

### 第三章 架設與方法

在這一章中介紹離焦探測光束式光子力顯微鏡的架設，以及系統的校正與實驗的方法。離焦探測光束式光子力顯微鏡主要是由兩部分組成：一部分是雷射鐳夾系統；另一部分是探測光束系統。系統的校正包括了探測光束最佳聚焦位置，以及光子力顯微鏡的解析度與雷射鐳夾光彈簧係數的校正。最後則是利用上述的系統來進行光彈簧係數量測法的研究。

#### 3.1 雷射鐳夾系統

本實驗的雷射鐳夾系統架設如圖 3.1.1 所示，雷射光由波長 1064 nm，最大功率 350 mW 的 Nd:YAG 雷射射出後，首先經過一組擴束器(BE1)將雷射擴束後，由一組半波長波板(HWP)及偏振分光鏡(PBS)控制雷射強度，再經過一片雙色分光鏡(DM1)反射，最後入射放大倍率為一百倍，NA 為 1.25 的顯微物鏡(OBJ1)成為一套雷射鐳夾系統。

我們將含有微小珠子的溶液放在載玻片與蓋玻片之中當作樣品(Sample)，再將樣品放在顯微物鏡的焦點處由LED光源照明。微粒子的影像透過顯微物鏡放大後通過成像鏡組成像在CCD攝影機上。我們使用螢幕觀察樣品情形，並以電腦及控制器操作精密壓電移動平台(PZT)進行樣品的操控。

