

MERJENJE BIOMOLEKULSKIH INTERAKCIJ Z OPTIČNO PINCETO

TILEN ŠALAMUN

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

Optična pinceta je zelo uporaben pripomoček za merjenje biomolekulskih interakcij, saj omogoča proučevanje posameznih molekul. Njeno delovanje temelji na močno fokusiranem laserskem snopu, s katerim lahko ujamemo in premikamo mikroskopske delce, omogoča pa nam tudi merjenje sil na ujetih delcih. V prvem delu članka je predstavljen fizikalni princip delovanja optične pincete, dejanska izvedba naprave ter kalibracija optične pasti, v nadaljevanju pa je predstavljena njena uporaba pri meritvah interakcij med biomolekulami.

MEASUREMENT OF BIOMOLECULAR INTERACTIONS WITH OPTICAL TWEEZERS

Optical tweezers are a very useful tool for measuring biomolecular interactions, as they enable the study of individual molecules. Their operation is based on a highly focused laser beam, which can be used to trap and manipulate microscopic particles, as well as measure forces acting on the trapped particles. The first part of the article presents the physical principles of optical tweezers, the actual implementation of the device, and the calibration of the optical trap, while the second part discusses their application in measuring interactions between biomolecules.

1. Uvod

Fotoni so delci z gibalno količino, kar pomeni, da tudi svetlobi lahko pripišemo gibalno količino. Ta se ji nato pri interakcijah z drugimi telesi spremeni (npr. pri sipanju, absorpciji ali odboju), zaradi njene ohranitve pa se gibalna količina prenese na telo. Na tak način lahko torej svetloba deluje na delce s silo [1]. Svetlobni tlak je bil znan že Keplerju, vendar pa je področje optičnih sil doživel razcvet šele z izumom laserja. Pred tem namreč ni bilo na voljo svetlobnih virov z dovolj visoko intenziteto, ki bi ustvarili znaten svetlobni tlak [2].

Optična pinceta v osnovi temelji prav na delovanju optičnih sil, ki ohranjajo delec v stabilnem ravnovesju na optični osi. Od njenega odkritja leta 1986, ko je Arthur Ashkin s sodelavci izdelal prvo optično past [3], je postala nepogrešljiv pripomoček za premikanje ujetih delcev, po čemer je naprava tudi dobila ime [2]. Njena prednost je tudi to, da nam preko merjenja odmikov, ki so posledica zunanjih sil, omogoča merjenje teh sil. Tipične vrednosti, ki jih lahko izmerimo s pomočjo optične pincete, so v območju pN, kar je ravno območje delovanja relevantnih sil v biofiziki in biokemiji [4].

2. Fizikalno ozadje delovanja optične pincete

Kljub razmahu na eksperimentalnem področju, je razvoj natančnih teoretičnih modelov za opis delovanja optične pincete nekoliko počasnejši in v veliki meri sloni na približkih. Ti so odvisni od velikosti ujetega delca v primerjavi z valovno dolžino svetlobe. Če je velikost delca veliko manjša od valovne dolžine vpadnega valovanja, se nahajamo v Rayleighovem režimu in delec lahko obravnavamo kot induciran električni dipol v električnem polju. Sili, ki deluje na delec v optični pasti v tem režimu, pravimo gradientna sila, saj je sorazmerna gradientu intenzitete vpadne svetlobe. V primeru, da je velikost delca znatno večja od valovne dolžine vpadnega valovanja, pa obravnavamo delec v približku geometrijske optike. Sila je v tem režimu sorazmerna z intenziteto svetlobe [5].

Izračun sile za poljubno velikost delca je bolj zapleten, velik vpliv na dinamiko delca v optični pinceti pa imata tudi oblika in sestava delca, kar še dodatno oteži problem [5]. Predstavljeni teoretični modeli se sicer nanašajo na statične primere, torej ko optična past miruje, vendar pa veljajo tudi takrat, ko optično pinceto dovolj počasi premikamo [6]. V nadaljevanju si bomo podrobneje ogledali oba režima.

2.1 Rayleighov režim

Za Rayleighov režim velja, da je velikost ujetega delca veliko manjša od valovne dolžine vpadne laserske svetlobe. V tem primeru lahko delec obravnavamo kot induciran točkasti dipol $\vec{p}_e$ v električnem polju $\vec{E}$ [7]. Na naboj e v elektromagnetnem polju deluje Lorentzova sila

$$\vec{F} = e \left(\vec{E}(\vec{r}) + \frac{d\vec{r}}{dt} \times \vec{B}(\vec{r}) \right). \quad (1)$$

Sila na dipol je zato

$$\vec{F} = \vec{F}_1 + \vec{F}_2 = e \left(\vec{E}(\vec{r}_1) - \vec{E}(\vec{r}_2) + \frac{d(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)}{dt} \times \vec{B} \right). \quad (2)$$

Pri tem smo upoštevali, da je $\vec{B} = \vec{B}(\vec{r}_1) = \vec{B}(\vec{r}_2)$, saj za svetlobo velja $\vec{E} \perp \vec{B}$ in je posledično $\vec{p}_e \perp \vec{B}$. Električni dipolni moment je definiran kot $\vec{p}_e = e(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)$. Za točkasti dipol velja $|\vec{r}_1 - \vec{r}_2| \ll \lambda$, zato lahko električno polje v okolici dipola razvijemo v Taylorjevo vrsto

$$\vec{E}(\vec{r}_1) = \vec{E}(\vec{r}_2) + ((\vec{r}_1 - \vec{r}_2) \cdot \nabla) \vec{E} + \dots \quad (3)$$

Iz enačbe (2) tako sledi

$$\vec{F} = e \left(((\vec{r}_1 - \vec{r}_2) \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{d(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)}{dt} \times \vec{B} \right) = \left((\vec{p}_e \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{d\vec{p}_e}{dt} \times \vec{B} \right). \quad (4)$$

