

激光微束细胞操作系统*

李 岩^a 张书练^a 孟祥旺^a 张志诚^b 欧家鸣^c 刘静华^a
(^a清华大学精密测试技术与仪器国家重点实验室, 北京, 100084)
(^b清华大学生物膜与膜生物国家重点实验室, 北京, 100084)
(^c云南师范大学物理系, 昆明, 650092)

摘要: 提出构建一种用于生物细胞操作的激光微束系统。即由 Nd YAG 激光经物镜聚焦形成的光刀和 He-Ne 激光器经物镜聚焦形成的光镊组成的激光微束系统, 进行了总体设计、关键部件设计和选择。在构建的激光微束操作实验系统上实现了非接触细胞操作, 验证了光镊的力学效应。采用 Nd YAG 经显微物镜会聚形成光刀可以对细胞或细胞器进行打孔或切割染色体。

关键词: 激光微束 光刀 光镊 细胞操作

A laser micro-beam system for cell manipulation

Li Yan^a, Zhang Shulian^a, Meng Xiangwang^a, Zhang Zhicheng^b, Ou Jiaming^c, Liu Jinghua^a
(^a State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tsinghua University, Beijing, 100084)
(^b State Key Laboratory of Biomembrane & Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing, 100084)
(^c Department of Physics, Yunnan Normal University, Kunming, 650092)

Abstract: A laser micro-beam system for cell manipulation is introduced in the paper. It consists of an optical scalpel, which is a Nd YAG laser beam focused tightly by an objective and an optical trap, the focused He-Ne laser beam. Not only the overall design of the laser micro-beam system but also the design and the choice of the critical components of the system are reviewed. The optical trap can manipulate cells in suspension, it validates the kinetic performance of the laser trap. The optical scalpel can concise chromosome and punch holes in cells or organelles.

* 北京市自然科学基金和清华大学基础研究基金资助。

- 3 Kurniawan H, Budi W S, Suliyanti M M *et al.* J Phys D: Appl Phys, 1997; 30: 3335
- 4 Kurniawan H, Ishikawa Y, Nakajima S *et al.* Appl Spectrosc, 1997; 51: 1769
- 5 Mahdiah M H, Hall T A. J Phys D: Appl Phys, 1997; 30: 588
- 6 Ni X W, Zhou B, Chen J P *et al.* Acta Physica Sinica (Overseas edition), 1998; 2: 143
- 7 Ni X W, Chen J P, Shen ZH *et al.* International J of Optoelectronics, 1998; 12: 37
- 8 Depaula R P, Flax L, Cole JH *et al.* IEEE J Q E, 1982; QE18(4): 213
- 9 Chen J P, Ni X W, Lu J *et al.* Progress in Natural Science, 1996; A supplement to vol 6: s425
- 10 Chen J P, Ni X W, Lu J *et al.* SPIE, 1996; 2895: 208
- 11 Vogel A, Lauterorn W. J Acoust Soc Amer, 1988; 84: 719
- 12 Siano S, Pacini G, Pini R *et al.* Optics Commun, 1998; 154: 319
- 13 Bar-Ziv E, Sgulim S, Kafri O *et al.* Appl Opt, 1983; 22: 5
- 14 Marcuse D. Light Transmission Opt. New York: Van Nostrand, 1972

* * *

作者简介: 陈建平, 男, 1967年12月出生。博士生。现从事激光对材料的破坏机理和测试技术研究。

Key words: laser micro-beam optical scalpel optical trap cell manipulation

引 言

在目前的基因工程中,国内外所使用转基因仪器基本上都是“显微操作仪”。现有显微操作仪因为是手动和接触工作方式,成功率受操作者自身因素的影响大,刺破细胞膜时易对细胞或胚胎造成机械损伤,效率低;而且胚胎或细胞在体外的操作时间过长,容易致死;准确度不够高,压入细胞的 DNA 数目不能控制。所以,科研人员普遍希望能够实现非接触的操作。

