

אוניברסיטת בן-גוריון בנגב  
הצעת תוכנית מחקר ללימודי דוקטורט

מחקר האינטראקציה של מולקולות dsDNA עם חלבון RecA בעזרת פינצטה אופטית

**Interaction of double stranded DNA (DsDNA) with RecA protein, using optical  
tweezers**

ניצן ממן

20.9.2007

חתימת מנחה: \_\_\_\_\_

חתימת יו"ר ועדת מוסמכים מחלקתי: \_\_\_\_\_

# תוכן עניינים

3	..... תקציר
4	..... 1. רקע תיאורטי
4	..... 1.1.1 DNA
4	..... 1.1.1.1 מולקולת החיים
5	..... 1.1.1.2 אריזה של DNA בתא
7	..... 1.1.1.3 אלסטיות של DNA
11	..... 1.2 חלבונים
11	..... 1.2.1 תפקידים ומאפיינים
12	..... 1.2.2 חלבון ה RecA ותפקידיו
13	..... 1.3 פינצטה אופטית
13	..... 1.3.1 לכידה אופטית של חלקיק דיאלקטרי
15	..... 1.3.2 מדידה של כוחות קטנים על חלקיק לכוד
15	..... 1.3.3 כיוול המלכודת
16	..... 2. מטרות המחקר
16	..... 3. שיטות ותוצאות ראשוניות
16	..... 3.1 מערכת הניסוי
16	..... 3.1.1 המערכת הקיימת ושינויים הדרושים בה
18	..... 3.1.2 גלאי מהיר ומדויק לעבודה בזמן אמת
28	..... 3.1.3 מערכת החימום
30	..... 3.1.4 דוגמאות זרימה
32	..... 3.2 הכנת הדוגמא
33	..... 4. המשך המחקר
34	..... 5. ביבליוגרפיה

## תקציר

מולקולת ה-DNA נמצאת כבר זמן רב במרכזם של מחקרים רבים, עקב חשיבותה הביולוגית וגם בעקבות התכונות הפיסיקליות שלה הדומות לפולימרים גמישים למחצה. פיתוח הפינצטה האופטית אפשרה לבצע מחקרים על מולקולה בודדת ללא שימוש בשיטות סטטיסטיות.

כיוון שה-DNA היא מולקולה פאסיבית ישנם ביו מולקולות אחרות שתפקידן לטפל ולתחזק אותה. טיפול זה כולל קיפול ואריזה של המולקולה בגרעין התא ועד קריאת המודל הגנטי תיקון ושכפול ה-DNA. סוג אחד של ביו מולקולות אלו הם החלבונים. תפקידי החלבונים בתא הם מגוונים ורוב משקלו של התא נתפס על ידי חלבונים אלו. עקב תפקידם החשוב חקר חלבונים אלו בכלל והאינטראקציה שלהם עם מולקולת ה-DNA בפרט הוא חשוב.

מטרת מחקר זה היא לחקור את האינטראקציה בין חלבון ה-RecA וה-DNA. חלבון ה-RecA הוא בעל תפקיד מרכזי בתהליך הרקומבינציה ההומולוגית ובתהליכים של תיקון DNA. כאשר חלבון זה מגיב עם מולקולת ה-DNA הוא מצפה אותה ומשנה את התכונות המכאניות שלה. במחקר זה ייחקרו גם מאפייני האינטראקציה (קצב הציפוי ה-DNA על ידי החלבון וכו') וגם השינויים הנגרמים במאפיינים האלסטיים של ה-DNA עקב הציפוי של החלבון.

המחקר יתחיל בבניית מערכת ניסוי מתאימה. המערכת תוכל לבודד מולקולת ה-DNA בודדת ולמדוד את הכוחות המופעלים כאשר היא נמתחת, בדיוק ובקצבים גבוהים, בזמן אמת תוך כדי ביצוע הניסוי. בנוסף תהיה אפשרות לשלוט על ריכוז החומרים בדוגמא ולהכניס חומרים חדשים תוך כדי הניסוי. כל ניסוי חייב להתבצע בטמפרטורה ידועה וקבועה המתאימה לטמפרטורת העבודה של החלבון.

בסיס המערכת יורכב מערכת פינצטה אופטית (optical tweezers) המאפשרת לכידה של כדור דיאלקטרי בעל גודל מיקרומטרי על ידי אור לייזר. מולקולת ה-dsDNA (double stranded) DNA שתשמש את הניסוי תילקח מווירוס  $\lambda$ -phage והיא תחובר אל הכדור המיקרומטרי ולזכוכית הדוגמא בדיוק בקצותיה על ידי פרוטוקול להדבקה ספציפית. בצורה זו כאשר מזיזים את הדוגמא בזמן שהמלכודת נשארת קבוע במקום ניתן למתוח את המולקולה. מדידת הכוחות תעשה על ידי גלאי QPD אשר ימדוד את תזוזת הכדור ממרכז המלכודת תוך כדי הניסוי ובדיוק רב (מספר ננומטרים) ובתדירות דגימה גבוהה (8KHz). הגלאי יעביר את הנתונים אל כרטיס A/D הנשלט על ידי המחשב. בזמן הניסוי תהיה אפשרות להזרים לתוך הדוגמא את חלבון ה-RecA עם ה-ATP בריכוז הדרוש לאינטראקציה כאשר כל זמן זה הטמפרטורה מבוקרת וידועה.

# 1. רקע תיאורטי

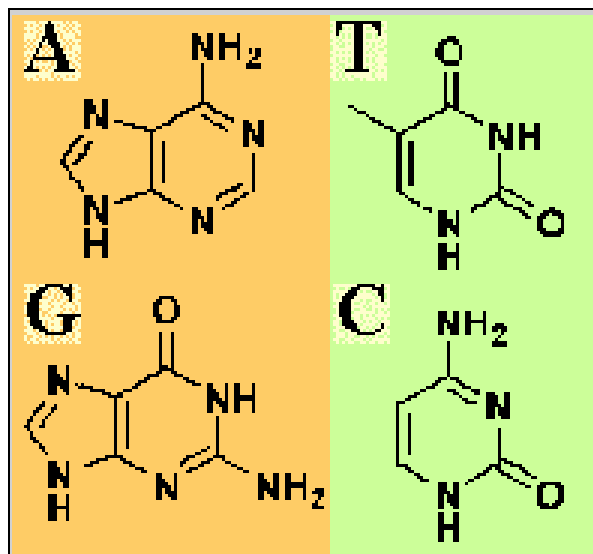
## 1.1.1 DNA

### 1.1.1.1 מולקולת החיים

DNA או **DeoxyriboNucleic Acid**, היא המולקולה הנושאת את כל האינפורמציה הגנטית של האורגניזם. ניתן להתייחס אליה כאל מרשם הקובע בנייה של חלבונים ומולקולות אחרות ההכרחיות לתפקוד התא. הוראות אלו נקראות גנום (**genome**) ויחידות האינפורמציה הם הגנים (**gene**) שמומרים לחלבונים על ידי הקודים הגנטיים.

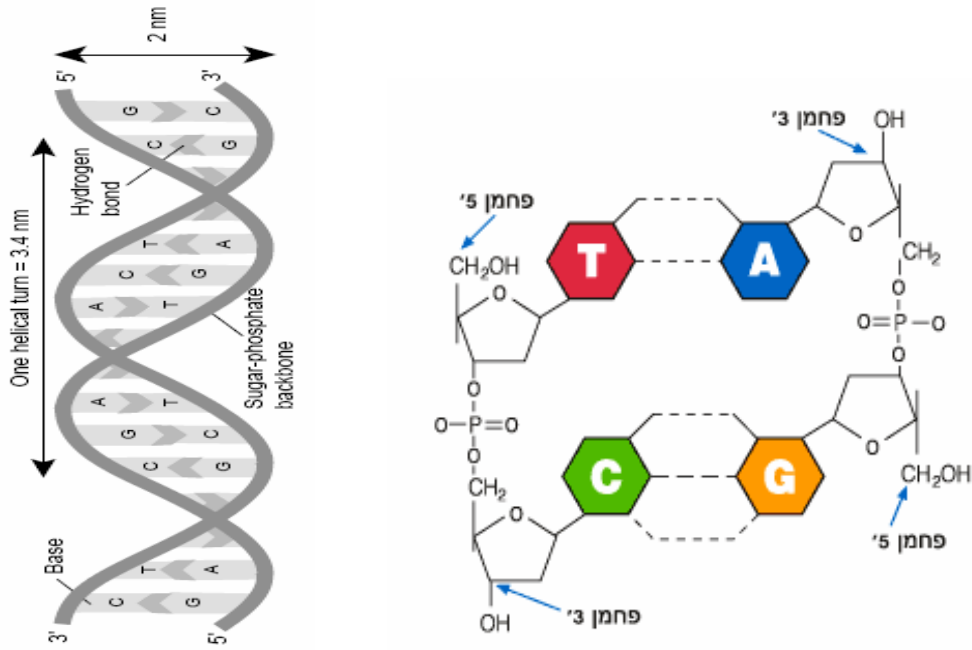
מולקולת ה DNA היא מולקולה פאסיבית וכל תפקידה הוא לאגור את המידע, הטיפול בה נעשה על ידי ביו מולקולות אחרות אשר מגיבות איתה בצורות שונות: כיפוף, העתקה, חיתוך תיקון וכו'. למרות היותה פאסיבית, מולקולת ה DNA נושאת מאפיינים פיסיקאליים ייחודיים אשר מאפשרים לגנום ארוך להיות ארוז בגרעין קומפקטי תוך כדי טיפול במולקולה. [1,2]

מולקולת ה DNA היא למעשה פולימר המורכב מנוקליאוטידים או בסיסים שכל אחד מהם הינו אות בקוד הגנטי. כל נוקליאוטיד בנוי מפוספט, סוכר ובסיס חנקתי. שני נוקליאוטידים מחוברים על ידי קשרים פוספאטיים שבו קבוצת ה 3' - Hydroxyl של נוקליאוטיד אחד מתחבר אל קבוצת ה 5' - Hydroxyl של השני דבר זה מוביל לשרשרת ארוכה אשר לשם נוחות קצבותיה מסומנים ע"י 3' ו 5'. קיימים שני סוגים של בסיסים, פורינים (**purines**) ופרימידינים (**pyrimidines**). סוגי הפורינים ב DNA הם אדינין (**A adenine**) וגואנין (**G guanine**), וסוגי הפרימידינים הם ציטוזין (**C cytosine**) ותימיין (**T thymine**).



**איור 1:** ארבעת הבסיסים במולקולת ה DNA מחולקים לקבוצות, פורינים (משמאל) ופרימידינים (ימין).

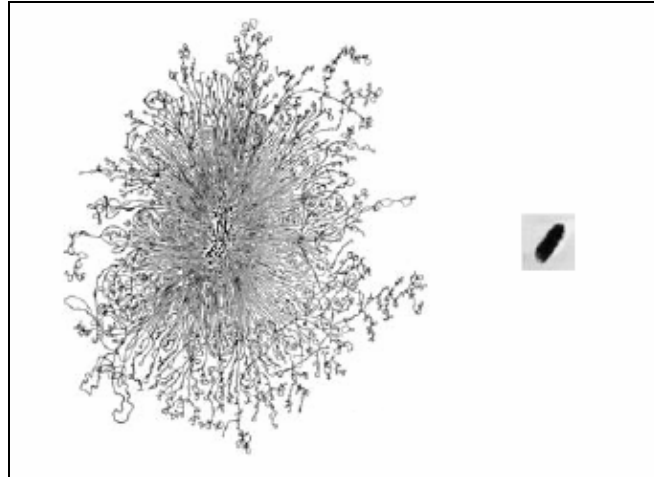
מבנהו של ה DNA הינו למעשה סליל כפול בו שני גדילים שבניהם מחוברים הבסיסים בקשרי מימן. A נקשר ל T ו G ל C, כל קשר כזה נקרא Base pair (BP) או קשר Watson-crick על שם מגלי מבנה ה DNA. מולקולת ה DNA במצבה הטבעי מסובבת בבורגיות ימנית כאשר כל BP אורכו הוא  $3.4\text{\AA}$  ויש 10 BP לכל סיבוב.



**איור 2:** מבנה ה DNA. מימין קישור זוגות הבסיסים שני גדילים המורכבים מסוכר ופוספט, ובניהם הבסיסים כאשר A נקשר ל T על ידי שני קשרי מימן ו G ל C על ידי שלושה קשרי מימן. משמאל צורת המולקולה הכללית.

