

Institutt for fysikk, Gruppe for biofysikk  
Fil: \00\mb1\_ls.tex 9.nov.00

Sted: Rom D4-150/D4-154 Realfagbygget.

## STATISK LYSSPREDNING

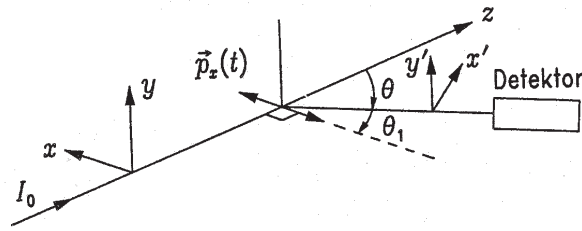
Oppgavens formål:

- Forstå begrepet spredevolum og dets avhengighet av spredevinkelen.
- Forstå viktigheten av å ha kontroll med mengden støv i prøven og bli kjent med prosedyrer for å oppnå dette.
- Måle vinkelavhengigheten til det spredte lyset fra et kjent prøvemolekyl.
- Tegne opp et Zimm-diagram og beregne derfra molekylvekt, treghetsradius og andre virialkoeffisient for prøvemolekylet.

En i hver gruppe tar med en egen diskett for lagring av data!

Laserlys er farlig å få i øynene!!

Det er meget at laserlyset er blokkert av hver gang man skifter løsning!



Figur 1: Stråling fra induisert dipol  $p_x(t)$  oscillerende i  $x$ -retning. Vinkelen  $\theta$  er spredningsvinkelen. Detektoren beveger seg i  $xz$ -planet.

## 1 Teori

Statisk lysspredning er en viktig metode for bestemmelse av molekylvekt og geometri til makromolekyler i løsning. Teorien for statisk lysspredning fra makromolekyløsninger er gjennomgått i relativt stor detalj i forelesningene i Molekylær biofysikk. Her repeteres de aspekt som er direkte relevant for forståelsen av det som skal demonstreres i denne labøvingen.

### 1.1 Dipolstråling

I klassisk elektromagnetisk teori beskrives en fluks av fotoner som en kontinuerlig harmonisk elektromagnetisk bølge med bølgetall

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{2\pi\nu}{c} \quad (1)$$

hvor  $\lambda$  er bølgelengden,  $c$  er fasehastigheten og  $\nu$  er frekvensen til lyset. For synlig lys ligger  $\lambda$  mellom 400 og 700 nm. Plasseres et atom i et slikt harmonisk elektromagnetisk felt, vil det påtrykte elektriske feltet  $E(t)$  perturbere elektronorbitalene og induere et harmonisk oscillerende dipolmoment  $p(t)$ , se Fig. 1. Dersom det elektromagnetiske feltet  $E$  er polarisert i  $x$ -retning er også det induserte dipolmomentet  $p$  i  $x$ -retning:

$$p_x(t) = \alpha E_x(t) \quad (2)$$

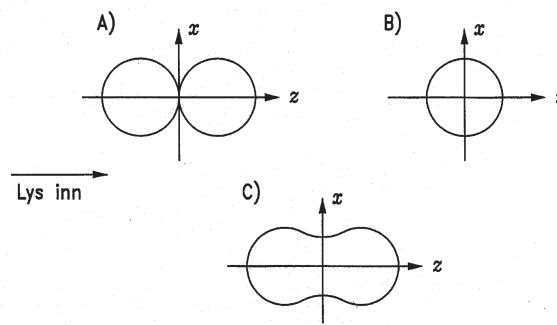
hvor  $\alpha$  er polariserbarheten til atomet. Den harmoniske tidsendringen til det induserte dipolmomentet innebærer at ladninger akselereres, noe som alltid fører til emisjon av elektromagnetisk stråling. For stråling fra en harmonisk oscillerende elektrisk dipol er det elektriske feltet til den resulterende *dipolstrålingen* polarisert i samme retning som dipolen svinger, i vårt tilfelle langs  $x$ . Med en detektor i spredretning  $\theta$  måles da komponenten av dipolstrålingen i  $x'$ -retningen (se Fig. 1), og denne er gitt ved uttrykket

$$E_{x'}(\theta) = \frac{p_x(t)\pi\nu^2}{\epsilon_r\epsilon_0 c_0^2 r} \cos\theta \quad (3)$$

hvor

- $\nu$  =  $\omega/2\pi$  = strålingens frekvens
- $\epsilon_r$  = relativ permittivitet i omgivende medium
- $\epsilon_0$  = permittiviteten i vakuum
- $c_0$  = lyshastigheten i vakuum
- $r$  = avstand dipolen – detektor
- $\theta$  = spredevinkelen (se Fig. 1)

