

摘要

我們建立了兩個以紅外線為光源的光鑷子（Optical tweezers），分別為：可調波長的摻鈦藍寶石雷射（Ti: sapphire laser， $0.7\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ ）以及固定波長的半導體雷射（Diode laser， 830nm ），兩者最大輸出功率均為數百毫瓦（mW）。我們將此裝置 couple 到顯微鏡的光路中，運用觀察樣本時所用的物鏡聚焦，以達到所需的光強梯度。我們使用聚苯乙烯膠粒（Polystyrene latex）來測試光鑷子的性能，並使用人類肝癌細胞（Hepatoma cells）來測試此波段之紅外光對生物的影響。這套設備將應用於生物學的領域上，包括細胞胞器（Organelle）位置之操縱，以及完成測量拖曳力與小珠相對於雷射聚焦光點位置的關係。如此可以藉由測量標準小珠與光點的相對位置，測量出力的大小，據估計其最大拖曳力約為 pN 級，在生物應用上恰好可以用以測定一些生命現象所牽涉到的力。

引言

光鑷子的發展史

在 1970 年代，Arther Ashkin 等人首先提出能利用光壓（Optical pressure）操弄微小粒子的概念¹，他們將兩道相向的雷射光加以聚焦，利用其相反方向的光壓構成一個穩定能量阱，建立第一套利用光壓操弄微小粒子的工具。這套方法由早先所研究的雷射致冷（Laser cooling）技術演變而來，假設雷射致冷的機制不只可以運用在原子分子的尺度，並且可以推廣到 μm 級的粒子上。之後的幾年中，Ashkin 等人陸續發表了幾種應用，包括了將質點提起以對抗重力等等²。

一直到 1980 年代初期，Ashkin 等人才發現單獨一道強烈聚焦的

光束就足以形成三軸都穩定的能量阱，可以吸引電介質粒子並侷限在光束腰部的中央，第一部「光鑷子 (Optical tweezers)」於焉誕生^{3,4,5}。也因此，光鑷子的正式名稱爲「Single-beam optical gradient force trap」，可以用來抓取並移動從數十nm到數十 μm 的微小粒子。

使用光鑷子，我們可以精確的移動 μm 級的粒子，並且施以無破壞性的遠距操控。很快的，這項技術就開始在許多領域中被廣泛的應用，尤其是生物及物理科學方面。在生物上，Svoboda和Block等人是這方面應用的佼佼者⁶，所及包括微管 (Microtubule) 的動力學問題，以及其中運動單位蛋白質 (Motor proteins) [例如：動力蛋白 (Dynein)、傳動素 (Kinesin) 等] 的運動行爲及特性。另外，在物理化學方面的膠體和界面科學上也有卓越的進展⁷。

生物領域中的應用

在本專題中，我們最有興趣的是光鑷子在生物學上的應用。基於光鑷子的特性，其應用的範圍通常爲提取並移動生物體內的胞器，也可以限制胞器的移動。除了操弄粒子的位置以外，參與生物過程的作用力也可以藉由光鑷子測量出來。其方法通常是先校正光鑷子的最大抓取力 (Trapping force)，再調整雷射的功率，使其恰達成力平衡，如此計算出力的大小，其中包括計算DNA的彈性係數⁸，以及在施力的狀況下做轉錄 (Transcription) 的實驗⁹。當然，除了這些方面以外，還有許多可能的應用，等待我們去開發，包括阻止細胞分裂 (Cytokinesis) 時染色體 (Chromosome) 的分離，彎曲某些長鏈狀生物分子等。

理論基礎

撇開光鐳子在各方面廣泛的應用不談，其作用理論基礎似乎還未達完備的地步。目前有兩種近似方法來計算其作用機制，分別適用在粒子尺寸遠小於波長及遠大於波長的情況下。最後我們將說明其完整量化的理論之困難所在。

Rayleigh 散射狀況¹⁰:

Rayleigh 散射狀況 (Rayleigh scattering regime) 是指當粒子大小遠小於電磁波波長時，故有以下兩個條件：

1. 將粒子看做是一個電介質 (Dielectric media)，會因電場 \mathbf{E} 的存在產生偶極矩 \mathbf{p} (Dipole moment)。一個電偶極在不均勻電場中所受的力 \mathbf{F}_{grad} 為：

$$\mathbf{F}_{grad} = [\mathbf{p} \cdot \nabla] \mathbf{E} \quad (1)$$

2. 設粒子半徑 a 相對於電磁波波長夠小，使得對粒子而言，其所感受到四周的電場大約為定值。此時，靜電學理論適用於偶極矩 \mathbf{p} 的計算，因而可得：

$$\begin{aligned} \mathbf{p}(\mathbf{r}, t) &= 4\pi\epsilon_2 a^3 \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2} \right) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \\ &= 4\pi n_2^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \end{aligned} \quad (2)$$

n 為粒子相對於介質的相對折射率， n_2 為四周介質之折射率。(2)代回(1)，得：

$$\mathbf{F}_{grad}(\mathbf{r}, t) = 4\pi n_2^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{1}{2} \nabla E^2(\mathbf{r}, t) \quad (3)$$

對時間作平均：

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{grad}(\mathbf{r}) &= \langle \mathbf{F}_{grad}(\mathbf{r}, t) \rangle_T = \pi n_2^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \nabla |\mathbf{E}(\mathbf{r})|^2 \\ &= \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \nabla I(\mathbf{r}) \end{aligned} \quad (4)$$

此式看似簡單，然而一個聚焦後的高斯型光束（Gaussian beam）在腰部附近的光場相當複雜，經由仔細的計算，在近軸近似狀況下，可以算出其光強對位置的變化 $I(\mathbf{r})$ 為：

$$I(\mathbf{r}) = \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \quad (5)$$

其中 P 為光束的總功率， $P = \pi w_0^2 n_2 \epsilon_0 c E_0^2 / 4$ ， \tilde{x} 、 \tilde{y} 和 \tilde{z} 則為轉換後的坐標（Normalized spatial coordinates）：
 $(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) = (x/w_0, y/w_0, z/kw_0^2)$ ， k 為光波的波數。

