

Magnetic Tweezers

- Micromanipulation and Force Measurement at the molecular Level

Gosse und Croquette
(Juni 2002)

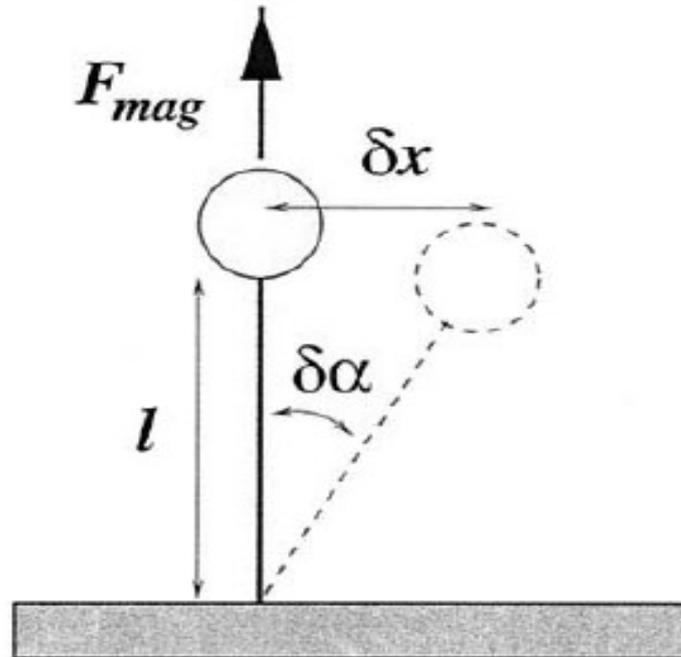


FIGURE 5 Principle of force measurement. The vertical magnetic force F_{mag} applied to the bead stretches the DNA molecule. The transverse Brownian fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$ of this inverted pendulum are then used to evaluate its rigidity F_{mag}/l and thus the pulling force F_{mag} .

Marvin Freitag

Gliederung

- * Einführung in die Technik
- * Experimentelle Methoden
- * Ergebnisse und Diskussion
- * Fazit
- * Quellen

Einführung in die Technik

- -Wie funktioniert die Technik?
- -Was sind die physikalischen Grundlagen der Methode?
- -Warum ist die Methode nützlich?
- -Was ist die Motivation für die jeweilige Forschungsarbeit?

Wie funktioniert die Technik?

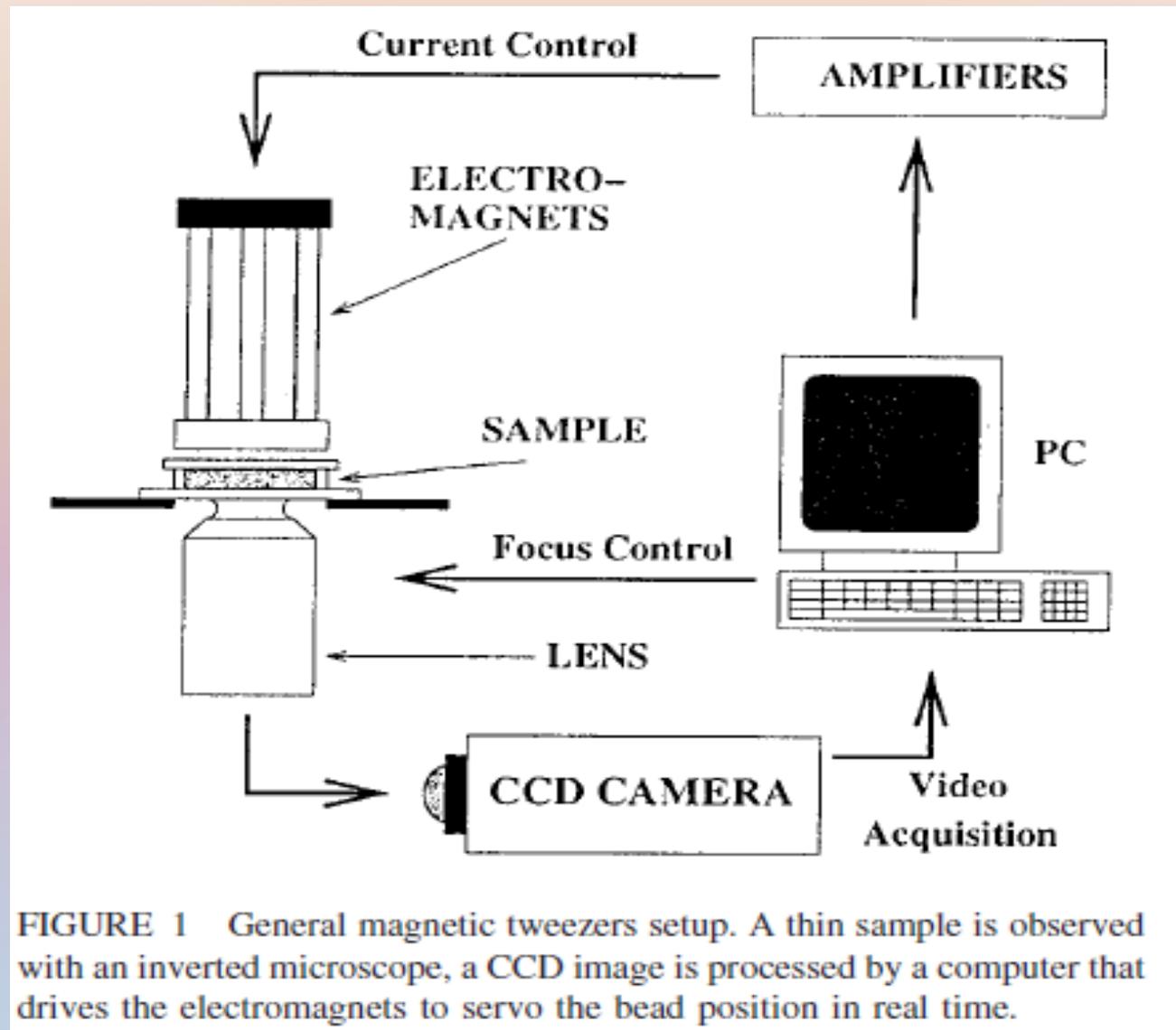


FIGURE 1 General magnetic tweezers setup. A thin sample is observed with an inverted microscope, a CCD image is processed by a computer that drives the electromagnets to servo the bead position in real time.

Wie funktioniert die Technik?

- 2 mm Blende
- 300 μm Probe
- In XYZ beweglichen Tisch
 - nm Genauigkeit – Kontrolle durch Computer
- Feedback Loop
- 6-fach symmetrisch angeordnete Elektromagnete
 - Rotation des B-Feldes

Wie funktioniert die Technik?

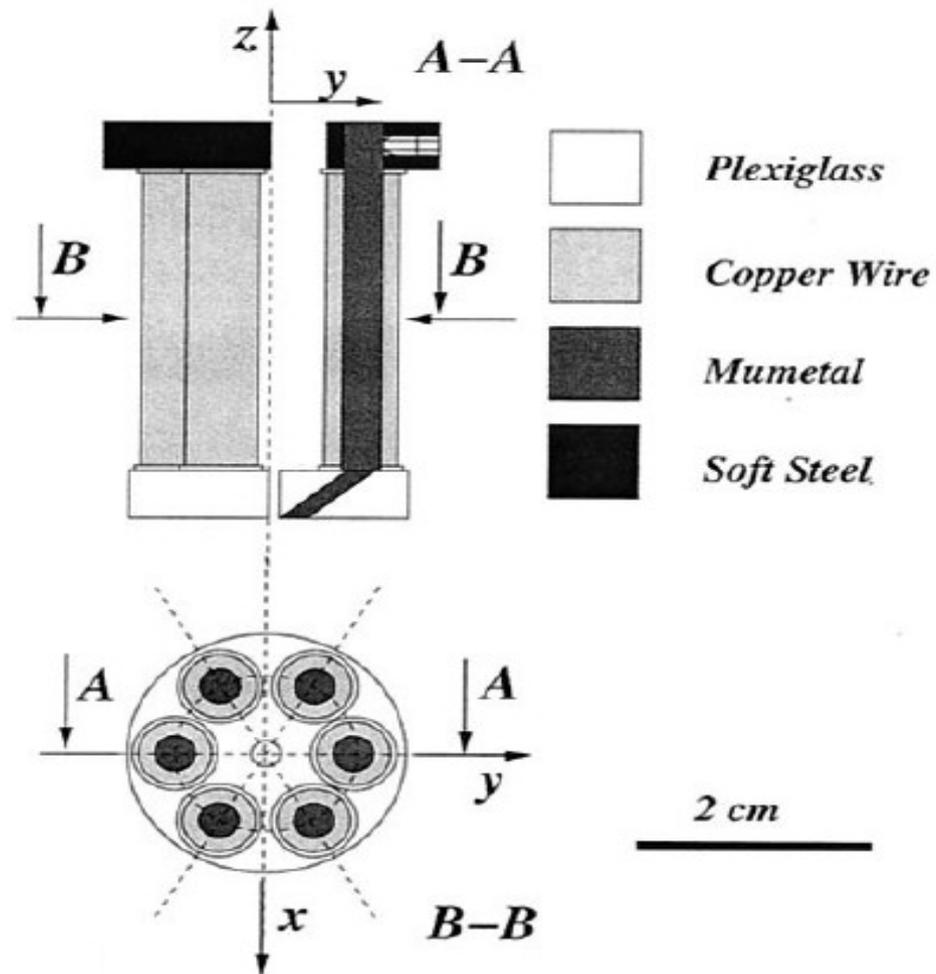


FIGURE 2 Detailed mechanical setup of the electromagnets. The six coils are placed in a hexagonal geometry, the magnetic field gradients occur between the tips of the mumetal pole pieces. With this configuration, the magnitude and direction of the force acting on the bead can be altered by modulating the driving currents in the coils.

