شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

سال دوازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۳ ■ شماره پیاپی ۴۷

ISSN 2538-3450

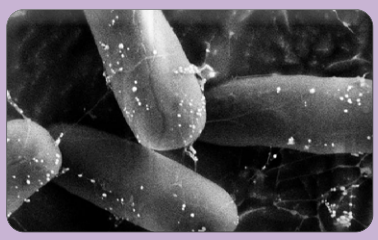
ریسک در بی‌طرفی آزمایشگاه

یازدهمین نشست سراسری مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی

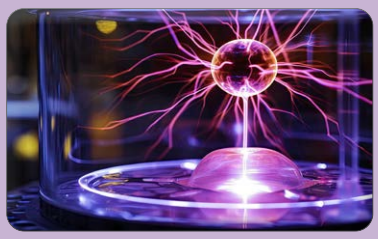
محصولات تراریخته: دوست یا دشمن

اندازه‌گیری وزن مولکولی ملکول‌های زیستی با استفاده از تجهیزات تفرق نور پویا

ارزیابی خطر ناشی از فلزات سنگین کادمیوم و سرب نمونه‌های گندم وارداتی در استان خراسان



کاربرد میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM برای آماده‌سازی لاملا میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو از نمونه‌های زیستی منجمد



کاربرد پلاسمای سرد در کشاورزی و مواد غذایی

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

اندازه‌گیری وزن مولکولی مولکول‌های زیستی با استفاده از تجهیزات تفرق نور پویا

نویسنده
دریاناز فرهمند بروجنی[۱و۲*]
۱. آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان - اصفهان
۲. عضو کارگروه زیست فناوری و کارگروه فنی اندازه ذرات
*dfarahmand@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰

واژه‌های کلیدی
مولکول‌های زیستی، تفرق نور پویا، وزن ملکولی، شعاع هیدرودینامیکی.

چکیده

پراکندگی نور پویا[۱] یک روش غیرتهاجمی رایج بین آزمایشگاه‌های دانشگاهی و صنعتی است که به سرعت، به بررسی کیفیت دقیق و قابل تکراری برای مطالعه مولکول‌های زیستی و غیر زیستی که به مقادیر بسیار کمی از نمونه نیاز دارد، می‌پردازد. این روش که با نام طیف‌سنجی همبستگی فوتون[۲] نیز شناخته می‌شود، ابزار بسیار قدرتمندی برای مطالعه رفتار انتشار مولکول‌های زیستی در محلول است. دستگاه تفرق نور پویا، ابزاری ساده و سریع برای تعیین وزن مولکولی است. این روش می‌تواند از روی شعاع هیدرودینامیکی نمونه‌های مختلف، وزن مولکولی آنها را مشخص کند و با استفاده از پراش ایستایی نور و همچنین به‌کارگیری نمونه‌های آماده‌سازی شده در غلظت‌های مختلف، فرآیند تعیین وزن مولکولی را انجام دهد. در این روش، یک محاسبه‌گر دبای تک زاویه‌ای وجود دارد که به کمک آن می‌توان اثرات زاویه‌ای را با استفاده از محاسبات ریاضی انجام داد. تعیین وزن مولکولی با استفاده از این تجهیز با سل مخصوص و استفاده از تولوئن به‌عنوان نمونه استاندارد قابل انجام است. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری یا تخمین وزن مولکولی مولکول‌های زیستی در دسترس محققان است. با این حال، مهم است که بدانید آنها چگونه کار می‌کنند و کدام ابزار برای برنامه شما مفیدتر است. هدف از این مقاله، ارائه یک دید کلی به خواننده برای تعیین وزن مولکولی ملکول‌های زیستی با دستگاه تفرق نور پویا است.

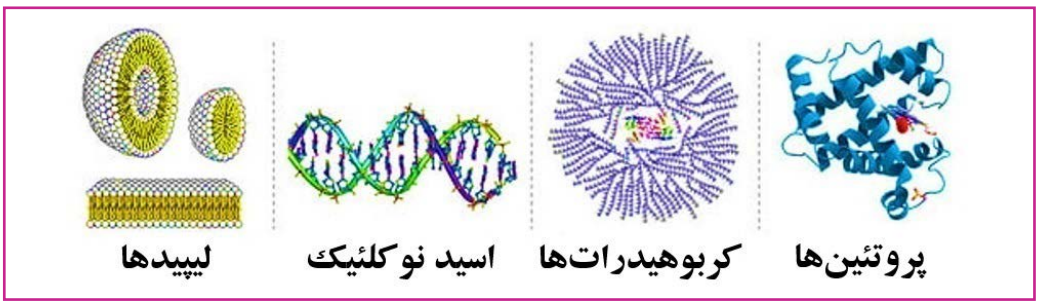
مولکول‌های زیستی[۳] در واقع مولکول‌هایی هستند که توسط موجودات زنده تولید می‌شوند. آنها ضروری‌ترین مولکول‌های آلی هستند که در فرآیندهای بقا و متابولیک موجودات زنده نقش دارند. مولکول‌های زیستی دارای طیف وسیعی از اندازه‌ها و ساختارها هستند، آنها از مولکول‌های کوچک مانند متابولیت‌های اولیه و ثانویه و هورمون‌ها تا درشت مولکول‌های بزرگ زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها را شامل می‌شوند (شکل (۱)). این دسته از ترکیبات به استثنای لیپیدها، دارای وزن مولکولی در محدوده ده هزار دالتون و بالاتر هستند (جدول (۱)). به همین دلیل، مولکول‌های زیستی، یعنی ترکیبات شیمیایی موجود در موجودات زنده به دو دسته تقسیم می‌شوند، دسته اول آنهایی که وزن مولکولی کمتر از یک هزار دالتون دارند و به‌طور معمول به‌عنوان میکرومولکول یا به زبان ساده مولکول زیستی نامیده می‌شوند؛ در حالی که دسته دوم آنهایی هستند که ماکرومولکول یا ماکرومولکول زیستی نامیده می‌شوند.