代回(4)可得抓取力 \mathbf{F}_{grad} 各分量的空間分佈：

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{grad, x}(\mathbf{r}) &= -i \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{2\tilde{x}/w_0}{1 + (2\tilde{z})^2} \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \\ &= -i \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{2\tilde{x}/w_0}{1 + (2\tilde{z})^2} I(\mathbf{r}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\mathbf{F}_{grad,y}(\mathbf{r}) &= -j \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{2\tilde{y}/w_0}{1 + (2\tilde{z})^2} \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \\
&= -j \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{2\tilde{y}/w_0}{1 + (2\tilde{z})^2} I(\mathbf{r})
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\mathbf{F}_{grad,z}(\mathbf{r}) &= -\mathbf{k} \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{8\tilde{z}/(kw_0^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \left[1 - \frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \\
&\quad \times \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \\
&= -\mathbf{k} \frac{2\pi n_2 a^3}{c} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{8\tilde{z}/(kw_0^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \left[1 - \frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] I(\mathbf{r})
\end{aligned}$$

由上面的式子，我們可以很容易的計算出 $\mathbf{F}_{grad,x}$ 和 $\mathbf{F}_{grad,y}$ 最大的位置分別在 $(x,y,z) = (\pm w_0/2, 0, 0)$ 以及 $(0, \pm w_0/2, 0)$ 處，而軸向的抓取力 $\mathbf{F}_{grad,y}$ 則在 $(0, 0, \pm kw_0^2/2\sqrt{3})$ 處有極大值。

除了抓取力以外，光束還產生一個散射力（Scattering force），也影響此粒子的運動。此力起因於電場隨時間週期性的變化，這個隨著電場同步感應的電偶極接著向四面八方放出散射波。如此的散射改變了入射波的強度及方向，其間的動量變化也會作用到這個粒子上，而成爲散射力，由理論計算可以推得此力的大小爲：

$$\mathbf{F}_{scat}(\mathbf{r}) = \frac{C_{pr} \langle \mathbf{S}(\mathbf{r}, t) \rangle}{c/n_2} = \mathbf{k} \left(\frac{n_2}{c} \right) C_{pr} I(\mathbf{r})$$

其中 C_{pr} 爲此粒子對此光波的散射截面（Cross section）， \mathbf{k} 爲 z 方向的單位向量，並設爲光束傳播方向。對適用於Rayleigh狀況的微小電介質粒子而言， C_{pr} 可以用下式表示：

$$C_{pr} = C_{scat} = \frac{8}{3} \pi (ka)^4 a^2 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2$$

於是，我們可以得出散射力 \mathbf{F}_{scat} ：

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{scat} = & \mathbf{k} \frac{n_2}{c} \frac{8}{3} \pi (ka)^4 a^2 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \\ & \times \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \end{aligned}$$

從這個式子我們可以看出，散射力必定沿著光行進的方向，並且與該處光強度成正比。亦即，粒子將會因散射的關係而被推往光前進的方向。對於z軸的光學力來說，散射力無疑的是破壞其穩定性及對稱性的重要因子，故對光鐳子的設計上，若要求z軸方向的穩定性，必須讓抓取力 \mathbf{F}_{grad} 大於散射力 \mathbf{F}_{scat} ，由此可知兩者的比值 R 須遵守以下規範：

$$\begin{aligned} R = & \frac{|F_{grad,x}(0,0, kw_0^2 / 2\sqrt{3})|}{|F_{scat}(0,0, kw_0^2 / 2\sqrt{3})|} \\ = & \frac{3\sqrt{3}}{128\pi^5} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{\lambda^5}{a^3 w_0^2} \geq 1 \end{aligned}$$

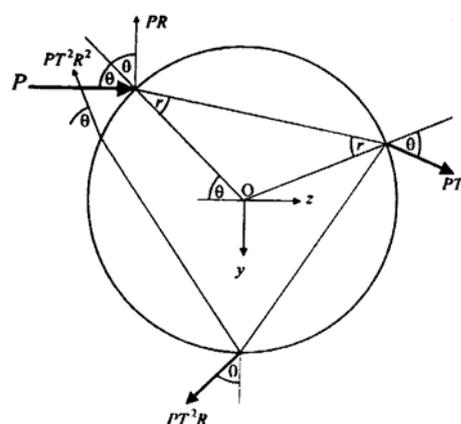
因此，要增大z軸的穩定性，最好的方法是增大粒子的相對折射率和減小光束腰部半徑。有趣的是：若粒子太大，z軸的穩定性也不易保持，這是因為散射力與粒子半徑的6次方成正比，而抓取力只有3次方正比的關係。由此也可以推測要求z軸的穩定性時，粒子大小的上限。用一般的數據加以估算：一個聚苯乙烯膠粒 (Polystyrene latex sphere) 在水中的相對折射率 $n = 1.65/1.33 = 1.24$ ，設 $2w_0 = 1.5\lambda = 0.58$

μm ，並要求 $R \geq 3$ ，則最大的粒子直徑約為 62 nm。

Mie 散射狀況¹¹:

若粒子大到數個 μm ，而使得粒子大小遠大於使用的光波長的話，則可以適用於 Mie 散射狀況 (Mie scattering regime)，此時可以做幾何光學的近似解，故又稱射線光學近似狀況 (Ray optics approximation)。

如圖，假設一道雷射光束從折射率為 n_2 的介質中射向一不吸收光能的透明圓球，則由於此光線受到多次部分折射與部分反射，光的行進方向改變，動量產生變化，故給予此透明圓球一個反衝動量，經由計算 (Rosen，



1979、Rosen和Imbert，1976)，可以得到其總變化量。假設光在每個界面上的透射率為 T ，反射率為 R ，則在球內傳播的光強度隨著光的多次反射為 PT^2 、 PT^2R 、 PT^2R^2 ... PT^2R^n ， P 為入射光強度，經由一連串的分析，可以得出所受軸向和徑向的光學力：

$$F_A = \frac{n_2 P}{c} Q_A$$

$$= \frac{n_2 P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2r) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\}$$

$$\begin{aligned}
F_R &= \frac{n_2 P}{c} Q_R \\
&= \frac{n_2 P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2r) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\}
\end{aligned}$$

