

3

Experimenteller Teil

3.1 Meßmethoden und Datenerfassung

Im Folgenden soll das theoretische Wissen in drei experimentellen Aufbauten umgesetzt werden. Dazu wird zunächst auf die Detektionsart näher eingegangen, da stets die Photonenzähl-detektion ihre Anwendung findet [79]. Dies geschieht mit Hilfe des sog. Photomultipliers, der die einfallenden Photonen statistisch mißt und so ein Maß für die Intensität des Streulichtes darstellt. Dafür wird zunächst die Mandel-Beziehung erläutert [80].

Die Mandel-Beziehung

Photonendetektion ist ein Wahrscheinlichkeitsprozeß, der durch die Poissonstatistik beschrieben wird, wie durch die Quantenelektrodynamik gezeigt werden kann [81].

Wenn I eine konstante Intensität, T die Dauer und α die Quantenausbeute (Wirkungsgrad) eines Photomultipliers darstellen, dann ist die Anzahl n der detektierten Photonen (Elektronenpulse) durch

$$\langle n \rangle = \alpha IT \tag{3.1}$$

gegeben. Dabei gehorcht n einer Poissonverteilung, d.h. es gilt

$$p(n, T) = \frac{(\alpha IT)^n}{n!} \exp(-\alpha IT). \tag{3.2}$$

Die Mandel-Formulierung berücksichtigt die Tatsache, daß die Intensität selbst eine fluktuierende Größe ist, die durch eine Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(I)$ beschrieben werden

kann:

$$p(n, T) = \int \frac{(\alpha IT)^n}{n!} \exp(-\alpha IT) p(I) dI. \quad (3.3)$$

Durch die Fakultätsmomente kann eine Addition und Integration erfolgen. Für das zweite Fakultätsmoment gilt:

$$\langle n(n-1) \rangle = \sum_n n(n-1)p(n, T) = \alpha^2 T^2 \langle I^2 \rangle. \quad (3.4)$$

Die obige Gleichung kann für das Produkt der nicht korrelierten Photonenpulse benutzt werden, d.h. zweier Pulse, deren Zeitdifferenz $\Delta t = t_2 - t_1$ größer als die Totzeit des Photomultipliers ist. Hieraus ergibt sich

$$\langle n(t_1)n(t_2) \rangle = \alpha^2 T^2 \langle I(t_1)I(t_2) \rangle. \quad (3.5)$$

Die Photonen - Autokorrelationsfunktion (AKF) unterscheidet sich also von der Intensitäts - AKF nur durch den skalaren Faktor $\alpha^2 T^2$. Es kann gezeigt werden, daß die Photonen-AKF eine größere Varianz besitzt als die Intensitäts-AKF. Das bedeutet, daß bei Messungen längere Zeiten notwendig sind, um die gewünschte Genauigkeit der Ergebnisse zu erzielen.

Für eine Null-Verzögerung, d.h. $\Delta t = 0$ ($t_1 = t_2$), ergibt sich:

$$\langle n(t)^2 \rangle = \alpha^2 T^2 \langle I(t)^2 \rangle + \alpha T \langle I(t) \rangle. \quad (3.6)$$

Der zweite Term wird als Rauschen bezeichnet, der sich aus der Rauschtheorie ableiten läßt. Hierbei ergibt sich ein diskontinuierlicher Schritt in der Autokorrelationsfunktion zwischen den Kanälen für Null und den restlichen Zeiten. Aus diesem Grund ist in den meisten Digitalkorrelatoren kein Null-Kanal implementiert.

Aufgrund der untersuchten in der Regel stochastischen Prozesse und der damit über dem Photomultiplier detektierten und statistisch schwankenden Intensität wird auf das Verhalten einer fluktuierenden Meßgröße eingegangen [82].

3.1.1 Fluktuierende Meßgröße

Es bezeichnet $A(t)$ irgendeine fluktuierende Meßgröße, dann ist ihr Zeitmittelwert gegeben durch

$$\langle A \rangle_T(\tau) := \frac{1}{T} \int_{\tau - \frac{T}{2}}^{\tau + \frac{T}{2}} A(t) dt. \quad (3.7)$$

Dabei ist T die Zeitdauer und τ der mittlere Zeitpunkt der Mittelung. T muß natürlich so groß gewählt werden, daß $A(t)$ in dieser Zeit oft genug geschwankt hat.

Hängt $\langle A \rangle_T(\tau)$ nicht von τ ab und somit nicht von T (sofern T groß genug ist), dann wird von einem stationären Schwankungsprozeß gesprochen. Allgemein wird dann geschrieben

$$\langle A \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T A(t) dt. \quad (3.8)$$

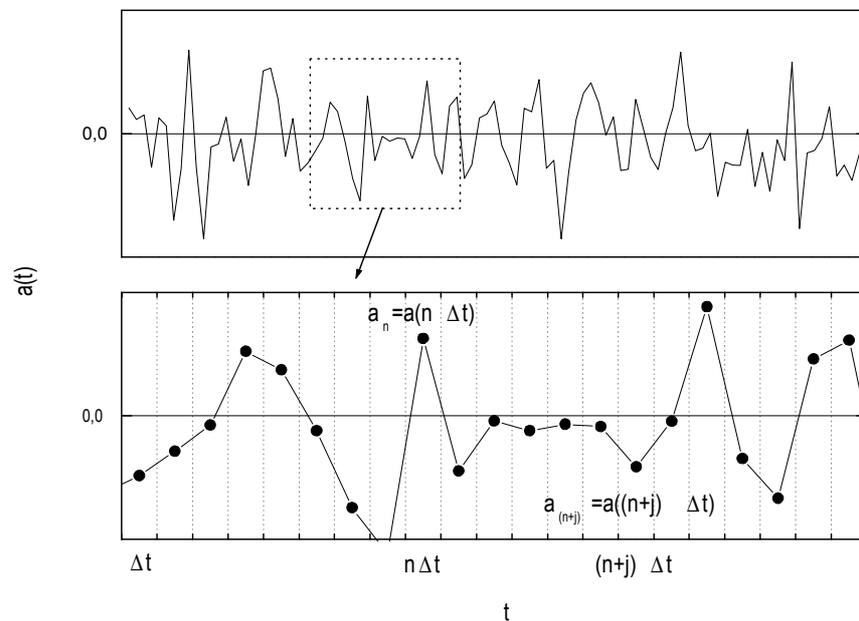


Abb.3.1: Fluktuierende Meßgröße über einem diskreten Raster mit $t = j\Delta t$, $\tau = n\Delta t$,

$$t + \tau = (n + j)\Delta t$$

Für die weitere Betrachtung werden stationäre Schwankungsprozesse vorausgesetzt, deren Mittelwert bereits abgezogen wurde

$$a(t) = A(t) - \langle A \rangle . \quad (3.9)$$

Somit ist natürlich $\langle a \rangle = 0$. In Abb.(3.1) wird eine fluktuierende Meßgröße über einem diskreten Raster mit dem konstanten Zeitinkrement Δt dargestellt.

Eine für die fluktuierende Meßgröße $a(t)$ charakteristische Funktion ist die Autokorrelationsfunktion $\langle a(0) a(\tau) \rangle$. Das ist eine Mittelung über alle mittleren Schwankungsregressionen, wobei jede noch zusätzlich mit ihrem Anfangswert multipliziert wird, um zu gewährleisten, daß der Mittelwert für $\tau = 0$ nicht Null ergibt. Die Autokorrelationsfunktion ist definiert wie folgt:

$$\langle a(0) a(\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T a(t) a(t + \tau) dt \quad . \quad (3.10)$$

Diese Autokorrelationsfunktion sagt aus, inwieweit die fluktuierende Meßgröße zur Zeit $t + \tau$ von ihrem Wert zur Zeit t abhängt. Sie hat die Eigenschaft, eine gerade Funktion zu sein. Sie nimmt ihren größten Wert bei $\tau = 0$ an, wenn die Werte $a(t)$ und $a(t + \tau)$ vollkommen korreliert sind. Mit zunehmendem τ wird der Anteil von negativen Produkten dieser beiden Werte immer größer, d.h. $\langle a(0) a(\tau) \rangle$ sinkt. Für $\tau \rightarrow \infty$ sind $a(t)$ und $a(t + \tau)$ unkorreliert, das Integral nimmt seinen minimalsten Wert an.

