

射光源的焦點附近，而可以藉由調整兩束雷射光束的焦點相對位置，找到一個最佳的狀態來進行散射偵測。

不過，在目前的文獻中，並沒有一個完整的討論仔細說明額外引進探測雷射可以對整個偵測系統的效能有多少增加，或者是提供一個簡單的指引，幫助我們尋找到最佳化的焦點相對位置。因此，在接下來的內容中，我們將詳細介紹如何架設一個探測光束式之單一粒子追蹤系統。同時，利用實驗的方式找到不同尺寸的微粒子所適合的焦點相對位置。並且，建立一個散射理論以說明實驗上的結果，也同時給予一個簡單系統最佳化的指引。

3-3 探測光束式單一粒子追蹤系統之架設

如前面所提到的，探測光束式單一粒子追蹤系統主要的觀念便是在原來的系統中額外加入另一道不同波長的探測雷射光束。而由於微粒子並不由這道探測雷射進行捕捉，因此，微粒子的位置便不必然像與捕捉雷射焦點一樣，一定在探測雷射焦點所在的位置的附近。這裡我們所指的「附近」，是和捕捉雷射光束相比，也就是大約 100~200 nm 的距離。換句話說，我們多了一個自由度，也就是微粒子的平均位置（捕捉雷射的焦點）與探測光束焦點之間的相對位置，以適應不同尺寸微粒子的偵測與追蹤。

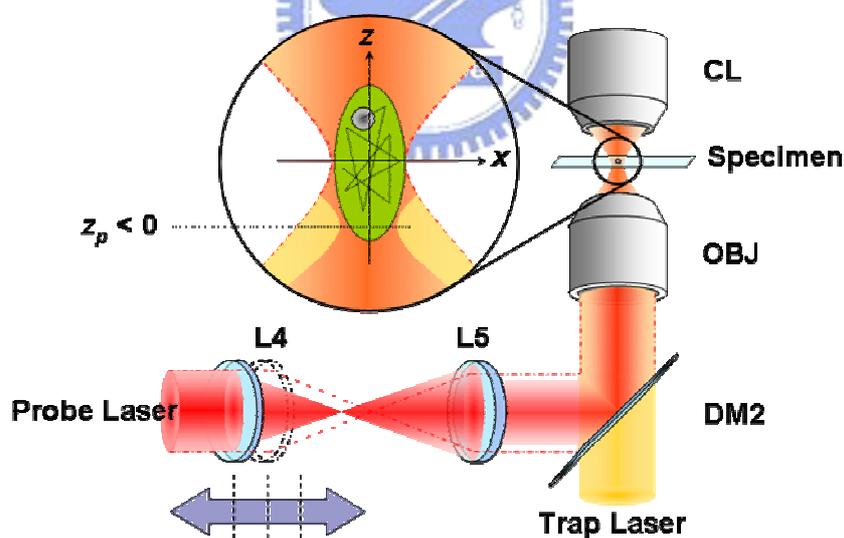


圖 3.7 探測光束式單一粒子追蹤系統示意圖

因此，由前所提的概念，在架設探針雷射光束時，我們便需要在原本的雷射鑷夾系統中，額外的安排探測雷射光束的進入，與一個可以調整聚焦位置的光路設計，如圖 3.7。簡單來說，我們可以利用一片適當波長的雙色分光鏡 DM2，便可以將探針雷射光束導引進入原來的光路當中。另外，在探測雷射的光路上安排一組預設為共焦的透鏡（L4、L5），藉由調整兩片透鏡的相對位置，便可以

