



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

87 EP 0 307 940 B1

10 DE 38 52 365 T 2

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 15/10
G 01 N 21/39
G 01 N 21/84
G 01 N 33/00
G 02 B 27/00

DE 38 52 365 T 2

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 38 52 365.5
- 86 Europäisches Aktenzeichen: 88 115 207.8
- 86 Europäischer Anmeldetag: 16. 9. 88
- 87 Erstveröffentlichung durch das EPA: 22. 3. 89
- 87 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 7. 12. 94
- 47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27. 4. 95

30 Unionspriorität: 32 33 31
17.09.87 US 98120

73 Patentinhaber:
AT & T Corp., New York, N.Y., US

74 Vertreter:
Blumbach, P., Dipl.-Ing., 65193 Wiesbaden; Weser,
W., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 81245
München; Bergen, P., Dipl.-Ing. Dr.jur., Pat.-Ass.,
65193 Wiesbaden; Kramer, R., Dipl.-Ing., 81245
München; Zwirner, G., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.,
65193 Wiesbaden; Hoffmann, E., Dipl.-Ing., 82166
Gräfelfing; Herden, A., Dipl.-Ing. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 65193 Wiesbaden

84 Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

72 Erfinder:
Ashkin, Arthur, Rumson New Jersey 07760, US;
Dziedzic, Joseph Martin, Clark New Jersey 07066,
US

54 Zerstörungsfreie optische Falle für biologische Partikel und Methode zu ihrer Bildung.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 52 365 T 2

EP 88 115 207
AT&T Corp.

ASHKIN 54
88AT062EPP

Beschreibung

Die Erfindung betrifft das Einfangen von Partikeln unter Verwendung einer Einzelstrahl-Gradientenfalle.

Einzelstrahl-Gradientenfallen wurden für neutrale Atome und dielektrische Partikel nachgewiesen. Allgemein gesprochen, besteht eine Einzelstrahl-Gradientenfalle lediglich aus einem stark fokussierten Laserstrahl, der einen nahezu Gauß'schen Intensitätsverlauf aufweist. Bei diesen Fallen werden die Komponenten der Strahlungsdruck-Streuung und der Gradientenkraft kombiniert, um einen stabilen Gleichgewichtspunkt zu bilden, der sich in der Nähe des Brennpunktes des Laserstrahls befindet. Die Streukraft ist proportional zur optischen Intensität und wirkt in Richtung des einfallenden Laserlichts. Die Gradientenkraft ist proportional zum optischen Intensitätsgradienten und weist in dessen Richtung.

Partikel in einer Einzelstrahl-Gradientenfalle werden von einer radialen Komponente der Gradientenkraft quer zu der Laserstrahlachse begrenzt. Das Stabilisieren der Partikel entlang der Axialrichtung der Falle wird dadurch erreicht, daß der Laserstrahl stark fokussiert wird, wobei die Axialkomponente der Gradientenkraft über die Streukraft in dem Fallenbereich dominiert.

In einer früheren Arbeit, in der optischen Einzelstrahl-Gradientenfallen für dielektrische Partikel zum Einsatz kamen, wurde der Einfangeffekt mit einer Laserquelle mit sichtbarem Licht ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$) nachgewiesen, deren Licht durch eine Linse mit einer hohen numerischen Apparatur gebündelt wurde.

Siehe hierzu A. Ashkin et al., Optics Letters, Band 11, Seiten 288-290. Die dielektrischen Partikel wiesen eine nahezu kugelförmige oder rundliche Form auf und bewegten sich in der Größe von Mie-Glaskugeln mit einem Durchmesser von $10\ \mu\text{m}$ ($a \gg \lambda$) bis hinunter zu Rayleigh-Partikeln mit einem Durchmesser von $260\ \text{\AA}$ ($a \ll \lambda$). Wie in diesen und anderen Aufsätzen gelehrt wurde, war die Verwendung solcher regelmäßig geformten Partikel im Mie-Bereich wünschenswert.

