

國立臺灣大學工學院機械工程研究所

碩士論文

Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

以扭轉模式原子力顯微鏡量測磷脂雙層膜之研究

Study of Lipid Bilayer using Torsion Mode Atomic

Force Microscope

張邑華

I-Hua Chang

指導教授：廖先順 博士

Advisor: Hsien-Shun Liao, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July, 2023



## 致謝


碩士班生涯轉眼間就快要結束了，首先我要感謝先順老師。除了讓我提早一年先進實驗室學習以外，在實驗遇到問題時也總是能夠迅速發現核心問題幫我解決。

感謝中研院的黃英碩老師、陳祺老師、志文學長、敬修學長、崇開學長，在我需要幫助時總是能夠給予幫助。尤其志文學長及敬修學長在我掃圖或程式遇到問題時總是不厭其煩的幫我解決問題。此外也要感謝精工室的師傅們，除了幫我做出各種複雜的工件以外，也幫我們解答各種加工上遇到的問題。

感謝實驗室的學長：鉉權、政融、亞康、柏魁、沂浩、心平、建源、式新在實驗上給予我各種幫助。感謝同屆的暄文、守程、俊佑，除了平常在實驗及論文撰寫時互相幫助以外，閒暇時也能一起到處走走晃晃。感謝實驗室的學弟妹：沛宸、凱彥、起雲、泓升、彥瑋給予的各種幫助讓我能順利完成實驗。

感謝我的家人，讓我能夠無後顧之憂地進行實驗並給予我極大的支持及鼓勵。另外也要感謝朋友們，除了閒暇時的消磨時間放鬆以外也能適時給予建議。

## 摘要



由於原子力顯微鏡(Atomic force microscope, AFM)有著能夠在不同溶液中得到樣本奈米級表面形貌以及微尺度機械性質的能力，一直是研究生物樣本的一大利器。其中磷脂雙層膜(Lipid bilayer)是組成細胞膜結構的代表性樣本之一。儘管使用原子力顯微鏡對磷脂雙層膜的各種研究不勝枚舉，卻鮮少有對其平面方向(In-plane)性質的研究。本論文使用扭轉(Torsion)以及輕敲(Tapping)的混和模式對 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) 及 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) 兩種磷脂質進行量測，結果顯示振幅、相位訊號能在雲母及兩種磷脂雙層膜上得到明顯差異。此外，相較於輕敲膜是，扭轉模式在相位上能夠得到更高的對比。實驗也對兩種磷脂雙層膜進行了力體積模式(Force volume)掃描。透過分析逐點力圖計算探針與樣本接觸點位置得到磷脂雙層膜厚度約為 2 至 4 nm，而利用探針刺穿磷脂雙層膜時之振幅、偏折力圖資訊則計算出平均膜厚約為 5 nm。此外，由力圖變化之斜率差異可以辨別材料軟硬度。

關鍵字：原子力顯微鏡、磷脂雙層膜、扭轉模式、力體積模式

## Abstract

Atomic force microscope (AFM) has the ability to measure surface morphology and mechanical properties at nano-scale, which is a powerful tool for studying biological samples. Lipid bilayer is one of the typical biological samples, which is the basic structure of the cell membrane. Although lipid bilayer has been widely studied by using AFM, its in-plane mechanical properties are still rarely discussed. In this thesis, a hybrid mode of torsion and tapping modes AFM was used to measure two types of the lipid bilayers, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC). The results show that significant contrast can be obtained on both amplitude and phase signal between mica and the lipid bilayers, and the phase signal of the torsion mode provided a higher contrast comparing with the tapping mode. Moreover, by using the force volume mode, the contact point positions between the cantilever tip and sample were calculated at each image pixels, and the thickness of the lipid bilayers was about 2 to 4 nm. By analyzing both amplitude and deflection force curve, an average thickness of 5 nm was obtained. Furthermore, the slope of the force curve can be utilized to distinguish the material stiffness.

Key words: atomic force microscope, lipid bilayer, torsion mode, force volume mode

# 目錄



致謝.....	i
摘要.....	ii
Abstract.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vii
表目錄.....	xi
一、 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 文獻回顧.....	1
1.2.1 AFM 起源及優勢.....	1
1.2.2 掃描模式簡介.....	2
1.2.3 懸臂探針偏折量測方法.....	3
1.2.4 TR 相關量測.....	4
1.2.5 磷脂雙層膜簡介.....	8
1.3 研究目的.....	10
1.4 內容簡介.....	10
二、 AFM 原理.....	12
2.1 AFM 架構.....	12
2.2 光偏折式光路.....	13
2.3 回饋模式原理.....	13
2.4 扭轉共振模式與垂直共振模式之比較.....	15
三、 實驗架構.....	18
3.1 系統架構.....	18
3.1.1 原系統.....	18
3.1.2 系統更改.....	19
3.1.3 修改後系統.....	21

3.2	實驗儀器.....	22
3.2.1	微懸臂探針與固定 .....	22
3.2.2	雷射與四象限感測儀 .....	23
3.2.3	訊號濾波放大器 .....	24
3.2.4	鎖相放大器 .....	24
3.2.5	資料擷取卡 .....	26
3.2.6	PXIe(National Instruments, NI).....	27
3.2.7	高壓放大器 .....	28
3.2.8	Z 軸位移平台 .....	29
3.2.9	壓電致動器 .....	29
3.3	樣本準備.....	30
3.4	實驗流程.....	32
3.4.1	垂直方向靈敏度 .....	32
3.4.2	水平方向靈敏度 .....	33
3.4.3	扭轉模式與輕敲模式 .....	34
3.4.4	力體積模式 .....	35
四、	實驗結果與討論.....	37
4.1	壓電致動器非線性.....	37
4.2	探針選用及其影響.....	38
4.3	水平方向靈敏度.....	39
4.4	高度校正.....	42
4.4.1	扭轉及輕敲模式 .....	42
4.4.2	力體積模式 .....	43
4.5	樣本掃描.....	44
4.5.1	HOPG .....	44
4.5.2	DOPC.....	45
4.5.3	DPPC .....	47
4.5.4	DOPC+DPPC .....	49

五、 結論與未來展望.....	70
參考文獻.....	71
附錄 A FMAuD 探針規格表.....	75
附錄 B CSC38 探針規格表.....	76
附錄 C PDQ80A 規格表.....	77



## 圖目錄



圖 1.1 G. Binnig 等人所開發之 AFM(a)原理及(b)架構圖[1]。	2
圖 1.2 (a)非接觸(b)暫接觸(c)接觸掃描模式[4]。	3
圖 1.3 (a)光槓桿式與(b)像散式 AFM 之雷射光點於 PSD 上之變化示意圖[2, 10]。	4
圖 1.4 雷射於探針上移動對應 XY 振幅圖[15]。	5
圖 1.5 HOPG 之(a)VR 高度(b)VR 相位(c)TR 相位圖[15]。	6
圖 1.6 MICA 之(a)高解析度影像(b)影像中兩相鄰掃描線剖面圖[17]。	6
圖 1.7 聚苯乙烯於 HOPG 表面上之(a)接觸模式(b)TR 模式高度影像及(c)偏折量 (d)TR 振幅力圖[19]。	7
圖 1.8 雲母表面之(a)高度影像(b)TR 頻率變化(c)結構簡圖(d)側視圖[20]。	7
圖 1.9 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC) 隨溫度上升形貌變化 圖[22]。	9
圖 1.10 (a)15°C 製備 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE)(b)30°C 製備之 POPE(c)15°C 製備之 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero- 3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (sodium salt)(POPG)(d)20°C 製備之 POPG，左 359nm/s、右 930nm/s 之力圖[26]。	10
圖 2.1 AFM 架構示意圖。	12
圖 2.2 (a)光槓桿原理(b)四象限儀示意圖。	13
圖 2.3 (a)接觸式、(b)輕敲式、(c)力體積式掃描示意圖。	14
圖 2.4 力圖示意圖，藍色線條為探針靠近樣本，紅色線條為探針遠離樣本。	15
圖 2.5 Torsion mode 示意圖[27]。	16
圖 2.6 Hydrodynamic function 對雷諾數(Reynolds number, Re)之值[27]。	17
圖 3.1 莊沂浩系統架構實體圖[29]。	18
圖 3.2 (a)原系統(b)新系統 PSD 位移平台架構實體圖。	19



圖 3.3 (a)原系統(b)新系統探針夾持示意圖。	20
圖 3.4 樣本放置原件實體圖。	20
圖 3.5 系統(a)架構圖(b)實體圖。	21
圖 3.6 Liquid cell(a)正面(b)背面實體圖。	22
圖 3.7 (a)雷射(b)透鏡(c)整體組裝圖[29]。	23
圖 3.8 PDQ80A 實體圖。	23
圖 3.9 SR560 實體圖。	24
圖 3.10 (a)easyPLL(b)HF2LI 實體圖。	25
圖 3.11 USB 6259 實體圖。	26
圖 3.12 PXIe 控制系統實體圖。	27
圖 3.13 高壓放大器實體圖。	28
圖 3.14 Z 軸位移平台示意圖[29]。	29
圖 3.15 PICA 實體圖。	29
圖 3.16 Lipid 溶液製備器材圖。	31
圖 3.17 SLB 培養製具實體圖。	32
圖 3.18 垂直靈敏度量測示意圖。	33
圖 3.19 水平靈敏度量測示意圖。	34
圖 3.20 扭轉/輕敲模式流程圖。	35
圖 3.21 力體積模式流程圖。	36
圖 4.1 PG 標準片圖。	37
圖 4.2 PG 標準片之連續掃描高度影像，圖中箭頭為掃描方向。	38
圖 4.3 CSC38-A 探針熱擾動頻譜，上圖為 X 訊號，下圖為 Y 訊號。	39
圖 4.4 接觸式掃描同時取得之(a)向右掃描(trace) (b)向左掃描(retrace) PSD X 訊號。	40

圖 4.5 不同掃描線分析之靈敏度圖，六組圖中的上圖為掃描線去回 PSD X 電壓、 中圖為用於擬合之線段、下圖為擬合線方程式。.....	41
圖 4.6 探針在(a)正常情況(b)受到排斥力(c)受到吸引力時激振情形示意圖。 ...	43
圖 4.7 回饋高度與接觸點位置差示意圖。 .....	44
圖 4.8 量測 HOPG 時探針(a)偏折(b)TR 振幅力圖，白線為探針接近樣本，紅線 為探針離開樣本。 .....	45
圖 4.9 HOPG 之(a)TR 回饋高度(b)TR 相位影像。 .....	45
圖 4.10 量測 DOPC 時探針(a)偏折(b)3 <sup>rd</sup> VR 振幅(c)TR 振幅力圖，圖中黑線為探 針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。 .....	46
圖 4.11 DOPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅電壓(c)力體積模式影像，圖中紅圈處 為相同位置。 .....	46
圖 4.12 量測 DPPC 時探針(a)偏折(b)3 <sup>rd</sup> VR 振幅(c)TR 振幅力圖，圖中黑線為探 針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。 .....	47
圖 4.13 DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c)VR 回饋高度(d)TR 相位(e)VR 回饋 高度(f)VR 相位影像，其中(a)(b)、(c)(d)、(e)(f)為同時取得。 .....	48
圖 4.14 第一組 DOPC+DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c)VR 回饋高度(d)TR 振幅影像。 .....	49
圖 4.15 第二組 DOPC+DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c) VR 回饋高度(d)TR 相位(e) VR 回饋高度(f)VR 相位影像。 .....	51
圖 4.16 第三組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)TR 相位影像。 .....	53
圖 4.17 第三組 DOPC+DPPC 力體積模式影像。 .....	53
圖 4.18 第三組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)探針垂直偏折(c)TR 回饋高度 (d)TR 相位(e)TR 回饋高度(f)VR 相位影像。 .....	54
圖 4.19 量測第三組 DOPC+DPPC 時之(a)完整力圖(b)放大力圖及取點區間(c)擬 合曲線圖，圖中綠線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。 .....	55

圖 4. 20 第三組 DOPC+DPPC 之(a)原始(b)經過偏折校正後之高度影像。	55
圖 4. 21 第四組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)VR 振幅(c)TR 回饋高度(d)TR 相位(e)TR 回饋高度(f)VR 相位影像。	57
圖 4. 22 量測第四組 DOPC+DPPC 時之(a)完整力圖(b)放大力圖及取點區間(c)擬合曲線圖，圖中綠線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。	58
圖 4. 23 第四組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)探針垂直偏折(c)校正後高度影像。	59
圖 4. 24 第四組 DOPC+DPPC 兩次力體積模式所得之高度影像。	59
圖 4. 25 於(a)mica 表面(b)lipid 上之力圖。	60
圖 4. 26 於 lipid 上之力圖示意圖，點 a, b, c, d 分別代表接觸點、刺穿點、接觸雲母點以及回饋點。	60
圖 4. 27 TR 振幅逐點力圖分析而得之(a)接觸點重建(b)刺穿點重建(c)位置 1 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖(d)位置 2 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖。	62
圖 4. 28 圖 4.27(d)之力圖放大及其(a)刺穿後(b)刺穿前靈敏度。	63
圖 4. 29 垂直偏折逐點力圖分析而得之(a)接觸點重建(b)刺穿點重建(c)位置 1 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖(d)位置 2 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖。	64
圖 4. 30 圖 4.29(d)之力圖放大及其(a)刺穿後(b)刺穿前靈敏度。	65
圖 4. 31 (a)TR 高度影像(b)振幅力圖接觸點重建影像(c)偏折力圖接觸點重建影像兩不同比較區域位置圖	66

## 表目錄

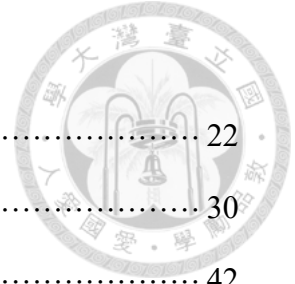


表 3.1 CSC38 各探針參數表。.....	22
表 3.2 DOPC 與 DPPC 性質表.....	30
表 4.1 轉換前探針水平靈敏度表(mV/point).....	42
表 4.2 轉換後探針水平靈敏度表(mV/nm).....	42
表 4.3 振幅力圖於區域 1 任取 10 點計算資料表。.....	66
表 4.4 振幅力圖於區域 2 任取 10 點計算資料表。.....	67
表 4.5 偏折力圖於區域 1 任取 10 點計算資料表。.....	67
表 4.6 偏折力圖於區域 2 任取 10 點計算資料表。.....	68
表 4.7 平均厚度比較表。.....	69
表 4.8 平均雙層膜靈敏度比較表。.....	69



## 一、緒論

### 1.1 研究背景

自古以來人們為了滿足對未知領域的好奇心不斷發展各式各樣的科技，而對於微觀世界的研究除了光學顯微鏡、電子顯微鏡以外，原子力顯微鏡對樣本與掃描條件之限制少，並在功能上有其不可取代之應用面向。除了能夠在水溶液環境中掃描生物樣本以外，AFM 在解析度上不受光學極限影響，可比光學顯微鏡能夠看到更細小的奈米結構。除了能夠得到表面形貌，AFM 能夠透過探針與樣本間的作用力量測出樣本的機械性質。然而常見的掃描模式如接觸式、輕敲模式 (Tapping mode) 及其他垂直共振模式 (Vertical resonance mode, VR) 僅能得到垂直方向的作用力，對於側向作用力較不靈敏或無法量測。扭轉模式 (Torsional resonance mode, TR) 便是量測側向作用力的一大利器，透過扭轉模式解讀樣品在側向反應的不同也能更加幫助我們了解樣本特性。

### 1.2 文獻回顧

#### 1.2.1 AFM 起源及優勢

AFM 於 1986 年由 G. Binnig 等人所開發[1]，透過以微懸臂探針與樣品間的交互作用力量測樣品表面形貌，其原理及架構如圖 1.1 所示：此系統透過將 B 探針與 A 樣本靠近，並以 C 端之穿隧式電子顯微鏡控制恆定之穿隧電流偵測探針之位置。同時 E 壓電在必要時可做為激振訊號源給予探針一固定振幅。AFM 的出現克服了穿隧式電子顯微鏡只能使用導電樣本的限制，也從中衍生出了不同的掃描方式如靜電力顯微術 (Electrostatic force microscopy, EFM)[2]、磁力顯微術 (Magnetic force microscopy, MFM)[3] 等。

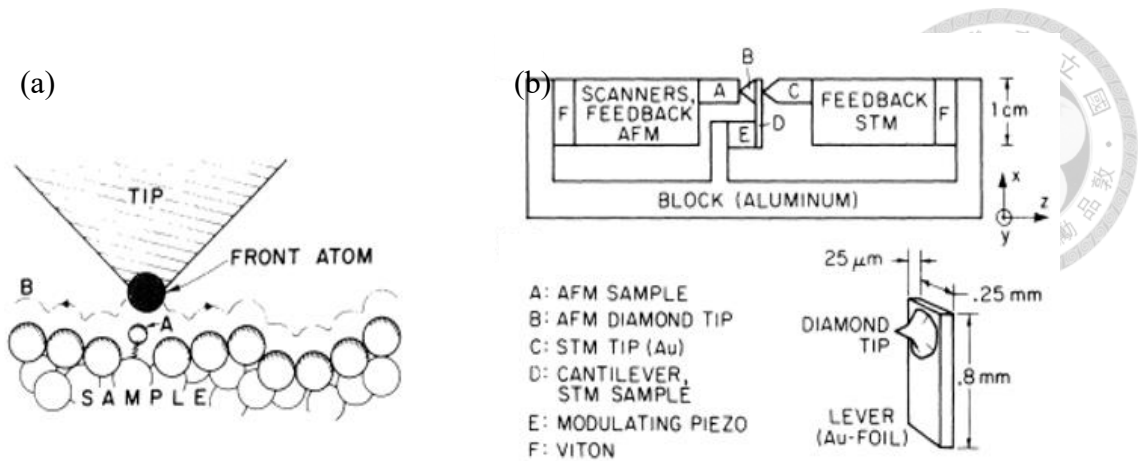


圖 1.1 G. Binnig 等人所開發之 AFM(a)原理及(b)架構圖[1]。

### 1.2.2 掃描模式簡介

通過探針與樣本間交互作用方式的不同可將掃描方式分為接觸式、非接觸式與暫接觸式三種如，圖 1.2 所示[4]。在接觸式掃描模式下，探針與樣本保持持續接觸，雖然能夠得到即時的表面形貌，但持續接觸表面所產生之側向摩擦力容易對探針及樣本造成傷害。非接觸式則利用探針與樣本間的凡德瓦力作為回饋依據，因其未與樣本實際接觸，對探針與樣本較不會造成傷害，相對的此方式受到環境影響因素較大，容易受到各種干擾影響且操作上較為困難。暫接觸式又稱為輕敲式掃描則介於兩者之間，透過探針與樣品間暫時性的接觸作為回饋，在不過度傷害樣本的情況下又有一定程度的穩定性。為了進行輕敲式掃描，常用的方法是將探針激振在其共振頻率，而激振方式包含了壓電激振[5]、熱激振[6]、靜電激振[7]、磁力激振[8]等。

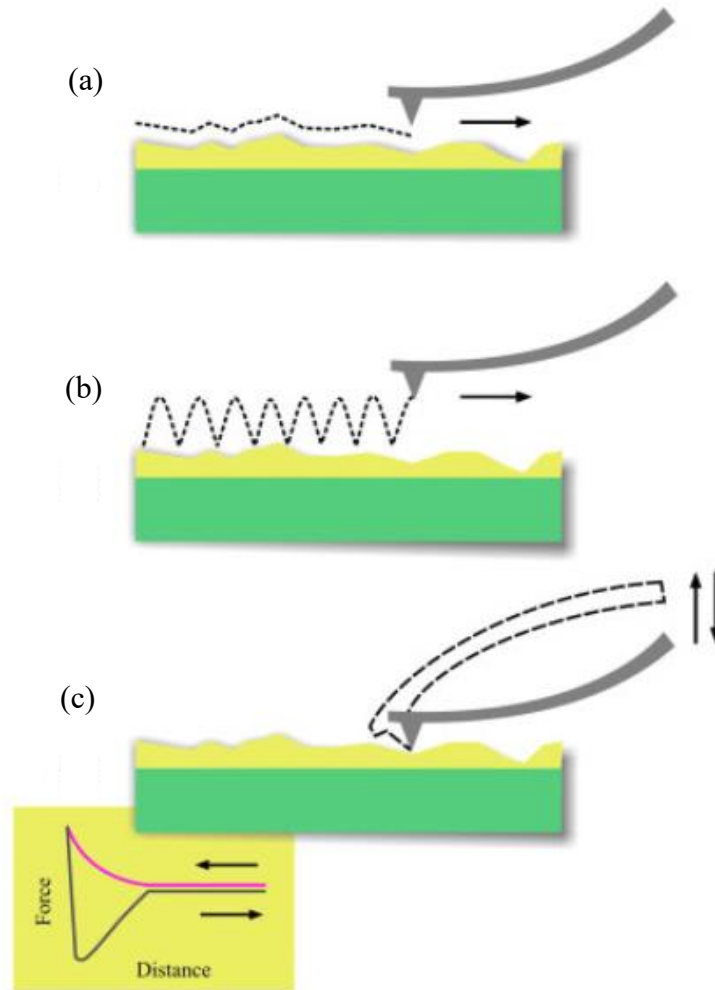


圖 1.2 (a)非接觸(b)暫接觸(c)接觸掃描模式[4]。

### 1.2.3 懸臂探針偏折量測方法

AFM 偵測微懸臂探針的方式有光偏折式、像散式、自回饋等。光偏折式透過光槓桿原理於位置感測器(Position sensitive detector, PSD)上偵測光點位置變化如圖 1.3 所示[2]。透過光點在 PSD 上不同方向的移動可以對應探針不同方向的偏折資訊：Y 方向上的訊號較多的是垂直方向的資訊，而 X 方向則能得到水平方向的資訊[9]；像散式將光束通過一或多個圓柱透鏡，透過探針在焦點附近偏折導致光點形狀變化所產生的 S 曲線得知探針位置[10, 11]。自回饋則排除了對外

部偵測機構的需求，利用探針自身偏折造成的變化得知目前位置，有壓電檢測 [12]、穿隧磁阻[13]、惠斯通電橋[14]等方法。

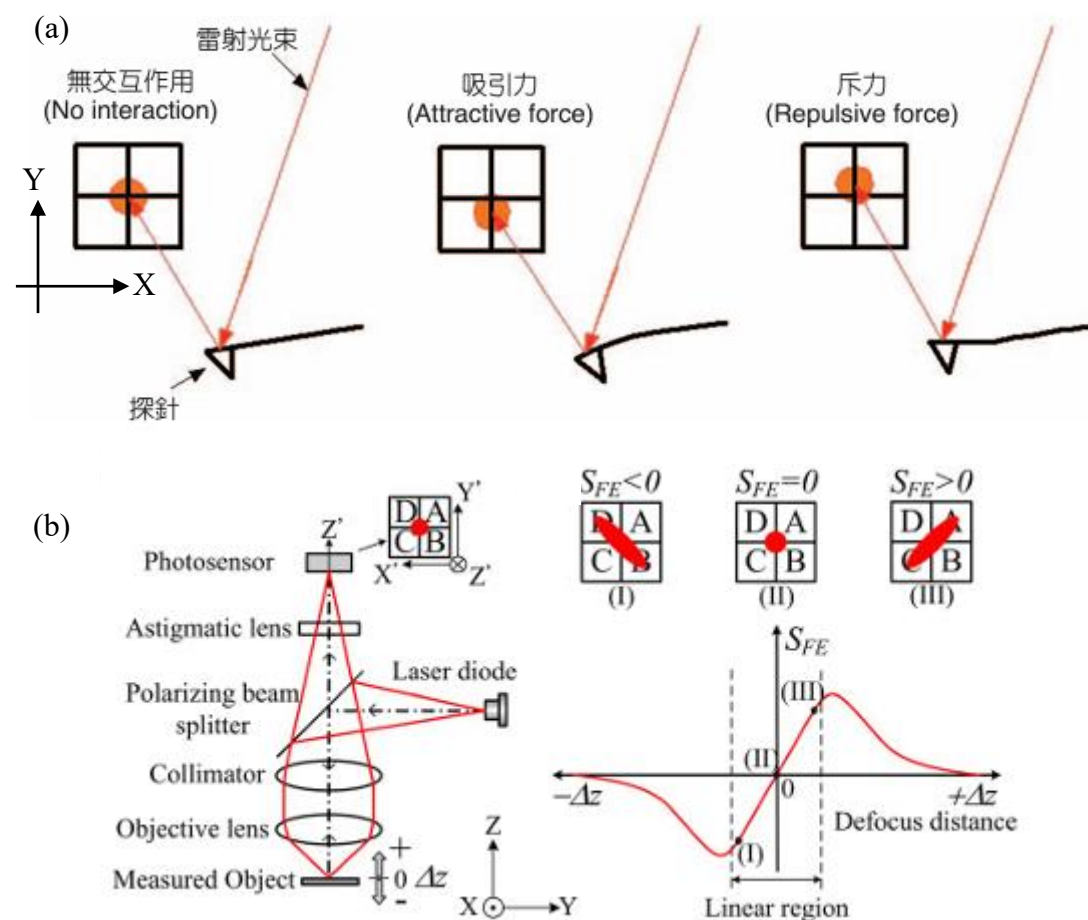


圖 1.3 (a)光槓桿式與(b)像散式 AFM 之雷射光點於 PSD 上之變化示意圖[2, 10]。

### 1.2.4 TR 相關量測

為了得到樣本在水平方向的機械性質，扭轉模式便成為了相當重要的工具之一。如圖 1.4 所示，當探針被激振在其 TR 頻率上時，隨著雷射在光點上的移動僅有 X 方向振幅有明顯變化可以得知探針為扭轉方向振動。在掃描高定向熱解石墨(Highly oriented pyrolytic graphite, HOPG)時，TR 相位對比在台階邊界上比起 VR 有著更明顯的對比，如圖 1.5 所示[15]。2004 年 Bharat Bhushan 與 Toshi Kasai 提出了一個透過 TR 量測側向摩擦力的方法，且其結果與掃描方向及樣本



表面形貌無關[16]，此方法使得摩擦力的量測變得較為簡便且免去了更改掃描方向交互檢查的步驟。2010年 Chih-Wen Yang 與 Ing-Shouh Hwang 以扭轉模式進行頻率調製，透過頻率調製較靈敏的反應以及 TR 較高的共振頻掃描之高解析度雲母影像如圖 1.6 所示[17]。2008年，Ozgun Sahin 與 Natalia Erina 以特製的 T 型探針量測多種樣本，可以在使用較小接觸力的情況得到較高的空間解析度[18]。2013年，Ing-Shouh Hwang 等人以 TR 模式進行水下掃描並發現因其對作用力的反應比起接觸式掃描更早且更靈敏，使 TR 模式能夠在探針相對較大的情況仍然得到高解析度影像，如圖 1.7 所示[19]。2020年，Megumi Umemoto 等人透過同時在探針上激振 VR 以及 TR 模式，在以 VR 模式作為高度回饋的同時取得 TR 模式的影像，得到雲母表面原子排列的結構，如圖 1.8 所示[20]。

