

# 时间飞行法测量光阱刚度的实验研究\*

周丹丹 任煜轩 刘伟伟 龚雷 李银妹†

(中国科学技术大学光学与光学工程系, 合肥 230026)

(2012年4月19日收到; 2012年6月12日收到修改稿)

传统的测量光阱刚度的方法如功率谱法是基于微粒的布朗运动, 适用于直径范围几百纳米到几微米的微球, 在几微米以上并不具有明显优势. 本文发展一种时间飞行的方法测量光阱对微球的刚度. 该方法是基于跟踪微粒的运动轨迹获得光阱刚度. 通过比较不同功率下, 不同大小以及不同材料的微球的光阱刚度和误差, 结果表明时间飞行法适用于直径范围 5–10  $\mu\text{m}$  的微球; 论文中用功率谱法和均方位移法测量了 5  $\mu\text{m}$  标准聚苯乙烯小球的光阱刚度与时间飞行法测得的结果作为对比, 由于受相机采集速率的影响, 所测刚度值比理想值偏高, 比较而言, 时间飞行法的测量结果更加接近于真实值, 对于光阱刚度的快速标定有着重要意义. 该方法可以应用在特殊光场分布的激光阱中测量微球的光阱刚度; 在实现细胞层次的力学特性测量中它可避免使用微球作为探针, 为更深层次研究细胞上的复杂单分子过程提供了一个研究手段.

**关键词:** 光镊, 光阱刚度, 时间飞行法, 细胞

**PACS:** 87.80.Cc, 42.50.Wk, 87.85.gf, 87.16.D–

## 1 引言

在蛋白质折叠动力学、核小体中组蛋白和 DNA 相互作用、马达蛋白的机械力学特性以及免疫细胞表面抗体抗原结合力的单分子测量中, 需要采用激光光镊来实时动态地监测它们的受力与相互作用<sup>[1–3]</sup>. 光镊源自 1986 年 Ashkin 等<sup>[4,5]</sup> 的一项发明技术, 利用一束高度汇聚的激光束在焦点处形成的光强梯度场俘获和操纵微米或纳米颗粒, 为细胞机械力学特性<sup>[6,7]</sup>、分散体系<sup>[5–8]</sup> 以及生物大分子间相互作用<sup>[3,4]</sup> 等研究提供了一个全新的工具. 强汇聚的激光束中心可以等效为一个谐振子势, 接近焦点的电介质小球都会受到指向势阱最低点的光阱力. 在一定范围内, 光阱力的大小和小球偏离光阱中心的位置成正比, 比例系数就是光阱的刚度, 它是衡量光阱俘获能力的一个重要参数. 实验上, 采用后焦面干涉或通过录像中小球影像的相关分析可以测量微球在光阱中的位移<sup>[8–10]</sup>. 在

单细胞层次的应用中, 需要测量细胞或脂质体膜的受力以及弹性. 通常的做法是采用聚苯乙烯微球作为力的探针. 根据胡克弹簧模型<sup>[11]</sup>, 微球所受的光阱力就等于光阱刚度乘以微球偏离光阱中心的位移. 因此, 光阱刚度的标定对于实时测量光阱力有着重要意义.

常用的标定光阱刚度的方法有流体力学法<sup>[12]</sup>、功率谱法<sup>[10,13]</sup>、均方位移法<sup>[14,15]</sup>. 流体力学法是通过流体的周期性振动对被俘获的小球施加黏滞阻力. 光阱力与液体黏滞力平衡, 由斯托克斯公式<sup>[12]</sup> 计算出黏滞力, 进而得到光阱力. 改变平台周期性振动的振幅和频率来控制小球相对于液体运动的速度就可以计算出小球在不同位置所受的光阱力, 拟合出光阱刚度. 目前流体力学法只适用于球形颗粒, 对于非球形颗粒如酵母细胞和红细胞等, 流体力学法并不适用. 且黏滞系数对光阱高度的修正在接近样品池底面时变大, 刚度的误差也随之变大. 功率谱方法是对测量到的小球布朗运动的电压信号进行傅里叶变换得到功率谱密度

\* 国家自然科学基金 (批准号: 21073174, 20974107, 31100555)、国家重大科学研究计划 (批准号: 2011CB910402) 和中国科学院微重力重点实验室资助的课题.

† E-mail: liyinmei@ustc.edu.cn

函数, 再从频率域中通过洛伦兹拟合得到拐点角频率和光阱刚度. 这种方法需要探测器的采集带宽足够大, 通常要比特征频率大至少一个数量级. 均方位移法通过探测小球热运动的涨落来标定刚度, 其精度受系统采集带宽的影响也较大<sup>[16]</sup>.

