

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za matematiko in fiziko
Oddelek za fiziko

Vlečenje posameznih polimerov z optično pinceto

Gašper Kokot
Nosilec predmeta: prof. Rudolf Podgornik

Ljubljana, september 2010

Povzetek

Obstaja več orodij za poskuse vlečenja posameznih molekul polimerov, najbolj obetavno za natančne študije je optična pinceta. Krivulje sile v odvisnosti od raztezka, ki jih izmerimo, so primerne za testiranje modelov elastičnosti polimerov. Nedavni teoretski razvoj je omogočil, da iz tovrstnih eksperimentov pridobimo podatke o energijski pokrajini proste energije - razdaljo od minimuma do energijske ovire, višino energijske ovire in celo hitrost prehoda prek nje.

Kazalo

1	Uvod	3
2	Optična pinceta	5
2.1	Umerjanje optične pasti	5
3	Eksperimenti vlečenja ene molekule	8
3.1	Prehod energijske ovire	11
4	Zaključek	14
	Literatura	15

1 Uvod

Preden so se pojavila orodja za poskuse na eni molekuli, so bile meritve lastnosti polimerov dostopne samo na makroskopskem nivoju in zato nujno statistična povprečja. Za vsakdanjo rabo ima ta pristop vsekakor večjo uporabno vrednost, vendar ne nudi globljega vpogleda v obnašanje polimerov. Pri nekaterih nas mogoče niti ne zanima obnašanje na molekularni ravni, pri drugih, predvsem bioloških molekulah, pa je poznavanje lastnosti enega gradnika lahko ključnega pomena (npr. pri transkripciji pride do razdruževanja zgolj ene molekule DNA in ne skupka¹).

Poskusi na eni molekuli so koristni v več pogledih. Ker poenostavimo sistem, omogočimo bolj nedvoumno interpretacijo podatkov kot v skupku molekul. Izognemo se interakcijam med molekulami, ki bi zapletle analizo, ter konfiguracijskemu povprečenju, ki je vselej prisotno pri meritvah skupkov. Pri treh najbolj razširjenih tehnikah z molekulami manipuliramo in jih prek sonde opazujemo posredno. Izbor najprimernejšega orodja med optično pinceto, magnetno (elektromagnetno) pinceto in mikroskopom na atomsko silo (AFM²) je pogojen z željami, ki jih imamo glede togosti³, časovne in krajevne ločljivosti, velikostjo sonde ter premikov in sil, ki jih želimo meriti (Tabela 1).

Tabela 1: Primerjava različnih tehnik za poskuse z eno molekulo [1].

	Optična pinceta	Magnetna (elektromagnetna) pinceta	AFM
Krajevna resolucija [nm]	0,1 – 2	5 – 10 (2 – 10)	0,5 – 1
Časovna resolucija [s]	10 ⁻⁴	10 ⁻¹ – 10 ⁻² (10 ⁻⁴)	10 ⁻³
Togost [pN/nm]	0,005 – 1	10 ⁻³ – 10 ⁻⁶ (10 ⁻⁴)	10 – 10 ⁵
Razpon sil [pN]	0,1 – 100	10 ⁻³ – 10 ² (0,01 – 10 ⁴)	10 – 10 ⁴
Razpon premikov [nm]	0,1 – 10 ⁵	5 – 10 ⁴ (5 – 10 ⁵)	0,5 – 10 ⁴
Velikost sonde [μm]	0,25 – 5	0,5 – 5	100 – 250

Vsem trem tehnikam je skupno, da opazovano molekulo vpnejo med dve makroskopski telesi. Z biokemijskimi prijemi oblečemo površino sond in pripravimo skrajne konce opazovane molekule tako, da se vežejo na molekule, ki smo jo uporabili za funkcionalizacijo sonde. Tvorjena vez mora biti dovolj trdna, da je med poskusom ne strgamo ali drugače spremenimo in s tem vplivamo na rezultate. Opisani, v principu enostaven pristop, ki poskrbi za postavitvev dobro definirane sistema za opazovanje, običajno vzame veliko

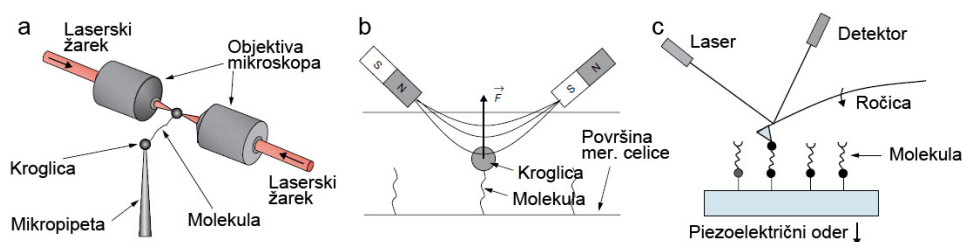
¹ angl. bulk

² angl. atomic force microscope

³ angl. stiffness

časa in predstavlja ogromen delež celotnega eksperimenta vlečenja molekule.

