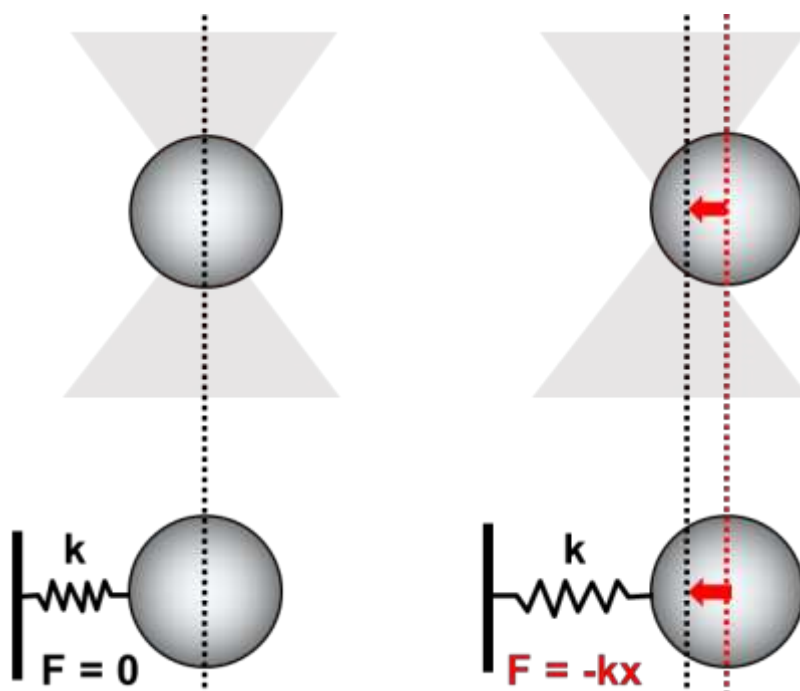


2-2. 光ピンセットの弾性率とは

光ピンセットにより、捕捉された粒子は、常に集光点に向かって力を受けるため、外力により変位が生じると、集光点からの距離に比例した復元力が働きます。したがって、捕捉した粒子の運動はバネのモデルとして考えることができます。レーザーの集光点の中心に粒子があることは、バネが自然長である状態となります。外力をうけて、粒子が集光点の中心から動かされると、変位 x の大きさに比例した復元力 F がはたらきます(フックの法則)。

$$F = -kx$$

このときの比例定数 k をトラップ弾性率(単位：pN/nm)と呼びます。



本製品はトラップ弾性率を調べるためのキット製品ですが、トラップ弾性率が分かるということは、変位 x を計測することによって、光ピンセットに加えられた微小な力を詳細に調べることができるようになります。

2-3. パワースペクトル密度を用いた弾性率の算出

レーザートラップでトラップされているビーズは、溶液の粘性抵抗とレーザートラップによる弾性力を受けています。さらに外力を $F(t)$ とすると、ビーズの運動方程式は、ランジュバン方程式

$$\gamma \frac{dx(t)}{dt} + kx(t) = F(t)$$

で表されます。 γ は粘性抵抗、 k はトラップ弾性率である。この式において外力 $F(t)$ はビーズのブラウン運動を駆動するランダムな力であり、この力の確率過程は平均値ゼロの定常ガウス過程です。したがって、ビーズのブラウン運動の平均をとると、

$$\langle F(t) \rangle = 0$$

となり、

$$\gamma \frac{d\langle x \rangle}{dt} + k\langle x \rangle = 0$$

で表されます。この解から、ビーズの運動の緩和時間 τ_0 は、

$$\tau_0 = \frac{\gamma}{k}$$

で定義されます。

また、このとき、ボルツマンのエネルギー等分配則から、

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k \langle x^2 \rangle$$

が成り立ちます。 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度です。

ここで、自己相関関数とパワースペクトル密度について考えます。今回の場合、自己相関関数 C_{xx} は、

$$C_{xx} = \langle x^2 \rangle \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_0}}$$

で表されます。また、ウィナー・ヒンチンの定理より自己相関関数とパワースペクトル密度 $\phi(\omega)$ はフーリエ関数で結ばれることがわかっているので、

$$\phi(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} C_{xx}(\tau) \cdot e^{i\omega\tau} d\tau$$