Falls die fluktuierende Meßgröße komplexwertig ist, wird einer der Faktoren konjugiert komplex genommen:

$$\langle a^*(0) a(\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T a^*(t) a(t + \tau) dt \quad . \quad (3.11)$$

Dies garantiert, daß wenigstens der Anfangswert reell ist.

Es ist auch möglich, zwei verschiedene fluktuierende Meßgrößen miteinander zu korrelieren, folglich nennt man diese Kreuzkorrelation.

Besteht die Meßgröße nicht nur aus einem stochastischem Prozess, sondern ist überlagert von einem periodischen Signal, so äußert sich das Verhalten in der folgenden Form (Abb.(3.2)):

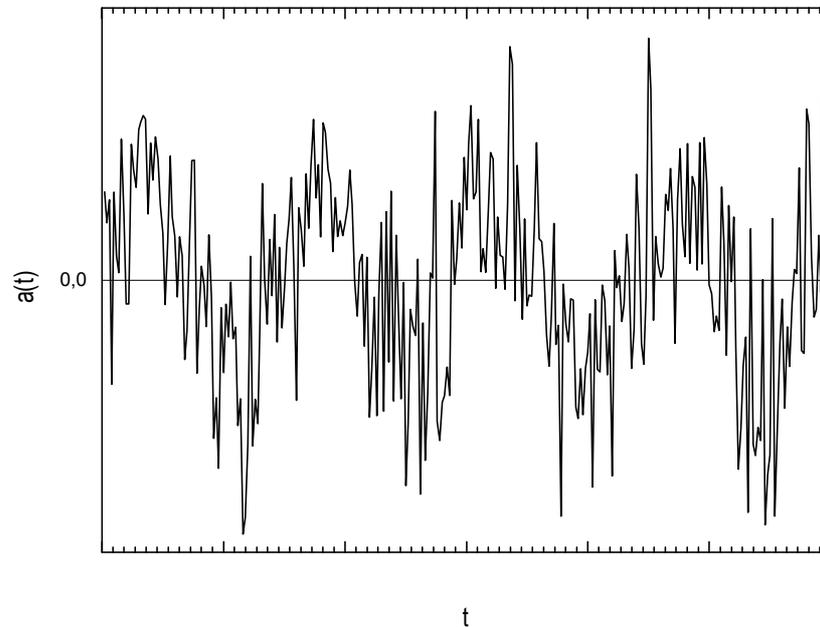


Abb.3.2: Fluktuierende Meßgröße mit periodischem Anteil

Mit dem soeben beschriebenen Verhalten einer stochastisch schwankenden Meßgröße wird nun auf die apparative Erfassung solcher Meßgrößen eingegangen. In den folgenden zwei Abschnitten werden die verwendeten Meßverfahren in ihrer prinzipiellen Funktionsweise erläutert, die die Phänomäne der dynamischen bzw. der elektrophoretischen Lichtstreuung praktisch umsetzen.

Die dynamische Lichtstreuung spielt eine Rolle in der Klein-Goniometer-Apparatur und in der Hängender-Tropfen-Apparatur. Dagegen kommt die elektrophoretische Lichtstreuung in der Laser-Doppler-Elektrophorese-Apparatur zur Anwendung.

3.1.2 Dynamische Lichtstreuung

In der Abb.(3.3) ist das Meßprinzip schematisch dargestellt.

Das Laserlicht wird direkt in das Streumedium fokussiert, wobei sich die Suspensionen in einer Küvette befinden oder als hängende Tropfen anbieten. Das gestreute Licht wird

unter einem bestimmten Winkel zwischen 0° und 180° mittels einer fokussierten Optik, die relativ zum Laserstrahl das Streuvolumen bestimmt, detektiert. In der Abb.(3.4) wird das definierte Streuvolumen dargestellt, das sich mit der Gaußstrahlcharakteristik in Abhängigkeit der optischen Komponenten in guter Näherung berechnen läßt [83].

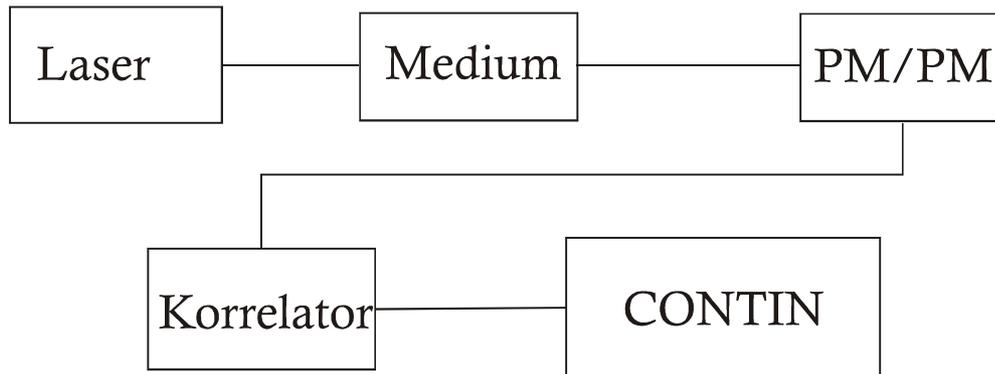


Abb.3.3: Prinzipskizze des DLS-Meßverfahrens

Über eine Glasfaser wird das Streulicht wahlweise über einen Faserkoppler zu einem oder zwei Photomultipliern geleitet. Die verstärkten TTL-Signale werden nun von einem digitalen Korrelator eingelesen, der in Realzeit die Korrelationsfunktion aus dem detektierten Streulicht berechnet. Der qualitative Verlauf des gemessenen Streulichtes ist in der Abb.(3.1) dargestellt.

Die Korrelationsfunktion beschreibt die Intensitätsähnlichkeit des detektierten Streulichts in Relation zu der Korrelationszeit τ . Die digitale Ermittlung der Korrelationsfunktion basiert darauf, daß die jeweils eingehenden Impulse während eines konstanten Zeitinkrements, bis hinunter zu $\Delta t = 10ns$, eingelesen, diese in einem nicht-linearen Verfahren hochaddiert und die jeweiligen zu einem bestimmten Zeitpunkt (sampling time τ) gespeicherten Impulse miteinander korreliert, d.h. multipliziert werden.

Dieses Verfahren ist als Multiple-Tau-Digitalkorrelation bekannt, welches die Korrelationsfunktion über mehrere Blöcke jeweils gleicher aber größer werdender Kanalzeiten erfaßt [84]-[86]. Der gravierende Vorteil zu einem linearen Korrelator, der die Korrelationsfunktion über einen Zeitbereich konstanter Kanalzeiten darstellt, ist die Reduzierung der Datenmenge. Der Unterschied der Kanalzahl liegt in der Größenordnung von 10^8 ! Für einen einfachen Relaxationsprozess ist die Korrelationsfunktion in Abb.(2.8) aufgezeigt.