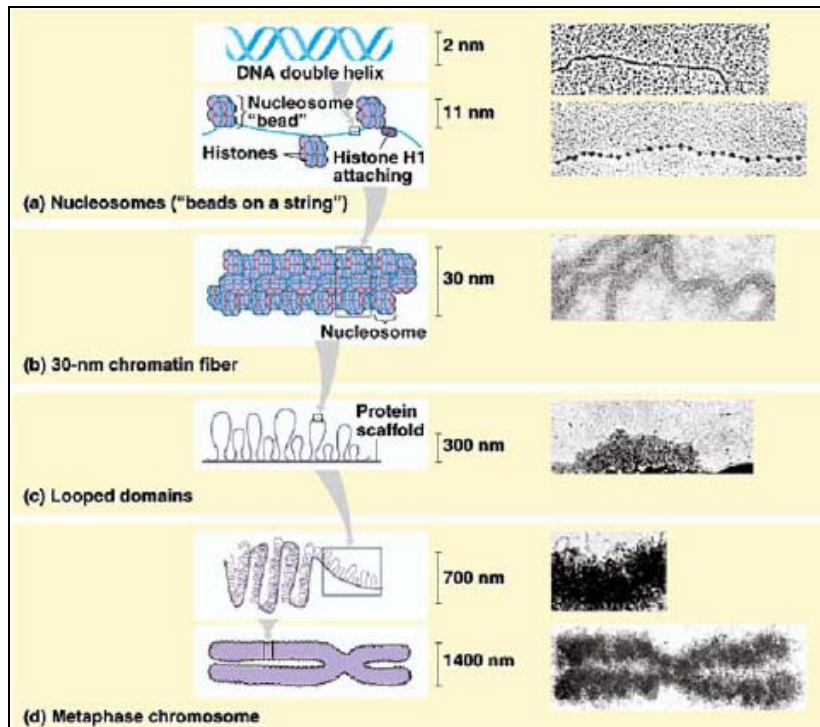
### 1.1.2. אריזה של DNA בתוך התא

האינפורמציה הגנטית של התא מאוכסנת ב DNA כאשר כל תא כולל את כל הגנים של האורגניזם. ביצורים פרוקריוטים (**prokaryotes**) ה DNA פשוט נמצא בתא, באיקריוטים (**eukaryotes**) ה DNA ארוז בצורה קומפקטית בתוך הגרעין. באופן כללי אם מותחים DNA הנמצא בתוך תא האורך שלו יהיה פי כמה אלפים מאורך התא עצמו, עבור אדם לדוגמה, אורך ה DNA הוא 1.8 מטרים ואורך תא טיפוסי הוא  $10^{-5}m$ , כאשר ה DNA תופס 10% מנפחו.



איור 3 : צילום של *e coli* שה DNA שלו התפזר בתמיסה משמאל יחד עם תא שלם מימין מדגיש את הכמות העצומה של המסה הנדחסת לתא קטן. ל DNA של *e coli* יש כשני מיליון BP והאורך שלו בערך פי אלף מהתא עצמו.

עבור אריזה כה יעילה יש לקפל את ה DNA במבנים מסדר גבוה יותר. קיפול ה DNA מסדר שני (הסדר הראשון הוא למעשה סדר ה BP והצורה הבורגית), מתבצע על ידי חלבונים הנקראים היסטונים (**histones**) שהם חלבונים קטנים בעלי מטענים חיוביים גדולים והם אורזים את המולקולה לצורה של שרשרת עם כדורים הנקראים נוקלאוסומים (**nucleosome**), למעשה יש מסה דומה של היסטונים ושל DNA בתא. על הקיפול מהסדר הבא, אחראי חלבון הכרומטין (**chromatin**) הדוחס את המולקולה לסיב בקוטר של כ  $30\text{nm}$  ולבסוף סדר הקיפול הגבוה ביותר הוא הכרומוזום (**chromosome**).



איור 4 : הדרך בא מקופל ה DNA בתא.

### 1.1.3 אלסטיות של DNA

מולקולת ה DNA הינה פולימר, שרשרת ארוכה של יחידות החוזרות על עצמן הנקראות מונומרים ולכן את ה DNA ניתן לתאר בדיוק גבוה על ידי מודלים פשוטים של פולימרים [3,4].

#### מודל ה- (Freely Jointed Chain) FJC

פולימרים הנמצאים בתמיסה נחשפים לפלקטואציות תרמיות אשר גורמות לחוסר קורולציה באוריינטציה של החוליות השונות בפולימר. בהנחה כי ה DNA הוא שרשרת של חוליות באורך  $l$  (של כל חוליה), המחוברות על ידי מחברים גמישים שניתן לסובב בחופשיות (איור 5). האורך הכללי של המולקולה יהיה  $Nl$  כאשר  $N$  הוא מספר החוליות. המרחק מקצה לקצה של הפולימר הוא:

$$Z = \sum_i l_i \quad (1)$$

כאשר  $l_i$  הוא וקטור המייצג את הקטע  $i$ . אורך מאפיין של המולקולה הוא  $Z^2$  והוא נתון על ידי:

$$Z^2 = \left( \sum_i l_i \right) \left( \sum_j l_j \right) \quad (2)$$

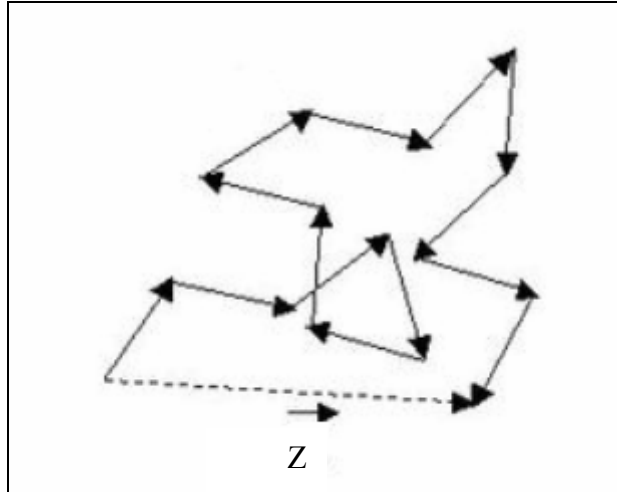
כאשר מחשבים את האברים בהם  $i = j$  ולוקחים ממוצע עבור כל הקונפיגורציות האפשריות מקבלים את המרחק מקצה לקצה הממוצע:

$$\langle Z^2 \rangle = Nl^2 + 2 \sum_{j>i} \langle l_i \cdot l_j \rangle \quad (3)$$

עבור כיוונים רנדומאליים האיבר השני ב (3) הוא אפס ולכן:

$$\langle Z^2 \rangle = Nl^2 \quad (4)$$

שהוא המרחק הממוצע בריבוע של מודל ה FJC בו השתמשנו. זהו המודל הפשוט ביותר לתיאור פולימרים והוא מדויק רק עבור ערכי  $N$  גדולים. כיוון שמזניחים את הקורלציה בין החוליות מודל זה לא מהווה תיאור מספיק מדויק של ה DNA.



**איור 5:** מודל ה N FJC חוליות המחוברות במחברים גמישים ולכן אין קורולציה בניהן הבעיה דומה לבעיית random walk כאשר גודל הצעד הוא  $l$  ונעשים N צעדים.

כאשר באים לחשב את הקשר בין המתוחות  $F$  הפועלת בין קצוות המולקולה ובין האורך  $Z$  בין הקצוות של המולקולה בטמפרטורה מסוימת  $T$  יש למצוא את פונקציית החלוקה שלה:

$$Z_N = Z_1^N \quad (5)$$

כאשר  $Z_1$  היא פונקציית החלוקה של חולייה אחת והיא נכתבת בצורה:

$$Z_1 = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi e^{-\frac{Fl \cos \theta}{k_B T}} d\theta \quad (6)$$

כאשר  $Fl \cos \theta$  היא האנרגיה של חוליה,  $\theta$  היא הזווית בין החוליות ולכל מצב אנרגיה יש  $2\pi$  כיוונים.

הפתרון של משוואה (6) והעלאת בחזקה נותן עבור פונקציית החלוקה:

$$Z_N = \left[ 2\pi k_B T \frac{e^{-\frac{Fl}{k_B T}} - e^{\frac{Fl}{k_B T}}}{fl} \right]^N \quad (7)$$

האורך מקצה לקצה הוא:

$$Z = -\frac{\partial G}{\partial F} = -k_B T \frac{\partial \ln Z_N}{\partial F} \quad (8)$$



$$Z = Nl \coth\left(\frac{Fl}{k_B T}\right) - \frac{Nk_B T}{F} \quad (9)$$

$$\frac{Z}{L} = \coth\left(\frac{Fl}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{Fl} \quad (10)$$

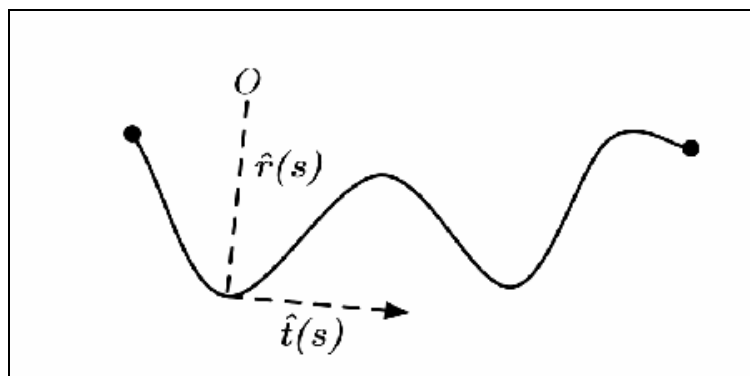
כיוון שמודל זה מתאר את ה DNA במדויק רק עבור כוחות קטנים נמצא את הגבול בו  $Fl \ll k_B T$  נפתח את הפונקציה ההיפרבולית לטור ונקבל עבור הכוח:

$$F = \frac{3k_B T}{l} \left(\frac{z}{L}\right) \quad (11)$$

נוסחה זו נכונה עבור כוחות מתיחה חלשים הפועלים על המולקולה ( $z/L$  קטן) כאשר רוצים תיאור למתיחויות גבוהות יותר יש להשתמש במודל אחר.

### מודל ה (Worm Like Chain) WLC

מודל ה WLC מתאר טוב יותר את מולקולת ה DNA והוא מתאים גם לכוחות חזקים יותר. המודל מתאר את שרשרת ה DNA כרציפה וגמישה (איור 6) וכל נקודה עליה מאופיינת על ידי וקטור יחידה משיק  $\hat{t}(s)$  כאשר S הוא המרחק לאורך השרשרת.



איור 6: מודל ה WLC.

כאשר לא פועלים כוחות על הפולימר הווקטור  $\hat{t}(s)$  מתפלג מרחבית לפי התפלגות גאוס סביב האפס עם שונות של  $1/l_p$ .  $l_p$  הוא אורך המולקולה בו יש קורלציה בין וקטורים משיקים, במידה ומסתכלים על המולקולה מרחוק ולאחר מכן מתקרבים אז  $l_p$  הוא הקטע המקסימאלי בו

קטע ה DNA עליו מסתכלים נראה ישר.  $l_p$  נקרא ה **persistence length** והוא תלוי בתנאי הסביבה, הטמפרטורה, ה PH ובסוג הפולימר. עבור DNA גודל זה הוא כ 50nm. האנרגיה של פולימר באורך L בזמן מתיחה של כוח חיצוני F הפועל בזמן t היא:

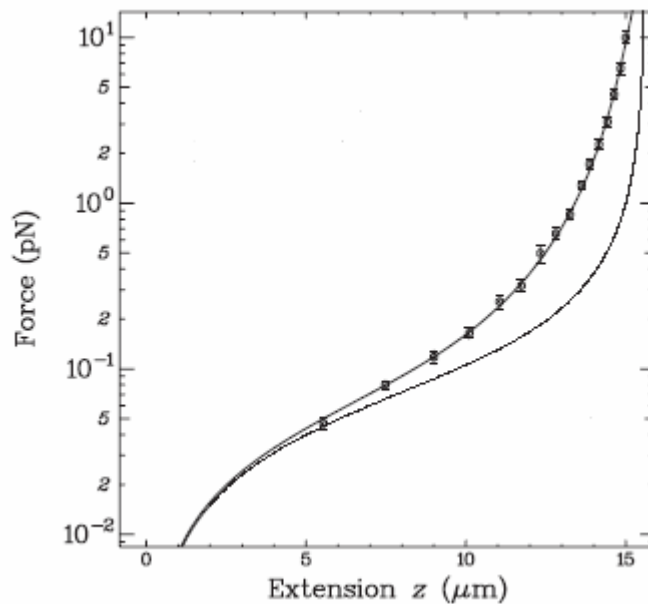
$$H_{wlc} = k_B T \frac{l_p}{2} \int_0^L ds \left( \frac{\partial \hat{t}(s)}{\partial s} \right)^2 - F \int_0^L (\hat{z} \cdot \hat{t}(s)) ds \quad (12)$$

האיבר הראשון ב (12) הוא האנרגיה האלסטית בעקבות התנגדות השרשרת לכיפוף והאיבר השני הוא העבודה המתבצעת על ידי הכוח המותח.

מודל זה מתלכד עם מודל ה FJC עבור כוחות חלשים ומתאר טוב את המולקולה עבור כוחות חזקים. פתרון אינטרפולציה המשלב את שני המודלים ומקשר בין הכוח החיצוני ובין  $z/L$  הוצע על ידי Marko and Siggia [4] והוא נתון בנוסחה הבאה:

$$F_{wlc}(z) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (13)$$

הפתרון מדויק בגבולות  $z \rightarrow 0$  או  $z \rightarrow L$  ובעל סטייה של כ 10% בתחום הביניים (כוח של  $F \approx 0.1 pN$ ). באיור 7 ניתן לראות גרף המראה את התאמת המודלים לתוצאות ניסיוניות של מתיחת DNA.



