

Microcmanipulatie met licht: Het Optisch Pincet

P.J.H. Bronkhorst, G.J. Brakenhoff

Inleiding

Vanuit de sterrenkunde is reeds lang bekend dat licht krachten kan uitoefenen. Een voorbeeld hiervan is het wegblazen van materie rond sterren door de stralingsdruk van de van de ster afkomstige straling. De krachten zijn relatief klein (pico-Newtons per megaWatt) zodat zij pas zichtbaar worden bij grote vermogens aan straling. Met de komst van de laser werd het mogelijk relatief grote vermogens te concentreren zodat de optische krachten, weliswaar op microscopische deeltjes, zichtbaar konden worden gemaakt.

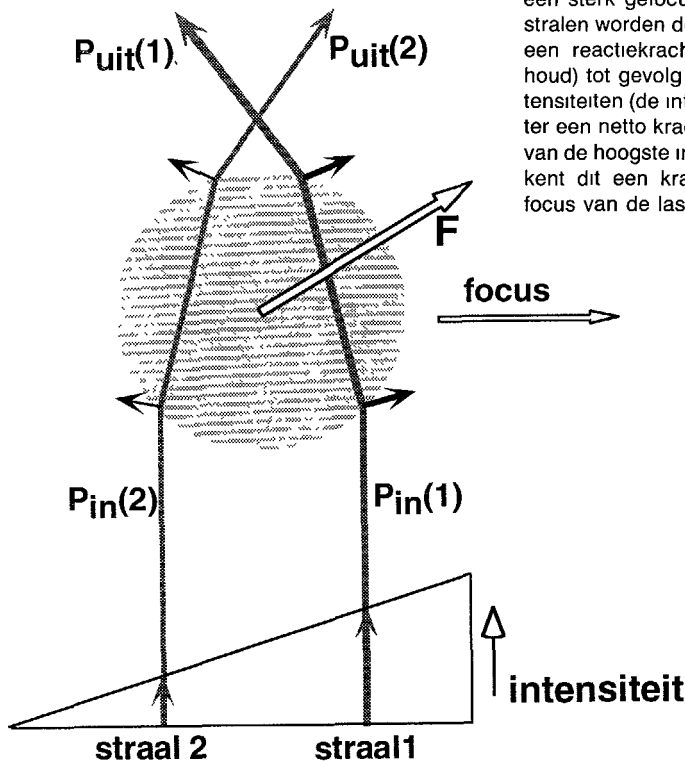
Een van de pioniers op het gebied van micromanipulatie met lasers, is Arthur Ashkin [1]. Hij liet zien dat glazen en polystereen bolletjes voortgestuwd konden worden en gebruikte dit om de grootte van dergelijke deeltjes, via de effectieve doorsnede voor de stralingsdruk, zeer nauwkeurig te bepalen. Veel belangrijker was zijn idee een optische val te creëren met een sterk gefocusseerde laserbundel [2]. De zo ontstane intensiteitsgradiënt bleek een stabiele optische val voor microscopische diëlektrische deeltjes waarvan de brekingsindex groter is dan het omringende medium. Deze stabiele positie, die zich nabij het focus van de laserbundel bevindt, wordt de "optical trap", "optical tweezers" ofwel het optisch pincet genoemd.

Met de optische pincetten wordt het mogelijk individuele deeltjes te positioneren in de ruimte, bijvoorbeeld voor lichtverstrooiings-experimenten aan een enkel deeltje [3]. Met interferentie van meerdere laserbundels kunnen complexere elektrische velden worden aangelegd waarin meerdere deeltjes gevangen worden in lokale

intensiteits-maxima of -minima ("optische materie" [4]). Ook kunnen atomen worden gemanipuleerd door hen met stralingsdruk te richten, bijvoorbeeld om smalle lijnpatronen op een substraat aan te brengen [5]. Veel toepassingen vinden we echter in de biologie waar in een aparte paragraaf op zal worden ingegaan