In Abhängigkeit der verwendeten Eingänge wird die Auto- bzw. die Kreuzkorrelation gebildet. Liegt nur dasselbe Streulicht vor, wird auch von der Pseudo-Kreuzkorrelation gesprochen. Dieser technische Trick beseitigt unerwünschte Nebeneffekte, wie das sog. Afterpulsing und Totzeiteffekte.

Bei nur kleinen Zählraten der Photomultiplier wird durch zusätzliche künstliche Impulse die Korrelationsfunktion verfälscht, was sich bei schnellen Relaxationsprozessen erheblich einwirkt. Aufgrund der Verwendung von zwei Photomultipliern, die dasselbe Streulicht detektieren, können unkorrelierte Signale herausgefiltert werden.

Zur Auswertung der Korrelationsfunktionen können verschiedene Verfahren benutzt werden. In dieser Arbeit wurden die gemessenen Daten stets mit dem Softwareprogramm CONTIN analysiert, welches die inverse Laplace-Transformation anwendet. Im Anhang dieser Arbeit wird die inverse Laplace-Transformation näher erläutert [87].

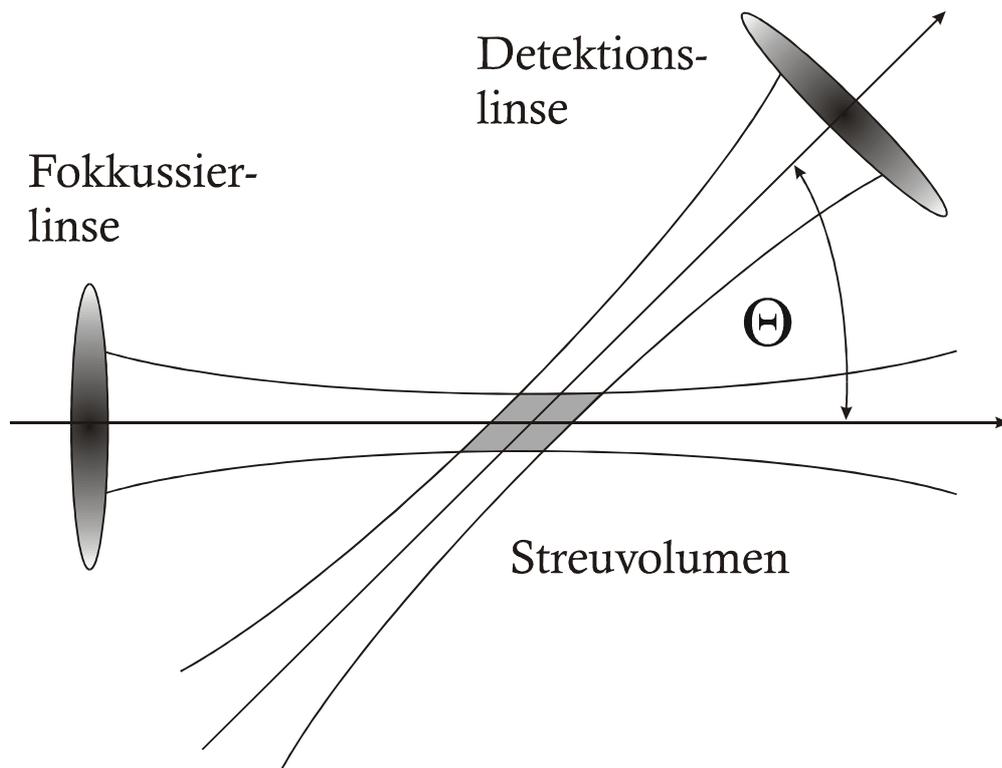


Abb.3.4: Detektionsvolumen erzeugt durch den Strahlenschnitt

Diese Software liefert eine Diffusionskoeffizienten-Verteilung der entsprechenden Relaxationsprozesse und eine relative Intensitätsangabe, da die Korrelationsfunktion direkt mit

der gemessenen Gesamtintensität normiert wird. Aus diesen Angaben lassen sich nun mit den physikalischen Zusammenhängen z.B. die Radienverteilung der Teilchen in der Suspension angeben.

3.1.3 Elektrophoretische Lichtstreuung

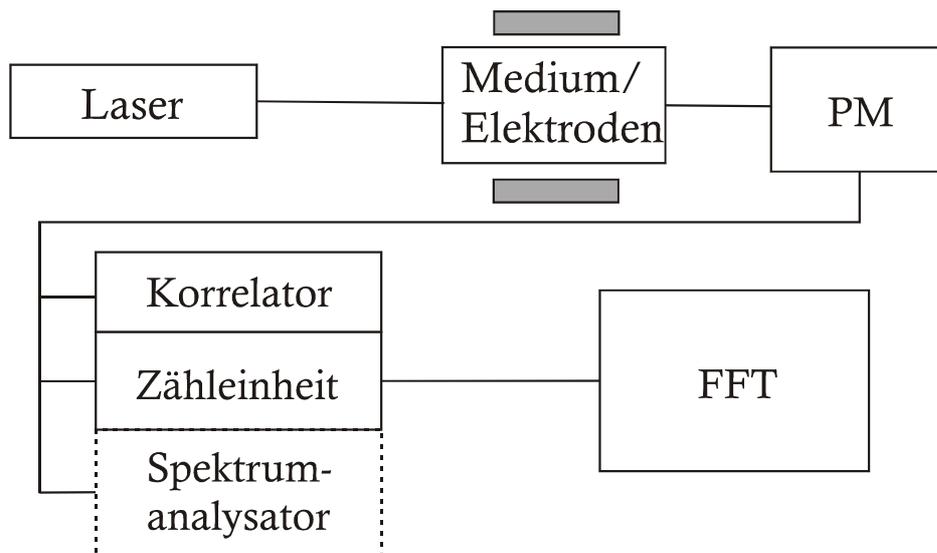


Abb.3.5: Prinzipskizze des ELS-Meßverfahrens

Bei diesem Prinzip in Abb.(3.5) wird der von einem Laser erzeugte Strahl durch einen Strahlteiler in zwei 50/50 Strahlen aufgeteilt, die durch eine Linse in der Meßzelle zum Schnitt gebracht werden. Zwei Elektroden werden mit einem festgelegten Abstand direkt in die Küvette gesetzt, wodurch ein elektrisches Feld in Richtung der Flächennormalen in der Ebene der Teilstrahlen erzeugt wird.

Die Detektionsoptik wird in diesen Kreuzungsbereich hineinfokussiert, womit das Streulicht der passierenden Partikel erfaßt wird. Das in Vorwärtsrichtung von wandernden Partikeln beim Passieren des Schnittvolumens gestreute Licht wird von einem Photomultiplier detektiert.

Das mit dem Photomultiplier (PM) gemessene Intensitätssignal wird per digitaler Zählleinheit (Counter) während eines konstanten Zeitinkrements $\Delta t = 1ms$ eingelesen. Das gesamte gespeicherte Meßsignal liegt somit über einem festen Zeitraster diskretisiert vor. Besteht das detektierte Signal aus einem Relaxations- und Konvektionsprozess, so führt

das wie in Abb.(3.2) zu dem qualitativen Verlauf. Anschließend wird mit der Fast-Fourier-Transformation (FFT) das Frequenzspektrum des gestreuten Lichtes berechnet [88].

Die Fast-Fourier-Transformation basiert auf der diskreten (digitalen) Umsetzung der Darstellung eines fluktuierenden Signales mit Hilfe der Fourier-Reihen. Die Zusammenhänge in integraler Form wurden in den Formeln (2.63) bis (2.67) diskutiert [89].

Zu erwähnen ist die Beachtung des Shannonschen Abtasttheorems, das die Nyquistfrequenz und das Aliasing berücksichtigt. Dies bezieht sich darauf, daß die Abtastfrequenz, mit der z.B. der Zähler die Impulse einliest, mindestens halb so groß sein muß wie die höchste in dem Meßsignal vorkommende Frequenz. Da die elektrophoretischen Signale im Bereich bis 100Hz liegen, ist diese Relation gegeben.