Wie funktioniert die Technik?

- **Kräfte** können bestimmt werden:
 - Beobachtung der Brown'schen Fluktuationen
 - Aufzeichnung des Spulenstroms
 - Kalibrierung gegen Reibungswiderstand
 - Bereich von Zehntel pN bis Zehntel fN
- Keine Permanentmagneten (Strick 98)
 - EM ermöglichen schnellere Kontrolle
→ Tweezers Mode

Wie funktioniert die Technik?

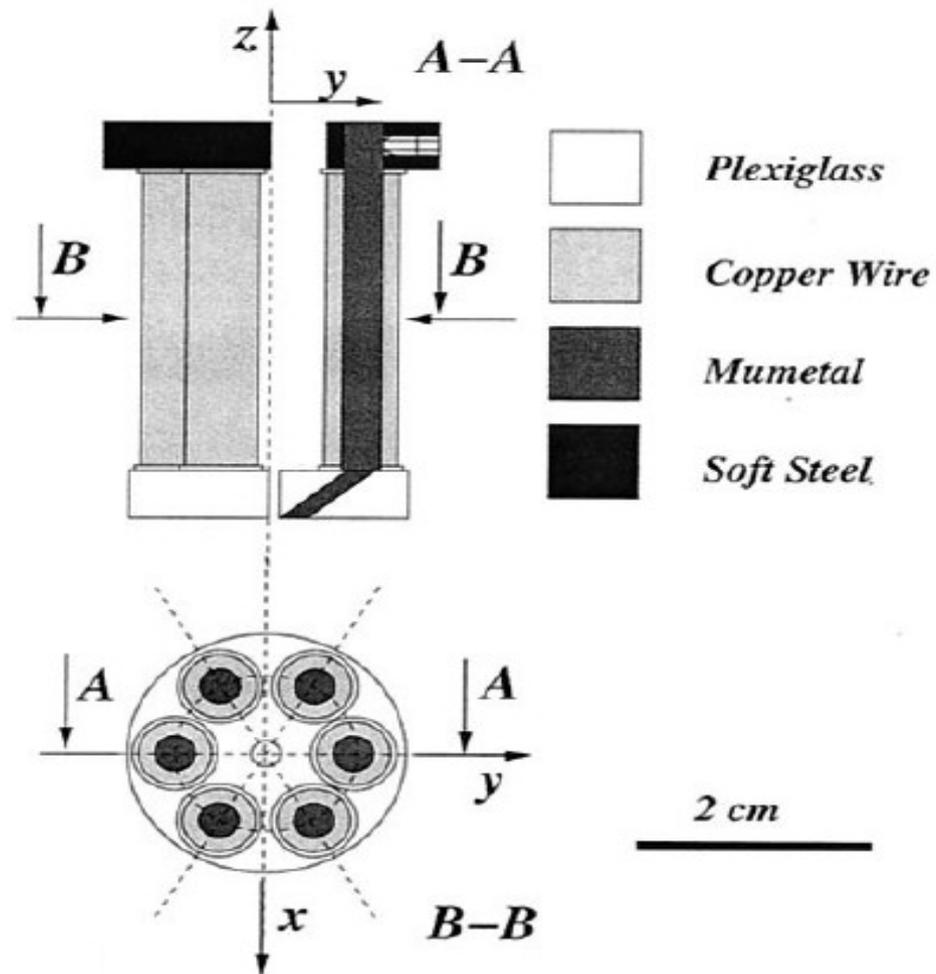


FIGURE 2 Detailed mechanical setup of the electromagnets. The six coils are placed in a hexagonal geometry, the magnetic field gradients occur between the tips of the mumetal pole pieces. With this configuration, the magnitude and direction of the force acting on the bead can be altered by modulating the driving currents in the coils.

Bestandteile der EM

- Kern besteht aus Weichstahl (XC15)
 - Schließt Feldlinien im System
→ erhöht die Magnitude
- Pole Pieces bestehen aus Mumetall (Eisen-Nickel)
 - geringe Remanenz (20 Gauß)
 - Zurückbleibende Magnetisierung
 - Hohe Permiabilität ($\mu_r = 50.000-140.000$)
 - Abschirmung
- Plexiglas dient zur Befestigung

Bestandteile der EM

- Spule aus Kupferdraht ($R = 10 \pm 0,2 \text{ Ohm}$)
 - Symmetrische Anordnung ermöglicht Rotation
 - Keine Anordnung entlang opt. Achse möglich
- Anlegung von Kräften in „fast“ 3D
 - Absinken nur durch Gravitation möglich
- Keine Magn. Hysterese durch Abklingkomponenten
- Erweiterbar durch Hall-Sonden
 - Ermöglichen Strom-Feedback in Pole Pieces
- Wirken auf super-paramagnetische Beads
 - Kleine, remanenzfreie ferromagn. Teilchen

Feedback Loop (FBL)

- dt: „Rückkopplung“ und „Schleife“
 - Kontrolle der Position des Bead in 3D
 - Vergleich mit aktueller und gemessener Position
 - Wie dies funktioniert folgt!
-
- Damit ist ein grobe Überblick in die Funktionsweise gewährleistet

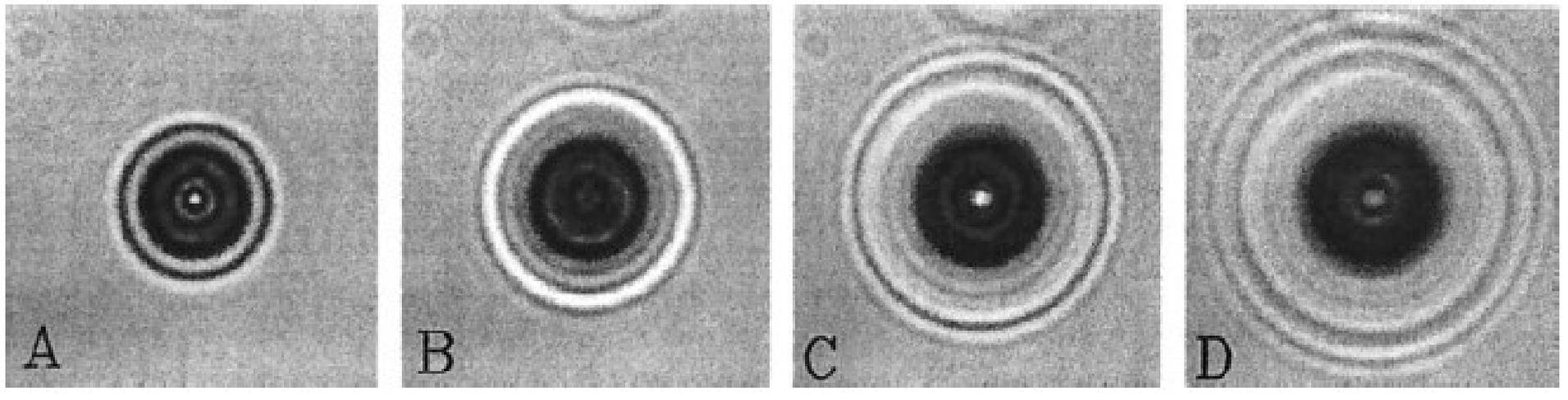
Einführung in die Technik

- - Wie funktioniert die Technik?
- - Was sind die physikalischen Grundlagen der Methode?
- - Warum ist die Methode nützlich?
 - Einfachheit des Aufbaus und der Kraftmessung
- - Was ist die Motivation für die jeweilige Forschungsarbeit?
 - Bessere Messapparatur zu erschaffen, die in vivo arbeitet ohne Schädigungen

Was sind die physikalischen Grundlagen der Methode?

- **Kräfte:** Magnet, Gewicht, Langevin:
 - Stochastische Kraft verursacht Fluktuationen
- Ströme in den Spulen ($B \sim I$)
- Mikromanipulation des Biopolymers
- Beugung
- Spezielle Bewegungsgleichung
 - Reibungswiderstand bei kl. Reynoldszahlen

Beugung



„Image of a magnetic bead $4,5 \mu\text{m}$ in diameter observed at various positions of the microscope focus plane

(A) $z = 1 \mu\text{m}$, (B) $z = 3 \mu\text{m}$, (C) $z = 5 \mu\text{m}$, (D) $z = 7 \mu\text{m}$.“

