

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DORTMUND

FORTGESCHRITTENEN PRAKTIKUM FESTKÖRPERPHYSIK

**Optische Pinzette**

Melina Helfrich, melina.helfrich@tu-dortmund.de

Felix Landmeyer, felix.landmeyer@tu-dortmund.de

DURCHFÜHRUNG AM 25./26.06.19

ABGABE AM 07.08.19

KORREKTURABGABE AM 27.08.2019

# 1 Theoretische Grundlagen

## 1.1 Einleitung

Dieser Versuch soll dazu genutzt werden, sich mit der Optischen Pinzette vertraut zu machen. Dafür wird ihr Einfluss auf mikrometer große Proben untersucht. Besonders interessant ist dabei die Untersuchung von lebendigen Zwiebelzellen, an denen die Zellabläufe innerhalb einer Zelle beobachtet werden sollen.

## 1.2 Grundlegendes Prinzip der Optischen Pinzette

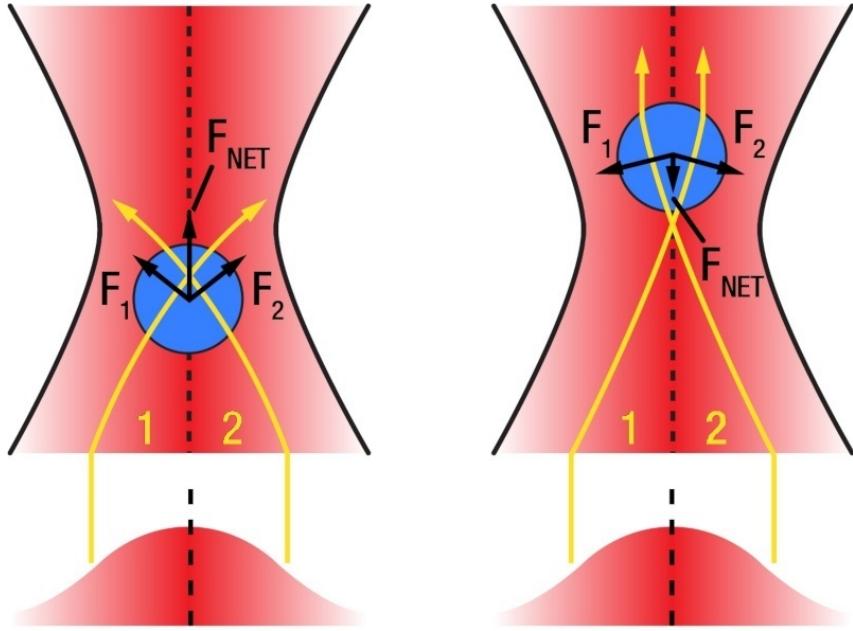
Eine Optische Pinzette wird dafür genutzt, mithilfe eines Lasers Partikel im mikrometer-Bereich zu fixieren oder zu bewegen. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass Photonen einen Impuls tragen und so in der Lage sind eine Kraft auszuüben. Diese Kraft liegt im Bereich von Pikonewton und hat so keinen Einfluss auf makroskopische Teilchen. Wird jedoch beispielsweise nur eine einzelne Zelle betrachtet, ist eine Kraft dieser Größenordnung verhältnismäßig groß.

Bei den, in diesem Versuch untersuchten Teilchen, liegt der Durchmesser der Teilchen in der Größenordnung des verwendeten Lasers. Damit gilt hier die obere Grenze der Mie-Theorie bzw. geometrische Optik. Im Folgenden wird die Funktionsweise der Optischen Pinzette anhand einfacher geometrischer Optik veranschaulicht.

Verwendet wird ein Laser mit einem fokussierten Strahl, der eine gaußförmige Intensitätsverteilung aufweist. Diese beiden Eigenschaften haben einen Einfluss auf die Partikel, die sich im Laserstrahl befinden. Durch die Brechung der Laserstrahlen an dem Objekt erfährt der Laserstrahl eine Impulsveränderung. Aufgrund der Impulserhaltung muss der Partikel diese Veränderung ausgleichen und bewegt sich dementsprechend. Durch die gaußförmige Intensitätsverteilung kommt es dazu, dass in der Mitte dieses Profils eine größere Kraft übertragen wird und Teilchen, die sich im Strahl befinden, in die Mitte gezwungen werden. In Abbildung 1 sind schematisch zwei fokussierte Strahlen mit einem eingefangenen Teilchen und den auftretenden Kräften abgebildet. Unterhalb ist jeweils das gaußförmige Intensitätsprofil des Strahls dargestellt. Im linken Bild befindet sich das Teilchen unterhalb des Fokus. Die gebrochenen Strahlen (gelb) bewirken die Kräfte (schwarz)  $F_1$  und  $F_2$  in entgegengesetzte Richtung. Da sich das Teilchen in der Mitte befindet, sind  $F_1$  und  $F_2$  gleich groß und es entsteht eine Nettokraft  $F_{NET}$ , die das Teilchen in den Fokus treibt.

Auf der rechten Seite ist das Teilchen oberhalb des Fokus. Somit bewirken die gebrochenen Strahlen eine Nettokraft nach unten zum Fokus.

Genauso verhält es sich bei Teilchen, die sich etwas weiter links oder rechts von der Längsachse des Laserstrahls befinden. Befindet sich ein Teilchen weiter links der Längsachse, ist die Intensität nahe der Längsachse größer und somit auch die entgegengesetzte Kraft, welche das Teilchen wieder nach rechts zur Längsachse zieht.



**Abbildung 1:** Strahlengänge und Intensitätsprofil eines fokussierten Lasers. Die gebrochenen Strahlen erzeugen Kräfte, die die Teilchen in der Mitte des Laserstrahls und in den Fokus treiben [1].

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das gaußförmige Intensitätsprofil die Kugel in die Mitte des Laserstrahls lenkt und die Fokussierung für die Bewegung in Richtung Laserfokus verantwortlich ist. Das Zusammenspiel sorgt dann letztendlich dafür, dass die Partikel in der optischen Falle eingefangen werden können.

### Boltzmann-Konstante

Mithilfe einer optischen Pinzette ist es möglich die Boltzmann-Konstante zu bestimmen. Die Boltzmann-Konstante ist Teil der idealen Gasgleichung

$$p \cdot V = n \cdot k_B \cdot T. \quad (1)$$

Im Allgemeinen beschreibt diese Gleichung das Phänomen, dass mikroskopische Teilchen, die in einem Volumen  $V$  eingeschlossen sind zu einem makroskopisch beobachtbaren Druck  $p$  führen können und bringt dieses in Verbindung mit der gesamten kinetischen Energie des Gases. Da es nahezu unmöglich ist, die in einem Gas vorkommenden Teilchen abzuzählen, um die Boltzmann-Konstante zu bestimmen, kann diese auf eine andere Art mit einer optischen Falle bestimmt werden.

Das Gleichverteilungstheorem besagt, dass jedem Freiheitsgrad eine kinetische Energie von  $\frac{1}{2}k_B T$  zuzuordnen ist, solange ein thermisches Gleichgewicht vorliegt. Außerdem besitzt ein Teilchen, dass in einem harmonischen Potential zu finden ist, eine Energie von  $\frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle$ . Durch Gleichsetzen ergibt sich somit

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle. \quad (2)$$

Ist die Fallensteifigkeit  $k$  der optischen Falle bekannt, kann so die Boltzmann-Konstante bestimmt werden. Umgekehrt funktioniert dies genauso.

### Brownsche Molekularbewegung und Fallensteifigkeit

Als Brownsche Molekularbewegung wird die fluktuierende Bewegung mikroskopischer Teilchen in Flüssigkeiten oder Gasen in Abhängigkeit von der Temperatur bezeichnet. Diese Teilchenbewegungen haben einen Einfluss auf ihre Umwelt, diese kann durch eine Kraft  $F(t)$  beschrieben

werden. Um die Position der Kugelchen über

$$F(t) = \beta \dot{x}(t) + kx(x) \quad (3)$$

bestimmen zu können, wird die Annahme getroffen, dass die Stöße zwischen den Kugelchen zufällig stattfinden und die Bewegung der Kugelchen stark gedämpft ist. Dabei beschreibt  $\beta$  den Widerstandswert mit  $\beta = 3\pi\eta d$ , wobei  $\eta$  die Mediumsviskosität und  $d$  den Kugeldurchmesser beschreiben. Die Fallensteifigkeit in der Gleichung wird wiederum durch  $k$  angegeben. Dabei ist zu beachten, dass Gleichung 3 nur für eine Raumrichtung gilt. Daher muss, für eine vollständige Beschreibung der Fallensteifigkeit, diese für alle Raumrichtungen bestimmt werden.

Eine andere Methode zur Bestimmung der Fallensteifigkeit einer optischen Pinzette liefert die Betrachtung der Leistungsspektren. Das Wiener-Chintschin-Theorem besagt, dass, wenn ein stationärer Zufallsprozess betrachtet wird, die Fouriertransformierte der Autokorrelation die spektrale Leistungsdichte bezeichnet. Somit ergibt sich

$$S_{xx}(f) = \sqrt{\frac{k_B T}{\pi^2 \beta (f^2 + f_0^2)}} \quad (4)$$

mit der Dämpfungsfrequenz  $f_0 = \frac{k}{2\pi\beta}$ . Mittels eines Fits des Leistungsspektrums kann diese Frequenz bestimmt werden und lässt so Rückschlüsse auf die Fallensteifigkeit zu. Als Orientierung ist bekannt, dass das Leistungsspektrum von weißem Rauschen gegeben ist durch  $\sqrt{4\beta k_B T}$ .