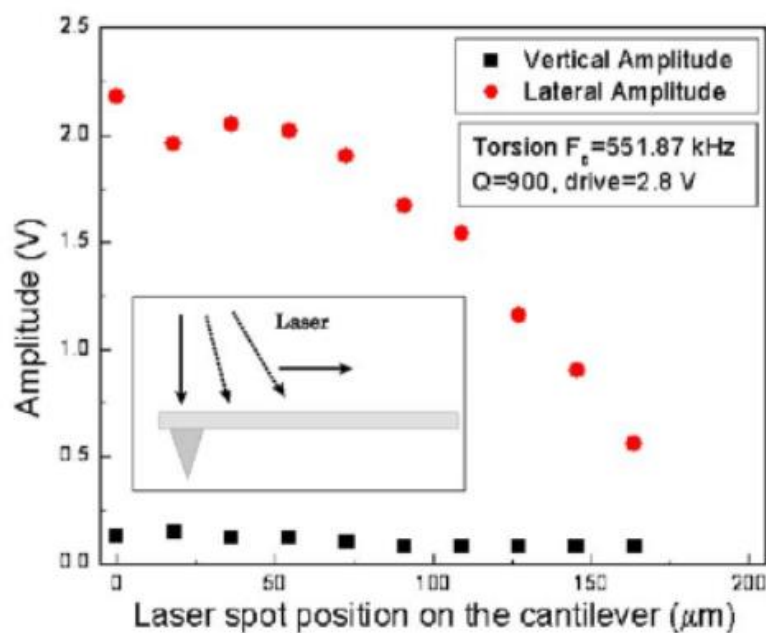


圖 1.4 雷射於探針上移動對應 XY 振幅圖[15]。

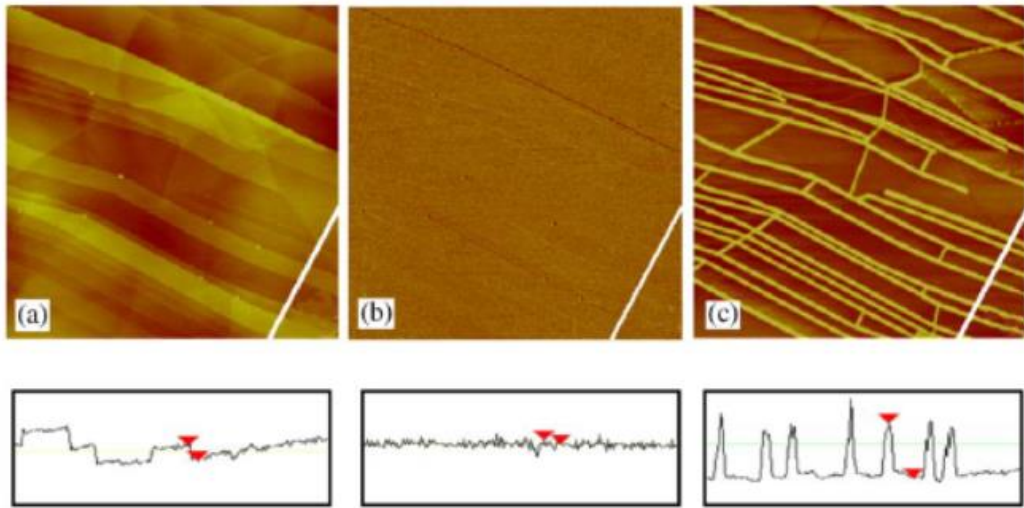


圖 1.5 HOPG 之(a)VR 高度(b)VR 相位(c)TR 相位圖[15]。

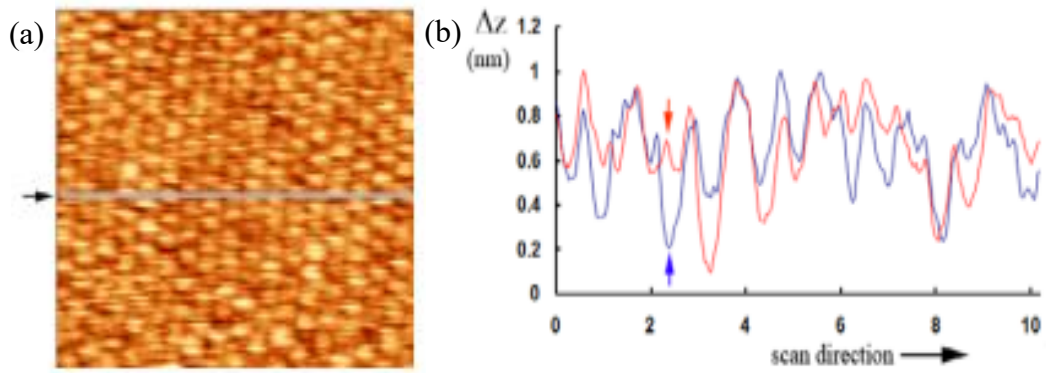


圖 1.6 MICA 之(a)高解析度影像(b)影像中兩相鄰掃描線剖面圖[17]。

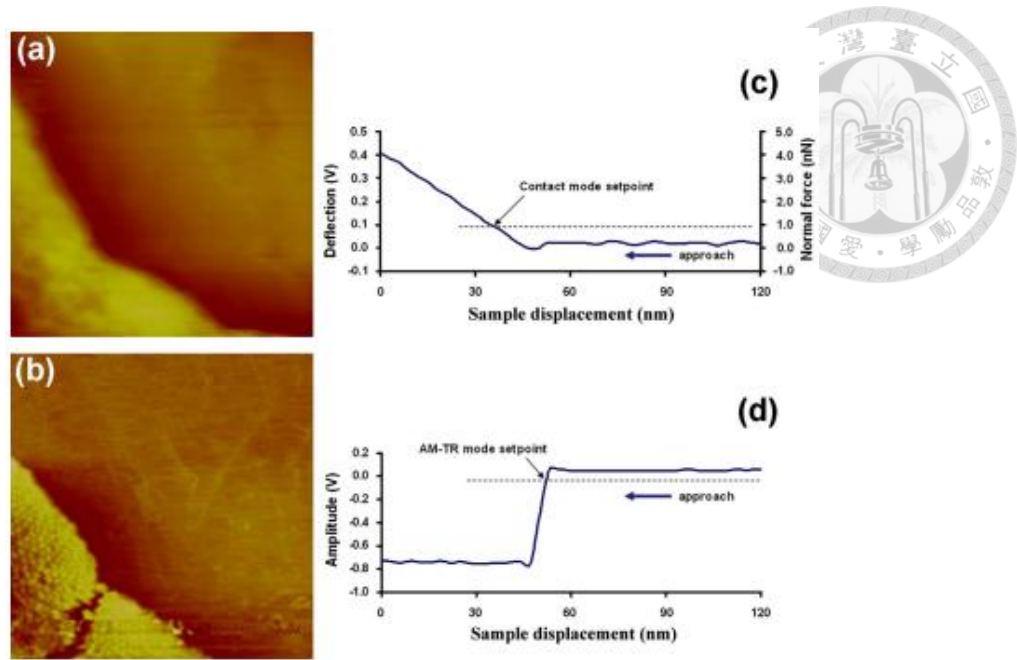


圖 1.7 聚苯乙烯於 HOPG 表面上之(a)接觸模式(b)TR 模式高度影像及(c)偏折量 (d)TR 振幅力圖[19]。

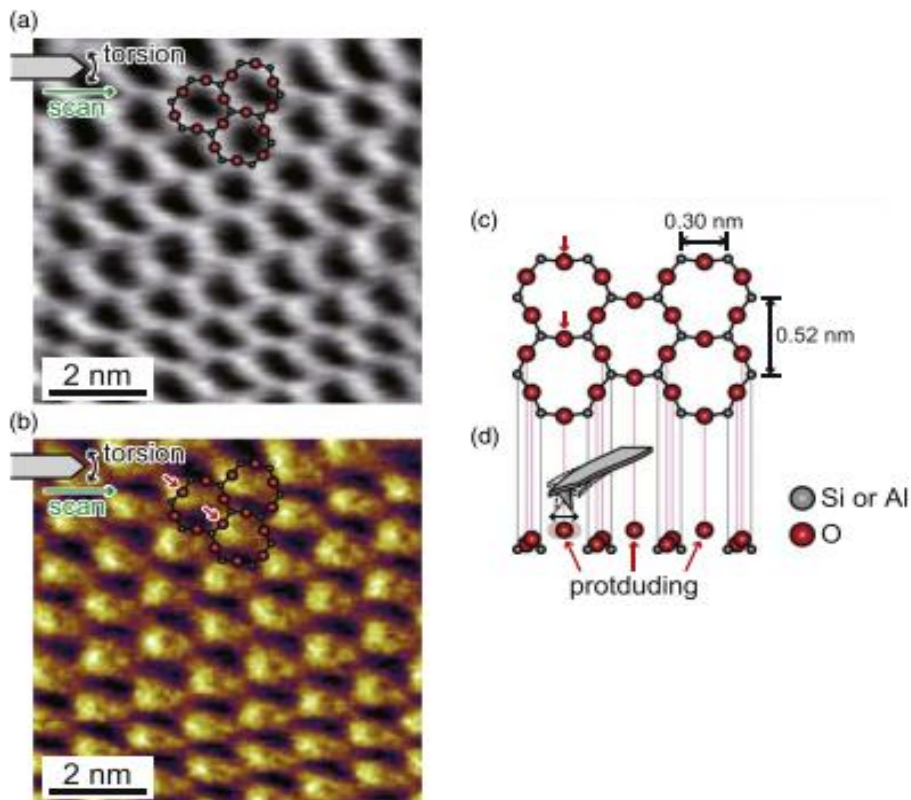


圖 1.8 雲母表面之(a)高度影像(b)TR 頻率變化(c)結構簡圖(d)側視圖[20]。

### 1.2.5 磷脂雙層膜簡介

使用 AFM 量測生物樣品的表面形貌及機械性質一直都是備受矚目的議題，其中 Lipid bilayer 便是廣被研究的樣品之一。Lipid bilayer 是細胞膜組成的基本結構。Lipid 分子由親油的長碳鏈以及親水的頭端所組成，在水中為了達到最小能量會以碳鏈端對接的方式形成雙層結構，稱為 Lipid bilayer[21]。Lipid bilayer 隨著溫度變化有不同排列方式又可分為凝膠態(Gel phase)以及液態(Liquid phase)：凝膠態在較低溫度時出現，在此狀態下 Lipid bilayer 排列較為整齊，整體厚度較厚且移動性較低；液態則在溫度較高時出現，此時 Lipid bilayer 排列較為鬆散，厚度較薄且有一定的流動性如圖 1.9 所示[22]。2012 年，Anna Åkesson 等人利用 AFM 以及其他工具量測及分析 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)以及 DPPC 所組成之支撐型磷脂雙層膜(supported lipid bilayer, SLB)在不同組成時所造成的特性改變，並闡述了樣本組成對 SLB 形成的重要性[23]。2019 年，Tatsuhiko Maekawa 等人量測了 DOPC 以及 DPPC 在不同比例下對樣本分子擴散造成的影響[24]。2012 年，Laura Picas 等人使用 PeakForce-Quantitative Nano-Mechanics(PF-QNM)模式對 DPPC 及 DOPC 進行量測得到其楊氏係數(Young's modulus)並推算出區域拉伸係數(Area stretch modulus)以及彎曲剛度(Bending stiffness)[25]。同年，Andrea Alessandrini 等人探討了在不同的 Lipid 組成成分、製備溫度以及力圖進行時探針速率對 SLB 在力圖上呈現的不同表現：在特定條件下力圖上會呈現兩個刺穿力(Break through force)而其他條件下則只有一個，如圖 1.10 所示[26]。

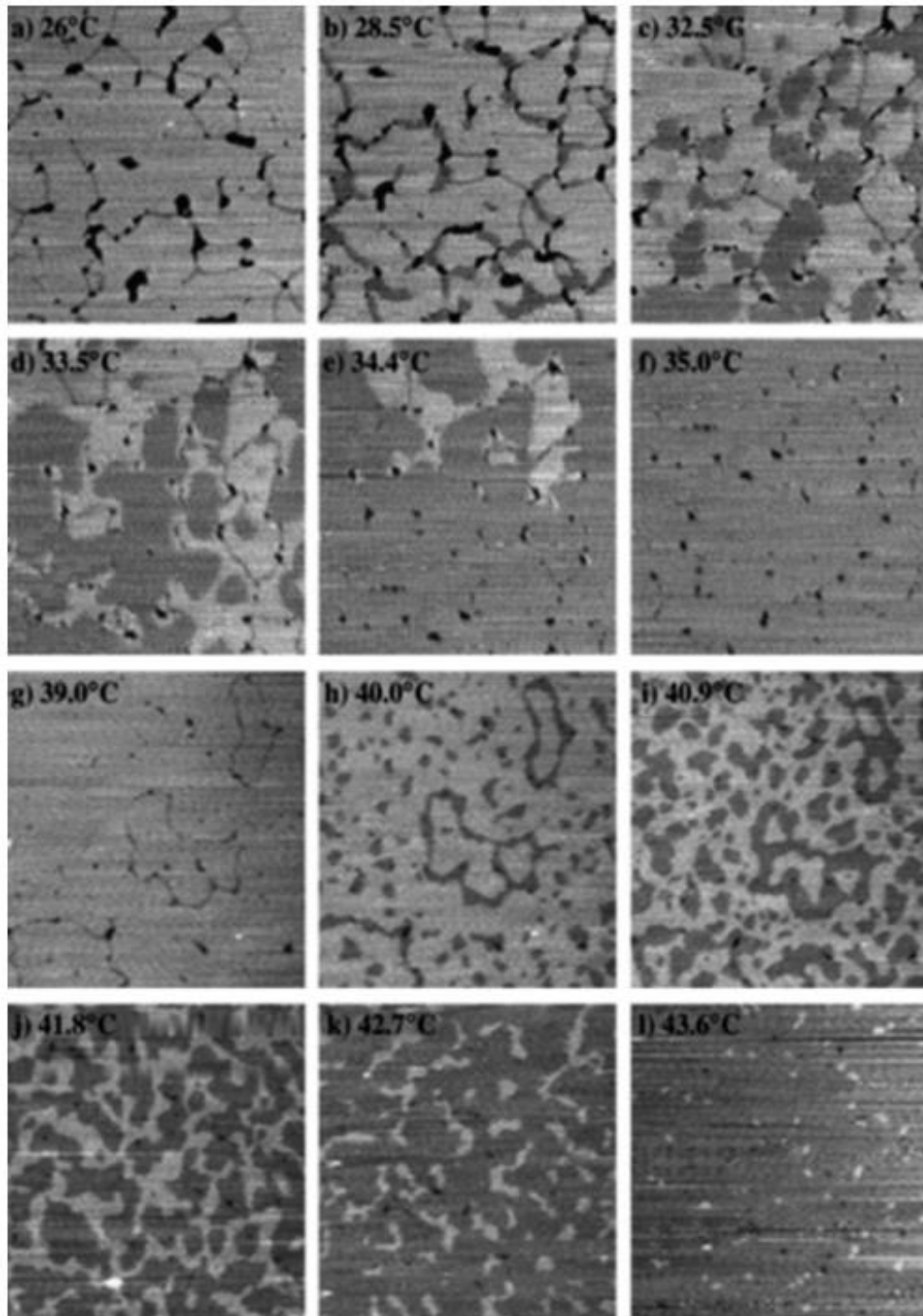


圖 1. 9 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC) 隨溫度上升形貌變化

圖[22]。

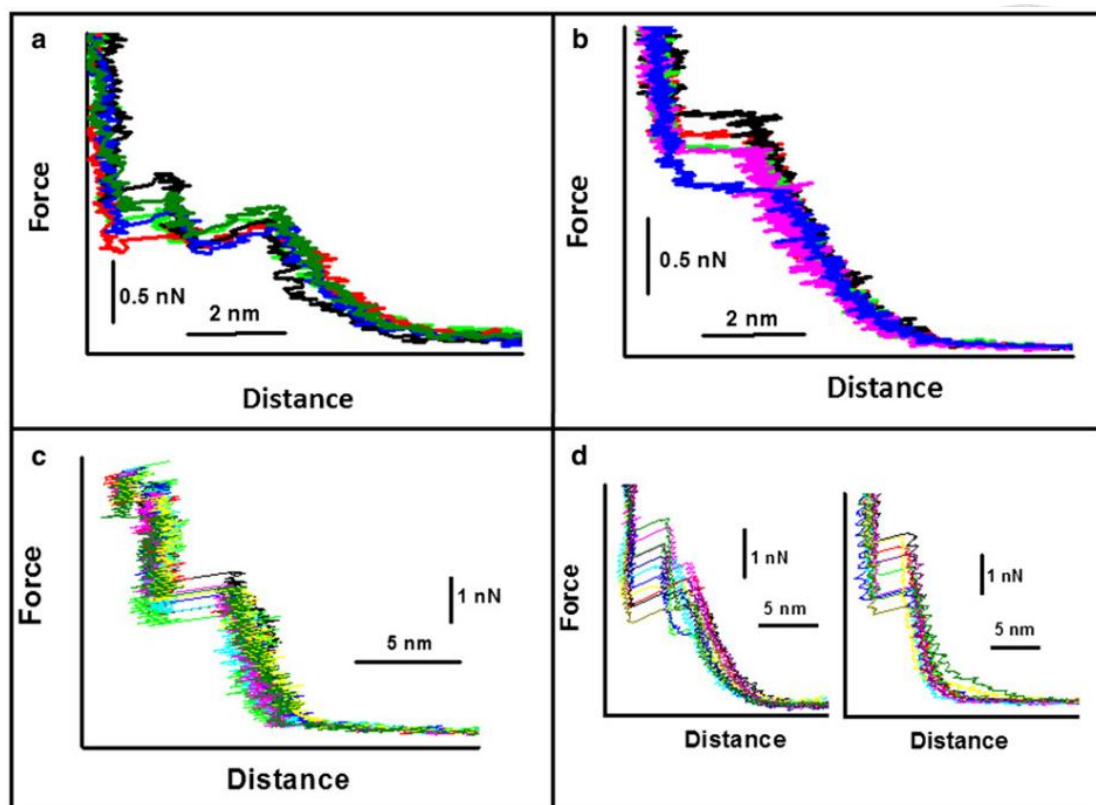


圖 1.10 (a)15°C 製備 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE)(b)30°C 製備之 POPE(c)15°C 製備之 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (sodium salt)(POPG)(d)20°C 製備之 POPG，左 359nm/s、右 930nm/s 之力圖[26]。

### 1.3 研究目的

研究微尺度下生物樣本的特性能夠幫助我們更加了解生物體基本結構及其如何應對環境變化等。雖然對於 Lipid 的相變化、混和物性質、機械性質等性質的研究不勝枚舉，卻鮮少有對 Lipid 側向性質的研究。本論文透過 TR 模式量測 DOPC 及 DPPC 樣本，希望能夠得到其在側向反應上的性質並加以比較。

### 1.4 內容簡介

本論文共分為五個章節，本章為緒論，首先介紹研究背景，接著對相關領域進行文獻回顧並講述研究目的，最後簡介論文內容。

第二章為 AFM 原理，首先介紹 AFM 基本架構，接著依序對光偏折、回饋模式進行介紹，並比較扭振模式與垂直共振模式。

第三章為實驗架構，首先對於系統的更動做介紹，接著介紹實驗所用到的儀器並說明樣本製備方法以及實驗流程。

第四章為結果與討論，分別對壓電致動器非線性、高度校正以及 HOPG、DOPC、DPPC 以及混和樣本的量測結果進行分析及討論。

第五章為結論與未來展望，總結本研究的結果後針對系統提出問題，並提出未來展望。



## 二、 AFM 原理

### 2.1 AFM 架構

AFM 大致可分為上方光路以及下方機構：上方光路通常由雷射、探針、PSD 三大元件及中間的光學元件所組成；下方機構則通常包含負責掃描的壓電致動器如壓電管、壓電塊以及用於將樣本靠近探針的步進系統，如圖 2.1 所示。

透過步進系統將樣本靠近至探針附近後以上方光路偵測微懸臂探針的偏折變化並將壓電致動器控制於特定高度進行回饋掃描以得到樣本的表面形貌及其他機械特性。

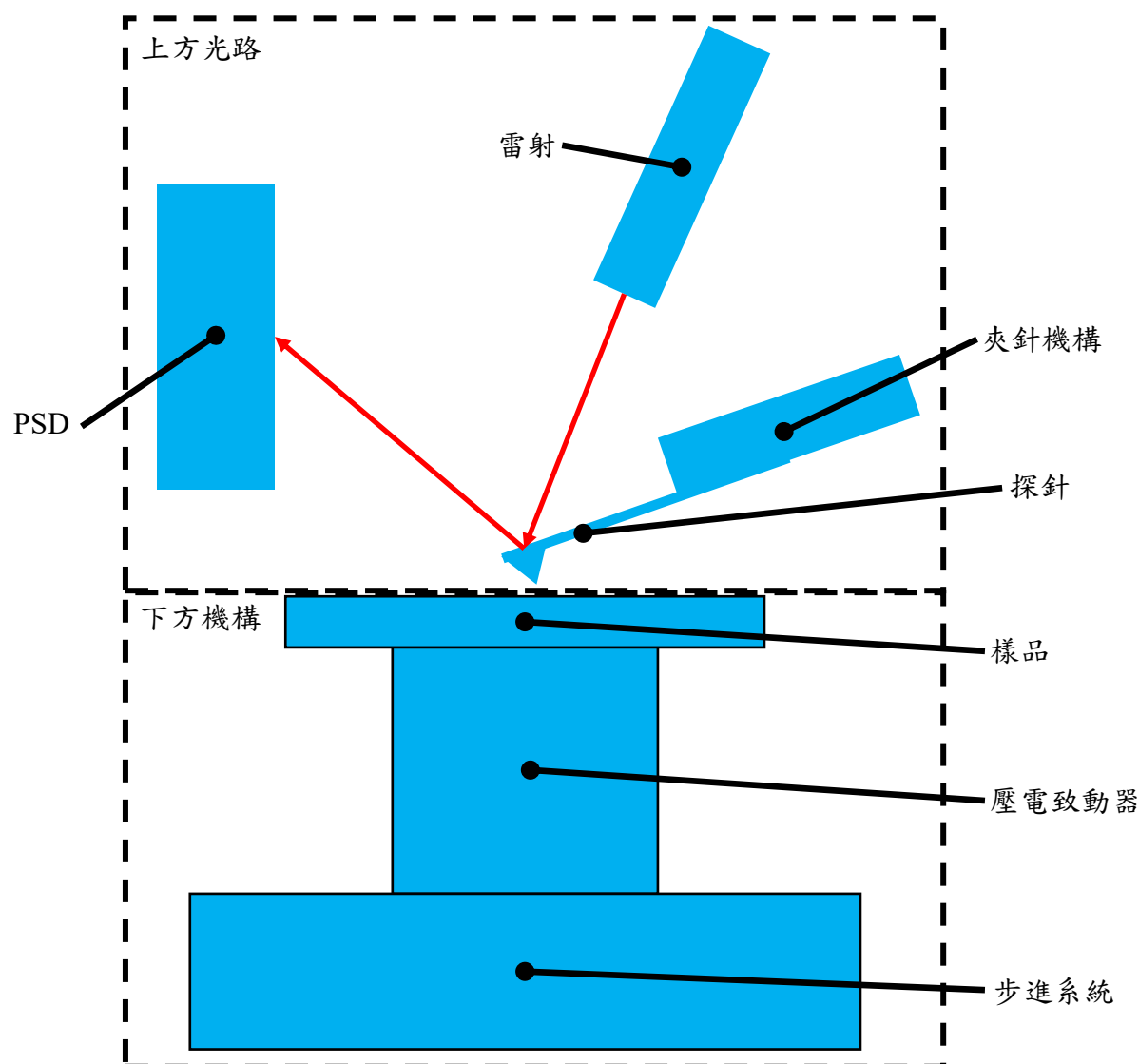


圖 2.1 AFM 架構示意圖。



## 2.2 光偏折式光路

在光偏折式的 AFM 光路中，雷射透過聚焦透鏡將光束聚焦於探針上，光反射後經過反射鏡將其打入 PSD 中進行偵測。探針的偏折變化因光槓桿原理導致光點在 PSD 上的位置隨之變動，如圖 2.2 (a)所示。PSD 為四象限位置感測架構，如圖 2.2 (b)所示。透過光點於 PSD 上位置的變動可以由式 2.1、式 2.2 計算出探針的偏折量以用於後端回饋，其中  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  分別為 PSD 四個象限分別接收到之電壓值。如果光點在 PSD 上為上下方向移動，回推探針則為上下擺動，收到的訊號為樣本垂直方向的資訊；如果光點為左右方向移動，則探針為左右扭動，收到的訊號為樣本側向資訊。

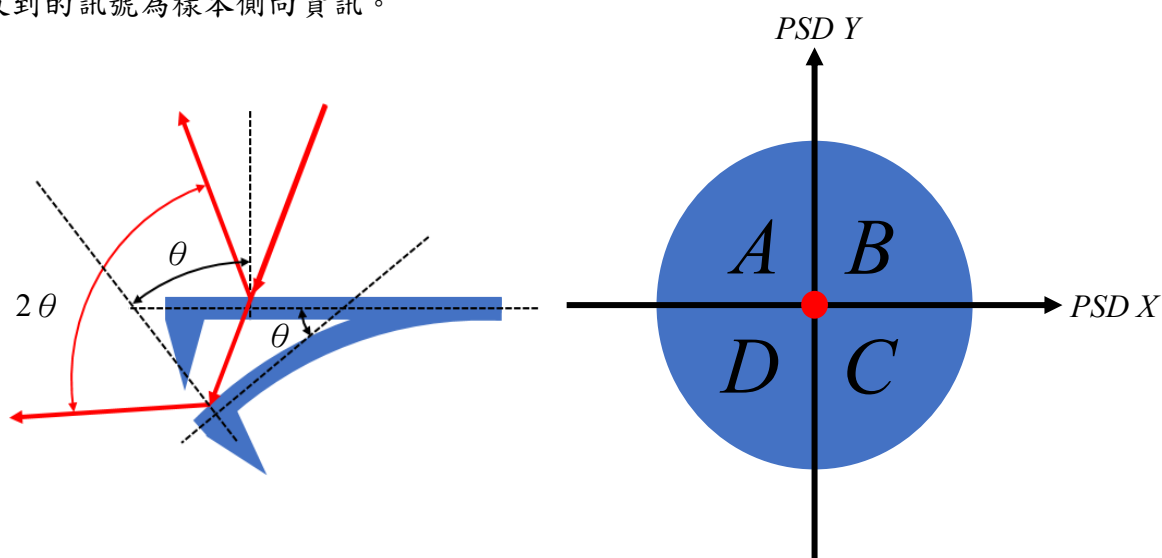


圖 2.2 (a)光槓桿原理(b)四象限儀示意圖。

$$PSD X = (B + C) - (A + D) \quad (2.1)$$

$$PSD Y = (A + B) - (C + D) \quad (2.2)$$

## 2.3 回饋模式原理

在接觸式掃描模式下，樣本與探針間保持接觸，透過懸臂的偏折量作為回饋依據，如圖 2.3 (a)所示。在此模式下樣本與探針間作用於斥力區，對於表面高度的變化較為敏感，而因為探針與樣本的持續接觸導致摩擦力的影響較大，較容易破壞探針與樣本。

進行輕敲模式時，探針被激振在其共振頻率上，當樣本與探針接近時因探針敲擊到表面造成振幅降低進而回饋至系統，如圖 2.3 (b)所示。此模式下探針與樣本間為暫時性接觸且沒有側向摩擦力，因此對探針及樣本傷害較低。為了將探針激振於共振頻率，系統透過安裝於夾針機構上的壓電片給予弦波訊號驅動壓電塊做出對應形變，以壓電塊的振動帶動夾針機構及探針整體進行振動。由於振動頻率為探針之共振頻，探針所做出的響應相較於機構會更為明顯，也能夠確保實際為探針與樣品接觸。

在力體積模式時，壓電致動器從設定位置出發，逐點進行伸長檢測，當探針接觸到樣品導致偏折量到達設定值時便收回並記錄回饋高度，如圖 2.3 (c)所示。此模式掃描時除了能得到高度資訊以外，就資料點而言每次掃描點皆進行了一次力圖掃描如圖 2.4 所示。進行力圖時系統紀錄壓電致動器的位移與 PSD 訊號，將其作圖後能夠得到探針在靠近樣本時的作用力變化。將各點力圖資料進行後續處理後能夠將各點力圖對應回高度影像形成力體積剖面圖，能夠有效讓我們了解不同區域上力圖的不同，進一步了解不同材料資訊。

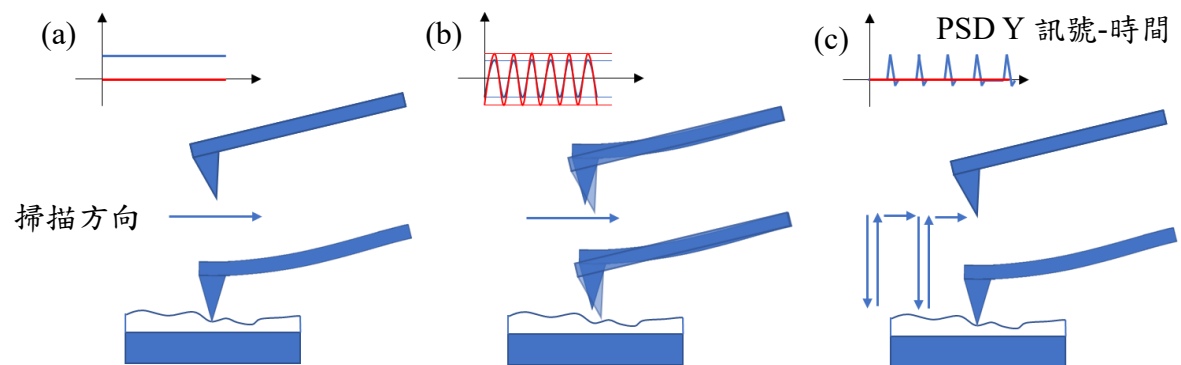


圖 2.3 (a)接觸式、(b)輕敲式、(c)力體積式掃描示意圖。

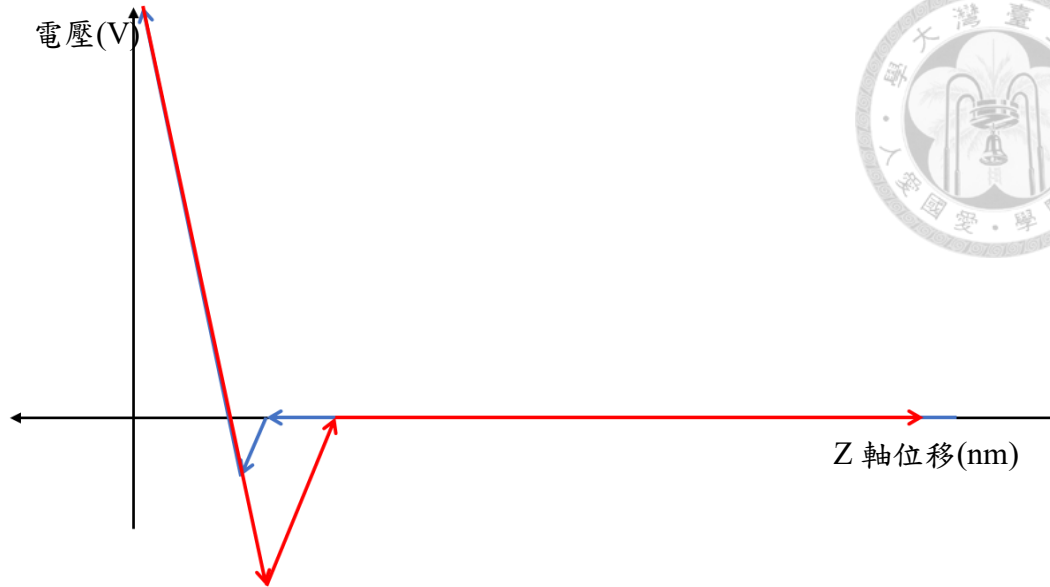


圖 2.4 力圖示意圖，藍色線條為探針靠近樣本，紅色線條為探針遠離樣本。

## 2.4 扭轉共振模式與垂直共振模式之比較

由於扭轉模式以微懸臂探針之固定端為節點進行扭轉振動，探針針尖以根部為圓心進行弧形擺動。比起垂直共振模式，扭轉模式在與樣本接觸時造成的垂直作用力可控制得更小。另外因扭轉模式之共振頻率較垂直振動模態之共振頻率高，其作用力反應通常較其他模式更靈敏。透過扭轉模式除了能夠得到高解析度的影像以外，由於探針接觸時為水平方向擺動，能夠透過其訊號回饋得到樣本於水平方向的機械性質如摩擦力等。當探針被激振於其扭轉共振頻率上時，其運動方程式為

$$\frac{GK}{L^2} \frac{\partial^2 \phi(x, t)}{\partial x^2} - \rho_c I_p \frac{\partial^2 \phi(x, t)}{\partial t^2} = m(x, t) \quad (2.3)$$

$$\phi(0, t) = 0, \left. \frac{\partial \phi}{\partial x} \right|_{x=L} = 0 \quad (2.4)$$

其中 $\phi(x, t)$ 為角度對主軸的函式，如圖 2.5 所示、 $G$  為探針剪切模量(Shear modulus)、 $K$  為探針截面積之幾何函式(Geometric function)、 $\rho_c$  為探針密度、 $L$  為探針長度、 $I_p$  為轉動慣量、 $t$  為時間、 $m(x, t)$  為單位長度所施加的扭矩對主軸的

函式，如圖 2.5 所示、 $x$  則是介於 0 至 1 的無因次量用以表示探針上之位置。經過轉換及整理之後得到

$$\hat{\Phi}(x|\omega) = \int_0^1 G(x, x'|\omega) \hat{t}_{drive}(x'|\omega) dx' \quad (2.5)$$

$$G(x, x'|\omega) = -\frac{\sec[A(\omega)]}{A(\omega)} \times \begin{cases} \cos\{A(\omega)[1-x']\} \sin[A(\omega)x], & 0 \leq x \leq x' \leq 1 \\ \cos\{A(\omega)[1-x]\} \sin[A(\omega)x'], & 0 \leq x' \leq x \leq 1 \end{cases} \quad (2.6)$$

$$A(\omega) = \frac{\pi}{2} \frac{\omega}{\omega_{vac,1}} \left( 1 + \frac{\pi \rho b^4}{8 \rho_x l_p} \Gamma(\omega) \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.7)$$

$$\hat{t}_{drive}(x|\omega) = \frac{L^2}{GK} \hat{M}_{drive}(x|\omega) \quad (2.8)$$