Bei Mie-Partikeln hängt die Größe und die Richtung der Kräfte von der Partikelform ab. Dadurch wird der Einfangeffekt auf ziemlich einfache Formen, wie z.B. auf Kugeln, Ellipsoide oder Partikel beschränkt, deren optische Streuung sich langsam mit der Ausrichtung in der Falle verändert. Im Rayleigh-Bereich wirkt das Partikel wie ein Dipol und die Kraftrichtung ist unabhängig von der Partikelform; nur die Kraft variiert mit der Partikelausrichtung.

Es ist kein unbedeutendes Ergebnis der früheren Arbeit, daß Silika und andere dielektrische Partikel eine unterschiedliche, irreversible optische Beschädigung durch die Falle erfuhren. Es wurde zwar vorgeschlagen, daß man die Einzelstrahl-Falle und die bekannten Ergebnisse auf biologische Partikel anwenden könnte, doch würde der resultierende Schaden die biologischen Partikel infolge der Bestrahlung in der Falle zerstören oder ihre Funktionsfähigkeit merklich beeinträchtigen und sie somit nutzlos machen. Da bereits bekannte optische Fallen für nahezu regelmäßig geformte, dielektrische Partikel definiert worden sind, erscheint ihre Anwendung auf biologische Partikel zweifelhaft, da eine regelmäßige Form nicht die Eigenschaft biologische Partikel ist.

Zusammenfassung der Erfindung

Biologische Partikel wurden erfolgreich in einer optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle, die eine Infrarot-Lichtquelle

aufweist, eingefangen. Eine Reproduktion eingefangener Partikel wurde beobachtet. Nachdem Partikel aus der Falle freigelassen worden sind, zeigten sie eine normale Motilität und setzten ihre Fortpflanzungsfähigkeit sogar fort, nachdem sie Einfangen für mehrere Lebenszyklen bei einer hohen Laserleistung von 160 mW eingefangen worden sind.

Bei einer Ausführungsform wird die Objektivlinse mit einer hohen numerischen Apertur in der Einzelstrahl-Gradientenfalle zum simultanen Beobachten eingefangener biologischer Partikel verwendet.

Zwei optische Einzelstrahl-Gradientenfallen werden in dieselbe Zelle eingeführt, um eine dreidimensionale Manipulation der biologischen Partikel zu ermöglichen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Ein vollständiges Verständnis der Erfindung kann dadurch erhalten werden, daß man die folgende Beschreibung einer speziellen Ausführungsform der Erfindung in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen liest. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Darstellung im Querschnitt einer Ausführungsform nach der Erfindung;
 Fig. 2 eine schematische Darstellung im Querschnitt einer Ausführungsform nach der Erfindung, die zwei Einzelstrahl-Gradientenfallen in einer Zelle verwendet, und
 Fig. 3 - 5 schematische Darstellungen unterschiedlicher Betriebszustände für eine optische Partikelfalle in einer Zelle.

Detaillierte Beschreibung

Optische Einzelstrahl-Gradientenfallen sind nützlich zum Begrenzen, Isolieren, Verschieben und Manipulieren von

wenigstens einem Partikel in einer Gruppe von Partikeln, die in einer Zelle, einem hängenden Tropfen oder dergleichen eingeschlossen sind. Spezielle Probleme tauchen auf, wenn es sich um biologische Partikel handelt. Beispielsweise kann die Absorption optischer Energie in der Falle durch das eingeschlossene Partikel zu einer Partikelvernichtung oder einem merklichen Verlust an Partikelmotilität führen. Zwar wird die Wellenlänge des Lichtstrahls zur Vermeidung des obengenannten Problems variiert, doch kann die Intensität der optischen Falle merklich herabgesetzt sein, so daß sie für die interessierenden Partikel unwirksam wird. Zwar kann die ausgewählte Wellenlänge für eine wirksame Funktion der optischen Falle ausreichend sein, doch kann dies bei einer Wellenlänge geschehen, die von dem die Partikel umgebenden Medium absorbiert wird und daher zu einer Wärmeerzeugung innerhalb der Zelle führt. Selbstverständlich müssen viele Faktoren berücksichtigt werden, wenn man die Betriebswellenlänge für die optische Falle auswählt.