Het principe

Om de oorsprong van de optische krachten die verantwoordelijk zijn voor de pincetwerking inzichtelijk te maken, gaan we uit van de volgende situatie: een deeltje met een brekingsindex hoger dan het omringende medium met afmetingen die groot zijn ten opzichte van de golflengte van het gebruikte laserlicht, bevindt zich in een sterk gefocusseerde laserbundel. Dit betekent dat het deeltje zich bevindt in een intensiteitsgradiënt (zie figuur 1A). Het licht wordt nu door het deeltje gebroken wat een verandering van de richting van de impuls van het licht tot gevolg heeft. In de situatie van figuur 1 betekent dit dat stralen die aan de rechterkant door het deeltje gaan naar links, en stralen door de linkerkant naar rechts, worden gebroken. De reactiekracht als gevolg van de wet van behoud van impuls is dus respectievelijk naar rechts en naar links gericht. Omdat de intensiteit (en dus ook de impuls) van de stralen die door de rechterkant van het deeltje lopen groter is dan aan de linkerkant, zal er een netto kracht naar rechts overblijven. Dus, het deeltje ondervindt een kracht in de richting van de hogere intensiteit, ofwel richting het focus van de laserbundel. Deze kracht wordt de gradiëntkracht genoemd omdat hij een gevolg is van de intensiteitsgradiënt

A

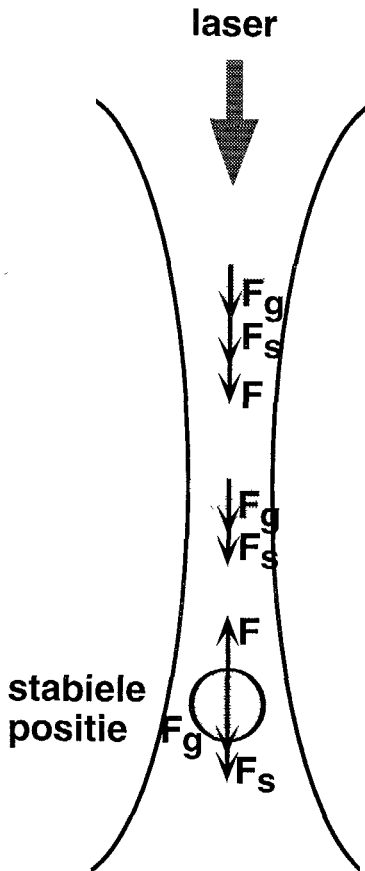
Figuur 1

A' Een deeltje ($n > \text{medium}$, diameter $> \lambda$) wordt belicht met een intensiteits-gradient in een sterk gefocusserte laserbundel. Lichtstralen worden door het deeltje gebroken wat een reactiekracht (op basis van impulsbehoud) tot gevolg heeft. Door de ongelijke intensiteiten (de intensiteit-gradient) zal er echter een netto kracht overblijven in de richting van de hoogste intensiteit. In de praktijk betekent dit een kracht in de richting van het focus van de laserbundel.

waarmee het deeltje belicht wordt. Uiteraard spelen ook de zwaartekracht en de voorwaarts gerichte stralingsdruk een rol en zal de uiteindelijke stabiele positie waar het deeltje wordt gevangen daar zijn waar de drie krachten elkaar opheffen. Dit punt bevindt zich nabij het focus van de laserbundel maar de exacte plaats is afhankelijk van de experimentele situatie en de eigenschappen van het deeltje. In figuur 1B is de situatie weergegeven voor een verticale opstelling waarbij het laser-licht van boven komt.

Bovenstaande redenering is in principe niet meer geldig voor kleinere deeltjes ($\approx \lambda$). Echter in veel toepassingen worden deeltjes met een grootte in de orde van mi-

crons gebruikt in combinatie met infrarood lasers. Toch blijken ook deze relatief kleine deeltjes een stabiele driedimensionale positie in te gaan nemen. En niet alleen "nette" deeltjes, ook deeltjes met onregelmatige vormen en inwendige structuren zoals cellen blijken te kunnen worden vastgehouden in zo'n optisch pincet. Dergelijke deeltjes nemen vaak ook nog een bepaalde stabiele oriëntatie aan. In dit soort gevallen ontbreekt vaak een exacte beschrijving van het lokale elektromagnetische veld en zijn de lokale optische eigenschappen en de exacte vorm van de objecten onbekend. Het gevolg hiervan is dat het berekenen van de optische krachten een complex probleem wordt zodat in de praktijk de grootte van de krachten niet

B

B. Het krachtenevenwicht op een deeltje in een verticale gefocusseerde laserbundel: De stralingsdruk, de zwaartekracht en de gradientkracht heffen elkaar op in een punt nabij het focus van de laserbundel. Dit is de locatie van het optische pincet.

