

# **Optische Pinzette**

Michael Gutnikov  
michael.gutnikov@udo.edu

Lasse Sternemann  
lasse.sternemann@udo.edu

Abgegeben am 31.07.2022

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Ziel</b>	<b>3</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Grundlagen der optischen Falle . . . . .	3
2.2 Fallensteifigkeit und Gleichverteilungstheorem . . . . .	4
2.3 Brown'sche Bewegung und spektrale Leistungsverteilungsfunktion . . . . .	4
2.4 Molekulare Motoren in der Mikrobiologie . . . . .	5
<b>3 Versuchsaufbau und -durchführung</b>	<b>6</b>
3.1 Vorbereitung . . . . .	6
3.2 Kalibrierung der Viersegmentphotodiode . . . . .	7
3.3 Messungen zur Bestimmung der Fallensteifigkeit und Boltzmann-Konstante	7
3.4 Untersuchung von Vesikeln in Zwiebelzellen . . . . .	7
<b>4 Auswertung</b>	<b>8</b>
4.1 Untersuchung von Quarzkügelchen . . . . .	8
4.1.1 Kamerakalibrierung . . . . .	8
4.1.2 Kalibrierung der Photodiode . . . . .	9
4.1.3 Kalibrierung der Fallensteifigkeit . . . . .	12
4.2 Untersuchung des Vesikeltransports in Zwiebeln . . . . .	19
<b>5 Diskussion</b>	<b>23</b>

# 1 Ziel

Ziel des Versuchs ist es, Quarz-Kugeln mittels einer optischen Pinzette einzufangen und zu untersuchen. Es wird daraus die Fallensteifigkeit und die Boltzmann-Konstante bestimmt. Außerdem wird der Transport von Vesikeln durch molekulare Aktin-Myosin-Motoren in Zwiebelzellen untersucht.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Grundlagen der optischen Falle

Da Photonen einen Impuls tragen übt Licht, wenn auch in sehr kleinen Maßen, Kraft aus. Diese Kraft kann zwar nichts in der makroskopischen Welt ausrichten, es ist aber möglich, z.B. durch eine optische Falle, mikroskopisch kleine dielektrische Kugeln zu manipulieren. [1] Die Physik hinter dem Einfangen und Bewegen durch eine optische Falle wird als Erstes für Objekte besprochen, welche viel größer sind als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes ( $d \gg \lambda$ ). Dazu wird die Impulsveränderung des Lichts untersucht. Dieses wird an der Mikrokugel gebrochen und es wird eine Gradientenkraft entgegengesetzt zur Impulsveränderung erzeugt. Die gebrochenen Lichtstrahlen und die entstehenden Gradientenkräfte im Falle von einer zentrierten und nicht zentrierten Mikrokugel sind in Abbildung 1 dargestellt. Da es sich um einen fokussierten Gaußstrahl handelt besitzt das

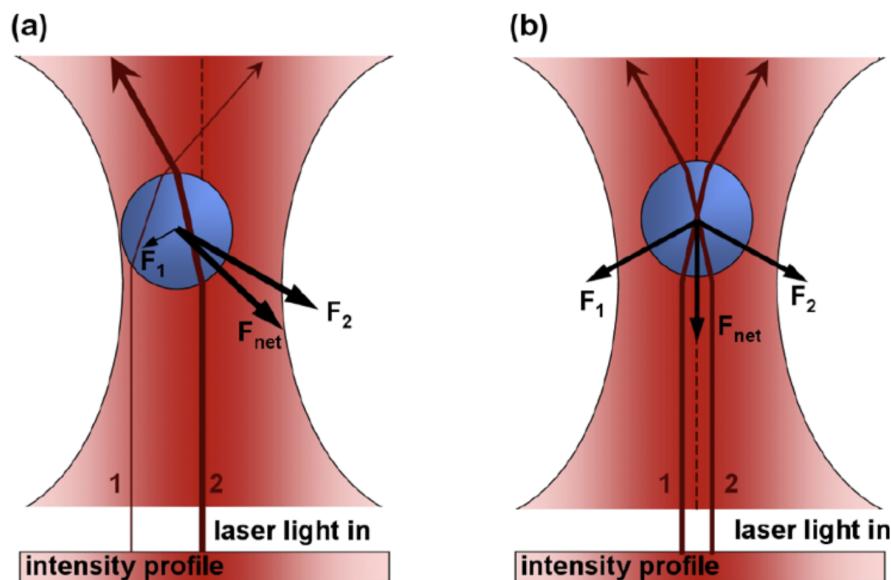


Abbildung 1: Schematische Skizze der resultierenden Kräfte für eine a) nach links ausgelenkte und eine b) zentrierte Mikrokugel. Entnommen aus [2]

Licht, das aus dem Zentrum gebrochen ist, die größte Intensität und damit die größte

Gradientenkraft. Bei einer nach links (rechts) ausgelenkten Kugel entspricht das einer resultierenden Kraft nach rechts (links). Zusammen mit der Streukraft des teilweise reflektierten Lichtes stellt sich so ein Gleichgewicht ein und die Mikrokugel wird im Fallenzentrum festgehalten.

Für Objekte, die  $d \gg \lambda$  nicht erfüllen, gilt die Beschreibung mit der Strahlenoptik nicht mehr. In diesem Fall kommt die Rayleigh-Streuung ins Spiel und das Objekt muss als Dipol betrachtet werden. [3]

## 2.2 Fallensteifigkeit und Gleichverteilungstheorem

Der Druck  $p$ , den  $N$  Teilchen bei einer Temperatur  $T$  in einem Volumen  $V$  bewirken, wird durch die ideale Gasgleichung

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

beschrieben, wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante ist. Diese Informationen reichen aber noch nicht aus, um  $k_B$  zu messen, da keine Schlüsse über die Teilchenanzahl  $N$  gezogen werden können.

Das lässt sich ändern, wenn die Energie eines einzelnen Teilchens mit der Kraftfluktuation kombiniert wird, welche aus den Stößen der Gasteilchen untereinander hervorgeht. Das Äquipartitionstheorem besagt, dass pro Teilchen und Freiheitsgrad die Energie  $\frac{1}{2}k_B T$  existiert. Mit dem Vergleich der optischen Falle mit einer Feder mit Federkonstante  $k$  ergibt sich für die Energie eines Teilchens, das sich in diesem harmonischen Potential bewegt  $\frac{1}{2}k\langle x \rangle^2$ . Das Gleichsetzen beider Ausdrücke ergibt

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

wobei  $k$  die Fallensteifigkeit der optischen Falle beschreibt und  $\langle x \rangle$  die Fluktuation der Teilchenbewegung aufgrund der Brown'schen Bewegung.

## 2.3 Brown'sche Bewegung und spektrale Leistungsverteilungsfunktion

Der Einfluss der Brown'schen Bewegung, gemittelt über eine große Anzahl an Teilchen, kann als zufällige Kraft  $F(t)$  beschrieben werden. Für eine viskose Bewegung, wie es in der optischen Falle der Fall ist, gilt für die Position  $x$  eines Objekts die Bewegungsgleichung

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

mit dem hydrodynamischen Zugwiderstand  $\beta = 3\pi\eta d$ , wobei  $d$  den Kugeldurchmesser des Objektes und  $\eta$  die Viskosität des verwendeten Mediums beschreibt. Diese Bewegungsgleichung kann für alle drei Raumrichtungen mit drei unterschiedlichen Fallensteifigkeiten  $k_x$ ,  $k_y$  und  $k_z$  aufgestellt werden.

