

第二章 原理

在這個章節中介紹的是本論文的原理部分：第一節將概述雷射鐳夾的兩種模型理論[11]；第二節針對四象限光偵測器的工作原理做一個介紹[6]；第三節則是光子力顯微鏡的數據分析原理[12]，最後是利用光學模擬軟體分析探測光束架設的方法。

2.1 雷射鐳夾捕捉機制

雷射鐳夾的理論基礎依照其捕捉微粒子的大小可分為兩種模型[11]。當微粒子的直徑 d 遠大於雷射波長 λ 時，即 $d \geq 10\lambda$ ，雷射鐳夾捕捉力的計算屬於「幾何光學模型(Ray Optics Model；RO Model)」的範圍，稱為 Mie 散射狀況(Mie scattering regime)[11,13]；當微粒子的直徑 d 遠小於雷射波長 λ 時，即 $d \leq \lambda$ ，則適用於「電磁波模型(Electromagnetics Model；EM Model)」的範疇，稱為 Rayleigh 散射狀況(Rayleigh scattering regime)[14]。

2.1.1 幾何光學模型

幾何光學模型[13]適用於微粒子直徑 d 比雷射光波長 λ 大的情況 ($d \geq 10\lambda$)。一道雷射光束經顯微物鏡聚焦，在雷射聚焦處形成一穩定的位能井，我們可以利用幾何光學中的折射現象與動量時變率產生力的概念，來解釋雷射鐳夾的工作原理。我們知道光線入射到不同介質時會發生折射現象。如圖 2.1.1 所示，雷射光由上方入射微粒子。當雷射光進入微粒子時，光線發生折射現象，光子的動量即產生改變，這表示微粒子對光子施以一個作用力，使得光子的運動方向改變。根據牛頓第三運動定律，微粒子本身同時受到一個大小相等，但方向相反的反作用力，而所有光子對微粒子所產生的反作用力的合力，即是這道雷射光對微粒子的捕捉力。此一捕捉力指向雷射光焦點，將微粒子拉向光焦點。當微粒子的圓心被拉到光焦點時，所有的光線正向入射微粒子，所有的力都降為零，微粒子便靜止不動。因此，微粒子最終平衡位置就在雷射光焦點上，焦點處即為雷射鐳夾捕捉中心。

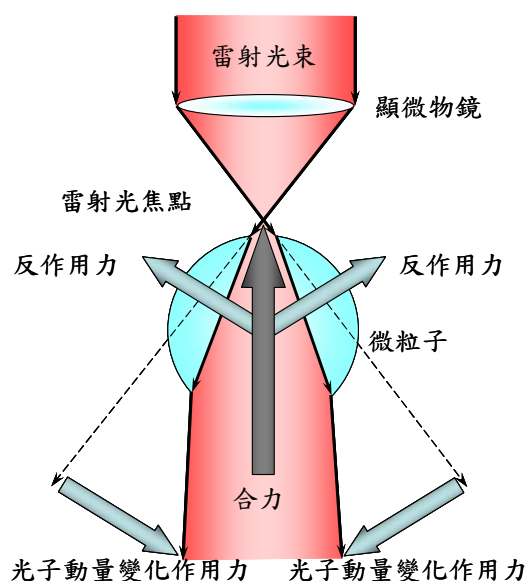


圖 2.1.1 雷射鐳夾幾何光學模型

2.1.2 電磁波模型

電磁波模型[14]則適用於微粒子直徑 d 小於雷射波長 λ 的情況 ($d \leq \lambda$)。雷射光的本質是電磁波，通常我們所使用的微粒子是介電物質，在雷射光範圍內會被電場所極化。此外，由於我們的雷射鐳夾是利用雷射光束經過物鏡強烈聚焦，在焦點處捕捉微粒子。因此，隨著雷射光束經過物鏡後光強度隨光行進方向的改變，其電場強度也會有所改變。如圖 2.1.2 所示，電場的強度在光焦點處會最大，其餘位置較小。而在雷射光範圍內的微粒子因為被極化了，因此會與雷射光束的電場產生交互作用，而有移向電場強度較大區域的傾向。對一高斯分布的聚焦雷射光而言，這種傾向即是將微粒子朝向焦點捕捉的捕捉力來源。