Dieser Aufbau wäre mit einem Spektrumanalysator auch in Realzeit möglich. Parallel dazu wird ein Korrelator zur Erstellung einer Korrelationsfunktion ausgewertet, der jedoch nur zu Justierzwecken eingesetzt wird.

Für den obigen Prozess ist die zugehörige Korrelationsfunktion in Abb.(2.9) und das Spektrum in Abb.(2.10) dargestellt [90],[91]. Aufgrund des Dopplereffektes ist die Frequenz des gestreuten Lichtes verschieden von der Frequenz des ursprünglichen Laserstrahles. Die Größe dieser Frequenzverschiebung ist abhängig von der Partikelgeschwindigkeit, so daß aus der gemessenen Frequenzverschiebung die Partikelgeschwindigkeit berechnet werden kann. Über physikalische Zusammenhänge läßt sich nun die elektrophoretische Beweglichkeit der Teilchen ermitteln.

Das eigentliche Meßvolumen ist das Schnittvolumen der beiden Laserstrahlen mit dem abgebildeten Bereich der Detektionsoptik. Der Schnittwinkel der beiden Laserstrahlen ist Θ . Durch die örtliche Überlagerung der beiden Laserstrahlen im Schnittvolumen erhält man konstruktive und destruktive Interferenz der beiden Lichtwellen. Es bildet sich ein Interferenzmuster in Form von Interferenzstreifen, die einen Abstand $\Lambda \approx 2\mu\text{m}$ in Abhängigkeit des Schnittwinkels Θ und der Laserwellenlänge λ haben:

$$\Lambda = \frac{\lambda}{2n \sin(\Theta/2)} \quad (3.12)$$

mit dem Brechungsindex n des Streumediums.

Die hindurchwandernden Partikel erzeugen somit ein Streulicht, das einen periodischen Anteil hat. Abb.(3.6) zeigt das Interferenzstreifenmuster im Schnittvolumen zwischen den Elektroden.

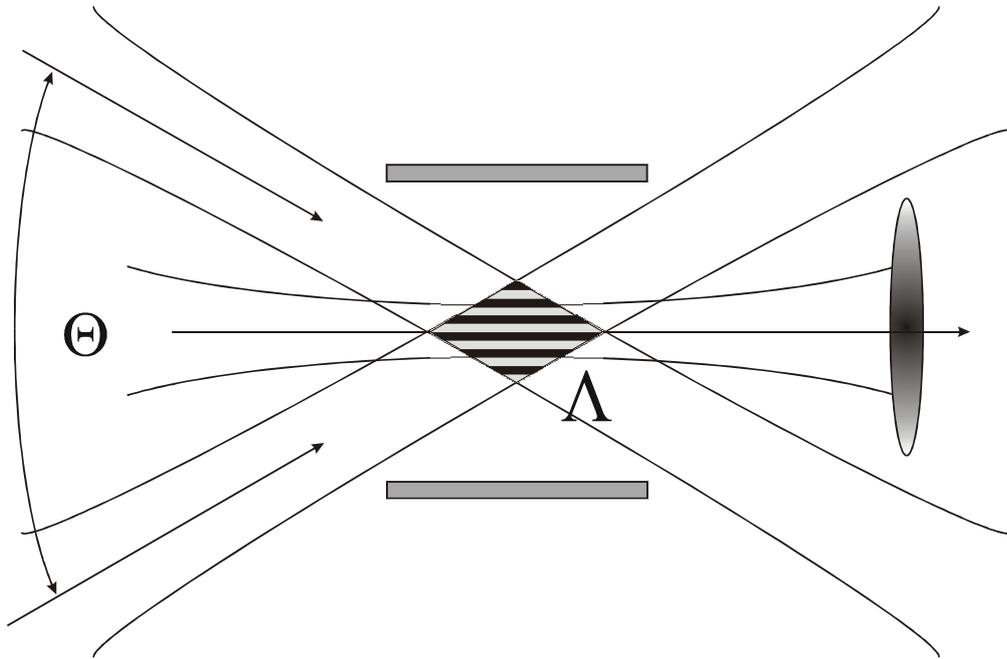


Abb.3.6: Strahlengang zur Verdeutlichung der Interferenzstreifen innerhalb des Streuvolumens

3.2 Materialien

Alle verwendeten Materialien in dieser Arbeit waren von analytischer Reinheit. Das für die Lösungen dienende Wasser wurde dreifach deionisiert, filtriert und durch eine Millipore - Q Apparatur aufbereitet.

Im wesentlichen wurde das Protein Lysozym in den verschiedenen Experimenten studiert [92],[93], und bei den Aggregationsmessungen wurde auch das Protein Concanavalin A untersucht. Beide Proteine gehören zu den am besten studierten Proteinen und sind in relativ großen Mengen verfügbar, sie wurden von dem Hersteller Sigma bezogen.

Zur weiteren Aufreinigung und Befreiung von gebundenen Salzen wurden jeweils Lysozym und Concanavalin A gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Messungen der Radien von beiden Proteinen unter Nichtaggregationsbedingungen mit dynamischer Lichtstreuung ergaben eine homogene, monodisperse Verteilung.

Bis auf Partikel mit einem Radius größer als 105nm wurden sämtliche Lösungen direkt

vor der Messung durch sterile Sartorius Minisart Filtrationsvorsätze mit einem Porendurchmesser von $0,2\mu m$ filtriert.

Die verwendeten Puffer waren 100 mM Na-Acetat mit einem pH-Wert von 4,26 und 50mM Phosphat mit pH 7,0.

3.2.1 Testpartikel

Zu Testzwecken wurden im wesentlichen Latexpartikel von der Firma Serva geliefert. Latexpartikel mit den nominellen Radien von $65nm$, $105nm$, $273,5nm$, $449,5nm$, $476nm$ und $1478nm$ wurden verwendet und Suspensionen mit verschiedenen Konzentrationen aus jeweils einer Stammlösung mit dreifach destilliertem Wasser hergestellt. Die Latexpartikel bestehen aus dem Material Silikon mit denselben Ionengruppen auf der Oberfläche.

Zur Justierung bzw. Kalibrierung wurde das Standardmaterial der Firma Malvern verwendet. Hierbei handelt es sich um in Wasser gelöste Polymere, die nach dynamische Lichtstreuungsmessungen einen Radius von $R_h = 100 \pm 5,4 nm$ haben. Diese Suspension wurde von Malvern mit einem Zetapotential von $\zeta = -50 \pm 5 mV$ angegeben.

3.2.2 Lysozym

Das Protein Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von $M = 14,32 kDa$. Das spezifische Volumen liegt bei $v = 0,703 ml/g$. Dieses Molekül ist von globulärer Form mit einer Größe von $4,5 \times 3,0 \times 3,0 nm$ und einem hydrodynamischen Radius $R_h = 1,98 nm$. Der entsprechende Diffusionskoeffizient ist $D_0 = 11,3 \cdot 10^{-7} cm^2/s$ [94],[5].

In der Tabelle (3.13) sind die wichtigsten Daten aufgelistet:

$$\begin{aligned}
 D_0 &= 11,3 \cdot 10^{-7} cm^2/s \\
 v &= 0,703 ml/g \\
 M &= 14,32 kDa \\
 R_h &= 1,95 nm \\
 Dim. &= 4,5 \times 3,0 \times 3,0 nm \quad .
 \end{aligned}
 \tag{3.13}$$

3.2.3 Concanavalin A

Dagegen besteht das Protein Concanavalin A aus 237 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von $M = 25,63 \text{ kDa}$. Das spezifische Volumen liegt bei $v = 0,732 \text{ ml/g}$. Dieses Molekül ist auch von globulärer Form mit einer Größe von $4,2 \times 4,0 \times 3,9 \text{ nm}$. Es hat einen hydrodynamischen Radius $R_h = 2,95 \text{ nm}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D_0 = 7,58 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ [95],[5].

