

Optische Pinzette

Michael Gutnikov
michael.gutnikov@udo.edu

Lasse Sternemann
lasse.sternemann@udo.edu

Abgegeben am 29.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Auswertung	3
1.1 Untersuchung von Quarzkügelchen	3
1.1.1 Kamerakalibrierung	3
1.1.2 Kalibrierung der Photodiode	3
1.1.3 Kalibrierung der Falleneigenschaft	6
1.2 Untersuchung des Vesikeltransports in Zwiebeln	10
2 Diskussion	14

1 Auswertung

1.1 Untersuchung von Quarzkügelchen

1.1.1 Kamerakalibrierung

Das in Abbildung 1 per optischer 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

$$1 \text{ px} = \frac{2,06 \mu\text{m}}{65} \approx 0,03169 \mu\text{m}$$

berechnet.

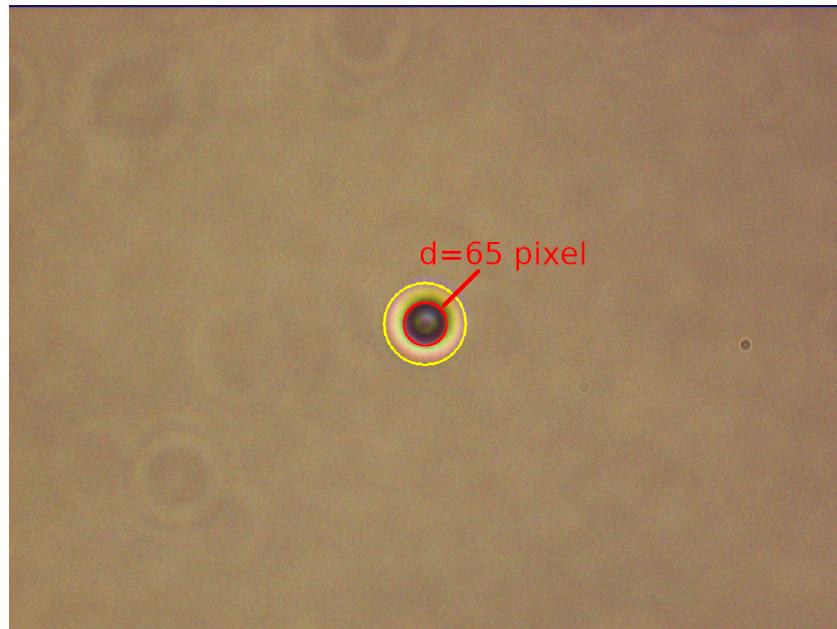


Abbildung 1: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

1.1.2 Kalibrierung der Photodiode

Die zur Kalibrierung der Photodiode aufgenommenen S-Kurven sind exemplarisch für eine Laserleistung von $4,83 \text{ mW}$ in einem Screenshot des Programms 2 für die x- und y-Achse dargestellt. In diesem Screenshot sind auch die per Programm berechneten und in Grafik 3 gegen die Laserleistung aufgetragenen Konversionsfaktoren der beiden Achsen eingetragen.

Dabei ergibt sich ein linearer Abfall der Konversionsfaktoren, die zur Berechnung der Position eines eingefangenenen Objekts durch die von der Vier-Segment-Diode gemessenen Spannung benötigt wird.

