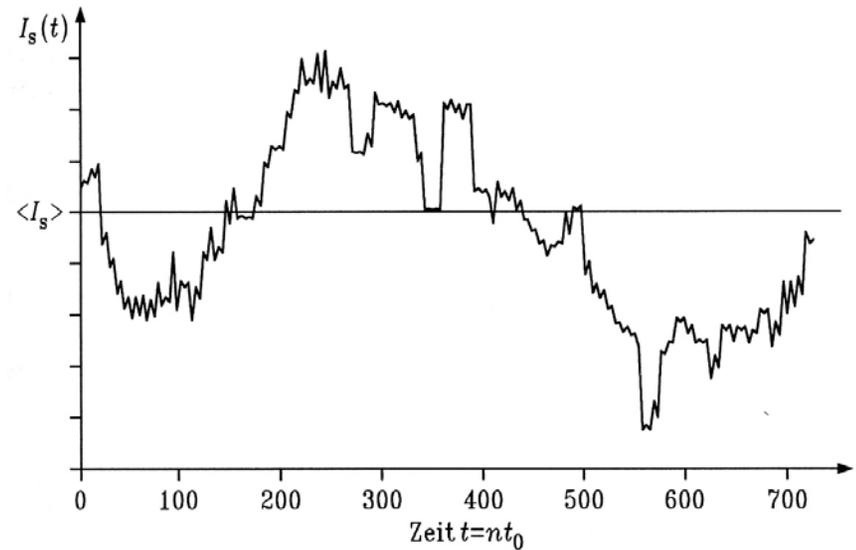
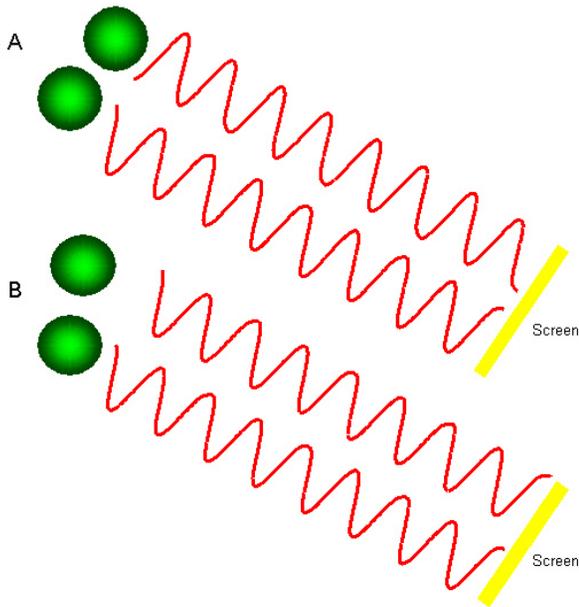
Nur für starre Kugeln gültig!

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_s}$$

Bsp.: BSA (67kDa) ($D=6 \cdot 10^{-11} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) für 1cm Wegstrecke werden 77h benötigt!

Brownsche Molekularbewegung bringt Interferenzen Interferenzen erzeugen Intensitätsfluktuationen

