

Praktikumsversuch G5B

## Die Magnetische Pinzette

Ludwig-Maximilians-Universität München

Fakultät für Physik

Lehrstuhl Gaub

Betreuer: Philipp Walker, Henrik Lüschen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
2.1	Kraft-Ausdehnungs-Verhalten von Molekülen . . . . .	3
2.1.1	Das FJC-Modell . . . . .	4
2.1.2	Das WLC-Modell . . . . .	5
2.2	Verhalten von Molekülen bei Verdrehung . . . . .	7
2.3	Bestimmung der Magnetkraft . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Technik</b>	<b>9</b>
3.1	Aufbau . . . . .	9
3.1.1	Mikroskop . . . . .	10
3.1.2	Beleuchtung . . . . .	11
3.1.3	Magnetanordnung . . . . .	12
3.2	Flusszelle . . . . .	13
3.3	Bestimmung der 3D-Position der Beads . . . . .	13
<b>4</b>	<b>Durchführung</b>	<b>15</b>
4.1	Präparation der Flusszelle . . . . .	15
4.2	Teilversuch 1: Force-Extension . . . . .	18
4.3	Teilversuch 2: Drehmodul der DNA . . . . .	19
<b>5</b>	<b>Auswertung</b>	<b>19</b>
5.1	Teilversuch 1: Force-Extension . . . . .	19
5.2	Teilversuch 2: Drehmodul der DNA . . . . .	19

# 1 Einleitung

In vielen biologischen Prozessen spielen mechanische Kräfte eine fundamentale Rolle. Mit den Methoden der modernen Kraftspektroskopie können solche Prozesse gut erforscht werden. Weit verbreitete Instrumente der Kraftspektroskopie sind das Raster-Kraft-Mikroskop, sowie optische und magnetische Pinzetten. Ziel des Versuches ist es, die Funktion der magnetische Pinzette näher vorzustellen und einen Eindruck ihrer Verwendungsmöglichkeiten zu geben.

Das Grundprinzip der magnetischen Pinzette besteht darin, ein Makromolekül an eine Oberfläche, sowie an eine kleine superparamagnetische Kugel (Bead) zu binden (Abb. 1). Durch einen Magneten können Kräfte auf das Molekül ausgeübt werden. Typische Messgrößen sind die vertikale Ausdehnung ( $Z$ ) des Moleküls, sowie das mittlere Schwankungsquadrat der horizontalen Position ( $XY$ ) des Beads. Hierfür werden die von der vertikalen Position abhängigen Beugungsmuster des Beads betrachtet. Aus ihnen kann ein Computer die Position des Beads im Raum bestimmen. Gegenüber der optischen Pinzette und dem AFM zeichnet sich die magnetische Pinzette durch die

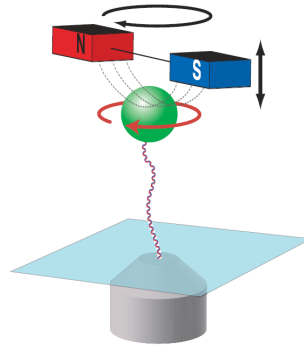


Abbildung 1: Prinzip der magnetischen Pinzette  
[?]

Fähigkeit aus, das Molekül zu verdrehen. Wegen ihrer Helixstruktur spielt dies insbesondere bei der Erforschung der DNA und an ihr wirkenden Enzymen eine große Rolle.

Da der Magnetfeldgradient über die Länge typischer Makromoleküle nahezu konstant bleibt, funktioniert die magnetische Pinzette als „Force-Clamp“. Die Magnetkraft ist also nahezu unabhängig von der  $Z$ -Ausdehnung des Moleküls. Bei den anderen Techniken ist zum Anlegen einer konstanten Kraft ein Feedbackmechanismus nötig.

**Aufgabe 1:** Erklären Sie den Begriff „Force-Clamp“.

## 2 Theorie

### 2.1 Kraft-Ausdehnungs-Verhalten von Molekülen

Zur theoretischen Beschreibung des Verhaltens eines Makromoleküls unter einer konstanten Kraft wollen wir zwei Modelle vorstellen. Das Freely-Jointed-Chain-Modell (FJC) beschreibt das Molekül als eine Kette flexibel verbundener, steifer Teilstücke, das Worm-Like-Chain-Modell (WLC)

nimmt es als kontinuierlich biegsam an. Im Versuch sollen die Vorhersagen der Modelle zum Kraft-Ausdehnungs-Verhalten überprüft werden.

### 2.1.1 Das FJC-Modell

Die folgende Rechnung orientiert sich an dem Artikel „Stretching of macromolecules and proteins“[?]. Das FJC-Modell setzt das Molekül aus  $N$  steifen Stücken der Länge  $b$  zusammen, die von den

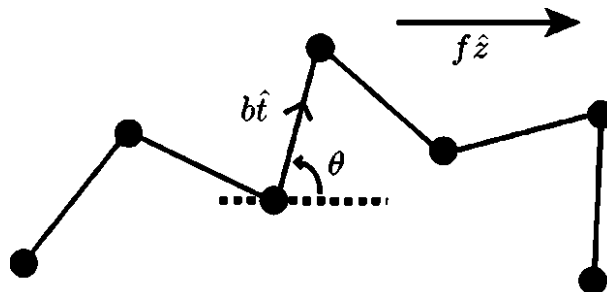


Abbildung 2: Schema einer Freely-Jointed-Chain  
[?]

Vektoren  $\{b\hat{t}_i\}$  beschrieben werden (Abb. 2). Die Verbindung dieser Stücke ist flexibel, das heißt die Winkel zwischen ihnen sind ohne Einwirkung einer äußeren Kraft zufällig verteilt. Die Orientierung der einzelnen Elemente ist also völlig unabhängig von den Nachbarn. Mit einer externen Kraft  $\mathbf{F} = f * \mathbf{e}_z$  ergibt sich für eine Winkelkonfiguration  $\Gamma_\alpha$  die potentielle Energie:

$$E_{Pot}^\alpha = - \sum_{i=1}^N \mathbf{F} \cdot b\hat{t}_i = -bf \sum_{i=1}^N \cos(\theta_i) \quad (1)$$

Die Winkel  $\theta_i$  geben dabei die Orientierung der einzelnen Elemente zur z-Achse an. Für die kanonische Zustandssumme  $W$  ergibt sich:

$$W = \sum_{\alpha} e^{-E_{Pot}^\alpha/k_B T} = \sum_{\alpha} \prod_{i=1}^N e^{fb \cos(\theta_i)/k_B T} = \left( \sum_{\alpha} e^{fb \cos(\theta)/k_B T} \right)^N \quad (2)$$

Die Summe über  $\alpha$  steht für die Summierung über alle möglichen Winkelkonfigurationen  $\Gamma_\alpha$ . Diese geht, da die Winkel kontinuierlich verteilt sind, in ein Integral über.

$$\begin{aligned} W &= \left[ \int d\Omega e^{fb \cos(\theta)/k_B T} \right]^N \\ &= \left[ \frac{2\pi k_B T}{fb} \sinh \left( \frac{fb}{k_B T} \right) \right]^N \end{aligned} \quad (3)$$

Durch Einsetzen in die Freie Energie  $G = -k_B T \ln(W)$  ergibt sich für die Ausdehnung  $z$  des Moleküls in Abhängigkeit der Kraft.

$$z = -\frac{\partial G}{\partial f} = L \left[ \coth \left( \frac{fb}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{fb} \right] \quad (4)$$

$L = bN$  ist die Konturlänge der Kette.

