

國立臺灣大學理學院物理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Physics

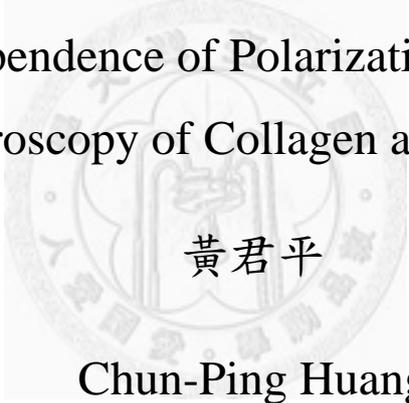
College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

應用相異波長偏振二倍頻顯維術於膠原蛋白與肌肉纖維

Wavelength Dependence of Polarization Second Harmonic  
Generation Microscopy of Collagen and Muscle Fiber



黃君平

Chun-Ping Huang

指導教授：董成淵 博士

Advisor: Chen-Yung Dong, Ph.D.

中華民國 102 年 5 月

May, 2013

## 誌謝

碩班念到現在也快四年了，回想起過去第一年全新的修課，碩二與碩三則是一邊教書一邊念書，晚上到實驗室做實驗，到現在碩四服替代役時，假日或平日有空到 LAB 取實驗 data，晚上睡在實驗室的「躺椅」，忙碌的生活成為我珍貴的回憶。但這麼累的日子，暫時是不想再過一次了.....

論文的完成首要感謝不斷費心指導我的董老師，即使我的時間很難配合，仍在假日或晚上抽空與我討論實驗進度，也在嘗試許多不同題目後給了我最後的論文題目方向，讓我得以在今日順利口試；另外要感謝實驗室大美女-小美學姐，若不是她常常撥空和我討論相關細節，以及給予我實驗技術上的指導，今天是沒辦法完成這本論文的；此外實驗室的大學長-志儒帥哥，除了陪我丟球以外，也給了許多研究上的經驗以及實驗技術指導，讓我收穫不少；助理-康薇美女，替我處理許多麻煩的雜事，也謝謝實驗室其他人包容我常常沒預約就在晚上做實驗。

最後要謝謝我的家人與女友，不斷的支持與鼓勵我，由其是我的女友宇平，沒有你、我不會順利考上老師，沒有你、我不會堅持下去做實驗，沒有你、我不會有機會完成這本論文，有了你的包容、鼓勵與諒解，我才得以走到今日，願往後的日子與妳一同陪伴，分享人生的喜、怒、哀、樂。

## 中文摘要

近年來，偏振二倍頻顯維術逐漸受到重視，利用不同的線偏振光產生二倍頻訊號來分析材料結構，成為非線性光學上的重要研究方法。而材料的二階極化率與其結構密切相關，研究不同材料的二階極化率可用來增加彼此的影像對比程度。

實驗上我們旋轉半波片與四分之一波片，取得線偏振光，因為分光鏡也會影響雷射光的偏振特性，造成雷射功率改變，實驗前先測量螢光劑的螢光強度當成校正功率的工具。

針對大鼠尾巴肌腱、大鼠氣管軟管、大鼠腿部肌肉，其分子理論模型都是圓柱對稱，二階極化率只有三個獨立變數，且上述樣品的自然共振波長約在 200nm ~ 300nm 左右，實驗的雷射波長在 700nm ~ 900nm，故我們引入了 Kleinman Symmetry 條件，當材料的自然共振頻率遠高於入射光頻率時，其二階極化率張量不隨入射光頻率而改變。本論文從廣義的非中心對稱材料的位能出發，得到電子在三維系統的自然共振頻率、入射光頻率及二階極化率張量的關係，並測量上述三種材料在不同波長下的二階極化率比值趨近一定值，驗證了在 700nm ~ 900nm 的波長範圍下，這三種生物材料使用圓柱對稱及 Kleinman Symmetry 假設條件的理論模型值得相信。

關鍵字： 偏振二倍頻、Kleinman Symmetry、膠原蛋白、肌肉纖維、二階極化率

# ABSTRACT

Recently, the polarization-resolved Second Harmonic Generation (SHG) microscopy has gained much attention from researchers in the field of non-linear optics and becoming an important researching method. The second order susceptibility( $\chi^{(2)}$ ) is closely related to material structure. The  $\chi^{(2)}$  in different materials can used to enhance the contrast of SHG images.

The linear polarization light is usually be done by rotating the half-wave plate and quarter-wave plate. However, the dichroic mirror also alters the power of laser. Therefore, in this study, we measured the two-photon fluorescence of a fluorescent agent(0.5mg/ml,sulforhodamine b,s1420-5g) to calibrate the change of SHG signal.

The structure of rat-tail tendons(RTT), rat-trachea cartilages(RTC), and rat-leg muscles(RLM) are based on the cylindrical symmetry theory. There have only three independent variables of  $\chi^{(2)}$ . The natural resonance frequency of RTT,RTC,RLM are about 200nm ~ 300nm, and the excitation laser wavelength is about 700nm ~ 900nm. The Kleinman Symmetry assumption was adopted in this study to hold  $\chi^{(2)}$  as a constant. By introducing the general potential of non-centrosymmetric material, it was found that the  $\chi^{(2)}$  ratio of RTT, RTC, and RLC with different wavelengths are approaching constants in the three dimension system.These results suggested that applying the hypothesis of the cylindrical model and Kleinman Symmetry to such materials is suitable.

keywords: Second Harmonic Generation · Kleinman Symmetry · Collagen · Muscle fiber · Second Order Susceptibility.

# 目錄

誌謝 .....	i
中文摘要 .....	ii
ABSTRACT .....	iii
目錄 .....	iv
Chapter 1 研究簡介 .....	1
Chapter 2 實驗原理 .....	3
<b>2.1 二倍頻原理 .....</b>	<b>3</b>
基本原理 .....	3
內在交換對稱 (Intrinsic permutation symmetry) .....	5
簡化符號 (Contracted notation) .....	6
<b>2.2 二倍頻顯微術 .....</b>	<b>7</b>
光學解析度 .....	7
鎖模雷射光源(mode-locked laser) .....	9
<b>2.3 具圓柱對稱材料理論模型 .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 分光鏡造成的相位偏移修正 .....</b>	<b>13</b>
分光鏡原理 (Dichroic mirror principle) .....	13
修正分光鏡造成的相位偏移 .....	14
<b>2.5 Kleinman Symmetry .....</b>	<b>19</b>
Chapter 3 實驗材料 .....	24

3.1	<b>膠原蛋白 (Collagen)</b> .....	24
3.2	<b>肌肉纖維</b> .....	28
Chapter 4	<b>實驗設計與方法</b>	30
4.1	<b>儀器架設</b> .....	30
4.2	<b>材料準備</b> .....	32
4.3	<b>實驗分析方法</b> .....	35
Chapter 5	<b>實驗結果與討論</b> .....	36
Chapter 6	<b>結論與未來方向</b> .....	46
REFERENCE	.....	47



## 圖目錄

圖 2-1 位能與位置的關係圖 .....	3
圖 2-2 Airy disk[8] .....	7
圖 2-3 (a)可以鑑別(b)恰可鑑別(c)無法鑑別 .....	7
圖 2-4 經透鏡產生之繞射條紋 .....	8
圖 2-5 脈衝雷射功率與時間的關係 .....	9
圖 2-6 (a)兩個波合成(b)三個波合成(c)十個波合成[9] .....	10
圖 2-7 鎖模雷射強度與頻譜關係 .....	10
圖 2-8 入射電場與膠原蛋白示意圖 .....	11
圖 2-9 雷射光進入樣品深度示意圖 .....	12
圖 2-10 分光鏡透射與反射示意圖 .....	13
圖 2-11 分光鏡造成相位偏移示意圖 .....	14
圖 2-12 確認不同方向的線偏振光角度示意圖 .....	16
圖 2-13 光強度與偏振光角度 .....	17
圖 2-14 二倍頻訊號隨著不同角度的線偏光改變 .....	18
圖 3-1 軟骨組織成分[12] .....	25
圖 3-2 膠原蛋白纖維示意圖[14] .....	26
圖 3-3 膠原蛋白分子排列與 D period 示意圖[15] .....	27
圖 3-4 第一類膠原蛋白在穿透式電子顯微鏡下的影像[16] .....	27
圖 3-5 肌肉纖維的橫紋圖樣[17] .....	28
圖 3-6 肌肉纖維組成示意圖[18] .....	28
圖 3-7 肌凝蛋白(myosin)示意圖[19] .....	29
圖 4-1 偏振二倍頻實驗架設圖 .....	30

圖 4-2(a)(b) rat-tail tendon 樣品製作流程 .....	32
圖 4-3 fresh rat-trachea cartilage .....	33
圖 4-4 軟骨結構(a)大鼠氣管外觀示意圖(b)氣管橫切面結構示意圖 .....	33
圖 4-5 大鼠大腿肌肉冷凍切片 .....	34
圖 5-1 rat-tail tendon 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 780nm .....	36
圖 5-2 rat-trachea cartilage 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 745nm.....	36
圖 5-3 rat-leg muscle 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 780nm.....	37
圖 5-4 (a)(b)(c)為單點 fitting 曲線(d)(e)(f)箭頭標示的紅點即為單點 fitting 區域...38	
圖 5-5(a)SHG image of tendon at 780nm(b) $d_{33}/d_{31}$ value(c) $d_{33}/d_{31}$ histogram (d) $d_{15}/d_{31}$ value(e) $d_{15}/d_{31}$ histogram .....	39
圖 5-6(a)SHG image of trachea at 740nm(b) $d_{33}/d_{31}$ value(c) $d_{33}/d_{31}$ histogram (d) $d_{15}/d_{31}$ value(e) $d_{15}/d_{31}$ histogram .....	40
圖 5-7(a)SHG image of muscle fiber at 750nm(b) $d_{33}/d_{31}$ value(c) $d_{33}/d_{31}$ histogram (d) $d_{15}/d_{31}$ value(e) $d_{15}/d_{31}$ histogram .....	41
圖 5-8 rat-tail tendon 在不同波長的 $d_{33}/d_{31}$ 與 $d_{15}/d_{31}$ .....	42
圖 5-9 rat-trachea cartilage 在不同波長的 $d_{33}/d_{31}$ 與 $d_{15}/d_{31}$ .....	43
圖 5-10 rat-leg muscle fiber 在不同波長的 $d_{33}/d_{31}$ 與 $d_{15}/d_{31}$ .....	44

## 表目錄

表 2-1 簡化符號表.....	6
表 3-1 組織中存在的各類膠原蛋白[13].....	26



# Chapter 1 研究簡介

近年來，非線性光學中的二倍頻顯微術（Second Harmonic Generation Microscopy）廣泛的應用在觀察生物樣本組織，如：第一類膠原蛋白（Type I collagen）、第二類膠原蛋白（Type II collagen）、肌原纖維（myofibril），這些具有非中心對稱（noncentrosymmetric）結構的材料，進而分析上述材料在結構上的差異[1,2]。二倍頻顯微術最大的優點在於，可以使用較低能量的光子進行實驗，如此可減低對樣品的傷害，而且只有焦點附近的區域才有二倍頻產生，可達到光學切片的效果。

我們使用的方法是，藉由旋轉半波片（half-wave plate）及四分之一波片（quarter-wave plate），使得在同一平面上產生不同方向的線偏振（Linear-Polarization）脈衝飛秒雷射光源（pulse femtosecond laser）。當不同方向的線偏振光射入材料中，我們發現由材料產生的二倍頻（SHG）訊號有強弱差異，藉由二倍頻訊號強度隨著不同方向的線偏振光而改變，可以獲得材料的二階非線性極化率張量  $\chi_{ijk}^{(2)}$ （second-order susceptibility tensor elements）[20,23]。

實驗結果顯示，雖然第一類膠原蛋白與第二類膠原蛋白都屬於纖維絲狀結構（fibrillar structure）且具有圓柱對稱性，但第一類膠原蛋白的分子是由兩條  $\alpha 1$  多胜肽鏈（poly-peptide）與一條  $\alpha 2$  多胜肽鏈所形成的三股螺旋結構，而第二類膠原蛋白分子則是由三條  $\alpha 1$  多胜肽鏈形成的三股螺旋結構[3]。因此造成二階極化率張量  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的差異，藉由  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的差異，可以直接利用光學方法分辨組織中第一類及第二類的膠原蛋白結構，而不需用其他染色標定的方法，減低對樣品的傷害[21]。

雖然二階極化率張量  $\chi_{ijk}^{(2)}$  有助於判斷材料結構特性，但數學處理上也相對線性光學系統複雜。在線性系統中，其極化向量（Polarization） $P_i = \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)} E_j$ ，其  $\chi_{ij}^{(1)}$  稱為線性極化率（linear susceptibility），可看出  $\chi_{ij}^{(1)}$  是一個二階張量，即  $3 \times 3$  的矩陣，且最多可以有九個分量來描述。但  $\chi_{ijk}^{(2)}$  是一個三階張量，允許有 27 個分量存在，造成數學計算上的困難。

如果針對第一類及第二類膠原蛋白、肌原纖維 (myofibril) 等，結構上具有圓柱對稱 (cylindrical symmetry) 的材料，其  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的 27 個分量不全然是獨立變數，可以使得理論模型得到進一步的簡化[4,5]。另外我們使用的雷射光源波長為 780 奈米，而膠原蛋白及肌肉纖維的自然共振波長約在 200~300 奈米左右[6,31,32]，若激發光源波長遠大於材料的自然共振波長 (即：激發頻率遠小於自然共振頻率)，則可引入  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的克萊曼對稱性 (Kleinman's Symmetry [註]：此後以英文稱之)。而 Kleinman symmetry 條件為  $\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)} = \dots = \chi_{kij}^{(2)}$ ，任意交換下標的位置， $\chi_{ijk}^{(2)}$  的值保持不變，若材料只考慮 Kleinman symmetry，可將  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的 27 個獨立變數合併成只有 10 個獨立變數，如此一來更容易建立模型並驗證理論。

本論文使用不同波長 (700 奈米~900 奈米) 的激發雷射光源，並且調整半波片及四分之一波片，使線偏振的激發雷射光射入材料中，實驗材料有第一類膠原蛋白、第二類膠原蛋白、肌原纖維 (myofibril) 等三種，利用倒立式的顯微鏡 (Inverted Microscope) 收集上述材料產生的二倍頻 (SHG) 訊號，並計算在不同波長下、不同材料的二階非線性極化率，以驗證 Kleinman symmetry 的正確性。

實驗使用的雷射波長從 700 奈米到 900 奈米，皆無法使材料 (type I、type II collagen、myofibril) 產生明顯共振效應，即偏振光源不會造成材料中電子的能階躍遷，故理論預測  $\chi_{ijk}^{(2)}$  在不同波長之下，應要維持一定值。而本實驗結果也顯示  $\chi_{ijk}^{(2)}$  在測量誤差範圍內，是可以視為一定值，與波長無關，確立了本實驗室使用的波長範圍下，配合圓柱對稱結構及 Kleinman symmetry，所進行的偏振二倍頻顯微術，其結果值得相信。

## Chapter 2 實驗原理

### 2.1 二倍頻原理

#### 基本原理

二倍頻最早是在 1961 年被發現，而在 1971 年第一次利用二倍頻技術觀察生物組織[4]。二倍頻是一非線性的光學現象，當入射光的電場足夠強時，材料產生的極化向量  $\bar{P}(t)$  不再只與入射電場成正比。從古典力學的角度出發，我們可以將材料中的束縛電子視為處在一位能阱中運動，並且在外來電場的干擾下，在平衡位置附近運動，簡單考慮一維直線的束縛電子，若其位能為  $U(x)$ ，平衡位置為  $x_0$ ，則可將位能  $U(x)$  以  $x_0$  做展開：

$$U(x) = U(x_0) + U'(x_0) \cdot x + \frac{1}{2!} U''(x_0) \cdot x^2 + \frac{1}{3!} U'''(x_0) \cdot x^3 + \dots \quad (2-1)$$

選取位能零點，令  $U(x_0) = 0$ ，並取前兩項作為位能的近似，即：

$$U(x) = \frac{1}{2!} U''(x_0) \cdot x^2 + \frac{1}{3!} U'''(x_0) \cdot x^3 = ax^2 + bx^3 \quad (2-2)$$

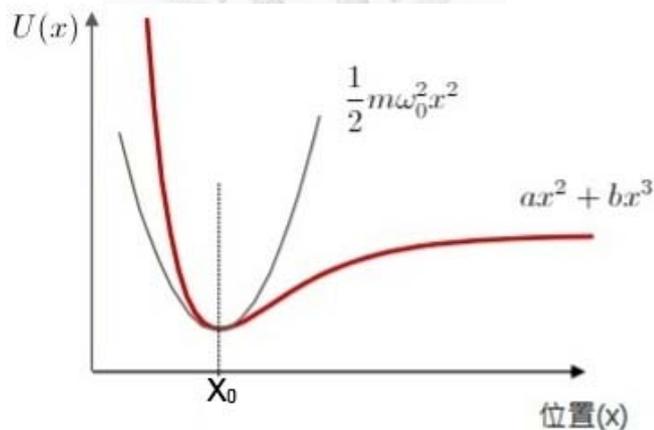


圖 2-1 位能與位置的關係圖

由上式可知，「 $ax^2$ 」表示一中心對稱的簡諧位能阱，「 $ax^2 + bx^3$ 」表示非中心對稱簡諧位能，如圖 2-1 所示，若一材料在電場夠大的情形下能產生二倍頻訊號

