



Der zweite Virialkoeffizient in der Rayleigh-Lichtstreugleichung ein wichtiger Parameter für die Polymeranalytik und die Proteinkristallographie

Dr. Gerhard Heinzmann

Einleitung

Die statische Rayleigh-Lichtstreuung ist eine Technik, die im Bereich der Polymer-, Biopolymer-, Protein- und Nanopartikelanalytik eingesetzt wird [1]. Mit der statischen Rayleigh-Lichtstreuung kann neben dem Molekulargewicht und der molekularen Größe von makromolekularen Proben auch der zweite Virialkoeffizient einer Probe bestimmt werden.

Der zweite Virialkoeffizient ist ein Faktor, der in der Theorie der Rayleigh-Lichtstreuung eine wichtige Rolle spielt. Er beschreibt die Wechselwirkungen zwischen den gelösten Probemolekülen und den Lösungsmittelmolekülen.

Die Rayleigh-Lichtstreugleichung (Gleichung 1) beschreibt das Streulicht das von einer Probe bei einem Messwinkel von Null Grad gestreut wird. Da man das Streulicht bei diesem Winkel aber nicht messen kann, weil hier der starke Primärlaserstrahl die Streulichtmessung unmöglich macht, misst man das Streulicht bei einem oder mehreren Winkeln R_θ , die größer als Null Grad sind, und definiert eine Streufunktion P_θ . Dies führt letztendlich zu Gleichung 3.

Instrumente für die statische Rayleigh-Lichtstreuung

Die statische Rayleigh-Lichtstreuung kann entweder im Batch-Verfahren, mit einem so genannten Goniometer, durchgeführt werden oder Sie wird in Form von Durchflussdetektoren in der Gelpermeationschromatographie (GPC) und der Feld-Fluss Fraktionierung (FFF) eingesetzt.

Im Fall eines Goniometers ist der Detektor auf einem schwenkbaren Arm

Gleichungen zur Theorie der Rayleigh-Lichtstreuung

$$(1) \quad \frac{KC}{R_0} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C$$

$$(2) \quad P_\theta = \frac{R_\theta}{R_0}$$

$$(3) \quad \frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{(M_w P_\theta)} + 2A_2C$$

R_0 = Rayleigh-Verhältnis beim Streuwinkel Null Grad

M_w = nach dem Gewicht gemittelttes mittleres Molekulargewicht

P_θ = Streufunktion beim Streuwinkel θ

C = Konzentration

K = optische Konstante
 $= (2\pi^2 n_0^2) / (N_A \lambda_0^4) \times (dn/dc)^2$

A_2 = zweiter Virialkoeffizient

angebracht. Somit können sehr viele unterschiedliche Messwinkel eingestellt werden. Im Fall der am Markt vorhandenen Durchflussdetektoren variiert die Zahl der verfügbaren Messwinkel: Es sind Geräte mit einem, zwei, drei, sieben, acht, neun, achtzehn und einundzwanzig Messwinkeln erhältlich.

Verfügt der Detektor nur über einen einzigen Messwinkel, welches in der Regel ein 90°-Winkel ist, spricht man von einem Rechtwinkel-Lichtstreuendetektor (englisch RALS = Right Angle Light Scattering). Ab zwei und mehr Winkeln werden die Geräte als Mehrwinkel-Lichtstreuendetektoren (englisch MALS = Multi Angle Light Scattering) bezeichnet.

Verfügt der Detektor über einen Messwinkel unterhalb von 10°, so spricht man von Kleinwinkel-Lichtstreuung (englisch LALS = Low Angle Light Scattering).

Auswertung der statischen Rayleigh-Lichtstreuung

Durch die Auftragung des Streulichtes bei verschiedenen Messwinkeln, kann aus dem Achsenabschnitt das absolute Molekulargewicht einer Probe bestimmt

werden. In der Regel wird der Term R_θ/KC über dem Term $\sin^2(\theta/2)$ aufgetragen (Abbildung 1).

Aus dem Achsenabschnitt der mathematischen Anpassung (Fit) der Streuwinkel beim extrapolierten, messtechnisch nicht direkt zugänglichen Winkel Null Grad, kann das absolute Molekulargewicht einer Probe ermittelt werden.

Aus der Anfangssteigung des Fit beim Winkel Null Grad, kann weiterhin der Trägheitsradius der Probe ermittelt werden [2].

Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten von makromolekularen Proben

Zur Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten muss eine Probe mit mehreren unterschiedlichen Konzentrationen gemessen werden. Alternativ dazu können auch unterschiedliche Volumina einer Probe mit derselben Konzentration gemessen werden.

Aus der Rayleigh-Lichtstreugleichung geht hervor, dass die Auftragung des Terms KC/R_θ über der Konzentration der

Probe eine Gerade mit der Steigung $2A_2$ ergeben muss (Abbildung 2).

Bedeutung des zweiten Virialkoeffizienten in der Rayleigh-Lichtstreuung

Der zweite Virialkoeffizient beschreibt die Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmittelmolekülen und den im Lösungsmittel gelösten Probenmolekülen. Von besonderem Interesse ist der zweite Virialkoeffizient daher im Bereich der Proteinkristallographie. Er ist einer der Faktoren, die das Entstehen und das Wachstum eines Proteinkristalls aus einer Proteinlösung begünstigen können [3-5].

