

中国科学技术大学
UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA

博士学位论文



论文题目 利用光镊研究生物细胞的力学行为

作者姓名 吴建光

学科专业 光学

导师姓名 郭光灿 教授 李银妹 教授

完成时间 二〇〇九年十一月

中国科学技术大学 博士学位论文



利用光镊研究生物细胞的力学行为

作者姓名: 吴建光
学科专业: 光 学
导师姓名: 郭光灿 教授 李银妹 教授
完成时间: 二〇〇九年十一月二十五日

郭光灿 李银妹

University of Science and Technology of China
A dissertation for doctor's degree



Study of mechanical behavior of biologic cells
using laser tweezers

Author: Jianguang Wu

Speciality: Optics

Supervisor: Prof. Guangcan Guo Prof. Yinmei Li

Finished time: Nov 25th, 2009

中国科学技术大学学位论文相关声明

本人声明所呈交的学位论文,是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

本人授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权,即:学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以将学位论文编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

作者签名: 吴建光

2009年12月1日

目录

摘要	1
ABSTRACT	4
第一章 绪论	9
1.1 光镊技术简介	10
1.2 光镊的原理与特点	10
1.2.1 光压与单光束梯度力光阱	11
1.2.2 光镊技术的特点	12
1.3 光镊技术在生物学中的应用	12
1.3.1 光镊进行水稻单条染色体分选	12
1.3.2 光镊研究马达蛋白运动过程	13
1.3.3 光镊研究蛋白质折叠与去折叠过程	15
1.4 生物单细胞和单分子力学行为研究的意义	16
1.5 本文主要内容简介	17
参考文献	19
第二章 光镊技术研究 NK 细胞的识别及杀伤	23
2.1 NK 细胞简介	23
2.2 NK 细胞识别假说	25
2.2.1 Missing Self 模型	25
2.2.2 At least one 模型	27
2.3 NK 细胞识别和杀伤机制	27
2.4 光镊研究 NK 细胞特异性识别的优势	28
2.5 实验材料与实验装置	29
2.5.1 实验材料	29
2.5.2 实验装置	30
2.6 NK 细胞对靶细胞杀伤过程的实时观测	31
2.6.1 NK92 细胞	31
2.6.2 人外周血 NK 细胞	33

2.7	讨论	34
2.8	本章小结	35
	参考文献.....	37
第三章	光镊技术研究 LFA-1 分子与其抗体间相互作用	39
3.1	LFA-1 分子结构及其在免疫反应中的功能	39
3.1.1	LFA-1 的分子结构.....	39
3.1.2	LFA-1 在免疫系统中的作用.....	40
3.2	NK 细胞表面的 LFA-1 分子研究	41
3.3	NK 细胞表面 LFA-1 分子与 Anti-LFA-1 分子的结合测定	42
3.3.1	样品试剂.....	42
3.3.2	实验装置与实验方法.....	42
3.3.3	实验测量.....	45
3.3.4	实验结果与分析.....	50
3.4	本章小结	51
	参考文献.....	52
第四章	光镊研究人类红细胞的力学行为	55
4.1	红细胞简介	55
4.1.1	红细胞特点.....	55
4.1.2	红细胞变形性的生理学意义.....	56
4.1.3	红细胞变形性的固有因素.....	56
4.2	红细胞变形能力的测量方法	57
4.2.1	粘度法.....	57
4.2.2	激光衍射法.....	58
4.2.3	微孔滤筛法.....	59
4.2.4	微管吮吸法.....	59
4.2.5	光镊牵拉法.....	60
4.3	光镊测量红细胞形变的渗透压谱	61
4.3.1	材料与方法.....	62
4.3.2	实验结果.....	63
4.3.3	分析与讨论.....	64

4.4	有限元法模拟红细胞的变形	65
4.4.1	有限元法的基础原理简介	66
4.4.2	红细胞力学模型	67
4.4.3	模拟计算	69
4.4.4	模拟结果	70
4.4.5	讨论	73
4.5	本章小结	74
	参考文献	76
第五章	旋转玻片实现分时复用多光阱	79
5.1	多光阱的实现方法及应用	79
5.1.1	多光阱的实现方法	79
5.1.2	多光阱的应用	81
5.2	旋转玻片实现分时复用多光阱	84
5.2.1	原理设计	84
5.2.2	实验结果	86
5.2.3	参数选择与讨论	88
5.2.4	利用分时复用多光阱实现红细胞的取向定位和拉伸	91
5.3	TSOT 光阱等效刚度的理论模拟与实验测量	93
5.3.1	实验测量	93
5.3.2	理论模拟	95
5.4	本章小结	99
	参考文献	101
第六章	生物细胞培养室的建立	102
6.1	细胞培养室的建立	102
6.1.1	细胞培养室的设置	102
6.1.2	细胞培养室的主要设备	103
6.1.3	无菌操作室的建立	103
6.1.4	常规设备订购、布置	103
6.2	细胞培养	104
6.2.1	Hela 细胞培养	104

6.3 本章小结	105
参考文献.....	106
论文的总结与展望	107
博士期间发表论文及专利目录	108
致谢	111

摘要

生命科学是研究生命现象、生命活动的本质、特征和发展规律的自然科学，与人类生存、人民健康以及社会发展有着密切的关系，是当今全球范围内最受关注的基础自然科学。其中，细胞生物学是生命科学的基础学科之一，它是以细胞为研究对象，从细胞的整体水平、亚显微水平以及分子水平等三个层次，研究细胞和细胞器的结构和功能。活细胞的新陈代谢、跨膜转运、信号转导等生命活动，都是细胞与其他生物大分子（如蛋白质、多糖、核酸等）相互作用的结果，在这些相互作用过程中，细胞和大分子的力学行为会发生不同的变化，换句话说，细胞和大分子的力学行为变化可以反映其功能及活动规律。传统的细胞生物学和分子生物学研究，大都是基于生物化学或药理学实验中的一些分子浓度变化而做出的，是许多细胞或分子活动的一个平均结果，往往掩盖了各个分子的个性，因此特别需要从单细胞、单分子的层次上研究其活动规律。

生物学研究不但依赖物理、化学知识，同时还依靠后者提供的实验仪器和研究手段，例如蛋白质电泳仪、光学和电子显微镜、断层扫描仪等等。而在单细胞、单分子层次上进行细胞生物学研究，光镊是一项非常适合的技术。事实上，光镊自诞生起就和生物学紧密相连，由于其独特的技术特点，一直以来被生物学家所青睐。目前，光镊已成为细胞生物学和分子生物学研究中重要的工具。

光镊可以捕获和操控几十纳米到几十微米大小的粒子，它还可以作为微小力力的探针，测量皮牛亚皮牛量级的力，正好可以用来研究生物细胞的力学行为，以及细胞与生物大分子如蛋白质等的相互作用等，进而从单细胞层次上揭示细胞生命活动的基本规律。

在本文的工作中，将光镊技术应用于细胞生物学力学行为的研究领域，即利用实验室的光镊技术平台，进行细胞力学性质的测量研究，主要研究了免疫细胞对靶细胞的特异性识别，对细胞表面受体分子与抗体分子间的相互作用进行了测量，从理论和实验两个方面研究了渗透压对红细胞变形性质的影响，另外，为了更加方便的研究生物细胞的膜弹性行为，发展了新型的光镊技术。

免疫是人体的一种生理功能，人体依靠免疫细胞识别外来抗原，产生特异性免疫应答，来维持机体健康。NK 细胞是免疫细胞的一种，自发现以来逐渐成为

免疫学领域的一个热点。NK 细胞活化过程的分子基础非常复杂，简单可以描述为效应细胞与靶细胞相互作用，效应细胞表面分子识别靶细胞上的配体，形成免疫突触，最终杀伤靶细胞。K562 是 NK92 细胞的杀伤敏感细胞，然而对于这对细胞的识别和杀伤机制一直不清楚，我们利用光镊捕获 NK 细胞与靶细胞接触，实时观察 NK 细胞对靶细胞 K562 的杀伤作用，发现 K562 细胞发生形变，表面出现巨大囊泡，但细胞膜没有破裂。研究结果可能有助于揭示 NK92 对 K562 的杀伤机制。

免疫细胞的活化与其表面受体分子有紧密的关系。淋巴细胞功能相关抗原-1 可能是 NK 细胞识别杀伤靶细胞的早期参与者，LFA-1 是在 CTL 介导靶细胞杀伤实验中发现的，它与机体自身免疫疾病以及肿瘤复发等密切相关。我们利用光镊研究了 NK 细胞表面 LFA-1 的单分子行为，发现 NK 细胞与包被了 LFA-1 抗体的小球之间的结合力随二者接触时间的延长而增强，表明 NK 细胞表面 LFA-1 分子可能会受 LFA-1 抗体影响而发生局部聚集。我们的研究不仅提供了一种实时观察单细胞间相互作用的方法，还建立了研究单分子对细胞活动影响的研究方法，推测存在一种新的诱导 LFA-1 分子活化的信号传导模式。

人类的红细胞没有细胞核，有着相对简单的结构，同时具有轴对称的形状，经常作为细胞力学模型而被研究。红细胞的变形对血液流动有着重要的影响，与一些疾病也有着直接的关联。由于红细胞的变形受到周围环境如渗透压、pH 值等因素的影响，因此我们利用光镊技术对不同渗透压下红细胞的形变特征进行了研究，发现等渗条件下双凹形的红细胞形变能力最强，渗透压降低时，红细胞形变能力下降，其主要是由于细胞形状的改变造成的，而在高渗条件下，细胞变形能力同样减弱，主要原因是细胞内液粘度呈指数增加。另外，我们还利用 ABAQUS 有限元软件对不同形状的红细胞变形进行了模拟，模拟结果与实验结果基本相符。

光镊研究细胞膜弹性常用的方法是利用小球做手柄来拉伸细胞，实际上，细胞被光阱捕获时形状会发生微小变化，如果细胞处于阱位不断变化的光阱中，其形变就会比较大而可以很容易的测量。根据这个思想，我们利用旋转玻片实现了分时复用多光阱，利用该分时复用多光阱研究了红细胞的变形特点，同时还实现了多粒子的捕获，并从理论和实验两方面研究了不同切换频率下的有效光阱刚

度。

本实验室一直以来以光镊技术研究为主，在生物学应用中，一直采取物理学提供工具、生物学提供样品的合作方式，但由于受到样品条件的限制，很多研究未能继续深入下去就草草结束。因此我们建立了自己的生物细胞培养室，创造生物样品制备条件。目前已经可以成功的培养 **Hela** 细胞并进行相关实验。

本论文的创新点在于利用光镊技术在单细胞层次上研究生物细胞的力学行为，包括细胞膜的变形规律、免疫细胞的特异性识别机制以及细胞表面分子和抗体分子间的相互作用，研究结果可以为阐明细胞生命活动的基本规律提供帮助。另外，还发展了新的产生多光阱的方法，可以在细胞力学行为研究中得到应用。

关键词：光镊、NK 细胞、红细胞、力学行为、多光阱

ABSTRACT

Life science focuses on the phenomenon of life, the nature, characteristics and developmental rules of life activities. It has close relation to human existence, health, and development of society, and attracts most worldwide attentions in basic sciences. Cell biology, which aims to study the cells, is one of the basic topics in life sciences, and it researches on the structure and function of cell and organelle from the cellular, sub-micron and molecular level. The metabolism, trans-membrane transport and signaling of live cells are all the results of the interaction of cell and other macromolecules such as protein, polysaccharides, and nucleic acid. In these interactions, the mechanical property of cell and molecule may change, and this change reflects the function and rules of cell activities. Traditional cell biological and molecular biological researches, which are based on the variation of concentration of some molecules in biochemical and pharmacological experiments, are the average results of the activities of many cells and molecules. The traditional research cannot reveal the performance of a single molecule; therefore, study of activities of a single molecule in cellular and molecular level is of great importance.

Biology not only relies on physical and chemical rules, but also relies on the experimental apparatus and research methods, such as protein electrophoresis, optical microscopy, electron microscopy, section scanner *etc.* Optical tweezers is a proper technique in cell biological research in cellular and molecular level. Factually, since its invention, optical tweezers has played important roles in biology and because of its technical uniqueness. Optical tweezers has attracted wide attention from biologists. Recently, optical tweezers becomes an important tool in cell biological and molecular biological researches.

Optical tweezers is able to trap and manipulate particles ranging in tens of nanometers to tens of microns, and can be used as probes to detect the forces of protein interaction or cellular forces in the range of pico-Newton to subpico-Newton. Furthermore, results from optical tweezers can be used to reveal life activity in cellular level.

In this thesis, we expand the application of optical tweezers into the areas of cell biology. The detailed researches lie in the measurements of the mechanical property of cells, specific identification of immune cell to target cell, interaction of antigen and antibody, theoretical and experimental research on the influence of osmotic pressure to the formation of cell membrane, and developed novel optical tweezers' technique to further study the mechanical property of cell membrane.

Immune is a physiological function of human body, which sustains healthy by identifying foreign antigen and generating specific immunological response. Natural Killer cells (NK cells) are one kind of immunological cells. Since its discovery, it gradually becomes hot topic in immunology. The activation of NK cell is very complex, and a simple description may goes as follows surface molecule on effective cell identifies ligand on target cell, forming immune synapse, and finally kill target cell. K562 cell is the sensitive cell of NK92, but the mechanism of identification and kill of this pair of cells hasn't clear. We utilize optical tweezers manipulate NK cell contact target cell, observing the kill effect of NK cell to target cell in real time. Experimental results show that K562 cell deforms with a vesicle on the surface, and the cell membrane hasn't broken. Our results help to reveal the kill mechanism of NK92 to K562.

The activation of NK cells has close relation with the surface receptors. Lymphocyte function associated antigen-1 (CD11a/CD18, LFA-1) is a member of the integrin family of cell surface receptors. It is possible one of the early actors in process of the recognition and killing of NK cells. LFA-1 was found in the killing experiment mediated by the CTLs and was likely to be involved in some immunological diseases and tumour recurrence. To study the activation mode of LFA-1 on the NK cell surface, a platform based on optical tweezers was constructed to observe the molecular behavior of LFA-1. According to the results, the adhesion force between an NK cell and a polystyrene microsphere coated with anti-LFA-1 antibody was confirmed to be time-dependent. And the force was increased with the time of contact between the cell and sphere which indicated the LFA-1 on cell surface has clustered induced by anti-LFA-1 antibody. So, a new method is developed in our

works to study the interaction between two cells in real time and to observe the single molecular behavior. Our results may provide a clue to explore the activation mechanism of LFA-1 on NK cells.

The human red blood cell has a relatively simple structure, and it does not contain a nucleus. Consequently, it has often been regarded as ‘model system’ in the study of single living cells. The formation of RBC greatly influences the flow of blood, and relates with some diseases. Naturally, the RBC is in a surroundings with many physical parameters such as osmotic pressure, pH *etc.* We adopt optical tweezers to study the formation characteristics of RBC under different osmotic pressure. The cell has large deformation ability under isotonic pressure; while the cell has low deformation ability under hypotonic environment because of change of cell shape; and the cell also has low deformation ability under hypertonic pressure due to the exponential increase of concentration of intracellular liquid. Additionally, a simulation adopting ABAQUS software to simulate the deformation of RBC with different shapes is conducted, and the results agree well with our experimental results.

Traditional method adopting optical tweezers to measure the elasticity of cell is to use micro bead handle to stretch cell. In fact, the form of cell suffers tiny changes under the trap. When a cell exposed in a jumping optical tweezers, this change may be larger that can be easily measured. We realized time-sharing multiple optical tweezers utilizing tilt rotating glass plate to further manipulate multiple particles and to study the formation characteristic of red blood cells. Meanwhile, we utilize this novel technique to investigate the effective stiffness under different trap switching frequencies both theoretically and experimentally

The main researches of our lab focus on the optical tweezers’ technique. In biological applications, we adopt the means of providing instruments by physicist and sample prepared by biologists. In many of the applications, because of the limitation of sample preparation, many researches cannot go in deep. Therefore, we setup our own cell cultivation room to independently cultivate cells in our lab. Recently, we can cultivate Hela cells and perform relative experiments.

The highlights of this thesis lie in research of the mechanical property of

biological cell in cellular level utilizing optical tweezers. The main results include formation of cell membrane, specific identification of immunological cells and interaction of antigen and antibody in cell membrane. Our results help us understand the basic rules of life activities of cells. Additionally, we developed novel methods to generate multiple optical tweezers, which will find applications in the researches of mechanics of cells.

Keywords: *optical tweezers, NK cell, red blood cell, mechanical behavior, multiple traps*

第一章 绪论

在科学迅猛发展的今天,单一学科的研究已不能适应科学自身发展的逻辑和满足生产发展的需求。数、理、化及生物等大学科间多学科、多角度的交叉联合研究已成为当今自然科学发展的大趋势。尤其是,生命科学的发展不断向数学和物理等学科提出更多、更深层次的新问题,要求发展新概念和开拓新研究领域。

生物学是目前国际上炙手可热的研究方向,它跟人类自身生存和整个世界的生态系统都息息相关,它的许多研究成果逐渐地直接或间接地影响和应用到了医学、化学和农业等方面。例如,重组 DNA 技术和淋巴细胞杂家瘤技术的出现,带动了生物技术的迅猛发展,并且对人类生活和经济活动产生了深刻的影。目前,随着研究手段越来越先进,人们对生物学研究已经深入到了单细胞、单分子的层次,不但研究生物细胞的结构,还研究在生命过程中生物分子的运动过程,生物学研究正逐渐向细微的方向发展。

传统的细胞生物学和分子生物学研究,大都是基于生物化学或药理学实验中的一些分子浓度变化而做出的,是许多细胞或分子活动的一个平均结果,即系综平均。系综平均的结果无疑是正确的,但它往往掩盖了各个分子的个性,因此很需要从单细胞、单分子的层次上研究其活动规律。这样的现状又对研究工具和实验方法提出了更高的要求,于是,开发新的实验技术、方法和手段成为一个重要的研究方向,新的实验手段往往成为学科交叉的切入点,新研究方向的生长点。而一种技术在另外一个学科领域得到实际的应用,不仅是对另外学科的贡献,更能促进自身技术的不断发展。

物理学的发展,无疑给生物学研究提供了非常有力的帮助。目前,使用光学的手段,例如荧光显微镜,可以观察生物大分子,不过不能分辨其结构,而利用电子显微镜和扫描探针技术,人们甚至可以直接看到单个的生物大分子,利用原子力显微镜可以直接或间接的操控一些大小合适的生物体,也可以进行拉伸和挤压来研究生物体的力学特性【1-3】。

而在进行活体单细胞研究时,以上技术还存在一些局限性,例如电镜或激光共聚焦技术要求所研究的生物样品经过化学或物理处理固定后再进行观察,显然,处理后的生物细胞将失去活性,研究得到的图像无法反映活细胞的活动特点。

而作为操控技术的原子力显微镜，由于对生物样品进行近距离直接接触操控，会对研究对象产生干扰。随着激光技术的发展，一项新的研究手段——光镊技术诞生了，并且自诞生起就和生物学紧密相连，由于光镊独特的技术特点，一直以来被生物学家所青睐。目前，光镊已成为细胞生物学和分子生物学研究中重要的工具。

1.1 光镊技术简介

光镊是以激光的力学效应为基础的一种物理工具，是利用强会聚的光场与微粒相互作用时形成的光学势阱来俘获粒子的【4】。1969年，A. Ashkin等首次实现了激光驱动微米粒子的实验。此后他又发现微粒会在横向被吸入光束（微粒的折射率大于周围介质的折射率）。在对这两种现象研究的基础上，Ashkin提出了利用光压操纵微粒的思想，并用两束相向照射的激光，首次实现了对水溶液中玻璃小球的捕获，建立了第一套利用光压操纵微粒的工具。1986年，A. Ashkin等人又发现，单独一束强聚焦的激光束就足以形成三维稳定的光学势阱，可以吸引微粒并把它局限在焦点附近，于是第一台光镊装置就诞生了【5, 6】。也因此，光镊的正式名称为“单光束梯度力势阱”（single-beam optical gradient force trap）。

由于使用光镊来捕获操纵样品具有非接触性、无机械损伤等优点，这使得光镊在生物学领域表现出了突出的优势。这些年来，随着研究的深入和技术的不断完善，光镊在生物学的应用对象由细胞和细胞器逐步扩展到了大分子和单分子等。目前，光镊常被用来研究生物过程中的细胞和分子的运动过程【7-10】，也常被用来测量生物过程中的一些力学特征【11-14】。

1.2 光镊的原理与特点

众所周知，光具有能量和动量，但是在实际应用中人们经常利用了光的能量，却很少利用光的动量。究其原因，这主要是因为在生活中我们接触到的自然光和照明光等的力学效应都很小，无法引起人们可以直接感受到或观察到的宏观效应。而科学家们利用激光所具有的高亮度和优良的方向性，使得光的力学效应在显微镜下显现了出来，在这里我们要介绍的光镊技术正是以这种光的力学效应为基础发展起来的。

1.2.1 光压与单光束梯度力光阱

光与物质相互作用的过程中既有能量的传递，也有动量的传递，动量的传递常常表现为压力，简称光压。1987年，麦克斯韦根据电磁波理论论证了光压的存在，并推导出了光压力的计算公式。1901年，俄国人 П.Н.列别捷夫用悬在细丝下的悬体实现了光压的实验测量【15】。此后，美国物理学家尼克尔、霍尔也分别测量了光压【16】。20世纪70年代，人们开始研究激光的辐射压力，并发展了原子束的激光偏转【17】、激光冷却【18】、光子粘团【19】等实验技术。在宏观微粒的光压力研究方面，由光悬浮发展到光捕获、光致旋转等【20】。1970年，A.Ashkin【21】首次实现了水溶液中的光悬浮。随后的一些研究【22-25】最终导致了光镊的发明。

通常光对物体的作用力都是推力。但是，在一定条件下光也可以对物体产生拉力，或更一般的，产生束缚力。这就牵涉到光对物体作用的梯度力。

为了阐明梯度力的概念，以透明介质小球为例说明。如图 1.1 所示，一个透明介质小球处于一个高斯分布的非均匀会聚光场中，小球的折射率大于周围介质的折射率。当会聚激光束照射到微粒上时，激光发生折射和反射，也包括一部分吸收。被微粒反射和吸收的光作用就是光辐射压力，或者称散射力，其方向与光传播方向一致，它趋向于使小球沿光束传播方向运动。与此同时，光束经过微粒会发生多次折射，有些会聚光线折射后传播方向更趋向于光轴（即光束传播方向），从而增大了轴向动量，因而给与微粒与光传播方向相反的作用力，表现为拉力，这就是轴向梯度力的本质，由于此拉力的作用，导致粒子在轴向可以稳定在激光焦点附近。而微粒在横向的偏离，由于光场的非均匀性，也会受到指向激光焦点的回复力，即横向梯度力。在梯度力和散射力的共同作用下，微粒被稳定束缚在激光焦点附近。

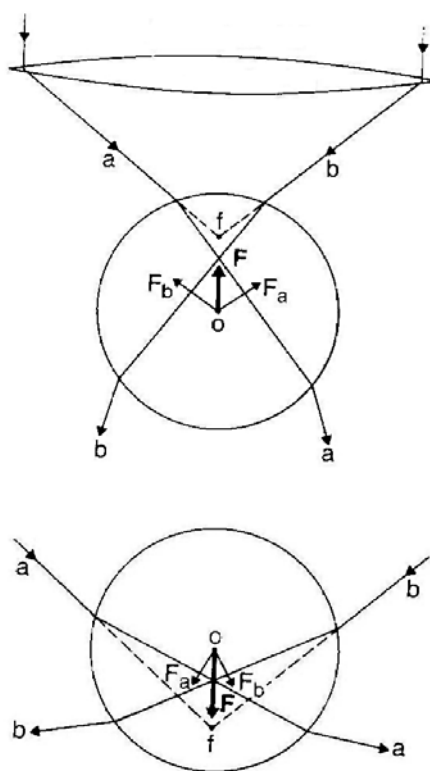


图 1.1 单光束梯度力光阱

这就是单光束梯度力光阱。

1.2.2 光镊技术的特点

光镊是对单光束梯度力光阱的形象的称呼，因为它与宏观的机械镊子具有相似的操控物体的功能。但与宏观的机械镊子相比，或者与传统的操控微纳米粒子的显微微针或原子力显微镜等相比，光镊具有不可比拟的优越性。光镊对微粒的操控是非接触的遥控方式，不会给对象造成机械损伤。这使得光镊在生物学研究特别是单细胞单分子研究领域应用非常合适。首先，光镊捕获微粒的尺度在几十纳米到几十微米，正好是生物细胞、细胞器以及生物大分子的尺度范围。其次，光镊的温和操控不会损失细胞，虽然激光会产生热，但可以通过选择合适的波长，避开细胞对光的吸收波长，将热效应降到最低。另外，由于大部分细胞膜是透明的，光可以穿过细胞膜操控细胞内部微粒，这是其他操控手段无法做到的。

光镊不仅可以操控微粒，还可以进行微小力的测量，粒子偏离捕获中心的距离和其受到的回复力成正比，类似与弹簧，在操控过程中能实时感应俘获粒子的微小负荷。因此，光镊是极其灵敏的力传感器，其作为微小力的探针，可以进行细胞和生物大分子之间的相互作用的定量测量，进一步揭示细胞的功能以及活动规律。

1.3 光镊技术在生物学中的应用

随着物理技术手段的不断进步，物理学和生物科学的结合使得对生命活动规律的认识逐步深入。从原来器官、组织的层次逐渐发展到细胞、生物大分子的层次。分子生物学概念、方法和技术的引入使得生物学研究取得了突破性进展，产生了许多新的生长点，并逐步形成新的概念与新的领域。其中特别是人们对生命规律的认知，从过去的对分子整体平均行为的宏观研究，发展到现在能对分子个体行为进行微观研究，使人们对生命规律的认知更深入、更本质，进而又促进了对生命宏观规律的认识。生物大分子之间如何相互作用及调控是当前生命科学面临的最基本问题之一，也是解释生命本质与奥妙的重要组成部分。而光镊技术由于其独特的优越性，对于了解生物大分子间相互作用及动力学过程无疑扮演着不可替代的作用。

1.3.1 光镊进行水稻单条染色体分选

2003年,王浩威等人报道了一种基于光镊技术的单条染色体分选技术【26, 27】,该技术利用光镊与光刀结合,辅以微吸管技术,分选了水稻的单条染色体。用该方法得到的水稻染色体样品经过分子克隆,制备出了染色体特异的DNA片段,可以用于水稻基因组的测序工作。这种方法与其它几种分选单条染色体的方法,如玻璃微针挑取、激光弹射以及流式细胞仪等技术相比,具有液相环境分离、操作简单、选择性高、损伤小和无污染等优点。

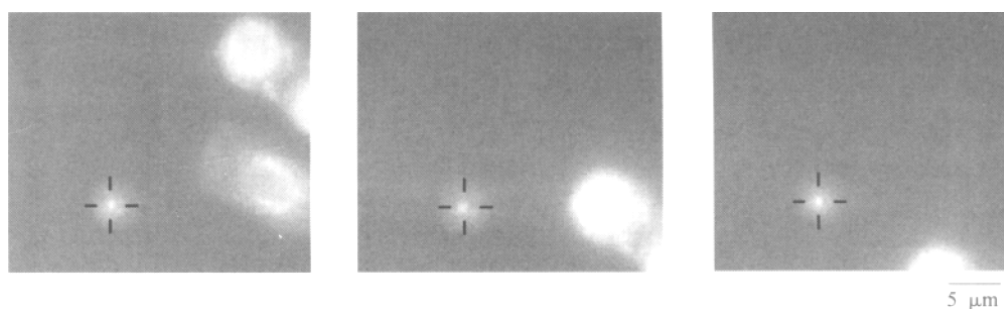


图 1.2 光镊操纵染色体的过程, 图片中十字标记对应的就是染色体

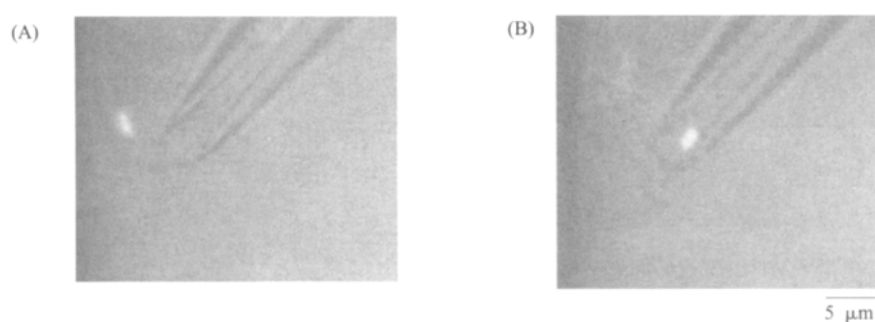


图 1.3 微吸管吸取染色体的过程

实验中,首先将水稻根尖组织分离成单个细胞,并使细胞沉降到样品池底,并对细胞中的染色体进行特异性染色。然后寻找合适的处于细胞分裂中期的细胞,使用激光光刀逐点击打细胞膜边缘直到细胞解体,从而使染色体从细胞内释放出来。利用光镊选择并捕获合适的染色体,并将其移出细胞残骸所在区域之外(如图1.2所示)。最后使用微吸管将被光镊操控分选出来的染色体吸走(如图1.3所示)。这样就完成了单条染色体的分离,使用光镊将单条染色体移开还有效地避免了细胞残骸的干扰。

1.3.2 光镊研究马达蛋白运动过程

从上世纪九十年代初开始, Nature和Nature Cell Biology杂志几次报道了Princeton大学Steven M. Block等人的有关kinesin马达蛋白(驱动蛋白)在微管上

行走的实验研究【28-31】。在这些实验中，光镊首次被成功地应用到了生物大分子的力学和运动学研究中，取得了一系列具有开创性意义的成果，其中的一些实验方法和思路也被后来许多人所借鉴。

Kinesin是一种由ATP水解提供能量的，具有双头的马达蛋白分子，它可以用这两头在微管上移动。Block等人的工作包含了研究kinesin分子在微管上移动的方式、移动的步长和移动时可承受的最大负载等。1993年，Block等人使用光镊与双光束干涉仪结合，首次观察到了kinesin分子的运动过程【29】。Kinesin分子在微管上以 8nm 的步长前进，每步的间隔在 1ms 的量级，这个实验证明了kinesin分子的运动过程是非连续的。1997年，Block等人进一步研究得出了kinesin分子每运动一步需要水解一个ATP分子的结论【30】。1999年，Block等人又再一次通过实验【28】得到了以下的结论：第一，kinesin分子运动时的负载能力具有很宽的范围；第二，具体负载的大小则由环境中的ATP分子浓度来决定；第三，分子负载越大运动的最大速度就会降低。

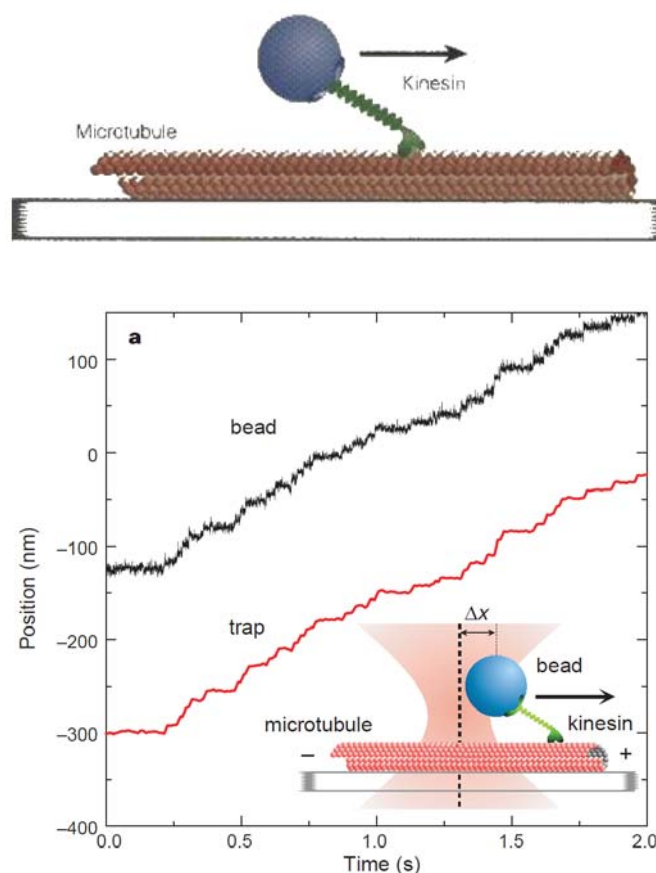


图 1.4 光镊研究 Kinesin 马达蛋白在微管上行走

在这一系列的实验中，光镊不仅被用作一个控制微粒的工具，而且具有了研

究微粒运动和受力的功能。如图1.4所示，微管被粘在样品池底的盖波片上，通过处理将kinesin分子修饰在硅小球的表面，使用光镊捕获并操纵硅小球使得kinesin分子的另一端（双头的一端）粘接到微管的表面，只要ATP水解提供能量，kinesin分子就可以在微管上移动。通过改变光镊的激光功率，改变小球所受到的光阱力，从而改变kinesin分子运动时所承受的负载，还可以精确测量kinesin分子在运动时能承受的最大的负载力。

