

第四章 結果與討論

本篇論文的最終目的是在實驗室架設第一套探測光束式光子力顯微鏡，並對架設此套系統的方法及技巧做一個探討，最後將這套系統實際應用在生物間黏附力的測量。首先，我們利用移動平台來控制塑膠小珠與雷射光焦點的相對位置來找出探測光束的最佳位置。其次，再比較四象限光偵測器所測量到的訊雜比來分析光子力顯微鏡的解析度。最後，使用探射光束式光子力顯微鏡量測微粒子的布朗運動，並用能量光譜密度法來校正雷射鐳夾的捕捉力。在本實驗中我們使用塑膠小珠來當做微粒子。在這個章節中將展示我們的實驗結果並進行分析與討論。

4.1 探測光束最佳位置

我們利用精密壓電移動平台控制在樣品平台上的塑膠小珠與雷射光焦點的相對位置。我們以塑膠小珠為雷射鐳夾捕捉中心當作原點，塑膠小珠遠離顯微物鏡的方向為正，反之為負。如圖4.1所示，雷射由下往上入射，我們把直徑為 $3\ \mu\text{m}$ 的塑膠小珠移動到 $+4.5\ \mu\text{m}$ 的位置後，開始在垂直光軸的方向上做掃描。掃描的步伐為一步 $50\ \text{nm}$ ，總共掃描的距離為 $6\ \mu\text{m}$ 。接著重複改變塑膠小珠在光軸上的相對位置，每一次移動 $0.5\ \mu\text{m}$ ，總共移動的距離是 $9\ \mu\text{m}$ 。我們使用CCD攝影機以及四象限光偵測器兩種方式來觀察探測光束經過聚光鏡收光後散射光圖樣的變化情形。

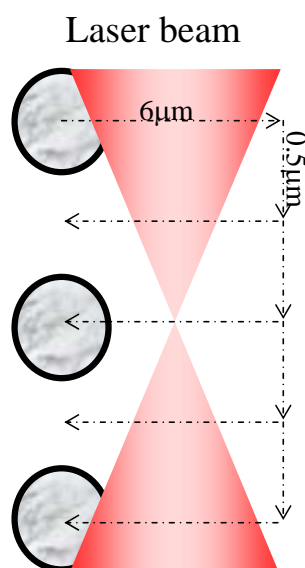


圖 4.1 探測光束最佳位置實驗方法示意圖

4.1.1 CCD攝影機觀察散射光影像

首先我們使用CCD攝影機在四象限光偵測器的位置上觀察散射光的圖樣。如圖4.1.2所示可以分類為三大部分：

第一部分是塑膠小珠從 $+4.5\ \mu\text{m}$ 到 $+1\ \mu\text{m}$ 的位置時的散射光圖樣。我們發現將此散射光圖樣與我們在第二章原理部分應用ZEMAX所做的模擬結果相比較可以得到相似的結果。探測光束經過塑膠小珠的微透鏡的效應被匯聚成一道收斂的光束，由聚光鏡收光後形成一個較為集中的光斑。此外我們還可以發現，在我們測量的範圍裡塑膠小球越接近雷射光焦點，則光斑的大小愈大。

其次，第二個部分是塑膠小珠從 $+0.5\ \mu\text{m}$ 到 $-0.5\ \mu\text{m}$ 的範圍的位置時的散射光圖樣。因為雷射光焦點大約在塑膠小珠的中心，所以雷射光不會產生很大的偏折，所以我們可以發現所呈現的光斑變的較為均勻的圖樣分布在整個視野中。當塑膠小珠朝負的方向漸漸遠離雷射光焦點時，CCD攝影機原本均勻的散射光光斑中央會出現一個較暗的光斑，這也就是第三個部分。

第三個部分是塑膠小珠從 $-1\ \mu\text{m}$ 的位置開始遠離到 $-4.5\ \mu\text{m}$ 的位置。中央的黑斑慢慢的形成一個較暗的圓環中央包著一個亮點，我們可以把它看成一個類似塑膠小珠投影在CCD上的影像。

除了ZEMAX模擬的方式來解釋利用塑膠小珠來當作微透鏡造成探測雷射匯聚成一道收斂的光束之外，我們還可以由圖4.1.1來解釋為什麼在雷射光焦點遠離塑膠小珠時，其散射光圖樣會呈現類似一個塑膠小珠的投影。如圖所示，雷射光由下往上打進樣品，雷射光的焦點在塑膠小珠之上，此時我們可以把雷射光當作一個光源均勻的照明這顆塑膠小珠，所以經過聚光鏡收光之後，塑膠小珠的影像便投影在CCD攝影機上形成圖4.1.2當中 $-2.5\ \mu\text{m}$ 到 $-4\ \mu\text{m}$ 的一個類似塑膠小珠投影的散射光圖樣。

