

摘要

随着科技的进步，人们对物质特性的认识日益向微小尺度深入，因此，微区物性的测量越来越受到人们的重视。本论文的中心之一就是利用光镊微操作技术研究微区物性，特别是微区温度的测量。温度不仅是重要的物理量，也是国际单位制中七个基本量之一。在自然界中任何物体的物理和化学性质都与温度有着密切的关系。比如在光镊微(微米尺度)操作系统中，需要了解被操作对象所处环境温度变化的情况，从而可以更好的了解和控制被操作对象的行为。

本文的工作之一就是建立利用光镊技术测量液相微区温度的方法。温度的测量都是利用物质某些性质随温度变化的特性，而所建立的新方法是通过直接测量被探测体系微区内微粒的布朗运动来确定该微区的温度。由于用作测温“探头”的微粒的尺寸是微米量级的，解决了微区温度测量中微小探测头难以制备的困难；与此同时，利用光镊技术可操控及移动微小粒子至任意确定空间位置的特点，可实现精确定位的温度测量，满足了对液相微区温度测量的实际需求。论文阐述了该方法的原理，从实验上论证了方法的可行性，并对方法的精度和进一步发展进行了讨论。

本论文进而利用所发展的新方法，从实验上研究了光镊应用中一直困扰人们的光镊光束的热效应问题，首次从实验上确证了光镊加热效应，并对光镊关闭后此热效应耗散过程进行了初步研究，由此推断得到光镊引起的小球温升，与先前的理论估测一致。所发展的方法将为针对具体研究对象选择合适的光镊参数(波长、强度)提供可靠的实验依据。我们还运用光镊技术研究了混合液体黏滞系数的组分依赖关系，这种非接触式的测量技术是采用微容量样品池进行的，所以大大降低了对样品的需求量；此外，所用样品池可以是密闭式的，使得该方法特别适用于对易挥发液体及其混合溶液的黏度测量。

本论文的另一项工作是“便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪”的研制。面临当前世界性疾病对人类健康、社会稳定带来危害的严峻问题，寻求一种能对疾病做到早期的快速、灵敏且可靠诊断的新技术、新方法，开发出超灵敏的测定技术和便利的检测仪器具有重要的现实意义。本工作是基于合作方(中科院生物物理所的乐加昌老师研究小组)在 ATP 合酶旋转分子马达与免疫识别

技术上的研究成果提出的。我们从物理和技术的角度讨论了相关检测分析方法和技术，提出了配套的检测装置的设计方案，完成了原理性装置的搭建和验证工作，以及样机的设计、研制及测试工作。结果显示，样机已具备观测和处理生物样品的荧光图像等最基本的功能。论文还给出了进一步完善仪器性能的改进意见。以上工作进展，为达成最终的研制目标，成就造福人类的美好愿望，奠定了工作基础。

关键词：光镊，温度，黏度，布朗运动，生物传感器，检测仪

Abstract

Along with the progressing of science and technology, the understanding of the matter characteristics is spreading to micro scale. So the measurement of the matter properties in a wanted micro-area becomes much more important than before. One of the main works in this thesis is to develop a new method based on optical tweezers for studying the physical characters in micro-area, especially the temperature. The temperature is not only an important physical quantity, but also one of the seven fundamental quantities in the International System of Units. The physical and chemical characteristics of all objects in nature are temperature dependent. When the micro scale matter is studied such as in the case of optical tweezers application, in order to understand better the behavior of the trapped object, it is necessary to know the local temperature field with high space resolution, that is, the measurement in micro area is needed.

In this work a new method of measuring the temperature at a wanted micro-area in liquid by using the technology of optical tweezers is developed. All methods of measuring the temperature are based on the relationship between the temperature and some property of the matter. The method here is directly based on the relationship between the temperature and the Brownian motion of a particle suspending in the liquid. Here the Brownian particle serves as the temperature sensor, of which the size is usually around micron, much smaller than the size of the ordinary sensor. This fact enables the temperature measurement with high space resolution. At the same time, the feature of the optical tweezers, that it is easy to control the detector in a given small area of the liquid, make the detection at any wanted micro area possibly.

Based on the above work, we studied the changing of temperature caused by optical tweezers in a micrometer-size region. The measured temperature rising caused by trapping beam is consistent with the theoretical value estimated before. This kind of measurement will certainly give a criterion for choosing proper parameters of the system in different case, such as the wave length or the intensity of the laser. In addition, we studied the relationship between the viscosity and the concentration of solutions by optical tweezers too. The amount of sample needed in this measurement is much less than that in other methods. In addition, due to the non-contact feature of the optical manipulation the sample cell used here could be a sealing one, which makes it easy to measure the volatile liquid or

its solutions.

Another work in this thesis is to develop a new kind of portable sensitive equipment used for detecting virus. This work is based on the result about F_0F_1 -ATPase biosensor of the Mr. Yue and his team in Institute of Biophysics of Chinese Academy of Sciences. We discussed here the designing, building and testing of the equipment prototype. The testing results indicate that the built prototype possesses elementary functions. And proposals to improve the equipment performance are also suggested.

Key word: Optical tweezers; Temperature; Viscosity; Brownian motion; Biosensor; Detection equipment;

第一章 绪论

§1.1 引言：从光压到光镊

光的本质是电磁波，它既具能量也有动量。当光与物质发生相互作用，如被物体吸收、反射、折射时，将把它的动量传给物体，对物体产生力的作用，从而表现出了光的力学特性。这种由于动量的传递，使被照射物体在单位面积上受到的光的作用力，即光压。由此可见，光与物质的相互作用不仅能产生热效应，光化学效应，还会产生力学效应。

早在 1901 年，列别捷夫首先在实验上观察到了光压现象。1909 年，德拜在他的关于辐射压力的博士论文中首先建议用辐射压力来抵消重力，但由于普通光源所产生的辐射压力极其微弱，故无法实现。直至 1960 年激光的出现，为光悬浮的实现提供了实验条件。1968 年，苏联光谱学家 Letokhov 就首先提出利用光的力学效应来限制原子的思想^[1]，光学势阱概念便随之问世了。70 年代初期，美国贝尔（Bell）实验室的 A.Ashkin 首次利用激光产生的辐射压力对自由悬浮在液体中的粒子成功地进行了加速实验，从实验上观察到了激光的辐射压力^[2,3]；此后，他们又发现微粒会在横向被吸入光束(微粒的折射率大于周围介质的折射率)；在这些研究工作的基础上，A.Ashkin 等人又提出了利用光压操纵微粒的思想，建议用两束相向照射的激光束形成的驻波阱来俘获较大的粒子，并实现了对水溶液中折射率比水大的小球的成功捕获^[4]，建立了利用光压操纵微粒的工具，从而揭开了辐射压力科学应用的篇章。随后，他又提出单束漂浮势阱(levitation)的设想，并通过成功地悬浮起一个直径为 20 μm 的透明玻璃小球^[5,6]。但这两种方法都存在结构复杂、应用不便的缺点。1978 年，A.Ashkin 再次提出了另一种单光束势阱的设想^[7,8]，即通过显微物镜对激光的强聚焦，利用“梯度力”形成一个三维空间稳定的光陷阱，并于 1986 年，用此方法实现了对半径在 10~25 μm 之间的粒子稳定地俘获^[9]，即当单独一束高会聚激光照射到微小粒子上时，光场和粒子的相互作用可以形成稳定的三维光学势阱，它可以吸引微粒并把它局限在焦点附近，利用这一原理操控微小粒子的装置就被形象地称为光镊（或光阱）^[2,9,10]。由于光镊是用一束光形成的梯度力势阱来操控

粒子的，因此光镊的正式名称为“单光束梯度力势阱”（single-beam optical gradient force trap）。对光辐射压力多年的探索与研究，为“光镊”技术的研究与应用奠定了扎实的基础。

§1.2 光镊技术的应用和进展

迄今为止，光辐射压力已得到了比较广泛的研究与应用，尤其是在此基础上发展起来的光镊技术。

光镊最突出的特点在于它可以对微小粒子进行非机械接触式的捕获和操纵^[9]。这种非接触性的操控方式使人们可以在不影响粒子本身性质和周围环境的情况下操控和观察粒子，并对粒子的性质以及它与周围环境的相互作用进行研究。光镊的另一基本功能是作为微小力的传感器或探针。基于其上述独特功能光镊技术已被广泛应用于生物学，物理学和化学等涉及微小粒子的研究领域和技术部门，成为研究各种凝聚态物质微粒物性的特有工具。

直接捕获液体、胶体或空气中的粒子，生物活细胞、细菌、病毒，甚或单个分子、原子等，并进行精细地操作与控制，是光镊技术最简单的应用。例如利用光镊捕获选定的生物细胞等微小粒子，操控它们使之相对于其它微粒运动、实现微小粒子的精细分类^[11,12]。光镊的这种操控微粒的功能又被用来使粒子按人们的需要排布成特定结构的聚集体^[13]，这种微粒人工排布技术为将来的纳米器件组装提供了新的手段。人们还利用光镊操控两个或多个微粒，研究它们之间^[14-25]以及与其它物体表面间的相互作用^[26,27]。另一方面，光镊作为微小力的探针，已被用来测量细胞，生物大分子及其它微小的宏观微粒的弹性，刚性等各种静态力学性质，以及这些微粒在各种物理，化学和生物过程中的动态力学行为。一个突出的例子就是利用光镊对生物分子马达在生化过程中产生的力和运动过程的研究^[28,29]，为揭开生命运动本原之谜提供了实验基础。微纳米粒子的操控是对它们的个体行为进行细致研究的首要条件，除了利用光镊本身测力的功能研究对象的力学特性外，光镊还与其它探测手段相结合，来获得被控制在一定外界条件下的微粒的各种信息，诸如光谱特性，以深入理解微粒与其它物体相互作用过程的微观机制。此外，“光镊”还可和其他的激光工具相结合，最重要的例子当数光镊与光刀结合在一起的全光学微加工机器，这种光学夹具和刀具组成的机器是对微小粒子进行各种显微加工的特有手段，已用于

选择性的细胞融合，单条染色体分选，染色体切割和片断回收等显微加工^[27-29*30-32]。基于光镊技术及其与其它实验手段的结合，对微小凝聚态粒子的研究已经扩展到非线性光电效应^[33]、球状凝聚物散射、折射率测量，微小液滴的拉曼（Raman）光谱等研究方面。例如用光镊移动微胶囊，然后在指定位置上开孔引出胶囊内的物质使之进行化学反应，同时进行实时光谱分析，跟踪观察化学反应的过程，使常规操作机械无法完成的微观精密化学实验得以实现。

与此同时，以上这些光镊的应用研究领域也对光镊本身提出了新的要求，促进了光镊技术和设备的发展。在生物大分子的操控和研究上，发展了通过操控作为中介手柄的微米小球来实现对黏附于其上的更小的微粒实现操控的间接操控技术，使光镊的应用深入到了分子层次，实现了对分子动力原蛋白、血影以及细胞骨架等大分子的研究^[34-42]。出现了可有效提高捕获力的环形光光镊^[43]；以一定频率开关的闪频光镊^[26,27]；可以限制粒子在激光束扫描轨迹上运动的扫描光镊^[44]；可以同时独立操控两个或者多个粒子的双光镊^[45]和多光镊；可以实现纳米精度位移测量和皮牛力监测的纳米光镊技术^[46-49]；以及拉盖尔-高斯（LG）^[50]光束形成的可以转动被捕获粒子^[51]，并可以操控低折射率小球^[52]和金属微粒^[53]的光镊等等新的光镊技术。这些新的光镊技术的出现使得光镊可以应用于更多的研究领域，推动微米级物质研究的深入发展。

光镊技术是一项正在蓬勃发展的新技术，为满足应用提出的需求，发展新的技术和方法仍将是今后光镊技术发展的一个重要方向。本论文就是围绕这一方向开展研究的。

§1.3 本文主要内容

本文主要围绕“光镊技术在液相体系微区特性参数测量中的应用”这一课题展开研究，提出一种利用光镊技术测量液相微区温度的新方法。此外，还介绍了在已有生物学研究的基础上，研制“便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪”已取得的工作进展。

由于论文的主要工作是围绕光镊技术在液相体系微区特性参数测量中的应用开展的，因此在介绍我们的研究工作之前，首先在第二章中介绍了作为本研究主要工具的光镊的原理。

第三、四章为我们的主要研究工作。

随着科技的进步，人们对物质运动特性的认识日益向微小尺度深入，很多相互作用局限在很小的空间区域，导致体系局部状态和物性，如黏度，温度等的变化，因而需要对体系微区特性进行细致的测量，为深入理解相互作用的规律提供实验依据。作为体系状态的重要参数的温度，也与相互作用的特点和过程密切相关，微区温度的测量也因此越来越受到人们的重视。已有的测量体系内部微区温度方法还存在很大困难。

在第三章中，我们针对以上的实际需要和存在的困难，提出了“利用光镊技术测量液相微区温度”的方法，具体论述和介绍了测量原理，方法和实验装置、并通过实验论证了所提出的方法的可行性。在该节的最后对这新方法的测量精度进行了分析讨论，对该方法的进一步完善和发展作了评述。并利用所发展的微区温度测量方法，从实验上研究了光镊应用中一直困扰人们的光镊光束热效应问题，也即光镊光束本身对粒子以及它周围的环境的加热效应。该研究首次从实验上论证了已有的对于光镊引起的温度变化的理论估测，得到的结果与先前理论的估测基本一致。此外，还运用光镊技术研究了混合液体黏滞系数的组分依赖关系，扩展了方法的适用范围。

疾病的快速、早期诊断对于挽救生命、防止传染病的暴发和改善人类健康具有重要意义。而在疾病初期，血液和体液中所含的与疾病相关的标志性分子的数量很低，以致当前国内外已发展的众多诊断各种疾病的早期检测技术、方法，尚难以完全做到对疾病早期、灵敏且简便但可靠地测定，满足早期诊断的要求。论文的最后一章介绍我们为解决问题，与中科院生物物理所的乐加昌老师研究小组合作，在他们旋转分子马达生物传感器的研究基础上，开发“便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪”的研究结果。论文在对研究工作的背景知识—生物领域 F_0F_1 -ATPase 分子马达的结构、特性以及已有的研究成果做了简要介绍后，具体地从物理和技术的角度讨论了检测仪的设计目标、物理设计、方案的实验研究、以及检测仪样机研制的初步结果。该研究为仪器的进一步改进与完善、最终目标的完成，奠定了基础。

