

# 應用於生物晶片上之微光學系統

## Micro-Optical System for Lab-on-a-Chip

周虹宇、楊宗勳

Hong-Yuh Chou, Tsung-Hsun Yang

近來由於生物技術發展上的突飛猛進，再加上整合工程領域上的微小化等技術，使得實驗室型生物晶片 (lab on a chip) 的研發成為新世紀跨領域技術整合的重要課題之一。針對生物晶片上的訊號偵測部分，本文介紹結合微光學系統技術利用於生物晶片上時，對於基礎的光源模型之建立與探討，以供微光學元件的設計與系統組合。

Moving toward the new era, based on the great progress in biotechnology and the miniaturization techniques in engineering, the development on the technology of lab on a chip becomes one of the most important subjects for the multi-discipline integration. In this text, it is to introduce the application of the micro-optic system techniques for the function of the signal detection on the chip. Especially, it will focus on the basic light source modeling.

### 一、前言

近年來，由於生物技術突飛猛進的發展、再加上微機電系統技術與封裝技術持續的發展並漸趨成熟，因此跨領域整合式實驗室型生物晶片 (lab on a chip) 的研究也隨之興起，並且已成為新世紀以來最為熱門的研究課題之一。基本上，實驗室型生物晶片的發展概念，乃在於將原本在試管中進行的許多生化反應，能夠具體地被縮小至一個微小的晶片上進行其完整功能，並儘量予以自動化。如此一來，除了能大大地減少測試物品的所需劑量，可大幅地節省實驗測試成本之外，更能加速所需的反應速度，並因而縮短檢測反應的時間。目前常見的微陣列晶片 (microarray)<sup>(1)</sup>、毛細管電泳晶片 (capillary electrophoresis chip, CE chip)<sup>(2-7)</sup> 以及聚合酶連鎖反

應晶片 (polymerase chain reaction chip, PCR chip)<sup>(7-15)</sup> 是其中幾項成品的實現。至於實驗室型生物晶片技術在生物醫學方面的應用領域，主要包括基因表現分析、疾病診斷、藥物篩選、基因定序、蛋白質分析等相關應用。

而除了讓生化反應在晶片上能夠進行正常的功能之外，另外還需要一套能夠讀取生化反應過程或是反應進行後之結果的訊號偵測系統，目前的生物晶片多半需要由特定的檢測系統加以讀取，此類檢測系統相對於晶片本身，大部分都是體積龐大而價格昂貴，並無法達到真正掌上型可攜式生醫檢測系統晶片的目標。因此如何將檢測系統微小化並整合在生醫晶片上，是進一步值得研究的方向，如此一來才有機會達到真正的可攜帶式生醫晶片。

目前的生物檢測系統所運用的原理<sup>(16)</sup> 包括有

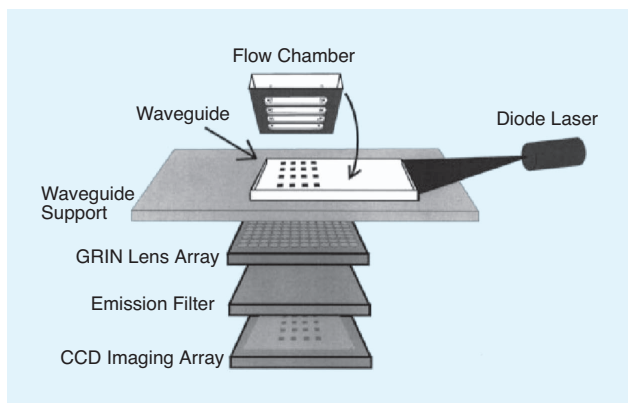


圖 1. 檢測系統架構示意圖<sup>(18)</sup>。

光學光譜的偵測，其中又可細分為螢光檢測法、反射率量測法與吸收率檢測法等；另外還有電化學式的偵測方式，其中又可再細分為電流檢測、導電率檢測以及電位檢測等；此外，還有質譜分析法等其他方式。在本文中主要是討論運用最為廣泛的螢光檢測法，其運作的機制乃是利用配合所使用螢光分子的特定波長之雷射激發光，用以激發具標定作用的螢光分子，藉由一光學系統偵測收集被激發出來的螢光能量，從而進一步分析得知待測樣品的成份。