V naslednjem koraku upoštevamo, da je obravnavani dipol induciran. Predpostavimo, da je odziv delca na električno polje linearen, torej $\vec{p}_e = \alpha \vec{E}$. Pri tem je α polarizabilnost delca, ki je podana kot [6]

$$\alpha = 3V\epsilon_0 \frac{n_d^2 - n_o^2}{n_d^2 + 2n_o^2}, \quad (5)$$

kjer je V prostornina delca, n_d lomni količnik delca in n_o lomni količnik okolice. Izraz za električni dipol vstavimo v enačbo (4) in dobimo

$$\vec{F} = \alpha \left((\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{d\vec{E}}{dt} \times \vec{B} \right). \quad (6)$$

Na prvem členu uporabimo vektorsko zvezo $(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} = \frac{1}{2} \nabla E^2 - \vec{E} \times (\nabla \times \vec{E})$ in silo izrazimo kot

$$\vec{F} = \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla E^2 - \vec{E} \times (\nabla \times \vec{E}) + \frac{d\vec{E}}{dt} \times \vec{B} \right) = \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla E^2 + \vec{E} \times \frac{d\vec{B}}{dt} + \frac{d\vec{E}}{dt} \times \vec{B} \right). \quad (7)$$

Pri tem smo v zadnji enakosti upoštevali Maxwelllovo enačbo $\nabla \times \vec{E} = -\frac{d\vec{B}}{dt}$. Izraz (7) poenostavimo in v drugem členu prepoznamo Poyntingov vektor $\vec{P} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \times \vec{B}$

$$\vec{F} = \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla E^2 + \frac{d}{dt} (\vec{E} \times \vec{B}) \right) = \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla E^2 + \mu_0 \frac{d\vec{P}}{dt} \right). \quad (8)$$

Ker se energijski tok vpadne laserske svetlobe s časom ne spreminja, je drugi člen enak 0 in končni rezultat je tako

$$\vec{F} = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2. \quad (9)$$

Sila kaže v smeri gradienta kvadrata velikosti električnega polja, zato ji pravimo gradientna sila. Ker je sorazmerna gradientu intenzitete vpadne svetlobe, je za delovanje optične pincete potreben močno fokusiran snop [2].

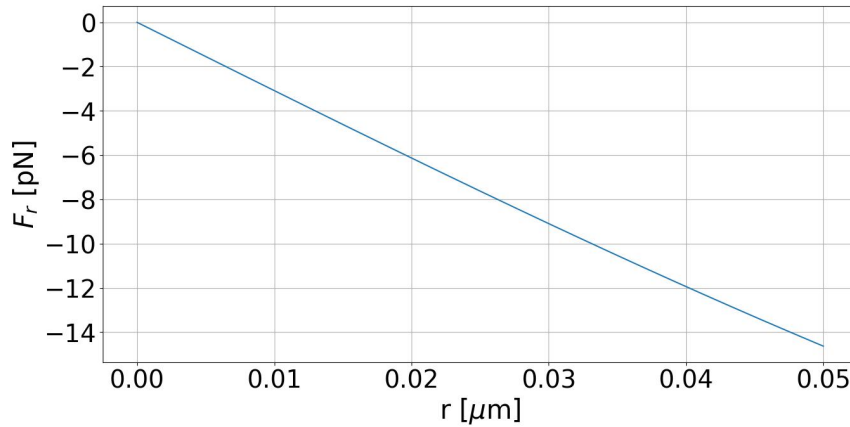
Z optično pastjo želimo ohranjati delec v stabilnem ravnovesju v grlu laserskega snopa, za kar potrebujemo ustrezen snop. V ta namen se zato pogosto uporablja Gaussovski laserski snop [6]. Velikost jakosti električnega polja je v cilindričnih koordinatah torej

$$E(r, z) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} e^{-\frac{r^2}{w^2(z)}}, \quad (10)$$

kjer je $w(z)$ polmer snopa, z komponenta v smeri optične osi, r pa oddaljenost od optične osi. Polmer snopa se vzdolž optične osi spreminja, v ravnini $z = 0$ pa ima vrednost w_0 . Poglejmo si radialno komponento gradientne sile:

$$F_r = \frac{1}{2} \alpha \frac{\partial}{\partial r} E^2(r, z) = \frac{1}{2} \alpha E_0^2 \frac{w_0^2}{w^2(z)} e^{-\frac{2r^2}{w^2(z)}} \left(-\frac{4r}{w^2(z)} \right). \quad (11)$$

Graf sile je za relevantno območje (kjer je delec v celoti znotraj laserskega snopa) prikazan na sliki 1.



Slika 1. Graf radialne komponente gradientne sile v odvisnosti od oddaljenosti od optične osi pri vrednostih, ki so tipične za optično pinceto: $z = 0$; $w_0 = 0,3 \mu\text{m}$; polmer delca $R = 0,25 \mu\text{m}$; $n_d = 1,59$; $n_o = 1,33$; $E_0 = 8 \cdot 10^6 \text{ V/m}$.