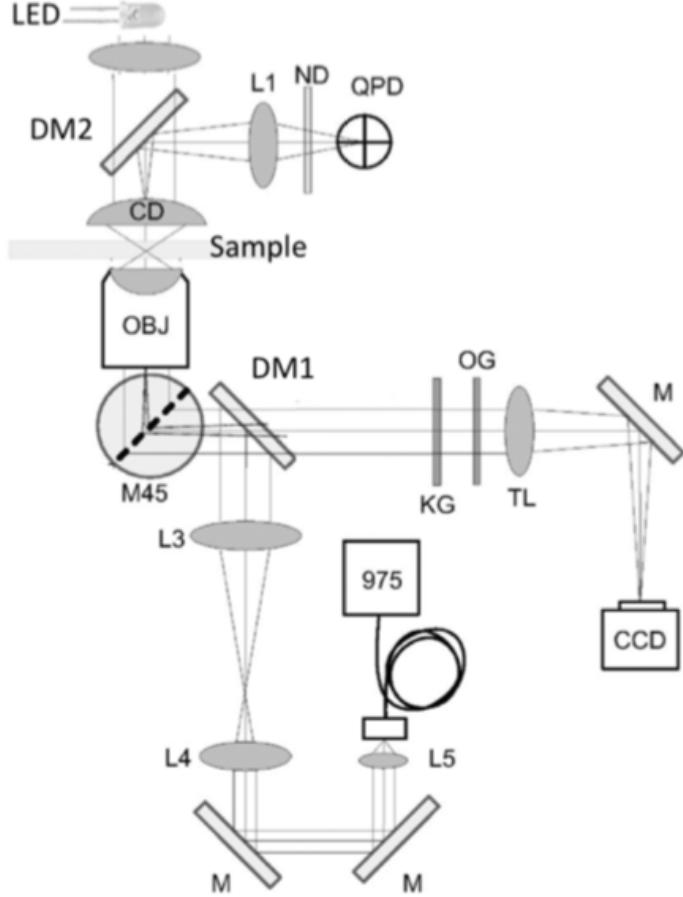
### 1.3 Struktur in Zwiebelzellen

Teil dieses Versuches ist es, die Vesikel innerhalb einer Zwiebelzelle zu beobachten, mithilfe der optischen Falle einzufangen und durch die Zelle zu bewegen. Bei einem Vesikel handelt es sich um ein Zellorganell, das von einer Membran umgeben ist und Nahrung, Informationen, aber auch Abbauprodukte enthalten kann. Innerhalb einer Zwiebelzelle sind diese Vesikel oftmals sphärisch oder stäbchenförmig. Ihre Größe beträgt in etwa 0,5 - 3 µm. Dadurch sind die Kräfte, die durch den Laser ausgeübt werden können groß genug, um diese Vesikel beeinflussen zu können.

Innerhalb einer Zelle bewegen sich Vesikel entlang von Cytoskelettfasern. Für die Bewegung entlang dieser Bahnen ist ein Motor-Protein verantwortlich, wobei es seine Energie aus Hydrolyseprozessen gewinnt. Die Vesikel innerhalb der Zwiebelzelle bewegen sich mithilfe von Myosin-Motoren entlang von Aktin-Mikrofasern.

## 2 Aufbau

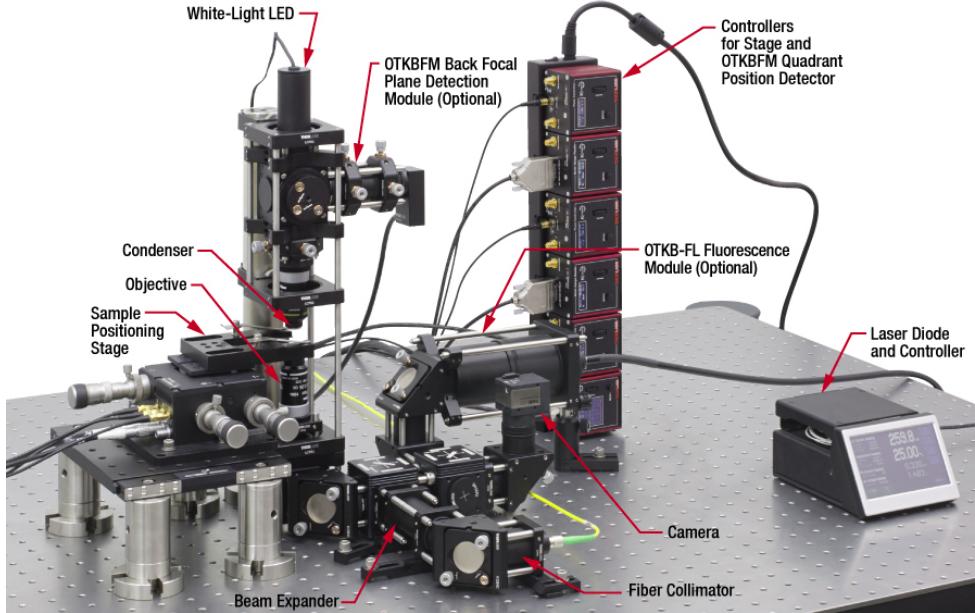
In Abbildung 2 ist der schematische Aufbau einer optischen Pinzette zu sehen. In diesem



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur optischen Pinzette [2].

Versuchsaufbau werden zwei Lichtquellen verwendet. Dabei handelt es sich um einen Laser mit einer Wellenlänge von 975 nm. Diese Wellenlänge wird verwendet, damit die Absorptionsbanden, die typischer Weise in biologischen Proben vorkommen, nicht getroffen werden. Zunächst trifft das Laserlicht auf einen Mikropositionierer (L5), der das einfallende Licht kollimiert. Über die beiden Spiegel (M) wird das Licht weitergeleitet zu zwei Linsen (L3,L4), die eine Strahlerweiterung bewirken. Als nächstes folgt ein "heißer" Spiegel (DM1). Dieser ist für Licht im sichtbaren Bereich durchlässig, reflektiert aber das vom verwendeten Laser ausgestrahlte infrarote Licht. Daraufhin wird das Licht über einen Drehspiegel (M45) auf das erste Objektiv gelenkt. Dabei handelt es sich um ein Ölimmersionsobjektiv. Das bedeutet, dass ein Tropfen Öl zwischen Präparat und Objektiv dazu verwendet wird, die Apertur zu erhöhen. Nach der Probe befindet sich das zweite Objektiv. Dies ist ein luftgeteiltes Kondensorobjektiv. Dieses fängt das, durch die Probe gestreute Licht ein und lässt das von oben einfallende Weißlicht hindurch. Nach der Reflektion an einem weiteren "heißen" Spiegel (DM2), wird das Licht über eine Linse auf die Viersegmentdiode fokussiert. Dazwischen befindet sich ein Neutraldichtefilter, der das, auf die Diode einfallende Licht, dämpft und eine Sättigung verhindern soll. Die Viersegmentdiode berechnet die Unterschiede zwischen den vier Segmenten bei einfallender Strahlung. Darüber lässt sich die Position der Laserstrahls auf dem Detektor bestimmen. Aufgrund der schnellen Reaktion der Diode ist es sogar möglich die Einflüsse der Brownschen Bewegung nachzuverfolgen. Der zweite Lichtpfad beginnt bei der Weißlicht-LED. Das ausgestrahlte Licht passiert den "heißen"

Spiegel (DM2) und trifft auf die Probe. Das transmittierte Licht fällt dann in das untere Objektiv und auf den Drehspiegel (M45). Daraufhin passiert es den zweiten "heissen" Spiegel (DM1) und wird, über Linsen und einen Spiegel, in die CCD-Kamera geleitet, denn die LED wird lediglich für die Visualisierung der Probe verwendet. In Abbildung 3 ist der Aufbau noch einmal dargestellt. Der Probentisch kann sowohl manuell als auch elektronisch über Piezo-Elemente geregelt werden.



**Abbildung 3:** Versuchsaufbau zur optischen Pinzette [1].

Dabei ist zu beachten, dass die Probe sich möglichst nah am unteren Objektiv befindet um die Apertur zu maximieren. Die Probe sollte außerdem möglichst dünn sein, damit das Licht nahezu ungehindert passieren kann.

Untersucht werden drei unterschiedliche Proben. Zum Einen werden freie Quarz-Kügelchen mit einem Durchmesser von  $2\text{ }\mu\text{m}$  untersucht. Durch das Hinzufügen von NaCl zu der Probe kommt es zur Abschirmung der Oberflächenladungen der Partikel und es kommt nicht länger zu einer Abstoßung zwischen Quarzkügelchen und Objektträgerglas. Dadurch heften sich die Kügelchen an die Oberfläche. Mit dem selben Verfahren werden ebenfalls kleinere Polyesterol Kügelchen betrachtet. Um zusätzlich eine biologische Probe zu untersuchen, wird ein Monolayer einer Zwiebelzelle untersucht.