### 2.1.2 Das WLC-Modell

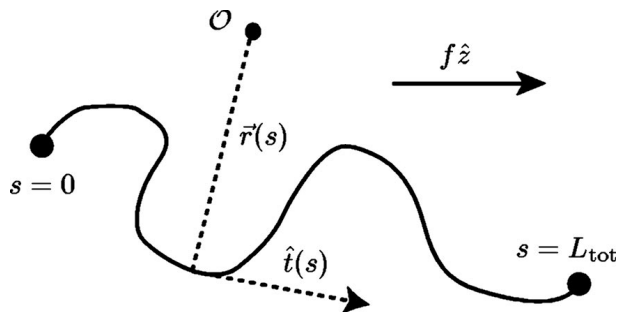


Abbildung 3: Schema einer Worm-Like-Chain  
[?]

Im Gegensatz zum FJC-Modell nimmt das WLC-Modell an, dass sich das Molekül analog zum Balken der klassischen Mechanik kontinuierlich biegen kann. Zur Beschreibung parametrisieren wir das Molekül über seine Konturlänge  $s \in \{0, L\}$ . Der Vektor  $\mathbf{r}(s)$  zeigt auf die Kette,  $\hat{\mathbf{t}}(s) = \frac{\partial \mathbf{r}(s)}{\partial s}$  ist der normierte Tangentialvektor (Abb. 3).

Für die Verbiegung eines Balkens mit Radius  $R$  ist bekannt [?]:

$$E_{\text{Balken}} \sim \frac{1}{R^2} \quad (5)$$

Mit  $\left| \frac{\partial \hat{\mathbf{t}}(s)}{\partial s} \right|^2 = \frac{1}{R^2}$  erhalten wir analog:

$$E_{DNA} = \int_0^L ds \left[ \frac{A}{2} \left| \frac{\partial \hat{\mathbf{t}}(s)}{\partial s} \right|^2 \right] \quad (6)$$

Die hier eingefügte Proportionalitätskonstante  $A$  kann mit der Persistenzlänge  $l_P$  als  $A = k_B T \cdot l_P$  identifiziert werden. Die Persistenzlänge ist ein Maß für die Steifheit des Moleküls.

Um die potentielle Energie unter Einwirkung einer externen Kraft zu bestimmen, lassen wir die Summe aus Gleichung (1) in ein Integral übergehen.

$$E_{Pot}^{WLC} = \int_0^L ds \hat{\mathbf{t}}(s) \cdot \mathbf{F} = f \cdot \int_0^L ds \hat{\mathbf{t}}(s) \cdot \mathbf{e}_z \quad (7)$$

Da eine exakte Lösung des WLC-Modells nicht möglich ist, wollen wir eine von Marko und Siggia vorgeschlagene Interpolationsformel für das Kraft-Ausdehnungs-Verhalten vorstellen [?]. Hierfür betrachten wir zunächst das Grenzverhalten im Bereich starker Kräfte. Für diese wird sich die Kette fast gerade strecken. Die Tangentialvektoren  $\hat{\mathbf{t}}(s)$  liegen dann nahezu auf der  $z$ -Achse. Wir nähern also:

$$\hat{\mathbf{t}}(s) \cdot \mathbf{e}_z = 1 - \frac{\mathbf{t}_\perp^2(s)}{2} \quad (8)$$

Dabei ist  $\mathbf{t}_\perp(s)$  die zur z-Achse orthogonale Komponente von  $\mathbf{t}(s)$ . Mit  $\mathbf{t} = \mathbf{t}_z + \mathbf{t}_\perp$  ergibt sich die Energie im WLC-Modell:

$$\frac{E_{tot}^{WLC}}{k_B T} = \int_0^L ds \left[ \frac{l_P}{2} \left| \frac{\partial \mathbf{t}_\perp(s)}{\partial s} \right|^2 + \frac{f \mathbf{t}_\perp^2}{2k_B T} \right] - \frac{fL}{k_B T} \quad (9)$$

Mit der Fouriertransformation

$$\tilde{\mathbf{t}}_\perp(q) = \int ds e^{iqs} \mathbf{t}_\perp(s) \quad (10)$$

lässt sich die Energie in ihre Normalmoden aufspalten.

$$\frac{E_{tot}^{WLC}}{k_B T} = \int \frac{dq}{2\pi} \left[ \frac{l_P q^2 + \frac{f}{k_B T}}{2} \cdot |\tilde{\mathbf{t}}_\perp(q)|^2 \right] - \frac{fL}{k_B T} \quad (11)$$

Jetzt lässt sich der Mittelwert von  $\tilde{\mathbf{t}}_\perp(q)$  mit Hilfe des Äquipartitionstheorems leicht abschätzen. Da  $\tilde{\mathbf{t}}_\perp(q)$  zwei Komponenten hat, muss der Integralterm aus Gleichung (11) insgesamt 1 ergeben. Da bei Hin- und Rücktransformation insgesamt ein Faktor von  $2\pi$  entsteht folgt daraus:

$$\langle |\tilde{\mathbf{t}}_\perp(q)|^2 \rangle = \frac{2}{l_P q^2 + \frac{f}{k_B T}} \quad (12)$$

Durch Rücktransformation erhält man:

$$\langle \mathbf{t}_\perp^2 \rangle = \int \frac{dq}{2\pi} \frac{2}{l_P q^2 + \frac{f}{k_B T}} = \sqrt{\frac{k_B T}{f l_P}} \quad (13)$$

Mit der Entwicklung aus Gleichung (8) gilt:

$$\frac{z}{L} = \frac{1}{L} \int_0^L ds \hat{\mathbf{t}}(s) \cdot \mathbf{e}_z = \frac{1}{L} \int_0^L ds \left( 1 - \frac{\langle \mathbf{t}_\perp^2 \rangle}{2} \right) = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{f l_P}} \quad (14)$$

Durch Umformen kommt man auf die Näherungsgleichung:

$$\frac{f l_P}{k_B T} = \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \quad (15)$$

Diese liefert eine gute Beschreibung für das Verhalten von Makromolekülen im Limes großer Kräfte, versagt aber für kleine Kräfte, wo wir eine lineare Abhängigkeit zwischen relativer Ausdehnung und Kraft erwarten würden. Da der Term  $\frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2}$  für kleine Kräfte ( $\frac{z}{L} \rightarrow 0$ ) gegen  $\frac{1}{4}$  geht, ergänzen wir die Gleichung und erhalten die Interpolationsformel:

$$\frac{f l_P}{k_B T} = \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \quad (16)$$

Diese einfache Formel liefert eine maximale Abweichung von 10% gegenüber der numerischen Entwicklung des WLC-Modells [?].