Zanimajo nas majhni odmiki v radialni smeri $r \ll w(z)$, zato lahko eksponentno funkcijo v izrazu (11) razvijemo v Taylorjevo vrsto $e^{-\frac{2r^2}{w^2(z)}} = 1 - \frac{2r^2}{w^2(z)} + \dots$ in izraz za silo je v prvem redu v r tako

$$F_r \approx -2\alpha E_0^2 \frac{w_0^2}{w^4(z)} r = -6V \varepsilon_0 \frac{n_d^2 - n_o^2}{n_d^2 + 2n_o^2} E_0^2 \frac{w_0^2}{w^4(z)} r. \quad (12)$$

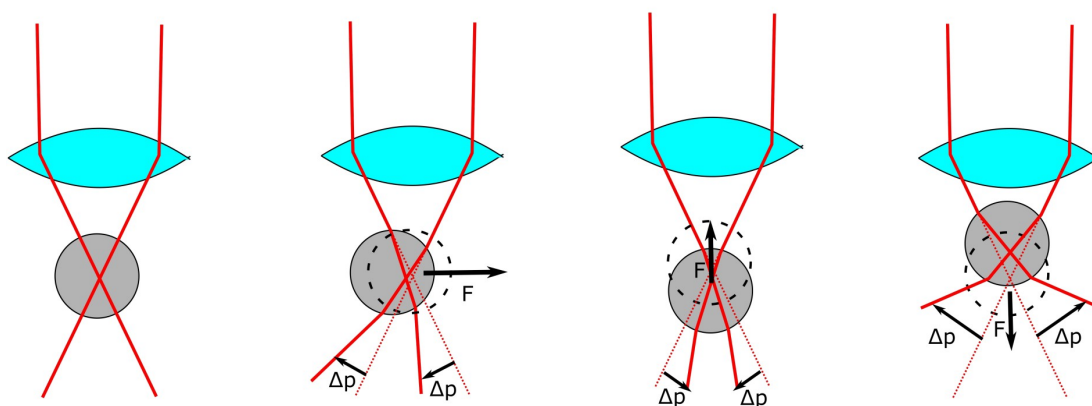
Velikost radialne komponente gradientne sile je sorazmerna odmiku delca od optične osi, kar ustreza Hookovemu zakonu $F_r = -k_r r$. Sila F_r vrača delec na optično os, vendar to še ni dovolj za stabilno ujetje delca v prostoru. Za ravnovesje v smeri optične osi poskrbi z komponenta gradientne sile, ki prav tako ustreza Hookovemu zakonu, glavno vlogo pri tem pa ima nekonstanten polmer laserskega snopa $w(z)$. Koeficient k opisuje trdoto optične pasti, njegovo poznavanje pa ima ključno vlogo pri merjenju sil. V izrazu za k_r nastopa razlika lomnih količnikov delca in okolice, zato je za delovanje optične pincete pomembno, da je lomni količnik delca večji od lomnega količnika okolice [6].

2.2 Geometrijska optika

Če je velikost delca veliko večja od valovne dolžine vpadnega valovanja, za obravnavo delca uporabimo približek geometrijske optike. Svetlobi se pri interakciji z ujetim delcem spremeni gibalna količina, zaradi njene ohranitve pa na delec deluje sila. Optične sile v optični pinceti so tako posledica sipanja in loma svetlobe, njihove velikosti pa so odvisne od lomnih količnikov delca in okolice, vpadnega kota svetlobe ter njene polarizacije [6].

Najprej si pogledjmo sipalno silo. Fotoni vpadaajo na delec vzdolž optične osi. Na njem se nato sipljejo in ker njihovo sipanje nima odlikovane smeri, se gibalna količina svetlobe v smeri optične osi zmanjša in posledično na delec deluje sila vzdolž optične osi [8]. Sipalna sila kaže stran od ravnovesne lege delca, zato želimo njen učinek izničiti. To lahko storimo tako, da v nasprotno smer pošljemo enak laserski snop, saj se v tem primeru sipalni sili snopov izničita. Omenjeni problem lahko rešimo tudi z uporabo mikroskopskega objektiva z veliko numerično aperturo. Objektiv nam omogoča, da obrobni žarki na delec vpadaajo pod velikimi koti, sipalna sila pa se zato zmanjša, saj smo z razširjanjem snopa zmanjšali gibalno količino svetlobe [6].

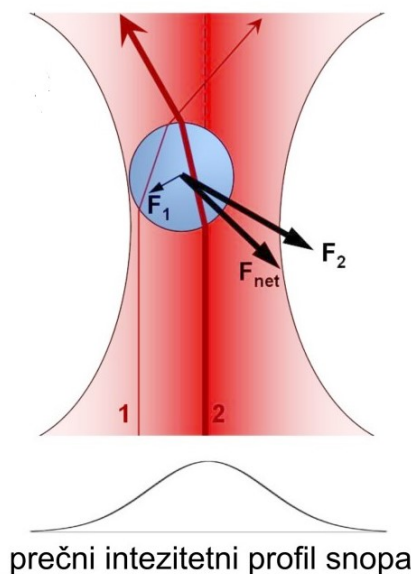
Na dinamiko delca ima pomemben vpliv tudi lom svetlobe. Če je delec homogen, se snop lomi na prehodih med delcem in okolico, pri čemer velja lomni zakon. Pri vsakem prehodu se del valovanja tudi odbije, zato bi morali v splošnem upoštevati tudi večkratne odboje znotraj delca. V našem primeru bomo te odboje zanemarili ter upoštevali le lom vpadnega snopa na vstopu in izstopu iz delca. Zaradi loma se snopu pri prehodu skozi delec spremeni smer gibalne količine, na delec pa zato deluje sila, ki je sorazmerna z intenziteto svetlobe [6]. Lom vpadnega snopa pri prehodu skozi delec v obliki kroglice je prikazan za različne položaje delca na sliki 2.



Slika 2. Lom snopa pri prehodu skozi delec. Zaradi preglednosti je snop upodobljen z dvema žarkoma – prikazan je torej lom zgolj teh dveh žarkov. Zaradi spremembe smeri gibalnih količin žarkov deluje na delec vsota sil, ki kaže proti grlu snopa. Če se delec nahaja v grlu, je vsota sil v prečni smeri enaka nič, saj v tem primeru žarki vpadaajo simetrično. Vir: [6].

Iz slike 2 je razvidno, da sila kaže proti grlu snopa in zato vrača delec v ravnovesno lego. Podobno kot pri Rayleighovem režimu je tudi tukaj pomembno, da je lomni količnik delca večji od lomnega količnika okolice. V nasprotnem primeru bi sila delovala stran od grla in delca ne bi mogli ujeti v stabilno ravnovesje [6].

