

文章编号: 0258-7025(2004)06-0729-06

# 光镊技术中的纳米位移探测及其 测量误差讨论

陈洪涛<sup>1</sup>, 李银妹<sup>1</sup>, 楼立人<sup>2</sup>, 孙黎<sup>2</sup>, 张达<sup>2</sup>, 龚璠<sup>1</sup>

(中国科学技术大学<sup>1</sup> 选键化学开放实验室,<sup>2</sup> 物理系, 安徽 合肥 230026)

**摘要** 光镊系统可以实现微米粒子的纳米精度位移测量, 对该测量装置和方法及各种误差来源进行了分析。着重讨论了动态图像分析法, 包括灰度重心法和新发展了的幂次重心法、二次曲线拟合法。提出了一种对图像分析法进行评估的数值模拟方法, 对这三种算法引起的误差进行了数值模拟。结果表明, 方法误差与随机噪声的性质有关: 在本底噪声为主时, 二次曲线拟合法精度高, 计算量小。用四象限探测器和图像分析法对固定的微米小球进行了位置测量, 二者的标准偏差分别为 1 nm 和 0.3 nm。在纳米精度的位移测量的基础上, 可以实现光阱刚度的测量, 并进而测量了微米小球所受到的亚皮牛顿力。基于位移和刚度的精密测量, 微小力的测量可以达到飞牛顿量级。

**关键词** 光电子学; 纳米位移; 光镊; 皮牛顿力; 数据处理; 测量误差

**中图分类号** O 435 **文献标识码** A

## Detection of Nanometer Displacement in Optical-Tweezers and Its Related Measuring Errors

CHEN Hong-tao<sup>1</sup>, LI Yin-mei<sup>1</sup>, LOU Li-ren<sup>2</sup>,  
SUN Li<sup>2</sup>, ZHANG Da<sup>2</sup>, GONG Zhan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Open Lab. of Bond Selective Chemistry, <sup>2</sup>Department of Physics,  
University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China)

**Abstract** Optical Tweezers can be used in measuring nanometer displacements of a particle with several micron diameters. Methods of measurement and data processing, error sources are analyzed. The dynamic image analysis methods including the gray centroid method and new developed methods: exponent centroid method and parabolic fit method are discussed and compared. A numerical simulation method was developed to evaluate errors caused by these different methods and compared the errors of three data processing methods. The result shows that the parabolic fit method has a high precision with fewer computing time when the background noise is the main noise source. The position of a fixed particle is measured by the quadrant detect (QD) method and the dynamic image analysis method. The measurement standard deviation is 1 nm and 0.3 nm respectively. Based on nanometer displacement measurement, the trap stiffness can be got. Finally, a sub-PicoNewton external force which is applied on the particle is measured successfully. It shows that the resolution of force measurement can reach femto Newton order.

**Key words** optoelectronics; nanometer displacement; optical-tweezers; pico-Newton force; data-processing methods; measuring error

光镊是基于光的力学效应的技术手段<sup>[1,2]</sup>, 它具有能够对微小个体进行无机接触操作和静态、

动态力学量测量的功能。光镊技术的这一独特功能, 使它很快就在细胞亚细胞层次、微米尺度微粒的

收稿日期: 2002-12-16; 收到修改稿日期: 2003-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 10072062)和中国科学院知识创新工程院重大项目(KJCX1-06-05)。

作者简介: 陈洪涛(1976—), 男, 新疆人, 中国科学技术大学博士研究生, 主要从事光镊技术和光学微操作微加工的研究和应用。E-mail: htchen@mail.ustc.edu.cn

各种生物、物理研究工作中发挥了重要作用。研究人员将生物大分子黏附在微米量级的小球上,以微米小球作为“手柄”,通过光镊对该小球的操控,间接实现了对生物大分子的操控<sup>[3~6]</sup>,这使光镊技术成了研究生物大分子个体行为的有力工具。生物大分子层次的研究工作要求对它的位移操控和测量达到纳米精度。这一需求使光镊从微米操作精度的光学机械手,逐步发展到了可以实现微米小球的纳米精度的定位和位移测量<sup>[7,8]</sup>,而且可以作为力的传感器,进行皮牛顿量级力的测量。对纳米位移和皮牛顿力这样微小力学量的测量,实验和数据分析所带来的误差及其控制是十分重要的问题。如何改进测试方法,提高测量精度是用于生物大分子研究的光