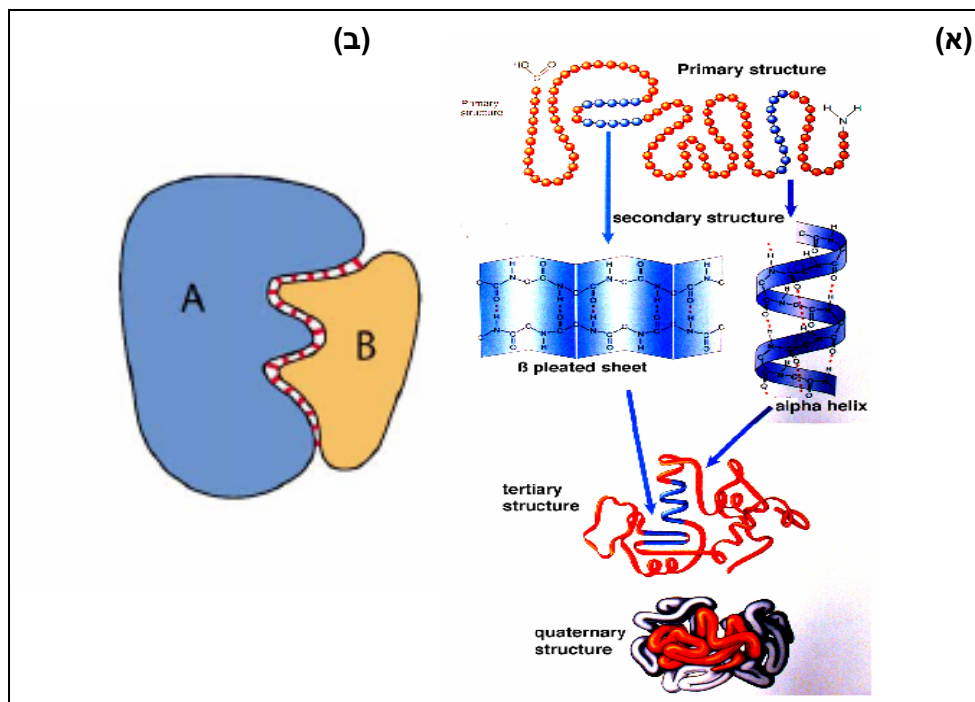
**איור 7:** כוח יחסית למתיחות של מולקולת DNA וגרפים תיאורטיים של המודלים FJC (התחתון) ו WLC. רואים התאמה טובה הרבה יותר עבור מודל ה WLC ושני המודלים מתלכדים עבור כוחות חלשים.

## 1.2. חלבונים

### 1.2.1. תפקידים ומאפיינים

החלבונים כוללים 60% ממשקל התא היבש והם מבצעים את רוב הפונקציות התאיות כמו העברה של ביו מולקולות (**transporting bio molecules**), הסדרה של תגובות ביולוגיות (**regulation biological responses**) וקטליזציה של תגובות ביוכימיות למטאבוליזם (**catalyzing chemical reaction for metabolism**). החלבונים בנויים ממגוון של 20 חומצות אמינו שונות המסודרות בדרך ספציפית המקודדת בגן המתאים. החלבונים בנויים מכמה מאות או אלפים של חומצות אמינו והמבנה שלהם מורכב מאוד ונשמר על ידי קשרים הידרופוביים, אלקטרוסטטיים ומימניים. ארגון מבנה של חלבון מסודר מ 4 רמות שונות [2]: המבנה הראשוני הוא סידור חומצות האמינו, המבנה מסדר שני הם סלילי ה  $\alpha$  ו  $\beta$  ( **$\alpha$  - helices** ו  **$\beta$  - helices**) הנוצרים על ידי קשרי מימן. המבנה מסדר שלישי הוא ה  $\alpha$  - helices וה  $\beta$  - helices ארוזים בצורת כדור באזורים מסוימים בחלבון והסדר הרביעי מתייחס לתחומים רבים המחוברים על ידי לולאות או מבנים מסדר שני. כיוון שהוא ארוז בצורה זו החלבון הוא חומר פולימרי דמוי מוצק.

המאפיין החשוב ביותר של חלבון הוא הצורה שיש לו במרחב, כלומר הסידור המיוחד של האטומים במבנה המקופל כיוון שהזיהוי והקשירה של חלבונים תלויה מאוד במבנה הגיאומטרי והכימי של השטח המגיב. תגובה זו של מנעול ומפתח (איור 8 ב) מונחת ביסודו של כל תהליך בתא. עיוות של צורה זו של החלבון (**protein deformation**) על ידי כוחות מכאניים משפיעים על זיהוי חלבון-חלבון וחלבון-DNA מה שמוביל לשינויים בתהליכים הביוכימיים השולטים בהתנהגות והתפקוד של התא.



**איור 8:** א., מבנה של חלבון ותתי המבנים שלו. ב. הצורה התלת ממדית של החלבון המאפשרת זיהוי בתהליך המנעול והמפתח.

## 1.2.2. חלבון ה RecA ותפקידיו

### א. רקומבינציה הומולוגית

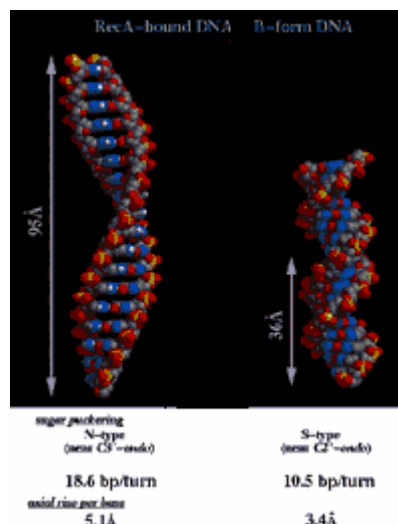
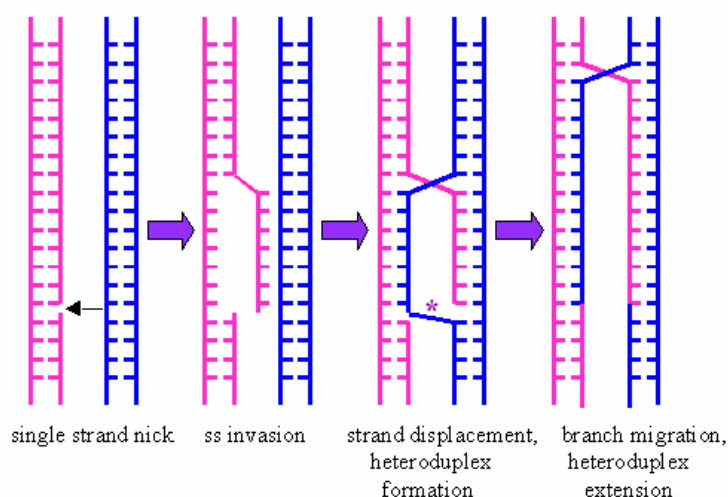
שיטה אחת בה נוצרים שינויים גנטיים היא רקומבינציה הומולוגית (**homologues recombination**). בתהליך זה שתי מולקולות DNA כפולות (dsDNA) מחליפות קטעים של DNA על ידי חיתוך וחיבור של גדילים [5]. רקומבינציה הומולוגית מתרחשת במגוון רחב של אורגניזמים בהקשרים שונים. לפי מודל הרקומבינציה נעשה חיתוך באחד מהגדילים של הסליל הכפול, דבר המאפשר לגדיל יחיד לחדור אליו, הגדיל הפולש מחליף את אחד הגדילים של ה dsDNA ונקשר לשני על ידי חיבור Watson-Crick. הגדיל המוחלף מצטלב עם השארית של הגדיל הפולש ומתחבר אליו. מבנה זה נקרא **Holliday junction**. חלבון ה RecA הוא קריטי בתהליך זה כאשר הוא גורם לחיבור של הגדיל היחיד (ssDNA) עם האזור המשלים של ה dsDNA. מונומרים של RecA תחילה מבצעים פולימריזציה (**polymerization**) סביב ה ssDNA ויוצרים סביבו סליל, בזמן תהליך זה החלבון מותח את ssDNA ב  $1.6\text{\AA}$  עבור כל BP. פולימר זה מגיע לסליל הכפול ונצמד אליו, הסליל הכפול נפרש מעט על מנת לאפשר חיבור של ה ssDNA אל האזור המתאים ולאחר מכן ממשיך להיפרם על מנת לאפשר החלפה של כל הקטע. אחרי ההיקשרות של החלבון אל ה DNA דרושה הידרוליזה של ATP כדי לנתק את גדילי ה DNA מסלילי ה RecA.

### ב. SOS response

בנוסף לתפקידו ברקומבינציה חלבון ה RecA מזרז ייצור של חלבון *lexA*. בתאים בריאים *lexA* מדכא את הביטוי של גנים המקודדים חלבוני תיקון של DNA (**SOS genes**). אחרי פגיעה ב DNA ה *lexA* מאפשר ייצור של חלבוני ה SOS הדרושים, אולם דבר זה יכול להתאפשר רק אחרי שחלבון זה מופעל על ידי גדיל של ssDNA-RecA. גדיל זה נקשר אל חלבוני ה *lexA* ומפעיל אותם ועל ידי זה מדרבן תיקון של DNA.

### ג. מכאניזם של חיבור RecA-DNA

במידה וחלבון ה RecA מוסף אל מולקולת ssDNA החלבון נקשר סביב הגדיל היחיד. תצפיות של מיקרוסקופ אלקטרוני הראו שה DNA במקרים אלו מתארך פי 1.5 עם 19 BP לסיבוב (במקום 10 ללא RecA). בנוכחות של ATP החלבון יכול להיקשר גם למולקולת DNA כפולה מה שמוביל גם שם להתארכות המולקולה פי 1.5.



**איור 9**: תיאור של רקומבינציה הומולוגית משמאל. מימין רואים את ההשפעה של היצמדות החלבון ל DNA. בצד ימין מתוארת מולקולת DNA ללא חלבון כאשר יש בערך 10.5 BP לסיבוב ומרווח של 3.4 Å ל BP. אחרי שהחלבון נקשר למולקולה המרווח בין BP גדל ל 5.1 Å ויש 18.6 BP לסיבוב.

השפעות מכאניות אלו בנוסף לקצב ההיצמדות של החלבון נמדדו גם באמצעים אחרים [5,7] והמטרה של מחקר זה היא למדוד אותם בצורה מדויקת כמה שיותר שתאפשר אבחנה בהיצמדות של מונומר אחד של חלבון.

### 1.3 הפינצטה אופטית

מערכת הפינצטה האופטית (**optical tweezers**) עושה שימוש בלחץ הקרינה על מנת ללכוד עצמים קטנים [8-11]. את הכוחות הפועלים על עצם זה ניתן למדוד בעזרת טכניקות שונות. היכולת של מערכת זו לשלוט במולקולה בודדת בדיוק ננומטרי ולמדוד את הכוחות הפועלים עליה, אפשרה פיתוח של מספר נושאים חשובים בביופיזיקה. יכולת זו מאפשרת בחינה של מודלים המתארים מולקולות DNA [12,13] ולהבחין בפעילות של חלבונים ואנזימים לא בצורה סטטיסטית [14-17].

#### 1.3.1 לכידה אופטית של חלקיק דיאלקטרי

לחץ הקרינה מוגדר ככוח ליחידת שטח והוא נגרם משינוי התנע של האור. תנע של פוטון יחיד בקרן אור הוא:

$$|\vec{p}| = \frac{h}{\lambda} \quad (14)$$

עצמת האור היא מספר הפוטונים העוברים דרך שטח ליחידת זמן. שטף התנע של פוטונים כאשר עצמת האור נתונה על ידי S הוא:

$$d\left(\frac{dp}{dt}\right) = \left(\frac{n}{c}\right) S dA \quad (15)$$

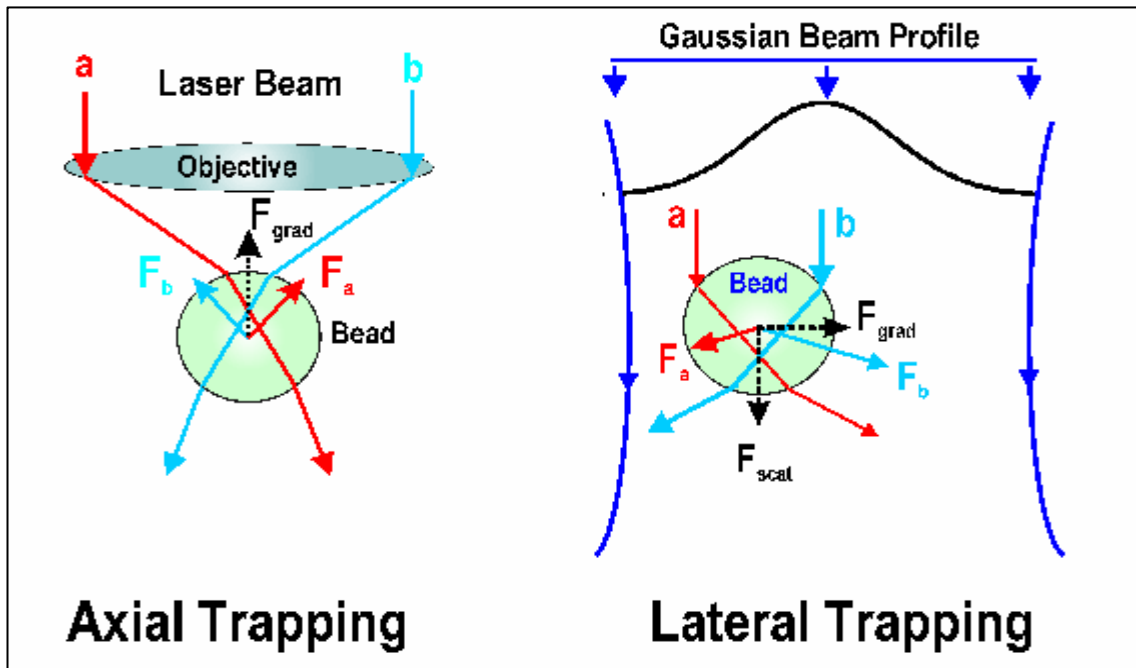
כאשר  $n$  הוא מקדם השבירה,  $c$  היא מהירות האור,  $p$  הוא התנע הכללי של הפוטונים ו  $dA$  הוא אלמנט שטח המאונך ל  $S$ .