Poglejmo si že prej omenjeni Gaussovski laserski snop še v kontekstu geometrijske optike. Delec v takšnem snopu je prikazan na sliki 3. Snop Gaussovske oblike še izboljša delovanje optične pasti, saj se žarki z največjimi intenzitetami po dvojnem lomu odklonijo stran od grla snopa, na delec pa posledično deluje večja sila v smeri grla [2].



Slika 3. Delec v laserskem snopu z Gaussovskim intenzitetnim profilom. Sila na delec je sorazmerna intenziteti lomljenega žarka, zato je sila 2. žarka $\vec{F}_2$ večja od sile 1. žarka $\vec{F}_1$ in rezultanta $\vec{F}_{net}$ kaže proti optični osi. Vir: [2].

3. Sestava optične pincete

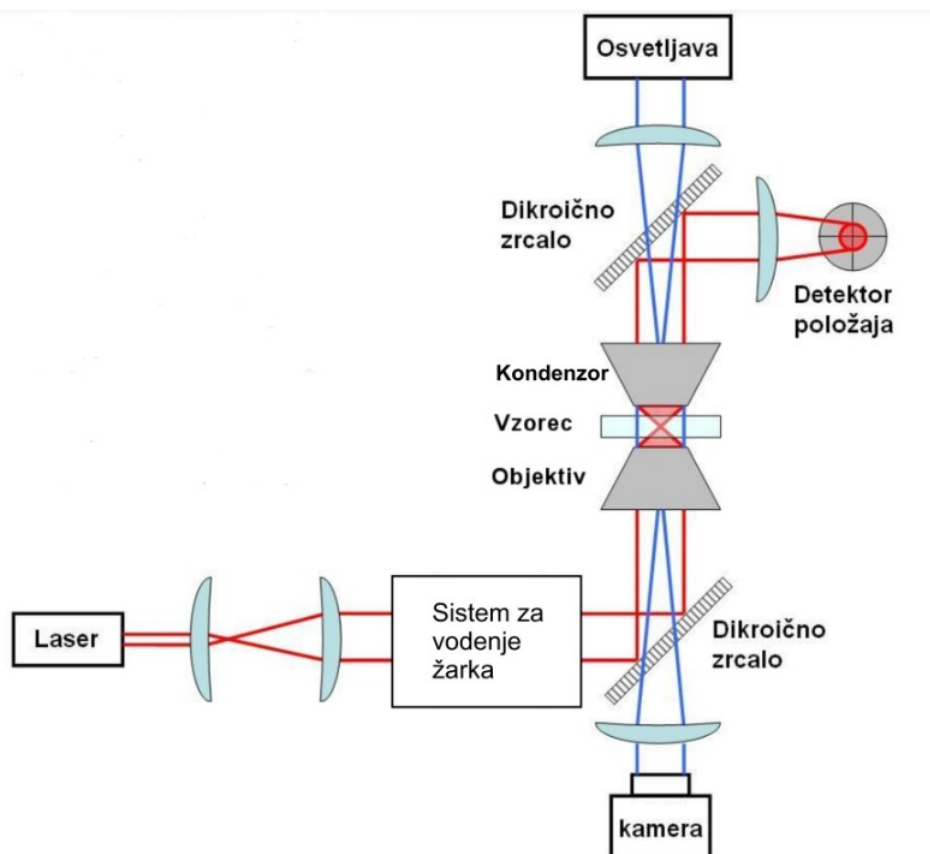
Shema standardne sestave optične pincete je prikazana na sliki 4. Vsaka pinceta ima dva ključna sestavna dela: sistem, ki s pomočjo laserskega snopa ustvari optično past, ter sistem za mikroskopijo vzorca [6].

Poglejmo si, kako naprava ustvari optično past. Ker je gradientna sila sorazmerna intenziteti vpadne laserske svetlobe, za delovanje optične pincete potrebujemo močne laserje ($P > 0,1 \text{ W}$). Za merjenje sil potrebujemo konstantno trdoto optične pasti k , zato mora biti laser tudi dovolj stabilen (nihanja intenzitete morajo biti čim manjša). Pomembna karakteristika je tudi valovna dolžina. V optičnih pincetah se večinoma uporablja infrardeče laserje (750 - 1200 nm), saj so močni infrardeči laserji precej dostopni, poleg tega pa infrardeča svetloba ne poškoduje bioloških vzorcev [4].

Laserski snop najprej potuje skozi sistem leč, ki snop razširijo. V sistemu za vodenje žarka se mu spremeni smer, nato pa se od dikroičnega zrcala odbije na objektiv, ki ima vlogo zbiralne leče z veliko numerično aperturo. Za dikroično zrcalo je značilno, da prepušča vidno svetlobo, lasersko pa odbija. Objektiv nato zbere žarke v gorišču znotraj vzorca, kjer nastane optična past. Laserski snop se pri prehodu skozi delec lomi, prepuščeni del svetlobe pa zbere kondenzorska leča. S pomočjo drugega dikroičnega zrcala nato prepuščeno svetlobo usmerimo na kvadrantno fotodiodo, ki služi kot detektor položaja delca. Merilna naprava je sestavljena iz štirih enakih fotodiod, s katerimi merimo intenziteto vpadne svetlobe. Vsak premik delca v optični pasti spremeni razmerja intenzitet na posameznih kvadrantih, iz česar je mogoče določiti relativni položaj delca glede na center optične pasti. Alternativni način določanja lege ujetega delca je s kamero preko analize slike [2].

Predstavljena postavitev optične pincete omogoča tudi mikroskopijo vzorca, pri čemer za osvetljavo uporabimo vidno svetlobo. Snop najprej potuje skozi dikroično zrcalo, ki je prepustno za vidno svetlobo, in kondenzorsko lečo do delca. Objektiv nato sliko delca poveča, končno sliko pa opazujemo preko kamere [6].