と表され、自己相関関数を代入して計算すると、

$$\phi(\omega) = \frac{1}{2\pi} \cdot \frac{\langle x^2 \rangle \tau_0}{1 + (\tau_0 \omega)^2}$$

となり、角速度 ω を周波数 f で書き直すと、

$$\phi(f) = \frac{\frac{2k_B T \gamma}{k}}{1 + \left(\frac{2\tau f \gamma}{k}\right)^2}$$

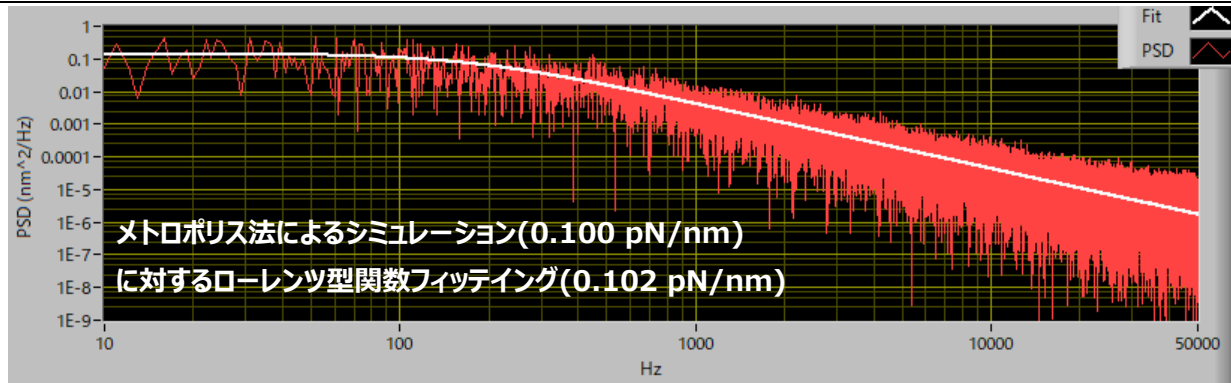
となります。ここで、 $f = 0$ のときの $\phi(0)$ とコーナー周波数 f_c を

$$\begin{aligned} \phi(0) &= \frac{2k_B T \gamma}{k} \\ f_c &= \frac{k}{2\pi\gamma} \end{aligned}$$

と定義すると、

$$\phi(f) = \frac{\phi(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2}$$

となります。



ここで、

$f \ll f_c$ の場合

$$\phi(f) \approx \phi(0)$$

$f = f_c$ の場合

$$\phi(f) \approx \frac{\phi(0)}{2}$$

$f \gg f_c$ の場合、

$$\phi(f) = \phi(0) f_c^2 \cdot \frac{1}{f^2}$$

となります。この 3 つの式から、パワースペクトル密度 $\phi(f)$ を周波数 f に対してプロットし、両対数グラフに表すと、 $f \ll f_c$ のとき、 $\phi(f)$ は一定で $\phi(0)$ となり、 $f \gg f_c$ において、 $\phi(f)$ は、 f^2 で減衰します。つまり、コーナー周波数より大きい周波数領域では、ナノ計測用ビーズは変位についていけず、シグナルは減衰します。

パワースペクトル密度

$$\phi(f) = \frac{\phi(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2}$$

について積分すると、

$$\int_0^\infty \phi(f) df = \int_0^\infty \frac{\phi(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} df = \left[\arctan\left(\frac{f}{f_c}\right) \right]_0^\infty = \frac{\pi \phi(0) f_c}{2}$$

となり、これが変位分散 $\langle x^2 \rangle$ と等しいことから

$$\langle x^2 \rangle = \frac{\pi \phi(0) f_c}{2}$$

エネルギー等分配則

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k \langle x^2 \rangle$$

より

$$k = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} = \frac{2 k_B T}{\pi \phi(0) f_c}$$