其中  $\Gamma(\omega)$  為流體動力函式(Hydrodynamic function)，其值如圖 2.6 所示 [27]。

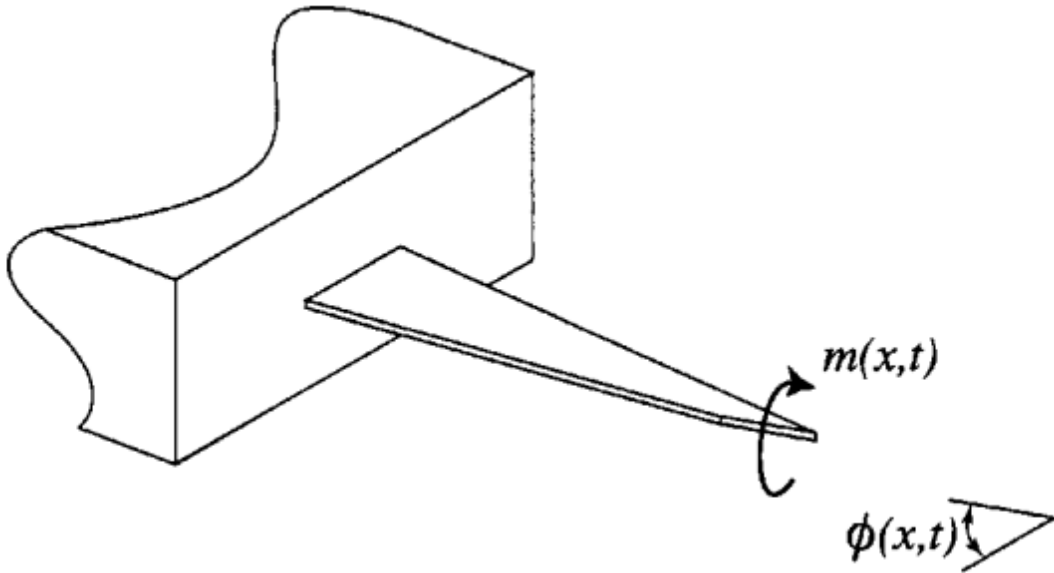


圖 2.5 Torsion mode 示意圖[27]。

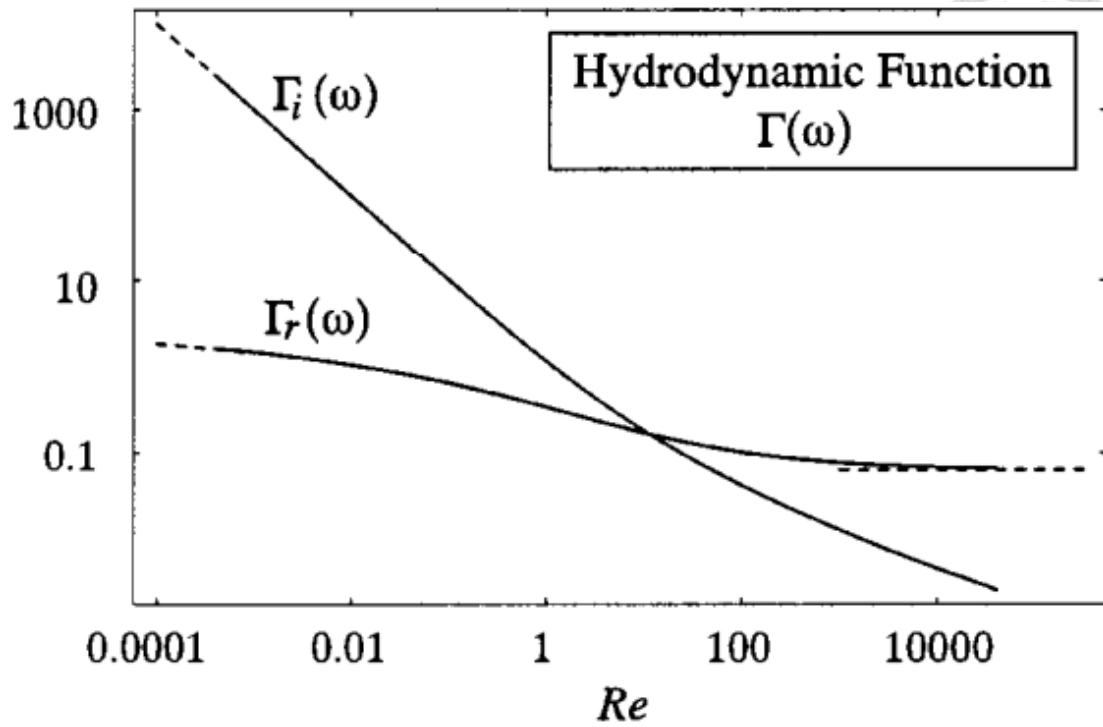


圖 2.6 Hydrodynamic function 對雷諾數(Reynolds number,  $Re$ )之值[27]。

探針扭轉方向  $k$  值則為

$$k_{\phi} = 0.1592\rho b^4 L Q_t \omega_t^2 \Gamma_i^t(\omega_t) \quad (2.9)$$

其中  $\rho$  為探針密度、 $b, L$  為探針寬度及長度、 $Q_t$  為品質因子、 $\omega_t$  為探針在液體中之第一扭轉共振頻率、 $\Gamma_i^t$  為圖 2.6 流體動力函式之虛部[28]。



### 三、 實驗架構

#### 3.1 系統架構

本研究所使用之系統為修改莊沂浩之系統而成[29]，本節將簡述新舊系統之間所做出的改動及原因。

##### 3.1.1 原系統

莊沂浩之系統照片如圖 3.1 所示：探針固定於一商用夾具上，並以夾持機構固定，並透過手動進給螺桿控制樣本及壓電致動器與探針間的距離。雷射經過聚焦透鏡聚焦於探針上，打到反射鏡後進入四象限感測儀接收探針偏折訊號[29]。

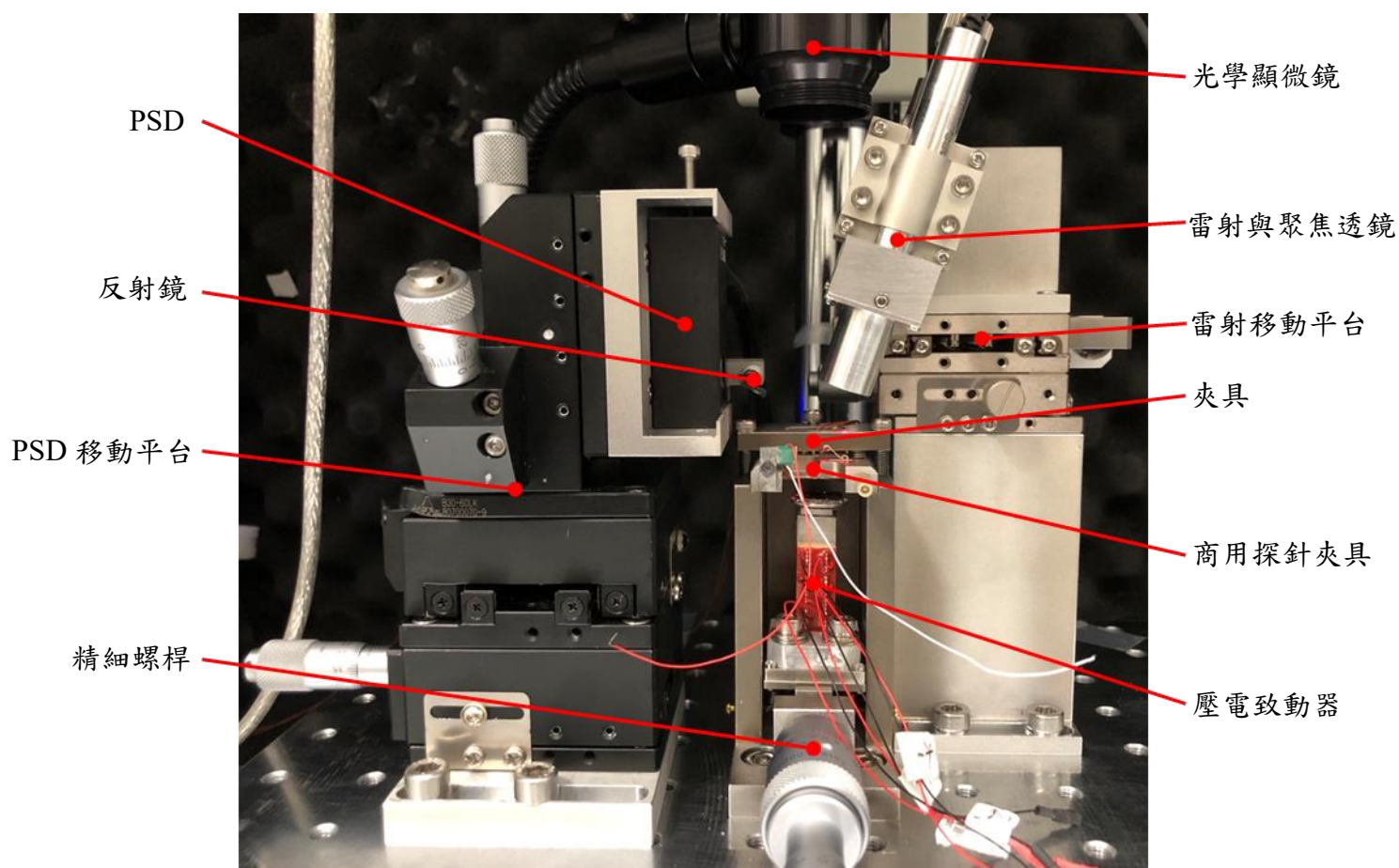


圖 3.1 莊沂浩系統架構實體圖[29]。



### 3.1.2 系統更改

莊沂浩之原系統在使用時所遇到的幾點問題有反射鏡同動、夾針不便以及樣本移動不便，以下對各項問題詳細敘述並提出改善。

原系統以一組 XYZ 位移平台帶動 PSD 及反射鏡同步移動，如圖 3.2(a)所示。此設計提高了將雷射光對齊 PSD 中心的難度：當移動 PSD 時會連帶造成雷射光於反射鏡上之反射點移動，若位置不當會導致光點移出反射鏡。新系統將原本之 Z 平台移除，將反射鏡固定於原本之 XY 平台上，並於上方安裝新的 XZ 平台以及 PSD，如圖 3.2(b)所示。此設計能夠在確保雷射進入反射鏡後單獨移動 PSD，有效降低將 PSD 訊號歸零的難度。

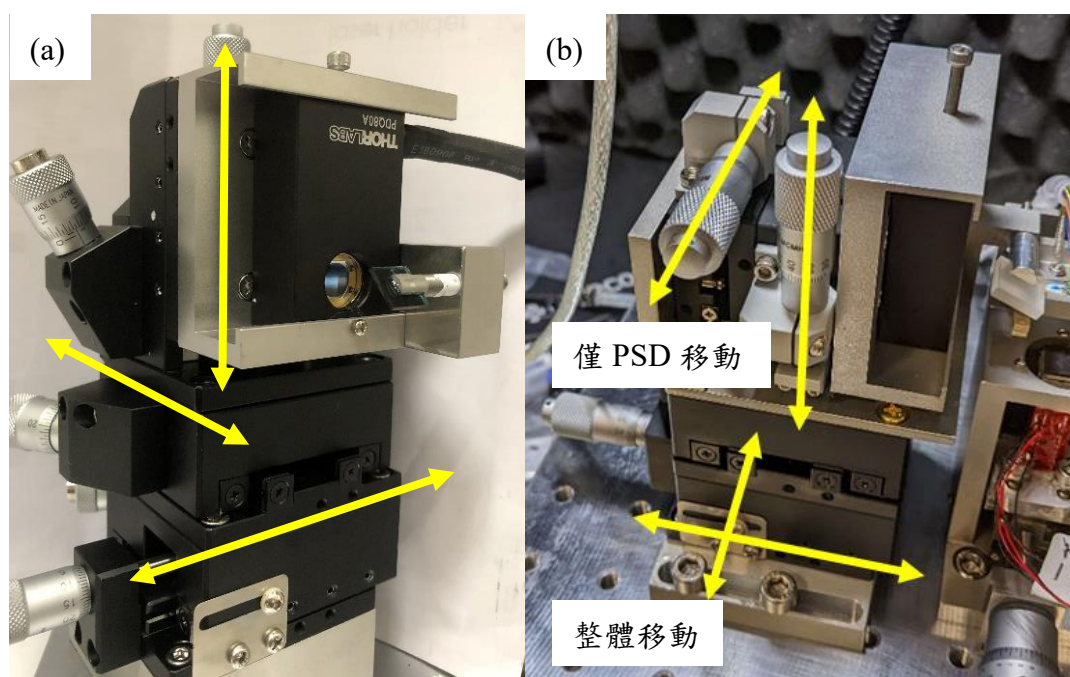


圖 3.2 (a)原系統(b)新系統 PSD 位移平台架構實體圖。

原系統以三根螺絲及彈簧將商用探針夾具固定於系統上，如圖 3.3(a)所示。此夾持方式雖然能夠穩定夾持探針夾具，但由於空間問題，每次上下針都需要將 PSD 退開才有足夠空間鎖螺絲。新系統以單一進給螺絲由後方進入，並透過轉軸將螺絲之位移轉為角度運動，並於夾具上安裝聚醚醚酮(polyetheretherketone,

PEEK)提供向下之固定力，如圖 3.3(b)所示。此設計能夠有效降低上下針的複雜程度以及花費時間，並省去了反射鏡在每次實驗時都要重新調整的問題。

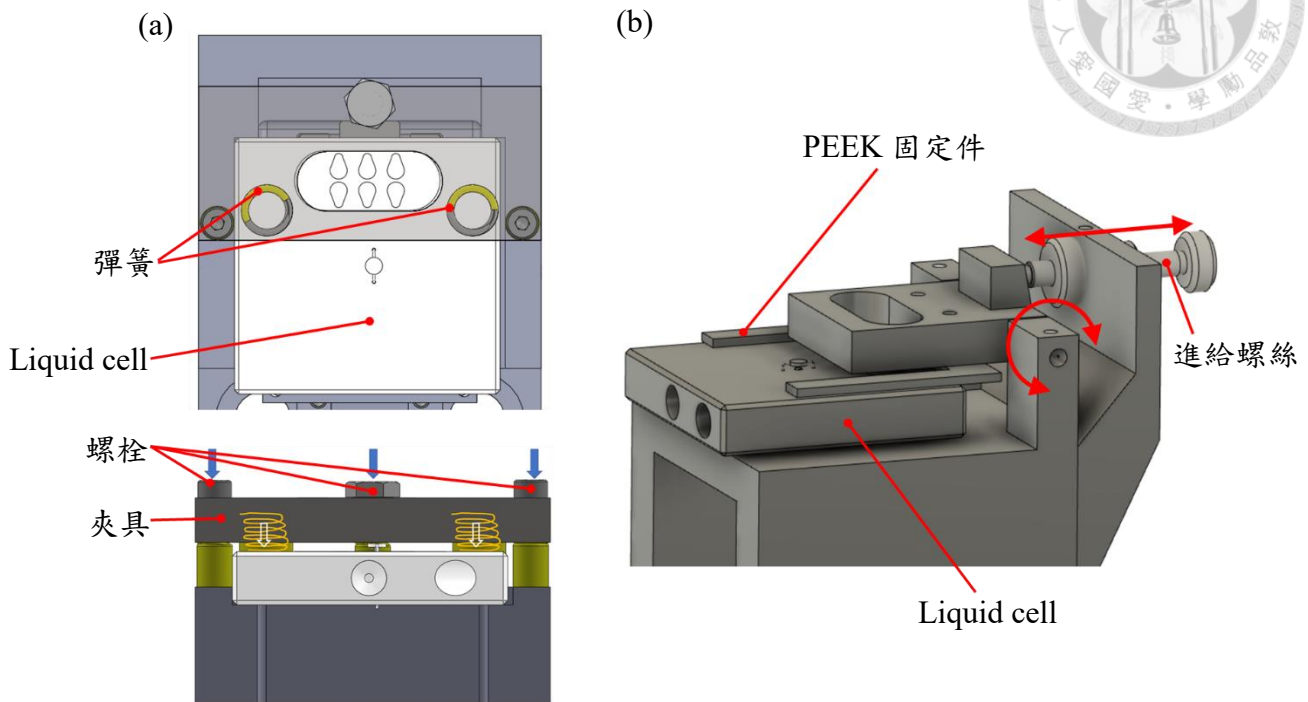


圖 3.3 (a)原系統(b)新系統探針夾持示意圖。

由於商用探針夾具大小遠大於樣本，原系統若需要移動樣本需以鑷子從下方進入微調，除了容易傷害探針及樣本外，由於空間限制僅能進行單一方向移動。在不過度增加系統高度的前提下，新系統設計了一個簡單的樣本放置元件，並透過其後端長形結構方便使用者手動平移樣本，如圖 3.4 所示。



圖 3.4 樣本放置原件實體圖。



### 3.1.3 修改後系統

新系統架構圖及實體圖如圖 3.5 所示，除了上述改動以外整體沿用莊沂浩原機構。

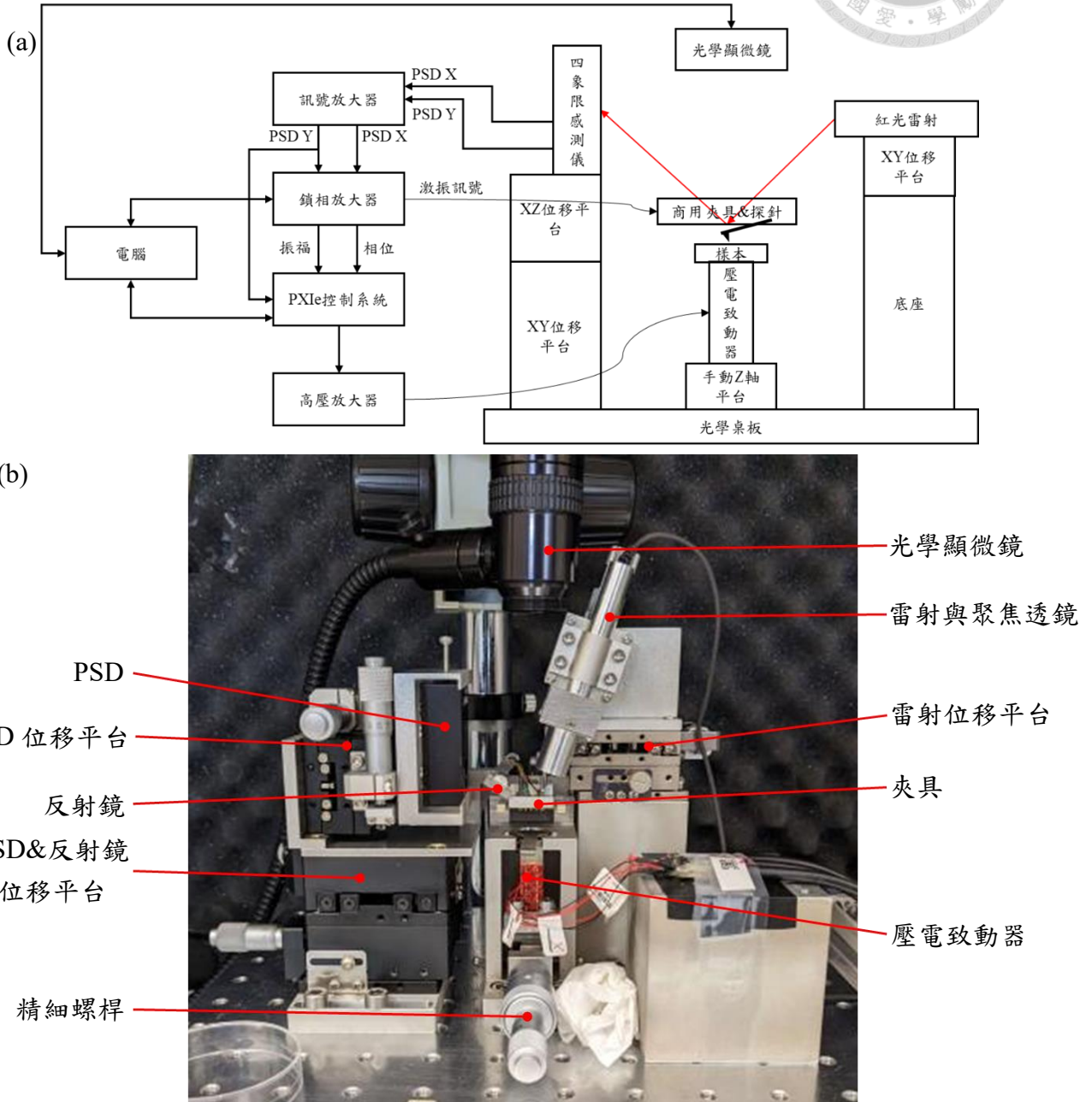


圖 3.5 系統(a)架構圖(b)實體圖。



### 3.2 實驗儀器

#### 3.2.1 微懸臂探針與固定

本研究使用到的探針有 FMAuD(PPP-FMAuD-50, Nanosensors)[附錄 A]以及 CSC38(HQ:CSC38, MikroMasch)[附錄 B]兩種。FMAuD 之為懸臂尺寸為 $225 \times 28 \times 3 \mu\text{m}^3$ 、彈性係數為 2.8 N/m、針尖直徑小於 10 nm；CSC38 之基座上有三根不同微懸臂，三根微懸臂之截面積皆為 $32.5 \times 1 \mu\text{m}^2$ 、針尖直徑小於 8 nm。最硬之 A 針長度為 250  $\mu\text{m}$ 、彈性係數為 0.09 N/m；最軟之 B 針長度為 350  $\mu\text{m}$ 、彈性係數為 0.03 N/m；C 針介於兩者之間，其長度為 300  $\mu\text{m}$ 、彈性係數為 0.05 N/m。

表 3.1 CSC38 各探針參數表。

CSC38	彈性係數(N/m)	第一共振頻(Hz)	長( $\mu\text{m}$ )	寬( $\mu\text{m}$ )	高( $\mu\text{m}$ )
A	0.09	20k	250	32.5	1
B	0.03	10k	350	32.5	1
C	0.05	40k	300	32.5	1

本研究使用商用微懸臂固定座(Liquid cell MTFML, Bruker)如圖 3.6 所示。當樣本接近 liquid cell 時 liquid cell 上的 O 環與樣本接觸形成一封閉環境，透過 liquid cell 上之管道即可在環境封閉後注入水溶液使系統含水。

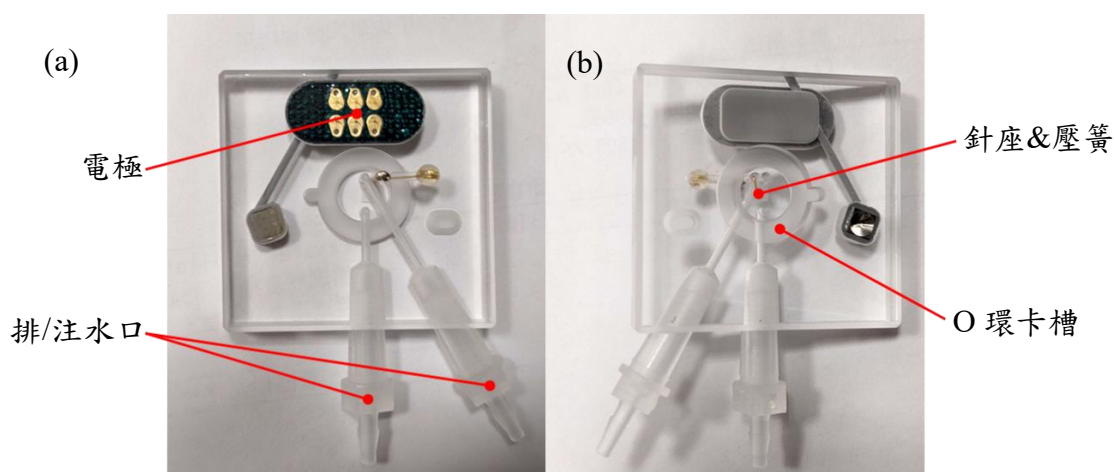


圖 3.6 Liquid cell(a)正面(b)背面實體圖。

### 3.2.2 雷射與四象限感測儀

本研究所使用之雷射為紅光準直雷射(CPS635R, 635 nm, 1.2 mW, Thorlab)並在雷射前端安裝一焦距為 30 mm 之聚焦透鏡(AC080-030-B-ML, Thorlab)，如圖 3.7 所示。四象限感測儀則使用 PDQ80A(Thorlab)如圖 3.8 所示[附錄 C]，其可接受波長為 400-1050 nm，頻寬為 150 kHz。

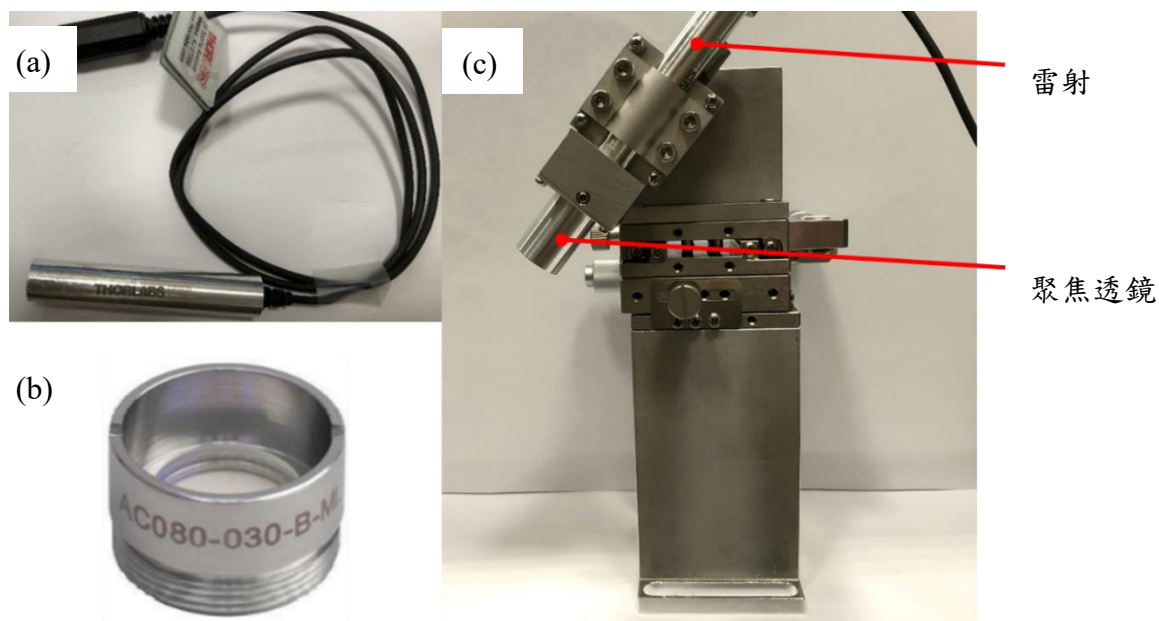


圖 3.7 (a)雷射(b)透鏡(c)整體組裝圖 [29]。



圖 3.8 PDQ80A 實體圖。

### 3.2.3 訊號濾波放大器

由於從 PSD 輸出之訊號電壓較小，需經過一定放大提高訊噪比。本研究所使用之訊號放大器為 SR560(Stanford Research Systems)如圖 3.9 所示，其最高能有 50000 倍的放大倍率、輸入雜訊低於 $4 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ 並有 1 MHz 的頻寬以及內置濾波器。

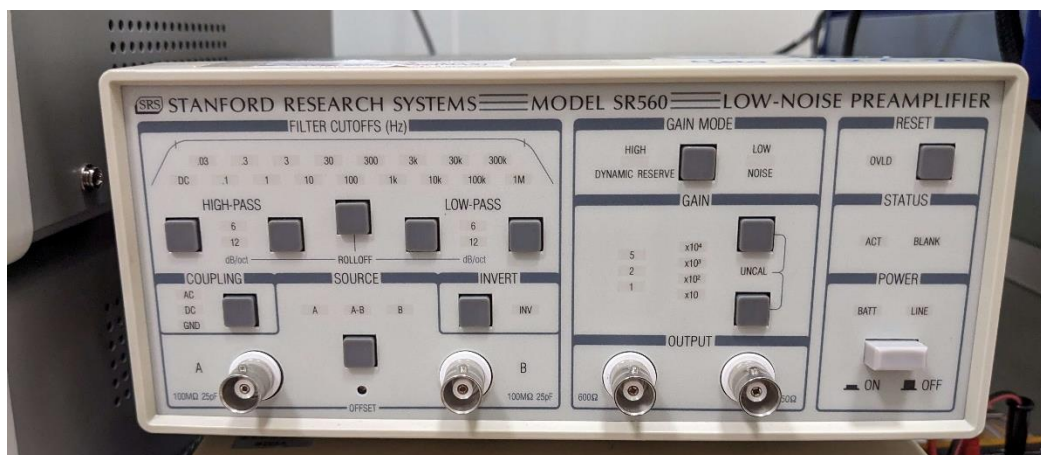


圖 3.9 SR560 實體圖。

### 3.2.4 鎖相放大器

鎖相放大器同時擔任給予探針激振訊號及解出輸入訊號中相應頻率訊號的功能，其能夠將輸入的 PSD 訊號轉換為振幅電壓以及相位電壓並以直流方式輸出至控制系統。本研究所使用之鎖相放大器為 easyPLL(Nanosurf)以及 HF2LI(Zurich Instruments)如圖 3.10 所示。easyPLL 的輸入頻率範圍為 10 kHz – 2 MHz 並且有最大 5.5 mHz 的頻率解析度；HF2LI 的輸入頻率範圍為 DC - 50 MHz 並且有最大 0.7  $\mu\text{Hz}$  的頻率解析度。

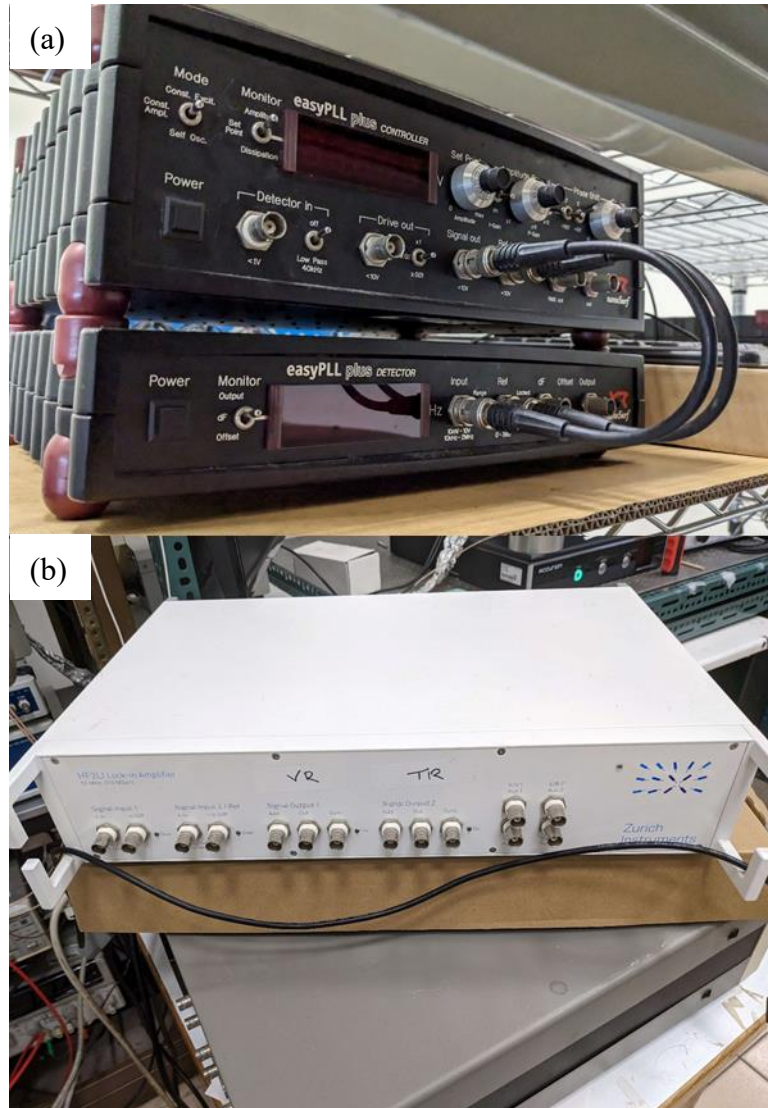


圖 3. 10 (a)easyPLL(b)HF2LI 實體圖。

### 3.2.5 資料擷取卡

資料擷取卡能夠幫助我們在進行測試時快速取得所需資料，本研究所使用之資料擷取卡為 USB 6259(National Instrument)如圖 3.11 所示。其取樣頻率為 1 MHz 並有 16 bit 的數位解析度以及 $\pm 10$  V 的輸入電壓。



