

第三章 探測光束式單一粒子追蹤系統

結合雷射鑷夾的單一粒子追蹤系統已經成為生物研究的重要工具。以目前的技術，這樣的系統對所追蹤的微粒子，在空間上具備了奈米級（nano-meter）的解析度。也因此，這不僅對於所捕捉微粒子所受到的外力上，可以達到次皮牛頓級（sub-pico-Newton）的解析度，同時也提供一個非常適合的方向，以研究生物分子和細胞胞器的機械結構和特性。

在本章中，我們將針對現有的單一粒子追蹤系統概念與方法作一些介紹。同時，對於利用探測光束的引入，以增加微粒子尺寸適用範圍的追蹤方式，其散射理論、光學設計、以及效能驗證也有詳細的說明。

3-1 單一粒子追蹤系統之介紹

於 1996 年，由 E. H. K. Stelzer 等人首先提出藉由觀察雷射鑷夾中，穿過被捕捉的微粒子的捕捉雷射光斑，以反推微粒子與捕捉雷射光束焦點之相對位移的觀念，並稱呼這樣的觀測技術為光子力顯微鏡（photonic force microscope）。^[13]而這項可以突破繞射極限的單一粒子追蹤技術，不僅增加了雷射鑷夾對微小力量測的解析度，同時藉由空間解析與力解析的提升，雷射鑷夾也就成為研究微小結構之物理與機械特性的新工具。

3-1-1 單一粒子追蹤系統的基本概念

目前，在以微粒子散射捕捉雷射光束的散射光變化，反推微粒子與雷射捕捉中心的相對位置的技術裡，除了如光子力顯微鏡，是以穿過捕捉微粒子的穿透光斑來偵測外，也可以觀察雷射光束受捕捉微粒子反射的反射光斑。其中，穿過微粒子的光斑，一般稱為前向干涉光斑，是前向散射光與未被散射的入射光兩者干涉的結果。而反射自微粒子的光斑，稱為背向散射光斑，則是背向散射光通過顯微系統的成像。

圖 3.1 是以捕捉雷射散射光斑，反推雷射鑷夾捕捉微粒子與雷射光束焦點相對位移的概念圖。其中，圖 3.1(a)是一個簡單的追蹤系統示意圖。雷射鑷夾的捕捉光束在分光鏡（beam splitter）BS 導引，與經由物鏡 OBJ 聚焦之後，在焦點位置便會捕捉微粒子。而該微粒子的前向散射光，在經過聚光鏡（condenser）CL 收集之後，往前散射到一個四象限光偵測器（quadrant photo-detector）QPD1 上。背向散射光則經過物鏡 OBJ 與筒鏡（tube lens）TL 顯微鏡系統，投射在另一個四象限光偵測器 QPD2 上。因此，若被捕捉的微粒子在垂直光軸的方向上，稍微偏移捕捉中心一些，如圖 3.1(b)，則所在四象限光偵測器所照射到的光分佈也會

產生對應的改變。類似的情形，若微粒子在平行光軸的方向上，位置偏移的話，如圖 3.1(c)，四象限光偵測器所偵測到的總光量也會有對應的改變。若我們觀察四象限光偵測器上的光斑分佈與微粒子位移的關係，如圖 3.1(d)，當微粒子具有垂直光軸方向，也就是在 x 與 y 方向的位移時，四象限光偵測器上的四個光偵測器便會量測到不同的強度，於是我們便可以由強度訊號變化推測出其相對的位移。如圖所示， x 方向的位移可以由四個光偵測器的偵測訊號 $S_x = (B+D) - (A+C)$ 得到；同理， y 方向則是 $S_y = (A+B) - (C+D)$ 。而在平行光軸方向的位移，則由於與四個偵測器所量到的總強度有關，便可以由 $S_z = (A+B+C+D)$ 求得。換句話說，微粒子相對雷射光焦點的位移 $\vec{b} = (b_x, b_y, b_z) \propto \vec{S} \equiv (S_x, S_y, S_z)$ 。