כיוון שהכוח על העצם הדיאלקטרי נתון על ידי שינוי התנע של האור הנגרם עקב שבירה של האור על ידי העצם, הכוח הכולל על העצם הוא ההפרש בין שטף התנע הנכנס ובין היוצא.

$$F = \left(\frac{n}{c}\right) \iint (S_{in} - S_{out}) dA \quad (16)$$

לכן כאשר האור הנכנס אל חומר דיאלקטרי משנה את כיוונו ולכן גם את הכיוון של  $S$  הוא מפעיל כוח על העצם. כוחות אלו של אור הם קטנים מאוד ומורגשים עבור עצמת אור חזקה וחלקיקים קטנים.

במערכת הפינצטה האופטית האור מסופק על ידי לייזר, והחפץ עליו מופעל הכוח הוא מסדר גודל של מיקרוניס בודדים. כאשר משתמשים בלייזר עם קרן גאוסיאנית הקרניים נשברות בצורה כזו שדוחפת את העצם אל מרכז הקרן (איור 10 מימין), אם בנוסף מרכזים את הקרן בצורה חדה על ידי אוביקטיב עם NA גבוה (איור 10 משמאל) ניתן ליצור מצב שהכוח הפועל על הכדור פועל בניגוד לכיוון ההתקדמות של האור ומאזן את הכוח הנגרם מפוטונים הפוגעים בכדור וחוזרים. בצורה כזו ניתן ללכוד את הכדור בשלושה מימדים.



**איור 10:** תרשים הכוחות של כדור במלכודת אופטית. מימין קרן בעלת פרופיל גאוסיאני גורמת לכוח לפעול בכיוון מרכז הקרן ועל ידי כך לכידה במישור XY. משמאל ריכוז הקרן בצורה חדה גורם לכוחות הפוכים לכיוון התקדמות האור המאזנים את הכוח הנגרם על ידי פוטונים הניתזים מהכדור מה שמאפשר לכידה בציר Z.

### 1.3.2. מדידה של כוחות קטנים על חלקיק לכוד

לכידה של עצמים על ידי הפינצטה האופטית מועילה רק בתנאי שניתן לבצע מדידות כמותיות של הכוחות הפועלים על הכדור הלכוד. כיוון שהקרן גאוסיאנית הכדור הלכוד חווה כוח אשר מחזיר אותו תמיד לכיוון מרכז הקרן, אשר פרופורציונאלי למרחק בין מרכז המלכודת ומרכז הכדור. ניתן לתאר בקירוב כוח של מלכודת אופטית על ידי המשוואה:

$$F = -\kappa \bar{x} \quad (17)$$

לכן על ידי הגדרה של הקבוע  $\kappa$  ניתן יהיה לדעת את הכוח הפועל על כדור אם יודעים את מיקום הכדור במלכודת.

### 1.3.3. כיוול המלכודת

ניתן לחשב את הכוחות על הכדור כתוצאה מגרר בתור הנוזל. כדור בעל רדיוס  $r$  הנע במהירות  $v$  בתוך נוזל בעל צמיגות  $\eta$  חווה כוח הנתון על ידי חוק סטוקס:

$$F_{vis} = \gamma v = 6\pi\eta r v \quad (18)$$

כאשר  $\gamma$  נקרא גם מקדם הגרר. כיוון שקוטר הכדור וצמיגות הנוזל ידועים ניתן להריץ את הכדור במהירות ידועה ועל ידי זה לדעת את הכוח הפועל עליו. כאשר מודדים בעזרת מצלמת וידאו או בכל דרך אחרת את תזוזת הכדור ממרכז המלכודת עבור מהירויות שונות, ניתן לכייל את הכוח עבור תזוזה מסוימת ולמצוא את  $\kappa$ . היתרונות של שיטה זו הם שניתן למצוא את הכוח בכל כיוון וכך לדעת אם המלכודת סימטרית, בנוסף השיטה לא דורשת אמצעים מיוחדים אלא רק מצלמה.

דרך נוספת למצוא את  $\kappa$  היא בעזרת תיאורית החלוקה השווה (Equipartition Theory). הפלקטואציות התרמיות של אובייקט לכוד יכולות לשמש למציאה של קבוע הקפיץ. עבור אובייקט בפוטנציאל הרמוני עם קבוע קפיץ  $\kappa$ :

$$\frac{1}{2} k_{BT} = \frac{1}{2} \kappa \langle x^2 \rangle \quad (19)$$

כאשר  $x$  הוא ההעתק של החלקיק מנקודת שיווי המשקל של המלכודת. לכן על ידי מדידה של השונות במיקום של כדור לכוד ניתן למצוא את קבוע הקפיץ  $\kappa$ . בשיטה זו יש למדוד את מיקום הכדור בתדירות גבוהה ולכס לא ניתן להשתמש במצלמת וידאו, בנוסף המלכודת צריכה להיות סימטרית.

## 2. מטרת המחקר

- הכרת מערכת הפינצטה האופטית, שיפור הסט אפ הקיים על מנת לאפשר ביצוע מדידות מדויקות בזמן אמת, בתדירות גבוהה, בטמפרטורה מיוצבת ותוך כדי שינוי ריכוז חומרים והוספת חומרים חדשים לדוגמא.
- מדידה של המאפיינים של הפולימריזציה של RecA על מולקולת DNA בודדת ואת השינויים הנגרמים לאלסטיות של מבנה המורכב מ RecA-DNA.

## 3. שיטות ותוצאות ראשוניות

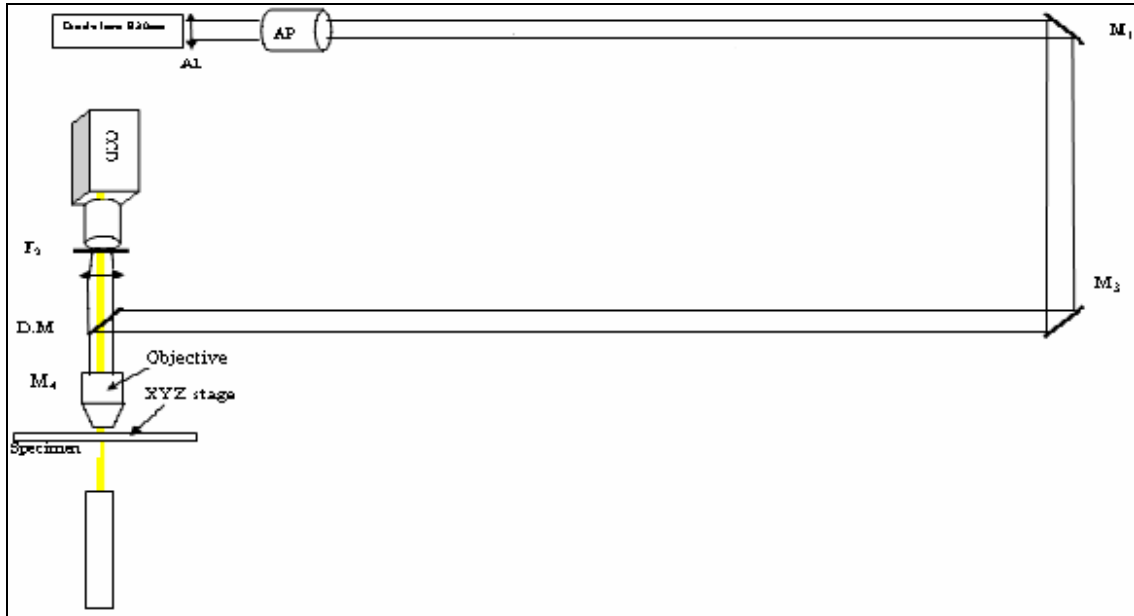
### 3.1 מערכת הניסוי

חלק גדול מביצוע הניסוי הוא הכנת המערכת. המערכת חייבת להיות בעלת מאפיינים ותכונות שונות ההכרחיות לביצוע הניסוי. תחילה ניתן תיאור של המערכת הבסיסית שהייתה לפני תחילת המחקר ומוגדרים השינויים הדרושים לביצוע ולאחר מכן מתוארת העבודה שהתנהלה וצריכה להתנהל כדי ליישם אותם.

### 3.1.1 המערכת הקיימת ושינויים הדרושים בה

המערכת שהייתה קיימת בתחילת המחקר (איור 11) הייתה מערכת פינצטה אופטית בסיסית. המערכת בנויה מלייזר אדום 833nm (SDL-5421-G1) הנאסף על ידי עדשה אספרית ההופכת את הקרן לכתם מרוכז ואליפטי. לאחר מכן הקרן עוברת דרך מעגל קרן (Melles Griot 3X) המרחיב אותה רק בציר אחד והופך אותה לעגולה. הקרן נשברת על ידי מראה דיכרואית המסיטה אותה אל האובייקטיב (Zeiss, 1.25 NA, oil immersion, 100X) בצורה כזו שהיא ממלאת את כל פתח הכניסה שלו, האובייקטיב מרכז את האור לתוך הדוגמא על מנת ללכוד את הכדור. האור החוזר מהכדור הלכוד חוזר חזרה דרך האובייקטיב ונכנס למצלמת CCD (-Cohu 4912) האור החוזר המחוברת למחשב. על מנת לראות את הדוגמא משתמשים באור לבן (PL-900 Dolan) אשר נכנס לדוגמא מלמעלה עובר דרך המראה הדיכרואית ונותן תמונה של הדוגמא ב CCD. הדוגמא מונחת על במת XYZ המונעת על ידי מנועים שניתן להזיז אותם בצעדים קטנים או במהירות קבועה. כיוול המערכת מתבצע על ידי הזזה של הבמה במהירויות קבועות וידועות חישוב הכוח של הגרר על ידי חוק סטוקס ומדידת מרחק הכדור ממרכז המלכודת על הסרט של מצלמת ה CCD בעזרת אלגוריתמים לעיבוד תמונה [18].





**איור 11:** מערכת הפינצטה האופטית הבסיסית שאותה היה צריך לשדרג לביצוע הניסוי. מסלול הקרן מתחיל בלייזר IR הנאסף על ידי עדשה אספרית (AL) ועובר דרך מעגל קרן (AP) הקרן מוסטת על ידי מראות רגילות (M1, M2) ואז על ידי מראה דיכרואית (DM) לתוך האוביקטיב. הקרן לוכדת את הכדור בדוגמא וחוזרת אל מצלמת CCD. אור לבן עובר דרך הדוגמא והאוביקטיב מהכיוון השני ומגיע למצלמה.

מערכת זו מאפשרת לכידה של כדורים בגודל של כמה מיקרונים עם קבוע קפיץ של  $k \approx 10 \frac{pN}{\mu m}$ .

אולם על מנת לבצע מחקר זה יש לשדרג ולשנות את המערכת במספר תחומים:

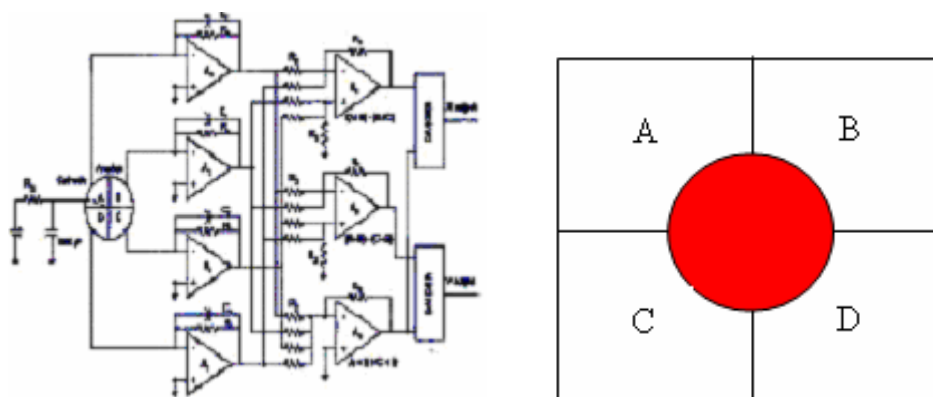
- **מדידת הכוחות בזמן אמת בדיוק גבוה ובתדירות גבוהה** - מצלמת ה CCD מאפשרת מדידת מיקום בדיוק גבוה יחסית כאשר מפעילים אלגוריתמים לעיבוד תמונה על סרטי הניסוי. אולם ניתוח זה לוקח זמן רב והוא מתבצע רק לאחר שהניסוי מסתיים ולא בזמן אמת. בנוסף המצלמה מאפשרת תדירות דגימה של  $20 \frac{f}{sec}$  בלבד דבר הגורם לאיבוד מידע חיוני. יש להוסיף למערכת גלאי שיאפשר קליטת נתונים בקצב גבוה יותר ותוך כדי ביצוע הניסוי.
- **אפשרות לחימום הדוגמא וייצוב הטמפרטורה שלה** - על מנת למדוד היצמדות של חלבון אל מולקולת DNA יש להביא את הדוגמא לטמפרטורת העבודה של החלבון ( $37^\circ$ ). סיבה נוספת לייצוב טמפרטורה היא התלות הגדולה של כל הנוסחאות (כוחות של DNA, חוק סטוקס....) ופרמטרים חשובים רבים (צמיגות, מקדם שבירה...) בטמפרטורה. לכן על מנת לבצע מדידות אמינות ומדויקות יש לדעת את הטמפרטורה ולשמור עליה מיוצבת במהלך הניסוי.
- **אפשרות קריאת נתונים ושליטה על הניסוי בזמן אמת** - בנוסף לקריאת נתונים וידיעת הכוחות בזמן אמת יש לדאוג לאפשרות לשלוט על הניסוי ולשנות פרמטרים בזמן אמת. לדוגמא אם רוצים להחזיק את מולקולת ה DNA במתח קבוע במשך כל זמן הניסוי (אפילו

שנצמידים אליה חלבונים) צריך לדעת את המתיחות בכל רגע נתון ולהחזיר אותה לערך הרצוי במידה והיא משתנה.