在细胞层次应用中, 由于细胞的不规则形状以及细胞膜内外的折射率相差较小, 采用后焦面干涉法以及功率谱密度法不能够有效地获取细胞的位置信息. 常见的细胞, 如 T 细胞<sup>[17]</sup>、B 细胞、NK 细胞、小鼠腹腔单核巨噬细胞<sup>[18]</sup> 以及脂质体囊泡<sup>[19-21]</sup> 的直径多在几个微米到几十微米的范围, 采用 CCD 相机或稍快速的 CMOS 相机能够很方便地探测细胞的位置以及形变. 采用录像记录细胞位置的动态变化, 由于采样带宽的限制, 功率谱法或者均方位移法所测量的刚度均比实际刚度大很多<sup>[16]</sup>. 为此我们发展一种基于时间飞行的方法<sup>[12]</sup>, 通过相机记录直径为 10  $\mu\text{m}$  左右的微球在向光阱中飞行的动态过程, 测量光阱对特定微球的刚度. 该方法的优点是对细胞层次力学特性的测量中可以不考虑细胞的形状以及不需要采用聚苯乙烯微球等作为探针.

## 2 原理与装置

### 2.1 时间飞行法的原理

经显微物镜强聚焦的单模高斯光束对处于其中的微小颗粒施加作用力. 对于颗粒的尺寸远大于激光波长, 可以采用几何光学近似模型<sup>[4,22]</sup>, 其中高斯光束可以分为许多单根光线, 每根光线经小球多次折反射后, 光子动量损失部分对微球产生沿光束传播方向的散射力和垂直的梯度力. 大小分别是<sup>[22]</sup>

$$F_{\text{grad}} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ R \sin(2\theta) - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\gamma) + R \sin(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\gamma)} \right\}, \quad (1)$$

$$F_{\text{scat}} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ 1 + R \cos(2\theta) - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\gamma) + R \cos(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\gamma)} \right\}, \quad (2)$$

其中,  $\theta$  是单根光线的入射角<sup>[22]</sup>,  $R, T$  分别为菲涅耳反射系数和透射系数.  $P$  为单根光线的功率,  $n_1$  是周围溶液的折射率. 总的梯度力是所有角度入射

的光线产生的梯度力之和. 当梯度力大于散射力时, 微球被稳定束缚在光阱里. 在围绕光阱中心一定的范围内, 光镊束缚小球的势阱近似于简谐势阱, 即光强梯度力与偏离光阱中心的距离满足胡克定律

$$F = -kx, \quad (3)$$

式中  $k$  是光阱的刚度, 它表征了光镊的俘获能力. 事实上, 光镊所操控的粒子大多在流体中, 如低压气体或液体环境, 这就意味着被光阱俘获的小球还会受到周围流体所施加的黏滞阻力以及周围液体分子的随机碰撞力的作用. 同时考虑光阱力、黏滞阻力以及布朗运动随机力, 光阱中粒子的一维运动可以用朗之万方程描述:

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t), \quad (4)$$

$m$  为小球的质量,  $x(t)$  代表小球在  $t$  时刻的瞬时位置,  $k_B$  为玻尔兹曼常数,  $T$  为热力学温度,  $\gamma = 6\pi\eta a$ ,  $\eta$  为流体的黏滞系数,  $a$  为小球的半径.  $\xi(t)$  描述的是随机高斯过程<sup>[15]</sup>, 满足

$$\langle \xi(t) \rangle = 0, \quad (5)$$

$$\langle \xi(t) \xi(t') \rangle = \delta(t - t'). \quad (6)$$

在低雷诺数条件下, 被俘获的微球可以近似看做是过阻尼振子, 惯性项远小于黏滞力项, 可以忽略. 假设初始时刻, 微球距离光阱中心位移大小为  $A$ , 在光阱力作用下, 微球将飞向光阱中心, 考虑稳态过程, 略去随机项, 郎之万方程可进一步简化为

$$\gamma\dot{x} + kx = 0. \quad (7)$$

上述一阶常微分方程的解为  $x(t) = A \exp(-t/\tau)$ , 其中  $\tau = \gamma/k$ , 为微球飞行的特征时间. 实验上, 通过相机记录显微镜下微球运动的录像, 通过数字图像处理得到微球向光阱中心飞行过程中位置变化信息. 采用指数曲线拟合微球时间飞行的动态位置可以得到飞行的特征时间, 进而可以求出光阱刚度.

