

中国科学技术大学

博士学位论文



驱动蛋白和细胞的力学行为 及高精度光镊技术的研究

作者姓名：李 迪

学科专业：物理学

导师姓名：郭光灿 教授 李银妹 教授

完成时间：二〇一六年五月四日

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



**Study of Mechanics of
Kinesins and Cells and
Research of High Precision
Optical Tweezers**

Author's Name: Li Di
Speciality: Physics
Supervisor: Prof. Guo Guang-Can Prof. Li Yin-Mei
Finished time: May 4th, 2016

中国科学技术大学学位论文原创性声明

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。

作者签名: _____

签字日期: _____

中国科学技术大学学位论文授权使用声明

作为申请学位的条件之一,学位论文著作权拥有者授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分用权,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,可将学位论文编入《中国学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索,可采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人提交的电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

公开 保密(____年)

作者签名: _____

导师签名: _____

签字日期: _____

签字日期: _____

摘要

生物物理学是物理学与生物学相结合的一门交叉学科，主要是应用物理学的概念、方法和技术研究生物各层次结构与功能的关系、生命活动的物理、物理化学过程和物质在生命活动过程中表现的物理特性的新型交叉学科。近半个世纪以来得益于不断涌现的新型物理实验方法和实验技术，生物物理学获得了迅猛的发展，其中光镊技术在生物物理学研究中作出了突出的贡献。

光镊（Optical tweezers）是一种以激光的力学效应为基础，利用强会聚激光与微粒相互作用形成的三维势阱来捕获和操控微粒的新技术。它可无接触、无损伤的操控细胞和微米尺寸的微粒，以及作为探测微小力和纳米位移的探针。近年来，随着生物学、生物物理学等领域的应用需求，促进了光镊技术长足发展，力和位移的测量精度和测量范围不断提升。目前时间分辨率达 0.1ms；位移的测量范围为 0.1-10⁵nm，空间分辨率达 0.1nm；力的测量范围为 0.1pN~100pN，力的分辨率达 0.001pN。

基于光镊自身技术特性及光镊适用的空间和时间尺度，在生物物理学领域中，非常适合研究 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子的结构和力学特性，以及研究细胞层次的生理功能和生命活动的机理。如驱动蛋白（Kinesin）是生物体内重要的具有运输功能的蛋白，在细胞内营养物质运输，细胞器迁移和细胞有丝分裂等过程中发挥了重要的生理功能。由于驱动蛋白与微管间的相互作用力以及驱动蛋白沿微管的运动位移恰好在光镊力的范围，近年开展了大量的应用光镊研究驱动蛋白力学特性的工作。

CENP-E（Centromere-associated protein E）蛋白是 Kinesin 蛋白家族中的一种蛋白，是维持稳定的动点-微管连接和纺锤体检查点功能的至关重要的一个大分子驱动蛋白，但目前人们对他的功能了解甚少。我们利用光镊力研究 CENP-E 分子弹性性质以及 CENP-E 受到 SUK4 抗体调控后的动力学特性变化。

细胞-细胞间的相互作用在多细胞生物的发育和生存中起着至关重要的作用，比如调节细胞生长，防止细胞癌变，控制离子和分子的细胞间扩散和胞外运输等。鉴于细胞间相互作用的重要生理功能，人为构建不同类型细胞的细胞连接并研究其生理功能就十分重要且具有挑战性。传统的检测方法无法验证细胞是否完成了桥连并定量的测量细胞桥连概率。但光镊能通过测量细胞间相互作用力的方法说明细胞间是否存在桥连，并能够定量测量桥连概率以及桥连的结构特征，这对于构建和验证新的桥连方法具有非常重要作用。

细胞入侵性吞噬（Entosis）是在多种肿瘤内都观察到的肿瘤恶性演化过程中极为常见的生理现象，是恶性肿瘤细胞不断“吞入”并杀死正常细胞或良性肿瘤细胞，从而促使肿瘤组织中恶性细胞得以存活并增殖的过程。生物学研究指出细

胞内三种蛋白 TIP150、MCAK 和 Aurora A 之间的相互作用调节了微管蛋白动态性,进而影响了细胞刚性,从而影响细胞入侵性吞噬进程。荧光等观测手段无法定量测量调控微管蛋白动态性对细胞刚性的影响,但光镊可测量不同条件下的细胞刚性,并为生物学方法的研究结论提供良好的支持。

本文主要工作,为针对所研究的生物学问题,深入研究开发了多项关键技术,并有效地运用于研究马达蛋白和细胞相互作用力的测量。

第一章为绪论,主要阐述包括光镊的原理、主要参数、功能及应用,驱动蛋白的研究背景及研究意义,细胞桥连的研究背景及研究意义等。第二章,首先介绍了单分子皮牛力谱仪的光路原理以及系统中各组件的功能和参数,设计了两种新型样品室。然后介绍了减少光镊系统中噪声的方法;最后,给出单分子皮牛力谱仪实现的功能和参数。第三章,从生物物理学研究特点出发,讨论了光镊参数标定的方法及其使用需注意的问题。第四章用光镊研究了驱动蛋白力学特性,着重研究了 DIC 光镊区别于普通光镊的新特性和研究了 CENP-E 的力学特性。第五章,光镊测量了生物正交点击反应桥连细胞时的特点以及桥连细胞的桥连结构和 MCF7 细胞的细胞膜刚性,证明调控微管动态性会影响细胞刚性,进而调控细胞入侵性吞噬。第六章是总结与展望。

关键词: 光镊, 标定方法, 生物物理学, 驱动蛋白, 细胞桥连, 细胞入侵性吞噬

ABSTRACT

Biophysics is an interdisciplinary field using concepts, methods and techniques of physics to study multiple bio-material aspects such as structure and function, physical processes and physicochemical processes, physical properties and so on. In nearly half a century, new physics experimental methods and technologies promoted the development of biophysics. In these new technologies, OT made outstanding contributions to the research of biophysics.

Using mechanical effects generated by strongly converged laser, optical tweezers (OT) can trap and manipulate micro particles in 3-D space. It is capable for non-contact, non-invasive micro particle manipulation, measurement of nanometer displacement and pico-newton force. In recent years, the research requests of the study of biology and biophysics promoted the rapid development of optical tweezers, and the accuracy and range of measurement for force/displacement has reached a much higher level. For some cutting edge OT setup, temporal and spatial resolution reaches 0.1 ms and 0.1 nm respectively; force/displacement measurement range is 0.1 pN ~ 100 pN and 0.1-10⁵ nm respectively; and the minimum measurable force is 0.001 pN.

Because its great spatial, temporal and force resolution, OT is very suitable to study cellular level physiological function and the structure/dynamics of biologic macromolecules, such as DNA, RNA and proteins. Being a significant transport protein *in vivo*, kinesin plays an important role in transportation of nutrients, movement of organelles and mitosis. Since displacement and interaction force of kinesin moving along microtubule are within OT measurement range, lots of researchers used OT to study properties and dynamic of kinesin and obtained very important results.

Centromere-associated protein E (CENP-E) is a member of kinesin family. As a microtubule motor protein, it is essential for chromosome congression during mitosis. However, only little study about CENP-E was performed with OT. OT is applied to measure the exact molecular flexibility of CENP-E and study dynamic characteristics of CENP-E, which regulated by SUK4 antibody.

Cell-cell interactions between membranes plays a crucial role in the development and cell function of multicellular organisms, such as regulation of cell growth, prevention cancer, regulation of diffusion and extracellular transport of ions and molecules. In consideration of the biological importance of cell interaction, it is a big

challenge for people to artificially build up cell junctions, bridge different types of cells in order to study their behaviors. Traditional detection methods, such as fluorescence microscopy techniques, could hardly verify whether the cells has been bridged, not to say quantifying the probability of bridging. On the contrary, OT is very suitable to measure the interaction force between cells and verify whether the cells has been bridged. Furthermore, OT can also quantify the probability of bridging directly.

Entosis has been observed in many types of tumors. It play an significant role in tumor progression. In entosis, malignant cells "swallowed" and kill normal cells or benign tumor cells, which contribute to the survival and proliferation of malignant cells in tumor tissue. Biological study show that a dynamic interaction of MCAK–TIP150 orchestrated by Aurora A-mediated phosphorylation governs entosis via regulating microtubule plus-end dynamics and cell rigidity. Traditional detection methods, such as fluorescence microscopy techniques, could hardly measure cell rigidity. On the contrary, OT is very suitable to measure cell rigidity, and provide good support for the conclusions of Biological study.

This thesis develops and studies a number of key OT technologies for the research of biology, and apply these technologies to the study of the mechanical properties of protein molecules and cells.

The first chapter was introduction focusing on the principle of OT, main parameters of OT system, functions and applications of OT, background and significance of kinesin research, background and significance of study of cell bridging. In the second chapter, firstly, I introduced the principle of optical path of SPNFS and the functions and parameters of each device in SPNFS. Secondly, some measures used in SPNFS to reduce noise were introduced. Finally the function and performance parameters of SPNFS were demonstrated. In the third chapter, I first discussed the new requirements for OT technology in biophysics research. Then, calibration methods of OT parameter, which provided high precise measurement for biophysics research, were proposed. In the fourth chapter, the differences between DICOT and ordinary OT were expounded. Then I used SPNFS to research the dynamics properties of Kinesin. In the fifth chapter, firstly, SPNFS was applied to study the character of the new cell bridging method and the character of bridging structure. Then, SPNFS was applied to measure rigidity of MCF7 cells to verify that a dynamic interaction of MCAK–TIP150 orchestrated by Aurora A-mediated phosphorylation governs entosis via regulating

microtubule plus-end dynamics and cell rigidity. The last chapter was a summary and outlook.

Key Words: Optical tweezers, Calibration methods, Biophysics, Kinesin, Cell bridging, Entosis

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 光镊技术简介.....	1
1.2 光镊系统的主要参数.....	3
1.2.1 压电载物台运动修正系数.....	4
1.2.2 “像素-距离”系数.....	4
1.2.3 温度和粘滞系数.....	4
1.2.4 光阱刚度和“电压-位移”转换系数.....	5
1.3 光镊的应用.....	5
1.4 生物物理研究对光镊的新要求.....	6
1.5 CENP-E 蛋白与微分干涉相衬显微镜.....	7
1.5.1 CENP-E 蛋白.....	7
1.5.2 微分干涉相衬显微镜.....	8
1.6 细胞间的相互作用.....	12
1.6.1 细胞桥连.....	13
1.6.2 细胞入侵性吞噬.....	13
1.7 本文内容简介.....	14
参考文献.....	14
第 2 章 单分子皮牛力谱仪.....	22
2.1 光路原理.....	22
2.2 各组件性能参数.....	23
2.2.1 激光器.....	24
2.2.2 显微镜和物镜.....	26
2.2.3 微分干涉相衬显微系统.....	28
2.2.4 光阱移动元件.....	28
2.2.5 微球位移探测器.....	29
2.2.6 压电载物台.....	30
2.2.7 样品室.....	31

2.3	降低噪声的措施.....	39
2.4	设备主要功能以及性能指标.....	40
2.5	本章小结.....	42
	参考文献.....	42
第 3 章 适于生物物理研究的光镊标定方法.....		45
3.1	生物物理学对标定方法的要求.....	45
3.1.1	生物物理实验的特点.....	45
3.1.2	光镊测量双链 DNA 分子的持续长度.....	47
3.2	压电载物台运动修正系数.....	52
3.2.1	功率谱密度法校准压电载物台.....	52
3.2.2	光散射法标定压电载物台.....	54
3.2.3	实验结果.....	56
3.2.4	小结.....	61
3.3	温度和粘滞系数.....	61
3.3.1	测量方法.....	63
3.3.2	光镊实验中的温度变化特性.....	66
3.4	光阱刚度和“电压-位移”转换系数.....	69
3.4.1	功率谱密度分析法.....	70
3.4.2	三角波流体力学法.....	71
3.4.3	正弦波流体力学法.....	72
3.4.4	对比三种标定方法.....	75
3.4.5	小结.....	82
3.5	本章小结.....	83
	参考文献.....	83
第 4 章 驱动蛋白动力学特性.....		87
4.1	引言.....	87
4.1.1	CENP-E 蛋白.....	87
4.1.2	微分干涉相衬显微镜.....	87
4.2	微分干涉相衬光镊的新特性.....	88
4.2.1	运动方向与受力方向不一致.....	88
4.2.2	DIC 光镊的光学模型.....	89

4.2.3	光阱新特性.....	91
4.2.4	小结.....	99
4.3	DIC 光镊研究驱动蛋白的实验方法.....	100
4.3.1	纯化驱动蛋白.....	100
4.3.2	聚合微管纤维.....	100
4.3.3	快速检测驱动蛋白活性.....	100
4.3.4	DIC 光镊检测驱动蛋白运动参数的方法.....	101
4.3.5	判断驱动蛋白单分子运动的标准.....	103
4.3.6	小结.....	104
4.4	K560 动力学特性.....	104
4.4.1	步幅 8.2nm 的步进运动.....	104
4.4.2	K560 蛋白的最大负载力及最大运动速度.....	105
4.5	CENP-E 蛋白的力学特性.....	107
4.5.1	单分子浓度检测.....	107
4.5.2	CENP-E 蛋白分子的弹性.....	108
4.5.3	CENP-E 的动力学特性.....	110
4.5.4	SUK4 抗体对 CENP-E 蛋白的影响.....	110
4.6	本章小结.....	111
	参考文献.....	112
第 5 章 光镊研究细胞相互作用的力学行为.....		114
5.1	定量测量桥连细胞间的相互作用.....	114
5.1.1	细胞桥连的荧光检测和它的局限性.....	116
5.1.2	光镊检测桥连实验方法.....	117
5.1.3	实验结果.....	121
5.1.4	小结.....	123
5.2	光镊力谱研究微管蛋白动态性调节细胞入侵性吞噬机理.....	124
5.2.1	光镊测量细胞膜刚性的实验方法.....	124
5.2.2	实验结果.....	126
5.2.3	小节.....	129
5.3	本章小结.....	129
	参考文献.....	130

第 6 章 总结与展望	135
附录 I “像素-距离”系数的标定方法	137
附录 II 玻片清洗方法.....	139
附录III 压电载物台振幅对 SDFM 和 TDFM 测量精度的影响	140
缩写词索引	143
致 谢	144
博士期间发表的学术论文与取得的成果	146

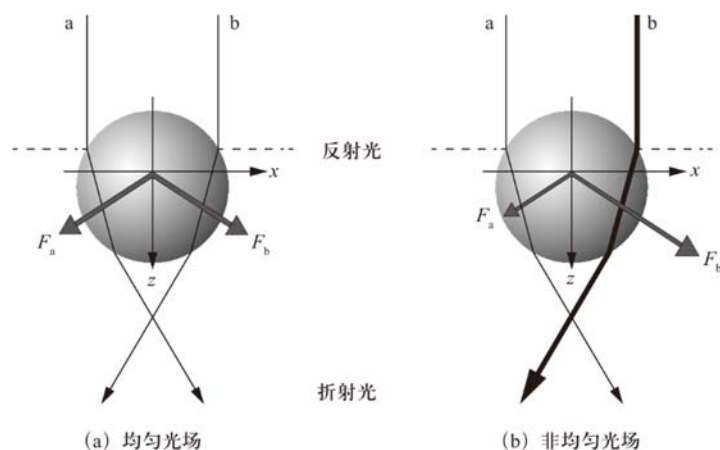
第1章 绪论

1.1 光镊技术简介

光镊 (optical tweezers) 是一种以光的力学效应为基础, 利用强会聚激光与微粒相互作用形成的三维势阱来捕获和操控微粒的新技术。最初, Bell 实验室的 Arthur Ashkin 在 1971 年首次提出了利用光压操纵微米量级颗粒的思想, 并借助两束相对照射的激光首次实现对水中悬浮的玻璃微粒的捕获, 构建出世界上第一套利用光压操纵微粒的装置^[1]。随后, Ashkin 等人在 1986 年对双光束光压操纵装置进行改进, 改进后的装置只需要一束激光即可形成稳定的三维势阱, 并稳定的捕获透明电介质颗粒^[2]。三十年来新研制的各种光镊设备大都沿用了这种单光束光阱的设计思想, 这种光势阱的正式名称是“单光束梯度力光阱”(single-beam optical gradient force optical trap), 简称“光镊”(optical tweezers)。

通常, 上述单光束光镊是用高数值孔径的物镜将一束准直高斯光束汇聚在物镜焦点处, 从而在激光焦点处形成高梯度光场。为了方便讨论并结合光镊技术自身特点, 本文统一将与物镜像平面平行的方向规定为横向, 与物镜主光轴平行的方向规定为轴向。当折射率高于周围液体介质的微球在焦点附近时, 微球将受到激光施加的横向梯度力, 轴向梯度力和散射力的共同作用, 将这三种力的共同作用力可称为光阱力, 光阱力可将微球稳定的束缚在焦点附近。这里我们将结合几何光学与光子动量理论来说明光阱力的产生原理以及如光镊何将微球束缚在焦点附近。

首先分析横向梯度力产生原因以及作用效果。光子是具有动量的, 而动量是一种矢量。若光线在经过微球折射后传播方向发生了改变, 则光线中所包含光子的动量也会发生改变, 并且也会施加给微球一个沿着与动量改变方向相反的作用力。如图 1-1 (a) 所示, 当微球被一束光强横向 (图中的 x 方向) 均匀分布的光线照射时, 由于微球的球对称特性, 均匀光场的各子光束 (a 光, b 光以及其它光束) 对微球作用力的横向分量相互抵消。但是当用存在横向强度梯度的光场 (比如图 1-1 (b) 中自左向右增强的光场) 照射微球时, 微球左右两侧光线折射后施加给微球的作用力将不再相互抵消。微球横向所受合力的方向将指向光强分布较强的一侧。这种由于横向光场强度分布不均匀产生的力称为横向梯度力^[3]。结合高斯光束的光强分布特性, 在用高斯光束或者汇聚的高斯光束照射微球时, 微球受到的横向梯度力应指向光轴。

图 1-1 均匀光场与非均匀光场中的透明微球受力分析^[3]

图中虚线为被微球反射的光线(a)为均匀光场，入射光束截面上光强是均匀的，则各子光束对微球的力在横向(x 方向)完全抵消；(b)为自左向右增强的光场，光线 b 的光强大于光线 a，进而光线 b 使微球获得较大的动量，从而产生较大的力 F_b 。这导致所有照射到微球上光束的作用力的合力，在横向不再完全抵消，横向合力把微球推向光强分布较强的一侧。

然后，讨论轴向梯度力的产生原因以及作用效果。当折射率相对周围介质较高的透明电介质微球的球心在物镜光轴上，并处于激光焦点外侧（远离物镜的一侧）时，激光与微粒的相互作用如图 1-2 所示^[3-5]。准直高斯光束经过高数值孔径物镜（图中以透镜代替）后，形成高度会聚的光束照射在微球上，如图中的光线 a 和 b 所示。当物镜汇聚后的不指向微球球心的光线 a 和 b 穿过微球时将被折射两次，成为趋向于与光轴平行的光线 a' 和 b'。在折射后，光子增大了原理物镜方向的轴向动量，则根据动量守恒的原理，所有被微球折射后的光束都将施加给微球一个微小的反作用力，即中 F_a 和 F_b 。由于光束为中心对称的，因此整个光束的合力 F 将沿着主光轴指向物镜，把微球拉回焦点。类似的，我们可分析微球球心处于激光焦点内侧时的受力情况，此时激光在微球折射后会产生一个指向焦点推力。综合上述情况可知，当微球球心处于光轴上时，强汇聚的高斯光束都将对微球产生一个指向激光焦点的回复力，我们将此回复力称为轴向梯度力。

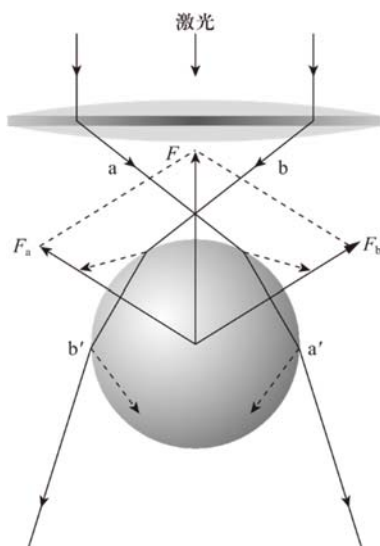


图 1-2 单光束梯度力光阱原理图[3]

图中微球的折射率大于周围介质的折射率。a 和 b 为经过物镜（图中用透镜代替）汇聚后入射至微球的光线，a' 和 b' 为光线 a 和 b 从微球射出的折射光线。Fa 和 Fb 为光束 a 和 b 经过微球发生折射后对微球产生的作用力。F 为 Fa 和 Fb 的合力，方向与入射光束相反。图中带箭头的虚线为在“微球-介质”界面上发生反射的光线。

最后，我们将讨论散射力对微球的作用。在前面的讨论中是以理想透明的电介质微粒为模型，不考虑微粒对光的吸收和反射等作用。实际上，当光入射到微球上时，除了产生横向和纵向梯度力外，还有光被吸收和反射而施加在微球上的力，我们将这些力的综合作用统称为散射力。散射力的方向趋向于光的传播方向，并且在高斯光汇聚程度足够强时，散射力远小于轴向梯度力。

因此，微球在激光焦点附近时，相对焦点的任何横向偏移都会使激光对微球产生横向梯度力，而相对焦点的任何轴向的偏移都会使微球受到轴向梯度力。因此，在计入散射力的作用后，微球将被高度汇聚的激光限制在激光焦点附近的三维空间内，微球的受力平衡位置在焦点附近但远离物镜的一侧。

单光束梯度力光镊结构简单，具备卓有成效的捕获能力，它的发明促使光镊作为一种简单可行的技术手段得到广泛的应用。

1.2 光镊系统的主要参数

在光镊系统中，为了表征光镊的性能，人们引入了多种光镊参数，本节介绍在单分子皮牛力谱仪中较为重要的光镊参数。

1.2.1 压电载物台运动修正系数

压电载物台 (Piezo-stages, PZT) 是亚纳米精度的操控装置, 它在光镊、原子力显微镜和扫描显微镜中得到广泛用。在光镊中, 压电载物台用于样品定位^[6], 光镊参数标定^[5,7], 力钳法研究生物分子^[8,9], 拉伸细胞膜^[10]和研究脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 结构^[11,12]等方面。被捕获微球在压电载物台产生的正弦流场作用下的运动响应可被用于标定光阱参数, 测量被捕获微球直径和测量溶液粘滞系数^[13-16]。

压电载物台在压电制动器驱动下的定位精确性和动态响应性能, 在光镊测量的被捕获微球的微小位移和所受到的微小力尤为重要。用于科研的压电载物台用带有前馈补偿功能的反馈控制器来追踪并提高压电载物台的运动精度^[17], 但如果反馈控制器速度过慢导致压电制动器滞后会减弱压电载物台的运动响应能力^[18]。因此提高反馈速率并给出压电载物台中的载物平台和驱动器之间摩擦力的精确模型对优化压电载物台的运动非常重要^[19]。综合上述因素, 由于压电制动器的机械性能以及反馈控制器的反馈速度限制, 压电载物台的运动精度需要校准, 商业购买的压电载物台已经用图像分析光栅运动的方法进行了标定^[6]。

但是在实验中, 我们发现压电载物台驱动样品室运动时, 压电载物台的位移设定值与样品溶液的真实位移存在差异, 后者要小于前者, 因此我们引入了参数“压电载物台运动修正系数”来综合描述压电载物台驱动样品室运动时所产生的流场大小与压电载物台设定振幅之间的关系, 它是样品溶液运动幅度与压电载物台运动幅度设定值之间的比值。

1.2.2 “像素-距离”系数

光镊实验中, 常用 CCD 相机观察样品或测量微观距离^[20,21], 这些应用中必须确切地测量出 CCD 图像中两个相邻像素之间的距离, 我们将这个距离称为“像素-距离”系数。

1.2.3 温度和粘滞系数

样品室中溶液的温度是光镊实验中重要的实验参数, 它会直接影响实验稳定性^[22], 干扰溶液微流变性质的测量^[23-25]和影响驱动蛋白的活性^[26-28]。

液体的粘滞系数表征了流体内摩擦力的性质, 只有在流体内存在相对运动时才表现出来。液体的粘滞系数都与液体温度有关, 会随着温度升高而减少。在光镊实验中, 样品溶液粘滞系数的准确性会直接影响光阱力的测量以及光阱参数的标定^[4,7]。

综上所述,光镊系统中样品室溶液的粘滞系数和温度是非常重要的实验参数,会直接影响后续实验测量精度,并且这两个参数之间也存在相互影响。由于溶液的温度和粘滞系数之间是互为相关的,本文将这两个参数放在一起讨论。

1.2.4 光阱刚度和“电压-位移”转换系数

光阱刚度反映了光阱中的微粒偏离光阱中心时所受力与偏离光阱中心的位移的比例关系。当光阱中的粒子受到外力 F_{ex} 作用而偏离光阱中心并移动至 x 处时,粒子将受到一个指向光阱中心的光阱力 F_{trap} , 两力大小相等,方向相反。经过理论推导以及实验验证,在光阱中心附近的一定范围之内,光阱可近似看成一个简谐势阱,即在这个范围内粒子偏离阱中心的位移 x 与粒子受到光阱力成正比 $F_{trap} = -k \cdot x$, 其中比例常数 k 称为光阱刚度(trap stiffness)。

“电压-位移”转换系数(Conversion Factor, CF)是在将光电探测器(Position Sensitive Detector, PSD)引入光镊系统后才出现的参数。在光镊系统中,为了获得更好的空间分辨率和时间分辨率,光镊用 PSD 替换 CCD 来探测被捕获微球的位移。在单分子皮牛力谱仪中,我们用基于 PSD 的后焦面(Back Focal Plane, BFP)探测方法^[29-31]来探测被捕获微球的位移。由于 PSD 输出信号为电信号,在后续数据处理中需要将电信号转化为被捕获微球的位移信号。根据 BFP 探测方法的原理,在一定的范围内,微球的位移与 PSD 的电信号成正比^[29, 32],即 $x = CF \cdot V_{signal}$, 其中 V_{signal} 为探测器的电信号,比例系数 CF 即为“电压-位移”转换系数。

1.3 光镊的应用

在 1986 年 Ashkin 的开创性工作至今的三十年来,不论是光镊技术本身还是光镊应用都取得了长足而迅猛的发展^[3]。目前,光镊可无接触、无损伤的操控微米大小的颗粒、细胞作为力和位移的探针,并借助 PSD 获得极高的空间、时间和力的分辨率,其中,时间分辨率可达 0.1 ms;位移的测量范围为 0.1 nm~10⁵ nm,空间分辨率可达 0.1 nm;力的测量范围为 0.1 pN~100 pN,力的分辨率可达 0.001pN^[33]。

借助于良好空间、时间和力的分辨能力,光镊被广泛的应用于生物学,生物物理学,物理学和化学等领域中,比如分选单条染色体^[34]、研究细胞膜的粘弹性^[10, 35]、辅助实现细胞之间^[36]或囊泡之间^[37]融合、活体内细胞操作^[38, 39]、肿瘤细胞杀伤^[39]、桥连不同种类细胞^[40];在单分子层次上研究 DNA 双链分子^[12, 41]、核

糖核酸 (Ribonucleic Acid, RNA) 发卡^[42, 43]和蛋白质分子^[44]的结构特性以及分子马达行走的力学行为^[45-49]; 直接测量分散体系的稳定率^[50]、高分子材料的流变学性质^[24, 51]、研究微粒之间的流体力学相互作用^[52]和静电相互作用^[53, 54]; 与拉曼光谱系统结合研究细胞特性^[55-57]以及偶氮囊泡的化学性质^[58-60]等等。

生物物理学是物理学与生物学相结合的一门交叉学科, 主要是应用物理学的概念、方法和技术研究生物各层次结构与功能的关系、生命活动的物理、物理化学过程和物质在生命活动过程中表现的物理特性的新型交叉学科^[61, 62]。得益于不断涌现的新兴物理实验方法和实验技术, 近年来生物物理学取得了迅猛的发展, 其中, 需要特别指出的是光镊在生物物理学研究中作出了突出的贡献。

在生物物理学研究中, 光镊主要是应用于研究细胞层次的生理功能和生命活动的机理^[38, 39, 55-57]或者研究 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子的结构和动力学特性^[12, 41-49]。在这些研究中, 光镊能完成其它技术无法代替的工作, 比如在驱动蛋白动力学研究中^[20, 46], 光镊可测量蛋白分子的运动速度等运动参数, 同时又可测量蛋白分子的发力情况; 再比如研究 DNA 分子时^[63, 64], 光镊能获得埃量级的空间精度。这些独特的优势也使得光镊成为生物学领域中一种不可或缺的独特技术。

1.4 生物物理研究对光镊的新要求

由于光镊在生物物理学的应用中的研究对象大都是生物大分子或生物细胞, 这对光镊技术本身提出了新的要求:

首先是对激光器的波长的要求。图 1-3 为生物组织体中几种物质的吸收光谱, 综合考虑图中各种物质的光吸收特点, 可认为 750~1200 nm 波长范围是较为适合生物研究的激光波段^[3]。此外, 实验表明波长在 1 μm 左右的激光器可有效的避免生物损伤^[4, 65, 66]。因此, 光镊用于生物物理学研究时的激光波长大都在 1 μm 左右。

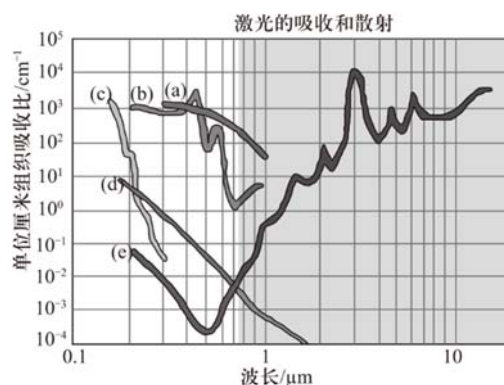


图 1-3 生物组织体中几种物质的吸收光谱^[3, 67]

横坐标为波长（单位为 μm ），纵坐标为每厘米组织的吸收比，右侧阴影区域为红外波段。(a) 为黑色素的吸收曲线；(b) 为血红蛋白的吸收曲线；(c) 为蛋白质的吸收曲线；(d) 为散射体的吸收曲线；(e) 为水的吸收曲线。

其次是对光镊的测量精度提出了更高的要求，比如研究生物大分子驱动蛋白和 DNA、RNA 时，分辨率应达到要求纳米量级，甚至埃量级。这需要严格控制光镊设备中的噪声，优化探测方案。可采取的措施有：对设备进行隔音处理，引入声光调制器（Acousto-optical Modulators, AOM）、单模光纤等激光功率稳定装置以及用 PSD 代替 CCD（电荷耦合元件，Charge-coupled Device, CCD）相机进行微球位置探测等。

最后需要注意的是生物样品活性时间有限，对生物大分子和生物细胞而言，活性时间通常不超过两小时。这对实验速度提出了要求，比如需要实时标定的光阱参数必须有快速、准确的测量方法。

1.5 CENP-E 蛋白与微分干涉相衬显微镜

驱动蛋白（kinesin）家族在细胞中起着非常重要的作用，比如沿着微管运输细胞器^[68]、牵引染色体^[69]和组装纺锤体微管^[70]等。虽然通过微管滑行实验^[71]能够测得驱动蛋白的运动极性和速度，但是并不能给出单个驱动蛋白分子的运动特性。因此借助光镊的微小物体操纵能力研究单个驱动蛋白分子的运动特性便成为了一个非常有价值的研究课题。在驱动蛋白的单分子动力学研究中，Block 等人作出了突出贡献。在 1990 年 Block 等人首次用光镊观察到了单个驱动蛋白（Kinesin-1）分子沿着微管运动的现象^[72]，并在随后的研究中首次观测到了单个 Kinesin-1 分子在微管轨道上以 8nm 的步幅阶梯式前进的情形，证明了驱动蛋白分子将化学能转换为机械能的过程是非连续的^[6]。随着研究的深入，用光镊研究驱动蛋白不断取得出色的研究结果，比如测量出最大负载力为 5 - 7 pN^[73]，确定驱动蛋白的每一步运动是由水解一个 ATP 分子驱动的^[74]以及确定了驱动蛋白的“交出手”运动模式^[75]等。最近关于驱动蛋白的研究主要是集中于多个驱动蛋白分子协同运动时的运动特性^[76, 77]。目前，研究驱动蛋白的力学特性已经光镊的典型应用之一。

1.5.1 CENP-E 蛋白

CENP-E（Centromere-associated protein E）蛋白是 Kinesin 蛋白家族中的一种蛋白，它对细胞有丝分裂过程中的染色体的平均分配起着重要的作用。在细胞

有丝分裂过程中纺锤体微管不断聚合和解聚,而位于染色体上的着丝粒动点蛋白机器能够正确捕获微管并保证着丝粒与微管粘连的稳定性。然后,随着微管与一系列蛋白质复合物协同作用,染色体排列到赤道板并最终将遗传信息均匀分配到子代细胞中。这其中,CENP-E 蛋白是维持“动点-微管”连接的稳定性以及实现纺锤体检查点功能的至关重要的一个大分子驱动蛋白。目前国际上关于 CENP-E 蛋白力学特性的研究依然较少。

1.5.2 微分干涉相衬显微镜

微分干涉相衬(Differential Interference Contrast, DIC)显微镜是 Nomarski 于 1952 年在相差显微镜原理的基础上发明的。DIC 显微镜的优点是其成像能呈现样品三维结构,物体具有浮雕感。此外,与相差显微镜相比,DIC 显微镜的标本可略厚一点,折射率差别更大,故影像的立体感更强。

DIC 显微镜可直接观察无荧光标记的微管^[78],从而方便光镊操纵修饰有驱动蛋白的微球定位到固定在玻片表面的微管上,进而借助被捕获微球测量驱动蛋白沿微管运动的动力学特性或驱动蛋白与微管相互作用的力学特性。因此,耦合了 DIC 显微镜的 DIC 光镊是驱动蛋白力学特性研究中必不可少的实验装置。

虽然前人利用 DIC 光镊进行了大量关于驱动蛋白的单分子实验研究,但是关于 DIC 光镊光阱特性的研究非常少,导致 DIC 光镊仅可测量微球沿特定方向(CCD 上的水平方向/ x 方向)运动时微球所受的光阱力和微球的位移。因此,在光镊研究驱动蛋白的力学特性时,只能选择沿着 x 方向固定的微管进行实验^[6, 73, 74],并用四象限探测器追踪驱动蛋白驱动微球的运动^[30]。但在将溶液中的微管固定在玻片表面的过程中,微管受到溶液分子无规则热运动的作用,并导致固定后微管的排布方向是随机的。因此之前只选择沿 x 方向的微管进行实验的做法将严重影响实验效率和实验精度。

综合上述问题,在应用 DIC 光镊开展驱动蛋白单分子力学研究之前需要首先解决三个问题:如何令 DIC 光镊可测量微球沿任意方向运动时微球所受的光阱力和微球的位移,DIC 光阱与普通光镊相比有何新特性,DIC 特性是否影响单分子实验。

DIC 显微镜是在明场光学显微镜的适当位置加入四个具有不同偏振特性的光学元件而成,如图 1-4 (a) 所示。下面,我们将从照明系统和成像系统这两方面对比说明 DIC 显微镜和商用明场光学显微镜的区别,阐明 DIC 显微镜的成像原理。

对照明系统而言,商用明场光学显微镜大都用柯勒照明系统对样品进行照明,从而获得均匀而明亮的照明光场^[79]。柯勒照明系统只关心照明强度的均匀性,并

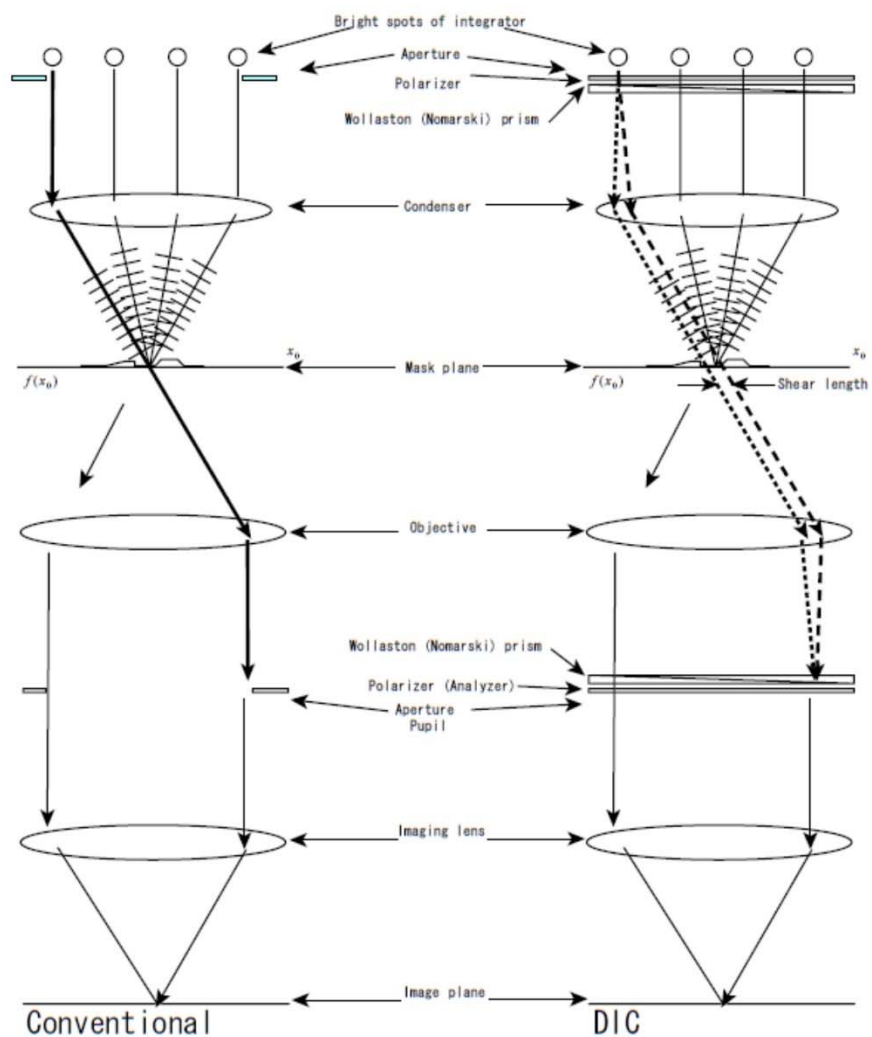
不关心光场的偏振和相位等光学性质。而 DIC 显微镜的照明系统是在柯勒照明光路中先用起偏器 (Polarizer) 将显微镜卤素灯发出的光线转变为线偏振光, 线偏振光经由聚光镜棱镜 (Condenser Prism, 见图 1-4(a) 中上方 Wollaston/Nomarski Prism) 分为偏振方向相互垂直并间隔一定距离的两束线偏振光 (o 光和 e 光), 图 1-4(a) 中的点画线和虚线所示。o 光和 e 光的分光位置称为干涉面 (Interference Plane), 两种光的间距与聚光镜和物镜的种类有关。在 DIC 显微镜的照明系统中应调节起偏器的偏振方向, 使 o 光和 e 光光强相同。此外, 为了不破坏柯勒照明的结构特点, 并保持 o 光和 e 光之间的良好的线偏振光相干性, 以及便于两束光经过物镜后合束, 聚光镜棱镜的干涉面应与聚光镜后焦面或者后焦面的共轭面重合。

对成像系统, 商用明场光学显微镜结构较为简单, 它用物镜 (Objective) 收集透过样品的光线, 通过成像透镜 (Imaging lens) 将光线汇聚在成像面上成像。而对 DIC 显微镜而言, 同一束光经聚光镜棱镜分成的 o 光和 e 光照射到物镜成像面处时, 间距大约为 $2\ \mu\text{m}$ 。当这两束线偏振光透过样品并被物镜收集后, 将由物镜棱镜 (Objective Prism, 见图 1.1 (a) 中上方 Wollaston/Nomarski Prism) 合束。此时, 两束光满足线偏振光干涉条件, 进而形成一束新的光束。当合束后的光线经过检偏器 (Analyzer) 时, 由于检偏器的透射方向与起偏器的透射方向相互垂直, 因此合束后的光线在通过检偏器后可能会出现两种情况:

第一种是 o 光和 e 光直接从溶液中穿过而未经过样品或者经过了样品中厚度和折射率分布基本一致的区域, 合束后的光线为线偏振光并且偏振方向与起偏器的偏振方向一致, 进而无法透过检偏器, 即如图 1-5 中左侧两种情况所示;

第二种是两束光中至少一束光经过了样品, 但由于样品厚度、折射率分布不均或者样品边缘的影响, 两束光之间存在光程差, 进而导致两束光的相位差发生变化, 合束后光束的偏振状态与起偏器的线偏振状态不一致, 即可部分透过检偏器, 如图 1-5 最右侧的光束情况。综合上述 DIC 显微镜成像原理可知, DIC 显微镜所得到图像的明暗能有效的反应出样品边缘或样品厚度起伏较为明显的区域以及折射率变化较为明显的区域, 对样品平坦光滑的区域并不敏感。

(a)



(b)

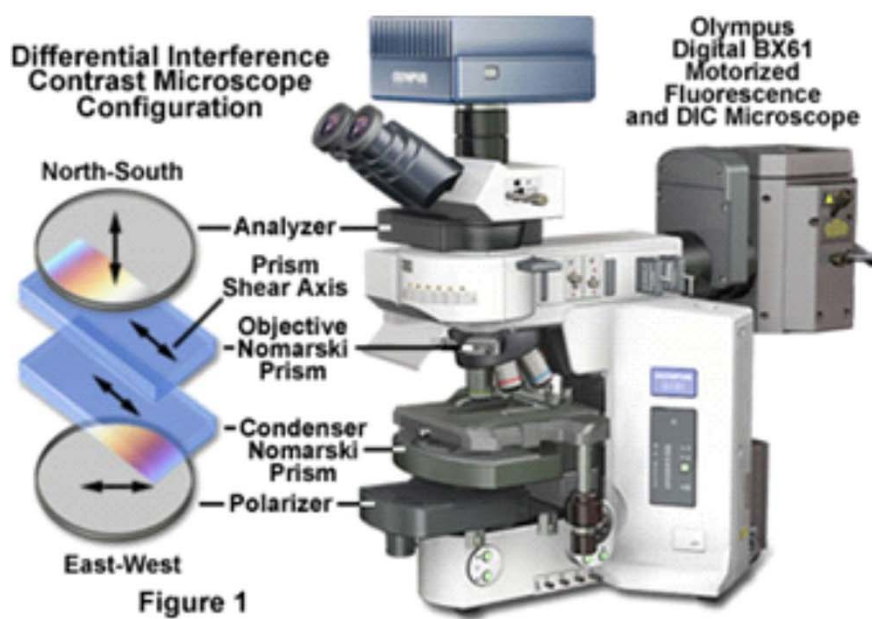


图 1-4 微分干涉相衬显微镜原理图及实物图

(a) 普通光学显微镜与微分干涉相衬显微镜的原理对比图[80]; (b) 加装了微分干涉相衬显微镜套件的 Olympus BX601 显微镜实物图[81]

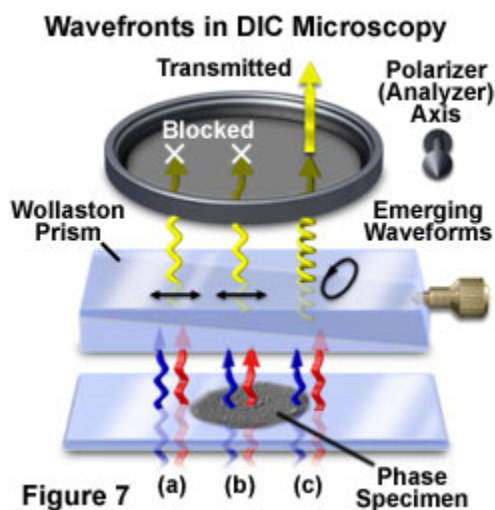


图 1-5 DIC 显微镜成像明暗变化原理图[81]

为了进一步的说明 DIC 显微镜的图像的特点，我们借助 DIC 显微镜观察血红细胞的图像进行说明。图 1-6 (a) 为观察到的红细胞，(b) 为斜 45° 方向的照明光光程变化情况，(c) 为为斜 45° 方向的照明光光程的一阶导数。可看到光程的一阶导数曲线与 DIC 显微镜下观察到的细胞的明亮变化情况基本一致，这一点也与前面描述的 DIC 原理一致。因此可将照明光光程的一阶导数近似为 DIC 显微镜成像的灰度分布，并且可借助这个原理进行 DIC 成像的简单模拟或者反向推断样品结构。

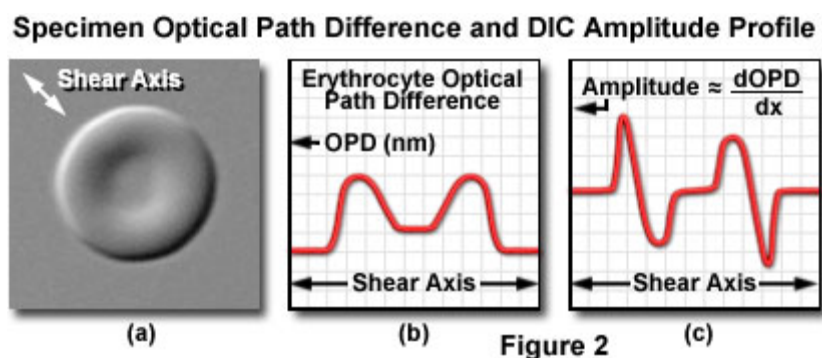


图 1-6 DIC 显微镜观察血红细胞[81]

(a) 为 DIC 显微镜观察到的红细胞，(b) 为斜 45° 方向的照明光光程变化情况，(c) 为为斜 45° 方向的照明光光程的一阶导数。

此外，DIC 显微镜可根据所用的分束、合束棱镜的不同而分为两种方案，一种是用沃拉斯顿棱镜 (Wollaston prisms)，另一种是用诺马斯基棱镜 (Nomarski

prisms), 如图 1-7 所示。这两种棱镜的区别在于 o 光和 e 光干涉面的位置不同, 沃拉斯顿棱镜 (Wollaston prisms) 的棱镜表面与入射光垂直, 干涉面在棱镜的中央, 而诺马斯基棱镜 (Nomarski prisms) 的棱镜表面与入射光的垂直面存在 8° 夹角 (图 1-7 中并不明显), 干涉面在棱镜外部光线出射的一侧。由于 DIC 显微镜中分束棱镜的干涉面和合束棱镜的干涉面需要分别与聚光镜的后焦面以及物镜的后焦面重合, 并且绝大部分物镜的后焦面在物镜内部, 因此用诺马斯基棱镜更加便于设计。目前绝大多数商用 DIC 显微镜中的分束、合束棱镜都是诺马斯基棱镜。

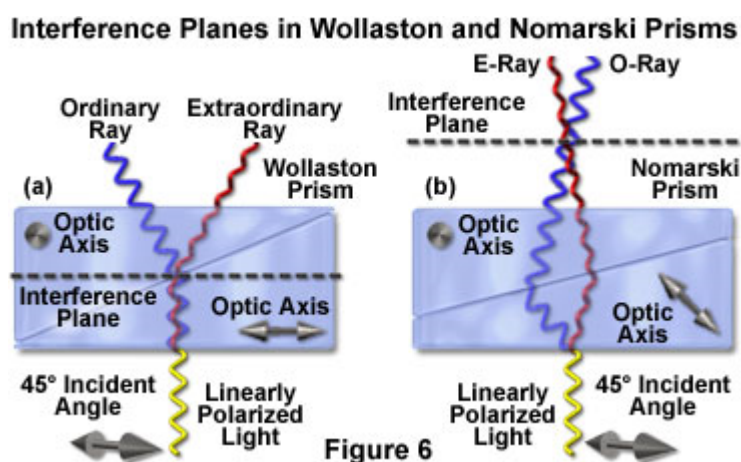


图 1-7 沃拉斯顿棱镜和诺马斯基棱镜的原理对照图[81]

(a) 沃拉斯顿棱镜 (Wollaston prisms) 对偏振方向为斜 45° 的线偏振光的分光情况; (a) 诺马斯基棱镜 (Nomarski prisms) 对偏振方向为斜 45° 的线偏振光的分光情况

鉴于 CENP-E 蛋白的重要生理学功能以及 DIC 光镊在 CENP-E 蛋白单分子力学研究中不可替代的作用, 阐明 DIC 光镊的特性, 建立 DIC 光镊研究驱动蛋白力学特性的实验方法以及研究 CENP-E 蛋白单分子力学和 SUK4 抗体的调控机理具有极大的科学价值和生物学意义了。

1.6 细胞间的相互作用

细胞间相互作用在多细胞生物的生存和发育中起着至关重要的作用。这些相互作用使细胞间能够相互交流, 以便对外部环境的变化做出反应。一旦细胞间的交流发生变化就可能导致细胞生长错乱, 甚至导致产生癌症^[82-84]。此外, 细胞间的相互作用可完成免疫反应, 实现细胞间离子和分子的自由扩散并控制胞外运输。

多细胞生物体内存在多种细胞间相互作用, 下面将介绍本文所关心的细胞桥

连和细胞入侵性吞噬两种细胞间相互作用。

1.6.1 细胞桥连

多细胞生物体（比如动物）中普遍存在一种可稳定细胞-细胞相互作用的结构形态——细胞连接(或细胞桥连)，比如在上皮组织中就存在特别丰富细胞桥连结构^[85-87]。细胞连接由多蛋白复合物组成^[87]，并且具有非常重要的生理功能，例如组织交界面处细胞的细胞膜具有良好的渗透性，细胞内部的离子和分子都可自由扩散到另一个细胞中^[85]；而在这个过程中细胞连接能够降低细胞间的胞外障碍并控制着胞外运输^[88]。

鉴于细胞间相互作用的生理功能的重要性，给出构建不同类型细胞的细胞连接的新方法并验证桥连特性就十分重要且具有挑战性。

但用传统的检测手段检测桥连特性时，比如荧光观察两种细胞之间的相互作用情况，仅可定性的说明多种细胞之间存在桥连，但无法定量的测量桥连新方法的桥连概率，也不能给出桥连的结构特征。因此，用光镊研究细胞桥连新方法所具有的特性就十分重要了。

鉴于细胞间相互作用的生理功能的重要性，已有的荧光观察两种细胞之间的相互作用的方法仅能定性的说明多种细胞之间存在桥连，不能定量的测量桥连概率，也不能给出桥连的结构特征。因此如何构建不同类型细胞间的细胞桥连和验证桥连特性就十分重要且具有挑战性。

1.6.2 细胞入侵性吞噬

细胞入侵性吞噬（Entosis）是肿瘤恶性演化过程中极为常见的生理现象，已在多种肿瘤内观察到，如恶性上皮肿瘤（carcinoma）^[89]，肉瘤（sarcoma）^[90]，血管平滑肌脂肪瘤（angiomyolipoma）^[91]和黑素瘤（melanoma）^[92]等。细胞入侵性吞噬与正常细胞的细胞吞噬（Phagocytosis）和细胞自噬（Autophagy）不同：细胞吞噬为各种巨噬细胞吞噬死细胞或病变细胞的过程^[93, 94]；细胞自噬是细胞内部清除变性的细胞器和蛋白的过程^[95]；细胞入侵性吞噬则是恶性肿瘤细胞不断“吞入”并杀死正常细胞或良性肿瘤细胞，从而促使肿瘤组织中恶性细胞得以保留和增长的过程^[96, 97]。

鉴于细胞入侵性吞噬在肿瘤恶性演化过程中的重要生理作用，深入研究细胞入侵性吞噬的机理有助于寻找防止肿瘤恶化的方法。

1.7 本文内容简介

本文主要工作,为针对所研究的生物学问题,深入研究开发了多项关键技术,并有效地运用于研究马达蛋白和细胞相互作用力的测量。论文框架如下:

第一章为绪论,主要阐述包括光镊的原理、主要参数、功能及应用,驱动蛋白的研究背景及研究意义,细胞桥连的研究背景及研究意义等三个方面的内容。第二章,首先介绍了单分子皮牛力谱仪的光路原理以及系统中各组件的功能和参数,列举了两种新型样品室;然后介绍了减少光镊系统中噪声的方法;最后,给出了单分子皮牛力谱仪所能实现的功能以及性能参数。第三章,从生物物理学研究特点出发,讨论了光镊参数标定的方法和这些方法所应注意的问题。第四章是用单分子皮牛力谱仪研究驱动蛋白力学特性,着重阐明了 DIC 光镊区别于普通光镊的新特性以及 CENP-E (Centromere-associated protein E) 的力学特性。第五章,首先用单分子皮牛力谱仪研究用生物正交点击反应桥连细胞时的特点以及桥连细胞的桥连结构,然后应用光镊定量测量 MCF7 细胞的细胞膜刚性,证明调控微管动态性会影响细胞刚性,进而调控细胞入侵性吞噬。第六章是总结与展望。

本文的主要创新点为:

第一,对高精度光镊系统提出和改进了多种光镊参数标定方法,系列研究从不同角度提升了光镊技术及其测量精度,使之光镊技术更适合研究单分子马达重要生物学问题。例如研究了 DIC 光镊的各向异性特点,建立了 DIC 光镊测量驱动蛋白力学特性的新方法等。

第二,应用 DIC 光镊力测量了 CENP-E 蛋白的弹性及 CENP-E 在 SUK4 抗体调控下的力学特性变化。该成果对研究驱动蛋白力学特性和深入阐明着丝粒动点与微管相互作用的机理具有重要的意义。

第三,光镊定量测量了表面分别修饰 Mal-Cys 和 Mal-CBT 的两种 HEK 293T 细胞间的相互作用力,证明了生物正交点击反应能桥连两种细胞,并说明了桥连的结构特性。这将有助于细胞间相互作用的深入研究。

第四,应用光镊力证明了调控微管动态性会影响细胞刚性,进而调控细胞入侵性吞噬。这将有助于解释细胞入侵性吞噬的机理和寻找防止肿瘤恶化的方法。

参考文献

- [1] ASHKIN A, DZIEDZIC J. Optical levitation by radiation pressure [J]. Applied Physics Letters, 1971, 19(8): 283-285.
- [2] ASHKIN A, DZIEDZIC J, BJORKHOLM J, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [J]. Optics Letters, 1986, 11(5): 288-290.