Beugung

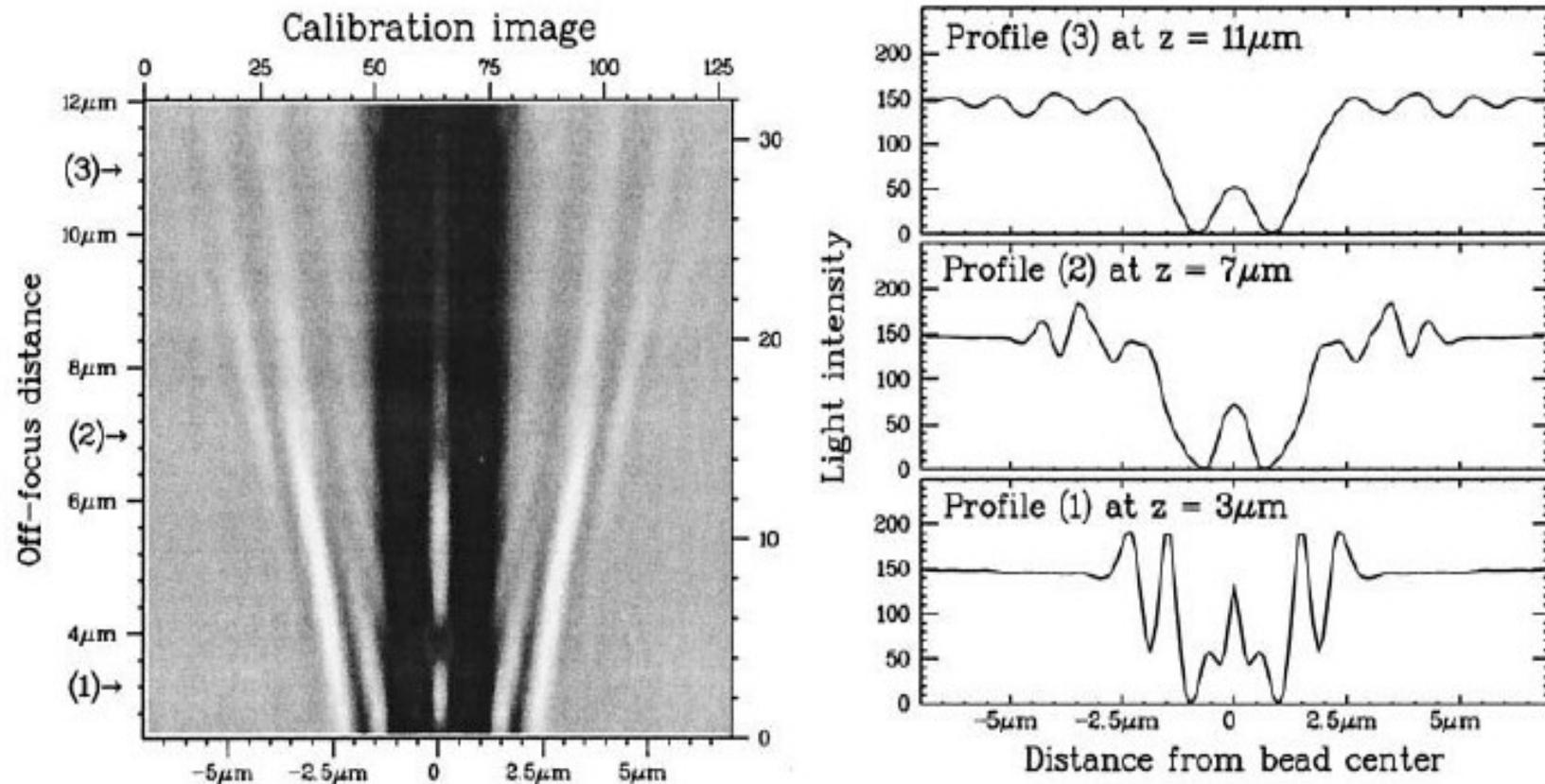


FIGURE 16 *Left.* Calibration image of a 4.5- μm bead laying on the glass surface. Each line is obtained by measuring the radial profile of the object at a given z position of the microscope objective. *Right.* Intensity profile corresponding to 3, 7, and 11 μm .

Experimentelle Methoden

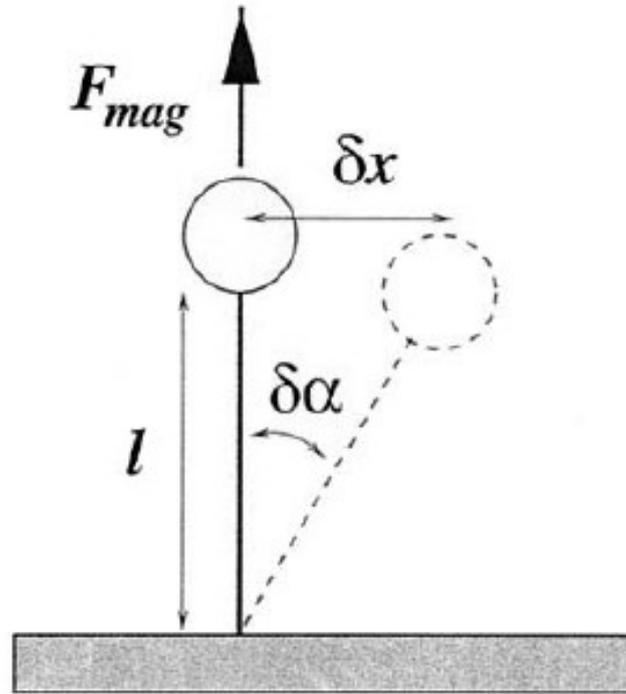
- -Was wurde gemessen?
 - 3D Tracking der Partikelposition und der Fluktuationen
 - Spulenstrom
- -Wie wurden Proben vorbereitet?
- -Wie wurden die Messdaten verarbeitet oder analysiert?

(Passive Tweezer)

Wie wurden Proben vorbereitet?

- Bead wird festgehalten und an DNA angehängen
 - Mit 2 verschiedenen DNA (16 μ m und 5 μ m lang)
- Ein Ende mit Biotin, eins mit Digoxigenin gelabelt
- Anhaftung von, mit Streptavidin beschichteten, super-paramagn. Beads ($d = 4,5\mu$ m) am Biotin-Ende
- Injektion dieser Beads/DNA in Lösung auf mit Antidigoxigenin beschichteten Glasoberflächen

Schema einer behandelten Probe



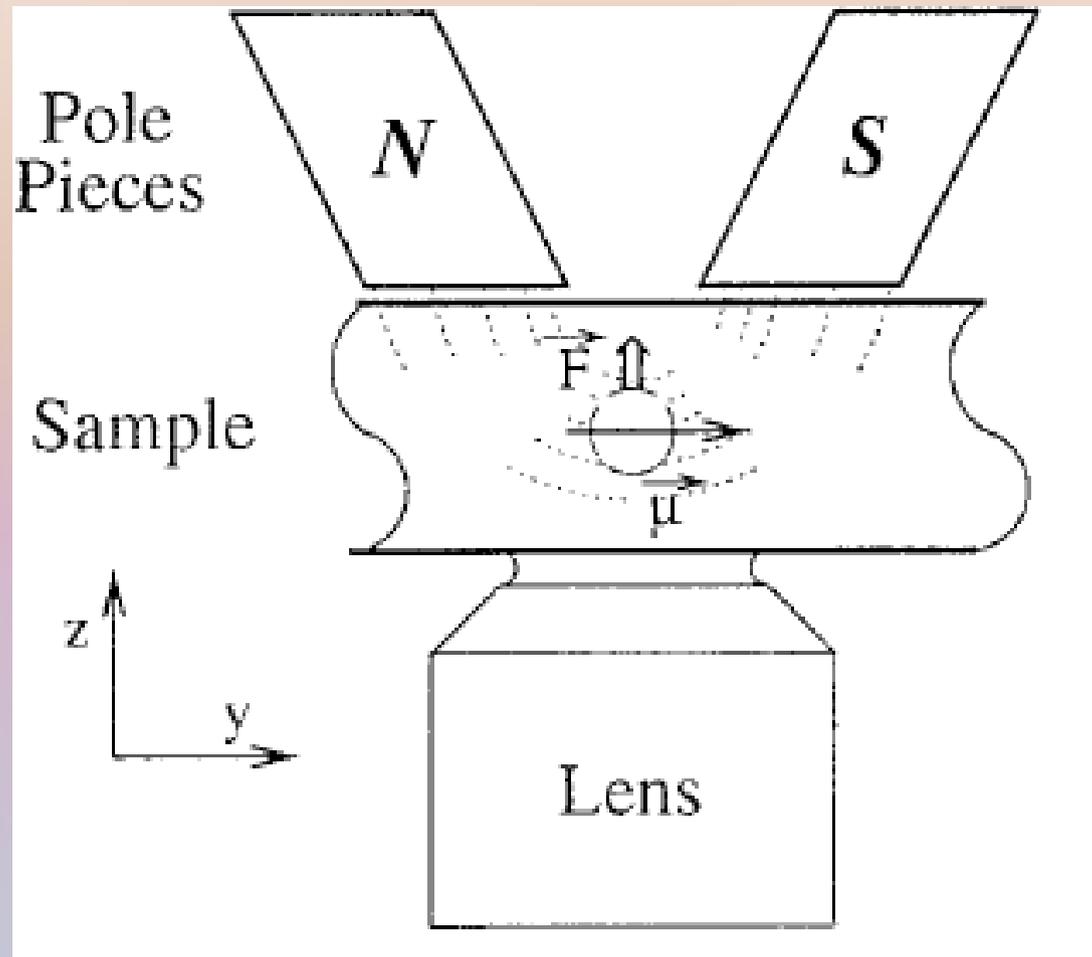
$$k_B T / l \langle \delta x^2 \rangle$$

FIGURE 5 Principle of force measurement. The vertical magnetic force F_{mag} applied to the bead stretches the DNA molecule. The transverse Brownian fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$ of this inverted pendulum are then used to evaluate its rigidity F_{mag}/l and thus the pulling force F_{mag} .