θ 爲入射光的入射角， r 則爲入射光第一次折射的折射角，也是接下來每次反射時的入射角， Q 則爲動量變化相對於入射動量的比值。式中我們所用的透射率 T 與反射率 R 與光的偏振態有關，其關係式爲：

$$\begin{aligned}
R_{\perp} &= r_{\perp}^2 = \left(\frac{\cos \theta - n \cos r}{\cos \theta + n \cos r} \right)^2 \\
T_{\perp} &= \frac{n \cos r}{\cos \theta} t_{\perp}^2 = \frac{n \cos r}{\cos \theta} \left(\frac{2 \cos \theta}{\cos \theta + n \cos r} \right)^2 \\
R_{\parallel} &= r_{\parallel}^2 = \left(\frac{\cos r - n \cos \theta}{\cos r + n \cos \theta} \right)^2 \\
T_{\parallel} &= \frac{n \cos r}{\cos \theta} t_{\parallel}^2 = \frac{n \cos r}{\cos \theta} \left(\frac{2 \cos \theta}{\cos r + n \cos \theta} \right)^2
\end{aligned}$$

其中 $n = n_1/n_2$ 爲球相對於四周介質的相對折射率。而 \perp 與 \parallel 則分別代表垂直和平行於入射平面（Plane of incidence）的電場方向。又入射角 θ 與折射角 r 遵守 Snell 定律：

$$\sin \theta = n \sin r$$

故我們可以計算出一道光線射進透明球所產生的力。

這只是在一條光線的入射下所造成的結果，但實際上要計算一道已知入射方向和電場強度分佈的一束光線則需要繁雜的計算，原則上計算的方式就是計算光入射參數的空間分佈，再以積分的方法計算

出每一條光線疊加所造成的總力。這是相當繁複的工作，需要加上一些近似的技巧才能減輕計算的份量¹²。此外，我們也可以從這裡知道抓取力與入射光的偏振性是有關的^{13,14}。

雖說在這兩種極限的近似下，我們可以得到某種程度定量的分析，但就其應用範圍來說，使用的粒子大小一般都與波長相近，亦即落在前述兩個狀況之間，兩種近似都不成立。

爲什麼應用的粒子要選在理論無法精確分析的範圍？原因是光強梯度的抓取力與體積成正比，在Rayleigh狀況中體積太小，所以力道反而小；另一方面，在Mie狀況下，粒子太大，粒子感受到的光強梯度不夠，光子折射所造成的動量差隨粒子越大逐漸變小，因此若要求最佳抓取力，應在那兩個狀況之間，亦即粒子直徑在波長附近。在這個範圍內，以精確的定量理論來說明其抓取力跟粒子大小及光束特性（腰部直徑、總功率等）之間的關係顯然相當困難，也因此一般都是利用實驗方法來校正^{15,16,17,18}。但更深入的理論仍然是必須的，藉由理論的推算或數值分析，我們可以創造出最佳的設計¹⁹。

光鑷子設計的最佳化

由以上的理論分析，我們可以獲得光鑷子在設計上的一些通則：

1. $\mathbf{F}_{\text{grad}} \propto P$ ，亦即抓取力的大小與光強度成正比，顯然雷射的功率越大越好；但對於樣品來說，功率太大無疑會造成一種傷害，尤其是生物性的樣品，故必須兩相權衡才行。
2. $\mathbf{F}_{\text{grad}} \propto \nabla I$ ，亦即在同一功率下，若要使抓取力變大，則要加大光強度在空間上的梯度，其中在一定的總功率下光強度的梯度又與光束腰部半徑成三次方反比，故減小腰部直徑爲增大抓取力的最好

方法。對於一束高斯型光束而言，經過焦距 f 的透鏡聚焦後所得的腰部直徑 d 其繞射極限為：

$$d \cong f\phi$$

其中 ϕ 為雷射光束的發散角，雷射光由雷射出口射出時，其發散角為：

$$\phi = \frac{1.27\lambda}{D}$$

D 為雷射光束出口直徑，而 λ 為光波長。故雷射光束聚焦後的腰部直徑為：

$$d \cong f \frac{1.27\lambda}{D} = 1.27\lambda \frac{f}{D} \cong \frac{1.27\lambda}{N.A.}$$

N.A.為數值孔徑（Numerical aperture）的縮寫。由此可知，增大 N.A. 可大幅提昇抓取力。

3. 雖說增大 N.A.值可以增加抓取力，但有一件事情一定要注意的，就是光束在送入聚焦用的顯微接物鏡時，一定要讓光束充滿整個透鏡的鏡面。因此，通常要經過擴束，否則空有物鏡的高 N.A.值，其實還是沒充分利用到。但也不可以擴得太大，否則會浪費掉一些光，最佳的方式當然就是擴束到填滿鏡面為止，這就是所謂的 N.A.值匹配的原理。

對於樣品來說，也有一些限制和要求。事實上，光鑷子只能捕捉具有某些條件的樣品，但反過來說，若我們能間接利用適合抓取的粒子（如玻璃珠或人造的高分子小珠）來操弄其他的物質的話，也不失為一個常用的方式，下面就列出適合抓取的粒子特性：

1. 首先，是粒子的大小問題。前面提過，要求有效率的抓取粒子的大小必須適中，一般而言是在約與聚焦所成的焦點大小約略相等為最佳的抓取大小。當然，若欲抓取的粒子大小不能改變，也可以藉由改變透鏡的 N.A. 值或使用之光波長來調整。但一般來說，雷射的光波長不易調整，故可以利用調整透鏡的 N.A. 值來調整至適合的焦點大小。
2. 樣品在所使用的光波波長吸收或散射必須要很小。無論是利用 Rayleigh 狀況或 Mie 狀況，為使 F_{scat} 減至最小，都要求其吸收或散射為最小，否則吸收或散射的光子動量變化會造成正光壓，而使負光壓的效應減小，因而減小抓取的效率²⁰。相對的來說，若樣品不能改變，雷射光本身波長的選擇就必須選在樣品吸收較小的範圍內才可。
3. 樣品相對四周環境的折射率越大越好。由前面的分析來看，可知若樣品折射率越大，所能造成的光子偏折越大，其動量變化便會增加，故可以加大其抓取力。
4. 樣品的形狀也有限制。以上的分析都是以圓球狀的樣品作分析，若遇到不規則形狀的樣品，則所受的力可能會相當複雜，若粒子不大，也許還可以移動，但越不規則的形狀所造成的複雜度可能足以抵銷抓取所需的力。例如，會觀察到旋轉的現象²¹。

