



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Katarína Križanová

Dynamický rozptyl světla ve světě biomolekul

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2018

Pod'akovanie

Týmto by som chcela pod'akovať RNDr. Kateřině Hofbauerové,Ph.D., RNDr. Vladimírovi Kopeckému jr., Ph.D., svojim rodičom, tete, sestre, kamarátom a všetkým ostatným ľuďom za či už priamu alebo nepriamu pomoc pri písaní bakalárskej práce. Ďakujem.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne.....

podpis

Název práce: Dynamický rozptyl světla ve světě biomolekul

Autor: Katarína Križanová

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Dynamický rozptyl světla (DLS) představuje nedestruktivní způsob měření díky kterému můžeme za pomoci rozptylu laserového záření na vzorku získat hydrodynamický průměr částic v roztoku a následně dopočítat jejich rozměry, či v případě proteinů stanovit molekulární hmotnost. DLS je dnes hojně užívanou metodou pro studium biomolekul a jejich reakcí, jak je v práci doloženo ve stručném přehledu. V naší experimentální práci jsme se zaměřily na měření proteinů pomocí DLS – jako modelový protein jsme užívaly lysozym. Úspěšně jsme pomocí těchto vzorků optimalizovaly postup pro přípravu vzorků a DLS měření biomolekul. V rámci optimalizace metodických postupů DLS jsme pomocí sacharózy otestovaly možnosti správné detekce co nejmenších částic. Při měření sacharózy jsme zašly až na samou dolní limitu velikosti částic měřitelných DLS. Při tomto měření jsme dokázaly pozorovat lineární závislost naměřeného hydrodynamického průměru na koncentraci sacharózy v roztoku a rovněž, v souladu s literaturou, určit velikost hydrodynamického průměru sacharózy. Prakticky jsme tak úspěšně demonstrovaly možnost stanovení velikosti částic menších 1 nm.

Klíčová slova: DLS, biomolekuly, proteiny, cukry

Title: Dynamic light scattering in the world of biomolecules

Author: Katarína Křižanová

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D., Institute of Physics of Charles University

Abstract: Dynamic light scattering (DLS) represents a non-destructive method which can determine the hydrodynamic radius of particles in a sample by laser scattering. Consequently, their real sizes can be calculated or, in the case of proteins, molecular masses can be estimated. DLS is nowadays widely used for the study of biomolecules and their reactions, as is documented in the thesis in a brief review. Our experimental work was focused on the measurement of proteins by DLS – lysozyme was used as a model protein. The laboratory protocol for sample preparation and DLS measurement was successfully optimized. In the framework of methodology optimization, the ability of correct detection of small particles was tested using sucrose. We came to the lowest limit of particle dimensions measurable by DLS using sucrose. We were able to observe the linear dependence of the measured hydrodynamic radius on sucrose concentration in the solution and we were also able to determine the hydrodynamic radius of sucrose correctly, in agreement with literature. We practically demonstrated the possibility of dimension determination of particles smaller than 1 nm.

Keywords: DLS, biomolecules, proteins, carbohydrates

Názov práce: Dynamický rozptyl svetla vo svete biomolekúl

Autor: Katarína Križanová

Ústav: Fyzikálny ústav UK

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D., Fyzikálny ústav UK

Abstrakt: Dynamický rozptyl svetla (DLS) predstavuje nedeštruktívny spôsob merania vďaka ktorému môžeme za pomoci rozptylu laserového žiarenia na vzorke získať hydrodynamický priemer častíc v roztoku a následne dopočítať ich rozmery, či v prípade proteínov stanoviť molekulárnu hmotnosť. DLS je dnes často využívanou metódou pre štúdium biomolekúl a ich reakcií, ako je v práci doložené v stručnom prehľade. V našej experimentálnej práci sme sa zamerali na meranie proteínov pomocou DLS – ako modelový proteín sme využívali lyzozým. Úspešne sme pomocou týchto vzoriek optimalizovali postup pre prípravu vzoriek a DLS meraní biomolekúl. V rámci optimalizácie metodických postupov DLS sme pomocou sacharózy otestovali možnosti správnej detekcie čo najmenších častíc. Pri meraní sacharózy sme zašli až na samotnú dolnú limitu veľkostí merateľných DLS. Pri tomto meraní sme dokázali pozorovať lineárnu závislosť nameraného hydrodynamického priemeru na koncentrácii sacharózy v roztoku a rovnako, v súlade s literatúrou, určiť veľkosť hydrodynamického priemeru sacharózy. Prakticky sme tak úspešne demonštrovali možnosť stanovenia rozmerov častíc menších ako 1 nm.

Kľúčové slová: DLS, biomolekuly, proteíny, cukry

Obsah

1.	Dynamický rozptyl svetla	1
1.1.	Základný princíp DLS.....	1
1.2.	Kumulatívna analýza.....	4
1.3.	Non-monomodálna distribučná metóda	5
2.	DLS proteínov a malých molekúl	6
2.1.	Proteíny	6
2.2.	Tepelná stabilita proteínov	6
2.3.	Informácie získateľné o proteínoch pri DLS.....	7
2.4.	Hydrodynamický priemer proteínov	7
2.5.	Proteíny a špecifiká pri ich štúdiu za pomoci DLS	8
2.6.	Rýchlosť čítania	9
3.	Príklady merania veľkosti malých molekúl	10
3.1.	DLS a iné metódy merania veľkosti biomolekúl	10
3.2.	DLS a meranie rôznych rozmerov molekúl	12
3.3.	DLS a meranie rozličných tvarov molekúl	13
3.4.	Vplyv viskozity rozpúšťadla na meranie	13
3.5.	Vplyv koncentrácie vzorky na meranie.....	13
3.6.	Vplyv prítomnosti NaCl v rozpúšťadle.....	14
3.7.	Vplyv teploty vzorky pri meraní	14
3.8.	DLS meranie proteínov s väzbou.....	15
3.9.	DLS a meranie roztokov s rôznymi hodnotami pH a tlaku.....	15
4.	Materiály a metódy	16
4.1.	Chemikálie	16
4.2.	Laboratórny materiál.....	17
4.3.	Kyvety	17
4.4.	Prístrojové vybavenie DLS	18
5.	Výsledky merania DLS a ich diskusia	19
5.1.	Vplyv prípravy vzorky na meranie	19
5.1.1.	Rozpúšťadlo	19
5.1.2.	Centrifugácia vzorky	21

5.1.3.	Filtre	22
5.1.4.	Optimálna príprava roztoku lyzozýmu	25
5.2.	Sacharóza pri rôznych koncentráciách	26
5.3.	Druhé meranie sacharózy	30
6.	Záver	33
7.	Literatúra	34
8.	Zoznam skratiek	38

1. Dynamický rozptyl svetla

1.1. Základný princíp DLS

Dynamický rozptyl svetla (po anglicky dynamic light scattering \equiv DLS) sa nazýva tiež kvazielektrický rozptyl (QELS \equiv quasi-elastic light scattering) alebo taktiež korelačná spektroskopia (PCS \equiv fotónová korelačná spektroskopia). Ide o neinvazívnu metódu, ktorá je vhodná na meranie veľkosti malých častíc [ŠEVČÍKOVÁ, 2014].

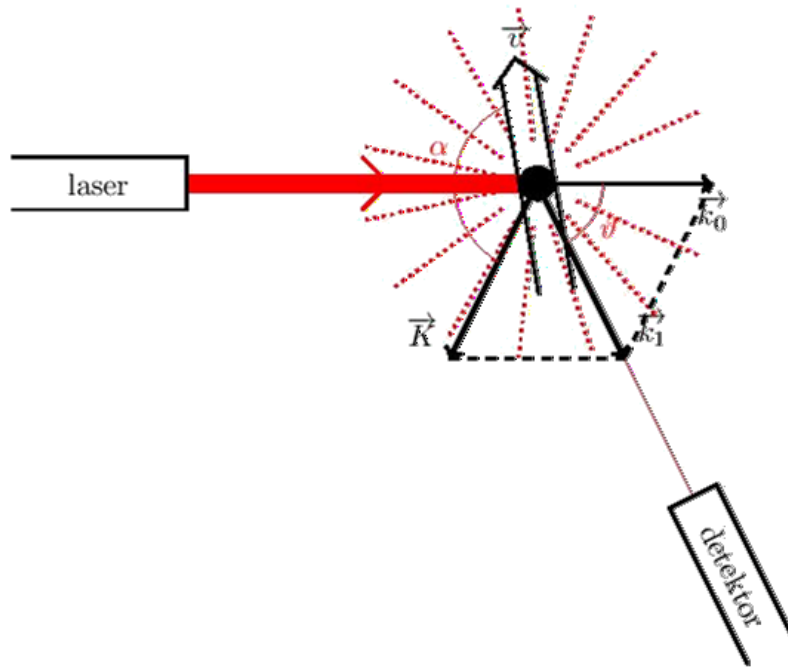
Pri DLS sa obmedzíme na úseky vcelku jemných spektrálnych zmien. Keď svetlo (ideálne laser, keďže ide o vysoko monochromatické svetlo) dopadne na nejakú látku, elektrické pole svetla vytvára oscilujúcu polarizáciu elektrónov v zasiahnutých molekulách, ktoré sa pohybujú neusporiadaným, tzv. Brownovým pohybom. Práve tieto molekuly následne slúžia ako druhotný zdroj svetla, ktoré vyžarujú (odrážajú) [BERNE, 1976; PROSSER, 1989].

Pri tomto type rozptylu nedochádza ku zmene vnútornej energie častíc, ktoré sa rozptyľujú, je to kvazielastický rozptyl. Počas pohybu rozptýlených častíc zato ale dochádza k menším zmenám frekvencií žiarenia. Tieto zmeny frekvencií sú realizované za kompenzácie zmien kinetickej energie rozptýlených častíc [PROSSER, 1989]. Spomínaný spektrálny posun býva dôsledkom optického Dopplerovho javu, čiže javu, pri ktorom je zmena vlnovej dĺžky vyvolaná relatívnym pohybom pozorovateľa a zdroja.

Veľkosť frekvenčného posunu $\Delta\nu$ pri rozptyle na častici pohybujúcej sa rýchlosťou \vec{v} možno vypočítať za pomoci vzťahu [PROSSER, 1989]:

$$\Delta\nu = \frac{1}{2\pi} (\vec{v}, \vec{q}) = \frac{2\nu_0 v n}{c} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \cos(\alpha), \quad (1)$$

pričom $\vec{K} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ nazývame vektor rozptylu, \vec{k}_0 a \vec{k}_1 sú vlnové vektory dopadajúcej a rozptýlenej vlny. θ je v našom značení uhol zvieraný vektormi \vec{k}_0 a \vec{k}_1 (uhol rozptylu), α je uhol medzi vektormi \vec{v} a \vec{K} . ν_0 značí frekvenciu dopadajúcej vlny a n je index lomu prostredia, v ktorom sa svetlo rozptyľuje. Aparatúra je znázornená na obrázku 1.



Obrázok 1: Schematické znázornenie aparátúry pre meranie dynamického rozptylu svetla, upravené z [PROSSER, 1989]

Vzorec, ktorý hovorí o spektre rozptýleného žiarenia dostaneme stredovaním vzťahu (1) cez hodnoty uhlov α a rýchlostí \vec{v} . Ide o Lorentzovskú závislosť so stredom v bode ν_0 [PROSSER, 1989]:

$$I(\nu) \sim \frac{D_T K^2}{4\pi^2(\nu - \nu_0)^2 + (D_T K^2)^2}, \quad (2)$$

pričom D_T značí koeficient translačnej difúzie, čo je skalár hovoriaci o vonkajšom posuvnom neusporiadanom pohybe častice. Táto Lorentzova krivka má pološíрку rovnú [PROSSER, 1989]

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{D_T K^2}{\pi} = D_T \frac{16\pi\nu_0^2 n^2}{c^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (3)$$

V prípade anizotropných látok pozorujeme frekvenčný posun rozptýleného žiarenia i na základe rotácie častíc. Konštruktívna a deštruktívna interferencia spôsobia, že rozptýlené svetlo sa skladá z vlny o frekvencii ν_0 a ďalších dvoch vln, ktorých frekvencia je $\nu_0 + 2/\tau$ a $\nu_0 - 2/\tau$. Posunuté frekvencie spôsobujú, že rozptýlené svetlo má rozdielne uhlové rozloženie intenzity a polarizácie.

Ak ku vzťahu (2) pripočítame ešte jednu z jednoduchších situácií rotácie anizotropných častíc, a to tyčinkovú molekulu s polarizáciou dopadajúceho žiarenia, ktorá je v rovine rozptylu a rozptýleného žiarenia polarizovaného kolmo k rovine rozptylu, dostaneme závislosť [PROSSER, 1989]:

$$I(\nu) \sim \frac{D_T K^2 + 6D_R}{4\pi^2(\nu - \nu_0)^2 + (D_T K^2 + 6D_R)^2} (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}), \quad (4)$$

kde α_{\parallel} , α_{\perp} sú jediné dve nezávislé zložky tenzoru polarizovateľnosti (rovnobežná a kolmá zložka k ose molekuly) a D_R je tenzor, koeficient rotačnej difúzie, popisujúci neusporiadaný vonkajší rotačný pohyb častice.

Formálne možno jemne upraviť vzťah (2) a dostať závislosť intenzity rozptýleného žiarenia na frekvencii v najhrubšom priblížení. Táto závislosť je [PROSSER, 1989]

$$I(\nu) \sim \frac{D_T K^2 + \Lambda}{4\pi^2(\nu - \nu_0)^2 + (D_T K^2 + \Lambda)^2}. \quad (5)$$

Pomocnú premennú Λ sme si zaviedli ako

$$\Lambda = 6D_R + \sum_k \tau_k, \quad (6)$$

τ_k značí relaxačný čas, čiže dobu potrebnú k tomu, aby intenzita klesla na hodnotu $1/e$ násobku jej maximálnej hodnoty, relaxačné časy sčítame cez jednotlivé pohyby úsekov.

Základným pilierom DLS metódy je zaznamenávanie rázových efektov, ktoré nastávajú pri koherentnom zmiešavaní elektromagnetických vln. V prípade, že dopadajú na detektor dve vlny s frekvenciami ν_1 a ν_2 , detektor zaznamená intenzitu [PROSSER, 1989]

$$I(t) = n^2 \varepsilon_0 c (|E_0^1|^2 + |E_0^2|^2 + 2\text{Re} \{E_0^1 E_0^{2*} \cdot e^{2\pi i(\nu_1 - \nu_2)t}\}). \quad (7)$$

ε_0 značí permitivitu vákua.

Signál zaznamenáva fotonásobič s vysokou citlivosťou. Prípadné výkyvy majú priamy súvis so stupňom difúzie molekuly v rozpúšťadle a je možné ich kvantifikovať za pomoci korelačnej funkcie, definovanej ako:

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E(t) \rangle^2}, \quad (8)$$

kde zátvorky značia stredovanie v čase a τ je časové oneskorenie.

V priblížení homodynneho rozptylu, tj. rozptylu pri ktorom fotodetektor registruje len rozptýlené svetlo a počítanie fotónov je náhodný Gaussovský proces, splňuje korelačná funkcia pre monodisperznú vzorku vzťah [STETFELD, 2016]:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = B + \beta |g_1(\tau)|^2 = B + \beta e^{-2K^2 D \tau}, \quad (9)$$

pričom B je hodnota funkcie v limitnom prípade $\tau \rightarrow \infty$, β je amplitúda korelačnej funkcie pri nulovom oneskorení, D je difúzny koeficient a K [PROSSER, 1989]:

$$K = \frac{4\pi v_0 n}{c} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (10)$$

je veľkosť vektoru rozptylu. V prípade polydisperzných roztokov by sme museli zovšeobecniť $|g_1(\tau)|$ na sumu (integrál) exponenciál [FRISKEN, 2001]. $g_2(\tau)$ sa v niektorej literatúre tiež označuje ako RCF (RCF \equiv raw correlation function).

Práve difúzny koeficient D vystupujúci vo vzťahu (9) potrebujeme zistiť fitovaním danej závislosti, aby sme následne zistený difúzny koeficient, prípadne koeficienty (pri polydisperzných vzorkách), mohli vložiť do Stokes-Einsteinovej rovnice a vypočítať tak tzv. *hydrodynamický priemer* D_H , čo je priemer tuhej sféry pohybujúcej sa rovnakou rýchlosťou ako meraná častica. Stokes-Einsteinova rovnica má tvar [Malvern, 2007]

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad (11)$$

kde k je Boltzmanova konštanta, T je absolútna teplota a η je viskozita rozpúšťadla.