Destruktive Interferenz



Konstruktive Interferenz

Zufallsbewegung

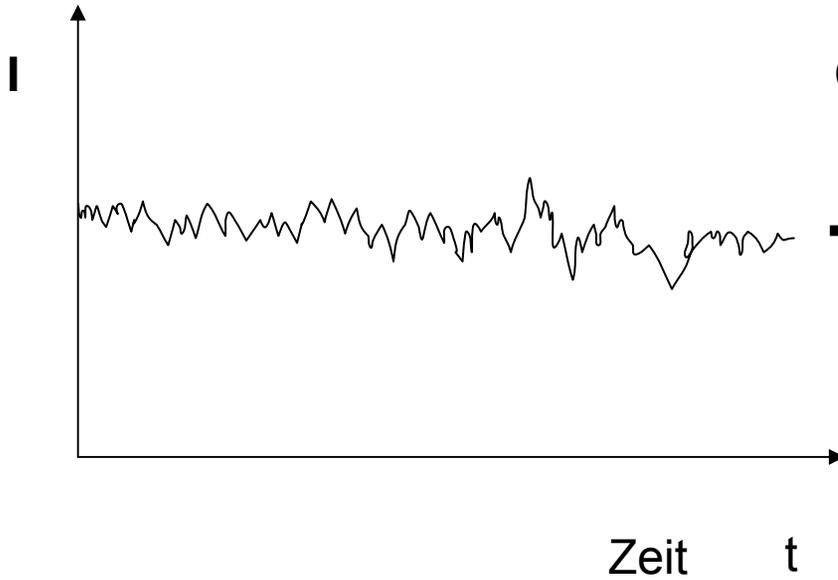


Zufallsfluktuationen

Ref.: Winter/Noll, Methoden der Biophysikalischen Chemie, Teubner Verlag

Fluktuation lässt sich auswerten - Autokorrelationsfunktion

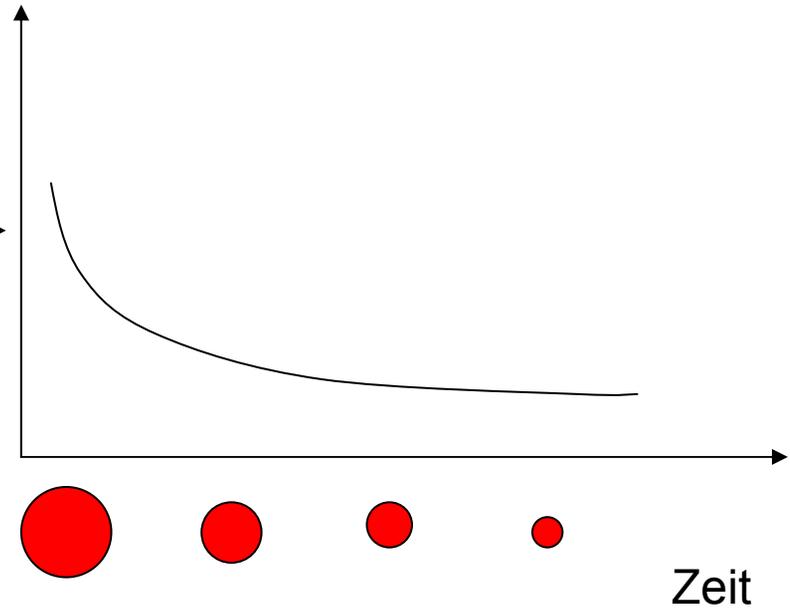
Intensitätsfluktuation



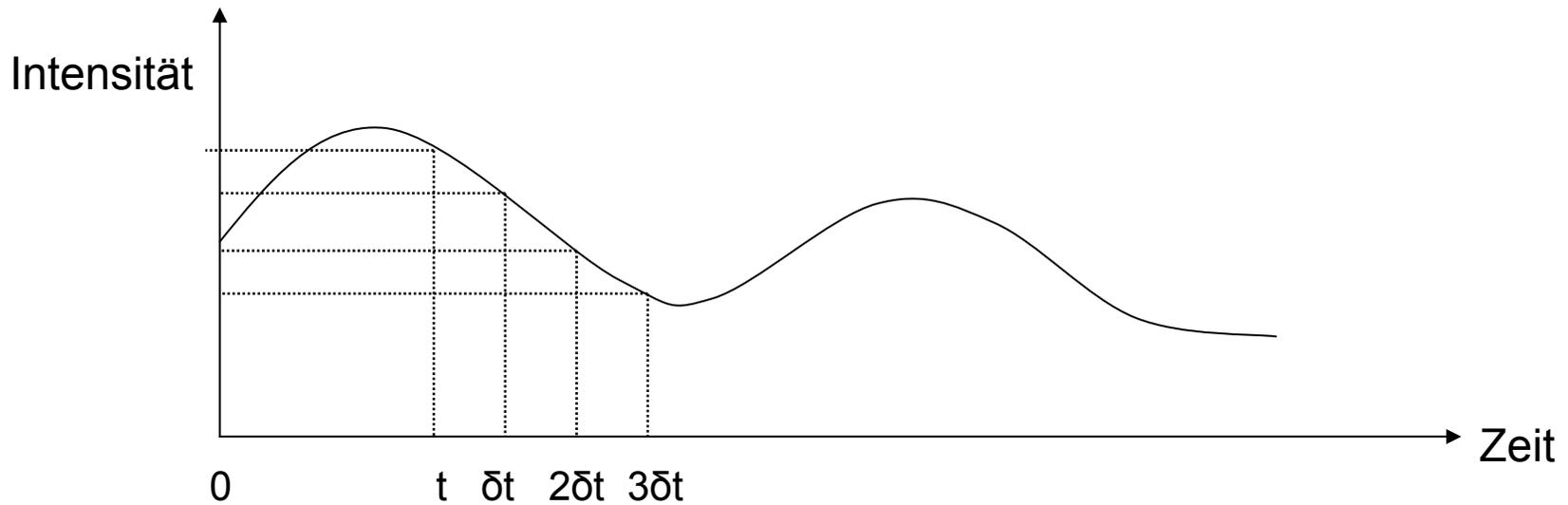
C

→

Autokorrelationsfunktion



Autokorrelationsfunktion

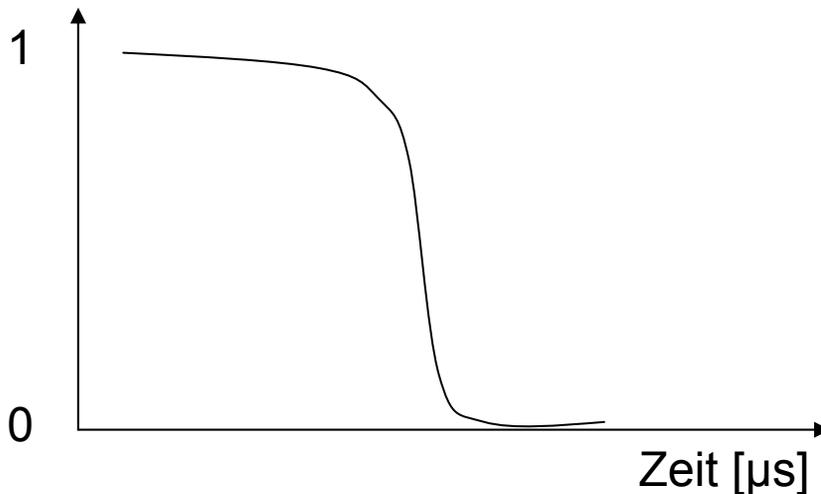
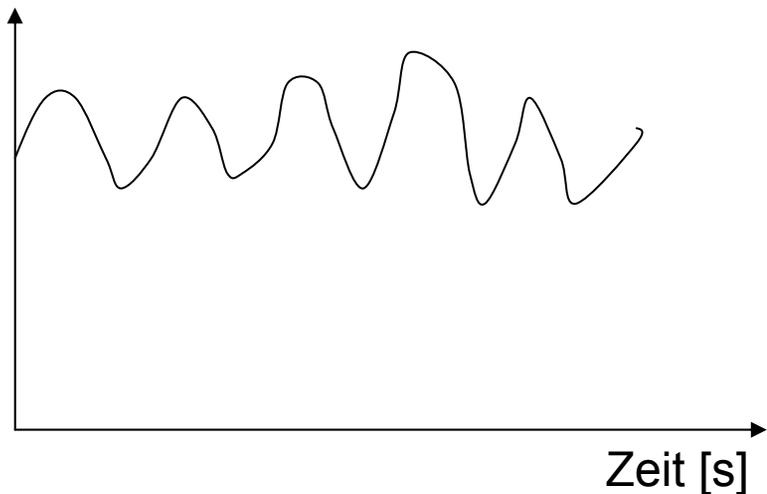


- δt = Delayzeit, typischerweise ns- μ s
- Signal mit der Zeit wird immer unkorrelierter (zufällige Teilchenbewegung)
- Zum Zeitpunkt t ist Signal perfect korreliert (=1), nach langer Zeit keine Korrelation mehr (=0)