1.3.3 光镊研究蛋白质折叠与去折叠过程

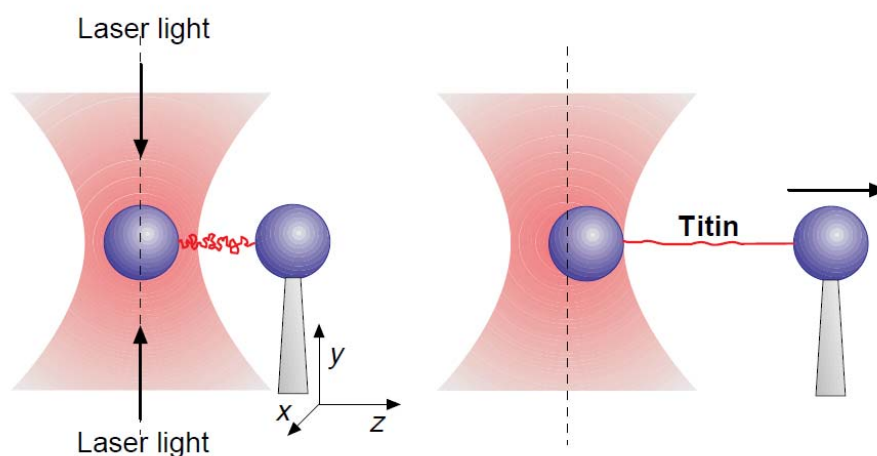


图 1.5 光镊和微针操控微球拉伸 titin 分子

1997年，Science杂志上发表了华盛顿州立大学Kellermayer等人的文章【32, 33】，文章报道了利用光镊研究titin分子（肌肉蛋白分子）的一些力学性质的实验和结果。Titin是一种丝状的大分子，它在维持肌小节结构的完整性以及缓冲外力冲击时起重要的作用。实验中，titin分子的两端分别粘接两个高分子小球，一个球用光镊捕获，另一个微针固定（如图1.4所示），通过匀速移动微针使固定在光镊和微针间的titin分子的长度改变。这里，光镊不单是操控titin分子的工具，更重要的是它可以被用来测量titin分子所受到的拉力。用这样的方法就可以研究titin分子的长度的拉伸量与受力大小的关系。实验结果表明，titin分子的弹性性质并非线性，它在被折叠与去折叠的过程中表现出了不同的性质，导致了力的“磁滞”效应，如图1.5A所示。另外，实验也表明了随着拉伸次数的增加，该“磁滞”效应也会逐渐减弱。

2009年，张晓晖等【34】利用光镊和微针相结合，研究了血管性假血友病因子(vWF)蛋白的去折叠和折叠过程。凝血是一个重要的生理过程，凝血过少会

引起流血致死，而凝血活动过多则导致血栓形成，凝血能力与 vWF 蛋白的长短有关。张晓晖利用光镊和微针操纵单个蛋白分子并实时观测其细微的结构变化，研究发现，该蛋白 A2 结构域对拉力非常敏感，在一定拉力作用下 A2 会失去其三维结构而去折叠，展开后的 A2 则会被 ADAMTS13 蛋白酶剪切导致 vWF 长度减少。人体通过 A2 这一精确的力传感器来调节血液中 vWF 的长短，该研究成果不但加深了对人体凝血机制的理解，还可为深入了解出血性疾病和血栓形成以及对于凝血有关的各类疾病的诊断和治疗提供帮助。

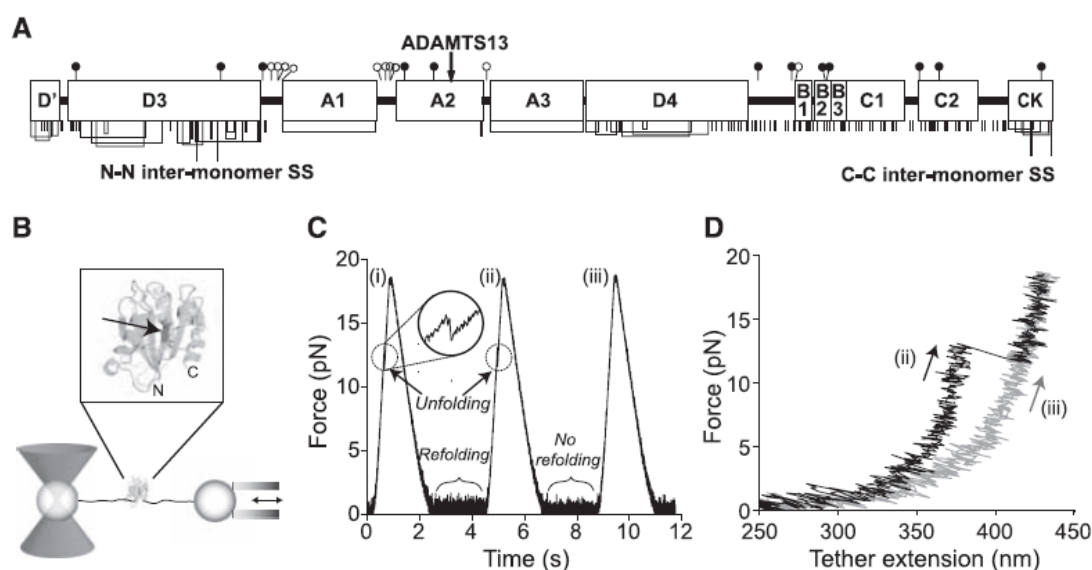


图 1.6 光镊研究 vWF 蛋白 A2 结构域的去折叠过程

1.4 生物单细胞和单分子力学行为研究的意义

19 世纪中期，细胞学说的出现使生物科学有了一个飞跃的发展，细胞是生物体和生命活动的基本单位。研究生命活动过程的本质，需要从生命有机体的基本单位——细胞入手。活细胞的新陈代谢、跨膜转运、信号转导等生命活动，都是细胞与其他生物大分子（如蛋白质、多糖、核酸等）相互作用的结果，在这些相互作用过程中，细胞和大分子的力学行为会发生不同的变化，换句话说，细胞和大分子的力学行为变化可以反映其的功能及活动规律。

免疫淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤过程，涉及到免疫细胞对肿瘤细胞的特异性识别、活化、迁移以及杀伤。从单细胞层次，研究免疫细胞的识别和杀伤机制，可以更深刻的揭示免疫细胞行使功能的过程，并可以在更高层次解读机体免疫系统特异性识别的分子机理。

生物分子马达是将化学能转化为力学能的生物大分子。这些大分子广泛存在于细胞内，它们可以是蛋白质，也可以是 DNA，它们通过消耗 ATP 水解所释放的化学能，进而改变自己的构象，一旦与轨道结合，马达分子在可以通过构象变换产生于轨道间的相对运动。生物马达将化学能转换为机械能，其转换效率非常惊人，驱动蛋白可达 60%，而 ATP 合成酶接近 100%，其中的力学化学耦合机制令科学家着迷。研究马达分子和轨道的相互作用，不仅有助于解读马达分子转换能量的机制，理解生物体某些宏观运动的本质，还有助于指导我们设计新型的能量转换纳米机器。

生物单细胞或者大分子的功能研究是生命科学研究的精髓，而分子的功能是由其结构所决定的，研究细胞与细胞、大分子与大分子之间相互作用的力学行为，可以探索其结构特征，进而有助于其功能的研究。

1.5 本文主要内容简介

本文的研究工作是利用实验室的光镊技术平台，进行细胞及生物分子的力学性质的测量。主要研究了免疫细胞对靶细胞的特异性识别相互作用，以及细胞表面因子与抗体分子之间的相互作用。还利用光镊对红细胞的膜弹性进行了测量，另外，为了更方便的研究细胞膜弹性，发展了新的多光阱技术。

论文第二章内容为 NK 细胞特异性识别的研究。介绍了 NK 细胞的识别假说以及研究现状，利用光镊捕获 NK 细胞和靶细胞接触，实时观测对靶细胞杀伤过程，从中获得 NK 细胞杀伤机制的线索。

论文第三章内容为 NK 细胞表面受体和抗体之间相互作用的测量。介绍了淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 分子的结构及其在免疫反应中的功能，为进一步研究 LFA-1 分子的功能，设计了相应的实验方案，建立了细胞-分子相互作用测量平台，并测量了 LFA-1 分子和对应的抗体之间的相互作用，推测存在一种新的诱导 LFA-1 分子活化的信号传导模式。

论文第四章内容为红细胞膜弹性测量研究。首先介绍红细胞变形性的测量方法，然后利用光镊技术对正常的人血红细胞的膜弹性进行了测量，通过改变渗透压，红细胞的形状即随之改变，测量了不同渗透压下的膜弹性模量。另外，还利用有限元软件对不同形状的红细胞形变特征进行了模拟进一步认识了红细胞的

形状对其形变能力的重要性。

论文第五章为旋转玻片法实现分时复用多光阱。介绍了目前已有的多光阱实现方法，并进行对比；介绍了利用旋转玻片实现多光阱的原理、参数选择以及实验结果，对光阱切换频率对分时复用多光阱的等效刚度的影响规律进行了测量和理论模拟；最后介绍了利用设计的分时复用多光阱在细胞取向定位和力学行为研究中的应用。

论文第六章为实验室细胞培养室的建立。从光镊实验室自主进行生物学研究出发论述了建立细胞培养室的重要性，介绍了细胞培养室的建立过程、主要设备的使用方法以及简单细胞的培养方法。细胞培养室的建立为实验室以后在生物学领域的应用打下基础。

参考文献

1. Lindsay S M et.al. Potentiostatic deposition of DNA for scanning probe microscopy. *Biophysical J*, 1992, 61:1570-1584.
2. Florin, et.al. Adhesion forces between individual and receptor pairs. *Science*, 1994, 264:415-418.
3. Rief M. et.al. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 1997, 276:1109-1112.s
4. 李银妹, 《光镊原理、技术和应用》, 中国科学技术大学出版社, 1996。
5. A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E.Bjorkholm, S.Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particle, *Opt.Lett.*, 1986, 11:288.
6. A. Ashkin. History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE J.Sel.Top. Quantum Elec.*, 2000, 6:841-856.
7. Yoshiharu Ishii, Toshio Yanagida, *Single Molecule Detection in Life Science. Single Molecule*, 2000, 1:s5-s16.
8. K. Kitamura, M. Tokunaga, A. H. Iwane, A Single Myosin Head Moves Along an Actin Filament with Regular Steps of 5.3 Nanometers. *Nature*, 1999, 397:129.
9. K. Visscher, M. J. Schnitzer, S. M. Block, Single Kinesin Molecules Studied with a Molecular Force Clamp. *Nature*, 1999, 400:184.
10. Y. Okada, N. Hirokawa, a Processive Single-Headed Motor: Kinesin Superfamily Protein KIF1A. *Science*, 1999, 283:1152.
11. Miklos S. Z. Kellermayer, Steven B. Smith, Carlos Bustamante, Mechanical Fatigue in repetitively Stretched Single Molecules of Titin. *Biophysical Journal*, 2001, 80:852-863.
12. Yu-Long Sun, Zong-Ping Luo, Kai-Nan An, Stretching Short Biopolymers Using Optical Tweezers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286:826-830.
13. Tadashi Fujii, Yu-Long Sun, Kai-Nan An, Mechanical Properties of Single Hyaluronan Molecules. *Journal of Biomechanics*, 2002, 35:527-531.
14. G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, A. Libchaber, Backscattering from a Teched Bead as a Probe of DNA Flexibility. *Applied Physics Letters*, 1998, 73:291-293.

15. Lebedev, P.N., Experimental examination of light pressure. *Ann. Der Physik* 6, 433.
16. Nichols, E.F., and Hull, G.F., *Phys. Rev.* 1901, 13:301.
17. J.E. Bjorkholm, R.R. Freeman, D.B. Pearson. Efficient transverse deflection of neutral atomic beams using spontaneous resonance-radiation pressure, *Phys.Rev.A*, 1981, 23:491.
18. W.D. Phillips, H.J. Metcalf. Laser cooling and electromagnetic trapping of neutral atoms., *J.Opt.Soc.Am,B*, 1985, 2:1751
19. A. Aspect, J. Dalibard, A. Heidmann, et al. Cooling atoms with stimulated emission., *Phys.Rev.Lett.*, 1986, 57:1688.
20. David G. Grier, A revolution in optical manipulation. *Nature*, 2003, 424:810.
21. A. Ashkin, Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Phys.Rev.Lett.*, 1970, 24:156-159.
22. A. Ashkin and J.M.Dziedzic, Optical levitation of liquid drops by radiation pressure, *Science*, 1975, 187:1073-1075.
23. Ashkin, A. & Dziedzic, J. M., Optical levitation in high-vacuum. *Appl. Phys. Lett.* , 1976, 28:333-335.
24. Ashkin, A. & Dziedzic, J. M. Feedback stabilization of optically levitated particles. *Appl.Phys. Lett.* 1977, 30: 202-204
25. A. Ashkin, Observation of Light Scattering from Nanospherical Particles Using Optical Levitation, *Appl. Optics*, 1980, 19: 660.
26. Haowei Wang, Xiaohui Liu, Yinmei Li. Isolation of a single rice chromosome by optical micromanipulation. *J.Opt. A: Pure Appl. Opt*, 2004, 6:89.
27. 王浩威, 刘晓辉, 李银妹等, 应用光学微操作技术分选单条水稻染色体. *生物物理学报*, 2004, 20: 50.
28. K. Visscher, M. J. Schnitzer, S. M. Block, Single Kinesin Molecules Studied with a Molecular Force Clamp. *Nature*, 1999, 400:184.
29. K. Svoboda, C. F. Schmidt, S. M. Block, Direct Observation of Kinesin Stepping by Optical Trapping Interferometry. *Nature*, 1993, 365:721-727
30. Mark J. Schnitzer, Steven, M. Block, Kinesin Hydrolyses one ATP per 8-nm Step. *Nature*, 1997, 388:386
31. Mark J. Schnitzer, Koen Visscher, Steven, M. Block, Force Production by Single Kinesin

- Motors. *Nature Cell Biology*, 2000, 2:718.
32. Miklos S. Z. Kellermayer, Steven B. Smith, Henk L. Granzier, Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers. *Science*, 1997, 276:1112-1116
 33. Miklos S. Z. Kellermayer, Steven B. Smith, Carlos Bustamante, Mechanical Fatigue in repetitively Stretched Single Molecules of Titin. *Biophysical Journal*, 2001, 80:852-863.
 34. Xiaohui Zhang, Kenneth Halvorsen, Timothy A. Springer et.al. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand Factor, *Science*, 2009, 324:1330-1334.

第二章 光镊技术研究 NK 细胞的识别及杀伤

免疫是指机体的免疫系统识别自身与异己物质，并通过免疫应答排除抗原性异物，以维持机体生理平衡的功能。机体的免疫系统包括两部分，由皮肤、黏膜以及体液中的杀菌物质、吞噬细胞组成天然防御系统，而免疫器官和免疫细胞是人体出生以后逐渐建立起来的后天防御系统。

免疫细胞主要是指能识别抗原，产生特异性免疫应答的淋巴细胞，在体内分布很广泛，包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、K 淋巴细胞和 NK 淋巴细胞。NK 细胞，即天然杀伤细胞(Natural Killer Cells, NK Cells)，自 70 年代初被发现以后，逐渐成为国际国内免疫学领域的一个热点。学者们提出 NK 细胞是机体天然免疫力 (Innate Immunity) 的主要承担者，并发现 NK 细胞不仅对癌细胞,对病毒,胞内寄生菌和老化变异细胞亦具有极强的清除能力，充分证实了 NK 细胞作为免疫监视第一道防线所担负的重任【1，2】。

2.1 NK 细胞简介

NK细胞是免疫系统中不同于T细胞和B细胞而存在的第三种免疫细胞，占淋巴细胞5%—10%，其体积较大，平均直径10~16微米，胞浆丰富，内含大量嗜苯胺颗粒，故称为大颗粒淋巴细胞。因为NK细胞没有T细胞和B细胞的特征和表面标志，所以又被称为裸细胞。NK细胞可以不经初次免疫，又无须抗体参与，就可以直接非特异性的杀伤被病毒感染的细胞和肿瘤细胞，具有抗肿瘤和抗感染的作用。以上特征使NK细胞成为非特异性免疫的重要成员之一。

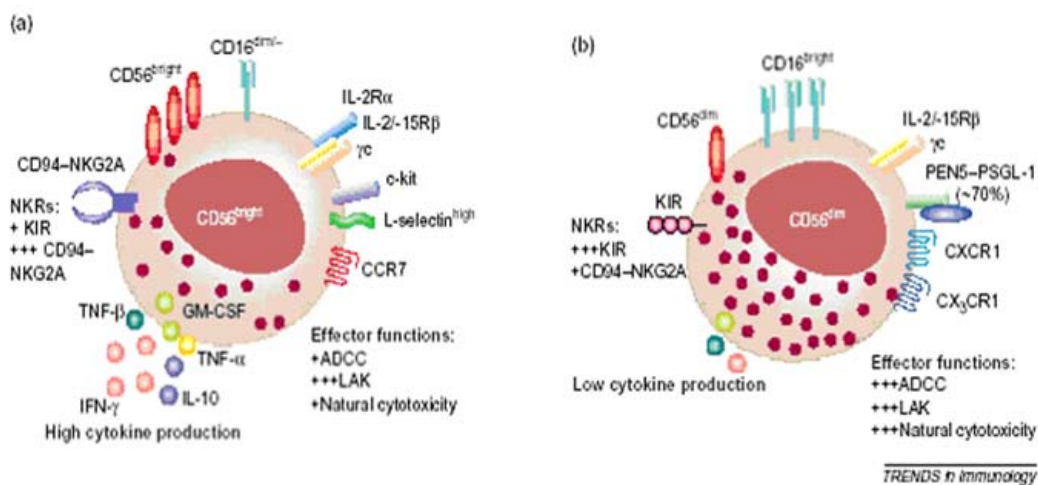


图2.1 NK细胞及其结构

NK细胞活化过程中的信号转导(signal transduction)及其分子基础极为复杂,是目前分子免疫学研究的热点【3-7】。NK 细胞活化过程可以简单地描述为:效应细胞与靶细胞相互作用,效应细胞上的表面分子识别其在靶细胞上的配体,表面分子发生运动并重新定位,免疫突触形成,效应细胞信号通路活化并最终介导细胞效应的产生,包括杀伤作用,细胞因子的分泌,淋巴细胞的进一步活化等等。

正常情况下,NK细胞主要存在于外周血,脾脏和骨髓中,但可以在不同的趋化因子的作用下向感染部位迁移并执行功能。NK细胞还可以通过分泌细胞因子和趋化因子来调节机体的免疫应答。另外NK细胞还参与移植排斥反应,自身免疫疾病和超敏反应。

因为NK细胞具有天然杀伤效应功能,所以就必然要求NK细胞不对自身的正常的细胞进行攻击,也就是说对自身的细胞耐受。NK细胞表面活化性受体和抑制性受体(表1)的平衡控制着NK细胞的细胞毒活性【8-10】。

表1 NK 细胞表面受体

Receptor	Species	Class	Motif/Adaptor	Ligand
Adhesion receptor				
CD2 (LFA-2)	H, M	IgSF	Proline-rich domain	CD48, CD58 (LFA-3)
CD11a (LFA-1)	H, M	IgSF	Src family kinases, PI3K	CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2)
CD11b (Mac-1)	H, M	IgSF	?	CD54 (ICAM-1)
CD43 (sialoadhesin)	H, M	IgSF	?	?
CD44	H, M	IgSF	?	Hyaluronic acid
CD49b (DX5)	M	IgSF	?	?
CD56 (N-CAM)	H	IgSF	?	?
Lag3	H	IgSF	?	HLA class II
Activating receptor				
CD16 (FcγRIII)	H, M	IgSF	ITAM/FcγR	Immune complexes
CD25 (IL-2Rα)	H	CytoR	?	IL-2
CD27	H, M	TNFRSF	TRAF	CD70
CD28	H, M	IgSF	YXXM/PI3K	CD80, CD86
CD69	H, M	C-lectin	?	?
CD94/NKG2C, E	H, M	C-lectin	ITAM/DAP12	HLA-E (H), Qa-1b (M)
CD122 (IL-2Rβ)	H, M	CytoR	JAK1, 3/STAT5a, 5b	IL-2, IL-15
CD161	H, M	C-lectin	?	Clr-g (NKR-P1F)
CD226 (DNAM-1)	H	IgSF	?	CD112 (Nectin-2), CD155
CD244 (2B4)	H, M	SLAM	TXYXXV-I/SAP, Fyn	CD48
NKG2D	H, M	C-lectin	YINM/DAP10, PI3K	MICA, B, ULBs (H), Rae1s(H, M), H60 (M)
KIR2S, KIR3S	H	IgSF	ITAM/DAP12	HLA class I
Ly49D, H, P	M	C-lectin	ITAM/DAP12	H-2 class I, MCMV m157 (Ly49H)
NCR (NKp30, 44, 46)	H, M (NKp46)	IgSF	ITAM/FcγR, CD3ζ (H), DAP12	Viral hemagglutinins (?)
ILT-1 (Ig-like transcript 1)	H	IgSF	ITAM/FcγR, DAP12	?
IFN-α/βR	H, M	CytoR	JAK1, Tyk2/STAT1, 4	Type I interferons

gp49A	M	C-lectin	ITAM	?
Inhibitory Receptor				
CD85 (ILT-2)	H	IgSF	ITIM/SHP-1	HLA-A, -B, -G
CD94/NKG2A	H, M	C-lectin	ITIM/SHP-1, -2	HLA-E (H), Qa-1b (M)
CD161	M	C-lectin	ITIM/SHP-1, -2	Clr-b (NKR-P1D)
CD244 (2B4)	H, M	SLAM	TXYXXV-I/SAP, Fyn	CD48
KIR2DL, KIR3DL	H	IgSF	ITIM/SHP-1, -2	HLA class I
Ly49 A-C, E-G, I-O	M	C-lectin	ITIM/SHP-1, -2	H-2 class I
KLRG1	M	C-lectin	ITIM/SHP-1, -2	?
TGF-βR	H, M	CytoR	Smad2	TGF-β family
IL-10R	?	CytoR	JAK2, Tyk2/STAT3	IL-10

2.2 NK 细胞识别假说

2.2.1 Missing Self 模型

与 T、B 细胞不同，NK 细胞对靶细胞的反应性不是由单一的抗原受体决定的，而是由 NK 细胞表面一系列的活化型和抑制型受体决定。最初的“Missing-self”模型认为，那些表达 MHC-I 类分子对应的抑制型受体的 NK 细胞在遇到不表达 MHC-I 类分子，或者是 MHC-I 类分子下调的靶细胞时，NK 细胞的抑制状态就会被解除。事实上，病毒感染以及细胞的恶性转化通常会导致细胞表面的 MHC-I 类分子的下调从而逃避 CTL 的攻击，而 NK 细胞的这种“missing-self”识别恰好对免疫系统起到补充作用。

NK 细胞表面并不只有抑制型受体，还存在活化型受体。实际上，NK 细胞表面的抑制型受体起着一个可变电阻的作用，调节活化型受体的信号。实验证据表明，抑制型受体只能够削弱，而不能全部终止 NK 细胞的效应功能，并且靶细胞表面 MHC-I 类分子的数量与抑制效果是相对应的。有实验表明，当多个活化型受体被同时刺激，或者是给与一个活化型受体的信号足够强的时候，即使靶细胞表面的 MHC-I 类分子与 NK 细胞表面的抑制型受体结合，NK 细胞也能够对靶细胞进行攻击。所以，近来“missing-self”模型被修改成为“NK 细胞会攻击那些缺乏 MHC-I 类分子或者是高表达 NK 细胞活化型受体配体的靶细胞”。这个模型也被称为“信号平衡”模型。

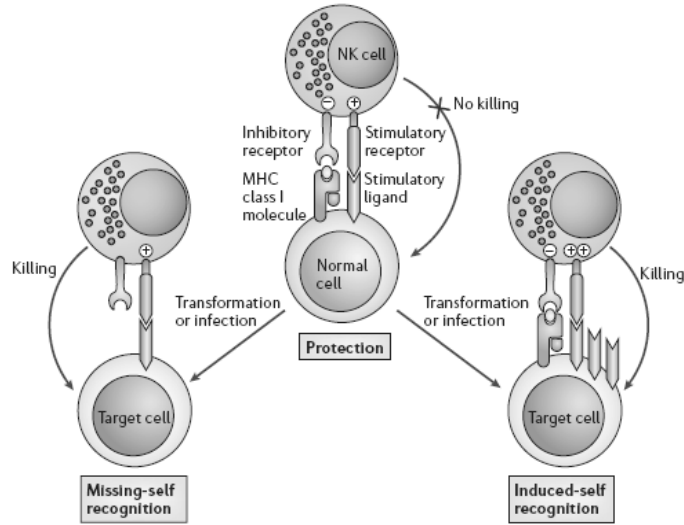


图 2.2 NK 细胞的免疫角色与刺激/抑制型受体信号平衡

“Missing-Self”假说的一个合理推论是 NK 细胞对潜在靶细胞不进行杀伤要么是由于抑制型受体介导的主动抑制，要么是由于缺乏持续有效的活化信号来激起反应（图 2.3）。后一种情况的一个代表性例子是循环外周血 NK 细胞与人红细胞之间的相互作用。尽管人红细胞不表达 MHC-I 类分子，NK 细胞依然不对其进行攻击；因此，红细胞缺乏能够刺激 NK 细胞表面活化型受体的配体。当然，对于那些表面不表达或低表达 MHC-I 类分子的正常组织细胞来说，通过表达 NK 细胞表面抑制型受体的非 MHC-I 类分子配体也可以起到保护作用。

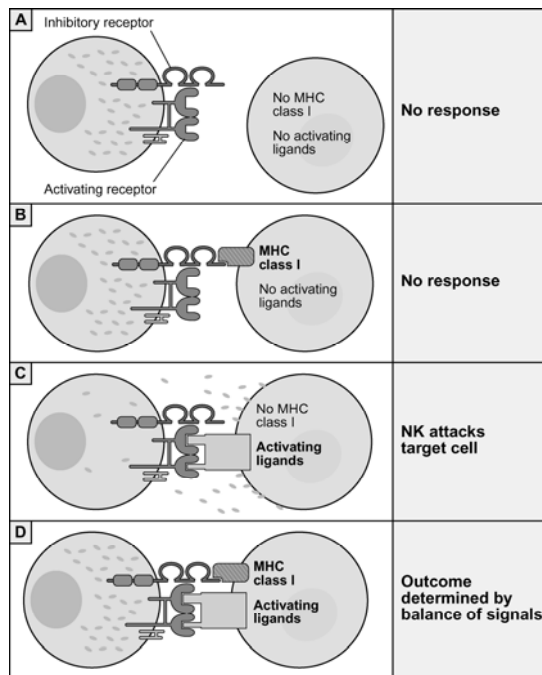


图 2.3 Missing-Self 假说示意图

2.2.2 At least one 模型

既然 NK 细胞只通过 MHC-I 类分子特异性的抑制型受体与靶细胞表面的 MHC-I 类分子作用来达成自身耐受，这就必然要求每个 NK 细胞都必须表达自身 MHC-I 分子特异性的抑制型受体。所以就有一种模型认为每个 NK 细胞表面至少表达一种 MHC-I 类分子对应的 NK 细胞的抑制性受体，这就是“at least one”模型。可能的原因有两个：第一，那些不表达的 MHC-I 类分子对应的抑制型受体的 NK 细胞在发育的时候被清除掉了；第二，对于单个的 NK 细胞，在发育的时候会持续不断的表达抑制型受体，直到该细胞至少表达一个抑制型受体。

2.3 NK 细胞识别和杀伤机制

1、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC）

NK 细胞低亲和力的 CD16 分子与靶细胞-IgG 抗体复合物结合后，活化蛋白酪氨酸激酶（PTK）使 PLC- γ 的酪氨酸磷酸化，裂解膜磷脂酰肌醇为三磷酸肌醇（IP₃）和二酰甘油，IP₃ 增加细胞内游离钙浓度，进而释放细胞毒性物质（如穿孔素和颗粒酶）。研究发现，IgG1 抗体与凝集抗原作用能增强 IgG1 与 NK 细胞的结合，且去除岩藻糖的 IgG1 抗体更易募集和活化 NK 细胞，从而减少诱导 ADCC 所需的抗原量并且明显提高 ADCC 作用【11】。

2、天然细胞毒性

与 ADCC 不同，该作用需要多个表面受体结合靶细胞传递溶细胞信号。例如 CD11a/CD18、CD2、CD44、CD54、CD58、CD69 均有利于 NK 细胞与靶细胞建立稳定连接，形成免疫突触。在动物模型中，Lck、Fyn、ZAP-70 分子的缺失会引起 T 细胞缺陷，但却不影响天然细胞毒性，表明 NK 细胞发挥细胞毒性不一定需要这些激酶。

3、NK 细胞介导的凋亡

靶细胞对 NK 细胞诱导的凋亡很敏感，尤其大多数对自然杀伤不甚敏感的肿瘤细胞对 NK 细胞诱导的凋亡却很敏感。NK 细胞直接通过胞吐作用释放穿孔素、颗粒酶、颗粒溶素等细胞毒性颗粒，活化 caspase 途径诱导靶细胞凋亡；此外，颗粒酶还可以通过受体介导的胞吞作用而摄入，颗粒酶摄入靶细胞后，穿孔素破坏核内膜，通过线粒体、caspase 途径及不依赖 caspase 途径诱导细胞凋亡【12】。

4、NK 细胞产生的细胞因子

除了直接释放细胞毒性颗粒发挥溶细胞效应外, NK 细胞还能合成和分泌多种细胞因子, 如 IFN- γ 、TNF- α 、L-1、L-5 和 G-CSF 等。其中 IFN- γ 是研究最多的因子, 它能抑制肿瘤细胞增殖, 杀伤感染细胞, 通过增加 MHC- I 及 II 类分子的表达和巨噬细胞的活化激发天然和获得性免疫反应【13】。Agerberth 等【14】还建立的活化 NK 细胞趋化因子库, 包括 XCL1、CCL1、CCL3、CCL4、CCL5、CCL22、 α -防御素和 CXCL8, 这些因子在 NK 细胞发挥免疫功能和调节造血方面起着重要作用。

5、NK 细胞受体

尽管 NK 细胞杀伤靶细胞的信号通路很多, 但 NK 细胞受体的作用仍值得重视。目前认为抑制 NK 细胞活性需要 MHC- I 类抑制受体的识别。NK 细胞识别自我与非我并不需要体细胞基因重排产生识别不同抗原的克隆, 而是表达多种受体执行功能。NK 细胞受体主要包括免疫球蛋白超家族 (如 KIR), 天然细胞毒性受体 (NCR), C 型凝集素家族如 Ly49 和 NKG2 受体。

不同 NK 细胞表达不同的活化抑制受体和共刺激受体, 决定了 NK 细胞的反应多样性。关于 NK 细胞受体-配体的研究一直是 NK 细胞研究的热点。新的受体和配体的发现和作用机制的探讨将进一步揭开 NK 细胞的奥秘, 为深入研究 NK 细胞在免疫系统和疾病的作用提供理论基础。

2.4 光镊研究 NK 细胞特异性识别的优势

在单细胞、单分子水平对生物单分子行为 (包括构象变换、相互识别、相互作用等) 的实时动态检测以及在此基础上的操控、调控等, 是分子生物学的自然延伸和必然趋势。目前 NK 细胞与调控细胞、靶细胞以及调控分子 (如识别受体的配体、细胞因子的配体) 的相互作用的研究方法大都不是单细胞或单分子的行为观察, 也无法达到实时动态的效果, 更多反映的是复杂生物体系的整体反应。因此, 进行单细胞单分子研究, 对弄清 NK 细胞的识别、活化和杀伤机制至关重要。

单分子研究技术如光镊技术、AFM、近场光学技术等的发展对生物单细胞单分子行为研究有重要的帮助。由于光镊是基于光学显微镜的微纳米操控技术,

非常适合进行活体单细胞单分子的实时动态研究。利用光镊技术可以将拟观察“对象”或“对象们”以研究者的意愿进行“配对”或“配群”并观察“配对”或“配群”后的新变化，以往对细胞或单分子的观察依赖于“微粒”之间自由运动而随机“配对”或“配群”，无法进行“科学设计”，故所获得信息并不全面。光镊技术用于 NK 细胞的特异性分子识别研究不仅可以验证传统方法的结果，而且很可能纠正或弥补传统方法的不足，并提出新的观点。此外，在操控细胞的同时，光镊还可以进行微小力的测量，可以实现 NK 细胞表面受体与配体之间的相互作用力的测量。

2.5 实验材料与实验装置

2.5.1 实验材料

1、细胞株

人慢性骨髓性白血病细胞系 K562, 人天然杀伤细胞细胞系 NK92, 中国科学技术大学免疫研究所培养。人慢性骨髓性白血病细胞系 K562 被认为是人天然杀伤细胞系 NK92 的杀伤敏感细胞，然而对于这对细胞的识别方式一直不清楚。

2、细胞培养试剂

RPMI-1640 培养液 (GIBCO 公司), 三蒸水 1000ml, 电磁搅拌 30 分钟, 加入 NaHCO_3 2g, 加 HCl 调 PH 到 7.2~7.4, 过滤除菌, 作无菌试验, 4℃ 保存, 使用时加入灭活新生牛血清至浓度为 10%。

α MEM 培养基 (GIBCO 公司), 三蒸水 1000ml, 电磁搅拌 30 分钟, 加入 NaHCO_3 2.2g, 加 HCl 调 PH 到 7.2~7.4, 过滤除菌, 4℃ 保存, 使用时加入灭活新生牛血清和马血清至浓度为 12.5%。

新生牛血清 (四季清公司), 无支原体污染, 使用前 56℃ 水浴 30 分钟灭活, 4℃ 保存, 即用即加。

3、其他实验仪器

CO ₂ 细胞培养箱	3111 series Thermo Forma
常温台式离心机	Sigma公司
1.5mL低温冷冻离心机	ZENTRIFUGEN公司
二氧化碳培养皿	MIU-IBC-IF-2 Olympus

流式细胞仪 (FACS 仪)

BD 公司

4、悬浮细胞培养技术

K562 细胞为悬浮生长的细胞, 可在完全 RPMI-1640 培养液中培养, 该培养液由 90% 不完全 1640 培养液[RPMI-1640 液 95mL; 0.1M 丙酮酸钠 1mL; 0.2M 谷氨酰胺 1mL; 1M Hepes 1mL; 7.5% NaHCO₃ 1mL; 青霉素、链霉素(各 1 万单位) 1mL]和 10% 灭活胎牛或新生牛血清。传代时直接传代或离心收集细胞后传代。通常采用离心方法传代, 即将细胞连同培养液一起转移到离心管内, 离心 800~1000 rpm 5min, 然后去除上清, 加新的培养液到离心管内, 用吸管吹打使之形成细胞悬液, 然后传代接种。根据细胞数量, 可采用 1 瓶传 3 瓶或其它比例传代。NK92 细胞也为悬浮生长细胞, 传代方法类似, 不同之处在于使用完全 α MEM 培养基, 同时加入重组人 IL-2 至终浓度 100U/mL。

5、K562 细胞 CFSE 染色

(1) 将分离的单个核细胞悬液调至 2×10^6 细胞/ml, 取 1ml 细胞悬液加入 15ml 离心管;

