

# 國立交通大學

電子物理學系

碩士論文

離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用

Construction and Application of a High-resolution-range  
Photonic Force Microscope by Using an Off-focus Probe Beam



研究生：范家傑

指導教授：徐 琅 教授

中華民國九十四年七月

離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用

Construction and Application of a High-resolution-range  
Photonics Force Microscope by Using an Off-focus Probing Beam

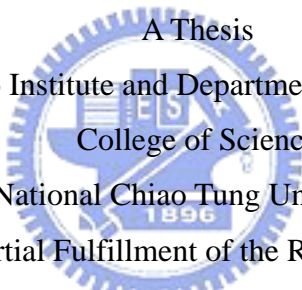
研究生：范家傑

Student : Chia-Chieh Fan

指導教授：徐 琅

Advisor : Long Hsu

國立交通大學  
電子物理學系  
碩士論文



A Thesis  
Submitted to Institute and Department of Electrophysics  
College of Science  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master  
in

Institute and Department of Electrophysics

June 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年七月

# 國立交通大學

## 博碩士紙本論文著作權授權書

(提供授權人裝訂於全文電子檔授權書之次頁用)

本授權書所授權之學位論文，為本人於國立交通大學電子物理系所  
\_\_\_\_\_組，93學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文題目：離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用

指導教授：徐 琅

### ■ 同意

本人茲將本著作，以非專屬、無償授權國立交通大學，基於推動讀者間「資源共享、互惠合作」之理念，與回饋社會與學術研究之目的，國立交通大學圖書館得以紙本收錄、重製與利用；於著作權法合理使用範圍內，讀者得進行閱覽或列印。

本論文為本人向經濟部智慧局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：\_\_\_\_\_，請將論文延至\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日再公開。

授 權 人：范家傑

親筆簽名：\_\_\_\_\_

中華民國          年          月          日

# 國家圖書館博碩士論文電子檔案上網授權書

ID:GT009221510

本授權書所授權之論文為授權人在國立交通大學理學院電子物理系所  
\_\_\_\_\_組 93學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文題目：離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用

指導教授：徐 琅

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文（含摘要），非專屬、無償授權國家圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或其他各種數位化方式將上列論文重製，並得將數位化之上列論文及論文電子檔以上載網路方式，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

※ 讀者基於非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法相關規定辦理。

授權人：范家傑

親筆簽名：\_\_\_\_\_

民國 年 月 日



1. 本授權書請以黑筆撰寫，並列印二份，其中一份影印裝訂於附錄三之二(博碩士紙本論文著作權授權書)之次頁；另一份於辦理離校時繳交給系所助理，由圖書館彙總寄交國家圖書館。

# 離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用

學生：范家傑

指導教授：徐琅

國立交通大學 電子物理學 系 (研究所) 碩士班

## 摘 要

光子力顯微術為結合雷射鑷夾與四象限光偵測器的單一微粒子追蹤技術，其原理為利用四象限光偵測器偵測被微小粒子散射之雷射光而可偵測微小粒子之位移達奈米級解析度。但由於微粒子的大小對於散射光分布的影響甚鉅，因而影響四象限光偵測器對散射光之響應。所以我們提出引入另一道雷射光作為探測光束，針對不同大小的微粒子調整探測光束的聚焦位置，得到最佳的四象限光偵測器對散射光之響應。在本論文中，我們將探測光束聚焦於微粒子前，並利用微粒子的微透鏡效應使得四象限光偵測器可以獲得最佳的響應。我們利用模擬及實驗的方式，觀察不同的探測光束聚焦位置所產生的散射光圖樣，以及四象限光偵測器對散射光光斑的響應，並提出最佳的離焦探測光束架設方式。我們分別針對直徑為 1、3、6  $\mu\text{m}$  的塑膠小珠進行模擬及實驗，並且得到探測光束最佳的聚焦位置為塑膠小珠中心前  $2/3$  倍直徑的位置。此外，我們驗證了新架設的離焦探測光束式光子力顯微鏡具有小於 10 nm 的空間解析度。且我們利用這套系統校正了雷射鑷夾的光彈簧係數並驗證了利用光彈簧係數法量測生物力彈簧的可行性。