Nach dem Wiener-Khinchin-Theorem gilt für das spektrale Leistungsspektrum

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

mit der sogenannten "Roll-Off-Frequenz"

$$f_0 = \frac{k}{2\pi\beta} \quad (5)$$

aus welcher die Fallensteifigkeit  $k$  der optischen Falle ermittelt werden kann.

## 2.4 Molekulare Motoren in der Mikrobiologie

In Zellen werden Informationen und verschiedene Stoffe mit Hilfe von Organellen/Vesikeln transportiert. Diese sind meistens  $\sim 1\mu\text{m}$  groß und bewegen sich entlang von Aktin-Kanälen. Diese Bewegung wird von einem Myosin-Motor-Protein verrichtet, welches sich praktisch an den Aktin-Kanälen 'entlanghangeln'. Dieser Prozess ist in Abbildung 2 schematisch verdeutlicht.

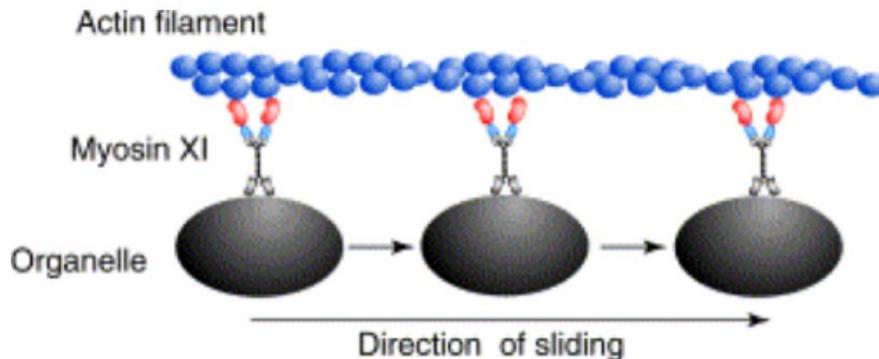


Abbildung 2: Bewegung eines Vesikels 'durch' Aktin-Kanäle mit Hilfe von Myosin-Motoren. Entnommen aus [2]

### 3 Versuchsaufbau und -durchführung

In Abbildung 3 ist das Experiment schematisch dargestellt. Dieses besteht aus der

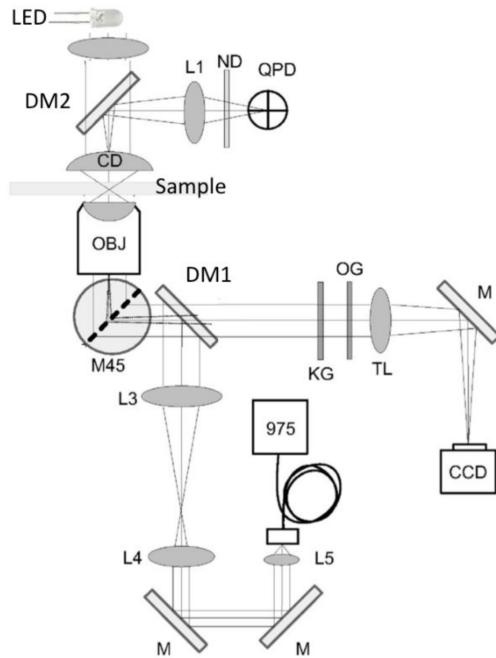


Abbildung 3: Schematische Skizze des verwendeten Versuchsaufbaus. Entnommen aus [2]

optischen Pinzette und einem Lichtmikroskop, um die Probe während des Experiments beobachten zu können. Für die optische Pinzette wird ein 975 nm Glasfaserlaser verwendet (975). Der Laserstrahl wird über verschiedene Linsen und Spiegel zu einem 100x Öl-Immersions-Objektiv (OBJ) gelenkt und auf die Probe fokussiert. Das transmittierte Licht wird durch ein weiteres Objektiv (CD) gesammelt und durch eine Viersegmentphotodiode (QPD) gemessen, welche es erlaubt, neben der Laserintensität ebenfalls die Position der Laserstrahls zu bestimmen. Um die Viersegmentphotodiode nicht zu übersättigen, passiert das Licht zuvor einen ND-Filter (ND). Für das Lichtmikroskop wird eine Weißlicht-LED (LED) verwendet. Der Strahlengang verläuft dabei entgegengesetzt zu dem des Lasers, also von oben nach unten durch die optische Pinzette, und wird von einer CCD-Kamera (CCD) aufgenommen. Um die Strahlen für die optische Falle und das Lichtmikroskop zu trennen werden zwei dichroitische Spiegel (DM1, DM2) eingesetzt, welche Licht abhängig von der Wellenlänge entweder transmittieren oder reflektieren.

#### 3.1 Vorbereitung

Zuerst wird eine Quarzkügelchen-Probe in einem Objektträger mit Hilfe einer Pipette präpariert. Diese wird mit dem Lichtmikroskop untersucht, um die Pixelgröße der CCD-

Kamera zu kalibrieren. Dann wird die optische Falle 'aktiviert', indem die Laserleistung aufgedreht wird, und ihre Position im beobachteten Bild bestimmt.

### **3.2 Kalibrierung der Viersegmentphotodiode**

Es wird eine neue Probe präpariert, diesmal in NaCl-haltigem Wasser, um die Beweglichkeit der Kugeln einzuschränken. Daraufhin wird ein Quarzkügelchen in die optische Falle plaziert und eine Positionskalibrierung, mit einer Scanlänge von 10 µm und 100 Schritten, durchgeführt für 5 verschiedene Laserleistungen (4,83 mW, 33,5 mW, 63,4 mW, 93,3 mW, 123,2 mW). Außerdem wurde durch eine Veränderung des z-Piezo-Stufenwerts die fokale Position der optischen Falle bis zu 250 µm variiert und das Diodensummensignal an der Viersegmentphotodiode gemessen.

### **3.3 Messungen zur Bestimmung der Fallensteifigkeit und Boltzmann-Konstante**

Als Nächstes wird die *force calibration* des Programms verwendet und damit das spektrale Leistungsspektrum aufgenommen. Das Ganze wird zuerst ohne externe Krafteinwirkung und dann mit einer externen Bewegung in x- und y-Richtung durchgeführt, auch hier wieder für 5 Werte der Laserleistung. Zum Schluss wird die Messung erneut wiederholt, diesmal mit einem eingesetzten Vortex-Retarder in den Strahlengang des Lasers. Der Fokus wird dabei die ganze Zeit über konstant gehalten und entspricht dem Fokus bei der Positionskalibrierung in 3.2.

### **3.4 Untersuchung von Vesikeln in Zwiebelzellen**

Es wird eine Monolage aus dem Innern einer Zwiebel entfernt und auf einem Objektträger präpariert. Zuerst wird ein Vesikel gefunden und dessen Bewegungsmuster untersucht. Daraufhin werden unterschiedliche Vesikel eingefangen und untersucht. Die Bewegung der Organellen werden auf verschiedene Weisen manipuliert und die Ergebnisse in Bildschirmaufnahmen festgehalten. Als Nächstes wird ein Vesikel mit konstanter Geschwindigkeit untersucht mit dem Ziel dessen Größe und Geschwindigkeit zu charakterisieren. Zum Schluss wird die Laserleistung langsam erhöht und die Spannung an der Viersegmentphotodiode gemessen, bis das Vesikel die optische Falle nicht mehr überwinden kann.