- **אפשרות הכנסת חומרים לדוגמא בזמן הניסוי** - הניסוי מחייב יכולת של הזרמת חומרים (חלבון, ATP) ושליטה על הריכוזים שלהם בזמן הניסוי. יש לבצע את הכנסת החומרים תוך כדי מתיחת DNA כלומר ההזרמה צריכה להיות מספיק איטית כך שהכדור לא ישתחרר מהמלכודת וה DNA לא ייקרע.

### 3.1.2 גלאי מהיר ומדויק לעבודה בזמן אמת

על מנת למדוד תזוזות בסקאלה ננומטרית בקצב גבוה הוחלט לשלב במערכת גלאי QPD (Quadrant Photodiode Detector). עקרון הפעולה של הגלאי מוצג באיור 12. הדיודה בנויה מארבעה פיקסלים שווים המסומנים A, B, C ו D כמו באיור, שכל אחד מהם מהווה פוטודיודה בפני עצמו הממירה את עוצמת האור הפוגעת בה לזרם, אל כל אחד מהרבעים מחובר מגבר אלקטרוני ההופך את הזרם למתח.



**איור 12:** עקרון הפעולה של ה QPD והתרשים האלקטרוני שתוכנן.

אחרי המגברים הממירים זרם למתח ישנו מעגל אלקטרוני המוציא 2 מוצאים.

$$OUTPUT_1 = 10 \times \frac{(A+B)-(C+D)}{(A+B+C+D)}$$

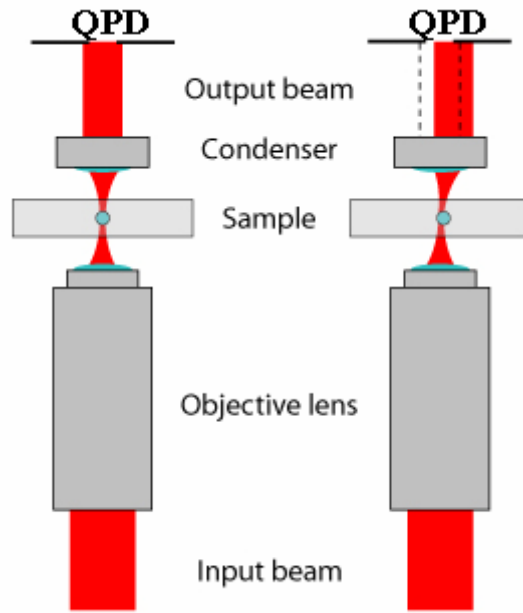
$$OUTPUT_2 = 10 \times \frac{(A+C)-(B+D)}{(A+B+C+D)}$$

הרעיון הוא שכאשר הקרן פוגעת בדיוק במרכז ה QPD (כלומר במידה שווה על כל אחר מהפיקסלים) המתח בשני המוצאים יהיה אפס. כאשר הקרן סוטה לדוגמא ימינה העוצמה של האור

על B ו D תהיה גדולה יותר מעל A ו C ולכן נקבל ב  $OUTPUT_2$  סיגנאל שלילי, כאשר הקרן תסטה שמאלה העצמה על B ו D תהיה קטנה מעל A ו C והסיגנאל ב  $OUTPUT_2$  יהיה חיובי. בצורה כזו אחרי כיוול נכון ניתן למצוא את היסט הקרן ממרכז ה QPD על מישור XY.

מיקום ה QPD במערכת הוא חשוב מאוד כיוון שצריך להיות במקום בו תזוזה של הכדור יחסית למרכז המלכודת יתבטא בתזוזה של הקרן על הגלאי. יש מספר שיטות לשלב את הדיודה במערכת פינצטה אופטית. שיטה אחת היא לשלב את ה QPD במיקום בו נמצאת מצלמת ה CCD, כלומר האור של הלייזר מגיע לכדור לוכד אותו נאסף חזרה על ידי האובייקטיב עובר דרך עדשת המצלמה ואז מתפצל חצי למצלמה וחצי לדיודה [16]. תוך כדי ניסיון לעבוד בשיטה זו התגלה כי עוצמת האור המגיעה למצלמה היא כל כך נמוכה שההגבר הדרוש לסיגנאל ( $4M\Omega$ ) מוריד את רוחב הפס בצורה משמעותית ומעלה את היחס אות לרעש (SNR). עצמת האור הייתה כל כך נמוכה בגלל שאור הלייזר המוחזר מהכדור צריך לעבור דרך המראה הדיכרואית (שתפקידה לשבור את ה IR) כדי להגיע אל ה CCD. לכן לא ניתן היה להגדיל את עצמת האור ללא החלפה של המראה הדיכרואית, דבר שהיה פוגע בעצמת הלכידה.

על מנת להגדיל את עצמת האור המגיעה ל QPD היה צורך לשנות את השיטה ולמקם את הדיודה מעל לדוגמא, כלומר לקלוט את האור העובר דרך הדוגמא ולא את זה שחוזר מהכדור. כדי לבנות סט-אפ כזה יש להוסיף קונדנסר למערכת. לקונדנסר יש שני תפקידים 1. לאסוף ביעילות את האור המתפזר של הלייזר. 2. למקד בצורה היעילה ביותר את התאורה הלבנה על הדוגמא. מסיבה זו הקונדנסר הוא אלמנט מורכב ואיכותי ולא ניתן להשתמש בעדשה רגילה בעלת עיוותים. אחרי ניסויים של כמה אופציות השתמשתי באובייקטיב 10X (Olympus) בעל NA של 0.3 לתפקיד זה. את הדיודה יש למקם בצורה כזו שהיא מצומדת למישור הפוקאלי האחורי (BFP) של הקונדנסר, כלומר להדמות על הדיודה את ה BFP של הקונדנסר. צורת עבודה זו הגדילה את עצמת האור באופן משמעותי ואפשרה להקטין את ההגבר ל ( $50K\Omega$ ). כאשר עובדים בצורה זו הגלאי לא רגיש לתזוזה של המלכודת בכיווני X-Y אלא רק לתנועה היחסית בין האובייקט למרכז המלכודת [19,20] כפי שרואים באיור 14 :



איור 14 : מסלול קרני הלייזר כאשר ה QPD ממוקם ב BFP של הקונדנסר.

## כיוול הדיודה

הכוונה בכיוול הדיודה היא לדעת את הקבוע הממיר את המתח המתקבל במוצאי המגברים  $OUTPUT_1$  ו  $OUTPUT_2$  לננומטרים. קיימים דרכים רבות לכיול QPD הדרך הטובה ביותר המספקת גם מידע על מצב המערכת ומצב הדיודה היא ה power spectrum method [21-24] שניתן להשתמש בה עבור נוזל עם קבוע גרר  $\gamma$  ידוע. חלקיק הלכוד בפוטנציאל הרמוני חווה כוחות רנדומאליים עקב פלקטואציות תרמיות [25], את משוואת התנועה של כדור ניתן לבטא בצורה:

$$\gamma \frac{dx}{dt} + \kappa x = F(t) \quad (20)$$

כאשר  $\gamma$  הוא מקדם הגרר ו  $\kappa$  הוא קבוע הקפיץ של המלכודת האופטית. אם  $f(t)$  נובע מפלקטואציות תרמיות אז הוא רנדומאלי, הערך הממוצע שלו הוא אפס וה power spectrum שלו קבוע ושווה ל:

$$|F(f)|^2 = 4\gamma k_B T \quad (21)$$

את הפתרון של משוואה (20) ניתן לקבל על ידי ביצוע טרנספורמצית פורייה משני צידיה:

$$2\pi\gamma(f_c - if)x(f) = F(f) \quad (22)$$

כאשר

$$f_c = (\kappa / 2\pi\gamma) \quad (23)$$

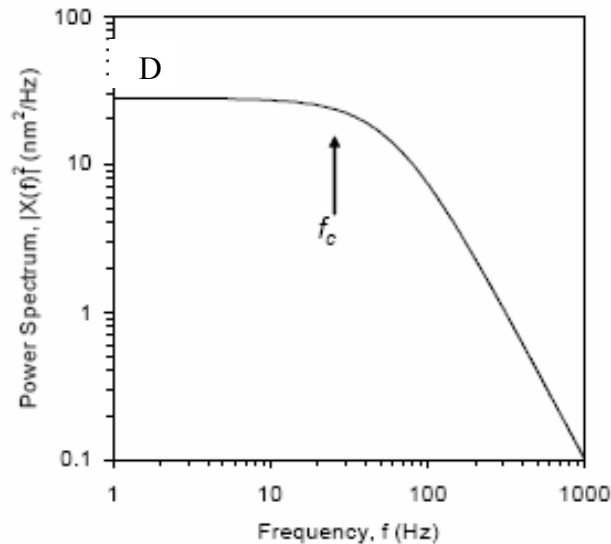
אחרי שמכפילים בצמוד מקבלים :

$$|x(f)|^2 = \frac{D}{\pi^2(f_c^2 + f^2)} \quad (23)$$

כאשר D הוא מקדם הדיפוזיה.

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} \quad (24)$$

ולכן אם נמדוד עם הדיודה את מיקום הכדור הנע בתנועה בראונית בתוך המלכודת ולאחר מכן נמצא את ה power spectrum של ההעתק ונבצע התאמה לפונקציה (23) נוכל למצוא ניסיונית את D ו  $f_c$  כאשר  $f_c$  היא תדירות הברך של הגרף (איור 15) ו D היא נקודת החיתוך עם ציר Y.

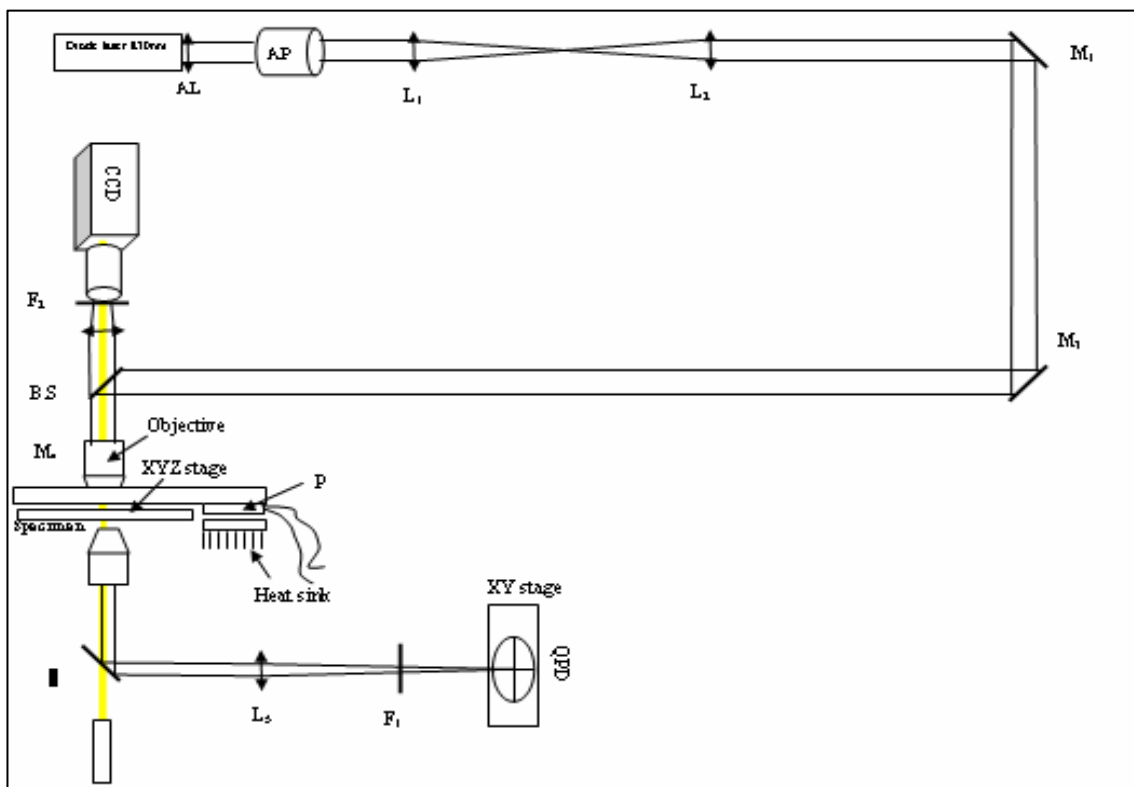


**איור 15:** גרף של הפונקציה (23) כאשר הפרמטרים D ו  $f_c$  מסומנים בשרטוט. הפונקציה היא בעצם לורנציאן אשר תדירות הברך שלו היא  $f_c$  ונקודת החיתוך עם ציר Y היא D.

על ידי משוואה (23) ובעזרת הפרמטר  $f_c$  שהתקבל בהתאמה ניתן למצוא את קבוע הקפיץ של המלכודת. את כיול הדיודה ניתן לבצע בעזרת D: כיוון שהערך של D המתקבל מההתאמה הוא ביחידות של  $V^2/sec$  וקבוע הדיפוזיה המחושב במשוואה (24) שכל הפרמטרים שלה ידועים מתקבל ביחידות של  $m^2/sec$  כל מה שנתר זה לחלק אותם אחד בשני להוציא שורש ולקבל את קבוע הכיול העובר מוולטים למטרים או לננומטרים.