## 2.2 Verhalten von Molekülen bei Verdrehung

Die folgende Herleitung erfolgt weitgehend analog zu dem Artikel „Stretching of macromolecules and proteins“ [?]. Vereinfacht kann man sich ein Macromolekül als elastisches Band mit Torsionsmodul  $C$  vorstellen. Bei Verdrehung des Moleküls unter Einwirkung einer Kraft  $F$  wird es sich in einer ersten Phase zunächst ohne Änderung der Ausdehnung in sich selbst verdrehen (Abb. 4). Das Drehmoment  $\Gamma$  steigt linear mit der Anzahl der Verdrehungen  $n$ . Die in die Torsion gesteckte Energie  $E_t$  ist:

$$E_t = 2\pi n\Gamma, \text{ mit } \Gamma = \frac{C}{L}2\pi n; \quad (17)$$

Ab einer bestimmten Anzahl  $n_b$  beginnen sich Schlaufen zu bilden (Buckling). In dieser zweiten Phase äußert sich die Verdrehung durch eine Änderung des End-zu-End-Abstandes um die Länge der entstehenden Schlaufen (Supercoils). Das Drehmoment bleibt jetzt konstant. Der Übergangspunkt liegt dort, wo die weitere Torsion des Stranges energetisch ungünstiger wird als die Ausbildung einer Schlaufe gegen eine externe Kraft  $F$ .

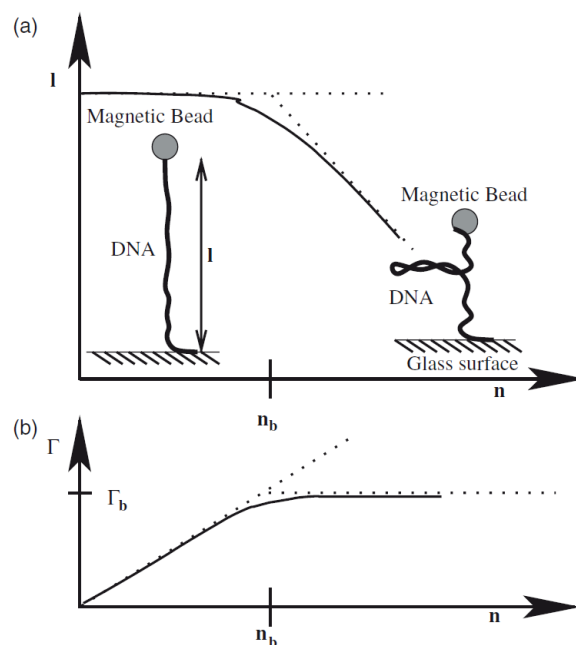


Abbildung 4: (a) Bei der Verdrehung von Makromolekülen wie z.B. DNA bilden sich ab  $n_b$  Verdrehungen Supercoils. Daher verkürzt sich die z-Ausdehnung der DNA. (b) Bevor sich Supercoils bilden steigt das Drehmoment in der DNA linear mit der Zahl der Verdrehungen. Sobald sich Supercoils bilden, bleibt das Drehmoment konstant.

[?]

Eine vollständige Schlaufe lässt sich stark vereinfacht als Kreis mit Radius  $r$  beschreiben. Die Energie zur Ausbildung dieses Kreises  $E_{loop}$  setzt sich aus der für die Verkürzung nötigen Arbeit

$W = 2\pi rF$ , und der zum Verbiegen des Stranges nötigen Energie  $E_{bend}$  zusammen. Die Bedingung für Buckling ist also:

$$E_t(n_b) = E_{loop} = W + E_{bend} \quad (18)$$

Aus dem WLC-Modell (Gleichung 6) folgt:

$$E_{bend} = \int_0^{2\pi r} ds \left[ \frac{A}{2} \frac{1}{r^2} \right] = \pi A \frac{1}{r} \quad (19)$$

Durch minimieren von  $E_{loop}$  ergibt sich:

$$r = \sqrt{\frac{A}{2F}} \quad (20)$$

und damit:

$$\Gamma_b = \sqrt{2AF}, \quad n_b = \frac{L}{2\pi C} \sqrt{2AF} \quad (21)$$

Aufgrund ihrer Helixstruktur unterscheidet man bei DNA positive und negative Drehrichtung. Positive entsprechen dabei einer Verdrehung mit der Helizität der DNA. Sie ziehen die Einzelstränge zueinander hin. Negative Drehungen treiben die Stränge auseinander. Bei hohen Kräften beobachtet man daher eine Denaturierung der DNA (Abb. 5).

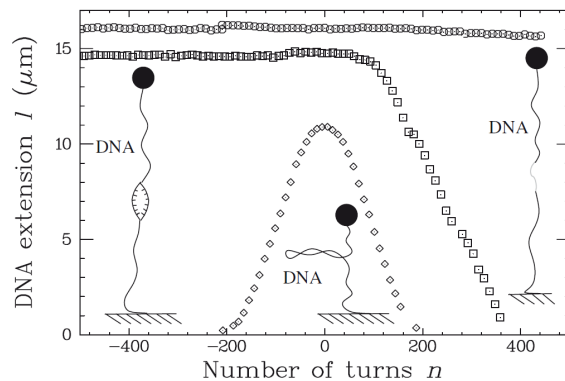


Abbildung 5: Verhalten der DNA bei positiver und negativer Verdrehung bei verschiedenen Kräften [?]

