

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 90-2213-E-009-085

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 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：jialing.ep89g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

說明：本計劃原「利用雷射鑷夾技術量測精蟲活動力之研究」，第一步必須先完成雷射鑷夾之力的校正¹，第二步則是尋找生物樣品(精蟲)進行量測。由於時間關係及生物樣品取得之困難，我們在計劃期限內僅完成第一步的力校正工作，因此本報告內容將著重於說明我們的校正工作。但目前也已著手開始準備生物樣品之量測工作，相信在不久將來將能實際量測不同的生物樣本。

一、中文摘要

雷射鑷夾具有非接觸性捕捉與操縱微米尺度的小粒子之特性，日益成為分子生物學中量測微小生物的運動力的工具。本計畫的目標即在利用影像處理技術架設一套可即時量測雷射鑷夾橫向捕捉力的工作平台。對此，我們設計了一雷射鑷夾橫向捕捉力量測實驗，利用已知的水流黏滯力與未知的雷射鑷夾捕捉力達力平衡狀態，據此量化「雷射鑷夾橫向捕捉力」的大小。同時利用影像處理技術測得「微粒子位移量」與「雷射鑷夾橫向捕捉力」的線性關係，並且校正實驗誤差。在不同的雷射功率捕捉之下，實驗結果與理論曲線趨勢相當近似，而且絕對值都相差 0.83 倍，其誤差來源可能為水黏滯係數隨溫度改變，只要將實驗結果作一比例轉換的校正，仍可作為定量上的分析。

關鍵詞：雷射鑷夾、捕捉力、即時影像處理系統

Abstract

Optical tweezers become a promising tool for its noninvasive trapping and micromanipulation for microscopic objects. The goal of this project is to setup a real-time force measurement platform using an optical tweezers system and imaging processing technique. In this experiment, the object, a polystyrene bead of 6.8 μm in diameter, is first trapped in the focus

of our optical tweezers system. Then, the bead is shifted by a water drag force, which is controllable. In equilibrium, the magnitude of the transverse trapping force is acquired, which is equal to that of the water drag force. Meanwhile, the displacement of the bead is measured using imaging processing technique. Consequently, the nearly linearly relationship between the force and displacement, which is also the effective spring constant of the optical tweezers system, is thus obtained. The measured spring constants at five different laser output powers fit well in shape with the theoretical expectations, respectively. However, the measured values differ the expected in magnitude by a factor of 0.83. This may be due to the uncertainty in temperature in the interface between the bead and the surrounding water, which gives rise to an improper value to the temperature-dependent drag coefficient in the calculation for the water drag force in use.

Keywords: Laser tweezers、trapping forces、real-time force measurement platform using an optical tweezers system.

二、緣由與目的

1. 雷射鑷夾捕捉力量測實驗之概念

將含有球形微粒子 (Polystyrene Beads) 的水溶液置於載玻片上做為實驗樣品，利用一道雷射光經由顯微物鏡聚焦在樣品平面上，當雷射功率夠

大，足以捕捉一顆微粒子時的平衡情形下，以水流沖刷被雷射鐳夾捕捉的微粒子。若微粒子仍被雷射鐳夾捕捉住，此時雷射鐳夾捕捉力 F_T 與水流黏滯力 F_W 形成一動態平衡，即 $F_T = F_W$ 。而微粒子的平衡位置與原先位置相較之下也將有所偏移，隨著水流流速愈大，微粒子偏移位置 D 也愈大，直至雷射光捕捉不住微粒子為止。

簡單來說，當整個雷射鐳夾系統呈平衡狀態時，雷射鐳夾捕捉力 F_T 等於水流黏滯力 F_W 。假設微粒子為圓球狀，對水流經圓球之流動狀況，其摩擦阻力及壓力阻力均會影響總黏滯力，在極低雷諾數之下²，即 $Re \leq 1$ ，此時之慣性力幾可忽略，則微粒子在水中所受的水流黏滯力可用 Stoke's law 表示： $F_W = 6 \pi a \eta v$ ，其中 a 為微粒子半徑， η 為水黏滯係數， v 為水流速度^{3,4}。因此，由水流速度 v 可求得水流黏滯力 F_W ，再利用 $F_T = F_W$ 的力平衡關係，使得我們的實驗可藉由改變水流沖刷樣品的速度 v ，來校正雷射鐳夾捕捉力 F_T ，圖 1 為實驗概念示意圖。如圖 1 (a) 所示，在無水流沖刷微粒子時，微粒子圓心與雷射鐳夾捕捉中心（即雷射光聚焦後的焦點位置）會重疊。當水流以速度 v_1 沖刷微粒子時，如圖 1 (b) 所示，微粒子圓心將偏移捕捉中心一段 D_1 距離。不同的水流速度，亦會使微粒子產生不同的偏移距離，如圖 1 (c)，當水流速度 $v_2 > v_1$ 時，則偏移距離 $D_2 > D_1$ 。因此，藉由這項實驗便可找出 F_T 與 D 之間的關係變化。