镊系统的关键技术,故一直为研究人员所关注。

本文介绍了利用光镊系统实现微米小球纳米位移测量的方法,对各种误差来源进行了分析,着重讨论了微米小球动态图像的数据处理和分析方法,在常用的灰度重心法基础上,发展了幂次重心法和二次曲线拟合法。

## 1 实验装置

实验系统如图 1 所示,包括光镊(及其控制)和位移测量两大部分。整个装置架设在气垫光学平台上。

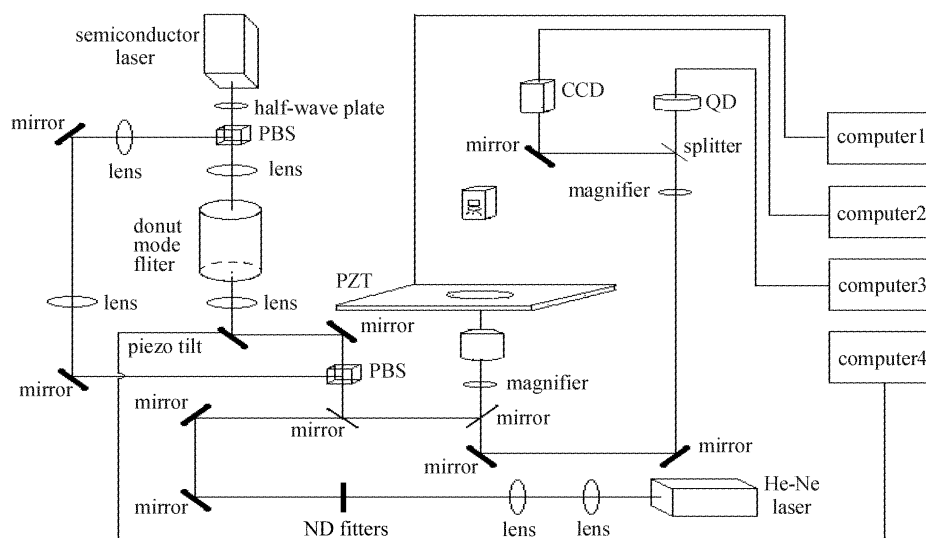


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Experimental setup

光镊部分采用输出功率为 10 mW 的 He-Ne 激光器和输出功率为 150 mW, 波长为 810 nm 的半导体激光器作为光源。He-Ne 激光具有良好的模式(基模)稳定性,形成的光镊可作为微小力传感器。激光束通过中性衰减片组改变光强,以适应不同测量范围的需要。随后经反射镜耦合至油浸物镜(100 $\times$ , NA 1.3),被强会聚形成光镊。

具有较高功率的半导体激光,通过半波片后被偏振分束棱镜(PBS)分成两束光。其中一束激光被扩束后,经过环形滤片变换成环形光,再由 PBS 将它与另一束激光汇合,经油浸物镜强会聚构成双光镊。其中环形光束作为扫描光镊,通过压电扫描转镜实现纳米步长的扫描。半导体光镊主要作为光学机械手与压电扫描平台一起进行样品的精确定位和

操作控制,也可用作力传感器。

位移测量部分由两路独立的测量系统构成。一路为四像限探测器位移测量系统,它通过对样品位置变化所引起的光场变化进行测量,来实现样品的位移测量。它可以实时地测量微米小球的位置改变,时间分辨率可达到 1 ms 或者更快。另一路为 CCD 相机图像采集和分析处理系统,利用对动态显微图像的分析来实现样品的位移测量,能够达到更高的测量精度。

## 2 测量方法和误差讨论

### 2.1 四像限探测器

四像限探测器是利用光电转换实现位移探测

的,具有较快的响应速度。当微米小球在水平方向位置变动时,在它探测面上的小球像的位置也随之发生变化,即照射在四像限探测器光敏面上的光强分布发生了改变。这样,四像限探测器将输出一带有位移信息的电压信号。在一定范围内,小球位置变化与输出电信号成线性关系,利用这个特点,可以实现纳米量级的位移探测<sup>[9]</sup>。