### 2.3 Bestimmung der Magnetkraft

Die Bestimmung der aktuellen Magnetkraft erfolgt über das mittlere Schwankungsquadrat der Beads. Hierzu betrachten wir den Bead mit der DNA als ein invertiertes Pendel. Die Auslenkung entsteht durch Brownsche Bewegung der Flüssigkeitsteilchen, die gegen den Bead stoßen. In positiver Z-Richtung wirkt die Magnetkraft  $\mathbf{F}_m$  (Abb. 6), die eine rückstellende Kraft

$$\mathbf{F}_r = \sin(\theta) \cdot \mathbf{F}_m \approx \frac{dx}{l} \mathbf{F}_m \quad (22)$$



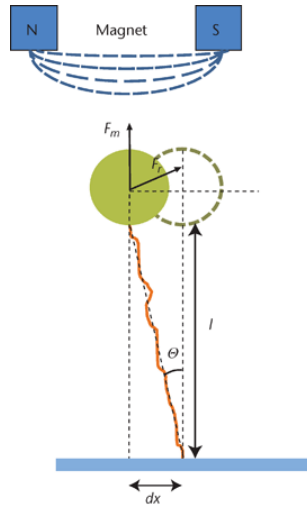


Abbildung 6: Bead mit DNA als invertiertes Pendel  
[?]

erzeugt. Die Kugel bewegt sich also in einem Potential der Form

$$U = \frac{1}{2} \frac{\mathbf{F}_m}{l} \langle dx^2 \rangle \quad (23)$$

Nach dem Äquipartitionsgesetz gilt, dass jeder Freiheitsgrad die Energie  $E = \frac{1}{2}k_B T$  hat. Daraus ergibt sich

$$\mathbf{F}_m = \frac{l \cdot k_B T}{\langle dx^2 \rangle} \quad (24)$$

Um die Magnetkraft zu bestimmen, müssen wir also die XY-Position des Beads über einen ausreichend langen Zeitraum messen. Da die Beads in ihrer Größe leicht variieren, kann die Kraft bei gleicher Magnetposition von Bead zu Bead unterschiedlich sein.

**Aufgabe 2:** Leiten sie die Formel für die Kraft über die Boltzmannverteilung her. Wie sehen die Wahrscheinlichkeitsverteilungen  $P(x)$  und  $P(r)$  für die Positionen des Beads aus? Tipp: Gehen Sie für die Berechnung von  $P(r)$  von  $P(r, \phi)$  aus.

### 3 Technik

Im folgenden Kapitel wollen wir Sie mit der Funktionsweise der magnetischen Pinzette vertraut machen. Abbildung 7 gibt einen Überblick über das Gerät.

#### 3.1 Aufbau

Die magnetische Pinzette besteht aus einem invertierten Mikroskop, der Beleuchtung, der Flusszelle und dem Magnethalter. Die Konstruktion ist darauf ausgelegt, Schwingungen zwischen Flusszelle

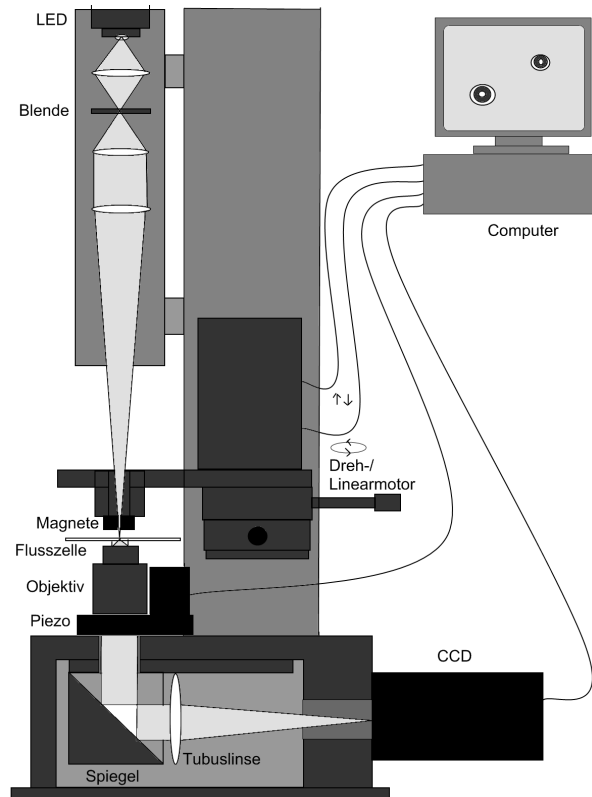


Abbildung 7: Skizze des Versuchsaufbaus

und Mikroskop zu vermeiden, sowie ein möglichst kontrastreiches Beugungsbild zu erzeugen. Hierfür muss geringstmögliche Divergenz bei ausreichender Intensität der Beleuchtung erreicht werden.

Das monochrome Licht der LED wird durch die Magnethalterung auf die Flusszelle fokussiert und von dem lichtempfindlichen Mikroskop auf die CCD geworfen. Die Fokusebene lässt sich mit einem Piezo verstellen.

Das Magnetfeld wird von zwei Würfelmagneten erzeugt. Diese lassen sich von einem Linearmotor in Z-Richtung bewegen und von einem Drehmotor um den Lichtweg drehen. Die Steuerung der Motoren und des Piezos, sowie die Auswertung der Bilder erfolgt über den Computer. Im Folgenden sollen die einzelnen Komponenten und ihre Funktion näher vorgestellt werden.

### 3.1.1 Mikroskop

Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Komponenten des Mikroskopkastens. Die Flusszellenhalterung besteht aus einem XYZ-Präzisionstisch und einem Träger. Der XYZ-Tisch ermöglicht die Auswahl und provisorische Scharfstellung eines geeigneten Beobachtungsbereiches. Die Flusszelle

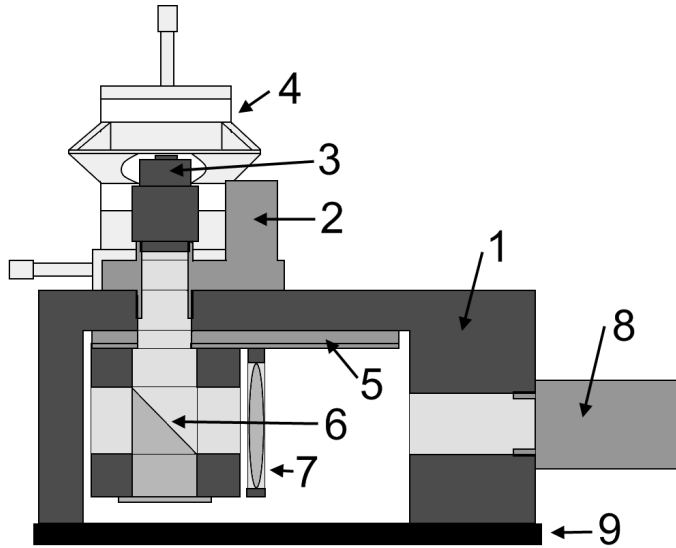


Abbildung 8: Die Basis des Aufbaus bildet der massive Mikroskopkasten (1). Auf diesem sind Piezo (2) und Objektiv(3) aufgeschraubt, sowie die Flusszellenhalterung (4) montiert. In dem Kasten sind mit einem Schienensystem (5) Umlenkspiegel (6) und Tubuslinse (7) angebracht. Er bietet Raum zur Montage von Tubuslinsen von 50 – 150mm Brennweite. Die CCD-Kamera (8) ist sowohl durch das C-Mount Gewinde als auch über einen großflächig anliegenden Winkel am Kasten befestigt. Dieser sorgt neben hoher Stabilität auch für eine gute Wärmeabfuhr. Durch die Bodenplatte (9) wird der Kasten geschlossen.

lässt sich mit einer Klammer fest in ihrem Halter einspannen.