(SHG)，通常  $\chi^{(1)}/\chi^{(2)} \cong 10^8$ ，故要產生明顯的非線性效應，一般來說入射電場強度至少要是線性的  $10^4$  倍以上，實驗上常將雷射光源聚焦在 1 微米平方左右的範圍，進而產生高強度電場。由理論可知道此材料必須要是非中心對稱 (noncentrosymmetric) 的結構，而式 (2-2) 的位能表示法恰可以描述一維材料的非中心對稱結構，往後將以此表示法為基礎，推導二階非線性極化率  $\chi^{(2)}$ 、入射光頻率、自然共振頻率的關係。

同理，我們也可以將極化向量做展開，若極化向量為  $\bar{P}(t)$ ，則：

$$\begin{aligned}\bar{P}(t) &= \sum e \cdot x = \epsilon_0 \chi^{(1)} \bar{E}(t) + \epsilon_0 \chi^{(2)} \bar{E}(t) \bar{E}(t) + \epsilon_0 \chi^{(3)} \bar{E}(t) \bar{E}(t) \bar{E}(t) + \dots \\ &= \bar{P}^{(1)}(t) + \bar{P}^{(2)}(t) + \bar{P}^{(3)}(t) + \dots\end{aligned}\quad (2-3)$$

此處「e」表示基本電量；「 $\chi^{(n)}$ 」表示 n 階極化張量 (susceptibility tensor)。

第一項「 $\bar{P}^{(1)}(t)$ 」為一階線性項，而「 $\bar{P}^{(2)}(t)$ 」為二階非線性極化向量，比較 (2-3) 可以得到：

$$\bar{P}^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \bar{E} \bar{E}$$

若將  $x-y-z$  座標系考慮進去，把  $\bar{P}^{(2)}(t)$  寫成分量的形式，則可得到：

$$P_i^{(2)}(t) = \sum_{j,k} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)} \bar{E}_j \bar{E}_k \quad (2-4)$$

由式 (2-4) 可知，二階極化率張量  $\chi_{ijk}^{(2)}$  有 27 個分量，故討論非線性的情形通常要比線性的複雜許多，不過若材料有對稱性存在，可以再減少  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的獨立變數使問題簡化。現在考慮在空間中，向某方向傳遞的一激發電場  $\tilde{E}(t)$ ，可寫成：

$$\tilde{E}(t) = \bar{E}(r) \cdot e^{i\omega t} \quad (2-5)$$

將上式帶入 (2-4) 中

$$P_i^{(2)}(t) = \sum_{j,k} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)} \bar{E}_j \bar{E}_k \cdot e^{i(2\omega)t} \quad (2-6)$$

上式即表示二倍頻 (SHG) 的產生。入射光的頻率為  $\omega$ ，而材料中因電子振盪產生的極化向量為  $2\omega$ ，是入射光頻率的 2 倍。

另外二倍頻訊號產生，並非所有材料皆可，必須要是非中心對稱 (noncentrosymmetric) 的材料才被允許，考慮一維中心對稱材料，其電子可視為

處在一簡諧位能阱中，即： $U(x) = \frac{1}{2}kx^2$ 。而電子的受力則與位移成一次方正比，

即： $\bar{F} = -k\bar{x}$ 。則一維系統單電子的運動方程式（equation of motion）可寫為：

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = -eE(t) \quad (2-7)$$

$\gamma$ ：阻尼係數。所以給與材料一反向電場時（ $\bar{E} \rightarrow -\bar{E}$ ），其極化向量 $\bar{P}$ 也應該反向。接著我們考慮二階極化向量

$$-P_i^{(2)}(t) = \sum_{j,k} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)}(-\bar{E}_j)(-\bar{E}_k) = \sum_{j,k} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)}(\bar{E}_j)(\bar{E}_k) = P_i^{(2)}(t) \quad (2-8)$$

若要使得 $-P_i^{(2)}(t) = P_i^{(2)}(t)$ ，唯一的可能是 $P_i^{(2)}(t) = 0$ ，可得到 $\chi_{ijk}^{(2)} = 0$

以上告訴我們，材料若要產生二倍頻訊號，除了電場要夠強以外，還須在非中心對稱材料上才可發生。

### 內在交換對稱（Intrinsic permutation symmetry）

從上面敘述可知道，考慮 $\chi_{ijk}^{(2)}$ 後，問題會較為複雜，但若考慮內在交換對稱，則可使得 $\chi_{ijk}^{(2)}$ 從27的獨立變數減少成18個。考慮一入射電場，其一般式可寫為：

$$\tilde{E}(t) = \sum_n \bar{E}(\omega_n) e^{-i\omega_n t}, \quad \text{而極化向量可表示為 } \tilde{P}(t) = \sum_n \bar{P}(\omega_n) e^{-i\omega_n t}, \quad \text{則式(2-4)}$$

可寫成：

$$P_i^{(2)}(\omega_m + \omega_n) = \sum_{jk} \sum_{mn} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_m + \omega_n, \omega_m, \omega_n) E_j(\omega_m) E_k(\omega_n) \quad (2-9)$$

觀察式(2-8)，可發現將 $m$ 、 $n$ 交換，或是將 $j$ 、 $k$ 交換時，其值將保持不變，即：

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_m + \omega_n, \omega_m, \omega_n) E_j(\omega_m) E_k(\omega_n) = \chi_{ikj}^{(2)}(\omega_m + \omega_n, \omega_m, \omega_n) E_k(\omega_n) E_j(\omega_m)$$

上式的物理意義說明，我們無法分辨 $E_j(\omega_m) E_k(\omega_n)$ 入射的先後順序，所以最合理的假設就是 $\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)}$ ，此即為內在交換對稱（intrinsic permutation symmetry）。

## 簡化符號 (Contracted notation)

根據以上的對稱性，為了方便及簡化表示，我們將  $\chi_{ijk}^{(2)}$  以  $d_{il}$  表示，並整理如下表 2-1 所示：

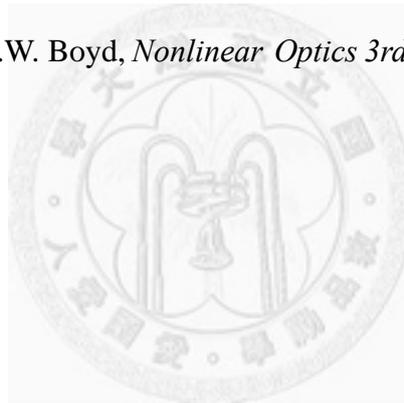
jk	11	22	33	23,32	31,13	12,21
$l$	1	2	3	4	5	6

表 2-1 簡化符號表

舉例來說：

$$\chi_{123} = \chi_{132} = d_{14}$$

※註：2 - 1 參考 "R.W. Boyd, *Nonlinear Optics 3rd edition*" [7]



## 2.2 二倍頻顯微術

### 光學解析度

任何光學顯微鏡的解析度，都受限於繞射極限，當光通過一孔徑，其波長與孔徑大小差不多時，將會形成繞射。而雷射光的波長與物鏡的孔徑大小，決定了光的繞射圖形。因物鏡是圓形透鏡，當繞射發生時，圖形如下所示，稱 Airy disk：



圖 2-2 Airy disk(參考[8]，重製圖)

若透鏡的孔徑為  $d$ ，雷射光波長為  $\lambda$ ，Airy disk 從中心到第一暗環的張角為  $\theta$ ，則將滿足以下式子：

$$\sin \theta = \frac{1.22\lambda}{d} \quad (2-10)$$

當兩個繞射圖形太過接近時，將無法分辨到底是不是同一光源產生，根據雷利判斷準則 (Rayleigh criterion)，當其中一方的繞射極大與另一方的第一繞射極小重疊時，我們恰可分辨是兩繞射圖案，反之兩繞射圖案若小於此距離，則無法鑑別。以下用圖 2-3 來解釋雷利的判斷準則

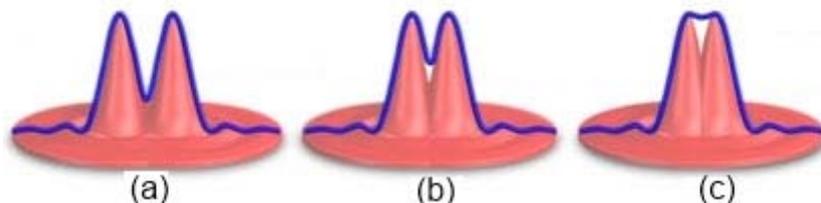


圖 2-3 (a)可以鑑別(b)恰可鑑別(c)無法鑑別

對於一物鏡而言，產生的繞射條紋如下圖所示：

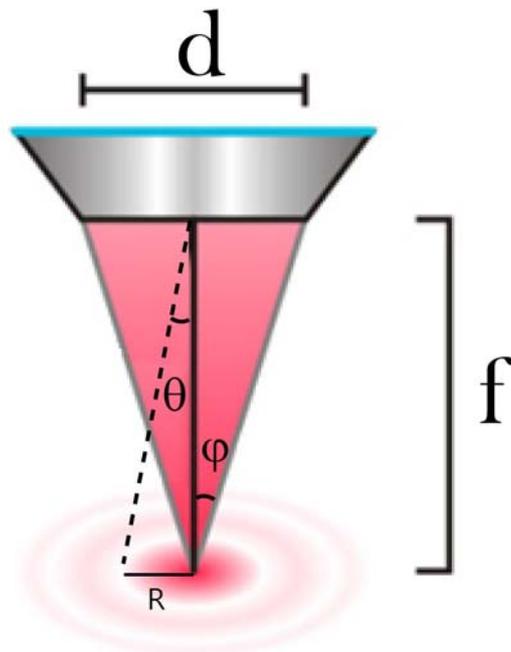


圖 2-4 經透鏡產生之繞射條紋

由圖上的幾何關係可以發現：

$$R = f \cdot \tan \theta \approx f \cdot \sin \theta \quad (2-11)$$

因為  $\theta$  很小，故上式中我們用了近似的條件， $f$  為透鏡焦距， $R$  為第一暗環的半徑，合併 (2-9)、(2-10) 可以得到：

$$R \approx \frac{1.22\lambda \cdot f}{n \cdot d} \quad (2-12)$$

$n$  為透鏡周圍環境的折射率，此外圖中還可看出  $\frac{d}{2f} = \tan \phi \approx \sin \phi$ ，代入式

(2-11) 整理後：

$$R \approx \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin \phi} \equiv \frac{0.61\lambda}{N.A.} \quad (2-13)$$

我們定義  $n \cdot \sin \phi = N.A.$  稱為物鏡的數值孔徑 (Numerical aperture)，由上式可以發現  $N.A.$  值越大，其  $R$  越小，表示空間上更能分辨兩繞射圖形，故  $N.A.$  越大，縱向解析度也越好，而實驗上，我採取的是  $N.A. = 0.8$  的水鏡進行偏振二倍頻實驗。

## 鎖模雷射光源(mode-locked laser)

雷射光的好處在於有高方向性 (directionality)、高相干性 (coherent) 以及單色性 (monochromatity)，一般來說，根據雷射輸出的時間，可以分成連續波雷射 (CW laser) 與脈衝雷射 (Pulse laser) 兩種[9]，由於要產生二倍頻訊號需要非常強的電場作用，所以若實驗上採取連續波雷射，如：氦氖雷射或氫雷射，在高功率的情形之下會造成生物樣本的光破壞 (photodamage)。而飛秒脈衝雷射的輸出功率是呈現週期性的變化，在極短的時間內 (約  $100\text{fs}$ )，輸出極大的功率，因作用時間很短，故對生物樣品傷害很小[5]。下圖 2-5 表示脈衝雷射隨時間的變化：

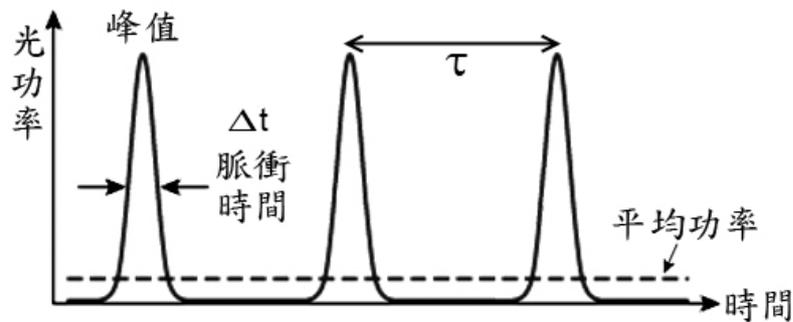


圖 2-5 脈衝雷射功率與時間的關係

接著我們要介紹脈衝雷射的原理，首先先以下圖 2-6 做解釋，圖(a)是由兩個連續週期波，保持相位 (phase) 相同但頻率不同做疊加原理，圖(b)是三個同相位但頻率不同的波相加，圖(c)是十個同相位但頻率不同的波相加，發現當越多頻率的波，保持相同相位做疊加後，就可製造出週期性的脈衝波，特定部分進行完全建設性干涉形成脈衝的波峯，其他部分則進行完全破壞性干涉使得振幅幾乎為零 [9]，這些過程發生在雷射共振腔中，稱為鎖模 (mode-locked)，而我們實驗使用的是鈦-藍寶石雷射 (Ti-Sapphier Laser)，其頻寬約為  $128\text{THz}$ ，即波長範圍約  $300\text{nm}$ ，而波峯在  $800\text{nm}$ 。每個脈衝的時間間隔  $\tau = \frac{2L}{c}$ ， $L$ ：雷射共振腔長度，每個模態

的頻率間隔  $\Delta\nu = \frac{1}{\tau}$ ，即圖 2-7 所示

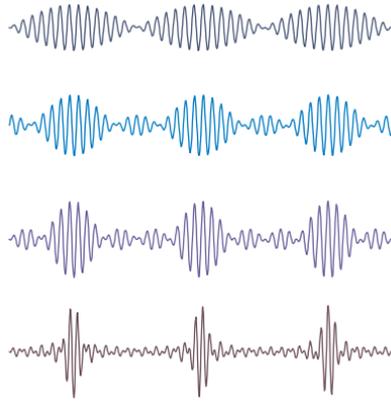


圖 2-6(a)兩個波合成(b)三個波合成(c)十個波合成[9]

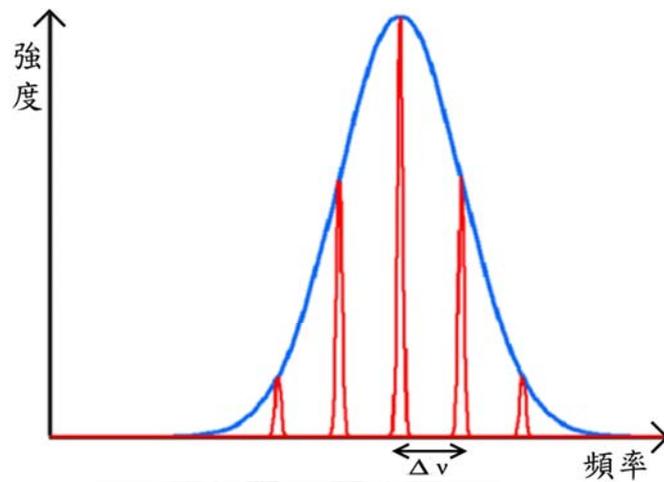


圖 2-7 鎖模雷射強度與頻譜關係

一般來說，雷射光對材料的破壞大約與 $\sqrt{\Delta t}$ 成正比[4,30]， $\sqrt{\Delta t}$ 表示雷射光的作用時間（pulse duration），使用鈦-藍寶石雷射，其脈衝作用時間 $\Delta t \approx 100\text{fs}$ ，故對樣品破壞極低。另一方面因為作用時間很短，所以可產生的瞬間能量很強，很容易就觀察出材料的非線性效應。

## 2.3 具圓柱對稱材料理論模型

我們在實驗上採用的材料是大鼠尾巴肌腱 (rat-tail tendon : type I collagen)、大鼠氣管軟骨 (rat-trachea cartilage : type II collagen)、大鼠大腿肌肉 (rat muscle : myosin)，這些生物材料的共同特性就是結構上具有圓柱對稱 (cylindrical symmetry)，並且使用的是線偏振脈衝雷射光源，使得材料產生二倍頻訊號，以下將推導在線偏振光的情況下，其二倍頻訊號強度與二階極化率張量  $\chi_{ijk}$  的模型。

首先以 rat-tail tendon 為例，假設膠原蛋白纖維是在  $x'-z'$  平面上，並且與  $x'$  軸夾角  $\theta_0$ ，而電場  $\vec{E}$  沿  $y$  軸射出紙面，其偏振方向與  $x'$  軸夾角  $\theta_e$ ，在圓柱對稱的條件下，二階極化向量可分成垂直及平行膠原蛋白纖維如圖 2-8 所示[28]：