假设照明光场均匀,小球成像均匀对称。当小球像的半径  $r$  近似为探测面半径  $R$  的一半时,对于四像限加减求解方法<sup>[10]</sup>,线性区域在距离探测中心  $0.6r$  的范围内。理想条件下,误差主要来源于采集噪声。四像限探测器的探测精度与微米小球的材料、大小和成像状态等具体实验情况有关。

## 2.2 显微图像分析

用 CCD 相机记录微米小球运动的过程,获得小球运动的动态图像序列,其中每一帧图像包含了相应时刻的小球位移信息。为了实现亚像素精度的位移测量,采用相关运算图像分析方法<sup>[11]</sup>。这种方法能有效地抑制杂波信号和非目标信号的影响。选取图像序列中任意一帧图像作为标准图像,在标准图像上选出包含待测微米小球图像的区域作为模板,用它同每一帧图像做互相关运算。从相关处理后得到的相关图中求出的极值点或者灰度重心,精确地反映了小球像的位置。

计算极值点或灰度重心,除了常用的灰度重心法,还提出了二次曲线拟合法和幂次重心法。

1) 二次曲线拟合法:对相关图上最大值点和它周围的四个点,分别做  $x$  和  $y$  方向的二次曲线拟合,再求出拟合曲线的极值点。所得到的极值点,就代表了每幅图中小球像的位置。

2) 相关图重心法:相关图的灰度重心代表了每幅图中的小球像的位置。在重心法基础上提出了幂次重心法,即在计算灰度重心的时候,对相关图中各点的灰度值进行幂次运算,从而提高权重大的点的贡献。当幂次重心法中各点的权重系数都为 1 时,它就是重心法。

## 2.3 误差分析

要对纳米位移和皮牛顿、亚皮牛顿力进行精确的测量,实验环境、实验仪器、光路调节、数据采集以及后期数据处理等许多方面都会带来不同程度的影响。误差的主要来源包括:1) 设备调试不当产生的误差,如光阱横向和轴向调节误差、照明光源调节误差和视场中污点的影响。2) 测量所使用的工具本身不完善所引起的误差,如四像限探测器的 A/D 转

换等,CCD 照相机像素大小、灰度分辨能力的影响。3) 由于外界环境的影响而产生的误差,如样品池内温度变化造成的误差、外界振动引起的误差。4) 数据处理引起的误差,如方法误差、采集的数据点个数有限而引起的误差等。以上所述也是建立光镊系统所要考虑的影响因素,虽然不能完全定量估计,但是对系统的建设和测量精度的定性分析具有指导意义。

在实验测量中,由于图像分析方法不是直接实现对位移的测量,它需要通过数据处理和分析才能得到位移信息。因此后期数据处理方法对实验结果有着重要的影响,特别是随机噪声性质上的差异对不同分析方法的影响也有所不同。为了分析数据处理方法本身所带来的误差,采用数值模拟方法进行误差评估。通常模拟计算所采用的模型与实验研究对象几何和光学特性相关。要恰当评估不同数据处理方法的误差,就要选用适当的模型,包括标准信号和噪声信号。

以实验中最常用的聚苯乙烯小球作为模拟对象。在上述的图像分析方法中,当小球成像最清晰时,像和背景的反差较小,视场污点等噪声会带来较大的偏差。因此,实验中对小球离焦成像,使小球像和背景具有较大的反差。采集被光阱捕获的小球的离焦像,对其强度分布进行函数拟合并且归一化,作为标准信号。实验测量照明光场的强度起伏,发现随机噪声信号可以分解为两部分,一部分为幅度与采集点光场强度近似线性相关(即具有一定的信噪比)的噪声,另一部分为不依赖光场强度的幅度恒定的本底噪声信号。因此在每次模拟计算中,随机噪声信号为本底噪声和与信号线性相关的噪声之和。然后将标准信号与随机噪声信号叠加,便得到计算所需的信号模型。最后,针对所讨论的不同数据处理方法进行数值模拟,将结果与标准值(标准信号的极值点或灰度重心)进行对比,由此可确定不同方法的误差大小。

