

AUFBAU EINER OPTISCHEN PINZETTE

Diplomarbeit

zum Erlangen des akademischen Grades

Diplom-Physiker

angefertigt von

Andy Sischka

aus Bielefeld

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	3
1 OPTISCHE KRÄFTE	4
1.1 ERSTE OPTISCHE FALLEN – TEIL 1	4
1.2 GAUßSCHE OPTIK	5
1.3 ERSTE OPTISCHE FALLEN – TEIL 2	10
1.4 DREIDIMENSIONALE OPTISCHE FALLEN	12
2 AUFBAU DER OPTISCHEN PINZETTE	19
2.1 DAS EINKOPPELN DES LASERS	27
3 ERSTE VERSUCHE UND ERGEBNISSE	30
4 AUFBAU EINER POSITIONSDETEKTION	36
4.1 EINBAU DES PIEZO- UND DES JUSTAGETISCHES	36
4.2 DETEKTION DES VORWÄRTSGESTREUTEN LASERLICHTES	39
4.3 ERSTELLEN DES STEUERUNGS- UND MEBPROGRAMMES IN LABVIEW	43
4.4 BAU EINER NEUEN FLÜSSIGKEITZELLE	48
5 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER KALIBRIERUNG	50
5.1 MESSUNG DER STABILITÄT DER FALLE ANHAND DER MAXIMALEN KRAFT UND DER STOKESSCHEN REIBUNG	50
5.2 KALIBRIERUNG MIT HILFE DER STOKESSCHEN REIBUNG	56
5.3 MESSUNG DER STABILITÄT DER FALLE ANHAND DER BROWNSCHEN BEWEGUNG	58
6 UMBAU DER OPTISCHEN PINZETTE	62
7 ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG DES VERBESSERTEN AUFBAUS	66

7	KRAFTMESSUNGEN AN EINER λ-DNA	76
8.1	λ-DNA	76
8.2	BIOTINYLIERUNG DER λ-DNA	79
8.3	DURCHFÜHRUNG DES EXPERIMENTES	80
8.4	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	88
9	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	93
<hr/>		
	ANHANG	96
<hr/>		
	GLOSSAR	97
<hr/>		
	LITERATURVERZEICHNIS	100

Einleitung

Mit Hilfe eines stark fokussierten Laserstrahles ist es möglich, ein dreidimensionales Fallenpotential (eine Optische Falle) zu generieren, in dem mikroskopische Objekte in der Größenordnung von Atomen bis hin zu einigen dutzend Mikrometern stabil gefangen werden können. Zu diesen Objekten lassen sich sowohl einzelne Zellen, Organellen und Bakterien zählen, als auch beispielsweise dielektrische sphärische Partikel, die mit Kräften der Größenordnung einiger Pikonewton gefangen werden. In dem Bereich liegen auch intramolekulare Kräfte, wie diejenigen, die beispielsweise in einem DNA-Molekül auftreten.

Die Bezeichnung Optische Pinzette rührt daher, daß es mit Hilfe einer solchen Apparatur möglich ist, mikroskopische Objekte nicht nur zu fangen und weiterhin an beliebigen Stellen neu zu plazieren, sondern vor allem exakte Kraftmessungen in diesem zuvor nicht zugänglichen Kraftbereich zu ermöglichen. Auch können mit Optischen Pinzetten lokale Viskositätsmessungen - beispielsweise an Grenzschichten - durchgeführt werden. In Kombination mit einem Laserskalpell können auch Zellen aufgetrennt und deren Bestandteile einzeln manipuliert werden.

In dieser Diplomarbeit wird der gesamte Aufbau einer Optischen Pinzette beschrieben, angefangen von der Theorie der Optischen Kräfte, über den mechanischen Aufbau, die kraftmessenden Komponenten, bis hin zu dem Versuch von Kraftmessungen an einem Makromolekül, nämlich der DNA des Lambda-Bakteriophagen. Hierbei werden zunächst die Gradienten- und Streukräfte in einer von einem Infrarotlaser mit Gaußschem Strahlquerschnitt erzeugten Optischen Falle beschrieben. Dem mechanischen Aufbau innerhalb eines inversen Mikroskops folgt das Erstellen eines Programms, mit dem eine Positions- und Kraftdetektion eines gefangenen Objektes und eine Steuerung eines Piezotisches, der die Flüssigkeitszelle trägt, ausgeführt werden kann. Messungen der auf gefangene Objekte ausgeübten maximalen Kraft, der Relation zwischen dem Detektorsignal und der auf das Objekt wirkenden Kraft, sowie die Aufnahme des Rauschspektrums dienen der Kalibrierung der Falle. Ein weiterer Umbau, das Erstellen einer möglichst effektiven Flüssigkeitszufuhr, aber vor allem die chemische Präparation der zu untersuchenden λ -DNA, waren für den Erfolg einer Kraftmessung unabdingbar.

1 Optische Kräfte

Bereits 1618 machte Johannes Kepler den Vorschlag, der Druck des Lichtes sei die Ursache, daß der Schweif jedes Kometen immer von der Sonne weggerichtet ist. Zwar lenkt der elektrisch geladene Teilchenstrom der Sonne vor allem die Ionen im Kometenschweif ab, aber allein der Strahlungsdruck¹ reicht aus, um den nichtionisierten Kometenstaub wegzublasen.

Eine erste Erklärung für die Ursache dieses Strahlungsdruckes liefert die elektromagnetische Theorie [Gerthsen 1993]: Das elektrische Feld der Welle erzeugt in der Materie eine Stromdichte j , die im magnetischen Feld der Welle eine Lorentzkraft F erfährt.

Die Quantentheorie schreibt dem Photon eine Energie $E = h\nu$ und einen Impuls $p = h\nu/c = h/\lambda$ zu. Der Strahlungsdruck auf eine ebene, senkrechte und vollständig absorbierende Oberfläche ergibt sich somit als Summe der Impulse aller auftreffenden Photonen und bei einer vollständig reflektierenden Oberfläche als zweifache Summe aller Impulse. Dies resultiert aus dem Impulserhaltungssatz.

1.1 Erste optische Fallen – Teil 1

Da die Kräfte, die der Strahlungsdruck auf Objekte ausübt, äußerst gering sind – einige mW bewirken Kräfte von einigen pN – wurde ihnen lange Zeit nur bei astronomischen Objekten Beachtung geschenkt, da dort Distanzen und Strahlungsintensitäten hohe Werte annehmen können. Mit der Erfindung des Lasers als kohärente Lichtquelle hoher Intensität war es möglich, die schwachen Kräfte auch in irdischen Labors zu untersuchen. Durch Fokussierung des Laserlichtes auf mikroskopische Objekte sollte der Strahlungsdruck dann aufgrund der geringen Masse der Partikel deutliche dynamische Effekte bewirken.

Arthur Ashkin stellte 1969 dazu folgende Überlegung an [Ashkin 1997]: Ein fokussierter Laserstrahl eines Lasers im Dauerstrichbetrieb (cw) von etwa 1 W soll auf ein Partikel fallen, dessen Radius der Größe der Laserwellenlänge entspricht. Unter der Annahme, daß der gesamte Impuls des Lichtes auf das Partikel übertragen wird, ergäbe sich eine Kraft von rund 10^{-3} dyn = 10 nN. Diese Kraft bewirke aufgrund der geringen Masse des Partikels eine Beschleunigung von rund dem hunderttausendfachen der Erdbeschleunigung.

Diese Überlegungen wurden von Ashkin dann in dem folgenden Experiment umgesetzt [Ashkin 1970]: Ein cw Argonlaser mit einer Leistung von $P = 1\text{ W}$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 514,5\text{ nm}$ wird verlustfrei auf ein dielektrisches Partikel mit einem Radius $r = \lambda$ fokussiert. Der Strahlungsdruck bewirkt dann eine Kraft von $F_{rad} = 2QP/c = 0,66\text{ nN}$,

¹ In Erdentfernung beträgt der Strahlungsdruck $9\mu\text{N}$ je Quadratmeter reflektierender Oberfläche.

wobei c die Lichtgeschwindigkeit ist, unter der Annahme, daß nur ein Bruchteil $Q = 0,1$ des auftreffenden Lichtes zurückreflektiert wird. Hiermit ergibt sich eine Beschleunigung des Partikels mit einer Masse m von $a = F_{rad} / m = 1,17 \cdot 10^6 \text{ m/s}^2$ bei einer Dichte des Partikels von 1 g/cm^3 .

Im ersten Experiment benutzte Ashkin transparente Latexkugeln mit einem Brechungsindex von $n_{\text{Objekt}} = 1,58$ mit drei verschiedenen Durchmessern ($0,59 \mu\text{m}$, $1,31 \mu\text{m}$ und $2,68 \mu\text{m}$) und suspendierte diese in Wasser ($n_{\text{Wasser}} = 1,33$). Der Vorteil von relativ transparenten Partikeln in einer transparenten Flüssigkeit ist der, daß diese sich und das sie umgebende Medium kaum aufheizen. Würde dies geschehen, dann wirkt eine thermische Kraft auf das Objekt, einige Größenordnungen stärker als die Kraft des Strahlungsdruckes.

Der von Ashkin verwendete Argonlaser emittiert Strahlung im TEM_{00} Modus; er hat somit ein Gaußsches Intensitätsprofil und gehorcht der Gaußschen Optik.

1.2 Gaußsche Optik

Die elektromagnetische Welle, die beispielsweise jeder Laser aussendet, kann durch eine Wellengleichung in skalarer Näherung beschrieben werden [Eichler 1998]:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} - \frac{1}{c} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) E(x, y, z, t) = 0. \quad (1.1)$$

Hierbei ist $E(x, y, z, t)$ die Feldstärke und $c = c_0 / n$ die Lichtgeschwindigkeit im jeweiligen Medium, die durch die Lichtgeschwindigkeit c_0 im Vakuum und den Brechungsindex n gegeben ist.

Die einfachsten Lösungen der Wellengleichung (1.1) sind zum Beispiel die ebenen Wellen oder ferner die Kugelwellen, so wie sie Gleichung (1.2) beschreibt:

$$E(x, y, z, t) = \frac{A}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \exp \left[-i \left(k \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} - \omega t \right) \right]. \quad (1.2)$$

Hierbei ist $A / \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$ die Amplitude der Feldstärke. Diese Lösungsansätze sind jedoch zur Beschreibung der Laserstrahlen ungeeignet, da eine ebene Welle eine unendliche Ausdehnung hat und somit eine unendliche Energie besitzt. Eine Kugelwelle breitet sich in alle Raumrichtungen aus und entspricht ebenfalls keiner brauchbaren Beschreibung.

Ein verbessertes Modell für einen Laserstrahl ist eine seitlich begrenzte, ebene Welle. Dabei ergibt sich ein Strahl konstanter Intensität über die Breite d eines Blendenquer-

schnittes. Nach dem Huygensschen Prinzip entsteht aber in großen Abständen $z > d^2 / \lambda$ ein Fraunhofersches Beugungsbild, welches mit zunehmendem Abstand von der Blende divergiert.

Bei einem Gaußschen Strahlprofil ist diese Divergenz jedoch am geringsten. Zudem bleibt die Gaußsche Intensitätsverteilung in jeder Entfernung bestehen.

Durch geeignete Wahl der Resonatoren eines Lasers kann aus den verschiedenen möglichen transversalen Feldverteilungen oder Moden diejenige mit Gaußschen Strahlprofil selektiert werden. Diese TEM_{00} Grundmode kann als Kugelwelle mit imaginärem Wellenzentrum angesehen werden.

Das Zentrum einer Kugelwelle ist in Gleichung (1.2) beliebig wählbar und kann sogar im Komplexen liegen:

$$z \rightarrow z + iz_R = q. \quad (1.3)$$

Die Größe z_R ist reell und hat später noch eine wichtige Bedeutung. Durch die Transformation (1.3) nimmt (1.2) folgende Gestalt an:

$$E(r, q, t) = \frac{A}{\sqrt{r^2 + q^2}} \exp \left[-i \left(k \sqrt{r^2 + q^2} - \omega t \right) \right]$$

$$\text{mit } r = \sqrt{x^2 + y^2}$$

Wird jetzt der z-achsnahe Bereich betrachtet ($r \ll |q|$), der als paraxialer Bereich bezeichnet wird, so gilt:

$$\begin{aligned} E(r, q, t) &\approx \frac{A}{q} \exp \left[-i \left(kq \sqrt{1 + r^2 / q^2} - \omega t \right) \right] \\ &\approx \frac{A}{q} \exp \left[-i \left(kq \left(1 + r^2 / 2q^2 \right) - \omega t \right) \right] = \frac{B}{q} \exp \left[-i \frac{kr^2}{2q} \right] \exp \left[i(\omega t - kz) \right] \end{aligned}$$

$$\text{mit } B = A \cdot \exp[kz_R].$$

Der komplexe Parameter $1/q$ kann auch folgendermaßen geschrieben werden:

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{R(z)} - i \frac{2}{k w^2(z)}.$$

Die Größen $w(z)$ und $R(z)$ werden als Fleckgröße und Krümmungsradius der Wellenfronten beschrieben.

Somit gilt für die Feldverteilung eines Gaußschen Strahles näherungsweise

$$E(r, z, t) \approx \frac{B}{q} \exp\left[-\frac{r^2}{w^2(z)}\right] \exp\left[-i \frac{kr^2}{2R(z)}\right] \exp[i(\omega t - kz)]. \quad (1.4)$$

Diese Feldverteilung entspricht in r-Richtung einer Gaußfunktion $\exp(-r^2/w^2)$. Die Fleckgröße bzw. Strahlweite $w(z)$ des TEM₀₀ Modus ist laut [Kneubühl 1999] der Abstand $r = w(z)$ von der z-Achse, bei dem das Feld $E(r, z, t)$ auf den $1/e$ -ten Wert von $E(0, z, t)$ abgefallen ist. Die Intensitätsverteilung $I \sim |E|^2$ ist dann durch

$$I/I_0 = \exp\left[-\frac{2r^2}{w^2(z)}\right] \quad (1.5)$$

gegeben.

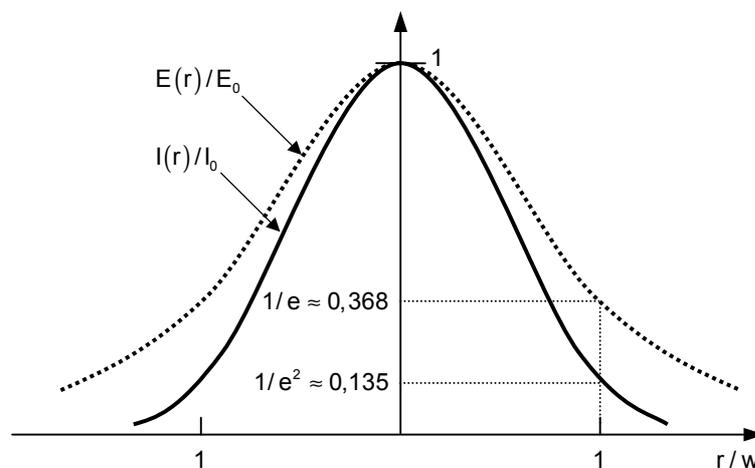


Abbildung 1: Feldverteilung und Intensitätsprofil eines Gaußschen Strahles nach [Siegmann 1986].

Aus Gleichung (1.4) ergeben sich folgende Parameter:

Strahltaille:
$$w_0 = \sqrt{\frac{2z_R}{k}} = \sqrt{\frac{z_R \lambda}{\pi}}$$

Rayleighlänge:
$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

Bei $z = z_R$ weitet sich der Strahl auf das $\sqrt{2}$ fache des Wertes w_0 auf.

Krümmungsradius:
$$R(z) = z + \frac{z_R^2}{z}$$

Fleckgröße:
$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/z_R)^2}$$

Halber Öffnungswinkel:
$$\theta = \frac{\lambda}{\pi w_0}$$

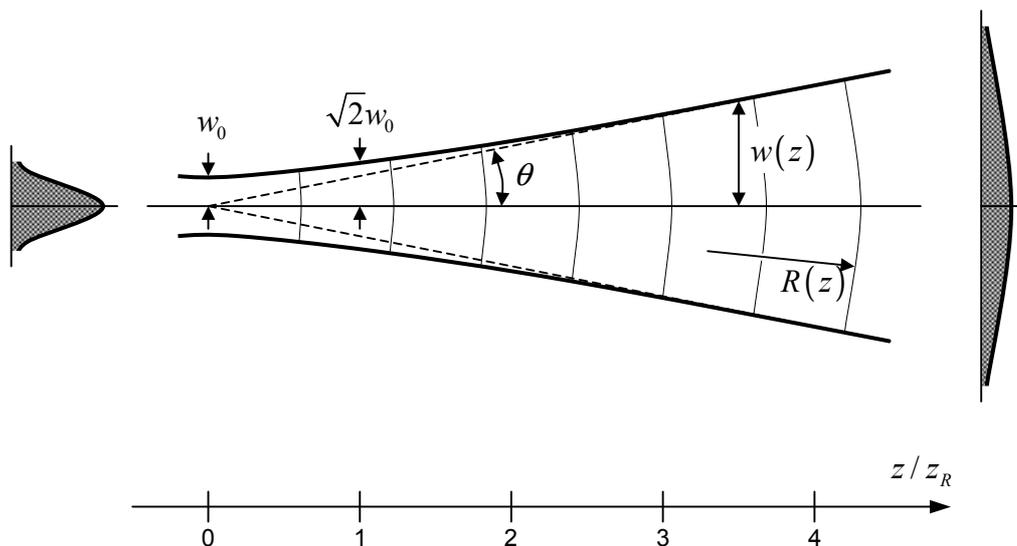


Abbildung 2: Darstellung aller Parameter, sowie der Divergenz eines Gaußschen Strahles von der Strahltaile aus.

Der Krümmungsradius R der Phasenflächen ist am Punkt der Strahltaile unendlich groß. Das Verhalten des Gaußschen Strahles im Fernfeld ($z \gg z_R$) wird durch den Öffnungswinkel 2θ beschrieben. Zudem haben im Fernfeld die Phasenflächen einen Krümmungsradius von $R = |z|$.

Anhand Abbildung 2 läßt sich erkennen, daß ein Gaußscher Strahl mit Hilfe eines idealen optischen Systems - welches das Strahlprofil nicht beschneidet – nur auf eine minimale

Strahlweite von der Größe der Strahltaile fokussiert werden kann. Ein Gaußscher Strahl wird jedoch in jedem optischen System aufgrund einer endlich großen Apertur beschnitten.

Für einen Gaußschen Strahl mit einer Leistung P ergibt sich nach (1.5) und nach [Siegmann 1986]:

$$I(r) = \frac{2P}{\pi w^2} \exp\left[-\frac{2r^2}{w^2}\right].$$

In vielen Anwendungen wird der Gaußsche Strahl durch eine Apertur abgeblendet, deren Radius a der Strahlweite w entspricht. Das geschieht zum Beispiel dann, wenn der Strahl in die rückseitige Öffnung eines Objektivs fällt.

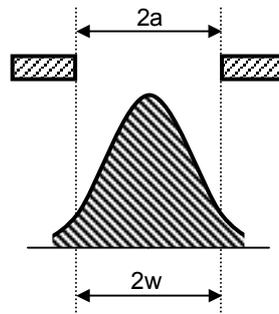


Abbildung 3: Ein Gaußscher Strahl wird durch eine Apertur mit dem Durchmesser $2a$ begrenzt.

Die in diesem Fall transmittierte Leistung ist laut [Siegmann 1986]:

$$\frac{P_{\text{Transm.}}}{P} = \frac{2}{\pi w^2} \int_0^a dr \cdot 2\pi r \cdot \exp\left[-\frac{2r^2}{w^2}\right] = 1 - \exp\left[-\frac{2a^2}{w^2}\right] \stackrel{a=w}{\cong} 86,47\% \quad (1.6)$$

und wird als „ $1/e$ -“ oder auch „86% -Kriterium“ bezeichnet. Beträgt die Größe der Apertur $2a < 2w$, dann wird sie als „vom Strahlprofil überfüllt“ bezeichnet und es werden weniger als 86,47% der Leistung transmittiert. In einem solchen Fall machen sich auch die durch die Apertur hervorgerufenen Beugungseffekte (Nahfeld-Fresnel und Fernfeld-Fraunhofer Beugungseffekte aus [Siegmann 1986]) zunehmend deutlicher bemerkbar als im Falle einer „ausgefüllten“ ($2a = 2w$) oder „unterfüllten“ ($2a > 2w$) Apertur.

1.3 Erste optische Fallen – Teil 2

Der von Ashkins [Ashkin 1970] Laser emittierte TEM_{00} Strahl wurde in eine $t = 120 \mu m$ schmale Flüssigkeitszelle fokussiert und bildete dort eine Strahltaile mit einem Durchmesser von $2w_0 = 12,4 \mu m$. In der Zelle befand sich die Suspension der Latexkügelchen, die mit einem dahintergeschalteten Mikroskop mit Filter betrachtet werden konnten.

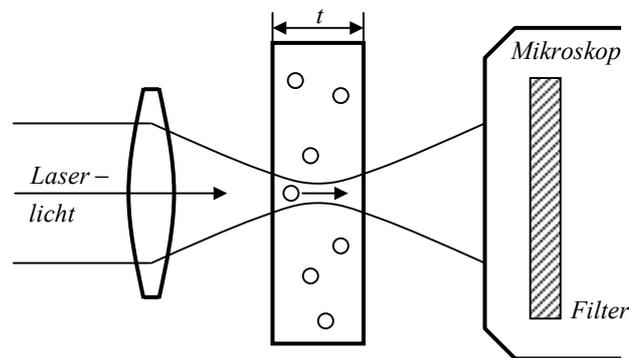


Abbildung 4: Der Versuchsaufbau des ersten Fallenexperimentes nach [Ashkin 1970].

Vom Laser getroffene Kügelchen bewegten sich zum einen wie vorhergesagt aufgrund des Strahlungsdruckes in die Richtung des Laserlichtes. Jedoch wurde auch eine Kraft beobachtet, die die Kügelchen in die Achse des fokussierten Strahles hin zog, wo sie von dort aus weiter - wie in Abbildung 4 zu sehen - nach rechts beschleunigt wurden. Kügelchen mit größerem Durchmesser wurden vom Strahlungsdruck stärker beschleunigt und erfuhren auch eine stärkere Kraft, die sie zur optischen Achse hin zogen. Trafen die Kügelchen dann an der Rückwand der Flüssigkeitszelle ein, so blieben sie dort in der Mitte des Strahles gefangen. Wurde der Laser abgeschaltet, wanderten die Kügelchen aufgrund der Brownschen Bewegung langsam von dieser Position weg.

Diese Kraft, welche die Kügelchen radial zur optischen Achse und damit in Richtung der höchsten Strahlungsintensität zieht, kann nach Abbildung 5 folgendermaßen verstanden werden.

1.4 Dreidimensionale Optische Fallen

Um eine stabile dreidimensionale Falle zu erstellen, können zum Beispiel zwei gegeneinandergerichtete optische Fallen verwendet werden, oder der Strahl entgegengesetzt der Schwerkraft ausgerichtet werden.

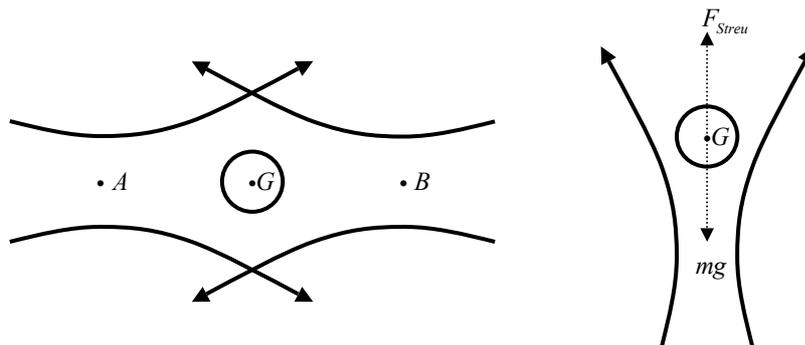


Abbildung 6: Prinzip einer 2-Strahl-Falle und einer Schwerkraftfalle nach [Ashkin 1997].

Beim erstgenannten Prinzip läßt sich das Kügelchen im Gleichgewichtspunkt G zwischen zwei möglichst gleichintensiven fokussierten Laserstrahlen mit ihren Strahltaillen A und B fangen. Das Kügelchen wird radial wiederum durch die Gradientenkraft der beiden Strahlen gefangen. In z Richtung rufen die Streukräfte einen stabilen Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Strahltaillen hervor.

Beim Beispiel der Schwerkraftfalle stellt sich ein stabiler Gleichgewichtszustand zwischen der nach oben gerichteten Streukraft und der nach unten gerichteten Schwerkraft ein.

Mit einer Kombination aus beiden Fallentypen gelang es [Ashkin 1971] einen stabilen Schwebezustand von $10 - 25 \mu m$ kleinen Glaskügelchen in Luft und im Vakuum hervorzurufen.

Einen neuen Typ einer dreidimensionalen Falle (single-beam gradient force trap) wurde in [Ashkin 1986] beschrieben. Der Fortschritt hierbei war die Erzeugung einer zusätzlichen axialen Gradientenkraft. Diese wurde hervorgerufen durch einen Intensitätsgradienten auf der optischen Achse, der eine Kraft erzeugt, die stärker ist als die Komponente der Streukraft, die parallel zur optischen Achse zeigt. Die Idee hierbei war, *einen einzigen* Laserstrahl möglichst stark zu fokussieren, also den Strahl extrem konvergieren zu lassen. Dazu benötigt es einer Linse – speziell eines Objektivs – mit einer hohen numerischen Apertur.

Die numerische Apertur NA errechnet sich nach

$$NA = n_{Medium} \cdot \sin \theta = r / f .$$

Hierbei ist θ der halbe Öffnungswinkel des durch das Objektiv erzeugten konvergenten Strahles, r der Radius der Apertur des Objektivs, f dessen Brennweite und n_{Medium} der Brechungsindex des Mediums. Typischerweise werden Objektive mit einer numerischen Apertur von $NA \geq 1,00$ verwendet.

Diese Art der Konstruktion einer optischen Falle mit Hilfe nur eines einzigen stark fokussierten Laserstrahles - als *Optische Pinzette* bezeichnet - war zunächst dafür vorgesehen, dielektrische Partikel zu fangen, die dem Rayleigh-Regime gehorchen [Ashkin 1978]. Für den Durchmesser $2r$ solcher Partikel im Vergleich zur verwendeten Wellenlänge λ des Laserlichtes gilt $2r < 0,2 \cdot \lambda$. Generell gilt für eine Kraft, die auf ein Objekt wirkt nach [Svoboda 1994] und [Ashkin 1986]

$$F = \frac{Q n_{Medium} P}{c} .$$

Q ist ein dimensionsloser Koeffizient, der dem Anteil der umgesetzten Kraft an der einfallenden Leistung P entspricht.

Befindet sich ein dielektrisches Partikel im Fokus eines Lasers, so wirkt zum einen eine Streukraft

$$F_{Streu} = \frac{I_0}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 n_{Medium} \quad (1.7)$$

in Richtung des einfallenden Lichtes auf das Objekt. Hierbei ist I_0 die Intensität des Laserstrahles und $m = n_{Objekt} / n_{Medium}$ der effektive Brechungsindex. Zum anderen zeigt die Gradientenkraft

$$F_{Grad} = -\frac{n_{Medium}}{2} \alpha \nabla E^2 = -\frac{n_{Medium}^3 r^3}{2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla E^2 \quad (1.8)$$

in die Richtung der höchsten Lichtintensität. Hier ist α die Polarisierbarkeit des dielektrischen Partikels und E die Feldstärke des elektrischen Feldes der Welle.

Die Bedingung, daß ein Objekt im Fokus einer dreidimensionalen Falle gefangen wird, ist, daß die Gradientenkraft betragsmäßig stärker und der Streukraft entgegengerichtet ist:

$$R = \frac{F_{Grad}}{F_{Streu}} \geq 1. \quad (1.9)$$

Die Bedingung (1.9) gilt speziell für in der Falle gefangene Atome [Ashkin 1986]. Im allgemeinen soll jedoch das Verhältnis R wesentlich größer als 1 sein. Gilt beispielsweise $R \geq 3$, dann ist das Stabilitätskriterium für alle Objekte im Rayleighbereich mit der Größe $2r \leq 95 \text{ nm}$ erfüllt. Das bedeutet jedoch nicht, daß Objekte mit $2r > 95 \text{ nm}$, also $R < 3$, dann nicht mehr stabil im Fokus gefangen werden, denn in diesem Fall verlassen lediglich die Formeln (1.7) und (1.8) ihren Gültigkeitsbereich.

Ein weiteres Stabilitätskriterium ist, daß für den Boltzmannfaktor

$$\exp(-U / kT) \ll 1$$

mit dem Potential $U = \frac{n_{Medium}}{2} \alpha E^2$ der Gradientenkraft

gelten muß. Dies bedeutet, daß die Zeit, in der das Objekt von außerhalb der Falle in die Falle gezogen wird, größer sein muß als die Zeit, in der das Objekt durch Diffusion infolge Brownscher Bewegung die Falle wieder verlassen kann ([Ashkin 1986] und [Visscher 1992a]).

Werden Objekte in der dreidimensionalen Falle gefangen, für deren Größe $2r \gg \lambda$ gilt – die sich also im Mie-Bereich befinden – so können die Gradienten- und Streukräfte wiederum leicht durch die geometrische Optik beschrieben werden ([Ashkin 1986] und [Ashkin 1992]):

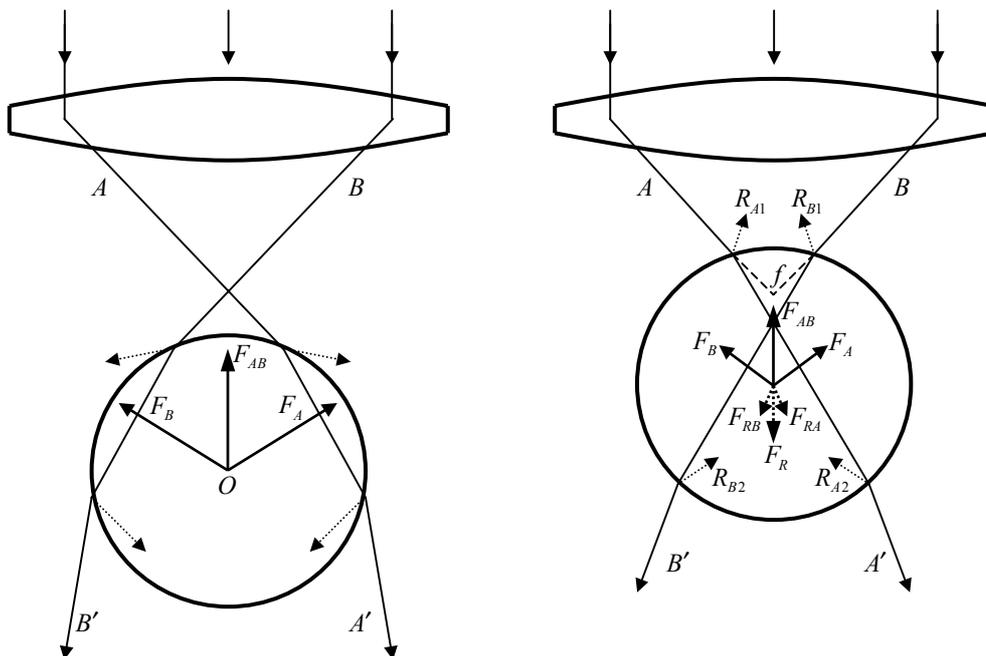


Abbildung 7: Geometrische Beschreibung der Streu- und Gradientenkräfte in der Optischen Falle nach [Ashkin 1986] (linkes Bild) und [Ashkin 1992] (rechtes Bild).

Die stark konvergenten Strahlen A und B werden beim Ein- und Austritt aus dem Kügelchen mit $n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}}$ gebrochen und infolge der geänderten Richtung der Strahlen A' und B' im Vergleich zu A und B wird deren Impuls auf das Kügelchen übertragen und ruft dort die Kräfte F_A und F_B hervor. Die resultierende Kraft F_{AB} zeigt in $-z$ Richtung und bildet somit die Gradientenkraft, die der Streukraft F_R entgegengerichtet ist und das Kügelchen in der Nähe des geometrischen Fokus f des Objektivs festhält. Obwohl in Abbildung 7 sich das Kügelchen im linken Bild außerhalb und im rechten innerhalb des geometrischen Fokus befindet, wirken in beiden Fällen Gradientenkräfte, die zum Fokus hin gerichtet sind. Aber die Gradientenkraft F_{AB} im linken Bild ist betragsmäßig stärker, da die Lichtstrahlen beim Durchgang durch das Kügelchen einer stärkeren Brechung unterliegen und somit der Impulsübertrag größer ist.

Die Streukräfte infolge der Reflexionen an der Oberfläche des Kügelchens beim Ein- und Austritt - dargestellt als Strahlen R_{A1}, R_{B1}, R_{A2} und R_{B2} - rufen eine Netto-Streukraft F_R hervor, welche bestrebt ist, das Kügelchen stets in Richtung des Lichtes wegzustoßen. Ein stabiler axialer Gleichgewichtszustand stellt sich dann ein, sobald die Gradientenkraft gleich der entgegengesetzten Streukraft ist. Wirken auf das Kügelchen noch zusätzliche äußere Kräfte (Schwerkraft, Reibungskräfte infolge der sich bewegenden umgebenden Flüssigkeit,

Zugkräfte infolge an das Kügelchen angebundener Makromoleküle, etc.) so stellt sich dann ein Gleichgewicht ein, sobald die Vektorsumme aller dieser Kräfte null ist.

Daß sich auch radial ein stabiler Gleichgewichtszustand einstellt und auch dann, sobald das Kügelchen weiter in Richtung Objektiv ausgelenkt wird, läßt sich auch folgendermaßen verdeutlichen [Ashkin 1992]:

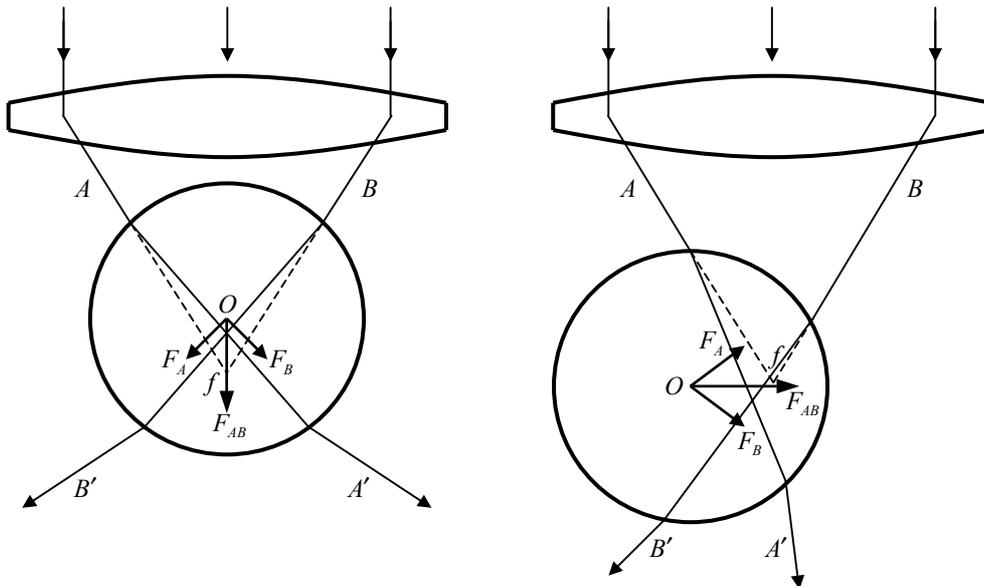


Abbildung 8: Gradientenkräfte im Falle eines weit in Richtung Objektiv (linkes Bild) und eines radial ausgelenkten Kügelchens (rechtes Bild).

