

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

利用雷射鑷夾技術量測細胞分裂力之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2215 - E - 009 - 110 -

執行期間：89年8月 1日至 90年 7月 31日

計畫主持人：徐 琅

共同主持人：

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

執行單位： 國立交通大學電子物理系

中 華 民 國 90年 10月 31日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2215-E-009-110

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：徐琅 E-mail：c2654@ms19.hinet.net

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

計畫參與人員：張博睿 E-mail：bojui.ep88g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學光電工程研究所

計畫參與人員：陳嘉齡 E-mail：jailing.ep89g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

計畫參與人員：張玉嫻 E-mail：ysc.ep89g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

說明：在本計劃「利用雷射鑷夾技術量測細胞分裂力之研究」中，由於我們欠缺生物細胞培養設備，而且對細胞分裂的操控不熟練，因此無法進行細胞分裂力之量測。然而我們在研究雷射鑷夾的過程中發現，若我們改變雷射光聚焦的焦點大小，則雷射鑷夾可以從過去只能捕捉及操控單一微粒子，變成可以捕捉一群微粒子。在經由與生物系的專家討論之後，我們認為這樣一個可捕捉一群微粒子的雷射鑷夾系統，可運用在生物醫學的樣品篩選上，對於生物醫學上的樣品處理將有很大的貢獻。因此本計劃我們研究目標改成「生物醫學樣品篩選的新利器：準焦與散焦雷射鑷夾」。

摘要

在過去，雷射鑷夾一直被廣泛應用在捕捉及搬運單一微粒子或微生物體。現在，我們已完成一套散焦雷射鑷夾，可用於提高樣品溶液的局部濃度，以及篩選微粒子的尺寸。如果成功，這對生物醫學上的樣品處理將有很大貢獻。本文即在介紹散焦雷射鑷夾的特色與應用，並展示其實際功能。
關鍵詞：雷射鑷夾、濃縮及篩選、準焦與散焦。

Abstract

In the past, optical tweezers have been widely used in the capture, move, and manipulation of a single micro particle at a time. Here, we have accomplished an off-focus optical tweezers system, which is capable of sample concentrate and sample sifting. If this work, it will contribute a great advantage in sample prepare in biology and medicine science. This thesis will introduce the character and application of off-focus optical tweezers, and demonstrate its function in practice

Keywords: Optical tweezers、Concentration and Sift、Off-focus and In-focus.

介紹

由於雷射鑷夾能捕捉到的微粒子大小約在 nm μm 的數量級，恰好與生物學中微小物的尺度相符，因此在雷射鑷夾誕生以後，立即被大量應用在生物學的研究上。藉著其可被量化的特性，量測出許多生物學中微小的力：例如肌動蛋白運動的作用力^{1,2,3}、細胞與細胞間的作用力大小、精子的運動情形⁴、DNA 分子的彈性係數⁵、RNA polymerase 的轉錄行為^{6,7}等等；這些基礎的研究在世界各地已被陸陸續續地發表出來。

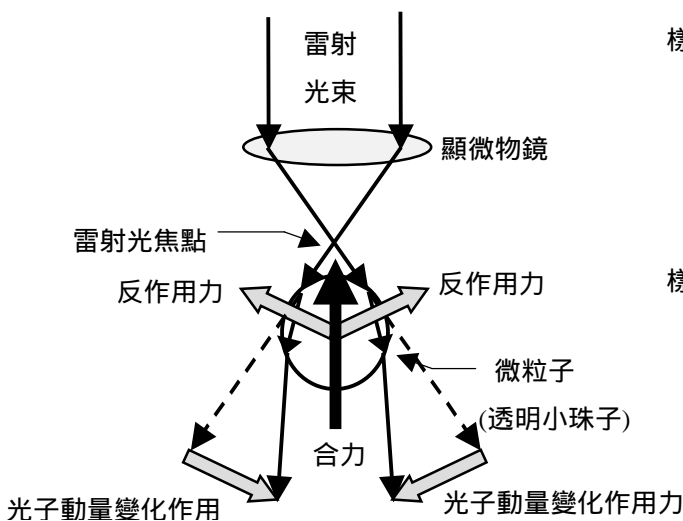
在研究雷射鑷夾的過程中，我們發現雷射鑷夾不只可以操控一個微小粒子，有時甚至會同時捕捉到數個微小的粒子。這樣的現象引發了我們的興趣，也因此我們開始研究如何能捕捉到更多的微小粒子。若能充分利用雷射鑷夾同時捕捉一大群微小粒子的功能，也許可以設計一個裝置，應用在生物醫學樣品的濃縮及篩選上。