Jede 30 Minuten muss die Probe dabei erneuert werden, da die Lebenszeit einer Zwiebelzelle zeitlich sehr beschränkt ist.

## 4 Auswertung

### 4.1 Untersuchung von Quarzkügelchen

#### 4.1.1 Kamerakalibrierung

Das in Abbildung 4 per optische Pinzette eingefangene Quarzkügelchen wird genutzt, um das Zentrum der optischen Falle (gelber Kreis) in der Kamersoftware zu markieren. Über den rot eingezeichneten Durchmesser von 65 Pixeln wird mithilfe des mittleren Durchmessers  $\bar{d}$  eines Quarzkügelchens von  $2,06 \mu\text{m}$  eine Pixelgröße im Realraum von

$$1 \text{ px} = \frac{2,06 \mu\text{m}}{65 \pm 4} \approx (0,0317 \pm 0,0020) \mu\text{m}$$

berechnet. Der Fehler von 4 Pixeln wird aufgrund der visuellen Bestimmung des Randes des Quarzkügelchens angenommen.



Abbildung 4: Abbildung eines in der optischen Falle (gelber Kreis) eingefangenenen Quarzkügelchens (roter Kreis).

#### 4.1.2 Kalibrierung der Photodiode

Die zur Kalibrierung der Photodiode aufgenommenen S-Kurven sind exemplarisch für eine Laserleistung von 4,83 mW in einem Screenshot des Programms 5 für die x- und y-Achse dargestellt. In diesem Screenshot sind auch die per Programm berechneten und in Grafik 6 gegen die Laserleistung aufgetragenen Konversionsfaktoren der beiden Achsen eingetragen.

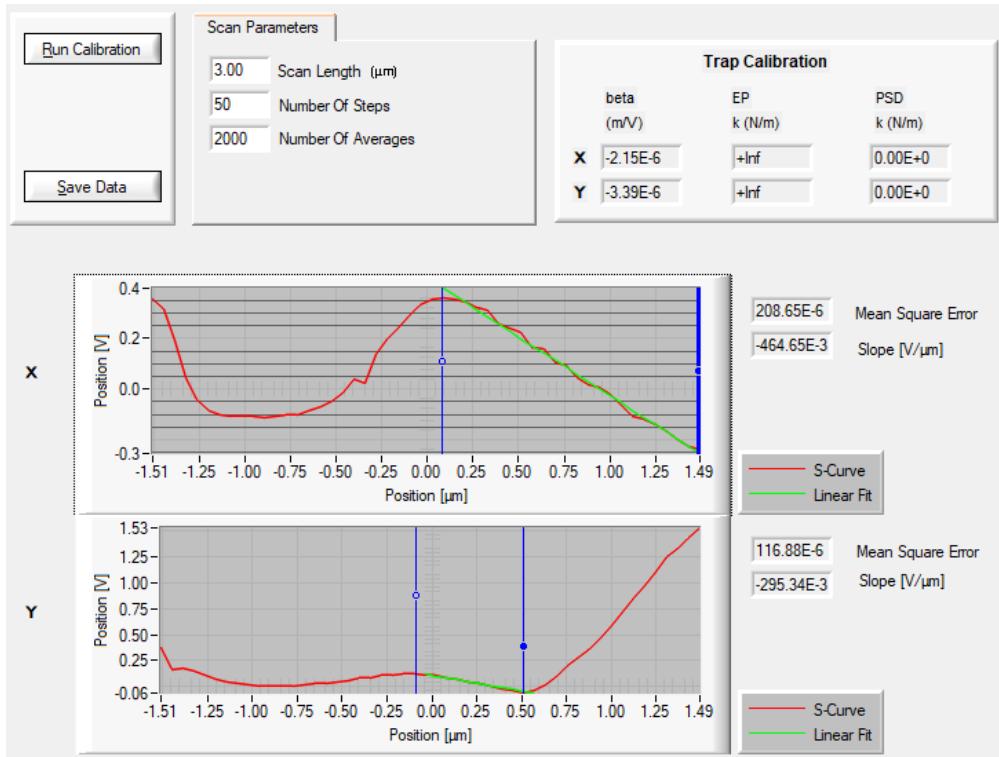


Abbildung 5: Abbildung einer aufgenommenen S-Kurve bei einer Laserleistung von 4,83 mW zur Kalibrierung der Konversionsfaktoren.

Daraus ergeben sich die Mittelwerte der Konversionsfaktoren

$$\overline{K_x} = (0,411\,15 \pm 0,000\,33) \frac{\text{V}}{\mu\text{m}} \quad \overline{K_y} = (0,265\,08 \pm 0,000\,10) \frac{\text{V}}{\mu\text{m}},$$

die zur Berechnung der Position eines eingefangen Objekts durch die von der Vier-Segment-Diode gemessenen Spannung benötigt werden.

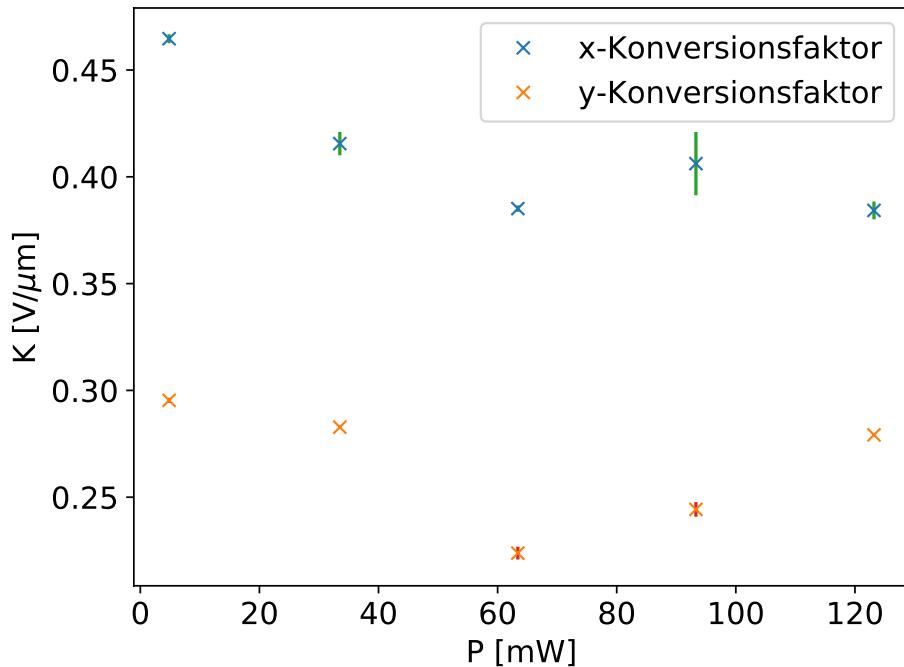


Abbildung 6: Die für beide Achsen gemessenen Konversionsfaktoren bei unterschiedlichen Laserleistungen sowie deren Fehler, die zur Sichtbarkeit um den Faktor 10 vergrößert sind.