Im linken Bild ist zu erkennen, daß die resultierende Kraft auf das Kügelchen dann in Strahlrichtung zeigt, falls dieses über den Gleichgewichtszustand hinaus Richtung Objektiv ausgelenkt wird. Beim rechten Bild wird das Kügelchen vom Gleichgewichtszustand aus senkrecht zur optischen Achse ausgelenkt und die vom Impuls des Lichtes übertragene, radial gerichtete Kraft ist bestrebt, es wieder auf die optische Achse zu ziehen.

In [Ashkin 1992] sind Ergebnisse von Berechnungen im Mie-Regime aufgelistet, bei denen verschiedene Parameter von Kügelchen, dem sie umgebenden Medium, Modenprofilen der verwendeten Laser, Ausleuchtungen der rückwärtigen Aperturen der Objektive und verschiedene Konvergenzwinkel der Strahlen berücksichtigt werden. Zusammenfassend läßt sich daraus entnehmen, daß stabile Fallen vor allem dann erreicht werden, wenn der relative Brechungsindex $m = n_{\text{Objekt}} / n_{\text{Medium}}$ mindestens 1,2 beträgt. Ein gaußförmiges Strahlprofil (TEM_{00}) oder ein wenig besser noch ein „donut“ Profil (TEM^*_{00}) eines Laser - welches allerdings schwer zu erzeugen ist - bilden stabile Fallen aus, aber ein Intensitätsprofil, welches die Apertur gleichmäßig ausfüllt, vergrößert noch weiter die

Stabilität der Falle. Dennoch werden meist TEM_{00} Intensitätsprofile verwandt, da dieser Modus sehr stabil in einem Laser schwingt.

Für möglichst stabile dreidimensionale Fallen muß der Konvergenzwinkel θ (siehe Abschnitt 1.2) im Bereich um 70° liegen. Bei zu kleinem Konvergenzwinkel ($\theta \sim 30^\circ$) dominiert die Streukraft über die axiale Gradientenkraft und eine stabile dreidimensionale Falle ist nicht mehr zu erzeugen.

Der Mittelpunkt eines in der optischen Falle gefangenen Kügelchens ist im Vergleich zum geometrischen Brennpunkt des Objektivs immer ein wenig in $+z$ verschoben, da im Vergleich zur axialen Gradientenkraft die betragsmäßig geringere $+z$ -Komponente der Streukraft es in diese Richtung schiebt.

Die in [Ashkin 1992] durchgeführten Berechnungen zeigen, daß im Mie-Bereich die optischen Kräfte unabhängig von der Objektgröße sind, im Gegensatz zum Rayleigh-Bereich, in dem die Kräfte mit r^3 variieren.

In [Visscher 1992b] wurde zur Berechnung der Kräfte auf Objekte im Mie-Bereich das elektromagnetische Feld im Fokus eines hochkonvergenten Strahles berücksichtigt - hier für die Berechnung der axialen Gradientenkraft:

$$\vec{F}_z = \int_0^\pi d\theta \int_{-\pi/2}^{\pi/2} d\phi \cdot n_{\text{Medium}} \frac{\langle \vec{S} \rangle}{c} F(\theta, i, i_1)_z \sin \theta$$

$$\text{mit } F(\theta, i, i_1)_z = \text{Re} \left(e^{j(i-\theta)} + R_{l,r} e^{j(i+\theta)} - T_{l,r}^2 \frac{e^{j(2i-i-\theta)}}{1 + R_{l,r} e^{2j \cdot i}} \right) \quad \text{und } j^2 = -1.$$

Hierbei ist $\langle \vec{S} \rangle$ der zeitliche Mittelwert des Poynting-Vektors, R und T die Fresnel-Koeffizienten für Reflexion und Transmission am Kügelchen, i und i_1 sind die Winkel zwischen dem einfallenden und dem im Objekt gebrochenen Strahl und der Oberflächennormalen, und θ ist der Winkel zwischen der Oberflächennormalen des Objektes und der optischen Achse. Mit dieser Berechnung wird für Partikel im Mie-Bereich eine 14% höhere Kraft errechnet, die das Objekt in der Falle festhält, wenn statt einer Wellenlänge von 532 nm eine Wellenlänge von 1064 nm benutzt wird; im Rayleigh-Bereich ist die Kraft bei 1064 nm sogar viermal so stark. Zu berücksichtigen ist, daß in dieser Rechnung keine Beugung betrachtet wurde.

Weiterhin wird in [Ashkin 1992] darauf hingewiesen, daß noch keine quantitativen Berechnungen für gefangene Objekte im Größenbereich $2r \approx \lambda$ existieren. Der Grund dafür liegt im Problem der Berechnung der an solchen Objekten auftretenden Streuung. Dennoch sollten Berechnungen der Kräfte mit Hilfe der geometrischen Optik laut [Ashkin 1992] bis in den Bereich von $2r \approx 6\lambda$ näherungsweise möglich sein. Jedoch bereitet der Größenbereich $2r \approx \lambda$ bei der experimentellen Bestimmung der Kräfte in der optischen Falle keine Probleme, da diese Kräfte leicht mit Hilfe der Stokesschen Reibungskraft, die

auf ein Kügelchen wirkt, welches sich mit einer konstanten Geschwindigkeit durch eine homogene Flüssigkeit bewegt, ermittelt werden können.

2 Aufbau der Optischen Pinzette

Das Ziel meiner Diplomarbeit ist der komplette Aufbau einer Optischen Einzelstrahl-Pinzette sowie der Entwurf von mechanischem Zubehör wie einer Flüssigkeitszelle und eines mechanischen Verstelltisches. Außerdem wird ein Steuerungsprogramm in LabView erstellt, um den Piezotisch relativ zur Optischen Falle bewegen zu können und um die Optische Falle zu kalibrieren. Zum Schluß folgt die Kraftmessung an einer zwischen zwei Polystyrolkügelchen gebundenen λ -DNA. Dazu müssen an die Enden der λ -DNA mit Hilfe biochemischer Präparation Biotinmoleküle angekoppelt werden, so daß die DNA zwischen den zwei streptavidinbeschichteten Polystyrolkügelchen angebunden werden kann.

Die Basis der Optischen Pinzette bildet ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 100), das auf einer 10 mm starken Aluminiumplatte ruht, die fixiert ist auf einer Optischen Bank von „Newport“, welche niederfrequente Schwingungen dämpft.

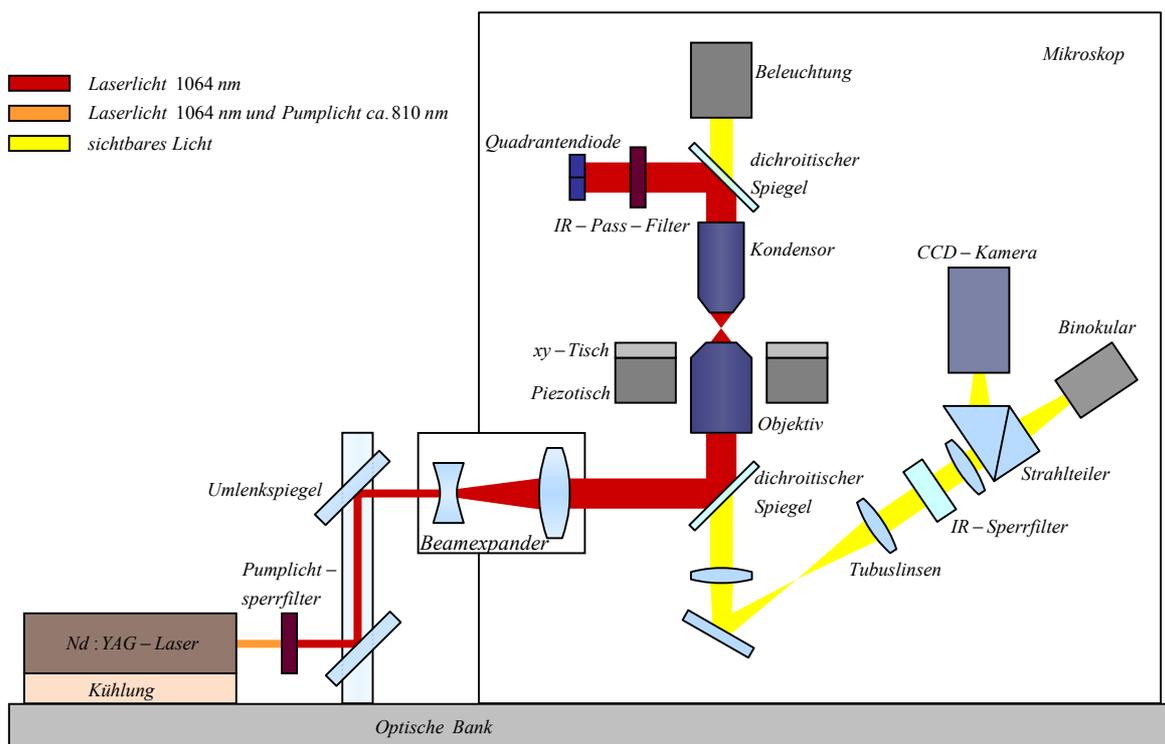


Abbildung 9: Schematischer Strahlengang der Optischen Pinzette.

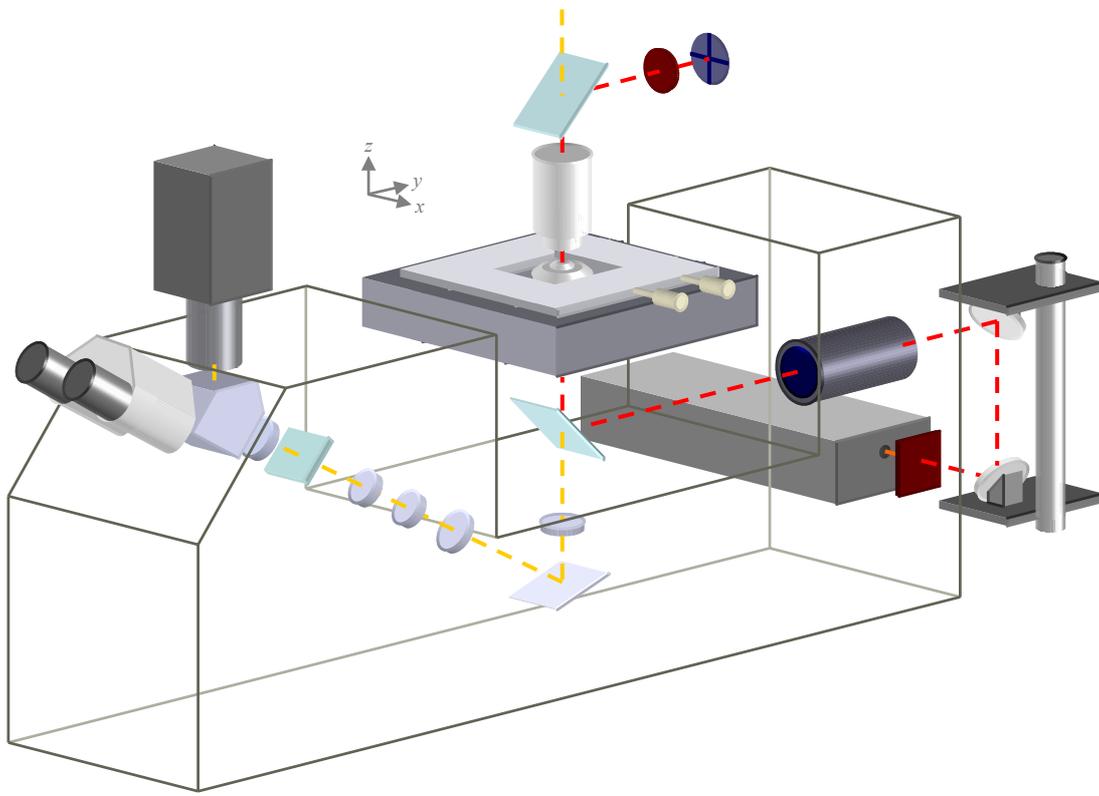


Abbildung 10: Vergleichbar zu Abbildung 9 sind hier alle wesentlichen Bauteile der Optischen Pinzette in ihrer räumlichen Position im und um das Mikroskop dargestellt.

Die Laserquelle ist ein diodengepumpter Nd:YAG Laser (von „Laser 2000“ Modell LCS-DTL-322) im cw-Betrieb mit einer Wellenlänge von 1064 nm . Die Ausgangsleistung kann am Laser-Steuergerät in 255 Schritten von null bis auf 1024 mW eingestellt werden. Der TEM_{00} Strahlquerschnitt wird laut Betriebsanleitung mit $1,5\text{ mm}$ und die Strahldivergenz mit einem halben Öffnungswinkel von $0,8\text{ mrad}$ angegeben.

Der Laser ruht auf einem separaten Kühlkörper mit einem darunter angebrachten Ventilator. Für diese Kühleinheit wurde zunächst eine Grundplatte aus Aluminium angefertigt, um den gesamten Laser fest auf der Optischen Bank zu fixieren. Da der Kühlkörper auf vier dünnen Säulen ruht, machte sich später im Laufe der ersten präzisen Messungen an der Optischen Pinzette diese Instabilität bemerkbar. Weiterhin verursachte der Ventilator eine 400 Hz Schwingung des gesamten Laserkopfes, die ebenfalls präzise Messungen im Nanometerbereich im Fokus der Optischen Pinzette störte.

Aus diesem Grund wurde die gesamte Kühleinheit durch einen nur 25 mm hohen Kupferblock (etwa ein zwei Fünftel der ursprünglichen Höhe der Kühleinheit) ersetzt, der die Wärme des Lasers aufnimmt und auch an die darunterliegende Optische Bank abgibt. In der Aufwärmphase unterliegt der Laser noch deutlichen Intensitätsschwankungen, aber danach sollen sie laut Hersteller weniger als 2% je Stunde betragen.

Der Kupferblock ist nach vorne hinaus verlängert; dort ist dann eine 3 mm dünne Nut hineingefräst, in der der Pumplichtsperrfilter Platz findet. Laut Herstellerangaben kann der Laser Pumplicht von etwa 810 nm emittieren. Der Laserstrahl wurde daraufhin durch ein Dreikantprisma geleitet und so zerlegte sich der Strahl in einen Anteil, der den 1064 nm entsprach und einem schwächeren Strahl, der laut [Wiebusch] das Pumplicht darstellt, welches ebenfalls eine hohe Strahlkonvergenz aufwies, und das sogar mit bloßem Auge als tiefroter Fleck auf einem dahintergehaltenen weißen Schirm sichtbar wurde. Mit einem wellenlängenselektiven Leistungsmeßgerät konnte festgestellt werden, daß die Leistung des Pumplichtes etwa einem Fünftel der Leistung des Infrarotlichtes entsprach.

Der Pumplichtsperrfilter ist ein $2,85\text{ mm}$ dicker *RG 850* Filter, der bei 810 nm eine Reintransmission $T < 0,2\%$ hat und bei 1064 nm mehr als 98% hindurchläßt.

Das Infrarotlicht kann durch ein IR-Detektorkärtchen (Fa. Laser 2000) sichtbar gemacht werden, auf dem dann ein grüner Fleck erscheint. Unglücklicherweise ruft auch das Pumplicht einen grünen Fleck hervor, der trotz der geringeren Intensität der Pumpstrahlung deutlich heller erscheint. Da das Pumplicht zwar auch sehr konvergent ist, aber nicht genau auf der optischen Achse des Infrarotlichtes verläuft, stört dieser Umstand dann bei der genauen Justage des Laserstrahles – man läuft dann halt Gefahr, nur den Pumplichtstrahl exakt zu justieren.

Außerdem erzeugte das Pumplicht eine „zweite Optische Falle“ – siehe Seite 35.

Zu Testzwecken fiel ein 60 mW Laserstrahl, nachdem er mit Neutralfiltern abgeschwächt wurde, auf den Chip der CCD-Kamera, die an Stelle des Objektivs an das Mikroskop angesetzt wurde – der Lichtweg betrug bis dahin circa 80 cm . Eine Aufnahme wurde ohne, eine zweite mit Pumplichtsperrfilter gemacht.

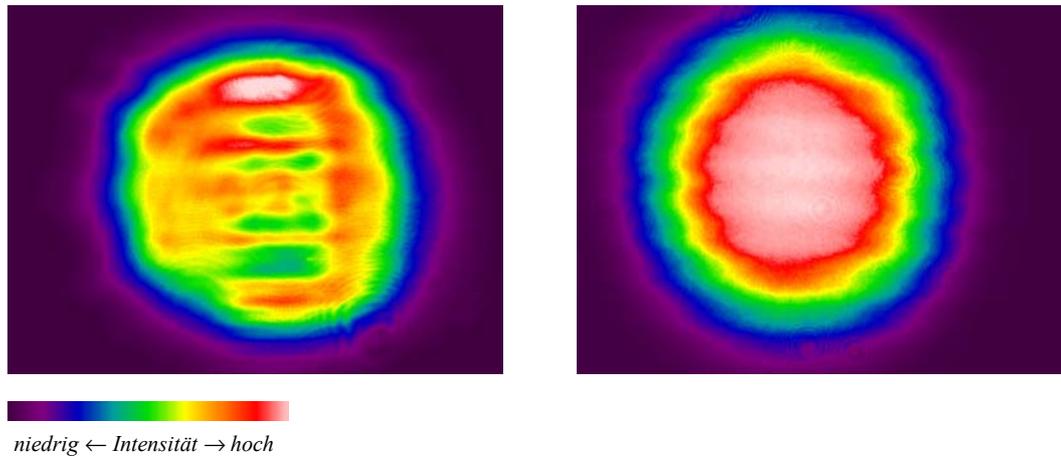


Abbildung 11: Das Strahlprofil des Laserstrahles in Falschfarbendarstellung, ohne und mit Pumplichtsperrfilter aufgenommen.

Bei dieser Art der Detektion des Strahlprofils sind nur qualitative Aussagen möglich. Da die CCD Kamera bei 810 nm deutlich empfindlicher ist als bei 1064 nm , sieht die Kamera im linken Bild vor allem das unregelmäßige Strahlprofil der Pumpstrahlung. Bei ausgefiltertem Pumplicht zeigt sich dann im rechten Bild das TEM_{00} Strahlprofil bei 1064 nm , wobei die Kamera hierbei ihre Belichtungszeit und den Verstärkungsfaktor automatisch regelte.

Dem $\text{RG } 850$ Filter folgen zwei ebene Umlenkspiegel von „New Focus“. Deren Reflektivität beträgt bei 1064 nm mehr als 95% . Beide Spiegel lassen sich mit je drei Einstellschrauben an deren Halterungen justieren, die wiederum auf einem soliden Turm angebracht sind. Der erste Spiegel lenkt das Licht nach oben, der zweite kippt es wieder in die Waagerechte, aber um 90° zur Seite gedreht.

Daraufhin tritt der Laserstrahl in einen Beamexpander (Sill Optics) mit variabler Strahlaufweitung von 1 bis 8-fach. Dieser Beamexpander wurde später infolge des kompletten Umbaus der Optischen Pinzette durch einen Beamexpander (ebenfalls Sill Optics) mit festem Aufweitungsfaktor von $10x$ ersetzt, dessen Strahldivergenz sich variieren ließ.

Wichtig bei der Justage des Laserstrahls ist, daß selbst wenn dieser mittig in den Beamexpander eintritt, der Strahl deswegen nicht zwangsläufig auf der optischen Achse des Beamexpanders verläuft.

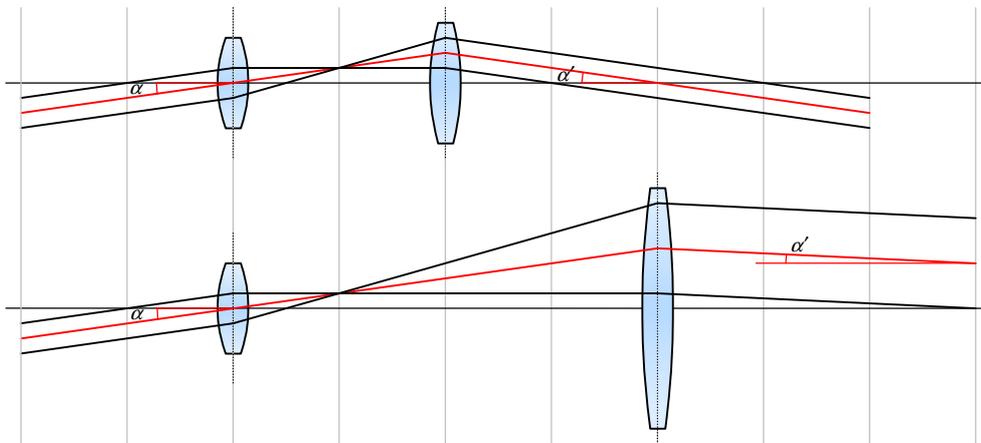


Abbildung 12: Ein Laserstrahl trifft mittig, aber unter einem Winkel α auf einen Beamexpander mit 1-facher und 3-facher Stahlaufweitung. In Analogie zum Fernrohr befindet sich links die Okular- und rechts die Objektivlinse.

In Abbildung 11 scheint zwar auf den ersten Blick die Justage eines Laserstrahles durch einen Beamexpander schwieriger zu sein (wenn das Infrarotkärtchen weit entfernt von der Objektivlinse positioniert wird), je größer dessen Aufweitungsfaktor A ist, denn für den Austrittswinkel α' gilt $\tan \alpha' = \tan \alpha / A$. Gleichzeitig macht sich jedoch der Umstand bemerkbar, daß bei einer großen Aufweitung der Laserstrahl in einem größeren Abstand von der optischen Achse den Beamexpander verläßt, was um so leichter zu detektieren ist.

Der aufgeweitete Laserstrahl tritt durch das Mikroskop in den Reflektorraum unter dem Objektiv ein. Dort befindet sich ein Schieber mit Aufnahmen für drei Umlenkspiegel und sechs Filter. In den Schieber ist ein $0,9 \text{ mm}$ dünner dichroitischer Spiegel eingesetzt, der laut Hersteller mehr als $99,6\%$ des Infrarotlichtes beliebiger Polarisation in Richtung Objektiv reflektiert - tatsächlich werden ca. 96% reflektiert, wie meine Messungen ergaben. Sichtbares Licht läßt dieser „hot mirror“ zu etwa 80% hindurch.

Die Oberfläche des dichroitischen Spiegels trägt nur auf einer Seite eine Beschichtung, die das Infrarotlicht reflektiert. Mit bloßem Auge ist nicht zu erkennen, welche Seite diese Beschichtung trägt. Wird der hot mirror falsch herum eingesetzt, so ergibt sich aufgrund von Interferenz zwischen dem IR-Licht, welches dann zum geringen Teil an der Vorderseite und zum Großteil an der Rückseite des Spiegels reflektiert wird, folgendes Strahlprofil:

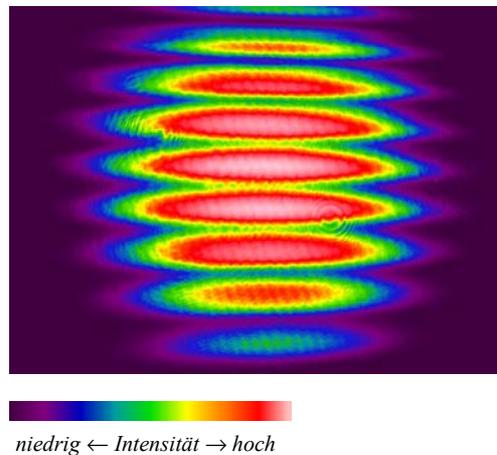


Abbildung 13: Das Strahlprofil bei falsch eingebautem IR-Umlenkspiegel.

Schwache Andeutungen von Interferenzmustern sind auch in Abbildung 11 rechts zu erkennen, da dort ebenfalls ein geringer Teil des Laserlichtes an der Rückseite des dichroitischen Spiegels reflektiert wird.

Danach tritt das Laserlicht in das für Infrarot konzipierte „UPlanApo / IR 60 x 1,20 W“ Objektiv (Olympus) ein. Es empfiehlt sich nach [Ashkin 1992] die Apertur des Objektivs mit einem Durchmesser von $8,5 \text{ mm}$ so zu überfüllen, daß in etwa der Radius des Strahlprofils $1,5$ mal so groß wie der Radius der Apertur ist.

Der Fokus dieses Wasserimmersionsobjektivs liegt etwa $250 \mu\text{m}$ über dessen Frontlinse – somit kann in einer entsprechend konzipierten Flüssigkeitszelle (siehe Kapitel 4.4) noch recht tief in deren Innern ($\approx 100 \mu\text{m}$) die Optische Falle erzeugt werden.

Das Objektiv hat laut Hersteller eine Transmission bei 1064 nm von $\approx 62\%$ (interpolierter Wert aus Datenblatt von Olympus).

Werden transparente Objekte in der Optischen Falle gefangen, dann kann das im Objekt vorwärtsgestreute Infrarotlicht zur Positionsdetektion benutzt werden. Hierzu wird dieses Licht zum Großteil im Kondensorobjektiv aufgefangen und wieder gebündelt, indem der Fokus des Kondensors sich im Prinzip am gleichen Punkt befindet wie der Fokus des Fallenobjektivs (Strahlenverlauf in Abbildung 9). Der Kondensor ist ein „Zeiss Epiplan-Neofluar 20 x 0,50“ mit einer rückwärtigen Apertur von etwa 7 mm Durchmesser.

Das im Kondensor parallelisierte Infrarotlicht wird von einem darüberliegenden Hot Mirror vom gleichen Typ wie der Erste umgelenkt und tritt durch einen weiteren RG 850 Filter (IR-Pass Filter), der vor allem sichtbares Licht davon abhalten soll, auf die Quadrantendiode zu fallen.

Die Positionsdetektion mit Hilfe der Quadrantendiode geschieht nach folgendem Prinzip:

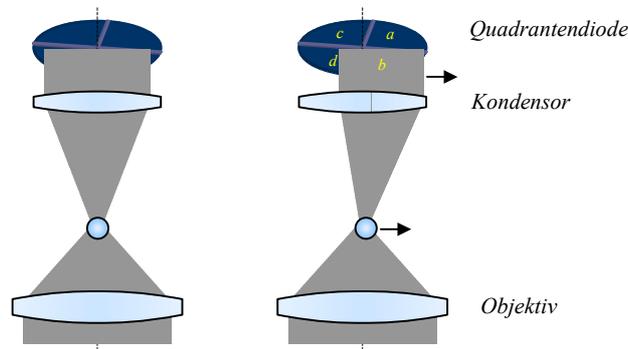


Abbildung 14: Das Prinzip des „laser deflection particle tracking“ nach [Yamada 2000] und [Gittes 1998]. Die unterschiedliche Strahlkonvergenz zwischen einfallendem und vorwärtsgestreutem Licht lässt sich auch an Abbildung 7 verdeutlichen.

Wird das gefangene Objekt durch eine äußere Kraft seitlich etwas aus der Falle herausgelenkt (rechtes Bild), dann wird ebenfalls das vorwärtsgestreute Licht im Objekt (wie in Abbildung 8 rechts) seitlich ausgelenkt. Diese Abweichung führt dann zu einer unterschiedlich starken Beleuchtung der vier Quadranten des Detektors und die dadurch unterschiedlich starken hervorgerufenen Spannungen im Detektor können dann in eine absolute Position des Objektes in der Falle umgerechnet werden – siehe Abschnitt 4.2.

Die hierzu verwendete Quadrantendiode (Silicon Detector Corp. SD 380-23-21-051) mit einem effektiven Durchmesser von $9,65\text{ mm}$ hat ihre spektrale Empfindlichkeit im Bereich von $400\text{--}1100\text{ nm}$. Jedem der vier Quadranten ist ein separater Verstärker (OPA-III-Burn-Brown) nachgeschaltet. Der Eingang des Verstärkers ist mit dem Ausgang über einen Widerstand mit $R = 1\text{ k}\Omega$ und parallel dazu mit einem Kondensator der Kapazität $C = 1\text{ nF}$ rückgekoppelt. Der Verstärkungsfaktor ist somit eintausend. Weiterhin ergibt sich eine Bandbreite des Verstärkers von $f = 1/(2\pi RC) \approx 160\text{ kHz}$. Die vier Ausgangsspannungen werden dann separat in eine analoge Selbstbau-Recheneinheit (Universität Basel) eingelesen, die aus den jeweiligen Spannungen der vier Quadrantendetektoren a , b , c und d eine relative Position in x-Richtung (I_x) und in y-Richtung (I_y) des auftreffenden Laserlichtes errechnet:

$$I_x = (a + b) - (c + d)$$

$$I_y = (a + c) - (b + d).$$

Diese relativen Positionen (die als Spannungen im Bereich von -12 bis $+12 V$ vom Gerät ausgegeben werden) können zuvor noch normiert werden, indem I_x und I_y analog durch $(a+b+c+d)$ dividiert werden. Die Normierung der Positionen führte jedoch zu keiner Verbesserung in der Präzision der Messung, daher wurden zukünftig nur die unnormierten Meßwerte benutzt.

Da spätere Kraftmessungen (beispielsweise Zugversuche an einer λ -DNA) zunächst nur in x -Richtung erfolgen sollten, wurden somit auch nur die Daten der x -Position berücksichtigt. Diese Spannungswerte wurden daraufhin geräteintern über einen Tiefpaß gefiltert, dessen Grenzfrequenz auf etwa $5 kHz$ eingestellt ist.

Diese, die relativen x -Positionen beschreibenden Spannungswerte, werden daraufhin über ein BNC Kabel an eine 16 bit A/D Input-Output-Datenbox verbunden mit einer GPIB Computerschnittkarte (PCI-6036E Fa. National Instruments) gesandt und direkt in den Meßrechner eingelesen (siehe Kapitel 4.3). In der I/O Box werden die analogen Spannungswerte mit 16 bit digitalisiert und da die Schnittkarte nur Spannungswerte von -10 bis $+10 V$ einlesen kann, beträgt eine Digitalisierungsstufe $\approx 0,15 mV$.

Als Beleuchtungseinheit wurde zunächst der mikroskopeigene Beleuchtungsturm benutzt. Im Zuge des Umbaus der Optischen Pinzette wurde dieser Turm dann entfernt und durch eine vom Mikroskop mechanisch entkoppelte Kaltlichtquelle ersetzt, da die Gefahr bestand, daß der Beleuchtungsturm als höchster Punkt des Mikroskops störende niederfrequente Schwingungen ausführt und auf das Mikroskop und damit auf die Optische Falle überträgt.

Das sichtbare Licht dringt zum größten Teil durch den oberen dichroitischen Spiegel und wird im Kondensator gebündelt. Da das sichtbare Licht der Kaltlichtquelle wie auch das des Beleuchtungsturmes leicht divergent ist, wird dieses Licht nicht in den gemeinsamen Fokus von Kondensatorobjektiv und Wasserimmersionsobjektiv fokussiert, sondern etwas tiefer und folglich wird der laterale Bereich um die Optischen Falle herum ($\sim 300 \mu m$) gut ausgeleuchtet.

Die Fokussierung im Mikroskop geschieht, indem das Wasserimmersionsobjektiv auf einem Schlitten in der Höhe über zwei Fein- und zwei Grobdrehknöpfe am Mikroskop verstellt werden kann. Das Objektiv erzeugt aus jedem Brennpunktstrahl ein paralleles Strahlenbündel, welches nach unten ins Mikroskop geleitete wird. Die ersten beiden Tubuslinsen wirken als terrestrischer Umkehrlinsensatz.

An dem oberen seitlichen Einschub des Mikroskops, der für einen seitlichen Kameraanschluß gedacht ist, habe ich eine Haltevorrichtung für zwei hintereinandergeschaltete Infrarotsperrfilter eingesetzt: Obwohl in der Optischen Falle das Infrarotlicht vor allem vorwärtsgestreut wird, kann dennoch ein kleiner Anteil rückgestreut werden und weiterhin können durch den unteren dichroitischen Spiegel ebenfalls noch etwa 4% Infrarotlicht hindurchtreten. Um diese Infrarotstrahlung endgültig abzublocken, sind diese Sperrfilter installiert, je $3 mm$ dicke *KG 5* Filter, die zusammen eine Transmission bei $1064 nm$ von weniger als $10^{-10} \%$ besitzen.

Den Sperrfiltern folgt ein abbildender Linsensatz von 170 mm Brennweite, der zusammen mit einem Strahlteiler sich in dem Kamera-Binokular-Aufsatz befindet. Der Strahlteiler leitet dem Binokular etwa 70% des Lichtes zu und den Rest zu der CCD-Kamera (DMK 3002-IR/C von „The Imaging Source“), deren Daten analog in den S-Video-Eingang einer Frame-Grabber-Karte (DFG/LC 1 ebenfalls von „The Imaging Source“) eingelesen werden.

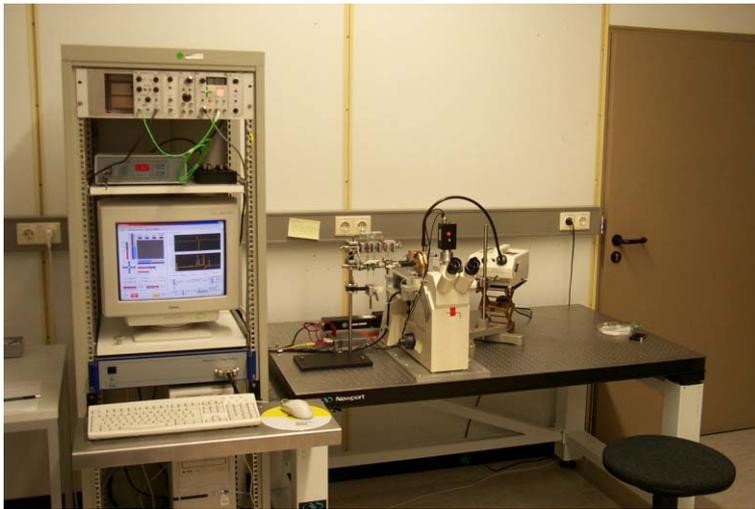


Abbildung 15: Aufbau des kompletten Experiments.

2.1 Das Einkoppeln des Lasers

Der erste Schritt beim Aufbau der Optischen Pinzette war, eine Grundplatte für das Mikroskop erstellen zu lassen, so daß dieses einen festen Halt auf der Optischen Bank findet. Das Mikroskop wurde auf vier ca. 35 mm hohen Füßen auf dieser Grundplatte fixiert, die daraufhin an vier Punkten über M6 Bolzen auf der Optischen Bank befestigt wurde.

Zu Beginn der Diplomarbeit wurde die Justageprozedur probeweise mit einem Argon-Ionen-Laser bei 488 nm durchgeführt, aber eine dreidimensionale Optische Falle ließ sich mit diesem Laser nicht erzeugen. Daher wurde dieser Laser wieder abgebaut und die Justage mit dem Nd:YAG Laser begonnen.

Eine zweite 10 mm dicke Grundplatte aus Aluminium wurde angefertigt, welche die Kühleinheit mit dem Ventilator unterhalb des Lasers tragen sollte. Ein Pumplichtsperrfilter wurde zunächst nicht eingebaut. Da sich auf der gesamten Optischen Bank ein Schachbrettraster von M6 Bohrungen im Abstand von 25 mm befindet, war es ein Leichtes,

das Mikroskop, den Laser und den Turm mit den Umlenkspiegeln daran zunächst grob auszurichten.

Bei industriell hergestellten Planspiegeln besteht immer das Risiko der „abgesunkenen Kanten“ – im Randbereich sind diese Spiegel dann nicht mehr exakt plan. Daher wurde der Laserstrahl zu Beginn mit Hilfe des Infrarot-Detektorkärtchens derart ausgerichtet, daß er möglichst mittig auf beide Umlenkspiegel fällt. Der Strahl wurde daraufhin dank der zwei justierbaren Umlenkspiegel so justiert, daß er waagrecht und exakt zentrisch durch die rückwärtige Öffnung des Mikroskops hindurchtreten würde. Dazu wurde zunächst die Höhe dieser Eintrittsöffnung über der Optischen Bank vermessen, danach der Laserstrahl ausgerichtet und erst dann das Mikroskop relativ zum Laserstrahl verschoben, bis dieser nun mittig ins Mikroskop eintritt. Während dieser ersten Justageprozedur wurde der Beamexpander noch nicht eingesetzt.