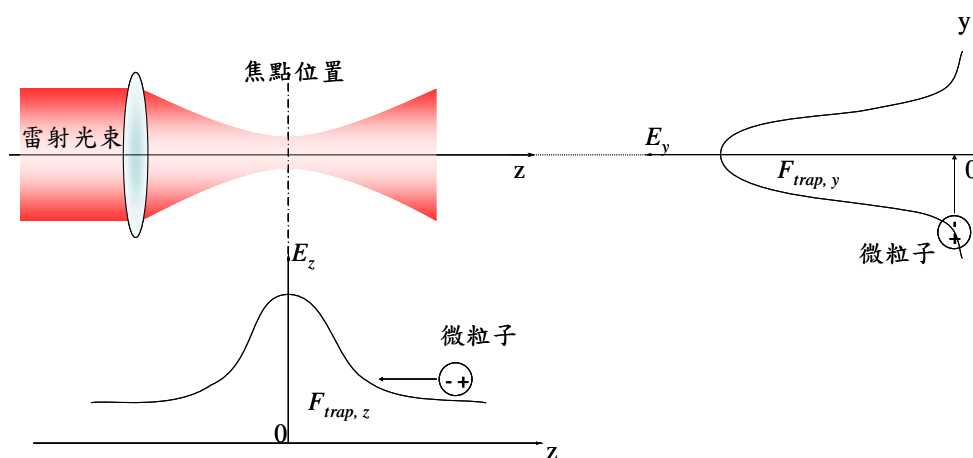


圖 2.1.2 雷射鐳夾電磁波模型

2.2 四象限光偵測器

傳統上，我們使用顯微鏡來觀察細胞的型態與其運動情形，並且使用雷射鑷夾來搬運、操控細胞。除了直接使用顯微目鏡做觀察之外，還可以利用 CCD 攝影機以及儲存設備來觀察、紀錄顯微鏡下的世界。但是因為我們必須觀察被捕捉的塑膠小球的微小位移，而這微小位移大多是在奈米的數量級，已超過了光學所能解析的範圍。所以我們無法利用 CCD 攝影機來觀察被雷射鑷夾捕捉的微粒子在溶液中微小的布朗運動(Brownian motion)。而光子力顯微鏡則是利用了四象限光偵測器來觀察微粒子在溶液中的微小運動。

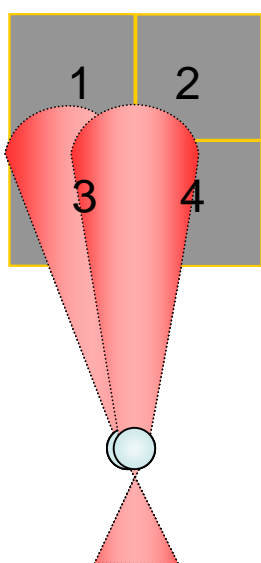
四象限光偵測器主要是透過光斑偏移的情形，進而分析出微粒子微小的偏移情形 [6]。如圖 2.2.1 所示，四象限光偵測器是由四個光偵測器 1、2、3、4 所組合而成。當光照射在四個偵測器上，經過放大器後分別產生 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 的電壓訊號。其中光強度與電壓訊號成正比。當光斑往水平方向偏移時，四個光偵測器所偵測到的電壓訊號會產生改變。我們可以利用

$$Signal_x = \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4} \quad (2.2.1)$$

得到光斑在水平方向上的偏移量。同理，我們利用

$$Signal_y = \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4} \quad (2.2.2)$$

來得到光斑在垂直方向上的偏移。



$$Signal_x = \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{(V_1 + V_2 + V_3 + V_4)}$$

$$Signal_y = \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{(V_1 + V_2 + V_3 + V_4)}$$

$$Signal_z = (V_1 + V_2 + V_3 + V_4)$$

圖 2.2.1 四象限光偵測器工作原理

經由以上的公式，我們利用數學軟體 Mathematica 來計算由四象限光偵測器測量一個強度均勻的圓形光斑從左方到右方掃描過四象限光偵測器後的電子訊號。如圖 2.2.2 所示，橫座標代表的是光斑移動的距離、縱座標則標示經過計算之後的電子訊號。當一個光斑掃描過四象限光偵測器時，我們會得到一個類似正弦波的曲線。圖形的波峰及波谷代表著光斑完全偏向於四象限光偵測器的某一側，而波峰及波谷中間的斜線即是用來解析光斑移動的線性範圍，我們可以利用這項特性來換算出四象限光偵測器對微粒子偏移的解析度。