Za številne raziskave je pomembno, da lahko optično past premikamo, kar dosežemo s spreminjanjem smeri laserskega snopa. Slednje nam omogoča sistem za vodenje žarka. Ena od možnih izvedb naprave je ta, da smer snopa spreminjamo kar s premikanjem leč in zrcal. To je precej zamudna metoda, zato je v optičnih pincetah pogosto uporabljena alternativna možnost in sicer



Slika 4. Standardna sestava optične pincete. Sistem za ustvarjanje optične pasti ter določitev lege delca je označen z rdečimi žarki, sistem za opazovanje delca pa je prikazan z modrimi žarki. Vir: [2].

akusto-optični deflektor, ki je v bistvu kristal, v katerem vzpostavimo stoječe zvočno valovanje. V deflektorju tako dobimo zgoščine in razredčine, ki delujejo kot uklonska mrežica. S spreminjanjem frekvence vzbujanja zvočnega valovanja se spremeni tudi uklonska mrežica in s tem uklon žarkov pri prehodu skozi kristal. Deflektor omogoča premikanje optične pasti na nanometrski skali, pri čemer za past uporabimo prvi red uklona, saj je njegova intenziteta največja. To premikanje ni povsem poljubno, saj lahko z deflektorji premikamo optično past zgolj v ravnini, ki je pravokotna na optično os. Ker en deflektor deluje vzdolž ene osi, za omenjeno premikanje potrebujemo dva med seboj pravokotna deflektorja [6].

Še ena prednost akusto-optičnega deflektorja je ta, da omogoča hitro spreminjanje oz. preklapljanje smeri laserskega snopa. Deflektor dopušča preklapljanja s frekvencami v območju 100 kHz in s tem ustvarjanje več kvazistatičnih optičnih pasti, ki so posledica zelo hitrega premikanja lokacije pasti. Preklapljanje mora biti tako hitro, da se past vrne preden delec zaradi Brownovega gibanja zapusti njeno območje. Takemu načinu vzpostavitve večih optičnih pasti pravimo časovno deljenje snopa. Obstaja še drug način, pri katerem se vhodni laserski snop razdeli v več snopov, vsak izmed nastalih snopov pa ustvari svojo optično past. Primer tega je hologrfska optična pinceta. Na ta način nastale pasti niso omejene na eno samo ravnino, za razliko od kvazistatičnih, ki so zaradi deflektorjev omejene na ravnino, pravokotno na optično os [2].

4. Kalibracija optične pincete

Za silo, s katero past deluje na ujet delec, velja Hookov zakon (enačba (12)), zato je za njeno določitev potrebno poznati koeficient oz. trdoto optične pasti ter odmik delca od središča pasti. Slednjega merimo s pomočjo kamere ali kvadrantne fotodiode, trdoto "vzmeti" pa dobimo tako, da optično

pinceto predhodno kalibriramo. Obstaja veliko kalibracijskih metod, najpogosteje uporabljena pa je metoda s potencialom optične pasti, ki upošteva Brownovo gibanje ujetega delca [5].

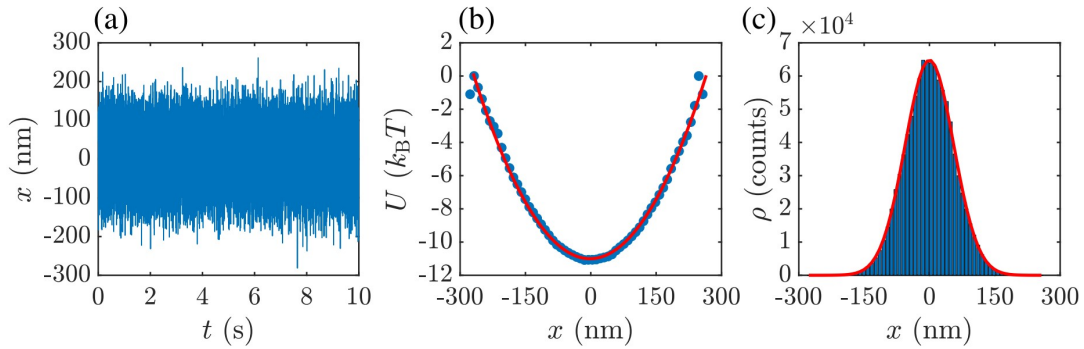
Poglejmo si gibanje delca v eni dimenziji, npr. v smeri osi x . Za majhne odmike od ravnovesne lege (središča pasti) velja

$$F = -k_x (x - x_{rav}), \quad (13)$$

kjer je F sila na ujet delec, k_x trdota optične pasti vzdolž smeri x , x_{rav} ravnovesna lega ter x položaj delca. Temu ustrezen potencial je harmonski:

$$U(x) = \frac{1}{2} k_x (x - x_{rav})^2. \quad (14)$$

Tipično gibanje delca znotraj optične pasti je prikazano na sliki 5(a). Delec se neprenehoma premika zaradi prisotnosti Brownovih fluktuacij in je hkrati v dinamičnem ravnovesju; termično gibanje ga potiska iz pasti, optične sile pa ga vlečejo nazaj proti središču. Če želimo delec ohranjati znotraj optične pasti, mora biti optični potencial dovolj globok: kot je prikazano na sliki 5(b), zadošča že nekaj $k_B T$ [8].



Slika 5. Brownovo gibanje delca v optični pasti. Ravnovesna lega je pri $x_{rav} = 0$ nm. (a) Naključno gibanje ujetega delca znotraj optične pasti. (b) Potencial optične pasti $U(x)$. Tega določimo iz izmerjene porazdelitve $\rho(x)$ z uporabo enačbe (15). Izmerjen potencial je prikazan z modro barvo, meritvam prilagojen harmonski potencial pa je narisana z rdečo barvo. (c) Verjetnostna gostota položaja ujetega delca. Vir: [8].