图 2(a)是  $3\ \mu\text{m}$  的聚苯乙烯小球通过 150 倍光学放大的离焦像,该小球像的强度分布如图 2(b)所示(选取一维情况)。该强度分布的主峰很接近高斯函数。对此主峰按高斯函数进行拟合并归一化后,取作标准信号。通过实验确定了本底噪声信号,其幅度约为最大采集光强的 0.3%。将标准信号、本底噪声信号和给定信噪比的噪声信号相加即为信号模型。用重心法、幂次重心法和二次曲线拟合法对信号模型进行数值模拟,将所得到的灰度重心或极值与标准值相比,得到了在不同信噪比(相同本底噪

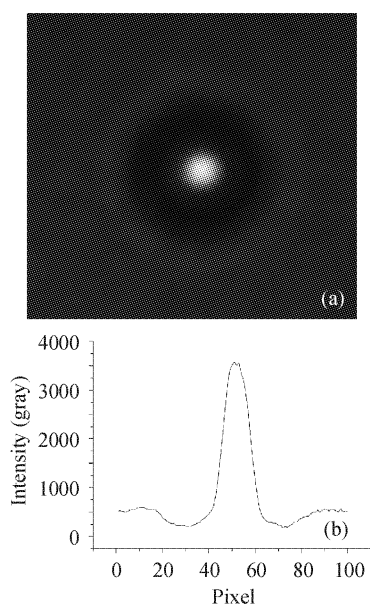


图 2 小球离焦像(a)及其强度分布(一维)(b)  
Fig. 2 (a) Out-of-focus bead image;  
(b) Intensity profile of bead image

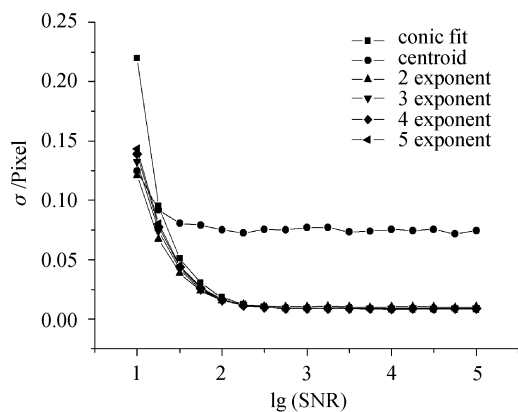


图 3 模拟计算结果比较  
Fig. 3 Comparison of results  
SNR: the signal-to-noise ratio;  $\sigma$ : standard deviation

声)情况下,随机噪声所引起的误差。

图 3 所示的 6 条曲线分别为二次曲线拟合法、重心法、幂次重心法(幂次分别为 2, 3, 4, 5)的数值模拟结果。图中每个点都为 1000 次计算的统计结果。图 3 中的横坐标为噪声中恒定信噪比分量的信噪比的对数,纵坐标代表模拟结果对标准值的均方根偏差。

由图 3 可见,幂次重心法提高幂次后,并没有明显的改善。在  $\lg(\text{SNR}) < 2$  的时候,高次幂次重心方法的误差略大于低次。当  $\lg(\text{SNR}) > 2$  时,高次幂次重心方法的误差要小于低次,但是当幂次高于 3(包括 3),这种提高并不大。重心法随着信噪比提

高其精度略有提高,但是当  $\lg(\text{SNR}) > 1.5$  时,基本没有改进。二次曲线方法在  $\lg(\text{SNR}) < 1.25$  时,偏差很大,随着信噪比的提高,效果明显提高。在  $1.5 < \lg(\text{SNR}) < 2$  时,它具有接近幂次重心法的精度。当  $\lg(\text{SNR}) > 2$  时,它的精度和 4 次,5 次幂次重心法接近,略优于低次幂次重心法。同时从曲线上可以看出,在信噪比较高的时候,误差已不随与光场强度线性相关的噪声分量的信噪比而变,也即误差主要来源于本底噪声。因为此时与信号线性相关的噪声分量,相对于大小恒定的本底噪声,它已变得很小,对结果的影响自然也很小。另外,幂次重心法和二次曲线法,在极值两边高强度区都有较高的权重,而重心法是等权的。在我们的模型中,本底噪声的幅度是恒定的。本底噪声分量为主,意味着对不同强度的信号,噪声幅度都相同,因而在高信号强度区,实际的信噪比也高。这导致了幂次重心法和二次曲线法的有效信噪比要高于重心法,因而在信噪比较高的时候,误差较小。