- [3] 李银妹, 姚焜. 光镊技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [4] SVOBODA K, BLOCK S M. Biological applications of optical forces [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1994, 23(1): 247-285.
- [5] NEUMAN K C, BLOCK S M. Optical trapping [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(9): 2787-2809.
- [6] SVOBODA K, SCHMIDT C F, SCHNAPP B J, et al. DIRECT OBSERVATION OF KINESIN STEPPING BY OPTICAL TRAPPING INTERFEROMETRY [J]. *Nature*, 1993, 365(6448): 721-727.
- [7] LI D, ZHOU J H, HU X Y, et al. In situ calibrating optical tweezers with sinusoidal-wave drag force method [J]. *Chinese Physics B*, 2015, 24(11): 626-632.
- [8] LANG M J, ASBURY C L, SHAEVITZ J W, et al. An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(1): 491-501.
- [9] FRANCK A D, POWERS A F, GESTAUT D R, et al. Direct physical study of kinetochore-microtubule interactions by reconstitution and interrogation with an optical force clamp [J]. *Methods*, 2010, 51(2): 242-250.
- [10] XIA P, ZHOU J H, SONG X Y, et al. Aurora A orchestrates entosis by regulating a dynamic MCAK-TIP150 interaction [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2014, 6(3): 240-254.
- [11] WANG M D, YIN H, LANDICK R, et al. Stretching DNA with optical tweezers [J]. *Biophysical Journal*, 1997, 72(3): 1335-1346.
- [12] BUSTAMANTE C, BRYANT Z, SMITH S B. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics [J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 423-427.
- [13] TOLIĆ-N RRELYKKE S F, SCHAFFER E, HOWARD J, et al. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2006, 77(10): 103101-103111.
- [14] GUZM N C, FLYVBJERG H, K SZALI R, et al. In situ viscometry by optical trapping interferometry [J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 93(18): 184102.
- [15] BUOSCIOLO A, PESCE G, SASSO A. New calibration method for position detector for simultaneous measurements of force constants and local viscosity in optical tweezers [J]. *Optics Communications*, 2004, 230(4-6): 357-368.
- [16] ANDERSSON M, CZERWINSKI F, ODDERSHEDE L B. Optimizing active and passive calibration of optical tweezers [J]. *Journal of Optics*, 2011, 13(4): 044020.
- [17] LIN C J, YANG S R. Precise positioning of piezo-actuated stages using hysteresis-observer based control [J]. *Mechatronics*, 2006, 16(7): 417-426.
- [18] LIN C-Y, CHEN P-Y. Precision tracking control of a biaxial piezo stage using repetitive control and

- double-feedforward compensation [J]. *Mechatronics*, 2011, 21(1): 239-249.
- [19] MERRY R J E, MAASSEN M G J M, VAN D M, M. J. G., et al. Modeling and Waveform Optimization of a Nano-motion Piezo Stage [J]. *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, 2011, 16(4): 615-626.
- [20] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, SMITH S B, et al. Recent advances in optical tweezers [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77(1): 205-228.
- [21] VISSCHER K, GROSS S P, BLOCK S M. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 1996, 2(4): 1066-1076.
- [22] SELVIN P R, HA T. *Single-molecule techniques* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
- [23] YAO A, TASSIERI M, PADGETT M, et al. Microrheology with optical tweezers [J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(17): 2568-2575.
- [24] SQUIRES T M, MASON T G. Fluid mechanics of microrheology [J]. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 2009, 42(1): 413.
- [25] TASSIERI M, DEL GIUDICE F, ROBERTSON E J, et al. Microrheology with Optical Tweezers: Measuring the relative viscosity of solutions 'at a glance' [J]. *Scientific reports*, 2015, 5:
- [26] KAWAGUCHI K, ISHIWATA S I. Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 272(3): 895-899.
- [27] NARA I, ISHIWATA S I. Processivity of kinesin motility is enhanced on increasing temperature [J]. *Biophysics*, 2006, 2(2): 13-21.
- [28] B HM K J, STRACKE R, BAUM M, et al. Effect of temperature on kinesin-driven microtubule gliding and kinesin ATPase activity [J]. *FEBS Letters*, 2000, 466(1): 59-62.
- [29] GITTES F, SCHMIDT C F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers [J]. *Optics Letters*, 1998, 23(1): 7-9.
- [30] ALLERSMA M W, GITTES F, DECASTRO M J, et al. Two-dimensional tracking of ned motility by back focal plane interferometry [J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74(2): 1074-1085.
- [31] PRALLE A, PRUMMER M, FLORIN E L, et al. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light [J]. *Microscopy Research and Technique*, 1999, 44(5): 378-386.
- [32] HAJIZADEH F, MOUSAVI S M, KHAKSAR Z S, et al. Extended linear detection range for optical tweezers using image-plane detection scheme [J]. *Journal of Optics*, 2014, 16(10): 105706.
- [33] NEUMAN K C, NAGY A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic

- tweezers and atomic force microscopy [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 491-505.
- [34] WANG H, LIU X, LI Y, et al. Isolation of a single rice chromosome by optical micromanipulation [J]. *Journal of Optics A Pure & Applied Optics*, 2004, 6(1): 89-93.
- [35] LI Z, ANVARI B, TAKASHIMA M, et al. Membrane Tether Formation from Outer Hair Cells with Optical Tweezers [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(3): 1386-1395.
- [36] LI Y, GUAN L, LOU L, et al. Laser-induced tobacco protoplast fusion [J]. *Science in China*, 1999, 42(2): 122-127.
- [37] SIMONE KULIN, RANI KISHORE, KRISTIAN HELMERSON, et al. Optical Manipulation and Fusion of Liposomes as Microreactors [J]. *Langmuir*, 2003, 19(20): 8206-8210.
- [38] ZHONG M C, WEI X B, ZHOU J H, et al. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers [J]. *Nature communications*, 2013, 4: 1768.
- [39] ZHONG M C, GONG L, ZHOU J H, et al. Optical trapping of red blood cells in living animals with a water immersion objective [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(23): 5134-5137.
- [40] YUAN Y, LI D, ZHANG J, et al. Bridging cells of three colors with two bio-orthogonal click reactions [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(11): 6425-6431.
- [41] XIAOWEI Z. Molecular biology. Unraveling DNA condensation with optical tweezers [J]. *Science*, 2004, 305(5681): 188-190.
- [42] LI P T X, COLLIN D, SMITH S B, et al. Probing the mechanical folding kinetics of TAR RNA by hopping, force-jump, and force-ramp methods [J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(1): 250-260.
- [43] FORNS N, DE LORENZO S, MANOSAS M, et al. Improving signal/noise resolution in single-molecule experiments using molecular constructs with short handles [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(7): 1765-1774.
- [44] XIAOHUI Z, KENNETH H, CHENG-ZHONG Z, et al. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor [J]. *Science*, 2009, 324(5932): 1330-1334.
- [45] GUYDOSH N R, BLOCK S M. Direct observation of the binding state of the kinesin head to the microtubule [J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 125-128.
- [46] MEHTA A D, RIEF M, SPUDICH J A, et al. Single-molecule biomechanics with optical methods [J]. *Science*, 1999, 283(5408): 1689-1695.
- [47] KUO S C, SHEETZ M P. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 232-234.
- [48] YARDIMCI H, VAN DUFFELEN M, MAO Y H, et al. The mitotic kinesin CENP-E is a processive transport motor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(16): 6016-6021.
- [49] ORIOLA D, CASADEMUNT J. Cooperative Force Generation of KIF1A Brownian Motors [J].

- Physical Review Letters, 2013, 111(4): 048103.
- [50] SUN Z, XU S, DAI G, et al. A microscopic approach to studying colloidal stability [J]. Journal of Chemical Physics, 2003, 119(4): 2399-2405.
- [51] GITTES F, SCHNURR B, OLMSTED P D, et al. Microscopic Viscoelasticity: Shear Moduli of Soft Materials Determined from Thermal Fluctuations [J]. Physical Review Letters, 1997, 79(17): 3286-3289.
- [52] CROCKER J C. Measurement of the hydrodynamic corrections to the Brownian motion of two colloidal spheres [J]. Journal of Chemical Physics, 1997, 106(7): 2837-2840.
- [53] CROCKER J C, GRIER D G. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid [J]. Physical Review Letters, 2014, 73(2): 352-355.
- [54] CROCKER J C, GRIER D G. When Like Charges Attract: The Effects of Geometrical Confinement on Long-Range Colloidal Interactions [J]. Physical Review Letters, 1996, 77(9): 1897-1900.
- [55] CHANGAN X, DINNO M A, YONG-QING L. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
- [56] PETROV D V. Raman spectroscopy of optically trapped particles [J]. Journal of Optics A Pure & Applied Optics, 2007, 9(9): 139-156.
- [57] SATISH R, STEFAN B, BENJAMIN C, et al. Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers [J]. Biophysical Journal, 2009, 96(1): 209-216.
- [58] SHEN G, XUE G, CAI J, et al. In situ observation of azobenzene isomerization along with photo-induced swelling of cross-linked vesicles by laser-trapping Raman spectroscopy [J]. Soft Matter, 2012, 8(35): 9127-9131.
- [59] SHEN G, XUE G, CAI J, et al. Photo-induced reversible uniform to Janus shape change of vesicles composed of PNIPAM-b-PAzPy2 [J]. Soft Matter, 2013, 9(8): 2512-2517.
- [60] CHEN K, XUE G, SHEN G, et al. UV and visible light induced fission of azobenzene-containing polymer vesicles [J]. RSC Advances, 2013, 3(22): 8208-8210.
- [61] 沈淑敏. 生物物理讲座 第一讲 生物物理研究的某些特点 [J]. 物理, 1988, (5):
- [62] 秦克诚. 邮票上的物理学史(77)——生物物理学 [J]. 大学物理, 2004, 23(11): 61-65.
- [63] GREENLEAF W J, BLOCK S M. Single-molecule, motion-based DNA sequencing using RNA polymerase [J]. Science, 2006, 313(5788): 801-801.
- [64] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, IZHAKY D, et al. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(24): 9006-9011.
- [65] BERNS M W, AIST J R, WRIGHT W H, et al. Optical trapping in animal and fungal cells using a

- tunable, near-infrared titanium-sapphire laser [J]. *Experimental Cell Research*, 1992, 198(2): 375-378.
- [66] NEUMAN K C, CHADD E H, LIOU G F, et al. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps [J]. *Biophysical Journal*, 1999, 77(5): 2856-2863.
- [67] JACQUES S L. Optical properties of biological tissues: a review [J]. *Physics in Medicine & Biology*, 2013, 58(11): 37-61.
- [68] VALE R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 467-480.
- [69] KIM Y, HEUSER J E, WATERMAN C M, et al. CENP-E combines a slow, processive motor and a flexible coiled coil to produce an essential motile kinetochore tether [J]. *The Journal of cell biology*, 2008, 181(3): 411-419.
- [70] VALENTINE M T, FORDYCE P M, KRZYSIAK T C, et al. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(5): 470-476.
- [71] THROWER D A, JORDAN M, SCHAAR B, et al. Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor [J]. *The EMBO journal*, 1995, 14(5): 918-926.
- [72] BLOCK S M, GOLDSTEIN L S B, SCHNAPP B J. BEAD MOVEMENT BY SINGLE KINESIN MOLECULES STUDIED WITH OPTICAL TWEEZERS [J]. *Nature*, 1990, 348(6299): 348-352.
- [73] SVOBODA K, BLOCK S M. FORCE AND VELOCITY MEASURED FOR SINGLE KINESIN MOLECULES [J]. *Cell*, 1994, 77(5): 773-784.
- [74] SCHNITZER M J, BLOCK S M. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 386-390.
- [75] ASBURY C L, FEHR A N, BLOCK S M. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism [J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2130-2134.
- [76] BLEHM B H, SCHROER T A, TRYBUS K M, et al. In vivo optical trapping indicates kinesin's stall force is reduced by dynein during intracellular transport [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(9): 3381-3386.
- [77] RAI A K, RAI A, RAMAIYA A J, et al. Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells [J]. *Cell*, 2013, 152(1): 172-182.
- [78] ALLEN R D. New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy [J]. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 1985, 14(1): 265-290.
- [79] BORN M, WOLF E. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- [80] SHIRATSUCHI M, HONGUH Y, HIRANO R, et al. Development of a captured image simulator

- for the Differential Interference Contrast microscopes aiming to design 199 nm mask inspection tools [M]/NABER R J, KAWAHIRA H. Photomask Technology 2007. Bellingham; Spie-Int Soc Optical Engineering. 2007: 67304W.
- [81] MURPHY D, HINSCH J, SALMON E, et al. Fundamental concepts in DIC microscopy [J]. Tallahassee, Florida, USA, 2003:
- [82] RUTISHAUSER U, ACHESON A, HALL A K, et al. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions [J]. *Science*, 1988, 240(4848): 53-57.
- [83] WOLFSBERG T G, PRIMAKOFF P, MYLES D G, et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions [J]. *The Journal of cell biology*, 1995, 131(2): 275-278.
- [84] ZIMMERMAN G A, PRESCOTT S M, MCINTYRE T M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules [J]. *Immunology today*, 1992, 13(3): 93-100.
- [85] LOEWENSTEIN W R, KANNO Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells [J]. *Nature*, 1966, 209(5029): 1248-1249.
- [86] WIENER J, SPIRO D, LOEWENSTEIN W R. Studies on an epithelial (gland) cell junction II. Surface structure [J]. *The Journal of cell biology*, 1964, 22(3): 587-598.
- [87] KUMAR V, ABBAS A K, ASTER J C. Robbins basic pathology [M]. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [88] VAN ITALLIE C M, ANDERSON J M. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 403-429.
- [89] ABODIEF W, DEY P, AL-HATTAB O. Cell cannibalism in ductal carcinoma of breast [J]. *Cytopathology*, 2006, 17(5): 304-305.
- [90] HONG I S. The exfoliative cytology of endometrial stromal sarcoma in peritoneal fluid [J]. *Acta cytologica*, 1980, 25(3): 277-281.
- [91] YOKOO H, ISODA K, NAKAZATO Y, et al. Retroperitoneal epithelioid angiomyolipoma leading to fatal outcome [J]. *Pathology international*, 2000, 50(8): 649-654.
- [92] FAIS S. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors [J]. *Cancer letters*, 2007, 258(2): 155-164.
- [93] FLOREY O, OVERHOLTZER M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment [J]. *Trends in cell biology*, 2012, 22(7): 374-380.
- [94] UNDERHILL D M, GOODRIDGE H S. Information processing during phagocytosis [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(7): 492-502.
- [95] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [96] SUN Q, LUO T, REN Y, et al. Competition between human cells by entosis [J]. *Cell research*, 2014,

24(11): 1299-1310.

- [97] SUN Q, CIBAS E S, HUANG H, et al. Induction of entosis by epithelial cadherin expression [J].
Cell research, 2014, 24(11): 1288-1298.

第2章 单分子皮牛力谱仪

随着单分子、单细胞生物力学研究的发展，我们光镊工作者与生物学家的合作研究逐渐深入，不断促进了光镊设备的发展，国际上光镊装备已经可取得更高的时间和空间分辨率^[1-3]。

为了利用光镊技术开展驱动蛋白的研究，我组将在原来的基础上研制符合单分子测量的光镊仪器，即“单分子皮牛力谱仪”。全面考察之前的光镊设备以及生物物理的研究需要，单分子皮牛力谱仪应实现的技术指标有：

一、百皮牛左右的最大光阱力。在之前的光镊设备中，最大光阱力仅为 5 pN，根本无法满足单分子、单细胞的生物力学研究。

二、将高衬度微分干涉相衬显微成像系统耦合进光镊系统，以便能直接观察 25 nm 微管纤维。

三、优化微球位置探测方案。之前的光镊设备用的是基于四象限探测器的背向探测方案，存在背景噪声大，探测靶面小，探测精度低，不适用于生物单分子研究。单分子皮牛力谱仪中计划改为 BFP 前向探测方案。

单分子皮牛力谱仪针对上述问题进行了改进，能够更好地适应于单分子和单细胞的生物应用。本章中将首先介绍单分子皮牛力谱仪的光路设计原理，然后介绍系统中每个组件的功能以及参数，接着分析系统中的噪声源以及屏蔽方式，最后给出单分子皮牛力谱仪的性能指标。

2.1 光路原理

单分子皮牛力谱仪的光路如图 2-1 所示，它是基于一台倒置的光学显微镜（IX71，日本 Olympus 株式会社）搭建地全新光镊系统。捕获光的光源为一台光纤激光器（AFL-1064-40-R-CL，香港 Amonics 有限公司），波长为 1064 纳米，额定最大功率为 10 瓦特。用偏振分光棱镜（Polarization Beam Splitter，PBS）对激光器出射的激光进行分光，分成直接从 PBS 棱镜透射的 P 光（偏振方向平行于光学平台，即水平偏振）和反射的 S 光，其中 S 光用声光偏转器（Acousto Optical Deflectors，AOD，型号：DTSXY-400-1064，法国 A.A. Sa 公司）和压电转镜（Steering Mirror，型号：S-330.2SL，德国 PI 公司）共同控制 S 光的传播方向。通过扩束透镜组将这台激光器出射的激光扩束为 7mm 左右，以便过充满物镜后瞳。系统中常用的物镜为两种，分别为数值孔径 1.2 的 60 倍水浸物镜（UPLSAPO 60XW，日本 Olympus 株式会社）和数值孔径 1.4 的 100 倍的油浸物镜（UPLSAPO

100XO, 日本 Olympus 株式会社)。P 光和 S 光经过物镜强汇聚后的激光光束可形成两个光阱并可分别稳定地捕获细胞和电介质微球。

通过调节 S 光的传播方向, 即可实现两个光阱的相对运动, 并且也可用压电载物台 (P-545.3R7, 德国 PI 公司) 驱动样品室底面和样品室内的溶液相对光镊运动。

此外, 为了提高光镊的探测精度, 我们用了波长 940 nm 的激光器作为探测光。这束激光首先被耦合入单模光纤以提高模式稳定性。然后, PBS3 将光纤出射光分为 P 光和 S 光。接着, 通过 PBS3, PBS4 以及 PBS3 与 PBS4 间的两个反射镜调节 940 nm 激光的 P 光和 S 光的传播方向与 1064nm 激光的 P 光和 S 光重合。最终经过物镜汇聚以及微球散射后, 被放置在聚光镜后焦面的共轭面处 (即 BFP 法探测被捕获颗粒的位置^[4-6]) 的 PSD 接收。因此, 被捕获颗粒的位置可同时用电荷耦合相机 (Charge-coupled Device/CCD, CoolSNAP HQ2, 美国 Photometrics 公司) 和 PSD (DL100-7PCBA3, 德国 Pacific Silicon Sensor 有限公司) 进行观测和。

为了生物物理实验的需求, 我们将 DIC 成像技术和宽谱荧光激发装置 (图 2-1 中 Xcite 装置) 耦合进了光镊系统中。

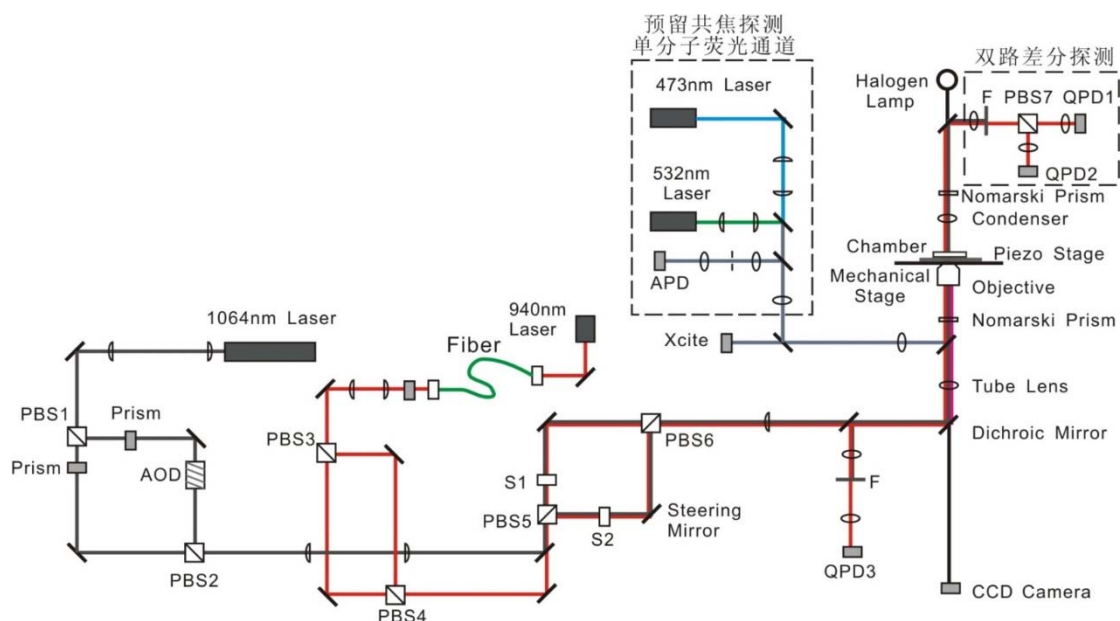


图 2-1 单分子皮牛力谱仪光路原理图

2.2 各组件性能参数

本节将逐个分析单分子皮牛力谱仪中的各个重要组件的功能, 以及它们的参数选择的原则。

2.2.1 激光器

为了获得更高的实验精度,我们将高功率的捕获光和高稳定性的探测光结合用。同时,由于单分子力谱仪的主要研究对象是生物样品,因此在选取激光器时需要考虑激光的生物损伤,根据 1.4 节中关于激光器波长的讨论,捕获光和探测光的波长都应选择为 $1\mu\text{m}$ 左右的激光。

在选择高功率捕获光时,由于 TEM_{00} 模式的 1064nm 高功率激光器有非常成熟的商业产品,因此我们选择 1064nm 波长的激光作为捕获激光,型号 AFL-1064-40-R-CL,香港 Amonics Limited 生产。它的波长为 1064.4nm ,线宽为 0.081nm ,最大出射功率 10 瓦特,输出功率稳定性约为 0.3% (不计入激光模式稳定性)。

在选取高稳定性的探测激光时,由于探测激光的对功率稳定性和模式稳定性要求较高,而对最大功率要求较低,所以我们选取了由 940nm 激光二极管(型号 M9-940-0100,美国 Thermolab 公司)和相应的 TEC 冷却安装座(型号 LDM21,美国 Thermolab 公司)组装成的半导体激光器,最大输出功率为 100mW 。此外,为了进一步的提高光镊探测精度,我们用单模光纤耦合装置对 940nm 激光进行限模。

光纤耦合装置的结构如图 2-2 所示, 940nm 激光器出射的激光首先经过光纤端口准直器(图 2-2 中(1)装置, FiberPort 准直器,型号: PAF-X-7-B,美国 Thermolab 公司)耦合进单模光纤跳线(图 2-2 中(2)装置,型号: P1-830A-FC-2,美国 Thermolab 公司)。然后单模光纤出射的限模后的 940nm 激光经光纤准直输出镜(图 2-2 中(3)装置,型号: GCX-L007-FC,中国大恒新纪元科技股份有限公司)准直为直径 5mm 左右的准直光束。最后准直光束与 1064nm 捕获束耦合作为探测光。

光纤耦合装置中的三个组件的主要参数为:

(1) 光纤端口准直器: 用可进行三维调节的非球面透镜,将入射的激光汇聚到光纤端面上的纤芯处,使得激光可在单模光纤内传播。适用的激光波长为 $600\text{-}1050\text{nm}$,允许输入光斑的最大直径 3.5mm ,用标准 FC/PC 接口与光纤跳线连接。

(2) 单模光纤跳线: 两端为标准 FC/PC 接口,适用波长为 $800\text{-}1000\text{nm}$,数值孔径为 $0.10\text{-}0.14$ 。

(3) 光纤准直输出镜: 选用了数值孔径 0.25 的准直镜(准直镜的数值孔径必须高于光纤跳线的数值孔径)。输出激光光斑直径为 5mm (可用“直径= $2\times$ 数值孔径 \times 透镜焦距”进行计算)。光纤准直镜用标准 FC/PC 接口与光纤跳线进行连接。

图 2-2 中的单模光纤耦合系统的最大耦合效率为 41%。耦合完成后, 940nm

激光功率波动小于 0.5%，并且经单模光纤限模后模式稳定性极好。

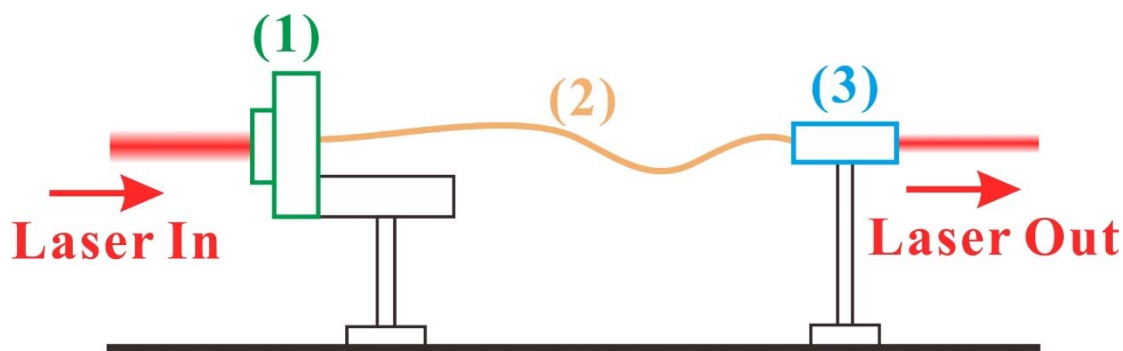


图 2-2 940nm 激光器单模光纤耦合装置示意图

940nm 激光器出射的激光首先经过光纤端口准直器 (1) 耦合进单模光纤跳线 (2)，然后单模光纤出射的限模后的 940nm 激光经光纤准直输出镜 (3) 准直为直径 5mm 左右的平行光束进入主光路作为探测光用。

为了进一步的验证激光对生物组织的损伤情况，我们将光镊长时间照射有丝分裂阶段的细胞，并观察细胞在有丝分裂时的变化情况。我们用微管荧光标记过的 heLa 细胞进行实验，首先用荧光成像的方法寻找处于有丝分裂中期纺锤体（如图 2-3 所示）。然后用 1064nm 的激光照射细胞，激光功率为 6W（物镜出射的激光功率在 200mW 左右）。最后，在 DIC 状态下观察细胞分裂过程。

观察到的实验结果如图 2-4 所示。图中 (1) 至 (9) 小图为一个 heLa 细胞从有丝分裂中期直到有丝分裂完成的整个过程，一共持续了大约 1.5 小时。实验表明激光器输出功率为 6W 时，细胞依然能正常完成有丝分裂过程，而在本文的绝大多数光镊实验中 1064 nm 激光器的出射功率都小于 6W，因此可以认为本文中所使用的波长 1064 nm 的捕获光不会对生物细胞产生太大损伤。此外，940 nm 激光器的出射功率远小于 1064nm 的激光器（约相差百倍），因此可认为单分子皮牛力谱仪中的两种激光器都不会对生物细胞产生太大损伤。

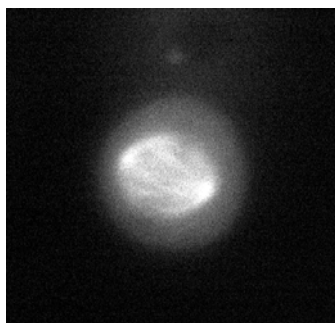


图 2-3 荧光观察细胞有丝分裂中期图片

图中较亮的圆形区域为细胞的位置，条带中排列的亮条纹为微管，亮条纹的两端最亮的两个点为细胞中心体的位置。

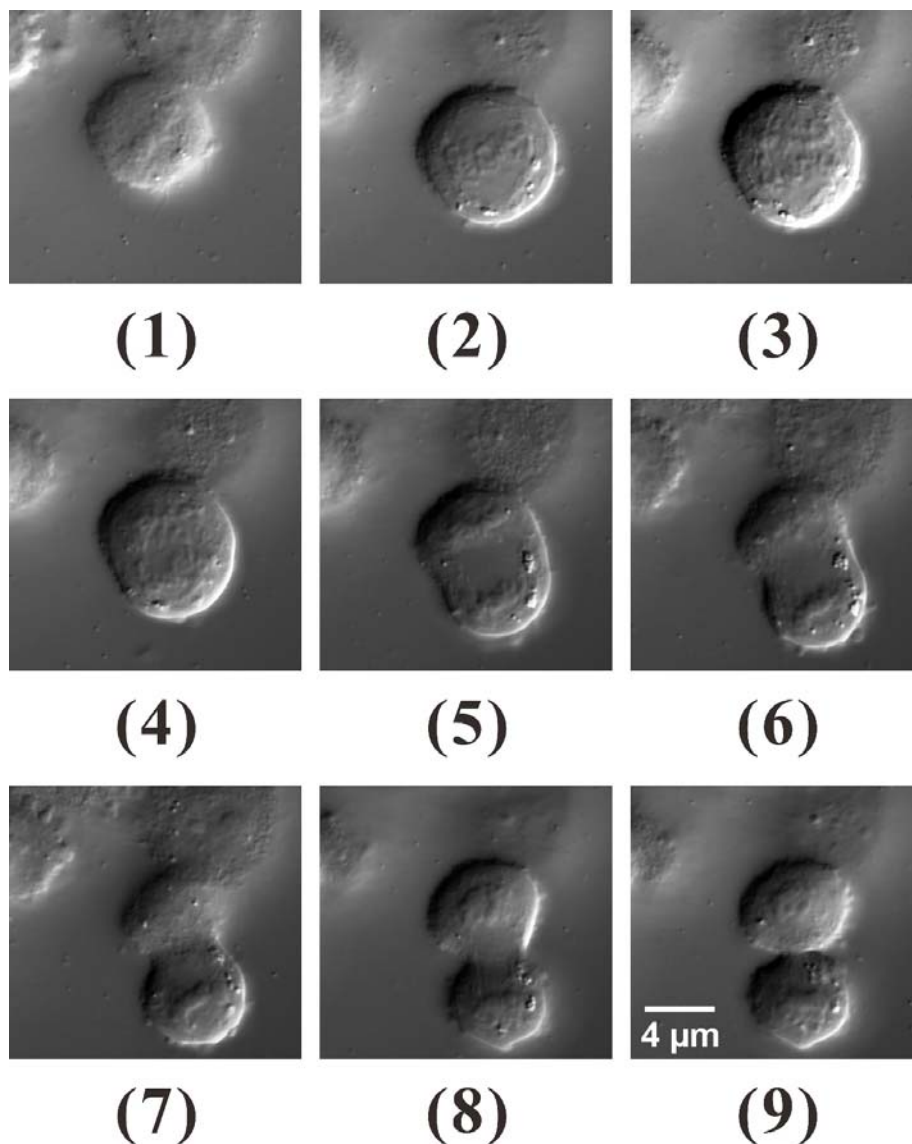


图 2-4 DIC 观察 1064nm 激光对细胞有丝分裂的影响

(1) 为细胞有丝分裂中期的图像，细胞内的染色体全部排列在赤道板附近；(6) 为细胞的染色体已经运动到细胞两极；(9) 细胞已经完成有丝分裂称为两个细胞。

2.2.2 显微镜和物镜

单分子皮牛力谱仪中用了 Olympus 公司生产的 IX 71 倒置显微镜，并配备了数值孔径高达 0.9（空气介质）/1.4（加入光学介质油）的聚光镜。这种显微镜机械加工精密，成像效果极好，具有良好的光学耦合性能，能够方便的耦合荧光系统、DIC 成像系统和引入外部激光。此外，为了与光镊系统相配合，我们用两种

物镜对激光进行汇聚,分别是为数值孔径 1.2 的 60 倍水浸物镜(UPLSAPO 60XW, 日本 Olympus 株式会社)和数值孔径 1.4 的 100 倍油浸物镜(UPLSAPO 100XO, 日本 Olympus 株式会社)。当分别用这两种物镜构建光镊系统时,各自特点如下所述(表 2-1 为汇总表格):

油浸物镜可提供更高的放大倍率,在观察微小样本或样本的微小结构时具有优势。但是由于物镜油的折射率与样品溶液的折射率不一致,因此 1064nm 的捕获光通过物镜汇聚进入溶液中时存在球差,导致**捕获深度**(被捕获颗粒中心到样品室底面的距离,也成为**离地高度**)只有 20 至 30 μm 并且在不同离地高度情况下光阱刚度并不相同。此外,我们所用的油浸物镜对 1064nm 激光的透射率较低,只有约 35%,因此在像差和透射率的共同作用下,油浸物镜构建的光阱的光阱刚度比水浸物镜小。在单分子皮牛力谱仪中能达到的最大光阱刚度约为 600pN/ μm (捕获直径 1 μm 的聚苯乙烯微球)。

水浸物镜用水作为浸没介质,与样品溶液之间折射率非常相近,可忽略像差,因此能够在物镜工作范围(280 μm)内进行捕获并且不同离地高度处的光阱刚度基本一致^[7]。水浸物镜对 1064nm 激光透过率较高,约 50%。像差小并且激光透过率较高,因此用水浸物镜构建光阱时光阱刚度较大,最大光阱刚度可达 1.5nN/ μm (捕获直径 1 μm 的聚苯乙烯微球)。

表 2-1 两种物镜参数对比图

项目	油浸物镜	水浸物镜
放大倍率	100	60
捕获激光是否存在球差	存在	极小
最大捕获深度	20-30 μm	280 μm
在不同捕获深度的光阱刚度	变化	基本不变
1064 nm 激光的透射率	35%	50%
最大光阱刚度 (捕获直径 1 μm 的聚苯乙烯微球)	600 pN/ μm	1500 pN/ μm

需要注意的是,在用油浸物镜或水浸物镜时,作为浸没介质的水或者物镜油中不能含有气泡。观察有无气泡的方法有两种,一种是观察显微镜成像,没有气泡时整个视野明暗变化较为均匀,有气泡时则不然;另一种是在样品室放置好的后,从多个方向观察物镜与样品之间的浸没介质,比较多个角度的浸没介质均匀性即可发现是否有气泡存在。

2.2.3 微分干涉相衬显微系统

微分干涉相衬显微镜 (Differential Interference Contrast Microscope, DIC 显微镜) 是单分子皮牛力谱仪的重要组成部分, 可用于观察直径 25nm 的微管以便开展驱动蛋白力学特性的研究。

单分子皮牛力谱仪中 DIC 成像系统为 Olympus 公司生产的适用于 IX 71 显微镜的 DIC 成像组件, 采用的是目前商用 DIC 中常用的诺马斯基棱镜构建方式, 通过在普通的光学成像光路中加入一个起偏器 (Polarizer), 聚光镜棱镜 (Nomarski Prism B/Condenser Prism), 物镜棱镜 (Nomarski Prism A/Objective Prism) 以及一个检偏器 (Analyzer) 构成, 如图 1-4 所示。

2.2.4 光阱移动元件

单分子皮牛力谱仪为双光镊装置, 为了能够控制两个光阱相对运动, 我们在 S 光的光路中加入光线偏折元件, 即为图 2-1 中的声光偏转器 (Acousto Optical Deflectors, AOD, 型号: DTSXY-400-1064, 法国 A.A. Sa 公司) 和压电转镜 (Steering Mirror, 型号: S-330.2SL, 德国 PI 公司)。借助这两个器件控制 S 光的传播方向, 即可在保持 P 光光阱静止的时, 操纵 S 光光阱运动, 从而实现两光阱相对运动、两光阱间物体拉伸等功能。

这两个光线偏折元件的特点如表 2-2 所示。其中, 声光偏转器的光束角度的调节范围更大, 并且距离物镜更远, 因此可获得更大的光阱操纵范围。此外, 声光偏转器的反应速度快适合于光阱的快速反馈控制。但是, 声光偏转器的劣势在于操纵精度远差于压电转镜, 并且耦合效率相对较低, 对所用的激光的光束直径也有限制。在实际应用中需要根据实验要求将两个调节元件结合起来用。图 2-5 是用双光镊操纵两个微球相互分离的录像。

表 2-2 声光偏转器和压电转镜性能对比

项目	声光偏转器	压电转镜
激光耦合效率	81%	>99%
每个轴的最大偏转角度	49mrad	2mrad
偏转精度	15 μ rad	0.05 μ rad
最大激光直径	6mm	没有限制
反应速率	<40ns	3.846×10^5 ns
光阱最大操纵范围	91.5 μ m	0.493 μ m
操纵精度	13.2nm	0.012nm

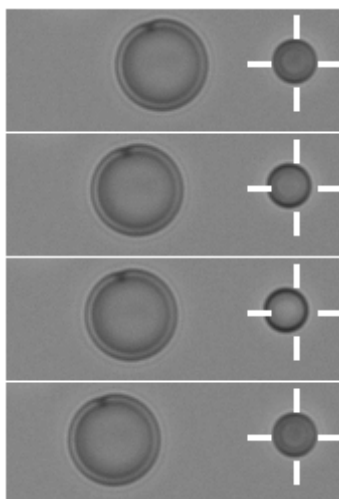


图 2-5 双光阱拉伸 $1/2 \lambda$ -DNA 拉伸和断裂过程。

双链 DNA 分子两端分辨连接左、右微球，双光镊操纵两微球分离。前三帧录像为左侧光阱中的微球在 DNA 分子的拉伸下偏离光阱中心；而在最后一帧中，DNA 分子与微球间的连接断裂，左侧微球回到光阱中心。

2.2.5 微球位移探测器

在单分子皮牛力谱仪的应用中，更加关心的是被捕获微球的横向位移。因此探测器以及探测方案的选择主要考虑的是微球横向位移的探测。目前国际上的绝大多数光镊系统中，可直接用 CCD 相机来观察和测量被光阱捕获的微球的位移^[8, 9]，优点是能直接、简便观察被捕获微球的运动状态以及附近的微观环境。用 CCD 相机追踪微球时，先借助显微标尺标定“像素-距离”系数（标定方法详见“附录 I “像素-距离”系数的标定方法”），然后将微球球心在图像中的像素坐标乘以“像素-距离”系数即可求得微球位置。但使用 CCD 相机测量微球位移存在采样速率慢（约 30 Hz）和空间分辨率低（不高于 0.1 个像素，约为 6-10nm）的缺点，无法满足生物物理研究中高精度的要求。

为了获得更高的空间分辨率和时间分辨率，光镊用 PSD 替换 CCD 探测被捕获微球的位移。目前，国际上已经提出了很多成熟的探测方案，比如，前向非成像探测方案^[10-13]，前向成像探测方案^[14]，前向后焦面探测方案（BFP 方案）^[4-6]以及背向位置探测方案^[15]。这其中 BFP 方案由于测量精度高、设备搭建简便的特点而得到了广泛的认可。因此，在单分子皮牛力谱仪中，我们也用了这个探测方案。

探测装置为图 2-1 中的双路差分探测的部分，我们用带通滤色片（透射可见光，反射红外光）将微球透射和散射的激光从显微镜聚光镜上方导出至附加的光

学平台上，并用 PSD 分光，将 P 光和 S 光的信号分离开。然后用两个非球面透镜接力成像的方式，将聚光镜的后焦面成像在 PSD（Position Sensitive Detector，PSD，型号：DL100-7PCBA3，德国 Pacific Silicon Sensor 有限公司）的探测靶面上，图 2-6 为探测光路的实物图。然后，我们用信号采集卡（PCI-6251，美国 National Instruments 公司）以及一个用 LabView 设计的信号采集软件将探测器的电信号收集起来。

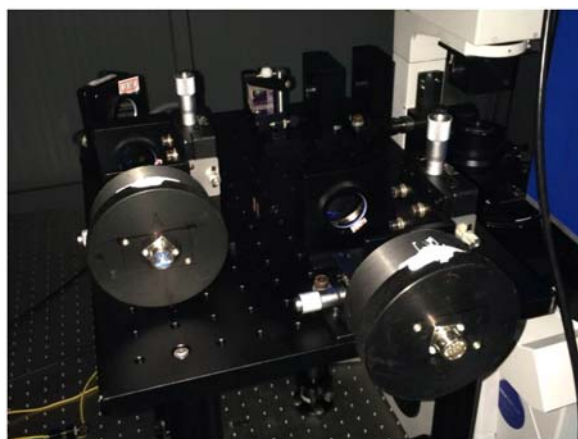


图 2-6 探测光路的实物图

2.2.6 压电载物台

压电载物台是亚纳米精度的操控装置，可高精度地定位样品或驱动样品室以特定的波形振动，是单分子皮牛力谱仪中的重要操纵组件。

压电载物台的主要性能指标包括，定位精度，响应时间和运动范围等。单分子皮牛力谱仪中选用了德国 PI 公司生产的 P-545.3R7 型压电载物台（运动范围 $200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}\times 200\ \mu\text{m}$ ）控制样品室精确运动，并安装在 PI 公司的 M-545.2MO 型手动调节台（运动范围 $25\ \text{mm}\times 25\ \text{mm}$ ）上实现大范围位置移动。

但是在长时间的使用过程中，我们发现即使厂家已经校准过得压电载物台的运动精度依然会用时间的增加而降低，即压电载物台的实际运动幅度与设定值有偏差。在实验中，我们还发现压电载物台带动样品室中的溶液进行正弦振动时，光阱附近的流场特性还会受到压电载物台和样品室之间的机械耦合性能以及样品室内液体层流等因素的影响。因此，我们引入了参数“压电载物台运动修正系数”来综合描述压电载物台驱动样品室运动时所产生的流场与压电载物台设定振幅之间的关系。它是样品溶液运动幅度与压电载物台运动幅度设定值之间的比值。详细的“压电载物台运动修正系数”测量方法以及这个参数的实验特性见 3.2 节。

2.2.7 样品室

样品室是存放实验样品的器皿，由于光镊设备中的样品大都是液体，因此需要用水密性良好的样品室。此外，由于样品室是置于显微镜的载物台上，因此样品室的外观尺寸应满足显微镜载物台的尺寸要求。

这里我们将介绍三种单分子皮牛力谱仪中常用的光镊样品室，即单分子样品室，永久性液态微球样品室，实时温控微型样品室。这些样品室的外观尺寸不仅满足我们所用的 P-545.3R7 型压电载物台的要求，还适合大部分光学显微镜。

2.2.7.1 单分子样品室

由于单分子皮牛力谱仪主要用于生物类实验，因此所用的样品室也应满足生物实验的要求，比如样品室无菌，样品室内壁整洁等。同时，由于用过的生物样品室清洗困难，所以样品室亦应价格低廉，以便于一次性用。

根据生物实验的特点，我们对原有的样品室进行改进。新的样品室结构如图 2-7 所示，包括盖玻片、玻片夹层和载玻片三个组件。各组件的处理方式如下：

①盖玻片（型号：2865-22，尺寸 $22\text{mm} \times 22\text{mm} \times 0.13\text{-}0.16\text{mm}$ ，美国 CORNING 公司）是光镊实验中直接观察的玻片，需要非常高的干净程度。这里用“附录 II 玻片清洗方法”清洗干净，晾干放后备用。

②玻片夹层（Parafilm，型号：PM-996，外形尺寸： $28\text{mm} \times 25\text{mm}$ ；内孔为 $24\text{mm} \times 6\text{mm}$ ；厚度约 0.16mm ，法国 PECHINEY 公司）为整块的封口膜（Parafilm）切割而成。封口膜中央用刀刻出长方形孔洞，借助封口膜的厚度，将这个孔洞可在盖玻片和载玻片之间形成容纳样品溶液的长条形腔体；再令长方形孔洞的长度略大于盖玻片长度，即可在腔体两端留出进样口和出气口。

③载玻片（型号：7101，尺寸： $75\text{mm} \times 25\text{mm} \times 2\text{mm}$ ，中国帆船牌）用“附录 II 玻片清洗方法”清洗干净，晾干放后备用。

将上述三个组件按照图 2-7 所示的方式依次叠放，放置在加热台上加热至 70°C ，然后用封口膜的热熔性将盖玻片和载玻片粘结成样品室容器。待冷却后用紫外灯照射 40min 灭菌，单分子样品室即制作完成，图 2-8 为实物图。

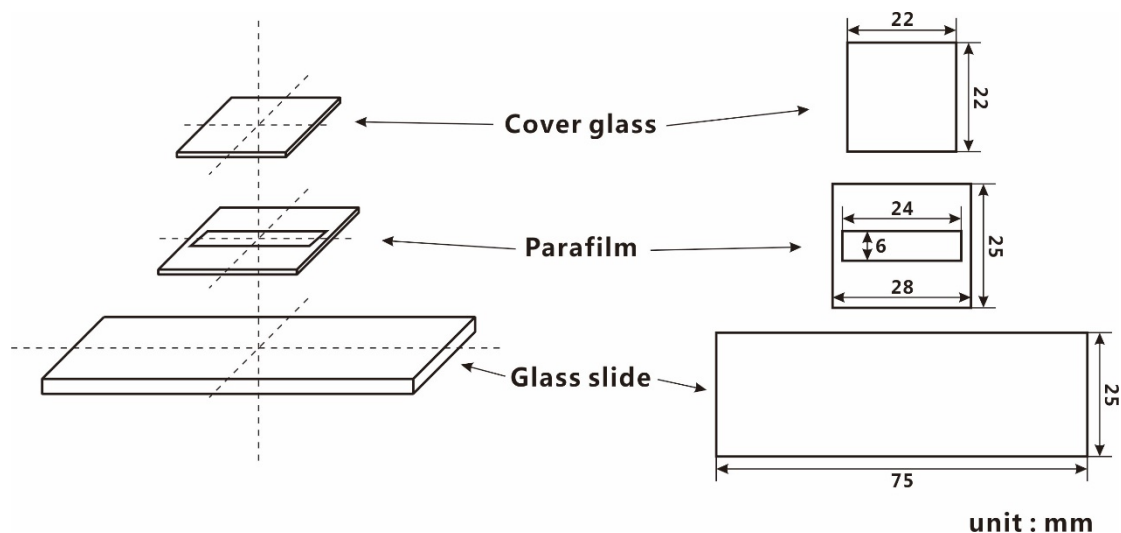


图 2-7 单分子样品室结构示意图

样品室为盖玻片、玻片夹层和载玻片三个部件摞合而成，利用封口膜的热熔性将盖玻片和载玻片粘结成样品室容器

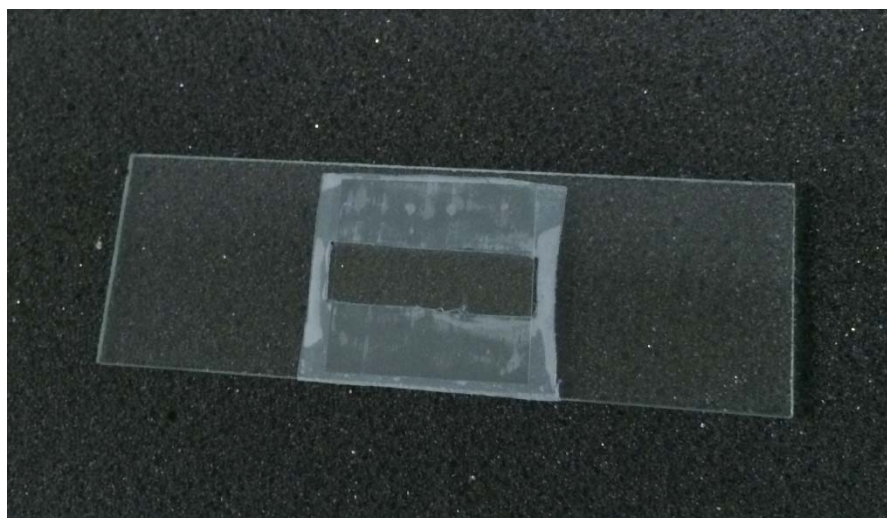


图 2-8 单分子样品室实物图

单分子样品室的优点有：首先，它具有良好的化学稳定性和耐受力，可在两周内保持样品室性能稳定。然后，由于样品室用显微镜匹配的盖玻片和载玻片制作而成，几何尺寸针对显微观测而设计，因而能用于绝大部分光学显微镜观察或光镊实验。最后，由于盖玻片和载玻片都进行了严格的清洗，可保证样品室内壁上没有大于 30 nm 的杂质颗粒，适合于观察盖玻片表面的微小样品，比如直径 25 nm 的微管。

2.2.7.2 永久性液态微球样品室

随着微观科学的研究和发展，微米尺寸的颗粒在化学^[16]，生物学^[17]和物理学

[18]等各个领域获得了广泛的应用。同时,微米尺寸颗粒也是光镊实验中常用的样品和研究对象,可用于标定光阱参数^[19,20],作为微小力和位移的探针^[8,21,22]以及用于液体粘弹性的研究^[23,24]等方面。

光镊实验,常用的实验样品为微米尺寸颗粒的悬浮液,且每次实验需重新制作样品室。这种重复工作不仅实验准备时间长,浪费实验材料,尤其限制了某些特殊的研究,无法满足科学研究日渐精细和深入的要求。

因此,开发一种能长期保存微米尺寸颗粒样品,能够多次反复利用的永久性样品室就十分有意义和实用价值。

长期存放装有悬浮液的样品室,存在密封困难,液体蒸发,易生细菌,溶液中微米颗粒易聚团、沉淀等问题。为了解决了上述问题,我们提出一种切实可行的样品室制作方案。这个设计方案已经申请专利并获得授权^[25]。下面是这种样品室的详细制作方法。

首先,按照 2.2.7.1 节方法制作出单分子样品室。

然后,配置微米颗粒悬浮液并注入样品室内。悬浮液含高浓度微球悬浮液、质量比 0.01%的酪蛋白(casein,美国 Sigma 公司)、质量比 0.02%的叠氮化钠(NaN_3 ,中国天宇化工有限公司)和水。悬浮液中微球的最终浓度根据需要而定,比如标定光阱参数时,我们用美国 Thermo Scientific 公司生产的直径 $1\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球(#4009A,直径 $0.994 \pm 0.021\ \mu\text{m}$,原液浓度:1%质量百分比),这种微球在悬浮液中的最终浓度仅为一百万分之一。悬浮液中添加微量酪蛋白可防止样品中的微米颗粒粘附于盖玻片或侧壁上或聚团,而适量叠氮化钠能抑制细菌,延长存储时间。由于悬浮液中酪蛋白和叠氮化钠的含量极低,因此溶液的物理性质与水相近。

在样品室内注入微米颗粒悬浮液后,用粘性较强的脂状物(如凡士林、高温润滑脂等)将长条形腔体两端封闭,使悬浮液与空气隔离,以避免液体挥发。再用 703 胶加封盖玻片四周,提高密封和防水性能,同时也起到加固样品室的作用。

最后,将样品室用紫外光灭菌 40min,保证微米颗粒悬浮液不带细菌,长期存放不变质。制作好的样品室如图 2-9 所示。



图 2-9 永久性液态微球样品室实物图

我们对永久性液态微球样品室的实际性能进行了测试，测试方法和结果如表 2-3 所示。实验表明该样品室的有效存放时间极长。我们将聚苯乙烯微球样品制作成永久性液态微球样品室，置于冰箱中 4℃ 保存 8 个月后用于光镊实验，实验表明样品溶液十分纯净，细菌和悬浮杂质极少，完全满足光镊高精度测量的要求。图 2-10 为用双光镊捕获悬浮微球的实验截图。

表 2-3 永久性液态微球样品室的性能

项目名称	测试方法	测试结果
样品室内壁杂质	DIC 显微镜观察	无大于 30nm 直径的颗粒
重复用次数	保守估计	50 次以上
有效用时间	实验验证	8 个月以上，详见图 2-10
样品室容积	实际测量	约 22 μ l
可存储样品类型	实验验证	多种材质（如聚苯乙烯，二氧化硅和多巴胺等）的微粒和不腐蚀玻璃的液体
微粒可用尺寸	实验验证	0.1~50 μ m
微粒可存储浓度	实验验证	不受限制，也可存储不含微球的普通液态样品