Na výpočet distribúcie veľkosti sa môže použiť tzv. NNLS (NNLS \equiv non-negative least squares) analýza, čiže metóda najmenších nezáporných štvorcov.

Základnou distribúciou, ktorú získame z DLS je práve intenzita (rozptylu svetla časticou podľa Rayleighovej aproximácie, ktorá je úmerná šiestej mocnine jej priemeru). Ostatné distribúcie sú generované až za ňou. Distribúcia objemu je vypočítaná na základe zistenej distribúcie intenzity.

1.2 Kumulatívna analýza

Kumulatívna analýza určuje priemernú veľkosť vzorky a index polydisperzity. Je vhodná iba pri meraniach, ktoré majú Gaussovskú distribúciu okolo priemerných hodnôt [STETFELD, 2016]. Tento typ analýzy sa využíva napríklad v softwari *Zetasizer* od firmy Malvern.

Pri kumulatívnej analýze využívame tzv. kumulatívnu generujúcu funkciu $L(-\tau, \Gamma)$, pričom $\Gamma = -DK^2$. Generujúca funkcia je definovaná ako [FRISKEN, 2001]:

$$L(-\tau, \Gamma) = \ln g_1(\tau). \quad (12)$$

Zároveň existuje vzťah pre m -tý kumulant distribučnej funkcie [FRISKEN, 2001]:

$$k_m(\Gamma) = \left. \frac{d^m L(-\tau, \Gamma)}{d(-\tau)^m} \right|_{-\tau=0}. \quad (13)$$

Pre $L(-\tau, \Gamma)$ teda platí [FRISKEN, 2001]:

$$L(-\tau, \Gamma) = \sum_{m=1}^{\infty} k_m(\Gamma) \frac{(-\tau)^m}{m!} \quad (14)$$

Využitím vzťahov (9), (12) a (14) dostávame veľmi dôležitý vzťah pre meranie veľkosti molekúl za pomoci DLS metódy [STETFELD, 2016]

$$\ln(g_2(\tau) - B) = \ln \beta + 2(-k_1\tau + \frac{k_2}{2!}\tau^2 - \frac{k_3}{3!}\tau^3 + \dots). \quad (15)$$

Štandardne sa nepoužívajú viac ako prvé tri členy rozvoja na pravej strane v rovnici (15), aby sa zbytočne neskomplikovalo riešenie [Malvern, 2007]. Dokonca, v prípade Gaussovskej závislosti platí, že koeficienty $k_{m>2}(\Gamma) = 0$ [FRISKEN, 2001].

Index polydisperzity, vyjadrujúci šírku distribúcie veľkosti [ISO22412-2017], značíme *Pdi*. Tento index je bez jednotiek a za daných podmienok ho možno určiť ako [Malvern, 2007]:

$$Pdi = -\frac{2}{3} \frac{k_2}{k_1^2}. \quad (16)$$

Relatívnou polydisperzitou označujeme pološíрку pásu vyjadrenú v percentách:

$$\%Pdi = \sqrt{(Pdi)100}. \quad (17)$$

Príliš vysoké hodnoty polydisperzity naznačujú, že vzorka nie je pravdepodobne príliš vhodná na meranie DLS metódou [Malvern, 2007].

1.3 Non-monomodálna distribučná metóda

Na rozdiel od kumulatívnej metódy, non-monomodálna distribučná teória nepredpokladá konkrétny tvar distribúcie pre vlastnosti difúzie, a preto je vhodnejšia pri meraniach s polydisperznými vzorkami [STETFELD, 2016].

2. DLS proteínov a malých molekúl

2.1. Proteíny

Proteíny sú zlúčeniny prítomné v každom živom organizme na Zemi. Jedná sa o organické zlúčeniny aminokyselín spojených peptidovou väzbou, ktoré zaujímajú rôzne konformácie, pričom existuje 20 základných aminokyselín [VOET, 2011]. Proteíny, ktoré sú stabilné sa často využívajú vo farmaceutickom priemysle. Stabilitu požadujeme kvôli bezpečnosti a efektívnosti terapeutických proteínov. Tie sa odvíjajú práve od spomínanej chemickej a fyzikálnej stability. Degradáciou proteínov ako je napríklad agregácia môže dôjsť k zmenšeniu dostupnosti proteínovej aktívnej formy a spôsobiť iné nežiaduce efekty [WEINBUCH, 2015].

Napriek tomu, že proteíny nerozptyľujú svetlo až s takou vysokou intenzitou, ich meranie sa stáva možné vďaka postupujúcej citlivosti prístrojov [SHIBA, 2010]. Už niekoľko desaťročí je využívaný DLS na meranie agregátov proteínov v roztokoch. Práve týmto spôsobom je možné študovať závislosť rôznych faktorov na stav agregácie daných proteínov a tiež detekciu agregátov v bioterapeutikách, ktoré sú, ako sme už spomínali, nežiaduce, keďže majú nepriaznivé účinky pri ich podávaní pacientom [LORBER, 2012]. Veľkosť proteínových agregátov dokážeme zmerať DLS metódou popísanou bližšie v kapitole 1. V prípade proteínov existujú isté špecifiká, ktoré sa pokúsime priblížiť v tejto kapitole.

V praxi sa stáva niekedy výhodou, že v prípade multimodálnych distribúcií sú často výsledky silnejšie pre rozmerovo väčšie proteíny. Rozptýlená intenzita je úmerná šiestej mocnine priemeru molekuly. To zaručuje, že zaznamenáme i menšie množstvo veľkých proteínov v prítomnosti veľkého množstva malých proteínov [Malvern, 2007].

Proteíny, ale vlastne všetky biomolekuly merané za pomoci dynamického rozptylu svetla, by nemali absorbovať svetlo s vlnovou dĺžkou identickou s vlnovou dĺžkou použitého laseru v meraní. [OGENDAL, 2016] Taktiež by mal byť pripravený roztok priehľadný a index lomu biomolekúl by mal byť odlišný od indexu lomu rozpúšťadla [SABU, 2017].

2.2. Tepelná stabilita proteínov

Teplota topenia proteínov je viditeľná pri meraní dynamickým rozptylom svetla a to výrazným nárastom nameranej intenzity i hydrodynamického priemeru častice.

Stabilita daného proteínu je viditeľná na jeho teplote topenia. Čím je proteín termálne stabilnejší, tým má vyššiu teplotu topenia. Na hodnotu teploty topenia má vplyv rýchlosť ohrevu vzorky a ich koncentrácie.

Pri vyšších teplotách sa mení štruktúra proteínu. Postupne sa rozbaľuje. Rozbalené časti proteínu zvyknú pôsobiť akoby proti Brownovskému pohybu a to

prispieva k väčšej náhodnosti hodnoty difúzneho koeficientu a zároveň sa prirodzene s rozbaľovaním zväčšuje i hydrodynamický priemer proteínu [SHIBA, 2010].

2.3. Informácie získateľné o proteínoch pri DLS

Pomerne často je pri štúdiu proteínov využívaná kryštalografia. Tá je však časovo veľmi náročná a navyše ak nesplníme pomerne zložité podmienky (homogenita proteínu a optimálne zloženie kryštalizačného pufru), nezískame kryštály proteínu vôbec alebo dostaneme zlú difrakciu a teda i získaná informácia nebude dostatočná [LATTMAN, 2008].

Dynamický rozptyl svetla sa ponúka ako pomerne jednoduchá, časovo nenáročná neinvazívna metóda pre overenie vhodnosti proteínových vzoriek na kryštalizačné pokusy.

Pri štúdiu proteínov chceme často zistiť parametre, ktoré možno zmerať i za pomoci DLS metódy. Parametre zahŕňajú napríklad teplotu topenia, rozmer proteínu a jeho stabilitu. Ako sme spomínali v podkapitole 2.1., to či je proteín stabilný je veľmi dôležité pri aplikácii vo farmaceutickom priemysle a i stabilita proteínu je zmerateľná taktiež dynamickým rozptylom svetla. DLS je ešte k tomu i metódou citlivou na zachytávanie zmien veľkosti proteínov spojených s denaturáciou agregácií alebo inými konformačnými zmenami [MINTON, 2016; PECORA, 1985].

Bližšie sa venujeme samotným meraniam proteínov a iných molekúl dynamickým rozptylom svetla spolu s ich zisteniami v kapitole 3.

2.4. Hydrodynamický priemer proteínov

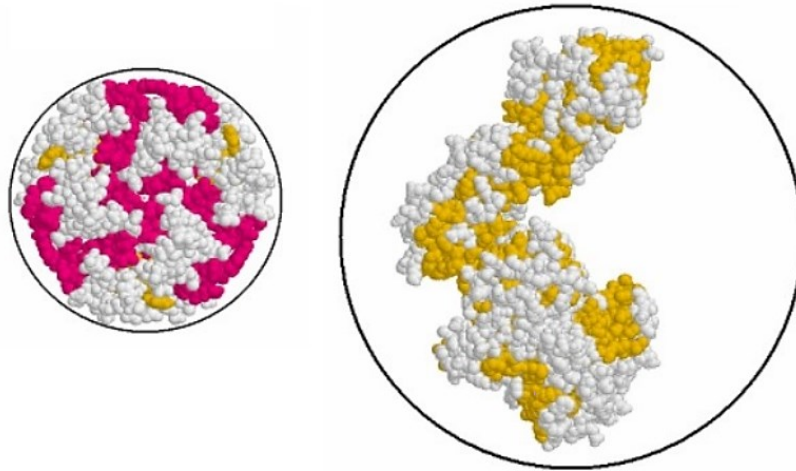
Hydrodynamický priemer D_H nesférických proteínov je priemer tuhej sféry pohybujúcej sa rovnakou rýchlosťou ako meraný proteín.

V prípade zisťovania veľkosti proteínov dynamickým rozptylom svetla je výhodou, že mávajú konzistentné zloženie a ak nie sú vystavené príliš vysokým teplotám, sú často zložené do pevných štruktúr. To možno využiť pri odhade ich molekulevej hmotnosti na základe zisteného hydrodynamického priemeru [Malvern, 2017].

Navyše, zväčša nadobúdajú proteíny sférické tvary, čiže je význam hydrodynamického priemeru priamočiarejší. Možné štruktúry proteínov spolu s načrtnutými hydrodynamickými priermi sú pre ilustráciu zobrazené na obrázku 2.

Hexamerný ľudský inzulín (34,2 kDa)
 $D_H=2,7$ nm

Immunoglobín G (160 kDa)
 $D_H=7,1$ nm



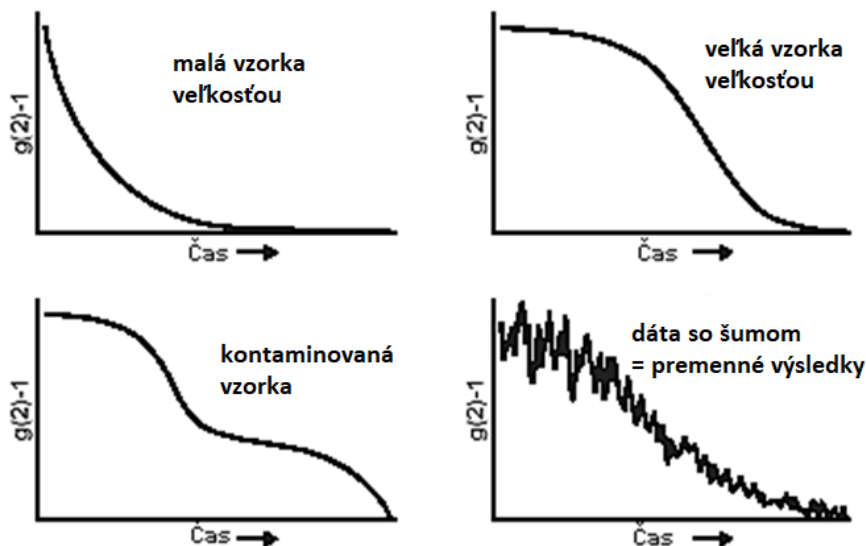
Obrázok 2: Hydrodynamický priemer proteínov, upravené z [Malvern, 2009]

Ak sa zmení tvar molekuly, môže dôjsť i ku zmene hydrodynamického priemeru a to kvôli zmene rýchlosti rozptylu. Parametre ovplyvňujúce hydrodynamické priemery proteínov sú predovšetkým relatívna molekulová hmotnosť a tvar štruktúry proteínu. V prípade nesférických biomolekúl je však stále možné určiť ich tvar DLS metódou. Pre nesférické molekuly je totižto možné použiť tzv. *Perrinov faktor* na prepočet pretiahnutých a sploštených osových pomerov. Tento faktor je úmerný hydrodynamickému priemeru [Malvern, 2007].

2.5. Proteíny a špecifiká pri ich štúdiu za pomoci DLS

Analýza distribúcie veľkosti pre proteíny zahŕňa, tak ako aj všeobecne (viď kapitola 1), NNLS analýzu. V prípade proteínov však nasleduje ešte výber tzv. *L-krivkou*. Princíp spočíva v tom, že sa vyberie 20 možných distribúcií a na osu x sa vynesie presnosť fitu, zatiaľ čo na ose y je hladkosť funkcie. Vznikne závislosť pripomínajúca písmeno L, kde nanesieme dve dotyčnice. Výsledná distribúcia veľkosti, ktorú vyberieme sa nachádza na priamke prechádzajúcej prienikom dotyčníc a počiatkom, najbližšie k bodu, kde pretne L-krivku [STETEFELD, 2016].

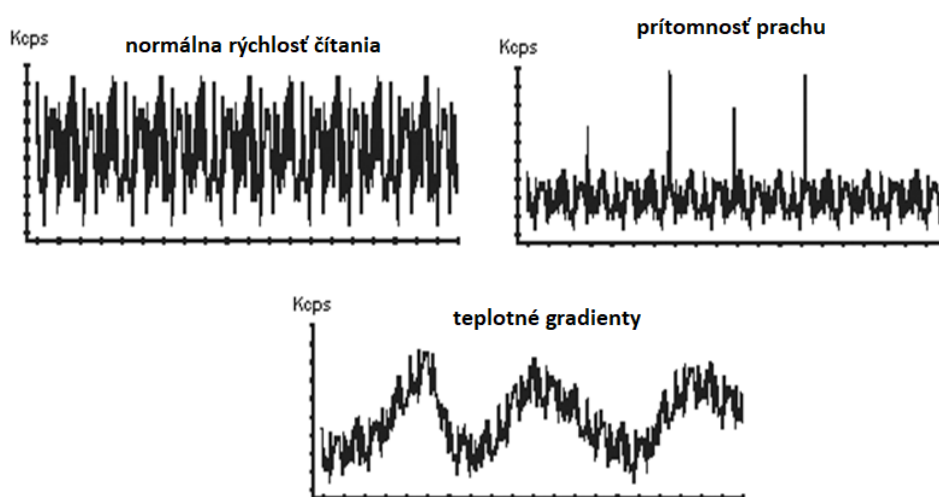
Z korelačnej funkcie (korelácia je prevádzaná v čase) možno určiť či meriame malé alebo veľké častice, alebo teda skôr porovnať veľkosti viacerých nameraných biomolekúl. Malé častice sú totižto rýchlejšie ako veľké a preto bude i sklon korelačnej funkcie „strmší“. Zo závislosti korelačnej funkcie sa dá takisto určiť či náhodou nemežeme kontaminovanú vzorkou alebo či výsledky nie sú príliš premenné (obrázok 3) [Malvern, 2007].



Obrázok 3: Tvary korelačných funkcií a závery, ktoré z týchto tvarov môžeme vyvodit', upravené z [Malvern, 2007]

2.6. Rýchlosť čítania

Rýchlosť čítania, ktorá je počas merania taktiež meraná je vlastne množstvo fotónov zaznamenaných za jednu sekundu, ukazuje nám teda kvalitu meranej vzorky a môže nám napovedať či je vo vzorke prítomný teplotný gradient alebo je teplota vyrovnaná a taktiež či je prítomný prach vo vzorke (viď obrázok 4). Pravdaže, pri meraní veľkosti proteínov a malých biomolekúl sa budeme snažiť o rovnomernú teplotu a čo najmenšiu prašnosť. V rýchlosti čítania môže tak isto dochádzať k rastu hodnôt v čase, prípadne k ich poklesu, v tom prípade sa vzorka proteínu zhlukuje, prípadne vzorka sedimentuje [Malvern, 2007].