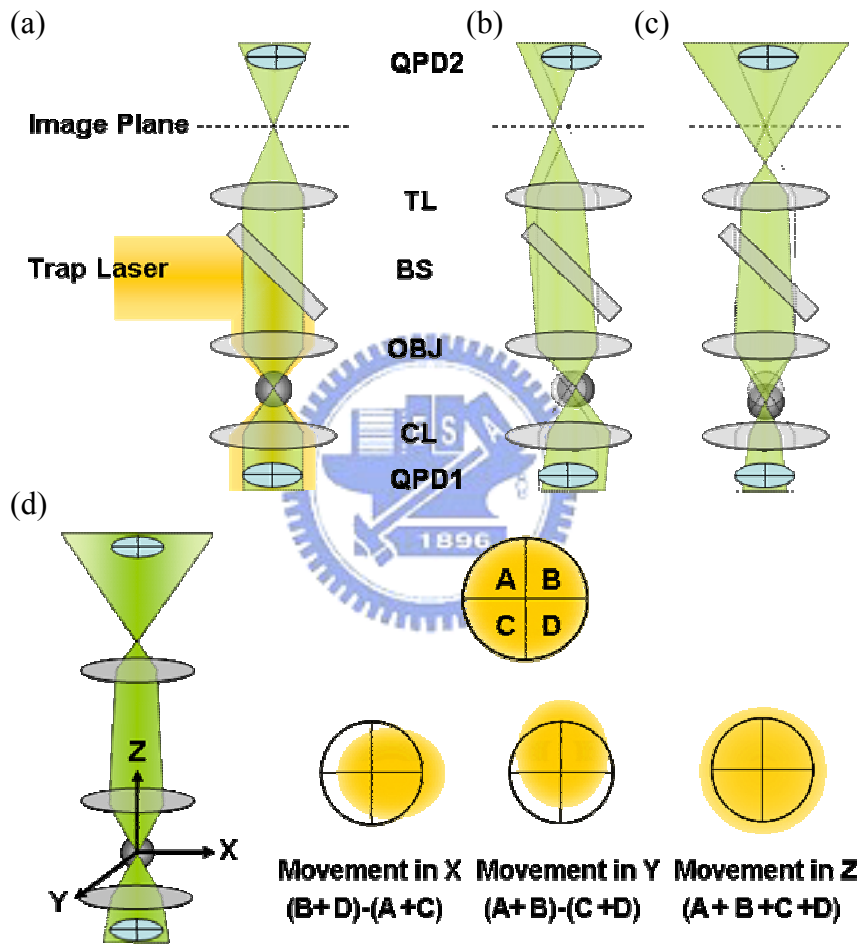


圖 3.1 散射光斑偵測單一粒子追蹤概念圖

在散射光斑的偵測上，當使用四象限光偵測器作為偵測光斑的元件時，由於散射的光所分佈的角度範圍很大，於是便需要有聚焦透鏡來收集不同角度的散射光，以供有限面積的四象限光偵測器偵測。這也是在前向干涉光斑的偵測當中，還需要額外安排一個聚光鏡來收集散射光的原因。且很明顯的，聚光鏡的條件會與偵測效能有很大關係。在目前的文獻中指出^[20]，在此種追蹤方式裡，如要最靈敏地觀察微粒子三維位移，聚光鏡需符合的條件主要有：其數值孔徑 (numerical

aperture) 大約為 0.65，也就是收光半角 θ 應符合 $\sin\theta=0.5$ ；另外，其位置應與物鏡共焦；而所觀察干涉光斑的位置也應設置於聚光鏡的後焦平面。由於這些對聚光鏡的嚴格要求，在光學系統的設置上也就相當麻煩。而對於背向散射光斑的偵測時，光學系統便不需要額外加入聚光鏡。因為，系統的安排上，便可直接利用一般雷射鐳夾系統中數值孔鏡高於 1 的物鏡，而不需要額外搭配一個是數值孔徑足夠高的聚光鏡。同時，由於物鏡本身自然的與自己共焦，所以，也就不需要去校準聚光鏡收光的光路。但是，其缺點就是背向散射光斑的光強度通常較前向干涉光斑的光強度小許多。也就是說，採用這種方式時，相對於固定電子雜訊之下，其訊雜比會相對比較小。

3-1-2 單一粒子追蹤系統的應用

這樣的一個單一粒子追蹤系統，其對微粒子與雷射光束焦點間位移的解析度通常可以達到數個奈米，甚至小於一奈米的空間解析度。因此，以這樣的雷射鐳夾系統進行捕捉力的量測時，其對力量測的解析度也可以精確到次皮牛頓 (sub-pico-Newton, 10^{-1} pN)，甚至是更小的力量，因此對於分子間單一鍵結的改變，也都可以量測出來。^[6]