### 2.2 实验装置和方法

实验光路图如图 1(a) 所示, 光镊光源采用二极管抽运的连续 Nd:YAG 激光器 (HPG-5000, ELFORLIGHT, 5.0 W), 激光的波长为 532 nm. 自激光器发出的线偏振基模高斯光经透镜组  $f_1$  和  $f_2$  组成的望远镜系统扩束<sup>[23]</sup>, 再经两个  $45^\circ$  全反镜  $M_1$  和  $M_2$  调整光束横向位置以及阱位透镜  $f_3$

聚焦耦合到显微镜 (Olympus IX-70, JAPAN) 中, 最后经高数值孔径油浸物镜 ( $NA = 1.3, 100\times$ ) 聚焦后在显微镜成像面形成单光阱. 微球在光阱附近飞行的录像由 CMOS 相机 (DALSA 1.4M100) 采集并记录在计算机硬盘上 [24]. 图 1(b) 是被光阱俘获的微球示意图以及做受限布朗运动信号的示意图. 飞行过程中, 微球位置的时序信号可以通过图像相关运算法 [25-27] 处理运动录像来获得. 实验中所用的 CMOS 相机的最大采集频率可达 100 Hz, 采用显微标尺对像素值进行标定, 得到每个像素对应成像面的实际距离为 65 nm. 如无特殊说明, 相机的同步频率均为 50.0 Hz, 曝光时间为 10 ms.

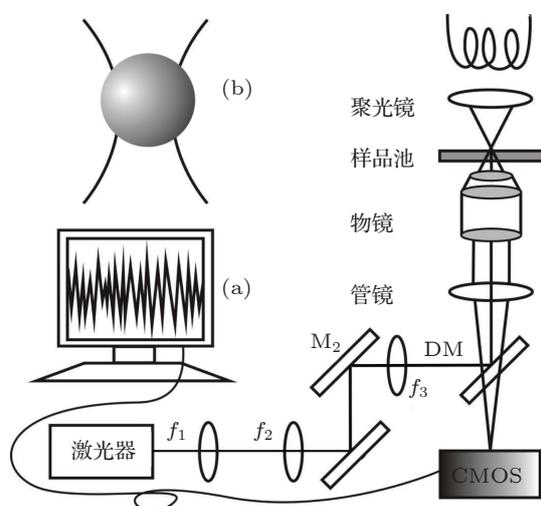


图 1 (a) 单光阱光路示意图; (b) 光阱与被俘获的微球示意图

采用时间飞行法以 PMMA 微球为探针在此单光镊装置上测量光阱刚度. 样品为分散在水溶液中的 PMMA 小球 (10% W/V, 武汉华科微科科技有限公司), 将原液稀释到平均每微升大约有 1000 个小球. 采用聚四氟乙烯固定件夹住一块 0.17 mm 厚的玻璃圆片组成半封闭的样品池. 将约 200  $\mu\text{l}$  稀释后的微球悬浮液直接滴在样品池中. 实验时挡住俘获光, 电动平台将某个作自由布朗运动的微球移到光阱附近后, 先打开 CMOS 相机录像, 再打开俘获激光, 小球陷入光阱的动态过程就被 CMOS 记录下来. 图 2 为耦合到显微镜前激光功率为 26 mW 时, 10  $\mu\text{m}$  PMMA 微球飞入光阱中心过程中相对位置的变化关系曲线. 其中图 2(a)–(c) 分别为从实验图像中提取的三个关键帧, 箭头所指的位置为三个关键帧在位置时间曲线上对应的点. 光阱的位置和小球中心的位置在

图中采用黑点标记, 两个黑点之间的距离即为微球相对于光阱中心位移的大小. 图 2(a) 为微球在光阱中心较远处, 距离光阱中心 2.13  $\mu\text{m}$ , 图 2(b) 微球已接近光阱中心, 距离光阱中心 0.56  $\mu\text{m}$ , 图 2(c) 微球在光阱中心附近作受限布朗运动的一幅图像. 经 MATLAB 作指数拟合, 拟合曲线的方程为  $x(\mu\text{m}) = -2.96 \exp(-t/122) + 3.04$ , 飞行的特征时间为  $122 \pm 9$  ms. 实验温度为 25  $^{\circ}\text{C}$  水的黏滞系数为  $0.894 \times 10^{-3} \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ , 小球半径为 5  $\mu\text{m}$ , 由  $\tau = 6\pi\eta a/k$ , 可算出 PMMA 小球的光阱刚度为  $0.69 \pm 0.05 \text{ pN}/\mu\text{m}$ , 误差为 7.2%, 在可接受的范围之内, 因此考虑将这种方法推广到其他类型的小球.