實驗系統的設計

在這一節裡，我們將介紹本計畫所完成之光鑷子設計及應用情形。目前，我們建立了兩部以紅外線為光源的光鑷子，分別為：可調波長的摻鈦藍寶石雷射（Ti: sapphire laser， $0.7\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ ）以及固定

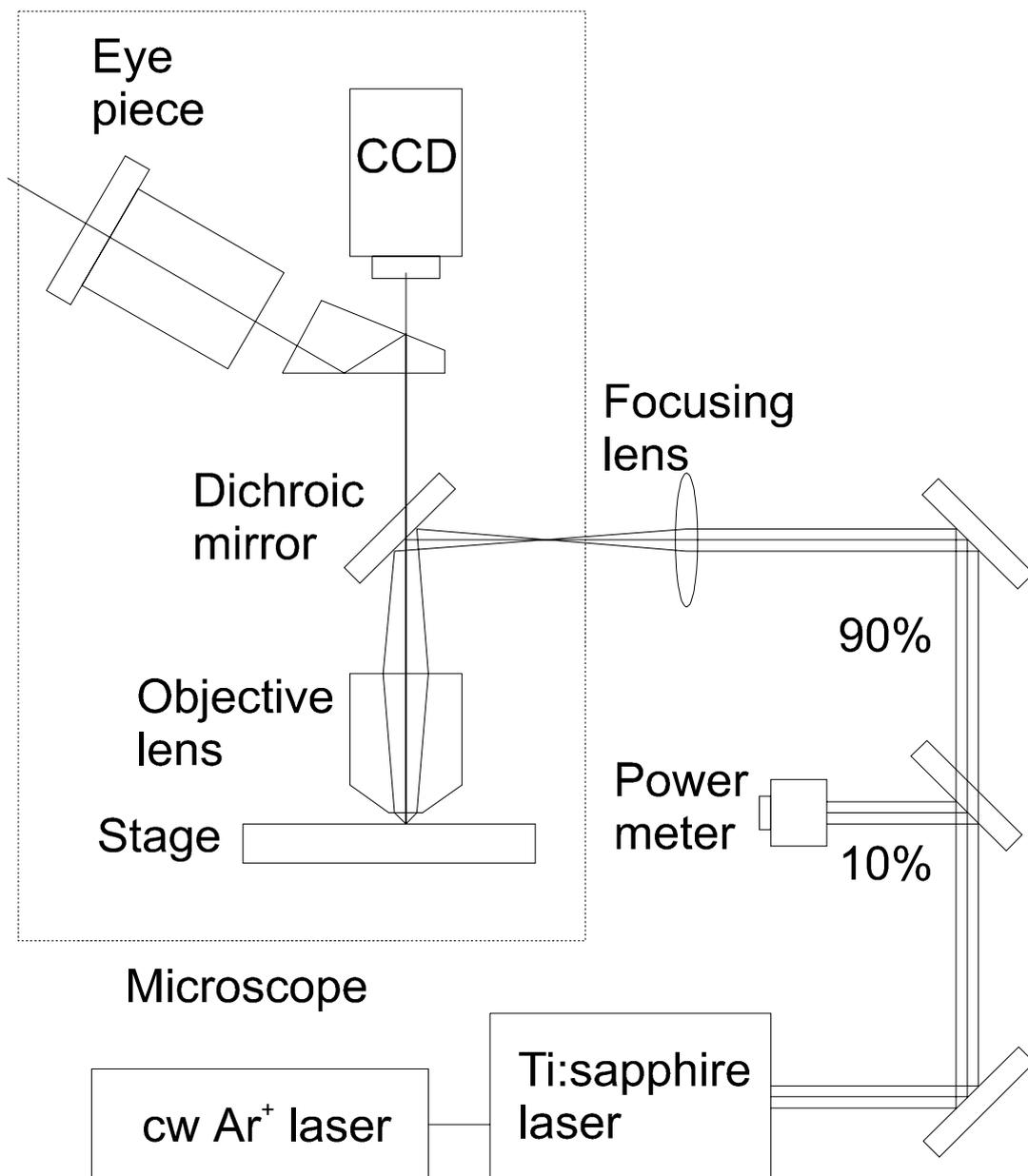
波長的半導體雷射（GaAlAs Diode laser，830nm），兩者最大輸出功率均為數百毫瓦（mW）。

選取紅外光的目的是因為要應用於生物樣本上，為避免生物樣本被短波長的雷射光破壞，故採用一般蛋白質及有機生物分子較不易吸收的紅外光區。在活體實驗時，這種選擇尤其更為必需。本計畫的前身，由鍾于彰學長所執行的計畫中，就曾經直接以氬離子雷射所發出的藍、綠光波抓取眼蟲、草履蟲等微生物，發現在提取所需的 100 mW 雷射光的照射下，這些生物在短短幾秒內就會破裂、蒸乾並死亡。

一般在設計光鑷子時，由於要求雷射光本身需要高度的聚焦，同時要求 N.A.值足夠大，故大多把雷射光直接引入觀察樣本所用的物鏡中，利用物鏡聚焦，並在玻片上形成三軸都穩定的捕捉區，移動光點的方法可以用光點直接移動的方式，或是固定光點而利用載物台的移動來產生兩者之相對運動。以下我們就針對目前所架設的兩部光鑷子之構造做詳細的描述。

摻鈦藍寶石雷射光鑷子 (Ti: sapphire laser tweezers)

利用摻鈦藍寶石雷射所完成的光鑷子目前架設在本校物理系光學實驗室中，以下簡稱為台大光鑷子 (TDOT)。我們利用的氬離子雷射 (Ar⁺ laser) 作為摻鈦藍寶石雷射的激發光源，以 514.5 nm、488 nm 等波長激發摻雜於藍寶石中的鈦離子 (Ti³⁺)，放出約 700~950nm 的近紅外光。當氬離子雷射光功率達到約 5W 時，摻鈦藍寶石雷射可



達居量反轉（Population inversion），並放出大約 750mW 的雷射光。在一般的工作範圍內，約 100mW 的近紅外光即可達到我們提取微小粒子的需求。

本次所使用的摻鈦藍寶石雷射，其最大的特性是在於波長可調，鈦離子在藍寶石晶體中放出約 700~950nm 的近紅外光，藉由在共振腔中加入利用雙折射（Birefringence）晶體的波長選擇器，可以在此範圍內調整輸出波長，此特性正好允許我們來研究不同波長的雷射光對樣品的影響。

