

Szczypce Optyczne

*Materiały przeznaczone dla studentów I-go stopnia fizyki oraz biofizyki
w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego*

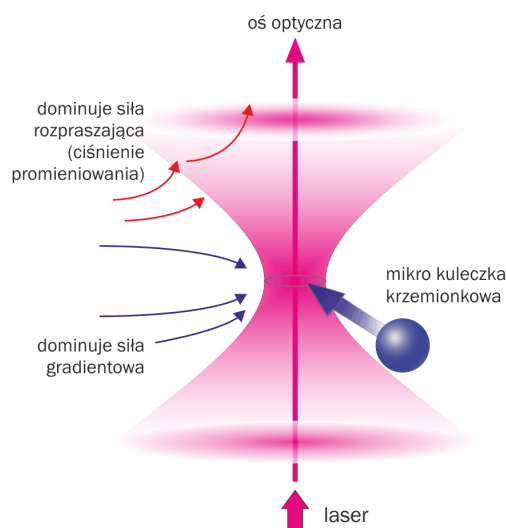
CEL ĆWICZENIA

Szczypce optyczne nazywane również pęsetą optyczną (ang. *optical tweezers*) wykorzystują silnie zogniskowaną wiązkę lasera do wytwarzania siły, która pozwala łapać małe cząstki i nimi poruszać. Ponieważ szczypce optyczne mogą w sposób precyzyjny i nieniszczący manipulować takimi obiektami jak bakterie, pojedyncze komórki i ich elementy składowe, dlatego stały się one niezwykle przydatne m.in. w badaniach biofizycznych. Za wynalezienie szczypiec optycznych i ich zastosowanie w badaniach układów biologicznych, Arthur Ashkin został uhonorowany w roku 2018 połową Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki [Berkovitz2018].

W tym eksperymencie student zapoznaje się z budową i działaniem szczypiec optycznych, których następnie używa do łapania i więzienia mikrometrycznych kuleczek krzemionkowych, zanurzonych w wodzie destylowanej. Student dowiadytuje się również jak mierzyć położenia złapanych kuleczek i w jaki sposób analizować widmo częstotliwości ich ruchów Browna oraz siły na nie wywierane przez otaczający ośrodek. Ponadto, bada parametry fizyczne wytworzonej pułapki optycznej jak np. jej sztywność (stałą sprężystości).

W trakcie ćwiczenia studenci zapoznają się z zasadami prowadzenia wiązek światła laserowego, ich ogniskowania w układzie mikroskopu odwróconego oraz z metodami obserwacji i rozpoznawania pułapkowanych obiektów. W eksperymentach, w pomiarach ilościowych, używa się m.in. fotodiody kwadrantowej jako detektora światła w celu szybkiej rejestracji zmiany położenia więzionych obiektów.

Ten zestaw ćwiczeniowy jest stosunkowo nowy i wciąż modyfikowany i rozwijany. Dlatego też nie wszystkie eksperymenty opisane w tej instrukcji będą do końca poprawnie działać. Wszelkie nieprawidłowości w działaniu układu należy zgłaszać asystentowi.



Rysunek 1. Siły optyczne wywierane na kulkę przez zogniskowaną wiązkę laserową.

PODSTAWY TEORETYCZNE

1. Wstęp

W roku 1619 Johannes Kepler zasugerował, że **ciśnienie promieniowania** słonecznego wraz z wiatrem słonecznym mogą być odpowiedzialne za to, że ogony komet są zawsze skierowane od Słońca. Dwa wieki później James Clerk Maxwell pokazał, że promieniowanie elektromagnetyczne rzeczywiście może wywierać siłę na powierzchnię. Po pojawieniu się lasera w latach 60. ubiegłego wieku **Arthur Ashkin** był jedną z pierwszych osób, które zbadały możliwość wykorzystania ciśnienia światła do manipulowania cząstkami za pomocą skupionych wiązek fotonów. Do tego czasu fizycy sądzili, że jedynie w astronomii ciśnienie promieniowania może prowadzić do znaczących efektów w wyniku działania małej siły, ale przez bardzo długi czas.

Ashkin zaobserwował, że używając skupionych wiązek laserowych o dużym natężeniu można w laboratorium zaobserwować ruch cząstek powodowany działaniem światła.

Ta obserwacja zaowocowała opracowaniem techniki wykorzystującej laser do chwytania cząstek dielektrycznych i manipulowania nimi. W ten sposób powstały **szczypce optyczne** zwane także pęsetą optyczną, które są obecnie szeroko wykorzystywane przez badaczy zajmujących się miękką materią, biofizyką, fizyką atomową i fotoniką, w tym do prowadzenia badań na poziomie pojedynczych molekuł.

W pierwszej demonstracji ciśnienia promieniowania - lewitacja kulki lateksowej o wielkości mikrona - Ashkin wykorzystał pęd, skierowanej w górę, wiązki światła pochodzącej z lasera argonowego o pracy ciągłej i mocy 1 W. W kolejnych eksperymentach, do napędzania przezroczystej kulki polistyrenowej, umieszczonej w kuwecie z wodą, używał **zielonego lasera** o mocy 150 mW i w 1969 roku otrzymał zaskakujący wynik. Zgodnie z oczekiwaniami padające światło wywierało **siłę rozpraszającą**, która przyspieszała kulkę w kierunku propagacji tejże wiązki. Ale, wbrew intuicji, kulka została również wciągnięta do środka wiązki, do obszaru o większej intensywności. Ashkin wyjaśnił to tak, że powierzchnia kulki działa jak soczewka, załamując światło i zmienia w ten sposób jego pęd. Z zasady zachowania pędu wynika zaś, że powstająca wówczas dodatkowa siła, zwana **siłą gradientową**, pociąga cząstkę w kierunku obszaru o większym natężeniu światła, czyli do środka wiązki laserowej. Dodanie drugiej, przeciwbieżnej wiązki zapewniło siłę, która przeciwdziałała sile rozpraszającej pochodzącej od pierwszej wiązki i razem utrzymywały one kulkę w miejscu. W ten oto sposób dokonano pierwszej demonstracji stabilnej trójwymiarowej pułapki optycznej [Ashkin1970]. Tego typu pułapka, wykorzystująca dwie przeciwbieżne wiązki laserowe, charakteryzowała się dużą objętością. Jednak również pojedyncza, **mocno skupiona wiązka gaussowska**, może służyć jako pułapka optyczna. Otóż, skupiając wiązkę laserową w kierunku jej propagacji pojawia się dodatkowa składowa siły gradientowej, działająca zawsze w stronę ogniska. Gdy ogniskowanie jest na tyle mocne, że siła gradientowa przewyższa siłę rozpraszającą, to oświetlona cząstka jest popychana w stronę ogniska, gdzie zostaje schwytana i uwięziona.

W ciągu ostatnich dwóch dekad pułapki optyczne, w tym szczypce optyczne, stały się standardowym narzędziem w naukach fizycznych i biologicznych, umożliwiając pomiary przemieszczeń optycznie więzionych mikrocząstek z dokładnością poniżej nanometra, a także pomiary wywieranych na nie sił o wielkości pojedynczych piko-niutonów. Stosując szczypce optyczne można manipulować – ciągnąć, rozciągać czy nawet kręcić - molekułami i

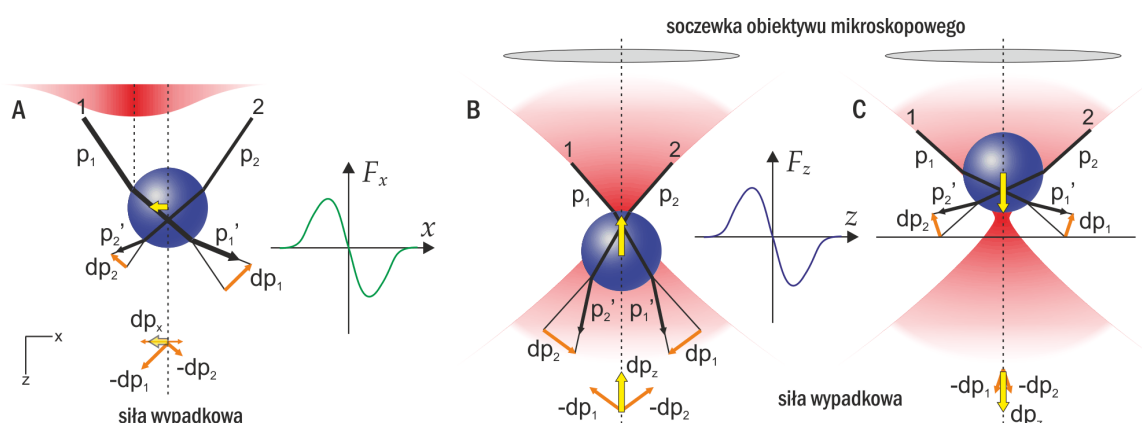
materiałem biologicznym, przyłączonymi do uwieczonych mikrocząstek dielektrycznych oraz mierzyć ich przesunięcia i działające na nie siły (lub moment obrotowy) z dużą przestrzenną (~ 1 nm) oraz czasową (~ 10 μ s) zdolnością rozdzielczą. Tego typu eksperymenty dostarczają cennych informacji na temat mechanizmów molekularnych, które uzupełniają tradycyjne badania biochemiczne.

2. Fizyczne podstawy pułapkowania światłem

Mikrocząstka dielektryczna, np. kuleczka krzemionkowa czy polistyrenowa, znajdująca się w obszarze ogniska wiązki laserowej doświadcza działania siły zwanej siłą gradientową, która to siła popycha ją w stronę ogniska lasera, czyli do obszaru o dużym natężeniu światła. Siła ta związana jest z przekazaniem takiej kuleczce pędem w procesie rozpraszania padającego na nią światła laserowego. Chociaż w pełni poprawny opis teoretyczny pułapkowania za pomocą sił optycznych jest bardzo złożony [np. [Nieminen2014](#), [Polimeno2018](#)], to kilka uproszczonych przypadków pozwala nabrać intuicji co do działania takich pułapek.