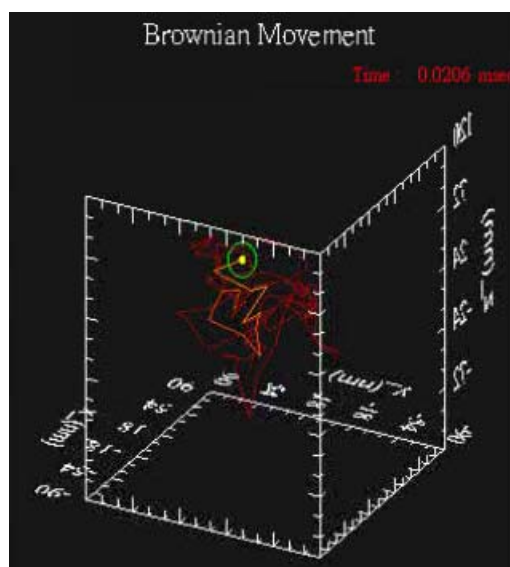


圖 3.2 雷射鐳夾捕捉之微粒子布朗運動位移的紀錄圖

另外，由於這樣的空間解析度，便可以連被捕捉的微粒子，在雷射鐳夾捕捉中心附近，因環境溶液分子碰撞而產生布朗運動 (Brownian motion) 的位移都可以觀測出來。而且，由於是使用光偵測器作為偵測器，則其電路響應的速率可以達到百萬赫茲 (mega-hertz, MHz) 的頻率，也就是時間的解析度可以達到微秒 (micro-second, μsec) 以下。這樣的響應速率對量測溶液中頻寬在數萬赫茲 (10 kilo-hertz, 10 kHz) 以下布朗運動來說，已經非常足夠。如圖 3.2，便是一個被雷射鐳夾捕捉，直徑為 $1\ \mu\text{m}$ 的微粒子，在 $20.6\ \mu\text{sec}$ 內布朗運動位移的紀錄圖。其中，微粒子的運動範圍僅有 $200\ \text{nm}$ 之內，而這麼小範圍的運動，則是一般白

光顯微鏡系統下，並無法觀測到的。

而結合這麼微小的位移與力量測，我們便可以利用這些被捕捉微粒子作為探針，以量測微小尺度下的物理與機械特性。如圖 3.3 則是一個利用雷射鐳夾單一粒子追蹤系統進行細菌線毛 (pilus) 彈性係數 (stiffness) 與楊式係數 (Young's modulus) 的實驗範例。