雷射鐳夾之捕捉機制

雷射鐳夾的基本概念是將一道雷射光束經顯微物鏡聚焦後，在雷射聚焦處形成一穩定的位能井。於是，在此焦點周圍的微粒子就會被吸引到焦點，而達到捕捉與操控的目的。

如圖一所示，我們利用簡單的幾何光學與動量變化產生力的概念就可以闡釋雷射鐳夾的捕捉機制。當光線由一介質中進入到另一不同介質中時，光會發生偏折的現象，也就是所謂的折射。如果我們將光線想像成由光子所組成，當光線發生偏折時，光子的動量即產生改變，而動量改變即反應有作用力的存在。所以當雷射光線經過透明小珠子（Bead）後發生偏折，此光線偏折力係由透明小珠子提供，也就是說透明小珠子對雷射光子施一作用力使之偏折。又由牛頓第三運動定律所描述之作用力與反作用力的關係知道，雷射光子亦對透明小珠子施一反作用力，而這些反作用力的合力便是雷射鐳夾的捕捉力。

因此，一道平行的雷射光束，經過顯微物鏡聚焦後，若有微小的透明物體在其焦點附近時，由於左右偏折對稱的關係，其合力指向焦點，就會產生一個類似彈簧力的恢復力，將這個微小物體往焦點拉，並在焦點的位置達到力平衡。這樣的一個現象，就像是用一個鐳夾去夾住物體，故琛為雷射鐳夾。以上所述就是雷射鐳夾的幾何光學模型⁸（Pseudo Ray Optics Model，或稱為 Ray Optics Approximation）。



圖一. 雷射鐳夾捕捉微粒的工作機制

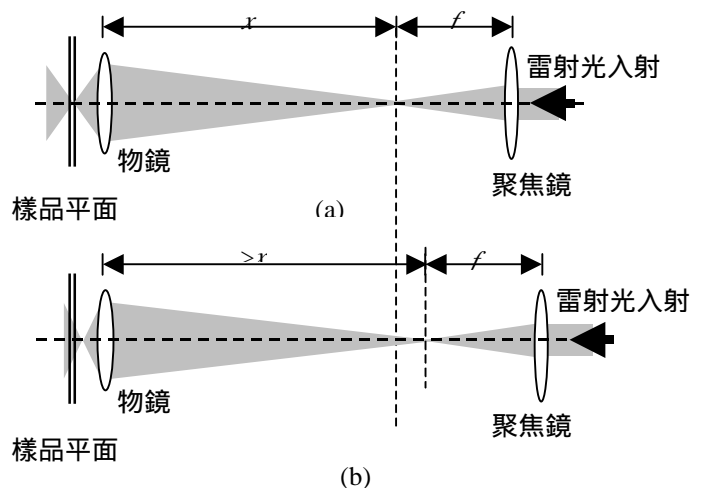
雷射鐳夾之準焦操作與散焦操作⁹

準焦與散焦雷射鐳夾是依其操作方式所命名。由於雷射鐳夾捕捉微小粒子的位置主要是在平行雷射光束經過物鏡後聚焦的焦點附近，因此過去對於雷射鐳夾最簡單的設計便是將雷射光束聚焦在所要捕捉的微小粒子的樣品平面上。然而，如果讓雷射光的焦點與樣品平面有些微的偏差，使得樣品平面的光點面積變大成為一個大光圈，將可以捕捉到更多的微小粒子。如圖二所示，在此我們定義準焦與散焦雷射鐳夾如下：