Das Bild des Objektivs wird durch einen Spiegel auf die Tubuslinse gelenkt, die es auf den CCD-Chip abbildet. Dieser liest das entstandene Bild mit 90 Hz auf 659 x 494 Pixeln mit  $7.4\mu\text{m}$  Pixelgröße aus. Wir verwenden eine Tubuslinse mit 150mm Brennweite und ein 100fach Zeiss-Objektiv, sodass 79nm auf einen Pixel abgebildet werden. Diese Auflösung ist weit größer als die durch Beugung begrenzte Mikroskop-Auflösung von ca. 240nm. Da aber keine Kanten sondern Beugungsmuster betrachtet werden, ist die gewählte Vergrößerung sinnvoll.

Um möglichst viele Beugungsordnungen sichtbar zu machen verwenden wir ein Ölimmersions-Objektiv mit hoher numerischer Apertur.

Der Kasten ist mit schwarzer Pappe ausgelegt, um Reflektionen zu vermeiden.

### 3.1.2 Beleuchtung

Zur Beleuchtung wird inkoheräntes Licht verwendet. Wir benutzen eine 7.5W-LED, die Licht mit einer Wellenlänge von 625nm und einer spektralen Breite von 18nm emittiert. Sie wird von einem rauscharmen Treiber mit konstantem Strom versorgt. Ein Laser würde so starke Beugungsmuster erzeugen, dass die Ringe unterschiedlicher Beads sich überlagern und die Auswertung erschweren würden. Das Licht der LED wird zunächst auf eine Blende fokussiert und diese von zwei Linsen auf die Probe scharf gestellt (Abb. 9). Durch die Blende geht ein beträchtlicher Teil der Intensität

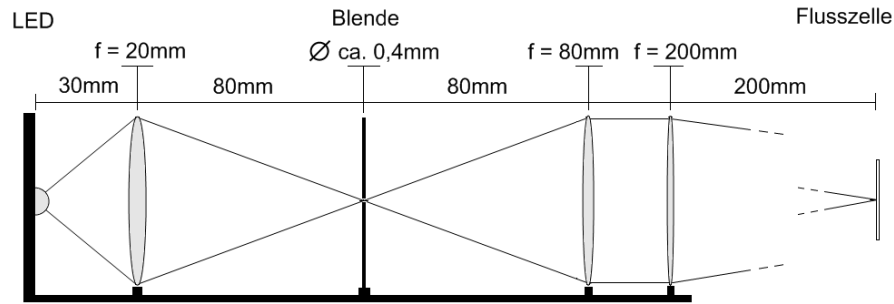


Abbildung 9: Anordnung von Linsen und Blende auf der optischen Schiene

verloren, sie ermöglicht es aber nahezu nur den beobachteten Bereich zu beleuchten. So wird das Auftreten von Streulicht vermindert und der Kontrast deutlich verbessert. Um die Divergenz trotz der Fokussierung auf die Probe gering zu halten, geschieht dies mit einer großen Brennweite von 200mm.

### 3.1.3 Magnetanordnung

Die Magnethalterung lässt sich durch Motoren rotieren und in der Höhe verstellen. Das Magnetfeld wird durch zwei Würfelmagnete mit Kantenlängen von 5mm erzeugt. Sie sind mit einem Abstand von 1,3 mm an einem Aluminiumhalter befestigt. In der von uns verwendeten Anordnung liegen ihre magnetischen Momente vertikal zur Flusszelle und antiparallel zueinander. Eine oft verwendete Alternative ist es, die Magnete mit horizontal zur Flusszelle ausgerichteten magnetischen Momenten in einem Eisenschuh zu befestigen. Mit beiden Anordnungen lassen sich ähnlich hohe Kräfte

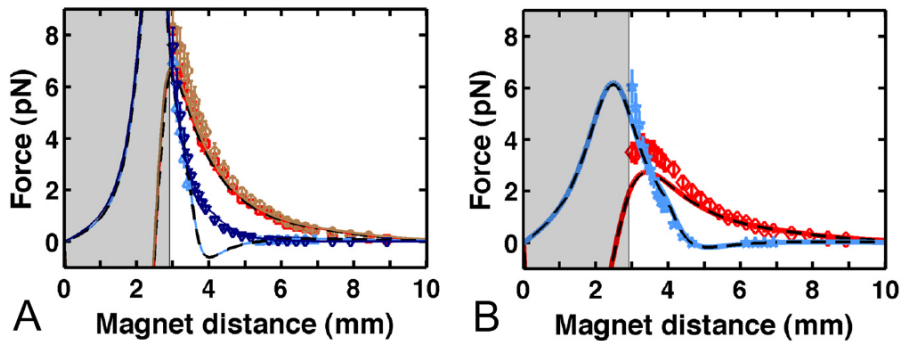


Abbildung 10: Magnetkräfte auf „MyOne“ Beads von Invitrogen, in Abhängigkeit vom Abstand der Magnetmittelpunkte zur Flusszelle. A, B zeigen den Verlauf bei horizontaler (hell- und dunkelblau) und vertikaler Anordnung (rot und braun) für die Magnetabstände 1mm respektive 2mm. Wiedergegeben sind die Ergebnisse aus experimenteller Kraftbestimmung (Symbole) und theoretischer Behandlung (schwarz gestrichelte Linien). Der graue Bereich markiert die Flusszelle.

[?]

erzielen, jedoch fällt die Kraft für die Vertikale mit steigendem Abstand zur Flusszelle langsamer ab (Abb. 10). Die Magnete müssen zum Erreichen moderater Kräfte also weniger nah an die Flusszelle gefahren werden. Dies verringert die Gefahr einer Beschädigung der Flusszelle bei der Positionierung der Magnete. Da der Strahlengang der Beleuchtung äußerst schmal ist, können die Magnete über  $12\text{mm}$  ohne Intensitätsveränderung verstellt werden, und so auch kleine Kräfte erreicht werden.

**Aufgabe 3:** Skizzieren Sie beide Magnetanordnungen mit Feldlinien. Wie kann für 2 Würfelförmige Magnete einfach herausgefunden werden, in welche der beide Anordnungen sie sich befinden?

### 3.2 Flusszelle

Die Flusszelle (Abb. 11) ist das Zentrum der Magnetischen Pinzette. In ihr befinden sich die zu beobachtenden Beads und Moleküle. Sie ist an einem XYZ-Positioniertisch befestigt, mit dem sich ein geeigneter Beobachtungsbereich auswählen lässt.

An der Flusszelle sind zwei Anschlüsse befestigt. Auf den offenen Anschluss kann mit einer Pipette Flüssigkeit getropft werden. Der andere Anschluss ist über einen Schlauch mit einer Spritze verbunden, mit der die Flüssigkeit auf dem offenen Ende durch die Flusszelle gezogen werden kann.