利用激光微束操作可实现非接触细胞操作,它主要包括“光镊”和“光刀”。与现在用得最多的机械式显微操作仪的接触操作不同,我们要建立的激光微束细胞操作系统在细胞操作时没有任何接触,正是由聚焦的激光束靠其光动力“抓住”细胞(光镊),再是激光聚焦微束在细胞膜上开孔(光刀),然后是另一激光束(第 2 把光镊)将细胞内质粒移出或外质粒(如带有 DNA 的金粒或大肠杆菌)移入,移动迅速、准确、定量。因此,采用激光提供的动量和能量,控制、操纵细胞将 DNA 导入细胞实现基因转移,可以大量节约资源,缩短转基因时间,提高成功率。所以,激光束操纵细胞技术是当前最先进的一种转基因技术。

1 实验系统的建立

经方案分析和比较,参考国内外现有激光微束系统,并考虑到我们以后的研究方向,我们设计了一套激光微束细胞操作系统,本系统是光刀和光镊的组合系统。设计方案如图 1 所示,其中, P_1 为倍频晶体, P_2 为混频晶体, L_1 为聚光镜, L_2 为扩束镜, M_3 为光束耦合器, OF 为衰减片。图中,激光光源使用了 Nd: YAG 激光器和 He-Ne 激光器。

1.1 系统中激光器的选择设计

激光微束系统中的光刀采用电光调 Q 非稳腔 Nd: YAG 激光器(波长为 1064nm)。经 KD^*P 晶体倍频后获得 532nm 的绿光。倍频光和剩余的基频光经第 2 块 KD^*P 晶体混频,产生 354.7nm 的紫外光。另外,也可将 532nm 的倍频光经第 2 块 KD^*P 晶体再混频获得 266nm 的紫外光。所以,我们具有 1064nm, 532nm, 354.7nm, 266nm 4 种激光波长可供选用。

紫外光具有较大的光子能量,容易获得所需要的相互作用。此外,波长越短理论上可聚焦的光斑就越小。同时,我们还要考虑激光对生物的伤害应尽量小。激光辐射切割的安全性也已得到证实:一般的紫外区被分为 3 个区,UV-A(200nm~290nm),UV-B(290nm~320nm),UV-C(320nm~400nm)。只有 UV-A 被认为能引起 DNA 的变异。我们使用的激光波长为 354.7nm,它的波长在 UV-C 区。在几个生物应用中,包括单一细胞操作,已经证明此激光器的安全性。因此,我们选用 354.7nm 的紫外光作为工作波长。

紫外激光输出能量在 0~30mJ 可调,稳定性优于 $\pm 5\%$,发散角小于 0.5mrad,脉宽为 5ns,触发频率 1Hz~20Hz 可调,光场分布为高斯光束。

YAG 激光器的输出经四棱镜分光后获得 354.7nm 的紫外光,也可以采用透镜镀膜方法

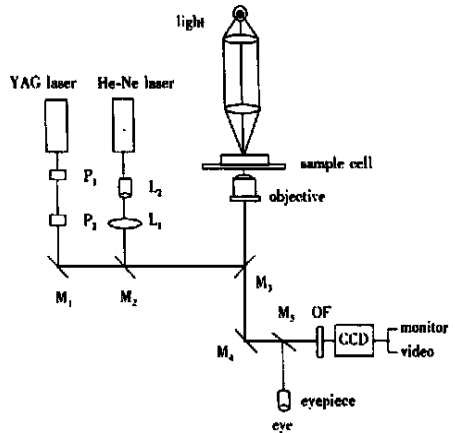


Fig. 1 Schematic diagram of a laser micro-beam cell manipulation system

将其它波长的光滤掉,而只剩下 354.7nm 的紫外光。紫外光再经物镜强会聚后,形成圆形光刀,可用于细胞打孔等操作。也可采用棱镜将其由圆形变换成椭圆形再会聚,形成线形光刀,可用于切割染色体等操作。

激光微束系统中的光镊采用 He-Ne 激光器聚焦后捕获细胞或细胞器。

我们使用的 He-Ne 激光器的腔长为 1.17m,功率大于 40mW,发散角小于 1.2mrad,光束直径为 1.1mm,功率稳定性 $\leq 5\%$,模式为 TEM₀₀。