Der Weg des Laserstrahles wurde daraufhin bis zum Objektivrevolver verfolgt, wobei das Wasserimmersionsobjektiv noch nicht eingesetzt wurde. Durch jenen Anschluß soll der Strahl ebenfalls mittig hindurchtreten, was leicht zu überprüfen ist, da ich Markierungen auf das Infrarotkärtchen aufgetragen hatte. Desweiteren muß der Laserstrahl senkrecht nach oben gerichtet sein, da der geometrische Fokus eines schräg ins Objektiv eintretenden Strahles durch auftretende Koma und Astigmatismus negativ beeinflusst, und durch Verzeichnung lateral verschoben werden kann.

Eine gute Überprüfung, ob denn der Laserstrahl senkrecht nach oben aus dem Objektivrevolver austritt, war dahingehend möglich, indem ich den Strahl durch einen Filterhalter am Beleuchtungsturm fallen lassen. Dazu mußte ich a priori davon ausgehen, daß dieser Halter samt Beleuchtungsturm sich von Produktionswegen her auch wirklich senkrecht über dem Revolver befand – was auch tatsächlich der Fall war, denn später wurde dies mit Hilfe eines Parallelreißers, eines speziellen Tischwinkels, an dem ein auf- und abfahrbarer Schlitten angebracht war, überprüft.

Sobald diese Justage beendet war, wurde der Beamexpander eingesetzt. Zuerst wurde dafür ein Beamexpander mit variabler Strahlaufweitung von 1 bis 8-fach verwendet. Um den mehrfach aufgeweiteten Strahl auf dem Infrarotkärtchen sichtbar zu machen, mußte die Leistung des Lasers erhöht werden. Sobald der Strahl auf das Detektorkärtchen fiel, machte sich ein leichter Schatten stets genau in der Strahlmitte bemerkbar, der bei allen eingestellten Leistungen und bei beliebigen Strahlaufweitungen sichtbar war, selbst bei dem Beamexpander mit festem Aufweitungsfaktor und auch nachdem der Pumplichtsperrfilter eingesetzt wurde. Mit der CCD Kamera ließ sich dieser Schatten jedoch nicht bestätigen!

Weiterhin fiel auf, daß der Laser nur bis zu einer Leistung von etwa 650 mW ein sauberes TEM_{00} Profil emittierte, bei höheren Leistungen wird das Gaußsche Strahlprofil deutlich verformt.

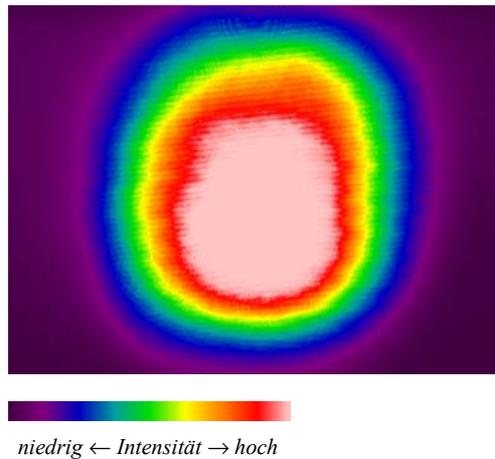


Abbildung 16: Das Strahlprofil bei 900 mW mit vorgeschaltetem Pumplichtsperrfilter.

Nachdem der Beamexpander eingesetzt worden war, machte sich die Justageun-
genauigkeit beim nicht-aufgeweiteten Strahl von etwa $0,5\text{ mm}$ natürlich deutlicher
bemerkbar: Hinter der Objektivlinse des Beamexpanders ist zu erkennen, wie in Abbildung
12 gezeigt, daß der nicht auf der optischen Achse in den Beamexpander eintretende Strahl
den Beamexpander um das Vielfache des Aufweitungsfaktors von der optischen Achse
entfernt verläßt. Um das festzustellen, wurde einfach das mit Markierungen versehene
Infrarotkärtchen hinter den Beamexpander positioniert. Beim Eintritt des Laserstrahles in
den Beamexpander wurde analog verfahren.

Nach dem Austritt aus dem Beamexpander hat der Strahl noch einen Weg von etwa
 25 cm bis zum Objektivanschluß im Objektivrevolver zurückzulegen. Am wichtigsten ist
natürlich, ob denn auch der aufgeweitete Strahl nun mittig und zugleich senkrecht durch die
Objektivhalterung im Objektivrevolver hindurchtritt. Hierbei leisteten wiederum der runde
Filterhalter im Beleuchtungsturm und später auch der Parallelreißer gute Dienste.

Ein weiterer Trick bei der Justage ist, diese über die Rückreflexion des Laserstrahles
auszuführen. Dazu wurde ein Planspiegel (ein mit Gold beschichteter Objektträger
übernahm diese Aufgabe) auf den ebenen Objektivanschluß auf dem Objektivrevolver
aufgelegt und der Rückreflex am Laser selbst betrachtet. Mit dieser Technik ließ sich
allerdings nur der Winkel des Laserstrahles zur optischen Achse kontrollieren, nicht aber
ein möglicherweise zwar paralleler, aber neben der optischen Achse verlaufender Strahl.

3 Erste Versuche und Ergebnisse

Sobald der aufgeweitete Laserstrahl derart justiert war, daß dieser genau mittig und senkrecht ins Objektiv eintrat, konnte bereits die Optische Falle in Betrieb genommen werden. Zu diesem Zeitpunkt war nichts weiter in und am Mikroskop installiert als die Bauteile entlang des Weges des Laserstrahles bis hin zum Wasserimmersionsobjektiv. Da die Betrachtung der Optischen Falle durch das Binokular zu risikoreich erschien, da noch kein Infrarotsperrfilter eingesetzt wurde, sollte zunächst ausschließlich mit der CCD Kamera die Optische Falle beobachtet werden.

Das erste Ziel war, kleine paramagnetische Polystyrolkügelchen („Dynabeads M-280“ von Fa. Dynal) in der Falle zu fangen. Deren Durchmesser ist mit $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ angegeben, das spezifische Gewicht mit $\rho = 1,3 \text{ g/cm}^3$. Die Kügelchen sind in der Stammlösung zu 3 Vol.% suspendiert, sie sind mit Streptavidin beschichtet und deren Brechungsindex beträgt $n = 1,57$. Da sich der Fokus des Objektivs nur rund $250 \mu\text{m}$ über dessen Frontlinse befindet, konnte ich demzufolge keinen Objektivträger ($76 \times 26 \times 1,00 \text{ mm}$) als Träger einer Flüssigkeitszelle benutzen. Statt dessen wurde ein metallener Rahmen von der Größe eines Objektträgers benutzt, in dessen inneren Rahmen ein kleines Deckgläschen ($18 \times 18 \times 0,14 \text{ mm}$) eingelassen werden konnte. 3 mm darüber bildete ein zweites Deckgläschen die Decke der nun fertigen kleinen Flüssigkeitszelle. Einige Mikroliter der 3 Vol.% Stammlösung wurde daraufhin etwa 1:100 verdünnt und in die Flüssigkeitszelle gefüllt.

Daraufhin wurde anstatt des gewöhnlichen Objektisches auf dem Mikroskop als erste Ausbaustufe ein Mikroschrittisch (Fa. Ludl Electronic Products) aufgesetzt, um die gesamte Flüssigkeitszelle mit Submikrometergenauigkeit über einen Bereich von mehreren Zentimetern relativ gegenüber der Optischen Falle in x- und y-Richtung bewegen zu können.

Sobald der Laser Infrarotstrahlung emittierte, erschien auf dem Bildschirm ein blendend heller Fleck, der das Bild überstrahlte und der die Vermutung nahe legte, daß noch zu viel Infrarotstrahlung den CCD-Chip erreichte.

Daher mußte zunächst ein Infrarotsperrfilter in den Strahlengang möglichst direkt unter dem dichroitischen Spiegel eingesetzt werden. Im Schieber, der diesen Spiegel aufnahm, war eine Aussparung für einen 1 Zoll Filter vorgesehen, aber mit einem KG 5 Filter von 2 mm Dicke konnte dieser Reflex nur geringfügig hinweggefiltert werden. Daher sollten in einem weiteren Schritt die zwei 3 mm dicken KG 5 Filter in den Strahlengang eingesetzt werden. Dazu wurde ein seitlicher Verschuß am Mikroskop geöffnet, der eigentlich für einen weiteren Kameraanschluß gedacht war und statt dessen eine Haltevorrichtung für die beiden Filter eingelassen.

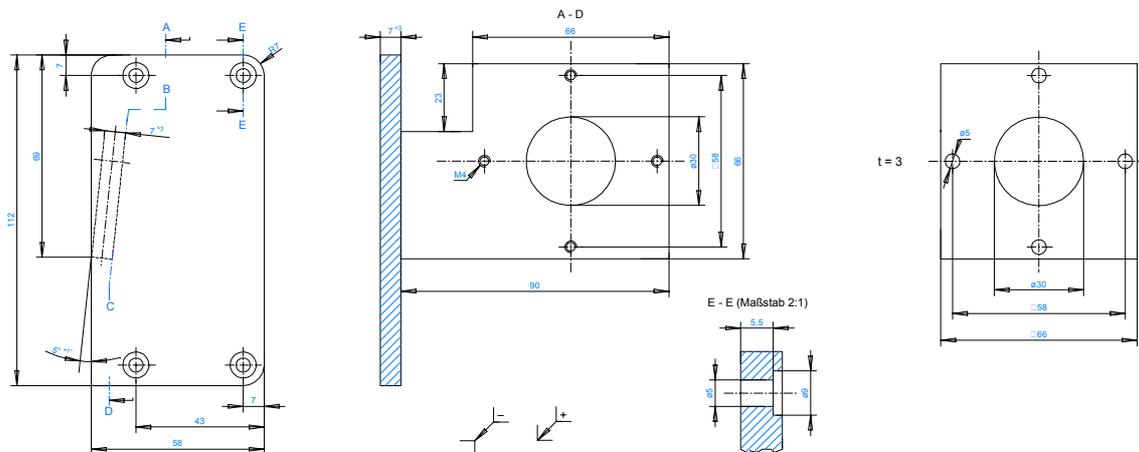


Abbildung 17: Die Haltevorrichtung für 50 x 50 mm große KG-5 Infrarotsperrfilter.

Nach dem Einsetzen der IR-Sperrfilter war der störende Reflex nahezu vollständig ausgefiltert. Allenfalls bei zu geringer Beleuchtung – dann, wenn die Kamera über die Automatik ihren Verstärkungsfaktor stark erhöht – kann noch ein winziger Reflex wahrgenommen werden.

Nachdem der Laser Infrarotstrahlung von zunächst 60 mW emittierte, mußte die Optische Falle über die Fokussierung so in der Flüssigkeitszelle positioniert werden, daß sich ein Kügelchen einige Mikrometer unterhalb der Falle befindet. Dann wird es zunächst einerseits durch die Streukraft nach oben, aber auch durch die Gradientenkraft in Richtung optische Achse geschoben, so daß es sich zwangsläufig zum Fokus hin bewegt und dort dann auch gefangen wird.

Das Experiment wurde zunächst ausschließlich über die CCD Kamera betrachtet. Hierbei fiel auf, daß die Kügelchen zwar durch den Strahlungsdruck nach oben geschoben, aber sich partout nicht fangen ließen. Das Problem wurde recht schnell gelöst, da die Kamera nicht den Bereich um die Optische Falle, sondern etwa $50 \mu\text{m}$ darüber abbildete. Über der Falle werden die Kügelchen durch den Strahlungsdruck nur noch weiter nach oben geschoben – dort ergibt sich eine Art Springbrunneneffekt.

Ein Blick durchs Okular zeigte sogleich, daß die Okulare die Ebene der Optischen Falle scharf abbildeten, sobald sich zufällig ein Kügelchen in der Falle fing. Um mit der Kamera ein scharfes Bild eines gefangenen Kügelchens zu erhalten, mußte demnach nur deren Abstand zu den abbildenden Tubuslinsen um mehrere Millimeter vergrößert werden. Hierzu wurde von mir ein in der Länge variabler Kameraadapter entworfen, der aus zwei über ein Gewinde verbundenen und mit einem Stelling feststellbaren Teilen bestand.

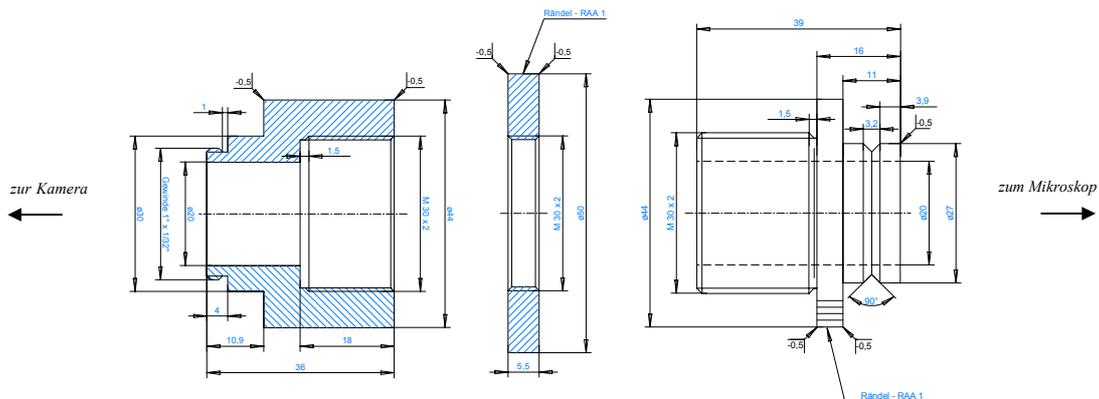


Abbildung 18: Kameraadapter mit variabler Länge.

Auf das Mikroskop aufgesetzt, wurde die Länge des Adapters so lange variiert, bis die Kamera ein scharfes Bild eines gefangenen Kügelchens lieferte.

Mit dem Mikroschrittisch und über die Fokussierung am Mikroskop ließ sich in x- und y-Richtung an jede beliebige Stelle und in z-Richtung bis etwa $100 \mu\text{m}$ vom Boden aufwärts in der Flüssigkeitszelle umherfahren und sich nun leicht der Fokus etwas oberhalb eines ausgewählten Kügelchens plazieren, so daß dieses daraufhin durch die Streukräfte und die radialen Gradientenkräfte von unten in die Falle geschoben und dort gefangen wurde.

Das von der CCD Kamera in den Rechner eingelesene Live-Video kann dort als AVI-Format (25 Bilder je Sekunde) und auch direkt als Folge von Einzelbildern (allerdings nur zu 15 Bildern je Sekunde) gespeichert werden.

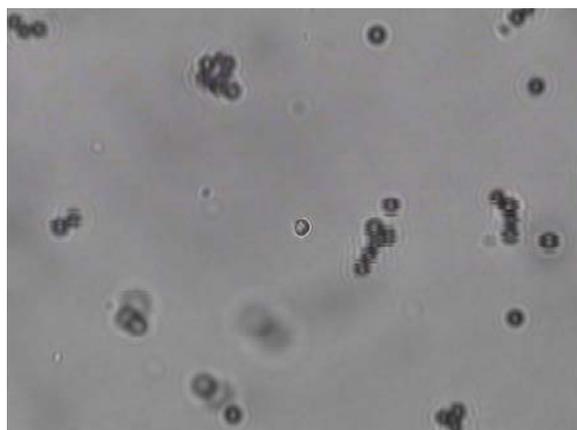


Abbildung 19: Ein Polystyrolkugelchen ist in der Optischen Falle gefangen (Bildmitte).

Mit dem Programm „Giotto“ [Dittié] kann eine AVI-Datei wiederum in Einzelbilder (25 je Sekunde) zerlegt werden. Vor allem ist dort die Möglichkeit gegeben, eine beliebig hohe Anzahl von Einzelbildern aufzuaddieren und zu mitteln. Ein Summenbild wird somit wesentlich rauschärmer.

Es kann beispielsweise auch eine Sequenz aufgenommen werden, in der eine Bewegung stattfindet, zum Beispiel wenn sich die Flüssigkeit und die darin suspendierten Kügelchen um ein gefangenes Kügelchen herum weiterbewegen. Das AVI wird daraufhin zerlegt und mehrere aufeinanderfolgende Einzelbilder aufaddiert. So kann mit diesem kleinen Trick die relative Bewegung zwischen Flüssigkeit und gefangenen Objekten sichtbar gemacht werden (Abbildung 20).

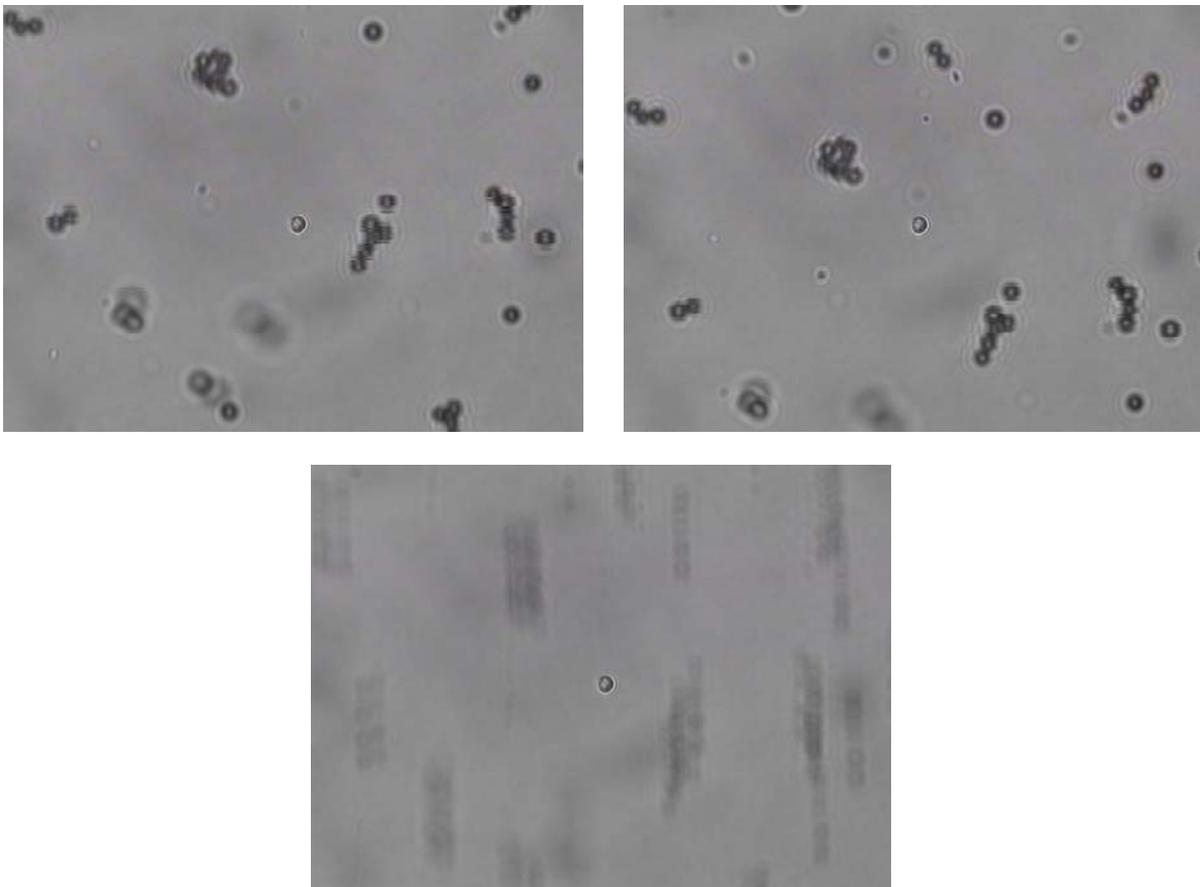


Abbildung 20: Links das gleiche Bild wie in Abbildung 19, rechts das letzte Einzelbild dieser einsekündigen Sequenz. Unten das aus allen 25 Einzelbildern erstellte Summenbild.

Diese paramagnetischen Kügelchen ließen sich schlecht in der Optischen Falle fangen, da die auf sie wirkende Streukraft fast so stark wie die in $-z$ -Richtung zeigende

Gradientenkraft war. Manchmal befreite sich ein gefangenes Kügelchen schlagartig allein durch seine Brownsche Bewegung aus der Falle oder bei zu schneller Bewegung der Flüssigkeitszelle infolge eines leichten Stoßes ans Mikroskop oder einer zu hohen Geschwindigkeit (nur wenige Dutzend Mikrometer je Sekunde) des Mikroschrittisches.

Eine Erhöhung der Laserleistung auf bis zu mehrere hundert Milliwatt erhöhte kaum die Kraft, mit der ein Kügelchen in der Falle in z -Richtung gefangen, wohl aber die Kraft, mit der es in x - oder y -Richtung gehalten wurde.

Daher sollten für weitere Experimente keine paramagnetischen Kügelchen mehr verwandt werden, sondern zunächst eine Satz unbeschichteter Polystyrolkügelchen (Fa. Polysciences), die in fünf verschiedenen Größen von etwa $0,5$ bis $2,8 \mu\text{m}$ in separaten Suspensionen mit einer Konzentration von $2,6 \text{ Vol.}\%$ vorlagen.

Nach [Ghislain 1994] zeigt es sich, daß im Bereich zwischen dem Mie- und dem Rayleigh-Regime vor allem die radiale Gradientenkraft mit zunehmender Objektgröße variiert. In deren Versuchen wurden Polystyrolkügelchen mit verschiedenen Größen gefangen und die durch die Kraft in der Optische Falle auf das Kügelchen hervorgerufene Federkonstante k ermittelt:

Durchmesser in μm	k_{radial} in $\text{pN}/\mu\text{m}$	k_{axial} in $\text{pN}/\mu\text{m}$
0,4	14	9,5
1,0	145	50
2,1	192	42
6,1	33	42

Weitere Experimente sollten daher mit den größten mir zu Verfügung stehenden unbeschichteten Polystyrolkügelchen durchgeführt werden. Diese hatten einen Durchmesser von $2,837 \mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung von $\sigma = 0,133 \mu\text{m}$ und vor allem eine glatte Oberfläche und eine wesentlich exaktere Kugelform als die zuvor verwendeten Kügelchen.

Diese Kügelchen ließen sich wesentlich stabiler in der Falle fangen ließen – was sich dadurch auch bemerkbar machte, daß sich die Flüssigkeitszelle mit einer höheren Geschwindigkeit um das gefangene Kügelchen herum bewegen ließ ($\approx 100 \mu\text{m}/\text{s}$ bei 60 mW Laserleistung) und daß eine Erhöhung der Laserleistung auch eine Erhöhung der Geschwindigkeit ermöglichte.

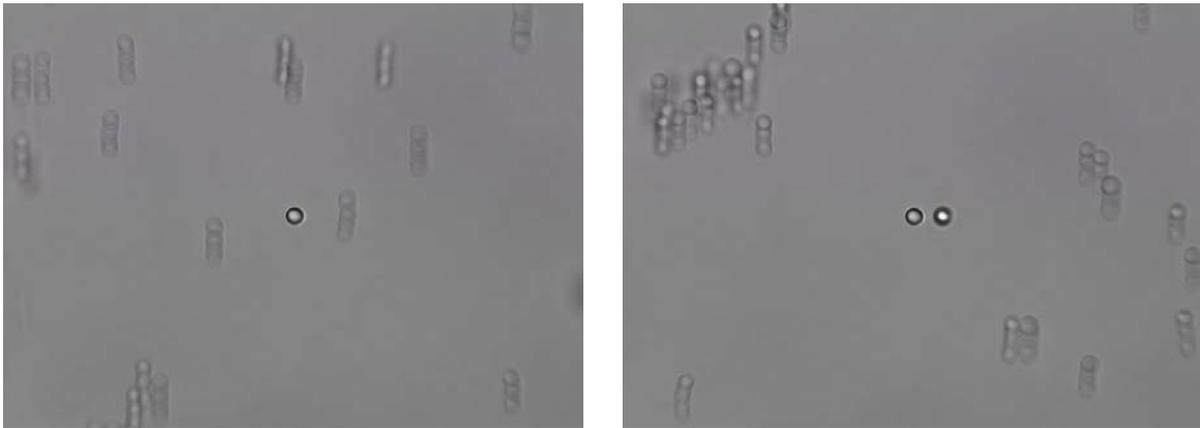


Abbildung 21: Ein Kügelchen von $2,8 \mu\text{m}$ Durchmesser wird bei 60 mW in der Falle gefangen (linkes Bild). Rechtes Bild: Häufig fängt sich ein weiteres Kügelchen (das rechte unscharfe) in einer Art „Nebenfalle“, deren Fokus sich einige Mikrometer neben und unterhalb (in z-Richtung – daher das unscharfe Kügelchen) der eigentlichen Optischen Falle befindet. Für jedes Bild wurden je 20 Einzelbilder aufaddiert.

Wie in Abbildung 21 recht zu erkennen, wird manchmal ein weiteres Kügelchen mit einer deutlich geringeren Kraft in einer „Nebenfalle“ gefangen, die sich selbst nach wiederholter Justage immer an der gleichen Stelle relativ zu eigentlichen Falle befand. Darüber berichtete auch Ulf Kleineberg [Kleineberg], der ebenfalls eine Optischen Pinzette in der Arbeitsgruppe „Molekül- und Oberflächenphysik“ aufbaute und dessen Laser ein nahezu identisches Modell des hier verwendeten Lasers war, allerdings mit dem Unterschied, daß jener nur maximal 300 mW Leistung besaß.

Dieses Auftreten der Nebenfalle war auch unabhängig von der Art der verwendeten Flüssigkeitszelle, konnte also somit keine Optische Falle sein, die aus Reflexen an den Glas-Wasser-Grenzflächen der Flüssigkeitszelle her rührte.

Diese „Nebenfalle“ verschwand jedoch, als hinter dem Laserausgang ein Pumplicht-sperrfilter eingesetzt wurde, denn das Pumplicht, welches nahezu ebenso konvergent war wie das Infrarotlicht, aber lateral etwas davon abwich, erzeugte diese „Nebenfalle“.

Außerdem verschwand sodann auch der auf Seite 30f beschriebene helle Reflex, denn dieser rührte ebenfalls von der Pumplichtstrahlung, da die Kamera für diese Wellenlänge wesentlich empfindlicher war, und der $KG 5$ Filter das Pumplicht zu $10^{-2} \%$ hindurchläßt.

4 Aufbau einer Positionsdetektion

Damit exakte Messungen an gefangenen Kügelchen überhaupt möglich sind, muß noch die Positionsdetektion aufgebaut, der Piezotisch eingesetzt, kalibriert und dafür ein Steuerungsprogramm in LabView geschrieben werden.

4.1 Einbau des Piezo- und des Justagetisches

Zunächst einmal wurde der Mikroschrittisch wieder abgebaut um Platz für einen Piezotisch („P-517.3CD“ Fa. Physik Instrumente) zu schaffen.

Die gesamte Piezo-Anlage besteht zum einen aus dem Piezotisch, der sich $100\ \mu\text{m}$ in x - und y -Richtung und $20\ \mu\text{m}$ in z -Richtung bewegen läßt – mit einer Präzision von $2\ \text{nm}$. Dieser Tisch ist $150 \times 150 \times 30\ \text{mm}$ groß und hat innen eine freie Öffnung von $66 \times 66\ \text{mm}$, durch die somit sehr bequem das Wasserimmersionsobjektiv ($\varnothing 32\ \text{mm}$) nach oben hin-durchragen kann.

Der Piezotisch wird über einen digitalen 20-bit-Piezocontroller („E-710“) angesteuert. Dieser kann an den Meßrechner über eine langsame RS-232 (100 Kommandos/Sekunde) Schnittstelle, oder über eine schnellere IEEE 488 Schnittstelle (300 Kommandos/Sekunde zum, und etwa 5000 Datenpakete/Sekunde vom Piezotisch) angesteuert werden; und die IEEE 488 Schnittstelle wurde dann über eine GPIB Karte eingerichtet.

Der Piezocontroller kann dann entweder über das Programm „NanoCapture“ eingerichtet und angesteuert, oder nach vollendeter Einrichtung - die im Prinzip nur ein einziges Mal durchgeführt werden muß, da der Controller alle Einstellungen speichern kann - mit dem „Term Tool 32 bit“ Programm über Textanweisungen angesteuert werden.

Positions- und Geschwindigkeitsanweisungen können wiederum auf zwei verschiedene Arten über den Controller an den Piezotisch gesandt werden. Einmal können direkt die Spannungswerte (-20 bis $+120\ \text{V}$) für die Piezokristalle übermittelt und gelesen werden. Andererseits wird zuerst ein Servo-Loop aktiviert und danach können direkt die Positionen und Geschwindigkeiten in μm und (nach Ermittlung eines Geschwindigkeitskoeffizienten) in $\mu\text{m}/\text{s}$ übermittelt und gelesen werden. Der Servo-Loop bewirkt, daß der Controller die gewählte Position am Piezotisch nicht nur exakt anfährt, sondern auch ständig aufrechterhält und diese nicht mehr als $2\ \text{nm}$ schwankt – was sich anhand der vom Piezotisch zurückgesandten Daten überprüfen ließ.

Um den Piezotisch auf einer soliden Basis im Mikroskop zu installieren, wurde eine U-förmige Auflage aus $15\ \text{mm}$ dickem Aluminium erstellt, in die der Piezotisch so eingelassen werden konnte, daß das Objektiv noch etwa $5\ \text{mm}$ über diesen hinausragt. Auf diese Weise kann die provisorische (und später eine neu erstellte und mit anderen Maßen versehene) Flüssigkeitszelle durch einen zusätzlichen Aufsatz noch grob justiert werden.

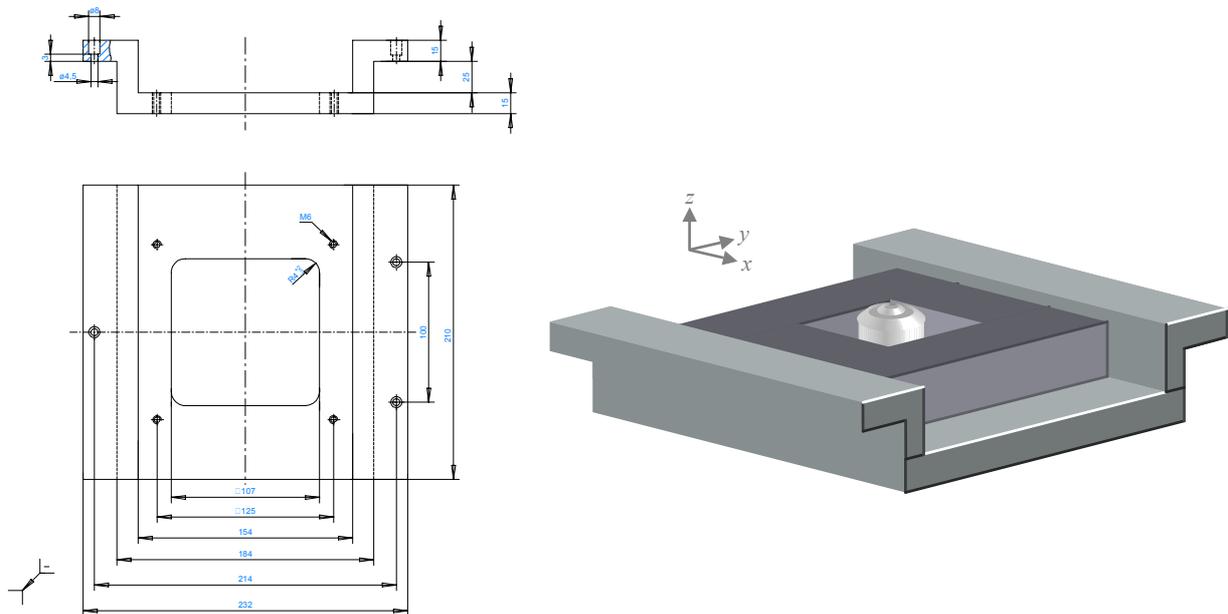


Abbildung 22: Der Auflagetisch, der in das Mikroskop eingesetzt wird und in dem der Piezotisch Platz findet.

Der Auflagetisch besteht aus drei Teilen – der Grundplatte und den beiden seitlichen Winkeln (in Abbildung 22 rechts angedeutet). Dies hat keinen negativen Einfluß auf die Stabilität, aber einen Vorteil. Der Piezotisch mußte im Laufe der Diplomarbeit noch um einige Millimeter höher installiert werden. Dabei wurden dann einfach die seitlichen Winkel abgenommen und deren Höhe um einige Millimeter reduziert, und somit die innere Auflagefläche angehoben.

Der Piezotisch besitzt auf seiner oberen Auflagefläche eine Vielzahl von $M3$ Bohrungen, an denen eine beliebig gestaltete Flüssigkeitszelle zwischen etwa $75 - 110 \text{ mm}$ Länge und Breite befestigt werden kann. Es muß aber die Möglichkeit offen gehalten werden, die Flüssigkeitszelle um mehrere Millimeter unabhängig vom Piezotisch verschieben zu können, wenn nötig auch mit einem bereits gefangenen Kügelchen, und zwar so bedächtig, daß dieses nicht durch zu starke Schwingungen und Erschütterungen aus der Falle hinausgestoßen wird.

Die Möglichkeit, den gesamten Piezotisch in einem Bereich von mehreren Millimetern seitlich verschieben zu können, wurde nicht in Betracht gezogen, da nicht genügend freier Raum unter dem Piezotisch zur Verfügung stand, in dem ein großer Verschiebetisch Platz finden könnte.

Daher wurde ein xy -Justagetisch entworfen, der auf den Piezotisch aufgesetzt und befestigt werden konnte.

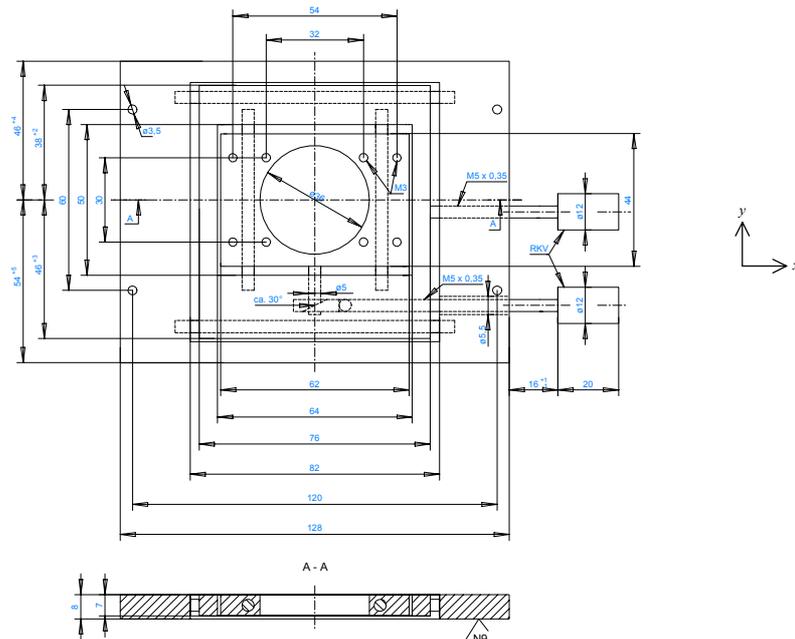


Abbildung 23: Der mechanische xy-Justagetisch.