Termično gibanje ujetega delca opisuje Boltzmannova porazdelitev. Ker je potencial optične pasti harmonski, ima verjetnostna gostota položaja delca $\rho(x)$ obliko Gaussove porazdelitve (slika 5(c)):

$$\rho(x) = \rho_0 \exp\left(-\frac{U(x)}{k_B T}\right) = \rho_0 \exp\left(-\frac{k_x (x - x_{rav})^2}{2k_B T}\right). \quad (15)$$

Sedaj uporabimo ekviparticijski izrek, ki pravi, da je povprečna energija vsake neomejene, neodvisne in kvadratične prostostne stopnje sistema enaka $\frac{1}{2}k_B T$, torej $\langle U(x) \rangle = \frac{1}{2}k_B T$. Posledično velja

$$\langle U(x) \rangle = \frac{1}{2} k_x \langle (x - x_{rav})^2 \rangle = \frac{1}{2} k_x \langle (x - \langle x \rangle)^2 \rangle = \frac{1}{2} k_x \sigma_x^2 = \frac{1}{2} k_B T, \quad (16)$$

pri čemer je $\sigma_x = \sqrt{\langle (x - \langle x \rangle)^2 \rangle}$ nedoločenost položaja ujetega delca. Iz zadnje enakosti izraza (16) tako dobimo

$$k_x = \frac{k_B T}{\sigma_x^2}. \quad (17)$$

Enak rezultat dobimo tudi neposredno iz definicije σ_x^2 Gaussove porazdelitve (izraz (15)). Z vzorčenjem verjetnostne porazdelitve položaja delca lahko torej določimo k_x . Tipične vrednosti koeficienta optične pasti so v območju pN/ μ m [8].

Za komponenti k_y in k_z je izračun podoben.

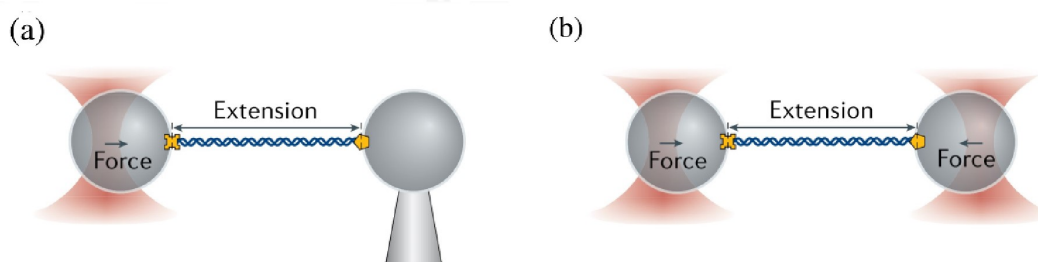
5. Meritve biomolekulskih interakcij

Optične pincete se uporablja predvsem za raziskave v biologiji in biofiziki, saj na teh področjih prevladujejo sile, ki so v njihovem merilnem območju. Omogočajo proučevanje celic in velikih biomolekul [9], kot sta npr. DNK in RNK, prav tako pa so uporabne tudi pri študijah biomolekulskih procesov (npr. korakanje molekulskih motorjev, delovanje encimov DNK in RNK polimeraze) [10]. Z uporabo optične pincete so izmerili sile pri zvijanju in razvijanju makromolekul ter številne elastične lastnosti omenjenih struktur [11], daleč najpogosteje pa se jo uporablja za natančno manipulacijo in razvrščanje mikroobjektov [2].

5.1 Potek meritve

Za izvedbo meritve je biomolekulo najprej potrebno pritrditi na ustrezno oporo. V ta namen se pogosto uporabljajo mikroskopske steklene ali polistirenske kroglice s premerom v območju 0,2 - 5 μm [4]. Vsaka kroglica je prevlečena s specifično snovjo, ki poskrbi, da se na površino veže zelena molekula [8].

Meritev sile poteka tako, da nasprotna konca molekule, ki jo želimo preučiti, pritrdimo na mikrokroglici ter nato eno izmed kroglic ujamemo v optično past, drugo pa pritrdimo na mirujoč objekt – mikropipeto (slika 6(a)). Meritev lahko izvedemo tudi z dvema pastema; v tem primeru je vsaka kroglica v svoji optični pasti, kot je prikazano na sliki 6(b). Ena izmed pasti nato držimo pri



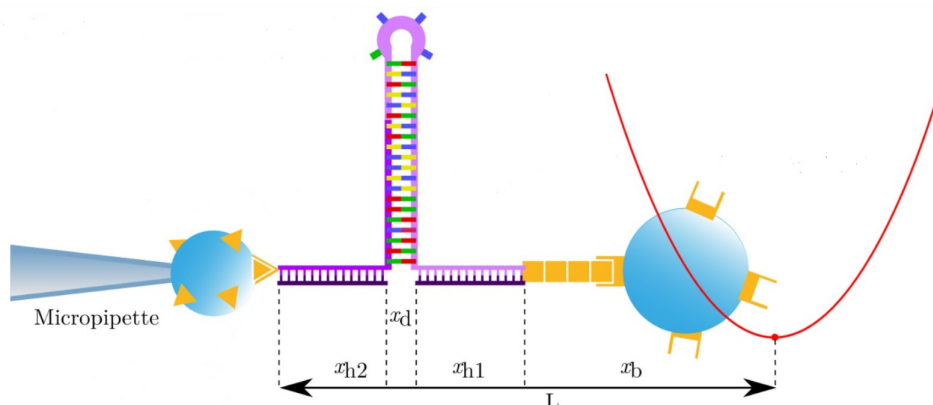
Slika 6. Tipični eksperimentalni postavitvi pri meritvah z optičnimi pincetami. (a) Uporaba ene optične pasti. Konca molekule (v tem primeru DNK) pritrdimo na kroglici, od katerih eno ujamemo v optično past, drugo pa pritrdimo na mikropipeto. (b) Uporaba dveh pasti. Pri tej metodi sta obe kroglici ujeti v optičnih pasteh. Vir: [4].

miru, drugo pa medtem počasi odmikamo. Pri tem se kroglici zaradi sile, ki jo povzroča raztegnjena biomolekula, odmakneta iz središča pasti. S pomočjo odmika lahko določimo silo, s katero past deluje na posamezno mikrokroglico, in ker je ta sila enaka sili, s katero je napeta struktura, lahko posledično natančno določimo obremenitev molekule. Predstavljeni način tako omogoča merjenje elastičnih lastnosti biomolekul [6].