Przybliżenie optyki geometrycznej

Z najprostszym przypadkiem mamy do czynienia wówczas, gdy cząstka jest dużo większa niż długość fali padającego na nią światła $D \gg \lambda$. Wówczas pochodzenie sił pułapkujących możemy wyjaśnić korzystając z formalizmu optyki geometrycznej, rozważając zjawiska załamania i odbicia wiązki laserowej na powierzchni sferycznej kulki (patrz Rys. 2). Przyjmijmy, że wiązka laserowa, o gaussowskim rozkładzie natężenia, rozchodzi się w kierunku osi z , a kuleczka znajduje się początkowo na prawo od jej osi. Promienie 1 i 2 ulegają dwukrotnemu załamaniu na powierzchni kulki i zmieniają kierunek swojego biegu, a co za tym idzie zmianie ulega pęd związanych z nimi fotonów. Zgodnie z zasadą zachowania pędu, zmiana pędu fotonów powoduje identyczną co do wielkości zmianę pędu cząstki, ale skierowaną przeciwnie. Z uwagi na przestrzenny rozkład natężenia wiązki lasera w kierunku poprzecznym i odpowiadające temu różne liczby fotonów, powstała siła wypadkowa popycha kulkę w stronę osi wiązki (patrz Rys. 2A). Sytuacja staje się nieco bardziej złożona, gdy wiązka jest ogniskowana wzdłuż osi z . Wówczas kuleczka,



Rysunek 2. Obraz jakościowy pochodzenia siły pułapkującej w formalizmie optyki geometrycznej z uwzględnieniem zjawiska załamania światła. (a) Poprzeczna siła gradientowa pochodząca od gaussowskiego profilu wiązki laserowej. (b, c) Siła gradientowa wzdłuż osi silnie zogniskowanej wiązki laserowej, działająca w stronę jej ogniska. Żółte strzałki oznaczają wypadkową siłę pułapkującą działającą na cząstkę w kierunku większego natężenia światła, a dp oznaczają zmianę pędu fotonów odpowiednich promieni i kulki. Należy zwrócić uwagę, że w żadnym z pokazanych przypadków nie zaznaczono siły rozpraszającej.

początkowo położona na osi wiązki i poniżej ogniska, na skutek zmiany pędu fotonów promieni 1 i 2 doznaje działania siły w górę, w stronę ogniska. W tym przypadku nie występuje siła poprzeczna, gdyż z uwagi na symetrię problemu wypadkowa zmiana pędu fotonów w kierunku poprzecznym wynosi zero (Rys. 2B). Podobnie, gdy kuleczka znajduje się na osi wiązki, ale powyżej jej ogniska (Rys. 2C), wypadkowa siła związana z załamaniem promieni 1 i 2 działa w dół, czyli znowu w stronę ogniska. Siła działająca na cząstkę w obszarze ogniska lasera jest liniowo proporcjonalna do natężenia wiązki - im więcej promieni ulega załamaniu tym większa siła - ale również do różnicy natężeń w danym kierunku stąd nazwa - **siła gradientowa**.

Oczywiście, nie cała wiązka lasera padająca na kulkę ulega załamaniu, ale zostaje też częściowo odbita. Siła związana z promieniami odbitymi, zwana **siłą rozpraszającą**, działa głównie w kierunku propagującej wiązki laserowej i powoduje, że początkowo cząstka jest popychana w stronę ogniska, a następnie z niego wypychana. Aby zapewnić pułapkovanie cząstki we wszystkich trzech kierunkach, w celu przeciwdziałania sile rozpraszającej, stosuje się albo dwie przeciwbieżne wiązki laserowe albo pojedyncza wiązka jest na tyle silnie zogniskowana w kierunku propagacji, że wytworzona wzdłuż osi siła gradientowa przewyższa siłę rozpraszającą. W tym drugim przypadku środek pułapki (miejsce pułapkovania kulki) zostaje nieco przesunięty w stosunku do ogniska wiązki, w kierunku jej propagacji. Podobnie jak siła gradientowa, siła rozpraszająca jest również tym większa im większe natężenie wiązki laserowej.

Przybliżenie dipolowe Rayleigha

W przypadku cząstek o rozmiarach równych lub mniejszych niż długość fali światła $D \leq \lambda$, dla poprawnego opisu sił występujących w układzie cząstka – światło wymagany jest model elektromagnetyczny. W tym podejściu z kolei można używać albo złożonych rozwiązań teorii Mie dotyczącej rozpraszania fal elektromagnetycznych na obiektach sferycznych lub eliptycznych, albo zdecydowanie prostszych rozwiązań, gdy cząstka jest znacznie mniejsza niż długość fali światła pułapkującego. W tym drugim przypadku, w obliczeniach stosujemy przybliżenie dipolowe, które zakłada, że w danej chwili cząstka znajduje się w jednorodnym polu elektromagnetycznym fali świetlnej oraz sama nie modyfikuje tego pola. Średnia siła (uśredniona po całym cyklu optycznym) działająca na cząstkę ma postać

$$\mathbf{F} = \frac{\alpha'}{2} \nabla \langle |\mathbf{E}|^2 \rangle + \omega \alpha'' (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) = \mathbf{F}_{\text{grad}} + \mathbf{F}_{\text{rozprasz}},$$

gdzie $\alpha = \alpha' + i\alpha''$ to zespolona polaryzowalność cząstki, a $\mathbf{E}$ i $\mathbf{B}$ to odpowiednio wektory pól elektrycznego i magnetycznego fali świetlnej. Pierwszy człon po prawej stronie to tak zwana siła dipolowa (gradientowa), która jest proporcjonalna do części rzeczywistej (dyspersyjnej) polaryzowalności i pochodzi od przestrzennej niejednorodności pola elektrycznego. Drugi człon to siła rozpraszająca (ciśnienie światła), w której rozpoznajemy wyrażenie na wektor Poyntinga. Część rzeczywistą polaryzacji wyliczamy z relacji Clausiusa-Mossotiego dla sferycznej cząstki dielektrycznej

$$\alpha' = 4\pi\epsilon_0 n_0^2 r^3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}.$$

W równaniu powyższym ϵ_0 to przenikalność elektryczna próżni, r to promień cząstki, $m = n/n_0$, gdzie n_0 i n to odpowiednio współczynniki załamania ośrodka, w którym zanurzona jest cząstka i materiału, z którego jest ona wykonana. Ostatecznie otrzymujemy siłę gradientową w postaci

$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = -\frac{2\pi n_0 r^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I(\mathbf{r}).$$

Przy wyprowadzaniu tego wzoru skorzystaliśmy z wyrażenia na średnie natężenie światła: $I(\mathbf{r}) = \varepsilon_0 c n_0 \langle |\mathbf{E}|^2 \rangle$, gdzie c to prędkość światła w próżni.

Jak widać, wielkość siły pułapkującej w sposób istotny zależy od stosunku współczynników załamania m . Co ciekawe, zmiana wartości tej wielkości może spowodować odwrócenie znaku siły gradientowej. Jeśli współczynnik załamania cząstki jest mniejszy od współczynnika załamania jej otoczenia, czyli jeśli $m < 1$, to siła zmienia znak i cząstka jest wypychana z obszaru o większym natężeniu światła. Zatem, jak wynika z równania (3) siła gradientowa jest wprost proporcjonalna do gradientu natężenia światła i powoduje wciąganie cząstek do obszarów o większym lub mniejszym natężeniu w zależności od względnych wartości współczynników załamania.

Ze stabilną pułapką mamy do czynienia wówczas, gdy wypadkowa siła działająca na cząstkę wynosi zero. Jakiemukolwiek wychyleniu z położenia równowagi prowadzi do pojawienia się siły optycznej, która przeciwdziała temu wychyleniu i sprowadza cząstkę z powrotem do tego położenia. Siła tego typu, w analogii do oscylatora harmonicznego, nazywana jest **siłą sprężystości** (ang. *restoring force*). Dla osiągnięcia stabilnego efektu pułapkowania, głębokość studni potencjału optycznego - prowadzącego do siły sprężystości równoważnej sile gradientowej - musi być zdecydowanie większa niż energia termiczna $\frac{3}{2}k_B T$ cząstek, gdzie k_B to stała Boltzmanna, a T to ich temperatura.

Dla kompletności opisu sił optycznych w przybliżeniu dipolowym (Rayleigha), należy również uwzględnić siłę rozpraszającą odczuwaną przez cząstkę oświetloną strumieniem fotonów o wektorze falowym $\mathbf{k}$. W ramach przybliżenia dipolowego oraz stosując relację Clausiusa-Mossottiego siła ta ma postać

$$\mathbf{F}_{\text{rozpr}} = \frac{8\pi n_0 k^4 r^6}{3c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I(\mathbf{r}) \frac{\mathbf{k}}{k}.$$

Zgodnie z powyższym równaniem siła rozpraszająca jest wprost proporcjonalna do natężenia wiązki światła i działa zawsze w kierunku jej propagacji.

Teoria rozpraszania Mie

Dla cząstek o rozmiarach pośrednich pomiędzy tymi rozważanymi w ujęciu optyki geometrycznej a rozważanym w przybliżeniu dipolowym Rayleigha, używa się teorii rozpraszania Mie. Otrzymywane wyniki są ścisłymi rozwiązaniami **równania Helmholtza** i przyjmują postać nieskończonych szeregów. Teoria Mie pozwala wypełnić lukę pomiędzy reżimem dipolowym, gdzie siła pułapkująca skaluje się z sześciannym promienia cząstki, a reżimem optyki geometrycznej, w którym zależność taka nie występuje. Szczegółowe obliczenia sił pułapkujących (z użyciem teorii rozpraszania Mie) wywieranych na cząstki o różnych rozmiarach i współczynnikach załamania światła i przez wiązki o różnych aperturach numerycznych zostały opisane w pracy [Stilgoe2008]. Natomiast, jeśli nie jest wymagana duża dokładność rozwiązań otrzymywanych metodą rozpraszania Mie, ale jesteśmy na granicy stosowalności teorii Mie i przybliżenia dipolowego Rayleigha, wówczas moment dipolowy cząstki możemy aproksymować dyskretną sumą wielu dipoli w celu zmniejszenia błędów wynikających z przybliżenia pojedynczego dipola.

Pozostałe siły działające na cząstkę

Aby w pełni poprawnie opisać działanie układu szczypiec optycznych, poza siłami optycznymi należy wziąć pod uwagę także pozostałe siły, takie jak siła lepkości (opór Stokesa), grawitacji, wyporu cieczy czy siłę związaną z przypadkowymi ruchami Browna. Występująca w układzie siła oporu Stokesa może być jednak bardzo trudna do ustalenia ze względu na wpływ sąsiadujących z cząstką powierzchni. W przypadku szczypiec optycznych, wpływ powierzchni dna szalki Petriego, uwzględnia się stosując prawo Faxena [Goldman1967, Krishnan1995].

Efekty działania wymienionych sił można badać traktując cząstkę wraz z działającymi na nią siłami jako tłumiony oscylator harmoniczny, a następnie wyznaczając parametry takiego oscylatora w sposób doświadczalny.