### 3 Durchführung

#### 3.1 Untersuchungen an freien Kügelchen

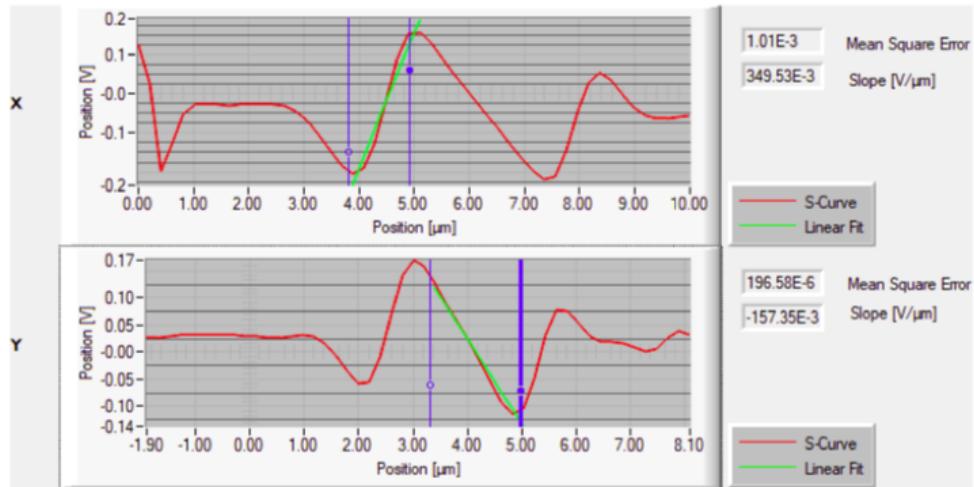
Im ersten Schritt werden die freien Quarzkügelchen auf einem Objektträger aufgetragen und die Lösung eventuell verdünnt, sodass nur vereinzelt Kügelchen unter dem Mikroskop gesehen werden. Zusammen mit einem Tropfen Öl kann das Präparat vorsichtig auf dem Probentisch platziert werden. Bevor mit den Messungen begonnen werden kann, muss der Fokus zunächst richtig eingestellt werden. Ob das der Fall ist, ist daran zu erkennen ob die Kügelchen eingefangen werden oder nicht. Ist der Fokus richtig eingestellt und ein Kügelchen gefangen, bietet es sich an, den Bereich der optischen Falle am Computerbildschirm zur Orientierung zu markieren.

Nun werden für drei Laserleistungen unterschiedliche Zeitserien aufgenommen. Wichtig ist dabei möglichst immer nur eines der Quarz-Kügelchen einzufangen. Zuerst wird eine Zeitserien ohne

zusätzliche äußere Einflüsse aufgenommen. Danach wird der Probentisch während der Aufnahmen, elektrisch gesteuert, in  $x$ - und  $y$ -Richtung periodisch ausgelenkt.

### 3.2 Positionskalibrierung mithilfe fixierter Kugelchen

Zur Messung der Translationsbewegung in  $x$ - und  $y$ -Richtung der untersuchten Teilchen wird die Viersegmentdiode genutzt. Zuvor muss diese allerdings kalkuliert und für jede Laserleistung der Umrechnungsfaktor zwischen Diodenspannung und Translation der Teilchen bestimmt werden. Der Probenlösung wird eine NaCl-Lösung hinzugefügt, sodass sich fixierte Kugelchen bilden. Eines dieser fixierten Kugelchen soll dann mithilfe der Falle eingefangen werden. Der Probentisch wird nun in einem festen Bereich in  $x$ - und  $y$ -Richtung ausgelenkt und die Position des Lasers auf der Viersegmentdiode aufgenommen. Dabei ergeben sich Ergebnisse wie in Abbildung 4 beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 4:** Beispieldaten für die Positionskalibrierung mithilfe fixierter Kugelchen [2].

Mithilfe der blauen Linien kann der Bereich ausgewählt werden, in welchem eine Ausgleichsgerade errechnet werden soll. Dafür wird entweder die aufsteigende oder absteigende Flanke ausgewählt. Die Ausgleichsgerade wird in grün dargestellt und liefert die gewünschten Umrechnungsfaktoren zwischen Diodenspannung und räumlicher Translation der Probe, die von der Laserleistung abhängen.

### 3.3 Untersuchung der Zwiebelzellen

Als letztes werden die Zwiebelzellen untersucht. Dafür wird eine Zwiebel aufgeschnitten und eine Monolage aus dem Inneren der Zwiebel isoliert. Zusammen mit einer NaCl-Lösung wird diese auf einem Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas fixiert. Da das Glas des Objektträgers zu dick ist und sich nicht für die Untersuchung eignet, muss in diesem Versuchsteil das Deckglas mit Öl präpariert werden und dem unteren der beiden Objektive zugewendet werden. Bei der Untersuchung ist zu beachten, dass die Zellen eine limitierte Lebenszeit haben. Ob die Zelle bereits tot ist, ist an der fehlenden Bewegung der Vesikel, abgesehen von der Brownschen Bewegung, zu erkennen. Ist dies der Fall, muss eine neue Monolage präpariert werden. Zunächst werden Fotos und Videos aufgenommen, um die Zellvorgänge besser beobachten zu können. Besonders sollen einzelne Vesikel beobachtet werden, um eine Bestimmung des Durchmessers möglich zu machen. Um zusätzlich die Geschwindigkeit der Vesikel zu bestimmen, wird versucht, die Laserleistung so weit wie möglich runterzudrehen, sodass die Vesikel nicht von der Falle eingefangen werden. Dann wird der Fokus auf eine Mikrofaser gerichtet und eine

Zeitserie aufgenommen, in der sich einzelne Vesikel durch den Fokus bewegen. Die Veränderung wird auf der Viersegmentdiode sichtbar.

Als letztes wird versucht den Punkt zu finden, an dem die Falle stark genug ist um den Aktin-Myosin-Motor zu überwinden und das Vesikel fest zu halten oder vom Filament zu lösen. Dafür wird die Laserleistung schrittweise erhöht bis dieser Punkt erreicht ist.

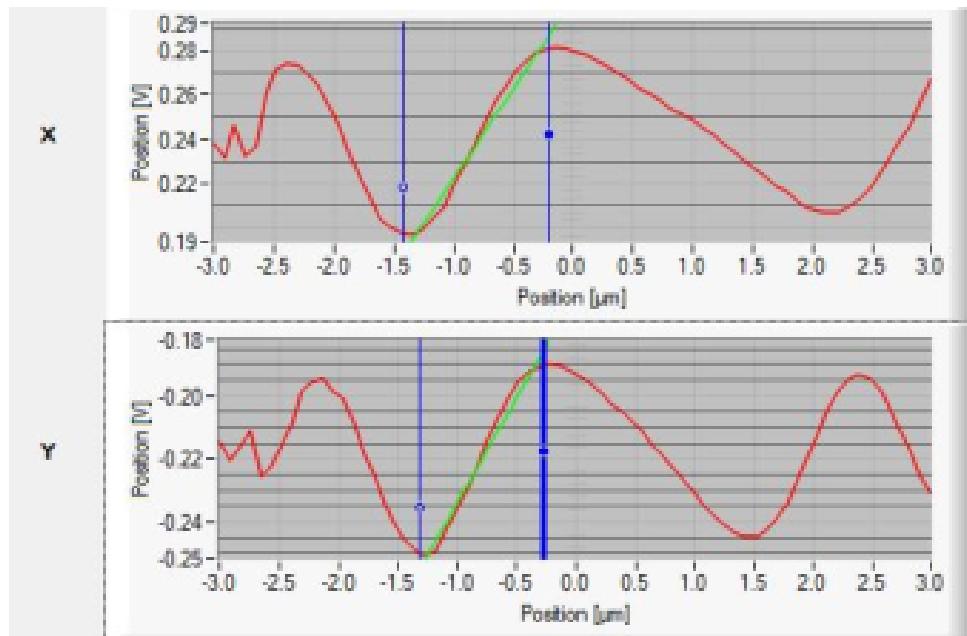
## 4 Auswertung

### 4.1 Positionskalibrierung mithilfe der fixierten Kugelchen

Zuerst soll die Positionskalibrierung anhand der fixierten Quarzkugeln analysiert werden, um die Umrechnungsfaktoren von Diodenspannung zu Translation der Teilchen zu finden. Dies ist für die Berechnung der Fallensteifigkeit und der Boltzmann-Konstante von Nöten.

In Abbildung 5 ist der Verlauf des Kalibrierungsprogramms am Beispiel der Messung mit 350 mA abgebildet. Sowohl in  $x$ - als auch in  $y$ -Richtung wird die Auslenkung der Viersegmentdiode als Funktion der Verschiebung eines fixierten Kugelchens gemessen. Aus den Flanken dieser Funktion wird mittels einer linearen Regression der Umrechnungsfaktor zwischen Diodenspannung und Position für beide Raumachsen bestimmt.

In Tabelle 1 sind die Umrechnungsfaktoren für alle Ströme aufgelistet.



**Abbildung 5:** Positionskalibrierung an einem einzelnen, festen Kugelchen. Zwischen den vertikalen Linien (blau) führt das Programm eine lineare Ausgleichsrechnung (grün) durch. Die Steigung dieser Ausgleichsrechnung ist der Umrechnungsfaktor zwischen Diodenspannung und Position.