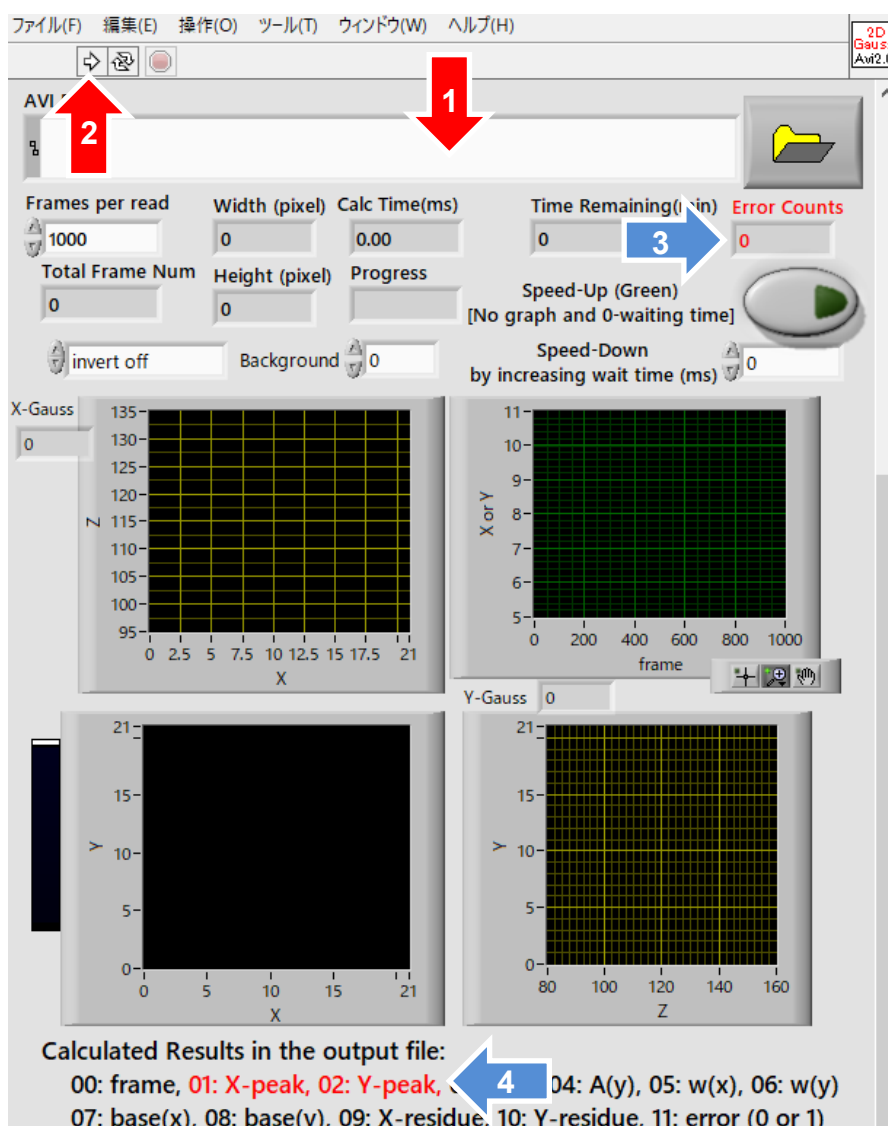
となります。

このように、パワースペクトル密度から、 f_c [Hz] と $\phi(0)$ [nm²/Hz] を実験結果から見積もることによって、トラップ弾性率 k を計算することができます。

5-4. 重心数値化ソフトによる解析 (2D-Gauss-2019-32.exe)

録画された 1 μ m ビーズの重心を数値化するソフトウェアです。グラフ表示をゆっくり確認しながら計算したり、グラフ表示を止めて高速計算させることができます(計算途中での切替が可能)。

① 基本的な使用方法



赤矢印 1) ビーズ画像を切り出した ROI 動画 AVI ファイル(非圧縮形式)を選択します。AVI Path にマウス操作でドロップする、あるいは、AVI Path のフォルダ図クリックから指定します。