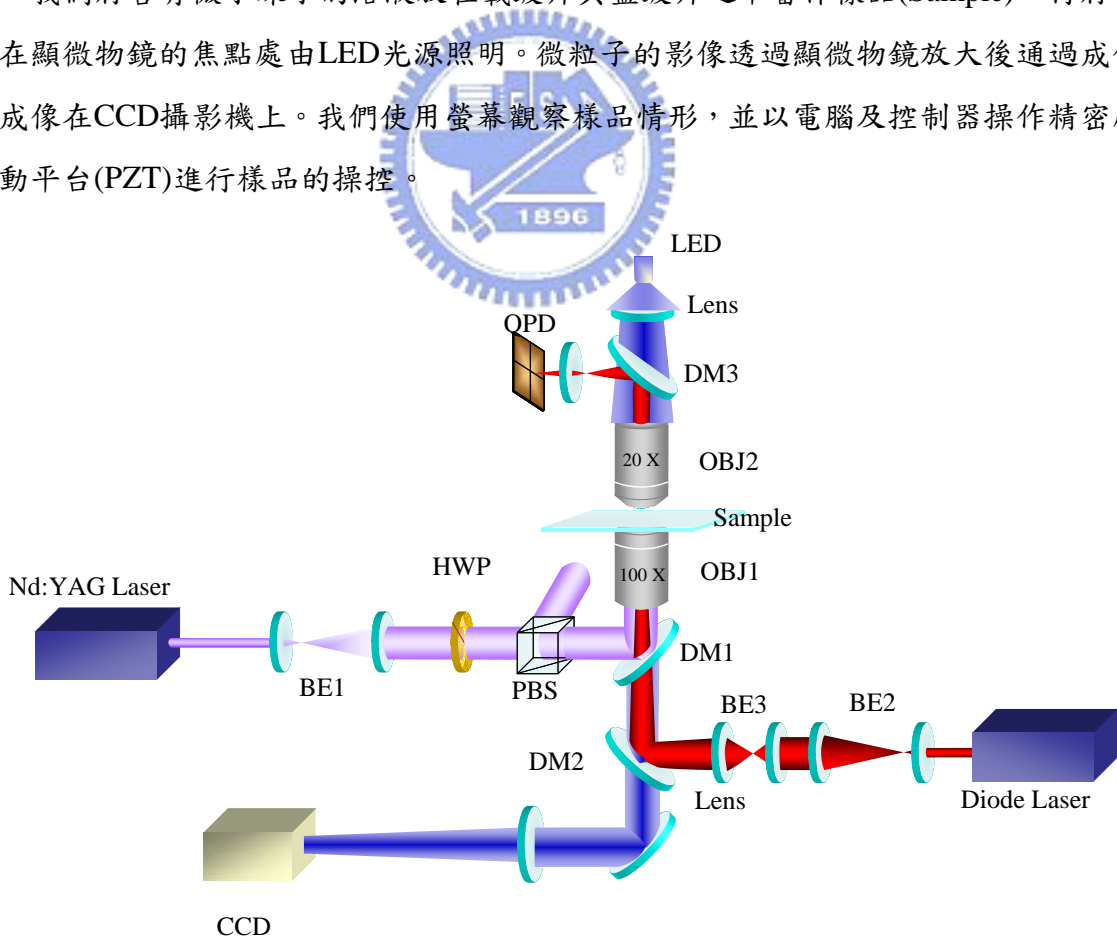


圖 3.1.1 離焦探測光束式光子力顯微鏡架設圖

### 3.2 探測光束系統

本實驗的探測雷射系統架設如圖 3.1.1 所示，雷射光由波長 658 nm 最大功率 30 mW 的半導體雷射射出後經過兩組擴束器(BE2, BE3)探測雷射光經過擴束後，再用雙色分光鏡(DM2)反射進入 OBJ1 形成探測雷射系統。

我們利用兩組擴束器控制探測雷射在光軸方向上聚焦的位置。我們將探測雷射光的位置與雷射鐳夾焦點位置在光軸方向上做個平移，並利用微粒子當作微透鏡，再透過一個放大倍率為二十倍，NA為0.4的顯微物鏡(OBJ2)當作聚光鏡收光。最後再利用雙色分光鏡(DM3)反射使探測雷射通過透鏡後打在四象限光偵測器(QPD)上。四象限光偵測器的訊號經過放大器後，由電腦透過資料擷取卡紀錄電壓訊號並由軟體處理後得微粒子的微小偏移量。

探測光束與雷射鐳夾的架設最大的不同在於雷射光在光軸方向上聚焦的位置。我們採取的方法是使用兩組擴束器來達到調整聚焦的位置，如圖3.2.1所示：第一組擴束器是讓探測雷射可以填滿顯微物鏡入瞳，由傅立葉光學得知，光束愈大經過透鏡聚焦後其光斑就會愈小；第二組擴束器則是方便我們調控探測雷射的聚焦位置。一組平行光的擴束器是利用兩片共焦的透鏡而形成，其放大率為兩片透鏡的焦距比。當兩片透鏡的距離大於其焦距和，入射的平行光束經過這兩片透鏡後將變成收斂的光束；反之兩片透鏡距離小於其焦距和將形成發散的光束。收斂的光束打入顯微物鏡後，光束會提前聚焦，反之則反，光束會延後聚焦。我們利用這種特性，控制探測光束發散與收斂的情形來改變經過物鏡聚焦後的位置。