Dieser Tisch besteht aus drei Aluminiumrahmen. Der äußere 8 mm hohe wird fest auf dem Piezotisch verschraubt und trägt über zwei Stahlbolzen in Messinglagern den mittleren 7 mm hohen Rahmen. Der dadurch hervorgerufene Abstand von 1 mm bewirkt, daß mittlerer und innerer Rahmen nicht auf dem Piezotisch schaben. Der mittlere Rahmen wird in x-Richtung über die (in Abbildung 23) obere Gewindeschraube um 4 mm verschoben und durch Druckfedern gegengehalten. Er trägt über wiederum zwei Stahlbolzen in zwei Messinglagern den inneren Rahmen, in dem eine Bohrung eingelassen ist, durch die das Wasserimmersionsobjektiv hindurchragt, und weiterhin acht Bohrungen, mit denen eine Flüssigkeitszelle befestigt werden kann. Der innere Rahmen wird durch die untere, ebenfalls seitlich angebrachte Gewindeschraube auch um 4 mm in y-Richtung verschoben, und wird ebenso durch Druckfedern gegengehalten. Da der xy-Tisch seitlich am besten zugänglich ist, muß für die Verschiebung des inneren Rahmens in y-Richtung der Druck der unteren Gewindeschraube umgelenkt werden. Das geschieht durch einen geneigten Keil im mittleren Rahmen.

Die mechanische Werkstatt hat bei der Herstellung so viel Sorgfalt walten lassen, daß das Achsspiel und die Verschiebegenauigkeit in beide Richtungen nicht mehr als $0,5 \mu\text{m}$ betragen.

4.2 Detektion des vorwärtsgestreuten Laserlichtes

„Mathematik ist nur ein erweitertes Wedeln mit den Händen.“

Prof. Wilhelm Raith

In [Gittes 1998] beschreibt ein Modell das normierte Intensitätssignal, das sich ergibt, wenn die Interferenz von vorwärtsgestreutem und nicht-gestreutem Laserlicht auf einen in zwei Hälften unterteilten Detektor fällt, der sich im Bereich der rückwärtigen Apertur der Kondensorlinse befindet.

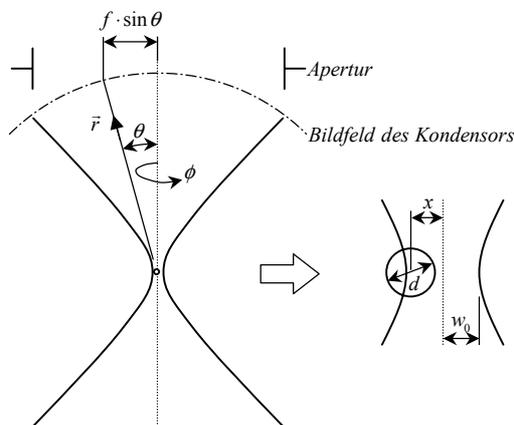


Abbildung 24: Geometrie für das Interferenzmodell nach [Gittes 1998].

In deren Modell werden Partikel im Rayleighregime mit dem Durchmesser $d \approx 0,5 \mu\text{m}$ beschrieben, die im Fokus eines Objektivs mit der Brennweite f gefangen werden. $k = 2\pi n_{\text{Medium}} / \lambda$ ist die Wellenzahl, λ die Wellenlänge, w_0 der Radius der Strahltaile, x der laterale Abstand vom Fokus und α die Polarisierbarkeit wie in Gleichung (1.8). Das winkelabhängige Interferenzmuster ergibt sich aus der lateralen Änderung der Intensität $\delta I(x)$ im Verhältnis zur Gesamtintensität I_{total} des Gaußschen Strahles infolge der Interferenz 1. Ordnung zwischen dem ungestörten Gaußschen Strahl und dem am Partikel vorwärtsgestreuten Licht zu

$$\frac{\delta I(x)}{I_{\text{total}}} = \frac{2k^3 \alpha}{\pi r^2} \exp\left[-x^2 / w_0^2\right] \cdot \sin(kx \cdot \sin \theta \cdot \cos \phi) \cdot \exp\left[-k^2 w_0^2 \theta^2 / 4\right]. \quad (4.1)$$

Die in zwei Hälften (+) und (-) aufgeteilte Photodiode nimmt die unterschiedliche Intensität des auf sie fallenden Laserlichtes in x-Richtung wahr. Die Integration von Gleichung (4.1)

über θ und ϕ unter den Bedingungen $\sin\theta \approx 0$ und $-\pi/2 < \phi < \pi/2$ und unter Berücksichtigung, daß die Lichtintensität, die auf die beiden Hälften des Detektors fällt, mit der Gesamtintensität normiert wird, ergibt das normierte Detektorsignal

$$\frac{I_+ - I_-}{I_+ + I_-} \approx \frac{16}{\sqrt{\pi}} \frac{k\alpha}{w_0^2} G(x/w_0) \quad (4.2)$$

mit dem Dawson Integral

$$G(x/w_0) = \exp\left[-2(x/w_0)^2\right] \int_0^{x/w_0} dy \cdot \exp\left[(x/w_0)^2\right].$$

Für $x \ll w_0$ ist das normierte Detektorsignal proportional zu d^3/w_0^3 . Nach [Yamada 2000] ist für Objekte der Größe $x \approx w_0$ das Detektorsignal nur noch proportional zu d^2/w_0^2 und für Objekte im Mie-Regime nimmt nach [Gittes 1998] das Detektorsignal mit $1/d$ ab.

Es ist nun möglich, das Kügelchen fest an eine Glasoberfläche anbinden zu lassen, und dann die gesamte Flüssigkeitszelle (beispielsweise mit einem Piezotisch) lateral durch den Fokus der Optischen Falle zu bewegen, so als würde es zunächst ohne Einwirkung einer äußeren Kraft in der Falle gefangen und daraufhin seitlich aus dem Fokus ausgelenkt. Auf diese Weise kann das normierte Detektorsignal, in Abhängigkeit der lateralen Auslenkung mit Nanometerpräzision oder besser, ermittelt werden. Aus Gleichung (4.2) ergibt sich folgender theoretischer Verlauf nach [Gittes 1998] anhand eines $0,5 \mu\text{m}$ kleinen Silica-Kügelchens ($n_{\text{Objekt}} = 1,45$), welches in einer Optischen Falle bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ mit der Strahltaile $w_0 \approx 0,53 \mu\text{m}$ gefangen wurde.

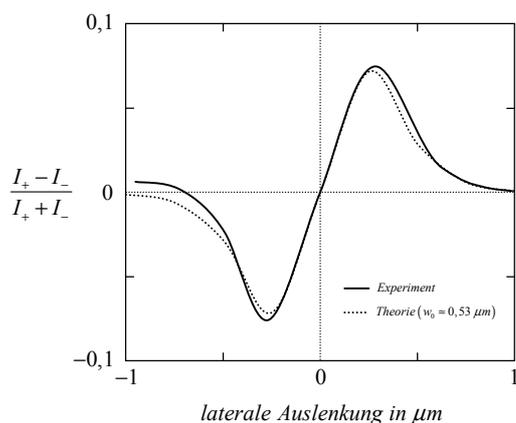


Abbildung 25: Das normierte Detektorsignal in Abhängigkeit der lateralen Auslenkung eines an eine Glasoberfläche angebindenen Kügelchens.

Zu erkennen ist der mittlere Bereich, in dem das Detektorsignal linear mit der lateralen Auslenkung ansteigt. In eben jenem linearen „Arbeitsbereich“ lassen sich dann Kraftmessungen durchführen, indem das Detektorsignal (als Spannungssignal) dann in eine Kraft umgerechnet wird.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die Positionsdetektion nahezu unabhängig von der Höhe der Falle relativ zur Position des Kondensors - also von der Fokussierung - ist.

Der erste Schritt beim Aufbau der Positionsdetektion bestand darin, das Kondensorobjektiv fest über der Falle zu positionieren. Zuerst wurde ein Hohlzylinder erstellt, auf dessen Außenfläche ein Gewinde hineingeschnitten wurde. Dieser Zylinder samt eingesetztem Objektiv wird in eine weitere Halterung hineingeschraubt, und auf diese Weise wird das Objektiv in der Höhe verstellbar.

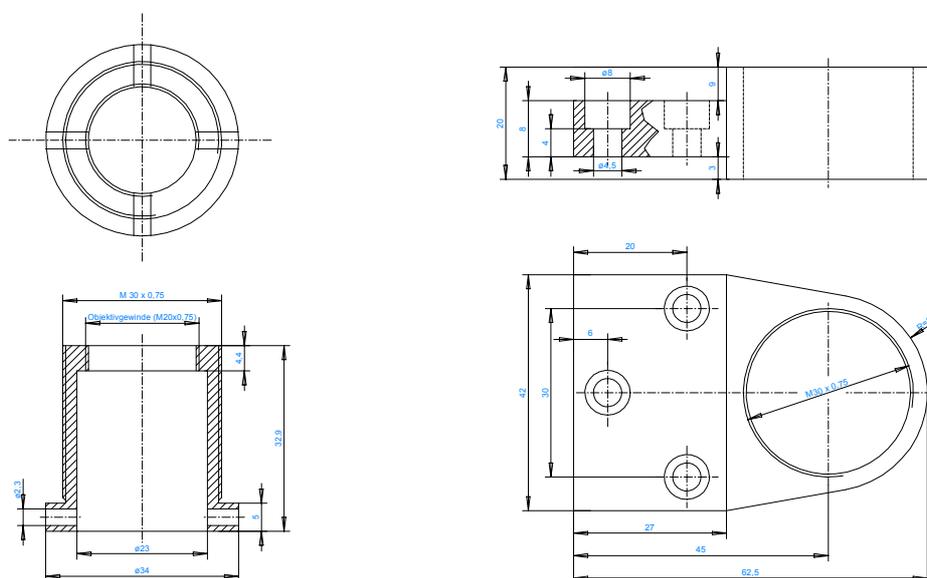


Abbildung 26: Bauteile für die Befestigung und Höhenverstellung des Kondensorobjektivs.

Wie schon in Kapitel 2 beschrieben, muß das im Kondensor fokussierte vorwärtsgestreurte Laserlicht durch einen nachfolgenden dichroitischen Spiegel umgelenkt werden, um sichtbares Licht für die Beleuchtung in den Kondensor einstrahlen zu können.

Eine Halterung für den dichroitischen Spiegel wurde entworfen und diese dann auf die Befestigung (Abbildung 26 rechts) aufgesetzt.

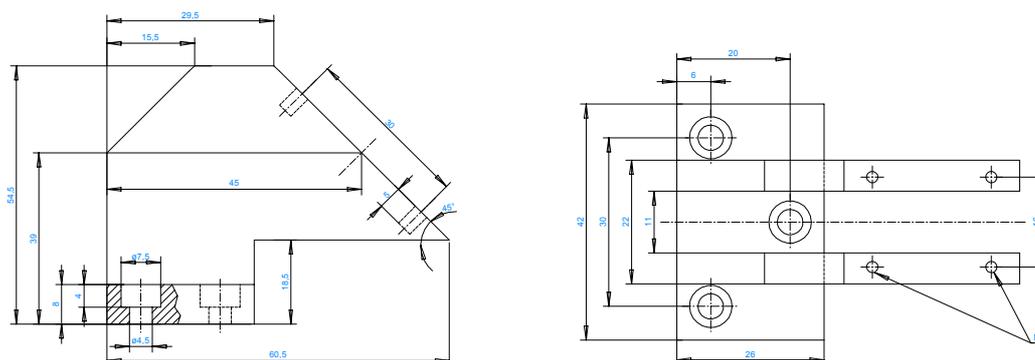


Abbildung 27: Die Halterung für den dichroitischen Umlenkspiegel.

Zunächst wurde der Spiegel noch auf die beiden 45° Schenkel über eine Andruckplatte angeschraubt, aber die Verschraubung verursachte eine leichte Verformung des $0,9\text{ mm}$ dünnen Spiegels, deshalb wurde dieser daraufhin verspannungsfrei mit Epoxidharz aufgeklebt.

Ein Aufsatz (Abbildung 28), der die soeben beschriebenen Halterungen trägt, wurde über dem Piezotisch angebracht, so daß sich über dem xy-Tisch noch etwa 20 mm freier Raum befand, in dem die Flüssigkeitszelle Platz finden sollte.

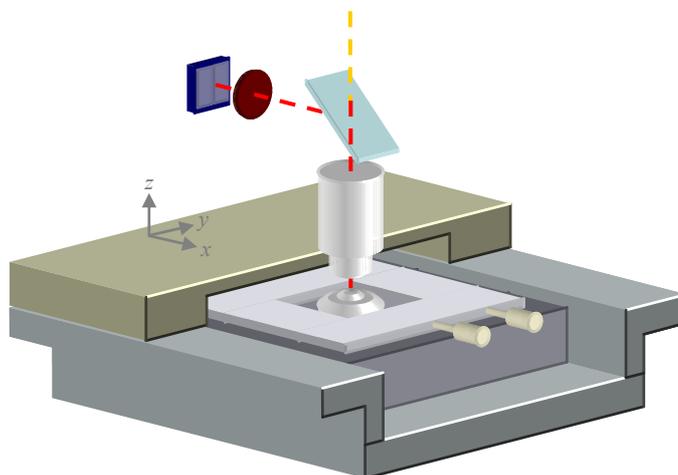


Abbildung 28: Der brückenartige Aufsatz (gelb) trägt über die weiteren Halterungen (nicht dargestellt) das Kondensorobjektiv, den dichroitischen Spiegel und in erster Ausbaustufe eine zweigeteilte Photodiode mit vorgesetztem IR-Pass-Filter. Das vorwärtsgestreute Infrarotlicht wurde nur in der ersten Ausbaustufe in $-x$ -Richtung ausgelenkt.

In der ersten Ausbaustufe wurde eine zweigeteilte Photodiode (LD2-2A von Lasercomponents) zur Positionsdetektion eingesetzt. Durch diesen Umstand kann eine Positionsdetektion (und somit auch eine Kraftmessung) zunächst nur in y-Richtung erfolgen.

Die Photodiode wurde in ein solides Messinggehäuse eingesetzt, in das auch der IR-Pass-Filter eingeschraubt werden konnte.

Da eine Photodiode in Sperrichtung betrieben wird, mußten am rückwärtigen Ende drei BNC-Anschlüsse angebracht werden; an zwei Anschlüssen wurden die Ströme der beiden Hälften der Photodiode gemessen, die durch die $2\text{ k}\Omega$ Innenwiderstände der nachfolgenden Transimpedanzverstärker flossen und die dann über einen variablen Verstärkungsfaktor (zunächst 10^4 , später 10^3) in Spannungswerte umgesetzt wurden. Am dritten BNC-Anschluß wurde die Sperrspannung von 10 V angelegt, die an einem der zwei Analogausgänge der 16 bit A/D Input-Output-Datenbox erzeugt werden konnte. Die Spannungswerte der beiden Transimpedanzverstärker wurden über die selbe Datenbox in den Meßrechner eingelesen.

4.3 Erstellen des Steuerungs- und Meßprogramms in LabView

Die in LabView (Fa. National Instruments) erzeugte grafische Programmoberfläche ermöglicht es, über virtuelle Instrumente (VI's) Daten ein- und auszulesen, Hardware anzusteuern und das umfangreiche Spektrum mathematischer und logischer Operationen voll auszuschöpfen.

Im Falle der Optischen Pinzette wird hierbei zunächst der Piezotisch über dessen eigenen Controller angesteuert, und dieser (über eine IEEE 488 Schnittstelle mit GPIB Karte mit dem Meßrechner verbunden) kann dann direkt über die VI's initialisiert und Daten hin- und zurückübertragen werden. National Instruments bietet (nicht nur) für den E-710 Controller des Piezotisches dazu spezielle vorgefertigte VI's über Internet an.

Das Einlesen der Daten der Photodiode über die 16-bit-A/D-Input-Output-Datenbox und die nachfolgende PCI-6036E Karte sowie die Ausgabe von analogen Daten (speziell die 10 V Sperrspannung) erfolgt in LabView direkt über das Aufrufen der verschiedensten DAQ (Data Acquisition) VI's.

Das Videobild wurde eingelesen, indem die Video-In-Karte über einen ActiveX-Befehl vom Steuerungsprogramm ausgelesen wurde.

Der angegebene Ablaufplan zeigt die sequentielle Abfolge der einzelnen Befehle, nicht aber die zahlreichen Pfade, über die Variablen, Konstanten und Boolesche Operatoren gesandt wurden. In blauen Rahmen sind alle manuellen Eingabemöglichkeiten (über animierte Schieber oder numerische Eingabehilfen) und in grünen Rahmen alle Booleschen Operatoren (Ein/Aus Schalter, Taster etc.) dargestellt.

Die Bedienungsoberfläche in der aktuellsten Version hat folgendes Aussehen:

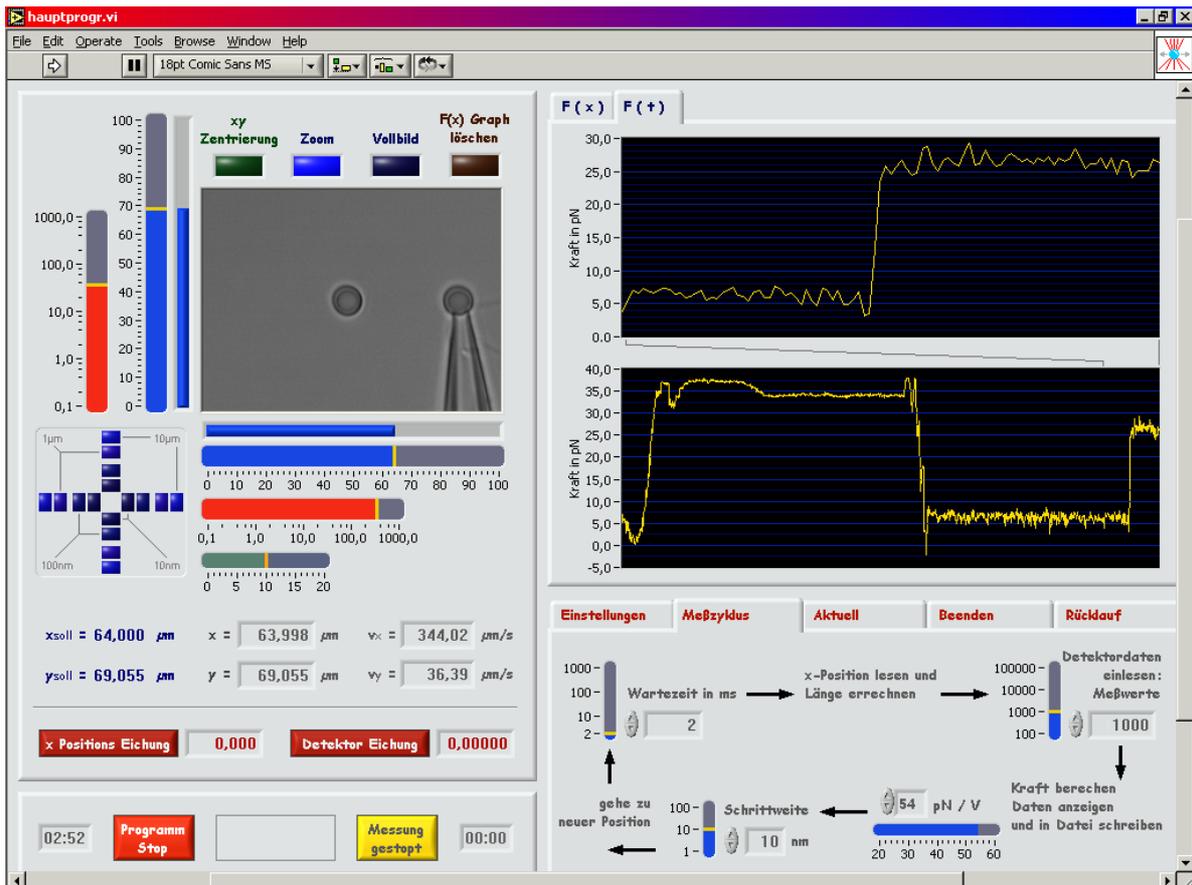


Abbildung 29: Die Programmoberfläche des Steuerungs- und Meßprogramms.

Um das Videobild sind die Schieberegler für x- und y-Position (blaue breite Balken) in μm angeordnet, weiterhin zwei blaue dünne Balken, die die augenblicklichen Positionen darstellen. Die roten Regler stellen die Geschwindigkeiten in $\mu\text{m}/\text{s}$ ein. Der kleine grüne Regler ist für die z-Position, ermöglicht also eine Art Fokussierung mit Hilfe des Piezotisches. Die xy-Zentrierung läßt auf Knopfdruck die Positionsregler in die Mitte (nach $50 \mu\text{m}$) springen – und ist eigentlich nur eine bedienungstechnische Bequemlichkeit. Die Zoom- oder Vollbild-Taste leuchtet auf, je nachdem welche Darstellung ausgewählt wurde. „F(x) Graph löschen“ leert nach der Messung das F(x)-Diagramm, welches auch erst dann

dargestellt wird, sobald die Messung gestartet wird, und zwar startet derjenige Schalter die Messung, der momentan noch „Messung gestopt“ anzeigt. Die beiden großen $F(t)$ -Graphen zeigen die augenblicklich gemessene Kraft an – der obere in einem kleinen und der untere in einem zehn mal größeren Zeitintervall.

Diese Zeitintervalle hängen davon ab, wie schnell das Programm einen Rechenzyklus durchläuft. Der zeitbestimmende Faktor hierbei ist vor allem die Zahl der aufaddierten Meßwerte der Photodiode (im Programm als Detektor bezeichnet). Es können hierbei 100 bis 100000 Meßwerte aufaddiert werden, und dementsprechend dauert ein Zyklus 0,06 bis 0,35 Sekunden, wobei natürlich auch die restlichen Operationen Rechenzeit beanspruchen. Somit betragen die dargestellten Zeitintervalle im oberen Diagramm etwa 5 bis 30 Sekunden und im unteren Diagramm eben zehnmal soviel – vorausgesetzt die Zahl der aufaddierten Meßwerte wird nicht ständig verändert. Die Meßwerte sind hierbei die Spannungswerte der Photodiode, die daraufhin normiert werden und eine dimensionslose Positionsangabe darstellen, die über einen Korrekturfaktor (nicht dargestellt) in die Kraft umgerechnet werden kann. Weiterhin ist in dem rechten unteren Kasten noch die Eingabe des Umrechnungsfaktors von Spannung in pN angezeigt. Dieser wurde allerdings erst ins Programm eingebaut, nachdem die Positionsnormierung in der später neu hinzugekommenen Verstärker- und Recheneinheit bereits analog ermittelt wurde und die dimensionslose Detektorposition dann wiederum als Spannungswert von der Recheneinheit ausgegeben und in das Programm eingelesen wurde.

Danach folgt die Eingabe der Schrittweite, denn sobald während des Meßzyklusses die Kraft für eine bestimmte Distanz ermittelt wurde, soll sich der Piezotisch in x-Richtung um eine gewisse Schrittweite (1–100 nm) weiterbewegen. Hat sich der Piezotisch um diesen Betrag weiterbewegt, so kann eine Wartezeit von mindestens 2 ms auferlegt werden (wobei während aller folgenden Messungen es keine Veranlassung gab, diese Zeit zu erhöhen). Daraufhin wird die neue x-Position gemessen und die Kraftmessung beginnt von neuem.

Ist der Meßzyklus nicht aktiv, wird selbstverständlich die Kraft ebenfalls bei jedem Zyklus ermittelt. Nur fährt der Piezotisch dann nicht immer stetig weiter, sondern es kann jede beliebige Position mit der ausgewählten Geschwindigkeit über die manuellen Regler angefahren werden.

Hierbei ist es so, daß der Piezotisch mitsamt der Flüssigkeitszelle und ihres Inhalts sich „unter der Optischen Falle hindurch“ bewegt. Insofern entsteht der Eindruck, man „bewegt“ mit den Schieberegler die nicht in der Falle gefangenen Objekte um die Falle herum – da sich die Position der Optischen Falle immer in der Mitte des Bildfeldes (ob 3fach-Zoom oder Vollbild) befindet.

Da die Einstellung mit Hilfe der Schieberegler in gewissen Situationen – wenn zum Beispiel ein gefangenes Kügelchen an eine Pipettenspitze angenähert werden soll – zuweilen etwas zu grob ist, wurde das augenfällige „Zielkreuz“ eingefügt, mit dessen Hilfe sich der Piezotisch in Schritten von 10, 100 nm, 1 und 10 μm in alle vier Richtungen über

die blauen kleinen Tasten bewegen läßt. Bei der jeweiligen Bewegung springen dann auch die blauen Schieberegler an die jeweilig neuen Positionen.

Darunter befinden sich die digitalen Anzeigen der x- und y-Position und zwar die x- und y-Sollwerte, die augenblicklichen x- und y-Werte und die ausgewählten Geschwindigkeiten.

Der Schalter „x Position eichen“ bewirkt, daß die aktuelle x-Position als neuer Nullpunkt der x-Skala angenommen werden soll, bei der „Detektoreichung“ ist es analog dazu der geeichten Positionswert der Photodiode.

Links neben dem „Programm Stop“ Taster ist die Zeit in Sekunden und Minuten angezeigt, die das Programm gelaufen ist - rechts neben dem „Messung gestopt“ Taster die Zeit, die vergangen ist, seit eine Messung gestartet wurde.

Wird die Messung gestartet, dann werden, wie im Ablaufplan angegeben, alle Schalter (auch der „Programm Stop“ Taster) und manuelle Einstellregler deaktiviert, außer die Vollbild- und Zoom-Schalter.

Der rechte untere Kasten besteht aus einer Art Karteiregister – so wie das Diagrammregister in dem das $F(x)$ - und die $F(t)$ -Diagramme arrangiert sind. Das hat den Vorteil, daß auf kleinem Raum viele Schalter, Regler und Anzeigen etc. untergebracht werden können.

Nicht angezeigt ist in Abbildung 29 unter anderem das „Einstellung“ Register. Dort läßt sich die Temperatur in der Flüssigkeitszelle eingeben – allerdings werden die Temperaturdaten noch nicht verwandt. Später soll damit über die Eyring-Relation die Viskosität des Wassers in der Flüssigkeitszelle exakter ermittelt werden. Weiterhin lassen sich Durchmesser des gefangenen Kügelchens in nm , dessen Beschichtung („Keine“, „Carboxyl“, „Avidin“ und „Streptavidin“) auswählen und die Laserausgangsleistung in mW manuell eingeben. Aus Datum, Uhrzeit und den drei letztgenannten Daten wird am Beginn jeder Messung eine ASCII Datei mit einem Namen bestehend aus den eben genannten fünf Daten erzeugt, in der dann die geeichte x-Position in μm und die entsprechende Kraft in pN bei jedem einzelnen durchlaufenen Programmzyklus abgespeichert werden.

Im „Aktuell“ Register werden die geeichten und ungeeichten Detektordaten, sowie die Kraft in pN , die geeichte Länge und eine der Kraft äquivalente Strömungsgeschwindigkeit angezeigt. Das bedeutet: Ein beispielsweise an das Kügelchen angebundenes Makromolekül zieht mit einer gewissen Kraft am Kügelchen. Die äquivalente Strömungsgeschwindigkeit ist diejenige Geschwindigkeit des umgebenden Mediums, bei der die Reibungskraft – verursacht durch die Stokessche Reibung – ebenfalls die selbe Kraft hervorruft.

Im „Beenden“ Register kann eingestellt werden, wann die Messung automatisch abgebrochen werden soll. Entweder falls eine gewisse Distanz erreicht wurde, oder falls eine gewisse äußere Kraft am gefangenen Kügelchen überschritten wurde. So läßt sich verhindern, daß das Kügelchen aus der Falle herausgezogen wird, oder daß ein angebundenes Molekül zerreißt (sofern die Kraft ausreichen würde).

Im „Rücklauf“ Register kann dann noch ausgewählt werden, ob nach Beenden der Messung (gleichgültig ob durch automatischen oder manuellen Stop) die letzte angefahrne Position beibehalten werden soll, oder ob der Piezotisch zur ursprünglichen Startposition zurückkehren soll.

Die Messung läßt sich nicht starten oder die laufende Messung wird automatisch abgebrochen, wenn die x-Position den Wert von $99,990 \mu\text{m}$ überschritten hat, denn der Piezotisch kann sich ohnehin nur bis Position $100,000 \mu\text{m}$ bewegen.

Alle Programmanweisungen werden sequentiell abgearbeitet. Zwischen den insgesamt 17 Sequenzen wird je eine Wartezeit von 2ms eingesetzt, um zu verhindern, daß beispielsweise das Senden und das sofort darauffolgende Empfangen von Daten zum und vom Controller sich überschneiden und zu Programmabstürzen führen können.

4.4 Bau einer neuen Flüssigkeitszelle

Anstatt der provisorischen Flüssigkeitszelle (siehe Seite 30), sollte für alle folgenden Messungen eine Zelle benutzt werden, die Flüssigkeitszufuhr und -abfluß besitzt. Zu- und Abfluß sind über einen schmalen Kanal verbunden, in dem dann die weiteren Experimente stattfinden.

Das wichtigste Detail sollte jedoch eine eingebettete Pipette sein, deren freie Öffnung an der Spitze einen kleineren Querschnitt haben sollte, als ein gefangenes Kügelchen, so daß dieses auf die Spitze aufgesetzt und mit Unterdruck dort festgesaugt werden kann.

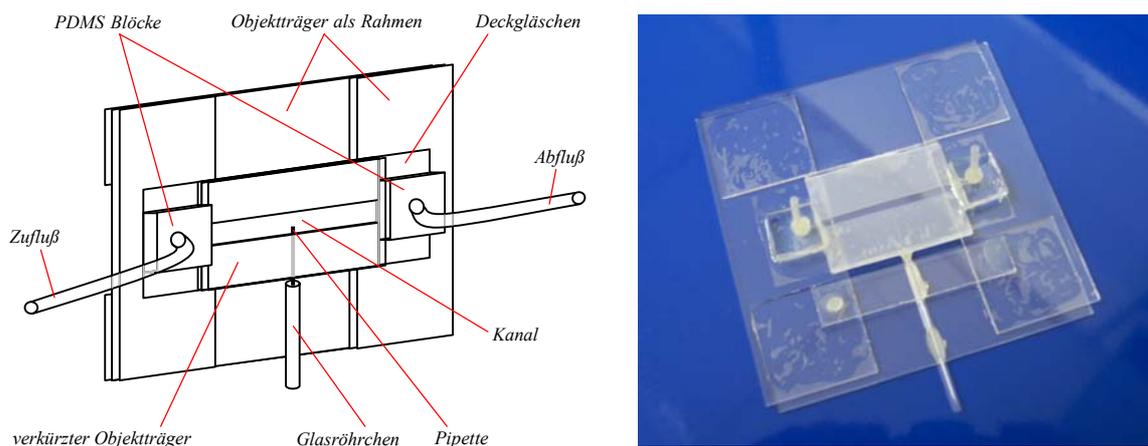


Abbildung 30: Skizze und Foto der Flüssigkeitszelle in ihrer aktuellsten Version.

Die Flüssigkeitszelle besteht aus einem Rahmen von vier Objektträgern. Ein Deckgläschen mit den Maßen $60 \times 25 \times 0,14 \text{ mm}$ bildet den Boden der Zelle und das dünne Glas ermöglicht es, die Optische Falle tief ($\approx 100 \mu\text{m}$) innerhalb der Zelle zu erzeugen, und ein darüberliegender, auf ca. 45 mm verkürzter Objektträger bildet die Decke. Diese werden an beiden Längsseiten mit Hilfe von doppellagigem „Parafilm“ (Fa. American National Can) unter Erwärmung auf etwa 50°C verklebt, so daß zwischen beiden Doppellagen ein Kanal von 5 mm Breite und $0,3 \text{ mm}$ Höhe entsteht, durch den die Flüssigkeit (Wasser, Puffer, Suspension mit Kügelchen, etc.) gepumpt werden kann.

An einer Seite wurde zuvor eine Pipette zwischen die Doppellage eingebracht, so daß deren Spitze in die Mitte des Kanals eintaucht und sich auch in der Höhe mittig im Kanal befindet.

Diese Pipette wurde in den ersten Versuchen aus einem *KG-33* Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von $1,1 \text{ mm}$ und einem Außendurchmesser von $1,5 \text{ mm}$ freundlicherweise am Pipettenziehgerät der Physikalischen Chemie III der Universität Bielefeld hergestellt. Die Spitze sollte zunächst auf etwa $0,1-0,2 \text{ mm}$ ausgedünnt und mehrere Millimeter in die Länge gezogen werden, um in einem zweiten Schritt dann auf einen Innendurchmesser von $1-2 \mu\text{m}$ gezogen werden.

Da diese Prozedur jedoch kaum reproduzierbar war, wurden filamentlose Glaskapillaren aus *KG-33* von Fa. Garner Glas bestellt, die einen Innendurchmesser von $80 \pm 8 \mu\text{m}$, einen Außendurchmesser von $150 \pm 15 \mu\text{m}$ und eine Länge von $100 \pm 3 \text{ mm}$ besaßen. Diese konnten wiederum mit dem Pipettenziehgerät der Physikalischen Chemie III auf einen Innendurchmesser von $1,5-2 \mu\text{m}$ und einen Außendurchmesser von $6 \mu\text{m}$ gezogen werden, wobei es vorläufig nicht möglich war, die Wandstärke auf unter $2 \mu\text{m}$ zu reduzieren.

An den Ein- und Ausgang des Kanals wurde ein PDMS-Block mit „Araldit“ angeklebt. In den Block wurde ein 2 mm Loch eingestanz, in das ein Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von $0,8 \text{ mm}$ und einem Außendurchmesser von $1,6 \text{ mm}$ eingeklebt wurde. In den Boden des Blocks wurde ein kleiner Kanal eingeschnitten, der an dem Kanal der Zelle dicht anlag und mit „Araldit“ umklebt wurde, so daß ein sicherer Zu- und Abfluß ermöglicht wurde.

Da die Pipette ein gefangenes Kügelchen ansaugen soll, wird der aus dem Kanal herausragende Teil der Pipette von einem Glasröhrchen (dem gleichen wie oben angegeben) dicht umschlossen – und über dieses Röhrchen wurde ein weiterer Silikonschlauch gestülpt und dieser mit einer 10 ml Spritze verbunden, mit deren Hilfe dann ein Unterdruck in der Pipette erzeugt werden konnte.

5 Durchführung und Ergebnisse der Kalibrierung

Mit Hilfe der Positionsdetektion ist es möglich, eine auf ein gefangenes Kügelchen wirkende äußere Kraft mit einer Genauigkeit von weniger als 1 pN zu messen. Die Meßgenauigkeit wird begrenzt durch das statistische Rauschen des Photostromes in der Photodiode, sowie der Verstärkerelektronik bis hin zum Analog/Digitalwandler. Weiterhin ist der Aufbau der Optischen Pinzette empfindlich gegenüber den Intensitätsschwankungen des Lasers, sowie vor allem den mechanischen Schwingungen entlang des Laserstrahles und auch entlang des Weges des vorwärtsgestreuten Laserlichtes.

Die Brownsche Bewegung des in der Optischen Falle gefangenen Objektes kann ebenfalls detektiert werden – solange diese nicht zu sehr durch die eben genannten Störungen überlagert wird.

5.1 Messung der Stabilität der Falle anhand der maximalen Kraft und der Stokeschen Reibung

Ein erstes Kriterium für die Stabilität der Falle ist, bei welcher Geschwindigkeit des umgebenden Mediums das in der Falle gefangene Kügelchen aus dieser herausgedrängt wird.