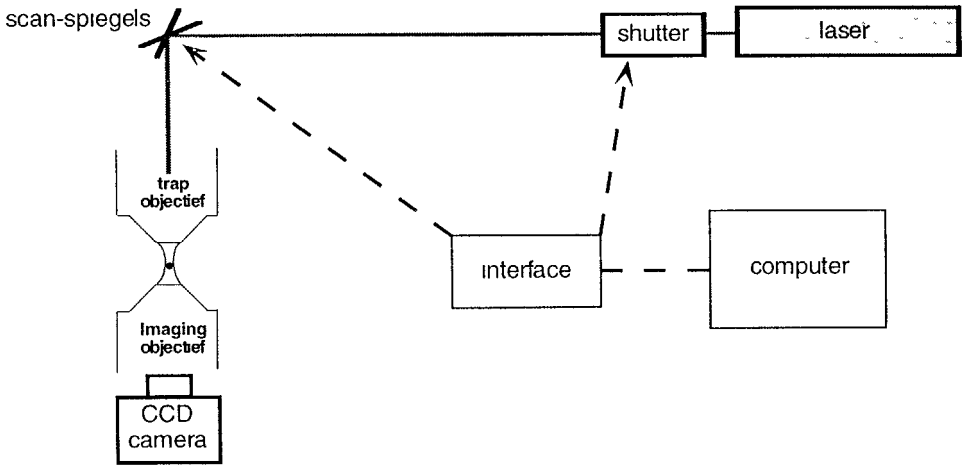
bekend is. Een extra aspect is er voor vervormbare deeltjes, waaronder de meeste biologische materialen, welke de neiging hebben om iets van vorm te veranderen door de interactie met de laser-bundel. Er zijn echter wel mogelijkheden om toch iets over de optische krachten te kunnen zeggen. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van bolletjes (krachten te berekenen) als kracht-transducer. In zo'n situatie wordt

een bolletje op het object geplakt en er wordt vervolgens aan het bolletje getrokken. Via bijvoorbeeld detectie van de verplaatsing van het bolletje uit het focus, kan het geheel als krachtmeter gebruikt worden. Een andere optie is het iken van het systeem in een vloeistofstroming met een bekende viscositeit.

De instrumentatie

Vanwege de sterke intensiteitsgradient die nodig is om een meetbare kracht te kunnen uitoefenen, wordt meestal gebruik gemaakt van hoge N.A. objectieven om de laserbundel te focuseren tot een door diffractie gelimiteerd spotje. Het focus van deze bundel is bij benadering de locatie van het optisch pincet en bevindt zich in het preparaat met het te manipuleren object. In figuur 2 is een voorbeeld van een optische-pincet-opstelling weergegeven zoals die in ons laboratorium wordt gebruikt. De laserbundel wordt door het objectief van een geïnventeerde microscoop ingekoppeld en het beeldvormings-objectief bevindt zich onder het preparaat. Voor het registreren van de beelden wordt gebruik gemaakt van een CCD camera. De hoek waaronder de laserbundel het objectief binnenkomt bepaalt de plaats van het focus in het horizontale vlak, en dus de positie van het pincet in het preparaat, welke kan worden gevarieerd door gebruik te maken van verstelbare inkoppelspiegels. Worden deze spiegels aangestuurd via een computer dan ontstaan er vele mogelijkheden voor micro-manipulatie.