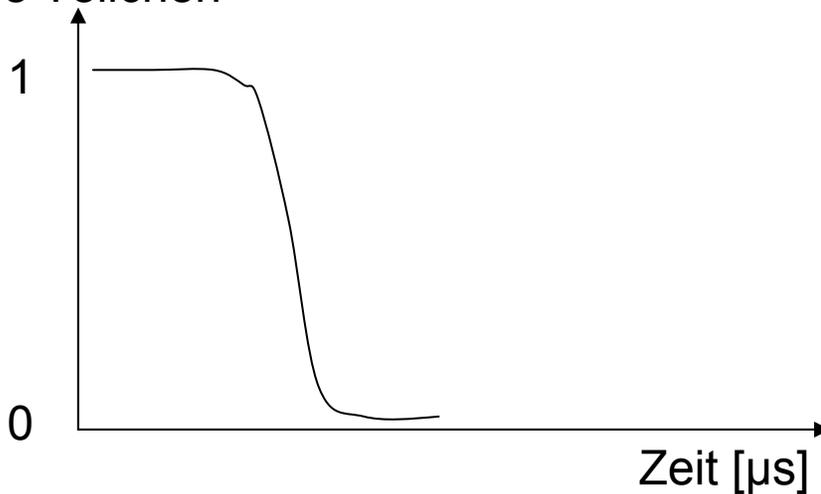
Intensitätsfluktuation

Autokorrelationsfunktion

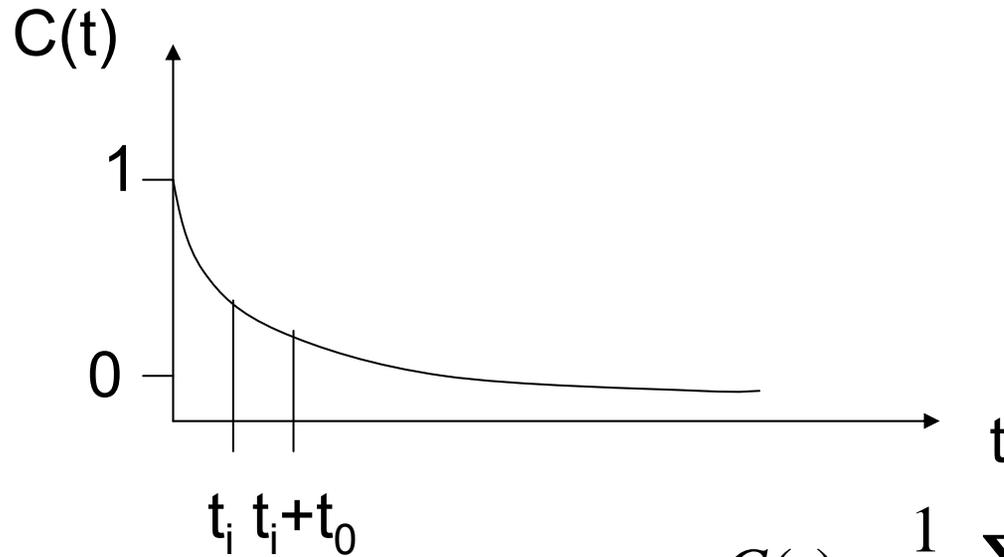
Großes Teilchen



Kleines Teilchen



Autokorrelationsfunktion C(t)



$$C(t) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n I_s(t_i) \cdot I_s(t_i + t_0)$$

$$C(t) = A_1 + A_2 \cdot e^{-2DQ^2t}$$

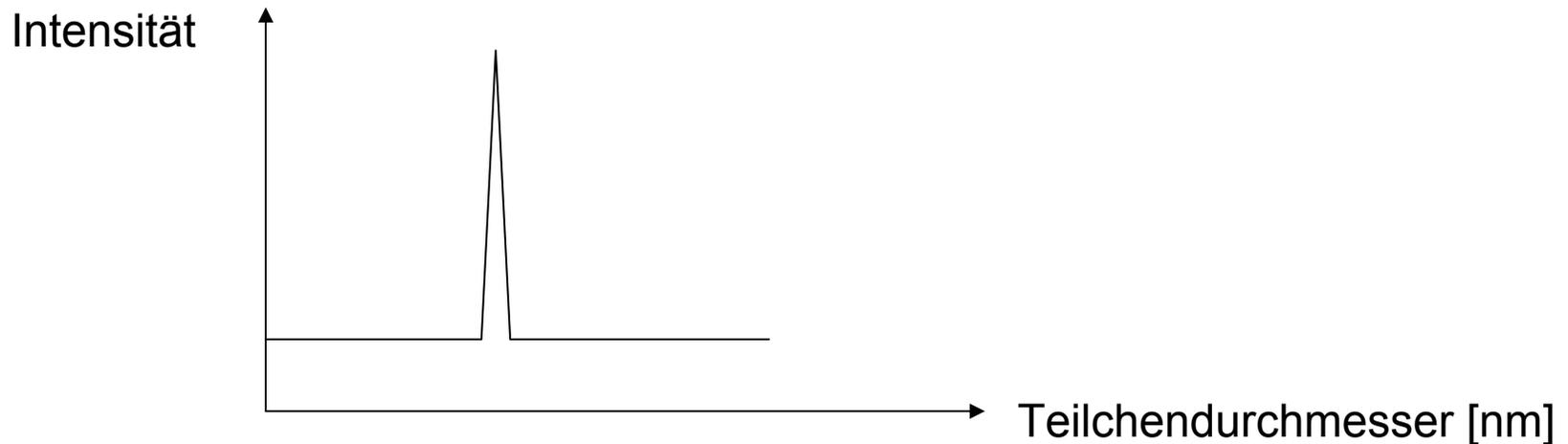
Autokorrelationsfunktion von Brechungsindex, Wellenlänge und Streuwinkel abhängig

$$Q = \left(\frac{4\pi \cdot n}{\lambda} \right) \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2} \right)$$

Auswertung der Korrelationsfunktion

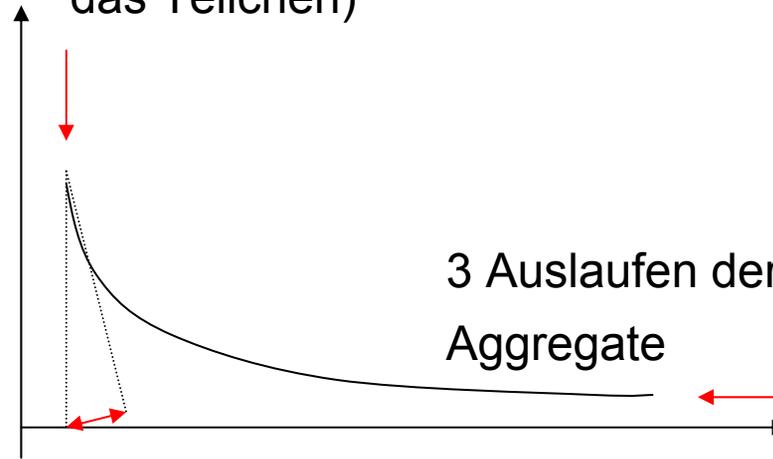
- Einfacher exponentieller Fit (Kumulantenanalyse) ergibt durchschnittliche Teilchengröße (Z-Mittel) und Breite der Größenverteilung (Polydispersitätsindex)
- Fit mit mehrfachen Exponentialfunktionen (z.B. CONTIN) ergibt Verteilung von Teilchengrößen