**Tabelle 1:** Umrechnungsfaktoren für Diodenspannung und Probenposition für die jeweiligen Ströme des Lasers.

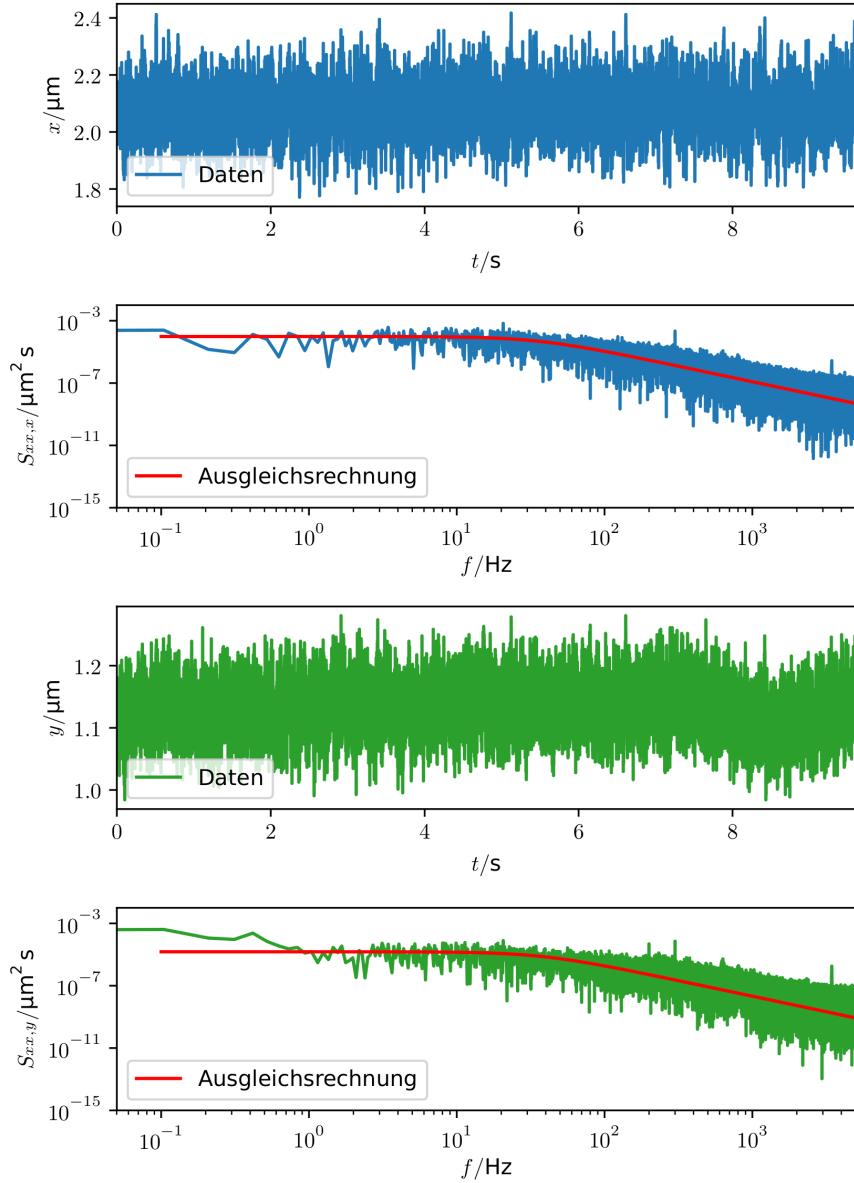
| $I / \text{mA}$ | $m_x / \frac{\text{V}}{\mu\text{m}}$ | $m_y / \frac{\text{V}}{\mu\text{m}}$ |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 150             | 0,117                                | -0,150                               |
| 250             | 0,082                                | -0,061                               |
| 450             | 0,081                                | -0,066                               |

### 4.2 Untersuchungen an freien Kugelchen

Für alle Laserströme soll im Folgenden am Beispiel der 150 mA Messung die Berechnung der Fallensteifigkeit und damit auch der Boltzmann-Konstanten  $k_B$  erläutert werden.

Aus den aufgenommenen Daten der Diodenspannung für  $x$ - und  $y$ -Richtung als Funktion der Zeit kann mittels des Umrechnungsfaktors aus Tabelle 1 und der Datenrate von 10 kHz die spektrale

Leistungsdichte abgeschätzt werden. Diese ist in Abbildung 6 abgebildet.



**Abbildung 6:** Daten und Leistungsdichte der Messung ohne Krafteinwirkung.

Für die spektrale Leistungsdichte wird eine Ausgleichsrechnung der Form

$$S_{xx}(f) = \frac{C}{f^2 + f_0^2} \quad (5)$$

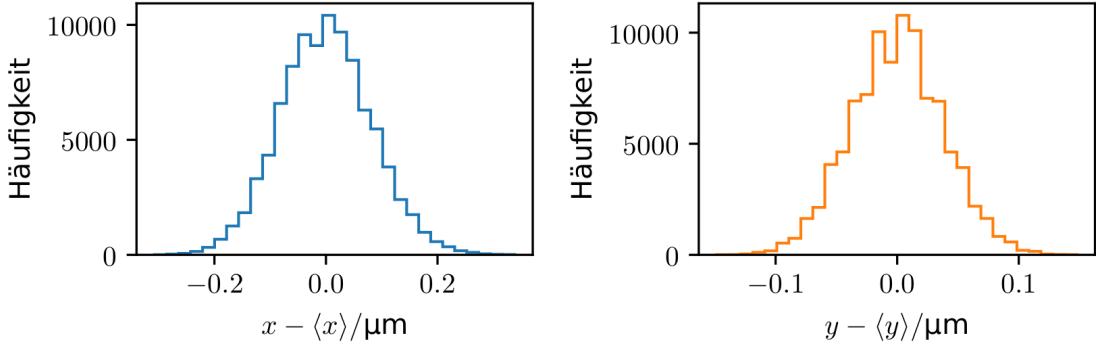
durchgeführt. Dabei beschreibt  $f_0$  die Dämpfungs-(*roll-off*)Frequenz und  $C$  einen freien Parameter, der sich aus dem Verhältnis von Konversionsfaktor und Diffusionsfaktor zusammensetzt [3]. Aus der Dämpfungsfrequenz wird mit

$$k = 2\pi\beta f_0 \quad (6)$$

die Fallensteifigkeit der Optischen Pinzette bestimmt. Für den hydrodynamischen Zugwiderstand  $\beta = 3\pi\eta d$  wird  $\eta = 8,9 \cdot 10^{-4}$  Pa s und  $d = 2$   $\mu\text{m}$  angenommen [2]. Aus den gemessenen Positionsdaten der Kugelchen kann eine Verteilung der Position in  $x$  und  $y$  bestimmt werden. Diese sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Verteilung folgt einer Normalverteilung und die Varianzen

$$\langle x^2 \rangle = 6,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}, \langle y^2 \rangle = 1,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m} \quad (7)$$

werden berechnet.



**Abbildung 7:** Verteilung der Messwerte um die Ruhelage.

Aus den Varianzen und der Fallensteifigkeit kann mit Gleichung 2 die Boltzmann-Konstante bestimmt werden. Als Temperatur wird  $T = 20^\circ\text{C}$  festgelegt. Da hier jeweils aus den Daten für  $x$  und  $y$  die Boltzmann-Konstante berechnet wird, werden die beiden Ergebnisse

$$k_{\text{B},x} = 8,52 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}, \quad (8)$$

$$k_{\text{B},y} = 1,95 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}, \quad (9)$$

$$\overline{k}_{\text{B}} = 5,24 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}. \quad (10)$$

gemittelt.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse für die Messungen ohne Krafteinwirkung aufgetragen.

**Tabelle 2:** Dämpfungs frequenzen und Fallensteifigkeiten für alle Laserleistungen.

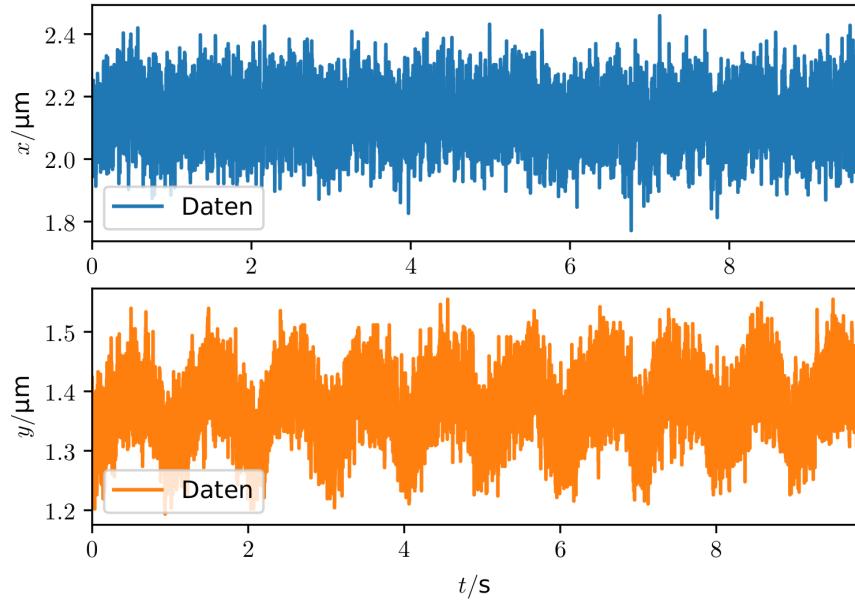
| $I / \text{mA}$ | $f_{0,x} / \text{Hz}$ | $f_{0,y} / \text{Hz}$ | $k_x / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ | $k_y / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|---|---|
| 150             | 35                    | 38                    | 37,3                                      | 39,6                                      |
| 250             | 118                   | 96                    | 124,5                                     | 101,2                                     |
| 450             | 54                    | 9                     | 57,9                                      | 10,1                                      |

Die Fallensteifigkeit und die Boltzmann-Konstante lassen sich ebenso durch die aufgenommenen Daten bei einer periodischen Krafteinwirkung, durch eine Verschiebung des Probentisches, ermitteln.