Ein Kügelchen mit dem Radius r , welches sich relativ zu einer ruhenden homogenen Flüssigkeit mit der Viskosität η mit einer Geschwindigkeit v bewegt, erfährt eine Stokesche Reibungskraft von

$$F_s = -6\pi\eta vr . \quad (5.1)$$

Hierbei tritt eine laminare Strömung um das Kügelchen auf, bei der die unmittelbar am Kügelchen anliegende Flüssigkeitsschicht dieselbe Geschwindigkeit wie das Kügelchen besitzt; und in einer Entfernung von der Größenordnung r von der Kugeloberfläche aus gesehen senkrecht (in z -Richtung) zur Strömungsgeschwindigkeit haben die Flüssigkeitsschichten wieder die Geschwindigkeit null [Gerthsen 1993]. Das Geschwindigkeitsgefälle beträgt somit $dv/dz \approx v/r$ und auf der Oberfläche $4\pi r^2$ des Kügelchens läßt sich näherungsweise eine bremsende Kraft

$$F \approx -4\pi r^2 \eta \frac{dv}{dz} \approx -4\pi\eta vr$$

ermitteln. Eine exakte Rechnung führt dann wieder zu Gleichung (5.1) und diese Kraft würde auch ein Kügelchen erfahren, das *ruht* und um das sich eine ausgedehnte homogene Flüssigkeit laminar mit der Geschwindigkeit v *bewegt*.

Die Stokessche Reibung gilt nur bei laminaren Strömungen und diese treten nur bei kleinen Reynoldszahlen² Re auf:

$$Re = vr\rho/\eta$$

[Svoboda 1994], wobei ρ das spezifische Gewicht der Kugel ist. Für Wasser ($\eta = 0,001 \text{ Nsm}^{-2}$ bei 20°C) und den hier verwendeten Kügelchen von $r \approx 1,5 \mu\text{m}$ bei einer Dichte von $\rho \approx 1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, die sich, wie später gezeigt, mit Geschwindigkeiten bis zu $v \approx 4600 \mu\text{m/s}$ bewegen, ergibt sich eine Reynoldszahl von $Re \approx 7 \cdot 10^{-6}$.

Zunächst wurde in die Flüssigkeitszelle eine Suspension von unbeschichteten Polystyrolkügelchen mit einem Radius von $r = 1,418 \mu\text{m}$ injiziert, wobei zuvor einige Mikroliter der 2,6 Vol.% Stammlösung der Kügelchen etwa 1000fach mit destilliertem Wasser verdünnt wurden.

Beim Experiment sollte sich die gesamte Flüssigkeit in der Zelle an der ortsfesten Optischen Falle mit einer über das Steuerungsprogramm wählbaren konstanten Geschwindigkeit vorbeibewegen. Daß sich der Piezotisch auch über den gesamten Bereich von $0 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$ mit einer konstanten Geschwindigkeit bewegt, mußte mit Hilfe des ursprünglichen Piezo-Steuerungsprogramms „Nano Capture“ überprüft werden. Hierbei stellte sich heraus, daß selbst bei Geschwindigkeiten von $5000 \mu\text{m/s}$ die Geschwindigkeit zwischen den Positionen $10 \mu\text{m}$ bis $90 \mu\text{m}$ nahezu konstant war.

Die Stokes-Gleichung (5.1) gilt nur für die Bewegung von Kügelchen in einem unendlichen Flüssigkeitsvolumen. Befindet sich der Mittelpunkt eines Kügelchens in einer Entfernung von $h \geq r$ über einer Grenzfläche (beispielsweise dem Boden der Flüssigkeitszelle) und bewegt er sich parallel zu dieser Grenzfläche, dann bewirkt der steigende Reibungskoeffizient bei Annäherung an diese Grenzfläche eine Erhöhung der Stokesschen Reibungskraft. Dies wird beschrieben im Faxenschen Gesetz [Svoboda 1994], welches für Bewegungen parallel zur Grenzfläche die Korrekturen von Gleichung (5.1) angibt:

$$F_s^{\parallel} = \frac{-6\pi\eta vr}{\left[1 - \frac{9}{16}(r/h) + \frac{1}{8}(r/h)^3 - \frac{45}{256}(r/h)^4\right]}. \quad (5.2)$$

² Laminare Strömungen treten bei einer umströmten Kugel nur bei Reynoldszahlen $Re \ll 100$ auf und eben nur in jenem Bereich gilt die Stokessche Reibung [Gerthsen 1993].

Das gefangene Kügelchen wurde über die Fokussierung in der Höhe verschoben, so daß verschiedene Abstände vom Boden der Flüssigkeitszelle eingehalten werden konnten.

Die Laserleistung wurde daraufhin auf 60 mW und danach auf 500 mW eingestellt, der Beamexpander generell auf einen Aufweitungsfaktor von acht und daraufhin diejenige Geschwindigkeit ermittelt, bei der das Kügelchen gerade noch nicht seitlich aus der Falle herausgeschoben wurde:

60 mW :

h in μm	h/r	v_{max} in $\mu\text{m}/\text{s}$	F_s^{\parallel} in pN
5	3,53	135	4,29
10	7,05	145	4,21
25	17,63	150	4,14
50	35,26	150	4,08

500 mW :

h in μm	h/r	v_{max} in $\mu\text{m}/\text{s}$	F_s^{\parallel} in pN
5	3,53	930	29,57
10	7,05	960	27,88
25	17,63	970	26,78
50	35,26	970	26,35

Bei Annäherung an den Boden der Flüssigkeitszelle sinkt die maximale Geschwindigkeit, da der Stokessche Reibungskoeffizient

$$\gamma_s^{\parallel} = \frac{-6\pi\eta r}{\left[1 - \frac{9}{16}(r/h) + \frac{1}{8}(r/h)^3 - \frac{45}{256}(r/h)^4\right]}$$

ansteigt und demnach fällt die maximale Geschwindigkeit ab. Dennoch sollte die Kraft, mit der das Kügelchen in der Falle gehalten wird, unabhängig vom Abstand zum Boden der Flüssigkeitszelle sein, insofern sollte auch die nach dem Faxenschen Gesetz korrigierte Stokessche Reibungskraft F_s^{\parallel} in allen Fällen konstant sein. Bei [Ghislain 1994] fällt jedoch, wie bei meinen Messungen, die Kraft mit steigendem h . Dies wird auf eine Erhöhung der sphärischen Aberration zurückgeführt, die entsteht, weil das dortige Ölimmersionsobjektiv

nur für einen bestimmten Abstand der Frontlinse vom Boden der Flüssigkeitszelle optimiert worden ist. Dieser Umstand sollte jedoch bei einem Wasserimmersionsobjektiv nicht auftreten.

Bei 60 mW weichen die Beträge der Kraft noch um maximal $5,1\%$ ab, während die Geschwindigkeit zwischen $50\ \mu\text{m}$ und $5\ \mu\text{m}$ wie vorhergesagt abnimmt, und zwar auf 90% . Bei 500 mW schwankt die Kraft sogar um $12,2\%$. Bei der Messung war es jedoch schwierig, die Höhe über dem Boden exakt einzustellen, da das Fokusrad am Mikroskop eine Skalenauflösung von $2,5\ \mu\text{m}$ besitzt. Weiterhin wurde beobachtet, daß das Kügelchen, wenn es auf dem Boden aufsitzt, beginnt, im Videobild unscharf zu werden – was schätzungsweise auf $\approx 0,5\ \mu\text{m}$ exakt durchgeführt werden kann. In diesem Moment wird die Position des Fokusrads abgelesen und daraufhin das Kügelchen über die Fokussierung um die gewünschte Höhe angehoben. Eine Erklärung, warum bei 500 mW allerdings die Abweichungen wesentlich größer als bei 60 mW sind, kann leider nicht gegeben werden, ebensowenig, warum kein Unterschied in der maximalen Geschwindigkeit bei $25\ \mu\text{m}$ und $50\ \mu\text{m}$ Höhe festgestellt werden konnte.

Viel entscheidender ist jedoch der Umstand, daß generell die Kraft, mit der das Kügelchen in der Falle gefangen wurde, im Vergleich zu Literaturwerten deutlich zu klein war. In [Ghislain 1994] beispielsweise wird angegeben, daß ein mit $2,1\ \mu\text{m}$ und $6,1\ \mu\text{m}$ Durchmesser gefangenes Polystyrolkugelchen mit einer Kraft von maximal 41 pN bzw. 53 pN in der Falle gehalten wird! Bei deren Messungen betrug die Laserleistung *am Punkt der Optischen Falle* allerdings 60 mW , bei mir war dies lediglich die am Laser-Steuergerät angezeigte Leistung. Daher sollte zunächst einmal die gemessene Laserausgangsleistung in Abhängigkeit der angezeigten Leistung ermittelt werden und weiterhin die Verluste auf dem Lichtweg, wenn möglich bis hin zu Optischen Falle.

Von der Laserphysik wurde mir daraufhin freundlicherweise ein wellenlängenselektives Leistungsmeßgerät zu Verfügung gestellt. Zuerst wurde die Laserausgangsleistung P_{aus} hinter dem Pumplichtsperrfilter in Abhängigkeit der am Steuergerät angezeigten Leistung P_{steu} ermittelt.

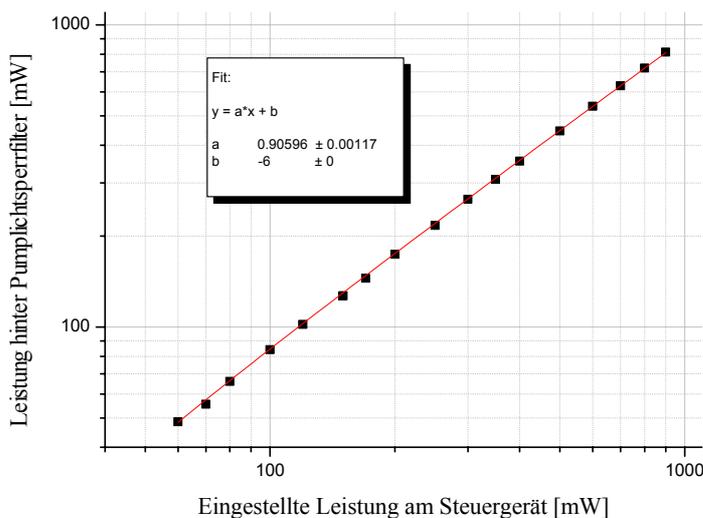


Abbildung 31: Gemessene Laserleistung hinter dem Pumplichtsperrfilter in Abhängigkeit der am Steuergerät eingestellten Leistung.

Die verschiedenen Datenpunkte in Abbildung 31 wurden noch gefittet. Die gemessene Leistung beträgt $P_{aus}[mW] \cong 0,906 \cdot P_{steu}[mW] - 6 mW$ im Bereich von $P_{steu} \geq 60 mW$. Bei einer am Steuergerät eingestellten Leistung von beispielsweise $60 mW$ konnte hinter dem Pumplichtsperrfilter eine Leistung von nur $48,6 mW$ gemessen werden.

Der weitere Verlust an Leistung auf dem Weg des Laserstrahles bis vor die rückwärtige Apertur wurde weiterhin gemessen. Die vor dem Wasserimmersionsobjektiv ankommende Leistung betrug dann in diesem Fall nur noch $33,8 mW$, also nur noch $69,6\%$ der Ausgangsleistung hinter dem Pumplichtsperrfilter. Aufgrund des Aufweitungsfaktors acht besitzt der Laserstrahl eine Fleckgröße von etwa $2w \cong 12 mm$. Die rückwärtige Apertur des Objektivs beträgt $2a = 8,5 mm$. Nach Gleichung (1.6) tritt somit nur ein prozentualer Anteil von $63,3\%$, also nur noch $21,4 mW$, in das Objektiv. Die Messung der Leistung über dem Objektiv gestaltete sich als unmöglich, da nach dem Fokus der Laserstrahl sehr divergent auseinanderstrebte und der Detektor des Leistungsmessers nicht dicht genug an die Frontlinse angenähert werden konnte, um den gesamten Querschnitt des austretenden Laserstrahles zu detektieren. Eine Abschätzung der transmittierten Laserleistung ergab eine Nachfrage bei Fa. Olympus: Das „UPlanApo / IR 60 x 1,20 W“ transmittiert bei $1064 nm$ etwa 62% der Leistung. Also kommt am Punkt der Falle in diesem Falle maximal noch eine Leistung von etwa $13,3 mW$ an! Infolge von Reflexionen an der Wasser-Glas-Wasser Grenzfläche³ in der Flüssigkeitszelle gehen hier noch schätzungsweise 1% an

³ Der Reflexionskoeffizient r beim senkrechten Durchtritt eines Lichtstrahles vom Medium mit der Brechzahl n_1 in das Medium mit der Brechzahl n_2 beträgt $r = (n_2 - n_1)^2 / (n_2 + n_1)^2$.

Leistung verloren. Somit werden nach dem Passieren des Pumplichtsperrfilters nur noch etwa 27,1% der Laserleistung in der Falle umgesetzt. Dies erklärt teilweise die geringe Kraft im Vergleich zu den Daten von [Ghislain 1994].

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sind alle angegebenen Leistungen die am Steuergerät eingestellten Leistungen.

Die Hauptursache für die geringe Kraft ist die noch nicht perfekte Justierung des Laserstrahles. Zunächst sollte überprüft werden, ob durch Änderung des Aufweitungsfaktors des Beamexpanders sich die laterale Kraft erhöhen ließ. Der Aufweitungsfaktor konnte bis auf 5fach abgesenkt werden, bei kleinerer Aufweitung wurde das Kügelchen immer durch die Streukräfte nach oben aus der Falle herausgeschossen. Messungen zeigten jedoch, daß die laterale Kraft nur bei einem Aufweitungsfaktor von acht ihren größten Wert annahm. Dies legte die Vermutung nahe, daß bei einer noch stärkeren Aufweitung sich die Kraft noch ein wenig erhöhen ließ. Dazu wurde vor dem Beamexpander, und zwar direkt hinter dem Pumplichtsperrfilter, aus einer Zerstreungs- und einer Sammellinse ein weiterer Beamexpander mit 2facher Aufweitung eingebaut. Somit konnte die Gesamtaufweitung auf maximal 16fach erhöht werden. Es zeigte sich jedoch, daß wiederum bei 8facher Aufweitung die maximal mögliche Kraft erreicht wurde, bei höheren Aufweitungsfaktoren nahm die Kraft dann wieder ab. Das lag auch an den Reflexions- und Transmissionsverlusten und an den geometrischen Abbildungsfehlern des provisorischen Beamexpanders, dessen Linsen Einzellinsen waren und somit geometrische Bildfehler nicht genügend korrigiert werden konnten.

Der provisorische Beamexpander wurde daraufhin entfernt und die Justage des Laserstrahles entlang des gesamten Weges bis zu Optischen Falle mehrere Male wiederholt, wobei sich anhand der Genauigkeit, mit der der nicht-aufgeweitete und der aufgeweitete Stahl mittig und senkrecht durch die Objektivfassung im Objektivrevolver fiel, zeigte, daß jeweils vorhergehende Justagen immer noch leicht verbessert werden konnten. Dennoch erhöhte sich die laterale Kraft nach den ersten Justagen bei beispielsweise einer eingestellten Leistung von 500 mW auf maximal $1200\text{ }\mu\text{m/s}$ bei Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 2,837\text{ }\mu\text{m}$, die etwa $50\text{ }\mu\text{m}$ über dem Boden der Flüssigkeitszelle gefangen wurden. Dies entspricht einer Kraft von $32,1\text{ pN}$. Bei 900 mW konnte eine Kraft von $56,1\text{ pN}$ ermittelt werden, was einer Geschwindigkeit von $2100\text{ }\mu\text{m/s}$ entsprach.

Erst nachdem die Abweichungen beim Durchtritt des Stahles durch den Objektivrevolver sukzessive auf weit unter einen Millimeter reduziert werden konnten, was mit Hilfe des Detektorkärtchens kaum noch nachweisbar war, konnte schlagartig eine deutlich erhöhte Kraft ermittelt werden (die Qualität der Optischen Falle ist sehr empfindlich gegenüber kleinster Dejustagen, wie Martin Hegner (Universität Basel) auch berichtete):

<i>Leistung in mW</i>	<i>v in $\mu\text{m/s}$</i>	<i>F in pN</i>
60	440	11,8
500	2500	66,8
900	4200	112,2

Auch hierbei ist zu erkennen, daß mit steigender Leistung die Kraft nicht linear zunimmt. Eine mögliche Erklärung ist, daß – wie schon in Kapitel 2.1 beschrieben – das Gaußsche Strahlprofil mit zunehmender Leistung verformt wird, auch wenn dies erst bei Leistungen von rund 650 mW deutlich sichtbar wird. Wie Martin Hegner mitteilte, erhält er bei der Optischen Pinzette der Universität Basel folgende Werte: $\approx 10\text{ pN}$ bei 60 mW , $\approx 80\text{ pN}$ bei 500 mW und sogar $\approx 160\text{ pN}$ bei etwa 1000 mW . Er benutzt jedoch Kügelchen mit einem Durchmesser von $2,1\text{ }\mu\text{m}$ und einen Beamexpander (Fa. Sill Optics) mit festem Aufweitungsfaktor von 10.

5.2 Kalibrierung mit Hilfe der Stokesschen Reibung

Bei der Kalibrierung der Falle wird jetzt die Ablenkung des vorwärtsgestreuten Lichtes im gefangenen Kügelchen detektiert, wenn dieses durch eine äußere Kraft – nämlich durch die Stokessche Reibung – lateral aus der Falle ausgelenkt wird. Vorher sind noch kleinere Justagen notwendig.

Der Kondensor wird über dessen Halterung so weit an die Falle herangeschraubt, daß dessen Fokus sich nahezu auf dem Punkt der Optischen Falle befindet. Das am Kügelchen vorwärtsgestreute Licht wird vom Kondensor aufgefangen und somit in ein nahezu paralleles Strahlenbündel übergeführt. Da die rückwärtige Apertur des Kondensors 7 mm Durchmesser hat, fällt dieses Strahlenbündel mit einem Durchmesser von ebenfalls 7 mm auf die zweigeteilte Photodiode (die möglichst mindestens genau so groß sein sollte). Laut [Gittes 1998] bewirkt die unterschiedliche laterale Ausleuchtung des Strahlenbündels infolge der lateralen Auslenkung des Kügelchens in der Falle dann einen Rückschluß auf eben diese laterale Auslenkung (siehe Kapitel 4.2). Die unterschiedliche Ausleuchtung bei der lateralen Auslenkung des Kügelchens aus dem Fokus konnte sogar mit dem Infrarot-Detektorkärtchen sichtbar gemacht werden.

Diese zweigeteilte Photodiode hat jedoch nur eine Breite von insgesamt etwa 3 mm . Infolgedessen muß das Kondensorobjektiv wieder etwas nach oben bewegt werden, um das Strahlenbündel nach dem Kondensor konvergieren zu lassen, was zum einen zur Folge

hat, daß nur der innere Teil des oberhalb der Falle divergenten Strahlenbündels vom Kondensator eingefangen werden kann. Die geringere eingefangene Leistung bewirkt somit ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis im Photodetektor. Würde man die Entfernung von Kondensator zu Detektor erhöhen, dann müßte das Strahlenbündel nach dem Kondensator weitaus weniger konvergent zusammenlaufen – im gleichen Zug kann der Kondensator der Falle wiederum weiter angenähert werden – aber aufgrund des längeren Weges zwischen Kondensator und Detektor wird der gesamte Aufbau weitaus schwingungsanfälliger. Momentan betrug der Abstand zwischen Kondensator und Detektor etwa 15 cm .

Die Kalibrierung konnte dennoch durchgeführt werden, allerdings durfte sich bei allen folgenden Messungen die Höhe des Fokus nicht ändern, da sich dann zwangsläufig auch der Abstand zwischen Optischer Falle und dem feststehenden Kondensator ändert.

Es wurden wiederum Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 2,837\ \mu\text{m}$ benutzt. Die mit destilliertem Wasser gefüllte Flüssigkeitszelle wurde mit einer über das Steuerungsprogramm einstellbaren Geschwindigkeit von beispielsweise $374\ \mu\text{m/s}$ an dem gefangenen Kügelchen vorbeibewegt. Somit wirkte auf das Kügelchen eine Stokessche Reibungskraft von exakt $10\ \text{pN}$. Die vom Steuerungsprogramm eingelesenen - zuvor über zwei separate Transimpedanzverstärker verstärkten - Spannungssignale wurden normiert und der Umrechnungsfaktor, der das normierte Signal in eine Kraft umrechnete, konnte problemlos ermittelt werden, da die angezeigte Kraft exakt $10\ \text{pN}$ betragen sollte. Das wurde am besten überprüft, indem sich die Flüssigkeitszelle abwechselnd mit $374\ \mu\text{m/s}$ die $100\ \mu\text{m}$ in x -Richtung hin und her gefahren wurde. Im $F(t)$ -Graphen ergab sich ein rechteckförmiger Ausschlag zwischen $-10\ \text{pN}$ und $+10\ \text{pN}$ bei entsprechendem Umrechnungsfaktor. Wurden andere Geschwindigkeiten ausgewählt, dann stieg und fiel die entsprechende Kraft linear zu der Geschwindigkeit. Überschritten die Geschwindigkeiten jedoch etwa $\sim 70\%$ der Geschwindigkeit, bei der das Kügelchen aus der Falle herausgezogen würde, dann konnte kaum noch ein Anstieg der Kraft detektiert werden. Bei weiterer Annäherung an die maximale Geschwindigkeit fiel die detektierte Kraft sogar ab.

5.3 Messung der Stabilität der Falle anhand der Brownschen Bewegung

Das Potential der Optischen Falle in einer Dimension läßt sich als Potential eines harmonischen Oszillators mit der Federkonstante k mit $V(x) = 0,5 \cdot k \cdot x^2$ beschreiben. Die rückstellende Kraft im Potential beträgt $dV/dx \equiv F = -k \cdot x$. Ein Teilchen mit der Masse m schwingt dann mit einer Eigenfrequenz von $f_0 = (k/m)^{0,5} \cdot (2\pi)^{-1}$.

Ist ein Partikel im Potential gefangen, befindet sich die Falle samt Partikel in einem Medium mit der Reibungszahl $\gamma = 6\pi\eta r$ (siehe Kapitel 5.1) und wird zudem eine zeitlich abhängige äußere Kraft $F(t)$ betrachtet, dann ergibt sich folgende Bewegungsgleichung für das Partikel [Svoboda 1994]:

$$\gamma \frac{dx}{dt} + k \cdot x = F(t). \quad (5.3)$$

Hierbei ist x die Auslenkung des Partikels. Diese Bewegungsgleichung wird als Langevin-Gleichung bezeichnet. In deren einfachster Form ist $F(t)$ die äußere Kraft, die die Brownsche Bewegung charakterisiert.

Weiterhin beschreibt das Äquipartitionstheorem für jeden Freiheitsgrad das mittlere Auslenkungsquadrat eines im Potential gefangenen Teilchens

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k}. \quad (5.4)$$

Hier ist k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Die Darstellung der Auslenkung x in einem Histogramm ermöglicht dann bei Kenntnis der Temperatur die Ermittlung der Kraftkonstante. Dazu muß das Potential der Falle auch exakt das eines harmonischen Oszillators sein. Am wichtigsten ist jedoch, daß das normierte Detektorsignal mit der Auslenkung x in Relation zu setzen ist (siehe Kapitel 7).

Der Weg über die Auslenkung x kann auch umgangen werden. Dabei wird zunächst die Langevin-Gleichung (5.3) mit Hilfe der Einstein-Stokes-Gleichung $D = k_B T / \gamma$ umgestellt. D ist hierbei die Diffusionskonstante. Die Langevin-Gleichung (5.3) nimmt daraufhin folgende Gestalt an [Pampaloni]:

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{k}{\gamma} x + \sqrt{2D} \xi. \quad (5.5)$$

Hier ist ξ eine Gaußsche stochastische Variable mit $\langle \xi(t) \rangle = 0$ und $\langle \xi(t) \cdot \xi(t') \rangle = \delta(t - t')$. Durch Fouriertransformation von (5.5) erhält man die Fourieramplitude

$$\tilde{x}(\omega) = \frac{\sqrt{2D}}{i\omega + k/\gamma}$$

und daraus dann das Lorentz-Spektrum

$$S(\omega) = \frac{2D}{\omega^2 + (k/\gamma)^2},$$

das mit $\omega_c = k/\gamma \Leftrightarrow f_c = k/2\pi\gamma$ und der Einstein-Stokes-Gleichung noch umgeschrieben werden kann:

$$S(f) = \frac{k_B T}{2\pi^2 \gamma (f^2 + f_c^2)}. \quad (5.6)$$

Diese Gleichung enthält die Eckfrequenz (corner frequency) f_c , über die, und mit Hilfe des einfach zu ermittelnden Stokesschen Reibungskoeffizienten γ , die Kraftkonstante $k = 2\pi\gamma f_c$ ermittelt werden kann. Um die Eckfrequenz zu ermitteln, wird das Frequenzspektrum (Rauschspektrum) eines gefangenen Kügelchens aufgenommen. Im Spektrum wird die Rauschamplitude (Spektrale Leistungsdichte) in $V^2 Hz^{-1}$ in Abhängigkeit der Frequenz in Hz aufgenommen. Dazu wurde nur ein Kanal der zweigeteilten Photodiode ausgelesen. Dies ermöglichte ein von LabView mitgeliefertes Programm eines Oszillographen, das noch dahingehend erweitert werden mußte, so daß es die Frequenz und die spektrale Leistungsdichte in eine ASCII-Datei schrieb, die mit dem Programm „Origin 6.0“ ausgewertet wurde, indem das Spektrum mit der Gleichung (5.6) gefittet wurde.

Dazu wurde wiederum ein Polystyrolkügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 2,837 \mu m$ in der mit destilliertem Wasser gefüllten Flüssigkeitszelle gefangen und das Spektrum aufgenommen. Die Leistung wurde wiederum auf $60 mW$ eingestellt.

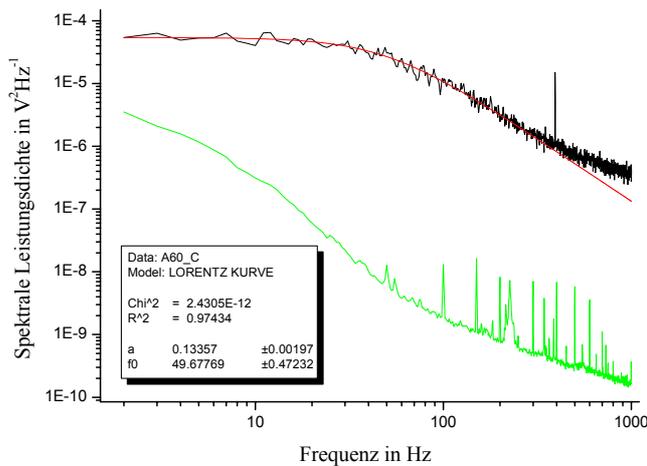


Abbildung 32: Das Rauschspektrum eines $2,873 \mu\text{m}$ großen Polystyrolkügelchens, das mit einer Laserleistung von 60 mW gefangen wurde (schwarz). Dargestellt ist außerdem die mit Gleichung (5.6) gefittete Kurve (rot), anhand der die Eckfrequenz von $49,7 \text{ Hz}$ ermittelt wurde. Weiterhin ist das Rauschspektrum der leeren Falle dargestellt (grün).

Mit Hilfe der gefitteten Kurve ließ sich eine Eckfrequenz von $f_0 \equiv f_c = 49,7 \text{ Hz}$ ermitteln. Die Gleichung (5.6) wurde dazu auf $S(f) = a/(f^2 + f_0^2)$ vereinfacht und die Werte a und f_0 auch in Abbildung 32 dargestellt. Hieraus konnte eine Kraftkonstante von $k = 8,35 \cdot 10^{-6} \text{ N/m} = 8,35 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ermittelt werden. Dieses Spektrum in Abbildung 32 für Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 2,837 \mu\text{m}$ bei 60 mW besaß die bis dahin höchste aufgenommene Eckfrequenz. In allen weiteren Versuchen lag diese bei etwa nur $\cong 30 \text{ Hz}$. Dies legte die Vermutung nahe, daß trotz gleichbleibender Stabilität der Falle (da zwischen diesen Messungen keine neuen Justagen durchgeführt wurden) äußere Einflüsse, wie zum Beispiel niederfrequente Schwingungen infolge eines vermuteten noch zu instabilen Aufbaus der Falle, auftraten. Diese niederfrequenten Störungen bewirkten, daß sich im Spektrum häufig überhaupt keine Eckfrequenz eindeutig feststellen ließ, weil nirgendwo das Rauschspektrum ein „Plateau“ unterhalb der Eckfrequenz ausbildete.

Das in Abbildung 32 dargestellte Spektrum war jedoch nicht das einzige aufgenommene Rauschspektrum. Weitere Spektren wurden bei verschiedenen Leistungen von $40 \dots 400 \text{ mW}$ aufgenommen und es wurden auch Kügelchen mit kleineren Durchmessern ($2r \cong 2,2 \mu\text{m}$) gefangen. Hierbei ergab sich, daß bei kleineren Kügelchen die Eckfrequenz anstieg (siehe Kapitel 7) und auch Martin Hegers Messungen unterstrichen dies. Die Eckfrequenz bei Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r \cong 2,2 \mu\text{m}$ erhöhte sich von $\cong 28 \text{ Hz}$ bei 40 mW auf $\cong 240 \text{ Hz}$ bei 400 mW , die Eckfrequenz scheint also linear mit der Leistung anzusteigen – zumindest in diesem Bereich mit einer Genauigkeit von $16,7 \%$.

Um noch einmal auf die soeben errechneten Kraftkonstante von $k = 8,35 \text{ pN} / \mu\text{m}$ bei $2r = 2,837 \mu\text{m}$ zurückzukommen: Die wahre Leistung am Punkt der Falle beträgt wie in Kapitel 5.1 berechnet höchstens $\cong 13,3 \text{ mW}$. Lege ich den bis auf 16,7% linearen Anstieg der Eckfrequenz im Verhältnis der Leistung zu Grunde, dann sollte die Eckfrequenz bei einer wahren Leistung von 60 mW am Punkt der Falle mindestens 193 Hz betragen. Dementsprechend erhöht sich die Kraftkonstante auf mindestens $32,4 \text{ pN} / \mu\text{m}$. Dieser Wert ist jedoch immer noch deutlich geringer als der in [Ghislain 1994] angegebene Wert von $192 \text{ pN} / \mu\text{m}$ - bei einem Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 2,1 \mu\text{m}$. Immerhin fällt die Kraftkonstante dort dann bei einem Kügelchen mit $2r = 6,1 \mu\text{m}$ Durchmesser auf $33 \text{ pN} / \mu\text{m}$ ab, aber auch dies täuscht nicht über die von mir gemessene geringe Kraftkonstante hinweg.

Wie schon erwähnt, schien die Ursache dafür am noch recht instabilen Aufbau der gesamten Versuchsanordnung zu liegen.

6 Umbau der Optischen Pinzette

Das weitaus größte Problem vor allem bei der Kraftmessung war, daß das Kraftsignal starken Schwankungen unterlag: Zum einen war es immerhin möglich, die Konstante, welche das normierte Detektorsignal in die Kraft umrechnet, auf etwa 15 % Genauigkeit zu bestimmen. Dies wurde kontrolliert, indem nacheinander gleichartige Kügelchen gefangen wurden und überprüft wurde, ob die stets konstante Geschwindigkeit ein gleiches Kraftsignal hervorruft.

Es traten Fluktuationen im Kraftsignal auf, die im ersten Moment aus der Brownschen Bewegung der Kügelchen in der Falle herrührten. Die Brownsche Bewegung ist ein statistischer Prozeß und die durch sie hervorgerufenen Schwankungen der Meßwerte können durch Aufaddition gemittelt werden. Das ist aber nur möglich, solange die Meßwerte in einem Zeitraum gewonnen werden, der deutlich größer ist als die Zeitspanne zwischen zwei Stößen von Molekülen des umgebenden Mediums an das Kügelchen - die Korrelationszeit. Ebenso kann das Schrotrauschen (das thermische Rauschen) eines Verstärkers oder des Photostromes der Photodiode durch Mittelung von N Meßwerten mit $1/\sqrt{N}$ reduziert werden.

Aus diesem Grund lassen sich im Steuerungsprogramm bis zu 100000 Meßwerte aufaddieren, die in einem Zeitraum von etwa 0,54 Sekunden gewonnen wurden, bei einer Datentransferrate von 185 kHz. Dennoch schwankte die gemessene Kraft, auch wenn keine äußere Kraft infolge einer Bewegung der Flüssigkeitszelle auftrat, bei der Mittelung von 1000 Meßwerten manchmal bis zu $\Delta F \approx 8 pN$. Bei 100000 Meßwerten waren es hin und wieder bis zu 3 pN bei geringen bis mittleren Leistungen.

Zunächst sei angemerkt, daß der Laser, vor allem wenn dieser bei hohen Leistungen betrieben wurde, eine Aufwärmzeit von bis zu 50 Minuten benötigte. Vor Ablauf dieser Zeit unterlag die Ausgangsleistung noch extremeren Schwankungen, obwohl der Laser stets im TEM₀₀ Modus lief, die zu Schwankungen im Kraftsignal von bis zu $\Delta F \approx 15 pN$ führten. Diese hatten den Verlauf einer Sägezahnschwingung mit einer Schwingungsdauer von anfänglich einigen Sekunden und dann stetig zunehmend auf etwa eine Minute. Erst nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen vom Laser an die Kühlung zugeführter Wärme und von der Kühlung abgeführter Wärme einstellte, verschwand die sägezahnförmige Variation im Kraftsignal, aber die völlig unregelmäßigen Schwankungen bis $\Delta F \approx 8 pN$ blieben bestehen. Deren Ursache konnten dann nur mechanische Instabilitäten im Aufbau, vor allem entlang des Laserweges, sein, die an mehreren Stellen von solch niederfrequenter Natur ($< 1 Hz$) waren, so daß diese nicht durch Aufaddition von testweise bis zu 600000 Meßwerten gemittelt werden konnten.

Das gesamte Experiment wurde daraufhin auseinandergebaut, um folgende Änderungen vornehmen zu können:

Die Kühleinheit inklusive des Ventilators wurde entfernt, da sich herausstellte, daß der Ventilator eine 400 Hz Schwingung auf den Laser übertrug, die auch als Störung während der Kraftmessung nachzuweisen war.

Die Kühlung wurde daraufhin durch einen flachen Kupferblock ersetzt, der die Wärme des Lasers an die Optische Bank abgab.

Der Pumplichtsperrfilter, der zunächst nur durch einen Greifarm hinter den Laserausgang gehalten wurde, konnte in einer Nut im Kupferblock direkt am Laserausgang fest verschraubt werden. Weiterhin wurde die Oberkante des Filters über einen Epoxidharzklecks am Gehäuse des Lasers befestigt, so daß der Filter nun oben wie unten fixiert war.

Der Weg des Laserstrahles bis hin zur Optischen Falle mußte, so weit das möglich war, verkürzt werden. Dazu wurde zuerst der Laser, der zuvor etwa 25 cm von der Halterung des unteren Umlenkspiegels entfernt war, nun auf wenige Millimeter an diesen angenähert.

Das Mikroskop, welches auf einer Grundplatte und auf vier etwa 35 mm hohen und 16 mm dicken Bolzen stand, wurde abmontiert, eine neue Grundplatte an zehn statt vier Bolzen mit der Optischen Bank verschraubt und auf neue, etwa 15 mm kurze Bolzen das Mikroskop daraufhin wieder aufgesetzt.

Da der Laserausgang aufgrund des flachen Kupferblockes und das Mikroskop aufgrund der kürzeren Bolzen niedriger montiert waren, konnten die Halterungen des unteren und des oberen Umlenkspiegels am Umlenkturm ebenfalls nach unten verschoben werden und eventuell auftretende Schwingungen des sonst stabilen Turmes übertragen sich nicht mehr in dieser Stärke auf die Umlenkspiegel.