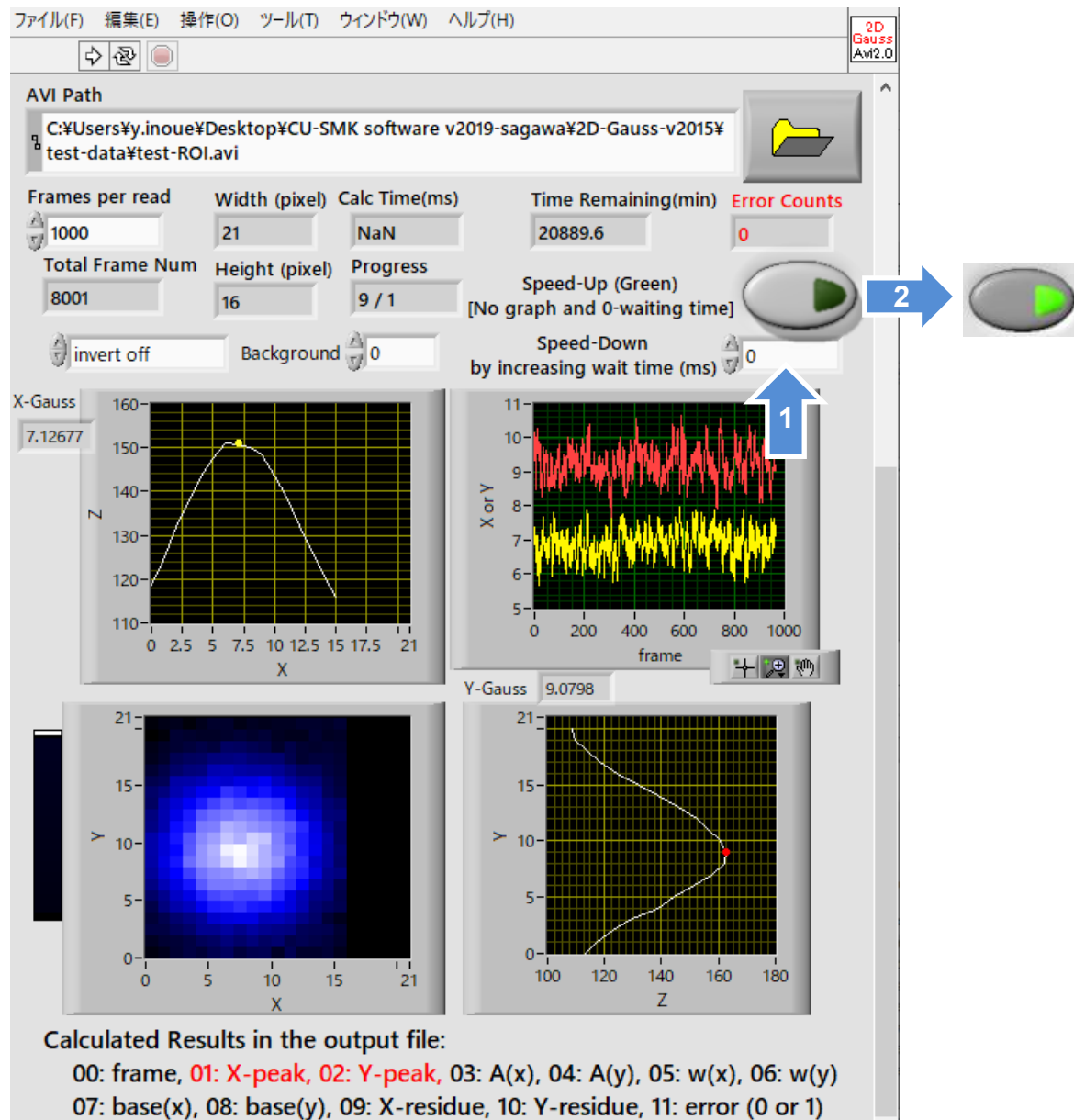
赤矢印 2) 右向きの白矢印ボタンをクリックすると、ガウスフィット計算を開始します。「Frames per read」を単位数として、「Progress」に進展状況が表示されます。

青矢印 3) Gauss フィットに問題が生じた場合には、該当フレーム数が Error Count に数値表示されます。

Error Count が 1 で連続データは 2 分割されますので、全フレーム数での解析を行うためには、Error Count をゼロにする必要があります。Error Count をゼロにするには、録画時の画像が適切に山型であることが重要です。また、ImageJ でフィルタを適用することで Error Count が改善される場合があります。

青矢印 4) 計算結果は、表記列順番で書き込まれたテキストファイルとして、AVI ファイルと同フォルダに出力されます。例として、DATA1.avi を解析すると、DATA1-2gauss.txt が書き出されます。