Das in Abhängigkeit des z-Piezo-Werts aufgenommene Diodensummensignal bei einem festen Quarzkügelchen ist in Abbildung 7 aufgetragen. Der Verlauf der Kurve entspricht dem zu erwartenden Anstieg in der Umgebung des Streumaximus und bestätigt, dass ein festes Quarzkügelchen vermessen wurde.

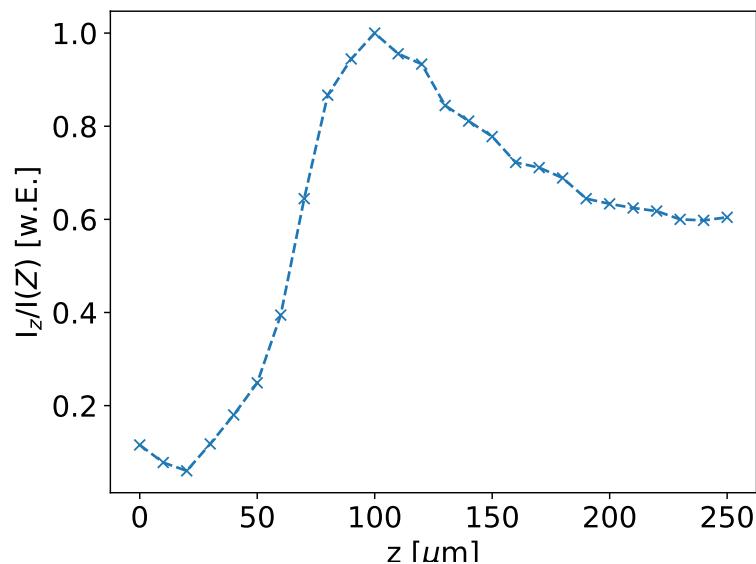


Abbildung 7: Das gemessene Diodensummensignal gegen die z-Position der optischen Falle im Bereich um das Streumaximum hier bei circa 100 μm.

### 4.1.3 Kalibrierung der Fallensteifigkeit

Der letzte Schritt der Kalibrierung, umfasst die Bestimmung der Fallensteifigkeiten  $k_x$  und  $k_y$  für beide Achsen.

Für die Kalibrierung ohne externe Krafteinwirkung wird die spektrale Leistungsdichte (PSD) genutzt, die im Screenshot 8 für beide Achsen bei einer Laserleistung von 63,4 mA dargestellt ist und direkt aus dem Programm exportiert werden kann.

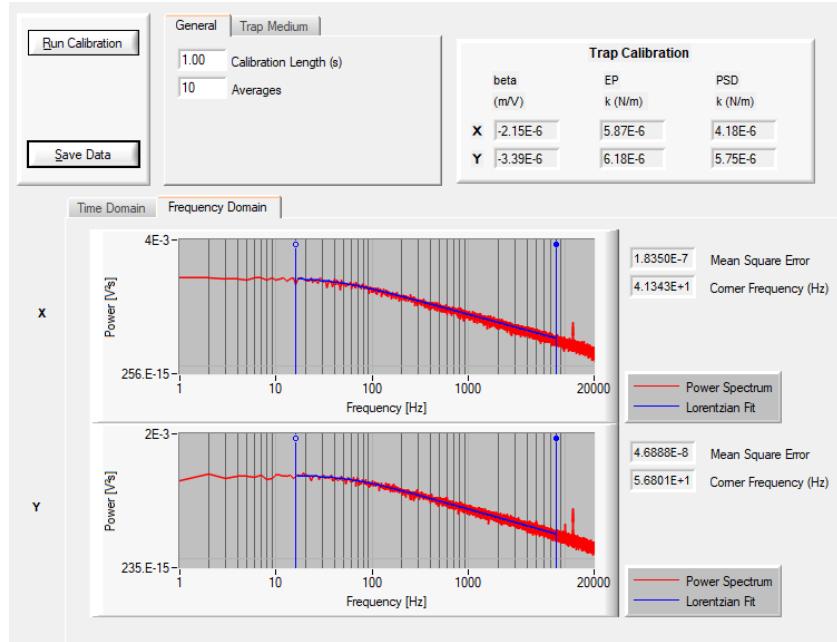


Abbildung 8: Bildschirmaufnahme des Programms zur Messung der Fallensteifigkeit mit Abbildungen im Frequenzraum und den vom Programm berechneten Fallensteifigkeiten für beide Achsen.

An diese Kurve wird folgende Funktion angepasst

$$\text{PSD}(f) = \text{const} \cdot \frac{1}{f^2 + f_0^2},$$

die die Frequenz  $f$  sowie die sogenannte Roll-Off-Frequenz  $f_0$  beinhaltet und die Eigenschaften der spektralen Leistungsdichte 4 wiedergibt. Aus diesen in Grafik 9 exemplarisch für eine Laserleistung von 63,4 mA dargestellten Anpassungen, werden die Fallensteifigkeiten über Formel 5 und die in Tabelle 1 aufgelisteten Roll-Off-Frequenzen ausgerechnet und in Tabelle 2 aufgetragen. Da der erste und letzte Wert deutlich vom zu erwartenden ansteigenden Trend der drei mittleren Werte abweichen, wird nur durch diese drei mittleren Werte eine lineare Ausgleichsgerade zur Kalibrierung der Fallensteifigkeit in Abhängigkeit der Laserleistung gelegt. Auch wenn die Fallensteifigkeit vom Gradienten

der Leistung senkrecht zur Strahlachse abhängt und dieser nicht linear verläuft, ist nach Masaaki Yasuda et al. [4] die Annahme einer linearen Abhängigkeit gerechtfertigt. Dies ergibt folgende Kalibrierung in Abhängigkeit der Laserleistung in mW für den Bereich von 93,3 mW bis 153,1 mW:

$$k_x(P) = 1.34 \cdot 10^{-8} \frac{\text{N mW}}{\text{m}} \cdot P - 7.71 \cdot 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}} \quad (6)$$

$$k_y(P) = 2.14 \cdot 10^{-8} \frac{\text{N mW}}{\text{m}} \cdot P - 1.46 \cdot 10^{-6} \frac{\text{N}}{\text{m}} \quad (7)$$