وزن مولکولی[۴] یک مولکول زیستی ارتباط نزدیکی با خواص زیستی، فیزیکی و شیمیایی آن دارد و این بدان معنی است که اندازه‌گیری وزن مولکولی یکی از عوامل کلیدی برای تعیین ویژگی‌های مولکول‌های زیستی و توصیف آنها است. روش‌های پراکندگی نور غیرتهاجمی، به ویژه روش‌های نوری مانند تفرق نور پویا و تفرق نور استاتیک[۵] داده‌هایی را در مورد مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، پلی ساکاریدها، الیگونوکلئوتیدها، آنتی‌بادی‌ها و همچنین مجموعه‌ها و موجودات بزرگ‌تر متشکل از آنها، ارائه می‌کنند که امروزه تکمیل کننده روش‌های دیگری برای تخمین و یا تعیین وزن مولکولی مانند کروماتوگرافی ژل تراوایی[۶]، الکتروفورز ژل، طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز[۷] و سانتریفیوژ اولترا است [۱].

بیشتر اوقات، مولکول‌های زیستی بزرگ به‌عنوان تابعی از دما، pH، قدرت یونی و غلظت تجمع می‌یابند. این اثرات باعث تغییراتی ساختاری در ساختار مولکول می‌شود که می‌تواند عملکرد زیست مولکول‌ها را تغییر دهد. درک این بینش‌ها در تحقیق، توسعه، تولید فرآیند و کنترل کیفیت زیست مولکول‌های امروزی اساسی است [۲].

جدول (۱): انواع ملکول‌های زیستی و وزن ملکولی آنها [۱۱].

ردیف	نوع	محدوده وزن ملکولی
۱	آمینو اسیدها	۱۰۰-۲۰۰ دالتون
۲	لیپیدها	۷۵۰-۱۵۰۰
۳	پلی ساکاریدها	در حدود میلیون
۴	کربوهیدرات‌های کوچک	۱۰۰-۲۰۰
۵	پروتین‌ها	چندین هزار تا بیش از یک میلیون
۶	نوکلئوتیدها	چند صد دالتون
۷	اسیدهای نوکلئیک (DNA-RNA)	بیش از چند بیلیون
۸	میوگلوبین	در حدود ۱۶/۷۰۰ دالتون
۹	آمیلوپکتین	بیش از ۱۰۰ میلیون
۱۰	اشرشیاکلی	$۲/۵ \times ۱۰^{۶}$



شکل (۱): انواع مولکول‌های زیستی [۱۴].

فناوری پراکندگی نور

پراکندگی نور پویا تحقیقی جدید و ابزار کنترل کیفیت برای توصیف فناوری‌های زیست مولکولی در قرن ۲۱ است [۱]. اندازه‌گیری وزن ملکولی و اندازه مولکول‌ها مهم است چرا که در کاربردهای صنعتی، برای کنترل کیفیت و ارزیابی همگنی نمونه، تعیین اندازه ذرات، بررسی اثر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی، بررسی اتصال لیگاندها، مطالعه برهم‌کنش‌های بین مولکول‌های زیستی، کنترل سرعت رهاسازی و تخریب پلیمرهای مورد استفاده در دارورسانی، بهبود حس چشایی پلی‌ساکاریدها در محصولات غذایی، هم برای صنایع مصرفی و هم برای طراحی و تولید صنعتی، دانستن اندازه مولکولی و وزن مواد می‌تواند تأثیر عمیقی بر طراحی و ساخت محصولات جدید و موجود داشته باشد.

پراکندگی نور پویا روشی غیرتهاجمی [۱] و رایج بین آزمایشگاه‌های دانشگاهی و صنعتی است که به سرعت، به بررسی کیفیت دقیق و قابل تکرار برای مطالعه مولکول‌های زیستی و غیر زیستی که به مقادیر بسیار کمی از نمونه نیاز دارد، می‌پردازد. این روش که با نام طیف‌سنجی همبستگی فوتون نیز شناخته می‌شود، ابزار بسیار قدرتمندی برای مطالعه رفتار انتشار مولکول‌های زیستی در محلول است. ضریب انتشار و در نتیجه، شعاع هیدرودینامیکی محاسبه شده از آن، به اندازه و شکل مولکول‌ها بستگی دارد [۳]. این دستگاه می‌تواند از روی شعاع هیدرودینامیکی نمونه‌های مختلف، وزن مولکولی آنها را مشخص کند و با استفاده از پراش ایستایی نور و همچنین به‌کارگیری نمونه‌های آماده‌سازی شده در غلظت‌های مختلف، فرآیند تعیین وزن مولکولی انجام می‌شود. در این دستگاه یک محاسبه‌گر دبای تک زاویه‌ای نیز وجود دارد که به کمک آن می‌توان اثرات زاویه‌ای را با استفاده از محاسبات ریاضی انجام داد.

هنگامی که یک پرتو لیزر پلاریزه و مونوکروم از یک حلال حاوی مولکول‌های زیستی عبور می‌کند، بسته به عوامل نوری سیستم، بخشی از نور، پراکنده خواهد شد. این نور پراکنده ممکن است چه از نظر شدت و چه از نظر نوسانات آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. نور اضافی پراکنده شده توسط مولکول‌ها با زاویه نسبت به پرتو پراکنده شده توسط حلال به تنهایی به‌طور مستقیم متناسب با وزن مولکولی برابر با غلظت زیست مولکول است [۱].