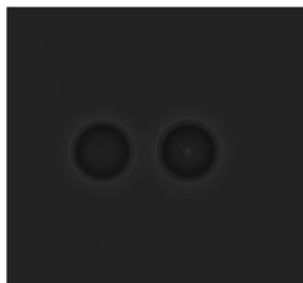


图 2-10 永久性液态微球样品室存储效果图

用聚苯乙烯微球制作的永久性液态微球样品室。置于冰箱中 4℃ 保存 8 个月后的样品室直接用于光镊实验，图中为用双光镊捕获样品室中悬浮微球的实验截图。

综上所述，永久性液态微球样品室的主要优点可总结为：

- ①可直接置于显微镜上观察
- ②可长时间储存并多次重复用，无污染不变质，微米颗粒不聚集成团；
- ③样品室具有优秀的化学稳定性和耐受力，并能承受一定的外力作用；
- ④样品室选材和几何尺寸设计适用于绝大部分光学显微镜，能直接用于显微观察或光镊实验，对没有相关用经验的用户也可直接用；
- ⑤样品室的设计也适合常规液态样品。

2.2.7.3 实时温控微型样品室

本课题组现有的光镊设备不具备温度调节功能，只能借助空调调节环境温度。但在生物和化学应用中，常需要在实验过程中稳定地维持非室温温度，或者在实验中实时调节温度。对样品的温控调节装置的设计，在单分子皮牛力谱仪器受到许多的制约，如由于单分子皮牛力谱仪使用了高数值孔径的聚光镜和高放大倍率的物镜，物镜与聚光镜前端最近处仅有 5 毫米空隙，使得载物台上样品槽的空间极为狭小；单分子皮牛力谱仪测量精度高，对外界扰动十分敏感，希望实现温度控制的同时不能引入外界噪声。因此，综合上述要求，单分子皮牛力谱仪中就迫切的需求一种能有效控制样品溶液温度的样品室或样品室控温装置，并且体积要小，不能带有噪声源。

目前市面上已有的显微镜用样品室温度控制装置体积大，带有风扇等噪声源，无法满足高精度单分子皮牛力谱仪。因此我们设计并制作了一种加装控温调节元件的实时温控微型样品室，它不带有振动噪声源，满足单分子皮牛力谱仪中狭小空间的限制，可安装在 PI 公司的 P-545 压电载物台载物槽中，该样品室已获得国家专利授权^[26]。

实时温控微型样品室包括控温装置 A、样品室 B 和控温仪表 C 三个部分组成。下面是该温控样品室的结构特点以及制作方法。

控温装置 A 是用半导体制冷片为核心温度控制元件的温度控制装置，能够在控温仪表 C 地调控下有效的控制样品室 B 的温度。控温装置 A 的结构如图 2-11 中的 A 部分所示，由 6 个部件组成。各部件的尺寸、材质以及作用分别为：

①U 型支撑板（图 2-11 中①号构件，铝制，几何尺寸见图 2-12（a）图所示）用于固定整个温控装置 A 并将两片半导体制冷片连接在一起；

②半导体制冷片（图 2-11 中②号构件，Thermoelectric Cooler, TEC，中国云辉公司，型号：TES 1-04902，外观尺寸 20 mm×20 mm×4 mm）利用半导体材料的珀尔帖效应^[27]使上下表面间产生温度差，从而调节上下金属板的温度；

③TEC 的金属导热片（图 2-11 中③号构件，铝制，几何尺寸见图 2-12（b）图所示）带有方形凹槽可固定热电偶，同时将 TEC 下表面的温度传导至热电偶

以及玻片支撑板，此外，可保证 U 型支撑板与 TEC 的金属导热片不直接接触，降低半导体制冷片的冷热面间的热传导；

④热电偶探头（图 2-11 中④号构件，K 型热电偶感温线，直径 2 mm，台湾路昌公司）探测玻片支撑板的温度并传输给控温仪表 C；

⑤玻片支撑板（图 2-11 中⑤号构件，铜制，厚度 3 mm，几何尺寸见图 2-12（d）图所示）辅助加固整个温控装置 A 并将 TEC 下表面的温度传导至样品室基板；

⑥隔热板（图 2-11 中⑥号构件，塑料制，外观尺寸 20 mm×20 mm×2 mm）。

组装控温装置 A 时，首先将①至⑤号构件用导热胶粘合在一起，以保证金属构件间的热传导能力以及控温装置 A 的整体机械强度，然后将⑥号构件用 502 速干胶粘在⑤号构件下表面。图 2-13 为组装好的控温装置 A 的示意图和实物图。

样品室 B 是直接盛放样品溶液的装置，通过金属构件将 TEC 下表面温度直接传导至溶液中，并且样品室 B 可与控温装置 A 分离，更换样品时只需更换样品室 B 部分即可。样品室 B 的结构如图 2-11 中的 B 部分所示，它由 3 个部件组成。各部件的尺寸、材质以及作用分别为，上盖玻片（图 2-11 中⑦号构件，帆船牌，外观尺寸 18 mm×18 mm×0.17 mm）为玻璃制作；样品室基板（图 2-11 中⑧号构件，厚度 0.1 mm，几何尺寸见图 2-12（c）图所示）为铜制，可直接将 TEC 下表面的温度传导至样品溶液；下盖玻片（图 2-11 中⑨号构件，型号：2865-22，美国 CORNING 公司，外观尺寸 22 mm×22 mm×0.13-0.16 mm）提供干净的样品观察底面。

组装样品室 B 时，首先用“附录 II 玻片清洗方法”中的方法清洗盖玻片⑦和⑨；然后将盖玻片⑦，样品室基板⑧和盖玻片⑨依次摞合起来压紧，并使它们中心重合、长短边分别平行；最后将 502 速干胶用注射器滴至盖玻片⑦的边缘，在毛细效应的作用下，胶水会很快充满两玻片间的空隙，等待胶水干燥（约十几秒）后，中间会产生一个长条型的样品腔，并且两端留有进样和排气开口。样品室 B 的容积可通过调节样品室基板⑧的厚度进行调节，若用厚度为 0.1 mm 的样品室基板⑧，则样品室内容积约 10 μl 。

控温仪表 C 由余姚众泰仪表定制的温控表头以及相应的稳压直流电源组成。它可实时采集热电偶探头的温度信号，然后利用电磁继电器反馈控制 TEC 中的电流方向，进而控制 TEC 下表面的温度。

使用时，先在样品室 B 中注入样品溶液，并用高温润滑脂（美孚金霸王，美国美孚公司）封住进样和排气开口，以保证良好的水密性、化学稳定性和耐热性，然后用透明胶将样品室 B 固定于控温装置 A 的下方，注意样品室 B 的上玻片⑦

朝上，此时上玻片⑦将正好处于玻片支撑板⑤中心方槽内。再然后将上述控温装置 A 和控温仪表 C 之间的导线连接好，并将控温装置 A 和样品室 B 整体放置在样品台上即可。最后，打开外部电源并在温控表头中设定所需温度，等待一段时间后（根据设定温度的高低，等到时间略有长短），样品室 B 内的样品溶液温度即可保持在所设定的温度上。

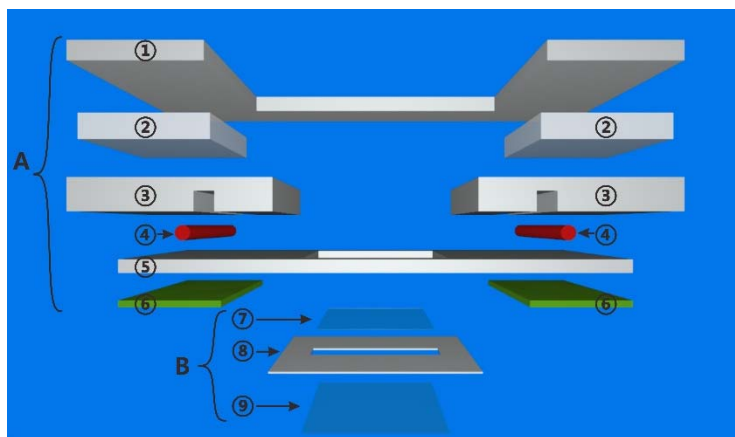


图 2-11 实时温控微型样品室结构示意图

图中上半部分为控温装置 A，包括 U 型支撑板①，半导体制冷片②，TEC 的金属导热片③，热电偶探头④，玻片支撑板⑤和隔热板⑥；图中下半部分为样品室 B，包括上盖玻片⑦，样品室基板⑧和下盖玻片⑨

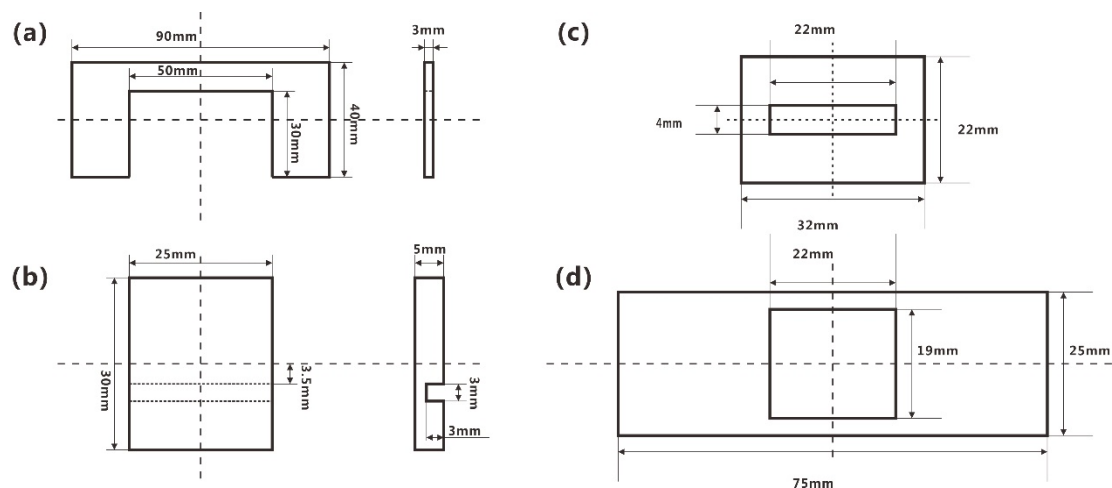


图 2-12 实时温控微型样品室各个部件尺寸图

(a) U 型支撑板的几何尺寸图，(b) TEC 的金属导热片的几何尺寸图，(c) 样品室基板的几何尺寸图，(d) 玻片支撑板的几何尺寸图。

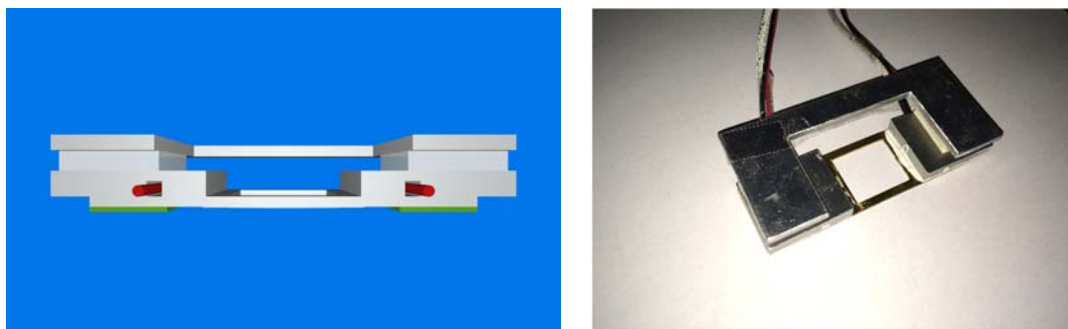


图 2-13 实时温控微型样品室组装好的控温装置 A 的示意图和实物图

为了检验这种样品室的控温能力，我们将微型热电偶（K 型，直径 0.3 mm，美国 Omega 公司）插于样品室 B 的溶液中，实时检测样品室内的溶液温度。实验表明样品室能有效调节溶液温度，温度响应时间小于 5 min，温度调节范围为 6-90 °C，温度波动小于 0.5 °C。

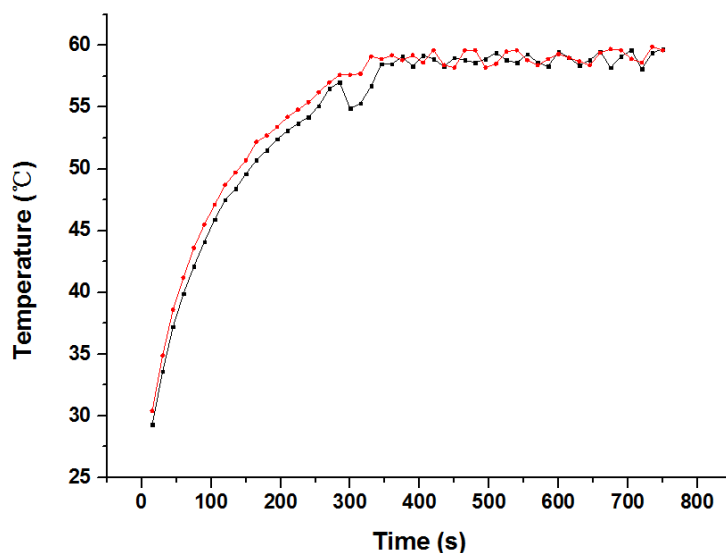


图 2-14 实时温控微型样品室控温能力测试图

设定温度 60°C 时，样品室内溶液温度随时间的变化关系，红色和黑色曲线分别为两次实验的测量结果。

本小节研制的实时温控微型样品室，通过控制与样品溶液紧密接触的导热金属的温度实现在实验过程中对样品溶液温度的实时控制和调节，具有较宽的温度调节范围，较精确的温度控制精度和较好的对温度时间响应能力。样品室外形尺寸小，能满足由于高数值孔径聚光镜和高倍率物镜结合使用导致的显微镜载物台空间十分有限的情况。样品室无噪声源（如风扇等机械振动噪声源）可用于高精测量实验。并且样品室内部容积可调，最少仅需 10 μl 溶液即可充满样品室。实时温控微型样品室比较好的解决了单分子皮牛力谱仪器在显微生物、物理、化学

实验中对样品温度进行调控的要求。

2.3 降低噪声的措施

随着生物学的不断深入，特别是针对生物大分子（RNA，DNA，蛋白质等）的深入研究，对光镊系统的空间分辨精度提出了越来越高的要求，比如用光镊研究 DNA 分子时，在某些研究中需要 1 个碱基对（1 base pair=0.34 nm）的探测精度^[2,3]，即要求探测精度达到亚纳米/埃量级。

在埃量级的探测精度要求下，任何轻微的噪声都可能产生非常大的影响。如何有效的控制和减小噪声成为建立高分辨率光镊的关键。前人在减少光镊噪声方面进行了不懈的努力，如对噪声的来源进行了细致的分析，并给出了减小噪声的多种方案^[1,28]。这一节中将以我们研制的单分子皮牛力谱仪中所遇到的问题以及解决方式为例讨论降低光镊噪声的方法。

在光镊系统中，环境噪声是无法避免对实验产生严重干扰的一种噪声，在单分子皮牛力谱仪中，我们采取了多种措施减少环境噪声。

首先，我们将光镊搭建在地下室中的带有气垫缓冲的光学平台上，在气垫平台的底部还垫有两厘米厚的橡胶垫，将电脑等控制设备与光学设备隔离，比较有效地减少地面传导的振动和控制设备传递的噪声。

然后，我们在光学平台外部安装了铝合金保护罩，达到防止灰尘掉落，减少气流扰动和隔音的效果。



图 2-15 光镊光路保护罩

所有光学调节架的底座都用厚度为半英寸（12.7 mm）的实心铝合金，以减少调解架振动带来的噪声。

实验发现探测器探测被捕获微球的功率谱信号噪声较大，如图 2-16（c）所示。图中灰色曲线为探测到的光镊信号强度 Power 在不同频率 f 下的分布，在 1

kHz 到 5 kHz 范围内有多个噪声峰。原因来自相机的风冷散热装置，散热的气流直接吹到探测光路中。为隔绝探测器产生的气流，为探测器加装了保护罩并得到较好的改善（如图 2-16 (b) 所示），探测器信号的噪声减小（如图 2-16 (d) 所示）。

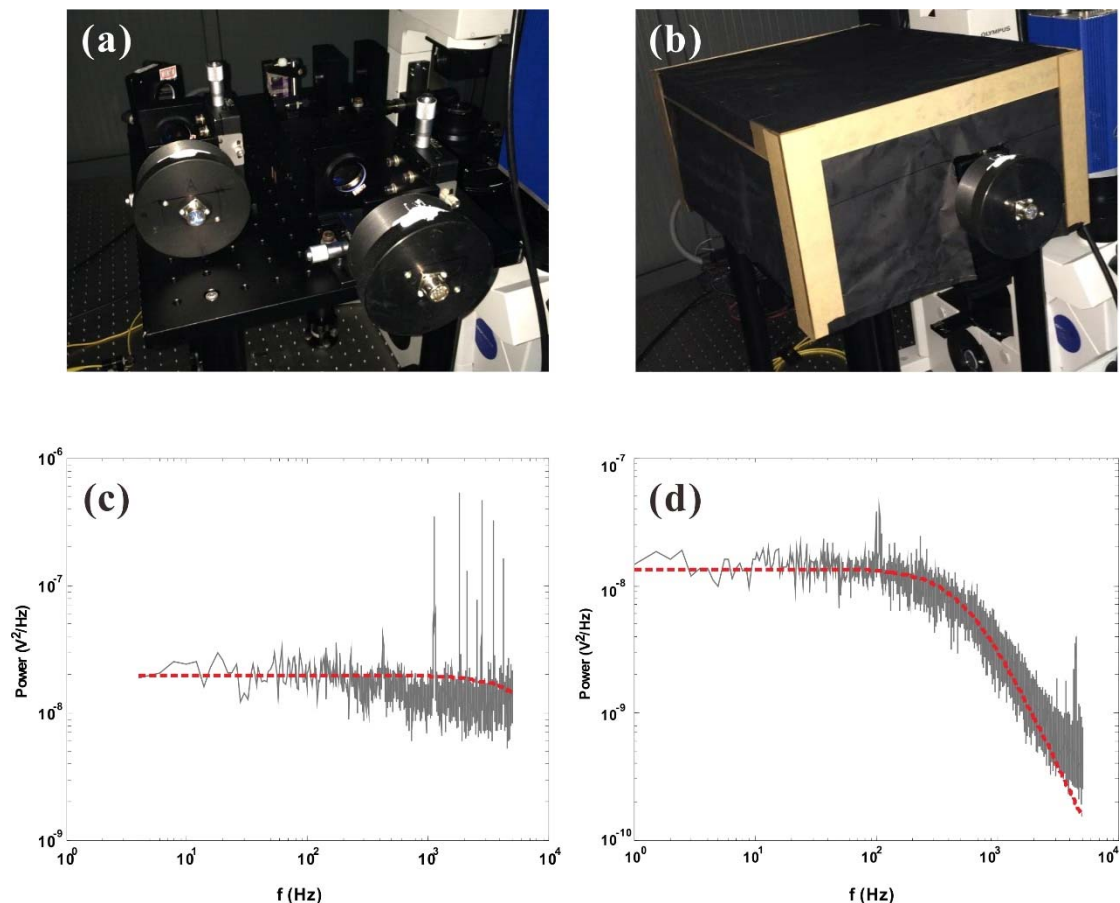


图 2-16 探测器的噪声屏蔽

(a) 未加装保护罩的探测光路的实物图；(b) 加装保护罩的探测光路的实物图；(c) 细实线为未保护罩时运动信号的功率谱密度分布曲线，虚线为功率谱密度分布曲线的洛伦兹拟合结果；(d) 细实线为加装保护罩后的运动信号的功率谱密度分布曲线，虚线为功率谱密度分布曲线的洛伦兹拟合结果。

2.4 设备主要功能以及性能指标

单分子皮牛力谱仪研制完成后，我们对系统进行了严格测试。目前，这套光镊系统的主要功能以及性能参数如下：

1. 可操控颗粒尺度为纳米至微米范围，其中俘获和操纵过的微粒包括：

- ①100nm C60 颗粒;
 - ②直径 100 nm/500 nm/1 μm /2 μm /3 μm /5 μm 聚苯乙烯微球;
 - ③微米尺度的偶氮囊泡;
 - ④~5 μm 红细胞;
 - ⑤~10 μm 干细胞;
2. 样品台操控范围可达 0~25mm, 压电载物台操控时的控制精度为 1nm。
3. 最大光阱力达纳牛级:
- ①水浸物镜 (60X, NA 1.2) :110pN (1 μm 微球), 278pN (2.16 μm 微球), 328pN (4.4 μm 微球);
 - ②油浸物镜 (100X, NA 1.4) : 67pN (1 μm 微球);
4. 光阱刚度 (激光功率 10W, 聚苯乙烯微球直径 1 μm , 离地高度 5 μm):
- ①水浸物镜 (60X, NA=1.2)
1550 pN/ μm (成像 1.0X), 713 pN/ μm (成像 1.6X)
 - ②油浸物镜 (100X, NA=1.4)
600 pN/ μm (成像 1.0X), 340 pN/ μm (成像 1.6X)
- 5.系统分辨率:
- ①静态测量: 1.1 nm;
 - ②动态测量: 1.76 nm;
 - ③采集带宽: 10 kHz;
 - ④力分辨率: 35 fN。
6. 能实现双光镊俘获并操纵两个光镊相对运动, 即一路光阱俘获颗粒不动, 另一路俘获颗粒可扫描移动, 如图 2-5 所示。
- 7.光阱扫描范围以及扫描精度为:
- ①大范围扫描 (AOD):
x/y 方向 91.5 μm , 扫描精度为 13.2 nm;
 - ②小范围扫描 (压电转镜):
x/y 方向 0.493 μm , 扫描精度: 0.012 nm。
- 8.具有良好的显微观察能力, 比如
- (a)观察直径 25nm 的微管纤维,
 - (b)荧光观察微管纤维
 - (c)观察 100nm 的 C60 颗粒, 如图 2-17 所示。

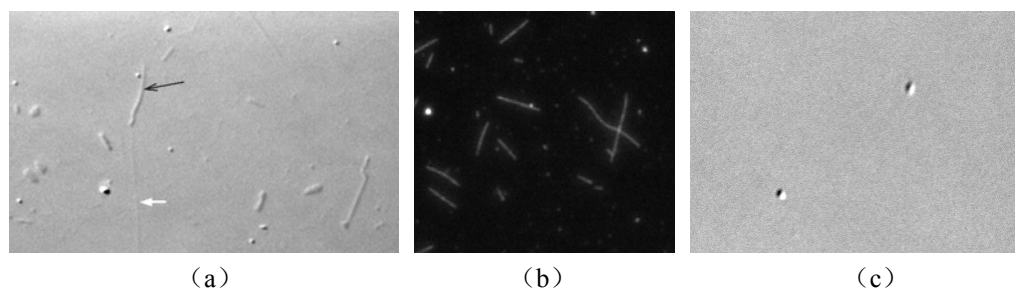


图 2-17 单分子皮牛力谱仪显微观察多种样品

(a) DIC 观察微管蛋白; (b) 荧光观察微管蛋白; (c) DIC 观察 100 nm C60 颗粒

9. 具有良好的温度调节能力:

控温范围为 6~90°C, 温度波动小于 0.5°C, 温度响应时间小于 5 分钟。

2.5 本章小结

本章针对单分子皮牛力谱仪的特点, 研究了系统中各个组件的功能和参数; 特别是光镊系统中消除噪声的方法; 给出这套系统所能实现的功能和性能参数。这些工作对高精度光镊设备的研制具有十分重要的指导作用。

高精度光镊用于实际的研究中, 需要结合实验需求标定光镊的系统参数, 在下一章将主要讨论光镊参数标定方法。

参考文献

- [1] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, IZHAKY D, et al. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(24): 9006-9011.
- [2] ABBONDANZIERI E A, GREENLEAF W J, SHAEVITZ J W, et al. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase [J]. Nature, 2005, 438(7067): 460-465.
- [3] GREENLEAF W J, BLOCK S M. Single-molecule, motion-based DNA sequencing using RNA polymerase [J]. Science, 2006, 313(5788): 801-801.
- [4] GITTES F, SCHMIDT C F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers [J]. Optics Letters, 1998, 23(1): 7-9.
- [5] ALLERSMA M W, GITTES F, DECASTRO M J, et al. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry [J]. Biophysical Journal, 1998, 74(2): 1074-1085.

- [6] PRALLE A, PRUMMER M, FLORIN E L, et al. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light [J]. *Microscopy Research and Technique*, 1999, 44(5): 378-386.
- [7] ZHONG M C, GONG L, ZHOU J H, et al. Optical trapping of red blood cells in living animals with a water immersion objective [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(23): 5134-5137.
- [8] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, SMITH S B, et al. Recent advances in optical tweezers [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77(1): 205-228.
- [9] VISSCHER K, GROSS S P, BLOCK S M. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 1996, 2(4): 1066-1076.
- [10] GHISLAIN L P, WEBB W W. Scanning-force microscope based on an optical trap [J]. *Optics Letters*, 1993, 18(19): 1678-1680.
- [11] GHISLAIN L P, SWITZ N A, WEBB W W. Measurement of small forces using an optical trap [J]. *Review of Scientific Instruments*, 1994, 65(9): 2762-2768.
- [12] SVOBODA K, SCHMIDT C F, SCHNAPP B J, et al. DIRECT OBSERVATION OF KINESIN STEPPING BY OPTICAL TRAPPING INTERFEROMETRY [J]. *Nature*, 1993, 365(6448): 721-727.
- [13] DENK W, WEBB W W. Optical measurement of picometer displacements of transparent microscopic objects [J]. *Applied Optics*, 1990, 29(16): 2382-2391.
- [14] HAJIZADEH F, MOUSAVI S M, KHAKSAR Z S, et al. Extended linear detection range for optical tweezers using image-plane detection scheme [J]. *Journal of Optics*, 2014, 16(10): 105706.
- [15] VOLPE G, KOZYREFF G, PETROV D. Backscattering position detection for photonic force microscopy [J]. *Journal of Applied Physics*, 2007, 102(8): 084701.
- [16] WANG C, WU H, CHEN Z, et al. Self-healing chemistry enables the stable operation of silicon microparticle anodes for high-energy lithium-ion batteries [J]. *Nature chemistry*, 2013, 5(12): 1042-1048.
- [17] MEHTA A D, RIEF M, SPUDICH J A, et al. Single-molecule biomechanics with optical methods [J]. *Science*, 1999, 283(5408): 1689-1695.
- [18] HELFER E, HARLEPP S, BOURDIEU L, et al. Microrheology of biopolymer-membrane complexes [J]. *Physical Review Letters*, 2000, 85(2): 457-460.
- [19] WANG Z Q, ZHOU J H, ZHONG M C, et al. Calibration of optical tweezers based on an autoregressive model [J]. *Optics Express*, 2014, 22(14): 16956-16964.
- [20] LI D, ZHOU J H, HU X Y, et al. In situ calibrating optical tweezers with sinusoidal-wave drag force method [J]. *Chinese Physics B*, 2015, 24(11): 626-632.

- [21] BUSTAMANTE C, BRYANT Z, SMITH S B. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics [J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 423-427.
- [22] XIA P, ZHOU J H, SONG X Y, et al. Aurora A orchestrates entosis by regulating a dynamic MCAK-TIP150 interaction [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2014, 6(3): 240-254.
- [23] BISHOP A I, NIEMINEN T A, HECKENBERG N R, et al. Optical microrheology using rotating laser-trapped particles [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 92(19): 198104.
- [24] WEI M T, ZAORSKI A, YALCIN H C, et al. A comparative study of living cell micromechanical properties by oscillatory optical tweezers [J]. *Optics Express*, 2008, 16(12): 8594-8603.
- [25] 李迪, 李银妹, 周金华, et al. 一种永久性液态微球样品室: 中国, ZL201420591155.2 [P]. 2015-01-07[2014-10-13].
- [26] 李迪, 李银妹, 呼新尧, et al. 实时温控微型样品室: 中国, ZL201420591122.8 [P]. 2015-02-04[2014-11-25].
- [27] 倪美琴, 陈兴华, 庄斌舵. 关注半导体制冷研究与发展 [J]. *制冷与空调 (北京)*, 2001, (1): 42-44.
- [28] SELVIN P R, HA T. *Single-molecule techniques* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

第3章 适于生物物理研究的光镊标定方法

光镊可操控微米量级的颗粒，并将其作为探针来探测拉伸单个大分子^[1]或者细胞膜^[2]时的机械响应，被光阱捕获的微球和细胞也可用于探测活体内^[3]或体外^[4]的微观变化，光镊被广泛应用于单分子生物学^[1, 5-7]，细胞生物学^[2, 3, 8, 9]，微流变学^[4]和化学^[10-12]等领域中。在这些应用中，为了定量测量各种类型的机械响应，精确地测量光镊施加在被捕获微球上光阱力就显得尤为重要，进而需要精确地标定光镊系统中的多个重要参数，比如溶液的粘滞系数，溶液的温度，光阱刚度，PSD 的“电压-位移”转换系数，压电载物台位移修正系数等参数。由于单分子皮牛力谱仪主要应用于生物物理学的研究，因此在选择参数标定方法时需要格外考虑生物物理实验的特殊性。本章将首先讨论生物物理实验对参数标定方法提出的新要求，然后对这些参数的测量原理和测量方法展开讨论，并对测量同一参数的多种常用测量方法进行比较。

3.1 生物物理学对标定方法的要求

3.1.1 生物物理实验的特点

“单分子皮牛力谱仪”的主要应用在生物物理学领域，因此设备参数的标定方法必须要满足生物物理实验要求：

首先，生物物理实验中的样品活性时间有限。生物物理实验中的样品大都是生物大分子或者细胞，在实验中需要保持其生物活性。即使采取适当的生化手段营造合适的生存环境，生物样品的活性时间一般不会超过两小时。因此，对需要在实验中实时标定的光镊参数而言，标定方法必须非常迅速以提高实验效率。

其次，光镊应用于生物物理实验时所用的微球尺寸分布较宽。光镊研究生物物理学问题时，被捕获的微球表面大都修饰有特殊化学基团，以便偶联其它生物样本。而目前市场上可买到的带有修饰的微球尺寸分布较宽，这会导致光阱捕获同一种类的不同大小微球，光镊参数差别较大。为了展示这一问题所带来的影响，我们研究了较为常用的修饰微球（表面修饰有羧基的聚苯乙烯微球，美国 Spherotech 股份有限公司，货号 CP-30-10，标称尺寸 3.0-3.4 μm ）的“电压-位移”转换系数（conversion factor/CF）。对 33 个微球的测量统计的 CF 分布如图 3-1 所示。实验结果表明微球的 CF 分布较宽，平均值和标准偏差为 $12603 \pm 4207 \text{nm/V}$ 。因此，若用此平均值作为微球的 CF，误差高达 33%。这个巨大的误差将严重影

响后续实验测量。

因此，当尺寸分布较宽的微球用于光镊实验时，就需要实时原位标定每个探针微球的光阱参数。

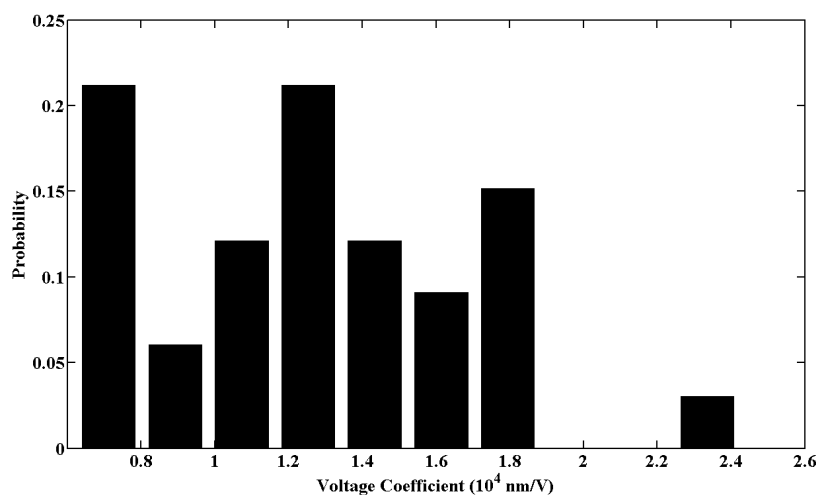


图 3-1 羧基修饰微球的“电压-位移”转换系数分布

用 SDFM 方法标定了用同一光阱捕获同种表面修饰有羧基的聚苯乙烯微球时的“电压-位移”转换系数，一共统计了 33 个微球的参数。

再次，样品溶液的粘滞系数与水有区别。光镊进行生物物理实验时，所用的溶液的溶剂大都不是水，而是带有特定化学物质的缓冲液，溶液中含有 DMSO，Casein 等导致溶液粘性增大的物质，溶液的粘滞系数要高于水。

为了说明这个问题，我们给出两种情况下的粘滞系数差别。①在研究细胞力学性质的实验中，我们所用溶液的粘滞系数为 $1.042 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ，而相同实验状态下水的粘滞系数为 $0.796 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ，二者相差 23.61%；②在研究驱动蛋白力学特性的实验中，测得的粘滞系数为 $1.064 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ，而相同实验状态下水的粘滞系数为 $0.874 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ，二者相差 17.86%。由此可见在实验中需要根据不同的实验体系重新测量溶液的粘滞系数。

最后，生物样品的个体差异性较大，需要测量多个样本，并对测量结果取平均值。这要求采集大量的实验数据，并且对实验方法的速度也提出了更高的要求。

这里我们以较为成熟的测量 DNA 分子弹性的方法作为范例，综合阐明当光镊应用于生物物理学时所面对的新问题。为了体现生物物理学实验对光镊系统的新要求，我们对同一种 ds-DNA 分子进行多次反复拉伸，并测量数据重现性。这里实验展示用平均光阱参数处理数据所带来的问题，进而说明实时标定每个探针微球的光阱参数的必要性。

3.1.2 光镊测量双链 DNA 分子的持续长度

3.1.2.1 双链 DNA 分子结构特性

DNA 分子是染色体的重要组成部分,也是主要的遗传物质。用光镊研究 DNA 分子是光镊近年来在生物物理学方面的重要应用之一^[1]。目前,人们已经利用光镊对单/双链 DNA 分子的结构特性进行了深入的研究,并给出了 DNA 分子的弹性模型。对双链 DNA (double-stranded DNA, ds-DNA) 分子而言,低张力区段 (DNA 两端张力小于 20pN) 的弹性曲线满足蠕虫链模型^[13],可用 Marko-Siggia 表达式来描述^[14]

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1-x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right] \quad (3.1)$$

其中 F 是 ds-DNA 分子两端的张力, x 是 ds-DNA 分子两端的距离, L_p 是 ds-DNA 分子的持续长度, L_0 是 ds-DNA 分子的轮廓长度, k_B 是玻尔兹曼常数, T 是周围环境的绝对温度。由于 ds-DNA 分子的结构参数稳定,因此 ds-DNA 分子常作为标准样品以标度和校准设备,比如用于标定光阱参数^[15, 16]。

图 3-2 为典型的 DNA 分子拉伸曲线,图中点为实验测量结果, dsDNA 旁的实线即为 DNA 双链分子的蠕虫链模型的理论曲线。可见在拉力小于 20 pN 时实验数据与理论数据吻合较好。而当两端张力达到 65 pN 时, ds-DNA 分子的“力-伸长”曲线严重偏离理论曲线,逐渐接近单链 DNA 分子的弹性曲线。这是 DNA 分子发生结构相变导致的,即 ds-DNA 分子在 65 pN 张力作用下逐渐从双链分子转变为单链分子。

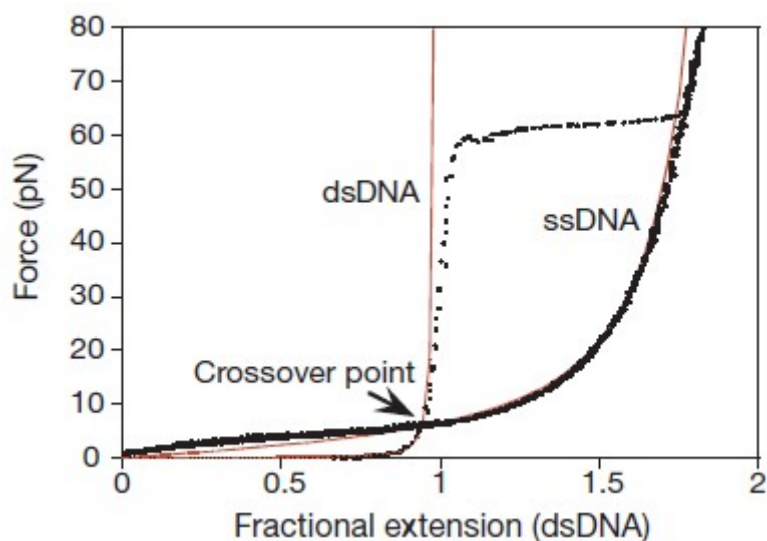


图 3-2 单/双链 DNA 分子的“力-伸长”曲线^[17]

图中黑色的点为实验测量结果, dsDNA 旁的红色实线即为 DNA 双链分子的蠕虫链模型的

理论曲线。ssDNA 旁的红色实线为 DNA 单链分子的蠕虫链模型的理论曲线。

3.1.2.2 光镊拉伸双链 DNA 分子的实验方法

用光镊测量 DNA 分子结构参数的方法有两种，如图 3-3 所示。第一种是用光镊捕获直径较小的微球 B 作为探针测量被拉伸的 ds-DNA 分子的受力，直径较大的微球 A 用多聚赖氨酸 (Poly-l-lysine) 固定在盖玻片的表面。当用压电载物台驱动样品室运动而光阱保持静止时，即可实现对 ds-DNA 分子的拉伸。第二种是方法是用双光镊捕获 DNA 分子两端的微球，然后操纵其中一个光阱相对另外一个光阱运动实现 ds-DNA 分子的拉伸。

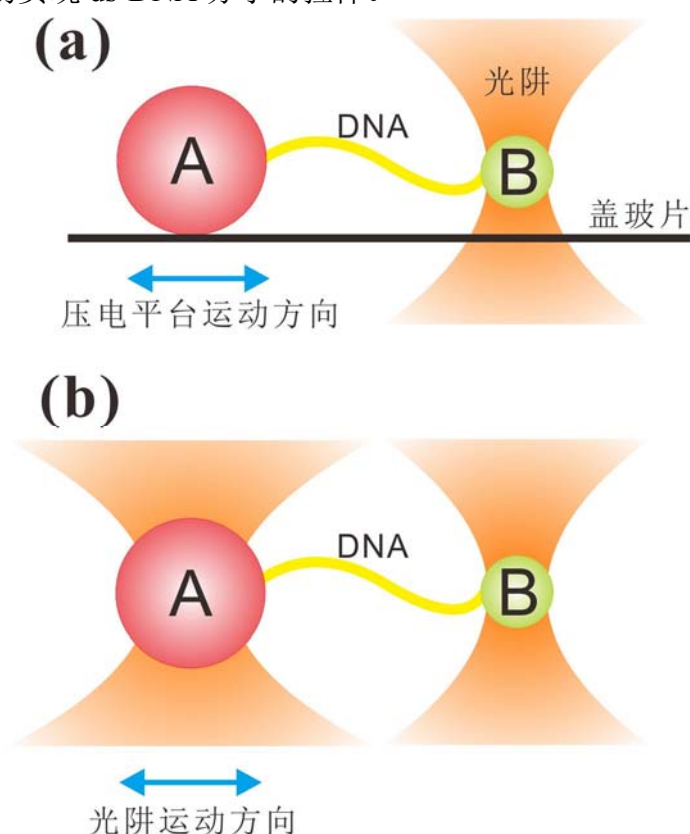


图 3-3 光镊拉伸 DNA 实验示意图

(a) 用光镊捕获直径较小的微球 B 作为探针测量被拉伸的 ds-DNA 分子的受力，直径较大的微球 A 用多聚赖氨酸 (Poly-l-lysine) 固定在盖玻片的表面。当用压电载物台驱动样品室运动而光阱保持静止时，即可实现对 ds-DNA 分子的拉伸；(b) 用双光镊捕获 DNA 分子两端的微球，然后操纵其中一个光阱相对另外一个光阱运动实现 ds-DNA 分子的拉伸

在拉伸的过程中，微球 B 所受光阱力的大小与 DNA 分子两端张力的大小一致。DNA 分子的长度可通过 CCD 图像上 A、B 两球的位置间距减去两球半径计算得到。图 3-4 (a) 为双光镊拉伸 DNA 分子的实验录像截图。图 3-4 (b) 为相应的“力-伸长”曲线，其中空心数据点为拉伸过程中的数据点，可明显的看到

ds-DNA 分子的相变过程。

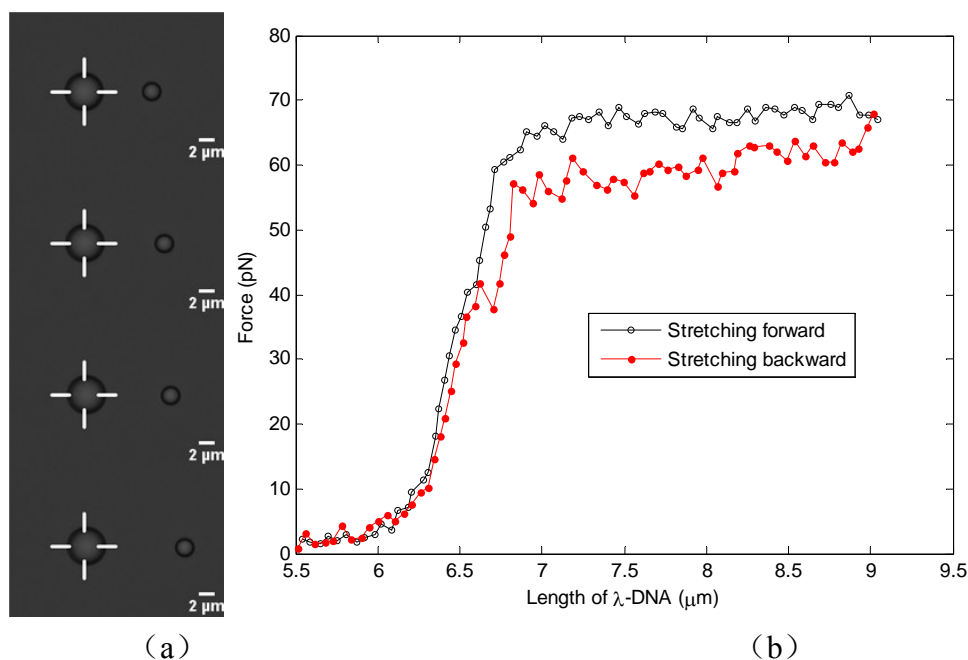


图 3-4 DNA 拉伸数据以及相应的实验录像

(a) 为双光镊拉伸 DNA 分子的实验录像截图；(b) 为相应的“力-伸长”曲线，空心数据点以及黑色实线为拉伸过程中的数据，可明显的看到 ds-DNA 分子的相变过程。

3.1.2.3 双链 DNA 分子的持续长度的测量结果

为了更加直接的展示生物物理实验的新要求，我们根据 3.1.2.2 所述的实验方法测量了长度为 1700 碱基对 (Base-Pair, BP) 的 ds-DNA 分子的持续长度。

图 3-3 (b) 为实验过程示意图，实验用缓冲溶液为 PBS 缓冲液 (钠离子浓度为 16mM)。ds-DNA 的两端用特异性偶联的方式被固定在两个不同直径的微球上。直径较大的微球 A (表面修饰有链霉亲合素的聚苯乙烯微球, 美国 Spherotech 股份有限公司, 货号 SVP-40-5, 标称尺寸 4.0-4.9 μm) 与 ds-DNA 分子修饰有生物素的那一端相连接; 直径较小的微球 B 为表面修饰有羧基的聚苯乙烯微球 (美国 Spherotech 股份有限公司, 货号 CP-30-10, 标称尺寸 3.0-3.4 μm)，我们在微球表面偶联上地高辛抗体，然后通过“地高辛-地高辛抗体”的方式偶联在 ds-DNA 分子的另一端。

在 ds-DNA 分子的两端与微球连接后，用压电载物台驱动固定在样品室底面的微球 A 以 150nm/s 的速度背向光阱运动，PSD 以 1 kHz 的采样频率测量被捕获微球 B 的运动信号。此时，ds-DNA 分子所受到的张力以及两端距离的变化可由下式求得

$$\begin{cases} F_{DNA} = x_B(t) \cdot k_B = \beta_B \cdot V_B(t) \cdot k_B, \\ l_{DNA} = v_A \cdot t - \beta_B \cdot V_B(t) + l_0 \end{cases}, \quad (3.2)$$

其中 F_{DNA} 为 ds-DNA 分子两端的张力, $x_B(t)$ 是微球 B 偏离光阱中心的位移, k_B 是微球 B 的光阱刚度, β_B 是微球 B 的“电压-位移”转换系数, $V_B(t)$ 是 PSD 记录的微球 B 偏离光阱中心的位移的电信号, l_{DNA} 是 ds-DNA 分子两端的距离, v_A 是微球 A 的运动速度, t 是拉伸时间, l_0 是开始拉伸时 ds-DNA 分子两端的距离。

由(3.2)式可求得 ds-DNA 分子的“ F_{DNA} - l_{DNA} ”对应关系, 既“力-伸长”曲线 (Force-extension curve)。然后用方程(3.1)对测得的“力-伸长”曲线进行拟合既可求得相应 ds-DNA 分子的结构参数。

实验中用 7 个不同的微球 B 测量了 7 个 ds-DNA 分子的数据, 并且每个微球 B 的光阱参数 (光阱刚度和 CF) 都进行了单独的标定。对测得的 7 个 PSD 信号采取了两种数据处理方式。第一种, 将 7 个电信号带入方程(3.2)中求得 7 个 ds-DNA 分子的“力-伸长”曲线, 方程(3.2)中的光阱参数统一用的是 7 个微球 B 的平均值; 第二种, 将 7 个微球 B 的光阱参数以及各自的信号分别代入方程(3.2)中, 求得相应的“力-伸长”曲线。这两种处理方式分别如图 3-5 的图 (a) 和 (b)。然后, 分别将右半图的“力-伸长”曲线带入方程(3.1)求出相应的 ds-DNA 分子结构参数, 再将结构参数的平均值带回蠕虫链模型中, 最终得到图 3-5 的左、右两图中虚线所示的蠕虫链理论模型曲线。

从图 3-5 所给的数据曲线中明显可看出, 图 (a) 中用平均光阱参数计算出的“力-伸长”曲线个体差异大, 并且大都偏离蠕虫链模型的理论曲线; 而图 (b) 中用各个微球单独标定的光阱参数得到的“力-伸长”曲线的重复性很好, 并且与理论曲线基本重合。

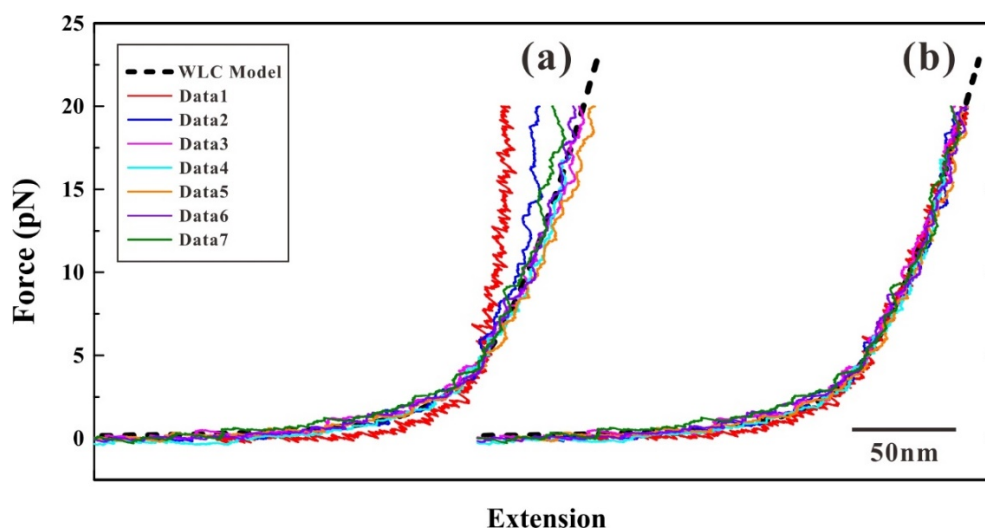


图 3-5 双链 DNA 分子的单分子“力-伸长”曲线

左侧图中的彩色实线为平均光阱参数计算出的“力-伸长”曲线。右侧图中的彩色实线为各自参数计算出的“力-伸长”曲线。两图中的黑色虚线为 DNA 分子蠕虫链模型的理论曲线。

为了进一步分析产生这一现象的原因，我们对图 3-5 中的数据进行深入分析，对比了多种数据处理方法求得的 ds-DNA 分子的持续长度。

首先，将图 3-5 中 7 个的 ds-DNA 分子的 PSD 原始数据带入方程(3.2)中，求出相应的“力-伸长”曲线。方程(3.2)中的光阱参数分别用如下四种情况：

- A. 光阱刚度和 CF 采用各个信号所对应微球的各自参数；
- B. 光阱刚度采用 7 个微球的平均值，而 CF 采用各个微球的各自参数；
- C. 光阱刚度采用各个微球的各自参数，而 CF 采用 7 个微球的平均值；
- D. 光阱刚度和 CF 都采用 7 个微球的平均值。

然后，将求得的“力-伸长”曲线带入方程(3.1)求出相应的 ds-DNA 持续长度。计算结果如表 3-1 所示。

表 3-1 的 A 种处理方法对应图 3-5 中 (b) 图的数据，计算出的 ds-DNA 分子的持续长度与前人的测量的结果最为相近(持续长度主要受到溶液中钠离子浓度的影响，当缓冲液中含有钠离子的物质为 10 mM NaHPO₄ 时，pH=7.0，持续长度为 47.4 ± 1.0 nm^[14]；当缓冲液中含有钠离子的物质为 20 mM NaCl 时，持续长度为 46 ± 5 nm^[18])，并且标准偏差也最小。但是对 D 情况而言，图 3-5 中 (a) 图的数据，实验测得的持续长度极不可信，标准偏差也非常大。通过分别对比 A 情况和 B 情况，以及 A 情况和 C 情况，发现 CF 的准确性对实验结果的准确性产生了更大的影响，这是由于 CF 影响的是 DNA 分子长度，而光阱刚度影响的是 DNA 受力，所以 CF 对持续长度影响更大。

表 3-1 双链 DNA 分子的持续长度

编号	光阱参数选取方法		持续长度 (nm)
	光阱刚度	“电压-位移”转换系数	
A	微球各自值	微球各自值	47.0 ± 8.4
B	平均值	微球各自值	44.4 ± 12.4
C	微球各自值	平均值	55.8 ± 37.3
D	平均值	平均值	57.0 ± 35.2

经过上述分析可知，用平均光阱参数进行实验会导致“力-伸长”曲线的重复性极差(如图 3-5 所示)，导致双链 DNA 分子的持续长度测量不准确(如表 3-1 所示)。因此，数据处理时由于微球尺寸偏差导致的实验误差将严重影响数据的稳定性和重复性，在实际工作中需要对所有被捕获微球逐一进行光阱参数的标定。

又由于生物样品的活性时间有限(约两个小时),故标定微球的光阱刚度和 CF 时需非常迅速。

综上所述,光镊研究生物物理学问题时所面临的问题主要包括:样品活性时间有限;被捕获微球的粒径不均一造成光阱参数分布较宽;溶液粘滞系数需要测量,采集数据量大和光镊参数标定速度加快等。这就对光镊技术本身,特别是在光镊参数标定方法上提出了更高的要求。下面我们将逐一讨论单分子皮牛力谱仪用于生物物理研究时所需要标定的参数,给出相应的标定方法。对一种参数有多重标定方法的情况,我们将对比各方法间的优劣,以及给出所适合的生物物理学研究的实验方法。

3.2 压电载物台运动修正系数

在前文 1.2.1 节和 2.2.6 节我们已经描述了压电载物台在光镊中的重要应用,在长时间的使用过程中,我们发现即使厂家已经校准过的压电载物台的运动精度依然会随使用时间增加而降低,即压电载物台的实际运动幅度与设定值有偏差。我们还发现压电载物台带动样品室中的溶液进行正弦振动时,光阱附近的流场特性受到压电载物台和样品室之间的机械耦合性能以及样品室内液体层流等因素的影响。因此,我们提出了“压电载物台运动修正系数”来综合描述压电载物台驱动样品室运动时所产生的流场与压电载物台设定振幅之间的关系。“压电载物台运动修正系数”是。

目前现有的压电载物台校准方法有两种,一种是生产厂家常用的光栅校准方法,这种方法设备结构复杂,不适合于光镊实验;另一种方法是用相机拍摄固定在样品室底面的微球的运动来追踪压电载物台的运动,由于普通相机拍摄频率较低,因此追踪微球的运动录像的方法很难应用于 >10 Hz 频率的压电载物台运动追踪,此外,粘底微球也难以描述样品室内液体层流等因素对光阱附近流场的影响。本节研究了光镊实验中两种新的压电载物台校准方法,实际测量了压电载物台的运动特性。