3. Kalibracja pułapki optycznej (szczypiec optycznych)

Procedura kalibracji pułapki optycznej jaką są szczypce jest kluczowa z punktu widzenia poznania jej właściwości i zrozumienia zjawisk istotnych dla samego procesu pułapkowania. Z jednej strony mamy prosty jakościowy opis pułapkowania światłem, ale z drugiej strony opis ten jednak nie wystarcza do wyliczenia sił działających na chwytane światłem cząstki. W naszych eksperymentach używamy bowiem cząstek o rozmiarach rzędu jednego mikrometra, a więc porównywalnych z długością fali lasera ($\lambda = 976 \text{ nm}$). Wobec tego żadne z opisywanych wcześniej podejść ani optyki geometrycznej, ani przybliżenia dipolowego Rayleigha, nie ma tutaj bezpośredniego zastosowania. Chociaż istnieje kilka adekwatnych podejść analitycznych i numerycznych to jednak ich wyniki byłyby mało wiarygodne, ponieważ używane modele wymagają dokładnej znajomości dużej liczby parametrów układu eksperymentalnego. W szczególności trudno jest dokładnie wyznaczyć natężenie padającej na cząstkę wiązki laserowej i jej rozkład przestrzenny. Dlatego w praktyce pułapka jest kalibrowana w sposób doświadczalny, poprzez przyłożenie do pułapowanej cząstki dobrze określonej siły i pomiar jej wychylenia pod wpływem potencjału skupionej wiązki światła lasera.

Kalibracja pułapki dotyczy kalibracji położenia schwytej cząstki oraz siły na nią wywieranej z zewnątrz. Zasadniczo kalibrację można wykonać zarówno używając kamery CCD jak i fotodiody kwadrantowej. Rejestracja video jest jednak wolna i wymaga analizy olbrzymiej ilości danych, zatem nie jest ona stosowana z uwagi na zdecydowanie szybsze działanie fotodiody kwadrantowej. W tym drugim przypadku, informacja o położeniu schwytego obiektu zawarta jest w sygnałach napięciowych fotodiody, na powierzchni której powstaje obraz dyfrakcyjny wiązki laserowej przechodzącej przez schwyty przez nią obiekt.

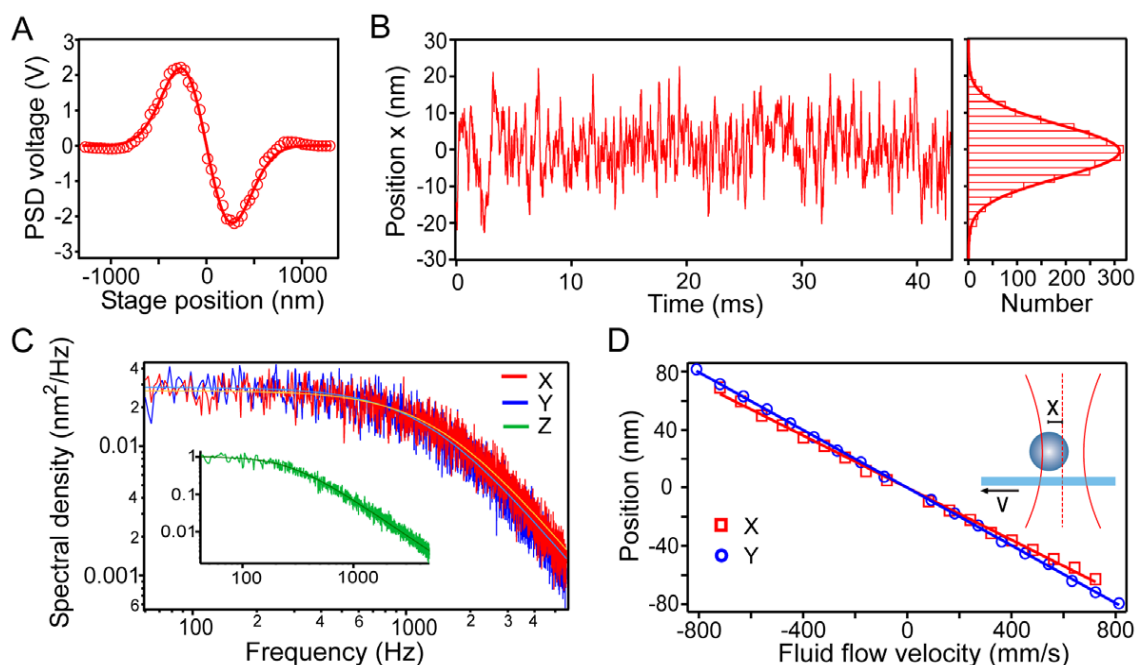
Kalibrację można podzielić na dwa etapy. Najpierw wymagane jest ustalenie relacji pomiędzy sygnałami napięciowymi V_x i V_y otrzymywanymi z fotodiody a przesunięciami x i y kuleczki w stosunku do położenia równowagi, czyli środka pułapki. W tym celu kuleczkę unieruchomioną na powierzchni szkiełka nakrywkowego lub na dnie szalki Petriego przesuwamy w poprzek wiązki laserowej używając stolika przesuwnego z elementem piezo¹. Jak pokazano na Rys. 3A, zależność taka jest bardzo dobrze opisywana pochodną

¹ Piezoelektryk, którym może być np. kryształ kwarcu, wykazuje odwrotne zjawisko piezoelektryczne nazywane też elektrostrykcją i polegające na zmianie wymiarów pod wpływem przyłożonego z zewnątrz pola elektrycznego.

funkcji Gaussa, a jej centralna, liniowa część pozwala wyznaczyć współczynniki konwersji $\xi_{x,y}$ [nm/V]. Współczynniki te są następnie używane do zamiany sygnałów napięciowych z fotodiody kwadrantowej na położenie w nanometrach. Szczegóły dotyczące teoretycznego uzasadnienia przyjętej zależności można znaleźć w pracy [Gittes1998].

Ponieważ pułapka działa jak sprężyna więc działającą na kulkę siłę sprężystości, która równoważy siłę wywieraną na nią ze strony ośrodka, wyznaczamy mierząc wychylenie x kulki ze środka pułapki i znając sztywność pułapki (stałą sprężystości) κ [pN/nm]. Na podstawie tych dwóch wielkości wyliczamy siłę sprężystości w oparciu o prostą relację, że $F = \kappa \cdot x$. Sztywność pułapki (stałe sprężystości) w kierunkach poprzecznych względem kierunku propagacji wiązki światła, jest ustalana za pomocą trzech oddzielnych metod, które oparte są o pomiary:

- wariancji położenia mikrocząstki wykonującej **ruchy Browna** i zastosowanie zasady ekwipartycji energii (Rys. 3B),
- rozkładu widmowego sygnału położenia mikrocząstki (Rys. 3C) oraz
- siły oporu (lepkości) Stokesa (Rys. 3D).



Rysunek 3. Kalibracja szczypiec optycznych. (A) Odpowiedź fotodiody kwadrantowej na zmianę położenia kuleczki, unieruchomionej na powierzchni szkiełka nakrywkowego przesuwanego w poprzek wiązki laserowej w kierunku osi x (czerwone kółka). Dane są dopasowane pochodną funkcji Gaussa, z którego otrzymujemy współczynnik konwersji napięcia (V) na położenie (nm). (B) Położenie schwytej kuleczki wzdłuż osi x jest monitorowane, a odpowiedni histogram dopasowany jest funkcją Gaussa (gruba czerwona linia) podającą wariancję położenia σ_x . (C) widmo położenia kuleczki w kierunkach x , y i z wraz z dopasowanymi funkcjami Lorentza. Na podstawie wyznaczonych wartości częstości odcięcia wyliczane są współczynniki sztywności κ_x , κ_y , κ_z . (D) W metodzie Stokesa na schwytaną kuleczkę działa siła oporu/lepkości powodowana przesuwem stolika ze stałą prędkością v_x co skutkuje jej nowym położeniem równowagi. Rysunek pochodzi z pracy [Candia2013].

W przypadku metody **a)** wyznaczana jest wariancja sygnału położenia uwięzionej mikrokulki $\sigma_x^2 = \langle x^2 \rangle$ (patrz Rysunek 3B) [np. Appleyard2007, Candia2013, Neuman2004, Polimeno2018]. Z zasady ekwipartycji energii wynika bowiem, że energia spułapkowanej mikrokulki wykonującej ruchy Browna w temperaturze otoczenia T wynosi $\frac{1}{2}k_B T$ i jest równa średniej energii potencjalnej oscylatora harmonicznego

$$\langle U \rangle = \frac{1}{2} \kappa_x \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} \kappa_x \sigma_x^2 = \frac{1}{2} k_B T.$$

Na podstawie tej relacji stała sprężystości przyjmuje postać

$$\kappa_x = k_B T / \sigma_x^2.$$

Obliczenia wariancji położenia są proste i są łatwym sposobem oszacowania sztywności pułapki, chociaż wymagają kalibrowanego detektora położenia. Takim detektorem może być np. wspomniana wcześniej fotodioda kwadrantowa.

W przypadku dwóch pozostałych procedur, przyjmujemy, że współczynnik oporu γ dla kulki o promieniu r , zanurzonej w cieczy o współczynniku lepkości η wynosi $\gamma = 6\pi\eta r$ i jest wielkością znaną. W metodzie **b)** wyznaczane jest widmo sygnału położenia mikrokulki, do którego dopasowywany jest profil Lorentza (patrz Rys. 3C). Na podstawie dopasowanej częstości odcięcia f_c współczynnik sprężystości (sztywności) wynosi

$$\kappa_x = 2\pi\gamma f_c.$$

Z kolei, w metodzie **c)** na uwięzioną kuleczkę wywieramy stałą siłę oporu przesuwając (za pomocą stolika z elementem piezo) szalkę Petriego ze stałą prędkością v_x . Siła lepkości przesuwająca mikrokulkę do nowego położenia równowagi, $x = \gamma v_x / \kappa_x$, które jest mierzone za pomocą fotodiody kwadrantowej. Procedura ta jest powtarzana dla kilku różnych prędkości przesuwu v_x , a sztywność pułapki jest odwrotnie proporcjonalna do nachylenia prostej dopasowanej do zależności $x(v_x)$ (patrz Rysunek 3D).

Zarówno położenie jak i sztywność (stała sprężystości) pułapki są kalibrowane w obu kierunkach poprzecznych, gdyż wielkości te zmieniają się w zależności od kształtu wiązki i jej polaryzacji oraz oczywiście w zależności od jej natężenia.

4. Widmo położenia mikrokulki

Zachowanie kulki zanurzonej w cieczy i będącej pod wpływem potencjału harmonicznego (w pierwszym rzędzie przybliżenia) pułapki optycznej można opisać równaniem ruchu tłumionego oscylatora wymuszonego

$$m\ddot{x}(t) + \gamma\dot{x}(t) + \kappa x(t) = F(t),$$

gdzie współczynnik tarcia $\gamma = 6\pi\eta r$ wiąże siłę oporu jakiej doznaje kulka o promieniu r w cieczy o współczynniku lepkości η z jej prędkością $\dot{x}$. Siła wymuszająca $F(t)$ jest losową siłą, powstałą na skutek przypadkowych zderzeń kulki z cząstkami otaczającego ośrodka (cieczy) – wynik ruchów Browna.² W klasycznym przypadku przyjmuje się, że średnia $F(t)$ po czasie wynosi zero, a jej widmo ma postać **białego szumu**

$$|\tilde{F}(f)|^2 = |\mathcal{F}\{F(t)\}|^2 = 4\gamma k_B T.$$

Zwykle jednak masa kulki jest na tyle mała, że liczba Reynoldsa jest bardzo mała, a wobec tego siły bezwładnościowe są znacznie słabsze niż siły oporu hydrodynamicznego. Zatem

² W 1827 roku Robert Brown obserwując pod mikroskopem zawieszoną pyłków kwiatowych w wodzie, zauważył, że cząstki zawiesiny znajdują się w nieustannym nieuporządkowanym ruchu. Zjawisko to wytłumaczyli niezależnie Albert Einstein i Marian Smoluchowski około 1905 roku na podstawie kinetycznej teorii materii. Chaotyczne ruchy, które zauważył Brown, są wynikiem przypadkowych zderzeń drobin zawiesiny (w naszym przypadku mikrokulek) z cząsteczkami cieczy. Drobinie cieczy poruszają się chaotycznie, stale zderzając się z cząstką zawiesiny, przekazując jej pewien pęd. Na skutek fluktuacji termicznych, zderzenia nie zachodzą równomiernie ze wszystkich stron i w efekcie obserwowana cząstka zawiesiny co chwilę zmienia kierunek swojego ruchu [Góra2005, Feynman2007].

czas tłumienia ruchu kulki (strata energii na skutek tarcia) jest dużo krótszy niż rozdzielczość czasowa eksperymentu (100 kHz) i wówczas ruch kulki opisuje równanie Langevina dla Brownowskiej cząstki przetłumionej, zwane równaniem Smoluchowskiego, postaci

$$\gamma \dot{x}(t) + \kappa x(t) = F(t).$$

Aby wyliczyć funkcję gęstości spektralnej (widmo) położenia mikrocząstki dokonujemy transformacji Fouriera powyższego równania wyraz po wyrazie

$$\mathcal{F}\{\kappa x(t)\} = \kappa \tilde{x}(f)$$

$$\mathcal{F}\{F(t)\} = \tilde{F}(f)$$

$$\mathcal{F}\{\gamma \dot{x}(t)\} = \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{2\pi i f t} \gamma \dot{x}(t) = [\gamma x(t) e^{2\pi i f t}]_{-\infty}^{\infty} - 2\pi i \gamma f \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{2\pi i f t} x(t) = -2\pi i \gamma f \tilde{x}(f).$$

Podstawiając i grupując odpowiednie wyrażenia otrzymujemy transformatę Fouriera funkcji fluktuacji położenia $x(t)$

$$\tilde{x}(f) = \tilde{F}(f) / (\kappa - 2\pi i \gamma f)$$

oraz jej widmo

$$S(f) = |\tilde{x}(f)|^2 = \frac{(k_B T / \gamma \pi^2)}{f_c^2 + f^2},$$

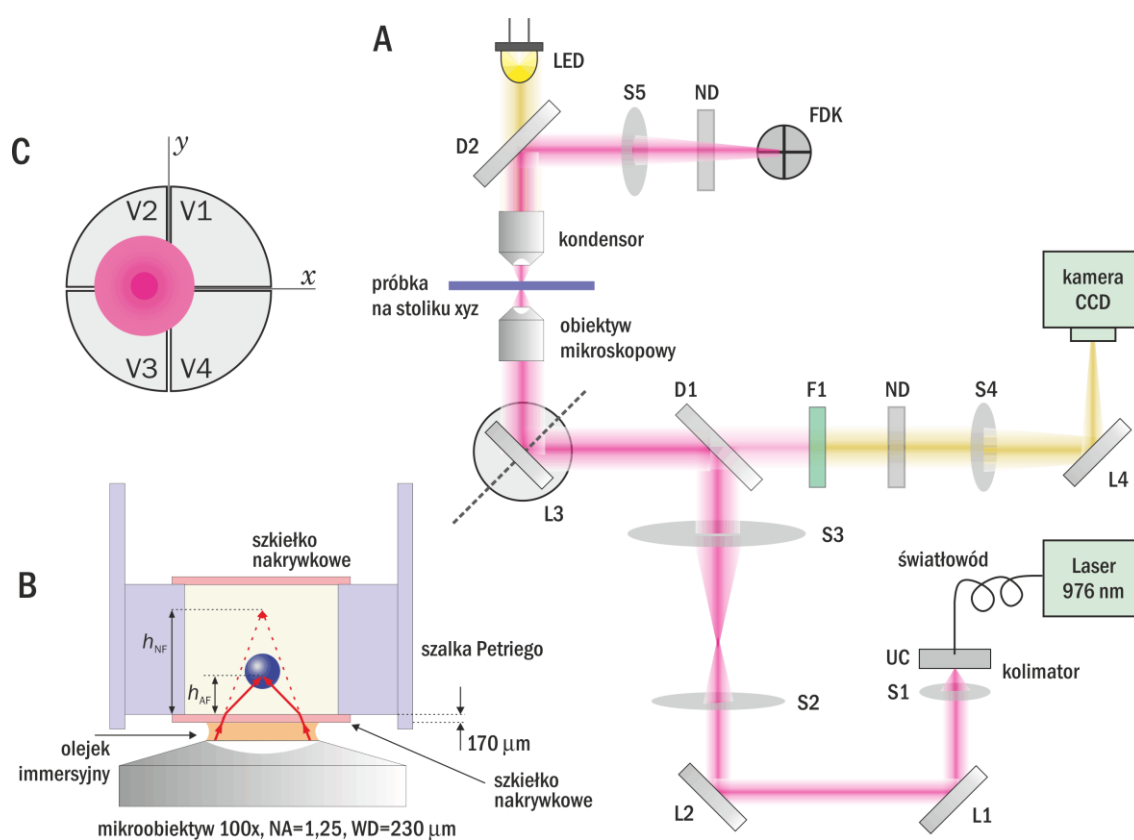
gdzie częstość odcięcia wynosi $f_c = \kappa / 2\pi\gamma$. Na tej podstawie sztywność pułapki wynosi

$$\kappa = 2\pi\gamma f_c.$$

Pomiar widma położenia za pomocą fotodiody kwadrantowej i dopasowanie częstotliwości odcięcia (jako parametr w dopasowywanej funkcji Lorentza) są proste do wykonania i zwykle zajmują kilka sekund. Typowa sztywność pułapki wynosząca 0.1 pN/nm daje częstotliwość odcięcia około 3 kHz dla mikrokulki o promieniu 0.5 μm .

UKŁAD EKSPERYMENTALNY SZCZYPIEC OPTYCZNYCH

Jak wynika z poprzedniego rozdziału, zasadniczo do stworzenia szczypiec optycznych potrzebne są laser i soczewka. W praktyce jednak soczewka musi być soczewką o wysokiej zdolności skupiającej, czyli o dużej aperturze numerycznej. Tego typu soczewki - obiektywy mikroskopowe - zbudowane są z kilku elementów w celu eliminacji aberracji chromatycznej oraz sferycznej i przystosowane są do pracy ze standardowymi szkiełkami mikroskopowymi. Z tych powodów większość szczypiec optycznych to modyfikacje komercyjnych mikroskopów optycznych, chociaż niektóre grupy badawcze konstruują je od podstaw. Schemat układu szczypiec optycznych używanego w tym eksperymencie został przedstawiony na Rys. 4A i jest wzorowany na układzie opisanym w pracy [Appleyard2007]. Wszystkie elementy tego układu zostały zamontowane na płycie optycznej o wymiarach 60 x 90 cm².

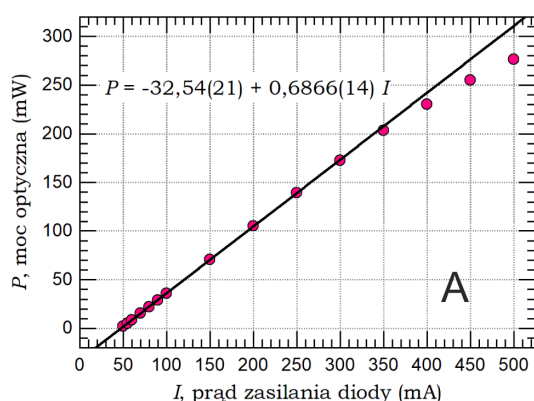


Rysunek 4. A) Układ optyczny szczypiec. Linia przerywana pod kątem 45° wskazuje na separację pomiędzy elementami umieszczonymi poziomo na płycie optycznej (u dołu po prawej stronie) i elementami ustawionymi pionowo (górna część po lewej) jako część mikroskopu odwróconego. ND - filtr szary, S1, S2, S3, S4 i S5 - soczewki o ogniskowych odpowiednio 11 mm, 35 mm, 150 mm, 200 mm i 35 mm, L1, L2, L3 i L4 - zwierciadła płaskie, F1 - filtr interferencyjny, UC – uchwyt światłowodu, D1 i D2 - zwierciadła dichroiczne odbijające światło podczerwone (976 nm) i przepuszczające światło widzialne, FDK - fotodioda kwadrantowa. B) W obiektywach zanurzonych w oleju immersyjnym występuje niedopasowanie współczynników załamania światła pomiędzy olejem a roztworem wodnym. W praktyce, rzeczywiste ognisko h_{AF} jest przesunięte poniżej ogniska nominalnego h_{NF} . C) Fotodioda kwadrantowa mierzy oddzielnie natężenie światła padającego na każdy sektor.

LASER PUŁAPKUJĄCY I BIEG JEGO WIĄZKI

Sercem szczypiec optycznych jest laser diodowy z wyjściem światłowodowym emitujący promieniowanie ciągłe o długości fali 976 nm i mocy do 300 mW. Laser ten zawiera siatkę Bragga, która jest częścią jego rezonatora i stabilizuje długość emitowanej fali i zapobiega przeskokom modów. Zależność mocy optycznej promieniowania emitowanego przez diodę laserową od prądu zasilania oraz sterownik lasera są przedstawione na rysunku 5.

Wiązka lasera wychodząca ze światłowodu jest skolimowana za pomocą soczewki asferycznej S1 o ogniskowej $f = 11$ mm, której odległość od końcówki światłowodu można regulować. Skolimowana wiązka, po przejściu przez soczewkę, ma średnicę 1,6 mm i jest następnie poszerzona do plamki o średnicy 6,8 mm za pomocą układu teleskopowego złożonego z dwóch soczewek płasko-wypukłych S2 i S3 o ogniskowych odpowiednio 35 mm i 150 mm. W ten sposób średnica wiązki jest dopasowana do apertury obiektywu mikroskopowego, co zapewnia maksymalne jej ogniskowanie, czyli maksymalną siłę gradientową. Zamocowanie soczewki S2 w oprawce z przesuwem xy umożliwia mechaniczne sterowanie położeniem pułapki (ogniska) w objętości próbki. Prowadzenie wiązki laserowej równoległe do stołu optycznego zapewniają dwa płaskie zwierciadła metaliczne L1 i L2, a trzecie takie zwierciadło L3, ustawione pod kątem 45° do stołu optycznego, kieruje wiązkę pionowo w górę na obiektyw mikroskopowy. Obiektyw ten skupia wiązkę lasera tworząc pułapkę, a światło rozproszone na cząstce i przechodzące jest zbierane przez kondensor i kierowane na fotodiodę kwadrantową FDK.



Rysunek 5. A. Zależność mocy optycznej diody laserowej (Thorlabs model BL976-SAG) od prądu zasilania. Pomiar mocy optycznej wykonano na wyjściu układu kolimacyjnego tzn. za soczewką S1. Prąd progowy powyżej którego zachodzi akcja laserowa wynosi 50 mA. Dane należy traktować wyłącznie orientacyjnie. B. Panel czołowy sterownika diody laserowej firmy Thorlabs.

MIKROSKOP ODWRÓCONY

Jak już wspomniano nasze szczypce optyczne pracują w układzie mikroskopu odwróconego (kondensor u góry, obiektyw na dole). Układ ten wybrano ze względu na jego stabilność i łatwość łączenia wielu wiązek oraz dlatego, że jest on układem, w którym kuleczki grawitacyjnie kierują się w stronę powierzchni szkiełka nakrywkowego lub dna szalki Petriego. Solidny układ mechaniczny sprzyja stabilności elementów optycznych i próbek. Kręgosłupem mikroskopu jest tłumiący drgania słupek o średnicy 1,5 cala. Do słupka przymocowane są dwa, zorientowane pionowo, uchwyty translacyjne zapewniające powierzchnie montażowe dla wsporników w kształcie litery L. Do tych wsporników z kolei mocowane są obiektyw mikroskopowy i kondensor. Apertura wejściowa obiektywu

mikroskopowego (100x, 1,25NA) wynosi 6 mm i jest nieco mniejsza od średnicy padającej na niego wiązki laserowej. Zgodnie z teorią pułapkowania, taki stosunek średnic pozwala w pełni wykorzystać aperturę numeryczną obiektywu i uzyskać możliwie najszywniejszą pułapkę tzn. o największej sile pułapkującej na kierunku wiązki laserowej. Kondensor z przerwą powietrzną i korekcją na nieskończoność, o aperturze numerycznej $NA = 0,9$, zapewnia równomierne oświetlenie pola obserwacyjnego i jednocześnie zbiera światło rozproszone z pułapki w celu wykrywania położenia pułapkowanej cząstki. Taki kondensor pozwala uniknąć stosowania olejku immersyjnego i umożliwia łatwe "ładowanie" cząstek. Jako źródła światła białego, niezbędnego do wizualizacji pułapkowanych cząstek techniką obrazowania w jasnym polu, użyto diody typu LED świecącej światłem białym. Rozdzielenie światła widzialnego od bliskiej podczerwieni (światło lasera) zachodzi na lustrach dichroicznych D1 i D2 umieszczonych odpowiednio za układem teleskopowym i powyżej kondensora. Z podstawami mikroskopii optycznej można się zapoznać studiując przewodniki opracowane np. przez firmy [Olympus] lub [Zeiss].

UKŁAD DETEKCJI

Układ detekcji położenia cząstki umieszczony jest nad kondensorem. W uchwycie, w postaci kostki, znajduje się zwierciadło dichroiczne D2, które odbija wiązkę światła laserowego w kierunku fotodiody kwadrantowej FDK i jednocześnie przepuszcza w stronę kondensora światło widzialne pochodzące z diody LED. Soczewka S5, o ogniskowej 35 mm, tworzy na fotodiodzie obraz sprzężony z tylną płaszczyzną ogniskową kondensora (ang. *back focal plane*). Fotodioda jest zamontowana w uchwycie przesuwym xy, co ułatwia jej pozycjonowanie względem obrazu wiązki i kalibrację jej sygnału względem środka pułapki. Umieszczony między soczewką a fotodiodą filtr neutralny ND pozwala ograniczyć ilość światła padającego na fotodiodę i uniknąć jej wysycenia. Fotodioda kwadrantowa FDK daje



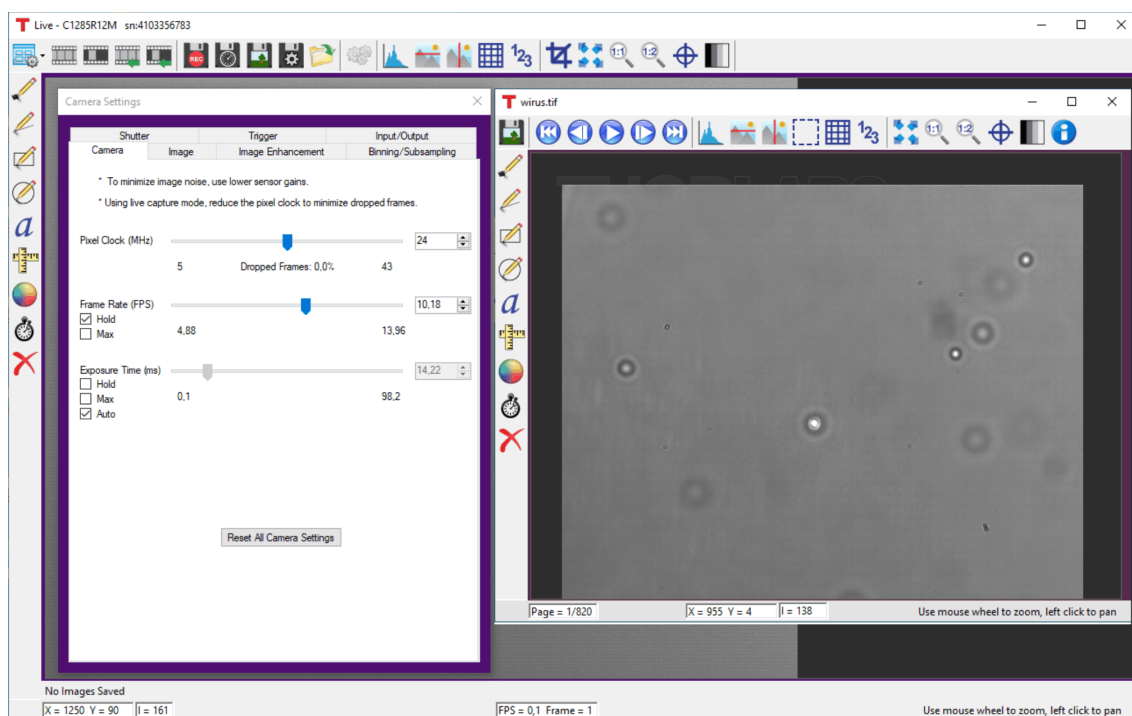
Rysunek 6. Sterownik stolika przesuwego xy wraz z regulatorem oświetlenia z diody LED oraz układ wskazań sygnałów napięciowych z fotodiody kwadrantowej FDK.

sygnały napięciowe wprost proporcjonalne do położenia cząstki znajdującej się w obszarze ogniska wiązki laserowej (patrz *Kalibracja pułapki...* i [Gittes1998]). FDK składa się z czterech fotodiod rozmieszczonych wokół środka płaszczyzny xy tak jak to pokazano na rysunku 4C. Poszczególne fotodiody są odległe od siebie o około 1 mm i mają bok/promień 4 mm. Napięcie generowane przez każdą z fotodiod jest proporcjonalne do mocy padającej na nią części wiązki laserowej. Dołączony do fotodiody kwadrantowy układ elektroniczny przetwarza jej sygnały napięciowe $V1 \div V4$ na sygnały odpowiadające położeniu cząstki $V_x = (V1+V4-V2-V3)/V_s$ i $V_y = (V1+V2-V3-V4)/V_s$, gdzie $V_s = V1+V2+V3+V4$ odpowiada całkowitemu natężeniu wiązki laserowej. Chociaż zakres liniowej zależności pomiędzy generowanym napięciem $V_{x,y}$ a położeniem x,y cząstki jest dosyć mały (rzędu 1 mikrometra) to jednak wystarczająco duży w porównaniu z typowymi przesunięciami cząstki w pułapce, które wynoszą do kilkudziesięciu/kilkuset nanometrów (patrz Rys. 3 A, B). Napięcia $V_{x,y}$ bardzo szybko reagują na zmianę położenia cząstki, dzięki czemu ich zmiany w czasie dobrze oddają ruchy cząstki o częstotliwości do 20 kHz.

Układ zasilania i elektronicznego przetwarzania sygnału fotodiody kwadrantowej daje różnicowe sygnały napięciowe (nie unormowane do V_s) w zakresie od -10 do 10 V i sygnał sumaryczny V_s w zakresie od 0 do 10 V, które są rejestrowane komputerowo za pomocą karty wejścia/wyjścia firmy *National Instruments* z 16 bitowym przetwornikiem analogowo cyfrowym.

INNE PODUKŁADY

W przypadku obrazowania próbek światłem białym celowo pomija się okular, aby obniżyć koszty i zmniejszyć ryzyko uszkodzenia oka. Zamiast tego, obrazowanie odbywa się za pomocą kamery CCD, która jest umieszczona w płaszczyźnie obrazowej soczewki S4 o ogniskowej 200 mm. Umieszczony pomiędzy tą soczewką a kamerą filtr interferencyjny F1 eliminuje wiązkę lasera. Filtr ten można usunąć w trakcie justowania układu lub w celach



Rysunek 7. Panel użytkownika programu ThorCam firmy Thorlabs służącego do sterowania i akwizycji danych z kamery CCD.

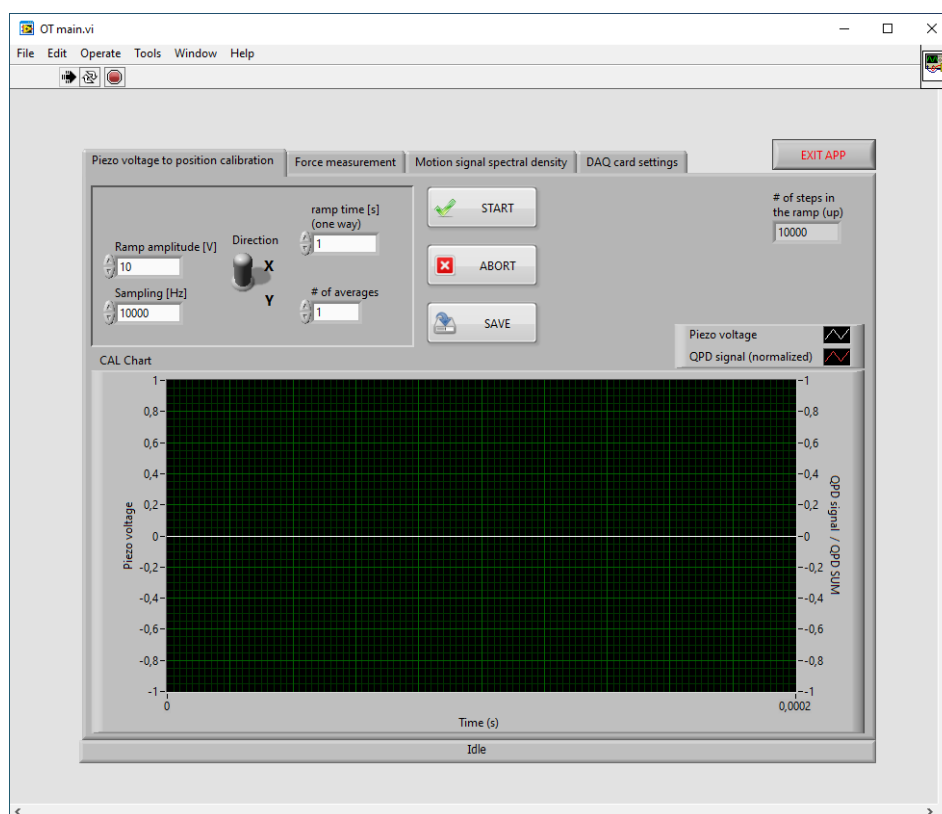
demonstracyjnych. Ale w takim przypadku należy zachować ostrożność, aby nie uszkodzić kamery CCD. Do rejestrowania obrazów z kamery CCD służy program **ThorCam** firmy Thorlabs, którego panel użytkownika jest przedstawiony na rysunku 7.

Szalka Petriego zawierająca próbkę w postaci 0,01% roztworu kuleczek krzemionkowych o średnicy $1\ \mu\text{m}$ w wodzie destylowanej, jest zamocowana na stoliku przesuwным xyz, który zapewnia jej stabilny i płynny przesuw we wszystkich kierunkach. Stolik ten jest zamocowany kilka centymetrów ponad powierzchnią stołu optycznego na grubych, 1,5 calowych prętach. Położenie stolika w zakresie kilku milimetrów, we wszystkich kierunkach, można regulować za pomocą śrub mikrometrycznych, a w zakresie mikrometrów, ale tylko w płaszczyźnie xy za pomocą nanoprzesuwników (wykorzystujących elementy piezoelektryczne) z minimalnym krokiem zaledwie 0,6 nm, aczkolwiek z pewną histerezą. Taka kontrola położenia ułatwia kalibrację sygnałów z detektora położenia (fotodiody kwadrantowej) i pozwala na precyzyjny pomiar sił lepkości (oporu Stokesa), co poszerza zakres potencjalnych zastosowań całego zestawu szczypiec.

SYSTEM AKWIZYCJI DANYCH

Panel użytkownika programu **OT_main** służącego do szybkiej akwizycji sygnałów napięciowych z fotodiody kwadrantowej oraz sterowania przesuwem stolika xyz został pokazany na rysunku 8. Program ten jest programem autorskim i został napisany w środowisku LabView firmy *National Instruments*.

Program posiada 3 główne zakładki, które odpowiadają trzem typom pomiarów wykonywanych w ćwiczeniu. Pierwsza zakładka *Piezo voltage to position calibration* pozwala na wykonanie kalibracji sygnału pozycji z fotodiody kwadrantowej podczas



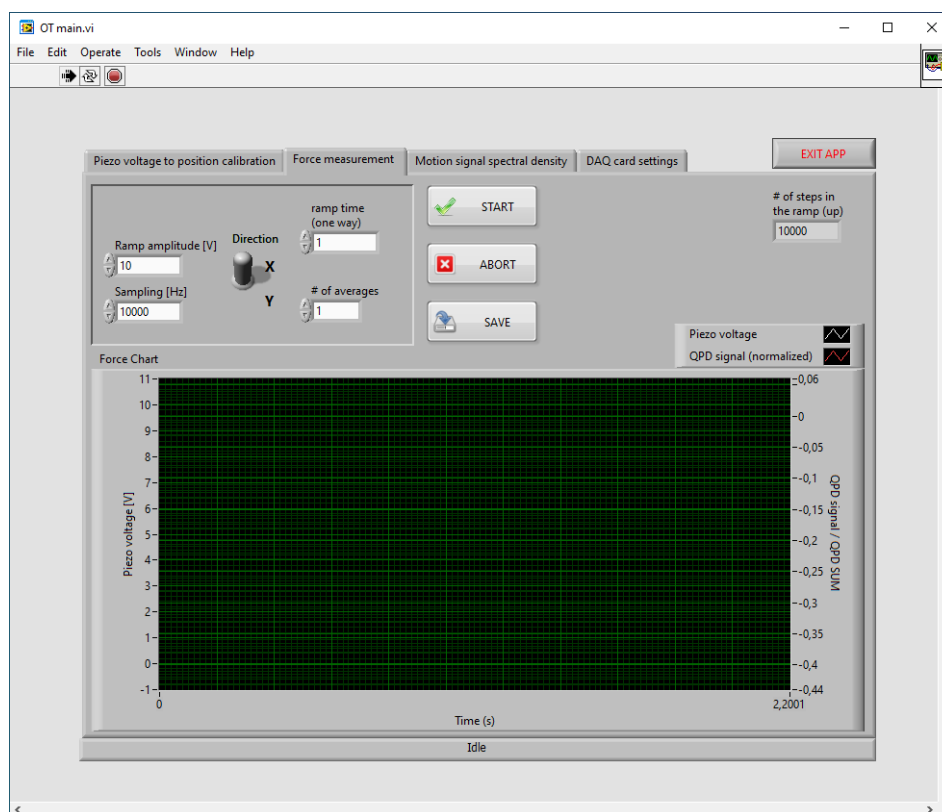
Rysunek 8. Panel użytkownika programu **OT_main** w zakładce *Piezo voltage to position calibration*.

przesuwania obiektu kalibracyjnego w postaci unieruchomionej mikrokulki na dnie szalki Petriego. Możliwe jest ustawienie takich parametrów jak:

- wybór kierunku przesuwu - *Direction X/Y*,
- amplituda rampy napięcia przykładanego do stolika piezo - *Ramp amplitude [V]*,
- liczba zmian napięcia na 1 sekundę - *Sampling [Hz]*,
- czas trwania rampy w górę - *ramp time [s] (one way)*
- liczba uśrednień przebiegów - *# of averages*.

W prawym górnym rogu wyświetlana jest informacja o liczbie kroków (schodków napięcia) wynikającej z zadanych parametrów. Odpowiednie przyciski pozwalają na uruchomienie pomiaru i jego zatrzymanie, a także na zapisanie zebranych danych (tylko dla ostatnio ustawionego kierunku przesuwu). Uruchomiony program zmienia napięcie na stoliku w postaci rampy „tam i z powrotem” jednocześnie rejestrując odpowiedni kanał wejściowy z fotodiody kwadrantowej: X/SUM lub Y/SUM (sygnał X lub Y jest normalizowany do sumy sygnałów ze wszystkich kanałów fotodiody).

Druga zakładka – *Force measurement* – w bieżącej wersji programu ma dokładnie takie same parametry wejściowe i jej obsługa jest analogiczna do pomiaru kalibracyjnego. Ponieważ rampa napięcia używana do kalibracji jest liniowa w czasie, umożliwia ona przesuwanie stolika ze stałą prędkością, gdy tylko liczba kroków w rampie jest wystarczająco duża (innymi słowy stolik uśrednia zmiany napięcia).



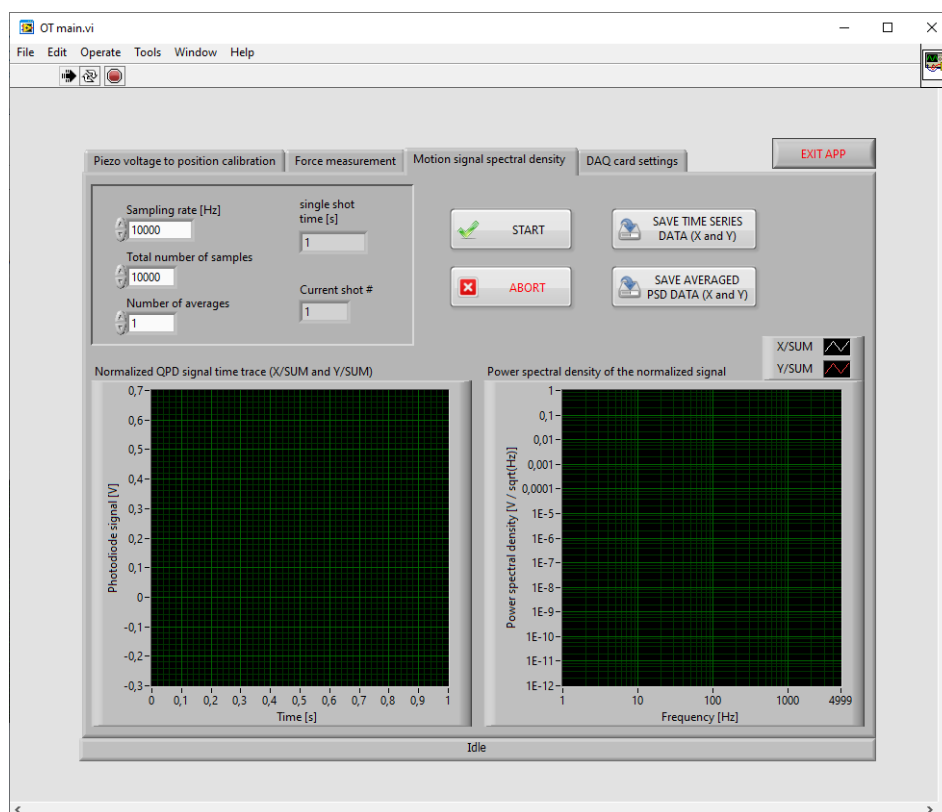
Rysunek 9. Panel użytkownika programu OT_main w zakładce *Force measurement*.

Trzecia z zakładek – *Motion signal spectral density* - umożliwia pomiar zależności położenia uchwyconego obiektu od czasu. Niezbędnymi parametrami są

- szybkość próbkowania napięcia - *Sampling rate [Hz]*,
- liczba próbek do zebrania - *Total number of samples* (w połączeniu z *Samplig rate* określa on także czas jednego pomiaru)
- liczba pomiarów - *number of averages*.

Podczas pomiaru rejestrowane są sygnały z obu kierunków (X i Y) i sygnał sumaryczny. Na panelu po lewej wyświetlane są znormalizowane przebiegi czasowe tych sygnałów podczas ostatniego pomiaru. Panel po prawej wyświetla natomiast uśrednione gęstości spektralne tych sygnałów, do obliczenia których użyto funkcji okna „Hanning”. W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że uśrednianie wykonuje się po obliczeniu transformat Fouriera kolejnych przebiegów czasowych. Z tego powodu, podczas zapisu danych położenia w czasie do pliku zapisywane są kolejne pomiary, jeden za drugim.

Do obróbki zapisanych danych konieczna jest znajomość wszystkich zadanych ustawień. Należy zatem prowadzić dokumentację prowadzonych pomiarów i podglądać format zapisanych danych.



Rysunek 10. Panel użytkownika programu OT_main w zakładce *Motion signal spectra density*.

PRZEBIEG ĆWICZENIA / POMIARÓW

Podstawowym zadaniem w tym eksperymencie, oprócz obserwacji zjawiska pułapkowania światłem, jest wyznaczenie współczynnika konwersji $\xi_{x,y}$ (nm/V) napięcia z fotodiody FDK na położenie cząstki w pułapce, pomiary sztywności $\kappa_{x,y}$ (pN/nm) pułapki oraz sił $F_{x,y}$ (pN) działających ze strony cieczy na mikrokulkę. Po zdobyciu doświadczenia co do działania szczypiec i posługiwania się nimi można przystąpić do eksperymentowania z materiałem biologicznym mierząc np. siły wywierane przez/na pływające w cieczy bakterie.

UWAGI OGÓLNE

Pomimo że eksperyment jest całkowicie bezpieczny dla studenta, to należy jednak pamiętać, że bezpośrednia ekspozycja oka na wiązkę lasera może doprowadzić do trwałego uszkodzenia wzroku. Wiązka jest bardzo silna, o mocy kilkuset mW, i niewidoczna. Przy każdym uruchomieniu lasera należy zatem stosować odpowiednie środki ostrożności dotyczące pracy z promieniowaniem laserowym. Oprócz kwestii bezpieczeństwa pracy z laserem należy również przestrzegać następujących zaleceń

- *Justowanie układu optycznego:* Wszystkie elementy optyczne zostały już zoptymalizowane i wstępnie ustawione. Jedyne korekty, które należy dokonać obejmują pozycjonowanie próbki na stoliku mikroskopowym xyz i pozycjonowanie fotodiody kwadrantowej w uchwycie xy. Absolutnie nie należy demontować, przesuwać ani regulować światłowodu i soczewki S1 kolimującej wiązkę lasera oraz zwierciadeł L1, L2, L3 i D1 oraz soczewek S2 i S3. Jeśli zmieni się ustawienia wyżej wymienionych elementów optycznych to pułapka przestanie działać i będzie wymagała żmudnego i czasochłonnego justowania.
- *Obiektów mikroskopowy 100X:* Należy uważać, aby nic (poza olejkim immersyjnym i bibułką do czyszczenia soczewek) nigdy nie dotykało soczewki dolnego obiektu mikroskopu. W trakcie ustawiania ostrości obrazu i pozycjonowania szalki Petriego należy zachować ostrożność, aby nie uderzyć w mikroobiektyw czy go porysować.
- *Światłowód lasera:* Nie należy ruszać ani dotykać światłowodu, gdyż jest on niezwykle delikatny, a naprawa bardzo kosztowna.
- *Ustawienia parametrów pracy lasera:* Moc wiązki laserowej regulujemy poprzez zmiany prądu zasilania diody laserowej w zakresie od 60 mA do maksymalnej wartości 500 mA. Laser posiada także programowalny układ stabilizacji temperatury celem stabilizacji jego długości fali i mocy optycznej na wyjściu. Można regulować prądem zasilania aż do wartości granicznej, ale nie wolno zmieniać tej wartości granicznej ani ustawionej temperatury na kontrolerze.

PRZYGOTOWANIE UKŁADU DO PRACY I POMIARÓW

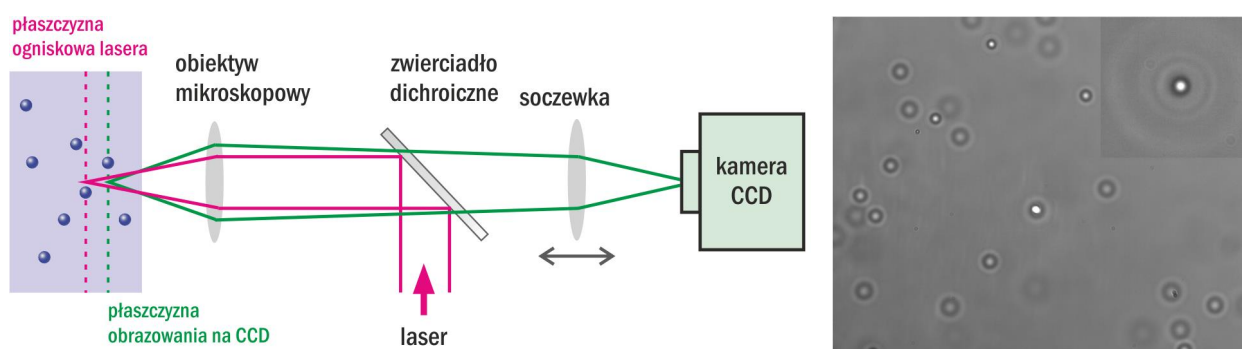
Aby układ szczypiec optycznych działał prawidłowo i można było za jego pomocą wykonać odpowiednie pomiary jakościowe i ilościowe należy przeprowadzić kolejno niżej opisane czynności.

1. *Justowanie wiązki lasera.* Zwykle ta część wymaga jedynie weryfikacji prawidłowego biegu wiązki i należy ją przeprowadzić, o ile to jest rzeczywiście konieczne, pod ścisłym nadzorem opiekuna. Poniżej zamieszczono instrukcję justowania wiązki lasera krok po kroku.

- 1.1. Zamontować światłowód, którego jeden z końców jest połączony z diodą laserową, w uchwycie UC razem z soczewką kolimacyjną S1. Ustawić całość tak aby końcówka światłowodu była na wysokości 90 – 95 mm nad powierzchnią płyty optycznej.
 - 1.2. Włączyć zasilanie lasera i ustawić prąd zasilania na ok. 80 mA tak aby wyjściowa moc lasera nie przekraczała 20 mW.
 - 1.3. Skierować wiązkę lasera w poprzek pokoju, na jedną ze ścian, oddaloną co najmniej 3 m i dobrać tak odległość soczewki S1 od końcówki światłowodu, aby wielkość plamki lasera na ścianie była jak najmniejsza.
 - 1.4. Zamontować zwierciadła L1 i L2 tak aby wiązka po odbiciu biegła równolegle do płyty optycznej, na wysokości 90 – 95 mm powyżej niej i wzdłuż jednego rzędu otworów płyty. Do tego celu można użyć przysłony irysowej i metalowej linijki z zaczepem magnetycznym.
 - 1.5. Ustawić duży słupek (średnica 1,5 cala) i zamontować na nim wsporniki obiektywu i kondensora wraz ze stolikami przesuwными. Ułożenie wsporników można łatwo wyrównać, kładąc słupek na płycie optycznej tak aby krawędzie wsporników leżały płasko na płycie. Następnie należy dokręcić śruby mocujące wsporniki. Jednocześnie należy się upewnić, że oba stoliki są ustawione w połowie zakresu przesuwu, a odległość pomiędzy górną powierzchnią wspornika obiektywu a dolną powierzchnią wspornika kondensora wynosi ok. 75 mm. Ponadto, górna powierzchnia wspornika obiektywu powinna być na wysokości ok. 120 mm ponad płytą.
 - 1.6. Zamontować zwierciadło dichroiczne D1 oraz zwierciadło L3, które kieruje wiązkę pionowo w górę. Najlepiej oba zwierciadła zamontować na prowadnicy przykręconej do płyty optycznej co pozwala na proste i powtarzalne przesuwanie wiązki w kierunkach X (suwając zwierciadłem D1) oraz Y (suwając zwierciadłem L3). W połączeniu z obrotem zwierciadła L3, te dwa przesunięcia pozwalają na idealne, pionowe ustawienie biegu wiązki laserowej i jej wycentrowanie na otworach obiektywu i kondensora. Precyzyjne centrowanie dość szerokiej wiązki lasera umożliwiają krążki z małymi otworami, które należy wkręcić w otwory we wspornikach.
 - 1.7. Ustawić rozszerzacz wiązki laserowej, montując na prowadnicy kolejno soczewki S2 i S3, w odległości 185 mm jedna od drugiej. Położenie tych soczewek należy tak dobrać, aby wiązka nadal prawidłowo przechodziła przez otwory obiektywu i kondensora. Kolimację wiązki sprawdzić w dalekiej odległości od układu.
2. Ustawienie i przetestowanie działania układu mikroskopu odwróconego
 - 2.1. Przy wyłączonej wiązce lasera włączyć komputer i uruchomić program **ThorCam** do obsługi kamery CCD.
 - 2.2. Ustawić kamerę, soczewkę S4 i zwierciadło L4 tak aby otrzymać na matrycy CCD ostry obraz przedmiotu oddalonego o co najmniej 4 m. W tym celu należy użyć dodatkowego zwierciadła płaskiego kierującego do kamery światło rozproszone od obrazowanego przedmiotu. Odległość pomiędzy soczewką S4 a matrycą CCD powinna wynosić 200 mm, pozostałe odległości są mniej krytyczne.
 - 2.3. Zamocować obiektyw i kondensor w otworach wsporników.
 - 2.4. Zamontować stół przesuwny, a na nim uchwyt na szalki Petriego.
 - 2.5. Nałożyć kroplę olejku immersyjnego na soczewkę obiektywu mikroskopowego.
 - 2.6. Na uchwycie, na stoliku przesuwным xyz, położyć szalkę Petriego (może już zawierać badany roztwór z mikrokulkami) i za pomocą śruby mikrometrycznej ostrożnie przesuwając stół w dół aż dno szalki dotknie powierzchni olejku immersyjnego.
 - 2.7. Zamontować i włączyć źródło światła białego LED powyżej kondensora.
 - 2.8. Włączyć laser i ustawić prąd zasilania diody laserowej na 80 mA.

- 2.9. Obniżać stolik z szalką Petriego za pomocą śruby mikrometrycznej i obserwować obraz z matrycy CCD na ekranie monitora. Należy pamiętać, że odległość robocza (ang. *working distance*) mikroobiektywu wynosi tylko 0,23 mm ze względu na jego dużą aperturę numeryczną ($NA=1,25$). Zbliżając próbkę do mikroobiektywu w pewnym momencie powinno się zobaczyć zniekształconą plamkę lasera na monitorze, co odpowiada obrazowi jej odbicia od dolnej powierzchni szalki (granica olej-szalka). Kontynuując powoli obniżanie stolika, początkowo plamka ta zniknie, a następnie pojawi się znacznie silniejsza w momencie zobrazowania jej odbicia od górnej powierzchni szalki (granica szalka-powietrze/roztwór). Odległość pomiędzy tymi dwiema płaszczyznami jest równa grubości dna szalki Petriego wynoszącej ok. $170\ \mu\text{m}$ (w zależności od rodzaju szalki) [Video1].
 - 2.10. Regulując zwierciadłem L4 ustawić obraz odbłasku mniej więcej w centrum matrycy CCD.
 - 2.11. Na drodze wiązki światła biegnącej do kamery CCD wstawić filtr interferencyjny F1, który osłabi wiązkę lasera i zabezpieczy CCD przed wysyceniem [Video2].
 - 2.12. Przygotować roztwór z mikrokulkami krzemionkowymi o średnicy $1\ \mu\text{m}$ i umieścić kilka kropli na szalce Petriego. Roztworu z mikrokulkami można używać już na etapie od punktu 2.6.
 - 2.13. Obniżyć stolik o około $5\ \mu\text{m}$ mierząc od granicy dno szalki - roztwór. W ten sposób ognisko lasera znajduje się w objętości roztworu i w tym momencie nasze szczypce są gotowe do działania. Jednocześnie refleks lasera przestaje być widoczny na kamerze CCD.
 - 2.14. Używając śrub mikrometrycznych stolika w kierunkach x i y wprowadzamy wybraną kulkę w obszar pułapki. Kulka wciągnięta w obszar ogniska wiązki lasera przestaje się swobodnie poruszać, co łatwo widać na tle innych kulek przesuwających się wraz z przesuwem stolika [Video3].
- Uwaga:** często zdarza się, że płaszczyzna ogniskowania lasera nie pokrywa się z płaszczyzną obrazowania mikrokulek i obraz uwięzionej kulki jest nieostry. Pokrywanie się płaszczyzn ogniskowania i obrazowania można uzyskać przesuwając nieco soczewkę S4 przed kamerą CCD tak jak to pokazano na rysunku 11.

W tym momencie mamy działające szczypce optyczne z obserwacją video na kamerze CCD.



Rysunek 11. Płaszczyzny ogniskowa lasera i obrazowania na kamerze CCD uwięzionej mikrokulki oraz obraz mikrokulki (w centrum) na kamerze CCD i jego powiększenie (górny prawy róg). Na zdjęciu widoczne są również inne swobodnie poruszające się mikrokulki zobrazowane w równych płaszczyznach.

3. Ustawienie i oświetlenie fotodiody kwadrantowej jako detektora położenia mikrokulki.
 - 3.1. Przy włączonej diodzie LED i przy braku próbki, ustawić kondensor w takiej odległości (około 5-6 mm) od obiektywu, aby otrzymać maksymalne oświetlenie kamery CCD. Położenie kondensora zmieniamy przesuwając stolik, na którym jest on zamocowany używając do tego celu śruby mikrometrycznej.
 - 3.2. Włączyć laser i przy zdjętej soczewce S5 i fotodiodzie kwadrantowej, zaobserwować z pomocą wizualizera podczerwieni wiązkę lasera po jej odbiciu od lustra dichroicznego D2.

- 3.3. Doregulować położenie kondensora tak aby uzyskać skolimowaną wiązkę światła, badając ją na odległości kilkunastu centymetrów za lustrem D2.
- 3.4. Następnie ustawić soczewkę S5 w odległości 3,5-4,5 cm od powierzchni fotodiody FDK, aby otrzymać na niej obraz tylnej płaszczyzny kondensora.
- 3.5. Za pomocą śrub uchwyty xy, w którym zamocowano fotodiodę FDK, ustawić ją na środku wiązki laserowej tak aby sygnały ze wszystkich jej sektorów były identyczne. Pomocna jest tutaj obserwacja wyświetlacza (patrz Rys. 6) napięć, który pokazuje różnice sygnałów w kierunkach x i y.
- 3.6. Należy tak ograniczyć ilość padającego światła aby nie doszło do wysycenia fotodiody.

W tym momencie mamy działające szczypce optyczne wraz z układem szybkiej detekcji położenia spałkowanej mikrokulki i możemy przystąpić do pomiarów ilościowych.

Jak już wspomniano wcześniej badania ilościowe dotyczą wyznaczenia:

- a) współczynnika konwersji sygnału FDK na położenie mikrokulki,
- b) współczynników sztywności pułapki optycznej w kierunkach x i y oraz
- c) siły Stokesa wywieranej na mikrokulkę przez będący w ruchu płyn.

We wszystkich pomiarach korzysta się z autorskiego programu **OT_main** pozwalającego na akwizycję sygnałów z fotodiody i sterowanie stolikiem przesuwным xyz na którym znajduje się szalka Petriego z badanym roztworem mikrokulek.

OPRACOWANIE WYNIKÓW POMIARÓW

Tę część należy szczegółowo przedyskutować z opiekunem.

LITERATURA

- [Appleyard2007] D. C. Appleyard, K. Y. Vandermeulen, H. Lee, M. J. Lang, "Optical trapping for undergraduates", *American Journal of Physics* **75** (1), 5-14 (2007).
- [Ashkin1970] A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure", *Physical Review Letters* **24**, 156-159 (1970).
- [Berkovitz2018] R. Berkovitz, "Father of optical trapping awarded a share of the Nobel Prize in Physics", *Physics Today*, December 2018, 14-17 (2018).
The Nobel Prize in Physics 2018, <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/2018/summary/>
- [Candia2013] C. N. Hernández Candia, S. T. Martínez, B. Gutiérrez-Medina, "A Minimal Optical Trapping and Imaging Microscopy System", *PLoS ONE* **8** (2): e57383.
doi: 10.1371/journal.pone.0057383.
- [Feynman2007] R. Feynman, R. B. Leighton, M. Sands, *Feynmana wykłady z fizyki (Tom 1, część 2)*, PWN (2007).
- [Gittes1998] F. Gittes and Ch. F. Schmidt, "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers", *Optics Letters* **23** (1), 7-9 (1998).
- [Goldman1967] A. J. Goldman, R. G. Cox, and H. Brenner, "Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall - I Motion through a quiescent fluid", *Chemical Engineering Science* **22**, 637-651 (1967).
- [Góra2005] P. Góra, "Sto lat teorii ruchów Browna", *Foton* **91**, 12 (2005).
- [Krishnan1995] G. P. Krishnan and D. T. Leighton, "Inertial lift on a moving sphere in contact with a plane wall in a shear flow", *Physics of Fluids* **7**, 2538-2545 (1995).

- [Nieminen2014] T. A. Nieminen, N. du Preez-Wilkinson, A. B. Stilgoe, V.L.Y.Loke, A.A.M. Bui, H. Rubinsztein-Dunlop, "Optical tweezers: theory and modeling", *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* **146**, 59-80 (2014).
- [Neuman2004] K. C. Neuman, S. M. Block, "Optical trapping", *Review of Scientific Instruments* **75**(9), 2787-2809 (2004).
- [Olympus] Basics of Light Microscopy & Imaging, www.olympus-europa.com.
- [Polimeno2018] P. Polimeno, A. Magazzù, M. A. Iati, F. Patti, R. Saija, C. D. E. Boschi, M. G. Donato, P. G. Gucciardi, P. H. Jones, G. Volpe, O. M. Maragò, "Optical tweezers and their applications", *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* **218**, 131-150 (2018).
- [Stilgoe2008] A. B. Stilgoe, T. A. Nieminen, G. Knoner, N. R. Heckenberg, and H. Rubinsztein-Dunlop, "The effect of Mie resonances on trapping in optical tweezers", *Optics Express* **16**, 15039-15051 (2008).
- [Zeiss] <https://www.zeiss.com/microscopy/int/solutions/reference/basic-microscopy.html#basic-knowledge>.
- [Video1] Powstawanie obrazów refleksu wiązki lasera od powierzchni denka szalki Petriego w miarę obniżania stolika, czyli w miarę wprowadzania ogniska lasera do badanego roztworu.
- [Video2] Powstawanie obrazów refleksu wiązki lasera od powierzchni denka szalki Petriego w miarę obniżania stolika, czyli w miarę wprowadzania ogniska lasera do badanego roztworu. Przed kamerą CCD zamontowano filtr interferencyjny F1 osłabiający natężenie tej wiązki.
- [Video3] Pułapkowanie mikrokulki w ognisku wiązki laserowej.