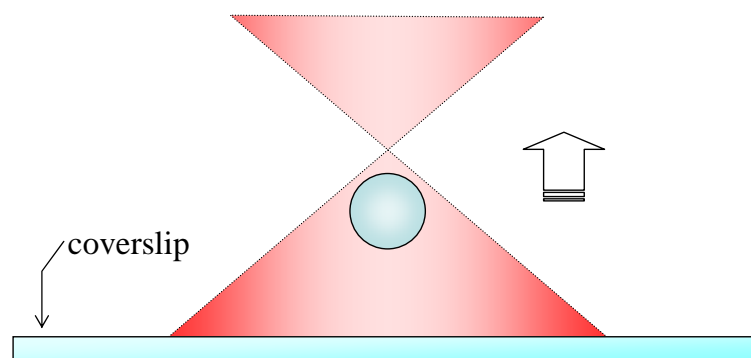


圖 4.1.1 微粒子投影示意圖

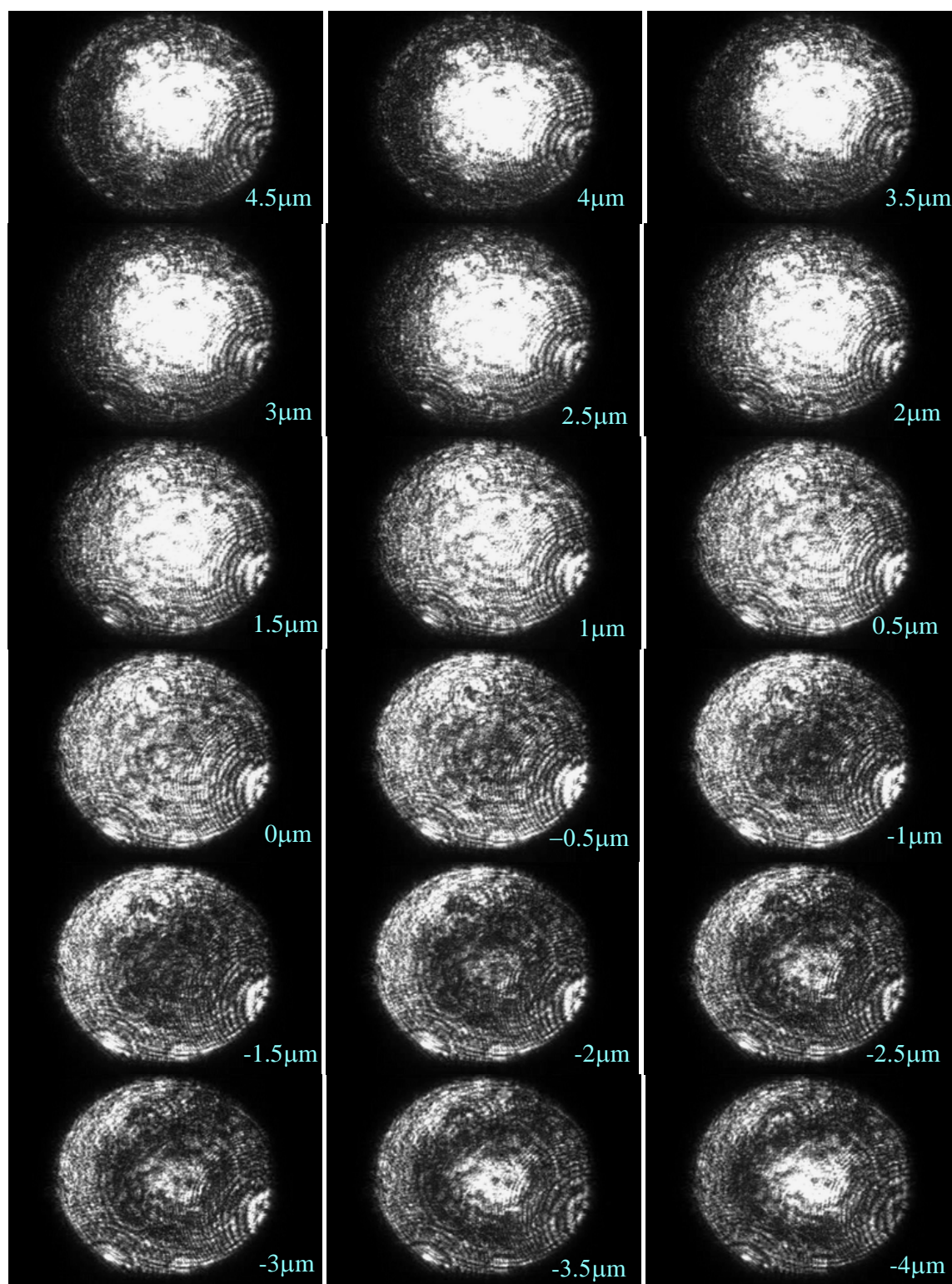


圖 4.1.2 利用 CCD 觀察掃描直徑 3μm 塑膠小珠不同位置的散射光圖樣

4.1.2 四象限光偵測器掃描結果

在上一節中我們利用CCD攝影機來觀察散射光圖樣的變化，而在本節中將利用四象限光偵測器來比較不同的塑膠小珠與雷射光焦點的相對位置下，塑膠小珠掃過雷射光焦點位置時不同的電壓訊號。我們以10 kHz的頻率針對同一顆塑膠小珠重複圖4.1的步驟掃描十次。圖4.1.4為其中一次實驗的結果。如圖4.1.4所示，由塑膠小珠在 $+4.5\text{ }\mu\text{m}$ 到 $+1\text{ }\mu\text{m}$ 的圖樣都可以看到一個類似正弦波的曲線，尤其在 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的位置上可以在中間線性區域得到最大的斜率，並且在這個位置上可以得到波峰、波谷的最大及最小值。當塑膠小珠介於 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 到 $-1\text{ }\mu\text{m}$ 的位置時，四象限光偵測器測量的結果幾乎沒有什麼變化量。而在 $-1.5\text{ }\mu\text{m}$ 以後的位置中，掃描的結果我們可以發現訊號只有微小的變化。

我們比較上一節CCD攝影機觀察的結果，來解釋四象限光偵測器所測量的電壓訊號。首先，第一個部分 $+4.5\text{ }\mu\text{m}$ 到 $+1\text{ }\mu\text{m}$ 的範圍中，因為散射光的圖樣呈現匯聚成一個光點的情形，所以相對的光強度較強，使得四象限光偵測器可以測量到比較大的訊號。如圖4.1.3所示，當塑膠小珠產生偏移時，光斑隨之產生移動的變化也很明顯。所以在第一個部分中可以得到比較好的線性區域訊號。

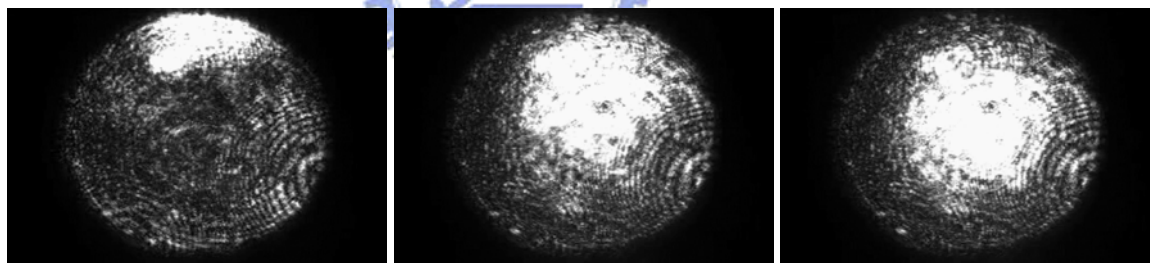


圖 4.1.3 利用 CCD 觀察不同位置散射光圖樣

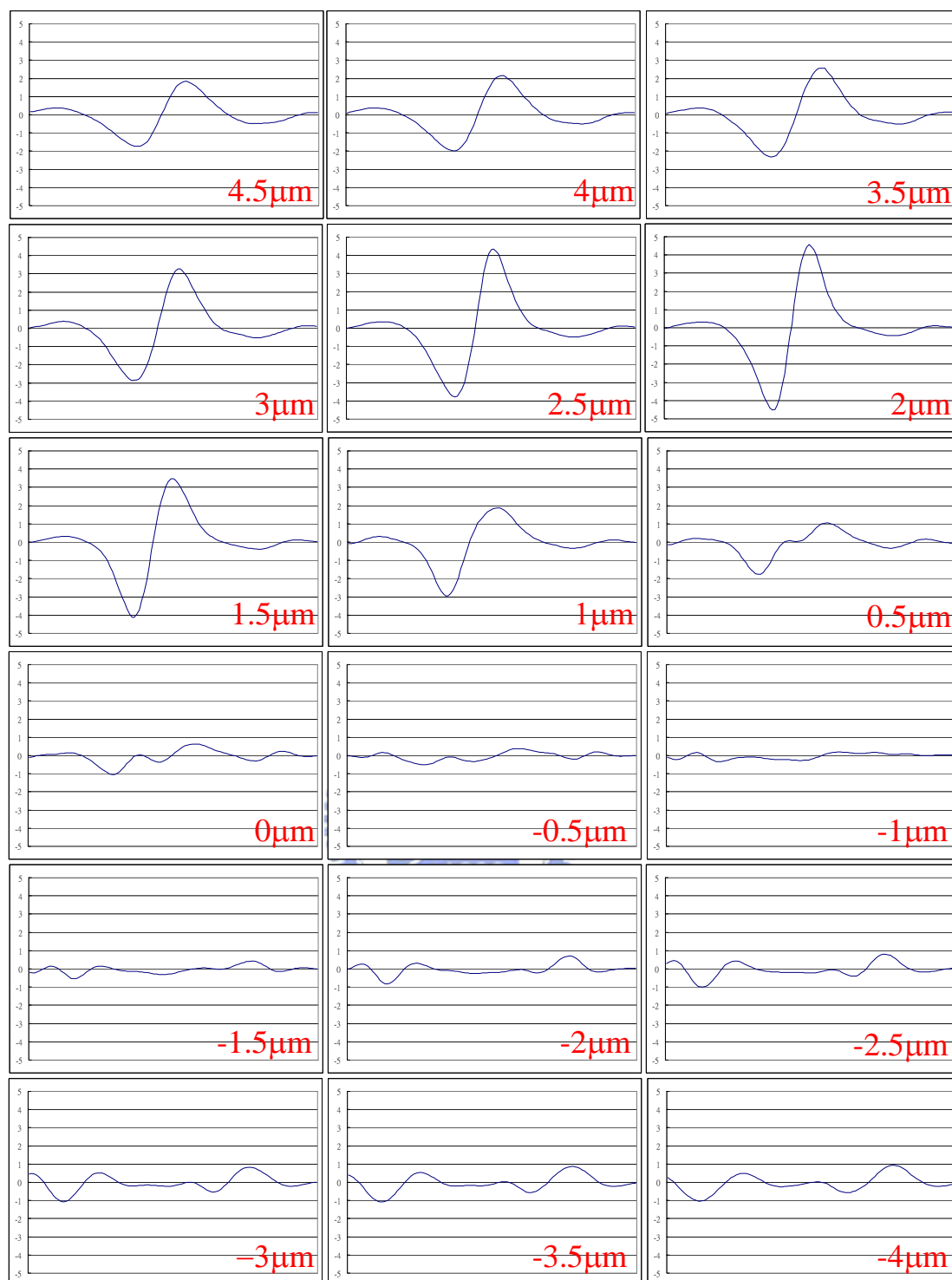
而在第二部分 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 到 $-0.5\text{ }\mu\text{m}$ 的範圍中，因為散射光的圖樣均勻分布在整個視野中，所以當塑膠小珠移動時，光斑的改變並不明顯。導致四象限光偵測器幾乎量測不到訊號的改變。