برای بیشتر مولکول‌های زیستی، زاویه جمع‌آوری منفرد ۹۰ درجه، تنها چیزی است که برای تعیین وزن مولکولی دقیق ضروری است؛ به شرطی که غلظت و ضریب شکست مشخص باشد. برای مولکول‌های بسیار بزرگ که به‌طور عمومی بزرگ‌تر از ۸۰۰ کیلو دالتون وزن دارند، جمع‌آوری نور لیزر پراکنده در دو زاویه ۹۰ و ۱۵ درجه، وزن مولکولی دقیق و محاسبه شعاع ژیراسیون[۸] را فراهم می‌کند [۱].

تعیین وزن مولکولی با سل یا کوت مخصوص آزمایش که می‌تواند از جنس شیشه‌ای و یا کوارتزی باشد، قابل انجام است و در بیشتر مواقع از تولوئن به‌عنوان نمونه استاندارد، برای انجام این آزمایش استفاده می‌شود.

تئوری پراکندگی ثابت شدت نور

در روش تفرق نور پویا و یا DLS برای تعیین وزن مولکولی نمونه، از روشی به نام پراکندگی ثابت شدت نور استفاده می‌شود. نور مرئی از منبع تابش به نمونه که نانوذرات معلق موجود در سوسپانسیون هستند، برخورد می‌کند و بعد از برخورد، از سطح ذرات متفرق می‌شود. به‌دلیل وجود حرکت براونی نانوذرات معلق در سوسپانسیون و جابجایی آنها به‌طور پیوسته، میزان پراکندگی ثابت شدت نور که با شناساگرهای دستگاه ثبت شده، در هر زمان متغیراست. لازم به ذکر است شدت پراکندگی متغیر نور، همان عاملی است که این دستگاه با استفاده از آن می‌تواند توزیع اندازه نانوذرات سوسپانسیون مورد آزمایش را نیز اندازه‌گیری کند. به میانگین شدت پراکندگی متغیر نور در یک بازه زمانی (به‌عنوان مثال، ۶۰ ثانیه‌ای)، شدت پراکندگی ثابت نور گفته می‌شود که برای تعیین وزن مولکولی و ضریب ویریال در روش تفرق نور پویا مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴].

اما چگونه پراکندگی نور با اندازه و وزن مولکولی نمونه مرتبط است؟ با استفاده از پراکندگی ثابت شدت نور در غلظت‌های مختلف سوسپانسیون حاوی نانوذرات مورد آزمایش، می‌توان وزن مولکولی آنها را با استفاده از معادله ریلی محاسبه نمود [۵]. معادله ریلی[۹] در واقع به ما می‌گوید که چگونه شدت و زاویه نور پراکنده با اندازه و وزن یک مولکول مرتبط است. مولکول‌هایی که اندازه بزرگتر و یا وزن مولکولی بالاتری دارند نسبت به مولکول‌های سبک‌تر و یا کوچکتر، نور بیشتری را پراکنده می‌کنند. علاوه‌بر این، یک رابطه خطی بین شدت نور پراکنده شده، افزایش وزن مولکولی و یک رابطه غیرخطی با اندازه یک مولکول وجود دارد. بنابراین، از نظر ریاضی، اگر همه عوامل معادله ریلی (رابطه (۱)) را بدانیم، می‌توانیم شدت نور پراکنده را برای محاسبه وزن مولکولی نمونه اندازه‌گیری کنیم:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{Mw} + 2A_2C\right)\frac{1}{P_\theta}$$ **رابطه (۱)**

که در آن:

(R_θ): نسبت ریلی (نسبت نور پراکنده شده به نور ساطع شده)، (M): وزن مولکولی نانوذرات، (A_2): ضریب دوم ویریال، (C): غلظت، (P_θ): وابستگی شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه آزمایشی به زاویه تابشی فوتون و (K): ثابت اپتیکی است که تابعی به‌صورت رابطه (۲) برای آن تعریف شده‌است:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A}\left(n_0\frac{dn}{dc}\right)^2$$ **رابطه (۲)**

که در آن:

(N_A): ثابت آووگادرو، (λ_0):طول موج نور متفرق شده، (n_0): ضریب شکست دیسپرسانت و ($\frac{dn}{dc}$): تغییرات ضریب شکست به تغییرات غلظت است.

نسبت ریلی یا R_θ

برای تعیین نسبت ریلی، نمونه استاندارد مورد نیاز است و به‌طور معمول برای اندازه‌گیری وزن مولکولی از طریق روش تفرق نور پویا، از تولوئن که تغییرات ناچیزی به نسبت ریلی، در دماها و طول موج‌های مختلف دارد، به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده می‌شود. با داشتن نسبت ریلی نمونه استاندارد و با استفاده از رابطه (۳) می‌توان ضریب ریلی نانوذرات مورد آزمایش را به‌دست آورد:

رابطه (۳)

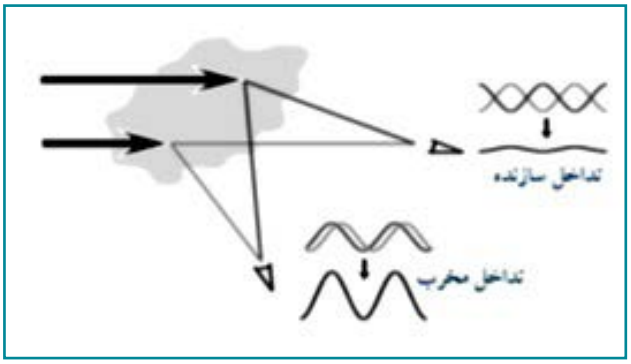
$$R_\theta = \frac{I_A n_0^2}{I_T n_T^2} R_T$$

که در آن:

(I_A): شدت پراکندگی نور باقیمانده، (I_T): شدت پراکندگی نور در تولوئن، (n_O): ضریب شکست دیسپرسانت، (n_T): ضریب شکست تولوئن و (R_T): ضریب ریلی تولوئن است.