上頁圖就是目前利用摻鈦藍寶石雷射所架設的光鐳子示意圖。摻鈦藍寶石雷射放出的紅外線經過兩次轉折鏡偏轉其方向，並進入顯微鏡（Nikon Optiphot-2）的螢光組件轉接口（Epi-fluorescence attachment port），經由一紅外線的高反射鏡打入物鏡中。此高反射鏡是用鍍膜方式使其對 800 nm 附近的光線有高反射率，其餘波長的光線幾乎都會通過，故為一二向色面鏡（Dichroic mirror）。這面鏡有幾個作用：一是將雷射光導入光鐳子中，並同時納入顯微鏡的觀察光路；二是使原本用以觀察標本的其他色光可以通過而不影響觀察；最後是可以扮演濾鏡（Filter）的角色，將從標本反射回目鏡的紅外光濾除，以減低對眼睛或攝影機的傷害。

聚焦所用的物鏡有 10X、40X 以及 100X（油鏡）等數種，其中 40X 和 100X（Oil）具有較大的 N.A.：0.65 和 1.25，較適合聚焦所需。值得注意的是，我們要在目鏡下觀察到實驗中的樣本，同時也希望光鐳子的捕捉區就在這個平面上，故調整顯微鏡與光鐳子兩者光路的動作指標，是使兩者入射的雷射光焦點平面與樣本的成像平面重疊。一般舊標準的物鏡其成像平面大多固定在 160 mm 的位置，本顯微鏡也

不例外。也就是說，在雷射光入射前必須經過一透鏡，使其聚焦在物鏡上方 160 mm 的位置，同時藉由改變此透鏡的前進後退，也可以在不改變顯微鏡物距的情況下改變捕捉區的深度（z 軸位置）。

雖說聚焦的位置已被顯微物鏡所固定，但此聚焦透鏡焦距的選擇，也是決定捕捉力的重要因素，而不可以隨意選取。前面在原理的部分說過，要完全利用到物鏡的 N.A. 必須讓光束完全充滿物鏡的鏡面，在這裡，聚焦透鏡就扮演擴束鏡的角色。本實驗所用的雷射光束 90% 光強都分佈在直徑約為 2 mm 的圓截面上，而物鏡入射鏡面直徑約為 6 mm，故所需的聚焦透鏡焦距約為： $160 \times 2 / 6 = 53 \text{ mm}$ ，故我們用 $f = 50 \text{ mm}$ 的平凸透鏡（Plano-convex lens）來達到此目的。

最後，為確保捕捉區的形狀是對稱的圓錐狀，雷射光必須往物鏡的正中央垂直射入鏡面，否則非但捕捉區無法顯示在視野中央，聚焦後之光束也會歪斜，形成不對稱狀。我們使用一些常用的技巧來校正光束的入射位置和角度，也就是利用物鏡各個透鏡鏡面部分的反射光所形成的光點。這些光點中，有些很小，有些很大，甚至可以涵蓋視野面積的一半。當光線入射的角度和位置改變時，這些光點會做相對的移動。校正的方式就是使這些光點重疊，並出現在視野中央，此時會看到很美麗的干涉條紋。當干涉條紋呈現完美的同心圓狀時，就表示調整到完全準直的情況了。

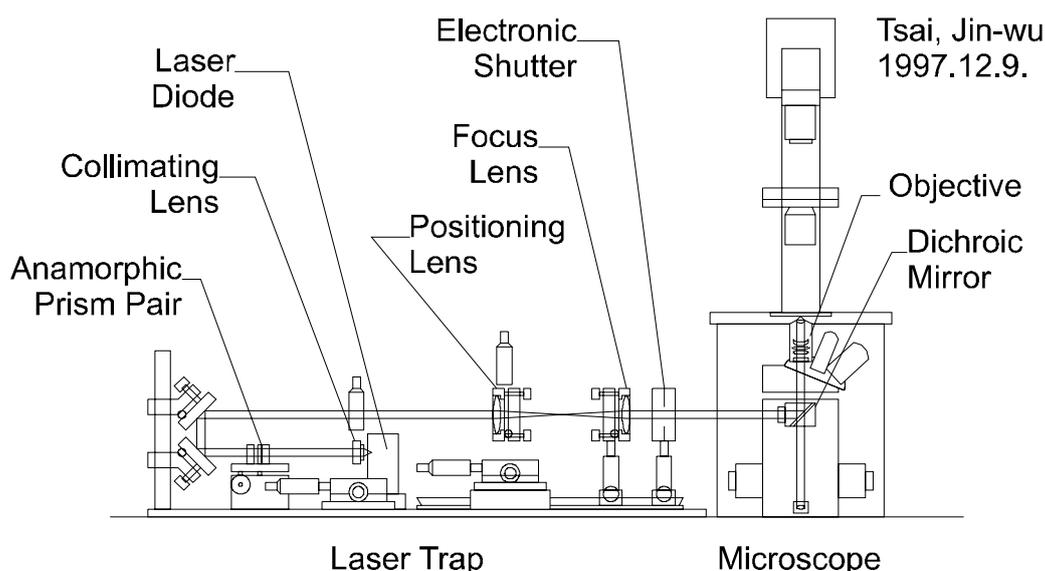
二極體雷射光鑷子（Diode laser tweezers）

目前這套利用半導體雷射所完成的光鑷子，架設在國立陽明大學微生物及免疫學研究所林奇宏老師實驗室，現正準備加入真正的生物科技研究的行列中，簡稱為陽明光鑷子（YMOT）。雖然半導體雷射光束的光學特性不如大型雷射的光束好，但靠著它輕薄短小以及高

效率的特性，目前在各個領域快速的成爲一理想的光源。這套光鐳子所用的半導體雷射可以發出 830 nm 的近紅外光，波長無法調整。其最大功率爲 100 mW，已足夠一般情況使用。光路架設的部分，其原理與前述以摻鈦藍寶石雷射爲光源的光鐳子是一樣的，但設計稍有不同。

首先，雷射光射出後最先通過的是準直透鏡（Collimating lens）與歪像稜鏡組（Anamorphic prism pair）。這兩個光學元件都是爲了半導體雷射所設計的。由於半導體雷射本身發光的特性，故從半導體雷射所射出的雷射光是發散的。準直透鏡的作用，便是把這發散的雷射光聚合成爲平行的光束，然而校正後的光線雖然平行，其截面形狀卻非理想雷射光所成的圓形，而是橢圓形。於是，再使用歪像稜鏡來放大橢圓的短軸，使得截面形狀成爲正圓，這是一般使用半導體雷射所必須經過的程序。經過這些程序之後，此光源就會變成所需的模態（光束截面上的光場分佈）較爲良好的準直雷射光源。