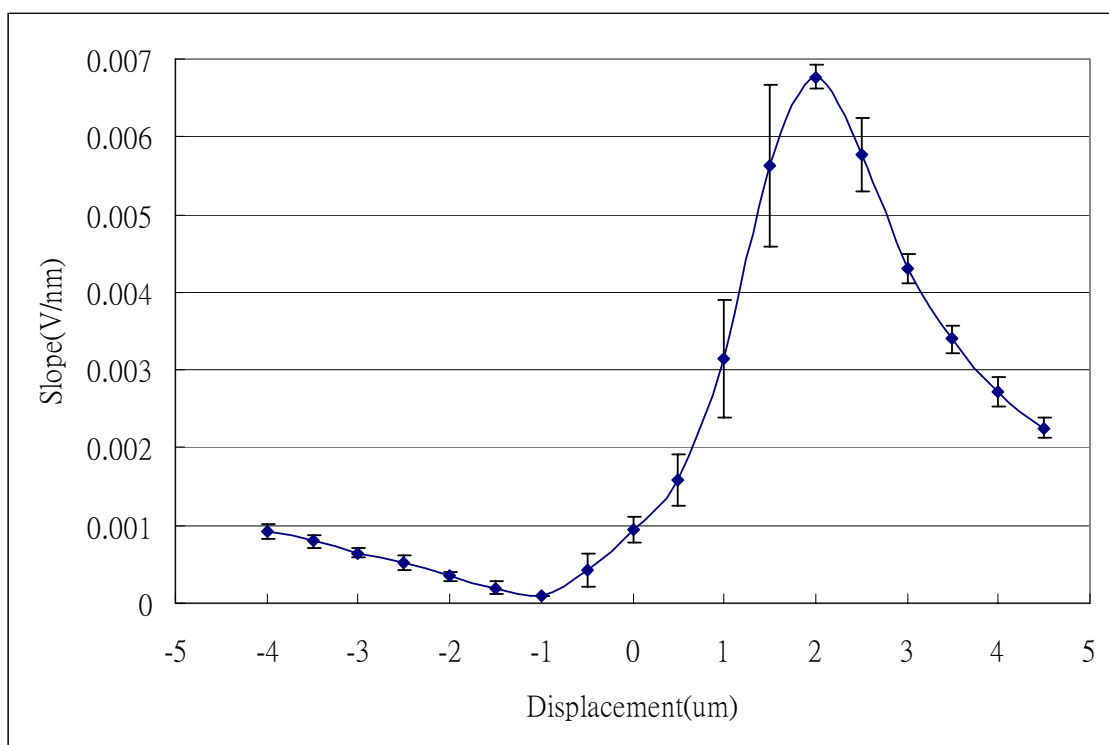
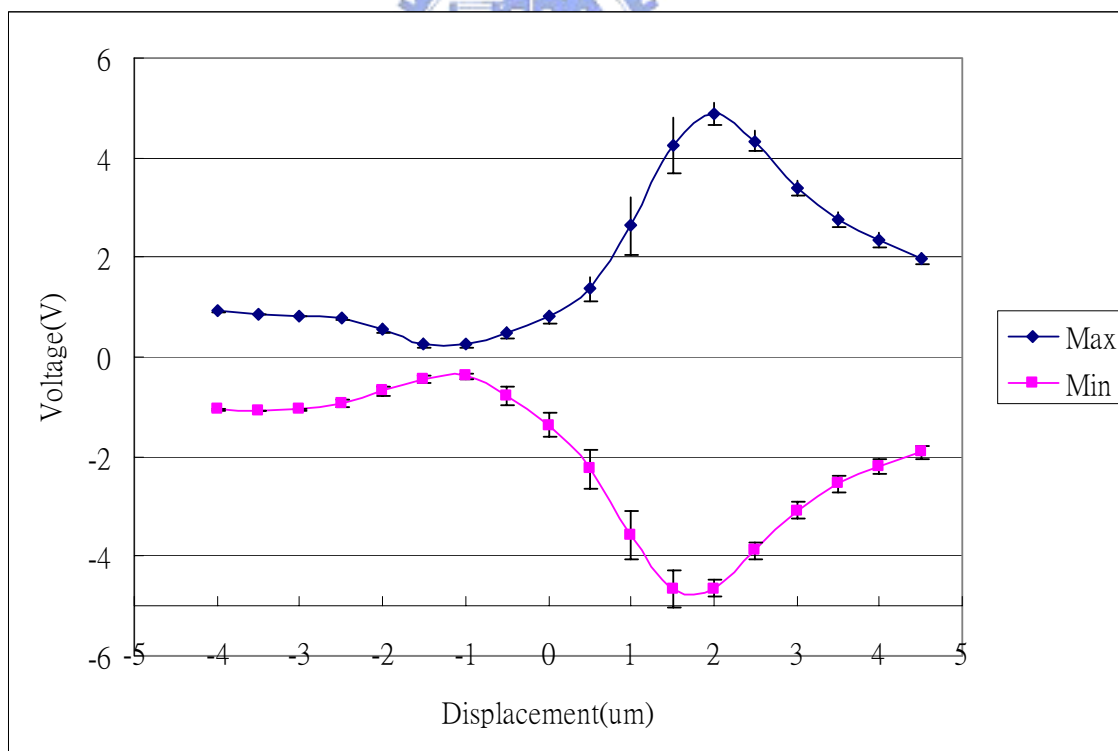
第三部分 $-1\text{ }\mu\text{m}$ 到 $-4.5\text{ }\mu\text{m}$ 的範圍中，我們把散射光的圖樣簡化成為一個光環包圍著一個暗點，所以當這樣的光圖樣掃過四象限光偵測器時，四象限光偵測器會交錯接收到亮紋與暗紋的訊號，所以經過四象限光偵測器測量到的訊號會呈現上下起伏且變化量不大的訊號。

最後我們把針對同一顆塑膠小珠反覆掃描十次的結果平均一起做比較，如圖4.1.5。

如圖4.1.5所示，橫座標代表的是塑膠小珠與雷射光焦點的相對位置，我們以塑膠小珠為雷射鐳夾捕捉中心當作原點，塑膠小珠遠離顯微物鏡的方向為正，反之為負。縱座標為線性區域的斜率。這裡斜率代表的是當塑膠小珠偏移1 nm時，四象限光偵測器所測量到電壓值的改變量。我們可以從圖中發現當塑膠小珠在相對於雷射光焦點+2 μm 的位置時可以得到最大的斜率。而且由圖4.1.6可以發現在同樣的位置上會得到相差最大的極大與小值。所以我們認為當使用直徑為3 μm 的塑膠小珠時探測光束最佳的聚焦位置為雷射鐳夾捕捉中心前2 μm ，這個結果也與我們利用ZEMAX模擬的結果相同。



圖 4.1.4 不同位置掃描直徑 $3\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖

圖 4.1.5 不同位置掃描直徑 3 μ m 塑膠小珠線性區域斜率比較圖圖 4.1.6 不同位置掃描直徑 3 μ m 塑膠小珠之極大極小值比較圖

4.1.3 改變微粒子大小之結果

在上個小節中，我們利用壓電精密移動平台控制直徑為 $3\text{ }\mu\text{m}$ 的塑膠小珠與探測雷射光焦點的相對位置，進而找出了探測光束在光子力顯微鏡是使用 $3\text{ }\mu\text{m}$ 的塑膠小珠時，探測光束最佳的聚焦位置。而在這一節裡中，我們將改變塑膠小珠的大小，並重複之前的實驗來比較不同塑膠小珠的大小對探測光束最佳聚焦位置的影響。

