

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用奈米技術設計與製作大腸桿菌生物幫浦 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2221-E-009-047-
執行期間：97年08月01日至99年01月31日
執行單位：國立交通大學電子物理學系(所)

計畫主持人：徐琅
共同主持人：彭慧玲

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99年03月09日

利用奈米技術設計與製作大腸桿菌生物幫浦

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC97-2221-E-009-047-

執行期間：097年08月01日至099年01月31日

計畫主持人：徐琅/副教授

共同主持人：彭慧玲/副教授

計畫參與人員：曾勝陽，張雅程

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學電子物理系

中華民國 98 年 12 月 18 日

研究計畫中英文摘要：

(一) 計畫中文摘要。

關鍵字：奈米技術，大腸桿菌，生物幫浦，空間光相位調變器，全像光學鑷夾，微流管道

自 2005 年至今，我們執行一個三年期的國科會國家型奈米計畫：“利用奈米技術探討細菌與寄主細胞之交互作用”；藉由量測大腸桿菌 (*E. coli*) 外膜的第三型線毛 (Type 3 Pili) 的機械特性，探討線毛在感染過程中的黏附作用機制。我們和大腸桿菌相處三年，對這種會游泳的細菌之游泳能力產生相當大的興趣。我們好奇如果能適當安排一群大腸桿菌持續“游泳踢水”，並巧妙整合其踢水的方向與力量，或將可以發明一種水溶液中的生物幫浦。因此，在本計畫中我們希望先分析大腸桿菌游泳的力量與機制，進而適當運用這種自然的生物力量，最後設計並製作出一種生物幫浦。

計畫中所提出的生物幫浦的原理是整合細菌游泳時所帶動的水流，因此我們需要一套可以在顯微鏡下同時捕捉多隻細菌與限制其游泳路徑的系統。全像光學鑷夾 (holographic optical tweezers HOT) 是藉由在雷射鑷夾中引入一個電腦控制的空間光調變器 (spatial light modulator SLM)，達成動態控制捕捉陷阱的數量與形狀。藉由此套系統我們可以同時操控多隻細菌與控制其運動方式。因此，本計畫的目標即為架設一套全像光學鑷夾 (holographic optical tweezers HOT)。

在此計畫中，我們如預期的架設了一套 HOT 系統，並且利用此套系統產生了環形的捕捉陷阱。此外我們也完成了一套圖形式的使用者介面，使用者能更方便的利用 Zaf 下的物體。

(二) 計畫英文摘要。

Keywords: Nanotechniques, *E. coli*, Bio Pump, Spatial Light Modulator, Holographic Optical Tweezers, Microchannel

In our 2005~2007 National Nanoscience and Nanotechnology Program: “By using nanotechniques to explore bacteria-host cell interaction”, we have been studying *E. coli* for the relationship between the mechanical properties of their type 3 pili and the corresponding physiology of adhesion during infection. Over the three years with *E. coli*, we are interested in the swimming of such bacteria. Therefore, we wonder whether the capability of swimming can be utilized to develop a novel *E. coli* bio-pump in liquid. For this purpose, we intend to study the swimming mechanism of *E. coli* for the realization of the bio pump.

The principle of the bio-pump is based on coordinating the water flow caused by swimming bacteria, so a system which is capable of capturing bacteria and restricting the swimming path of bacteria under microscope at the same time is required. Holographic optical tweezers (HOT) can create multiple traps with various properties dynamically by incorporating a computer-controlled spatial light modulator (SLM) in optical tweezers. Many objects can be manipulated simultaneously by using HOT. The first step of the project is thus to construct HOT to control the motions of bacteria.

In this project, we have accomplished setting up a HOT system and utilizing HOT to create ring traps as planned. In addition, we also developed a graphic user interface to provide a much easier way to manipulate multiple objects under microscope.

研究計畫之背景及目的：

傳統雷射鑷夾功能、特色與應用：單一捕捉點，非破壞性，生物研究

雷射鑷夾利用雷射光操控微粒子，具有非侵入性、非接觸性之光學作用力。此外，近年來研究發現，在使用近紅外波長的雷射光以進行捕捉生物體時，較不易傷害生物。所以目前，雷射鑷夾已經被當作重要的技術在生物科技的研究上，例如細胞組織排列[1]、細菌光損害研究[2]，或是各種生物力的量測。

全像雷射鑷夾特色：多個捕捉點，同時操控多個物體

然而，針對傳統雷射鑷夾而言，是藉由一道雷射光束經過顯微物鏡聚焦，而僅只會產生一個捕捉點，如圖一所示，因此就只能操控單一物體。近十年來，有些研究者為了創造多點捕捉操控之功能，進而將液晶顯示器結合雷射鑷夾技術以調變雷射光的空間相位分布，達到多樣圖案之光捕捉功能，例如多點陣列[3]、線型[4]、漩渦型[5]等。

全像雷射鑷夾發展背景：M. Reicherter & David G. Grier

這種全像雷射鑷夾的設計想法源自於 1999 年，M. Reicherter, T. Haist, E. H. Wagemann, H. J. Tiziani [3]首先利用這個技術，不但在物鏡的焦平面產生多個亮環，而且每個亮環的位置與半徑都可以獨立且動態地改變[6]。直到 2002 年，David G. Grier 提出動態全像光學鑷夾 (Holographic Optical Tweezers; HOT)[7]。他們根據計算所需的相位圖樣，控制雷射鑷夾中的雷射光在樣品上的光強度分布，不僅能產生多個動態捕捉點，並且可獨立控制每一個捕捉點的各項功能，延伸這項技術的應用彈性。

本計畫的動機與生物意義：整合大腸桿菌游泳的力量，發明一種生物幫浦

在國家型奈米計畫中，我們和大腸桿菌相處三年，對這種會游泳的細菌之游泳能力產生相當大的好奇與興趣。如同其他會游泳的細菌一樣，有鞭毛的大腸桿菌利用其內嵌在細胞壁的旋轉馬達帶動結構為左旋的鞭毛運動。當旋轉馬達逆時針轉動時，左旋鞭毛會被捆成一束而規律地旋轉，使細菌游泳前進。反之，當旋轉馬達順時針轉動時，則左旋鞭毛不會被捆成一束，結果細菌只是翻轉而不前進。然而，我們注意到細菌無論游泳或翻轉都可以推動水流，如同我們游泳時腳“踢水”一樣。如果我們能適當安排運用一群大腸桿菌持續“踢水”，並統一其踢水的方向，將可以發明一種水溶液中的生物幫浦。

此外，在寬度僅約數十微米的微流管道中控制流速是相當困難的。一般利用微機電製程製作的微型幫浦，尺度約在毫米到 0.1 毫米[8-10]，是由靜電或熱能驅動，但是在 100 倍物鏡下由 CCD 擷取訊號得到的畫面，整個視野大小約為 67 微米，加上一般細菌約數個微米大小，微流管道最小約 20 微米大小，使現有的微型幫浦要在微流管道中控制流速應用在細菌或細胞相關實驗會有困難，並且微型幫浦由靜電或熱能驅動也可能會限制細菌或細胞實驗內容。

本計畫的目的：研究大腸桿菌游泳的力量與機制，設計並製作一生物幫浦

於是，我們利用過去幾年在雷射鑷夾與在奈米生物科技累積的經驗與能力，希望先分析大腸桿菌游泳的力量與機制，進而適當運用這種自然的生物力量，最後設計並製作出一種水

溶液中的生物幫浦。

本計畫的各年度目標：

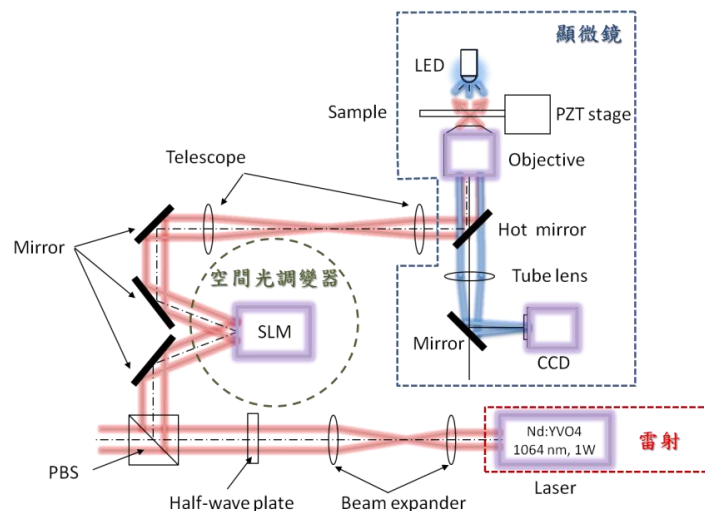
為此，本計畫擬在第一年架設一套動態全像雷射鐳夾系統，並用以產生一個漩渦型捕捉亮環。第二年，將大腸桿菌侷限在此一漩渦型亮環內游泳，並利用量化大腸桿菌游泳的速度與力量大小，然後量測影響大腸桿菌游泳的條件，如溫度、光損害、或酸鹼值(pH)等，最後找到大腸桿菌游泳的最佳條件。第三年，利用全像雷射鐳夾製作多樣性的捕捉圖案，安排一群大腸桿菌在最佳條件下“游泳踢水”，並利用微流管道技術整合其踢水力量，希望能製作出一種水溶液中的生物幫浦。圖四為此概念的示意圖：一群大腸桿菌被侷限在兩個全像雷射鐳夾漩渦型亮環內巡迴“游泳踢水”，其游泳推動水流的方式有如兩個對稱的渦流，使得兩渦流中間產生力量集中且方向集中的幫浦效果。

研究方法與結果：

本計畫為三年計劃的第一年計畫。此三年計劃的主要目標是利用全像光學鐳夾系統研究大腸桿菌游泳的力量與機制，設計並製作一生物幫浦。而本計畫主要的目的是架設一套動態全像光學鐳夾(Holographic Optical Tweezers HOT)系統同時操控多個生物樣品，並用以產生一個環型捕捉陷阱，限制游泳細菌的路徑。本計畫主要已完成的工作包含下列幾項: 1.全像光學鐳夾系統之架設，2.圖形式使用者介面之建立，3.環型光強度分布之產生。下面我們將分別說明上列幾項工作的成果內容。

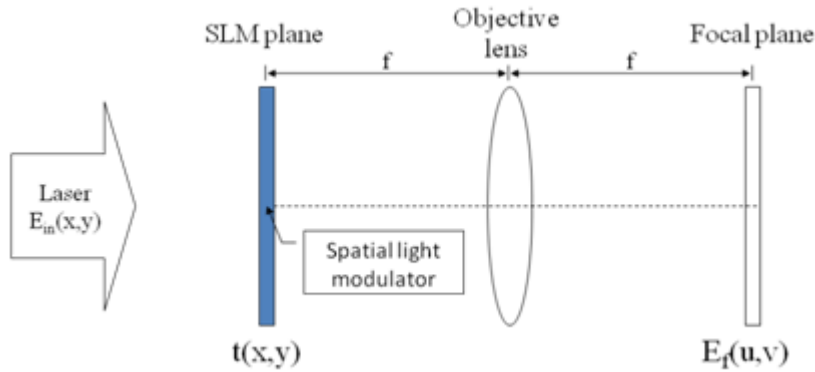
全像光學鐳夾系統之架設：

HOT[7]是一種利用多個高度聚焦的雷射光點，捕捉與操控多個微米尺度粒子的裝置。此套系統中主要的儀器包含一雷射光源、空間光調變器(Spatial Light Modulator SLM)與顯微鏡，如圖一所示。從雷射本體發出的雷射光束會先經過透鏡組(Beam expander)、半波板(Half-wave plate)、分光鏡(PBS)、與面鏡(Mirror)後到達 SLM，從 SLM 反射出來光再經過透鏡組(Telescope)與熱反射鏡(HOT mirror)後，穿過顯微物鏡(Objective)，聚焦在樣品空間中，產生捕捉光點。樣品的影像由 LED 照亮後，經過顯微物鏡與透鏡(Tube lens)成像在攝影機(CCD)上。



圖一 全像光學鑷夾光路架設。

由於系統中的 SLM 在經過透鏡組後會成像在顯微物鏡的後焦平面上，因此 HOT 可以簡化為圖二的結構。入射的雷射光經過 SLM 調變後，經過顯微物鏡聚焦在焦平面上產生所需的光場分布。



圖二 HOT 架設示意圖。

從富氏光學[11]中可以知道，在剛離開 SLM 平面的光場分布， $E_{in}(x,y)t(x,y)$ ，與焦平面上的光場分布 $E_f(u,v)$ 的關係是一個簡單的富氏轉換，即

$$E_f(u,v) = F\{E_{in}(x,y)t(x,y)\}_{f_x=\frac{u}{\lambda f}, f_y=\frac{v}{\lambda f}}, \quad (2-1)$$

其中 $E_{in}(x,y)$ 為入射光場、 $t(x,y)$ 為 SLM 的穿透函數、 f_x 與 f_y 分別為富氏轉換後 x 方向與 y 方向的空間頻率。

如果所需的光場為已知，則 SLM 所需產生的穿透函數為將 $E_f(u,v)$ 反富氏轉換後再除以入射光場，即

$$t(x,y) = F^{-1}\{E_f(u,v)\}/E_{in}(x,y)。 \quad (2-2)$$

由於 HOT 中所使用的 SLM 只能調變光的相位分布，即 $t(x,y)$ 的絕對值大小只能是一。但是當以上式計算所需的 $t(x,y)$ 時，所得到的 $t(x,y)$ 的絕對值並不一定是一，因此無法完全控制光場的分布(強度分布與相位分布)。不過由於光學鑷夾的捕捉力只與光強度有關，所以有許多研究者發展了不同的演算法計算產生所需強度分布的相位圖樣[6-7, 12]。

我們採用文獻[7]所提出的演算法，利用 MATLAB 計算所需的相位分布，並將計算的結果輸入到 SLM 上，產生多個捕捉點。在產生 5 個捕捉點、電腦 CPU 為 Intel Core 2 Duo E6850 3 GHz、記憶體為 2GB 與 MATLAB 的版本為 2008a 的情況下，相位分布的計算速度大約是每秒兩張。

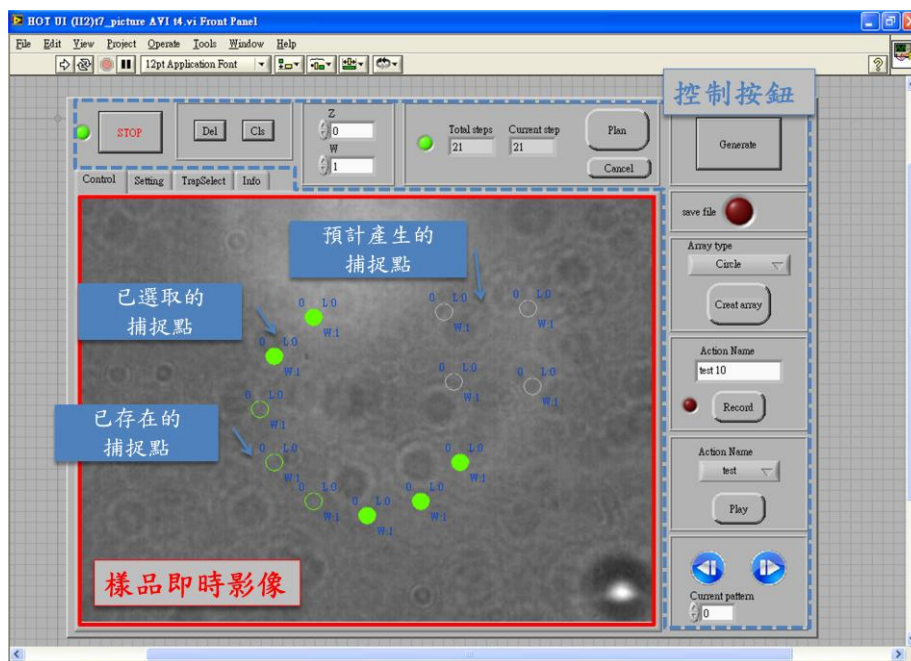
圖形式使用者介面之建立

由於控制 HOT 中捕捉光點的位置與運動必須具備許多知識，如富氏光學，電腦全像術，與數學軟體(如 MATLAB)等，對於一般不具相關知識的使用者會造成使用上的障礙。此外在此介面程式建立之前，樣品的即時影像則是由顯微鏡上的 CCD 擷取，直接顯示在獨立的螢幕上。當使用者想要捕捉顯微鏡下某一個目標物時，使用者必須先估計目標物在螢幕畫面中的座標，再轉換成相關參數輸入 MATLAB 計算出所需的相位分布。而計算所得的相位分