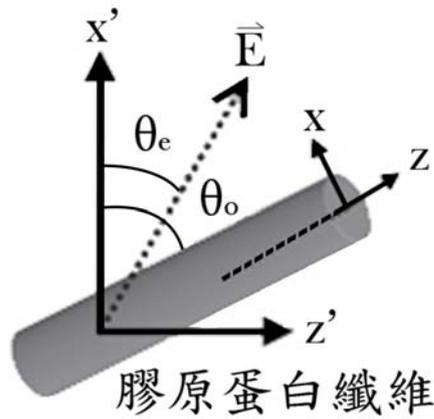


圖 2-8 入射電場與膠原蛋白示意圖

$$P_z^{(2)} = \chi_{zzz} E_z E_z + \chi_{zxx} E_x E_x \quad (2-14)$$

$$P_x^{(2)} = \chi_{zxx} E_z E_x + \chi_{xxz} E_x E_z$$

其中：

$$E_x = E_0 \sin(\theta_0 - \theta_e) \quad (2-15)$$

$$E_z = E_0 \cos(\theta_0 - \theta_e)$$

由電磁理論可知，強度 (intensity) 正比於極化向量的平方，即： $I \propto P^2$

所以二倍頻訊號的強度可以表示成：

$$I_{SHG} \propto P_z P_z^* + P_x P_x^* \quad (2-16)$$

$$\Rightarrow I_{SHG} \propto \left[ \left( \frac{d_{33}}{d_{31}} \right) \cos^2(\theta_0 - \theta_e) + \sin^2(\theta_0 - \theta_e) \right]^2 + \left[ \left( \frac{d_{15}}{d_{31}} \right) \sin 2(\theta_0 - \theta_e) \right]^2 \quad (2-17)$$

這裡使用簡化符號： $d_{33} = \chi_{zzz}$ ； $d_{31} = \chi_{zxx}$ ； $d_{15} = \chi_{xxz}$ ，我們控制不同偏振角度的入射電場，收集樣品表面反射的二倍頻訊號，並分析二倍頻訊號隨著 $(\theta_0 - \theta_e)$ 的變化，進而得出 $d_{33}/d_{31}$ 、 $d_{15}/d_{31}$ ，實驗上要注意的是，避免偏振光源進入樣品太深，我們採取的方式是，觀察到清楚的二倍頻訊號後，其向下的深度不超過 $5\mu m$ 為佳，以圖 2-9 為例，否則其數據將與理論預測差異過大，造成此現象的原因是，當線偏振光源進入材料時，必須要考慮材料本身的雙折射效應 (birefringence effect)，故偏振光經過快軸 (fast axis) 與慢軸 (slow axis) 將有相位的差異[33]，使得線偏振光變為橢圓偏振光，以上的模型將不適用。

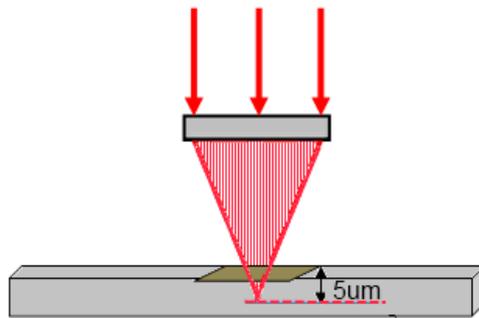


圖 2-9 雷射光進入樣品深度示意圖

## 2.4 分光鏡造成的相位偏移修正

### 分光鏡原理 (Dichroic mirror principle)

在二倍頻顯微術裡，當光打到材料上，可以收集透射光的倍頻訊號 (forward SHG)，或是反射光的倍頻訊號 (backward SHG)，收集反射的訊號一般說來是較為方便的，原因是反射光不需要考慮材料厚度造成光的衰減，另一個好處是，反射光是和入射光同一個物鏡收集，不需在透射光處，再重新使用透鏡或另一物鏡對焦，故收集反射光訊號對生物材料是比較合適的。由於使用同一顆物鏡收光，所以需要分光鏡將激發光源與倍頻訊號分開，以下討論其原理。

分光鏡主要是利用光的干涉原理[9]，製作上使用兩層介質，其折射率為  $n_1$ 、 $n_2$ ，如圖 2-10 所示，當光通過分光鏡兩介質介面時，其反射率 ( $\eta$ ) 將正比於折射率差值的平方，即： $\eta \propto (n_1 - n_2)^2$ 。設計上，若介質厚度  $t = \frac{1}{4}\lambda$  時，則反射光將與入射光相位相反 (out-of phase)，兩者進行破壞性干涉，使得透射光的強度增強；若介質厚度  $t = \frac{1}{2}\lambda$  時，反射光與入射光同相位 (in phase)，兩者進行建設性干涉，使得反射光增強。一般而言，對單層介面，其反射率大約只有 10%，所以通常會在分光鏡鍍上多層材質，使反射光增強。由上述分析可知，當光經過分光鏡反射時，也會因折射率的差異，影響原來光的偏振方向、強度、相位[9,29]。

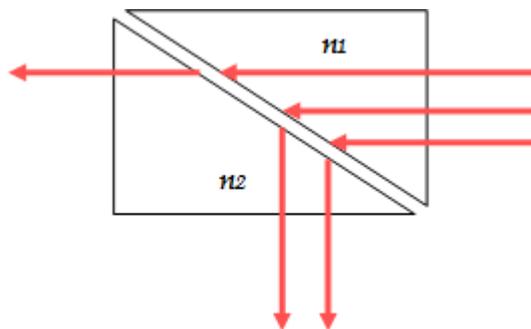


圖 2-10 分光鏡透射與反射示意圖

## 修正分光鏡造成的相位偏移

在實驗上，我們是利用半波片（half-wave plate：HWP）及 $\frac{1}{4}$ 波片（quarter-wave plate：QWP）來調整需要的線偏振光源，如圖 2-11 所示[27,29]。

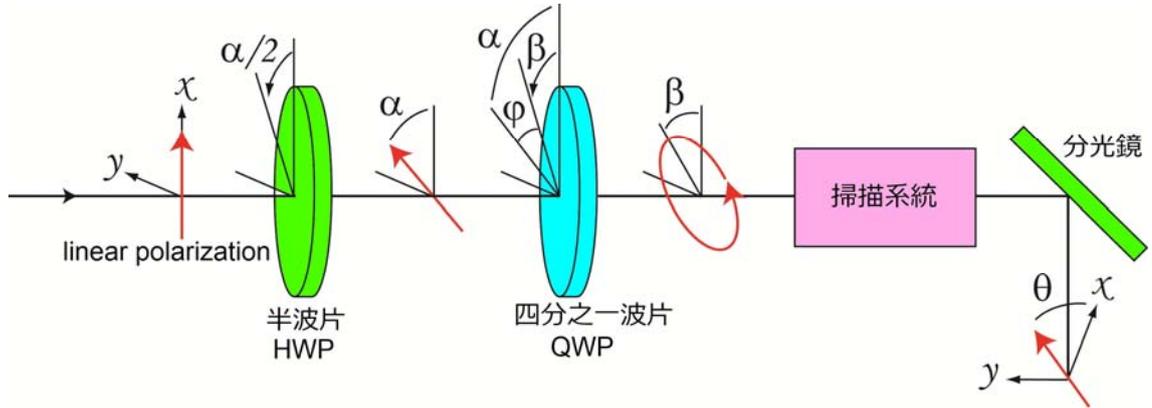


圖 2-11 分光鏡造成相位偏移示意圖

考慮當一線偏振光源經分光鏡反射（或透射）其快軸（fast-axis）與慢軸（slow-axis）有相位差  $\delta$ ，並且電場對於分光鏡快慢軸的反射（或透射）係數為  $\eta_f$  和  $\eta_s$ ，定義反射率比值為  $\gamma = \frac{\eta_f}{\eta_s}$ ，另外由圖 2-11 可知道，當線偏振光通過 $\frac{1}{4}$ 波片時，會形成橢圓偏振光，在此處假設 $\frac{1}{4}$ 波片其慢軸與  $x$  軸夾角  $\beta$ ，現在有一電場沿著  $z$  軸傳播，線偏振為  $x$  方向，寫成  $\vec{E} = (E_o \cos \omega t)\hat{x}$ ， $E_o$  表示電場振幅，若經過半波片後，其線偏振旋轉了  $\alpha$ ，其電場可寫為：

$$\vec{E} = (E_o \cos \alpha \cos \omega t)\hat{x} + (E_o \sin \alpha \cos \omega t)\hat{y} \quad (2-18)$$

而通過 $\frac{1}{4}$ 波片後，其電場沿  $x, y$  軸的分量寫成：

$$\begin{aligned} \vec{E} = & E_o (\cos \varphi \cos \beta \sin \omega t - \sin \varphi \sin \beta \cos \omega t)\hat{x} \\ & + E_o (\cos \varphi \sin \beta \sin \omega t + \sin \varphi \cos \beta \cos \omega t)\hat{y} \end{aligned} \quad (2-19)$$

其中角度  $\varphi = \alpha - \beta$ ，代表線偏振光經過半波片後，與 $\frac{1}{4}$ 波片慢軸的夾角，接著經過分光鏡時，考慮相位延遲  $\delta$  與反射率比  $\gamma$  之後，其電場可寫成

$$\begin{aligned} \bar{E} = E_o(\cos \varphi \cos \beta \sin \omega t - \sin \varphi \sin \beta \cos \omega t) \hat{x} \\ + \gamma \cdot E_o[\cos \varphi \sin \beta \sin(\omega t + \delta) + \sin \varphi \cos \beta \cos(\omega t + \delta)] \hat{y} \end{aligned} \quad (2-20)$$

接著利用和角公式展開  $\sin(\omega t + \delta)$ 、 $\cos(\omega t + \delta)$ ，整理後如下：

$$\bar{E} = E_o(d_1 \sin \omega t + d_2 \cos \omega t) \hat{x} + E_o(d_3 \sin \omega t + d_4 \cos \omega t) \hat{y} \quad (2-21)$$

其中：

$$\begin{cases} d_1 = \cos \varphi \cos \beta \\ d_2 = -\sin \varphi \sin \beta \\ d_3 = \gamma(\cos \varphi \sin \beta \cos \delta - \sin \varphi \cos \beta \sin \delta) \\ d_4 = \gamma(\cos \varphi \sin \beta \sin \delta + \sin \varphi \cos \beta \cos \delta) \end{cases}$$

可以發現  $d_1$ 、 $d_2$ 、 $d_3$ 、 $d_4$  皆與時間無關 (time-independent)，因為經過分光

鏡反射後是線偏振光，表示電場的  $x, y$  分量比值是個常數，可寫成  $\frac{d_1}{d_3} = \frac{d_2}{d_4}$ ，將值

帶入後可得到  $\tan \varphi$  的二次方程式：

$$\tan \delta \sin 2\beta \tan^2 \varphi - 2 \tan \varphi = \tan \delta \sin 2\beta \quad (2-22)$$

解為：

$$\tan \varphi_{\pm} = \frac{1 \pm (1 + \sin^2 2\beta \tan^2 \delta)^{1/2}}{\sin 2\beta \tan \delta} \quad (2-23)$$

上式可看出  $\gamma$  未出現，這表示分光鏡快慢軸造成的反射率比值不影響入射光的偏振，僅相位延遲  $\delta$  才會影響光的偏振特性。另外此兩根的乘積  $(\tan \varphi_+) \cdot (\tan \varphi_-) = -1$ ，表示  $\varphi_+$ 、 $\varphi_-$  角度相差  $90^\circ$ 。實驗上，調整半波片與  $\frac{1}{4}$  波片，最後經過分光鏡後，選擇特定的兩組  $\alpha$  皆可以產生線偏振光。

現在我們分析最後的線偏振光角度  $\theta$ ， $\theta$  為偏振和  $x$  軸的夾角，由電場的分量大小決定，所以寫成：

$$\tan \theta = \frac{E_y}{E_x} = \frac{d_3 \sin \omega t + d_4 \cos \omega t}{d_1 \sin \omega t + d_2 \cos \omega t} = \gamma \tan \beta \cos \delta - \gamma \tan \varphi \sin \delta \quad (2-24)$$

接著將 (2-22) 代入 (2-24)，替換掉  $\tan \varphi$ ，則可表示：

$$\tan \beta_{\pm} = \frac{\gamma^2 - \tan^2 \theta \pm (\gamma^4 + \tan^4 \theta + 2\gamma^2 \cos 2\delta \tan^2 \theta)^{1/2}}{-2\gamma \cos \delta \tan \theta} \quad (2-25)$$

上式的物理意義在於，若知道了分光鏡造成的相位延遲  $\delta$ ，及快慢軸的反射

率  $\gamma$  (可先於實驗前做測試), 轉動  $\frac{1}{4}$  波片, 可以找到對應的線偏振光角度。實驗上使用的分光鏡, 其  $\gamma$  約為 1.03, 在 780nm 之下造成的  $\delta$  約為  $52^\circ$ 。另一方面, 為了確定最後打入樣品的是線偏振光, 儀器架設圖 2-12 所示:

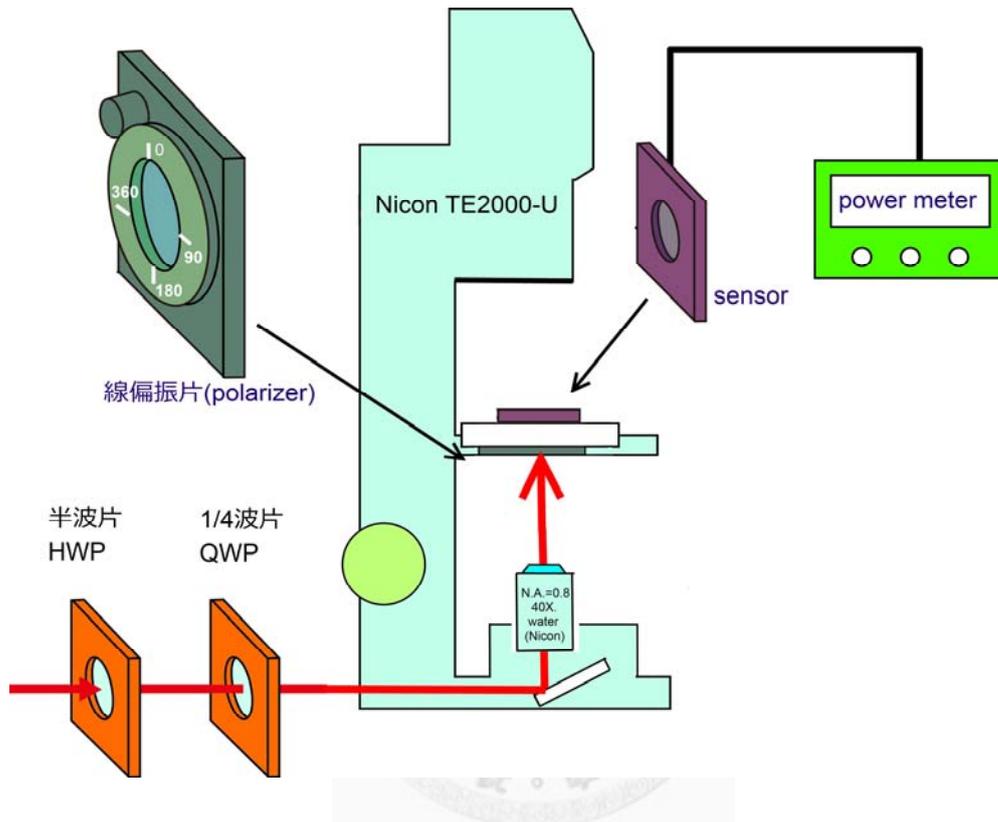


圖 2-12 確認不同方向的線偏振光角度示意圖

載物台中再放置一偏振片 (polarizer), 並於上方架設光度計 (power meter) 測量光的強度, 假如射出的光是線偏振, 則我們不斷的旋轉偏振片後, 會發現有一個峰值, 且相差  $90^\circ$  的方向光強度幾乎為零, 如圖 2-13 所示, 這時就可保證打到樣品表面為線偏振光源。

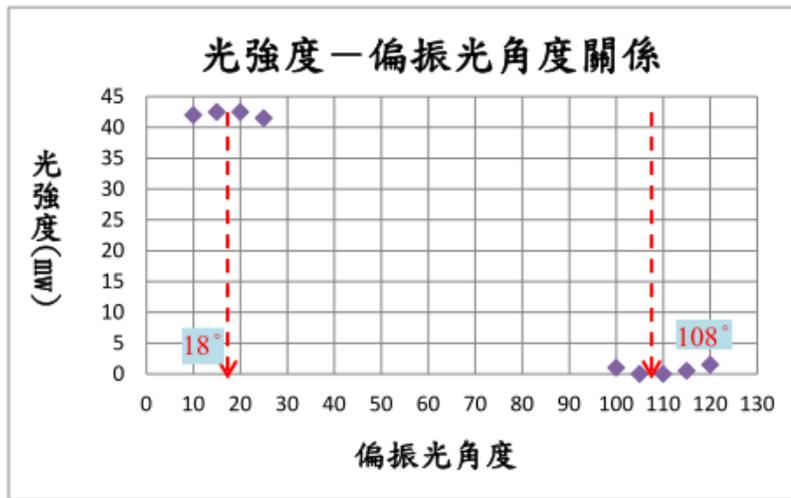


圖 2-13 光強度與偏振光角度

最後要考慮的是，雖然偏振光經過半波片與  $\frac{1}{4}$  波片不影響光功率，但當不同方向的偏振光經過分光鏡反射時，反射率  $\eta$  也不相同，故功率  $P$  將有差異，以下將分析此情況。由電磁理論知道，光的功率與電場平方成正比，寫成： $P \propto E_x^2 + E_y^2$ ，若最後經分光鏡反射後的電場為  $E_x$ 、 $E_y$ ，則反射前的電場可寫成  $\frac{E_x}{\eta_x}$ 、 $\frac{E_y}{\eta_y}$ ，故反射前與反射後的光功率關係可表示為：

$$P_{output} = \frac{E_x^2 + E_y^2}{\left[\left(\frac{E_x}{\eta_x}\right)^2 + \left(\frac{E_y}{\eta_y}\right)^2\right]} \cdot P_{input} \quad (2-26)$$