首先，我們把使用的塑膠小珠直徑改為 $6\text{ }\mu\text{m}$ ，同樣的改變塑膠小珠在光行進方向上的位置，每次移動 $1\text{ }\mu\text{m}$ ，總共移動的範圍是 $12\text{ }\mu\text{m}$ 。並在這些位置上做垂直光軸方向的掃描，掃描的步伐為一步 50 nm ，總共掃描的距離也是 $12\text{ }\mu\text{m}$ 。同樣地，我們使用CCD攝影機以及四象限光偵測器兩種方式，來觀察探測光束經過聚光鏡收光後散射光圖樣的變化情形。

圖4.1.7所表示的是利用CCD攝影機觀察的結果。我們可以發現在圖的前部分一樣會呈現雷射光束經過塑膠小珠聚焦而形成較為集中的光斑。所以我們與圖4.1.8四象限光偵測器所偵測的結果比較之後，從塑膠小珠在 $+6\text{ }\mu\text{m}$ 到 $+3\text{ }\mu\text{m}$ 的位置的範圍中，可以清楚發現到我們需要的線性區域訊號。

而 $+1\text{ }\mu\text{m}$ 到 $-3\text{ }\mu\text{m}$ 的範圍中，可以看到散射光圖樣的改變並不太會隨著雷射光焦點與塑膠小珠中心的相對位置的改變而改變，所以在圖4.1.8的掃描結果也看不到訊號有明顯的變化。在圖4.1.7的最後兩張圖中可以看到，散射光的圖樣漸漸變為塑膠小珠經過雷射照射之後的投影，這個現象也可以用圖4.1.1來做相同的解釋，這樣的結果也造成了四象限光偵測器無法利用散射光的圖樣來解析出塑膠小珠的偏移。

最後，我們同樣的去計算圖4.1.8當中每張圖中央線性區域的斜率。從圖4.1.9中，我們可以發現在 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的位置上會得到最大的斜率，並且從圖4.1.10中也可以得到在同樣 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的位置上會有差距最大的極大與極小值。所以我們認為當使用直徑為 $6\text{ }\mu\text{m}$ 的塑膠小珠時探測光束最佳的聚焦位置為雷射鐳夾捕捉中心前 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。這個結果也同樣的與ZEMAX模擬的結果不謀而合。

接下來，我們再把塑膠小珠換成直徑為 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的塑膠小珠並繼續重複上述的實驗。塑膠小珠在光行進方向上的位移，每次移動 150 nm ，總共移動的範圍是 $2.4\text{ }\mu\text{m}$ 。在垂直光軸方向上的掃描的步伐為一步 50 nm ，總共掃描的距離為 $3\text{ }\mu\text{m}$ 。同樣地，使用CCD攝影機以及四象限光偵測器兩種方式來觀察探測光束經過聚光鏡收光後散射光圖樣的變化情形。

圖4.4.11則是利用四象限光偵測器掃描的結果。我們可以發現在改變塑膠小珠與雷射光束聚焦位置的相對位置時，皆可得到類似正弦波形的曲線。再進一步去觀察其線性區域的斜率時，我們發現，塑膠小珠與雷射光束聚焦位置的相對位置在正的方向時，四象限光偵測器的響應還是可以得到較大的斜率。因此，我們認為既使在塑膠小珠的尺寸小於幾何光學的範疇時，利用探測光束並將其光束焦點聚焦於雷射鐳夾捕捉中心前的位置時；利用偵測探測光束打在塑膠小珠的散射光時，四象限光偵測器仍然可以得到很好的響應。