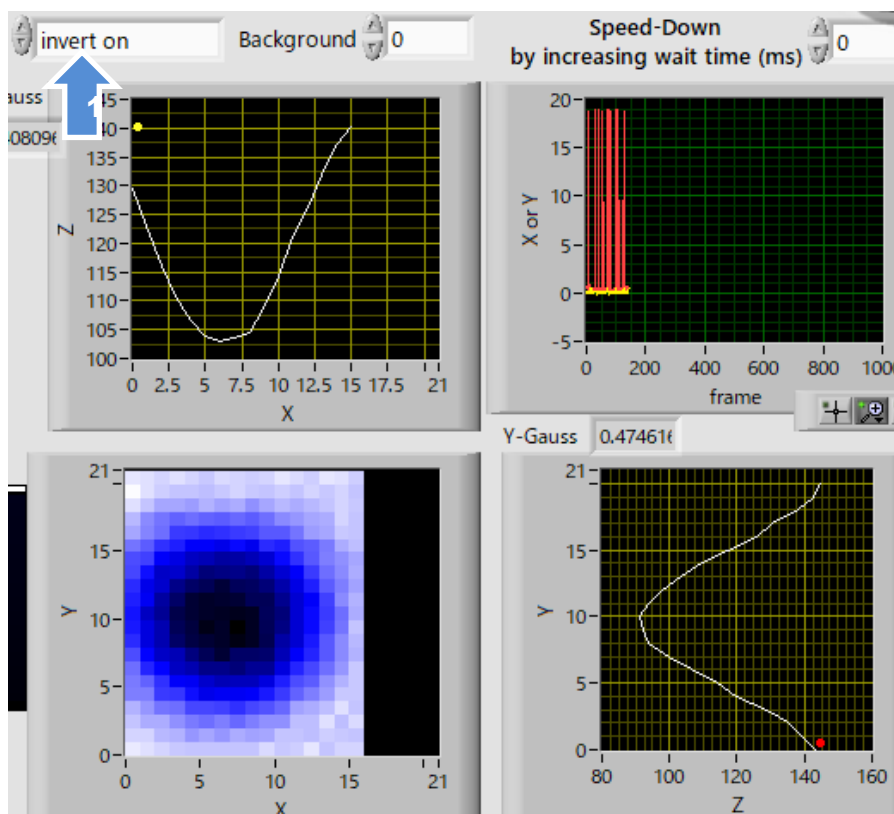
② 速度調整



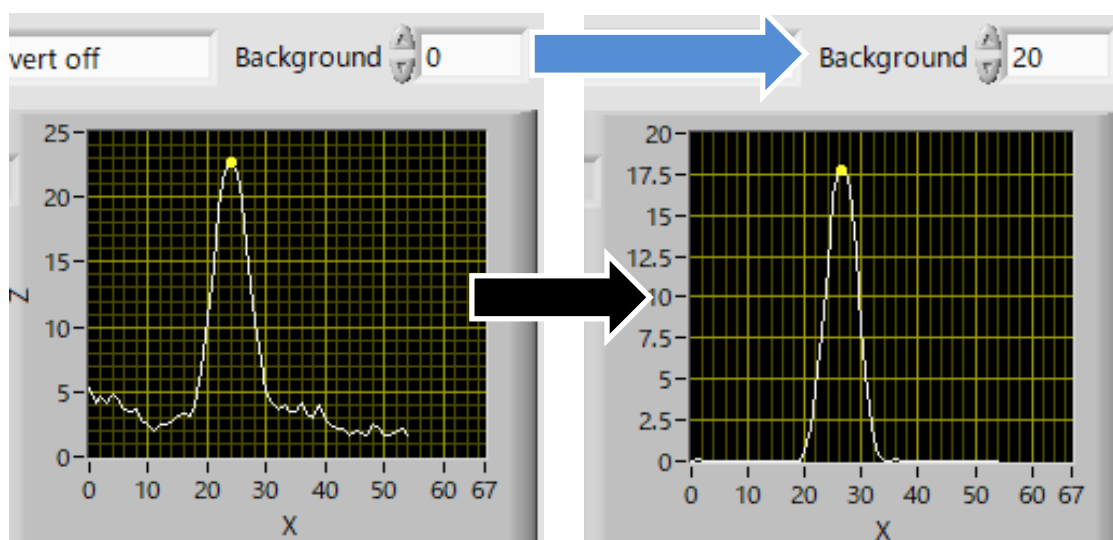
青矢印 1) 計算結果をゆっくりグラフで確認したい場合は、wait time を ms 単位で入力します。wait time は、計算中でも変更可能です。