前面提到，偏振光角度  $\tan \theta = \frac{E_y}{E_x}$ 、 $\gamma = \frac{\eta_y}{\eta_x}$ ，代入 (2-25) 可得：

$$P_{output} = \eta_x^2 \cdot \gamma^2 \cdot \left(\frac{1 + \tan^2 \theta}{\gamma^2 + \tan^2 \theta}\right) P_{input} \quad (2-27)$$

因為分光鏡的  $\eta$ 、 $\gamma$  是固定值，由上式可知，最後的線偏振光功率  $P_{output}$  只與  $\theta$  有關。實驗前我們使用螢光劑 (0.5mg/ml, Sulforhodamine B, S1420-5G) 測量雙光子激發的螢光強度做為校正，因雙光子螢光激發為非線性現象，強度和功率平方成正比，由式 (2-26) 可得：

$$F \propto P_{output}^2 = \gamma^4 \left( \frac{1 + \tan^2 \theta}{\gamma^2 + \tan^2 \theta} \right)^2 \quad (2-28)$$

$F$ ：雙光子螢光強度 (two-photon fluorescence intensity)，下圖 2-14 為理論與實驗曲線，我們利用此結果修正材料產生的倍頻訊號與線偏振光的關係，使得各方向的線偏振光功率皆一致，以便符合理論所預測的結果[29]。

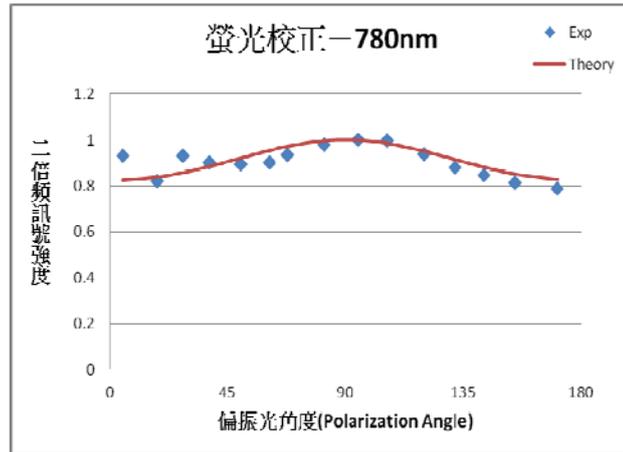


圖 2-14 二倍頻訊號隨著不同角度的線偏光改變

## 2.5 Kleinman Symmetry

先前討論到內在交換對稱 (intrinsic permutation symmetry)，此性質表示  $\chi_{ijk}$  其  $j$ 、 $k$  互換，不影響  $\chi_{ijk}$  值，如此一來  $\chi_{ijk}$  獨立變數將從 27 個減為 18 個。而 Kleinman Symmetry 條件為，若入射光的頻率  $\omega_i$  遠離材料的自然共振頻率  $\omega_0$ ，則  $\chi_{ijk}$  將與入射光頻率無關，得到：

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \chi_{kij}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \chi_{jki}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \dots = \chi_{ikj}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2)$$

即任意交換  $i, j, k$ ， $\chi_{ijk}^{(2)}$  不改變。如此一來，獨立變數將減為 10 個，引入此性質，可簡化理論模型的複雜計算，以下我們會以一維的非中心對稱材料出發，證明 Kleinman Symmetry 的結果，又因我們觀察的材料都屬於三維物體，故會再將理論推廣到三維，並得到一簡單結果。由前述 2-1 得到，一維非中心對稱材料的位能為  $U(x) = ax^2 + bx^3$ ，若寫成力的形式則[7]：

$$F(x) = -m\omega_{ox}^2 x - mD \cdot x^2 \quad (2-29)$$

其中： $\omega_{ox}^2$  為材料的自然共振頻率， $D$  為常數，若入射光電場為  $E(t) = E_{ox} e^{i\omega t}$

則我們可以寫下材料其中一個電子的運動方程 (equation of motion EOM)：

$$\ddot{x} + \gamma_x \dot{x} + \omega_{ox}^2 x + D \cdot x^2 = -\frac{eE(t)}{m} \quad (2-30)$$

$\gamma_x$  為阻尼係數，接著將位置函數  $x$  做展開，寫成：

$$x(t) = x^{(1)} e^{i\omega t} + x^{(2)} e^{i(2\omega)t} + x^{(3)} e^{i(3\omega)t} + \dots \quad (2-31)$$

$x^{(1)}$  表示一階線性項的位置振幅， $x^{(2)}$  表示產生二倍頻的位置振幅，以此類推，將式 (2-30) 代回 (2-29)，並歸納同類項得到：

$$\begin{cases} \ddot{x}^{(1)} + \gamma_x \dot{x}^{(1)} + \omega_{0x}^2 x^{(1)} = -\frac{eE(t)}{m} - \textcircled{1} \\ \ddot{x}^{(2)} + \gamma_x \dot{x}^{(2)} + \omega_{0x}^2 x^{(2)} + D \cdot [x^{(1)}]^2 = 0 - \textcircled{2} \end{cases}$$

整理一階項

$$\textcircled{1} \Rightarrow -\omega^2 \cdot x^{(1)} \cdot e^{i\omega t} + i\omega\gamma_x \cdot x^{(1)} \cdot e^{i\omega t} + \omega_{0x}^2 \cdot x^{(1)} \cdot e^{i\omega t} = -\frac{e}{m} \cdot E_{ox} \cdot e^{i\omega t}$$

$$\Rightarrow (-\omega^2 + i\omega\gamma_x + \omega_{0x}^2) \cdot x^{(1)} = -\frac{e \cdot E_{ox}}{m}$$

$$\Rightarrow x^{(1)} = -\frac{e \cdot E_{ox}}{m(\omega_{0x}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_x)} \quad (2-32)$$

利用  $\begin{cases} P^{(1)}(\omega) = -Ne \cdot x^{(1)}(\omega) \\ P^{(1)}(\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E(\omega) \end{cases}$

$N$ : 單位體積的原子數，最後得到一階極化率  $\chi^{(1)}$  與自然共振頻率  $\omega_{0x}$  的關係為：

$$\chi^{(1)}(\omega) = \frac{N \cdot \left(\frac{e^2}{m}\right)}{\varepsilon_0(\omega_{0x}^2 - \omega^2 - i\omega\gamma)} \quad (2-33)$$

接著整理二階項

$$\textcircled{2} \Rightarrow -4\omega^2 \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + 2i\omega\gamma_x \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + \omega_{0x}^2 \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + D \cdot [x^{(1)}]^2 = 0$$

$$\Rightarrow x^{(2)}(2\omega) = \left(\frac{e}{m}\right)^2 \cdot \frac{D}{(\omega_{0x}^2 - 4\omega^2 + i\omega\gamma_x) \cdot (\omega_{0x}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_x)^2} E_{ox}^2$$

利用  $\begin{cases} P^{(2)}(2\omega) = -Ne \cdot x^{(2)}(2\omega) \\ P^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) E^2(\omega) \end{cases}$

最後得到二階極化率張量與自然共振頻率  $\omega_{ox}^2$  的關係為：

$$\chi^{(2)}(2\omega) = \frac{D \cdot \left(\frac{e^3}{m^2}\right) \cdot N}{\epsilon_0 (\omega_{ox}^2 - 4\omega^2 + i\omega\gamma_x) \cdot (\omega_{ox}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_x)^2} \quad (2-34)$$

由式 (2-34) 發現，當入射光頻率遠小於共振頻率時，即  $\omega_{ox} \gg \omega$ ，可寫成

$$\chi^{(2)}(2\omega) \cong \frac{D \cdot \left(\frac{e^3}{m^2}\right) \cdot N}{\epsilon_0 \cdot \omega_{ox}^2 \cdot \omega_{ox}^2} = const$$

表示二階極化率張量與入射光頻率無關，由於上述討論是一維結果，故尚無法完整說明為何互換  $\chi_{ijk}^{(2)}$  的下標後，不會影響其值。接下來，我們將把位能的形式推廣到三維問題上面，寫出廣義的非中心對稱的位能如下：

$$V(\vec{r}) = \frac{1}{2} k_{ij} x_i x_j + \frac{1}{3} D_{ijk} x_i x_j x_k + \dots \quad (2-35)$$

其中  $i, j, k$  表示  $x, y, z$ ，在一維問題  $k, D$  為一常數，若寫成上述形式，則  $k_{ij}$  為二階張量， $D_{ijk}$  為三階張量，例如： $k_{xy}$  對應到「 $k_{xy} \cdot xy$ 」這一項， $D_{xxz}$  對應到「 $D_{xxz} \cdot xxz$ 」這一項，可以發現  $k_{ij}$  共有 9 項變數，而  $D_{ijk}$  共有 27 項變數。由例子可知道， $k_{ij}$ 、 $D_{ijk}$  都具有對稱的形式，即滿足：

$$k_{ij} = k_{ji}$$

$$D_{ijk} = D_{ikj} = \dots = D_{kji} \quad (2-36)$$

故  $k_{ij}$  實際的獨立變數只有 6 個， $D_{ijk}$  則有 10 個獨立變數。特別的是  $k_{ij}$  可用一方陣表示，寫成：

$$K = \begin{pmatrix} k_{xx} & k_{xy} & k_{xz} \\ k_{yx} & k_{yy} & k_{yz} \\ k_{zx} & k_{zy} & k_{zz} \end{pmatrix} \quad (2-37)$$

式 (2-37) 為對稱矩陣，故可做對角化處理，也就是說，對於一材料而言，必定可以選擇一座標軸，使得只有「 $k_{xx}, k_{yy}, k_{zz}$ 」三項存在。據此，其電子沿著各軸的運動方程可寫成：

$$\left\{ \begin{array}{l} \ddot{x} + \gamma_x \dot{x} + \omega_{0x}^2 \cdot x + D_{xxx} x^2 + D_{yyy} y^2 + D_{zzz} z^2 + 2D_{xyz} yz + 2D_{xxz} xz + 2D_{xyx} xy = -\frac{eE_x}{m} \\ \ddot{y} + \gamma_y \dot{y} + \omega_{0y}^2 \cdot y + D_{yxx} x^2 + D_{yyy} y^2 + D_{yzz} z^2 + 2D_{yyz} yz + 2D_{yxz} xz + 2D_{yxy} xy = -\frac{eE_y}{m} \\ \ddot{z} + \gamma_z \dot{z} + \omega_{0z}^2 \cdot z + D_{zxx} x^2 + D_{zyy} y^2 + D_{zzz} z^2 + 2D_{zyz} yz + 2D_{zxx} xz + 2D_{zxy} xy = -\frac{eE_z}{m} \end{array} \right.$$

其中  $E_x = E_{x0} e^{i\omega t}$   
 $E_y = E_{y0} e^{i\omega t}$  ,  $x(t) = x^{(1)} e^{i\omega t} + x^{(2)} e^{i(2\omega)t} + x^{(3)} e^{i(3\omega)t} + \dots$  , 且  $\omega_{ox}, \omega_{oy}, \omega_{oz}$  表示各  
 $E_z = E_{z0} e^{i\omega t}$

軸的自然共振頻率，接著仿照一維的處理方法，我們得到一階項  $x^{(1)}$  為：

$$x_i^{(1)} = -\frac{e \cdot E_{oi}}{m(\omega_{oi}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_i)} \quad i = x, y, z \quad (2-38)$$

此即一維結果，接著考慮  $x$  方向之二階項，將有  $e^{i(2\omega)t}$  的項放在一起可得到：

$$-4\omega^2 \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + 2i\omega\gamma_x \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + \omega_{ox}^2 \cdot x^{(2)} \cdot e^{i(2\omega)t} + \sum_{jn} D_{xjn} j_{10} n_{10} \cdot e^{i(2\omega)t} = 0$$

$$\Rightarrow (-4\omega^2 + 2i\omega\gamma_x + \omega_{ox}^2) \cdot x^{(2)} + \sum_{jn} D_{xjn} j_{10} n_{10} = 0$$

$$\Rightarrow x^{(2)} = \frac{\sum_{jn} D_{xjn} j_{10} n_{10}}{(4\omega^2 - \omega_{ox}^2 - 2i\omega\gamma_x)}$$

$$= \frac{1}{m(4\omega^2 - \omega_{ox}^2 - 2i\omega\gamma_x)} \times \left[ \sum_{jn} D_{xjn} \cdot \frac{e \cdot E_{oj}}{m(\omega_{oj}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_j)} \cdot \frac{e \cdot E_{on}}{m(\omega_{on}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_n)} \right]$$

$$\propto D_x(2\omega) D_j(\omega) D_n(\omega)$$

其中

$$D_x(2\omega) = \frac{1}{(4\omega^2 - \omega_{ox}^2 - 2i\gamma_x\omega)}; D_j(\omega) = \frac{1}{(\omega_{oj}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_j)}; D_n(\omega) = \frac{1}{(\omega_{on}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_n)}$$

由前計算可知  $x^{(2)} \propto \chi_{xjn}$ ，經過計算後可得到[7]：

$$\begin{aligned} \therefore \chi_{ijk}^{(2)} &\propto D_{ijk} \cdot \frac{1}{[(2\omega)^2 - \omega_{oi}^2 - i(2\omega)\gamma_i]} \cdot \frac{1}{(\omega_{oj}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_j)} \cdot \frac{1}{(\omega_{ok}^2 - \omega^2 + i\omega\gamma_k)} \quad (2-39) \\ &\propto D_{ijk} \cdot \chi_i(2\omega)\chi_j^{(1)}(\omega)\chi_k^{(1)}(\omega) \end{aligned}$$

$i, j, k = x, y, z$

由式 (2-39) 可以看出，二階極化率與各軸的共振頻率可拆成三個獨立式子做相乘，將此結果套用到式 (2-17)，可寫成：

$$\begin{aligned} d_{33} = \chi_{zzz} &\propto D_{zzz} \frac{1}{(\omega_{0z}^2 - 4\omega^2 - 2i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0z}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0z}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \\ d_{31} = \chi_{zxx} &\propto D_{zxx} \frac{1}{(\omega_{0z}^2 - 4\omega^2 - 2i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0x}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0x}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \\ d_{15} = \chi_{xxz} &\propto D_{xxz} \frac{1}{(\omega_{0x}^2 - 4\omega^2 - 2i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0x}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \cdot \frac{1}{(\omega_{0z}^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} \end{aligned}$$

所以若滿足 Kleinman symmetry 的條件，入射光頻率  $\omega \ll \omega_{ox}, \omega_{oy}, \omega_{oz}$  則：

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{d_{33}}{d_{31}} = \frac{\chi_{zzz}}{\chi_{zxx}} &\approx \frac{D_{zzz}}{D_{zxx}} \cdot \frac{\omega_{0z}^2 \cdot \omega_{0x}^2 \cdot \omega_{0x}^2}{\omega_{0z}^6} = const \\ \frac{d_{15}}{d_{31}} = \frac{\chi_{xxz}}{\chi_{zxx}} &\approx \frac{D_{xxz}}{D_{zxx}} \cdot \frac{\omega_{0z}^2 \cdot \omega_{0x}^4}{\omega_{0z}^2 \cdot \omega_{0x}^4} = \frac{D_{xxz}}{D_{zxx}} = const \end{aligned} \right. \quad (2-40)$$

此論文主要驗證，若材料具有圓柱對稱，在遠離共振的條件下，其二階極化率比

值  $\frac{d_{33}}{d_{31}}$ 、 $\frac{d_{15}}{d_{31}}$  將不隨入射光頻率的不同而改變。

## Chapter 3 實驗材料

### 3.1 膠原蛋白 (Collagen)

膠原蛋白是在人體裡最豐富的蛋白質，將近占了人體所有蛋白質的 30% 左右 [10]，韌帶 (ligament) 與肌腱 (tendon) 主要是膠原蛋白纖維所構成，其他如：皮膚、血管、軟骨、角膜等等也都富含膠原蛋白成分。膠原蛋白是位於細胞外間質 (extracellular matrix)，結構如繩索般的纖維狀蛋白質，用以連結兩個組織，其主要功能是維持組織間的結構，並使組織具有彈性，在組織受到外力時，擔任緩衝的角色。膠原蛋白是蛋白質家族的一員，我們知道胺基酸 (amino acid) 是構成蛋白質的基本單元，膠原蛋白也是如此，只是其序列與其他不同，膠原蛋白是以三條多胜肽鏈  $-(Gly-X-Y)_n-$  為週期性排列的三股右手螺旋結構，此序列中 *Gly* 是甘胺酸 (glycine)、*X* 是脯胺酸 (proline)、*Y* 是羥脯氨酸 (hydroxyproline)。當形成此結構時，大約各有 1000 個胺基酸分子，主要靠著各胜肽鏈的氫鍵連結，進而形成穩定的狀態。