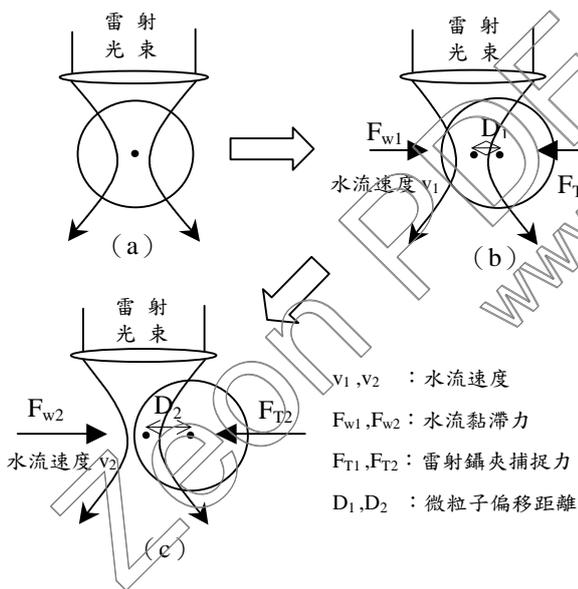


圖 1 利用水流黏滯力校正雷射鐳夾橫向捕捉力的實驗概念示意圖

2. 雷射鐳夾捕捉力量測實驗之方法

改裝原有的顯微鏡樣品平台，成為可由一步進馬達控制平移方向及速度的移動平台，當等速移動

平台時，可製造出水溶液與懸浮微粒一同與平台等速移動的效果。當雷射鐳夾啟動時，被捕捉的微粒子不再隨水溶液流動，兩者之間產生的一相對速度，微粒子因而受到一個與流速方向同向的黏滯力（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。因此，改變平台移動速度，即可改變雷射鐳夾捕捉力大小，記錄下微粒子圓心相對雷射光焦點位置的偏移距離，直至平台移動速度逐漸增加至微粒子「恰好」脫離雷射鐳夾捕捉陷阱而漂走時，此時的樣品平台速度即為「逃脫速度（Escape Velocity）」，微粒子圓心偏移距離即為「雷射鐳夾最大捕捉範圍」，並可得到雷射鐳夾之最大捕捉力！

3. 實驗裝置

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 2 雷射鐳夾裝置圖所示，本實驗將一道 A_r^+ 雷射光束為穿過由兩面 45° 反射鏡所組成的潛望鏡，之後再經過聚焦鏡，最後送入顯微物鏡抓住微粒子。在送入顯微物鏡之前，加上一片只讓雷射光幾乎全反射而其他可見光幾乎全穿透的雙色分光鏡。此外，在這片斜放 45° 的分光鏡上方，另外放置一片濾光鏡，目的是為了降低觀察時因雷射光過強而造成的散射光干擾。

顯微目鏡改由 CCD 攝影機取代，可透過監視器來觀察雷射鐳夾的捕捉情形，並且即時將 CCD 攝影機所接收的訊號傳送至電腦，同步進行影像擷取及數據分析。

在樣品平台部分，利用精密步進馬達來控制樣品平台的移動方向及移動速度，而這步進馬達是由電壓的輸入來控制馬達的輸出速度。因此，只要使用類比數位 (A/D) 介面卡，令電腦操控步進馬達所輸出的移動速度，就可精確地掌握樣品平台移動速度。如此一來，這套雷射鐳夾系統就能完全地即時電腦自動化，以節省許多人工操作及校準的時間。

