

激光光镊对生物体的光操纵研究*

王瑞丽¹ 张加春² 尚鹤龄¹ 欧家鸣¹ 杨卫平¹

(云南师范大学¹ 物理系,² 生命科学系 昆明 650092)

提要 根据光镊捕获电介微粒的理论研究结果, 简析了光对生物体的力学作用, 给出了用不同参数的激光陷阱操纵不同种类的微生物的实验结果. 分析比较表明, 生物体的预培养是实现光操纵的重要环节.

关键词 光镊, 微生物, 操纵条件

1 引 言

把高会聚激光束产生的梯度力作为一把镊子——光镊, 对单个生物体在不失活状态下进行无机械接触的操纵和定向控制已有许多成功报道^[1-5]. 从物理原理上讲, 只要被捕获物体能透过构成光镊的光波波长, 使用光镊就可捕获在数十微米以内的任何微粒. 然而面对广博、复杂、具有非线性特征和生命现象的生物界, 已实现光捕获的生物种类只能算是沧海一束, 欲把光镊推向实用化, 还需进行广泛研究, 提供更多实验依据. 鉴于微生物样品取材容易, 种类繁多, 并具有一定的代表性, 我们以此为材料, 对数十种不同性状、不同培养周期和培养条件的微生物样品进行了光镊操纵^[6]. 本文以不同性状的酵母细胞和曲霉分生孢子为例, 报道光操纵实验结果及其对比分析.

2 光对生物体的力学作用

光对物体具有力学作用, 是因为光与物体相互作用过程中动量传递的结果. 光作用到物体上, 物体对光产生折射、反射和吸收, 当把具有一定模式和能量的激光会聚到微米量级, 由光对中性物理微粒力学作用的光线光学理论研究已知^[7,8]: 忽略微球对光的反射和吸收, 光对高折射物理微粒将产生三维且指向光束焦点的梯度力, 只要微粒靠近光束焦点, 该力可将数纳米至数十微米的粒子推向光场最强处, 并稳定在那里, 随光束焦点的移动而移动; 当球形微粒对光呈全反射时, 每根光线对微粒产生的作用力将指向粒子的几何中心, 如果光束的焦点刚好位于小球的底部所处的平面, 小球将受到二维且指向光轴的力, 否则力是背离光轴的; 当粒子对光具有强烈的吸收时, 由于光场分布的非均匀性, 光能被粒子吸收后, 将在粒子内部产生一温度

* 国家自然科学基金(19774046)、云南省自然科学基金(97A016M)和云南省光学重点学科资助项目.

收稿日期: 1999-05-11; 收到修改稿日期: 1999-07-14

梯度分布,越靠近光轴,温度越高.由温度梯度产生的热辐射力将把粒子推离光轴,即排斥粒子.

实际生物体如细胞、细胞器等,与光线的相互作用包括上述三个方面,即同时存在对光的折射、反射和吸收,问题在于哪一个过程起主导作用.吸收的存在,一方面使物体的折射率为一复数,其大小与光的波长及物体吸收特性有关,另一方面,生物体对光的吸收是有波长选择性的,不同的生长时期和不同的性状都将使生物体对光的吸收程度不同.因此可以预测,当生物体位于激光场中,将会受到指向光轴的吸引力或背向光轴的排斥力,指向光轴的力是三维还是二维,以及受力大小与方向不仅与光束参数、光路调节有关,显然还与生物体的性状和培养条件有关.我们希望所操纵的生物微粒对光镊波长具有高的折射性能,这是获得光捕获的重要条件.