Izbira delca, ki ga želimo manipulirati, je pogojena z izbiro naprave. Z optično pinceto lahko držimo in/ali manipuliramo dielektrične kroglice (Slika 1a), z magnetno pinceto superparamagnetne (Slika 1b), pri AFM pa je sonda kar konica mikroskopa (Slika 1c). Nabor naprav za detekcijo premikov sonde je ogromen, med najbolj razširjenimi so kamera, šibek laser in kvadrantna fotodioda. Številne uspešne aplikacije omenjenih orodij vključujejo nova odkritja in vpoglede pri diskretnem premikanju molekularnih motorjev ([2], [3] in reference tam), študiju molekul DNA in RNA ([4] in reference tam) in raztegovanju proteinov ([5] in reference tam).



Slika 1: Skica treh orodij za poskuse na eni molekuli. Pri vseh treh molekulo vpnemo med dve makroskopski telesi. a) Pri optični pinceti eno dielektrično kroglico ujamemo v optično past, ki jo ustvarimo s fokusiranim laserskim snopom. V prikazani izvedbi drugo kroglico trdno držimo z mikropipeto, medtem ko sledimo premikom prve. b) Pri magnetni pinceti za sondo uporabljamo superparamagnetno kroglico, ki se odziva na polje in gradient magnetnega polja. Drugi konec proučevane molekule je pritrjen na površino merilne celice. c) Tudi pri AFM en konec molekule pritrđimo na površino merilne celice, ki je vpeta na piezoelektrični oder, s katerim vršimo premike. Namesto kroglice za sondo uporabimo kar konico ročice mikroskopa, katere odziv opazujemo z odbitim laserskim snopom. Slika prirejena po [4].

Vsaka od omenjenih tehnik ima svoje omejitve. Magnetna pinceta je zaradi robustne postavitve najmanj prilagodljiva od treh, delcev z njo ne moremo premikati, težko je zaznavati zelo hitre ali zelo kratke premike. Elektromagnetna izvedba pincete sicer s pomočjo povratnih zank dovoljuje tridimenzionalno manipulacijo, vendar nima nič boljše resolucije, poleg tega so za ustvarjanje dovolj velikih polj in gradientov potrebni visoki tokovi, ki izdatno grejejo opremo.

Največja omejitev AFM je njegova velikost in velika togost ročice, ki postavlja spodnjo mejo uporabnemu območju sil, še posebej v vodnem okolju. Številne biološke molekule so tako izven dometa AFM, poleg tega konica mikroskopa deluje nespecifično in vselej dobimo konvolucijo vseh interakcij med konico, preiskovano molekulo in okolico.

Ker detekcija in manipulacija pri optični pinceti poteka s svetlobo, pomembno vlogo igrajo optične perturbacije, ki vplivajo na intenziteto oziroma porazdelitev intenzitete laserja in posledično na togost pasti. Dobra priprava homogenih vzorcev je zato nadvse pomembna. Optična past ujame ka-

terikoli dielektrični delec v bližini (lahko tudi več naenkrat), zato morajo biti v merilni celici koncentracije kroglic, ki jih uporabljamo za sondo, nizke. Iz enakega razloga mora biti prisotnih čim manj nečistoč, ki bi lahko motile ali zastrle detekcijo. Pri velikih močeh laserja lahko pride do znatne absorpcije in lokalnega gretja, kar sproži lokalne spremembe viskoznosti, konvekcijske tokove, poškodbe bioloških vzorcev in vpliva na potek procesov, ki jih opazujemo. S previdno in natančno pripravo vzorcev, pravilno izbiro moči in valovne dolžine laserja se lahko večini težav pri optični pinceti izognemo. Če to združimo z visoko stopnjo prilagodljivosti specifičnim eksperimentom (tvorimo lahko več pasti naenkrat, zvezen nabor togosti pasti, natančen nadzor manipulacije) in območjem sil, premikov, ki jih zmoremo meriti, ter časovno in krajevno resolucijo, je optična pinceta odlično orodje za poskuse z biološkimi molekulami. Njeno delovanje in umerjanje bom opisal v nadaljevanju seminarja, nato pa se posvetil eksperimentom vlečenja posameznih molekul polimerov pri konstantni hitrosti.

2 Optična pinceta

Pred dvajsetimi leti so Ashkin in sod. [6] pokazali, da je s fokusiranim laserskim snopom možno premikati strukture velikosti μm . Blizu fokusa na dielektrični delec deluje sila velikostnega reda pN. V ravnini pravokotno na propagacijo laserskega snopa (xy ravnina) se delec stabilno ujame, zato sta se naprave prijeli tudi imeni optična pinceta in optična past. V smeri propagacije laserskega snopa (z smer) je vselej prisotna sipalna sila, ki je posledica fotonskega tlaka na ujeti delec. Ob pravilni izbiri delca glede na medij (ponavadi kroglica premera okrog μm s primernim lomnim količnikom), v katerem se nahaja, sipalna sila uravnoteži silo teže delca v mediju in omogoči stabilno tridimenzionalno držanje. Še stabilnejše držanje v z smeri lahko dosežemo z dvožarkovno izvedbo optične pincete, kjer poskrbimo za propagacijo dveh laserskih snopov v nasprotnih smereh.

Uporabna vrednost optične pincete znatno naraste z učinkovitimi kalibracijskimi in detekcijskimi tehnikami, saj jo lahko izkoristimo za merjenje majhnih odmikov in sil. Dokler je ujeti delec v bližini centra pasti, ostaja v parabolčnem potencialu (Slika 2), zato lahko za majhne odmike Δx optično silo zapišemo kot harmonično vzmet:

$$F_{opt} = \kappa_{opt} \Delta x, \quad (1)$$

kjer κ_{opt} predstavlja koeficient pasti (togost). Optična sila je sorazmerna z močjo laserja, zato s spreminjanjem le-te nadziramo κ_{opt} in s tem razpon odmikov Δx , ki jih bomo lahko zaznali.