青矢印 2) グラフ表示を停止して計算を高速化したい場合は、Speed-Up ボタンを押して、右側のような明るいグリーン表示にします。このとき wait time もゼロに戻されます。Speed-Up ボタンによるグラフ表示/停止切替は、計算途中でも変更可能です。

③ その他の機能

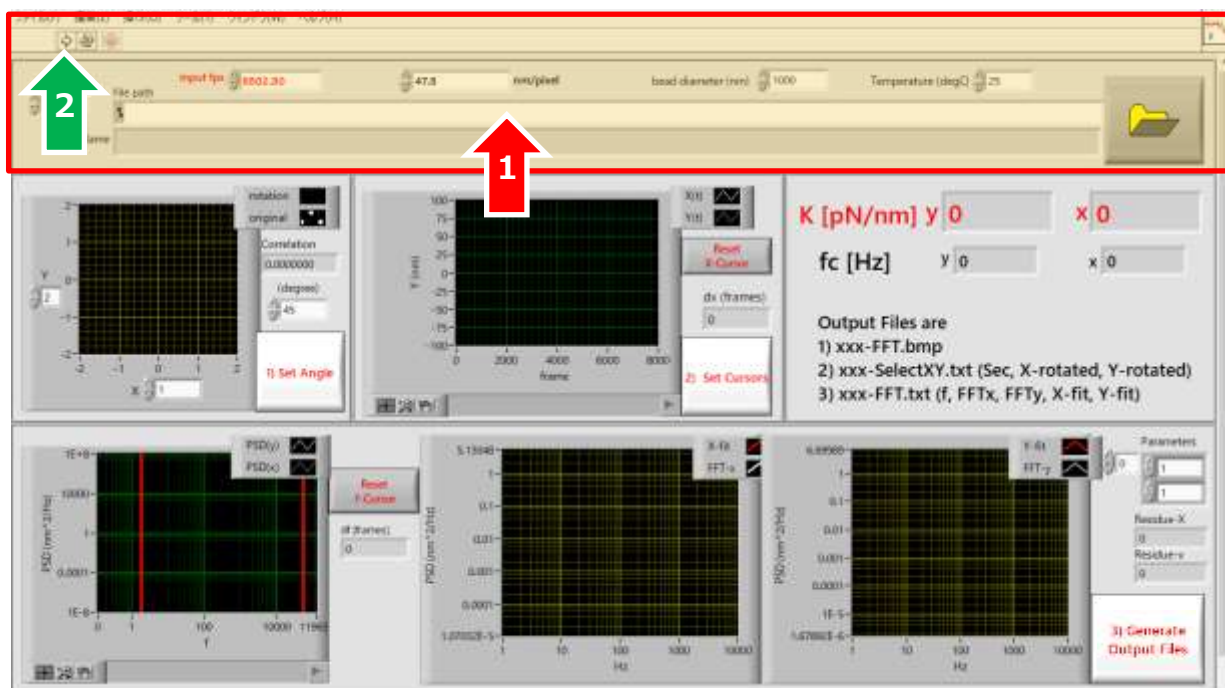


青矢印) invert on/invert off の切替で、8ビット画像の輝度を反転させます。白黒反転した画像の場合はご利用ください。invert on/invert off の切替は計算中に変更できません。



青矢印) Background に数値入力すると、バックグラウンド除去を行います。Gauss フィットが失敗しやすいときには有効になる場合があります。Background 値入力は、計算途中でも変更可能です。

5-5. 弾性率計算ソフトによる解析(k-psd-2019-32.exe)



赤矢印 1) ガウスフィットしたテキストファイル(例, DATA1-2gauss.txt)を選択します。File Path にマウス操作でドロップする、あるいは、File Path のフォルダ図クリックから指定します。また以下パラメータも同様に設定します。