In der Tabelle (3.14) sind die wichtigsten Daten aufgelistet:

$$\begin{aligned}
 D_0 &= 7,58 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} \\
 v &= 0,732 \text{ ml/g} \\
 M &= 25,63 \text{ kDa} \\
 R_h &= 2,95 \text{ nm} \\
 Dim. &= 4,2 \times 4,0 \times 3,9 \text{ nm} \quad .
 \end{aligned}
 \tag{3.14}$$

3.2.4 Elektrolyte

Die Ausfällungssalze wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Die Elektrolyte Natriumthiocyanat (NaSCN), -nitrat (NaNO_3), -chlorid (NaCl), -sulfat (Na_2SO_4), -citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) und Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden in den Messungen unterschiedlich verwendet.

Für die notwendigen Salzlösungen wurden der Na-Acetat-Puffer (100mM, pH 4,26) und der Phosphat-Puffer (50mM, pH 7,0) verwendet und zunächst Stammlösungen angesetzt. Die entsprechenden Meßkonzentrationen wurden durch weitere Verdünnung hergestellt.

Bei allen Aggregationsansätzen wurden die Protein- sowie Salzlösungen jeweils bezogen auf die Endkonzentration in doppelter Konzentration im Verhältnis 1:1 gemischt. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3 Apparative Aufbauten

3.3.1 Klein-Goniometer-Apparatur

Das in dieser Apparatur, siehe Abb.(3.7), umgesetzte Meßverfahren entspricht der sogenannten homodyne scattering technique. Sie ermöglicht mittels der dynamischen Licht-

streuung in verschiedenen Streugeometrien die Bestimmung der Partikelgröße über die Diffusionsmessung.

Der gesamte Meßaufbau ist zur Schwingungsisolierung auf einem Leicht-Breadboard montiert. Diese Platte von $24kg$ hat die Ausmaße $60 * 90cm^2$ und eine Dicke von $50mm$. Im Abstand von $25mm$ ist die Oberfläche mit einem Raster aus $M6$ Gewindebohrungen ausgestattet.

Ein Nd:YAG Festkörperlaser (ADLAS) wird im cw-Betrieb verwendet. Gemessen wird mit monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von $532nm$ und einer Laserleistung von $100mW$. Der Strahldurchmesser beträgt ca. $0,7mm$.

Der generelle Aufbau besteht aus einem Strahlaufweiter, einem Graufilter, zwei Umlenkspiegeln, einer Fokussierlinse und einem rotierbaren Tisch, auf dem der Probenhalter sowie die Detektionsoptik befestigt sind. Das detektierte Streulicht wird über eine Glasfaser zu einem Photomultiplier (Hamamatsu, H6180-01) geleitet. Über einen Diskriminator und einem Verstärker werden die Photonen in TTL-Impulse umgewandelt und an einen Autokorrelator gekoppelt. Am Ende der optischen Achse wird der Laserstrahl in einer Streufalle verschluckt, um zusätzliches unerwünschtes Streulicht zu vermeiden.

Der Strahlaufweiter, ein sogenannter Expander, besteht aus einem Linsenpaar mit den Brennweiten $f = 3cm$ und $f = 10cm$. Somit wird der Laserstrahl um das Dreifache vergrößert. Diese Maßnahme ist notwendig, um mittels der längerbrennweitigen Fokussierlinse ein kleineres Streuvolumen zu erhalten. Diese Mindest-Brennweite wird durch den Rotationstisch festgelegt, welcher einen Kreisradius von $30cm$ hat.

Um die Lichtstreuintensität variieren zu können, ist nach dem Expander ein Graukeil mit einem Transmissionsbereich von 1% bis 80% in den Strahlengang eingesetzt. Nachfolgend wird der Laserstrahl über zwei Umlenkspiegel um 180° weitergeführt und durch eine $f = 20cm$ brennweitige Linse auf ca. $40\mu m$ fokussiert.

Dieser Streudurchmesser läßt sich z.B durch eine längerbrennweitige Linse vergrößern.

Alle nun folgenden Bauteile befinden sich auf dem Rotationstisch, welcher um 360° drehbar ist. Einstellbare Meßwinkel sind 15° , 30° bis 150° sowie 165° . Aufgrund der verwendeten Optikhalter sind die Vorwärts- bzw. Rückwärtsstreugeometrien in ihren Gradeinstellungen eingeschränkt. Die Messungen wurden bei einem Winkel von 32° durchgeführt.