Der variable Beamexpander sollte durch einen Beamexpander mit festem Aufweitungsfaktor ersetzt werden. „Sill Optics“ bot uns hierfür zwei Beamexpander mit 6- und 10fachem Aufweitungsfaktor zum Test an. Der 10x lieferte in punkto Stabilität der Falle die eindeutig besseren Ergebnisse (siehe Kapitel 7), und es ließ sich die Strahldivergenz variieren. Zudem hat ein optisches System mit festem Vergrößerungsfaktor eine geometrisch bessere Abbildungsleistung als ein System mit variablen Parametern. „Sill Optics“ testeten den variablen Beamexpander auf Abbildungsfehler, konnten aber keine solchen feststellen. Dennoch hatte der neue Beamexpander entscheidende Vorteile. Aufgrund des geringeren Gewichtes und der kürzeren Baulänge wurde eine neue Halterung entworfen, die es ermöglichte, den Beamexpander weitestgehend im Mikroskop zu

versenken. Der variable Beamexpander schaute noch zu weit aus der rückwärtigen Öffnung des Mikroskops heraus und verhielt sich wie eine Stimmgabel, die den hindurchtretenden Laserstrahl relativ zu optischen Achse modulierte.

Aufgrund der kürzeren Baulänge des neuen Beamexpanders konnte das Mikroskop auch näher an den oberen Umlenkspiegel herangesetzt werden, was den Lichtweg nochmals um etwa 10 *cm* verkürzte.

Der in Kapitel 4.2 beschriebene Aufbau zur Positionsdetektion des gefangenen Kügelchens wurde neu entworfen. Zunächst wurde die in Abbildung 28 dargestellte Brücke entfernt, aber alle anderen Teile beibehalten, wie die Haltervorrichtungen für das Kondensorobjektiv und für den dichroitischen Spiegel. Die zweigeteilte Photodiode wurde durch eine Quadrantendiode mit separatem Verstärker und der analogen Rechneinheit ersetzt – wie im Kapitel 2 auf Seite 25f beschrieben. Wurde das vorwärtsgestreute Laserlicht beim ursprünglichen Aufbau noch, wie in Abbildung 28 gezeigt, in $-x$ -Richtung ausgelenkt, so geschieht dies nun in y -Richtung (wie in Abbildung 10), auch aus Stabilitätsgründen, denn dadurch war es möglich, den Quadrantendetektor in der Nähe der hinteren Auflagefläche der neuen Brücke auf dem Auflagetisch (Abbildung 22 und 33) zu plazieren:

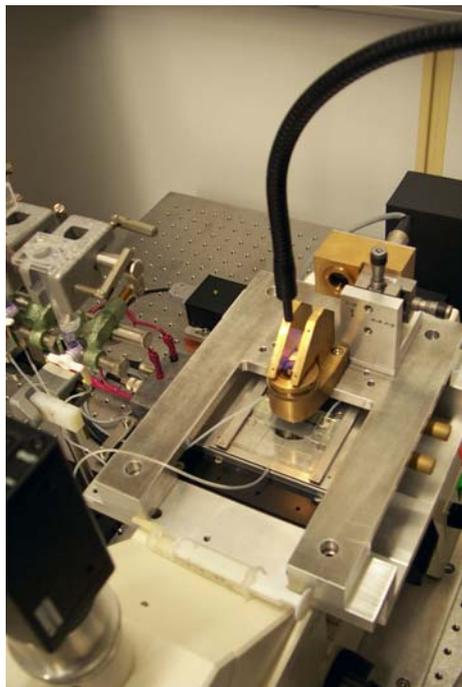


Abbildung 33: Der neue Aufbau der Positionsdetektion.

Diese Brücke besteht im Gegensatz zur alten, die in der Mitte aus 7 *mm* dickem Messing gefertigt war, aus 10 *mm* dickem Aluminium in der Mitte, das sich an den Auflageflächen

auf 25 mm aufweitet. Aufgrund des geringeren Gewichtes wird die Schwingung des oberen Teiles des Mikroskops somit reduziert, ebenso wie die Schwingung der Brücke in sich.

Da das vorwärtsgestreute Laserlicht nun in $-x$ -Richtung ausgelenkt wird, mußten im Steuerungs- und Meßprogramm die am Piezotisch anzusteuernenden Achsen vertauscht und die CCD Kamera um 90° gedreht werden.

Da die Quadrantendiode deutlich größer ist als die zuvor verwendete Photodiode, mußte ein neues Gehäuse aus Messing angefertigt werden. Das Gehäuse wurde über eine 2-Achsen Justage in x- und y-Richtung justierbar befestigt.

Alle losen Kabel wurden mit selbstklebenden Kabelbindern entweder am Mikroskop oder mit verschraubten Metallstreifen direkt auf der Optischen Bank befestigt, so daß diese nicht lose herumhängen und ihre Schwingungen auf den Aufbau übertragen können.

Beim wohl wichtigsten Teil des Umbaus wurde der mikroskopeigene Beleuchtungsturm entfernt, da dieser den höchsten Punkt des Mikroskops darstellte und somit, sowie aufgrund seines hohen Gewichtes, die stärkste Quelle für niederfrequente Schwingungen darstellte. Der Beleuchtungsturm wurde durch eine Kaltlichtquelle ersetzt, in der das Licht durch einen dicken Schlauch von Glasfasern (der schwarze Schlauch in Abbildung 33 oben) bis über den dichroitischen Spiegel geleitet wurde.

7 Ergebnisse und Auswertung des verbesserten Aufbaus

Nach dem Umbau war es wieder nötig, den Laserstrahl vom Laser bis hin zur Falle komplett neu zu justieren. Zunächst war die Qualität der Justage noch völlig unbefriedigend. Die maximale Kraft war geringer als während der ersten Versuche, die in Kapitel 5.1 beschrieben wurden. Deshalb wurde sich wiederum schrittweise der optimalen Justage angenähert, diesmal auch mit Hilfe des Parallelreißers. Während etlicher Versuche erhöhte sich zunächst kaum die Kraft, mit der ein Kügelchen gefangen wurde, bis aber infolge weiterer Justagen eben jene Qualität erreicht wurde, bei der die maximale Kraft selbst die bestmöglichen Werte der zurückliegenden Messungen überschritt.

Da im Rahmen der Diplomarbeit Kraftmessungen an einer λ -DNA durchgeführt werden sollen und dazu die DNA zwischen zwei mit Streptavidin beschichteten Kügelchen angebunden werden muß, wurden jetzt beschichtete Polystyrolkügelchen von „Spherotech“ mit einem Durchmesser von $2r = 3,18 \mu\text{m}$ verwendet.

Die Messung der maximalen Kraft ergab folgende Werte (in Abhängigkeit der am Steuergerät eingestellten Leistung):

<i>Leistung in mW</i>	<i>v in $\mu\text{m} / \text{s}$</i>	<i>F in pN</i>
4	10,8	0,33
60	516	15,5
500	2550	76,4
600	2805	84,1
900	4250	127,4
1000	4625	138,6

Hier ist zuerst zu berücksichtigen, daß aufgrund des Aufweitungsfaktors von zehn, nun statt ehemals 63,3 % nur noch 47,4 % der Leistung nach Gleichung (1.6) in das Objektiv eintreten. Entsprechend verringert sich die Leistung am Punkt der Optischen Falle nun auf 20,3 % der ursprünglichen Leistung hinter dem Pumplichtsperrfilter. Dennoch ist der Anstieg der maximalen Kraft im Vergleich mit den Daten auf Seite 56 um mindestens 13,5 % bei 900 mW bis hin zu 31,4 % bei 60 mW auffallend, besonders da der

Stokessche Reibungskoeffizient aufgrund des 12,1% größeren Kugelchens ebenfalls um diesen Wert angestiegen ist. Der Wert von $138,6 \text{ pN}$ bei 1000 mW zeigt auch, daß sich die Qualität der Falle bei solch hohen Leistungen trotz der Verformung des Gaußschen Strahlprofils schon relativ nahe der Qualität der Optischen Pinzette von Martin Hegner angenähert hat, dort waren es $\approx 160 \text{ pN}$ bei etwa 1000 mW . Die $\approx 80 \text{ pN}$ bei 500 mW in Basel konnten fast eingestellt werden und bei 60 mW übertrifft es dann die dortigen $\approx 10 \text{ pN}$. Der Wert von nur $0,33 \text{ pN}$ bei 4 mW diente eigentlich nur um zu zeigen, daß selbst bei solch extrem geringen Leistungen (am Punkt der Falle beträgt die Leistung schätzungsweise weniger als 1 mW - die Korrekturfunktion in und unterhalb von Abbildung 31 darf dabei selbstverständlich nicht mehr berücksichtigt werden) noch Kugelchen gefangen werden können, auch wenn diese sich schon allein durch die Brownsche Bewegung fast von selbst aus der Falle befreien könnten. Daher auch der überproportional starke Abfall der maximalen Geschwindigkeit bei dieser geringen Leistung.

Bevor die Schwankungen im Kraftsignal bei einem gefangenen Kugelchen untersucht wurden, sollte das „Rauschen“ des Lasers und noch eventuelle Schwingungen des gesamten Versuchsaufbaues detektiert werden. Hierzu durfte selbstverständlich kein Kugelchen gefangen werden, um Rauschen und störende Schwingungen nicht durch die Brownsche Bewegung zu überdecken.

Zunächst muß der Laser auf Arbeitstemperatur gebracht werden. Das Rauschen während der ersten Minuten dieser Aufwärmphase wurde testweise aufgenommen, nur um mal einen Vergleich mit den Daten zu besitzen, während der Laser stabil läuft. Zuvor mußte jedoch noch der Faktor ermittelt werden, der das Detektorsignal (ein Spannungssignal in V), welches vom Steuerungs- und Meßprogramm eingelesen wird, in ein Kraftsignal (in pN) umrechnet. Dies konnte schon während der Messung der maximalen Kraft durchgeführt werden, da der Stokessche Reibungskoeffizient, die Geschwindigkeit und das Detektorsignal schon bekannt waren, bzw. eingelesen werden konnten. Hierbei ergab sich ein Wert von 54 pN/V , wobei die analoge Recheneinheit ein Spannungssignal von $-12 V$ bis $+12 V$ ausgeben konnte. Dieses Signal konnte im Gegensatz zur Datenerfassung der alten Photodiode statt mit 185 kHz nun mit 370 kHz eingelesen werden, da nur noch ein Kanal (eben der eine Spannungswert, der das auf Wunsch normierte oder nicht normierte Detektorsignal darstellt) ausgelesen werden mußte.

Dem Signal des loslaufenden Lasers bei 250 mW und dem Signal des Lasers auf Betriebstemperatur sind kaum noch störenden Schwingungen des mechanischen Aufbaus - so lange sie überhaupt noch detektiert werden können - überlagert.

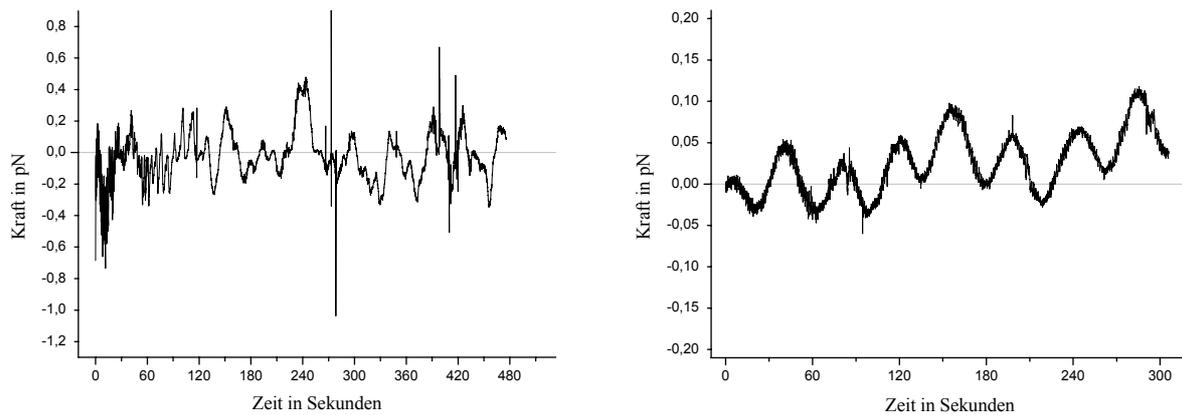


Abbildung 34: Das Kraftsignal der Schwingungen des Aufbaus zusammen mit dem Rauschen des Lasers zu Beginn (links) und nach Beendigung der Aufwärmphase (rechts) nach 50 Minuten bei je 250 mW. Das Kraftsignal in pN dividiert durch 18,5 ergibt das Spannungssignal des Detektors in mV. Man beachte die verschiedenen Skalen der Ordinaten. Es wurden je 1000 Meßwerte gemittelt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß nach dem Aufwärmen vor allem eine Störung mit einer Schwingungsdauer von etwa 45 Sekunden vorherrscht, die nur von Intensitätsschwankungen des Lasers herrühren kann. Störungen, die ihre Ursache in mechanischen Schwingungen haben, bewirken nur Schwankungen von $\Delta F \approx 0,03 \text{ pN}$. Aber: Dies darf nicht überinterpretiert werden. Wird ein Kügelchen gefangen, dann ist dies vor allem auch aufgrund der es umgebenden Flüssigkeit bedeutend empfindlicher gegenüber mechanischen Schwingungen und Intensitätsschwankungen des Lasers. Kügelchen und Flüssigkeit wirken dann wie eine hochempfindliche „Antenne“, die selbst Umgebungsgeräusche als Störungen im Kraftsignal anzeigt.

Als nächstes wurden daher die wahren Schwankungen im Kraftsignal bei einem gefangenen Kügelchen von $2r = 3,18 \mu\text{m}$ Durchmesser bei verschiedenen Leistungen detektiert. Hierbei wurden dann 100000 Meßwerte aufaddiert – genau so viele, wie während zukünftiger Kraftmessungen.

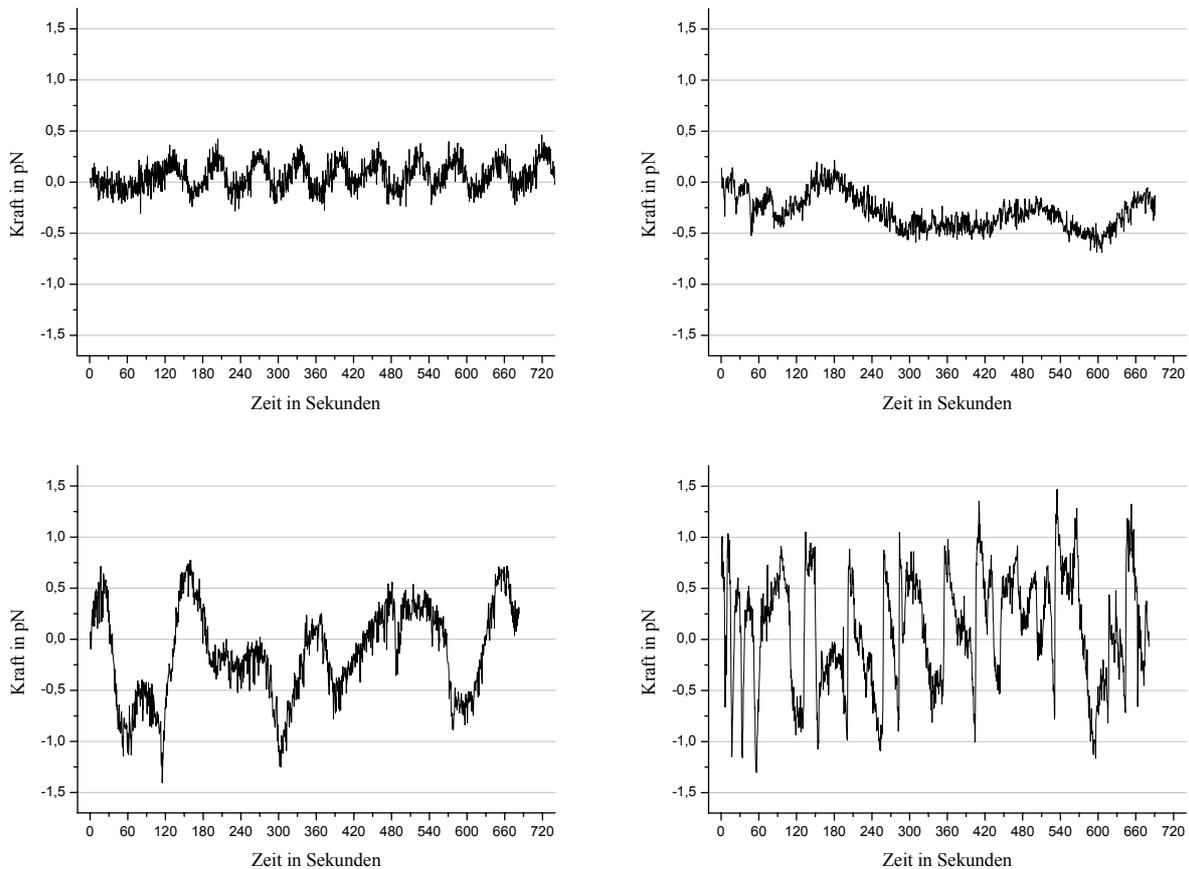


Abbildung 35: Die Schwankungen im Kraftsignal bei einem gefangenen Kügelchen mit 3,18 μm Durchmesser. Es wurden je 100000 Meßwerte gemittelt und dies bei Leistungen von 60 mW (von oben links nach unten rechts), 250 mW, 600 mW und 900 mW.

Alle Kraftwerte in Abbildung 35 sind aus dem unnormierten Detektorsignal mit dem Faktor von 54 pN/V ermittelt wurden. Nur mit Hilfe des unnormierten Signals ist es möglich, daß das Kraftsignal unabhängig von der Leistung des Lasers immer konstant ist.

Es ist zu erkennen, daß das Kraftsignal mit steigender Leistung größeren Schwankungen unterliegt. Hierbei sind beispielsweise die Schwankungen mit einer Schwingungsdauer von etwa 60 Sekunden bei 60 mW mit einer Amplitude von $\Delta F \approx 0,6 \text{ pN}$ vorhanden. Die unregelmäßigen Schwankungen bei 250 mW und wesentlich stärker dann bei 600 mW und die starken Ausschläge mit bis zu $\Delta F \approx 2,5 \text{ pN}$ sind alle auf Intensitätsschwankungen in der Laserleistung zurückzuführen. Diese „großräumigen“ Schwankungen im Signalverlauf allein auf die Brownsche Bewegung zurückzuführen, führt scheinbar zu einem Widerspruch, denn nach dem Äquipartitionstheorem (5.4) muß bei geringen Leistungen, die einhergehen mit einer geringen Federkonstante k der Falle, die Auslenkung des Kügelchens in der Falle

ansteigen. Nun wird aber nicht die Auslenkung gemessen, sondern die Kraft. Es ist selbstverständlich richtig, daß eine konstante äußere Kraft bei einer geringeren Leistung des Lasers das Kügelchen weiter aus der Mitte der Falle herausdrängt. Aber das unnormierte Detektorsignal spricht nicht linear auf die Auslenkung an, sondern linear auf die Kraft. Dies bestätigten die Messungen, die bei den unter Abbildung 35 angegebenen Leistungen durchgeführt wurden. Eine Geschwindigkeit der Falle von $333,6 \mu\text{m}/\text{s}$ rief bei allen Leistungen ein Kraftsignal von 10 pN hervor, bei dem konstanten Faktor von $54 \text{ pN}/V$.

Die Brownsche Bewegung hingegen stellt sich in Abbildung 35 als die Schwankung mit einer Amplitude von etwa $\Delta F \approx 0,4 \text{ pN}$ dar, wohlgermerkt bei 100000 gemittelten Meßwerten. Bei 1000 Meßwerten ergeben sich Schwankungen bis zu $\Delta F \approx 2 \text{ pN}$ bei mittleren Leistungen. Dies zeigt auch Abbildung 36, wo bei 250 mW ein Kügelchen über einen Zeitraum von 70 Sekunden betrachtet wurde, in dem der Laser sehr konstant lief, und nur jeweils 1000 Meßwerte gemittelt wurden.

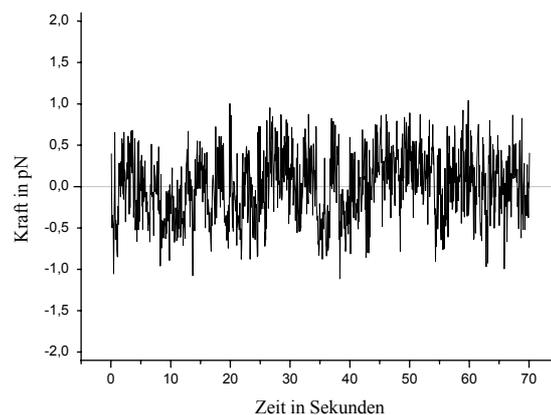


Abbildung 36: Das Kraftsignal eines $3,18 \mu\text{m}$ großen Kügelchens bei 250 mW , wobei jeweils nur 1000 Meßwerte gemittelt wurden.

Im Vergleich mit den Werten des alten Aufbaus der Pinzette (bis zu $\Delta F \approx 3 \text{ pN}$ bei immerhin 100000 Meßwerten bei 60 mW) stellt dies eine deutliche Verbesserung dar.

Die mechanischen Schwingungen können natürlich nicht vollständig beseitigt werden, aber es zeigt sich an Abbildung 35, daß der Laser momentan noch die größere Störquelle ist.

Der nächste Schritt war die Aufnahme der Rauschspektren. Neben den Kügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 3,18 \mu\text{m}$ wurden auch Spektren von unbeschichteten Polystyrolkügelchen mit einem Durchmesser von $2r = 1,05 \mu\text{m}$ aufgenommen, bei Leistungen von 60 mW , 250 mW und 900 mW .

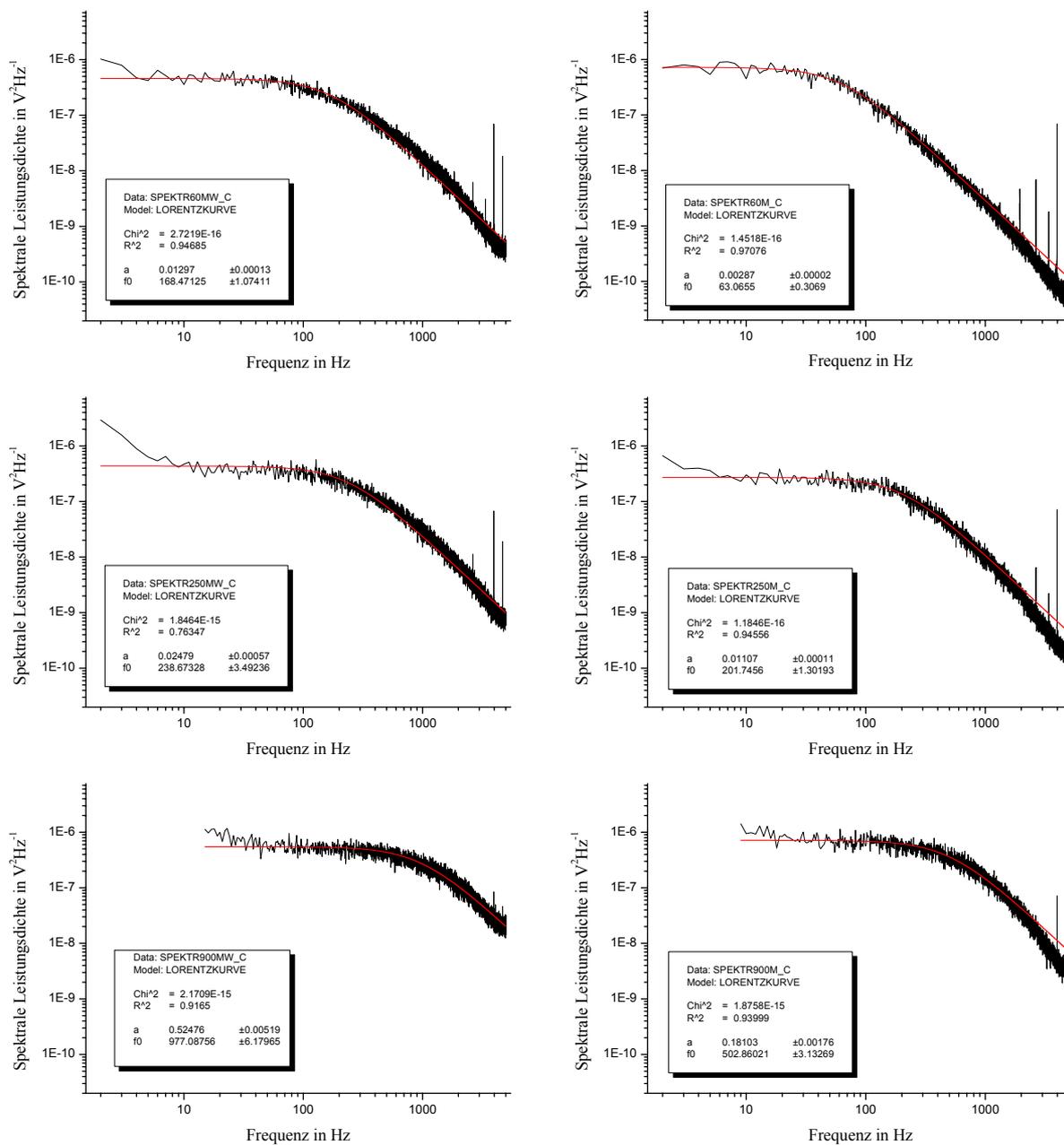


Abbildung 37: Die Rauschspektren von gefangenen Kügelchen mit 1,05 μm Durchmesser (linke Spalte) und 3,18 μm Durchmesser (rechte Spalte) bei (von oben nach unten) 60 mW, 250 mW und 900 mW. Man erkennt, daß ab mittleren Leistungen die Rauschamplitude bei sehr kleinen Frequenzen (< 10 Hz) wieder leicht ansteigt, bei 900 mW war dieser Anstieg wesentlich deutlicher, so daß nur Daten bei Frequenzen oberhalb von 10 Hz berücksichtigt wurden.

Der Vergleich der Daten beider Kügelchen zeigt, daß generell die kleineren eine höhere Eckfrequenz hervorrufen, allerdings ist dieser Anstieg nicht exakt umgekehrt proportional zum Durchmesser der Kügelchen. Bei 60 mW hingegen besitzt das ein Drittel so große Kügelchen eine gut 2,7 mal so hohe Eckfrequenz. Bei 250 mW dagegen ist dieser Anstieg auf lediglich das 1,18 fache begrenzt, während bei 900 mW sich die Eckfrequenz um das 1,94 fache erhöhet.

Die Eckfrequenz der $3,18\text{ }\mu\text{m}$ Kügelchen steigt in vergleichbarer Weise an, wie die maximale Kraft in der Tabelle auf Seite 66. Dort erhöhet sich die Kraft beim Anstieg der Leistung von 60 mW auf 900 mW um das 8,22 fache, während die Eckfrequenz immerhin um das 7,97 fache ansteigt. Bei den $1,05\text{ }\mu\text{m}$ Kügelchen erhöhet sich die Eckfrequenz um das 5,8 fache.

Ein wichtiger Vergleich mit den Daten von Abbildung 32 bei 60 mW zeigt, daß trotz des 12,1% größeren Kügelchens die Eckfrequenz aufgrund des stabileren Aufbaus und der besseren Justage auf $63,1\text{ Hz}$ angestiegen ist. Auch muß man bedenken, daß aufgrund des 10fach Beamexpanders die Leistung am Punkt der Falle im Vergleich zum 8fach Beamexpander nur noch drei Viertel der Leistung beträgt.

Die Ermittlung der Kraftkonstanten $k = 2\pi\gamma f_c$ anhand der Eckfrequenz ergibt folgende Werte:

<i>Leistung in mW</i>	<i>wahre Leistung in der Falle in mW</i>	<i>k in pN / μm beim 1,05 μm Kügelchen</i>	<i>k in pN / μm beim 3,18 μm Kügelchen</i>
60	9,8	10,5	11,9
250	44,8	14,8	38,0
900	164,3	60,8	94,7

Bei einer Leistung von 60 mW in der Falle würde die Kraftkonstante eines $3,18\text{ }\mu\text{m}$ Kügelchens etwa $k \approx 46\text{ pN} / \mu\text{m}$ betragen, bereits unter Berücksichtigung, daß die Kraftkonstante nicht ganz linear mit der Leistung ansteigt. Beim Kügelchen mit $1,05\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser würde diese Kraftkonstante mindestens $18\text{ pN} / \mu\text{m}$ betragen, unter Umständen bis zu $\approx 30\text{ pN} / \mu\text{m}$, wenn der schwache Anstieg der Kraftkonstante zwischen 60 mW und 250 mW als „Ausrutscher“ in der Messung gedeutet würde. Selbst der Wert von $\approx 46\text{ pN} / \mu\text{m}$ bei $3,18\text{ }\mu\text{m}$ wäre aber immer noch deutlich zu klein im Vergleich mit den Daten von [Ghislain 1994], wo bei einem $1\text{ }\mu\text{m}$ und einem $2,1\text{ }\mu\text{m}$ Kügelchen die Kraftkonstanten $145\text{ pN} / \mu\text{m}$ und $192\text{ pN} / \mu\text{m}$ betragen. Dennoch zeigt der Vergleich der Daten der maximalen Geschwindigkeit mit den Daten von Martin Hegner, daß die Falle trotz der zu geringen Eckfrequenz eine hohe Stabilität aufweist.

Mit einem kleinen Trick können Kraft und Auslenkung in einer Messung direkt ermittelt werden: Wie schon in Kapitel 4.2 beschrieben wird die Kraft wie üblich über die Positionsdetektion aus den Daten des Quadrantendetektors ermittelt. Die Auslenkung kann über die Position des Piezotisches bestimmt werden. Deshalb wird ein gefangenes streptavidinbeschichtetes Kügelchen mit $3,18 \mu\text{m}$ Durchmesser dem Boden der Flüssigkeitszelle angenähert, bis dieses fest an die Oberfläche adsorbiert. Dies geschieht jedoch nicht sofort. Meistens müssen diese Kügelchen etliche Minuten auf dem Boden aufliegen, bis sie fest an die Oberfläche anbinden. Hat dann das Kügelchen an die Oberfläche adsorbiert, so wird nun das Kügelchen lateral durch die Optische Falle hindurchbewegt. Die Höhe der Falle (z -Position) muß ebenfalls so eingestellt sein, als wenn das Kügelchen tatsächlich in der Falle gefangen wäre. Anhand des Videobildes, bei dem die Schärfe des Bildes des Kügelchens sensibel auf Änderung in z -Richtung reagiert, kann gut die korrekte z -Position überprüft werden. Die Leistung betrug 900 mW .

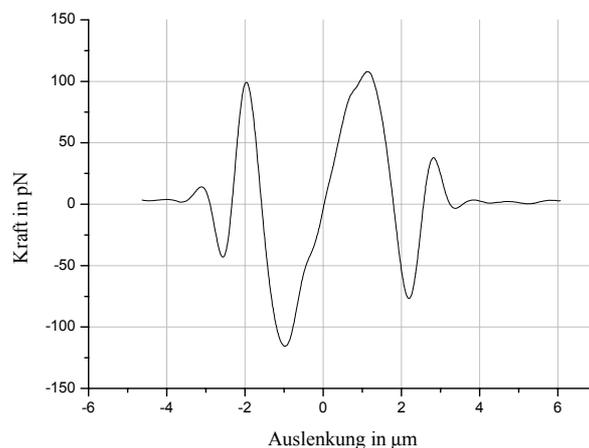


Abbildung 38: Kraft-Auslenkungsdiagramm eines Kügelchens von $3,18 \mu\text{m}$ Durchmesser bei 900 mW .

Der Vergleich mit Abbildung 25 zeigt deutlich, daß das Modell von [Gittes 1998] hier nicht mehr anwendbar ist, vor allem aufgrund der Tatsache, daß dieses nur für den Rayleigh-Bereich eine gültige Beschreibung liefert. Deutlich sind die „Nebenmaxima“ im Kraftsignal zu erkennen. Dennoch existiert auch hier der lineare Arbeitsbereich bei einer Auslenkung x zwischen $\approx -0,7 \mu\text{m}$ und $\approx +0,7 \mu\text{m}$. Darin ist jedoch bei etwa $-0,5 \mu\text{m}$ und $+0,8 \mu\text{m}$ eine Schwankung zu erkennen. Diese hat ihre Ursache allem Anschein nach in einer kleinen Bewegung des Kügelchens aufgrund der auftretenden lateralen Kraft. Offensichtlich war das Kügelchen nicht ganz unverrückbar fest an die Glasoberfläche adsorbiert.

Auch ist zu erkennen, daß der Detektor nur eine Kraft von maximal etwa 110 pN anzeigen kann und danach bei höheren Kräften, die einhergehen mit größerer Auslenkung des Kügelchens aus der Falle, wieder eine abfallende Kraft anzeigt. Dieses Problem ist noch nicht gelöst.

Dennoch kann aus Abbildung 38 die Kraftkonstante bestimmt werden. Dies ist der Anstieg im linearen Arbeitsbereich. Die Kraftkonstante beträgt in etwa $130 \text{ pN} / \mu\text{m}$, ist also $37,3\%$ höher als die anhand der Eckfrequenz ermittelte Kraftkonstante. Ob auch diese Messung oder allein die Bestimmung der Eckfrequenz mit einem Fehler behaftet ist, kann leider nicht entschieden werden. Doch zeigt dies die Problematik, die daraus entsteht, wenn die Kraft nicht direkt aus dem unnormierten Detektorsignal und über die Stokesche Reibung, sondern über den (in diesem Falle noch zu sehr mit Fehlern behafteten) Weg der Kraftkonstante und die aus dem normierten Detektorsignal errechnete Auslenkung bestimmt wird.

Mit dem normierten Detektorsignal kann hingegen das Äquipartitionstheorem überprüft werden. Da das normierte Signal linear mit der Auslenkung ansteigt, muß sich dementsprechend bei steigender Leistung P das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ verringern. Die Kraftkonstante k steigt typischerweise proportional zur Leistung P , und nach dem Äquipartitionstheorem gilt

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k}.$$

In einem Diagramm, in dem auf der Ordinate die mittlere Schwankungsbreite (RMS) des normierten Detektorsignals aufgetragen ist (das proportional der Schwankungsbreite der mittleren Auslenkung ist) und bei dem auf der Abszisse $1/\sqrt{P}$ aufgetragen ist, sollte demnach $RMS(\text{Detektorsignal}) \sim 1/\sqrt{P}$ sein.

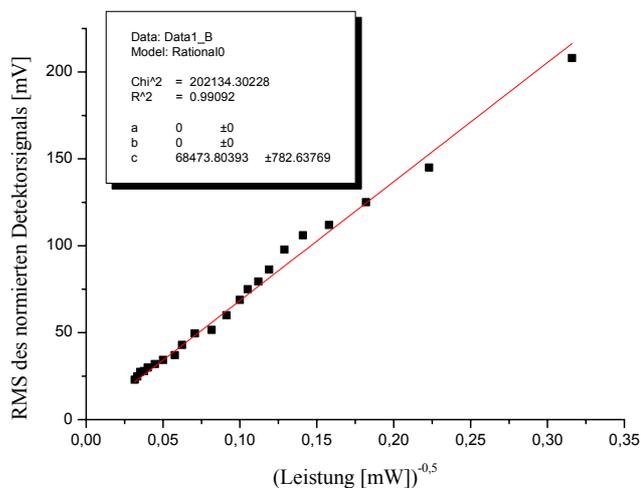


Abbildung 39: Der RMS-Wert des normierten Detektorsignals - der proportional zur mittleren Auslenkung x ist - in Abhängigkeit der inversen Wurzel der Laserleistung. Deutlich ist der lineare Zusammenhang zu erkennen.

Der lineare Zusammenhang läßt sich, abgesehen von kleinsten Abweichlern, ohne weiteres erkennen. Hierbei wurde über ein von LabView mitgeliefertes Datenerfassungsprogramm aus je 30000 Meßwerten der RMS-Wert ermittelt. Der Laser war hierbei selbstverständlich bereits auf Betriebstemperatur, sonst würden die Intensitätsschwankungen selbst das normierte Detektorsignal deutlich stören.