Obrázok 4: Zobrazenie priebehu rýchlosti čítania pri DLS meraní: normálna rýchlosť čítania (vľavo hore), teplotný gradient (dole) a prítomnosť prachu vo vzorke (vpravo hore) charakterizovaná náhlymi odľahlými skokmi v rýchlosti, upravené z [Malvern, 2007]

3. Príklady merania veľkosti malých molekúl

Rozoberme niektoré známe výsledky pri meraní veľkosti molekúl za pomoci DLS metódy a porovnajme túto metódu s inými metódami, ktoré nám tiež dovoľujú stanoviť veľkosť malých molekúl.

3.1. DLS a iné metódy merania veľkosti biomolekúl

Dynamický rozptyl svetla je pomerne účinná neinvazívna metóda, ktorá dokáže zmerať veľkosti biomolekúl v pomerne veľkom rozpätí veľkostí. Stále sa však môžeme zamyslieť nad tým či je táto metóda vždy najvhodnejšia alebo existujú metódy, ktoré za istých podmienok dokážu zmerať rozmery biomolekúl presnejšie.

Pomerne populárnou metódou na zobrazovanie nanočastíc je dozaista transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) [PABISCH, 2012]. Touto metódou je možné získať distribúciu veľkosti častíc i s odhadovanou polydisperzitou. Často sa však stáva, že tieto dve metódy (DLS a TEM) dávajú rozdielne výsledky, keďže základy spomínaných dvoch metód sú úplne odlišné. DLS pracuje s roztokmi, zatiaľ čo TEM vyžaduje suché vzorky v ultravysokom vákuu. Všeobecne býva veľkosť častíc zistená dynamickým rozptylom svetla väčšia ako veľkosť určená transmisnou elektrónovou mikroskopiou. Výhodou oproti TEM je pri DLS schopnosť zmerať oveľa väčší počet častíc.

DLS vyžaduje pre meranie veľkostí riedenie vzorky v rozpúšťadle. Oproti tomu SAXS (SAXS \equiv small-angle X-ray scattering, Röntgenový rozptyl pod malými uhlami) dovoľuje zmerať i veľkosť pre nanočastice v prášku. V meraniach [PABISCH, 2012] vychádzali pre DLS o trochu väčšie hodnoty veľkosti molekúl ZrO_2 a SiO_2 , pravdepodobne kvôli hydrodynamickej obálke. (Hodnoty zistené oboma spôsobmi sa zhodovali v rámci chyby.) V meraniach tiež bolo vyzorované, že na rozdiel od dynamického rozptylu svetla, SAXS nie je metóda citlivá na veľké častice malých koncentrácií (prítomnosť veľkých častíc s koncentráciou 1 až 2 % bola zaznamenaná DLS, ale nie SAXS).

V článku [PABISCH, 2012] je dynamický rozptyl svetla tiež porovnaný s XRD (XRD \equiv X-ray diffraction, Röntgenová difrakcia). Keďže XRD sa môže použiť iba pri kryštalických vzorkách, môžeme skonštatovať, že DLS je metódou obecnjšie využiteľnou pri meraní malých molekúl. XRD bolo v práci využité teda iba pri meraní rozmerov zirkónových nanočastíc. Meranie sa zdarilo iba pre malé častice zirkónia, kde výsledky súhlasia s výsledkami merania DLS metódou. Pri väčších časticiach boli pravdepodobne detekované namiesto agregátov nanočastíc malé kryštalické jednotky.

Ďalšou alternatívou dynamického rozptylu svetla môže byť i AFM (AFM \equiv atomic force microscopy). Nevýhodou pri porovnávaní s DLS je však menší počet analyzovaných častíc a teda horšia distribúcia veľkosti a Pdi ako pri meraní DLS [BHATTACHARJEE, 2016]. V knihe [MUSCHOL, 2014] sú zhrnuté hydrodynamické polomery viacerých prechodných medziproduktov počas rastu

lyzozymového vlákna zistené DLS a AFM. Pri krátkych a dlhých vláknach a monomérech vychádzali hodnoty hydrodynamického polomeru z AFM menšie ako tie z DLS merania. Naopak, oligoméry a protofibrily mali hydrodynamický priemer zistený AFM väčší ako DLS.

Biochemicky často používanou metódou je natívna polyakrylamidová elektroforéza. V článku [O'NEAL, 1998] ju použili v gradientovej podobe a porovnávali s DLS metódou meranou prístrojom *Zetasizer 300* pri zisťovaní veľkosti lipoproteínov, bolo zistené, že merania veľkostí týmito metódami sú dobre korelované. Na rozdiel od elektroforézy je však pri DLS možné presne zmerať i lipoproteíny nízkej hustoty rýchlo a s menšou šancou na chybovosť.

V článku [MEHN, 2017] je zhrnuté meranie metódou analytickej ultracentrifugácie (AUC). Táto metóda bola pôvodne určená na zistenie hmotnosti proteínov na základe ich sedimentácie, ale ukázala sa ako vhodná i pri meraní distribúcie veľkosti lipozómu. Na rozdiel od DLS metódy nemusí byť pri meraní analytickej ultracentrifugáciou fluorescencia vzorky prekážkou.

AUC môže detekovať agregáty, ktoré DLS bezaznamená, ako tomu je i v publikácii [SCOTT, 2005], kde je prezentované meranie rastu ZrO_2 koloidov, pri ktorom DLS metódou pri 50 °C nebola detekovaná agregácia častíc. Naopak, AUC zaznamenala rast asi 1,6 nm veľkej častice.

Metóda NTA (NTA \equiv nanoparticle tracking analysis, analýza trajektórií nanočastíc) pracuje na veľmi podobnom princípe ako dynamický rozptyl svetla. Taktiež sa zisťuje hydrodynamický priemer častice dosadením do Stokes-Einsteinovej rovnice (11). Na rozdiel od dynamického rozptylu svetla však NTA určuje difúzny koeficient iným spôsobom (CCD kamerou) a preto môžu veľkosti vychádzať rozdielne. Hustota častíc vo vzorkách musí byť obvykle vyššia pri DLS ako pri NTA. Pri DLS vychádza veľkosť všeobecne menšia ako pri NTA, ale s väčšou chybovosťou. A nakoniec, NTA je vhodnejšou metódou pri meraní polydisperzných vzoriek. Celkovo má NTA lepšie rozlíšenie ako DLS a je vhodnejšia pre väčšie molekuly. DLS je zas vhodnejšia pri meraní rozmerov častíc menších ako 30 nm a ide o jednoduchšie a v súčasnosti menej finančne nákladné meranie [FILIPPE, 2010; BHATTACHARJEE, 2016].

Disperzná Taylorova analýza (TDA \equiv Taylor dispersion analysis) je oproti DLS pomerne nová. V práci [HAWE, 2011] je práve táto metóda porovnávaná s dynamickým rozptylom svetla a to pri zisťovaní rozmerov terapeutických peptidov, proteínov a ich agregátov (napríklad oxytocín, hovädzí sérový albumín či etanercept), ktorých hydrodynamické priemery mali byť približne v rozmedzí od 1,6 nm do 14,2 nm. Obe metódy boli schopné určiť správne rozmery väčších častíc i pri menších koncentráciách. Ako konzistentnejšou metódou pri veľmi malých rozmeroch a zároveň koncentráciách sa však ukázala TDA. DLS pri meraní najmenšej častice (oxytocínu) a to hlavne pri nízkych koncentráciách pravdepodobne neregistrovala len proteín, ale i iné čiastočky v roztoku akými sú i prachové častice. Vyvodzujeme to z príliš veľkých nameraných hydrodynamických priemerov oproti predpokladanému priemeru. Pre určité koncentrácie dosahoval rádovo až stovky

nanometrov a pritom sa predpokladalo, že hydrodynamický priemer bude pre oxytocín rádovo veľký jednotky nanometrov.

3.2. DLS a meranie rôznych rozmerov molekúl

V práci [HALAKA, 2003] použili spektroskopiu dielektroforetickým dynamickým rozptylom svetla (DDLS \equiv dielectricophoretic dynamic light-scattering), ktorá určuje typ makromolekuly na základe ich dielektrických alebo polarizačných vlastností. Tieto merania prebiehajú v nerovnomernom, oscilujúcom elektrickom poli, ktoré spôsobuje, že sa molekuly začnú pohybovať a to sa prejaví na DLS autokorelačnej funkcii. Analyzované boli spektrá v priestore frekvencií, ktoré boli získané Fourierovou transformáciou. Analyzovali sa častice latexu a bunky kvasiniek. DDLS metóda je použiteľná v prípade, že makromolekuly, ktorých veľkosť chceme zmerať sú polarizovateľné a zároveň musí byť sila použitého magnetického pola silnejšia ako gravitačná sila alebo Brownovská. DDLS je vhodné použiť pre častice veľké aspoň 10 nm a za optimálnu bola stanovená veľkosť 50 nm. DDLS tak nie je vhodná na meranie väčšiny proteínov a polysacharidov, naopak je napríklad vhodná na meranie polymérov citlivých na DDLS. Necitlivosť na malé molekuly a proteíny môže byť i výhodou, keďže ich detekcia v bunkovej kultúre často iba komplikuje interpretáciu merania.

Rádovo 10 nm veľkú časticu sa podarilo zmerať v práci [CADOGAN, 2017], kde bola za pomoci dynamického rozptylu svetla určená veľkosť micely a to hydrodynamickým priemerom rovným 17 nm.

V práci [DEV, 2006] sú pri meraní proteínu, arašidového aglutinínu, DLS metódou tak isto namerané hydrodynamické priemery veľké rádovo 1–10 nm.

V publikácii [BUMILLER, 2006] dokázali DLS metódou efektívne zmerať molekuly ako agregáty fullerénu C_{60} (radovo veľké stovky nanometrov), nanotrubicu CdSe (radovo desiatky nanometrov dlhá a jednotky nanometrov široká), nanočastice syntetizované z oxidov kovov (s veľkosťami v rozpätí 72–190 nm). Mnohé vzorky museli upraviť či už použitím ultrazvuku na rozptýlenie častíc alebo zmenou povrchovej chémie. Pri agregátoch fullerénu C_{60} sa merala vzorka pred a po použití ultrazvuku. Po použití ultrazvuku došlo k zmenšeniu hydrodynamického priemeru a taktiež polydisperzity.

Pri štúdiu limitných hodnôt veľkosti častíc meraných DLS metódou, a to konkrétne využívajúc metódu spätného odrazu (popísaná v podkapitole 4.4), v práci [KASZUBA, 2008] bolo zistené, že veľkosti častíc menších ako 1 nm (molekula sacharózy) je stále možné zmerať DLS metódou. Boli merané rôzne koncentrácie sacharózy. Zistené hydrodynamické priemery molekuly spadali do hodnôt, ktoré boli pre sacharózu rovnako predpokladané využitím Stokes-Einsteionovej rovnice (11), do ktorej boli dosadené difúzne koeficienty zistené v [ENGELSEN, 1997].

3.3. DLS a meranie rozličných tvarov molekúl

Meranie dynamickým rozptylom svetla závisí i na tvare častice, ktorú meriame. Napríklad častice ktoré sú sférické a kompaktnjšie dokážu rozptýliť viac svetla ako menej kompaktnjšie častice [BHATTACHARJEE, 2016].

V prípade nesférických tvarov molekúl je stále možné pomerne presné určenie ich skutočných rozmerov. V publikácii [BUMILLER, 2006] merali okrem iného vzorku CdSe. Častice mali byť podľa výrobcu 4 nm široké a 25 nm dlhé, rozhodne sa teda nejednalo o sférické molekuly. Rozmery na základe merania dynamickým rozptylom svetla boli určené pomerne presne, a to na 5,2×25,5 nm. Rozmery boli vypočítané na základe hydrodynamického priemeru zisteného z merania DLS metódou využívajúc Perrinovu teóriu (viď podkapitola 2.4.).

3.4. Vplyv viskozity rozpúšťadla na meranie

Ako vidno už i zo Stokes-Einsteinovej rovnice (11), určenie hydrodynamického priemeru za pomoci DLS metódy závisí na viskozite rozpúšťadla a to nepriamoúmerne. Ak meriame jednu molekulu vo viacerých rozpúšťadlách, každé majúce inú viskozitu, je potrebné previesť opravu a až potom porovnávať výsledky z meraní. V práci [LORBER, 2012] je zhrnuté meranie 7 proteínov v pufoch rôznej viskozity, sledujúc vplyv viskozity na určenie hydrodynamických priemerov. V niektorých prípadoch viskozita nezohrala rolu a to v prípade, že bol pufer blízky vodnému roztoku. Naopak, pri iných vzorkách biomolekúl už viskozita zasahovala do určenia hydrodynamického priemeru a po prevedení korekcie bolo zistené, že skutočný hydrodynamický priemer je menší. Polydisperzita sa kvôli viskozite nezmenila.

Pri meraní veľkosti častíc vo vzorke ľudského hemoglobínu G [PANCHAL, 2014] bolo nutné taktiež upraviť dáta kvôli závislosti hydrodynamického priemeru na viskozite vzorky. Hydrodynamický priemer i polydisperzita sa po korekcii zmenšili.

3.5. Vplyv koncentrácie vzorky na meranie

Stáva sa, že vyššie koncentrácie nanočastíc vyústia do viacnásobného rozptylu, pričom už raz rozptýlené svetlo interaguje s ďalšími molekulami, pred tým než dorazí do detektora. Kvôli tomu zaznamenávame nižšiu intenzitu svetla a preto získaná veľkosť je umelo menšia.

Naopak, pri príliš rozriedených vzorkách nemusíme vygenerovať dostatočné množstvo svetla, aby bolo zaregistrované detektorom [BHATTACHARJEE, 2016].

Pri meraní veľkosti polystyrénových častíc veľkostí v rozmedzí 20–1 000 nm pri dynamickom rozptyle svetla prevádzanom pod uhlom rozptylu veľkom 90° bola v práci [PANCHAL, 2014] študovaná závislosť výsledkov merania na koncentrácii vzoriek. Pre častice veľké 20 nm bolo možné DLS metódou presne zmerať rozmery vzorky pri koncentrácii 10^{13} – 10^{15} častíc na mL, keďže namerané veľkosti hydrodynamického priemeru súhlasili s rozmermi udávanými výrobcom. Pri menších

koncentráciách však bol už zistený hydrodynamický priemer väčší ako ten udávaný dodávateľom. 1 000 nm častice pri koncentrácii 10^{10} častíc na mL vykazovali menšie hydrodynamické priemery ako mali. Pri nižšej koncentrácii, 10^8 častíc na mL, rozmer zistený DLS metódou súhlasil s hodnotou udávanou výrobcom. Pri ešte nižších koncentráciách už boli rozmery premrštené. Celkovo sa dospelo k záveru, že pri vzorkách s vysokou koncentráciou boli výsledné hydrodynamické priemery podhodnotené. Naopak, pri vzorkách s nízkou koncentráciou dostaneme nadhodnotené rozmery častíc. Keď to zhrnieme, s rastúcim rozmerom meranej častice sa znižovali koncentrácie pri ktorých bola správne merateľná jej veľkosť metódou dynamického rozptylu svetla. Bolo taktiež zaznamenané nadhodnotenie indexu polydisperzity pri nízkych koncentráciách a to najmä pri väčších časticiach.

V práci [LORBER, 2012] sa konštatuje, že koncentrácia môže mať priamy vplyv na určovanie hydrodynamického priemeru meranej biomolekuly. Pozorovali až 60% nárast hydrodynamického priemeru na základe zmeny koncentrácie biomolekuly tRNA syntetázy termofilnej baktérie *Thermus thermophilus*. Tento efekt, spôsobený príťažlivými alebo odpudivými silami medzi populáciami biomolekúl, je však možné odstrániť sériou meraní s rôznymi koncentraciami a extrapoláciou závislosti hydrodynamického priemeru na koncentrácii. Efekt bol v niektorých prípadoch možné výrazne zmeniť pridaním NaCl do rozpúšťadla.