基於實驗室型生物晶片的種種優點，再加上可輕易地重複複製以作為大量不同測試物的平行處理檢測，近來也開始出現許多文獻報告，發表有關螢光檢測系統微小化、平行處理的設計與研究<sup>(17-19)</sup>。整個檢測系統架構如圖 1 所示，透過微流通道的導通，將各種試劑引至所設計的位置 (flow chamber) 進行反應。利用波導的結構將半導體雷射 (diode laser) 的雷射光導引到反應區，同時以內全反射式 (total internal reflection) 所附帶產生的漸逝波 (evanescent wave) 作為標定螢光的激發。之後，利用微透鏡陣列 (grin lens array) 將激發出來的螢光收集起來，再經過一前置濾光片 (emission filter) 以去除原激發光的背景雜訊干擾，最後由 CCD 影像偵測器 (CCD image array) 擷取各位置上的螢光光量，以供後續的數據分析。

儘管作到如此已經是非常大的突破，但是在微流通道 (microchannel) 中的待測物和螢光標定分子相互接合後，也透過漸逝波 (evanescent wave)

的方式激發出螢光，能夠更進一步獲得完整收光的螢光光譜，這可以經由插入一微光柵的作用，使得不同形式的螢光能量會依照不同的波長分布而被分配到不同的空間位置，從而得以記錄整個發光光譜。有了整個螢光光譜的動態變化，即得以監控整個生化反應的過程與其反應速率的快慢，而且也更可以在應用上同時加入一種以上的螢光標定分子，增加不同的測試反應數量。如此新的架構，除了將能夠獲得更多有關待測物的資訊以外，同時藉由光譜的變化與分析，將可以更精確地得到螢光的能量大小而得到量化的結果，也因此更能夠對待測物的反應過程做即時的監控。因此基於以上的概念實現，對於傳統大型的光學系統設計自然已經不是問題，而對於必須整合進微型晶片內的微光學系統而言，所需的各式微光學元件目前相關技術也已發展成熟，如微透鏡、微光柵等<sup>(20-21)</sup>。只是在新的系統架構下，必須回頭將所激發出來的螢光發光情形作一清楚的瞭解，建立完整的螢光發光模型，才能有更精確的微光學系統設計。

在建立螢光發光模型的過程中，將考慮到所使用的激發雷射光源型式、所激發出的螢光分布情形，以及此螢光訊號在射出微流通道之前，還會受到整體待測物溶液中粒子的影響，例如其他未被激發的螢光分子、生物探針、待測分子等等，而造成不同的散射 (scattering) 效應，從而改變了螢光發光的空間分布。本文以下將針對上述的概念，將實驗室型生物晶片中的螢光光源模型建立做一介紹。

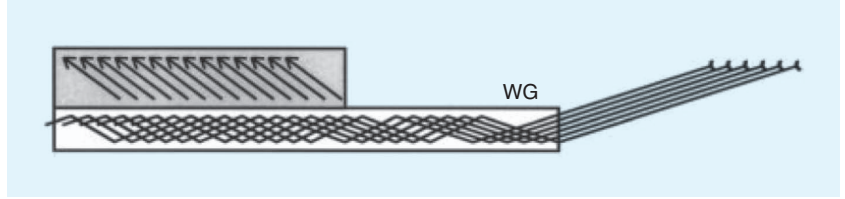
## 二、漸逝波的模擬<sup>(22)</sup>

首先，考慮到螢光激發光源是在光波導內，經由全內反射 (total internal reflection) 的方式引入，而當一道光束從高折射率介質向低折射率介質入射時，同時在入射角大於臨界角的條件下，就會有全內反射的情況出現，此時激發光能量幾乎完全被反射回高折射率介質內，但在低折射率介質內仍然有漸逝波的產生，在此藉以用來激發螢光分子 (如圖 2 所示)。根據 Snell's law，其臨界角為

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_t}{n_i}\right) \quad (1)$$

圖 2.