وابستگی زاویه‌ای شدت پراکندگی ریلی یا R_θ

اندازه شدت پراکندگی نور به زاویه‌ای که شناساگر به امتداد تابش نور دارد، وابسته است. برطبق شکل (۲)، با بررسی شدت پراکندگی فوتون‌های متفرق شده، می‌توان به این مطلب پی برد که اندازه شدت پراکندگی این ذره از دو زاویه مختلف با هم تفاوت دارد و جواب به‌دست آمده برای اندازه شدت پراکندگی، دو اندازه مختلف است. از یک زاویه، شدت تفرق فوتون‌های برخورد کننده با ذره با هم جمع می‌شوند و از زاویه دیگر، باعث خنثی شدن یکدیگر شده‌اند. به این پدیده که موجب تغییر در شدت پراکندگی نور فوتون‌های متفرق شده از نمونه آزمایش در زوایای مختلف می‌شود، پراکندگی می[10] گفته می‌شود و زمانی که اندازه ذرات به قدری بزرگ باشند که فوتون‌های متعددی با این ذره برخورد کنند، اتفاق می‌افتد.



شکل (۲): محل قرارگیری شناساگر در دو زاویه مختلف [۴].

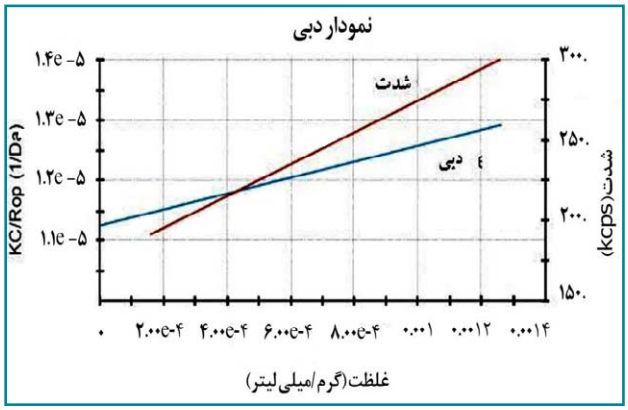
در صورتی که ذرات موجود در سوسپانسیون خیلی کوچک باشند، وابستگی زاویه‌های شدت پراکندگی نور نزدیک به عدد یک است و می‌توان از آن در معادله ریلی، صرف نظر کرد. برای نمونه‌هایی با اندازه ذرات کوچک، معادله ریلی به‌صورت رابطه (۴) ساده شده و در واقع، شدت پراکندگی تقریبی، جایگزین شدت پراکندگی ریلی می‌شود.

رابطه (۴)

$$R_\theta = \frac{I_A n_0^2}{I_T n_T^2} R_T$$

نمودار دبی[11]

شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه آزمایشی، با غلظت سوسپانسیون نمونه مورد آزمایش و همچنین وزن مولکولی آن تناسب دارد. در این روش برای به‌دست آوردن وزن ملکولی نمونه، شدت پراکندگی نور متفرق شده در غلظت‌های مختلف از نمونه مورد نظر و در یک زاویه اندازه‌گیری می‌شود. سپس تغییرات شدت پراکندگی نور در غلظت‌های مختلف با شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه استاندارد تولوئن مقایسه می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توانیم وزن مولکولی نمونه را تعیین کنیم. نمودار حاصل از این مقایسه را نمودار دبی می‌نامند که در شکل (۳) نشان داده شده‌است [۴].



شکل (۳): نمودار دبی غلظت بر شدت پراکندگی نور [۴].

آماده‌سازی نمونه

یکی از اصلی‌ترین و مهم‌ترین مراحل انجام آزمون با روش تفرق نور پویا، آماده‌سازی نمونه است؛ برای استفاده از این آزمون، تعیین وزن ملکولی هم دارای نکات ویژه‌ای است که به آن اشاره می‌کنیم. به دلیل این که نتایج به‌دست آمده در آزمون اندازه‌گیری وزن مولکولی به شدت نسبت به گرد و غبار و آلودگی حساس هستند، یکی از سخت‌ترین کارها در این آزمون، مراقبت از نمونه تهیه شده در برابر آلودگی است و نیاز به تهیه نمونه‌های تمیز و عاری از گرد و غبار است [۶]. علاوه‌بر این، در این آزمون، به هیچ وجه نباید از کووت‌های یکبار مصرف پلی استایرنی که به آسانی روی سطح آنها خش ایجاد می‌شود، استفاده نمود.

غلظت نمونه آماده‌سازی شده برای انجام آزمون‌های مختلفی که با این دستگاه انجام می‌شود، دارای محدودیت‌هایی است که بیشتر و یا کمتر بودن آن نسبت به محدوده غلظت تعیین شده، می‌تواند نقش تعیین‌کننده‌ای در نتایج به‌دست آمده از دستگاه داشته باشد و بهتر است در چندین غلظت مختلف تهیه شود. فراموش نکنید که محدوده غلظت در نمونه‌های آماده‌سازی شده برای آزمون تعیین وزن مولکولی، با توجه به عواملی که قبلا به آنها اشاره شد، یعنی نرخ پرتوهای تفرق یافته تعیین می‌شود. نرخ پرتوهای تفرق یافته نمونه‌های تهیه شده در پایین‌ترین غلظت برای انجام این آزمون، باید حداقل ۳۰ درصد بیشتر از نرخ پرتوهای تفرق یافته محیط، بدون وجود ماده مورد بررسی، یعنی دیسپرسانت و یا حلال خالص باشد [۷]؛ بنابراین، ترجیحا دانستن حداقل غلظت زیست ملکول‌های مورد نیاز برای اندازه‌گیری DLS مفید است. همچنین درصورت نیاز، اندازه‌گیری‌های DLS می‌توانند در غلظت‌های بالاتر تکرار شوند [۸]؛ غلظت‌های پیشنهاد شده به‌طور معمول بین ۰/۲۵-۱ گرم بر لیتر است. مورد مهم بعدی، دیسپرس شدگی یکنواخت ذرات موجود در دیسپرسانت، برای انجام آزمون، از اهمیت زیادی برخوردار است. تجهیزاتی نظیر ترازو، دستگاه اولتراسونیک و همزن برقی می‌توانند به کاربر در تهیه نمونه‌ای با کیفیت بالا کمک کنند. سعی کنید دیسپرسانت و حلال را قبل از آزمون و با استفاده از غشاهایی با اندازه ۰/۱ µm فیلتر کنید [۹]؛ این امر برای برطرف شدن آلودگی‌های احتمالی موجود در آنها ضروری است. رعایت نکردن حذف آلودگی نمونه آماده‌سازی شده، می‌تواند در نتایج به‌دست آمده موثر باشد.