3.6. Vplyv prítomnosti NaCl v rozpúšťadle

Ako sme videli v podkapitole 3.5, niekedy pridaním soli, najčastejšie NaCl, do rozpúšťadla meníme iónovú silu roztoku, čím môžeme výrazne ovplyvniť vlastnosti pozorovaných látok. Skupina [LUNDBERG, 2011] pri meraniach zistila, že keď sa zvýšila koncentrácia NaCl na 10 mM, neprišlo ku žiadnej zmene charakteru zhlučkov DNA a proteínov. Naopak, v prípade, že sa zvýši koncentrácia ešte viac, ku zmene dochádzalo. V 100 mM roztoku NaCl sa už menila štruktúra zhlučkov a z podlhovastých reťazcov sa stávajú menej dobre definovateľné tvary.

3.7. Vplyv teploty vzorky pri meraní

Publikácia [LORBER, 2012] opisuje vplyv teploty merania na zdanlivé a zároveň i reálne veľkosti proteínov. Čo sa týka metódy dynamického rozptylu svetla, treba rozlišovať dva vplyvy teploty na meranie.

Za prvé, voda je menej viskózna so zvyšujúcou sa teplotou, zmenu viskozity je treba vziať do úvahy pri výpočte rozmeru meranej biomolekuly. Keď boli prevedené pri dvoch vzorkách [LORBER, 2012] korektúry s ohľadom na meniacu sa viskozitu pri meniacej sa teplote, došlo sa k záveru, že iné vplyvy na meranie pri zmene teploty sú zanedbateľné, keďže po korekcii sa už hodnoty hydrodynamického priemeru pri rôznych teplotách zásadne nemenili.

Netreba však zabúdať i na teplotnú závislosť tvorenia agregátov proteínov. V práci [LORBER, 2012] je opísané meranie tRNA syntetázy z termofilnej baktérie *Thermus thermophilus*, pri ktorom bolo pozorované precipitovanie proteínu pri

ochladiť vzoriek s dostatočnou koncentráciou daného proteínu. Hydrodynamický priemer pri teplotách menších ako 5 °C sa zvyšoval, tak isto pri vyšších teplotách. Taktiež bolo vyzorované, že ak sa s meranými proteínmi neprekročia isté medze teploty (v jednom z prípadov napríklad približne 50 °C), a vzorku spätne ochladíme, nepozorujeme žiadne zmeny.

V publikácii [AHMED, 1975] nájdeme zhrnutie DLS merania dvoch hlavných glykoproteínov s vlastnosťou proti zamrznaniu, ktoré pochádzali z krvného séra Antarktiskej ryby *Trematomus borchgravinki*. Sú mimoriadne účinné vo vode a spôsobujú zníženie jej teploty mrazu. Táto vlastnosť bola viditeľná i pri dynamickom rozptyle svetla týchto proteínov. Pri meraní neboli DLS metódou v okolí 0 °C zaznamenané konformačné zmeny. Pri ešte nižších teplotách blížiacich sa k posunutej teplote mrazu roztoku bolo možné za pomoci dynamického rozptylu svetla vyzorovať zmenšenie hydrodynamického priemeru glykoproteínu.

3.8. DLS meranie proteínov s väzbou

V prípade proteínov, ktoré sa naviažu na iné častice, možno pozorovať zmenu v distribúcii veľkosti pred a po naviazaní. V práci [SHIBA, 2010] bol tento fenomén vyzorovaný pri proteíne kalmodulín, ktorý sa naviazal na ióny Ca^+ . Pri porovnávaní závislosti intenzity na priemere častíc bola pozorovaná zmena a to najmä čo sa týka polydisperzity, naviazaním proteínu klesla relatívna polydisperzita o 8 %, boli merané tak isto iné proteíny, ktoré sa viazali na iné ligandy. V článku sa konštatuje, že pri naviazaní určitého ligandu na proteín dochádza k poklesu polydisperzity zaznamenatej dynamickým rozptylom svetla.

3.9. DLS a meranie roztokov s rôznymi hodnotami pH a tlaku

DLS meranie možno uskutočniť pri rôznych hodnotách pH. V práci [PARK, 2012] porovnávali vplyv pH v rozmedzí 5–11 na stabilitu nanočastíc oxidu železa s upraveným povrchom. Experimenty porovnávali s teoretickými výpočtami a s meraniami nukleárnej magnetickej rezonancie.

V práci [CADOGAN, 2017] pri meraní rozmeru superkritickej CO_2 -narastenej micely neboli zistené pri meraní vzoriek žiadne náznaky toho, že by bolo meranie DLS metódou závislé na tlaku.

4. Materiály a metódy

4.1. Chemikálie

Na prípravu vzoriek sme používali deionizovanú vodu ($18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$), vyrobenú vo výrobníku ELGASTAT[®] II UHQ od firmy ELGA LabWater.

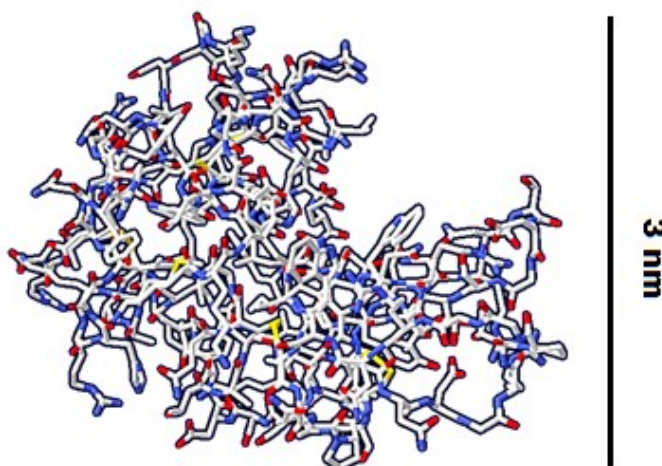
Používané kyvety (vid' paragraf 4.3) sme po meraní vždy dôkladne očistili za pomoci kyseliny chromsírovej typ A (PENTA), aby sme odstránili všetky možné nečistoty držiace sa na stenách kyviet. Kyvety vždy a pipetové špičky v niektorých prípadoch boli následne prefúkané stlačeným inertným plynom.

Stlačený plyn bol tetrafluorethan v spreji ItDuster od firmy Taerosol (primárne určený pre mikroelektroniku).

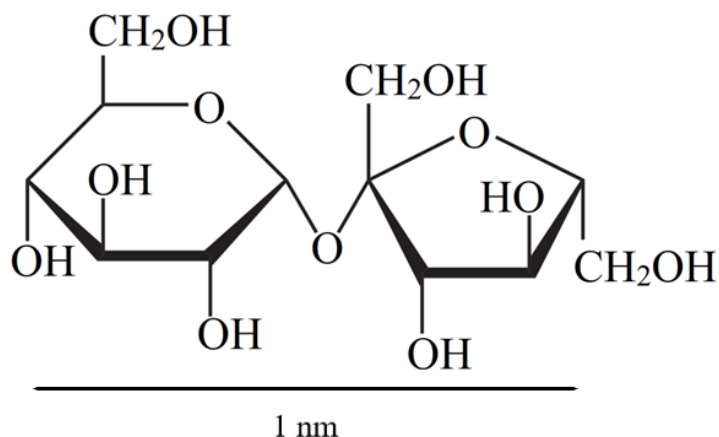
Ako proteínovú vzorku sme používali lyzozým pochádzajúci z vaječného bielka (HEWL) od firmy Fluka s relatívnou molekulovou hmotnosťou $M_{\text{lyz}} = 14\,600$ a pripravili sme si vzorku o koncentrácii $1,0 \text{ mg/mL}$ v deionizovanej vode s prídavkom 10 mM NaCl ($M_{\text{NaCl}} = 58,44$). 3D model HEWL možno vidieť na obrázku 5.

Ďalšou vzorkou bola sacharóza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ od firmy PENTA, s relatívnou molekulovou hmotnosťou $M_{\text{sach}} = 342,30$. 2D štruktúra sacharózy je zobrazená na obrázku 6.

Použité chemikálie boli čistoty p.a..



Obrázok 5: 3D model HEWL lyzozýmu, rozlíšenie $1,1 \text{ \AA}$, prebraté z [CIPRIANI, 2012], databáza PDB: 4B0D, spracované v programe Swiss-PdbViewer [GUEX, 1997]



Obrázok 6: Chemická štruktúra sacharózy

4.2. Laboratórny materiál

K pipetovaniu chemikálií a študovaných vzoriek nám poslúžila kompletná sada pipiet od firmy Gilson s originálnymi špičkami, prípadne sme mali k dispozícii sterilné špičky bez RNAz a DNAz s filtrom od firmy TopLine.

Na purifikáciu vzoriek od prachových častíc a ďalších nečistôt sme používali centrifugačné filtričky Ultrafree-MC o objeme 0,5 mL s hydrofilnými PVDF membránami s rozmermi pórov 0,22 μm a 0,1 μm od firmy Millipore a striekačkový filter Anotop s rozmermi pórov 0,02 μm od firmy Whatman. Ako už bolo zmienené, ide o filter striekačkového typu, ktorý patrí k filtrom s najmenšími pórmí aké sa v dnešnej dobe vyrábajú. Centrifugačné filtre boli pred použitím dva razy prepláchnuté 0,5 mL deionizovanej vody a stočené a to preto, aby došlo k omytiu prípadných konzervačných chemikálií na póroch filtrov. Na filtrovanie pufrov sme mali k dispozícii striekačkový filter Puradics s priemerom disku 25 mm, s pórmí veľkosti 0,2 μm s PES membránou od firmy Whatman.

Centrifugovanie vzoriek bolo uskutočňované na stolnej centrifuge GmCLab od firmy Gilson, ktorá umožňuje centrifugáciu pri 6 000 otáčkach za minútu. Sacharózu sme s deionizovanou vodou miešali za pomoci magnetického miešadla C-MAG HS 7 od firmy IKA.

Vzorky boli vážené na analytických váhach od firmy METTLER TOLEDO, typ A6245 alebo na laboratórnych váhach FZ-2000i-EC od A&D Instruments.

4.3. Kyvety

Na meranie vzoriek sme používali trojokienkové kyvety z kremenného skla od firmy Hellma Analytics s vnútornými rozmermi 3×3 mm (katalógové číslo 105.251-QS). Vonkajšie rozmery kyvety sú štandardne 10×10 mm a vnútorný vzorkový priestor je clonený čiernym kremenným sklom, z ktorého je kyveta vyrobená. Ide o najmenší rozmer kyvety odporúčaný výrobcom s ohľadom na 173° spätný rozptyl používaný v rámci našich meraní DLS. Meraný objem vzorky bol vždy 40 μL .

4.4. Prístrojové vybavenie DLS

Na meranie veľkosti biomolekúl sme používali komerčný prístroj *Zetasizer Nano S* od firmy Malvern s He-Ne laserom o vlnovej dĺžke 633 nm. Výrobcom je udávané, že prístroj meria veľkosť častíc v rozmedzí veľkostí 0,6 nm – 6 μm v kvapalnom médiu a ich potenciál zeta [Malvern, 2007].

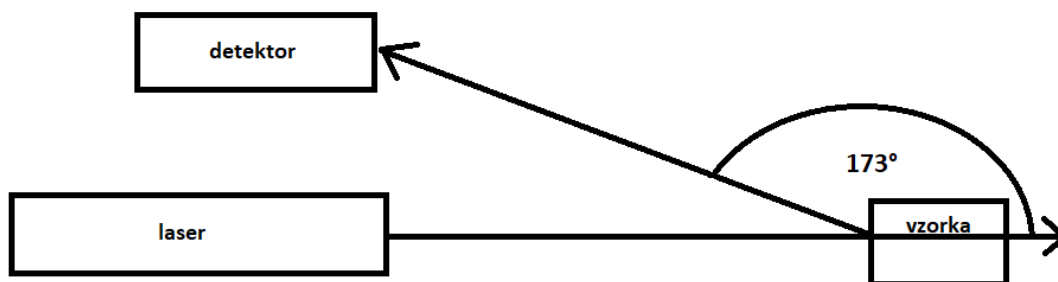
Merania sme prevádzali pod uhlom 173° (obrázok 6), čiže pod uhlom blízkym spätnému rozptylu. Táto konfigurácia sa nazýva detekcia spätného odrazu a využíva sa pri nej tzv. technológia NIBS, neinvazívnom spätnom rozptyle (NIBS ≡ non-invasive back-scattered).

Toto usporiadanie má hneď viacero výhod. Za prvé, dopadajúci lúč nemusí prechádzať celou vzorkou a teda optická dráha môže byť kratšia, vďaka čomu môžeme zmerať i viac koncentrované vzorky, ktoré by inak mohli prechádzajúci lúč výrazne zoslabiť či úplne absorbovať. Taktiež sa znižuje možnosť nežiaduceho mnohonásobného rozptylu pri priechode vzorkou. Prípadná prítomnosť prachových častíc nie je až tak výrazná, keďže prachové častice bývajú pomerne veľké (oproti časticiam bežne študovaných vzoriek) a preto rozptyľujú svetlo najmä dopredu a teda v takomto usporiadaní (obrázok 7) nie sú zaznamenané.

Prístroj je tiež vybavený pohyblivou šošovkou, vďaka ktorej je možné minimalizovať efekt mnohonásobného rozptylu meraním bližšie ku stene kyvety. Naopak, pri vzorkách s menšou koncentráciou chceme maximalizovať rozptyl svetla, t.j. oddialenie meracieho bodu ďalej od steny kyvety a bližšie ku stredu kyvety nám zabezpečí dostatočný signál. [Malvern, 2007] Prístroj prevádza nastavenie polohy šošovky automaticky s ohľadom na získaný signál rozptylu vzorkou.

Z hľadiska teplotnej stability prístroj umožňuje merať v rozsahu teplôt od 2 °C do 90 °C. Teplota vzorkového priestoru je nastavovaná Peltierovým článkom. Pretože pri meraní s nízkymi teplotami by dochádzalo k nežiadúcej kondenzácii vodných pár na stenách kyvety, je v tomto prípade nutné prístroj prefukovať sušeným vzduchom, na tento prípad je *Zetasizer* taktiež vybavený a to špeciálnym vstupom pre externé prefukovanie plynmi.

Pre obsluhu prístroja, zber dát a následné vyhodnocovanie meraní bol používaný originálny firemný software *Zetasizer*, verzia 6.20 od firmy Malvern.



Obrázok 7: Schéma geometrického usporiadania merania pri spätnom rozptyle v prístroji Zetasizer Nano S, upravené z [Malvern, 2007]

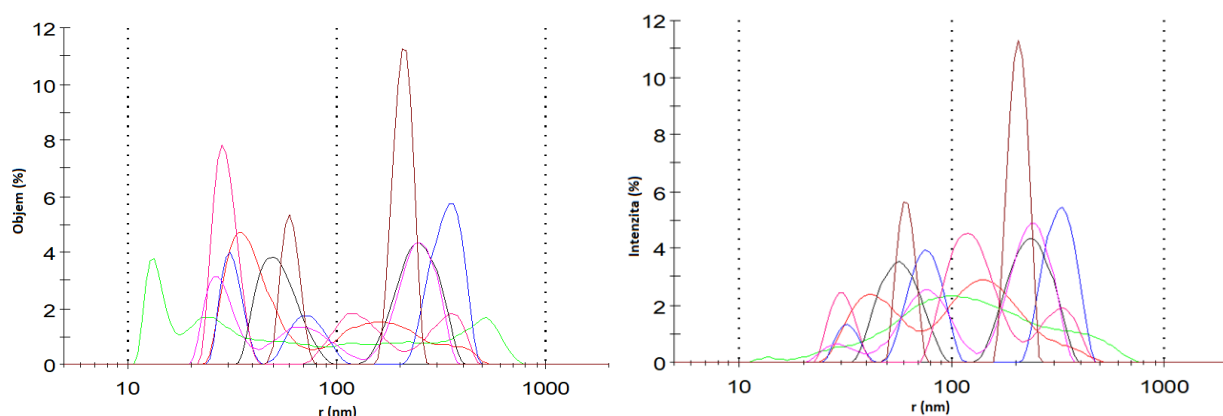
5. Výsledky merania DLS a ich diskusia

5.1. Vplyv prípravy vzorky na meranie

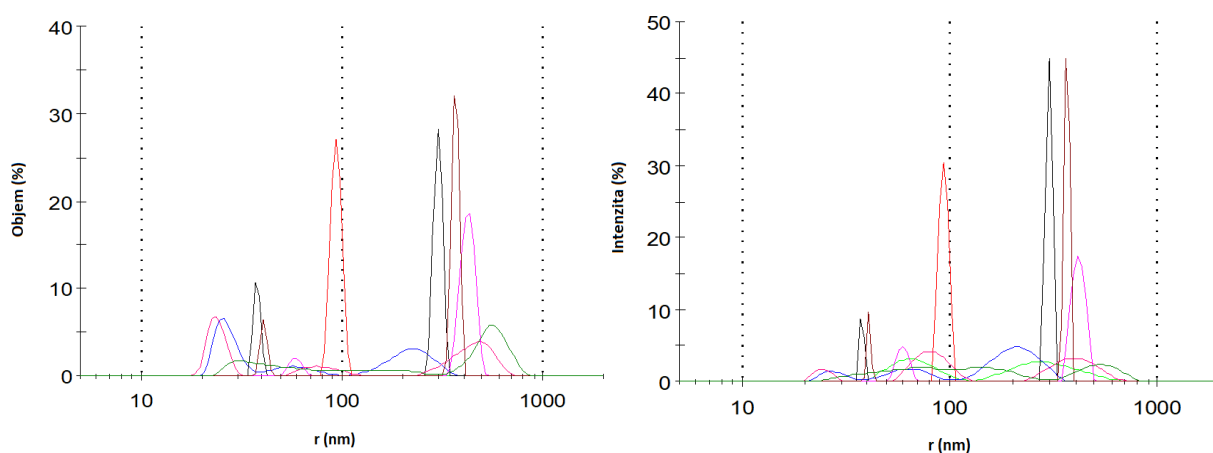
Pri meraní sme zisťovali, akým spôsobom vzorku pripravíme tak, aby sme čo najmenšími úpravami mohli zmerať rozmery malých biomolekúl za pomoci DLS.

