

Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung mit Dual Attenuation Technologie - eine neue Dimension in der Photonenkorrelationsspektroskopie

Dr. Gerhard Heinzmann, Dr. Bernd Tartsch

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) oder Quasi-elastische Lichtstreuung (Quels) bezeichnet, ist seit vielen Jahren eine etablierte Technik um Partikel- und Molekülgrößen im Bereich von ca. 0,5 nm bis 1 µm zu bestimmen. Ihre Hauptanwendungsgebiete sind zum einen die Proteinkristallographie wo das schnelle Screening von Proteinproben auf Aggregationen die Hauptaufgabe darstellt sowie die Nanotechnologie wo die Größenbestimmung von Nanoteilchen dominiert. Bislang war es technisch nahezu unmöglich sowohl eine hinreichend gute Empfindlichkeit eines DLS-Instrumentes zu gewährleisten, so dass auch noch hoch verdünnte Lösungen von kleinen Proteinen oder Partikeln zuverlässig gemessen werden konnten und gleichzeitig hoch konzentrierte Proben wie sie in der Proteinkristallographie eingesetzt werden oder sehr große Nanopartikel. Der Grund hierfür ist die Tatsache dass das Streulicht einer Probe exponentiell mit deren Größe anwächst. Das neue DLS-Instrument Modell 802 von Viscotek (Abb.1) kann nun beide Extrembereiche abdecken. Durch die patentierte Single Mode Fiber (SMF) Optik, exklusiv bei Viscotek, ist eine maximale Empfindlichkeit des Gerätes gewährleistet und die Dual Attenuation Technologie (DAT) ermöglicht ohne jede Veränderung des Gerätes die Messung von hoch konzentrierten Proben und großen Partikeln.



Abb.1: Das neue DLS-Instrument Modell 802 von Viscotek mit Single Mode Fiber (SMF) Optik und Dual Attenuation Technologie (DAT)

Single Mode Fiber (SMF) Optik und Dual Attenuation Technologie (DAT)

"From the theoretical point of view, a single-mode fibre receiver appears to be the ultimate device for dynamic light scattering." Jaroslav Rička, Applied Optics, V.32/N.15, P.2860 (1993).

Diese bereits mehr als 10 Jahre alte Aussage hat sich innerhalb der vergangenen Jahre bestätigt. Die Geräte mit Single Mode Fiber Optik haben sich hinsichtlich Ihrer Empfindlichkeit allen anderen Geräten gegenüber als überlegen herausgestellt. Gewährleistet wird dies durch die überragende Signalqualität die durch die Lichtübertragung mittels einer Einzelmoden-Lichtleitfaser erreicht wird.

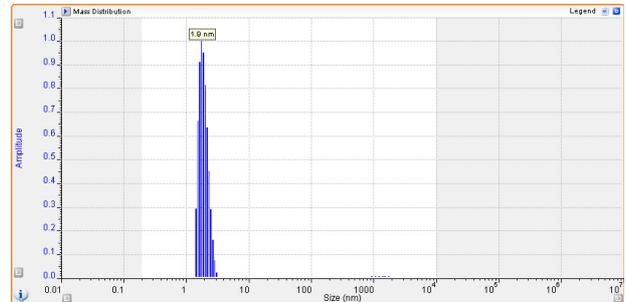
Dynamische Lichtstreuung

Der Einzelmoden-Lichtleiter nimmt hier die Funktion eines Filters wahr und eliminiert störendes Streulicht. Dabei wird sowohl das Laserlicht welches zur Probe gelangt durch eine solche Faser geführt wie auch das Licht welches von der Probe gestreut wird und zum Detektor gelangt. Während frühere Geräte noch durch extern geführte Lichtleiter auffallen sind bei modernen Geräten alle Lichtleitfasern im Gerät fest montiert so dass keine Probleme mehr durch Dejustage der Lichtleiter entstehen können und die Geräte somit uneingeschränkt mobil sind.

Die Dual Attenuation Technologie hingegen ist eine völlig neue Entwicklung im Viscotek Modell 802. Während bei Geräten älterer Bauart in der Regel nur die Laserintensität variiert werden kann ermöglicht die Dual Attenuation Technologie gleichzeitig auch eine Abschwächung des Streulichtes auf der Detektorseite. Damit wird der erfassbare Konzentrationsbereich einer Probe um Größenordnungen erweitert. Besonders elegant und bedienungsfreundlich ist die DAT-Technologie aufgrund der Tatsache dass sich das Gerät die optimalen Messbedingungen, d. h. die optimale bzw. vom Anwender vorgegebene Streulichtintensität selbst sucht. Sowohl die Laserintensität wie auch die Abschwächungseinheit auf der Detektorseite werden von der Software gesteuert. Somit muss der Bediener lediglich eine ausreichend hohe Konzentration seiner Probe herstellen, diese in eine Küvette füllen (minimales Volumen: 2 µl) und in das Gerät stellen. Nach wenigen Sekunden hat das Gerät die perfekte Streulichtintensität eingestellt und die Messung kann beginnen.

Applikationsbeispiele

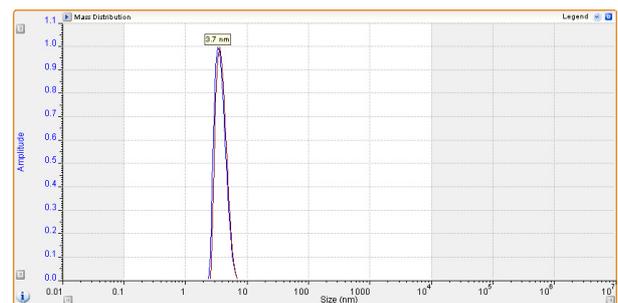
Ein Beispiel welches die hohe Sensitivität und Nachweisstärke des Viscotek Model 802 DLS-Instrumentes belegt zeigt Abb. 1. Hier wurde eine Lysozym-Probe (Molekulargewicht ca. 14.000 D) mit einer Konzentration von nur 0,1 mg/ml gemessen. Aufgrund der mit der Molekülgröße exponentiell anwachsenden Streulichtintensität können größere Moleküle natürlich in weit geringeren Konzentrationen gemessen werden.