In diesem Fall gilt das Gleichgewicht

$$k x = \beta \dot{x}. \quad (11)$$

Dabei beschreibt  $\dot{x}$  die Geschwindigkeit des Probentisches. Diese kann am Laborcomputer, über Ansteuerung der Piezo-Elemente, eingestellt werden. Wird nun die Gleichung nach  $k$  umgestellt, so ergibt sich wieder die Fallensteifigkeiten für  $x$ - und  $y$ -Richtung. Eine Darstellung Kugelposition bei periodischer Krafteinwirkung in  $y$ -Richtung findet sich in Abbildung 8. Die, von der Laserleistung abhängigen, Fallensteifigkeiten sind in Tabelle 3 aufgelistet und werden dort mit den Ergebnissen aus Tabelle 2 verglichen. Die Fallensteifigkeiten, die aus den Messungen mit periodischer Krafteinwirkung berechnet werden, sind durch den Index F gekennzeichnet.



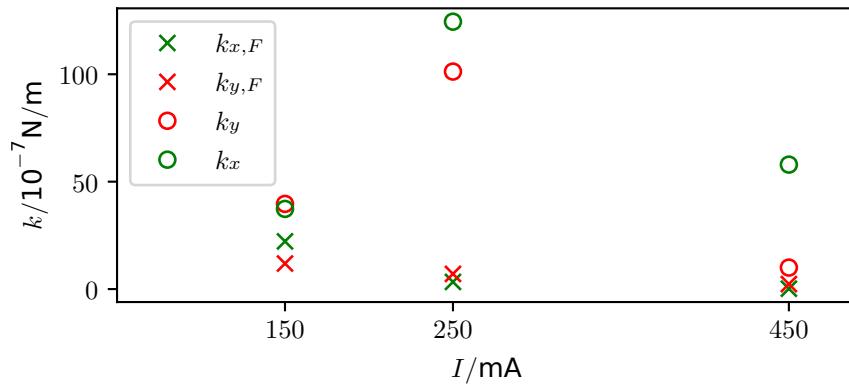
**Abbildung 8:** Aufgenommene Daten bei periodischer Verschiebung des Probentisches zur Bestimmung der Fallensteifigkeit für 150 mA.

**Tabelle 3:** Fallensteifigkeit für die Laserleistungen bei periodischer Krafteinwirkung.

| $I / \text{mA}$ | $k_x / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ | $k_y / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ | $k_{x,F} / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ | $k_{y,F} / 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}}$ |
|-----------------|---|---|---|---|
| 150             | 37,3                                      | 39,6                                      | 22,2  | 11,9  |
| 250             | 124,5                                     | 101,2                                     | 3,3   | 7,1   |
| 450             | 57,9                                      | 10,1                                      | 0,2   | 2,3   |

### 4.3 Vergleich der Messungen mit und ohne Krafteinwirkung

In Abbildung 9 sind die Fallensteifigkeiten als Funktion der Laserleistung für die Messungen ohne Krafteinwirkung und mit periodischer Krafteinwirkung aufgetragen. Es wird deutlich, dass für die hier analysierte Messungen keine Aussage über mögliche Korrelationen zwischen Laserleistung und Fallensteifigkeit getroffen werden können.



**Abbildung 9:** Fallensteifigkeiten aller Messungen.

Aus allen Fallensteifigkeiten kann nun die Boltzmann-Konstante zu

$$\overline{k_B} = 1,06 \cdot 10^{-22} \frac{\text{J}}{\text{K}} \quad (12)$$

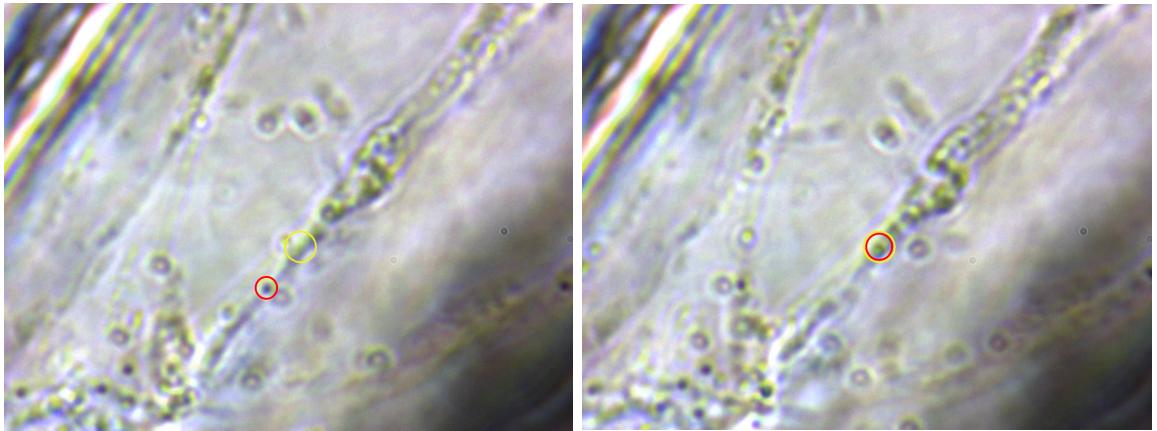
$$\overline{k_{B,F}} = 1,49 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \quad (13)$$

berechnet werden.

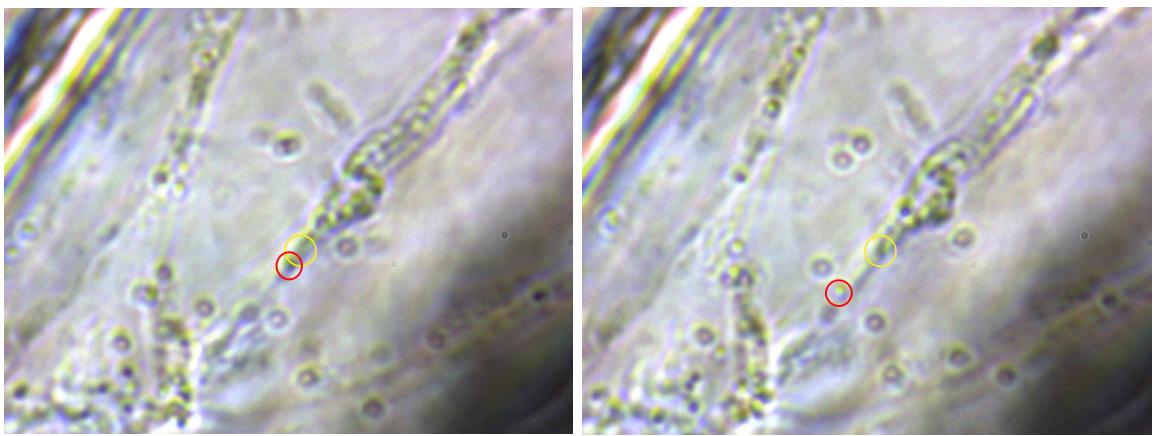
#### 4.4 Untersuchung der Zwiebelzellen

Für die Betrachtung der Zwiebelzelle werden Zellen ausgewählt, die einen intakten Zellkern aufweisen und die gerichteten Bewegungen der Vesikel entlang von Spuren deutlich zu erkennen sind. Bevor die Vesikel und deren Bewegungen genauer untersucht werden, wird die Bewegung zunächst qualitativ untersucht.

Zuerst wird der allgemeine Einfluss auf ein Vesikel untersucht, wenn es von der optischen Falle eingefangen wird. Dazu wird möglichst nur ein Vesikel eingefangen. Der Einfluss ist in Abbildung 10 dargestellt. Beobachtet wird dabei das rot umkreiste Vesikel. In Abbildung 10b befindet sich das Vesikel im Fokus der Falle und gilt als eingefangen, nachdem es sich zuvor von unten angenähert hat. Nach dem Ausschalten des Lasers, hat die Falle nicht länger einen Einfluss auf das Vesikel und es bewegt sich aus dem gelben Bereich der den Fokusbereich des Lasers darstellt. Das Vesikel bewegt sich jedoch in die Richtung zurück aus der es vor dem Einfangen durch die optische Pinzette gekommen ist. Diese Gegenbewegung ist in Abbildung 10c und 10d zu erkennen. Das bedeutet, dass dieses beobachtete Vesikel durch das Einfangen von seiner Bewegungsrichtung abweicht. Dies lässt jedoch keine allgemeine Schlussfolgerung für das Bewegungsverhalten nach dem Einfangen durch die optische Falle zu.



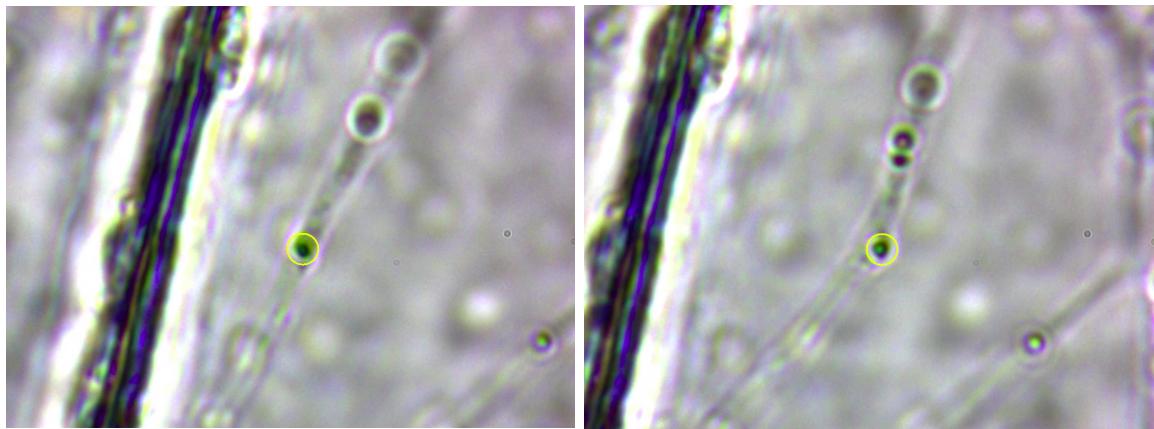
(a) Bewegung des Vesikels auf den Fokus der optischen Falle zu.  
(b) Bei 100 mA wird das Vesikel durch die Falle eingefangen.