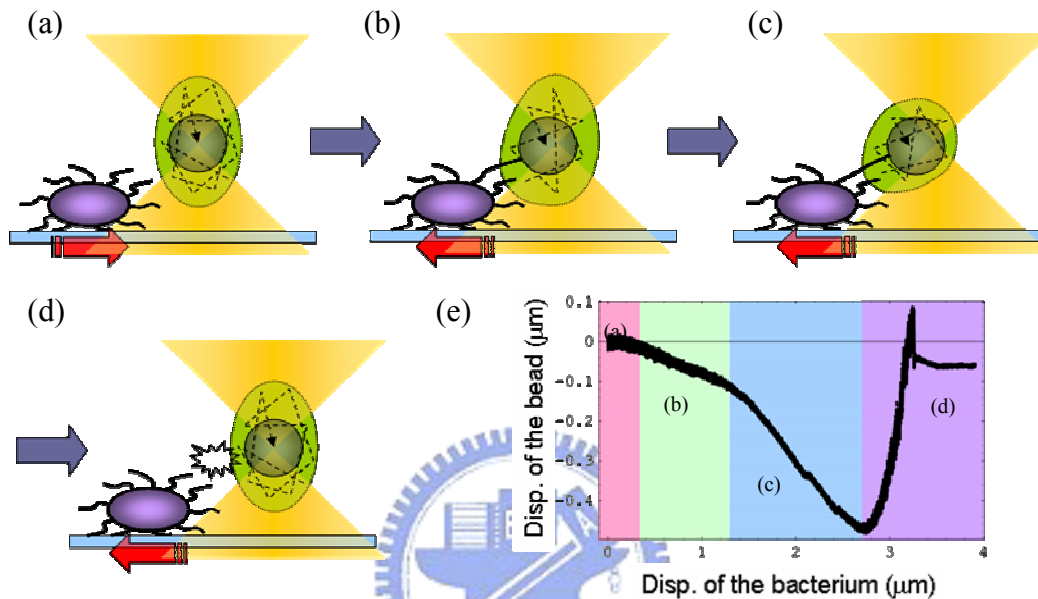


圖 3.3 細菌線毛彈性係數與楊式係數量測概念圖

實驗中，如圖 3.3(a)，我們可以利用雷射鐳夾將表面處理上連接分子的微粒子捕捉，並利用樣品平台將已經黏附在玻片上的細菌移至微粒子附近。而此時，捕捉微粒子所受到的力量，仍僅有雷射鐳夾捕捉力與環境溶液分子的碰撞，所以其運動軌跡分佈便是對稱的。但當我們將細菌靠近微粒子，使微粒子黏附到細菌表面一根線毛，又漸漸將細菌拖離時，微粒子運動軌跡的分佈便會改變，如圖 3.3(b)與(c)。這是由於微粒子不再僅受溶液分子碰撞與雷射鐳夾捕捉力，且同時會受到細菌線毛的限制，而形成雷射鐳夾捕捉力與線毛彈力互相抗衡的狀態。若我們持續拉開細菌與雷射鐳夾捕捉中心的間距，雷射鐳夾的捕捉力與線毛彈力也會持續跟著持續增加。當這兩個互相抗衡的力量大小超過了線毛頂端與微粒子表面連接分子的黏附力時，線毛便會脫開微粒子，微粒子又會回到雷射鐳夾的捕捉中心，如圖 3.3(d)。

在前面的拉拔過程中，如果我們將微粒子的平均位移對細菌的位移做圖，便會得到如圖 3.3(e)的結果。從圖中，由於我們知道雷射鐳夾光彈簧的特性，也就是微粒子的位移會與雷射鐳夾對微粒子的捕捉力成正比。而在拉拔的過程當中，在平均位移的位置上，雷射鐳夾的捕捉力大小恰與線毛對微粒子拉扯的力大小相

同。因此，我們便可以由微粒子對捕捉中心的位移，推測出線毛所施予的力量。同時由，細菌位移與微粒子位移，我們也可以得到線毛的伸長量。於是，由上面的這些條件，我們便可以推測細菌線毛的彈力常數與楊式係數了。另外，由在拔斷瞬間（(c)與(d)區交界）的最大位移，則可以得到拉拔過程中雷射鑷夾施以微粒子最大的捕捉力，而這也恰好是線毛與微粒子上連接分子的黏附力。也就是說，利用這種方式，我們可以利用精確的位移追蹤，以量測分子間的黏附力。而且，除了前面所描述的之外，我們也可以藉由微粒子的運動分佈，分析線毛機械結構特性相關的資訊。

除了前面這個範例之外，結合單一粒子追蹤功能的雷射鑷夾系統也可以適用在其他類似的研究上，同時亦確實提供了研究生物分子和細胞胞器之機械結構和特性的新方向。

3-2 捕捉光束式單一粒子追蹤系統的限制

由前面的介紹，一個精確的單一粒子追蹤系統，確實使雷射鑷夾能夠量測更多資訊，也對生物研究有更多的幫助。然而，在許多生物力的量測當中，由於其力量大小與雷射鑷夾的捕捉力相當接近，便可能造成當生物力超過雷射鑷夾捕捉力而無法進行量測的情形。因此，我們便會需要將雷射鑷夾的捕捉力提升。

一般來說，增加雷射鑷夾捕捉力的方式有兩種：一種是增加捕捉雷射的功率，另一種則是使用尺寸較大的微粒子來進行量測。以增加雷射功率的方式來說，在生物實驗當中，這是比較有疑慮的。由於聚焦的雷射光束在樣品當中，當雷射功率增加時，可能會使樣品溶液溫度的增加，或者是生物樣品本身的吸收，而造成生物樣品的損害。因此，增加雷射捕捉功率以提升雷射鑷夾的捕捉力，對生物實驗來說，並不是一個很好的選擇。相較起來，採用尺寸較大的微粒子，在生物實驗中則會是比較適合的選擇。且由之前我們所提到的雷射鑷夾捕捉力模型中，在微粒子的尺寸遠大於捕捉雷射波長之前，雷射鑷夾的最大捕捉力與光彈性係數確實會隨著微粒子尺寸的增加而增加。