圖 3.11 USB 6259 實體圖。

### 3.2.6 PXIe(National Instruments, NI)

本研究使用 PXIe 作為核心控制系統，負責接收由鎖相放大器輸出之振幅電壓及相位電壓以及來自訊號放大器的 PSD X、PSD Y 訊號並輸出三軸位移訊號至高壓放大器。本研究所使用的 PXIe 為 PXIe-1062 如圖 3.12 所示，於 PXIe-1062Q 的機殼內設有 PXIe-8135 嵌入式控制器並於其韌體安裝即時系統(Real time, RT)、PXIe-7961R 與 PXIe-7962R 兩張現場可程式化邏輯閘陣列(Field Programmable Gate Array, FPGA)模組，並於兩張 FPGA 上外掛 NI 5781 類比轉接器模組。電腦透過網路線與 RT 通訊，並透過 RT 與兩張 FPGA 溝通；輸入訊號則分為兩種：即時的回饋訊號經由 FPGA 傳至 RT 運算並顯示於電腦；進行力體積模式的較大量資料則由 FPGA 以先進先出(First In, First Out, FIFO)的方式暫存於 FPGA 再轉交至 RT 儲存，並於實驗結束後再另行下載分析。

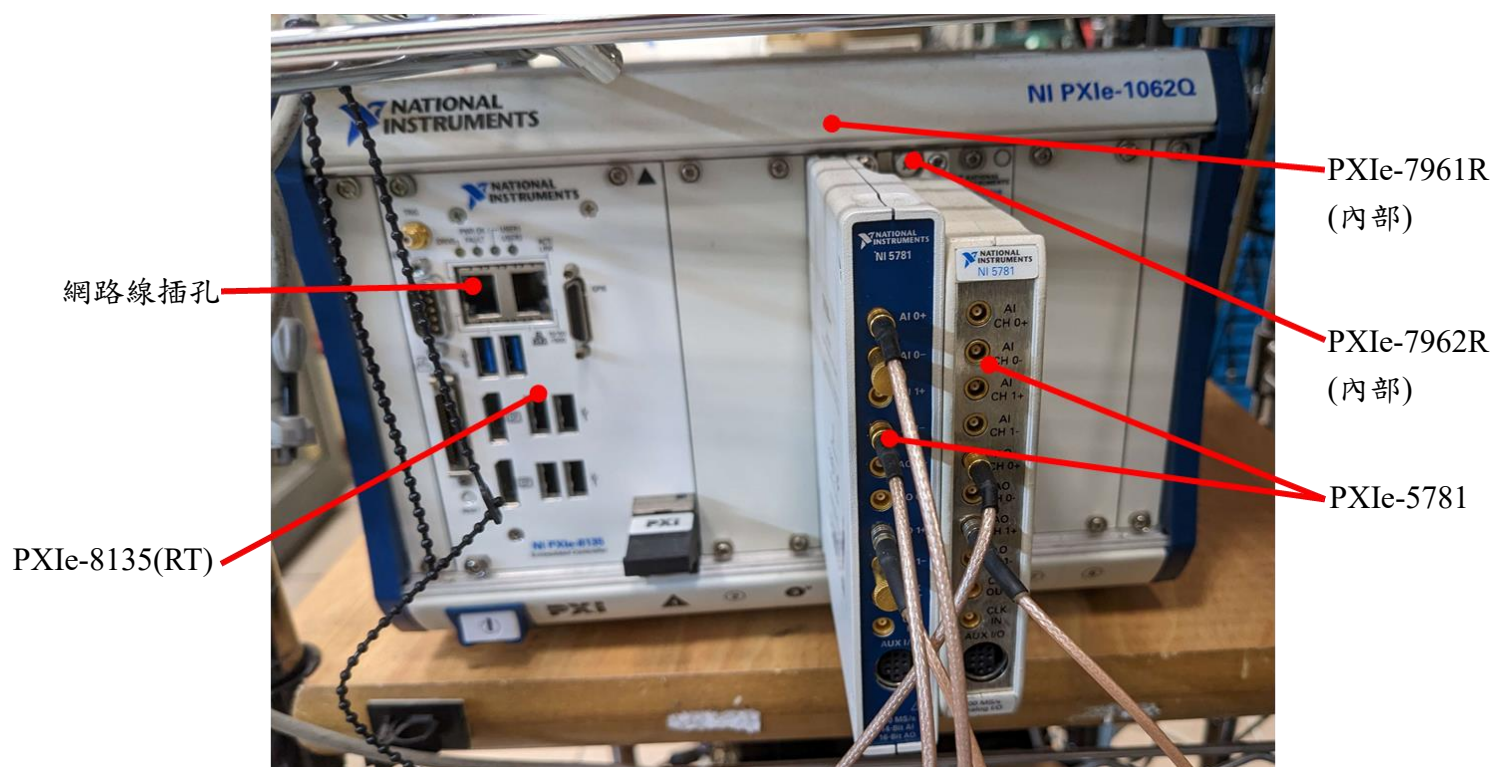


圖 3.12 PXIe 控制系統實體圖。

### 3.2.7 高壓放大器

高壓放大器負責將 PXIe 輸出之 $\pm 1$  V電壓放大至 $\pm 200$  V供壓電致動器使用，本研究所使用的高壓放大器為負責 XY 軸的 TD250(PiezoDrive)以及負責 Z 軸的 PD200(PiezoDrive)如圖 3.13 所示。TD250 可同時接收三組輸入訊號並透過轉接盒將其放大並轉為正負訊號輸出或分別放大六組訊號，TD200 則僅能放大單一訊號。為了最小化 Z 軸回饋與其他兩軸間的影響因此採用將 Z 軸高壓放大器獨立之配置。

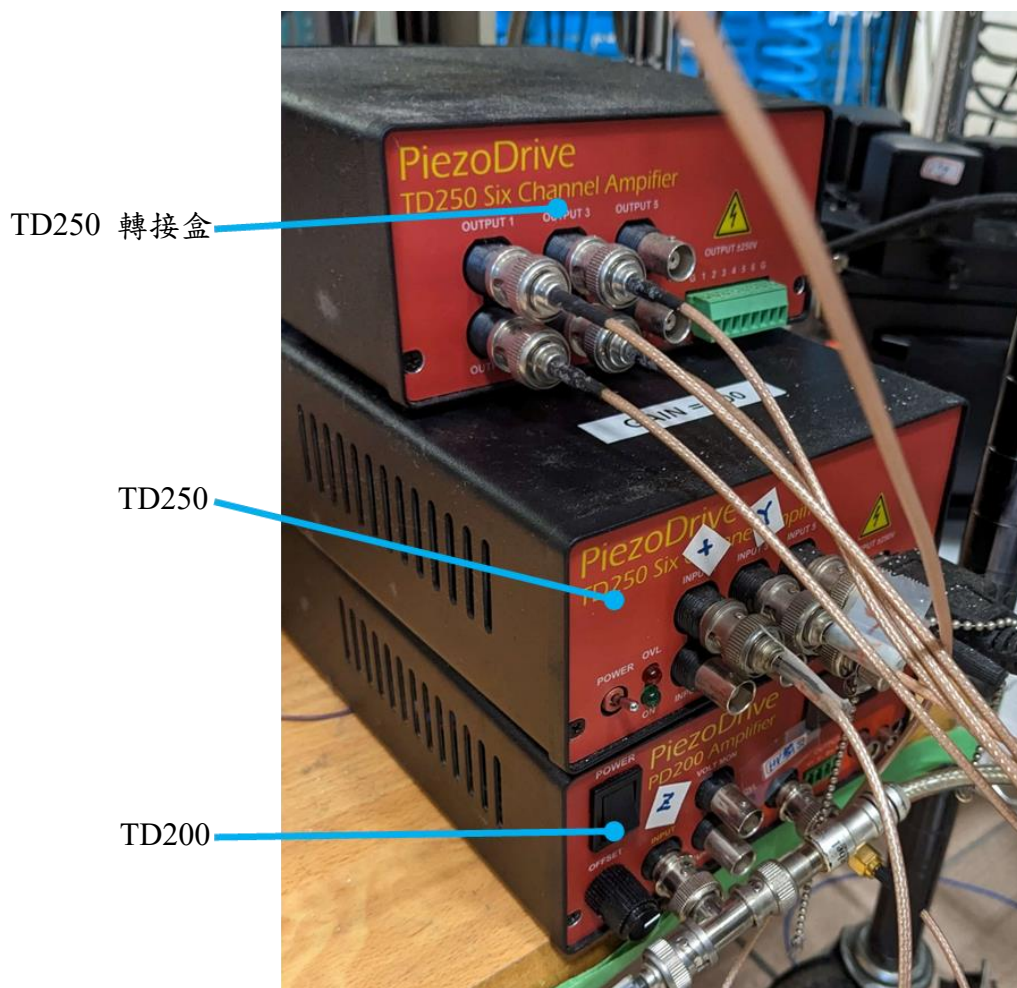


圖 3.13 高壓放大器實體圖。



### 3.2.8 Z 軸位移平台

Z 軸位移平台負責控制探針與樣本間的距離，本研究使用精細螺桿(110-502, Mitutoyo)與線性滑軌(SSEBS8G-40, Misumi)配合斜面自製而成的 Z 軸位移平台，如圖 3.14 所示。精細螺桿有 13 mm 之全行程以及細調節輪之最小 0.5  $\mu\text{m}$  刻度。

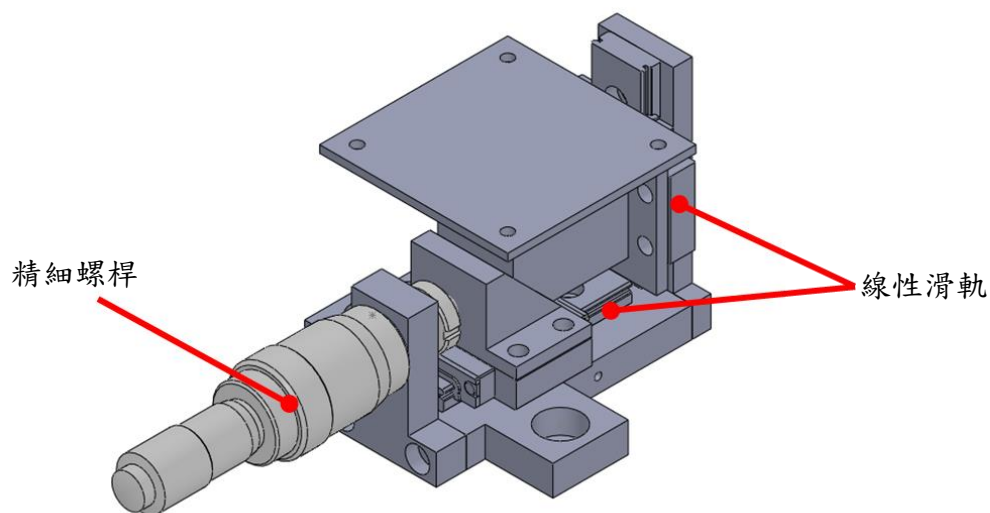


圖 3.14 Z 軸位移平台示意圖[29]。

### 3.2.9 壓電致動器

壓電致動器負責最終之 XY 掃描以及 Z 軸回饋的工作，本研究所使用之壓電致動器為 PICA(P-143.05)如圖 3.15 所示。PICA 為剪切式致動器(shear actuator)，透過將多層壓電材料堆疊而成，其全行程為輸入電壓 $\pm 250\text{ V}$  時 XYZ 方向各 5  $\mu\text{m}$ 。



圖 3.15 PICA 實體圖。

### 3.3 樣本準備

本研究所使用之樣本為 DOPC(850375P, Avanti)與 DPPC(850355P, Avanti)，其結構式及性質如表 3.1 所示，為了將其攤平於雲母表面製成 SLB，本研究使用實驗室傳承之製程並參考其他資料[30]。最終所使用之製備方法如下：首先將買來的 Lipid 粉末以 1 mM 之濃度溶於乙醇中；依據所需樣本在燒瓶內加入 DOPC、DPPC 乙醇溶液或都加；在 60 °C 水浴中將上述溶液用幫浦抽乾；加入等體積的去離子水(Deionized Water, DI water)並於 60 °C 水浴中水合 15 分鐘；將溶液移至超音波振洗機(1210R-DTH, Branson)以 80 W, 47 KHz 振洗 15 分鐘均質化處理；水合及振洗步驟反覆進行總共 4 次；上述溶液可收於冷藏保存並於掃描前再進行後續步驟，製備器材如圖 3.16 所示。

表 3.2 DOPC 與 DPPC 性質表

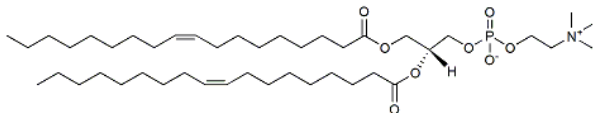
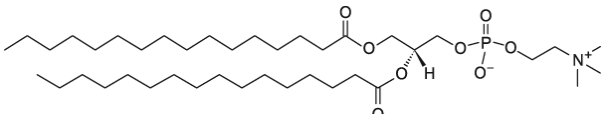
	結構式	室溫硬度	室溫排列	相變溫度
DOPC	 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	軟	液態(liquid phase)	-20 °C
DPPC	 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	硬	凝膠態(gel phase)	43 °C



圖 3. 16 Lipid 溶液製備器材圖。

掃描前將前面製備之溶液與緩衝溶液(三羥甲基胺基甲烷, 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol, TRIS 100 mM, 氯化鈉, NaCl 100 mM, 氯化鈣,  $\text{CaCl}_2$  3 mM)以 1 : 20 之體積比混合；將混合之室溫溶液滴至事先固定於鐵片上之全新雲母表面，並於自製培養製具中靜置 1 小時，如圖 3.17 所示；以 DI 水潤洗雲母表面並確保表面有液體殘留；進入 AFM 掃描。

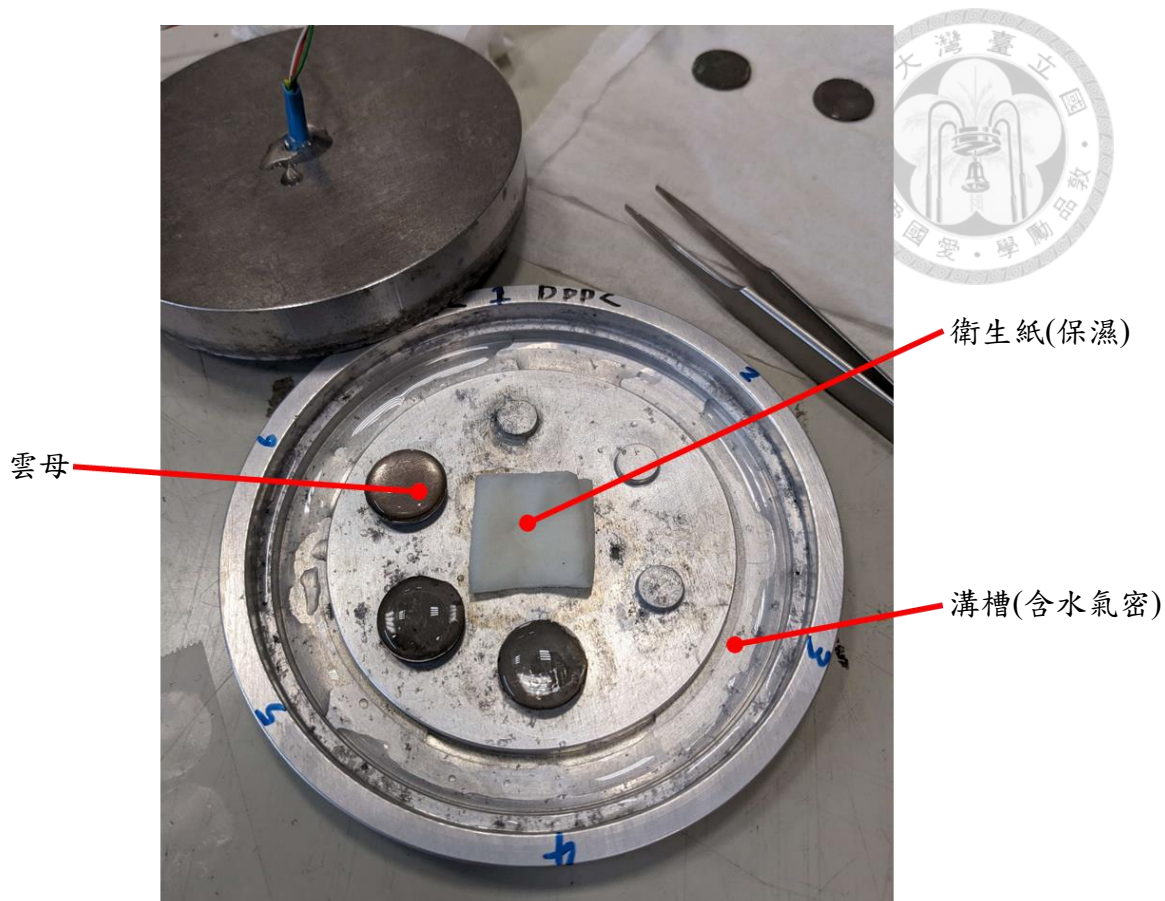


圖 3.17 SLB 培養製具實體圖。

### 3.4 實驗流程

為了得到 PSD 電壓訊號與實際偏折之間的關係，首先需要進行垂直及水平方向靈敏度實驗。此外本實驗透過兩種不同模式分析樣本，分別為以振幅作為回饋依據的扭轉模式與輕敲模式以及逐點做力圖的力體積模式。

#### 3.4.1 垂直方向靈敏度

為了得到垂直方向之靈敏度，我們進行一次力圖掃描，當探針接觸到樣本後隨著樣本持續靠近而偏折，此偏折在 PSD 訊號上呈現一斜直線，透過計算其斜率即可得到位移對應訊號之變化即為此探針垂直方向靈敏度如圖 3.18 所示。

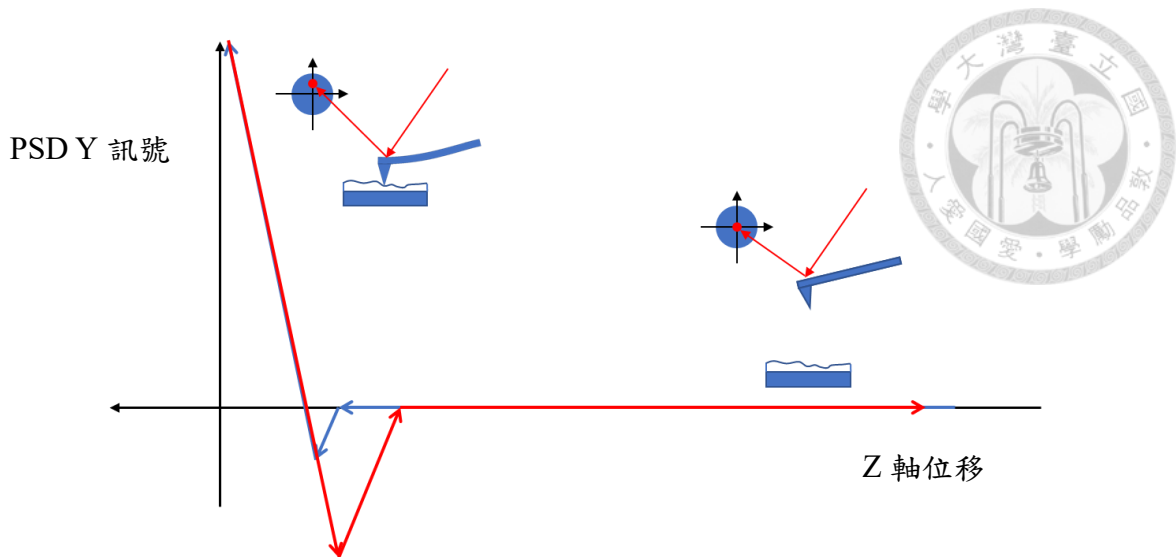


圖 3.18 垂直靈敏度量測示意圖。

### 3.4.2 水平方向靈敏度

為了量測探針之水平方向靈敏度，需要以特定方法在可控情況下得到探針水平位移對應偏折量，方法之一為使用探針進行接觸式掃描：當探針以一固定作用力回饋於表面時，將探針來回移動會導致探針因摩擦力產生側向偏轉，當到達折返點時因作用力的變化會導致探針針尖固定於樣本表面並往另一方向偏轉，如圖 X 所示。透過量測此時 PSD X 訊號之變化對應樣本移動量作圖即可得到探針於水平方向之靈敏度如圖 3.19 所示。

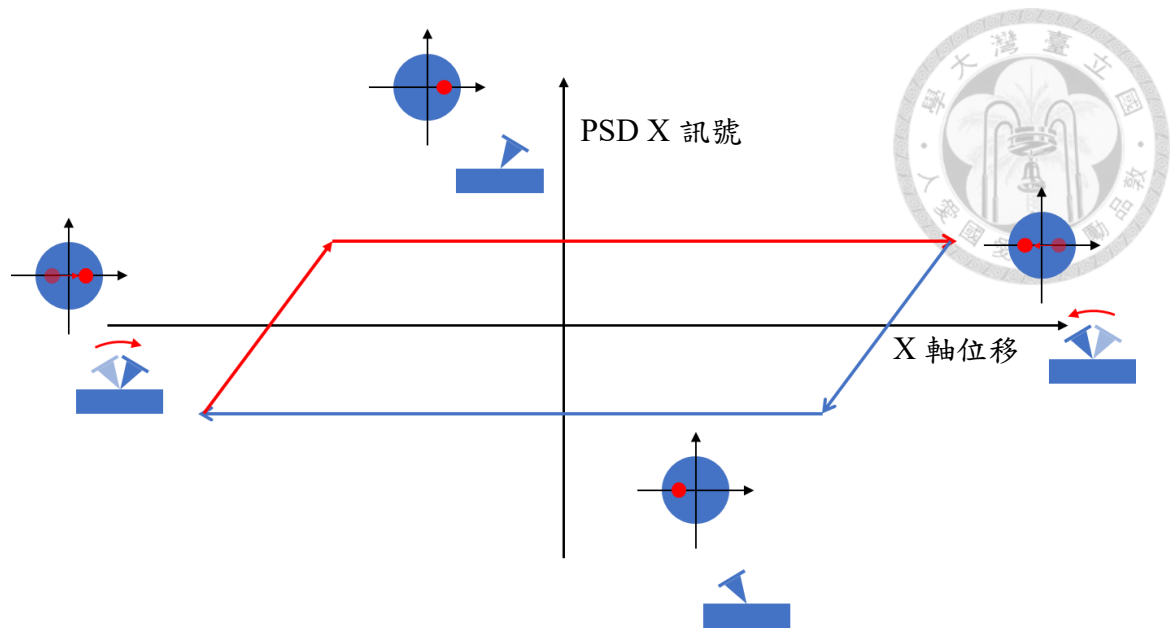


圖 3.19 水平靈敏度量測示意圖。

### 3.4.3 扭轉模式與輕敲模式

此實驗中所使用的探針為 CSC38-A，其流程圖如圖 3.20 所示。首先將製備完成之 SLB 放上樣本載台並將 liquid cell 架設至定位。為了確保環境封閉，先將樣本以精細螺桿靠近 liquid cell 並讓 O 環與樣本接觸。確保環境封閉後檢查環境內是否被 DI 水充滿，若有空氣則需額外灌水至內部完全入水以確保光路在掃描時穩定。環境入水後將雷射對至探針、確保反射光進入 PSD 中心後使用 PSD Y 訊號作為回饋將樣本接近至探針附近。選擇以 PSD Y 訊號回饋是因為 TR 振幅以及高階 VR 振幅走向較不穩定，為了確保能穩定進針而採用探針偏折回饋。將探針靠近樣本表面後將回饋關閉並收回 Z 軸以利掃頻及設定振幅，設定完成後在以偏折控制的情況下同步取得振幅力圖，並以力圖判讀掃描條件。掃圖時以 VR 或 TR 振幅作為回饋，並可以透過另一輸入同步成像其他訊號。

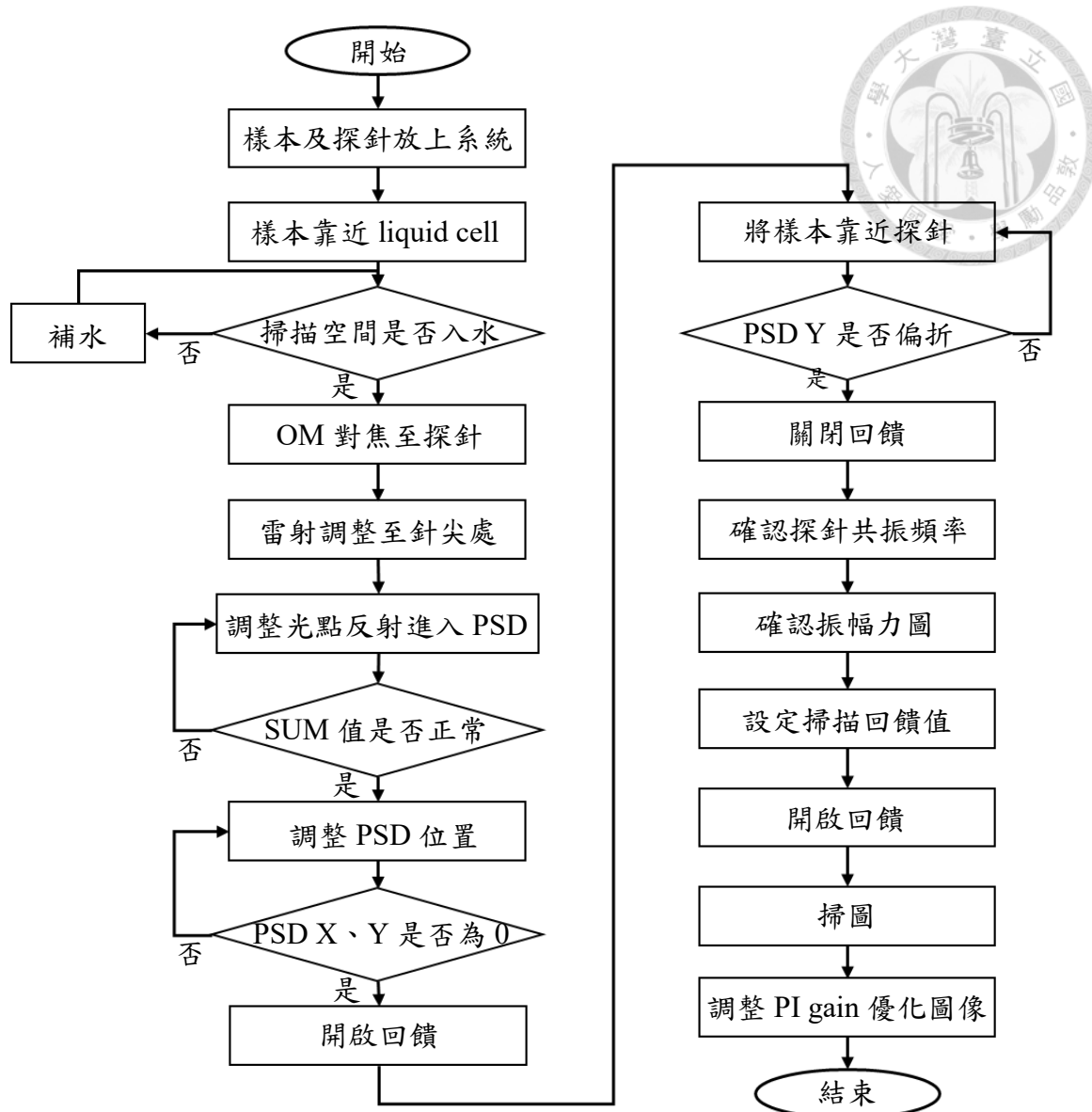


圖 3.20 扭轉/輕敲模式流程圖。

### 3.4.4 力體積模式

此實驗所適用的探針也是 CSC38-A，流程圖如圖 3.21 所示。此實驗大致與前述相同，唯掃描模式為逐點力圖的形式，並僅能以探針偏折作為 trigger 訊號。如同前實驗，在掃圖時能夠同步取得另一訊號的力圖資訊。

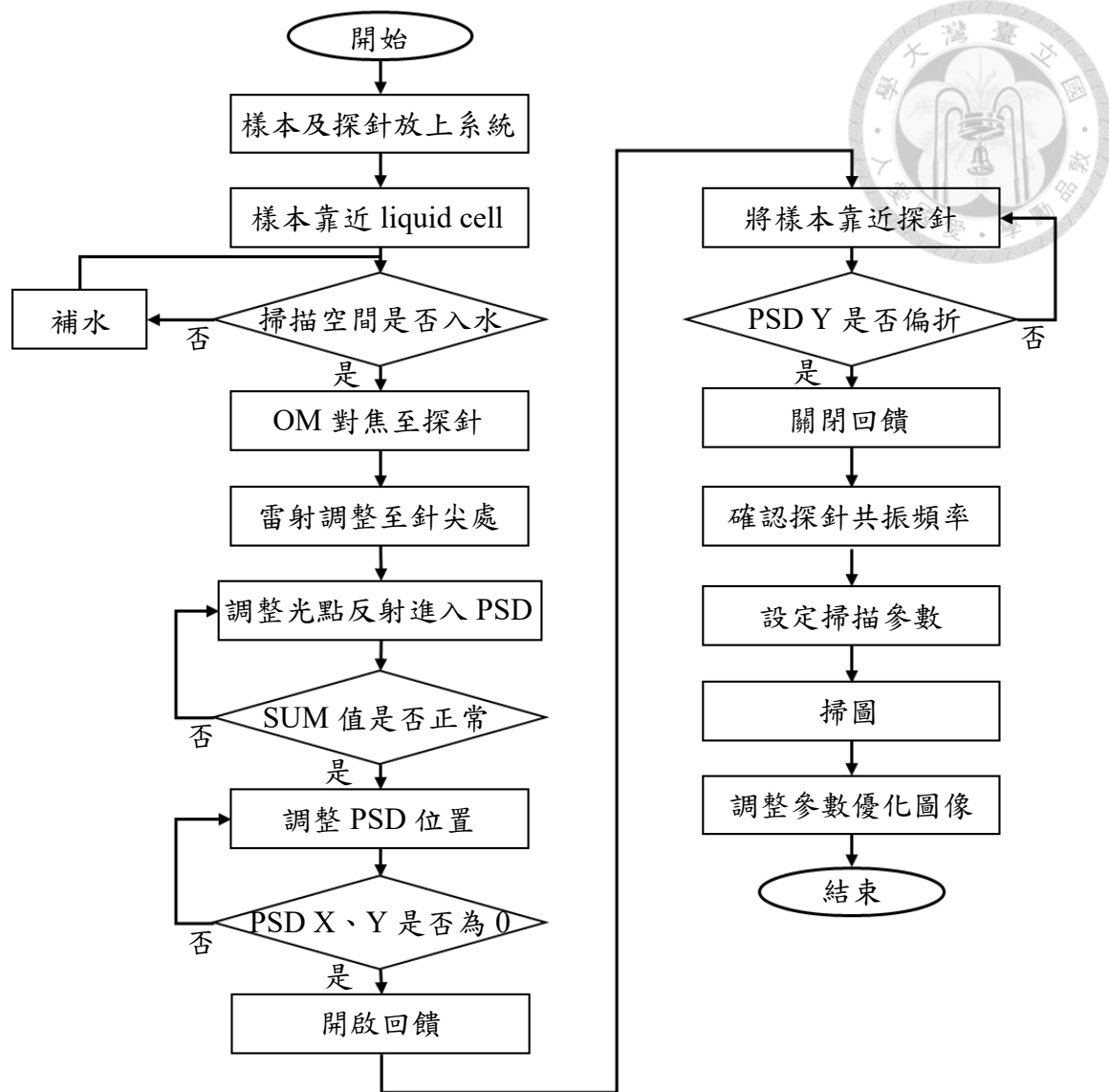


圖 3.21 力體積模式流程圖。





#### 四、 實驗結果與討論

本章首先對系統特性進行量測，包含壓電致動器之非線性、探針特性以及探針靈敏度。其後對 HOPG、DOPC、DPPC 等樣本進行量測並探討其在 VR 與 TR 上表現之不同。

