

Versuch: Diffusionsverhaltens von Einzelmolekülen

Ziel des Versuches:

- Einführung in den theoretischen Hintergrund von Einzelmolekülbewegungen
- Aneignen von Erfahrung und Fähigkeiten beim
 - Präparieren von Proben
 - Aufbau der Messapparatur
 - Entstehen und Verarbeiten der Bilder
- Analyse der gewonnenen Bilder / Messwerte

Vorbetrachtung:

Ziel des Versuches war es, die Brownsche Molekularbewegung der verwendeten Beads in einer Flüssigkeit zu beobachten. Charakteristische Größen, welche diese Bewegung beschreiben, sind die mittlere quadratische (zurückgelegte) Wegstrecke (MSD) und die daraus abgeleitete Diffusionskonstante. Die Diffusionskonstante lässt sich auf zwei Wegen bestimmen. Der erste Weg führt über den statistischen Mittelwert der quadratischen Entfernung $\Delta x(t)^2$, angegeben hier in n Schritten der konstanten Zeiteinheit t , zu folgender Formel:

$$D = \frac{\overline{\Delta x^2}}{n \cdot t} \quad (1)$$

Der zweite Weg nutzt die phänomenologische Natur der Diffusionskonstanten aus. In diese Formel gehen die Größen Beadradius R , die absolute Temperatur T und die Viskosität η der Flüssigkeit ein.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \quad (2)$$

Versuchssetup:

- 488 nm ArKr-Laser (Coherent Corp.)
- akustisch-optischer Modulator (AA. Sa Corp., Frankreich)
- Filter D488/647 (zur Separation von Anregungs- und Emissionslicht)
- Filter D535/550 (zum Abblocken von gestreutem Anregungslicht)
- Objektiv: Olympus UPlanApo 60x / 1.20 W (Wasser-Immersion Objektiv)
- CCD-Kamera: CoolSnap HQ, Roper Scientific Corp.

Durchführung:

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie wurde das Diffusionsverhalten von Einzelmolekülen anhand von mit Fluoreszenzfarbstoffen beschichteten Polystyrolkugeln (Beads) in Wasser nachgebildet.

Verwendet wurde ein optisches System, das sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem Dunkellabor befand. Neben Spiegeln, Blenden und Linsen gehörten zu den wesentlichen optischen Komponenten ein Argon-Krypton-Laser im Multi-Line-Betrieb, ein akusto-optischer Modulator, ein Inversions-Mikroskop und eine hochsensitive CCD-Kamera. Zur Auswertung diente ein an die Kamera angeschlossener PC mit den Programmen *Winspec*, *ImageJ* und *View5D*.