(c) Nach dem Ausschalten der Falle bewegt sich das Vesikel aus dem Fokus.  
(d) Das Vesikel bewegt sich in die Richtung zurück aus der es gekommen ist.

**Abbildung 10:** Beobachtung des Einflusses der optischen Falle auf ein Vesikel.

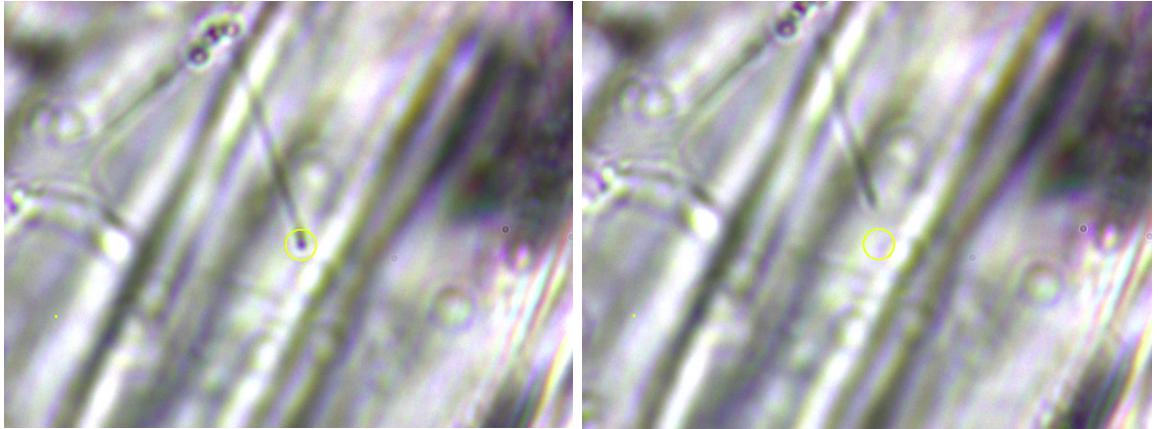
Wenn die Laserleistung hoch genug ist, ist die Falle nicht nur in der Lage Vesikel einzufangen, sondern zusätzlich ist es möglich die Vesikel zu bewegen. Dadurch kann nicht nur das Vesikel bewegt werden, sondern es kommt zu einer Bewegung der gesamten Faser. Das liegt an dem Aktin-Myosin-Motor. In Abbildung 11a ist eine Aktinfaser beispielhaft zusammen mit einer Anzahl von Vesikeln dargestellt. Daraufhin wird eines der Vesikel eingefangen und ausgelenkt. Der Moment der Auslenkung und der darausresultierende Einfluss auf die Aktin-Faser sind in Abbildung 11b zu sehen.



(a) Einfangen eines Vesikels mithilfe der optischen Falle bei 130 mA.  
(b) Auswirkung der optischen Falle auf die gesamte Aktifaser.

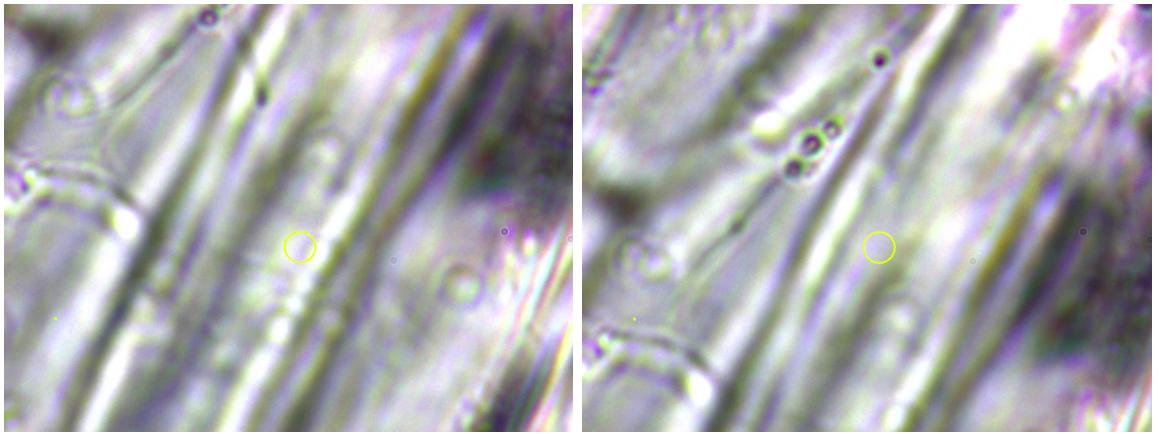
**Abbildung 11:** Einfangen eines Vesikels und die Auswirkung auf die Aktinfaser durch das Bewegen des Vesikels mithilfe der optischen Pinzette.

Bei dieser Auslenkung mithilfe der optischen Falle kommt es an einem Punkt dazu, dass das Vesikel der Falle entkommt, da die Kraft der Aktin-Myosin-Motoren die der Falle übersteigt. Nach dem Verlassen der Falle kehrt das Vesikel zusammen mit der Faser in den Ausgangszustand zurück. Der Verlauf eines solchen Vesikels ist in Abbildung 12 zu sehen.



(a) Maximale Auslenkung des Vesikels vor dem Entkommen der Falle bei 210 mA.

(b) Kurz nach dem Verlassen der Falle bewegt sich das Vesikel in Richtung Ausgangsposition.



(c) Das Vesikel inklusive Aktinfaser ziehen sich langsam in Richtung des Ausgangspositions zurück.

(d) Das Vesikel ist wieder zurück auf der Ausgangsposition, wo die optische Falle es eingefangen hat.

**Abbildung 12:** Rückkehr des Vesikels in die Ausgangsposition nach dem Entkommen der optischen Falle.

Nach dieser Rückkehr in die Ausgangsposition zurück nimmt das Vesikel seine vorherige Bewegung jedoch nicht wieder auf sondern verharrt an dieser Stelle. Genau das gleiche gilt auch für die anderen Vesikel die in Abbildung 12 zu sehen sind. Nach der Auslenkung von der eigentlichen Spur runter, werden auch die anderen sich auf dieser befindlichen Vesikel beeinflusst.

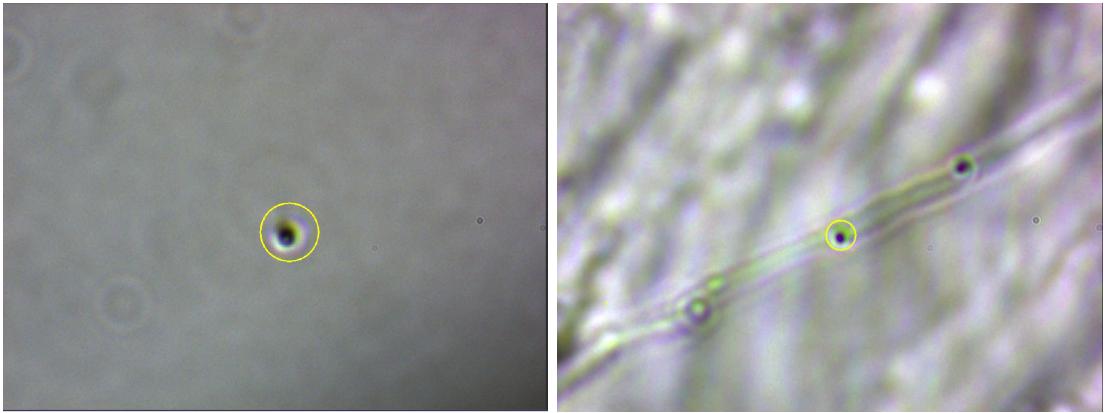
Wird jedoch ein Vesikel eingefangen, aber seine Position nicht geändert, hat dies keinen weiteren Einfluss auf andere Vesikel. Entweder die anderen Vesikel werden ebenfalls eingefangen oder sie weichen leicht von ihrer Bewegung ab, um dem eingefangenen Vesikel auszuweichen.

Um den Durchmesser der Vesikel zu bestimmen, wird versucht möglichst nur eines der Vesikel einzufangen. Basierend auf den vorherigen Aufnahmen bei der Untersuchung der Quarz-Kügelchen ist es nun möglich den Durchmesser ungefähr zu bestimmen. Verwendet werden sollen dazu Bildschirmaufnahmen. Bei dem Quarzkügelchen in Abbildung 13a ist der Durchmesser mit  $2 \mu\text{m}$  bekannt [2]. Mithilfe eines Fotovermessungsprogramms kann die Anzahl an Pixeln bestimmt werden, die den Durchmesser des Quarz-Kügelchens ausmacht. Somit ergibt sich

$$80\text{Pixel} \hat{=} 2 \mu\text{m} \quad (14)$$

$$1\text{Pixel} \hat{=} 25 \text{ nm}. \quad (15)$$

Mit diesem Umrechnungsfaktor ist es nun möglich den Durchmesser der Vesikel zu bestimmen. Da die Vesikel nicht alle gleich groß erscheinen werden die Durchmesser unterschiedlicher Vesikel aus verschiedenen Messungen bestimmt. Die bestimmten Durchmesser sind in Tabelle 4 aufgeführt.