De geschetste situatie leent zich direct voor het oppakken en verslepen van deeltjes. Met geschikte software kan dat met de computer-muis worden gedaan terwijl men op een monitor "ziet wat men doet". Als gebruik wordt gemaakt van voldoende snelle spiegels (bijvoorbeeld galvanische scanspiegels) in combinatie met een voldoende snelle shutter (bijvoorbeeld een akoestische cel) wordt het mogelijk meerdere pincetten te creëren gebaseerd op time-sharing van die ene laserbundel, zoals enkele jaren geleden in ons lab is ontwik-



Figuur 2

Schematische weergave van een optische pincetten opstelling waarbij een apart trap- en imaging-objectief wordt gebruikt. Besturing van de pincet-positie geschiedt met de computer door aansturing van de scan-spiegels en de shutter.

keld door K. Visscher [6]. De bundel wordt dan langs de verschillende pincet-posities gescand en tussen die posities wordt de bundel onderbroken met een shutter. Als de scanfrequentie hoog genoeg is, blijft de pincet-werking per punt behouden en zijn effectief meerdere pincetten ontstaan.

Een dergelijk scanprincipe maakt het ook mogelijk deeltjes met een brekingsindex lager dan het omringende medium te manipuleren. Zo'n deeltje wordt juist afgestoten door het pincet maar kan niettemin op z'n plaats gehouden worden door een cirkelvormige scannende beweging van het pincet rond het deeltje te maken.

Vooral voor toepassingen in de biologie zijn inmiddels commerciële systemen op de markt (o.a. Cell Robotics Inc., SL Microtest GmbH, P.A.L.M. Mikrolaser-technologie GmbH). Het gaat hierbij om systemen met één pincet (al dan niet op een vaste positie) maar ook om systemen die meerdere pincetten hebben op basis van het eerder genoemde scanprincipe. In de meeste gevallen is het geheel gebouwd om een conventionele microscoop waarbij één objectief voor zowel het focuseren van de

laserbundel als voor de beeldvorming wordt gebruikt. Het nadeel van een dergelijk systeem is echter dat het pincet zelf niet zichtbaar is in tegenstelling tot de in figuur 2 weergegeven situatie waar het laserlicht ook op de CCD camera valt. In vrijwel alle gevallen is het apparaat eenvoudig te bedienen door uitgebreide software.

Behalve via hoge N.A. objectieven zijn er ook nog andere manieren om deeltjes te vangen met laserbundels, bijvoorbeeld voor deeltjes die het licht niet of onvoldoende breken. Zo'n deeltje kan worden opgetild in een verticale bundel en wordt dan op een bepaalde hoogte gehouden door het krachtenevenwicht tussen stralingsdruk en zwaartekracht. Men kan ook meerdere lasers tegen elkaar in sturen zodat het deeltje naar een bepaald punt "geblazen" wordt door de stralingsdruk.

Biomedische toepassingen

Belangrijke toepassingen van optische pincetten liggen in de bio-medische sfeer. Dit is voornamelijk het gevolg van het feit dat de biologische materialen niet daadwerke-

lijk hoeven te worden aangeraakt of doorgeprikd waardoor relatief eenvoudig, en met minimale beschadiging, de deeltjes kunnen worden gemanipuleerd. Het feit dat de systemen meestal rond conventionele microscopen zijn heengebouwd, maakt het mogelijk naar de objecten te kijken met de in de biologie gebruikelijke imaging methoden. Ook het feit dat deeltjes gemakkelijk en snel kunnen worden losgelaten zonder "plakken" door het onderbreken van de laserbundel, is een belangrijk aspect.

Voor biomedische toepassingen wordt meestal een 1064 nm Nd:Yag laser gebruikt omdat biologische materialen over het algemeen een verwaarloosbare absorptie hebben bij die golflengte. Absorptie betekent immers opwarming van het weefsel waardoor beschadigingen kunnen optreden. Het is daarom noodzakelijk om voor ieder soort materiaal en experiment kritisch te kijken naar invloeden van de laserbundel en zonnig het laser vermogen en/of meettijden aan te passen. Echter, bij de vermogens die in de praktijk nodig zijn (50 - 500 mW), blijken beschadigingen veelal minimaal. Wij hebben bijvoorbeeld gezien dat 95% van de gistcellen die over een grote afstand werden versleept ten behoeve van cel-selectie [7] naderhand nog gewoon functioneren en zich vermenigvuldigen. Zwemmende organismen, zoals alges of spermacellen, zwemmen verder als ze weer losgelaten worden.