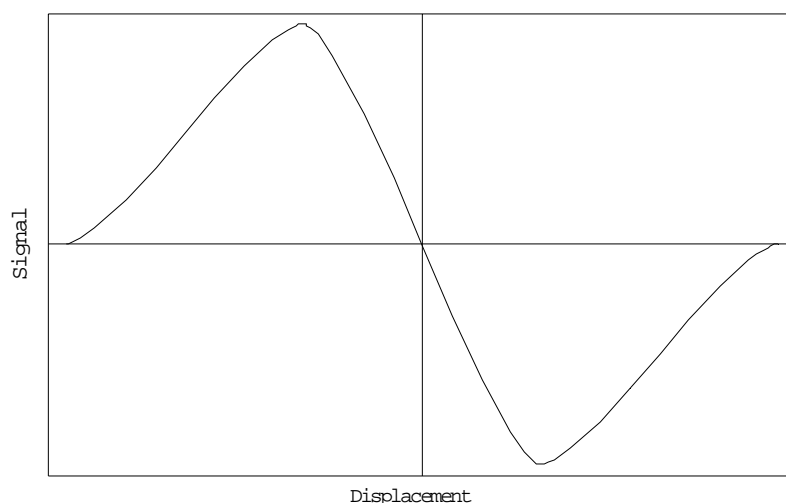


圖 2.2.2 四象限光偵測器電子訊號示意圖

光子力顯微鏡即是利用四象限光偵測器上述的特性，偵測被雷射鐳夾捕捉住之微粒子發散出的前向(或背向)散射光，來分析出微粒子在液體中的布朗運動。接著我們還可以利用分析這些布朗運動的軌跡計算得微粒子所受到的作用力。有關微粒子偏移造成散射光偏折以及光子力顯微鏡力量測機制將在之後的章節中再做介紹。

2.3 光子力顯微鏡力量測機制

一個自由的粒子在液體中受到溶液分子連續的撞擊產生的隨機行走稱之為布朗運動。根據漲落-耗散定理(fluctuation-dissipation theorem)我們可以得到一個流體黏滯係數 β ，並可用來表示愛因斯坦關係式(Einstein expression)的自由擴散係數 D ：

$$D = \frac{k_B T}{\beta} \quad (2.3.1)$$

其中自由擴散係數 D 與一個自由擴散的粒子在每一個維度上的運動表示式 $x(t)$ ，可表示成： $\text{Var}[x] = \overline{x^2} - \bar{x}^2 = 2Dt$ (2.3.2)

對於一個三維的擴散來說，因為 $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$ 所以粒子從原點移動距離的平方可表示為： $r(t)^2 = 6Dt$ (2.3.4)

所以粒子的隨機運動的距離將隨著時間而變大。依照愛因斯坦關係式，隨機的擴散距離正比於絕對溫度 T 。

相對的，當一個粒子被侷限於雷射鐳夾的光學陷阱時，粒子不僅僅受到溶液分子的撞擊，另外也會受到雷射鐳夾產生的捕捉力把粒子限制在此光學陷阱中，並阻止粒子做大範圍的擴散。

光子力顯微鏡基本上是利用偵測被捕捉粒子的布朗運動，去統計並分析後得到粒子所受到的作用力。比較常用的方法有：分布統計圖(Histogram)[10]及能量光譜密度(Power Spectrum Density) [15~17]。在本論文中，我們使用能量光譜密度來分析得到微粒子所受到雷射鐳夾的作用力。

我們利用朗茲凡方程式(Langevin equation)來描述粒子在雷射鐳夾位能井中的布朗運動：

$$F(t) = m \frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \beta \frac{dx(t)}{dt} + kx(t) \quad (2.3.5)$$

(2.3.5)式表示一個力平衡的方程式，其中粒子加速度的產生的力與液體的黏滯力以及一個類似彈簧的恢復力，這三個力的合力與溶液分子隨機撞擊產生的作用力達到力平衡。而雷射鐳夾的作用力隨著微粒子與雷射光焦點中的位移而改變，其改變為一次的線性改變恰好與彈簧恢復力的模式相同。所以我們可以把(2.3.5)式中的彈簧回覆力看成是雷射鐳夾的捕捉力。又因為微粒子在溶液中布朗運動的速率幾乎相同，所以可以把(2.3.5)式中加速度產生的力忽略為零：

$$F(t) = \beta \frac{dx(t)}{dt} + kx(t) \quad (2.3.6)$$

而微粒子在液體中受到溶液分子撞擊的力對時間做平均是零，所以其能量光譜 $S_F(f)$ 為一個定值，代表其白噪音(white noise)，根據Nyquist方程式可以得到：

$$\overline{F(t)} = 0, S_F(f) = |F(f)|^2 = 4\beta k_B T \quad (2.3.7)$$

此處 $F(f)$ 代表 $F(t)$ 的傅立葉轉換而 $\beta = 6\pi\eta r$ 表示阻尼係數， η 為水流黏滯係數， r 為微粒子的半徑， T 為絕對溫度。另外 $x(t)$ 的傅立葉轉換標記為 $X(f)$ ：

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f) e^{-2\pi i f t} df \quad (2.3.8)$$

又 $\frac{dx(t)}{dt}$ 的傅立葉轉換為 $-2\pi i f X(f)$ 。將簡化過的朗茲凡方程式(2.3.6)式兩邊做富立葉轉換後可以得到：

$$F(f) = 2\pi\beta(f_c - if)X(f) \quad (2.3.9)$$

$f_c = \frac{k}{2\pi\beta}$ 表示為截止頻率。因為(2.3.9)式兩邊均為複數的表示式，所以把兩邊平方得到

$S_x(f) = |X(f)|^2$ 為微粒子位置分布的能量光譜密度，且

$$S_F(f) = |F(f)|^2 : 4\pi^2\beta^2(f_c^2 + f^2)S_x(f) = S_F(f) \quad (2.3.10)$$

代入(2.3.7)式，可以得到 $x(t)$ 的能量光譜：

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\beta\pi^2(f_c^2 + f^2)} \quad (2.3.11)$$