布再以圖片的形式顯示在 SLM 上，產生所需的捕捉點捕捉目標物。由於系統的操作過程需要在不同的程式間切換，且相關參數必須手動輸入，因此當使用者完成整個過程後，目標物通常也不在原本的位置上。此外由於目標物的座標是以目測的方式決定，有時最後產生的捕捉點會不在預期的位置上，造成操作上的困擾。這些複雜的操作步驟不僅會造成系統使用上的不便，同時也讓使用者無法專注於實驗本身。

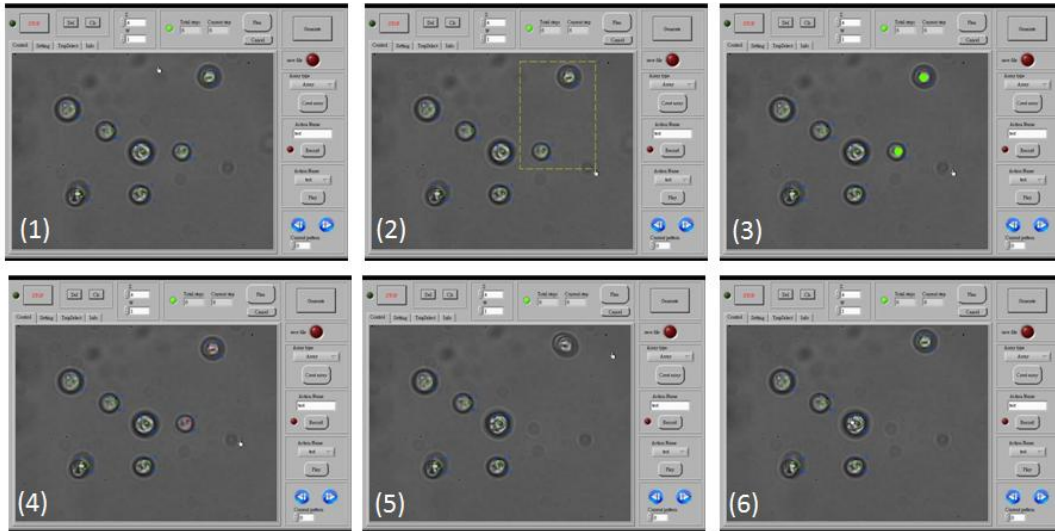
因此我們利用 LabVIEW 建立一套整合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面。在此介面程式中，顯微鏡中樣品的即時影像會顯示在介面程式上。使用者利用滑鼠游標在樣品影像上直接點選，藉此產生、刪除或移動捕捉點。介面程式會根據使用者所輸入的資訊，計算所需的相位分布，並將所計算的結果顯示在 SLM 上更新捕捉點。使用者可以坐在電腦前，輕鬆的利用滑鼠點選，操控顯微鏡下微米尺度的粒子。讓使用者能專注在實驗的進行上，而非系統的操作上，即使是非相關領域的人也能輕鬆使用。

圖三是介面程式外觀。在圖三中，紅色實線所包圍的部分為顯微鏡下樣品的即時影像。使用者可以直接利用滑鼠游標在樣品的即時影像上點選，選擇產生捕捉點的位置或是指定已捕捉到的物體要移動的目的地。由於系統中的雷射光點已被濾光片擋住，在樣品的即時影像中並無法看見捕捉點的位置，因此我們在介面程式的即時影像上，加入一些圓圈，標示捕捉點位置，並在圓圈的周圍標示捕捉點的性質，如深度、強度等。此外為了區分已存在的捕捉點與將會產生的捕捉點，我們以不同顏色的圓圈標示不同狀態的捕捉點，如灰色的圓圈標示尚未存在的捕捉點、深綠色圓圈標示正在計算的捕捉點、綠色圓圈標示為已存在的捕捉點、紅色圓圈標示目前存在但即將被刪除的捕捉點。此外程式再以圓圈的填滿與否表示目前捕捉點的選取與否。圖中藍色虛線所包圍的部分是介面的控制按鈕，負責功能的切換，捕捉點的產生與捕捉點性質的改變等。



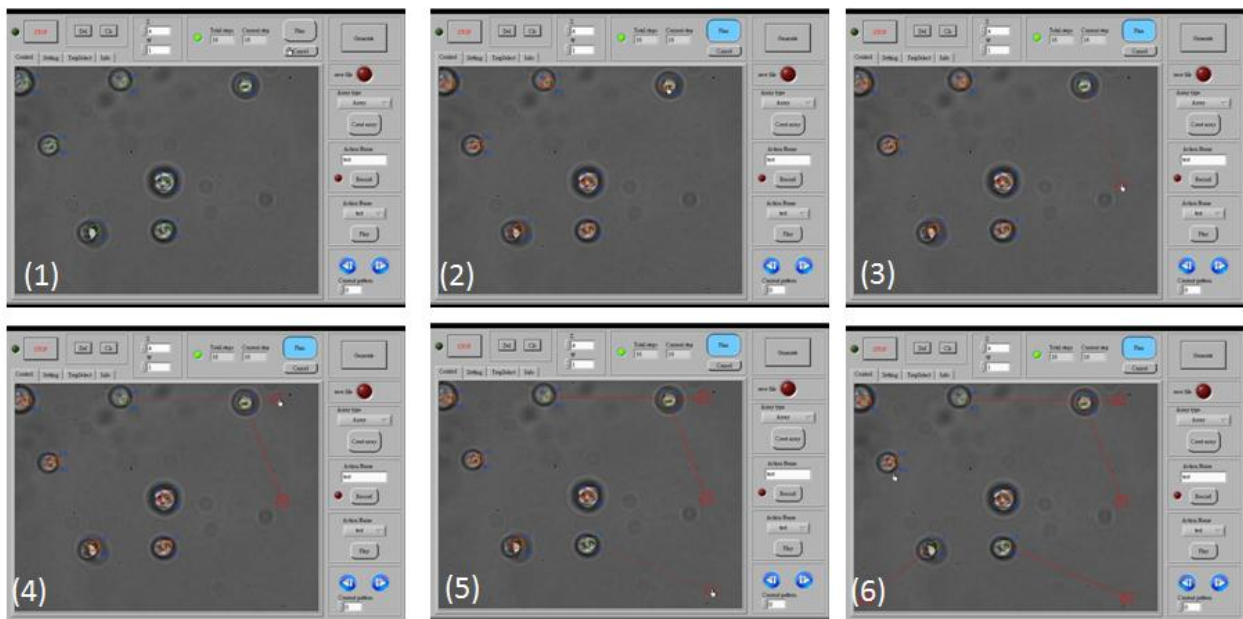
圖三 介面程式的外觀。紅色部分所顯示的是樣品的即時影像，影像中綠色圓圈是目前已存在的捕捉點位置，灰色圓圈則是預計產生的捕捉點位置，此外實心的圓圈則是目前被選取的捕捉點。藍色虛線所包圍的部分是介面程式的控制按鈕，負責功能切換。

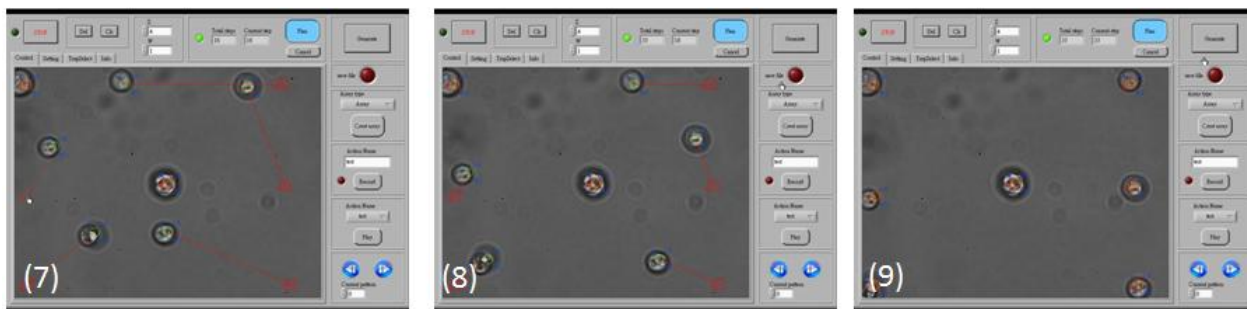
圖四為操作介面程式時的連續圖，樣品影像中的白色圓形粒子是酵母菌細胞。在實驗的一開始，我們利用滑鼠圈選影像右方的兩個捕捉點，如圖四(2)(3)所示。在圈選完成後按下鍵盤中的 Delete 鍵，原本綠色的圓圈就會變成紅色，如圖四(4)所示。接著再按下介面程式右上角的 Generate 鈕後，系統的捕捉點會消失，其中一個酵母菌細胞被影像中央的捕捉點所捕捉，而另一個細胞則稍微飄離原本的位置，如圖四(5) 所示。最後我們又再產生一個新的捕捉點，捕捉這個尚未飄離很遠的細胞，如圖四(6) 所示。



圖四 操作介面程式選取、刪除與新增捕捉點連續圖。

圖五為操作介面程式移動捕捉點的連續圖。實驗樣品為酵母菌細胞。在實驗開始前已經七個細胞酵母菌細胞被捕捉住，如圖五(1)所示。按下介面程式右上角的 Plan 鈕後，介面程式會啟動捕捉點移動模式。此時影像上每一個代表捕捉點的圓圈皆會出現一個紅色方形框框在其外圍，如圖五(2)所示。利用滑鼠游標選取紅色方形框框並將其拖曳到目的地，如圖五(3)~(7)所示。按下 Generate 鈕後，捕捉光點即會自行移動至目的地，如圖五(8)~(9)所示。

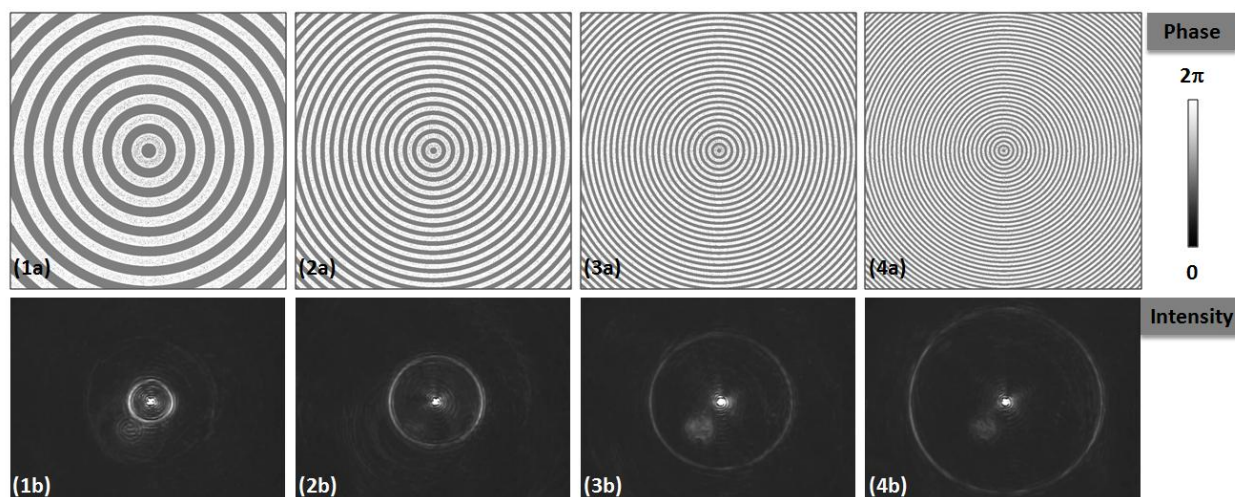




圖五 操作介面程式移動捕捉點連續圖。

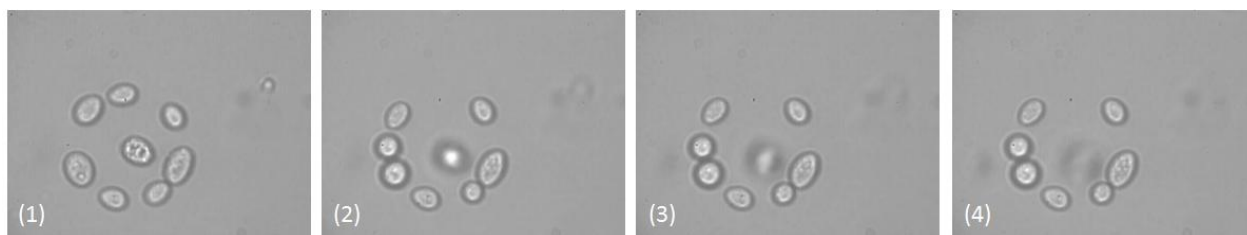
環型光強度分布之產生

本計畫中我們預計利用環形捕捉陷阱限制細菌游泳的路徑。為了讓細菌可以在捕捉陷阱中繼續游動，此環形捕捉陷阱必須能三維捕捉細菌，以避免細菌黏在載玻片上。我們選用 Shape-phase[13]演算法，計算輸入 SLM 的相位分布，產生所需的環形光強度分布。圖六中的上排各圖是輸入 SLM 的相位分布，而每一個相位分布圖的下方則是其所產生在顯微鏡樣品平面上的光強度分布。藉由改變輸入 SLM 的相位分布，我們可以產生所需大小的環形捕捉陷阱。



圖六 SLM相位分布圖與顯微鏡樣品平面光強度分布圖。

被三維捕捉的酵母菌是固定在顯微物鏡的前焦平面上，因此酵母菌的影像不會隨著樣品平台高度的改變而改變。相反的，如果酵母菌沒有被三維捕捉，其影像就會著平台高度改變而改變。為了確認此環形捕捉陷阱可以穩定的三維捕捉生物樣品，我們改變樣品平台的高度，並比較被捕捉與未被捕捉的酵母菌的影像。



圖七 不同樣品深度下的酵母菌影像。

圖七為不同樣品深度下的酵母菌影像。我們利用環形捕捉陷阱捕捉了數個酵母菌，接著再移動樣品平台的高度，改變顯微鏡前焦平面在樣品中的深度，並且紀錄樣品的影像。從圖七中我們可以發現，被捕捉的酵母菌的成像不會隨著樣品平台的高度改變而改變，因此我們所產生的環形捕捉陷阱是具有三維捕捉的能力。

在成功產生具有三維捕捉能力的環形捕捉陷阱後，我們嘗試著將游泳速度很快的綠膿桿菌捕捉在環形捕捉陷阱中，如圖八所示。在初步的嘗試中，我們發現到一些困難。

第一，環形捕捉陷阱中的細菌大多不會游動。樣品中除了會游泳的綠膿桿菌外還有許多綠膿桿菌是不會游動的，而這些不游動的細菌會阻礙健康細菌游動。

第二，細菌樣品影像對比不佳。由於細菌本身很透明，且其折射率又接近水溶液的折射率，造成細菌影像與其背景對比不佳，導致觀察上的困難。

第三，系統捕捉點更新緩慢。目前的 HOT 的操作系統捕捉點的更新速度大約是 2Hz。從使用者輸入指令到捕捉點更新完成大約需要 0.5 秒的時間。因此在初步的實驗中，細菌的捕捉都是採取被動的等待細菌落入陷阱中，而非主動的捕捉。

第四，無法控制細菌游動的方向。在初步的實驗過程中，我們觀察到當細菌在環形捕捉陷阱中游泳的方向並不固定，因此如何讓多隻細菌在環中沿著同一方向運動是此計畫未來必須克服的問題。



圖八 被捕捉在環形捕捉陷阱中的綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

結論：

在本年度的計畫中，我們完成了全像光學鑷夾系統的架設。並且為了簡化此系統的操作程序，方便一般使用者操作，我們也建立了一套圖形式的使用者介面，讓使用者可以坐在電腦前，利用滑鼠點選，輕鬆操控顯微鏡下的生物樣品。此外為了限制細菌在游泳的軌跡，我們也成功產生所需的環形捕捉陷阱，並且也利用此環形捕捉陷阱捕捉到酵母菌與綠膿桿菌。在未來，我們將克服目前實驗上所遇到的困難，以達成原計畫所提出的生物幫浦。

參考文獻：

1. R. E. Holmlin, M. Schiavoni, Clifford Y. Chen, Stephen P. Smith, Mara G. Prentiss, and George M. Whitesides, "Light-Driven Microfabrication: Assembly of Multicomponent, Three-Dimensional Structures by Using Optical Tweezers¹³," *Angewandte Chemie* **39**, 3503-3506 (2000).
2. S. Ayano, Y. Wakamoto, S. Yamashita, and K. Yasuda, "Quantitative measurement of damage caused by 1064-nm wavelength optical trapping of Escherichia coli cells using on-chip single cell cultivation system," *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 678-684 (2006).
3. M. Reicherter, T. Haist, E. U. Wagemann, and H. J. Tiziani, "Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display," *Optics Letters* **24**, 608-610 (1999).
4. S.-Y. Tseng, S. Chi, and L. Hsu, "Particle-sorting by optical pattern of line shapes," in (SPIE, 2004), 687-694.
5. J. E. Curtis and D. G. Grier, "Structure of optical vortices," *Physical Review Letters* **90**(2003).
6. J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist, and H. J. Tiziani, "Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms," *Optics Communications* **185**, 77-82 (2000).
7. J. E. Curtis, B. A. Koss, and D. G. Grier, "Dynamic holographic optical tweezers," *Optics Communications* **207**, 169-175 (2002).
8. V. Seidemann, J. Rabe, M. Feldmann, and S. Büttgenbach, "SU8-micromechanical structures with in situ fabricated movable parts," *Microsystem Technologies* **8**, 348-350 (2002).
9. N.-T. Nguyen, A. H. Meng, J. Black, and R. M. White, "Integrated flow sensor for in situ measurement and control of acoustic streaming in flexural plate wave micropumps," *Sensors and Actuators A: Physical* **79**, 115-121 (2000).
10. N. T. Nguyen, S. Schubert, S. Richter, and W. Dotzel, "Hybrid-assembled micro dosing system using silicon-based micropump/valve and mass flow sensor," *Sens. Actuator A-Phys.* **69**, 85-91 (1998).
11. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (McGraw-Hill, 1996).
12. R. Di Leonardo, F. Ianni, and G. Ruocco, "Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays," *Optics Express* **15**, 1913-1922 (2007).
13. Y. Roichman and D. G. Grier, "Projecting extended optical traps with shape-phase holography," *Optics Letters* **31**, 1675-1677 (2006).