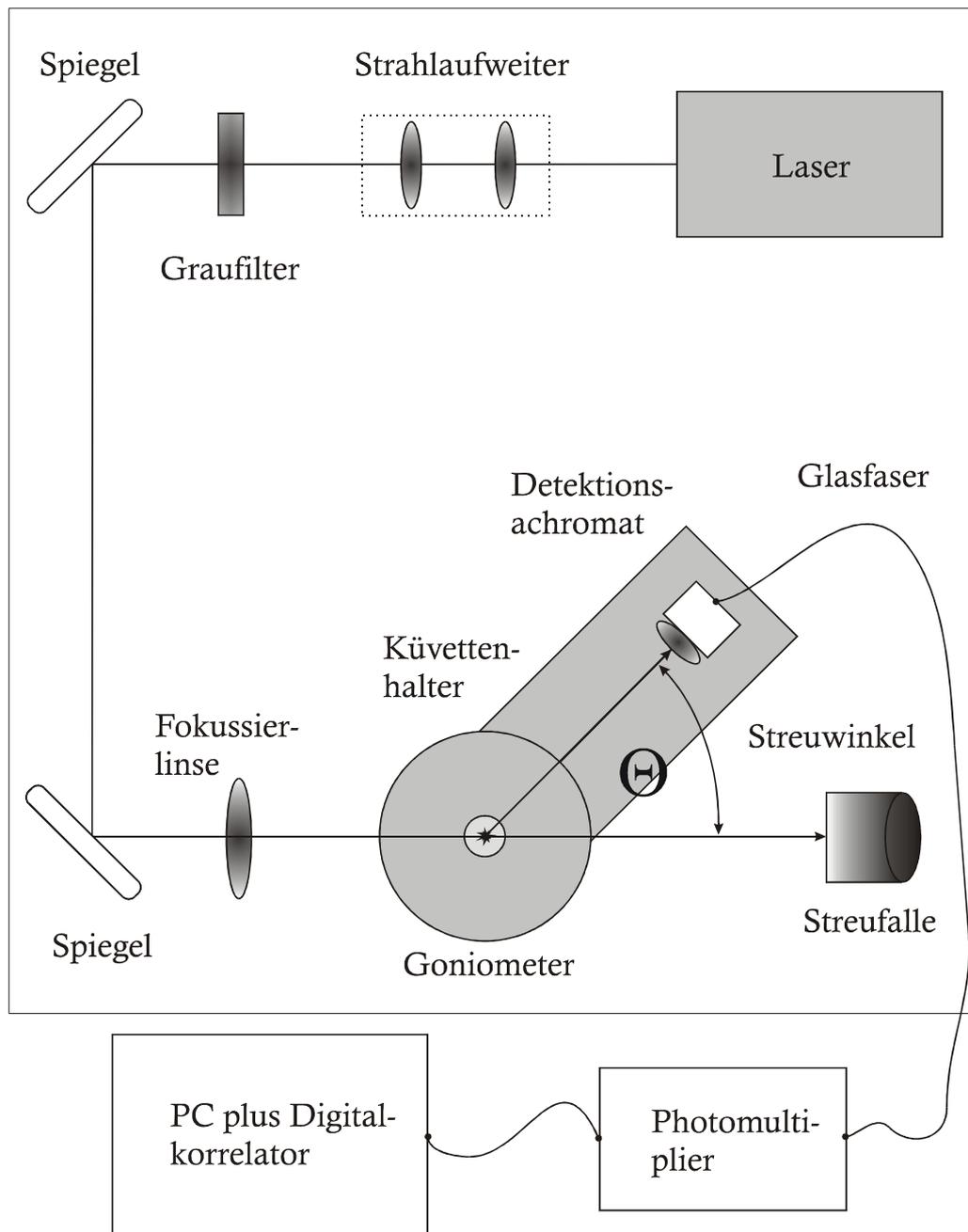


Abb.3.7: Klein-Goniometer-Aufbau

Der Probenhalter direkt über der Drehachse faßt zylindrische Glasküvetten mit einem Innendurchmesser von 6mm und einer Höhe von 40mm . Das maximal meßbare Volumen beträgt 1ml , doch kann bis hinunter zu $50\mu\text{l}$ gemessen werden.

Desweiteren befinden sich Irisblenden auf diesem Tisch, welche zur Justierung der Detektionsoptik und zur Reduzierung von parasitärem Streulicht benötigt werden.

Die Detektionsoptik besteht aus einem Achromaten mit einem Durchmesser von 5mm und einer Brennweite von 10mm . Diese Linse bildet den Streuquerschnitt auf den Glasfasereingang mit einer numerischen Apertur von $NA = 0.1$ ab. Die singlemode Glasfaser führt die $488/514\text{nm}$ Wellenlänge im TEM_{00} -Mode, was einen Kerndurchmesser von $3\mu\text{m}$ erfordert. Diese Bedingungen erhalten die Kohärenz der Detektion [96]-[105].

Um nun den vollen Streuquerschnitt von $40\mu\text{m}$ zu detektieren, muß die Sammellinse in einem Abstand von mindestens 150mm positioniert werden. Für einen variablen Streuquerschnitt ist der Abstand der Sammellinse von 100mm bis 250mm veränderbar, wodurch der große Kreisdurchmesser des Rotationstisches resultiert.

Zur Zeit werden Autokorrelationskarten ALV/5000E der Firma ALV eingesetzt, welche sogar nur einzelne Photonen zählen können. Je kleiner die Kanalöffnungszeiten sind, desto schnellere bzw. kleinere Relaxationszeiten sind meßbar, d.h. kleinere Partikel.

3.3.2 Hängender-Tropfen-Apparatur

Bei der Dampfdiffusionsmethode enthält die Proteinlösung (Tropfen) Salz als Fällungsmittel, dessen Anteil unterhalb der zur Ausfällung nötigen Konzentration liegt. Der Tropfen wird mit einem großen Volumen einer an dem Fällungsmittel höher konzentrierten Reservoirlösung in ein geschlossenes System gebracht. Durch Dampfdiffusion stellt sich ein Gleichgewicht her, bei dem das Lösungsmittel aus der Proteinlösung diffundiert und somit die Proteinlösung aufkonzentriert und sich schließlich der Phasenübergang einstellt. Praktische Durchführungsmöglichkeiten sind die "hanging drop" und die "sitting drop" Methode, wobei hier die zuerst genannte Methode mit Tropfenvolumina von $10\mu\text{l}$ zum Einsatz kommt.

Der Aufbau besteht aus zwei Aluminium-Säulen, die sich auf einem $60\text{cm} * 90\text{cm}$ Breadboard zur besseren Schwingungsisolierung befinden, Abb.(3.8). An diesen Säulen sind jeweils die Sende- und Empfangsoptiken (Achromaten) befestigt, an denen Verschraubungen zur Verbindung von Glasfasern bestehen. Die Achromaten haben eine Fokuslänge von 10mm , einen Durchmesser von 5mm und sind auf einen Arbeitsabstand von 130mm eingestellt.

Zwischen diesen befindet sich ein kleiner Tisch zur Aufnahme der sog. Linbro-Platten, welcher in allen drei Richtungen justierbar ist. Als monochromatische und kohärente Lichtquelle dient ein $20mW$ He-Ne Laser (Uniphase), an dem eine polarisationserhaltende "single-mode" Faser mit einem Kerndurchmesser von $4\mu m$ angekoppelt ist. Diese Faser transmittiert nur die TEM_{00} Mode, die ein Gauß'sches Intensitätsprofil aufweist. Die Wellenlänge des Laserlichtes ist $\lambda = 632,8nm$.

Das gestreute Licht wird unter einem Winkel von 140° gesammelt und durch eine weitere "single-mode" Faser mit Hilfe eines Faserkopplers zu gleichen Teilen zu zwei Photomultipliern (Hamamatsu H7155-01) geleitet. Diese Faser dient gleichzeitig als Raumfilter und gewährleistet eine kohärente Detektion. Durch die zwei detektierten Signale läßt sich eine Pseudo-Kreuzkorrelation durchführen, um die "after-pulsing" Effekte herauszukorrelieren. Dies gelingt, indem die beiden Signale, verstärkt und digitalisiert, in einen ALV/5000E digitalen Korrelator geschickt werden.

Die Meßdauer für kontrastreiche Korrelationsfunktionen beträgt zwischen $30s$ und $60s$. Durch die gewählten Fokussierabstände der Optiken zum hängenden Tropfen in der Linbro Platte läßt sich ein Strahldurchmesser von $50\mu m$ einstellen, entsprechend einem Streuvolumen von $10^5\mu m^3$ ($0,1nl$). Diese Parameter lassen sich ohne weiteres variieren.

Zur Justierung des Aufbaus wird anstelle des Photomultipliers eine kleine Diode an die Faser angeschlossen, mit der dann das Streuvolumen in guter erster Näherung durch das Kreuzen der beiden Laserstrahlen bestimmt wird. Präziseres Justieren wird danach an einem gut streuenden Tropfen, z.B. bestehend aus einer Latexsuspension, über die Zählrate und den Kontrast der Korrelationsfunktion durchgeführt.

Die Suspensionen wurden auf Plastik-Plättchen pipettiert und umgedreht auf die Linbro-Platten mit Vakuumpfett zur Abdichtung gedrückt. Je nach Art des Experiments sind die Linbro-Platten mit Lösung gefüllt oder bleiben leer.

Für die Aggregationsexperimente sind die Protein- und Elektrolytlösungen im selben Puffer als Stammlösung gelöst und separat durch sterile Filter (Minisart $220nm$) filtriert worden. Unmittelbar vor der Messung wurden die beiden Komponenten auf dem Plastik-Plättchen gemischt.

Für die stationären Messungen wurde der Mittelwert aus einer Meßreihe von zehn Messungen mit einer Dauer von jeweils $30s$ gebildet. Bei den Aggregationsmessungen wurden die

einzelnen Korrelationsfunktionen über 30s bis 60s aufgenommen, je nach Signalintensität, und über etliche Stunden bis Tage gespeichert.