(2.3.11)式為一個勞倫茲函數(Lorentzian function)的形式。表示在不同頻率 f 下的波動。而截止頻率 f_c 區分出微粒子作布朗運動的兩種情形。在低頻 $f \ll f_c$ 的部分，能量光譜密度大約為一定值： $S_x(f) \doteq S_0 = 4\beta k_B T / k^2$ ，代表微粒子被雷射鐳夾限制在位能井內的狀態，故微粒子只能進行一定範圍的布朗運動。而在高頻 $f \gg f_c$ 的部分，能量光譜密度 $S_x(f)$ 以 $1/f^2$ 的趨勢減少，代表在高頻處，亦即在很短的時間內，微粒子感受不到雷射鐳夾的存在，因此高頻部分反映出微粒子如同不受限制的情形下自由地擴散。

我們利用擬合的方式由勞倫茲方程式(2.3.11)式得到雷射鐳夾的光彈簧係數 k ，以及水阻力常數 β 。我們將其能量光譜與頻率的關係圖，以對數-對數的方式描繪出來如圖2.3.4所示，即可用簡單的方式估算出這些參數。

在頻率較低的位置上，其對數譜線應該是水平的，但是在頻率最低的地方 $S(f)$ 會因為飄移作用以及低頻的震盪而提高。在低頻水平處畫一條水平線，其高度為 S_0 。而在頻率較高的位置上可以畫出一條斜率大約為-2的斜直線，延伸這條斜直線並與水平線 S_0 相

交處及為截止頻率 f_c 。

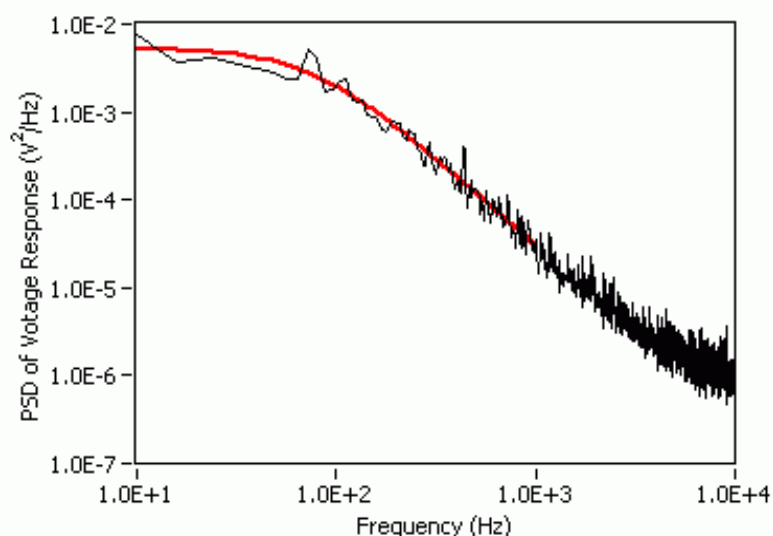


圖 2.3.1 能量光譜密度圖

當我們得到 S_0 以及 f_c 之後便可以計算雷射鑷夾的光彈簧係數：

$$k = \frac{2k_B T}{\pi S_0 f_c} \quad (2.3.12)$$

以及水阻力常數：

$$\beta = \frac{k_B T}{\pi^2 S_0 f_c^2} \quad (2.3.13)$$

若我們已經知道水阻力常數 β ，則可由(2.3.12)與(2.3.13)推得：

$$k = 2\pi\beta f_c \quad (2.3.14)$$

直接用水阻力常數 β 與截止頻率 f_c 直接得到雷射鑷夾的光彈簧係數。

所以，由上述推導我們可以得到一個微粒子在一個雷射鑷夾裡所受到的光彈簧係數。接著如果我們將一些蛋白質塗佈在這些很小的塑膠小珠上，然後將這些微粒子用雷射鑷夾移到細胞表面，則這些微粒子上的蛋白質會跟細胞上面的蛋白質有交互作用。因此這時候我們量到的位置對時間的圖不一樣，分析出來其所受到的力彈簧係數也不一樣。然後我們再利用力的分析及彈簧模型的串聯並聯公式等等，即可推算出蛋白質與細胞間的作用力彈簧係數。

2.4 探測光束式光子力顯微鏡

光子力顯微鏡是利用四象限光偵測器對由微粒子散射的散射光訊號進行處理，而達到對微粒子微小運動的偵測。傳統上，我們偵測的是雷射鐳夾的雷射光打到微粒子所產生的散射光。而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微小偏移。