改變探測雷射光束焦點與捕捉雷射光束焦點之間的相對位置。其中，為了保留在垂直光軸方向上偵測的對稱性，因此，探測雷射光束在調整的過程中，應該維持聚焦在光軸上。也就是說，我們在調整透鏡 L4 時，只需要前後移動，使得捕捉光束是收斂或發散的方式入射物鏡，而造成在通過物鏡後提早或延後聚焦。在圖 3.7 中，虛線部分所表示的，便是兩片透鏡 L4 與 L5 共焦的情形，探測光束的聚焦位置便會與捕捉光束相同。而當透鏡 L4 如圖向前移時，探測光束便會在物鏡後提早聚焦。同理，若透鏡 L4 向後移，探測光束則會延後聚焦。另外，由於為了能夠在透鏡 L4 移動的過程中，探測光束都能維持如捕捉光束般填滿物鏡入瞳，因此，我們對透鏡 L4 與 L5 的焦距 (f_4 和 f_5) 與位置便有一些條件。而這些條件則可以由幾何光學的光線追跡法求出。

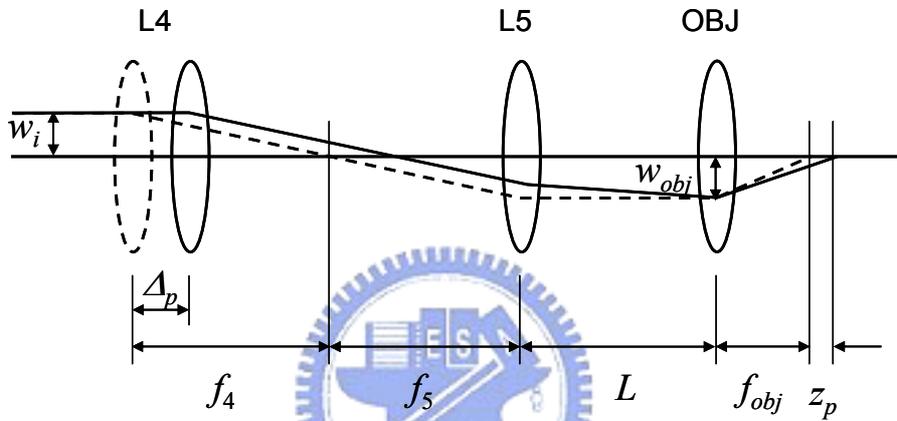


圖 3.8 探測雷射光束光路設計圖

如圖 3.8 是探測雷射光束光路設計圖，虛線的部分是預設透鏡 L4 與 L5 位置共焦時的情形。其中， f_{obj} 是物鏡 OBJ 的焦距， w_i 是入射探測雷射的半寬， w_{obj} 是物鏡的入瞳半徑， L 則是物鏡 OBJ 與透鏡 L5 間的距離。另外， z_p 則是當透鏡 L4 移動 Δ_p 時，探測雷射光束焦點的對應位移。利用光線追跡法，我們可以得到 w_{obj} 與出射物鏡時的傾角 w'_{obj} ，可以表示為，

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} w_{obj} \\ w'_{obj} \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_{obj} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & L \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_5 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & f_4 + f_5 - \Delta_p \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_4 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} w_i \\ 0 \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} -w_i [f_5^2 + (L - f_5)\Delta_p] / f_4 f_5 \\ w_i [f_5^2 - f_5 \Delta_p + (L - f_{obj})\Delta_p] / f_4 f_5 f_{obj} \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (3.1)$$

若 w_{obj} 符合前述條件，而不受 Δ_p 影響，則 $L = f_5$ 。同時，我們也會得到於是 w_i 、 f_4 與 f_5 間的關係需符合 $w_i f_5 / f_4 = -w_{obj}$ 。另外， z_p 則也可以求得為

$$z_p = w_{obj} / w'_{obj} = -\frac{f_{obj}}{1 - (f_{obj}/f_5^2)\Delta_p} \approx \frac{f_{obj}^2}{f_5^2} \Delta_p \equiv M_p \Delta_p, \quad (3.2)$$