3.2.1 功率谱密度法校准压电载物台

功率谱密度法校准压电载物台是借助被捕获的微球对周围流场产生的响应测量压电载物台的运动情况。我们将微球作为一个传感器来探测光阱附近的流场情况,求得相应条件下的“压电载物台运动修正系数”,具体标定原理如下:

当压电载物台驱动样品室做正弦振动时,压电载物台的位移随时间的变化为

$$A(t) = A_{PZT} \sin(2\pi f_d t), \quad (3.3)$$

其中 A_{PZT} 为压电载物台振动振幅, f_d 为压电载物台振动频率。样品室中溶液相对静止光阱的运动速度可描述为

$$V(t) = 2\pi f_d \alpha A_{PZT} \cos(2\pi f_d t), \quad (3.4)$$

其中 α 即为“压电载物台运动修正系数”, 此参数物理意义为样品溶液正弦运动振幅与压电载物台振幅设定值之间的比值。若压电载物台的运动幅度与设定值完全吻合, 压电载物台和样品室也完全耦合在一起, 样品室内液体无层流, 则有 $\alpha=1$ 。被捕获微球在正弦流场中的运动可描述为

$$S(t) = A_{bead} \cos(2\pi f_d t + \varphi) \quad (3.5)$$

其中 A_{bead} 为微球的振动振幅, φ 为微球相对正弦流场的相位延迟因子^[19]。流体的粘滞阻力 $3\pi\eta dV(t)$ 将与光阱的回复力 $\kappa S(t)$ 保持平衡, 其中 η 为动态粘度, d 为微球直径, κ 为光阱刚度。

当微球很小时, 微球处于过阻尼的运动中, (3.5)式中的相位延迟因子可被忽略, 修正系数 α 可近似为

$$\alpha = \kappa A_{bead} / (12\pi^2 \eta d f_d A_{PZT}). \quad (3.6)$$

当用刚度已知的小尺寸微球并且忽略震荡频率对流体动力学的修正时, 这个方程可方便地标定出修正系数 α 。

为了更加精确的标定修正系数 α , 可用带有有流体动力学修正的功率谱密度分析的方法^[20-22]。对离地高度为 h 的被捕获微球, 其位移的功率谱密度由微球热运动和微球对外流场的响应两部分组成

$$P(f, k_h) = P_{therm}(f, k_h) + P_{response}(f, k_h), \quad (3.7)$$

其中 $k_h = d/h$ 为离底高度与微球直径的比例。

在单边功率谱密度的理论中^[21, 22], 微球热运动的功率谱为

$$P_{therm}(f, k_h) = \frac{D_0 \operatorname{Re}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0)}{\pi^2 \{ [f_{c,0} + f \operatorname{Im}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0) - f^2 / f_{m,0}]^2 + [f \operatorname{Re}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0)]^2 \}}, \quad (3.8)$$

微球对外流场的响应部分的功率谱为

$$P_{response}(f, k_h) = \frac{(A f_d |\gamma(f, k_h) / \gamma_0|)^2 \delta(f - f_d)}{2 \{ [f_{c,0} + f \operatorname{Im}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0) - f^2 / f_{m,0}]^2 + [f \operatorname{Re}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0)]^2 \}}, \quad (3.9)$$

其中, $D_0 = k_B T / \gamma_0$, k_B 为玻尔兹曼常数, $\gamma_0 = 3\pi d \eta$, η 为温度 T 时的粘滞系数,

$f_{c,0} = \kappa / (2\pi\gamma_0)$, $f_{m,0} = \gamma_0 / (2\pi m)$, m 为被捕获微球质量。摩擦力系数比率 $\gamma(f, k_h) / \gamma_0$ 在频域包括一个实数部分

$$\text{Re}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0) = 1 + \sqrt{\frac{f}{f_v}} - \frac{3k_h}{32} + \frac{3k_h}{8} \exp\left(-\frac{4}{k_h} \sqrt{\frac{f}{f_v}}\right) \cos\left(\frac{4}{k_h} \sqrt{\frac{f}{f_v}}\right) \quad (3.10)$$

和虚数部分

$$\text{Im}(\gamma(f, k_h) / \gamma_0) = -\sqrt{\frac{f}{f_v}} + \frac{3k_h}{8} \exp\left(-\frac{4}{k_h} \sqrt{\frac{f}{f_v}}\right) \sin\left(\frac{4}{k_h} \sqrt{\frac{f}{f_v}}\right) \quad (3.11)$$

其中 $f_v = 4\eta / (\rho\pi d^2)$, ρ 是被捕获微球的密度。

实验中, 我们用压电载物台驱动样品室做正弦振动, 然后用 PSD 记录被捕获微球的位移信号, 被捕获微球的功率谱密度可写为

$$P(f) = \beta^2 P^D(f), \quad (3.12)$$

其中 $P^D(f)$ 是 PSD 的电信号的功率谱密度。电压信号的扩散系数 D_0^D 和转角频率

$f_{c,0}$ 可通过方程(3.8)拟合得到。“电压-位移”转换系数 β 可通过 $\beta = D_0 / D_0^D$ 求得。

最终, 即可求出修正系数 α 为

$$\alpha = \beta \frac{\sqrt{2w_{ex} [(f_{c,0} / f_d + \text{Im}(\gamma(f_d, k_h) / \gamma_0) - f_d / f_{m,0})^2 + \text{Re}^2(\gamma(f_d, k_h) / \gamma_0)]}}{A_{PZF} |\gamma(f_d, k_h) / \gamma_0|} \quad (3.13)$$

其中功率谱信号由于正弦振动产生的信号尖峰(如图 3-7 (b) 所示)的高度 w_{ex}

在特定的振动频率 f_d 时的大小为 $w_{ex} = [P^D(f_d) - P_{therm}^D(f_d)] \Delta f$ 。

3.2.2 光散射法标定压电载物台

第二种可标定压电载物台的方法为光散射的方法。实验中, 我们用直径较小的聚苯乙烯微球作为探针探测压电载物台运动情况。之所以选择直径较小的微球, 是由于所选取微球的直径越小, 压电载物台的最小振幅就越小, 可标定的振幅范围就越大。这里我们用直径 500nm 的聚苯乙烯微球(直径: $491 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, 货号: 3495A, 美国 Thermo 公司)进行实验, 此时压电载物台的最小振幅为 $3 \mu\text{m}$ 。下面详细描述实验标定和数据处理方法。

首先用光镊捕获两个微球并操纵其接触玻片底面 5 秒钟, 使得微球固定在玻片表面, 两微球的连线要与压电载物台运动方向平行。为提高微球粘底的效率, 可在微球悬浮液中加入少量的盐。

然后, 操纵压电载物台使得两个微区在显微镜中成像清晰, 使光镊的激光汇

聚点处于两个微球之间的连线上。

最后，压电载物台设定所需的频率和振幅进行正弦振动，当颗粒经过光束中心时 PSD 上会出现散射光的尖峰，记录 PSD 得到的光强信号即可。

实验中，设置压电载物台的振动幅度足够大，使得两个微球都可扫过光阱中心，在压电载物台的一个振动周期内可观察到四次由于激光扫过微球导致 PSD 光强信号的改变。

图 3-6 为压电载物台振动时 PSD 探测到的典型运动信号。压电载物台以 25Hz 的频率沿 x 方向正弦振动。假设盖玻片的实际运动振幅为 A ，在 $t=0$ 时刻光镊的激光汇聚点在图 3-6 插图最左端（这个点定义为横坐标原点），则激光汇聚点与原点的间距随时间的变化为 $S(t) = A - A\cos(2\pi f_d t)$ 。

激光汇聚点从原点开始第一次经过左球中心并产生 1 号峰所需的时间正好等于两个相邻的 1 号峰间的时间间隔的一半，将这个时间记为 t_1 。类似的，我们也可求出激光汇聚点从原点开始第一次经过右球中心并产生 2 号峰所需时间为 t_2 。两个微球球心之间的距离 S_{12} 可直接从 CCD 图像上求得。这样即可通过方程 $A = S_{12} / [\cos(2\pi f_d t_1) - \cos(2\pi f_d t_2)]$ 计算出盖玻片的实际振幅。

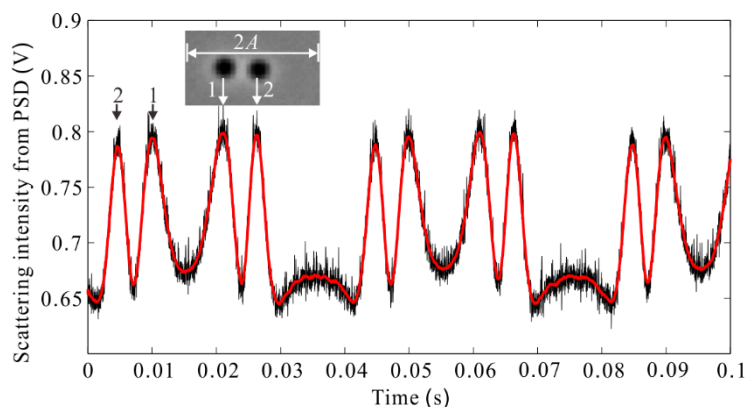


图 3-6 光散射方法标定压电载物台修正系数 α

将 500 nm 颗粒用光阱捕获后沿 x 方向排列固定在盖玻片表面，通过压电载物台振动带动粘底颗粒扫过固定位置光束，当颗粒过光束中心时会出现散射光的尖峰。插图中颗粒对应的尖峰见箭头所示。实验中的设定振幅 A 为 3 μm ，压电载物台振动频率为测量 25 Hz。黑色实线的数据为 PSD 使用 50 kHz 频率采集到的信号，红色实线为原始数据平滑滤波（滤波窗口为 0.001 秒）后的结果。

功率谱方法能够标定出样品溶液的流动速度变化情况，但无法测量样品室底面的运动情况；而光散射的方法正好相反，只能给出样品室底面的运动情况，无法给出样品溶液的流动速度。因此，在研究压电载物台运动特性时需要结合这两

种方法分析影响压电载物台运动精度的各个因素,比如压电载物台的实际运动幅度与设定值的偏差,压电载物台和样品室之间的机械耦合不理想以及样品室内液体存在层流等。下面我们将结合这两种方法测量压电载物台运动精度并给出实验结果,然后分析不同因素对压电载物台运动精确的影响。

3.2.3 实验结果

3.2.3.1 功率谱密度分析方法的实验结果

首先用功率谱密度分析的方法测量压电载物台运动修正系数。这里用 2.2.7.1 节中的单分子样品室进行实验,样品室内部腔体长 22 mm,宽 5 mm。将长边方向定义为 x 方向,短边方向定义为 y 方向。

实验中,对激光进行衰减以避免焦点区域的激光热效应,衰减后的激光照射进溶液的功率为 33 mW,从而可忽略激光照射样品引起的温升^[23],溶液的粘滞系数可用水在室温下的粘滞系数 $\eta=0.911\times 10^{-3}$ Ns/m²。设置压电载物台驱动样品室做频率为 10 Hz、振幅为 $A_{PZT}=0.5$ μm 正弦振动,PSD 以 10 kHz 的采样频率记录被捕获微球的运动信号,每个信号采集 40 秒。样品微球直径为 2 μm (货号以及直径: #4202A, 1.999 ± 0.020 μm , 美国 Thermo scientific 公司),离底高度 $h=30$ μm 。图 3-7 (a) 中的灰色实线为 PSD 记录的 1 秒钟内的微球运动信号,黑色实线为原始信号平滑滤波(滤波窗口为 0.004 秒)后的数据,红色曲线为黑色实线滤波后数据使用(3.5)式拟合的结果。针对 PSD 采集的 40 秒的电压信号,拟合得到的 PSD 信号振幅为 $A_{PSD}=5.563\times 10^{-3}$ V。

将 PSD 采集到的微球运动信号进行傅里叶变换得到图 3-7 (b) 中的黑色曲线。然后用方程(3.8)对傅里叶变换后的黑色曲线进行拟合(拟合时舍去功率谱中的尖峰部分以及 3 kHz 以外的带有高频噪声的信号),拟合结果如图 3-7 (b) 中的红色曲线。由拟合结果可计算出图 3-7 的实验数据所对应光阱刚度为 14.7 pN/ μm ,转角频率 $f_{c,0}$ 为 136.2 Hz,“电压-位移”转换系数 β 为 5494.8 nm/V。根据(3.6)式可求得忽略流体动力学修正时的修正系数 $\alpha=0.833$,与用(3.13)式求得的修正系数 α 一致。这是由于在这个实验条件下 $k_h=1/15$,粒子和玻片之间的流体动力学相互作用可被忽略,因此两种方法求得的修正系数 α 一致。

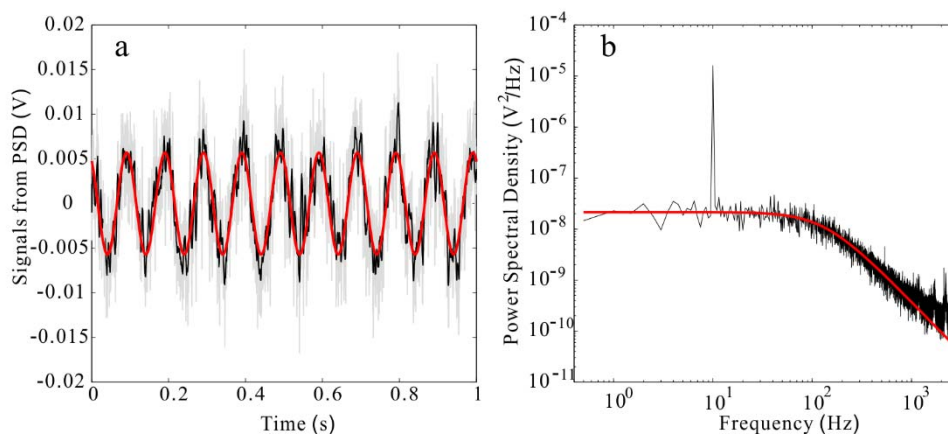


图 3-7 压电载物台正弦振动时被捕获微球的运动信号以及功率谱密度

(a) 压电载物台正弦振动时被捕获微球的运动信号，灰色实线为 PSD 信号的原始数据，黑色实线为原始信号平滑滤波（滤波窗口为 0.004 秒）后的数据，红色曲线为滤波后数据正弦拟合后的结果；(b) 压电载物台正弦振动时被捕获微球的运动信号的功率谱密度，黑色实线为微球 40 秒运动信号对应的功率谱密度，红色实线为对功率谱密度进行洛伦兹拟合的结果。

在这组实验中，修正系数 $\alpha < 1$ 说明被捕获微球周围的流场与压电载物台运动的设定值不一致，可能是由多个原因造成的，比如压电载物台的实际运动幅度与设定值有偏差，压电载物台和样品室之间的机械耦合不理想以及样品室内液体存在层流等。下面我们将逐一分析这些问题的可能性。

首先，分析压电载物台振动频率以及样品室与压电载物台的耦合程度对修正系数 α 的影响。我们测量了固定样品室（用双面胶将样品室固定在压电载物台上，并用载物台上的夹子夹紧）和不固定样品室（直接将样品室放置在载物台上，不做任何固定）两种情况下修正系数 α 在不同振动频率（2.5 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 25 Hz 和 50 Hz）下的变化趋势。在不同条件下，压电载物台的设定振幅统一选为 0.5 μm ，微球距离底面 30 μm 。为了提高计算精度，这里只用(3.13)式计算修正系数 α 。

实验结果如图 3-8 所示。压电载物台沿着 x 方向（样品室内部腔体的长边方向）运动时（图 3-8 (a)），固定的样品室和不固定样品室两种情况下的修正系数 α 非常相近。在振动频率低于 10 Hz 时，随着振动频率的增加 α_x 缓慢的减小。当振动频率为 10 Hz 时，固定样品室情况下的 α_x 为 0.842 ± 0.002 (平均值 \pm 标准偏差)，不固定样品室情况下的 α_x 为 0.837 ± 0.012 。如果根据压电载物台振幅的设定值计算样品溶液的流动速度会产生高达 16% 的误差。当压电载物台进行高频振荡时（振动频率 > 10 Hz）， α_x 随着振动频率的增加而迅速下降。特别是用 50 Hz

振动时, α_x 分别为 0.534 ± 0.003 (固定样品室的情况) 和 0.534 ± 0.002 (不固定样品室的情况), 如果忽略修正系数 α , 会导致实际流场速度被高估~2 倍。这个误差将严重影响后续的基于压电载物台运动振幅的计算和校准。

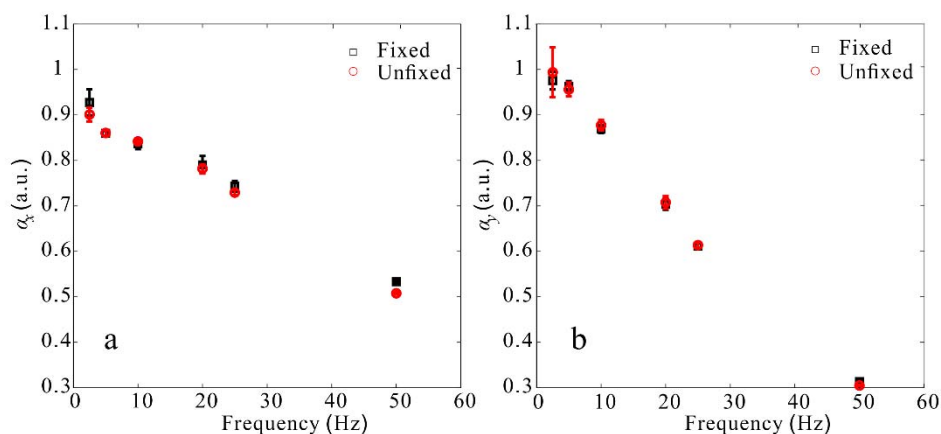


图 3-8 修正系数 α 随压电载物台振动频率的变化关系。

黑色的数据点代表样品室固定在压电载物台上的情况, 红色为样品室不固定的情况。(a) 压电载物台沿 x 方向 (样品室内部腔体的长边方向) 运动时的响应, (b) 沿 y 方向的响应。从 (a) 和 (b) 说明耦合比随着振动频率增大而迅速降低, 尤其是 y 方向。

此外, 综合 x 方向和 y 方向的实验数据可发现, 在固定和不固定样品室两种情况下, 修正系数 α 差别不大, 这说明样品室与压电载物台之间的机械耦合良好。即使是直接将样品室放置在压电载物台载物槽中不做任何固定措施, 样品室与压电载物台之间的摩擦力也能保证两者间良好的机械传动。

然后, 关于样品室内部溶液的层流是否会对修正系数 α 产生影响。当压电载物台正弦运动时, 样品室和样品室内的不可压缩的溶液会在压电载物台驱动下作正弦运动, 溶液的运动将会形成一个相对被捕获微球正弦变化的流场。根据边界条件, 样品室内不同区域的溶液的流动速度与该区域距离样品室盖玻片的距离有关^[21]。因此, 我们实验测量了样品室不同离底高度下的修正系数 α 。

实验中, 设置压电载物台驱动样品室正弦振动, 振幅 $0.5 \mu\text{m}$, 被捕获微球距离底面的高度分别为 $10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ 和 $30 \mu\text{m}$, 实验结果如图 3-9 所示。当压电载物台沿着 x 方向运动时(图 3-9 (a)), 在三个深度测得的修正系数 α 是相似的, 这说明样品室中流体的流动速度并不取决于距离底面的深度。由于这三个实验的并不是在同一个样品室中完成的, 考虑到样品室的样品腔在压电运动方向上是用凡士林进行封闭, 其差异可能会引起不同实验的误差, 进而导致三个深度测得的修正系数 α 不完全重合。但值得注意的是, 在 y 方向(图 3-9 (b))在三个深度的修

正系数 α 非常一致, 这说明用恰当的封闭方式时, 压电载物台修正系数 α 与所用的样品室无关也与样品室内的层流无关。

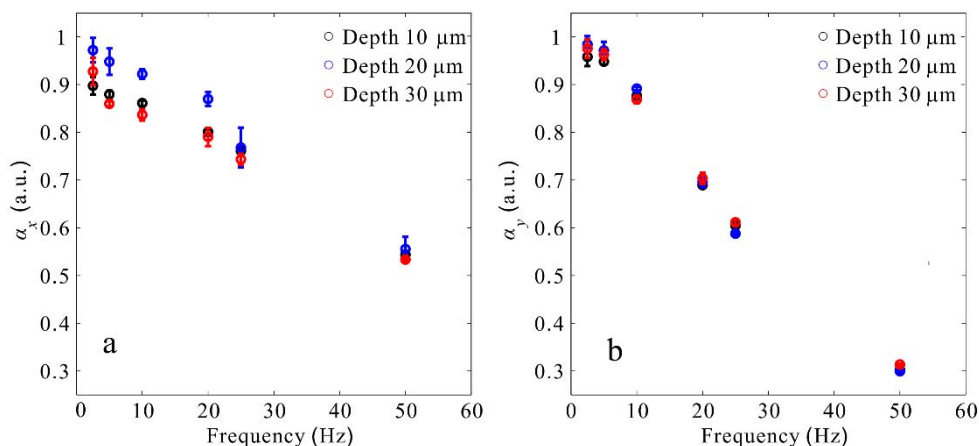


图 3-9 不同俘获深度处采用光镊测量压电载物台的修正系数 α

(a) 压电载物台沿 x 方向运动; (b) 压电载物台沿 y 方向运动。图中黑色, 蓝色和红色数据点分别为捕获深度 $10\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$ 和 $30\ \mu\text{m}$ 时的实验结果。

3.2.3.2 光散射方法的实验结果

为了进一步验证功率谱密度分析的方法得到的实验结论, 证明样品室的封闭方式会直接影响压电载物台运动精度, 我们用光散射的方法, 测量了不同压电载物台振动频率下的修正系数 α 变化情况。实验两个沿着 x 方向排列的微球间距离 S_{12} 为 $963\ \text{nm}$, 两个沿着 y 方向排列的微球间距为 $1009\ \text{nm}$ 。在这两种情况下压电载物台设定振幅为 $A_{PZT}=3\ \mu\text{m}$ 。

实验结果如图 3-10 所示。 x 方向的修正系数 α (圆圈) 随着压电载物台振动频率的增加而减小, 而在 y 方向上, 修正系数 α (方框) 随着振动频率的增加而迅速减小。随着振动频率的增加, y 方向的修正系数 α 要远小于 x 方向的修正系数 α 。两个方向的实验结果中, 当压电载物台振动频率较高时, 盖玻片的运动幅度都远小于压电载物台运动幅度的设定值。由于两个微球都是固定在盖玻片上的, 而盖玻片是固定在压电载物台上 (前面已经证明了固定的牢固性), 因此用这种方法测得的修正系数 α 可被认为是压电载物台综合动态响应 (包含压电致动器, 传感器反馈能力和压电载物台内部机械耦合等) 的表现。

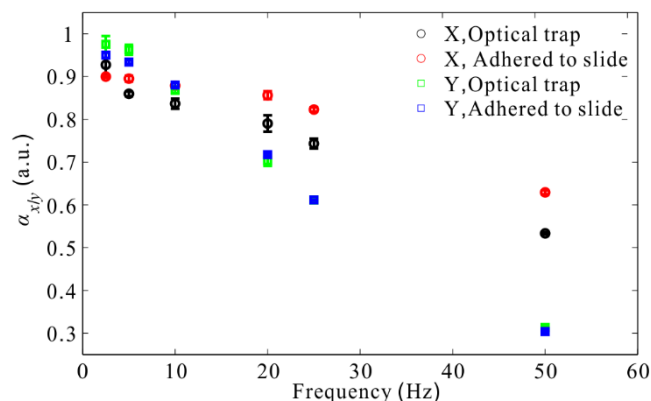


图 3-10 光镊和光散射测量修正系数 α 随振动频率的关系

光阱测量（黑色和绿色）和光散射测量结果（红色和蓝色）： y 方向结果重合非常好，此方向与样品室流道方向垂直，流道两侧为封口膜固化封闭； x 方向结果有一定偏差，主要原因为流道两端采用凡士林封闭，软的凡士林导致样品室变形。

通过对比图 3-10 中光散射方法和光镊方法得到的实验数据，当压电载物台振动频率较高时，用光散射方法测得的 x 方向修正系数 α 相对更大，并且随着频率的升高，两种方法的测量结果相差越来越大。当振动频率是 50Hz 时，光散射方法测得的修正系数 α 是 0.63，但是功率谱分析方法的测量结果是 0.53。这说明 x 方向的修正系数 α 很可能不仅仅跟压电品台自身运动特性有关，还与样品室的结构特点有关系。在 x 方向上，样品室用了软的凡士林进行封闭以防止溶液挥发和泄露，这会导致压电载物台 x 方向上振动时样品室两端的形变。而这个形变应为导致两种方法测得的 x 方向修正系数 α 不相同的原因。而在 y 方向上样品室用形变较小的封口膜封闭的，因此两种方法测得的 y 方向修正系数 α 应比较接近，图 3-10 中的实验结果也确实反映了这一现象。

为了更深入的证明较软的凡士林封闭样品室会影响所测得的修正系数 α ，我们用 502 胶（中国深圳 Ausbond 有限公司）封闭样品室，待 502 胶凝固后，可认为样品室基本不会产生形变。接着使用功率谱密度方法和光散射方法测量此样品室的压电载物台的运动修正系数，实验结果如图 3-11 所示。实验表明，光散射方法和功率谱密度方法测得的修正系数 α_x 非常接近。在不同的振动频率条件下，两种方法的差别小于 3%。对比图 3-10 和图 3-11 中的实验结果可知，样品室的形变会影响压电载物台的修正系数 α 。

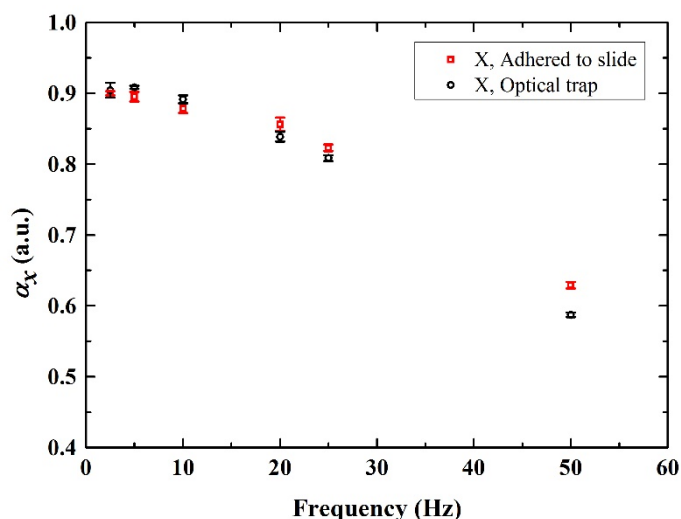


图 3-11 光镊和光散射测量修正系数 α 随振动频率的关系

使用 502 胶封闭的样品室时的测量结果。黑色空心圆为功率谱分析方法的实验结果，红色方框为光散射法的测量结果，两种方法的实验结果基本一致。

3.2.4 小结

本小节中给出两种光镊实验中可用的压电载物台校准方法，即功率谱密度分析方法和光散射方法。功率谱密度分析方法能够标定出样品溶液的流动速度变化情况，但无法测量样品室底面的运动情况；而光散射的方法正好相反，只能给出样品室底面的运动情况，无法给出样品溶液的流动速度。因此，在研究压电载物台运动特性以及标定运动精度时需要结合这两种方法。

实验中我们发现，即使直接将样品室放置在压电载物台载物槽中不做任何固定措施，样品室与压电载物台之间的摩擦力也能保证两者间良好的机械传动。还发现 PZT 真实振幅比名义振幅要小，并随着振动频率升高而迅速降低； x 和 y 方向上的振幅响应相差较大，这一结果在两种标定方法中都得到了验证。这种振幅响应特性与样品室可变形能力和平台自身特性有关，与样品室中的层流无关。即使采用固化密封的样品室，当发送 50 Hz 的正弦振动时， x 方向的实际振幅高估为~2 倍， y 方向接近~3 倍。因此，若以 PZT 名义振幅为真实值时，将在后续测量中引起巨大的误差。

鉴于上述结论，在实际的光镊实验中，压电载物台的运动精度需要事先标定，要根据实验关心的是底面运动幅度还是溶液流动速度来选择合适的标定方法。

3.3 温度和粘滞系数

样品室内溶液的温度是光镊实验中重要的实验参数，它直接影响实验稳定性

[24]、溶液微流变性质^[25-27]以及驱动蛋白的活性^[28-30]。在光镊实验中,影响溶液温度的因素有很多,比如环境温度或激光照射等^[23,24]。因此,对溶液温度进行标定,定量研究各个因素对温度的影响非常必要。目前可用于光镊温度测量的方法有微型热电偶直接测量法和借助粘滞系数测量温度法^[23,31]。

微型热电偶可快速方便地测量样品溶液的温度,但是它对精细实验扰动较大,只能测量一定范围内(约 300 μm)溶液的平均温度,因此微型热电偶直接测量法不适合于光镊校准。较适合光镊实验的方法是借助粘滞系数测量温度法。比如光镊实验中经常用的溶剂是水,它的粘滞系数和温度之间存在经验公式

$$\eta(T) = 10^{\left\{ \frac{\left[1.3272 \times (20 - T) - 0.001053 \times (T - 20)^2 \right]}{105 + T} - 2.999 \right\}} \quad (3.14)$$

其中 T 为溶液温度, $\eta(T)$ 为溶液的粘滞系数。通过测量液体粘滞系数即可反推溶液温度。因此这里涉及到光镊研究另一个重要实验参数,即溶液的粘滞系数。

液体的粘滞系数表征了液体内部摩擦力的性质,只有在液体内部存在相对运动时才表现出来。液体的粘滞系数与液体温度有关,它随温度升高而减小。在光镊实验中,样品溶液粘滞系数的准确性直接影响光阱力的测量和光阱参数标定^[32,33]。

测量粘滞系数的方法很多,已成为一门单独的学科,根据所研究的尺度可分为流变学和微流变学。流变学发展较早,目前已有多达数百种相关的测量方法和测量仪器,比如落球法、毛细管法和转筒法等方法,以及根据相关原理开发出的商用流变仪^[34,35]。

落球法是根据斯托克斯公式建立的,也称斯托克斯法,该方法物理概念清晰明了、装置简单、测量便捷应用普遍。但斯托克斯法在实验中存在两个问题,一个是由于无法保证微球的每次轨迹都与玻璃管中心重合而产生测量误差,另一个是可测量对象的范围较小,只限于透明或半透明的黏滞系数较大的液体^[36]。

毛细管法依据泊肃叶方程建立,可测量从气体到液体的多种测量对象。但该方法的测量精确度依赖于测量过程和流体状态,如液体能否稳定流动,是否可被压缩等^[37,38]。

转筒法(也称旋转法)的理论依据是牛顿黏滞定律,商业产品有经济易用的 Sarlc 黏度计和更为高级的 Couette 黏度计。这种方法虽然有成熟的商品仪器,但测量准确性较差,价格昂贵^[39]。除上述方法外,还有其它一些测量粘滞系数的方法,比如适用于黏滞系数较大的流体的振动法^[40],超声多普勒效应法^[41]和布里渊散射法^[42]等。随着探测技术和设备制造技术的进步,测量方法的测量精度也在不断地提高,但样品用量大以及无法测量挥发性液体的粘滞系数等问题依然限制了它们的应用范围。

近 20 年随着研究手段的不断改进,特别是将光镊应用于流变学测量后,微流变学作为流变学在微观领域的分支开始为人们所关注^[25-27,35,43]。应用光镊测量流体的粘滞系数时,大都用 PSD 或者 CCD 相机记录微球的布朗运动情况,然后分析得到液体的粘滞系数。由于所用的探针是微米量级的微粒,实验中所需观察的范围应与微粒的在单次测量时间内的布朗运动范围相当,即约几十微米。这大大减少了实验中样品溶液的用量,仅需几十微升。此外,实验时流体样品置于密封的样品室中,因而可测量易挥发的液态样品甚至是气态样品。

综合上述讨论可知,光镊系统中样品室溶液的粘滞系数和温度是非常重要的实验参数,两者的测量精确性直接影响后续实验的测量精度,并且这两个参数之间也互为相关。由于溶液的温度和粘滞系数之间存在密切的联系,因此本小节将这两个参数一起讨论。首先,我们从现有的粘滞系数和温度的测量方法中选择较为适合于单分子生物物理实验的简单易行的实验方法;然后,利用此方法研究光镊实验中影响温度的因素,以及应注意的问题。

此外,在下面的测量中需要注意的是,由于光镊实验中微球大都靠近玻片底面,因此在用粘滞系数进行计算时需要计入流体动力学修正,既修正后的粘滞系数为

$$\eta' = \frac{\eta(T)}{\left[1 - \frac{9}{16}\left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{r}{h}\right)^5\right]} \quad (3.15)$$

其中 η' 为修正后的粘滞系数, r 为微球直径, h 为微球球心距离底面的高度^[32]。

3.3.1 测量方法

光镊实验中,光阱附近溶液的温度直接影响对实验,因此标定光镊温度实际上是标定光阱附近溶液的温度,即测量微区温度。鉴于实验用的溶剂是水或甘油等已知“温度-粘滞系数”关系的液体,我们可借助方程(3.14)或查表的方法,用测得的粘滞系数来标定温度。因此,我们首先依据生物物理实验特点来讨论液体的粘滞系数的标定方法。然后给出温度的测量方法。

3.3.1.1 粘滞系数测量方法

目前光镊实验中测量溶液的粘滞系数可用的方法主要有两种,第一种是用 PSD 测量被捕获微球的位置,然后借助功率谱密度分析的方法求解粘滞系数^[23];另一种是用 CCD 相机拍摄光镊关闭后的微球的布朗运动,计算微球的均方位移进而求解粘滞系数^[35]。这里我们先描述两种方法的测量原理,然后分析两者间的优劣差别。

首先是功率谱密度分析的方法。在光阱与流体相对静止时，被光镊捕获的微球在周围液体分子的热运动作用下，处于受限布朗运动状态，信号如图 3-12(a) 所示。对运动信号进行傅里叶变换得到相应的功率谱密度分布如图 3-12 (b) 中的灰色实线所示。由理论分析可知，被捕获微球的功率谱密度为洛伦兹函数的形式

$$P(f) = \frac{1}{\beta_{CF}^2} \frac{D/(2\pi^2)}{f_c^2 + f^2}, \quad (3.16)$$

其中 β_{CF} 是 PSD 的“电压-位移”转换系数， $f_c = k/(2\pi\gamma_0)$ ， $\gamma_0 = 6\pi\eta r$ ，

$$D = \frac{k_B T}{\gamma_0} = \frac{k_B T}{6\pi r} \times \frac{T}{\eta(T)},$$

k 是光阱刚度， r 为微球直径， k_B 是玻尔兹曼常数， T 是

环境温度， f 是频率^[22]。用(3.16)式对微球的功率谱密度信号拟合即可得到系数 D ，液体粘滞系数可用下式求得：

$$\eta(T) = \frac{k_B}{6\pi r} \times \frac{T}{D}. \quad (3.17)$$

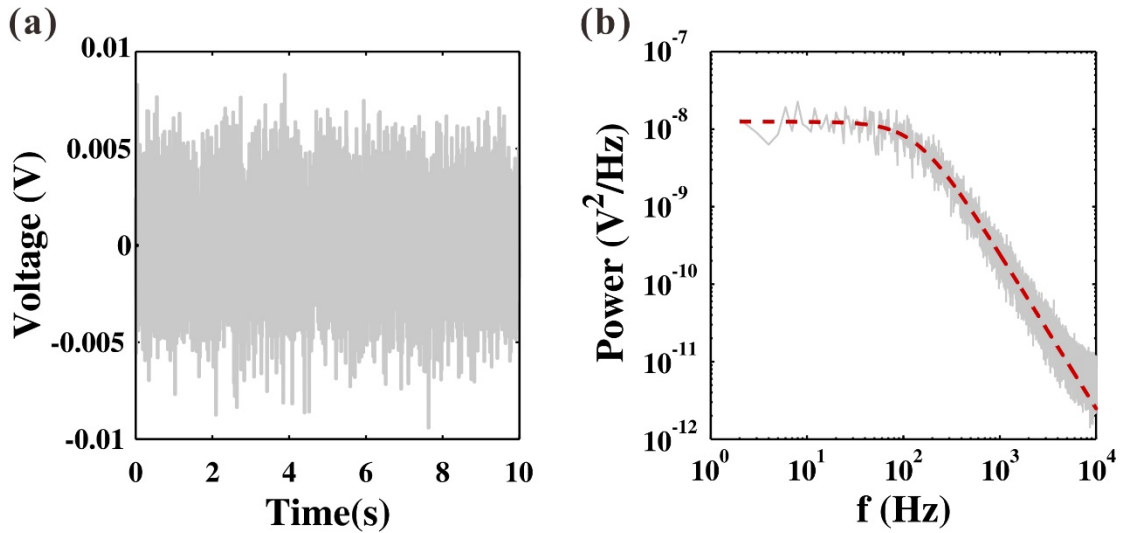


图 3-12 功率谱密度分析方法测量溶液粘滞系数

(a) 灰色实线为 PSD 得到的微球位置信号，(b) 灰色实线为运动信号的功率谱密度分布曲线，红色虚线为功率谱密度分布曲线的洛伦兹拟合结果。

另一种方法是用 CCD 相机拍摄光镊关闭后微球的布朗运动，然后计算微球的均方位移进而求解出粘滞系数。由布朗运动的朗之万理论^[44]可知，液体中微球布朗运动的均方位移 (Mean Square Displacement, MSD) 满足关系：

$$\left\{ \begin{array}{l} MSD = \frac{\sum_{i=1}^n |\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}|^2}{n}, \quad \vec{r}_i = \overline{r(i \cdot \Delta t)} \\ MSD = \frac{2dk_B T}{6\pi\eta(T)r} \Delta t \end{array} \right. \quad (3.18)$$

其中 \vec{r}_i 是 $t=i \cdot \Delta t$ 时刻微球球心的位置向量, n 是 CCD 相机拍摄图片的数量减一, Δt 是 CCD 相机拍摄间隔, d 为所计算位移的空间维数, k_b 是玻尔兹曼常数, T 是溶液的绝对温度, r 为布朗粒子的半径, $\eta(T)$ 为溶液的粘滞系数。由(3.18)式即可求得液体粘滞系数的表达式为

$$\eta(T) = \frac{dk_B T}{3\pi r \cdot MSD} \Delta t. \quad (3.19)$$

在实验中, 用 CCD 相机拍摄光阱关闭后微球的布朗运动图像, 即可求得微球运动的均方位移。最后, 将其带入(3.19)式, 得到当前溶液的粘滞系数。

对比这两种方法可知, 两者方法都需要已知溶液的“温度-粘滞系数”关系 $\eta(T)$ 和微球半径 r 。功率谱分析法需要额外测量 PSD 的“电压-位移”转换系数 β_{CF} , 均方位移的方法需要额外测量 CCD 相机的采样间隔。因此用功率谱分析的方法测量粘滞系数时需要测量每个微球的“电压-位移”转换系数 β_{CF} , 而均方位移法则只需要测量一次 CCD 采样间隔时间(实验表明不同采样之间差别 < 0.1%) 即可。

同时需要注意的是, 生物物理实验具有的三个特点: 首先, 实验时所用的表面带有修饰的微球尺寸分布较宽, 因此两种方法都无法在生物实验中精确地原位标定粘滞系数, 都需要在额外的实验中用标准尺寸的微球进行单数的粘滞系数测量实验; 其次, 由于影响溶液粘滞系数的因素主要为溶液成分, 环境温度, 光镊激光功率等, 而这些因素在实验中基本不变, 因此在单独的实验中标定粘滞系数具有合理性; 最后, 实验表明, 即使用标准尺寸的微球, 不同微球之间“电压-位移”转换系数 β_{CF} 依然偏差较大, 仍需要标定每个微球的 CF, 比如直径 $1 \mu\text{m}$ 的微球(货号以及直径: #4009A, $0.994 \pm 0.021 \mu\text{m}$, 美国 Thermo scientific 公司)的“电压-位移”转换系数 β_{CF} 的标准偏差约为 10%, 微球直径的标准偏差仅为 2.1%。

综上所述, 均方位移方法更加适用于生物物理实验中粘滞系数的测量。

3.3.1.2 溶液温度测量方法

由于溶液温度主要受到环境温度和激光功率等因素的影响, 而与样品的成分关系不大, 因此完全可在实验前用已知“温度-粘滞系数”关系的液体标定出溶液的温度, 然后将标定结果直接用于后续实验。

在实验中用水作为标准液体, 用 3.3.1.1 节中给出的溶液粘滞系数测量方法

即可测量出当前条件下的溶液粘滞系数，然后将其带入(3.14)式，即可求得当前溶液的温度。

3.3.2 光镊实验中的温度变化特性

光镊系统中影响温度的主要因素为环境温度和激光照射^[23,24]，我们发现，显微镜的照明强度也直接影响样品溶液的温度。本小节中，我们用之前给出的光镊温度测量方法测量溶液的温度，进而一一展示诸多因素如何影响单分子力谱仪的溶液温度。

实验中，我们依然用 2.2.7.1 节中的单分子样品室并用光镊捕获直径 $2\ \mu\text{m}$ 的标准微球。为了减少由于微球距离底面过近导致的粘滞系数测量误差^[32]，我们将被捕获微球悬浮在溶液的中央，样品室中溶液为厚度 $140\ \mu\text{m}$ 的立方体，微球的离地高度为 $70\ \mu\text{m}$ 。此时，由(3.15)式可知，光镊关闭后微球纵向位移对测得的粘滞系数影响小于 1%。然而，为了提高测量的精确性，需要采集足够的 CCD 图像 (>500 帧)。但实验表明，关闭光阱 5 至 10 秒（总计 100 至 200 帧）后，微球将在重力作用下离焦，因此需要在实验中每隔一段时间打开一次光阱，吸引微球再次回到光阱中心，反复几次后，即可测得足够的实验数据。

图 3-13 为典型实验数据，光阱中心为坐标原点，淡红色和灰色曲线为微球处于光阱中心时在 X 和 Y 方向上的位移，而红色和黑色曲线分别为光阱关闭后微球在 X 和 Y 方向上的位移。图中光阱三次将布朗运动的微球捕获回来，这样可在单次实验中采集到更多的实验数据，提高实验测量精度。

接着，根据微球的位置数据求得微球运动的均方位移，将均方位移带入(3.19)式中，求得当前溶液的粘滞系数。

最后，将溶液的粘滞系数带入(3.14)式，即求得当前溶液的温度。

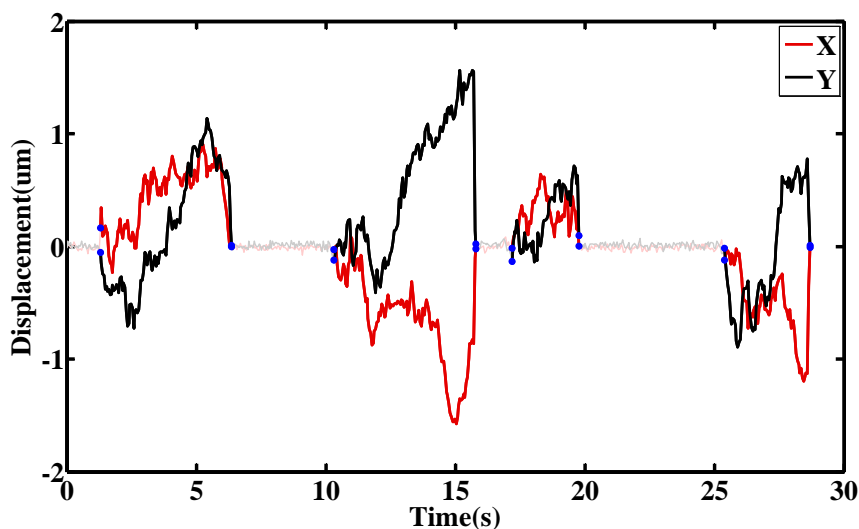


图 3-13 CCD 测量微球布朗运动的均方位移图片

光阱中心在位移为零的位置，淡红色和灰色曲线为微球处于光阱中心的阶段在 X 和 Y 方向上的位移，而红色和黑色曲线分别为光阱关闭后微球在 X 和 Y 方向上的位移。图中光阱三次将布朗运动的微球捕获回来。

3.3.2.1 环境温度对溶液温度的影响

当关闭激光和显微镜照明光时，实验表明样品室内溶液温度与环境温度基本一致，这与前人结果一致并符合理论预期。

3.3.2.2 激光对溶液温度的影响

首先，我们测量了不同激光功率下溶液的温度，测量结果见表 3-2。实验表明激光功率对溶液温度有明显影响。激光功率越高，溶液温度越高，在 8 W 的功率下（物镜出射功率约 900 mW），溶液温度较室温提高了近 20 °C。

表 3-2 激光功率与样品室温度关系

激光器出射功率（瓦特）	0（室温）	4	8
温度（°C）	22.3	29.93	39.48

然后，我们测量了激光加热溶液的速度。实验中，用功率为 4 W 的 1064nm 激光捕获直径 2 μm 微球，然后移动样品台 3 mm 到新的位置，此时可认为此处溶液温度与室温一致（热电偶实验证明距离物镜焦点 2 mm 处的溶液温度已经与室温一致），测量压电载物台移动后溶液温度随时间的变化趋势，结果如图 3-14 所示。从图中可看出，自样品移动 30 秒钟后，溶液温度在 20 min 内的平均值为 30.35 ± 0.51 °C。说明激光热效应的响应速度很快，1 min 后即达到最终温度。

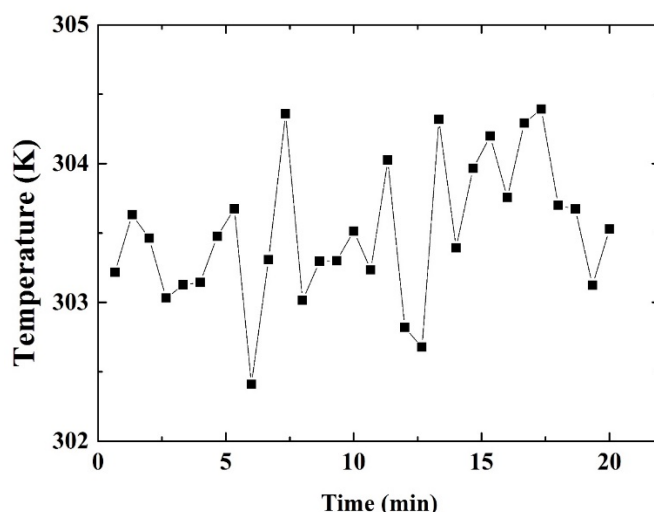


图 3-14 激光导致温度变化与时间的关系

激光照射溶液 30 秒钟后，溶液温度在 20 min 内的平均值为 30.35 ± 0.51 °C。

3.3.2.3 显微镜照明光对溶液温度的影响

Olympus 的 IX 71 显微镜是通过照明调节旋钮调节照明光的强弱，没有准确的刻度，因此我们将照明强度调节旋钮的调节范围均匀地分为 0 到 7 的 8 个不同照明强度，设置 0 为照明光关闭状态，7 为照明光强度最大状态。将照明系统中的 4 片滤色片全部打开，即照明光不经过任何衰减。

照明光强度对温度的影响如图 3-15 所示。图中方块数据曲线为 DIC 状态下的测量结果，圆点为明场条件下的测量结果。可看到两种状态下样品室温度都随着照明强度的升高而升高。二者相较，明场状态下温度升高更为明显，这是由于 DIC 状态下显微镜照明光到达样品前通过了两个偏振元件，这两个元件对照明光强度有较大的衰减。此外，两种状态的温度在照明光关闭时不同，这是因为实验中先测量了 DIC 状态下的温度，未待样品室完全冷却就进行明场状态下的温度测量所致。

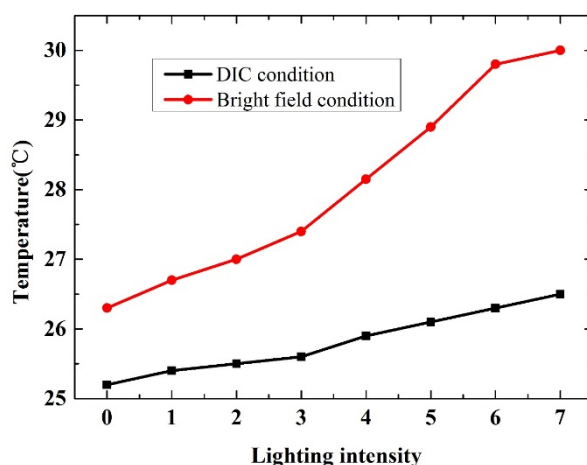


图 3-15 显微镜照明光的强度对光镊温度的影响

图中方块的数据曲线为 DIC 状态下的温度测量结果，圆点为明场条件下的温度测量结果。

进一步，我们研究了显微镜照明光对溶液温度的影响随时间的变化情况，用 DIC 显微镜进行实验，并将照明光调至最强。连续 90 分钟的温度变化数据如图 3-16 所示。图中方块数据曲线为温度变化曲线，样品溶液的温度随着照明时间的增加而不断上升，在前 70 分钟，温度随时间均匀上升。图中直线为前 70 分钟的溶液温度的直线拟合结果，拟合得到的温度增长速率为 $0.023 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

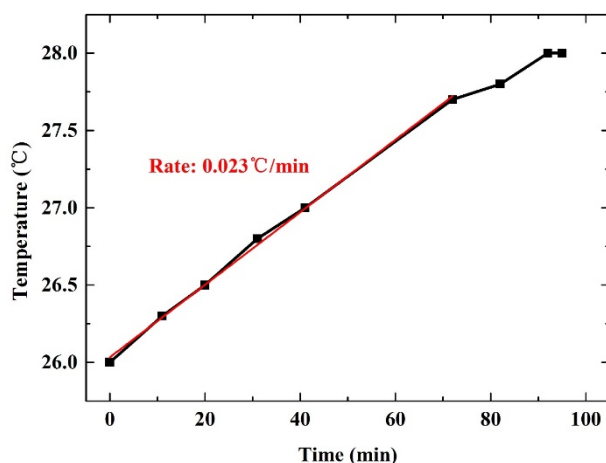


图 3-16 显微镜照明时间对光镊温度影响

图中方块数据曲线即为温度变化曲线，红色直线为前 70 分钟的温度直线拟合结果。

对比图 3-14 和图 3-16 的实验结果,我们发现激光可使溶液温度迅速升高,并且在长时间内保持稳定,而照明光却使得温度随时间不断线性上升。这两者的区别应是因为激光的功率较低并且水对 1064 nm 波长的光吸收较弱(见图 1-3),照射区域与未照射区域很容易达到热平衡;而显微镜照明光的功率较高并且水对近红外波段光线的吸收较强,加热能力超过了样品溶液的热传导能力,使得样品室温度不断升高。

在本节中,我们研究了光镊实验中标定溶液温度和粘滞系数的多种方法,对这些方法进行了比较。用这些实验方法研究了光镊实验中的温度变化特性。通过实验发现,影响光镊中溶液温度的因素不只有环境温度和光镊激光,显微镜照明光也会对溶液的温度产生影响,这是之前常常被忽略的地方^[23,24]。照明光会使溶液温度升高,最高可升高 5 °C,并且随着照明时间的增加溶液温度逐渐升高,这与激光使溶液温度迅速升高并在长时间内保持稳定的特点有所区别。

3.4 光阱刚度和“电压-位移”转换系数

准确测量光阱施加于被捕获微球的皮牛量级力是光镊系统的重要功能。光阱力的准确测量依赖于光阱刚度的精确标定和被捕获微球的位移的精确测量。本论文主要关心光阱中微球的横向受力情况,讨论横向光阱刚度的标定和横向位移的测量。

光阱刚度反映了光阱中的微粒偏离光阱中心时所受力与偏离光阱中心的位移的比例关系。当光阱中的粒子受到外力 F_{ex} 作用而偏离光阱中心并移动至 x 处时,粒子将受到一个指向光阱中心的光阱力 F_{trap} , 两力大小相等,方向相反。经

过理论推导以及实验验证,在光阱中心附近的一定范围之内,光阱可近似为简谐势阱,即在这个范围内粒子偏离阱中心的位移 x 与粒子受到光阱力成正比:

$$F_{trap} = -k \cdot x, \quad (3.20)$$

其中比例常数 k 称为光阱刚度(trap stiffness)。

光阱刚度的标定方法有很多,比如三角波/正弦波流体力学法^[45],功率谱密度分析法(PSDM)^[22,46],逃逸力法^[47],热运动分析法^[48]以及阶跃响应法^[48]等等。前人层对这些方法的优劣进行讨论^[48]。

“电压-位移”转换系数是将 PSD 的电压信号转化为被捕获微球的位移信号的比例系数。在单分子皮牛力谱仪中,为了测量被捕获微球的位移时获得更好的空间分辨率和时间分辨率,我们用基于 PSD 的 BFP 探测方法来探测被捕获微球的位移。由于 PSD 输出信号为电信号,我们在后续数据处理中需要将电信号转化为被捕获微球的位移信号。根据 BFP 探测方法的原理,在一定的范围内,微球的位移与 PSD 的电信号成正比^[49,50],即

$$x = CF \cdot V_{signal}, \quad (3.21)$$

其中 V_{signal} 为探测器的电信号,式中的比例系数 CF 即为“电压-位移”转换系数(conversion factor/CF)。

国际上现有的转换系数标定方法主要为追踪粘底微球法^[50-52],功率谱密度分析法(Power Spectrum Density Method, PSDM)^[22],三角波流体力学法(Triangular-wave Drag Force Method, TDFM)^[53]等等。这些标定方法之间的区别暂未被详细讨论。