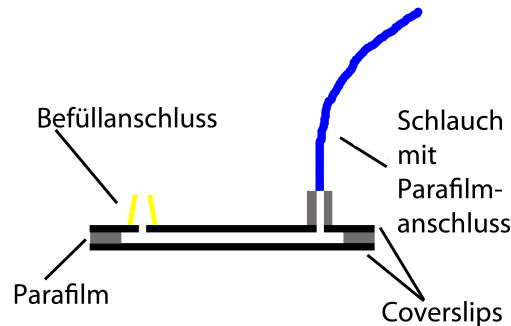


Abbildung 11: Aufbau der Flusszelle.

Die DNA wird spezifisch an den Flusszellenboden und den magnetischen Bead gebunden. Um ein unspezifisches Haften der DNA oder der Beads am Boden zu vermeiden, wird die Flusszelle und die Beadoberfläche mit BSA geblockt. Trotzdem haften noch genug magnetische Beads am Boden um diese als Referenzbeads verwenden zu können. Alternativ können hierfür auch unmagnetische Beads aus Latex verwendet werden. Für die spezifischen Bindungen an Bead und Boden wird die DNA an einem Ende mit Biotin, am anderen mit Digoxigenin gelabelt. Diese binden mit dem am Bead befestigten Streptavidin und dem am Boden der Flusszelle aufgetragenen Anti-Digoxigenin. Da die einzelnen Bindungen sich frei drehen können werden für die Beobachtung von Supercoils mehrere Bindungsstellen benötigt. Zusätzlich wird auf der Glasoberfläche eine Schicht Epoxysilan aufgetragen, an der das Anti-Digoxigenin besser haftet als auf Glas (Abb.: 12).

### 3.3 Bestimmung der 3D-Position der Beads

Um die Z-Ausdehnung der DNA zu bestimmen, muss für jedes Bild die 3D-Position der Beads bestimmt werden. Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick geben, wie aus einem 2D-Bild eine

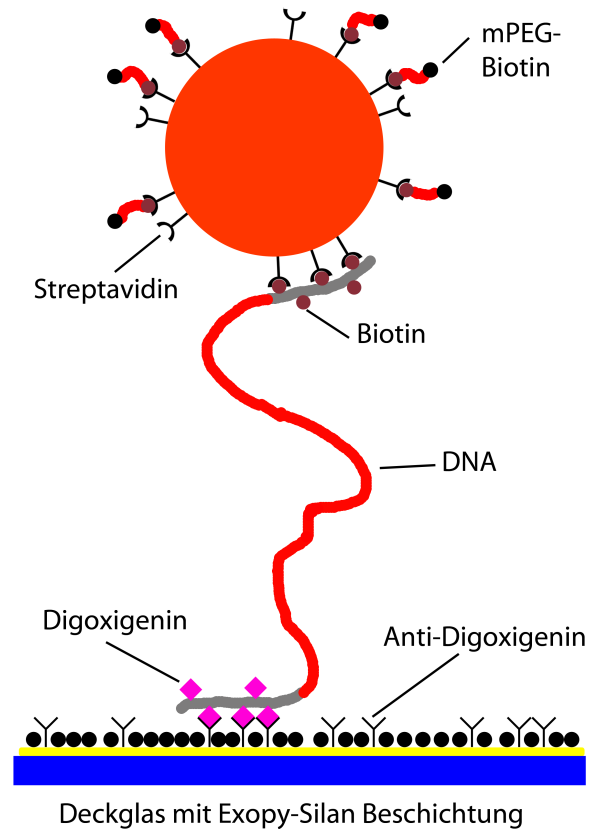


Abbildung 12: Die BSA-Blocking-Solution füllt die Zwischenräume der Antikörper, so dass sich die DNA nicht unspezifisch zwischen den Antikörpern anlagern kann.

3D-Position berechnet werden kann.

Sowohl die Bestimmung der XY-, als auch die Bestimmung der Z-Position nutzt die Beugungsringe der Beads. Für die XY-Position wird die Symmetrie der Beugungsmuster entlang der Koordinatenachsen der Beads genutzt. Mit Hilfe einer geschätzten Position, die der Benutzer durch ein Fadenkreuz angeben kann, kann durch eine Kreuzkorrelation entlang der Achsen des Fadenkreuzes der Abstand der Symmetrieachsen des Beugungsbildes zu dem Fadenkreuz, und somit die XY-Position des Beads bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Z-Position nutzen wir die Abhängigkeit des Beugungsmusters vom Abstand des Beads zur Fokusebene des Objektivs (Abb.: 13).

Zunächst werden bei konstanter Position des Beads (hohe Magnetkraft) Referenzbildern aufgenommen (Abb.: 14). Hierfür wird der Piezo in kleinen 200 nm Schritten verfahren. An jeder Position wird das radiale Intensitätsprofil der Beads gespeichert. Später können die aktuellen radialen Intensitätsprofile mit diesen Referenzwerten korreliert, und so deren Z-Position bestimmt werden. Aus der Differenz der Höhen des magnetischen und des Referenzbeads ergibt sich die Z-Ausdehnung der DNA.

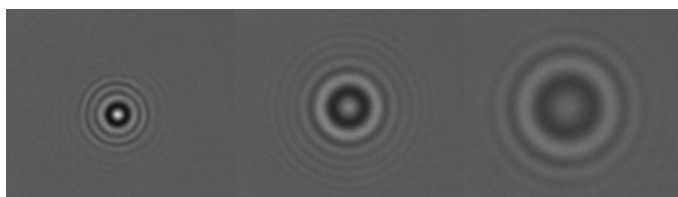


Abbildung 13: Beugungsringe eines Beads in unterschiedlichen Höhen. Alle drei Bilder sind unter Fokus aufgenommen worden. Entscheidend für das Tracking der Z-Position ist das erste Maximum, was weit unter Fokus besonders stark ausgeprägt ist.

## 4 Durchführung

### 4.1 Präparation der Flusszelle

Vor dem Versuch muss zunächst die Flusszelle vorbereitet werden. In ihr befindet sich bereits eine Antidigoxigenin-Beschichtung, an der die DNA haften wird, sowie das zum Blocken der Oberfläche notwendige BSA. Die benötigten Materialien werden Ihnen von ihrem Betreuer zur Verfügung gestellt.