De toepassingen van optische pincetten in biomedisch onderzoek zijn zeer uiteenlopend en er komen bijna dagelijks nieuwe bij. Ze worden gebruikt voor het manipuleren van hele cellen (b.v. bloedcellen, bacteriën, sperma- en eicellen etc.) of van individuele moleculen (b.v. DNA). Het kan gaan om eenvoudige manipulaties als het vasthouden van een object, het samenbrengen of juist uit elkaar trekken van meerdere objecten, maar ook om complexe experimenten waarbij de pincetten in combinatie met krachtmetingen worden

gebruikt. Aangezien het onmogelijk is een volledig overzicht van de toepassingen te geven, worden hieronder een aantal in het oog springende genoemd.

Manipulatie van individuele moleculen

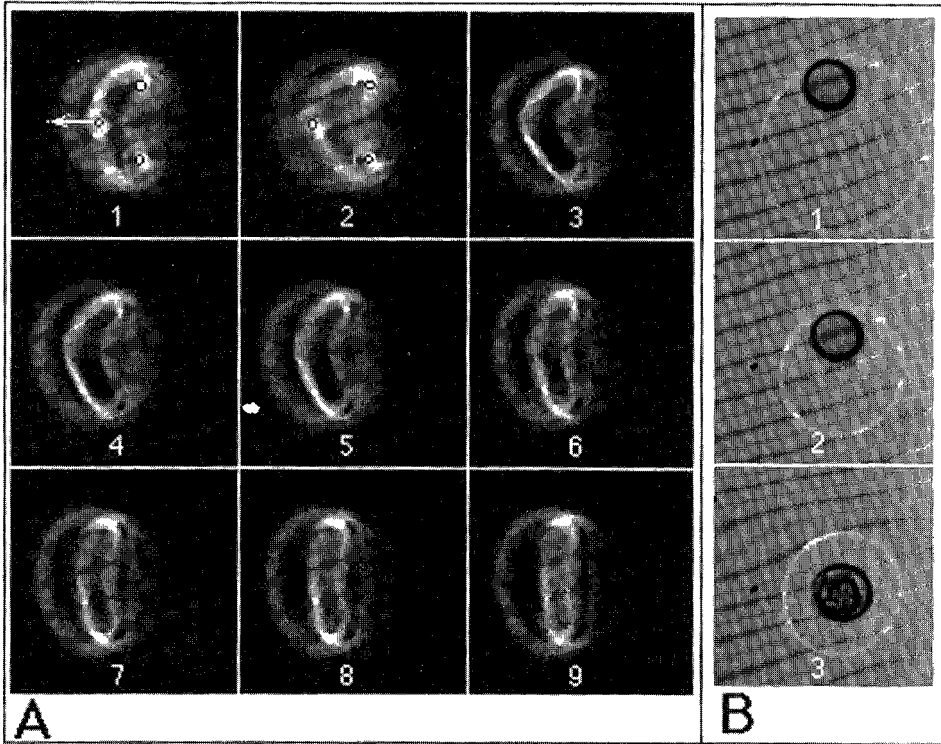
In het lab van Steve Block in Princeton is met succes de kracht waarmee motormoleculen langs elkaar schuiven gemeten. Het zijn deze bewegingen op moleculair niveau die aan de oorsprong van een spiersamentrekking liggen. Dit werd gedaan door een bolletje aan zo'n motormolecuul te plakken en aan de hand van de verplaatsing van dat bolletje uit het focus van de laserbundel kon de kracht worden bepaald. Ook heeft hij aangetoond dat het geen continu proces is maar dat het ene molecuul met stapjes van ca 8 nm langs het andere "loopt"

Elasticiteits-metingen

Optische pincetten kunnen ook gebruikt worden om lokaal de visco-elasticiteit van bijvoorbeeld membranen te bestuderen. In ons laboratorium wordt gewerkt aan een toepassing waarbij de vervormbaarheid van humane rode bloedcellen wordt bepaald ten behoeve van medisch onderzoek naar de invloed van de eigenschappen van individuele rode bloedcellen op de bloedstroming [8]. Bij deze methode wordt een rode bloedcel (in rust biconcaaf van vorm) gebogen met behulp van 3 pincetten (figuur 3A). Na het loslaten van de cel veert deze terug en de tijdsconstante van dit proces is een maat voor de vervormbaarheid van de cel. Ook kan de elasticiteit van losse structuren worden bepaald door gebruik te maken van één pincet die het materiaal vasthoudt in een vloeistofstroming [9].