He-Ne 激光器的波长是 632.8nm,为可见光。由于激光的高强度,激光在通过显微系统中的各个光学元件以及入射到液体时,漫反射造成的杂散光将充满整个视场,严重影响生物样品的观察清晰度。为了消除此杂散光,必须在观察通道中加入相应的滤光片。但是,照明光中的相当一部分光也被滤掉了,因此,视场着色并且变暗。

由于我们的目标是研制出一台激光微束的科学仪器,因此,我们必须要考虑其实用性和经济性。Nd YAG 激光器价钱昂贵,不利于推广,因此,我们最终将用较便宜的氮分子激光器取代它。氮分子激光器的工作波长为 337.1nm,脉冲宽度为 5ns,脉冲能量大于 6mJ,光斑尺寸为 6mm \times 24mm,发散角为 2 \times 5mrad,脉冲能量稳定性小于 10%。由于氮分子激光器的光斑为矩形,不能直接耦合到显微镜中,因此,必须将其转化为高斯光束,这是研究课题的一部分。

我们要用的另一台激光器是波长为 808nm 的半导体激光器来取代 He-Ne 激光器作为光镊捕获细胞或细胞器。这样,解决了视场内杂散光的问题,而且半导体激光器的功率远大于 He-Ne 激光器的功率,可以解决功率不足的问题。

1.2 捕获聚焦镜

捕获聚焦镜是能够把非均匀光场的激光会聚成衍射极限光斑并实现对粒子捕获的会聚透镜。捕获聚焦镜一般都采用高倍显微物镜。因为高倍显微物镜具有高的数值孔径,即高的空间分辨率,同时,产生强的光场梯度分布,从而满足形成三维光学阱的需要。选择显微物镜的另一重要原因是,以显微物镜为核心的显微镜的光学成像系统正是光镊微米级操作的显微镜观察所必备的装置。

高倍率大数值孔径的物镜在实现强梯度光场的同时,也具有高的放大倍率,这有利于光镊操纵和分辨物体的精细结构。同时,我们需要的高倍显微物镜应适用于紫外到近红外波段,具有大数值孔径。由于大数值孔径的物镜工作距都很短,不利于生物样品操作,因此,最好采用倒置显微镜,而我们采用的正好是倒置显微镜,利于实验的进行。

1.3 操作平台

平台就是显微镜的操作台,它用于承载样品室。操作台在 $x-y$ 平面和沿光轴方向都可以连续地调节,所以,同时也可用来调节光阱与待捕获粒子之间在三维空间上的相对位置。

由于光镊作用的粒子都是微米量级,相应的要求三维平台的操作精度在微米或亚微米量级。我们使用的显微镜操作台在 z 向的调整精度为 1 μ m,基本可以满足要求。而 $x-y$ 平面的调整精度很低,因此,需要建立精密的调整平台。我们采用了压电陶瓷(PZT)驱动的精密切割工作台,其机械部分为弹性铰链结构,根本上消除了其它类型的工作台间隙造成的运动误差,其 $x-y$ 调整精度为 1 μ m,并将该精密工作台置于显微镜操作台之上,实现粗动精动一体化。

1.4 扩束镜、物镜的选取

系统中 He-Ne 激光器的光束直径为 1.1mm,我们使用的显微镜的 100 倍物镜的参数为:后光阑孔径为 3mm,物镜外露孔径为 3mm,数值孔径(物镜浸在蔗糖溶液中)为 1.25,工作距

为 0.17mm。40 倍物镜的后光阑孔径为 8mm，外露孔径为 8mm。按照理论，只有当激光束充满物镜后瞳时，激光束才能在物平面上聚焦最小。显然 $1.1\text{mm} < 3\text{mm}$ ，因此，我们必须将其扩束后再使用。物镜和目镜的光路示意图如图 2 所示。

