

雷射光鉗技術在生物作用力研究上的應用

林奇宏、蔡金吾

國立陽明大學微生物暨免疫學研究所

雷射光鉗技術對操縱生物樣本及測量生物作用力的應用相當廣泛。在我們的研究中，我們使用「穿透散射光分析 (FORSA) 模組」來進行生物作用力的測量，這個位移可以很容易的轉換成所測得的施力。我們已經將這套系統用來研究細胞與分子間交互作用力的測量，在這些應用中，細胞被小心的定位與移動使之與另一個細胞相接觸，我們發現細胞間的作用力在接觸後的數分鐘內逐漸上升，我們也進行對不同的突變的馬來亞蝮蛇蛇毒蛋白 (rhodostomin) 與細胞表面組合蛋白 (integrin) 之相對作用力的精準測量，顯示了雷射光鉗提供了一個對生物活動的偵測與生物作用力變化的測量有效而方便的方法。

一、雷射光鉗簡介

在 1970 年代，Arthur 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。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]。這套方法後來發展成雷射致冷 (Laser cooling) 技術，使得這套技術不僅可以使用在微米級的粒子上，更可以推廣到原子分子的尺度，雷射致冷技術也使朱棣文 (Steven Chu) 獲得 1997 年的諾貝爾物理獎。

一直到 1980 年代初期，Ashkin 等人又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「光鉗(optical tweezers)」於焉誕生^[3,4,5]。也因此，光鉗的正式名稱為「單束光梯度力阱 (single-beam optical gradient force trap)」，可以用來抓取並移動從數十奈米 (nanometer) 到數十微米 (micrometer) 的微小粒子。

光鉗的發明使得許多研究中，人們可以從被動的觀察轉而成為主動的操縱，我們可以精確的移動微米級的粒子，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]，運用所及包括微管 (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) 等的運動行為及特性。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]。

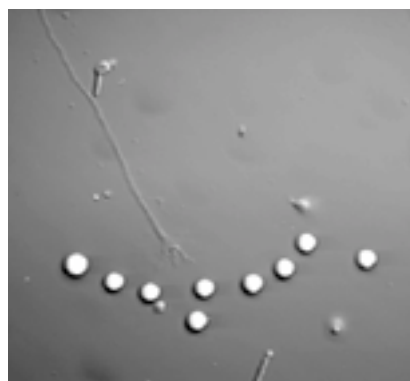
在眾多的應用層面中，我們最有興趣的是光鉗在生物學上的應用。基於光鉗的特性，其應用的範圍不僅可以抓取微生物或細胞，也可以透過細胞膜捕捉並移動生物體內的胞器，並限制他們的移動。除了操弄粒子的位置以外，參與生物過程的作用力也可以藉由光鉗測量出來。其中的應用包括計算 DNA 的彈性係數^[8]，在施力的狀況下做轉錄 (transcription) 的實驗^[9]，以及阻止細胞分裂 (cytokinesis) 時染色體 (chromosome) 的分離，彎曲某些長鏈狀生物分子等。當然，除了這些方面以外，還有許多可能的應用，等待我們去開發。

在建立光鉗的過程中，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，並改良作用力量測的方法。本實驗室所架設的光鉗目前正積極加入生物醫學研究的行列，並已進入實際應用的階段，包括研究神經軸突生長之膜蛋白 (membrane protein) 的運動、細胞間質 (extracellular matrix) 分子對神經軸突 (axon) 生長的影響、細胞間交互作用中瞬間行為的觀察、細胞間黏著力的測量、分子與受體之間黏著力之測量，以及其他生命現象中交互作用力之研究。