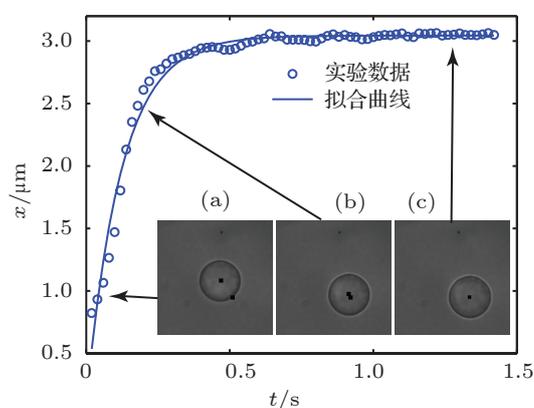


图 2 PMMA 微球陷入光阱的位置时间曲线 (a) 微球距离光阱中心 2.13  $\mu\text{m}$ ; (b) 微球距离光阱中心 0.56  $\mu\text{m}$ ; (c) 微球在光阱中心

### 3 实验结果与讨论

为更加清楚地了解时间飞行法的适用范围, 实验设计不同激光功率、不同微球大小以及不同材料的微球通过时间飞行法确定光阱刚度. 通过标准的聚苯乙烯小球, 可以比较不同方法所测量的刚度结果的准确性以及评估各自的误差水平.

#### 3.1 激光功率对光阱刚度的影响

实验中旋转激光器上的表盘, 用功率计 (Thorlab, PM100D) 测得显微镜入光口处的激光功率, 做出相应的标定曲线. 然后再测量表盘上不同刻度下小球的飞行时间, 通过功率的标定曲线就可以得到不同激光功率下小球的飞行时间. 图 3(a) 是不同激光功率下 10.6  $\mu\text{m}$   $\text{SiO}_2$  微球 (5% W/V, 武汉华科微科科技有限公司) 和 10  $\mu\text{m}$  PMMA

微球 (10% W/V, 武汉华科微科科技有限公司) 飞行的特征时间与功率的关系曲线. 由于刚度与功率呈正比关系  $k = \alpha P$ , 而刚度和特征时间关系由  $\tau = 6\pi\eta a/k$  确立, 因而特征时间  $\tau$  与功率呈反比关系, 即  $\tau = \beta/P$ . 实验结果也表明, 激光功率越大, 飞行时间越小, 二者呈现反相关, 如图 3(a) 所示. 图 3(a) 中 PMMA 的拟合曲线方程为  $\tau(\text{ms}) = 10^3(1.8/P + 0.023)$ ,  $\text{SiO}_2$  为  $\tau(\text{ms}) = 10^3(5.3/P + 0.010)$ . 图 3(b) 是采用两种微球作为探针测量得到的光阱刚度随功率的变化关系. 对实验数据进行线性拟合得到, PMMA 微球满足方程  $k(\text{pN}/\mu\text{m}) = 0.017P + 0.38$ ,  $\text{SiO}_2$  微球满足方程  $k(\text{pN}/\mu\text{m}) = 0.012P + 0.13$ .

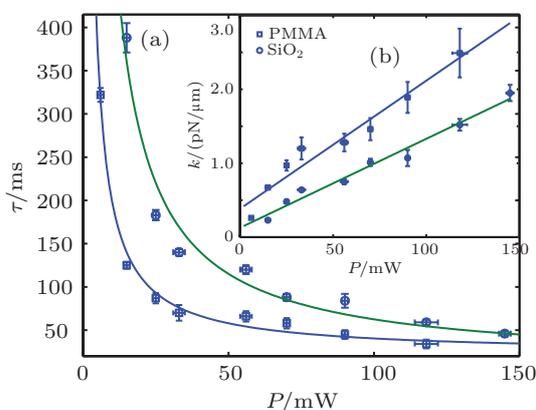


图 3 (a) 不同激光功率下  $\text{SiO}_2$  微球和 PMMA 微球飞行的特征时间; (b) 不同激光功率下  $\text{SiO}_2$  微球和 PMMA 微球的光阱刚度

PMMA 球的刚度随功率改变要比  $\text{SiO}_2$  球改变快, 这是因为 PMMA 的折射率较大的缘故 ( $n(\text{SiO}_2) = 1.40$ ,  $n(\text{PMMA}) = 1.48$ ,  $l = 532 \text{ nm}$ ). 根据 (1) 式, 数值计算结果显示入射角在  $0\text{--}60^\circ$  范围内, 单根光线产生的梯度力对于高折射率小球较大, 从而光阱力较大. 二者刚度都随着激光功率的增大而增大, 表明激光功率越大, 单位时间内小球吸收的光子数越多, 高斯光束传递给小球的动量越大. 实验测量结果与理论公式相互符合.