離焦探測光束式光子力顯微鏡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，使其散射光的光斑圖樣可以讓四象限光偵測器作精準的量測。這種偵測探測雷射光來取代原本雷射鐳夾的散射光的方式，除了保持光子力顯微鏡原本可以觀察微小位移的優點之外。更可以針對不同大小的微粒子任意調整探測雷射焦點與微粒子中心的相對位置，使散射光在四象限光偵測器上得到較好的圖樣。其主要的目的是讓我們可以精確的分析出不同大小微粒子移動的情形。

2.4.1 ZEMAX模擬

為了瞭解微粒子中心與雷射光聚焦位置產生偏移時，雷射光打到微粒子透過聚光鏡收光所發出散射光的圖樣的不同。我們使用光學軟體 ZEMAX 來進行一連串的模擬。單純只考慮幾何光學的情形下，為了排除模擬時產生不必要的像差，除了微粒子本身之外的透鏡都使用理想透鏡來進行模擬。如圖 2.4.1 所示，雷射光設定為高斯分布的平行光由左至右射出，通過一個焦距為 1.6 mm 的透鏡(OBJ1)作為一百倍物鏡，其焦平面處即為顯微鏡觀察的樣品平面。雷射光通過 OBJ1 打到直徑為 3 μm ，玻璃材料 BK7 的微粒子後，在與 OBJ1 共焦處使用一個焦距為 8 mm 的透鏡(OBJ2)，作為一個放大率為二十倍的聚光鏡收光。



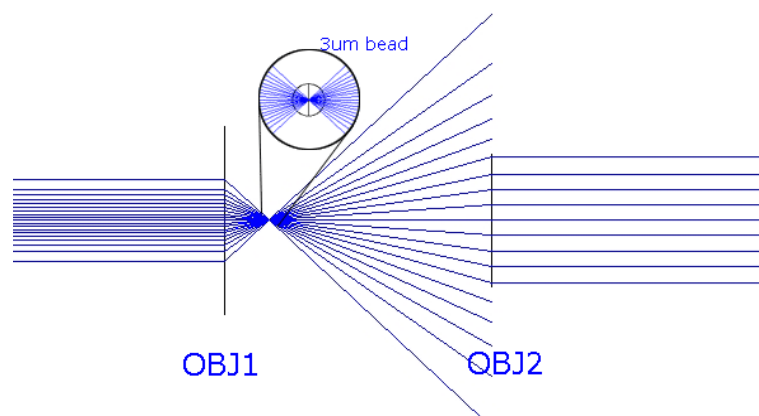


圖 2.4.1 光學模擬架設

如下圖所示，圖2.4.2表示直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的微粒子在光軸方向與雷射光焦點產生偏移時所對應之散射光的光斑圖樣。正方向為微粒子遠離物鏡(OBJ1)的方向，原點表示微粒子中心在雷射光焦點處，即是雷射鐳夾的位置。

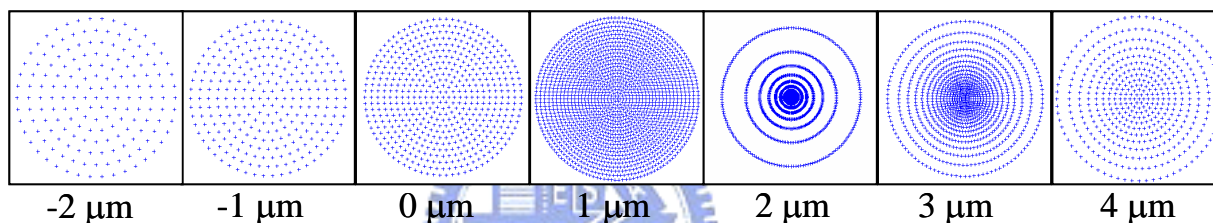


圖 2.4.2 微粒子於光軸方向位移之散射光圖樣

從模擬的結果得知散射光的光斑圖樣會隨著微粒子在光軸方向上的偏移而改變，我們訂微粒子為於雷射鐳夾捕捉中心當作原點，微粒子遠離顯微物鏡的方向為正，反之為負。當微粒子與雷射光的焦點距離由 $-2\ \mu\text{m}$ 到 $2\ \mu\text{m}$ 時，光斑會由一個範圍較大強度較小的圓，漸漸往中央收斂變為一個範圍較小強度較強的光點。而當微粒子與雷射光的焦點距離由 $2\ \mu\text{m}$ 到 $4\ \mu\text{m}$ 時，光斑則會再度的漸漸發散。由此可知，微粒子在光軸方向上與雷射光焦點有偏移時，光斑的大小以及強度會隨之改變。

利用上述的結果我們可以做更進一步的模擬。除了改變雷射光焦點與微粒子在光軸上的相對位置外，我們在垂直光軸方向上，分別將微粒子偏移 $250\ \text{nm}$ 以及 $500\ \text{nm}$ 並觀察其光斑圖樣的改變。找出雷射光焦點與微粒子中心距離在垂直光軸上偏離時的散射光圖樣變化的趨勢。最後利用模擬的結果解釋利用探測光束取代傳統上偵測捕捉雷射光的理由。

