

M. Hryc

Pomiar współczynnika dyfuzji i średnicy hydrodynamicznej

6 marca 2025

Spis treści

1. Opis metody	1
2. Badane próbki	1
3. Przykładowy ślad intensywności	2
4. HullRad	2
5. Dyskusja	2
6. Wykresy z dopasowaniem do krzywej autokorelacji	3
7. Tabela wartości	15

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 energię 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 Boltzmanna T — temperatura w Kelvinach η — lepkość roztworu D_h — średnica hydrodynamiczna (średnica twardej kuli, której współczynnik dyfuzji wynosi D)

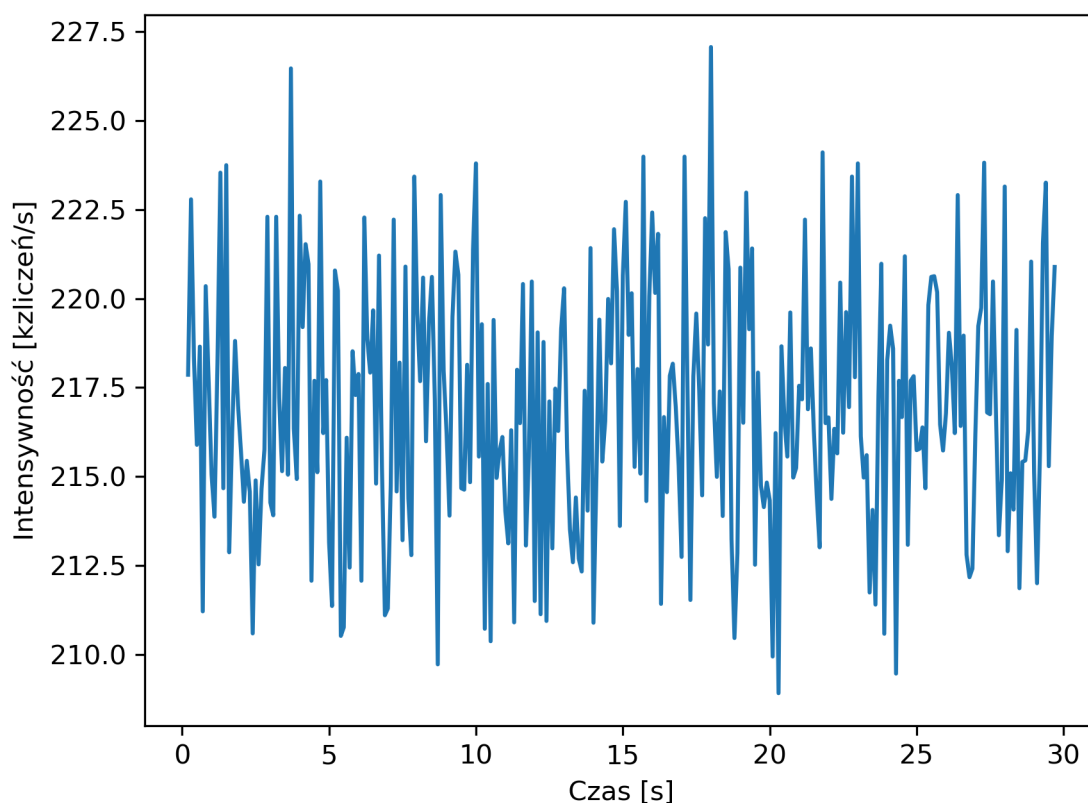
W trakcie pomiaru światło lasera przechodzi przez próbkę i ulega rozproszeniu. Detektor umieszczony pod określonym kątem (np. 175°) mierzy zmianę intensywności światła w czasie. Ze śladu intensywności wyliczana jest funkcja autokorelacji porównująca różnicę między wartościami zmierzonej intensywności między czasem t a $t + \tau$. Na podstawie wykresu wartości funkcji autokorelacji względem wartości τ 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. BSA L w H_2O
4. BSA L w PBS
5. dHSA6
6. GFP w PBS

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 intensywności



Rysunek 1: Przykładowy ślad intensywności.

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 %) polidispersyjność, co świadczy o mniejszej precyzji pomiaru. Pomiary GFP i tri-HSA cechują się wysoką polidispersyjnością

pomimo prowadzenia pomiaru w PBS, ale ponieważ analiza tych białek nie została przeprowadzona w H_2O nie można stwierdzić czy w ich wypadku także spowodowałyby to wyższą polidispersyjność.

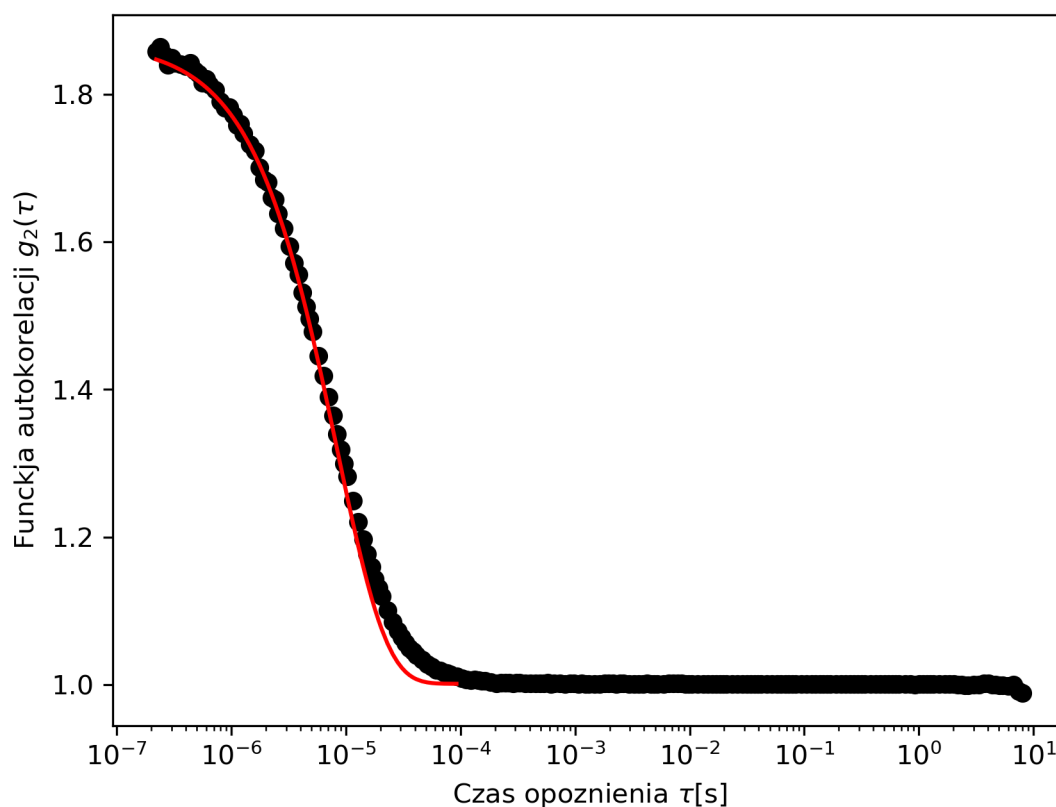
Błąd dopasowania dla wszystkich pomiarów jest bardzo mały, w najgorszym wypadku wynosi $8.592 \cdot 10^{-3}$.