2.1 Umerjanje optične pasti

Za nadgradnjo manipulacijskega orodja v analitično so ključne učinkovite kalibracijske tehnike. Ker je κ_{opt} odvisna tudi od velikosti delca in lastnosti medija, v katerem se nahaja, in ker optična pinceta omogoča zgolj relativne meritve, jo moramo v vsakem primeru umeriti, preden lahko z njeno

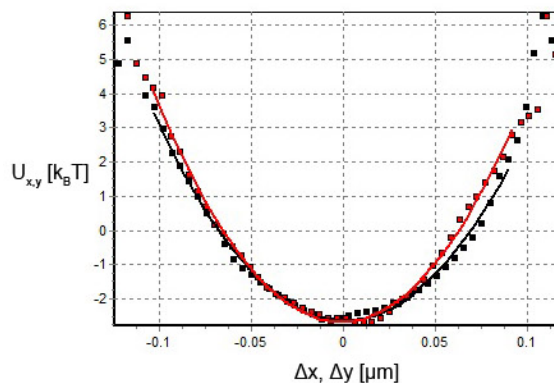
pomočjo pridobimo koristne podatke. S snemanjem delca, ki se v pasti Brownovo giblje okrog ravnovesne lege, lahko izmerimo verjetnostno gostoto porazdelitve lege delca $\rho(x, y)$:

$$\rho(x, y) = C \exp -\frac{U(x, y)}{k_B T}, \quad (2)$$

kjer so C normalizacijska konstanta, $U(x, y)$ potencial, v katerem se nahaja delec, k_B Boltzmannova konstanta in T absolutna temperatura medija. Slika 2 prikazuje primer meritve potenciala $U(x, y)$, pridobljenega iz enačbe (2). Za majhne odmike je oblika $U(x, y)$ parabolična, zato ga zapišemo v harmoničnem približku:

$$U(x, y) = \frac{1}{2} \kappa_x \Delta x^2 + \frac{1}{2} \kappa_y \Delta y^2 \quad (3)$$

in s prilagajanjem na izmerjene odmike od centra pasti, Δx in Δy , določimo koeficienta pasti, κ_x in κ_y , v obeh smereh.



Slika 2: Primer meritve potenciala optične pasti. Črne (rdeče) točke predstavljajo meritve v x (y) smeri, črna (rdeča) črta pa prikazuje prilagajanje kvadratne enačbe na meritve. Kot je razvidno iz te meritve, je predpostavka o harmonični naravi optičnega potenciala upravičena.

Posnetke Brownovo gibajočega se delca v optični pasti lahko obdelamo tudi drugače [7]. V okviru Einstein-Ornstein-Uhlenbeck teorije Brownovega gibanja [8] obnašanje delca v harmoničnem potencialu zapišemo z Langevinovo enačbo:

$$m\ddot{x}(t) = -\kappa_x x(t) - \gamma \dot{x}(t) + \sqrt{2k_B T \gamma} \zeta(t), \quad (4)$$

kjer m predstavlja maso delca, γ koeficient upora in $\zeta(t)$ beli Gaussov šum. Zadnji člen v (4) ponazarja Brownove sile, ki so naključne narave. Ker se pri meritvah z optično pastjo skoraj izključno uporablja kroglice, lahko po Stokesu za koeficient upora vzamemo $\gamma = 6\pi\eta R$, kjer je η dinamična

viskoznost in R radij kroglice. Karakteristični čas m/γ , da zamre inercialni člen, mora biti precej krajši od časovne resolucije eksperimenta, da smemo zanemariti levo stran enačbe (4):

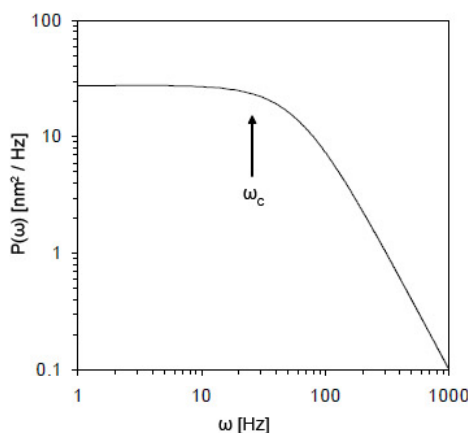
$$\dot{x}(t) + 2\pi\omega_c x(t) = \sqrt{2D}\zeta(t), \quad (5)$$

kjer sta $\omega_c = \kappa_x/2\pi\gamma$ in $D = k_B T/\gamma$ difuzijska konstanta.

Enačbo (5) Fourierovo transformiramo in definiramo spekter moči kot $P(\omega) \equiv |x(\omega)|^2/T_{mer}$, T_{mer} predstavlja čas posamezne meritve. Pričakovana vrednost $P(\omega)$ se glasi:

$$P(\omega) = \frac{D/2\pi^2}{\omega_c^2 + \omega^2}. \quad (6)$$

Od tod s prilagajanjem frekvence preloma spektra moči ω_c in poznanih ostalih parametrov določimo κ_x (Slika 3).