如圖2.4.3所示，橫軸方向是表示微粒子於光軸方向的位移， $0\ \mu\text{m}$ 即代表微粒子在光軸方向與雷射焦點重合的位置；正方向代表微粒子遠離物鏡，也就是位於雷射光聚焦之

後。縱軸方向則是代表垂直於光軸方向的偏移量， $0\mu\text{m}$ 即代表的垂直於光軸方向微粒子與雷射焦點重合的位置。另外虛線代表的是散射光圖樣的中心線，也就是子午平面與散射光圖樣平面的交線。

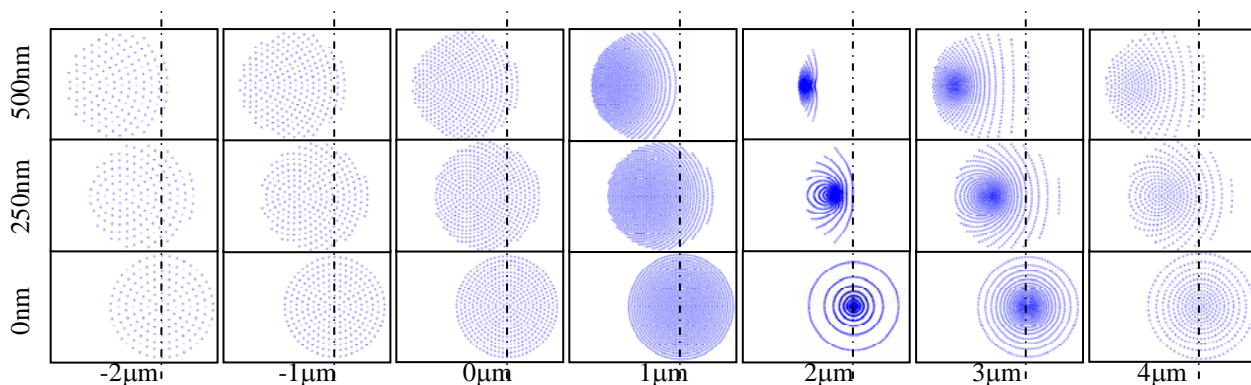


圖 2.4.3 微粒子於垂直光軸方向位移之散射光圖樣改變情形改變

從模擬的結果我們可以發現不論在光軸上哪個位置，當微粒子在垂直光軸方向有少許的偏移時，光斑的圖樣都會隨著微粒子的偏移而改變。特別是微粒子在光軸方向距離雷射焦點1到3 μm 時，此光斑圖樣的改變更明顯。

雷射光束透過微粒子聚焦的效果可由圖2.4.4多做說明。如圖所示，雷射光由左向右射出，圖2.4.4(a)代表微粒子在光軸方向與雷射光焦點重疊，圖2.4.4(b)則表示雷射光聚焦於微粒子中心前方2 μm 處；由上至下圖2.4.4分別表示微粒子在垂直光軸方向偏移500、250，以及0 nm。