計畫成果自評:

本計畫的目標包含了全像光學鑷夾(holographic optical tweezers HOT)的架設與環型捕捉陷阱的產生。這兩個目標在本計畫結束時皆已完成。

此外在計畫執行期間為方便使用者操作 HOT，我們利用 LabVIEW 建立一套整合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面。使用者可以坐在電腦前，輕鬆的利用滑鼠點選，操控顯微鏡下微米尺度的粒子。讓使用者能專注在實驗的進行上，而非 HOT 系統的操作上，使非相關領域的人也能輕鬆使用。此計畫所完成的介面程式也參加了美商國家儀器公司所舉辦的**第七屆虛擬儀控應用徵文比賽**。投稿的題目為”**全像光學鑷夾圖形式使用者介面之建立**”並進入複賽。附錄一為比賽投稿的文章，附錄二為徵文比賽結果網頁的截圖。相關的內容我們也在 **Proceedings of 2009 National Symposium on System Science and Engineering** 上發表，附錄三是在該會議上我們所發表文章內容。

附錄一：

第七屆虛擬儀控應用徵文比賽投稿文章

全像光學鑷夾圖形式使用者介面之建立

全像光學鑷夾圖形式使用者介面之建立

曾勝陽

博士班五年級

交通大學 電子物理系

徐 琅

副教授

交通大學 電子物理系

使用產品

軟體:

名	稱	產	品	序	號
LabVIEW 8.2		M63X75695			
Vision Development Module 8.2		M63X75695			

硬體:

名	稱	產	品	序	號
NI PCI-1405					

應用領域

生物光電

欲研究之問題與目的

全像光學鑷夾[1]是一種利用多個高度聚焦的雷射光點，捕捉與操控多個微米(10^{-6} 公尺)尺度粒子的裝置。此種裝置對於所操控的粒子具有非接觸性與非破壞性，因此非常適合用於生物研究上。

但由於控制此系統中捕捉光點的位置與運動必須具備許多知識，如富氏光學，電腦全像術，與數學軟體(如 MATLAB)等，對於一般不具相關知識的使用者會造成使用上的障礙。此外在系統的操作過程中，使用者時常需要在不同的程式間切換，同時還需要判斷目標物的位置與輸入相關的參數產生捕捉光點。對於具備相關知識的使用者會造成使用上的不便。

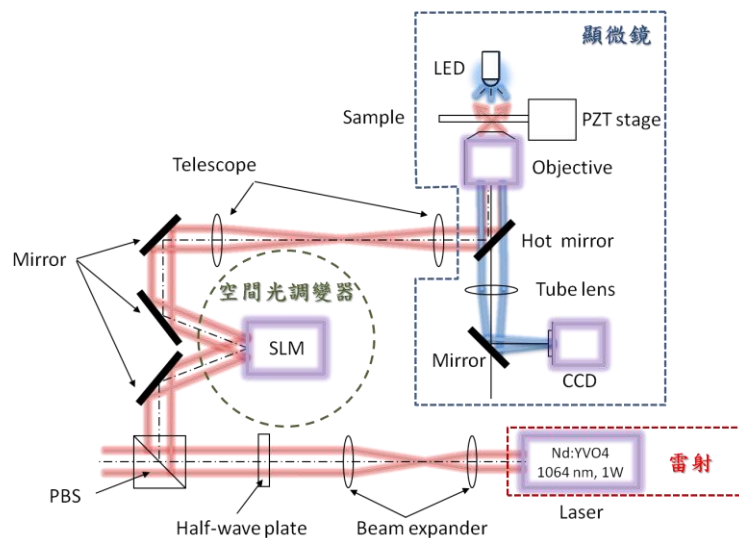
因此我們利用 LabVIEW 建立一套整合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面，讓使用者可以坐在電腦前，輕鬆的利用滑鼠點選，操控顯微鏡下微米尺度的粒子。讓使用者能專注在實驗的進行上，

而非系統的操作上。

研究方法/應用方案

全像光學鑷夾:

全像光學鑷夾是一種利用多個高度聚焦的雷射光點，捕捉與操控多個微米尺度粒子的裝置。此套系統中主要的儀器包含一雷射光源、空間光調變器(Spatial Light Modulator SLM)與顯微鏡，如圖一所示。從雷射本體發出的雷射光束會先經過透鏡組(Beam expander)、半波板(Half-wave plate)、分光鏡(PBS)、與面鏡(Mirror)後到達 SLM，從 SLM 反射出來光再經過透鏡組(Telescope)與熱反射鏡(HOT mirror)後，穿過顯微物鏡(Objective)，聚焦在樣品空間中，產生捕捉光點。樣品的影像由 LED 照亮後，經過顯微物鏡與透鏡(Tube lens)成像在攝影機(CCD)上。



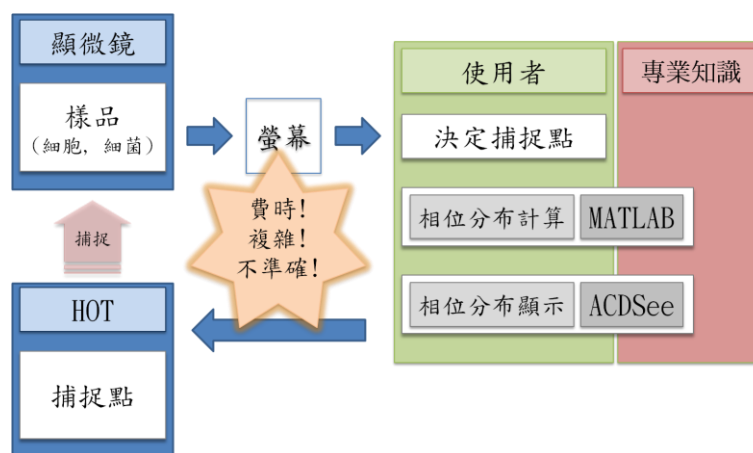
圖一 全像光學鑷夾光路架設。

此套系統產生多個捕捉光點的關鍵是 SLM。SLM 的功能是改變入射雷射光束的相位分布。當雷射光的相位分布不同時，經過顯微物鏡後所產生的捕捉光點的數量與位置也不同。此 SLM 的相位分布可以由電腦所控制。控制的方式為將 SLM 視為一個螢幕，輸入螢幕每個像素(Pixel)的灰階值即對應在該位置的相位值。只要透過適當的演算法[2]，計算所需輸入的相位分布，再以圖片的方式顯示在 SLM 上，即可在樣品空間中產生所需的捕捉光點。

以往的系統操作方式:

在此介面程式建立之前，樣品的即時影像則是由顯微鏡上的 CCD 擷取，直接顯示在獨立的螢幕上。當使用者想要捕捉顯微鏡下某一個目標物時，使用者必須先估計目標物在螢幕畫面中的座標，再轉換成相關參數輸入 MATLAB 計算出所需的相位分布。而計算所得的相位分布再以圖片的形式顯示在 SLM 上，產生所需的捕捉點捕捉目標物，如圖二所示。

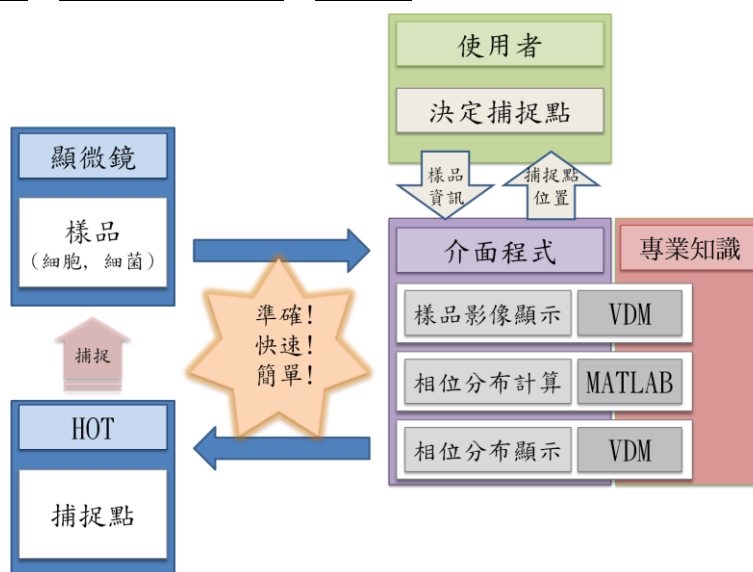
由於系統的操作過程需要在不同的程式間切換，且相關參數必須手動輸入，因此當使用者完成整個過程後，目標物通常也不在原本的位置上。此外由於目標物的座標是以目測的方式決定，有時最後產生的捕捉點會不在預期的位置上，造成操作上的困擾。這些複雜的操作步驟不僅會造成系統使用上的不便，同時也讓使用者無法專注於實驗本身。



圖二 介面程式發展前系統操作流程圖。在介面程式發展前，系統使用者除了需要具備相關專業知識外，還需要負擔大多數的系統操作工作，如判斷目標位置、決定捕捉點位置、相位計算、相位顯示等工作，造成系統使用上的不便。

介面程式的特點:

為了讓任何的使用者，在經過簡單的使用說明後，即可輕鬆使用全像光學鑷夾系統操控顯微鏡下的微粒子。我們需要建立一套整合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面。



圖三 介面程式發展後系統操作流程圖。在介面程式發展後，介面程式負擔大多

數的系統操作工作，如相位計算、相位顯示等工作。使用者只需在樣品即時影像上，以滑鼠游標指定捕捉點位置，即可利用系統操控微粒子。

在此介面程式中，顯微鏡中樣品的即時影像會顯示在介面程式上。使用者利用滑鼠游標在樣品影像上直接點選，藉此產生、刪除或移動捕捉點。介面程式會根據使用者所輸入的資訊，計算所需的相位分布，並將所計算的結果顯示在 SLM 上更新捕捉點，如圖三所示。如此使用者只需利用滑鼠點選，即可操控顯微鏡下的物體，即使是非相關領域的人也能輕鬆使用。

要製作出一套整合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面有許多程式語言可以選擇。在介面程式建立前，我們曾經評估過以 Visual C++ 與 LabVIEW 製作介面程式的優缺點。但在最後我們選擇了以 LabVIEW 建立介面程式，原因是利用 LabVIEW 可以在最短的時間內完成介面程式，而且在過程中唯一需要的程式語言就只有 LabVIEW。表一是比較以 Visual C++或 LabVIEW 製作介面程式所需的時間(假設已熟悉 Visual C++與 LabVIEW)。

利用 Visual C++雖然可以建立圖形式的使用者介面，但在編寫程式的過程中依然是傳統程式碼的形式。此外在影像擷取方面，樣品的即時影像需要利用 DirectX 將影像顯示在程式中，而 DirectX 的使用需要數個月的時間學習。在接收使用者輸入資訊方面，Visual C++原本程式的架構即是以事件驅動，因此對於使用者輸入資訊可以很容易獲得。最後捕捉光點的控制是以 Visual C++建立介面程式最困難的部分。此部分牽涉到許多數學計算，如 Fast Fourier Transform FFT、複數運算、矩陣相乘等。這些運算原本皆由 MATLAB 所完成。如果要以 Visual C++計算相位分布，原本由 MATLAB 寫成的演算法皆需重新寫過，而且還要將原本用到的數學運算改寫成 C++版本，因此會嚴重拖慢程式的完成。

相反的，由於 LabVIEW 在程式編寫過程與完成的程式介面皆是圖形介面，同時 NI 也提供相關的影像擷取硬體，讓樣品的即時影像可以經由簡單的幾個步驟顯示在介面程式中。此外 LabVIEW 提供 MATLAB Script Node，讓原本已編寫完成的 MATLAB 函數可直接由 LabVIEW 所呼叫，完全不需要重新編寫。而 MATLAB 函數所得結果，又可利用 Vision Development Module, VDM 顯示在 SLM 上。因此藉由 LabVIEW，我們可以將原本全像光學鑷夾複雜且不方便的操控過程整合成單一圖形式介面。使用者只需要利用滑鼠游標，在樣品的即時影像上點選，即可輕鬆地操控與捕捉顯微鏡下的微小粒子，如細胞、細菌等。

我們利用 NI 的影像擷取卡(NI PCI-1405)將樣品的即時影像顯示在介面程式上。使用者的滑鼠輸入資訊由 LabVIEW 的 Event case 接收。介面程式在接收到使用者的輸入資訊後，會將其轉換成相關的參數輸入至 MATLAB 的計算核心中進行

計算。計算的結果會送回介面程式，由 VDM 顯示在 SLM 上，更新全像光學攝夾的捕捉點。

特點	程式語言	說明	學習時間	快速完成
圖形式介面	LabVIEW	從程式碼編寫到程式本身皆是圖形介面	0	◎
	Visual C++	程式本身是圖形介面	0	
樣品即時影像之顯示	LabVIEW	利用 Vision Development Module (VDM) 與影像擷取卡 (NI PCI-1405)，可以在簡單幾個步驟內，將樣品影像顯示在程式中。	<一小時。	◎
	Visual C++	如不購買 NI 的影像擷取卡，則需利用 DirectX 將樣品影像擷取至程式中。	數個月。	
使用者輸入資訊之接收	LabVIEW	利用 LabVIEW 中的 event case 即可簡單的獲得使用者滑鼠動作資訊。	0	
	Visual C++	程式原本架構即可獲得使用者滑鼠動作資訊	0	◎
捕捉光點之控制	LabVIEW	利用 LabVIEW 中的 MATLAB Script Node 即可呼叫將原本由 MATLAB 寫成的函數。	0	◎
	Visual C++	需要將原本由 MATLAB 寫成的演算法，以及所需的數學運算與資料類型重新編寫成 C++ 的版本。	數個月。	

表一 以 Visual C++與 LabVIEW 製作介面程式所需時間比較表。

介面程式的程式架構:

在設計介面程式架構時，主要有下列幾項因素需要考量:

1. 樣品影像顯示與相位分布運算的不同步

由於相位分布的計算的運算量很大，通常計算的速度大約是每秒一兩張左右 (CPU : Intel Core 2 Duo E6850 3 GHz, RAM : 2GB, MATLAB 2008a,)。但是在顯示樣品的影像時，通常影像的更新速率最慢是每秒 15 張。所以在計算相位分布的同時，保持樣品影像的更新速度是程式架構的最主要考量。

我們解決的方法是將樣品影像的顯示與相位分布運算這兩項工作分別置於不同的迴圈中，避免樣品的影像更新被相位分布計算所拖累。同時由於介面程式需要快速、連續的接收使用者的輸入資訊，因此我們將使用者的輸入資訊接收與樣品影像顯示置於同一迴圈中。此外介面程式會將相位分布顯示於 SLM 上，而此相位分布除了即時計算外，還可以選擇讀取先前所儲存的檔案，而且相位分布無需持續更新，因此顯示相位分布於 SLM 的工作又另外置於一迴圈中。所以介面程式的基本架構為三個獨立迴圈，迴圈之間的資訊交換是利用 Queue operation 與 Notifier operation 完成。

2. 電腦資源有效利用:

由於相位分布的計算需要很大的運算量，如果介面程式一直不斷的在計算相位分布，將容易造成介面程式其他部分的資源不足，拖慢樣品影像更新速度，或是造成程式反應遲滯等現象。我們的解決方式是讓相位分布的計算只有在使用者確定要更新捕捉點時才會進行計算。