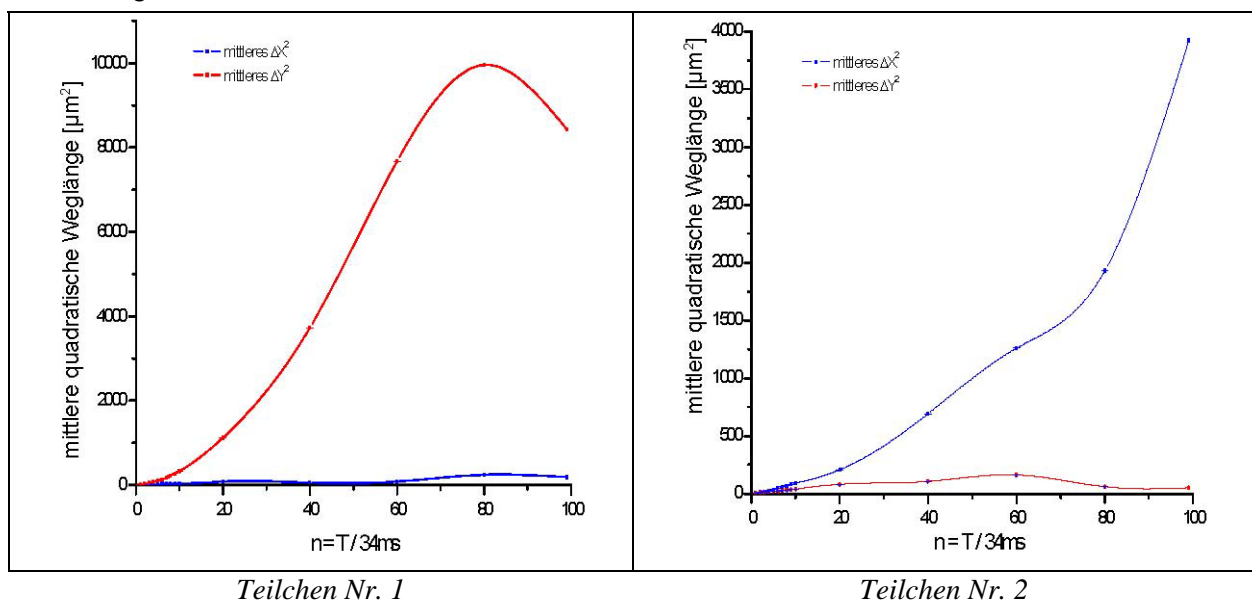
Der erste Teil des Versuches bestand aus der Kalibrierung der gesamten Apparatur. Dazu wurden die optischen Elemente, wie Linsen, Blenden und Umlenkspiegel so im Strahlengang positioniert, so dass bei einer Weitfeldbelichtung der Objektebene im Mikroskop eine homogene und nahezu parallele Ausleuchtung möglich ist. Dies ist notwendig um aussagekräftige und qualitativ hochwertige Bilder zu erhalten. Die verwendeten Wellenlängenfilter vor dem Mikroskop dienten zur Absorption der ungewünschten Laser-Linien außerhalb der Anregungswellenlänge ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$), die im Mikroskop verwendeten Filter

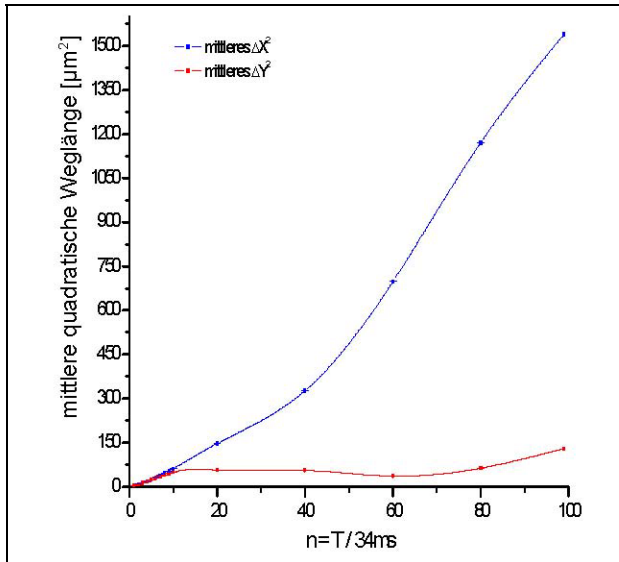
zum Separieren von Anregungs- und Emissionslicht ($\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$). Diese Trennung wird zum einen durch einen im 45° Winkel zum Lichtstrahl eingebauten dichroitischen Filter gewährleistet, der das Anregungslicht zu ca. 95% reflektiert, während das Emissionslicht zu ca. 80% transmittiert wird. Zum anderen dient ein hinter dem Dichroiten befindlicher Emissionsfilter dazu, die Intensität des verbliebenen Anregungslichts um einen Faktor von ca. 10^6 zu schwächen.

Im zweiten Teil des Versuches wurde eine Probenlösung (Bead-Radius $R = 1 \mu\text{m}$) mit einer Konzentration $c = 103 \mu\text{l}^{-1}$ in 100 % Wasser auf ein Deckglas gebracht und durch das Mikroskop beobachtet. Zu beachten war dabei, dass die Beleuchtungszeit so kurz wie nötig gehalten wurde, um ein zu schnelles Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffes und damit die Verminderung der Emissionsintensität der Beads zu verhindern. Wichtig war außerdem das korrekte Einstellen der Bildgröße (ROI...Region of Interest) bzw. der auszulesenden Fläche des CCD-Chips. Da bei der maximalen Auflösung ($1392 * 1040 \text{ Pixel}$) nicht mehr als 10 Bilder in Serie aufgenommen werden konnten, wurde die Auflösung im Computerprogramm *Winspec* zur Steuerung von Laser und Kamera so weit herabgesetzt, dass 100 Bilder pro Film aufgenommen werden konnten, ohne den Computer und dessen Speicher zu überlasten und damit möglicherweise Zeitfehler zu forcieren.