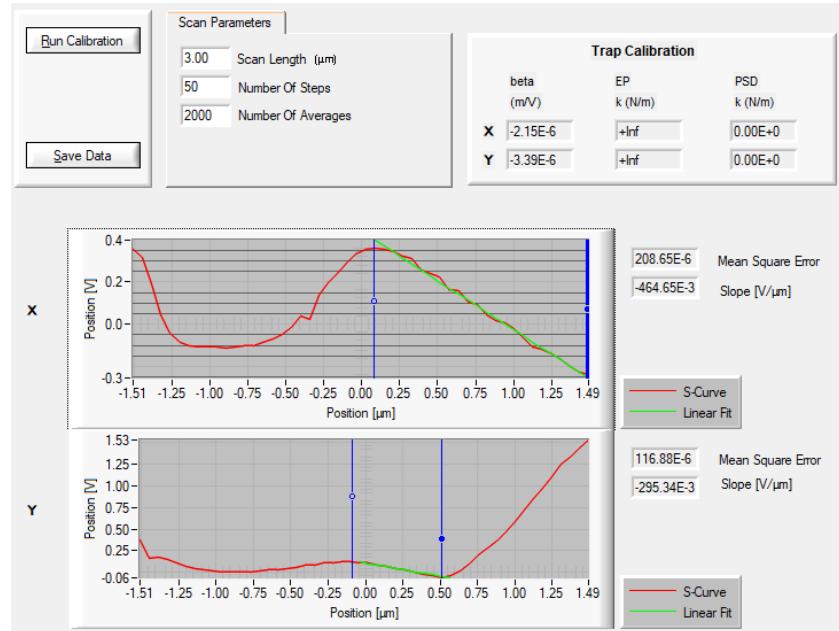


Abbildung 2: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

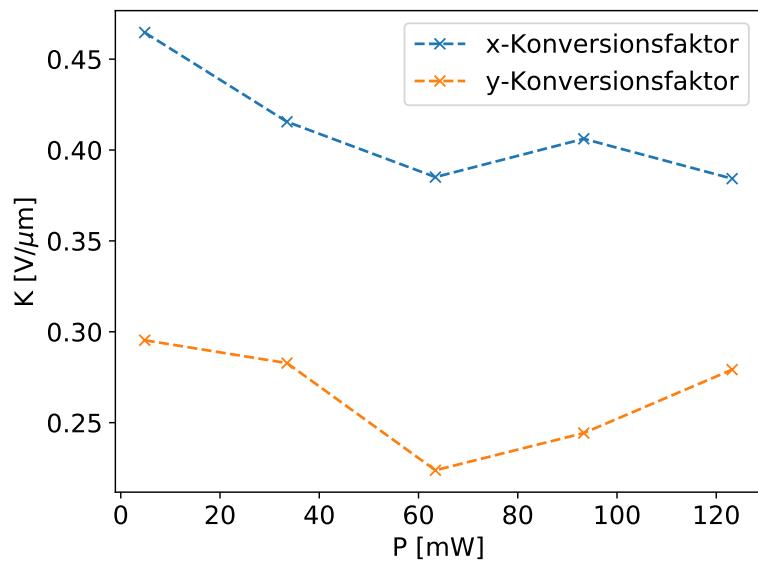


Abbildung 3: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

Das in Abhängigkeit des z-Piezo-Werts aufgenommene Diodensummensignal bei einem festen Quarzkügelchen ist in Abbildung 4 aufgetragen. Der Verlauf der Kurve entspricht dem nach Abbildung REF ZU THEORIE zu erwartenden Anstieg in der Umgebung des Streumaximus und bestätigt, dass ein festes Quarzkügelchen vermessen wurde.

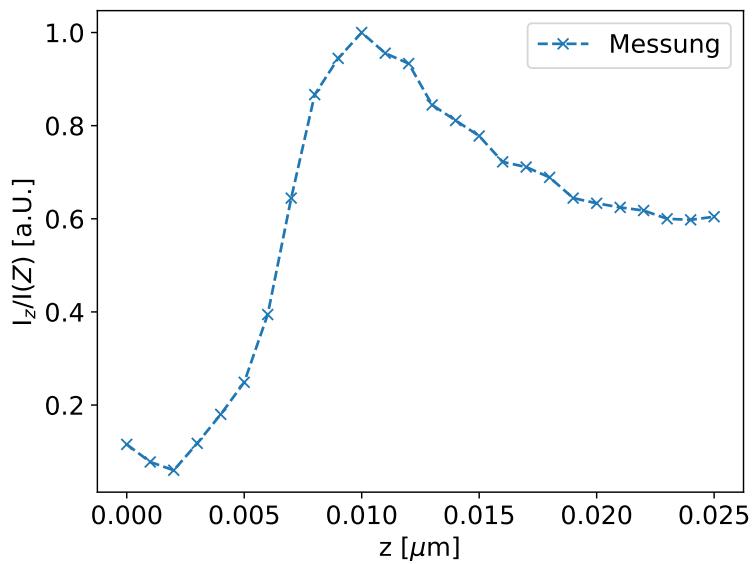


Abbildung 4: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

1.1.3 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 5 für beide Achsen bei einer Laserleistung von 63,4 mA dargestellt ist und direkt aus dem Programm exportiert werden kann.