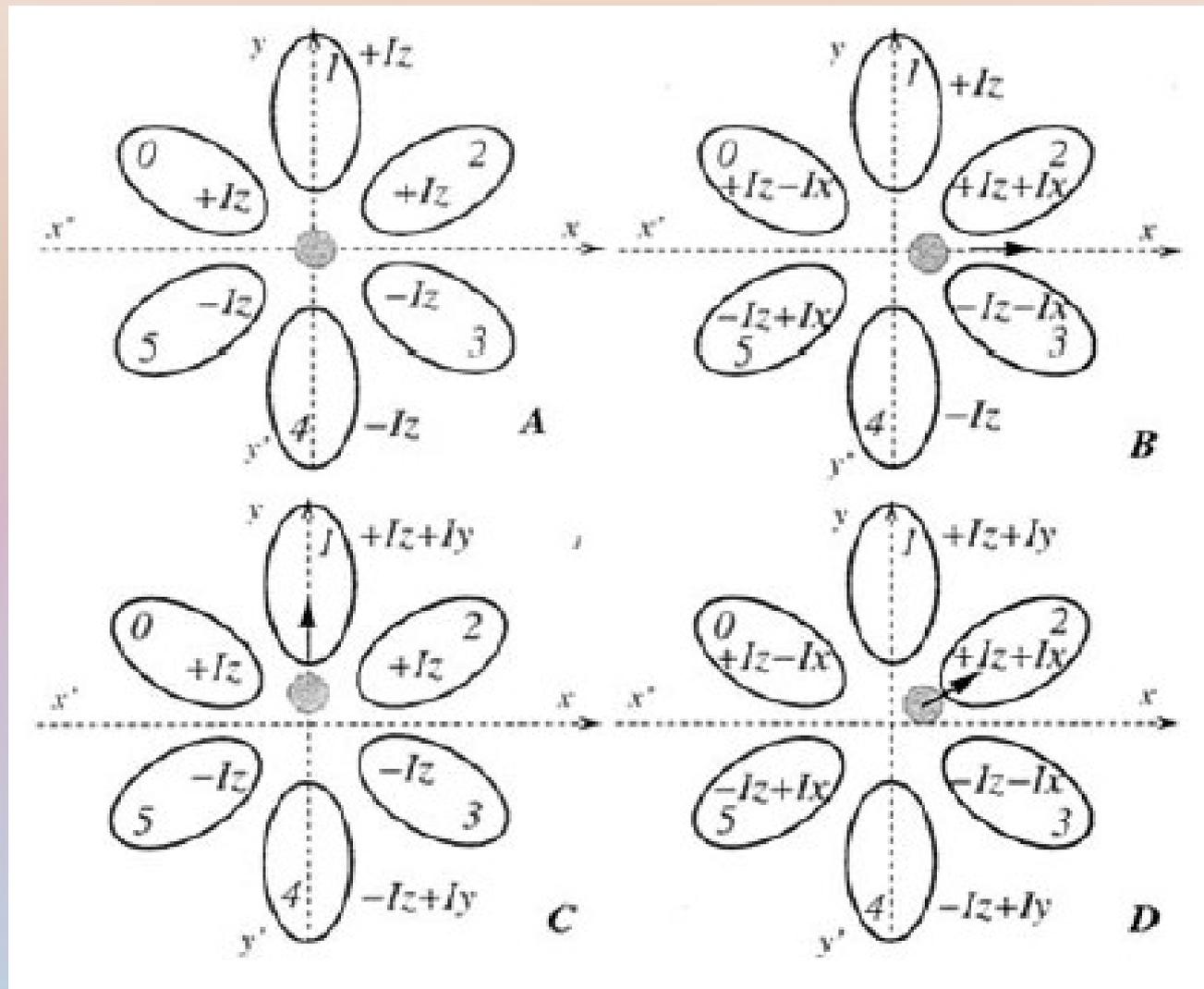
Experimentelle Methoden

- **-Was wurde gemessen?**
 - 3D Tracking der Partikelposition und der Fluktuationen
 - Spulenstrom
- **-Wie wurden Proben vorbereitet?**
- **-Wie wurden die Messdaten verarbeitet oder analysiert?**

Elektromagnetismus



EM Konfigurationen



Experimentelle Methoden

- -Was wurde gemessen?
 - 3D Tracking der Partikelposition und der Fluktuationen
 - Spulenstrom
- -Wie wurden Proben vorbereitet?
- **-Wie wurden die Messdaten verarbeitet oder analysiert?**

Videoaufnahme & Datenverarbeitung

- 100 x ölimmersionsoobjektiv
 - (invertiertes Mikroskop)
- CCD CAM (50Hz) am Computer

Apperatur

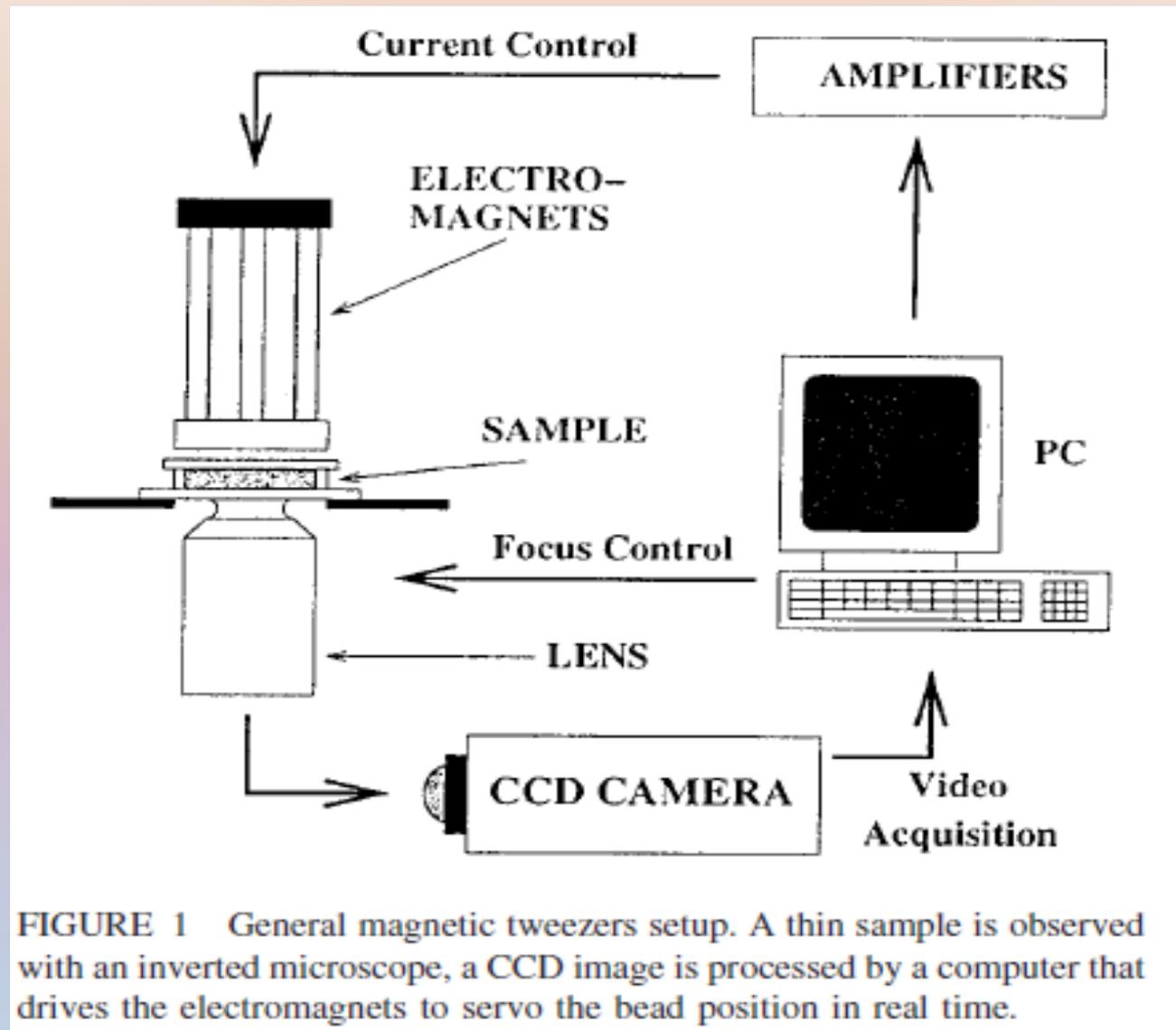


FIGURE 1 General magnetic tweezers setup. A thin sample is observed with an inverted microscope, a CCD image is processed by a computer that drives the electromagnets to servo the bead position in real time.

Videoaufnahme & Datenverarbeitung

- 100 x ölimmersionsoobjektiv
 - (invertiertes Mikroskop)
- CCD CAM (50Hz) am Computer
- 3D-Tracking in Realzeit durch Programm
 - 25 fps oder 50 fps (gerade/ungerade Bilder)
 - Sub-pixel Auflösung für Längere Zeiten (größerer Noise mit $1/f$ – Abhängigkeit)
- nm Genauigkeit in X,Y; 10nm in Z
 - Z-Messung durch Vergleich von Beugungsmuster

Positioning

- 128 x 128 Pixel² zentriert auf den Bead pro Bild
- Korrelationsfunktion um dx,dy zu bestimmen
 - Fast Fourier Transform Algorithmus
 - Polynomiale Interpolation
 - Sub-Pixel Auflösung
- Entlang Z: Vergleich von Beugungsbildern
 - Sind ab 10µm schwer erkennbar

Digital FBL

- Fängt das Partikel in gewünschter Position
- Seien $I_x, I_y \sim I_z$ gewählt $I_u = -I_z C_u$ with $C_u = [P_u \cdot u + K_u \sum (u)]$.
- U: Fehler zwischen gesetzter und aktuellen Position
 - $E(u) :=$ Summe der Fehler
 - Stabilisiert entgegen einer kontinuierlicher, konstanten Kraft: F_g
 - $P_u, K_u :=$ Prop. Bzw. Integr. Koeffizienten
 - $\rightarrow C_u$ norm. Korrektur Signal
- Z-Feedback möglich durch Aufzeichnung von I_z