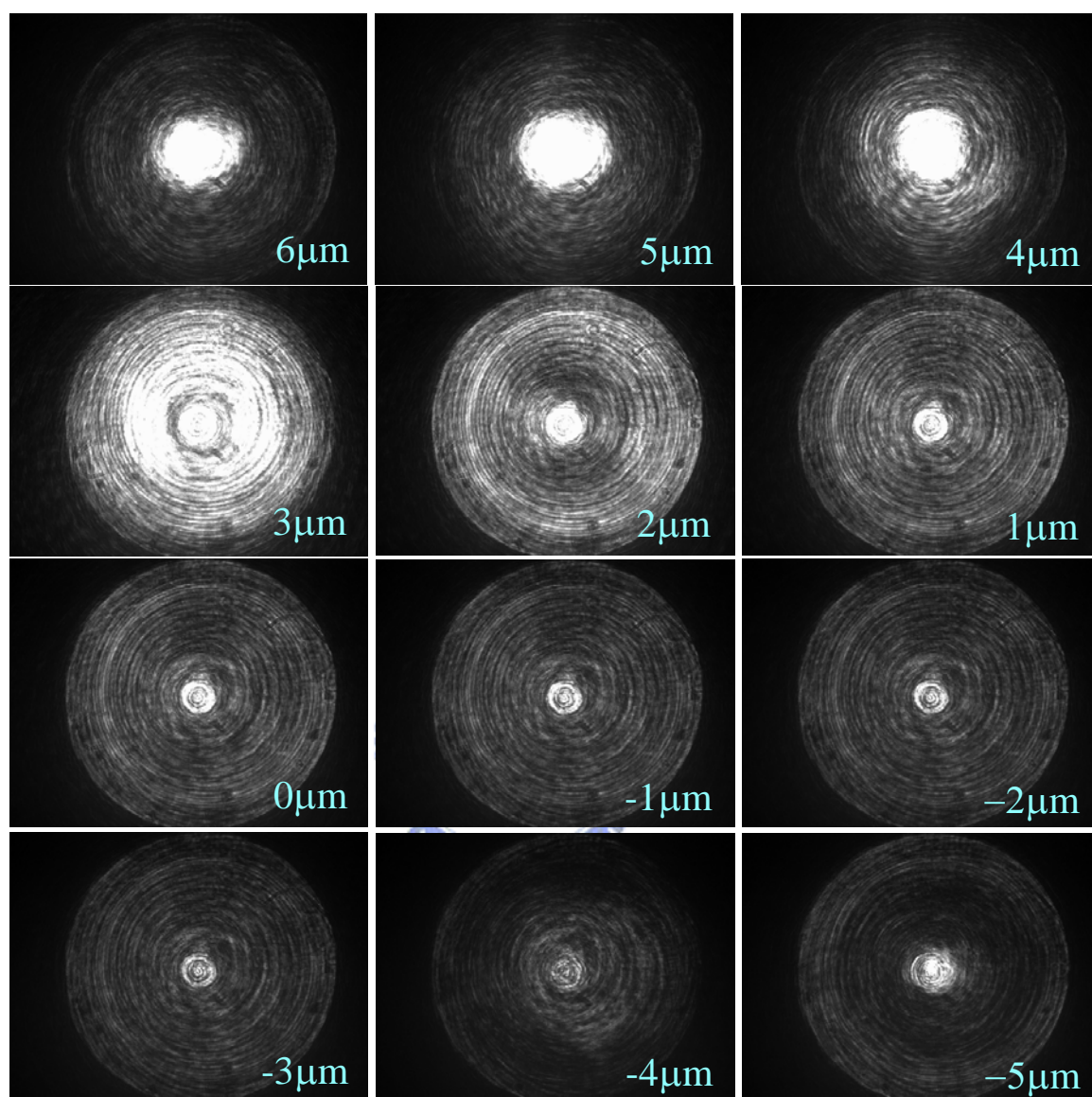
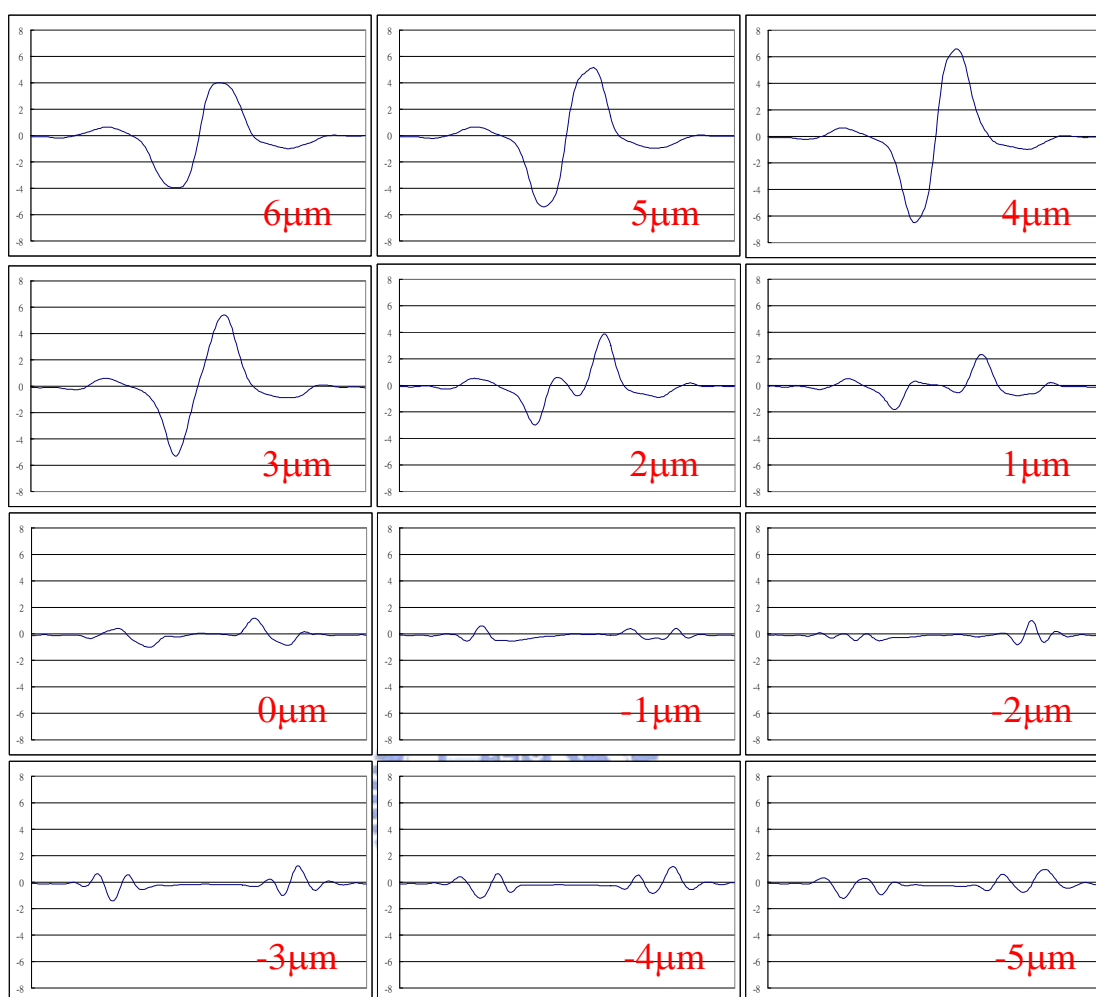
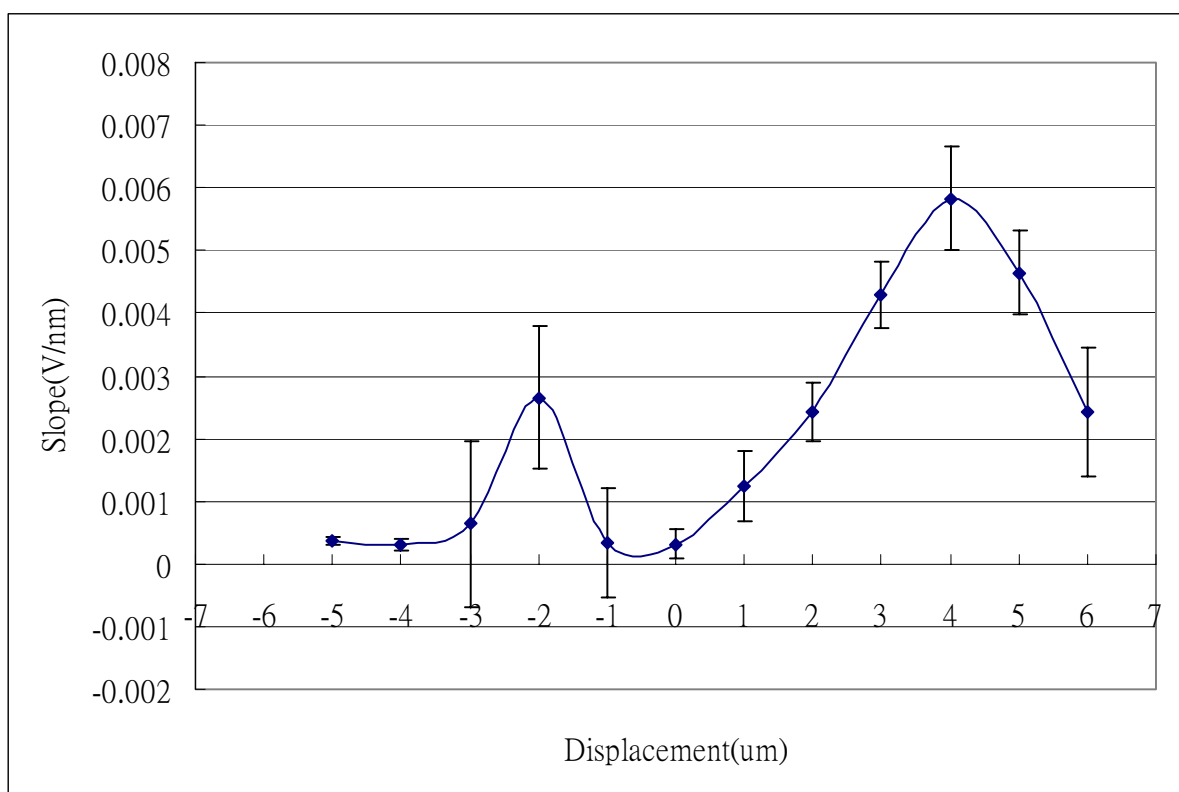
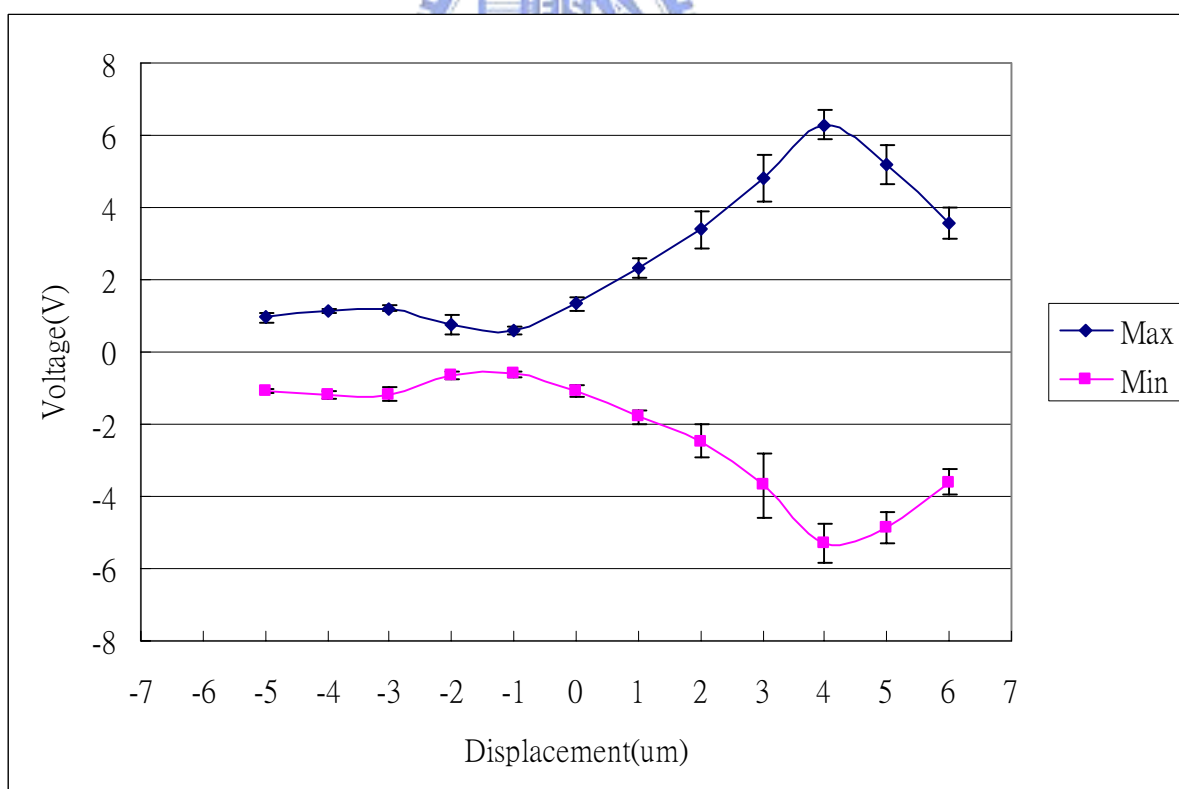