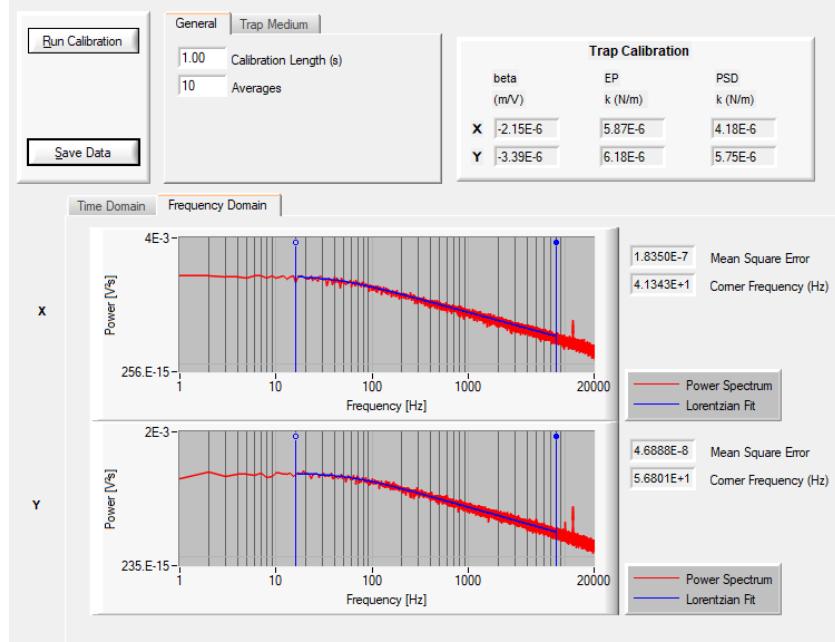


Abbildung 5: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

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 REF ZUR THEORIE wiedergibt. Aus diesen in Grafik 6 exemplarisch für eine Laserleistung von 63,4 mA dargestellten Anpassungen, werden die Fallensteifigkeiten über Formel REF ZUR THEORIE ausgerechnet und in Tabelle 1 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 Ausgleichsgerade zur Kalibrierung der Fallensteifigkeit in Abhängigkeit des Pumpstrom gelegt. Dies ergibt folgende Kalibrierung in Abhängigkeit der Laserleistung in mW für den Bereich von 93,3 mW bis 153,1 mW:

$$k_x(P) = 1.34 \cdot 10^{-8} \frac{\text{N mW}}{\text{m}} - 7.71 \cdot 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{m}} \quad (1)$$

$$k_y(P) = 2.14 \cdot 10^{-8} \frac{\text{N mW}}{\text{m}} - 1.46 \cdot 10^{-6} \frac{\text{N}}{\text{m}} \quad (2)$$

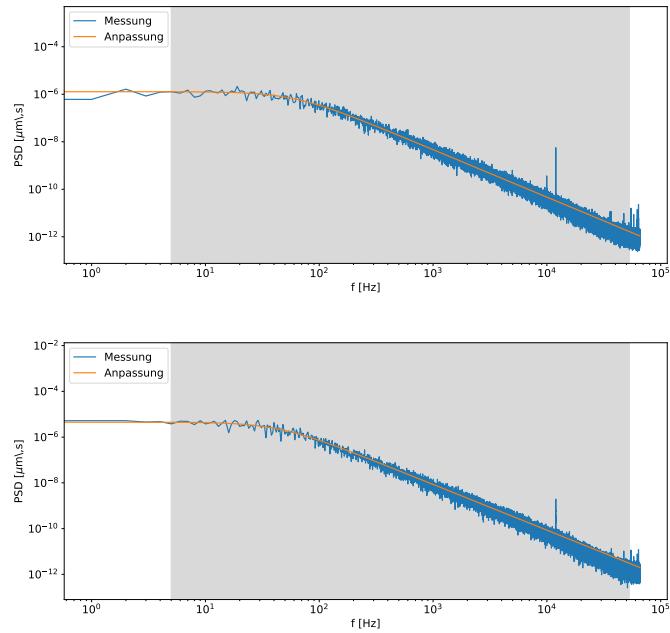


Abbildung 6: Die spektrale Leistungsdichte gegen die Frequenz aufgetragen sowie eine theoretische Anpassungen, die auf den Werten im markierten Bereich beruht.

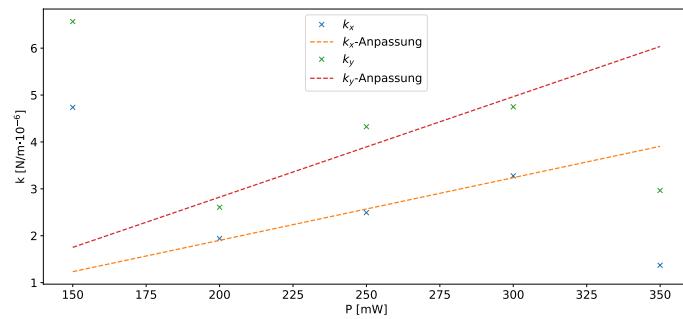


Abbildung 7: Aus den PSD-Anpassungen gewonnene Fallensteifigkeiten aufgetragen gegen die Laserleistung und eine lineare Anpassung der mittleren drei Werte zur Kalibrierung der Fallensteifigkeiten.