这三种方法有各自的优点和应用范围,幂次重心法效果最好,适应范围广,精度高,缺点是计算量太大,而且随着幂次的提高,精度并没有显著的改善;重心法在低信噪比的情况下具有和幂次重心法接近的精度,但是随着信噪比的提高,其误差要高于其他方法;二次曲线法在信噪比较小的情况下误差较大,但随着信噪比的提高,它的精度也明显提高,而且计算量小。基于此,可以根据具体情况和精度要求,考虑三种方法各自的特点,选择合适的方法进行实验数据的分析处理。

### 3 探测精度的实验测量

小球位移的测量精度受到诸多因素的影响,这些影响难以一一估计。本文采用直接测量静止微米小球位置的方法,对系统所能达到的测量精度进行评估。

将聚苯乙烯小球(直径  $3.063 \mu\text{m} \pm 0.027 \mu\text{m}$ )粘在样品池底部,样品池内充满蒸馏水,并密封样品池。小球经 150 倍光学放大离焦成像到探测器靶面,其强度分布如图 2 所示。对静止的小球进行测量。1) 图像分析法:曝光速度为每张 5 ms,采集灰度级别为 12 bit,采集 5000 张,然后进行二次曲线处理,得到代表小球位置的数据点。位置偏差的峰峰值约为 1.5 nm,线性拟合得到小球位移的标准偏差为 0.3 nm。2) 四像限探测器法:如前所述,四像

限探测器的成像要求不同于图像分析法,需要纵向调节四像限靶面位置,使小球像近似理想状态。采集间隔为 5 ms,采集 5000 个数据点。分析数据可得出位置偏差的峰峰值约为 7 nm,线性拟合得到小球位移标准偏差为 1 nm。图 4 给出了上述两种方法的测量结果(各截取了其中 1000 个数据点),图 4(a)为二次曲线拟合处理图像分析法得到的结果,图 4(b)为四像限探测器法得到的结果。

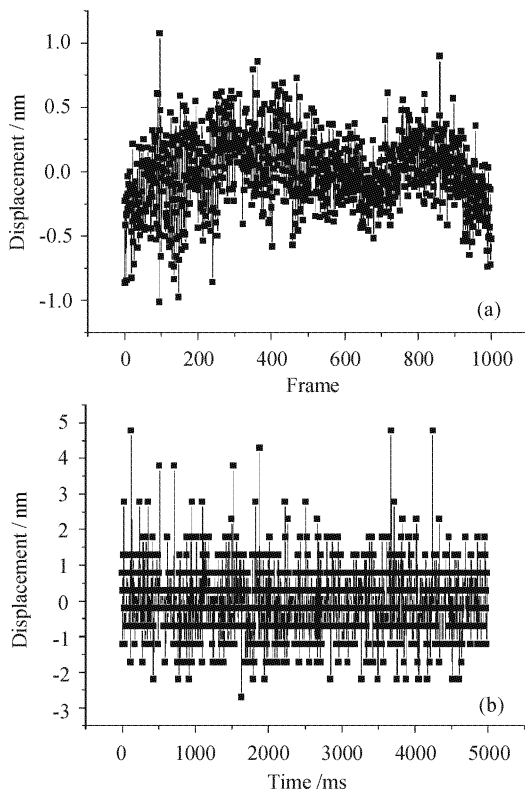


图 4 固定的微米小球位置测量

(a) 二次曲线拟合处理图像分析法得到的结果;