本章参考文献

1. V. S. Letokov, Pis'mu Zh. Eksp. Teor. Fiz., T, 348 (1968) (TETP.lett....T,272 (1969)).
2. A.Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure [J]. Phys.Rev.lett., 1970,24(4):156-159.
3. A.Ashkin. The pressure of laser light. Sci.[J]Am.1972, 226(5): 63-71.
4. A.Ashkin. Phy.Rex.lett.[J], 1970,25:1321.
5. A.Ashkin and J.M.Dziedzic. Optical levitation by radiation pressure [J]. Appl.Phys.lett., 1971,19(6):283-285.
6. G.Roosen, C.Imbert. The TEM₀₁ model laser beam —a power tool for optical levitation of various types of sphere[J]., Opt.Commwn.1978, 26(3): 432-436.
7. A.Ashkin. Trapping of atoms by resonances radiation pressure [J]. Phy. Rex.lett., 1978,40(12):729-732.
8. A.Ashkin. Application of laser radiation pressure. Science[J].Am.1980, 210: 1081-1088.
9. A.Ashkin, J.M.Dziedzic, J.E.Bjorkholm, and S.Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," Opt.Lett. **11**, 288-290 (1986).
10. 李银妹, 《光镊原理、技术和应用》中国科学技术大学出版社 1996.
11. A.Ashkin and J.M.Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. Science, 1987, 235:1517-1520.
12. A.Ashkin, et al. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature (London) [J], 1987, 330: 769-771.
13. Xu Sheng-hia,Li Yin-mei,Lou Li-ren,et al. Steady patters of microparticles formed by optical tweezers. Jpn. J. Appl. Phys. [J],2002,41:166-168.
14. J.C.Crocker, "Measurement of the hydrodynamic corrections to the Brownian motion of two colloidal spheres," J. Chem. Phys. **106**, 2837-2840 (1997).
15. J.C.Crocker, and D.G.Grier, "Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid," Phys. Rev. Lett. **73**, 352-355 (1994).
16. J.C.Crocker, and D.G.Grier, "When like charges attract: The effects of geometrical confinement on long-range colloidal interactions," Phys. Rev. Lett. **77**, 1897-1900 (1996).
17. R.J.Owen, J.C.Crocker, R.Verma, and A.G.Yodh, "Measurement of long-range steric repulsions between microspheres due to an adsorbed polymer," Phys. Rev. E. **64**, art. No.11401 (2001).
18. A.D.Dinsmore, A.G.Yodh, and D.J.Pine, "Entropic control of particle motion using passive surface microstructures," Nature **383**, 239-242 (1996).
19. R.Verma, J.C.Crocker, T.C.Lubensky, and A.G.Yodh, "Entropic colloidal interactions in concentrated DNA solutions," Phys. Rev. lett. **81**, 4004-4007 (1998).
20. J.C.Crocker, J.A.Matteo, A.D.Dinsmore, and A.G.Yodh, "Entropic attraction and repulsion in binary colloids probed with a line optical tweezers," Phys. Rev. Lett. **82**, 4352-4355 (1999).
21. S.H.Xu, L.R.Lou, Y.M.Li, and Z.W.Sun, "On the aggregation kinetics of two particles

- trapped in an optical tweezers," *Colloids Surf. A* **225**, 159-163 (2005).
22. S.H.Xu, Y.M.Li, and L.R.Lou, "Axial optical trapping forces on two particles trapped simultaneously by optical tweezers," *Appl.Opt.* 已接收
 23. Z.W.Sun, S.H.Xu, G.L.Dai, Y.M.Li, L.R.Lou, Q.S.Liu, and R.Z.Zhu, "A microscopic approach to studying colloidal stability," *J.Chem.Phys.* **119**, 2399-2405 (2003).
 24. Z.W.Sun, S.H.Xu, J.Liu, Y.M.Li, L.R.Lou, and J.C.Xie, "Improved procedure on the microscopic approach to determine colloidal stability," *J.Chem.Phys.* 已接收
 25. Z.W.Sun, Y.M.Li, S.H.Xu, L.R.Lou, G.L.Dai, and X.Q.Dong, "A direct test on the possibility of an aggregate in dispersion being disrupted by shear flow," *J.Colloid Interface Sci.* **242**, 158-163 (2001).
 26. B.H.Lin, J.Yu, and S.A.Rice, "Direct measurements of constrained Brownian motion of an isolated sphere between two walls," *Phys. Rev. E* **62**, 3909-3919 (2000).
 27. B.H.Lin, J.Yu, and S.A.Rice, "Diffusion of an isolated colloid sphere confined between flat plates," *Colloids Surf. A* **174**, 121-131 (2000).
 28. Jeffrey, T.Finer, et al. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps. *Nature*[J], 1994, 368:113-119.
 29. Robert M.Simmons, J.J.Finer, S.Chu, et al. Quantitative Measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophysical Journal*[J], 1996,70:1813-1822.
 30. R.W.Steubing, S.cheng, W.H.Wright, et al. Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap [J]. *Cytometry*, 1991,12(6): 505-510.
 31. Li Yin-mei, Lou Li-ren. Laser-induced tobacco protoplast in fusion [J].*Science China*, 1999, 42(2): 122-127.
 32. M.W.Berns, W.H.Wright, B.J.Transerg, et al. Use of a laser-induced force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle [J].*Natl. Acad.Sci.USA*, 1989,86:4539-4543.
 33. K.Sosaki, M.Koshioka,H.Misawa,et al.Optical trapping of a metal particle and a water droplet by a scanning laser beam [J].*Appl.Lett.*,1992,60(7): 807-809.
 34. K.Suoboda, C.F.Schmidt, B.T.Schnapp et al. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry.*Nature*[J],1993,365(21):721-727.
 35. H.Rubinsztein-Dunlop, M.E.Jfriese, et al. Optical trapping of absorbing particles. In Press(1997).From the authors Dept .Of Physics ,The university of Queensland, Queensland, Brisbane, Qlnd 4072.Australia.
 36. S.R.Quake, H.Babcock, S.Chu. The dynamics of partially extended single molecules of DNA [J].*Nature*,1997,388:151-155.
 37. M.S.I.Kellermayer,S.V.Smith,H.L.Granzier,C.Bustamante .Folding-unfold-ing transitions in single titian molecules characterized with laser tweezers [J].*Science*,1997,276(5135):1112-1116.
 38. 蔡惟泉等.光镊与光扳手.激光与光电子学进展[J], 1998, (12): 34-37.
 39. Dai Jianwu, P.S.Michael. Cell membrane mechanics.*Method in Cell Biology*[J],1998,55:151-

- 171.
40. Akihiro Kasumi, Yasushi Sako, Jakahire Fujiwara, et al. Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate of plasma membrane protein. *Method in Cell Biology*[J], 1998,55:173-193.
 41. C.Veigel, L.M.Colnui, et al. The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*[J], 1999,396:530-553.
 42. C.bustamante, S.Smith, J.Liphardt, et al. Single molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*[J], 2000,10:279-285.
 43. 崔国强, 李银妹, 翁明琪, 楼立人. 环形光对光阱有效捕获力的提高. *中国激光*[J]. Vol.28, No.1, 2001:89-92.
 44. K.Sasaki, M.Koshio, H.Misawa, N.Kitamura, and H.Masuhara, "Pattern-formation and flow-control of fine particles by laser-scanning micromanipulation," *Opt. Lett.* **16**, 1463-1465 (1991).
 45. E.Fallman, and O.Axner, "Design for fully steerable dual-trap optical tweezers," *Appl. Opt.* **36**, 2107-2113 (1997).
 46. 李银妹, 楼立人. 纳米光镊技术——新兴的纳米生物技术. *激光与光电子学进展* [J]. Vol.40, No.1, 2003:1-5.
 47. H.T.Chen, Y.M.Li, L.R.Lou, and H.W. Wang, "High precision measurements in an optical tweezers for studying single biomolecule motion," *Proceedings of SPIE*, **4536**, 75-81 (2002).
 48. R.M.Simmons, J.T.Finer, S.Chu, and J.A.Spudich, "Quantitative Measurements of Force and Displacement Using an Optical Trap," *Biophys. J.* **70**, 1813-1822 (1996).
 49. E.L.Florin, A.Pralle, E.H.K.Stelzer, and J.K.H.Hörber, "Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis," *Appl. Phys. A* **66**, 75-78 (1998).
 50. L.Allen, M.W.Beijersbergen, R.J.C.Spreeuw, and J.P.Woerdman, "Orbital angular momentum of light and the transformation of laguerre-gaussian laser modes," *Phys. Rev. A*, **45**, 8185-8189 (1992).
 51. H.He, M.E Fries, N.R.Heckenberg, and H.Rubinsztein-Dunlop, "Direct observation of transfer of angular momentum to absorptive particles from a laser with a phase singularity," *Phys.Rev.Lett.* **75**, 826-829 (1995).
 52. K.T.Gahagan, and G.A.Swartzlander,Jr, "Optical vortex trapping of particles," *Opt. Lett.* **21**, 827-829 (1996).
 53. A.T.O'Neil, and M.J.Padgett, "Three-dimensional optical confinement of micron-sized metal particles and the decoupling of the spin and orbital angular momentum within an optical spanner," *Opt.Comm.* **185**, 139-143 (2000).

第二章 光镊的原理

本论文的工作，是围绕光镊技术在液相体系微区特性参数测量中的应用开展的，因此在介绍我们的研究工作之前，先介绍一下光镊的原理。

光镊的原理

光镊是一种利用光动量传递产生力的作用实现对微小粒子捕获、迁移及翻转等操控的技术手段或工具。因其具有传统机械镊子挟持和操纵微小物体的功能，又为不至使失其本质，才形象地称之为光镊。随着激光的出现，及激光微束动力效应的应用发展，美国学者 A.Ashkin 于 1986 年，用显微物镜对激光的强聚焦后，形成一个三维空间稳定的“梯度力”光陷阱，并实现了微米量级生物粒子的稳定捕获^[1]，此举奠定了光镊技术的研究基础。

光镊的物理机制可以从以下几方面做一简要介绍:

§2.1 光的动量和光压

光具有能量和动量。然而，由于普通光的动量微乎其微，几乎不能引起可觉察的宏观力学效应，直到激光出现后，才使基于光力学效应的光镊技术^[2-5]慢慢发展了起来。

提到光的动量，就要提到“光压”的概念，虽然人们很早就知道了它的存在，这可以追溯到开普勒和牛顿时代，例如由于太阳光对彗星物质的压力作用，使得进入太阳系后的彗星彗尾总是背向太阳的。

所谓“光压”是指：当光照射到某种媒质表面被吸收、反射或是折射后，它的动量就发生了改变，这表明光在媒质表面受到了媒质的作用力，根据牛顿第三定律，这束光对媒质表面也施加了一个大小相等但方向相反的作用力，此即光辐射压力，简称光压。1873 年，Maxwell 根据电磁波理论从光的波动性角度，论证了光压的存在(电磁波辐射压)并算出了垂直入射到部分反射吸收体表面的光束产生的光压，即动量的传递，为 $\frac{E}{c}(1+R)$ ，其中 E 为每秒垂直入射到 1m^2 上的能量， c 为光速， R 为光所照射物体的反射系数。

从光的粒子性看，光压就是光子把它的动量传给吸收壁或反射壁的结果。按照光的波粒二象性理论，光子携带的动量为：

$$P = h \cdot k = \frac{h}{\lambda} = \frac{E}{c} \quad (2.1)$$

其中， h 为普朗克常数， k 为光波数， λ 为光波长， $E = h\nu$ 为光子的能量， c 为光速。

设单色光正入射到壁上， N 个光子携带能量为 $E = Nh\nu$ ， N 个光子传给绝对吸收壁的动量为 $N\frac{h\nu}{c}$ 或传给绝对反射壁的动量为 $2N\frac{h\nu}{c}$ 。一般情况下，被照物体的反射系数为 R ，则 N 个光子传给物体的动量和根据电磁波理论得到的结果一致，为：

$$(1-R)N\frac{h\nu}{c} + R2N\frac{h\nu}{c} = N\frac{h\nu}{c}(1+R) = \frac{E}{c}(1+R) \quad (2.2)$$

十九世纪末，俄国物理学家列别捷夫第一次从实验中测量了光压，此后，美国物理学家尼科尔、霍尔也分别独立地在实验室发现并测量了光压^[6,7]。

§2.2 激光的力学效应

光压一般非常小，据估算距强度为 100 万烛光的光源 1m 处的镜面上受到的可见光的光压只有 0.1 达因/m²；垂直入射的太阳光在地球表面的光压也只有 0.5 达因/m²，与日常经验中的力相比较小得多，很难感觉到它的存在。直至具有高亮度、方向性好、能聚焦到很小光斑的单色光源——激光问世后，才使本来微乎其微的光压有了显著提高，能产生可观的力学效应。如功率为 10mw 的 He-Ne 激光器发射的光束光斑会聚到 1 μm^2 时，光束中心可产生 10⁶ 达因/m² 的辐射压力，它可使一个微米量级的电介质小球产生约 10³g 的加速度 (g 为重力加速度)。此后，人们开始了对激光辐射压力全面、深入的研究，其中一方面就是对辐射于宏观微粒上的压力的研究，包括对宏观介质微粒的光悬浮、光捕获和光操纵等，这方面的研究奠定了基于光力学效应的光镊技术诞生的基础。

§2.3 微粒的激光悬浮

光场中的微粒由于光压的作用，会受到一个沿光传播方向的推力。而光悬浮就是以光对微粒的推力为基础的。1970 年，A. Ashkin 首次报道了水溶液中的乳

胶微球在沿水平方向传播的高斯激光束中的运动情况。并用两束等强度相向照射的激光，实现了粒子的光捕获^[8]。此后，他通过用竖直上传播的激光，使光压与微粒本身的重力相平衡，首次用单束激光实现了光悬浮^[9]。

§2.4 光捕获的基本原理

光辐射压力可分解为散射力和梯度力。散射力沿光传播的方向，其大小与光强成正比。梯度力指向光强梯度的方向，大小与光强梯度成正比。正是梯度力保持了一定尺寸的微小粒子静止在光束焦点附近，使之随焦点位置的移动而同步的移动，此现象即光捕获或光操纵。现采用几何光学的近似方法(对于几 μm 的粒子是合适的)，并借以透明介质小球(其折射率 n_2 大于周围介质的折射率 n_1)为模型，考察光穿过介质球后产生的作用力。