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

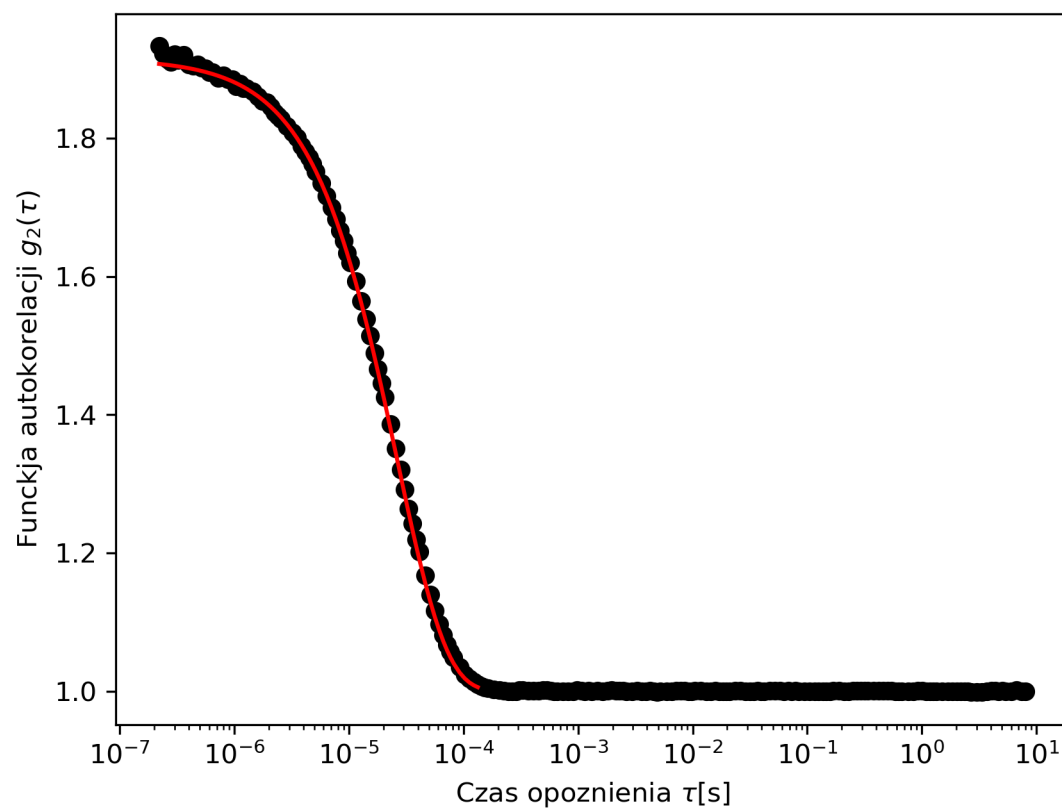
Dodatkowo zmierzono długość i szerokość struktur białek wykorzystanych do analizy HullRad (długość jest podana w Angstrmach). Pozwala to zauważyć, że DLS pozwala dosyć dobrze oszacować rozmiar białka. Na pewno jest to ułatwione przez fakt, że wszystkie badane białka miały mniej więcej kolisty kształt.

Ponieważ pH czystej H_2O wynosi 7, oznacza to, że stężenie molowe H_3O^+ wynosi 10^{-7} . PBS składa się m.in. z Na_2HPO_4 , $NaCl$ i KH_2PO_4 , więc w porównaniu z wodą zawiera znacznie więcej jonów, które będą wchodzić w interakcję z polarnymi rejonami na powierzchni białka i wpływać na pomiar. Wyniki pomiarów dla BSA C, BSA L i HSA sugerują, że większe stężenie jonów w roztworze doprowadziło do spowolnienia ruchów białek, a w efekcie do wyższej wartości średnicy hydrodynamicznej. W przypadku lizozymu obliczona średnica hydrodynamiczna jest mniejsza dla próby w PBS, co wskazuje, że efekt interakcji z jonami jest zależny od białka. Być może wykonanie analizy dystrybucji ładunku na powierzchni badanych białek pozwoliłoby lepiej zrozumieć różnice między pomiarami w różnych buforach.

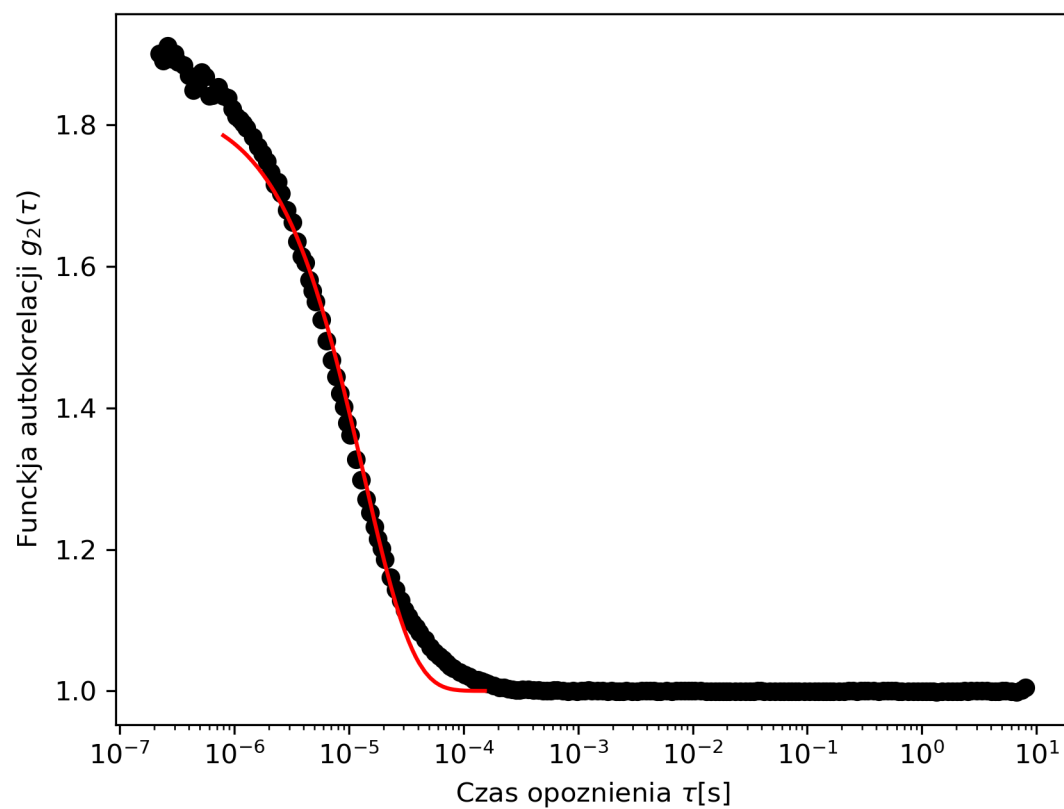
6. Wykresy z dopasowaniem do krzywej autokorelacji