(2) 取 1ml PBS/0.1%BSA, 加入 4ul 5mM CFSE 溶液, 充分混匀 (终浓度为 20uM);

(3) 将 20uM CFSE 溶液加入细胞悬液中, 用吸管充分混匀, 37°C 5% CO₂ 培养箱避光孵育 10min, 使 CFSE 与细胞充分结合;

(4) 加入 10mL 冰浴的完全培养基, 4°C 避光孵育 5min, 中止 CFSE 与细胞的结合;

(5) 离心 1200rpm \times 10min, 再用冰浴的 PBS/0.1% BSA 洗涤 3 次, 用完全培养基重悬。

2.5.2 实验装置

光阱光源采用 He-Ne ($\lambda=633\text{nm}$, P=35mw Polarized, Coherent, USA)激光器。He-Ne 激光经过耦合光路进入倒置显微镜 (Olympus IX70), 由 100 倍的油浸物镜 (N. A. =1.35) 强汇聚在样品池内形成光阱。样品被直径 1cm, 厚 2mm 的玻璃样品池密封, 防止样品泄漏和流动。小球的动态图像由 CCD (Coolsnap cf) 相机采集并显示在计算机屏幕上。激发光源使用的是生物显微镜 (Olympus IX70) 自带的激发光源 (100w 汞灯, USH102D)。它发出的激发光由显微镜荧光通道进

入镜体，然后激发光再进过分光镜进入 100 倍油浸物镜，照射到样品池中。通过选择显微镜镜体中不同型号的分光镜可以得到不同波长的激发光。

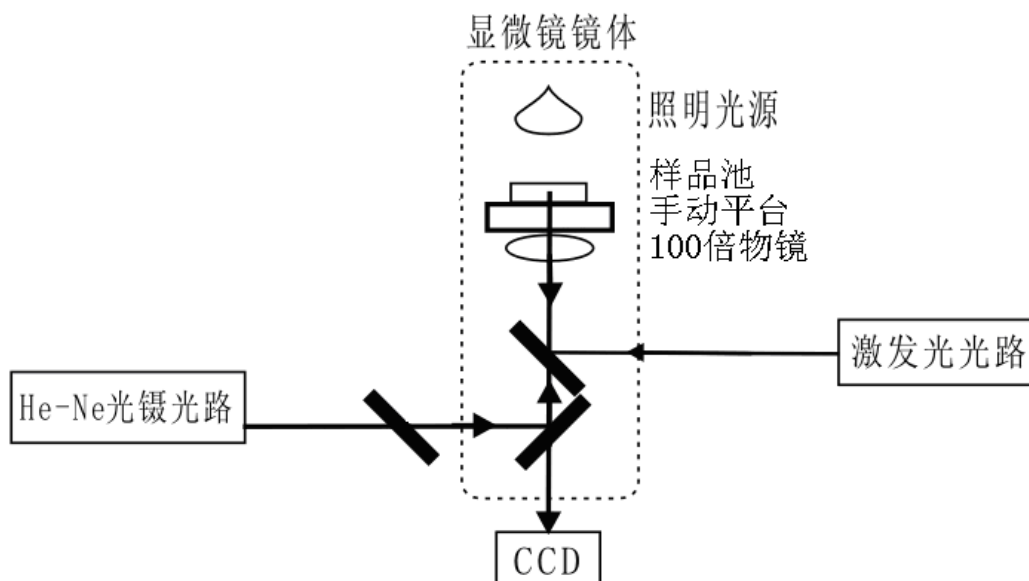


图 2.4 实验设备图

为了保持细胞较长时间的活性，以延长可供实验操作的时间，我们在实验平台上安装了二氧化碳培养皿，获得 37 摄氏度的恒温以及 5% 的二氧化碳浓度，维持细胞生存。

2.6 NK 细胞对靶细胞杀伤过程的实时观测

2.6.1 NK92 细胞

由于 NK92 细胞和 K562 细胞的大小均在 10~15 微米的范围，为了能在显微镜下区分两种细胞，将 K562 细胞用非特异性染料 CFSE 进行荧光标记。CFSE 染色效率由流式细胞仪进行检测，结果显示染色效率接近 100%。

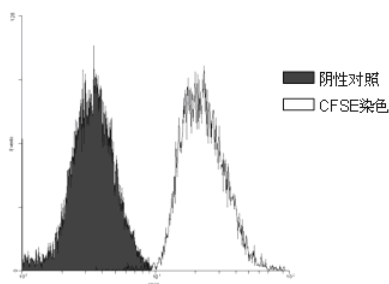


图 2.5 K562 细胞染色效率流式检测结果

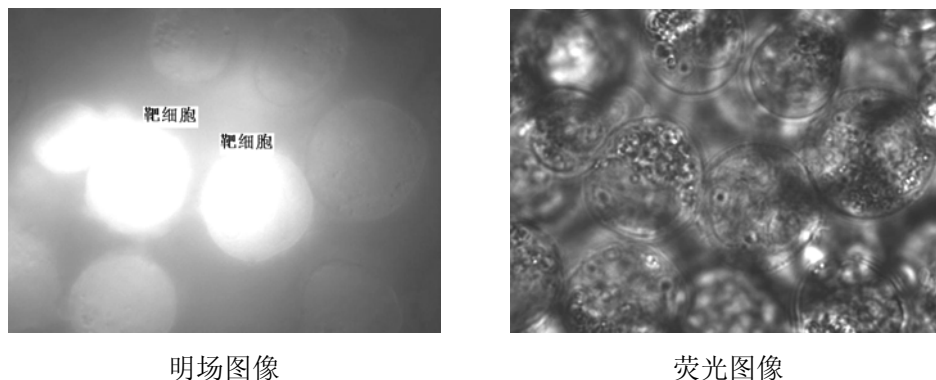
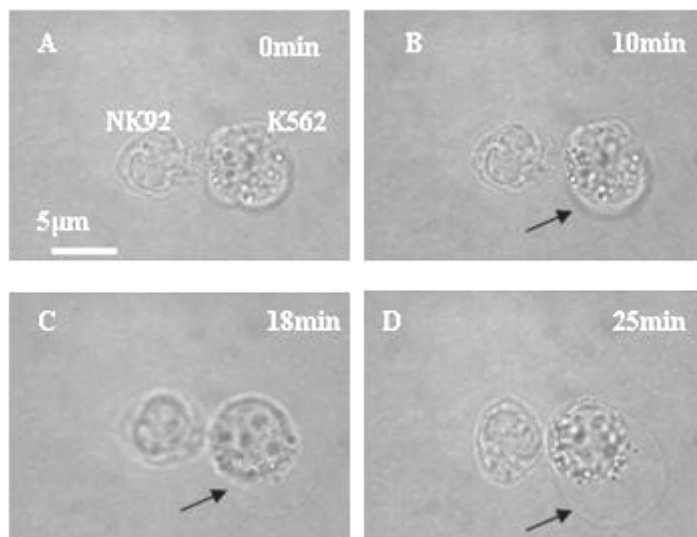


图 2.6 荧光染色法分辨靶细胞和效应细胞

首先，利用生物常规放射性实验检测效靶比（NK92 与 K562 的比例）10: 1 时 K562 细胞被杀伤比例大于 50%，表明 NK92 对 K562 有比较强的杀伤作用。然后，我们利用光镊技术研究单个 NK 细胞对单个 K562 细胞的杀伤过程。将 K562 和 NK92 细胞按照 1:1 的比例混合，加入到样品槽中。在显微镜下找到合适的细胞，并通过荧光变换确定细胞的种类（能被激发荧光的为 K562 细胞）。利用光镊操控一个 NK92 细胞接近 K562 细胞，并使两细胞紧密接触，如图 2.7（A）所示。两细胞接触经过约 10 分钟时间，观测到 K562 细胞开始发生膨胀，见图 2.7B 所示，该现象表明细胞膜对杀伤过程有所响应。随着两细胞接触时间的增加，K562 细胞突起处逐渐增大变为囊泡如图 2.7（C，D），整个过程约 25 分钟完成，如图 2.7 B—C—D 所示。膨胀突起的囊泡，内部不含细胞质，透光性好。



A、NK92 与 K562 接触；B、K562 表面开始出现突起
C、突起变为囊泡；D、囊泡增大到接近原细胞体积大小

图 2.7 NK92 细胞对 K562 细胞的杀伤

观察整个样品，发现未与 NK92 细胞接触的 K562 细胞，其表面没有突起或囊泡。

Calcein-AM 荧光检测 Ca 离子流失情况：

NK92 细胞对 K562 细胞作用后，K562 细胞表面出现囊泡，为了检验细胞膜的通透性是否遭到破坏，我们利用 Calcein-AM 荧光检测细胞内 Ca 离子是否流失。Calcein-AM 是一种特殊荧光染料【15】，可标记细胞中的 Ca 离子，当细胞膜选择通透性遭到破坏，导致 Ca 离子流失时，荧光将迅速减弱，该方法可以检测细胞是否具有完整的膜结构。将 K562 细胞用 calcein-AM 荧光染料处理，按 10: 1 效靶比（NK92 细胞与 K562 细胞数量比）混合，置于荧光显微镜下观察（图 3A），四个小时后再次观察，发现荧光强度未明显降低，K562 细胞数量也未明显减少（图 2.8B）。

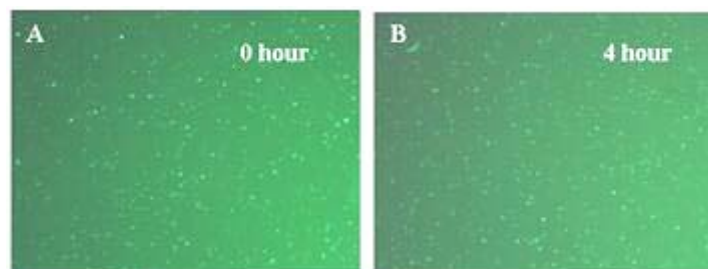
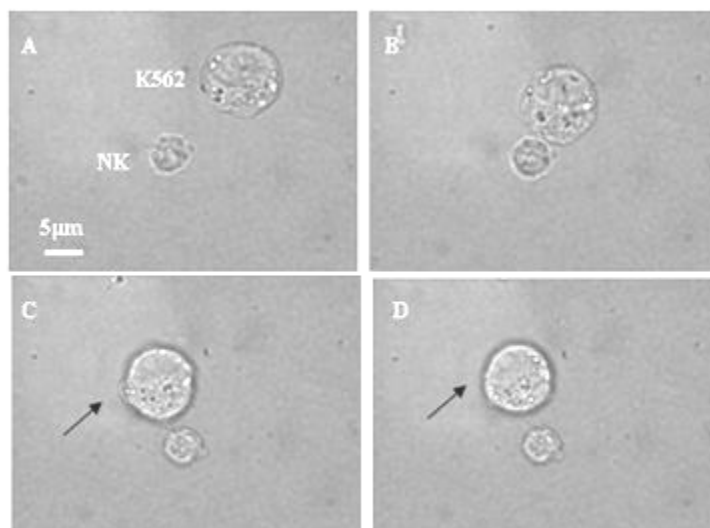


图 2.8 Calcein-AM 荧光检测结果

2.6.2 人外周血 NK 细胞

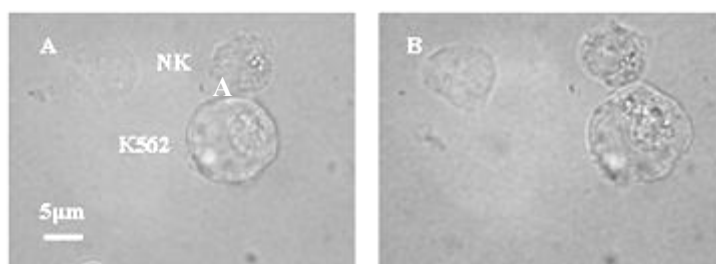
人外周血 NK 细胞约 5 微米，与 K562 细胞在形态上可以区别，如图 2.9 所示。用光镊使两细胞接触后，K562 细胞表面出现一个小的突起，人外周血正常 NK 细胞对 K562 细胞也有一定的杀伤效果如图 2.9 (C) 所示，但此突起比 NK92 细胞对 K562 细胞杀伤时所出现的囊泡小很多。经过较长时间的接触，K562 细胞表面的突起没有变化；当 NK 细胞离开 K562 细胞时，即两细胞分开后，发现 K562 表面囊泡迅速减小并消失，如图 2.9D。



A.光镊捕获 NK 细胞；B.移动平台，使 K562 细胞靠近 NK 细胞；
C.K562 表面出现突起；D.两细胞分开后，NK 细胞表面突起消失。

图 2.9 人外周血正常 NK 细胞对 K562 的杀伤

另外，实验中还观察到 K562 被杀伤后，表面并未出现突起，而是体积增大（图 2.10），增大幅度可达原体积的 10~20%。



A. K562 细胞与 NK 细胞接触；B. K562 细胞体积增大

图 2.10 NK 细胞对 K562 细胞杀伤

2.7 讨论

实验中发现，NK92 细胞和人外周血正常 NK 细胞对 K562 细胞都有杀伤效果，被杀伤的 K562 细胞形态上发生了变化，表现为细胞表面出现突起、囊泡或者体积增大。该现象与文献报道 T 细胞对靶细胞杀伤现象不同【16】，与 NK 细胞对 YB 细胞的杀伤也不同【17】，K562 细胞被 NK 细胞攻击后没有坏死解体，而是细胞表面出现囊泡。可见不同的淋巴细胞攻击不同的靶细胞时，杀伤现象和机制都不尽相同。

单个 NK92 细胞和单个 NK 细胞对 K562 杀伤程度不同，NK92 细胞对靶细

胞杀伤后,靶细胞表面会出现囊泡,而且囊泡体积会逐渐增大,当 NK92 细胞远离靶细胞后,囊泡不会消失即靶细胞形态无法恢复;而 NK 细胞杀伤作用只会让靶细胞表面产生小的突起,且 NK 细胞远离后,靶细胞可以恢复原来形态。这表明 NK92 细胞对 K562 细胞的杀伤程度比 NK 细胞强,单个 NK 细胞对单个 K562 细胞没有致命效果, K562 细胞被 NK 细胞杀伤后可以自我修复。

本研究中,多例实验观察到被杀伤的 K562 细胞表面出现突起或囊泡现象(图 2.7, 图 2.9),囊泡内部无细胞质。但也观察到少数特别现象:即人外周血正常 NK 细胞与 K562 细胞接触后, K562 表面并未出现突起,而是细胞体积增大,其增大幅度可达原来体积的 10~20%,如图 2.10 所示。该结果与 Mikael Eriksson 观察到现象相近。这可能意味着 NK 细胞针对同一种靶细胞有着不同的杀伤方式,可能 NK 细胞与靶细胞在不同部位接触时,受到的激活信号不同而导致杀伤机制不同。

NK92 细胞对 K562 细胞作用后, K562 细胞表面出现囊泡,为了检验被杀伤的 K562 细胞膜的通透性是否遭到破坏,我们利用 Calcein-AM 荧光检测靶细胞内 Ca 离子是否流失。结果发现经过 4 小时的杀伤作用后, K562 细胞内荧光强度未明显降低, K562 活体细胞数量也未明显减少。这说明 NK92 细胞对 K562 细胞杀伤后细胞膜通透性未受到破坏。

根据生物常规放射性实验检测结果,我们观察到的 K562 细胞表面出现囊泡现象确实是 NK92 细胞对它的杀伤作用导致的,而且 K562 被杀伤后,细胞膜的通透性并未受到破坏,具体杀伤机制有待进一步探讨。

2.8 本章小结

我们利用光镊技术捕获了 NK 细胞,并移动 NK 细胞使其与 K562 细胞互相接触了一段时间,并且观察到了 K562 细胞的形变:即 k562 细胞出现了巨大的囊泡。这可能是 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤效应。但是因为 K562 细胞并没有出现破裂、细胞质流出等更明显的现象,故在判断 K562 细胞是否死亡时遇到了困难。经过更换实验方法,对 K562 细胞染上特殊荧光材料 Calcein 后发现, K562 细胞出现囊泡后在激发光照射下仍会发出荧光,这很可能说明 NK 细胞对 K562 的杀伤仅限于破坏 K562 的部分结构,但无法使其完全破裂。

我们利用光镊技术在单细胞层次研究了 NK92/NK 细胞对 K562 细胞的杀伤，所观察到的实验现象及其分析讨论，对认知 NK92/NK 细胞对 K562 细胞的宏观识别杀伤机制及细胞表面分子微观作用机理提供重要实验基础。

利用光镊技术研究 NK 细胞杀伤过程，与流式细胞术、免疫组化等方法相比有很多优点，可以方便的操控两个细胞，使他们接触并实时观察杀伤现象，从单细胞层次研究 NK 细胞的杀伤，更有助于理解杀伤的机制。

参考文献

1. Trinchieri , G. *Adv. Immunol.* 1989 47:187–376.
2. 金伯泉.细胞与分子免疫学[M].世界图书出版公司,1995:259-274
3. Gumperz , J.E., and P. Parham. *Nature.* 1995 378: 245-248.
4. Ryan, J.C., E.C. Niemi el. *J. Exp. Med.* 1995 181:1911–1915.
5. Lanier, L.L. *Curr. Opin. Immunol.* 1997 9:126–131.
6. Yokoyama, W.M. *Curr. Opin. Immunol.*1998 10:298–305.
7. Marcenaro E et al, *Eur J Immunol*, 2003,33(12):3367-3376
8. Natarajan K, Dimasi N, Wang J, et al. *Annu Rev Immunol*, 2002,20,853
9. Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. *Eur J Immunol*, 2002,32:1025
10. 田志刚, 魏海明等. *中国免疫学杂志* 2004 20: 33-35
11. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y etal. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2327-2336
12. Smyth M J, Cretney E, Kelly J M etal. *Mol Immunol*, 2005, 42:501-510.
13. Zompi S, Colucci F. *Immunology Letters*, 2005, 97:31-39.
14. Agerberth B, Charo J, Werr K etal. *Blood*, 2000, 96: 3086-3093.
15. Aurelie Wiedemann, Davie Depoil. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 10985-10990.
16. Paul A.Negulescu el. *Immunity*, 1996 Vol. 4, 421-430.
17. Mikael Eriksson el.,*Journal of Experimental Medicine* 1999 7:1005-1012s

第三章 光镊技术研究 LFA-1 分子与其抗体间相互作用

3.1 LFA-1 分子结构及其在免疫反应中的功能

淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1, CD11a/CD18)最初是在 CTL 介导靶细胞杀伤实验中发现的与 CTL 功能相关的膜蛋白分子。LFA-1 属白细胞整合素(leukocyte integrin)家族, 或白细胞黏附分子(leukocyte cell adhesion molecule)家族, 局限在白细胞上表达, 分布广泛。LFA-1 组成型地表达于淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等多种免疫细胞表面, 可参与细胞毒 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 自然杀伤细胞和淋巴细胞激活的杀伤细胞(lymphokine activated kill cell, LAK 细胞)的杀伤效应; 辅助性 T 淋巴细胞对外来抗原和丝裂原的增生反应; 粒细胞及单核细胞介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC); 白细胞的定位、渗出和迁移、淋巴细胞向外周淋巴结的归巢(homing)等【1, 2】。CD18(β_2 整合素)基因缺陷导致 LFA-1 等整合素分子功能不全, 白细胞不能黏附和穿过血管内皮细胞, 由此引起一种称之为白细胞黏附缺陷症(leukocyte adhesion deficiency, LAD)的严重免疫缺陷病。欧洲开展的一项研究表明, 应用 LFA-1 抗体阻断 LFA-1/ICAM-1 协同刺激信号可减少抑制物被排斥和 GVHD 发病率, 但该法同时造成了严重感染率和白血病复发率的增加。可见, LFA-1 与器官移植的排斥、感染、自身免疫疾病以及肿瘤复发等临床密切相关【3-6】。

3.1.1 LFA-1 的分子结构

LFA-1 是 β_2 家族整合蛋白, 整合素是一大类异源二聚体膜糖蛋白, 由不同种 α 和 β 亚基组合而成, 其 N 端为配体结合位点。LFA-1 为 α 链 CD11a 和 β 链 CD18 组成的异二聚体, 两条多肽链通过非共价键连接而成, 分子质量为 180 / 95KDa。 α 亚单位是一典型的跨膜蛋白, 包括 1 个 15~25 氨基酸的引导序列, 1 个 1 063~1 089 氨基酸的胞外区, 1 个大约 26 氨基酸的胞浆区。其 mRNA 为 5.2Kb, 基因位于 16 号染色体 p11.1~13。成熟的 β 亚单位是一典型的 I 型跨膜蛋白, 由 747 氨基酸组成, 包括胞外区(678 氨基酸), 跨膜区(23 氨基酸), 胞浆区(46 氨基酸), 其 mRNA 为 3.0Kb, 基因位于 21 号染色体 q22.3。尽管 $\alpha\beta_2$ 的胞外区结构复杂, 但是其配体结合位点全部位于 α L 的 180 个残基所组成的插入(I)

结构域。CD11a I-domain 包括一个五股平行 β 折叠构成的核心，周围被 α 螺旋所包围(图 3.1)。

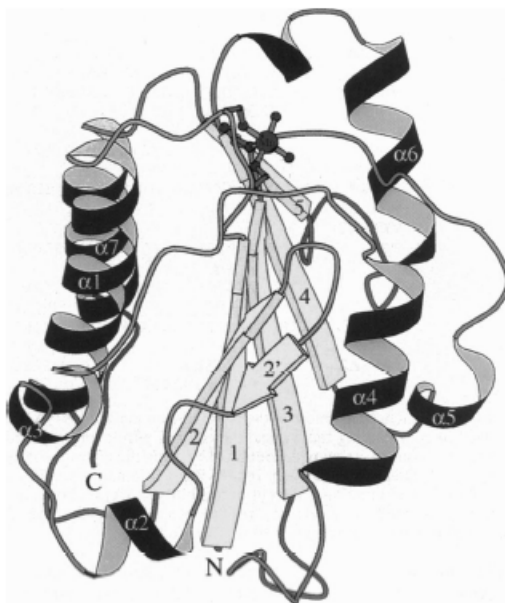


图 3.1 CD11a I-domain 结构示意图

3.1.2 LFA-1 在免疫系统中的功能

1、T 细胞的激活与调节

T 细胞的活化不仅取决于其 TCR/CD3 复合体对抗原提呈细胞 (APC) 表面主要组成组织 MHC 分子-抗原多肽的特异性双识别，还需要其他协同刺激信号。LFA-1/ICAM-1, LFA-1/ICAM-2, LFA-1/ICAM-3 等分子对之间的相互作用，可以提高 T 细胞对抗原刺激的敏感性，稳定细胞间接触，从而提高 T 细胞激活所不可缺少的协同刺激信号。T 细胞活化后，上述多种粘黏附分子表达水平均增高，而 LFA-1/ICAM-1 等表达增高又可增强树突状细胞、单核细胞等抗原提呈细胞的功能。

2、B 细胞的激活与调节

B 细胞表面所表达的黏附分子 (LFA-1/ICAM-1 等) 与滤泡树突状细胞表面相应配体相互作用，有助于 B 细胞的存活。静止的 B 细胞可借助 LFA-1/ICAM-1 黏附分子对之间的相互作用与活化 T 细胞黏附，使 T 细胞得以向 B 细胞传递活化信号。黏附分子介导的 T 细胞-B 细胞相互作用可调节 B 细胞向浆细胞分化并产生抗体。

3、参与细胞凋亡

大部分细胞需要与胞外基质黏附才能增生,组织一旦与基质分离,即可发生凋亡。LFA-1 与配体的有效结合可抑制凋亡【7】,其主要是通过骨架蛋白发生重排和通过衔接蛋白影响细胞的生长和分化。

4、LFA-1 与免疫性疾病

在炎症反应和免疫应答方面,LFA-1 具有关键作用。Borthwick NJ 等【7】用实验方法确定炎症信号刺激 LFA-1 持续高表达,使激活的 T 淋巴细胞不能正常凋亡,进而导致自体免疫性疾病。Richardson BC【8】认为自体免疫性疾病、炎症、早衰、肿瘤均与 T 淋巴细胞 DNA 去/低甲基化而引起的 LFA-1 过高表达密切相关。

3.2 NK 细胞表面的 LFA-1 分子研究

目前为止,没有发现某个受体在 NK 细胞毒作用中是必须或者足以激起免疫应答。一些重要的受体,如 NKG2D 和天然细胞毒受体 NKp46,在肿瘤和病毒感染细胞裂解中的重要作用在一些特定的 NK 细胞靶细胞组合中被很好的描述,提示 NK 细胞活化受体和活化途径中存在可能的冗余。LFA-1 分子在 NK 细胞毒作用过程中可能是一个重要的信号受体。在小鼠双 Syk 和 ZAP70 缺失的 NK 细胞以及针对缺乏 NKG2D 配体的靶细胞细胞毒作用中观察到 ITAM-和 NKG2D-非依赖的天然杀伤活性。这种杀伤活性对 Src 家族激酶的抑制和 PI3K 的抑制敏感。同时有报道观察到了 LFA-1 触发的靶细胞杀伤。

需要强调的是,LFA-1 对 NK 细胞毒作用早期信号的贡献与整合素介导的 T 细胞活化是完全不同的。T 细胞并不黏附到 ICAM 阳性的细胞上,除非有一个 inside-out 信号上调黏附亲和力。与 T 细胞相比,NK 细胞利用 LFA-1 直接和靶细胞接触,传递信号激发细胞毒作用。在这一点上,NK 细胞毒作用的触发更类似于中性粒细胞的天然反应,即 LFA-1 的聚集可以诱导脱颗粒。

由于每个 NK 细胞可同时表达多个或多种受体分子,这些分子在与相应配基结合后分别传递着阴性或阳性的信号,NK 细胞究竟是整合(或怎样整合)这些信号,抑或以某些为主某些为辅,抑或某一信号决定“全或无”,均将依赖于单分子单细胞行为观察得出结论。从单细胞、单分子层次研究 NK 细胞表面受体的活化机制可能更有利于揭示其本质。本章利用光镊技术研究 LFA-1 分子与其抗体间相互作用,不仅建立了一种测量细胞表面受体分子与其抗体或配体结合能力

的定量评价方法, 研究结论还可为 NK 细胞活化信号的数理模型的形成, NK 细胞活化/阻遏之谜的全面揭开奠定基础。

3.3 NK 细胞表面 LFA-1 分子与 Anti-LFA-1 分子的结合测定

3.3.1 样品试剂

1、血液来源

由安徽省立医院血液科提供,抽取正常人外周血,去血清后 4℃ 保存,并保证当天进行 PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) 分离。血液供者没有病毒感染或者其他慢性感染,在进行 PBMC 分离前,均对血液提供者性别、年龄、血型等进行了记录,以保证血液来源的可靠性和代表性。

2、淋巴细胞分离试剂

1×PBS 溶液: KH_2PO_4 0.144g + NaCl 9.00g + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.062 g, 溶于 1L 蒸馏水中。

聚蔗糖-泛影葡胺 (Ficoll-urografin) 分层液: 比重 1.077 ± 0.001 天津灏洋生物制品科技有限责任公司。

3%冰醋酸:冰醋酸由中国医药集团上海化学试剂公司生产,蒸馏水稀释配制。

3、MACS 细胞分选试剂

MS Columns :Miltenyi Biotec Inc.公司生产

Buffer(degassed): PBS pH7.2 含 0.5%BSA, 2mM EDTA, 过滤除菌

CD56 MicroBeads (human): Miltenyi Biotec Inc.公司生产

4、羧基聚苯乙烯微球包被试剂

3um 单分散羧基聚苯乙烯微球[5% (W/V)]: 天津倍思乐有限责任公司

EDC·HCl: BBI 公司

NHS: Sigma 公司

MES: Sigma 公司

Quench buffer: 40mM 甘氨酸 + 1%BSA

3.3.2 实验装置与实验方法

1、实验装置

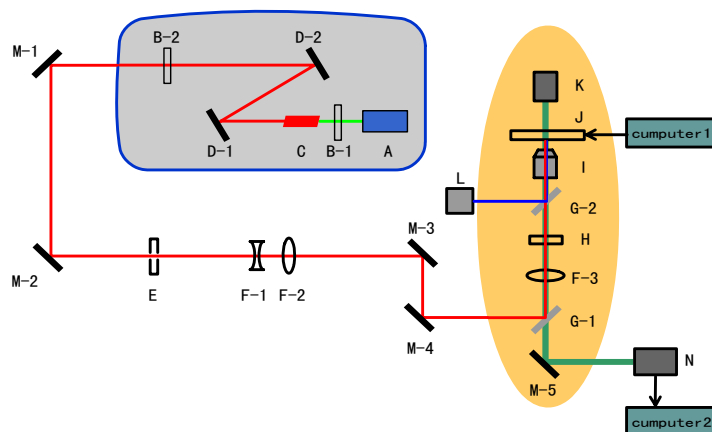


图 3.2 光镊装置示意图

本设备采用钛宝石激光器作为光镊光源，激光器由脉冲激光改造为连续激光，输出功率可达 2W，波长 780nm；显微镜为 Olympus IX70，100X 油浸物镜，数值孔径 1.35；荧光采用汞灯激发，激发谱线包括：330~385nm，460~490nm，520~550nm；CCD：实验动态图像由 CCD (MediaCybernetics Coolsnap cf) 相机采集并显示在计算机屏幕上；样品置于显微镜平台上，平台为计算机控制的电动平台，精度为 0.2um。由于本设备采用高功率钛宝石激光器作为光镊光源，测量范围比较大，可以达到 100pN，表 3.1 是该系统的元件说明。

表 3.1 光镊系统元件说明

A	钛宝石激光器泵浦源		$\bar{\lambda} = 533\text{nm}$ $P_{\text{max}} \sim 10\text{W}$
B	B-1	后腔镜	780nm 0 度全反
	B-2	输出腔镜	780nm 0 度 部分反
C	钛宝石晶体		
D	D-1	腔内反射镜	780~810nm 全反
	D-2		
E	电子快门		计时
F	F-1	凹透镜	$f = -10\text{mm}$
	F-2	凸透镜	$f = 50\text{mm}$
	F-3	显微镜辅助透镜	$f = 120\text{mm}$
G	G-1	二色镜	45 度反 780nm, 透白光
	G-2	二色镜	45 度反荧光, 透 780nm

H	1.5×透镜组		
I	显微镜物镜		100×油浸物镜，NA=1.30
J	电动平台		精度：0.1um
K	照明灯		
L	荧光光源		
M	M-1	反射镜片	780nm 45度全反
	M-3		
	M-4		
	M-2	反射镜片组	光路高度调节
	M-5	反射镜片	反射光进入 CCD
N	CCD 相机		MediaCybernetics CoolSNAP cf

2、实验方案

本实验利用光镊测量NK细胞表面LFA-1分子与其抗体间的相互作用，LFA-1抗体分子利用分子偶联技术修饰在聚苯乙烯小球表面。包被了抗体分子的微球被光阱俘获，细胞通过微针进行固定，移动微针与微球接触并结合，然后移动微针使二者分开，直到二者分开，在此过程中光阱中的小球将离开激光捕获中心，利用其离开光阱中心的距离可以得到细胞和微球之间的作用力，微球和细胞分开瞬间，可以测量出细胞和微球之间的结合力。实验中，为了避免微针对细胞的损伤，利用微针的毛细作用先固定一个微球，利用这个微针-微球为“手柄”固定细胞（图3.3）。通过分析实验录像，可以得到细胞与微球的接触时间以及微球偏离光阱中心的位移，将位移量带入公式 $F = -k_x \cdot x$ 即可求得微球与细胞结合力。

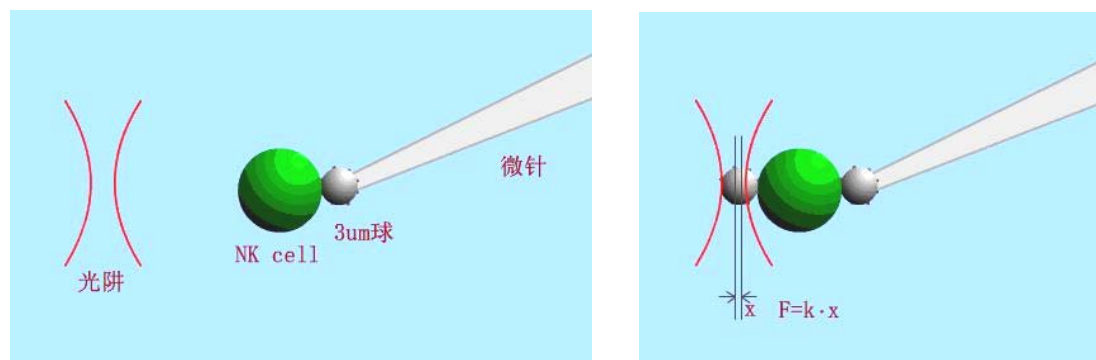


图 3.3 微球与细胞结合力测量示意图

3、微球表面分子偶联技术【9】

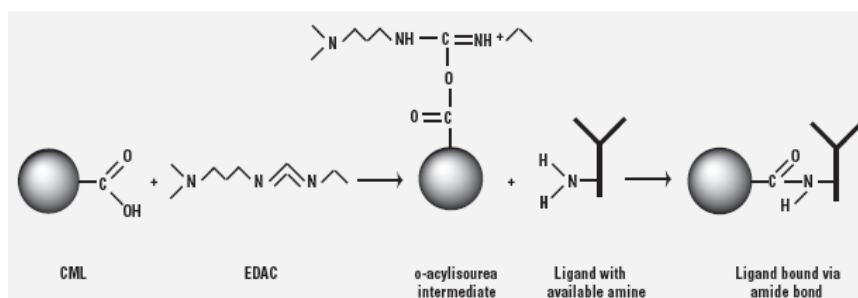


图 3.4 羧基聚苯乙烯微球蛋白偶联示意图

- (1) 吸取 100 μ L 5%(w/v)的单分散羧基聚苯乙烯微球于 1.5ml EP 管中，分别用三蒸水和 MES buffer 洗一次，转速 12000rpm 5min；
- (2) 用 100 μ L 三蒸水重悬微球，并在 EP 管中先后加入 50 μ L 10 \times MES buffer (PH=6)、100 μ L NHS、100 μ L EDAC、150 μ L 三蒸水；
- (3) 将 EP 管置于摇床里，室温 300rpm 摇动 30min；
- (4) 用三蒸水将 untreated NHS 和 EDAC 洗去，转速时间同上；
- (5) 吸取 20 μ L 蛋白重悬微球后即用振荡器进行振荡，然后放入摇床中，200rpm 室温振摇 2h，振摇中要多次使用振荡器振荡以防微球沉淀；
- (6) 加入 1mL quench buffer 洗涤微球，离心去上清后 500 μ L quench buffer 4 $^{\circ}$ C 封闭微球过夜；
- (7) 使用前吸取适量微球用 1 \times PBS 洗涤除去 quench buffer。