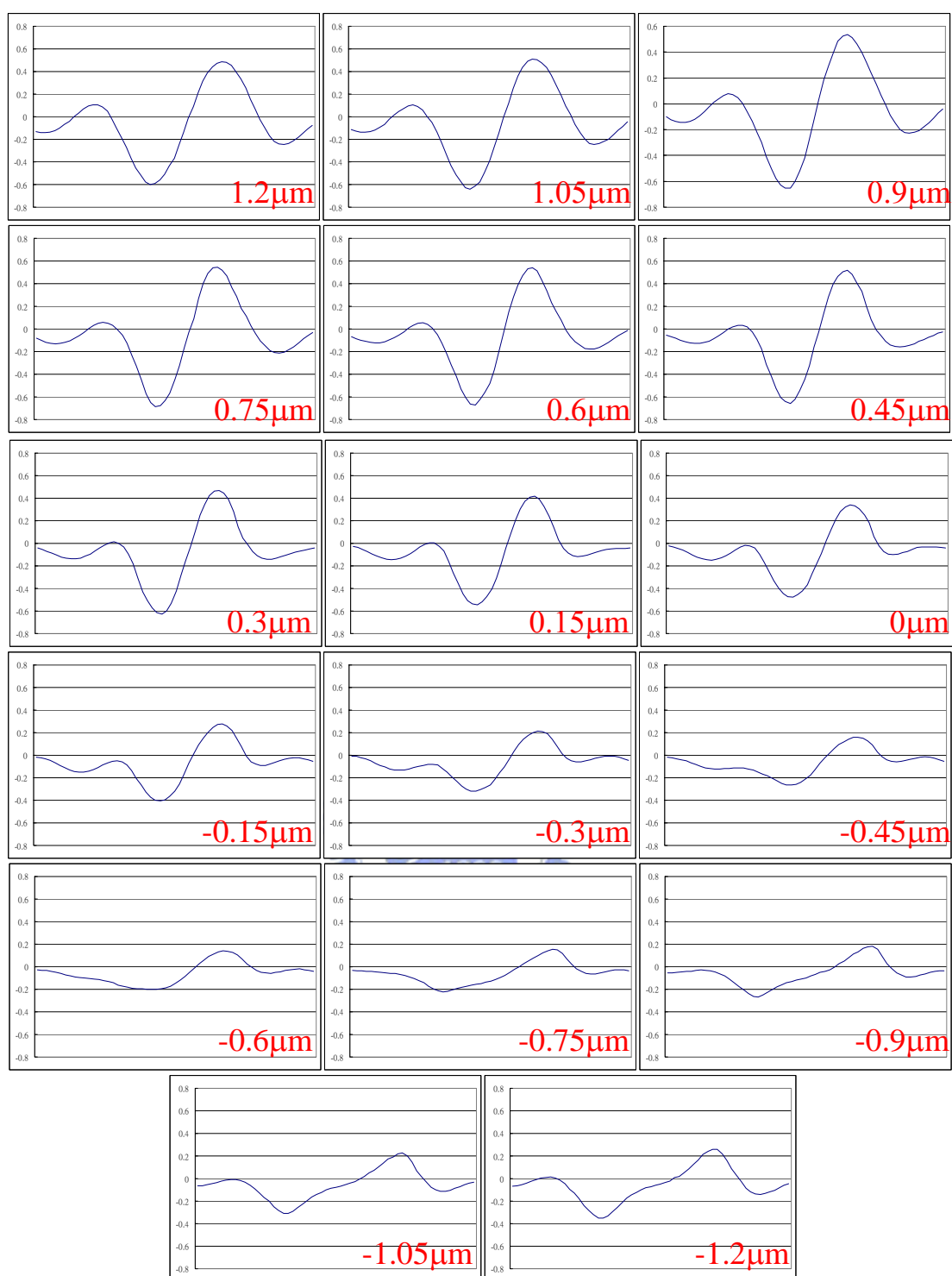
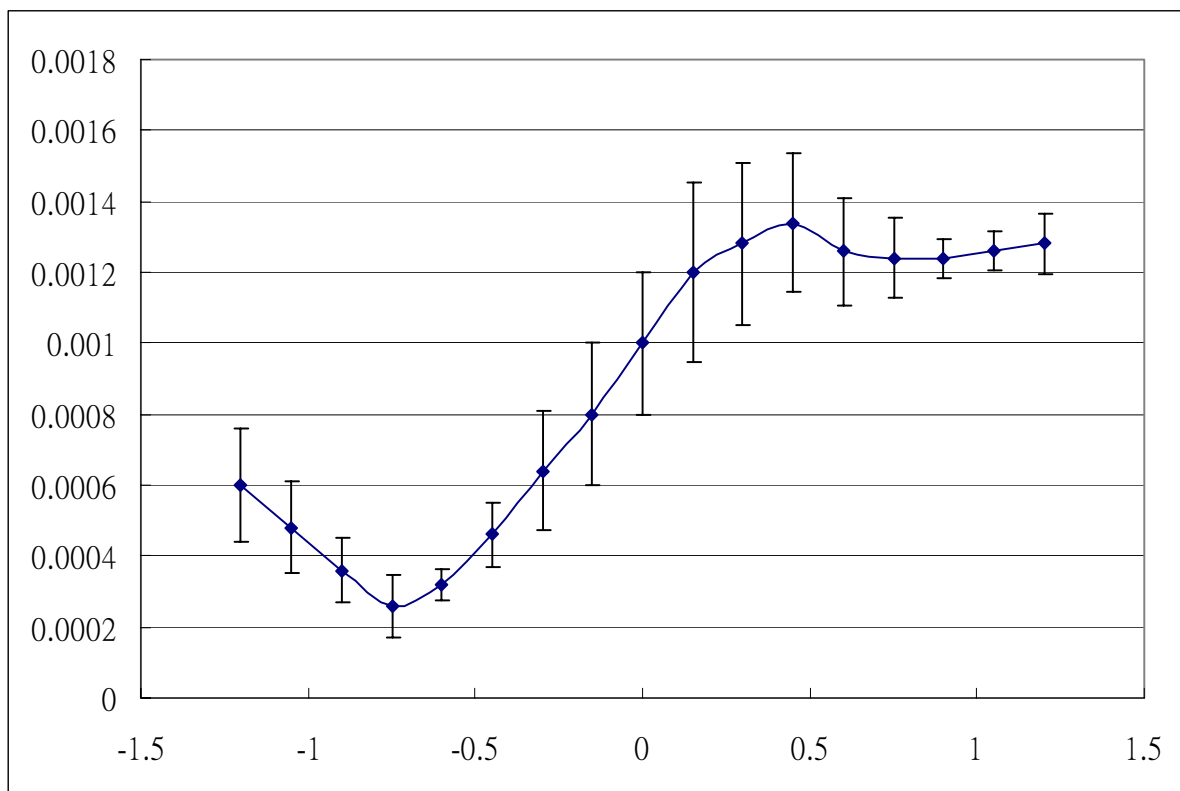
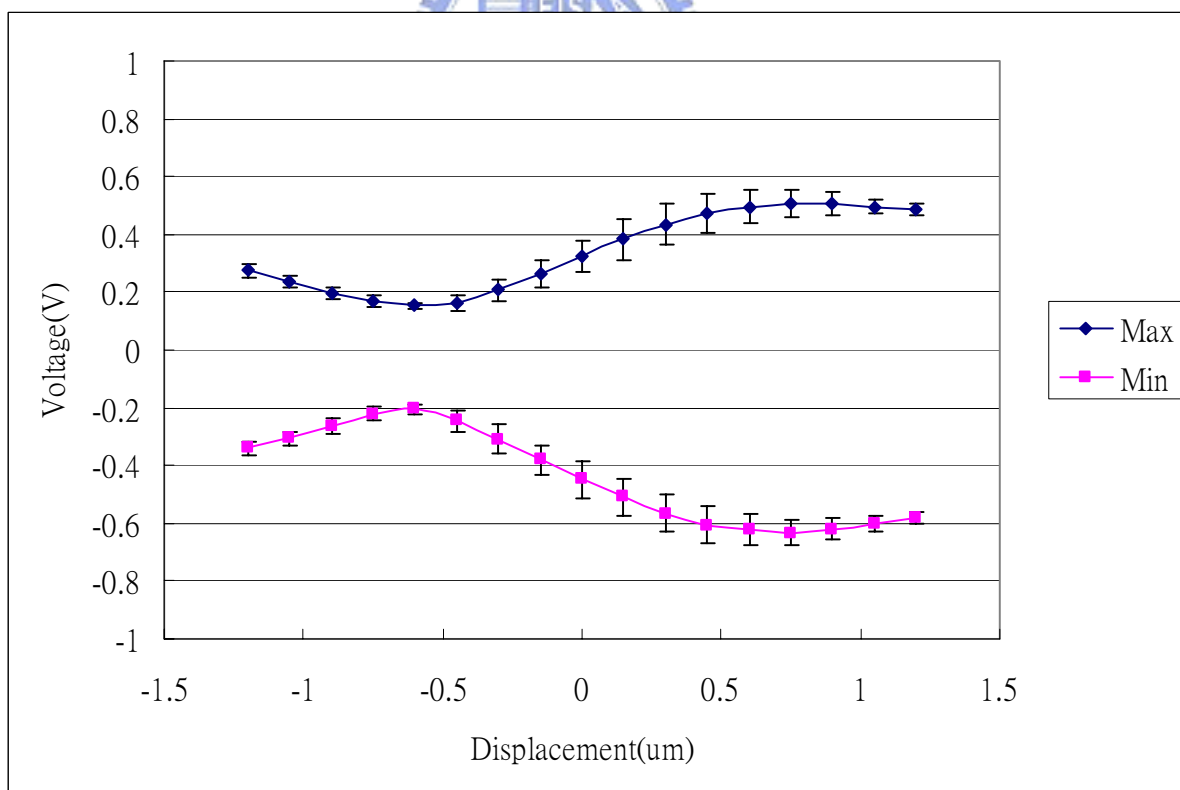