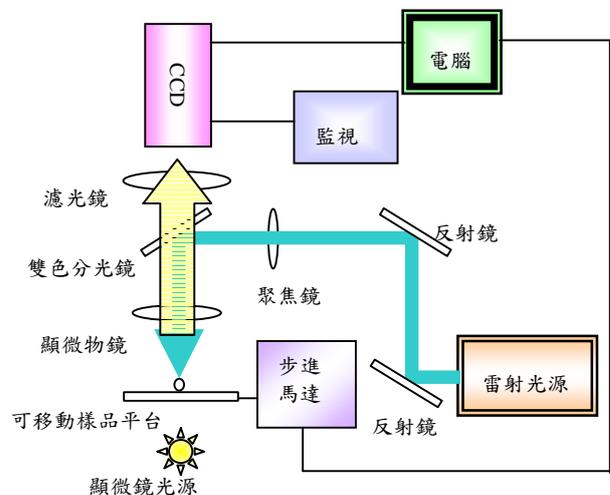


圖 2 雷射鐳夾裝置圖

4. 影像分析系統

本實驗室使用 National Instrument 的 Imaq 影像處理系統，來做為雷射鐳夾捕捉力量測實驗時的影像分析工具。由於它可以即時計算我們的影像資訊，例如：微粒子的數目、移動座標、移動速度等等。因此，在雷射鐳夾捕捉力實驗中，Imaq 可將電腦所擷取的影像作即時的資訊分析，這將可避免人為的計算誤差及影像分析時的工作時間，達到「即時雷射鐳夾捕捉力量測系統」的功能。

以下圖 3 為利用 Labview 軟體及 Imaq 所寫出的「即時雷射鐳夾捕捉力量測系統」之操作面板。其可同時控制步進馬達的速度，及即時影像擷取分析，並計算出在各個平台速度下的微粒子圓心位移平均值，最後以 Excel 的形式儲存至資料夾中，以方便我們做數據分析。

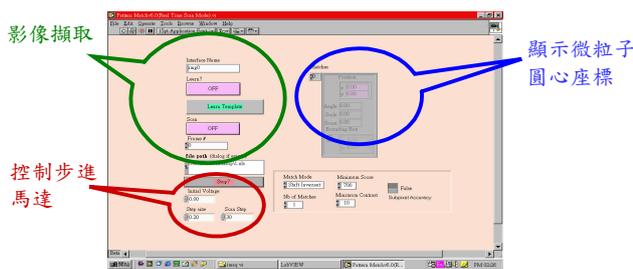


圖 4 利用 Labview 軟體及 Imaq 所寫出的「即時雷射鐳夾捕捉力量測系統」之操作面板

三、結果與討論

本計畫最主要的目的，是希望能在利用雷射鐳夾捕捉細胞、細菌等生物體的同時，能即時得到被捕捉的生物體的作用力之定量關係！然而，要達到此項目的的首要工作就是雷射鐳夾捕捉力的校正，定量地了解雷射鐳夾捕捉力的分佈，也就是微粒子位移量與雷射鐳夾捕捉力的關係，就可以經由位移量的監測隨時得知捕捉力的大小，這對生物力的量測來說就不是件難事了。

首先將實驗的結果與理論模型預測的數值，針對雷射鐳夾的橫向捕捉力及橫向捕捉範圍作一分析與比較。圖 4 為理論值曲線，圖 5 為實驗值曲線，其結果顯示兩曲線之橫向捕捉力分佈相當近似，僅斜率稍有不同，實驗所對應的捕捉力值平均都是理論值的 0.83 倍。

至於捕捉力 F_y 的實驗推算值與理論值之 0.83 倍誤差來源，可能為微粒子尺寸規格誤差，及水黏滯係數的不準確。由於我們是利用 $F_T = F_w = 6\pi a \eta v$ 來計算雷射鐳夾捕捉力，因此微粒子半徑 a 及水黏滯係數 η 就顯得相當重要。其一，我們並不能保證所購得的微粒子尺寸規格毫無誤差。其二，則是黏滯係數會隨溫度而改變，而我們於實驗過程當中並無法輕易測量微粒子周圍的水溫。因此，我們

並不能確定在實際上的 η 值須帶入何種溫度下的黏滯係數值。圖 5 實驗結果是代入水溫為 30 °C，黏滯係數 $\eta = 0.798$ 所得到的實驗結果。假若，在此處代入水溫為 20 °C，黏滯係數 $\eta = 1.002$ 所得到的實驗結果，實驗值與理論曲線僅差 0.99 倍，兩者近乎符合。事實上，水溫不應該低於室溫，但在實驗過程中水溫分佈並不均勻而難以取樣，因為雷射光會造成樣品局部加熱，且有水流不停地把雷射光焦點的热量帶走。因此，目前我們並無法得知微粒子周圍的適切水溫，但在未來工作中，仍希望能找到準確量取樣品水溫的方法以解決問題。總而言之，雖然實驗的結果有這些固定比例的誤差，但只要將實驗結果作一比例轉換的校正，仍可作為定量上的分析！