二、光鉗在神經軸突生長之應用

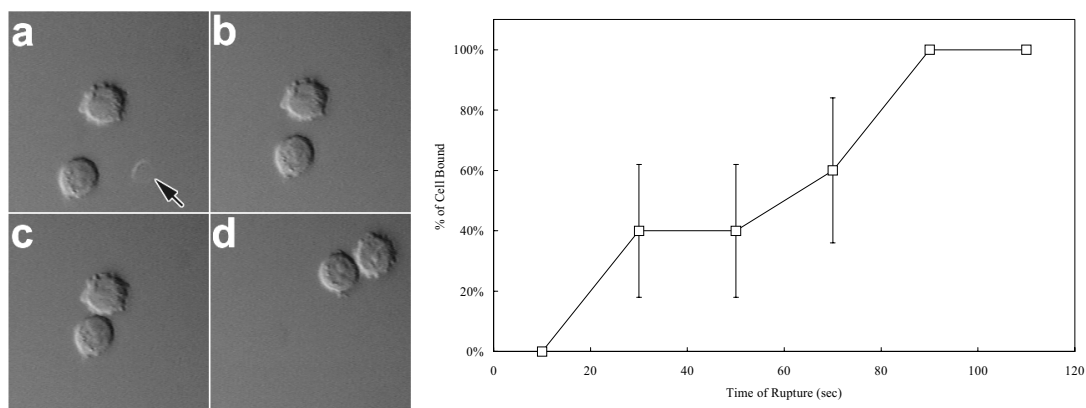
神經細胞具有樹突 (dendrites) 及軸突，分別為神經細胞接收及發出神經傳導物質 (neural transmitter) 的位置，軸突的前端稱為生長錐 (growth cone)，生長錐可以往前延伸並觸碰另一個神經細胞，其運動的機制與細胞內骨架 (cytoskeleton) 的重塑 (remodeling) 有關，並牽涉到細胞膜 (cell membrane) 的流動，而這些細胞的重塑與流動的過

程常常可以顯現在細胞膜蛋白的運動上^[10]。我們可以将塑膠微粒覆上一層對某些蛋白具有專一性的分子或抗體，用以標記、定位這些膜蛋白，我們利用光鉗抓取並將之放置於細胞膜上以做為細胞膜上某些蛋白質分子的標記，利用顯微影像技術就可以追蹤並分析這些蛋白質的運動型態，以做為神經細胞生長時機制的重要指標。



圖一、運用光鉗所排列的塑膠微粒圖樣，以研究神經軸突對空間訊號的反應。圖中自左上角延伸至下方之纖維即為神經軸突。

此外，光鉗也可以用來探討不同型態之空間訊號對神經之發育 (development) 與重組 (remodeling) 的影響。神經細胞在發育的時候，其生長需要靠外界許多分子的誘導，某些細胞會在細胞表面表現不同的蛋白，來指揮神經軸突。我們將包覆著各種細胞間質分子的塑膠 (polystyrene) 微粒以光鉗排列為不同之圖樣，期望能引發不同的軸突生長型態，配合自動間歇攝影 (time-lapse recording) 觀察生長中的神經軸突碰觸後的反應，相信此研究對神經系統的發育與學習具有極重要之影響。圖一即為利用光



圖二、左圖顯示利用光鉗 (a 圖箭頭所指光點) 移動左下角之細胞 (b) 使兩細胞相接觸 (c)。待其緊密黏著，移動其中一細胞可同時拖曳另一細胞 (d)。右圖則是分別在不同時間利用光鉗試著將兩細胞拉開時，細胞仍保持黏著無法被拉開的比率，細胞黏著比率呈現穩定上升，大約 90 秒所有細胞均已黏著，50%的細胞約在 60 秒左右已黏著。

鉗所排列之微粒圖樣。

三、雷射光鉗在細胞與細胞間作用力間之研究

目前所架設完成的光鉗不僅可以抓取塑膠微粒，其嵌住力並足以移動直徑約為 10~20 微米大小之細胞。我們可以移動細胞促使細胞附著，圖二就是使用雷射光鉗技術將人類胚胎腎臟細胞 (human embryonic kidney cell) HEK-293T 利用光鉗嵌住並移動，使兩個細胞進行附著。我們發現在兩細胞相互接觸後，在極短的時間內就會開始進行黏著反應，在大約 1 分鐘內就有 50%左右的細胞會進行附著。這樣的時間尺度，使用傳統的方法很難加以研究，使用雷射光鉗可以達到的高時間解析度，對於生物的快速反應的研究來說，無非是加上的一個利器。此外也可以同時搭配各種顯微鏡技術，例如鈣離子顯像術 (calcium imaging) 及其他的螢光顯微鏡技術 (fluorescence microscopy)，使我們可以觀察