圖 4.1.7 利用 CCD 觀察掃描直徑 $6\mu\text{m}$ 塑膠小珠不同位置的散射光圖樣

圖 4.1.8 不同位置掃描直徑 $6\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖

圖 4.1.9 不同位置掃描直徑 6 μ m 塑膠小珠線性區域斜率比較圖圖 4.1.10 不同位置掃描直徑 6 μ m 塑膠小珠之極大極小值比較圖

圖 4.1.11 不同位置掃描直徑 $1\mu\text{m}$ 塑膠小珠 QPD 訊號圖

圖 4.1.12 不同位置掃描直徑 1 μ m 塑膠小珠線性區域斜率比較圖圖 4.1.13 不同位置掃描直徑 1 μ m 塑膠小珠之極大極小值比較圖

4.2 光子力顯微鏡之空間解析度

經過以上的實驗之後，可以知道當我們要利用不同大小的塑膠小珠時探測光束最佳的聚焦位置。針對我們新架設的探測光束式光子力顯微鏡，我們將使用直徑為 $3\mu\text{m}$ 的塑膠小珠，在完成光路的調教之後，首先我們必須進行系統解析度的校正。這裡所謂的解析度是指利用探測光束以及四象限光偵測器可以解析塑膠小珠偏移的能力。

首先說明我們如何校正光子力顯微鏡的解析度：我們利用移動平台控制固定在樣品中的塑膠小珠，再由四象限光偵測器所偵測到的電壓訊號來跟移動平台的步伐做比較得出系統的解析度。由圖4.2.1所示，橫座標代表的是時間軸，縱座標則代表電壓訊號。這張圖代表的意義是在垂直光軸的方向，隨著時間一步一步改變塑膠小珠的位置，再由四象限光偵測器量測得到的電壓訊號。

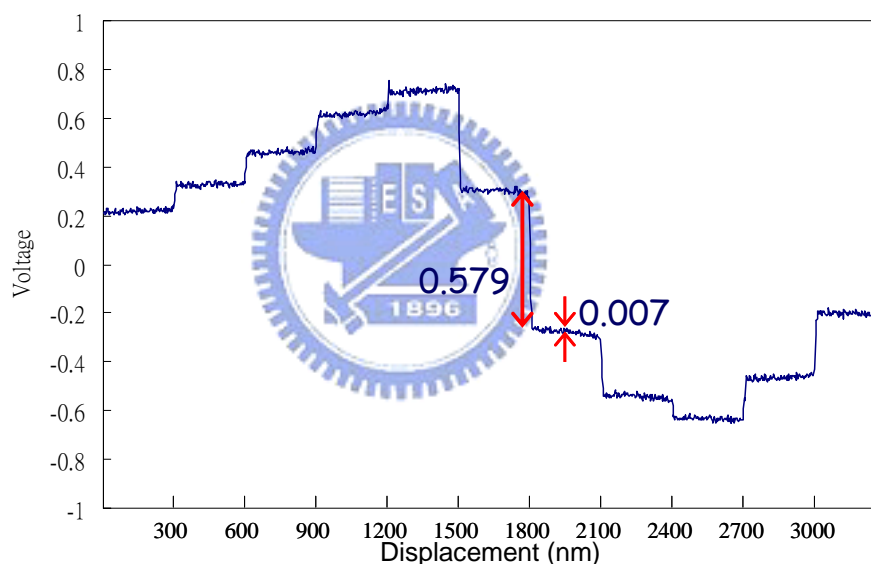


圖 4.2.1 光子力顯微鏡解析度分析圖

我們控制移動平台的步伐為每步 300 nm ，在圖4.2.1最中間一步的移動裡電壓訊號改變 0.579 V 。然而，在每一步中間停留的時間所量測到訊號的改變量為 0.007 V ，我們將這個改變量視為電子的雜訊。我們利用4.2.1式的計算可以得到我們探測光束式光子力顯微鏡的解析度為 3.63 nm 。

$$\begin{aligned} 0.579(\text{V}) : 300(\text{nm}) &= 0.007(\text{V}) : x(\text{nm}) \\ \therefore x &= 3.63(\text{nm}) \end{aligned} \quad (4.2.1)$$

同樣的實驗重複數次之後，我們可以認定這套光子力顯微鏡的系統解析度在 10 nm 之下。所以接下來我們即可利用這套系統來進行光彈簧係數的校正。

4.3 光彈簧係數之校正

在計算出這套探測光束式光子力顯微鏡之後，要進行的是光彈簧係數 k 的校正。我們可以把雷射鐳夾簡化看成一個三維的光學彈簧，所以與虎克定律 $f=-kx$ 相似。當被捕捉的塑膠小珠與雷射鐳夾捕捉中心產生位移時，其位移乘上光彈簧係數即是雷射鐳夾的恢復力。所以我們可以藉由能量光譜密度的方法來得到這套探測光束式光子力顯微鏡的光彈簧係數。