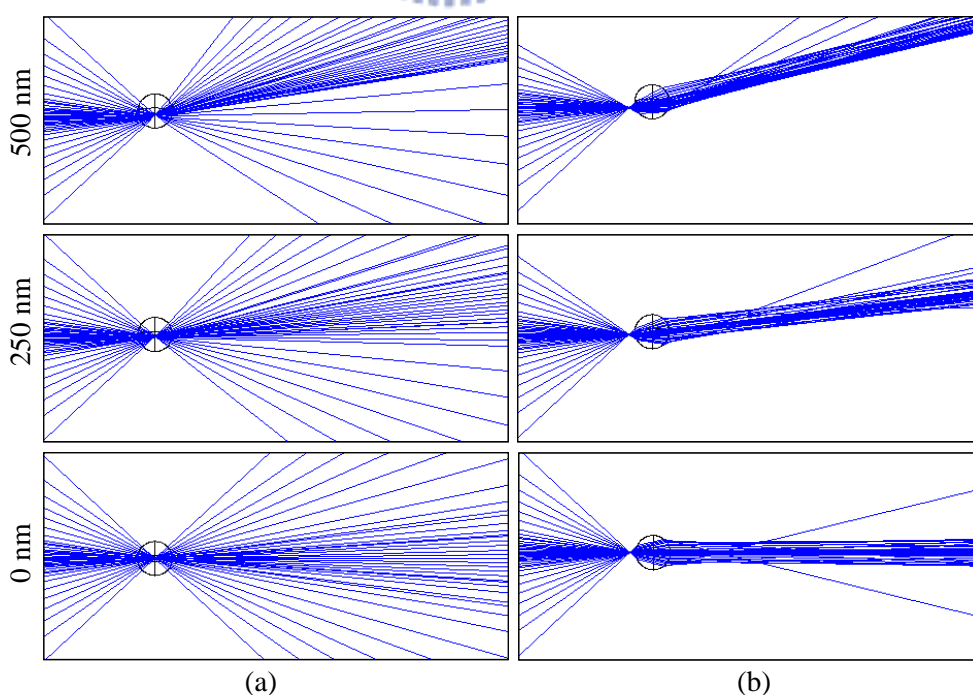


圖 2.4.4 微粒子之微透鏡效應改變

由圖2.4.4(a)可知，當微粒子中心與雷射光焦點重疊時；也就是微粒子位於雷射鐳夾的捕捉中心時，因為雷射光都是垂直入射微粒子所以不會造成光束任何的偏折。而當微粒子在垂直光軸方向稍做移動時，雷射光才會有些許的偏移。另外由圖2.4.4(b)我們可以發現，雷射光入射微粒子後依照司乃耳定律(Snell's Law)發生偏折，使得原本發散的光束經過微粒子聚焦後匯聚成一收斂的光束。當微粒子在垂直光軸方向移動時，收斂的光束也隨之偏折。我們可以與圖2.4.2光斑的圖樣來做比較，當微粒子在光軸方向由 $0\ \mu\text{m}$ 的位置移動到 $2\ \mu\text{m}$ 時，雷射光透過微粒子聚焦由聚光鏡收光後產生的光圖樣會由原本均勻分散的情形匯聚成一個比較集中、強度較強的光點。如此我們認為可以利用這樣的特性來提高四象限光偵測器的訊雜比以提高系統的解析度。

由於光子力顯微鏡是用四象限光偵測器來觀察被微粒子散射的雷射光來分析微粒子的微小偏移量。所以系統的雜訊除了電子雜訊以外，另一部分可能是來自於系統本身光學訊號的雜訊。為了方便解釋，我們把圖2.4.4的模擬結果用卡通的方式呈現。如圖2.4.5所示，雷射光由下往上打入樣品，最下方為樣品的蓋玻片。左邊代表的是利用雷射鐳夾捕捉一個微粒子，也就是傳統的光子力顯微鏡觀察的情況。右圖則表示雷射光焦點在微粒子中心下方 $2\ \mu\text{m}$ 的情形，即是離焦探測光束式光子力顯微鏡所使用的探測光束。