Input fps: 実験で用いたフレームレートです。(LMS-SMK では最速 8802.8 fps)

nm/pixel: 画面のピクセル長換算値です。100 倍対物で LMS-SMK を用いた場合は、通常 47.8 です。

bead diameter (nm): 1 μm ビーズの場合は 1000 nm です。

Temperature (degC): 溶液温度($^{\circ}\text{C}$)を入力します。

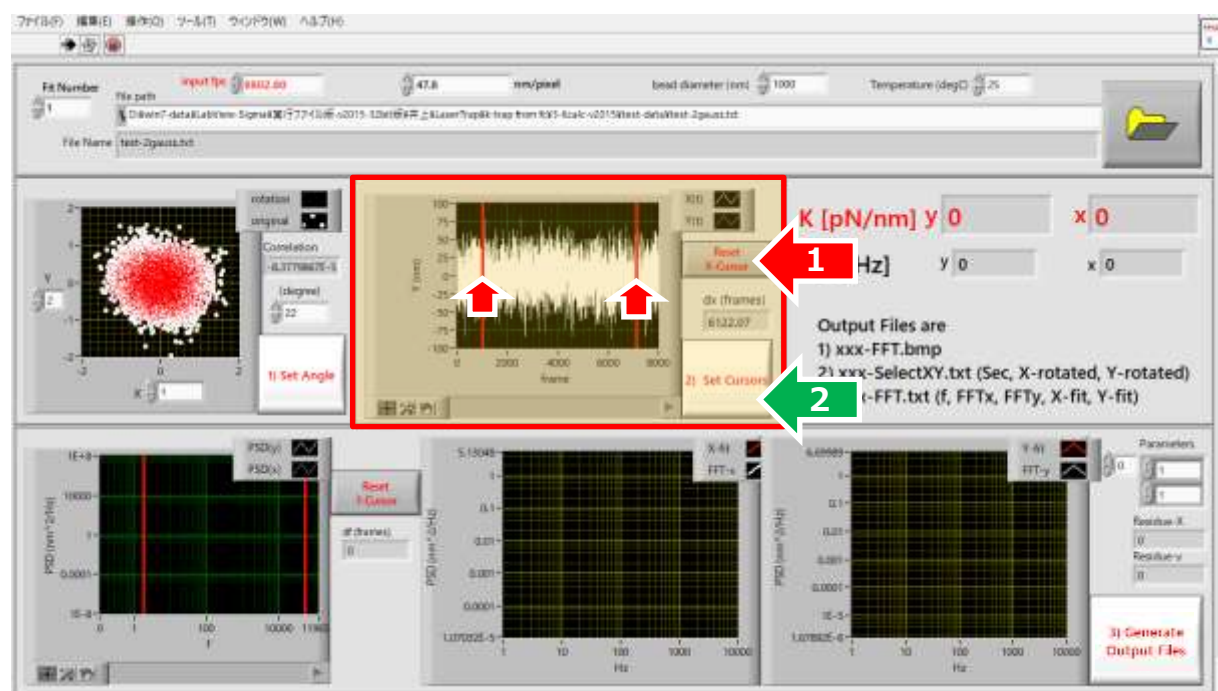
Fit Number: 解析パラメータや対象区間を変えるなど、同じデータで複数回計算したい場合に利用します。

緑矢印 2) 右向きの白矢印ボタンをクリックすると、計算を開始します。計算は 3 ステップに分かれており、それぞれ 1) Set Angle, 2) Set Cursors, 3) Generate Output Files を押すことで進行します。緑矢印は次のステップに進行するボタンです。