全內反射式光波導 (WG) 架構，激發光在微流通道與光波導的邊界上，以漸逝波的形式進入微流通道內。<sup>(18)</sup>



上列公式中， $n_i$  和  $n_t$  分別是折射介質和入射介質的折射率。就幾何光學而言，發生全反射時光無法傳遞到透射介質  $n_t$  中；然而就電磁波理論的角度來看，在全反射的介面上仍有光能量可以穿透過一小段距離，但其能量大小隨著穿透深度的增加而快速地呈指數式衰減，這個穿透的光能量傳遞即為漸逝波 (evanescent wave)。

### 1. 平面波

首先我們先考慮理想的平面波 (plane wave) 激發光所造成的漸逝波，一般平面波可以分成 *S-polarization* 和 *P-polarization* 二種偏振態，從描述光束經過兩種不同介質之穿透的 Fresnel 方程式 (公式 2 與 3) 中，我們可分別得到 *S-polarization* (公式 4) 和 *P-polarization* (公式 5) 所造成的漸逝波電場分布 (公式 4 與 5) 和強度分布 (公式 6 與 7) 的關係式如下：

$$t_s = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (2)$$

$$t_p = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (3)$$

$$\mathbf{E}_{ts} = \frac{2E_{0i} \cos \theta_i}{(1-n^2)^{1/2}} e^{i\delta_s} e^{i(k_x x \sin \theta_i)} e^{-z/d} \mathbf{y} \quad (4)$$

$$\mathbf{E}_{tp} = 2E_{0i} \cos \theta_i (n^4 \cos^2 \theta_i + \sin^2 \theta_i - n^2)^{-1/2} \times [(\sin^2 \theta_i - n^2)^{1/2} \mathbf{x} - z \sin \theta_i] e^{i\delta_p} e^{i(k_x x \sin \theta_i)} e^{-z/d} \quad (5)$$

$$I_s = I_{0i} \frac{4 \cos^2 \theta_i}{(1-n^2)} e^{-2z/d} \quad (6)$$

$$I_p = I_{0i} \frac{4 \cos^2 \theta_i (2 \sin^2 \theta_i - n^2)}{n^4 \cos^2 \theta_i + \sin^2 \theta_i - n^2} e^{-2z/d} \quad (7)$$

其中

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} (n_i^2 \sin^2 \theta_i - n_t^2)^{-1/2} \quad (8)$$

在上述的公式中， $E_{0i}$  與  $I_{0i}$  分別為入射光之電場強度與光強度， $\theta_i$  和  $\theta_t$  則分別代表入射角和折射角， $\lambda$  是入射光波長， $z$  為縱軸穿透距離， $d$  為特徵深度。由公式 8 可知，當超過臨界角的入射角越大時，特徵深度  $d$  越小，也就是說漸逝波會隨著入射角的變大而衰減越快；同時隨著入射光波長的不同， $d$  也會隨之改變。

一般微光學系統以及生物晶片常用的基板材質之一為玻璃 ( $n_i = 1.52$ )，而待測物樣品通常以水溶液的形式呈現 ( $n_t = 1.33$ )，由此兩種折射率所構成的臨界角約為  $61.04^\circ$ ，因此當入射光分別為理想的 *S-polarization* 或是 *P-polarization* 的平面波時，藉由圖 4 所示，可以知道 *P-polarization* 的穿透深度比 *S-polarization* 還要來得深，而且其強度隨穿透距離  $z$  的增加而呈指數式遞減。其中橫軸代表強度，縱軸代表穿透深度，並假定入射角為  $62^\circ$ 。

### 2. 高斯光束

考慮常見的的螢光激發光源為雷射光源，而雷射光一般多屬於高斯光束。因此其所造成的漸逝波電場和強度，在微流通道中的詳細空間分布情形，也必然與平面波的情形不盡相同。整個架構的示意圖可以參考圖 3，首先利用 Fourier 積分形來表示