定義：

1. 準焦(In-Focus)雷射鐳夾：雷射光焦點與樣品平面共平面。
2. 散焦(Off-Focus)雷射鐳夾：雷射光焦點與樣品平面不共平面。

由於雷射鐳夾的作用力與光強度成正比，因此我們推論散焦雷射鐳夾的抓力應比準焦雷射鐳夾弱。但有趣的是，由於散焦的關係，雷射光束在樣品平面上分布的範圍比較大，能吸引的微粒子也越多，即散焦雷射鐳夾的捕捉範圍較大。因此從捕捉效率而言，散焦雷射鐳夾會比準焦雷射鐳夾用在增加微粒子濃度還來得適合。



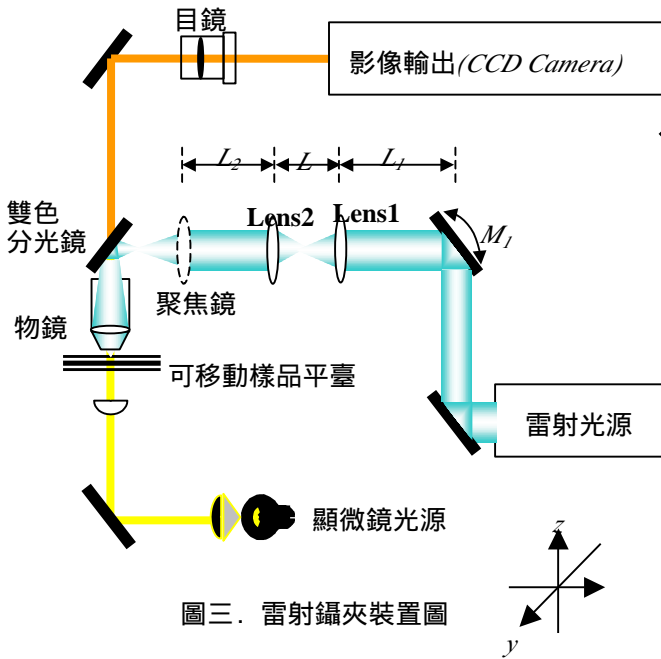
圖二. 利用聚焦鏡調變準焦或散焦操作模式

- (a) 準焦雷射鐳夾：在樣品平面捕捉範圍較小
- (b) 散焦雷射鐳夾：在樣品平面捕捉範圍較大

實驗裝置⁹

雷射鐳夾基本上是由一雷射光源、反射鏡與透

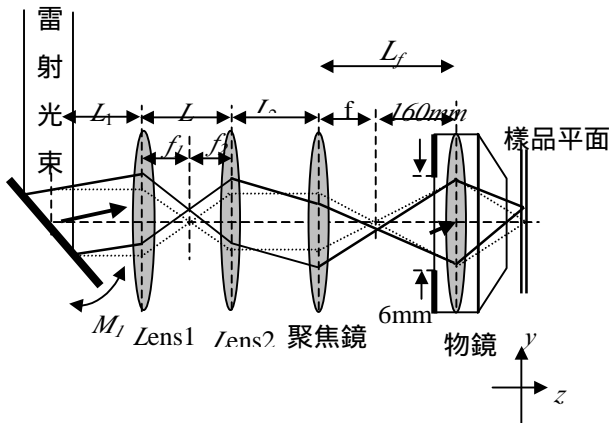
鏡所組成，如圖三雷射鐳夾裝置圖所示。其準焦與散焦操作情形如下分述兩點。



圖三. 雷射鐳夾裝置圖

1. 準焦雷射鐳夾：

本文之雷射鐳夾裝置，其準焦操作情形如圖四。利用 *Lens1*、*Lens2*、與聚焦鏡的配合，使雷射光束聚焦在樣品平面上，並且可以藉由 *M1* 的調整在樣品平面上移動雷射光焦點。