其中，近似的條件是 $\Delta_p \ll f_5^2 / f_{obj}$ 。一般來說，雷射鑷夾系統中，由於對數值孔

鏡的要求，都會採用放大倍率為 100X 的物鏡，而其焦距也大約是 1~2 mm。因此，不僅近似條件很容易達成，且我們也可以利用 M_p 可以設計為很小的特性，很精確地控制探測光束對應捕捉光束離焦的距離 z_p 。例如：若我們考慮物鏡焦距 $f_{obj} = 2 \text{ mm}$ 、而透鏡 L5 的焦距 $f_5 = 200 \text{ mm}$ ，則當 $\Delta_p = 1 \text{ mm}$ 時， $z_p = 100 \text{ nm}$ 。而且，一般的手調移動平台都可以達到約 $10 \mu\text{m}$ 的解析度，若我們採用這樣的平台以調整透鏡 L4， z_p 就已經具備了奈米級的精確調整了。

另外，當我們持續將鏡片 L4 向 L5 靠近時，其移動範圍是有限制的，最大的移動量顯然必須小於 $f_4 + f_5$ ，因此，物鏡下的位移 z_p 的最大限制便是 $(f_{obj}^2 / f_5^2) \times (f_4 + f_5)$ 。接續前面的範例，而且也考慮透鏡 L4 的焦距 $f_4 = 200 \text{ mm}$ ，可以調整的範圍便大約是 $40 \mu\text{m}$ 。由後面章節的實驗當中可以發現，這樣的位移範圍，在一般的單一粒子追蹤系統中，已經足夠使用了。

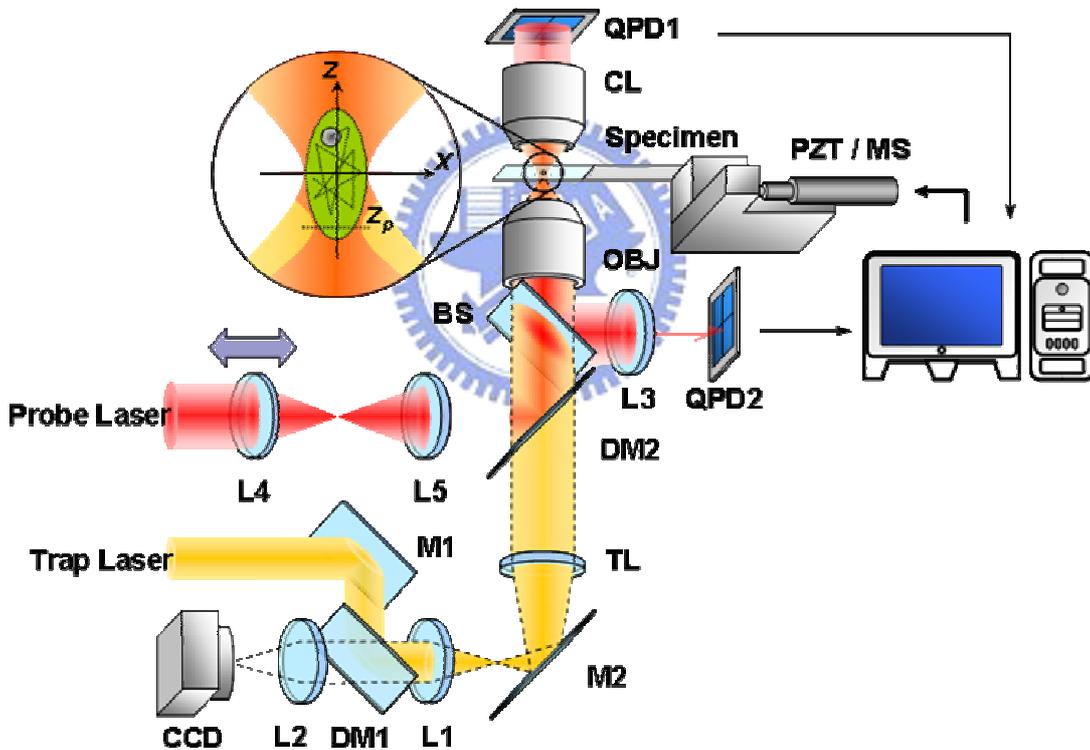


圖 3.9 探測光束式單一粒子追蹤系統架設圖

因此，我們所架設的探測光束式單一粒子追蹤系統，便如圖 3.9 所示。當中結合了第二章中所提到的雷射鐳夾系統，與圖 3.8 之概念圖的探測雷射光束設計，以及利用光路導引與四象限光偵測器偵測散射光斑、追蹤微粒子的架構。架設中，我們所使用的捕捉雷射與探測雷射分別為 Nd:YAG 雷射與氦氖雷射。他們於樣品溶液，也就是水中的波長為 800 nm 與 475.8 nm。另外，為了精密操作樣品，我們將機械電控平台結合了壓電平台 (piezo-translation stage, PZT)，其