Slika 3: Primer spektra moči s frekvenco preloma pri ω_c (teoretska krivulja). Ker prelom takšnih krivulj ni oster, je ponavadi težko natančno določiti ω_c . Slika prirejena po [9].

Namesto Brownovih fluktuacij lahko za umeritev izkoristimo Stokesov zakon upora. Kroglico ujamemo v optično past, in jo nato s konstantno hitrostjo $\dot{x}(t)$ vlečemo. Za premikanje pasti se uporablja motorizirana optika, premikanje celotne mizice z vzorcem s pomočjo piezo elementov ali krmiljenje z akustooptičnimi deflektorji (AOD). Zadnja izbira se ogne mehanskim tresljajem in omogoča najmanj zašumljene meritve.

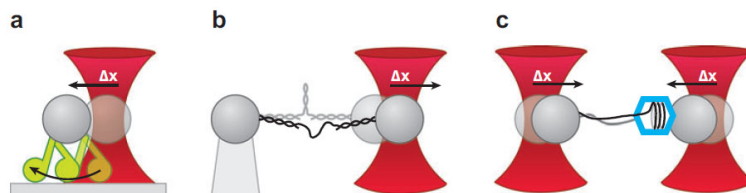
Hitro po začetku vlečenja se vzpostavi ravnovesno stanje med F_{opt} in silo upora:

$$6\pi\eta R\dot{x}(t) = \kappa_x\Delta x. \quad (7)$$

Z izmerjeno izmaknjenostjo iz centra pasti Δx določimo κ_x . Pri različici tovrstne kalibracije namesto konstantne hitrosti uporabimo sinusno oscilirajoče premikanje pasti in opazujemo amplitudo nihanja kroglice.

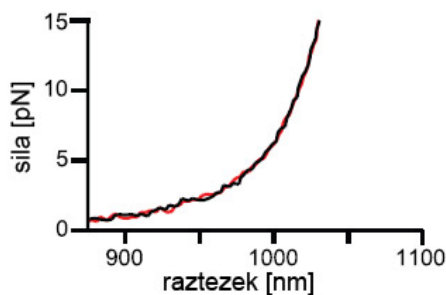
3 Eksperimenti vlečenja ene molekule

Po uspešni pripravi merilnih okoliščin in kalibraciji imamo na izbiro več načinov vpetja opazovane molekule. Lahko je med kroglico in površino merilne celice ali med dvema kroglicama, kjer je vsaj ena od kroglic v optični pasti (Slika 4).



Slika 4: Primeri različnega vpetja preiskovane molekule pri poskusih z optično pinceto: a) med površino objektnega stekla in kroglico v optični pasti; b) med dvema kroglicama, kjer eno držimo z mikropipeto in drugo z optično pastjo in c) med dvema kroglicama, ki ju držimo v ločenih optičnih pasteh. Slika vzeta iz [10].

Velik del poskusov temelji na principu vlečenja. En konec molekule držimo na mestu, drug konec molekule pa vlečemo s konstantno hitrostjo. Hkrati opazujemo raztezek molekule in odmik od centra optične pasti ter posledično silo, ki jo vršimo na molekulo. Rezultat takšnih meritev je krivulja sila-raztezek (FEC⁴), katere primer je Slika 5.



Slika 5: Primer dveh meritev FEC na isti molekuli. Slika prirejena po [11].

Običajno v eksperimentih vlečenja opazujemo fleksibilne polimere, za katere obstaja več teoretskih modelov elastičnosti. Najbolj uspešni skupini sta črvi podobna veriga (WLC⁵) in prosto združena veriga (FJC⁶). Konkretni izrazi za zvezo med silo in raztekom so odvisni od teoretskih predpostavk, predvsem od upoštevanja entropičnih in/ali entalpičnih prispevkov

⁴angl. force-extension curve

⁵angl. wormlike chain

⁶angl. freely jointed chain

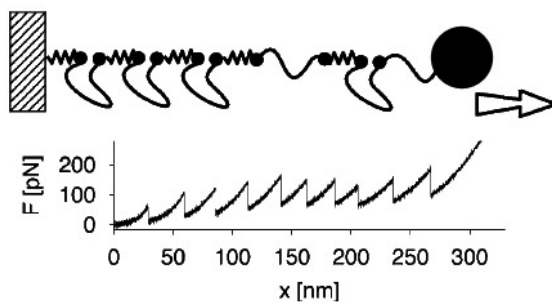
(v Tabeli 2 so prikazani štirje). Vsi omenjeni modeli imajo tri parametre. Persistenčna dolžina, L_p , je definirana kot dolžina, prek katere se izgubijo korelacije v smeri tangente na molekulo. Za dolžine krajše od L_p bomo torej polimer videli kot približno ravnega, za dolžine daljše od L_p pa se bo zvijal (v FJC modelu je L_p polovica Kuhnove dolžine, ki predstavlja dolžino enega segmenta verige). Dodatna parametra sta še elastični modul molekule, K_0 , in dolžina konturja pri odsotnosti napetosti, L_0 . Pri nabitih polimerih (npr. DNA), ima pomembno vlogo senčenje ionov, ki so prisotni v okoliški raztopini. Treba jih je dodatno upoštevati (za DNA se je kot pravilen izkazal pristop Podgornika in sod. [12]).