Bei den Experimenten mit der bekannten optischen Falle, über die in der Literatur berichtet wird, war die Partikelempfindlichkeit nicht das Problem. Dies hängt allgemein mit der Tatsache zusammen, daß dielektrische Partikel eine homogene Zusammensetzung haben und eine regelmäßige Form aufweisen, so daß es einfach ist, die Wirkung der Falle auf ein Partikel oder einen Abschnitt eines Partikels zu beobachten und die Wirkung auf andere Partikel oder andere Abschnitte des gleichen dielektrischen Partikels genau vorherzusagen. Bei biologischen Partikeln ist deren Empfindlichkeit extrem wichtig. Denn biologische Partikel weisen eine heterogene Zusammensetzung und unregelmäßige Formen auf. Daher ist die Wirkung der Falle auf einen Abschnitt eines biologischen Partikels in keiner Weise für die Wirkung auf einen anderen Abschnitt desselben Partikels vorhersagbar.

Fig. 1 zeigt im Querschnitt eine schematische Darstellung der Vorrichtung zur Erzeugung einer optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle nach den Grundsätzen der Erfindung. Ein Infrarot-Laser 10 wird als Standardlaser verwendet, der einen kohärenten Lichtstrahl im wesentlichen im infraroten Wellenlängenbereich, beispielsweise zwischen 0,8 und 1,8 μm , ausstrahlt.

Ein Lichtstrahl 11 des Infrarot-Lasers 10 fällt auf eine Anordnung aus optischen Elementen zum Fokussieren des Lichtstrahls mit einer ausreichenden Konvergenz zum Bilden einer optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle zum Einfangen biologischer Partikel in einem bestimmten Bereich. Die Anordnung optischer Elemente enthält eine verstellbare, montierte Divergenzlinse 12 und eine Linse 23 hoher Konvergenz.

Die Linse 12 kann in drei Dimensionen (x, y, z) verstellt werden, indem man eine verstellbare Halterung 13 betätigt. Es ist wichtig, daß die Linse 12 sich bis zur Punktgröße des Lichtstrahls 11 erstreckt, um einen wesentlichen Bereich auf der Oberfläche der Linse 23 zu erfassen. Wie in Fig. 1 gezeigt ist, fällt der divergierende Lichtstrahl 14 auf einen großen Bereich der gegenüberliegenden Oberfläche der Linse 23, so daß eine relativ hohe Intensität des Strahls 14 die Apertur der Linse 23 ausfüllt. Um die Kräfte zu erzeugen, die zur Funktion der optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle erforderlich sind, ist es wünschenswert, daß die Linse 23 zum Fokussieren auf eine Punktgröße kleiner als λ , näherungsweise $\lambda/2$ ausgebildet ist. Bei einem beispielhaften Experiment ist die Linse 23 eine Mikroskopobjektivlinse für Wasserimmersion mit einer starken oder hohen Konvergenz, die eine numerische Apertur von ungefähr 1,25 (gemessen in Wasser) aufweist, wobei die numerische Apertur als Brechungsindex für das Medium multipliziert mit dem Sinus des halben Winkels, der von dem konvergierenden Lichtstrahl erfaßt wird, definiert ist. Ein

Element 24 stellt die Flüssigkeit (Wasser oder Öl) dar, in die die Linse 23 zur verbesserten optischen Kopplung an die Zelle 25 eingetaucht ist.