1. Sie müssen die Flüssigkeit, in der sich die magnetischen Beads befinden, reinigen. Geben Sie dafür 40  $\mu$ l PBS (20 mmol Mg) und 10  $\mu$ l der Bead-Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß („Eppi“). Mit Hilfe eines magnetischen Halters lassen sich die Beads sammeln. Entfernen Sie 40  $\mu$ l der übrigen Flüssigkeit mit einer Pipette.  
Wiederholen Sie diesen Schritt ein Mal. Es müssen 10  $\mu$ l gereinigte Beads übrig bleiben.
2. Geben Sie nun 1  $\mu$ l der DNA (5 ng/ $\mu$ l) hinzu. Lassen Sie die Mischung 15 Minuten stehen.
3. Fügen Sie 5  $\mu$ l mPEG-Biotin zu. Warten Sie wieder 15 min. Füllen Sie dann das Eppi mit 400  $\mu$ l Standardpuffer auf.
4. Geben sie 100  $\mu$ l Standardpuffer in den Befüllanschluss der Flusszelle. Hiermit soll gewährleistet werden, dass die Flusszelle nicht ausversehen austrocknet.
5. Erneuern Sie den Öltropfen des Objektivs und befestigen Sie die Flusszelle am Objekthalter. Kontrollieren Sie hierzu, dass der Motor für die Z-Position der Magneten ganz nach oben gefahren ist. Tipp: Drehen sie den Objektträger per Mikrometerschraube ein paar Millimeter nach oben, um die Flusszelle leichter einsetzen zu können.  
**Wichtig:** Achten Sie darauf, die Flusszelle nicht zu verdrecken oder zu beschädigen. Sie ist äußerst empfindlich und langwierig in der Herstellung. Es dürfen keine Luftbläschen durch die Flusszelle gezogen werden.
6. Ziehen Sie in eine 5 ml Spritze ca. 500  $\mu$ l PBS, so dass sie keine Luft enthält. Ersetzen sie die 1 ml Spritze der Flusszelle durch die eben aufgezugene 5 ml Spritze.  
**Wichtig:** Bauen Sie die 5 ml Spritze noch nicht in die Spritzenpumpe ein!

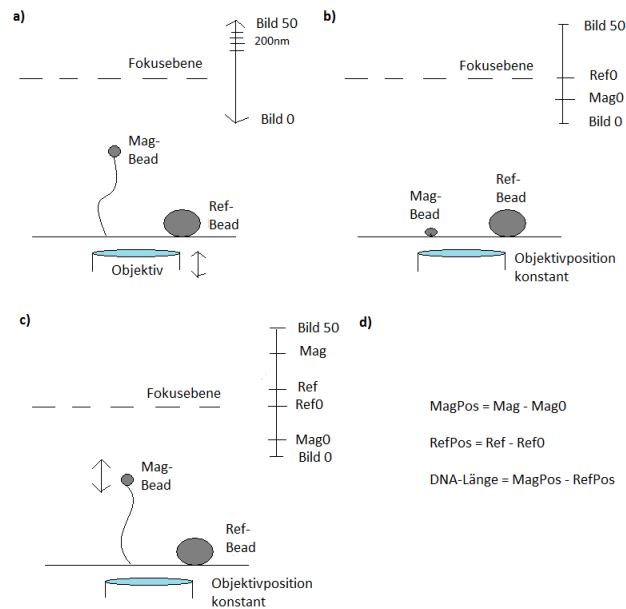


Abbildung 14: Bestimmung der Z-Position der Beads mit Hilfe von Referenzbildern: a) Aufnahme der Referenzbilder bei konstanter Beadposition (hohe Magnetkraft). Die Fokusebene des Objektivs wird durch einen Piezo verschoben. b) Bestimmung der Positionen der Beads ohne Magnetkraft. Dies ergibt einen festen Referenzwert, an dem der Bead auf dem Boden liegt. c) Während der Messung wird für beide Beads jeweils das ähnlichste Referenzbild gesucht. d) Errechnung der Z-Ausehnung der DNA

7. Schalten Sie die Spritzenpumpe ein und starten Sie das LabView-Programm „PumpDriver.exe“. Warten Sie die automatische Referenzfahrt der Pumpe ab und fahren Sie die Pumpe in die richtige Position, so dass Sie die Spritze einbauen können.
8. Spülen Sie 700  $\mu\text{l}$  Standardpuffer durch die Zelle. Setzen Sie hierzu die Geschwindigkeit der Pumpe auf  $f = 1000000$ .
9. Mischen Sie die DNA-Bead-Lösung nochmal vorsichtig mit einer Pipette durch auf und ab pipettieren und befüllen Sie die Flusszelle mit 50  $\mu\text{l}$  der DNA-Bead-Lösung. Hierbei muss nicht die ganze 50  $\mu\text{l}$  Lösung in die Flusszelle gezogen werden. Stoppen Sie die Pumpe und geben Sie 100  $\mu\text{l}$  Standardpuffer in den Befüllanschluss, um ein Leerziehen der Flusszelle durch das Nachziehen der Pumpe zu verhindern.
10. Verwenden Sie den XYZ-Tisch um die Beads ungefähr scharf zu stellen. Sie sollten diese nun durch die Flusszelle schwimmen sehen.
11. Warten Sie 30 Minuten.



12. Spülen Sie wiederum 700  $\mu\text{l}$  Standardpuffer mit einer Geschwindigkeit von  $f = 1000000$  und geben Sie 100  $\mu\text{l}$  Standardpuffer zur Sicherheit in den Befüllanschluss.
13. Fahren Sie die Magnete um 22 mm nach unten. Die Flusszelle ist nun fertig präpariert und eine Kraft zieht die Beads leicht nach oben.
14. Nun müssen Sie einen für die Messungen geeigneten Bead finden. Wiederholen Sie dafür die folgenden Schritte so lange, bis Sie einen Bead gefunden haben, der allen Anforderungen genügt.
  - (a) Verfahren Sie die Flusszelle so lange, bis Sie einen Bereich sehen, in dem ein magnetischer (stark schwankender) Bead (er hängt an einer DNA) und ein nicht schwankender Bead zu sehen ist. Die Interferenzringe sollten, wenn möglich, sich mit keinen anderen überlagern. (siehe Abb. 15)

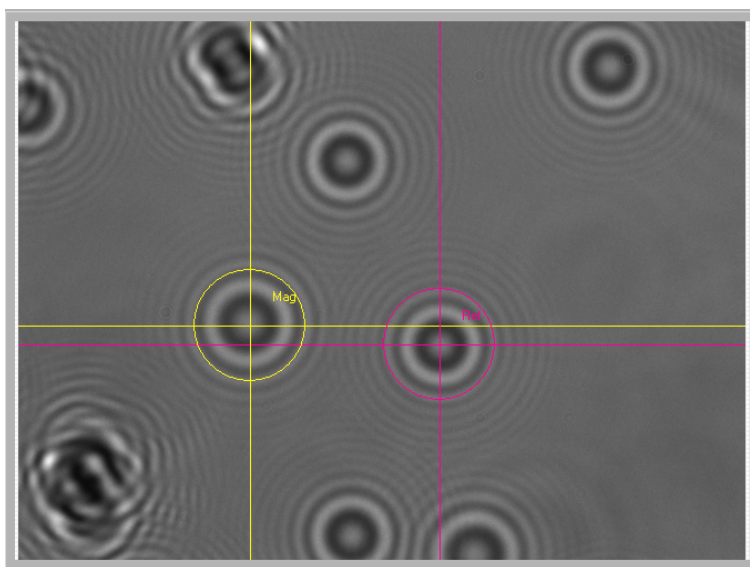


Abbildung 15: Magnetischer- und Referenzbead. Die Beugungsringe dürfen sich innerhalb der Kreise der Fadenkreuze nicht überlagern.