Zur Überprüfung der Kalibrierung wird aus der Variation der Position des Kügelchens aufgrund der Brown'schen Bewegung, die in den Grafiken 8 für eine Laserleistung von 63,4 mW dargestellt ist, und den zuvor berechneten Fallensteifigkeiten die Boltzmannkonstante zu den in Tabelle 1 aufgelisteten Werten bestimmt.

Tabelle 1: Die Durchmesser der 4 vermessenen Vesikel in der Einheit von Pixeln und im Realraum

P[mW]	k_x [N/m]	$k_{B,x}$ [J/K]	k_y [N/m]	$k_{B,y}$ [J/K]
63,4	$4,74 \cdot 10^{-6}$	$2,42 \cdot 10^{-24}$	$6,57 \cdot 10^{-6}$	$1,34 \cdot 10^{-24}$
93,3	$1,94 \cdot 10^{-6}$	$1,31 \cdot 10^{-24}$	$2,61 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-24}$
123,2	$2,49 \cdot 10^{-6}$	$1,32 \cdot 10^{-24}$	$4,33 \cdot 10^{-6}$	$1,35 \cdot 10^{-24}$
153,1	$3,28 \cdot 10^{-6}$	$1,40 \cdot 10^{-24}$	$4,75 \cdot 10^{-6}$	$1,22 \cdot 10^{-24}$
182,0	$1,37 \cdot 10^{-6}$	$1,13 \cdot 10^{-24}$	$2,96 \cdot 10^{-6}$	$7,53 \cdot 10^{-25}$

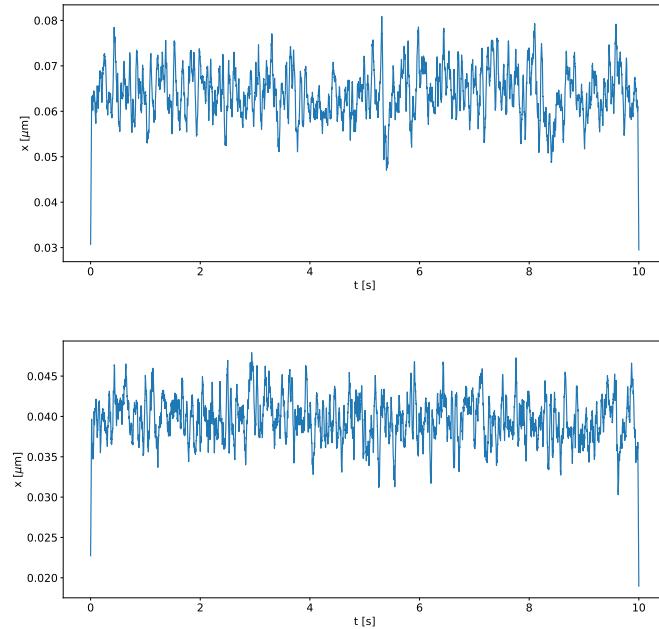


Abbildung 8: Der Ort des Quarzkügelchens aufgetragen gegen die Messzeit.

1.2 Untersuchung des Vesikeltransports in Zwiebeln

Zur Charakterisierung der Vesikel werden zunächst die Größen der vier in Abbildung 9 rot hervorgehobenen Vesikel bestimmt. Dazu wird der Durchmesser der Vesikel über eine Bildbearbeitungssoftware in der Einheit pixel bestimmt und anschließend über die in Abschnitt REF berechnete Größe eines Pixels im Realraum zu den in Tabelle 2 aufgelisteten Werten umgerechnet. Im Mittel ergibt sich so ein Vesikeldurchmesser d_{Vesikel} von 0,705 µm.

Tabelle 2: Die Durchmesser der 4 vermessenen Vesikel in der Einheit von Pixeln und im Realraum