OPTICS ALIGNMENT OF THE LASER TRAP



裝置中使用的顯微鏡爲 Leica 公司 *DM IRB/E* 系列的反轉顯微鏡（Inverted microscope），這是一部結合了螢光顯微鏡（Fluorescence

microscope) 及微量分束干涉對比顯微鏡 (Differential interference contrast microscope ; DIC) 的顯微工作平台 (Work station) , 甚至可以加上共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 模組, 變成一部共軛焦顯微鏡。雷射光點也是從螢光組件轉接口 (Fluorescence module adopter) 打入, 經由, 經由對 830 nm 附近之紅外線有高反射率的二向色面鏡進入顯微鏡的光路中。

與前一個光鐳子相同, 要使光能聚焦在樣本平面時, 雷射光進入物鏡前的成像位置必須與樣本經過物鏡後之成像位置重疊。新型的顯微鏡標準是將此像置於無限遠處, 稱為無限光程 (Infinite light path) ; 亦即, 我們直接將一道平行光打入物鏡中, 就可以得到所需的聚焦平面。在光路設計上, 這個設計提供很大的方便性與彈性, 因為許多種用途所需的光線將可很容易的納入至顯微鏡的光路中, 並且此段光路也可以無限延伸, 不受舊標準 (160 mm) 的限制。

我們事實上可以直接使用已經準直過的紅外線雷射光, 但在此光路中間我們仍然加入了兩個平凸透鏡, 其目的有三個:

1. 由於實驗上的需要, 我們希望改由移動光點的方式來移動所抓取的粒子, 也就是藉由透鏡位置的移動, 改變雷射光的入射角度及位置, 因而改變捕捉區的 x - y 位置。
2. 從雷射出來的光束可以經由這兩片透鏡, 利用透鏡焦距的配合加以擴束。
3. 最後, 不同色光打入物鏡後, 由於色像差的緣故, 聚焦位置可能不同, 故平行的入射光不見得就可以聚在所需之位置。本實驗所用的雷射光已偏離可見光範圍, 像差可能大到一定的程度以至於

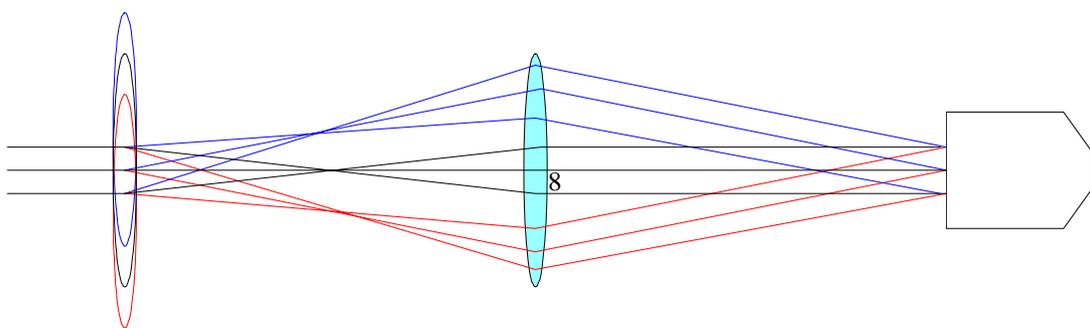
無法聚焦在工作平面上，故加這一對透鏡可以補償此效應。當然另一個重要的功能是可以調整工作平面的位置，以隨心所欲的在三維空間中操縱粒子。

實驗中所使用的雷射光直徑恰好可以充滿物鏡的孔徑，不需要擴束，所以選用的兩透鏡焦距相同，而兩者相距約等於兩焦距之和。爲了達到利用透鏡移動光點的目的，我們利用三維的移動平台來控制其中一片透鏡的位置，稱之爲定位透鏡（Positioning lens）。移動這一面透鏡顯然可以改變光束進入物鏡的位置及角度，進而改變光點在視野中的位置。

至於透鏡焦距的選擇則是一個重要的事，因爲入射光束已經充滿物鏡的入射孔徑，假若移動光束入射位置，則將有部份光束落於孔徑外，此時光強度勢必減弱，同時也將破壞光束的對稱性，嚴重影響到捕捉的效果。故期望光點位置的變化是經由入射角度改變而達成，而非改變入射位置。由簡單的幾何光學理論可以推得，當一道平行光經由兩片焦距各爲 f_1 及 f_2 的凸透鏡，且兩片透鏡相距恰爲 $f_1 + f_2$ 時（如此光才會再度成爲平行光），若第一片透鏡垂直於光軸移動，光束中心仍然會通過第二片凸透鏡光軸，且距離爲：

$$\frac{f_2}{f_1}(f_1 + f_2)$$

的位置（如下圖）。從這裡我們可以知道，在設計上若符合此位置關係，則可以達到在不影響捕捉效率的情況下，改變捕捉區的位置。實驗時由於不需要擴束，故 $f_1 = f_2 = f$ ，也就是說物鏡距第二片凸透鏡的



距離必須為 $2f$ ，實驗時所使用的透鏡與物鏡的距離為 20 cm，故選用焦距 f 為 10 cm 的凸透鏡。

光路的最後一個部分是顯微鏡的物鏡，此顯微鏡有 10X、20X、40X (Oil) 以及 100X (Oil) 等不同的物鏡，同樣的，我們也是選擇高 N.A. 值的 40X (Oil) 和 100X (Oil) 其 N.A. 值分別為 0.55 及 1.25。

實驗的樣品

在實驗中我們使用兩種不同的樣品，分別測試光鑷子的性能及對生物的影響：

1. 聚苯乙烯微粒 (Polystyrene microspheres)：

我們所使用的聚苯乙烯 (PS) 微粒購自 Bangs Laboratories, Inc. (Carmel, Indiana)。直徑為 $2.00\mu\text{m}$ ，對於 830 nm 的折射率則為 1.57，可以經由色散方程式：

$$n = a + b/\lambda_0^2$$

算出，其中 $a = 1.5683$ 、 $b = 10.087 \times 10^{-4}$ ，波長則以 μm 為單位。這些球形微粒均假設對 830 nm 為透明，即不吸收此波長的光能。