8 Kraftmessungen an einer λ -DNA

Wie bereits angemerkt, sollte der Abschluß des Aufbaus die Kraftmessung an einer Lambda-DNA sein. Diese muß zuvor biochemisch präpariert werden: Biotinmoleküle müssen an beide Enden des Stranges angekoppelt werden, so daß diese Moleküle dann an Streptavidinmoleküle auf der Oberfläche zweier Kügelchen anbinden. Ein Kügelchen wird an einer dünnen Pipettenspitze mit Unterdruck festgehalten, während das andere in der Falle gefangen wird. Dann werden Pipettenspitze samt Flüssigkeitszelle relativ zur Optischen Falle voneinander wegbewegt und die von der DNA auf das Kügelchen in der Falle wirkende Kraft gemessen.

8.1 λ -DNA

Das Objekt der Begierde ist das nur 48502 Basenpaare umfassende DNA-Molekül des Lambda-Bakteriophagen, einem Virus, der seine DNA in Bakterien injiziert, sodaß diese daraufhin in ihrem Innern weitere Lambda-Phagen produzieren.

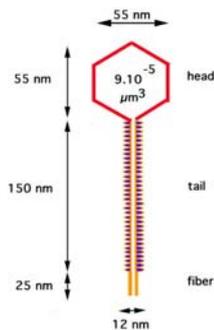


Abbildung 40: Aufbau einer Lambda-Bakteriophage. Aus [Louvain].

Die DNA ist zunächst im Kopf des Phagen aufgerollt und wird erst dann entrollt, wenn sich der Phage auf ein Bakterium setzt und die DNA in die Bakterie injiziert werden soll. Im Kopf des Phagen liegt die DNA in zyklisierter Form vor, das heißt, die beiden Enden der DNA sind über eine Länge von 12 Basenpaaren verbunden.

Die λ -DNA besteht aus 48502 Basenpaaren. Jedes Basenpaar ist ein über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpftes Adenin-Thymin (zwei Wasserstoffbrücken) oder Guanin-Cytosin (drei Wasserstoffbrücken) Paar. Adenin und Guanin sind organische Purinbasen, Thymin und Cytosin hingegen organische Pyrimidinbasen.

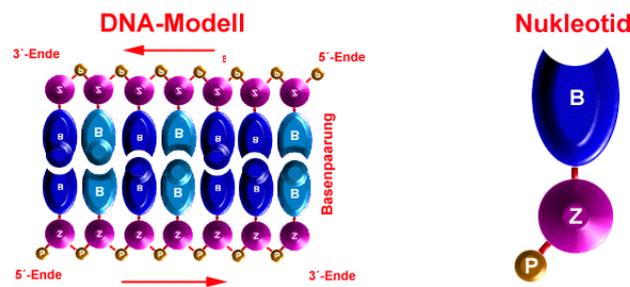


Abbildung 41: Schematischer Aufbau einer DNA und eines Nucleotids. Aus [Molekulargenetik].

Je eine der vier Basen, ein Zuckermolekül (Pentose) und ein Phosphatrest, bilden zusammen ein Nucleotid; Zucker und Phosphatrest das Rückgrat eines DNA-Moleküls. Jedes Nucleotidpaar ist gegenüber dem vorherigen um 36° verdreht, in der Gesamtheit ergibt sich somit eine Sekundärstruktur in Form einer „verdrehten Strickleiter“ (Doppelhelix).

Eine linearisierte – also in nicht zyklisierter Form vorliegende – DNA besitzt an jedem Ende ein 3' und ein 5' Ende, benannt nach der Position des Phosphatrestes am Ring des Zuckermoleküls. Der Durchmesser eines DNA-Moleküls beträgt etwa 2 nm . Die Höhe eines Basenpaares beträgt $0,338 \text{ nm}$. Das bedeutet, daß eine λ -DNA, würde sie eine gerade Form einnehmen, eine Länge von $16,4 \mu\text{m}$ besitzt – die Konturlänge.

Nun ist die DNA kein starres Gebilde, sondern kann sich als freies Molekül in einer Flüssigkeit prinzipiell verknäulen. Eine gängige Beschreibung dieses Zustands von Polymeren nach [Biophysik] ist die des „freely jointed chain“-Modells. Hier wird angenommen, daß ein Polymer aus N Monomeren aufgebaut ist. Jedes Monomer ist mit dem nächsten Monomer mit einem Abstand von l_i verbunden. Die Gesamtlänge des Polymers beträgt somit

$$\vec{L} = \sum_{i=1}^N \vec{l}_i.$$

Für den Winkel θ zwischen zwei Verbindungsstellen \vec{l}_i und \vec{l}_j gilt im Mittel

$$\langle \cos \theta \rangle = 0$$

und für den gemittelten quadratischen Abstand der beiden Enden eines Polymers gilt

$$\langle L^2 \rangle = Nl^2.$$

Da sich die Monomere aber statistisch unabhängig voneinander ausrichten können, ist die Wahrscheinlichkeit P_N , daß ein Polymer gerade die Ausdehnung L hat

$$P_N(L) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{3/2} \exp \left[-\frac{3L^2}{2Nl^2} \right].$$

Dieses Modell einer Gaußschen Kette gibt die Realität nur ungenügend wieder. Besser ist das Modell einer frei rotierenden Kette („freely rotating chain“ oder auch „worm like chain“), bei der θ konstant gehalten wird, sich die Segmente aber frei drehen können. Hierbei wird ein Steifheitsmaß

$$\sigma = \frac{\langle L^2 \rangle}{Nl^2}$$

eingeführt, wobei das Steifheitsmaß vom jeweiligen verwendeten Polymermodell (z.B. „freely jointed chain“-Modell: $\sigma = 1$) abhängig ist. Weiterhin kann eine statistische Kuhn-Länge l_e definiert werden, für die gilt:

$$\langle L^2 \rangle = Nl^2 \sigma = N_e l_e^2$$

wobei das Polymer dann aus N_e Kuhn-Segmenten besteht und die Konturlänge $\Lambda = Nl = N_e l_e$ ist. Für die sogenannte Persistenzlänge l_p gilt $l_p = 2l_e$. Bei einer DNA, die sich in einer Lösung mit einer Ionenkonzentration von 10–100 mM befindet, ist die Persistenzlänge etwa $l_p \cong 53 \text{ nm}$.

Für die mittlere end-end Distanz $\sqrt{\langle L^2 \rangle}$ eines Polymermoleküls, das in gestreckter Form die Länge L hat, gilt

$$\sqrt{\langle L^2 \rangle} = \sqrt{2} l_p L.$$

Für die λ -DNA ergibt sich eine Distanz $\langle L^2 \rangle^{1/2} \cong 1,3 \mu\text{m}$. Das heißt, daß in Lösung die λ -DNA in einem Knäuel von etwa dieser Größe anzutreffen ist.

Wird versucht, eine λ -DNA zu strecken, dann muß zunächst Arbeit in das Knäuel von etwa $1,3 \mu\text{m}$ gesteckt werden, um der entropischen Elastizität entgegenzuwirken [Smith 1996]. Eine Ausdehnung der DNA auf bis zu 10...15 μm erfordert Kräfte von $< 5 \text{ pN}$. Die DNA befindet sich dann in der sogenannten B-Form. Bei weiterer Ausdehnung von etwa 16 μm auf 18 μm , wenn also die Konturlänge erreicht und überschritten wird, wird vor allem die DNA-Spirale größtenteils abgewickelt (nur wenn beiderseits der 5' Enden der DNA eine

Kraft ausgeübt wird) und die Basenpaare fangen an, sich gegenüber dem Rückgrat der DNA zu verbiegen [Lebrun 1996]. Die Kraft steigt in diesem Bereich dann bis auf $\approx 65 \text{ pN}$ an (bei einer Ionenkonzentration von $10 \dots 150 \text{ mM}$). Dies kann noch am besten durch das „inextensible worm like chain model“ beschrieben werden. Bei weiter ansteigender Streckung (bis etwa $28 \mu\text{m}$ geht die Kraft fast in ein Plateau über – ein Anstieg von nur etwa 2 pN auf einer Länge von $\approx 10 \mu\text{m}$), während die B-Form der DNA sich übersteckt (bei geringeren Ionenkonzentrationen liegt das Plateau dementsprechend niedriger - bis auf $\approx 45 \text{ pN}$). Hierbei nimmt die Neigung der Basenpaare gegenüber dem Rückgrat der DNA immer weiter zu, aber vor allem nimmt der Abstand der Phosphatgruppen von $0,338 \text{ nm}$ auf $0,58 \text{ nm}$ zu. Dann, bei Streckungen von über $28 \mu\text{m}$, brechen die Basenpaare auf und die Kraft kann über 100 pN ansteigen. Dennoch ist die Streckung einer λ -DNA reversibel, bei zu geringen Ionenkonzentrationen ($< 3 \text{ mM}$) tritt zudem im Bereich zwischen $18 \mu\text{m}$ und $24 \mu\text{m}$ eine Hysterese auf.

8.2 Biotinylierung der λ -DNA

Die λ -DNA muß über eine Biotin-Streptavidin-Kopplung mit beiden Enden an zwei streptavidinbeschichtete Polystyrolkugeln mit $3,18 \mu\text{m}$ Durchmesser angebunden werden.

Im ersten Schritt wurde eine Pufferlösung angesetzt, mit der die konzentrierte DNA-Lösung verdünnt werden soll. Der Puffer soll auch später das destillierte Wasser in der Flüssigkeitszelle ersetzen. Der Puffer ist eine 10 mM Natriumchlorid, 10 mM tris/HCl und 1 mM EDTA Lösung mit pH 7,8.

Die λ -DNA (Fa. Promega) liegt teilweise in zyklisierter Form vor. Die molare Masse der λ -DNA beträgt $30,6 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$. Die Konzentration beträgt $488 \mu\text{g/ml}$. Davon wurden $5 \mu\text{g} = 10,24 \mu\text{l} \cong 80 \text{ nM}$ entnommen und etwa fünf Minuten bei 50°C erwärmt. Dadurch geht die zyklisierte Form der DNA in eine lineare Form über, indem die DNA sich an einer speziellen Bruchstelle (charakterisiert durch eine 12 Basenpaare umfassende Sequenz) auftrennt. Dabei bleiben je 12 Basen zu beiden Seiten frei.



Abbildung 42: Die beiden Enden („sticky ends“) der linearisierten λ -DNA mit den 12 überstehenden Nukleotiden.

An die je 12 freien Basen der 5' Enden können jetzt die Biotinmoleküle biochemisch angekoppelt werden. Da ein Biotinmolekül aber nicht direkt an die Basen binden kann, wird es zunächst an ein Nukleotid gekoppelt. Das Molekül Biotin-14-dCTP (Biotin-14-Desoxycytidintriphosphat, Fa. „Gibco BRL“) ist ein patentiertes dCTP Analoges, welches an die N⁴ Position des Biotins gekoppelt ist. Eine DNA-Polymerase (Klenow-Fragment, Fa. „New England Biolabs“) katalysiert die schrittweise Addition der Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP und Biotin-14-dCTP), beginnend am 3' Ende, und füllt so die freien Enden auf der λ -DNA auf.

Nun werden $10,24 \mu\text{l}$ der λ -DNA Stammlösung (entsprechen 317 fmol an λ -DNA Einzelsträngen und somit $\approx 80 \text{ nM}$ an freien λ -DNA Enden) mit $202 \mu\text{l}$ der Lösung des Klenow-Fragmentes (enthält $180 \mu\text{l}$ Wasser, $20 \mu\text{l}$ Puffer, bestehend aus 10 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 und $7,5 \text{ mM}$ Dithiothreitol sowie $2 \mu\text{l}$ Klenow-Fragmente) gemischt. Dazu werden dreimal je $0,21 \mu\text{l}$ an dATP, dGTP und dTTP in wässriger Lösung und $12,5 \mu\text{l}$ des Biotin-14-dCTP (in 100 mM Tris/HCl und $0,1 \text{ mM}$ EDTA) hinzugegeben. Nukleotide und Biotin-14-dCTP sind in einer etwa 1000fach höheren Konzentration vorhanden als die freien λ -DNA Enden.

Diese Mischung wird dann für etwa zwei Stunden bei 37°C inkubiert. In jener Zeit verrichtet die Polymerase ihre Arbeit und koppelt Nukleotide und Biotin-14-dCTP an die DNA.

Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch durch einen Cellulosefilter (Microcon YM 50, Fa. Amicon), der Moleküle mit einer molaren Masse von mehr als 50000 g/mol (und somit in diesem Falle nur die λ -DNA) zurückhält, zweimal mit 14000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde die biotinylierte λ -DNA fünfmal mit Puffer gewaschen. Die Biotinylierte- λ -DNA wird als 3 nM Lösung aufbewahrt.

8.3 Durchführung des Experiments

Mit dem Versuch der Kraftmessung an einer λ -DNA wurde bereits begonnen, noch bevor der Umbau der Optischen Pinzette (Kapitel 6) in Erwägung gezogen wurde.

Die ersten Versuche dienten dem Fangen in der Optischen Falle und dem Annähern und Festhalten von Kügelchen mit der Pipette. Die ersten Pipettenspitzen (Kapitel 4.4) wurden aus einem KG-33 Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von $1,1 \text{ mm}$ und einem Außendurchmesser von $1,5 \text{ mm}$ in zwei Zügen gefertigt, aber die Qualität war so gut wie nicht reproduzierbar, und Kügelchen ließen sich nicht festsaugen. Die Pipetten, die aus filamentlosen Glaskapillaren (KG-33 von Fa. Garner Glas) gezogen wurden, erwiesen sich als brauchbar. Allerdings war die Wandstärke an der Spitze der Pipette noch deutlich zu hoch und die Abbruchkante war uneben und meist etwas geneigt.

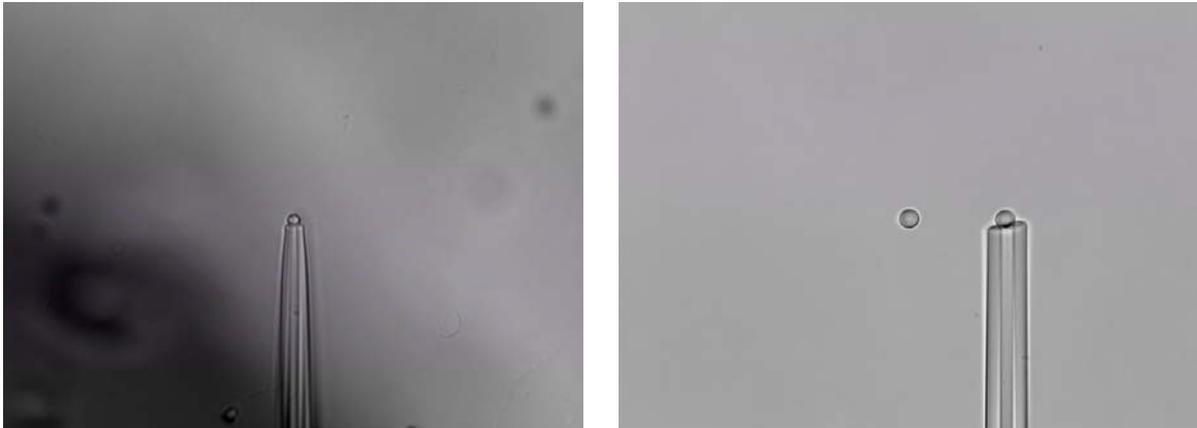


Abbildung 43: Ein $2,1 \mu\text{m}$ Polystyrolkugelchen wird an der ersten Pipette festgesaugt (links). Rechts: Mit einer neuen Pipette wird ein $3,18 \mu\text{m}$ streptavidinbeschichtetes Kugelchen festgehalten, während ein zweites in einem Abstand von etwa $16 \mu\text{m}$ in der Falle gefangen wird. Je 20 Einzelbilder wurden gemittelt.

Während der ersten Versuche (linkes Bild in Abbildung 43) wurde die Stammkonzentration der $2,1 \mu\text{m}$ kleinen Kugelchen etwa 3000fach verdünnt und direkt in die Flüssigkeitszelle injiziert. Ein Kugelchen wurde in der Falle gefangen. Mit einer 10 ml Spritze wurde ein Druck von etwa 7 Bar ausgeübt, so daß der Luft/Flüssigkeitsmeniskus in der Pipette (deren freier Innendurchmesser an der Spitze betrug $\approx 1 \mu\text{m}$) sich fast bis an die Spitze vorschob. Der Druck wurde aufrechterhalten, und das Kugelchen in der Falle behutsam an die Pipettenspitze bis auf $\approx 0,5 \mu\text{m}$ angenähert, während mit dem Fokusrad am Mikroskop die z -Positionen von Kugelchen und Spitze angeglichen werden konnten. Der Druck in der Spritze konnte daraufhin reduziert werden und die Flüssigkeit wurde – auch aufgrund des Kapillareffektes – in die Pipette hineingesogen, so daß das Kugelchen mitgerissen wurde und sich an der Spitze festsaugte. Diese Kraft war selbstverständlich so groß, daß auch bei höchster Laserleistung das festgesaugte Kugelchen nicht gelöst werden konnte.

Da die ersten Pipettenspitzen einen Innendurchmesser von $\approx 1 \mu\text{m}$ hatten, und sich dieser über eine lange Distanz ($\approx 300 \mu\text{m}$) kaum aufweitete, war es nahezu unmöglich, durch sehr hohen Druck mit der Spritze die komplette Pipette bis zur Spitze mit Luft zu füllen. So verblieb aber während mehrerer Tage Wasser in der Pipette, worauf sich diese mit Bakterien bzw. Schwebeteilchen zusetzte.

Die folgenden Pipettenspitzen mit einem Innendurchmesser von etwa $2\ \mu\text{m}$ wurden daraufhin für die $3,18\ \mu\text{m}$ Kügelchen gefertigt, aber auch diese konnten nur so gezogen werden, daß auch sie über eine lange Distanz ihren Innendurchmesser kaum erhöhten. Auch sie konnten kaum komplett mit Luft gefüllt werden und verstopften innerhalb einer Woche.

Noch vor dem Umbau der Optische Pinzette sollte eine erste Flüssigkeitszufuhr entworfen werden. Um eine DNA zwischen zwei Kügelchen (wie in Abbildung 43 rechts) anzubinden, muß folgende Prozedur durchlaufen werden (in leichter Abwandlung zu der von [Smith 1996]): Die Flüssigkeitszelle muß mit dem Puffer (Kapitel 8.2) geflutet werden. Dann werden einige Mikroliter an verdünnter Suspension der Kügelchen eingeleitet. Ein Kügelchen wird gefangen und an die Pipette angesaugt, ein zweites wird gefangen und verbleibt in der Falle. Daraufhin wird der Fluß des Puffers durch die Zelle wieder angestellt, und - das ist immens wichtig - darf jetzt nicht mehr unterbrochen werden. Denn nun werden etwa $50\ \mu\text{l}$ von $2\ \text{pM}$ (auf Empfehlung von Martin Hegner) Biotinylierter- λ -DNA-Lösung parallel zum Fluß des Puffers in die Flüssigkeitszelle injiziert. [Wuite 2000] hingegen benutzt $10\ \text{pM}$ und injiziert diese Lösung $100\ \text{s}$ lang in die Flüssigkeitszelle. Aufgrund des vorhandenen Flusses des Puffers durch die Zelle wirkt eine Kraft auf das Kügelchen. Passieren nun die DNA-Moleküle das gefangene Kügelchen, dann sollte sich (je nach Konzentration) ein Sprung im Kraftsignal feststellen lassen, nämlich in dem Moment, wo eine λ -DNA an das Kügelchen anbindet. Die Wahrscheinlichkeit für ein solches Anbinden soll mit zunehmender Geschwindigkeit des Flusses abnehmen [Hegner], deshalb ist eine Geschwindigkeit von größenordnungsmäßig $\approx 600\ \mu\text{m}/\text{s}$ optimal. Bindet sich dann eine DNA an das Kügelchen, dann findet ein Sprung im Kraftsignal von etwa $+0,5\ \text{pN}$ statt. Martin Hegner benutzt für seine Experimente Kügelchen mit $2,1\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Er detektiert den Sprung um $+0,5\ \text{pN}$ dann, wenn die Stokessche Reibungskraft somit etwa $12\ \text{pN}$ beträgt. Bei einer Kraft von $20\ \text{pN}$ wird ein Sprung von $+1\ \text{pN}$ erreicht. Dieser nicht ganz lineare Zusammenhang leuchtet ein, wenn man bedenkt, daß bei einer geringeren Geschwindigkeit des Flusses die DNA auch nicht so extrem gestreckt wird, sich mit einem größeren Teil ihrer Gesamtlänge im „Strömungsschatten“ des Kügelchens „versteckt“ und somit der strömenden Flüssigkeit eine kleinere Angriffsfläche bietet. Die DNA sollte laut Martin Hegner bei einer Strömungsgeschwindigkeit von $600\ \mu\text{m}/\text{s}$ etwa auf $10\ \mu\text{m}$ gestreckt sein.

Hierbei läßt sich auch erkennen, daß die Detektion des Sprunges im Kraftsignal vor dem Umbau der Optischen Pinzette nicht zu erkennen war, da die mechanischen Schwingungen Schwankungen im Kraftsignal von mindesten $\Delta F \approx 3\ \text{pN}$ hervorriefen.

Dennoch wurde bereits vor dem Umbau versucht, eine Kraftmessung durchzuführen. Der erste Schritt war der Aufbau einer Flüssigkeitszufuhr für Puffer, Suspension der Kügelchen, Lösung der DNA und, wenn möglich, für destilliertes Wasser, um die Flüssigkeitszelle nach Beendigung des Experiments durchzuspülen.

Für die Flüssigkeitszufuhr bot sich zunächst ein „Dosimat“ an, eine Maschine, die einen Kolben in einen Glaszylinder mit verschiedenen Volumina (1 ml bis 20 ml) hineinbewegt. Dabei kann eine Pumpleistung von $2\ \mu\text{l}/\text{min}$ bis zu $60\text{ ml}/\text{min}$ generiert werden. Bei der Flüssigkeitszelle mit einem Querschnitt von $0,75\text{ mm}^2$ ergibt sich beispielsweise bei einer Pumpleistung von $4,5\ \mu\text{l}/\text{min}$ eine Strömungsgeschwindigkeit von $\approx 100\ \mu\text{m}/\text{s}$. Nun wird der Kolben nicht kontinuierlich bewegt, sondern aus mechanischen Gründen nur ruckweise. Das führt zu einer immensen Variationen in der Pumpleistung:

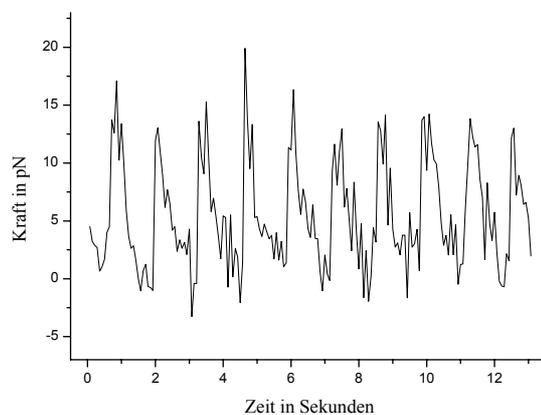


Abbildung 44: Die Variationen in der Pumpleistung des Dosimaten führen zu extremen Schwankungen der Strömungsgeschwindigkeit und somit auch zu Schwankungen im Kraftsignal.

Bei diesen extremen Schwankungen wäre es unmöglich geworden, den Anstieg im Kraftsignal beim Anbinden einer DNA zu detektieren. Entscheidend im weiteren Verlauf der Vorbereitung zur Kraftmessung ist jedoch, daß der Fluß nicht zum Erliegen kommen darf, sobald eine DNA an eines der beiden Kügelchen angebinden hat. Andernfalls schnell die zuvor im Fluß ausgestreckte DNA zurück und kann mit ihrem anderen Ende ebenfalls an das selbe Kügelchen anbinden. Sollte jedoch eine DNA mit nur einem Ende an ein Kügelchen angebinden haben und sich im Fluß ausstrecken, dann kann mit dem zweiten Kügelchen stromabwärts nach dem anderen Ende der DNA gefischt werden. Der Abstand vom Rand des einen Kügelchen zum Rand des anderen sollte dann in etwa zwischen $10\ \mu\text{m}$ und $15\ \mu\text{m}$ betragen. Da nach derjenigen DNA gefischt wird, die an das Kügelchen in der Falle angebinden hat, hat man die Gewißheit, daß der Punkt, an dem die DNA am

Kügelchen angebunden hat, immer stromabwärts zeigt, denn die DNA zieht über das auf das Kügelchen wirkende Drehmoment ihren Angriffspunkt stromabwärts. Bei einer zuerst an das Kügelchen an der Pipette angebundenen DNA kann man entweder den Unterdruck in der Pipette verringern, so daß sich das Kügelchen etwas von der Spitze löst und frei drehen kann, oder man zieht die dann ans andere Kügelchen angebundene DNA nach *beiden* Seiten und entscheidet anhand der zwei Kraftkurven während der Kraftmessung, die dann im Allgemeinen bei gleichen Abständen verschiedene Kräfte anzeigen, wo genau die DNA am Kügelchen an der Pipette angebunden hat.

Trotzdem wurde in mehreren Versuchen das Anbinden von DNA an gefangene Kügelchen getestet. Dazu wurde zuerst eine neue Flüssigkeitszelle mit drei Zuflüssen erstellt und drei Dosimate für Puffer, Suspension der Kügelchen und DNA-Lösung über Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von $0,8\text{ mm}$ und einem Außendurchmesser von $1,6\text{ mm}$ benutzt. Weiterhin wurde die Pumpleistung des Dosimaten für den Puffer so eingestellt, daß der Fluß trotz der Schwankungen nie ganz zum Erliegen kam. Die größte Schwierigkeit stellte jedoch die Wahl der passenden Konzentration an DNA-Lösung dar. Es wurden etliche Male DNA-Lösungen mit Konzentrationen von 2 pM bis 20 pM durch die Flüssigkeitszelle gepumpt. Dazwischen wurde sie mit Puffer durchgespült und jeweils auch neue Kügelchen hineingepumpt. Bei geringen DNA-Konzentrationen konnte merkwürdigerweise zu keiner Zeit eine DNA aufgefischt werden. Bei zu hohen Konzentrationen hingegen fingen sich Flocken von DNA-Knäueln häufig an der Pipette, blieben dort hängen, weiter Kügelchen banden sich an diese Flocken an und bald war ein riesiges Knäuel aus DNA und Kügelchen entstanden.



Abbildung 45: Ein Knäuel aus DNA und Kügelchen bildete sich häufig bei höheren Konzentrationen an DNA.

Aber selbst aus diesem Knäuel können einzelne Kügelchen mit der Optischen Falle herausgefischt und etwas herausgezogen werden. Da sich an diesen Kügelchen jedoch meist mehrere DNA-Moleküle angebunden haben, sind so natürlich keine sinnvollen Messungen möglich.

Bei weiteren Versuchen mit Konzentrationen an DNA von $\approx 6 \text{ pM}$ wurde dennoch immer stromabwärts nach einer eventuell angebondenen DNA gefischt, auch nach DNA, die am Kügelchen in der Falle angebunden haben könnte. Zuweilen wurde beobachtet, wie sogar im ersten Moment die Kraft um mehrere Pikonewton anstieg, so als ob tatsächlich sich eine DNA mit ihrem anderen Ende an das Kügelchen auf der Pipettenspitze angebunden hat. Daraufhin wurde der Fluß des Puffers abgestellt, um eine exakte Kraftmessungen durchführen zu können. Doch nachdem der Abstand der Kügelchen etwa $16 \mu\text{m}$ erreicht hatte, fiel die Kraft sogleich auf null ab. Wurde der Fluß des Puffers wieder in Gang gesetzt so konnte keine DNA mehr gefangen werden – das legte den Schluß nahe, das diese beim Rückfall des Kraftsignals sich nun mit beiden Enden an das Kügelchen in der Falle angebunden hatte. Der erste kleine Anstieg im Kraftsignal zu Beginn legte jedoch die Vermutung nahe – wie später auch von Martin Hegner vermutet – daß aufgrund des zu großen Unterdruckes in der Pipette das freie Ende der DNA an der ungleichmäßigen Auflagefläche vorbei am Kügelchen in die Pipette eingesaugt wurde, und sich aber dennoch nicht an das Kügelchen angebunden hat. Ein weitaus geringerer Unterdruck bei den folgenden Versuchen bewirkte jedoch, daß das Kügelchen sich nicht mehr fest an die Pipette ansaugen ließ und durch den Fluß des Puffers weggerissen wurde.

Weiterhin machten sich die Silikonschläuche störend bemerkbar, denn diese waren hochelastisch und jede kleine Erschütterung des Schlauches bewirkte eine Erschütterung der Flüssigkeitssäule im Schlauch, die sich bis in die Flüssigkeitszelle fortpflanzte und hin und wieder das Kügelchen aus der Falle herausschoß.

Ein sinnvoller Umbau der Flüssigkeitszufuhr wäre, mit Hilfe des Dosimats nur pneumatischen Druck in einem abgeschlossenen Gefäß aufzubauen und mit dessen Hilfe die Flüssigkeit durch die Zelle zu pumpen. Die Luft wirkt dabei als Dämpfer für die Schwankungen in der Pumpleistung. Die Schwankungen des Luftdruckes bei Temperaturänderungen, sowie die Notwendigkeit einer extrem guten Abdichtung ließen nur den bereits in Basel erprobten Aufbau mit Hilfe des hydrostatischen Druckes zu. Der Höhenunterschied zwischen der Wassersäule der Vorratsgefäße (für Puffer, Suspension der Kügelchen und Lösung der DNA) und des Abflußgefäßes dient zur Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen - wenn auch mit der Zeit langsam abnehmenden – Druckes und somit auch eines gleichförmigen Flusses über viele Minuten hinweg. Immens wichtig war jedoch auch der gesamte Umbau der Optischen Pinzette, der zuerst in Angriff genommen wurde, um präzisere Messungen durchführen zu können.

Nach Beendigung der darauffolgenden Messungen (Kapitel 7) wurde diese neue Flüssigkeitszufuhr aufgebaut. Dazu wurden zuerst auf ein Gestell drei Spritzen montiert, die als Vorratsbehälter dienen.

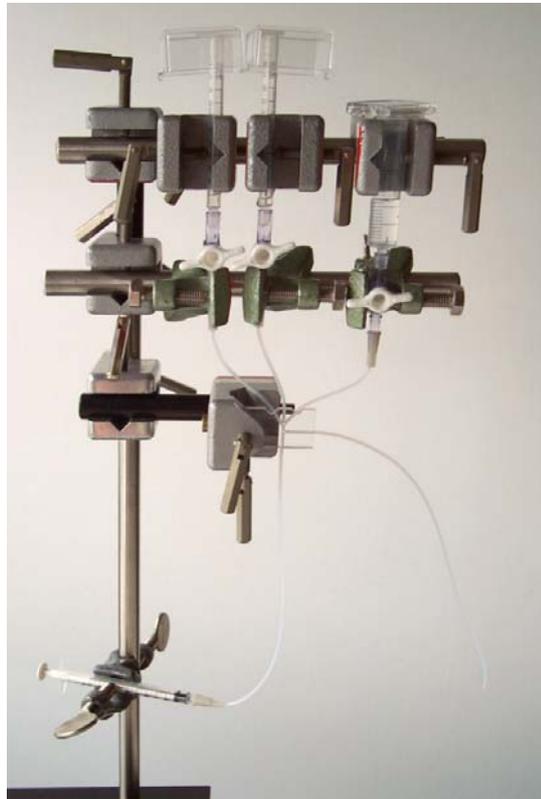


Abbildung 46: Die hydrostatische Flüssigkeitszufuhr für die Suspension der Kügelchen, die Lösung der DNA und den Puffer.

Die linke 1 ml Spritze enthält die etwa 500fach verdünnte Stammlösung der streptavidin-beschichteten Polystyrolkugeln, die mittlere 1 ml Spritze die 2 pM Lösung der biotinylierten λ -DNA und die rechte 5 ml Spritze den Puffer. Diese Spritze ist etwas tiefer befestigt, da am häufigsten Puffer durch die Flüssigkeitszelle strömen und auch der Flüssigkeitsspiegel einige Millimeter niedriger liegen sollte, denn sobald neben diesem daruntergesetzten Ventil (Fa. Novodirect) für den Puffer auch ein Ventil für Kügelchen oder DNA geöffnet wird, strömen diese Flüssigkeiten nur etwas den Schlauch in Richtung 5 ml Spritze hinauf, werden dann aber durch den Fluß des Puffers wieder mitgerissen.

Die Schläuche sind hierbei keine Silikon-, sondern Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von nur $0,3\text{ mm}$ und einem Außendurchmesser von $1,6\text{ mm}$. Dieser Schlauch ist relativ starr und somit ist die Flüssigkeit im Innern relativ geschützt gegenüber Stößen und Schwingungen des gesamten Schlauches.

Zunächst wurde die Verbindung von Spritze zu Schlauch über $1,1\text{ mm}$ dicke Kanülen mit darübergestülptem Silikonschlauch erstellt, aber an den Metallkanten und Teflonschlauchkanten bildeten sich bereits nach kürzester Zeit Luftbläschen, die den Fluß sofort stoppten, sobald diese in den Teflonschlauch vordrangen. Daraufhin wurden alle Flüssigkeiten zuvor unter Wasserstrahlpumpenvakuum für mehrere Minuten entgast, zum anderen die Metallkanülen entfernt und die Teflonschläuche direkt in die Plastikhalterung der Kanüle eingesetzt. Aufgrund der dünnen Schläuche mußte die Flüssigkeit einen hohen Strömungswiderstand überwinden. Somit wurde eine Strömungsgeschwindigkeit von etwa $600\ \mu\text{m/s}$ bei einem Höhenunterschied der Wassersäule von den Vorratsgefäßen und dem Abflußgefäß von rund 25 cm erreicht.

Die drei Schläuche laufen in einer Weiche zusammen. Weiterhin läuft dort von unten ein Schlauch hinein, der an einer weiteren Spritze angeschlossen ist. Damit können noch eventuelle Luftblasen in der Weiche abgesaugt werden (besonders, sobald die Weiche auf den Kopf gestellt wird). Der Ausgang aus der Weiche (der Schlauch der nach rechts verläuft, in Abbildung 46) wird in den Zulauf der Flüssigkeitszelle eingesetzt.

Mit Hilfe eines neuen Pipettenziehgerätes („P-2000“ von Fa. Sutter Instruments Co.) der Biophysik sollten noch deutlich bessere Pipetten gezogen werden. Dazu wurden ebenfalls die Glaskapillaren aus *KG-33* von Fa. Garner Glas benutzt. Die Ergebnisse der erstaunlich gut reproduzierbaren Pipetten zeigen Abbildung 47.