(1) 梯度力

当一束光穿过介质小球时，由几何光学确定其传播路线。

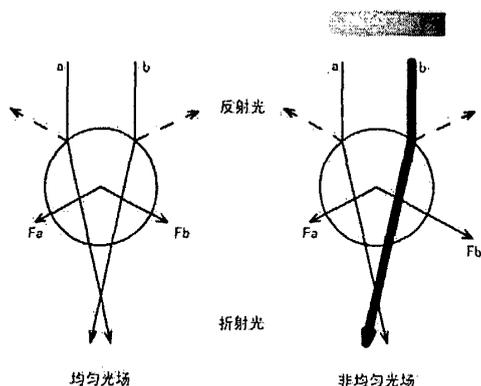


图 1

如图 1 所示，分别描述了小球处在均匀光场、非均匀光场中的光线传播路线及受力方向，在此以 a、b 两条光线为代表，着重分析因折射施加在小球上的力。

若折射前所有光线沿 z 方向传播，即光的动量是沿 z 方向的，穿过球的光因折射传播方向发生了改变，光的动量因此也改变了。由 x - y 方向上的动量守恒，光施加给小球一个与它动量改变量等大小但方向相反的动量，相应的产生了作用力，设作用力为 F_a , F_b 。均匀光场中的小球，受到的各光束的力在横向完全抵消；而非均匀光场中的小球，强度较大的光线会使小球获得较大的动量，使得射到小球上的所有光束的合效应在横向上不能完全抵消，总合力将小球推向光强度较大的梯度力。

(2) 二维光学势阱

如图 1 中的右图所示，小球在垂直于光线传播方向的 x - y 平面内得到了一个横向动量，即横向光压，使小球向光强较大处运动，可见小球在此平面内受

到了束缚，称这种只限制了小球在垂直于光轴平面内运动的情形为二维光学势阱。由于其并不能束缚粒子在光传播方向 z 轴上的运动，仅用于光悬浮、双光束挟持等，但复杂的器件构成，限制了光压在二维捕获中的应用价值。直到强聚焦单光束梯度力势阱的出现，简单、稳定地捕获成为可能，揭开了光镊技术广泛应用的序幕。

§2.5 单光束梯度力光镊原理-三维梯度力势阱

要光阱在传播方向上也能产生对粒子的束缚，必须有逆向光压用以抵消粒子受到的沿光束传播方向上的散射力，以达到平衡实现三维地束缚。1986年 A.Ashkin 用一束强聚焦激光首次实现了对生物粒子三维稳定地俘获。

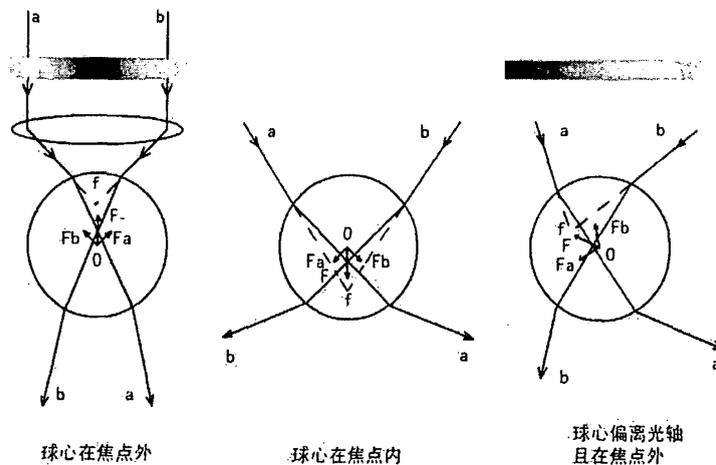


图 2 强聚焦高斯光场中粒子的受力图 Fig.2 The picture of force acceptance of the particle in single Gaussian beam of highly convergent

图 2 为入射的高斯光束经过透镜后，形成的高度会聚的光束作用在小球上的光线传播及受力情况。其中左图为小球几何中心在 z 轴上并处于焦点以外时的情形，由图可见，当轴外光线穿过小球被折射后，其传播方向趋向于更平行于光轴，即增大了纵向动量，相应的，粒子获得了沿负 z 方向的动量，即小球受到了为拉力的纵向力，如图示中的 F ，它趋于把小球拉向焦点而被拖回光阱。这种把焦点以外的粒子拉回至焦点的力的来源，为负辐射压力。对于处于焦点以内、几何中心不在 z 轴上的粒子的情形做类似分析后，几何中心不在焦点处的粒子，都将受到指向焦点的梯度力，此即三维光阱效应。

综上所述，单光束梯度力势阱即三维光学势阱，对任何在横向、纵向偏离势阱中心的粒子都会产生由光强梯度存在引起的回复拉力，故在焦点附近的粒子将会受到三维空间的回复力，而被稳定地束缚于以焦点为中心的势阱中。用装置简单的器械便实现稳定捕获的单光束梯度力势阱的发明，有效地弥补了二维光学势阱的不足，使光的力学效应在俘获生物粒子领域的应用走向了实用阶段。

通过以上对光镊机理的分析可知，要用光在某个方向上限制粒子的运动，就必须使光在该方向上有较大的光强梯度。在满足了这一基本条件后，还要就一些物理方面的性质，如所用光束的波长、功率、会聚后的束腰半径、粒子的大小、吸收系数和相对液体的折射率以及几何中心与光轴、束腰的间距等，这些因素都不同程度地影响着束缚效果。一般而言，束腰的大小、波长、光功率密度及粒子的折射率（一般要大于其周围介质的折射率，否则将被踢出光场；对于无法满足该条件的粒子，可采用 TEM_{01}^* 模激光^[15]）、形状、大小和其吸收系数是影响势阱深度的主要因素。此外，还应注意，当光入射到小球上时，除产生梯度力外，还有散射力，另外，由材料对光的吸收也会产生一定的力，但这两种力的方向均与光传播方向一致，所以将趋向于使粒子沿光轴方向运动从而有可能逸出阱域，这就是为什么说，只有按一定的梯度分布的光辐射力方能够保持一定尺寸的微小粒子静止在光束焦点附近的原因。由此可见，就对光阱捕获粒子的贡献而言，逆向梯度力 F 更为重要，它是否大于散射力也是能否成功捕获的判据。

本章参考文献

1. Ashkin, J.M.Dziedzic, J.E.Bjorkholm, and S.Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt.Lett.* **11**, 288-290 (1986).
2. 李银妹, 《光镊原理、技术和应用》中国科学技术大学出版社 1996.
3. A Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Phys.Rev.Lett.* **24**, 156-159 (1970).
4. Ashkin, J.M.Dziedzic, J.E.Bjorkholm, and S.Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt.Lett.* **11**, 288-290 (1986).
5. Ashkin, "History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules," *IEEE J.Sel.Top. Quantum Elec.* **6**, 841-856 (2000).
6. 母国光, 战元龄, 《光学》, 人民教育出版社 1978.
7. 雷仕湛, 应兴国, 《光的世界》, 科学普及出版社 1980.
8. J.E. Bjorkholm, R.R. Freeman, and D.B. Pearson, "Efficient transverse deflection of neutral atomic beams using spontaneous resonance-radiation pressure," *Phys.Rev.A* **23**,491-497 (1981).
9. A.Ashkin, and J.M.Dziedzic, "Optical levitation of liquid drops by radiation pressure," *Science* **187**, 1073-1075 (1975).
10. 杨小丽, 王俊波, 冯志超. 聚焦高斯光束对微粒的俘获效应. *电子科技大学学报*[J], Vol.25, No.1, (1996): 63-68.

第三章 应用光镊技术测量液相体系 微区的特性参数

§3.1 应用光镊技术测量液相微区温度

温度不仅是重要的物理量，也是国际单位制中七个基本量之一。在自然界中任何物体的物理和化学性质都与温度有着密切的关系。

温度测量的问题最早可以追溯到两千多年前，有文献可考在当时古希腊的亚历山大城，人们便开始对在生产实践活动中逐渐认识到的大多数金属、液体和气体都具有的热胀冷缩特性展开探究。最早又最广泛使用的温度计是于18世纪由旅居荷兰的德国仪器制造家华伦海特发明的玻璃水银柱温度计，伴随着工业的发展和科技的进步，不同测试原理的温度计纷纷出现，与此同时，方法和精度等方面也都有了很大的提高与改良^[1-3]。

温度的测量都是利用物质某些性质随温度变化的特性，通常是用温度敏感的材料制作成温敏探头与待测物达到热平衡，由温敏材料性质的变化来确定温度；也有直接利用被测物体本身具有的温敏特性进行温度测量的方法，但往往也需要一个特性探测头置于待测区。而随着科技的进步，人们对物质运动特性的认识日益向微小尺度深入，很多相互作用局限在很小的空间区域，导致体系局部温度的变化，因而需要对体系温度的空间分布或微区温度有更细致的了解，微区温度的测量也因此越来越受到人们的重视。比如在光镊^[4]微(微米尺度)操作系统中，需要了解被操作对象所处环境温度变化的情况，从而可以更好的了解和控制被操作对象的行为。

已经发展了多种测量微体系温度的方法^[5]，其中有些方法可以对一维体系(微流体)和二维体系(或表面)进行高空间分辨率的微区温度测量。但是对三维体系，特别是液相体系，用通常的测温方法，需将测温探头伸到体系中的待测位置。因而，减小测温探头尺寸是微区测温空间的维度扩展和分辨率提高的关键，同时也减小了对温度场的干扰。液相微区测温技术还很不成熟，已有的适合透明液相体系内部微区温度测量的方法有拉曼光谱法和热色液晶法。拉曼光

谱测温是利用拉曼散射谱中的 Stokes 和 Anti-Stokes 分量的强度比与散射介质绝对温度满足一定关系的特性, 来确定散射体微区温度的光谱测温技术, 测量精度可达 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, 且具有较高的空间分辨率, 但只适用于具有拉曼散射的分子体系。热色液晶法利用热显色液晶在不同温度下反射不同颜色的光的性能, 是一种可直接显示温度分布的测温技术, 灵敏度和精度都比较高, 但测温范围一般都较窄, 大约为 $0.5\text{-}5^{\circ}\text{C}$ 。但用于温度探测的液晶微胶囊大小通常在几十微米范围, 限制了其可测微区尺度的下限。以上方法的应用范围都受一定的限制。而且, 由于特定条件下设备间的耦合问题, 这些方法也不能完全适应不同液相体系微区温度测量的实际需求。发展新方法以适应不同体系的特定要求, 扩大应用范围是非常有意义的。

本文提出一种利用光镊技术测量液相微区温度的新方法。该方法通过测量被探测体系微区内微粒的布朗运动, 并由此确定该区域液体的黏滞系数, 利用液体黏滞系数的温度依赖关系来确定该微区的温度。由于所监测的微粒, 即测温“探头”尺寸是微米量级的, 很好地解决了微区温度测量中微小探测头难以制备的困难。特别是在很多情况下所监测微粒就是被探测体系的组分, 因而不会影响被测体系的温度场。利用光镊技术测量微区温度的方法是属于“非接触式”的温度测量技术。此外, 利用光镊技术可操控及移动微小粒子至任意确定空间位置的特点, 可以轻松地把作为探头的布朗粒子定位到任意待测微区, 以实现精确定位的温度测量。方法的提出解决了液相体系在微区温度测量难以实现的问题, 对适应不同体系的特定要求, 及扩大测温应用范围都是非常有意义的。同时, 解决了光镊技术应用中对微区温度实时监测的需求。

§3.1.1 测量原理

液体的温度是与液体中分子运动直接相关的。分子的无规热运动对液体中小球会施加一作用力, 此作用力分为黏滞阻力与随机作用力两部分, 小球的布朗运动就是在这样的力作用下产生的, 因而与温度有直接的关系。这为液体温度的测量提供了一种直接途径。

由布朗运动的朗之万理论, 经过时间 Δt 后布朗粒子位移的平方平均值为^[6]

$$\langle r^2 \rangle_{\text{ave}} = \frac{2d \cdot K \cdot T}{\alpha} \Delta t \quad (1)$$

其中, $\langle r^2 \rangle_{\text{ave}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\bar{r}_i - \bar{r}_{i-1}|^2$ 为粒子在时间间隔 0 到 Δt , Δt 到 $2\Delta t$, $2\Delta t$ 到 $3\Delta t$, ……的一系列位移 r_1 , r_2 , r_3 , ……的均方值, d 为布朗粒子的运动维数, K 是玻尔兹曼常数, T 是体系的绝对温度, $\alpha = 6\pi a\eta$ 为布朗粒子所受的黏滞阻力, a 为布朗粒子的半径, η 为布朗粒子所在体系的动力黏滞系数。

又知对于任意液相的体系, 其动力黏滞系数随温度变化的规律是随着温度 T 的上升呈指数衰减的, 可表示为^[7] $\eta = \eta_0 e^{\frac{\Delta W}{KT}}$ (2)

其中, η_0 和 ΔW 对于任意一种液体都为特定的常数, 只需知道液体在任意两个不同温度 T 下的 η 值, 便可求出。

由(1)和(2)式, 并利用黏滞力的表达式, 可得:

$$\frac{K \cdot T \cdot d \cdot \Delta t}{3\pi a \langle r^2 \rangle_{\text{ave}}} = \eta_0 e^{\frac{\Delta W}{KT}} = \eta \quad (3)$$

利用这一关系式, 通过测量微球在待测微区内的布朗运动的均方位移, 可以得到该微区的温度值 T 。在此, 布朗粒子起到了温度探头的作用。

利用光镊可操控及移动微粒到确定空间位置的功能, 可以把作为探头的布朗粒子定位到待测空间位置, 进而利用系统本身精确测量小球实时位置的功能, 可以跟踪小球的布朗运动, 从而可以测得围绕该空间位置的微区温度值。

§3.1.2 实验论证

利用上节给出的理论公式(3)测温, 首先要对该公式进行标定, 即确定公式中的常数 η_0 和 ΔW 。这二个常数描述的是液体的黏滞性质与温度的关系, 可以用通常的宏观方法来测定, 而且文献中已经有大量的实验资料可供利用。以纯水为例, 利用手册^[8]中的数据, 可以确定 $\eta_0 = 0.02483$ 和 $\Delta W = 0.3555 \times 10^{-19}$ 。我们也用了毛细管方法测量了 273.15 和 283.15K 这两个温度下的黏滞系数, 核对了上述常数。对其它液体, 我们也是采用文献资料和常规实验测量相结合的方法, 对公式(3)进行标定。