這套結合了雷射鐳夾系統與探測雷射系統的裝置即是本篇論文的探測光束式光子力顯微鏡的實驗架設。

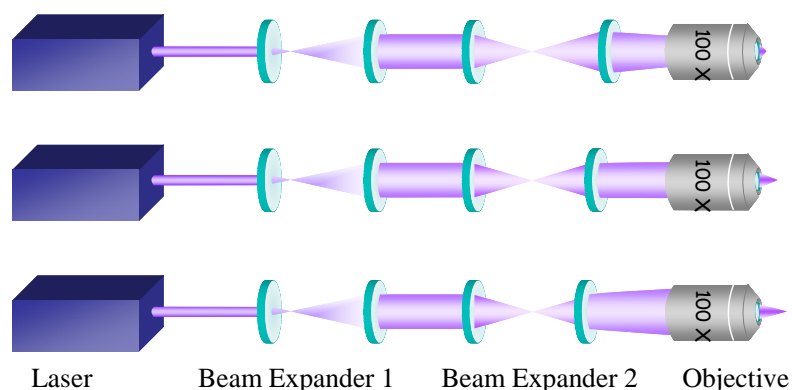


圖 3.2.1 利用改變擴束鏡組情形控制光束焦點位置示意圖

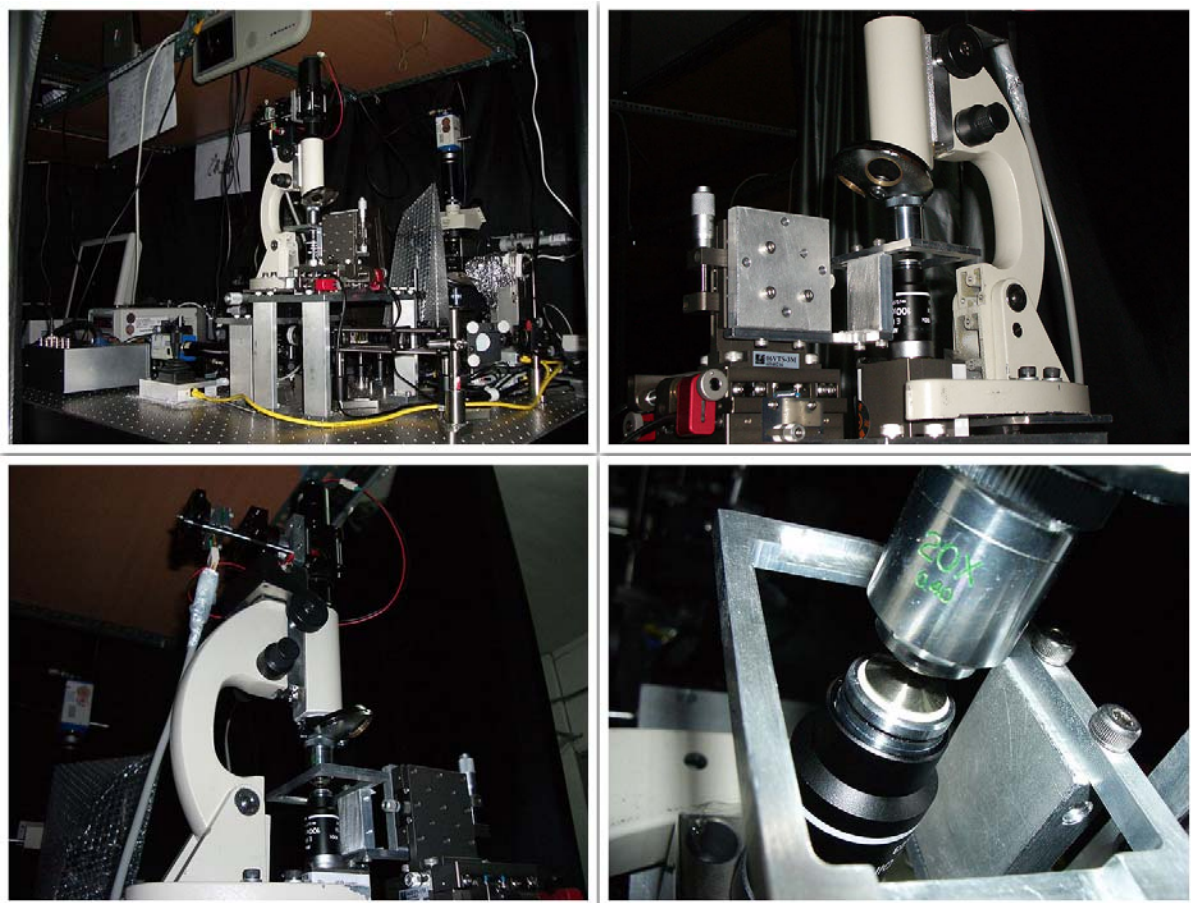


圖 3.2.2 實際離焦探測光束式光子力顯微鏡架設圖



### 3.3 探測光束最佳位置

在上個章節中(3.25 節)提到，要架設探測光束的光子力顯微鏡時，必須改變探測光束的位置。而從第二章的光學模擬以及其他參考資料中發現，假設探測光束的行進方向是由下往上打，也就是架設在一個倒立式顯微鏡上，則探測光束的焦點必須在微粒子中心的下方。但是對於：

1. 最佳的聚焦位置為何處？
2. 最佳要如何定義？
3. 不同大小的微粒子與聚焦的位置有何關係？

這幾個問題並沒有特別的提出來討論，因此本節將介紹我們如何探討這幾項問題的實驗方法。

首先如圖3.3.1所示，我們把一個直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠固定在玻片上，再利用壓電精密移動平台(PZT Stage)來控制塑膠小珠與雷射光焦點的相對位置。我們先讓塑膠小珠沿著光行進方向移動到特定位置後，再讓塑膠小珠沿著光軸垂直方向移動。當塑膠小球掃過雷射光時，四象限光偵測器將紀錄被塑膠小球散射的雷射光。