היתרון של שיטה זו הוא שהיא מאפשרת לבדוק את מצב המערכת כיוון שאם מצב המערכת לא תקין (המלכודת לא סימטרית, ה QPD לא נמצא במקום הנכון בדיוק, הדוגמא מלוכלכת וכו) ה power spectrum מונחת מהר ולא נראה כמו לורנציאן.

שרטוט המערכת החדשה יחד עם ה QPD ומערכת החימום עליה יורחב בהמשך מוצג באיור 16.

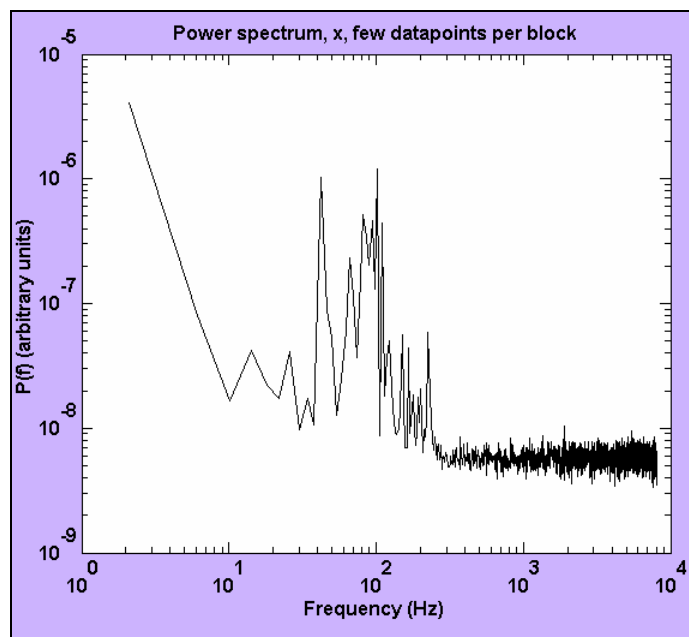


**איור 16:** שרטוט המערכת אחרי הוספת ה QPD ומערכת החימום. קרן הלייזר מתפזרת אחרי לכידת הכדור ונאספת על ידי הקונדנסר, משם היא נשברת על ידי מראה דיכרואית נוספת עוברת דרך עדשה ופילטר ומגיעה ל QPD הנמצא במקום צמוד ל BFP של הקונדנסר. מערכת הטלסקופ אחרי מעגל הקרן נועדה לשלוט בהתכנסות או התבדרות הקרן המגיעה לאוביקטיב, דבר ההכרחי למערכת החימום.

ה QPD יושבת על במת XY כדי שיהיה ניתן לכוון את הקרן שתפגע בדיוק במרכז, העדשה שלפני ה QPD נועדה על מנת להדמות עליה את ה BFP של הקונדנסר והפילטר נועד כדי לסנן הפרעות אור חיצוניות ולהעביר רק את אור הלייזר. הקרן מוסטת אל ה QPD על ידי מראה דיכרואית נוספת שמאפשרת מעבר של אור לבן.

קליטת הנתונים נעשית על ידי כרטיס A/D הנמצא במחשב ונשלט על ידי תוכנת labview. את הנתונים קוראים בתדירות של 16K דגימות לשנייה כלומר לפי תיאורית Nyquist התדירות המקסימאלית לעבודה היא 8kHz.

התוצאות הראשונות שהתקבלו לא היו דומות לפונקציה (23) ולא ניתן היה לבצע התאמה. גם כאשר בוצעה אופטימיזציה למצב המערכת וסימטריית המלכודת לא התקבל power spectrum שנראה כמו לורנציאן אלא גרף המונחת בצורה חדה כבר בתדירויות נמוכות (איור 17).



**איור 17:** הגרף של ה power spectrum שהתקבל בתחילת העבודה. הגרף מונחת כבר בתדירויות מאוד נמוכות ולא נראה כמו לורנציאן.

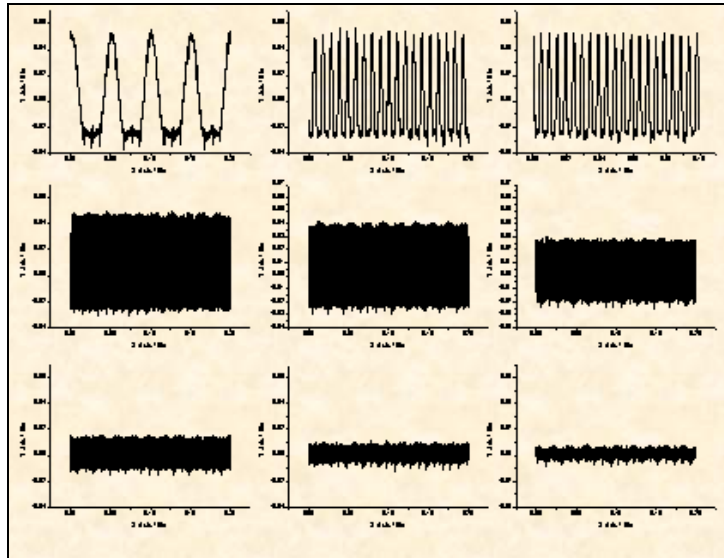
ההסבר היחיד לקבלת גרף זה היה תפקוד לקוי של המגברים האלקטרוניים של ה QPD שחייבים לספק נתונים ברוחב פס גבוה על מנת שה power spectrum לא ייחתך. למרות שלפי החישובים התיאורטיים המערכת עמדה בדרישות (רוחב פס גבוה מ 8KHz) היה צורך למצוא דרך לבדיקה ניסיונית של רוחב הפס של הגלאי.

למטרה זו נעשה שימוש ב LED שיכול להבהב בתדירויות גבוהות המחובר אל מחולל פונקציות אשר מספק מתח בתדירות ידועה ונשלטת. כאשר מניחים את ה LED צמוד ל QPD ובודקים את מוצא המגברים ניתן לראות באיזו תדירות הגבר המגברים מונחת. דבר זה נחוץ וחשוב משתי סיבות:

1. ללא רוחב פס גבוה שיטה זו לא יכולה לעבוד וגם לא ניתן יהיה לאסוף נתונים בקצב גבוה כמו שהניסוי דורש.

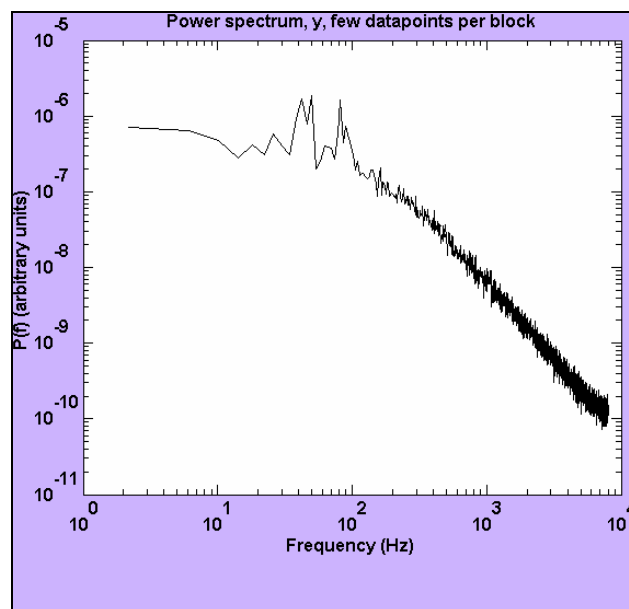
2. צריך לדעת את רוחב הפס על מנת לדעת איזה פילטר לשים על המגברים ( anti aliasing filter) כדי להנחית תדירויות גבוהות יותר מאלו הדרושות לנו כיוון שהן עלולות להכניס הפרעות גם לתדירויות בהן עובדים.

בצורה כזו ניתן היה לראות שבניגוד לחישובים התיאורטיים רוחב הפס נמוך מידי וזו הייתה הסיבה לקבלת power spectrum שטוח. באותו אופן ניתן היה לבדוק כל קונפיגורציה של המעגל האלקטרוני עד שנמצאה קונפיגורציה העומדת בדרישות. באיור 18 ניתן לראות דוגמא של בדיקת רוחב פס של אחד התכנונים.



**איור 18:** בדיקה בעזרת LED של רוחב הפס של הגלאי. נסרקו תדירויות הבהוב של 1000, 2000, 4000, 6000, 10000, 20000, 20000, 60000, 100000 הרץ משמאל לימין. רואים בבירור מהגרפים שמתחילה הנחתה כבר ב 1000Hz שהולכת ומחמירה ככל שהתדירות עולה.

אחרי שינוי התכנון של האלקטרוניקה התוצאות השתפרו בצורה משמעותית וה power spectrum שהתקבל קיבל צורה של לורנציאן.



**איור 19:** power spectrum שהתקבל אחרי מציאה של קונפיגורציה אלקטרונית העומדת בדרישות.

למרות השיפור בתוצאות עדיין הייתה בעיה בעבודה עם הגלאי. ה power spectrum אמנם לא הונחת אבל לא ניתן היה לבצע התאמה לפונקציה (23) בצורה מדויקת ולקבל ערכים אמינים ובעלי שגיאה נמוכה של  $D$  ו  $f_c$ .



הדרך היחידה שבעזרתה התקבלו תוצאות טובות החוזרות על עצמן לאורך זמן הייתה על ידי שימוש בכדורים קטנים בקוטר של 1.4 או 2 מיקרון. הטבלה הבאה מראה חלק מהמדידות הרבות שנעשו כדי לנסות לכייל את ה-QPD. המדידות בטבלה זו נעשו על כדור בקוטר של 1.6 מיקרון כאשר טמפרטורת הדוגמא לא הייתה מיוצבת. ניתן לראות שעבור אותו כדור סטיית התקן עבור המדידות של שני הפרמטרים  $f_c$  ו  $D$  לא גדולה, אולם כאשר מחליפים כדור גם  $f_c$  וגם  $D$  משתנים בצורה משמעותית. דבר זה נבע בעיקר מהשינוי בגובה הלכידה מעל לזכוכית שקשה לשמור עליו קבוע כאשר לוכדים כדור אחר במקום אחד בדוגמא ומהסטייה בקוטר הכדורים שלפי נתוני היצרן היא להיות  $\pm 5\%$ . ניתן לראות שהערכים של  $D$  מתפזרים יותר מאשר של  $f_c$  אבל כיוון

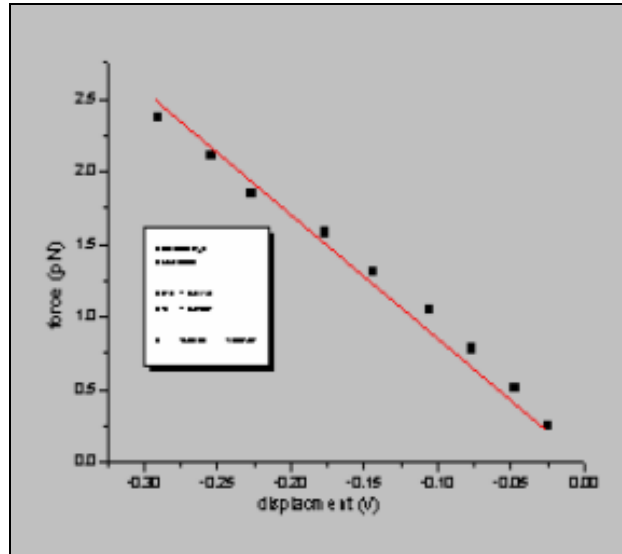
שקבוע הכיול מחושב על ידי  $\sqrt{D\gamma/k_B T}$  אז הפיזור על קבוע הכיול קטן יותר.

טבלה 1.

תוצאות מדידות שנעשו בניסיונות לכיול ה-QPD.