Ist der zweite Virialkoeffizient gleich Null, dann befindet man sich im so genannten Theta-Zustand: die Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmittelmolekülen untereinander sowie zwischen den Lösungsmittelmolekülen und den Probenmolekülen sind identisch.

Ist der zweite Virialkoeffizient positiv, dann sind die Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmitteln und den Molekülen der Probe stärker als die Wechselwirkungen zwischen den Probenmolekülen selbst; die Probenmoleküle werden daher gut solvatisiert und zeigen nur wenig Tendenz aus der Lösung auszutreten und einen Kristall zu bilden.

Ist der zweite Virialkoeffizient negativ, dann sind die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen der Probe untereinander stärker als die Wechselwirkungen zwischen den Probenmolekülen und den Molekülen des Lösungsmittels. In diesem Fall neigen die Probenmoleküle dazu aus der Lösung auszutreten.

Ist der zweite Virialkoeffizient allerdings stark negativ, dann besteht die Gefahr, dass die Probenmoleküle in einer amorphen Masse ausfallen. Nur bei einem leicht negativen zweiten Virialkoeffizienten neigen die Probenmoleküle dazu, sehr langsam aus der Lösung auszutreten.

Im Bereich der Proteinkristallographie ist man daher bestrebt, Proteinlösungen

eine schwache Tendenz haben, langsam aus der Lösung auszutreten und einen

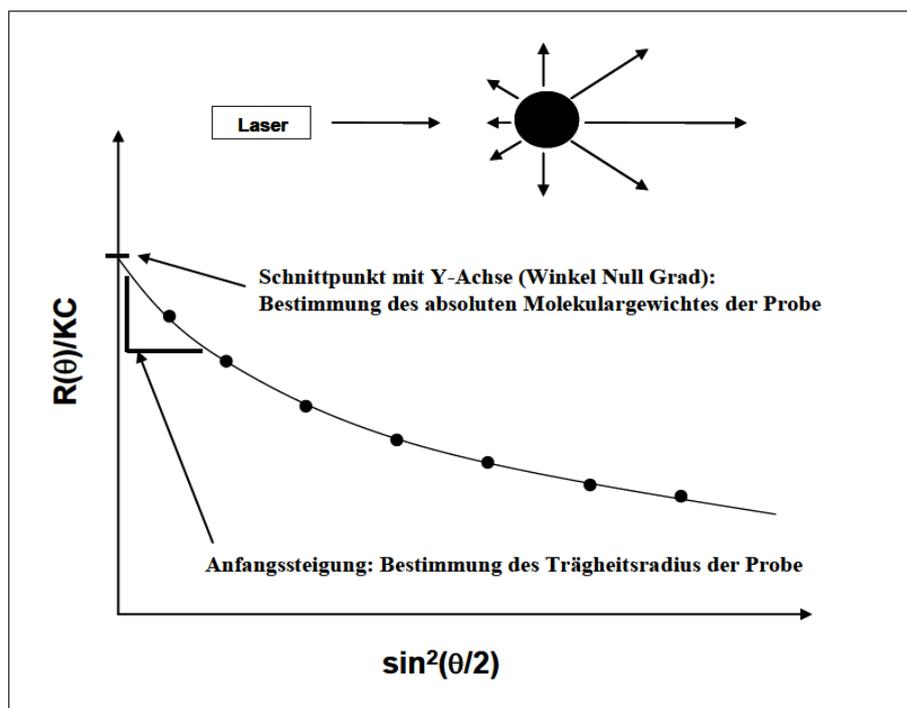


Abb. 1: Auswertung der Mehrwinkel-Lichtstreuung

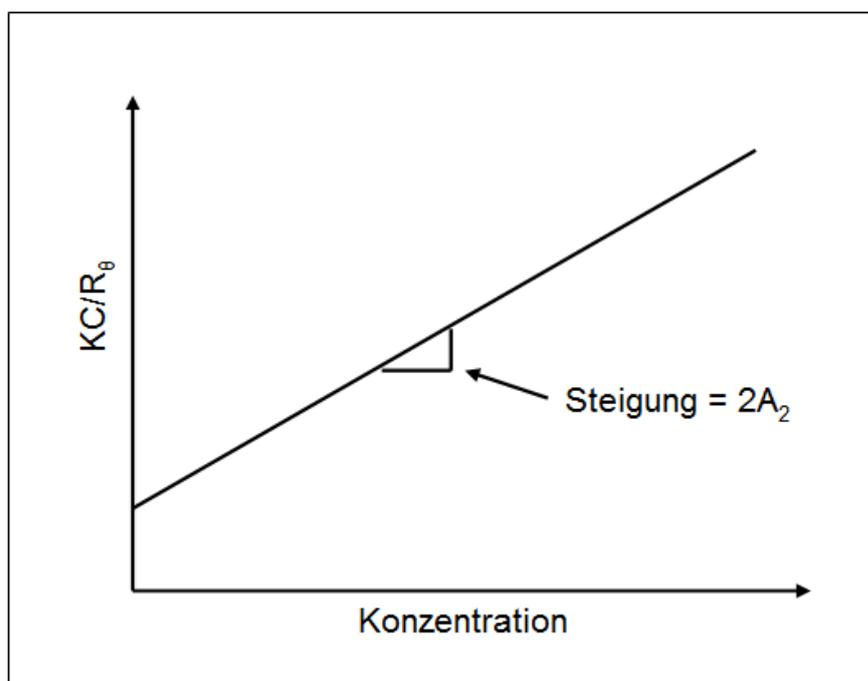


Abb. 2: Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten in der Rayleigh-Lichtstreuung