下面我们将对本文提出的测量方法进行实验论证。鉴于目前还没有很适用的其它液相微区温度测量方法, 论证采用通常的宏观温度测量方法与本方法进行比较, 对同样条件下的被测对象进行测量。宏观对照实验采用探头尺寸约

0.5mm, 材料为镍铜-镍铝的 K 型热电偶温度计, 以及上海医用仪表厂出产的 WMY-01 型探头尺寸为 2mm 的数字温度计, 尽管二者与本方法(空间分辨率为微米量级, 详见于讨论中)的空间分辨率不同, 为毫米尺度, 而且探头的引线还会对待测对象的温度造成干扰, 但对稳定的温度场, 测量是可比的。

§3.1.2.1 实验装置

本方法的实验采用如图 1 所示的纳米光镊装置^[9]。

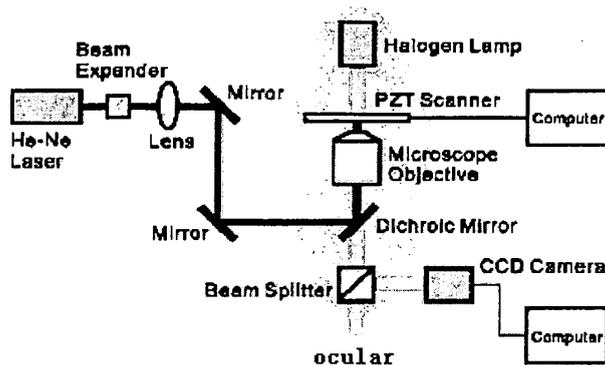


图 1 实验装置图

光镊光源为 He-Ne 激光器 (10mW, Polarized, Coherent, USA), 输出的激光波长为 632.8nm, 输出的激光束由扩束镜扩束后, 经由耦合光路耦合进入倒置显微镜 (IX70, OLYMPUS, JAPAN), 再由 100 倍油浸物镜 (100X, NA 1.3, OLYMPUS, JAPAN) 强会聚后形成激光光阱。He-Ne 激光束通过中性衰减片组来改变光强, 以适应不同测量范围的需要。实验装置中用 CCD (CoolsnapCF monocamera, USA) 作为图像采集工具, 用分析软件对动态显微图像进行相关分析来实现小球位移的测量。对样品的精确定位和操控是通过压电扫描平台 (P-517.3CL, PI, German, PZT=piezoelectricity) 来实现的, 利用计算机程序自动/手动控制压电扫描平台的运动, 从而在三维空间上控制样品池相对物镜的移动。

§3.1.2.2 实验结果

将直径为 $1\mu\text{m}$ ($0.997\pm 0.021\mu\text{m}$ PS product of Duke Scientific Corporation, USA) 的聚苯乙烯小球悬浮于水中, 然后将该悬浮液置于样品池中, 通过观测悬浮小球的布朗运动来测量水的温度。为了减小其它小球对所监测小球运动的

干扰, 需要使体系内小球的含量(浓度大约为 2.5×10^8 个/ml)比较低, 以使在整个 CCD 视场里只有一个小球。

实验中先用光镊捕获小球, 再用由计算机程序控制(自动或手动)的压电扫描平台来控制样品池相对于物镜的移动, 将所捕获的小球移至样品池中待测温度的微小区域。然后关闭光镊, 让小球做自由布朗运动。为了尽可能减小光镊对小球扩散运动的影响, 即消除光镊光源对被探测体系温度可能造成的影响, 在光镊关闭后 2 秒再开始跟踪测量小球的自由布朗运动, 直到小球远离物镜焦平面时再停止测量。跟踪测量的时间一般不长于 30 秒, 以保证在这样的时间长度内, 小球自由布朗运动在纵向的位置变化不会过大而使成像模糊, 为横向位移的测量带来困难。在本实验中每次跟踪记录的时间为 20 秒左右, 此时小球在纵向的位移的变化范围约 $5 \mu\text{m}$ 。为得到足够数量的布朗运动位移值, 要多次重复上述操作, 即重新捕获“探头”小球, 移回至待测温区, 并跟踪其布朗运动。用相关运算法^[9]对 CCD 采集的小球布朗运动图像进行处理, 得到一系列相邻两帧图中小球的二维布朗运动位移值, 相邻两帧图的时间间隔为 Δt , 在本实验中 Δt 为 0.11 秒(受限于所采用的 CCD)。对大量的布朗运动位移值进行统计平均, 得出布朗位移均方值为 $0.2538 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 并利用标定的常数 η_0 和 ΔW , 代入(3)式, 可算得样品池内液体温度为 $T=302.37\text{K}$, 即实验时样品池内待测微区的温度为 $29.22 \pm 0.58^\circ\text{C}$ 。这一结果与用对照探测器: 镍铜-镍铝的 K 型热电偶温度计和 WMY-01 型数字温度计的测量结果之差小于 2%。它们的一致性证明了新方法的可靠性。

为进一步验证方法的可靠性, 还用上述方法对一系列质量百分比含量不同的乙醇水溶液的微区温度进行了测量, 所得结果如下表所示:

表一 质量百分比含量不同的乙醇水溶液的微区温度测量值

Table1 The results of the ethanol-water solutions of different ethanol concentration measured in this method

Ethanol concentration	10%	20%	30%	40%	50%	60%
Temperature (°C)	32.29 ± 0.59	32.33 ± 0.64	32.54 ± 0.41	34.03 ± 0.33	31.98 ± 0.20	30.17 ± 0.31

这与用镍铜-镍铝的 K 型热电偶温度计和 WMY-01 型数字温度计对同样条件下的被测对象的测量结果一致, 误差小于 3%。

由此可见, 利用光镊系统本身可操控微粒并观测它在微区中的布朗运动的功能来测量体系微区温度的方法是实际可行的。

§3.1.3 讨论

上述温度测量实验显示, 本文提出的方法测量误差小于 3%。上述实验结果是在对采集了 1000 帧以上的小球布朗运动图片分析计算而得, 依统计学分析可知, 对于 95%的置信度其误差小于 5%, 此时的采集量是足够的。在此基础上, 估算出该测量方法的精度可以达到 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内, 误差小于 3%, 与实验结果是一致的。该测量精度偏低, 尤其是在温度敏感的场所, 肯定是不理想的, 不过在没有更合适的测量方法的情况下, 本方法的测量精度仍是目前所知较为合理、实用, 能满足光镊技术应用领域温度实时监测的要求。此外, 鉴于测量精度主要取决于统计误差, 因而可以通过增大统计量来提高, 但这将影响到测量方法的时间分辨率(详见于后述讨论中), 但鉴于新型高速摄像机的问世, 测量精度在适当协调这二个指标的基础上是可以提高到 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 以内的。

方法本身是依据微粒的布朗运动来进行的, 所以空间分辨率取决于布朗运动范围的大小, 而这又是由所选用的粒子尺寸(这决定了布朗运动的激烈程度)和每次实时跟踪的时间。本实验用 $1\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯小球进行探测, 每次跟踪的时间约 20 秒, 此时的空间分辨率约为 $10\times 10\times 5\ \mu\text{m}^3$ 。当改用 2 或 $3\ \mu\text{m}$ 的微粒作为“探头”时, 空间分辨率会有所提高。减短跟踪时间也可提高空间分辨率, 但要以增加重复捕获、定位和跟踪的次数为代价。

这种方法的时间分辨率受 CCD 的帧速和为能达到较高可信度的数据统计量这二个因素的限制。在我们的实验条件下, 时间分辨率约为三分钟。改用帧速更快的摄像机(最近获悉已有一种高速 CMOS 摄像机(pco.1200hs, the cooKe corporation)商品问世, 帧速(full frame)可达 636 帧/秒), 便可以使本方法的时间分辨率提高至 2 秒, 从而满足温度场变化较快场合的测量需求。若改用 2 或 $3\ \mu\text{m}$ 的微粒(此时, 采集较少的数据量就可保证有同样的置信度, 同时也减小了微区温度测量的空间分辨率)作为“探头”, 测量精度将有望提高, 以满足温度在短时间内有较大变化体系的测量要求。此外, 可借助多光镊操作系统的优势

来同时操控几个“探头”，以提高时间分辨率，但要以牺牲空间分辨率为代价。

在本实验中，是用 100 倍物镜进行观察测量的，此时样品在纵向的可测量范围受到物镜工作距离的限制而较小，约为几十微米，但这是可以根据实际情况，换用工作距离较大的物镜(60 倍或 40 倍)来拓展。另外，对很多人关心的光镊技术的应用场合，此测量范围是够用的。

在本实验中，“探头”小球距离样品池下底面的高度，约为 $10\mu\text{m}$ ，这是为了使“探头”小球在做布朗运动时不受样品池底面的影响^[10,11]。当然，此方法对待测样品池底面附近的温度测量也是适用的，但需对测量结果作一定的修正^[12-15]。

§3.1.4 小结

本文提出了利用光镊技术的液相微区温度测量方法，并且具体对纯水和若干质量百分比含量不同的乙醇水溶液进行了实验研究，肯定了此方法的可行性，在所用实验条件下得出的空间分辨率为 $10\times 10\times 5\mu\text{m}^3$ ，时间分辨率 3 分钟，温度测量精度为 1 度。依据目前已有摄像探头产品的水平分析可知，时间分辨率不难达到几秒。此外，本文还对测量精度、空间分辨率和时间分辨率的影响因素及它们间的关系作了讨论。在具体的应用中，要选择合适尺寸的微粒作为“探头”，在有些情况下，也可利用待测体系本身含有的微粒作为“探头”，并选择合适的跟踪观测时间，以满足对测量精度、时间和空间分辨率的要求。

§3.2 光镊测温技术研究光镊光束的加热效应

自 1986 年，Ashkin 等人首次利用单光束梯度力势阱成功捕获并操控微米量级的粒子，即光镊技术的最初雏形问世后，由于光镊独有的可以在三维实现对粒子的稳定的、非机械接触式的捕获和操纵^[16]的优势，以及技术本身是和标准的显微镜相结合，方便了同步观测的进行，而被广泛应用于生物物理和生物化学、医药学、胶体化学和软物质科学等领域中。

光镊的非接触性操控的优势对粒子以及它周围的环境影响很小，但在某些应用场合，这种影响仍是一个不容忽视的限制因素。比如在运用光镊技术对活体生物微粒的操控和研究时，为了保证观测实验的成功展开，保持待测样品的生物活性是很重要的。其中，以光镊本身对操控对象及它周围的环境造成的温度影响最为显著，假设样品所处环境的吸收系数为 0.1cm^{-1} ，功率为 80mW 的红外光阱将引起若干度的温升^[17]；在一些具体的实验中，人们也注意到了光镊光束的加热效应，比如在用光镊对 PTK_2 细胞中有丝分裂染色体的显微操作实验中，就发现光镊光束的热效应会提高染色体的运动速度^[18]。但从已有的报道来看，对光镊引起的温升都只是做了简单的理论的估测^[17, 18]，由于没有合适的探测手段，至今尚没有具体的测量数据来直接论证。而应用光镊技术测量液相微区温度方法的建立，使得对光镊加热效应的直接测量成为可能。

本章将以聚苯乙烯小球悬浮液为例，利用上节发展的测温方法，从实验上论证光镊的加热效应。对这种温升效应的实验评估方法的建立，将为针对具体研究对象选择合适的光镊参数(波长、强度)提供可靠的实验依据。实验的测量原理与装置，与在前节§3.1中已详细介绍过的相同，这里就不再赘述。

§3.2.1 实验

实验选用直径分别为 $1\mu\text{m}$ 及 $3\mu\text{m}$ (4009A— $0.997\pm 0.021\mu\text{m}$ 和 4203A— $3.063\pm 0.027\mu\text{m}$, PS product of Duke Scientific Corporation, USA)的聚苯乙烯小球悬浮液作为待测样品。由于温度的测量是通过观测悬浮小球的布朗运动来进行的，为了减小其它小球对所监测小球运动的干扰，需要使悬浮液内小球的含量比较低，我们设定的判据是，保证在实验时整个 CCD 视场里只有一个小球，这时相应的小球浓度大约为 2.5×10^8 个/ml。

实验前，先将已装好待用监测样品的样品池置于光镊系统的样品台上，并打开显微镜的照明灯(模拟与平时实验时选用的照明亮度同)，放置约半小时或以上，使样品与样品池、光镊装置的样品台在照明光作用下达到一恒定的温度，然后再开始样品的温度测量实验。做这项预备工作是为了避免在测量实验中会引入显微镜照明光和样品池周围环境对样品温度变化造成的影响。实验时，首先用光镊捕获测温探头一布朗粒子后，再用由计算机程序控制(自动或手动)的压电扫描平台来控制样品池相对于物镜的移动，将所捕获的小球移至样品

池中的温度待测区域。之后，并不是像前面所述的那样立刻关闭光镊，而是保持光镊的开启状态让布朗小球在光阱中停留一段时间，使光镊的热效应积聚到一定程度或者达到饱和。在我们的实验中这段时间约一分半钟或更长。随后，关闭光镊让小球做自由布朗运动，同时开始跟踪记录小球的自由布朗运动。每次跟踪记录的时间一般不长于 30 秒，以保证在这样的时间长度内，小球自由布朗运动在纵向的位置变化范围不会过大而造成像模糊，影响到横向位移的测量。为得到足够数量的布朗运动位移值，要多次重复上述操作，即重新捕获“探头”小球，移回至同一待测区域，并跟踪其布朗运动。小球在不同时刻的位置是用相关运算法^[9]对 CCD 采集的小球布朗运动图像进行处理得出的，由此可得到一系列相邻两帧图中小球的二维布朗运动位移值，相邻两帧图的时间间隔为 Δt 。由于光镊的加热作用积聚起来的温度升高，在光镊关闭后将经历一个逐渐降低并最终趋于热平衡的过程，温度的测量应该是时间分辨的。为此我们对光镊关闭后不同时间段内的布朗位移均方值进行统计平均，再利用上节标定的常数 η_0 和 ΔW ，代入(3)式，算得样品池中光镊捕获区域内液体受到光镊影响后，在对应时间段内的温度值。