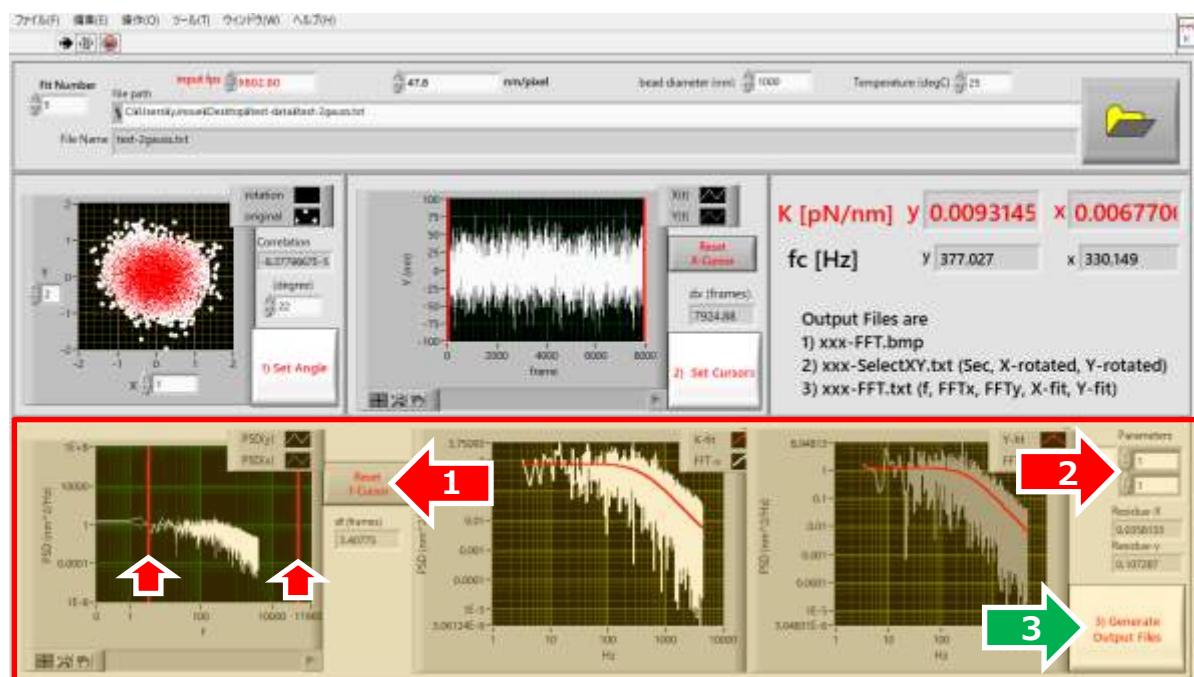
赤矢印 1) 楕円レーザーを用いた場合は、XY プロットが楕円となりますので、回転角度を与えて楕円の長軸を調整します。角度(degree)を 1 度ずつ変化させるごとに、相関係数 Correlation が変化します。相関係数が最もゼロも近づいて、楕円長軸が X 軸方向になるように調整します。(真円度の高いレーザーをお使いの場合は調整不要です。)

緑矢印 2) 上記角度調整が終了したら、Set Angle をクリックして次のステップへ移ります。



赤矢印 1) X および Y のフレームに対するプロットについて参照範囲を設定します。2 本の赤カーソルバーをマウスでそれぞれドラッグ操作することで、挟まれた範囲を指定します。全フレーム領域での計算が望まれますが、人為的なシグナルが含まれる場合には、取り除くことが可能になります。2 本の赤いカーソルバーが表示されていない場合は、Reset X-Cursor を押すと表示されるようになります。

緑矢印 2) 上記角度調整が終了したら、Set Angle をクリックして次のステップへ移ります。



赤矢印 1) フーリエ変換とローレンツ型関数フィッティングを行います。左図のパワースペクトル密度(PSD)に対して、2本の赤カーソルバーをマウスでそれぞれドラッグ操作することで、挟まれた範囲を指定します。指定範囲にしたがって、FFT(x), FFT(y)のフィッティングが実行されます（中央図および右側図）。幅広い周波数領域での計算が望まれますが、人為的な低周波がある場合には、取り除くことが可能になります。

赤矢印 2) 上記フィッティングが外れている場合には、初期パラメータの桁を変えてください。2つのパラメータのうち、1つ目は PSD(縦軸方向)、2つ目は Hz (横軸方向)にそれぞれ影響を与えます。

緑矢印 3) 上記フィッティングが終了したら、Generate Output Files をクリックするとファイル出力と共にプログラムが終了します。弾性率の計算結果(pN/nm)は、x 方向と y 方向について表示されています。また、関連する各種パラメータも下部に表記されますのでご参照ください。

出力されるファイルは 3 種類であり、プログラム画面上に表記されている通り、ビットマップ画像と 2 つのテキストファイルです。

Output Files are

- 1) xxx-FFT.bmp
- 2) xxx-SelectXY.txt (Sec, X-rotated, Y-rotated)
- 3) xxx-FFT.txt (f, FFTx, FFTy, X-fit, Y-fit)

- DATA1-2gauss.txt
- DATA1-2gauss-01-FFT.bmp
- DATA1-2gauss-01-FFT.txt
- DATA1-2gauss-01-SelectXY.txt