2. 生物活體：

到目前為止，我們使用的生物活體只有一種，就是實驗室正在培養的肝癌細胞。我們用光鑷子抓取其中的膜狀構造，目的只是在測試紅外線對生物活體是否有所傷害。未來，若真正開始進行實際的生物應用，則會依實驗的目的需要，應用於更多種的生物細胞上。

實驗結果

整個研究計畫中，大部分的工作是關於實驗設備的設計和組裝，由於時間上的限制，實驗操作方面只有初步進行光鐳子的部分測試。在抓取 PS 微粒的實驗中，我們觀察到運用 100 mW 的紅外線雷射光，經由 40X 及 100X (Oil) 的物鏡，均可以提取直徑為 2.00 μm 的小球，尤其在 100X (Oil) 的物鏡下可說提取得非常牢固，而可以藉由移動載物台達到相對移動的效果，也可以經由改變雷射光的入射角度移動粒子在視野下的位置。以我們使用的微粒來說，一個光點甚至可以同時捉住數顆粒子。我們尚未完成量化的實驗，但若未來實驗需要，我們也將進行提取力及效率的分析。

在實驗中，一個有趣的現象值得注意，那就是 z 軸的穩定性問題。由前面的原理我們可以知道，作用於粒子在 z 軸的力共有四個：抓取力、散射力、重力 (Gravity) 以及浮力 (Buoyancy)，其中抓取力形成一穩定的能量阱，理論上若沒有其他的力作用，則粒子會固定在焦點的對稱中心上。然而由於其他力的作用，則不一定會達成平衡，而要在符合一定的條件時 (見前面的原理部分) 達成。散射力沿著光前進的方向，重力為向下，浮力向上，但在一般的例子中，重力往往大於浮力，故後面兩力的總和方向為向下，將之稱為視重。

在台大光鐳子 (TDOT) 中，雷射光是由上往下入射，所以散射力往下，故必須要有至少一個力為往上，才能達到平衡。在焦點以下，抓取力朝上，所以成為平衡所必需的作用力。因此在此情況下，粒子平衡位置通常在光點下方，也就是說，若我們想要物體懸浮在正確的焦平面上，則光鐳子必須聚焦於稍高的位置。在陽明光鐳子 (YMOT) 中，由於使用反轉顯微鏡，故雷射光是由下方朝上聚焦，散射力往上，

如此可以與視重稍微抵銷，故顯然這個設計較容易達到平衡，使 z 軸方向的抓取較為容易，並達到較高的穩定性。我們的經驗中，散射力往往比視重還大，故我們可以觀察到許多粒子被抓取後從底部往上升，而與前面一種設計相反，若要使微粒被抓取在正確的焦平面上，則光鐳子需聚焦在較低的位置。

在生物樣品方面，我們只有測試過目前正在林奇宏教授實驗室中培養的肝癌細胞，目的是要測試光鐳子對生物樣本的提取效果以及傷害的程度。在 DIC 顯微鏡中，生物細胞可以不需固定染色，而可以看到內部透明的構造，亦即，細胞可以在視野下活生生的展現出來。我們所做的測試過程中，可以明顯看到細胞內某些膜狀構造可以被吸引並牢牢的抓住，我們也可以藉由移動雷射光點來改變這些胞器的相關位置。目前我們尚未進一步去探究這些胞器的組成，但顯然這些胞器也可以被光鐳子所操弄。在抓取的過程中，也沒有看到細胞膜有破裂或溶解的現象，說明了紅外線對細胞活體幾乎不具傷害性，但其影響的程度，仍得做更仔細的觀察才能確定。

討論與展望

在建立光鐳子的過程中，我們主要朝的工作方向是要把這項技術運用在真正有價值的生物系統中，解決一些傳統生物技術所無法達到的精細操縱手法。

目前有幾個生物的典型系統（Model system）正在準備進行實驗，首先是有關於細胞運動機制的研究，所用的生物系統為一種稱為海兔（*Aplysia*）的軟體動物，我們取其神經節（Ganglia）內的神經細胞（Neuron）作為研究的對象。神經細胞具有樹突（Dendrites）及軸突（Axons），分別為神經細胞接收及發出神經傳導物質（Neural

transmitter) 的位置，軸突的前端稱為生長錐 (Growth cone)，生長錐可以往前延伸並觸碰另一個神經細胞，其運動的機制牽涉到細胞內骨架 (Cytoskeleton) 的重塑 (Remodeling)，並牽涉到細胞膜 (Cell membrane) 的流動。運用光鑷子，我們可以抓取小球以做為細胞膜上某些蛋白質分子的標記，而這些蛋白質可能與膜內的細胞骨架纖維如：微管 (Microtubule) 及肌動蛋白 (Actin) 有關。

其次是骨髓內的蝕骨細胞 (Osteoclast)，這是骨髓內負責破壞骨骼組織的細胞。當骨骼內的組織有缺陷或損壞時，蝕骨細胞會移動到該處，將該處的骨細胞吞噬，並留下空缺，再由骨原細胞 (Osteoblast) 加以修補。此外，蝕骨細胞的活動也與血液中鈣離子的濃度有關，若其活性較高，則血鈣濃度變高；反之則降低。我們有興趣的，仍然是其運動的機制。選擇此細胞當典型系統的主要原因是此細胞為數十個細胞融合而成，其體積非常大，可達 1 mm，肉眼甚至可見。推測其運動仍與細胞內的骨架有關，但也希望從細胞質的流動及胞器的運輸來找尋一些線索。光鑷子在這裡的功用是阻止或釋放某些胞器的運動，藉以觀察對其運動的影響，甚至可以藉由定量的分析來測量其中所施加的力。

最後，陽明大學微生物及免疫學研究所的羅時成教授正在研究出血性蛇毒蛋白 Rhodostomin 對血小板 (Platelet) 某些膜蛋白的影響。由於蛇毒蛋白會影響血液凝集的能力，推測是由於血小板上的某些蛋白質如 Integrin 受到影響，使得凝集反應無法進行。傳統的測試凝集能力方法，是將血小板懸浮液以一定濃度與流速通過一基質，再計算被附著於基質上攤平的細胞數目。現在我們可以利用光鑷子直接測量血小板之間作用的力，以計算蛇毒蛋白對凝血反應的影響程度。