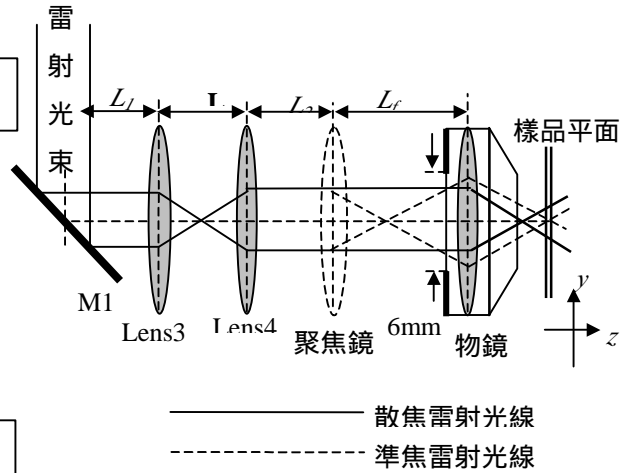


圖四. 準焦雷射鐳夾

2. 散焦雷射鐳夾：

在散焦雷射鐳夾的操作中，將聚焦鏡拿掉，使雷射光束會先在物鏡焦點聚焦，在到達樣品平面時散為一光圈，成為一散焦雷射鐳夾

系統，如圖五所示。



圖五. 散焦雷射鐳夾裝置圖

準焦與散焦雷射鐳夾橫向力之比較

我們直接引用電磁波模型¹⁰的結果作為理論分析基礎。雷射鐳夾橫向的捕捉力為：

$$\begin{aligned} F_{grad,y}(\mathbf{r}) &= -\hat{y} \frac{2fn_2a^3}{c} \left(\frac{n^2-1}{n^2+2} \right) \frac{2\tilde{y}/w(z)}{1+(2\tilde{z})^2} \left(\frac{2P}{f w(z)^2} \right) \frac{1}{1+(2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+(2\tilde{z})^2} \right] \\ &= -\hat{y} \frac{2fn_2a^3}{c} \left(\frac{n^2-1}{n^2+2} \right) \frac{2\tilde{y}/w(z)}{1+(2\tilde{z})^2} I(r) \end{aligned} \quad (1)$$

其中 r 為樣品平面上距原點的距離， n_1 為微粒子的折射率， n_2 為微粒子所在介質折射率， $n = n_1 / n_2$ ， a 為微粒子直徑， c 為光速， $w(z)$ 為雷射光點半徑 (Spot Size)，

$w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/fw_0^2)^2}$ ， w_0 為雷射光腰半徑 (Beam Waist)， \tilde{x} 、 \tilde{y} 和 \tilde{z} 則為正規化座標

(Normalized spatial coordinates)：

$(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) = (x/w(z), y/w(z), z/kw^2(z))$ ， k 為光波的波數， P 為雷射功率， $I(r)$ 雷射光強度在樣品平面上的分布，

$$I(r) = \frac{2P}{f w(z)^2} e^{-2r^2/w^2(z)}$$

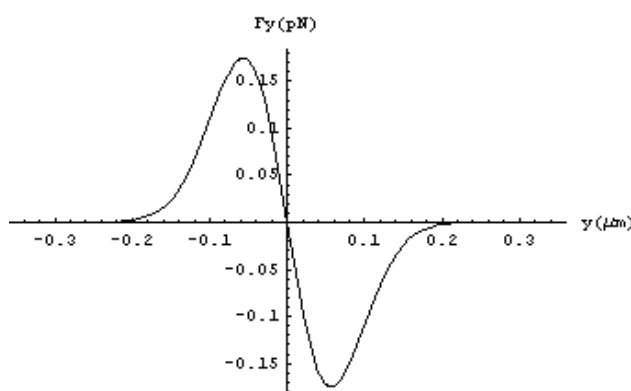
若把式中的 n_2 、 n 、 a 、 c 、 $w(z)$ 、 k 、 P 、 \tilde{z} 等數值代入， $F_{grad,y}$ 主要與 y 及 $I(r)$ 有關，也就是可以把(1)式看成：