3 实验装置

光操纵装置如图 1 所示.系统通过光路耦合器把激光光镊与生物显微操纵部份(DH-2

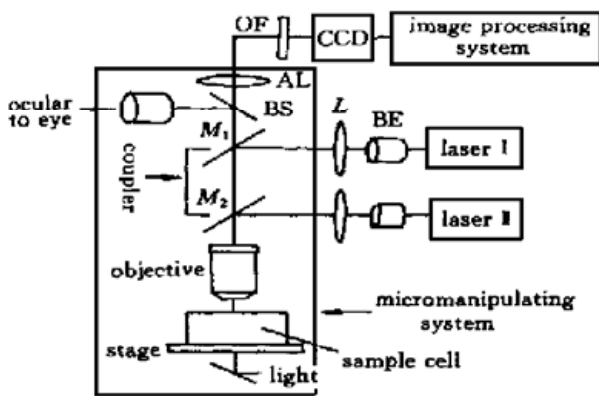


图 1 光镊操纵系统

OF: 激光器; AL: 放大镜; L: 透镜; BS: 分束器; BE: 扩束器

Fig. 1 Schematic diagram of manipulating system for optical tweezers

OF: optical filter; AL: amplifying lens; L: lens; BS: beam splitter; BE: optical beam expander

不再随载物台移动.利用计算机图像处理功能可剪辑所需图片,测量光镊对被捕获粒子的操纵速度;通过显微镜尺确定研究目标的大小.该系统用 40(数值孔径 N. A. = 0.75) 和 100(N. A. = 1.25) 倍物镜时在电视机上获得的放大倍数分别为 5000 和 12000 倍.

4 微生物的光镊操纵

使用 TEM₀₀模式的 He-Ne 激光和不同模式的 Ar⁺ 激光,对不同菌龄和不同色貌的酵母菌细胞、曲霉孢子(分别呈红、白、黑)进行了激光光镊操纵实验研究.

4.1 生物样品处理

生物样品取自云南师范大学生命科学系微生物实验室,酵母菌株直接在 PDA 培养液中培养 48h 后使用.曲霉菌株分别接种于 PDA 和稀释的 PDA 固体培养基上,于 28℃ 培养箱内

OLYMPUS 正立显微镜)有机结合,通过 CCD 摄像头(TK-1380E)把显微图像送到计算机系统,借助显微镜物镜头会聚激光束而不影响原光路成像.通常使用高数值孔径水浸物镜,以使镜头能直接贴近培养液中的生物样品,并获得较大会聚角度的光斑,增大光镊梯度力.光路耦合器是整个系统的核心,在光学和机械性能上均有特殊要求.我们利用磁悬浮原理设计制作了具有六个调节自由度的双光路耦合器,体积小,调节灵活,具有较好的稳定性和波长选择性,可同时引入两束不同波长的激光.通过扩束器 BE 和透镜 L,能灵活调节激光的束腰位置.通过分束器 BS,可由显微目镜和监视器同时观察操纵过程.

实验中,固定激光束焦点位置,用显微镜载物台将样品移入视野,一旦粒子被光镊捕获,将

分别培养 4, 6, 8 天, 后用无菌生理盐水制备成孢子悬浮液以供使用. 稀释 PDA 培养基的目的是用于促孢培养, 有利于孢子的大量形成. 孢子保存在生理盐水中以延长使用时间.

4.2 生物样品特性^[9]

酵母菌: 酵母菌为单细胞, 真核微生物, 一般为卵圆和椭圆形, 形状与大小随培养条件及时间不同而有所变化. 酵母菌有不同的颜色, 通常出芽繁殖. 实验所用菌种为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、红酵母 (*Rhodotorula Asp.*) 和黑酵母 (*Sac. niger*). 酿酒酵母营养细胞为乳白色, 多为椭圆形, 大小为 $4\sim 7\ \mu\text{m}\times 5\sim 12\ \mu\text{m}$, 出芽孢子十分多; 红酵母细胞椭圆形, 略比酿酒酵母小一些, 大小为 $3\sim 5\ \mu\text{m}\times 5\sim 10\ \mu\text{m}$; 黑酵母为棒状或腊肠形, 比酿酒酵母大, 大小为 $3\sim 6\ \mu\text{m}\times 5\sim 14\ \mu\text{m}$.