##### 4.1 壓電致動器非線性

本實驗使用 PG 標準片做為樣本，其方格週期為  $1\ \mu\text{m}$  並有  $100\ \text{nm}$  的深度，如圖 4.1 所示。實驗採用 FMAuD 探針以輕敲模式進行掃描，掃描速度為  $0.2\ \text{Hz}$ ，如圖 4.2 所示。其中(a)~(d)為由左向右掃描；(e)~(h)為向左掃描；(a)(c)(e)(g)為向下掃描；(b)(d)(f)(h)為向上掃描；(a)(e)、(b)(f)、(c)(g)、(d)(h)分別為同一次掃描中去回所取得並且四組影像為連續掃描而得。由圖可以發現隨著探針移動方向不同，除了不同區域被拉伸、壓縮以外，掃描區域也不盡相同：當探針往下掃描時，上半部的圖像被拉伸，且整體掃描區域被往上移動；往上掃描時則是下半部圖像被拉伸，掃描區域較偏下方；在左右掃描方向上也有相同現象發生。造成此現象的原因為壓電致動器在製造時產生的誤差以及非均質性所產生的非線性。此現象直接導致在移動探針時，從不同方向移動到指定點時探針實際位置不同的問題，也造成後續進行實驗時所有單點力圖沒有辦法確定探針在圖像上的位置。

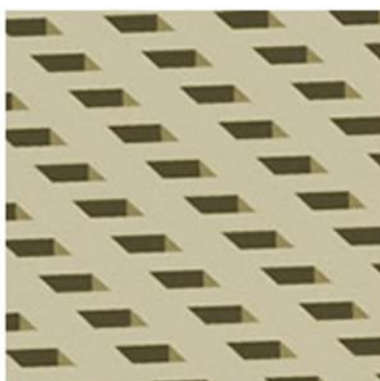


圖 4.1 PG 標準片圖。

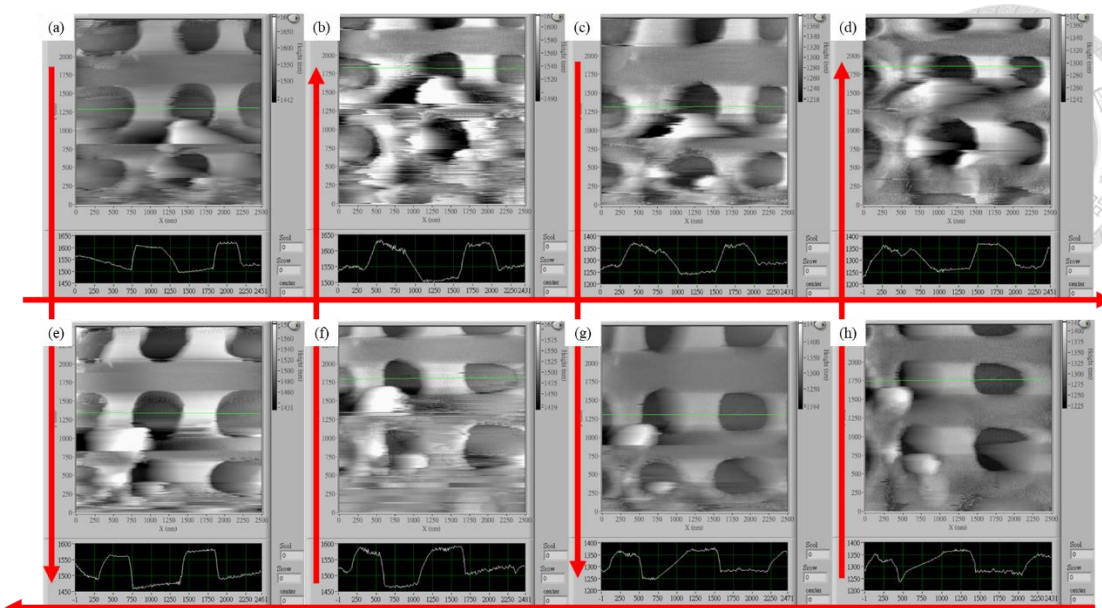


圖 4.2 PG 標準片之連續掃描高度影像，圖中箭頭為掃描方向。

## 4.2 探針選用及其影響

為了瞭解樣本於平面上側向之性質，我們需要將探針激振於其 TR 共振頻上。TR 共振頻通常較 VR 模式高，考量到 PDQ80A 的頻寬僅 150 kHz，若使用 FMAuD 探針會造成其 TR 共振頻率超出 PDQ80A 之頻寬，因此我們採用較軟之 CSC38-A 探針，為了取得探針之自然共振頻，我們使用商用 AFM 系統(MultiMode 8-HR, Bruker)量測其於水中熱擾動頻譜，結果如圖 4.3 所示。由於此探針於空氣中之第一共振頻約為 20 kHz，進入水中後第一共振頻較低，而圖上僅標出 VR 第二共振頻約 49.92 kHz 以及第三共振頻約 149.9 kHz；TR 共振頻則大約為 132.8 kHz，超過 150kHz 之部分則不予討論。由於此探針之第三 VR 共振頻與 TR 之第一共振頻頻率非常接近，當探針被激振在 TR 共振頻上時，除了扭轉振動以外垂直振動也會被激發。另外由於此探針 k 值較低，在掃描時較易受到探針與樣本間作用力影響而導致探針呈現預期外偏折之情況，此現象將於後面章節再行分析。

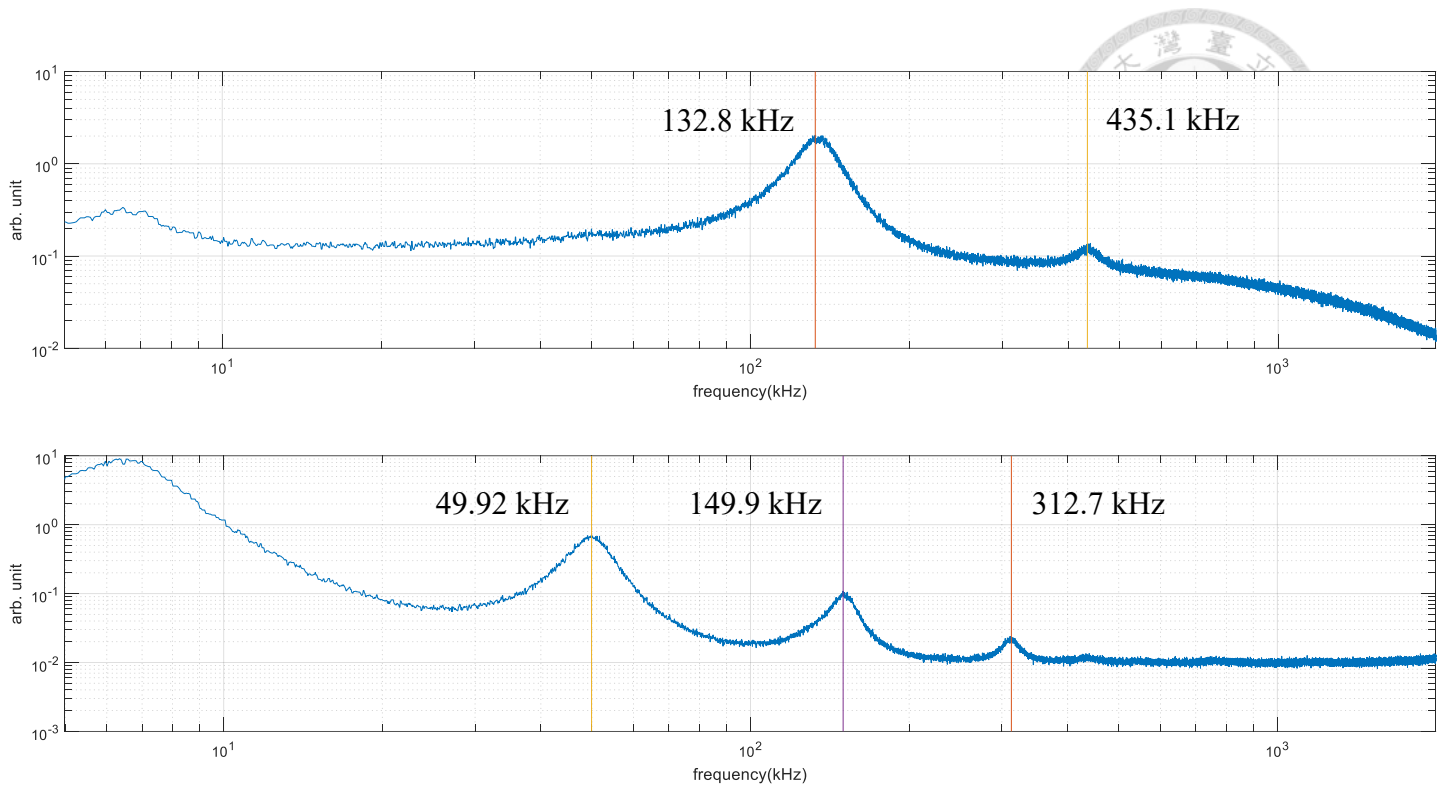


圖 4.3 CSC38-A 探針熱擾動頻譜，上圖為 X 訊號，下圖為 Y 訊號。

### 4.3 水平方向靈敏度

為了量測探針水平方向靈敏度，本實驗使用 CSC38-A 探針以接觸模式掃描  $500 \times 500 \text{ nm}^2$  的面積並同時記錄 PSD X 訊號，結果如圖 4.4 所示。

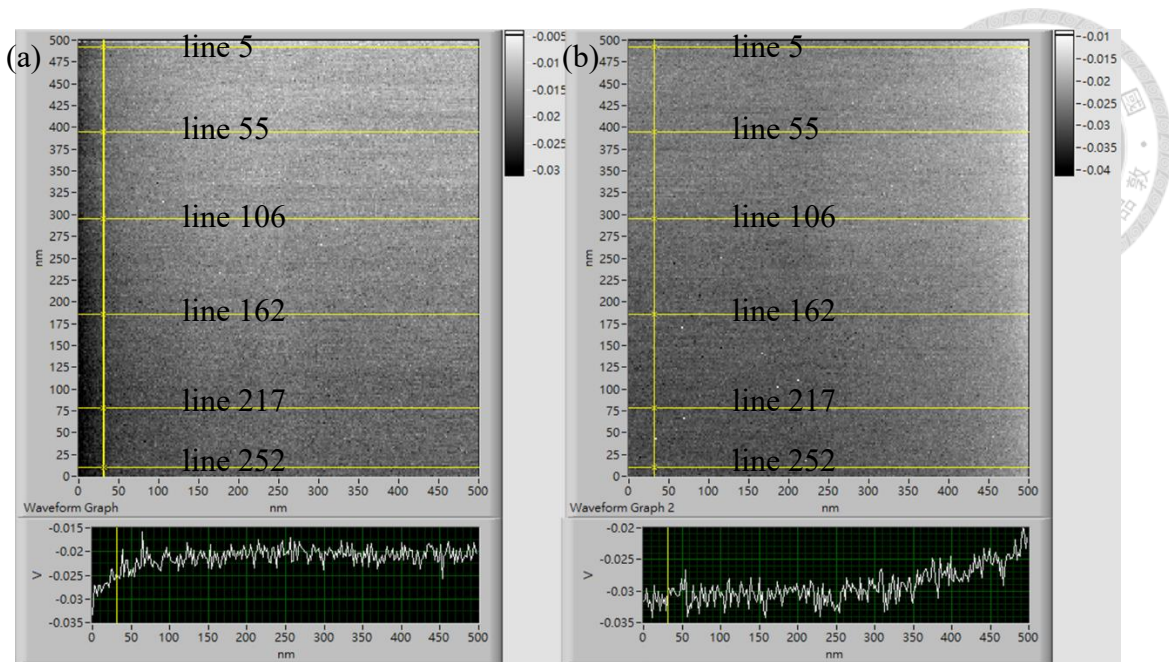


圖 4.4 接觸式掃描同時取得之(a)向右掃描(trace) (b)向左掃描(retrace) PSD X 訊號。

將圖 4.4 六組指標剖面資料取出並分析其掃描線頭尾斜率可得到其水平力圖資訊如圖 4.5 所示。

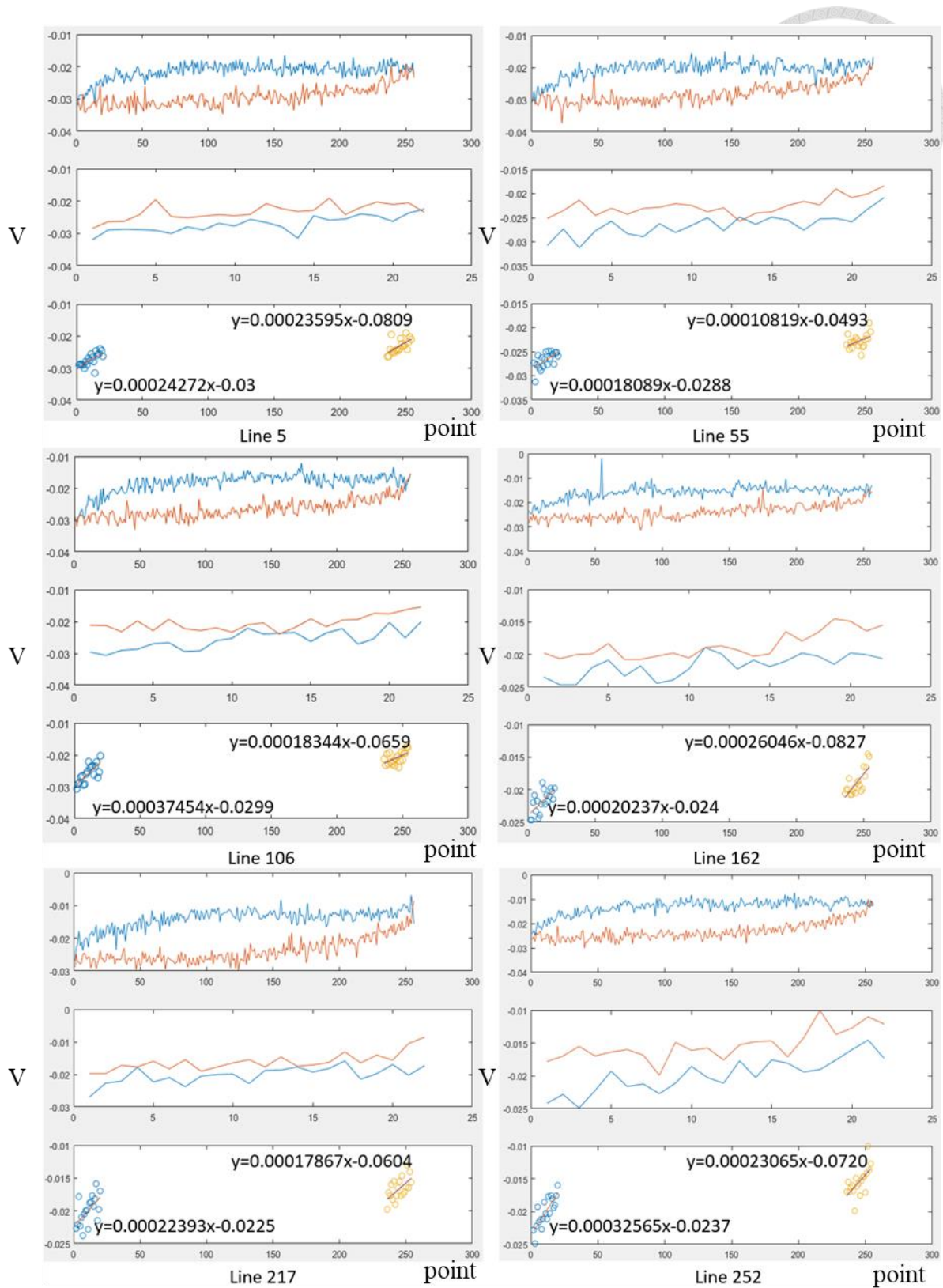


圖 4.5 不同掃描線分析之靈敏度圖，六組圖中的上圖為掃描線去回 PSD X 電壓、中圖為用於擬合之線段、下圖為擬合線方程式。

圖 4.5 中擬合所得之斜率單位為 V/point，為了將其轉換為 mV/nm，首先需要將點數及位移做轉換：由於每條掃描線有 256 個資料點，而掃描範圍為 500 nm，因此可以得到每點約對應實際位移 1.953 nm。轉換前後之資訊分別如表 4.1、4.2 所示。

表 4.1 轉換前探針水平靈敏度表(mV/point)

Line	5	55	106	162	217	252	Average
Trace	0.24272	0.18089	0.37454	0.20237	0.22393	0.32565	0.25835
Retrace	0.23595	0.10819	0.18344	0.26046	0.17867	0.23065	0.19956

表 4.2 轉換後探針水平靈敏度表(mV/nm)

Line	5	55	106	162	217	252	Average
Trace	0.12427264	0.09261568	0.19176448	0.10361344	0.11465216	0.1667328	0.1322752
Retrace	0.1208064	0.05539328	0.09392128	0.13335552	0.09147904	0.1180928	0.10217472

由表 4.2 可得平均探針水平靈敏度為 0.117 mV/nm，標準差為 0.0359 mV/nm，透過此資訊便能夠在探針被激振在 TR 頻率時得知其真實振幅。

#### 4.4 高度校正

本研究所使用的兩種不同模式會因為不同的問題而造成量測高度不準確，此節分別講述導致量測誤差的原因及校正方法。

##### 4.4.1 扭轉及輕敲模式

由於本研究所選擇之掃描探針為 CSC38-A 而其 k 值較小，在掃描時探針容易受到外力影響而產生偏折如圖 4.6 所示。當探針受到排斥力時，壓電致動器需

要移動更多距離才能到達回饋點，導致量測之高度較實際高度低；反之當探針受到吸引力，量測之高度較實際高度高。



圖 4.6 探針在(a)正常情況(b)受到排斥力(c)受到吸引力時激振情形示意圖。

為了將探針偏折所造成的高度誤差校正，首先需要透過力圖取得探針在垂直方向的靈敏度。進行掃描時，除了回饋取得的高度影像外，同時接收 PSD Y 訊號於回饋點的偏折資訊。掃描結束後，以前面取得的靈敏度與探針偏折進行校正將 PSD Y 訊號轉為偏折量並加上高度影像即可得到原始高度資訊。

#### 4.4.2 力體積模式

在力體積模式下，由於進行力圖時若探針針尖較尖，則容易發生刺穿 lipid bilayer 的問題而造成以回饋點為成像條件的影像出現誤差。為了校正力體積模式的高度影像，我們將逐點力圖資料分別取出並透過重建接觸點的方式做圖取得實際接觸高度，如圖 4.7 所示。

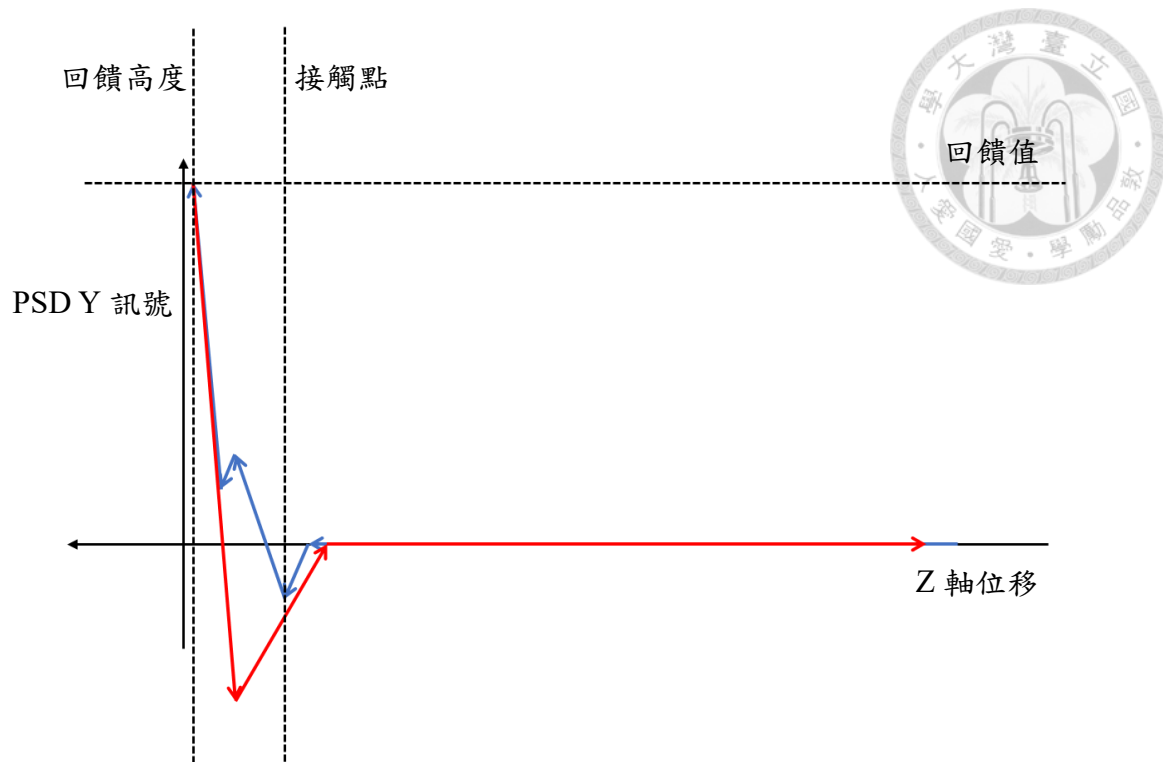


圖 4.7 回饋高度與接觸點位置差示意圖。

## 4.5 樣本掃描

### 4.5.1 HOPG

本研究首先使用 TR 振幅做為回饋對 HOPG 樣本於水中以 0.2 Hz 進行掃描，除了確認系統性能以外，也能對 TR 模式有一定的了解，力圖及影像如圖 4.8、4.9 所示。由圖中可以發現雖然有環境雜訊存在，TR 模式仍然能看到相對微小的結構。此外 TR 相位影像能夠在環境雜訊較大的情況下對結構邊界仍然有相當高的解析度，其在高度影像被雜訊蓋過的情形下仍能夠對結構有高度的分辨能力。



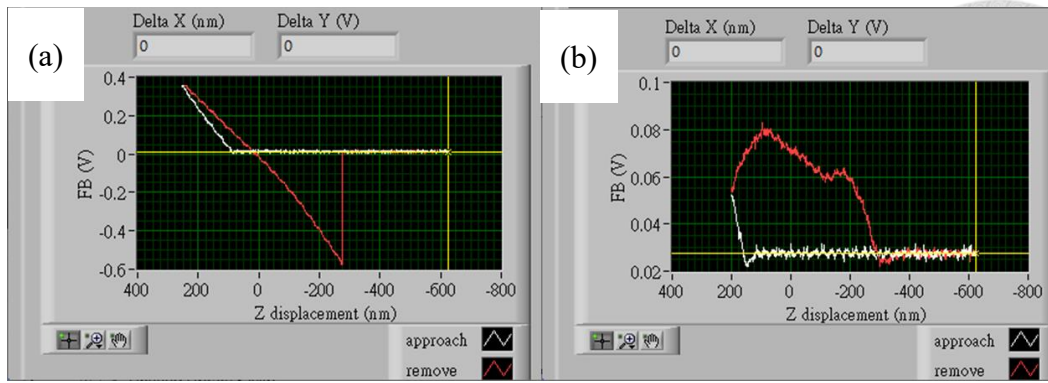


圖 4.8 量測 HOPG 時探針(a)偏折(b)TR 振幅力圖，白線為探針接近樣本，紅線為探針離開樣本。

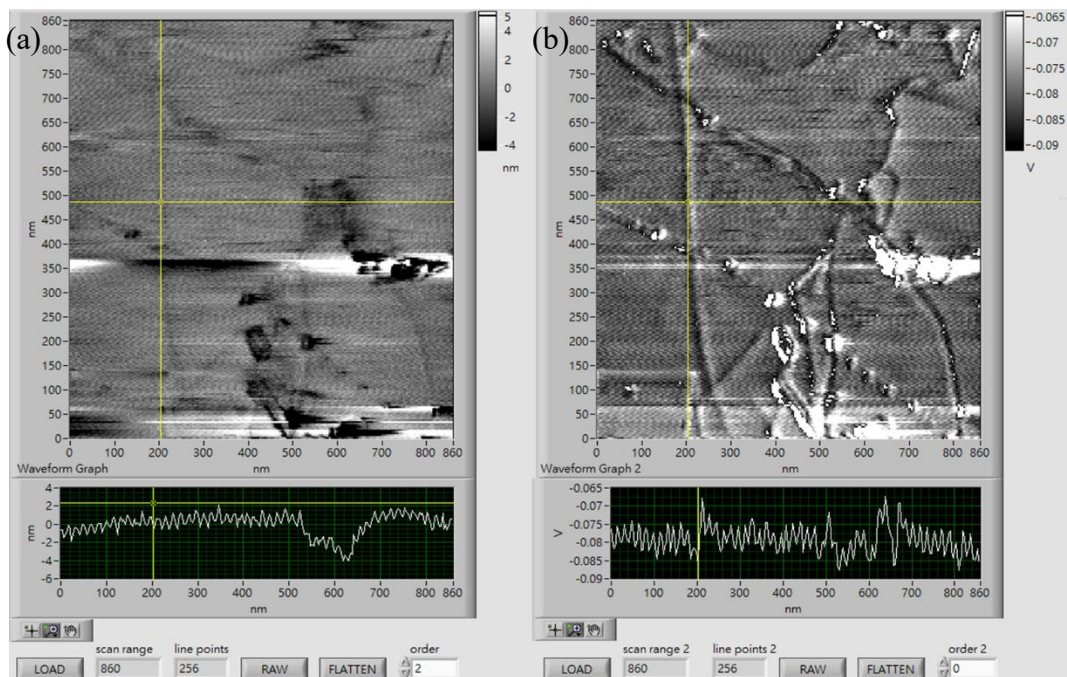


圖 4.9 HOPG 之(a)TR 回饋高度(b)TR 相位影像。

## 4.5.2 DOPC

此組資料為 DOPC 單相樣本，掃描時探針被激振於 142.98 kHz 的頻率，在此頻率下，TR 及 VR 都會被激發出來使得我們可以同時量測兩者訊號。量測時力圖資訊及結果分別如圖 4.10、4.11 所示。由力圖資訊首先可以發現 TR 振幅在接觸樣本時反而變大。造成此現象之原因為探針與樣本間若有足夠的吸引力導致針尖被黏在樣本上，探針的振動模態便會改變為以針尖為扭轉支點而導致振幅上

升。圖 4.11(a)、(b)以 VR 振幅做為回饋，0.3 Hz 掃描速率並同時成像高度及 TR 振幅訊號而得。由掃描結果可以發現圖 4.11(a)紅圈處之 lipid 在掃描過程中出現了高度反轉的現象，此現象為探針在掃描過程中發生變化導致探針與樣本間作用力不同而導致。由圖 4.11(b)便可以看出同時取得的振幅訊號沒有明顯差異，其回饋電壓與雲母表面有大約 0.01 V 的差異。圖 4.11(c)則是透過力體積模式以偏折 0.15 V，0.2 Hz 掃描速率掃描同一區域成像取得，可以發現力體積模式較不會被作用力變化影響，其在成向上較為一致而量測到的雲母及 DOPC 高度差約為 3nm。

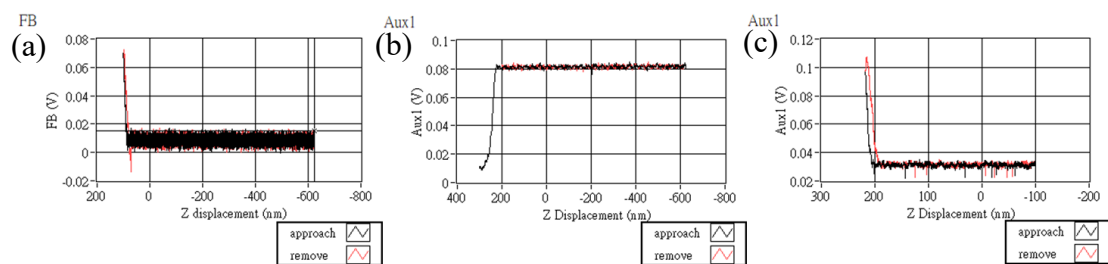


圖 4.10 量測 DOPC 時探針(a)偏折(b)<sup>3</sup><sup>rd</sup> VR 振幅(c)TR 振幅力圖，圖中黑線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。

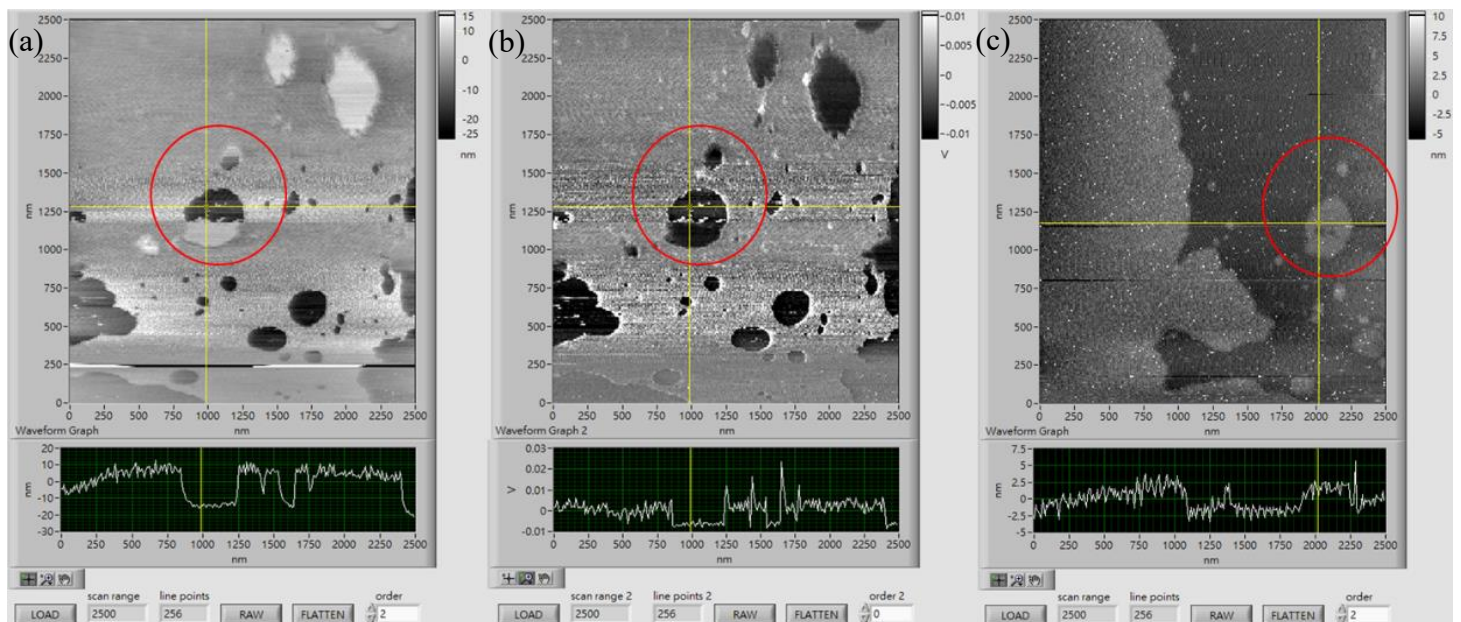


圖 4.11 DOPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅電壓(c)力體積模式影像，圖中紅圈處為相同位置。