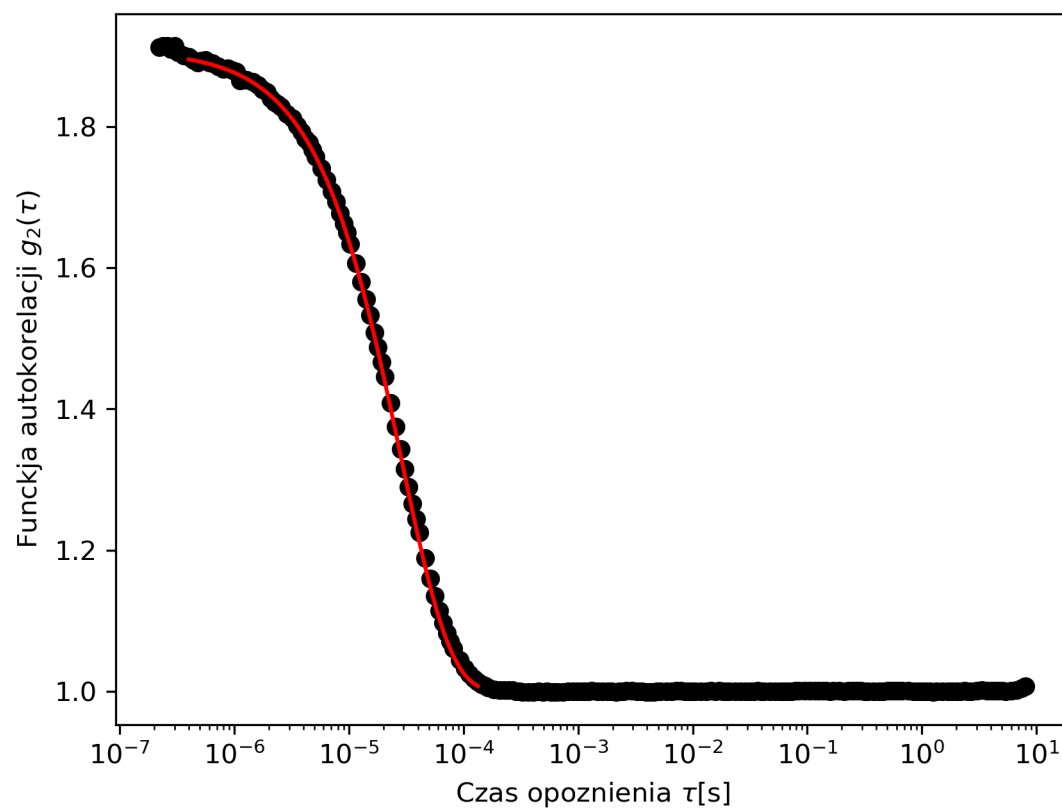
Rysunek 2: BSA C w H_2O



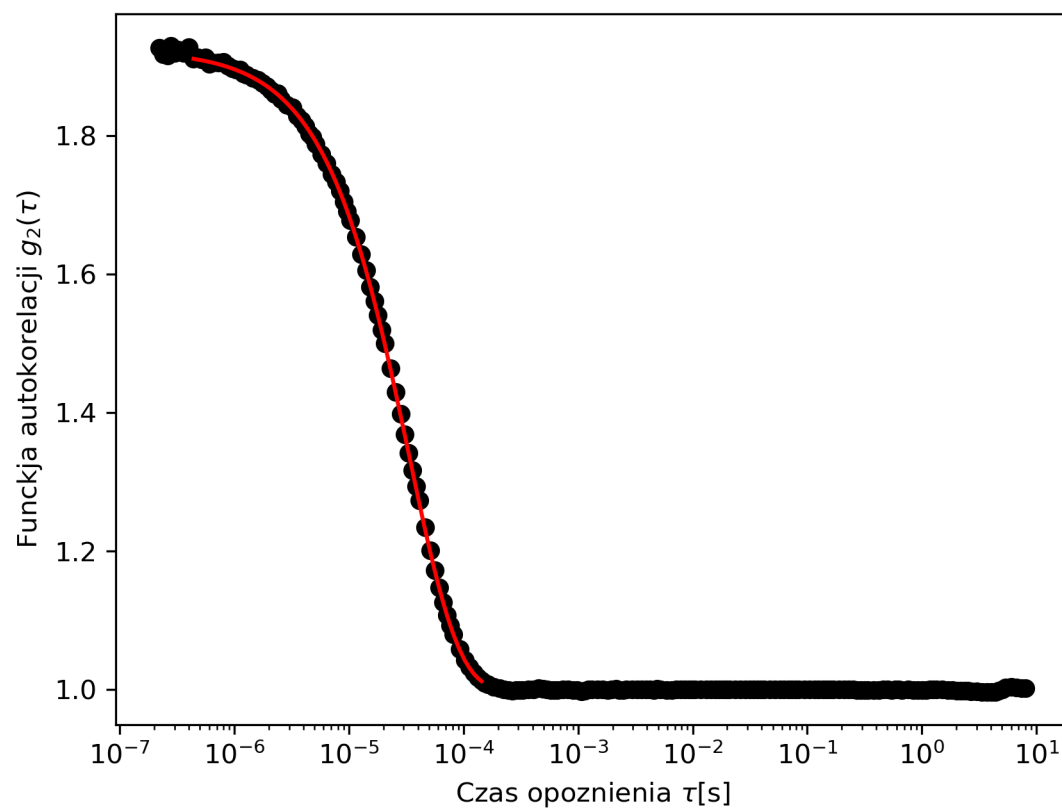
Rysunek 3: BSA C W PBS



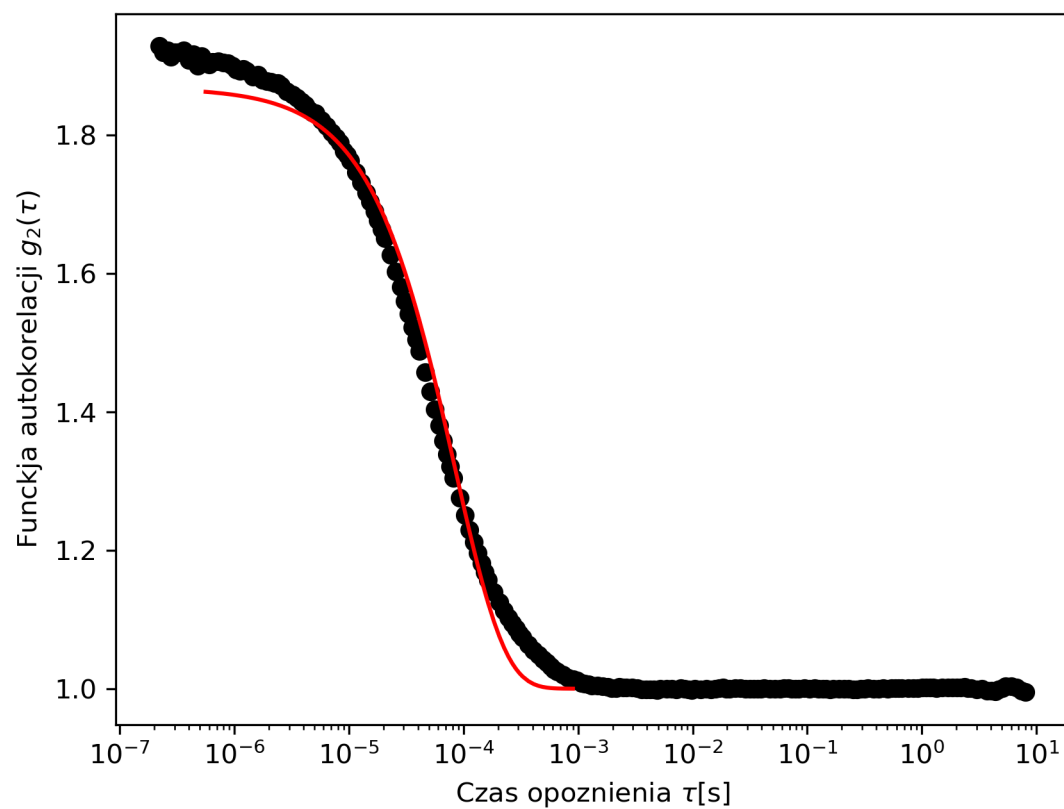
Rysunek 4: BSA L w H_2O



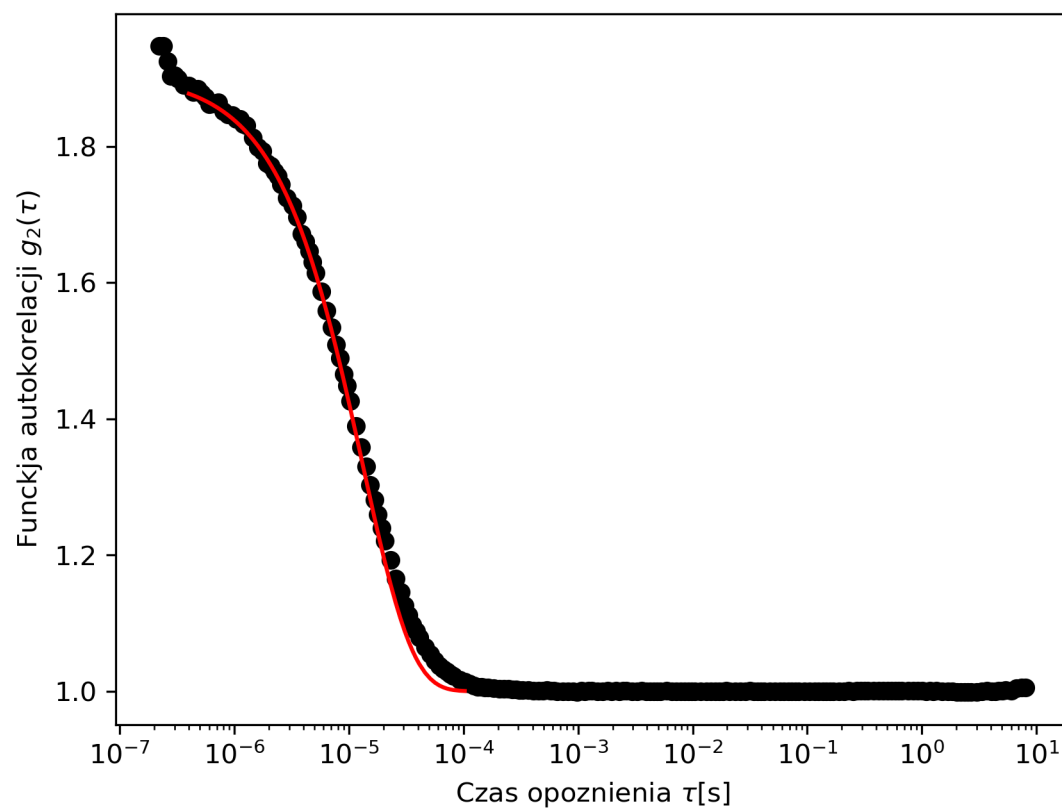
Rysunek 5: BSA L w PBS