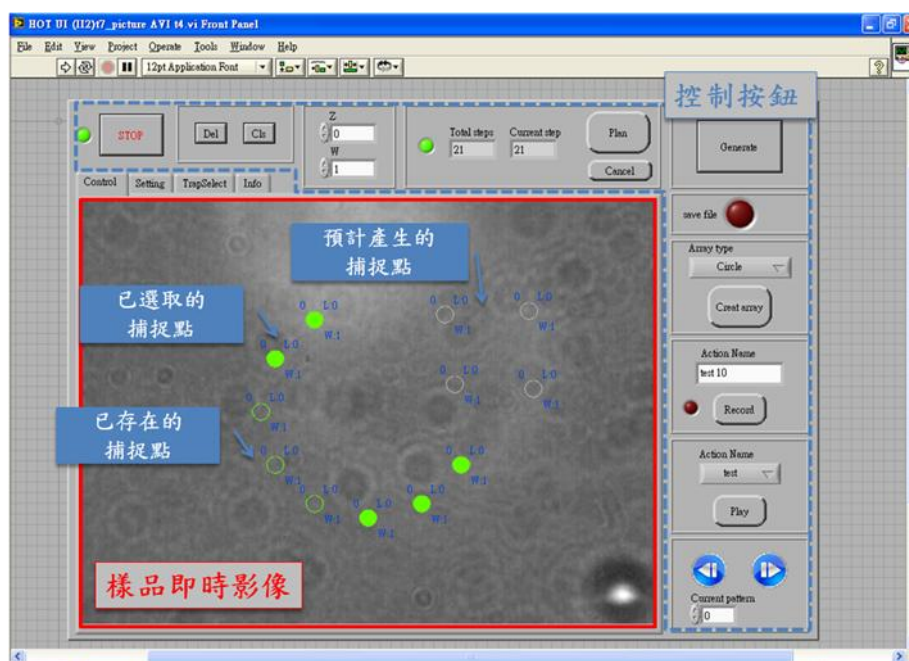
3. 視窗作業系統式的滑鼠操作模式:

由於在樣品的即時影像中看不到捕捉光點的位置，為了讓使用者知道捕捉點的位置與性質，介面程式必須在樣品的影像中捕捉點的位置上標示記號。同時我們希望任何的使用者，在經過簡單的使用說明後，都能使用此程式，因此我們需要將捕捉點記號的操作模式儘量貼近視窗作業系統下用滑鼠點選物件的模式。雖然 LabVIEW 的介面已經是圖形式介面，但對於樣品影像上的標記的增加、刪除、選取等並未提供一個方便快捷的工具，因此我們花了許多的時間在製作捕捉點記號的操作上。

研究/應用介紹

介面程式的外觀

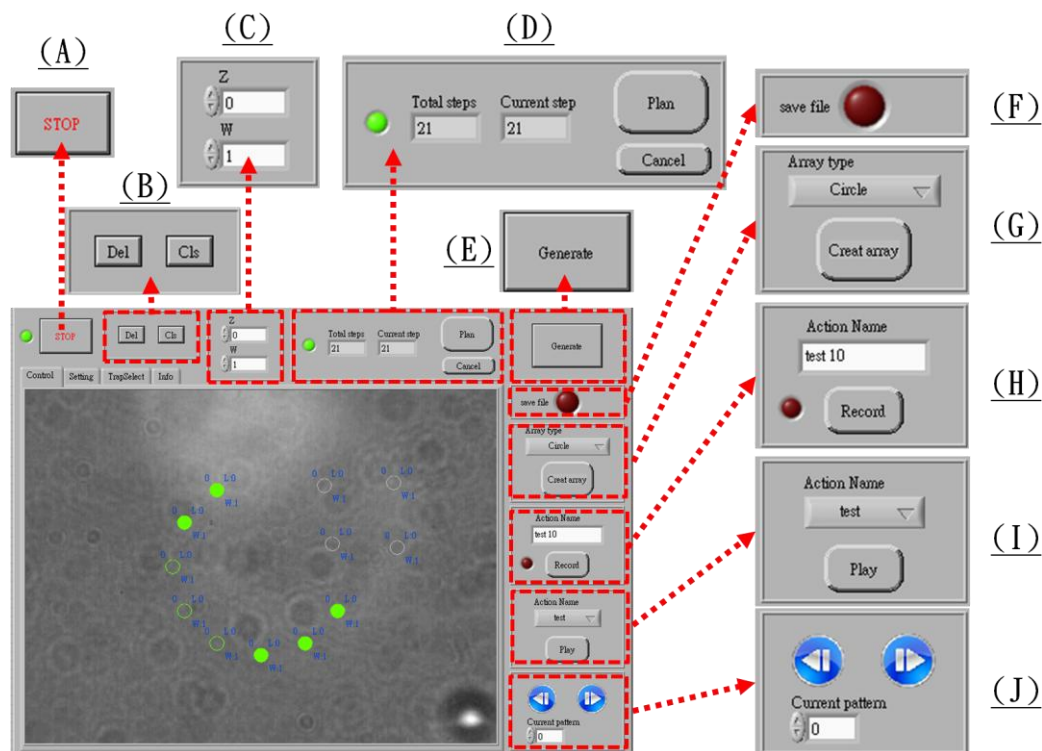
圖四是目前最新版本的介面程式外觀。在圖中，紅色實線所包圍的部分為顯微鏡下樣品的即時影像。使用者可以直接利用滑鼠游標在樣品的即時影像上點選，選擇產生捕捉點的位置或是指定已捕捉到的物體要移動的目的地。由於系統中的雷射光點已被濾光片擋住，在樣品的即時影像中並無法看見捕捉點的位置，因此我們在介面程式的即時影像上，加入一些圓圈，標示捕捉點位置，並在圓圈的周圍標示捕捉點的性質，如深度、強度等。此外為了區分已存在的捕捉點與將會產生的捕捉點，我們以不同顏色的圓圈標示不同狀態的捕捉點，如灰色的圓圈標示尚未存在的捕捉點、深綠色圓圈標示正在計算的捕捉點、綠色圓圈標示為已存在的捕捉點、紅色圓圈標示目前存在但即將被刪除的捕捉點。此外程式再以圓圈的填滿與否表示目前捕捉點的選取與否。圖中藍色虛線所包圍的部分是介面的控制按鈕，負責功能的切換，捕捉點的產生與捕捉點性質的改變等。



圖四 介面程式的外觀。紅色部分所顯示的是樣品的即時影像，影像中綠色圓圈是目前已存在的捕捉點位置，灰色圓圈則是預計產生的捕捉點位置，此外實心的圓圈則是目前被選取的捕捉點。藍色虛線所包圍的部分是介面程式的控制按鈕，負責功能切換。

圖五為介面程式的控制按鈕說明。圖中(A)為程式停止鍵，負責程式的停止。(B)為捕捉點刪除鍵，其中 Del 負責刪除捕捉點，Cls 負責清除所有未存在的捕捉點。(C)為捕捉點性質設定，其中 Z 負責設定捕捉點深度，而 W 負責捕捉點強度。(D)為捕捉點移動模式控制鍵，Plan 負責啟動，Cancel 為取消捕捉點的移動，Total steps 顯示此次移動的總步數，而 Current step 顯示目前已走步數。(E)為捕捉點更新鍵，負責啟動相位運算，更新捕捉點。(F)為資訊儲存鍵。按下此鍵後程式會記錄下當時的捕捉點位置、樣品影像與相位分布。(G)為產生預設的捕捉點

陣列鍵，陣列的形式可以由 Array type 選擇，按下 Create array 後即可在樣品即時畫面上產生捕捉點陣列。(H)為捕捉點動作記錄鍵。當此鍵按下時，每當捕捉點更新時，介面程式會紀錄下新的相位分布圖。(I) 為捕捉點動作撥放鍵。當此鍵按下時，系統可以讀取先前已記錄的動作，而此動作可以由播放控制鍵(J)選擇此動作的前一步或下一步。



圖五 介面程式的控制按钮。(A)程式停止鍵。(B)捕捉點刪除鍵。Del:刪除捕捉點，Cls:清除所有未存在的捕捉點(C)捕捉點性質設定，Z:捕捉點深度，W:捕捉點強度。(D)捕捉點移動模式控制鍵。Total steps:移動總步數，Current steps:目前已走步數，Plan:啟動捕捉點移動模式，Cancel:取消移動。(E)捕捉點更新鍵。(F)資訊儲存鍵。(G)產生預設的捕捉點陣列。Array type:選擇陣列型式，Create array:產生捕捉點陣列。(H)捕捉點動作記錄鍵。Action Name:動作名稱，Record:啟動記錄。(I) 捕捉點動作撥放鍵。Action Name:動作名稱，Play:啟動播放模式。(J)播放控制鍵。上一步與下一步。

介面程式的操作說明

1. 捕捉點的產生

捕捉點的產生有兩種方法，一是在即時影像上所需的位置上用滑鼠 Double Click。此時在該處會產生一個灰色的圓圈標示即將產生的捕捉點，接著再按下捕捉點更新鍵 Generate (圖五(F))，該圓圈就會由灰色變成綠色。當圓圈變綠時，捕捉點也在系統中產生。另一個方式是利用捕捉點陣列產生鍵(圖五(G))。首先利用 Array type 選擇捕捉點陣列型式再按下 Create array，此時樣品即時影像上會出現灰色圓圈的陣列，再按下捕捉點更新鍵 Generate 後，當灰色圓圈變成綠色時，捕捉點陣列即在系統中產生。

2. 捕捉點的選取

捕捉點的選取有兩種方法，一是用滑鼠遊標在欲選取的捕捉點上點選，此時原本空心的圓圈會變成實心，此捕捉點即被選取。另一種選取方式則是利用滑鼠游標圈選。利用滑鼠游標即時影像上適當的位置上，按下左鍵不放後再移動滑鼠游標，此時即時影像上會出現一個虛線方形框框，當放開滑鼠左鍵時，在此框框中的捕捉點皆會被選取。

3. 捕捉點的刪除

首先選取欲刪除的捕捉點，接著再按下捕捉點刪除鍵中的 Del (圖五(B))或按下鍵盤上的 Delete 鍵。若選取的捕捉點的圓圈為綠色時，捕捉點會由綠色變成紅色，接著再按下 Generate 後紅色的圓圈即會消失，而此時系統中的捕捉點也會消失。若選取的捕捉點的圓圈為灰色時，灰色的圓圈在按下 Del 後會立即消失。若要刪除即時影像上所有未產生的捕捉點(灰色圓圈)，按下 Cls 即可。

4. 捕捉點性質的改變

首先選取欲改變性質的捕捉點，接著再改變圖五(C)中的 Z 的值改變捕捉點的深度，或改變 W 的值以改變捕捉點強度。

5. 捕捉點的移動

首先按下圖五(D)中的 Plan，此時即時影像上每一個代表捕捉點的圓圈皆會出現一個方形框框在其外圍。利用滑鼠游標選取後，再拖移到移動的目的地，接著在按下 Generate 後，捕捉光點即會自行移動至目的地。如果要中途終止捕捉點移動，按下圖五(D)中的 Cancel 即可。

6. 捕捉點動作紀錄

首先在圖五(H)中的 Action name 輸入要記錄動作的名稱，接著按下 Record 即可。此時介面程式會記錄下每一個新計算的相位分布。

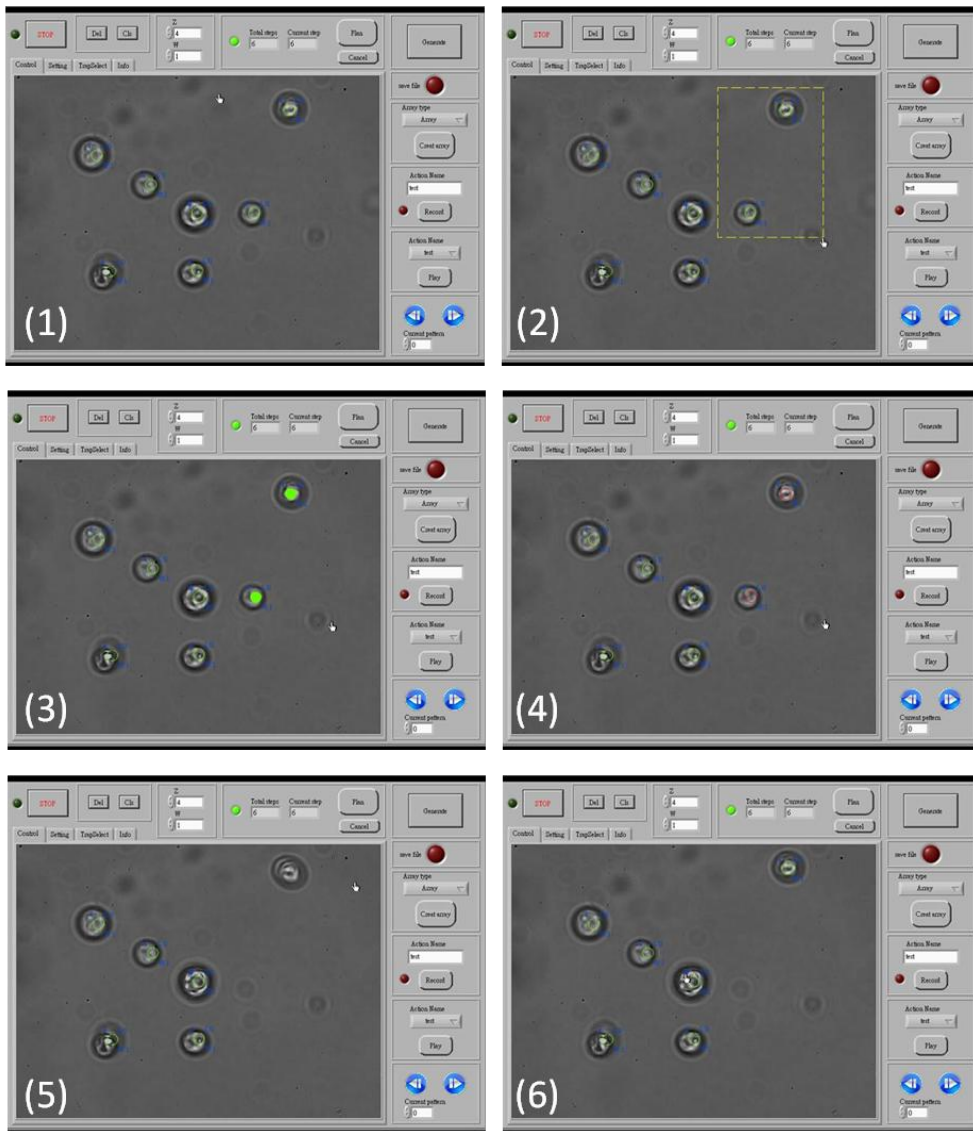
7. 捕捉點動作播放

首先在圖五(I)中的 Action name 選擇要讀取的動作名稱，接著按下 Play 即可。此時介面系統會讀取先前已記錄的相位分布。利用圖五(J)中的按鍵則可以該選擇動作中的上一步或下一步。