目前已知的膠原蛋白有 28 種類別 [11]，在此論文中採用的大鼠尾巴肌腱主要為第一類膠原蛋白 (type I collagen)，大鼠氣管中的軟骨主要是第二類膠原蛋白 (type II collagen)。首先討論第一類膠原蛋白，其含量佔總膠原蛋白有 90%，十九世紀科學家在組織中發現的膠原纖維 (collagenous fiber) 即為第一類膠原蛋白，目前也證實是構成組織、器官的重要結構性蛋白質。在生物體中，主要存在於結締組織中，包含了皮膚、硬骨、肌腱、韌帶、角膜等，其分子是由兩個  $\alpha 1$  與一個  $\alpha 2$  胜肽鏈所形成的螺旋結構，以人類的皮膚為例，在真皮組織中約有 70% 是第一類膠原蛋白，故隨著年紀增長，膠原蛋白老化或缺少，就會使皮膚形成皺紋而失去彈性。

第二類膠原蛋白也是屬纖維狀結構，但分子是由三個  $\alpha 2$  鏈形成三股螺旋結構，主要存在於關節軟骨、眼球玻璃體和椎間盤的髓核中，以軟骨為例，第二類膠原蛋白約佔了軟骨中的膠原蛋白 80%，其他的組成成分如圖 3-1 所示，隨著年齡

增加，會逐漸鈣化及降解，喪失關節保護作用，導致骨頭間的磨損並引起疼痛，特別的是，軟骨組織中沒有淋巴、血管及神經的分布，養分輸送與廢物排出倚賴的是擴散作用，故受到傷害時不會流血，無法藉血管系統造成發炎反應，所以一旦受傷將難以復原。第三類膠原蛋白（type III collagen）通常伴隨第一類膠原蛋白出現，在皮膚、血管、腸胃道等可發現，只是含量較低，約占膠原蛋白總量的5%，其功能為保持水分與傷口癒合。膠原蛋白種類繁多，以下列出幾項常見的提供參考：

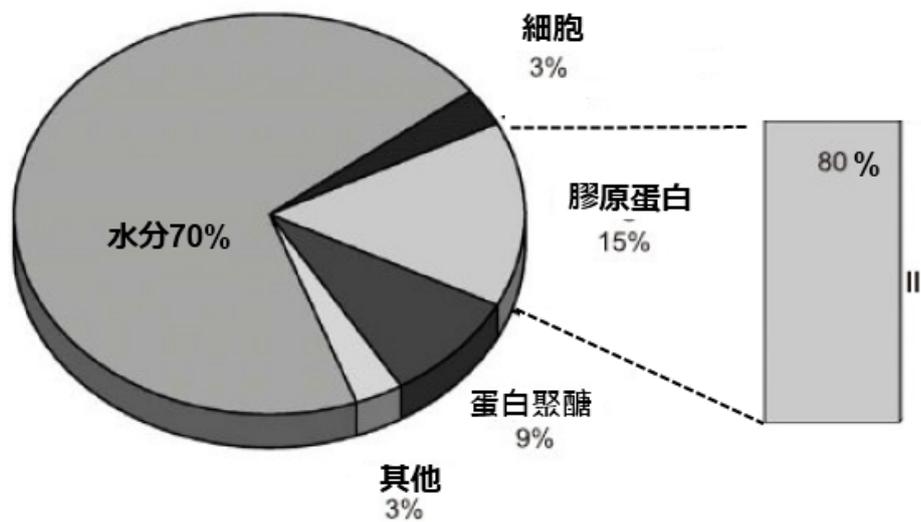


圖 3-1 軟骨組織成分[12]

類型	鍵的組成	組織分布
I	$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$	皮膚、硬骨、肌腱、韌帶、角膜
II	$\alpha 1$	關節軟骨、眼球玻璃體
III	$\alpha 1$	皮膚、血管、腸道
V	$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$	硬骨、皮膚、胚胎、角膜
XI	$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$	軟骨、椎間盤
XIII	$\alpha 1$	內皮細胞、眼球、心臟、骨骼肌

XXV	$\alpha 1$	大腦
XXVIII	$\alpha 1$	神經

表 3-1 組織中存在的各類膠原蛋白[13]

由上面已知，膠原蛋白基本上是以三股胜肽鏈纏繞形成一個單元，以第一類膠原蛋白為例（如圖 3-1），我們發現每五個單元也會互相纏繞而形成一束膠原微纖維（microfibrils），其直徑大約在 1nm~5nm 之間，長度可以從數百奈米到數千奈米，接著膠原微纖維再藉由彼此共價鍵的作用，形成一束直徑約為 20nm~90nm 的膠原細纖維（collagen fibrils），最後這些細纖維再結合成一般我們看到的膠原蛋白纖維（collagen fibers），若以電子顯微鏡觀察膠原蛋白纖維時，可發現約每間隔 67nm 左右會出現明暗相間的橫紋（或稱 D-period），且明暗條紋長度約為膠原蛋白分子的四分之一，這是因為膠原蛋白微纖維彼此結合時，是以錯開的方式排列，如圖 3-3 所示，若明暗條紋的長度為 D，分子間錯開的距離約 0.6D，故當觀察膠原蛋白時，每個分子重疊的部分使得訊號較弱，會形成暗區，而存在空隙的地方則會形成亮區。

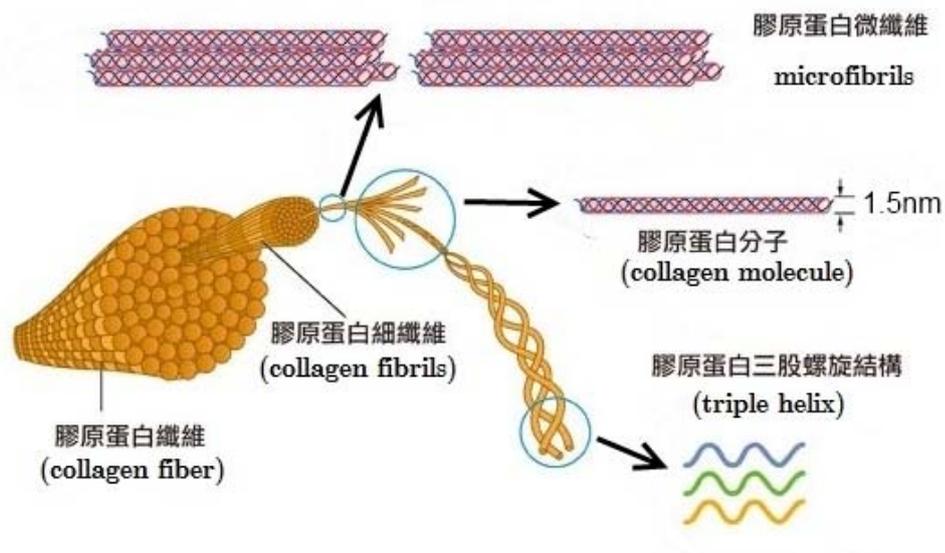


圖 3-2 膠原蛋白纖維示意圖[14]

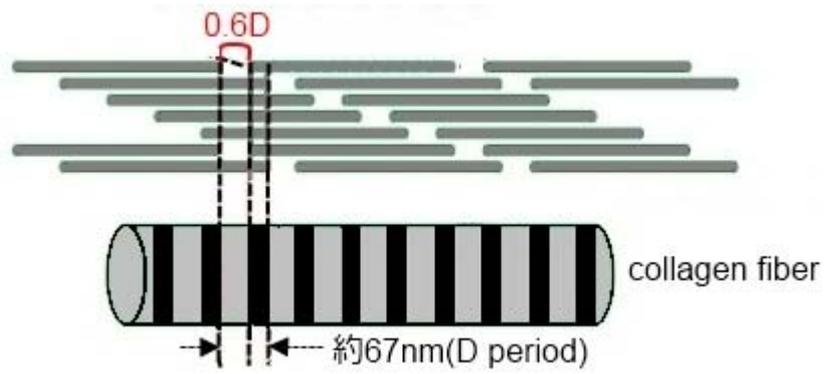


圖 3-3 膠原蛋白分子排列與 D period 示意圖(參考[15]，重製圖)

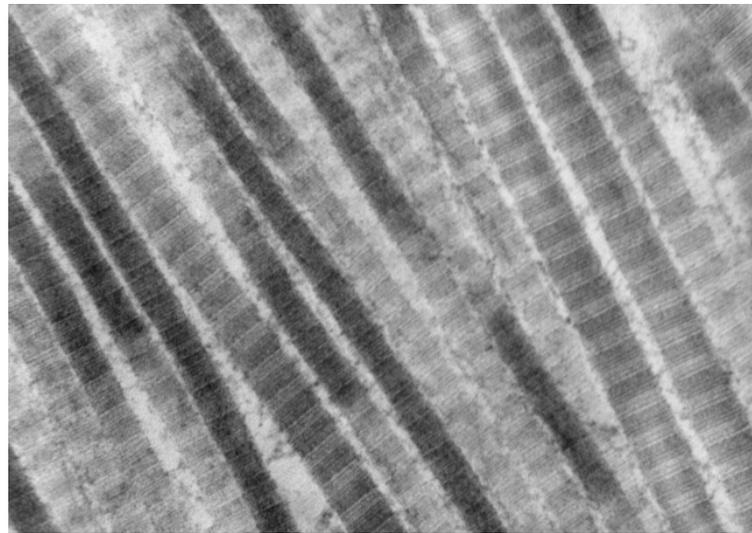


圖 3-4 第一類膠原蛋白在穿透式電子顯微鏡下的影像[16]

## 3.2 肌肉纖維

我們取大鼠腿部肌肉是屬於橫紋肌，因為每一個肌細胞或稱肌纖維(myofiber)是由每個肌肉的收縮單位—肌小節(sarcomere)重複的週期性排列組成的，所以在顯微鏡下會呈現明顯的橫紋圖樣，如圖 3-5 所示。從結構上看，肌纖維是由數以千計的肌原纖維(myofibrils)所組成，而肌原纖維由許多肌小節(sarcomere)所組成，相鄰肌小節的分界稱為 Z-line，而肌小節是由含有肌凝蛋白(myosin)的粗肌絲(thick filament)及含有肌動蛋白(actin)的細肌絲組成(thin filament)，粗肌絲位於肌小節的中央部分，細肌絲則是在肌小節的兩端，在顯微鏡底下較深色的部分稱為 A band，主要為 thick filament 並與少部分的 thin filament 交錯而成，在 A band 中純粹只有肌凝蛋白(myosin)的成分稱為 H zone；淺色部分稱為 I band，只含有 thin filament (actin)，結構示意如圖 3-6。

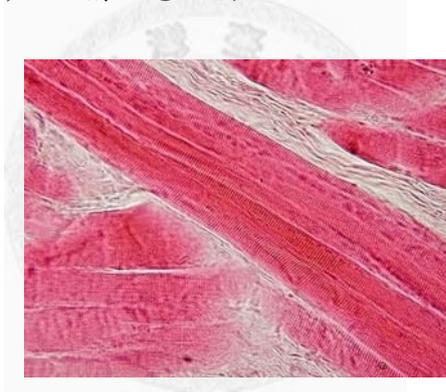


圖 3-5 肌肉纖維的橫紋圖樣[17]

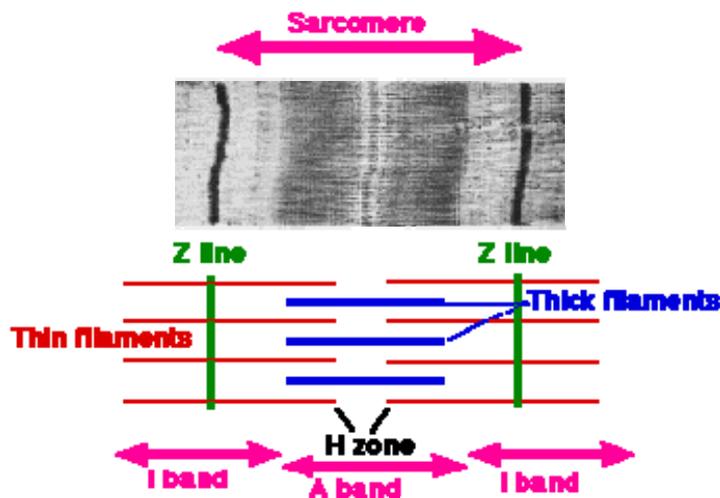


圖 3-6 肌肉纖維組成示意圖[18]

接著討論肌凝蛋白 (myosin)，肌凝蛋白結構還可細分為球型的頭部 (heads) 以及鏈狀的尾端 (tail or myosin rod) 如圖 3-7 所示，進行二倍頻實驗時，我們發現二倍頻訊號是來自於 thick filament (myosin) 的部分，而 thin filament (actin) 並不會產生二倍頻訊號，再來當我們入射不同角度的線偏振光時，肌凝蛋白的頭部部分並不隨著偏振光的不同，造成二倍頻強度的改變，真正隨著不同偏振光方向而改變二倍頻強度的，是肌凝蛋白的尾端(myosin tail or myosin rod)部分[20]。

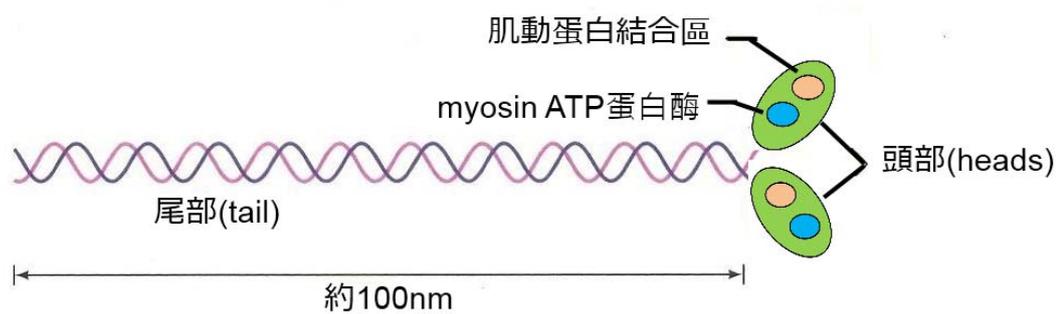


圖 3-7 肌凝蛋白(myosin)示意圖(參考[19]，重製圖)

## Chapter 4 實驗設計與方法

### 4.1 儀器架設

我們以倒立式雷射掃描顯微鏡 (Nicon, TE2000-U) 來進行實驗，儀器的架設如圖 4-1 所示，使用脈衝飛秒鈦-藍寶石雷射 (Ti-Sapphire pulsed laser, Tsunami, spectral physics) 當成激發光源，可使用的波長範圍在 690nm 到 1080nm，脈衝頻率為 80MHz，實驗所取的波長範圍在 720nm~900nm 之間。由圖上可看到，雷射一出來遇到一個半波片與線偏振片，我們藉由旋轉半波片來控制光源打入樣品的強度，由於線偏振片固定不動，所以旋轉半波片並不影響光的偏振性。之後的一組半波片與四分之一波片就是實驗上用來產生不同方向的偏振光，為了精準的獲得角度，我們使用了電動轉盤來旋轉波片，其精準度可以達到  $0.0025^\circ$ ，並且約每差  $15^\circ$  紀錄一組線偏振光。

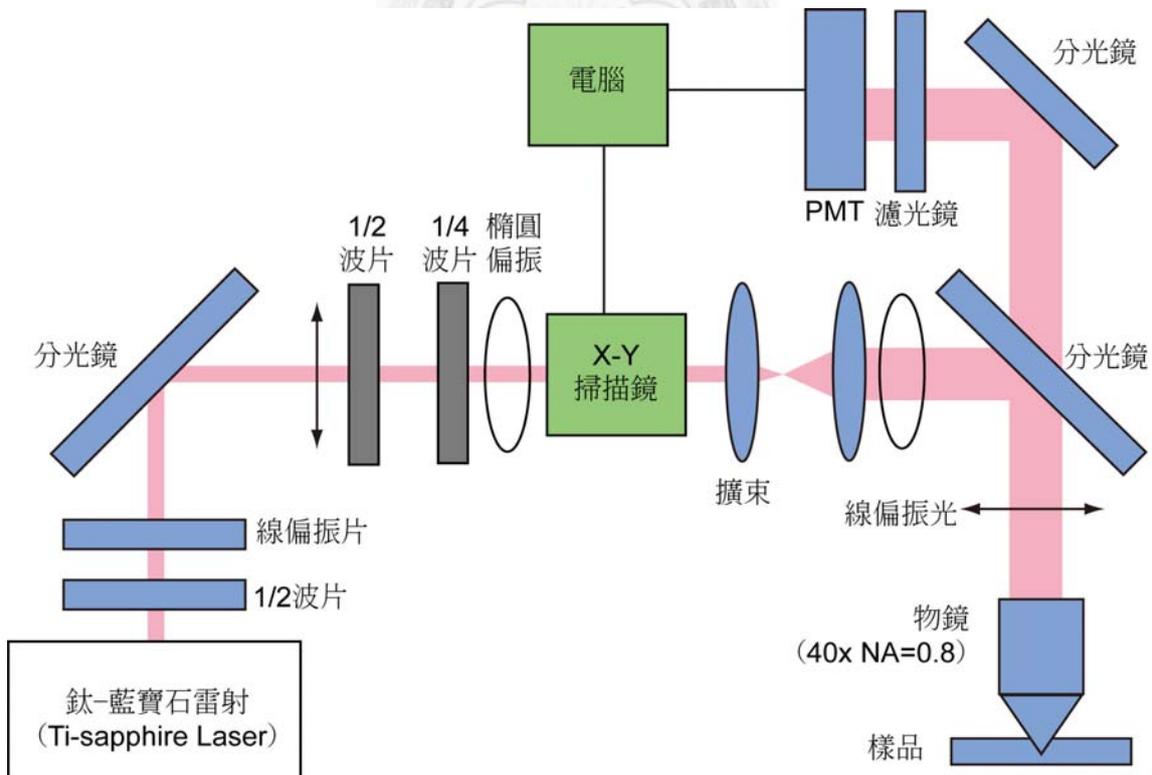


圖 4-1 偏振二倍頻實驗架設圖

掃描系統是利用電腦控制兩面鏡子 (X-Y mirror) 獲得二維的樣品影像。分

光鏡(FF720-SDi01,SEMROCK)在光波長超過 700nm 時會造成反射,低於 700nm 時會使光穿透。由於實驗過程是改變不同波長,所以收到的二倍頻訊號也需要用不同的濾鏡(filter)收光,使用的濾鏡有 FF01-390/18、Z390/20、Z420/20 (SEMROCK),最後再由 PMT (photomultiplier tube, R7400T, Hamamatsu) 紀錄二倍頻訊號並轉成電子訊號後由電腦分析。實驗使用的物鏡為 Nikon 40X Water-immersion,N.A.=0.8,進行 rat-ail tendon 及 rat-trachea cartilage 實驗是收反射光,故激發光源與反射的二倍頻訊號都是通過同一個物鏡接收,而 rat-leg muscle 則是收透射的二倍頻訊號,原則上使用 N.A.值越高的物鏡,解析度越高、影像越好,不過當使用 N.A.值大於 0.8 的物鏡時,會使得光的偏振方向改變,進而影響實驗精確度[24]。