$$F_{grad,y}(\mathbf{r}) = -Const \times \tilde{y} \times I(r) \quad (2)$$

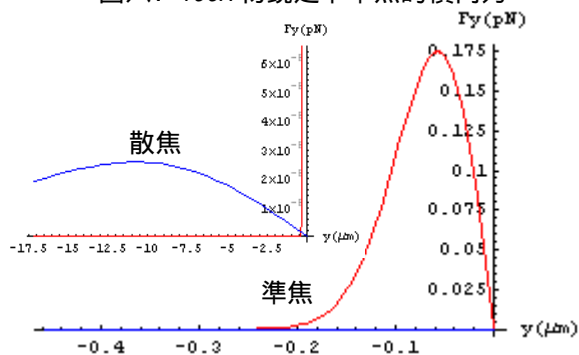
圖六為一個 $100\times$ 物鏡下，直徑為 $1\mu m$ 的微粒 (polystyrene Bead)，在雷射功率為 $100 mW$ 下的準

焦雷射鐳夾的橫向力 F_y 分布，本圖呈現一以原點為對稱中心的圖形。在原點附近某範圍內，當 $I(r)$ 的指數衰減還不劇烈，可視為常數時，(2)式就類似於一彈簧恢復力的作用力方程式，因此，在圖五原點附近某範圍內也就如一彈簧恢復力的線性作用情形。當超過某範圍後， $I(r)$ 的指數衰減劇烈，已不能視為一常數時，圖六就如指數衰減的情形。

另外，在圖中，當 y 為正值時， F_y 為負值；代表的是當微粒子在正 y 方向時，橫向力 F_y 是把它拉回光束中心。此時為一負 y 方向的力，橫向力 F_y 為負值。反之，當微粒子在負 y 方向時，橫向力 F_y 也要把它拉回光束中心，此時即為一正 y 方向的力，橫向力 F_y 為正值。而當微粒子在光束中心時，即 $y=0$ ，橫向力 F_y 消失，微粒子不受力，所以光束中心是力平衡的捕捉中心。



圖六. 100X 物鏡之下準焦的橫向力



圖七. 100X 物鏡下，準焦與散焦雷射鐳夾的橫向力分布

圖七為 100X 物鏡下，準焦與散焦雷射鐳夾的橫向力分布。我們可以發現在相同物鏡下，散焦的橫向力的大小比準焦的橫向力小的多，而散焦的橫

向力的分布卻比準焦大許多。圖七畫有主副兩圖，主圖為準焦的橫向力分佈，副圖為散焦的橫向力分佈。

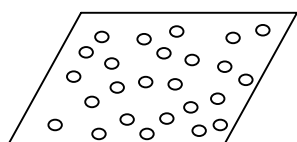
準焦與散焦雷射鐳夾的功能比較

我們設計一個可同時比較準焦與散焦雷射鐳夾的捕捉範圍與捕捉力大小的實驗⁹。

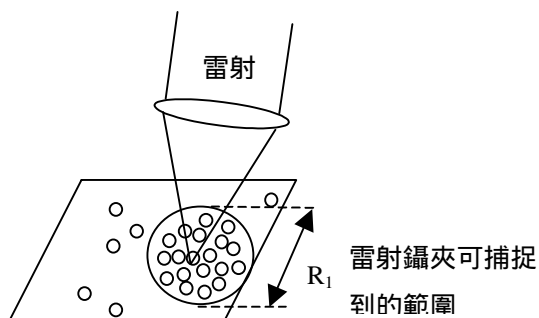
如圖八所示，改裝原有顯微鏡的樣品平台成為一個可精密控制的移動平台，接著等速移動平台，製作出水溶液與懸浮微粒子等速移動的效果。當雷射鐳夾啟動時，被捕捉的微粒子不再隨水溶液流動，兩者之間產生相對速度，微粒子因而受到一個與流速方向相同的黏滯力 (*Dragging Force*)。此黏滯力的大小與相對速度成正比，方向與捕捉力相反，會降低雷射鐳夾的捕捉成效，並縮小捕捉範圍。