到細胞與細胞交互作用時，極短時間內的各種變化，例如細胞內鈣離子等訊息傳遞 (signal transduction) 分子的變化。

四、雷射光鉗在細胞與分子之間作用力之研究

除了可以進行細胞與細胞間作用力的研究之外，雷射光鉗也可以進行分子間或分子與細胞間作用力的研究。目前正與陽明大學微免所羅時成教授合作，研究由馬來亞蝮蛇所分離出來的出血性蛇毒蛋白 (rhodostomin) 對血小板 (platelet) 某些膜蛋白的影響。此種蛇毒蛋白會影響血液凝集的能力，目前已知馬來亞蝮蛇毒蛋白為一含 68 個氨基酸的小蛋白，具有六對雙硫鍵鎖住了蛋白特定的三維結構，將三胜肽 (Arg-Gly-Asp, 簡稱 RGD) 露於環狀結構頂端，藉由 RGD 環可與由於血小板上的組合受體 (integrin) 結合，啟動細胞內生化變化而造成型態改變^[11]。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。另外也可以使用生

化的鍵結親和力 (**binding affinity**) 法來測試分子間鍵結的親和力，但這些方法都需要較長的反應時間，但生物的生理反應往往都在數十秒乃至於數分鐘就已開始發生，現在我們可以利用光鉗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。

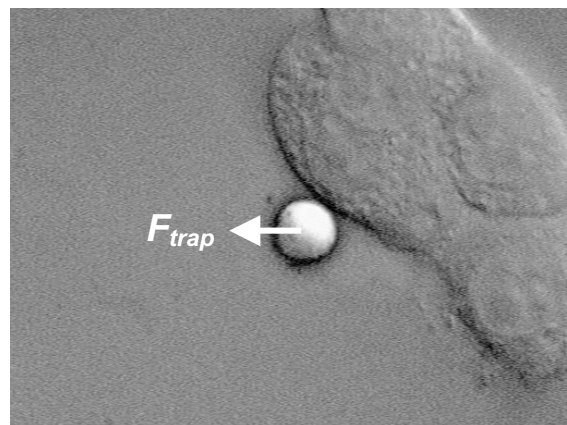
由於我們要研究的分子無法使用一般的光鉗來嵌住，因此通常我們會將分子覆於微小的塑膠微粒上，藉由操控塑膠微粒與細胞接觸來引發分子鍵結及細胞的反應，進而可以量出分子間作用力並研究細胞內的訊息傳遞等過程。圖中就是將蛋白質覆於 7.75 微米的聚苯乙烯 (**polystyrene**) 膠體顆粒，利用雷射光鉗碰觸細胞並將其拉開，如此可以測量細胞表面受體與蛇毒蛋白之間相對之作用力。我們發現所得到的結果與用傳統的方法相符，並且可以得到較好的準確度，而測量的結果也更具細胞生理意義。

五、高解析度的作用力測量

此外，光學嵌住亦可精準的測量許多生物反應時所參與的作用力。一般的方法通常是先校正光鐳子的最大抓取力 (**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。此外還有更精確的方法可以用以測量力。當透明微粒受到嵌住光束的吸引時，物體將處在光焦點附近的平衡位置，若此時物體受到外力牽引，將會離開平衡位置，如同彈簧作用力一般，此時光鉗的作用力也會開始增大，直到光鉗的作用力與外力相等則再度達成新平衡。若測量光鉗嵌住力與位移的關係，則可以藉由測量物體相對於平衡位置的位移，得知物體所受外力之大小，但這個位移往往很小，只有數個奈米 (**nanometer**) 到數個微米大小，直接測量

位移常常無法達到所需的解析度。

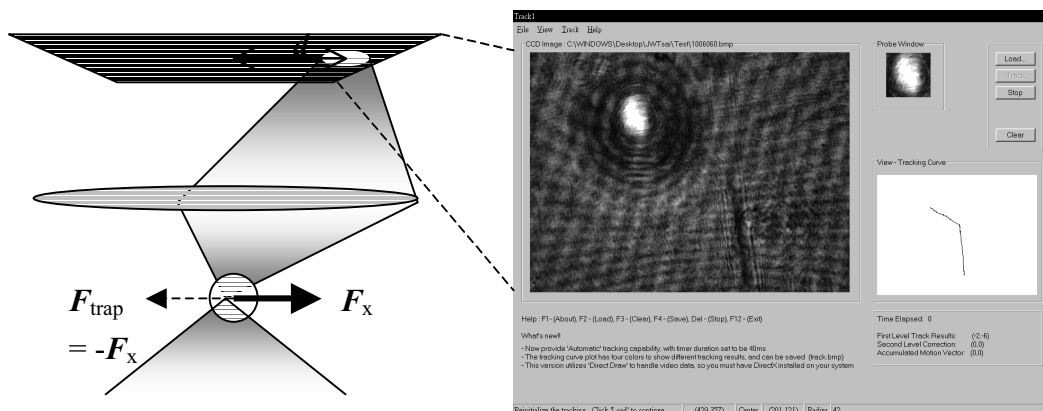
目前有幾個方法可以增加測量位移的解析度，其中之一是使用正向散射光的分析。當光鉗嵌住微粒時，雷射光束會受到折射而產生正向散射光，收集這些散射光可產生其繞射光點，當微粒受到外力時，微粒會產生偏移，因而雷射光束的偏轉方向亦