能否精确地标定光阱刚度和“电压-位移”转换系数直接影响光阱力和被捕获粒子的位移的测量精度。在生物物理学研究中需要对光阱刚度和“电压-位移”转换系数同时进行快速精确地原位标定。本小结将这两参数的标定方法放在一起讨论。

在这一小节中,我们首先给出标定光阱刚度和 CF 的三种方法,并讨论前人对流体力学法的误解,然后再从理论和实验两方面对比分析这几种方法的优劣。

3.4.1 功率谱密度分析法

在前文中已经多次用功率谱密度分析的方法求解光镊参数,因此功率谱密度的理论原理将不再详述。这里将直接给出实验测量方法。

实验保持光阱与流体相对静止时,被光镊捕获的微球在周围液体分子的热运动作用下处于受限布朗运动状态。用 PSD 记录被捕获微球的位移随时间的变化情况,将被捕获微球的运动信号进行傅里叶变换后得到微球运动的功率谱密度分

布。用(3.16)洛伦兹函数对功率谱密度分布进行拟合,即可得到(3.16)式中的各项参数。进而,光阱刚度由公式 $k = f_c / (2\pi\gamma_0)$ 计算得到,“电压-位移”转换系数为(3.16)式中的 β_{CF} 。

3.4.2 三角波流体力学法

流体力学法是标定光阱参数时的常用方法。实验中,用高精度的压电载物台驱动密闭样品室进行周期性运动,使样品室内的液体相对光阱产生定向流动。被捕获微球偏离光阱中心的距离用 CCD 测量,微球的受力情况通过斯托克斯方程计算微球的粘滞阻力得到,PSD 的信号亦可同步拍摄。计算三者之间的比例关系,求得光阱刚度和“电压-位移”转换系数。

根据压电载物台运动波形的不同,流体力学法可细分为分别用三角波和正弦波作为驱动波形的三角波流体力学法和正弦波流体力学法。三角波流体力学法数据处理简便,因此应用较早,可直接原位测量光阱刚度和“电压-位移”转换系数等参数,但是为了获得较高的标定准确性,需要多次测量。

3.4.2.1 标定原理

当用流体力学法标定光镊参数时,被捕获微球的运动可通过郎之万方程来描述,为了简单起见,这里只给出郎之万方程的一维形式:

$$m\ddot{x}(t) = 6\pi\eta r [v - \dot{x}(t)] - kx(t) + F_{Brownian}(t), \quad (3.22)$$

其中 $x(t)$ 是被捕获微球偏离光阱中心的位移, m 是被捕获微球的质量, η 是样品溶液的粘滞系数, r 是被捕获微球的半径, v 是样品溶液相对光阱中的流动速度(与压电载物台振动波形有关), k 是光阱刚度, $F_{Brownian}(t)$ 是被捕获微球受到的随机布朗作用力。

在三角波流体力学法中,样品溶液相对光阱中心的运动方程可简化为分段函数:

$$\begin{cases} y_{\Delta}(t) = \begin{cases} \frac{4a}{T}t + b, & (0 \leq t \leq \frac{T}{2}) \\ -\frac{4a}{T}(t - \frac{T}{2}) + 2a + b, & (\frac{T}{2} < t \leq T) \end{cases} \\ v_{\Delta}(t) = \frac{dy_{\Delta}}{dt} = \begin{cases} \frac{4a}{T}, & (0 \leq t \leq \frac{T}{2}) \\ -\frac{4a}{T}, & (\frac{T}{2} < t \leq T) \end{cases} \end{cases} \quad (3.23)$$

其中 $y_{\Delta}(t)$ 是溶液的重心位置, T 是压电载物台的振动周期, a 是压电载物台的振动振幅, b 是压电载物台的起始偏置因子, $v_{\Delta}(t)$ 是溶液相对光阱中心的流速。

将(3.23)式带入(3.22)式中,求得被捕获微球的位移随时间的变化

$$x_{\Delta}(t) = \begin{cases} 24\pi\eta r a / kT, & (0 \leq t \leq \frac{T}{2}) \\ -24\pi\eta r a / kT, & (\frac{T}{2} < t \leq T) \end{cases}, \quad (3.24)$$

即被捕获微球的运动存在两个平衡位置,在每个平衡位置各自停留半个周期。被捕获微球受到的粘滞阻力可用斯托克斯公式求得

$$F = -6\pi\eta r v. \quad (3.25)$$

由于被捕获微球在运动过程中一直处于平衡位置处,所受到的粘滞阻力与光阱力平衡,因此微球受到的最大光阱力为 $F_{\Delta\max} = -6\pi\eta r v_{\Delta\max} = -24\pi\eta r a / T$, 光阱刚度为 $k = F_{\Delta\max} / x_{\Delta\max}$ 。

3.4.2.2 实验测量方法

实验中,压电载物台进行三角波振动,振动频率为 2.5Hz,振幅为五个不同的振幅 (A_{TDFM}),即 A , $5A/6$, $2A/3$, $A/2$ 和 $A/3$ 。用多个振幅是为了提高标定精度。用 CCD 和 PSD 同时记录被捕获微球的运动,每次采集时间为 10 秒。

然后统计被捕获微球的位置分布,用双高斯曲线拟合位置分布数据,得到每个信号中两平衡位置的坐标,两平衡位置间距的一半即为相应信号的振幅。这里将 CCD 信号的振幅和 PSD 信号的振幅分别记为 D_{CCD} 和 D_{PD} ,压电载物台的 5 个振幅与 CCD 信号的 5 个振幅一一对应。将这 5 对振幅进行线性拟合,即可得到线性拟合比例系数 $\lambda = dD_{\text{CCD}}/da$,则光阱刚度由(3.24)式的改进形式

$$k = 24\pi\eta r / \lambda T \quad (3.26)$$

求得。最后,线性拟合 5 对 D_{CCD} 和 D_{PD} 振幅,求得的斜率即为“电压-位移”转换系数。

3.4.3 正弦波流体力学法

正弦波流体力学法(SDFM)与 TDFM 方法类似,SDFM 用压电载物台驱动样品室正弦振动在光阱附近产生正弦变化的流场,进而测量光阱参数。SDFM 方法在光镊中已经有应用,例如测量设备噪声^[51],结合功率谱密度分析的方法标定光镊参数^[21]以及前文提到的用于校准光阱刚度^[14,32,48]。此外,前人也曾经用正弦震荡的光阱来测量高分子溶液的粘弹性^[54]以及细胞内外溶液的粘弹性^[19]。我们发现,这些研究并未将 SDFM 用于标定 CF ,对这种方法的认识也存在误区。因此,我们首先给出 SDFM 方法的测量原理,从理论论证 SDFM 方法修正和未修正的

区别，然后通过实验验证的方式证明修正的必要性。

3.4.3.1 标定原理

在 SDFM 方法中，样品室中溶液相对光阱中心的运动方程可写作：

$$\begin{cases} y_{\sin}(t) = a \sin\left(\frac{2\pi}{T}t\right) + c \\ v_{\sin}(t) = \frac{dy_{\sin}}{dt} = \frac{2\pi a}{T} \cos\left(\frac{2\pi}{T}t\right) \end{cases}, \quad (3.27)$$

其中 $y_{\sin}(t)$ 是溶液的重心位置， T 是压电载物台的振动周期， a 是压电载物台的振动振幅， c 是压电载物台的起始偏置因子， $v_{\sin}(t)$ 是溶液相对光阱中心的流速。

因此，我们可计算出被捕获微球的位移随时间的变化情况。将(3.27)式带入(3.22)式中，求出方程(3.22)式的稳态解为：

$$x_{\sin}(t) = B \sin(\omega t - \varphi + \pi/2), \quad (3.28)$$

其中

$$B = \frac{f_0}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\beta^2\omega^2}}, \quad (3.29)$$

$$\varphi = \tan^{-1}\left(\frac{2\beta\omega}{\omega_0^2 - \omega^2}\right), \quad (3.30)$$

并且 $\omega = 2\pi/T$ ， $\omega_0^2 = k/m$ ， $\beta = 3\pi\eta r/m$ 和 $f_0 = 6\pi\eta r\omega a/m$ 。

前人在用 SDFM 标定光阱参数时，会对(3.28)式作近似简化^[14, 32]。由于在绝大多数光镊系统中 $\omega_0^2 \gg \omega^2$ 并且 $\omega_0^2 \gg \beta\omega$ ，因此根据(3.28)式和(3.29)式将光阱中微球的最大位移近似为：

$$x_{\sin/\max} = B \approx \frac{f_0}{\omega_0^2} = \frac{12\pi^2\eta r a}{kT}. \quad (3.31)$$

同时由(3.25)式计算在正弦振动的过程中，光阱中微球所受到的最大粘滞阻力为 $F_{\sin/\max} = 12\pi^2\eta r a/T$ ，光阱中微球的最大位移为 $x_{\sin/\max} = F_{\sin/\max}/k_{\sin}$ 。因此，

前人曾用关系式 $k_{\sin} = F_{\sin/\max}/x_{\sin/\max}$ 计算光阱刚度^[14, 32]。为了与下文区分，将这种计算光阱刚度的方法称为“未修正的正弦波流体力学法”（Uncorrected Sinusoidal-wave Drag Force Method, USDFM）。

根据(3.29)式，光阱刚度的严格解为

$$k'_{\sin} = m\omega^2 + m\sqrt{(f_0/B)^2 - 4\beta^2\omega^2}. \quad (3.32)$$

我们将用(3.32)式计算光阱刚度的方法称为“修正后的正弦波流体力学法”(Corrected Sinusoidal-wave Drag Force Method, CSDFM)。经过简单估算可知, USDFM 方法中的近似计算会在光阱刚度较弱, 被捕获微球较大以及压电载物台振动频率较高时产生很大的误差; 在绝大多数光镊系统中 β 大于 ω 。因此用 USDFM 标定后的光阱刚度一般会大于 CSDFM 方法得到的光阱刚度。

3.4.3.2 实验测量方法

根据(3.28)式可知, 在压电载物台开始振动几个周期后, 被捕获的微球将在流场的驱动下开始正弦振动。用 CCD 和 PSD 同时探测被捕获微球的运动信号。然后, 用 Matlab 对每个信号进行正弦函数拟合得到每个信号的振幅, 将 CCD 的信号振幅记为 A_{CCD} , PSD 的信号振幅记为 A_{PD} 。被捕获微球偏离光阱中心的最大位移为 $x_{\sin/\max} = B = A_{CCD}$, 进而可通过(3.31)式和(3.32)式分别计算出 USDFM 和 CSDFM 方法的标定出的光阱刚度。“电压-位移”转换系数可直接由 $CF = A_{CCD}/A_{PD}$ 计算得到。

3.4.3.3 SDFM 修正的必要性

为了直观展示 USDFM 和 CSDFM 方法的区别, 说明对 SDFM 修正的必要性, 我们用 PSDM, TDFM, USDFM 和 CSDFM 四种方法测量相同条件下的光阱刚度和 CF。实验用同一个光阱捕获 4 种不同直径的聚苯乙烯微球(货号以及直径: #4009A, $0.994 \pm 0.021 \mu\text{m}$; #4202A, $1.999 \pm 0.020 \mu\text{m}$; #4203A, $3.002 \pm 0.019 \mu\text{m}$; #4205A, $4.993 \pm 0.040 \mu\text{m}$, 美国 Thermo scientific 公司), 对每种光阱状态都用四种方法进行标定。

具体的标定方法见 3.4.1 节, 3.4.2.2 节和 3.4.3.2 节中提到的参数标定方法。在 TDFM 方法中压电载物台振幅分别为 $15 \mu\text{m}$, $12.5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $7.5 \mu\text{m}$ 和 $5 \mu\text{m}$, 振动频率为 5 Hz; USDFM 和 CSDFM 方法中压电载物台振幅为 $15 \mu\text{m}$, 振动频率为 5 Hz。用 CCD(采样频率 30 帧/秒)和 PSD(USDFM 方法, CSDFM 方法和 TDFM 方法中采样频率为 1 kHz, PSDM 方法中采样频率为 20 kHz)同时测量被捕获微球的运动情况。

此外, 为了防止周围溶液中的微球影响实验测量, 我们将微球悬浮液稀释至每个视场 1 个或 2 个微球。此时只需要计入“玻片-溶液”界面附近的流体动力学修正^[32]后, 即可直接用水的粘滞系数做为样品溶液的粘滞系数。实验时环境温度控制在 24°C 保持不变, 认为样品溶液的温度为 24°C , 相应粘滞系数为 $\eta = 0.911 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ 。被捕获微球的球心距离底面高度为 $20 \mu\text{m}$ 。

表 3-3 为实验标定结果, 可见用 USDFM 方法标定的光阱刚度比 CSDFM

大，这与 3.4.3.1 节中的分析结果是一致的。对比不同方法的刚度数据，CSDFM 方法测得的光阱刚度与 TDFM 方法和 PSDM 方法的标定结果都比较相近。然而 USDFM 的标定结果与其它三种方法差别比较大。因此，我们可将 CSDFM 方法的标定结果作为标准值来计算 USDFM 方法的测量误差，数据见表 3-3 的最右栏。值得注意的是，直径 5 μm 微球的光阱刚度误差高达 11.25%，这种尺寸的微球是光镊实验经常用的^[2, 55]，因此用正弦波流体力学法测量光阱参数时，特别是被捕获微球直径较大时，将 USDFM 方法修正为 CSDFM 是非常必要的。

鉴于上述实验结果，后文中将直接用修正后的正弦波流体力学法标定光阱参数，而不再用未修正的正弦波流体力学法，并用 SDFM 代表修正后的正弦波流体力学法。

表 3-3 不同微球的光阱刚度标定结果

微球直径 (μm)	光阱刚度 ($\text{pN}/\mu\text{m}$)				USDFM 方法的误 差 (%)
	TDFM	PSDM	CSDFM	USDFM	
0.994 ± 0.021	12.26 ± 0.52	12.22 ± 0.47	12.13 ± 0.40	12.13 ± 0.40	-
1.999 ± 0.020	9.28 ± 0.27	9.31 ± 0.40	9.23 ± 0.04	9.25 ± 0.04	0.22
3.002 ± 0.019	5.04 ± 0.05	5.10 ± 0.20	5.24 ± 0.04	5.31 ± 0.04	1.34
4.993 ± 0.040	3.14 ± 0.03	3.15 ± 0.26	3.11 ± 0.03	3.46 ± 0.02	11.25

3.4.4 对比三种标定方法

为了找出更加适合于生物物理实验的标定方法，我们从多个方面对 PSDM, TDFM 和 SDFM 三种方法进行了对比。

3.4.4.1 理论对比

由方程(3.24)与(3.31)对比可知，在绝大部分光镊系统中，SDFM 方法中被捕获微球的位移更大，约为 TDFM 方法的 $\pi/2$ 倍。因此，在相同的实验条件下，SDFM 方法可获得更高的微球位移测量精度。

此外，TDFM 方法标定光阱参数时存在无法消除的系统误差，降低标定精确性。首先，由于压电载物台的机械特性导致其在到三角波的拐点附近的运动曲线会偏离理想的三角波。这一偏差将会影响测得的被捕获微球的两个平衡位置。其次，在样品溶液的粘滞阻力以及被捕获微球的阻尼振荡作用下，微球在两个平衡

位置间的运动也需要时间，即微球位移不是方程(3.24)所示的理想分段函数。而 SDFM 方法中并无这些问题，这说明 SDFM 相对 TDFM 而言能够取得更好的实验测量精度。

3.4.4.2 仿真对比

为了更加直接的展示 SDFM, TDFM 和 PSDM 方法之间的区别，我们用了 Matlab 模拟了这三种方法标定光阱刚度和“电压-位移”转换系数时的精度。由于实验中影响标定精度的因素通常为环境噪声，电子噪声，激光功率和光阱刚度等，因此我们模拟了信噪比（SNR，代表了环境噪声和电子噪声的强弱）或光阱刚度（代表了激光功率和光阱刚度的强弱）变化而其它参数（与设备实际参数一致，或者在合理的范围内）保持不变时，三种方法的测量精度的变化情况。为了明确地表征每个方法的标定精度，针对任意一种特定的实验条件，我们分别用三种方法标定相同条件下的光阱 10 次，然后计算出 10 次模拟的测量值与设定值之间的均方误差（mean square error/MSE）。MSE 将作为精度的度量标准，即 MSE 越小标定精度越高。

在模拟时，实验温度设定为 25℃，真实的“电压-位移”转换系数设定为 5000nm/V。用 CCD（采样频率 30 帧/秒）和 PSD（SDFM 方法和 TDFM 方法中采样频率为 1 kHz，PSDM 方法中采样频率为 20 kHz）同时测量直径 2 μm 的被捕获微球的运动，每次采集 10 秒。微球球心距离盖玻片底面 20 μm。在 SDFM 方法的模拟中，压电载物台进行正弦的周期性振动，振动频率为 2.5 Hz，振动的振幅为 A 。在模拟 TDFM 方法时，压电载物台为三角波振动，振动频率为 2.5 Hz，振幅为五个不同的振幅（ A_{TDFM} ），即 A , $5A/6$, $2A/3$, $A/2$, $A/3$ 。对 PSDM，压电载物台和光镊都保持静止。

我们用蒙特卡洛模拟的方法产生模拟信号^[56]。模拟原理为，首先只计算忽略光阱中微球的布朗热噪声和探测设备的电子噪声的情况下的理想信号，然后将蒙特卡洛模拟得到的布朗热噪声耦合进理想信号中，最后用高斯白噪声代表探测器的电子噪声和外界环境噪声，并耦合进模拟信号中。模拟到被捕获微球的运动信号后，三种方法的模拟信号分别用各自不同的数据处理方法进行处理，得到相应的标定结果。

三种标定方法的信号模拟以及参数标定过程如下：

TDFM 方法中，由于前文分析过的系统误差的影响，被捕获微球在平衡位置间的移动过程将变得十分复杂，因此这里对问题进行简化，用梯形波（图 3-17（a）左侧图中的黑色实线）作为微球理想运动轨迹。耦合热运动噪声和高斯白噪声后的信号为图 3-17（a）左侧图中的灰色实线。然后统计被捕获微球位置分布（图 3-17（a）右侧图中灰色柱状图），并用双高斯曲线（图 3-17（a）右侧图

中的红色实线)拟合得到两平衡位置的坐标(图 3-17 (a) 图用红色虚线标出)。两平衡位置间距的一半即为相应信号的振幅。这里将 CCD 信号的振幅和 PSD 信号的振幅分别记为 D_{CCD} 和 D_{PD} 。模拟过程中压电载物台用了 5 个不同的振幅,与 5 个 CCD 信号的振幅一一对应。将 5 对振幅线性拟合,即可得到比例系数 $\lambda = dD_{CCD}/da$, 带入方程(3.26)中即可求得光阱刚度。再线性拟合 5 对 D_{CCD} 和 D_{PD} 振幅,所得斜率即为“电压-位移”转换系数。

SDFM 方法中被捕获微球的理想运动信号应为正弦函数形式(图 3-17 (b) 中的黑色实线)。加入噪声后的运动信号为图 3-17 (b) 中的灰色实线。直接对模拟信号进行正弦拟合得到振幅, CCD 信号的振幅和 PSD 信号的振幅分别记为 A_{CCD} 和 A_{PD} , 图 3-17 (b) 中的红色虚线为正弦拟合结果。进而,用方程(3.32)即可求得光阱刚度,并用 $CF = A_{CCD}/A_{PD}$ 求得“电压-位移”转换系数。

PSDM 方法中,压电载物台和光镊都保持静止。因此被捕获微球的理想运动信号应为静止的水平线(图 3-17 (c) 左侧小图中的黑色实线)。而加入噪声后的运动信号为图 3-17 (c) 左侧小图中的灰色实线。对运动信号进行傅里叶变换即可得到功率谱密度分布曲线(如图 3-17 (c) 右侧小图中的灰色实线所示)。用方程图 3-17 对功率谱密度分布曲线进行拟合(如图 3-17 (c) 右侧小图中的红色虚线所示)得到相应的拟合参数。进而,光阱刚度可由公式 $k = f_c/(2\pi\gamma_0)$ 计算得到,“电压-位移”转换系数为 β_{CF} 。

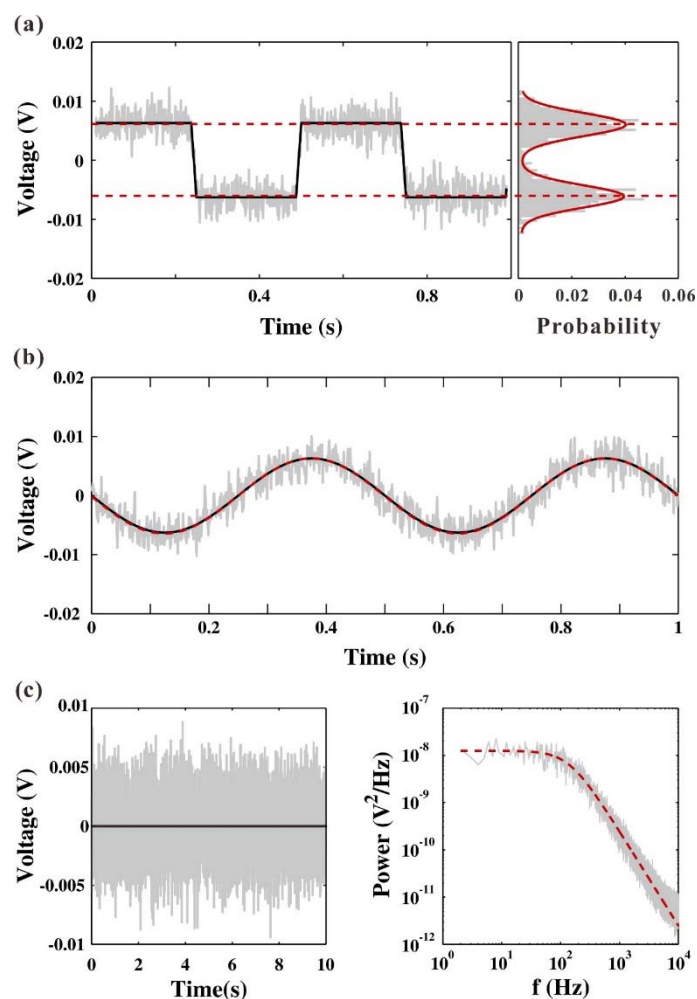


图 3-17 模拟三种标定方法标定光阱参数

(a) TDFM 方法标定光阱参数的模拟结果。左侧小图中灰色实线为 PSD 得到的微球位置模拟结果，右侧小图中灰色柱状图为相应的统计分布曲线，红色实线为双高斯拟合轮廓线，红色虚线为根据模拟信号计算出的微球平衡位置。(b) SDFM 方法标定光阱参数的模拟结果。灰色实线为 PSD 得到的微球位置模拟结果，红色虚线为用正弦函数拟合运动轨迹得到的拟合结果。(c) PSDM 方法标定光阱参数的模拟结果。左侧小图中灰色实线为 PSD 得到的微球位置模拟结果，右侧小图中灰色实线为运动信号的功率谱密度分布曲线，红色虚线为功率谱密度分布曲线的洛伦兹拟合结果。

模拟结果如图 3-18 所示。在图 3-18 的 (a) 和 (b) 中，三种标定方法的标定结果的 MSE 都随着 SNR 的增加而减小，这是由于更高的信噪比意味着噪声受到抑制，因此这三种方法在高信噪比时都可获得更高的测量精度。并且，对所有不同的 SNR 而言，SDFM 方法标定结果的 MSE 要远小于 TDFM 和 PSDM。这说明 SDFM 在所有的不同信噪比条件下，都具有更好地标定精度和稳定性。在图 3-18 的 (c) 和 (d) 中，随着光阱刚度的增加，三种标定方法的标定结果的

MSE 迅速减小。在相同光阱刚度下，SDFM 方法的标定准确性依然比 TDFM 和 PSDM 更好。此外，在图 3-18 所示的所有情况中，即使在信噪比非常低或者光阱刚度非常弱的情况下，SDFM 标定结果的 MSE 都小于 5%，并且在实验条件较好时，SDFM 方法的 MSE 可降至 1% 以下。即从模拟结果看，SDFM 更加适合于校准光阱刚度和“电压-位移”转换系数。

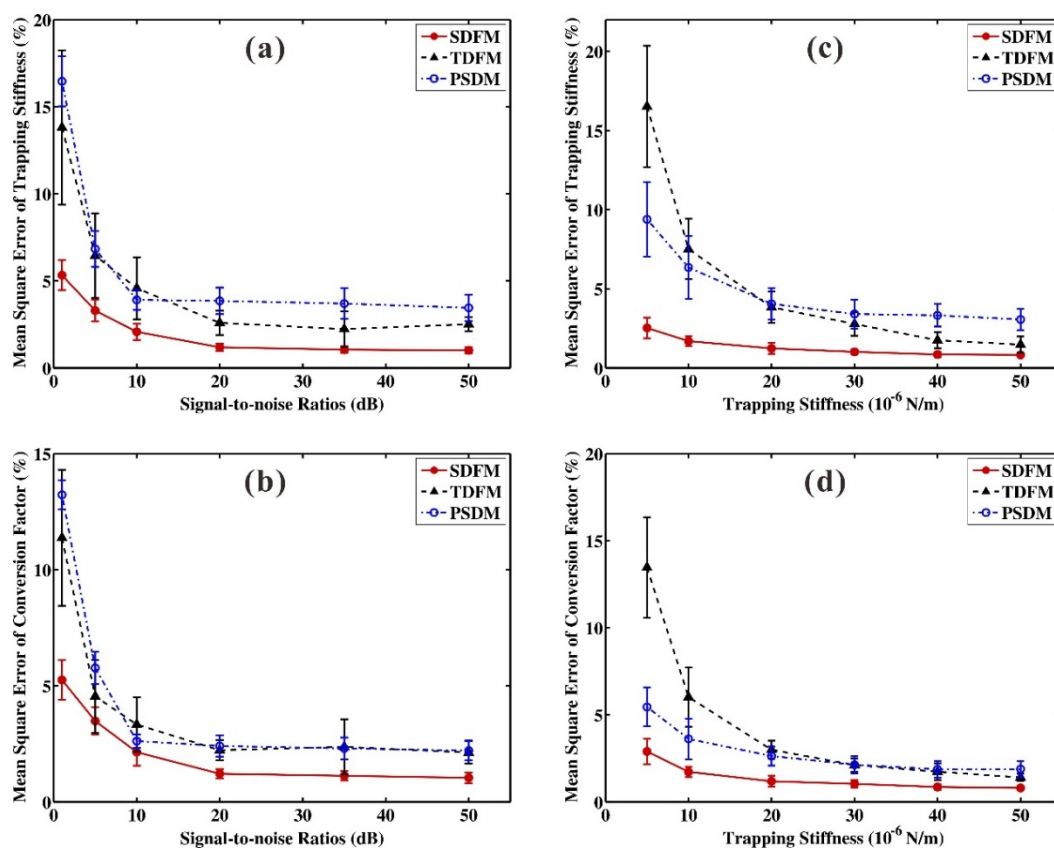


图 3-18 模拟 SDFM, TDFM 和 PSDM 标定光阱刚度和 CF

带有实心点的红色实线是 SDFM 方法的模拟结果，带有实心三角的黑色虚线是 TDFM 方法的模拟结果，带有空心圆环的蓝色虚线是 PSDM 方法的模拟结果。(a) 光阱刚度的标定精度随信噪比的变化情况；(b) “电压-位移”转换系数的标定精度随信噪比的变化情况；(c) 光阱刚度的标定精度随光阱刚度的变化情况；(d) “电压-位移”转换系数的标定精度随光阱刚度的变化情况。图中的误差棒为同条件下 10 个 MSE 的标准偏差。

3.4.4.3 实验对比

为了更加直观地展示 SDFM, TDFM 和 PSDM 的不同，我们直接用这三种方法标定本文中的全新光镊系统。实验中，我们用 5 个不同功率激光 (33.26 mW, 66.52 mW, 99.78 mW, 133.04 mW 和 166.30 mW) 捕获同一种标准尺寸的聚苯乙烯微球 (货号以及直径: #4202A, $1.999 \pm 0.020 \mu\text{m}$; 美国 Thermo scientific 公司)，对每种光阱状态都用三种方法标定 6 个不同的微球，取平均值作为标定结

果。

具体的标定方法可见 3.4.1, 3.4.2.2 和 3.4.3.2 节中提到的参数标定方法。需要说明的是 TDFM 方法中压电载物台振幅分别为 15 μm , 12.5 μm , 10 μm , 7.5 μm 和 5 μm , 振动频率为 2.5 Hz; SDFM 方法中压电载物台振幅为 15 μm , 振动频率为 2.5 Hz。此振幅和频率可保证在进行 TDFM 和 SDFM 实验时, 被捕获微球的运动范围不会超出光阱刚度以及 PSD 的线性区。在 PSDM 方法中, 压电载物台不振动, 从而保持光阱周围的溶液和光阱中心相对静止。用 CCD (采样频率 30 帧/秒) 和 PSD (USDFM 方法, CSDFM 方法和 TDFM 方法中采样频率为 1 kHz, PSDM 方法中采样频率为 20 kHz) 同时测量被捕获微球的运动情况。此外, 为了防止周围溶液中的微球影响实验测量, 我们将微球悬浮液稀释至每个视场 1-2 个微球。此时只需要计入“玻片-溶液”界面附近的流体动力学修正^[32]后, 即可直接用水的粘滞系数做为样品溶液的粘滞系数。实验时, 我们将环境温度控制在 24 $^{\circ}\text{C}$ 保持不变, 因此可认为样品溶液的温度为 24 $^{\circ}\text{C}$, 查表可知此时水的粘滞系数为 $\eta=0.911\times 10^{-3}\text{Ns/m}^2$ 。被捕获微球的球心距离底面 20 μm 。

光阱刚度和“电压-位移”转换系数的标定实验结果分别如表 3-4 和表 3-5 所示。表中误差为相应实验条件下用相应标定方法所标定的 6 个微球实验数据的标准偏差。实验中微球的最大位移不会超过微球半径的 20%, 在这个范围内, 由于横向位移导致的微球纵向平衡位置改变并不会影响光阱刚度的标定^[57]。通过对比分析表 3-4 和表 3-5 的数据可知:

首先, 由表 3-4 数据可知, 在不同激光功率下, 用三种方法标定出的光阱刚度平均值非常接近, 其中 SDFM 方法的标定误差最小; TDFM 方法的误差随着激光功率的增加而明显变大; PSDM 方法的误差在激光功率较低时较大。

其次, 表 3-4 展示了在不同激光功率下“电压-位移”转换系数的标定结果。其中, SDFM 方法的数据中, 在全部的 5 种功率情况下, “电压-位移”转换系数的平均测量结果非常稳定, 且标定误差也是三种方法中最小的; 对 TDFM 方法而言, 标定误差依然随着激光功率的增加而明显变大; 在 PSDM 方法中, 低激光功率下的标定误差较大, 且平均结果也不可信。

同样的, 在上述实验结果中, 由于用 SDFM 和 TDFM 方法标定光阱时, 在不同的激光功率下, 压电载物台振幅保持一致。因此在激光功率较高时, 光阱刚度较大, SDFM 方法和 TDFM 方法的实验中被捕获微球的位移偏小, 进而导致这两种方法的标定误差升高。但是 TDFM 方法的误差变化迅速, 在某些功率下会超出 5% 实验允许误差; 而 SDFM 的误差即使在高功率下依然较小。这一实验现象可等效为: 用任意特定的激光功率, SDFM 方法只需要较小的压电载物台振幅即可获得良好的标定精度, 而 TDFM 方法想要获得同样的标定精度则需要更

大的平台振幅。这一结论的证明详见“附录III 压电载物台振幅对 SDFM 和 TDFM 测量精度的影响”。SDFM 方法的这一特点在实际实验中是非常有意义的。这是由于在用 SDFM 或者 TDFM 方法标定光阱参数时，由于下列因素的影响，压电载物台的运动幅度不能过大：①压电载物台运动范围有限，一般为百微米左右。②样品室底面极难做到完全水平，在大振幅情况下，微球离底高度会有变化，严重影响测量精度。③光镊实验，样品室内会有一些量的悬浮微球，当压电载物台进行大幅度的振动时，实验易受到光阱外微球的干扰。④光阱的可用区域有限（比如光阱刚度线性区，电压系数线性区，恒力区等等），平台振幅过大会导致微球离开光阱的可用区域。因此，SDFM 方法需要压电载物台振幅较小，相对 TDFM 方法更加适合于光镊实验。

由表 3-4 和表 3-5 数据可知，PSDM 方法的误差随激光功率的降低而升高。这是由于激光功率较低时，光阱刚度减弱，导致洛伦兹函数(3.16)中的转角频率 f_c 较小，进而在数据拟合时，受到光镊系统中难以屏蔽的低频噪声的影响，导致拟合精度下降，实验误差增大。

最后，我们还应注意到在表 3-4 和表 3-5 的实验数据未反映的标定用时。用 SDFM 和 PSDM 方法只需要十几秒钟即可标定任意一个被捕获微球的光阱参数；而在相同的实验条件下，TDFM 至少要花费 SDFM 方法的大概 5-6 倍的实验时间。

表 3-4 不同激光功率条件下的光阱刚度

激光功率 (mW)	光阱刚度(pN/ μ m)			误差(%)		
	SDFM	TDFM	PSDM	SDFM	TDFM	PSDM
33.26	13.69 \pm 0.19	13.48 \pm 0.32	13.28 \pm 0.53	1.41	2.34	4.01
66.52	26.28 \pm 0.17	26.58 \pm 0.48	26.63 \pm 0.70	0.63	1.79	2.64
99.78	40.28 \pm 0.57	41.33 \pm 1.29	41.68 \pm 1.12	1.41	3.11	2.69
133.04	52.48 \pm 0.66	53.82 \pm 2.11	54.20 \pm 1.27	1.26	3.92	2.35
166.30	65.22 \pm 0.73	65.02 \pm 5.30	66.33 \pm 1.55	1.12	8.15	2.33

表 3-5 不同激光功率条件下的“电压-位移”转换系数

激光功率 (mW)	“电压-位移”转换系数(nm/V)			误差 (%)		
	SDFM	TDFM	PSDM	SDFM	TDFM	PSDM
33.26	4903 ±34	4962 ±85	5205±121	0.70	1.71	2.32
66.52	5061 ±42	4979±107	5158±82	0.83	2.15	1.59
99.78	5015 ±78	4885±172	5059±85	1.55	3.51	1.68
133.04	4916 ±65	4748±249	4903±66	1.33	5.25	1.35
166.30	4806 ±37	4935±484	4845±66	0.77	9.81	1.36

3.4.5 小结

本节中给出了标定光阱刚度和“电压-位移”转换系数的三种方法,即 PSDM, TDFM 和 SDFM 方法,详细地描述了各自的标定原理和实验标定流程,其中对 SDFM 方法,分析了前人在用该方法时的误区并引入了修正后的正弦波流体力学法,然后通过实验验证的方式证明了对原来的方法进行修正的必要性。最后通过理论分析,仿真模拟和实验验证等手段对比分析三种方法各自的特点。

PSDM 法的测量速度是最快的,测量每个微球的电压系数仅需几十秒左右,但需要事先已知微球尺寸。当样品中微球粒径偏差较大时,这很可能需要其它额外的实验工作。若用平均尺寸进行计算,则精度会下降。此外设备的高频噪声也会对测量产生影响,并且相较于其它的电压系数测量方法,这种方法的数据处理过程也更为复杂。

TDFM 法原理简单、操作简便,是光镊系统的标定中比较常用的实验方法。通常的做法是用压电载物台带动样品室中的液体进行三角波振动,由于液体粘滞阻力的作用,光阱中微球交替处于两个新的平衡位置上,测量相应的 PSD 和 CCD 信号,即可得到两平衡位置的电压距离和实际位置距离,用多个不同振幅得到相应电压距离和实际位置距离进行线性拟合即可得到电压系数。标定精度较高,但是由于需要测量多个不同振幅的信号,因此标定速度较慢(标定一个微球的电压系数需几分钟,这在很多生化实验中是无法接受的)。

SDFM 方法标定光阱参数时,在适当的实验条件下标定误差可降到 1%以下,且仅需要十几秒的时间即可完成一次标定。此外,即使是在实验环境很差的条件下进行标定,比如设备的信噪比很低,光阱刚度或激光功率很弱时,SDFM 方法依然能获得良好的测量精度。相对 TDFM 方法,SDFM 具有实验用时少,无的系统误差,标定结果的稳定性好且误差小的优势,特别是在压电载物台振幅较小时,标定的精度优势尤为明显。相对 PSDM 方法而言,SDFM 方法的精确度和稳

定性也更好,特别是在激光功率较低或者光阱刚度很弱的时候,SDFM 方法的表现极好。此外,由于研究样品的活性时间有限(特别是在生物学实验中),标定必须快速完成。因此,SDFM 能够快速准确标定光阱参数的特点,使其相对其它两种方法更加适合于光镊在生物物理学方面的实验。

3.5 本章小结

由于生物物理学对光镊参数标定方法提出的新要求,我们针对性地提出或改进了多种光镊参数标定方法,比如功率谱方法和光散射方法校准压电载物台,正弦波流体力学法标定光阱参数等;以及将这些方法应用于生物物理学研究时所应注意的问题。这些工作对光镊设备顺利地应用于生物物理学实验是十分必要的。

参考文献

- [1] MOFFITT J R, CHEMLA Y R, SMITH S B, et al. Recent advances in optical tweezers [J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77(1): 205-228.
- [2] XIA P, ZHOU J H, SONG X Y, et al. Aurora A orchestrates entosis by regulating a dynamic MCAK-TIP150 interaction [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2014, 6(3): 240-254.
- [3] ZHONG M C, WEI X B, ZHOU J H, et al. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers [J]. Nature communications, 2013, 4: 1768.
- [4] BISHOP A I, NIEMINEN T A, HECKENBERG N R, et al. Optical microrheology using rotating laser-trapped particles [J]. Physical Review Letters, 2004, 92(19): 198104.
- [5] GREENLEAF W J, BLOCK S M. Single-molecule, motion-based DNA sequencing using RNA polymerase [J]. Science, 2006, 313(5788): 801-801.
- [6] GUO H, QU E, XU C, et al. Application of optical tweezers in life science [J]. Physics, 2007, 36(6): 476.
- [7] XU C H, GUO H L, QU E, et al. Measurement of binding force between microtubule-associated protein and microtubule [J]. Chinese Physics Letters, 2007, 24(9): 2714-2716.
- [8] ZHONG M C, GONG L, ZHOU J H, et al. Optical trapping of red blood cells in living animals with a water immersion objective [J]. Optics Letters, 2013, 38(23): 5134-5137.
- [9] ZHONG M C, GONG L, LI D, et al. Optical trapping of core-shell magnetic microparticles by cylindrical vector beams [J]. Applied Physics Letters, 2014, 105(18): 181112.
- [10] SHEN G, XUE G, CAI J, et al. Photo-induced reversible uniform to Janus shape change of vesicles composed of PNIPAM-b-PAzPy2 [J]. Soft Matter, 2013, 9(8): 2512-2517.

- [11] XUE G, CHEN K, SHEN G, et al. Phase-separation and photoresponse in binary azobenzene-containing polymer vesicles [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, 436(35): 1007-1012.
- [12] YUAN Y, LI D, ZHANG J, et al. Bridging cells of three colors with two bio-orthogonal click reactions [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(11): 6425-6431.
- [13] PHILLIPS R, KONDEV J, THERIOT J, et al. *Physical biology of the cell* [M]. New York: Garland Science, 2012.
- [14] WANG M D, YIN H, LANDICK R, et al. Stretching DNA with optical tweezers [J]. *Biophysical Journal*, 1997, 72(3): 1335-1346.
- [15] RICKGAUER J P, FULLER D N, SMITH D E. DNA as a metrology standard for length and force measurements with optical tweezers [J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11): 4253-4257.
- [16] DELTORO D, SMITH D E. Accurate measurement of force and displacement with optical tweezers using DNA molecules as metrology standards [J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 104(14): 143701.
- [17] WUITE G J L, SMITH S B, YOUNG M, et al. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity [J]. *Nature*, 2000, 404(6773): 103-106.
- [18] SALOMO M, KEGLER K, GUTSCHE C, et al. The elastic properties of single double-stranded DNA chains of different lengths as measured with optical tweezers [J]. *Colloid and Polymer Science*, 2006, 284(11): 1325-1331.
- [19] WEI M T, ZAORSKI A, YALCIN H C, et al. A comparative study of living cell micromechanical properties by oscillatory optical tweezers [J]. *Optics Express*, 2008, 16(12): 8594-8603.
- [20] GUZM N C, FLYVBJERG H, K SZALI R, et al. In situ viscometry by optical trapping interferometry [J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 93(18): 184102.
- [21] TOLIĆ-N RRELYKKE S F, SCHAFFER E, HOWARD J, et al. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2006, 77(10): 103101-103111.
- [22] BERG-S RENSEN K, FLYVBJERG H. Power spectrum analysis for optical tweezers [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(3): 594-612.
- [23] PETERMAN E J, GITTES F, SCHMIDT C F. Laser-induced heating in optical traps [J]. *Biophysical Journal*, 2003, 84(2): 1308-1316.
- [24] SELVIN P R, HA T. *Single-molecule techniques* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
- [25] YAO A, TASSIERI M, PADGETT M, et al. Microrheology with optical tweezers [J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(17): 2568-2575.
- [26] SQUIRES T M, MASON T G. Fluid mechanics of microrheology [J]. *Annual Review of Fluid*

- Mechanics, 2009, 42(1): 413.
- [27] TASSIERI M, DEL GIUDICE F, ROBERTSON E J, et al. Microrheology with Optical Tweezers: Measuring the relative viscosity of solutions 'at a glance' [J]. Scientific reports, 2015, 5:
- [28] KAWAGUCHI K, ISHIWATA S I. Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 272(3): 895-899.
- [29] NARA I, ISHIWATA S I. Processivity of kinesin motility is enhanced on increasing temperature [J]. Biophysics, 2006, 2(2): 13-21.
- [30] B HM K J, STRACKE R, BAUM M, et al. Effect of temperature on kinesin-driven microtubule gliding and kinesin ATPase activity [J]. FEBS Letters, 2000, 466(1): 59-62.
- [31] 张文静, 李银妹, 楼立人, et al. 应用光镊技术测量液相微区温度 [J]. 中国激光, 2006, 33(5): 663-666.
- [32] SVOBODA K, BLOCK S M. Biological applications of optical forces [J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994, 23(1): 247-285.
- [33] LI D, ZHOU J H, HU X Y, et al. In situ calibrating optical tweezers with sinusoidal-wave drag force method [J]. Chinese Physics B, 2015, 24(11): 626-632.
- [34] SCHRAMM G. A practical approach to rheology and rheometry [M]. Haake Karlsruhe, 1994.
- [35] 张文静, 庄礼辉, 李银妹, et al. 非接触光镊法研究混合液体黏滞系数的组分关系 [J]. 应用激光, 2006, 26(4): 257-260.
- [36] 郭敏. 一种测量液体粘滞系数的新方法 [J]. 物理, 2001, 30(4): 220-222.
- [37] 刘继英. 毛细管法测液体的粘滞系数 [J]. 八一农学院学报, 1994, (4): 89-91.
- [38] 方涌. 奥氏粘滞计测定液体粘滞系数 [J]. 贵州师范大学学报:自然科学版, 2000, 18(3): 60-62.
- [39] 姜雪洁, 盖同祥. 旋转粘度计检测机理分析与改进建议 [J]. 青岛建筑工程学院学报, 2002, 23(1): 67-69.
- [40] 陈刚, 朱震刚, 水嘉鹏. 利用强迫振动扭摆方法测量液体粘滞系数的原理 [J]. 物理学报, 1999, (3): 421-425.
- [41] 郭敏, 赵敬忠. 一种测量泥浆粘度的新方法——微机控制超声多普勒法 [J]. 中国陶瓷, 2001, 37(2): 39-40.
- [42] 徐建峰, 李荣胜, 周静, et al. 用布里渊散射测量水的体粘滞系数 [J]. 光学学报, 2001, 21(9): 1112-1115.
- [43] HELFER E, HARLEPP S, BOURDIEU L, et al. Microrheology of biopolymer-membrane complexes [J]. Physical Review Letters, 2000, 85(2): 457-460.
- [44] 汪志诚. 热力学·统计物理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [45] LING L, GUO H L, HUANG L, et al. The Measurement of Displacement and Optical Force in

- Multi-Optical Tweezers [J]. Chinese Physics Letters, 2012, 29(1): 14214.
- [46] WANG Z Q, ZHOU J H, ZHONG M C, et al. Calibration of optical tweezers based on an autoregressive model [J]. Optics Express, 2014, 22(14): 16956-16964.
- [47] LI X C, SUN X D. Improvement of the axial trapping effect using azimuthally polarised trapping beam [J]. Chinese Physics B, 2010, 19(11): 119401.
- [48] VISSCHER K, GROSS S P, BLOCK S M. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1996, 2(4): 1066-1076.
- [49] GITTES F, SCHMIDT C F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers [J]. Optics Letters, 1998, 23(1): 7-9.
- [50] HAJIZADEH F, MOUSAVI S M, KHAKSAR Z S, et al. Extended linear detection range for optical tweezers using image-plane detection scheme [J]. Journal of Optics, 2014, 16(10): 105706.
- [51] SVOBODA K, SCHMIDT C F, SCHNAPP B J, et al. DIRECT OBSERVATION OF KINESIN STEPPING BY OPTICAL TRAPPING INTERFEROMETRY [J]. Nature, 1993, 365(6448): 721-727.
- [52] GHISLAIN L P, SWITZ N A, WEBB W W. Measurement of small forces using an optical trap [J]. Review of Scientific Instruments, 1994, 65(9): 2762-2768.
- [53] CAPITANIO M, ROMANO G, BALLERINI R, et al. Calibration of optical tweezers with differential interference contrast signals [J]. Review of Scientific Instruments, 2002, 73(4): 1687-1696.
- [54] VALENTINE M T, DEWALT L E, OU-YANG H D. Forces on a colloidal particle in a polymer solution: A study using optical tweezers [J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 1996, 8(47): 9477-9482.
- [55] KHEIFETS S, SIMHA A, MELIN K, et al. Observation of Brownian Motion in Liquids at Short Times: Instantaneous Velocity and Memory Loss [J]. Science, 2014, 343(6178): 1493-1496.
- [56] CZERWINSKI F, RICHARDSON A C, ODDERSHEDE L B. Quantifying noise in optical tweezers by Allan variance [J]. Optics Express, 2009, 17(15): 13255-13269.
- [57] GONG Z, WANG Z, LI Y M, et al. Axial deviation of an optically trapped particle in trapping force calibration using the drag force method [J]. Optics Communications, 2007, 273(1): 37-42.