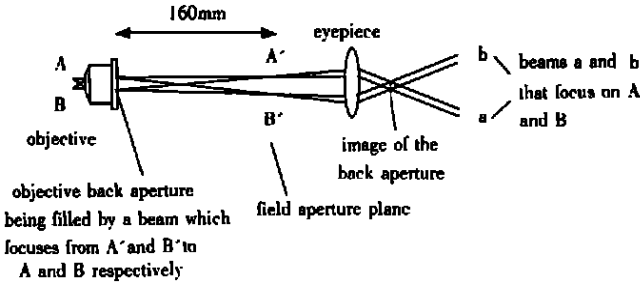


Fig. 2 Simplified optics of objective and eyepiece

由此可以计算出入射光的发散角为： $\theta = 3/160 = 0.01875$ 。入射光经 3 倍扩束镜扩束后光束直径为 $D = 3.3\text{mm}$ ，所以，选用的会聚透镜的焦距为： $f' = D/\theta = 3.3/0.01875 = 176\text{mm}$ 。故

我们选用的扩束镜为 3 倍，会聚透镜焦距为 176mm。当光束充满物镜后瞳时，A, B 两点被聚焦得最小。出射点位于物镜后瞳通过目镜所成的像上。通过 A', B' 的光线方向不同但都充满物镜后瞳，AB 平面与 A'B' 平面互为共轭。

1.5 显微动态检测系统

实验中，我们采用由 CCD 连接的图像处理系统。它可以实时观察、连续记录，也可以随时进行调整。该系统具有很高的时间和空间分辨率，它能够进行静态和动态记录。

由于系统中采用了大功率的 Nd:YAG 激光器和 He-Ne 激光器，为了保护 CCD，同时避免人眼受到伤害，我们在系统中加入了衰减片。同时，我们还为成像系统建立相应的图像处理系统，便于对激光微束操作所录制的图像进行剪辑处理。

1.6 光耦合器

光耦合器是将激光耦合到显微镜的重要部件，它的质量的好坏将直接影响到实验结果。光耦合器能够保持原来的成像系统的分辨率和清晰度，实现个光路自己的功能并且与显微镜齐焦。我们的系统中采用的光耦合器是一个与光轴成 45° 角的双色分束器，它上面镀的膜可以同时把 Nd:YAG 激光器和 He-Ne 激光器的光耦合到显微镜中，保证其足够的功率和高的成像质量。

2 实验内容与结果

2.1 光镊捕获酵母细胞实验

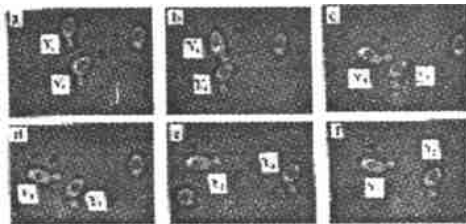


Fig. 4 A yeast cell was trapped using a He-Ne laser (indicated by an arrow)

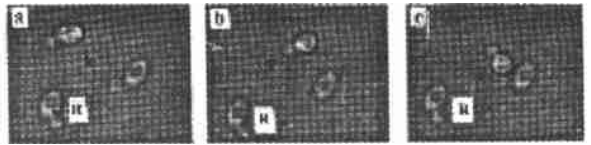


Fig. 3 A yeast cell was trapped using a He-Ne laser (indicated by an arrow)

图 3 所示是使用 He-Ne 激光陷阱捕获处于马铃薯培养基中的出芽酵母菌孢子的情形。图中捕获始终为同一个的酵母菌孢子。载物台由右往左再往上移动。捕获速度 $6.122\mu\text{m/s}$ ；陷阱功率约 7mW ；物镜 40 倍；放大 5000 倍。