5.1.1. Rozpúšťadlo

Počas prvých piatich minút sme v grafe rýchlosti čítania pozorovali teplotný gradient a preto sú všetky nasledujúce uvádzané výsledky a grafy z meraní po teplote trvajúcej 5 minút. Prvé meranie prebiehalo s kvetami s vodou z vodovodu, destilovanou vodou a deionizovanou vodou. Kvety sme pred meraním vyfúkali inertným plynom a s pipetami so špičkami bez filtru sme ich naplnili daným typom vody. Výsledok merania je vidieť v grafe 1 a 2.



Graf 1: Závislosť podľa objemu (vľavo) a intenzity (vpravo) na veľkosti prítomných komponent pre 7 meraní: voda z vodovodu, logaritmická škála



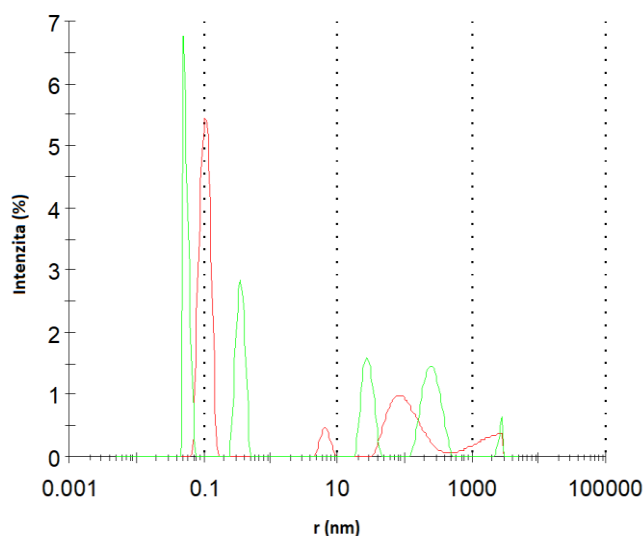
Graf 2: Závislosť podľa objemu (vľavo) a intenzity (vpravo) na veľkosti prítomných komponent pre 7 meraní: destilovaná voda, logaritmická škála

Voda z vodovodu vykazovala veľkú polydisperzitu, ako vidno i v grafe 1, kde je nanesená závislosť intenzity a objemu na veľkosti meraných častíc. Závislosť má väčšie množstvo vrcholov. O niečo lepšie dopadlo meranie s destilovanou vodou, vid' graf 2. Nakoniec sme sa rozhodli ďalej pracovať už iba s deionizovanou vodou, keďže tá vyšla, čo sa týka polydisperzity, najlepšie, keďže prímеси bolo tak málo, že meranie nebolo prakticky takmer ani možné a po prvých dvoch zaznamenaných meraniach bolo kvôli malej intenzite takmer nemerateľné.

Ako sme už zmienili, práve deionizovaná voda sa ukázala pri štúdiu korelačnej funkcie ako najvýhodnejšia na meranie, a preto sme s ňou uskutočňovali ďalšie merania.

V meraniach sme tiež zisťovali či je výhodnejšie merať DLS metódou pri pipetovaní vzorky cez špičku s filtrom alebo bez filtra a v prípade bez použitia filtra, či je lepšie prefúknanie pipety a stisnutie piestu pipety a až potom následne nasadenie špičky na pipetu a pipetovanie.

Čo sa týka pipetovania, najvýhodnejšie, čo sa týka prašnosti a prítomnosti iných veľkých molekúl vyšla metóda stlačenia piestu pred nasadením špičky bez filtra, ktorá bola prefúkaná. Pri pipetovaní prefúknutými špičkami sme pozorovali normálnu rýchlosť čítania, naopak pri špičkách s filtrom bola v rýchlosti čítania zaznamenaná prašnosť. V grafe 3 vidíme polydisperznú distribúciu veľkosti pre merania so vzorkou pipetovanou so špičkou s filtrom, čo svedčí o prítomnosti častíc pochádzajúcich pravdepodobne z filtra.



Graf 3: Závislosť podľa intenzity na veľkosti prítomných komponent: deionizovaná voda prepipetovaná so špičkou s filtrom pre 2 merania, logaritmická škála

Postup pri ktorom pipetujeme s prefúkanou špičkou sme používali vo všetkých nasledujúcich prípravách vzoriek. Prefúknanie špičky stlačeným plynom z oboch strán nás zbaví istého množstva prachu. Možno je prekvapivé, že nepoužitie filtra v špičke pipety je lepšie ako jeho použitie, no to môže byť spôsobené uvoľňovaním predovšetkým vlákien a drobných čiastočiek z filtra špičky pipety.

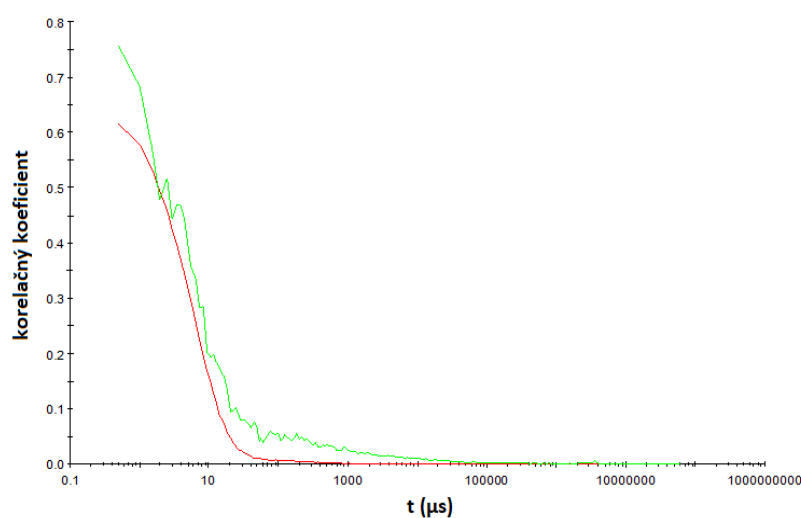
Po prvých meraniach s vodou, kedy sme vylepšovali metódu prípravy, sme sa dostali až na stav, pri ktorom pripravené rozpúšťadlo malo príliš slabý signál a meranie nebolo možné. Preto bolo nutné pridať do rozpúšťadla i nejakú dobre charakterizovanú biomolekulu so známou veľkosťou. Ako vzorovú biomolekulu sme si zvolili proteín lyzozým rozpustený len v deionizovanej vode. Tento proteín má známu kryštalovú štruktúru a teda ho možno porovnať s DLS stanoveným hydrodynamickým priemerom lyzozýmu.

Pri spracovaní merania lyzozýmu v programe *Zetasizer* sme zistili na základe polydisperzných distribúcií veľkosti a taktiež porovnaním molekulových váh experimentu s hodnotami, ktoré sme očakávali so zistením, že hodnoty vyjdú rozdielne a to i medzi meraniami samotnými, sme vyvodili záver, že príprava vzorky nebola optimálna. Na ilustráciu, softwarom *Zetasizer* odhadnutá molekulová váha na základe našich meraní s lyzozýmom rozpusteným v deionizovanej vode (po temperácii) pri centrifugácii a použití filtra na prefiltrovanie vzorky (distribúcia veľkosti už nebola polydisperzná), bola 4 razy menšia ako výrobcom udávaná relatívna molekulová hmotnosť lyzozýmu, a to $M_{lyz} = 14\ 600$.

Ďalšie meranie pre lyzozým sme preto prevádzali v 10 mM roztoku NaCl.

5.1.2. Centrifugácia vzorky

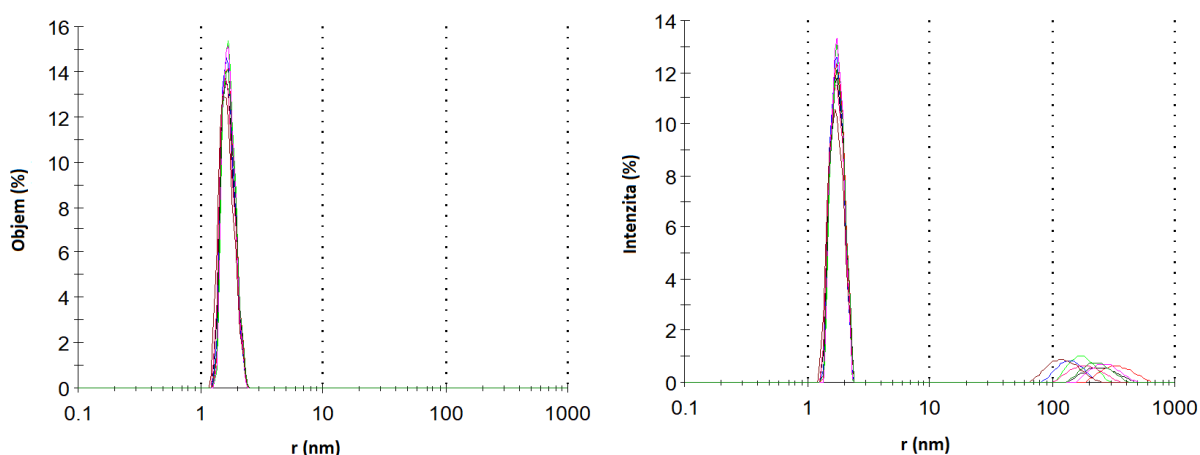
Zisťovali sme tiež či je vhodné použiť centrifugáciu vzorky lyzozýmu v 10mM roztoku NaCl. Centrifugáciu pri 6 000 otáčkach sme prevádzali po dobu 5 minút. Následne sme odpipetovali 40 μ L vzorky do kvety a vzorku zmerali. Ako vidieť v grafe 4, kde je znázornená závislosť korelačného koeficientu na čase pre spriemerované merania bez a s scentrifugovanou vzorkou, došlo ku zlepšeniu kvality merania. V prípade nescentrifugovaného lyzozýmu pozorujeme dáta so šumom, dochádza ku výkyvom vo výsledkoch.



Graf 4: Korelačný koeficient pre spriemerovaných 8 meraní vzorky scentrifugovaného (červená krivka) a nescentrifugovaného (zelená krivka) lyzozýmu, logaritmická škála.

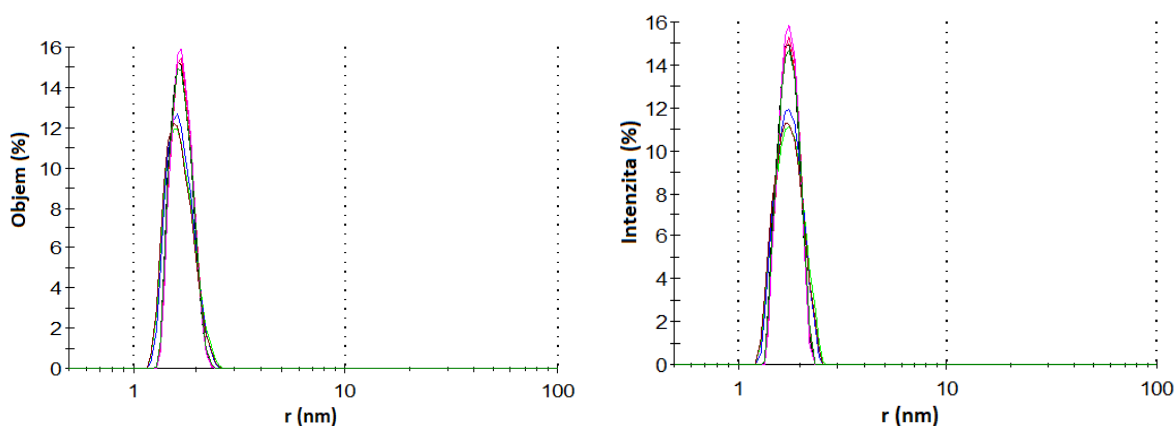
5.1.3. Filtre

V ďalších meraniach sme zisťovali či príde k zlepšeniu kvality merania v prípade, že použijeme filter na prefiltrovanie vzorky a v prípade, že áno, aká veľkosť pórov filtra a aký typ filtra pri prefiltrovaní lyzozýmu je optimálne použiť. Pri meraní sme najprv nepoužili žiaden filter (graf 5) a následne sme použili dva centrifugačné filtre s rozmermi pórov 0,22 μm a 0,1 μm a jeden striekačkový filter s rozmermi pórov 0,02 μm .



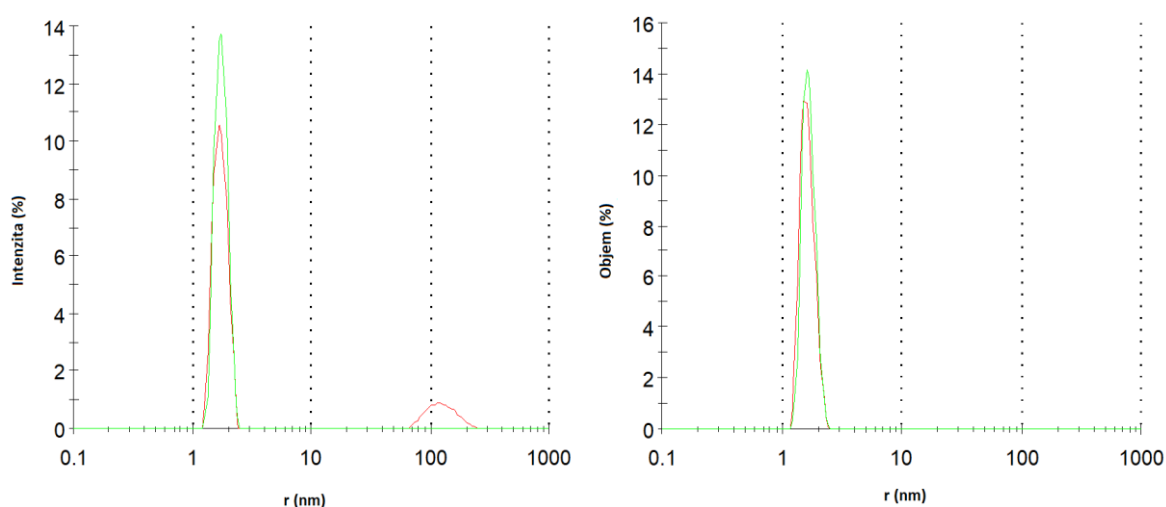
Graf 5: Závislosť podľa objemu (vľavo) a intenzity (vpravo) na veľkosti lyzozýmu zo slepačieho vajca bez filtrovania pre 8 meraní, logaritmická škála

V grafoch je znázornená závislosť intenzity na veľkosti molekuly a z toho dopočítané závislosti objemu na veľkosti proteínu pre sedem meraní po temperácii, pričom pri príprave vzorky bol použitý striekačkový filter s rozmermi pórov 0,02 μm (graf 6). Počas merania bez filtra sme pozorovali polydisperzné vrcholy v intenzitnej závislosti (graf 5), pri použití filtra už len monodisperzné (graf 6).