Izbira med postavitvijo z eno optično pastjo in postavitvijo z dvema pastema je večinoma odvisna od same raziskave, vendar pa ima vpliv na delovanje pasti. Segrevanje objektiva zaradi močnega laserja, ki je potreben za delovanje pasti, lahko povzroči premik gorišča objektiva, kar predstavlja problem pri meritvah. Pri postavitvi z eno pastjo se za ublažitev omenjenega premika uporablja hlajenje objektiva, pri postavitvi z dvema pastema pa je situacija nekoliko drugačna. Optični pasti sta namreč pogosto ustvarjeni z istim laserjem, zato je premik gorišča pri obeh pasteh enak, razdalja med obema goriščema pa tako ostane nespremenjena. Postavitev z dvema optičnima pastema torej zagotavlja večjo stabilnost med merjenjem [4].

5.2 Meritve elastičnih lastnosti molekule DNK

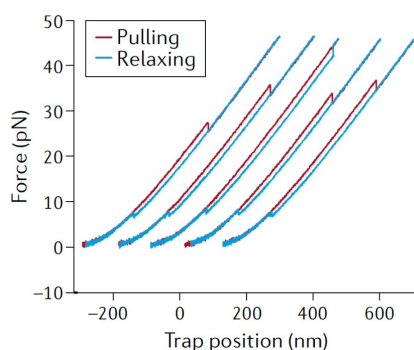
Tipičen primer biomolekule, ki je primerna za meritve z optično pinceto, je DNK lasnica; na sliki 7 je narisana z vijolično barvo. Lasnica je enojna veriga DNK (angl. single-stranded DNA, ssDNA),



Slika 7. Eksperimentalna postavitev pri raztegovanju DNK lasnice, ki je preko dveh dvojnih vijačnic DNK pritrjena med mikrokroglici. Optična past je shematsko prikazana s harmonskim potencialom. Vir: [8].

ki tvori dvojno vijačnico sama s seboj in se na enem koncu zaključuje z zanko. Na drugem koncu je povezana z dvema dvojnima vijačnicama DNK (angl. double-stranded DNA, dsDNA), ki delujeta kot ročaja, saj se na njiju pred meritvijo pritrdita mikrokroglici. Pomembna vloga dvojne vijačnice DNK je tudi to, da loči lasnico od mikrokroglice ter s tem prepreči njuno medsebojno interakcijo [8].

Primer preproste meritve z uporabo optične pincete je raztegovanje DNK lasnice (slika 7). Merjenje poteka po prej opisanem postopku: zvita lasnica je pritrjena na mikrokroglici, od katerih je ena ujeta v optični pasti, druga pa je pritrjena na mikropipeto. Slednja med meritvijo ostane pri miru, optično past pa počasi s konstantno hitrostjo odmikamo. Graf omenjene meritve je prikazan na sliki 8. Pri odmikavanju pasti se povečuje sila in na neki točki je sila dovolj velika, da se dvojna



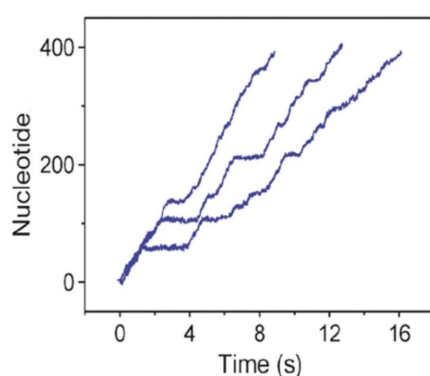
Slika 8. Graf sile v odvisnosti od položaja optične paste pri raztegovanju DNK lasnice. Zaporedni cikli raztegovanja (rdeča barva) in relaksacije (modra barva) so zaradi nazornosti zamaknjeni vzdolž osi x . Nenadne spremembe na grafu so posledica zvijanja oz. razvijanja lasnice. Vir: [4].

vijačnica razpre in lasnica preide v razvito stanje [12]. Ta prehod se odraža kot nenadno povečanje raztezka pri nespremenjeni sili. Z raztegovanjem razvite molekule nadaljujemo do neke sile, nato pa obremenitev počasi zmanjšujemo. Med relaksacijo se na neki točki raztezek znatno zmanjša, kar nakazuje na zvijanje lasnice. Ko sila doseže začetno vrednost, je DNK lasnica skrčena na prvotno dolžino, kar pomeni, da lahko začnemo z novim ciklom raztegovanja [8].

Ob tem velja omeniti, da se zvijanje in razvijanje lasnice zgodita vsakič pri drugačnih silah, kar nakazuje na stohastično naravo teh procesov. Iz večjega števila meritev tako dobimo porazdelitvi

sil, pri katerih pride do zvijanja in razvijanja lasnice. Ploščina med rdečo in modro krivuljo ustreza nepovratnemu delu, ki je potrebno za en cikel. Če se sili pri zvijanju in razvijanju ne razlikujeta preveč, je mogoče najti vmesno območje sil, v katerem lasnica „preskakuje“ med zvitim in razvitim stanjem, kar omogoča merjenje življenjskih časov omenjenih stanj v odvisnosti od sile ter hitrosti zvijanja in razvijanja [4].