如圖六所示，雷射鐳夾的橫向捕捉力在原點附近某範圍內為類似彈簧恢復力的作用方式，在此範圍之外則會隨距離而衰減。因此當平台拖曳速度 $v=0$ 時，某些微粒子受雷射鐳夾捕捉力作用而聚集成一圓面積，如圖八(2)所示。接著再以 $v>0$ 的速度等速移動平台，如圖八(3)所示，使得微粒子於平台移動方向受一黏滯力作用，此黏滯力會隨平台拖曳速度增加而變大。因為雷射鐳夾的捕捉力並不會隨平台拖曳速度而改變，所以在被捕捉範圍內，捕捉力小於水流黏滯力處的微粒子很容易脫離捕捉範圍，使得雷射鐳夾可捕捉的範圍變小。

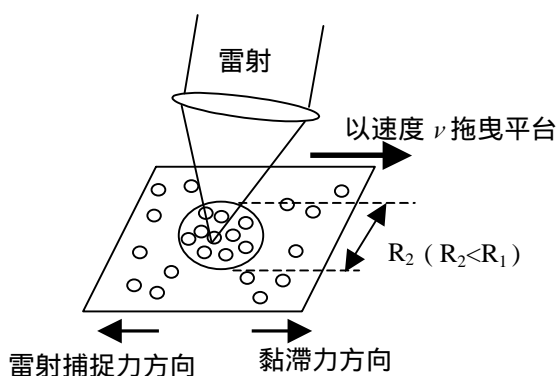
由於準焦雷射鐳夾在樣品平面上的光點面積小，捕捉範圍小，捕捉力量大；而散焦雷射鐳夾在樣品平面上的光圈面積大，捕捉範圍大，捕捉力量小。因此，推測在樣品流速較低，水溶液黏滯力作用較小時，雷射鐳夾捕捉範圍仍由光焦點截面積大小所決定，所以散焦雷射鐳夾的捕捉範圍會比準焦雷射鐳夾的捕捉範圍大。但在樣品流速較高，水溶液黏滯力作用較大，此黏滯力大小足以影響其捕捉範圍時，主宰雷射鐳夾捕捉範圍的關鍵不再是光焦點截面積大小，而是雷射鐳夾的橫向捕捉力。捕捉力越大，才能捉住微粒子不使其脫離捕捉範圍，故此時準焦雷射鐳夾可捕捉的範圍較散焦雷射鐳夾可捕捉的範圍大。



(1) 微粒子均勻散佈



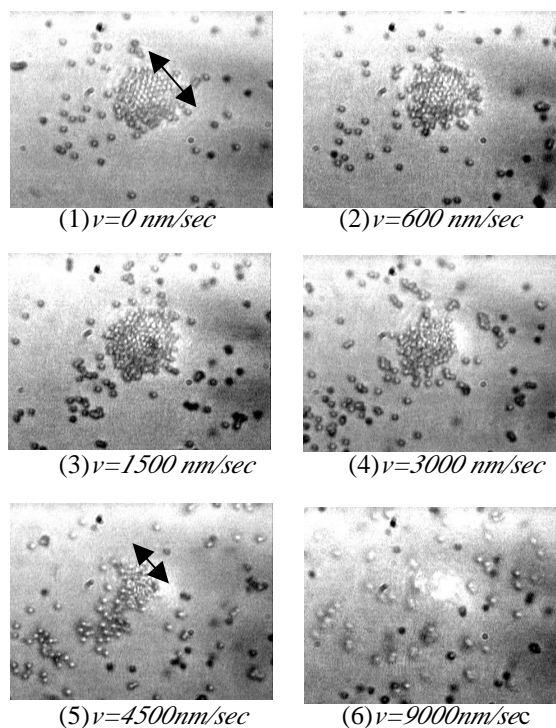
(2) 微粒子因雷射鐳夾捕捉而聚集
(平台拖曳速度 $v = 0$)