### 4.5.3 DPPC

此組資料為 DPPC 單相樣本，探針被激振於量測時力圖資訊及結果分別如圖 4.12、4.13 所示。此組資料的 TR 振幅同樣為在與樣本接觸時變大。掃描時由 VR 振幅做為回饋，掃描速率為 0.3 Hz 並依序同時成像 TR 振幅、TR 相位、VR 相位。由圖像中也可以看到在有 lipid bilayer 的位置 TR 振幅有下降的趨勢，只是在這筆資料中只有 0.004 V 的差值。推測是因為 DPPC 在室溫環境為凝膠態，其硬度較 DOPC 硬，在材料性質上會與雲母更接近導致振幅訊號差異較小。另外由相位訊號可以發現 TR 相位 0.02 V 的差值比起 VR 相位的 0.005 V 差值有更大的對比，可以說明 TR 相較於 VR 有更大的材料分辨率。

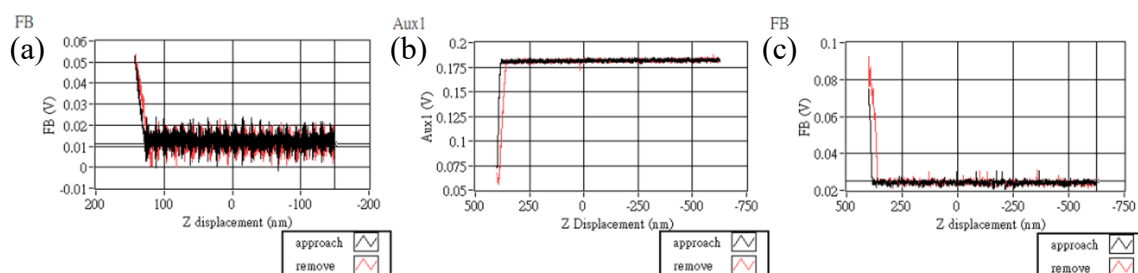


圖 4.12 量測 DPPC 時探針(a)偏折(b)3<sup>rd</sup> VR 振幅(c)TR 振幅力圖，圖中黑線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。

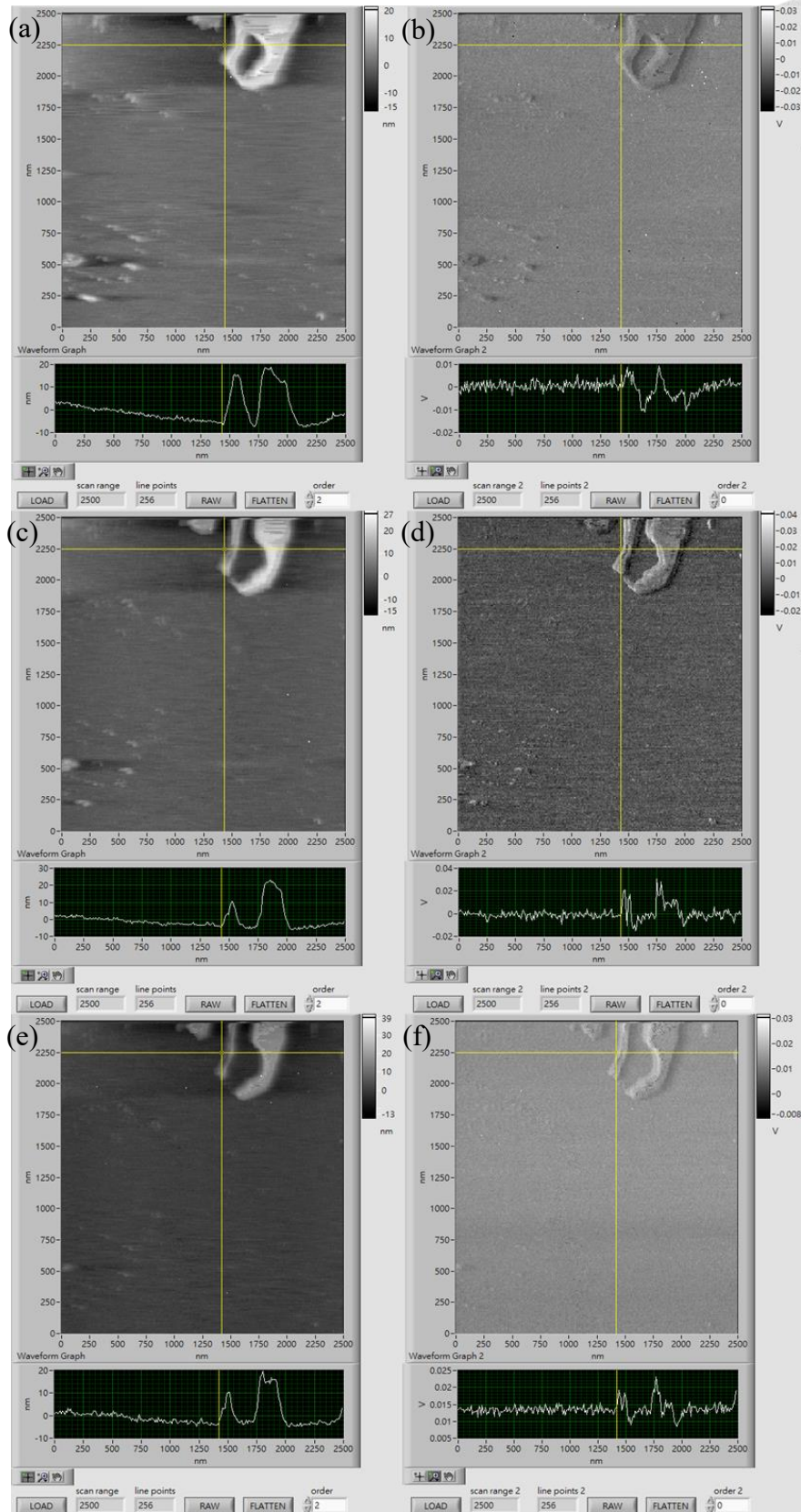


圖 4.13 DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c)VR 回饋高度(d)TR 相位(e)VR 回饋高度(f)VR 相位影像，其中(a)(b)、(c)(d)、(e)(f)為同時取得。

#### 4.5.4 DOPC+DPPC

此節之四組實驗皆為 DOPC+DPPC 之混合樣本，在第一組實驗中探針被激振於 130 kHz，以 VR 振幅做為回饋，同步成像 TR 振幅並以 0.2 Hz 的速率進行掃描，如圖 4.14 所示。由圖 4.14(a)、(c)兩次不同掃描觀察可以發現高度影像出現了前述反轉的現象，且高度回饋影像並不是非常穩定。反觀圖 4.14(b)、(d)TR 振幅影像可以明顯看出兩種不同 lipid 上的電壓差，且其在兩次掃描中表現一致，對比雲母表面的振幅電壓差分別約為 0.03 V 以及 0.05 V 並且振幅訊號在不同材料的交界處有較為明顯的邊界。

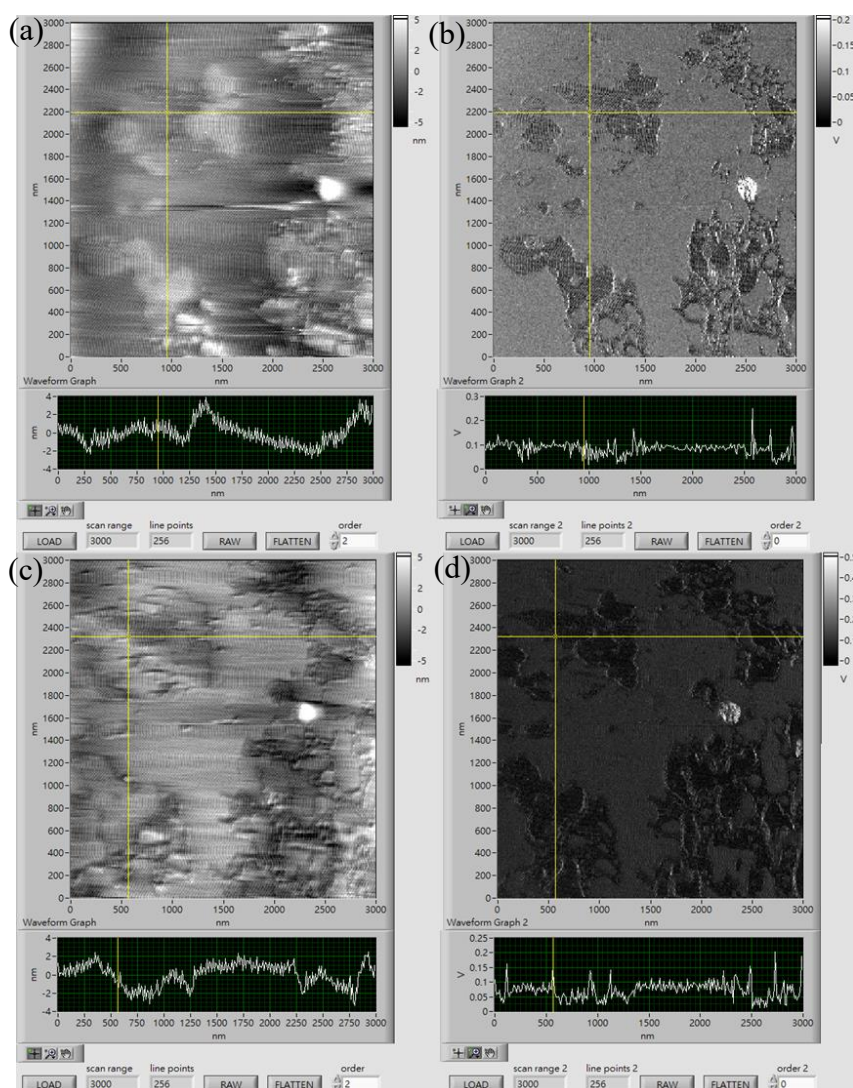


圖 4.14 第一組 DOPC+DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c)VR 回饋高度  
(d)TR 振幅影像。

第二組實驗如圖 4.15 所示。探針被激振於 140.93 kHz，以 VR 振幅做為回饋並以 0.2 Hz 的速率進行掃描。由圖中可以發現高度影像有較複雜的層次且其在振幅、相位資訊上皆反映出不同訊號，可能是多層 lipid 互相重疊所造成。在高度影像上雖然左側看起來比較像是 lipid 材料，但由振幅訊號可以看出在樣本左側的振幅電壓較大，研判有可能反而右側區域才是 lipid bilayer 而左側則是不同破碎結構相互疊加而成。由於此圖資訊較為複雜且沒有探針偏折訊號或力體積逐點資訊，較無法明確判斷區域，但仍能從圖像中看出 TR 振幅與 VR 振幅在對比上有明顯的差異。

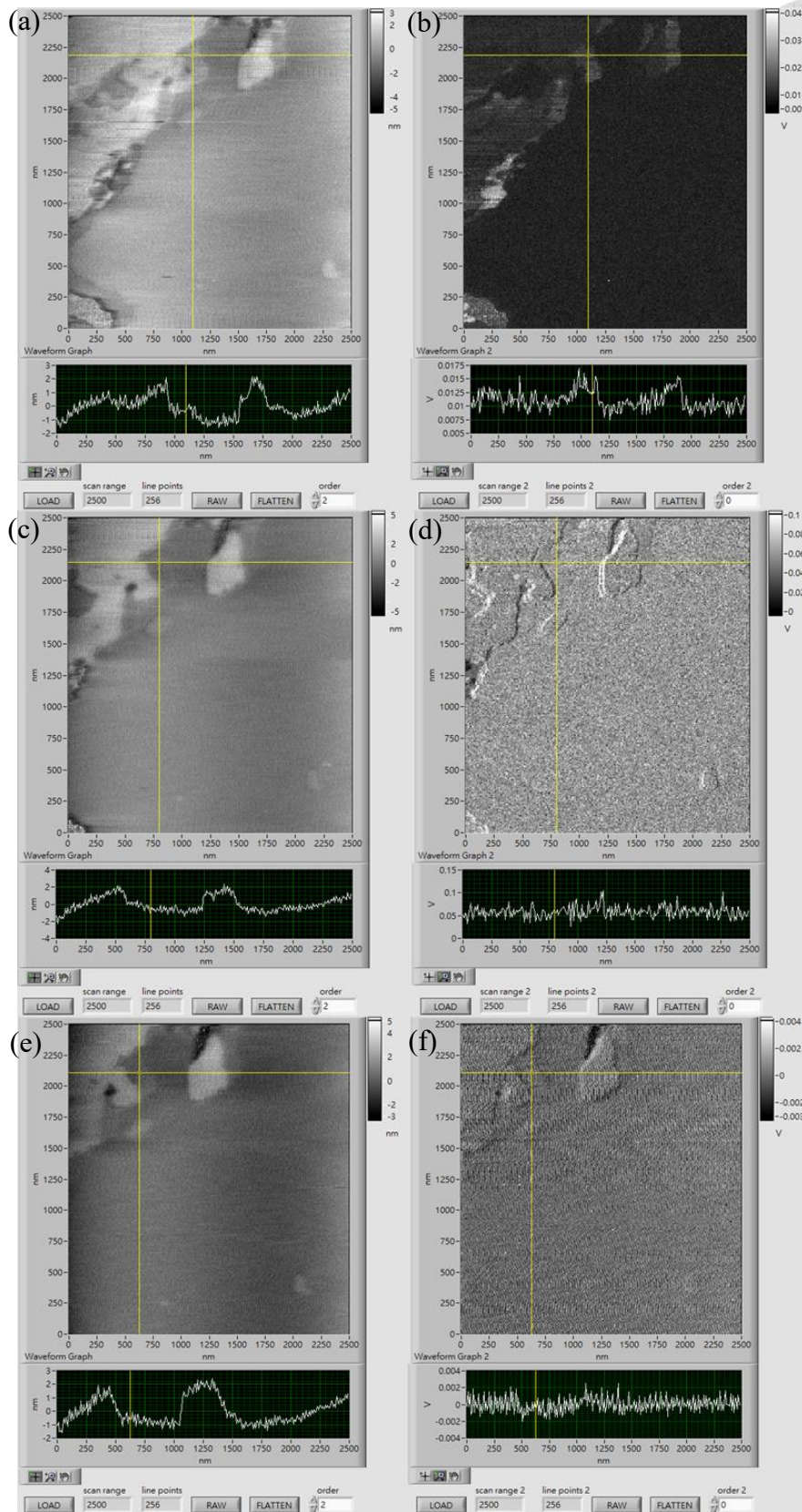


圖 4.15 第二組 DOPC+DPPC 之(a)VR 回饋高度(b)TR 振幅(c) VR 回饋高度 (d)TR 相位(e) VR 回饋高度(f)VR 相位影像。

在圖 4.16 所示的第三組實驗中探針被激振於 140.66 kHz，使用 TR 振幅做為回饋並以 0.3 Hz 的速率掃描。圖中可以明顯看出三種不同高度分別為雲母、DOPC 及 DPPC，且其在相位上也有明顯的對比。為了得到相對正確的高度，我們以偏折 0.03 V、0.2 Hz 的速率進行力體積模式掃描如圖 4.17 所示。在力體積模式的圖像中可以發現原本存在於表面的大量結構於圖像中都沒有出現，僅剩下少數結構存在。為了再次確認我們重新使用 TR 模式進行掃描得到影像如圖 4.18 所示。由圖中可以看出左上角有一個區塊的結構消失，可能是因為進行力體積模式時掃描參數問題導致相對不穩定的部分被探針破壞，然而右側結構仍然存在且表現與圖 4.16 一致。推測在力體積模式看不到其他結構的可能原因為較軟之 DOPC 在達到力體積回饋點之前已經被完全壓扁，又或者發生 lipid bilayer 被刺穿而導致回饋點為雲母表面而不是 lipid bilayer 的正確位置。在此次實驗中也能發現雖然在 TR 的相位資訊中可以明顯的看出三種不同材料的位置分布，且高度影像上也有一定的辨認性，在 VR 相位資訊中卻沒有看出相對應的差異，再次說明 TR 模式對不同材料的分辨率較佳。另外在圖 4.18 中可以看到在進行掃描時探針很明顯地受到樣本的吸引力而導致垂直偏折訊號出現明顯的變化導致樣本高度起伏遠大於理論值，我們使用了前述方法嘗試將其校正：首先我們取得探針力圖資訊並算出靈敏度如圖 4.19 所示，將探針垂直偏折資訊由電壓轉為位移後加上原本的高度影像便得到圖 4.20(b)的影像。由圖可以發現其高度由原本的約 10 nm 被校正成大約 4 nm，說明此方法能夠一定程度的將樣本還原成正確高度以利判讀。



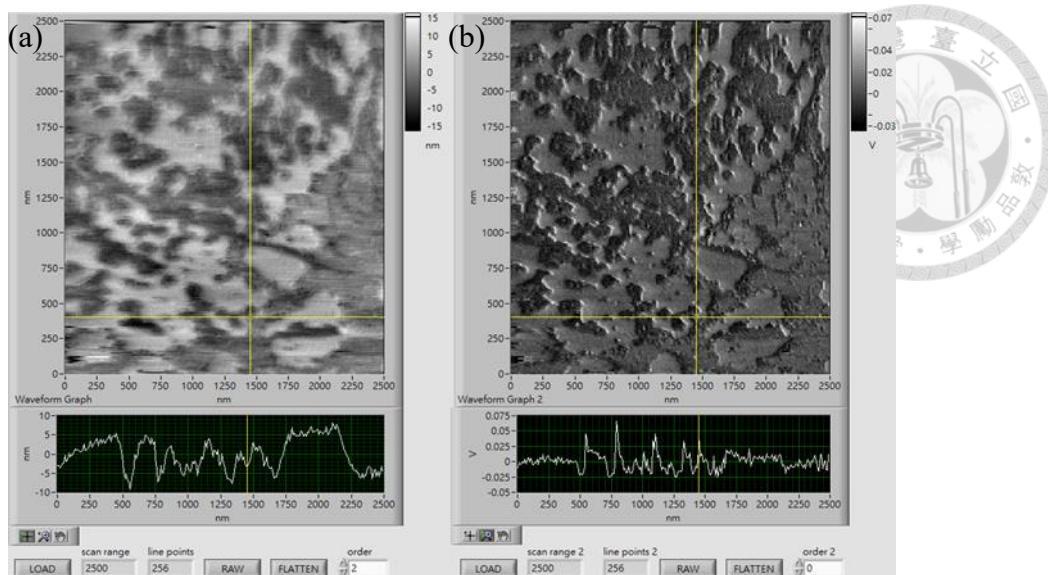


圖 4.16 第三組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)TR 相位影像。

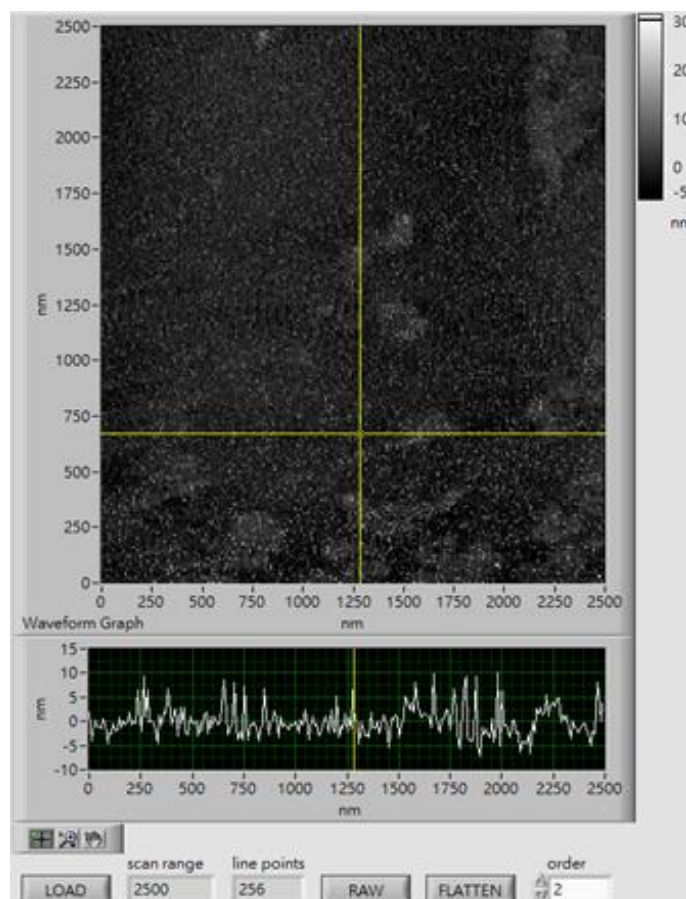


圖 4.17 第三組 DOPC+DPPC 力體積模式影像。

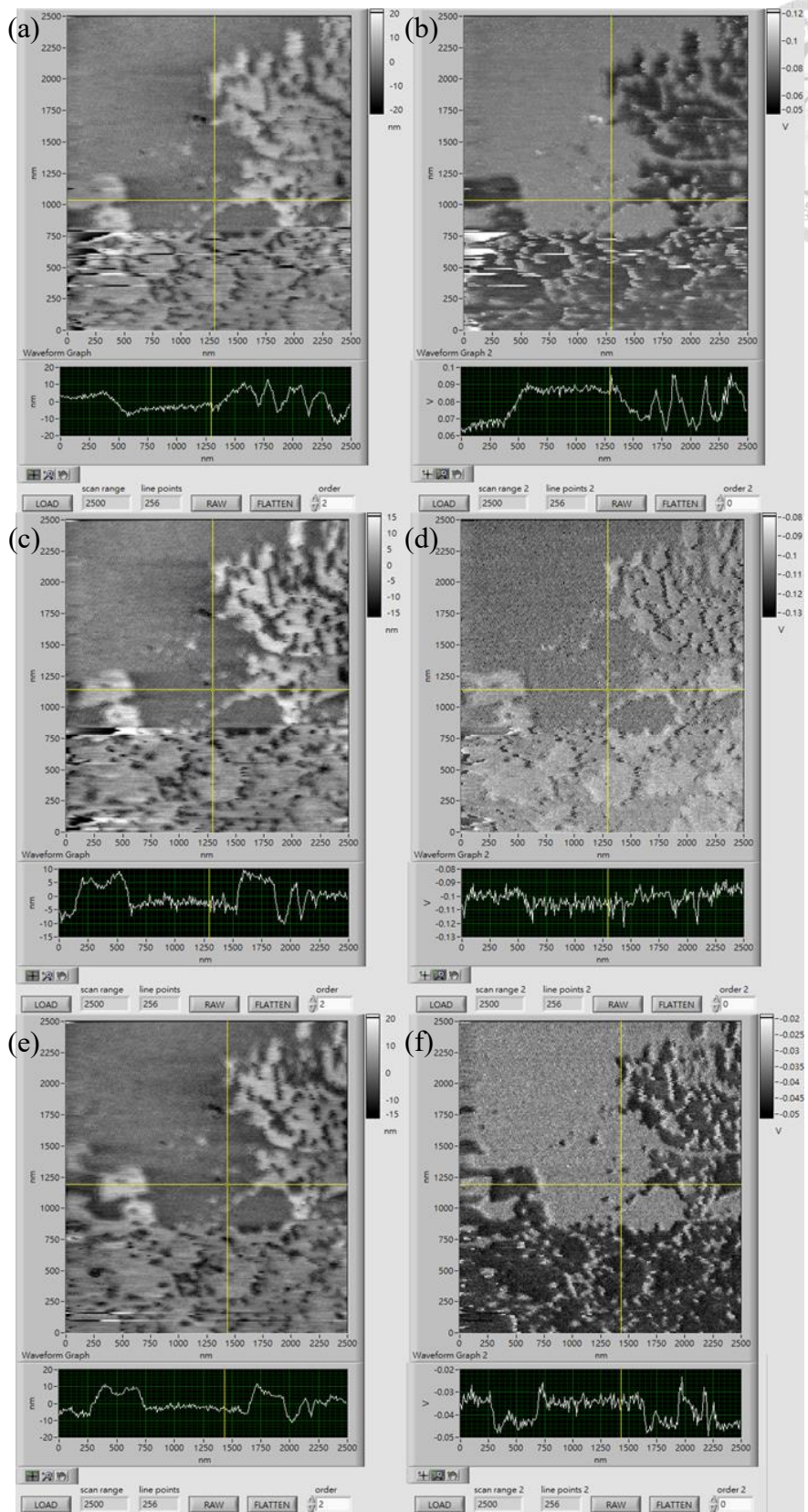
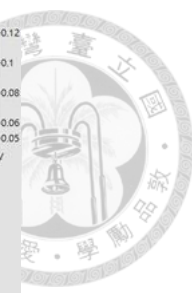


圖 4.18 第三組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)探針垂直偏折(c)TR 回饋高度  
(d)TR 相位(e)TR 回饋高度(f)VR 相位影像。

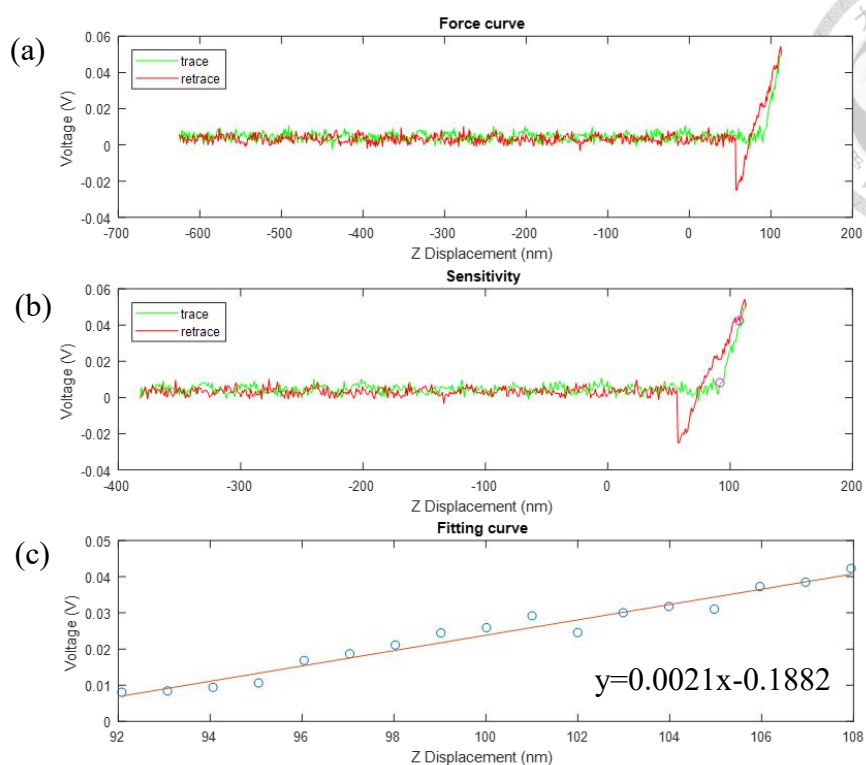
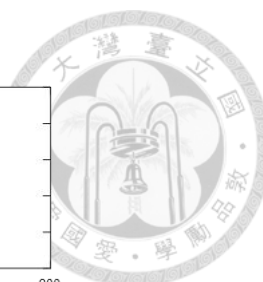


圖 4.19 量測第三組 DOPC+DPPC 時之(a)完整力圖(b)放大力圖及取點區間(c)擬合曲線圖，圖中綠線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。

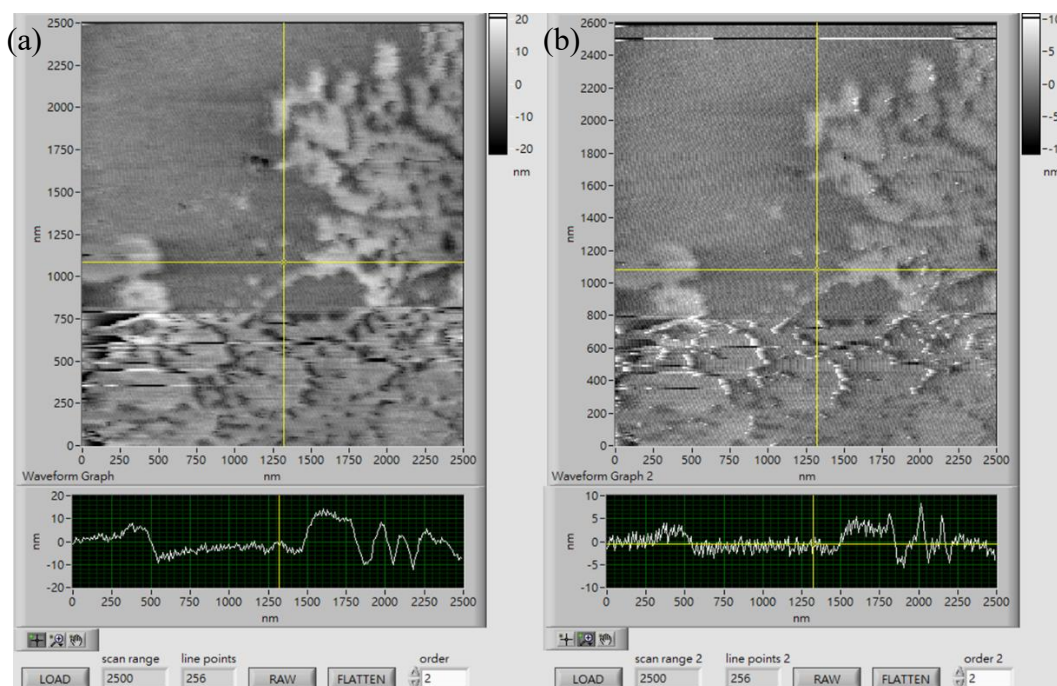


圖 4.20 第三組 DOPC+DPPC 之(a)原始(b)經過偏折校正後之高度影像。

為了確認力體積模式下探針的表現，我們對另一組混和樣本進行了實驗，以 140.2 kHz 的頻率激振探針、TR 振幅回饋並以 0.3 Hz 的速率掃描如圖 4.21 所示。圖像中也能夠明顯看出三種不同高度的區域，且在不同的訊號中都有明顯的對比。我們先使用了前述的高度校正法在取得圖 4.22 所示的靈敏度後將偏折補償加上得到圖 4.23 的影像。接著我們進行兩次以偏折 0.03 V、0.3 Hz 速率掃描的力體積模式，分別儲存 TR 振幅及探針垂直偏折的逐點力圖資訊，影像如圖 4.24 所示。在進行逐點力圖分析時會出現如圖 4.25 所示的兩種情況：當探針在沒有 lipid bilayer 的區域進行力圖時力圖呈現單一斜直線；當探針在有 lipid bilayer 的區域進行力圖時首先出現一段斜率較緩的 lipid bilayer 變形階段，當受力大於所需的刺穿力之後探針刺穿 lipid bilayer 並壓到 bilayer 下方的雲母結構並得到第二段不同斜率。在取得如圖 4.26 所示的力圖後我們可以得到探針初次接觸樣本的接觸點以及探針刺穿樣本前的刺穿點。透過取得所有力圖的接觸點及刺穿點位置後做圖便能夠重建出接觸點及刺穿點高度影像。由於刺穿點在雲母上並不存在，若程式判斷無刺穿點便會將位置設定在力圖回饋點而造成刺穿點重建後無刺穿點的位置高度較低。