# Construction and Application of a High-resolution-range Photonics Force Microscope by Using an Off-focus Probing Beam

Student: Chia-Chieh Fan

Advisors: Dr. Long Hsu

Department (Institute) of Electro Physics  
National Chiao Tung University

## ABSTRACT

Photonic Force Microscopy is a single particle tracking technique which operates by combining an optical tweezers and a quadrant photo detector (QPD). The movement of the micro-particle is tracked by using a QPD to detect the scattering light from the particle, which is illuminated by the laser beam. The spatial resolution of this particle-tracking technique can reach under a few nanometers. Nevertheless, the size of micro-particle influences the scattering light a lot and consequently, influence the response of the QPD to the scattering light. . Therefore, we propose to import another laser beam to be a probing beam. By adjusting the focus of the probing beam according to different sizes of particle, one can always obtain the best response of the QPD to the scattering light. In this thesis, we focused the probing beam in front of micro particle, and let the QPD could have the best response by the micro lens effect of the micro particle. We used optical-simulation program and an experiment to observe the scattering light under different probing beam focusing position, and we also observe the response of the QPD to these different scattering patterns. We performed the simulation and experiments of the signal response upon three kinds of trapped polystyrene beads whose size are 1- $\mu\text{m}$ , 3- $\mu\text{m}$ , and 6- $\mu\text{m}$ -in-diameter, respectively. It also obtained that the optimized distance between the probing laser focus and a trapped bead is one third of the diameter of the bead in front of the center of the bead. Besides, we attained that the spatial resolution of our Probing Beam Type Photonic Force Microscope (PBPFM) to track a particle is less than 10 nm. At last, the stiffness of our optical tweezers with our PBPFM is calibrated and the possibility to measure the adhesive stiffness of biological samples by stiffness method is also confirmed. At last, the stiffness of our optical tweezers with our PBPFM is calibrated and the possibility to measure the adhesive stiffness of biological samples by stiffness method is also confirmed.

## 誌 謝

經歷了這兩年的洗鍊後，口試圓滿結束了，雖然沒有非常深刻如釋重負的感覺，但也成功的打贏這場與自己的戰爭，所憑藉的是兩年內陪我走過這一切的點點滴滴。徐琅老師的提拔與栽培，不僅僅讓我在這個所在得到我想要的，更讓我學習、體驗到更多無法想像的成果與未來。實驗室的各位：禾千、博睿、宜仁、博真、佳翰、益志、勝陽、愛堂、哲良、玉堂、怡君、豐榮。我們一起苦過、一起笑過、一起流汗、一起分享這最終的榮耀。若沒有你們的指導、討論、協助、鼓勵，這一切終將成為泡影，這所有的成果是屬於大家的。

一路走來陪伴我，幫助我的摯友：豪哥、葳葳、小姍、嘉顯、小靜、小體、昌祥，若不是你們在我最脆弱的時候當我最強力的後盾，我怎麼走的過這一切。最後，感謝父母及家人在我求學的過程中不斷的給我支持與鼓勵，給我最溫暖的家。



# 目 錄

中文摘要	.....	i
英文摘要	.....	ii
誌謝	.....	iii
目錄	.....	iv
圖目錄	.....	v
一	簡介	1
1.1	雷射鐳夾之背景介紹	1
1.2	光子力顯微鏡之特色	2
1.3	探測光束式光子力顯微鏡之特點	2
1.4	實際之應用	3
1.5	論文各章簡介	3
二	原理	4
2.1	雷射鐳夾	4
2.1.1	幾何光學模型	4
2.1.2	電磁波模型	5
2.2	四象限光偵測器	6
2.3	光子力顯微鏡力量測機制	8
2.4	探測光束式光子力顯微鏡	11
2.4.1	ZEMAX 模擬	11
三	架設與方法	16
3.1	雷射鐳夾系統	16
3.2	探測光束系統	17
3.3	探測光束最佳聚焦位置	18
3.4	光子力顯微鏡解析度	19
3.5	光彈簧係數之校正	20
3.6	實際應用	21
四	結果與討論	22
4.1	探測光束最佳聚焦位置	22
4.1.1	CCD 攝影機觀察散射光之影像	23
4.1.2	四象限光偵測器掃描之結果	25
4.1.3	改變微粒子大小之結果	29
4.2	光子力顯微鏡之空間解析度	36
4.3	光彈簧係數之校正	37
4.4	光彈簧係數量測法	38
五	結論	39
參考文獻	.....	41