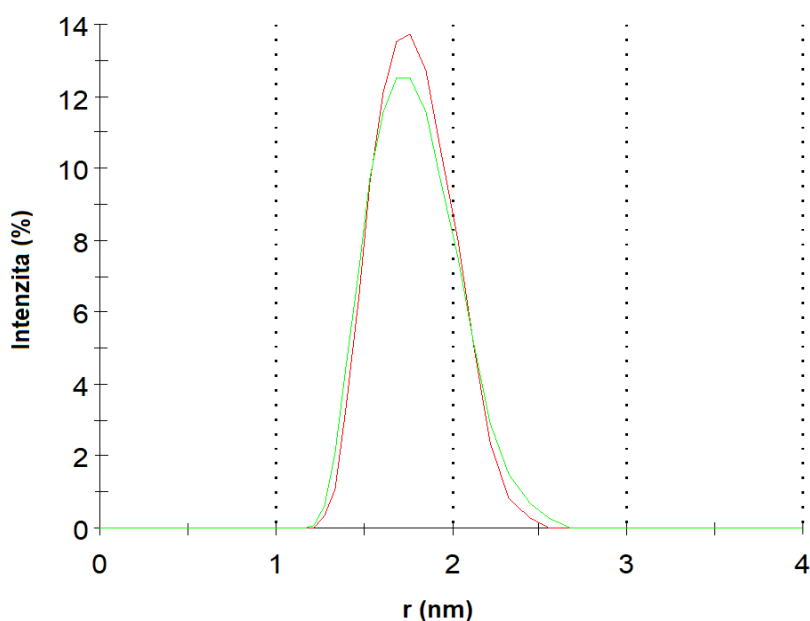
Graf 6: Závislosť podľa objemu (vľavo) a intenzity (vpravo) na veľkosti lyzozýmu zo slepačieho vajca pri filtrovaní vzorky filtrom s veľkosťou pórov 0,02 μm pre 7 meraní, logaritmická škála

V grafoch je tak isto porovnanie merania bez filtra a so striekačkovým filtrom s rozmermi pórov 0,02 μm (graf 7). V grafe 7 je pre meranie s filtrom nanesený graf, ktorý sme dostali spriemerovaním 7 meraní.



Graf 7: Závislosť podľa intenzity (vľavo) a objemu (vpravo) na veľkosti lyzozýmu s (zelená krivka) a bez (červená krivka) použitia filtra 0,02 μm , logaritmická škála

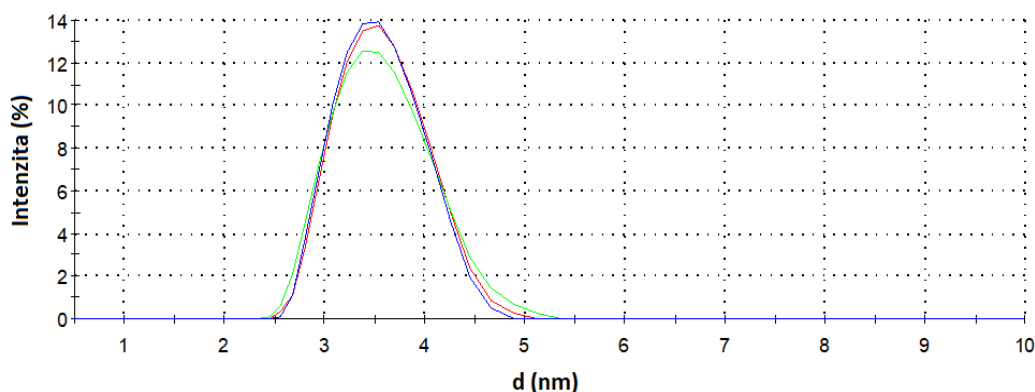
V grafe 8 vidíme distribúciu intenzity pre merania s centrifugačným filtrom s rozmermi pórov 0,22 μm , je nanesená iba jedna závislosť, ktorá vznikla spriemerovaním ôsmich meraní po teplote.



Graf 8: Závislosť podľa intenzity na veľkosti proteínu pre spriemerovaných 8 meraní: lyzozým s použitím centrifugačného filtra s rozmermi pórov 0,22 μm (zelená krivka) a 0,02 μm (červená krivka), logaritmická škála

Na základe nameraných dát v grafe 6 program *Zetasizer* odhadol molekulovú hmotnosť vzorky lyzozýmu pri meraní s vzorkou prefiltrovanou filtrom s rozmermi pórov 0,02 μm na $M_r = 12\,800 \pm 1\,400$. Z priemeru meraní zobrazených v grafe 8, pri filtrovaní cez póry 0,22 μm zas odhadol program *Zetasizer* molekulovú hmotnosť lyzozýmu na $M_r = 11\,700 \pm 2\,400$. Tieto údaje možno porovnávať s hodnotou uvádzanou výrobcom, keďže ide o monodisperzný vrchol. Pri zrovnaní môžeme konštatovať, že namerané hodnoty sú v rámci chyby vzájomne zhodné, no namerané hodnoty sú blízke nominálnej hodnote, ale v rámci chyby o niečo nižšie ako udávaná hodnota pre lyzozým (v rámci chyby nie sú zhodné), čo mohlo byť spôsobené algoritmom pre výpočet hmotnosti z hydrodynamického priemeru (ako vidíme na obrázku 5, lyzozým má ďaleko od dokonalej sféry).

Do grafu 9 sme naniesli spriemerované hodnoty pre merania s tromi rôznymi filtermi. Môžeme skonštatovať, že výsledky sa veľmi dobre zhodujú, keďže sa krivky takmer prekrývajú. Ako vidno z odhadnutých molekulových hmotností i z grafu 9, pri meraní rozmeru malej biomolekuly dynamickým rozptylom svetla je vhodné roztok prefiltrovať filtrom s pórmi veľkými 0,22 μm alebo menšími. Zároveň však už nedochádza ku veľkým rozdielom v prípade, že použijeme menšie a menšie póry vo filtre. Tak isto sa výsledky dramaticky nelíšia pri filtrovaním striekačkovým a centrifugačným filtrom.



Graf 9: Porovnanie zistenej distribúcie veľkosti lyzozýmu pre 3 rôzne filtre s rozmermi pórov 0,22 μm , 0,1 μm a 0,02 μm , spriemerované po 8 meraniach

Hodnoty hydrodynamického polomeru zistené pre spriemerované hodnoty všetkých meraní po temperácii pre jednotlivé filtre v programe *Zetasizer* (ich distribúcie veľkostí sú zobrazené v grafe 9) sú $R_h^{0,02} = (1,69 \pm 0,39)$ nm, $R_h^{0,1} = (1,72 \pm 0,25)$ nm, $R_h^{0,22} = (1,70 \pm 0,35)$ nm. Vidíme, že chyby hydrodynamických priemerov sú pomerne veľké (14–23 %), ale zároveň sa merania v rámci chyby zhodujú pre všetky tri filtre, takže dostávame z meraní pomerne dobrú predstavu o rozmeroch nami meraného lyzozýmu. Najnižšia chyba je pri výsledkoch z merania lyzozýmu prefiltrovanom filtrom s veľkosťou pórov 0,1 μm .

V práci [KUMAR, 2014] bol taktiež meraný hydrodynamický priemer lyzozýmu a dopracovali sa ku hodnotám v rozpätí 3,32–3,52 nm, s relatívnou chybou

merania 9 %. V našich meraniach lyzozýmu teda vychádzala hodnota hydrodynamického priemeru v rámci chyby rovnako.

5.1.4. Optimálna príprava roztoku lyzozýmu

Optimálnym postupom na meranie veľkosti proteínov, ktorý bol demonštrovaný pre lyzozým, za pomoci DLS metódy sa javí nasledujúci:

- 1) Kyselinou chromsírovou vyčistíme kyvety, následne ich prepláchneme deionizovanou vodou a vysušíme v piecke položené dnom nahor na filtračnom papieri, aby sme predišli znečistením prachovými časticami.
- 2) Pripravíme 10 mM roztok NaCl v deionizovanej vode a následne ho prefiltrujeme cez 0,22 μm filter.
- 3) V mikroskúmavke rozpustíme 1 mg lyzozýmu v 1 mL 10mM roztoku NaCl.
- 4) Centrifugačný filtrík s rozmerom pórov 0,1 μm 2 razy prepláchneme 0,5 mL deionizovanej vody.
- 5) Pipetou odstránim zvyšky vody.
- 6) Dva razy prefiltrujeme cez ten istý centrifugačný filter minimálne 50 μL pripravenej vzorky s lyzozýmom, vzorku pipetujem s pipetou so špičkou bez filtra, z oboch strán prefúkanou inertným plynom.
- 7) Vysušenú kyvetu v rukaviciach prefúkame stlačeným inertným plynom, tak isto viečko kyvety.
- 8) Prefúkame špičku pipety bez filtra z oboch strán stlačeným inertným plynom.
- 9) Stlačíme piest pipety a nasadíme z oboch strán inertným stlačeným plynom prefúknutú špičku.
- 10) Prepipetujeme 40 μL pripravenej vzorky do nízkoobjemovej kyvety, ktorá už vychladla.
- 11) Po temperácii trvajúcej 5 minút meriame DLS metódou.

K tomuto postupu sme prišli na základe viacerých meraní DLS metódou a ich následného spracovania v programe *Zetasizer*, ktoré sú opísané v predchádzajúcich podkapitolách.

Určenie filtru na prefiltrovanie vzorky je diskutabilné, keďže pri všetkých troch typoch filtru vyšli hodnoty hydrodynamického priemeru podobne. Zároveň merania pri použití všetkých troch filtroch vykazujú odhadovanú molekulovú hmotnosť blízku predpokladanej hmotnosti. Preto je možné, že namiesto použitia centrifugačného filtru v krokoch 4–6 môžeme využiť filter striekačkového typu. Minimálny rozmer pórov pri použití centrifugačného filtru je 0,22 μm .

V prehľadovom článku [STETFELD, 2016] nájdeme taktiež odporúčania týkajúce sa čistenia kyvety, autori avšak opomenuli spomenúť zásady pri pipetovaní. Na to však nemožno zabudnúť, keďže prefúknutie špičky pipety nás zbaví veľkej časti prachu (ako bolo ukázané vyššie), ktorá by inak mohla mariť meranie rozmerov proteínov dynamickým rozptylom svetla.

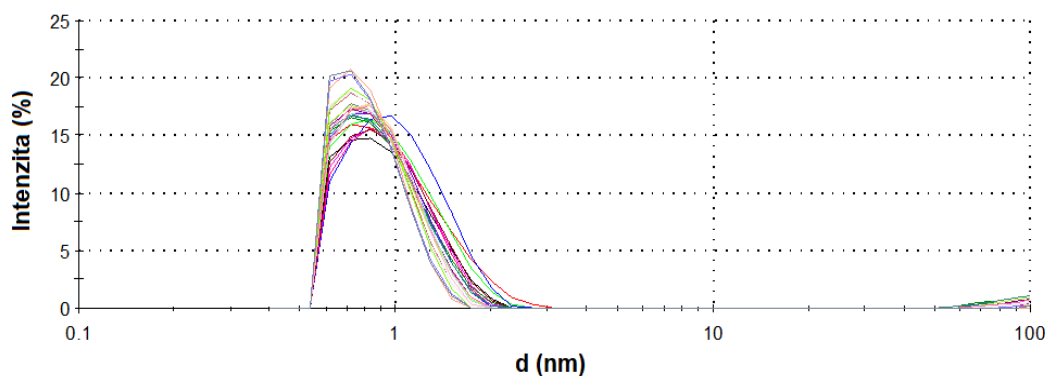
5.2. Sacharóza pri rôznych koncentráciách

Pri meraní sacharózy DLS metódou, sme sa snažili pri rôznych koncentráciách zistiť ako závisí meranie na zmene koncentrácie meranej vzorky a tiež aká je dolná limita určenia rozmerov molekúl dynamickým rozptylom svetla. Pripravili sme si 7 vzoriek od 5 % do 35 % (w/v) koncentrácie sacharózy v deionizovanej vode tak, aby vznikli vzorky po 10 mL. Pripravené vzorky v 7 kadičkách sme rozmiešali, aby sa sacharóza rozpustila v rozpúšťadle.

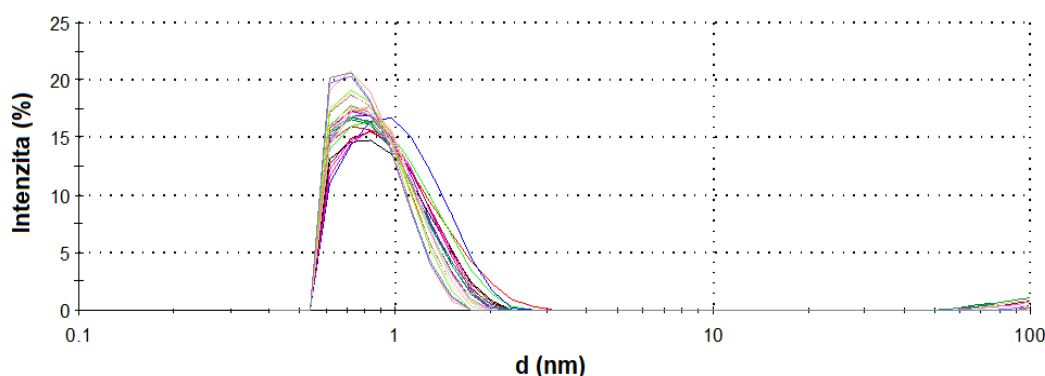
Následne sme vzorky prefiltrovali cez striekačkový filter s veľkosťou póru 0,02 μm do prefúknutých skúmaviek. Z tých sme prepipetovali s pipetami so stlačeným piestom pred nasadením z oboch strán stlačeným vzduchom prefúkanej špičky bez filtra 40 μL vzorky do kyviet.

Meranie sa uskutočnilo po teplote vzorky trvajúcej 5 minút pri teplote 25 °C. Pre každú hodnotu koncentrácie sme uskutočnili 4 merania.

Ako vidieť v grafoch 10–11, je nutné výsledné dáta upraviť na základe viskozity vzorky.



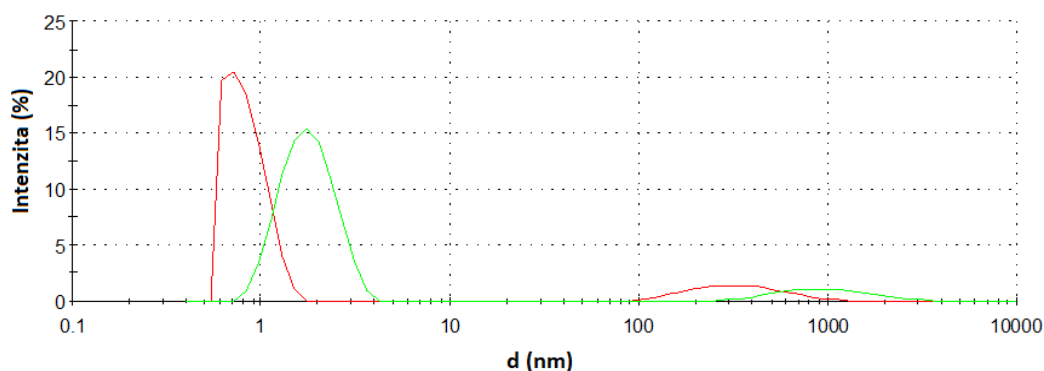
Graf 10: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách, bez opravy vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála



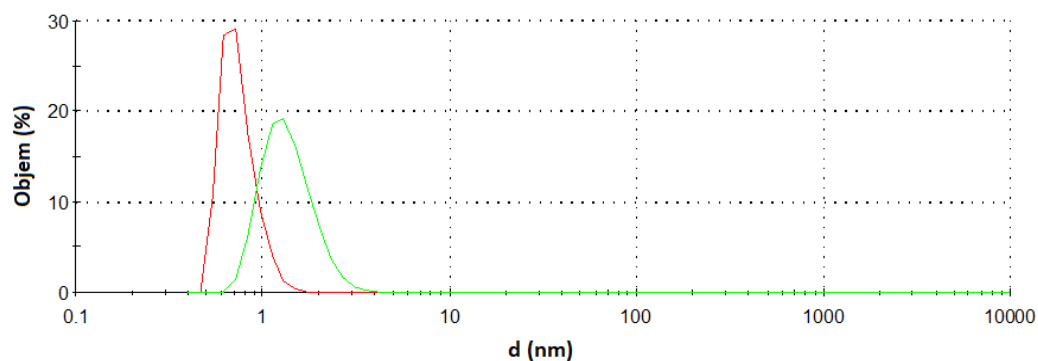
Graf 11: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách s opravou vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála

My sme tak učinili využívajúc dáta dostupné z [KASZUBA, 2008] v programe *Zetasizer* (viď graf 11). Po úprave sa už distribúcie intenzity dobre zhodovali pre rôzne hodnoty koncentrácie.