d_{Vesikel} [Pixel]	d_{Vesikel} [μm]
21	0.666
19	0.602
21	0.666
28	0.887

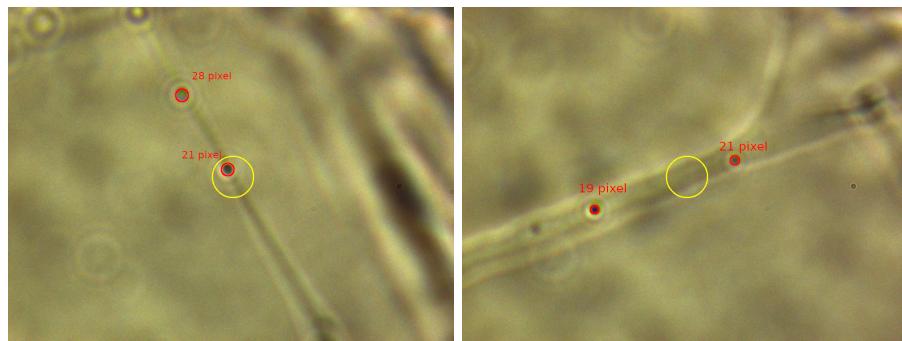


Abbildung 9: Abbildung der vier vermessenden Vesikel, die rot hervorgehoben und deren Größe in Pixeln angegeben sind.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Vesikeltransports ist die Intensität der Photodiode gegen die Zeit beim Durchlauf eines Vesikels durch die optische Falle in Abbildung 9 aufgetragen. Daraus geht eine Durchquerungszeit Δt von 1 s hervor, die auf eine Vesikelgeschwindigkeit von

$$v_{\text{Vesikel}} = \frac{2d_{\text{Vesikel}}}{\Delta t} = 1,410 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$$

schließen lässt.

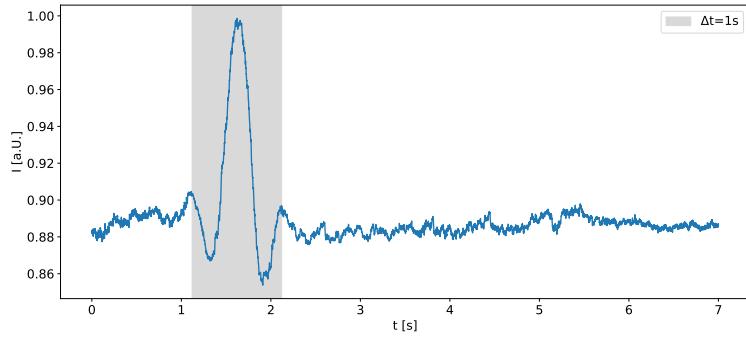


Abbildung 10: Auf die Dauer einer Sekunde bestimmte Intensitätsänderung aufgrund des Durchlaufens eines Vesikels durch die optische Falle.

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 11 zu sehen, über $16 \mu\text{m}$ weit von der Actin-Straße entfernt werden, ohne dass sich die Bindung der Myosin-Motoren zwischen der Straße und dem Vesikel lösen. Bei Deaktivieren der optischen Pinzette springt das Vesikel zunächst zurück an seine alte Position und läuft dann weiter in die ursprüngliche Richtung.



Abbildung 11: Ein Vesikel, das über $16 \mu\text{m}$ 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 12 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.

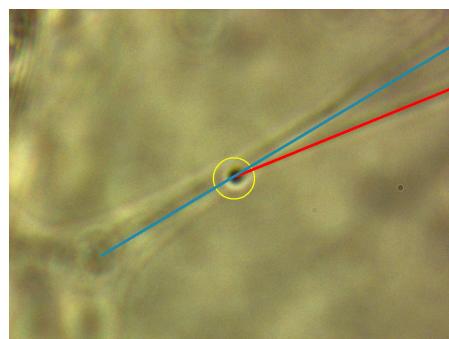


Abbildung 12: Das über der blauen Straße platzierte Vesikel springt bei Deaktivierung der optischen Falle auf seine Ausgangsposition auf der Straße am rechten Ende der roten Linie zurück.

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 13 schematisch eingezeichnet, möglich.



Abbildung 13: 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 von 63 mW zu beobachten. Dies entspricht einer aufgrund der schlechten Kalibrierungsmessungen nur abzuschätzenden Fallensteifigkeit von einigen wenigen $10 \cdot 10^{-6}$ N/m.

2 Diskussion

Die zur Kalibrierung der optischen Falle durchzuführenden Messungen lieferten größtenteils Ergebnisse, die starke Messfehler vermuten lassen.

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. Alleinig die Messung der nötigen Fallensteifigkeit zum Stopp des Vesikeltransports liefert aufgrund der zuvor gescheiterten Kalibrierung der Fallensteifigkeit von der Laserleistung keine aussagekräftigen Ergebnisse.

Im Allgemeinen konnte das Konzept und Funktionsprinzip einer optischen Pinzette im Rahmen des Versuches gut erforscht werden. Während viele Messungen zur Kalibrierung der Falle ungenaue Ergebnisse liefern und nicht als erfolgreich zu bezeichnen sind, hat die phänomenologische Beobachtung des Vesikeltransports vollends funktioniert.