3.3.3 实验测量

1 NK 细胞 MACS 分选纯度鉴定及其 LFA-1 分子表达检测

新鲜分离的人 PBMC 细胞，使用 CD3-Cy5、CD56-FITC 荧光标记进行流式细胞检测，可以简单的将人 PBMC 细胞分为 CD3-CD56+NK 细胞，CD3+CD56-T 细胞和 CD3+CD56+NKT 细胞三个亚群（图 3.5）。

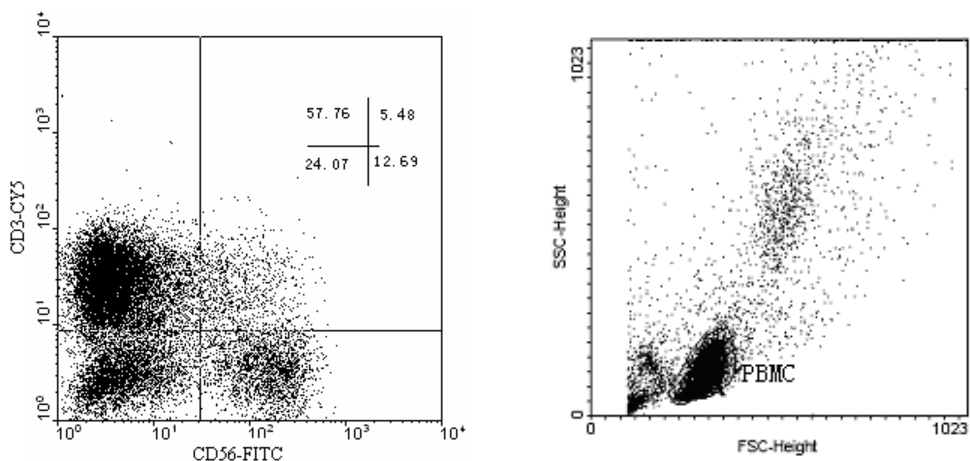


图 3.5 新鲜分离的人 PBMC 细胞的 FACS 分析结果

采用 MACS 分选以后，使用流式细胞术检测，可见分选后 CD56+ 细胞比例达到 90%（图 3.6）。利用 CD11a-PE 荧光抗体标记 MACS 分选后的细胞，由图 3.7 可见其全部高表达 CD11a。

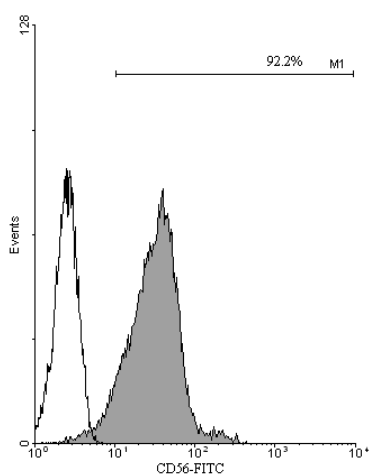


图 3.6 MACS 分选 CD56+ NK 细胞纯度图

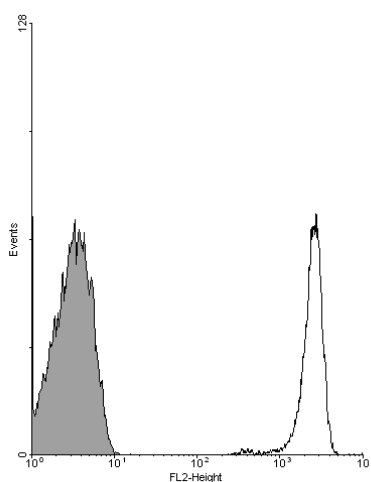
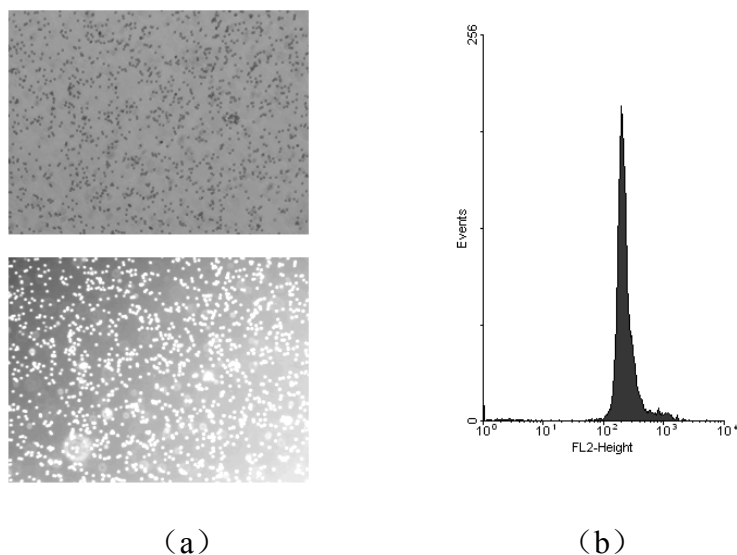


图 3.7 LFA-1 分子在 CD56+NK 细胞表面表达情况

2 羧基聚苯乙烯微球包被效率检测

利用羧基聚苯乙烯微球包被技术,我们在 $3\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球上包被 LFA-1 分子的荧光抗体,分别在荧光显微镜和流式细胞仪上进行检测,发现包被的阳性率可达 100% (图 3.8),同时从荧光强度上来看蛋白包被均一程度很好。



(a) 为荧光显微镜照片, 上图为明场, 下图为荧光观察; (b) 为流式细胞仪结果

图 3.8 聚苯乙烯微球表面蛋白包被检测

3 光镊刚度标定

光镊在势阱中心附近一定范围内可以近似看出一个简谐势阱, 即在这个范围内粒子偏离光阱中心的位移 x 与粒子受到的光阱力成正比:

$$\vec{F}_{trapping} = -k_x \cdot \vec{x} \quad (3.1)$$

其中比例系数 k 称之为光阱刚度。这样, 光阱力的精确测量转化为对小球偏移量 x 的精确测量, 同时, 光阱刚度 k 的标定也成为光镊测力的重要环节。

光镊刚度标定方法有很多种, 常用的有流体力学法、热运动分析法、功率谱法和外加周期驱动力法等【10-14】。本实验采用流体力学法进行刚度标定。利用光镊捕获一个标准的聚苯乙烯小球, 通过电动平台驱动样品池来获得液体以一定速度相对小球运动。实验中平台先朝一个方向匀速运动, 然后改变方向再朝相反方向匀速运动, 平台加速和减速过程中小球的位移信号不予处理。在平台匀速运动过程中, 光阱中的小球将偏离光镊中心稳定在一个新的平衡位置, 此时, 小球受到液体的粘滞力与光阱力相平衡, 而在一定流速的稳恒流场中, 粒子受到的

粘滞力可由流体力学中的 Stokes 公式给出：

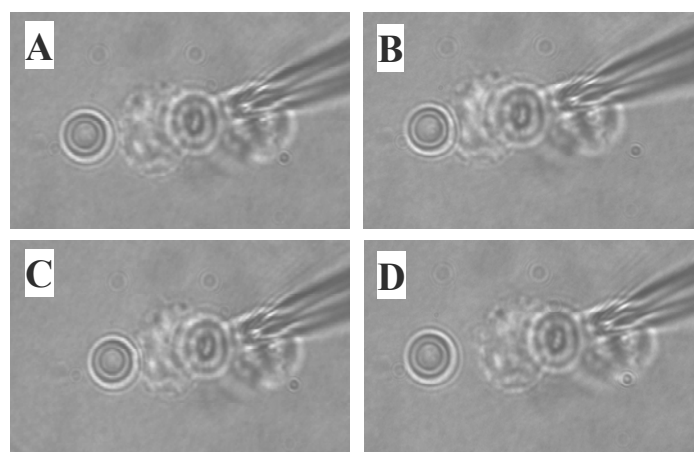
$$F_{Stokes} = 6\pi\eta av \quad (3.2)$$

实验采用 CCD 图象分析法进行数据的采集和分析处理，CCD 相机记录若干周期的运动图象，然后通过图象分析法计算小球的两个新平衡位置距离，其距离的二分之一就是小球受到流体粘滞力而偏离光镊中心的位移 x ，根据式 3.1 和 3.2 即可求出光镊刚度 k_x ：

$$k_x = \frac{6\pi\eta rv}{x} \quad (3.3)$$

4 微球与细胞结合力测定

实验中，先利用负压在微针尖端固定一个聚苯乙烯小球，在样品中寻找合适的 NK 细胞，移动微针靠近细胞，使小球与细胞接触直到二者结合。利用光阱捕获另外一个小球，调节显微镜，使小球中心距离样品池高度为 15 μm ，调整微针高度，使细胞中心与小球保持一致。然后移动微针让细胞靠近并稍微挤压光阱中心的小球，二者结合一段时间后，缓慢移动微针带动细胞拉动小球远离光阱中心直到细胞和小球分开，见图 3.9。



A、NK 细胞靠近被光阱捕获的小球；B、NK 细胞与小球接触一段时间
C、移动微针，光阱中小球偏离光阱中心；D、细胞与小球分开，小球回到光阱中心

图 3.9 微球与细胞结合、分离过程

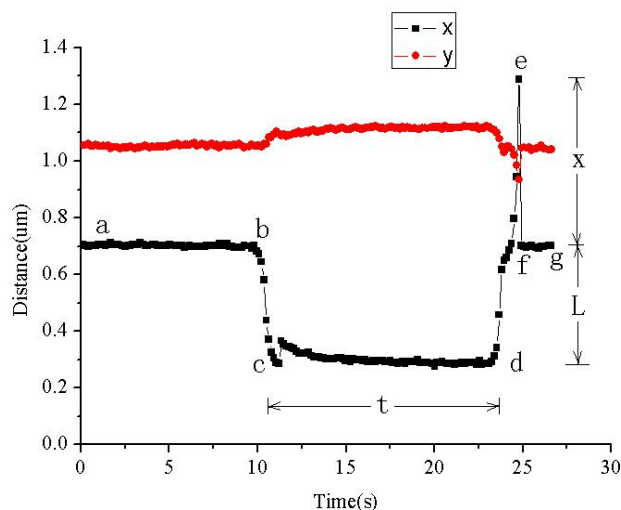


图 3.10 细胞与微球结合时间及微球偏离光阱最大位移

通过分析实验录像，可以得到在细胞和小球接触、结合、拉伸和分离整个过程中，光阱中小球的位置信号，测量小球偏离光阱中心最大位移量 x ，代入公式 3.1 即可求出结合力，从数据结果中还可以得到细胞和小球的结合时间，见图 3.10。此例中微针移动方向为 x 方向；黑色和红色点分别表示光阱中小球 x 、 y 方向位置。a-b 为细胞靠近小球的过程，b-c 为细胞开始接触并挤压小球，小球偏离位移 L ，c-d 为细胞与小球结合阶段，d-e 为细胞在微针带动下开始远离光阱中心，在 e 点细胞与小球分开，f-g 表示小球与细胞分开后回到光阱中心位置。从图 3.10 中可以得到，小球和细胞接触时间为 14s，分开时，小球偏离光阱中心距离为 0.58um，光阱刚度为 57.8pN/um，所以小球和细胞结合力为 33.5pN。

5 不同结合时间下的结合力测量

改变细胞和小球的结合时间，测量二者的结合力，测量结果如下：

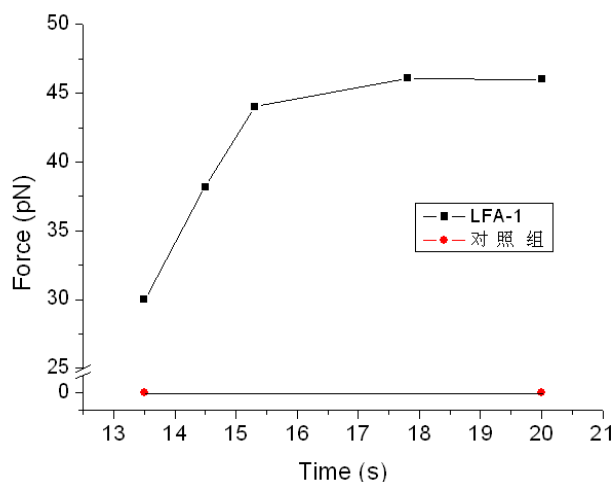


图 3.11 不同结合时间下的结合力测量

由图 3.11 可以看出, 包被了 LFA-1 抗体的小球与 NK 细胞表面 LFA-1 分子的结合力随接触时间的延长而增大, 为排除小球与细胞非特异性结合, 我们在小球表面包被了鼠 IgG 的同种类型对照抗体, 结果发现, 这种对照组微球与细胞不结合。

3.3.4 实验结果与分析

利用光镊测量了细胞和小球不同结合时间时的结合力大小, 发现随着细胞和包被了 LFA-1 抗体分子的小球的接触时间延长, 二者结合力增强。一个可能的原因是抗原、抗体形成化学键需要一定的时间——时间越长形成化学键的可能性就越大。另一种可能的原因是, 细胞表面 LFA-1 分子受到包被在小球上的抗体刺激后, 局部发生招募导致接触面分子密度随时间的推移而增大。

为了验证这两种可能, 我们采用多聚甲醛固定过的 NK 细胞进行对照实验。光镊测量结合力的结果发现, 预先固定后的细胞与微球之间的结合力大幅降低, 时间依赖性不复存在。多聚甲醛固定是流式细胞仪检测胞内分子的一个重要步骤, 流式细胞术检测结果证明多聚甲醛固定后的细胞表面仍能结合大量 LFA-1 的荧光抗体。因此, 多聚甲醛固定后的细胞和小球之间结合能力的降低不能用抗原抗体结合受限解释, 而应该用细胞表面分子成簇受限来解释。由此可见, NK 细胞与微球结合的时间依赖性很可能是由于局部 LFA-1 分子发生招募聚集所产生。

LFA-1 的配体 ICAM-1 在细胞表面以二聚和多聚体形式存在。ICAM-1 的二聚能提高其结合 LFA-1 的能力。事实上, 表达 LFA-1 的淋巴母细胞能更有效的结合表达野生型二聚 ICAM-1 的细胞, 而与表达等量糖基磷脂酰肌醇交联 ICAM-1 (单体 ICAM-1 形式) 的细胞结合能力较弱。然而另一方面, 有研究证明单个 ICAM-1 单体足以结合 LFA-1, 而 ICAM-1 的二聚对于形成一个完整的 LFA-1 结合位点并不是必须的。我们猜想, LFA-1 抗体与 LFA-1 分子的结合能力在此可能模拟了 ICAM-1 的二聚, 引发细胞表面 LFA-1 分子发生交联, 这种交联传递信号导致更多的 LFA-1 分子聚集在接触面。这也可以解释为什么蛋白水平上 ICAM-1 本身的二聚不影响其与 LFA-1 分子的结合, 但显著影响细胞与细胞之间的结合。换句话说, 可能存在一种新的诱导 inside-out 信号产生模式, 即 LFA-1 分子交联后直接诱导引发 LFA-1 分子的局部活化招募。

3.4 本章小结

本章检测结果表明人外周血 NK 细胞表面高表达 LFA-1 分子, 而且 LFA-1 有可能是 NK 细胞的识别杀伤的早期参与者, 我们利用光镊来研究 NK 细胞表面 LFA-1 的单分子行为。在研究中, 我们发现 LFA-1 抗体包被的小球与 NK 细胞的结合力随接触时间的延长而增强。我们的研究提示 NK 细胞表面 LFA-1 分子可能会受 LFA-1 抗体影响而发生局部聚集。

我们的研究不仅提供了一种实时观察单细胞间相互作用的方法, 还建立了研究单分子对细胞活动影响的研究方法, 推测存在一种新的诱导 LFA-1 分子活化的信号传导模式。

参考文献

1. Lo CG, Lu TT, Cyster JG. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp[J]. *J Exp Med*, 2003, 197:353-361.
2. Riaz AA, Wan MX, Schaefer T, et al. Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/ reperfusion-induced leukocyte- endothelium interactions in the mouse colon[J]. *Ann Surg*, 2002, 236:777-784.
3. Melero, I., M.A. Balboa, J.L. Alonso, et al. Signaling through the LFA-1 leucocyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor-alpha production in natural killer cells. *European Journal of Immunology*. 1993, **23**(8): 1859-1865.
4. Sugie, K., Y. Minami, T. Kawakami, et al. Stimulation of NK-like YT cells via leukocyte function-associated antigen (LFA)-1. Possible involvement of LFA-1-associated tyrosine kinase in signal transduction after recognition of NK target cells. *Journal of Immunology*. 1995, **154**(4): 1691-1698.
5. Luo, D., D. Vermijlen, K. Vanderkerken, et al. Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytotoxicity and apoptosis of colon carcinoma cells. *Journal of hepatology*. 1999, **31**(1): 110-116
6. Matsumoto, G, Y. Omi, U. Lee, et al. Adhesion mediated by LFA-1 is required for efficient IL-12-induced NK and NKT cell cytotoxicity. *European Journal of Immunology*. 2000, **30**(12): 3723-3731
7. Borthwick NJ, Akbar AA, Buckley C, et al. Transendothelial migration a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134:246-252.
8. Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer[J]. *J Nutr*, 2002, 132:2401S-2405S.
9. Bangs Laboratoried, Inc. Covalent coupling, TechNote, 2002, 205:1-8.
10. H.T. Chen, Y.M.Li, L.R.Lou, et al. Single molecules detection in optical tweezers. Xing Zhu. *Nano-Optics and Nano-Structures, Proceedings of SPIE Vol. 4923*, 98-105.
11. Robert M.Simmons, J.T.Finer, S.Chu etc. "Quantitative Measurements of Force and

- Displacement Using an Optical Trap,” *J. Biophysical Journal*, 1996, **70**, 1813-1822
12. Karl Otto Greulich. *Micromanipulation by light in biology and medicine: the laser microbeam and optical tweezers*. Berlin: Birkhauser Verlag, 1999, 90-96.
 13. Florin E.-L., Pralle A., Stelzer E.H.K., et al. “Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis,” *J. Appl. Phys. A*, **1998**, **66**, S75-S78 .
 14. 龚鏊, 陈洪涛, 李银妹, 四种光阱刚度测量法的实验研究与比较. *中国科技大学报*, 2005, 35: 601。

第四章 光镊研究人类红细胞的力学行为

红细胞是悬浮于血浆中数量最多的有形成分，主要功能是给机体组织器官输送氧气，这一功能的发挥要求细胞具有良好的变形能力以便通过各种毛细血管。300年前，卢文-虎克首次报道了红细胞在通过毛细血管时发生形态变化，但未引起重视，直到20世纪六、七十年代微循环和血液流变学开始发展起来，医学界对红细胞变形性的重要性才逐渐有所了解。

4.1 红细胞简介

4.1.1 红细胞特点

红细胞在体内可以存活120多天，在血液循环过程中，要经历很大的形变，尤其是在穿过一些内径小于 $3\mu\text{m}$ 的毛细血管时，红细胞的双面凹形状就会变成子弹形、降落伞形或拖鞋形，当约束解除时，其形状又会恢复正常。此外，红细胞特有的形状还被认为与运输气体有关，即气体可以更快的通过较大的弥散表面进入细胞内。

正常红细胞是双面凹的圆盘形，直径 $7\sim 8.5\mu\text{m}$ ，中央厚度 $1\mu\text{m}$ ，边缘厚度 $2.4\mu\text{m}$ ，表面积 $103\sim 163\mu\text{m}^2$ ，容积 $85\sim 90\mu\text{m}^3$ ，其特点是具有较大的表面积和较小的容积。红细胞这一几何形态曾引起许多学者的兴趣和关注。在正常情况下，红细胞表面积与体积之比高于1.5，这有利于红细胞经历各种变形而不需要增加其表面积。如果比表面 S/V 为1.0，红细胞呈球形， S/V 为0.7左右，红细胞呈椭球形【1】，这些情况均使红细胞变形性下降。

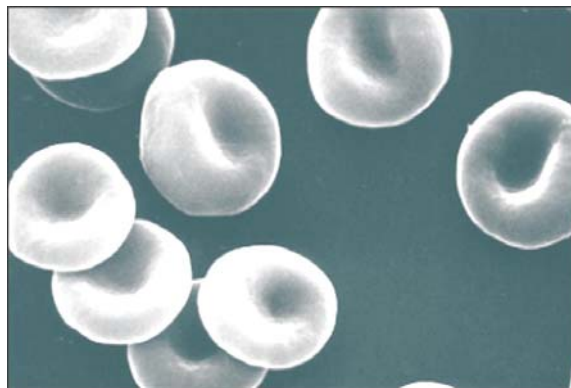


图 4.1 电镜下的红细胞

4.1.2 红细胞变形性的生理学意义

红细胞变形性是指红细胞能自主通过比其自身直径小的微血管的能力，是一种重要的流变现象，也是影响血液循环的主要因素之一【2】，具有重要的生理学意义。

1、红细胞变形性是保证微循环灌注的重要条件。人体内毛细血管直径一般小于最小红细胞直径，故红细胞只有变形才能通过狭细管道。不难理解，大量红细胞在微血管内堆积和聚集，必然导致局部的血流停滞，最终组织缺血、缺氧。

2、红细胞变形性是影响血液粘度和血流阻力的重要因素。实验证明，正常红细胞比积高达 95%~99%时血液仍保持流动状态，而刚性颗粒的悬浮，浓度在 65%以上就呈混凝土样不能流动。这是由于红细胞能够随着流场内的剪切力而发生变形，并随着流线方向而取向流动，从而降低血液粘度，加强血液流动性。

3、红细胞变形性是决定红细胞寿命的重要因素。正常红细胞从成熟到消失经历幼、中、老各期，寿命平均 120 天。衰老的红细胞，比表面积降低，变形能力降低，在碰到微循环孔道时，变形能力降低的红细胞就被扣押，被吞噬细胞清除。一些遗传性红细胞异常的疾病发生贫血，就是因为这些红细胞过多的被破坏所造成。

4.1.3 红细胞变形性的固有因素

决定红细胞变形性的固有因素有：细胞的几何形状、细胞膜的粘弹性以及细胞内液的粘度。

1、正常红细胞在静止状态下呈双凹圆盘形，平均表面积与体积之比高于 1.5，这样使红细胞非常容易变形。正常红细胞可以拉伸至原长的 230%左右。球形红细胞由于表面积与体积之比降低，故其变形能力较差。刘凝慧【3】曾分析了脊椎动物各纲共 21 种动物的红细胞形态和变形能力的关系，结果发现哺乳动物红细胞的变形能力比低等动物的高，而最主要的原因就是红细胞形态从有核双凸椭圆形改变为无核双凹圆盘形，前者的比表面要低于后者。体外实验也证明：在低渗溶液中，红细胞膨胀为近球形，比表面降低，变形能力也下降【4】。

2、红细胞膜的粘弹性在很大程度上决定了红细胞的粘弹性。红细胞通过毛细血管时产生很大变形，要求细胞膜有着高度的可变形性和稳定性，即膜必须具有较大的曲度变化，在变化过程中不发生破裂并且能恢复原状。红细胞膜由脂双

层和骨架蛋白构成。脂双层具有流动性,若膜中胆固醇和磷脂之比升高,其流动性变小。冠心病、糖尿病、高血压及高脂血症等患者血胆固醇浓度明显增高,使红细胞膜胆固醇与磷脂比值增大,膜流动性降低,变形性减弱,从而导致血液流变性障碍【5】。红细胞膜的骨架主要由膜血影蛋白、肌动蛋白及锚蛋白等构成,研究证明,膜的剪切弹性模量、弯曲模量及表面粘性系数等力学参数均与膜骨架有直接关系。膜骨架蛋白的分子结构或它们之间连接上的缺陷和异常均可引起临床一系列的疾病。

3、红细胞内液的粘度是决定红细胞变形性的又一重要因素,内液粘度受平均血红蛋白浓度和血红蛋白物理化学性质影响。正常情况下,红细胞内液粘度对它的变形性影响不大。当血红蛋白浓度增高到一定时,如高于 37g/dl,红细胞内液粘度呈指数增长,使红细胞“坦克履带运动”阻力增加,细胞适应流场的能力降低,故使细胞变形能力降低【1】。当血红蛋白分子病变及糖化血红蛋白增高时,细胞内液粘度也增大,导致变形性降低。未成熟的人红细胞和成熟的非哺乳类红细胞,由于细胞核的存在,使红细胞可变形性降低。网织红细胞由于胞浆内仍然包含有核的残留物质,其可变形性也低于成熟的正常红细胞。

另外,外在因素也会影响红细胞的变形能力,如细胞浓度、血流速度、毛细血管直径、介质的粘度以及 PH 值和渗透压等,所以在红细胞变形能力测量中,必须注意控制实验条件。

4.2 红细胞变形能力的测量方法

测量红细胞的变形性有重要的理论和实际意义。目前已发展了许多方法和仪器,有的是利用在大的几何系统内由于流动红细胞发生变形,引起悬浮液的一些物理特性(粘度、透光性、导电性等)的变化,通过测量这些物理特性的变化间接估计和比较细胞群体的平均变形性的好坏,有的方法是通过测量红细胞变形过程中应力-应变之间的关系拉力研究单个细胞或细胞膜的力学性质。所以可以将这些方法分为宏观法和微观法两大类,宏观法有粘度法、微孔滤筛法、激光衍射法、光度法以及电测量法等,微观法有微吸管法、底部附着法以及光镊牵拉法等。

4.2.1 粘度法

粘度法是利用红细胞悬浮液的表现粘度随剪切率的增高而降低这一物理特

性来间接的估计和比较红细胞的变形性的。其原理是正常红细胞在悬浮液中随着所受切应力增加,变形和定向程度增加,使红细胞的有效体积浓度降低,从而使悬浮液的表现粘度降低,而硬化了的红细胞则无此效应。在较高剪切率下,表现粘度降低越明显,红细胞的变形能力越好。粘度法测量仪器可采用毛细管粘度计或旋转式粘度计。著名的澳大利亚血液流变学家 Dintenfass 对此方法作了多年的研究,总结出如下公式作为红细胞刚性或变形性的量度【6】:

$TK = (\eta_r^{0.4} - 1) / \eta_r^{0.4} * H_r$, 式中 TK 为细胞刚性值, η_r 为血液相对粘度, H_r 为红细胞体积浓度。正常情况下 TK 值约 0.9, TK 值越大,表示变形性越差,病理状态下可高达 1.3。

粘度测量法设备和操作简单,优点是一次测量可以获得红细胞群体的平均变形性,并且把变形性与血液流动性直接联系起来,适合于临床研究,缺点是不能分辨单个红细胞和细胞亚群体的变形行为,不能获得物理测量和实际变形之间的定量关系【2】。

4.2.2 激光衍射法

激光衍射测量红细胞变形性的方法是 Bessis 和 Mohandas【7】在 1975 年提出的,已得到国际流变学界的公认。后来很多研究者对此方法进行了改进【8-10】。其原理如图 4.2 所示。红细胞悬浮液注入内外圆筒的间隙中,当外筒旋转时有流体切应力作用于红细胞,使其在切应力方向上被拉伸成椭圆形。当激光束通过红细胞悬浮液时,可产生衍射,得到反映细胞形状变化的细胞群体衍射叠加图。根据衍射图像不同可以测定红细胞的可变形性【11-13】。静态双凹盘形的红细胞产生圆形的衍射图;而切应力作用下变成椭圆形的细胞产生椭圆形衍射图,两者具有相同椭圆度,根据 Bessis 提出的经验公式 $d_f = d_0 \cdot a_0 / a_f$, d_f 和 d_0 分别为红细胞变形后的长轴和静态下的平均直径, a_0 为静态衍射图中心亮斑的直径, a_f 为动态衍射图中心亮斑横轴长度。

激光衍射法获得的衍射图,是细胞群体衍射的叠加,反映的是红细胞的平均形变性。该方法有用血量少,重复性好,对同一样品 10 次重复测量,变异系数只有 1%。但由于红细胞在悬浮液中悬浮的形态不同,不能分析不同年龄或不同受损程度的红细胞群。

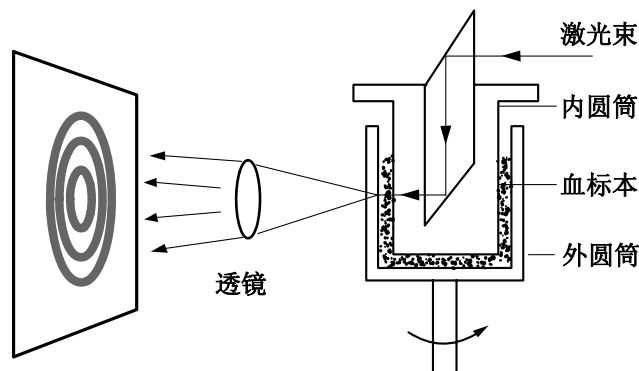


图 4.2 激光衍射仪工作原理示意图

4.2.3 微孔滤筛法

Gregersen 等【14】在 1976 首先介绍应用聚炭酯膜作过滤器研究红细胞的可变形性，后来 Reid-Dormady 等加以改进。方法是测量一定量的红细胞悬浮液通过一定大小筛孔的滤器需要的时间或从细胞悬浮液通过滤器时的压力~流量关系来测量红细胞的变形性。此法优点是仪器简单，在一定程度上可模拟红细胞通过微血管时的流动状态，缺点是影响红细胞滤过的因素较多，重复测定的变异系数较大。

Rosasco 等【15】曾比较了激光衍射法和微孔过滤法的结果，发现激光衍射法测得的红细胞变形指数 DI 值与过滤法中红细胞悬浮液滤过时间呈双曲线关系，DI 越大，滤过时间越短，反之，滤过时间延长。如将被滤过的红细胞作激光衍射测定，发现 DI 值明显大于未能通过滤膜的红细胞 DI 值。

4.2.4 微管吮吸法

微吸管法是用内径 $3\sim 5\mu\text{m}$ 的微管在一定的负压下吮吸红细胞，测量在一定负压下红细胞被吸入管内所需要的最小直径，或者测量在一定管径下细胞被吸入管内所要求的最小吮吸负压，以此在比较红细胞的可变形性的好坏。此方法首先由 Michthison 和 Swann【16】发明，后来 Lacelle【17】和 Burton【18】进行了改进并用来研究红细胞的可变形性。Evans【19, 20】等利用它对红细胞的力学性质做了理论分析。若管径小于 $3\mu\text{m}$ ，则红细胞仅部分吸入管内，由吸入部分的长度和所采用的负压可计算红细胞膜的切边模量和其他力学参数。还可以根据吮吸期间红细胞被吸入的时间过程，或放出之后形状恢复的时间过程计算细胞膜的表面粘性系数。

微吸管法的优点在于能定量计算单个红细胞的可变形性及膜的一些力学参

数，应力-应变关系十分清楚。缺点是只能测量单个细胞，要估计细胞群体的特点必须测量大量细胞，因此不适宜临床检查，主要适用于实验研究。另外，红细胞膜在微吸管实验中的变形相当复杂，并且在微吸管端头附近很可能有显著的弯曲阻力，微吸管法测得的可能是弯曲和拉伸弹性的综合效应。

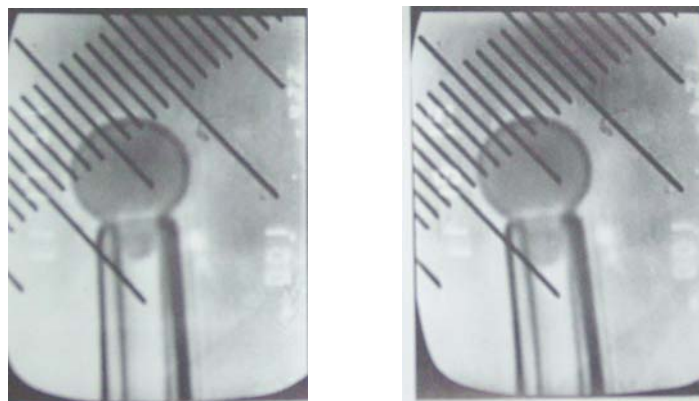


图 4.3 微管吮吸红细胞

4.2.5 光镊牵拉法

光镊技术可以捕获、移动细胞、细胞器或胶体颗粒等，且对它们的损伤很小【21】，更重要的是光镊还是微小力的探针，可以对细胞的力学特性进行定量研究【22, 23】。光镊牵拉实验中，先利用光镊捕获两个小球（聚苯乙烯或者硅球）黏附在细胞直径两端，其中一个小球附着在平板上，另一小球作为手柄被光镊操控，然后对红细胞进行拉伸。拉伸中任一瞬间，拉伸力通过小球偏离光镊光阱中心位移量来计算得到，细胞直径可以通过两个小球间距来获得，这样可以得到细胞的拉力-拉伸关系。Sylvie【24】利用光镊对人的红细胞进行单轴拉伸，在小变形情况下，测量细胞横向直径大小与拉伸力的关系，测得细胞膜的剪切模量为 $2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ ，比微吸管法测量结果稍小。

光镊拉伸有两种方式：单光镊和多光镊。单光镊法中细胞两端的小球一个被光镊操控，另一个附着在样品池底部平板上【24, 25】。而多光镊系统中，小球都被光镊捕获，这样可以消除单光镊法中样品池底面的影响。Guillaume 等【26】从红细胞膜上萃取了血影蛋白骨架（skeleton），对其面积扩张模量和剪切模量进行了测量。实验中将硅球加入溶液中会粘于细胞膜表面，当脂双层被分解后，硅球仍联结在膜骨架上，寻找粘有三个硅球的膜片，通过三光镊分别操控三个硅球（图 4.4），并对血影蛋白骨架进行拉伸变形，测得等渗条件下，红细胞膜骨架面