不過，雖然捕捉力確實可以利用增加微粒子的尺寸，但是否在單一粒子追蹤時的散射訊號也可以不受微粒子的尺寸影響，擁有相同的高空間解析能力，便是一個也需要同時注意的問題。然而，事實上，隨著微粒子的尺寸增加，在位移訊號的偵測確實會受到影響。而這個影響可分為兩部分：一部份是由於散射光斑的變化，造成利用位移訊號量測微粒子位移的線性位移範圍縮小；另一部份則是位移訊號會受到不同方向位移的耦合，而造成估計微粒子位移的錯誤。

3-2-1 微粒子尺寸與位移訊號量測線性範圍的關係

我們首先針對量測線性工作範圍縮小的問題討論。圖 3.4 是我們將系統中的四象限光偵測器以 CCD 攝影機取代，並紀錄下固定在玻片上之不同尺寸的聚苯乙烯 (polystyrene) 微粒子在物鏡聚焦之氦氖雷射焦點附近時，所產生的前向與後向散射光斑。其中，我們使用了三種尺寸的微粒子，半徑分別為 245 nm、500 nm 與 1500 nm。相較於所拍攝的聚焦雷射在水中的波長 $\lambda = 475.8$ nm，則微粒子半徑為 0.51λ 、 1.05λ 與 3.15λ 。而微粒子的位移 $\vec{b} = (b_x, 0, 0)$ 則分別是在焦點 $b_x = 0$ 以及在與焦點位置的 x 方向上 $b_x = 200$ nm 的位置。由圖中，我們可以發現，當微粒子的半徑較波長小時，散射光斑像是一個光圓盤的形狀，而光斑隨微粒子移動時，則是光圓盤便隨著位移移動。但隨著微粒子的尺寸增加，散射光斑便會變得越複雜。因此，在利用前面所提到以四象限光偵測器的位移訊號 S_x 來反推微粒子位置 b_x 時，便會可能會有不同的響應。