Ved videre å anta  $\epsilon_r = 1$  (lysgangen mellom kuvetteholder og detektor er vesentlig luft) og benytte relasjonen  $\lambda_0 = c_0/\nu$ , får man følgende uttrykk for intensiteten,  $I_{x'}(\theta)$ , til det spredte



Figur 2: Polardiagram som kvalitativt viser intensiteten til lys spredt i  $xz$ -planet (Fig. 1) fra punktspredere når det innfallende lyset er polarisert henholdsvis i A)  $x$ -retning, B)  $y$ -retning og C) når det innfallende lyset er upolarisert.

lyset i retning  $\theta$

$$I_{x'}(\theta) \propto E_{x,0}^2 \frac{\alpha^2 \pi^2}{\epsilon_0^2 \lambda_0^4 r^2} \cos^2 \theta \quad (4)$$

Likningen over er gyldig for atomer (punktspredere), men viser seg å være riktig også for makromolekyler forutsatt at  $kl \ll 1$ , hvor  $l$  er makromolekylets lengde og hvor  $\alpha$  erstattes med  $\alpha_M$  som er makromolekylets polarisasjon. For makromolekyløsninger hvor  $N_0$  er antall spredende makromolekyl pr. volumenhet, vil intensiteten til det spredte lyset regnet *pr. volumenhet av makromolekyløsningen* være lik

$$I_{x'}(\theta) = N_0 I_0 \frac{\alpha_M^2 \pi^2}{\epsilon_0^2 \lambda_0^4 r^2} \cos^2 \theta \quad (5)$$

når det innfallende lyset med intensitet  $I_0$ , er polarisert i  $x$ -retningen (Fig. 1).

For innfallende lys polarisert i  $y$ -retningen blir det spredte lyset polarisert i  $y'$ -retning og har intensitet

$$I_{y'}(\theta) = N_0 I_0 \frac{\alpha_M^2 \pi^2}{\epsilon_0^2 \lambda_0^4 r^2} \quad (6)$$

Dersom innfallende lys er upolarisert er intensiteten den samme for alle polarisasjonsretninger. Dette gir

$$I_{\text{upol}}(\theta) = N_0 I_0 \frac{\alpha_M^2 \pi^2}{\epsilon_0^2 \lambda_0^4 r^2} \frac{1}{2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (7)$$

Disse likningene 5 – 7 er grafisk vist i Fig. 2.

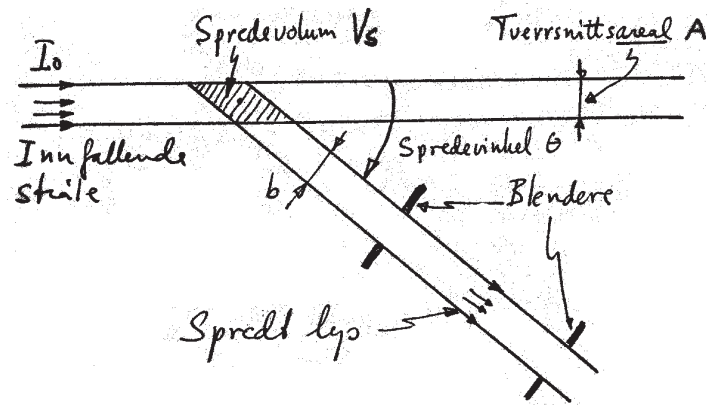
## 1.2 Punktspredere (Rayleigh-spredning)

Instrumentet vi skal bruke anvender vertikal( $y$ )-polarisert lys slik at det spredte lyset er polarisert i  $y'$ -retning. Likn. (6) skal derfor anvendes. I det følgende utelater vi indeksen  $y'$  da vi kun betrakter denne typen polarisert lys.