Tabela 2: Modeli elastičnosti za fleksibilne polimere. Prirejeno po [13].

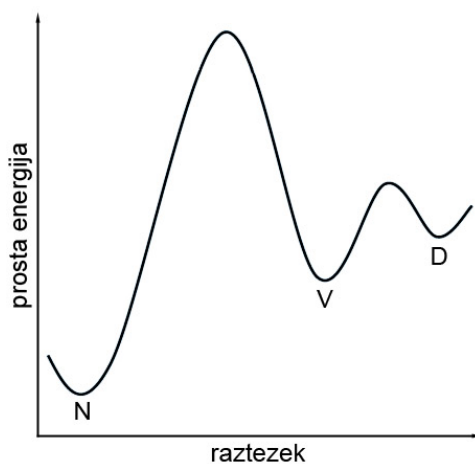
Model	Enačba
Marko-Siggia WLC [14]	$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1-x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right]$ <p>Entropična teorija. Interpolacijska enačba točne rešitve za koncentracije soli ≥ 10 mM. Od točne rešitve se razlikuje do 10% blizu $F \approx 0.1$ pN. Točni rešitvi se približa pri nizkih in visokih silah.</p>
Odičk WLC [15]	$x = L_0 \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_B T}{F L_p} \right)^{1/2} + \frac{F}{K_0} \right]$ <p>Entropično-entalpična teorija. Omejena z $x - L_0 /L_0 \ll 1$ (območje velikih sil).</p>
Smith in sod. FJC [16]	$x = L_0 \left[\coth \left(\frac{2F L_p}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{2F L_p} \right] \left(1 + \frac{F}{K_0} \right)$ <p>Entropično-entalpična teorija. Primerna za polimere, ki se obnašajo približno kot FJC.</p>
Prirejen Marko-Siggia WLC [17]	$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1-x/L_0+F/K_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} - \frac{F}{K_0} \right]$ <p>Entropično-entalpična teorija. Marko-Siggia enačba z upoštevanjem entalpičnega raztezanja. Pri $F \approx 0.1$ pN ima podobne omejitve kot model Marko-Siggia.</p>

Z vlečenjem polimera lahko nadaljujemo v režim večjih sil, kot so potrebne za preprosto raztezanje, in slejkoprej pride do hitre, v odvodu nezvezne spremembe FEC (Slika 6). Če sila pade na nič smo strgali molekulo oz. vezni člen med molekulo in sondo, ki jo uporabljamo za manipulacijo. Druga možnost je, da sila pade na manjšo vrednost, kar pomeni, da je prišlo zgolj do nenadne spremembe v konformaciji molekule (t.j. da smo strgali eno oz. nekatere od šibkih vezi, ki so zadržane za terciarno ali kvartarno strukturo polimera). V tem primeru nadaljujemo z vlečenjem in dobimo novo FEC za novo konformacijo. Polimer ima lahko več konformacij (Slika 6),

lahko so prisotna tudi vmesna stanja med eno in drugo konformacijo (Slika 9a). S trganjem otipamo energijsko pokrajino⁷ proste energije. Vsakemu strganju ustreza lokalni minimum proste energije (Slika 7).



Slika 6: Zgoraj: Preprosta shema molekule titina s petimi enotami in vezno molekulo na kroglici. Enote (gładke črte) so med sabo povezane z močnimi harmoničnimi vezmi (žagaste črte). Ko so posamezne enote zvite, se obnašajo kot vzmet, če so raztegnjene, se obnašajo kot WLC. Spodaj: Simulirana FEC za enako shemo z desetimi enotami. Nezvezne spremembe ustrezajo raztegnjenju ene enote. Slika prirejena po [18].



Slika 7: Skica energijske pokrajine, ki jo vidimo med poskusom vlečenja. N označuje naravno stanje, V vmesno stanje in D denaturirano stanje molekule. Slika prirejena po [19].

⁷angl. energy landscape

3.1 Prehod energijske ovire

Sprememba konformacije oz. trganje vezi je, energijsko gledano, prehod čez energijsko oviro. Ta proces je stohastičen, zato mora biti obravnavana sila pri strganju⁸ nujno statistična. Analiza spektra sil pri strganju nudi merilo za energije vezi, hitrosti prehoda iz enega v drugo energijsko stanje in celotne energijske pokrajine molekul, pri katerih pride do večkratnega strganja. Običajen pristop je opazovanje srednje vrednosti sile pri strganju \bar{F} pri različnih hitrostih vlečenja v .

Prvi korak k interpretaciji teh eksperimentov je napravil Bell [21], ki je vez v biološki molekuli opisal analogno vezi v trdni snovi. V tem modelu se posplošen koeficient hitrosti strganja vezi $k(t)$ glasi:

$$k(t) = k_0 \exp[\beta F(t)x^\ddagger], \quad (8)$$

kjer so k_0 pravi koeficient hitrosti prehoda v novo energijsko stanje (sprememba konformacije, strganje vezi), $\beta^{-1} = k_B T$, $F(t)$ časovno odvisna zunanja sila in x^\ddagger razdalja med minimumom proste energije in energijsko bariero (Slika 8a). Za \bar{F} Bellov model napoveduje sorazmernost:

$$\bar{F} \sim \ln v. \quad (9)$$

Taka fenomenološka obravnava je neodvisna od višine energijske ovire ΔG^\ddagger , kar se je izkazalo za ključno pomanjkljivost pri odstopanju napovedi od eksperimentov. Poleg tega osnovna predpostavka modela zahteva, da je sistem v termodinamskem ravnovesju ves čas eksperimenta, čemur ni zadoščeno.