## 圖目錄

圖 2.1.1	雷射鐳夾幾何光學模型.....	5
圖 2.1.2	雷射鐳夾電磁波模型.....	5
圖 2.2.1	四象限光偵測器工作原理.....	6
圖 2.2.2	四象限光偵測器電子訊號示意圖.....	7
圖 2.3.1	能量光譜密度圖.....	10
圖 2.4.1	光學模擬架設.....	12
圖 2.4.2	微粒子於光軸方向位移之散射光圖樣.....	12
圖 2.4.3	微粒子於垂直光軸方向位移之散射光圖樣改變情形.....	13
圖 2.4.4	微粒子之微透鏡效應.....	13
圖 2.4.5	利用探測雷射降低雜訊產生示意圖.....	14
圖 2.4.6	不同大小微粒子之散射光圖樣.....	15
圖 3.1.1	離焦探測光束式光子力顯微鏡架設圖.....	16
圖 3.2.1	利用改變擴束鏡組情形控制光束焦點位置示意圖.....	17
圖 3.3.1	探測光束最佳位置實驗方法示意圖.....	18
圖 3.4.1	光子力顯微鏡解析度測量結果圖.....	19
圖 3.6.1	光彈簧係數法示意圖.....	21
圖 4.1	探測光束最佳位置實驗方法示意圖.....	22
圖 4.1.1	微粒子投影示意圖.....	23
圖 4.1.2	利用 CCD 觀察掃描直徑 3 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠不同位置的散射光圖樣.....	24
圖 4.1.3	利用 CCD 觀察不同位置散射光圖樣.....	25
圖 4.1.4	不同位置掃描直徑 3 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖.....	27
圖 4.1.5	不同位置掃描直徑 3 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠線性區域斜率比較圖.....	28
圖 4.1.6	不同位置掃描直徑 3 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠之極大極小值比較圖.....	28
圖 4.1.7	利用 CCD 觀察掃描直徑 6 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠不同位置的散射光圖樣.....	31
圖 4.1.8	不同位置掃描直徑 6 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖.....	32
圖 4.1.9	不同位置掃描直徑 6 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠線性區域斜率比較圖.....	33
圖 4.1.10	不同位置掃描直徑 6 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠之極大極小值比較圖.....	33
圖 4.1.11	不同位置掃描直徑 1 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖.....	34
圖 4.1.12	不同位置掃描直徑 1 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠線性區域斜率比較圖.....	35
圖 4.1.13	不同位置掃描直徑 1 $\mu\text{m}$ 塑膠小珠之極大極小值比較圖.....	35
圖 4.2.1	光子力顯微鏡解析度分析圖.....	36
圖 4.3.1	光彈簧係數與雷射功率關係圖.....	37
圖 4.4.1	光彈簧係數量測法.....	38

# 第一章 簡 介

由於資訊科技的進步以及網際網路爆炸性的發展，導致知識的傳播變的十分便利且普遍。因此，本實驗室致力於雷射鐳夾進行了數年的研究後，對於其基本原理以及實驗技巧也不斷的進步。本實驗室大約在三年前開始了光子力顯微鏡的架設與研究，在這段期間，我們也不斷的與清大生科所張晃猷教授、交大生科所彭慧玲老師學習許多生物方面的知識，並且利用雷射鐳夾結合生物科技展開密切的合作。這種結合物理、光電的技術與生物界的互動也間接的刺激了各種跨領域的整合。最近這兩年，我們更擴大跨領域的組合，分別與清大動機所劉承賢老師、清大材料所游萃蓉老師開始合作。在與生物、微機電，以及材料各種不同領域的互動後，我們認為可以針對先前架設的光子力顯微鏡愈加改善，以求提高我們光電領域的技術，進而刺激我們這個難得的跨領域合作機會。我們將這個對於本實驗室的新技術稱之為「離焦探測光束式光子力顯微鏡」。

在本論文中，我們首先利用光學模擬以及實際架設的結果找出離焦探測光束式光子力顯微鏡的架設方式與技巧，並比較傳統光子力顯微鏡的異同。在這一章中，我們將介紹雷射鐳夾之背景、光子力顯微鏡之特色、探測光束式光子力顯微鏡之特點、系統實際的應用、以及論文各章節的介紹。希望能藉著這篇論文，可以對光子力顯微鏡有更多的認識，進而引發更多各式各樣的研究與課題。

## 1.1 雷射鐳夾之背景介紹

1970 年 Arthur Ashkin 等人提出利用兩道光束的光壓操縱微小粒子的觀念[1]之後，引發了朱棣文雷射致冷及在原子物理的研究[2]，也因此朱棣文獲得了 1997 年的諾貝爾物理獎。接著在 1986 年 A. Ashkin 首次提出利用單一雷射高度聚焦可將微小粒子局限於空間中的現象[3]。而這種運用單一雷射所形成的光學位能井來操控微小粒子的技術，稱之為雷射鐳夾(Optical Tweezers)。因為雷射鐳夾擁有非接觸以及非破壞來捕捉微小粒子的特性，且捕捉大小約為幾十個 nm 到幾十個 $\mu\text{m}$  的微粒子，恰好與生物學中微小生物的尺度相符，使得雷射鐳夾能夠在生物科技的領域上漸漸發展成一種廣泛運用的一種工具。

雷射鐳夾的基本概念是將一道雷射光束經過顯微物鏡高度聚焦後，在雷射聚焦處形成一穩定的位能井，而焦點附近的微粒子就會被吸引、捕捉以及操控。由於雷射鐳夾的捕捉力屬於皮牛頓(Pico-Newton)的維度，恰好適合應用在量測生物分子間的作用力：如細菌與細胞之間、細胞與細胞之間、蛋白質與蛋白質之間等等，因此便有越來越多人開