對樣品移動的解析度可達 1.22nm。而此壓電平台也可以經由電腦程式控制，操作樣品。另外，為了避免捕捉雷射的散射光干擾，我們不僅選用的只對可見光有反應的四象限光偵測器，同時也在光斑入射偵測器的光路上，放置了只讓氦氖雷射波長的光通過的濾片，以減少雜訊的發生。

3-4 探測光束離焦距離對追蹤偵測訊號影響之量測

在前面的介紹當中，我們可以架設出一個以雷射鐳夾系統為基礎的單一粒子追蹤系統。同時在這個系統中，也具備了可以離焦量測的探測雷射光束設計。因此，我們便可以藉由這套系統，選擇最適合的離焦距離，以針對不同大小的微粒子追蹤偵測。

3-4-1 量測方法

為了可以精確控制微粒子與探測光束聚焦位置間的距離，在本論文中，我們利用壓電平台精確三維移動的能力，將固定在樣品當中的微粒子對固定的探測雷射光束焦點進行相對移動。這樣的方式，雖然並不如改變探測雷射光束的聚焦位置的方式直覺，但卻是一個比較穩定的實驗方式。此實驗方式最重要的優點便是，不需要擔心在實驗的過程中，因為探測光束焦點在進行縱向移動時，也因為機械不穩定的影響，而同時造成些微的橫向移動。

另外，為了模擬微粒子被雷射鐳夾捕捉在水中的情形，我們並不將微粒子沈降固定在玻片的表面，而是將微粒子固定在 1% 的洋菜粉水溶液所製作的洋菜凝膠 (agarose gel)。由於，所使用的洋菜粉其實非常稀薄，其所製作的洋菜凝膠僅恰足以固定微粒子，但折射率卻與水是幾乎相同。如此，我們就可以模擬微粒子被雷射鐳夾在水中捕捉的狀態，卻不會受到布朗運動的影響。

如圖 3.10(a)，我們利用壓電平台，將固定的微粒子在垂直光軸方向 (x 、 y) 的設定平面範圍內，一步一步地移動，並記錄下移動過程中微粒子在每個位置上所造成探測光束之散射光斑所對應的位移訊號。其中，每一步的間距為 24.4 nm，平面位移範圍則兩邊皆為 100 步，也就是 2440 nm (約為 5λ) 的正方形範圍。在記錄下一層垂直光軸的位移訊號之後，便將微粒子在平行光軸方向 (z) 稍微移動，繼續下一層的紀錄。而對於不同大小的微粒子，我們在平行光軸方向上的位移範圍與步伐則會稍微不同。

但由於在我們移動的過程中，並不能確定我們所行經垂直光軸方向之正方形區域的中心便是光軸所在的位置，因此，我們便利用訊號的對稱性，去找出每層量測平面的光軸所在位置。由於光學上，在相同的縱向位移 b_z 下，微粒子的相對光軸位移時，光斑的變化是具有對稱關係的。而在偵測位置座標 (ξ, η) ，由散

射光斑的強度分佈 $I(\xi, \eta, b_x, b_y)$ ，可以證明會遵守下式關係：

$$I(\xi, \eta, b_x, b_y) = I(-\xi, \eta, -b_x, b_y) = I(\xi, -\eta, b_x, -b_y)。 \quad (3.3)$$