§3.2.2 结果及分析讨论

实验中，对光镊光源引起水的温升的耗散过程做了两组不同时间长度的跟踪测量。

第一组，设定 CCD 在采集相邻两帧图片的时间间隔 $\Delta t = 0.11\text{s}$ (受限于所采用的 CCD) 以保证能达到最小时间分辨率的情况下，分别用 $1\mu\text{m}$ 和 $3\mu\text{m}$ 的小球跟踪记录了关闭光镊光源后约 5 秒内小球的布朗运动情况，分析处理后得到结果如下所示：

时间(秒)		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5
温度 (°C)	1 μm	31.93	25.18	23.59	22.4	25.42
	3 μm	28.16	24.34	24.14	21.64	25.20
温度变化值 (°C)	1 μm	6.75	1.59	1.19	-3.02	
	3 μm	3.82	0.2	2.5	-3.56	

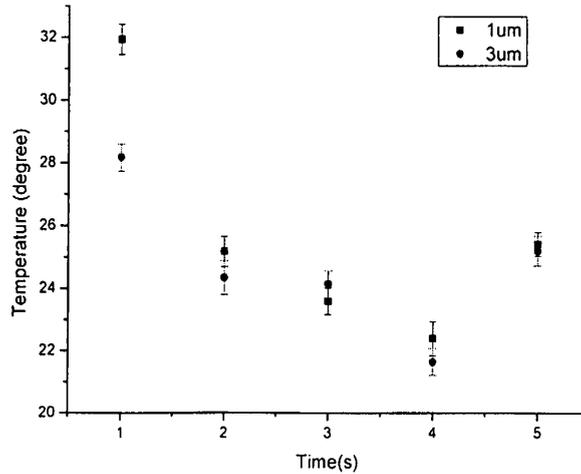


图 1 关闭光镊光源后微区温度随时间的变化

以上结果间接的反映了光镊光束对被操控小球所在区域引发的温升效应。尽管对二种小球，所在区域的温度趋于平衡的过程不尽相同，它们随时间变化的趋势还是一致的，都是单调降低。由此可见，光镊光源的确对被操控样品及其周围环境造成了温升效应，引起的温度变化值约 5°C 左右(此为采用输出的激光波长为 632.8nm 、功率为 10mW 的 He-Ne 激光器作为光镊光源时的测量结果)，与原有的理论估测是一致的。

此外，为了更具体了解在光镊关闭后，对光镊热效应造成的捕获区域的水温趋于平衡的“耗散”过程，还做了第二组更长时间，约 20 秒的跟踪测量。由于数据量较大，在做这组测量时，降低了时间分辨率，设定 CCD 在采集相邻两帧图片的时间间隔为 $\Delta t = 0.545\text{s}$ ，用 $1\mu\text{m}$ 小球跟踪记录了关闭光镊光源后约 20 秒内小球的布朗运动情况，分析处理后得出每 5 秒内的平均温度，结果如下所示：

时间(秒)	1-5	5-10	10-15	15-20
温度 ($^{\circ}\text{C}$)	26.08	24.72	25.19	24.63
温度变化值 ($^{\circ}\text{C}$)	1.36	-0.47	0.56	

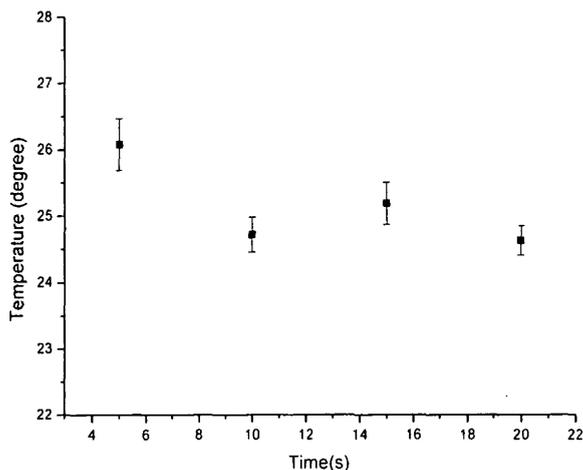


图 2 关闭光镊光源后微区温度随时间的变化

可见，关闭光镊 5 秒后，光镊捕获区的温度已趋于平衡，也即温度的耗散过程已基本结束。换言之，光镊光源引起的热效应将会在光镊关闭 5 秒后消除，不再影响样品及其周围的环境。

以上结果中，用 3 μm 测温探头小球的情形，测得的温度值普遍低于 1 μm 小球的情形，认为产生此结果的原因在于，所用 3 μm 聚苯乙烯小球的体积是 1 μm 小球的 27 倍，其热容量也就相应地要大于 1 μm 的小球，因而相同光镊光束的加热效应引起的小球温升较小，传给周围介质的热能也就较少，并因此使捕获区介质的温升较小。

§3.2.3 小结

运用前述工作中提出的“应用光镊技术测量液相微区温度”的方法，对光镊光源引起的热效应首次从实验上进行了测量，得到采用输出的激光波长为 632.8nm、功率为 10mW 的 He-Ne 激光器作为光镊光源，将会引起 5 $^{\circ}\text{C}$ 左右的温升，与先前的理论估测基本一致。对用不同尺寸测温探头小球的实验结果之间的差异作了简要分析。此外，通过对光镊光源引起的温升在光镊关闭后的耗散过程进行长达 20 秒左右的跟踪测量，得出光镊光源引起的热效应会在光镊关闭 5 秒后消除。

受所用实验装置性能所限,本研究的时间分辨率偏低,采用灵敏度更高、响应时间更快的摄像器件将可明显提高测量精度,从而对光镊加热效应有更精细的了解,这将为光镊应用中恰当选择光镊装置的参数提供可靠的实验依据。

§3.3 应用光镊技术研究混合液体黏滞系数的组分依赖关系

液体的黏滞系数,又称液体动力黏度,是流体的重要特征和物理属性之一。1687年,牛顿在把流体力学运用于天体力学中的问题时,首次提出了流体力学中黏度的概念,他把单位流体表面上所受的阻力与沿该面法线方向上速度梯度的比值这个常数定义为流体的黏滞系数,它表示流体内部抵抗流体剪切运动的一种物理性质。流体黏滞系数的研究成为定量描述流体流动性质的基础,了解流体的黏滞系数不仅有助于物性的研究,而且在工业生产和科学研究中也具有重要的实际意义,因此,流体黏滞系数的测定在许多领域日益受到重视。

国内外研究者对黏度已做了多年深入的研究,关于这方面的文献很多。1798年,库仑发明了振动盘式黏度计;50年后,泊肃叶、魏德曼、哈根和斯托克斯发明了毛细黏度计,并进行了改进;1890年,库爱特发明了同心圆柱式黏度计,1907年拉登布尔格的落球式黏度实验克服了斯托克斯遇到的困难。人们在经历数百年坚持不懈的研究中,发展、改进了的黏度测量方法,到目前为止,黏度测量的方法和仪器已达数百种。其中,常用方法有:落球法、毛细管法和转筒法等。依据斯托克斯公式的落球法,也称斯托克斯法,因其物理概念简单清晰、装置简单、测量方便,而被普遍采用,但测量的精度和准确度不高,主要问题在于采用人工秒表计时,存在着视差和反应误差,虽然有报道采用计算机实时数据采集系统与超声波探测技术、半导体激光光电传感器和单片机计时等已克服了视差和反应误差;此外,还存在由于无法使小球每次都恰好沿着玻璃管中心线下落引入的测量误差,以及测量对象只限于黏滞系数较大,透明或半透明的液体等问题^[19]。依据泊肃叶方程的毛细管法,有较宽的测量范围,从气体到液体均可测量,但方法对测量过程中条件和状态的要求较苛刻,如液体是否做稳定流动、压缩与否等,将会对测量结果造成很大的影响^[20,21]。依据牛顿黏滞定律发展而来的转筒法,即旋转法,有普遍型的Sarric黏度计和高级型的Couette黏度计,目前为陶瓷行业中普遍采用,这种方法虽因有成套的商品仪器

而简便易行，但准确性较差且仪器大多价格昂贵^[22]。此外，还有可以有效地测量液体黏滞系数较大的振动法^[23]、微机控制超声多普勒效应法^[24]、布里渊散射法^[25]等。

随着科技的进步，上述测量方法在取得改进的同时，也大大提高了测量精度，但它们仍存在样品需求量多的问题。在我们的研究工作中，注意到了通过监测微粒的布朗运动可以得到微粒所处环境的一些信息，比如液体的黏度，并做过一些尝试性的实验研究。由于所被监测微粒的尺寸是微米量级的，对应的布朗运动范围约 $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$ ，这就大大减少了样品需求量，约70ul足矣；另外，测量时样品是放置于密封的样品池内，这一点对于测量易挥发的样品，以及需保持组分含量不变的以特定比例混合的溶液的黏度，是十分有利的。

§3.3.1 测量原理

由于布朗运动是和用来表征液体黏滞阻力的黏滞系数直接相关的，这就为液体黏滞系数的测量提供了一种途径。

由布朗运动的朗之万理论，经过时间 Δt 后布朗粒子位移的平方平均值为：

$$\langle r^2 \rangle_{\text{ave}} = \frac{2d \cdot K \cdot T}{\alpha} \Delta t \quad (1) \quad [6]$$

其中， $\langle r^2 \rangle_{\text{ave}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\bar{r}_i - \bar{r}_{i-1}|^2$ 为粒子在时间间隔 0 到 Δt ， Δt 到 $2\Delta t$ ， $2\Delta t$ 到 $3\Delta t$ ，……的一系列位移 r_1 ， r_2 ， r_3 ，……的均方值， d 为布朗粒子的运动维数， K 是玻尔兹曼常数， T 是体系的绝对温度， $\alpha = 6\pi a\eta$ 为布朗粒子所受的黏滞阻力， a 为布朗粒子的半径， η 为布朗粒子所在体系的动力黏滞系数。

$$\text{由(1)得: } \eta = \frac{K \cdot T \cdot d \cdot \Delta t}{3\pi a \langle r^2 \rangle_{\text{ave}}} \quad (3)'$$

此即待测的液体黏滞系数 η 。

§3.3.2 实验

以纯水为例，对所提出的方法做了验证实验。将直径为 $1 \mu\text{m}$ ($0.997 \pm 0.021 \mu\text{m}$ PS product of Duke Scientific Corporation, USA) 的聚苯乙烯小球悬浮于水中，通过观测小球的布朗运动来测量水的黏滞系数。为了减小其它

小球对所检测小球运动的干扰，需要使体系内小球的含量(浓度大约为 2.5×10^8 个/ml)比较低，以使在整个 CCD 视场里只有一个小球。实验装置与步骤，与 §3.1 中的近同，这里就不再赘述。对大量的布朗运动位移值进行统计平均，得出布朗位移均方值为 $0.2538 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ，代入(3)式，可算得样品池内液体黏度为 $\eta = 76.83 \times 10^{-6} \text{kgf} \cdot \text{m}/\text{K}$ 。这一结果与用常用测量方法的测量结果之差小于 9%。它们的一致性证明了方法的可靠性。

在本实验中 Δt 为 0.11 秒。对大量的布朗运动位移值进行统计平均，得出布朗位移均方值，代入(3)式得：

$$\eta = \frac{K \cdot T \cdot 2 \times 0.11}{3\pi \cdot 0.5 \times 10^{-6} \times 0.2538 \times 10^{-12}} = 76.83 \times 10^{-6} \text{kgf} \cdot \text{m}/\text{K} \quad (3)''$$

其中的温度 $T=29.22^\circ\text{C}$ ，是用探头尺寸约 0.5mm，材料为镍铜-镍铝的 K 型热电偶温度计测得的。

该方法在测量时是将样品放置在一密封的样品池内，这一点对于测量易挥发的样品是必要的。我们对一组质量百分比含量不同的乙醇水溶液在 30°C 下的黏度进行了测量，实验结果如下：

乙醇浓度 (质量 百分含量)	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
黏度 (kgf·m/K)	105.53	137.35	164.51	174.68	191.51	194.62	186.89	168.31	141.91

以上测量结果与 20°C 、 40°C 左右的乙醇水溶液黏度随乙醇含量的变化规律是一致的，如下图所示：

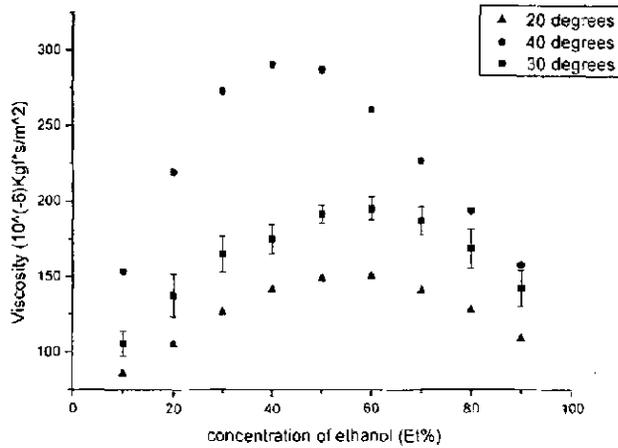


图 3 不同温度下乙醇水溶液黏度与乙醇含量的关系

另外，利用式 $\eta = \eta_0 e^{\frac{\Delta W}{KT}}$ [2] 和已知的 20℃、40℃ 的乙醇水溶液的黏度值，可以计算出 30℃ 的乙醇水溶液黏度的理论估测值，与实验测得的结果基本一致，二者之间的偏差小于 15%，如下图所示：

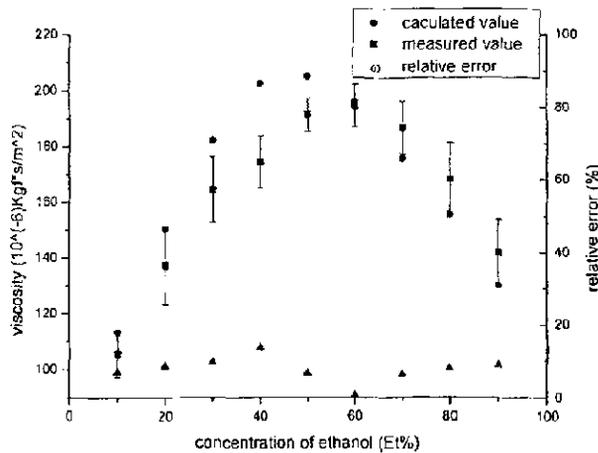


图 4 不同方法测得的乙醇水溶液黏度的比较(T=30°)