曲霉属: 曲霉属为真核微生物, 分生孢子多为圆形, 颜色多样. 实验选用菌种为安卡红曲 (*Monascus anka*)、浅白曲霉 (*Asp. albidus*) 和黑曲霉 (*Asp. niger*). 安卡红曲菌落红色, 样品中同时含有分生孢子和闭囊壳. 闭囊壳圆形, 直径约 $12\ \mu\text{m}$, 内含子囊及子囊孢子. 分生孢子圆形或卵圆形, 直径约 $6\ \mu\text{m}$; 浅白曲霉菌落白色, 分生孢子圆形, 直径 $3.5\sim 5.5\ \mu\text{m}$; 黑曲霉菌落黑色, 分生孢子棕褐色, 比浅白曲霉略小, 直径为 $3\sim 5\ \mu\text{m}$.

4.3 生物样品的光镊操纵

下面给出对曲霉孢子和酵母菌细胞进行光操纵的部分图片, 其中箭头所指为被捕获在激光陷阱中的粒子, *R* 表示随载物台一起移动的微粒, 用于参考. 显微物镜 40 倍.

图 2 中, 几个分生孢子 *R* 与被捕获在 Ar^+ 激光陷阱中的红曲霉闭囊壳连在一起, 闭囊壳中的子囊和子囊孢子依稀可见. 图片从左至右给出: 当载物台下左上右移动时, 分生孢子随载物台的移动而顺时针旋转, 这说明闭囊壳在陷阱中做旋转运动, 但由于光镊作用而始终没有脱离陷阱. 陷阱功率约 $17\ \text{mW}$; 闭囊壳直径 $12\ \mu\text{m}$.

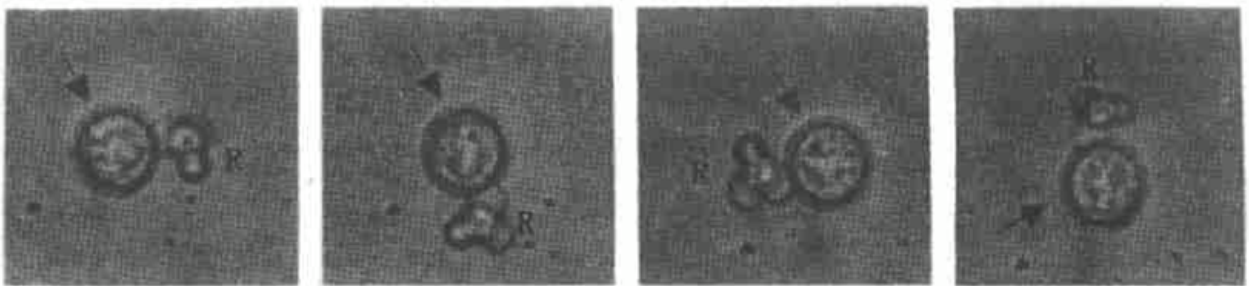


图 2 一个 6 天菌龄的红曲霉闭囊壳在 Ar^+ 激光陷阱中, *R* 所指为分生孢子

Fig. 2 A *Monascus anka* cleistocarp of six days age was trapped using an Ar^+ laser (indicated by an arrow)