V grafoch 12–13 je vynesená závislosť intenzity a objemu na veľkosti sacharózy pri 35 % (w/v) pre upravené a neupravené hodnoty, ktoré sú spriemerované. V grafe 12 tiež vidíme okrem hlavného vrcholu i vedľajšie vrcholy, ktorí má ale oveľa väčšiu hodnotu hydrodynamického priemeru a intenzita je pre neho malá. Tento druhotný vrchol sme pozorovali pri každom meraní vzoriek sacharózy v intenzitných distribúciách veľkostí. Môžeme sa domnievať, že ide pravdepodobne o prachové či iné vzhľadom na sacharózu veľké častice, ktorých prítomnosť je síce oproti sacharóze výrazne menšia (vydedukovali sme z intenzity), avšak DLS metóda je citlivá na väčšie častice a preto boli zaznamenané dynamickým rozptylom svetla i tak.



Graf 12: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri koncentrácii 35 % (w/v), bez upravenej viskozity (zelená krivka) a s upravenou viskozitou (červená krivka), hodnoty sú spriemerované zo všetkých meraní pri danej koncentrácii, použitá logaritmická škála

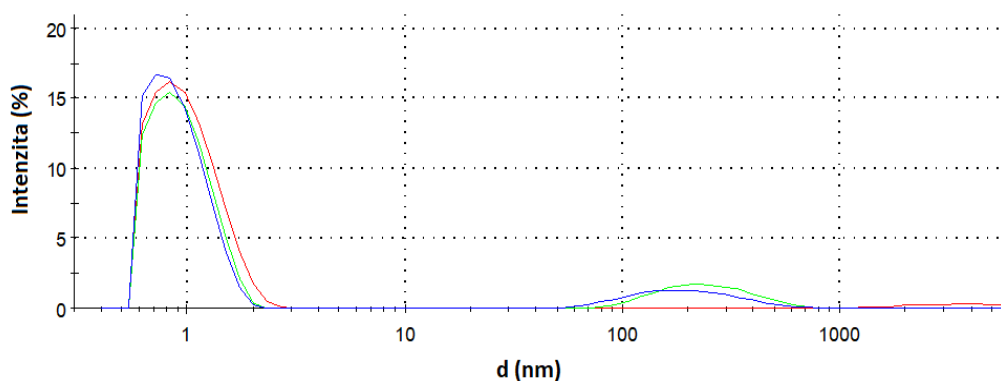


Graf 13: Závislosť podľa objemu na veľkosti sacharózy pri koncentrácii 35 % (w/v), bez upravenej viskozity (zelená krivka) a s upravenou viskozitou (červená krivka), hodnoty sú spriemerované zo všetkých meraní pri danej koncentrácii, použitá logaritmická škála

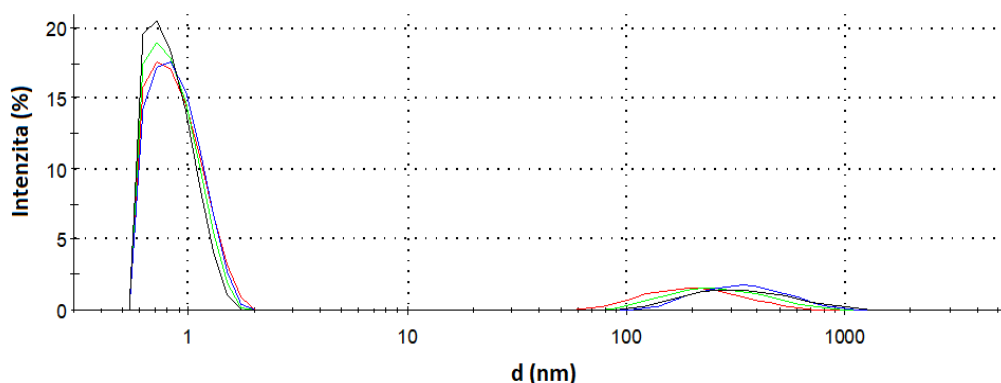
Z grafov 10, 11, 12 a 13 možno vypozať, že čím bola vyššia koncentrácia sacharózy v roztoku, tým bola neupravená závislosť vzhľadom na upravenú posunutá smerom k vyšším hydrodynamickým priemerom. Pri 35 % (w/v) koncentrácii je tento posun najbadateľnejší a preto sme vyobrazili posun vrcholu práve pri najväčšej koncentrácii sacharózy (graf 12 a 13).

Program *Zetasizer* upozorňoval na to, že vzorky nespĺňajú kritéria kvality, čo bolo spôsobené veľmi malými rozmermi sacharózy a dostali sme sa až na dolnú limitu veľkosti častíc merateľných dynamickým rozptylom svetla, na hydrodynamický priemer častice blízky 1 nm.

V grafoch 14 a 15 vidíme závislosť intenzity na veľkosti meranej častice. V prípade vzorky s koncentráciou 5 % (v/w) sme spriemerovali iba tri merania lebo jedno bolo mierne odlišné od zvyšných. Nepresnosť pri vzorke s najnižšou koncentráciou mohlo spôsobiť to, že sacharóza je veľmi malá častica a z podkapitoly 3.5. vieme, že čím je menšia častica, tým sa zvyšuje koncentrácia, pri ktorej je rozumne zmerateľná jej veľkosť dynamickým rozptylom svetla. Pravdepodobnejšie však išlo len o zlé určenie koncentrácie vzorky. Pri ďalších koncentráciách sme už spriemerovali všetky štyri merania.



Graf 14: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri koncentracii 5 % (w/v) (červená krivka), 10 % (w/v) (modrá krivka), 15 % (w/v) (zelená krivka), spriemerované upravené hodnoty, logaritmickej škála

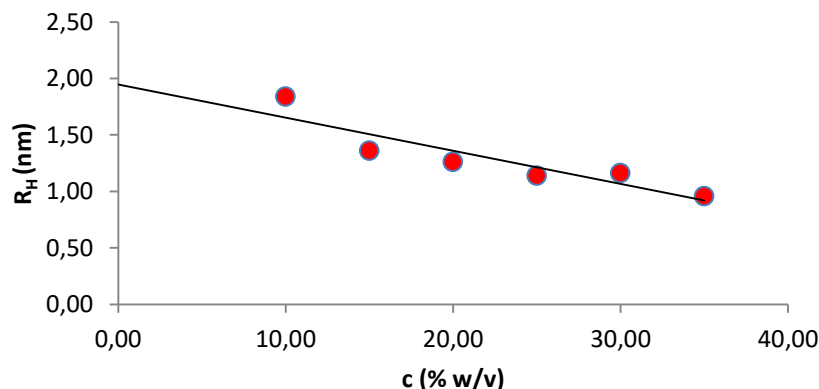


Graf 15: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri koncentracii 20 % (w/v) (červená krivka), 25 % (w/v) (zelená krivka), 30 % (w/v) (modrá krivka), 35 % (w/v) (čierna krivka), spriemerované upravené hodnoty, logaritmickej škála

Z týchto spriemerovaných dát (až na hodnotu koncentrácie 5% (w/v)) sme tak isto odhadli v programe *Zetasizer* hydrodynamický polomer a následne sme vyniesli do grafu 16, tzv. *Debayovho grafu*, závislosť hydrodynamického priemeru na

koncentrácií. Najnižšia koncentrácia je vynechaná z dôvodu veľkej odchýlky od ostatných meraní, meranie s tak malou koncentráciou bolo pravdepodobne príliš nepresné aj kvôli tomu, že sme pred tým filtrovali striekačkovým filtrom vzorky s koncentráciou 35% (w/v) a pravdepodobne zostalo v striekačke malé množstvo roztoku s vysokou koncentráciou, ktoré sme následne nabrali do kyvety.

Lineárnou regresiou v tabuľkovom editore *Excel* dostávame lineárny fit nanesený v grafe 16 a hodnotu hydrodynamického polomeru pri nulovej koncentrácii a to $R_{H,0} = 1,9$ nm.



Graf 16: Debyov graf, závislosť hydrodynamického polomeru sacharózy (zisteného z priemeru intenzitných distribúcií veľkostí) na jej koncentrácii pri meraní DLS metódou, s lineárnym fitom predĺženým do nulovej koncentrácie

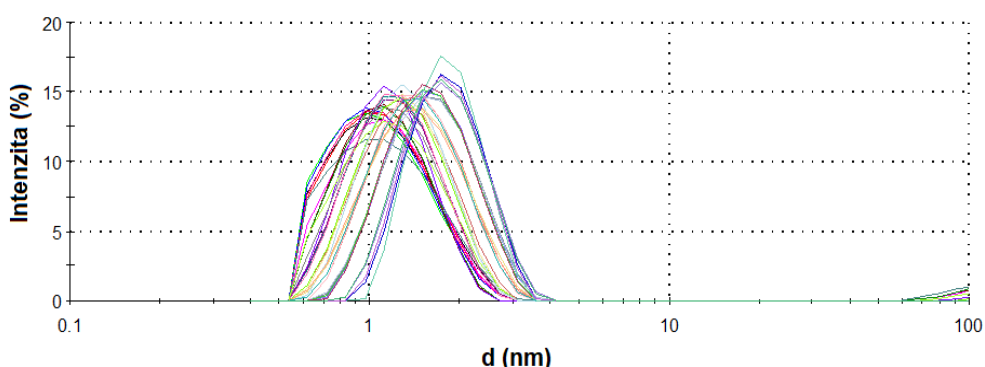
Pri porovnaní s výsledkami z článku [KASZUBA, 2008] zisťujeme, že nami zistený hydrodynamický priemer je väčší. V tomto texte boli pre 4 merania extrapolované závislosti do nuly a zistené hydrodynamické priemery v rozmedzí od 1,03 nm do 0,59 nm. My sme zistili hodnotu hydrodynamického priemeru spriemerovaním všetkých meraní, čiže tu sa naše spracovanie so spomínaným textom mierne líšia. Taktiež u nás mohlo dôjsť pri meraní s rôznymi koncentráciami ku zlému určeniu danej koncentrácie, čo možno vyvodit' i z drobných odchýlok nameraných dát od lineárneho preloženia závislosti v grafe 16.

Pre nepresnosť našej prípravy vzorky (chyba v koncentráciách) nebola dosiahnutá maximálna možná presnosť merania, no i tak sme boli schopný zmerať rádovo správne rozmery sacharózy a hlavne zaznamenať závislosť merania na koncentrácii vzorky. Z práce [KASZUBA, 2008] však vyplýva, že dynamický rozptyl svetla je schopný pomerne presne zmerať i tak malú časticu akou je sacharóza. Usúdili sme z toho, že pre budúce sacharózy meranie DLS metódou a podobne malých častíc je nutné vyvarovať sa nepresnému určeniu koncentrácií a následne sme zmerali sacharózu ešte raz, tento krát s väčšou presnosťou v určení koncentrácie vzorky.

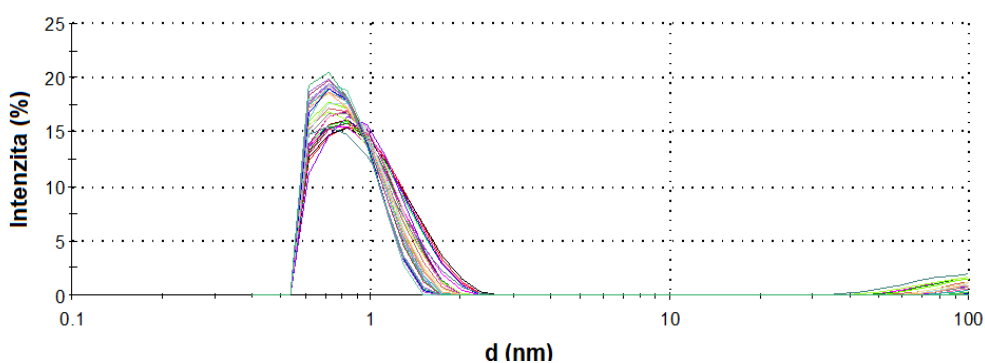
5.3. Druhé meranie sacharózy

Pri druhom meraní sacharózy išlo o obdobné meranie popísané v podkapitole 5.3., avšak pár krokov sme previedli presnejšie, aby sme sa dostali ku lepšej presnosti určenia koncentrácie sacharózy. Za prvé sme pri vážení sacharózy využili analytické váhy, ktoré sú presnejšie. Za druhé sme upravili spôsob filtrovania vzorky. Stále sme filtrovali filtrom s pórmí 0,02 μm , no tento raz sme pri každom prefiltrovaní prvých asi 1 mL roztoku dali do odpadovej kadičky z dôvodu prečistenia filtra. Po filtrovaní každého roztoku sme si vymenili striekačku. Roztoky sme filtrovali od najmenej koncentrovaného po najkoncentrovanejší, využijúc jeden filter na dva roztoky (až na filter pri 35 % (w/v), ten sme použili iba na túto vzorku). Pre všetky vzorky sme namerali 5 meraní po teplote.

Pozorovali sme podobné posuny, čo sa týka úpravy dát na základe reálnej viskozity roztoku, bližšie popísanú v podkapitole 5.2., viď graf 17 a graf 18 s neupravenými a upravenými hodnotami.

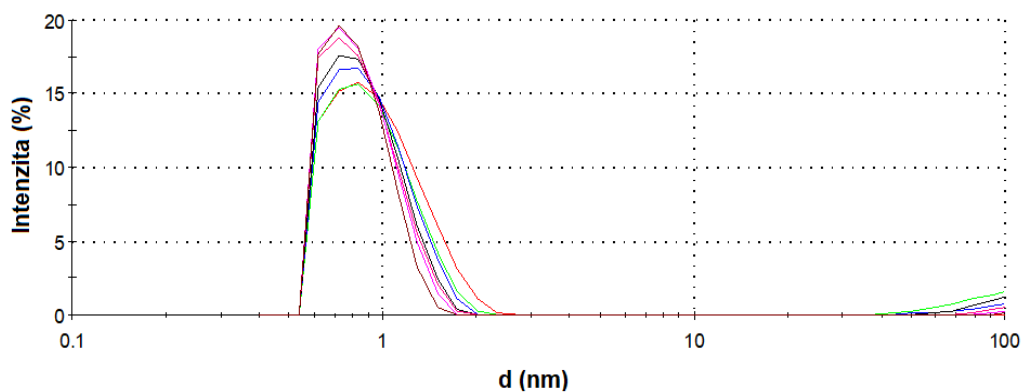


Graf 17: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách, bez opravy vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála

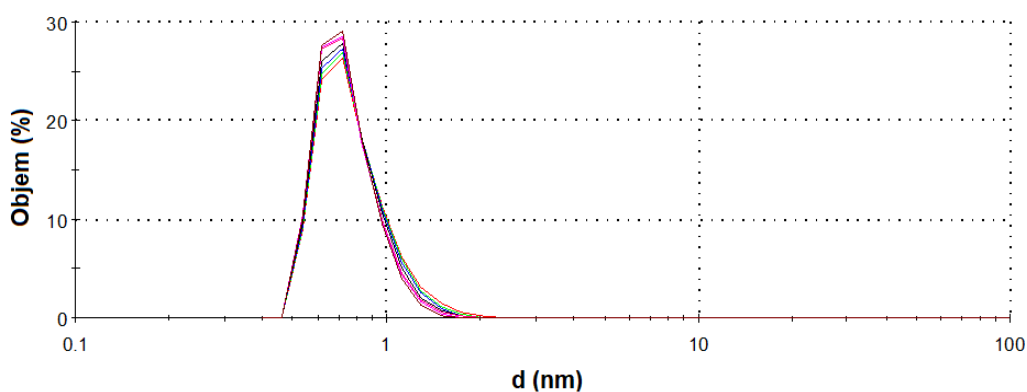


Graf 18: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách s opravou vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála

V grafe 19 a grafe 20 je nanesená distribúcia veľkosti pre vzorky všetkých koncentrácií, ktoré sme upravili podľa viskozity a spriemerovali.