积扩张模量 K_c 为 $6.1\mu\text{N/m}$ ，剪切模量为 $\mu_c=2.7\mu\text{N/m}$ 。

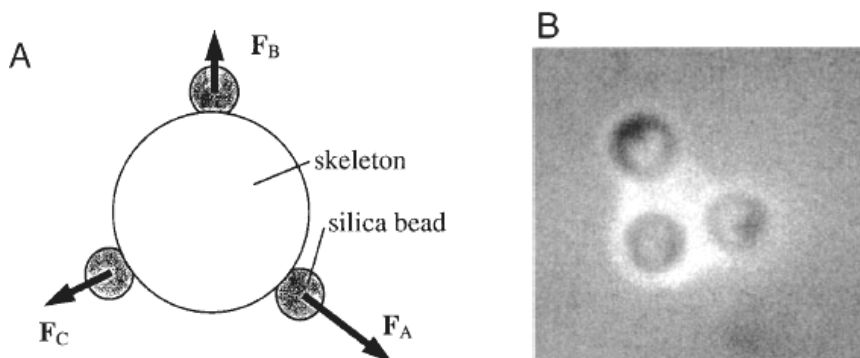


图 4.4 三光镊研究红细胞膜骨架变形

光镊牵拉法只能对单个红细胞膜弹性进行测量，但该方法原理简单、精度高且可靠性强。光镊拉伸法测量红细胞膜剪切模量数值比微吸管法的结果小，因为在微吸管法，细胞经历了大的形变，细胞应变与应力关系超出线性范围，而且在微吸管和细胞的接触区域，细胞受力复杂，简化分析时将导致测量结果偏差。另外，利用光镊技术也可以很方便的进行细胞形变恢复能力的检测，当细胞被拉伸后，撤掉光镊，细胞将会慢慢恢复原来形态，由此获得细胞的松弛特点

红细胞的变形能力与血液循环有着很大的关系，其变形能力的改变是一些疾病的主要原因或重要临床表现，所以对红细胞变形性的测量和研究有着重要的意义。红细胞与一般粘弹性体的最大区别是具有一定的聚集性（由于红细胞膜表面的蛋白带有一定量的电荷），因此红细胞在流动中会发生一定的聚集，这也是红细胞流变形的一个重要性质，在激光衍射法的红细胞变形仪中，可检测红细胞的聚集和解聚过程，从而测出红细胞的聚集性。变形性、松弛性和聚集性三者结合起来，才能完全反应红细胞在机体中的流动性。另外，对红细胞变形能力的深入了解有助于人们阐明具有更复杂结构的细胞的力学性质。同时，深入研究红细胞的相关特性，可为人工红细胞的构建提供实验依据，推进人工红细胞替代红细胞应用研究的步伐。

4.3 光镊测量红细胞形变的渗透压谱

红细胞的变形能力受到细胞所处环境的很大影响，例如血液粘度、pH 值以及渗透压等。在这方面的研究大都使用的是宏观测量方法，没有以单个红细胞为对象进行研究。前面关于红细胞变形能力的测量方法中已经提到了光镊技术，光

镊技术的优点在于可以对单个红细胞的力学行为进行研究测量。研究者们已经利用光镊技术研究并测量了单个红细胞膜的弹性模量,但渗透压对细胞弹性模量的影响还没有人进行测量。下面介绍的研究工作主要是测量不同渗透压下红细胞膜的弹性模量。

4.3.1 材料与方法

1、材料

红细胞在校医院化验室现场采集获取。细胞处理方法:血红细胞加入适量 0.9% 的 NaCl 溶液后,放入离心机离心三次(800 转 10 分钟)。最终,细胞置入不同渗透压的 NaCl 溶液(PH=7.4)中。

2、实验方案

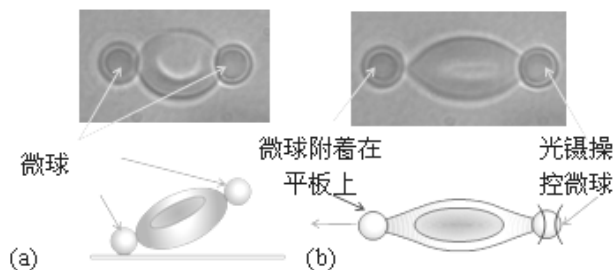


图 4.5 单光镊法拉伸红细胞

实验中利用光镊拉伸红细胞的方法如图 4.5 所示,在细胞直径两端分别固定一个小球,其中一个小球固定在样品池底部,另外一个小球被光阱所捕获。由于细胞很靠近样品池底部,会因为非特异性作用受到底面吸引,所以事先要把样品池表面用聚赖氨酸处理,避免红细胞与样品池玻璃表面的结合。实验中光镊所操纵的小球为直径 $3\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球,其表面包被一层人体 IgG 抗体蛋白,以便更容易与细胞结合。在测量低渗或者高渗下红细胞膜弹性时,细胞和小球都事先用相应渗透压的 NaCl 溶液进行稀释,再加入样品池中。然后用玻片覆盖密闭,以减少实验过程中溶液蒸发导致的渗透压变化。

将处理好的样品池放在显微镜载物台上,利用捕捉一个小球,调整光阱高度,将小球压在样品池底面约 1min,然后关闭光镊观察小球是否还动,确认小球与载玻片粘合。调整光镊光源功率($<100\text{mw}$),避免激光功率过高将红细胞损伤。开启光镊捕获红细胞,移动红细胞,以使细胞膜与固定在载玻片上的小球粘连;粘连后,保持 2min 左右,关闭光镊以确认细胞膜与小球粘合。再用光镊捕获另外一个小球,靠近红细胞,与细胞膜粘合。需要注意的是,要尽量使两小球粘合

点分别位于细胞长轴直径的两个端点。

用一定功率的光镊操控粘在细胞可移动端的小球拉伸细胞,随着小球的移动,细胞也被拉长,当细胞被拉伸到一定长度时,细胞反弹并带动小球从光镊中逃逸,并回复到初始形态。

整个实验过程用计算机直接显示和控制,同时录像。分析图像可以测量细胞拉伸过程的每一帧中两个小球球心的距离,该距离减去细胞平衡状态时的直径 D ,即为细胞被拉后的伸长长度 L ,定义 L / D 为细胞的相对伸长 ϵ 。用光镊操控小球的力 F 除以相对伸长 ϵ ,得到拉力与伸长比值: F / ϵ 。逐步加大光镊操控力 F ,细胞相对伸长 ϵ 也加大,可得到一系列 F / ϵ 值,即拉力-伸长关系曲线,根据拉力-伸长曲线可以计算得到细胞膜的剪切弹性模量。配制不同渗透压溶液,分别进行拉伸实验,可得到膜弹性模量与渗透压的关系曲线。

4.3.2 实验结果

下图为等渗 (300mOsmol/L) 条件下,红细胞拉伸过程。实际拉伸红细胞是通过水平移动样品台来实现的,为了使拉伸力沿水平方向,光阱中的小球要尽量靠近样品池底面,使其与固定在样品池底面的小球高度接近。由于拉伸过程是一个准静态过程,所以阱位靠近样品池底面影响不大(流体力学法进行光阱刚度标定时,光阱中小球距离底面不能太近,否则要对 Stokes 力进行修正)。

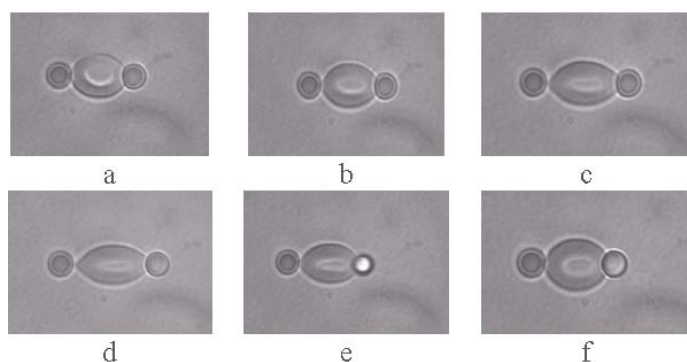


图 4.6 红细胞拉伸过程

通过对拉伸录像的分析,可以得到拉伸力 F 与细胞的相对伸长 ϵ 的关系,如图 4.7 所示(激光功率 $P=60\text{mW}$),从图中可以看出,拉伸力与细胞相对伸长成正比。改变激光功率进行拉伸实验,结果如图 4.8,同样,拉伸力与相对伸长成正比,与激光功率没有关系。

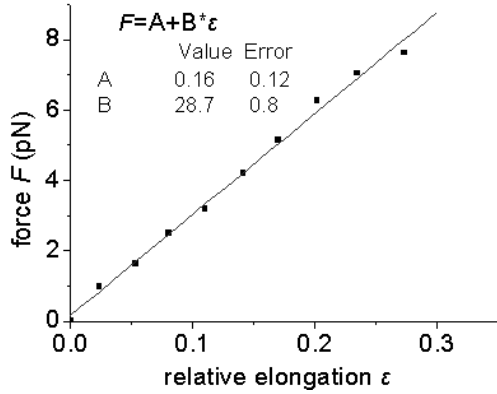


图 4.7 拉伸力与细胞相对伸长的关系

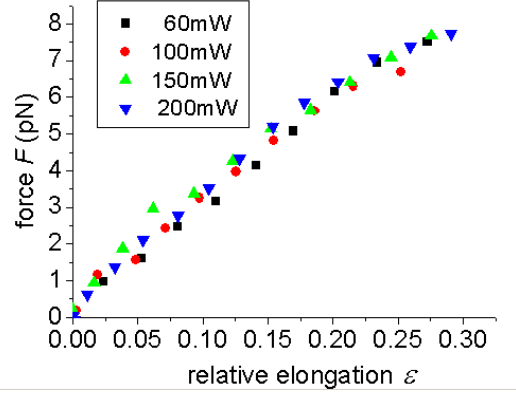


图 4.8 不同功率下的 F~ε 曲线

从图中可以看出，当拉伸力大于 7pN 时，F 与不再随 ε 线性变化，在 F 小于 7pN 时，细胞的形变小于 30%，这是红细胞在等渗条件下的线性形变区，根据 F/ϵ 的值可以得出红细胞膜的剪切模量 μ ， μ 的大小可以反映红细胞的变形能力。其值越大，表明细胞越“硬”，越不容易形变，反之，细胞越容易变形。红细胞膜的剪切模量 μ 与 $(F/\epsilon)^{3/2}$ 成正比【25, 27】，所以 F/ϵ 的值直接可以反映细胞形变能力，其值越小，细胞越容易变形。直接从 F/ϵ 本身的意义也可以得到这个结论， F/ϵ 越小，表示细胞产生一定的形变，需要的拉力也越小，显然说明细胞容易发生形变。

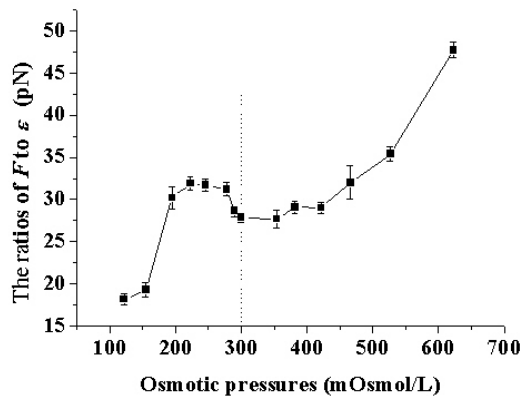


图 4.9 不同渗透压下的 F/ϵ

为了研究渗透压对细胞变形性的影响，我们测量了不同渗透压下，红细胞膜的 F/ϵ ，结果如图 4.9，发现渗透压在 200mOsmol/L 以上时， F/ϵ 的值在等渗条件下最低，这意味着细胞在等渗条件下变形性最好，这与传统研究结果一致。

4.3.3 分析与讨论

红细胞的变形能力与细胞膜的粘弹性有很大关系。在红细胞未受外力时，spectrin（血红蛋白）分子聚集至团状，发生变形时，在可逆变形范围内，细胞

膜骨架网络重新分布, 仅部分 spectrin 分子收缩和折迭, 随着应力的增加, 这种伸展和压缩都达到最大限度, 这就是可逆形变的临界状态, 再增大应力, 骨架蛋白之间薄弱的连接处就会发生断裂, 膜内复合物联结的任何损伤都将破坏膜的机械完整性, 这正是红细胞膜在其表面积增大 2~3% 时膜就会破裂的原因。由此可见, 在光镊拉伸红细胞的线性形变范围内, 细胞膜的面积可以认为保持不变。另外, 在等渗条件下, 红细胞内血红蛋白浓度约 33g/dl, 内粘度约为 7mpa.s, 它对红细胞的变形影响可以忽略, 所以, 在等渗以及低渗条件下, 细胞变形时能量主要消耗在膜上。因此在等渗及低渗条件下, 细胞膜的弹性模量可以直接反映红细胞的变形性。

由图 4.9 可以看出, 渗透压在 220~300mOsmol/L 范围内, 随着渗透压的降低, F/ε 在增大, 细胞膜弹性模量增大, 细胞变形能力减弱, 这主要是因为渗透压降低后, 细胞外面的水分子进入细胞内, 细胞体积增大, 同时细胞膜表面积不变, 所以比表面减小, 所以红细胞的变形能力减弱。当渗透压低于 200mOsmol/L 时, 细胞膜弹性模量急剧降低, 这是由于随着渗透压的降低, 红细胞膜发生损伤, 细胞发生溶血, 细胞膜骨架的破坏导致细胞变形及其容易。

当渗透压高于 300mOsmol/L 即高渗条件时, 随着渗透压升高, F/ε 先缓慢增加, 然后开始急剧增大, 即细胞变形能力先缓慢减弱, 当渗透压超过 500mOsmol/L 后, 细胞变形能力急剧降低。事实上, 高渗条件下细胞膜弹性模量并没有很大变化, 之所以细胞变形能力下降, 是因为细胞内液粘度变化引起的。前面提到, 在等渗和低渗条件下, 细胞内液粘度很低, 对细胞形变影响很小, 但随着渗透压升高, 细胞内水分子不断通过细胞膜进入体液中, 细胞内血红蛋白浓度将会呈指数增加, 这时候, 内粘度逐渐成为影响红细胞变形能力的重要因素。从图中可以看出 F/ε 随渗透压呈指数增加, 由此可见, 在高渗条件下, F/ε 可以直接反应红细胞的变形能力, 但不能反映细胞膜的剪切模量。

4.4 有限元法模拟红细胞的变形

为了更容易理解形状不同对红细胞变形能力的影响以及双凹形对红细胞变形能力的重要性, 我们利用有限元法对不同形状的红细胞变形进行模拟。有限元 (Finite Element Analysis, FEA) 是一门以结构力学和弹性力学为理论基础, 以计

算机为媒体,以有限元程序为主体,对结构工程的数值计算方法。有限元是工程技术领域进行科学计算的极为重要的方法之一,利用有限元分子可以获得很多复杂工程结构的各种机械性能信息,还可以直接就工程设计进行评判,对各种工程事故进行技术分析。

自从 1960 年波音公司提出有限元这一概念以来,有限元方法在工程技术领域得到了广泛的应用,从简单的弹性力学到复杂的弹塑性非线性分析,从最初只在航空工业中使用到目前广泛应用于机械设计制造、航空、汽车、土木工程、生物力学、生物医学等领域,从最初的结构静力学分析到现在的结构动力学、热学、电磁学、流体力学以及多种物理场耦合分析。短短 40 多年,有限元分析方法在各个领域都得到了广泛应用。

4.4.1 有限元法的基础原理简介

有限元的概念早在几个世纪前就已经产生并得到了应用,例如用多边形逼近圆来求得圆的周长,但作为一种方法被提出,则只有几十年。有限元法的实质是把具有无限个自由度的连续系统,理想化为只有有限个自由度的单元集合体,使问题转化为适合于数值求解的结构型问题。有限元分析是物理现象的模拟,是对真实情况的数值模拟,通过对分析对象划分网格,把具有无限个自由度的连续系统离散成有限个自由度的单元集合体,通过求解有限个数值来近似模拟真实环境的无限个未知量。

有限元方法和其他求解边值问题近似方法的根本区别在于它的近似性仅限于相对小的子域中。不同于求解满足整个定义域边界条件的允许函数的 Rayleigh Ritz 法,有限元法将函数定义在简单的几何形状的单元域上,不考虑整个定义域的复杂边界条件,这是有限元法优于其他近似方法的原因之一。

对于不同物理性质和数学模型的问题,有限元求解问题的基本步骤通常为;

- 1、 问题及解域定义: 根据实际问题近似确定解域的物理性质和几何区域。
- 2、 求解域离散化: 将求解域近似为具有不同有限大小和形状且彼此相连的有限单元组成的离散域,习惯上成为有限元网络划分。显然单元越小近似程度越好,计算结果也越精确,但计算量和误差都将增大。
- 3、 确定状态变量及控制方法: 具体的物理问题通常可以用一组包含问题状态变量边界条件的微分方程式表示,为适合有限元求解,通常转化为等价的泛函

形式。

4、单元推导：对单元构造一个合适的近似解，建立单元试函数，从而形成单元矩阵。为保证问题求解的收敛性，单元推导有许多原则要遵循，例如每个单元的解题性能和约束。

5、总装求解：将单元总装形成离散域的总矩阵方程，放映对近似求解域的离散域的要求，即单元函数的连续性要满足一定的联系条件。总装是在相邻单元结点进行，状态变量及其导数连续性建立的结点处。

6、联立方程组求解和结果解释：联系方程组的求解可用直接法、迭代法和随机法。求解结果是单元结点处状态变量的近似值。

大型通用有限元商业软件有：NASTRAN、SAP、ANSYS、ABAQUS 等。这里，我们采用 ABAQUS 软件。

4.4.2 红细胞力学模型

Evans 和 Fung 在 1972 年测量了大量人类红细胞的形状，并给出了一个描述红细胞双凹形的函数：

$$Z = \pm 0.5R_0 \sqrt{1 - \frac{X^2 + Y^2}{R_0^2}} \left[C_0 + C_1 \frac{X^2 + Y^2}{R_0^2} + C_2 \left(\frac{X^2 + Y^2}{R_0^2} \right)^2 \right] \quad (4.1)$$

$$R_0 = 3.91 \mu\text{m}, C_0 = 0.207, C_1 = 2.00, C_2 = -1.12$$

其中 $2R_0$ 为细胞的平均直径，不同红细胞的直径跨度为 7~8.5 μm 。由于细胞形状的对称性，可以只取一半细胞作为模型进行计算。在光镊拉伸实验中，过细胞中心垂直于拉伸方向的平面将细胞分为对称的两部分，在横截面上，每一点在拉伸方向是不受力的。

1、基本假设

ABAQUS 软件中没有规定单位，所有单位由使用则自行设定，在本文模拟中，单位制取为 pN， μm 。理论模拟不可能完全接近实际情况，该力学问题中用到以下基本假设，在简化模型的同时力求接近实际情况：

- (1) 假设细胞膜材料性质不变，用均匀的不可压缩的标准 Neo-Hookean 和 Yeoh 模型进行描述；
- (2) 假设拉伸的小球是刚体，小球和细胞的接触面积不变；

(3) 忽略周围流体的粘弹性和温度变化的影响。

2、材料属性

人的红细胞的细胞膜由磷脂双分子层、血影蛋白网络和膜蛋白组成。膜中的脂质主要包括磷脂、胆固醇脂和糖脂，脂双层具有流动性，可以影响红细胞的变形性。膜骨架蛋白对脂双层起着支撑作用，其成分变化或者膜的其他成分变化均可改变膜流动性。根据红细胞膜的性质，我们采用连续的超弹性材料来模拟。

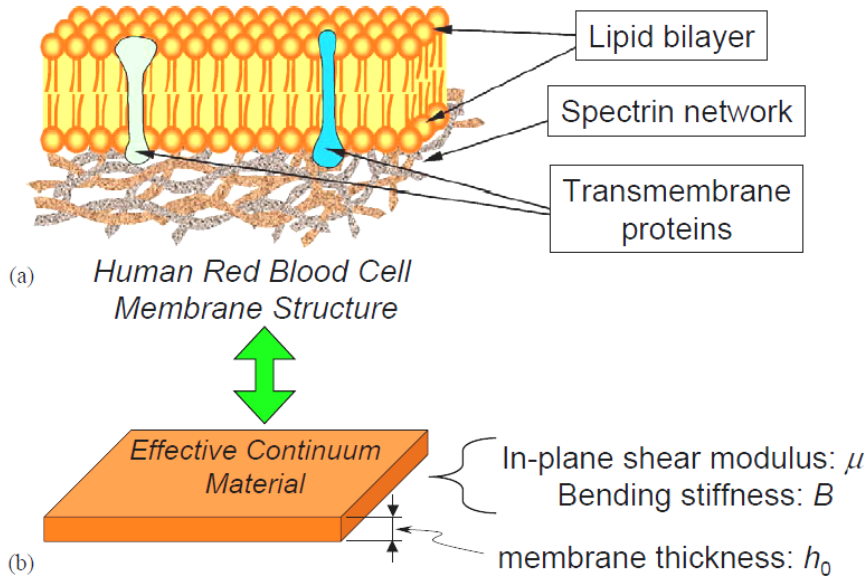


图 4.10 红细胞膜结构及连续介质模型示意图

超弹性材料的性质一般在橡胶材料中出现，其应力-应变关系是非线性的。在小形变状态下，超弹性性质退化为弹性性质，在大形变状态下，超弹性材料会出现非线性。在这里，我们使用 neo-Hookean 模型，该模型是超弹性模型中最简单的，只使用剪切模量 G_0 一个参数。Neo-Hookean 材料的应变能密度函数为

$$U = \frac{G_0}{2} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \quad (4.2)$$

其中 G_0 是初始剪切模量， $\lambda_i = 1 + \varepsilon_i$ ， ε_i ($i=1, 2, 3$) 是名义应变的主应变。在不可压情况下，有 $\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 = 1$ 。在单轴拉伸情况下，拉伸方向上的膜应力 T_1 可以表示为

$$T_1 = h \frac{\partial U}{\partial \lambda_1} = G_0 h_0 (\lambda_1^{1.5} - \lambda_1^{-1.5}) \quad (4.3)$$

h 是瞬时的膜厚， h_0 是初始膜厚度，因此，膜的剪切应力为

$$T_s = 0.5(T_1 - T_2) = G_0 h_0 (\lambda_1^{1.5} - \lambda_1^{-1.5}) / 2 \quad (4.4)$$

故膜的剪切模量为

$$\mu(\lambda_1) = \frac{1}{2} \frac{\partial T_s}{\partial \gamma_s} = \frac{3G_0 h_0 (\lambda_1^{0.5} + \lambda_1^{-2.5})}{4(\lambda_1 + \lambda_1^{-3})} \quad (4.5)$$

当 $\lambda_1 = 1$ 时, 由上式可得

$$\mu_0 = \frac{3}{4} G_0 h_0 \quad (4.6)$$

查 ABAQUS 用户手册得到 $C_{10} = 0.5G_0$, 其中 C_{10} 为 ABAQUS 中表征 neo-Hookean 模型的参数。

4.4.3 模拟计算

1、几何模型的创建

在 ABAQUS/CAE 中创建三维可变性实体模型:

Modeling Space: 3D Type: Deformable

Shape: Solid Type: Revolution/Extrusion Approximate size: 20

根据式 (4.1) 所示红细胞形状方程画出半个红细胞模型, 膜厚取 $0.0075\mu\text{m}$, 然后旋转 180° 得到所需细胞模型。然后画直径 $1\mu\text{m}$ 的圆柱, 与细胞模型进行布尔差运算, 在细胞表面截得椭圆区域, 模拟聚苯乙烯小球与细胞接触的区域。最后模型图如图 4.11。取细胞膜弹性模量 $\mu_0 = 2.0\text{pN}/\mu\text{m}$, 则 $C_{10} = 0.5G_0 = 2\mu_0/3h_0 = 178$ 。

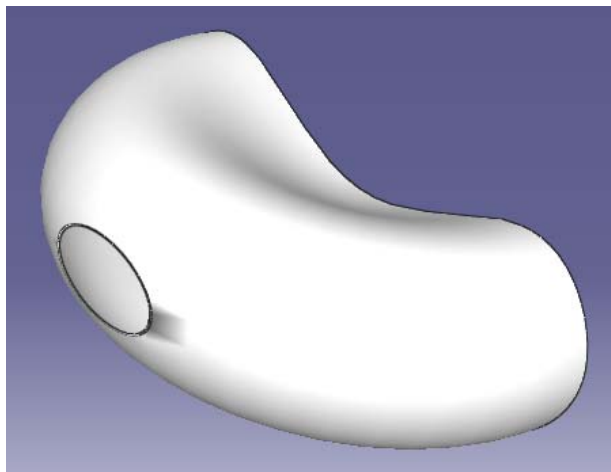


图 4.11 红细胞几何模型示意图

2、材料属性的定义

选择超弹性属性并赋予给上一步所画模型, 参数如下:

Mechanical Elasticity Hyperelastic(超弹性)

属性: Strain energy potential:Neo Hooke

C10	D1
178	0

3、边界条件设定

细胞拉伸方向设为 z 方向, 中心截面为 x-y 平面, 且长轴方向为 x 方向。在中心截面上各点只有 x 和 y 方向的自由度, z 方向自由度被限制, 长轴直径两端点只有 x 方向自由度。负载加在圆柱截出的椭圆形区域上。

4、网格划分

这里采用三角形网络自由划分, 布点密度与模型形状有关, 正常红细胞形状比较复杂, 为了保持网络的对称性, 布点密度应适当增大。网格划分结果如下图, 建立任务后即可提交进行计算。

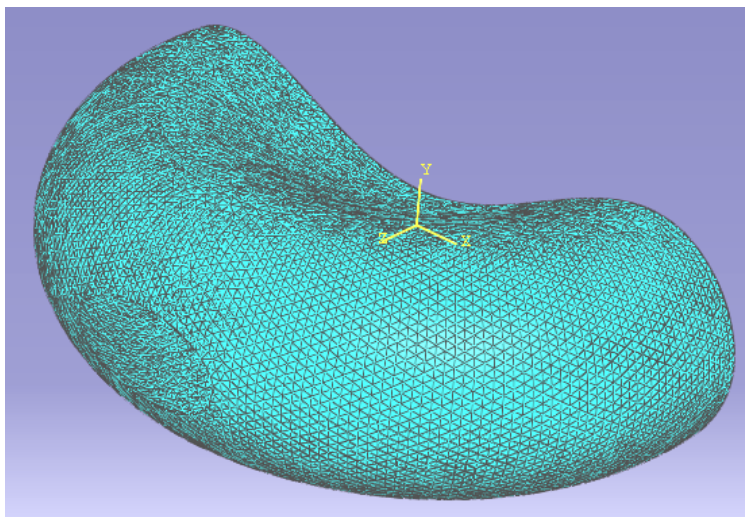


图 4.12 模型网络划分示意图

5、不同形状的细胞模型

为了与实验结果比较, 选择不同形状的细胞进行拉伸模拟, 在考虑到细胞表面积不变的情况下, 选取各种不同形状来对正常双凹形红细胞逐渐变为球形的过程进行模拟。

4.4.4 模拟结果

1、双凹形正常红细胞

正常红细胞的形状由式 4.1 确定，通过模拟得到在不同的拉伸力作用下，细胞轴向直径（沿拉伸放方向）的变化情况，如图 4.13 所示，图 4.14 为红细胞变形过程图示。当拉力比较小时，细胞直径与拉伸力成正比，随着拉伸力增大，细胞发生非线性形变，曲线斜率变小，说明细胞变硬，与小变形情况相比，大变形时细胞变得不容易被拉伸，细胞变形能力逐渐变弱。

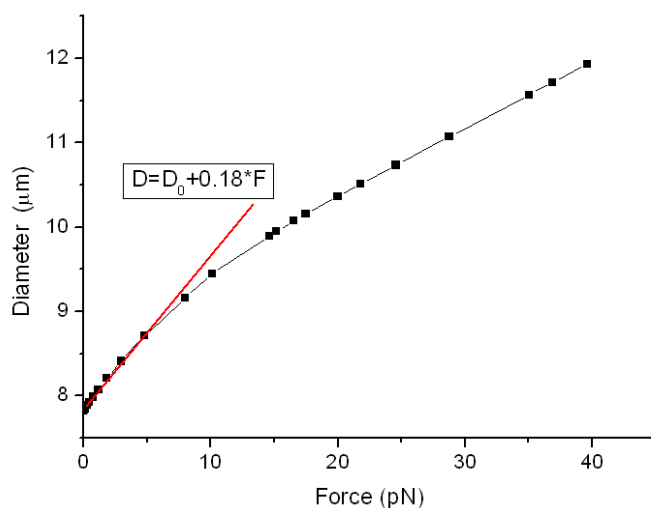


图 4.13 正常红细胞的拉伸曲线

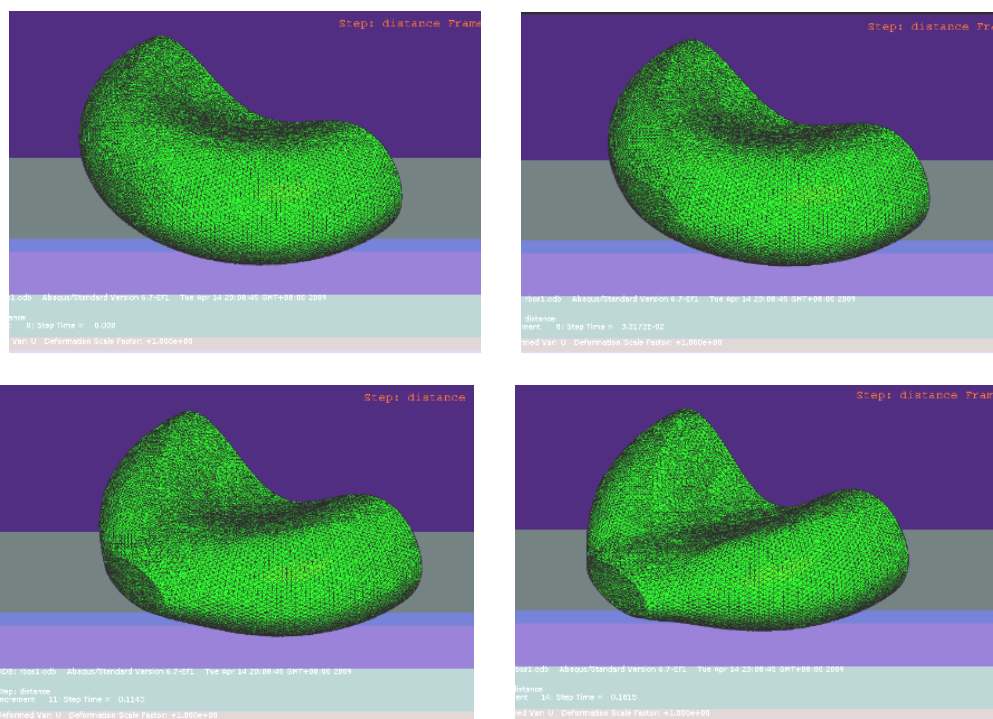


图 4.14 红细胞变形过程模拟

2、椭球形细胞

当红细胞外环境渗透压降低时，细胞体积增大，细胞会逐渐变成椭球形，最

后变为球形。由于红细胞膜的面积扩张模量很大，所以在细胞变形中细胞膜的表面积保持不变。假设红细胞变成椭球时为 aab 型旋转椭球，用长短轴之比为 2:1 的椭球来模拟红细胞由双凹形变成球形过程中的某个状态。由式 4.1 决定的红细胞表面积约为 $135\mu\text{m}^2$ ，变为长短轴之比为 2 的旋转椭球后，根据表面积不变，可以计算得到 $a=3.87\mu\text{m}$ ， $b=1.94\mu\text{m}$ 。通过 ABAQUS 模拟该形状的细胞在拉力作用下的变形情况，结果如图 4.15。当拉力比较小时，细胞直径与拉伸力成正比，随着拉伸力增大，细胞发生非线性形变，曲线斜率变小，说明细胞变硬，与小变形情况相比，大变形时细胞变得不容易被拉伸，变形能力稍微变弱，但与小变形时的变形能力差别不是很大。

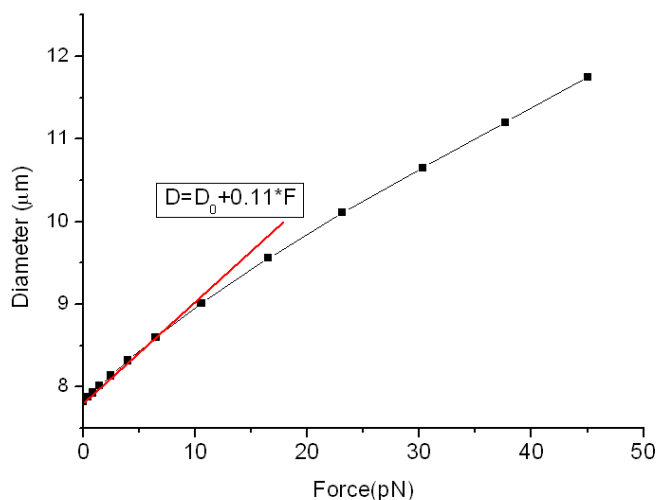


图 4.15 椭球形细胞的拉伸曲线

3、球形细胞

当红细胞周围环境渗透压降低到一定程度时，细胞逐渐变为球形，仍然假设细胞膜表面积为 $135\mu\text{m}^2$ ，则半径为 $3.28\mu\text{m}$ 。细胞膜由双凹形涨大为球形，表面各处的变形能力并不相同，为简化模型，假设球形细胞膜处处均匀，每个地方变形能力多相同。模拟结果如图 4.16 所示，发现在 0 到 50pN 拉伸力范围内，细胞直径和拉伸力都是成线性关系，也就是说在大形变时，细胞的变形能力没有减弱。