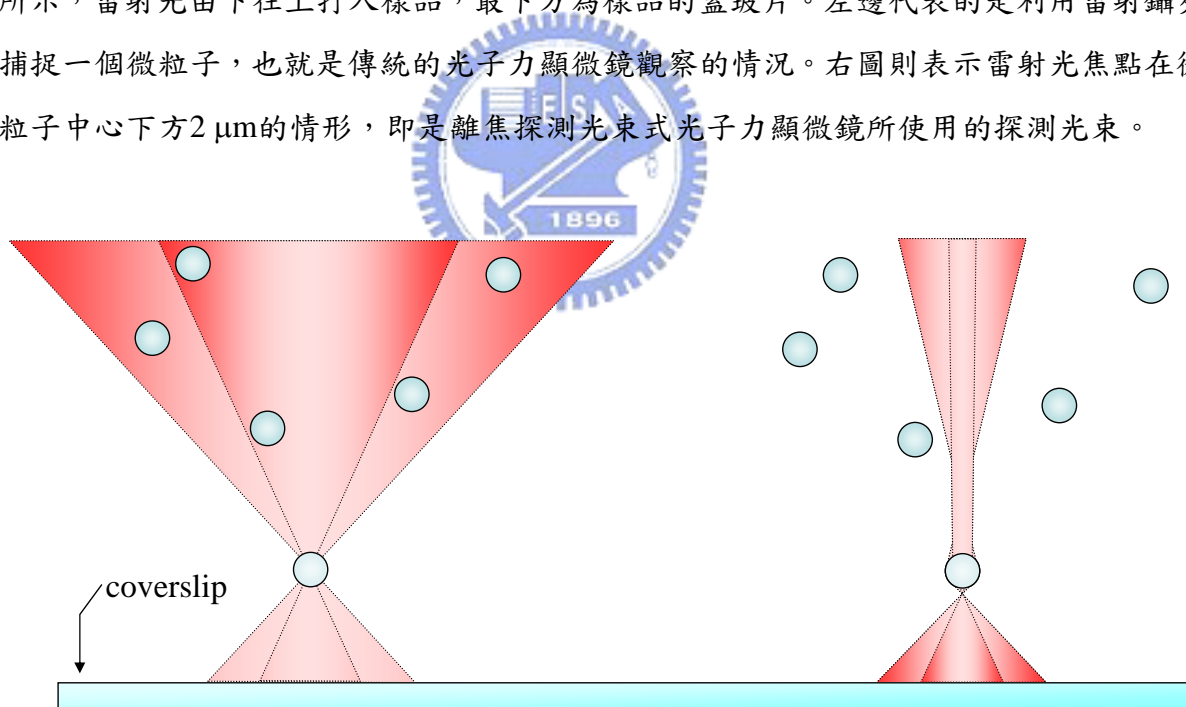


圖 2.4.5 利用探測雷射降低雜訊產生示意圖改變

比較左右兩邊的圖我們可以發現，左圖雷射鐳夾的情形中，通過微粒子的散射光發散的範圍很大，所以很容易照射到散佈在其他位置上的微粒子，造成其他的散射光形成光學的雜訊。如果改用右邊的探測光束，雷射光被微粒子聚焦而形成較為收斂的雷射光。如此以一來即可減少雷射打到其他微粒子的情形發生，進而降低雜訊。

接下來，我們改變微粒子的大小重複上述的模擬。由於我們模擬的透鏡皆為理想透鏡，所以不會產生任何的像差。當我們改變微粒子的大小時，我們發現只要等比例改變雷射光焦點與微粒子中心的相對位置即可得到相同的結果。舉例來說，在先前對直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的微粒子模擬時，我們發現雷射光焦點在 $2\ \mu\text{m}$ 處會得到最佳的散射光圖樣，所以當我們針對直徑為 $6\ \mu\text{m}$ 的微粒子模擬時，發現雷射光焦點會在 $4\ \mu\text{m}$ 的位置得到相同的結果。

我們分別針對直徑為 $1\ \mu\text{m}$ 、 $3\ \mu\text{m}$ 以及 $6\ \mu\text{m}$ 的微粒子做模擬，而雷射光的焦點與微粒子中心的距離皆為最佳位置，分別是 $0.66\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ 以及 $4\ \mu\text{m}$ 。同樣地，我們改變微粒子在垂直光軸方向上的位置，並觀察透過聚光鏡收光後的散射光圖樣。如圖2.4.6所示，從圖中我們發現在不考慮像差等因素的情形下，只要我們正確的控制探測雷射光焦點與微粒子中心的相對距離時，散射光的改變並不大。而圖2.4.6中，當直徑為 $1\ \mu\text{m}$ 的微粒子再光軸方向上移動 $500\ \text{nm}$ 時，並沒有發現到散射光的圖樣。這是因為聚光鏡的數值孔徑(NA)不夠大，所以收光的能力有限以致於無法得到散射光的圖樣。

從模擬的結果我們得到了在架設探測光束時，我們只要把探測光束在微粒子的前方聚焦，即可利用微粒子來當作微透鏡，進而把探測光束匯聚得到較好的散射光圖樣。不過，如果把像差以及繞射極限的情形考慮進去時，雷射光聚焦後的光斑大小大約為一個波長。所以當微粒子的大小小於雷射鐳夾幾何光學的範圍時，探測光束是否適用？這將留在實驗的部分在做討論。

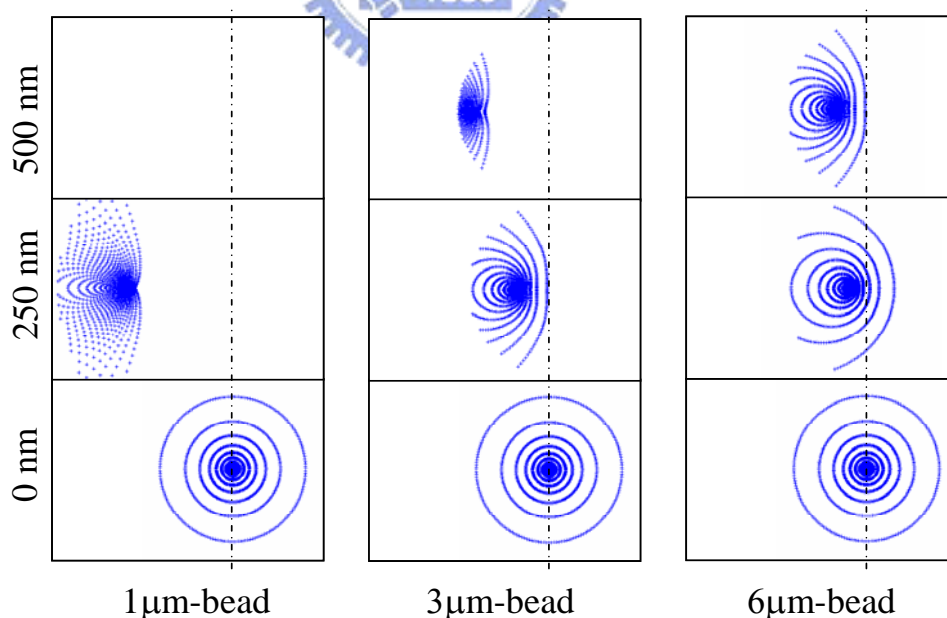


圖 2.4.6 不同大小微粒子之散射光圖樣改變