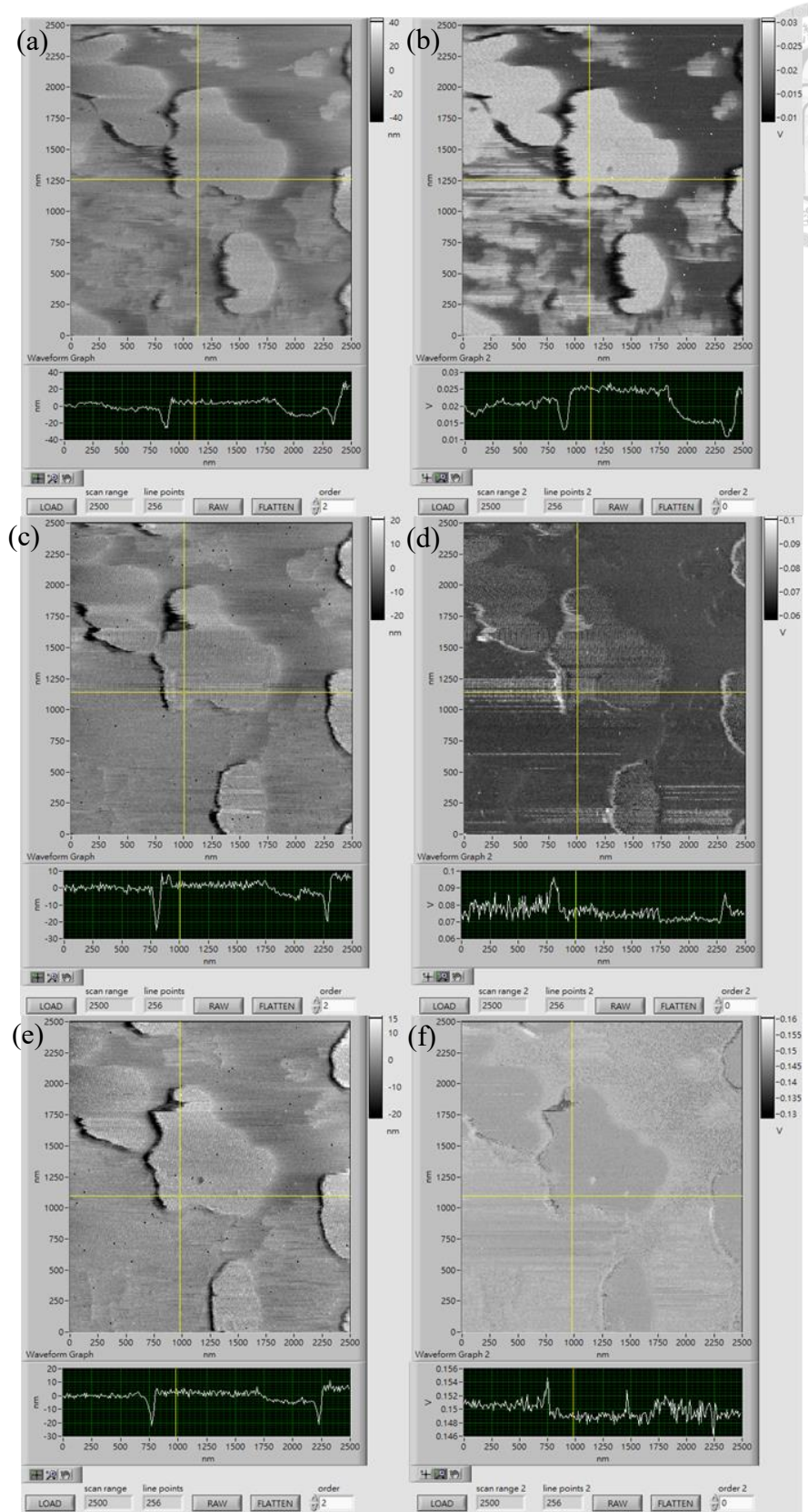
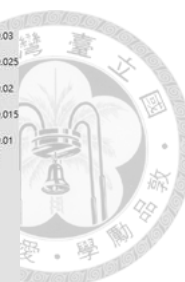


圖 4.21 第四組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)VR 振幅(c)TR 回饋高度(d)TR 相位(e)TR 回饋高度(f)VR 相位影像。

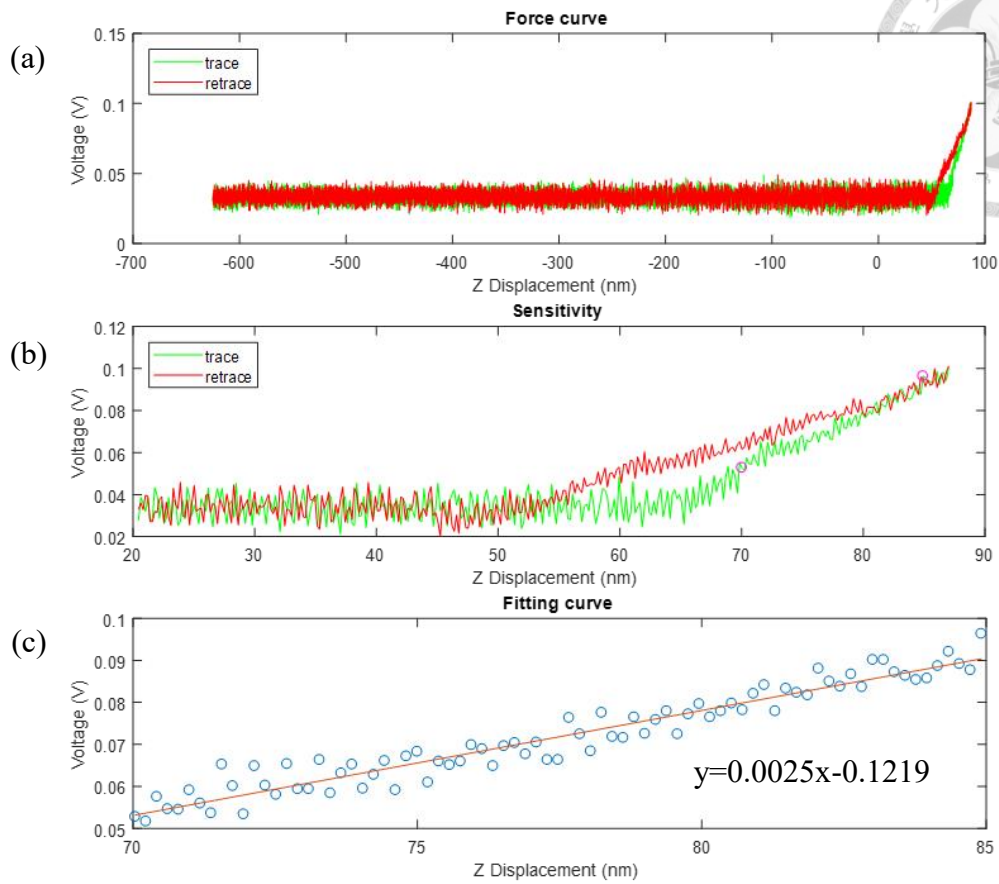
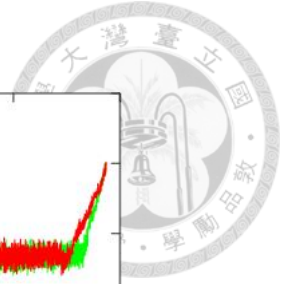


圖 4.22 量測第四組 DOPC+DPPC 時之(a)完整力圖(b)放大力圖及取點區間(c)擬合曲線圖，圖中綠線為探針接近樣本，紅線為探針遠離樣本。

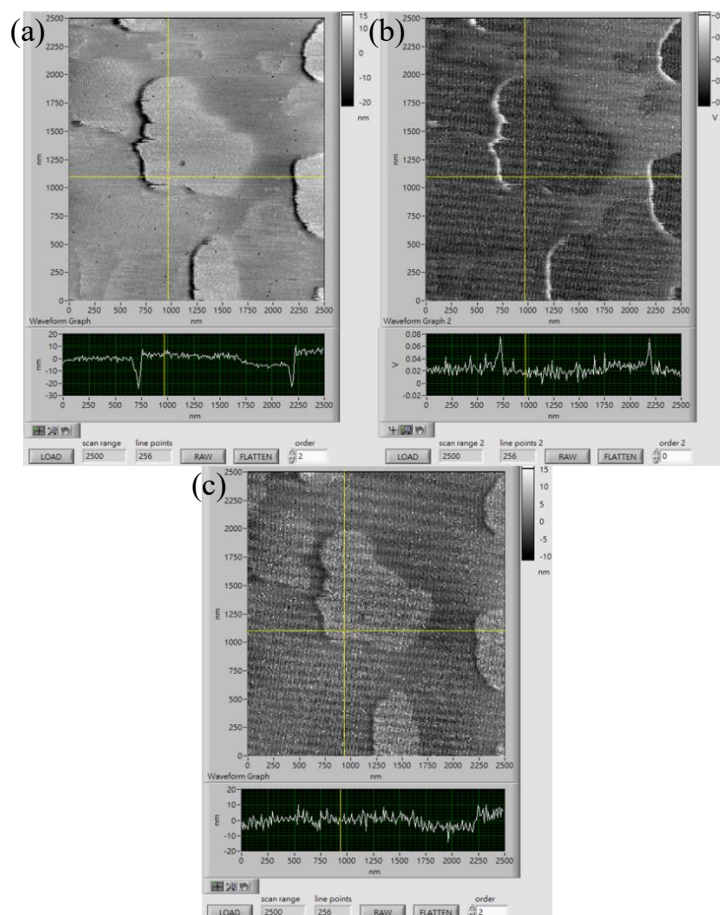


圖 4.23 第四組 DOPC+DPPC 之(a)TR 回饋高度(b)探針垂直偏折(c)校正後高度影像。

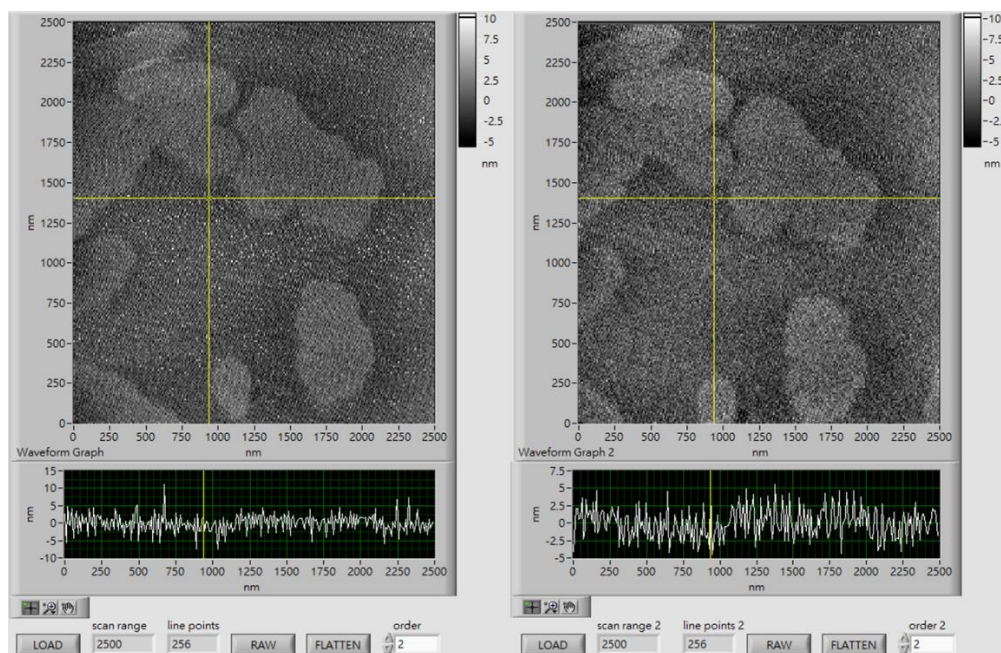


圖 4.24 第四組 DOPC+DPPC 兩次力體積模式所得之高度影像。

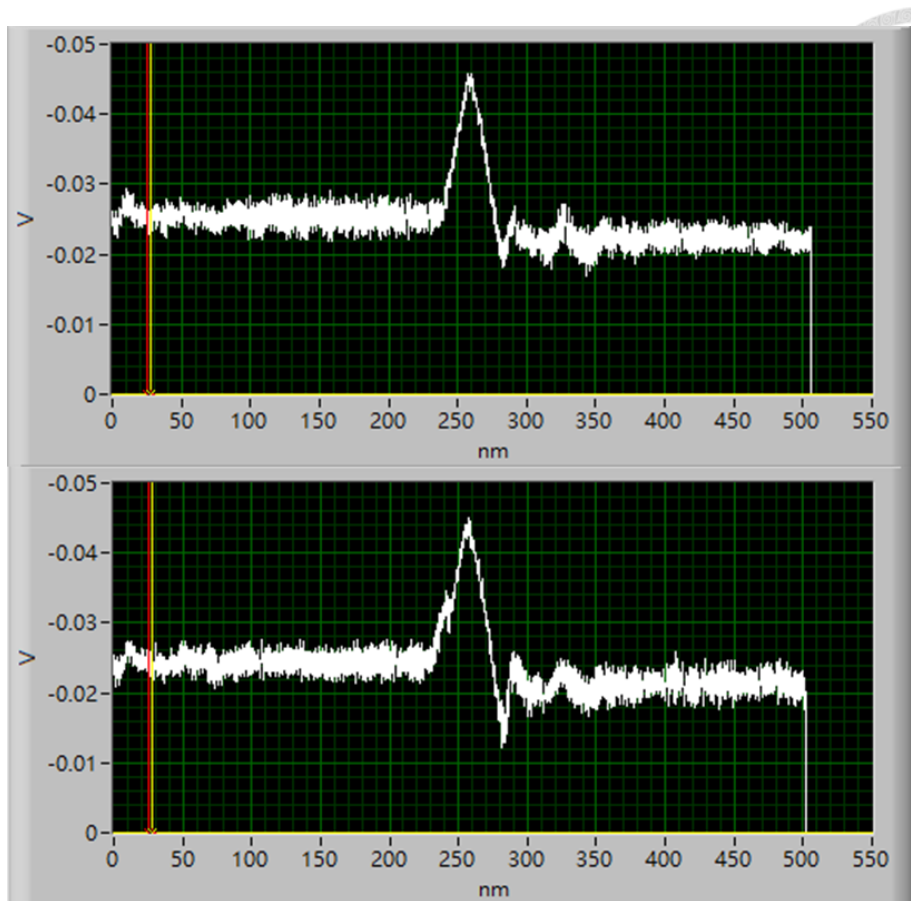


圖 4.25 於(a)mica 表面(b)lipid 上之力圖。

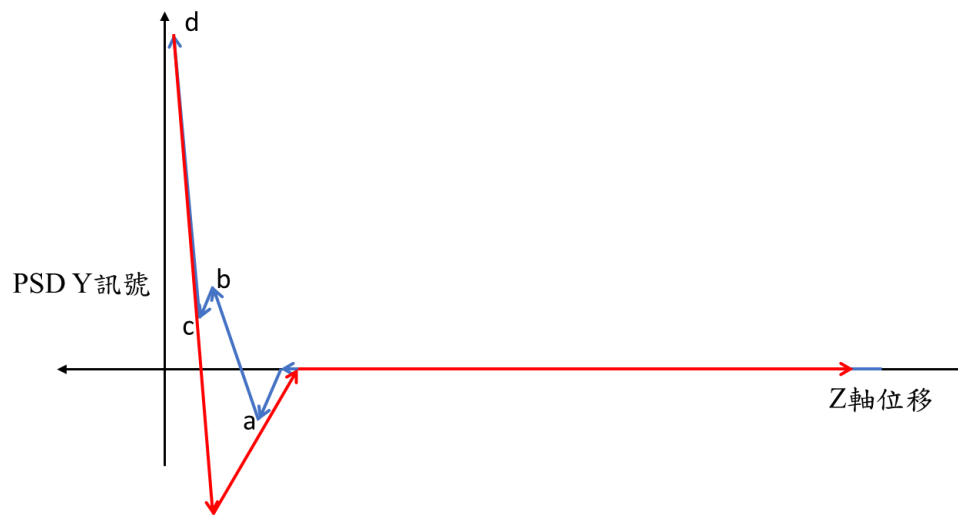


圖 4.26 於 lipid 上之力圖示意圖，點 a, b, c, d 分別代表接觸點、刺穿點、接觸雲母點以及回饋點。



我們首先對振幅的逐點力圖進行分析，在重建接觸點及刺穿點後得到影像如圖 4.27(a)、(b)所示。可以發現原本力體積模式量測較高的地方在接觸點重建後反而較矮，由刺穿點也能看出有刺穿點也就是 lipid 所在的區域跟接觸點重建對應並且結構厚度約為 4 nm。在力圖反應上也能看出在沒有刺穿點的位置靈敏度為 0.951 mV/nm 與圖 4.28(a)刺穿後的 0.934 mV/nm 接近，並且大於圖 4.28(b)刺穿前的 0.613 mV/nm。對垂直偏折的逐點力圖分析後得到影像如圖 4.29 所示，其接觸點資訊與刺穿點符合振幅所取得之資訊，唯因為探針垂直偏折較易受到環境影響導致雜訊較大造成分析時較難準確取得刺穿位置。在沒有刺穿點的位置靈敏度為 0.695 mV/nm 與圖 4.30(a)刺穿後的 0.708 mV/nm 接近，並且大於圖 4.30(b)刺穿前的 0.404 mV/nm。此外從這兩筆數據也能看出探針 TR 振幅的靈敏度較垂直偏折大，也代表 TR 模式能看到更多樣本資訊。對於高度重建後仍然反向的問題，我們認為是由於探針發生變化所造成。如圖 4.22 及圖 4.28 所示，兩者雖然都是探針偏折靈敏度，但可能因為在掃描一段時間後探針狀態不同而有一定程度的靈敏度差，另外探針被激振在不同頻率時以及沒有激振的等效 k 值也會造成靈敏度的變化導致高度重建的失準。

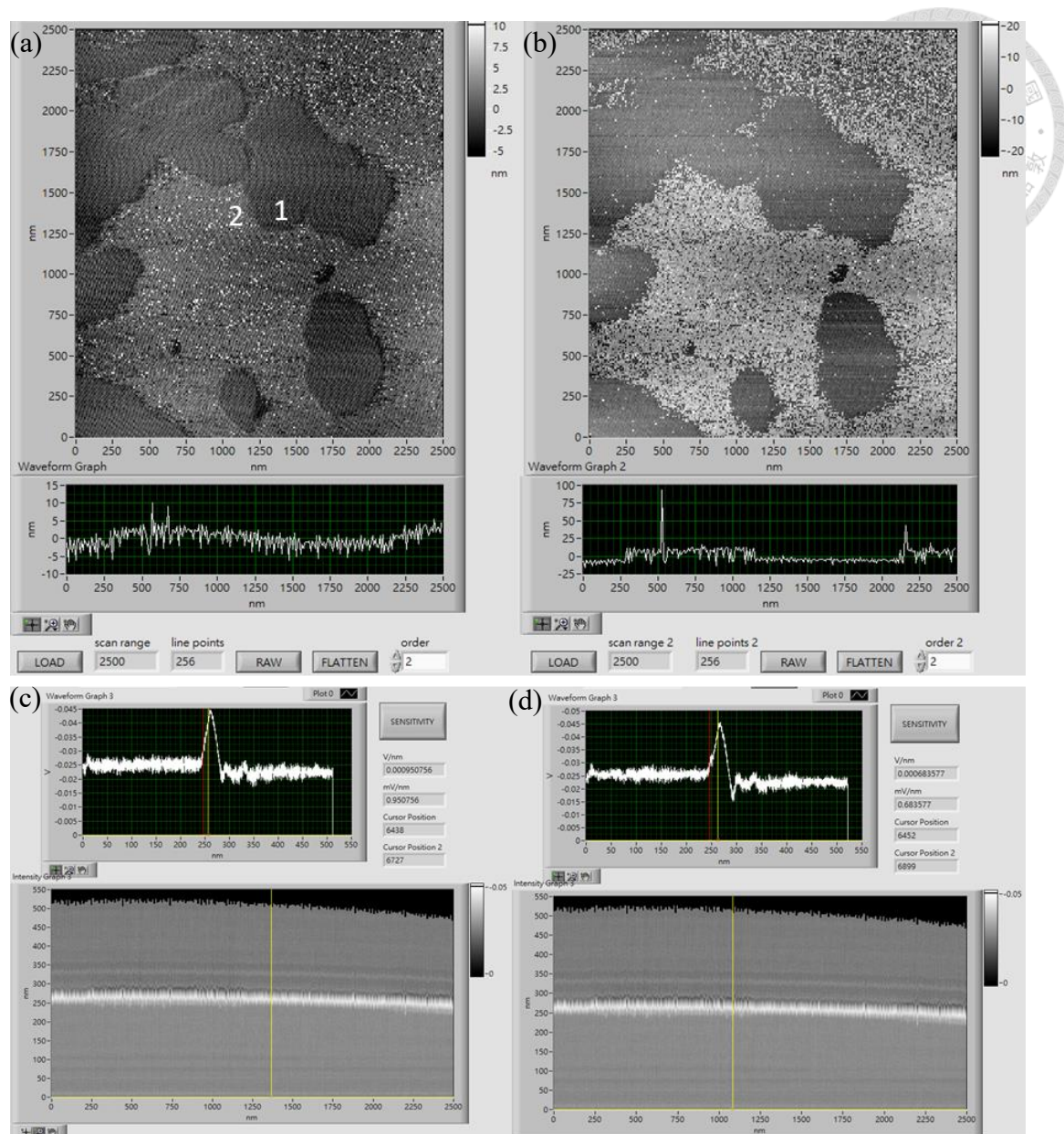


圖 4.27 TR 振幅逐點力圖分析而得之(a)接觸點重建(b)刺穿點重建(c)位置 1 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖(d)位置 2 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖。

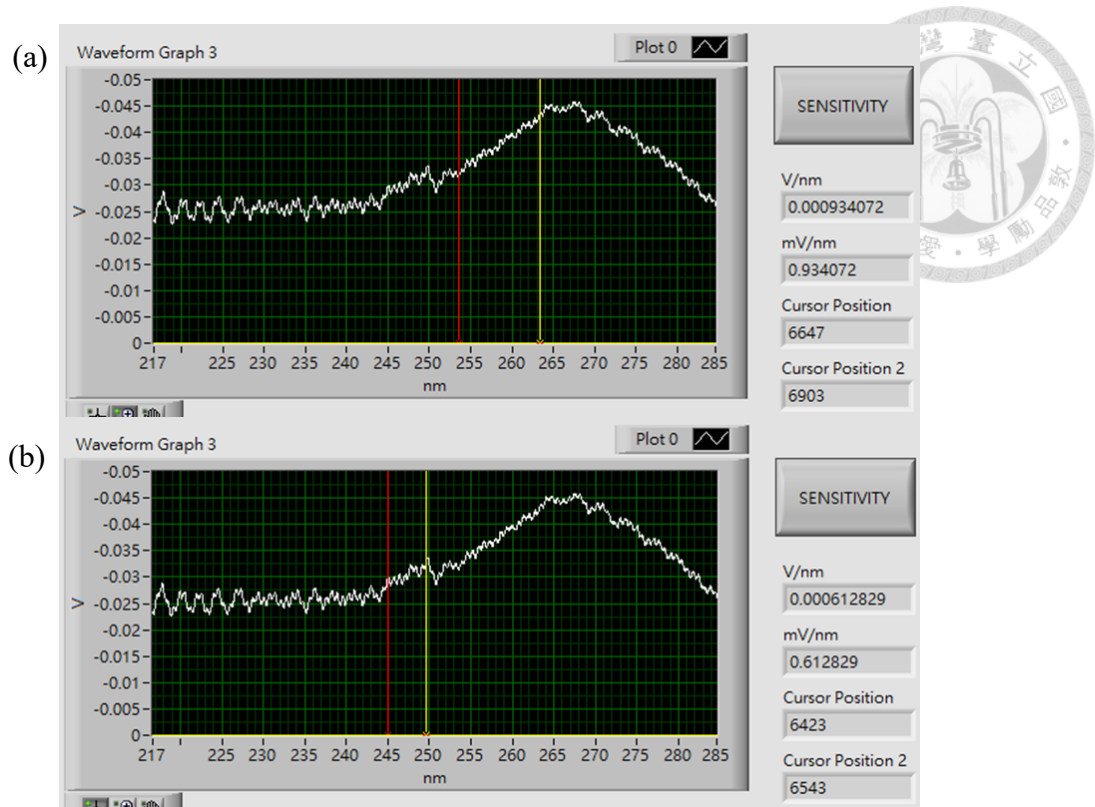


圖 4.28 圖 4.27(d)之力圖放大及其(a)刺穿後(b)刺穿前靈敏度。

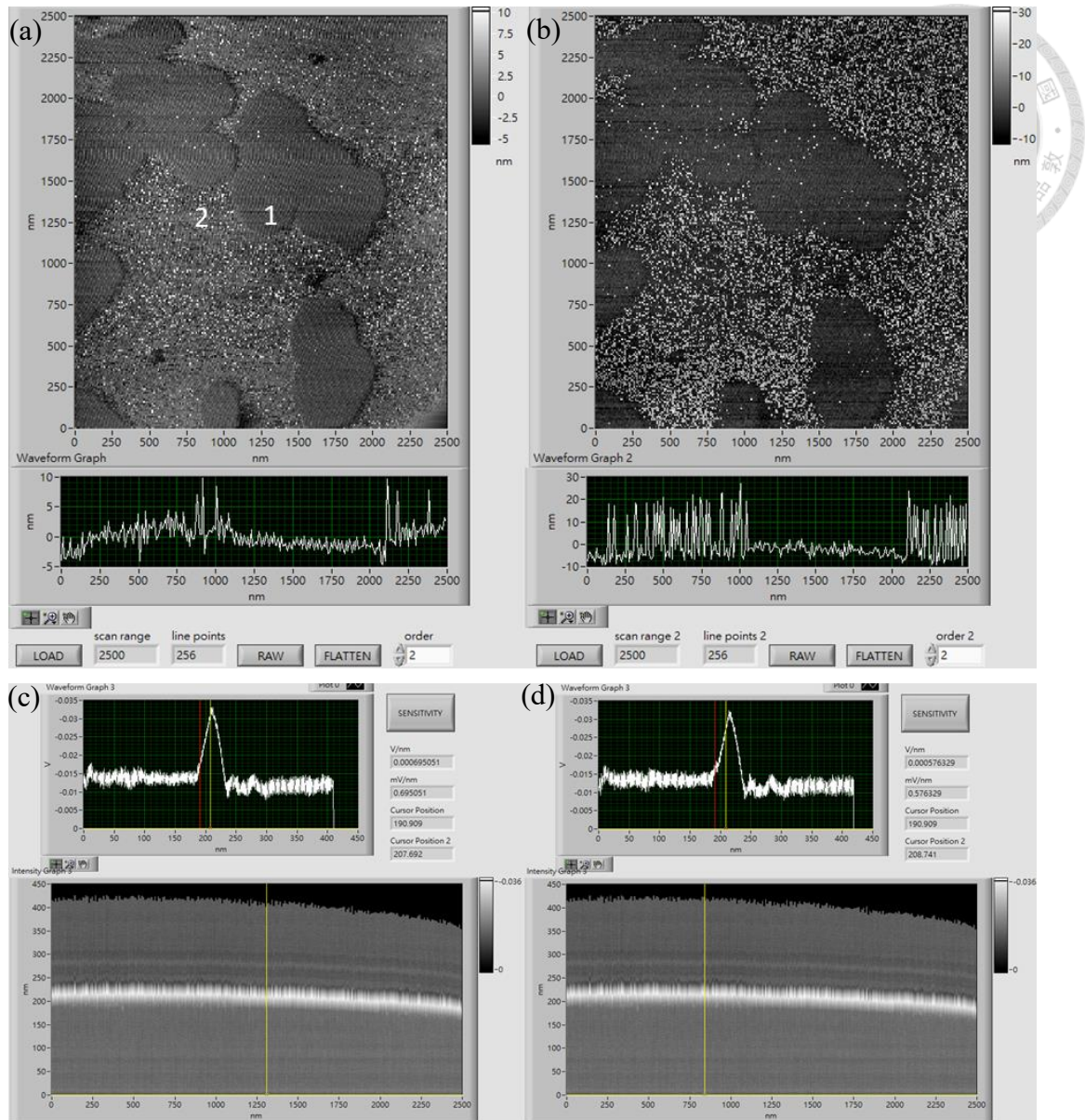


圖 4.29 垂直偏折逐點力圖分析而得之(a)接觸點重建(b)刺穿點重建(c)位置 1 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖(d)位置 2 之力圖、靈敏度及掃描線剖面力圖。