Het bestuderen van een respons-reactie

Omdat met het optische pincet in de scantende mode ook deeltjes met een lagere brekingsindex kunnen worden gemanipuleerd, kunnen ook fusies van bellen, gesuspendeerd in een olie-achtige vloeistof, worden geïnitieerd (figuur 3B). Het proces wat plaatsvindt binnen de bel na fusie



Figuur 3

A. Het gebruik van optische pincetten om individuele rode bloedcellen te buigen (1->2) De relaxatie (3-9) na het verwijderen van de pincetten geeft informatie over de vervormbaarheid van de cel.
 B. Fusie van een AgNO_3 en een NaCl bel met een "knijpend" cirkelvormig scannende pincet. Na fusie begint een neerslagreactie.

wordt direct via de microscoop gevolgd. Als zich binnen de bellen cellen bevinden, kan de respons na fusie met een andere bel, waarin zich bijvoorbeeld een chemische stof bevindt, worden bestudeerd.

Optische pincetten en I.V.F.

Optische pincetten worden ook veel gebruikt in combinatie met de z.g. UV microbeams. Deze laatste zijn sterk gefocuseerde UV-laserbundels die als "snijbrander" werken. Op deze manier worden bijvoorbeeld spermacellen van hun staart ontdaan en "gaten" gemaakt in eicellen. Met een normaal optisch pincet wordt dan

vervolgens de immobiele spermacel in de eicel gebracht om zo een bevruchting tot stand te brengen ten behoeve van In Vitro Fertilisatie [10]

Slotopmeringen

In de ca. 10 jaar sinds de eerste experimenten van Ashkin, is het aantal toepassingen explosief toegenomen. Het is een zeer populaire techniek geworden, niet in de laatste plaats door de spectaculaire beelden die ermee kunnen worden gemaakt. Het is inmiddels uitgegroeid tot een volwassen micro-manipulatie techniek en wordt als een serieus alternatief voor

micro-pipetten gezien. Mede door de relatieve eenvoud van de methode en het feit dat er commerciële apparaten op de markt zijn, is de techniek in steeds meer laboratoria te vinden. Het is dan ook te verwachten dat er nog vele nieuwe toepassingen zullen volgen.

Referenties

1. A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, en S. Chu. *Optic Lett.* 11 (1986), 288-290.
2. A. Ashkin, *ASGSM Bull.* 4 (1991), 133-146.
3. R.M Doornbos, M. Schaeffer, A.G. Hoekstra, P.M.A. Slood, B.G. de Grooth, J. *Applied Optics* 35 (1996), 729-734.
4. M.M Burns, J. Fournier, J.A. Golovchenko, *Science* 249 (1990), 749-754.
5. J.J. McClelland, R.E. Scholgen, E.C. Palm, en R.J. Celotta, *Science* 262 (1993), 877-880.
6. K. Visscher, G.J. Brakenhoff, en J.J. Krol. *Cytometry* 14 (1993), 105-114.
7. J A Grimbergen, K. Visscher, D.S. Gomes de Mesquita, en G.J Brakenhoff *Yeast* 9 (1993), 723-732.
8. P.J.H. Bronkhorst, G.J. Streekstra, J. Grimbergen, E.J. Nijhof, J.J. Sixma, en G.J. Brakenhoff. *Biophys. J.* 69 (1995), 1666-1673.
9. K. Svoboda, C.F. Schmidt, D. Branton, en S.M. Block. *Biophys. J.* 63 (1992), 784-793.
10. A. Clement-Sengewald, K. Schütze, A. Ashkin, G A. Palma, G. Kerlen, en G. Brem. *J. of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 13 (1996), 259-265.