Die optische Falle ist in der Zelle 25 zusammen mit Partikeln 27 gezeigt, die in der Falle gefangen sind. Die Partikel 27 sind in einem flüssigen Medium, z.B. Wasser, suspendiert, das von der Zelle 25 eingeschlossen ist. Die Zelle 25 ist ein transparentes Gehäuse zum Einschließen der in Suspension gehaltenen biologischen Partikel oder ein durchsichtiges Dia, von dem Partikel enthaltene Tröpfchen herabhängen können. Bei einer Ausführungsform hat die Zelle die Abmessung 1 cm x 3 cm x 100 µm.

Die Lage der Zelle 25 kann in drei Dimensionen (x, y, z) durch den Einsatz einer verstellbaren Halterung 26 verstellt werden. In der Praxis ist die Halterung 26 zum Anordnen und Manipulieren der biologischen Partikel nützlich.

Ein Beobachten der biologischen Partikel in der Falle kann unmittelbar oder durch den Einsatz eines Monitors erfolgen. Zwar sind andere Beobachtungsmöglichkeiten, wie z.B. das unmittelbare Betrachten in der Zelle 25 möglich, doch ist es ein zusätzliches Merkmal der Erfindung, daß ein Beobachten durch dieselbe Linse erfolgt, die gleichzeitig die optische Falle erzeugt.

Eine Beleuchtung zum Beobachten wird durch eine Lichtquelle 29 mit sichtbarem Licht bereitgestellt und durch eine konvergierende Linse 28 auf die Partikel im Blickfeld projiziert. Eine Beobachtung mit hoher Auflösung erfolgt mit Hilfe der Linse 23, durch die das sichtbare Licht entweder zum Okular oder zum Monitor 18 läuft. Zur direkten Beobachtung wird das sichtbare Licht, das als gestrichelte Linie dargestellt ist, von einem Strahlenteiler 19 zu einem Mikroskopokular 21 reflektiert. Ein Infrarot-Sperrfilter 22

ist vor dem Okular 21 angeordnet, um die Beobachtungsoptik (das Auge des Betrachters) von Reflexionen von der Zelle 25 zu isolieren. Zum Beobachten durchläuft das sichtbare Licht den Strahlenteiler 19 und es wird vom Strahlteiler 15 zum Infrarot-Sperrfilter 17 und schließlich zum Monitor 18 reflektiert. Das Infrarot-Sperrfilter 17 isoliert den Monitor gegenüber Reflexionen von der Zelle 25.

Nach Fig. 2 ist die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung um eine zweite Infrarot-Laserquelle und optische Elemente erweitert, um in der Zelle 25 eine zweite optische Einzelstrahl-Gradientenfalle zu erzeugen. Eine Infrarot-Laserquelle 30 erzeugt einen Lichtstrahl 31, der auf eine verstellbar montierte Divergenzlinse 32 fällt. Die Linse 32 bewirkt, daß der Strahl 31 wie der Lichtstrahl 34 in ein divergierendes Muster übergeht. Ein Verstellen der Linse 32 in drei Dimensionen (x, y, z) erfolgt über eine verstellbare Halterung 33. Der Lichtstrahl 34 wird von einem Spiegel 35 reflektiert, der gleichzeitig die Übertragung des Lichtstrahls 14 ermöglicht. Dies geschieht durch umsichtiges Auswählen verschiedener Betriebswellenlängen für die separaten Laserquellen. Andererseits kann das Element 35 als Strahlteiler verwirklicht werden, der ungefähr die Hälfte des einfallenden Lichtstrahls reflektiert und die verbleibende Hälfte durchläßt. Wie in Fig. 2 gezeigt ist, wird der Lichtstrahl 34 durch die Linse 23 konvergiert, um in der Zelle 25 eine zweite Falle zu bilden. Partikel 36 sind in der zweiten Falle eingeschlossen.