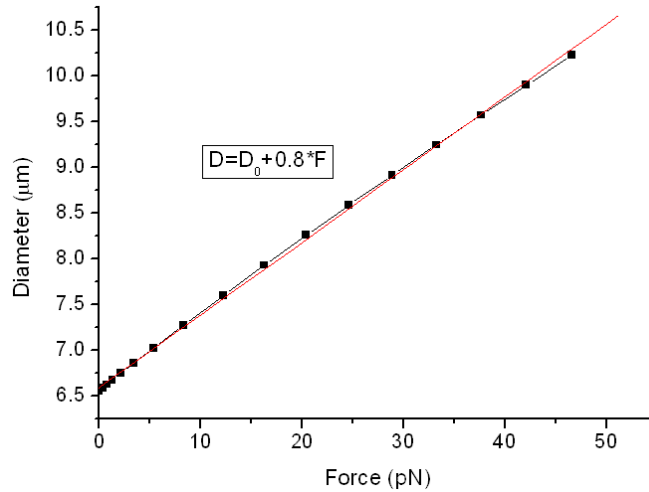


图 4.16 球形细胞拉伸曲线

4.4.5 讨论

从以上模拟结果发现，不同形状的红细胞，其变形能力有很大差别。对于正常的双凹形细胞和椭球形细胞，当拉伸力小于 10pN 时，细胞发生弹性形变，当拉力再增加时，细胞发生非线性形变，形变量不再随拉力呈线性增加，而且随着拉力增加，细胞变形能力减弱，细胞形状越接近球形，变形能力减弱的越慢。这个结果从另一方面也说明了双凹形细胞的变形能力最强。

根据红细胞直径随拉力的变化关系可以得到细胞相对伸长量随拉力的关系，从而得到细胞的拉力-相对伸长曲线，如图 4.17(a)、(b)，从图中可以明显的看出来，双凹形红细胞的 F/ϵ 值最小，也就是说最容易发生形变。在小形变范围内 ($F < 20\text{pN}$)，球形细胞变形能力最弱。当拉力进一步增大时，球形细胞变形能力超过椭球形细胞，这与预期不相符合，可能是由于模型过于简单所造成。由图 4.17(b)可看出，当拉伸力小于 10pN 时，各种形状的细胞的型变量与拉力都呈线性关系。以上模拟结果与实验结果（图 4.8）都比较符合。

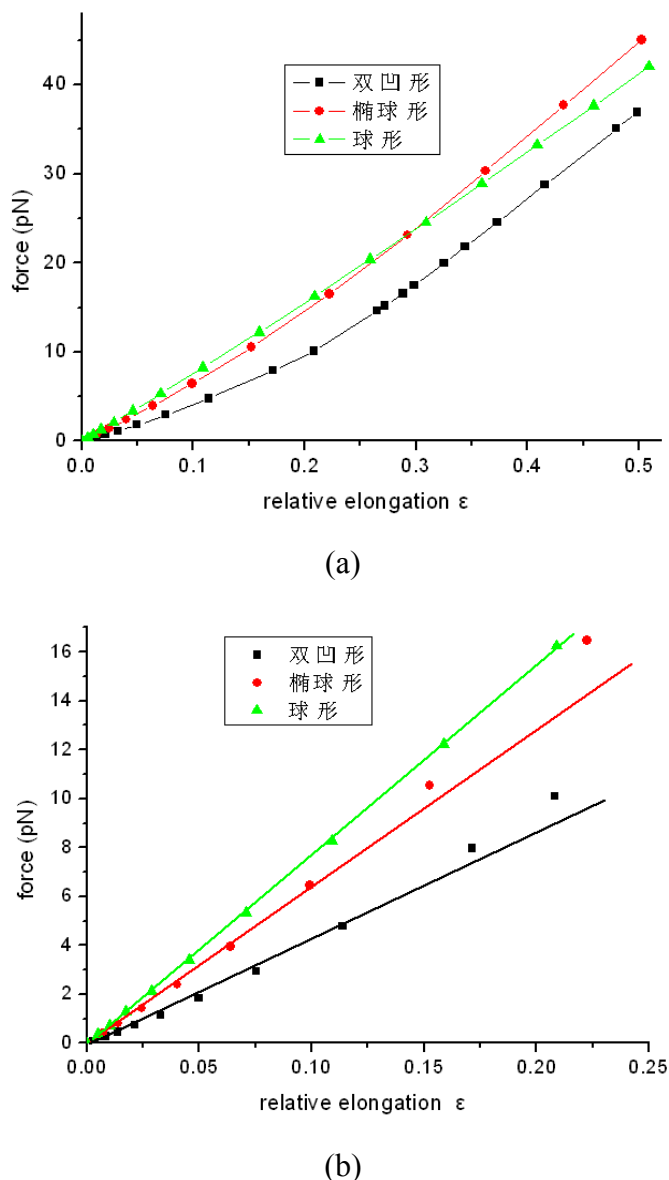


图 4.17 不同形状细胞的力-伸长曲线模拟结果

4.5 本章小结

长期以来，人类的红细胞就是科学家研究的一个焦点，红细胞有一个相对简单的结构，没有细胞核，同时具有轴对称的形状，红细胞的变形特征一直为研究者所感兴趣，因为红细胞的变形对血液流动有着重要的影响，与一些疾病也有着直接的关联。在这一章中，我们利用光镊技术对等渗条件下的正常双凹形红细胞的膜弹性进行了测量研究，测量结果与以往报道结果接近。由于红细胞的变形受到周围环境如渗透压、pH 值等因素的影响，这方面的实验报导很少，因此我们对不同渗透压下红细胞的形变特征进行了研究，发现等渗条件下双凹形的红细胞形变能力最强，渗透压降低时，红细胞形变能力下降，其主要是由于细胞形状的

改变造成的，细胞由双凹形逐渐变为椭球形、球形时，表面积与体积之比值增大，细胞变形能力下降；而在高渗条件下，细胞变形能力同样减弱，主要原因是细胞内液粘度呈指数增加。另外，我们还利用 ABAQUS 有限元软件对不同形状的红细胞变形进行了模拟，模拟结果与实验结果基本相符，该结果有助于理解红细胞双凹形的形状对其形变能力的影响。

红细胞的长期保存对临床医学研究的重要课题，目前红细胞的冻干保存引起了人们的广泛关注，其机理是通过加入保护剂后冻干减少水分来降低酶活性，有效延长细胞存活时间，干燥过的细胞可以在常温下长期保存或远距离运输。在红细胞冻干之前需要利用高渗法加入保护剂（如海藻糖等），而保护剂的保护机理人们还未真理解。利用光镊技术研究高渗状态下加入保护剂前后红细胞的力学性质，有助于揭示保护剂对细胞结构和功能的保护机理。

参考文献

1. 易仁亮, 邹霞英. 红细胞变形性的影响因素[J]. 中国病理生理杂志, 1995, 11(6): 658-659
2. 范家骏, 赵国欣. 血液流变学基础与临床[M]. 陕西科学技术出版社, 1995, 1.
3. 刘凝慧, 祁友键. 21 种不同纲脊椎动物红细胞变形能力的测量[J]. 徐州医学院学报, 1989, 9 (3), 181-185
4. 尹翠娥. 红细胞变形性的研究进展. 重庆医学, 1997, 26 (2): 81-83
5. 王红勇, 何作云, 李希楷. 冠心病患者红细胞变形性和全血粘弹性的变化. 中华老年医学杂志, 2001, 20 (6): 455-456
6. 何作云, 王瑞兴. 临床细胞流变学[M]. 重庆大学出版社, 1997
7. Bessis M, Mohandas N A, Claude Feo. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. Blood Cell, 1980, 6:315-327
8. Fieger R , Grebe R. Cell-elastometry: a new method to measure erythrocyte elasticity. Biorheology , 1997 , 34 (3) : 223-291
9. Wen Zongyao , Yan Zonggyi , Gao Tie , et al. The study of effects of WGA and ConA on RBC receptors with a new Ektacytometry. Clinical and Microcirculation , 1997 ,17(6) :467~478
10. 文宗曜, 严宗毅, 施岩等. 测量红细胞膜剪切弹性模量及粘度的新方法, 清华大学出版社, 1997, 741-744.
11. 严宗毅. 测量红细胞变形性的新方法[J]. 国外医学生物医学工程分册, 1997, 20 (5): 257-263
12. 王玉英, 王益民, 史红. 激光衍射法测量红细胞变形原理及有关问题分析[J]. 天津中医学院学报, 2003, 22 (2): 66-67
13. Shin S, Ku Y. Disposable laser-diffraction ektacytometry to measure red blood cell deformability[J]. Progress in Biomedical Optics and Imaging-Proceedings of SPIE, 2005, 5630(1): 168-176
14. Magus I. Gregersen, Cyrus A. Bryant, Walter E. Hammerle, Shunichi Usami and Shu Chien. Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves. Science, 1967, 157(3790):825-827
15. 王怡. 实用临床血液流变学, 学苑出版社, 1994, 113-115

16. Micthison JM, Swann MM. The mechanical properties of the red cell surface[J]. *J Exp Biol*, 1954, 31:443-460
17. Lacelle PL. Effect of sphering on erythrocyte deformability. *Biorheology*. 1972, 9(2):51-59
18. Rand RP, Burton AC. Mechanical properties of red cell membrane[J]. *Biophys J*, 1964,4:115-135
19. Evans E.A., 1973. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear-and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys. J.* 13(9), 941-954.
20. Evans E.A., Waugh R. 1977. Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane. *Biophys. J.* 20:307
21. Ashkin A. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 1987, 330:769-771
22. Svoboda K. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, 23:247-285
23. Sheetz MP. *Laser tweezers in cell biology*. London, UK: Academic Press; 1998
24. Sylvie Hénon, Guillaume Lenormand, Alain Richert and Francois Gallet. A new determination of shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. 1999, 76:1145-1151
25. 周辉, 李先锋, 李银妹等. 单光镊技术测量红细胞膜弹性新方法的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28 (6): 904-907
26. Guillaume Lenormand. Direct measurement of the area expansion and shear module of the human red cell membrane skeleton. *Biophysical Journal*. 1999, 81:43-56
27. John Sleep, David Wilson, Robert Simmons, and Walter Gratzer. Elasticity of the red cell membrane and its relation to Hemolytic disorders: An optical tweezers study. *Biophysical Journal*. 1999, 77:3085-3095.

第五章 旋转玻片实现分时复用多光阱

光镊可以捕获几纳米到几十微米的微粒，在很多领域已经有所应用。然而单束激光只形成一个光阱是光镊应用的一个限制因素，很多研究中需要操控多个粒子，如研究胶体粒子相互作用【1】，复杂流体的流变学性质【2】，拉伸 DNA 丝【3】以及测量蛋白质间的相互作用【4】等，这些研究都需要多光阱技术。随着光镊应用领域的不断扩大，研究者们已经不再满足于用单光镊对物体进行简单的操控，应用上的需求引导光镊研究向多光阱光镊转移。Arthur Chiou 等【5】利用 AOM 实现分时复用的跳跃光阱来拉伸红细胞，测量红细胞的变形特点。而目前发展较快的全息光镊技术有望在细胞及药物分选等领域得到应用。

5.1 多光阱的实现方法及应用

5.1.1 多光阱的实现方法

目前实现多光阱的方法有很多，如采用多个光镊光源分别形成光阱、利用偏振分束器将单光源分束形成双光阱、利用声光调制器切换光束实现多光阱、采用全息衍射光学元件形成复杂多光阱等。下面分别对各种方法进行介绍。

1、采用多束激光作为光镊光源：每束激光波长各不相同，这种方法形成的多光阱比较稳定，每路光镊可以独立操控，使用比较方便。但是成本过高，如果每路光源都选择功率高、模式好的激光器，显然价格昂贵，即使可以选择价格较低的半导体光源，但多波长光源同时耦合进入显微镜，要求加工满足多波长反射、透射的光学元件，对光学元件镀膜要求很高。

2、偏振分束形成双光阱：为避免同种波长激光干涉，利用偏振分束棱镜将光源分解成偏振方向互相垂直的两束光，然后再耦合进入显微镜形成双光阱。两个光阱可以独立操控，由于两路光波长相同，对光学元件镀膜要求不高，缺点是只能形成两个光阱。在实际应用中，偏振分束法经常与多光源法相结合，形成更多数量的光阱，例如我们小组的纳米三光镊设备【6】。

3、利用声光调制器偏转光束实现多光阱

声光设备可以看作是一种媒质，光和声波的相互作用产生光束的衍射。当超声波在声光晶体材料中传播时，导致晶体密度的变化，从而导致折射率发生变化，

这样折射率就可以被周期性的调制，形成可变化的相栅，在一定条件下，光束穿过声光晶体的相栅时会发生布拉格衍射，如下图，

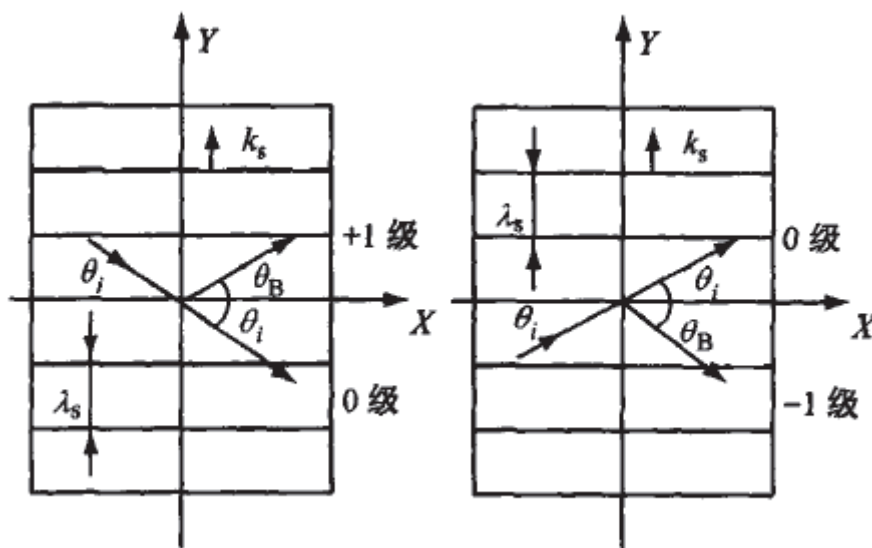


图 5.1 拉布格衍射

满足布拉格衍射时有

$$\sin \theta_B = \frac{\lambda}{\lambda_s} \quad (5.1)$$

由于 $\lambda \ll \lambda_s$ ，所以布拉格角 θ_B 很小，因此偏转角为

$$\Delta\theta = 2\theta_B = \frac{\lambda}{nv} f_s \quad (5.2)$$

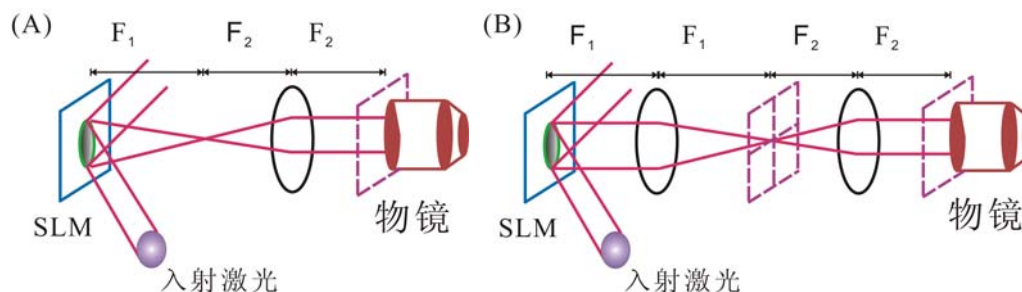
其中， λ 为入射光波长， n 为介质折射率， f_s 为超声波频率， v 为介质中的声速。当声光调制器工作于布拉格模式时，衍射光束的偏转角与超声波的频率呈线性关系。改变超声波的频率，即可达到控制激光束的目的，这就是声光偏转器的原理。

在光镊光路中加入声光调制器，对光束进行偏转，实现光阱位置的改变，通过改变超声波的频率，可以改变光束偏转方向。利用声光调制器，可以产生线扫描光阱，实现多粒子的线状排布【7】以及拉伸红细胞【5】等。另外，也可以利用快速反射镜（FSM）实现光束偏转，只是带宽没有声光调制器大。

4、全息光镊

全息光镊是利用全息元件构建的具有特定功能的光场而形成的光镊，如多粒子操控的阵列光镊，旋转粒子的涡旋光镊以及最近几年发展起来的三维阵列光阱。最好的全息光镊是芝加哥大学 Eric R.Dufresne 等【8】与 1998 年实现，他们利用 DOE 将准直的激光束分成多个独立的光束，通过强会聚透镜聚焦后形成多

光镊。目前全系光镊的全息元件多由空间光调制器 (SLM) 形成, 其中由计算机寻址的液晶空间光调制器最为常见。实现全息光镊的常见光路有菲涅尔型【9】和傅里叶型【10-12】, 如图 5.2 所示。



(A) 菲涅尔型光路; (B) 傅里叶型光路

图 5.2 实现全息光镊的典型光路

利用全息光镊可以实现各种复杂的操控, 光阱数量可以多达 400 个【13】。动态全息光镊可以操控粒子沿着任意设定的轨迹运动, 实现各种复杂的操控【10, 14, 15】, 在药物分选等领域有很大的应用价值。然而昂贵的价格使得 AOM 与动态全息等技术的发展受到一定的限制。此外, 动态全息光镊稳定束缚多个粒子要求入射激光的功率很高。

5.1.2 多光阱的应用

1、测量胶体粒子间相互作用势

胶体体系是一种相当广泛的物质体系, 在日常生活和生产活动中, 人们都会不断的和胶体打交道, 例如牛奶、油漆以及化妆品等都属于胶体。对胶体体系中粒子之间的相互作用的研究一直是该领域的活跃的方向。光镊在胶体领域也有了很多的应用。任洪亮等【16】利用双光镊测量了胶体粒子间的长程相互作用势, 所得结果与 DLVO 理论相符合。Pantina 等【6】利用扫描光镊捕获和操控多个胶体粒子, 依靠粒子间的相互作用吸引力, 排列成线性小球链, 如图 5.3, 然后利用双光镊沿小球链方向拉伸小球, 如图 5.4, 直到小球链中某处断开, 测量该状态下粒子间的结合力。另外, 他们还对小球链的弯曲力学性质进行了测量【17】。

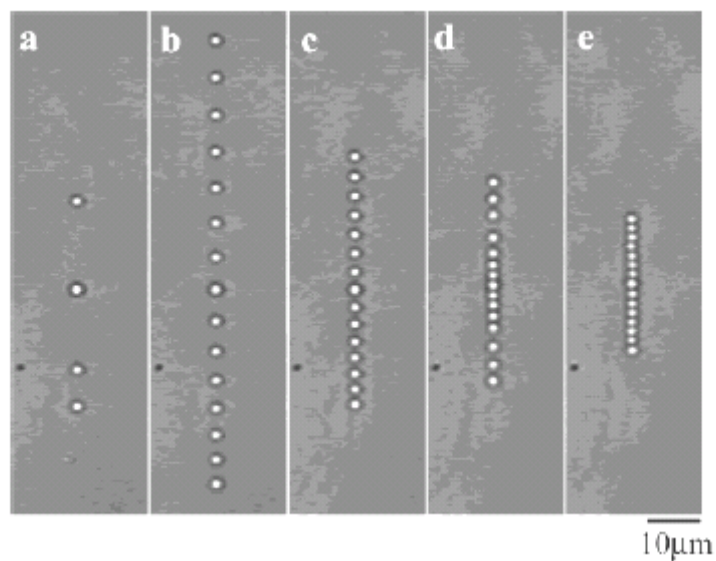


图 5.3 利用扫描光镊把粒子排布成线性小球链

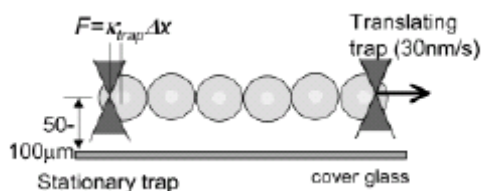
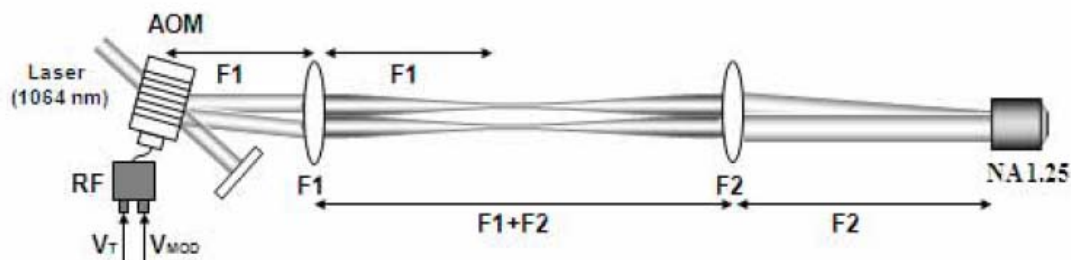


图 5.4 双光镊测量胶体小球间的结合力

2、拉伸红细胞

上一章详细介绍了光镊技术拉伸红细胞的方法，普通的方法是在红细胞直径两端粘两个小球，光镊操控小球来拉伸红细胞。Arthur Chiou 等【7】发展了一种新的拉伸红细胞的技术，他们利用声光调制器产生一维跳跃光阱，光阱之间的距离通过超声波频率来控制，用这种跳跃光阱来拉伸红细胞，同样可以研究红细胞膜的力学特性。



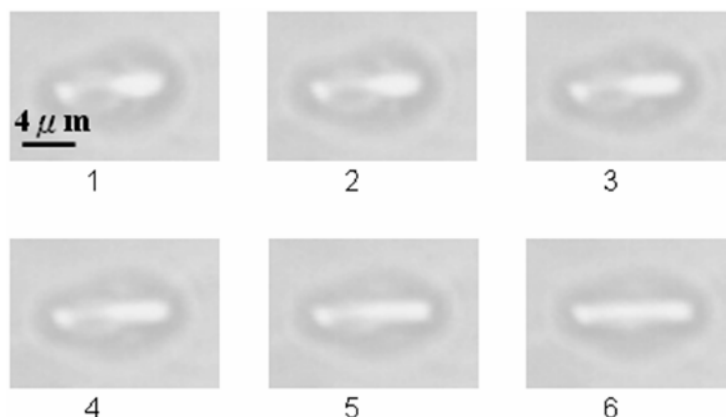


图 5.5 一维跳跃光阱拉伸红细胞

3、多粒子的复杂运动

全息光镊可以形成各种功能的光阱，对粒子实现复杂的操控，科学家 Grier【10】预言，全息光镊将引发光学操控的一场技术革命。利用光波前校正技术所产生的力可以实现快速控制，对多粒子进行实时动态的捕获和操控【18, 19】。Jesacher A.等【20】利用全息光镊产生了圆形、椭圆、多边形和笑脸等形状的振幅分布、相位分布，还操控微小粒子在光阱中逆时针运动。全息光镊发明之前，光镊技术的应用主要侧重在基础研究方面，由于全息光镊在多粒子操控方面的优势，将会为光镊走向实用化、规模工业生产打开新局面。全息光镊的不足是目前采用的空间光调制器的衍射效率还比较低，而且同时形成光阱数量很多，平均到单个光阱中的激光功率比较低，会导致光阱捕获能力下降。

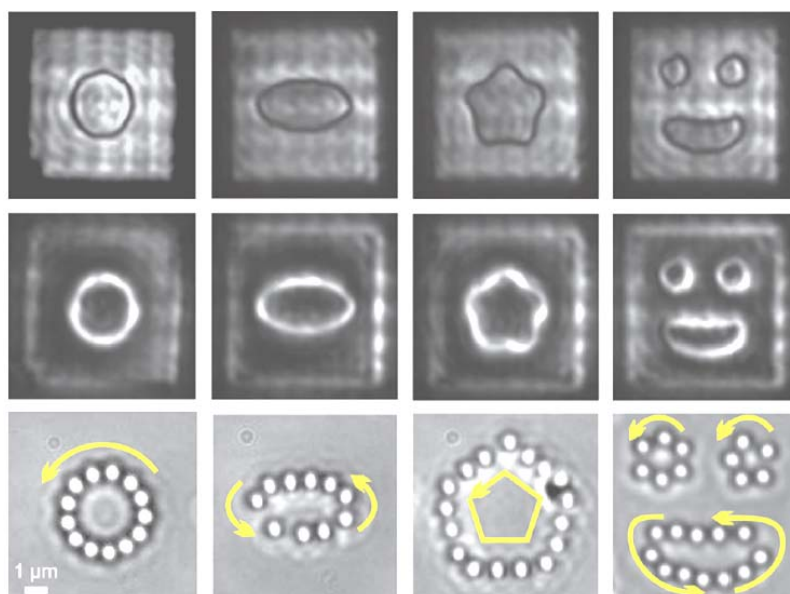


图 5.6 全息光镊形成各种形状的光镊

5.2 旋转玻片实现分时复用多光阱

本章介绍一种在普通单光镊装置上实现分时复用光阱 (time sharing optical tweezers, TSOT) 的新方法, 利用光经过一定厚度的倾斜玻片产生微小偏移来实现光阱位置的变化。将不同厚度的玻片放置于转盘中并倾斜安置在光镊光路的合适位置, 当转盘旋转时即可实现多光阱。旋转玻片实现多光阱的方法新颖巧妙, 与转镜或 AOM 实现分时复用技术相比, 该方法装置更加简单, 成本更加低廉, 很容易推广应用。

5.2.1 原理设计

光线斜入射到平板玻片上, 经过两次折射, 出射光线会发生一定平移, 如图 5.7(a)所示, 出射光线相对于入射光线的平移量 x_0 与入射角度 θ 、玻片厚度 t 以及玻璃折射率 n 间满足如下关系:

$$x_0 = t \cdot \left(\sin \theta - \frac{\sin \theta \cdot \cos \theta}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \theta}} \right) \quad (5.3)$$

由式 (5.3) 可知, 光线平移量 x_0 与 t 、 θ 、 n 都呈单调递增关系。

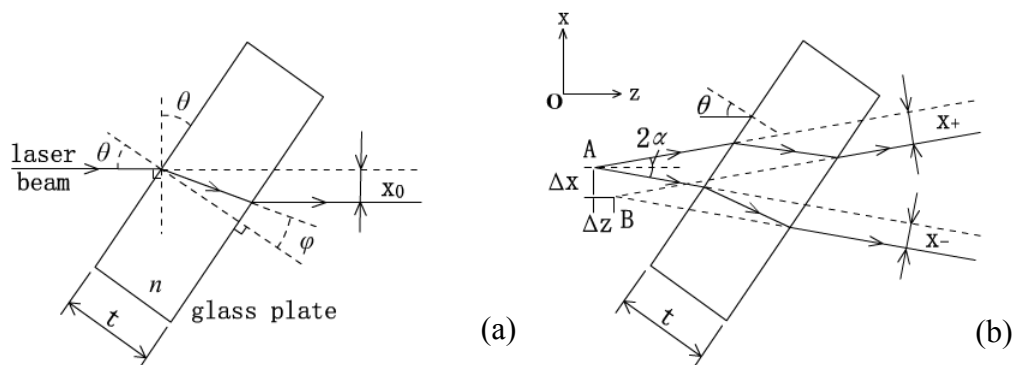


图 5.7 (a)单束光线和(b)微发散光线束经过平板玻璃的传播示意图

考虑 x - z 平面内 A 点发出的两条光线, 如图 5.7(b)所示, 它们与 z 轴夹角分别为 $\pm\alpha$ ($\alpha \ll 1$), 入射到倾斜角为 θ 的玻片上 (玻片表面法线在 x - z 面内), 则入射角分别为 $\theta \pm \alpha$, 经过玻片后两条光线都发生平移, 设平移量分别为 x_{\pm} 。当 $\alpha \ll \theta$ 时, 一级近似下有 $x_{\pm} = x_0 \pm \alpha \cdot dx/d\theta$, x_0 为发散角为 0° 的光线经过玻片后在 x 方向的平移量。由图 5.7(b)可知, 两条微发散光线斜入射玻片后都发生平移, 但出射光线反向延长线的交点 B 与 A 点不重合, 交点 B 相对于 A 在 x 、 z 方向上都有偏移, 分别为:

$$\Delta x = \frac{x_+ + x_-}{2 \cos \alpha} \approx x_0 = t \cdot \left(\sin \theta - \frac{\sin \theta \cdot \cos \theta}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \theta}} \right) \quad (5.4)$$

$$\Delta z = \frac{x_+ - x_-}{2 \sin \alpha} \approx \frac{\partial x_0}{\partial \theta} = t \cdot \left(\cos \theta - \frac{\cos 2\theta}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \theta}} - \frac{\sin^2 2\theta}{4\sqrt{(n^2 - \sin^2 \theta)^3}} \right) \quad (5.5)$$

由于 $\alpha \ll \theta$ ，一级近似下，偏移量与发散角 α 无关。由此可知从 A 点出发的发散角在 $\pm\alpha$ 范围内的所有光线经平板平移后均反向会聚于 B 点。当入射光线不在 x - z 平面内时，需要考虑光线在 y 方向的发散角所造成的影响，经分析可知， y 方向发散的光经玻片后，出射光线反向延长线同样会聚于 B 点。根据光路可逆原理，对于微会聚的光束照射到倾斜玻片上，也会造成会聚点的偏移，且偏移量与会聚角度没有关系，大小仍由式(5.4)、(5.5)决定。

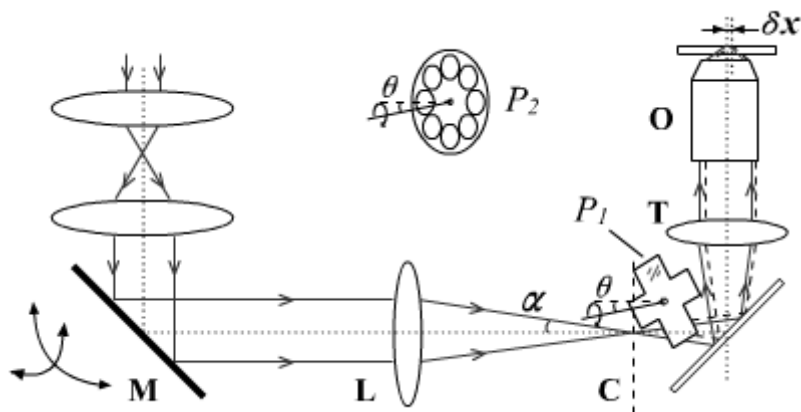
由显微镜光路可知，对于放大倍率为 γ 的物镜，共轭点处的物横向和纵向偏移 Δx 、 Δz ，对应物镜焦平面上的象横向和纵向分别偏移 δx 、 δz ，它们的关系为：

$$\delta x = \Delta x / \gamma \quad (5.6)$$

$$\delta z = \Delta z / \gamma^2 \quad (5.7)$$

于是，在共轭点后方放置倾斜玻片，使入射光束发生横向及轴向偏移，可造成物镜焦平面上光斑的偏移。根据这个思想可以实现光阱位置的改变。

单光镊光路如图 5.8 所示，平行光经过阱位透镜 L 聚焦在显微镜共轭成像面 C 处，然后以微发散的光束耦合进入显微镜，通过辅助透镜 T($f=150\text{mm}$)后以平行光进入物镜 O 中。在光镊设计中，要求物镜后瞳的光束直径 d 为 3~5mm【21】，由此可知 C 点前后光束的发散角 2α 约 0.03rad，属于微发散光束。在显微镜共轭成像面后方（也可以在前方，但要在 L 之后）放置倾斜玻片，如图 5.8 中 P_1 ，玻片表面法线方向与光束传播方向保持夹角 θ ，则光束通过玻片会产生微小偏移，造成光镊阱位发生横向变化。当玻片绕与表面垂直的轴旋转时，以一定的频率对激光进行斩波，可以实现光镊阱位的横向跳动。当斩波频率大于一定值时，跳动的两个光阱都可以稳定俘获粒子，此时单光镊变成了分时复用的双光镊。将图 5.8 中 P_1 换为转盘 P_2 ，并在转盘内安置不同厚度的玻片，转盘转动时可产生多个光阱。



(实线：没有玻片；虚线：光线经过玻片发生偏移)

图 5.8 分时复用多光阱原理示意图

5.2.2 实验结果

实验采用典型的光镊设备：包括倒置显微镜(Olympus IX-70, 100 \times 油浸物镜 NA=1.3, 1.5 \times 辅助成像透镜)和激光器(Spectra-Physics, CW, $\lambda=780\text{nm}$), 样品为分散于水中的直径为 $1\mu\text{m}$ 和 $3\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球 (Duke Scientific Corporation, USA)。设计了如图 5.8 所示的八孔转盘, 通光圆孔直径为 10mm 。所用直流电机的额定电压为 24V , 转速最高可达 5000rpm , 通过电机带动转盘绕中心轴旋转实现对激光束的斩波, 加载不同厚度的玻片后, 可以实现多光阱。改变转盘转轴方向, 可以改变阱位间距。实验所用玻片材料为 K9 玻璃, 折射率 $n=1.51$, 玻片直径为 12mm 。

1、玻片对横向阱位的控制

在光镊光路中插入玻片后, 通过改变玻片的厚度和倾斜角度可以实现对光阱横向位置的控制。

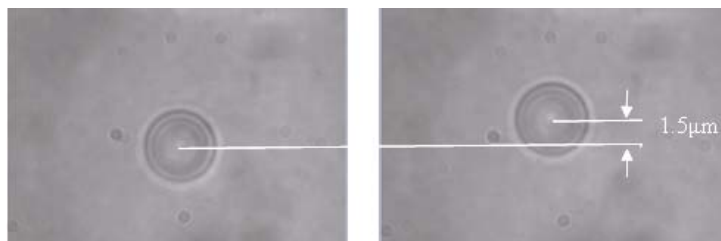


图 5.9 放置倾斜玻片后阱位发生变化 ($t=2\text{mm}$, $\theta\sim 20^\circ$)

将厚度为 2mm 的玻片放置于显微镜共轭点处, 倾角为 20° 时, 光阱横向偏移 $1.5\mu\text{m}$, 如图 5.9 所示。玻片倾角不同时, 光阱阱位偏移也不同, 如图 5.10(a)

所示，阱位偏移量随倾角增大而增大，图中实线为根据式 (5.3) 计算的理论结果，点为实验测量数据，实验与理论符合很好。通过改变玻片厚度也可以实现阱位控制，图 5.10 (b) 为玻片倾角 30° 时光阱偏移量随玻片厚度的线性变化关系。