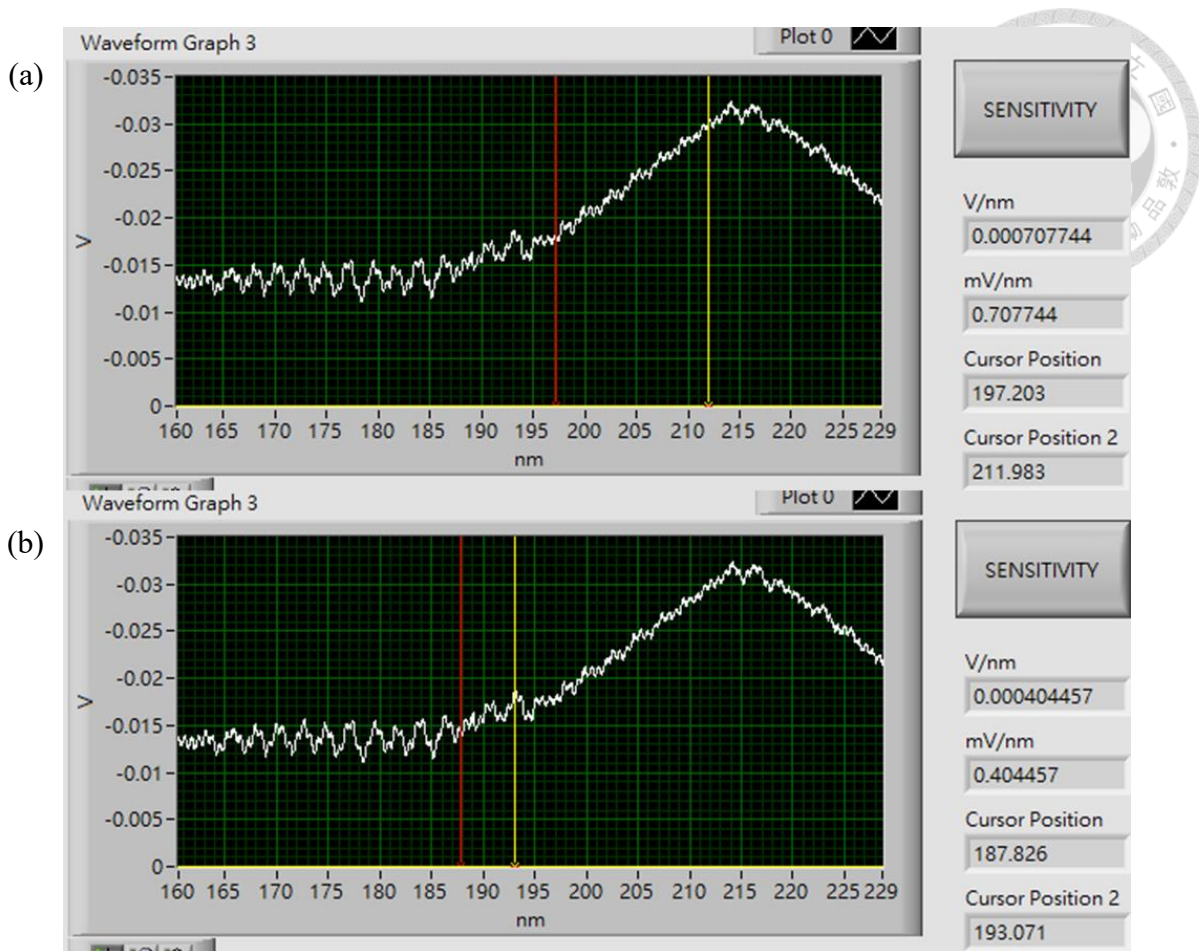


圖 4.30 圖 4.29(d)之力圖放大及其(a)刺穿後(b)刺穿前靈敏度。

取得逐點力圖資訊除了確認不同區域的材料以外也能夠將力圖資訊用於計算 lipid 厚度，以圖 4.26 為例：我們首先透過 c 點與 d 點間的線性區間取得探針靈敏度，以此靈敏度計算探針於 a、b 點以及 b、c 點區間的偏折，將壓電致動器的位移扣除探針偏折後便能得到探針於 a 點至 c 點區間實際位移量便是 lipid bilayer 膜厚。我們透過接觸點重建確認 lipid bilayer 的覆蓋區域，並由圖 4.21 中發現有 lipid 覆蓋的地方分成兩種不同材料的區塊，因此將後續資料分區進行分析及比較如圖 4.31 所示。

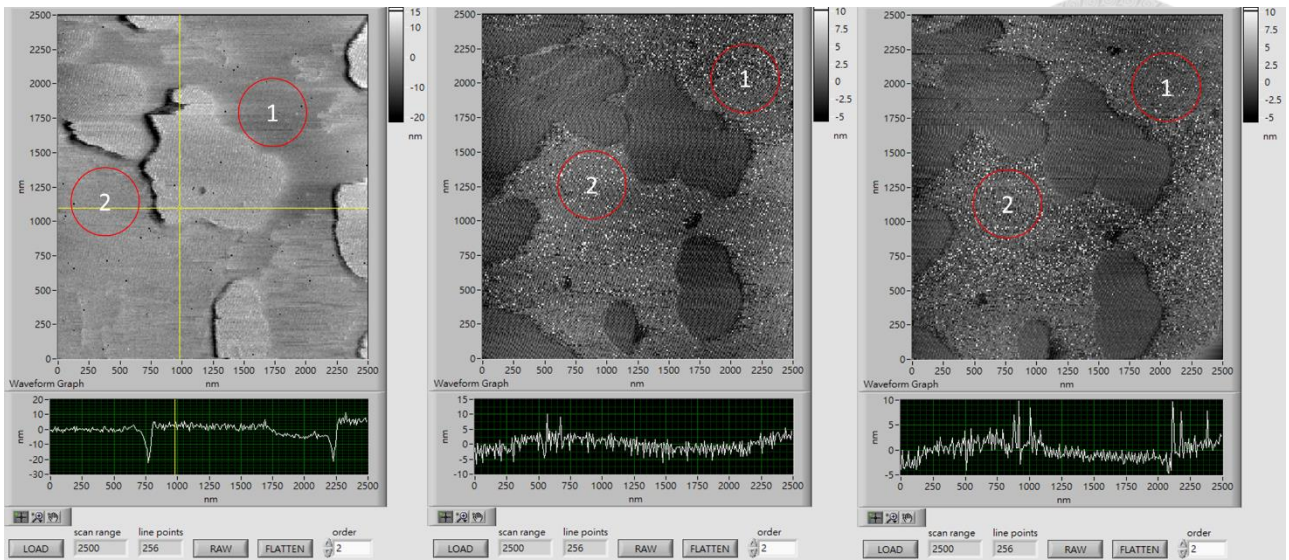


圖 4.31 (a)TR 高度影像(b)振幅力圖接觸點重建影像(c)偏折力圖接觸點重建影像兩不同比較

區域位置圖

將圖 4.31 中區域 1 及區域 2 各取 10 點進行膜厚計算得到資料如表 4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8 所示。

表 4.3 振幅力圖於區域 1 任取 10 點計算資料表。

X(nm)	X2(nm)	$\Delta X$ (nm)	Y(nm)	Y2(nm)	$\Delta Y$ (nm)	Sensitivity(mV/nm)	Thickness(nm)	Sensitivity lipid(mV/nm)
248.834	241.987	6.847	29.1045	25.8706	3.2339	1.12858	3.981541	0.560364
252.215	242.624	9.591	30.3483	25.6219	4.7264	0.948786	4.609476	0.695645
248.208	236.87	11.338	30.8458	25.1244	5.7214	1.01879	5.722122	0.465914
244.15	235.26	8.89	29.3532	26.1194	3.2338	1.0426	5.788331	0.710545
245.862	236.046	9.816	34.0796	26.6169	7.4627	1.03975	2.638602	1.13728
250.692	234.338	16.354	33.3333	26.3682	6.9651	0.897151	8.590424	0.742065
247.064	238.123	8.941	30.8458	25.6219	5.2239	0.994824	3.68992	0.511982
250.626	242.125	8.501	31.3433	26.8657	4.4776	0.987581	3.967093	0.844948
249.452	242.998	6.454	30.0995	26.8657	3.2338	0.93937	3.01148	0.353695

241.19	234.351	6.839	29.1045	26.6169	2.4876	0.931312	4.16793	0.483357
						Average(nm)	4.616692	0.65058
						Standard deviation(nm)	1.724353	0.227598

表 4.4 振幅力圖於區域 2 任取 10 點計算資料表。

X(nm)	X2(nm)	$\Delta X$ (nm)	Y(nm)	Y2(nm)	$\Delta Y$ (nm)	Sensitivity(mV/nm)	Thickness(nm)	Sensitivity lipid(mV/nm)
251.984	244.622	7.362	29.1045	24.8507	4.2538	0.955422	2.909727	0.845946
252.449	242.842	9.607	29.8507	24.8756	4.9751	0.958864	4.418464	0.771789
246.732	235.399	11.333	29.3532	23.6318	5.7214	0.967946	5.422133	0.786322
249.758	239.943	9.815	28.1095	24.3781	3.7314	0.920932	5.763235	0.627735
250.131	239.354	10.777	32.4627	25.0746	7.3881	0.943067	2.94288	0.833756
247.392	238.066	9.326	29.1045	25.3731	3.7314	1.07179	5.844534	0.673579
249.225	242.265	6.96	28.4328	25.7463	2.6865	0.893798	3.954287	0.465599
249.821	238.793	11.028	30.597	24.6269	5.9701	1.01186	5.127875	0.808642
248.666	238.143	10.523	31.0945	24.3781	6.7164	0.97745	3.651651	0.81526
245.741	236.653	9.088	29.5522	24.1791	5.3731	1.02743	3.858349	0.65943
						Average(nm)	4.389314	0.728806
						Standard deviation(nm)	1.101264	0.120691

表 4.5 偏折力圖於區域 1 任取 10 點計算資料表。

X(nm)	X2(nm)	$\Delta X$ (nm)	Y(nm)	Y2(nm)	$\Delta Y$ (nm)	Sensitivity(mV/nm)	Thickness(nm)	Sensitivity lipid(mV/nm)
197.752	183.494	14.258	25.8706	19.7015	6.1691	0.697678	5.415669	0.663951

195.114	186.358	8.756	22.6866	19.7015	2.9851	0.714549	4.5784	0.397605
199.338	190.422	8.916	23.4826	19.3035	4.1791	0.703626	2.976623	0.4217
201.447	190.161	11.286	24.0796	20.0995	3.9801	0.72987	5.832837	0.779806
195.339	187.594	7.745	20.2985	17.3134	2.9851	0.690683	3.423046	0.434873
196.812	185.252	11.56	20.0249	17.7612	2.2637	0.725603	8.44025	0.304045
200.818	190.96	9.858	21.2438	17.7612	3.4826	0.749986	5.214447	0.372596
200.797	189.15	11.647	21.7662	17.0647	4.7015	0.68099	4.743081	0.610011
198.862	189.193	9.669	21.0697	17.5871	3.4826	0.686263	4.594269	0.485936
200.02	189.452	10.568	20.6965	17.7114	2.9851	0.688046	6.229482	0.599284
						Average(nm)	5.14481	0.506981
						Standard deviation(nm)	1.528937	0.149937

表 4.6 偏折力圖於區域 2 任取 10 點計算資料表。

X(nm)	X2(nm)	$\Delta X$ (nm)	Y(nm)	Y2(nm)	$\Delta Y$ (nm)	Sensitivity(mV/nm)	Thickness(nm)	Sensitivity lipid(mV/nm)
192.351	178.777	13.574	13.7313	11.6418	2.0895	0.667304	10.44274	0.321894
195.749	185.949	9.8	15.9701	12.2388	3.7313	0.70764	4.527121	0.716109
200.518	182.121	18.397	21.7662	12.3632	9.403	0.650197	3.935229	0.666109
193.127	181.608	11.519	17.3134	12.6866	4.6268	0.697139	4.88216	0.597772
186.367	177.73	8.637	15.8209	13.1343	2.6866	0.672325	4.641016	0.531766
188.901	175.891	13.01	15.3234	12.0149	3.3085	0.673319	8.096282	0.592232
187.028	178.13	8.898	14.9254	12.5373	2.3881	0.668932	5.327981	0.654527
182.95	176.016	6.934	14.3284	12.0896	2.2388	0.659116	3.537329	0.603405
179.264	168.704	10.56	16.8905	13.5821	3.3084	0.685441	5.733326	0.596637



184.707	177.936	6.771	13.7313	12.2388	1.4925	0.683841	4.588475	0.379645
					Average(nm)		5.571166	0.56601
					Standard deviation(nm)		2.11876	0.124684

表 4.7 平均厚度比較表。

儲存模式	振幅	偏折
區域 1	4.616692 nm	5.14481 nm
區域 2	4.389314 nm	5.571166 nm

表 4.8 平均雙層膜靈敏度比較表。

儲存模式	振幅	偏折
區域 1	0.65058 mV/nm	0.506981 mV/nm
區域 2	0.728806 mV/nm	0.56601 mV/nm

由表中數據可以發現雖然在圖像上能夠看出高度及相位上的差異，但各區域的平均值是接近的，大約坐落在厚度 5 nm 左右，此外由表格中也可以發現各區域的標準差都相當大。推測會造成不同區域沒有明顯差異且離群值多的原因可能有以下幾點：首先是系統雜訊太大，過大的雜訊導致接觸點及刺穿點資訊被覆蓋在雜訊之下造成無法精確取得正確位置；其次是由於雜訊影響，程式無法有效抓取所需要的各點資訊造成需要手動判斷接觸及刺穿點而造成誤差；此外在掃描過程中探針針尖若發生變化也會造成刺穿 lipid bilayer 的難易度變化導致刺穿厚度的誤差。另外由表 4.8 可以發現在區域 2 的平均靈敏度較區域 1 高，可以說明區域 2 材料平均硬度較硬，或許是 DPPC 區間，而較軟的區域 1 則是 DOPC。

## 五、 結論與未來展望

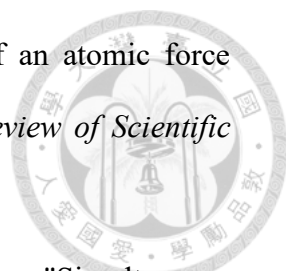
本研究透過 TR 模式量測 DOPC 及 DPPC，除了能夠分辨不同 lipid 區間以外，更能夠透過同步成像的方式取得振幅、偏折、相位等不同訊號的資訊。透過這些資訊發現在掃描如 lipid bilayer 等薄樣品時，由於 TR 模式在掃描時較不會受到基板效應影響，使得其穩定度以及辨識能力上較 VR 模式高，尤其 TR 相位在探針狀況改變時仍然能夠有效分辨不同材料區間。透過力體積模式的逐點力圖分析並重建接觸點、刺穿點使我們能夠有效校正樣本高度約為 2 至 4 奈米。最後透過分析不同區域的力圖能夠計算出 lipid bilayer 的平均厚度約為 5 nm，雖然在厚度上沒有看出明顯差異，但在不同區域的刺穿前靈敏度能夠有效說明不同區間的軟硬度不同並有效分辨不同材料。

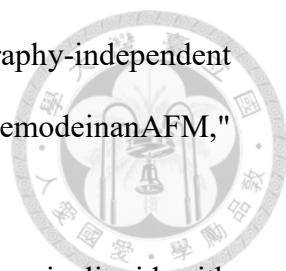
若需要對 lipid bilayer 的平面機械性質有更加深入的了解，首先需要將系統的抗雜訊能力再提升，並且需要有更加完整的數學模型對應如何計算 TR 振幅在接觸樣本時不減反增的情形。此外為了能夠正確的對應掃描點及探針位置，需要對壓電致動器進行非線性校正將其位移線性化。另外由於 CSC38 探針較軟，容易受到環境影響，若要更穩定的成像環境則需使用硬度較高之探針並連帶將 PSD 的頻寬提高以利偵測。

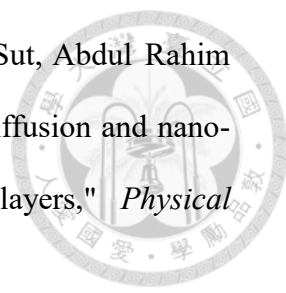
## 參考文獻



- [1] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930-933, 3 1986.
- [2] 黃英碩, "掃描探針顯微術的原理及應用," *科儀新知*, 編號 144, pp. 7-17, 2005.
- [3] U. Hartmann, "Magnetic Force Microscopy," *Annual Review of Materials Science*, vol. 29, no. 1, pp. 53-87, 1999.
- [4] Shaoyang Liu and Yifen Wang, "Application of AFM in Microbiology: A Review," *Scanning*, vol. 32, no. 2, pp. 61-73, 2010.
- [5] Constant A. J. Putman, Kees O. Van der Werf, Bart G. De Grooth, Niek F. Van Hulst, Jan Greve, "Tapping mode atomic force microscopy in liquid," *Applied Physics Letters*, vol. 64, no. 18, p. 2454–2456 , 1994.
- [6] Takeshi Fukuma, "Wideband low-noise optical beam deflection sensor with photothermal excitation for liquid-environment atomic force microscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 80, no. 2, 2009.
- [7] Ken-ichi Umeda, Noriaki Oyabu, Kei Kobayashi, Yoshiki Hirata, Kazumi Matsushige and Hirofumi Yamada, "High-Resolution Frequency-Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids Using Electrostatic Excitation Method," *Applied Physics Express*, vol. 3, no. 6, p. 065205, 2010.
- [8] Kaito Hirata, takumi igarashi, Keita Suzuki, Keisuke Miyazawa & takeshi fukuma, "Wideband Magnetic excitation System for Atomic force Microscopy cantilevers with Megahertz-order Resonance frequency," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 9133, 2020.

- 
- [9] Q. Li; K.-S. Kim; A. Rydberg, "Lateral force calibration of an atomic force microscope with a diamagnetic levitation spring system," *Review of Scientific Instruments*, vol. 77, no. 6, p. 065105, 2006.
- [10] E.-T. Hwu; S.-K. Hung; C.-W. Yang; I.-S. Hwang; K.-Y. Huang, "Simultaneous detection of translational and angular displacements of micromachined elements," *Applied Physics Letters*, vol. 91, no. 22, p. 221908, 2007.
- [11] H.-S. Liao; Y.-H. Chen; R.-F. Ding; H.-F. Huang; W.-M. Wang; E.-T. Hwu; K.-Y. Huang; C.-S. Chang; I.-S. Hwang, "High-speed atomic force microscope based on an astigmatic detection system," *Review of Scientific Instruments*, vol. 85, no. 10, p. 103710, 2014.
- [12] Michael G. Ruppert; S. O. Reza Moheimani, "A novel self-sensing technique for tapping-mode atomic force microscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 84, no. 12, p. 125006, 2013.
- [13] Ali Tavassolizadeh; Tobias Meier; Karsten Rott; Günter Reiss; Eckhard Quandt; Hendrik Hölscher; Dirk Meyners, "Self-sensing atomic force microscopy cantilevers based on tunnel magnetoresistance sensors," *Applied Physics Letters*, vol. 102, no. 15, p. 153104, 2013.
- [14] G E Fantner, W Schumann, R J Barbero, A Deutschinger, V Todorov, D S Gray, A M Belcher, I W Rangelow and K Youcef-Toumi, "Use of self-actuating and self-sensing cantilevers for imaging biological samples in fluid," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 43, p. 434003, 2009.
- [15] Lin Huang, Chanmin Su, "A torsional resonance mode AFM for in-plane," vol. 100, no. 3-4, pp. 277-285, 2004.

- 
- [16] Bharat Bhushan and Toshi Kasai, "Asurfacetopography-independent friction measurement technique using torsional resonance mode in an AFM," *Nanotechnology*, vol. 15, no. 8, pp. 923-935, 2004.
- [17] Chih-Wen Yang and Ing-Shouh Hwang, "Soft-contact imaging in liquid with frequency-modulation torsion resonance mode atomic force microscopy," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 6, p. 065710, 2010.
- [18] Ozgur Sahin and Natalia Erina, "High-resolution and large dynamic range nanomechanical mapping in tapping-mode atomic force microscopy," *Nanotechnology*, vol. 19, p. 445717, 2008.
- [19] Ing-Shouh Hwang, Chih-Wen Yang, Ping-Hsiang Su, En-Te Hwu, Hsien-Shun Liao, "Imaging soft matters in water with torsional mode atomic force microscopy," *Ultramicroscopy*, vol. 135, pp. 121-125, 2013.
- [20] Megumi Umemoto, Ryuzo Kawamura, Hiroshi Y. Yoshikawa, Seiichiro Nakabayashi and Naritaka Kobayashi, "Simultaneous atomic-resolution flexural and torsional imaging in liquid by frequency modulation atomic force microscopy," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 59, no. S1, 2020.
- [21] John F Nagle, Stephanie Tristram-Nagle, "Lipid bilayer structure," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 10, no. 4, pp. 474-480, 2000.
- [22] Andrea Alessandrini and Paolo Facci, "Phase transitions in supported lipid bilayers studied by AFM," *Soft Matter*, vol. 10, pp. 7145-7164, 2014.
- [23] Anna Åkesson, Tania Lind, Nicky Ehrlich, Dimitrios Stamou, Hanna Wacklin and Marité Cárdenas, "Composition and structure of mixed phospholipid supported bilayers formed by POPC and DPPC," *Soft Matter*, vol. 8, pp. 5658-5665, 2012.

- 
- [24] Tatsuhiro Maekawa, Hokyun Chin, Takashi Nyu, Tun Naw Sut, Abdul Rahim Ferhan, Tomohiro Hayashi and Nam-Joon Cho, "Molecular diffusion and nano-mechanical properties of multi-phase supported lipid bilayers," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, pp. 16686-16693, 2019.
- [25] Laura Picas, Felix Rico, Simon Scheuring, "Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers," *Biophys*, vol. 102, no. 1, pp. L01-L03, 2012.
- [26] Andrea Alessandrini, Heiko M. Seeger, Tommaso Caramaschi, and Paolo Facci, "Dynamic Force Spectroscopy on Supported Lipid Bilayers: Effect of Temperature and Sample Preparation," *Biophysical Journal*, vol. 103, no. 1, pp. 38-47, 2012.
- [27] Christopher P Green, John E Sader, "Torsional frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope," *Journal of applied physics*, vol. 92, no. 10, pp. 6262-6274, 2002.
- [28] Christopher P. Green; Hadi Lioe; Jason P. Cleveland; Roger Proksch; Paul Mulvaney; John E. Sader, "Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers," *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, no. 6, p. 1988–1996, 2004.
- [29] 莊沂浩, “可於水溶液環境量測之光偏折式原子力顯微鏡之設計開發,”  
*國立臺灣大學機械工程學研究所碩士論文*, 2022.
- [30] Zhengjian Lv, Siddhartha Banerjee, Karen Zagorski, and Yuri L. Lyubchenko, "Supported Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy Studies," *Methods Mol Biol.*, vol. 1814, pp. 129-143, 2018.



## 附錄 A FMAuD 探針規格表

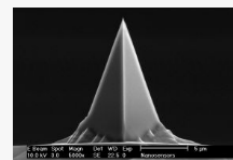
### PPP-FMAuD

#### Cantilever data:

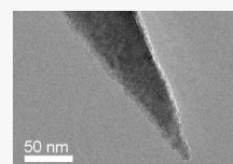
Property	Nominal Value	Specified Range
Resonance Frequency [kHz]	75	45 - 115
Force Constant [N/m]	2.8	0.5 - 9.5
Length [ $\mu\text{m}$ ]	225	215 - 235
Mean Width [ $\mu\text{m}$ ]	28	20 - 35
Thickness [ $\mu\text{m}$ ]	3	2 - 4

#### Order codes and shipping units:

Order Code	AFM probes per pack	Data sheet
PPP-FMAuD-10	10	of all probes



PointProbe® Plus AFM tip front view



PointProbe® Plus AFM tip closeup

#### Product description

### PointProbe® Plus Force Modulation Mode - Au coating (Detector side)

The PointProbe® Plus (PPP) combines high application versatility and compatibility with most commercial SPMs. The typical AFM tip radius of less than 7 nm and the minimized variation in AFM tip shape provide reproducible images and enhanced resolution.

NANOSENSORS™ PPP-FMAuD is offered for force modulation microscopy. The force constant of this AFM probe spans the gap between contact and non-contact mode and is specially tailored for the force modulation mode. Furthermore non-contact or tapping mode operation is possible with the FM tip but with reduced operation stability.

#### The AFM probe offers unique features:

- guaranteed AFM tip radius of curvature < 10 nm
- AFM tip height 10 - 15  $\mu\text{m}$
- highly doped silicon to dissipate static charge
- Au coating on detector side of AFM cantilever
- chemically inert

A metallic layer (Au) is coated on the detector side of the AFM cantilever which enhances the reflectivity of the laser beam by a factor of about 2.5. Furthermore it prevents light from interfering within the AFM cantilever. As the coating is nearly stress-free the bending of the AFM cantilever due to stress is less than 2 degrees.

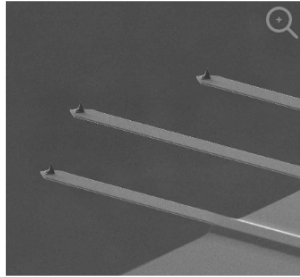
This AFM probe features alignment grooves on the back side of the holder chip. These grooves fit to the NANOSENSORS Alignment Chip.

# 附錄 B CSC38 探針規格表



HQ:CSC38/AI BS

20/10/14 kHz  
0.09/0.03/0.05 N/m



## AFM Probe with 3 Different Contact Mode AFM Cantilevers

AFM probes of the HQ:CSC38 series have three different soft contact mode AFM cantilevers on one side of the holder chip. They can be used in various applications.

The HQ AFM probes offer high consistency of the AFM tip radius, the AFM cantilever reflectivity and the quality factor.

The aluminum reflective coating enhances the laser reflectivity of the AFM cantilevers by approximately 2.5 times. For operation in liquids we recommend using the HQ.NSC36/Cr-Au BS with a reflective gold coating.

### Coating

Reflective Aluminum

## AFM Probe Specifications

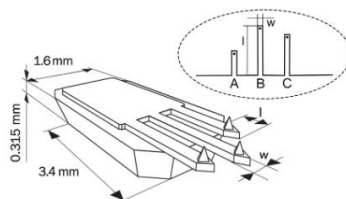
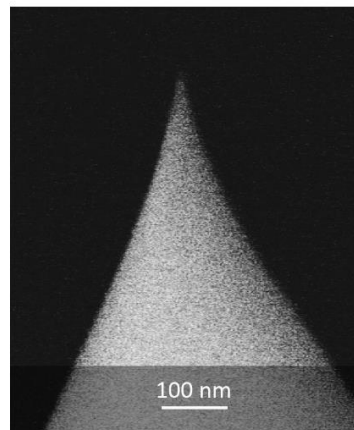
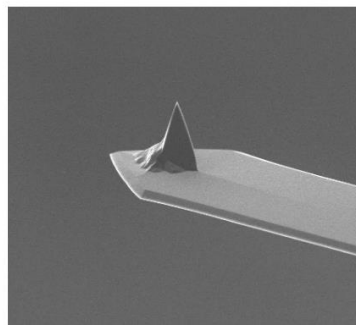
### AFM Tip

SHAPE	HEIGHT	FULL CONE ANGLE	RADIUS
Rotated	15 $\mu\text{m}$ (12 - 18 $\mu\text{m}$ )*	40°	< 8 nm

## AFM Cantilever

CANTILEVER	SHAPE	FORCE CONST.	RES. FREQ.	LENGTH	WIDTH	THICKNESS
Cantilever A	Beam	0.09 N/m (0.01 - 0.36 N/m)*	20 kHz (8 - 32 kHz)*	250 $\mu\text{m}$ (1 - 255 $\mu\text{m}$ )*	32.5 $\mu\text{m}$ (29.5 - 35.5 $\mu\text{m}$ )*	1 $\mu\text{m}$ (0.5 - 1.5 $\mu\text{m}$ )*
Cantilever B	Beam	0.03 N/m (0.003 - 0.13 N/m)*	10 kHz (5 - 17 kHz)*	350 $\mu\text{m}$ (1 - 355 $\mu\text{m}$ )*	32.5 $\mu\text{m}$ (29.5 - 35.5 $\mu\text{m}$ )*	1 $\mu\text{m}$ (0.5 - 1.5 $\mu\text{m}$ )*
Cantilever C	Beam	0.05 N/m (0.005 - 0.21 N/m)*	14 kHz (6 - 23 kHz)*	300 $\mu\text{m}$ (1 - 305 $\mu\text{m}$ )*	32.5 $\mu\text{m}$ (29.5 - 35.5 $\mu\text{m}$ )*	1 $\mu\text{m}$ (0.5 - 1.5 $\mu\text{m}$ )*


\* typical values






# 附錄 C PDQ80A 規格表





## Position-Sensing Detector



**PDQ80A**

**Description**


The PDQ80A detector is a segmented, position sensing, silicon, quadrant detector for precise path alignment of light in the 400 to 1050 nm range. The device is capable of measuring beams with a spot size smaller than 7.8 mm, which is the diameter of the quadrant photodiode array. However, to prevent beam walk-off, we recommend that the beam diameter be less than 3.9 mm. Also, since the detected signal strength decreases significantly when large portions of the spot cross the boundary between the quadrants, beam diameters greater than 1 mm are suggested. Therefore, we recommend this device to be used with beams with a diameter between 1 mm and 3.9 mm.

**Specifications**


Electrical Specifications	Value	Physical Specifications	Value
Wavelength Range	400 - 1050 nm	Sensor Size	Ø7.8 mm
Peak Responsivity	0.4 A/W @ 633 nm 0.64 A/W @ 900 nm	Clear Aperture	Ø1/2" (Ø12.7 mm)
Transimpedance Gain	10 kV/A	Aperture Thread	SM05 (Ø.535" - Ø0)
Max Photocurrent	200 µA	Dimensions	2.00" x 1.20" x 0.65" (50.8 x 30.5 x 16.5 mm)
Output Voltage Range	+2 V <sub>max</sub>	Mounting Thread	8-32 x 0.25" Min Depth
Signal Output Offset	100 mV <sub>max</sub>	Metric Adapter	M4 to 8-32 Adapter (Item # A5488E)
Bandwidth	150 kHz	Cable Length	5.0' (1.5 m)
Recommended Spot Size	Ø1.0 mm to Ø3.9 mm	Connector Plug	Hirose HST0A-7P-6P
Supply Voltage Requirement	+5 VDC to +15 VDC	Main Receptacle	Hirose HRT0A-7R-6S
Operating Temperature	10 to 40 °C	Weight	0.25 lbs. (114 g)
Storage Temperature	-20 to 80 °C		

**Instructions**

- Unpack the PDQ80A sensor. Install the adapter if metric mounting is preferred.
- Plug the connector into one port of a PDQ8051 hub.
- Follow the directions for operation of the hub as described in its operating manual.
- Place a spot onto the detection window for measurement. The input beam spot size should be between Ø0.2 mm and Ø7 mm. For best results the spot should be located within 80% (7.2 mm x 7.2 mm) of the center of the detector. Adjust the power level so that the sum output voltage is less than or equal to 4 V. This will ensure the best signal to noise ratio and that the system is not saturated.



September 17, 2021  
13183-S01, Rev E  
www.thorlabs.com/contact



**Application Note**

For best results low power levels should be used for the position sensor. For the PDQ80A the max photocurrent is 2 V / 10 kV/A = 200 µA. Using the photosensitivity curve below, the system saturation power can be calculated as:

$$P_{max} = \frac{200 \mu A}{\text{Photosensitivity (A/W)}}$$

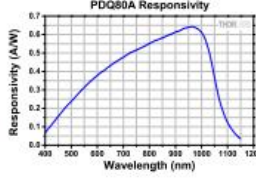
The PDQ8051 hub has a sample resolution of 12 bits with an input voltage range of ±5 V (10 V range), or a voltage resolution of:

$$V_{step} = \frac{10 V}{2^{12}} = 2.44 mV$$

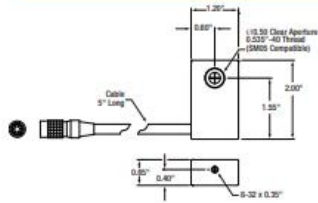
$$I_{step} = \frac{V_{step}}{10 kV/A} = 244 nA$$

From this the minimum power required can be determined based on the required accuracy. For example if the user requires an accuracy of 1% then the reading must be accurate to 1 part in 100. The minimum photocurrent is therefore the I<sub>step</sub> x 100, or 24.4 µA. Use the Formula below to find the minimum optical power for a given wavelength.



$$P_{min} = \frac{24.4 \mu A}{\text{Photosensitivity (A/W)}}$$



**Drawings**



Pin Assignments	
Pin 1	X-Axis (Q2 + Q3) - (Q1 + Q4)
Pin 2	Y-Axis (Q1 + Q2) - (Q3 + Q4)
Pin 3	SUM (Q1 + Q2 + Q3 + Q4)
Pin 4	+V (+5 to +15V)
Pin 5	Common
PIN 6	-V (-5 to -15V)

September 17, 2021  
13183-S01, Rev E  
www.thorlabs.com/contact