Uttrykk for den molekylære polariserbarheten har vi i kompendiet:

$$\alpha_M = 2n_L \frac{d\tilde{n}}{dc} c \frac{\epsilon_0}{N_0} \quad \text{med} \quad N_0 = c \cdot \frac{N_A}{M} \quad (8)$$

Bruk av denne i likn. (6) gir den relative intensiteten fra punktspredere



Figur 3: Skjematisk skisse av spreddevolumet. Den innfallende laserstrålenes tverrsnittsareal er lik  $A$ , bredden til spaltene som begrenser lyset inn på lysdetektoren er lik  $b$ .

$$\frac{I(\theta)}{I_0} \equiv I'(\theta) = \frac{4\pi^2 n_L^2 (d\tilde{n}/dc)^2 cM}{N_A \lambda_0^4 r^2} = c M \kappa \cdot \frac{1}{r^2} \quad (9)$$

der

$$\kappa \equiv \frac{4\pi^2 n_{\text{buf}}^2 (d\tilde{n}/dc)^2}{N_A \lambda_0^4} \quad (10)$$

der  $n_{\text{buf}} = n_L =$  brytningsindeksen i bufferen og  $\tilde{n} =$  brytningsindeksen i løsningen.

Disse likningene er parallellene til likningene (14.112)-(14.114) i kompendiet som gjelder for upolarisert lys. For  $y$ -polarisert lys erstattes altså  $\frac{1}{2}(1 + \cos^2 \theta)$  med 1 og dermed  $\kappa \rightarrow 2\kappa$ .

Rayleighfaktoren for  $y$ -polarisert lys fra punktspredere blir dermed (parallellen til likn. (14.127) i kompendiet):

$$R_\theta = \frac{r^2}{I_0} \cdot I(\theta) \quad (11)$$

### 1.3 Spreddevolum

Normalt vil spredt lys bare fra en liten del av den belyste makromolekyløsningen nå fram til lysdetektoren (Fig. 3). Prøvens spreddevolum er den delen av prøveløsningen som bidrar med spredt lys til lysdetektoren. Fra Fig. 3 følger at spreddevolumet  $V_s$  er lik

$$V_s = \frac{Ab}{\sin \theta} \quad (12)$$

Spreddevolumet er størst for  $\theta = 0$  og minst for  $\theta = \pi/2$ . Denne vinkelavhengigheten til spreddevolumet gir følgende sammenheng mellom den observerte lysintensiteten  $I_{\text{exp}}$  og spredeintensiteten pr. volumenhet  $I$  gitt i likn. 5 – 7.

$$I \propto I_{\text{exp}} \sin \theta \quad (13)$$

## 1.4 Spredelikning

Lysspredningslikningen for makromolekyler er basert på formfaktor og strukturfaktor (likn. (14.138) i kompendiet):

$$\frac{\kappa c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left[ 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda_{\text{buf}}^2} R_G^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \right] \cdot [1 + 2B_2c] = \frac{1}{M} \left[ 1 + \frac{q^2}{3} R_G^2 \right] \cdot [1 + 2B_2c] \quad (14)$$

der spredevektoren  $q$  er definert

$$q = |\Delta \vec{k}| = k \cdot |\Delta \vec{s}| = \frac{2\pi}{\lambda_{\text{buf}}} \cdot 2 \sin(\theta/2) = \frac{4\pi \cdot n_{\text{buf}} \sin(\theta/2)}{\lambda_0} \quad (15)$$

I de siste likningene er

$\lambda_{\text{buf}}$  = laserlysets bølgelengde i bufferen (antatt lik lysfarten i prøveløsningen),

$\lambda_0$  = laserbølgelengden i vakuum (luft), og

$n_{\text{buf}} = c_0/c_{\text{buf}} = \lambda_0/\lambda_{\text{buf}} =$  brytningsindeksen i bufferen.

I spredelikningen (14) er intensiteten  $I(\theta)$  som inngår i Rayleighfaktoren  $R_\theta$  (likn. (11)) lik netospredningen fra molekylene korrigert for spredevolumet (dette er ikke presisert i kompendiet). Det betyr at for spredning fra makromolekyler må Rayleighfaktoren i (11) modifiseres:

$$R_\theta = \frac{r^2}{I_0} \cdot (I_{\text{sol}}(\theta) \cdot \sin(\theta) - I_{\text{buf}}(\theta) \cdot \sin(\theta)) \quad (16)$$

der  $I_{\text{sol}}$  og  $I_{\text{buf}}$  er målt intensitet for henholdsvis prøve (solution) og buffer.