Obwohl nicht dargestellt, so sollte es nunmehr für einen Durchschnittsfachmann offensichtlich sein, daß eine zweite Falle in der Zelle erzeugt werden kann, indem ein zusätzlicher Satz von optischen Elementen, einschließlich eines weiteren Mikroskops mit hoher Konvergenz, benutzt wird. Die zweite Falle kann durch Licht erzeugt werden, das in die Zelle auf der Seite, die dem Strahl für die erste Falle gegenüberliegt

oder für diesen Fall unter einem Winkel bezüglich des Strahls für die erste Falle eintritt.

Ein Manipulieren oder Ausrichten der Partikel wird dadurch erreicht, daß man beispielsweise jedes Ende eines stabförmigen Partikels ergreift und es beliebig bewegt.

Im Betrieb ist es notwendig, die eingefangenen biologischen Partikel in die Beobachtungsebene zu bewegen. Dies wird dadurch ausgeführt, daß man die Stellung der Divergenzlinse oder -Linsen verstellt. Auf ähnliche Weise ist ein Verschieben, eine Separation oder Isolation von biologischen Partikeln leicht möglich, indem man die Halterung 26 um einen gewünschten Betrag verstellt.

Die Fig. 3 bis 5 zeigen mehrere Betriebszustände für dieselbe optische Falle. Fig. 3 zeigt den herkömmlichen Betriebszustand, bei dem der Brennpunkt des Strahls von der Linse 23 innerhalb der Zelle 25 liegt und die Einfangwirkung über die rückwärts gerichtete Gradientenkomponente der optischen Kraft erfolgt. In Abhängigkeit von der Größe der Partikel ist es möglich, bis zu vier oder fünf Partikel innerhalb der Falle gleichzeitig gefangen zu halten.

Die beiden in Fig. 4 und 5 gezeigten Zustände erfordern eine geringere Intensität als die Falle nach Fig. 3. Nach Fig. 4 liefert die Bodenplatte der Zelle 25 die rückwärts gerichtete Einfangkraft und der Gradient die einfangende Querkraft. Es ist möglich, ungefähr 12 oder mehrere biologische Partikel gleichzeitig gefangen zu halten. In Fig. 5 bildet die Streukraft des fokussierten Lichtstrahls aufgrund seiner nach innen gerichteten Richtung eine quer verlaufende Begrenzung; ein Rückwärtsfangen wird durch die Bodenplatte der Zelle 25 geliefert. Im letztgenannten Betriebsmodus ist es möglich, viel mehr Partikel einzufangen als in den nach Fig. 3 und 4 gezeigten Modi.

Verschiedene biologische Partikel wurden in dieser optischen Falle isoliert, begrenzt und transportiert. Einige erfolgreich eingefangene biologische Partikel sind Tabakmosaikviren (siehe Ashkin et al., Science, Band 235, Seiten 1517-1520 (1987)), Hefe, E. Coli-Bakterien, Hämoglobin enthaltende Blutzellen und komplexe Zellen oder Zellteile, die Chlorophyllstrukturen enthalten.

Im allgemeinen weisen die untersuchten biologischen Partikel nicht die regelmäßige Form der früher studierten dielektrischen Kugelteilchen auf. Beispielsweise wurden passive, strangähnliche Organismen eingefangen, die etwa 50 μm lang und einen Durchmesser von etwa 1 μm hatten. Im Fall des Tabakmosaikvirus ähneln die Partikel einem Zylinder mit einem Durchmesser von etwa 200 \AA und einer Länge von 3100 \AA .

Die Erfindung liefert einen erheblichen Beitrag dazu, daß die Partikelmotilität sowie die Fortpflanzungsfähigkeit der Partikel bewahrt wird. Die Fortpflanzung bei eingefangenen biologischen Partikeln wurde bei einem Nachkommen beobachtet, der in der Falle blieb. Mit anderen Worten erlaubt die optische Falle eine nicht zerstörende Manipulation von biologischen Partikeln bei optischen Leistungen, die einige 100 mW betragen.