因此，所量測出來的位移訊號，便也會具備相同的對稱關係。對位移訊號(S_x, S_y, S_z)來說，則分別符合

$$S_x(b_x, b_y) = -S_x(-b_x, b_y) = S_x(b_x, -b_y)； \quad (3.4)$$

$$S_y(b_x, b_y) = S_y(-b_x, b_y) = -S_y(b_x, -b_y)； \quad (3.5)$$

$$S_z(b_x, b_y) = S_z(-b_x, b_y) = S_z(b_x, -b_y)。 \quad (3.6)$$

由對稱性的判斷，我們便可以將前面所得到的每個掃瞄平面對應的位移訊號，框出一個邊長 1464 nm (約為 3λ) 的正方形範圍，且以光軸為中心的位移與位移訊號關係圖。如圖 3.10 (b)，便是一個半徑為 0.5 μm (1.05λ) 的微粒子在兩個不同縱向位移下，所得到的位移與位移訊號關係圖。

另外，由於我們是採用移動微粒子的方式，因此，微粒子的在 z 方向上，若向上位移 b_z ，實際上也可以視為是捕捉雷射光束焦點向下位移了 b_z 。換句話說，若我們用捕捉光束焦點的位移的角度來看，則捕捉光束焦點的位移 $z_p = -b_z$ 。之後，藉由將各層的訊號結合在一起，便可以得到與圖 3.10(c)的關係圖。這個關係圖其實和圖 3.6(c)是很相似的，只是縱軸換成捕捉光束焦點的位移 z_p 。不過，也藉由這個實驗結果，我們可以發現，利用調整探測光束離焦距離，確實可以對半徑並不小於波長的微粒子，也可以提供可以讓位移訊號是線性操作的位置。以圖 3.10(c)作為範例，在捕捉光束波長為 475.8 nm 的情況下，對半徑為 0.5 μm (1.05λ) 的微粒子進行追蹤時，最適合的離焦距離大約是 2λ ($\sim 950\text{nm}$)。

額外一提的是，在量測中，為了除去在量測不同微粒子時，四象限光偵測器可能採用的放大電路放大率不同的影響，我們便需要加入一個條件，以歸一化我們所量測的訊號。其中，在前向散射光斑的量測裡，由於雷射光沒有照射到微粒子時，探測雷射光束依然會穿透過樣品與聚光鏡，而照射在四象限光偵測器上。因此，我們便可以利用此訊號作為規一化的參數。也就是說，對於量測不同大小的微粒子之前，都先量測以實驗條件的放大率下，捕捉雷射光束每有照射到微粒子的電壓訊號。而採用此一訊號作為規一化的參數，不僅能除去電子放大器放大率，還能同時消除雷射光路中，光學穿透率的影響。因此，對於前向散射光斑偵測的實驗電壓訊號，便經由除以這個訊號進行規一化的動作，再記錄下來。

但，對於背向散射光斑的訊號來說，便沒有這麼容易。由於當探測雷射光束沒有照射到微粒子時，由於聚焦處附近，也就是雷射光強度對高的區域裡，並沒有散射體的存在，因此，背向散射光其實是非常少而微弱的，於是拿這樣的訊號

進行規一化便不是很好的選擇。因此，在背向散射光的實驗中，我們便在實驗之前，將雷射出射物鏡的功率先量測出來，作為規一化的條件。不過這樣的結果，便會將光路中的穿透率包含在實驗結果當中。