Ergebnis ist Intensitäts-Größen-Verteilung



Informationsgehalt der Autokorrelationsfunktion

1 Beginn des Abfalls der AKF (je früher, je kleiner das Teilchen)

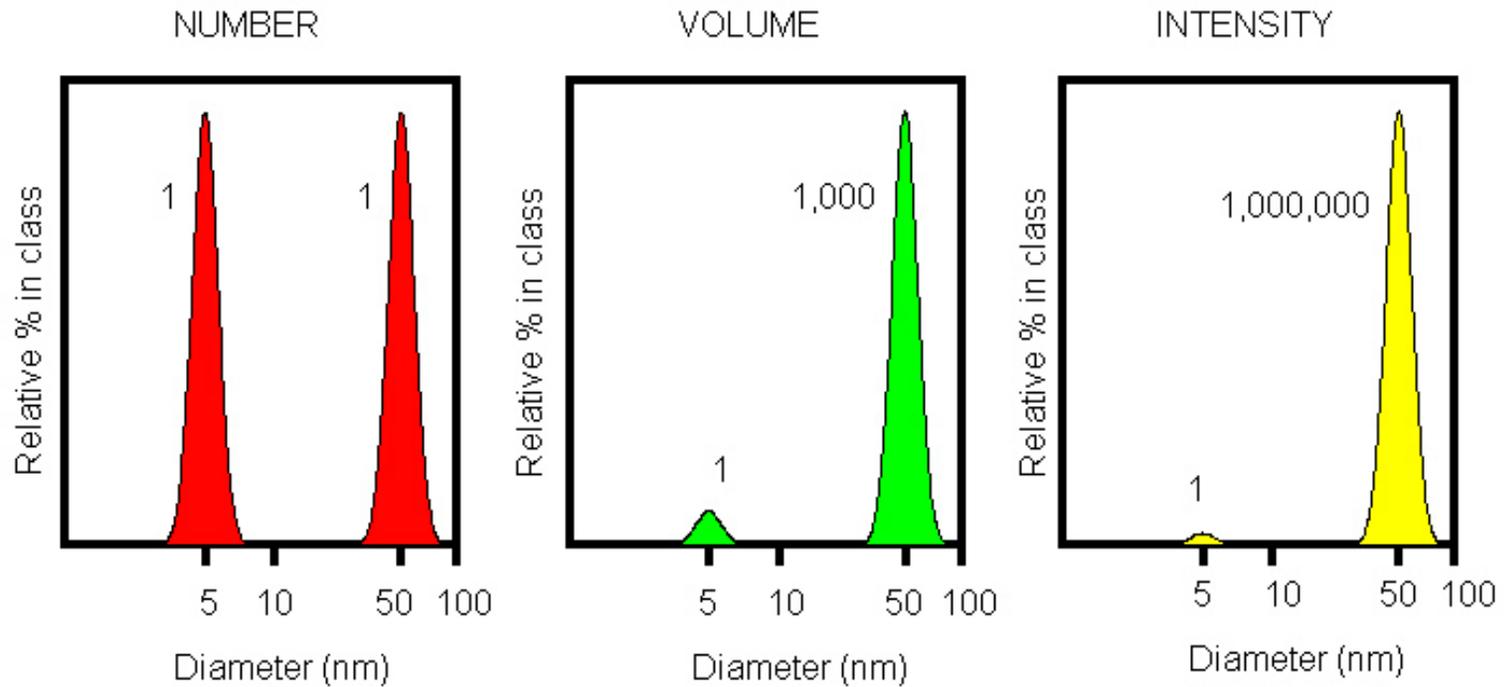


3 Auslaufen der AKF gibt Hinweise auf Aggregate

2 Je flacher die AKF abfällt, desto mehr Polydispersität!

Größenverteilungen

Bsp.: Gemisch aus 5nm und 50nm Teilchen

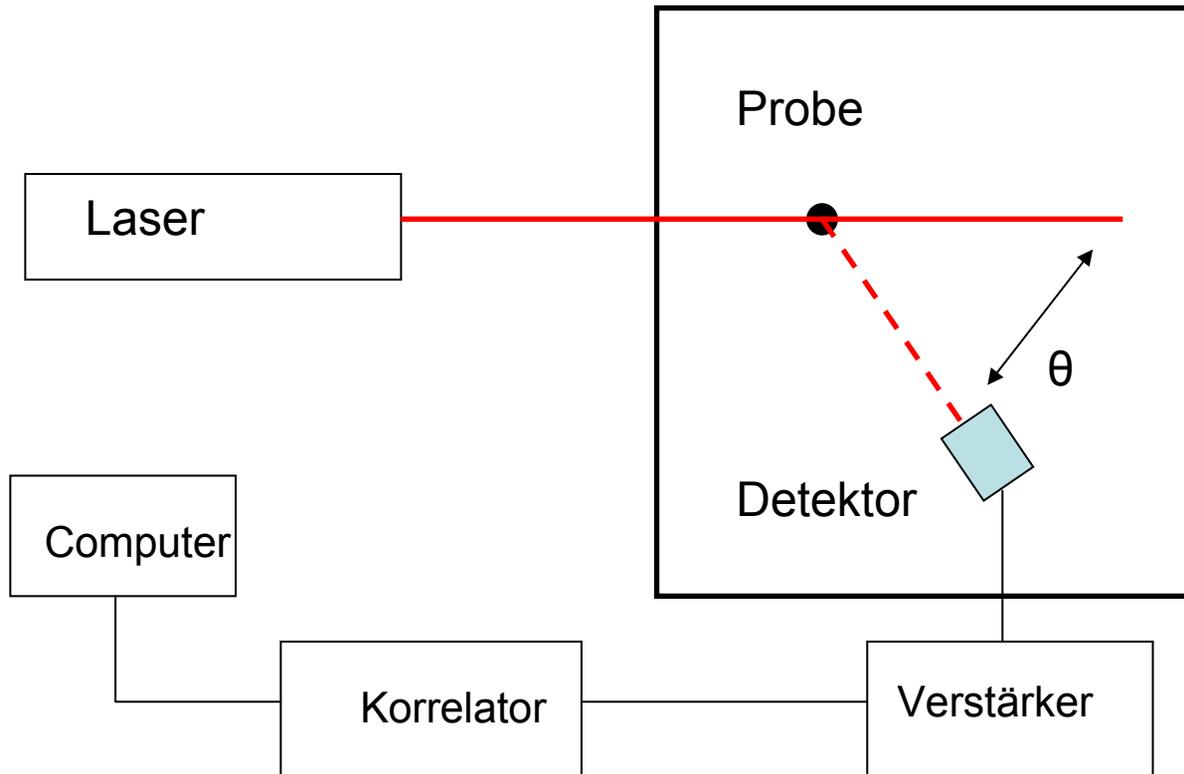


$$V \propto d^3$$

$$I_s \propto d^6$$

Abb.: Malvern Instruments

Instrumenteller Aufbau der DLS



DLS Instrument in unserer Arbeitsgruppe: Zetasizer Nano S von Malvern Instruments