Man beachte, daß bei gleicher Laserleistung der Einsatz von Infrarot-Licht zu einer Falle mit niedrigerer Intensität in dem Brennpunkt führt als bei Fallen, die sichtbares Licht benutzen. Allerdings sind die Kräfte in der Falle näherungsweise gleich. Daher hat die Infrarot-Falle gegenüber Fallen aus sichtbarem Licht den weiteren Vorteil, daß sie in dem Brennpunkt eine niedrigere örtliche Erwärmung verursacht.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Erzeugung einer optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle für Partikel mit einem Laser zur Erzeugung eines Lichtstrahls einer vorbestimmten Wellenlänge und einer Einrichtung zur Fokussierung des Lichtstrahls mit ausreichender Konvergenz zur Bildung der optischen Falle in einem vorbestimmten Bereich, dadurch gekennzeichnet, daß die vorbestimmte Wellenlänge im wesentlichen im infraroten Wellenlängenbereich zwischen $0,8 \mu\text{m}$ und $1,8 \mu\text{m}$ einschließlich liegt, so daß die Falle wenigstens ein biologisches Partikel nicht zerstörend begrenzt.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, bei der die Fokussiereinrichtung eine Linse mit einer numerischen Apertur größer als 0,9 enthält.
3. Vorrichtung zur Erzeugung einer optischen Einzelstrahl-Gradientenfalle für Partikel mit einem Laser zur Erzeugung eines Lichtstrahls einer vorbestimmten Wellenlänge und einer Einrichtung zur Fokussierung des Lichtstrahls mit ausreichender Konvergenz zur Bildung der optischen Falle in einem vorbestimmten Bereich, dadurch gekennzeichnet, daß die vorbestimmte Wellenlänge im wesentlichen im infraroten Wellenlängenbereich liegt, so daß die Falle

wenigstens ein biologisches Partikel begrenzt,
daß die Vorrichtung ferner eine Einrichtung zur Erzeugung
eines zweiten Lichtstrahls im wesentlichen mit der
vorbestimmten Wellenlänge enthält, und
daß der zweite Lichtstrahl durch die Fokussiereinrichtung
unter Bildung einer zweiten optischen Falle in einem zweiten
vorbestimmten Bereich fokussiert wird.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3,
mit ferner einer Einrichtung zur unabhängigen Variation der
relativen Positionen der vorbestimmten Bereiche.
5. Vorrichtung nach Anspruch 1,
mit ferner einer Einrichtung zur Variation einer Position
des vorbestimmten Bereichs.