herzustellen die einen leicht negativen zweiten Virialkoeffizienten aufweisen. Nur dann ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass in der Proteinlösung Proteinkristalle wachsen, da die Proteinmoleküle nur in diesem speziellen Fall

Kristall zu bilden.

Ein leicht negativer zweiter Virialkoeffizient ist allerdings keine Garantie für die Entstehung eines Proteinkristalls sondern bestenfalls ein guter Ansatzpunkt; neuere Arbeiten haben

gezeigt. dass dieser Parameter ggf. differenzierter betrachtet werden muss [6].

Im Bereich der Polymeranalytik wird der zweite Virialkoeffizient oft vernachlässigt wenn man mit chromatographischen Methoden oder der Feld-Fluss Fraktionierung arbeitet. Grund hierfür ist, dass man meist mit verdünnten Lösungen arbeitet. Werden diese über eine Trennsäule oder einen Trennkanal aufgetrennt, dann ist die Konzentration an jedem Elutionspunkt so gering, dass der gesamte zweite Term der Rayleigh-Lichtstreugleichung ($2A_2C$) sehr klein wird und daher vernachlässigt werden kann.

Arbeitet man mit einem Goniometer im Batch-Modus, dann wird die Probe nicht mehr aufgetrennt und für den Fall, dass die Konzentration der Probe genügend hoch ist, muss der zweite Virialkoeffizient unbedingt berücksichtigt werden, da ansonsten die resultierenden Molekulargewichte nicht korrekt wären.

Fazit

Der zweite Virialkoeffizient in der Rayleigh-Lichtstreugleichung ist ein Parameter, der in der Chromatographie und der Feld-Fluss Fraktionierung meist vernachlässigt wird, da man hier mit verdünnten Proben arbeitet und durch die Auftrennung der Proben die Konzentration an jedem Punkt des Elutionsvolumens sehr klein ist; dadurch wird der gesamte zweite Term der Rayleigh-Lichtstreugleichung ($2A_2C$) sehr klein. Er hat daher keinen nennenswerten Einfluss auf die Resultate.

Anders verhält es sich, wenn Lichtstremessungen im Batch-Modus, ohne Auftrennung der Probe, gemacht werden. Je nach Konzentration der Probe kann der A_2 -Wert in diesem Fall einen nennenswerten Einfluss auf das Ergebnis haben. Er muss daher bei den Messungen berücksichtigt werden.

Eine wichtige Größe stellt der zweite Virialkoeffizient im Bereich der Proteinkristallographie dar. Ein leicht negativer zweiter Virialkoeffizient ist eine gute Voraussetzung für die Züchtung von Proteinkristallen. Ist der zweite Virialkoeffizient positiv, dann bilden sich keine Kristalle, da die Proteinmoleküle keine Tendenz dazu aufweisen, die Lösung zu verlassen. Ist der zweite Virialkoeffizient zu stark negativ, dann besteht die Gefahr, dass die Proteinmoleküle als amorphe Masse ausfallen. Ein leicht negativer zweiter Virialkoeffizient ist allerdings keine Garantie für die Entstehung eines Proteinkristalls sondern bestenfalls ein guter Ansatzpunkt.

Literatur

- [1] P. Kratochvíl, "Classical Light Scattering from Polymer Solutions", Elsevier, Amsterdam, 1987, ISBN 0-444-42890-9
- [2] G. Heinzmann. „Statische und Dynamische Lichtstreuung – Grundlagen und Anwendungen in der Polymer-, Protein- und Nanopartikelanalytik“, Fachartikel Analytik-News.de, 2016
- [3] A. George, Y. Chiang, B. Guo, A. Arabshahi, Z. Cai and W. W. Wilson, "Second virial coefficient as predictor in protein crystal growth", *Methods in Enzymology*, Volume 276, 1997, Pages 100-110
- [4] W. W. Wilson and L. J. DeLucas, "Applications of the second virial coefficient: protein crystallization and solubility", *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, May 2014, 70, Pages 543-554.
- [5] A. George and W. W. Wilson, „Predicting protein crystallization from a dilute solution property“, *Acta Cryst.* (1994), D50, Pages 361-365
- [6] M. Deszczynski, S. E. Harding and D. J. Winzor, "Negative second virial coefficients as predictors of protein crystal growth: Evidence from sedimentation equilibrium studies that refutes the designation of those light scattering parameters as osmotic virial coefficients", *Biophysical Chemistry* 120 (2006), Pages 106 – 113