- (b) Positionieren Sie nun die Fadenkreuze möglichst exakt über den Beads und wechseln Sie in den Modus „Z-Positioning“. Hier werden im Folgenden die Referenzbilder aufgenommen, mittels derer später die Z-Positionen der Beads bestimmt werden. Um ein gutes Tracking gewährleisten zu können muss jetzt ein geeigneter Fokusbereich ausgewählt werden.
  - i. Das Programm nimmt Referenzwerte in einem Bereich von 10  $\mu\text{m}$  auf. Das genaueste Tracking erhält man normalerweise durch die Betrachtung der Beads weit unter Fokus. Schieben Sie zur Bestimmung der unteren Grenze des Bereiches den Piezoregler so weit nach links, dass der Peak des ersten Maximums in den Graphen gerade noch zu sehen ist (Abb.: 16).

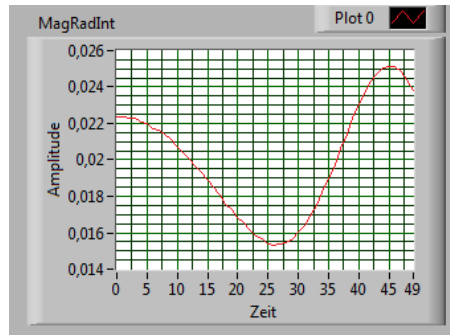


Abbildung 16: Radiale Intensitätsverteilung des magnetischen Beads am weitesten Punkt unter Fokus, der noch für das Tracking geeignet ist.

- ii. Kontrollieren Sie jetzt die Intensitätsverteilung an der oberen Grenze (+10  $\mu\text{m}$ ). Sollte der Bead im gesamten Bereich von dem Programm trackbar sein, setzen Sie den Piezoregler auf die Mitte des so bestimmten Intervalls und starten Sie den Einmessvorgang. Sollten Sie in den Intensitätsverteilungen eine waagerechte Linie sehen deutet dies darauf hin, dass der Bead über den gewählten Bereich nicht stabil zu tracken ist. Variieren Sie dann entweder den Bereich oder wählen Sie einen neuen Bead.
  - (c) Um einen festen Wert für die Z-Ausdehnung der DNA zu bekommen, muss noch eine Nullposition angegeben werden, an dem der Bead auf dem Boden liegt. Fahren Sie die Magnete dafür im „Standard“-Modus mindestens 8 mm nach oben und drücken Sie dann auf „Get New Z-0-Position“. Fahren Sie die Magnete dann wieder herunter, um ein Festkleben des Beads am Boden zu vermeiden.
  - (d) Sie verfügen nun über einen vollständig eingemessenen Bead. Nun müssen sie kontrollieren, ob der Bead Supercoils bilden kann. Kontrollieren Sie zunächst, ob der Bead bei sehr tief eingestellten Magneten eine Länge zwischen 3 und 4  $\mu\text{m}$  hat. Sollte dies nicht der Fall sein, müssen Sie einen neuen Bead wählen. Fahren Sie dann die Magnete nach oben, bis die DNA eine Z-Ausdehnung von ca. 1,8  $\mu\text{m}$  aufweist. Drehen sie die Magnete dann in positive Richtung 20 Mal. Sie sollten eine deutliche Verkürzung der DNA beobachten können. Ist dies nicht der Fall, müssen Sie einen neuen Bead wählen.
15. Sie verfügen nun über einen funktionsfähigen, vollständig eingeleseenen Bead. Bevor Sie eine Messung starten, fahren Sie die Magnete auf die tiefste Position, an der Sie eine Messung durchführen wollen. Stellen Sie außerdem sicher, dass die DNA möglichst keine Supercoils enthält.

## 4.2 Teilversuch 1: Force-Extension

Ziel dieses Teilversuchs ist die Bestimmung der Magnetkraft, sowie die Überprüfung der theoretischen Vorhersagen des FJC- und des WLC-Modells zum Kraft-Ausdehnungsverhalten. Führen Sie hierfür eine Kraftmessung durch. Die gesamte Messdauer sollte 45 min nicht überschreiten. Verwenden Sie zum Abschätzen der Messzeit, dass das Programm 90 Messpunkte in der Sekunde

aufnehmen kann.

Bevor Sie mit dem Teilversuch 2 fortfahren, sollten Sie zunächst Teil 1 der Auswertung zum Teilversuch 1 durchführen.

### 4.3 Teilversuch 2: Drehmodul der DNA

In diesem Versuch soll das Drehmodul der DNA bestimmt werden. Hierfür muss die Ausdehnung der DNA an verschiedenen Drehmotorpositionen für verschiedene Kräfte bestimmt werden. Messen Sie an 3 verschiedenen Kräften unter 0,8 pN die Ausdehnung der DNA in einem Bereich von 30 bis -30 Umdrehungen.

## 5 Auswertung

### 5.1 Teilversuch 1: Force-Extension

1. Berechnen Sie für jeden Messpunkt zunächst die Kraft. Plotten Sie dann die Kraft gegen die Z-Motorposition und fitten Sie die Daten mit einer Exponentialfunktion. Benutzen Sie diese Funktion um für die nachfolgenden Messreihen die Kraft abzuschätzen.
2. Plotten Sie nun die Kraft gegen die Z-Ausdehnung der DNA. Fitten Sie die Force-Extension Formeln des FJC und WLC an diese Daten. Bestimmen Sie für das FJC die Länge  $b$ . Über wie viele Basenpaare kann die DNA als steif angenommen werden? Bestimmen Sie weiter aus dem WLC die Persistenzlänge der DNA. Welches Modell beschreibt das Verhalten der DNA besser?

### 5.2 Teilversuch 2: Drehmodul der DNA

Plotten Sie für die verschiedenen Kräfte die Auslenkung der DNA gegen die Anzahl der Verdrehungen. Bestimmen Sie aus der Steigung des Graphen im linearen Bereich die Größe einer Schlaufe. Berechnen Sie daraus einen weiteren Wert für die Persistenzlänge und vergleichen Sie diesen mit dem Ergebnis aus Teilversuch 1. Bestimmen Sie aus ihren Daten  $n_b$  und  $\Gamma_b$  für die verschiedenen Kräfte und plotten Sie diese gegeneinander. Berechnen Sie hieraus das Torsionsmodul der DNA. Begründen Sie die Unterschiede der Graphen bei großen, bzw. kleinen Kräften.