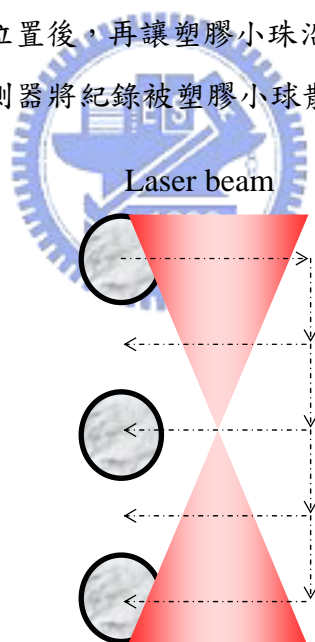


圖 3.3.1 探測光束最佳位置實驗方法示意圖

如此不斷的改變塑膠小珠中心與雷射光焦點的相對位置，並且來回重複地掃描。最後利用軟體分析、並比較四象限光偵測器量測得到的訊號。我們利用比較掃描後訊號的線性區域的斜率，以及正弦波形波峰、波谷的值，進而推得微粒子中心與雷射光焦點沿著光行進方向的最佳位置。

接著我們改變微粒子的尺寸並重複以上的步驟，找出不同大小的微粒子所對應微粒

子中心與雷射光焦點的最佳位置，並從結果中嘗試找出某關係。

我們除了可以使用四象限光偵測器來分析散射光的訊號，另外也利用CCD攝影機在四象限光偵測器的位置上拍攝散射光的圖樣，並重複以上的實驗。這樣做的目的是為了比較不同的散射光圖樣對應的四象限光偵測器所測量到的訊號，並找出最佳的散射光圖樣。如此一來，在日後架設光子力顯微鏡時，只要利用CCD攝影機來觀察散射光圖樣即可概略的找出探測光束最佳的聚焦位置。

### 3.4 光子力顯微鏡解析度

雷射鑷夾結合四象限光偵測器來分析被捕捉住微粒子的布朗運動即可稱為光子力顯微鏡。所以對塑膠小珠微小移動的解析度對光子力顯微鏡是非常重要的。在上個章節中(3.4節)已經介紹如何找出探測雷射最佳的聚焦位置之後，在這節中將介紹測量光子力顯微鏡解析度的方法。

影響光子力顯微鏡解析度的原因可分為兩部分，一是雷射光除了會打到我們要測量的微粒子之外，還會照射到其他的微粒子造成光學上的雜訊。另一個部分則是四象限光偵測器所測量到的電壓訊號，經過放大器放大以及其他種種可能干擾電子訊號的雜訊。光學上的雜訊我們已經利用探測光束的方式來降低可能的雜訊，所以在這裡針對電子訊號的雜訊來做分析。

首先我們利用改變探測光束系統中的擴束鏡，將探測雷射的焦點調整到我們認為最好的位置後便固定不再改變。同樣的，我們把一個直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠固定在玻片上，並利用壓電精密移動平台(PZT Stage)來控制塑膠小珠沿著垂直於光軸的方向移動。與3.2節探測光束最佳位置實驗步驟不同的是：我們控制移動平台讓塑膠小珠一步一步移動，每移動一次就利用電腦紀錄一段四象限光偵測器的電壓訊號。如圖3.4.1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壓訊號。可以從圖中看到訊號呈現階梯狀的改變，每一個階梯即表示移動平台移動一次的訊號。我們將有中間線性區域的曲線圖形中間一個步伐所對應的電壓改變值與一個平台所測量到的電壓訊號的標準差做比較，即可得出光子力顯微鏡對塑膠小珠空間位移上的解析度。