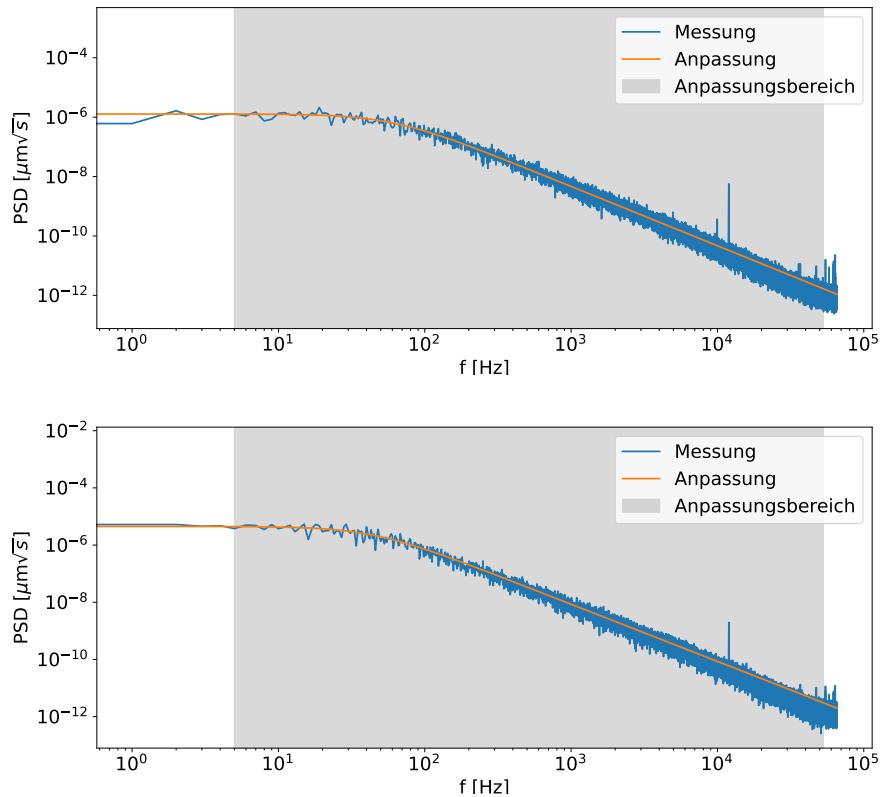


Abbildung 9: Die spektrale Leistungsdichte oben für die x-Achse und unten für die y-Achse gegen die Frequenz aufgetragen sowie eine theoretische Anpassung, die auf den Werten im markierten Bereich beruht.

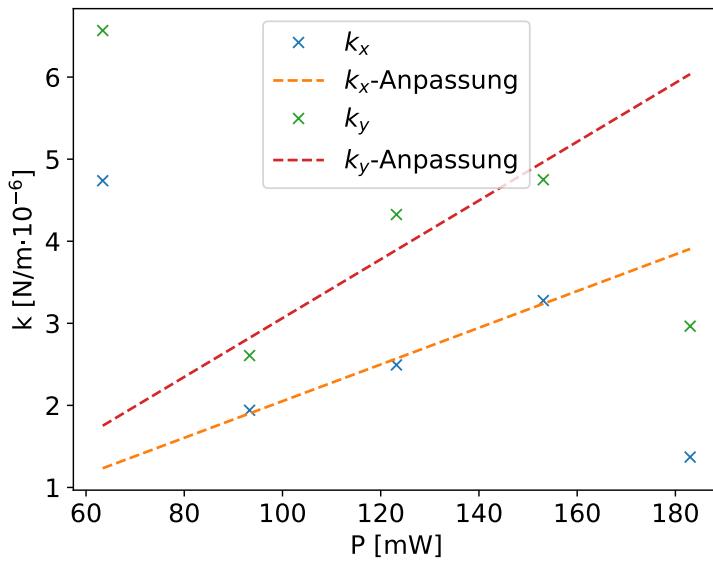


Abbildung 10: Aus den PSD-Anpassungen gewonnenen Falleneigenschaften aufgetragen gegen die Laserleistung und eine lineare Anpassung der mittleren drei Werte zur Kalibrierung der Falleneigenschaften.

Zur Überprüfung der Kalibrierung wird aus der Variation der Position des Kugelchens aufgrund der Brown'schen Bewegung, die in den Grafiken 11 für eine Laserleistung von 63,4 mW dargestellt ist, und den zuvor berechneten Falleneigenschaften die Boltzmannkonstante zu den in Tabelle 2 aufgelisteten Werten bestimmt.

Tabelle 1: Die aus den Anpassungen der PSD gewonnenen Roll-Off-Frequenzen bei verschiedenen Laserleistungen und keiner externen Krafteinwirkung.

P [mW]	$f_{0,x}$ [Hz]	$f_{0,y}$ [Hz]
63,4	$43,59 \pm 0,12$	$60,42 \pm 0,15$
93,3	$17,85 \pm 0,04$	$23,99 \pm 0,07$
123,2	$22,94 \pm 0,06$	$39,80 \pm 0,11$
153,1	$30,15 \pm 0,10$	$43,70 \pm 0,15$
182,0	$12,61 \pm 0,03$	$27,28 \pm 0,10$

Tabelle 2: Die über die aus der Anpassung der spektralen Leistungsdichte gewonnenen Roll-Off-Frequenzen berechneten Fallensteifigkeiten in x- und y-Richtung sowie die daraus berechneten Werte für die Boltzmannkonstante bei verschiedenen Laserleistungen und keiner externen Krafteinwirkung.

P[mW]	$k_x$ [N/m]	$k_{B,x}$ [J/K]	$k_y$ [N/m]	$k_{B,y}$ [J/K]
63,4	$(4,737 \pm 0,013) \cdot 10^{-6}$	$(1,432 \pm 0,004) \cdot 10^{-23}$	$(6,567 \pm 0,017) \cdot 10^{-6}$	$(1,908 \pm 0,005) \cdot 10^{-23}$
93,3	$(1,941 \pm 0,005) \cdot 10^{-6}$	$(7,751 \pm 0,019) \cdot 10^{-24}$	$(2,607 \pm 0,008) \cdot 10^{-6}$	$(1,561 \pm 0,005) \cdot 10^{-23}$
123,2	$(2,493 \pm 0,006) \cdot 10^{-6}$	$(7,819 \pm 0,019) \cdot 10^{-24}$	$(4,325 \pm 0,012) \cdot 10^{-6}$	$(1,916 \pm 0,005) \cdot 10^{-23}$
153,1	$(3,277 \pm 0,011) \cdot 10^{-6}$	$(8,253 \pm 0,028) \cdot 10^{-24}$	$(4,749 \pm 0,016) \cdot 10^{-6}$	$(1,735 \pm 0,006) \cdot 10^{-23}$
182,0	$(1,370 \pm 0,003) \cdot 10^{-6}$	$(6,688 \pm 0,016) \cdot 10^{-24}$	$(2,965 \pm 0,010) \cdot 10^{-6}$	$(1,071 \pm 0,004) \cdot 10^{-23}$

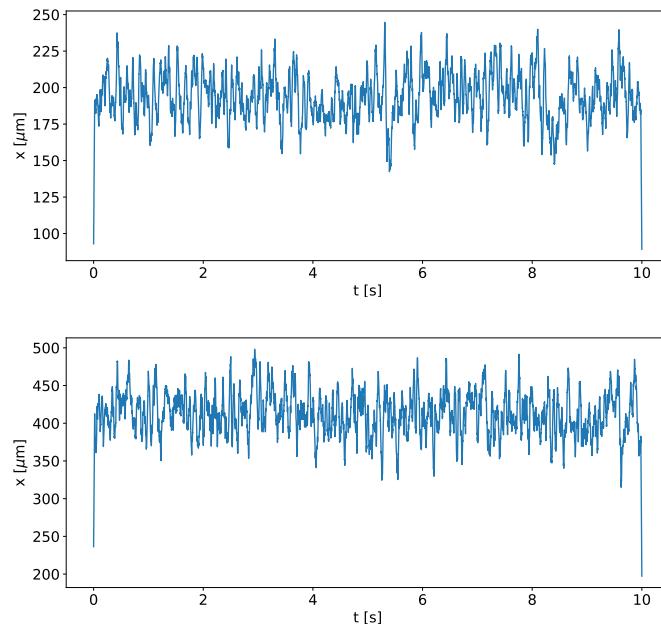


Abbildung 11: Der Ort des Quarzkügelchens aufgetragen gegen die Messzeit.