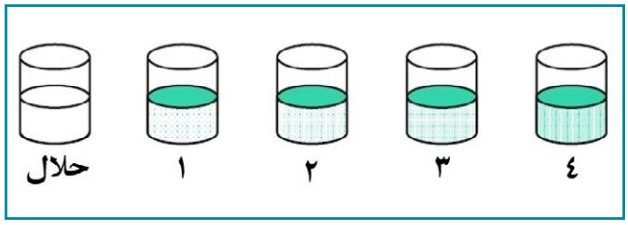
از تولوئن با درجه اسپکتروفتومتری استفاده نمایید. در ابتدا کووت را با تولوئن شستشو دهید و درصورت امکان از یک اشاره‌گر لیزری برای جستجوی لکه‌های گرد و غبار استفاده کنید. اگر آنها آشکار باشند، تولوئن باید فیلتر شود [۹].

برای تهیه یک نمونه آزمایشی مناسب، رعایت تمام نکات مهم در مرحله آماده‌سازی و به‌کارگیری دقت زیاد در تمامی مراحل، امری لازم و ضروری است و هر اشتباهی در مرحله آماده‌سازی می‌تواند سبب به وجود آمدن خطا در نتایج آزمون انجام شده شود. در پایان باید به این نکته اشاره کرد که تجربه کاربری ماهر، می‌تواند مشکلات به وجود آمده در این مرحله که متناسب با نمونه مورد آزمایش است، را به خوبی برطرف کند.

توجه داشته باشید که برای وزن مولکولی کاملا ناشناخته، انتخاب غلظت، کاملا نادرست است. اگر سیگنال خیلی ضعیف است، با غلظت‌های بالاتر تکرار کنید. اگر سیگنال بیش از حد قوی است، با غلظت‌های پایین‌تر تکرار کنید. توجه داشته باشید که مقدار dn / dc در محاسبات ضروری است. از پیش فرض‌های نرم‌افزار استفاده نکنید. اگر لازم است، بدانید که از ۰/۱۵ برای پلیمرهای مصنوعی در حلال آلی و ۰/۱۸۵ برای مولکول‌های زیستی (به‌عنوان مثال، پروتئین) در آب استفاده کنید. مقدار dn / dc به جفت پلیمر/حلال برای یک طول موج خاص بستگی دارد (به راهنمای دستگاه خود مراجعه کنید) [۹].

روش کار دستگاه DLS برای اندازه‌گیری وزن ملکولی

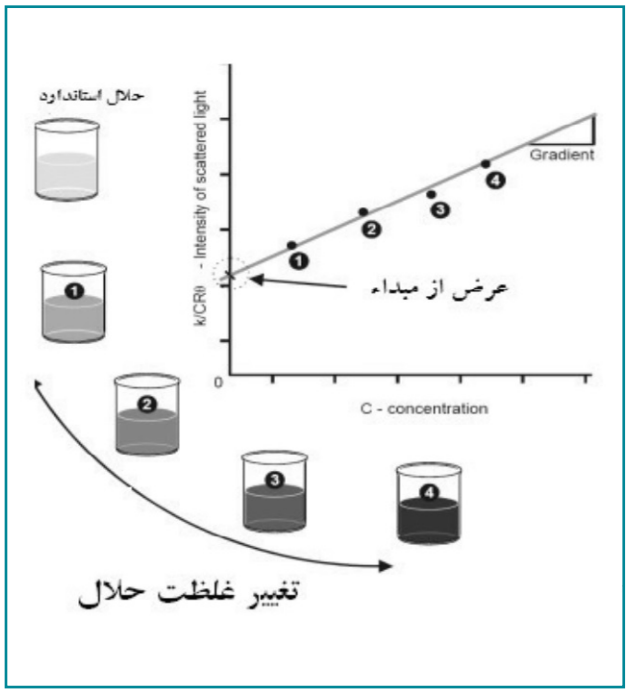
برای به‌دست آوردن وزن مولکولی با دستگاه، نیاز به تهیه سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌هایی بر حسب گرم بر میلی‌لیتر از نمونه است (شکل (۴)). همان‌طور که قبلا اشاره شد، می‌توان برای افزایش اطمینان از نتیجه به‌دست آمده، سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌های بالاتر هم تهیه نمود.



شکل (۴): آماده‌سازی غلظت‌های مناسب [۱۳].

با توجه به شکل (۵) می‌توان نتیجه گرفت که غلظت سوسپانسیون با شدت پراکندگی نور رابطه مستقیم دارد و همچنین با افزایش غلظت شدت پراکندگی نور در نمونه زیاد می‌شود، چنانچه شدت پراکندگی نور تنها از یک زاویه ثبت شود، نسبت به غلظت باید به‌صورت خطی باشد.

درنهایت، با داشتن نسبت (K_C/R_θ)، نمودار اندازه شدت پراکندگی نور در غلظت صفر که به کمک نمودار دبی قابل محاسبه است و نقطه تلاقی نمودار دبی با محور yها و استفاده از معادله ریلی، می‌توان وزن مولکولی نمونه مورد نظر را محاسبه کرد. لازم به ذکر است که ضریب ویریال نیز از روی شیب نمودار دبی قابل محاسبه است [۴].