### 3.2 小球大小对光阱刚度的影响

实验设计一系列不同直径的聚苯乙烯微球 (Duke Scientific, USA) 作为探针, 利用时间飞行法测量同一激光功率下光阱刚度. 实验样品取直径分别为  $1, 1.6, 2, 3, 5 \mu\text{m}$  的聚苯乙烯微球. 调节显微镜物镜与样品池底面的相对位置, 使得微球被光

阱俘获时离样品池底玻片的距离为  $\sim 6 \mu\text{m}$ , 显微镜入口处测得激光功率为  $26 \text{ mW}$ . 光阱刚度随微球直径的变化关系如图 4 所示, 图 4 结果表明,  $5 \mu\text{m}$  小球的光阱刚度最小, 约为  $1.33 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ,  $3 \mu\text{m}$  次之, 光阱刚度为  $2.83 \text{ pN}/\mu\text{m}$ . 图中还将  $10 \mu\text{m}$  的  $\text{SiO}_2$  微球在同样激光功率下测量的光阱刚度作为比较, 尽管二者材料不同, 但是  $10 \mu\text{m}$  的  $\text{SiO}_2$  刚度最小, 由此我们推测  $10 \mu\text{m}$  聚苯乙烯小球的刚度要比  $5 \mu\text{m}$  聚苯乙烯小, 在小球直径大于激光波长范围内, 刚度随着直径的增大而减小. 光阱刚度随微球直径的变化关系与文献中的报道一致 [28].

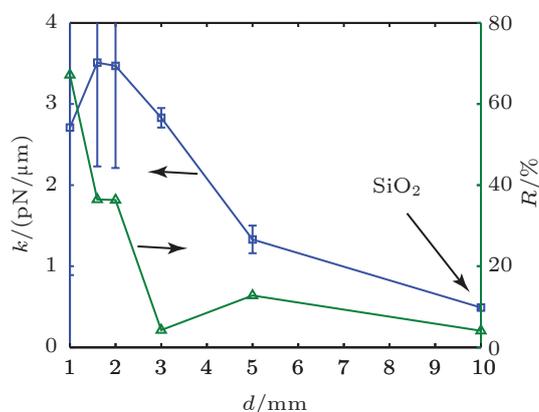


图 4 不同直径小球的光阱刚度和相对误差

刚度的误差分析显示, 微球直径较小时, 相对误差较大. 直径在  $1\text{--}2 \mu\text{m}$  之间微球的相对误差高达  $36\%\text{--}67\%$ . 这是由于受 CCD 拍摄速率的限制, 尽管  $1 \mu\text{m}$  小球的飞行时间很短, 但 CCD 却没能捕捉到足够多帧数微球临近光阱前的图像, 以至于在对实验数据进行拟合时可用的数据点较少, 拟合的误差较大.

### 3.3 材料对光阱刚度的影响

表 1 是激光功率为  $26 \text{ mW}$  时不同材料样品的光阱刚度. PMMA 小球和  $\text{SiO}_2$  小球的直径相当, 但二者的刚度却有明显差异, 表明光阱刚度还与材料有关, 具体就是几何光学模型中小球的折射系数 ( $n(\text{PS}) = 1.59$ ,  $l = 532 \text{ nm}$ )、菲涅耳折射率和反射率. 总体上, 粒径小的颗粒的刚度大于粒径大的颗粒, 表明尽管是不同材料的样品, 但是直径对光阱刚度值有着更大的影响. 从表中还可以看出, 直径大的颗粒相对误差小, 但酵母细胞是个例外. 原因是酵母细胞是不规则球体, 在未进入光阱时, 其

表 1 各种材料微球的刚度对照表

	聚苯乙烯	聚苯乙烯	酵母细胞	PMMA	SiO <sub>2</sub>
直径/ $\mu\text{m}$	3	5	$\sim 7$	10	10.6
特征时间/ms	$5 \pm 2$	$32 \pm 4$	$67 \pm 11$	$87 \pm 6$	$183 \pm 6$
刚度/ $\text{pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$	$2.83 \pm 0.12$	$1.32 \pm 0.17$	$0.88 \pm 0.14$	$0.97 \pm 0.07$	$0.49 \pm 0.02$
相对误差/%	4	13	16	7	4

图像呈椭圆形,有长短轴之分,在飞行过程中其横向的旋转必然会带来椭圆中心的移动;而当其陷入光阱之后,为了实现稳定俘获,椭球的长轴方向会转向光束传播的方向,拍摄的图像呈圆形.以上因素都会带来测量误差,但误差仍在可接受的范围之内.