Det konstante forholdet  $\frac{r^2}{I_0}$  kan man finne fra måling av lysspredningen på en standard:

$$R_{\theta,\text{std}} = \frac{r^2}{I_0} \cdot I_{\text{std}} \sin(\theta) \quad \Rightarrow \quad \frac{r^2}{I_0} = \frac{R_{\theta,\text{std}}}{I_{\text{std}} \sin(\theta)} \quad (17)$$

der  $I_{\text{std}}$  er målt intensitet for gitt vinkel for standarden. Dermed kan  $R_\theta$  i likn. (16) uttrykkes

$$R_\theta = \frac{R_{\theta,\text{std}}}{I_{\text{std}} \sin(\theta)} \cdot (I_{\text{sol}} \sin(\theta) - I_{\text{buf}} \sin(\theta)) \quad (18)$$

$$= R_{\theta,\text{std}} \cdot \frac{I_{\text{sol}} \sin(\theta)/I_{\text{mon}} - I_{\text{buf}} \sin(\theta)/I_{\text{mon}}}{I_{\text{std}} \sin(\theta)/I_{\text{mon}}} \quad (19)$$

Man har her fått inn intensiteten  $I_{\text{mon}}$  som er en målbar intensitet som er en viss andel av innfallende lys. Denne måles ved å sende 4% av lysstrålen via en beam-splitter inn på en lysdetektor.

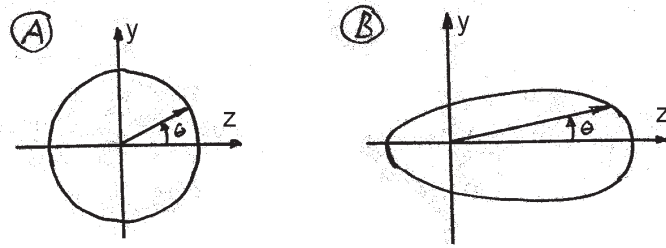
Måledataene fra instrumentet inkluderer også en korreksjon av spredevolumet pga. sylindrisk kuvette (brytning pga. ulik brytningsindeks i omgivende væske (standard) og prøvewæske. Denne tas inn i uttrykket for  $\kappa$  slik at vi får en korreksjon i forhold til likn. (10):

$$\kappa \equiv \frac{4\pi^2 n_{\text{buf}}^2 (d\tilde{n}/dc)^2}{N_A \lambda_0^4} \left( \frac{n_{\text{std}}}{n_{\text{buf}}} \right)^2 \quad (20)$$

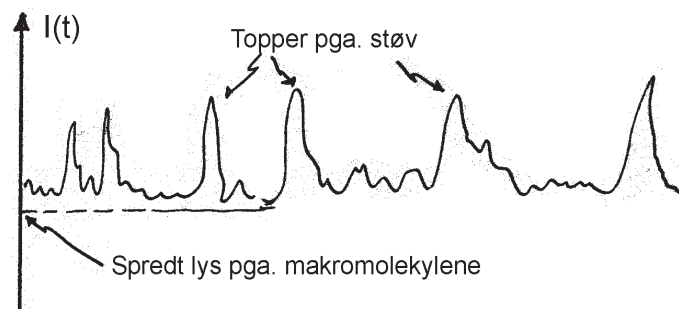
## 1.5 Spredning fra makromolekyler og støv

I forelesningene i Molekylær biofysikk er det vist at vinkelavhengigheten til lys spredt fra makromolekyløsninger og partikkelsuspensjoner avhenger av størrelsen til makromolekylene/partiklene. Dette er illustrert i Fig. 4.

Etter hvert som makromolekylene/partiklene blir større og større blir spredningen mer og mer asymmetrisk. Denne asymmetrien inneholder *kvantitativ* informasjon om makromolekylene/par-



Figur 4: Polardiagram som skjematisk viser vinkelavhengigheten til det spredte lyset pr. volumenhet for henholds punktspreedere (A) og makromolekyler/partikler (B) hvor man ikke lengre har oppfylt kravet  $kl \ll 1$ , hvor  $k$  er bølgetallsvektoren og  $l$  er makromolekyl/partikkelstørrelsen.