Teoretični prijem, ki pomaga razrešiti težave, je razkril Jarzinsky [22]. Če vzamemo sistem, ki ga končno hitro (dovolj počasi) preklapljammo med dvema konfiguracijskema stanjema v faznem prostoru, lahko za razliko klasične proste energije ΔG^\ddagger med tema dvema ravnovesnima stanjema zapišemo enakost:

$$\Delta G^\ddagger = -\beta^{-1} \ln \overline{\exp(\beta W)}, \quad (10)$$

kjer je W delo, ki smo ga opravili na sistemu, in črta ponazarja ansambelsko povprečenje. Tako lahko pridobimo informacije o sistemu v ravnovesju iz informacij ansambla meritev sistema, ko ni bil v ravnovesju. Uporabnost (10) je omejena na sisteme, kjer so fluktuacije W med eno in drugo meritvijo sistema velikostnega reda $k_B T$ in manjše, saj bi v nasprotnem primeru za uporabo (10) potrebovali eksperimentalno nerazumno število meritev. S tem je izključena večina makroskopskih sistemov, ne pa meritve na eni molekuli.

Hummer in Szabo [18] sta s pomočjo (10) v mikroskopskem opisu eksperimentov vlečenja razširila Bellov model. Upoštevala sta, da se v prisotnosti sonde spremeni energijska pokrajina proste energije. Energijska ovira za prehod v drugo stabilno stanje se ob prisotnosti zunanjih potencialov efektivno zniža in premakne. Kadar so pri vlečenju s silo $F(t)$ vpleteni harmonični potenciali (npr. pri poskusih z AFM ali optično pinceto), se energijska pokrajina spremeni sledeče:

$$U(x) = U_0(x) - F(t)x, \quad (11)$$

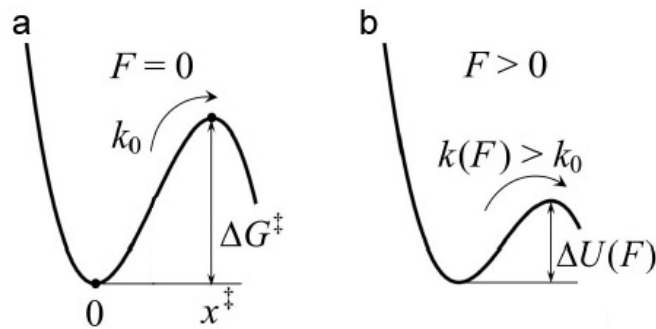
⁸angl. rupture force

kjer je $U_0(x)$ prava energijska pokrajina ob odsotnosti sonde in x razdalja od ravnovesne lege (Slika 8b). Posledično se k_0 in x^\ddagger razlikujeta od tistih pridobljenih zgolj z uporabo Bellove teorije. Za izračun k_0 se je treba obrniti na Kramersovo teorijo difuznih (stohastičnih) kemijskih reakcij v režimu visokih energijskih ovir [23]. Kakšen izraz bomo dobili za sredjo vrednost sile pri strganju, je odvisno od predpostavke, ki jo naredimo za $U_0(x)$. Hummer in Szabo sta se odločila za koničasti potencial (14) in dobila odvisnost:

$$\bar{F} \sim (\ln v)^{1/2}. \quad (12)$$

Skoraj istočasno so Dudko in sod. [24] po malce drugačni poti z uporabo Kramersove teorije in skalirnimi zakoni za visoke sile, ki jih je zapisal Garg [25], pokazali, kako pridobiti kritično silo F_C , kjer energijska ovira izgine. Njihova napoved za srednjo vrednost sile pri strganju je:

$$\bar{F} \sim (\ln v)^{2/3}. \quad (13)$$



Slika 8: a) Skica energijske ovire, kadar ni prisotnih zunanjih sil. Parametri pri premagovanju energijske ovire: x^\ddagger je razdalja med minimumom proste energije in energijsko bariero, ki je visoka ΔG^\ddagger , k_0 je pravi koeficient hitrosti prehoda v novo energijsko stanje. b) Zunanja sila efektivno spremeni parametre. Premakne in zniža energijsko oviro ter s tem omogoči lažji prehod prek nje. Slika prirejena po [20].

Čeprav se (12) in (13) kvalitativno razlikujeta, so kasnejše analize [20] obelodanile, da gre razlika zgolj na račun predpostavke o $U_0(x)$. Za (12) je predpostavljen koničast potencial (14), sorazmernost (13) pa z enakim izračunom dobimo za linearno-kubično energijsko površino (15):

$$U_0(x) = \begin{cases} \beta \Delta G^\ddagger \left(\frac{x}{x^\ddagger}\right)^2, & x < x^\ddagger; \\ -\infty, & x \geq x^\ddagger, \end{cases} \quad (14)$$