介面程式的功能展示

1. 捕捉點的選取、刪除與產生

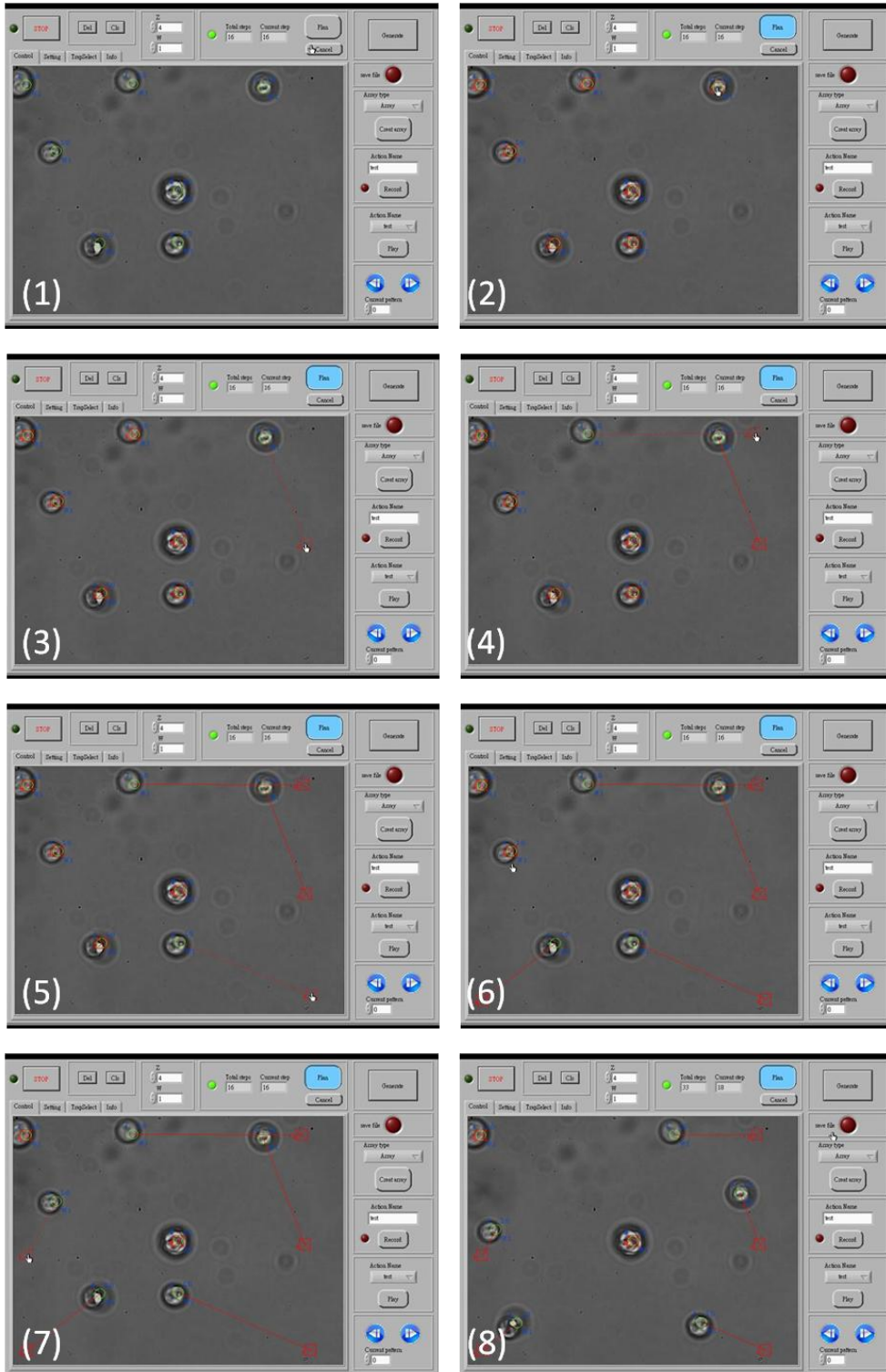
圖六為操作介面程式時的連續圖，樣品影像中的白色圓形粒子是酵母菌細胞。在實驗的一開始，我們利用滑鼠圈選影像右方的兩個捕捉點，如圖六(2)(3)所示。在圈選完成後按下鍵盤中的 Delete 鍵，原本綠色的圓圈就會變成紅色，如圖六(4)所示。接著再按下介面程式右上角的 Generate 鈕後，系統的捕捉點會消失，其中一個酵母菌細胞被影像中央的捕捉點所捕捉，而另一個細胞則稍微飄離原本的位置，如圖六(5) 所示。最後我們又再產生一個新的捕捉點，捕捉這個尚未飄離很遠的細胞，如圖六(6) 所示。

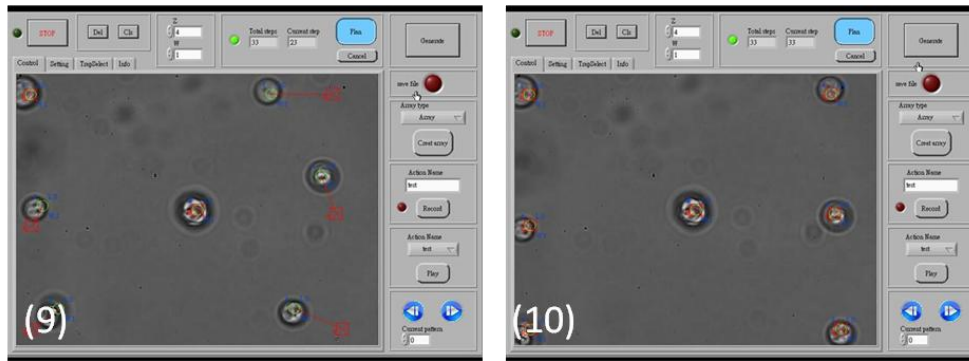


圖六 操作介面程式選取、刪除與新增捕捉點連續圖。

2. 捕捉點的移動

圖七為操作介面程式移動捕捉點的連續圖。實驗樣品為酵母菌細胞。在實驗開始前已經七個細胞酵母菌細胞被捕捉住，如圖七(1)所示。按下介面程式右上角的 Plan 鈕後，介面程式會啟動捕捉點移動模式。此時影像上每一個代表捕捉點的圓圈皆會出現一個紅色方形框框在其外圍，如圖七(2)所示。利用滑鼠游標選取紅色方形框框並將其拖曳到目的地上，如圖七(3)~(7)所示。按下 Generate 鈕後，捕捉光點即會自行移動至目的地，如圖七(8)~(10)所示。





圖七 操作介面程式移動捕捉點連續圖。

結論與建議

我們利用 LabVIEW 建立一套合即時樣品影像顯示、使用者輸入資訊之接收與捕捉光點之控制的圖形式使用者介面。這個介面提供了一個使用者友善的操控介面，對於非相關領域的人員，在經過簡單的解說介面程式功能後也能輕鬆上手。由於 LabVIEW 豐富的硬體與對 MATLAB 支援讓我們能迅速將原本所需的操控動作整合在單一介面程式上。因此利用 LabVIEW 建立全像光學鑷夾的圖形化使用者介面是再適合不過。

參考文獻：

1. Jennifer E. Curtis, Brian A. Koss, David G. Grier, Dynamic holographic optical tweezers Opt. Comm., 2002, 207:169.
2. David Mendlovic, Zeev Zalevsky, Gal Shabtay, Emanuel Marom, “High-efficiency arbitrary array generator”, App. Opt. ,1996, 35:6875

附錄二：

第七屆虛擬儀控應用徵文比賽結果

學術組作品精選文集

名次	參賽題目	參賽單位	立即下載
第一名	利用LabVIEW及PXI實現麥克風陣列聲場可視化	國立交通大學	下載
第二名	低成本無人飛機飛控模擬硬品迴路測試之研究	國防大學	
第三名	多通道微電極陣列晶片系統同步進行電生理信號記錄與細胞影像擷取	國立交通大學/國立新竹教育大學/中臺科技大學	
NI 特選	CompactRIO/FPGA於光纖光柵(FBG)解讀系統之應用	國立交通大學	下載
佳作五名	軟性電子噴墨製程系統研製	國立台灣大學	
	應用機器視覺影像辨識於 DNA 重組晶片流程	國立台灣大學	
	AI馬達機器人	亞東技術學院	
	應用LabVIEW於無人化水果採收系統之設計	國立宜蘭大學/國立台灣大學	
	動態物體追蹤射擊系統	長庚大學	
入圍複審一	人體平衡動態量測與評估系統	中華技術學院	下載
	LabVIEW 應用於真空鍍膜系統的自動化與監測	大葉大學	
	獨立成份分析法於即時心電訊號萃取應用	國立中央大學	
	區域型精密3D電磁地圖量測	國立中正大學	
	同步電力品質量測網路與LAMP的結合	國立中正大學	
入圍複審二	DAQmax用於控制氣壓工程及機體運動-爬牆機構	國立中興大學	下載
	光學同調斷層掃描系統應用於口腔癌之臨床診斷	國立台灣大學	
	使用LabView建置之平衡復健平台	國立台灣大學/台北醫學大學/恩典復健診所	
	原子力顯微鏡教學平台之開發	國立台灣大學/中央研究院	
	智慧型三次元量測系統之研發	國立台灣大學/國立台灣科技大學/鳳山科技大學	
入圍複審三	自動化晶圓級低頻雜訊量測系統	正修科技大學	下載
	PXI與多功能DAQ卡應用於無人飛行載具飛控系統設計之硬體迴路模擬實驗環境之開發	正修科技大學	
	CompactRIO解決『退化型病患』行動力之維持-三個月開發可客制化、抑噪音之即時聲帶振動分析聲控輪椅	國立交通大學	
	全像光學攝夾圖形式使用者介面之建立	國立交通大學	
	X症候群檢測儀	國立東華大學/花蓮基督敎門諾會醫院/花蓮佛敎慈濟醫學中心	

資料來源:

<http://digital.ni.com/worldwide/taiwan.nsf/web/all/F7FC7C6C6F2AE568862575230026EF50#2>

附錄三：

Proceedings of 2009 National Symposium on System Science and Engineering

圖形化操控界面的全像式雷射攝夾系統

圖形化操控界面的全像式雷射鐷夾系統

張雅程¹、曾勝陽²

¹ 交通大學電子物理所

¹ E-mail: timing.ep95g@nctu.edu.tw

² 交通大學電子物理所

² E-mail: tsy.eo91g@nctu.edu.tw

摘要

在1970年代，Arther Ashkin等人，首次利用雷射光的光壓操控微小粒子[2]，到了1987年時，他們更進一步利用一道高度聚焦的雷射光焦點捕捉、搬運微米大小的微小粒子 [3]。即目前大家所知的光學鐷夾或是雷射鐷夾。光學鐷夾利用雷射光操控粒子，在紅外光範圍的雷射光下，幾乎不會傷害生物物體。所以光學鐷夾被廣泛的應用在生物的研究上，例如細胞、細菌搬運捕捉，或是生物力的量測[1]。一道雷射光束經過顯微物鏡聚焦後，只會產生一個焦點，所以傳統的光學鐷夾只有一個捕捉中心，只能操控單一的微粒子。在1999年， M. Reicherter, T. Haist, E. H. Wagemann, H. J. Tiziani首先利用液晶顯示器改變雷射鐷夾中的雷射光強度分佈[4]。2002年，David G. Grier提出動態全像光學鐷夾(holographic optical tweezers HOT)[6]。他們提出比上述論文更有系統的方法，計算所需的相位圖樣，控制雷射鐷夾中的雷射光強度分布，不僅動態的產生多個捕捉點，並且每一個捕捉點的位置與光強度分布皆可獨立控制。在微粒子如細胞或細菌的操控上，全像式雷射鐷夾是一個具有潛力的工具，但是對於非屬於光電相關領域的研究人員還必須花時間心力去了解傅氏光學、MATLAB或其他數學軟體計算全像術的相位，才能操控全像式雷射鐷夾，使用者也經常需要在不同的程式間切換，同時還需要判斷目標物的位置與輸入相關的參數，產生捕捉光點，除了造成使

用上的不便，也無法真正達到即時操控，會降低全像式光學鐷夾的應用層面。我們將雷射鐷夾、全像術、演算法、快速傅立葉轉換、數學軟體MATLAB等軟體及硬體，利用LabVIEW軟體整合起來，建構一套圖形化操控界面(Graphic User Interface GUI)的全像式雷射鐷夾系統，圖形化操作界面只用滑鼠就可以直覺的產生各種不同的捕捉圖案，並即時動態的分別移動每一個捕捉中心，改變每一個捕捉中心的捕捉力大小，最後利用我們建構的圖形化界面全像雷射鐷夾系統捕捉並搬移酵母菌。

關鍵詞：可程式化相位調變器、全像式雷射鐷夾、圖形化使用者介面。

Abstract

In 1970s, Arther Ashk operated a microparticle by the pressure of laser. [2], In 1987, they caught and moved a micro-order particle by a superiorly focusing laser beam [3]. As we knew Optical Tweezers OT. If we choose the light source of Optical Tweezers a infrared laser(1064nm), we can measure the force of a cell[1] and operate cells. A laser only produces a focusing point for catching a single particle. In 1999, M. Reicherter, T. Haist, E. H. Wagemann ang H. J. Tiziani changed the pattern of intensity by spatial light modulator SLM. [4] In 2002, David G. Grier built a dynamic holographic optical tweezers HOT[6]

for generating multiple points for catching particles and operating the pattern of intensity. HOT has high potential for operating and moving micro-order particles, but it cost users time to develop Fourier transformation, perform mathematical calculations and program mathematical softwares, like MATLAB. Users simultaneously have to operate HOT by different softwares and input parameters to generate catching points by estimating the position of objects. It's not a friendly system for all users. We try to combine all hardwares and softwares to form a Graphic User Interface GUI. Users only need a mouse to generate the pattern of intensity and dynamically operate multiple micro-order particles by a real time image in the window of GUI.

keywords : spatial light modulator SLM、Holographic Optical Tweezers HOT、graphic user interface GUI。

1. 前言

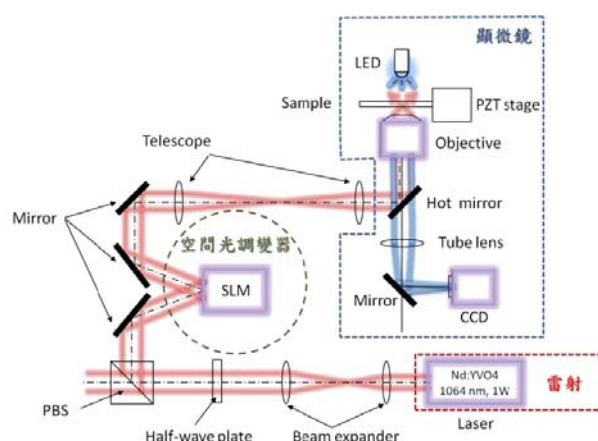
一道雷射光入射到透明圓球內時，雷射光會在圓球與周圍環境的界面上進行多次的反射與折射。這些反射與折射造成了光線作用在圓球上的兩種力，一種是梯度力 (gradient force)，另一種是散射力 (scattering force)。梯度力會將粒子吸引到光強度最大的區域，而散射力則會將粒子沿著光傳播方向推進，其中梯度力即是光學鑷夾捕捉力的來源，在焦點附近的微小粒子被雷射光照到後即被捕捉到焦點上。傳統的光學鑷夾只有一個捕捉點，全像雷射鑷夾 (Holographic Optical Tweezers HOT) 結合光空間調變器 (spatial light modulator SLM) 控制光場分布與光學鑷夾的系統。雷射光聚焦後的光場分布可以透過 SLM 動態的控制，產生多個捕捉點，同時操控多個微米等級粒子，例如細胞或細菌。本論文整合所有軟體及硬體，建構全像式雷射鑷夾的圖形化使用者介面，讓所有研究人員都可以輕易的利

用滑鼠直覺的操控多個微米等級的粒子。

2. 研究方法

2.1. 全像式雷射鑷夾系統架設

全像雷射鑷夾利用多個高度聚焦的雷射光點，捕捉與操控多個微米尺度的粒子。此套系統中主要的儀器包含雷射光源、空間光調變器 (Spatial Light Modulator SLM) 與顯微鏡，如下圖一所示。



圖一 全像光學鑷夾光路架設。

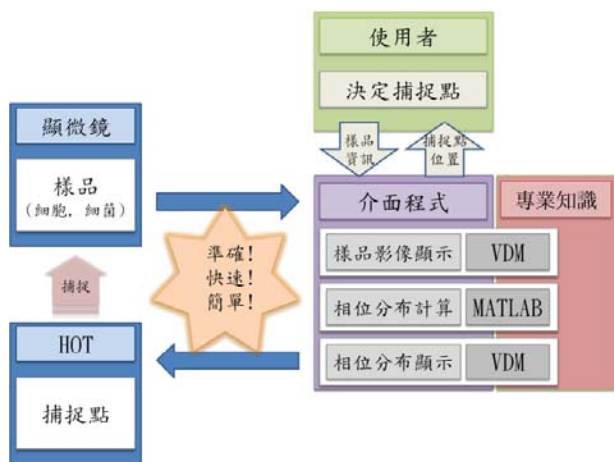
從雷射本體發出的雷射光束會先經過透鏡組 (Beam expander)、半波板 (Half-wave plate)、分光鏡 (PBS)、與面鏡 (Mirror) 後到達 SLM，從 SLM 反射出來光再經過透鏡組 (Telescope) 與熱反射鏡 (HOT mirror) 後，穿過顯微物鏡 (Objective)，聚焦在樣品空間中，產生捕捉光點。樣品的影像由 LED 照亮後，經過顯微物鏡與透鏡 (Tube lens) 成像在攝影機 (CCD) 上。全像式雷射鑷夾產生多個捕捉光點的關鍵是 SLM，SLM 能改變入射雷射光束的相位分布，當雷射光的相位分布不同時，經過顯微物鏡後所產生的捕捉光點的數量與位置也不同。SLM 的相位分布由電腦控制。簡單的把 SLM 視為一個螢幕，輸入螢幕每個像素 (Pixel) 的灰階值，即對應在該位置的相位值。透過適當的演算法 [7]，計算所需輸入的相位分布，再以圖片的方式顯示在 SLM 上，即可在樣品空間中產生所需的捕捉光點。