首先，我們使用雷射鐳夾捕捉一顆直徑為 $3\mu\text{m}$ 的塑膠小珠。再利用四象限光偵測器以 50kHz 的掃描頻率連續紀錄5秒鐘，量測塑膠小珠因為水分子撞擊而產生的布朗運動。我們改變不同的雷射功率量測塑膠小珠的布朗運動，分別在每個功率下測量二十組以上的數據。最後，再用程式計算其能量光譜密度進而求出各種功率下的光彈簧係數。由圖4.3.1所示，橫座標為雷射光的功率，縱座標為光彈簧係數。圖中的兩條趨勢線分別代表垂直光軸方向面上 x 方向以及 y 方向的光彈簧係數。在校正出雷射鐳夾的光彈簧係數後，這套探測光束式光子力顯微鏡就正式架設完成。

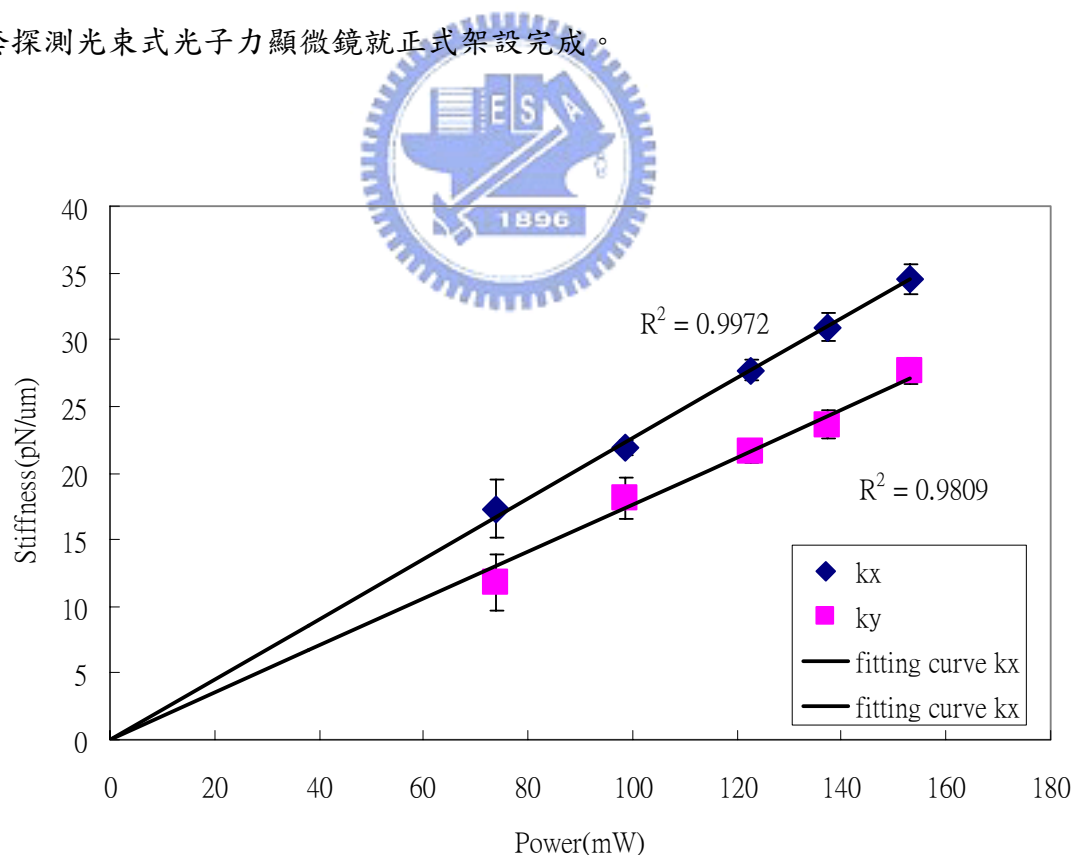


圖 4.3.1 光彈簧係數與雷射功率關係圖

4.4 光彈簧係數量測法

在校正出雷射鐳夾系統的光彈簧係數後，我們即可將這套離焦探測光束式光子力顯微鏡應用在各種領域上。本節中，我們使用光彈簧係數法來比較不同情況下塑膠小珠所受到的光彈簧係數。

如圖4.4.1所示，首先，我們分別將直徑 $3\mu\text{m}$ 以及 $6\mu\text{m}$ 的塑膠小珠塗佈上膠原蛋白，並置入樣品中。接著，如圖(a)我們測量一顆直徑 $3\mu\text{m}$ 的塑膠小珠被雷射鐳夾捕捉之後受到的光彈簧係數 k 。其次，我們將同一顆塑膠小珠移動並黏附到一顆直徑為 $6\mu\text{m}$ 的塑膠小珠上。最後，我們再量測一次直徑為 $3\mu\text{m}$ 塑膠小珠所受到的力彈簧係數 k' 。

簡易來說，塑膠小珠受到膠原蛋白黏附住之後，其所受到的力彈簧係數會有所改變。其改變的原因是因為， k' 是原來的光彈性係數 k 與黏附力彈性係數的並聯，所以 $k' - k = \Delta k$ 代表的則是黏附力的彈性係數。我們將前後量測到的彈簧係數 k 與 k' 做一比較，並由 $\Delta k = k' - k$ 可得到塑膠小珠所受到彈簧係數的改變，進而得到黏附力的彈簧係數。從實驗中我們得到塑膠小珠受到膠原蛋白黏附之後，所受到彈簧係數的改變 Δk 大約佔原本雷射鐳夾光彈簧係數的40%。從這個實驗我們確定了光彈簧係數量測法的可行性，也印證了這套系統可以進行更多相關的研究。

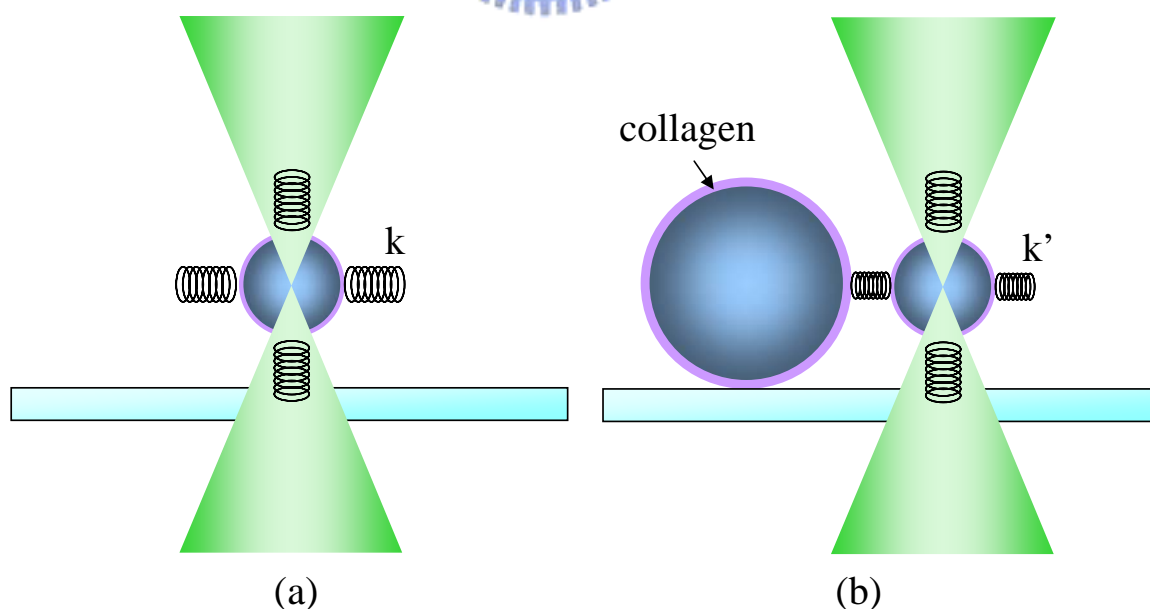


圖 4.4.1 光彈簧係數量測法