### M. Hryc

# Pomiar współczynnika dyfuzji i średnicy hydrodynamicznej

#### 3lutego2025

#### Spis treści

1.	Opis metody	1
2.	Badane próbki	1
3.	Przykładowy ślad intenstywności	2
4.	HullRad	2
5.	Dyskusja	2
6.	Wykresy z dopasowaniem do krzywej autokorelacji	16
7.	Tabela wartości	16

#### 1. Opis metody

Metoda DLS (ang. Dynamic Light Scattering) służy do szacowania rozmiaru cząsteczek zawieszonych w roztworze (w tym przypadku białek). Ponieważ cząsteczki rozpuszczalnika w temperaturze powyżej zera absolutnego posiadają eneregię kinetyczną, stale zderzają się ze sobą oraz z zawieszonymi w roztworze cząsteczkami badanego białka. Skutkiem tego jest obserwowany ciągły ruch cząsteczek w losowych kierunkach (ruch Browna). Prędkość tego ruchu jest zależna od rozmiaru cząsteczki zgodnie z równaniem Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_h}$$

gdzie: D — współczynnik dyfuzji  $k_B$  — stała Boltzmana T — temperatura w Kelvinach  $\eta$  — lepkość roztworu  $D_h$  — średnica hydrodynamiczna (średnica twardej kuli, której współczynnik dyfuzji wynosi D)

W trakcie pomiaru światło lasera przechodzi przez próbkę i ulega rozproszeniu. Detektor umieszczony pod określonym kątem (np. 175°) mierzy zmianę intensywności światła w czasie. Ze śladu intensywności wyliczana jest funkcja autokorelacji porównująca różnicę między wartościami zmierzonej intensywności między czasem t a  $t + \tau$ . Na podstawie wykresu wartości funkcji autokorelacji względem wartości  $\tau$  uzyskujemy informację o czasie w jakim przemieszcza się cząsteczka — a ponieważ jest to zależne od jej rozmiaru — możemy oszacować jej rozmiar (średnicę hydrodynamiczną).

#### 2. Badane próbki

1. BSA C w  $H_2O$ 2. BSA C w PBS 3. BSC L w  $H_2O$ 4. BSA L w PBS 5. dHSA6 6. GFP w PBS



Rysunek 1: Przykładowy ślad intensywności.

7. HSA w  $H_2O$ 8. HSA w PBS 9. Lizozym w  $H_2O$ 10. Lizozym w PBS 11. mHSA 12. tHSA 13. tri-HSA w PBS

## 3. Przykładowy ślad intenstywności

## 4. HullRad

Numery akcesyjne PDB: Lizozym 194L, HSA 1AO6, BSA 8WDD.

białko	$2 \cdot R_{Translation}(nm)$	$D_t(\frac{\mu m^2}{s})$
BSA	9.092	47.2
HSA	8.986	47.7
Lizozym	3.682	116

### 5. Dyskusja

Na podstawie wyników można zauważyć, że pomiary prowadzone w  $H_2O$ cechuje wysoka (ponad 25 %) polidyspersyjność, co świadczy o mniejszej pre-



Rysunek 2: BSA C w  $H_2O$ 

cyzji pomiaru. Pomiary GFP i tri-HSA cechują się wysoką polidyspersyjnością pomimo prrowadzenia pomiaru w PBS, ale ponieważ analiza tych białek nie została przeprowadzona w  $H_2$  nie można stwierdzić czy w ich wypadku także spowodowałoby to wyższą polidyspersyjność.

Błąd dopasowania dla wszystkich pomiarów jest bardzo mały, w najgorszym wypadku wynosi $8.592\cdot 10^{-3}.$ 

Wartości średnicy hydrodynamicznej i współczynnika dyfuzji obliczone przez HullRad są zbliżone do wartości zmierzonych dla BSA, HSA i Lizozymu w PBS.

Dodatkowo zmierzono długość i szerokość struktur białek wykorzystanych do analizy HullRad (długość jest podana w Angstremach). Pozwala to zauważyć, że DLS pozwala dosyć dobrze oszacować rozmiar białka. Na pewno jest to ułatwione przez fakt, że wszystkie badane białka miały mniej więcej kolisty kształt.



Rysunek 3: BSA C W PBS



Rysunek 4: BSA L w $H_2O$ 



Rysunek 5: BSA L w PBS



Rysunek 6: dHSA 6



Rysunek 7: GFP w PBS



Rysunek 8: HSA w  $H_2O$ 



Rysunek 9: HSA w PBS



Rysunek 10: Lizozym w  ${\cal H}_2 {\cal O}$ 



Rysunek 11: Lizozym w PBS



Rysunek 12: mHSA



Rysunek 13: tHSA



Rysunek 14: Tri-HSA w PBS



Rysunek 15: BSA, długość

## 6. Wykresy z dopasowaniem do krzywej autokorelacji

próba	$D(\frac{\mu m^2}{s})$	$D_h(nm)$	% polidyspersyjności	błąd dopasowania
BSA C w $H_2O$	193.608	2.403	26.431	$6.925 \cdot 10^{-05}$
BSA C w PBS	59.368	7.723	7.915	$2.988 \cdot 10^{-05}$
BSC L w $H_2O$	116.200	4.004	25.685	$4.261 \cdot 10^{-4}$
BSA L w PBS	54.959	8.342	9.677	$1.075 \cdot 10^{-05}$
dHSA6	46.599	9.053	1.252	$2.983 \cdot 10^{-06}$
$GFP \le PBS$	18.503	24.779	28.181	$5.868 \cdot 10^{-4}$
HSA w $H_2O$	118.305	3.933	26.118	$7.263 \cdot 10^{-5}$
HSA w PBS	57.471	7.978	9.201	$1.183 \cdot 10^{-05}$
Lizozym w $H_2O$	7.880	59.046	27.934	$9.512 \cdot 10^{-4}$
Lizozym w PBS	105.907	4.329	11.087	$2.475 \cdot 10^{-5}$
mHSA	61.059	6.909	4.784	$4.446 \cdot 10^{-6}$
tHSA	34.199	12.335	13.562	$1.756 \cdot 10^{-5}$
tri-HSA w PBS	3.080	148.849	30.359	$8.592 \cdot 10^{-3}$

## 7. Tabela wartości



Rysunek 16: BSA, szerokość



Rysunek 17: HSA, długość



Rysunek 18: HSA, szerokość



Rysunek 19: Lizozym, długość



Rysunek 20: Lizozym, szerokość