樣品的即時影像由顯微鏡上的 CCD 擷取，直接顯示在獨立的螢幕上。當使用者想要捕捉顯微鏡下

某一個目標物時，使用者必須先估計目標物在螢幕畫面中的座標，再轉換成相關參數輸入MATLAB計算出所需的相位分布。計算所得的相位分布再以圖片的形式顯示在SLM上，產生所需的捕捉點捕捉目標物。系統的操作過程需要在不同的程式間切換，且相關參數必須手動輸入，因此當使用者完成整個過程後，目標物經常已經不在原本的位置上。此外，由於目標物的座標是以目測的方式決定，有時最後產生的捕捉點不在預期的位置，造成操作上的困擾。這些複雜的操作步驟不僅會造成系統使用上的不便，干擾使用者無法專注於實驗本身。

2.2. 圖形化使用者介面

本論文建立一套整合顯示即時樣品影像、接收使用者滑鼠的輸入資訊，動態控制捕捉光點的圖形式使用者介面。在這個圖形化介面程式中，顯微鏡中樣品的即時影像，利用影像擷取卡(NI PCI-1405)顯示在介面程式上。使用者透過滑鼠點選輸入資訊由LabVIEW的Event case接收，轉換成相關的參數輸入MATLAB數學軟體的計算核心，計算所需的相位分布，再送回介面程式，由Vision Development Module VDM顯示在SLM上，更新全像雷射鐳夾的捕捉點。使用者只需要利用滑鼠游標在樣品影像上直接點選，藉此產生、刪除或移動捕捉點。如下圖二所示。



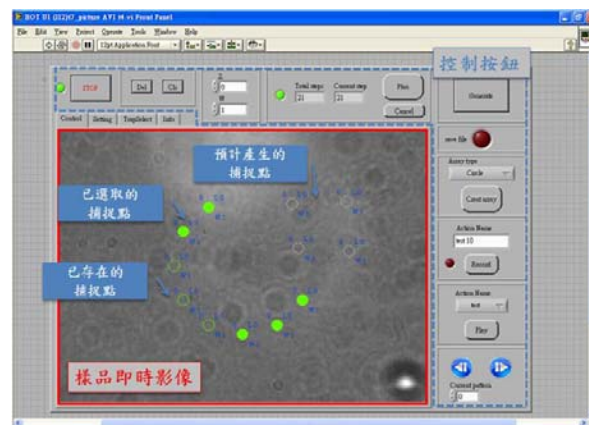
圖二 圖形化介面程式整合軟硬體流程

在MATLAB數學軟體中，相位分布計算的運算量很大，通常運算的速率大約是每秒一張相位圖案

(CPU : Intel Core 2 Duo E6850 3 GHz, RAM : 2GB, MATLAB 2008a.)。但是SLM顯示樣品影像的更新速率最慢是每秒15張。所以在計算相位分布的同時，保持相位計算速率與樣品影像的更新速度維持同步是程式架構的最主要考量。本論文的解決方法是將樣品影像的顯示與相位分布運算這兩項工作分別獨立於不同的迴圈中，避免樣品影像的更新速率被相位分布計算速率所拖累，導致微粒子從雷射鐳夾脫逃。由於介面程式需要快速、連續接收使用者滑鼠的輸入資訊，我們將使用者的輸入資訊的接收與樣品影像顯示放在同一個迴圈中。此外介面程式會透過VDM將相位分布顯示在SLM上，如果相位分布沒有變化就無需持續更新，所以相位分布除了仰賴MATLAB數學軟體即時運算，還可以選擇讀取先前儲存的相位圖案，所以本論文把顯示相位分布於SLM的工作另外獨立於一迴圈。所以介面程式的基本架構為三個獨立迴圈，迴圈之間的資訊交換是利用Queue operation與Notifier operation完成。

樣品的即時影像中看不到紅外光雷射捕捉光點的位置，為了讓使用者知道捕捉點的位置與性質，介面程式必須在樣品影像中顯示捕捉點的位置。LabVIEW軟體並未提供工具在樣品影像上增加、刪除、選取標記，因此我們花了額外的時間在製作捕捉點記號上。

本論文建構的全像式雷射鐳夾的圖形化介面程式如下圖三所示。



圖三 圖形化介面程式外觀

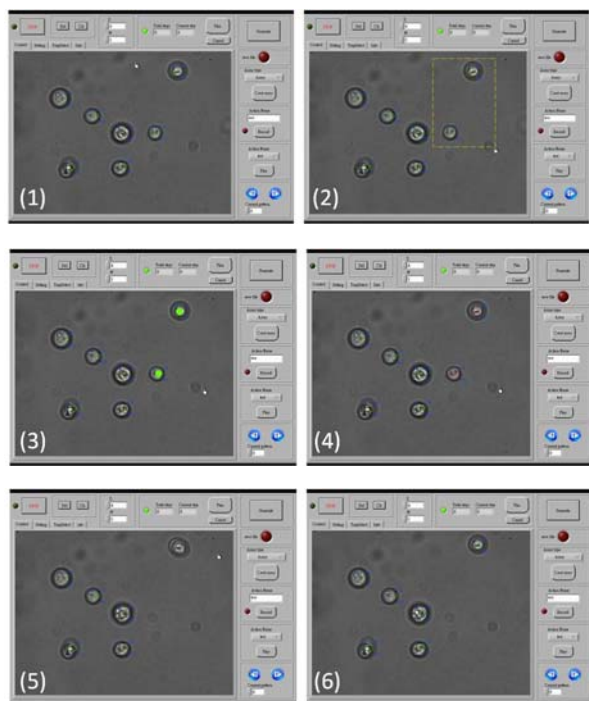
紅色實線所包圍的部分為顯微鏡下樣品的即時影像。使用者可以直接利用滑鼠游標在樣品的即時影像上點選，選擇產生捕捉點的位置或是指定已

捕捉到的物體要移動的目的地。介面程式的即時影像上的圓圈，標示捕捉點位置，並在圓圈的周圍標示捕捉點的性質，如深度、強度等。此外為了區分已存在的捕捉點與將會產生的捕捉點，我們以不同顏色的圓圈標示不同狀態的捕捉點，如灰色的圓圈標示尚未存在的捕捉點、深綠色圓圈標示正在計算的捕捉點、綠色圓圈標示為已存在的捕捉點、紅色圓圈標示目前存在但即將被刪除的捕捉點。此外程式再以圓圈的填滿與否表示目前捕捉點的選取與否。圖中藍色虛線包圍的部分是介面的控制按鈕，負責功能的切換，產生捕捉點並改變捕捉點性質。

3. 結果與結論

3.1. 實驗結果

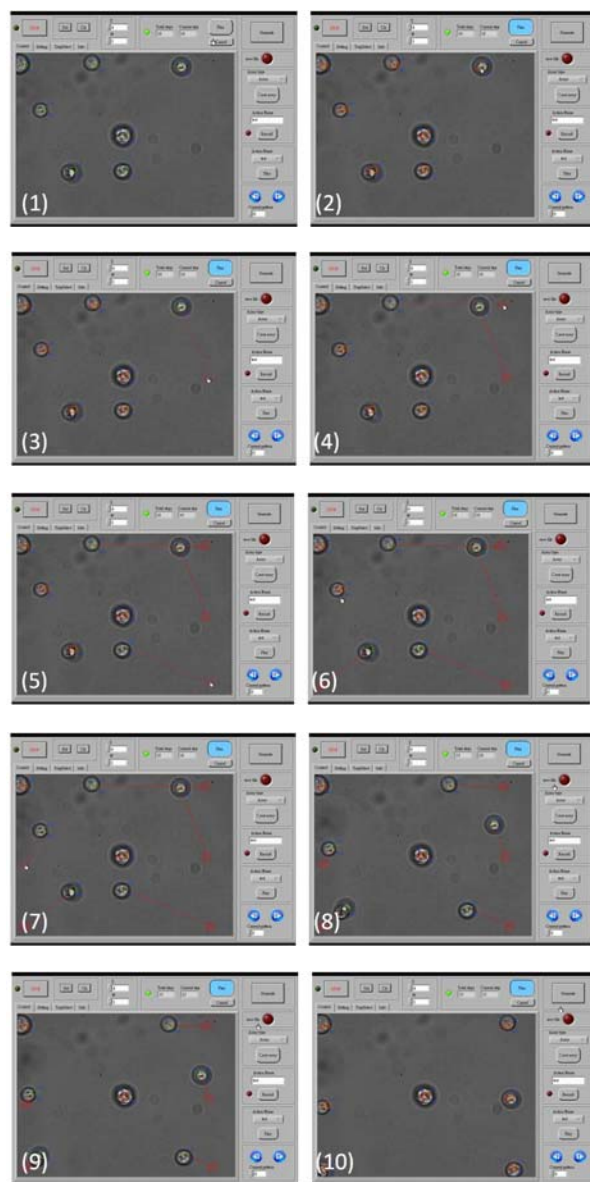
我們規畫的圖形化介面全像式雷射鐳夾系統選擇 1064nm 的紅外光雷射，生物細胞對紅外光雷射的吸收低，可以避免高功率雷射對生物微粒子造成光損害，所以我們的系統除了可以操控一般微米等級的粒子，也可以適用在細胞或細菌等生物微粒子的操控。下圖四說明圖形化介面全像式雷射鐳夾捕捉酵母菌的連續過程。



圖四 圖形化介面全像雷射鐳夾捕捉酵母菌

樣品影像中的白色圓形粒子是酵母菌細胞。我們先利用滑鼠圈選影像右方的兩個捕捉點，如圖四(2)(3)所示。圈選完成後按下鍵盤中的 Delete 鍵，原本綠色的圓圈就會變成紅色，如圖四(4)所示。接著再按下介面程式右上角的 Generate 鈕後，全像式雷射鐳夾系統的捕捉點會消失，其中一個酵母菌細胞脫離原來位置，而另一個酵母菌細胞則偏離原本的位置，如圖四(5) 所示。然後我們再產生一個新的捕捉點，捕捉這個尚未偏離很遠的酵母菌細胞，如圖四(6) 所示。

我們建構的圖形化介面雷射鐳夾系統除了可以捕捉微米等級的粒子，也可以進行搬移，如下圖五所示。



圖五 圖形化介面全像雷射鐳夾搬移酵母菌

實驗樣品為酵母菌細胞。在實驗開始前有七個酵母菌細胞被捕捉住，如圖五(1)所示。按下介面程式右上角的 Plan 鈕後，介面程式會啟動捕捉點移動模式。即時影像上每一個代表捕捉點的圓圈皆會出現一個紅色方形框框在其外圍，如圖五(2)所示。利用滑鼠游標選取紅色方形框框並拖曳到目標位置，如圖五(3)~(7)所示。按下 Generate 鈕後，捕捉光點就會自行移動至目標位置，如圖五(8)~(10)所示。

3.2. 討論

本論文所建構的圖形化介面全像式雷射鑷夾系統，可以提供給需要在顯微鏡下即時動態操控微米等級粒子的研究人員使用，研究人員在即時影像的視窗中利用滑鼠直覺的輸入操控需求，不需要具有光電領域的相關背景，也能輕鬆使用全像式雷射鑷夾，未來我們的工作將著重於相位分布計算速率的改進，以期能符合快速操控搬移及產生更多元化捕捉圖案的需求。

4. 參考文獻

- [1] Paras N. Prasad, Introduction to Biophotonics, Wiley-Interscience, New Jersey, 2003.
- [2] Ashkin A: "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure", *Phy. Rev. Lett.*, 1970, 24: 156-159.
- [3] Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S: "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles", *Opt. Lett.*, 1986, 11:288-290
- [4] M.Reicherter, T. Haist, E.U. Wagemann, H.J. Tiziani Optics "particle trapping with computer-generated holograms written on liquid-crystal display", *Opt. Lett.*, 1999, 24:608-610.
- [5] J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist, H.J. Tiziani, "Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms", *Opt. Comm.*, 2000, 185:77-82
- [6] Jennifer E. Curtis, Brian A. Koss, David G. Grier, Dynamic holographic optical tweezers *Opt. Comm.*, 2002, 207:169-175.
- [7] David Mendlovic, Zeev Zalevsky, Gal Shabtay, Emanuel Marom, "High-efficiency arbitrary array generator", *App. Opt.*, 1996, 35:6875

5. 致謝

感謝在研究過程中，我的指導教授徐琅老師的指導跟建議，使我獲益良多，也感謝曾勝陽學長在實驗過程、系統架設過程及撰寫論文過程不厭其煩的指導，才能有今天這篇論文完成。

MEMES 2010 心得

電物所黃瀚平

在朋友口中得知 MEMS 這研討會之後，便很想要參加，與學長們一起寫了一篇文章投稿，雖然與自身所學領域不同，一邊是半導體製程與微系統，一邊是光學與雷射鐳夾，且國科會計畫已經完成並繳交了結果報告書，但是我相信不同領域之間的激盪一定可以有更漂亮的火花，加上投稿通過，於是在此信念之下，帶著老師與學長姐的祝福踏上了旅程。

踏入香港的第一印象就是，每個人的英文都好流暢，就算是老奶奶也是，加上公車系統與道路指標都很健全，香港真的是一個適合旅遊的地方，唯一的缺點大概就是物價較高，感覺是台灣的兩三倍以上，對於還是學生的我，荷包真的有點傷。這次的 MEMS 舉辦在香港灣仔的香港會議展覽中心，為期四天，其中包含了 MEMS 的許多領域，像是 Actuator、Fabrication、Fluidic、Sensors 等等，我也參與了許多個 oral sessions，雖然平時可以與外國朋友溝通自如，但是此時卻總遇到聽不懂的問題，除了演講者可能因為練習過的關係講的比較快之外，主要原因應該是跨領域的關係，對我來說，有太多的名詞我從未聽過，這讓我深深了解到跨領域的困難，這個非跨越不可的鴻溝，已經成了我必定要達成的目標。

由於在 oral sessions 中毫無收穫，我決定在 poster sessions 中要更努力的學習，並在此結交到許多朋友。除了協助東銘學長講解海報內容，學習如何簡單且清楚的表達之外，更在「**OPTOELECTRONIC TWEEZERS FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF EMBRYO DEVELOPMENTAL STAGE**」這篇研究中獲得許多。這篇研究主要是利用光電鐳夾篩選老鼠的卵細胞，藉此提高顯微注射法的成功率，像這樣的生物應用是我一直在尋找的，實際且有意義。此外我更發現，光電鐳夾更可以應用在大腸桿菌的旋轉上，一樣可以完成生物幫浦，可惜計畫已經即將結案，不然或許可以有更多有趣的發現。

就這樣，在經歷了許多研究的洗禮之後，我返回了台灣，過程中，我學習到許多，不僅是外語能力的增長，研究視野的開拓是我最大的收穫，期待能以此行獲得的經驗作為能量，讓自己的研究可以更多有趣的發現。



ORGANIC PHOTOCONDUCTIVE DIELECTROPHORESIS BY USING TITANIUM OXIDE PHTHALOCYANINE FOR MICRO-PARTICLES MANUPULATION

Tung-Ming Yu¹, Shi-Mo Yang¹, Hang-Ping Huang¹, Meng-Yen Ku¹, Sheng-Yang Tseng¹, Ming-Huei Liu³, Long Hsu¹ and Cheng-Hsien Liu^{2*}

¹National Chiao-Tung University, Taiwan, R.O.C.

²National Tsing Hua University, Taiwan, R.O.C.

³Sinonar Corp., Taiwan, R.O.C.

ABSTARCT

This paper reports our updating development for the organic photoconductive dielectrophoresis (OPDEP) by using titanium oxide phthalocyanine (TiOPc) material for the manipulation of micro-objects. The advantages of organic photoconductive material include non-toxicity, low cost, easy coating fabrication, flexibility, panchromaticity and high photosensitivity [1]. TiOPc has the high photoconductivity and the optical absorptions in the near infrared region (550 – 850 nm) to be a candidate of the light-sensitive charge generation layer. OPDEP chip is easily mass-produced by using a spin-coating process. Here, we demonstrate two kinds of the manipulations of micro-particles on our OPDEP chip. Firstly, the trapping and movement of single micro-particle is achieved by the ring shaped virtual electrode. Secondly, the steel rim shaped virtual electrode is designed to rotate micro-particles and characterize the OPDEP induced force.

INTRODUCTION

Recently, a tremendous amount of attention has been paid to the photoconductive material based dielectrophoresis (DEP) because of the features of its virtual electrodes induced by programmable, low-intensity and incoherent optical images. We do not need complicated lithography and metal patterning process to fabricate the fixed DEP microelectrodes. Due to the photovoltaic effect of converting optical energy into electricity, the conductivity of photoconductive materials can be changed by controlling the light power illuminating on it. The illuminated areas become the virtual electrodes to generate the DEP force for the manipulations of micro-particles. Optical images can be produced by several kinds of the light sources, such as the projector, laser, light-emitting diode (LED) and digital micro-mirror device (DMD). The ranges of optical absorption of photoconductive materials are different. The optimal experimental parameters of

DEP force depend on the chosen light source and the setup of optical lens.