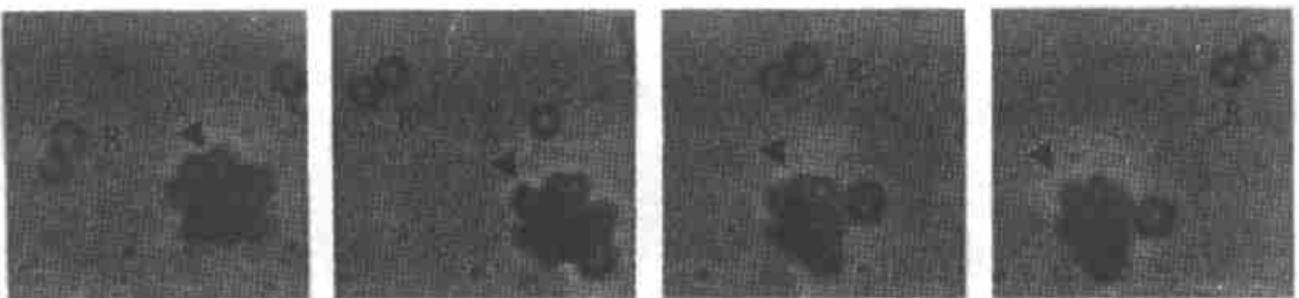


图 3 一团 8 天菌龄的黑曲霉孢子在 Ar^+ 激光陷阱中

Fig. 3 Some *Asp. niger* spores of eight days age was trapped using an Ar^+ laser (indicated by an arrow)

图 3 给出的是用 Ar^+ 激光陷阱捕捉到的一团 8 天菌龄的黑曲霉孢子. 当载物台从下往上再往右移动时, 参考孢子 R 随载物台同步移动, 陷阱中的孢子在翻转但位置不变, 第 2 张图片中有一孢子从阱中脱出. 陷阱功率约 13 mW; 捕获平均速度 $32.71 \mu\text{m/s}$; 孢子平均直径 $4.50 \mu\text{m}$.

图 4 给出的是用 He-Ne 激光陷阱捕获一个 4 天菌龄的白曲霉孢子的情景. 图片由左至右给出: 载物台由下到上移动时, 6 个参考孢子 ($R1$ 和 $R2$) 随载物台同步移动, 分别从被捕获的孢子两旁擦边而过; 尽管参考孢子群由于陷阱中孢子的力学作用其相对位置发生了变化, 但被捕获孢子的位置由于光镊作用而没有发生改变. 陷阱功率约 12 mW; 平均移动速度 $4.62 \mu\text{m/s}$; 被捕获孢子尺寸约 $5 \mu\text{m}$.

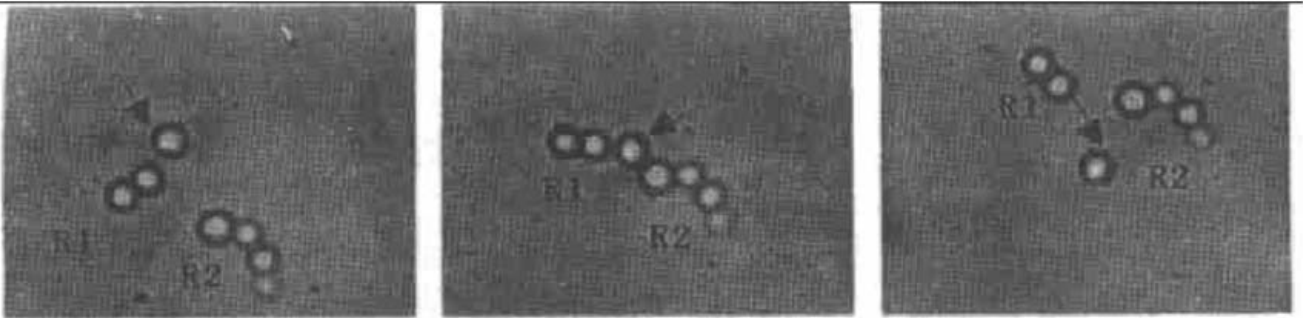


图 4 一个 4 天菌龄的白曲霉孢子被捕获在 He-Ne 激光陷阱中

Fig. 4 An *Asp. Albidus* spore of four days age was trapped using a He-Ne laser (indicated by an arrow)



图 5 一个红酵母细胞被捕获在 He-Ne 激光陷阱中

Fig. 5 A *Rhodotorula Asp.* spore was trapped using a He-Ne laser (indicated by an arrow)

图 5 给出的是使用 He-Ne 激光陷阱捕获一个处在马铃薯培养基中的红酵母细胞的情景. 溶液浓度高, 故背景模糊, 但可以清楚地看出, 当参考孢子 R 随载物台由参考孢子的右下方移到右上方, 再往左移动时(图片从左至右), 被捕获的孢子在陷阱中位置没有改变. 陷阱功率约 13 mW; 平均移动速度 $4.38 \mu\text{m/s}$; 孢子尺寸 $7.80 \mu\text{m} \times 5.65 \mu\text{m}$.