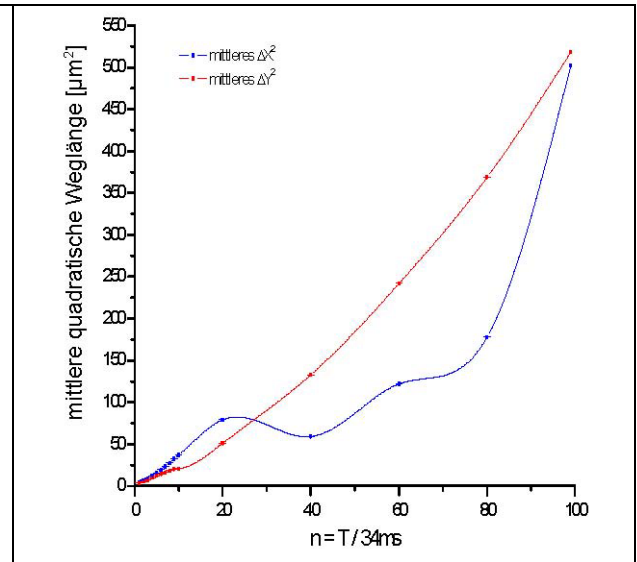
Nachdem mit *Winspec* 11 Beads in 9 Filmen (mit je 100 Bildern im zeitlichen Abstand $t = 34 \text{ ms}$) beobachtet und aufgenommen wurden, konnte mit Hilfe der Programme *ImageJ* und *View5D* deren Trajektorien gefittet und gleichzeitig die zurückgelegten mittleren quadratischen Wegstrecken (für verschiedene Zeiten $T = n \cdot t$ mit $n = 1, 2, \dots, 60, 80$ und 99 und $t = 34 \text{ ms}$) ermittelt werden. Aus Formel (1) folgt, dass bei wachsender Zeitdifferenz T die Anzahl an Einzelmesswerten sinkt, was zu einer Vergrößerung der statistischen Unsicherheit führt. Im Rahmen der Auswertung sollten für die einzelnen Beads die mittleren quadratischen Weglängen in Abhängigkeit von der Zeitdifferenz T dargestellt werden und anschließend die Diffusionskonstante D für die hier verwendeten Beads bestimmt werden.