(a) Ein durch die optische Falle eingefangenes Quarzkügelchen.  
(b) Ein durch die optische Falle eingefangenes Vesikel.

**Abbildung 13:** Gegenüberstellung von Quarz-Kügelchen und Zwiebelzellen-Vesikel zur Durchmesserbestimmung.

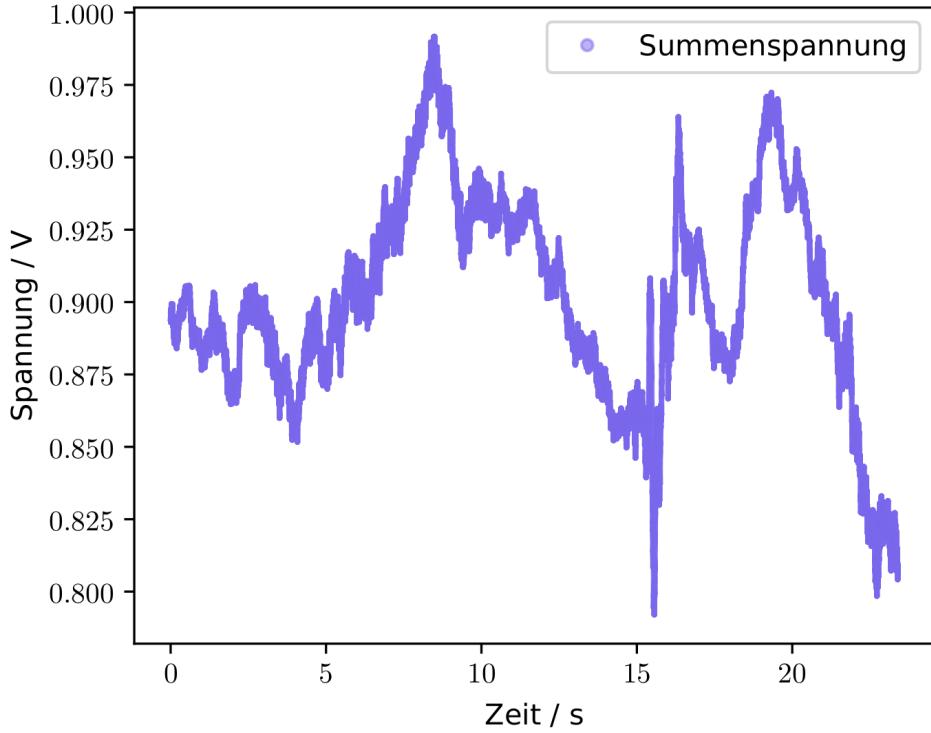
Vesikel 1 ist dabei das in Abbildung 13b dargestellte. Aus den gemessenen Werten ergibt sich ein

**Tabelle 4:** Aus den Bildschirmaufnahmen bestimmten Durchmesser verschiedener Vesikel.

| Vesikel | Pixel | Durchmesser |
|---------|-------|-------------|
| 1       | 42    | 1,05 µm     |
| 2       | 34    | 0,85 µm     |
| 3       | 38    | 0,95 µm     |
| 4       | 39    | 0,96 µm     |
| 5       | 38    | 0,95 µm     |

mittlerer Durchmesser von ca.  $(0,952 \pm 0,003)$  µm für die Vesikel innerhalb einer Zwiebelzelle.

Im nächsten Schritt wird die Geschwindigkeit der Vesikel mittels Zeitserien bestimmt. Durch die Bewegung der Vesikel durch den Laserfokus, ohne jedoch eingefangen zu werden, wird der Laserspot angelenkt. Das äußert sich in einem veränderten Signal der Viersegmentdiode für diesen Zeitraum. Damit die Vesikel nicht eingefangen werden, wird der Laser lediglich mit 100 mA betrieben. Die aufgenommenen Werte für die Gesamtspannung an der Viersegmentdiode sind in Abbildung 14 an einer beispielhaften Messung dargestellt. Die Daten werden mit einer Abtastrate von 10 kHz aufgenommen, somit kann direkt in die gemessene Zeit umgerechnet werden.



**Abbildung 14:** Aufgenommene Spannungswerte bei Bewegung von Vesikeln durch den Laserfokus.

Die großen Peaks nach etwa fünf Sekunden sind nicht zu erklären, auf einem gleichzeitig aufgenommenen Video der CCD-Kamera sind in diesem Zeitraum keine Vesikel zu erkennen. Es ist möglich, dass diese großen Peaks durch Vesikel, oder sonstige Stoffe, erzeugt werden, die unter- oder oberhalb des Fokus den Laserstrahl ablenken.

Auf dem Video sind allerdings zwei Vesikel zu erkennen, die bei etwa zwei Sekunden in den Fokus des Lasers treten. In Abbildung 15 ist der Bereich der ersten fünf Sekunden dargestellt, es ist ein breiter Peak nach etwa zwei Sekunden zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Bildmaterial und es kann angenommen werden, dass dieser Peak durch die zwei Vesikel verursacht wird.

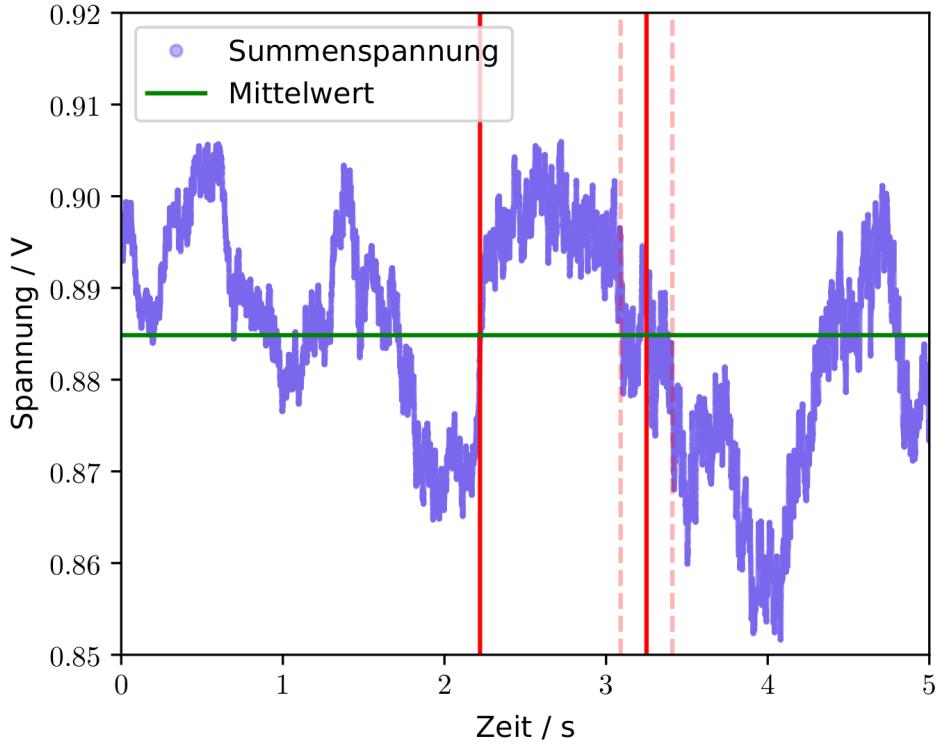
Um nun grob die Breite des Peaks zu bestimmen, wird der Mittelwert der Daten in diesem Bereich ermittelt. Es folgt

$$\bar{U} = 0,885 \text{ V}.$$

Weiterhin wird bestimmt, wo die Flanken des Peaks diesen Mittelwert schneiden. Die rechte Flanke des Peaks ist stark verauscht und schneidet den Mittelwert in einem breiten Bereich, hieraus ergibt sich die Unsicherheit auf die Geschwindigkeit der Vesikel.

Für die Breite des Peaks folgt somit

$$\Delta t = (1,03 \pm 0,16) \text{ s}. \quad (16)$$



**Abbildung 15:** Aufgenommene Spannungswerte bei Bewegung von Vesikeln durch den Laserfokus.

Die Strecke, die die Vesikel in dieser Zeit zurücklegen, wird zu ca.  $2 \mu\text{m}$  angenommen. Dies entspricht ungefähr der Größe der Quarzkügelchen aus den vorherigen Versuchsteilen. Sie entsprechen in etwa der Größe des Laserfokus.