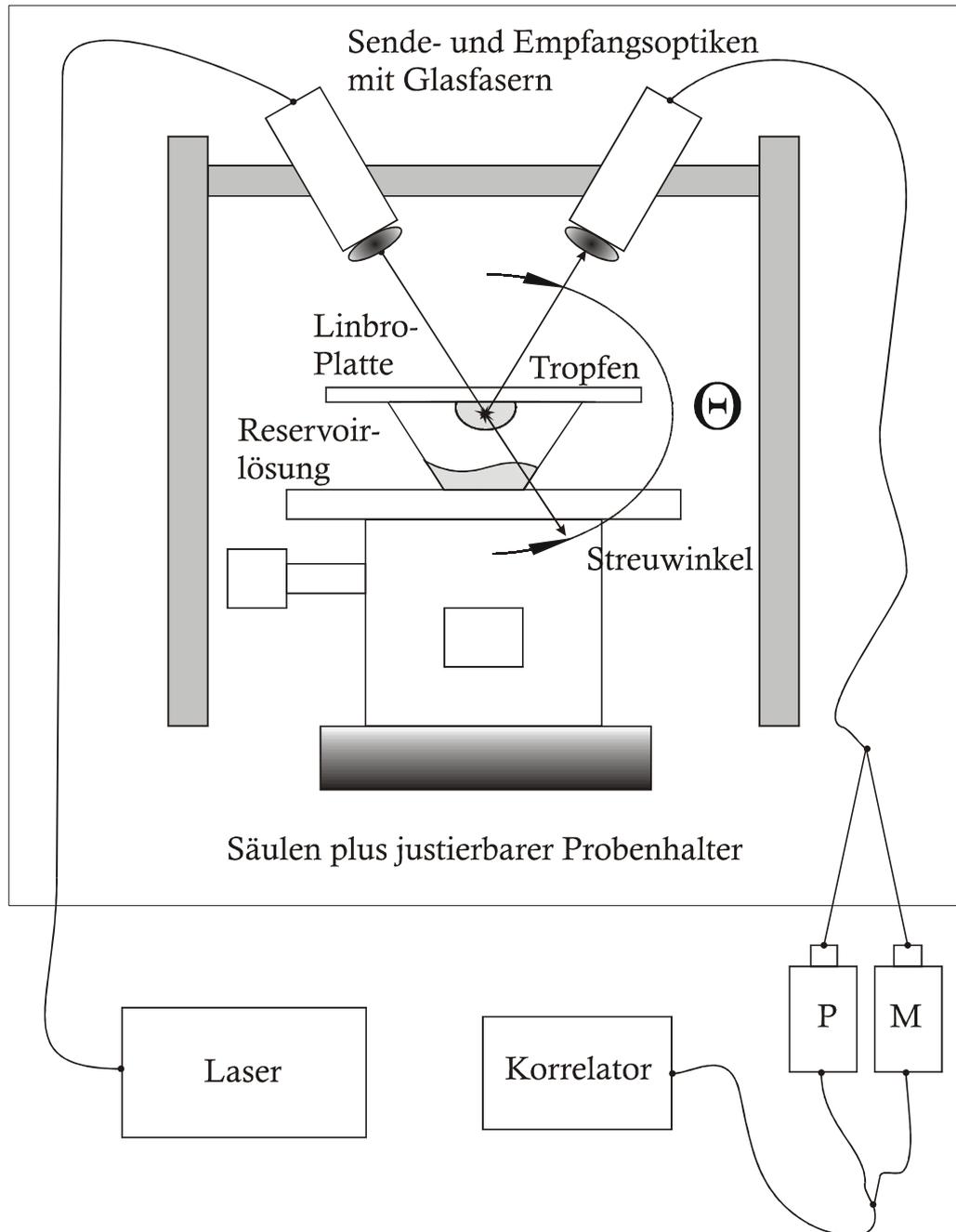


Abb.3.8: Hängender-Tropfen-Aufbau

3.3.3 Laser-Doppler-Elektrophorese-Apparatur

Der gesamte Meßaufbau, siehe Abb.(3.9), ist auch in diesem Fall zur Schwingungsisolierung auf einem Leicht-Breadboard montiert. Diese Platte von $24kg$ hat die Ausmaße $60*90cm^2$ und eine Dicke von $50mm$. Im Abstand von $25mm$ ist die Oberfläche mit einem Raster aus $M6$ Gewindebohrungen ausgestattet.

Der von einem Helium-Neon-Laser (Uniphase) erzeugte Strahl wird durch einen Strahlteiler in zwei $50/50$ Strahlen aufgeteilt. Gemessen wird mit monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von $632,8nm$ und einer Laserleistung von $20mW$. Der Strahldurchmesser beträgt ca. $0.7mm$. Die beiden Strahlen werden durch eine plankonvexe Linse (Newport, BK7, $\varnothing = 50.8mm, f = 63mm$) in der Meßzelle zum Schnitt gebracht. Hierfür dienen Umlenkspiegel, die die beiden Strahlen im selben Abstand vom Linsenmittelpunkt führen.

Das gestreute Licht wird in Vorwärtsrichtung detektiert. Das Meßvolumen wird durch die Detektionsoptik mit dem verwendeten Achromaten (Linos, $f = 10mm, \varnothing = 5mm$) festgelegt. Das gemessene Streulicht wird nun über eine "single-mode" Glasfaser direkt zum Photomultiplier (Hamamatsu H6180-01) geführt. Diese Faser ist für das rote Licht ausgelegt und führt dementsprechend nur die TEM_{00} -Mode des gesammelten Streulichtes.

Das verstärkte Signal, welches in TTL-Impulse umgewandelt ist, wird nun jeweils zu einem Hardware-Korrelator (J. Zhu) und einem Zähler (Counter, National-Instruments) geführt. Beide Geräte werden über eigene Programme gesteuert. Die Hauptmessungen werden mit der Zählereinheit durchgeführt; von den gespeicherten Daten wird anschließend mit der Fast-Fourier-Transformation (FFT) das Frequenzspektrum berechnet.

Die Steuerung der Messung wird von einem selbst geschriebenen Programm übernommen, das über einen digitalen Schalter den Stromkreis eines bipolaren Hochspannungsverstärkers ($+/- 220V$) mit den Elektroden schließt und nach einer bestimmten Meßzeit wieder öffnet. Weiterhin wird durch einen Funktionsgenerator eine Rechteckspannung an den Verstärker gelegt, der wiederum während der Messung ein periodisches elektrisches Feld innerhalb der Elektroden erzeugt. Die Triggerung läuft mit derselben Frequenz und startet eine Messung bei einer positiven Flanke. Über ein Oszilloskop wird der ganze Ablauf kontrolliert.

Der Korrelator wird mit einem anderen eigenen Programm über die USB-Schnittstelle gesteuert, und es werden dieselben Daten eingelesen. Die Meßzeit eines Daten-Arrays

und dementsprechend eines Frequenzspektrums lag bei allen Messungen bei 0,5s. In Abhängigkeit des Elektrolytgehaltes wurde eine entsprechende Anzahl zwischen 10 und 20 Spektren gemittelt.