- He-Ne Laser (632 nm)
- Fester Winkel (173° backscatter)
- Probenvolumen 12 µl-2 ml
- Temperaturkontrolle 20-90 °C
- Teilchen mit 0.6-6 µm Durchmesser
- Auch für statische LS



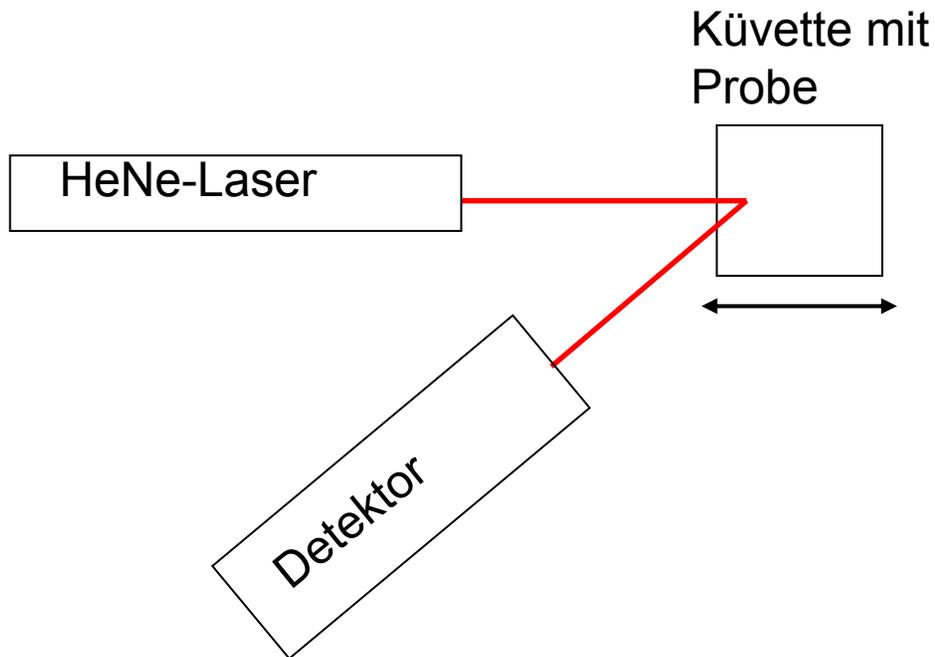
Anwendungen:

- Größenbestimmungen (Peptide, Proteine, Micellen, Vesikel, Bicellen, Sporen, Zellen etc.)
- Abschätzung der Teilchenform
- Molekulargewichtsbestimmungen
- Zweiter Virialkoeffizient B
- Proteindenaturierung (Schmelzpunkt)

Ref.: Malvern Instruments

NIBS-Technologie

- NIBS= Non Invasive Back Scatter (dt. nicht-invasive Rückstreuung)

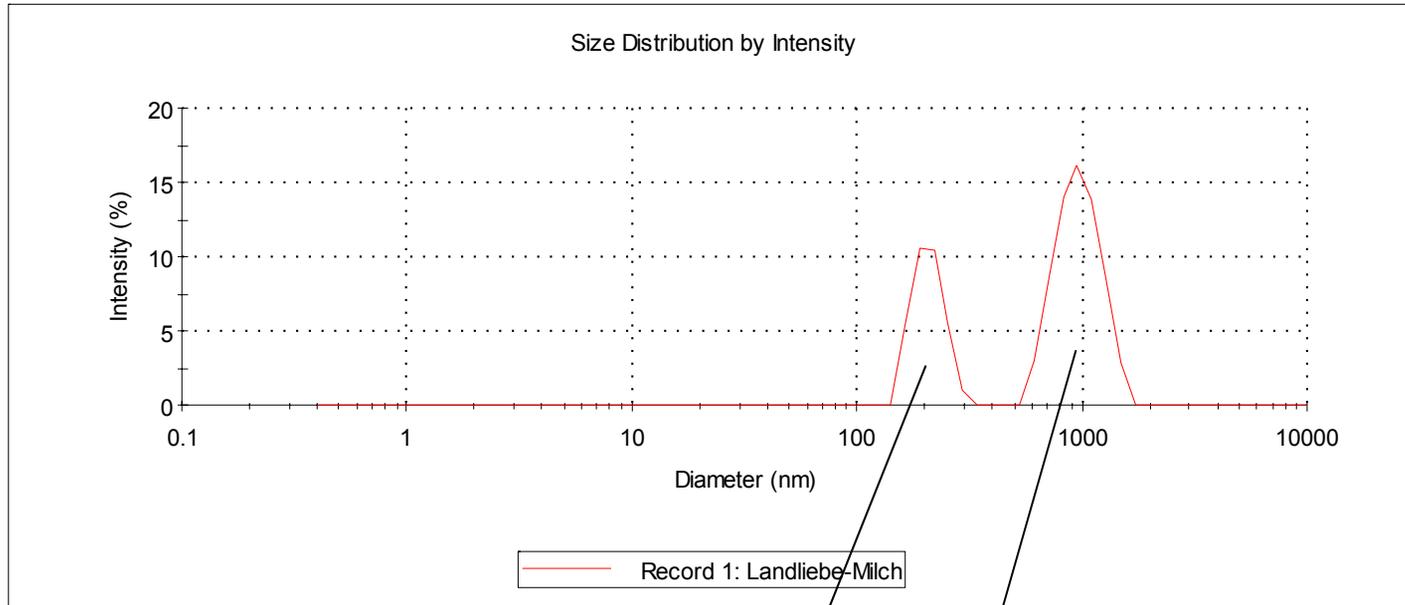


Vorteile:

- Geringe Streuung durch Staub (wenig Mie-Streuung)
- Auch trübe Lösungen messbar
- Fokus beweglich, um bestes Signal zu bekommen