5 结果与分析

盛放酵母菌的 PDA 液体培养基折射率 $n = 1.3333$. 我们曾对处于生理盐水中的啤酒酵母进行过成功的光捕获, 本实验中, 我们又实现了用 TEM_{00} 模 He-Ne 激光和 TEM_{00} , TEM_{01} , TEM_{10} , TEM_{11} 以及 TEM_{01}^* 模 Ar^+ 激光, 在 40 倍显微物镜下, 对酿酒酵母和红酵母细胞进行激光光镊操纵, 最低陷阱功率仅为几个毫瓦, 捕获十分容易. 对黑酵母的激光捕获没有成功, 实验中也没观察到对三种酵母细胞的排斥现象.

盛放曲霉孢子的悬浮液为无菌生理盐水,用阿贝折射仪测得白曲和黑曲的折射率 $n = 1.3335$, 红曲 $n = 1.3330$ 。用上述激光光陷实现了对这三种颜色的微生物的光捕获,但红曲和白曲的光捕获要比黑曲容易得多。实验中观察到了光镊对黑曲霉孢子的排斥现象。光镊能实现对生物粒子的捕捉、旋转和翻转,能同时捕获多个粒子。从实验中总结出:

1) 光陷阱对折射率高的粒子产生的作用力大。红曲、红酵母均能较好地透过红光,当 He-Ne 激光陷阱功率降至 1 mW 以下时,对其仍有力学效应,而且测得 Ar⁺ 激光捕获的平均最低功率要大于 He-Ne 激光,为数毫瓦。白曲和白酵母由于透光好也容易捕获;

2) 孢子越饱满,菌龄越短,越容易实现光陷捕获。在黑曲霉样品中,激光陷阱只能捕获那些颜色浅的孢子,在 4 天菌龄样品中,能捕获的孢子数要比 6 天和 8 天菌龄的多一些;

3) 对生物活性高、布朗运动明显的孢子容易实现捕获,且一旦物体进入陷阱,并发生旋转运动,则捕获力明显增加。图 2 的实例就说明了这一点;

4) 生物的培养条件和取材时间十分重要,它决定了生物体的光学特性,我们对没有进行促孢培养的黑曲霉,仅在 100 倍显微镜下实现过对 5 天菌龄的孢子的捕获;

5) 光镊捕获力的大小与激光功率及光束会聚角有关。激光功率越大、光束会聚度越高,捕获力越大。

这些结论与前述预言基本一致,事实上几乎所有幼龄孢子均为浅色,因而相对易于捕获,这说明了生物体的预培养条件,包括取材时间、培养方法,是实现光操纵的重要环节,我们可通过选择激光波长和恰当的生物预处理,达到增大光捕获力和减少光损伤的目的。由于生物体的复杂性,仅用宏观的分析显然是不够的,如为什么激光陷阱对黑酵母没有表现出任何力学作用,包括排斥。不同生物体内含有不同的生化成分,激光与生物体相互作用的微观机理要用量子与非线性科学理论进行分析。