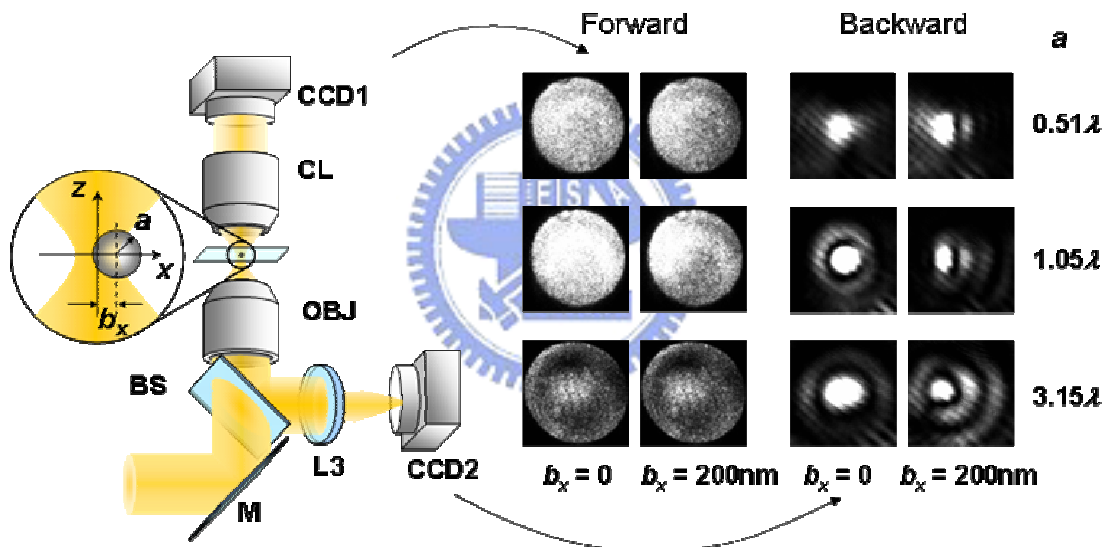


圖 3.4 不同尺寸微粒子之前向與後向散射光斑圖

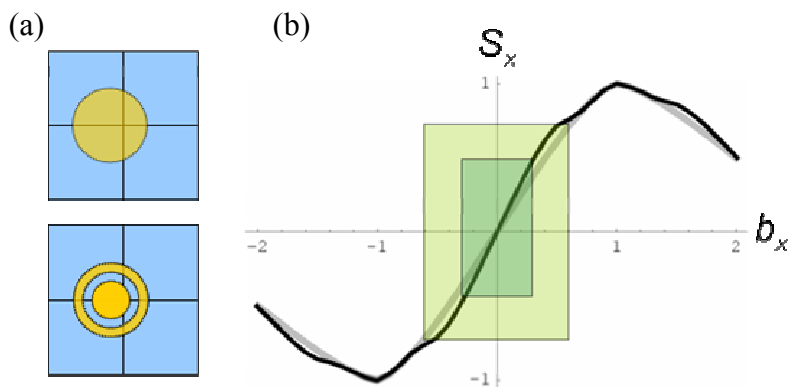


圖 3.5 散射光斑對位移訊號量測影響示意圖

為了估計散射光斑對訊號的影響，我們考慮一個簡單的範例，如圖 3.5。在這個範例中，我們計算了如圖 3.5(a)的兩種光斑在 x 方向上移動時，所造成的位移訊號，如圖 3.5(b)。其中，均勻圓盤光斑與有外環的光斑的位移訊號分別以灰色與黑色的線條標示。另外，對兩個計算結果中，位移訊號與光斑位移量呈現線性的範圍，也就是我們在量測時的工作範圍，也分別由淺綠色與深綠色標示。我們可以發現，當光斑較複雜時，不僅位移訊號與光斑位移量之間的關係會改變，且可量測的位移範圍也會縮小。

綜合前面的兩個現象，當我們使用尺寸較大的微粒子時，雖然增加了最大捕捉力與光彈性係數，但卻也同時造成散射光斑變得複雜，縮小了可以量測的位移範圍。而由於可量測的捕捉力範圍，其實是由光彈性係數與量測位移範圍的乘積來決定，於是也就造成即使採用較大的微粒子，增加了光彈性係數，卻不能肯定一定可以增加可量測捕捉力範圍的情形。

3-2-2 位移訊號與不同方向位移的耦合

除了可量測的線性位移範圍縮小之外，另一個隨著微粒子的尺寸增加，造成位移量測的困擾則是位移訊號受到不同方向的位移耦合的現象。在理想的位移訊號響應裡，指定位移訊號只會隨著該方向的位移改變，而不會受到其他方向的位移影響。因此，我們便可以完全利用指定方向的位移訊號，反推回該方向的位移。但是，如果指定方向的位移訊號，並不只是該方向上位移的函數，也就是有其他方向的位移耦合進位移訊號的話，那麼當我們直接由位移訊號反推位移時，就會發生錯誤。舉例來說，在理想情況下， S_x 僅是 b_x 的函數，那我們就可以在在前面所提的線性工作範圍之內，利用 S_x 直接求回 b_x 。但是，若 S_x 除了是 b_x 的函數，同時有耦合了 b_y 和 b_z ，則當 S_x 發生改變時，我們便不能確定是不是由於 b_x 的改變所造成，還是其實是 b_y 或 b_z 發生了改變。於是，我們便不能利用 S_x 直接求回 b_x ，在微粒子的追蹤上，也就出現錯誤。

圖 3.6 是微粒子位移與位移訊號之間的關係圖。其中，圖 3.6(a)是微粒子與捕捉雷射光束的示意圖，圖 3.6(b)則是理想情況下的關係圖，其左側與右側則分別是表示位移訊號 S_x 與 S_z 和微粒子位移的關係。在關係圖中，橫軸與縱軸分別代表微粒子在 x 與 z 方向上的位移， b_x 和 b_z ，而位移訊號的變化則利用等訊號線與顏色變化表示。我們可以發現，由於理想的訊號響應裡， S_x 僅是 b_x 的函數，與 b_z 無關，因此， S_x 只會隨 b_x 而改變， S_x 的等訊號線便為彼此平行的直線且垂直圖中的橫軸。同理， S_z 也只會隨 b_z 而改變， S_z 的等訊號線也就為垂直縱軸的平行直線。另外，由於理想的關係裡，位移訊號與微粒子位移是呈線性關係，所以若等高訊號線之間的訊號差距是相同的，等訊號線的位移間距也會是相同的。