Auswertung

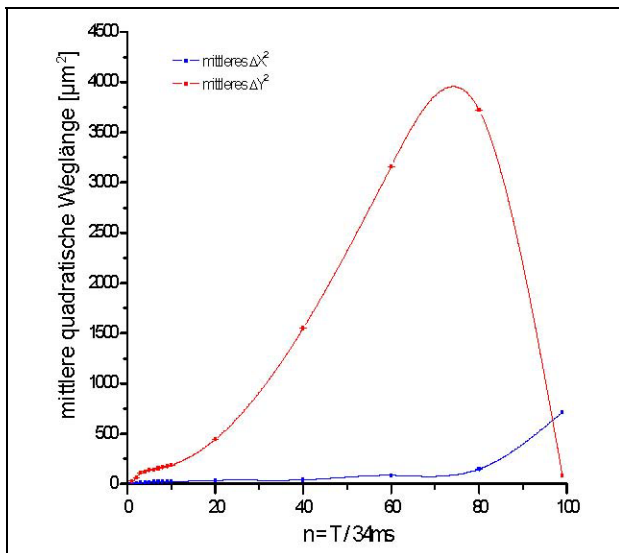




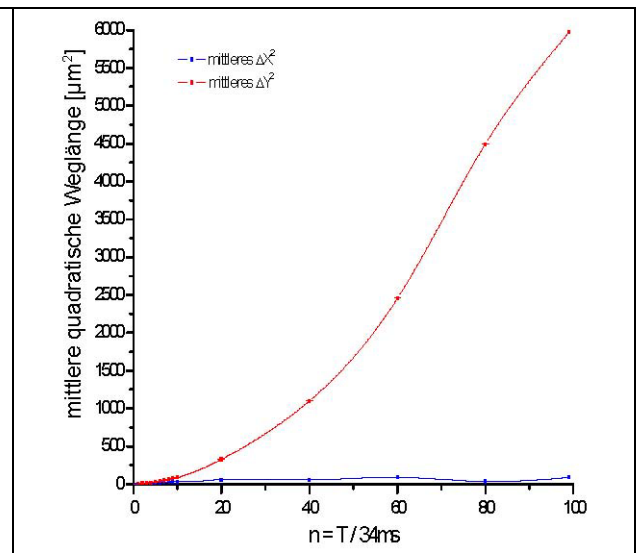
Teilchen Nr. 3



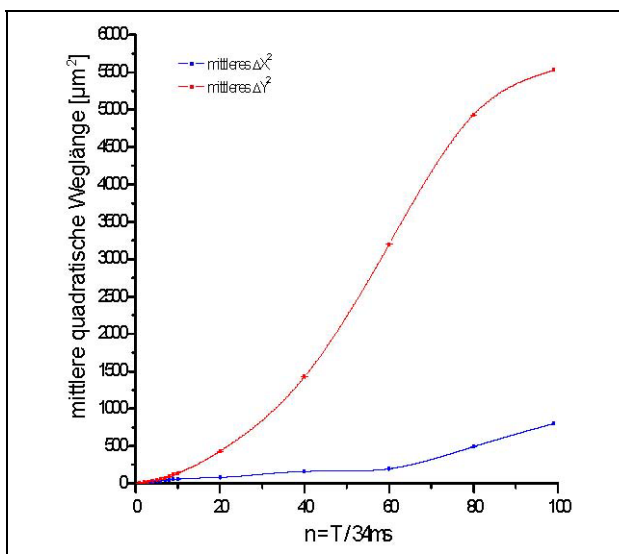
Teilchen Nr. 4



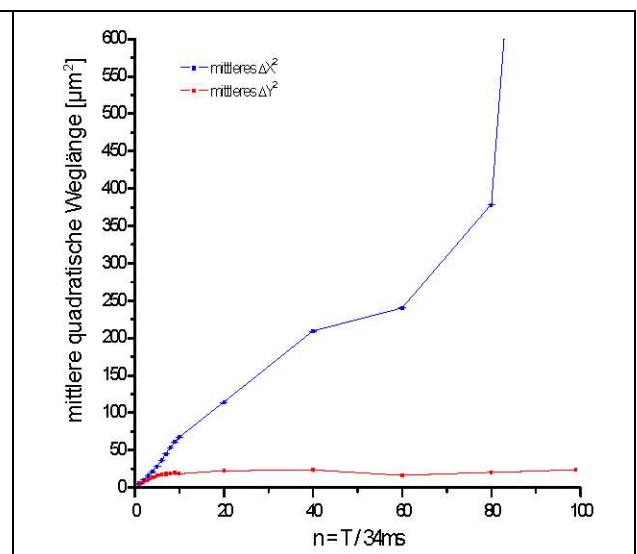
Teilchen Nr. 5



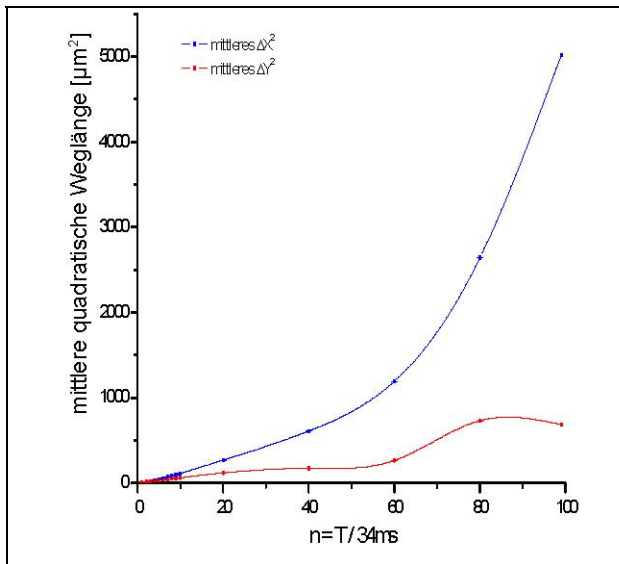
Teilchen Nr. 6



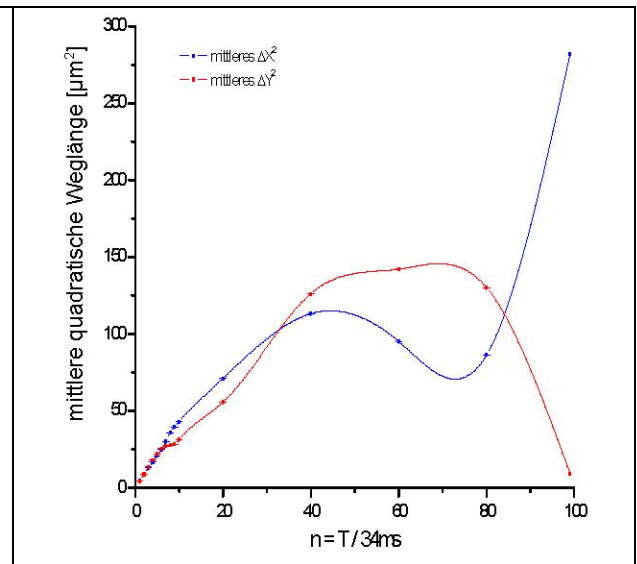
Teilchen Nr. 7



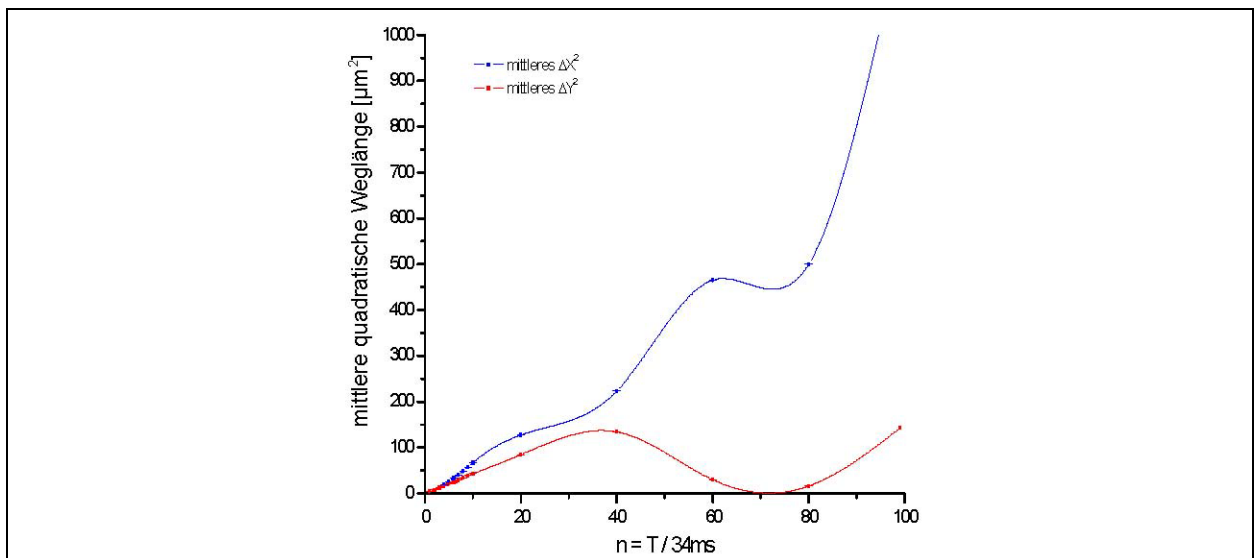
Teilchen Nr. 8



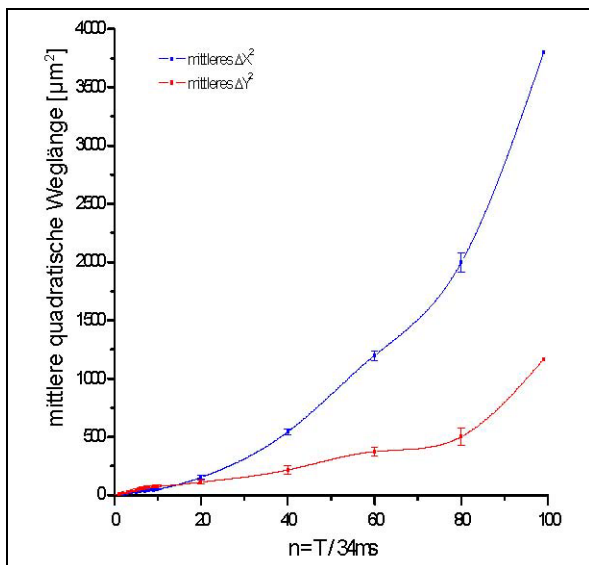
Teilchen Nr. 9



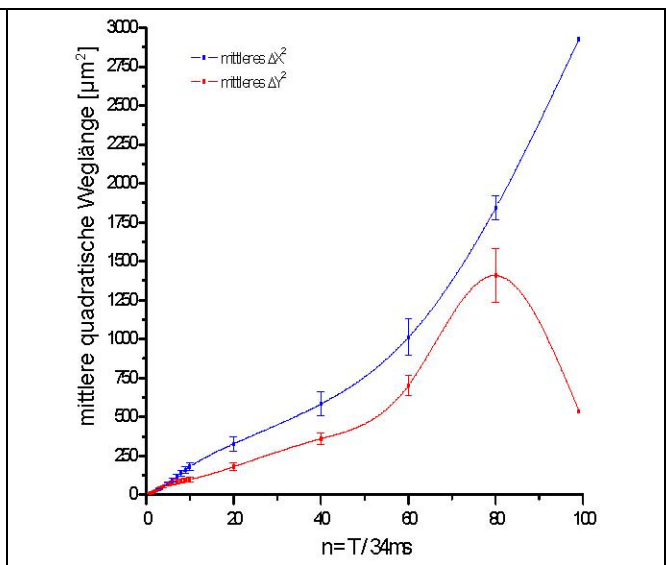
Teilchen Nr. 10



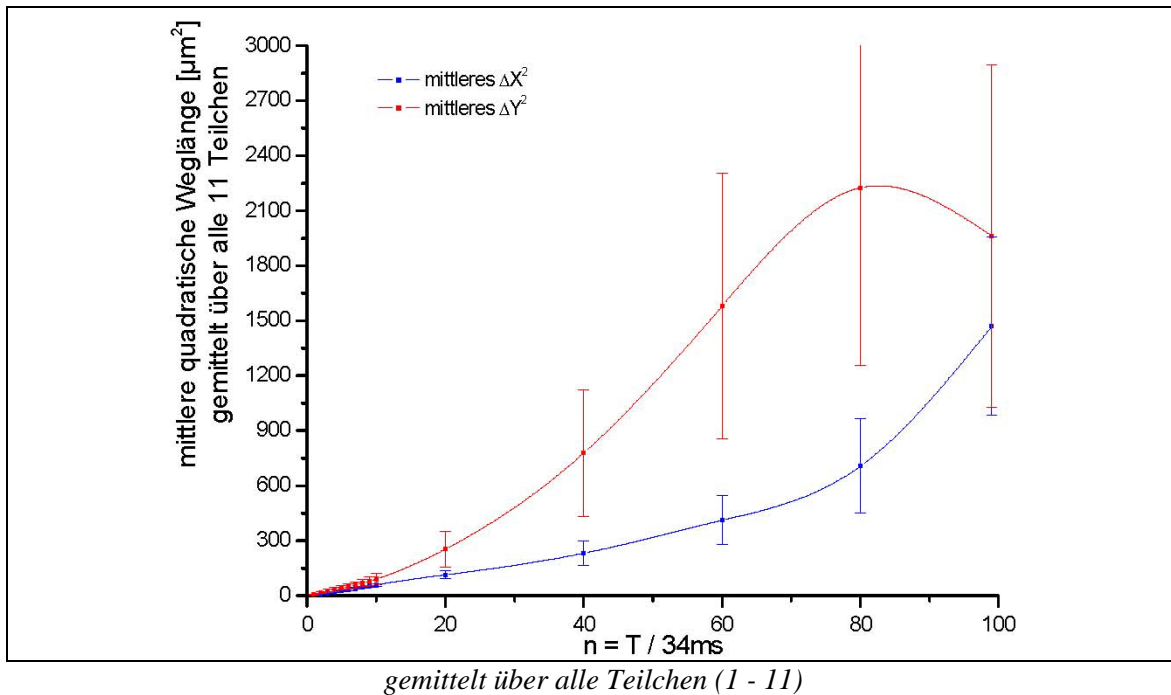
Teilchen Nr. 11



Teilchen Nr. 3 + 4 (relativ)



Teilchen Nr. 9 + 10 (relativ)