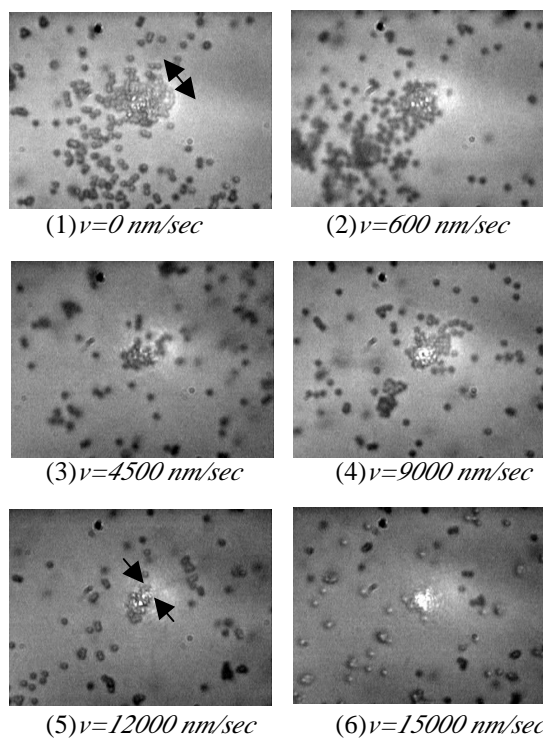
(3) 平台以等速度 v 拖曳，捕捉範圍變小

圖八. 實驗方法：量測在不同速度 v 下，
捕捉範圍的大小(R)

圖九是一系列在雷射功率為 $100mW$ 物鏡放大率為 $40X$ ，雷射鐳夾為散焦操作下的圖片。發現當樣品流速增加時，捕捉的範圍慢慢地減少。圖十是一系列在雷射功率為 $100mW$ 物鏡放大率為 $40X$ ，雷射鐳夾為準焦操作下的圖片。比較圖九及圖十發現(注意圖九(1)、九(5)及圖十(1)、十(5)的箭號)，在散焦操作下，雷射鐳夾在樣品速度小時可以捕捉到較多微粒子，但速度增大後，就無法捕捉到那麼多。相反的，在準焦操作下，雖然一開始在樣品速度小時捕捉的微粒子較少，但當樣品速度增大後，仍能捕捉到幾個微粒子。

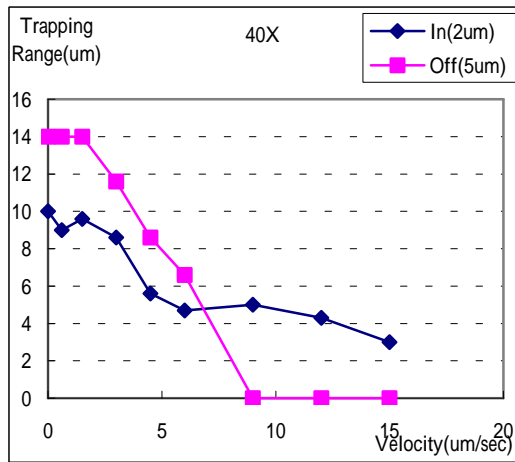


圖九. 散焦雷射鐳夾在不同的樣品流速下的捕捉情形，物鏡倍率為 $40X$ ，雷射功率為 $100mW$ 。



圖十. 散焦雷射鐳夾在不同的樣品流速下的捕捉情形，物鏡倍率為 $40X$ ，雷射功率為 $100mW$ 。

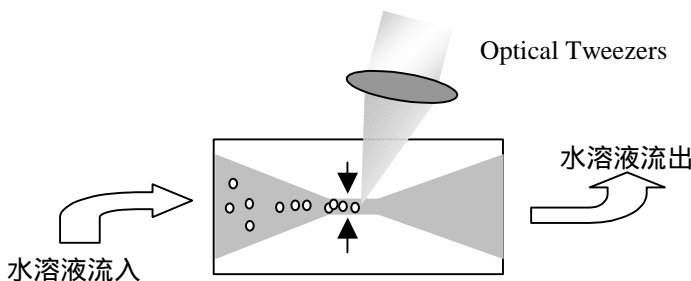
接著再利用 *Labview* 軟體分析捕捉範圍的大小。在雷射功率為 $100mW$ 之下，圖十表示物鏡倍率為 $40X$ 時，準焦與散焦雷射鐳夾的捕捉範圍與樣品流動速度的關係。