其中， $\eta = \eta_0 e^{\frac{\Delta W}{KT}}$ 是对液体动力黏滞系数随温度 T 变化特性的表示式，式中的 η_0 和 ΔW 对于任意一种液体都为特定的常数，只需知道液体在任意两个不同温度 T 下的 η 值，便可求出。20℃ 的乙醇水溶液的黏度值出自手册^[8]中，40℃ 的乙醇水溶液的黏度值是用毛细管方法测量而来。

以上结果, 在为方法的可靠性提供了进一步证实的同时, 也说明了本方法还适用于易挥发样品、以及混合溶液的黏度的测量。由此可见, 利用光镊系统本身可观测体系布朗运动的特点来测量液体黏滞系数的方法, 其测量对象不仅可以是一般液体, 也可以是易挥发的液体或混合溶液。

§3.3.3 分析讨论与小结

上述实验结果表明, 基于光镊技术的液体黏度测量方法是可行的。这里将对测量精度作一讨论。由于本方法是通过观测和分析小球布朗运动来实现的, 因而数据的统计问题显得十分重要。我们的实验是在对采集了 1000 帧以上的小球布朗运动图片分析计算而得, 依统计学分析知, 对于 95% 的置信度其误差小于 5%, 此时的采集量是足够的。在此基础上, 对上述黏度测量实验结果作了分析, 得出该方法的精度可以达到 $\pm 10 \text{kgf} \cdot \text{m} / \text{K}$ 以内, 方法的测量误差小于 15%。此外, 从与理论估算的对比结果分析得, 二者的相对误差在 13% 以内, 还是比较一致的。当然, 所进行的初步实验测量的精度还偏低, 这一方面是由于所用实验装置较简单, 测试条件的稳定性差, 这不难通过完善实验装置来提高; 另一方面, 测量精度在很大程度上还取决于统计误差, 因而可以通过增大统计量来提高。

这种方法的测量所需时间, 受 CCD 的帧速和为能达到较高可信度的数据统计量这二个因素的限制。在我们的实验条件下, 测量时间要十分钟左右。改用帧速更快的摄像机便可以大大缩短本方法的测量时间, 这对于动态过程的研究十分重要。若改用 2 或 3 μm 的微粒(此时, 采集较少的数据量就可保证有同样的置信度)作为观察对象布朗粒子, 测量时间也将有望缩短。

在本实验中, 为了使小球在做布朗运动时不受样品池底面的影响^[10, 11], 应使小球在距离样品池下底面约 10 μm 的高度处做布朗运动。当然, 通过观测待测样品池底面附近布朗粒子的运动来完成测量也是可以的, 但需对测量结果作一定的修正^[12-15]。

本部分工作利用光镊技术对乙醇水溶液的黏度随含量变化的特性做了实验研究, 由于测量方法的非接触特性, 使之可以测量密闭容器内的液体, 这点尤适用于对易挥发液体或其混合溶液的黏度测量。此外, 这种测量技术可以采用微容量样品池进行的, 所以大大降低了对样品的需求量, 约 70 μl 足矣。可以看

出，这里介绍的光镊方法也可望用于对微小粒子内的液体(例如细胞液)黏度测量。

本章致谢：

在此要感谢中国科学技术大学热科学和能源工程系燃烧学实验室提供的液体黏滞系数的测量验证条件，为本部分工作的顺利完成给予了莫大的支持。

本章参考文献

1. J.Z.Yang , History of Measuring Temperature , Popular Standardization No.4.2001: P30
杨建增, 温度计量小史[J], 大众标准化 2001 年第 4 期: 30
2. W.L.Mang , F.Y.Chen , The Measurement of Temperature , Journal of Beijing Agriculture College , No.1,Vol.10 , June.1995: P99
莽万里、陈逢岩, 温度的测量[J], 北京农学院学报 1995 年 6 月第 10 卷第 1 期: 99
3. Y.J.Cheng , The Introduction of the 7th International Symposium and its Proceedings about Temperature , Aviation Metrology & Measurement Technology , Vol.14 No.5 Oct.1994 : P35
成玉骏, 第七届国际温度讨论会及其文集简介[J], 航空计测技术 1994 年 10 月第 14 卷第 4 期: 35
4. A. Ashkin , Applications of laser radiation pressure[J], Science, 1980,Vol. 210 No. 4474:P1081
5. J.Dai , S.L.Wang , Z.L.Fang , Temperature Measurement Techniques for Microfluids , Progress in Chemistry , Vol.16 No.6 Nov. , 2004 : P886
戴敬、王世立、方肇伦, 微流体温度测量技术[J], 化学进展 2004 年 11 月第 16 卷第 6 期: 886
6. Z.C.Wang , Thermodynamics and Statistical Physics,Beijing: Higher Education Press , 1980,(2001 second Edition):P386
汪志诚, 热力学与统计物理[M], 北京: 高等教育出版社, 1980(2001 年重印), 386
7. C.LI , Calorifics , Beijing : People Education Press , 1978: P313
李椿等, 热学[M], 北京: 人民教育出版社, 1978, 313
8. Z.X. Gong, S.J.He , Handbook of Technology in Physics Experiment , Shanghai : Shanghai-Cishu Press ,1995:P588
龚镇雄、何圣静, 物理实验技术手册[M], 上海: 上海辞书出版社, 1995, 588
9. H.T.Chen,Y.M.Li,L.R.Lou et al.,High precision measurements in an optical tweezers for studying single biomolecule motion[C], Proceedings of SPIE(2002), 4536:P75
10. Z.Q Wang , The foundation of Hydromechanics , Beijing ,Higher Education Press ,1987:P348
王致清, 流体力学基础(边界层理论)[M], 北京: 高等教育出版社, 1987, 348
11. J. Happel and H. Brenner , Low Reynolds Number Hydrodynamics[J], Kluwer, Drodrecht, 1983:P322
12. Luc P.Faucheux and albert J.Libchaber , Confined Brownian motion[J], Phys.Rev.E(1994),49(6): P5158
13. Binhua Lin, Jonathan Yu and Stuart A. Rice , Diffusion of an isolated colloidal sphere confined between flat plates[J], Colloids and Surfaces A :Physicochem. Eng Aspects(2000),174:P121

14. Binhua Lin, Jonathan Yu and Stuart A. Rice , Direct measurements of constrained Brownian motion of an isolated sphere between two walls[J], Phys.Rev.E(2000), 62(3): P3909
15. Y.F.Sun , S.H.Sheng , Y.M.Li et al. The Study of Diffusion Coefficient of micro-particle in Confined Dispersion. ACTA Mechanica Sinica ,Vol.36 No.6 Nov. 2004 : P739
孙玉芬, 徐升华, 李银妹等, 受限分散体系中粒子扩散特性的研究[J], 力学学报, 36(6) (2004) 739
16. A.Ashkin, J.M.Dziedzic, J.E.Bjorkholm, and S.Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," Opt.Lett. 11, 288-290 (1986)
17. A.Ashkin, et al. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature (London) [J], 1987, 330: 769-771.
18. M.W.Berns, W.H.Wright, B.J.Tramserg, et al. Use of a laser-induced force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle [J].Natl. Acad.Sci.USA, 1989,86:4539-4543.
19. M. Guo, A Novel Method to Measure the Viscosity Factor of Liquids[J], Physics, Vol. 30, No. 4, 2001:220-222
郭敏, 一种测量液体粘滞系数的新方法[J], 物理 2001 年 30 卷第 4 期: 220-222
20. J.Y. Liu, Determination of liquid coefficient of viscosity by means of the method of Capillary[J], Journal of August 1st Agri. College, Vol.17, No.4, Dec. 1994:89-91
刘继英, 毛细管法测液体的粘滞系数[J], 八一农学院学报, 1994 年 12 月第 17 卷第 4 期: 89-91
21. Y. Fang, A discussion about the experiments of determination of the viscosity coefficient for liquids with ostward - type viscometer[J], Journal of Guizhou Normal University (Natural Science),Vol. 18, No.3, 2000:60-62
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 年 8 月第 18 卷第 3 期: 60-62
22. G. Chen, Z.G. Zhu, J.P. Shui, Study on the principle of the viscosity measurement of liquid with a forcedvibration torsion pendulum[J], ACTA Physica Sinica, Vol.48, No.3, March 1999:421-425
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 年 3 月, 第 48 卷第 3 期: 421-425
23. X.J. Jiang, T.X. Gai, The analysis of the measuring mechanism of rotatory viscometer and improving proposal[J], Journal of Qingdao Institute of Architecture and Engineering, Vol.23, No.1,2002:67-69
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 年第 23 卷第 1 期: 67-69
24. M. Guo, J.Z. Zhao, A peculiar new method of measure the viscosity factor of slurry - ultrasonic Doppler effect under the control of microcomputer[J], China Ceramics, Vol.37, No. 2, Apr. 2001:39-40

- 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年4月第37卷第2期: 39-40
25. J.F. Xu, R.S. Li, J. Zhou et al, Measurements of Bulk Viscosity of Water Using Brillouin Scattering[J], Acta Optica Sinica, Vol.21, No.9, Sept., 2001:1112-1114
- 徐建峰, 李荣胜, 周静等, 用布里渊散射测量水的体粘滞系数[J], 光学学报 2001年9月第21卷第9期: 1112-1114

第四章便携式分子马达生物传感 超灵敏检测仪研制

§4.1 引言

疾病的快速、早期诊断对于挽救生命、防止传染病的暴发和改善人类健康具有重要意义。而在疾病初期，血液和体液中所含的与疾病相关的标志性分子的数量很低，以致当前国内外已发展的众多诊断各种疾病的早期检测技术、方法，尚不能满足早期诊断的要求。其中，比较常用的有 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定)技术、芯片电泳技术、基于场效应管的纳米技术、PCR(polymerase chain reaction, 聚合酶链反应)技术等。但由于疾病初期与疾病相关的标志性分子(如蛋白分子)在血液和体液中的含量很低，以致当前众多的所谓早期诊断技术还不能满足早期诊断的需要。如目前最流行的 ELISA 方法，虽然技术成熟，但存在操作过程复杂因而检测时间长、样品消耗量大、以及检测限较高，即灵敏度不够高，等问题；芯片电泳技术，优点是样品消耗量小，分析速度快，但重现性较差，检测限也较高；基于场效应管的纳米技术^[1,2]，因检测限很低，可以达到 10^8 个/ml，分析速度较快，样品需求量少，而成为一种比较有前途的技术，但该方法的制作工艺复杂，检测成本也较高；PCR 技术，也是现有检测技术、方法中比较常用且成熟的一种，检测限度也低，可以达到 10^4 个/ml，样品的消耗量也很少，但缺点是检测过程复杂，耗费时间长。由此可见，现有的这些技术都还难以完全做到对疾病早期、灵敏且简便但可靠地测定。因而，迫切需要发展一种超灵敏的生物分子测定技术，以满足生物、医学的需求。

面临当前世界性疾病——潜伏期较长的 HIV(艾滋病)病毒的快速蔓延、曾于 2003 年在我国引起大规模非典型性肺炎暴发的 SARS 病毒(一种全新冠状病毒)的快速变异、以及目前暴发于全世界范围的 H5N1 禽流感病毒等对人类健康、社会稳定带来危害的严峻问题，如何进行疾病的快速监控、防止扩散流行与大规模暴发已迫在眉睫。故寻求一种能对疾病做到早期的快速、灵敏且可靠诊断的

新技术、新方法，以突破现有技术、方法的检测灵敏度，开发出超灵敏的测定技术和便利的检测仪器为世人所期待，也成为相关领域科学家从不同角度协同攻关奋斗的目标。

近年来在生物大分子的研究中，发现 F_0F_1 -ATPase 分子马达是一个旋转分子机器^[3]，它特殊的结构与功能，使之具备了发展成为生物传感器的潜在优势。2005 年美国科学家进一步明确提出用旋转分子马达 (F1) 作为生物传感器的技术，并启动了 F_0F_1 -ATPase 分子马达作为网络式智能化的传感器的研究课题，用于对生物分子的探测。日本、美国、德国等国家已在蛋白质分子马达的研究方面投入了巨额经费，期望能在某些应用方面取得突破性进展。

目前，随着纳米技术的发展，把各种各样的纳米粒子作为生物分子与基片的连接媒介已不是难事，并且可以利用此技术在基片上直接阵列生物分子(如酶，核酸，生物色素复合物)以构建出纳米尺度的生物芯片。如在原子力显微镜技术基础上发展起来的 DPN(Dip-Pen Nanolithography, 蘸笔纳米平板印刷术)技术，利用它对阵列元素可直接操控的性能，便可以实现生物芯片的构建。因此，从生物、医学以及纳米科学等多领域的发展及应用需求来看，发展纳米技术的生物传感器，是目前和今后相当长一段时间内世界生命科学发展的一个重要方向。

另一方面,随着生物医学、科技农业、环境监测、军事分析以及工业流程监控等领域的现代化发展,对分析仪器提出了非常急迫的小型化、轻量化的要求,在某些特殊的场合(如环保、野外、现场的监测,星载分析检测等)还要求仪器牢固耐震。检测、分析仪器的小型化设计已成潮流。目前,许多国家都已在致力于功能不亚于传统庞大实验室仪器的小型化、轻量化甚至全固化仪器的设计与开发,例如可在野外工作的短柱高速气相色谱仪、便携式质谱仪、便携式气相色谱/质谱联用仪、便携式 γ 射线分析仪等种种运动部件少、全固态化仪器。

本章主要介绍在利用 ATP 合酶旋转分子马达具有的特殊结构与功能开发全新免疫识别技术的已取得初步成果的研究基础上,从物理和技术的角度讨论相关检测分析方法和技术,提出装置的设计方案、以及样机研制的进展情况、初步结果,并给出进一步完善的改进意见等,渴望能为攻破现今诊断技术中尚未很好解决的早期检测的超灵敏、快速等难题起到推动作用。

§4.2 检测仪的生物学基础——

F_0F_1 -ATPase 分子马达生物传感器

本研究工作属交叉合作领域，为了更好的了解本研究工作，在此先简单介绍一下合作方——中科院生物物理所乐加昌老师实验小组已有的工作基础。

中科院生物物理所的乐加昌老师下属的旋转分子马达的研究小组在国家基金委的支持下，启动了围绕分子马达特殊结构与性能的研究，以及如何利用分子马达的特性开发出一种生物传感器的研究课题，经过多年的研究与积累，已取得以下实际进展：