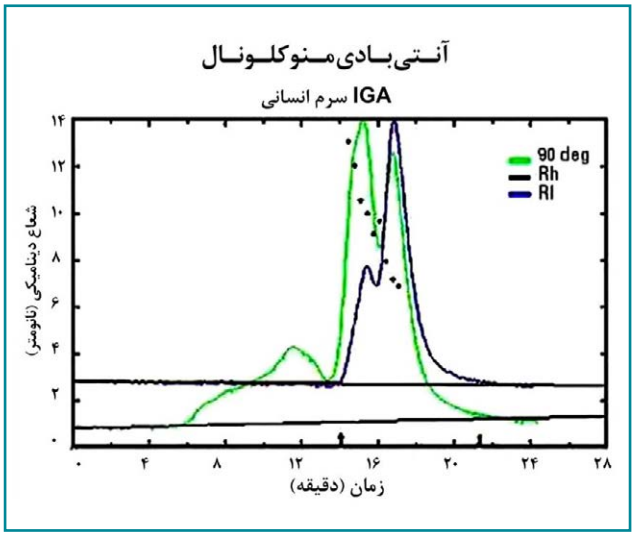
شکل (۵): تصویر نمودار دبی نمونه مورد آزمایش در آزمون وزن مولکولی [۴].

مثالی کاربردی در زیست فناوری

حوزه زیست فناوری برای تعیین وزن مولکولی به سرعت افزایش یافته است و الزامات برای یک تصویرکامل از رفتار زیست‌مولکول‌ها در محلول، نه تنها برای درک آکادمیک، بلکه از دیدگاه نظارتی برای ایمنی و کارایی حیاتی است. به‌عنوان مثال، داروهای زیستی مانند اینترفرون که در درمان هپاتیت مزمن استفاده می‌شود، لازم است که توده‌های مولی بالاتر از توده‌های کلیوی باشند تا نیمه عمر و در نتیجه کارایی دارو افزایش یابد. در صنعت داروسازی حوزه بزرگی از علاقه‌مندی‌ها به سمت درمان و تشخیص‌های پروتئین‌هایی مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و mAb سوق دارد که می‌توان برای اهداف خاصی همچون درمان و کاهش بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان و یا حتی آرتروز، از آنها کمک گرفت [۱۰].

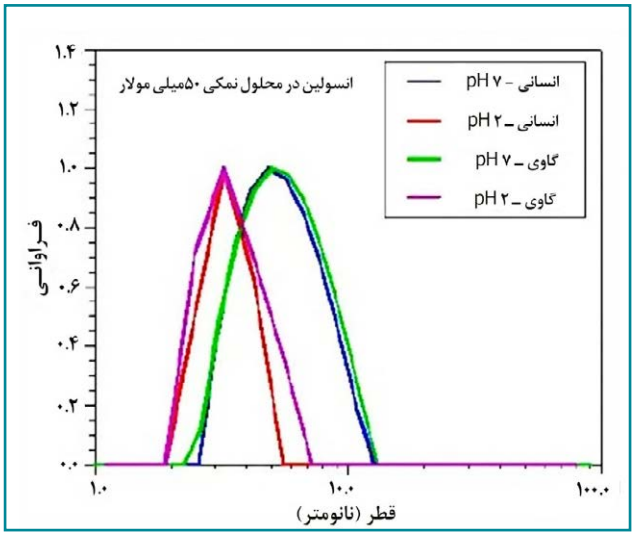
از دستگاهی با قابلیت تفرق نور، برای شناسایی و تعیین کمّی الیگومرها و تجمع آنها هنگام مطالعه زیست‌مولکول‌های محلول حیاتی مانند پروتئین‌ها، پلی پپتیدهای بزرگ، پلی ساکاریدها، الیگونوکلئوتیدها و آنتی‌بادی‌هایی که وزن مولکولی آنها به‌طور عمومی بیشتر از ۱۰ کیلو دالتون است، می‌توان استفاده نمود [۱].

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یکی از مولکول‌های مهم زیستی است که به دلیل پیچیدگی و تغییرات ظریف در فعالیت زیستی به‌عنوان تابعی از تغییرات همساز قلمداد می‌شوند. تغییرات ساختاری ساده ناشی از تغییرات گلیکوزیلاسیون می‌تواند اثرات دارویی و ایمنی‌زایی قابل توجهی ایجاد کند. استفاده از روش پراکندگی نور پویا، برای مشخص کردن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، امکان محاسبه «بلادرنگ» شعاع هیدرودینامیک را می‌دهد و توزیع وزن ملکولی آنتی‌بادی مونوکلونال را فراهم می‌کند. شکل (۶) یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی را نشان می‌دهد که با استفاده از کروماتوگرافی اندازه طردی[۱۲] با الوتاسیون مستقیم به یک آشکارساز پراکندگی نور دینامیک جدا شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌شود DLS حساسیت بالاتری نسبت به مولفه وزن مولکولی بزرگ‌تر با مقادیر مرتبط Rh دارد. تغییرات Rh به‌عنوان تابعی از شرایط مختلف (pH، دما، غلظت و غیره) به محققان اجازه می‌دهد تا فعالیت دارویی را بهتر درک کنند و به قسمت‌های کنترل کیفیت اجازه می‌دهد تا سازگاری محصول یا فرآیند خود را برای ارائه‌های نظارتی تضمین کنند [۱].



شکل (۶): آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی [۱].