鉴于以上分析,我们认为时间飞行结合相机测量光阱刚度的方法非常适合直径范围 5—10  $\mu\text{m}$  的微球.在临床上,有一种贫血病患者的红细胞异常,变形能力弱.光镊可以用来拉伸红细胞,这往往需要借助手柄小球作为力的探针,而手柄小球的直径通常选择在 3—5  $\mu\text{m}$ ,标定出手柄小球的刚度和位移就可以算出光阱力,即拉伸力,拉伸力和细胞伸长量的比值衡量的就是细胞的变形能力.借助于时间飞行法,我们还可以直接选用细胞作为力的探针研究红细胞在不同渗透压浓度, pH 值下的变形能力,研究免疫细胞表面分子间相互作用.此外,处在生物体内的细胞其周围环境相比于实验条件更加接近于其真实环境,在研究活体内细胞的力学特性时,时间飞行法由于避免了流体力学法中平台的机械振动和功率谱法中细胞表皮组织的散射光对 QD 采集信号的影响,因而具有独特的优势.

### 3.4 功率谱法测量光阱刚度

为验证时间飞行法的准确性以及确立该方法的适用范围,实验中采用快速相机记录直径为 5  $\mu\text{m}$  的聚苯乙烯小球在 26 mW 激光形成的光阱中受限布朗运动的录像,经图像相关分析得到小球运动的时序信号.分别利用功率谱法<sup>[13]</sup>和均方位移法测量光阱刚度<sup>[9]</sup>.所测得的聚苯乙烯小球在光阱中布朗运动的位移信号随时间变化关系如图 5 中的插图所示,相机的采样速率为 95 帧每秒,通过均方位移分析得到光阱的刚度为  $k = 1.5 \text{ pN}/\mu\text{m}$ .将上述信号进行频谱分析,得到小球运动位移信号的功率谱,见图 5.通过洛伦兹拟合得到功率

谱曲线的角频率为  $f_c = 2.4 \text{ Hz}$ ,对应的光阱刚度为  $k = 3.3 \text{ pN}/\mu\text{m}$ .由表 1 可知,时间飞行法测量的 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯小球在 26 mW 激光形成的光阱的刚度为  $k = 1.32 \text{ pN}/\mu\text{m}$ .这些表明,采用基于 CMOS 相机的图像分析数据,功率谱法和均方位移法测量的刚度均比时间飞行法得到的结果大.这是由于前两种基于布朗运动的方法受到像模糊效应的影响,实际测量值偏大<sup>[29]</sup>.

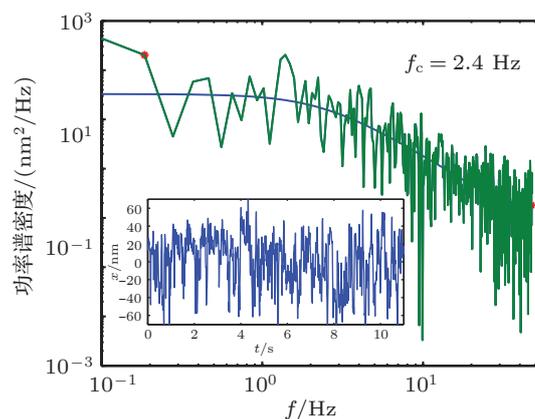


图 5 5  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯小球的功率谱,激光功率为 26 mW (插图为小球在光阱中布朗运动的位移时间关系)

上述结果表明,对于较大的微米小球,典型地直径大于 5  $\mu\text{m}$  的微球,时间飞行法比功率谱法以及均方位移法测量结果更加准确可靠.该方法可以直接测量多种细胞在光阱中的刚度,直接采用细胞作为力的探针,测量系统中无需引进其他的微球,如聚苯乙烯微球,简化实际应用中测量体系的复杂程度.