$D$	ציר $f_c Y$	$D$	ציר $f_c X$	
$0.524 \pm 0.00317$	$86.83 \pm 4.72$ 34.5%	$0.435 \pm 0.00264$	$104.05 \pm 4.24$ 0%	כדור 1 מדידה 1
$0.581 \pm 0.00352$	$79.32 \pm 5.04$ 24.7%	$0.499 \pm 0.00304$	$101.93 \pm 4.34$ 3.1%	כדור 1 מדידה 2
$0.634 \pm 0.00386$	69.4% $96.31 \pm 4.53$	$0.606 \pm 0.00368$	$102.44 \pm 4.29$ 10.4%	כדור 1 מדידה 3
$0.571 \pm 0.00346$	81.2% $83.87 \pm 4.87$	$0.550 \pm 0.00334$	$102.54 \pm 4.30$ 74.2%	כדור 1 מדידה 4
<b>0.577 0.0451</b>	<b>86.582 7.18</b>	<b>0.522 0.0728</b>	<b>102.74 0.913</b>	<b>ממוצע סטיית תקן</b>
$0.677 \pm 0.00412$	15% $101 \pm 4.42$	$1.14 \pm 0.00689$	$88.85 \pm 4.64$ 38.1%	כדור 2 מדידה 1
$0.677 \pm 0.00414$	$107.33 \pm 4.31$ 69.7%	$1.12 \pm 0.00679$	$89.17 \pm 4.60$ 20.3%	כדור 2 מדידה 2
$0.626 \pm 0.00382$	$102.15 \pm 4.41$ 41.8%	$0.988 \pm 0.00600$	$99.78 \pm 4.37$ 30.8%	כדור 2 מדידה 3
$0.694 \pm 0.00426$	9% $110.71 \pm 4.32$	$0.997 \pm 0.00608$	$104.31 \pm 4.34$ 28.8%	כדור 2 מדידה 4
$0.650 \pm 0.00396$	77.8% $97.63 \pm 4.52$	$0.916 \pm 0.00559$	$105.07 \pm 4.34$ 68.6%	כדור 2 מדידה 5
<b>0.6648 0.027</b>	<b>103.764 5.22</b>	<b>1.032 0.095</b>	<b>97.436 7.95</b>	<b>ממוצע סטיית תקן</b>
$0.435 \pm 0.00263$	40.1% $70.73 \pm 5.46$	$0.380 \pm 0.00231$	$103.91 \pm 4.31$ 63.5%	כדור 3 מדידה 1
$0.417 \pm 0.00252$	21.9% $64.59 \pm 5.81$	$0.354 \pm 0.00216$	$104.22 \pm 4.31$ 4.2%	כדור 3 מדידה 2
$0.408 \pm 0.00246$	11.2% $73.11 \pm 5.28$	$0.319 \pm 0.00193$	$93.77 \pm 4.52$ 3.3%	כדור 3 מדידה 3
$0.392 \pm 0.00236$	7.2% $77.09 \pm 4.99$	$0.302 \pm 0.00183$	$106.04 \pm 4.20$ 1.7%	כדור 3 מדידה 4
$0.394 \pm 0.00237$	26.5% $63.10 \pm 5.83$	$0.313 \pm 0.00191$	$103.96 \pm 4.33$ 59.9%	כדור 3 מדידה 5
<b>0.41 0.0177</b>	<b>69.724 5.85</b>	<b>0.334 0.0324</b>	<b>102.38 4.89</b>	<b>ממוצע סטיית תקן</b>

לאחר שבעזרת הכדורים הקטנים התבצע כיוול אמין של ה QPD, נעשו ניסיונות להשתמש בה ולבדוק אותה ביישומים שונים. דבר ראשון שהתבצע היה בדיקה של חוק סטוקס (למעשה הדרך הישנה לכיול המלכודת בעזרת מצלמת ה CCD). כלומר הזזת הכדור בנוזל במהירויות שונות ובדיקה הסטייה ממרכז המלכודת. הגרף של הכוח (המחושב מהמהירות על ידי חוק סטוקס) כפונקציה של המרחק ממרכז המלכודת עבור מהירויות נמוכות בתחום הליניארי של המלכודת הוא קו ישר עם שיפוע  $k$ . ה  $k$  שנמצא לפי גרף זה היה זהה לזה שנמצא בעזרת תדירות הברך של הלורנציאן:

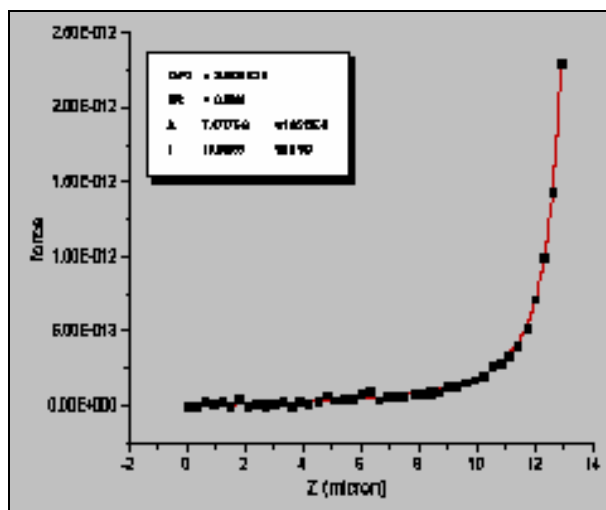


**איור 20:** הקשר בין התזוזה ממרחק המלכודת ובין הכוח הפועל על כדור הנע במהירויות שונות בנוזל. עבור מרחקים קטנים ממרכז המלכודת הקו הזה הוא בקירוב ליניארי והשיפוע שלו הוא קבוע הקפיץ של המלכודת.

דבר שני שהתבצע היה בדיקת נוסחת Marko and Siggia (13) לכוח המפעילה מולקולה מתוחה.

הניסוי התבצע בצורה הבאה:

- הוכנה דוגמא עם DNA וכדורים בהדבקה ספונטנית (כלומר ערבוב של כל המרכיבים ב PBS עם 6 PH ואינקובציה בטמפרטורת החדר על מנת שהם יידבקו).
  - נלכד כדור המחובר ל DNA בצורה כזו שהמלכודת נמצאת מעל אזור החיבור שלו עם הזכוכית.
  - לאחר מכן מזיזים את הבמה בקפיצות קבועות לכיוון מסוים כאשר עבור כל קפיצה לוקחים מדידה של מיקום הכדור בתוך המלכודת.
- הגרף שהתקבל מוצג באיור 21 יחד עם התאמה לנוסחה (13), ה persistence length המתקבל שונה מהתיאורטי (70nm) בגלל שאורך ה DNA לא היה ידוע (צורת הכנת דוגמא זו לא מבטיחה שה DNA ידבק בקצוות שלו לכדור ולזכוכית).



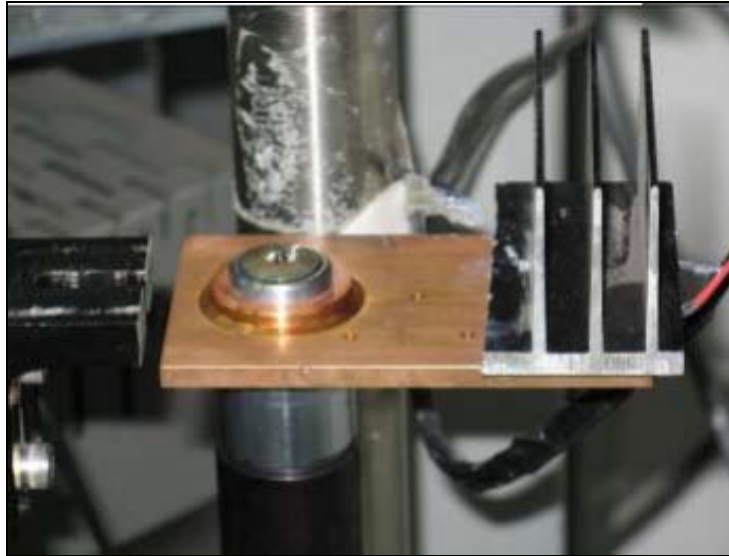
**איור 21:** המתיחות שמפעילה מולקולת DNA בודדת כאשר מותחים אותה. רואים התאמה טובה לנוסחה (13). מדידת הכוחות התבצעה על ידי גלאי ה QPD.

על מנת לעבוד עם כדורים גדולים שלהם יתרון בכך שהם נלכדים טוב יותר וקל יותר להדביק אליהם DNA, יש להמשיך לשפר את המערכת. כדי להבין טוב יותר מה קורה על QPD הותקנה מצלמת CCD נוספת שממוקמת במקום ה QPD כדי שתאפשר לראות איך נראה ה BFP של הקונדנסר. כאשר מבצעים זאת ניתן למקם בצורה מדויקת הרבה יותר את הדיודה. העבודה עם המצלמה הנוספת כדי למצוא במדויק את המיקום בו למקם את ה QPD היא יעילה ויכולה לעזור כדי לאפיין ולפתור את הבעיה.

### 3.1.3 מערכת החימום

ניתן לראות שכל המשוואות בהן משתמשים ופרמטרים רבים תלויים בטמפרטורת הדוגמא. הטמפרטורה חייבת להיות יציבה וידועה במשך כל הניסוי על מנת לקבל תוצאות אמינות. בנוסף יש צורך לחמם את הדוגמא לטמפרטורת העבודה של החלבון על מנת שיוכל להיצמד ביעילות ל DNA.

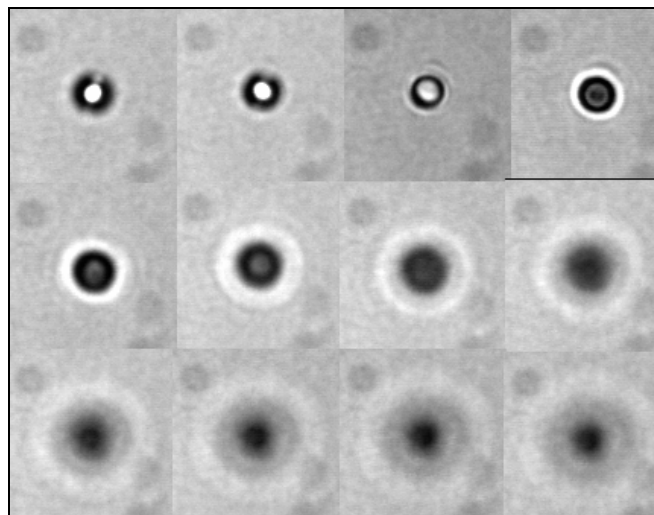
מערכת החימום נבחרה בצורה כזו שהיא לא תחמם את הדוגמא ישירות אלא דרך האובייקטיב. היתרונות של שיטה זו הם שמחממים ממש את האזור בו נלכד הכדור והחימום אחיד, החסרונות הם שהאובייקטיב והשמן משנים את המאפיינים האופטיים שלהם אחרי חימום. מערכת החימום עובדת על עקרון פלטייה (Paltier) כאשר לוח נחושת בעל מסה תרמית גדולה מתלבש על האובייקטיב, על לוח זה הוצמדה פלטת הפלטייה ומעליה צלעות הקירור. בלוח הנחושת נקדחו חורים כדי שתהיה אפשרות להכניס אליהם טרמיסטור שימדוד את טמפרטורת המשוב. מערכת המשוב המספקת זרם לפלטייה היא מערכת מסחרית (wavelength electronics).



**איור 22:** מערכת החימום מורכבת מפלטה בעלת מסה תרמית גדולה המחממת את האובייקטיב, heat sink שתפקידו לסלק את החום או הקור מהצד השני של הפלטייה הנמצא מתחתיו. הטרמיסטור (לא נראה בתמונה) מושחל אל אחד החורים בצד השני של הלוח במרחק הרצוי מהאובייקטיב.

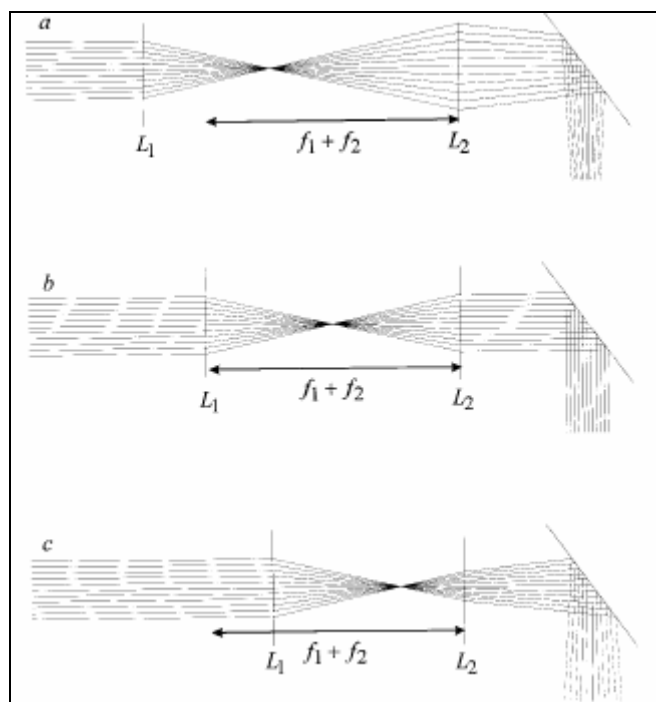
לאחר בחירה נכונה של heat sink ומיקום של הטרמיסטור מערכת החימום אפשרה ייצוב טמפרטורה בתווך בין 15-50 מעלות ביציבות של עשירית מעלה.

אולם חימום האובייקטיב שינה את התכונות האופטיות שלו ולכן את המאפיינים האופטיים של המערכת. מיקום פוקוס הדוגמא משתנה מצורה משמעותית בין אובייקטיב מחומם ולא מחומם וכיוון שמיקום המוקד של האובייקטיב השתנה לא ניתן היה ללכוד כדורים כאשר מערכת החימום עבדה.



**איור 23:** שינוי הפוקוס במהלך החימום. באיור רואים איך כדור שהיה בפוקוס לפני שמערכת החימום הופעלה יוצא מפוקוס ככל שהטמפרטורה עולה. התצלומים נלקחו בהפרישי זמן קבועים כאשר הטמפרטורה השתנתה בין 23-37 מעלות צלזיוס.

פתרון הבעיה התאפשר על ידי הכנסת טלסקופ למערכת. שרטוט הטלסקופ יחד מערכת החימום מוצג באיור 16 ועקרון הפעולה שלו מוצג באיור 24. הטלסקופ נבנה משתי עדשות בעלות אורך מוקד דומה כך שההגדלה שלו היא 1 כאשר מניחים את העדשות במרחק  $2f$  אחת מהשנייה. אבל אם מרחיקים או מקרבים את מרחק זה ניתן לשלוט בזווית ההתבדרות או ההתכנסות של הקרן [26]. כאשר קרן מתכנסת נכנסת לאובייקטיב הוא ימקד אותה יותר קרוב מקרן מקבילה. בצורה זו ניתן לשלוט על מרחק המיקוד של הלייזר ולכן על גובה הלכידה. אם מניחים את הטלסקופ בצורה כזו שהעדשה הראשונה שלו מצומדת לפתח האובייקטיב ניתן לשמור שם על גודל כתם קבוע ולכן לא לשנות את עצמת הלייזר.