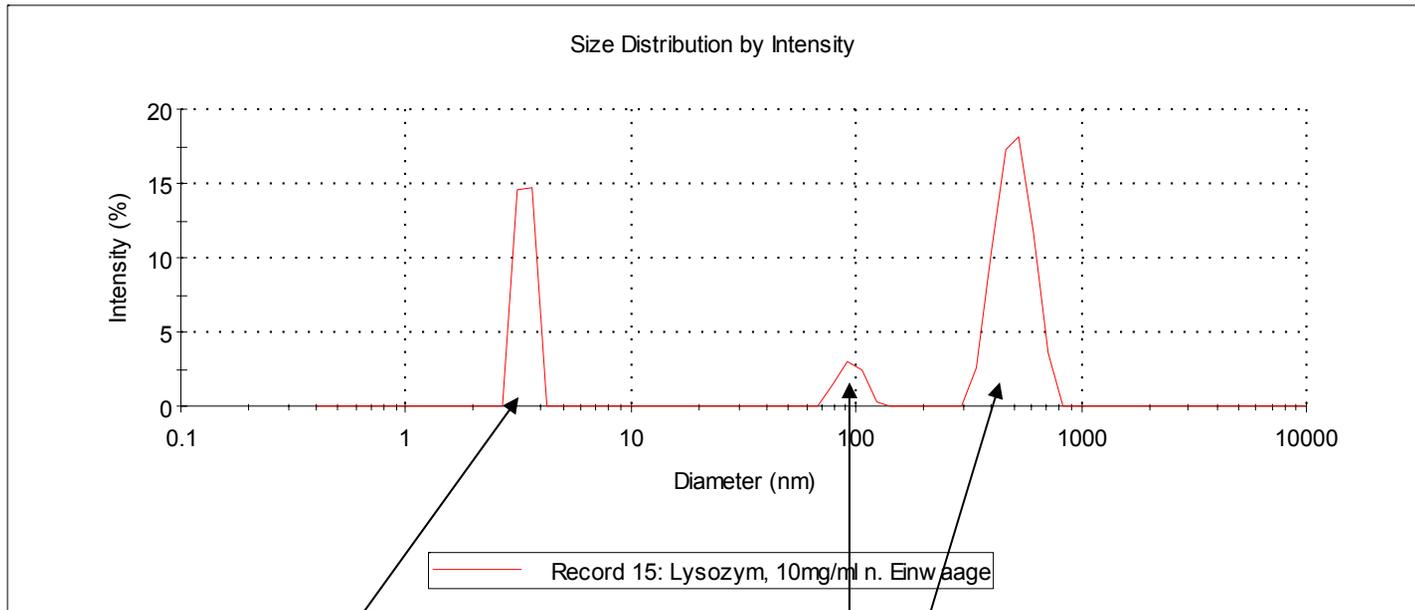
DLS-Messungen an sehr trüben Proben

- Bsp.: Vollmilch, unverdünnt („Landleibe“)



?

Richtige Proben: Bsp. Lysozym

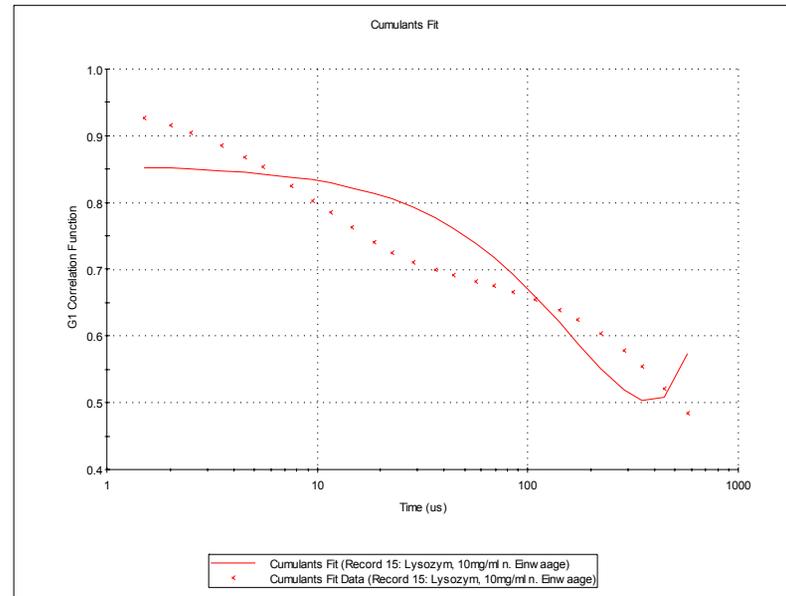
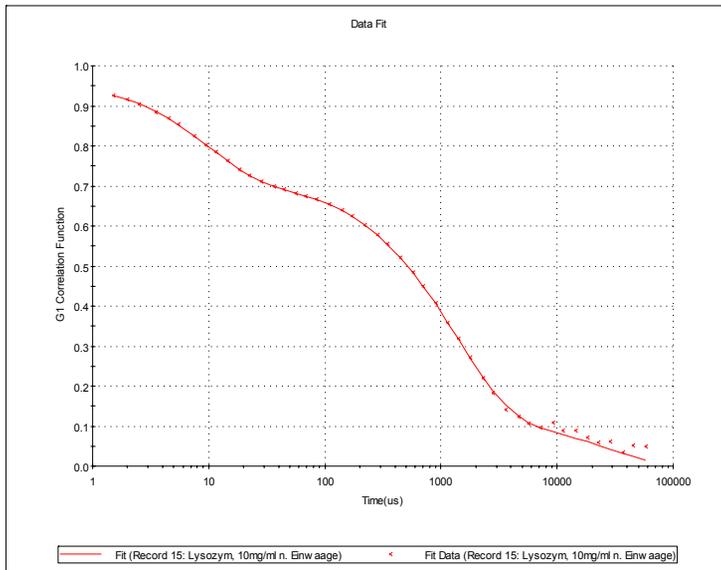
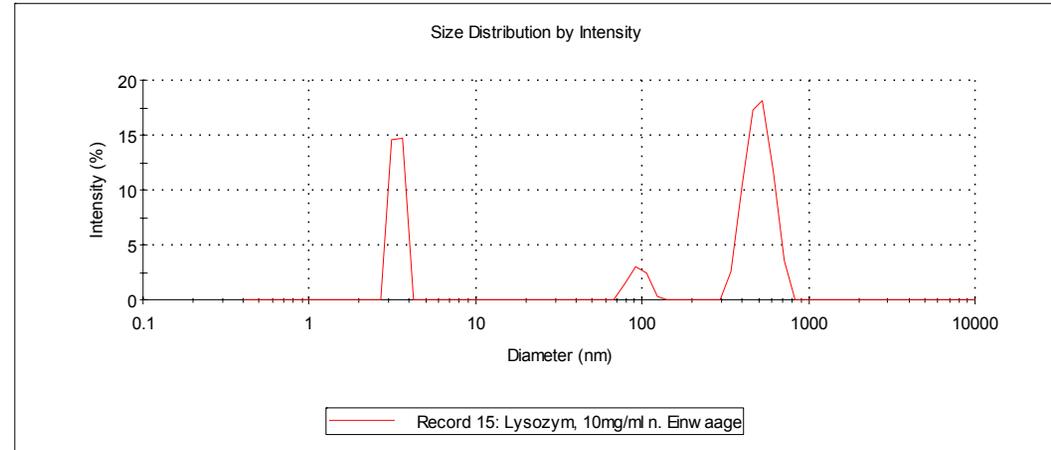
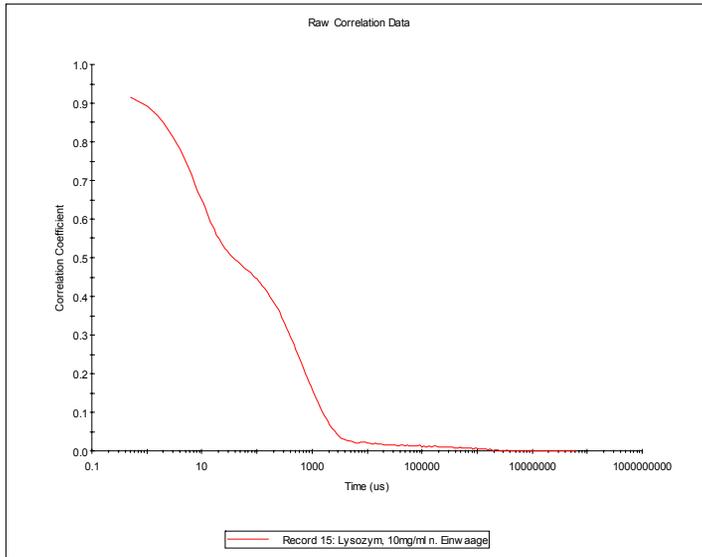