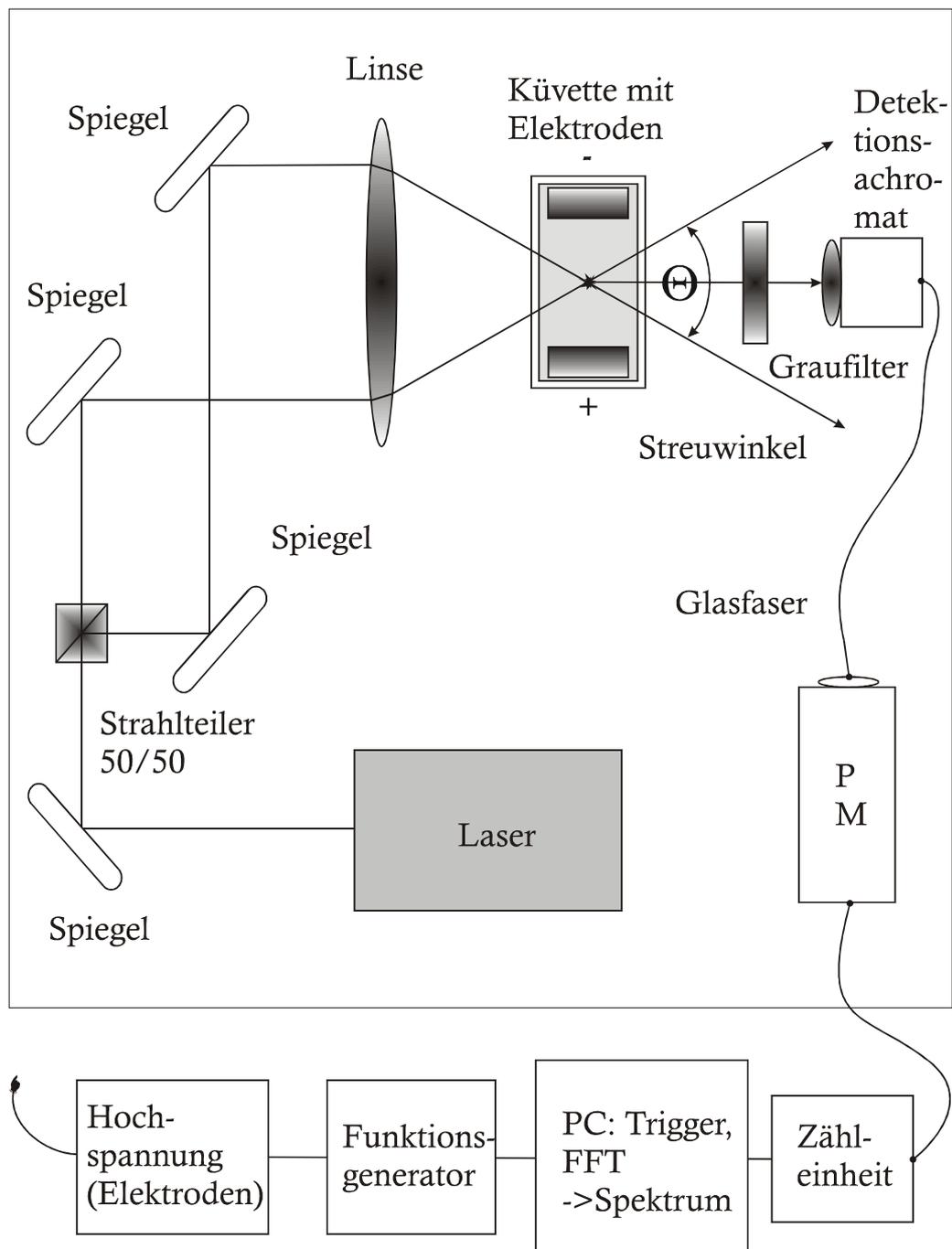


Abb.3.9: Laser-Doppler-Elektrophorese-Aufbau

Die Elektroden tauchen komplett in die Meßzelle ein, sodaß das elektrische Feld nicht im Bereich der Zellwände liegt. Diese Elektrodenanordnung (Brookhaven Instruments, USA) wurde so konzipiert, daß eine Elektrosmose und die damit verbundene Gegenströmung nahe der Zellenwände nicht stattfindet. Die Meßzelle besteht aus 2 Goldelektroden und ist aus Acryl gefertigt. Das hier umgesetzte Meßprinzip wurde bereits in den siebziger Jahren von Uzgiris beschrieben [106].

Durch die vertikale Anordnung der Elektroden wird die Geschwindigkeitskomponente der Partikel in der horizontalen Ebene bestimmt. Die Teilchenbewegung wird aufgrund von Konvektionsströmen, die sich hier primär vertikal ausbilden, nicht beeinflusst. Ursache dieser Konvektionsströme ist die Joule'sche Aufheizung des Dispersionsmediums zwischen den Elektroden. Für die Mitte des Elektrodenraumes ergibt sich die nach folgender Gleichung zu berechnende Temperaturerhöhung:

$$\Delta T = \frac{0.24 \cdot d^2 \cdot E^2}{8 \cdot p \cdot \kappa}$$

mit ΔT Temperaturerhöhung, d Elektrodenabstand, E Elektrische Feldstärke, p elektrischer Widerstand der Lösung und κ Wärmeleitfähigkeit der Lösung.

Um die Joule'sche Aufheizung zu minimieren und die sich bei zu starker Konvektionsströmung ergebenden Turbulenzen zu vermeiden, sollte der Elektrodenabstand so klein wie möglich gehalten werden. Zusätzlich bedingt ein kleiner Elektrodenabstand im Vergleich zur Elektrodenbreite ein homogenes elektrisches Feld. Der Elektrodenabstand war auf genau

$$d = 0,365\text{cm}$$

nachgemessen worden. Da für die Durchführung einiger Messungen sehr hohe Spannungen angelegt wurden, waren sehr kurze Meßzeiten zur Reduzierung der Aufheizung notwendig. Die durchschnittliche Temperaturerhöhung bei elektrolythaltigen Messungen liegt bei $\Delta T = 11,2 \pm 8,7\text{K}$.

Durch Vermeidung der Elektrosmose und der durch sie bedingten notwendigen Einstellung auf die stationäre Schicht wird eine nicht unbeträchtliche Fehlerquelle ausgeschlossen; zusätzlich entfallen sich wiederholende Justierarbeiten. Auch wird die Gefahr ausgeschaltet, daß es im Laufe einer Meßserie zu einer Dejustierung und Messung außerhalb der stationären Schicht kommt.

Aufgrund von Brechungseffekten beim Übergang Luft-Küvettenmaterial bzw. Küvettenmaterial-Suspension und umgekehrt entsteht ein nicht geradliniger Verlauf der Laserstrahlen, der den Detektionswinkel verkleinert. Da der Schnittwinkel der beiden Laserstrahlen Θ ist, ergibt sich für den Detektionswinkel $\Theta/2$. Aufgrund der verwendeten Linse mit der Öffnungszahl 1,2 ergibt sich für den Winkel zwischen den Laserstrahlen in der Küvette

$$\Theta_{Fl} = 12,56^\circ,$$

was einem Streuwinkel von $\frac{\Theta_{Fl}}{2} = 6,28^\circ$ entspricht. Dies resultiert aus dem folgenden Zusammenhang:

$$\Theta_{Fl} = 2 * \sin^{-1}\left(\frac{1}{n} \sin\left(\frac{\tan^{-1}\left(\frac{D}{FL}\right)}{2}\right)\right)$$

mit $D = 19mm$, der Brennweite $FL = 63mm$ und n dem Brechungsindex der Lösung.

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau ist die Grundversion für die Durchführung von elektrophoretischen Messungen. Aus der gemessenen Dopplerfrequenz $\omega(\mathbf{q})$ allein läßt sich in diesem Fall noch nicht das Vorzeichen der Partikelladung Q ermitteln. Bei dem bisher beschriebenen Verfahren ergeben Partikel unabhängig von ihrer Wanderungsgeschwindigkeit zwischen den Elektroden beim Passieren des Laserstrahl-Schnittvolumens eine identische Dopplerfrequenz, wobei gleiche Partikelgeschwindigkeit vorausgesetzt ist.

Die Problemlösung liegt in der Verwendung optischer oder akustischer Modulatoren. Darüber hinaus liegt eine Verbesserung in der Umsetzung der sogenannten Amplitudengewichteten-Phasen-Messung [107],[108]. Für zukünftige Untersuchungen sind diese Erweiterungen eine notwendige Voraussetzung.

Bis hierhin sind die wesentlichen Bestandteile im theoretischen wie auch im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben worden, die für die folgende Darstellung der Meßergebnisse und deren Diskussion benötigt werden.