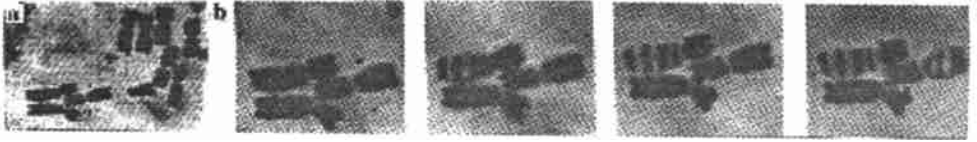
图 4 所示是使用 He-Ne 激光陷阱捕获处于马铃薯培养基中的出芽酵母菌孢子的情形。与图 3 不同，图中捕获的酵母菌孢子在变化。图 4a 是 Y_2 在激光陷阱中；图 4b 是载物台向下移动 Y_1 进入陷阱， Y_2 被挤出陷阱；图 4c 和图 4d 是载物

台由左边往右边移动时, Y_1 在陷阱中不动, 而 Y_2 随载物台同步运动, 远离了 Y_1 的情形。图 4e 和图 4f 是载物台由右边往左边移动时, Y_1 在陷阱中不动, 而 Y_2 随载物台同步运动, 靠近 Y_1 的情形。捕获速度 $3.42\mu\text{m/s}$; 孢子尺寸 $8.30\mu\text{m} \times 11.67\mu\text{m}$; 陷阱功率约 7mW ; 物镜 40 倍; 总体放大 5000 倍。

2.2 光刀显微操作

采用 Nd:YAG 经显微物镜会聚形成光刀可以对细胞或细胞器进行打孔或切割。我们用

激光微束
实现了切
割染色体
的实验。



如图 5 所
示。图中

Fig. 5 The process of ryes' chromosome incision

a—the picture of chromosome in $100\times$ objective b—the process of the first chromosome incision

为黑麦细胞的染色体, 图中给出切割标示为 1 的染色体的切割前后的详细过程, 切割后的效果清晰可见。实验中脉冲 Nd:YAG 激光微束采用的线形切口, 而非圆形切口。圆形切口是由激光直接由显微物镜聚焦后, 进行切割。而线形切口, 则是由激光先经过一个棱镜, 将圆形光斑转化为椭圆形光斑后, 再经显微物镜聚焦后(聚焦后为一条线, 而非一个圆形会聚斑), 进行切割。线形光刀和圆形光刀各有优缺点。线形光刀用于切割则效率高, 操作简单, 能量控制得好, 则一刀可以到位, 但是不能用它进行打孔。圆形光刀则用于给细胞或细胞器打孔, 操作较为容易, 不能用它切割染色体, 因为一般染色体都有十几微米, 而圆形光刀一般只有 $1\mu\text{m}$ 左右, 要切割完成需要连续切割多次操作复杂, 效率低下。

3 结束语

我们采用 Nd:YAG 激光器和 He-Ne 激光器组合构建的激光微束操作实验系统实现了非接触细胞操作。通过实验验证了光镊的力学效应。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。通过实验我们也验证了光刀的作用, 采用 Nd:YAG 经显微物镜会聚形成光刀可以对细胞或细胞器进行打孔或切割。

该研究工作得到了沈子威教授的指导和尚鹤龄老师的帮助。作者在此深表感谢。

参 考 文 献

- 1 Ashkin A, Schutze K, Dziedzic J M *et al.* Nature, 1990; 348: 346~ 348
- 2 Ashkin A, Dziedzic J M. Science, 1975; 187(21): 1073~ 1075
- 3 Ashkin A, Dziedzic J M. Science, 1987; 235: 1517~ 1520
- 4 Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Nature(London), 1987; 330: 769~ 771
- 5 Ashkin A. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94(5): 4853~ 4860
- 6 Sato S, Inaba H. Optical and Quantum Electronics, 1996; 28: 1~ 16
- 7 Afzal R S, Brian T. Rev Sci Instrum, 1992; 63(4): 2157~ 2163
- 8 Li Y M, Guan L J, Lou L R *et al.* Science in China(Series C), 1999; 42(2): 122~ 127
- 9 蔡惟泉, 从 征. 激光与光电子学进展, 1998; (12): 34~ 37
- 10 王瑞丽, 尚鹤龄, 欧家鸣 *et al.* 激光生物学报, 1998; 7(3): 171~ 175

* * *

作者简介: 李 岩, 男, 1963 年出生。博士, 副教授。现从事激光技术及精密计量测试方面的科研与教学。