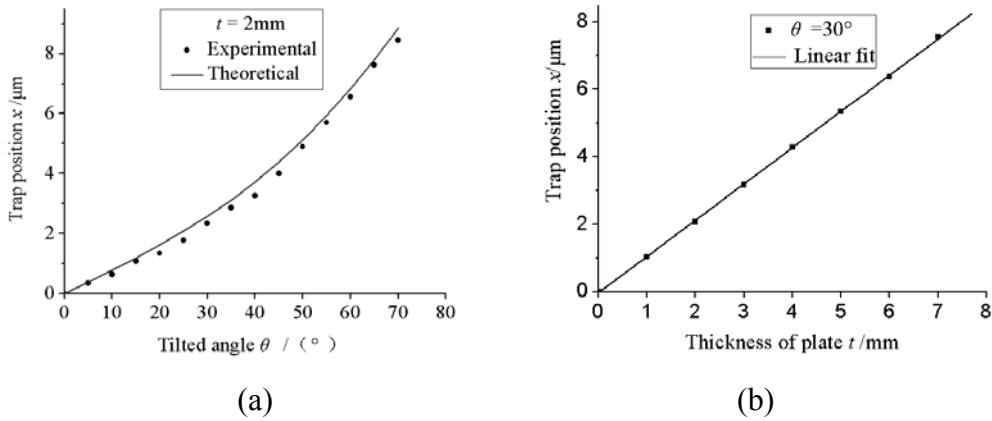
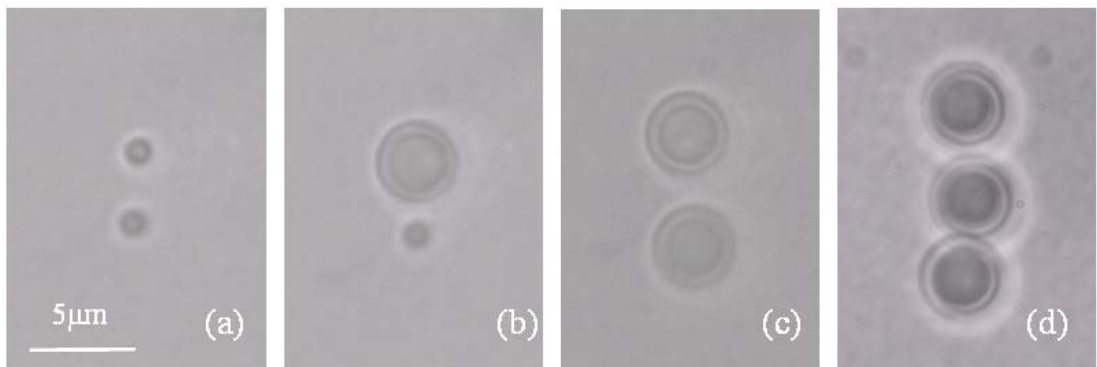


图 5.10 阱位横向偏移量随玻片(a) 倾角 θ 和 (b) 厚度 t 变化关系 ($\gamma=150$, $n=1.51$)

2、 旋转玻片实现多光阱

将两块厚度 4mm 的玻片置于转盘中心对称的两圆孔内，旋转转盘可以实现双光阱。当玻片与入射光夹角 θ 为 25° 时，两光阱相距 $3.6\mu\text{m}$ 。利用此双光阱同时捕获了两个 $1\mu\text{m}$ 小球，如图 5.11(a)，也可以同时捕获一个 $3\mu\text{m}$ 小球和一个 $1\mu\text{m}$ 小球，如图 5.11(b)。改变夹角 θ 为 40° 时，两光阱间距 $6\mu\text{m}$ ，同时捕获了两个 $3\mu\text{m}$ 小球，如图 5.11(c)。实验中，电机转动频率在 $25\sim 75\text{Hz}$ 之间改变，即光阱切换频率为 $50\sim 150\text{Hz}$ ，两个光阱都能稳定捕获小球。



(a) 两个直径为 $1\mu\text{m}$ (b) 直径 $3\mu\text{m}$ 和 $1\mu\text{m}$ (c) 两个直径 $3\mu\text{m}$
(d) 三个直径 $3\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯小球

图 5.11 分时复用光阱同时捕获

取 2mm 和 4mm 的玻片各两块，间隔放入转盘中，电机转动频率大于 25Hz 时实现了三光阱。利用产生的三光阱同时捕获了三个 $3\mu\text{m}$ 小球，如图 5.11(d)。

5.2.3 参数选择与讨论

1、玻片位置

在图 5.8 所示光路中，将倾斜玻片放置在阱位透镜 L 和显微镜之间任何一点，都可以实现光阱横向位置的变化。若将玻片放置在透镜 L 前面的平行光光路中，光束经过玻片将发生微小平移，经过物镜仍会聚于物镜焦点，但焦点后方的光束不再关于物镜光轴对称，光束强度中心偏离光轴。事实上，由于被捕获粒子的中心并不在物镜焦点处，而是处于焦点之外大约一个粒子半径处的光束强度中心【22】，所以光束中心的离轴会造成光阱横向位置变化。下面将详细讨论玻片放在平行光路中对阱位变化的影响。

设沿 z 方向传播的平行光经过厚度 t 、倾斜角度 θ 的玻片后偏移 Δx ，如图 5.12 所示。光束中心光线 3 经过阱位透镜 L 后与 z 轴夹角为 φ ，经过物镜后出射光线 3' 与 z 轴夹角为 β 。图中 F 为物镜焦点即激光会聚点，A 和 B 分别为光阱变化前后被捕获小球的球心，易知 A 点在物镜光轴上，到 F 的距离等于小球半径 R，而 B 点位于光线 3' 上，到 F 距离也是 R。设物镜放大倍率为 γ ，阱位横向偏移量设为 $\delta x'$ 。根据图 5.12 中几何关系有

$$\varphi \approx \Delta x / f \quad \beta \approx \gamma \cdot \varphi \quad \delta x' \approx R \cdot \beta \quad (5.8)$$

于是有

$$\delta x' \approx \Delta x \cdot \gamma \cdot R / f \quad (5.9)$$

取 $t=1\text{mm}$, $\theta=30^\circ$, $n=1.51$, $\gamma=100$, $R=1.5\mu\text{m}$, $f=350\text{mm}$ ，代入式(5.9)可得 $\delta x'=75\text{nm}$ 。若将同样的玻片以相同倾角放置于显微镜共轭点处，阱位偏移 $\delta x=\Delta x/\gamma=1.8\mu\text{m}$ 。由此可见，倾斜玻片应当放在阱位透镜 L 后方的光路中，才能产生更大的横向阱位偏移。

另外，旋转玻片对光束切割会造成光阱捕获粒子不稳定，切割时间与捕获时间之比越小，捕获越稳定，因而玻片最佳位置为光束直径最小处，即阱位透镜的焦点位置。

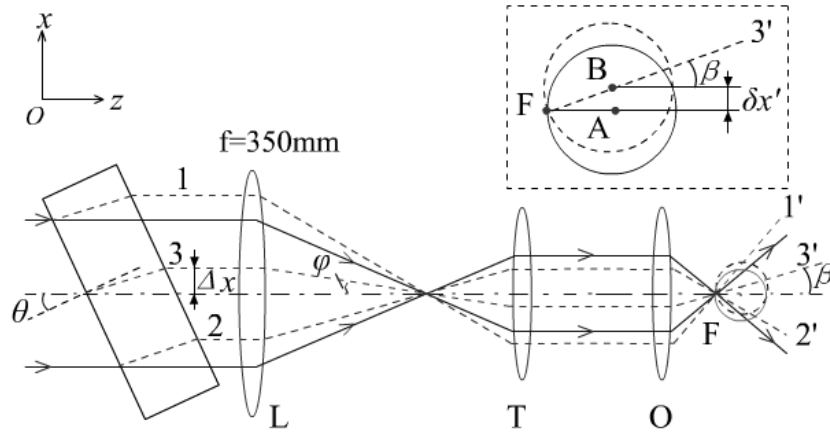


图 5.12 玻片在平行光光路中对阱位的影响

2、玻片厚度

实验中，根据光阱阱位偏离距离的需要来选择玻片的厚度。由式(5.4)易知，玻片厚度越大，造成的阱位偏移量也越大。取玻片折射率 $n=1.51$ ，厚度 $t=1\text{mm}$ ，倾斜角度 $\theta=45^\circ$ ，由式(5.4)得： $\Delta x=0.3\text{mm}$ 。当物镜放大倍率 $\gamma=100$ 时，光阱阱位横向偏移 δx 为 $3.1\mu\text{m}$ 。若需要增大阱位扫描范围，则根据需要增加玻片厚度。由于玻片的引入，光阱在轴向也会发生偏移。由式(5.7)知，轴向偏移量与物镜放大倍率 γ 的平方成反比，可见玻片对阱位轴向位置影响相对比较小。但当玻片厚度增加时，由于轴向阱位改变，与未加玻片时相比粒子成像将变模糊。在形成多光阱时，不同光阱中的粒子成像清晰度差别较大，将不利于后续数据处理。由式(5.5)， $\Delta z/t (\theta=45^\circ) \approx 0.6$ ，则玻片厚度 $t=\Delta z/0.6=\delta z*\gamma^2/0.6$ 。取 $\gamma=100$ ，若要求 $\delta z<1\mu\text{m}$ ，则玻片厚度 $t<17\text{mm}$ 。事实上，17mm 厚的玻片可以产生阱位横向偏移 $51\mu\text{m}$ ，假设产生多光阱时，光阱间距 $4\mu\text{m}$ ，则可以形成多达 12 个光阱。由此可见，采用倾斜玻片法实现多达 12 个光阱时，由于不同厚度的玻片引起的轴向阱位变化可以忽略。

3、玻片倾角

光束通过倾斜玻片（放置于共轭点处）后发生偏移，导致光阱横向和轴向位置都发生变化。而光阱轴向位置的改变会造成被捕获粒子成像发生变化，所以设计中应当设法减小阱位轴向变化的影响，即降低 $\delta z/\delta x$ 的值。由式(5.6)和式(5.7)得：

$$\frac{\delta z}{\delta x} = \frac{1}{\gamma} \cdot \frac{\Delta z(\theta)}{\Delta x(\theta)} \quad (5.10)$$

由式(5.10)可知,物镜倍率越高,轴向影响越小。当物镜选定后, $\delta z/\delta x$ 的值由玻片倾斜角度 θ 决定。 Δx 、 Δz 和 $\Delta z/\Delta x$ 随 θ 的变化关系如图 5.13 所示, $\Delta z/\Delta x$ 随 θ 单调递减,也就是说,相对于阱位的横向变化来说,玻片倾斜角越大,轴向变化越小。

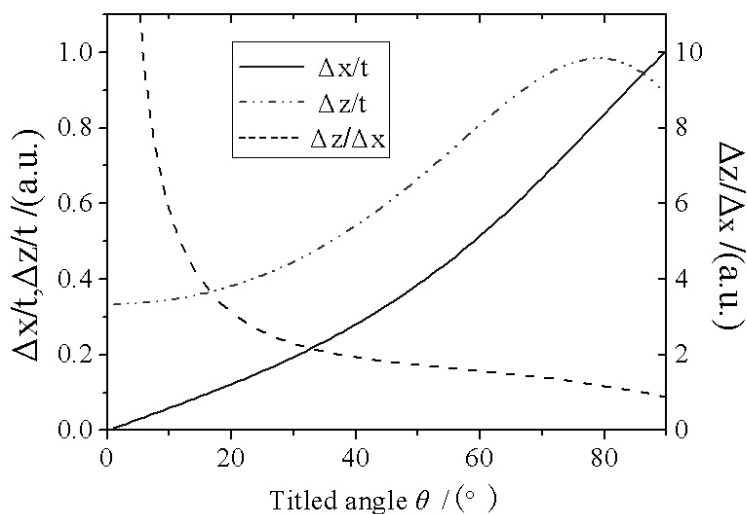


图 5.13 Δx 、 Δz 和 $\Delta z/\Delta x$ 与 θ 的关系 ($n=1.51$)

但玻片倾斜角度并非越大越好,根据菲涅耳反射折射公式可知,入射角 θ 较大时($>60^{\circ}$),玻片表面反射率急剧增大,将造成激光功率不同程度的浪费。斜入射时,不同偏振态的光反射率不同, θ 小于 30° 时, s 光(偏振方向与入射面垂直)和 p 光(偏振方向在入射面内)反射率都比较小,大于 30° 且小于 θ_B 时, s 光反射率增大,而 p 光反射率降低。所以要降低玻片反射率的影响,玻片倾斜方向要选择让激光以 p 光接近 θ_B 入射。考虑到阱位改变大小和激光功率利用率,玻片倾斜角度可以在 $20^{\circ}\sim 60^{\circ}$ 范围内改变,如果入射光中 s 分量更多,则玻片倾斜角度应该小于 50° 。

4、玻片转速

当光阱距离小于粒子直径时,相邻光阱无法同时捕获两个粒子。当光阱捕获一个粒子后,粒子会受到两个光阱的作用。如果玻片转速很低,即光阱位置切换很慢,那么粒子将跟随光阱的切换而运动。随着玻片转速增大,当光阱位置切换后,如果粒子还未到达光阱中心,光阱已经切换到原来位置,粒子的运动将会落

后于光阱的切换，且粒子振荡幅度小于光阱间距。当光阱切换频率足够高时，粒子将稳定在两光阱中间的平衡位置。

如果光阱距离大于粒子直径，那么相邻光阱都可以稳定捕获粒子。如果玻片转速过低，在光阱切换过程中，原先光阱中的小球由于布朗运动将可能离开捕获位置，所以如果需要光阱可以稳定捕获粒子，玻片转速不能过低，即有一个临界转速。而对于不同大小的粒子，由于其布朗运动幅度不同，临界转速也将不同。另外，由于此多光阱设计依靠直流电机带动转盘转动，如果电机转速过高，会产生较大的振动，影响多光阱的稳定捕获。实验中发现，当电机转速小于 4200rpm (70Hz) 时，产生的振动可以忽略。

以上讨论了玻片位置、厚度、倾斜角度以及转动速度等因素对光阱位置控制的影响，发现玻片放置在阱位透镜后面比前面可以实现更大的光阱位置改变；而需要不同大小的阱位变化，可以通过选择玻片的厚度和倾斜角来实现；为了降低玻片表面反射而造成的激光功率损失，需要选择合适的入射光偏振方向以及合适的玻片倾斜角度；同时，应该选择合适的电机转速，使多光阱可以稳定捕获粒子，同时避免电机高速转动带来的振动影响。

5.2.4 利用分时复用多光阱实现红细胞的取向定位和拉伸

1、红细胞的取向定位

人的红细胞很容易被光镊捕获，被偏振光捕获的红细胞在光阱中会发生旋转，取向不定，这对红细胞的观察和实验造成不便。例如在利用小球作为手柄拉伸红细胞的实验中，需要将小球粘在细胞的直径两端，由于被捕获的细胞取向不定，所以小球不太容易粘在对称的两端，如果作为手柄的两个小球的连线不是细胞的直径，那么拉伸细胞得到的细胞膜弹性模量就会产生很大误差。利用分时复用多光阱可以很容易实现红细胞的取向定位。

本实验是在实验室的纳米光镊平台上做的。光源为 HeNe 激光器，波长为 633nm，功率为 35mW；显微镜为 Olympus IX70，物镜为 100X 油浸物镜，加 1.5X 的辅助透镜，总放大倍率为 150X。实验过程由 CCD 相机 (Cool snap, cf) 记录。利用倾斜玻片实现分时复用双光阱，玻片厚度为 2mm，改变玻片倾斜角度可以实现多光阱距离的调节，玻片通过直流电机带动旋转。红细胞为当天采样的新鲜

血液，加入抗凝剂防止细胞聚集，并用生理盐水稀释。

实验结果如图 5.14，图中 A 和 B 分别为没有玻片和加入倾斜玻片后的光阱单独捕获红细胞的结果，由于捕获光为偏振光，红细胞在光阱中会发生旋转。当玻片开始旋转后形成分时复用双光阱，光阱间距为 $4\mu\text{m}$ ，此时红细胞沿光阱跳跃方向取向，且长度有所伸长。

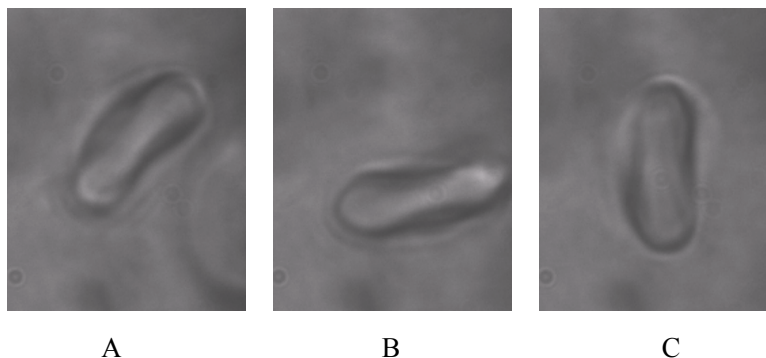


图 5.14 双光阱实现红细胞取向定位

2、红细胞的拉伸

分时复用双光阱的每个光阱都可以单独捕获红细胞，当玻片开始低速转动切换阱位时，红细胞就会随着阱位跳跃而跟随运动，当光阱切换频率继续增大时，红细胞将会沿光阱连线方向伸长。改变光阱之间的距离，细胞伸长量也会改变，结果如图 5.15 所示，图 A 为玻片未旋转时单光阱捕获的红细胞，细胞长轴直径为 $7.40\mu\text{m}$ 。玻片旋转后细胞被拉长，光阱间距离为 $2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 和 $4\mu\text{m}$ 时，红细胞长轴直径增大到 $7.62\mu\text{m}$ 、 $7.80\mu\text{m}$ 和 $8.04\mu\text{m}$ 。与文献报道的利用 AOM 分时复用光阱拉伸红细胞的结果对比发现，我们实验中细胞伸长量比较小，可能是由于光阱切换频率较低所导致，文献中 AOM 切换光阱频率为 100Hz ，而我们利用电机带动玻片旋转，光阱切换频率只有大约 50Hz 。

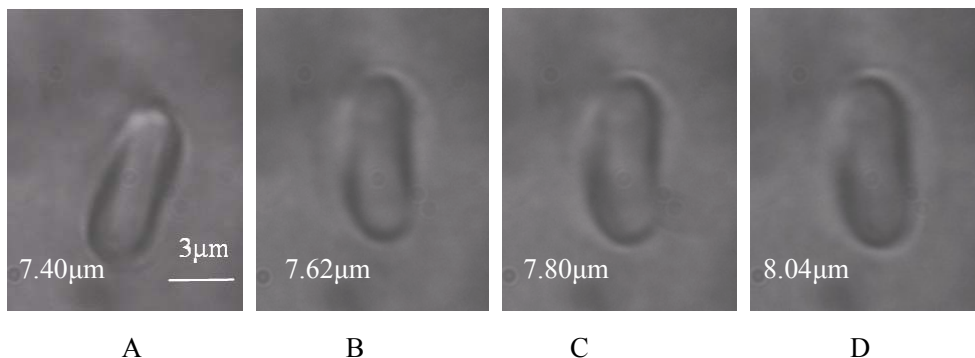


图 5.15 分时复用双光阱拉伸红细胞

5.3 TSOT 光阱等效刚度的理论模拟与实验测量

上一节中讨论了玻片转速对分时复用多光阱捕获稳定性的影响,被捕获粒子在光阱中做受限布朗运动,运动幅度比较小,但是当激光从捕获粒子的位置移开时,粒子开始做自由布朗运动,在激光再次切换回来前,粒子有可能离开光阱捕获范围,从而影响光阱捕获粒子的稳定性。因此,被分时复用光阱捕获的粒子,其运动是受限布朗运动和自由布朗运动的叠加,光阱的实际刚度(等效刚度)与相同功率激光形成的非扫描光镊相比有所降低,而且等效刚度与光阱切换频率有很大关系。我们在实验上对扫描光镊等效刚度进行了测量,由于受到电机转速的限制,只能测量到光阱切换频率低于 100Hz 的情况,对于高频时切换频率对等效刚度的影响,我们从用 Monte-Carlo 方法进行了模拟。

5.3.1 实验测量

TSOT 是利用不同位置共享一束激光而形成多光阱的,对某一个捕获位置来说,激光周期性的开或者关,图 5.16 为激光开关的序列图,定义占空比为激光开关时间之比

$$\beta = \frac{a}{b} \quad (5.11)$$

于是,激光切换频率为

$$f_{sw} = \frac{1}{T} = \frac{1}{a+b} \quad (5.12)$$

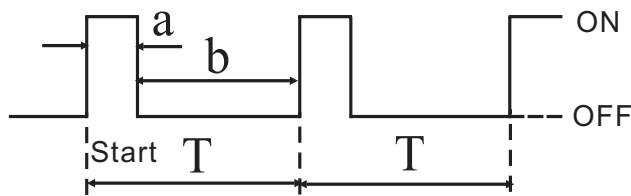


图 5.16 激光开关序列示意图

光阱刚度测量的常用方法之一是热运动法,也就是分析处于光阱中的粒子的受限布朗运动的情况来得到刚度。在这里我们也采用热运动法进行刚度测量,在 TSOT 光阱中的粒子,其运动是受限布朗运动和自由布朗运动的叠加,等效刚度为

$$k_{eff} = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (5.13)$$

下图为实验测量装置图,光源为波长 780nm 的钛宝石激光,激光通过显微

镜的 100X 物镜后形成光阱，在显微镜入光口附近放置倾斜 8 孔转盘，转盘通过直流电机带动进行转动从而形成分时复用多光阱，电机最大转速为 5000rpm。在转盘后方放置小角度倾斜玻片，玻片反射很少一部分激光进入探测器 PD，PD 的信号通过示波器（DS05012A, Agilent）分析可以得到激光切换频率。实验中使用的样品为 3 μm 聚苯乙烯小球（Duke Scientific Corporation, USA），被光阱捕获的小球运动图像由 CMOS 相机（Falcon 1.4M100, Dalsa）记录，通过分析小球的运动信息利用式（5.13）可以得到光阱的等效刚度。以下实验都是在室温下（ $T=298\text{K}$ ）进行的。

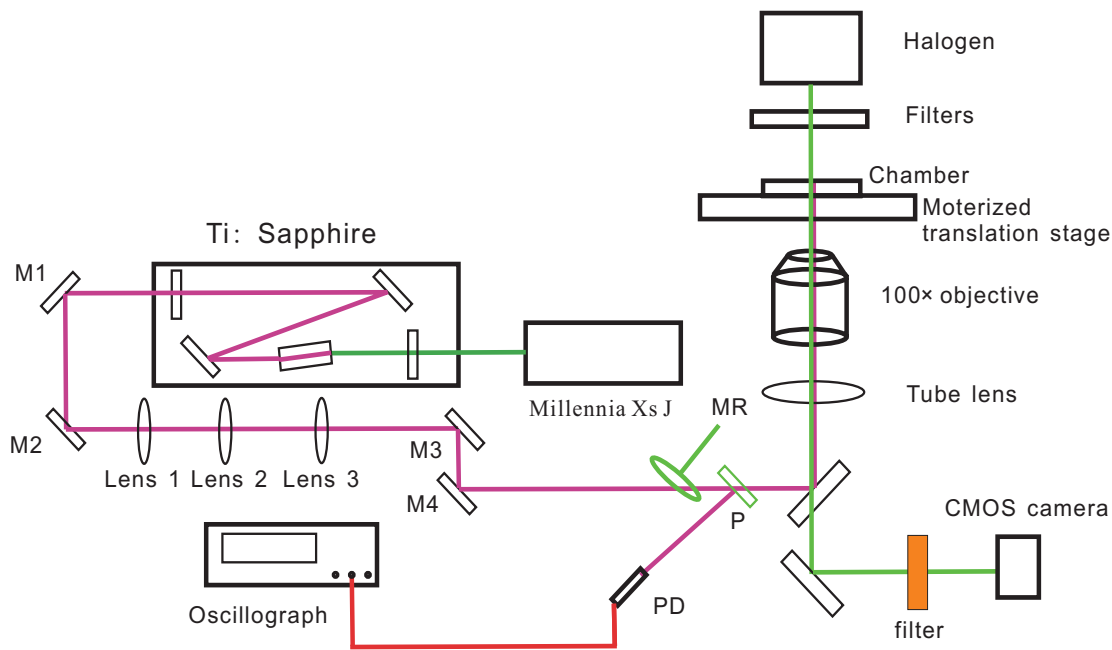


图 5.17 TSOT 等效刚度测量实验装置图

实验中，我们在 8 孔转盘沿某直径方向的相对的两孔内放入玻片，其他六孔空着。这样可以形成双光阱，两个光阱的激光占空比分别为 3: 1 和 1: 3。激光持续照射时的光阱刚度 $k_0=20\text{pN}/\mu\text{m}$ ，激光切换频率从 5Hz 开始到 70Hz。 k_{eff}/k_0 的测量结果如图 5.18，图中光阱 A 的激光占空比为 3: 1，光阱 B 为 1: 3，随着激光切换频率的增加，光阱等效刚度也在增加，在同样切换频率下，激光占空比大的光阱，其等效刚度更大，这是因为在光阱位置激光存在时间越长，被捕获的小球受限布朗运动时间越长，而与自由布朗运动相比，小球的受限布朗运动使小球更趋向于光阱中心，从而导致 $\langle x^2 \rangle$ 减小，根据式 5.13 可知，等效刚度会变大。

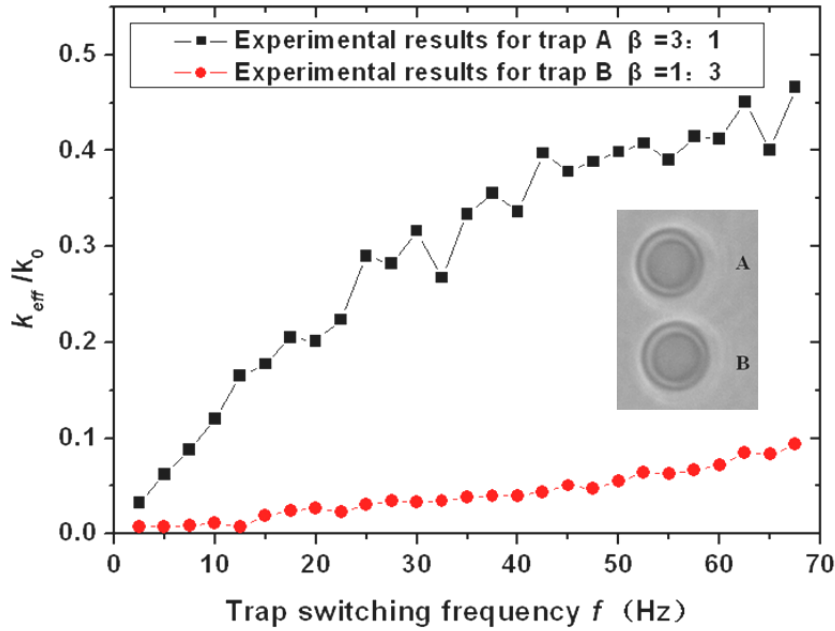


图 5.18 激光切换频率对光阱等效刚度的影响

5.3.2 理论模拟

从图 5.18 发现，随着激光切换频率增加，光阱等效刚度并非线性增加，增加的速度在减慢，有逐渐饱和的趋势，可能在频率达到某个值以后稳定在一个值附近。为了研究等效刚度随光阱切换频率变化的变化规律，特别是切换频率比较高的情况，我们进行了 Monte-Carlo 模拟。

处于 TSOT 中粒子的运动是受限布朗运动和自由布朗运动的叠加，激光开的时候小球受限布朗运动方程为

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + k_x x - F_{rand}(t) = 0 \quad (5.14)$$

其中 $\gamma = 6\pi\eta a$ ， a 是微粒的半径， η 是液体的粘滞系数（与温度有关）， k_x 是激光照射时的光阱刚度， $F_{rand}(t)$ 是时间平均等于 0 随机力。在低 Reynolds 数的情况下，粒子的运动可以近似成一个过阻尼振子，此时的惯性力相对粘滞力来说可以忽略，因此方程 5.14 可以简化为：

$$\gamma\dot{x} + k_x x = F_{rand}(t) \quad (5.15)$$

当激光切换到其他阱位时，小球运动仍满足上式，只是此时 k_x 为 0。通过分析小球布朗运动可以得到 TSOT 光阱的等效刚度（式 5.13）。

我们使用 Monte-Carlo 方法【23, 24】来模拟小球的运动，从而获得 TSOT 的等效刚度。Monte-Carlo 方法要将运动过程细化成许多步，每一步的时间步长假设为 Δt ，这个模拟过程可以计算出每一个时间步长后微粒所处的位置，这个位置我们称为“元位置”。我们采用的具体的算法公式如下：

$$\begin{cases} x_n = x_{n-1} + v_{n-1}\Delta t \\ v_n = v_{n-1} - \frac{k_x x_{n-1}\Delta t}{m} - v_{n-1} \frac{6\pi\eta a}{m} \Delta t \\ \quad + \frac{\sqrt{12\pi k_B T \eta a \Delta t}}{m} \times \sqrt{-2\ln(u)} \cos(2\pi v) \end{cases} \quad (5.16)$$

这里， n 为时间步的序号， x_n 表示第 n 个时间步长后的元位置， v_n 是第 n 个时间步长后微粒的速度， u 和 v 是在 $[0,1]$ 空间内均匀分布的随机数，它们与随机力有关。在模拟中，温度取为室温 298K， η 取为 298K 下水的粘滞系数 $0.894 \times 10^{-3} \text{ kg/m}\cdot\text{s}$ ，小球质量取为 $1.05 \times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$ ，激光开时光阱刚度为 $18 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ，步长 Δt 取为 10ns。

为了可以与实验进行比较，我们还需要模拟数据采集系统来对小球布朗运动过程的记录。假设位移探测系统（比如 CCD 或者 QD）的采集带宽为 t_0^{-1} （指探测器的曝光时间，不包括采集数据后的保存时间），那么模拟过程中 t_0 时间内的小球元位置的平均值，就是探测系统得到的小球运动位置。光阱有效刚度通过分析 10000 个布朗运动位置得到。模拟过程中， t_0 取为 0.1ms。

图 5.19 为小球布朗运动模拟结果，光阱切换频率 $f=100\text{Hz}$ ，求出小球布朗运动高斯分布拟合参数 $\sigma=25.55\text{nm}$ ，因此等效刚度 $k_{\text{eff}}=k_B T/\sigma^2=6.3\text{pN}/\mu\text{m}$ 。当光阱切换频率改变时，等效刚度也发生变化，模拟结果如图 5.20，其中激光持续照射小球时的刚度 $k_0=18\text{pN}/\mu\text{m}$ 。

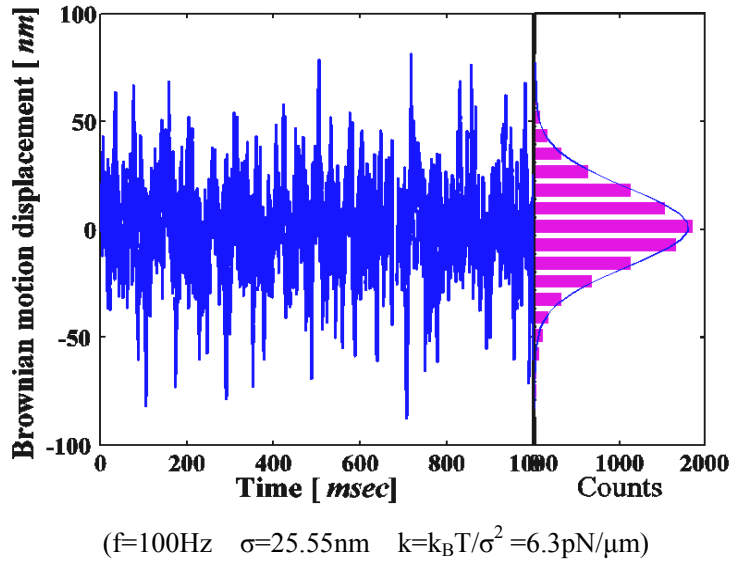


图 5.19 小球布朗运动模拟结果

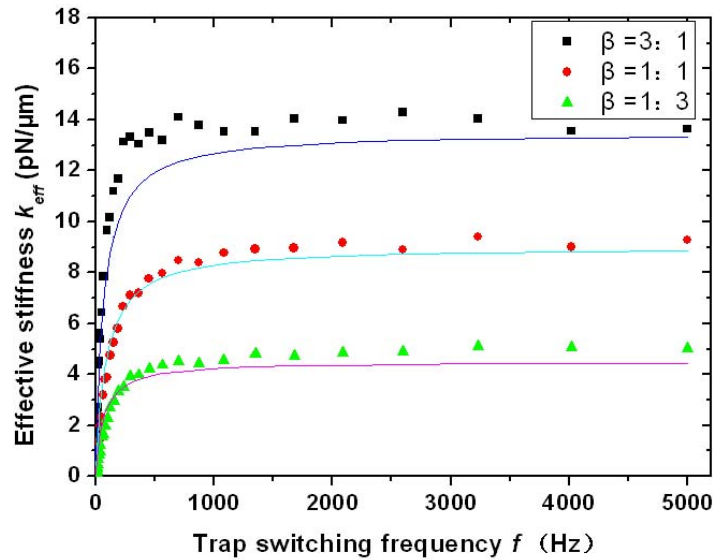


图 5.20 TSOT 等效刚度随光阱切换频率变化模拟结果

从图 5.20 可以看出，随着光阱切换频率 f 的增加，TSOT 的等效刚度先增加然后逐渐稳定在某个值。当 f 超过 1000Hz 以后， k_{eff} 基本不再随 f 改变，只和激光占空比有关。此时，激光关闭状态的影响为捕获小球的平均激光功率下降到原来功率的 $\beta / (\beta + 1)$ ，因此 k_{eff} 等于激光全部照射小球时的刚度的 $\beta / (\beta + 1)$ 倍，即

$$k_{\text{eff}} = \frac{\beta}{\beta + 1} k_0 \tag{5.17}$$

而在低频区，激光关闭时小球自由布朗运动时间增加，小球的平均运动位置

更加远离光阱中心。由布朗运动的朗之万理论和爱因斯坦关系可知， Δt 时间内布朗粒子位移的平方平均值为【25】

$$\langle r^2 \rangle = \frac{2dk_B T}{6\pi\eta a} \Delta t = \frac{2dk_B T}{\alpha} \cdot \Delta t \quad (5.18)$$