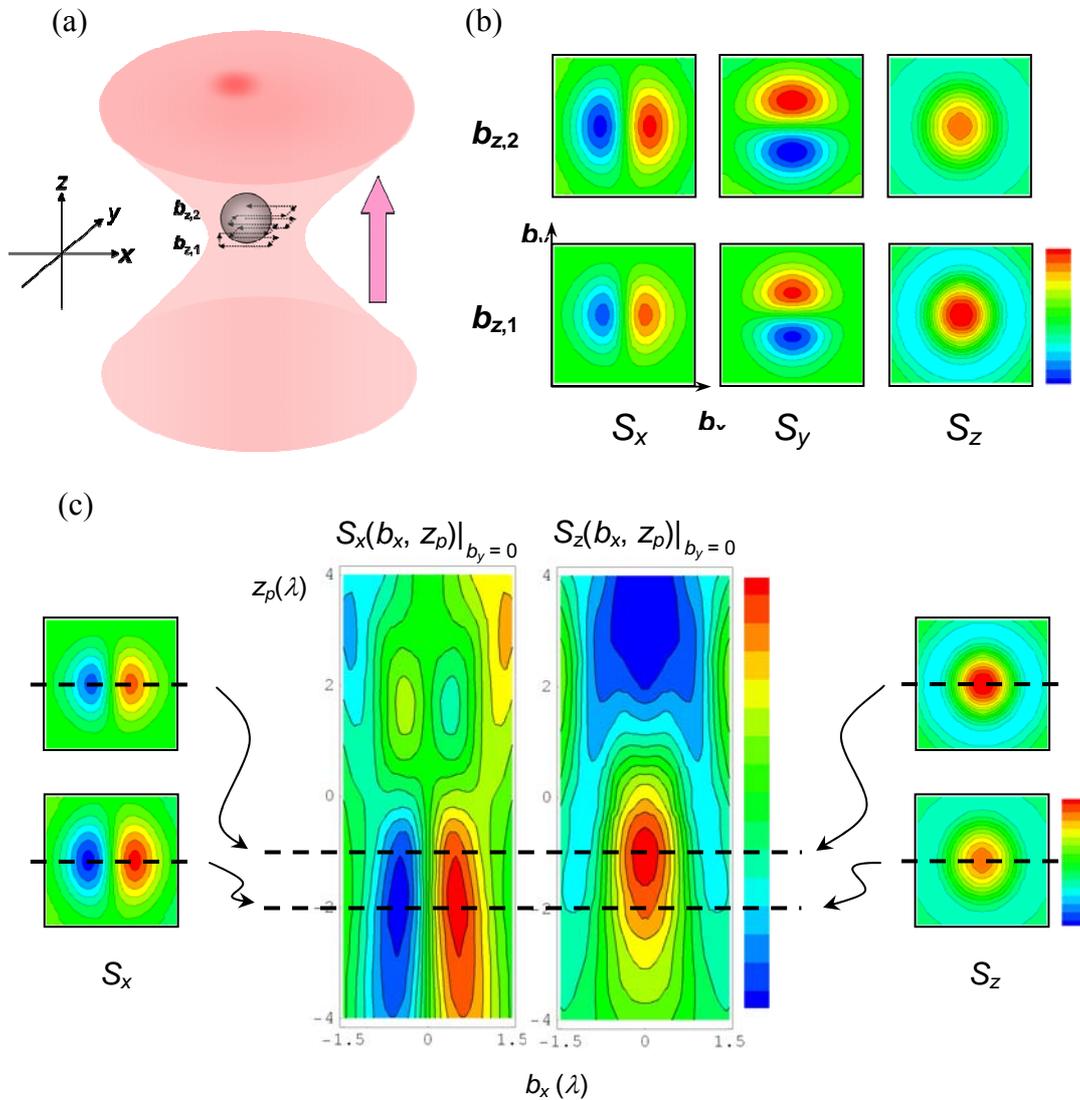


圖 3.10 探測光束離焦距離對追蹤偵測訊號的關係量測之概念圖

3-4-2 量測結果

圖 3.11 與圖 3.12 分別為對不同大小的微粒子所量測出的，探測光束離焦距離對追蹤偵測訊號關係圖。其中，在二圖裡，(a)~(e)代表了不同微粒子的尺寸，分別為半徑 245 nm (0.515λ)、500 nm (1.05λ)、1500 nm (3.15λ)、2200 nm (4.62λ) 與 3100 nm (6.52λ) 的聚苯乙烯微粒子。另外，在每一個項中，由左至右，我們顯示了微粒子在 x - z 平面時的位移訊號 S_x 、在 y - z 平面時的位移訊號 S_y 、及在 x - z 與 y - z 平面時的位移訊號 S_z 。由圖中，我們確實可以發現，對應不同尺寸的微粒子，當我們調整探測雷射光束的聚焦位置，都可以找到較適合單一粒子追蹤量測的位置。