圖二、利用雷射光鉗進行分子與細胞間附著力之測量。將蛋白質覆於膠體微粒上再利用光鉗移動使之與細胞接觸，在不同的時間內將其拉開，並測量期間最大的作用力。

產生改變，由於此光點位移 d 的大小與微粒位置有關，因而可以轉換成所受外力 F_x 的大小，因此經過精準的校正後，若量測其位移即可得知其施力大小。

我們已成功的運用其繞射圖形，來偵測微粒與嵌住中心 (**trapping center**) 的相對位置，並已著手校準其偏折程度與作用力之轉換。搭配目前正在發展的全自動化線上影像分析系統，可以同時進行影像之擷取與作用力之運算，可以即時測量作用力對時間的變化，由於此系統運用正向散射光的分析，因此我們稱之為「正向散射光分析 (**forward scatter analysis**)」，簡稱 FORSA，使用這套系統，我們已證明其解析度與傳統的方法大為提高^[12]。



圖三、散射圖形的產生及擷取。左圖為散射圖形產生的機制，雷射光通過微粒產生的繞射光點收集後可以加以校正產生嵌住力 F_{trap} 與位移 d 的關係圖，以用來測量未知的力 F_x ，右圖即為「全自動化即時影像分析系統」所擷取之繞射圖形，右方視窗為繞射中心運動之軌跡，可用來進行即時的作用力分析。

在我們的研究中，我們將整套光鉗設備架設在一部反轉式顯微鏡上，並使用「正向散射光分析模組 (FORSA module)」來進行生物作用力的測量，在整個「正向散射光分析模組」內，雷射光經散射後，我們透過攝影機 (CCD) 收集散射光所造成的繞射圖案，並由電腦擷取、紀錄及分析。與直接測量鉗住物體的位移比較起來，我們證明了測量這個繞射圖案的位移對具有較高的精確度，這個位移可以很容易的轉換成所測得的施力。同時，由於經由探測光束所成的圖案與直接收集光鉗雷射相較具有較高的對比，我們發展了一套全新的快速演算法，可以對物體移動的軌跡 (即施力的大小) 進行即時測量。

結論

由於其運用領域的重要性及方便性，雷射光鉗這項技術已在許多研究的領域展露頭角，目前台灣

也在這方面的應用上開始跟上腳步，也因此這項技術在許多實驗室的努力下無論在其機制、應用、及各式新的架設方面都奠下基礎，我們在這裡所討論到的只是其中在細胞學上的一小部分應用，相信還有許多應用值得我們去嘗試。

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，光鉗就是一個很好的例子。雷射的這種應用，為生物體的操控技術開啓了全新的空間，未來，這些技術都將在許多自然科學中開創全新的領域。

參考資料

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.
 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.
 7. Crocker JC, Grier DG: Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *J Colloid Interface Sci* 1996. 179:298-310.
 8. Perkins TT, Smith DE, Larson RG, Chu S: Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science* 1995. 268:83-87.
 9. Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM, Gelles J: Transcription against an applied force. *Science* 1995. 270:1653-1657.
 10. Lin CH, Forscher P: Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 1995. 14:763-771.
 11. Chang HH, Tsai WJ, Lo SJ: Glutathione S-transferase-rhodostomin fusion protein inhibits platelet aggregation and induces platelet shape change. *Toxicon*. 1997. 35: 195-204.
 12. Tsai JW, Liao BY, Huang CC, Hwang WL, Wang DW, Chiou AE, Lin CH: Applications of optical tweezers and an integrated force measurement module for biomedical research. *Proc SPIE* 2000. 4802:213-221.