Digital FBL

- Annahme einer virtuellen Feder ist zu einfach

$$F_u = -A_u I_z P_u \cdot u \quad \text{and} \quad k_u = A_u I_z P_u$$

$$F_u = -A_u I_z C_u$$

- In kl. Kraftbereichen ($F < 1 \text{ pN}$); Gravitation und Bead ist nicht magnetisch gesättigt: $F_z \sim (I_z)^2$

$$I_z = I_0 \sqrt{-(P_z \cdot z + K_z \sum(z))}$$

Taylor:



$$I_z = I_0 \left(1 - \frac{P_z \cdot z}{2} \right)$$

$$F_z = mg - A_z I_0^2 P_z \cdot z$$



$$k_z = A_z I_0^2 P_z$$

Kraftmessung entlang Z

- Bead verhält sich wie ein umgekehrtes Pendel in einem Wärmebad T
- Bestimmung der Dehnkraft der DNA aus den Brown'schen Fluktuationen nach (Strick, 96)
- Die Bead-Positions-Software bestimmt:
 - Extension l
 - Fluktuationen $\langle dx \rangle$
- $F_{\text{mag}} = \frac{k_B T}{\langle \delta x^2 \rangle}$ (Gleichverteilungssatz)

Elastizität der DNA

- Bei gleichen Spulenstrom; F, l und F, I – Diagramme
- Tweezers Kraftbereich: 50fN bis 20pN
 - 5 mal weniger als Allemand 1998 mit permanenten Magneten anlegte
- Elastizität mit dem worm-like-chain Model gefittet
- *Unsättigung ($<1\text{pN}$) / Sättigung (ab 20pN) bestätigt
 - Sättigung entspricht Ausrichtung aller Spins

Elastizität der DNA

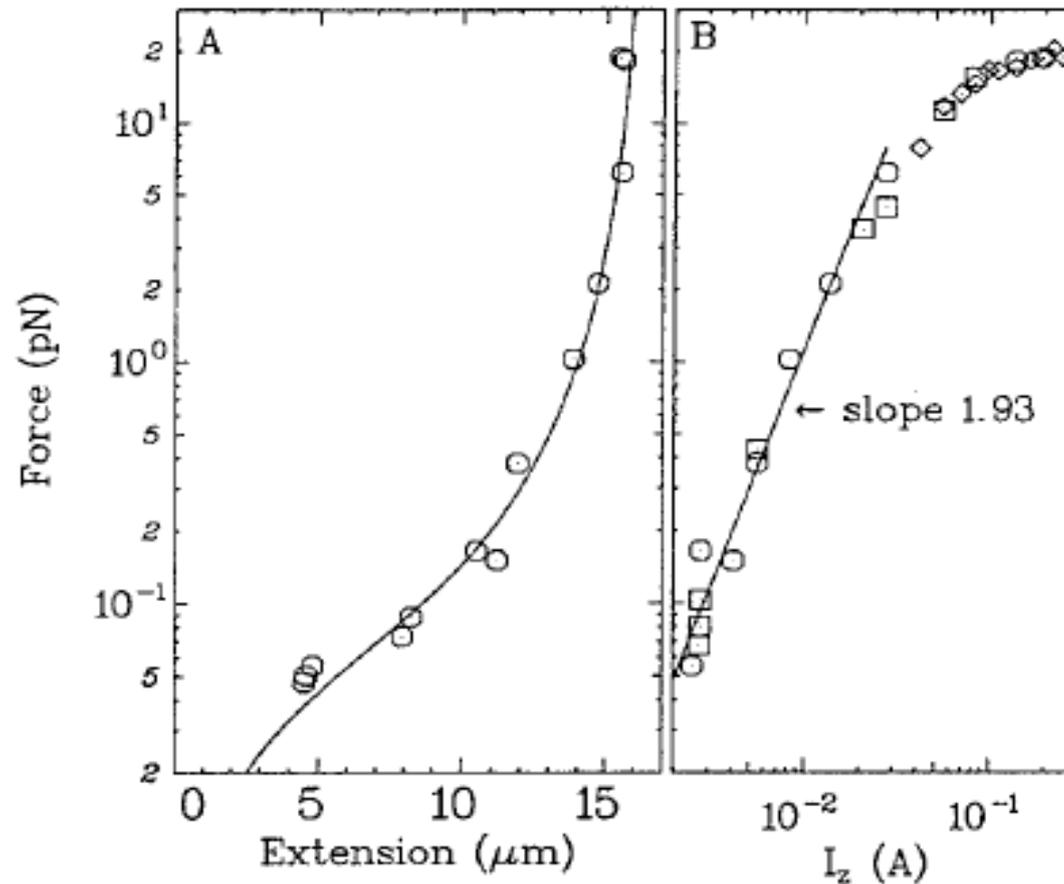
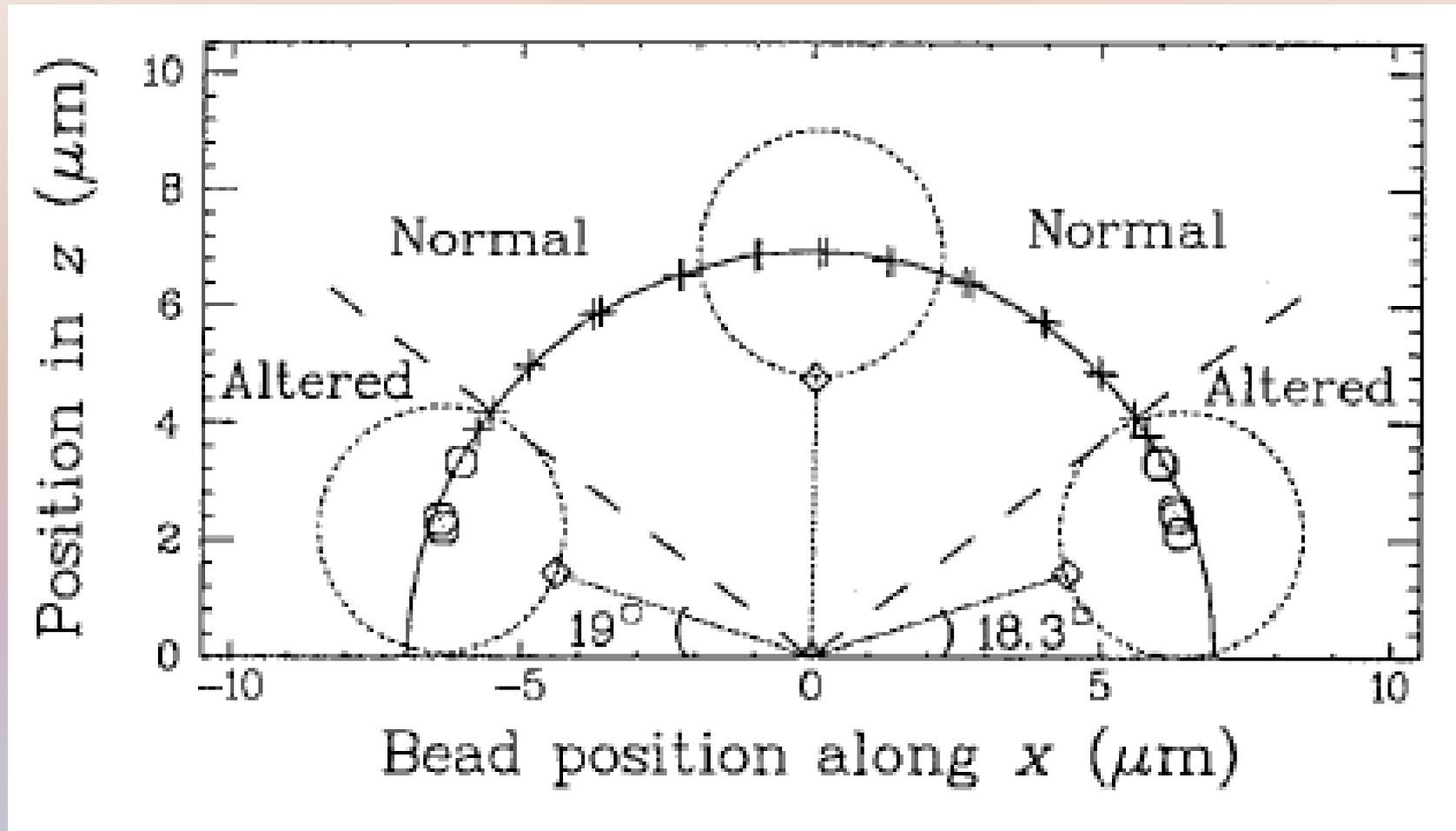


FIGURE 6 (A) Force versus extension curve measured for a $4.5\text{-}\mu\text{m}$ bead attached to a λ DNA molecule. The full line is a fit to the worm-like chain model with a persistence length of 50 nm. (B) The current I_z producing the corresponding vertical force F_z . Data were collected with different DNA molecules.