1、发现在旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase 的 β 亚基上连结不同的负载将直接调控其的活性。

F_0F_1 -ATPase 是一个旋转分子马达(图 1)，由定子和转子两部分组成，它利用氧化磷酸化或光合磷酸化过程中产生的跨膜质子动力势，以 ADP 和无机磷酸为原料合成 ATP，在此过程中， F_0F_1 -ATPase 会向膜外转运质子，导致膜内的 PH 值升高；而在 ATP 水解的过程中， F_0F_1 -ATPase 将会吸收该过程中 ATP 水解时释放出来的能量，以与合成过程中相反的方向旋转，并向膜内转运质子，使膜内的 PH 值降低。并且，ATP 合成(或水解)的速率与 F_0F_1 -ATPase 的旋转速率成正比，而 F_0F_1 -ATPase 的旋转速率又可以反映为它转运质子的快慢。因此，当 F_0F_1 -ATPase 合成或水解 ATP 的活性越高时，它转运质子的速率也就越快。

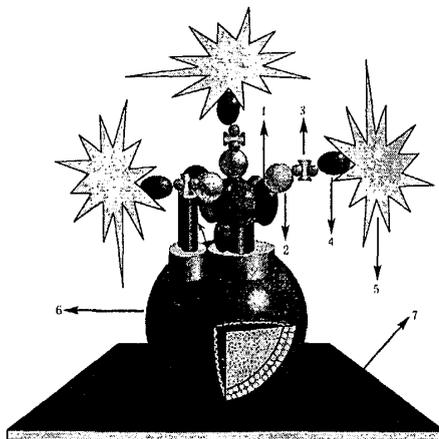


图 1 基本免疫旋转- F_0F_1 -ATPase 生物传感器示意图

1、 F_0F_1 -ATPase 上的 β 亚基； 2、 β 亚基上抗体； 3、biotin-streptavidin -biotin(生物素-抗生物素蛋白-生物素) 连接系通； 4、H9 禽流感病毒抗体； 5、 H9 禽流感病毒； 6、 F_0F_1 -

ATPase 合酶旋转分子马达的载色体 chromatophores(光合细菌载色体外翻膜囊泡); 7、玻璃表面。

后来又发现, F_0F_1 -ATPase 的旋转速率会受到它的 β 亚基上所连接负载多少的影响。其 β 亚基上加了负载后, 将会抑制它的旋转速率, 表现为 F_0F_1 -ATPase 转运质子的速率变慢了。基于此特性, 建立起了用单分子马达测定分子量未知的病毒、生物大分子等的分子量的方法。

2、发现 F_0F_1 -ATPase 的旋转活性与其 β 亚基上的负载之间并非简单的反比单调关系, 而有这么一个使得 F_0F_1 -ATPase 的旋转活性从抑制转变为激活的拐点存在的新现象。

在发现 F_0F_1 -ATPase 的旋转速率还要受到它的 β 亚基上所连接负载影响之初, 只简单的认为二者间是单调的反比关联, 即 β 亚基上所连接负载质量越大, F_0F_1 -ATPase 的旋转速率就越慢, 经过实验观测后发现, 实际情况并非如此, 它们之间的关联存在一个跳变点, 即当 β 亚基上的负载超过一定质量后, 负载的增大对 F_0F_1 -ATPase 旋转活性的影响将从抑制变为激活, 反而加快了 F_0F_1 -ATPase 的旋转速率。而修饰在 β 亚基上任意一种病毒抗体(具特异结合性)在结合对应病毒前后的两种不同负载情况刚好分别处于旋转活性跳变点的前后, 因而这一新现象的发现, 为把旋转活性可调的 F_0F_1 -ATPase 分子马达发展成检测病毒的生物传感器, 奠定了理论及实验基础。

3、发现 F_0F_1 -ATPase 分子马达对 β 亚基上所连接的微小负荷(如某种生物分子)可以十分敏感的反应为其旋转速度的改变(已申请国家发明专利^[4]和 PCT 国际申请, 申请号: PCT/CN2005/002195)。

生物领域常用的荧光标记染料 F1300, 是一种 PH 值敏感的荧光材料, 其荧光强度随着 PH 值的增加而增加。当把 F1300 标记到膜内后, 在 ATP 的合成或者水解过程中, 如前所述, F_0F_1 -ATPase 的旋转活性表现为其运输质子的速率的快慢, 而运输质子的速率快慢将直接导致膜内 PH 值变化, 这点可直接被 F1300 发光强度的变化反映出来, 也即 F_0F_1 -ATPase 的旋转速率可以由 F1300 荧光强度的变化来检测。将 F1300 成功标记到膜内的技术, 解决了如何将旋转信号转换为可直接探测的荧光信号的问题, 并为以后利用荧光 pH 敏感探针检测质子转运的单分子技术与多分子技术的建立奠定了实践基础。

与此同时,乐老师他们已掌握了在分子马达的应用方面解决零负载马达调控的关键技术,以及如何用化学方法启动分子马达旋转的关键技术^[5],并在单分子研究中已建立起可调控研究体系并在分子马达的预实验中取得了初步结果^[6](如图 2 所示)。

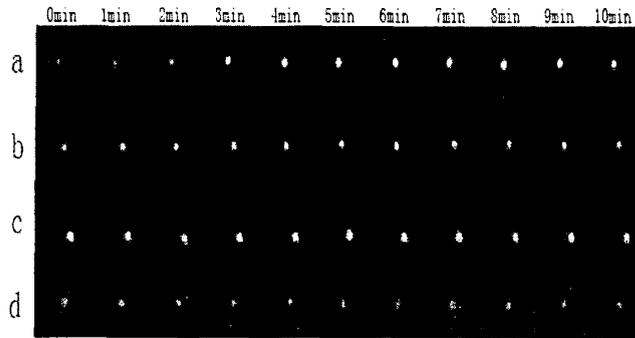


图 2 研究免疫旋转 F_0F_1 -ATPase 在不同情况下连接 H9 禽流感病毒后
标记荧光材料随 PH 值变化的发光照片

- β 亚基上连接了 H9 禽流感病毒特异抗体(β 亚基抗体-生物素-抗生物素蛋白-生物素-H9 抗体)的免疫旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase 与 H9 禽流感病毒的混合样品,在加 ADP 启动反应后的荧光强度变化(反映了 F_0F_1 -ATPase 的 β 亚基上的负载质量在拐点之后,负载对 F_0F_1 -ATPase 的旋转活性从抑制转变为激活的现象);
- β 亚基上未加任何负载的免疫旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase,加 ADP 启动反应的过程(反映了 F_0F_1 -ATPase 自身旋转活性随 ATP 合成活性的变化情况);
- β 亚基上连接了 H9 禽流感病毒特异抗体(β 亚基抗体-生物素-抗生物素蛋白-生物素-H9 抗体)的免疫旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase,但未与 H9 禽流感病毒混合的样品,加 ADP 启动反应的过程(反映了 F_0F_1 -ATPase 的 β 亚基上的负载质量在拐点之前,负载对 F_0F_1 -ATPase 旋转活性的抑制现象);
- β 亚基上未加任何负载的免疫旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase,但没有加 ADP (不起动反应,即使 F_0F_1 -ATPase 旋转起来,反映了荧光探针 F1300 自身淬灭的情况)。

综上所述,这些已有研究进展、成果(实验上已经取得对盐酸克伦特罗(瘦肉精),CRP 蛋白等物质的成功检测的可喜进展,实践证明其检测限超过了传统 ELISA 方法的 100-1000 倍)及技术积累,特别是近来在单分子水平研究中建立起的一套具有独立知识产权、应用价值的新技术,新方法,即利用 F_0F_1 -ATPase 分子马达作为微量探针,使分子马达的旋转特殊功能与荧光技术

相结合, 就可以构建 F_0F_1 -ATPase 单分子生物传感器, 再利用纳米粒子与生物分子的直接连接技术, 形成特殊的生物芯片, 便可以实现一种基于单分子马达旋转原理的用于检测微量病毒的新技术, 为本工作即单分子马达生物传感器及与其配套的高灵敏度检测仪器的综合研制的开展, 提供了重要的生物学基础。

§4.3 检测仪的研制

我们将在这一节, 从物理和技术的角度, 具体讨论和实施将生物物理所对旋转分子马达已有的研究成果付诸实用, 开发相配套的单分子检测分析仪器并给出已经取得的结果。

§4.3.1 设计目标

在利用 ATP 合酶旋转分子马达 F_0F_1 -ATPase 特殊的结构与功能作为生物传感器来研究 ATP 分子马达的旋转免疫识别技术(新型的免疫-诊断、分析技术和阵列式的微流道芯片阅读式检测器)的基础上, 开发出具备能对样品实现定位检测、数据读取及处理等功能, 以及检测灵敏度(争取达到单分子量级)、速度比现有的免疫-诊断技术会有显著提高的检测分析仪器。与此同时, 尽量使系统成为集检测、结果处理与输出等技术于一体的小型化、重量轻、使用简便的新一代检测分析仪。具体而言, 要达到以下技术指标:

1. 检测对象: 液体中的病毒
2. 采样量: 几十微升
3. 检测限: 病毒浓度最小量— 10^9 个/ml
4. 系统分辨率: 亚微米
5. 显微视场: 100 微米×75 微米
6. 信号采集: 芯片的单分子信号和阵列信号
7. 系统操作简便、实时显示图像信号, 计算机数据采集和处理、及打印检测结果

对整个便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪系统的开发, 主要包括以下三方面的工作: 1 生物传感器性能的进一步优化与阵列的单个生物传感器的进

一步小型化；2 集光学显微成像系统和荧光强度检测体系于一体的光学系统的设计与构建；3 将信号控制和数据处理系统的集成工作。

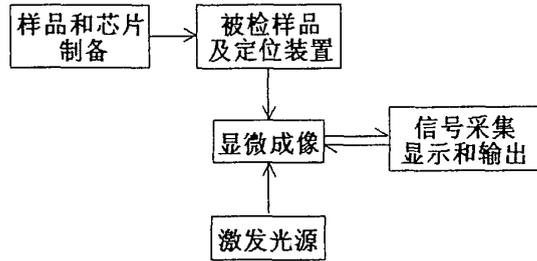


图3 检测仪原理示意图

第一方面有关生物部分的工作，是由合作方中科院生物物理所乐加昌实验小组负责的，而所在中国科学技术大学激光生物实验室则负责后两方面有关物理和技术方面的工作，合作双方在各自完成相对独立的单元技术研究后，再根据设计要求，协同完成相对独立的局部体系，最后进行交叉实验，完成系统集成。

下面，就中国科学技术大学激光生物实验室承担的工作中本人主要参与的光学成像和荧光强度检测体系的搭建工作做一简要介绍。

§4.3.2 检测仪的物理设计

根据生物学超灵敏检测的要求，仪器的物理性能应满足三条：第一、用此检测仪器观测时，能够得到清晰的生物传感器的荧光图像；第二、能够达到对分子马达转速变化的灵敏检测，即不但能够观测出荧光强度变化的差值，响应也要足够快；第三、能够达到对荧光信号处理的自动化，并给出定量的结果。因而，物理上的设计考虑可分为以下四部分：

(1)、照明光源和照明系统

选择合适的激发照明光源，设计合理的照明光路，以达到在荧光显微镜物面上形成均匀和足够强的激发光照明。

(2)、成像系统

由显微物镜和摄影目镜组成。由于是选用 CCD 作为成像的接收观测屏，所以要采用平视场物镜；此外，需采用分辨本领达到亚微米的观察物镜，这样方

可使生物传感器的荧光图像(几十到几百纳米的荧光亮点)能够清晰地呈现在 CCD 所连接的计算机显示屏上。

(3)、接收系统

由 CCD 和计算机组成。出于为了最大限度地降低由样品池底面反射过来的激发光的影响以得到信噪比较高的荧光图像的考虑,需要在 CCD 前面加干涉滤光片。此外,也可以考虑使用像增强器,以进一步提高测量的灵敏度。

(4)、配套的计算机图像处理技术

开发能对荧光信号强度的变化幅度随马达旋转速率变化的高精度观测,并自动完成把强度结果转变为具体数据的处理软件,进一步提高系统的分辨本领及检测效率。

§4.3.3 检测仪的实验研究

出于以上四点物理的设计考虑,我们构建了检测仪原理性实验系统(图 5)。从整机结构上说该实验系统类似于反射式照明的荧光显微镜。

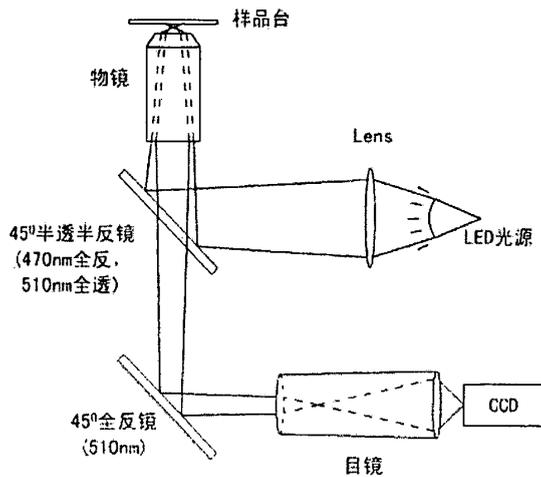


图 4 检测仪光路原理图

系统的照明/激发光源出射的光,经双色反射镜照到物镜的后瞳,经物镜会聚后照在样品平面上;样品中标记在生物传感器上的荧光探针 F1300 被激发后发射出中心波长为 514nm 的荧光。荧光由物镜收集,通过摄影目镜成像在 CCD 靶面上,由 CCD 将其转换为可直接观测的样品的荧光图像。

根据国家标准显微镜物镜的共轭距离,设计样品台到摄影目镜场镜的光学距离为 195mm;考虑到检测所用的荧光探针 F1300 的激发(吸收)和发射波长分别为 490nm 和 514nm,选择中心波长为 470nm 的 LED(半导体发光二极管)作为激发/照明光源;照明系统中所选用的会聚透镜的焦距约 50mm,为了使 LED 光源可以充满物镜后瞳以达到最好的照明、激发效果,LED 光源与会聚透镜间的距离略大于 50mm,约 52mm,使得出射的照明光为微会聚的近平行光束,再经物镜会聚后均匀的照亮视场,便于显微观察;45°的 470nm 全反 510nm 全透的半透半反镜和 45°的 510nm 全反镜的参数选择是由荧光材料 F1300 的激发、发射光决定的,以便提高整个观测系统的信噪比。当选用不同的荧光材料时,照明/激发光源、45°半透半反镜和 45°全反镜的参数选择都需要做相应改变,以优化观测的信噪比。