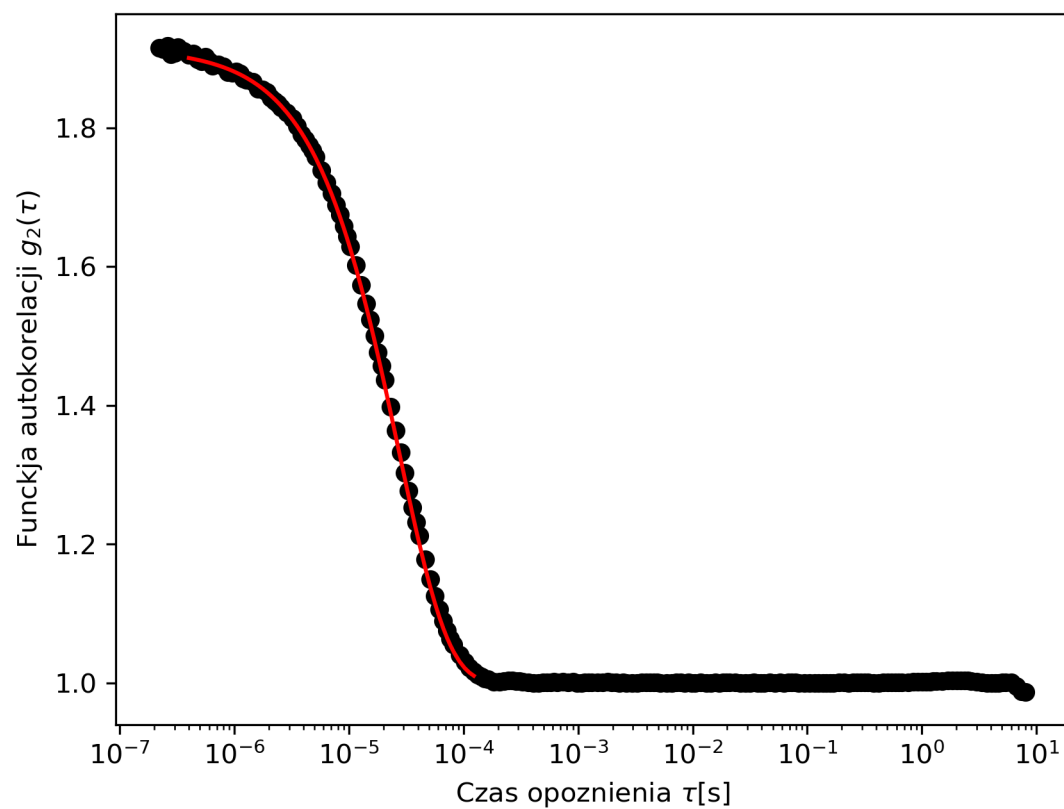
Rysunek 6: dHSA 6



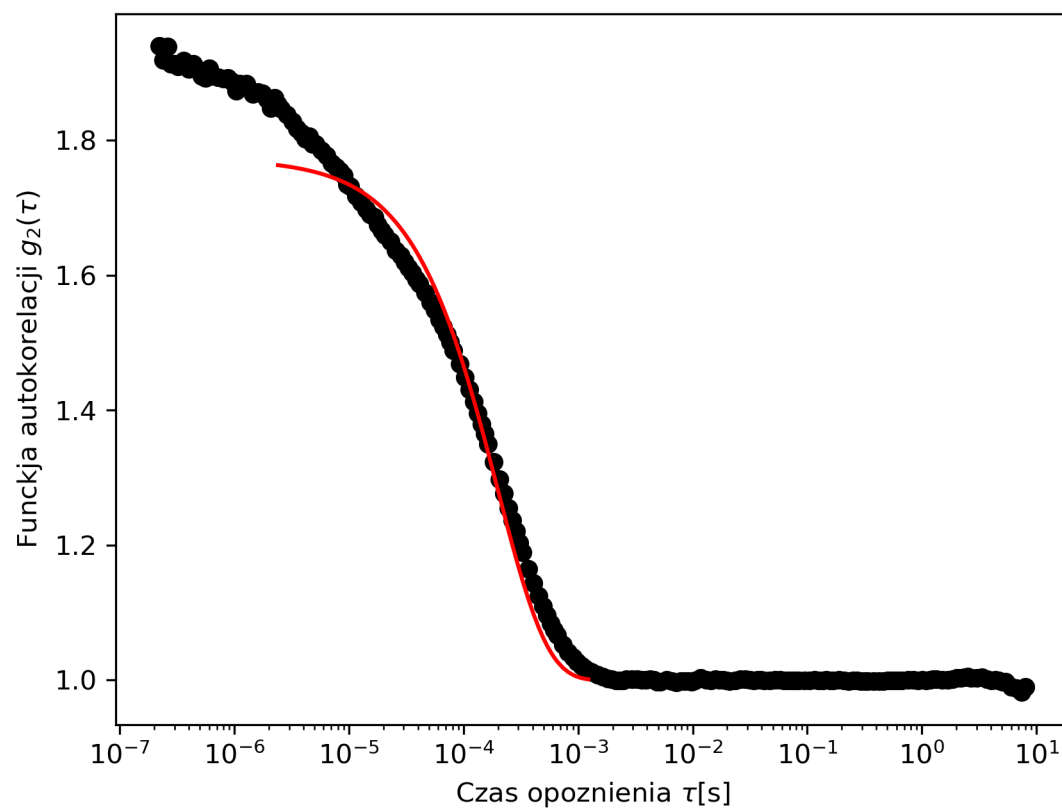
Rysunek 7: GFP w PBS



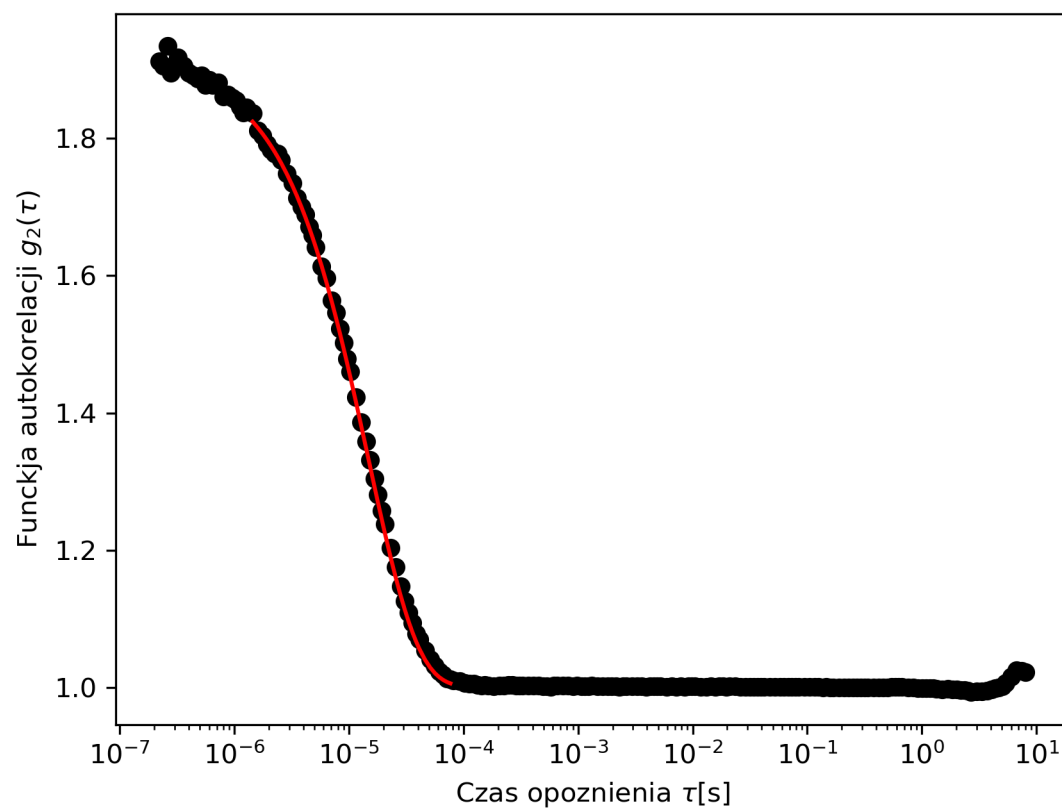
Rysunek 8: HSA w H_2O



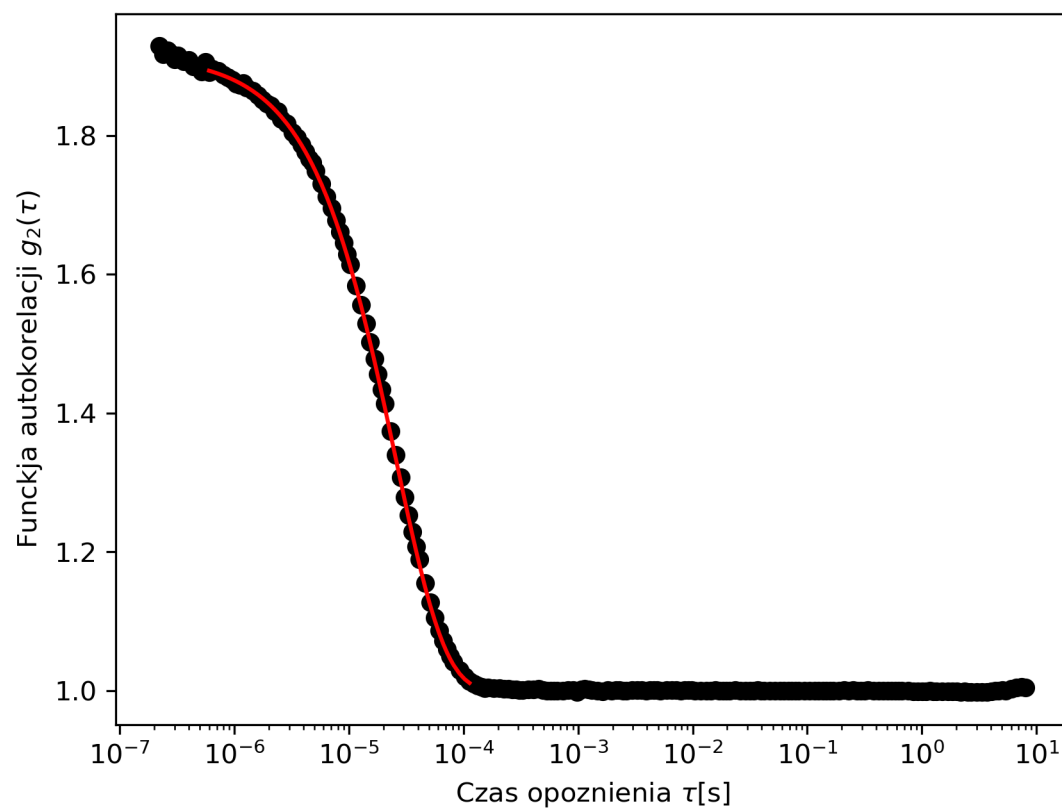
Rysunek 9: HSA w PBS