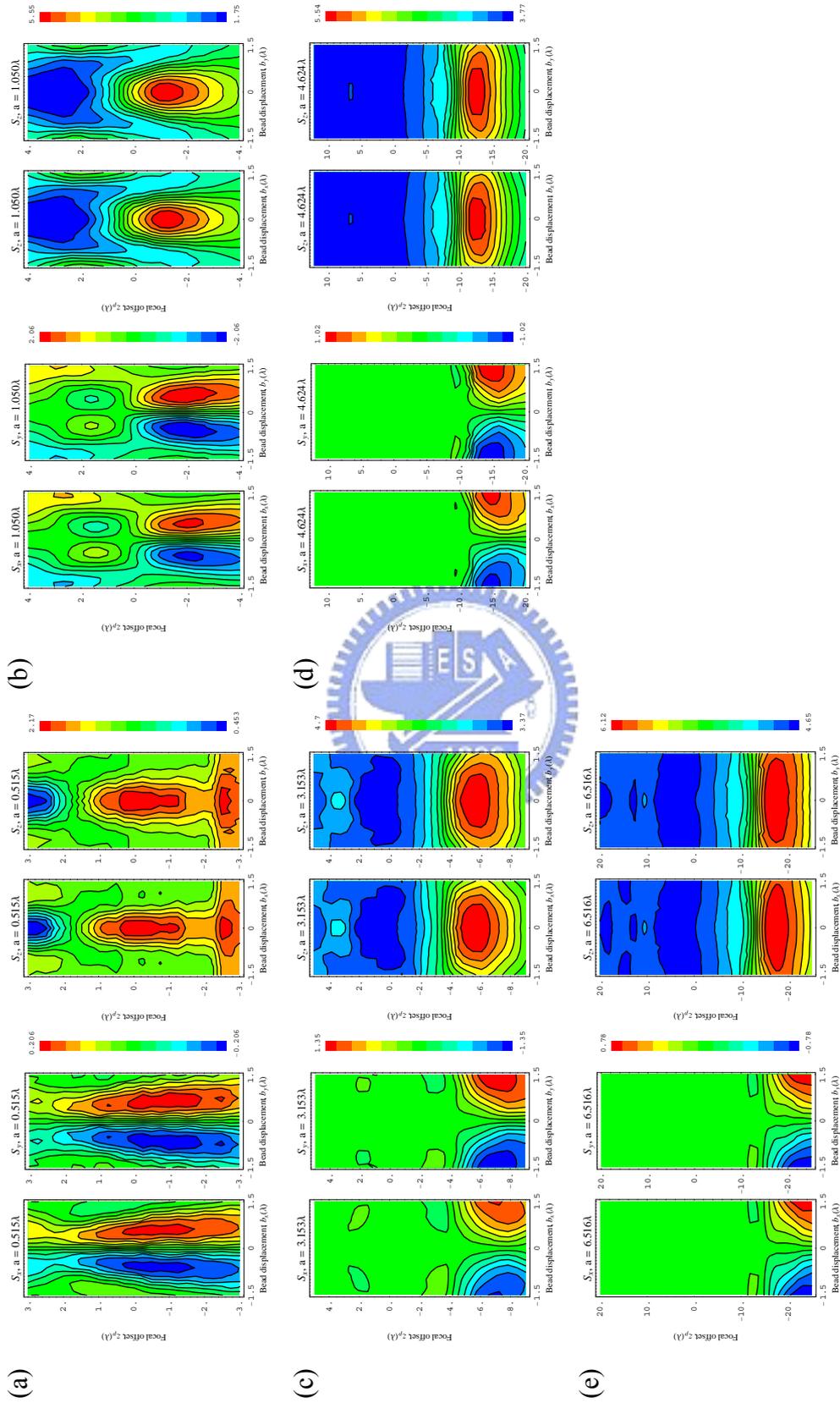


圖 3.11 微粒子位移與前向散射位訊號關係圖