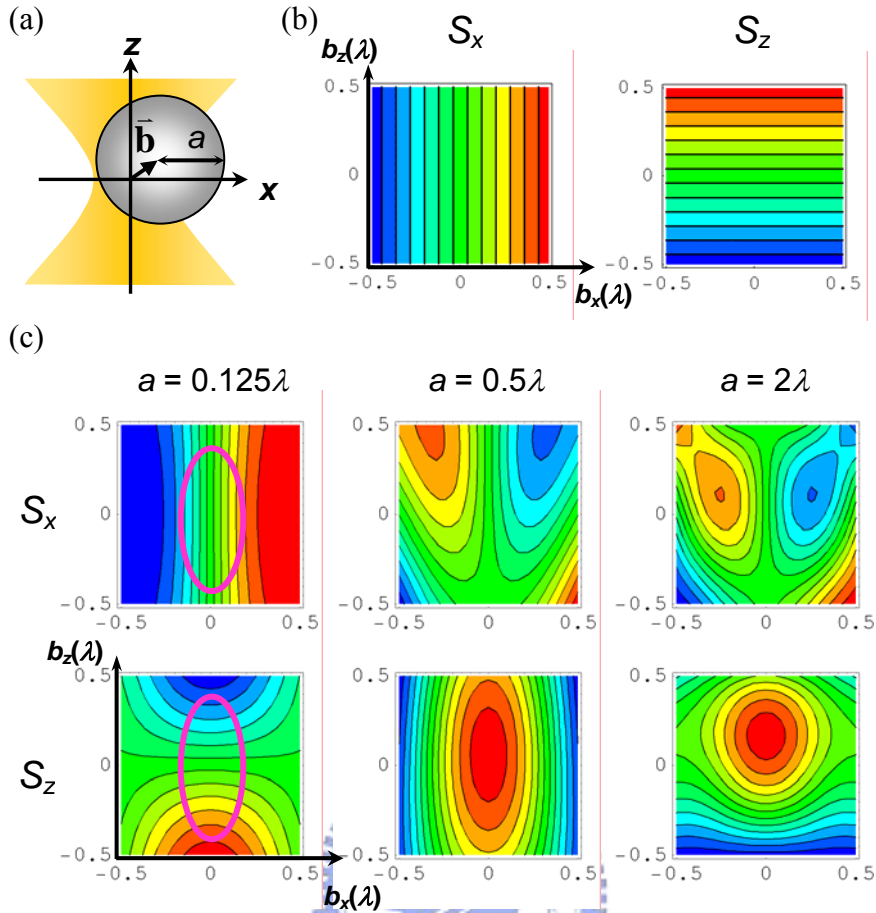


圖 3.6 不同尺寸微粒子之位移與位移訊號關係圖

圖 3.6(c)則是經由我們利用後面章節中將介紹的散射模型，所計算不同尺寸的微粒子位移與前向散射位移訊號之間的關係圖。我們可以發現，當微粒子的半徑小於波長時，隨著位移的增加，位移耦合的現象會越來越嚴重，於是等訊號線也就隨之不為直線且彼此不平行。同時， S_x 的等訊號線也不再垂直橫軸， S_z 的等訊號線也不再垂直縱軸。但是，我們仍能在雷射光焦點，也就是捕捉中心的附近，框出工作範圍，在範圍之內，位移訊號 S_x 與 S_z 的響應仍同時大約是理想的。然而，當微粒子的半徑增加之後，耦合的現象便很嚴重，便無法在捕捉中心的附近選定一個工作範圍。也就是說，當在這樣的尺寸下，不只是可量測的位移範圍縮小的問題，而是位移訊號並無法正確反推微粒子位移。這也使得以採用尺寸比較大的微粒子作為增加雷射鑷夾捕捉力的方式，反而造成無法利用捕捉光束的散射光斑，正確追蹤微粒子位移的情形。

於是，為了在追蹤時，對不同尺寸的微粒子都有很好相容性，便出現新的偵測方式——在系統中採用兩種不同波長的雷射光束，分別為捕捉微粒子的捕捉雷射光束和追蹤微粒子的探測雷射光束。主要的原因是，當實驗中不需要偵測捕捉雷射的散射光，改而偵測探測雷射的散射光時，微粒子分佈區域不一定需要是散