第4章 驱动蛋白动力学特性

4.1 引言

驱动蛋白(kinesin)家族在细胞中起着非常重要的作用,如沿着微管运输细胞器^[1]、牵引染色体^[2]和组装纺锤体微管^[3]等。利用光镊对微小物体的操纵能力研究单个驱动蛋白分子的运动特性,是非常有价值的研究课题,Block等人已作出了突出贡献。1990年Block等人首次用光镊观察到了单个驱动蛋白(Kinesin-1)分子沿着微管运动的现象^[4]。1993年在分子水平上首次观测到了Kinesin-1分子在微管轨道上以8 nm的步幅阶梯式前进的情形,证明了驱动蛋白分子将化学能转换为机械能的过程是非连续的^[5]。随着研究的深入,用光镊研究驱动蛋白已经取得了一批出色的研究结果,比如测量出最大负载力为5 - 7 pN^[6],证实驱动蛋白的每一步运动是由一个ATP分子的水解驱动的^[7],以及确定了驱动蛋白的“交出手”运动模式^[8]等。最近关于驱动蛋白的研究主要集中于多个驱动蛋白分子协同运动时的运动特性^[9,10]。目前,研究驱动蛋白的力学特性已经是光镊技术的典型应用之一。

4.1.1 CENP-E 蛋白

CENP-E蛋白是Kinesin蛋白家族中的一种蛋白,它对细胞有丝分裂过程中的染色体的平均分配有重要作用。在细胞有丝分裂过程中纺锤体微管不断聚合和解聚,而位于染色体上的着丝粒动点蛋白机器能够正确捕获微管并保证着丝粒与微管粘连的稳定性。然后,随着微管与一系列蛋白质复合物协同作用,染色体排列到赤道板并最终将遗传信息均匀分配到子代细胞中。其中,CENP-E蛋白是维持“动点-微管”连接的稳定性以及实现纺锤体检查点功能的至关重要的一个大分子驱动蛋白。目前国际上关于CENP-E蛋白单分子力学特性研究较少。

4.1.2 微分干涉相衬显微镜

微分干涉相衬(Differential Interference Contrast, DIC)显微镜是Nomarski于1952年在相差显微镜原理的基础上发明的。DIC显微镜的优点是其成像能呈现样品三维结构,物体具有浮雕感。此外,与相差显微镜相比,DIC显微镜的标本可略厚一点,折射率差别更大,故影像的立体感更强。

DIC显微镜可直接观察无标记的微管^[11],从而方便光镊操纵修饰有驱动蛋白

的微球定位到固定在玻片表面的微管上,进而借助被捕获微球测量驱动蛋白沿微管运动的动力学特性或驱动蛋白与微管相互作用的力学特性。因此,耦合了 DIC 显微镜的 DIC 光镊是驱动蛋白力学特性研究中必不可少的实验装置。

虽然前人利用 DIC 光镊进行了大量关于驱动蛋白的单分子实验研究,但是关于 DIC 光镊光阱特性的研究非常少,导致 DIC 光镊仅可测量微球沿特定方向 (CCD 上的水平方向/ x 方向) 运动时微球所受的光阱力和微球的位移。因此,在光镊研究驱动蛋白的力学特性时,只能选择沿着 x 方向固定的微管进行实验^[6, 7, 12],并用四象限探测器追踪驱动蛋白驱动微球的运动^[13]。但在将溶液中的微管固定在玻片表面的过程中,微管受到溶液分子无规则热运动的作用,并导致固定后微管的排布方向是随机的。因此之前只选择沿 x 方向的微管进行实验的做法将严重影响实验效率和实验精度。

综合上述问题,在应用 DIC 光镊开展驱动蛋白单分子力学研究之前需要首先解决三个问题:如何令 DIC 光镊可测量微球沿任意方向运动时微球所受的光阱力和微球的位移,DIC 光阱与普通光镊相比有何新特性,DIC 特性是否影响单分子实验。因此,本章我们首先从理论和实验两方面研究 DIC 光阱的特性,展示前人所忽略的 DIC 光镊的光阱刚度和“电压-位移”转换系数的各向异性特点,给出存在各向异性时的数据处理方法。然后,结合测量驱动蛋白 Kinesin-1 的动力学特性的实验,说明光镊各向异性特点对驱动蛋白的影响。最后,应用 DIC 光镊测量 CENP-E 蛋白的力学特性。

4.2 微分干涉相衬光镊的新特性

DIC 光镊是在普通光学显微镜光镊基础上结合 DIC 成像技术构成,它是将准直高斯光束引入 DIC 显微镜而构建出来的。结合 1.5.2 节中 DIC 光学显微镜的构造和原理,本节对 DIC 光镊的力学特性进行深入的讨论和研究,并提出 DIC 光镊研究驱动蛋白力学特性时所应注意的问题。下面我们将首先介绍 DIC 光镊中的新奇力学现象。

4.2.1 运动方向与受力方向不一致

当用 TDFM 方法标定光阱刚度时,被捕获微球在流体粘滞阻力和光阱力的共同作用下在两个平衡位置间来回跳动,两个平衡位置的连线应与流场的方向平行。

但我们发现压电载物台驱动样品溶液沿着 x 方向运动时,DIC 光阱中微球的运动方向与溶液的流动方向不一致,如图 4-1 所示。

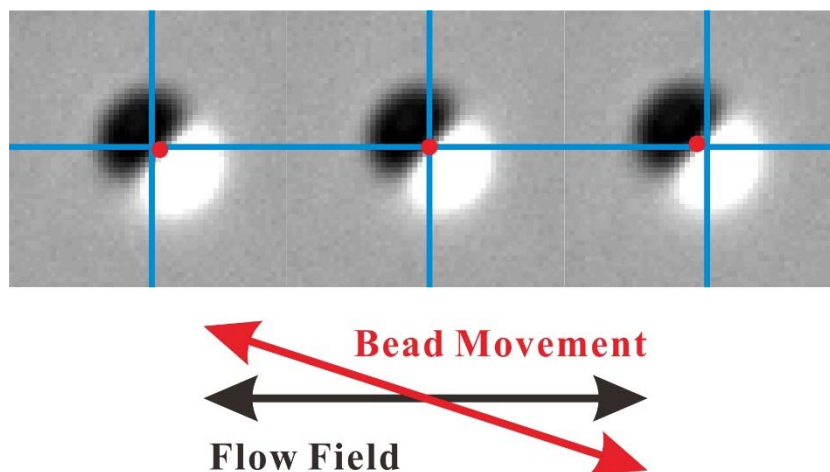


图 4-1 DIC 光镊捕获的微球在水平流场中的运动录像

图为 DIC 光阱中微球在外加流场中的三帧运动录像，其中黑白半圆图像为直径 500nm 微球，红色圆点为微球的中心位置，黑色箭头指示流场方向，红色箭头指示微球运动方向。可明显的观察到微球有沿垂直于流场方向的位移。

在图 4-1 中，微球只受到光阱力和流体粘滞阻力的作用，而我们观测到微球有垂直于流畅方向的位移。这一现象看似违反了“物体受到两个力的作用而平衡时，这两个外力应大小相同方向相反”的物理规律。欲解释这种“违反”物理规律的现象，必须要深入分析 DIC 光镊的光学原理。

4.2.2 DIC 光镊的光学模型

目前商用 DIC 显微镜（包括我们用的 IX 71 显微镜）中都是用 Nomarski 棱镜作为偏振分光元件，因此将以此作为示例展开讨论。

图 4-2 给出 DIC 光镊的光学模型。这是从单分子皮牛力谱仪的光路图 2-1 简化而来，保留了 DIC 光镊中的必要光学元件。

如图所示，从激光器出射的激光，经过 L1-L2 透镜组扩束为直径 6 mm 的准直高斯光束，然后经过 PBS 分光为两束，其中反射光 S 被截断了，不再进入显微镜，而透射光 P 光（偏振方向平行于光学平台，即水平偏振）经过 L3-Tube Lens 的 1:1 望远镜系统进入进入显微镜。

随后 P 光经过 DIC 显微镜中的第一个偏振元件——检偏器（图 4-2 中的 Analyzer）。实验表明，检偏器对任意偏振方向的线偏振 1064 nm 激光的透过率都在 79.4%左右（透射率的变化小于 0.5%），对 1064 nm 的红外光没有偏振调制功能，因为检偏器是对可见光波段设计的。

接着，P 光将通过第一个 Nomarski 棱镜（图 4-2 中的 Nomarski Prism A，在

IX 71 显微镜中为 DIC 滑板)。经检查该棱镜不仅对可见光有效, 也对 1064 nm 的线偏振光进行分光; 由于棱镜的晶体光轴与 P 光的偏振方向为 45° 夹角, 因此 P 光经过棱镜后将分为偏振方向互相垂直的两束光, 如图 4-2 中的 1 和 2 光线所示。

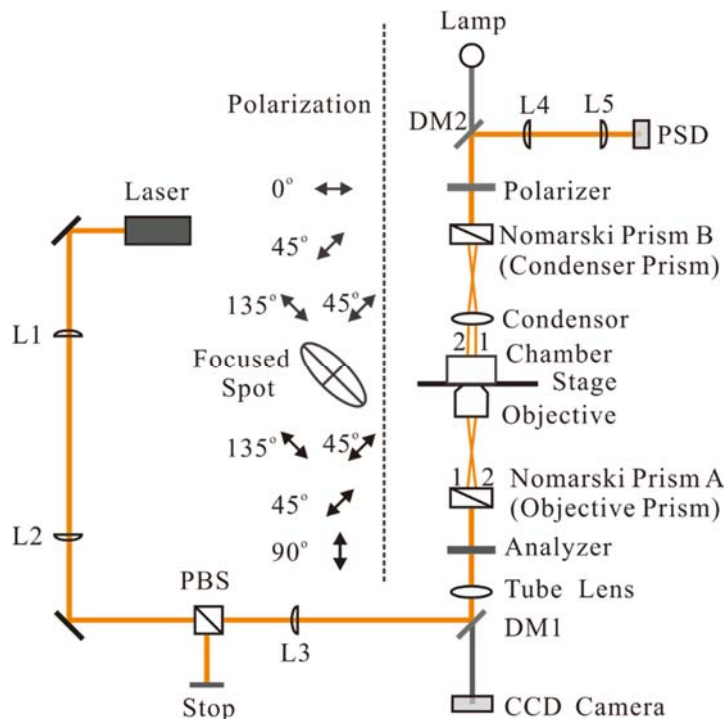


图 4-2 DIC 光镊的光路原理图

由单分子皮牛力谱仪的光路图 2-1 简化而来, 只保留了 DIC 光镊部分所用和所关心的部分, 其中 DIC 的元件包括一个起偏器 (Polarizer), 两个棱镜 (Nomarski Prism A 和 B) 以及一个检偏器 (Analyzer)

两束光经过物镜汇聚后在成像面形成两个强汇聚的光斑, 光斑中心的连线与显微镜的放置方向成 45° 夹角, 即连线与 CCD 图像的 x 轴成 45° 或 135° 夹角。由于两个光斑相距极近, 间距小于衍射极限也小于微球的直径, 因此两个光斑将干涉叠加形成一个光阱捕获粒子^[12, 14]。

之后, 被微球散射和折射的激光经过聚光镜的收集以及聚光镜棱镜 (图 4-2 中的 Nomarski Prism B, 在 IX 71 显微镜中为 DIC 环) 的合束, 形成一束前向散射光并经过起偏器 (图 4-2 中的 Polarizer)。此时的起偏器依旧对 1064nm 激光无作用。

最后, 用 BFP 探测方法, 通过 L4 和 L5 两个透镜接力成像的方式将聚光镜后焦面出的光场分布成像至探测器。

4.2.3 光阱新特性

在这一小节，依据 DIC 光镊的光学模型，细致分析 DIC 光镊区别于普通光镊的新特性。

4.2.3.1 入射光的偏振方向影响光阱平衡位置

在前面的分析中，P 光将被物镜棱镜分成两束偏振方向相互垂直的 o 光和 e 光，当这两束光通过高数值孔径物镜后，在焦点处形成两个高度汇聚并相互重叠的光斑，进而形成干涉光阱。因此，进入显微镜的 P 光的偏振方向将会直接影响物镜焦点附近的两个光斑的强度比值，进而影响被捕获微球在光阱中的平衡位置。

为了验证这一结论，我们在图 4-2 的 PBS 和透镜 L3 之间加入半波片来调节进入显微镜的捕获光的偏振方向，然后借助被捕获微球，测量不同偏振角度下的光阱平衡位置。图 4-3 为光阱平衡位置分布图，图中角度值为进入显微镜的偏振光与水平方向（即未加半波片时的 P 光偏振方向）的夹角， 0° 表示偏振方向为水平方向，其他偏振方向对应的角度依照“顺时针方向为正，逆时针方向为负”的方式确定；每个偏振角度所对应的光阱平衡位置为角度值边上的黑色圆点，光阱平衡位置集中分布在 $100\text{ nm} \times 100\text{ nm}$ 的方形区域内。下面我们将逐条对比理论分析结果与实验结果的异同点，并分析异同点的产生原因。

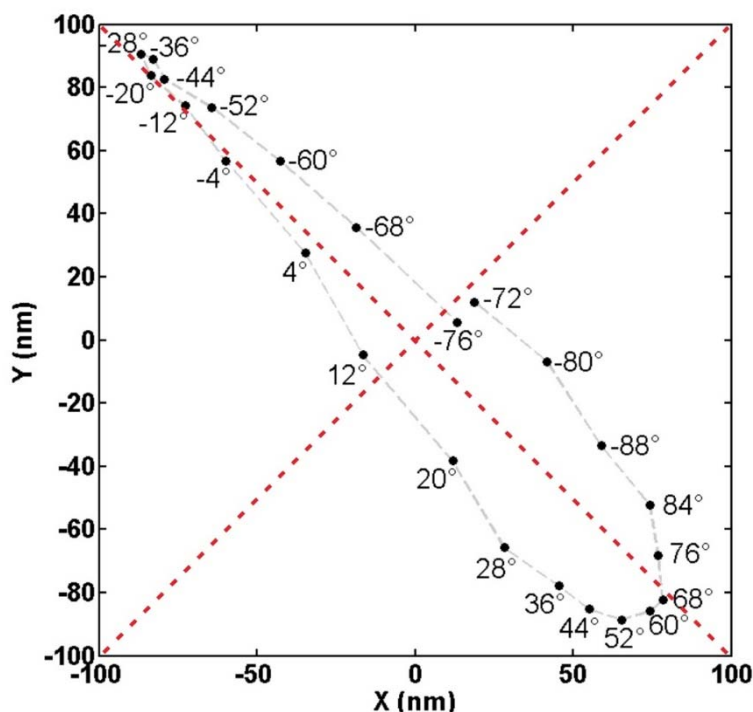


图 4-3 捕获光的偏振方向对 DIC 光阱位置的影响

此图是垂直于物镜主光轴的 x - y 平面内的光阱平衡位置分布图。图中的角度值为进入显微镜

的偏振光与水平方向（即未加偏振片时的 P 光偏振方向）的夹角， 0° 表示偏振方向为水平方向，其他偏振方向对应的角度依照“顺时针方向为正，逆时针方向为负”的方式确定；每个偏振角度所对应的光阱平衡位置为角度值边上的黑色圆点，光阱平衡位置集中分布在 $100\text{ nm}\times 100\text{ nm}$ 的方形区域内，对角线在图中用红色虚线标出。

我们关心的是入射光偏振方向与光阱中心位置的关系。根据理论模型，当改变入射光的偏振方向时，o 光和 e 光经物镜汇聚的光斑位置不变，而两者的光强比应从 0:1 变化至 1:0，即光阱平衡位置应在 o 光汇聚点和 e 光汇聚点之间往复移动。根据对称性可知，移动路径应为 CCD 图像中 45° 直线。实验中光阱平衡位置的确呈现斜 45° 分布；但并不是直线，而是一条比较窄的条带，条带长度约 240 nm 最大宽度约 45 nm 。分析造成光阱平衡位置的分布不是直线的原因是由于半波片不完全垂直于捕获光导致的。这个推论可由如下实验现象证明：如果故意将半波片倾斜放置，则可观察到这个条带宽度加大。

由对称性可知，偏振方向旋转 180° 前后的光阱平衡位置应重合。这一点在实验中得到了很好的验证，图 4-3 中 -72° 的平衡位置与 -76° 的平衡位置非常接近。

根据 DIC 显微镜的构造原理，物镜棱镜会将偏振方向与晶体主界面成 45° 夹角的线偏振光（即 P 光）均匀的分为 o 光和 e 光，此时光阱的平衡位置应在光阱分布图的中心位置，即图 4-3 中两个对角线的交点处。但是图中 P 光的平衡位置（即图中 0° 的光阱平衡位置）距离中心点约 60 nm ，这一距离与光阱分布条带的宽度相近，也应该是半波片安装不正造成的。

综合上述实验结果，P 偏振方向确实会影响被捕获微球在光阱中的平衡位置。同时，这一结论也反过来证明了我们给出的 DIC 光镊的光学模型的合理性。

4.2.3.2 光阱力不一定指向光阱中心

DIC 光阱是由两束偏振方向相互垂直的强聚焦激光叠加而成。我们采用矢量衍射理论^[15]模拟偏振方向相互垂直的两束高斯光强聚焦在焦点附近的光强密度，如图 4-4 所示。从图中可以看出，从中心开始光强减弱迅速，将 o 光和 e 光的光场叠加起来之后，光强分布就变成各向异性。强度的轮廓线（白色曲线）呈现椭圆分布，对称轴为像平面内 45° 和 -45° 。由于微球在光阱中的受力方向是指向光强轮廓线的法线方向，因此对椭圆状的轮廓线而言，微球受力方向将不再指向光阱中心。对光阱力的模拟结果同样反应出这一特性，图 4-4 中的箭头即为该位置微球的受力方向。微球在对称轴附近受到的光阱力指向光阱中心，但是其它位置的微球受到的光阱力不指向光阱中心，比如当微球处于 x 轴的负半轴时，光阱力并不平行指向 x 轴正方向，而是与 x 轴正方向成 16° 夹角并指向第一象限。因

此除非微球沿着 $\pm 45^\circ$ 的光强对称线运动，否则微球受到的光阱力不指向光阱中心。

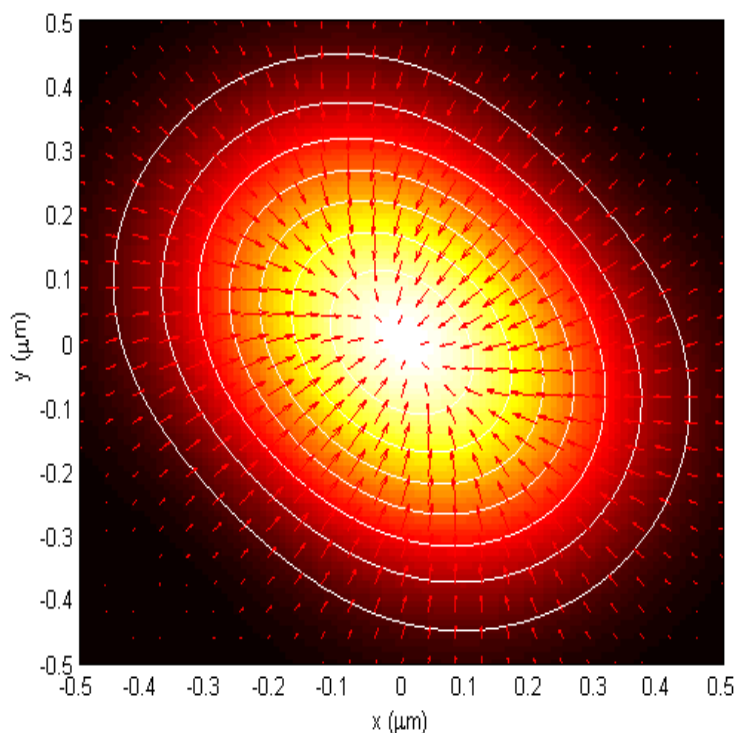


图 4-4 物镜焦平面的聚焦光束密度分布以及光阱力分布

图中颜色越亮，代表光强越强，白色曲线是强度的轮廓线，箭头指示光阱力方向。

由于微球偏离光阱中心时受到的光阱力大都不指向光阱中心，因此这里我们首先定义两个角度，第一个是微球受力的角度 $\tan \theta_f = F_y / F_x$ ，第二个是微球偏离光阱中心处于 (x, y) 处的空间角度 $\tan \theta_p = y / x$ 。理论模拟表明，在微球角度 θ_p 取 0 到 2π 范围时，两个角度的差值 $(\theta_f - \theta_p)$ 呈现震荡变化的趋势，如图 4-5 中黑色曲线所示。

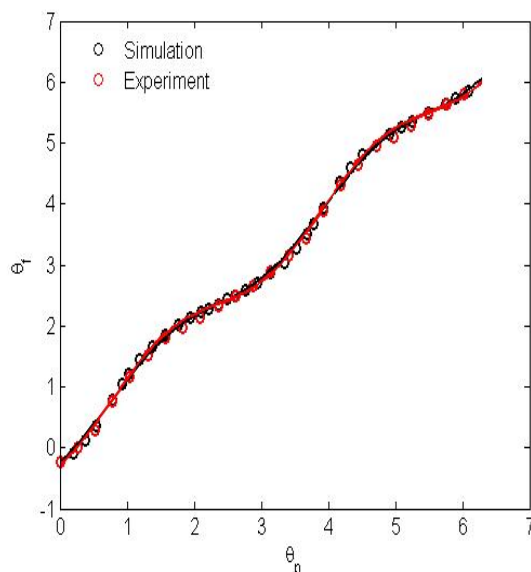


图 4-5 微球受力的角度与微球位置角度之间的变化关系

微球偏离光阱中心的角度 θ_p 取 0 到 2π 范围内时，微球受力的角度 θ_f 呈现震荡变化的趋势，黑色的曲线为理论模拟结果，红色曲线为实验结果。

为了进一步说明理论的合理性，我们用流体力学法^[16, 17]测量微球的受力与方位角的关系。实验设置压电载物台 x 方向和 y 方向同步线性振动，振动方向为 180° 内间隔 15° 的 12 个方向，振动方向即微球受流体力的方向 θ_f ，实际合振幅 $5 \mu\text{m}$ 。其中压电载物台运动幅度根据功率谱方法进行修正^[18]，流体粘滞系数根据离底高度进行修正^[19]。通过自相关方法追踪微球的位置，进而可以计算出微球位置的角度 $\tan\theta_p = y/x$ ，如图 4-5 中红色曲线所示。

图 4-5 表明理论和实验结果十分吻合，证实了 DIC 光阱中微球受到的光阱力的方向并不指向光阱中心，即的微球偏离光阱中心的方向与微球受力的方向不一致，合理解释 4.2.1 节中“违反”物理规律的现象了。

当应用 DIC 光镊研究驱动蛋白的力学特性时，微球沿着微管运动，微球受到的光阱力的方向与运动方向不一致，则 DIC 光阱会产生一个垂直于微管方向的分量，这个力的分量有可能会影响驱动蛋白沿微管的定向运动。因此为了避免外力的干扰，应尽量选择沿着 $\pm 45^\circ$ 的光强对称轴方向的微管进行实验，而不是前人的实验^[6, 7, 12]中沿着 CCD 上的水平方向。

4.2.3.3 光阱刚度各向异性分布

准确地标定光阱刚度是定量测量光阱力的前提。根据前面的分析，当微球沿着任意方向 θ_p 运动时，光阱刚度可被描述为 $k_{\theta_p} = F_{\theta_p} / \Delta(\theta_p)$ ，其中 $\Delta(\theta_p)$ 是微球

偏离光阱中心的位移, F_{θ_p} 是微球受到的光阱力。当 $\Delta(\theta_p)$ 为 50~60 nm 时, 模拟得到归一化光阱刚度分布相对位置角度的关系如图 4-6 黑色圆圈所示。这个分布呈现对称的花生形状。最大的光阱刚度在 $\theta_p = \pi/4$ 附近的长轴方向上, 最小刚度在 $\theta_p = -\pi/4$ 的短轴方向上。用 4.2.3.2 节中的流体力学法测量得到的光阱刚度以图 4-6 中的红色圆圈表示, 它与理论模拟结果非常相近, 也是对称的花生型分布, 并且对称轴也与模拟结果的对称轴相近。模拟和实验结果都证明了光阱刚度呈现各向异性的特点。

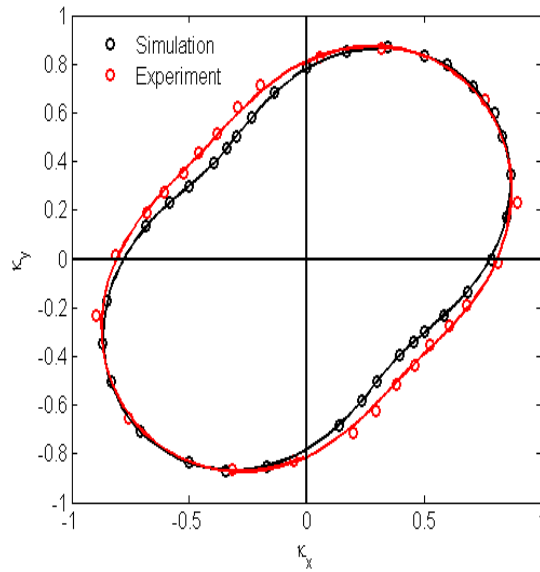


图 4-6 归一化光阱刚度分布相对位置角度的关系

图中黑色圆圈为理论模拟结果, 黑色曲线为正弦拟合“光阱刚度-位置角度”的结果; 红色圆圈为实验结果, 红色曲线为正弦拟合“光阱刚度-位置角度”的结果。

为了能够将标定的光阱刚度直接用于实验数据的标定, 我们尝试对模拟和实验结果用方程 $\kappa_{\theta_p} = A \sin(B\theta_p + C) + D$ 进行正弦拟合, 其中 A , B , C 和 D 是拟合参数。用模拟到的光阱刚度进行拟合, 得到四个参数分别为 0.2213, 1.9992, 0.0001 和 0.7814, 确定系数 R^2 为 0.9998。对实验数据进行拟合, 得到四个参数分别为 0.1827, 2.0034, -0.0116 和 0.8117, 确定系数 R^2 为 0.9932。两种情况下的确定系数 R^2 均高于 0.99, 因此可认为使用正弦函数拟合是合理的。结合物理意义, 我们将拟合方程重新写为

$$\kappa_{\theta_p} = A \sin(2\theta_p + \varphi_k) + \kappa_0, \quad (4.1)$$

其中 A 为光阱刚度波动振幅, κ_0 为各个方向光阱刚度的平均值, φ_k 为角度偏置常数。从拟合结果知, 模拟结果和实验结果的刚度最大值和最小值之差分别达到了 44% 和 37%; 这是非常大的实验误差, 会严重影响不同方向光阱力的大小的测量, 特别是当应用 DIC 光镊研究驱动蛋白的力学特性时, 玻片底面固定的微管的取向是随机, 则若忽略光阱刚度各向异性将严重影响测得的微球沿着微管运动时受到的光阱力。

4.2.3.4 “电压-位移”转换系数各向异性分布及“电信号-位移信号”转换方法

精确标定微球的“电压-位移”转换系数是将 PSD 电信号转化为微球位移信号的前提。应用 DIC 光镊测量驱动蛋白的动力学特性时, 由于玻片底面固定的微管的取向是随机, 因此, 微球沿微管运动时的运动方向大都不沿着 x 方向或 y 方向。此时, PSD 探测到的微球位置信号存在 V_x 和 V_y 两个分量, 即对应两个“电压-位移”转换系数 $CF_x = D_x/V_x$ 和 $CF_y = D_y/V_y$, 其中 D_x 和 D_y 分别为微球在 x 方向和 y 方向的位移分量。

实验表明, DIC 光镊中被捕获微球的运动方向发生改变时, “电压-位移”转换系数 CF_x 和 CF_y 都会发生相应变化。为了能在后续的数据处理中将 PSD 得到的电压信号有效的转换为微球的位置信息, 需要寻找一种转化方法。

为了寻找转化方法, 首先, 建立 PSD 的电压信号坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 和微管坐标系 $x_{MT}-y_{MT}$ 。当微球处于 PSD 探测范围内的任意位置时, 微球的空间坐标 (D_x, D_y) 与相应的 PSD 电压信号坐标 (V_x, V_y) 一一对应, 因此可建立 PSD 电压信号坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 描述微球位置, 坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 的原点与光阱中心重合, 如图 4-7 (a) 所示。当微球沿微管运动至 (V_x, V_y) 处时, 微球运动方向在坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中空间角度 θ_V 为 $\tan \theta_V = V_y/V_x$, θ_V 也是微管在坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中的方向。将微管的方向定义为 x_{MT} , 垂直于微管的方向定义为 y_{MT} , 建立微管坐标系 $x_{MT}-y_{MT}$ 。此外, 定义微球的合“电压-位移”转换系数 (Resultant Conversion Factor, RCF) 为

$$RCF = \sqrt{D_x^2 + D_y^2} / \sqrt{V_x^2 + V_y^2} \quad (4.2)$$

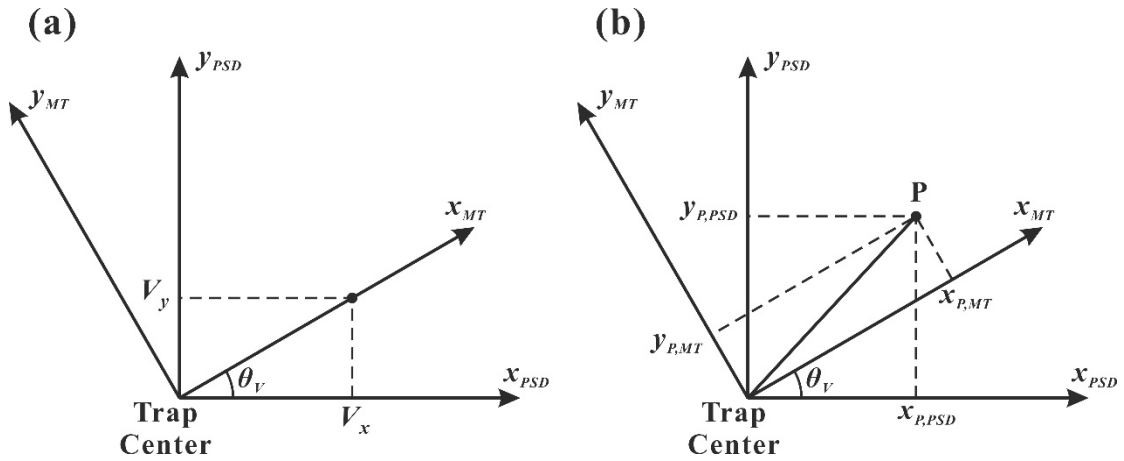


图 4-7 PSD 电压信号坐标系与微管坐标系的关系

PSD 电压信号坐标系 x_{PSD} - y_{PSD} 与微管坐标系 x_{MT} - y_{MT} 之间的夹角为 θ 。空间中任意一点 P 在 PSD 电压信号坐标系 x_{PSD} - y_{PSD} 中的坐标 $(x_{P,PSD}, y_{P,PSD})$ 可通过矩阵运算的方式转变为微管坐标系 x_{MT} - y_{MT} 中的坐标 $(x_{P,MT}, y_{P,MT})$ 。

然后，用流体力学法测量不同运动方向 θ_V 的 RCF 的变化情况。设定 12 个压电载物台的振动方向，即 x - y 平面内 $0^\circ \sim 180^\circ$ 间隔 15° 的 12 个振动方向，实际合振幅 $5 \mu\text{m}$ 。

实验结果如图 4-8 黑色圆圈所示， RCF 与 θ_V 之间呈现正弦关系，因此我们尝试用正弦函数

$$RCF(\theta_V) = a_{RCF} \sin(b\theta_V + c) + RCF_0 \quad (4.3)$$

对实验数据进行拟合，其中 a_{RCF} 为 RCF 的波动振幅， b 和 c 为拟合参数， RCF_0 为各角度的 RCF 的平均值。图 4-8 中红色曲线为正弦拟合结果， a_{RCF} 等四个拟合参数分别 1544.5, 1.9875, 3.3502 和 5437.7，确定系数 R^2 为 0.9929。

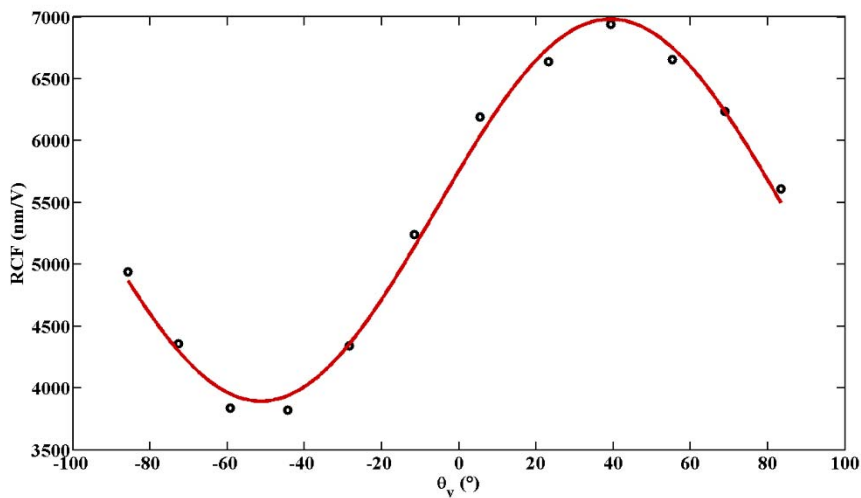


图 4-8 “电压-位移”转换系数与 PSD 信号角度间的变化关系

圆圈为实验测量点，曲线为测量数据点的正弦拟合结果。确定系数 R^2 为 0.9929

确定系数 R^2 高于 0.99，因此可认为用正弦函数(4.3)拟合“ $RCF-\theta_V$ ”数据是合理的。此外，根据对称性可知，流体力学法中压电载物台运动方向取 $0^\circ\sim 180^\circ$ 时测得的 RCF 应与取 $180^\circ\sim 360^\circ$ 运动时的测量结果对称，即拟合到的正弦函数的周期应为 180° 。根据实验结果拟合得到的正弦函数的周期为 181° ，两者吻合极好。充分表明用正弦函数拟合“ $RCF-\theta_V$ ”数据是合理的。

若将相应角度的 RCF 和 PSD 电信号带入(4.2)式中计算微球的沿微管的位移，则(4.2)式中的平方和开方运算以及微球布朗热噪声将对运动信号产生强烈的干扰，并在微球运动幅度较小时产生很大的测量误差。因此，我们用坐标变换的方式求解微球位移对应的 PSD 坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中的电信号，如图 4-7 (b) 所示。空间中的任意一点 P 在 PSD 坐标系中的坐标为 $(x_{P,PSD}, y_{P,PSD})$ ，在微管坐标系 $x_{MT}-y_{MT}$ 中的坐标为 $(x_{P,MT}, y_{P,MT})$ ，两坐标应满足如下关系：

$$\begin{pmatrix} x_{P,MT} \\ y_{P,MT} \end{pmatrix} = Rot(\theta_V) \begin{pmatrix} x_{P,PSD} \\ y_{P,PSD} \end{pmatrix}, \quad (4.4)$$

其中 $Rot(\theta_V) = \begin{pmatrix} \cos \theta_V & \sin \theta_V \\ -\sin \theta_V & \cos \theta_V \end{pmatrix}$ ， θ_V 为两坐标系的夹角。通过方程(4.4)即可求得

微球位移对应的 PSD 坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中的电信号 $x_{P,MT}$ ， $x_{P,MT}$ 乘以相应角度的 RCF 即得到微球沿微管方向的位移。

PSD测得的微球在驱动蛋白牵引下的运动信号如图 4-9所示，其中 (A) 图和 (B) 图分别是探测器信号的x和y分量。坐标变换后的沿着微管方向的运动信号和垂直于微管方向的运动信号分别如图 4-9 (C) 和 (D) 所示。对比坐标变换前后的运动信号可知，坐标变换的方法可将沿着微管运动的信号很好地分离出来，且噪声水平未发生变化。图中可观察到光阱力超过驱动蛋白负载力导致驱动蛋白从微管上脱离，微球迅速回到光阱中心的过程。

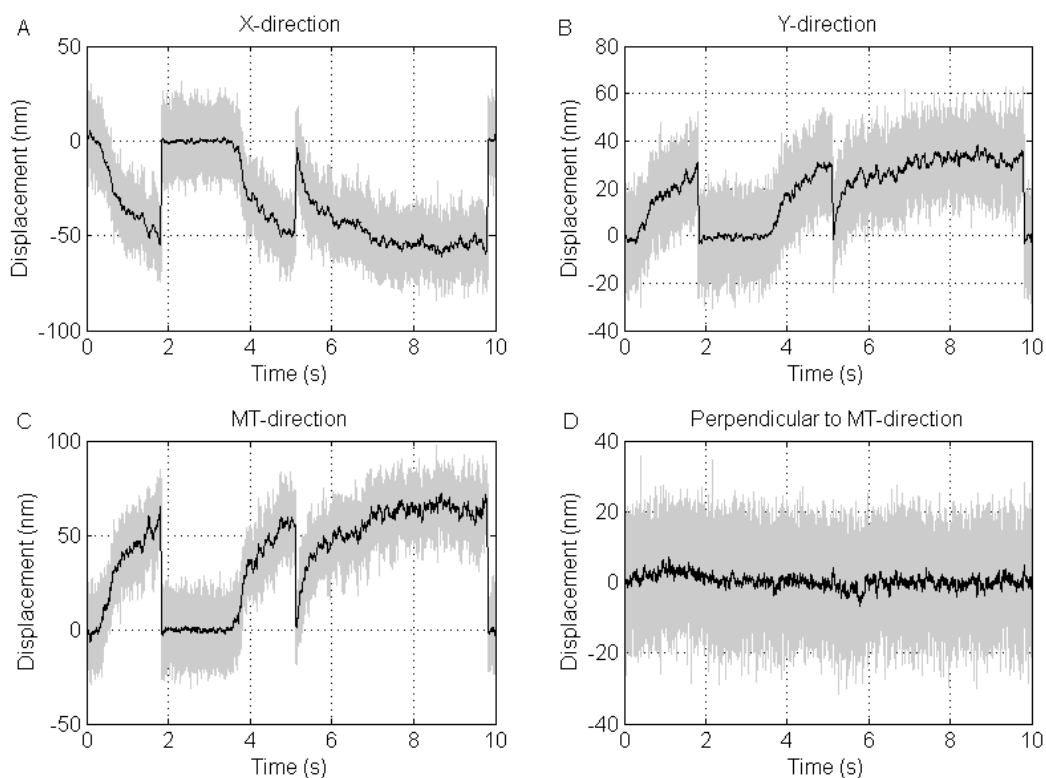


图 4-9 驱动蛋白运动的 PSD 信号

图中灰色实线为 PSD 记录的微球位置信号，黑色实线为原始数据平滑滤波后的结果，滤波窗口为 5 ms。(A) 图和 (B) 图分别是探测器信号的 x 和 y 分量。(C) 图和 (D) 图分别为坐标变换后的沿着微管方向的运动信号和垂直于微管方向的运动信号。

综上，我们完成了 DIC 光镊中将 PSD 的电信号转化为微球位移信号的新方法：首先根据 PSD 电信号计算出微球运动方向在坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中空间角度 θ_V ；然后将角度带入事先标定的“ $RCF-\theta_V$ ”关系式(4.3)中求解微球的合“电压-位移”转换系数 RCF ；接着用坐标变换的方式求解微球位移对应的 PSD 坐标系 $x_{PSD}-y_{PSD}$ 中的电信号 $x_{P,MT}$ ；最后将 RCF 与 $x_{P,MT}$ 相乘即可求得微球的位移。利用该方法我们可以量化 DIC 光阱中 PSD 的电信号所对应的微球位移大小。

4.2.4 小结

本节首先指出了 DIC 光镊中“违反”物理规律的现象。然后从 DIC 光镊的光学模型出发，分析并展示了 DIC 光镊区别于普通光镊的各向异性特点。最后给出 DIC 光镊光阱刚度的标定方法和 PSD 电信号转化为位移信号的方法。这些讨论有助于应用 DIC 光镊进行驱动蛋白的研究。

4.3 DIC 光镊研究驱动蛋白的实验方法

本小节从制备驱动蛋白样品, 检测驱动蛋白活性, 定量测量驱动蛋白运动参数和标定驱动蛋白单分子浓度四个方面详细阐述 DIC 光镊研究驱动蛋白的实验方法。

4.3.1 纯化驱动蛋白

纯化出所需要的蛋白是进行后续单分子动力学研究的基础。我们共纯化了两种蛋白, 分别是非全长的 Kinsin-1 蛋白(只包含了蛋白 N 端的前 560 个氨基酸, 简记为 K560 蛋白)和非全长的 CENP-E 蛋白(只包含了蛋白 N 端的前 473 个氨基酸)。

K560 蛋白为大肠杆菌表达, 并通过 Ni-NTA 琼脂糖亲和的方法纯化^[20]。先用高浓度咪唑洗脱缓冲液(Elution Buffer: 25 mM pipes; 300 mM KCl; 200 mM imidazole; 2 mM MgCl₂; 0.5 mM EGTA;)将蛋白洗脱。接着使用 BRB 80 缓冲液(80 mM K-Pipes, pH 6.8, 1 mM MgCl₂和 1 mM EGTA)脱盐, 加入 10%的蔗糖。最后马大蛋白储液用小管分装, 液氮速冻后长期保存在-80℃。

CENP-E 蛋白的纯化方法与 K560 类似, 区别是 CENP-E 蛋白冻存前加 10%的甘油。

4.3.2 聚合微管纤维

在含有三磷酸鸟苷(guanosinetriphosphate, GTP)的 BRB 80 缓冲液中, 37℃ 孵育 10mg/ml 的无标记的微管蛋白(tubulin)和 5mg/ml 的带有罗丹明标记的微管蛋白 30 分钟, 然后用紫杉醇(Taxol)固定微管以防解聚。最后分装为小管用液氮速冻后长期保存在-80℃。

4.3.3 快速检测驱动蛋白活性

驱动蛋白纯化完成后, 首先需要检测蛋白活性。用凝胶电泳法检测蛋白的纯度, 无法检测蛋白的运动活性。因此, 我们用显微荧光观察微管滑行^[21]的方式检测蛋白运动活性。该方法检测速度快, 实验简单, 样品准备也比较简单。

实验中, 我们首先用高浓度的无荧光标记的驱动蛋白孵育单分子样品室(制作方法见 2.2.7.1 节) 10 分钟。然后用实验缓冲液(Assay Buffer: BRB 80 缓冲液中加入 1 mM ATP、1 mM 二硫苏糖醇、50 μg/ml 酪蛋白、10 μM 紫杉醇、1.2 μg/ml 磷酸肌酸激酶、2.4 mM 磷酸肌酸、250 μg/ml 葡萄糖氧化酶、70 μg/ml 过

氧化氢酶和 10 mg/ml 葡萄糖) 冲洗样品室, 洗掉未固定在玻片底面的游离驱动蛋白。然后用封闭剂 (Assay Buffer 中加入 0.02% 的酪蛋白) 封闭样品底面 10 分钟, 防止微管粘在底面上。最后, 用 Assay Buffer 冲洗样品室, 并加入带有罗丹明标记的微管的悬浮液, 即完成样品室的准备工作。

将准备好的样品室置于显微镜上, 用荧光观察样品室底面的微管运动情况, 寻找是否存在定向运动的微管。图 4-10 为驱动蛋白活性良好时的实验结果, 图中箭头指示驱动蛋白的大概位置。对比 4 帧图片可明显的观察到微管的定向运动。此时即说明驱动蛋白具有活性。

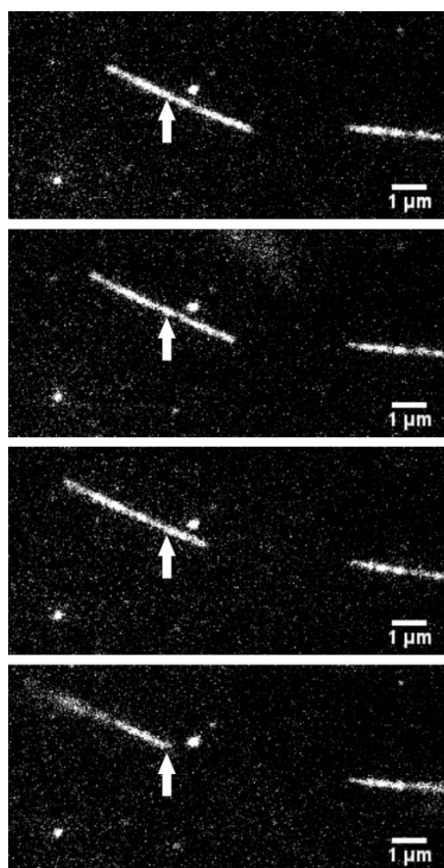


图 4-10 荧光观察驱动蛋白运动录像

无标记的驱动蛋白固定在玻片表面, 罗丹明标记的微管悬浮游离在溶液中, 荧光观察底面附近的微管的运动情况。图中箭头处为 K560 蛋白的大概位置。

4.3.4 DIC 光镊检测驱动蛋白运动参数的方法

基于 4.2.3 节展示的 DIC 光镊新特性以及标定 DIC 光镊光阱力和被捕获微球的位移的方法, 本小节将阐明 DIC 光镊定量测量驱动蛋白运动参数的方法。

样品室为 2.2.7.1 中的单分子样品室, 此样品室极为干净, 可保证在 DIC 成像系统中清晰地观察到微管。样品室用 α 微管蛋白抗体(DM1A, 美国 Sigma 公司)

孵育 10 分钟，然后用带有 10 μM 紫杉酚 (taxol) 的 BRB 80 缓冲液冲洗样品室，洗掉未固定在玻片底面的游离抗体。接着将聚合后用紫杉酚稳定的微管^[22]置入样品室内，并孵育 10 分钟。为了移去未固定的微管，用 Assay Buffer 冲洗样品室。羧基修饰的聚苯乙烯微球 (直径 0.51 μm ，货号: W050CA，美国 Thermo 公司) 用带有 1 mM ATP 的 BRB 80 缓冲液稀释 320 倍，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，与稀释后的脱盐驱动蛋白溶液混合孵育 50 分钟。将表面修饰有驱动蛋白的微球用封闭剂酪蛋白封闭 10 分钟。最后，将微球悬浮液用实验缓冲液稀释后加入底面固定有微管的样品室中。此时微球浓度是微球储液浓度的 1/19200 倍。

将准备好的样品室置于显微镜载物台，用 100X 油浸物镜进行实验。在 DIC 状态下，观察到底面固定的微管呈现模糊的条纹状。用光镊捕获一个微球，操纵微球与微管接触 30 秒。当微球表面接近微管的区域存在驱动蛋白分子时，驱动蛋白分子的马达域与微管结合，驱动蛋白分子借助水解 ATP 分子提供的能量沿着微管的向正端运动。单向运动的驱动蛋白能够拖拽微球偏离光阱中心，如图 4-11 所示。此时，用 CCD 相机和 PSD 记录微球沿微管的运动信号。

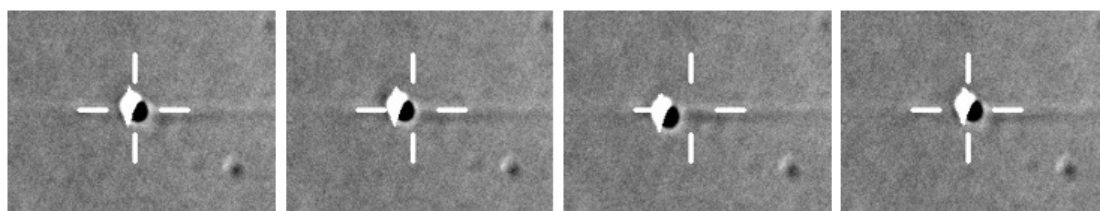


图 4-11 驱动蛋白分子运动录像

驱动蛋白分子沿着微管运动的实验录像截图，白色十字为光阱中心位置。从左向右，前三幅图为被捕获微球在驱动蛋白拖拽下偏离光阱中心。第四幅图为光阱力超过驱动蛋白负载力 (Stall force)，驱动蛋白从微管上脱离，微球回到光阱中心。

根据 CCD 图像中测得的微球运动角度 θ_p 和 (4.1) 式可量化微球的光阱刚度；微球运动位移可借助 4.2.3.4 节方法由 PSD 电信号转化得到。光阱刚度乘以微球位移即为微球受到的光阱力，即驱动蛋白承受的负载力 $F_{kinesin}$ 。

微球在驱动蛋白牵引下偏离光阱中心的过程中，微球承受的光阱力以及蛋白两端所承受的张力都逐渐增大，蛋白分子被逐渐拉长。因此，在驱动蛋白分子弹性的影响下，驱动蛋白马达域沿微管的位移不等于微球沿微管的位移，驱动蛋白的实际位移为

$$x_{kinesin}(t) = \left(\frac{k_{kinesin} + k_{trap}}{k_{kinesin}} \right) x_{bead}(t), \quad (4.5)$$

其中 $x_{kinesin}(t)$ 为驱动蛋白的实际位移, $k_{kinesin}$ 为驱动蛋白分子的弹性, k_{trap} 为光阱刚度, $x_{bead}(t)$ 为微球的位移。

综上, DIC光镊检测驱动蛋白运动参数的方法总结为: 首先, 标定驱动蛋白分子的弹性以及微球沿任意方向运动时的光阱刚度和 RCF , 即(4.1)式、(4.3)式和(4.5)式中的各项参数。然后, 光镊操纵被捕获微球接触微管, CCD相机和PSD记录微球沿微管的运动信号。接着, 由(4.1)式计算微球的光阱刚度, 由4.2.3.4节中的方法定量微球的位移信号。最后, 驱动蛋白负载力 $F_{kinesin}$ 由微球的光阱刚度乘以微球的位移得到, 驱动蛋白沿微管的位移由(4.5)式求得。

4.3.5 判断驱动蛋白单分子运动的标准

在驱动蛋白力学特性研究中, 人们更为关心的是单个驱动蛋白分子的运动特性, 因此实验需要控制驱动蛋白和微球之间的相对浓度, 保证微球的运动是由单个驱动蛋白分子拖拽完成的。统计学分析给出了选取适合蛋白浓度的方法^[6]。在实验中, 捕获的任意微球可沿微管运动的概率与驱动蛋白的相对浓度之间应满足泊松分布关系 $P(c) = 1 - e^{-\lambda c}$, 其中 $P(c)$ 是微球运动的概率, c 是驱动蛋白分子的相对浓度^[6]。图 4-12 中 B 图为我们测量 K560 蛋白的实验结果。当 $P(c) < 0.5$ 时, 根据统计学的理论, 绝大部分微球的运动可认为是单个驱动蛋白分子拖拽产生的。因此, 为了让我们的实验是在单分子层次完成, 我们将驱动蛋白的相对浓度控制在 $P(c) < 0.5$ 范围内。

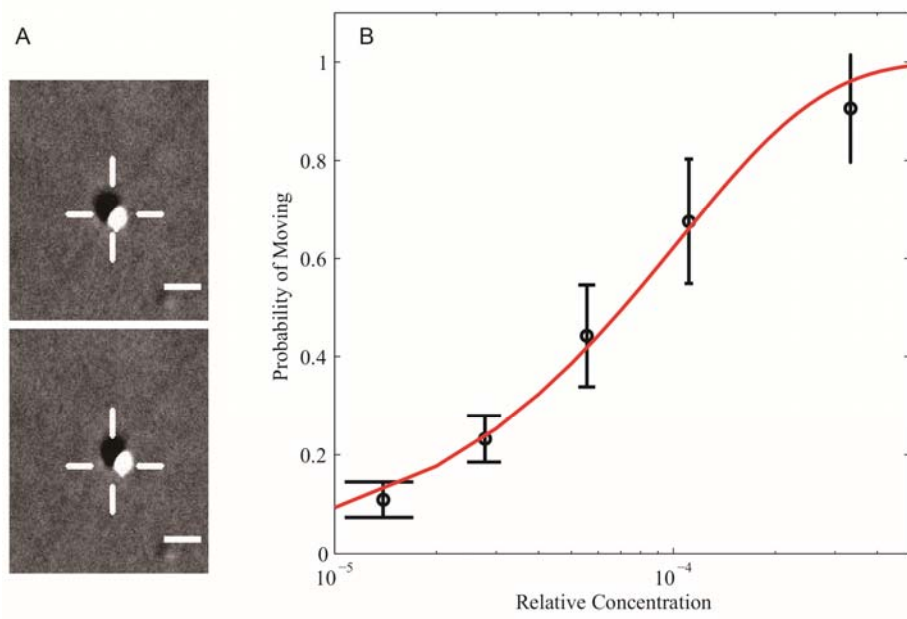


图 4-12 被捕获微球运动概率 K560 蛋白浓度之间的关系

A 图为 K560 分子沿着微管运动的实验录像，白色的十字为光阱中心位置，图中比例尺长度为 $1 \mu\text{m}$ 。B 图中带有误差棒的黑色圆圈为 K560 分子的不同浓度下任意微球可沿微管运动的概率，曲线是用 $P(c) = 1 - e^{-\lambda c}$ 函数对实验数据进行拟合的结果。

4.3.6 小结

本节结合 DIC 光镊特性给出了 DIC 光镊检测驱动蛋白力学特性的实验方法。相对于只选择沿 x 方向的微管进行实验的方法^[6, 7, 12]，本节中给出的方法可以选取任意方向的微管进行实验，大大提高了实验效率和实验精度。

4.4 K560 动力学特性

在 4.2 节和 4.3 节中已经给出了 DIC 光镊的新特性以及 DIC 光镊检测驱动蛋白力学特性的方法，本节将应用此方法研究 Kinesin-1 蛋白的力学特性，并与前人的实验结果作对比，验证此方法的可靠性。

4.4.1 步幅 8.2nm 的步进运动

根据前人的实验结果，驱动蛋白的运动模式为步幅 8.2nm 的步进运动^[23]，我们首先测量了 K560 分子的运动步长，选取合适单分子 K560 蛋白浓度，将 ATP 浓度降低至 $20 \mu\text{M}$ 。在这种实验条件下，我们成功的观察到了 K560 蛋白的 8.2 nm 步进

运动，结果如图 4-13所示。

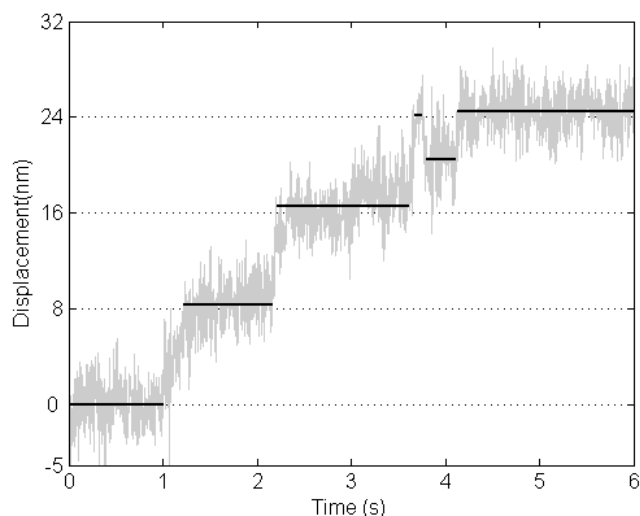


图 4-13 K560 蛋白沿微管的 8.2nm 步进运动

灰色实线为 PSD 测得的微球运动信号，黑色直线为 K560 蛋白在运动中的停滞位置。

4.4.2 K560 蛋白的最大负载力及最大运动速度

我们用4.3.4节的方法测量K560蛋白的在沿微管运动时的位移信号和承受的负载力，数据处理时我们使用了文献报道的Kinesin-1的蛋白弹性 $k_{motor}=340\text{pN}/\mu\text{m}$ [24]。将测得的驱动蛋白“位移-时间”曲线按照一定位移间隔或时间间隔分段并线性拟合，斜率即为蛋白运动速度，而各间隔内微球承受的平均光阱力即为加载在驱动蛋白上的负载力。

为了说明DIC光镊的各向异性特点对驱动蛋白动力学特性的影响，我们分别研究了将沿x方向刚度作为实际光阱刚度和将刚度各向异性计入后的光阱刚度作为实际光阱刚度两种情况下的K560蛋白的“速度-负载力”曲线，实验结果如图 4-14和表 4-1所示。

驱动蛋白承受的负载力越大，运动速度越低。对统计得到的速度和力作线性拟合，即可得到无负载时（负载力 $F=0$ ）驱动蛋白的最大运动速度以及驱动蛋白停止运动时（速度 $v=0$ ）的最大加载负载力（stall force）。用200ms时间间隔作为位移信号分段标准时，统计了66例运动结果如图 4-14中A所示。当将沿x方向刚度（ $32.6\text{pN}/\mu\text{m}$ ）作为实际光阱刚度时，最大负载力为2.6 pN，无负载速度为109.7 nm/s。当计入刚度各向异性后的光阱刚度作为实际光阱刚度时，最大负载力为3.6 pN，无负载速度为98.3 nm/s。可见这两种光阱刚度的处理方法会导致K560蛋白

的最大负载力存在较大差异。在前人文献报道中光阱刚度增大或者ATP浓度降低都会导致kinesin分子的负载力减小^[6]。我们实验采用的光阱刚度较大，且ATP浓度很低（20 μM），计入刚度各向异性后测得的最大负载力为3.6 pN比较符合Kinesin-1的运动特性。

对同样微球运动位移数据，用20nm运动距离作为位移信号分段标准时，统计结果见图 4-14中B所示。将沿x方向刚度（32.6 pN/μm）作为实际光阱刚度时，最大负载力为2.7 pN，无负载速度为121.4 nm/s。将刚度各向异性计入后的光阱刚度作为实际光阱刚度时，最大负载力为3.7 pN，无负载速度为116.8 nm/s。