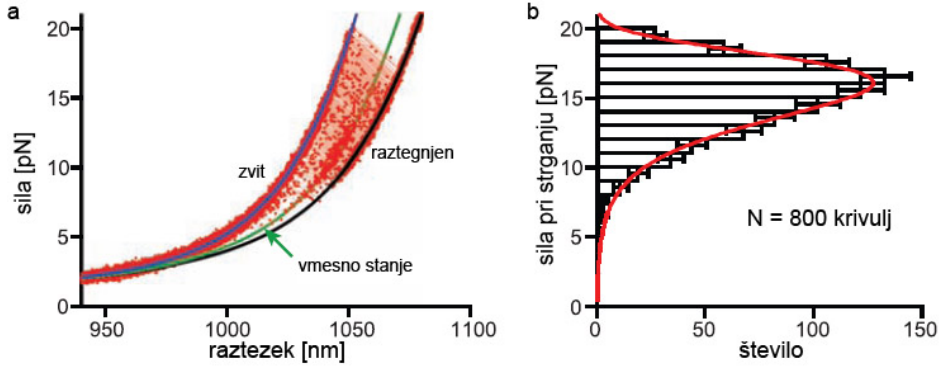
$$U_0(x) = \frac{3}{2} \beta \Delta G^\ddagger \frac{x}{x^\ddagger} - 2 \beta \Delta G^\ddagger \left(\frac{x}{x^\ddagger}\right)^3. \quad (15)$$

Asimptotski enačbi za povprečno silo pri strganju in njeno varianco lahko zapišemo kompaktno:

$$\bar{F} \cong \frac{\Delta G^\ddagger}{\xi x^\ddagger} \left(1 - \left(\frac{1}{\Delta \beta G^\ddagger} \ln \frac{k_0 e^{\beta \Delta G^\ddagger + \gamma}}{x^\ddagger \kappa v} \right)^\xi \right), \quad (16)$$

$$\sigma_{\bar{F}}^2 \cong \frac{\pi^2 \beta^2}{6 x^{\ddagger 2}} \left(\frac{1}{\beta \Delta G^\ddagger} \ln \frac{k_0 e^{\beta \Delta G^\ddagger + \tilde{\gamma}}}{x^\ddagger \kappa v} \right)^{2\xi - 2}. \quad (17)$$

Vrednost $\tilde{\gamma} = \gamma^2 - 3/\pi^2 \psi''(1) \approx 1,064$, kjer sta $\psi''(1) = -2,404 \dots$ konkretna vrednost tetragama funkcije in $\gamma = 0,577 \dots$ Euler-Mascheronijeva konstanta. S parametrom ξ razločimo med različnimi modeli: $\xi = 1$ predstavlja fenomenološki Bellov model, $\xi = 1/2$ mikroskopski model s koničastim potencialom in $\xi = 2/3$ model z linerno-kubično nezmoteno površino proste energije.



Slika 9: Podatki zbrani iz 800 poskusov vlečenja. a) FEC krivulja kaže široko porazdelitev sil potrebnih za razteg molekule iz zvitega v raztegnjeno stanje z enim jasnim vmesnim stanjem procesa. Za zvito stanje so avtorji uporabili prilagajanje enojne WLC (modra črta), na vmesno (zelena črta) in raztegnjeno stanje (črna črta) pa so prilagajali model z dvema zaporednima WLC. b) Iz histograma sil potrebnih za spremembo konformacije so s prilagajanjem modela Dudko in sod. [20] (rdeča črta) pridobili ΔG^\ddagger , x^\ddagger in k_0 . Slika prirejena po [11].

Kako blizu so si modeli med sabo, so preizkusili na podatkih pridobljenih iz simulacij Brownove dinamike za koničasti potencial (14). Uporabili so parametre za opis molekul titina in RNA ter nato preverili kakšne vrednosti dobimo iz preostalih dveh modelov za najboljše prilagajanje (16) na simulirane podatke. Tabela 3 ponazarja, da so kinetični parametri pridobljeni iz mikroskopske teorije za kubično-linearni potencial ($\xi = 2/3$) dokaj blizu pravim vrednostim uporabljenim v simulaciji za koničasti potencial ($\xi = 1/2$). Po drugi strani rezultati Bellovega fenomenološkega pristopa ($\xi = 1$) precej manj ustrezno zadanejo prave vrednosti ($\xi = 1/2$).

Tabela 3: Primerjava kinetičnih parametrov različnih modelov za molekuli titina in RNA. Parametri so bili pridobljeni s prilagjanjem na simulacije Brownove dinamike v koničastem potencialu ($\xi = 1/2$). Povzeto po [20].

	Titin			RNA		
	$\xi = 1/2$	$\xi = 2/3$	$\xi = 1$	$\xi = 1/2$	$\xi = 2/3$	$\xi = 1$
k_0 [10^{-4}s^{-1}]	1	2,4	38	1	1,1	34,3
x^\ddagger [nm]	0,4	0,34	0,21	12	11,8	9,7
ΔG^\ddagger [$k_B T$]	20	17,6	/	40	31,1	/

4 Zaključek

Eksperimentalnih pristopov k vlečenju posamezne molekule je več, tu je podrobneje opisana optična pinceta, ki s svojim merilnim razponom in natančnostjo največ obeta na tem področju. Tovrstni eksperimenti so pronicljiv način za raziskovanje elastičnih lastnosti polimerov. Z zadostno statistiko in nedavnimi teoretičnimi prijemi je iz njih možno pridobiti podatke o energijski pokrajini proste energije v ravnovesnem stanju, čeprav je meritev neravnovesna. Tako pripomorejo k razumevanju zvijanja polimerov, vendar ne ponudijo celotne slike. Energijska pokrajina je precej bolj zapletena, kot jo poenostavljeno vidimo v tovrstnih poskusih. Pri marsikaterih polimerih je možnih poti zvijanja več in slika ni zgolj enodimenzionalna, kot jo vsiljuje smer vlečenja. Še vedno je odprta razprava, če je smer vlečenja sploh ustrezna reakcijska koordinata za vse polimere, saj ne vidimo efektov kot je npr. vrtenje molekule. Vseeno so ti eksperimenti že priskrbeli poglobljen vpogled v naravo številnih molekul in mehanizmov (titin, DNA, prepisovanje RNA ...).