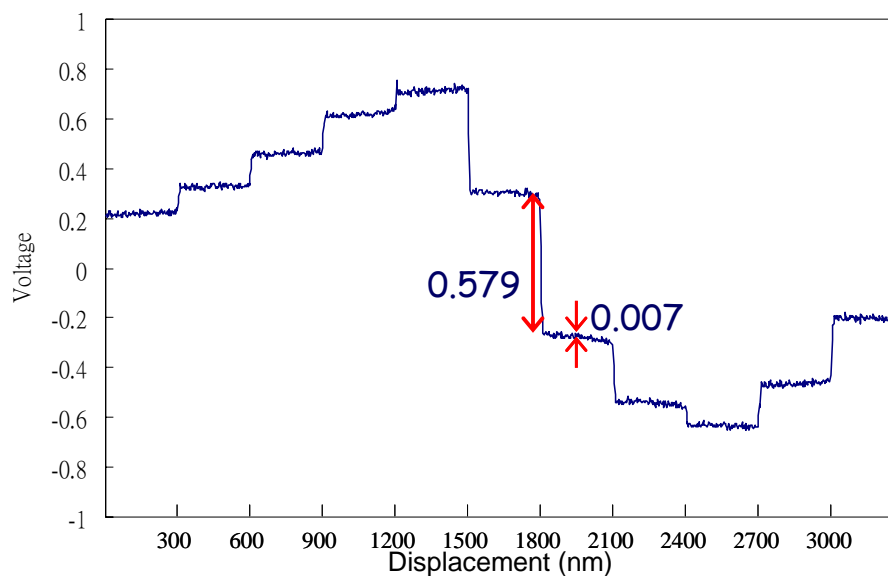


圖 3.4.1 光子力顯微鏡解析度測量結果圖

### 3.5 光彈簧係數之校正

傳統上，測量雷射鐳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鐳夾的捕捉力，所以對於捕捉力的解析度有限，也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鐳夾作用力的解析度。在3.4節測量完光子力顯微鏡的解析度後，我們將針對能量光譜密度來進行光彈簧係數的校正。

當我們的探測光束式光子力顯微鏡架設完成後，便可以很輕鬆的利用能量光譜密度來進行雷射鐳夾光彈簧係數的校正。我們使用雷射鐳夾捕捉住一顆直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠，再用四象限光偵測器測量探測光束打到塑膠小珠的散射光，最後用電腦來紀錄四象限光偵測器的電壓訊號，經過換算可得出塑膠小珠的布朗運動情形。接著再做數據的計算即可以得到雷射鐳夾的光彈簧係數。最後我們分別改變雷射鐳夾的雷射功率，並重複以上的步驟，即可分析出不同雷射功率下的光彈簧係數。在我們量測出在各個雷射功率下的光彈簧係數後，便可以開始實際的應用在各個領域上。

### 3.6 光彈簧係數量測法

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。因為在拔離的過程中，如果移動平台的不穩定而產生微粒子多餘的晃動，便會造成實驗結果的偏差。所以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。為了免除移動平台的外在因素，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力彈簧係數，並證實這種方法的可行性。

光彈簧係數法的概念可以如圖3.6.1來解釋：首先如圖(a)，我們捕捉一顆直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠，並且利用四象限光偵測器測量其布朗運動。經過能量光譜密度的計算後，得到微粒子所受的光彈簧係數 $k$ 。接著如圖(b)，我們利用控制移動平台，讓這顆被捕捉的塑膠小珠去黏附到另一顆有塗佈上膠原蛋白且固定在玻璃上直徑為 $6\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠。我們再繼續測量這顆直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 塑膠小珠所受到的力彈簧係數 $k'$ 。我們比較前後測得的光彈簧係數，以驗證光彈簧係數法的可行性。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。

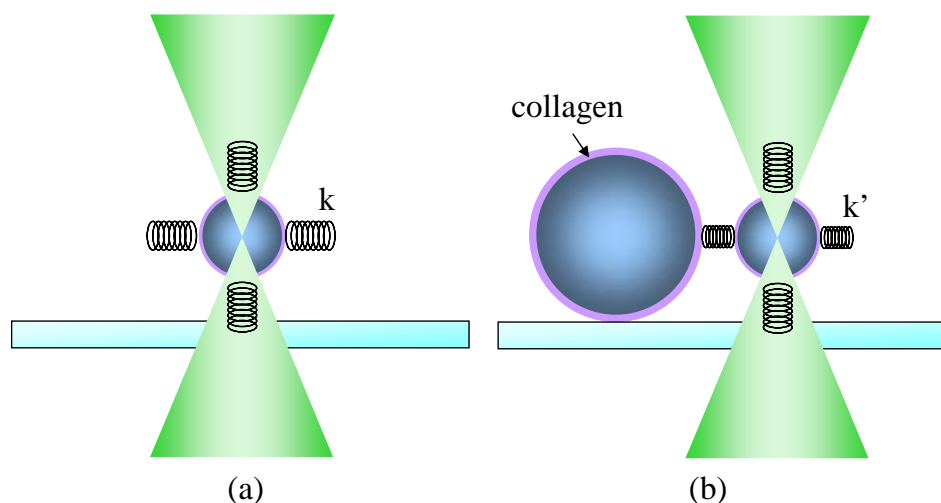


圖 3.6.1 光彈簧係數量測法示意圖