Nicht aggregiert

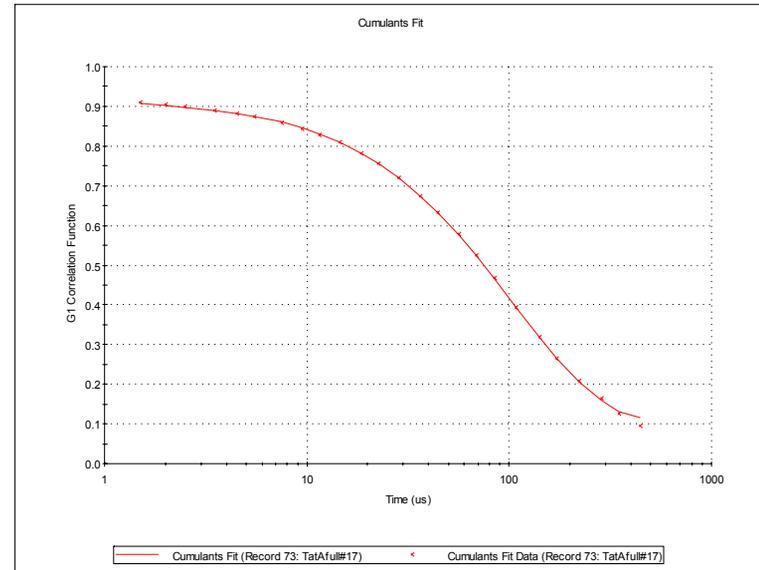
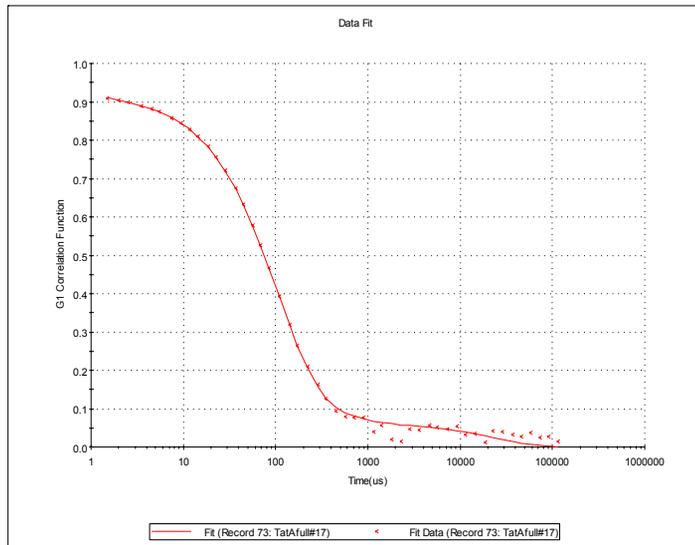
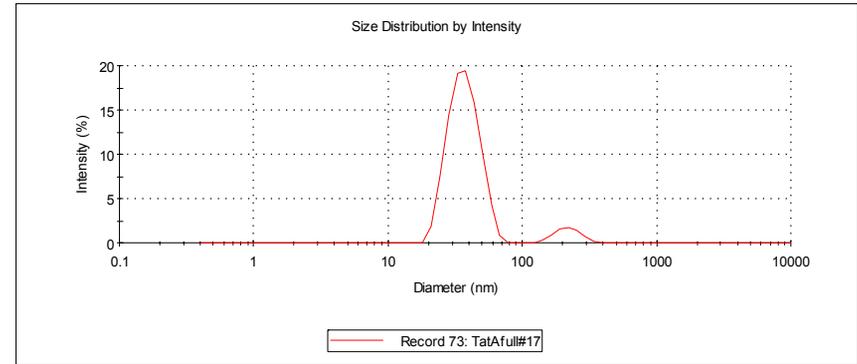
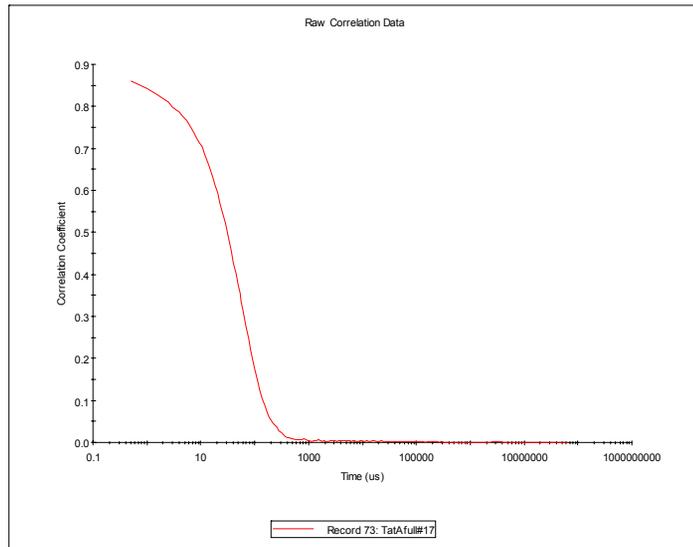
aggregiert