Zelo priljubljen predmet raziskav je tudi dvojna vijačnica DNK. Njeno natančno poznavanje je ključnega pomena za razumevanje številnih biomolekulskih procesov (npr. delovanje encimov DNK in RNK polimeraze) [13]. Poleg tega se DNK pogosto uporablja pri raziskavah drugih struktur kot molekularni ročaj, zato je za ustrezno vrednotenje rezultatov potrebno poznati njene lastnosti ter njen vpliv upoštevati. Za opazovanje delovanja DNK polimeraze eno mikrokroglico, ujeta v optični pasti, pritrdimo na konec molekule DNK, drugo kroglico pa pritrdimo na encim. Pomikanje polimeraze opazimo kot diskretno pomikanje kroglice, iz razdalje med kroglicama pa lahko določimo njen premik. Primer meritve časovne odvisnosti položaja DNK polimeraze pri konstantni sili prikazuje slika 9. Sodobne optične pincete omogočajo določanje položaja na bazni par natančno [4]. S pinceto



Slika 9. Graf položaja DNK polimeraze (nukleotid, pri katerem se encim nahaja) v odvisnosti od časa pri konstantni sili. Hitrost delovanja encima ni konstantna, prav tako pa se razlikuje med posameznimi molekulami polimeraze. Vir: [14].

je možno kroglico z encimom vleči tudi v nasprotno smer in tako ugotoviti, s kolikšno silo DNK polimeraza deluje na DNK [2].

Še en pomemben primer je merjenje sile, ki je potrebna za pretrganje baznih parov med vijačnicama DNK. Pri tej meritvi mikrokroglici pritrdimo na različni vijačnici in s počasnim odmikanjem kroglic dvojno vijačnico DNK razvijamo v dve enojni vijačnici, pri čemer se bazni pari postopoma trgajo. Znanstveniki so pri omenjeni raziskavi ugotovili, da sila pri razvijanju DNK ni konstantna, temveč je odvisna od zaporedja baznih parov. Za pretrganje baznega para gvanin-citozin je namreč potrebna večja sila kot za pretrganje para adenin-timin, saj je bazni par G-C medsebojno povezan s tremi vodikovimi vezmi, par A-T pa le z dvema [13].

6. Zaključek

S pomočjo optične pincete lahko ustvarimo optične pasti, v katere je mogoče ujeti mikroskopske delce. Poleg tega nam pinceta omogoča tudi premikanje pasti in s tem manipulacijo delcev ter merjenje sil na ujete delce. Tipične vrednosti, ki jih lahko izmerimo z omenjeno napravo, so v območju pN, kar je ravno območje, v katerem je mnogo relevantnih sil v biofiziki in biokemiji, zato ni presenetljivo, da se optične pincete množično uporablja pri raziskavah na teh področjih. Z njihovo uporabo so raziskovalci izmerili številne elastične lastnosti biomolekul, kar je omogočilo boljše razumevanje bioloških procesov in preverjanje teoretičnih modelov, ki opisujejo dinamiko biomolekul.

LITERATURA

- [1] Wikipediija, *Optična pinceta*, 2024, [Spletna stran: https://sl.wikipedia.org/wiki/Opti%C4%8Dna_pinceta; pridobljeno 17.2.2024].
- [2] N. Osterman, *Optična pinceta in ustvarjanje ultrakratkih optičnih sunkov visokih intenzitet, nobelova nagrada za fiziko 2018.*, Obzornik za matematiko in fiziko **65** (2018), no. 5, 171–183.
- [3] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu, *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Optics Letters **11** (1986), no. 5, 288–290.
- [4] C. J. Bustamante, Y. R. Chemla, and S. Liu, *Optical tweezers in single-molecule biophysics*, Nature Reviews Methods Primers **1** (2021), no. 25, 1–25.
- [5] P. Polimeno, A. Magazzù, M. A. Iatì, F. Patti, R. Saija, C. Degli Esposti Boschi, Maria Grazia Donato, Pietro G. Gucciardi, Philip H. Jones, Giovanni Volpe, and Onofrio M. Maragò, *Optical tweezers and their applications*, Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer **218** (2018), 131–150.
- [6] J. Godec, *Optična pinceta*, Matrika **8** (2021), no. 2, 1–9.
- [7] Wikipedia, *Optical tweezers*, 2024, [Spletna stran: https://en.wikipedia.org/wiki/Optical_tweezers; pridobljeno 23.2.2024].
- [8] J. Gieseler, J. R. Gomez-Solano, A. Magazzù, and I. Pérez Castillo, *Optical tweezers — from calibration to applications: a tutorial*, Advances in Optics and Photonics **13** (2021), no. 1, 77–82.
- [9] C. J. Bustamante, L. Alexander, K. Maciuba, and C. M. Kaiser, *Single-molecule studies of protein folding with optical tweezers*, Annual review of biochemistry **89** (2020), 443–470.
- [10] A. Zaltron, M. Merano, G. Mistura, C. Sada, and F. Seno, *Optical tweezers in single-molecule experiments*, The European Physical Journal Plus **135** (2020), no. 896, 1–33.
- [11] J. Camunas-Soler, M. Ribezzi-Crivellari, and F. Ritort, *Elastic properties of nucleic acids by single-molecule force spectroscopy*, Annual review of biochemistry **45** (2016), 65–84.
- [12] C. Yang, X. Song, Y. Feng, G. Zhao, and Y. Liu, *Stability of dna and rna hairpins: a comparative study based on ox-dna*, Journal of Physics: Condensed Matter **35** (2023), no. 26, 1–11.
- [13] C. Ghimire and P. Guo, *Optical tweezer and tirf microscopy for single molecule manipulation of rna/dna nanostructures including their rubbery property and single molecule counting*, Biophysics Reports **7** (2021), no. 6, 449–474.
- [14] I. Heller, T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. G. Peterman, and G. J. L. Wuite, *Optical tweezers analysis of dna-protein complexes*, Chemical Reviews **114** (2014), no. 6, 3087–3119.