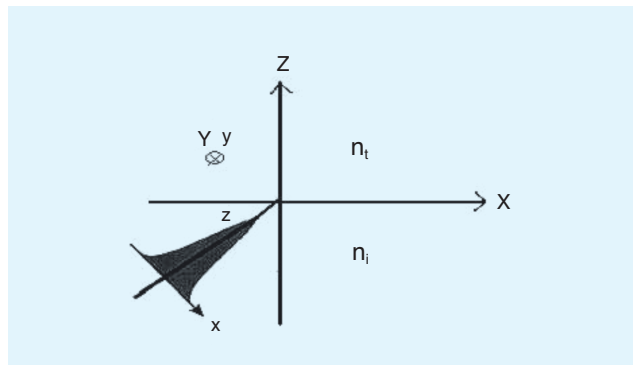


圖 3. 全反射之漸逝波分析所採用的座標系統。

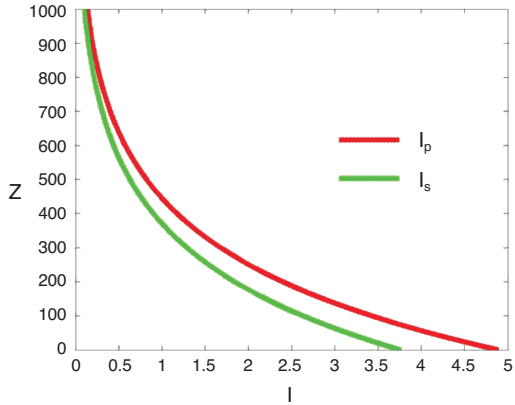


圖 4. 平面波在入射角  $62^\circ$  時，其所產生的漸逝波強度  $I$  和穿透深度  $Z$  的關係。 $I_p$  代表  $P$ -polarization 的情形， $I_s$  則代表  $S$ -polarization 的情形。

垂直入射的高斯光束 (Gaussian beam)<sup>(23)</sup>：

$$E_{\text{int}}(x, y, z) = \iint A_i(u, v) \exp[i(ux + vy + w_1 z)] dudv \quad (9)$$

$$w_1 = \left[ \left( n_i \frac{w}{c} \right)^2 - u^2 - v^2 \right]^{1/2} \quad (10)$$

上式表示有許多不同振幅  $A_i(u, v)$  的平面波相互疊加，其中  $(u, v, w_1)$  為在介質  $n_i$  的波向量 (wave vector)。為了定義此高斯光束的偏極態，還需把振幅  $A_i(u, v)$  分為  $x$  方向和  $y$  方向，分別代表著  $P$ -polarization 和  $S$ -polarization 的情況：

$$\begin{cases} A_{ix}(u, v) = \alpha_x A_0(u, v) \\ A_{iy}(u, v) = \alpha_y A_0(u, v) \end{cases} \quad (11)$$

其中定義  $\alpha = (\alpha_x, \alpha_y)$ ，若表示成  $P$ -polarization 時，則  $\alpha = (1, 0)$ ，若表示成  $S$ -polarization 時，則  $\alpha = (0, 1)$ ；其振幅  $A_0(u, v)$  滿足高斯表示形式：

$$A_0(u, v) = \pi a^2 A_0 \exp\left[ \frac{-a^2(u^2 + v^2)}{4} \right] \quad (12)$$

在此  $a$  即代表高斯光束的腰寬。

現進一步考慮斜向入射的高斯光束狀況，可藉由簡單的座標轉換，將  $(x, y, z)$  座標系統轉成  $(X, Y, Z)$  座標系統，並把全反射的條件帶入，最後即得到如公式 13 的透射電場大小：

$$E_i(x, y, z) = \iint T(U, V) A_i(U, V) \exp[i(UX + VY + W_2 Z)] dU dV \quad (13)$$

$$W_2 = \left[ \left( n_t \frac{w}{c} \right)^2 - U^2 - V^2 \right]^{1/2} \quad (14)$$