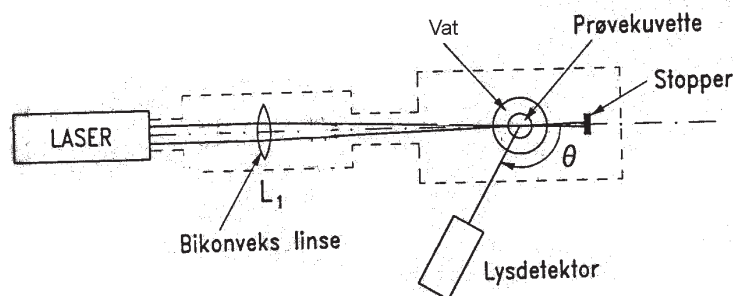
Figur 5: Skjematisk skisse av intensiteten til det spredte lyset  $I(t)$  som funksjon av tiden. Tidsvariasjoner med karakteristiske tider ned mot brøkdeler av et sekund skyldes støv. Desto færre støvpartikler spredevolumet i middel inneholder, desto mer markert er disse fluktuasjonene. For bestemmelse av verdien av lysspredningen som kommer fra makromolekylene, er det riktig å lese av minimumsverdiene av  $I(t)$ .

tiklenes størrelse, men det skal vi ikke komme inn på her.

I praksis viser et seg at man aldri helt klarer å fjerne alt støv selv fra destillert vann, og slett ikke fra makromolekyløsninger. Den egentlige grunnen til dette er uklar, men det fører i alle fall til at man alltid har en viss usymmetrisk bakgrunnsspredning ved all måling av statisk lysspredning. Desto mindre spredevolumet er, desto færre støvpartikler vil til en hver tid befinne seg inne i spredevolumet. Med et mindre spredevolum vil derfor intensiteten fluktuere kraftigere for hver støvpartikkel som kommer inn i spredevolumet, og støvpartiklene er derfor lettere å identifisere (Fig. 5). Når man har minimum i intensiteten til det spredte lyset, er spredevolumet på sitt mest støvfrie. Det er derfor denne minimumsverdien man søker (Fig. 5).

## 2 Apparat

Vi bruker et høypresisjons lysspredningsinstrument fra ALV innkjøpt og installert oktober 2000. En skjematisk skisse av apparaturen sett ovenfra er vist i Fig. 6. Lyskilden er en luftkjølt He-Ne-laser med bølgelengde lik 633 nm, vertikal polarisasjon og utgangseffekt 22 mW. Intensiteten inn på prøven kan varieres med et blendersystem. Linsa  $L_1$  er svakt bikonvex. Den er satt inn for å redusere diameteren til strålen i det den passerer spredevolumet. Dette gjør at det, som forklart over, blir lettere å skille mellom lys spredt fra henholdsvis makromolekylene og støvpartiklene.



Figur 6: Skjematisk skisse av lysspredningsapparatet sett ovenfra.

Kuvetta som inneholder prøven er sylindrisk og rommer ca 5 ml. Rundt kuvetta er det plassert et konsentrisk temperaturkontrollert fat ("Vat") som inneholder toluen. Det foretas også lysmålinger på en standard med toluen i kuvetta (se ovenfor). Toluen er en væske med småmolekyl som spredde like mye for alle vinkler, dessuten har væsken en brytningsindeks svært nær glass. Det er viktig å merke seg at ved alle overganger mellom glass og luft får man ca. 4 % lysrefleksjon.

Prøvekuvetta plasseres med høy presisjon i sentrum av fatet i en fast posisjon. Prøvekuvetta må alltid holdes tett i toppen for å hindre at støv fra omgivelsene trenger ned i makromolekyløsningen. Det spredte laserlyset blir detektert av en lysdiode ("avalanche photo diode") i ulike vinkelposisjoner ved en steppingsmotor som er styrt av datasystemet.

For visuelt å sjekke støvmengden i prøven bruker vi et stereomikroskopet og betrakter spredningen 90 grader på laserstrålen. Til denne inspeksjon brukes en annen laser (i naborommet) enn den for selve lysspredningsapparatet.

Innstilling av vinkler og registrering av alle måleverdier gjøres via et dataprogram i en tilkople PC. Dataprogrammet presenterer måleresultater i en tabell med følgende verdier:

	Angle	$q^2$	CR	dCR	I <sub>mon</sub>	dI <sub>mon</sub>	$T$	d $T$	$Kc/R$	d $Kc/R$	Rad	dRad

der

første kolonne (uten heading) angir konsentrasjonen i g/ml (OBS! ikke mg/ml),

Angle = målevinkel  $\theta$  i grader,

$q$  = spredevektor =  $|\Delta \vec{k}|$

CR = tellerate for detektoren i kHz (brukes som målt intensitet  $I$ ),

dCR = standardavvik for CR i %,

I<sub>mon</sub> = monitorintensitet, ca. 4% av innfallende intensitet  $I_0$ ,

dI<sub>mon</sub> = standardavvik for I<sub>mon</sub> i %,

$T$  = temperaturen i Kelvin,

d $T$  = standardavvik for  $T$  i %,

$Kc/R = \kappa c/R_\theta =$  normalisert, inverst spredningsforhold som inngår i likn. (14),

d $Kc/R$  = standardavvik for  $Kc/R$  i %,

Rad og dRad gjelder dynamisk lysspredning (brukes ikke her).