Modulation der Krafrichtung

- Partikel wird nun bei gleichbleibender Kraft (etwa 5pN) in willkürliche Richtungen gezogen
 - Die Länge der dsDNA kann variieren (ab 1pN)
 - Beadgewicht ($F < 1\text{pN}$) ist vernachlässigbar
- Der X-Winkel ist sehr groß (70° in jede Richtung)
 - (In Y-Richtung nur 50° in jede Richtung)
- *DNA horizontal zu ziehen, dient zur Visualisierung von enzymatische Bewegung entlang Polymeren

Modulation der Krafrichtung



Ideale Tweezers

(Model für Aktive Tweezers)

- Ideale Tweezers sollten Mikromanipulation zulassen und die 3 Kraftkomponenten messen
- Kalibrierung einfach erreicht werden durch aufzeichnung der partikel Fluktuationen
- Einfaches Tweezer Model: 2 Parameter
 - Falleneelastizität k_u (low freq.)
 - Reibungswiderstand G_{nr} (high freq.)
 - → 2 Anwendung: Viskositäts- und Kraftmesser
- Bestimmung im Fourierraum

Ideale Tweezers

- Durch Delay des FBL zerfällt das einfache Model
 - (Analyse ist der von optischen Fallen ähnlich)
- Bead gefangen im virtuellen 1D-Potentialtopf
- Bewegungsgleichung:
Überdämpfung (kl. Reynoldszahl)
- Fl: Langevin'sche Kraft (entspricht Fluktuationen)

$$\Gamma \eta r \frac{du}{dt} + k_u u = F_L,$$

- Im FR weißes Rauschen: $|F_L(f)|^2 = 4k_B T \Gamma \eta r.$

- Fluktuationsdichte:

$$|u(f)|^2 = \frac{4k_B T \Gamma \eta r}{|k_u + i\Gamma \eta r 2\pi f|^2} = 4k_B T \frac{\Gamma \eta r}{k_u^2} \frac{1}{1 + (ff_c)^2},$$

mit $f_c = k_u / (2\pi \Gamma \eta r).$

Herleitung der 3 Fit-Parameter

Delta:= $u_{n+1} = u_n - \alpha u_{n-\Delta} + L_n,$ $k_u u_{n-\Delta} = \Gamma \eta r \cdot \frac{\alpha u_{n-\Delta}}{\delta t},$
 Delay

$$\alpha = \frac{k_u \delta t}{\Gamma \eta r} = \frac{A_u I_z P_u \delta t}{\Gamma \eta r} = 2\pi f_c \delta t.$$

$$L_n = L_0 e^{2i\pi f n} \quad \text{with} \quad L_0^2 = \frac{4k_B T \delta t^2}{\Gamma \eta r} = 4D \delta t^2.$$

Fourier: $u_n = u(f) e^{i(2\pi f n + \phi)}$

$$|u(f)|^2 = \frac{L_0^2}{|e^{2i\pi f} - 1 + \alpha e^{-2i\pi f \Delta}|^2}.$$

$$u_{n+1} = u_n - \alpha \left[u_{n-\Delta} + \beta \sum_{-\infty}^{n-\Delta} u_i \right] + L_n,$$

$$|u(f)|^2 = \frac{L_0^2}{\left| e^{2i\pi f} - 1 + \alpha e^{-2i\pi f \Delta} \left[1 - \frac{i\beta e^{i\pi f}}{2 \sin(\pi f)} \right] \right|^2}.$$

Korrekturfunktion:
für endliche CAMs

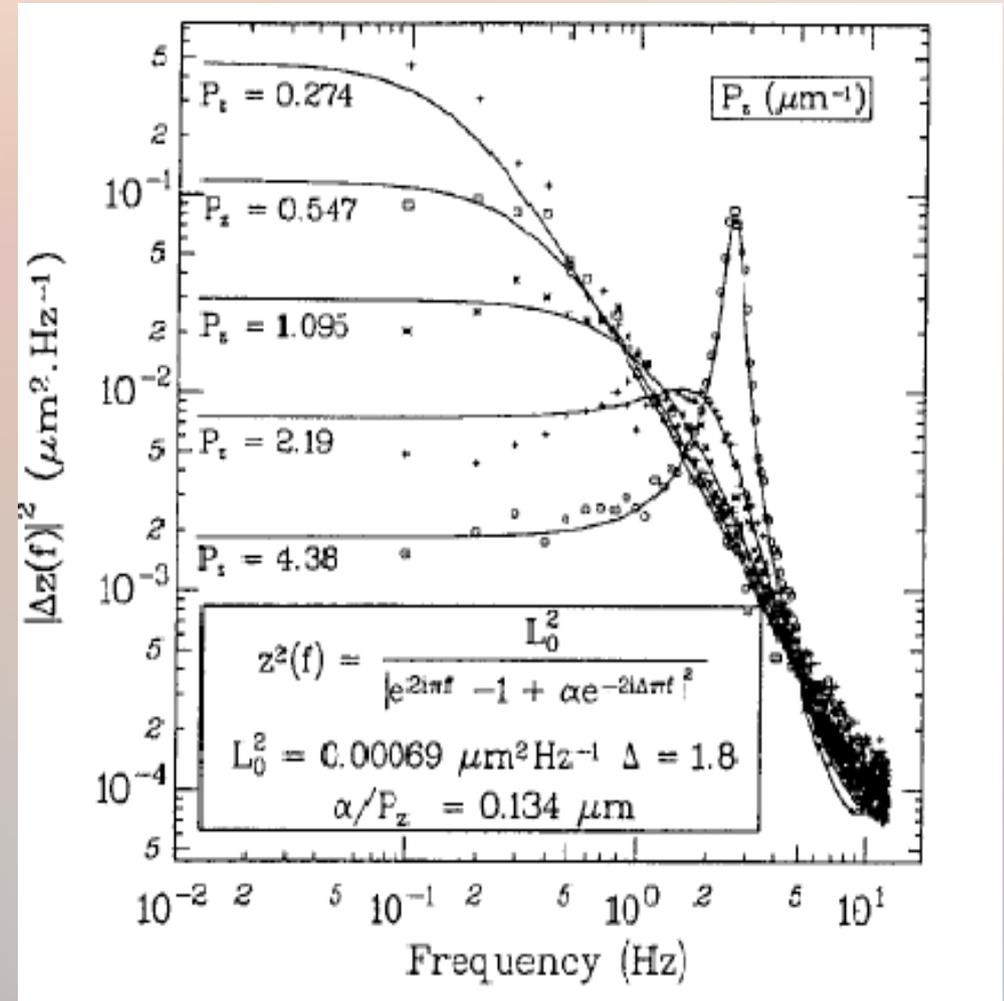
$$C_{r_0}(f) = \frac{\sin(\pi \delta t_i (f/f_s)) \cos(\pi f/f_s)}{(\pi \delta t_i (f/f_s)) 4\pi (f/f_s)^2}$$

Lorentz-Kurve (anschauliche Behandlung)

- Antwort auf eine am Bead befestigt Feder, die im viskosen Medium eingetaucht ist und durch den white noise ausgelenkt.

$$V_u^2(f \gg f_c) = \frac{4k_B T}{\Gamma \eta r} = 4D.$$

→ Viskosimeter für kl. Steifigkeiten ku



Tweezers Mode: Kraftmessung

- Apparat als Kraftmesser (ku-Messung) kalibriert

$$k_u = \frac{k_B T}{\int_0^\infty df |u(f)|^2}$$

- Aufzeichnung der Fluktuationen mit einer unendlichen Frequenz (idealer Tweezer)
 - Begrenzungen: Bandbreite und Genauigkeit
- Bandbreite (auch f_c) begrenzt zwischen halber Abtastfreq. Und Inversen der Beobachtungszeit
- 655s gibt eine Genauigkeit von 6,5% (10^{-7} N/m)
 - 16.384 Bilder bei 25 Hz
 - Für große P_u gilt das einfache Model nicht mehr

Kalibrierung gegen Reibungswiderstand

- Oft für für opt. Tw genutzt
- Aber bei MTw benötigt man keine Bewegung, nur Software
- Anlegen einer Rechteck-Funktion auf I_u . Daraus folgt:
- Max. I_u bestimmt max. Geschwindigkeit V_u

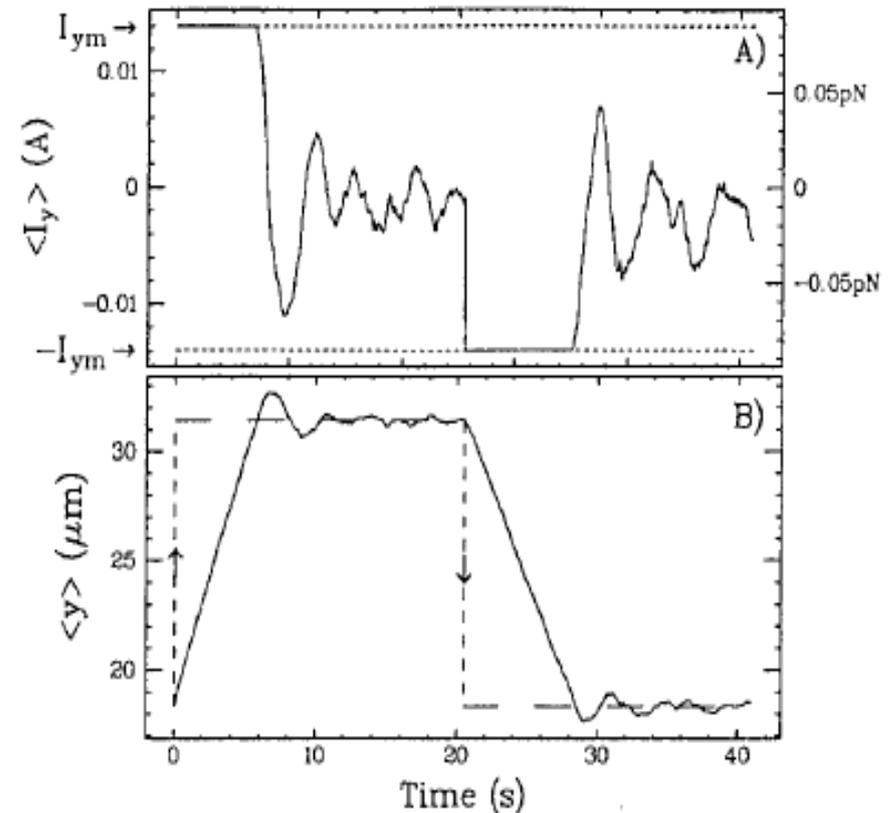


FIGURE 10 Procedure for tweezers calibration using Stokes' law. (A) Averaged coil-driving current producing the back and forth bead motion. (B) Corresponding averaged oscillations of the bead with constant moving velocity. The dash line corresponds to the imposed well position. When the calibration is achieved, the driving current may be converted in force as done on the right axis of panel A.