مثال خوب دیگر برای نشان دادن ارزش تخمین‌های وزن مولکولی مبتنی بر DLS، ارزیابی ساختار چهارتایی انسولین است که در شکل (۷) نشان داده شده‌است. در pH (۲)، انسولین ساختار دیمری با وزن مولکولی شناخته شده ۱۱/۴ kDa دارد. شعاع هیدرودینامیک در pH (۲) برابر با ۱/۷ نانومتر است که با وزن مولکولی ۱۲/۱ کیلو دالتون با استفاده از منحنی کالیبراسیون پروتئین کروی سازگار است. در pH (۷)، انسولین ساختار چهارتایی هگزامر با وزن مولکولی شناخته شده ۳۴/۲ kDa دارد. شعاع در pH (۷) برابر ۲/۷ نانومتر است که با وزن مولکولی تخمین زده شده ۳۴/۱ کیلو دالتون، به‌طور تقریبی با مقدار شناخته شده یکسان است.



شکل (۷): توزیع اندازه انسولین انسانی و گاوی در pH (۲) و (۷). اندازه‌گیری شده با سیستم نانوابزار مالورن [۱۲].

نتیجه‌گیری

وزن ملکولی زیست ملکول‌ها را می‌توان با دستگاه DLS تخمین زد، اما به‌عنوان یک برآوردگر وزن مولکولی توصیه نمی‌شود و باید از این روش با احتیاط استفاده شود [۸]. روش پراکندگی نور پویا را می‌توان به راحتی به ابزارهایی نظیر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۱۳]، کروماتوگرافی مایع پروتئینی سریع[۱۴] و کروماتوگرافی ژل تراوایی[۱۵] که در حال حاضر تعیین وزن مولکولی زیست مولکول‌ها را انجام می‌دهند، اضافه کرد تا این تشخیص با حساسیت بالا همراه با تعیین شعاع هیدرودینامیک[۱۶]، بینش‌های جدیدی را در مورد ترکیب و سازگاری زیست مولکول‌های مدرن فراهم کند. استفاده از ترکیب پراکندگی نور استاتیک و دینامیک در یک سلول، ابزار جدیدی برای به‌دست آوردن اطلاعاتی برای زیست مولکول‌ها فراهم می‌کند. این بینش‌ها به بخش‌های تحقیقاتی برای توسعه ترکیبات فعال دارویی بهبود یافته و بخش‌های کنترل کیفیت برای کنترل بهتر سازگاری محصول تجاری شده کمک خواهد کرد [۱].

با دستگاه آنالایزر نانوذرات مدل SZ-۱۰۰ از برند هوریبا می‌توان وزن مولکولی متوسط را با استفاده از روش DLS یا تفرق نور پویا اندازه‌گیری کرد. فراموش نکنید برای این آزمون از زاویه ۹۰ درجه شناساگر و کووت‌های چهار طرف شفاف استفاده کنید. باید نمونه با غلظت‌های مختلف را تهیه نموده و به همراه یک نمونه استاندارد برای آزمون استفاده کنید. ماده استاندارد تولوئن با ضریب شکست ۱/۴۹۶ و نسبت ریلی $RT=۱/۳۵\times۱۰^{-۵}\ cm^{-۱}$ است. در این دستگاه با استفاده از معادله ریلی، وزن مولکولی و ضریب دوم ویریال محاسبه می‌شود [۴]. اندازه گیری در محدوده ۱×۱۰^{۳} تا ۲×۱۰^{۷} گرم بر مول یا دالتون و با دقت ۱۰ ± درصد قابل دستیابی است.

پی‌نوشت

1. Dynamic light scattering (DLS)
2. Photon correlation spectroscopy (PCS)
3. Biomolecules
4. Molecular Weight
5. Static Light Scattering (SLS)
6. Gel permeation chromatography (GPC)
7. MALDI coupled to time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)
8. Radius of gyration (Rg)
9. Rayleigh theory
10. Mie theory
11. Debye plot
12. Size exclusion chromatography (SEC)
13. High-performance liquid chromatography (HPLC)
14. Fast \Protein Liquid Chromatography (FPLC)
15. Gel Permutation Chromatography (GPC)
16. Hydrodynamic radius (RH)

مراجع

[1] J. P. Helfrich, Precision Detectors Inc, Static And Dynamic Light Scattering for Determining Absolute Molecular Weight And Hydrodynamic Radius Of Biomolecules. Pharmaceuticalonline, 1999.

[2] S.E. Harding, Determination of Diffusion Coefficients of Biological Macromolecules by Dynamic Light Scattering, Methods in molecular biology, 22(1994),97-108.

[3] C. Rochas, E.Geissler, Measurement of Dynamic Light Scattering Intensity in Gels. Macromolecules, American Chemical Society, 2014, Macromolecules, 47 (22), pp.6. 10.1021.

[4] D.Gharailou, S.Moraddeh, Determination of molecular weight by Dynamic Light Scattering (DLS), Iranian journal of Laboratory Knowledge Volume 3, Issue 2, summer 2015, No.10.

[5] How to measure molecular weight and size using light scattering detectors, Bimolecular Science-Guide, Sep 2017.

[6] B.Lorber, Analytical light scattering methods in molecular and structural biology: Experimental aspects and results, doi.org/10.48550/arXiv:1810.00611.

[7] D.Gharailou, S.Moraddeh, Sample preparation techniques in DLS , Iranian journal of Laboratory Knowledge Volume 3 , Issue 3 ,Fall 2015 , No.11.

[8] G. E. O. Borgstahl , How to Use Dynamic Light Scattering to Improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals, Methods Mol Biol, 2007:363:109-29.

[9] Molecular weight measurement using Dynamic Light Scattering equipment, Technical note, NT01-Molecular Weight_EN_V01.

[10] B.MacCreath, G.Cleaver, and G.Saunders, SEC-Light Scattering for Biomolecular Characterisation, Chromatography Today, 2011.

[11] D. w louda, Overview of biomolecules, College of Medicine, Florida Atlantic University, 2012.

[12] Can The MW Be Measured With Dynamic Light Scattering? frequently asked question,Malvern Instruments.