Wie man an den Diagrammen erkennen kann, nimmt bei den hier vorliegenden Messungen die im Mittel zurückgelegte quadratische Wegstrecke der Beads bei zunehmender Messzeit erwartungsgemäß zu. Jedoch ist aufgrund der großen statistischen Streuung kein zeitlich linearer Verlauf erkennbar, da die Bewegung chaotisch und isotrop erfolgt. Dies hat zur Folge, dass man, um quantitativ gute Ergebnisse zu erzielen, eine möglichst (infinitesimal) kleine Messzeit zu wählen hat.

Als letztes sind die Diffusionskonstanten aus der phänomenologischen und der statistischen Beschreibung zu vergleichen:

Phänomenologisch:

Radius R 1 μm
 Temperatur θ (T) $\sim 25^\circ\text{C}$ (298 K)
 Viskosität $\eta(\theta)$ $0,89 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Damit lässt sich nun die Diffusionskonstante D berechnen, und es ergibt sich aus Gleichung (2):
 $D = 2,29 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Experiment:

Messzeit n·t (t=34 ms)	Diffusionskonstante D	
	[k^2/s]	[$10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$]
1t	$1,78 \pm 0,32$	$20,65 \pm 3,71$
2t	$1,85 \pm 0,42$	$21,46 \pm 4,87$
3t	$1,98 \pm 0,49$	$22,97 \pm 5,68$
4t	$1,96 \pm 0,44$	$22,74 \pm 5,10$
5t	$1,98 \pm 0,43$	$22,97 \pm 4,99$
6t	$2,00 \pm 0,42$	$23,20 \pm 4,87$
7t	$2,06 \pm 0,44$	$23,90 \pm 5,10$
8t	$2,11 \pm 0,47$	$24,48 \pm 5,45$
9t	$2,14 \pm 0,49$	$24,82 \pm 5,68$
10t	$2,19 \pm 0,53$	$25,40 \pm 6,15$
20t	$2,71 \pm 0,88$	$31,44 \pm 10,21$
40t	$3,71 \pm 1,51$	$43,04 \pm 17,52$
60t	$4,88 \pm 2,11$	$56,61 \pm 24,48$
80t	$5,39 \pm 2,26$	$62,52 \pm 26,22$
99t	$5,09 \pm 2,11$	$59,04 \pm 24,48$

Der Umrechnungsfaktor zwischen Pixel und cm berechnet sich folgendermaßen:

Kantenlänge eines Pixels: $k = 107,5 \text{ nm}$,
 Fläche eines Pixels: $k^2 = 11,6^{-9} \text{ cm}^2$

Diskussion

Die phänomenologisch bestimmte Diffusionskonstante ist um eine Größenordnung kleiner als die durch die obige Messung ermittelte, dh. liegen experimentell bestimmten Werte im Bereich $2\text{-}5\cdot 10^{-8}$ cm^2/s , der theoretische bei $2\cdot 10^{-9}$ cm^2/s . Die Beads bewegen sich also schneller als durch Gleichung (2) beschrieben. Möglicherweise spielen Wasserströmungen durch lokale Dichteschwankungen oder Korrelationen zwischen Molekülen eine Rolle.