4

4 16 09 09

FIG. 1

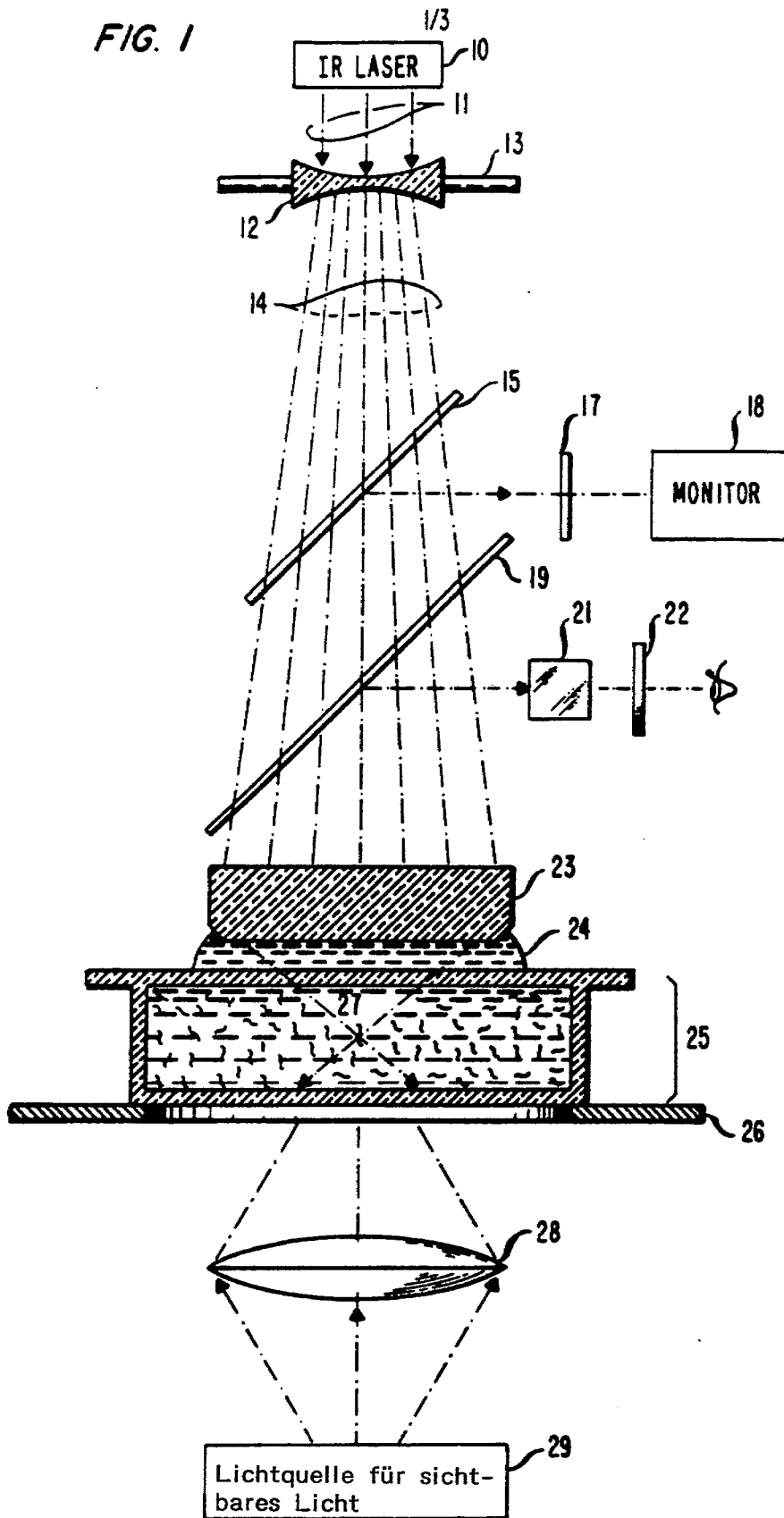
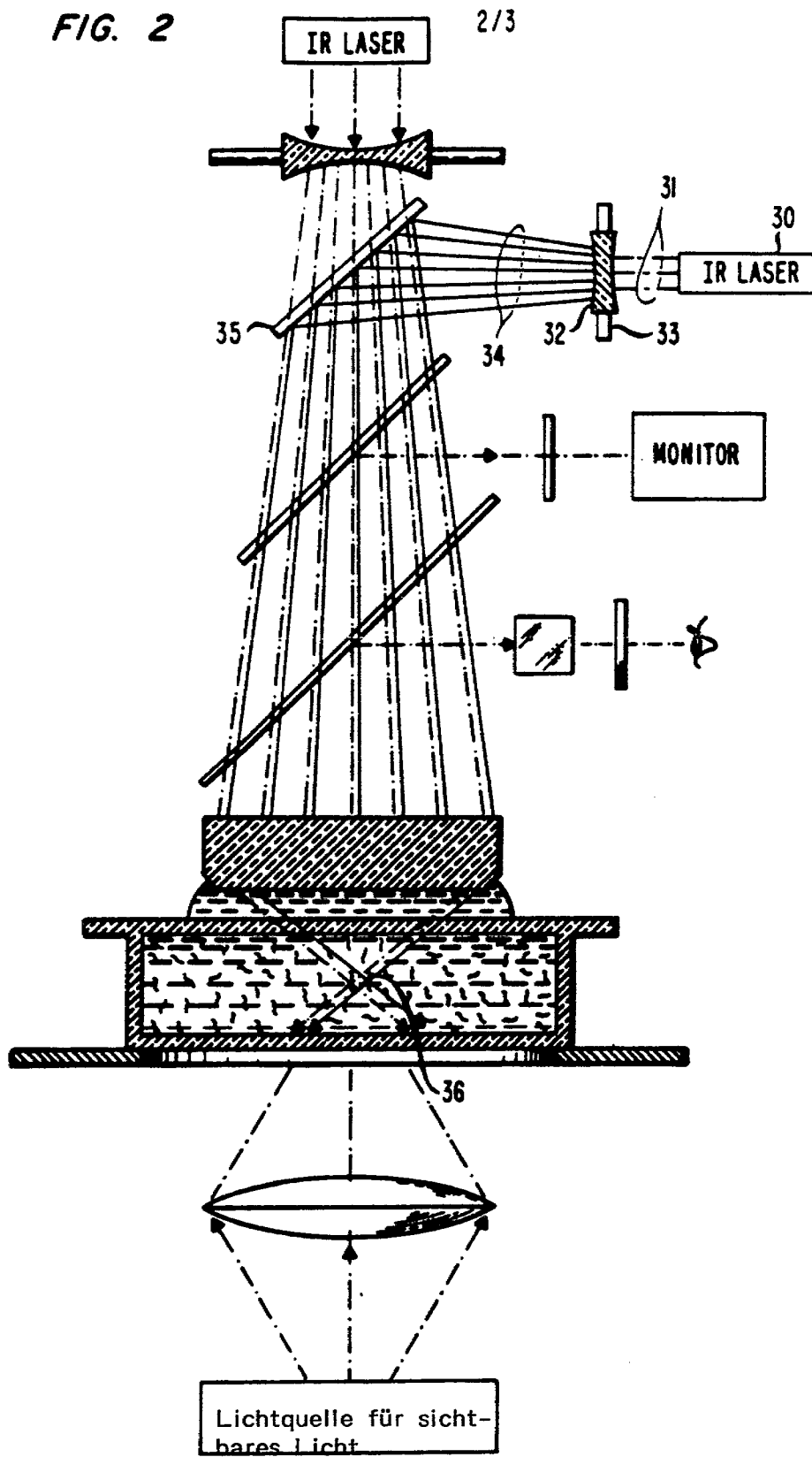