(b) 四像限探测器法得到的结果

Fig. 4 Results of the position measurement of a fixed bead

(a) parabolic fit method; (b) QD method

实验测量结果表明两套测量系统的位置分辨率均达到了纳米量级。四像限探测器的探测采集速度要远高于图像分析法,可以实时观察位移的变化;图像分析法精度较高,但是由于信号传输和处理的速度导致采集速度较低,而且还需要进一步的数据处理才能够最后得到位移信息,不能够实时观测精细的位移变化。将两种方法相结合,发挥各自优势,使纳米位移的实时测量成为可能。

## 4 纳米位移测量的应用——皮牛顿力测量

位移测量达到纳米精度,使得光镊技术不仅可以精细地研究生物大分子的运动特性,也使生物大分子之间微小相互作用力的测量,从皮牛顿量级拓展到更微小的量程,因而可以更精细地研究生物大分子的动力学行为。为此,从实验上考察了在纳米精度的光镊系统上所能达到的微小力测量水平。

利用光镊测量微小力是基于下述事实:在光镊中心的附近区域,光镊束缚小球的势阱近似于简谐势,小球受到的阱力  $F$  与其偏离平衡点的位移  $x$  成线性关系  $F = -K_x \cdot x$ ,其中  $K_x$  称之为光阱刚度。光阱刚度类似于弹簧的倔强系数,是光镊的重要力学特性。在对光阱刚度作了标定之后,微小阱力的测量就归结为微小位移的精确测量。

### 4.1 光阱刚度的标定——热运动分析法

光阱刚度的标定也依赖于微小位移的精确测量。光镊势场中的微米小球,在平衡点附近作无规则的热运动。位置分布的概率密度遵从 Boltzmann 定律<sup>[12]</sup>。对光镊中小球的位置反复进行测量,得到大量的小球热运动位移,统计得到小球位置概率分布的实验曲线。将实验曲线与理想简谐势模型下 Boltzmann 概率密度曲线相拟合,即可得到光阱刚度。

我们在不同的光镊(激光)功率下,对实验中常用的聚苯乙烯小球(同上)标定了光阱刚度。实验中,将聚苯乙烯小球的悬浮液置于密闭样品池内。测量被光镊捕获的小球的位置。每个激光功率采集 5000 帧图像,每帧的曝光时间为 4 ms,采集灰度为 12 bit。图 5(a),(b)给出了用重心法和二次曲线法得到的光阱刚度与激光功率的关系曲线。两种方法的结果符合得较好。光阱刚度与激光功率成线性关系。测量精度可达 fN/nm。

### 4.2 微小力的光镊测量

已知刚度的光镊,犹如一个弹簧,可以作为微小力的探针。作为一个应用实例,测量了微小的流体粘滞阻力。

一个小球相对周围液体环境以一定速度运动时,将受到液体环境的粘滞阻力。对微米量级的小球,每秒数十微米的速度,粘滞阻力仅为皮牛顿量级。我们用上述方法测量了这一粘滞阻力。

实验条件同上,激光功率为 20 mW 时,光阱刚度为 0.0061 pN/nm。用光镊捕获悬浮液中一个 3  $\mu\text{m}$  的聚苯乙烯小球。通过压电扫描平台使样品池

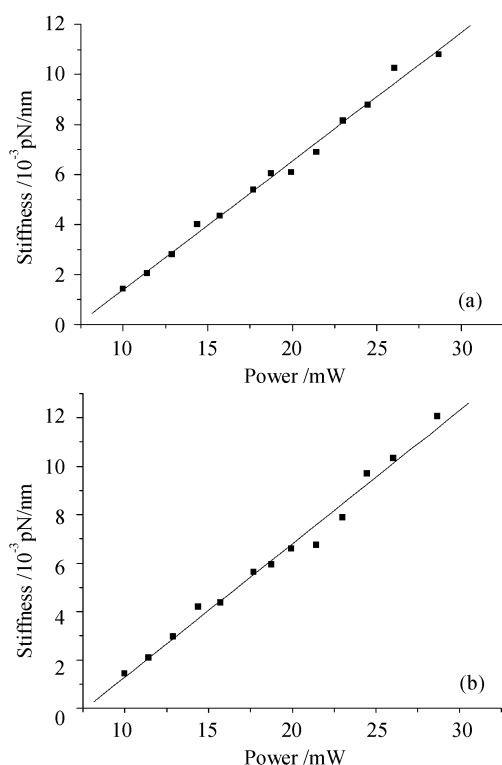


图5 功率-刚度关系

(a) 相关-重心法;(b) 相关-二次曲线法

Fig. 5 Power vs stiffness using

(a) crosscorrelation-centroid method;