Probe: 10mg/ml Lysozym in 10mM NaPi pH 7,0, frisch (!) angesetzt

Bsp. Lysozym: Qualität der Fits

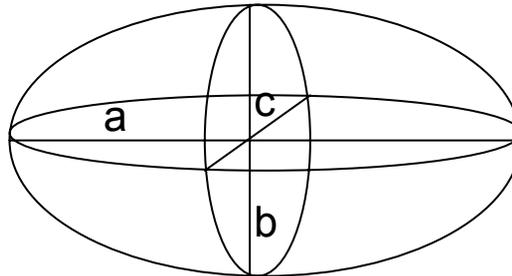


Bsp. Tata: Qualität der Fits



Abschätzung der Teilchenform aus DLS Messergebnissen

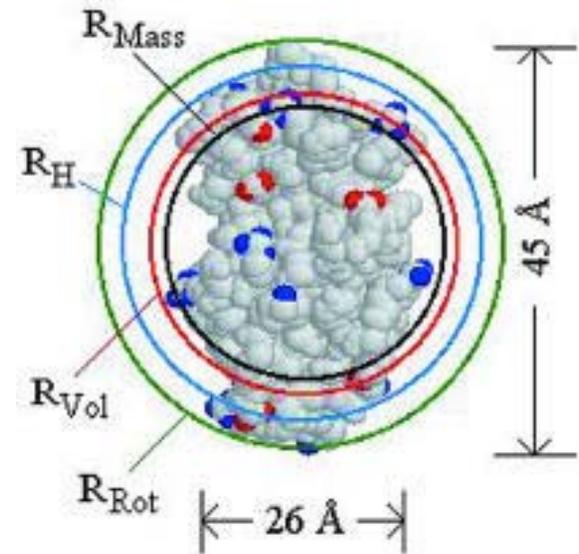
- Perrin-Faktor: Verhältnis der Diffusionskoeffizienten für Teilchen mit bestimmtem hydrodynamischem Durchmesser und Teilchen mit bestimmter Masse
- Formabschätzung mit Ellipsoid-Modell



Achsen-Verhältnisse geben über Form des Teilchens Auskunft

Beispiel: Lysozym

- Lysozym: hydrodynamischer Radius: 1,9 nm
- Berechnung des Masseradius R_{Mass} aus spez. Volumen und Molmasse
- Verhältnis $R_{\text{Vol}}/R_{\text{Mass}}$ ergibt Perrin-Faktor
- Perrin-Faktor: 1,02
- Achsenverhältnis 1,73
- Lysozym keine wirkliche Kugel



Ref.: Malvern Instruments

Abschätzung der Molekularmasse aus DLS Messergebnissen

- Mark-Houkin-Beziehung
- Diffusionskoeffizient (durch DLS messbar) wird in Relation zur Molekularmasse gesetzt.
- Mark-Houkin-Parameter: k und a

$$D = k \cdot M^{-a}$$

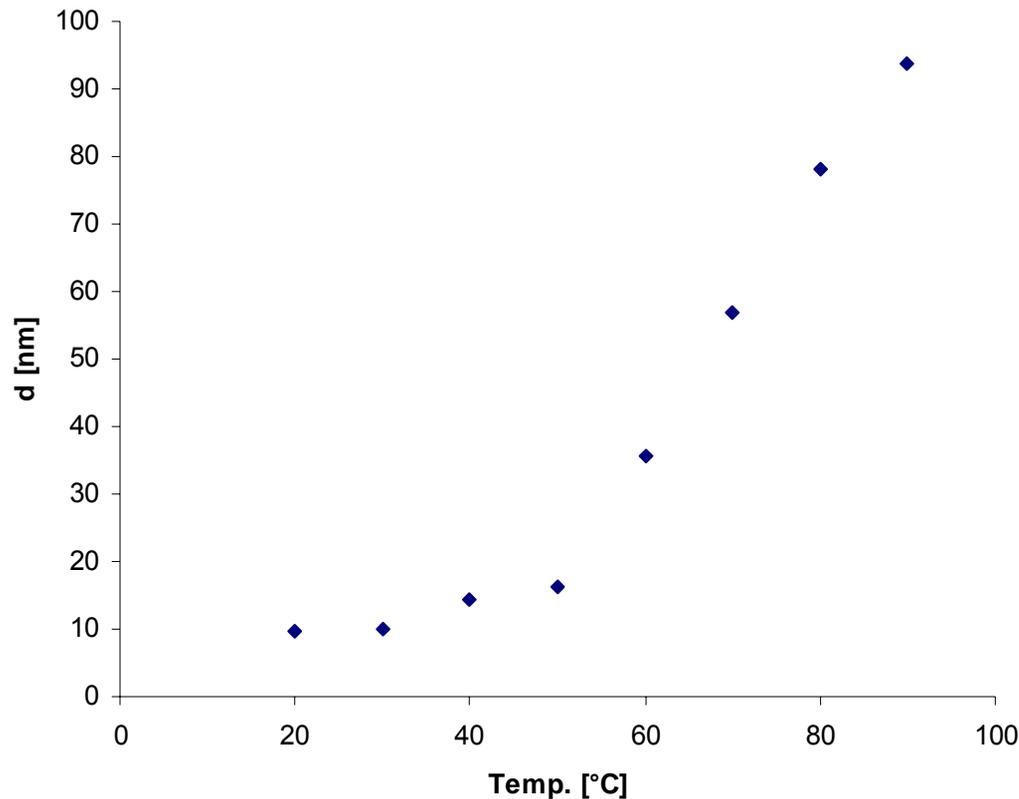
sind in Tabellenwerken zu finden

Für globuläre Proteine:

$$M = (1,68 \cdot R_H)^{2,3394}$$

Bestimmung des Schmelzpunktes von Proteinen

- Prinzip: Messung des hydrodyn. Durchmessers des Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur (z.B. 20-90°C)
- Wenn Protein denaturiert wird Durchmesser größer (Entfaltung)
- Bsp.: Alkoholdehydrogenase, 1mg/ml in 10mM NaPi pH 7,0



Probenvorbereitung für die LS

- Wichtig: staubfreie Proben (wegen NIBS nicht so problematisch)
Maßnahmen: Filtration durch Membranfilter (z.B. 0,2 μm Porengröße)
oder Zentrifugation

Problematik: Probe wird verändert, Bsp.: aggregiertes Protein wird entfernt

- Probenvolumina: von 20 μl bis 3ml (je nach Probenangebot)
- Lösungsmittel: (fast) alles
Voraussetzung: Viskosität und Brechungsindex sind bekannt,
ggf. experimentell ermitteln (mit Viskosimeter bzw. Refraktometer)!

Welche Informationen liefert die DLS?

- Diffusionskoeffizient D
- Hydrodynamischer Radius R_h
- Änderung des R_h durch Konformationsänderung
- Form des Teilchens (Perrin-Theorie)

Vorteile und Nachteile von SLS und DLS

- Vorteile

zerstörungsfreie Methoden
wenig Probenvorbereitung
schnelle Durchführung
verschiedenste Proben messbar



- Nachteile

nicht diskriminierende Methoden („was streut denn da?“)
nur für „einfache“ Proben geeignet



Ende