## 4.2 材料準備

我們驗證 Kleinman Symmetry 理論使用三種不同的生物材料，分別為大鼠尾巴肌腱(rat-tail tendon)、大鼠氣管的軟骨(rat-trachea cartilage)及大鼠腿部肌肉(rat-leg muscle)，首先 rat-tail tendon (type I collagen) 的處理方式為，從剛犧牲大鼠身上取下整條尾巴，切開皮膚後會看到白色如細繩般的組織，並以鑷子取下一段 rat-tail tendon，如圖 4-2(a)(b)所示，接著將取下的 rat-tail tendon 以 PBS (phosphate buffered saline) 沖洗後放置載玻片上，接著以蓋玻片輕壓樣品，利用膠帶將玻片周圍封好，即可置入顯微鏡下進行二倍頻實驗，當次沒用完的 rat-tail tendon 會放置 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存等待下次使用。研究顯示，經 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存後再使用的 rat-tail tendon 不影響其二倍頻訊號[4]。

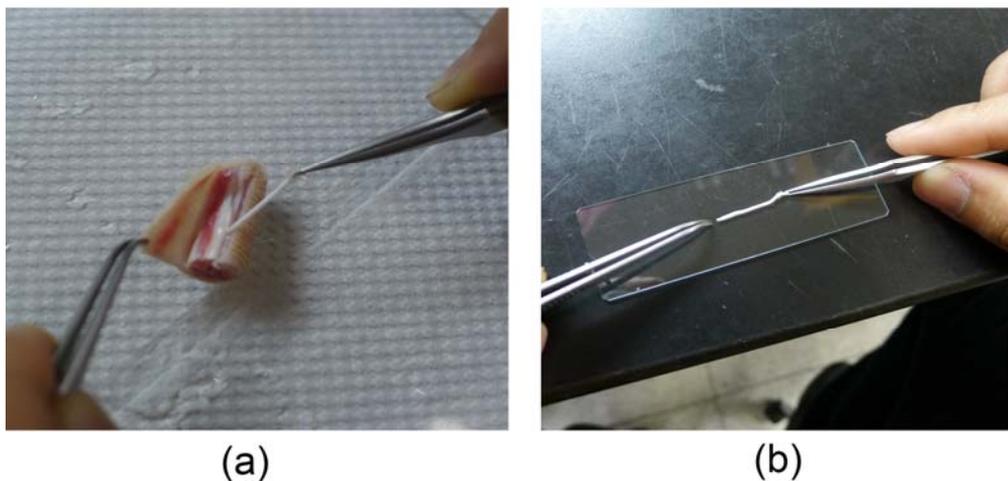


圖 4-2(a)(b) rat-tail tendon 樣品製作流程

軟骨組織 (type II collagen) 的部分，我們將剛犧牲的大鼠取出其氣管部分，會發現氣管會呈現紅白相間的排列方式，如圖 4-3 所示：



圖 4-3 fresh rat-trachea cartilage

白色的部分即為我們要使用的軟骨組織，利用手術刀取下軟骨，以 PBS 沖洗後放置於在玻片上，由於直接蓋上蓋玻片不易固定樣品，故我們先將其四周以雙面厚膠帶墊高，高度的選擇是讓樣品輕碰到蓋玻片，最後將其封好後即可進行二倍頻實驗。我們主要觀察為圖 4-4 的 C 型軟骨部分，實驗時需注意區分肌肉與軟骨。

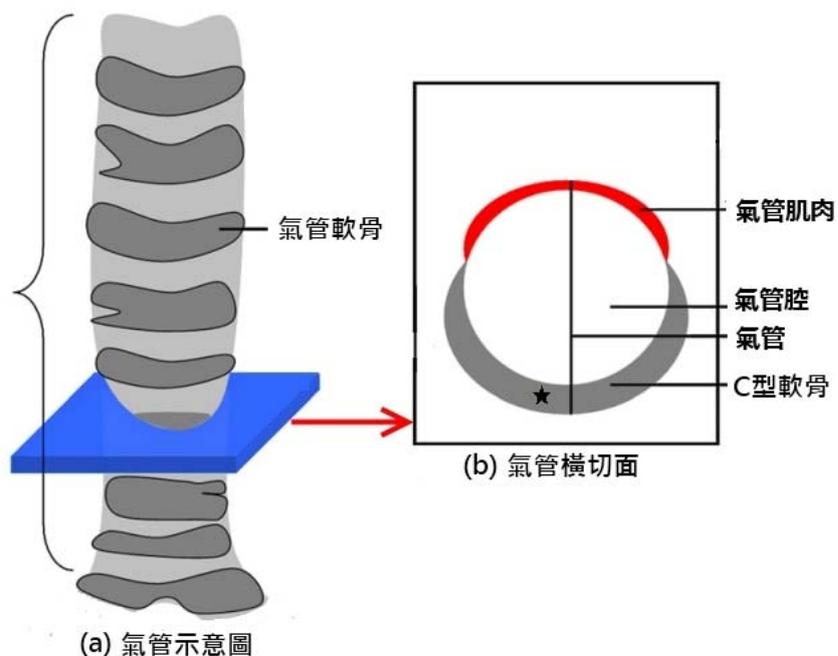


圖 4-4 軟骨結構(a)大鼠氣管外觀示意圖(b)氣管橫切面結構示意圖

最後是大鼠腿部肌肉，同樣的我們將剛犧牲的大鼠以手術刀切開大腿部分，取下肌肉組織，由於肌肉組織的二倍頻訊號在反射部分及其微弱，難以進行分析。所以我們將肌肉組織進行冷凍切片，樣品如圖 4-5 所示，其厚度約  $7\mu\text{m}$ ，再蓋上蓋玻片後將其密封好，並取 forward 的二倍頻訊號。軟骨組織與肌肉組織也是將其放置  $-80^{\circ}\text{C}$  下供下次時使用。



圖 4-5 大鼠大腿肌肉冷凍切片

### 4.3 實驗分析方法

理論部分已於 2-3 介紹過了，推導出二倍頻強度與不同偏振光角度的關係式 (2-17) 為：

$$I_{SHG} \propto \left[ \left( \frac{d_{33}}{d_{31}} \right) \cos^2(\theta_o - \theta_e) + \sin^2(\theta_o - \theta_e) \right]^2 + \left[ \left( \frac{d_{15}}{d_{31}} \right) \sin 2(\theta_o - \theta_e) \right]^2$$

或寫成  $I_{SHG} = c \cdot [a \cdot \cos^2(\theta_o - \theta_e) + \sin^2(\theta_o - \theta_e)]^2 + [b \cdot \sin 2(\theta_o - \theta_e)]^2$  (4-1)

$$a = d_{33} / d_{31} \quad b = d_{15} / d_{31} \quad c = const$$

實驗上我們在每個波長取 14 到 15 組的不同線偏振光 (如表 2)，並於每個偏振光角度取三張像素 (pixel) 為 256×256 影像，再將這三張影像取平均值做為二倍頻的強度，我們使用 IDL 程式，引用式 (4-1) 來分析每個 pixel 強度 ( $I_{SHG}$ ) 隨著偏振角度的變化，利用最小平方法找出最適合曲線[25,26]，進而求得對應的二階極化率張量比值  $d_{33} / d_{31}$  與  $d_{15} / d_{31}$ 。

$\lambda = 780\text{nm}$			
NO.	QWP	HWP	LP
1	132	118.5	0
2	121	114	11
3	107.5	106	26
4	97	101.5	37
5	80	94	53
6	160	88	66
7	148.5	82	78
8	136	72.5	90
9	121	69	106
10	107.5	62	120
11	97	56.5	132
12	81	50.5	148
13	153.5	128	160
14	139.5	121	174

表 4-1 不同 HWP、QWP 組合出各角度的線偏振光

## Chapter 5 實驗結果與討論

不同角度的線偏振光照射材料後，其二倍頻訊號強度會隨著變化，以下用三個不同角度的線偏振光，圖 5-1 為 rat-tail tendon、圖 5-2 為 rat-trachea cartilage、圖 5-3 為 rat-leg muscle。從圖 5-1 可以發現，對於 tendon 而言，膠原纖維的走向與偏振光接近平行時，其二倍頻強度最大；若纖維走向與偏振光接近垂直時，二倍頻強度最小，此結果是符合先前的理論模型。而在圖 5-2 中，因軟骨的纖維走向不像 tendon 這麼有序，故在整體二倍頻強度的變化較不明顯，但線偏振光與纖維走向愈有平行趨勢，所得到的二倍頻強度也將越強。而圖 5-3 的 muscle fiber，我們發現線偏振光若是與纖維走向接近  $45^\circ$  時，得到的二倍頻強度為最大[20,23]。

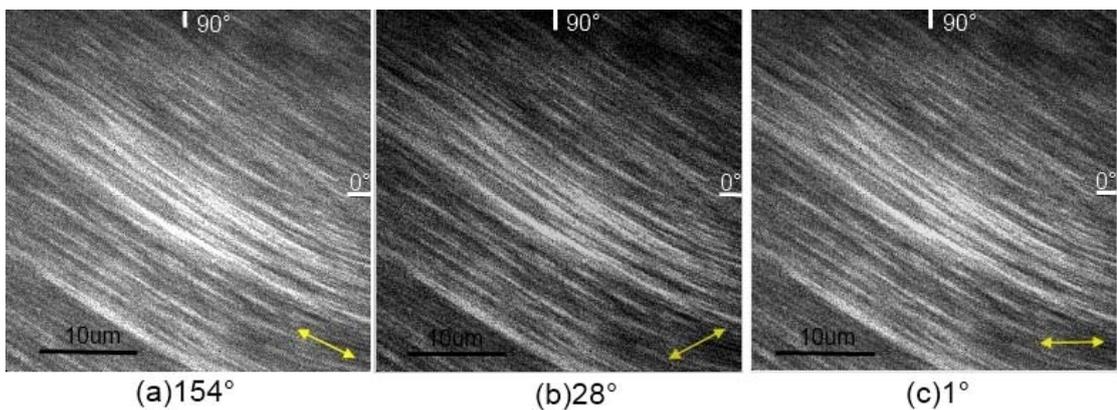


圖 5-1 rat-tail tendon 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 780nm

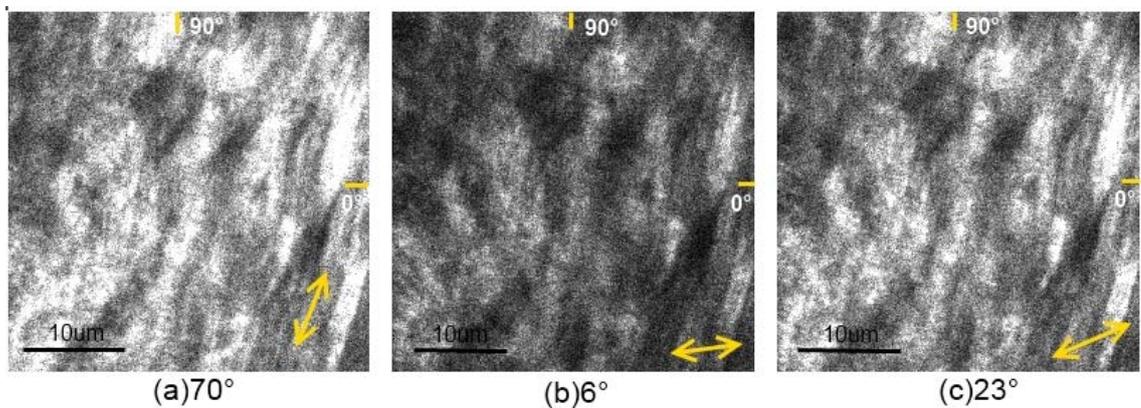


圖 5-2 rat-trachea cartilage 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 745nm

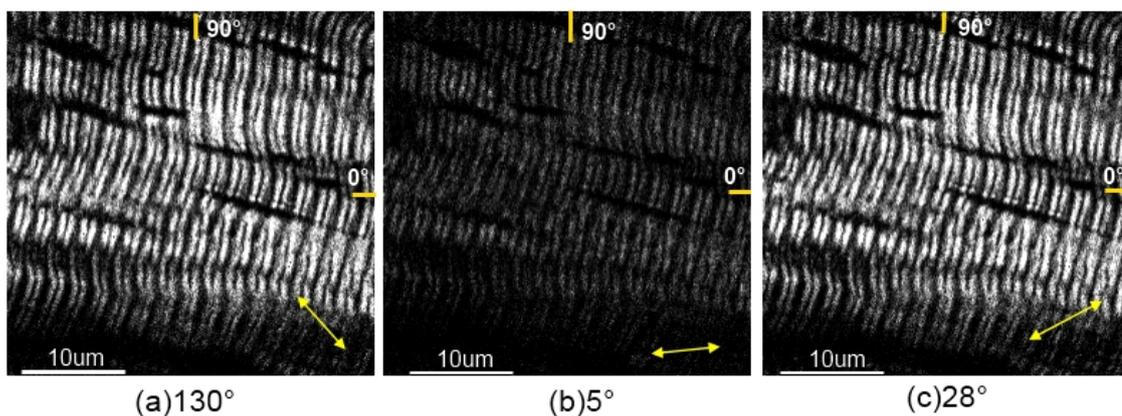


圖 5-3 rat-leg muscle 二倍頻強度隨不同偏振光的變化 at 780nm

雖然三種材料都屬於圓柱對稱，但其隨著線偏振光的角度不同，強度變化也不相同，下圖 5-4(a)(b)(c)為其中一個 pixel 的歸一化二倍頻強度隨著線偏振光角度的變化。不同的曲線，表示這三種材料分別對應到不同的二階極化率  $d_{33}$ 、 $d_{31}$ 、 $d_{15}$ ，在我們的實驗裡得到 rat-tail tendon 的  $d_{33}/d_{31} \cong 1.40$ 、 $d_{15}/d_{31} \cong 0.70$ ，而 rat-trachea cartilage 的  $d_{33}/d_{31} \cong 1.20$ 、 $d_{15}/d_{31} \cong 0.40$ ，rat muscle 則是  $d_{33}/d_{31} \cong 0.60$ 、 $d_{15}/d_{31} \cong 0.90$ ，這告訴我們雖然同是圓柱對稱材料，但在分子尺度下，仍是有結構上的差異，利用此差異性我們可以有進一步的應用，比如說正常的軟骨細胞形成大部分是 type II collagen，但在組織工程中，以人類骨髓幹細胞(human bone marrow stem cells)誘導分化成軟骨細胞時，卻會同時有 type I and type II collagen 存在[21,22]，我們可以利用 type I、type II collagen 在  $\chi^{(2)}$  比值上的差異，當成一種影像對比技術，在一定的區域內，分辨出 type I collagen 與 type II collagen[21]，這是傳統光學顯微鏡在無任何染色的情況下所做不到的。