Kalibrierung gegen Reibungswiderstand

- Variation von max. I_u ermöglicht Kalibrierung
- (Gnr) kann durch optische Methoden oder wie zuvor bestimmt werden
- Kalibrierung entlang Z geht durch Variation von I_z
- Wegen Ungenauigkeiten kann man Bead verlieren

$$B_u = V_u / I_u$$

$$A_u = B_u \cdot \Gamma \eta r$$

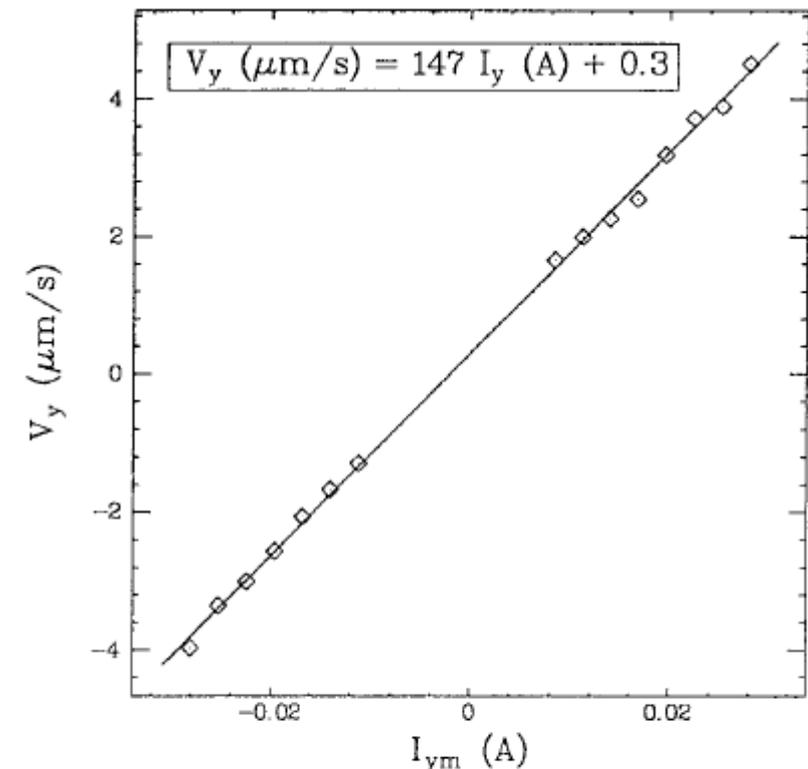


FIGURE 11 Calibration along y using Stokes' law. We have reported the bead velocity V_y versus I_{ym} , the maximum value allowed on the driving signal. Note that the linear behavior is even found for large modulation. Small driving currents are inaccessible because they prohibit normal operation of the feedback loop.

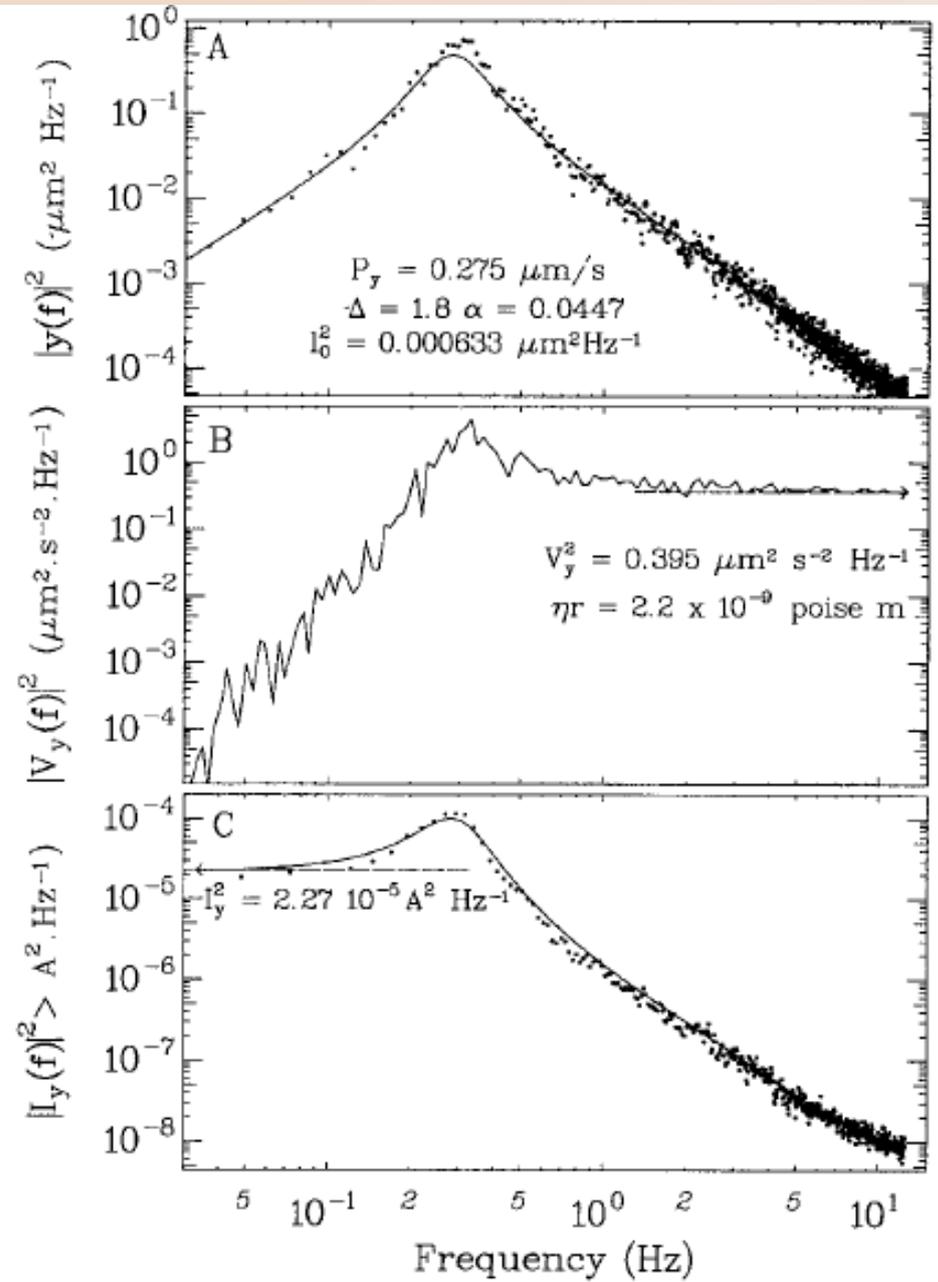
Kalibrierung mit Brown'schen Fluktuationen

- 2 neue Kalibrierung mit gefangenem Bead:
- 1. Asymptotisches \rightarrow Spektrum Analysieren
- 2. Kompletter Fit der FB Antwort \downarrow

$$\Gamma \eta r = \frac{4k_B T \delta t^2}{L_0^2} \quad \text{and} \quad k_u = \alpha \frac{4k_B T \delta t}{L_0^2}$$

$$A_u = \frac{4k_B T \alpha \delta t}{L_0^2 I_z P_u} \quad \text{and} \quad B_u = \frac{\alpha}{P_u \delta t I_z},$$

$$A_z = \frac{4k_B T \alpha \delta t}{L_0^2 I_0^2 P_z} \quad \text{and} \quad B_z = \frac{\alpha}{P_z \delta t I_0^2}.$$



Ergebnisse und Diskussion

- -Was wurde herausgefunden?
- -Wie vergleicht sich die Methode mit verwandten Methoden?

Vergleich der Kalibrierungen

TABLE 2 Calibration parameters obtained by the three different methods*

Calibration Parameter	Viscous Drag	Asymptotic Spectrum	Fitted Model	Units
A_x	—	9.45 ± 0.7	9.6 ± 0.25	pN/A
A_y	$6.1 \pm 0.2^\dagger$	5.49 ± 0.5	6.03 ± 0.2	pN/A
A_z	—	176 ± 10	200 ± 5	pN/A ²
B_x	—	227 ± 15	241 ± 5	$\mu\text{ms}^{-1}\text{A}^{-1}$
B_y	147 ± 3	132 ± 15	145 ± 3	$\mu\text{ms}^{-1}\text{A}^{-1}$
B_z	—	3900 ± 200	4560 ± 80	$\mu\text{ms}^{-1}\text{A}^{-2}$
k_x	—	7.28	7.4 ± 0.3	10^{-8} N/m
k_y	4.7	4.23	4.64 ± 0.2	10^{-8} N/m
k_z	—	15.1	17.2 ± 0.4	10^{-8} N/m
k_x/P_x	—	0.265	0.268	pN
k_y/P_y	0.1708	0.154	0.168	pN
k_z/P_z	—	0.138	0.157	pN
$\Gamma_x \eta r / 6\pi^\ddagger$	—	2.2 ± 0.06	2.12 ± 0.04	10^{-9} poise·m
$\Gamma_y \eta r / 6\pi^\S$	—	2.2 ± 0.06	2.12 ± 0.04	10^{-9} poise·m
$\Gamma_z \eta r / 6\pi$	—	2.39 ± 0.06	2.33 ± 0.04	10^{-9} poise·m

The parameters A_z and B_z cannot be compared to their horizontal equivalent due to the nonlinear behavior of the force with I_z . A more reliable parameter is given by k_u/P_n , which is expressed in pN and compares the tweezers maximum force for the mean current I_0 . Errors on fits were estimated by the boost-trap method.

*All the results were obtained with $\langle I_z \rangle = I_0 = 0.028$ A.