Bei der Messung mit externer Krafteinwirkung und der Messung mit externer Krafteinwirkung sowie eingesetztem Vortex-Retarder werden die Messungen direkt vom Programm ausgewertet. Mit dessen gespeicherter Kalibrierung der S-Kurven, kann es die Fallensteifigkeiten berechnen und auslesen lassen. Da das Programm die Fallensteifigkeiten nicht fehlerbehaftet ausgibt, werden die Fehler konservativ über die maximalen Fehler der Fallensteifigkeiten bei selbst durchgeföhrter Berechnung abgeschätzt. Diese nun fehlerbehafteten Werte sind für die Messung mit externer Krafteinwirkung in x-Richtung in Grafik 12 gegen die Laserleistung aufgetragen, wobei kein Zusammenhang zwischen den Werten der Fallensteifigkeiten und der Laserleistung zu erkennen ist. Wie zuvor wird die Boltzmannkonstante über das Äquipartitionstheorem berechnet und mit den Fallensteifigkeiten in Tabelle 3 für die x-Richtung und in Tabelle 4 für die y-Richtung aufgelistet.

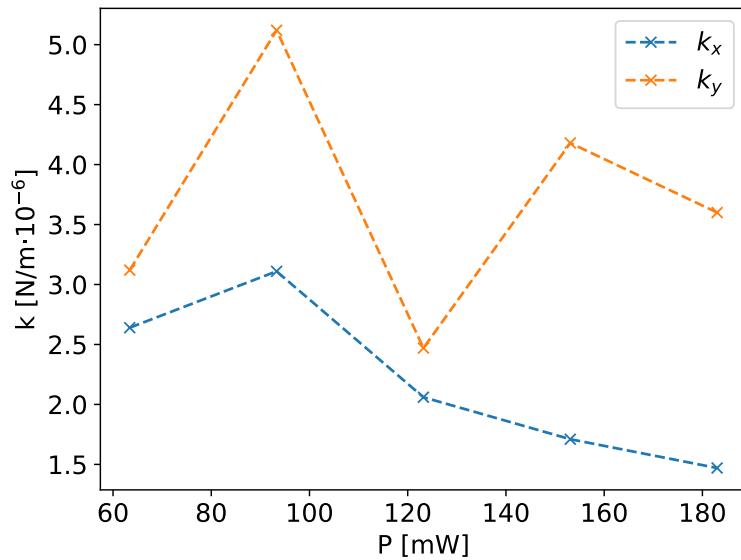


Abbildung 12: Vom Programm aus den PSD bestimmten Fallensteifigkeiten aufgetragen gegen die Laserleistung bei externer Krafteinwirkung in x-Richtung.

Tabelle 3: Die vom Programm über die spektralen Leistungsdichten berechneten Fallensteifigkeiten in x-Richtung sowie die daraus berechneten Werte für die Boltzmannkonstante bei verschiedenen Laserleistungen und externe Krafteinwirkung in x-Richtung.

P[mW]	$\langle x^2 \rangle [\mu\text{m}^2]$	$k_x [\text{N/m}]$	$k_{B,x} [\text{J/K}]$
63,4	$1,61 \cdot 10^{-3}$	$(2,640 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,422 \pm 0,011) \cdot 10^{-23}$
93,3	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$(3,110 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,129 \pm 0,007) \cdot 10^{-23}$
123,2	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$(2,060 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,047 \pm 0,010) \cdot 10^{-23}$
153,1	$1,16 \cdot 10^{-3}$	$(1,710 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(6,66 \pm 0,08) \cdot 10^{-24}$
182,0	$1,42 \cdot 10^{-3}$	$(1,470 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(6,98 \pm 0,10) \cdot 10^{-24}$

Tabelle 4: Die vom Programm über die spektralen Leistungsdichten berechneten Fallensteifigkeiten in y-Richtung sowie die daraus berechneten Werte für die Boltzmannkonstante bei verschiedenen Laserleistungen und externe Krafteinwirkung in x-Richtung.

P[mW]	$\langle y^2 \rangle [\mu\text{m}^2]$	$k_y [\text{N/m}]$	$k_{B,y} [\text{J/K}]$
63,4	$1,41 \cdot 10^{-3}$	$(3,120 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,485 \pm 0,010) \cdot 10^{-23}$
93,3	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$(5,120 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,740 \pm 0,007) \cdot 10^{-23}$
123,2	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$(2,470 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,148 \pm 0,009) \cdot 10^{-23}$
153,1	$1,36 \cdot 10^{-3}$	$(4,180 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,903 \pm 0,009) \cdot 10^{-23}$
182,0	$1,14 \cdot 10^{-3}$	$(3,600 \pm 0,020) \cdot 10^{-6}$	$(1,376 \pm 0,008) \cdot 10^{-23}$

Die Fallensteifigkeiten bei externer Krafteinwirkung in x-Richtung sowie eingesetztem Vortex-Retarder sind in Abbildung 13 gegen die Laserleistung aufgetragen und mitsamt der über sie berechneten Werte der Boltzmannkonstante in Tabelle 5 aufgetragen.

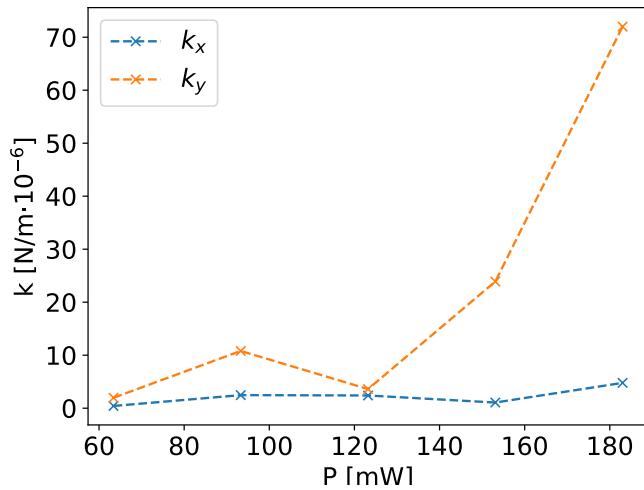


Abbildung 13: Vom Programm berechnete Fallsteifigkeiten aufgetragen gegen die Laserleistung bei eingesetztem Vortex-Retarder und externer Krafteinwirkung in x-Richtung.

Tabelle 5: Die vom Programm über die spektralen Leistungsdichten berechneten Fallsteifigkeiten in x- und y-Richtung sowie die daraus berechneten Werte für die Boltzmannkonstante bei verschiedenen Laserleistungen, eingesetztem Vortex-Retarder und externen Krafteinwirkung in x-Richtung.