其中 $\langle r^2 \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}|^2$ ， d 为布朗粒子的运动维数， k_B 为波尔兹曼常数， T 是

绝对温度， η 为液体粘滞系数， a 为粒子半径， $\alpha = 6\pi\eta a$ 为粒子所受粘滞阻力。

只考虑 x 维度且注意到小球自由布朗运动的时间 $\Delta t = 1/[(\beta+1)f]$ 时，上式变为

$$\langle \Delta x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\alpha} \cdot \Delta t = \frac{2k_B T}{\alpha(\beta+1)f} \quad (5.19)$$

式中 f 为光阱切换频率。在光阱切换的低频区，自由布朗运动使得粒子远离光阱中心的概率增加，根据布朗运动方向的随机性，有一半几率粒子平均运动远离光阱中心，那么在计算等效刚度时， $\langle x^2 \rangle$ 会增加 $\langle \Delta x^2 \rangle / 4$ ，再考虑到激光平均功率的下降（式 5.17），可以得到低频区粒子的平均位置为

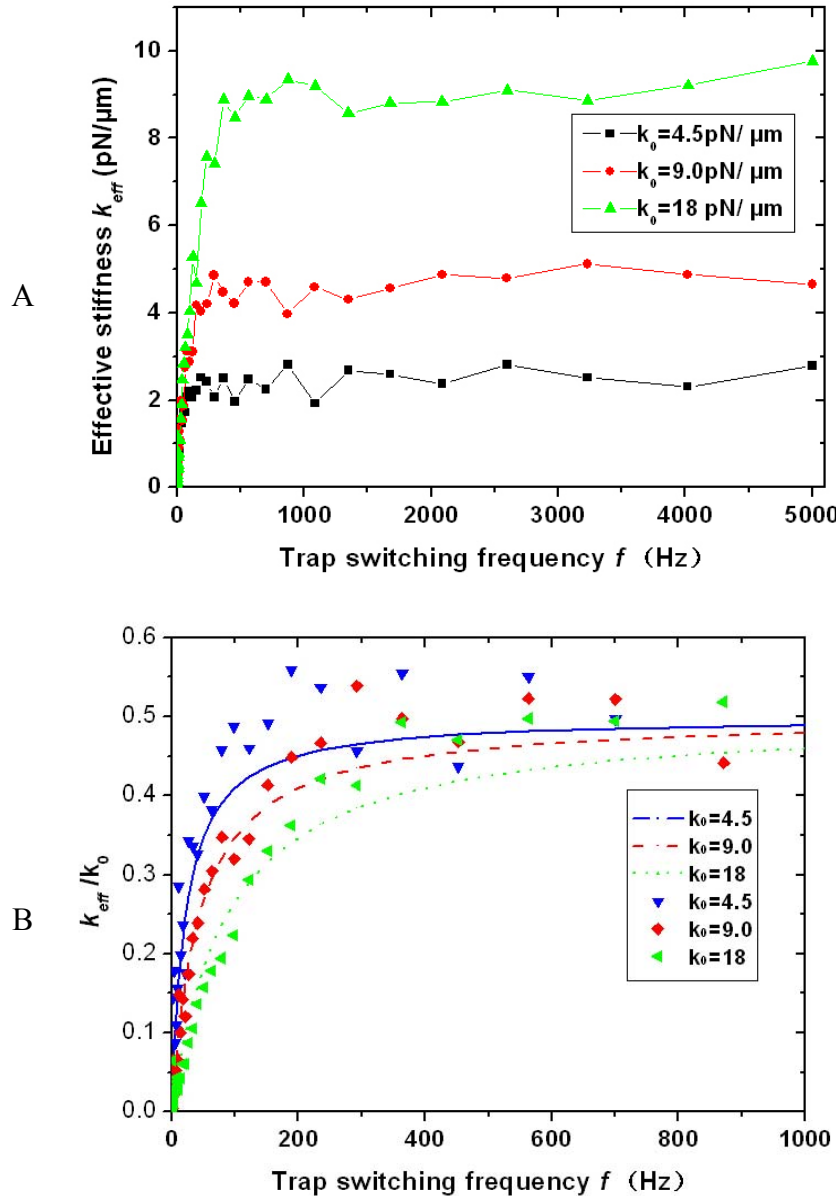
$$\langle x^2 \rangle = \frac{\langle \Delta x^2 \rangle}{4} + \frac{\beta+1}{\beta} \frac{k_B T}{k_0} = \frac{k_B T}{2\alpha(\beta+1)f} + \frac{\beta+1}{\beta} \frac{k_B T}{k_0} \quad (5.20)$$

于是，等效刚度为

$$k_{eff} = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} = \frac{1}{1/[2\alpha(\beta+1)f] + 1/[\beta/(\beta+1)k_0]} \quad (5.21)$$

根据上式来拟合 TSOT 等效刚度随激光切换频率的关系，如图 5.20，与 Monte-Carlo 模拟结果符合的很好。

以上讨论没有考虑持续光照射时的光阱刚度 k_0 的影响，我们对此也进行了模拟， k_0 分别取 4.5 pN/ μm 、9.0 pN/ μm 和 18 pN/ μm ，激光占空比都取 1:1。模拟结果如图 5.22A 所示，在高频区，等效刚度都稳定在 $k_0/2$ 的附近，不同 k_0 主要影响低频区，为了更容易看清其影响，将等效刚度用 k_0 无量纲化，如图 5.22B，用式 5.21 对数据进行拟合，从图中可以看出 k_0 越小， k_{eff}/k_0 随 f 增加的越快，越早达到饱和值。这是由于 k_0 变小的时候，小球在光阱中受限布朗运动范围扩大，当激光关闭时自由布朗运动造成的小球运动范围扩大的影响变小。

图 5.22 k_0 对 TSOT 等效刚度的影响

5.4 本章小结

在单光镊装置中的显微镜共轭成像面处放置平板玻片可以实现光镊阱位横向与轴向的改变，通过改变玻片的厚度和倾斜角度，可以实现光阱位置的控制。快速改变玻片厚度则可以实现阱位的快速切换。在旋转转盘内放置不同厚度玻片，可以将单光阱变为分时复用多光阱。利用设计的装置，进行了两个小球和三个小球的稳定捕获，实现了双光阱和三光阱。进一步，放置多种厚度的玻片，将能够获得更多的光阱位。旋转玻片法实现分时复用多光阱方法简单，成本低廉，实施易行，可以在胶体粒子相互作用的测量、小球链的排布以及细胞拉伸等方面

得到应用。

利用设计的分时复用多光阱进行了红细胞的取向定位和拉伸实验。由于偏振光捕获红细胞是，细胞在光阱中会旋转，无法取向在某个方向，不利于观察和实验，利用设计的分时复用光阱可以实现红细胞的取向定位，细胞长轴将稳定在光阱跳跃的方向上。同时，细胞长轴方向还会被拉伸，拉伸长度与光阱切换频率和光阱间距离多有关系。

分时复用光阱的等效刚度是衡量光阱捕获粒子稳定性的一个很重要的参数。我们实验上测量了低频情况下，等效刚度随光阱切换频率的变化规律。然后用 Monte-Carlo 方法进行了模拟，发现高频情况下，等效刚度主要由激光平均功率决定，而低频情况下光阱等效刚度更低是由粒子布朗运动所造成的。

参考文献

1. Ren Hongliang, Zhuang Lihui, Li Yinmei. Measurement of interaction potential between colloidal particles using dual optical tweezers. *Chinese J. Lasers*, 2008, 35(1):151-155
2. Furst EM. Applications of laser tweezers in complex fluid rheology[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005, 10: 79-86.
3. Dame RT, Noom MC, Wuite GJL. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation[J]. *Nature*. 2006, 444(16): 387-340.
4. Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps[J]. *Nature*. 1994, 368: 113-119.
5. Guan Bo Liao, Paul B. Bareil, Arthur Chiou. et al. One-dimensional jumping optical tweezers for optical stretching of bi-concave human red blood cells. *Optical Society of America*. 2008, 16(3): 1996-2004.
6. 陈洪涛. 纳米光镊技术研究, 2003, 中国科学技术大学博士学位论文。
7. J.P.Pantina and E.M.Furst, "Directed assembly and rupture mechanics of colloidal aggregates," *Langmuir* **20**, 3940-3946 (2004).
8. Dufresne E.R., Grier D.G. Optical tweezers and optical substrates created with diffractive optics.[J]. *Rev. Sci. Instr.*, 1998, 69(5): 1974-1977.
9. Jesacher A., Fürhapter S., Bernet S. et al. Diffractive optical tweezers in the Fresnel regime [J]. *Opt. Exp.*, 2004, 12(10): 2243-2250.
10. Grier D.G. A revolution in optical manipulation[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 810-816.
11. Grier D.G. Roichma Y.. Holographic optical trapping[J]. *Appl. Opt.*, 2006, 45(5): 880-887.
12. Roichman Y., Sun B. et al.. Optical forces arising from phase gradients[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2008, 100(1): 013602.
13. Curtis JE, Koss BA, Grier DG. Dynamic holographic optical tweezers[J]. *Opt. Commun.* 2002, 207: 169-175.
14. Jesacher A, Maurer C, Fürhapter S *et al.* Optical tweezers of programmable shape with transverse scattering forces[J]. *Opt. Commun.* 2008, (281): 2207-2212.
15. 任煜轩, 周金华, 吴建光 等. 全息光镊—光镊家族中极具活力的成员[J]. *激光与光电子*

- 学进展. 2008, 45(11): 35-41.
16. 庄礼辉, 任洪亮, 李银妹等. 同步斩波法测量胶体粒子间相互作用势, 应用激光, 2007, 27: 132-135.
 17. J.P.Pantina and E.M.Furst, "Elasticity and critical bending moment of model colloidal aggregates," *Phys.Rev.Lett.* **94**, 138301 (2005).
 18. Pleguezuelos E., Carnicer A., Andilla J. et.al.. Holotrap: Interactive hologram design for multiple dynamic optical trapping[J]. *Computer Phys. Comm.*, 2007, 176:701-709.
 19. Curtis J.E., Koss B.A., Grier D.G. Dynamic holographic optical tweezers[J]. *Opt. Comm.*, 2002, 207: 169-175.
 20. Jesacher A., Maurer C., Furrer S. et al.. Optical tweezers of programmable shape with transverse scattering forces[J]. *Opt. Comm.*, 2008, 281: 2207-2212.
 21. BingHuan Meng, JinHua Zhou, JianGuang Wu. *et al.* Improvement of transverse trapping efficiency of optical tweezers[J]. *Chin. Phys. Lett.* 2008, 25(6): 2300-2302.
 22. 李银妹, 楼立人, 姚媛 等. 光阱阱位的观察与调节[J]. *中国激光 Chinese Journal of Lasers.* 1998, 25(12): 1083-1086.
 23. Shenhua Xu, Yinmei Li, Liren Lou etc., Computer simulation of the collision frequency of two particles in optical tweezers. *Chinese Physics*, 2005, 14:382.
 24. Zan Gong, Hongtao Chen, Shenghua Xu, Yinmei Li, Liren Lou. Monte-Carlo simulation of optical trap stiffness measurement. *Optics Communications*, 263(2), 229-234, 2006.
 25. 汪志诚. 热力学与统计物理[M], 北京: 高等教育出版社, 1980 (2001年重印), P386.

第六章 生物细胞培养室的建立

目前,随着细胞生物学和分子生物学的发展,迫切需要物理学在测量技术和方法上提供定量测量的手段。生物学领域的很多发现和研究结果都是生命科学最基本的问题,例如2009年诺贝尔生物学或医学奖的获得者的研究——端粒和端粒酶的机理,这些发现对生命医学发展甚至对人类攻克癌症等疾病,有着深远的影响。这些生化专家的一系列重大发现为单分子生物物理研究提供了无限的研究前景与巨大的挑战。不过,生化专家往往只是从实验上论证了这些分子在生物学过程中起作用以及起什么作用,但可能并不知道如何起作用,而后者正是单分子生物物理要回答的问题。利用物理学的方法,对转录调控、蛋白质折叠、生物分子结构功能等的定量测量研究,往往可以揭示更深刻的生物物理机制。光镊技术从发明开始就在生物学领域广泛应用,目前,光镊技术已经成为生物研究的重要工具,而生物学研究也是光镊技术未来发展的主要应用领域。

对于生物学实验室,可以直接购买光镊技术成品进行测量研究。但对于不同的生物学系统,设计不同的研究方案,可能需要对光镊系统进行改造,而这些工作又需要靠物理学科来完成。同理,对于以光镊技术研究为主的实验室,在生物学应用研究中需要依靠生物学合作者提供样品。本实验室即属于这种状况,然后在与生物学研究人员合作过程中逐渐发现,生物样品制备周期长成为实验进展缓慢甚至停滞不前的主要因素。因此,在以光镊技术为主的实验室,不能完全依靠生物合作者提供样品,需要自主进行生物学研究。

本实验室一直以来以光镊技术研究为主,同时将光镊技术在胶体化学和生物学领域进行应用。在生物学研究中,一直采取物理学提供工具、生物学提供样品的合作方式,虽然得到了一些研究结果,但由于受到样品条件的限制,很多研究未能继续深入下去就草草结束。这些现象迫使我们不得不采取措施,在物理实验室建立生物细胞培养室,创造生物样品制备条件。

6.1 细胞培养室的建立

组织细胞培养技术与其他一般实验室工作的主要区别在于要求保持无菌操作,避免微生物及其他有害因素的影响。目前超净工作台的广泛使用,很大程度

上方便了组织细胞培养工作，并使一些常规实验室有可能用于进行细胞培养。细胞培养实验室应能进行六方面的工作：无菌操作、孵育、制备、清洗、消毒灭菌处理、储藏【1】。

6.1.1 细胞培养室的设置

1、 无菌操作室：无菌操作室只限于细胞培养及其他无菌操作的区域，最好能与外界隔离，不能穿行或受到其他干扰。理想的无菌操作室应划分为三部分：

(a) 更衣室：供更换衣服、鞋子及穿戴帽子和口罩；(b) 缓冲间：位于更衣间和操作间之间，目的是为了保证操作间的无菌环境；(c) 无菌操作间：专用于无菌操作、细胞培养。无菌操作间需要有空气消毒装置，包括紫外线灯和空气过滤的净化器。在隔离好的无菌间中，还应有更加洁净环境的超净工作台。

2、 孵育区：该区对无菌的要求没有无菌区严格，但仍需要洁净无尘。孵育可在孵育箱或可控制温度的温室内进行。

3、 制备区：在该区主要进行培养液及有关培养用的液体等的制备。

4、 储藏区：主要存放各类冰箱、干燥箱、液氮罐、培养瓶等，此环境也需要清洁无尘。

5、 清洗和消毒灭菌区：清洁和消毒灭菌区应与其他区域分开，主要进行所有细胞培养器皿的清洗、准备、消毒和三蒸水制备等工作。

6.1.2 细胞培养室的主要设备

1、 倒置显微镜：这是组织细胞培养室所必需的日常工作常规使用设备之一，便于掌握细胞的生长情况并观察有无污染等。如有条件，可以配置带有摄像系统的相差、荧光显微镜等，以便随时观察、记录、摄影细胞生长情况。

2、 培养箱：体外培养的细胞和体内细胞一样，需要在恒定的温度下生存，大多数情况是 37℃，因此需要有能控制温度的培养箱。目前多数的细胞培养室广泛采用 CO₂ 培养箱，在细胞培养时提供一定量的 CO₂，易于使培养液的 pH 保持稳定，适用于开放或半开放培养。同时培养箱内应放置无菌蒸馏水，放置培养液蒸发，使箱内相对湿度保持 100%。

3、 干燥箱：用于细胞培养的器械和器皿需要烘干后才能使用。

4、 水纯化装置：细胞培养对水的质量要求较高，用水必须事先严格纯化处理，水纯化可以采用离子交换装置或蒸馏器。进行细胞培养时配置各种培养液以

及试剂均需使用三次蒸馏水。玻璃器皿的冲洗，至少应使用双蒸水。

5、冰箱：细胞培养室必须配备。普通冰箱用于存放培养液、生物盐水等培养用的物品及短期组织标本。低温冰箱（-20℃）用于储存需要冷冻保存生物活性及较长时期存放的制剂，如酶、血清等。

6、离心机：进行细胞培养时，常规需要进行制备细胞悬液、调制细胞密度、洗涤、收集细胞等工作，通常需要离心机。

7、消毒器：直接或间接与细胞接触的物品均需要消毒灭菌处理。常用设备为手提式高压蒸汽灭菌锅。

8、培养器皿：供细胞接种和生长的器皿，常用的有玻璃培养器皿和一次性使用的塑料制品。

9、其他用品：不同规格的移液器，收集细胞的离心管、试管，酒精灯，装消毒液的喷壶等。

6.1.3 无菌操作室的建立

由于无法单独建立理想的细胞培养室（包括更衣室、缓冲间和无菌室），本实验室在原来光镊实验室中隔离出一个房间来建立细胞培养室。在培养室内，安装有苏州净化的空气过滤器，用来净化房间的空气，同时安装两支紫外灯进行消毒灭菌。整个房间完全密封，与光镊实验室隔离开来。目前培养室和光镊室之间还未设缓冲间，将来有必要建立。



图 6.1 细胞培养室（空气过滤器和紫外灯）

6.1.4 常规设备订购、布置

1、显微镜：Olympus BX50

2、培养箱：Thermo Fisher Scientific THM#3111；控温范围和精度：高于室温 $5\sim 55\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ；T/C 检测 CO_2 浓度；

- 3、超净工作台：SW-CJ-2F 单人双面超净台，垂直风；
- 4、冰箱：实验室原有冰箱，有 4℃、0℃和-20℃三种冷藏室；
- 5、离心机：TL-04，4000rpm；TGL-16k，16k rpm；
- 6、手提式高压灭菌锅：SYQ-DSX-280B，18L，上海申安；
- 7、移液器：20ul、200ul 的小容量移液器，5ml 大龙移液器，100ml 电动移液器；
- 8、混匀器：VORTEX-5；

在无菌操作室内放入细胞培养操作需要的必需设备：二氧化碳培养箱、冰箱、超净工作台、显微镜和离心机等。



图 6.2 常规设备布置

几种常规设备的使用说明：

1、二氧化碳培养箱

(1) 第一次使用时加满循环水（~45L 纯净水），以后使用中缺水报警时应及时加水；

(2) 通入 CO₂ 气体，压力：0.08MPa<P<0.1MPa；

(3) 设置：箱内温度 37℃，CO₂ 浓度 5%，过温保护 42℃；

(4) 校正：在培养箱内放入温度计，与温度探头测量结果比较，进行温度校正；CO₂ 浓度校正需要使用专用探头进行测量，在该设备安装测试时已经校正过，无须再校正；

(5) 清洗与消毒：用消毒酒精溶液擦拭箱内每处地方，不留死角，有条件时可以用紫外灯照射消毒；

(6) 湿度：在培养箱内放入盛有无菌蒸馏水的水槽，防止培养液蒸发，使

箱内相对湿度始终保持 100%；

(7) 培养：放入细胞培养，每次开关箱门时间尽量短，注意保持培养箱内空气清洁；

(8) 培养箱应该定期消毒、加水，当 CO₂ 气体压力不足时应该更换气瓶。

2、超净工作台

(1) 75%酒精擦洗台面；

(2) 紫外线灭菌灯照射 30min；

(3) 启动风机运转 3~5min；

(4) 点燃酒精灯，开始培养细胞操作；

(5) 操作完毕后，取出工作台上物品；

(6) 风机运转 2min 后关闭。

3、高压灭菌锅

(1) 需要灭菌的器皿用蒸馏水清洗，然后吹干；

(2) 用干净报纸将器皿包扎好，放入灭菌锅内胆中，摆放不要太挤，以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果；

(3) 灭菌锅外层锅内加入适量水，水面比三角搁架稍微即可；

(4) 加盖，并将排气软管插入排气槽内；

(4) 根据灭菌物品的要求设置灭菌时间和温度；

(5) 开机，灭菌；

(6) 灭菌完毕后，断电，等待自然冷却后再打开锅盖，取出器皿；

(7) 灭菌后的器皿放入烘干箱内干燥；

(8) 清洗灭菌锅。

6.2 细胞培养

体外培养的细胞，按其生长方式可以分为贴附型和悬浮型两大类。目前本实验室已开展贴附型细胞的培养。下面以 HeLa 细胞的培养为例介绍细胞培养的一些基本方法。

6.2.1 HeLa 细胞培养

HeLa 细胞株是由正常子宫颈细胞被一种人类乳突状瘤病毒 (Human

Papillomavirus 18 或 HPV18) 转型成癌细胞的, 与正常子宫颈细胞有很多不同。Hela 细胞株因被用作癌症研究而广为流传, 至今已经被视为不死的, 而且可以不限次数的分裂下去。目前 Hela 细胞株被大量应用于很多疾病研究试验中, 如药物对 Hela 的作用【2, 3】, 转染试剂对细胞的毒性及作用【4】等。细胞培养成功与否, 细胞的功能与活性直接关系到实验的成败。

1、正常培养

(1) 放在培养皿中培养, 使用 DMEM 培养基培养;

(2) 更换培养液: (平时培养, 当细胞没有覆盖培养皿 80%以上时, 视细胞状态, 可以进行换液, 以维持其健康生长)。倾斜培养皿, 用移液器将培养液吸出扔掉。用少量 PBS 缓冲液 (1ml 左右) 清洗细胞 (轻轻倾斜培养皿数次即可, 严禁剧烈摇晃), 放入新的培养液。培养液从冰箱拿出后需要加温至 37 摄氏度才能使用;

(3) 放入培养箱中继续培养。

2、传代培养, 当培养皿中的细胞长得比较密集时, 需要传代培养。

(1) 倾斜培养皿, 用移液器将培养液吸出扔掉;

(2) 放入胰酶 200-500ul 消化使细胞脱壁, 放入培养箱中 1~2min, 使得胰酶发生作用, 当细胞成片从培养皿底部脱落时为消化完成;

(3) 加入培养液中中止胰酶作用;

(4) 用吸管吸取培养皿中的溶液反复冲洗培养皿的拐角, 因为那里细胞长的比较多;

(5) 吸出含有细胞的溶液, 放入离心管, 离心 (转速 800, 时间 3min);

(6) 经离心后, 细胞沉淀在离心管底部, 成胶状。用吸管将上层培养液吸掉丢弃, 注意不能碰到细胞层;

(7) 在新的培养皿中加入培养液, 以覆盖皿的底部合适 (大约 2ml);

(8) 在离心管中加入培养液, 用移液器加吸管吹匀称, 将其吸出, 在上一步加好培养液的皿里滴入 2~5 滴细胞悬液, 反复吸出使其均匀 (经验来说, 一般滴入 2 滴左右三天可以长满; 5 滴隔天就可以长满);

(9) 放入培养箱培养。

6.3 本章小结

光镊技术在生物学领域有着广泛的应用，但在与生物学合作研究过程中，一旦样品制备遇到困难，合作实验将会停滞下来，为此，我们自己建立了生物细胞培养实验室，创造生物样品制备条件。细胞培养室对无菌环境要求非常严格，因此我们建立了无菌操作室，安装了空气过滤器和灭菌紫外灯，对培养室内环境进行净化和消毒。购买了细胞培养需要的常规设备后，现在已经可以成功的培养 **Hela** 细胞。接下来将会研究药物对 **Hela** 细胞膜弹性的影响，药物通过脂质体包裹，接触细胞后，与细胞膜融合，并将药物释放到细胞内部，进而对细胞进行作用。

参考文献

1. 司徒镇强, 吴军正.细胞培养[M], 世界图书出版公司, 2007.
2. 牟章兵, 杜之渝, 晏丕松.汉防己甲素等 5 种抗纤维化药物对离体 HELA 的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2006, 26(8): 592-596.
3. Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, etal. Ascorbic acid enhances As₂O₃-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells[J]. Blood, 2001,98(3): 805-813.
4. 李新宇, 李贵刚, 朱雪菲.Bcl2xl/Lipofectamine2000 比值对人 HELA 转染效率的影响[J]. 眼科新进展, 2006, 27(7): 524-526.

论文的总结与展望

传统的细胞生物学和分子生物学研究,大都是基于生物化学或药理学实验中的一些分子浓度变化而做出的,是许多细胞或分子活动的一个平均结果,往往掩盖了个体的信息,从单细胞、单分子的层次上研究其活动规律,更能反映活细胞的新陈代谢、跨膜转运、信号转导等生命活动的微观机制。

在单细胞以及生物大分子层次上研究生物学,首先要实现对细胞和生物大分子的操控,而光镊是一项非常适合的技术。光镊可以捕获和操控几十纳米到几十微米大小的粒子,它还可以作为微小力的探针,测量皮牛亚皮牛量级的力,正好可以用来研究生物细胞的力学行为,以及细胞与生物大分子如蛋白质等的相互作用等,进而从单细胞层次上揭示细胞生命活动的基本规律。目前,光镊已成为细胞生物学和分子生物学研究中重要的工具。本论文的主要工作是围绕“光镊技术在生物细胞力学行为研究中的应用”这一课题展开的。

在本文的工作中,将光镊技术应用于细胞生物学力学行为的研究领域,即利用实验室的光镊技术平台,进行细胞力学性质的测量研究:1、研究了免疫细胞对靶细胞的特异性识别及杀伤过程,对NK细胞表面受体分子与抗体分子间的相互作用进行了测量,发现二者结合力对接触时间存在依赖关系,我们认为LFA-1分子交联后会直接诱导引发LFA-1分子的局部活化聚集。2、利用光镊拉伸红细胞,研究了不同渗透压下细胞的变形规律,并通过ABAQUS有限元方法模拟了渗透压引起的细胞形状变化对红细胞变形性质的影响。3、为了更加方便的研究生物细胞的力学行为,发展了新的光镊技术,利用旋转倾斜玻片的方法实现了分时复用多光阱,对该调制光阱的等效刚度进行了测量,并从理论上模拟了光阱切换频率对等效刚度的影响。利用分时复用光阱可以实现红细胞的取向定位和拉伸,在细胞力学行为研究方向可以得到应用。4、最后介绍了细胞培养室的建立过程,由于在和生物研究者合作中经常遇到样品制备的困难,从而影响实验进度,因此我们建立了细胞培养室,为实验样品制备提供条件,也为将来实验室在生物学领域的发展打下基础。

随着物理学观测和操控技术的快速发展,物理学和生物学在细胞和生物大分子研究领域的交叉已经快速推进到了单分子水平。单分子生物物理研究已经揭

示, 在转录调控、蛋白质折叠、酶催化以及生物分子结构功能进化等一些重要生物学功能背后, 存在着一些以前被忽略或者由于技术和方法局限无法精细刻画, 但发挥着重要甚至关键性作用的物理机制。生物体系在单分子水平体现出来的微观结构和动力学涨落, 往往在生物学功能上具有重要的意义。这些信息只有依靠单分子生物物理研究技术才能得到。光镊技术在单分子操控以及单分子力谱测量方面有着很大的优势, 几乎是进行活细胞体系中单分子研究的唯一工具。

然而进行单分子研究单纯依靠光镊技术还不够, 生物单分子研究还要求发展超高分辨率的成像技术, 从而在分子尺度上探测生命活动的细节。目前单分子荧光观测技术发展迅速, 如近场显微术、全内反射荧光显微术、4Pi 显微术、受激辐射损耗显微术 (STED) 以及单分子定位的超分辨率荧光显微术 (STORM、PALM) 等, 在与光镊技术平台的整合中, 有些技术存在一些局限性, 在光镊系统中可以借鉴 SRORM 和 PALM 两种技术来整合单分子荧光显微观测系统。

另外, 激光拉曼光谱技术与光镊技术的结合也可以很大程度上提高光镊技术的应用范围。拉曼光谱技术本身已经很成熟, 与光镊的结合也有所报道, 二者结合可以在探测单分子力谱过程中获取分子的结构和构象变化信息。

总之, 光镊与单分子成像及光谱测量等技术相结合后, 在分子生物学领域将有很大的应用前景, 这个领域的研究将会揭示更多的生命科学规律的本质。

博士期间发表论文及专利目录

1. 吴建光, 王浩威, 李银妹. 实时温控生物样品池[实用新型专利], 专利号: ZL 2005 20077025.8, 2006.
2. **Jianguang Wu**, Yinmei Li, Di Lu, Zhong Liu, Zhengdong Cheng and Liqun He. Measurement of the membrane elasticity of red blood cell with osmotic pressure by optical tweezers. *CryoLetters*, 2009, 30(2), 89-95.
3. 吴建光, 任煜轩, 王自强, 周程, 李银妹. 旋转玻片法实现分时复用多光阱[J]. *中国激光*, 2009, 36(10): 2751~2756.
4. Haodong Chen, Kuikui Ge, Yinmei Li, **Jianguang Wu**, Yuqiang Gu, Haiming Wei, Zhigang Tian. Application of Optical Tweezers in the Research of Molecular Interaction between Lymphocyte Function Associated Antigen-1 and Its Monoclonal Antibody. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, 4(3):221-225.
5. BingHuan Meng, **JianGuang Wu**, YinMei Li, LiRen Lou. Aging process of the bond between colloidal particles measured using laser tweezers. *Colloids and Surfaces A*. 2008, 322, 253-255.
6. BingHuan Meng, JinHua Zhou, MinCheng Zhong, YinMei Li, **JianGuang Wu**, HongLiang Ren. Improvement of transverse trapping efficiency of optical tweezers. *Chinese Physics Letters*, 2008, **25**(6), 2296-2298.
7. 任煜轩, 周金华, 吴建光, 李银妹. 全息光镊——光镊家族中极具活力的成员. *激光与光电子学进展*, 2008, 45 (11): 35-41.
8. 张晓晖, 郭彦, 吴建光, 张钰, 李银妹. 光镊技术在生命科学研究中的应用. *激光与光电子学进展*, 2009, 46 (6): 24-31.
9. Yuxuan Ren, Mincheng Zhong, **Jianguang Wu**, Ziqiang Wang and Yinmei Li. Experimental investigation on how sampling frequency affects the measured stiffness of an optical trap. *IEEE in the international symposium on photonics and optoelectronics*, Wuhan, 2009.
10. Yuxuan Ren, Man Chen, **Jianguang Wu**, Yinmei Li. Effective stiffness of

- rotating-glass-plate time-sharing multiple optical tweezers. SPIE in optical trapping and microscopic imaging, Shanghai, 2009.
11. 任煜轩, **吴建光**, 周小为, 付绍军, 孙晴, 王自强, 李银妹. 位相片角向衍射产生拉盖尔高斯光束的实验研究. 物理学报, 2010, (6). (已接受)
 12. Yuxuan Ren, **Jianguang Wu**, Mincheng Zhong, Yinmei Li. Monto-Carlo simulation of effective stiffness of time-sharing optical tweezers. Chinese Optics Letter, 2010, 8(2). (Accepted)
 13. Yuxuan Ren, **Jianguang Wu**, Man Chen, Huang Li, Yinmei Li. Stability of novel time-sharing dual optical tweezers using rotating tilt glass plate. Chinese Physics Letter. (Submitted)

致谢

本论文的工作是在导师郭光灿教授和李银妹教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。从大三进实验室到博士毕业这将近七年的时间里，两位导师严肃的科学态度和严谨治学精神时时刻刻都激励着我，他们精益求精的工作作风也深深地感染着我。郭老师学识渊博，每次听他指导总是让我醍醐灌顶，让我能够在学习和科研上快速地进步。李老师工作极其认真敬业，给我们做了最好的榜样，在她腰部扭伤的日子里，还带病上班，对工作的认真是我们每个学生都要好好学习。她还总是教育我们做事情要有恒心和信心，只要下功夫，一切困难都可以克服。我的每一点进步和成绩都凝聚了她的心血。在此，谨向两位导师表示崇高的敬意和衷心的感谢。

特别感谢的是曾经在实验室工作过的王浩威老师，是他将我引入生物学领域，给予我很多指导和帮助，让我能够在这一领域进行研究，完成我的毕业论文。王老师实验动手能力非常强，每次实验之前的方案都准备的非常充分，从他身上我学到了很多，也就是那时候开始养成了科研工作需要的好的习惯。再次感谢他的帮助。

我还要特别感谢何立群教授，何老师总是那么的平易近人，想问题时思路非常开阔，每次与他讨论问题，总是收益颇丰，然后对科研之路充满十足的信心。何老师经常自己到实验室找我讨论，从他身上可以看出他对科研的执着和热情。在此向他表示衷心的感谢和致敬。

感谢在实验室默默奉献的姚焜老师和王自强老师，姚老师人老心不老，虽然退休了但仍保持一颗年轻的心，跟年轻人一起工作，一起吃苦，给我们做出了很好的榜样。王老师在实验室兢兢业业，做事情不求回报，在我的研究工作中给了很大的支持。

感谢实验室兄弟姐妹们对我的帮助和支持，实验室融洽的工作氛围和良好的科研环境让我在这段时间里感受到了大家的真诚，也感受到了科研的乐趣所在。感谢曾经一起工作过的谷勇强和孟炳寰师兄，我论文的一部分是跟他们合作完成的，正是跟他们一起工作中，我才打下了扎实的实验技能基础，这将是我一生的财富。感谢周金华和钟敏成师弟，他们给我提出了很多宝贵的建议，感谢你们的帮助。特别要感谢任煜轩师弟，在我的后期研究工作中给予了鼎力支持，相信他将来在科研上会做出不平凡的成就。

感谢我的父母、姐姐、姐夫和妻子，是你们给了我最最无私的关心、帮助和

鼓励，没有你们我不可能顺利完成我的工作。在这里我想说：“我永远爱你们！”

还要感谢在科大认识的好朋友刘小勇、廖致刚、李统藏、李彦波、毛王君……是你们陪伴我读过了科大近十年的生活，在这人生最美好的阶段，你们都给我留下了难忘的欢乐和回忆。

感谢那些所有我应该感谢但却无法在这里一一列出的人。

铁打的营盘流水的兵，虽然很舍不得，但是还是要毕业说再见了。真心祝愿实验室可以继续蓬勃发展！祝愿老师们身体健康！祝愿各位同学学业有成、工作顺利！祝愿所有的朋友心想事成！

吴建光

二零零九年十一月于中国科学技术大学



中国科学技术大学博士学位论文