The first photoconductive material based DEP device introduced is the optoelectronic tweezer (OET), which consists of multiple featureless layers of ITO-coated glass, an n+ hydrogenated amorphous silicon (a-Si:H) layer, an undoped a-Si:H layer, and a silicon nitride layer. The optical image, which is 100,000 times less optical intensity than optical tweezers, is utilized to generate high-resolution DEP electrodes for many microfluidic applications, like parallel manipulation of massive micro-particles [2], light-induced AC electroosmosis for nanoparticle manipulation [3], electrowetting-on-dielectrics (EWOD) for the operation of droplets and the manipulation of individual particle inside the droplets using OET [4]. The process of a-Si:H film deposited on the ITO glass is fabricated by the process of plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD). The main light wavelength range used for OET chip is the near-infrared region (625 ~ 685 nm) for recent researches [5-7].

Polymer materials provide alternative choice for photoconductive material based DEP applications. Polymer-based optically-induced DEP platform has been reported by using P₃HT/PCBM film as photoconductive layer spin-coated on the ITO glass for biological applications such as cell lysis, the cytometry function and micro-particles separation with different sizes [8]. The spin-coating fabrication of this polymer material provides low-cost and convenient process in the laboratory.

In this paper, we report our research by using TiOPc material, which has been extensively applied to the organic photo conductor (OPC) for commercial laser printers, to implement the OPDEP device. This fabrication process greatly reduces the technical threshold into the photoconductive material based DEP field because of the easy access to TiOPc and the simple fabrication without the need of PECVD. We successfully prove the feasibility of using the TiOPc based OPDEP device to manipulate micro-

particles. The trapping force of micro-particles is measured by the rotation of the steel rim shaped optical image.

THEORY

The OPDEP is a derivation of traditional DEP except the electric-field gradient induced by the photovoltaic effect. The OPDEP force can be expressed by using the DEP formula as in (1).

$$F_{DEP} = 2\pi a^3 \varepsilon_m \operatorname{Re}[K^*(\omega)] \nabla(E^2) \quad (1)$$

where a , ε_m , E and $K^*(\omega)$ are the particle radius, the permittivity of surrounding medium, the electric field and Clausius-Mosotti factor. The $K^*(\omega)$ can be expressed as

$$K^*(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (2)$$

where complex permittivity $\varepsilon^* = \varepsilon - j(\sigma/\omega)$. σ is the conductivity and ω is the angular frequency. The subscripts p and m denote the particle and the surrounding medium respectively. The DEP utilizes the geometry of the electrode to generate spatially non-uniform ac electric fields. In response to the gradient of electric fields, positive dielectrophoresis (pDEP) is defined as the phenomenon of polarizable particles moving towards the region of maximum electrical-field strength (i.e. $\operatorname{Re}[K^*(\omega)] > 0$). In the opposite case, negative dielectrophoresis (nDEP) is defined that particles are repelled from the electrodes and move towards the region of weakest electrical-field strength (i.e. $\operatorname{Re}[K^*(\omega)] < 0$). The polarization properties of particles are strongly dependent upon the frequency of the electric field. Changes of the conductivity of the medium can also alter the moving direction of particles under DEP manipulation of a given operation frequency.

MATERIAL AND METHODS

TiOPc material fabrication

The OPDEP chip is fabricated by spin-coating the TiOPc film of 300nm in thickness onto the top of ITO glass as the photoconductor layer. To enhance the adhesion between the TiOPc and the surface of the ITO glass, the chip is put on the hotplate at 120-degree Celsius for 30 minutes after the spin-coating process. The TiOPc layers at the edge are removed for the purpose of electrical contact. The copper conductive tape is used to connect the electric signal to the OPDEP chip. The final chip is shown in Fig. 1(a). Fig. 1(b) is the commercially available

transparent ITO glass.

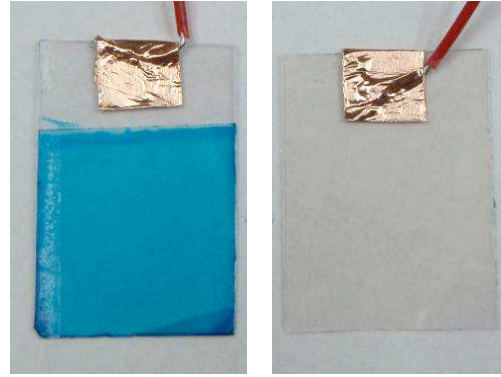


Figure 1: Photographs of our OPDEP device. (a) The photoconductive TiOPc coated on the ITO glass. (b) The commercially available ITO glass.

The structure of our OPDEP device is comprised of the ITO glass and the OPDEP chip with a 50um spacer in between. Micro-particles and DI water are confined in the prototype device as illustrated in Fig. 2. The AC potential and the electrical ground provided from a function generator are applied to the top and bottom ITO electrodes, respectively, in the OPDEP device. Without the illumination of optical images, the major voltage drop appears across the photoconductor layer when the AC voltage is applied. When the designed optical images are projected onto the TiOPc layer to increase its conductivity, then the major voltage drop turns out to appear across the liquid media above the illuminated region to produce the virtual electrodes that can be utilized for DEP applications.

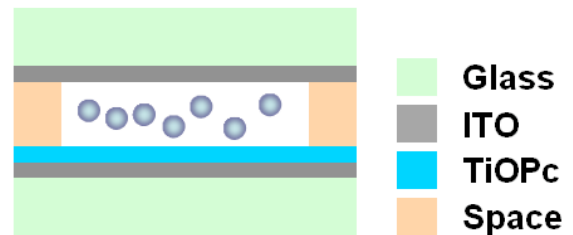


Figure 2: The illustration of our OPDEP device and material.

Methods

The experimental setup as illustrated in Fig. 3 includes a projector, optical lens module, a microscope and a CCD camera. Optical lens module integrates with a condensing lens L1, a 10 X objective lens L2 and a mirror M1. L1 collimates the optical image generated by the projector. M1 is a broadband dielectric mirror which allows the reflection of the light wavelength from 650 to 1200 nm for the optical

absorption of TiOPc. L2 transfers the collimated optical images to the focus plane of the OPDEO chip. The Optical images are produced from the projector with the MicroSoft PowerPoint file and are transmitted through optical lens module into the OPDEP device. The image of the microscope is captured by the CCD. When the AC voltage is applied across the OPDEP device, the electric fields become higher at the illuminated regions because the photovoltaic effect on the illuminated TiOPc layer enhances the electrical conductivity locally. The optical image induced virtual electrodes generate the DEP force on micro-particles around the edge of the illuminated regions.

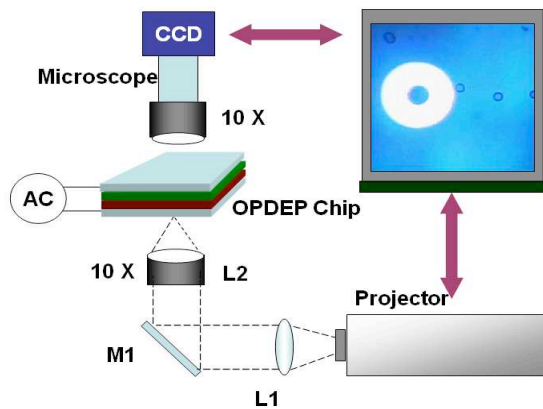


Figure 3: Schematic of the experimental setup.

RESULTS AND DISCUSSION

The trapping and manipulation of single micro-particle

Fig. 4(a)-(c) demonstrate that single micro-particle with the diameter of $16 \mu\text{m}$ is trapped and moved by the ring shaped optical pattern at 10 Vpp under the frequency of 1 kHz . When the optical pattern is projected to the OPDEP device, the induced DEP force generated around the pattern edge repels the surrounding micro-particles. The single micro-particle inside without contacting to other surrounding particles is transported to its destination directly.

DEP trapping force measurement

Fig. 5 shows the method to measure the DEP force of the micro-particle in OPDEP device. When the steel rim shaped virtual electrode induced by the optical image rotates clockwise, the drag force (F_{DRAG}) and DEP force (F_{DEP}) are exerted on micro-particles simultaneously in the opposite direction. F_{DRAG} will equal F_{DEP} because of micro-particles moving at a constant angular velocity (ω) on the OPDEP chip.

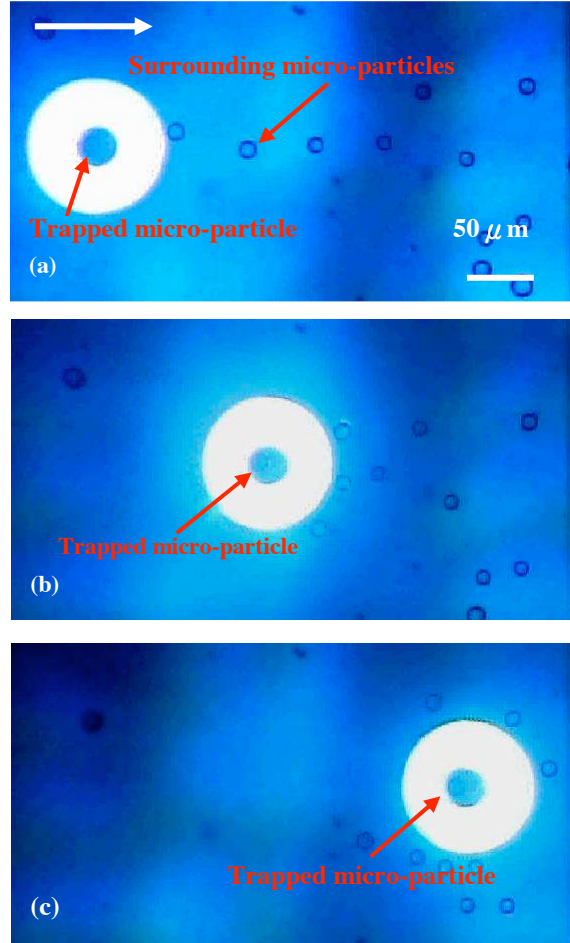


Figure 4: The ring shaped optical image pattern traps single micro-particle and moves it from the left to the right. This optical pattern repels the other surrounding micro-particles along the moving direction of light pattern to accomplish the movement of single micro-particle.

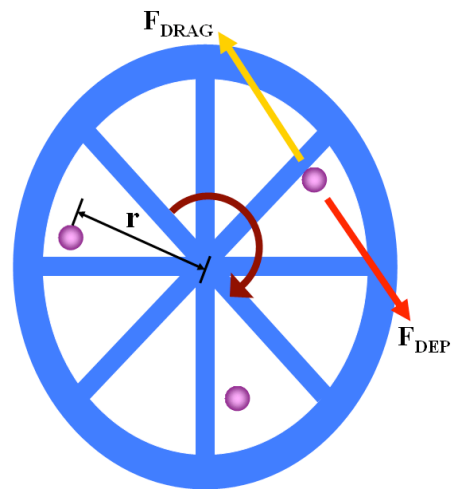


Figure 5: The DEP force is measured by using the steel rim shaped virtual electrode. The F_{DRAG} and F_{DEP} are exerted on the micro-particle at a constant ω in the opposite direction.

Fig. 6(a)-(d) show that micro-particles with the diameter of 16 μm are captured and rotated via the steel rim shaped optical pattern at 10 Vpp under the frequency of 1 kHz. We increase the rotation speed of light pattern to find the maximum rotation speed of ω which still traps the micro-particle. The DEP force is calculated by the formula $F_{\text{DEP}} = F_{\text{DRAG}} = \gamma r \omega$, where r is the rotation radius of micro-particle (for the micro-particle C, $r = 150 \mu\text{m}$) and γ is the friction coefficient. $\gamma = 6\pi\eta a$, η is the viscosity of the liquid (for water at 20 $^{\circ}\text{C}$, $\eta = 1.002 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), a is the radius of micro-particle. The maximum available DEP force applied on micro-particles on our present device is characterized to be about 10 pN.

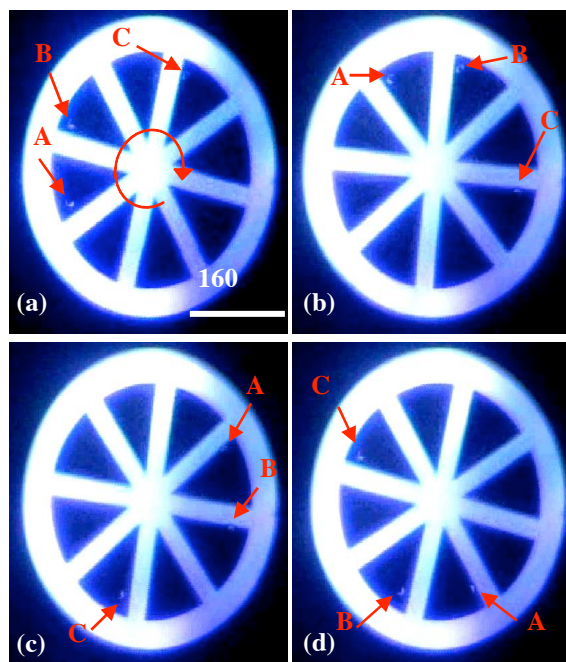


Figure 6: Micro-particles A, B and C are captured and rotated clockwise inside the steel rim shaped optical image pattern. When the maximum rotation speed ω is measured, the DEP force of the chosen micro-particle can be characterized.

CONCLUSION

In this research, we accomplish the functional tests of the TiOPc based organic photoconductive DEP device. The capabilities of our OPDEP device are demonstrated by trapping and manipulating micro-particles with programmable optical images. Experimental results show that single micro-particle can be trapped inside the ring shaped virtual electrode and moved toward the assigned direction. The DEP force of OPDEP is measured by calculating the

maximum drag force of the micro-particle in the rotating steel rim shaped virtual electrode.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the National Science Council of Taiwan, under the grant NSC- 98-2120-M-007 -003. The authors would like to thank Sinonar Corp. (Taiwan) for providing TiOPc material and helping the fabrication.

REFERECES

- [1] K. Y. Law, "Organic Photoconductive Materials: Recent Trends and Developments" Chem. Rev., vol. 99, pp. 449-485, 1993.
- [2] P. Y. Chiou, A. T. Ohta and M. C. Wu, "Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images" Nature, vol. 436, pp.370-372, 2005.
- [3] P. Y. Chiou, A. T. Ohta, A. Jamshidi, H.Y. Hsu and M. C. Wu, "Light-Actuated AC Electroosmosis for Nanoparticle Manipulation ", Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 17, no. 3, pp. 525-531, 2008.
- [4] G. J. Shah., P. Y. Chiou, J. Gong1, A. T. Ohta, J. B. Chou, M. C. Wu and C.J. Kim., "Integrating Optoelectronic Tweezers For Individual Particle Manipulation With Digital Microfluids Using Electrowetting-On-Dielectric (EWOD)" Micro Electro Mechanical Systems 2006, Istanbul, pp. 130-133, 2006.
- [5] S. L. Neale1, M. Mazilu, J. I. B. Wilson, K. Dholakia, and T. F. Krauss, "The resolution of optical traps created by LightInduced Dielectrophoresis (LIDEP)" Optics Express, vol. 15, no. 20, pp. 12619-12626, 2007.
- [6] M. Hoeb, J. O. Radler, S. Klein, M. Stutzmann, and M. S. Brandt, "Light-Induced Dielectrophoretic Manipulation of DNA" Biophysical Journal, vol. 93, pp. 1032-1038, 2007.
- [7] J. K. Valley, A. Jamshidi, A. T. Ohta, H.Y. Hsu and M. C. Wu, "Operational Regimes and Physics Present in Optoelectronic Tweezers" Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 17, no. 2, pp. 342-350, 2008.
- [8] G. B. Lee, Y. H. Lin, W. Y. Lin, W. Wang and T. F. Guo, "Optically-Induced Dielectrophoresis Using Polymer Material For Biomedical Applications" Transducers 2009, Denver, CO, USA, June 21-25, pp. 2135-2138, 2009.