## 4 结论

传统的测量光阱刚度的方法如功率谱法在采用几百纳米到 5  $\mu\text{m}$  的微球测量光阱刚度方面具有较为广泛的应用.采用 5  $\mu\text{m}$  以上的微球或者脂质体等作为探针,测量光阱刚度时布朗运动噪声法、流体震荡法等并不具有优势.本文通过测量直径范

围为 1—10  $\mu\text{m}$  的不同微粒在不同功率下的光阱刚度, 发展时间飞行法测量 5  $\mu\text{m}$  以上微球作为探针时的光阱刚度. 实验结果表明所测光阱刚度与激光功率成正比, 与微球大小成反比, 还与材料的折射率, 菲涅尔系数等有关. 为了验证时间飞行法的可靠性, 我们分别用功率谱法和均方位移法测量了标准聚苯乙烯微球的光阱刚度, 比较三种方法发现, 功率谱法和均方位移法所测量得到的刚度受相机曝光时间的影响较大, 刚度值和理想的刚度值相比明显偏高, 而时间飞行法所测的刚度值比上述两种方法所得的结果都小, 更加接近真实刚度. 本文所发展的方法特别适合直径范围 5—10  $\mu\text{m}$  的微粒的光阱刚度, 且它对微粒的形状没有特殊要求, 不需要使用压电平台, 位置敏感探测器等高精度位移控制和测量装置, 设备简单, 易于搭建, 对于快速标定光阱刚度有着重要价值.

在物理方面, 一些具有特殊光场分布的光束所形成的光阱, 如径向偏振光<sup>[30]</sup>、Airy 光<sup>[31,32]</sup>、拉盖尔 - 高斯光<sup>[33,34]</sup> 等, 微球在其中的位置探测不能用采用位置敏感探测器和常规的激光干涉模型来获得<sup>[8]</sup>. 本文所拓展的方法在这些新型调制光阱<sup>[29]</sup> 的刚度测量方面以不需要太高的时间探测精度以及模型简单等优点必将发挥其他方法所不可取代的作用. 在免疫学等细胞生物学应用中, T 细胞受体 (TCR) 和抗原肽/MHC 复合物 (pMHC) 相互作用测量实验<sup>[35]</sup>, 通过时间飞行法测量 T 细胞在光阱中的刚度, 直接用 T 细胞作为测力的探针. 和传统的基于微球的测量体系相比, 基于 T 细胞探针的测量手段简化了测量体系, 为更深层次研究细胞上的更加复杂的单分子过程, 如有多肽参与的三元复合体系单分子相互作用力<sup>[36]</sup>, 提供一个很好的研究手段.

- [1] Zhou R B, Kunzelmann S, Webb M R, Ha T 2011 *Nano Letters* **11** 5482
- [2] Morrison E A, DeKoster G T, Dutta S, Vafabakhsh R, Clarkson M W, Bahl A, Kern D, Ha T, Henzler-Wildman K A 2012 *Nature* **481** 45
- [3] Qu X H, Wen J D, Lancaster L, Noller H F, Bustamante C, Tinoco I 2011 *Nature* **475** 118
- [4] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, Chu S 1986 *Opt. Lett.* **11** 288
- [5] Ashikin A 1970 *Phys. Rev. Lett.* **24** 156
- [6] Wu J G, Li Y M, Lu D, Liu Z, Cheng Z D, He L Q 2009 *Cryo Lett.* **30** 89
- [7] Chen H D, Ge K K, Li Y M, Wu J G, Gu Y Q, Wei H M, Tian Z G 2007 *Cellular & Molecular Immunology* **4** 221
- [8] Allersma M W, Gittes F, deCastro M J, Stewart R J, Schmidt C F 1998 *Biophys. J.* **74** 1074
- [9] Ren Y X, Wu J G, Chen M, Li H, Li Y M 2010 *Chin. Phys. Lett.* **27** 028703
- [10] Sirinakis G, Ren Y X, Gao Y, Xi Z Q, Zhang Y L 2012 *Rev. Sci. Instrum.* **83** 093708
- [11] Grier D G 2003 *Nature* **424** 810
- [12] Neuman K C, Block S M 2004 *Rev. of Sci. Instru.* **75** 2787
- [13] van der Horst A, Forde N R 2010 *Opt. Express* **18** 7670
- [14] Ren Y X, Wu J G, Zhong M C, Li Y M 2010 *Chin. Opt. Lett.* **8** 170
- [15] Ren Y X, Wu J G, Li Y M *Application of Monte Carlo Simulation in Optical Tweezers*. In: Mordechai S, ed. *Applications of Monte Carlo Method in Science and Engineering*. Rijeka: Intech; 2011:21-34.
- [16] Wong W P, Halvorsen K 2006 *Opt. Express* **14** 12517
- [17] Waggoner S N, Cornberg M, Selin L K 2011 *Nature* **481** 394
- [18] Geissmann F, Manz M G, Jung S, Sieweke M H, Merad M, Ley K 2010 *Science* **327** 656
- [19] Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P 2011 *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**
- [20] Roux A, Koster G, Lenz M, Sorre B, Manneville J B, Nassoy P 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** 4141
- [21] Sorre B, Callan-Jones A, Manneville J B, Nassoy P, Joanny J F, Prost J, Goud B, Bassereau P 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** 5622
- [22] Ashkin A 1992 *Biophys. J.* **61** 569
- [23] Sun Q, Ren Y X, Yao K, Li Y M, Lu R D 2011 *Chin. J. Laser* **38** 109003 (in Chinese) [孙晴, 任煜轩, 姚焜, 李银妹, 卢荣德 2011 中国激光 **38** 109003]
- [24] Gao H F, Ren Y X, Liu W W, Li Y M 2011 *Chin. J. Laser* **38** 404002 (in Chinese) [高红芳, 任煜轩, 刘伟伟, 李银妹 2011 中国激光 **38** 404002]
- [25] Saunter C D 2010 *Biophys. J.* **98** 1566
- [26] te Velthuis Aartjan J W, Kerssemakers Jacob W J, Lipfert J, Dekker N H 2010 *Biophys. J.* **99** 1292
- [27] Liu W W, Ren Y X, Gao H F, Sun Q, Wang Z Q, Li Y M 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 188701 (in Chinese) [刘伟伟, 任煜轩, 高红芳, 孙晴, 王自强, 李银妹 2012 物理学报 **61** 188701]
- [28] Rohrbach A 2005 *Phys. Rev. Lett.* **95** 68102
- [29] Ren Y X 2012 *Ph. D. Dissertation* (hefei: University of Science and Technology of China) (in Chinese) [任煜轩 2012 博士学位论文 (合肥: 中国科学技术大学)]
- [30] Zhan Q W 2009 *Advances in Optics and Photonics* **1** 1
- [31] Zhang P, Prakash J, Zhang Z, Mills M S, Efremidis N K, Christodoulides D N, Chen Z G 2011 *Opt. Lett.* **36** 2883
- [32] Zhang P, Zhang Z, Prakash J, Huang S, Hernandez D, Salazar M, Christodoulides D N, Chen Z G 2011 *Opt. Lett.* **36** 1491
- [33] Ren Y X, Li M, Huang K, Wu J G, Gao H F, Wang Z Q, Li Y M 2010 *Appl. Opt.* **49** 1838