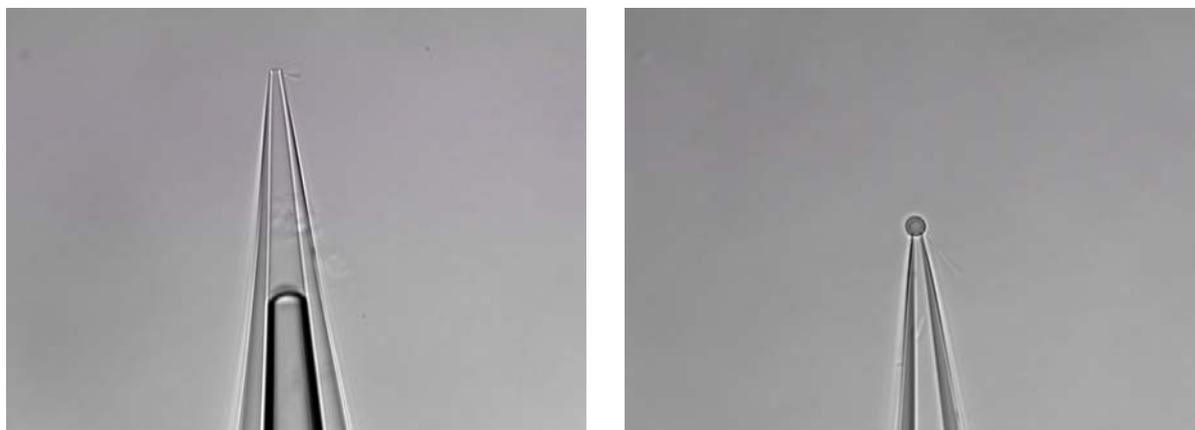


Abbildung 47: Die neue Pipette mit einem Innendurchmesser an der Spitze von etwa $1\ \mu\text{m}$ und einer Wandstärke von weniger als $0,5\ \mu\text{m}$. Je 50 Einzelbilder wurden gemittelt.

Auch ein Vorteil dieser Pipetten ist die Tatsache, daß diese durch Überdruck von knapp 7 bar leicht mit Luft gefüllt werden können. Der konisch zur Spitze zusammenlaufende Innenquerschnitt macht dies möglich. Somit kann so gut wie sämtliches Wasser entfernt

werden und die Pipette setzt sich nicht mehr mit Bakterien und Schwebeteilchen zu. Weiterhin ist die Bruchstelle an der Spitze so glatt, daß Kügelchen allein dadurch gefangen werden können, daß die durch die Kapillarkraft langsam in die Pipette hineinströmende Flüssigkeit das Kügelchen festhält. Aufgrund der extrem geringen Strömung um das festgesaugte Kügelchen und dem Umstand, daß das Kügelchen dicht auf der Spitze aufsitzt, dürfte so gut wie keine DNA mehr in die Pipette gesaugt werden.

Weiterhin ist aufgrund der schmalen Spitze das Strömungsprofil der Flüssigkeit im Bereich des festgesaugten Kügelchen nicht so stark abgelenkt, so wie es bei den alten dicken Pipetten der Fall war, die im Vergleich zur Größe des Kügelchens ein deutliches Strömungshindernis darstellten.

8.4 Ergebnisse und Auswertung

Nachdem die Flüssigkeitszufuhr installiert und die verbesserte Pipette in eine neue Flüssigkeitszelle integriert worden war, konnten wieder Versuche unternommen werden, DNA an Kügelchen anzubinden. Trotz dutzender Versuche konnte das Anbinden als Erhöhung des Kraftsignals noch nicht beobachtet werden. Dies lag auch daran, daß sich häufig noch kleine Luftbläschen vor allem am Anschluß der Flüssigkeitszelle bildeten, und diese behinderten noch empfindlich den gleichmäßigen Fluß des Puffers, so daß Schwankungen von mehreren Pikonewton auftraten. Die Luftbläschen bildeten sich vor allem an den Schlauchenden im PDMS-Block, an dem eingeschnittenen Kanal im PDMS-Block und an den Kanten des Deckgläschens über dem Kanal der Flüssigkeitszelle. Eine bessere Möglichkeit des direkten Anschlusses des Schlauches an den Kanal der Flüssigkeitszelle wurde noch nicht gefunden.

Dennoch schienen sich hin und wieder DNA-Moleküle anzubinden, die sich aber stromabwärts nicht mit dem zweiten Kügelchen auffischen ließen. Wurden beide Kügelchen so weit angenähert, daß diese sich berührten, dann blieben sie meist untrennbar miteinander verbunden. Dies konnte nur geschehen, wenn zumindest ein DNA-Ende an einem Kügelchen angebunden hatte und die benachbarten Biotinmoleküle des selben Endes des DNA-Moleküls an das zweite Kügelchen anbanden. Die reinen Kügelchen kleben hin und wieder zwar auch zusammen, können dann aber schon bei geringen Laserleistungen leicht voneinander getrennt werden.

Angesichts des ausbleibenden Erfolges eines Anbindens an beide Kügelchen gab es zunächst die Möglichkeit, die Suspension der Kügelchen und die Lösung der DNA einmal direkt miteinander zu mischen. Dabei binden willkürlich DNA und Kügelchen aneinander.

Dies wurde in einer provisorischen Flüssigkeitszelle ohne Pipette und Flüssigkeitszufuhr durchgeführt. Daraufhin wurden dutzende Kügelchen nacheinander eingefangen, um zu

überprüfen, ob denn zufällig zwei Kügelchen aneinandergebunden hatten. Zufällig wurde ein Kügelchen eingefangen, welches ein zweites im „Schlepptau“ hatte.

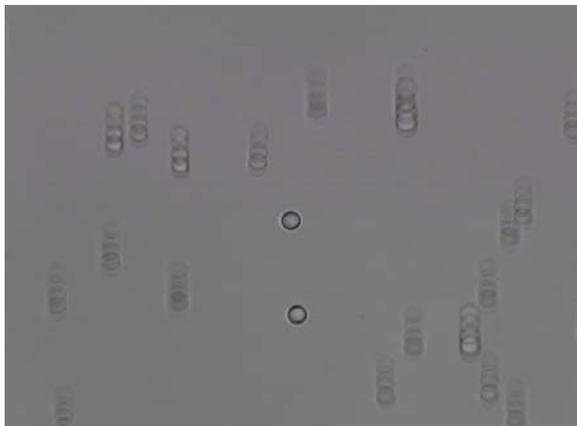


Abbildung 48: Durch Mischen der Suspension der Kügelchen und der Lösung der DNA banden sich zufällig zwei Kügelchen aneinander. Deren Abstand beträgt schätzungsweise $16 \mu\text{m}$. 7 Einzelbilder wurden gemittelt. Sie entstammen einer Videosequenz, die während der Bewegung der Flüssigkeitszelle entstand.

Die Frage, ob denn die Kügelchen durch nur eine einzige DNA verbunden sind, kann nur durch eine Kraftmessung beantwortet werden. Die provisorische Flüssigkeitszelle enthielt jedoch keine Pipette, an die eines der Kügelchen festgesaugt werden konnte. Aber eine Notlösung bestand darin, die Kügelchen auf den Boden zu ziehen, und zwar so, daß sie sich nicht berührten. Dann würde Gefahr bestehen, daß diese aneinander kleben blieben. Am Boden blieb nur ein Kügelchen einige Minuten in Ruhe, das andere wurde knapp oberhalb des Bodens in der Falle gehalten. Das dann am Boden adsorbierte Kügelchen befindet sich rechts relativ zum in der Falle gefangenen, so daß wenn die Messung gestartet wird, sich das Kügelchen am Boden weiter nach rechts - also in positiver x -Richtung - bewegt. Das Problem bei der Messung ist, daß sich das in der Falle gefangene Kügelchen an sich in gleicher Höhe (z -Position) wie das adsorbierte befinden soll. Bewegt sich das Kügelchen in der Falle nur in z -Richtung, dann wird das Signal des Detektors verfälscht. Dennoch muß das Kügelchen in der Falle einige hundert Nanometer über dem Boden sich befinden. Dadurch ergibt sich zwangsläufig eine kleine Kraftkomponente in $-z$ -Richtung, die das Detektorsignal leicht verfälscht. Dennoch wurde die Messung gestartet.

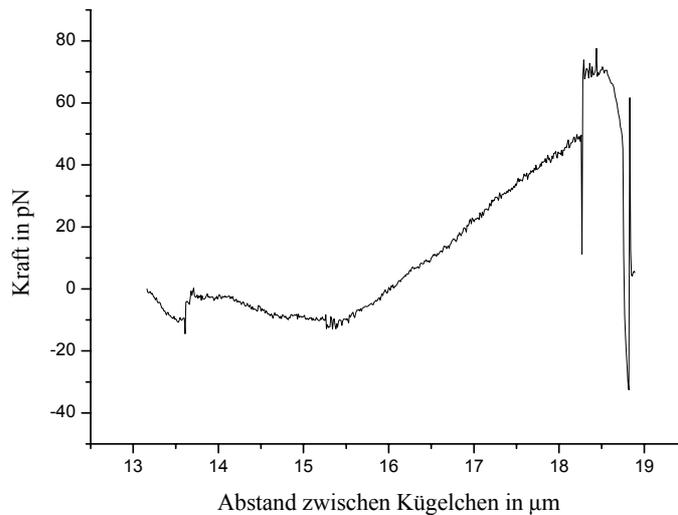


Abbildung 49: Die erste (noch mit Fehlern behaftete) Kraftmessung an einer λ -DNA.

Im Kraftdiagramm ist bei $13,5 \mu m$ ein Sprung zu erkennen. Dort wurde unvorsichtigerweise der Fokus noch etwas korrigiert, da das Kügelchen in der Falle auf dem Boden aufzusetzen drohte. Der Anstieg der Kraft zwischen $16 \mu m$ und $18 \mu m$ ist ein Resultat der elastischen Dehnung der DNA in ihrer B-Form. Bei $\approx 18,2 \mu m$ drohte das Kügelchen in der Falle wieder den Boden zu berühren. Deshalb mußte sofort über den Fokus wieder das Kügelchen angehoben werden, was zum Sprung von $\approx 40 pN$ auf $\approx 60 pN$ führte. Über $\approx 18,2 \mu m$ ist ein kleiner Bereich des Plateaus zu erkennen. Dieses befindet sich aufgrund der Fokussierung nicht bei $\approx 60 pN$ sondern bei $\approx 40 pN$. [Smith 1996] hatte bei einer geringen Ionenkonzentration von $0,625 mM$ ein Kraftplateau von etwa $45 pN$ gemessen. Bei meiner Messung jedoch wurden Kügelchen und DNA vor deren Mischung nicht im $10 mM$ Puffer, sondern in destilliertem Wasser verdünnt. Die Tendenz, daß bei sinkender Ionenkonzentration der Betrag der Kraft bei der überstreckten B-Form der DNA ebenfalls sinkt, konnte hier gezeigt werden.

Jedoch riß sich kurz darauf das am Boden adsorbierte Kügelchen los und ließ sich im Laufe des Experiments nicht mehr am Boden adsorbieren.

Daraufhin wurden wieder Experimente an der ursprünglichen Flüssigkeitszelle durchgeführt. Das Anbinden wurde aber wiederum nicht beobachtet. Martin Hegner sah die Ursache darin, daß sich in unserer DNA-Lösung noch zu viele freie Biotin-14-dCTP-Moleküle befanden, die im Vergleich zur λ -DNA in Überzahl vorlagen, zusammen mit der DNA am Kügelchen vorbeiströmen und dessen Streptavidinoberfläche absättigen, indem sie in Überzahl an das Kügelchen anbinden. Freundlicherweise stellte er mir einige Mikroliter der in Basel biotinylierten λ -DNA zur Verfügung. Diese wurde im Gegensatz zur hier

präparierten insgesamt acht mal mit den „Microcon“-Cellulosefiltern aufgereinigt und nach Martin Hegners Ansicht erst dadurch fast alle Biotin-14-dCTP-Moleküle entfernt.

Diese neue λ -DNA-Lösung wurde dann in den letzten Experimenten benutzt. Aber schlußendlich konnte in nur einem Fall eine DNA zwischen zwei Kügelchen angebunden werden. Hierbei nahm die elastische Dehnung der DNA schon bei einem Abstand zwischen den beiden Kügelchen von nur etwa $8 \mu\text{m}$ zu. Dies ließ nur den Schluß zu, daß sich ein Ende der DNA teilweise um die Pipette gewickelt haben muß. Denn wurde der Abstand mit den manuellen Reglern schrittweise erhöht, so konnte der Anstieg der Kraft und sogar der Übergang auf das Kraftplateau erkannt werden. Dennoch konnte die Messung nicht gestartet werden, da nach dem Annähern der beiden Kügelchen die DNA sich unerklärlicherweise von einem der beiden Kügelchen löste. Daraufhin wurde der Fluß wieder angestellt, doch die DNA konnte nicht wieder eingefangen werden. Da jedoch die Daten der Kräfte im F(t)-Diagramm des Steuerungs- und Meßprogramms noch einige Zeit angezeigt wurden, wurde das Programm gestoppt, und nur über ein digitales Bildschirmfoto konnte die Kraftmessung abgespeichert werden. Es ist dies die Abbildung 29. Den Ausschnitt des F(t)-Diagramms, der die Kraftmessung, aber leider keine Abstandsdaten enthält, zeigt Abbildung 50.

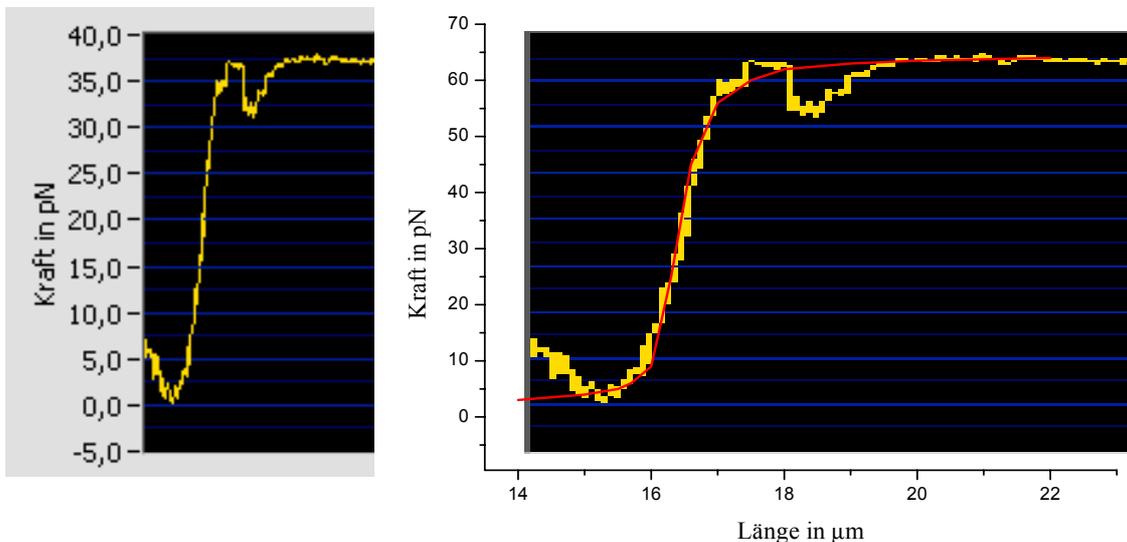


Abbildung 50: Links die Kraftkurve einer λ -DNA, die an einem Ende teilweise um die Pipette aufgewickelt wurde. Rechts ist die selbe Kraftkurve in x-Richtung gestreckt dargestellt und, unter der Prämisse, die Kraft beim Übergang auf das Plateau betrage aufgrund von Justageungenauigkeiten 65 pN, mit der Kraftkurve der Messung von C. Bustamante [Smith 1996] überlagert.

Zu Beginn der Messung ist eine kleine Abweichung von 6 pN zu erkennen, deren Ursache aber unbekannt ist. Die Kraftkurve enthält noch eine Abweichung im Kraftsignal beim Übergang von der elastischen Streckung zur überstreckten Phase der DNA, für die ebenfalls keine Begründung gegeben werden kann. Weiterhin ist der Betrag der Kraft in der überstreckten Phase nur $\approx 37 \text{ pN}$. Da die Messung aber im 10 mM Puffer durchgeführt wurde, sollte der Betrag der Kraft während der überstreckten Phase etwa 65 pN betragen. Im Nachhinein könnte das nur mit einem Fehler in der Kalibrierung der Falle erklärt werden.

Im rechten Bild von Abbildung 50 wurde dann die Kraftkurve der Messung von C. Bustamante in [Smith 1996] als rote Kurve den Meßdaten überlagert. Hierbei wurde zunächst die hier gemessene Kraftkurve dahingehend angepaßt, daß angenommen wurde, die gemessenen Kräfte seien aufgrund von Justageungenauigkeiten zu klein. Daraufhin wurden diese auf 65 pN normiert, und weiterhin wurden auch die Längenangaben auf die von Bustamante normiert. Die dort angegebenen Kräfte und Längendaten beziehen sich zwar auf Bustamantes Messung, dennoch zeigt sich die Ähnlichkeit von Bustamantes Kraftkurve zu der hier aufgenommenen. Dies kann als starkes Indiz für die Richtigkeit der hier vorgenommenen Messung gedeutet werden. Somit wurde der qualitative Verlauf der Kraftkurve während der elastischen Streckung und der Überstreckung einer B-Form der λ -DNA dargestellt.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Der zentrale Punkt der vorliegenden Diplomarbeit war die Durchführung und Beschreibung des kompletten Aufbaus einer Optischen Pinzette. Dazu mußte zunächst der infrarote Strahl eines Nd:YAG Lasers mit einer Wellenlänge von 1064 nm in das inverse Mikroskop eingekoppelt werden. Zum einen stellte sich heraus, daß die zunächst mit einem Ventilator betriebene Kühleinheit des Lasers aufgrund sich auf den Laser übertragender Schwingungen entfernt und durch nichts weiteres als einen Kupferblock ersetzt werden mußte. Weiterhin war es notwendig, die Pumplichtstrahlung von etwa 810 nm wirksam abzublocken, da diese sonst eine zweite Optische Falle einige Mikrometer neben der eigentlichen Optischen Falle - generiert aus dem Fokus der Infrarotstrahlung des Lasers – erzeugen würde.

Der Laser benötigt für jede eingestellte Leistung eine individuelle Aufwärmzeit und somit auch eine individuelle Arbeitstemperatur, da sonst Intensitätsschwankungen in der emittierten Strahlung auftreten würden. Diese beeinträchtigen die Positionsmessung von in der Falle gefangenen Objekten erheblich. Die Optische Falle befindet sich im Fokus eines Wasserimmersionsobjektivs mit einer hohen numerischen Apertur von $1,20$, um eine stabile dreidimensionale Optische Falle zu erzeugen.

Die Positionsdetektion dient dazu, die laterale Abweichung eines in der Falle gefangenen Objektes von dessen Position auf der Optischen Achse zu detektieren. Diese Abweichungen können aufgrund von äußeren Kräften auftreten, wie beispielsweise Stokessche Reibungskräfte.

Zunächst mußte jedoch der Laserstrahl extrem genau in das Objektiv eingekoppelt werden, wobei sich zeigte, daß die Qualität der Optischen Falle – gekennzeichnet durch die maximale Kraft, mit der ein Objekt in der Falle festgehalten werden kann – empfindlich von der Genauigkeit der Justage des Laserstrahles abhängt. Weiterhin mußte die rückwärtige Apertur des Objektivs vom Gaußschen Strahlprofil des Lasers „überfüllt“ werden, um eine maximale Kraft hervorzurufen.

Es wurden Polystyrolkugeln verschiedenen Durchmessers gefangen und die maximalen Kräfte bei verschiedenen Laserleistungen und verschiedenen Abständen vom Boden einer Flüssigkeitszelle gemessen. Die Tatsache, daß bei Annäherung an den Boden der Stokessche Reibungskoeffizient ansteigt und sich somit die maximale Geschwindigkeit, mit der sich die Flüssigkeit relativ zum gefangenen Kugeln bewegt, reduziert, konnte bei verschiedenen Laserleistungen bestätigt werden.

Die Positionsdetektion ermöglichte die absolute Bestimmung der lateralen Auslenkung eines in der Falle gefangenen Kugeln im Nanometerbereich und nach Durchführung einer Kalibrierung auch die Bestimmung einer auf das Kugeln wirkenden äußeren Kraft im Subpiknewtonbereich. Die thermische Bewegung der Wassermoleküle um das Kugeln ermöglichte es, die Brownsche Bewegung mit Hilfe eines Rauschspektrums zu

charakterisieren und daraus ebenfalls die Stabilität der Optischen Falle zu bestimmen. Hierbei ergaben sich zu Beginn immense Abweichungen zum einen von den Werten, die mit Hilfe der Stokesschen Reibung ermittelt wurden, und zum anderen eine generell zu geringe Stabilität der Falle. Die Ursache für die Instabilität war, wie schon erwähnt, die störende Kühlung des Lasers, aber weiterhin der noch recht instabile Aufbau des Mikroskops. Es zeigte sich, daß wenn der Weg des Laserstrahles so kurz wie möglich gehalten wird und wenn weit ausladende Teile des Mikroskops – wie der Beleuchtungsturm – entfernt werden und weitere stabilisierende Maßnahmen in und um das Mikroskop aufgebaut werden, die Qualität der Optischen Falle weiter erhöht werden kann. Der Vergleich mit Daten der Optischen Pinzette an der Universität Basel zeigte, daß die maximale Kraft bei geringen und mittleren Laserleistungen höher als in Basel ist, aber bei hohen Laserleistungen nicht in dem Maße ansteigt. Das konnte zum einen auf noch vorherrschende Intensitätsschwankungen des Lasers, als auch auf eine Verzerrung des Gaußschen Strahlprofils (TEM_{00} Mode) des Laserstrahles zurückgeführt werden. Dennoch zeigten die Rauschspektren, daß die auf diese Weise ermittelten Werte immer noch geringer als die in der Literatur angegebenen Werte für die Kraftkonstante des Fallenpotentials sind. Doch der Vergleich bei der maximalen Kraft mit den Daten aus Basel zeigt eine gute Qualität der Optischen Falle auf. Vermutlich treten bei der Bestimmung des Rauschspektrums noch Störungen auf, deren Quelle in der Detektion des vorwärtsgestreuten Laserlichtes liegen. Dies muß das Ziel weiterer Untersuchungen sein. Dies wird zum Teil auch durch die Bestimmung einer höheren Kraftkonstante anhand der Messung des Kraft-Auslenkungsdiagrammes (Abbildung 38) bestätigt.

Die biochemische Präparation einer biotinmarkierten λ -DNA und der Versuch der Kraftmessung war der Beginn, einen Bogen zu weiteren biologischen Untersuchungen und Messungen mit Hilfe dieses Instrumentes zu spannen. Der bisher noch nicht geglückte Versuch einer exakten Kraftmessung war vor allem auf das Auftreten einer Vielzahl kleinerer Probleme, vor allem seitens der Flüssigkeitszufuhr, zurückzuführen, die einer Lösung bedürfen. Aber auch die Tatsache zeigt, daß trotz der widrigen Umstände, unter denen die im letzten Kapitel angegebenen Teilerfolge zustande kamen, es nur noch eines kleinen Schrittes bis zu einer exakten Kraftmessung bedarf.

Die aktuelle Ausbaustufe der Optischen Pinzette stellt bei weitem nicht deren Abschluß dar. Die folgenden Schritte würden beispielsweise darin bestehen, wie in [Pampaloni] angegeben, die Positionsdetektion anhand des am gefangenen Objekt *rückwärtsgestreuten* Lichtes durchzuführen. Ein Nachteil wäre hierbei die wesentlich geringere Lichtintensität im Vergleich zum vorwärtsgestreuten Licht. Die entscheidenden Vorteile liegen in folgenden Punkten: Das Wasserimmersionsobjektiv dient gleichzeitig als Kondensor, der nicht justiert zu werden braucht, völlig unabhängig vom Fokus (z-Position) arbeitet und aufgrund der hohen numerischen Apertur deutlich mehr gestreutes Licht einfängt. Weiterhin können somit Messungen über rauhen Oberflächen durchgeführt werden, die sonst das

vorwärtsgestreute Licht völlig ungleichmäßig ablenken und streuen und diese Art der Detektion vereiteln würden. Auch können Messungen über nicht-transparenten Oberflächen, die ebenfalls ungleichmäßig gestaltet sein können, durchgeführt werden – dabei muß dann jedoch die Beleuchtung von „unten“ erfolgen, was sich prinzipiell problemlos durchführen läßt.

Ein weiterer Schritt wäre entweder die Aufspaltung des Laserstrahles oder das Einkoppeln eines zweiten Lasers, so daß eine zweite Optische Falle dicht neben (einige Mikrometer) der ersten generiert werden kann. Dies hätte eine Kraftmessung, der wie in Abbildung 48 angegebenen zufällig aneinandergebundenen Kügelchen, ohne Zuhilfenahme einer Pipette ermöglicht. Der die zweite Falle erzeugende Laserstrahl muß dann relativ zum ersten - und somit auch die Position beider Fallen relativ zueinander - justierbar sein.

Die Möglichkeit der Positionsdetektion mit Hilfe einer Videoanalyse ist durchaus möglich, die laut [Wuite 2000] Abweichungen von $\approx 3 \text{ nm}$ detektieren könnte (selbst bei einer Kraftkonstante von $130 \text{ pN} / \mu\text{m}$ ergibt dies eine Kraftauflösung von $\approx 0,4 \text{ pN}$).

Das Einkoppeln eines kurzwelligen Lasers, dessen Strahl justierbar sein sollte, ermöglicht den Aufbau eines Laserskalpells, mit dessen Hilfe dann beispielsweise Zellen aufgetrennt und deren Bestandteile mit der Optischen Pinzette manipuliert werden können.

Der wichtigste Ausbauschnitt ist jedoch der Einbau eines elektrooptischen Modulators, um die Laserleistung weiter stabilisieren zu können, da Intensitätsschwankungen sich störend auf die Positionsdetektion auswirken.

Anhang

Einstellungen am Pipettenziehgerät

Am Pipettenziehgerät von „Sutter Instruments Co.“ Modell „P-2000“ wurden filamentlose Glaskapillaren aus *KG-33* von Fa. Garner Glas gezogen, die einen Innendurchmesser von $80 \pm 8 \mu\text{m}$, einen Außendurchmesser von $150 \pm 15 \mu\text{m}$ und eine Länge von $100 \pm 3 \text{mm}$ besaßen. Nach langem Experimentieren konnten bei folgenden Einstellungen verschiedene Spitzen mit einer Wandstärke von etwas weniger als $0,5 \mu\text{m}$ gezogen werden.

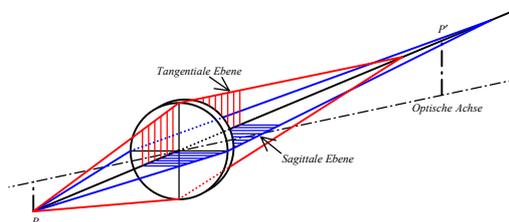
Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull	Innen- \emptyset der Spitze
130	0	30	128	0	6 μm (in 2 Schritten)
145	0	30	128	0	2 μm
148	0	30	128	0	1,5 μm
150	0	30	128	0	1,0 μm

Glossar

Astigmatismus

Astigmatismus entsteht, wenn tangential einfallende Lichtstrahlen eine andere Brennweite haben als sagittal einfallende. Der Punkt P' gilt als bester Brennweiten-

kompromiß – dort befindet sich kein geometrischer Brennpunkt, sondern ein kleiner Kreis. Im tangentialen und sagittalen Brennpunkt ist das Bild des Punktes P ein Strich, dazwischen und jenseits davon ist es eine Ellipse. Die Quelle P kann selbstverständlich auch im Unendlichen liegen.

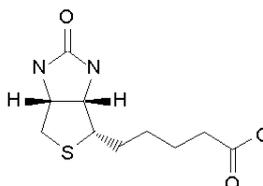


Avidin

Ähnlich dem Streptavidin. Avidinmoleküle besitzen im Unterschied zum Streptavidin eine positive Oberflächenladung und haben daher eine stark erhöhte unspezifische Bindungsaffinität.

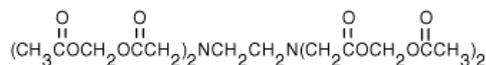
Biotin

Vitamin H. Es dient als Coenzym bei Carboxylierungsreaktionen und kommt vor allem in Leber, Nieren und Eigelb vor. Strukturformel und Foto von Biotinkristallen sind aus [Roche] entnommen.



EDTA

Die Kurzform für Ethylendi-aminetraacetat.

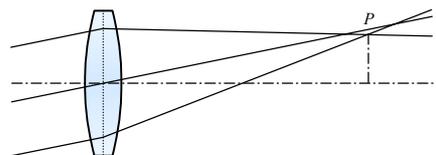


Eyring-Relation

Die Eyring-Relation gibt empirisch das Verhalten der Viskosität η von Flüssigkeiten bei steigender Temperatur T an. In guter Näherung gilt dann: $\eta = \eta_\infty \cdot \exp[b/T]$. Nach [Gerthsen 1993].

Koma

Koma entsteht, wenn die parallelen und unter einem Winkel zu optischen Achse eintretenden Strahlen in verschiedenbrennwei-



tigen Zonen einer Linse unterschiedlich stark gebrochen werden. Im bestmöglichen Brennpunkt P entsteht ein kleiner kometenartiger Brennfleck.

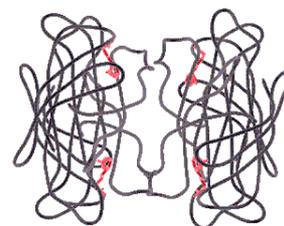
M (Molarität) Die Molarität M ist der Quotient aus Stoffmenge in mol des gelösten Stoffes und Volumen der Lösung in 1000 ml .

mol Ein mol ist die Stoffmenge, die aus ebenso vielen Teilchen besteht, wie 12 Gramm des Nuklids ^{12}C . Dies sind $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen (=Avogadro-Konstante).

Monomer Eine in Einzelmolekülen vorliegende Substanz.

Nd:YAG Neodym (Nd) Ionen sind in einem transparenten Wirtskristall eingebettet, der aus Yttrium Aluminium Granat ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) besteht. Mit einer Laserdioden können vier Übergänge des Neodyms vom $^4\text{I}_{9/2}$ Zustand in den $^4\text{F}_{5/2}$ Zustand gepumpt werden. Danach folgt schnell ein strahlungsloser Übergang in den $^4\text{F}_{3/2}$ Zustand, der dann unter einer Emission von 1064 nm in den $^4\text{I}_{11/2}$ Zustand übergeht und zu guter Letzt wieder in den $^4\text{I}_{9/2}$ Zustand relaxiert. Aus [Kneubühl 1999].

Streptavidin Ein aus vier Monomeren (Tetramer) aufgebautes Protein mit einer starken Affinität gegenüber Biotin. Jedes der vier Monomere des gesamten Streptavidinmoleküls (graues Knäuel) bindet ein Biotinmolekül (rot). Aus [BS Tutorial].



PDMS Polydimethylsiloxan. Elastisches, transparentes Polymer. $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$

Polystyrol Eigentlich Polystyren. Glasklares, sprödes Polymer des Styrens. $\left[\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}_2- \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n$

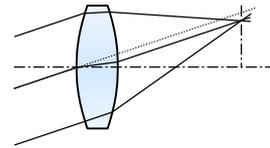
Tris Die Kurzform für Trihydroxyaminomethan.

Terrestrische
Umkehrlinsen

Ein Verbund aus zwei üblicherweise gleichbrennweitigen Sammellinsen (wie in Abbildung 12 oben) mit gemeinsamem Brennpunkt. Ein seiten- und höhenverkehrtes Bild (beim Keplerschen Fernrohr beispielsweise) wird durch sie seiten- und höhenrichtig dargestellt.

Verzeichnung

Verzeichnung ist die laterale Abweichung des Brennpunktes bei Strahlen, die in eine Linse eintreten. Diese Abweichung, die nicht linear vom Winkel abhängig ist, unter dem die Strahlen in die Linse eintreten, verursacht zudem eine Verzerrung des Bildfeldes in dessen äußeren Bereichen.



Literaturverzeichnis

- [Ashkin 1970] A. Ashkin
Acceleration and trapping of particles by radiation pressure
Phys. Rev. Lett. 24, Seite 156-159, (1970)
- [Ashkin 1971] A. Ashkin, J.M. Dziedzic
Optical Levitation by Radiation Pressure
Appl. Phys. Lett. 19, Seite 283-285, (1971)
- [Ashkin 1978] A. Ashkin
Trapping of atoms by resonance radiation pressure
Phys. Rev. Lett. 40, Seite 729-732, (1978)
- [Ashkin 1986] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu
Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles
Opt. Lett. 11, Seite 288-290, (1986)
- [Ashkin 1992] A. Ashkin
Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime
Biophys. J. 61, Seite 569-582, (Februar 1992)
- [Ashkin 1997] A. Ashkin
Optical Trapping and manipulating of neutral particles using lasers
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, Seite 4853-4860, (Mai 1997)
- [Biophysik] Vorlesungsskript der Lehrveranstaltung
Biophysik
Universität Bielefeld, Dozent: Dario Anselmetti
- [BS Tutorial] *Biotin/Streptavidin Tutorial*
<http://www.amber.ucsf.edu/amber/tutorial/index.html>
- [Dittié] G. Dittié
“Giotto” – Astronomische Bildbearbeitung
<http://www.videoastronomy.org>

- [Eichler 1998] J. Eichler, H. J. Eichler
Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen
3. Auflage, Springer Verlag, (1998)
- [Gerthsen 1993] C. Gerthsen, H. Vogel
Physik
17. Auflage, Springer Verlag, (1993)
- [Ghislain 1994] L. P. Ghislain, N. A. Switz, W. W. Webb
Measurement of small forces using an optical trap
Rev. Sci. Instrum. 65, Seite 2762-2768, (1994)
- [Gittes 1998] F. Gittes, C. F. Schmidt
Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers
Optics Letters 23, Seite 7-9, (Januar 1998)
- [Hegner] Dr. Martin Hegner, Physiker, Universität Basel
- [Kleineberg] Dr. Ulf Kleineberg, Physiker; Molekül- und Oberflächenphysik,
Universität Bielefeld
Persönliche Gespräche
- [Kneubühl 1999] F. K. Kneubühl, M. W. Sigrist
Laser
5. Auflage, Teubner-Studienbücher, (1999)
- [Lebrun 1996] A. Lebrun, R. Lavery
Modelling extreme stretching of DNA
Nucleic Acids Research, Vol. 24, Nr. 12, Seite 2260-2267, Oxford
University Press, (1996)
- [Louvain] Université catholique de Louvain
Lambda-Phage
[http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/
Lambda.html](http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/Lambda.html)
- [Molekulargenetik] *Kurs Molekulargenetik*
<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-1.htm>

- [Pampaloni] F. Pampaloni, M. Böhmer, D. Berti, P. Baglioni, J. Enderlein
Measuring viscosity by monitoring the Brownian motion of optically trapped micro-beads
Publikation des "Institute for Biological Information Processing I" des Forschungszentrums Jülich
- [Roche] *Biotin*
<http://www.roche.com/vitamins/what/anh/vits/biotin.html>
- [Siegmann 1986] A. E. Siegmann
Lasers
1. Auflage, University Sciences Books, (1986)
- [Smith 1996] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante
Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules
Science Vol. 271, Seite 795-799, (9. Februar 1996)
- [Svoboda 1994] K. Svoboda, S. M. Block
Biological applications of optical forces
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, Seite 247-285, (1994)
- [Visscher 1992a] K. Visscher, G. J. Brakenhoff
Theoretical study fo optically induces forces on spherical particles in a single beam trap I: Rayleigh scatterers
Optik 89, Seite 174-180, (1992)
- [Visscher 1992b] K. Visscher, G. J. Brakenhoff
Theoretical study fo optically induces forces on spherical particles in a single beam trap II: Mie scatterers
Optik 90, Seite 57-60, (1992)
- [Wiebusch] Dr. Gerd Wiebusch, Physiker; Laserphysik, Universität Bielefeld
Persönliche Gespräche und Tests am Nd:YAG Laser der Optischen Pinzette
- [Wuite 2000] G. J. L. Wuite, R. J. Davenport, A. Rappaport, C. Bustamante
An Interated Laser Trap/Flow Control Video Microscope for the Study of Single Biomolecules
Biophys. J. 79, Seite 1155-1167, (August 2000)

- [Yamada 2000] S. Yamada, D. Wirtz, S. C. Kuo
Mechanics of living cell measured by laser tracking microrheology
Biophys. J. 78, Seite 1736-1747, (April 2000)