[13] U. Nobbmann, Protein sizing by light scattering, molecular weight and polydispersity, www.malvern.co.uk/proteins.

[14] https://byjus.com/biology/biomolecules/

No.47 ■ Fall 2024 ■ Issue 3 ■ Volume 12
Iranian Journal of Laboratory Knowledge

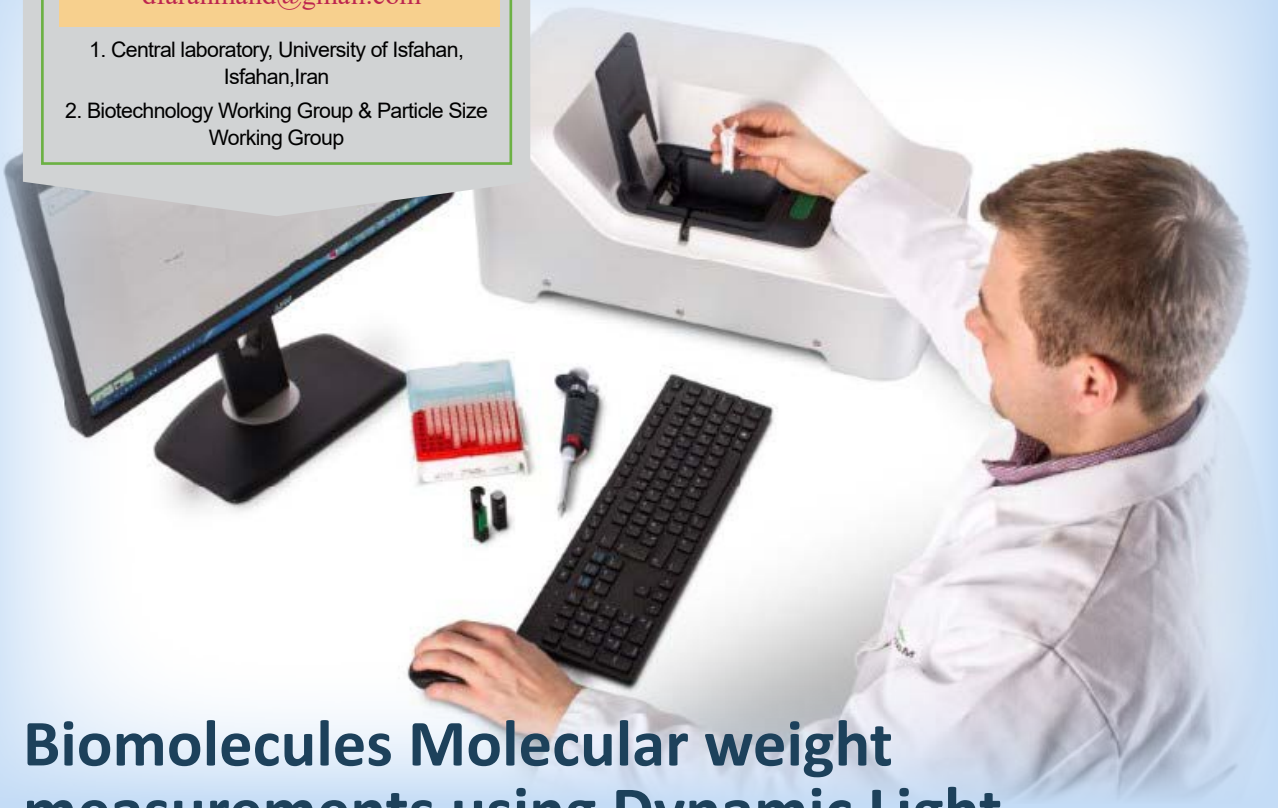
Author

Daryanaz Farahmand Broujeni[1,2*]

*dfarahmand@gmail.com

1. Central laboratory, University of Isfahan, Isfahan,Iran

2. Biotechnology Working Group & Particle Size Working Group



Biomolecules Molecular weight measurements using Dynamic Light Scattering equipments

Abstract

Dynamic light scattering is a non-invasive method common among academic and industrial laboratories that provides rapid, accurate and reproducible quality assurance for the study of biological and non-biological molecules that requires very small amounts of sample. This method, also known as photon correlation spectroscopy (PCS), is a very powerful tool for studying the diffusion behavior of biomolecules in solution. The dynamic light scattering device is a simple and fast tool for molecular weight determination. This method can determine the molecular weight of different samples based on the hydrodynamic radius and perform the process of determining the molecular weight by using static light diffraction and using samples prepared in different concentrations. In this method, there is a single-angle Debye calculator that can be used to calculate angular effects using mathematical calculations. Determination of molecular weight can be done using this equipment with special cell and using toluene as a standard sample. Various methods are available to researchers to measure or estimate the molecular weight of biological molecules. However, it's important to know how they work and which tool is most useful for your application. The purpose of this article is to provide an overview to the reader for determining the molecular weight of biomolecules with dynamic light scattering.

Keywords

Biomolecules, Dynamic light scattering, Molecular Weight, Hydrodynamic radius

Iran Nanotechnology Laboratory Network

Iranian Journal of Laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

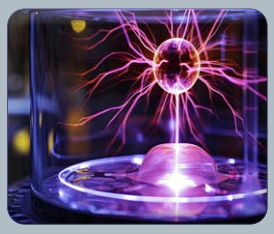
Volume 12 ▪ Issue 3 ▪ Fall 2024 ▪ No.47

Application of Cryo-FIB-SEM for Cryo-TEM lamella preparation from frozen biological specimen

Transgenic products: friend or enemy

Aprossessment of the risk caused by heavy metals cadmium and lead in imported wheat samples in khorasan vince

Biomolecules Molecular weight measurements using Dynamic Light Scattering equipments



Application of cold plasma in agriculture and food

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir