
FP12

Untersuchung von DNA mit magnetischen Pinzetten

Fortgeschrittenenpraktikum
23. September 2026



Universität
Augsburg
University

Experimentalphysik I
Institut für Physik
Universität Augsburg

Leonhard Schatt, Dr. Prithwidip Saha und Prof. Dr. Jan Lipfert

Diese Versuchsanleitung gibt es in Deutsch und Englisch. Bei englischsprachigen Assistentinnen/Assistenten dient die englische Version dazu die entsprechende englische Terminologie zu vermitteln

Zusammenfassung

Magnetische Pinzetten

Kräfte und mechanische Eigenschaften von biologischen Makromolekülen spielen eine wichtige Rolle in Biologie, Biophysik und (bio-)nanotechnologischen Anwendungen. Einzelmolekülexperimente mit magnetischen Pinzetten erlauben es die mechanischen Eigenschaften einzelner Biomoleküle, insbesondere DNA, RNA oder Proteine, zu untersuchen. Dabei werden Moleküle an einer Oberfläche fixiert und am jeweils anderen Ende an superparamagnetische, ca. $1\text{ }\mu\text{m}$ große Kugeln gebunden. Durch ein äußeres Magnetfeld lassen sich definierte Zugkräfte und Drehmomente auf die Kugeln und damit auf die Moleküle ausüben. In diesem Versuch untersuchen wir das Verhalten von DNA unter verschiedenen Kräften (sogenannte “force-extension curves”) und vermessen DNA “supercoils”, d.h. zusätzliche Verwindungen der doppelsträngigen DNA Helix.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Summary	I
1 Einleitung	1
2 Theorie	4
2.1 Kraft-Dehnungs-Verhalten von Molekülen	4
2.1.1 Freely-jointed chain model (FJC)	5
2.1.2 Worm-like chain model (WLC)	6
2.2 Doppelsträngige DNA unter Kraft und Drehmoment	7
2.2.1 Kraftkalibrierung	7
2.2.2 Verdrehung bzw. Torsionsmessungen an DNA-Molekülen	9
3 Aufbau	12
3.1 Experimenteller Aufbau	12
3.2 Software	14
3.3 Flusszelle und Anbindungschemie	15
4 Anmerkungen zu diesem Versuch	17
4.1 Fragen zum Verständnis	18
5 Messungen	19
5.1 Vorbereitung der Durchflusszelle und des Versuchsaufbaus	19
5.2 Experiment 1: Kraft-Dehnungs-Messung	24
5.2.1 Kraftkalibrierung aus lateralen Fluktuationen	24
5.3 Experiment 2: Rotations-Extensions-Messung	25
6 Auswertung	26
6.1 Auswertung von Experiment 1	26
6.2 Auswertung von Experiment 2	26

1. Einleitung

Mechanische Eigenschaften und physikalische Kräfte spielen in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Ein bedeutendes Beispiel hierfür ist DNA, die den genetischen Code enthält und zunehmend in einer Vielzahl biotechnologischer Anwendungen eingesetzt wird. Unsere genetische Information ist in der Sequenz der DNA-Basen (A, C, T und G) gespeichert. DNA ist jedoch nicht nur ein abstrakter Informationsträger, der in einem Vier-Buchstaben-Alphabet geschrieben ist, sondern auch ein physikalisches Polymer, das stark negativ geladen ist und eine spezifische Biege- und Torsionssteifigkeit besitzt. Diese physikalischen Eigenschaften der DNA spielen eine entscheidende Rolle bei der Speicherung, dem Auslesen und der Regulation genetischer Information.

So enthält jede unserer Zellen mehr als 1 m DNA, die in einem etwa $\approx 10 \mu\text{m}$ großen Zellkern gespeichert werden muss. Darüber hinaus führt die Bindung von Proteinen an DNA-Moleküle häufig zu Konformationsänderungen, die darüber entscheiden können, ob ein Gen aktiv ist oder nicht. Da alle biologischen Prozesse von den zugrunde liegenden physikalischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle beeinflusst werden, ist die Untersuchung ihrer mechanischen Eigenschaften von großem Interesse.

Es gibt mehrere Einzelmolekül-Techniken wie die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM), optische Pinzetten (Optical Tweezers, OT) oder magnetische Pinzetten (Magnetic Tweezers, MT), mit denen mechanische Parameter von Molekülen wie DNA oder Proteinen auf Einzelmolekül-Ebene gemessen werden können.

In magnetischen Pinzetten (Magnetic Tweezers, MT) wird eine superparamagnetische Kugel (Bead) an das zu untersuchende Molekül (hier: DNA) gebunden, während das andere Ende am Boden der Flusszelle befestigt ist. Superparamagnetisch bedeutet, dass die Kugel durch ein äußeres Magnetfeld magnetisiert wird, nach dessen Abschalten jedoch keine nennenswerte Restmagnetisierung behält; dadurch werden unerwünschte magnetische Aggregationen vermieden. Zwei Permanentmagnete, die in vertikaler Anordnung direkt über der Flusszelle positioniert sind, erzeugen ein Magnetfeld, das eine magnetische Kraft auf die Kugel und damit auf das DNA-Molekül ausübt (**Abbildung 1.1**). Der Gradient des Magnetfeldes ist auf der Skala typischer Molekülgrößen nahezu konstant, was bedeutet, dass die magnetische Kraft für einen gegebenen Abstand der Magnete zur Flusszelle über das gesamte Gesichtsfeld konstant ist. Im Gegensatz dazu wird bei Messungen mit optischen Pinzetten (OT) und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) typischerweise die molekulare Extension (Ausdehnung) kontrolliert, während die Kraft fluktuiert. Daher erfordern Kraftmessungen bei konstanter Kraft in OT- und AFM-Experimenten eine Rückkopplungsschleife.

In MT wird ein inverses Mikroskop zusammen mit einer CMOS-Kamera verwendet, um die Bewegung der magnetischen Kugel zu verfolgen. Aus dem Beugungsmuster der Kugel kann ihre dreidimensionale Position (x-, y- und z-Richtung) und damit die Extension (Ausdehnung) des DNA-Moleküls bestimmt werden. Zusätzlich kann die auf das

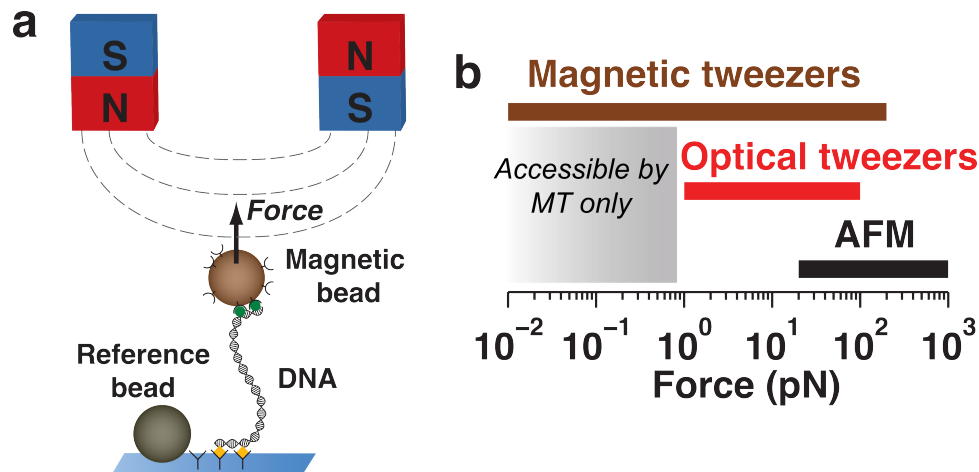


Abbildung 1.1: (a) Prinzip eines MT-Aufbaus: Eine superparamagnetische Kugel ist über spezifische Bindung an das DNA-Molekül gekoppelt, während das andere Ende über Antikörperbindung am Boden der Flusszelle befestigt ist. Permanente Magnete sind oberhalb der Flusszelle angeordnet und üben eine magnetische Kraft auf die Kugel aus. Die Streckkraft und die Rotation des DNA-Moleküls können durch die Kontrolle der Magnetposition in Translation und Rotation gesteuert werden. (b) Schematische Darstellung des Kraftbereichs, der mit verschiedenen Einzelmolekül-Techniken zugänglich ist und sich bis zu mehreren zehn PicoNewton (pN) erstreckt, einem für die Untersuchung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene relevanten Bereich. MT eignen sich besonders gut für präzise Messungen bei sehr niedrigen Kräften.

DNA-Molekül wirkende Streckkraft kalibriert werden. Darüber hinaus lassen sich DNA-Moleküle durch Rotation der externen Magnete verdrillen.

In diesem Fortgeschrittenenpraktikum erhalten Sie die Gelegenheit mit magnetischen Pinzetten zu experimentieren sowie Ihre eigenen MT-Messdaten anschließend zu analysieren. Die Experimente konzentrieren sich auf die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von DNA. Sie lernen die Prinzipien eines konventionellen magnetischen Pinzettenaufbaus kennen, führen Kraft-Dehnungs-Messungen an doppelsträngiger DNA durch und führen Rotations-Experimente zur Beobachtung von DNA-Supercoiling durch.

Lernziele

Nach Durchführung des Versuchs können Sie ...

1. das Funktionsprinzip magnetischer Pinzetten erklären und gegenüber optischen Pinzetten einordnen,
2. die Kraft auf eine magnetische Kugel aus ihren Brownschen Fluktuationen bestimmen,
3. Kraft-Dehnungs-Daten eines einzelnen DNA-Moleküls mit dem FJC- und WLC-Modell beschreiben,
4. die Persistenzlänge und Kuhn-Länge aus experimentellen Daten bestimmen,
5. erklären, wie Torsionsspannung und Supercoiling in DNA entstehen,
6. einen Buckling Point aus einer Rotations-Extensions-Kurve bestimmen,
7. aus den Messdaten die Torsionssteifigkeit der DNA abschätzen,
8. experimentelle Abweichungen von den idealisierten Modellen diskutieren.

2. Theorie

Doppelsträngige DNA-Moleküle sind typischerweise deutlich länger als ihr Durchmesser von etwa ≈ 2 nm. Die Länge doppelsträngiger DNA hängt von der Anzahl der Basenpaare ab, wobei jedes Basenpaar etwa ≈ 0.34 nm zur Länge beiträgt. Für die 3 Milliarden Basenpaare des menschlichen Genoms ergibt sich daraus eine gesamte Konturlänge von etwa ≈ 1 m. In diesem Versuch verwenden wir DNA-Moleküle mit 21,000 Basenpaaren, was eine Länge von ungefähr $7\text{ }\mu\text{m}$ entspricht — also mehr als tausendmal länger als der DNA Durchmesser. Für solche kettenartigen Moleküle können statistische Modelle angewendet werden, um ihr Verhalten unter Streckkräften zu beschreiben.

In diesem Praktikum führen Sie Kraft-Dehnungs-Messungen an doppelsträngiger DNA durch, bei denen verschiedene Streckkräfte angelegt und die resultierende Extension des DNA-Tethers beobachtet werden. In einem zweiten Experiment werden Sie DNA-Moleküle verdrehen und ihr Verhalten anhand der dabei auftretenden Änderungen der DNA-Länge untersuchen. Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über den theoretischen Hintergrund, der für die Durchführung dieses Praktikumsversuchs erforderlich ist.

Tabelle 2.0.1: Notation der wichtigsten Größen in diesem Kapitel.

Symbol	Bedeutung	Einheit
L_c	Konturlänge der DNA	μm
z	gemessene Extension	μm
F	Zugkraft	pN
L_p	Persistenzlänge	nm
l_K	Kuhn-Länge	nm
C	Torsionssteifigkeit	pN nm ²
n	Anzahl angelegter Windungen	1

2.1 Kraft-Dehnungs-Verhalten von Molekülen

Um das Verhalten biologischer Makromoleküle unter konstanten Kräften zu beschreiben, führen wir zwei gängige theoretische Modelle ein: das Modell der frei gelenkigen Kette (Freely Jointed Chain, FJC) und das "wurmartige" Kettenmodell (Worm-Like Chain, WLC). Das erste Modell (FJC) betrachtet das Molekül als eine Kette, die aus starren Segmenten besteht, während das zweite Modell (WLC) das Molekül als einen isotropen Stab auffasst, der kontinuierlich flexibel ist.

2.1.1 Freely-jointed chain model (FJC)

Das FJC-Modell betrachtet ein Polymer der Gesamtlänge L , das aus N Monomeren besteht, die jeweils die gleiche und konstante Länge l (Kuhn-Länge) besitzen:

$$L = N \cdot l$$

$\vec{R}$ ist der End-zu-End-Vektor des Moleküls und beschreibt die „tatsächliche“ Größe des Moleküls in seiner Umgebung. Alle Segmente werden durch einen Vektor $l \cdot \vec{r}_i$ beschrieben. Das FJC-Modell nimmt an, dass es keine Wechselwirkungen zwischen den Monomeren gibt und dass die Bindung zwischen zwei Vektoren $\vec{r}_i$ und $\vec{r}_{i+1}$ vollkommen flexibel ist (die Kette führt daher einen Random Walk aus), siehe **Abbildung 2.1**. Alle Konformationen des Polymers sind in Lösung gleich wahrscheinlich. Wirkt eine äußere Kraft $\vec{F} = f \cdot \vec{e}_z$ auf das Molekül, so ist die potentielle Energie E_{pot}^α des Moleküls in einer bestimmten Winkelkonformation α gegeben durch:

$$E_{\text{pot}}^\alpha = - \sum_{i=1}^N \vec{F} \cdot l \cdot \vec{r}_i = -l \cdot f \sum_{i=1}^N \cos \theta_i \quad (2.1.1)$$

Dabei ist θ der Winkel zwischen einem Monomer und der in z -Richtung wirkenden Kraft f .

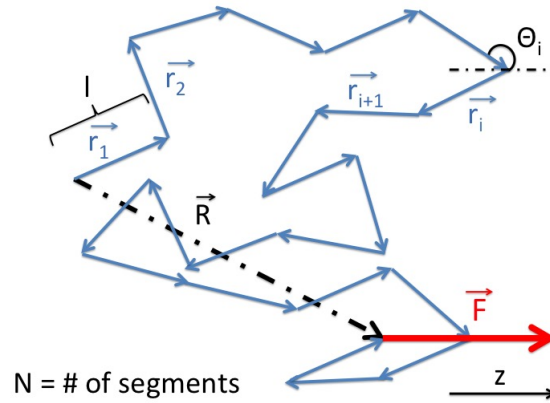


Abbildung 2.1: Im FJC-Modell wird ein Polymer als aus N starren Segmenten der Länge l bestehend betrachtet. Ebenfalls in dieser Abbildung gezeigt ist die Definition des End-zu-End-Vektors $\vec{R}$, der vom ersten Segment bis zum letzten Segment des Polymers aufgespannt wird.

Die Reaktion (Ausdehnung) eines Moleküls auf eine auf es wirkende Kraft kann mithilfe der statistischen Mechanik hergeleitet werden. Ein kanonisches Ensemble ist ein statistisches Ensemble zur Beschreibung aller möglichen Zustände eines mechanischen Systems im thermischen Gleichgewicht. In einem kanonischen Ensemble werden das Volumen V , die Teilchenzahl N und die Temperatur T als konstant angenommen. Die kanonische Zustandssumme Z kann mit der folgenden Formel definiert werden, und durch Einsetzen von Gleichung (2.1.1) ergibt sich das folgende Resultat:

$$Z = \sum_{\alpha} e^{\frac{-E_{\text{pot}}^\alpha}{kT}} = \sum_{\alpha} \prod_{i=1}^N e^{\frac{fl \cos \theta_i}{kT}} = \left(\sum_{\alpha} e^{\frac{fl \cos \theta}{kT}} \right)^N \quad (2.1.2)$$

Dabei ist k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur.

Da der Winkel kontinuierlich ist, kann die Summe durch ein Integral ersetzt werden, wobei über den gesamten Raum integriert wird:

$$Z = \left(\int d\Omega \cdot e^{\frac{fl \cos \theta}{kT}} \right)^N = \left(\frac{2\pi kT}{fl} \sinh\left(\frac{fl}{kT}\right) \right)^N \quad (2.1.3)$$

Durch Einsetzen in die Definition der *Gibbsschen freien Energie* (G), $-kT \cdot \ln(Z)$, kann die Ausdehnung z des Moleküls infolge der auf es wirkenden Kraft $\vec{F}$ berechnet werden:

$$z = -\frac{\delta G}{\delta f} = L \cdot \left(\coth\left(\frac{fl}{kT}\right) - \frac{kT}{fl} \right) \quad (2.1.4)$$

2.1.2 Worm-like chain model (WLC)

Im Vergleich zum FJC-Modell betrachtet das WLC-Modell das Molekül als eine kontinuierlich flexible Kette, siehe **Abbildung 2.2**.

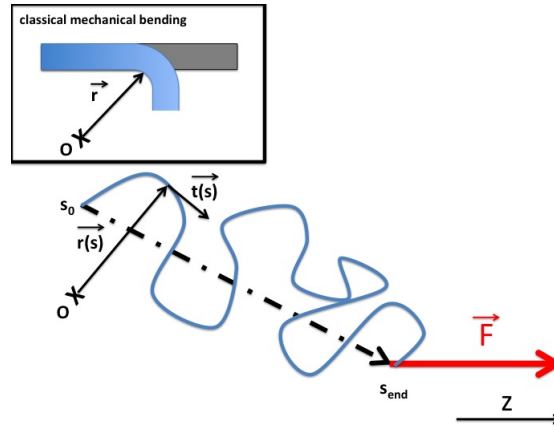


Abbildung 2.2: Die Wurm-ähnliche Kette ist vergleichbar mit der klassischen mechanischen Biegung eines Stabes, siehe schwarzes Kästchen oben links. Das Molekül der Länge L_c wird durch Punkte s auf dem Molekül parametrisiert. Der Vektor $\vec{r}(s)$ zeigt auf die Kette, während $\vec{t}(s)$ der Tangentialvektor am Punkt s ist.

Die Kette besteht aus Segmenten s mit der Länge ds , wobei $s \in [0, L_c]$ gilt und L_c die Konturlänge des Moleküls ist. $\vec{t}(s)$ sind die Tangentenvektoren an jedem Punkt s . Wirkt eine Kraft $\vec{F}$ auf das Molekül, so wirkt sie auf jeden Tangentenvektor. Daher ergibt sich für die Energie E^{WLC} ein Integral, das über die gesamte Länge des Moleküls verläuft:

$$E = \int_0^{L_c} ds \cdot \vec{t}(s) \cdot \vec{F} = f \cdot \int_0^{L_c} ds \cdot \vec{t}(s) \cdot \vec{e}_z \quad (2.1.5)$$

Im Allgemeinen wird die Worm-Like-Chain in Analogie zur Freely-Jointed-Chain gelöst: Zunächst wird die Energie einer Konformation (E_α^{WLC}) des Polymers definiert, und anschließend wird die Zustandssumme berechnet. Um über alle Konformationen zu integrieren, muss ein Pfadintegral $D(\vec{t}(s))$ ausgeführt werden, das über alle Tangentenvektoren am Punkt s integriert. Hier beschränken wir uns auf ein Minimum an mathematischem Formalismus. Man betrachte, dass sich das Polymer wie ein Stab verhält, der durch eine Kraft $\vec{F}$ gebogen wird (klassische Mechanik), siehe **Abbildung 2.2**, schwarzer

Kasten. Die Energie zur Deformation eines Stabes ist proportional zu $\frac{1}{R^2}$, wobei R der Radius des Biegekreises ist. Unter Berücksichtigung der Beziehung $\left(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s}\right)^2 = \frac{1}{R^2}$ ergibt sich:

$$E_{\alpha}^{WLC} = \int_0^{L_c} ds \cdot \left(\frac{A}{2} \cdot \left(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s}\right)^2\right) \quad (2.1.6)$$

Dabei ist $A = kT \cdot L_P$. L_P wird als Persistenzlänge bezeichnet und definiert die Steifigkeit der Kette. Segmente, die kleiner als die Persistenzlänge sind, verhalten sich wie ein starrer Stab. Segmente, die größer als die Persistenzlänge sind, sind flexibel und können gebogen werden. Eine exakte Lösung des WLC-Modells ist schwer herzuleiten, da das Pfadintegral berechnet werden muss:

$$\int_{\vec{t}(0)}^{\vec{t}(L)} D(\vec{t}(s)) \cdot \exp\left(-\frac{L_P}{2}\right) \cdot \int_0^L ds \left(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s}\right)^2 \quad (2.1.7)$$

Anstelle einer exakten numerischen Lösung verwendet man häufig eine approximative Interpolationsformel, die hinreichend genau ist, um experimentelle Daten zu analysieren:

$$\frac{f L_P}{kT} = \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \quad (2.1.8)$$

Dabei ist f die auf das Molekül wirkende Kraft, L_P die Persistenzlänge, z die Ausdehnung und L_C die Gesamtlänge des Moleküls.

Ein zentraler Punkt ist hier, dass es Energie erfordert (die hier durch die externe -in diesem Fall magnetische- Kraft aufgebracht wird), ein Polymer im FJC- oder WLC-Modell zu strecken, obwohl das Modell annimmt, dass es keine Wechselwirkungen zwischen den Segmenten gibt. Der Grund dafür ist, dass es viele Konformationen des Polymers gibt, bei denen die Enden nahe beieinander liegen, und nur wenige (im Extremfall der vollständigen Streckung nur eine einzige) Konfiguration, bei der die Enden weit voneinander entfernt sind. Das Strecken des Polymers ist daher entropisch ungünstig und diese Situation wird daher auch als "entropische Feder" bezeichnet.

2.2 Doppelsträngige DNA unter Kraft und Drehmoment

In diesem Kapitel erklären wir, wie die Kraft auf die Kugeln in magnetischen Pinzetten kalibriert wird und wie DNA auf induzierte Drehmomente reagiert.

2.2.1 Kraftkalibrierung

In einem magnetischen Pinzettenaufbau üben Magnete ein magnetisches Feld und damit eine magnetische Kraft auf eine magnetische Kugel aus. Diese Kugel ist an einem Ende des DNA-Moleküls befestigt (über mehrere Biotin-Streptavidin-Verknüpfungen), während das andere Ende über Antikörperbindung am Boden der Flusszelle fixiert ist, siehe **Abbildung 2.3**. Die Kugel überträgt die Kraft auf das Molekül: Es kann durch

einfaches Steuern der Magnetposition in Translation und Rotation gestreckt und verdrillt werden.

Die Streckkraft wird anhand der Fluktuationen der magnetischen Kugel in Lösung kalibriert, die durch die Brownsche Bewegung verursacht werden. Der Aufbau kann als umgekehrtes Pendel betrachtet werden, siehe **Abbildung 2.3**.

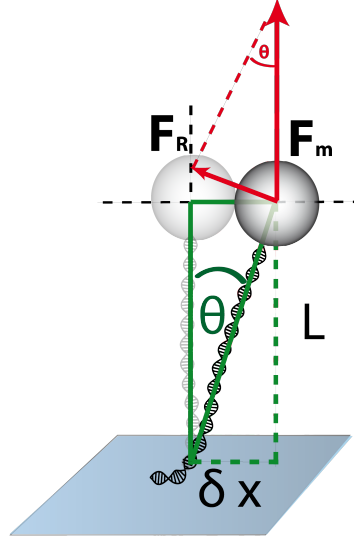


Abbildung 2.3: Die Magnete üben eine Kraft $\vec{F}_m$ auf die magnetische Kugel aus. Die Kraft kann über die Abweichung δx der Kugel von ihrer ursprünglichen Position kalibriert werden, die durch Brownsche Bewegung verursacht wird. Die Länge des Moleküls ist mit L bezeichnet, die Winkelabweichung wird Θ genannt, und $\vec{F}_R$ ist die rückstellende Kraft, die auf die Kugel wirkt.

Die Kraft ($\vec{F}_m$) auf die Kugel zeigt in z -Richtung. Aufgrund der Brownschen Bewegung fluktuiert die Kugel um ihren Ursprung. Eine rückstellende Kraft ($\vec{F}_R$) zwingt die Kugel stets zurück in ihre Ausgangsposition. Mit der Winkelabweichung Θ und den transversalen Fluktuationen der Kugel δx wird die Kraft definiert:

$$\vec{F}_R = \sin \Theta \cdot \vec{F}_m = \frac{\delta x}{l} \cdot \vec{F}_m \quad (2.2.9)$$

Wir stellen fest, dass sich die Kugel in einem harmonischen Potential mit der Federkonstanten $\kappa = \frac{F_m}{\langle z \rangle}$ befindet. Nach dem Energieequipartitionstheorem besitzt jeder Freiheitsgrad im thermischen Gleichgewicht die Energie $\frac{1}{2}k_B T$:

$$\frac{1}{2} \cdot \kappa \cdot (\delta x)^2 = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.2.10)$$

Setzt man die Federkonstante ein und löst die Gleichung nach F_m auf, können wir die auf die Kugel wirkende Kraft berechnen:

$$F_m = \frac{l \cdot k_B T}{(\delta x)^2} \quad (2.2.11)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante ist, T die absolute Temperatur, $\langle z \rangle$ die mittlere Ausdehnung der DNA-Verbindung und $\langle \delta x^2 \rangle$ die Varianz der lateralen Fluktuationen

der Kugel darstellt.

Mit anderen Worten, die Kraft kann durch Messen der x - y -Bewegung der Kugel über eine ausreichend lange Zeit kalibriert werden. Um verlässliche Kraft-Dehnungs-Messungen zu gewährleisten, muss das experimentelle Protokoll die charakteristische Relaxationszeit des Systems (τ) berücksichtigen, um die insgesamt für statistische Genauigkeit erforderliche Messzeit (t) zu bestimmen. Die Relaxationszeit definiert die Zeitskala, auf der die Kugel thermischen Fluktuationen innerhalb der harmonischen Falle unterliegt. Sie wird als Verhältnis des Reibungskoeffizienten (γ) zur Federkonstanten der Falle (k) berechnet:

$$\tau = \frac{\gamma}{k}$$

Die Fallensteifigkeit k in den magnetischen Pinzetten wird durch das Verhältnis der aufgetragenen Kraft zur gemessenen Ausdehnung der DNA-Verbindung gegeben: $\frac{F}{\langle z \rangle}$. Folglich führen höhere Kräfte zu kürzeren Relaxationszeiten und damit zu schnelleren Kugelfluktuationen.

Um eine gewünschte statistische Genauigkeit (ϵ) zu erreichen, muss die Messzeit deutlich länger als die Relaxationszeit (τ) sein, ausreichend lang, um diese Fluktuationen hinreichend zu erfassen. Man kann sich vorstellen, dass die Genauigkeit mit $\sqrt{N}$ zunimmt, wobei N die Anzahl unabhängiger Messungen ist. In diesem Fall kann jede Messung von Dauer τ als eine weitere unabhängige Messung betrachtet werden. Für Kräfte oberhalb von 1 pN wird die minimale Messzeit τ_{measure} abgeschätzt als:

$$\tau_{\text{measure}} \approx \frac{12\pi^2\eta R l_0}{F\epsilon^2}$$

wobei η die Flüssigkeitsviskosität ist, R der Kugelradius und l_0 die Konturlänge der DNA darstellt.

Diese Beziehung impliziert, dass die Datenerfassungszeit erhöht werden muss, wenn mit längeren DNA-Verbindungen gearbeitet wird oder einfach wenn eine höhere Präzision angestrebt wird (kleineres ϵ , typischerweise 5% oder 10%), um statistisch aussagekräftige Kraft-Dehnungs-Messungen sicherzustellen.

2.2.2 Verdrehung bzw. Torsionsmessungen an DNA-Molekülen

Zusätzlich zum Anlegen von Kräften können MT auch DNA-Moleküle verdrehen. In einer typischen Messung wird die DNA bei einer konstanten Kraft gehalten und entweder um n Windungen über- oder unterwunden. DNA ist ein rechtshändiges Molekül und verhält sich (für Kräfte größer als 1 pN) unterschiedlich in Abhängigkeit von der Richtung der angelegten Windungen. Positive Windungen verdrillen die DNA entlang ihrer helikalen Natur, während negative Windungen das Molekül entgegen seiner intrinsischen Helizität verdrillen. Die Antwort der DNA auf angelegte Windungen hängt von der Dehnungskraft ab. Für Kräfte kleiner als 1 pN verhält sich die DNA symmetrisch in Bezug auf die angelegte Anzahl an Windungen, siehe **Abbildung 2.4A** (linke Spalte). Für eine kleine Anzahl an Windungen bleibt die Molekülausdehnung konstant, während das molekulare rückstellende Drehmoment linear ansteigt. Jenseits der Knickinstabilität ("buckling point"; gekennzeichnet durch blaue Quadrate für 0,9 und 1,1 pN) nimmt die Molekülausdehnung linear ab, während das molekulare Drehmoment konstant bleibt. Nach der Knickinstabilität ist es energetisch günstiger, DNA-Plektoneme zu bilden (siehe die

Simulationen in 2.4B) als die DNA weiter zu verdrehen. In diesem Regime führt jede weitere Windung des Moleküls zur Bildung einer weiteren Umdrehung der DNA-Superhelix. Für höhere Dehnungskräfte (> 1 pN) ist die Antwort der DNA auf die Richtung der angelegten Windungen asymmetrisch. Während sich der Knickpunkt im Allgemeinen mit steigender Dehnungskraft zu einer größeren Anzahl angelegter Windungen verschiebt, existiert in negativer Richtung kein Knickpunkt, siehe **Abbildung 2.4A** (rechte Spalte). Stattdessen tritt ein durch Drehmoment induziertes Schmelzen bei -10 pN·nm auf. Die Verdrehung wird hierbei durch lokale Basenpaarbrüche aufgenommen.

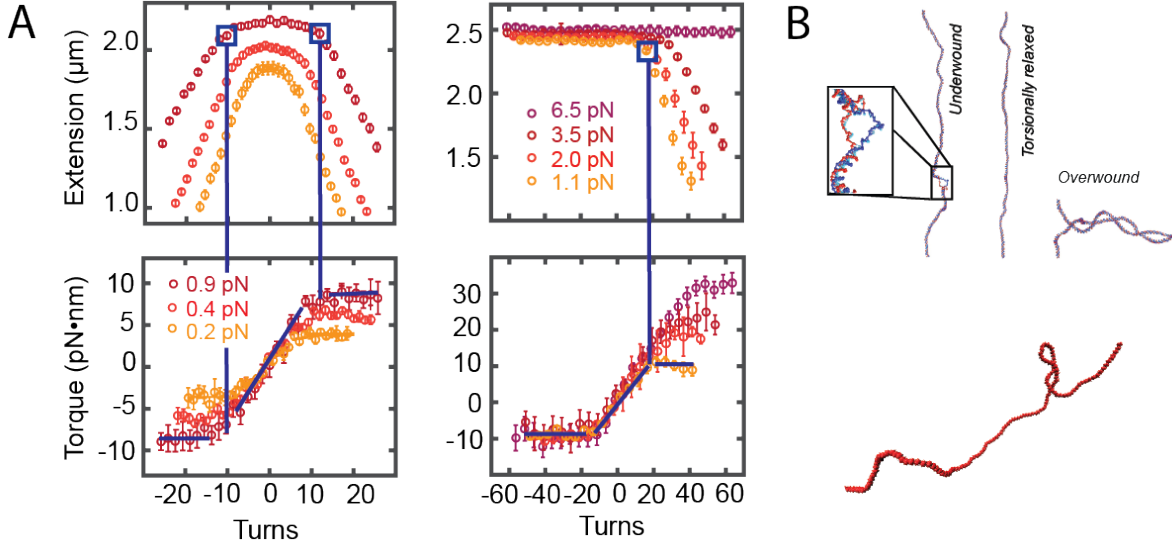


Abbildung 2.4: (A) Dehnung (oben) und Drehmoment im Verhältnis zur Anzahl der angelegten Umdrehungen (unten) für verschiedene Dehnkräfte. Knickpunkte (n_b) sind für 0.9 pN und 1.1 pN im Dehnungs-gegen-Umdrehungen-Diagramm mit einem blauen Quadrat markiert. Drehmomentmessungen wurden mit magnetischen Drehmoment-Pinzetten durchgeführt, einer speziellen Art von Magnetpinzetten. (B) Grobmodellierter DNA-Simulationen zeigen torsionsfrei entspannte DNA, unterwundene DNA (bei drehmomentinduziertem Schmelzen bei -10 pN · nm) und überwundene DNA mit der Ausbildung von DNA-Pletonemen.

Am Knickpunkt (n_b) wird die Ausdehnung der DNA aufgrund der Bildung plektonischer Superhelices reduziert. Die Änderung des Abstands der Enden entspricht dem Anteil der DNA, der DNA-Superhelices bildet. Ein einfaches Modell für das Knicken und die Superhelixbildung der DNA ist wie folgt. Im Regime vor der , Knickinstabilität in dem die DNA näherungsweise gerade bleibt, nehmen das Drehmoment und die torsionale Energie mit zunehmender Verdrehung des Moleküls mit der Anzahl der angelegten Windungen stetig zu:

$$E_{\text{torsion}} = 2\pi n \cdot \Gamma \quad (2.2.12)$$

$$\Gamma = \frac{C}{L} \cdot 2\pi n \quad (2.2.13)$$

wobei Γ das Drehmoment und C die Torsionssteifigkeit ist.

Am Knickpunkt (n_b) entspricht die Torsionsenergie E_{torsion} des Moleküls der Energie, die benötigt wird, um eine solche kreisförmige Schleife zu bilden (E_{loop}). E_{loop} besitzt

zwei Beiträge: die Arbeit W , die gegen die externe Kraft verrichtet wird, um die DNA zu verkürzen, sowie die Biegeenergie E_{bend} , die zum Biegen des DNA-Strangs benötigt wird.

$$E_{\text{torsion}}(n_b) = E_{\text{loop}} = W + E_{\text{bend}} \quad (2.2.14)$$

In unserem einfachen Modell wird eine Superhelix als eine kreisförmige Schleife mit dem Radius r angenähert. Die Arbeit, die benötigt wird, um die Länge des DNA-Moleküls gegen die Kraft F zu verkürzen, ist

$$W = -2\pi r F \quad (2.2.15)$$

während die zum Biegen benötigte Energie zur Ausbildung einer einzelnen Schleife (siehe WLC-Abschnitt) gegeben ist durch

$$E_{\text{bend}} = \int_0^{2\pi r} ds \frac{A}{2} \frac{1}{r^2} = \pi A \frac{1}{r} \quad (2.2.16)$$

Durch Minimierung der Schleifenenergie in Bezug auf r lässt sich der optimale Radius r^* der Schleife herleiten

$$r = \sqrt{\frac{A}{2F}} \quad (2.2.17)$$

Kennt man den Radius, lassen sich das Knickdrehmoment Γ_b sowie die Anzahl der Windungen n_b berechnen, bei denen das Knicken einsetzt.

$$\Gamma_b = \sqrt{2AF} \quad (2.2.18)$$

$$n_b = \frac{L}{2\pi C} \cdot \sqrt{2AF} \quad (2.2.19)$$

3. Aufbau

Dieses Kapitel beschreibt den experimentellen Aufbau, die zur Steuerung des Instruments verwendete Software, sowie die Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Flusszellen.

3.1 Experimenteller Aufbau

In der MT wird das zu untersuchende Molekül (hier DNA) an der Oberfläche einer Flusszelle befestigt und auf der anderen Seite an einer superparamagnetischen Kugel (**Abbildung 3.1**). Ein Paar Permanentmagnete, das oberhalb der Flusszelle angebracht ist, erzeugt magnetische Felder, die wiederum magnetische Kräfte auf die superparamagnetische Kugel ausüben. Die Kraft kann durch Ändern der Position der Permanentmagnete gesteuert werden, d. h. durch Näherung oder Entfernung von der Flusszellenoberfläche. Die Rotation der Moleküle kann durch Drehen der Magnete kontrolliert werden. Die Flusszelle ist auf einem Flusszellenhalter montiert, sodass sie auf einem Öl-Immersionsobjektiv platziert ist. Das Objektiv kann mit einem Piezo sehr präzise nach oben und unten bewegt werden, was insbesondere für die Erstellung einer "Look-Up-Tabelle" (LUT) zum Z-Tracking erforderlich ist. Um den Flüssigkeitsaustausch zu kontrollieren, ist eine Peristaltikpumpe mit der Flusszelle verbunden. Eine LED beleuchtet die Flusszelle monochromatisch durch den Spalt (1 mm) der Magnetanordnung. Bilder des beleuchteten Bereichs werden von einer CMOS-Kamera aufgenommen und an einen Computer zur Bildanalyse übertragen. Das DNA-Tether (DNA-Molekül zwischen Oberfläche und magnetischer Kugel) wird in der MT nicht direkt beobachtet; stattdessen werden die Kugelpositionen verfolgt und für die Datenanalyse verwendet.

Messungen der Kugeln werden mit den Kugeln einige μm ausserhalb des Fokus durchgeführt. Das Beugungsmuster der Kugeln wird verwendet, um die Tether-Ausdehnung entlang der z-Achse zu verfolgen (**Abbildung 3.2**). Eine Kalibrierung des Beugungsmusters der Kugel wird vor der Messung durchgeführt. Für die Kalibrierung werden die Magnete näher an die Flusszelle gebracht, um große Kräfte auszuüben und so die Fluktuationen der Kugel zu reduzieren. Die Position des Objektivs kann mit einem Piezo gesteuert werden. Um einen LUT zu erstellen, wird die Objektivposition in Sub- μm -Schritten bewegt und das Beugungsmuster der Kugel aufgenommen. Für präzise Messungen der vertikalen Position interpoliert die Software zwischen den einzelnen Bildern und erstellt den LUT. Während der Messung bleibt der Piezo auf einer festen Position, und das aktuelle Beugungsmuster der Kugeln wird mit dem LUT verglichen, welche die z-Position der Kugel und damit die Ausdehnung des Moleküls liefert. Für die laterale Position der Kugel wird das Zentrum der Beugungsringe mittels Kreuzkorrelation berechnet.

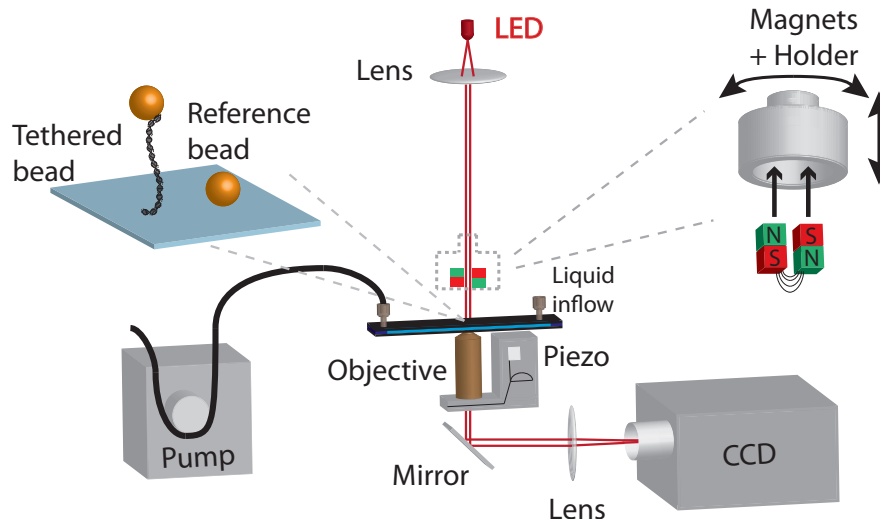


Abbildung 3.1: Übersicht über ein MT-Setup. Ein Paar Permanentmagnete wird über der Durchflusszelle platziert. Das Licht der LED beleuchtet die Probe von oben. Das Licht wird über einen Spiegel und eine Linse zu einer Kamera geleitet.

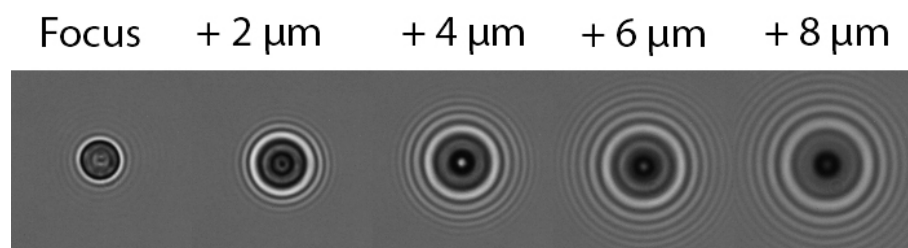


Abbildung 3.2: Verfolgte Bilder von Magnetkugeln. Das Beugungsmuster der Kugel ändert sich abhängig von ihrem Abstand zur Brennebene des Objektivs. Dieses Merkmal wird verwendet, um die Dehnung der an Kugeln gebundenen DNA zu bestimmen.

Um den Effekt mechanischen Drifts zu reduzieren, der die Messungen sowohl in lateraler als auch in vertikaler Richtung stören kann, werden Referenzkugeln verfolgt. Diese Referenzkugeln sind Polystyrolkugeln, die an der Oberfläche der Flusszelle befestigt sind. Zur Korrektur der Drift wird die aufgezeichnete Position einer Referenzkugel von den zu untersuchenden, DNA-gebundenen magnetischen Kugeln subtrahiert.

Sie werden aufgefordert, eine Kraftkalibrierung des MT-Aufbaus sowie Kraft-Dehnungs-Messungen für DNA-Moleküle durchzuführen. **Abbildung 3.3** zeigt die Kräfte als Funktion der Höhe der Magnete über der Flusszelle, die in diesem Laborpraktikum verwendet werden, und kann zur Erstellung von Messprotokollen genutzt werden.

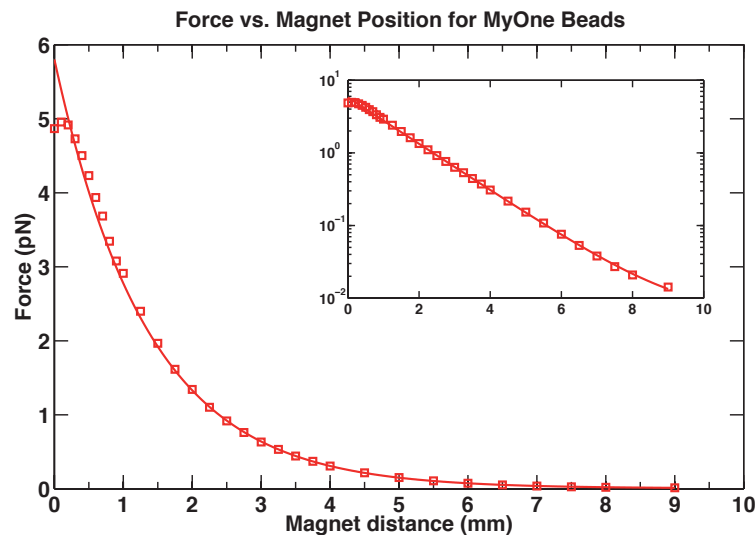


Abbildung 3.3: Kraft-gegen-Magnet-Positions-Kalibrierung für das in diesem Labor-kurs verwendete MT-Setup mit MyOne-Kugeln. Die durchgezogene Linie ist eine Doppel-Exponentialanpassung an die gemessenen Werte. Einsatz: die Daten in einem Halblogarithmus-Diagramm mit logarithmischer y-Achse und linearer x-Achse.

3.2 Software

Die Software zur Steuerung des Instruments ist in LabVIEW geschrieben. Die Piezo-Bühne sowie beide Motoren, die für die Translation und Rotation der Magnete verantwortlich sind, können mittels der Software gesteuert werden. Die Peristaltikpumpe zum Flüssigkeitsaustausch muss manuell betrieben werden.

Die Software besteht aus drei separaten Fenstern (siehe **Abbildung 3.4** und **3.5**). Ein Live-Bild des Sichtfelds der Flusszelle wird im Fenster “BeadTrackerMain_modV1.vi” angezeigt. Grundlegende Konfigurationen, die Auswahl der Kugeln und die LUT werden in diesem Fenster vorgenommen. Motoren und die Piezo-Bühne werden in “MotorUI.vi” gesteuert. “ExperimentProgramUI_modV1.vi” enthält alle Optionen zum Starten und Steuern der Messungen. Die Positionen der Kugeln werden in Echtzeit verfolgt und in Textdateien gespeichert, einschließlich der Positionen der Motoren.

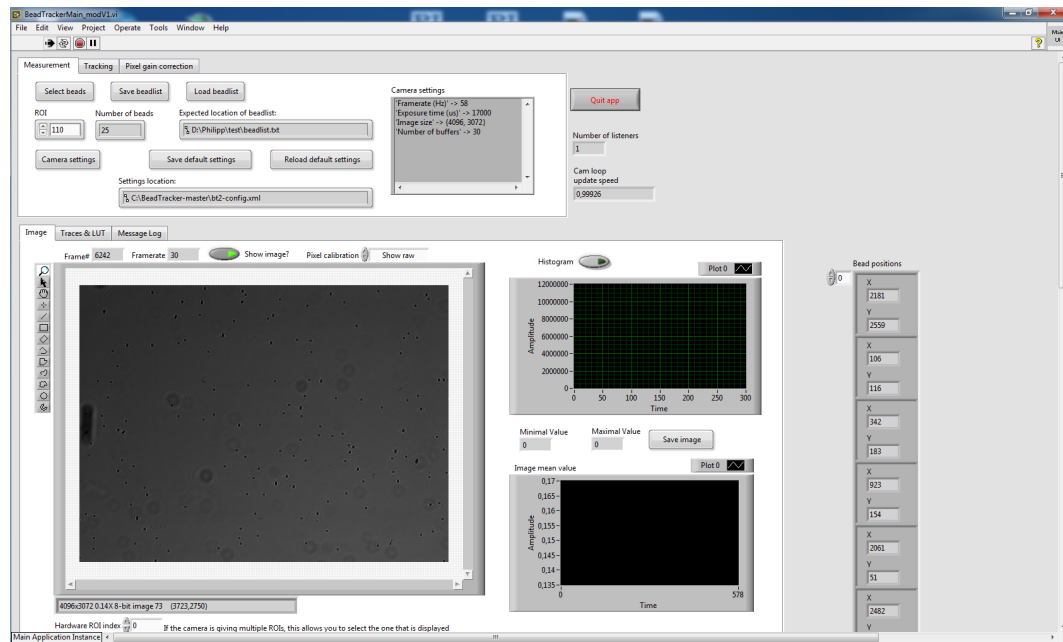
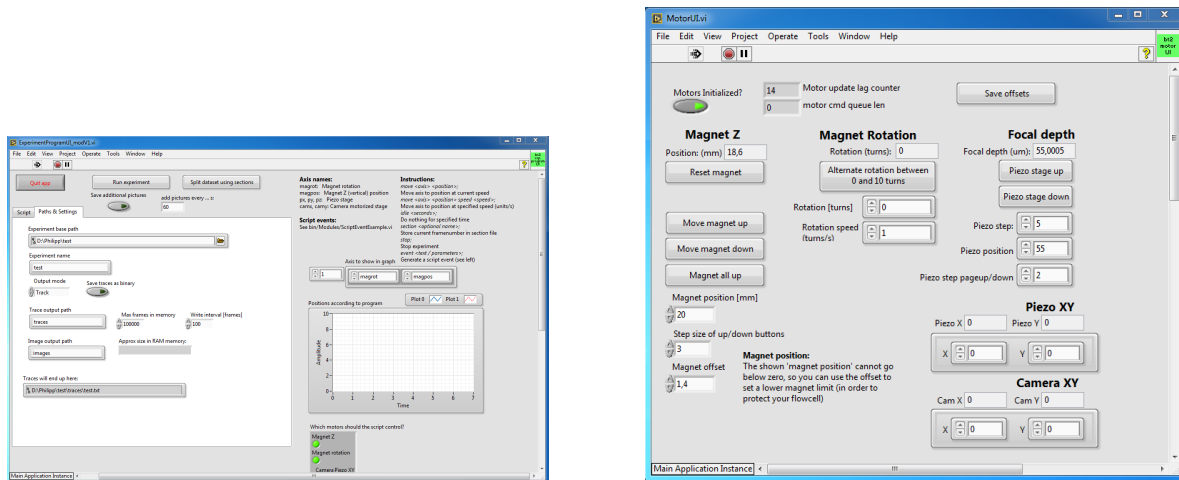


Abbildung 3.4: “BeadTrackerMain modV1.vi” is the main window of the software. It displays a real-time image of the field of view and provides option to select beads and perform a LUT.

3.3 Flusszelle und Anbindungschemie

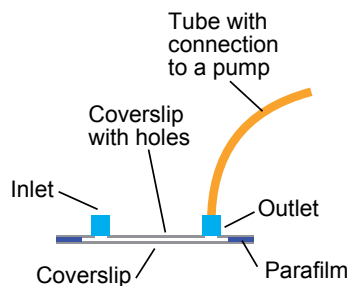
Die Flusszelle (**Abbildung 3.6a**) stellt die Messkammer für die magnetischen Pinzetten bereit. Zwei Mikroskopdeckgläser, getrennt durch einen weichen, geschmolzenen Parafilm-Abstandshalter, bilden eine $\approx 25 \mu\text{L}$ Mikrofluidik-Kammer. Das obere Deckglas hat zwei Löcher (Einlass und Auslass) für den Flüssigkeitsaustausch in der Flusszelle. Das untere Deckglas ist mit (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilan funktionalisiert und anschließend mit Anti-Digoxigenin inkubiert, um DNA zu befestigen. Die lineare 21 kbp DNA besitzt zwei “Griffe”, d. h. DNA-Segmente an den Enden, die als Befestigungspunkte dienen. Jeder Griff ist etwa 600 bp lang und enthält mehrere Nukleotide mit Biotin (Biotin-Griff) oder Digoxigenin-Gruppen (Digoxigenin-Griff). Der Biotin-Griff bindet an eine mit Streptavidin beschichtete $1 \mu\text{m}$ Durchmesser superparamagnetische Kugel, während das Digoxigenin-markierte Ende der DNA an der mit Anti-Digoxigenin beschichteten Oberfläche der Flusszelle bindet (**Abbildung 3.6b**). Häufig werden $1 \mu\text{m}$ Durchmesser Polystyrolkugeln als Referenzkugeln verwendet. Beachten Sie, dass Drehmoment- und Verdrehungsmessungen an DNA nur möglich sind, wenn die doppelsträngige DNA keine “Defekte” (so genannte Nicks) aufweist und die Befestigung durch mehrere Biotin- und Streptavidin-Moietäten an den Enden erfolgt. Um unspezifische Bindungen der Kugel an der Oberfläche zu vermeiden, wird das Deckglas mit bovinem Serumalbumin (BSA) passiviert.



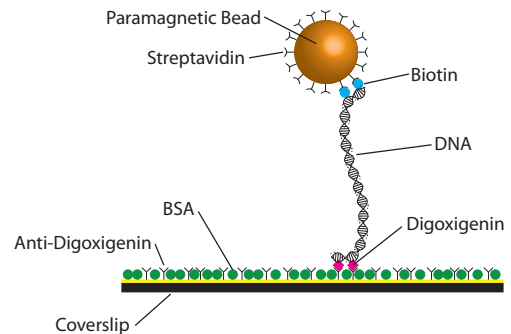
(a) Das Fenster “ExperimentProgramULmodV1.vi” ermöglicht es den Benutzern, den Ordnerpfad festzulegen, Protokolle zu erstellen und Messungen zu starten.

(b) Mit “MotorUI.vi” können die Piezobühne sowie die beiden Motoren für die Magnete manuell gesteuert werden.

Abbildung 3.5: “ExperimentProgramULmodV1.vi” bzw. “MotorUI.vi”, um Messungen zu starten bzw. Motorpositionen zu steuern.



(a) **Schematische Darstellung einer Durchflusszelle.** Zwei Glasdeckgläser, die durch einen Parafilm-Abstandhalter getrennt sind, bilden eine Kammer für MT-Messungen. Die Montage der Durchflusszelle wird in einen Durchflusszellhalter eingesetzt und auf dem optischen Tisch des MT-Setups positioniert. Die Durchflusszelle ist mit einer Peristaltikpumpe verbunden, um einen kontrollierten Flüssigkeitsaustausch zu ermöglichen.



(b) **Schematische Darstellung eines Bead-Tether-Surface-Aufbaus.** Anti-Digoxigenin ist über Epoxysilan-Chemie an das untere Deckglas gebunden. Die paramagnetische Kugel besitzt eine mit Streptavidin beschichtete Oberfläche. Ein DNA-Konstrukt, das an einem Ende mit Digoxigenin und am anderen Ende mit Biotin markiert ist, bindet entsprechend an die Oberfläche bzw. an die Kugel. Zur Passivierung wird das untere Deckglas mit BSA beschichtet.

Abbildung 3.6: Aufbau der Durchflusszelle und Bindungschemie für typische MT-Messungen.

4. Anmerkungen zu diesem Versuch

Bitte reichen Sie Ihre Dateien mit der Dateinamensstruktur FP12-GRXXX-Jahr_Monat_Tag ein. Alle wichtigen Informationen finden Sie unter <https://www.uni-augsburg.de/de/fakultaet/mntf/physik/groups/exp4/teaching/fp/>.

Vorbereitung auf den Praktikumstag

Um einen reibungslosen Ablauf und ein erfolgreiches Experimentieren im Praktikum zu gewährleisten, bitten wir Sie eindringlich, gut vorbereitet zum Versuchstag zu erscheinen. Eine gründliche Auseinandersetzung mit den theoretischen Grundlagen (insbesondere Polymer-Modelle wie FJC und WLC sowie DNA-Supercoiling) und den einzelnen Schritten des Messprotokolls ist zwingend erforderlich. Zur Unterstützung und zur Förderung des allgemeinen Verständnisses finden Sie am Ende dieses Kapitels einen vorbereitenden Fragenkatalog.

Nutzung digitaler Geräte im S1-Labor

Bitte beachten Sie, dass es sich beim Praktikumslabor um einen Bereich der Sicherheitsstufe 1 (S1) handelt. Aus Gründen der Arbeitssicherheit und Kontaminationsvermeidung bitten wir darum, **auf die Verwendung digitaler Endgeräte (z. B. iPads, Tablets, Laptops) zum Lesen des Skripts im Labor nach Möglichkeit zu verzichten.**

- **Eigene Notizen:** Falls Sie handschriftliche Anmerkungen oder eigene Notizen nutzen möchten, drucken Sie sich das Skript bitte vorab aus und bringen Sie es in Papierform mit.
- **Ausdrucke vor Ort:** Wenn Sie kein eigenes Exemplar ausdrucken möchten, liegt für Sie am Lehrstuhl direkt im Labor eine gedruckte Fassung der Anleitung bzw. des Schritt-für-Schritt-Protokolls bereit.

Verwendung von Hilfsmitteln und KI-Tools

Wie in jeder wissenschaftlichen Arbeit gilt auch für dieses Protokoll und die Auswertung zu diesem Praktikum der Grundsatz der guten wissenschaftlichen Praxis: Eigenleistung und verwendete Hilfsmittel müssen stets klar und transparent gekennzeichnet werden. Sollten Sie generative KI-Tools (wie z. B. ChatGPT oder vergleichbare Sprachmodelle) zur Texterstellung, Formulierungshilfe oder Code-Generierung einsetzen, ist diese Nutzung im Bericht explizit anzugeben und darzulegen, an welchen Stellen und in welchem Umfang

das jeweilige Tool verwendet wurde. Reine Eigenleistungen müssen für die Korrigierenden zweifelsfrei erkennbar bleiben.

4.1 Fragen zum Verständnis

Nutzen Sie die folgenden Fragen, um Ihre Vorbereitung auf das Antestat und die Messungen zu überprüfen:

1. Funktionsprinzip & Messaufbau:

- Warum werden bei magnetischen Pinzetten superparamagnetische anstelle von ferromagnetischen Kugeln verwendet?
- Über welche biochemischen Bindungen wird das DNA-Molekül an die Oberfläche der Flusszelle sowie an die magnetische Kugel gekoppelt?
- Wie wird die Z-Position (Extension) der Kugeln optisch bestimmt, obwohl das DNA-Molekül selbst unter dem Mikroskop nicht sichtbar ist?

2. Kraftkalibrierung & Polymermodelle:

- Wie lässt sich die auf das Molekül wirkende Zugkraft mithilfe der Brownschen Bewegung und des Äquipartitionstheorems kalibrieren?
- Worin unterscheiden sich das *Freely-Jointed-Chain*- (FJC) und das *Worm-Like-Chain*-Modell (WLC) in ihren Grundannahmen?
- Was versteht man unter der Persistenzlänge L_P und der Kuhn-Länge l ? Warum spricht man bei der Dehnung von DNA im Niedrigkraftbereich von einer „entropischen Feder“?

3. DNA-Supercoiling & Topologie:

- Was versteht man unter dem Knickpunkt (*buckling point*) und was passiert mechanisch jenseits dieser Schwelle mit der DNA-Länge?
- Warum reagiert doppelsträngige DNA bei Kräften $F > 1$ pN asymmetrisch auf positive bzw. negative Windungen?
- Was ist ein DNA-*Nick* und wie macht sich eine beschädigte DNA im Rotationsexperiment bemerkbar?

4. Versuchsdurchführung:

- Wozu dienen Referenzkugeln während der Messung?
- Welche drei Vortests werden vor der eigentlichen Datenerfassung durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur einzelne, intakte und verdrillbare DNA-Tether vermessen werden?

5. Messungen

Dieses Kapitel bietet Ihnen eine Schritt-für-Schritt-Anleitung für die Experimente. Bitte lesen Sie das experimentelle Protokoll sorgfältig, wie hier dargestellt.

5.1 Vorbereitung der Durchflusszelle und des Versuchsaufbaus

Die Flusszelle wurde bereits mit Anti-Digoxigenin vorbehandelt und über Nacht gelagert. Um die DNA zu befestigen, bereiten Sie eine DNA-Kugel-Lösung vor und injizieren Sie diese in die Flusszelle. Nach der Inkubation spülen Sie die Mikrofluidik-Kammer mit Puffer (wir verwenden PBS bzw. “phosphate buffered saline”, ein häufig verwendeter Puffer, der den pH-Wert und die Salzkonzentration in Zellen nachahmt), um nicht gebundene Kugeln zu entfernen, und setzen anschließend die Magnete ein. Der Magnet-Offset-Schritt wurde ebenfalls vorher durchgeführt.

Hinweis: Der Magnet-Offset definiert die Referenz-“Null”-Position, die für die Experimente verwendet wird. Alle nachfolgenden Magnetpositionen werden relativ zu diesem Offset gemessen. Um den effektiven Offset zu bestimmen, beginnen Sie mit der Magnetposition leicht oberhalb der Flusszelle und verringern diese vorsichtig in kleinen Schritten (0,01 mm), während Sie die Bewegung der Kugeln genau beobachten. Die Magnetposition, bei der die Bewegung der Kugeln durch das Berühren der Oberfläche der Flusszelle erstmals erkannt wird, wird als Magnet-Offset aufgezeichnet. Dies definiert die Nullposition des Magneten relativ zur Flusszelle.

Ein Schritt-für-Schritt-Protokoll wird unten bereitgestellt. Bevor Sie mit dem folgenden Protokoll beginnen, entfernen Sie den Magnethalter und stellen den Motor auf “Magnet all up” ($\approx 18,9$ mm).

- Spülen Sie die Flusszelle mit 600–800 μL 1x PBS unter Verwendung der Peristaltikpumpe.
- Spülen Sie die Flusszelle mit 300 μL BSA in PBS (jeweils 100 μL auf einmal).
- Füllen Sie den Einlass mit PBS und inkubieren Sie mindestens 1,5 Stunden.
- Spülen Sie die Flusszelle mit 600–800 μL 1x PBS (jeweils 200 μL) und wickeln Sie den Einlass des Flusszellenhalters mit Parafilm ein.
- Reinigung der Kugeln: Geben Sie 2 μL gut gemischte Kugellösung (MyOne superparamagnetische 1 μm -Kugeln) zu 198 μL 1x PBS und mischen Sie kurz durch Vortexen in einem LoBind-Mikrofugentübchen.

- Stellen Sie das Röhr in einen Magnethalter, um die Kugeln auf eine Seite zu ziehen, warten Sie 20 Sekunden und entfernen Sie dann die Lösung.
- Wiederholen Sie den Waschschrift zwei Mal.
- Fügen Sie 50 μL 1x PBS hinzu.

Hinweis: Vortexen Sie die Lösung kurz, um sicherzustellen, dass alle Kugeln im Puffer suspendiert sind, bevor Sie DNA hinzufügen.

- Geben Sie 2 μL DNA-Konstrukt zur Kugellösung und inkubieren Sie einige Minuten, wobei das Mikrofugentübchen waagrecht gehalten wird. Vermeiden Sie das Mischen mit einer Pipette (kann zu DNA-Nicks führen).
- Füllen Sie mit 48 μL 1x PBS auf ein Gesamtvolumen von 100 μL auf.
- Füllen Sie die Kammer mit ca. 50 μL DNA-Kugeln und warten Sie 20 Minuten.

Hinweis: Wenn am Ende keine DNA-Tether beobachtet werden, verwenden Sie die verbleibenden 50 μL der DNA-Kugel-Lösung, um von diesem Schritt neu zu starten.

- Spülen Sie die Kammer mit 1x PBS, bis die Anzahl der frei beweglichen Kugeln stark reduziert ist.
- Stoppen Sie die Pumpe und setzen Sie die Magnete ein. Wenden Sie hohe Kraft an (≈ 5 pN, entspricht 0,6 mm Magnetabstand) und Rotationen (z. B. abwechselnd zwischen 0 und 50 Windungen mit 5 Windungen/s), um unspezifisch gebundene Kugeln zu lösen.
- Entfernen Sie den Magneten und wiederholen Sie den Spülschritt mit PBS, bis keine ungebundenen Kugeln mehr vorhanden sind.
- Setzen Sie die Magnete wieder in den Halter ein.

Hinweis: Ab diesem Punkt sollten die Magnete nie einen größeren Abstand als 10 mm von der Flusszelle für mehr als 20 Sekunden haben, um ein Anhaften der Kugeln an der Oberfläche der mikrofluidischen Kammer zu vermeiden.

Im nächsten Schritt wählen Sie die Kugeln aus, die an einer einzelnen, verdrehbaren DNA-Molekül-Tether gebunden sind.

- Erstellen Sie auf dem Computer einen Ordner, um den Speicherort der Kugelliste zu sichern. Folgen Sie diesem Pfad: ExperimentProgramUI_modV1.vi $\rightarrow$ Path and Settings $\rightarrow$ 'Choose/auswählen'.
- Bewegen Sie die Piezo-Bühne auf/ab (Fenster "MotorUI.vi"), um die Kugeln in den Fokus zu bringen (idealerweise sollten zwei Foki zu erkennen sein: einer für an DNA gebundene Kugeln und einer für unspezifisch an der Flusszellen-Oberfläche befestigte Kugeln).
- Für eine grobe Kontrolle der DNA-gebundenen Kugeln bringen Sie die Magnete etwas näher an die Flusszelle (z. B. 2 mm) und achten auf Kugeln, die Echtzeit-Seitenschwankungen zeigen (aufgrund des Magnetfeldes) im Sichtfeld des Fensters BeadTrackerMain_modV1.vi. Alternativ können die DNA-gebundenen Kugeln mit dem Piezo fokussiert werden, da ihre Muster sich von denen der Oberflächen-Kugeln unterscheiden.

- Suchen Sie weiterhin drei Kugeln, die sich nicht bewegen, d. h. unspezifisch an der Oberfläche befestigt sind, und deren Beugungsmuster sich nicht überlappen. Merken Sie sich deren Positionen. Diese Kugeln können als Referenzkugeln verwendet werden.

Hinweis: Dies gilt nur, wenn die Referenzkugeln aus den festgeklebten MyOne-Kugeln ausgewählt werden. Bei Verwendung von Polystyrol-Kugeln werden Referenzkugeln typischerweise vor Zugabe der DNA ausgewählt.

- Ändern Sie die ROI auf 120.
- Drücken Sie “select beads” und klicken Sie auf “remove all”. Drücken Sie “add” und klicken Sie zuerst auf die drei zuvor gewählten Referenzkugeln. Klicken Sie nun auf alle weiteren DNA-gebundenen Kugeln, deren Beugungsmuster sich nicht überlappen. Stellen Sie sicher, dass die vom Programm um die Kugeln gesetzten Quadrate vollständig im Sichtfeld sichtbar sind. Verwenden Sie keine Kugeln, die zu nah am Rand des Sichtfeldes liegen.
- Drücken Sie “close”, um das Fenster zu schließen, und “save”, um die Kugelliste zu speichern.

Für das Z-Tracking muss für jede einzelne Kugel eine LUT kalibriert werden:

- Stellen Sie im “Tracking”-Panel die Anzahl der Schritte auf 200 mit einer Schrittweite von $0,1\ \mu\text{m}$ ein. Dies definiert den gesamten Z-Bereich, d. h. $20\ \mu\text{m}$.
- Bewegen Sie die Magnete auf einen Abstand von $0,6\ \text{mm}$, um eine hohe Kraft ($\approx 5\ \text{pN}$) anzuwenden, was notwendig ist, um große Fluktuationen der Kugeln während der LUT-Messung zu vermeiden.
- Passen Sie im Fenster “MotorUI.vi” die Brennweite an, um die untere Grenze der LUT festzulegen. Dies geschieht, indem der Piezo (Objektiv) in Bezug auf die Kugeln bewegt wird und das Beugungsmuster der unscharfen Kugeln beobachtet wird.
- Klicken Sie auf “Tracking” in “BeadTrackerMain_modV1.vi” und setzen Sie das aktuelle Piezo-Z als Start-Piezo-Z (untere Grenze der LUT).
- Drücken Sie “Build ZLUT”, um die LUT-Messung zu starten, und warten Sie, bis die Software fertig ist. Speichern Sie die ZLUT.

Hinweis: Falls die Software abstürzt, kann die Kugelliste und die ZLUT erneut geladen werden.

Das Setup ist nun bereit, die Kugeln zu verfolgen. Um sicherzustellen, dass die verfolgten Kugeln an einer einzelnen, aufwickelbaren DNA-Tether gebunden sind, werden vor den eigentlichen Messungen drei Tests durchgeführt:

- Wählen Sie einen Ordner, um die Messungen zu speichern, und vergeben Sie einen Namen für die Messung im Fenster “ExperimentProgramUI_modV1.vi”.

- Der 1. Test dient dazu, DNA-Tether auf die erwartete Konturlänge zu prüfen. Dazu wird der Magnetabstand zur Flusszelle von 0,6 mm bis 10 mm variiert, was etwa ≈ 5 pN bzw. fast null Kraft für die in diesem Experiment verwendeten MyOne-Kugeln entspricht.

Hinweis: Bei einer Magnet-Höhe von 0,6 mm sind die DNA-Tether auf $> 95\%$ ihrer Konturlänge gedehnt, während bei 10 mm (nahe Null-Kraft) die Kugeln die untere Oberfläche berühren, was einer Null-Tether-Extension entspricht.

- Starten Sie die Messung mit dem Button “Run experiment” im Fenster “Experiment-ProgramUI_modV1.vi”.
- Ein neues Fenster wird sich öffnen. Warten Sie, bis die Kamera reagiert (Bildnummer in diesem Fenster), bevor Sie einen anderen Button anklicken.
- Bewegen Sie den Motor auf 10 mm Abstand, warten Sie 10 Sekunden und fahren Sie dann auf 0,6 mm zurück.
- Stoppen Sie die Messung (“abort experiment”).
- Aktivieren Sie “Trace & LUT” im Fenster “BeadTrackerMain_modV1.vi” und klicken Sie durch die Traces. Nur Kugeln mit Tether-Längen nahe der erwarteten Konturlänge der 21 kbp DNA ($\approx 7 \mu\text{m}$) werden für die weiteren Messungen ausgewählt. (Bei diesem Screening werden die Kugeln Nummer 0, 1 und 2, die als Referenzkugeln dienen, nicht berücksichtigt.)

Hinweis: Subtrahieren Sie eine Referenzkugel von den Traces der DNA-gebundenen Kugeln, um deren Z-Extension deutlicher zu erkennen.

- Ändern Sie den Namen der Messung für den 2. Test.

Hinweis: Die 2. Messung dient dazu, zu prüfen, ob eine Kugel an mehreren DNA-Tether gebunden ist, und die Kugeln auszuwählen, die nur an einem einzelnen Doppelstrang-DNA-Molekül-Tether befestigt sind. Dies wird durch die asymmetrische mechanische Reaktion der DNA auf Unter- und Überwindung bei verschiedenen Dehnkräften erreicht.

- Stellen Sie sicher, dass der Motor auf einen Abstand von 0,6 mm (≈ 5 pN) eingestellt ist.
- Starten Sie die Messung.
- Drehen Sie die Motoren auf -70 Umdrehungen (bei 2 U/s), d. h. negative Drehungen unter hoher Spannung.
- Drehen Sie zurück auf 0 Umdrehungen bei gleicher Dehnkraft (≈ 5 pN).
- Stoppen Sie die Messung.
- Überprüfen Sie die Traces auf Kugeln, die sich nicht wie erwartet verhalten, und löschen Sie diese mit “Discard bead”.

Hinweis: Kugeln, die eine Abnahme der Tether-Länge zeigen, werden als an mehrere DNA-Moleküle gebunden angenommen.

- Ändern Sie den Namen der Messung für den 3. Test.

Physikalischer Hintergrund: Ein DNA-Nick ist ein Bruch in nur einem der beiden DNA-Stränge. Dadurch wird die torsionale Kopplung des DNA-Moleküls aufgehoben: Eingebraachte Drehungen können sich an der Bruchstelle entspannen und werden nicht mehr als Torsionsspannung im gesamten Molekül gespeichert. Im Rotationsexperiment zeigt sich ein solcher Nick daher durch eine deutlich veränderte Rotationskurve, insbesondere durch das Ausbleiben oder die starke Abschwächung der typischen Verkürzung der Tether-Länge nach dem Buckling.

Hinweis: Dieser Test überprüft, ob unter den ausgewählten Kugeln eine torsionsfrei bewegliche Tether (mit Unterbrechungen oder Nicks) vorhanden ist.

Hinweis: Der 3. Test wird typischerweise zusammen mit dem 2. Test durchgeführt, sodass beide Tests gemeinsam geplottet werden können. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Auswertung der beiden Eigenschaften und vereinfacht die Übersicht über die Kugeln bei der Ergebnisaufzeichnung.

- Drehen Sie +70 Umdrehungen bei einem Magnetabstand von 3,7 mm ($\approx 0,5$ pN) und drehen Sie zurück auf 0 Umdrehungen, wobei derselbe Magnetabstand (d. h. gleiche Dehnkraft) beibehalten wird. Überprüfen Sie die Traces und verwerfen Sie Kugeln, die sich nicht wie erwartet verhalten.

Hinweis: Eine Kugel, die an einer einzelnen, aufwickelbaren DNA gebunden ist, zeigt Buckling und eine entsprechende Verkürzung der Tether-Länge, im Gegensatz zu DNA-Molekülen mit Nicks.

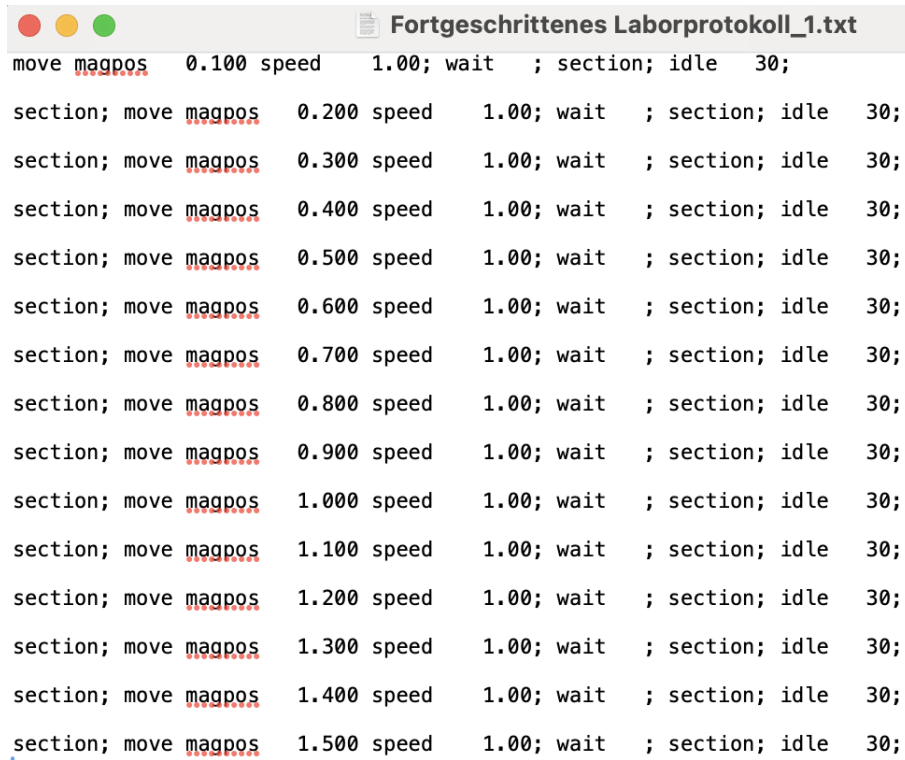
- Nur Kugeln, die alle diese Tests bestehen, werden für die Experimente berücksichtigt.

5.2 Experiment 1: Kraft-Dehnungs-Messung

5.2.1 Kraftkalibrierung aus lateralen Fluktuationen

Für jeden im Protokoll verwendeten Magnetabstand werden neben der z-Position auch die lateralen x-y-Fluktuationen der Kugeln aufgezeichnet. Bestimmen Sie aus der Varianz der x-Fluktuation und mithilfe des Equipartitionstheorems die Kraft. Tragen Sie die so bestimmten Kraftwerte gegen den Magnetabstand auf. Die resultierende Kraft-Magnetpositions-Kurve wird mit einer doppelten Exponentialfunktion angepasst und anschließend zur Bestimmung der Kraftwerte für die Kraft-Dehnungs- und Rotationsmessungen verwendet.

Verfolgen Sie die Positionen der Kugeln (x, y, z) , indem Sie die Magnetposition relativ zur Flusszelle variieren. Ein Beispiel für ein Messprotokoll ist in **Abbildung 5.1** dargestellt. Beginnen Sie mit der höchsten Kraft im Protokoll. Bevor Sie das Skript ausführen, drücken Sie im Fenster “ExperimentProgramUI.vi” auf “Simulate script”.



```

move magpos 0.100 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.200 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.300 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.400 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.500 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.600 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.700 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.800 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.900 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.000 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.100 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.200 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.300 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.400 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.500 speed 1.00; wait ; section; idle 30;

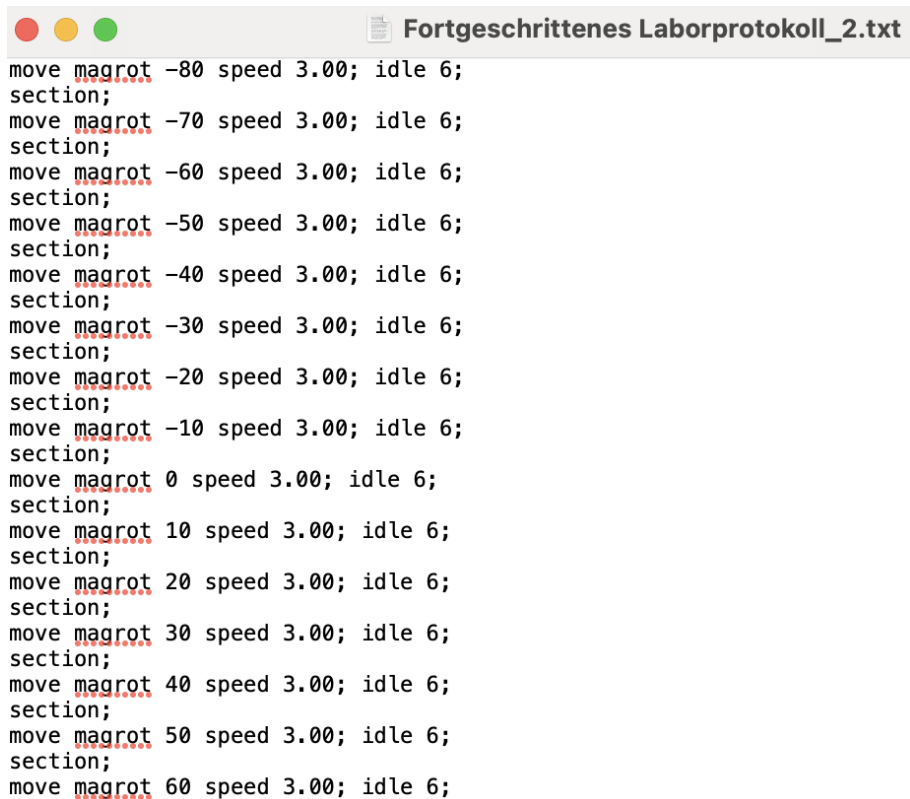
```

Abbildung 5.1: Ein Beispiel für ein Skript zur Kraft-Dehnungs-Messung. Bewege die Position des Magneten schrittweise; der Wert nach “magpos” gibt den absoluten Abstand der Magnete von der Durchflusszelle an. Die Zahl nach “idle” definiert die Zeit in Sekunden, während der Frames aufgezeichnet werden. Der Geschwindigkeitswert sollte stets wie im Beispiel verwendet werden (Z-Motor = 1,0).

5.3 Experiment 2: Rotations-Extensions-Messung

Hier wird die Ausdehnung der DNA-Tether beim Drehen der Magnete getestet. Messen Sie dazu Rotationskurven von -70 bis +70 Windungen in Schritten von 2 Windungen bei Kräften von 5,0 pN, 2,0 pN, 1,5 pN, 1,0 pN, 0,7 pN und 0,5 pN. Beginnen Sie mit der höchsten Kraft. Es wird empfohlen, für jede Kraft eine neue Messung zu starten, um die Analyse zu erleichtern. Eine Messzeit von 6 s pro Windung ist ausreichend. Alternativ kann das in **Abbildung 5.2** dargestellte Protokoll bei unterschiedlichen Kräften ausgeführt werden.

Die in diesem Experiment verwendeten Kraftwerte werden aus der in Experiment 1 bestimmten Kraft-Magnetpositions-Kalibrierung entnommen.



```

move magrot -80 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -70 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -60 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -50 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -40 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -30 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -20 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -10 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 0 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 10 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 20 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 30 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 40 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 50 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 60 speed 3.00; idle 6;

```

Abbildung 5.2: Ein Beispiel für ein Skript zur Rotations-Extensions-Messung. Der Wert nach “magrot” gibt die absoluten Werte des Rotationsmotors an. Die Zahl nach “idle” definiert die Zeit in Sekunden, während der Frames aufgezeichnet werden. Die Geschwindigkeitswerte sollten stets wie im Beispiel verwendet werden (Rotationsmotor = 3,0). Jeder “section”-Block speichert die Frame-Nummern in einer Textdatei, was die Zuordnung der Motormovements für die Analyse erleichtert.

6. Auswertung

Die hier aufgeführten Aufgaben dienen nur als Inspiration. Sollte Sie einen anderen Aspekt analysieren wollen, der Ihnen besonders interessant erscheint, können Sie dies gerne tun.

6.1 Auswertung von Experiment 1

- Bestimmen Sie für jeden Magnetabstand aus der Varianz der lateralen x-Fluktuation und mithilfe des Equipartitionstheorems die Kraft. Erstellen Sie ein Diagramm der Kraft gegen den Abstand der Magnete von der Flusszelle, ähnlich wie in **Abbildung 3.3**, und passen Sie eine doppelte Exponentialfunktion an Ihre Daten an. Verwenden Sie diese Kalibrierkurve, um die Kraftwerte für die Kraft-Dehnungs- und Rotationsmessungen zu bestimmen.
- Erstellen Sie ein Diagramm der Kraft-Dehnungs-Kurve des DNA-Moleküls und fitten Sie sowohl das FJC- als auch das WLC-Modell an. Bestimmen Sie die Kuhn-Länge (FJC) sowie die Persistenzlänge (WLC). Wie vielen Basenpaaren entspricht die aus dem WLC-Fit bestimmte Persistenzlänge? Welche physikalische Bedeutung hat diese Länge? Vergleichen Sie Ihre Werte mit der Literatur. Vergleichen Sie die Qualität der FJC- und WLC-Beschreibungen im untersuchten Kraftbereich. In welchen Bereichen zeigen die Modelle systematische Abweichungen von den Messdaten? Diskutieren Sie mögliche physikalische Ursachen.

6.2 Auswertung von Experiment 2

- Erstellen Sie ein Diagramm der Länge der DNA in Abhängigkeit von der Anzahl der Drehungen für jede Kraft.
- Erklären Sie die Unterschiede der Diagramme für alle Kräfte.
- Bestimmen Sie die ungefähre Größe einer Supercoil.
- Bestimmen Sie den Knickpunkt n_b und das Knickmoment Γ_b für alle Kräfte und ermitteln Sie die Torsionssteifigkeit der DNA.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Cocco, J. F. Marko, and R. Monasson. Theoretical Models for Single-Molecule DNA and RNA Experiments: From Elasticity to Unzipping. *Comptes Rendus. Physique*, 3(5):569–584, 2002.
- [2] D. Dulin. An introduction to magnetic tweezers. In I. Heller, D. Dulin, and E. J. G. Peterman, editors, *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, volume 2694 of *Methods in Molecular Biology*, pages 375–401. Humana Press, New York, NY, 3 edition, 2023.
- [3] J. Lipfert, J. W. J. Kerssemakers, T. Jager, and N.H. Dekker. Magnetic Torque Tweezers: Measuring Torsional Stiffness in DNA and RecA-DNA Filaments. *Nature Methods*, 7(12):977–980, 2010.
- [4] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule. *Science*, 1996.
- [5] I. D. Vilfan, J. Lipfert, D. A. Koster, S. G. Lemay, and N. H. Dekker. Magnetic tweezers for single-molecule experiments. In P. Hinterdorfer and A. van Oijen, editors, *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, pages 371–395. Springer US, New York, NY, 2009.

FP12

Magnetic Tweezers Experiments to Probe DNA Mechanics

Praktikum für Fortgeschritten
October 2, 2026



Universität
Augsburg
University

Experimentalphysik I
Institut für Physik
Universität Augsburg

Dr. Prithwidip Saha, Prof. Dr. Jan Lipfert and Leonhard Schatt

Diese Versuchsanleitung gibt es in Deutsch und Englisch. Bei englischsprachigen Assistentinnen/Assistenten dient die englische Version dazu die entsprechende englische Terminologie zu vermitteln

Summary

Magnetic Tweezers

Forces and mechanical properties of biological macromolecules play an important role in biology, biophysics, and (bio)nanotechnology applications. Single-molecule magnetic tweezers are a biophysical method that can be used to investigate the mechanical properties of individual biomolecules, in particular DNA, RNA, or proteins. In the magnetic tweezers, molecules are fixed to a surface and bound at their other end to superparamagnetic beads approximately $1\text{ }\mu\text{m}$ in size. External magnetic field are used to exert defined stretching forces and torques on the beads and thus on the molecules. In this experiment, we investigate the behavior of DNA under different forces (so-called “force-extension curves”) and measure DNA supercoils, i.e., additional coils of the double-stranded DNA helix.

Contents

1	Introduction	1
2	Theory	4
2.1	Force-extension behaviour of molecules	4
2.1.1	Freely-jointed chain model (FJC)	4
2.1.2	Worm-like chain model (WLC)	6
2.2	Double-stranded DNA under force and torque	7
2.2.1	Force calibration	7
2.2.2	Applying twists to DNA molecules	9
3	Setup	11
3.1	Experimental setup	11
3.2	Software	13
3.3	Flow cell and attachment chemistry	13
4	Notes on this experiment	17
4.1	Questions for understanding	17
5	Measurements	19
5.1	Preparation of flow cell and instrument setup	19
5.2	Experiment 1: force-extension measurement	24
5.2.1	Force calibration from lateral fluctuations	24
5.3	Experiment 2: rotation-extension measurement	25
6	Analysis	26
6.1	Analysis for experiment 1	26
6.2	Analysis for experiment 2	26

1. Introduction

Mechanical properties and physical forces play important roles in many biological processes. An important example is DNA, which carries the genetic code and is increasingly used in a range of biotechnological applications. Our genetic information is stored in the sequence of DNA bases (A, C, T, and G). However, DNA is not just an abstract information carrier written in a four-letter alphabet, but also a physical polymer that is highly negatively charged and has distinct bending and torsional stiffnesses. These physical properties of DNA play crucial roles in the storage, readout and regulation of genetic information. For example, each of our cells contains more than 1 m of DNA, which must be stored in a $\approx 10\text{ }\mu\text{m}$ -sized nucleus. In addition, the binding of proteins to DNA molecules often induces a conformational change that can determine whether a gene is active or not. As all biological processes are influenced by the underlying physical properties of the molecules involved, the study of their mechanical properties is of great interest. There are several single-molecule techniques such as the atomic-force microscopy (AFM), optical tweezers (OT) or magnetic tweezers (MT), that can be used to measure mechanical parameters of molecules such as DNA or proteins at the single-molecule level.

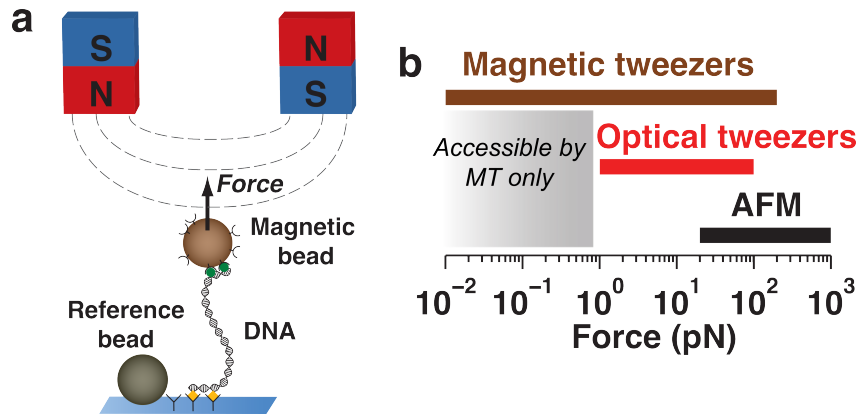


Figure 1.1: (a) Principle of a MT setup: a superparamagnetic bead is attached to the DNA molecule using specific binding, while the other end is attached to the bottom of the flow cell through antibody binding. Permanent magnets are placed above the flow cell and exert a magnetic force on the bead. The stretching force and the rotation of the DNA molecule can be controlled by controlling the magnets position in translation and rotation. (b) Schematic illustrating the force range accessible to various single molecule techniques, extending up to several tens of picoNewtons (pN), a range relevant to probe biological processes at the molecular level. MT are particularly well suited for the precise measurement at very low forces.

In MT, a superparamagnetic bead is attached to the molecule of interest (here, DNA), while the other end is attached to the bottom of the flow cell. Two permanent magnets placed in a vertical configuration just above the flow cell exert a magnetic field that

induces a magnetic force on the magnetic bead and thus on the DNA molecule (**Figure 1.1**). The gradient of the magnetic field is nearly constant over typical molecule sizes, which implies that the magnetic force is constant over the field of view for a given distance of the magnets to the field cell. In contrast, OT and AFM measurements typically control molecular extension while the force fluctuates. Therefore, constant force measurements in OT and AFM require a feedback loop.

In MT, an inverted microscope and a CMOS sensor camera is used to track the magnetic bead's movement out-of-focus. From the bead's diffraction pattern, its three dimensional position (x , y , and z), and thus the DNA molecule's extension, can be determined. In addition, stretching force acting on the DNA molecule can be calibrated. Furthermore, DNA molecules can be twisted by rotating the external magnets.

In this advanced lab course, you will gain hands-on experience with the practical techniques of magnetic tweezers and the subsequent data analysis. The experiments focus on investigating the mechanical properties of DNA. You will learn the principles of a conventional magnetic tweezers setup, perform standard force-extension measurements of double-stranded DNA, and conduct rotational experiments to observe DNA supercoiling.

Learning objectives

After completing the experiment, you will be able to . . .

1. explain the operating principle of magnetic tweezers and distinguish them from optical tweezers,
2. determine the force acting on a magnetic bead from its Brownian fluctuations,
3. describe force-extension data of a single DNA molecule using the FJC and WLC models,
4. determine the persistence length and Kuhn length from experimental data,
5. explain how torsional stress and supercoiling arise in DNA,
6. determine a buckling point from a rotation-extension curve,
7. estimate the torsional stiffness of DNA from the measurement data,
8. discuss experimental deviations from the idealized models.

2. Theory

Double-stranded DNA molecules are typically much longer than their diameter of ≈ 2 nm. The length of double-stranded DNA depends on the number of base pairs, with each base pair contributing ≈ 0.34 nm. For the 3 billion base pairs of the human genome, the total contour length is ≈ 1 m. In this work, we use a 21,000 bp DNA molecule, which is approximately $7 \mu\text{m}$ long—more than 1,000-fold longer than its width. For such chain-like molecules, statistical models can be applied to describe their response to stretching forces.

In this laboratory course, you will perform force-extension measurements on double-stranded DNA, which means to apply various stretching forces and observe the DNA's tether extension. In a second experiment you will apply turns to the DNA molecule and study its behavior upon analyzing changes in the DNA's length. This chapter covers briefly the theoretical background that is needed to do this laboratory course.

Table 2.0.1: Notation of the key quantities used in this chapter.

Symbol	Meaning	Unit
L_c	DNA contour length	μm
z	measured extension	μm
F	stretching force	pN
L_p	persistence length	nm
l_K	Kuhn length	nm
C	torsional stiffness	pN nm^2
n	number of applied turns	1

2.1 Force-extension behaviour of molecules

In order to describe the response of constant forces acting on biological macromolecules, we would like to introduce two typical theoretical models, the freely-jointed chain model (FJC) and the worm-like chain model (WLC). The first model (FJC) considers the molecule as a chain, consisting of rigid segments, while the other model (WLC) considers the molecule as an isotropic rod that is continuously flexible.

2.1.1 Freely-jointed chain model (FJC)

The FJC model considers a polymer of total length L that consists of N monomers each with the same length l (Kuhn-length):

$$L = N \cdot l$$

$\vec{R}$ is the end- to- end vector of the molecule, describing the "actual" size of the molecule in its environment. All segments are described by a vector $l \cdot \vec{r}_i$. The FJC model assumes that there are no interactions between the monomers and the bond between two vectors $\vec{r}_i$ and $\vec{r}_{i+1}$ is perfectly flexible (and the chain, therefore, performs a random walk), see **Figure 2.1**. All conformations of the polymer are equally likely to occur in solution. If an external force $\vec{F} = f \cdot \vec{e}_z$ acts on the molecule, the potential energy E_{pot}^α of the molecule in a particular angular conformation α is:

$$E_{pot}^\alpha = - \sum_{i=1}^N \vec{F} \cdot l \cdot \vec{r}_i = -l \cdot f \sum_{i=1}^N \cos \theta_i \quad (2.1.1)$$

Where θ is the angle between one monomer and f the force acting in z- direction.

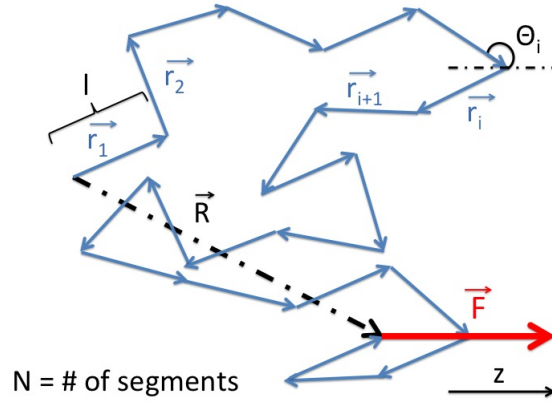


Figure 2.1: In the FJC model a polymer is considered to consist of N rigid segments with length l . Also shown in this figure is the definition of the end- to- end vector $\vec{R}$, which is spanned from the first segment to the last segment of the polymer.

The response (extension) of a molecule to a force acting on it, can be derived through statistical mechanics. A canonical ensemble is a statistical ensemble to represent all possible states of a mechanical system that is in thermal equilibrium. In a canonical ensemble the volume V , the number of particles N and the temperature T are considered constant. The canonical partition sum Z can be defined using the following formula and inserting equation (2.1.1) leads to the following result:

$$Z = \sum_{\alpha} e^{\frac{-E_{pot}^\alpha}{kT}} = \sum_{\alpha} \prod_{i=1}^N e^{\frac{fl \cos \theta_i}{kT}} = \left(\sum_{\alpha} e^{\frac{fl \cos \theta}{kT}} \right)^N \quad (2.1.2)$$

Where k is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature.

Due to the fact that the angle is continuous, the sum can be replaced by an integral, integrating over the whole space:

$$Z = \left(\int d\Omega \cdot e^{\frac{fl \cos \theta}{kT}} \right)^N = \left(\frac{2\pi kT}{fl} \sinh\left(\frac{fl}{kT}\right) \right)^N \quad (2.1.3)$$

Inserting this to the definition of the *Gibbs free energy* $G = -kT \cdot \ln(Z)$ the (mean) extension z of the molecule due to the force $\vec{F}$ acting on it can be calculated:

$$\langle z \rangle = -\frac{\delta G}{\delta f} = L \cdot \left(\coth\left(\frac{fl}{kT}\right) - \frac{kT}{fl} \right) \quad (2.1.4)$$

2.1.2 Worm-like chain model (WLC)

In comparison to the FJC model, the WLC model considers the molecule as a continuously flexible chain, see **Figure 2.2**.

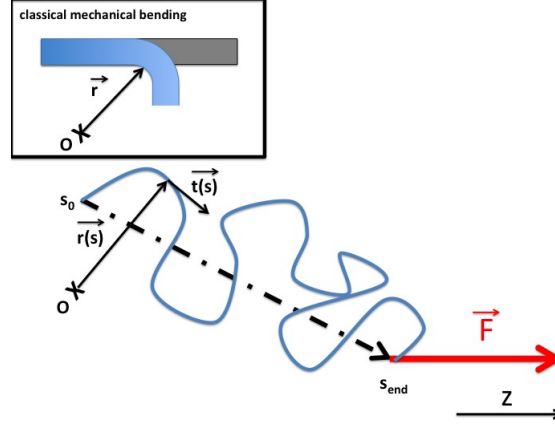


Figure 2.2: The worm-like chain is comparable to the classical mechanical bending of a rod, see black box on the top left. The molecule of length L_c is parametrized by points s on the molecule. Vector $\vec{r}(s)$ points to the chain whereas $\vec{t}(s)$ is the tangential vector to point s .

The chain consists of segments s with length ds , with $s \in [0, L_c]$, where L_c is the contour length of the molecule. $\vec{t}(s)$ are the tangent vectors to each point s . If a force $\vec{F}$ is acting on the molecule, it acts on each tangential vector. Therefor the formula of the energy E^{WLC} ends up in an integral, integrating over the whole length of the molecule:

$$E = \int_0^{L_c} ds \cdot \vec{t}(s) \cdot \vec{F} = f \cdot \int_0^{L_c} ds \cdot \vec{t}(s) \cdot \vec{e}_z \quad (2.1.5)$$

Generally the worm-like chain is solved in analogy to the freely-jointed chain: first, one defines the energy for one conformation (E_α^{WLC}) of the polymer and second, one calculates the partition sum. In order to integrate over all conformations, one has to perform a path integral $D(\vec{t}(s))$, integrating over all tangent vectors in point s . Here, we keep the mathematics to a minimum. Consider that the polymer behaves like a bar that is bend by a force $\vec{F}$ (classical mechanics), see **Figure 2.2**, black box. The energy to deform a bar is proportional to $\frac{1}{R^2}$, where R is the radius of the bending circle. Taking into account that $(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s})^2 = \frac{1}{R^2}$ we get:

$$E_\alpha^{WLC} = \int_0^{L_c} ds \cdot \left(\frac{A}{2} \cdot \left(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s} \right)^2 \right) \quad (2.1.6)$$

Where $A = kT \cdot L_P$. L_P is called persistence length and defines the rigidity of the chain. Segments, smaller than the persistence length behave like a rigid rod. Segments

larger than the persistence length are flexible and can be bend. An exact solution of the WLC model is hard to derive, as one has to perform the path integral:

$$\int_{\vec{t}(0)}^{\vec{t}(L)} D(\vec{t}(s)) \cdot \exp\left(-\frac{L_P}{2}\right) \cdot \int_0^L ds \left(\frac{\delta \vec{t}(s)}{\delta s}\right)^2 \quad (2.1.7)$$

Instead of an exact numerical solution one often uses an approximate interpolation formula, which is sufficiently accurate to analyse experimental data:

$$\frac{f L_P}{kT} = \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \cdot (1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \quad (2.1.8)$$

Where f is the force acting on the molecule, L_P is the persistence length, z is the extension and L_C is the total length of the molecule.

A key point here is that it requires energy (supplied by the external -magnetic, in this case- force) to stretch a polymer in the FJC or WLC model, despite the fact that the model assumes that there are no interaction between the segments. The reason is that there are many conformation of the polymer where the ends are close together and only few (in the extreme case of being fully stretched only one) configuration with the ends far apart. Stretching the polymer is, therefore, entropically unfavourable and this situation is sometimes called an “entropic spring”.

2.2 Double-stranded DNA under force and torque

In this chapter, we explain how the stretching force on the bead is calibrated in a magnetic tweezers setup and how DNA reacts to induced torques.

2.2.1 Force calibration

In a magnetic tweezers setup, magnets exert a magnetic field and thus a magnetic force on a magnetic bead. This bead is attached to one end of the DNA molecule (via multiple biotin-streptavidin linkages), while the other end is attached to the bottom of the flow cell via antibody binding, see **Figure 2.3**. The bead transfers the force to the molecule: it can be stretched and twisted simply by controlling the magnets position in translation and rotation.

The stretching force is calibrated using the fluctuations of the magnetic bead in solution, which are caused by Brownian motion. The setup can be seen as an inverted pendulum, see **Figure 2.3**.

The force ($\vec{F}_m$) on the bead is pointing in z-direction. Due to Brownian motion the bead fluctuates around its origin. A restoring force ($\vec{F}_R$) forces the bead always back to its initial position. Using the angular deviation Θ and the bead’s transverse fluctuations δx the force is defined:

$$\vec{F}_R = \sin \Theta \cdot \vec{F}_m \approx \frac{\delta x}{\langle z \rangle} \cdot \vec{F}_m \quad (2.2.9)$$

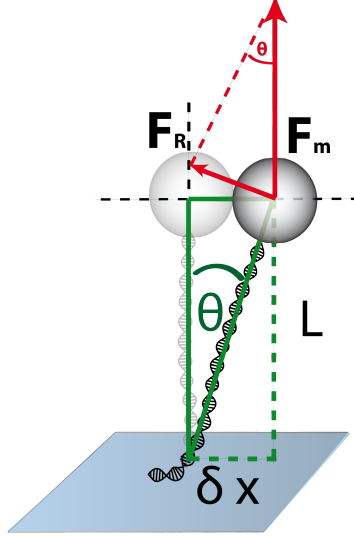


Figure 2.3: The magnets exert a force $\vec{F}_m$ on the magnetic bead. The force can be calibrated using the deviation δx of the bead from its original position, which is due to Brownian motion. The length of the molecule is labeled with L , the angular deviation is called Θ and $\vec{F}_R$ is the restoring force acting on the bead.

We find that the bead is in a harmonic potential with spring constant $\kappa = \frac{F_m}{\langle z \rangle}$. By the equipartition theorem, each degree of freedom has $\frac{1}{2}k_B T$ energy in thermal equilibrium:

$$\frac{1}{2} \cdot \kappa \cdot \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.2.10)$$

Inserting the spring constant and solving the equation for F_m , we can calculate the force acting on the bead:

$$F_m = \frac{k_B T \langle z \rangle}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (2.2.11)$$

where, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, $\langle z \rangle$ is the mean extension of the DNA tether, and $\langle \delta x^2 \rangle$ is the variance of the bead's lateral fluctuations.

In other words, the force can be calibrated by measuring the the x-y movement of the bead for a sufficiently long time. To ensure reliable force-extension measurements, the experimental protocol must account for the system's characteristic relaxation time (τ) to determine the total measurement time (t) required for statistical accuracy. The relaxation time defines time scale of the bead undergoing thermal fluctuations within the harmonic trap. It is calculated as the ratio of the friction coefficient (γ) to the trap's spring constant (k):

$$\tau = \frac{\gamma}{k}$$

The trap stiffness k in the magnetic tweezers is given by the ratio of the applied force to the measured extension of the DNA tether $\frac{F}{\langle z \rangle}$. Consequently, higher forces result in a shorter relaxation times and thus faster bead fluctuations.

To reach a desired statistical accuracy (ϵ), the measurement time must be significantly

longer than the relaxation time (τ), long enough to sample these fluctuations sufficiently. You can think about the accuracy improving with $\sqrt{N}$, where N is the number of independent measurements. In this case, each measurement of duration τ can be thought of as another independent measurement. For forces above 1 pN, the minimum measurement time τ_{measure} is estimated as:

$$\tau_{\text{measure}} \approx \frac{12\pi^2\eta R l_0}{F\epsilon^2}$$

where, η is the fluid viscosity, R is the bead radius, and l_0 is the DNA contour length.

This relationship implies that data collection time must be increased when working with longer DNA tethers or simply when aiming for higher precision (smaller ϵ , typically 5% or 10%) to ensure statistically meaningful force–extension measurements.

2.2.2 Applying twists to DNA molecules

In addition to applying stretching forces, MT can also twist DNA molecules. In a typical measurement, the DNA is held at a constant stretching force and is either overwound or underwound by n turns. DNA is a right handed molecule and behaves (for forces larger 1 pN) different upon the direction of applied turns. Positive turns twist DNA with its helical nature, while negative turns twist the molecule against its intrinsic helicity. The response of DNA to applied turns depends on the stretching force. For forces smaller 1 pN, DNA behaves symmetric according to the applied number of turns, see **Figure 2.4A** (left column). For a small number of turns the molecule's extension stays constant, while the molecular torque increases linearly. Beyond the buckling transition (indicated with blue squares for 0.9 and 1.1 pN) the molecule's extension decreases linearly, while the molecular torque stays constant. At the buckling transition it is energetically more favorable to form DNA plectonemes as indicated by coarse-grained simulations in 2.4B in contrast to staying overwound. In the post-buckling regime every turn of the molecule leads to the formation of a DNA supercoil. For higher stretching forces (> 1 pN) the respond of DNA upon the direction of applied turns is asymmetric. While in general the buckling point shifts to a larger number of applied turns with higher stretching forces, there is no buckling point in negative direction, see **Figure 2.4A** (right column). Instead torque-induced melting occurs at -10 pN·nm. Torsional stress is hereby released by local basepair breaks.

At the buckling point (n_b) the DNA's extension is reduced due to the formation of plectonemic supercoils. The change in the end-to-end distance corresponds to the part of DNA that forms DNA supercoils. A simple model for DNA buckling and supercoiling is as follows. In the pre-buckling regime, when the DNA remains approximately straight, the torque and torsional energy increase as the molecule is twisted more and more with the number of applied turns:

$$E_{\text{torsion}} = 2\pi n \cdot \Gamma \quad (2.2.12)$$

$$\Gamma = \frac{C}{L} \cdot 2\pi n \quad (2.2.13)$$

where Γ is the torque and C is the torsional stiffness.

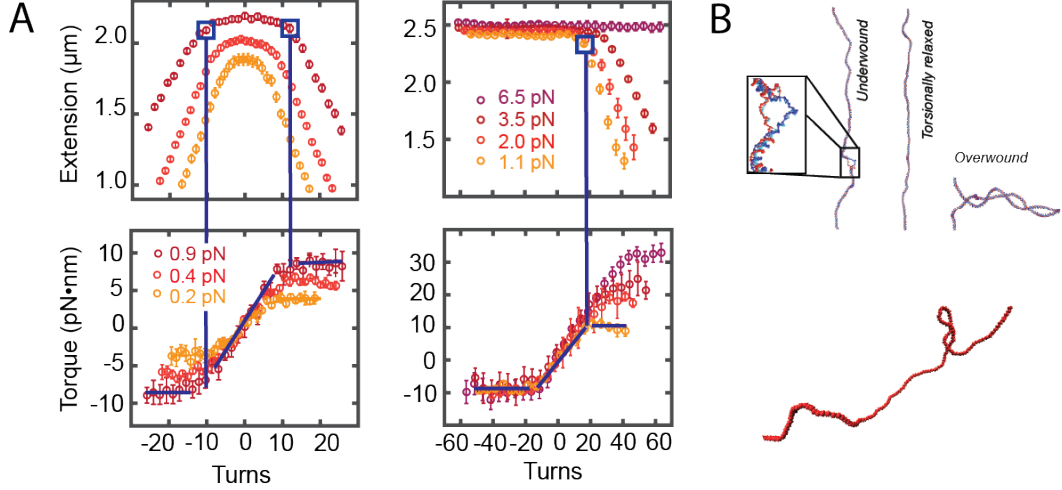


Figure 2.4: (A) Extension (top) and torque vs. applied number of turns (bottom) for different stretching forces. Buckling points (n_b) are indicated for 0.9 pN and 1.1 pN in the extension vs. turns plot with a blue square. Torque measurements were obtained using magnetic torque tweezers, a specialized type of magnetic tweezers. (B) Coarse-grained DNA simulations show torsionally relaxed DNA, underwound DNA (upon torque-induced melting at -10 pN·nm) and overwound DNA with the formation of DNA plectonemes.

At the buckling point (n_b) the twist energy $E_{torsion}$ of the molecule corresponds to the energy that is needed to form such a loop (E_{loop}). E_{loop} has two contributions: the work W that is needed to shorten the DNA and E_{bend} to bend the DNA strand.

$$E_{torsion}(n_b) = E_{loop} = W + E_{bend} \quad (2.2.14)$$

In our simple model, one supercoil is approximated as a circular loop with radius r . The work, needed to reduce the length of the DNA molecule against the force F is

$$W = -2\pi r F \quad (2.2.15)$$

while the energy for the bending to perform one loop is (see the WLC section)

$$E_{bend} = \int_0^{2\pi r} ds \frac{A}{2} \frac{1}{r^2} = \pi A \frac{1}{r} \quad (2.2.16)$$

Minimizing the looping energy with respect to r , one can derive the optimal radius r^* of the loop

$$r^* = \sqrt{\frac{A}{2F}} \quad (2.2.17)$$

Having the radius, one can calculate the buckling torque Γ_b and the number of turns n_b where the buckling takes place.

$$\Gamma_b = \sqrt{2AF} = \sqrt{2L_P k T F} \quad (2.2.18)$$

$$n_b = \frac{L}{2\pi C} \cdot \sqrt{2AF} \quad (2.2.19)$$

3. Setup

This chapter describes the experimental setup, the software used to control the instrument, and the fabrication of the flow cells used in this experiment.

3.1 Experimental setup

In MT, the molecule of interest (here, DNA) is attached to the surface of a flow cell and on the other side to a superparamagnetic bead (**Figure 3.1**). A pair of permanent magnets placed above the flow cell exert magnetic fields, which in turn induce magnetic forces on the superparamagnetic bead. The stretching force can be controlled by changing the permanent magnets position, i.e. translating it closer and further away from the flow cell surface. The molecules' rotation can be controlled by rotating the magnets. The flow cell is mounted on a flow cell holder, such that the flow cell is placed on top of an oil immersion objective. The objective can be moved up and down very precisely using a piezo, which is in particular needed to perform a "look up table" (LUT) for z-tracking. To control liquid exchange, a peristaltic pump is connected to the flow cell. A LED monochromatically illuminates the flow cell through the gap (1 mm) of the magnet assembly. Images of the illuminated area are taken by a CMOS camera and transferred to a computer where image analysis is performed. The DNA tether is not directly observed in the MT, instead the bead positions are tracked and used for data analysis.

Measurements of beads are performed out-of-focus. The diffraction pattern of the beads is used in order to track the tether extension along z (**Figure 3.2**). A calibration of the bead's diffraction pattern is performed prior to the measurement. For the calibration, the magnets are brought close to the flow cell to exert large stretching forces which reduce the fluctuations of the bead itself. The position of the objective can be controlled by a piezo. In order to create a LUT, the objective's position is moved in sub- μm steps and the bead's diffraction pattern is captured. To get precise information in vertical direction, the software interpolates between each picture and creates the LUT. During the measurement, the piezo is kept at a fixed position and the current diffraction pattern of the beads are compared to the LUT, which returns the z-position of the bead and, therefore, the extension of the molecule. For the lateral position of the bead, the center of the diffraction rings are calculated via cross-correlation.

To reduce the effect of mechanical drift, which can disturb the measurements in lateral as well as in vertical direction, reference beads are tracked. These reference beads are polystyrene beads that are stuck to the flow cell surface. To correct for drift, the recorded trace of a reference bead is subtracted from the DNA-bound magnetic beads under study.

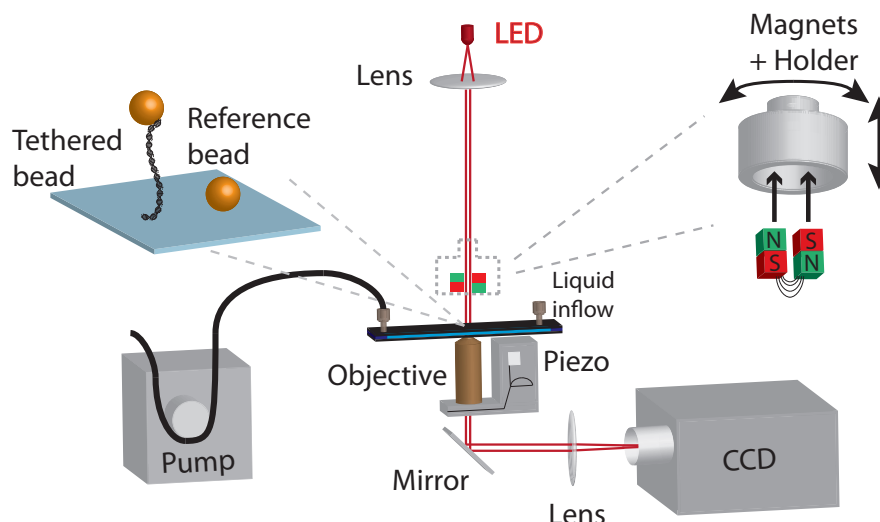


Figure 3.1: Overview of a MT setup. A pair of permanent magnets is placed on top of the flow cell. The light of the LED illuminates the sample from above. The light is directed to a camera via a mirror and a lens.

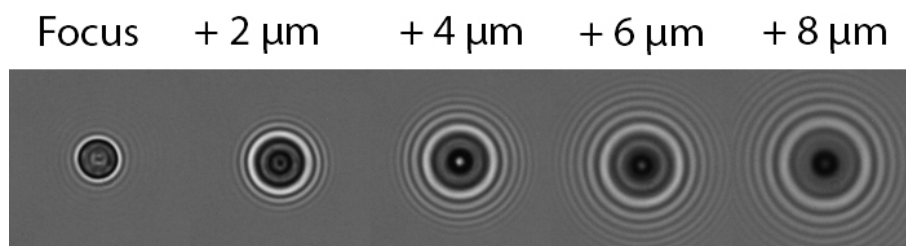


Figure 3.2: Tracked pictures of magnetic beads. The bead's diffraction pattern changes depending on its distance from the objective's focal plane. This feature is used to determine the extension of bead-bound DNA.

You will be asked to perform a force calibration of the MT setup as well as force-extension measurements for DNA molecules. **Figure 3.3** illustrates the forces as a function of the height of the magnets above the flow cell used in this laboratory course and can be used to write measurement protocols.

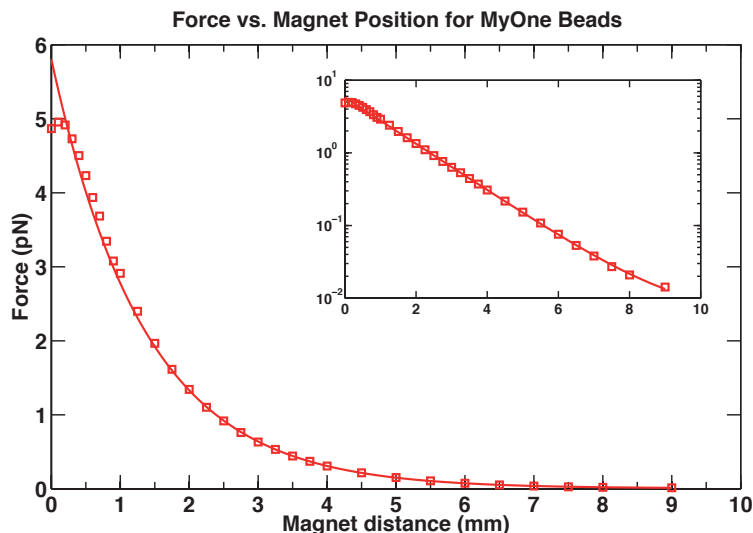


Figure 3.3: Example of a force vs. magnet position calibration for the MT setup used in this lab course with MyOne beads. The solid line is a double-exponential fit to the measured values. Inset: the data on a semi-log plot with logarithmic y-axis, and linear x-axis

3.2 Software

The software to control the instrument is written in LabVIEW. The piezo stage and both motors responsible for magnet translation and rotation, can be controlled using the software. The peristaltic pump to exchange fluids has to be used manually.

The software consists of three separated windows (see **Figure 3.4** and **3.5**). A live image of the field of view of the flow cell is shown in “BeadTrackerMain_modV1.vi” window. Basic setup configurations, selection of beads and the LUT are made in this window. Motors and the piezo stage are controlled in “MotorUI.vi”. “ExperimentProgramUI_modV1.vi” contains all options to start and control the measurements. The bead positions are tracked in real time and saved in text files including the motor positions.

3.3 Flow cell and attachment chemistry

The flow cell (**Figure 3.6a**) provides the measurement chamber for the magnetic tweezers. Two microscope cover slips separated by a soft melted parafilm spacer provide a $\approx 25 \mu\text{L}$ microfluidic chamber. The top cover slip has two holes (inlet and outlet) for fluid exchange in the flow cell. The bottom coverslip is functionalized with (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane followed by incubation with anti-digoxigenin for DNA attachment. The linear 21 kbp DNA has two “handles”, i.e. DNA segments at the end that serve as attachment points. Each handle is approximately 600 bp long and contains several nucleotides with biotin (biotin handle) or digoxigenin groups (digoxigenin handle). The biotin handle binds to a streptavidin coated $1 \mu\text{m}$ diameter superparamagnetic bead and the digoxigenin labeled end of the DNA binds to the anti-digoxigenin coated surface of the flow cell (**Figure 3.6b**). Often, $1 \mu\text{m}$ diameter polystyrene beads are used as reference beads. Note that torque and twist measurement on DNA are only possible if the double-stranded DNA does not have any “defects” called nicks and if the attachment is via multiple biotin and streptavidin moieties at the ends. To avoid nonspecific binding

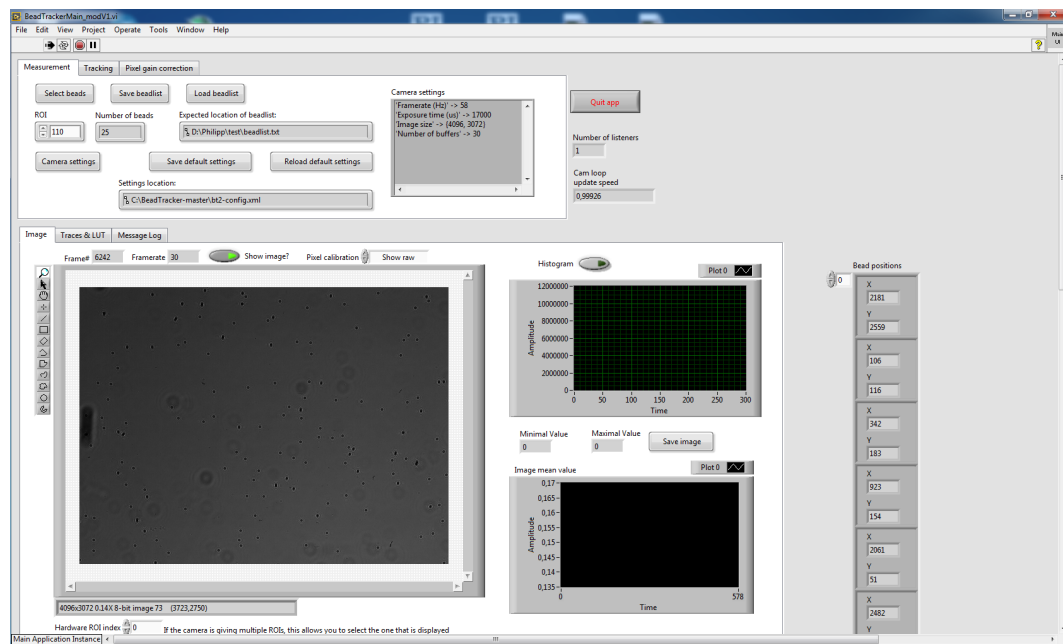
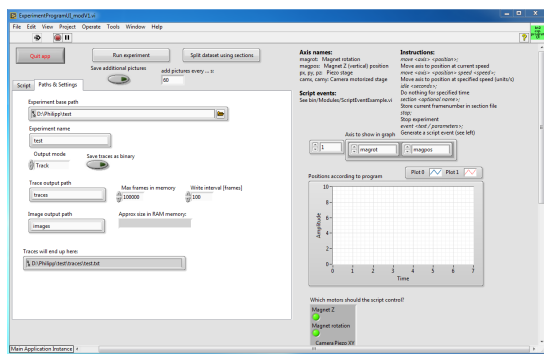
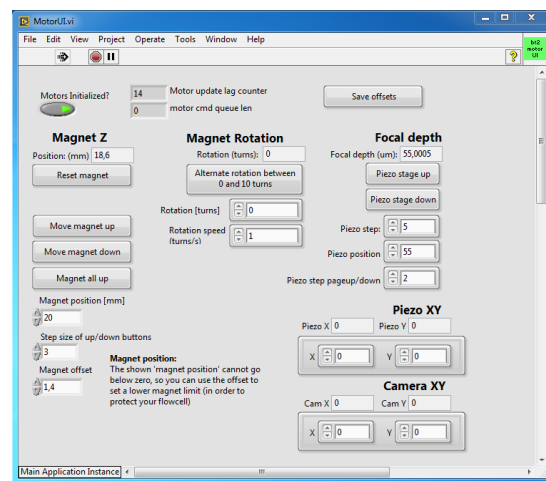


Figure 3.4: “BeadTrackerMain_modV1.vi” is the main window of the software. It displays a real-time image of the field of view and provides option to select beads and perform a LUT.

of the bead to the surface, the cover slip is passivated with bovine serum albumin (BSA).

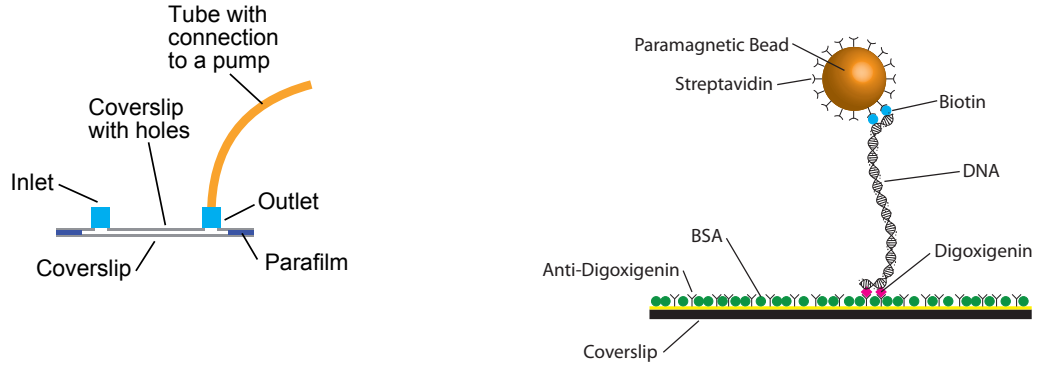


(a) The “ExperimentProgramUI.modV1.vi” window allows users to define the folder path, create protocols, and start measurements.



(b) With “MotorUI.vi”, the piezo-stage as well as the two motors for the magnets can be controlled manually.

Figure 3.5: “ExperimentProgramUI.modV1.vi” and “MotorUI.vi” to start measurements and to control motor positions, respectively.



(a) **Schematic illustration of a flow cell.** Two glass coverslips separated by a parafilm spacer form a microfluidic chamber for MT measurements. Flow cell assembly is placed in a flow cell holder and is mounted in the optical stage of the MT setup. The flow cell is connected to a peristaltic pump for controlled liquid exchange.

(b) **Schematic illustration of a bead-tether-surface construct.** Anti-digoxigenin is bound to the bottom coverslip by epoxysilane chemistry. The paramagnetic bead has a streptavidin coated surface. A DNA construct containing digoxigenin labels on one end and biotin on the other binds to the surface and the bead, respectively. For passivation, the bottom coverslip is coated with BSA.

Figure 3.6: Flow cell construction and attachment chemistry for typical MT measurements.

4. Notes on this experiment

Please submit your files using the filename structure **FP12_GRXXX_Jahr_Monat_Tag**. All important information can be found at <https://www.uni-augsburg.de/de/fakultaet/mntf/physik/groups/exp4/teaching/fp/>.

Preparation for the practical day

To ensure a smooth workflow and successful experimentation in the lab, we strongly ask you to **arrive well prepared for the experiment day**. A thorough engagement with the theoretical foundations (especially polymer models such as FJC and WLC as well as DNA supercoiling) and with the individual steps of the measurement protocol is mandatory. To support this and to promote general understanding, you will find a preparatory question catalogue at the end of this chapter.

Use of digital devices in the S1 laboratory

Please note that the practical lab is located in a safety level 1 (S1) area. For reasons of work safety and contamination prevention, we ask you to **avoid using digital end devices** (e.g. iPads, tablets, laptops) to read the script in the lab whenever possible.

- **Personal notes:** If you would like to use handwritten notes or your own annotations, please print the script in advance and bring it in paper form.
- **Printouts on site:** If you do not wish to print your own copy, a printed version of the instructions or step-by-step protocol is available directly in the lab at the chair.

4.1 Questions for understanding

Use the following questions to check your preparation for the pre-test and the measurements:

1. Operating principle & measurement setup:

- Why are superparamagnetic rather than ferromagnetic beads used in magnetic tweezers?
- Via which biochemical bonds is the DNA molecule attached to the surface of the flow cell and to the magnetic bead?

- How is the Z-position (extension) of the beads determined optically even though the DNA molecule itself is not visible under the microscope? What is the purpose of creating a look-up table (LUT)?

2. Force calibration & polymer models:

- How can the tensile force acting on the molecule be calibrated using Brownian motion and the equipartition theorem?
- How do the basic assumptions of the *Freely-Jointed-Chain* (FJC) and *Worm-Like-Chain* (WLC) models differ?
- What is meant by the persistence length L_P and the Kuhn length l ? Why is the stretching of DNA in the low-force regime described as an „entropic spring“?

3. DNA supercoiling & topology:

- What is meant by the buckling point and what happens mechanically to the DNA beyond this threshold?
- Why does double-stranded DNA respond asymmetrically to positive and negative turns when $F > 1$ pN?
- What is a DNA *nick* and how does a nicked DNA become noticeable in the rotation experiment?

4. Experimental procedure:

- What are reference beads used for during the measurement?
- Which three preliminary tests are carried out before the actual data acquisition to ensure that only single, intact, and torsionally constrained DNA tethers are measured?

Use of aids and AI tools

As in any scientific work, the principle of good scientific practice also applies to the protocol and evaluation for this practical course: independent work and the tools used must always be clearly and transparently identified. If you use generative AI tools (such as ChatGPT or similar language models) for text creation, formulation support, or code generation, this use must be explicitly stated in the report and explained at which points and to what extent the respective tool was used. Purely independent work must remain clearly recognizable to the assessors.

5. Measurements

This chapter provides you step-by-step guidance for the experiments. Please read the experimental protocol carefully as outlined here.

5.1 Preparation of flow cell and instrument setup

The flow cell has already been pre-coated with anti-digoxigenin and stored overnight. To attach the DNA, prepare a DNA-bead solution and inject it into the flow cell. After incubation, flush the microfluidic chamber with buffer (we use PBS or “phosphate buffered saline”, a frequently used buffer that mimics the pH and salt concentration found in cells) to remove unbound beads, and finally insert the magnets. The magnet offset step has also been performed beforehand.

Note: The magnet offset defines the reference “zero” position used for the experiments. All subsequent magnet positions are measured relative to this offset. To determine the effective offset, start with the magnet position slightly above the flow cell and then decrease it carefully in step with small increments (0.01 mm) and carefully monitor the beads’ movement. The magnet position at which bead motion due to the magnets touching the top surface of the flow cell is first detected is recorded as the magnet offset. This defines the magnet’s zero position relative to the flow cell.

A step-by step protocol is provided below. Before starting with the following protocol, remove the magnet holder and the motor has to be set to “Magnet all up” (≈ 18.9 mm).

- Flush the flow cell with 600-800 μL 1x PBS using the peristaltic pump.
- Flush the flow cell with 300 μL of BSA in PBS (100 μL at a time).
- Fill the inlet with PBS and incubate for atleast 1.5 hours.
- Flush flow cell with 600-800 μL 1x PBS (200 μL at a time) and wrap the inlet of the flow cell holder with parafilm.
- Cleaning the beads: add 2 μL of well mixed bead solution (MyOne superparamagnetic 1 μm beads) to 198 μL 1x PBS and mix by brief vortexing in a LoBind microfuge tube.
- Place the tube in a magnetic holder to draw the beads to one side, wait 20 seconds, and then remove the liquid.
- Redo the washing step two times.

- Add 50 μL 1x PBS.

Note: Briefly vortex the solution to make sure all the beads are in the buffer, before adding DNA.

- Add 2 μL DNA construct to the bead solution and incubate a couple of minutes with the microfuge tube kept in horizontal position. Avoid mixing with a pipette (results in DNA nicks).
- Fill up with 48 μL 1x PBS to have overall volume of 100 μL .
- Fill the chamber with ca. 50 μL DNA-beads and wait for 20 minutes.

Note: If no DNA tether is observed at the end, use the remaining 50 μL of the DNA-bead solution to restart from this step.

- Rise the chamber with 1x PBS until the number of freely moving beads is greatly reduced.
- Stop the pump and insert the magnets. Apply high force (≈ 5 pN, that is 0.6 mm magnet distance) and rotations (e.g. alternative rotation between 0 and 50 turns with 5 turns/s) to loosen the nonspecifically bound beads.
- Remove the magnet and repeat rinsing step with PBS until no unbound beads remain.
- Mount the magnets back in the holder.

Note: From this point, the magnets should never have a larger distance than 10 mm from the flow cell for more than 20 seconds to avoid sticking of the beads to the microfluidic chamber surface.

In the next step, select the beads that are bound to a single, coilable DNA molecule.

- Create a folder in the computer to save the location of the beadlist. Follow this path: ExperimentProgramUI_modV1.vi $\rightarrow$ Path and Settings $\rightarrow$ ‘Choose/auswählen’.
- Move the piezo-stage up/down (window “MotorUI.vi”) to get the beads in focus (ideally one should find two foci, one for beads attached to DNA and one for beads unspecifically attached to the surface of the flow cell).
- For a coarse check of DNA-bound beads, bring the magnets little closer to the flow cell (e.g. 2 mm) and look for beads that show real-time lateral fluctuations (due to the presence of magnetic field) within the field of view in the BeadTrackerMain_modV1.vi window. Alternatively, the DNA-bound beads can be focused using the piezo, as their patterns will differ from those of the beads on the surface.
- Further, search for three beads which are not moving, i.e. unspecifically attached to the surface, and whose diffraction pattern are not overlapping. Remember their positions. These beads can be used as reference beads.

Note. This is only valid when the reference beads are selected from the stuck myOne beads. While using polystyrene beads, reference beads are typically chosen before adding the DNA.

- Change the ROI to 120.
- Press “select beads” and click “remove all”. Press “add” and click first on the three beads chosen before as reference beads. Now, click on every other DNA-bound beads whose diffraction patterns are not overlapping. Make sure that the squares that the program puts around the beads is fully visible in the field of view. Do not use beads that are too close to the edge of the field of view.
- Press “close” to close the window and “save” the beadlist.

For z-tracking, a LUT has to be calibrated for every single bead:

- In the “Tracking” panel, set the number of steps to 200 with a step size of $0.1\ \mu\text{m}$. This defines the total Z range i.e. $20\ \mu\text{m}$.
- Move magnets to a distance of 0.6 mm to apply a high force ($\approx 5\ \text{pN}$), which is necessary to avoid large fluctuations of the beads during the LUT-measurement.
- In the “MotorUI.vi” window, adjust the focal length to define the lower limit of the LUT. This should be done by playing with the piezo (objective) distance with respect to the beads and monitoring the diffraction pattern originating from the out-of-focus beads.
- Click on “Tracking” in ‘BeadTrackerMain_modV1.vi’ and set current piezo Z as the start piezo Z (lower limit of LUT).
- Press “Build ZLUT” to start the LUT measurement and wait until the software has finished. Save the ZLUT.

Note. In case the software crashes, one can load the bead list and the ZLUT again.

The setup is now ready to track beads. To ensure that tracked beads are attached to a single and coilable DNA tether, we perform three tests prior to the actual measurements:

- Choose a folder to save the measurements and a name for the measurement in window “ExperimentProgramUI_modV1.vi”.
- The 1st test is to check DNA tethers that have expected contour length. For that, the magnet distance to the flow cell is varied from 0.6 mm to 10 mm, which corresponds to $\approx 5\ \text{pN}$ and close to zero force for the MyOne beads used in this experiment.

Note: At a magnet height of 0.6 mm, the DNA tethers are stretched to $> 95\%$ of their contour length whereas at 10 mm (close to zero force) the beads drop the bottom surface, corresponding to zero tether extension.

- Start the measurement with the button “Run experiment” in the window “ExperimentProgramUI_modV1.vi”.
- A new window will pop up. Wait until the camera reacts (frame number in this window) before clicking on any other button.
- Move the motor to 10 mm distance, wait 10 seconds and drive back to 0.6 mm.

- Stop measurement (“abort experiment”).
- Activate “Trace & LUT” in window “BeadTrackerMain_modV1.vi” and click through the traces. Only beads with tether lengths close to the expected contour length of 21 kbp DNA ($\approx 7 \mu\text{m}$) are selected for the further measurements. (In this screening, do not consider the beads number 0, 1 and 2 which are reference beads).

Note: Subtract a reference bead from the traces of DNA-bound beads to see their z-extension more clearly.

- Change the measurement name for the 2nd test.

Note: The 2nd measurement is to check if any bead is bound to multiple DNA tethers and to select those beads which are tethered by a single double stranded DNA molecule. This is achieved by the asymmetric mechanical response of DNA upon underwinding and overwinding at different stretching forces.

- Check that the motor is at a distance of 0.6 mm ($\approx 5 \text{ pN}$).
- Start the measurement.
- Rotate the motors to -70 turns (at 2 turns/s) i.e. negative turns under high tension.
- Rotate back to 0 turns at the same stretching force ($\approx 5 \text{ pN}$).
- Stop the measurement.
- Check the traces for beads who do not behave as expected and delete them with “Discard bead”.

Note: Bead showing a decrease in tether length is assumed to be bound by multiple DNA molecules.

- Change the measurement name for the 3rd test.

Physical background: A DNA nick is a break in only one of the two DNA strands. It removes the torsional coupling of the DNA molecule: applied turns can relax at the break and are no longer stored as torsional stress throughout the molecule. In the rotation experiment, a nick therefore produces a markedly different rotation curve, in particular the absence or strong reduction of the characteristic tether shortening after buckling.

Note: This is to check whether any torsionally unconstrained tether (with breaks or nicks) is present among the selected beads.

Note: The 3rd test is typically performed together with the 2nd test so that both tests can be plotted together. This allows for simultaneous evaluation of the two characteristics and simplifies creating an overview of the beads when recording the results.

- Rotate + 70 turns at a distance of 3.7 mm ($\approx 0.5 \text{ pN}$) and rotate back to 0 turns keeping the same magnet distance (i.e. same stretching force). Check the traces and discard beads which do not behave as expected.

Note: A bead attached by a single, coilable DNA molecule shows buckling and a corresponding decrease in the tether length, in contrast to nicked DNA molecules.

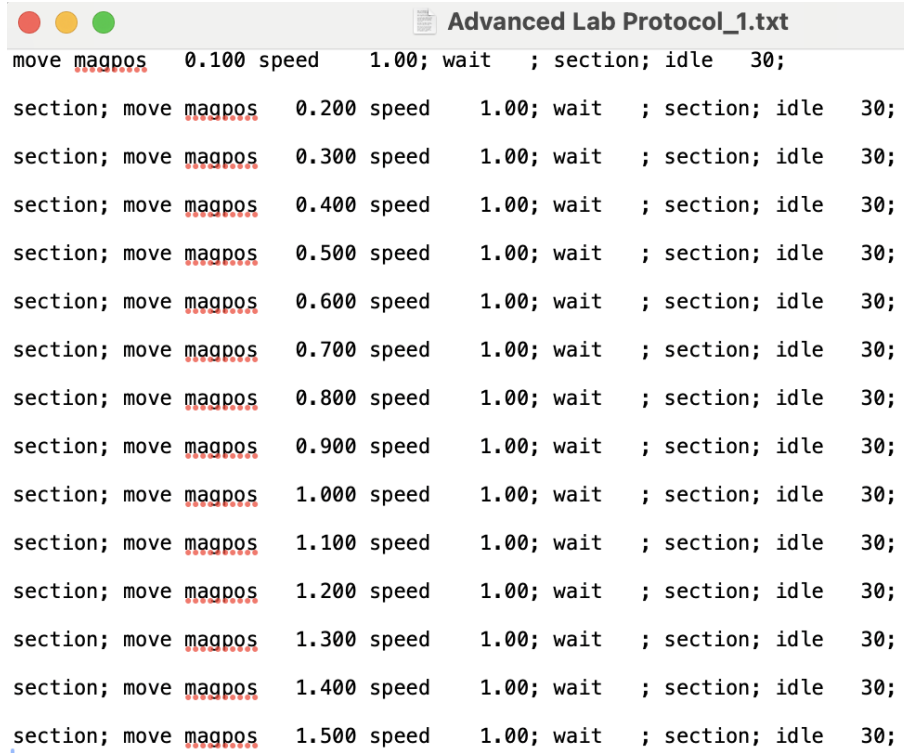
- Only beads those pass all these tests will be considered for the experiments.

5.2 Experiment 1: force-extension measurement

5.2.1 Force calibration from lateral fluctuations

For each magnet distance used in the protocol, record not only the z-position but also the bead's lateral x-y fluctuations. Determine the force from the variance of the x-fluctuation using the equipartition theorem. Plot the resulting force values against magnet distance. Fit the force-magnet-position curve with a double exponential function and use it to determine the force values for the force-extension and rotation-extension measurements.

Track the beads' position (x, y, z) by varying the magnet position with respect to the flow cell. An example of a measurement protocol is shown in **Figure 5.1**. Start with the highest force in the protocol. Before running the script, press “Simulate script” in the “ExperimentProgramUI.vi”.



```

move magpos 0.100 speed 1.00; wait ; section; idle 30;

section; move magpos 0.200 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.300 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.400 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.500 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.600 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.700 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.800 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 0.900 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.000 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.100 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.200 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.300 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.400 speed 1.00; wait ; section; idle 30;
section; move magpos 1.500 speed 1.00; wait ; section; idle 30;

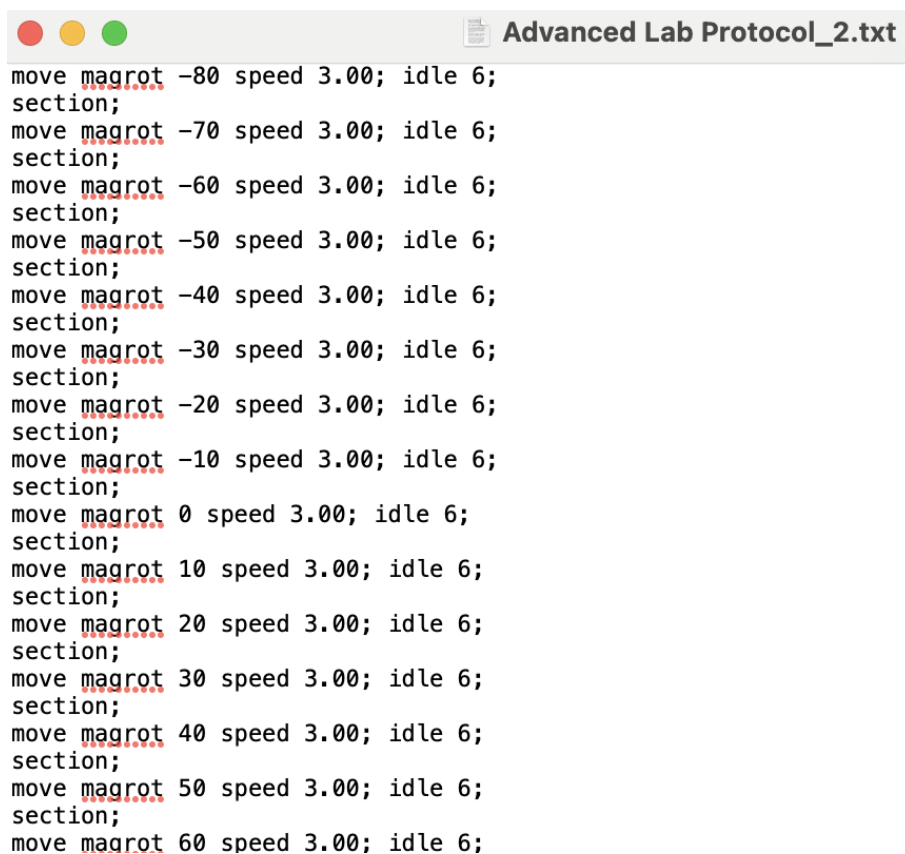
```

Figure 5.1: An example of a script for the force-extension measurement. Move the position of the magnet in steps, the value following “magpos” is the absolute distance of the magnets from the flow cell. The number following “idle” defines the time to record frames in seconds. The speed value should be always used as given in the example (z-motor = 1.0).

5.3 Experiment 2: rotation-extension measurement

Here, test the DNA tether extension upon turning the magnets. Therefore, measure rotation curves from - 70 to + 70 turns in steps of 2 turns at forces of 5.0 pN, 2.0 pN, 1.5 pN, 1.0 pN, 0.7 pN and 0.5 pN. Start with the highest force. It is recommended to start a new measurement for every force for easier analysis. A measurement time of 6 s for each turn is sufficient. Alternatively, run the protocol shown in **Figure 5.2** at different stretching forces.

The force values used in this experiment are obtained from the force–magnet–position calibration determined in Experiment 1.



```

move magrot -80 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -70 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -60 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -50 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -40 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -30 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -20 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot -10 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 0 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 10 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 20 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 30 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 40 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 50 speed 3.00; idle 6;
section;
move magrot 60 speed 3.00; idle 6;
section;

```

Figure 5.2: An example of a script for the rotation-extension measurement. The value following “magrot” defines the absolute values of the rotation motor. The number following “idle” defines the time to record frames in seconds. The speed values should be always used as given in the example (rotation motor = 3.0). Every “section” will save the frame numbers in a text file, which makes it easy to find motor movements for analysis.

6. Analysis

6.1 Analysis for experiment 1

- Determine the force for each magnet distance from the variance of the lateral x-fluctuation using the equipartition theorem. Generate a plot of force against magnet distance, similar to **Figure 3.3**, and fit a double exponential function to your data. Use this calibration curve to determine the force values for the force-extension and rotation-extension measurements.
- Plot the force-extension curve of the DNA molecule and fit both the FJC model and the WLC model. Determine the Kuhn length from the FJC fit and the persistence length from the WLC fit. How many base pairs does the persistence length determined from the WLC fit correspond to? What is the physical significance of this length? Compare your values to literature. Compare the quality of the FJC and WLC descriptions in the investigated force range. In which ranges do the models show systematic deviations from the data? Discuss possible physical causes.

6.2 Analysis for experiment 2

- Plot the extension of the DNA molecule as a function of the number of turns for each applied force.
- Explain the differences observed in the plots for different forces.
- Determine the approximate size of a single supercoil.
- Determine the buckling point n_b and the buckling torque Γ_b for all forces and determine the torsional stiffness of DNA, comparing your results with Strick *et al.* [4].

Bibliography

- [1] S. Cocco, J. F. Marko, and R. Monasson. Theoretical Models for Single-Molecule DNA and RNA Experiments: From Elasticity to Unzipping. *Comptes Rendus. Physique*, 3(5):569–584, 2002.
- [2] D. Dulin. An introduction to magnetic tweezers. In I. Heller, D. Dulin, and E. J. G. Peterman, editors, *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, volume 2694 of *Methods in Molecular Biology*, pages 375–401. Humana Press, New York, NY, 3 edition, 2023.
- [3] J. Lipfert, J. W. J. Kerssemakers, T. Jager, and N. H. Dekker. Magnetic Torque Tweezers: Measuring Torsional Stiffness in DNA and RecA-DNA Filaments. *Nature Methods*, 7(12):977–980, 2010.
- [4] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule. *Science*, 1996.
- [5] I. D. Vilfan, J. Lipfert, D. A. Koster, S. G. Lemay, and N. H. Dekker. Magnetic tweezers for single-molecule experiments. In P. Hinterdorfer and A. van Oijen, editors, *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, pages 371–395. Springer US, New York, NY, 2009.