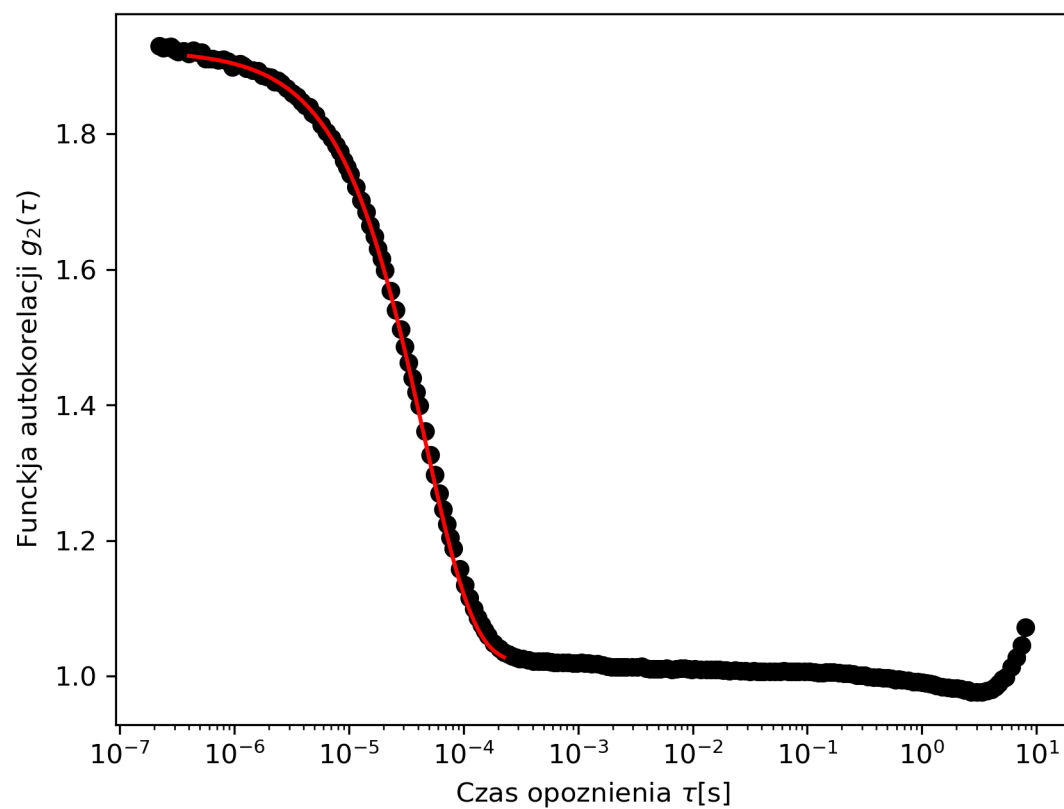
Rysunek 10: Lizozym w H_2O



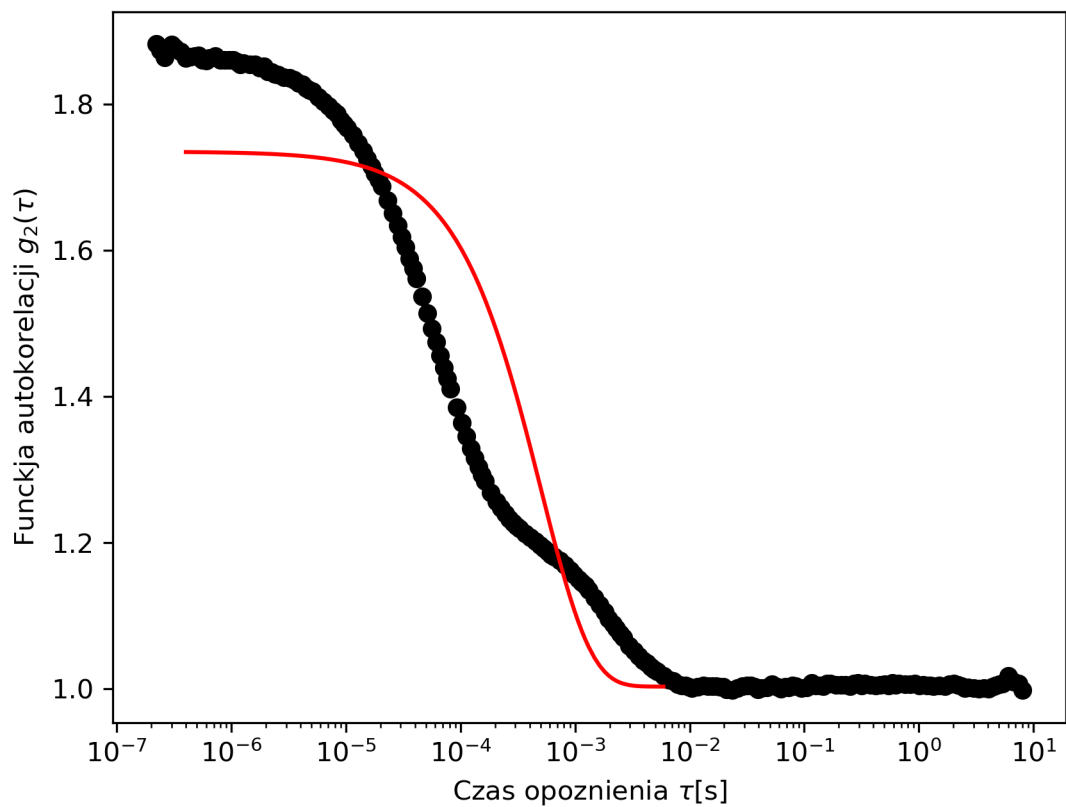
Rysunek 11: Lizozym w PBS



Rysunek 12: mHSA



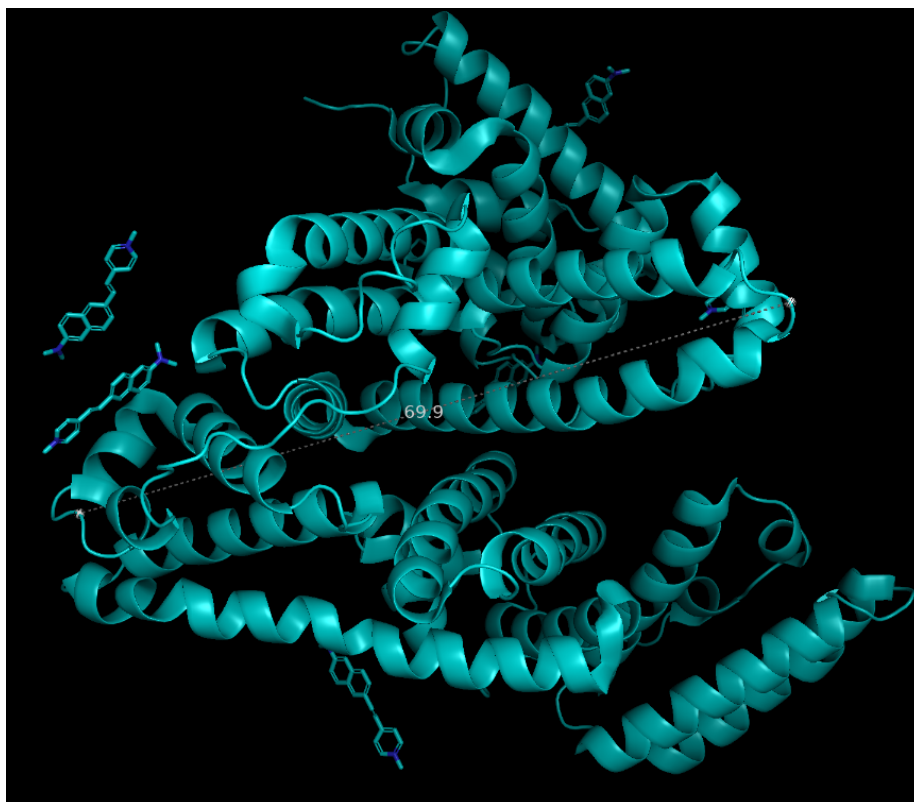
Rysunek 13: tHSA



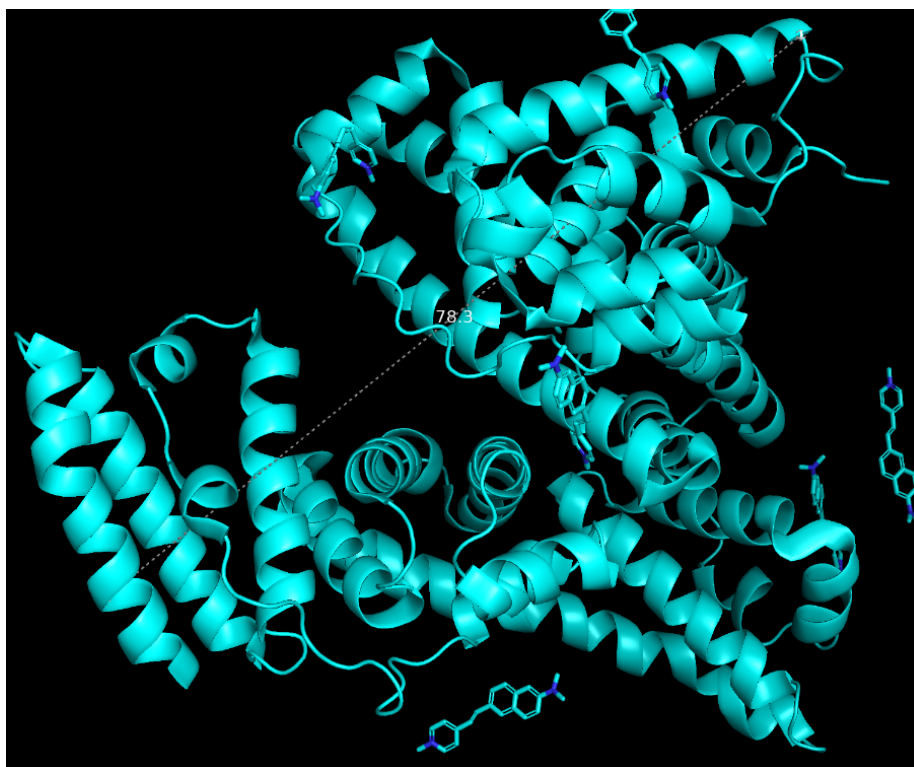