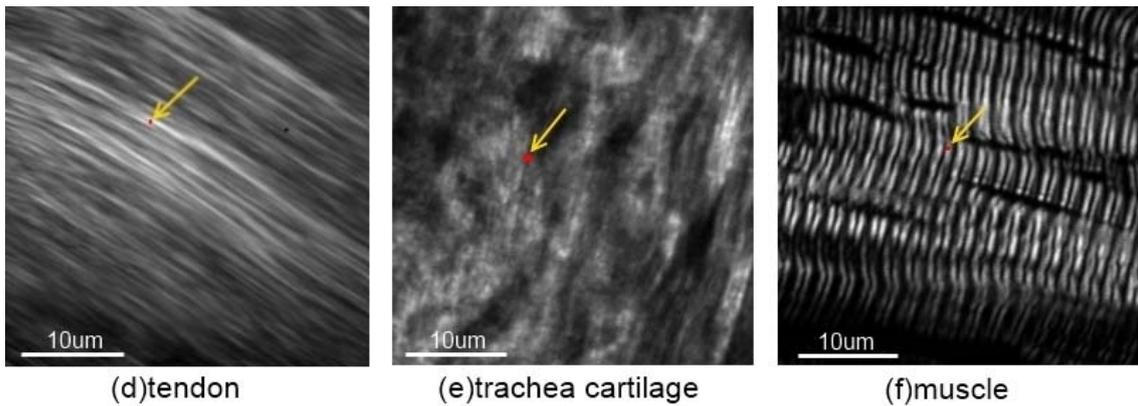
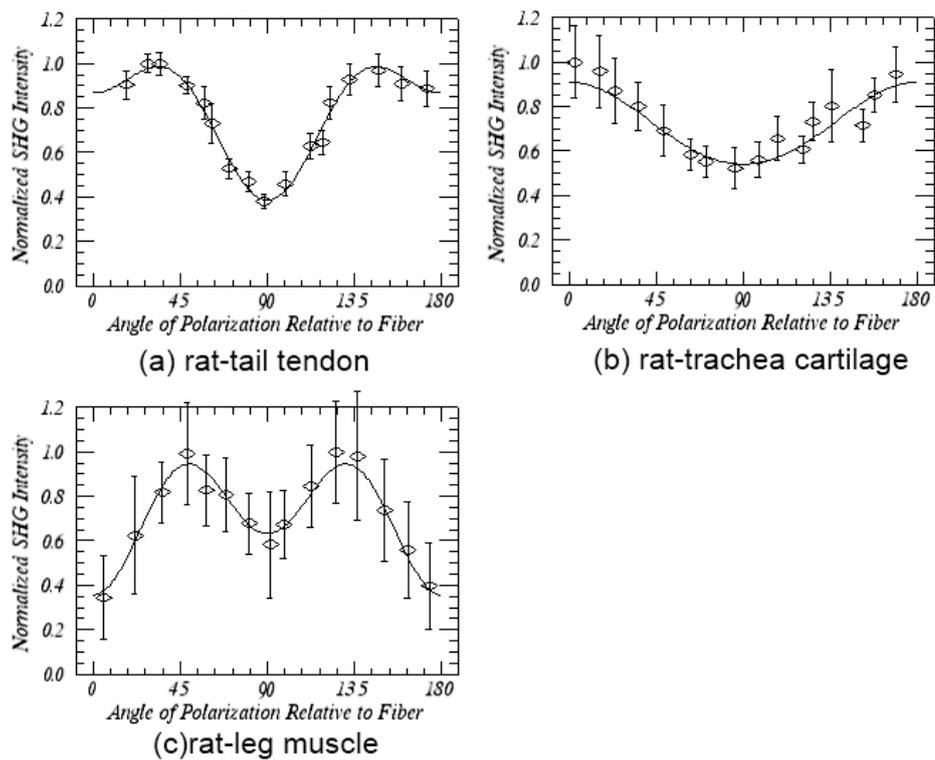


圖 5-4 (a)(b)(c)為單點 fitting 曲線(d)(e)(f)箭頭標示的紅點即為單點 fitting 區域

接下來我們進行 area fitting，將影像中每一個 pixel 都藉由 IDL 程式找出對應的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$ ，圖 5-5(a)為 tendon 在 780nm 波長下得到的二倍頻影像，(b)(d) 為每一點計算出來的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  以顏色分布圖表示，圖(c)(e)為  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  的 histogram，由此得到，對於 tendon 而言，其  $d_{33}/d_{31}$  幾乎落在 1.4 附近，而  $d_{15}/d_{31}$  大約落在 0.8 附近，我們對同一波長取兩次影像，計算每一個 pixel 得到的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  加以平均當成我們的實驗值，並計算標準誤差 (standard

deviation)。圖 5-5 與圖 5-6 也是如此。

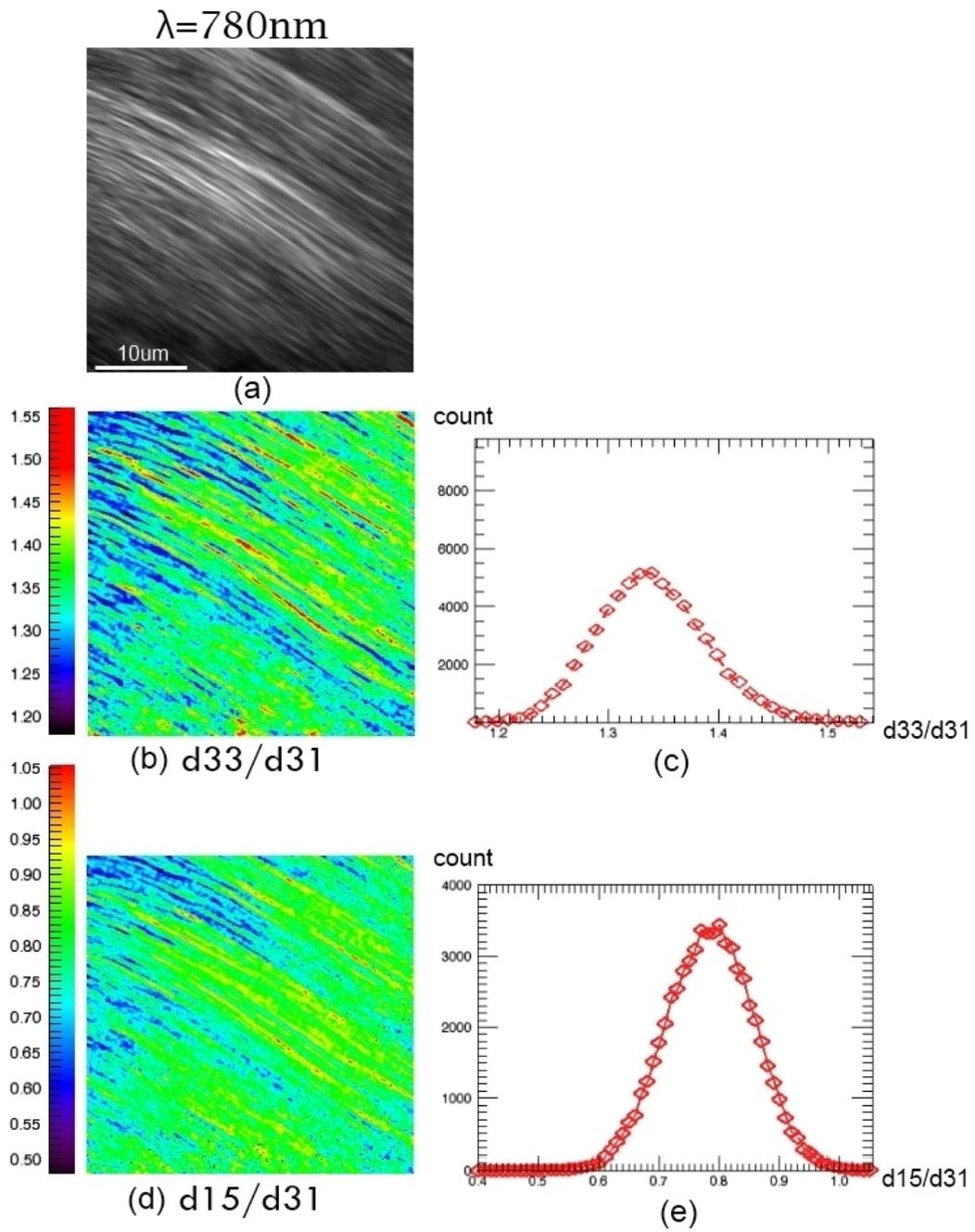


圖 5-5(a)SHG image of tendon at 780nm(b)  $d_{33}/d_{31}$  value(c)  $d_{33}/d_{31}$  histogram  
(d)  $d_{15}/d_{31}$  value(e)  $d_{15}/d_{31}$  histogram

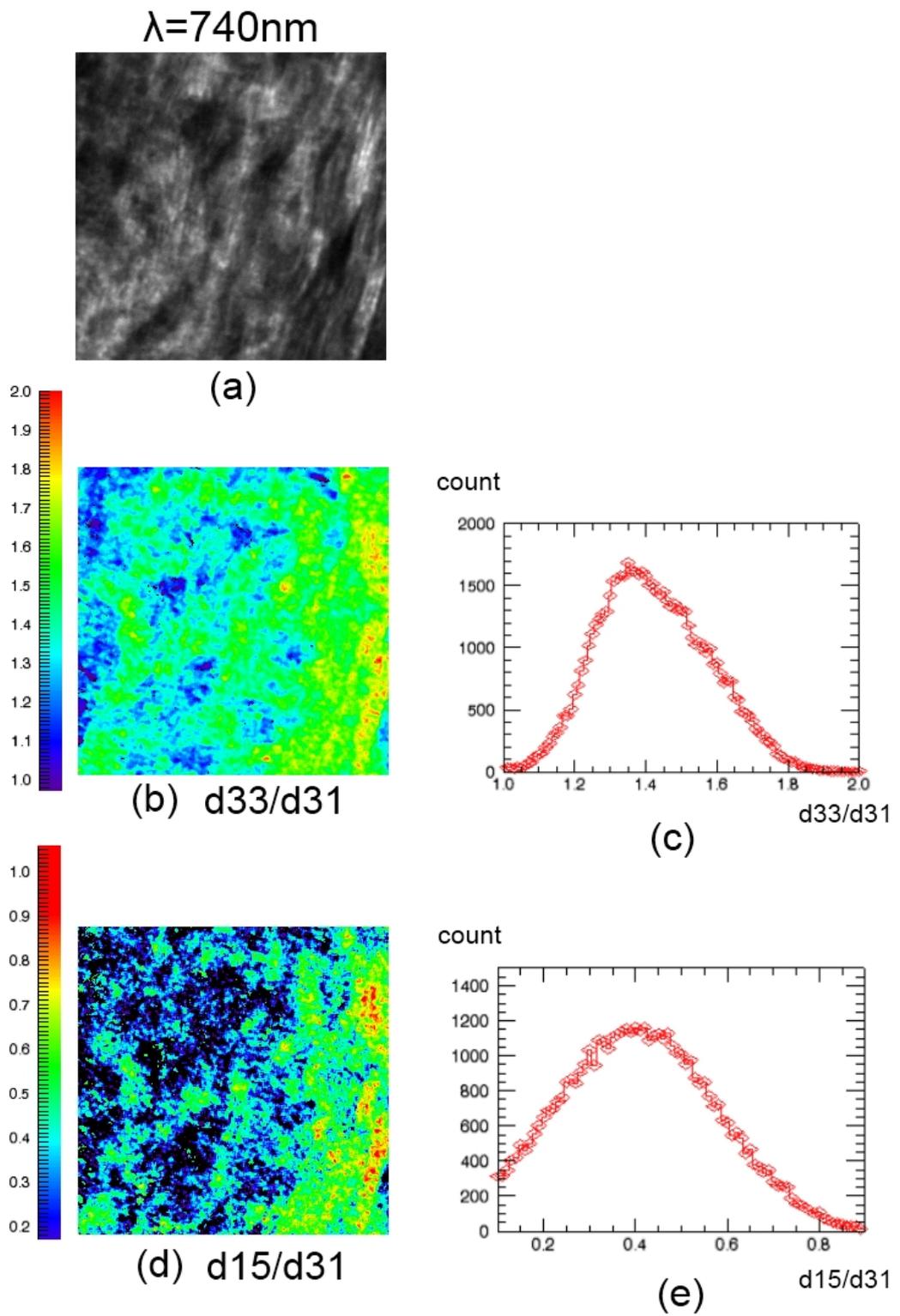


圖 5-6(a)SHG image of trachea at 740nm(b)  $d_{33}/d_{31}$  value(c)  $d_{33}/d_{31}$  histogram

(d)  $d_{15}/d_{31}$  value(e)  $d_{15}/d_{31}$  histogram

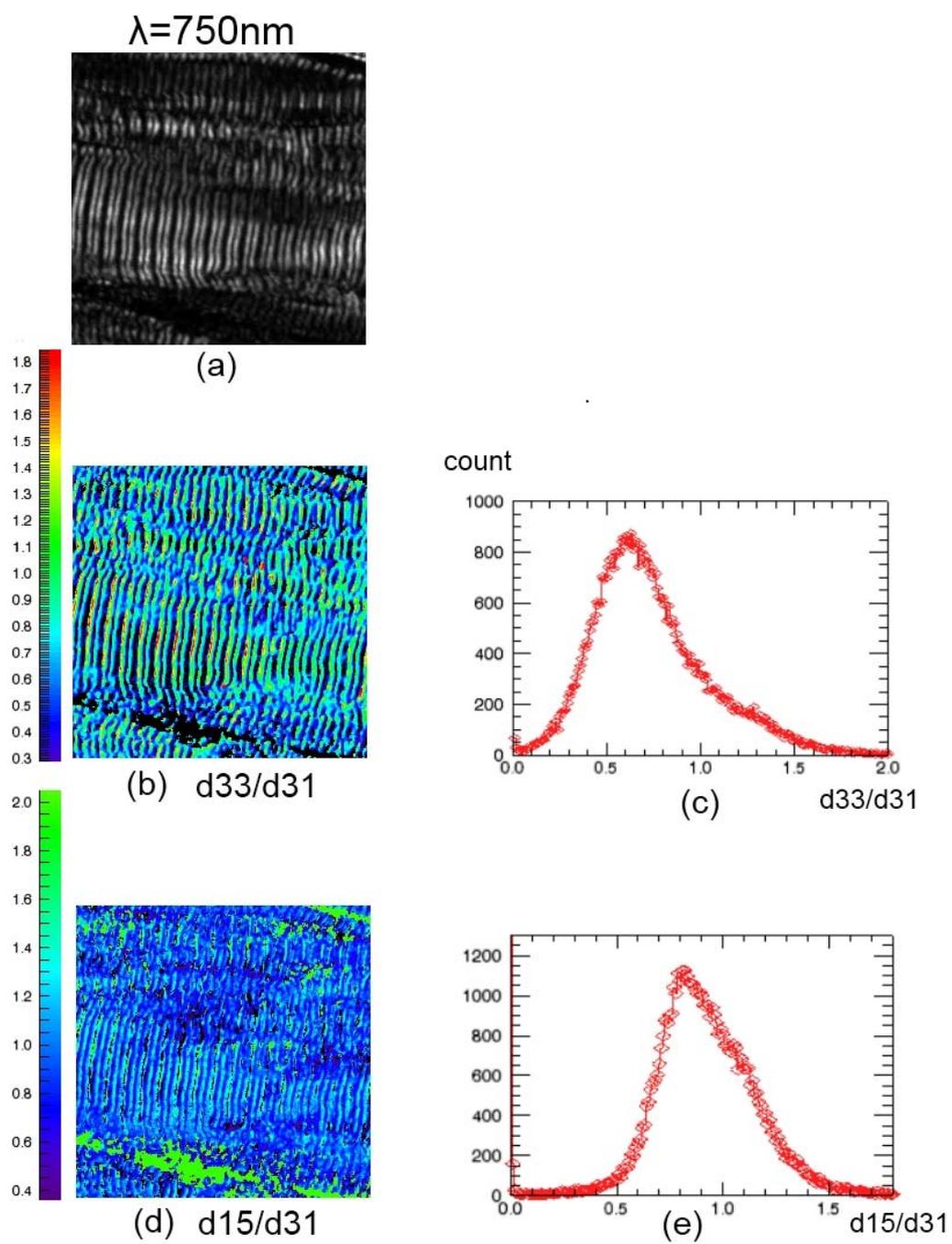
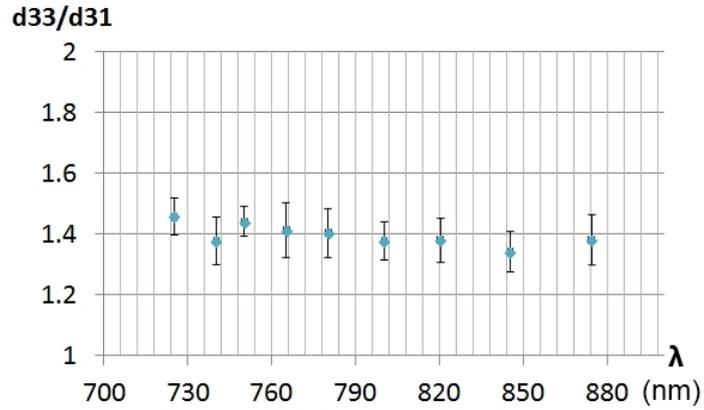
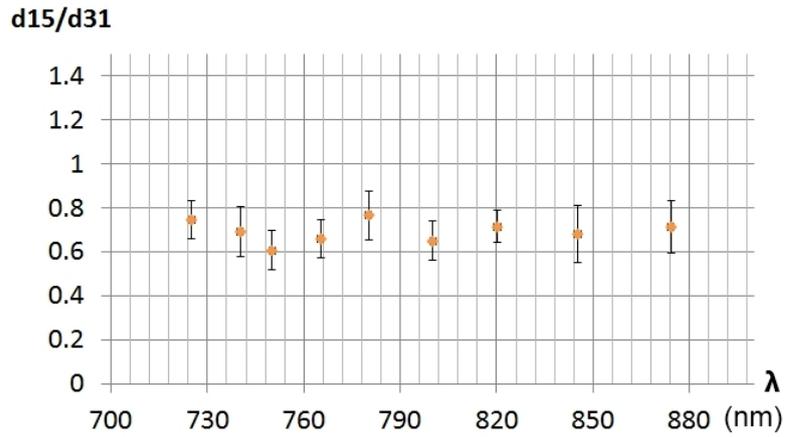