始利用雷射鑷夾來探討生物分子力的問題，所以對於雷射鑷夾捕捉力的校正儼然成為重要的課題。

傳統上，測量雷射鑷夾捕捉力的方法很多[4]：如水流黏滯力法(Dragging Force Method)、飄移時間法(Time of fly method)等等。但是，由於這些方法是間接的透過步進馬達控制樣品的移動，以及影像辨識的方法來量測雷射鑷夾的捕捉力，所以對於捕捉力的解析度有限，因此無法精確的解析出生物分子間作用力更微小的變化。有鑒於此，便有人提出利用單一微粒子追蹤[6]的方式來提高對雷射鑷夾作用力的解析度。這種技術稱之為光子力顯微術[5] (Photonic Force Microscope)。

## 1.2 光子力顯微鏡之特色

光子力顯微鏡基本上是以雷射鑷夾為基礎發展的一種單一微粒子追蹤技術。當一個微粒子被雷射鑷夾捕捉至雷射光焦點時，巨觀的來看，微粒子被穩定的侷限在光學陷阱中。但是從微觀的角度來看，微粒子仍會因為水分子的撞擊在焦點處進行微小的布朗運動。光子力顯微鏡乃是一種可以偵測這種布朗運動的工具，它是在雷射鑷夾系統中加上一個四象限光偵測器(Quadrant Photo Detector)，利用偵測微小粒子的散射光來精確的量測微小粒子之布朗運動[7]。過去很早就有人利用四象限光偵測器分析黏附肌動蛋白 kinesin 的微小珠子在 microtubule 上的運動情形[8]，且另外有人將此種技術命名為"Optical Force Microscope"[9]。而在德國 European Molecular Biology Lab.的 Dr. Ernst Stelzer 則首次將之命名為光子力顯微術。

## 1.3 探測光束式光子力顯微鏡之特點

光子力顯微鏡是利用四象限光偵測器去測量雷射鑷夾捕捉住一個微粒子時所產生散射光的分布情形，進而解析出微粒子之微小偏移量。從使用光子力顯微鏡的經驗中我們得知，不同大小的微粒子對於散射光變化的情形影響非常劇烈。所以便有人提出多使用一道雷射光束來作為探測雷射光[10]，使得四象限光偵測器能夠更精確的分析微粒子的布朗運動。

它的基本概念是讓探測雷射於微粒子前聚焦，並利用微粒子當作一個微透鏡讓探測光束匯聚成一個較為收斂的光束，使其散射光圖樣可以讓四象限光偵測器作精準的量測。這種利用探測雷射光來取代原本雷射鑷夾的散射光的方式，除了保持光子力顯微鏡可以觀察微小位移的優點之外，更可以任意調整探測雷射焦點與微粒子中心的相對位置，進而得到較好的散射光圖樣；並且可以降低來自於其他微粒子的散射光，以增進訊

號的可信度。

## 1.4 系統實際之應用

光子力顯微鏡是一種利用觀察微小粒子的布朗運動進而推論出雷射鐳夾光彈簧係數的技術。在之前，本實驗室大多是利用雷射鐳夾拔離法來量測生物間的作用力。要使用這種方式的前提是必須擁有穩定，且非常精確的移動平台才能進行可信的拉拔實驗。因為探測光束式光子力顯微鏡可以有效的降低傳統光子力顯微鏡在量測上的不準度，所以我們轉而利用光彈簧係數量測法，來比較單一被捕捉的微粒子的光彈簧係數與被膠原蛋白所黏附住的微粒子的光彈簧係數，並證實這種方法的可行性。

## 1.5 論文各章簡介

本篇論文的重點在於探討探測光束式光子力顯微鏡架設的方法與技巧，並且利用實驗來驗證光子力顯微鏡的功能。我們將依序介紹實驗原理、架設、實驗方法。以及結果與結論。在第二章原理的部分將從雷射鐳夾的捕捉機制切入介紹兩種不同的理論模型；接著是四象限光偵測器的工作原理、光子力顯微鏡的力測量機制、以及利用 ZEMAX 光學軟體對探測光束所做的模擬。第三章實驗架設與方法分為數個項目，分別是雷射鐳夾系統、探測雷射系統、探測光束最佳位置實驗方法、光子力顯微鏡之解析度、光子力顯微鏡光彈簧技術之校正、以及實際之應用。第四章則為結果與討論的部分：首先，我們利用 CCD 攝影機，與四象限光偵測器來觀察在不同探測光束聚焦位置與微粒子中心的相對位置下散射光光斑的響應。接著改變微粒子的大小，再觀察其散射光的變化。其次是光子力顯微鏡之空間解析度與光彈簧係數之校正。最後是實際應用的結果。第五章為本篇論文的結論，並探討這套系統在實驗室未來的應用及發展。