Rysunek 14: Tri-HSA w PBS

7. Tabela wartości

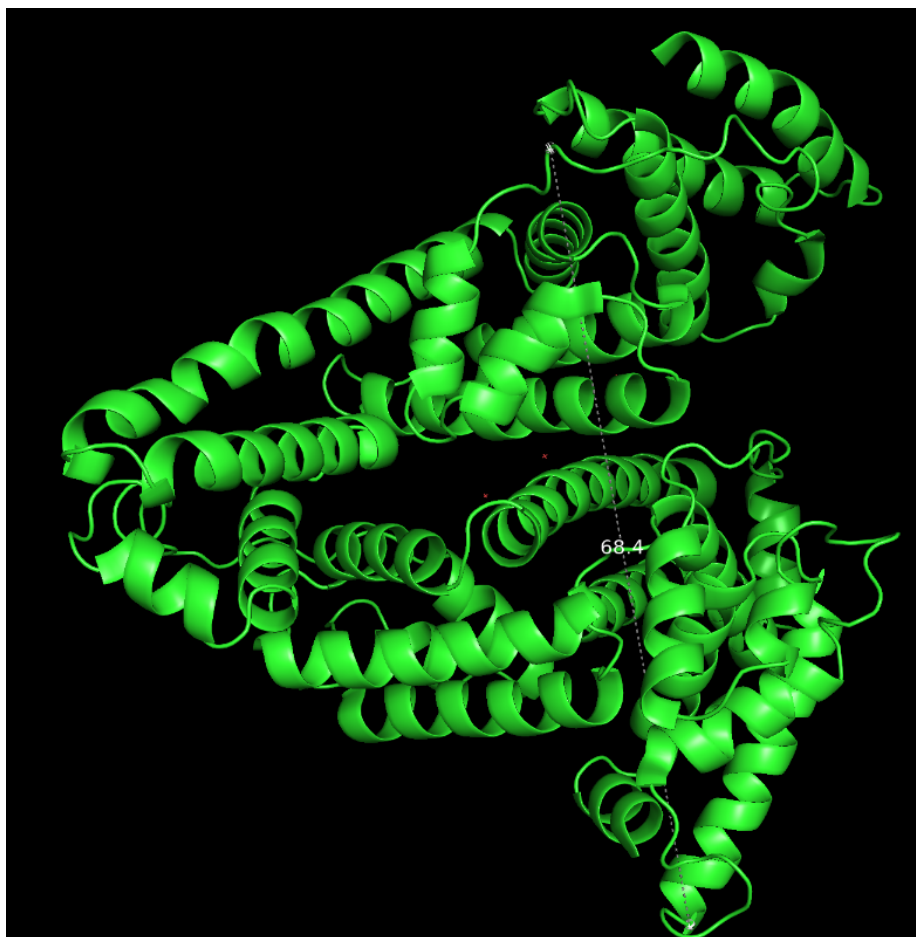
próba	$D(\frac{\mu m^2}{s})$	$D_h(nm)$	% polidispersyjności	błąd dopasowania
BSA C w H_2O	193.608	2.403	26.431	$6.925 \cdot 10^{-05}$
BSA C w PBS	59.368	7.723	7.915	$2.988 \cdot 10^{-05}$
BSC L w H_2O	116.200	4.004	25.685	$4.261 \cdot 10^{-4}$
BSA L w PBS	54.959	8.342	9.677	$1.075 \cdot 10^{-05}$
dHSA6	46.599	9.053	1.252	$2.983 \cdot 10^{-06}$
GFP w 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	$8.592 \cdot 10^{-3}$