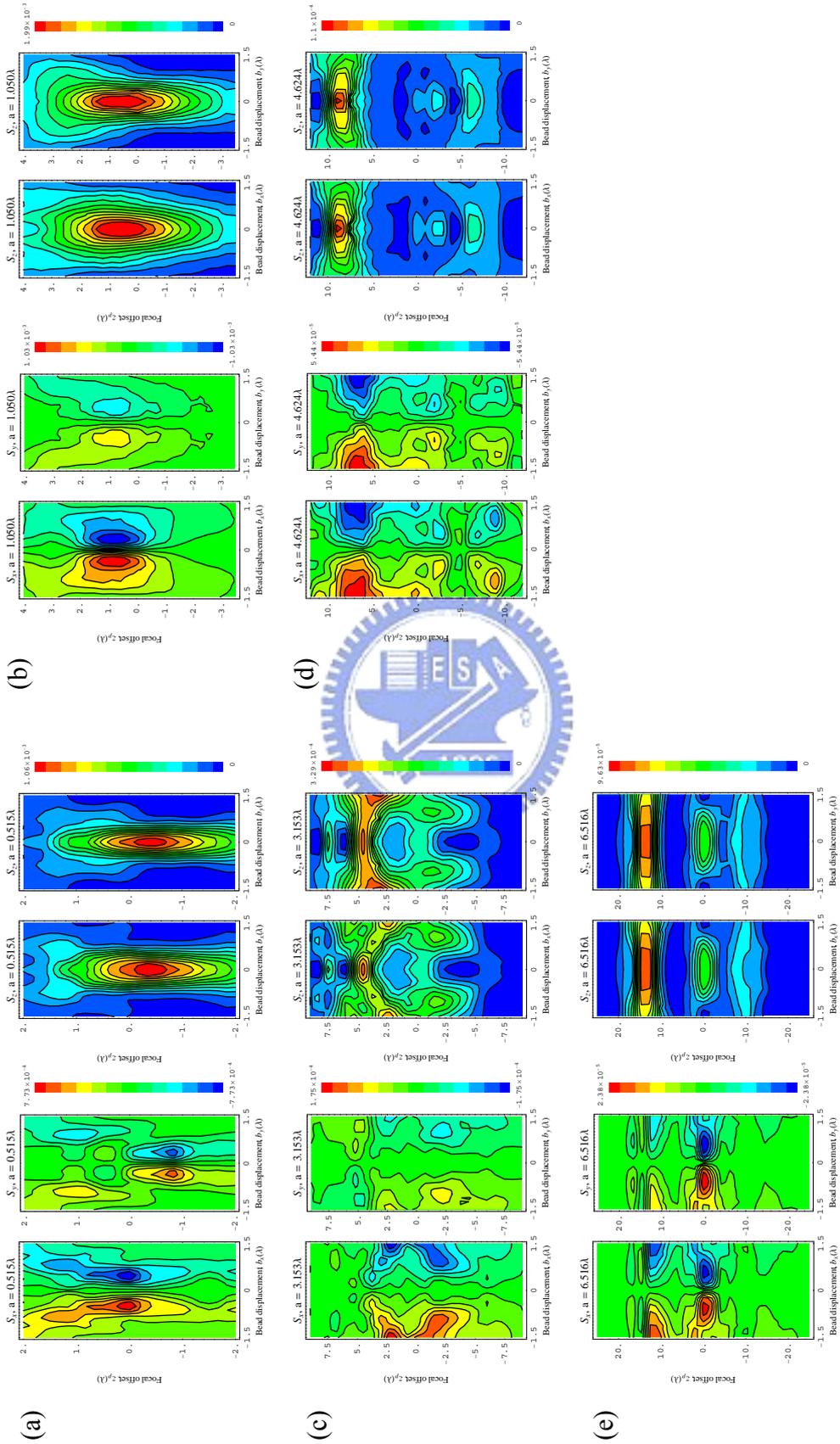


圖 3.12 微粒子位移與背向散射位移訊號關係圖