**איור 24:** עקרון הפעולה של מערכת הטלסקופ שנועדה לשלוט בהתבדרות והתכנסות הקרן בכניסה לאובייקטיב ולכן גם על גובה הלכידה.

על ידי שילוב הטלסקופ ניתן היה לשנות את המיקום של מיקוד הלייזר ולהצליח ללכוד כדורים יחד עם חימום.

### 3.1.4 דוגמאות זרימה

דוגמת הזרימה נועדה לאפשר להזרים חומרים לדוגמא תוך כדי הניסוי והיא נותנת אפשרות לשלוט על ריכוזים. הרעיון הראשוני היה לעבוד עם דוגמאות שמיועדות לשם כך, הדוגמאות הן קפילרות זכוכית בעלות פרופיל מרובע שבהן ניתן ליצור את דוגמת ה DNA. אל הקפילרה מחברים שתי צינוריות סיליקון כל אחת מחוברת לכלי קיבול. כאשר רוצים ליצור דוגמא מכניסים את הנוזל לאחד מכלי הקיבול והוא זורם אל תוך הדוגמא עד איזון פוטנציאלים. אחרי שהדוגמא מוכנה ניתן

להוסיף חומרים לאחד מכלי הקיבול ולשלוט על מהירות הזרימה על ידי משחק בגובה היחסי בין שני כלי הקיבול.

אולם התברר שהקפילרה לא מתאימה לצרכים של הניסוי, האור הלבן אמנם לא ממש מושפע מהכדורים נראים כמו בדוגמא רגילה אבל אור הלייזר נראה מעוות הצייר אחד כנראה מהסיבה שהקפילרה דקה יחסית לעדשת האובייקטיב והשמן לא מכסה את כל מעבר קרני הלייזר. קרן לייזר שעוברת משמן לאוויר נשברת ולא נכנסת לקפילרה.



**איור 25:** האיור מסביר את אחת הסיבות שבגללה לא ניתן לעבוד עם קפילרות. השמן לא מכסה את כל הדרך האופטית של הקרן ולכן לא כולה נכנסת את הדוגמא.

גם לאחר שנפתרו בעיות אלו על ידי שימוש בקפילרה רחבה יותר היו בעיות נוספות, הלכידה לא הייתה טובה וכך גם קריאת ה QPD. כאשר הקפילרה נבדקה במיקרוסקופ רגיל התגלה שהיא מלאה בסדקים ובעוות שעיוותו את הקרן ולכן לא אפשרו ביצוע לכידה טובה ובטח לא לעבוד עם ה QPD. היה צורך לחזור לעבוד עם הזכוכיות הרגילות (cover slip) המיוצרות באיכות הרבה יותר טובה ולאפשר הכנסת נוזלים לדוגמא כזו. הפתרון היה שדרוג של מחזיק הדוגמא הישן כך שניתן יהיה להעביר שני מחטים לתוך הדוגמא ולהזרים פנימה חומרים (איור 26). הדוגמא נבנית משכבת פרפילם בעובי יחסית גדול על מנת לאפשר כניסה של מחט. בשכבה זו חותכים חתך מרובע שבו יהיו הנוזל עם הכדורים וה DNA, את השכבה שמים בין 2 זכוכיות נושאות וסוגרים על ידי בורג המפעיל לחץ שווה על הקצוות. את המחטים מכניסים בכל אחת מהפינות של הדוגמא. אל המחטים מתחברות צינוריות הסיליקון שמתחברות לכלי הקיבול כמו בדוגמא המקורית.

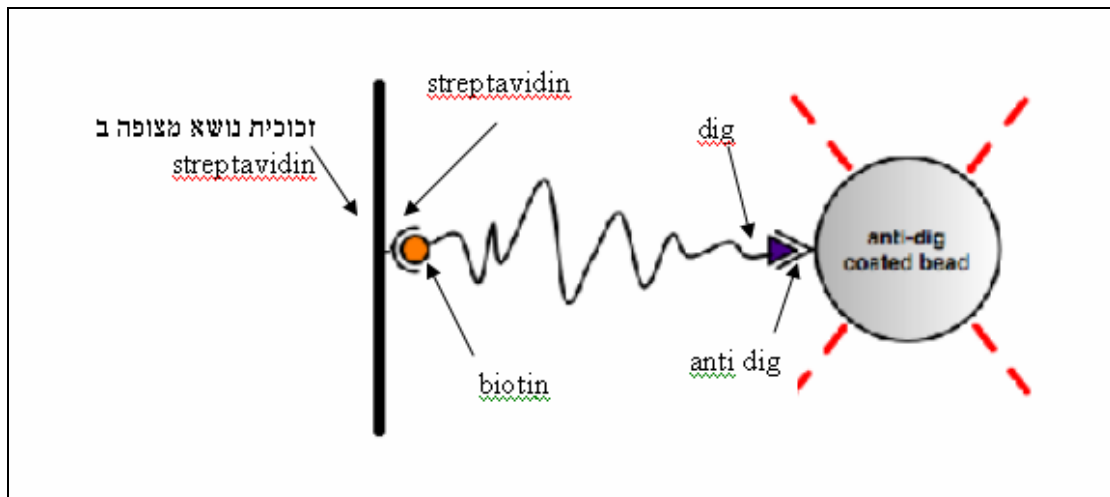


איור 26: מחזיק הדוגמא המאפשר עבודה עם זכוכיות באיכות טובה והזרמת נוזלים.

### 3.2. הכנת הדוגמא

לשם ביצוע הניסוי יש ליצור דוגמא שבה יש מולקולות DNA הקשורות בקצה אחד לכדור דיאלקטרי אותו ניתן ללכוד ובקצה השני לזכוכית הדוגמא. דרך אחת לבצע זאת היא על ידי הדבקה ספונטאנית. פרוטוקול ההדבקה הספונטנית הוא פשוט קל ומהיר אולם כיוון שההדבקה נעשית באופן ספונטאני מולקולת ה DNA יכולה להידבק לכדור או לזכוכית בכל נקודה על האורך שלה. מצב זה גורם שרוב גדול מהכדורים שנדבקים ל DNA לא נדבקים בקצה וכל כדור בדוגמא מחובר ל DNA באורך שונה. כיוון שאורך המולקולה הוא פרמטר מאוד חשוב שיש לדעת אותו במדויק הכנת דוגמא זו לא מתאימה ויש להשתמש בפרוטוקול אחר.

הפרוטוקול השני הוא פרוטוקול להדבקה ספציפית המבוסס על מבנים ביולוגיים. בפרוטוקול זה מנצלים את העובדה של DNA- $\lambda$  יש קצוות דביקים שניתן להדביק אליהם ביוטין (biotin) בקצה אחד ודאוקסיגנין (digoxigenin) בקצה שני. אל הכדורים המצופים חומצות אמינו מחברים anti-digoxigenin ובצורה כזו הכדור יכול להתחבר על צד אחד של ה DNA בצורה של body-antibody mechanism. בחלק השני של הפרוטוקול הזכוכית הנושאת מצופה בציפוי המונע היצמדות ספונטאנית של DNA, ולאחר מכן מצפים את הזכוכית ב streptavidin אשר מתחברת ל biotin הנמצא על הקצה השני של ה DNA. על ידי פרוטוקול זה מבטיחים שרק מולקולות באורך מלא יכולות להימצא בדוגמא.



איור 27: עקרון הפעולה של ההדבקה הספציפית המבטיחה הדבקה של ה DNA בשני הקצוות שלו ולכן ידיעה מדויקת של האורך שלו.



## 4. המשך המחקר

העבודה על המערכת טרם הסתיימה. יש לשפר את גלאי ה QPD על מנת שיהיה ניתן לעבוד עם כדורים גדולים (קוטר של  $3\mu m$ ) בצורה אמינה ומדויקת. בנוסף צריך לדאוג לכך כי כל המרכיבים יחד יעבדו, כלומר שמערכת החימום, הגלאי, הכנת דוגמא עם הדבקה ספציפית ואפשרות הזרמת הנוזלים יעבדו במקביל ללא הפרעה לפעילות אחד של השני.

שיפורים נוספים שיש לבצע הם :

- תכנון מערכת feed back אשר תיתן אפשרות לשלוט במתיחות המולקולה ולעבוד עם מתיחות קבועה במשך כל הניסוי. רוב הפעילות במשימה זו הוא תכנות, התכנית תקרא את הנתונים הכוח מהגלאי כל פרק זמן שנבחר ובמידה וכוח זה גדל או קטן מעבר לסף מסוים התוכנה תיתן הוראה לאחד המנועים למתוח או להרפות את המולקולה.
- שדרוג נוסף של ה QPD הוא אפשרות מדידת גובה מעל פני הזכוכית. הגובה מעל פני הזכוכית הוא פרמטר חשוב מאוד בניסוי. הגובה משפיע גם על עצמת הלכידה וגם על מקדם הכיול של הדיודה וכיום הוא נמדד על ידי צורת פסי ההתאבכות של הכדור על המצלמה. ניתן למצוא את הגובה של הלכידה על ידי שינויים בעצמת האור הכולל על ארבעת הרבעים של ה QPD. שיפור זה במערכת יועיל מאוד ויאפשר עבודה בגבהים שונים ומדידת גובה מדויקת.

## 5. ביבליוגרפיה

- [1] Austin, R. H., and Brody, J.P. (1997). "Stretch Genes." Physics Today 50: 32-38.
- [2] Bao, G. (2002). "Mechanics of biomolecules." J. Mech. Phys. Solids 50: 2237-2274.
- [3] Storm, C. and Nelson, P.C. (2003). "Theory of high-force DNA stretching and overstretching." Phys. Rev. A 67: 051906-1- 051906-12.
- [4] Marko, J. F. and Siggia., A.D. (1995). "Stretching DNA." Macromolecules 28: 8759-8770.
- [5] Friedberg, E. C. (1985). DNA damage tolerance in Prokaryotic cells. DNA repair. New-York, W.H. Freeman and company.
- [6] Galletto, R., Amitani, I., Baskin, R.J., and Kowalczykoski, S.C. (2006). "Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules." Nature 443(19): 875-878.
- [7] Shivashankar, G.V., Feingold, M., Krichevsky, O., and Libchaber, A. (1999). "RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96: 7916-7921.
- [8] Ashkin, A. (1992). "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime." Biophys. J. 61: 569-582.
- [9] Ashkin, A. (1997). "Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94: 4853-4860.

- [10] Ashkin, A. and. Driedzic, J.M. (1989). "Optical trapping and manipulation of single living cells using infrared-laser beams." Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. 93(3): 254-260.
- [11] Neuman, K.C. and. Block, S.M. (2004). "Optical trapping." Rev. Sci. Instrum. 75(9): 2787-2809.
- [12] Goshen, E., Zhao, W.Z., Carmon, G., Rosen, S., Granek, R., and Feingold, M. (2005). "Relaxation dynamics of a single DNA molecule." Phys. Rev. A 71(6): 061920.
- [13] Lang, M. J., Asbury, C.L., Shaevitz, J.W., and Block, S.M. (2002). "An automated two dimensional optical force clamp for single molecule studies." Biophys. J. 83: 491-501.
- [14] Bhattacharyya, A.J., and Feingold, M. (2001). "Single molecule study of the reaction between DNA and formamide." Talanta 55: 943-949.
- [15] Kress, H. Stelzer., H.K., Griffiths, G., and Rohrbach, A. (2005). "Control of relative radiation pressure in optical traps: Application to phagocytic membrane binding studies." Phys. Rev. A 71: 061927-1 - 061927-9.
- [16] Rice, S. E., Purcell, T.J., and Spudich, J.A. (2003). "Building and using optical traps to study properties of molecular motors." Methods-Enzymol. 361: 112-133.
- [17] Feingold, M. (2001). "Single-molecule studies of DNA and DNA-protein interactions." Phys. Rev. A 9: 616-620.
- [18] Gelles, J., Schnapp, B.J., and Sheetz, M.P. (1988). "Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision." Lett. of Nat. 331(4): 450-453.

- [19] Visscher, K. and Block, S.M. (1998). "Versatile optical traps with feedback control." Methods-Enzymol. 298: 460-489.
- [20] Pralle, A., Prummer, M., Florin, E.L., Stelzer, E.H.K., and Horber, J.K.H. (1999). "Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light." Microscopy Research and Technique 44: 378-386.
- [21] Tolic-Nørrelykke, S. F., Schäffer, E., Howard, J., Pavone, F.S., Jülicher, F., and Flyvbjerg, H. (2006). "Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane." Rev. Sci. Instrum. 77: 103101-1- 103101-11.
- [22] Tolic-Nørrelykke, I. M., Berg-Sorensen, and K., Flyvbjerg, H. (2004). "Matlab program for precision calibration of optical tweezers." Comput. Phys. Commun. 159: 225-240.
- [23] Dreyer, J. K., Berg-Sorensen, K., and Oddershede, L. (2004). "Improved axial position detection in optical tweezers measurements." Appl. Opt. 43(10): 1991-1995.
- [24] Berg-Sorensen, K. and Flyvbjerg, H. (2004). "Power spectrum analysis for optical tweezers." Rev. Sci. Instrum. 75(3): 594-612.
- [25] Pathria, R.K. (1996). Chapter 14. Statistical mechanics. Oxford, Butterworth Heineman.
- [26] Fallman, E. and Axner, O. (1997). "Design for fully steerable dual-trap optical tweezers." Appl. Opt. 36(10): 2107-2113.