Literatura

- [1] NEUMAN, K. C. in A. NAGY. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. V: *Nature Methods*. 5. 491-505.
- [2] BERG, H. C. (2003). The Rotary Motor of Bacterial Flagella. V: *Annu. Rev. Biochem.* 72. 19-54.
- [3] KOLOMEISKY, A. B. in M. E. FISHER. (2007). Molecular Motors: A Theorist's Perspective. V: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58. 675-695.
- [4] WILLIAMS, M. C. in I. ROUZINA. (2002). Force Spectroscopy of Single DNA and RNA Molecules. V: *Current Opinion in Structural Biology*. 12. 330-336.
- [5] BORGIA, A., P. M. WILLIAMS in J. CLARKE. (2008). Single-Molecule Studies of Protein Folding. V: *Annu. Rev. Biochem.* 77. 205-228.
- [6] ASHKIN, A., J. M. DZIEDZIC, J. E. BJORKHOLM in S. CHU. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. V: *Opt. Lett.* 11. 288-290.
- [7] BERG-SØRENSEN, K. in H. FLYVBJERG. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. V: *Rev. Sci. Instrum.* 75. 594-612.
- [8] UHLENBECK, G. E. in L. S. ORNSTEIN. (1930). On the theory of the Brownian motion. V: *Physical Review*. 36. 823-841.
- [9] WILLIAMS, M. C. Optical Tweezers: Measuring Piconewton Forces [Online]. [Citirano 25. avgusta 2010; 13.29]. Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/williams.pdf>.
- [10] MOFFITT, J. R., Y. R. CHEMLA, S. B. SMITH in C. BUSTAMANTE. (2008). Recent Advances in Optical Tweezers. V: *Annu. Rev. Biochem.* 77. 205-228.
- [11] GREENLEAF, W. J., K. L. FRIEDA, D. A. N. FOSTER, M. T. WOODSIDE in S. M. BLOCK. (2008). Direct Observation of Hierarchical Folding in Single Riboswitch Aptamers. V: *Science*. 319. 630-633.
- [12] PODGORNIK, R., P. L. HANSEN in V. A. PARSEGIAN. (2000). Elastic moduli renormalization in self-interacting stretchable polyelectrolytes. V: *J. Chem. Phys.* 113. 9343-9350.
- [13] WANG, M. D., H. YIN, R. LANDICK, J. GELLES in S. M. BLOCK. (1997). Stretching DNA with Optical Tweezers. V: *Biophys. J.* 72. 1335-1346.
- [14] MARKO, J. F. in E. D. SIGGIA. (1995). Stretching DNA. V: *Macromolecules*. 28. 8759-8770.

- [15] ODIJK, T. (1995). Stiff Chains and Filaments under Tension. V: *Macromolecules*. 28. 7016-7018.
- [16] SMITH, S. B., Y. CUI in C. BUSTAMANTE. (1996). Overstretching B-DNA: The Elastic Response Of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. V: *Science*. 271. 795-799.
- [17] BOUCHIAT, C., M. D. WANG, J.-F. ALLEMAND, T. STRICK, S. M. BLOCK in V. CROQUETTE. (1999). Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements. V: *Biophys. J.* 76. 409-413.
- [18] HUMMER, G. in A. SZABO. (2003). Kinetics from Nonequilibrium Single-Molecule Pulling Experiments. V: *Biophys. J.* 85. 5-15.
- [19] BORGIA, A., P. M. WILLIAMS, J. CLARKE. (2008). Single-Molecule Studies of Protein Folding. V: *Annu. Rev. Biochem.* 77. 101-125.
- [20] DUDKO, K. D., G. HUMMER in A. SZABO (2006). Intrinsic Rates and Activation Free Energies from Single-Molecule Pulling Experiments. V: *Phys. Rev. Lett.* 96. 108101-108104.
- [21] BELL, G. I. (1978). Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. V: *Science*. 200. 618-627.
- [22] JARZYNSKI, C. (1997). A nonequilibrium equality for free energy differences. V: *Phys. Rev. Lett.* 78. 2690-2693.
- [23] KRAMERS, H. A. (1940). Brownian motion in a field force and the diffusion model of chemical reactions. V: *Physica*. 7. 284-304.
- [24] DUDKO, K. D., A. E. FILIPOV, J. KLAFTER in M. URBAKH. (2003). Beyond the conventional description of dynamic force spectroscopy of adhesion bonds. V: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100. 11 378.
- [25] GARG, A. (1995). Escape-field distribution for escape from a metastable potential well subject to a steadily increasing bias field. V: *Phys. Rev. B.* 51. 15592-15595.