圖十一. 物鏡倍率為 $40X$ 時，準焦與散焦雷射鐳夾的捕捉範圍與樣品流動速度的關係。右上角的圖例 In 代表的是準焦雷射鐳夾，Off 代表的是散焦雷射鐳夾。括弧內的數字代表的是雷射光點的直徑。

散焦雷射鐳夾在生物樣品局部濃度控制的應用⁸

因為散焦雷射鐳夾在樣品平面捕捉力較小，但捕捉範圍較大，且在樣品平面並沒有強烈的聚焦，較不會對樣品造成傷害。所以，我們認為可以利用散焦雷射鐳夾做一個裝置，用來濃縮生物檢測上樣品的濃度。設計概念如圖十二。



圖十二. 利用散焦雷射鐳夾濃縮檢測樣品的設計概念圖

濃縮樣品的原理是讓欲檢測的溶液樣本流過一具有微小的通道的裝置。在此通道中加入散焦雷射鐳夾，使得欲觀察的東西如微生物或細菌等等能被雷射鐳夾抓住，而在通道中累積，達到濃度增加的效果。

由於雷射鐳夾的捕捉還是有一定的範圍，因此

必須設計微小通道的寬度，以及將來要通過此一微小通道的流速，以提高捕捉的效率。

結論

雷射鐳夾自 1970 年發明以來，在生物科技上的應用已是越來越多。在國外，雷射鐳夾早已被廣泛應用在生物科技研究上，然而在國內卻仍未見許多研究發表。近來生物醫學與理工學科的跨領域整合漸漸地大放異彩。在未來的研究中，我們希望繼續開創雷射鐳夾在生物科技領域的應用，例如即時 (Real Time) 量測力的系統、本文所提之濃縮樣品濃度裝置、以及微粒子的篩選等等。冀望藉由這樣跨領域的接觸與合作模式，能刺激國內光電或半導體與生物科技的整合，創造出更多的新點子與新發明，提升國內生物科技的技術發展，對全人類的生活福祉有一貢獻。

參考資料

1. Chris M. Coppin, Daniel W. Pierce, **Long Hsu**, and Ronald D. Vale, "The load dependence of kinesin's mechanical cycle," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 94, 8539-8544, **1997**.
2. Svoboda K, Block SM: Biological applications of optical forces. Ann Rev Biophys Biomol Struct 1994. 23:247-285. Comprehensive review of optical tweezer techniques and theory with applications to biological systems.
3. Claudia Veigel, Lynne M. Coluccio, James D. Jontes, John C. Sparrow, Ronald A. Milligan, and Justin E. Molloy. "The motor protein myosin-1 produces its working stroke in two steps. Nature, Vol.398, pp.530-533, 8 April **1999**.
4. J. M. Colon, P. Sarosi, P. G. McGovern, A. Askin, J. M. Dziedzic, J. Skurnick, G. Weiss, E. M. Bonder, "Controlled micromanipulation of human sperm in three

dimensions with an infrared laser optical trap:
Effect on sperm velocity,” Fertility &
Sterility, Vol. 57, pp 695-698, **1992**.

5. Perkins TT, Smith DE, Larson RG, Chu S:
Stretching of a single tethered polymer in a
uniform flow. Science **1995**.263:83-87.
6. Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R,
Block SM, Gelles J: Transcription against an
applied force. Science **1995**.270:1653-1657.
7. Michelle D.Wang,Steven M. Block:Force
and Velocity Measured for Single Molecules
of RNA Polymerase. Science
(282):902-907,30 Oct. **1998**.
8. W. H. Wright, G. J. Sonek, and M. W. Berns,
1994,”Parametric study of the forces on
micro spheres held by optical tweezers, ”
Appl. Opt., Vol. 1735-1748.
9. 張博睿, 徐琮, “準焦與散焦雷射鑷夾之設
計與應用,”90 年度國立交通大學電子物理
學系碩士論文.
10. Harada Y, Asakura T: Radiation forces on a
dielectric sphere in the Rayleigh scattering
regime.Opt Comm 1996.124:529-541.