- [34] Ren Y X, Wu J G, Zhou X W, Fu S J, Sun Q, Wang Z Q, Li Y M  
2010 *Acta Phys.Sin.* **59** 3930 (in Chinese) [任煜轩, 吴建光, 周小  
为, 付绍军, 孙晴, 王自强, 李银妹 2010 物理学报 **59** 3930]  
[35] Huang J, Zarnitsyna V I, Liu B Y, Edwards L J, Jiang N, Evavold

- B D, Zhu C 2010 *Nature* **464** 932  
[36] Huppa J B, Axmann M, Mortelmaier M A, Lillemeier B F, Newell  
E W, Brameshuber M, Klein L O, Schutz G J, Davis M M 2010  
*Nature* **463** 963

# Calibration of optical tweezers using time of flight method\*

Zhou Dan-Dan Ren Yu-Xuan Liu Wei-Wei Gong Lei Li Yin-Mei<sup>†</sup>

1) (Department of Optics and Optical Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

(Received 19 April 2012; revised manuscript received 12 June 2012)

## Abstract

Conventional method of calibrating optical trap stiffness is applicable for microspheres whose diameters range from hundreds of nanometer to several micrometers, but only have a slight advantage for those microspheres with diameters larger than five micrometers. To compensate this, we experimentally develop a time of flight method for measuring optical trap stiffness with larger microspheres. By comparing the optical trap stiffness of microspheres with different sizes and different materials at different laser powers, the time of flight method is confirmed to be more accurate and practical for microspheres larger than 5  $\mu\text{m}$ ; the result is of the same order of magnitude as the results of Brownian noise based analysis of 5  $\mu\text{m}$  polystyrene bead. The results are higher than theoretical values due to the limited bandwidth of the camera. In comparison, the time of flight method is superior to other methods and does make sense in the fast calibration of optical trap stiffness on cell level. This method can be applied to optical traps with special field distributions. In the measurement of mechanical properties of cells, it can avoid using microspheres as force probe, thus providing a novel approach to the study of sophisticated single molecule process on the membrane of cells.

**Keywords:** optical tweezers, optical trap stiffness, time of flight method, cell

**PACS:** 87.80.Cc, 42.50.Wk, 87.85.gf, 87.16.D–

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 21073174, 20974107, 31100555), the National Basic Research Program of China (Grant No. 2011CB910402), and the Key Laboratory of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences.

<sup>†</sup> E-mail: liyinmei@ustc.edu.cn