結論

在現今的科技世界中，各領域的分界已經逐漸打破，有許多問題若只從傳統上的想法及作法來著手，有時很難看出本科的盲點。物理學對近代生物科技有著卓越的貢獻，不僅提供更精巧的實驗方法及儀器外，更提供了新的視野。

光鐳子就是一個很好的例子，它提供了容許不須硬體接觸且對外膜無傷害性的穿透效果，並且很容易深入內部作業，而這裡正是它的應用範圍。雷射的這種應用，為細胞體的操控技術開啓了全新的空間。沒有其他任何設備可以讓我們在目標物內部工作而不需要打開它。未來，這個技術將在許多自然科學中找到他的出路。

致謝

首先我要感謝我的指導老師：台大物理系曹培熙教授以及范文祥教授，他們提供我實驗上所有需要的幫助與指導；陽明大學微免所林奇宏教授以及羅時成教授給予我在生物學上應用的機會及建議；東華大學電機研究所邱爾德所長也給予我經驗上的指點。

另外我要感謝台大物理所張銘顯以及鍾于彰學長幫助我在架設中排除疑難雜症；陽明大學醫工所王智昱學長在光電技術方面的指導，以及微免所楊舜鈞、連偉男、吳子維學長在生物技術方面的建議與指導，在這裡一併向他們致謝。

台大醫學院雷射醫學研究中心提供的摻鈦藍寶石雷射，是台大光鐳子（TDOT）的關鍵儀器，它的重要性不言可喻。因此也要感謝雷射醫學中心的周松男主任和陳進庭教授。

參考文獻

- ¹ Ashkin A: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett* 1970. 24:156-159.
- ² Ashkin A: Optical levitation by radiation pressure. *Appl Phys Lett* 1971. 19:283-285.
- ³ Ashkin A: Applications of laser radiation pressure. *Science* 1980. 210:1081-1088.
- ⁴ 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.
Original report of optical tweezers.
- ⁵ Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T: Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 1987. 330:769-771.
- ⁶ 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.
- ⁷ Crocker JC, Grier DG: Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *J Colloid Interface Sci* 1996. 179:298-310.
Describes image analysis techniques useful for precise measurement of colloidal dynamics. Spheres' centroids are located to within 20 nm in the focal plane and tracked at 1/30 sec intervals using conventional NTSC video signals. Sample applications include measurement of colloidal diffusion and interactions between charged spheres using blinking optical tweezers to prepare initial conditions. Straightforward extensions of the methods described make possible measurements of the out-of-plane motions to within 30 nm for full three-dimensional

tracking [E. Dufresne and D. G. Grier, unpublished (1997)].

- ⁸ Perkins TT, Smith DE, Larson RG, Chu S: Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science* 1995. 268:83-87.

A strand of DNA affixed at one end to a colloidal sphere is stretched in an elongational fluid flow while the sphere is immobilized in an optical tweezer.

- ⁹ Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM, Gelles J: Transcription against an applied force. *Science* 1995. 270:1653-1657.

- ¹⁰ Harada Y, Asakura T: Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Opt Comm* 1996. 124:529-541.

- ¹¹ Wright WH, Sonek GJ, Berns MW: Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. *Appl Opt* 1994. 33:1735-1748.

- ¹² Ren KF, Gr_薛an G, Gouesbet G: Prediction of reverse radiation pressure by generalized Lorenz-Mie theory. *Appl Opt* 1996. 35:2702-2710.

Generalized Lorenz-Mie approach provides a unified framework for calculating radiation pressure due to realistically modeled focused Gaussian beams on spherical particles. Calculations cover the range from Rayleigh to Mie domains. Interesting predictions include the inability to axially trap 1 μm diameter glass spheres in water with a focused Gaussian beam.

- ¹³ Wohland T, Rosin A, Stelzer EHK: Theoretical determination of the influence of the polarization on forces exerted by optical tweezers. *Optik* 1996. 102:181-190.

Hybrid wave optics / ray optics calculation of the axial and lateral forces on a latex sphere suspended in water trapped by a focused Gaussian beam. The axial displacement of the trapping point from the

focal point is found to scale linearly with particle radius. Interesting predictions include the possibility of creating two axial trapping points for appropriately sized spheres.

- ¹⁴ Farsund Ø, Felderhof BU: Force, torque, and absorbed energy for a body of arbitrary shape and constitution in an electromagnetic radiation field. *Physica A* 1996. 227:108-130.

Calculation using Debye potentials of the forces exerted on an arbitrarily shaped particle with characteristic size ranging up to the wavelength of light. Describes how to address particles with nonlinear interactions with light.

- ¹⁵ D'Helon C, Dearden EW, Rubinsztein-Dunlop H, Heckenberg NR: Measurement of the optical force and trapping range of a single-beam gradient optical trap for micron-sized latex spheres. *J Mod Opt* 1994. 41:595-601.

- ¹⁶ Rosin A, Wohland T, Stelzer EHK: Calculation and measurement of the axial forces exerted by photonic tweezers. *Zoological Studies* 1995. 34:167-169.

- ¹⁷ Friese MEJ, Rubinsztein-Dunlop H, Heckenberg NR, Dearden EW: Determination of the force constant of a single-beam gradient trap by measurement of backscattered light. *Appl Opt* 1996. 35:7112-7116.

Describes calibration of optical tweezer trapping potential using the power spectral density of fluctuations in light scattered by a trapped particle. The technique is applied to both Gaussian and optical vortex tweezers. Discusses potential applications to scanning force microscopy.

- ¹⁸ Simmons RM, Finer JT, Chu S, Spudich JA: Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys J* 1996. 70:1813-1822.

-
- ¹⁹ Liebert RB, Prieve DC: Force exerted by a laser beam on a microscopic sphere in water: Designing for maximum axial force. *Ind Eng Chem Res* 1995. 34:3542-3550.
- ²⁰ Simpson NB, Allen L, Padgett MJ: Optical tweezers and optical spanners with Laguerre-Gaussian modes. *J Mod Opt* 1996. 43:2485-2491
- ²¹ Higurashi E, Ukita H, Tanaka H, Ohguchi O: Optically induced rotation of anisotropic micro-objects fabricated by surface micromachining. *Appl Phys Lett* 1994. 64:2209-2210.