参 考 文 献

- 1 A. Ashkin, J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 1987, **235**(4795): 1517~ 1520; Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* (London), 1987, **330**(6149): 769~ 771
- 2 A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc. Acad. Sci. USA, Physics*, 1997, **94**: 4853~ 4860
- 3 H. Liang, W. H. Wright, W. He *et al.*. Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical forces (optical tweezers). *Exp. Cell Res.*, 1993, **204**: 110~ 120
- 4 Hiroaki Kojima, Etsuko Mato, Hideo Higuchi *et al.*. Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Bioph. J.*, 1997, **73**: 2012~ 2022
- 5 Jeffrey T. Finer, R. M. Simmons, J. A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 1994, **368**(6467): 113~ 119
- 6 Wang Ruili, Ou Jiaming, Shan Heling *et al.*. Optical manipulating for different microbiological samples using a single-beam laser trap. *Acta Laser Biology Sinica* (激光生物学报), 1998, **7**(3): 171~ 175 (in Chinese)
- 7 A. Ashkin. Force of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Bioph. J.*, 1992, **61**: 569~ 582
- 8 S. Sato, Y. Harada, Y. Waseda *et al.*. Optical trapping of microscopic metal particles. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(22): 1807~ 1809
- 9 Xu Xiahua. *The World of Microorganism*. Beijing: Science Press, 1989. 51~ 53, 57 (in Chinese)

Optical Trapping and Manipulation of Microbe Using Laser Tweezers

Wang Ruili¹ Zhang Jiachun² Shan Heling¹ Ou Jiaming¹ Yang Weiping¹

(¹Department of Physics, ²Department of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

Abstract According to the physics mechanism of laser manipulating dielectrical particles, the biological samples can be trapped and moved by a highly focused laser beam. Some experimental results of laser manipulating for different kinds of microbe are discussed. The results show that the preculture of biological specimen is the key step for realizing laser manipulating.

Key words optical tweezers, microbe, manipulating conditions

YN-100-[→]型 1.34 μm 激光治疗机通过科技成果鉴定

中国科学院福建物质结构研究所的科技人员在研究不同波长激光与物质的相互作用时发现,水对 1.34 μm 激光的吸收系数约为对 1.06 μm 激光吸收系数的 14 倍,但较 10.6 μm, 2.9 μm 和 2.1 μm 的吸收系数小,在猪肉中穿透深度的初步实验结果表明,1.34 μm 激光穿透深度比 1.06 μm 激光浅,但较 10.6 μm, 2.9 μm 和 2.1 μm 激光的穿透深度深,介于两者之间.临床试验表明,该波段既具有较好的气化、切割组织的作用,又具有较好的凝固、止血功能.在中国科学院重大项目的资助下,已研制成新颖 1.34 μm 智能化治疗机.该机已取得了中国发明专利和美国专利.

由福建省科学技术委员会和福建省医药管理局联合主持对我所研制的 YN-100-[→]型 1.34 μm 激光治疗机进行了科技成果鉴定.鉴定委员会对该成果进行了认真全面的评议,一致认为:新研制的 YN-100-[→]型 1.34 μm 激光治疗机所用的激光器件技术先进,有创新性.主要技术创新是综合运用了灯棒最佳匹配、最佳抽运方式、最佳共振腔设计,使灯抽运 Nd:YAP 激光能量转换效率突破现有的 1.3% 的水平,达到 5%,大大推进了这种激光在医疗上的应用.在医疗机的设计上,采用新式光纤注入技术,大大提高了整机的能量转换效率,光纤终端效率达 4.4%,超过了目前各种灯抽运固体激光治疗机的水平.该医疗机采用了先进电子技术,整机工作智能化,可靠性、稳定性高,实用性能好.经福建省立医院耳鼻喉科、厦门市第一医院、河南省人民医院和福建漳州市皮肤病防治院临床使用,获得良好疗效.根据福建科技信息所国内外联机查新,未发现灯抽运固体激光器能量转换效率超过本成果的水平,也未见有 1.34 μm 的激光治疗机的报道.根据以上资料和实地考察结果,鉴定委员会一致认为,YN-100-[→]型激光治疗机综合指标达到国际先进水平,其中光纤终端激光效率处于国际领先水平.该成果有很好的应用价值,应用范围广阔,市场前景好.

目前,该成果已与福日集团联合实施产业化.

中国科学院福建物质结构研究所 福州 350002

沈鸿元 曾瑞荣 黄呈辉 林文雄 黄文 黄见洪 张戈

收稿日期: 2000-07-24