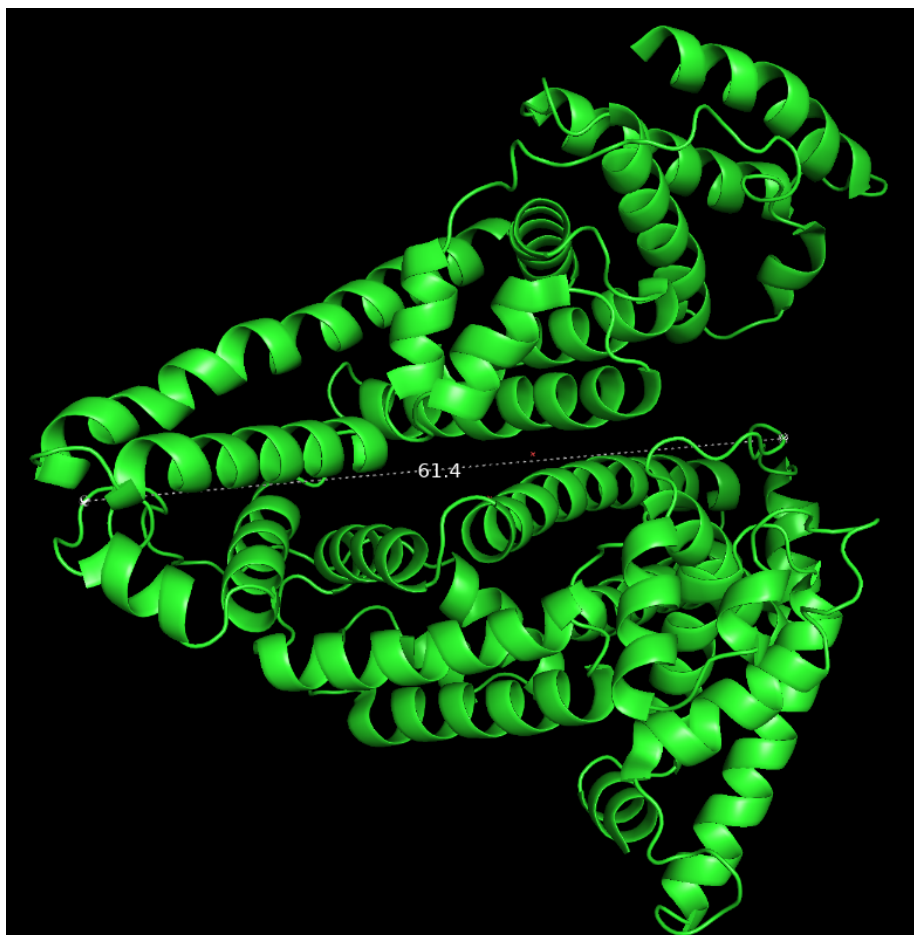
Rysunek 15: BSA, długość. Numer akcesyjny PDB: 4F5S



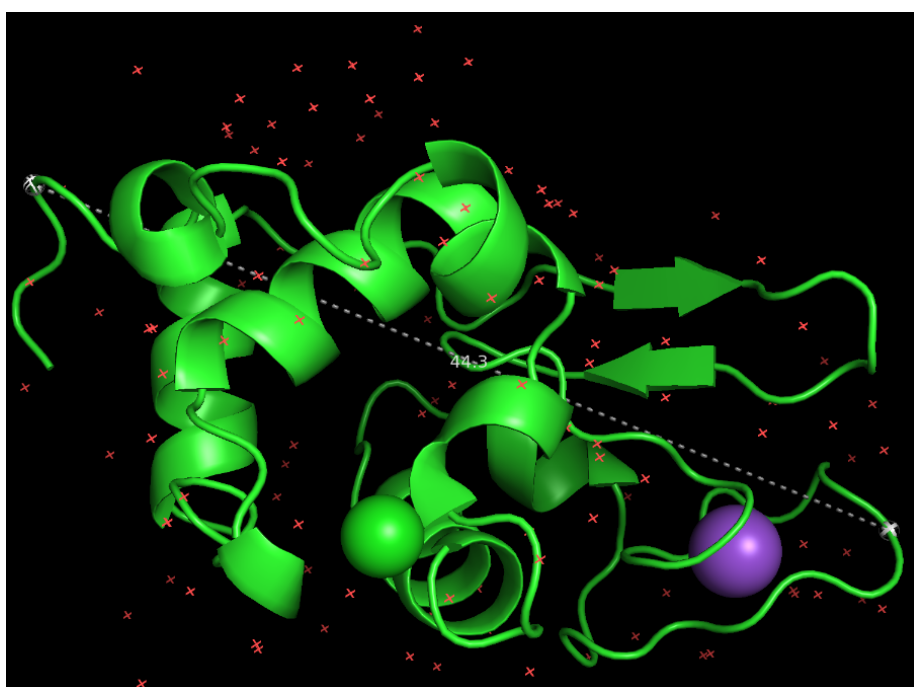
Rysunek 16: BSA, szerokość. Numer akcesyjny PDB: 4F5S



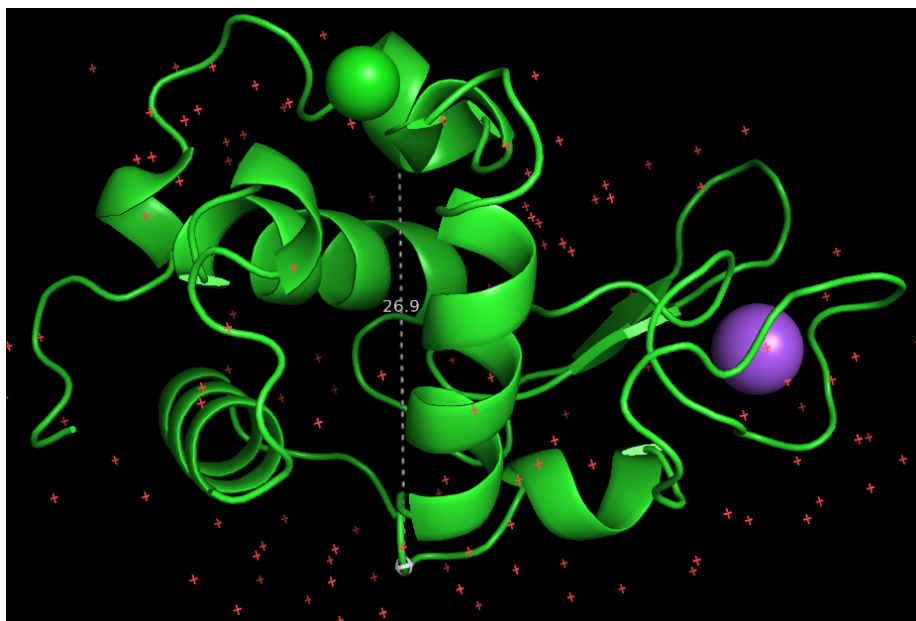
Rysunek 17: HSA, długość. Numer akcesyjny PDB: 1AO6



Rysunek 18: HSA, szerokość. Numer akcesyjny PDB: 1AO6



Rysunek 19: Lizozym, długość. Numer akcesyjny PDB: 194L



Rysunek 20: Lizozym, szerokość. Numer akcesyjny PDB: 194L