FIG. 2



3/3

FIG. 3

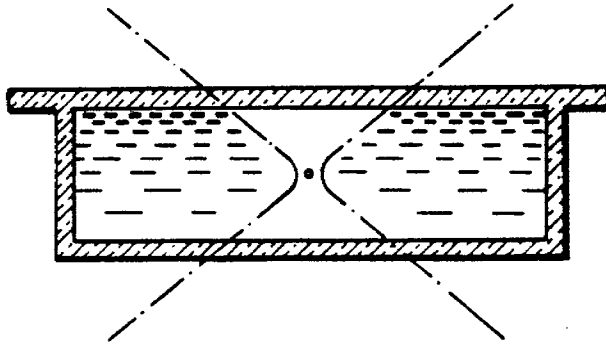


FIG. 4

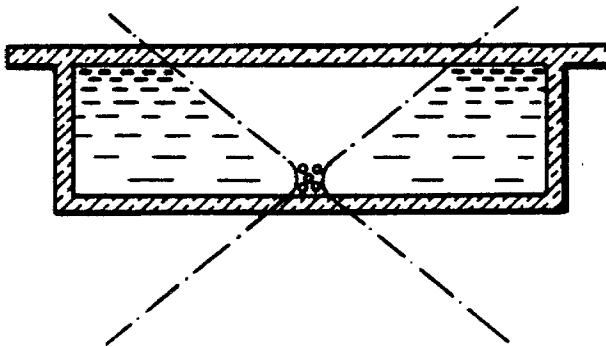


FIG. 5