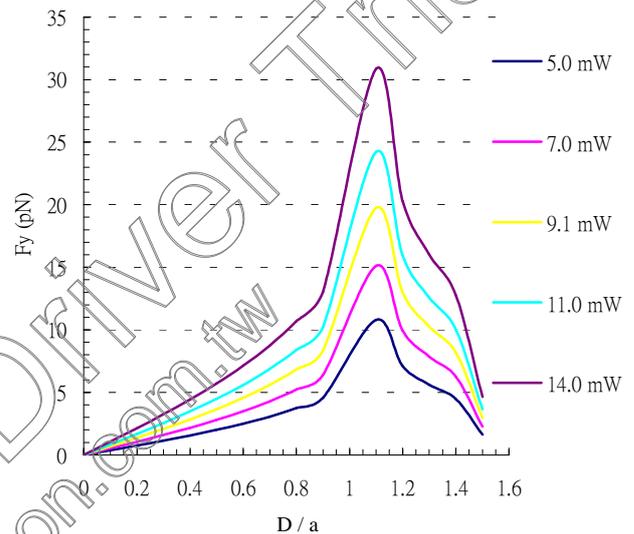


圖 4 利用 Mathematica 模擬雷射鐳夾在不同雷射光功率下的捕捉力空間分佈圖

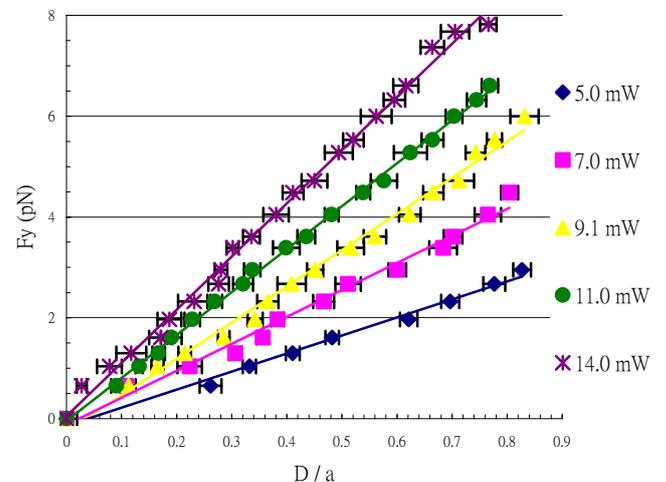


圖 5 實際操作雷射鐳夾捕捉半徑 a 為 3.4 μm 的微粒子，在不同雷射光功率下的橫向捕捉力 F_y 與微粒子圓心位移 D 的線性關係圖

四、結論

1. 雷射鑷夾捕捉力的量化：由於雷射鑷夾具有非接觸、非破壞而可捕捉並操縱微小粒子的特性，因此可藉著其可被量化的特性，量測出許多生物學中微小的力。
2. 雷射鑷夾系統的即時自動化：在這二十一世紀講求科技微小化的時代，更講求操作工具的高效率及便利性，這套可即時顯微操縱及量測生物力的雷射鑷夾系統，在生物科技的發展上，對於一些非光電、電子等背景的人來說，將是操作簡單、省時省力的重要工具。
3. 實驗結果與預測結果間的誤差及校正：實驗數據與理論曲線趨勢相當近似，但絕對值相差 0.83 倍，而誤差來源可能為微粒子尺寸規格的誤差，及水黏滯係數隨溫度改變的緣故，冀能在未來工作中找出可確切測量微粒子周圍水溫的方法。
4. 目前我們對於生物樣品的量測將從較小的微生物或細菌開始，此係由於精蟲體積較大，游泳力量較強，因此實驗技巧需更加成熟。我們與清大生命科學系張晃猷教授已尋找適當的生物樣品⁵先作練習，相信在不久的將來應可以將研究的成果發表。
5. 本計劃嚴格來說僅完成了一半的工作，但也由於這一半的工作將使得我們未來的工作更加輕鬆。我們目前積極測試這套系統在生物系統量測的準確性，若證明其實用性，希望能更加推廣至台灣其他基礎研究上。

五、參考文獻

1. 陳嘉齡, 徐琅, “雷射鑷夾捕捉力之量測與分析,” 91 年度國立交通大學電子物理學系碩士論文.
2. Shapiro, A. H., *Shape and Flow, The Fluid Dynamics of Drag*. New York: Anchor (1961).
3. W. H. Wright, G. J. Sonek, and M. W. Berns, “Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers,” *Appl. Opt.*, **33**, 1735 (1994).
4. S. Sato, and H. Inaba, “Optical trapping and manipulation of microscopic particles and biological cells by laser beam,” *Opt. Quant. Electron.*, **28**, 1 (1996).
5. Makoto Miyata, William S. Ryu, and Howard C. Berg, “Force and Velocity of Mycoplasma mobile Gliding,” *Journal of Bacteriology*, Apr. 2002, p. 1827-1831.