Ved sammenlikning med likningene i kompendiet i Molekylær biofysikk vær oppmerksom på at Zimm-plottet der er plottet med  $\sin^2(\theta/2) + A \cdot c$  som  $x$ -akse. Fordi instrumentets dataprogram oppgir  $q^2$  og ikke  $\sin^2(\theta/2)$  er det imidlertid naturlig å bruke  $q^2 + A \cdot c$  som  $x$ -akse. Dette er grunnen til at likn. (14) også er angitt med  $q$  som parameter, og man slipper skaleringer for å beregne  $R_G$  og  $M_w$ .

### 3 Løsninger

0. Jonsvann (dvs. vann rett fra springen)
1. 20 mM fosfatbuffer pH 7,6
2. Dextran  $c = 0,00010$  g/ml (0,10 mg/ml)
3. Dextran  $c = 0,00025$  g/ml (0,25 mg/ml)
4. Dextran  $c = 0,00050$  g/ml (0,50 mg/ml)

Løsningsmiddel for 2-4 er 20 mM fosfatbuffer (løsning 1). Alle prøvene 1-4 er filtret. Dextran er et polysakkarid med oppgitt molekylvekt  $\langle M \rangle = 500$  kg/mol og  $d\tilde{n}/dc = 0,148$  ml/g.

Støv og makromolekylaggregater i prøven forsøker vi å fjerne ved å filtrere prøven og all buffer gjennom et dobbelt sett filter med  $5,0$   $\mu\text{m}$  porer. Alt glassutstyr og ikke minst målekuvetta må være skylt med filtrert vann. Man må til enhver tid ha lokk på prøvekuvetta.

### 4 Oppgave

Veileder instruerer i bruk av instrumentet og dataprogrammet som styrer målingene.

A) Fyll en prøvekuvette med vann fra springen (prøve 0) og sett på lokket. Vannet fra springen inneholder oftest svært mye støv og rusk. See på prøven vha. stereomikroskopet.

B) Filtrer prøve 1 (buffer) direkte ned i en reingjort prøvekuvette. Se på prøven i stereomikroskopet og sammenlign med ufiltrert Jonsvann. Forhåpentligvis vil du nå finne mindre støv. Prøve 2-4 er fylt på kuvette av veilederen på forhånd. Kontroller støvinnholdet også i disse prøvene.

C) Kuvetten med prøve 1 settes på plass i lysspredningsapparatet. Skriv inn måleparametre i dataprogrammet (hvilke vinkler måle ved, antall ganger målt ved hver vinkel, tid for måling, etc.). Sett i gang målingene og lagr resultatet i ei fil på internt format og ei fil for tekstformat.

D) Utfør tilsvarende målinger for prøvene 2, 3 og 4. Innstill nå på "solution". Lagre resultatene.

E) Hent ut måleresultatene fra tekstfilene og plott resultatene vha. Excel i et Zimm-plott. Høvelig verdi for konstanten  $A$  i Zimm-plottet kan oppgis av veileder hvis dere ikke finner ut av det selv. Dobbeltekstrapoler til  $c = 0$  og  $\theta = 0$  og beregn for Dextranmolekylene treghetsradius, andre virialkoeffisient og midlere molekylvekt som beskrevet i kompendiet.

F) Lysspredningslikningen gjelder for **tynne** løsninger, dvs. molekylene må være i god avstand fra hverandre. Beregn den såkalte overlappkonsentrasjonen  $c^*$  for Dextranmolekylene ved å anta at molekylene er kuler med radius  $R_G$  og molekylvekten er  $M_w$  (verdier fra egne resultater). Hvordan er de brukte konsentrasjonen i forhold til  $c^*$ ?

### 5 Rapport

Det skal leveres rapport som gir svar på alle spørsmålene stilt over. Alle aktuelle plott skal legges ved samt tabeller over avleste data.