(b) crosscorrelation-parabola method

沿水平面作周期性匀速率三角波运动(振幅  $27 \mu\text{m}$ , 周期 2 s),在单向运动过程中,小球处在新的平衡位置。采用动态图像分析方法测量小球位移,得到小球新的平衡点偏离其原始平衡位置为 107 nm。再由光阱刚度计算得到小球受到的光阱力为 0.65 pN。这与直接根据 Stokes 公式计算小球受到的粘滞阻力 0.77 pN 基本符合。由于光阱刚度的标定可以达到 fN/nm 的精度,这意味着力的测量精度可以达到飞牛顿量级。

## 5 结 论

针对纳米位移测量的误差问题,提出了一种对不同数据分析方法进行评估的模拟算法,并具体讨论了常用的灰度重心法和新发展的高次重心法与二次曲线拟合法。分析表明,三种数据处理方法所带来的误差与随机噪声的性质有关。在本底随机噪声为主的情况下,二次曲线拟合法具有接近高次重心法的高精度而计算量小的优点。结果也说明所采

用的数值模拟方法能够对不同数据处理过程的误差进行评估。

四像限探测器和动态图像分析装置组合在一起,使光镊系统具备了纳米空间精度、毫秒时间精度的分辨能力。分别用四像限探测器法和图像分析法对固定的微米小球的位置进行了测量,二者的标准偏差分别为 1 nm 和 0.3 nm。基于位移的准确测量,结合热运动分析方法,得到了反映光镊力学特点的重要参数——光阱刚度,并进而实现了微米小球所受到的亚皮牛顿力的测量。纳米位移和 fN/nm 刚度的测量精度表明微小力的测量可以达到飞牛顿量级。

## 参 考 文 献

- Li Yinmei. The Optical Tweezers: Principle, Technology and Application [M]. Hefei: Publishing Company of USTC, 1996. 8~18  
李银妹 编译. 光镊原理、技术和应用[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,1996. 8~18
- A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm *et al.*. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [J]. *Opt. Lett.*, 1986, **11**(5):288~290
- Amit D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich. Biomechanics, one molecule at a time [J]. *J. Biological Chemistry*, 1999, **274**:14517~14520
- Amit D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich *et al.*. Single-molecule biomechanics with optical methods [J]. *Science*, 1999, **283**:1689~1695
- K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp *et al.*. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry [J]. *Nature*, 1993, **365**:721~727
- J. T. Finer, R. M. Simmons, J. A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps [J]. *Nature*, 1994, **368**:113~119
- H. T. Chen, Y. M. Li, L. R. Lou *et al.*. High precision measurements in an optical tweezers for studying single biomolecule motion [C]. *SPIE*, 2001, **4536**:75~81
- Guo Hongliang, Yao Xingcheng, Li Zaolin *et al.*. Measuring displacement and force applied on particles in optical tweezers [J]. *Science in China (A)*, 2002, **32**(2):97~102  
郭红莲,姚新程,李兆霖等. 光镊系统中微小颗粒的位移和所受力的测量[J]. 中国科学(A辑), 2002, **32**(2):97~102
- R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu *et al.*. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap [J]. *Biophysical Journal*, 1996, **70**(4):1813~1822
- Feng Longling. Discussion of the signal processing technologies in the quadrant photodiode [J]. *Optics Technology*, 1995, (3):12~17  
冯龙龄. 浅析四像限光电探测系统中信号处理的技巧[J]. 光学技术, 1995, (3):12~17
- Jeff Gelles, B. J. Schnapp, M. P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometer-scale precision [J]. *Nature*, 1998, **391**:450~453
- E.-L. Florin, A. Pralle, E. H. K. Stelzer *et al.*. Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis [J]. *Appl. Phys. A*, 1998, **66**:S75~S78