P[mW]	$k_x$ [N/m · 10 <sup>-6</sup> ]	$k_{B,x}$ [J/K]	$k_y$ [N/m · 10 <sup>-6</sup> ]	$k_{B,y}$ [J/K]
63,4	$0,423 \pm 0,020$	$(3,93 \pm 0,19) \cdot 10^{-24}$	$1,970 \pm 0,020$	$(8,64 \pm 0,09) \cdot 10^{-25}$
93,3	$2,470 \pm 0,020$	$(8,95 \pm 0,07) \cdot 10^{-24}$	$10,800 \pm 0,020$	$(1,8292 \pm 0,0034) \cdot 10^{-24}$
123,2	$2,400 \pm 0,020$	$(8,73 \pm 0,07) \cdot 10^{-24}$	$3,610 \pm 0,020$	$(8,31 \pm 0,05) \cdot 10^{-26}$
153,1	$1,070 \pm 0,020$	$(5,32 \pm 0,10) \cdot 10^{-24}$	$23,900 \pm 0,020$	$(3,6191 \pm 0,0030) \cdot 10^{-25}$
182,0	$4,780 \pm 0,020$	$(1,281 \pm 0,005) \cdot 10^{-23}$	$72,000 \pm 0,020$	$(1,188\,91 \pm 0,000\,33) \cdot 10^{-24}$

## 4.2 Untersuchung des Vesikeltransports in Zwiebeln

Zur Charakterisierung der Vesikel werden zunächst die Größen der vier in Abbildung 14 rot hervorgehobenen Vesikel bestimmt. Dazu wird der Durchmesser der Vesikel über eine Bildbearbeitungssoftware in der Einheit pixel bestimmt und anschließend über die in Abschnitt 4.1.1 berechnete Größe eines Pixels im Realraum zu den in Tabelle 6 aufgelisteten Werten umgerechnet. Im Mittel ergibt sich so ein Vesikeldurchmesser  $d_{\text{Vesikel}}$  von  $(0,71 \pm 0,08) \mu\text{m}$ .

Tabelle 6: Die Durchmesser der 4 vermessenen Vesikel in der Einheit von Pixeln und im Realraum

$d_{\text{Vesikel}}$ [Pixel]	$d_{\text{Vesikel}}$ [ $\mu\text{m}$ ]
$21 \pm 4$	$0,67 \pm 0,13$
$19 \pm 4$	$0,60 \pm 0,13$
$21 \pm 4$	$0,67 \pm 0,13$
$28 \pm 4$	$0,89 \pm 0,14$

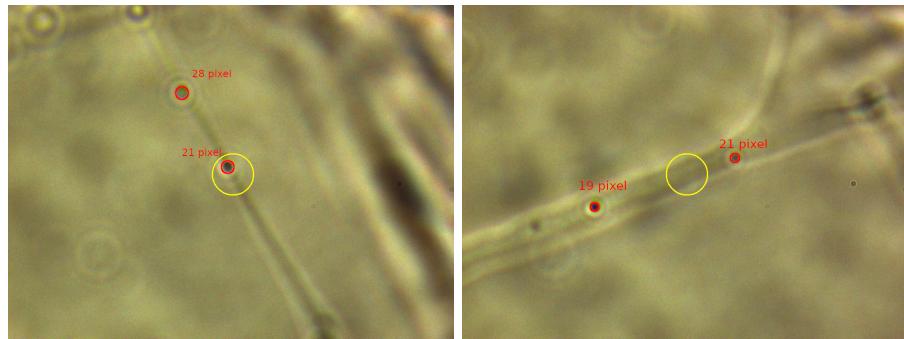


Abbildung 14: Abbildung der vier vermessenen Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Vesikeltransports ist die Intensität der Photodiode gegen die Zeit beim Durchlauf eines Vesikels durch die optische Falle in Abbildung 14 aufgetragen. Daraus geht eine Durchquerungszeit  $\Delta t$  von 1 s hervor, die auf eine Vesikelgeschwindigkeit von

$$v_{\text{Vesikel}} = \frac{2d_{\text{Vesikel}}}{\Delta t} = (1,41 \pm 0,15) \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$$

schließen lässt.

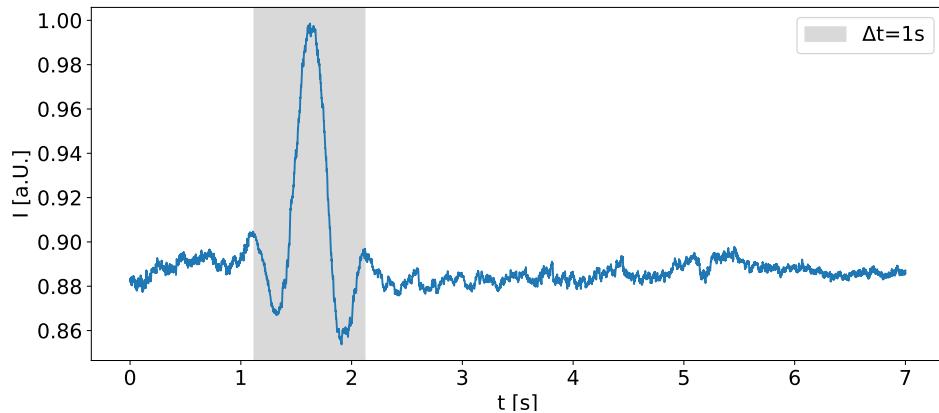


Abbildung 15: Auf die Dauer einer Sekunde bestimmte Intensitätsänderung aufgrund des Durchlaufens eines Vesikels durch die optische Falle.

Aus den restlichen Videoaufnahmen lassen sich weitere Schlüsse über das typische Verhalten des Vesikeltransports ziehen. So laufen entlang einer Actin-Straße alle Vesikel entlang einer Richtung und überholen sich nicht. Wenn ein Vesikel mit Hilfe der optischen Pinzette gegriffen wird, kann es, wie in Abbildung 16 zu sehen, über  $16\text{ }\mu\text{m}$  weit von der Actin-Straße entfernt werden, ohne dass sich die Bindung der Myosin-Motoren zwischen der Straße und dem Vesikel löst. Bei Deaktivieren der optischen Pinzette springt das Vesikel zunächst zurück an seine alte Position und läuft dann weiter in die ursprüngliche Richtung.



Abbildung 16: Ein Vesikel, das über  $16\text{ }\mu\text{m}$  von seiner Ausgangsposition auf der Actin-Straße entfernt wurde.

Da die Verbindung der Myosin-Motoren nicht gebrochen werden kann, war es auch nicht möglich Vesikel von einer Straße durch Bereiche ohne Straße auf eine andere zu transferieren. Dies ist in Abbildung 17 zu sehen. Ein Vesikel wird von der Straße am rechten Ende der roten Linie abgefangen und direkt über der blauen Straße platziert. Beim Deaktivieren der optischen Falle geht das Vesikel auf seine Ausgangsposition auf der ehemaligen Straße zurück.

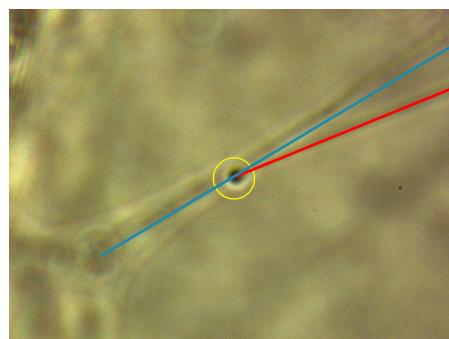


Abbildung 17: Das über der blauen Straße platzierte Vesikel springt bei Deaktivierung der optischen Falle auf seine Ausgangsposition auf der Straße am rechten Ende der roten Linie zurück.

Auch beim Entfernen der Vesikel von der Straße sind diese jedoch noch beweglich, da die Myosin-Motoren weiterhin funktionieren. In der Nähe einer Kreuzung ist so das schnelle Verschieben der Myosin-Motoren entlang der Kreuzung durch Verschieben des Vesikels, wie in Abbildung 18 schematisch eingezeichnet, möglich.