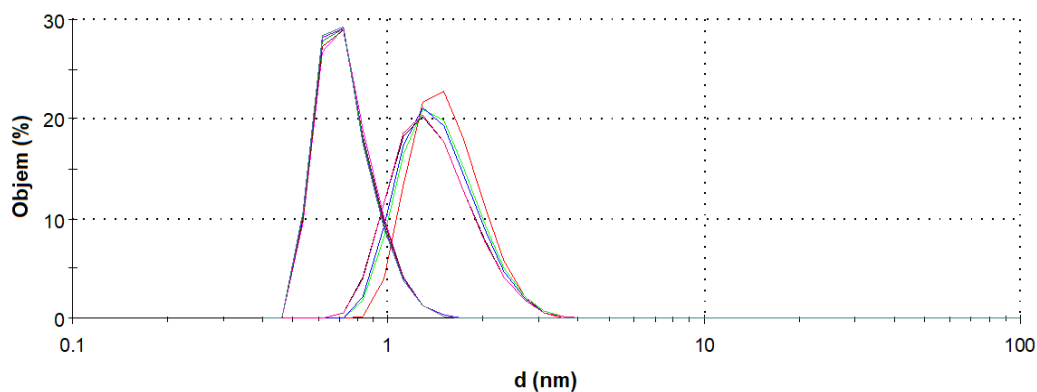


Graf 19: Závislosť podľa intenzity na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách (pri každej koncentrácii bolo spriemerovaných 5 meraní) s opravou vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála



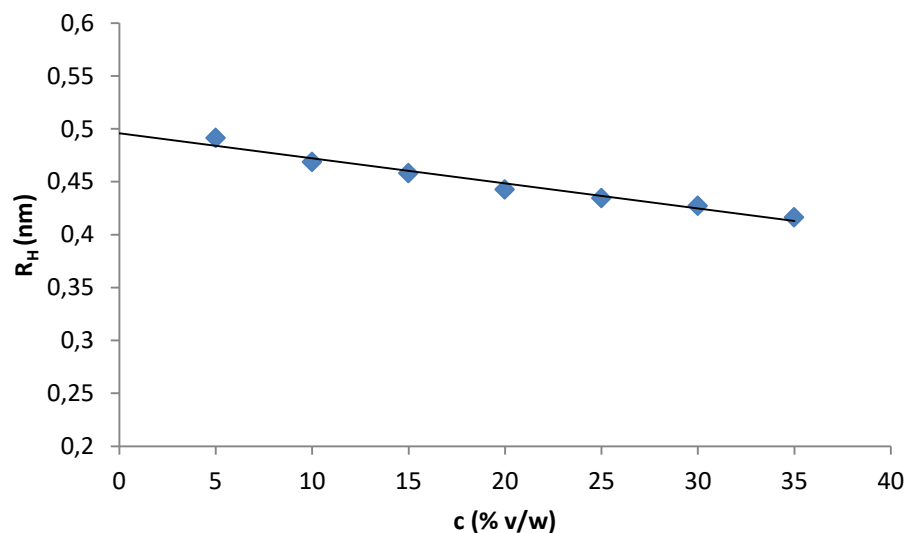
Graf 20: Závislosť podľa objemu na veľkosti sacharózy pri rôznych koncentráciách (pri každej koncentrácii bolo spriemerovaných 5 meraní) s opravou vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála

V grafe 21 je ešte viditeľnejší posun na základe úpravy viskozity. Vidíme, že pri úprave pre roztok s koncentráciou 35 % (w/v) sa odhadovaný hydrodynamický priemer zmenšil.



Graf 21: Závislosť podľa objemu na veľkosti sacharózy pri koncentrácii 35 % (w/v) 5 meraní s opravou a 5 meraní bez opravy vzhľadom na meniacu sa viskozitu, logaritmická škála

Na rozdiel od predchádzajúceho merania sacharózy sme však určili oveľa presnejšie koncentrácie vzoriek, čo nám i potvrdzuje získaný Debayov graf zo spriemerovaných 7 vzoriek po 5 meraniach (viď graf 22), kde sme lineárny fit opäť predĺžili do nulovej koncentrácie a obdržali sme hodnotu hydrodynamického polomeru, a to $R_{H,0} = 0,50$ nm, čo súhlasí s meraním v článku [KASZUBA, 2008], kde boli hydrodynamické priemery sacharózy určené v rozmedzí od 1,03 nm do 0,59 nm.



Graf 22: Debayov graf, závislosť hydrodynamického polomeru sacharózy (zisteného z priemeru intenzitných distribúcií veľkostí) na jej koncentrácii pri meraní DLS metódou, s lineárnym fitom predĺženým do nulovej koncentrácie

Taktiež vidíme, že na rozdiel od grafu 16, aj 5 % (w/v) bola nameraná správne a celkovo nameraná závislosť má oveľa bližšie k lineárnej ako v grafe 16. Dokázali sme teda, že DLS metóda je schopná, i keď už ide o limitu, zmerať častice, ktoré dosahujú rozmerov len 1 nm.

6. Záver

Meranie veľkostí častíc za pomoci DLS metódy je často vhodnou metódou v prípade, že sa prevádza za optimálnej prípravy vzorky a ak máme na pamäti jej limity. Meranie je rýchle a s malými nárokmi na prípravu vzorky oproti iným metódam. Určenie hydrodynamického priemeru biomolekúl pri dynamickom rozptyle svetla býva ovplyvnené koncentráciou vzorky, viskozitou, teplotou a ďalšími faktormi. V prípade nesférickej častice je často možné reálny tvar častice dopočítať na základe hydrodynamického priemeru. Z doteraz dostupných výsledkov a tiež našich meraní vyplýva, že DLS metódou možno zmerať rozmery biomolekúl veľkosti rádovo od 1 nm až do 1 000 nm.

Pri sérii rôznych meraní sme zisťovali ideálny postup pri príprave vzorky na meranie veľkosti biomolekuly za pomoci DLS metódy s využitím metódy detekcie spätného odrazu NIBS, ako vzorový proteín nám poslužil lysozým. Na základe týchto meraní popísaných v kapitole 5 považujeme za optimálne pripraviť vzorku nasledujúcim spôsobom:

Vyčistíme kyselinou chromsírovou alebo iným čistiacim roztokom kyvety a prepláchneme ich deionizovanou vodou. Vysušíme v piecke otočené dnom nahor na filtračnom papieri. Vzorku s biomolekulou v polárnom roztoku dva razy prefiltrujeme za pomoci centrifugačného filtra s veľkosťou pórov 0,22 μm a menej, ktorý sme pred tým prepláchli deionizovanou vodou. Tu treba však zakaždým zvážiť či je naozaj možné centrifugačný filter použiť, keďže sa môže stať, že sa bude daná biomolekula viazať na membránu filtra, čo je nežiaduce. Špičku pipety bez filtra prefúkame z oboch strán stlačeným inertným plynom, stlačíme piest pipety a nasadíme špičku na pipetu. Prepipetujeme vzorky do vysušenej, prefúkanej a vychladnutej kyvety. Kyvetu vložíme do prístroja. Na začiatku počkáme 5 minút na teplotu a potom začneme zaznamenávať meranie.

V rámci optimalizácie metodických postupov DLS sme sa rozhodli otestovať možnosti správnej detekcie čo najmenších častíc. Pri našom meraní sacharózy sme zašli až na samú dolnú limitu veľkostí častíc, ktoré možno zmerať dynamickým rozptylom svetla. Pri tomto meraní sme dokázali vypočítať lineárnu závislosť nameraného hydrodynamického priemeru na koncentrácii sacharózy v roztoku a taktiež súhlasne s literatúrou určiť veľkosť hydrodynamického priemeru sacharózy. Prakticky sme tak úspešne demonštrovali stanovenie rozmerov častíc veľkých 1 nm.

7. Literatúra

- AHMED A. I., FEENEY R. E., OSUGA D. T., YEH Y. (1975) Antifreeze glycoprotein from Antarctic fish. *Journal of Biological Chemistry* **250**(9): 3344–3347.
- BHATTACHARJEE S. (2016) DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release* **235**: 337–351.
- BERNE B. J., PECORA R. (1976) *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. General Publishing Company, Toronto. ISBN 99-058317.
- BUMILLER M., DELUCA T., MATTISON K., RAWLE A. (2006) Particle characterization of nanoscale materials using dynamic and static light scattering. *Technical Proceedings of the 2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show – Nanotech 2006*, zväzok 1. *Nanoparticle Processes & Applications*. 381–384. ISBN 0-9767985-6-5.
- CADOGAN S. P., HAHN C. J., RAUSCH M. H., FROBA A. P. (2017) Study on the applicability of dynamic light scattering (DLS) to microemulsions including supercritical dioxide-swollen micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* **499**: 202–208.
- CIPRIANI F., ROWER M., LANDRET C., ZANDER U., FELISAZ F., MARQUEZ J.A. (2012) CrystalDirect: a new method for automated crystal harvesting based on laser-induced photoablation of thin films. *Acta Crystallographica* **68**(10): 1393–1399.
- DE LIMA M. C. P., SIMOES S., PIRES P., FANECA H. a DUZGUNES N. (2001) Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**(2–3): 277–294.
- DEV S., SURIOLA A. (2006) Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: Size, shape and urea denaturation. *Journal of Biosciences* **31**: 551–556.
- ENGELSEN S. B., PEREZ S. (1997) Internal motions and hydration of sucrose in a diluted water solution. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **15**(2): 122–131.
- FILIPE V., HAWE A., JISKOOT W. (2010) Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research* **27**(5): 796–810.
- FRISKEN B. J. (2001) Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics* **40**(24): 4087–4091.

- GUEX N., PEITSCH M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714–2723.
- HALAKA F. G. (2003) Dielectrophoretic dynamic light-scattering (DDLDS) spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(18): 10164–10169.
- HAWE A., HULSE W. L., JISKOOT W., FORBES R. T. (2011) Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharmaceutical Research* **28**: 2302–2310.
- ISO (2017): *ISO22412-2017 Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS)*
- KASZUBA M., MCKNIGHT D., CONNAH M. T., MCNEIL-WATSON F. K., NOBBMANN U. (2008) Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* **10**: 823–829.
- KUMAR T., SHARMA G. S., SINGH L. R. (2014) Existence of molten globule state in homocysteine-induced protein covalent modifications. *Plos One* **9**(11): 1–9.
- LATTMAN E. E., LOLL P. J. (2008) *Protein crystallography: a concise guide*. The John Hopkins University Press, Baltimore. ISBN 978-0-8018-8808-3.
- LORBER B., FISCHER F., BAILLY M., ROY H., KERM D. (2012) Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **40**(6): 372–382.
- LUNDBERG D., CARNERUP A. M., SCHILLEN K., MIGUEL M. G., LINDMAN B. (2011) Size and morphology of assemblies formed by DNA and lysozyme in dilute aqueous mixtures. *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**: 3082–3091.
- Malvern (2007) *Zetasizer Nano – Příručka pro uživatele*. Malvern Instruments.
- Malvern (2009) *Protein interactions investigated with dynamic light scattering*. Webinar. [cit. 2018-07-16] Dostupný z WWW: <www.malvern.com>
- Malvern (2017) *An Introduction to Proteins in 30 minutes*. Technical note. [online] Malvern Instruments. [cit. 2018-07-10] Dostupný z WWW: <www.malvern.com>
- MEHN D., IAVICOLI P., CABALEIRO N., BORGOS S. E., CAPUTO F., GEISS O., CALZOLAI L., ROSSI F., GILLILAND D. (2017) Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **523**: 320–326.
- MINTON A. P. (2016) Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry*. **501**: 4–22.

- MUSCHOL M., HILL S. E., MULAJ M. (2014) *Bio-Nanoimaging*. Academic Press. ISBN 978-0-12-394431-3.
- OGENDAL L. (2016) *Light Scattering a brief introduction*. [online] University of Copenhagen. [cit. 2018-07-11] Dostupný z WWW: <http://www.nbi.dk/~ogendal/personal/lho/LS_brief_intro.pdf>
- O'NEAL D., HARRIP P., DRAGICEVIC G., RAE D. a BEST J. D. (1998) A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light scattering methods. *Journal of Lipid Research* **39**: 2086–2090.
- PABISCH S., FEICHTENSCHLAGER B., KICKELBICK G., PETERLIK H. (2012) Effect of interparticle interactions on size determination of zirconia and silica based systems – A comparison of SAX, DLS, BET, XRD and TEM. *Chemical Physics Letters* **521**: 91–97.
- PANCHAL J., KOTAREK J., MARSZAL E., TOPP E. M. (2014) Analyzing subvisible particles in protein drug products: a comparison of dynamic light scattering (DLS) and resonant mass measurement (RMM). *AAPS Journal* **16**(3): 440–451.
- PARK Y., WHITAKER R. D., NAP R. J., PAULSEN J. L., MATHIYAZHAGAN V., DOERRER L. H., SONG Y.-Q., HURLIMANN M. D., SZLEIFER I., WONG J. Y. (2012) Stability of supermagnetic iron oxide nanoparticles at different pH values: Experimental and theoretical analysis. *Langmuir* **28**: 6245–6255.
- PECORA R., ed. (1985) *Dynamic Light Scattering*. Plenum Press, New York. ISBN 978-1-4612-9459-7.
- POUHLÝ, J. (2001) *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vydanie 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0422-X.
- PROSSER V., a kolektiv (1989) *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha. ISBN 80-200-0059-3.
- SABU T., RAJU T., AJESH K. Z., RAGHVENDRA K. M. (2017) *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Elsevier, Amsterdam. ISBN 978-0-323-46139-9.
- SCOTT D. J., HARDING S. E., ROWE A. J., ed. (2005) *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*. The Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-547-3.
- SHIBA K., NIDOME T., KATOH E., XIANG H., HAN L., MORI T., KATAYAMA Y. (2010) Polydispersity as a parameter for indicating the thermal stability of proteins by dynamic light scattering. *The Japan Society for Analytical Chemistry* **26**: 659–663.

- STETEFELD J., MCKENNA S. A., PATEL T. R. (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* **8**: 409–427.
- ŠEVČÍKOVÁ P., KAŠPÁRKOVÁ V., KREJČÍ J., VLTAVSKÁ P. (2014) Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické Listy* **108**: 479–482.
- VOET D., VOET J. G. (1995) *Biochemie*. Victoria Publishing. ISBN 80-85605-44-9.
- WEINBUCH D., CHEUNG J. K., KETELAARS J., FILIPE V., HAWE A., ENGELSMAN J., JISKOOT W. (2015) Nanoparticulate impurities in pharmaceutical-grade sugars and their interference with light scattering-based analysis of protein formulations. *Pharmaceutical Research* **32**: 2419–2427.

8. Zoznam skratiek

- AFM \equiv atomic force microscopy, mikroskopia atómových síl
- DDLS \equiv dielectrophoretic dynamic light-scattering, dielektroforetický dynamický rozptyl svetla
- DLS \equiv dynamic light scattering, dynamický rozptyl svetla
- HEWL \equiv hen egg white lysozyme, lyzozým z bielka vajca sliepky
- NIBS \equiv non-invasive back-scattering, neinvazívny spätný rozptyl
- NNLS \equiv non-negative least squares, nezáporné najmenšie štvorce
- NTA \equiv nanoparticle tracking analysis, analýza trajektórií nanočastíc
- PCS \equiv photon correlation spectroscopy, fotónová korelačná spektroskopia
- Pdi \equiv polydisperzita
- PES \equiv polyethersulfone, polyetersulfón
- PVDF \equiv polyvinylidene fluoride, polyvinilidén-fluorid
- QELS \equiv quasi-elastic light scattering, kvazielelastický rozptyl svetla
- RCF \equiv raw correlation function, čistá korelačná funkcia
- RMM \equiv resonant mass measurement, rezonančné meranie hmotnosti
- SAXS \equiv small-angle X-ray scattering, Röntgenový rozptyl pod malými uhlami
- TEM \equiv transmisná elektronová mikroskopia
- TDA \equiv Taylor dispersion analysis, disperzná Taylorova analýza
- XRD \equiv X-ray diffraction, Röntgenová difrakcia