圖 5-7(a)SHG image of muscle fiber at 750nm(b) $d_{33}/d_{31}$  value(c) $d_{33}/d_{31}$  histogram (d) $d_{15}/d_{31}$  value(e) $d_{15}/d_{31}$  histogram

最後將不同入射光波長所得到的二階極化率張量比值整理如下：



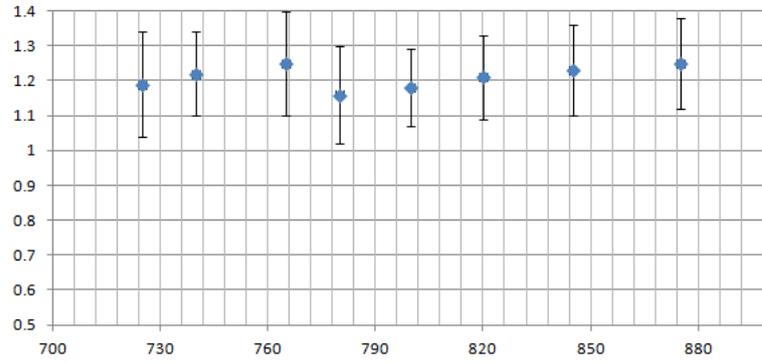
Rat-tail tendon	725 nm	740 nm	750 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm	874 nm
d33/d31	1.46 ± 0.06	1.38 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.41 ± 0.09	1.41 ± 0.08	1.38 ± 0.06	1.38 ± 0.07	1.34 ± 0.07	1.38 ± 0.08



Rat-tail tendon	725 nm	740 nm	750 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm	874 nm
d15/d31	0.75 ± 0.09	0.69 ± 0.11	0.61 ± 0.09	0.66 ± 0.09	0.77 ± 0.11	0.65 ± 0.09	0.72 ± 0.07	0.69 ± 0.13	0.72 ± 0.12

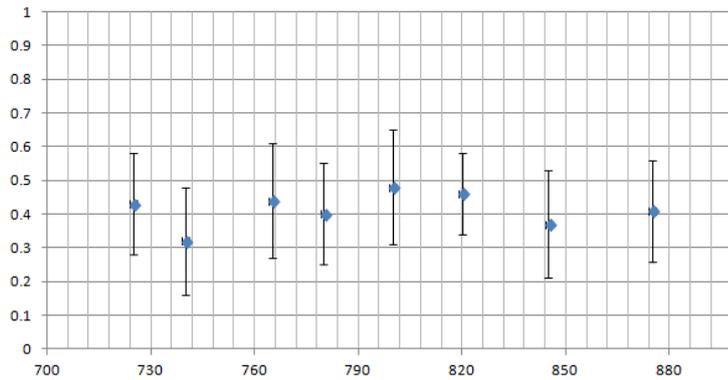
圖 5-8 rat-tail tendon 在不同波長的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$

**d33/d31 of trachea cartilage**



Rat trachea cartilage	725 nm	740 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm	875 nm
d33/d31	1.19 ±0.15	1.22 ±0.12	1.25 ±0.15	1.16 ±0.14	1.18 ±0.11	1.21 ±0.12	1.23 ±0.13	1.25 ±0.13

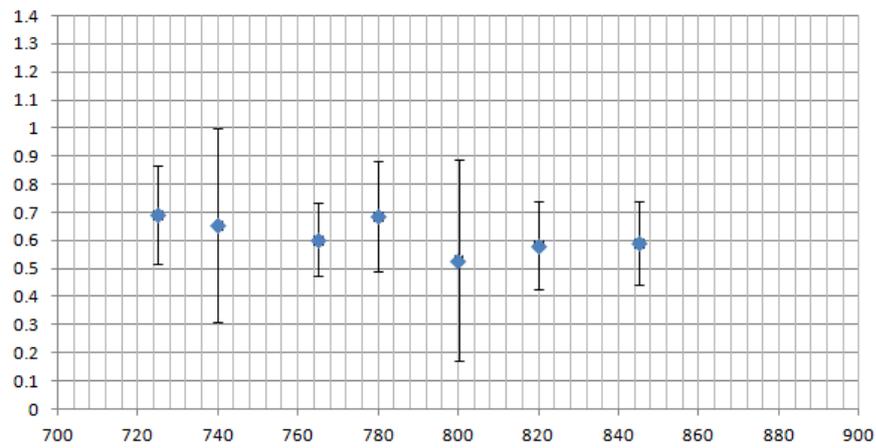
**d15/d31 of trachea cartilage**



Rat trachea cartilage	725 nm	740 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm	875 nm
d15/d31	0.43 ±0.15	0.32 ±0.16	0.44 ±0.17	0.40 ±0.15	0.48 ±0.17	0.46 ±0.12	0.37 ±0.16	0.41 ±0.15

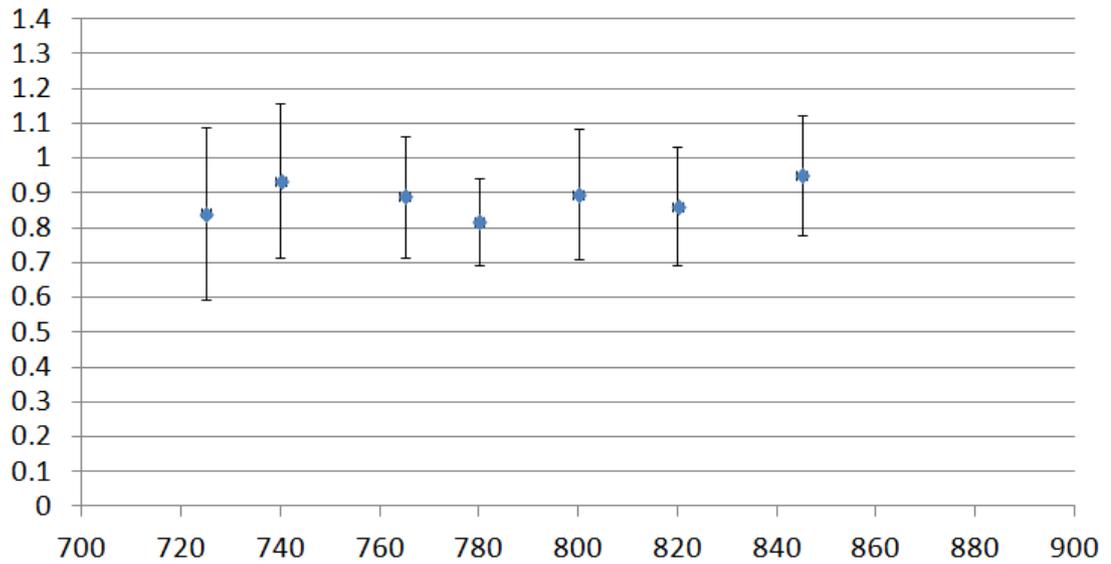
圖 5-9 rat-trachea cartilage 在不同波長的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$

muscle fiber d33/d31



Rat-leg muscle	725 nm	740 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm
d33/d31	0.69 ± 0.17	0.66 ± 0.34	0.60 ± 0.13	0.69 ± 0.20	0.53 ± 0.36	0.58 ± 0.16	0.59 ± 0.15

muscle fiber d15/d31



Rat-leg muscle	725 nm	740 nm	765 nm	780 nm	800 nm	820 nm	845 nm
d15/d31	0.84 ± 0.25	0.94 ± 0.22	0.89 ± 0.17	0.82 ± 0.13	0.90 ± 0.19	0.86 ± 0.17	0.95 ± 0.17

圖 5-10 rat-leg muscle fiber 在不同波長的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$

由以上的數據可得出，在我們實驗使用的波長範圍下（700nm~900nm），的確可將二階極化率的比值  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  視為一常數，與入射光頻率無關。另外我們發現，對於 rat-tail tendon 而言，其誤差較小，推測主因是其纖維的排列方向很有序且均勻，故各點得到的二階極化率比值均較接近。誤差最大的 rat-leg muscle 我們推測，由前述章節得知會隨著偏振光改變二倍頻訊號的是 myosin tail 的部分，所以雖 myosin head 會產生二倍頻，但其強度不隨偏振方向而改變，這將使程式 fitting 時會出現較大偏離的  $\chi^{(2)}$  值，故雖  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  的平均值相差不大，但其分佈的範圍較廣而增加誤差值。



## Chapter 6 結論與未來方向

Kleinman Symmetry 使用的條件是，當材料的共振頻率遠大於入射光頻率時，其二階極化率張量與入射光頻率無關，且  $\chi_{ijk}^{(2)}$  下標互換其值保持不變，可是所謂的「遠大於」其數量級是多少？本論文驗證，若材料自然共振波長在 200nm~300nm 時，入射光波長在 700nm~900nm 的範圍下，都是可以使用 Kleinman Symmetry 條件，另外我們從三維的廣義位能出發，分析材料電子運動方程，得到任一材料從理論上可以找到三個主軸，每一主軸上都有其自然共振頻率  $\omega_{ox}$ 、 $\omega_{oy}$ 、 $\omega_{oz}$ ，且二階極化率張量  $\chi_{ijk}^{(2)}$  與三個主軸的自然共振頻率有關，且可將  $\omega_{ox}$ 、 $\omega_{oy}$ 、 $\omega_{oz}$  拆成各自獨立相乘的形式，故在「理論上」敘述 Kleinman Symmetry 應為：「材料各方向的自然共振頻率  $\omega_{ox}$ 、 $\omega_{oy}$ 、 $\omega_{oz}$  皆遠大於入射光的頻率之下， $\chi_{ijk}^{(2)}$  下標互換其值保持不變，與頻率無關。」，而我們用了 rat-tail tendon、rat-trachea cartilage、rat-leg muscle fiber 等生物材料，因其有圓柱對稱特性，只需考慮  $d_{33}$ 、 $d_{31}$ 、 $d_{15}$  三項，最後得到在 700nm~900nm 的  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  趨近一常數，驗證了我們的想法。

未來可以繼續擴大波長範圍進行實驗，找出  $d_{33}/d_{31}$  與  $d_{15}/d_{31}$  到底會如何變化？以驗證論文中的理論；另一方面，若是入射光頻率遠大於自然共振頻率，從式 (2-39) 可以得到以下的近似：

$$\chi_{ijk}^{(2)} \propto \frac{1}{[(2\omega)^2 - i\gamma_i(2\omega)]} \cdot \frac{1}{(-\omega^2 + i\omega\gamma_j)} \cdot \frac{1}{(-\omega^2 + i\omega\gamma_k)} \cong \frac{1}{\omega^6}$$

若上式可成立，雖同樣滿足入射光頻率與自然共振頻率差距極大，但  $\chi_{ijk}^{(2)}$  卻與入射光頻率有關，故 Kleinman Symmetry 在此情形下將不會成立，且此時  $\chi_{ijk}^{(2)}$  對於入射光頻率非常敏感，往後也朝此方向繼續實驗發現，或許有機會應用在光學相關領域。

## REFERENCE

- [1] P. J. Campagnola, L. M. Loew " *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms* " Nature Biotechnology 21, 1356 - 1360 (2003)
- [2] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, W. W. Webb " *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation* " Jun 10;100(12):7075-7080.(2003)
- [3] M. D. Shoulders, R. T. Raines " *Collagen structure and stability*". Annu Rev Biochem 78:929-58.( 2009)
- [4] P. Stoller, B. M. Kim, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser, L. B. Silva " *Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon*", Journal of Biomedical Optics 7(2), 205–214 (April 2002)
- [5] A. Diaspro, Confocal and Two-photon Microscopy. (2001)
- [6] J. Zhang, R. Chen, W. Liu, Z. Chen, L. Shu, Y. Liu, " *The spectra character of photodegraded the pyridinoline cross-links by Hypocrellin B* " The 9th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, Journal of Physics: Conference Series 277,012016 (2011)
- [7] R.W. Boyd," *Nonlinear Optics* ." Academic Press (2003)
- [8] <http://www.amateurphotographer.co.uk/how-totech-explained/529490/depth-of-field-vs-resolution>
- [9] E. Hecht," *Optics 4th edition* " section 7.4 (2001)
- [10] S. H. Liu, R. S. Yang, R. al-Shaikh, J. M. Lane " *Collagen in tendon, ligament, and bone healing*." Clin Orthop Relat Res 318,256-278(1955)
- [11] C. Söderhäll, I. Marenholz, T. Kerscher, F. Rüschenhoff, J. Esparza-Gordillo, M. Worm, C. Gruber, G. Mayr, M. Albrecht, K. Rohde, H. Schulz, U. Wahn, N.

- Hubner, Y. A. Lee "Variants in a novel epidermal collagen gene(COL29A1) are associated with atopic dermatitis". PLoS Biol 5,e242(2007)
- [12] T. Aigner, J. Stove " *Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair*". Advanced Drug Delivery Reviews, .55(12):p. 1569~1593(2003)
- [13] R. B. Sylvie., "The Collagen Family", Cold Spring Harb Perspect Biol 2011 originally published online December 15, (2010)
- [14] <http://sa.ylib.com/MagCont.aspx?Unit=easylearn&id=1837>
- [15] <http://bhgroup.lsa.umich.edu/research/collagen>
- [16] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fibers\\_of\\_Collagen\\_Type\\_I\\_-\\_TEM.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fibers_of_Collagen_Type_I_-_TEM.jpg)
- [17] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Skeletal\\_muscle\\_-\\_longitudinal\\_section.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Skeletal_muscle_-_longitudinal_section.jpg)
- [18] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sarcomere.gif>
- [19] <http://www.studyblue.com/notes/note/n/3rd-test-muscle-contraction/deck/2336823>
- [20] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola, W. A. Mohler, " *Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres.*" Biophysical journal **90**,693-703(2006)
- [21] P. J. Su, W. L. Chen, T. H. Li, C. K. Chou, T. H. Chen, Y. Y. Ho, C. H. Huang, S. J. Chang, Y. Y. Huang, H. S. Lee, C. Y. Dong. "The discrimination of type I and type II collagen and the label-free imaging of engineered cartilage tissue" Biomaterials 31 9415-9421. (2010)
- [22] H. S. Lee, S. W. Teng, H. C. Chen, W. Lo, Y. Sun, T. Y. Lin, L. L. Chiou, C. C. Jiang, C. Y. Dong. " *Imaging human bone marrow stem cell morphogenesis in polyglycolic acid scaffold by multiphoton microscopy*". Tissue Eng;12(10):2835-41. (2006)
- [23] S. W. Chu, S. Y. Chen, G. W. Chern, T. H. Tsai, Y. C. Chen, B. L. Lin, C. K. Sun.

*"Studies of  $x(2)/x(3)$  Tensors in Submicron-Scaled Bio-Tissues by Polarization Harmonics Optical Microscopy"*. Biophysical Journal Volume 86 June 3914–3922 (2004)

- [24] B. Richard, E. Wolf *"Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System"*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences 1934-1990, 253,358-379(1959)
- [25] Markwardt, C. B. MPFITFUN. NASA/GSFC Code 662, Greenbelt, MD 20770 (<http://cow.physics.wisc.edu/~craigm/idl/idl.html>,2007).
- [26] Markwardt, C. B. MPFIT. NASA/GSFC Code 662, Greenbelt, MD 20770 (<http://cow.physics.wisc.edu/~craigm/idl/idl.html>,2007).
- [27] C. K. Chou, W. L. Chen, P. T. Fwu, S. J. Lin, H. S. Lin, C. Y. Dong" *Polarization ellipticity compensation in polarization second-harmonic generation microscopy without specimen rotation.*" Journal of Biomedical Optics 13(1),014005 (2008)
- [28] P. J. Su, W. L. Chen, Y. F. Chen, C. Y. Dong," *Determination of Collagen Nanostructure from Second-Order Susceptibility Tensor Analysis* " Biophysical Journal Volume 100 April 2053–2062. (2011)
- [29] C. K. Chou,"*Collagen Structure Analysis By Polarization Second Harmonic Generation Microscopy*" Department of Physics College of Science National Taiwan University Master Thesis.(2007)
- [30] B. C. Stuart, M. D. Feit, S. Herman, A. M. Rubenchik, B. W. Shore, M. D. Perry *"Nanosecond-to-femtosecond laser-induced breakdown in dielectrics."* Physical Review B,53 1749-1761 (1996)
- [31] P. Stoller, K. M. Reiser, P. M. Celliers, A. M. Rubenchik."*Polarization Modulated Second Harmonic Generation in collagen.*" Biophysical Journal Volume 82 June 2002,3330-3342.(2002)
- [32] E. C. Rothstein, S. Carroll, C. A. Combs, P. D. Jobsis, R. S. Balaban" *Skeletal*

*Muscle NAD(P)H Two-Photon Fluorescence Microscopy In Vivo: Topology and Optical Inner Filters*" Biophysical Journal Volume 88 March 2165–2176 (2005)

- [33] I. Gusachenko, G. Latour, M. C. Schanne-Klein" *Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues*"August Vol. 18, No. 18 OPTICS EXPRESS 19340 (2010)