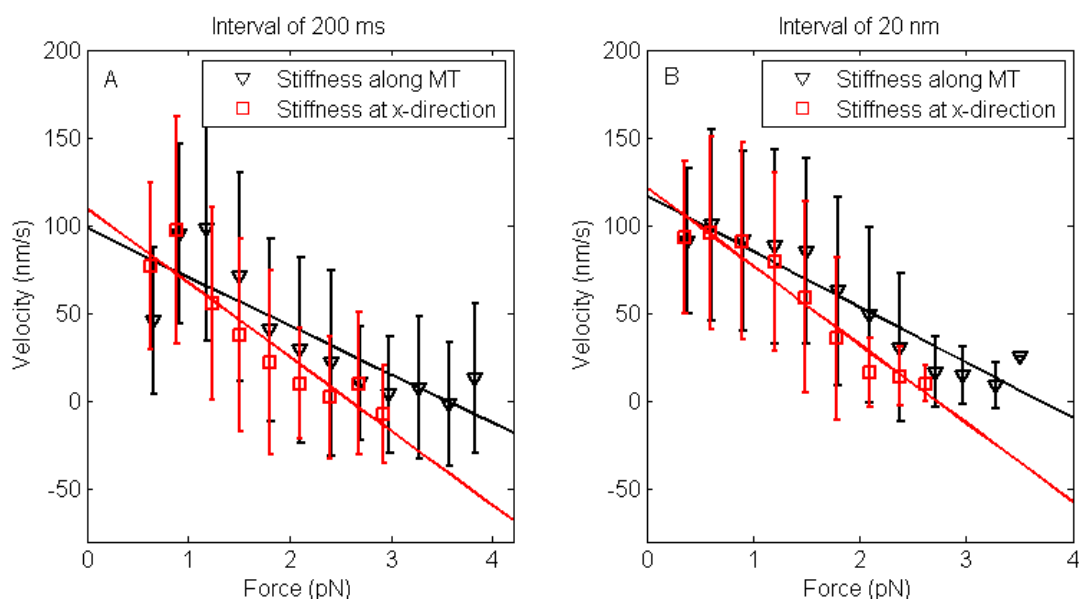


图 4-14 K560 蛋白负载力与运动速度之间的关系

用 200ms 时间间隔（A）或用 20nm 运动距离（B）作为位移信号分段标准时，将沿 x 方向刚度作为实际光阱刚度（红色方框数据点以及红色实线）和将刚度各向异性计入后的光阱刚度作为实际光阱刚度（黑色三角数据点以及黑色实线）时的 K560 运动数据统计结果。实验中 ATP 浓度为 20 μM，共统计 66 例运动。

表 4-1 不同数据处理方式求得的 K560 蛋白动力学参数

间隔	计入光阱刚度各项异性		不计入刚度各项异性	
	最大速度 (nm/s)	最大负载力 (pN)	最大速度 (nm/s)	最大负载力 (pN)
200ms	98.3	3.6	109.7	2.6
20nm	116.8	3.7	121.4	2.7

20nm运动距离作为位移信号分段标准的结果与200ms时间间隔作为位移信号分段标准时的结果相近，因此可认为K560蛋白的“速度-负载力”曲线并不依赖采取何种方式分析，而依赖于光阱刚度的准确性。

由于我们的实验对微管的方向未做要求，依然能准确的测量出K560蛋白的运动特性，这无疑比只选择沿着探测方向（ x 方向）的微管进行实验的方法^[6, 7, 12]大大地提高了实验效率。

4.5 CENP-E 蛋白的力学特性

在 0 节中，我们测量了 K560 蛋白的动力学特性并验证了 4.3 节给出的研究驱动蛋白力学特性的方法。在此基础上，本节我们应用 DIC 光镊研究 CENP-E 蛋白的分子弹性，动力学特性以及在 SUK4 抗体作用下的动力学特性变化情况。

4.5.1 单分子浓度检测

单分子检测首先需要确定合适的蛋白浓度，从而保证后续实验数据都是单个 CENP-E 分子产生的。

本小节用 4.3 节中的 DIC 光镊研究驱动蛋白的实验方法检测任意微球沿微管运动的概率与 CENP-E 相对浓度间的关系。图 4-15 为实验测得的任意微球沿微管运动的概率随 CENP-E 蛋白相对浓度的变化关系。图中带有误差棒的黑色方框为实验数据点，红色实线为相应的泊松分布拟合曲线。在后续实验中，为了保证测得数据是单个 CENP-E 分子的特性，我们选择了运动概率略低于 50%时的蛋白浓度进行实验。

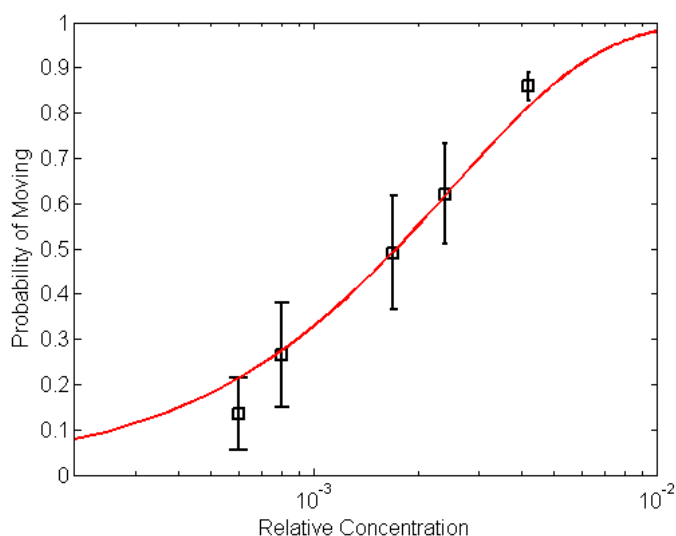


图 4-15 被捕获微球运动概率与 CENP-E 蛋白浓度之间的关系

带有误差棒的黑色方框为在相应的 K560 浓度下, 任意微球可在微管上运动的概率, 红色的曲线是按照 $P(c) = 1 - e^{-\lambda c}$ 函数对实验数据进行拟合后的结果。

4.5.2 CENP-E 蛋白分子的弹性

依据 4.3.4 节的讨论结果, 应用 DIC 光镊测量 CENP-E 蛋白的动力学特性时, CENP-E 分子的位移需将微球位移和 CENP-E 蛋白分子的弹性代入(4.5)式求得。因此, CENP-E 蛋白的分子弹性是光镊研究 CENP-E 蛋白动力学特性的重要参数, 直接影响实验结果的准确性。

实验样品的准备方式与 4.3.4 节基本一致, 其中将 ATP 改为了亚胺二磷酸腺苷(AMP-PNP)。AMP-PNP 是一种 ATP 代替物, 可阻断 CENP-E 蛋白的 ATP 水解循环, 从而使 CENP-E 蛋白的马达域固定在微管上无法解离。通过这种方式, 可将 CENP-E 蛋白的一端固定在玻片表面, 另一端固定在微球上。然后只需压电载物台驱动玻片移动即可实现对蛋白拉伸。

为了便于数据分析并提高数据分析精度, 首先将一个未做修饰的微球固定在微管的附近作为底面位置的标度 (即图 4-16 中 A 的插图中的 Fixed Bead)。接着, 用光镊操纵一个修饰有 CENP-E 的微球接触微管 30 秒后关闭光镊, 若微球在周围液体的布朗力的作用下不脱离微管, 则证明微球表面有 CENP-E 分子已与微管结合。最后, 用压电载物台操纵样品室底面以 100nm/s 的速度沿 y 方向运动, 并用 CCD 相机记录微球位置。

图 4-16 的 A 图为典型的实验录像, 图中黑色和红色曲线分别为两个微球在 y 方向的位移变化曲线。从 35 帧开始, 压电载物台驱动固定微球沿着 y 方向运动, 固定微球的 y 方向位移随压电载物台的运动而均匀增加; 但被捕获微球在光阱力和蛋白弹性回复力的共同作用下, 与压电载物台运动不完全同步, 当光阱力足够大时, CENP-E 蛋白从微管上解离下来, 被捕获微球回到光阱中心。对两个微球的运动轨迹进行线性拟合得到两微球的运动速度 (v_{fixed} 为固定微球的运动速度, $v_{trapped}$ 为被捕获微球的运动速度), 如图 4-16 的 C 图所示。此时蛋白的弹性可用

$$k_{kinesin} = v_{fixed} \cdot k_y / (v_{trapped} - v_{fixed}) \quad (4.6)$$

计算的得到, 其中 $k_{kinesin}$ 为驱动蛋白的分子弹性, k_y 为 y 方向的光阱刚度。

实验表明, CENP-E 蛋白在 150nm (DIC 光镊检测 CENP-E 动力学特性时 CENP-E 分子的运动范围) 伸长范围内的分子弹性为 45.7 ± 3.5 pN/ μ m, 相应状态下 K560 蛋白的分子弹性为 340pN/ μ m (如图 4-16 的 B 图所示)。这说明 CENP-E 蛋白相对 K560 蛋白是一种弹性更大的驱动蛋白。

根据(4.5)式可知，在单分子皮牛力谱仪测量 CENP-E 动力学特性时，若忽略 CENP-E 分子弹性，而将微球位移作为驱动蛋白分子的位移会产生约 46%~82% 的实验误差。这就证明准确标定 CENP-E 蛋白弹性对于精确测量 CENP-E 分子的动力学特性是十分必要的。

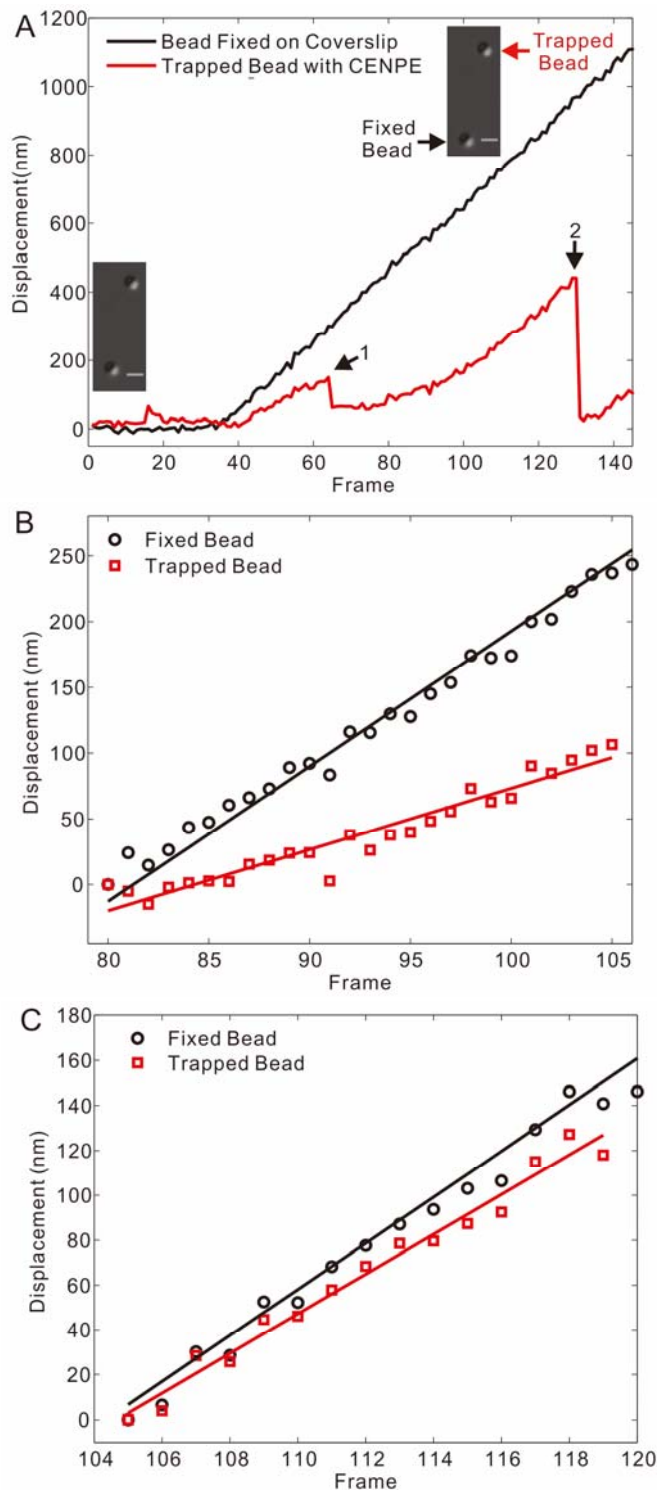


图 4-16 测量驱动蛋白分子弹性

A 中插图为相应的实验录像截图，黑色和红色曲线分别为固定微球和被捕获微球在 y 方向

的位移变化曲线，红色曲线在 1 和 2 处的跳变为驱动蛋白从微管上解离造成的；B 黑色和红色数据点分别为拉伸 K560 蛋白时的两个微球在 y 方向的位移，黑色和红色直线为线性拟合结果；C 黑色和红色数据点分别为拉伸 CENP-E 蛋白时的两个微球在 y 方向的位移，黑色和红色直线为线性拟合结果。

4.5.3 CENP-E 的动力学特性

准确标定了 CENP-E 蛋白分子的弹性后，即可测量 CENP-E 分子的运动特性。我们测量了 CENP-E 蛋白运动速度随 ATP 浓度的变化关系。实验结果如图 4-17 所示。ATP 浓度为 1.33 mM 时（图 4-17 的 A），运动速度约为 100 nm/s，ATP 浓度为 110 μ M 时（图 4-17 的 B），运动速度约为 30 nm/s。可见即使在饱和 ATP 浓度下（1.33mM），CENP-E 蛋白的运动速度依然远小于 Kinesin-1 蛋白的运动速度（400 nm/s ~800 nm/s^[25]）。

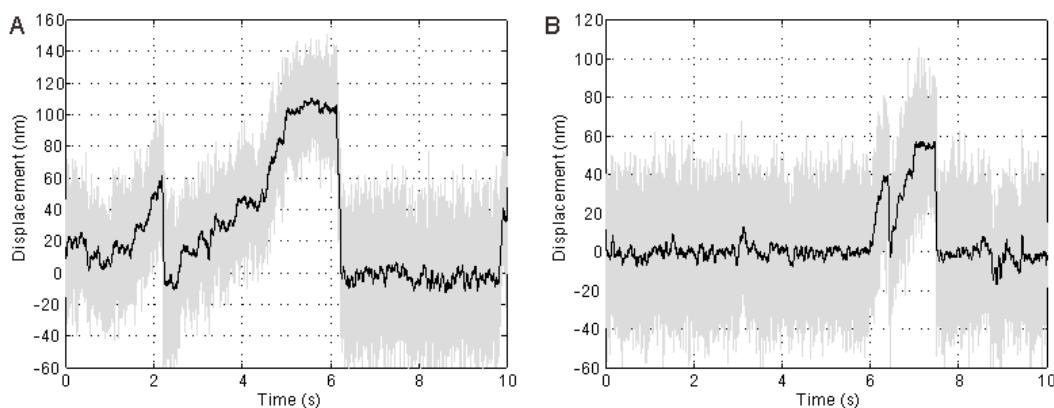


图 4-17 CENP-E 蛋白在不同 ATP 浓度下的运动曲线

A 图为 ATP 浓度为 1.33 mM 时的运动曲线；B 图为 ATP 浓度为 110 μ M 时的运动曲线。

4.5.4 SUK4 抗体对 CENP-E 蛋白的影响

SUK4 抗体可特异性的结合在非全长 CENP-E 蛋白 C 端，但是该抗体对 CENP-E 的运动特性的影响机理尚不清楚。我们用光镊研究 SUK4 抗体对 CENP-E 蛋白的运动特性的影响。

样品的准备方式与之前研究 CENP-E 动力学特性时的方式基本一致，最后的溶液额外中加入 SUK4 抗体。实验发现，在 1.33 mM 的 ATP 浓度下，CENP-E 蛋白的运动经常受到阻碍，即驱动蛋白在运动的过程中会出现 >5s 的停滞。经过一定的时间之后，停滞被打断，CENP-E 蛋白会从微管上脱离或者继续沿微管运动。图 4-18 为一条典型的微球运动曲线。这种特殊的运动现象应是 SUK4 抗体作用

于 CENP-E 蛋白后产生的。

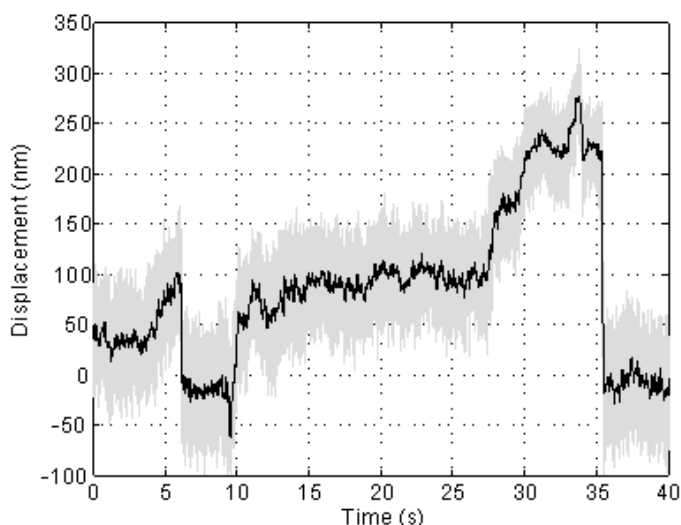


图 4-18 CENP-E 蛋白在 SUK4 抗体作用下的运动曲线

图中灰色实线为 PSD 测得的微球位置数据，黑色实线为原始数据滤波平滑后的结果，滤波窗口为 5 ms。

4.6 本章小结

我们用单分子皮牛力谱仪研究了驱动蛋白力学特性。利用光镊开展单分子检测驱动蛋白动力学特性时，DIC 成像无需监控微管蛋白标记荧光就可帮助操作者迅速找到微管位置，方便了操作者将手柄微球定位到微管上开展驱动蛋白的检测。

激光通过 DIC 元件时导致光阱呈现出各项异性的特性，理论模拟的结果与流体力学法结果都表明 DIC 光镊的光阱刚度分布为椭圆，长轴的方位角与 DIC 棱镜主轴方位角接近，这将对 DIC 光镊的力谱检测结果产生影响。在 DIC 光阱中探测的驱动蛋白的运动数据，需要根据运动偏移确定微管在探测器上的方位，然后采用坐标旋转的方式将探测器的数据还原到沿微管的运动位移。通过对 K560 蛋白运动位移的检测和比较不同数据处理方式下得到的“速度-负载力”曲线，证实了采取坐标旋转和椭圆分布光阱刚度能很好地真实反应驱动蛋白运动和所承受的负载力。最后，我们借助新建立的驱动蛋白研究方法，研究了 CENP-E 蛋白的分子弹性，动力学特性以及在 SUK4 抗体调控下的动力学特性变化情况。

了解 DIC 光阱特性将有助于研究微管末端动态聚合/解聚的调控时，TIP150 蛋白的单分子动力学特性。对 CENP-E 蛋白的动力学特性的研究以及在 SUK4 抗体调控下的动力学特性变化情况有助于深入研究着丝粒动点与微管间的相互作用。

参考文献

- [1] VALE R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 467-480.
- [2] KIM Y, HEUSER J E, WATERMAN C M, et al. CENP-E combines a slow, processive motor and a flexible coiled coil to produce an essential motile kinetochore tether [J]. *The Journal of cell biology*, 2008, 181(3): 411-419.
- [3] VALENTINE M T, FORDYCE P M, KRZYSIAK T C, et al. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(5): 470-476.
- [4] BLOCK S M, GOLDSTEIN L S B, SCHNAPP B J. BEAD MOVEMENT BY SINGLE KINESIN MOLECULES STUDIED WITH OPTICAL TWEEZERS [J]. *Nature*, 1990, 348(6299): 348-352.
- [5] KUO S C, SHEETZ M P. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 232-234.
- [6] SVOBODA K, BLOCK S M. FORCE AND VELOCITY MEASURED FOR SINGLE KINESIN MOLECULES [J]. *Cell*, 1994, 77(5): 773-784.
- [7] SCHNITZER M J, BLOCK S M. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 386-390.
- [8] ASBURY C L, FEHR A N, BLOCK S M. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism [J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2130-2134.
- [9] BLEHM B H, SCHROER T A, TRYBUS K M, et al. In vivo optical trapping indicates kinesin's stall force is reduced by dynein during intracellular transport [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(9): 3381-3386.
- [10] RAI A K, RAI A, RAMAIYA A J, et al. Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells [J]. *Cell*, 2013, 152(1): 172-182.
- [11] ALLEN R D. New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy [J]. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 1985, 14(1): 265-290.
- [12] SVOBODA K, SCHMIDT C F, SCHNAPP B J, et al. DIRECT OBSERVATION OF KINESIN STEPPING BY OPTICAL TRAPPING INTERFEROMETRY [J]. *Nature*, 1993, 365(6448): 721-727.
- [13] ALLERSMA M W, GITTES F, DECASTRO M J, et al. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry [J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74(2): 1074-1085.
- [14] CAPITANIO M, ROMANO G, BALLERINI R, et al. Calibration of optical tweezers with

- differential interference contrast signals [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2002, 73(4): 1687-1696.
- [15] RICHARDS B, WOLF E. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences*, 1959, 253(1274): 358-379.
- [16] BUOSCIOLO A, PESCE G, SASSO A. New calibration method for position detector for simultaneous measurements of force constants and local viscosity in optical tweezers [J]. *Optics Communications*, 2004, 230(4-6): 357-368.
- [17] LI D, ZHOU J H, HU X Y, et al. In situ calibrating optical tweezers with sinusoidal-wave drag force method [J]. *Chinese Physics B*, 2015, 24(11): 626-632.
- [18] ZHOU J H, LI D, HU X Y, et al. Calibrating oscillation response of a piezo-stage using optical tweezers [J]. *Optics Express*, 2015, 23(19): 24108-24119.
- [19] SVOBODA K, BLOCK S M. Biological applications of optical forces [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1994, 23(1): 247-285.
- [20] COY D L, HANCOCK W O, WAGENBACH M, et al. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain [J]. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(5): 288-292.
- [21] THROWER D A, JORDAN M, SCHAAR B, et al. Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor [J]. *The EMBO journal*, 1995, 14(5): 918-926.
- [22] GUTI RREZ-MEDINA B, BLOCK S M. Visualizing individual microtubules by bright field microscopy [J]. *American Journal of Physics*, 2010, 78(11): 1152-1159.
- [23] GUYDOSH N R, BLOCK S M. Backsteps induced by nucleotide analogs suggest the front head of kinesin is gated by strain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(21): 8054-8059.
- [24] COPPIN C M, FINER J T, SPUDICH J A, et al. Detection of sub-8-nm movements of kinesin by high-resolution optical-trap microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(5): 1913-1917.
- [25] VISSCHER K, SCHNITZER M J, BLOCK S M. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp [J]. *Nature*, 1999, 400(6740): 184-189.

第5章 光镊研究细胞相互作用的力学行为

细胞间相互作用在多细胞生物的生存和发育中起着至关重要的作用。这些相互作用使细胞间能够相互交流,以便对外部环境的变化做出反应。一旦细胞间的交流发生变化就可能导致细胞生长错乱,甚至导致产生癌症^[1-3]。此外,细胞间的相互作用可完成免疫反应,实现细胞间离子和分子的自由扩散并控制胞外运输。

多细胞生物体内存在多种细胞间相互作用,本章研究了细胞桥连和细胞入侵性吞噬两种细胞间相互作用的结构或机理。

5.1 定量测量桥连细胞间的相互作用

多细胞生物体中普遍存在一种可稳定细胞-细胞相互作用的结构——细胞连接或称作细胞桥连,例如在上皮组织中就存在特别丰富的细胞桥连结构^[4-6]。细胞连接由多蛋白复合物组成^[6],具有非常重要的生理功能。组织交界面处的细胞膜具有良好的渗透性,细胞内部的离子和分子都可自由扩散到另一个细胞中^[4],在这个过程中细胞连接能够减少细胞间的胞外障碍并控制着胞外运输^[7]。鉴于细胞间相互作用的生理功能的重要性,生物学家采取人为构建不同类型细胞的细胞连接研究其生理功能。

中国科学技术大学化学系的梁高林教授设想通过一种全新的方式来桥连细胞,即通过两种生物正交点击反应桥连三种细胞。

生物正交反应指的是,参与化学反应的功能性基团能够选择性地在活体细胞或组织中相互结合,而不会干扰生物自身的生化反应^[8]。利用生物正交反应在生物细胞或组织中检测特定的生物分子一般分为两个步骤:首先,化学小分子(如醛、叠氮、炔基或烯烃等)通过一定的生物合成或生化反应选择性识别所研究的生物分子;然后,携带同类活性基团的生物探针与化学小分子之间发生原位生物正交反应从而选择性地标记所研究的生物分子^[9]。前人已经将生物正交反应大量地应用到生命科学研究中,如糖组显像、蛋白脂化及脂质运输、蛋白活性检测等^[10-13]。

点击反应是 Sharpless 及其合作者所定义的一种高效、高选择性、易实现、原料易得、用范围广且对空气和水不敏感的反应,反应产物的分离十分简单,且无需色谱纯化^[14-16]。发展到今天,点击反应在肿瘤靶向显像和生物正交检测标记物、细胞等方面表现出独特优势^[17-21]。

鉴于生物正交点击反应的优势,通过两种生物正交点击反应可方便同时桥连

三种细胞。桥连是通过两步点击反应完成的。首先是 CBT-Cys 点击反应^[22, 23]。这是萤火虫体内进行荧光素再生时所发生的点击反应，高效率、生物兼容性好，被成功地用于生物分子检测、制备纳米结构低聚物和分子成像(如磁共振成像、核素成像和光学成像)等领域中^[24-26]。在 pH=7.4 的溶液中，CBT 与 Cys 的点击反应可自发进行，得到可共价桥连两种细胞的噻唑环。然后第二步反应是已被广泛的应用于生物正交体系的 Cu(I)催化的叠氮炔基点击环加成反应^[27]。我们利用此反应将第三种细胞连接在第一步反应形成的细胞对上。

如图 5-1 (a) 所示，梁高林教授课题组设计和合成了化合物 Mal-CBT、Mal-Cys、Mal-Alkyne 和 Mal-N₃，它们包含了用来进行点击反应的生物正交功能性基团和用于连接细胞膜、细胞壁上疏基的马来酰亚胺基团。这四种化合物的合成路径和表征详见项目合作者袁月博士论文中图 8.2-8.12^[28]。此外，由于化合物 Mal-N₃ 不稳定，因此实验中用 Mal-NHS 和 N₃-NH₂ 制备的新鲜 Mal-N₃。该实验的可行性博士论文^[28] 中图 8.10-8.12 的结果予以证明。

由于前人的实验虽然已经证实单独的 CBT-Cys 缩合反应或叠氮炔基环加成反应在生物体系中具有兼容性，但这两个反应同时发生时的反应位点的特异性却未被证实。因此，这里首先验证了两个生物点击反应之间的正交性，详细结果见博士论文^[28]中图 8.13-8.21。

图 5-1 (b) 中展示了用两种生物正交反应桥连三种细胞的过程。首先在还原性环境下，利用 CBT-Cys 缩合反应将表面修饰有 Mal-Cys 的细胞 A 与同时修饰有 Mal-CBT 和 Mal-Alkyne 基团的细胞 B 桥连起来，然后，在 Cu(I)催化下，利用环加成反应将 A-B 细胞对中细胞 B 上修饰的 Mal-Alkyne 与细胞 C 上修饰的 Mal-N₃ 结合，从而形成 A-B-C 细胞复合体。

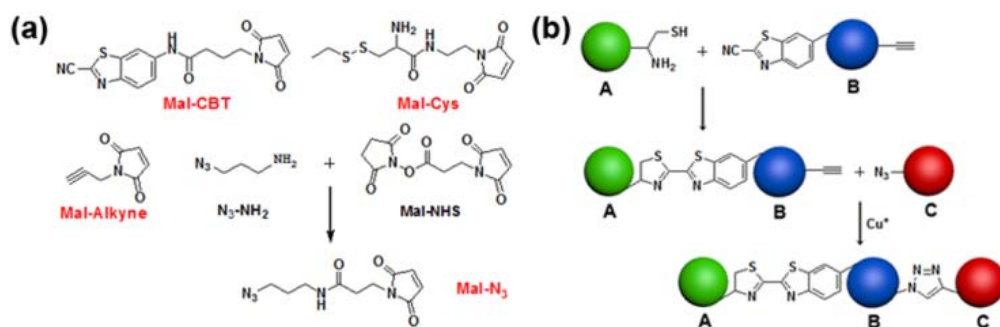


图 5-1 桥连原理示意图

(a)包含发生点击反应所需的生物正交功能性基团的化合物 Mal-CBT、Mal-Cys、Mal-Alkyne 和 Mal-N₃ 的化学结构 (b) 用两种生物正交反应桥连三种细胞的示意图。

5.1.1 细胞桥连的荧光检测和它的局限性

验证这种新的两种生物正交点击反应桥连三种细胞的桥连方法的有效性, 实验用 4%多聚甲醛固定了的三种细胞分别转录了绿色(eGFP)、蓝色 (eBFP) 和红色(DsRed)荧光蛋白的 HEK 293T 细胞。然后, 用显微荧光技术检测以下四种实验条件下各种细胞之间的桥连情况, 实验结果如图 5-2 所示。

图 5-2 (a) 为 Mal-Cys 处理过的 GFP⁺细胞与 Mal-CBT 及 Mal-Alkyne 处理过的 BFP⁺细胞在含有 100 μM TCEP 的 37 $^{\circ}\text{C}$ PBS 缓冲液中震荡 1.5 小时后的实验结果。图中大多数 GFP⁺细胞与 BFP⁺细胞发生了桥连。

图 5-2 (b) 为 (a) 图的对照组的实验结果, 对照组的实验采用与 (a) 图实验中相同的处理方式但不加入 TCEP。可看到两种细胞只是随机分散在视场中, 未产生桥连。(b) 图与 (a) 图中的明显差别应是由于 GFP⁺细胞上 Mal-Cys 的双硫键未被 TCEP 还原, 因而不能与 BFP⁺细胞上的 Mal-CBT 发生缩合反应导致的。

图 5-2 (c) 为 (a) 图中桥连后的 BFP⁺-GFP⁺细胞对与 Mal-N₃ 处理过的 RFP⁺细胞在含有 100 μM CuSO₄ 和 700 μM NaVc 的 37 $^{\circ}\text{C}$ PBS 缓冲液中孵育 1.5 小时后的实验结果。图中大多数 RFP⁺细胞与 BFP⁺-GFP⁺细胞对中的 BFP⁺细胞或单独的 BFP⁺细胞产生了桥连, 这说明产生了叠氮炔基环加成反应。并且 (c) 图中未发现 RFP⁺细胞与 GFP⁺细胞直接桥连, 再次说明 CBT-Cys 缩合反应与叠氮炔基环加成反应的正交性。

图 5-2 (d) 为图 5-2 (c) 的对照组实验, 未经过 Mal-N₃ 修饰的 RFP⁺细胞与 Mal-Cys 处理过的 GFP⁺细胞和 Mal-CBT 及 Mal-Alkyne 处理过的 BFP⁺细胞混合时, 这三种细胞之间不会产生任何细胞桥连。

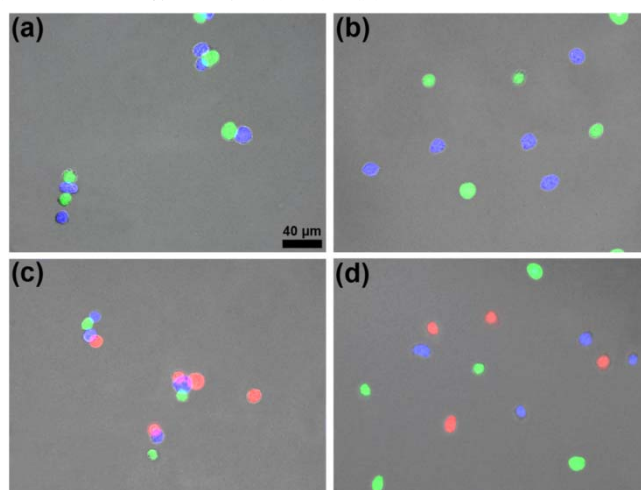


图 5-2 真核细胞桥连的显微荧光图片

(a) Mal-Cys 处理过的 GFP⁺细胞与 Mal-CBT 及 Mal-Alkyne 处理过的 BFP⁺细胞在含有

100 μ M TCEP 的 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液中震荡 1.5 小时后的实验结果；(b) Mal-Cys 处理过的 GFP+细胞与 Mal-CBT 及 Mal-Alkyne 处理过的 BFP+细胞在不含 TCEP 的 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液震荡 1.5 小时后的实验结果；(c) Mal-N₃ 处理过的 RFP+细胞与 (a) 图中桥连后的 BFP+GFP+细胞对在含有 100 μ M CuSO₄ 和 700 μ M NaVc 的 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液孵育 1.5 小时后的实验结果；(d) 未修饰 Mal-N₃ 的 RFP+细胞与 Mal-Cys 处理过的 GFP+细胞和 Mal-CBT 及 Mal-Alkyne 处理过的 BFP+细胞在含有 100 μ M CuSO₄ 和 700 μ M NaVc 的 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液孵育 1.5 h 后的实验结果。

荧光实验定性地说明确所采用的两种生物正交反应可桥连三种细胞，但是并不能定量地测量生物正交反应对细胞桥连概率的影响，也不能给出桥连的结构特征，亦不能说明细胞桥连是否为共价偶联实现。因此，我们用光镊研究了表面带有 Mal-Cys 基团的 GFP⁺ HEK 293T 细胞和表面带有 Mal-CBT 基团的 BFP⁺ HEK 293T 细胞在有 TCEP（作为实验组，两细胞可通过点击反应完成桥连）和没有 TCEP（作为对照组，两细胞无法通过点击反应完成桥连）两种情况下的相互作用力的差别。

5.1.2 光镊检测桥连实验方法

这里将从描述光镊研究细胞相互作用的实验方法开始讨论，然后引入光镊研究微观相互作用时经常遇到的非特异性相互作用对特异性相互作用产生干扰的问题。进一步讨论在光镊实验中减少非特异性相互作用干扰的常用方法。最后，讨论数据处理方法以及测得的实验结果。

5.1.2.1 光镊实验方法

实验用单分子皮牛力谱仪进行，用数值孔径为 1.2 的 60 倍水浸物镜（UPLSAPO 60XW，日本 Olympus 株式会社）作为捕获物镜，物镜后瞳处入射的激光功率为 1.78 W，CCD 相机（CoolSNAP HQ2，美国 Photometrics 公司）观察实验状态并记录实验数据。

样品室为 2.2.7.1 介绍的单分子样品室，用带有方形孔洞的封口膜粘合盖玻片和载玻片制作而成。先使多聚赖氨酸溶液（货号：P4707，0.01%，美国 Sigma-Aldrich 公司）室温（25-26 $^{\circ}$ C）孵育玻片 10 分钟，在盖玻片表面形成粘附层。然后，用样品室容积为 10 倍体积的 PBS 缓冲液冲洗样品室，冲洗掉溶液中游离的多聚赖氨酸分子。再然后将表面带有 Mal-CBT 的 BFP⁺ HEK 293T 细胞置换进样品室中孵育 20 分钟，使 BFP⁺ HEK 293T 细胞固定在盖玻片表面。其后，在用 PBS 冲洗掉悬浮的 BFP⁺细胞后，加入与 100 μ M TCEP 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后的表面带有 Mal-Cys 基团的 GFP⁺ HEK 293T 细胞悬浮液（表面的-SH 基团已经

裸露出来), 悬浮液中含有低浓度封闭剂 (casein, 质量百分比 0.06%, 美国 Sigma 公司)。低浓度的封闭剂可防止 GPF⁺细胞粘附在盖玻片的表面, 减轻 GPF⁺细胞与 BPF⁺细胞之间非特异性相互作用, 并且不会干扰 GPF⁺细胞与 BPF⁺细胞之间点击反应。最后将样品室密封并置于显微镜载物台上。在对照组实验中, 样品和样品室的准备方法与实验组类似, 唯一的区别是 GPF⁺细胞加入样品室之前不用 TCEP 进行处理。

准备好样品室之后, 用光镊测量 GPF⁺细胞与 BPF⁺细胞之间的相互作用力。我们首先通过荧光观察的方法区分 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞。然后用光镊捕获 GPF⁺细胞并操纵其与底面上的 BPF⁺细胞接触 20 秒, 如图 5-3 (a) 的上图所示。然后用压电载物台带动盖玻片上的 BPF⁺细胞以 1.4 $\mu\text{m/s}$ 的速度 (对应加载力速度为 49 pN/s) 向远离光阱的方向运动, 如图 5-3 (a) 的中图所示 (为了明显起见, 此图为两细胞之间存在相互作用力时的情况)。此时, 与 BPF⁺细胞相接触的 GPF⁺细胞会出现随着 BPF⁺细胞一起运动的趋势, 但是由于 GPF⁺细胞向着远离光阱中心的方向运动, 因此会受到指向光阱中心的光阱回复力的阻碍。

在光阱回复力的作用下, 可能产生以下三种实验现象: 第一种是 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间无相互作用, 两个细胞在压电载物台开始运动后立即分离, 如图 5-3 (b) 所示; 第二种是 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间在前面的 20 秒接触中被桥连在了一起, 但是桥连后的细胞可被光镊分开, 如图 5-3 (c) 所示, 此时, 可用图像分析的方法计算被捕获 GPF⁺细胞的受力随时间的变化情况, 进而计算出断裂力, 详细分析过程见 5.1.2.3 节。最后一种实验现象如图 5-3 (d) 所示, 即光镊始终无法分离桥连的 GPF⁺-BPF⁺细胞对, 直到被捕获的 GPF⁺细胞脱离光阱的作用范围。这是由于桥连细胞间的断裂力超出了我们光镊设备的量程 (大约 200 pN) 导致的。

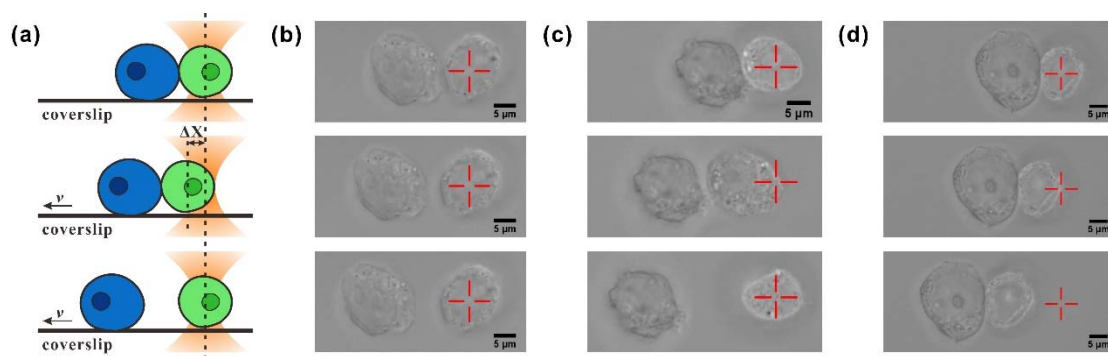


图 5-3 光镊测量桥连细胞断裂力的实验过程示意图以及典型的实验录像

(a) 用光镊测量 GPF⁺细胞与 BPF⁺细胞之间相互作用力的过程示意图; (b) GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间无相互作用时的光镊拉伸实验录像; (c) 桥连后的 GPF⁺-BPF⁺细胞对被光镊分离开的实验录像; (d) 桥连后的 GPF⁺-BPF⁺细胞对无法被光镊分开情况下的光镊拉伸实验

录像。

5.1.2.2 特异性相互作用与非特异性相互作用

生物大分子间的相互作用（如配体-受体相互作用^[29]和抗原-抗体相互作用^[30, 31]）和细胞间相互作用（比如炎症反应^[32]）在生物正常生命活动以及生理功能中起着至关重要的作用，引起广泛的关注和深入研究。目前，研究这些微观相互作用的方法有很多，比如微流道法^[33]（Flow chamber）、微针法^[34]（Micropipette aspiration）、生物膜力探针法^[35]（Biomembrance force probe）、原子力显微镜法^[36, 37]（Atomic Force Microscopy, AFM）和光镊法^[38, 39]等等。在这些方法中，通常用细胞或者微米尺寸的微球作为载体，或者直接操控细胞来研究微观相互作用。

但当载体微球在研究微观相互作用的过程中相互靠近时，由于细胞表面的蛋白种类繁多、结构十分复杂，微球之间多存在静电作用，导致这些细胞、微球间产生相互吸引的作用力^[40]。人们将这种载体细胞、微球之间的相互吸引的作用称为非特异性相互作用（nonspecific interaction），将待研究的相互作用称为特异性相互作用（specific interaction）。

微观相互作用大都是一随机性的动力学过程^[29, 41]，因此，当用微针法、原子力显微镜法和光镊法等方法研究特异性相互作用时，无法判断单次相互作用究竟是由特异性相互作用、还是由非特异性相互作用所引起的。因而，非特异性相互作用会对特异性相互作用的研究产生严重的干扰。下面我们将分析非特异性相互作用对光镊实验的影响，以及光镊实验中常用的减弱非特异性相互作用的措施。

光镊研究特异性相互作用时，若研究对象是分子间的特异性相互作用，是用光镊捕获的微球或细胞作为研究对象的载体和探测相互作用力的探针^[39, 42]；若研究对象是细胞间的特异性相互作用，可直接用细胞作为力的探针^[43, 44]。在这些研究中，细胞、微球之间的非特异性相互作用将直接影响光镊测得的细胞、微球之间发生相互作用的概率和相互作用力，因此非特异性相互作用会对测量结果产生影响。

光镊实验中会采取多种措施以减少非特异性相互作用对实验的干扰。结合我们的实验经验，行之有效地减少非特异性相互作用的措施总结如下：

①加入封闭剂。封闭剂会覆盖在细胞或者微球表面，借助同种电荷相互排斥的原理有效减少非特异性相互作用，而不会完全阻断特异性相互作用。常用的封闭剂为酪蛋白（casein）和牛血清蛋白（Bull Serum Albumin, BSA）。我们发现酪蛋白相对牛血清蛋白能更好地减少非特异性相互作用，而高浓度的封闭剂会降低特异性相互作用的概率。因此，用适当浓度的酪蛋白作为封闭剂可有效的降低非特异性相互作用的发生概率。

②合理控制微球或细胞的接触时间。我们发现随着接触时间的延长，微球或

细胞间非特异性相互作用的产生概率逐渐增加,作用强度也逐渐增强。考虑到形成待研究的特异性相互作用也需要接触时间,因此实验需要合理地控制接触时间,以达到既有较大的概率形成特异性相互作用,又不会使非特异性相互作用过强影响实验结果。

③选择合理的加载力速度。在研究微观相互作用时,用“加载力速度”(单位时间内外加力的变化量)来表征施加外力的速度。根据文献^[37,45]所给出的结果,特异性相互作用和非特异性相互作用的断裂力随着加载力速度的增大而增大,其中特异性相互作用的断裂力变化更加明显。因此,在光镊测量特异性相互作用的断裂力时,应选取恰当的加载力速度,既不能太大使得断裂力超出光镊量程,又不能太小导致实验速度缓慢,稳定性降低,或者两种相互作用的断裂力无法区分。在我们的实验中,通过多次实验验证,采用了 50pN/s 的加载力速度拉伸两细胞。

④进行统计对比。用光镊同时测量具有特异性相互作用的细胞、微球间的相互作用强度以及空白细胞、微球间的相互作用强度,对比两者之间的差异,寻找由于特异性相互作用带来的新特性。同时,鉴于微观相互作用的个体差异较大,需要在对照实验的基础上分别对两种情况进行大量实验,然后寻找统计规律。

在测量桥连细胞间的断裂力的实验中,我们采取了上述措施取得良好的效果。

5.1.2.3 求解桥连细胞的断裂力

实验只能得到 CCD 拍摄的光镊拉伸两个桥连细胞的一系列图片,无法直接给出两个桥连细胞间的断裂力。这里我们依然用(3.20)式计算被捕获细胞受到的光阱力,因此需要实现标定光阱刚度并测量被捕获细胞的位移。

标定光阱刚度,必须先标定实验中所用的缓冲液的粘滞系数,我们用 3.3 节中描述的追踪微球随机布朗运动计算粘滞系数的方法测量出溶液在功率 1.78 W 激光(进入物镜后瞳的激光功率,并与测量断裂力实验中的激光功率一致)照射下的粘滞系数为 $1.042 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ 。接着,用 3.4 节中描述 SDFM 方法测量了 GPF⁺细胞在距离玻片表面 20 μm 处的光阱刚度。并且由于拉伸实验中所用的捕获物镜为水浸物镜,因此可认为光阱刚度不随距离玻片表面的远近而变化^[46]。

被捕获细胞的位移可用 Matlab 分析 CCD 相机的录像中两个细胞位置随时间的变化关系而求得,分析结果如图 5-4 (a) 所示。具体方法为,首先用了膨胀和腐蚀的图像处理方法^[47]将图像中相互接触、重叠的两个细胞分离。然后计算出两个细胞各自的轮廓(图 5-4 (a) 中蓝色和绿色实线)以及细胞各自的图像重心(图 5-4 (a) 中蓝色和绿色的 ⊗ 符号标出)。最后即可计算每一帧图像中被捕获细胞偏离光阱中心(图 5-4 (a) 中红色十字标出)的距离。

将被捕获微球偏离光阱中心的距离乘以光阱刚度,即可得到此时细胞受到的光阱力。图 5-4 (b) 给出了被捕获细胞在光镊拉伸过程中的典型“受力-时间”

曲线。图中，在开始大约 4 秒内，压电载物台保持静止，被捕获细胞收到的光阱回复力为零。然后随着压电载物台的运动，底面上 BFP⁺细胞的带动被捕获的 GFP⁺细胞远离光阱中心，GFP⁺细胞受到的光阱力逐渐增加。一旦光阱力大于桥连的 GFP⁺-BFP⁺细胞对的断裂力（此图中为 165.7 pN），两个细胞将相互分离，被捕获细胞迅速回到光阱中心，光阱力归零。在拉伸过程中的最大光阱力即可认为是桥连的 GFP⁺-BFP⁺细胞对的断裂力。

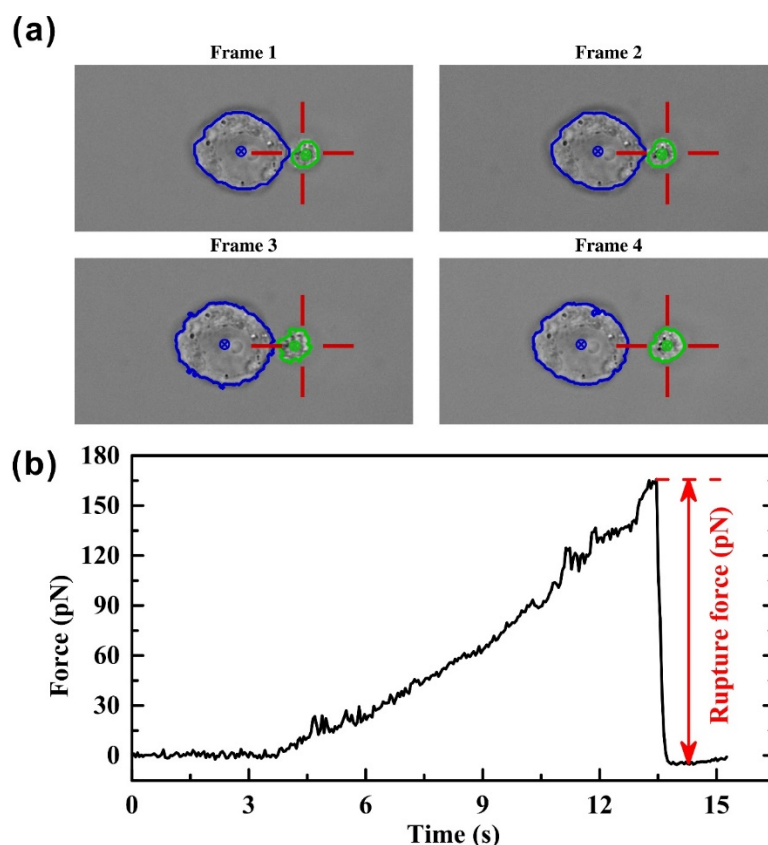


图 5-4 光镊拉伸两桥连细胞的实验数据处理

(a) 光镊拉伸桥连的 GFP⁺-BFP⁺细胞对过程中的连续四帧实验图像，蓝色和绿色实线为两个细胞各自的轮廓线，颜色与细胞荧光颜色一致，蓝色和绿色的⊗符号为细胞的图像重心，中红色十字线为光阱中心位置；(b) 为被捕获细胞在光镊拉伸过程中典型的“受力-时间”曲线，当光阱力大于桥连的 GFP⁺-BFP⁺细胞对的断裂力时（此图中为 165.7 pN），两个细胞将相互分离，被捕获细胞迅速回到光阱中心，光阱力归零。在拉伸过程中的最大光阱力即可认为是桥连的 GFP⁺-BFP⁺细胞对的断裂力。

5.1.3 实验结果

在实验组中，我们用光镊一共测量了 71 对不同细胞间的“接触-拉伸”过程，在对照组中，则一共测量了 63 个“接触-拉伸”事件。实验结果如表 5 - 1 和图

5-5 所示。

在表 5-1 中可见, 在对照组的实验中, 图 5-3 (b) 所示的 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间无相互作用的情况占所有的“接触-拉伸”事件的比例为 80.9%, 但是在实验组中只有 33.9%。这两个概率上的巨大差距说明点击缩合反应能够以非常高的效率桥连真核细胞。

对表 5-1 中所示的第二种情况, 即图 5-3 (c) 所示的情况, 我们可用 5.1.2.3 节的方法计算两桥连细胞的断裂力。图 5-5 为实验组和对照组的断裂力的统计结果。在未加入 TCEP 的对照组中, 断裂力的统计分布只有一个 45.0 pN 处的特征峰。然而实验组的统计结果存在两个特征峰。第一个断裂力较小的特征峰在 60.6 pN 处, 与对照组的特征峰的断裂力比较接近; 第二个断裂力较大的特征峰在 153.8 pN 处, 这一断裂力与前人模拟得到的硅-碳共价键的断裂力^[48]具有相同的数量级。因此, 通过对比实验组和对照组的断裂力统计分布, 可推断实验组中 153.8 pN 处的额外特征峰应是由于 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间的 CBT-Cys 点击反应所形成的共价键产生的。

对表 5-1 中所示的第三种情况, 在对照组的实验中, 图 5-3 (d) 所示桥连的 GPF⁺-BPF⁺细胞对无法被光镊分开的情况占所有的“接触-拉伸”事件的比例仅为 6.4%, 这应是低浓度的封闭剂不能完全去除 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞间的非特异性相互作用导致的。在实验组中发生此种情况的概率为 40.7%, 这个概率远高于对照组。我们认为这应是由于细胞间的非特异性相互作用和单个桥连的 GPF⁺-BPF⁺细胞对间存在多个点击反应连接共同导致的, 并且后者应是主要原因。

表 5 - 1 光镊拉伸相接触的 GPF⁺细胞和 BPF⁺细胞时的不同拉伸现象的概率

	两细胞间 无相互作用	细胞间存在桥连 且可被光镊分开	细胞间存在桥连 但光镊无法分开
实验组 (带有 TCEP)	33.90%	25.42%	40.68%
对照组 (不加 TCEP)	80.85%	12.77%	6.38%

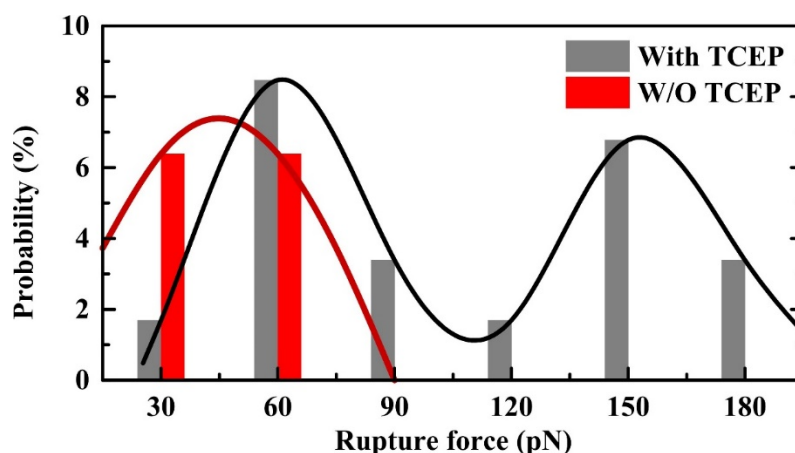


图 5-5 桥连的 GPF+细胞和 BPF+细胞间断裂力的统计分布图

灰色的柱状图和相应的黑色实线是在有 TCEP 时 GPF+细胞和 BPF+细胞间桥连断裂力的测量结果，红色的柱状图和深红色的实线是在不加入 TCEP 条件下的两细胞间作用力的测量结果。

5.1.4 小结

多细胞生物的正常生理功能非常依赖于细胞间的相互作用，人为构建不同类型细胞的细胞连接是生物学研究的迫切需求且具有挑战性。通过与化学系梁高林教授课题组合作，将四种链接试剂 Mal-CBT, Mal-Cys, Mal-Alkyne 和 Mal-N₃ 修饰在细胞表面以桥连三种细胞。但传统的检测方法无法验证细胞是否完成了桥连以及定量的测量细胞桥连概率，必须借助光镊微小力的测量能力证明细胞间存在桥连并说明桥连的结构特性。

我们用光镊定量的测量了 Mal-Cys 修饰和 Mal-CBT 修饰的两种 HEK 293T 细胞之间的连接概率。实验结果表明 CBT-Cys 点击反应将细胞连接效率从 19.15% 显著的提高到 66.10%。在此之后，借助 Matlab 的图像分析技术追踪光镊拉伸过程中两细胞的位置变化情况，进而得到“细胞受力-时间”曲线，得到每对桥连细胞的断裂力。通过统计断裂力特征谱得到 CBT-Cys 桥连细胞对的特征断裂力为 153.8 pN（加载力速度为 49 pN/s）。这一断裂力的大小与共价键的断裂力的理论结果的数量级一致，因此可证明细胞连接为共价连接。这一方法也可被应用于测量其它的微观相互作用在低加载力速度下的断裂力。