[†]Calculated using the $\Gamma \eta r$ measured from the bead fluctuations.

[‡]Obtained from the calibration procedure along the x axis.

[§]Obtained from the calibration procedure along the y axis.

$$\Gamma_{x,y} = 6\pi \left(1 + \frac{9r}{16d} \right) \quad \text{and} \quad \Gamma_z = 6\pi \left(1 + \frac{8d}{9r} \right),$$

Mikromanipulation/Translation

- Nur Gravitation kann Bead senken
- Bead ist gefangen im ganzen Kameraaufnahmefeld, nicht nur im Potentialtopf (wie bei optischen Fallen)
- Der MTw bringt den Bead wieder zurück bei Störung (durch z.B. Transit)

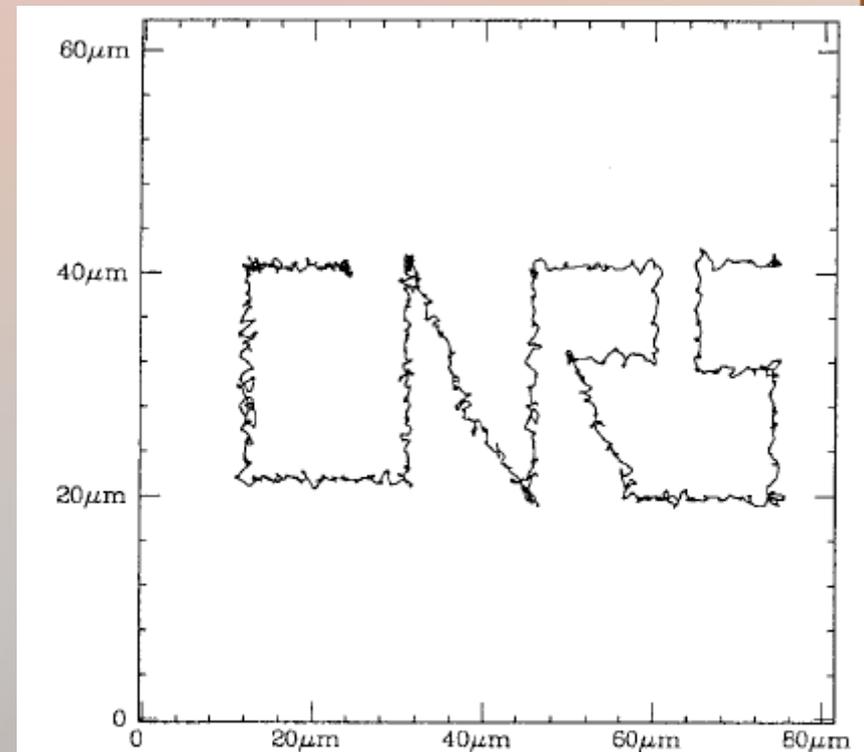


FIGURE 13 Control of the movement of a 4.5- μm bead in solution. The position of the particle is controlled by the computer keyboard. The maximum displacement velocity is $\sim 5\mu\text{m/s}$.

Micromanipulation/Rotation

- 3 Beads zu linearen Triplet mit dsDNA verbunden
- 6fache Symmetrie erlaubt Permutation der Spulenströme → Rotation
- Rotationsgeschw. von 10 Turns / s

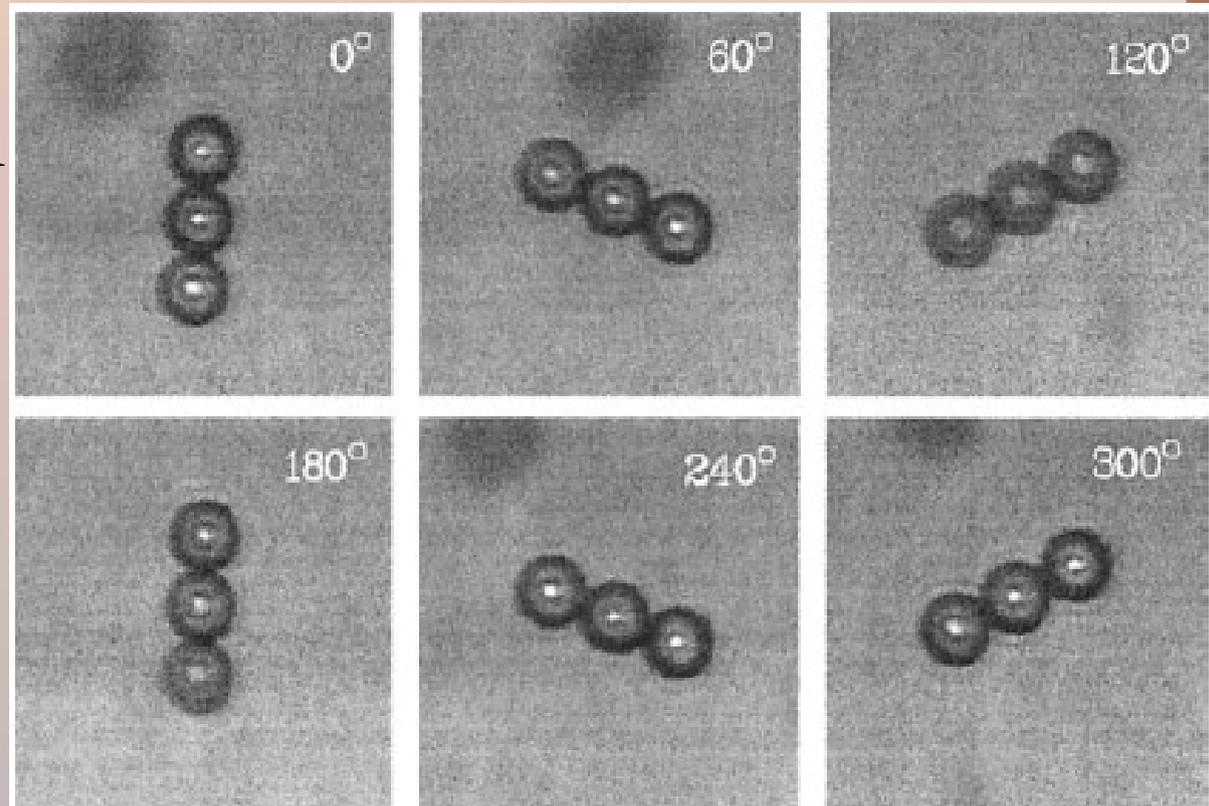


FIGURE 14 Counter-clockwise rotation of three aggregated beads linked to a surface by a double-stranded DNA molecule. This manipulation could also be done with a single locked particle, but we chose these images because of their higher visual impact.

Leistung

- Feedback mode begrenzt durch F_g (0,16pN)
→ Bestimmt Spulenantrieb I_0 (Schwebestrom)
- 0,27pN (8 $\mu\text{m/s}$) in X und 0,17pN (5 $\mu\text{m/s}$) in Y
- Anlegen von höhere Kräfte, nachdem Bead gebunden hat: bis 20pN in Z und 5pN in X und Y
- Fitparameter ist durch den Delay, Resonanz limitiert
- Leistung schlägt Kantilevers bzw. OptTw. Nicht
 - Einfacher Aufbau zur Veranschaulichung

Verbesserungen

- ABER: Grenzen sind rein technischer Natur:
High-Speed-Aufnahmen := Angstrom-Genauigkeit
- Hinzufügen von einem zweiten EM-Set unter Probe
- Steifigkeit gegenüber Opt.Tw. Verbessern
(10^{-7} und 10^{-5} N/m)
- Wegen kl. Zeitskala (~ 100 ms) der 25Hz – CAM
→ Einfache, unkomplizierte Kraftmessung
- Siehe Prof.-Vortrag von letzter Woche

Wie vergleicht sich die Methode mit verwandten Methoden?

Referenz: Optische Tweezers

- Werden unter Bewegung gegen Reibungswiderstand kalibriert
- Bead kann verloren gehen (nicht abreißen gemeint)
- Zu dem Zeitpunkt: Höhere Steifigkeiten aber keine Messung von so kleinen Kräften
- Magnetische Fallen sind biokompabile: kein Photodamage, kein Erhitzen

Fazit

- -Geben Sie eine kurze Zusammenfassung, beschreiben Sie wichtige Rückschlüsse.
- -Was sind die zukünftigen Anwendung dieser Arbeit?

Zukunftsmusik (Stand:2002)

Verfolgung einzelner Molekül-Motoren:

- Kinesin beschichtetes Bead zu Mikrotubuli gebracht (Feedback System)
- Tweezer auf passiv ($F=\text{const}$ / einige pN)
- Beobachtung der Bewegung mit nm Genauigkeit

- Rotationsexperimente und höhere Steifigkeiten
- DNA – Stretching, DNA Polymerase - und Topoisomerase Analysen sind nun reproduzierbar

SCHLUSStfolgerung

- MTw. Erfüllt alle Anforderungen der Micromanip. und pN – Kraftmessung von biologischen Proben
- Totale Bestimmung der Bead-Position
 - EM, 3D Tracking Software, FBL und Pot.topf
- Kräfte sind in 3D anlegbar und messbar
- Selbst-Kalibrierung oder gegen Reibungswiderstand
- Einfache Drehung der Probe (nicht mit Opt.Tw.)
Studien an supercoiled DNA, flagullären Motoren
- Arbeiten in vivo und ohne Schädigungen

Danke!
Für eure Aufmerksamkeit und
Hitzeresistenz :)



Quellen

- Croquette_BioPhysJ_2002.pdf
- en.wikipedia.org/wiki/Magnetic_tweezers
 - Diverse Begriffserklärungen
- Sackman: Einführung in die Biophysik

Danke!
Für eure Aufmerksamkeit und
Hitzeresistenz :)