Somit ergibt sich eine Vesikelgeschwindigkeit von

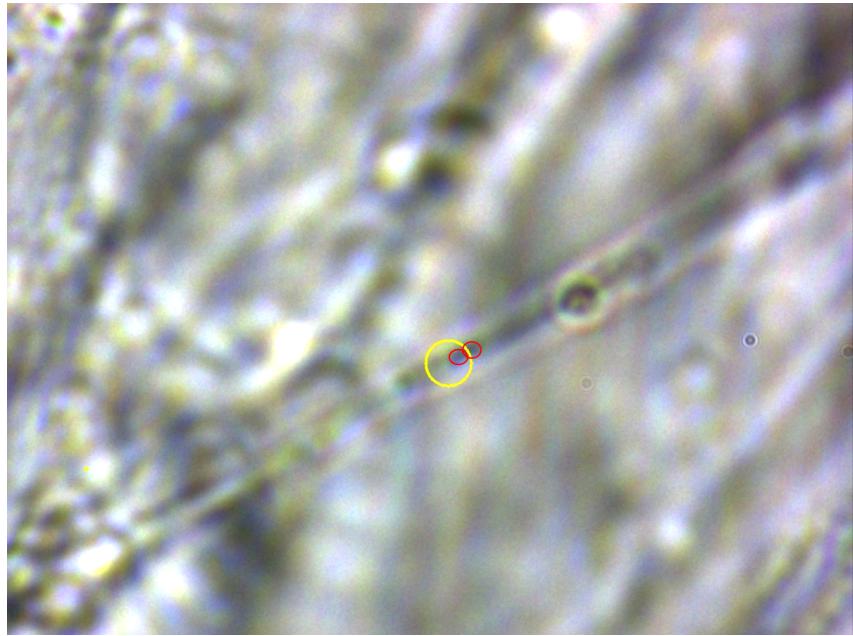
$$v_{\text{Vesikel}} = \frac{2 \mu\text{m}}{(1,03 \pm 0,16) \text{s}} = (1,94 \pm 0,30) \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}. \quad (17)$$

In Abbildung 16 sind die beiden Vesikel (rot) zu erkennen. Das hintere Vesikel befindet sich noch im Fokus des Lasers, während das vordere den Fokus schon verlassen hat. Da zwei Vesikel durch den Laserfokus gehen, ist die Aussage der Vesikelgeschwindigkeit aus Gleichung (17) nicht eindeutig. Es kann auf dem Videomaterial nicht erkannt werden, ob die Vesikel in der selben Reihenfolge in den Fokus treten, wie sie ihn wieder verlassen oder ob ihr Abstand zueinander gleich bleibt.

Wird angenommen, dass sich die Vesikel in gleichbleibendem Abstand und mit der selben Geschwindigkeit durch den Laserfokus bewegen, so halbiert sich die berechnete Geschwindigkeit zu

$$v_{\text{Vesikel}} = (0,97 \pm 0,15) \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}. \quad (18)$$

Im letzten Schritt in der Untersuchung der Vesikel innerhalb einer Zwiebelzelle wird versucht ein Vesikel einzufangen und von der Aktinfaser zu lösen. Anhand der aufgewendeten Kraft ist es dann möglich auf die Kraft der Aktin-Myosin-Motoren zu schließen. Jedoch ist es mit dem verwendeten Aufbau nicht möglich ein Vesikel zu lösen. Mit der Maximalleistung des Lasers kann das Vesikel lediglich bis zum Erreichen der Zellmembran durch die Zelle bewegt werden.



**Abbildung 16:** Schnappschuss des Videomaterials zu den Daten aus Abbildung 14 und 15. Zu sehen sind zwei Vesikel, die soeben den Laserfokus passiert haben .Die Vesikel sind durch zwei rote Kreise, der Fokus des Lasers durch einen gelben Kreis markiert.

## 5 Diskussion

In dem durchgeföhrten Versuch wurde versucht, die Fallensteifigkeit der Optischen Pinzette und die Boltzmann-Konstante anhand von Quarzkügelchen zu bestimmen. Für eine Zwiebelprobe wurde die Bewegung von Vesikeln auf Aktinfilamenten beobachtet und manipuliert. Es wurde weiterhin die Transportgeschwindigkeit der Vesikel abgeschätzt. Die Messungen mit den kleineren Latexkügelchen konnten nicht durchgeföhrten werden, da die Probe falsch auf dem Probentisch positioniert wurde.

Die berechnete Fallensteifigkeiten liegen nahe der Größenordnung vergleichbarer Werte von  $50 \cdot 10^{-7}$  N/m bis  $500 \cdot 10^{-7}$  N/m [4, 5]. Dabei liegen die Werte für die Messungen ohne Krafteinwirkung näher an den Literaturwerten, als die der Messungen mit Krafteinwirkung. Wie in Abbildung 9 zu sehen, steigen die Werte der Fallensteifigkeit nicht mit steigender Laserleistung, sondern sinken teilweise sogar. Dies hängt auch damit zusammen, dass nicht garantiert werden konnte, dass keine weiteren Kügelchen von der Falle eingefangen wurden. Oftmals wurde nicht bemerkt, dass weitere Kügelchen eingefangen wurden, da sich diese von unten in den Fokus und die Falle bewegt haben. Zudem ließ sich der Fokus des Lasers nicht konstant halten, da dieser durch das Ausweichen vor anderen Kügelchen teilweise verändert wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Messungen sehr genau aufgepasst werden sollte, dass der Fokus des Lasers konstant bleibt und nur ein Teilchen im Fokus des Laser platziert ist. Zudem ist es ratsam, für mehr Messungen die Fallensteifigkeit zu berechnen, um einen aussagekräftigen Verlauf der Werte zu erhalten. Bei nur drei Messungen, lässt sich nur schwer eine generelle Korrelationen zwischen Laserleistung und Fallensteifigkeit erkennen.

Die Normalverteilung der Brownschen Molekularbewegung ist gut zu erkennen (vgl. Abbildung 7). Die in Kapitel 4.3 berechneten Boltzmann-Konstanten für die Messungen mit und ohne Krafteinwirkung werden in Tabelle 5 mit dem Literaturwert verglichen. Es zeigt sich, dass die Berechnung der Boltzmann-Konstante durch die Messungen mit Krafteinwirkung deutlich näher

am Literaturwert liegt, als die Berechnung anhand der Messungen ohne Krafteinwirkung, obwohl die Fallensteifigkeiten dieser Messung näher an den Literaturwerten liegen.

**Tabelle 5:** Abweichung der abgeschätzten Boltzmann-Konstante von dem Literaturwert.

|            | $k_{B,\text{exp.}} / 10^{-23} \text{ J/K}$ | $k_{B,\text{Lit.}} / 10^{-23} \text{ J/K}$ [6] | Abweichung / % |
|------------|--|--|----------------|
| ohne Kraft | 10,6                                       | 1,38   | 668            |
| mit Kraft  | 1,49                                       | 1,38   | 8              |

Die Untersuchung der Zwiebelzelle liefert einen Eindruck von der Nutzbarkeit von Optischen Pinzetten in der Mikrobiologie.

Es zeigt sich jedoch auch, dass solche Versuche besonderen Rahmenbedingungen unterliegen. So war es, wegen der hohen Anzahl an Vesikeln, nicht möglich, einzelne Vesikel in der Falle einzufangen. Ebenso kann die Kraft zum Abziehen eines Vesikels von dem Aktinfilament nicht eindeutig bestimmt werden. Dies liegt an der hohen Elastizität der Aktinfilamente, sodass das ganze Aktinfilament bewegt wird, anstatt ein Vesikel vom Filament zu trennen. Weiterhin scheint die Größe der Vesikel ein entscheidender Faktor zu sein, der sich nicht beeinflussen lässt.

Die berechnete Vesikelgröße von  $0,952 \mu\text{m}$  liegt innerhalb des Bereichs der Literaturwerte von  $0,5 - 3 \mu\text{m}$  [7, 2].

Die Geschwindigkeit der Vesikel liegt nahe der Literaturangabe von  $0,89 \mu\text{m/s}$  [8]. Durch die Videoaufnahme kann der hier vermessene Peak zu den beiden beobachteten Vesikeln zugeordnet werden. Im Allgemeinen sind die Messungen stark verauscht und nicht alle Peaks, selbst mit Videomaterial, können nicht eindeutig zu bestimmten Ereignissen zugeordnet werden. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass die Geschwindigkeit der Vesikel von den Vitalfunktionen der Zelle, der Temperatur und der Größe der Vesikel abhängt, was eine allgemeine Aussage über Geschwindigkeiten von Vesikeln erschwert.

## Literatur

- [1] Thorlabs. *Modular optical tweezers*. URL: [https://www.thorlabs.com/newgroupage9.cfm?objectgroup\\_id=3959](https://www.thorlabs.com/newgroupage9.cfm?objectgroup_id=3959) (besucht am 02.07.2019).
- [2] Jörg Debus. *Versuchsanleitung zum Versuch der Optischen Pinzette*. 2019. URL: [https://moodle.tu-dortmund.de/pluginfile.php/912553/mod\\_resource/content/2/FKP-Versuch\\_OptischePinzette\\_v2b.pdf](https://moodle.tu-dortmund.de/pluginfile.php/912553/mod_resource/content/2/FKP-Versuch_OptischePinzette_v2b.pdf).
- [3] Optical Trapping Lab Biopt. *Power spectrum*. URL: <http://biopt.ub.edu/force-detection/brownian> (besucht am 12.08.2019).
- [4] N Malagnino u. a. “Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers”. In: *Optics Communications* 214.1 (2002), S. 15–24. ISSN: 0030-4018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0030-4018\(02\)02119-3](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(02)02119-3). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401802021193>.
- [5] Mohammad Sarshar, Winson Wong und Bahman Anvari. “Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers”. In: *Journal of biomedical optics* 19 (Nov. 2014), S. 115001. DOI: [10.1117/1.JBO.19.11.115001](https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.11.115001).
- [6] Eric Jones, Travis Oliphant, Pearu Peterson u. a. *SciPy: Open source scientific tools for Python*. 2001. URL: <http://www.scipy.org/>.

- [7] K. J. Oparka, D. A. M. Prior und N. Harris. "Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells". In: *Planta* 180.4 (März 1990), S. 555–561. ISSN: 1432-2048. DOI: 10.1007/BF02411454. URL: <https://doi.org/10.1007/BF02411454>.
- [8] Tal Scully. *Measurement of Onion Myosin Protein Force with Optical Trapping*. URL: <http://web.mit.edu/tals/www/writing/jlab/opticaltrap.pdf> (besucht am 17.08.2019).