用江南光学仪器厂生产(后面简称为“江南”)的 20 倍物镜和 2.5 倍摄影目镜搭建的原理性装置(图 5)对样品做了检测实验,实验结果如图 6 所示,可以激发并清晰地观察到 1 μ m 荧光小球的图像。

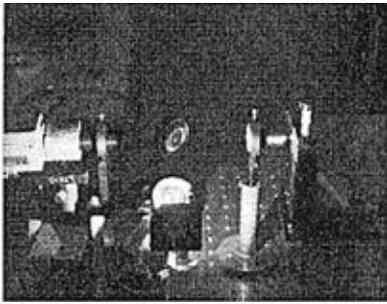


图 5 检测仪原理性实验装置



图 6 1 μ m 荧光小球的观测截图

根据初步的实验结果,认为仪器各环节的技术指标,以及整个检测系统的集成效果应从以下几个方面考虑做必要调整和修改:

1、荧光信号采集的优化:换用高灵敏的制冷 CCD(或 ICCD)作为信号采集部件,或使用像增强器,以进一步提高测量的灵敏度。此外,为降低由样品池底面反射过来的激发光的影响以得到信噪比较高的荧光图像的考虑,在 CCD 前面加干涉滤光片,以滤除激发光。

2、标定出系统荧光信号的检测范围：分析已有定量研究 F_0F_1 -ATPase 分子马达旋转能力的调控规律和微小负载影响旋转速度变化的规律的实验结果，定出荧光信号的强度范围。

3、荧光信号的输出和处理：研究分子马达的旋转速度与荧光强度变化快慢间的对应规律，提出相应的图像识别方法以便信号的有效分析和输出，提高系统的检测效率。

4、系统集成：仪器设计为专一用途的检测仪，以达到仪器的便携性(即小型化、使用方便)的设计目标。

§4.3.4 检测仪样机的雏形

在原理性实验的基础上，设计和研制了适用于 F_0F_1 -ATPase 分子马达生物传感器芯片观测的小型装置的样机(图7)。

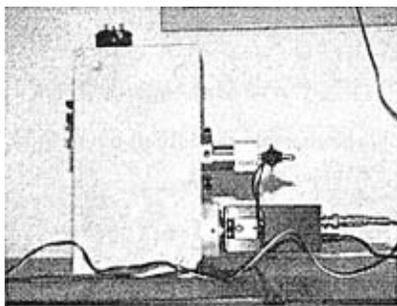


图7 检测仪元件集成装置一样机照片

该样机已可观测和处理生物样品的荧光图像，具备了最基本的功能，如图8-11所示。

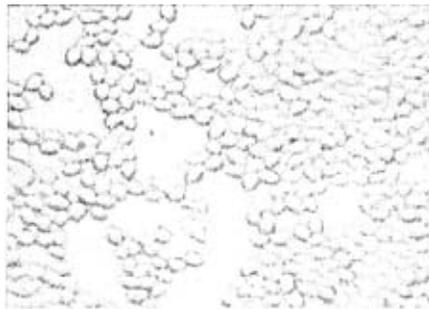
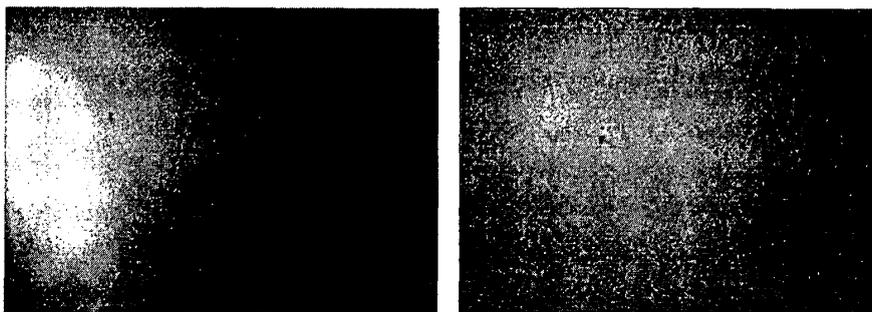


图8 酵母细胞



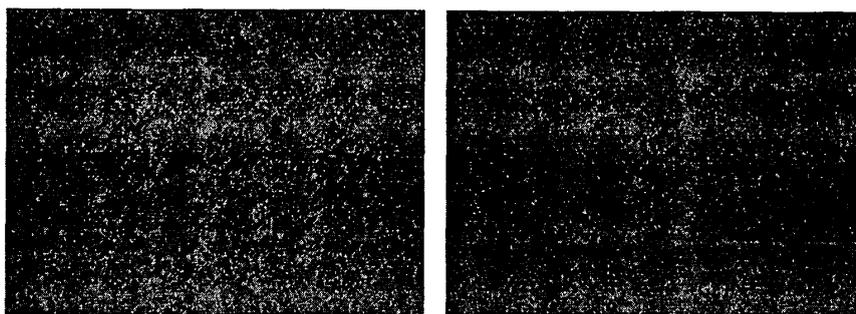
图9 受激后 F1300 的荧光照片



a、用 63 倍 Leitz 物镜观察

b、用 100 倍江南油浸物镜观察

图 10 待测样品 chromatophores 的荧光显微图像



a、5 分钟后

b、8 分钟后

图 11 加了 ATP 启动 buffer (缓冲液) 后

待测样品 chromatophores (图 10-b) 的荧光显微图像

其中, 图 8 是选用 100 倍江南油浸物镜的样机仪器对酵母细胞观察的截图, 说明样机具备对一般生物样品的显微观测功能; 图 9 是用同样装置的样机仪器对待用荧光材料 F1300 观察的截图, 说明样机具备对特定荧光材料的激发与观测功能; 图 10-a、10-b 分别是用选用 63 倍 Leitz 物镜和 100 倍江南油浸物镜的样机仪器对样品 chromatophores 观察的截图, 图 10-b 及图 11 则为选用 100 倍江南油浸物镜的样机对同一样品 chromatophores 加 ATP 启动 buffer(缓冲液)前后的跟踪观察的截图, 说明样机具备待测目标荧光强度变化可分辨的观测功能。以上结果, 为便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪的进一步完善奠定了良好的基础。

§4.4 小结

本研究工作开发设计了尺度小、重量轻、需样品量小且灵敏度高的新一代疾病检测、分析仪器, 已完成样机的研制, 并给出了进一步完善仪器性能的改

进意见。该仪器首次将 F_0F_1 -ATPase 应用于病毒的检测，开拓了分子马达的新的应用领域，目前国际上尚未检索到利用 F_0F_1 -ATPase 分子马达作为传感器的疾病检测分析仪器。该仪器的灵敏度和检测限等指标均超过传统的技术(如 ELISA)，并能同时实现多个目标病毒、目标分子的并行检测。由于该仪器的使用简单，便捷，还可望成为家用个人病毒检测仪器，有广阔的应用前景。

本仪器研制工作的进展，为仪器的进一步改进与完善，完成最终的目标，成就造福人类的美好愿望，并获得具有我国原创性的自主知识产权的研究成果，奠定了重要的工作基础。

本章参考文献:

- 1、 F. Patolsky, G.F. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X.W. Zhuang, C. M. Lieber, Electrical detection of single viruses, *PNAS*(Proceedings of the National Academy of Sciences, USA), 2004, 101, 14017-14022
- 2、 Robert A., Freitas, Current Status of Nanomedicine and Medical Nanorobotics, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, Volume 2, Number 1, March 2005,1-25(25)
- 3、 Ricky K. Soong, George D. Bachand, Hercules P. Neves, Anatoli G. Olkhovets, Harold G. Craighead, and Carlo D. Montemagno. Powering an Inorganic Nanodevice with a Biomolecular Motor, *Science*, 24 November (290)2000: 1555-1558
- 4、用分子马达的单分子探测器, 专利号: WO2005080603, 2005/09/01; Univ. ARIDNA (US)
- 5、 Cui Yuanbo, Zhang Fan, Yue Jiachang , Detecting proton flux across chromatophores driven by F_0F_1 -ATPase using *N*-(fluorescein-5-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, *Analytical Biochemistry*, (344)2005, 102-107
- 6、 Liu Xiaolong, Zhang Yun, Yue Jiachang, Jiang Peidong, Zhang Zhenxi, F_1F_0 -ATPase as biosensor to detect single virus, *Biochem. Bioph. Res. Co.* (accepted,2006)

论文的总结和展望

论文的主要工作之一是围绕“光镊技术在液相体系微区特性参数测量中的应用”这一课题展开研究，提出了利用光镊技术测量液相微区温度的新方法。该方法是通过测量被探测体系微区内微粒的布朗运动，并由此确定该区域液体的粘滞系数后，再利用液体粘滞系数的温度依赖关系来确定该微区的温度。由于所监测的测温“探头”尺寸是微米量级的，解决了微区温度测量中微小探头难以制备的困难；与此同时，利用光镊技术可操控及移动微小粒子至任意确定空间位置的特点，可实现精确定位的温度测量，满足了对液相微区温度测量的实际需求。

并在此基础上，利用所发展的新方法，首次从实验上研究了光镊应用中一直困扰人们的光镊光束的热效应问题，论证了已有的对于光镊引起的温度变化的理论估测。该研究工作为针对具体研究对象选择合适的光镊参数(波长、强度)提供了可靠的实验依据。此外，还运用光镊技术研究了混合液体黏滞系数的组分依赖关系，在再次肯定了方法的可靠性的同时，验证了方法在对易挥发液体以及混合溶液的黏度测量中的实用价值，扩展了方法的适用范围。

论文的另一主要方面是从事了对“便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪”的研制工作。这项工作是基于合作单位(中科院生物物理所的乐加昌老师研究小组)在对 ATP 合酶旋转分子马达具有的特殊结构与功能研究积累及发展的全新免疫识别技术等研究成果基础上，为了满足实用目标，而提出的。我们的主要工作是如何从物理和技术的角度讨论相关检测分析方法和技术，提出配套的检测装置的设计方案。目前，已完成了原理性装置的搭建和验证工作，样机的设计、研制及测试工作，并给出了进一步完善仪器性能的改进意见。已完成的工作，为达成“便携式分子马达生物传感超灵敏检测仪”的最终研制目标，即突破已有众多诊断各种疾病的早期检测技术、方法，尚难以完全做到对疾病早期、灵敏且简便但可靠地测定的局限，以满足早期诊断的要求，奠定了工作基础。

除以上两项主要工作外，在攻读硕士学位期间，还参与了：(1)、利用光镊技术研究分散体系稳定性，以及围绕该主题相关的理论和实验研究的工作，为

建立的从微小粒子层次来测量体系稳定率的新的实验研究方法做了大量的实验论证工作，与此同时，使自己对分散体系中微粒的碰撞聚集过程和体系的稳定性的微观机理有了更深入的认识。(2)、在已有利用光镊控制粒子的聚集过程，实现了对分散体系中的粒子形成具有给定结构的聚集体的稳定排布的工作基础上，对排布的条件做了进一步更全面的摸索；同时，也对排布好的微结构体在干燥时将会受到的引起变形的干扰因素(如水的表面张力、样品浓度、电解质含量)作了分析测试，估测了影响程度，这些工作将为微排布方法用于对胶体晶体和生物学领域的应用奠定实验基础。

攻读学位期间发表的论文及申请的发明专利

发表论文：

- 1、张文静、李银妹、楼立人等，应用光镊技术测量液相微区温度，中国激光，2006年5月第33卷第5期：663-666。

附注：已撰写了下列二篇文章：

1. “Experimental observation of the heating effect caused by optical tweezers”
2. “应用光镊技术研究混合液体黏滞系数的组分依赖关系”。

发明专利：

张文静、李银妹、楼立人，发明专利“一种测量液相微区温度的方法”，申请号：200510095374.7，审批中。

致谢

本论文的工作是在导师李银妹教授、楼立人教授、姚焜副教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。在实验室的这些年中，老师们严肃的科学态度、严谨的治学精神，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。李老师严以律己、工作认真投入，她总是教育我在工作上要迎难而上，不能逃避、推托责任，做事要细心，同时她对人关怀无微不至，从她身上我学到了不少为人处世的道理。楼老师学识渊博，思想深邃，每次和楼老师讨论问题，在增长知识的同时，也学到了考虑、分析、解决问题的方式方法，让我能够在学习和研究上快速地进步。姚老师有着扎实的物理基础功底，及精深的实验技能，在她的耐心指导下，我的实验动手和光学设计能力有了显著的提高。在此，谨向三位老师表示崇高的敬意和衷心的感谢。

在此，还要感谢中国科学院力学研究所的孙祉伟教授以及已毕业的徐升华博士，是他们将我带到我原本一窍不通的分散体系领域，让我能够在对这一领域有了一定认识后开展研究，完成我的毕业论文。孙老师思路开阔，在理论和实验上都有深厚的功底，使我学到了很多新的思考方式和研究方法。徐升华博士物理基础知识好，实验技能强，思维敏捷，也让我学习到了很多。

在实验室的这三年来，师兄弟姐妹在研究上都给了我很多关心和帮助，而平常大家的随意交流和娱乐活动也让我充分感受到实验室融洽的氛围，这些都缓解了我的工作压力，让我能够轻松地进行研究。

感谢在分散体系小组和我一同工作过的孟炳寰博士、任洪亮博士、庄礼辉硕士，感谢选键小组的同学对我们小组工作的配合，没有他们的配合，我的毕业论文的很多工作将无法完成。感谢王浩威老师、王自强老师、龚鋈博士、王忠硕士、吴建光硕士、谷勇强硕士，已经毕业的鲍建华硕士、沈为民硕士等同学，在我的研究过程中，他们都提了很多宝贵的建议。

感谢我的父母及其他家人，是他们给了我无私的关爱、鼓励和支持，没有他们，我不可能成长到今天并顺利完成我的学生生涯和科研工作。

感谢那些所有我应该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。希望在将来，我能有机会再为实验室贡献力量。

张文静

二零零六年四月于中国科学技术大学