5.2 光镊力谱研究微管蛋白动态性调节细胞入侵性吞噬机理

细胞入侵性吞噬 (Entosis) 是肿瘤恶性演化过程中极为常见的生理现象, 已在多种肿瘤内观察到, 如恶性上皮肿瘤 (carcinoma) [49], 肉瘤 (sarcoma) [50], 血管平滑肌脂肪瘤 (angiomyolipoma) [51] 和黑素瘤 (melanoma) [52] 等。细胞入侵性吞噬与正常细胞的细胞吞噬 (Phagocytosis) 和细胞自噬 (Autophagy) 不同: 细胞吞噬为各种巨噬细胞吞噬死细胞或病变细胞的过程 [53, 54]; 细胞自噬是细胞内部清除变性的细胞器和蛋白的过程 [55]; 细胞入侵性吞噬则是恶性肿瘤细胞不断“吞入”并杀死正常细胞或良性肿瘤细胞, 从而促使肿瘤组织中恶性细胞得以保留和增长的过程 [56, 57]。

细胞生物学研究表明“Rho-ROCK-myosin”路径中作用于微丝蛋白骨架的收缩力主导了细胞入侵性吞噬 [58], 但微管蛋白骨架动态性对细胞入侵性吞噬的影响尚不明确。

中国科学技术大学生命科学学院的姚雪彪教授课题组, 通过生化研究指出细胞内三种蛋白 TIP150、MCAK 和 Aurora A 之间的相互作用调节了微管蛋白动态性, 进而影响了细胞刚性, 从而影响细胞入侵性吞噬进程。但是, 荧光等观测手段无法定量测量调控微管蛋白动态性对细胞刚性的影响, 因此我们用光镊测量细胞入侵性吞噬时细胞形变的力学特性, 以支持姚雪彪教授提出的细胞入侵性吞噬受微管动态性调控的模型。

5.2.1 光镊测量细胞膜刚性的实验方法

5.2.1.1 光镊实验方法

实验用单分子皮牛力谱仪进行, 用数值孔径为 1.2 的 60 倍水浸物镜 (UPLSAPO 60XW, 日本 Olympus 株式会社) 作为捕获物镜, 物镜后瞳处入射的激光功率为 1.78 W。实验在室温 (25°C~26°C) 完成。

手柄微球表面修饰有凝集素以便与细胞粘连。用含有 0.5 mg/ml 凝集素 (Lectin, 美国 Sigma 公司) 的 PBS 缓冲液孵育聚苯乙烯微球 (货号以及直径: #4205A, $4.993 \pm 0.040 \mu\text{m}$, 美国 Thermo scientific 公司) 90 分钟。用 PBS 缓冲液清洗孵育过的微球 3 次后, 用细胞培养液 1:10 稀释。

样品室为 2.2.7.1 介绍的单分子样品室, 用带有方形孔洞的封口膜粘合盖玻片和载玻片制作而成。先使多聚赖氨酸溶液 (货号: P4707, 0.01%, 美国 Sigma-

Aldrich 公司) 孵育玻片 30 分钟, 在盖玻片表面形成粘附层。然后, 用 10 倍于样品室容积的细胞培养液冲洗样品室, 冲洗掉溶液中游离的多聚赖氨酸分子。接着将 MCF7 细胞置换入样品室中孵育 20 分钟, MCF7 细胞固定在盖玻片表面。其后, 用细胞培养液冲洗掉悬浮的 MCF7 细胞。最后, 加入修饰有凝集素的聚苯乙烯微球并将样品室密封。

将准备好的样品室置于显微镜载物台上, 用光镊捕获聚苯乙烯微球并操纵其与底面上的 MCF7 细胞接触 3 分钟, 如图 5-6 (a) 中上图所示。由于微球表面的凝集素可与细胞表面的糖蛋白相互结合^[59], 微球将紧密的连接在细胞表面。然后用压电载物台驱动盖玻片上的 MCF7 细胞以 $v = 100 \text{ nm/s}$ 的速度背向光阱中心运动。此时, 与 MCF7 连接在一起的微球逐渐远离光阱中心, 因此微球受到指向光阱中心的光阱回复力 F 的阻碍, 并由于微球紧密的连接在细胞表面, 细胞的细胞膜将在微球传递的回复力 F 的作用下发生形变, 形变大小受细胞膜刚性的影响, 如图 5-6(a) 中下图所示。使用 CCD 相机 (CoolSNAPHQ2, 美国 Photometrics 公司) 记录微球与细胞间的相互作用过程。图 5-6 (b) 和 (c) 为不同细胞膜刚性大小的实验录像, 可明显发现 (b) 图中的细胞膜形变较大, 细胞膜刚性较小。

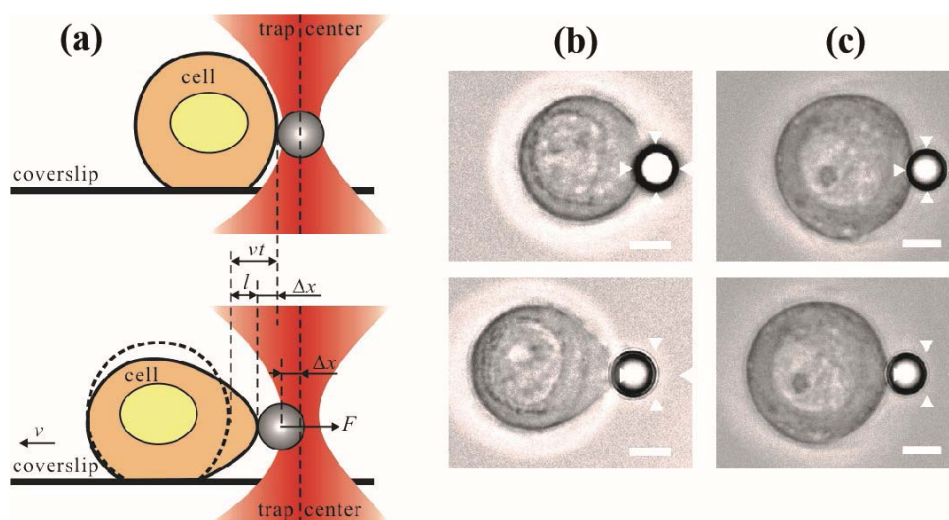


图 5-6 光镊测量细胞膜弹性实验示意图及实验录像截图

(a) 用光镊测量细胞膜弹性实验示意图; (b) 细胞膜弹性较大时, 细胞膜在光阱力作用下明显变形; (c) 细胞膜弹性较小时, 细胞膜在光阱力作用下形变较小。(b) 和 (c) 中白色箭头处为光镊的中心位置, 坐标尺为 $5 \mu\text{m}$ 。

5.2.1.2 表征细胞膜刚性

自压电载物台开始运动至时间 t 时, 细胞运动的距离为 vt , 但由于细胞膜形变, 微球的偏离光阱中心的位移 Δx 小于细胞位移, 细胞膜的形变长度为

$$l = vt - \Delta x, \quad (4.7)$$

微球受到的光阱力为 $F_{trap} = -k\Delta x$ ，其中 k 是光阱刚度。微球施加在细胞膜上的力与光阱力大小相等，即

$$|F_{cell}| = |F_{trap}| = k\Delta x。 \quad (4.8)$$

我们用 3.3 节中描述的追踪微球随机布朗运动计算粘滞系数的方法测量出溶液在功率 1.78 W 激光（进入物镜后瞳的激光功率，并与测量断裂力实验中的激光功率一致）照射下的粘滞系数为 $8.6 \times 10^{-4} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ 。接着，用 3.4 节中描述 SDFM 方法测量了 $5 \mu\text{m}$ 在距离玻片表面 $20 \mu\text{m}$ 处的光阱刚度 $k=405.7 \text{ pN}/\mu\text{m}$ 。并且由于拉伸实验中所用的捕获物镜为水浸物镜，因此可认为光阱刚度不随距离玻片表面的远近而变化^[46]。

互相关的方法^[60]追踪 CCD 录像中的微球位置即求得微球偏离光阱中心的位移 Δx 。将 Δx 和压电载物台运动速度 v 带入(4.7)式即可求得细胞膜的形变长度 l ；将 Δx 和光阱刚度 k 带入(4.8)式即可求得细胞膜受到的张力 F_{cell} 。得到的“力-细胞膜形变长度”关系如图 5-7 所示。线性拟合“力-细胞膜形变长度”曲线可求得细胞膜单位形变长度所对应外力的大小，此力表征了细胞膜形变的难易程度，因此，这里将细胞膜单位形变长度所对应外力的大小定义为细胞膜刚度。在后续试验中将用细胞膜刚度表征细胞刚性。

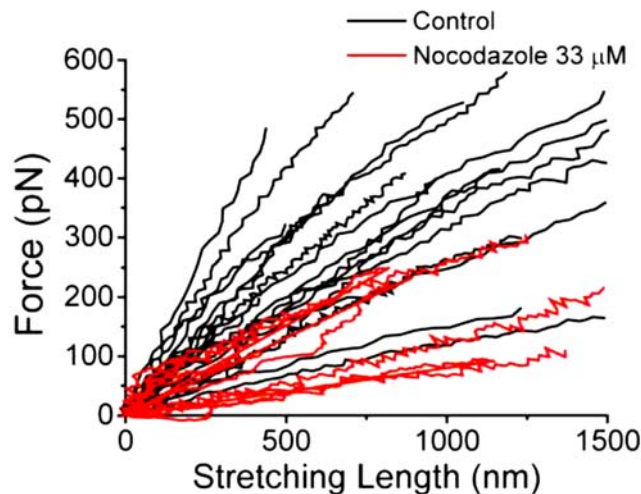


图 5-7 光镊测量细胞膜弹性的“力-细胞形变长度”曲线

图中黑色曲线为不经任何处理的 MCF7 细胞的实验数据，红色曲线为诺考达唑处理的细胞的实验数据，可看出诺考达唑处理过的细胞的刚性更小。

5.2.2 实验结果

应用 5.2.1 节中测量细胞膜刚度的实验方法，我们测量了不同种类的 MCF7

细胞的细胞膜刚度，以阐明微管动态性和细胞膜刚度对细胞入侵性吞噬的影响。

5.2.2.1 微管动态性对于细胞膜刚度的影响

首先测量微管动态性对于细胞膜刚度的影响。实验对比了分别使用诺考达唑（Nocodazole）和紫杉醇（Taxol）处理过的 MCF7 细胞的细胞膜刚度。诺考达唑可使促使细胞内微管解聚，而紫杉醇可稳定细胞内微管不解聚。实验结果如图 5-8 所示。诺考达唑处理过的 MCF7 细胞（图 5-8 中 Noc 33 μM 组和 Noc 100 nM 组）的细胞膜刚度小于正常 MCF7 细胞（图 5-8 中 Control 组）的细胞膜刚度，且诺考达唑的浓度越高细胞膜刚度越小。紫杉醇处理过的 MCF7 细胞（图 5-8 中 Taxol 1 μM 组）的细胞膜刚度大于正常 MCF7 细胞（图 5-8 中 Control 组）的细胞膜刚度。这些实验数据说明细胞内微管动态性将影响细胞膜刚度，微管稳定不解聚时细胞膜刚度变大，解聚后细胞膜刚度减小。

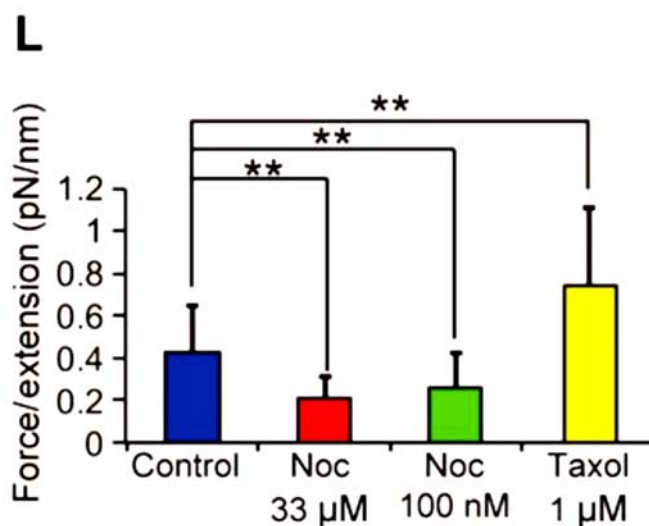


图 5-8 微管动态性对细胞膜刚度的影响

图中为四种不同方法处理后的 MCF7 细胞的细胞膜刚度，Control 为正常细胞的细胞膜刚度；Noc 33 μM 和 Noc 100 nM 分别为浓度 33 μM 和 100 nM 的诺考达唑处理后的细胞的细胞膜刚度；Taxol 1 μM 为浓度 1 μM 的紫杉醇处理后的细胞的细胞膜刚度。

5.2.2.2 细胞入侵性吞噬中两种细胞的刚度

在确定了微管动态性对细胞膜刚度的影响后，我们对比测量了正在进行细胞入侵性吞噬的两个正常 MCF7 细胞的细胞膜刚度，实验结果如图 5-9 所示。实验表明，入侵细胞（图 5-9 中 Inner cell）的细胞膜刚度高于被入侵的包裹细胞（图 5-9 中 Outer cell）的细胞膜刚度。由于入侵细胞和包裹细胞为同种细胞，因此可认为细胞膜刚度将影响两细胞间细胞入侵性吞噬中的入侵与被入侵关系，

即细胞膜刚度影响细胞入侵性吞噬。

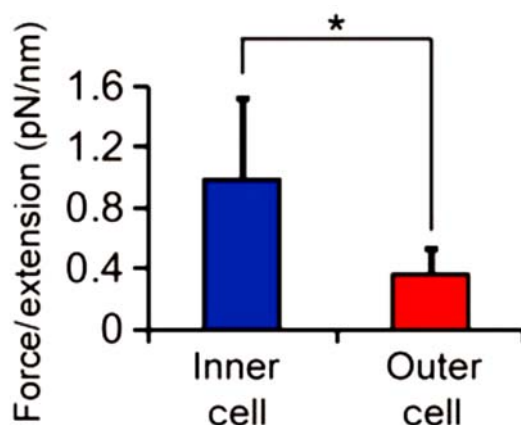


图 5-9 细胞入侵性吞噬中两种细胞的刚度

Inner cell 是入侵性吞噬中的入侵细胞，Outer cell 是被入侵细胞入侵的包裹细胞。

5.2.2.3 TIP150、MCAK 和 Aurora A 对细胞膜弹性的调控

TIP 150, MCAK 和 Aurora A 是细胞中够调控微管动态性的三种蛋白。因此可以推测这三种蛋白的浓度和活性将会影响细胞膜弹性。

首先，我们测量了 TIP 150 和 MCAK 蛋白的浓度对细胞膜弹性的影响，实验结果如图 5-10 所示。通过与正常细胞（图 5-10 中 Control 组）对比可知，敲除 TIP 150 和 MCAK 蛋白后 MCF7 细胞（图 5-10 中 TIP 150 siRNA 组和 MCAK siRNA 组）的细胞膜刚度明显变大，而当 TIP 150 和 MCAK 蛋白过表达时（图 5-10 中 TIP 150-eGFP 组和 MCAK-eGFP 组），细胞膜刚度则变小。

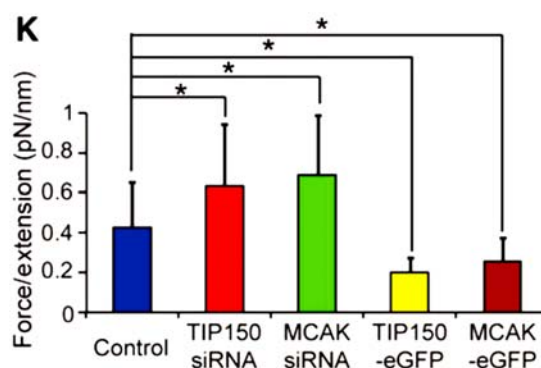


图 5-10 细胞中 TIP150 和 MCAK 蛋白的浓度对于细胞膜弹性的影响

Control 是正常 MCF7 细胞的细胞膜刚度，TIP 150 siRNA 和 MCAK siRNA 是分别敲除 TIP 150 蛋白和 MCAK 蛋白后的 MCF7 细胞的细胞膜刚度，TIP 150-eGFP 和 MCAK-eGFP 是 MCF7 细胞中 TIP 150 蛋白和 MCAK 蛋白分别过表达时的细胞膜刚度。

然后，我们测量了 Aurora A 激酶对细胞膜弹性的影响，实验结果如图 5-11

所示。MCF7 细胞中缺少 Aurora A 激酶时（图 5-11 中 Aurora A siRNA 组和 VX680 组）细胞膜刚度减小；而 Aurora A 激酶过表达时（图 5-11 中 Aurora A-eGFP 组）细胞膜刚度增加。

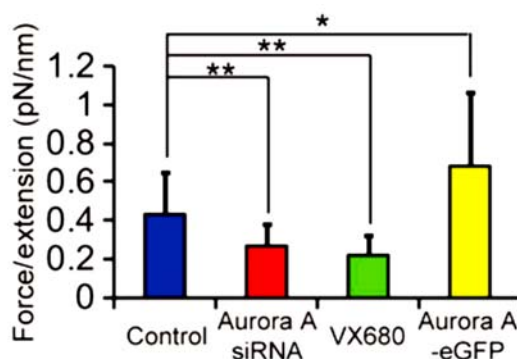


图 5-11 Aurora A 的浓度对于细胞膜弹性的影响

Control 是正常 MCF7 细胞的细胞膜刚度，Aurora A siRNA 是敲除 Aurora A 激酶后的 MCF7 细胞的细胞膜刚度，VX680 是经 Aurora A 激酶的抑制剂 VX680 处理后的 MCF7 细胞的细胞膜刚度，Aurora A-eGFP 是 MCF7 细胞中 Aurora A 激酶过表达时的细胞膜刚度。

结合 5.2.2.2 节的讨论可知，TIP 150 和 MCAK 蛋白过表达的 MCF7 细胞以及缺少 Aurora A 激酶的 MCF7 细胞都易作为包裹细胞被正常的 MCF7 细胞入侵。这与姚雪彪教授课题组的生物学实验结果吻合。

5.2.3 小节

本小节中，光镊定量测量多种生化处理后的 MCF7 细胞的细胞膜刚度。实验表明：微管的动态性会影响细胞的细胞膜刚度；细胞膜刚度将影响两细胞间细胞入侵性吞噬中的入侵与被入侵关系，即细胞膜刚度影响细胞入侵性吞噬；TIP 150、MCAK 和 Aurora A 能够调控细胞内微管动态性，进而调控细胞的细胞膜刚度和细胞入侵性吞噬。

光镊测得的细胞入侵性吞噬的力学特性，有力支持了姚雪彪教授提出的 TIP150、MCAK 和 Aurora A 调控细胞入侵性吞噬的机理。

5.3 本章小结

本章中，应用光镊测量微小相互作用力的能力研究了细胞的力学行为。在 5.1 节中，通过光镊测量细胞间的相互作用力证明生物正交点击反应能桥连两种细胞，说明了桥连的结构特性。在 5.2 节中，通过光镊定量测量多种生化处理后的 MCF7

细胞的细胞膜刚度有力支持了姚雪彪教授提出的细胞入侵性吞噬的调控机理。在这些应用中,光镊都发挥了荧光等检测手段无法实现的功能,有力的佐证了相关的化学和生物学结论。

参考文献

- [1] RUTISHAUSER U, ACHESON A, HALL A K, et al. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions [J]. *Science*, 1988, 240(4848): 53-57.
- [2] WOLFSBERG T G, PRIMAKOFF P, MYLES D G, et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions [J]. *The Journal of cell biology*, 1995, 131(2): 275-278.
- [3] ZIMMERMAN G A, PRESCOTT S M, MCINTYRE T M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules [J]. *Immunology today*, 1992, 13(3): 93-100.
- [4] LOEWENSTEIN W R, KANNO Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells [J]. *Nature*, 1966, 209(5029): 1248-1249.
- [5] WIENER J, SPIRO D, LOEWENSTEIN W R. Studies on an epithelial (gland) cell junction II. Surface structure [J]. *The Journal of cell biology*, 1964, 22(3): 587-598.
- [6] KUMAR V, ABBAS A K, ASTER J C. Robbins basic pathology [M]. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [7] VAN ITALLIE C M, ANDERSON J M. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 403-429.
- [8] SLETTEN E M, BERTOZZI C R. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(9): 666-676.
- [9] SONG W, WANG Y, QU J, et al. A photoinducible 1, 3 - dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole - containing proteins [J]. *Angewandte Chemie*, 2008, 120(15): 2874-2877.
- [10] LAUGHLIN S T, BERTOZZI C R. Imaging the glycome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(1): 12-17.
- [11] HANG H C, WILSON J P, CHARRON G. Bioorthogonal chemical reporters for analyzing protein lipidation and lipid trafficking [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(9): 699-708.
- [12] CRAVATT B F, WRIGHT A T, KOZARICH J W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry [J]. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 383-414.
- [13] YE D, SHUHENDLER A J, CUI L, et al. Bioorthogonal cyclization-mediated in situ self-assembly of small-molecule probes for imaging caspase activity in vivo [J]. *Nature chemistry*, 2014, 6(6):

- 519-526.
- [14] KOLB H C, FINN M, SHARPLESS K B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [15] KOLB H C, SHARPLESS K B. The growing impact of click chemistry on drug discovery [J]. *Drug Discovery Today*, 2003, 8(24): 1128-1137.
- [16] YUAN Y, LIANG G. A biocompatible, highly efficient click reaction and its applications [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2014, 12(6): 865-871.
- [17] BEST M D. Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(28): 6571-6584.
- [18] SPEERS A E, ADAM G C, CRAVATT B F. Activity-based protein profiling in vivo using a copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(16): 4686-4687.
- [19] BASKIN J M, PRESCHER J A, LAUGHLIN S T, et al. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(43): 16793-16797.
- [20] SAXON E, BERTOZZI C R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction [J]. *Science*, 2000, 287(5460): 2007-2010.
- [21] MAMMEN M, CHOI S-K, WHITESIDES G M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1998, 37(20): 2754-2794.
- [22] LIANG G, REN H, RAO J. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells [J]. *Nature chemistry*, 2010, 2(1): 54-60.
- [23] LIANG G, RONALD J, CHEN Y, et al. Controlled Self - Assembling of Gadolinium Nanoparticles as Smart Molecular Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(28): 6283-6286.
- [24] YUAN Y, SUN H, GE S, et al. Controlled intracellular self-assembly and disassembly of ¹⁹F nanoparticles for MR imaging of caspase 3/7 in zebrafish [J]. *ACS nano*, 2014, 9(1): 761-768.
- [25] LIU S, TANG A, XIE M, et al. Oligomeric Hydrogels Self-Assembled from Reduction-Controlled Condensation [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(12): 3639-3642.
- [26] YUAN Y, ZHANG J, AN L, et al. Oligomeric nanoparticles functionalized with NIR-emitting CdTe/CdS QDs and folate for tumor-targeted imaging [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(27): 7881-7886.
- [27] WANG Q, CHAN T R, HILGRAF R, et al. Bioconjugation by copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(11): 3192-3193.
- [28] 袁月. CBT-Cys 点击缩合反应在分子成像, 肿瘤治疗及细胞桥联中的应用 [D]; 中国科学技术大学, 2015.

- [29] ZHU C. Kinetics and mechanics of cell adhesion [J]. *Journal of Biomechanics*, 2000, 33(1): 23-33.
- [30] WILSON I A, STANFIELD R L. Antibody-antigen interactions [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, 3(1): 113-118.
- [31] KARLSSON R, MICHAELSSON A, MATTSSON L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system [J]. *Journal of immunological methods*, 1991, 145(1): 229-240.
- [32] MAYYA V, LUNDGREN D H, HWANG S I, et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions [J]. *Science Signaling*, 2009, 2(84): ra46.
- [33] KAPLANSKI G, FARNARIER C, TISSOT O, et al. Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow [J]. *Biophysical Journal*, 1993, 64(6): 1922-1933.
- [34] LONG M, ZHAO H, HUANG K-S, et al. Kinetic measurements of cell surface E-selectin/carbohydrate ligand interactions [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2001, 29(11): 935-946.
- [35] EVANS E, LEUNG A, HAMMER D, et al. Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(7): 3784-3789.
- [36] FRITZ J, KATOPODIS A G, KOLBINGER F, et al. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(21): 12283-12288.
- [37] DUDKO O K, HUMMER G, SZABO A. Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(41): 15755-15760.
- [38] 章燕, 叶志义, 霍波, et al. 应用光阱技术测量 P-selectin /PSGL-1 键解离的断裂力 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2005, 22(5): 961-965.
- [39] ZHONG M C, XUE G S, ZHOU J H, et al. Measurement of interaction force between RGD-peptide and Hela cell surface by optical tweezers [J]. *Chinese Optics Letters*, 2012, 10(10): 101701.
- [40] LECKBAND D, SCHMITT F-J, ISRAELACHVILI J, et al. Direct force measurements of specific and nonspecific protein interactions [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(15): 4611-4624.
- [41] 龙勉, 朱承. P-选择子/PSGL-1 配体相互作用的二维反应动力学 [C]//朱承, 龙勉. 生物力学的最新进展——首届中外青年生物力学工作者学术研讨会论文集. 北京; 高等教育出版社. 2001: 65-65.
- [42] BIANCO P, NAGY A, KENGYEL A, et al. Interaction forces between F-Actin and titin PEVK

- domain measured with optical tweezers [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 93(6): 2102-2109.
- [43] REICHLER C, SPARBIER K, MULLER T, et al. Combined laser tweezers and dielectric field cage for the analysis of receptor-ligand interactions on single cells [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 272-282.
- [44] KNONER G, CAMPBELL J H, HECKENBERG N R, et al. Formation of an artificial blood vessel: Adhesion force measurements with optical tweezers [M]//DHOLAKIA K, SPALDING G C. *Optical Trapping and Optical Micromanipulation*. Bellingham; Spie-Int Soc Optical Engineering. 2004: 234-245.
- [45] 李宁, 章燕, 孙淦云, et al. 非特异性相互作用的断裂力与寿命测量 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(1): 35-39.
- [46] VERMEULEN K C, WUITE G J, STIENEN G J, et al. Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations [J]. *Applied Optics*, 2006, 45(8): 1812-1819.
- [47] GONZALEZ R C, WOODS R E, EDDINS S L. *Digital image processing using MATLAB* [M]. Chennai: Pearson Education India, 2004.
- [48] SCHMIDT S W, BEYER M K, CLAUSEN-SCHAUMANN H. Dynamic strength of the silicon-carbon bond observed over three decades of force-loading rates [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(11): 3664-3668.
- [49] ABODIEF W, DEY P, AL-HATTAB O. Cell cannibalism in ductal carcinoma of breast [J]. *Cytopathology*, 2006, 17(5): 304-305.
- [50] HONG I S. The exfoliative cytology of endometrial stromal sarcoma in peritoneal fluid [J]. *Acta cytologica*, 1980, 25(3): 277-281.
- [51] YOKOO H, ISODA K, NAKAZATO Y, et al. Retroperitoneal epithelioid angiomyolipoma leading to fatal outcome [J]. *Pathology international*, 2000, 50(8): 649-654.
- [52] FAIS S. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors [J]. *Cancer letters*, 2007, 258(2): 155-164.
- [53] FLOREY O, OVERHOLTZER M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment [J]. *Trends in cell biology*, 2012, 22(7): 374-380.
- [54] UNDERHILL D M, GOODRIDGE H S. Information processing during phagocytosis [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(7): 492-502.
- [55] MIZUSHIMAN, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [56] SUN Q, LUO T, REN Y, et al. Competition between human cells by entosis [J]. *Cell research*, 2014, 24(11): 1299-1310.
- [57] SUN Q, CIBAS E S, HUANG H, et al. Induction of entosis by epithelial cadherin expression [J]. *Cell research*, 2014, 24(11): 1288-1298.

- [58] OVERHOLTZER M, MAILLEUX A A, MOUNEIMNE G, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 966-979.
- [59] KAJI H, SAITO H, YAMAUCHI Y, et al. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(6): 667-672.
- [60] GELLES J, SCHNAPP B J, SHEETZ M P. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision [J]. *Nature*, 1988, 331(6155): 450-453.

第6章 总结与展望

本文主要工作是利用光镊技术研究驱动蛋白分子和细胞的力学特性,以及研制符合生物物理研究的高精度光镊设备和光镊技术。开展的工作如下:

在光镊技术方面,参与研制了性能可满足生物物理学研究需要的高精度光镊设备“单分子皮牛力谱仪”;基于生物物理学对光镊参数标定方法的要求,改进或引入多种光镊参数标定方法;详细阐明了研究驱动蛋白动力学特性所必需的 DIC 光镊的各向异性特点,以及 DIC 光镊中力和位移的测量方法;建立了 DIC 光镊测量驱动蛋白运动参数的新方法。

在生物学应用方面,定量测量了驱动蛋白 Kinesin-1 和 CENP-E 的动力学特性,以及 SUK4 抗体对 CENP-E 蛋白的调控作用;定量测量了 Mal-Cys 修饰和 Mal-CBT 修饰的两种 HEK 293T 细胞间的相互作用力,证明了生物正交点击反应能桥连两种细胞,并说明了桥连的结构特性;定量测量 MCF7 细胞的细胞膜刚性,证明调控微管动态性会影响细胞刚性,进而调控细胞入侵性吞噬。

本文的主要创新点为:

第一,对高精度光镊系统提出和改进了多种光镊参数标定方法,系列研究从不同角度提升了光镊技术及其测量精度,使之光镊技术更适合研究单分子马达重要生物学问题。例如研究了 DIC 光镊的各向异性特点,建立了 DIC 光镊测量驱动蛋白力学特性的新方法等。

第二,应用 DIC 光镊力测量了 CENP-E 蛋白的弹性及 CENP-E 在 SUK4 抗体调控下的力学特性变化。该成果对研究驱动蛋白力学特性和深入阐明着丝粒动点与微管相互作用的机理具有重要的意义。

第三,光镊定量测量了表面分别修饰 Mal-Cys 和 Mal-CBT 的两种 HEK 293T 细胞间的相互作用力,证明了生物正交点击反应能桥连两种细胞,并说明了桥连的结构特性。这将有助于细胞间相互作用的深入研究。

第四,应用光镊力证明了调控微管动态性会影响细胞刚性,进而调控细胞入侵性吞噬。这将有助于解释细胞入侵性吞噬的机理和寻找防止肿瘤恶化的方法。

本文的工作还可在以下两个方向进行深入研究。

首先是深入研究驱动蛋白 CENP-E 的运动特性:测量 CENP-E 蛋白在其它小分子抑制剂(如 Syntelin 和 GSK)作用下的动力学特性变化;CENP-E 蛋白的多分子协运输的机理;磷酸化对 CENP-E 蛋白的影响。

其次是应用光镊研究化学键的作用强度随加载力速度变化的情况,特别是在加载力速度极低时化学键的断裂力如何变化。这将对计算化学键作用强度的物理

学机理给予证明或新的解释。

附录 I “像素-距离”系数的标定方法

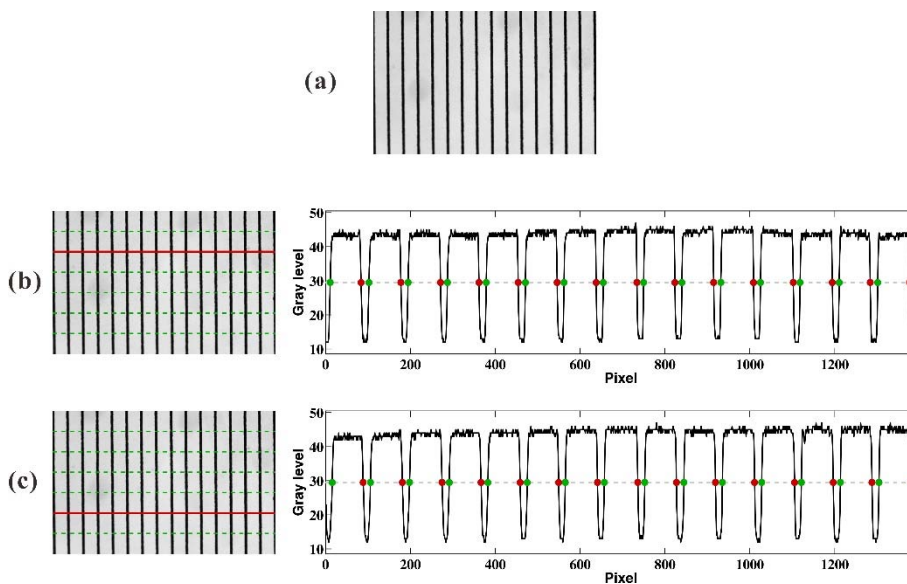
光镊实验常用 CCD 相机观察样品和测量微观距离，这些应用中必须确切地测量出 CCD 图片中两个相邻像素之间的距离，我们将这个距离称为“像素-距离”系数。下面给出借助显微标尺标定“像素-距离”系数的方法。

首先用 CCD 拍摄显微标尺的图像。附图 1-1 (a) 为 CCD 拍摄到的显微标尺的图像，图中每条相邻黑线之间的距离为 $10\ \mu\text{m}$ 。

接着，用横线将图像分为等宽度的 7 个部分(可根据实际情况多分或少分)，如附图 1-1 (b) 和 (c) 左侧图像所示。

然后，依次处理每条横线上的灰度数据。这里以第二条横线上的数据作为例子来说明。第二条横线上像素的灰度分布为附图 1-1 (b) 右侧图像中的黑色曲线。将最大灰度和最小灰度的平均值作为灰度阈值，即附图 1-1 (b) 右侧图像中的灰色虚线。计算出代表灰度分布的黑色曲线跟灰度阈值的交点，在附图 1-1 (b) 右侧图像中灰度阈值与灰度分布曲线的交点用实心圆点标出。然后即可用逐差法计算出 $10\ \mu\text{m}$ 范围内平均包含多少像素点，进而计算出“像素-距离”系数。同样地，我们可求得第五条横线(如附图 1-1 (c) 所示)以及其它横线所对应的“像素-距离”系数。

最终，7 条横线的“像素-距离”系数的平均值即为标定结果。



附图 1-1 CCD 拍摄的显微标尺图片以及数据分析过程

附表 1-1 给出了 Olympus 公司生产的 IX 71 显微镜用 1.0X 放大层时，不同的物镜的“像素-距离”系数 (CCD 相机为 CoolSNAPHQ2, 美国 Photometrics 公

司生产)。表中的数据表明，不同的物镜的“像素-距离”系数与物镜的放大倍率成反比，证明了该方法的精确性。

附表 1-1 IX71 显微镜用不同物镜时的“像素-距离”系数

物镜型号	放大倍率	像素/10 μm 的条纹间距包含的数	“像素-距离”系数 (nm/pixel)
UPLSAPO 60XW	60 倍	92.25 ± 0.10	108.40 ± 0.12
UPLSAPO 100XO	100 倍	153.44 ± 0.09	65.17 ± 0.04

附录 II 玻片清洗方法

玻片表面的干净程度将直接影响显微成像质量，也会影响玻片表面吸附蛋白分子或化学小分子的能力。为了得到表面整洁且性状均一的玻片，载玻片和盖玻片在用前需要依照下述方法清洗。

1. 实验用洗洁精清洗玻片表面；
2. 将玻片置于 5 mol/L 的氢氧化钾溶液中超声清洗 5 min；
3. 用去离子水将玻片漂净；
4. 将玻片置于离子水中超声清洗 5 min；
5. 将玻片置于酒精中超声清洗 5 min；
6. 晾干玻片。

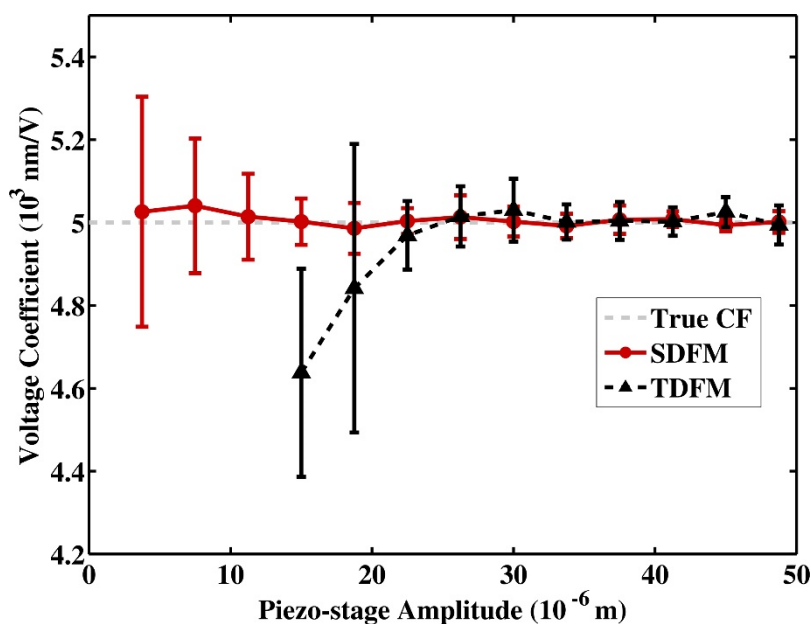
附录III 压电载物台振幅对 SDFM 和 TDFM 测量精度的影响

这里我们通过模拟和实验两种方法来说明压电载物台振幅的大小对 SDFM 和 TDFM 方法的测量精度的影响。

首先,用 3.4.4.2 节中所用的模拟方法对比 SDFM 方法和 TDFM 方法标定“电压-位移”转换系数时的精度受到压电载物台振幅大小的影响。在模拟时,实验温度设定为 25 °C,信噪比设定为 40,光阱刚度设定为 50 pN/ μm ,真实的“电压-位移”转换系数设定为 5000 nm/V。用 CCD(采样频率 30 帧/秒)和 PSD(采样频率为 1 kHz)同时测量直径 2 μm 的被捕获微球的运动,每次采集 10 秒。微球球心距离底面 20 μm 。在分析其中任意一个压电载物台振幅的情况时,将 SDFM 方法的压电载物台振幅和 TDFM 方法中 5 个压电载物台振幅中的最大值定为同一个值,都记为 A 。压电载物台的振幅从 3.75 μm 到 48.75 μm 范围内每隔 3.75 μm 距离选取一个振幅,一共选取 13 个振幅,压电载物台振动频率为 2.5 Hz。对任意一种特定的实验条件,分别用两种方法标定光阱 10 次。

模拟结果如附图 2-1 所示。图中任意振幅条件下的数据点以及误差棒均由此条件下的 10 次模拟结果统计得到。可看到,随着压电载物台振幅的逐渐增加,两种方法的标定结果的平均值(图中红色圆点和黑色三角所示)都更加靠近真实值(图中灰色虚线所示),并且误差棒也逐渐减小。值得注意的是,在压电载物台振幅小于 15 μm 时,图中仅有 SDFM 方法的数据,没有 TDFM 方法的数据点。这是由于压电载物台振幅小于 15 μm 时,TDFM 方法中微球运动幅度过小,即使对信号进行滤波处理,依然无法拟合出微球的平衡位置,因而无法标定出电压系数的数据;而 SDFM 方法在相同压电载物台振幅条件下可获得更大的微球位移,从而可测得比较准确的电压系数。在压电载物台振幅大于 15 μm 时,TDFM 可标定出电压系数,并且随着压电载物台振幅的增大,标定结果的准确性逐渐提高,误差棒也逐渐变小。但测量平均值的稳定性和标准偏差依然差于 SDFM 方法的标定结果。

模拟数据表明,在实验误差允许的范围内,两种标定方法各自可选择的压电载物台振动范围有很大区别,SDFM 标定方法的适用范围更广,精度更高(选取合适的压电载物台振幅,测量误差 $<0.5\%$)。精度较 TDFM 方法提高了 3.3 倍。

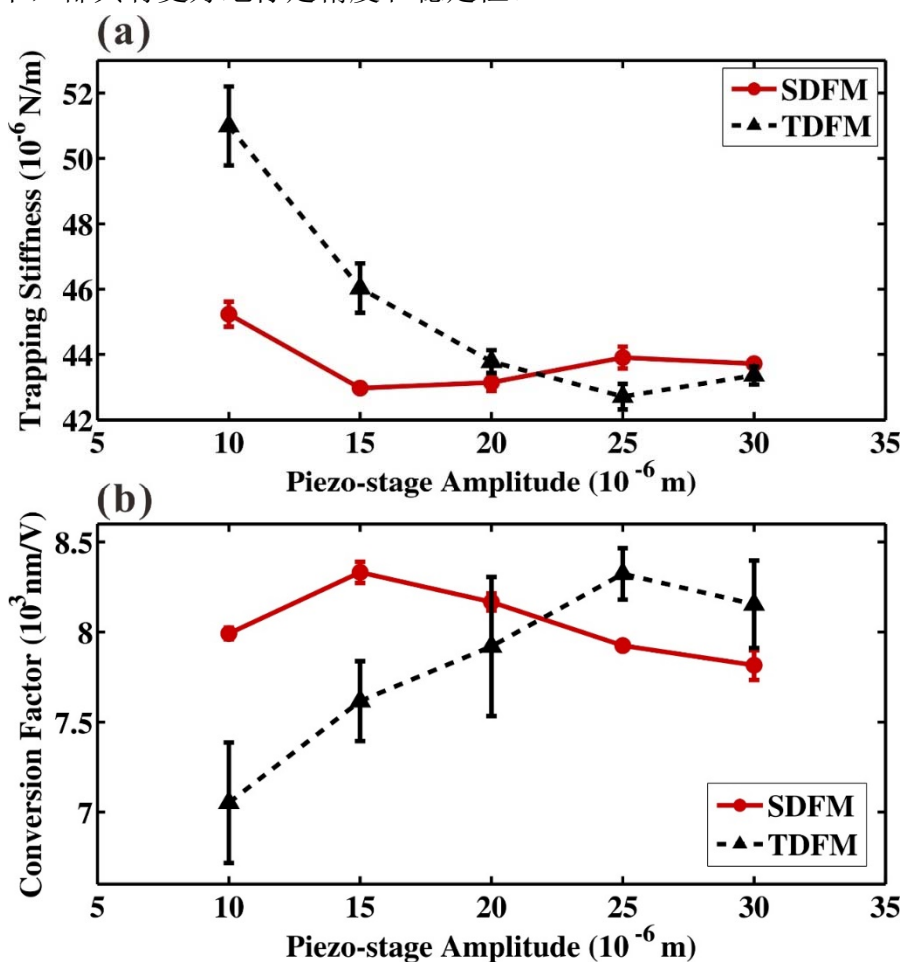


附图 2-1 SDFM 方法和 TDFM 方法标定电压系数的对比模拟结果

图中带有误差棒的红色圆点以及红色实线为 SDFM 方法的“电压-位移”转换系数标定结果，带有误差棒的黑色三角以及黑色虚线为 TDFM 方法的“电压-位移”转换系数标定结果，灰色虚线为电压系数真实值 5000 nm/V。

其后我们通过实验展示压电载物台振幅大小对 SDFM 和 TDFM 方法的标定精度的影响。具体的标定方法可见 3.4.1, 3.4.2.2, 3.4.3.2 以及 3.4.4.3 节中提到的参数标定方法。实验中，我们用光镊捕获同一种标准尺寸 $2\ \mu\text{m}$ 直径的聚苯乙烯微球（货号以及直径：#4202A, $1.999 \pm 0.020\ \mu\text{m}$ ；美国 Thermo scientific 公司）。实验温度设定为 $25\ ^\circ\text{C}$ ，用 CCD（采样频率 30 帧/秒）和 PSD（采样频率为 1 kHz）同时测量被捕获微球的运动，每次采集 10 秒。微球球心距离底面 $10\ \mu\text{m}$ 。在分析其中任意一个压电载物台振幅的情况时，依然将 SDFM 方法的压电载物台振幅和 TDFM 方法中 5 个压电载物台振幅中的最大值定为同一个值，都记为 A 。压电载物台的振幅从 $10\ \mu\text{m}$ 到 $30\ \mu\text{m}$ 范围内每隔 $5\ \mu\text{m}$ 距离选取一个振幅，一共选取 5 个振幅，压电载物台振动频率为 $2.5\ \text{Hz}$ 。此振幅和频率可保证在进行 TDFM 和 SDFM 实验时，被捕获微球的运动范围不会超出光阱刚度以及 PSD 的线性区。对每种光阱状态都用三种方法标定 6 个不同的微球，取平均值作为标定结果。此外，为了防止周围溶液中的微球影响实验测量，我们将微球悬浮液稀释至每个视场 1-2 个微球。进而，此时只需要计入“玻片-溶液”界面附近的流体动力学修正后，即可直接用水的粘滞系数做为样品溶液的粘滞系数。实验时，我们将环境温度控制在 $24\ ^\circ\text{C}$ 保持不变，因此可认为样品溶液的温度为 $24\ ^\circ\text{C}$ ，查表可知此时水的粘滞系数为 $\eta=0.911 \times 10^{-3}\ \text{Ns/m}^2$ 。

实验结果见附图 2-2。附图 2-2 的 (a) 和 (b) 分别展示了光阱刚度和“电压-位移”转换系数的标定结果随压电载物台振幅的变化情况。两图中的数据反映了相似的数据变化趋势。随着压电载物台振幅的增加,两种方法标定结果的平均值波动减少,误差棒迅速减小。对 TDFM 方法而言,在压电载物台振幅较低时,数据结果不可信,并且误差棒较大,只有振幅较大时标定结果才比较稳定。而 SDFM 方法在压电载物台振幅较低时的精度优势依然非常明显,并且误差棒也始终小于同条件下的 TDFM 方法的结果。这说明 SDFM 在所有压电载物台振幅条件下,都具有更好地标定精度和稳定性。



附图 2-2 实验对比 SDFM 和 TDFM 方法的标定精度

图中带有误差棒的红色圆点以及红色实线为 SDFM 方法的标定结果,带有误差棒的黑色三角以及黑色虚线为 TDFM 方法的标定结果。(a) 在不同压电载物台振幅条件下的光阱刚度标定结果;(b) 在不同压电载物台振幅条件下的“电压-位移”转换系数标定结果

缩写词索引

- AFM, Atomic Force Microscopy, 原子力显微镜
- AOD, Acousto Optical Deflectors, 声光偏转器
- AOM, Acousto-optical Modulators, 声光调制器
- ATP, Adenosine triphosphate, 腺嘌呤核苷三磷酸
- BFP, Back Focal Plane, 后焦面
- BP, Base-Pair, 碱基对
- BSA, Bull Serum Albumin, 牛血清蛋白
- CCD, Charge-coupled Device, 电荷耦合元件
- CENP-E, Centromere-associated protein E, 着丝粒蛋白 E
- CF, Conversion Factor, “电压-位移”转换系数
- DIC, Differential Interference Contrast, 微分干涉相衬
- DICOT, Differential Interference Contrast Optical tweezers, 微分干涉相衬光镊
- DNA, Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
- ds-DNA, double-stranded DNA, 双链脱氧核糖核酸
- GFP, Guanosine Triphosphate, 三磷酸鸟苷
- MSD, Mean Square Displacement, 均方位移
- OT, Optical tweezers, 光镊
- PBS, Polarization Beam Splitter, 偏振分光棱镜
- PSD, Position Sensitive Detector, PSD
- PZT, Piezo-stages, 压电载物台
- RCF, Resultant Conversion Factor, 合“电压-位移”转换系数
- RNA, Ribonucleic Acid, 核糖核酸
- SPNFS, Single-molecule Pico-Newton Force Spectrometer, 单分子皮牛力谱仪
- TEC, Thermoelectric Cooler, 半导体制冷片

致 谢

本文的工作是在三位老师郭光灿院士、李银妹教授，周金华博士后的亲切关怀和悉心指导下才得以完成的。我于 2011 年进入光学系光镊课题组学习，中间经历了很多困难和挫折，但在老师们的帮助下，成功研制了一套拉曼光镊系统，从而使我的博士论文工作得以顺利完成。在中国科学技术大学的五年多时间里，导师们严肃的科学态度，严谨的治学精神，深厚的理论和实验功底，精益求精的工作作风，诲人不倦的师道品格深深地感染和激励着我。在论文收笔之际，谨向三位老师表达诚挚的感谢。

特别感谢中国科学技术大学生命科学学院的姚雪彪教授及其课题组内的窦震副教授，严峰博士，夏鹏博士，王文文博士和王雪莹硕士等同学。他们提供驱动蛋白力学特性研究中所需的 Kinesin-1 蛋白和 CENP-E 蛋白，同我一起进行实验方案的探讨，论文的修改等工作，为研究地顺利进行提供了不少有益的建议。姚雪彪教授生物学功底深厚，思路开阔，创新性思维能力极强，让我学到了很多新的思考方式和研究方法。

特别感谢中国科学技术大学化学系的梁高林教授及其课题组内的袁月博士提出的细胞桥连新方法和给与的细胞桥连实验中所需的细胞。在实验以及论文的撰写过程中，他们帮助了我制定实验方案，修改论文并分析实验结果。正是由于他们的无私帮助，我才能够顺利的完成细胞桥连特性的研究。梁高林教授具有极高的学术素养和工作效率，分析问题能力极强，科研思路开阔，这些都是非常值得我学习和借鉴的地方，也必将对我以后的科研工作产生极为良好的推动效果。

感谢实验室诸位老师和同学对我的帮助和支持，实验室融洽的工作氛围和良好的科研环境让我在这一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。感谢实验室的师兄师姐周金华，钟敏成，任煜轩，薛国胜，刘伟伟博士，李煌，高红芳，周丹丹硕士。这几位师兄师姐带领我从熟悉实验室设备开始，一步步教给我实验操作技术以及很多细节的实验技巧，让我打下了扎实的实验技能基础，这将是我一生的财富。感谢蔡俊老师，王自强老师和王浩威老师在背后默默的奉献和兢兢业业的工作，为我的研究工作提供了很多支持。另外感谢龚雷博士，他跟我一起进入光镊课题组学习，与我相互激励，共同学习进步。从他身上学到了很多生活上的感悟以及为人处事的经验。感谢赵德强，邱型泽，呼新尧，赵倩，余盼盼，李宣令等师弟师妹，在我毕业之际，给予了我不少帮助。

感谢那些所有我应感谢但却无法在这里一一列出的人。

在我即将毕业之时，祝愿实验室永远充满生机，蓬勃发展，祝愿师长和同学

们工作顺利，事事顺意。

最后谨以此文献给我的父亲和母亲，感谢他们在背后支持着我不断前进！

李迪

二零一六年四月于中国科学技术大学

博士期间发表的学术论文与取得的成果

已发表论文:

- [1] **LI D**, ZHOU J H, HU X Y, et al. In situ calibrating optical tweezers with sinusoidal-wave drag force method [J]. **Chinese Physics B**, 2015, 24(11): 626-632.
- [2] YUAN Y*, **LI D***, ZHANG J, et al. Bridging cells of three colors with two bio-orthogonal click reactions [J]. **Chemical Science**, 2015, 6(11): 6425-6431 (*Contributed equally to this work).
- [3] ZHOU J H, **LI D**, HU X Y, et al. Calibrating oscillation response of a piezo-stage using optical tweezers [J]. **Optics Express**, 2015, 23(19): 24108-24119.
- [4] WANG Z Q, **LI D**, ZHONG M C, et al. Application of Wavelet Filter Method in Optical Tweezers Signal Processing [M]//LU Q, ZHANG C G. **Advances in Mechatronics Automation & Applied Information Technologies**. Stafa-Zurich; Trans Tech Publications Ltd. 2014: 966-971.
- [5] XIAP, ZHOU J H, SONG X Y, WU B, LIU X, **LI D**, et al. Aurora A orchestrates entosis by regulating a dynamic MCAK-TIP150 interaction [J]. **Journal of Molecular Cell Biology**, 2014, 6(3): 240-254.
- [6] WANG Z Q, ZHOU J H, ZHONG M C, **LI D**, et al. Calibration of optical tweezers based on an autoregressive model [J]. **Optics Express**, 2014, 22(14): 16956-16964.
- [7] ZHONG M C, GONG L, **LI D**, et al. Optical trapping of core-shell magnetic microparticles by cylindrical vector beams [J]. **Applied Physics Letters**, 2014, 105(18): 181112.

已授权或已申请的专利:

- [1] 李迪, 李银妹, 周金华, 等. 一种永久性液态微球样品室: 中国, ZL201420591155.2 [P]. 2015-01-07[2014-10-13].
- [2] 李迪, 李银妹, 呼新尧, 等. 实时温控微型样品室: 中国, ZL201420591122.8 [P]. 2015-02-04[2014-11-25].
- [3] 周金华, 李迪, 李银妹, 等. 一种基于光学俘获的颗粒粒径检测方法, CN201410685965.9 [P]. 2015-2-25[2014-11-25].

- [4] 周金华, **李迪**, 李银妹, 等. 一种基于光学俘获的原位校准压电载物台位移的方法, CN201410685964.4 [P]. 2015-3-11[2014-11-25].
- [5] 周金华, **李迪**, 李银妹, 等. 基于显微成像的图像灰度测量颗粒粒径的方法, CN201410685961.0 [P]. 2015-3-4[2014-11-25].

待发表的论文:

- [1] Anisotropic optical trap for single molecule assays of kinesin