Abbildung 18: Bei der gegebenen Vesikelposition können die Myosin-Motoren entlang der Kreuzung auf die andere Straße verfahren.

Durch Platzierung der optischen Pinzette über einer Actin-Straße und sukzessivem Erhöhen der Laserleistung ist ein Stopp des Vesikeltransports bei einer Laserleistung bei einer Grenzlaserleistung zu beobachten. Da die zugehörige Aufzeichnung verloren gegangen ist, kann keine genaue Angabe dieser Leistung gemacht werden. Hier wird ein als nicht repräsentativ zu bewertender Erinnerungswert von circa 100 mW genutzt, der einer über die Kalibrierungsmessungen abzuschätzenden Fallensteifigkeit von etwa  $2,5 \cdot 10^{-6}$  N/m entspricht.

## 5 Diskussion

Die zunächst durchgeführten Messungen zur Kalibrierung der Kamera und der Photodiode anhand bekannter Quarzkügelchen lieferten realistische Ergebnisse, die die Annahme einer korrekten Kalibrierung der Detektionswege gerechtfertigen. Bei den von der genutzten Viersegmentdiode abhängigen Konversionsfaktoren zeigt sich ein für alle Laserleistungen kohärentes Ergebnis, sodass ein Mittelwert angenommen werden konnte. Die Messung des Diodensummensignals in Abhängigkeit der z-Position der optischen Falle bei eingefangenem Quarzkügelchen gibt den theoretischen monotonen Anstieg bis zum Streumaximum wieder, der für Quarzkügelchen auftritt, die fest an der Oberfläche haften. Demnach wurde die Salzlösung korrekt präpariert.

Die Kalibrierung der optischen Falle liefert für die unterschiedlichen Messaufbauten abweichende Ergebnisse. Bei der Messung ohne externe Kraft ist ein linearer Trend bei drei der fünf Messwerte erkennbar und die daran angepasste Gerade wird zur Kalibrierung der Fallensteifigkeit bei der Untersuchung des Vesikeltransports genutzt. Die aus den Fallensteifigkeiten berechneten Werte für die Boltzmannkonstante weichen maximal um 52% vom Theoriewert von 1,38 J/K [5] ab.

Die Messungen mit extern wirkender Kraft sollten dieselben oder zumindest vergleichbare Fallensteifigkeiten ergeben. Die berechneten Fallensteifigkeiten befinden sich wie erwartet in der selben Größenordnung, weisen im Gegensatz aber keine Abhängigkeit von der Laserleistung auf. Dies liegt vermutlich an falsch gewählten Anregungsfrequenzen, die nicht die Bedingung ans Verlieren des Quarzkügelchens aus der optischen Falle erfüllten. Auch wenn kein Zusammenhang der Fallensteifigkeiten zu erkennen ist, liefern diese ähnlich zur vorherigen Messung Werte für die Boltzmannkonstante, die nicht mehr als 52% von dem Literaturwert abweichen. Eine im Vergleich zur nicht vorhandenen externen Kraft neue Fehlerquelle, ist die periodische Bewegung der Probenhalterung durch Piezomotoren. Die Piezoelemente sind zum Beispiel mit einer Hysterese behaftet und führen so nie genau die selbe Bewegung durch.

Die letzte Messung bei externer Kraft und eingesetztem Vortex Retarder liefert für die y-Richtung beinahe eine konstante Fallensteifigkeit, die wiederum Werte für die Boltzmannkonstante liefern, die alle beinahe um 100% vom Literaturwert abweichen. Die starke Abweichung zum Literaturwert der Boltzmannkonstante könnte am Vernachlässigen der Effekte liegen, die durch die Rotation des Quarzkügelchens aufgrund des Drehimpulsübertrags bei eingesetztem Vortex-Retarder entstehen.

Alle Methoden zusammen lieferten eine gemittelte Boltzmann-Konstante von  $(9,899 \pm 0,004) \cdot 10^{-24} \text{ J/K}$ , die um 99,99% vom gegebenen Literaturwert abweicht. Zu dieser Abweichung können neben den bereits genannten, für die Messreihen spezifischen Gründen auch die Detektion von Störsignalen durch nicht perfekt saubere Probenhalter oder durch die Anwesenheit von weiteren Quarzkügelchen im Bereich der optischen Pinzette geführt haben. Die Asymmetrie der Werte zwischen x- und y-Richtung könnte in einer Asymmetrie der Apparatur, in Form der Piezomotoren zur Erzeugung der externen Kraft oder einer nicht perfekt ausgerichteten Vier-Segment-Photodiode, begründet sein. Aber auch eine nicht perfekt horizontale Ausrichtung der Probe zum Boden könnte zu

einer Asymmetrie der Kräfte und somit Messergebnisse geführt haben. Zusätzlich werden die Quarzkügelchen in der optischen Falle als unabhängig angesehen. Innerhalb der Falle kommt es jedoch unter anderem aufgrund der thermischen Erhitzung zu Konvektionsströmen [6], die die Kugelchen ebenfalls beeinflussen und nicht berücksichtigt worden sind.

Die Untersuchung des Vesikeltransports innerhalb von Zwiebelzellen über die optische Pinzette konnte mit geringem Aufwand beeindruckende Ergebnisse liefern. Die Charakterisierung der Größe und Geschwindigkeit der Vesikel stellte keine Problem dar. Besonders die dynamische Untersuchung des Vesikelverhaltens in Kombination mit Videoaufnahmen bot schnelle und tiefe Einblicke in die Charakteristik des Vesikeltransports.

Im Allgemeinen konnte das Konzept und Funktionsprinzip einer optischen Pinzette im Rahmen des Versuches gut erforscht werden. Auch wenn mit fortschreitender Komplexität in Form der externen Krafteinwirkung und des eingesetzten Vortex-Retarders vermehrt Abweichungen aufgrund neuer Fehlerquellen, wie der Bewegung der Piezomotoren, und Vernachlässigung von Effekten wie des Drehimpulsübertrags bei eingesetztem Vortex-Retarder, auftraten, konnten die Messungen qualitativ erfolgreich durchgeführt werden. Die komplett phänomenologische Beobachtung des Vesikeltransports hat demnach auch sehr gut funktioniert.

## Literatur

- [1] A. Ashkin. „Acceleration and trapping of particles by radiation pressure“. In: *Phys. Rev. Lett.* 24.156 (1970).
- [2] TU Dortmund. *FP2-Versuch: Optische Pinzette*. 2022.
- [3] K. C. Neuman et al. „Optical trapping“. In: *Rev. Sci. Instrum.* 75.2787 (2004).
- [4] Masaaki Yasuda et al. „Direct measurement of optical trapping force gradient on polystyrene microspheres using a carbon nanotube mechanical resonator“. In: *Scientific Reports* 7.1 (Dez. 2017), S. 2825. DOI: 10.1038/s41598-017-03068-2.
- [5] National Institute of Standards {and} Technology. *The NIST Reference on Constants, Units and Uncertainty*.
- [6] Chie Hosokawa et al. „Convection Dynamics Forced by Optical Trapping with a Focused Laser Beam“. In: *The Journal of Physical Chemistry C* 124.15 (16. Apr. 2020), S. 8323–8333. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b11663.