CONTACT

* C.H. Liu, tel: +886-3-5715131 ext: 33706; liuch@pme.nthu.edu.tw

OPTOELECTRONIC TWEEZERS FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF EMBRYO DEVELOPMENTAL STAGE

Justin K. Valley^{1§}, Maurice Garcia^{2§}, Paul Swinton², Steven Neale¹, Hsan-Yin Hsu¹, Arash Jamshidi¹ and Ming C. Wu¹

¹University of California, Berkeley, USA

²University of California, San Francisco, USA

[§]Both authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Successful *in vitro* fertilization (IVF) requires that only the top ~1-2 healthiest embryos are transferred to the uterus. The current gold standard is to select only the most developmentally advanced embryos for uterine transfer. This approach is solely *qualitative* and consequently has limited sensitivity and specificity. A quantitative approach, if more sensitive, would greatly improve IVF outcomes. We assess the response of mouse embryos to Optoelectronic Tweezers (OET) throughout key stages in their early development, and demonstrate that OET can serve as a means to quantitatively guide identification of the most developed (i.e. likeliest to be healthy) embryos, following IVF.

INTRODUCTION

In the United States alone, 1.2 million women (or 2% of women of reproductive age) visited their doctor for reproductive assistance [1]. Of those treated, approximately 30% will successfully deliver one or more children (in 2006) [1]. One of the major factors involved in successful birth outcomes is the selection of healthy embryos for implantation. Currently, embryos are selected by an experienced technician using solely qualitative observations. One of the major indicators of an embryo's health is its developmental maturity relative to its peers. Embryos which reach developmental stages faster than their peers have a greater chance of successful implantation into the mother. Therefore, a method to quantitatively discern embryos which reach certain developmental stages faster than others could greatly improve the success rate of *in vitro* fertilization (IVF).

During development there are vast changes in embryo morphology. These differences in morphology can manifest themselves as differences in electrical properties. Therefore, if one can systematically detect differences in electrical properties of different embryos, those embryos could be sorted by developmental stage. One such technique that can

accomplish this is dielectrophoresis (DEP). DEP is the force exhibited on the induced dipole moments in a particle when subjected to a non-uniform electric field. The DEP force scales as [2]:

$$F_{DEP} \propto Re[K^*] \nabla E^2 \quad (1)$$

where E is the electric field and K* is the Clausius-Mosotti (CM) Function defined by [2] (pp. 5-33):

$$K^* = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

where ϵ_p^* and ϵ_m^* are the complex permittivity of the particle and medium respectively. The complex permittivity is equal to $\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega$, where ϵ , σ , and ω are the permittivity, conductivity, and electric field frequency, respectively. The CM factor can be either positive or negative meaning that the DEP force can cause particles to be either attracted to (pDEP) or repelled from (nDEP) electric field maxima, respectively. Thus, if the electrical properties of the embryos in different stages of development are unique, then their respective CM factor will be different manifesting itself as a difference in DEP response. While there has been prior work on using DEP to sort *unfertilized* oocytes [3] and *pre-cleavage* embryos [4], there has no work in the literature regarding the sorting of *post-cleavage* embryos via DEP.

In this paper, DEP forces are enacted on pre-implantation mouse embryos through use of a device known as Optoelectronic Tweezers (OET) [5]. In the device, low intensity (<1 W/cm²), incoherent light interacts with a photosensitive substrate and, in conjunction with an externally applied electrical bias, creates localized DEP traps in the illuminated areas (Fig. 1). On-demand, parallel DEP trap generation is possible simply by altering the optical pattern.

EMBRYO CM FACTOR MODELING

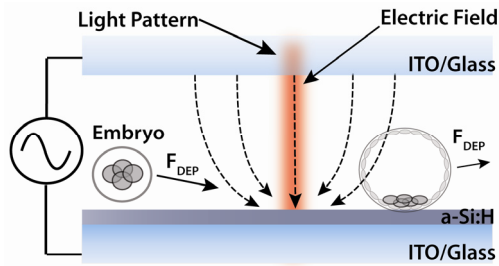


Fig. 1: Overview of OET device for embryo sorting. Incident light creates localized areas of high conductivity in a-Si:H layer. This causes an externally applied electric field to form gradients in the liquid layer. Particles in the vicinity of the gradients experience a DEP force.

To investigate the CM factor (and DEP force) for embryos we look at two critical stages of embryo development, the morula and blastocyst stage. These are the stages at which embryos are typically implanted at following IVF. At the morula stage, embryos consist of a dense clump of 16-32 cells encased in an electrically leaky membrane known as the *zona pellucida*. At the end of the morula stage, the cells in the morula differentiate for the first time to form an inner cell mass (which later becomes the fetus) and a membrane of cells (trophoblast) surrounding a fluid filled cavity (blastocoele). To electrically model these two stages of development, we model the 1-cell to morula stage as an insulating core surrounded by an electrically leaky membrane, and the blastocyst as an insulating shell. Using a multi-shelled model [2] and typical cell parameters [6, 7], we extract an effective complex permittivity for each. The resulting complex permittivity is then placed into the Eq. 2 assuming media with conductivity 10 mS/m and a relative permittivity of 78.

The predicted real part of the CM factor is plotted in Fig. 2 for both the morula (insulating core) and blastocyst (insulating shell) as a function of frequency. Below 100 kHz, there is a stark contrast between the two stages. Namely, the morula exhibits a strong pDEP response and the blastocyst exhibits a strong nDEP response. At earlier stages of development (1-cell through 4-to-16-cell/morula), the embryo possesses a greater electrical admittance, relative to the surrounding medium. This is likely due to the highly conductive space between the *zona pellucida* and interiorly-located embryonic cells. This results in a positive CM factor, and, therefore, a pDEP response. However, starting at the early-blastocyst stage, the admittance of the embryos becomes smaller than that of the media, resulting in a negative valued CM factor, and, thus, an nDEP response. This is likely due to the formation of the trophoectoderm epithelium which

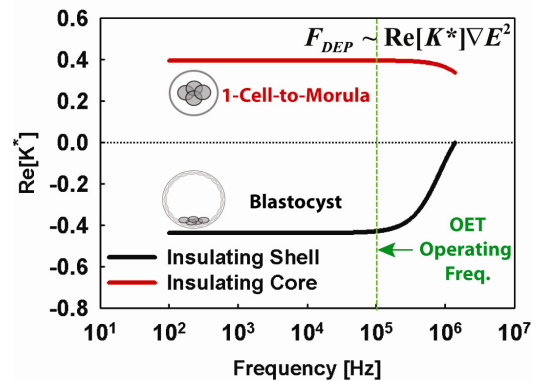


Fig. 2: CM factor versus frequency for insulating core (1-cell to morula) and insulating shell (blastocyst). The insulating core exhibits pDEP and the insulating shell exhibits nDEP. This suggests that embryos in the 1-cell to morula stage and blastocyst stage should experience a pDEP and nDEP response, respectively.

electrically screens the highly conductive interior (blastocoele). This decrease ($\sim 1000\times$) in admittance at the blastocyst stage has been confirmed by Benos *et al.*[8].

The response shown in Fig. 2 is predicated on the selection of a suitable medium. Specifically, the medium conductivity used must fall in between the low and high admittance states of the developing embryos. Media conductivities outside of this range will result in either a pDEP or nDEP response regardless of embryo morphology. Therefore, it can be presumed that optimized media conductivities for different strains of embryos will be necessary in order to produce the largest dichotomy in response. In the context of these experiments, it is important that the media conductivity remain relatively constant for all groups due to the dependence of the DEP response on the electrical properties of the media. This sensitivity to media conductivity is most prevalent at the point where the two complex permittivities are nearly identical (i.e. where the developing embryo transitions from a pDEP response to a nDEP response). To maximize internal consistency and precision, medium conductivity must be carefully monitored. It is also important to note that only certain conductivities of media ($\sim 1\text{mS/m} - 100\text{mS/m}$) can be used in the OET device presented here due to the fact that the liquid layer is part of the electrical circuit pertaining to device operation. For higher liquid conductivities ($\sim 1\text{S/m}$), a different OET device has been developed [9]. However, as above, at these high conductivities the embryos are unlikely to exhibit the large full scale range of DEP responses observed here.

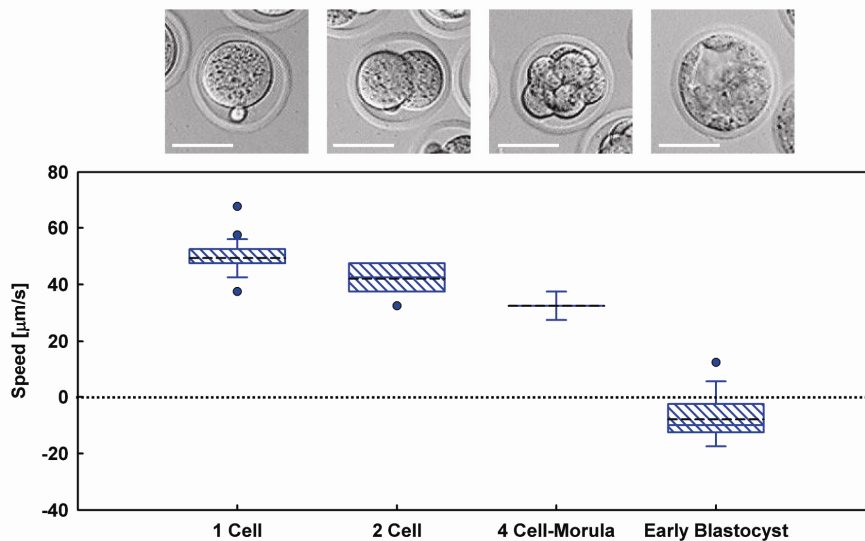


Fig. 3: Morphological dependence of Embryo DEP response. Box plot showing speeds of embryos at varying developmental stages ($n = 30-35$, for each stage) (black dashed line is mean speed). A typical brightfield image corresponding to the embryos at each stage is placed above each box. Mean values are all significantly different (two-tail alpha, $p < 0.005$). Scale bar $50 \mu\text{m}$.

EXPERIMENTAL

A 6" glass wafer with a 300 nm layer of sputtered indium tin oxide (ITO) (Thin Film Devices, USA) was coated with a $1 \mu\text{m}$ layer of hydrogenated amorphous silicon (a-Si:H) deposited via plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) (100 sccm 10% SiH_4 :Ar, 400 sccm Ar, 900 mTorr, 350°C , 200 W). The a-Si:H coated ITO wafer, along with another 6" ITO-coated glass wafer, was then diced into 2×2 cm chips with a dicing saw (ESEC 8003) forming the bottom and top OET substrates, respectively. The bottom OET substrate (a-Si:H coated ITO) was then subjected to a brief oxygen plasma (51.1 sccm O_2 , 300 W, 1 min.) and placed in a solution of 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane (Gelest Inc., USA) for 2 hours. The immersed chips were then rinsed in ethanol and air dried. This resulted in a thin layer of poly-ethylene glycol (PEG) on the surface of the bottom substrate which aided in reducing adherence of the embryos to the surface. Electrical contacts were made to the ITO on both the top and bottom substrate using an electrically conductive silver epoxy. The top and bottom substrates are separated by a $200 \mu\text{m}$ layer of double sided tape.

A custom-built microscope was used for all experiments. The sample was placed on a stage connected to a mechanical drive (Newport LTA-HL and Newport ESP300-1NN111), which allowed the stage to be moved at a known rate. Viewing occurred from the topside via a 5x objective lens. The optical patterns used for manipulation were formed using a

commercial data projector (2400MP, Dell, USA) controlled by an external computer running commercial presentation software (Microsoft Powerpoint 2003). Viewing and image capture occurred via a CCD camera (XCD-X710CR, Sony, USA) connected to an external computer. Electrical bias was applied using a standard function generator (33220A, Agilent, USA).

A total of 164 mouse zygotes were harvested at the 1-cell stage and cultured *ex vivo*, in KSOM+AA media. Groups of 30-35 embryos at the developmental stages shown in Fig. 3 were suspended in 10 mS/m buffer (Media T, Cytopulse Sciences) and placed in the OET device. The maximum induced speed (directly proportional to DEP force) associated with each embryo was recorded (20 Vppk, 100 kHz). pDEP and nDEP responses were associated with positive and negative speeds, respectively (Fig. 3). As is evident from Fig. 3 and 4, at the 1-cell stage, embryos exhibit a strong pDEP response. Progressing from the 1-cell stage onwards, the embryos experience a smaller and smaller pDEP response until the blastocyst stage, at which point the embryos experience a nDEP response. Mean values of response at the four developmental stages shown are significantly different ($p < 0.005$). As expected from the CM factor modelling, the 1 cell to morula stage embryos experience decreasingly positive DEP, while at the early blastocyst stage, embryos experience negative DEP. This broad spectrum in DEP responses is attributed to the changing morphology, and concurrent changes in impedance, of the embryo relative to the suspension media.

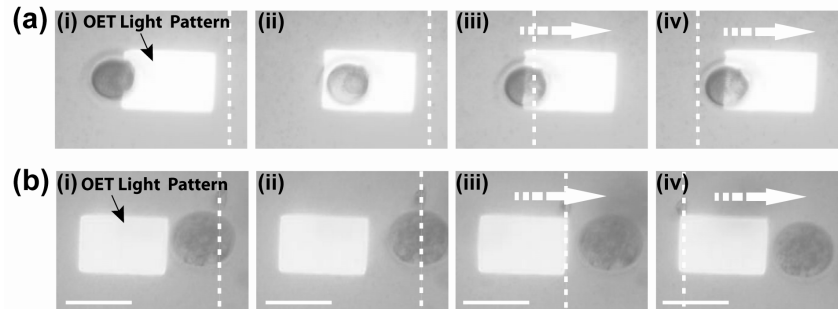


Fig. 4: White dotted line indicates a stationary point on the OET chip. (a) Sequence of images of a 1-cell embryo undergoing pDEP response. Embryo is spontaneously attracted to light pattern (i)-(ii). Stage is moved relative to light pattern resulting in movement of embryo (arrow) (iii)-(iv). (f) Sequence of images of a blastocyst undergoing nDEP response. Embryo is spontaneously repulsed from light pattern (i)-(ii). Stage is moved relative to light pattern resulting in movement of embryo (arrow) (iii)-(iv). Scale bar 100 μm .

CONCLUSION

The use of OET to quantitatively assess the developmental maturity of pre-implantation embryos has been demonstrated. This method removes the subjectivity associated with current state-of-the-art techniques. By providing a means of systematically and quantitatively assessing the developmental maturity of individual embryos, the success rate of IVF transfers can be enhanced and instances of adverse outcomes (maternal and fetal complications) will be reduced.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the UC Berkeley Microlab where all devices were fabricated and the Berkeley Sensor and Actuator Center. This work was funded by NIH/NCRR UCSF-CTSI Grant Number UL1 RR024131, NIH K-12 MRHR Grant, and the Center for Cell Control, a NIH Nanomedicine Development Center under grant PN2 EY018228. Care and handling of all experimental animals were in accordance with the University of California San Francisco's institutional animal care and use committee policies.

REFERENCES

[1] "Assisted Reproductive Technology," www.cdc.gov/ART/; Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
 [2] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
 [3] W. Choi, J.-S. Kim, D.-H. Lee, K.-K. Lee, D.-B. Koo, and J.-K. Park, "Dielectrophoretic oocyte selection chip for in vitro fertilization," *Biomedical Microdevices*, vol. 10, pp. 337-345, 2008.

[4] S. W. Dessie, F. Rings, M. Holker, M. Gilles, D. Jennen, E. Tholen, V. Havlicek, U. Besenfelder, V. L. Sukhorukov, U. Zimmermann, J. M. Endter, M. A. Sirard, K. Schellander, and D. Tesfaye, "Dielectrophoretic behavior of in vitro-derived bovine metaphase II oocytes and zygotes and its relation to in vitro embryonic developmental competence and mRNA expression pattern," *Reproduction*, vol. 133, pp. 931-946, May 2007.
 [5] P. Y. Chiou, A. T. Ohta, and M. C. Wu, "Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images," *Nature*, vol. 436, pp. 370-372, Jul 21 2005.
 [6] W. Arnold, R. Schmutzler, A. Schmutzler, H. v. d. Ven, S. Al-Hasani, D. Krebs, and U. Zimmermann, "Electro-rotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 905, pp. 454-464, 1987.
 [7] S. Neale, A. T. Ohta, H. Y. Hsu, J. K. Valley, A. Jamshidi, and M. C. Wu, "Optoelectronic Tweezers (OET) trap stiffness with HeLa cells," in *SPIE Optics and Photonics*, San Diego, CA, 2008.
 [8] D. J. Benos, "Developmental changes in epithelial transport characteristics of preimplantation rabbit blastocysts," *The Journal of Physiology*, vol. 316, pp. 191-202, July 1981 1981.
 [9] H.-Y. Hsu, A. T. Ohta, P.-Y. Chiou, A. Jamshidi, S. L. Neale, and M. C. Wu, "Phototransistor-based optoelectronic tweezers for dynamic cell manipulation in cell culture media," *Lab on a Chip*, vol. DOI: 10.1039/b906593h, 2009.