Peak	% Area	Rh (nm)	Position	Std Dev	% RSD	MW (kD)
1	100.0	1.86	1.78	0.21	11.2	14.33

Abb. 1: Messung einer Lysozym-Probe mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml

Ein Beispiel für die Messung von konzentrierten Proben ist in Abbildung 2 dargestellt. Hier wurde ein Protein welches für Kristallisationsexperimente verwendet wurde in der für diese Art von Experimenten üblichen Konzentration von 30 mg/ml gemessen. Zur Überprüfung der Resultate wurde die Proteinlösung verdünnt und bei einer Konzentration von 10 mg/ml nochmals gemessen. Die Überlagerung beider Messungen zeigt dass die Resultate identisch sind.



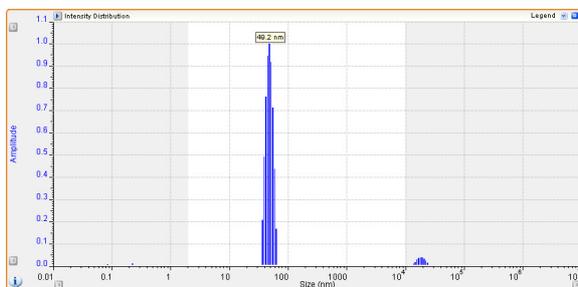
Peak	% Area	Rh (nm)	Position	Std Dev	% RSD	MW (kD)
1	100.0	3.71	3.31	0.75	20.3	73.28
1	100.0	3.74	3.35	0.74	19.9	75.25

Abb. 2: Überlagerung zweier Messungen einer Proteinprobe mit einer Konzentration von 10 mg/ml und 30 mg/ml. Hier wurde die Darstellung der Konturen anstatt der Balkendiagramme gewählt, da sich ansonsten die Peaks gegenseitig überdecken

Dynamische Lichtstreuung

Besonders im Bereich der Nanotechnik ist die DAT-Technologie ein wichtiges Werkzeug. Die hydrodynamischen Radien von Proteinen liegen meist im Bereich unterhalb von 10 nm. Bei Nanoteilchen können die Radien je nach Applikationsbereich auch deutlich über 100 nm liegen. Diese großen Teilchen erzeugen eine enorme Menge an Streulicht, so dass bei herkömmlichen Geräten schnell der Messbereich überschritten wird. Nur die DAT-Technologie gewährleistet, dass derartige Suspensionen von großen Nanoteilchen auch noch in Konzentrationsbereichen von mehreren Prozent gemessen werden können. Abbildung 3 zeigt die Messung von 100 nm großen Nanoteilchen mit einer Konzentration von 1 %.

Alle aufgeführten Messungen konnten ohne Veränderungen mit dem Viscotek Modell 802DLS durchgeführt werden. Die optimale Streulichtmenge wird von dem Gerät selbst eingestellt. Dadurch ist das 802DLS ein ausgesprochen einfach zu bedienendes Instrument. Dem Anwender obliegt letztendlich nur noch die Interpretation der Messergebnisse.



Peak	% Area	Rh (nm)	Position	Std Dev	% RSD
1	100.0	49.15	48.98	6.70	13.6

Abb. 3: Messung von 100 nm großen Nanoteilchen mit einer Konzentration von 1 %.

Durch eine intelligente Steuerung wird außerdem die Detektordiode des 802DLS vor Überlastung geschützt: sieht der Detektor nach dem Einsetzen der Probe bei der Standardeinstellung eine zu hohe Streulichtintensität so wird umgehend das Streulicht vollständig ausgeblendet. Dann wird die Lichtabschwächung auf den Maximalwert

eingestellt. Nun fährt die Software die Abschwächung so lange nach oben bis der Zielwert erreicht ist. Sollte die Probe auch bei höchstmöglicher Abschwächung noch immer zuviel Streulicht emittieren, dann wird das Streulicht dauerhaft ausgeblendet und der Anwender wird aufgefordert die Probe zu verdünnen.

Zusammenfassung

Das neue DLS-Instrument Modell 802 von Viscotek ermöglicht durch seine patentierte Single Mode Fiber (SMF) Optik und die Dual Attenuation Technologie (DAT) eine maximale Empfindlichkeit und Nachweisstärke und deckt gleichzeitig einen enorm großen Messbereich ab. Es können kleine Proteine mit einer Konzentration von nur 0,1 mg/ml gemessen werden, wie auch hoch konzentrierte Proteinlösungen mit einer Konzentration von 30 mg/ml und mehr, ebenso große Nanopartikel mit mehr als 1% Konzentration. Das Gerät muss nicht kalibriert werden, die Software stellt automatisch die optimale bzw. vom Anwender vorgegebene Streulichtmenge ein. Die Detektionsoptik ist durch ein intelligentes System vor Überlastung durch zu viel Streulicht geschützt. Somit ist das neue DLS-Instrument Modell 802 von Viscotek ein leistungsfähiges und ausgesprochen bedienerfreundliches Gerät das wichtige Informationen in den Bereichen Molekularbiologie, Proteinkristallographie und Nanotechnologie liefert.