其中  $T(U, V)$  為穿透係數<sup>(23)</sup>， $W_2$  則是在介質  $n_t$  中  $z$  方向的波向量，再由公式 13 的電場分布取其絕對值的平方，可以得到漸逝波強度隨空間變化的分布。

同樣地，考慮常見的狀況，其介質分別為玻璃 ( $n_i = 1.52$ ) 和水溶液 ( $n_t = 1.33$ )，同時入射角為  $62^\circ$ ，並假定高斯光束的光束大小為 1 mm，其波長為 632.8 nm。由公式 13 可以計算得到，在此條件狀況下的漸逝波在水溶液中的穿透強度分布情形，如圖 5 所示。

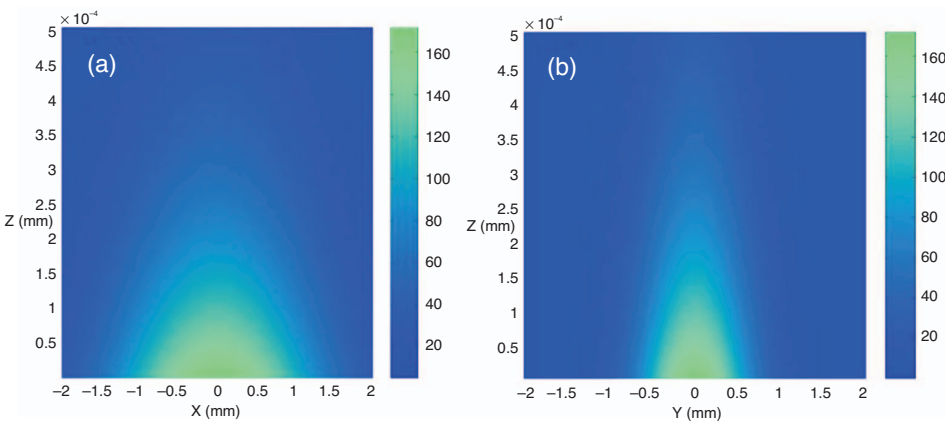


圖 5. (a) 漸逝波在  $X$ - $Z$  的空間強度分布，(b) 漸逝波在  $Y$ - $Z$  的空間強度分布。

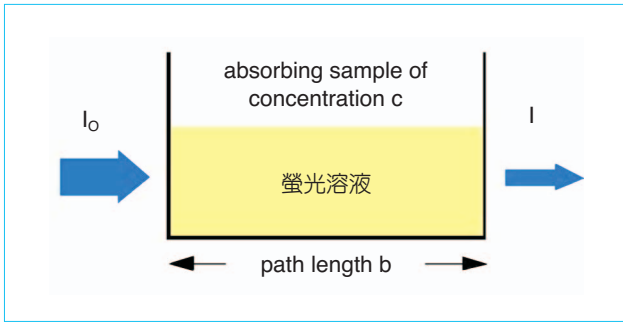


圖 6. 入射光激發螢光。溶液的濃度、激發光強度、螢光分子的吸收係數以及螢光分子的激發量子效率等因素，均會影響螢光的激發結果。

有了漸逝波的光場分布狀況之後，接下來則要進一步了解在微流道中，螢光分子受到漸逝波激發初始發光的能量分布情形。

### 三、漸逝波激發螢光的機制

一般而言，雖然螢光分子是否能夠被激發僅由激發光波長所決定，而控制螢光訊號的強弱卻有許多因素，包含整個溶液的濃度、激發光強度、螢光分子的吸收係數 (absorbed coefficient) 以及螢光分子的激發量子效率 (quantum efficiency) 等等。參考圖 6 的示意圖，因此激發出來的螢光強度 ( $F$ ) 可以被描述成：

$$F = \phi(I_0 - I) \quad (15)$$

其中  $I_0$  為入射光強度， $\phi$  為量子效率。經由 Beer-Lambert law 的推導，可把公式 15 表示成下式：

$$F = \phi I_0 (1 - e^{-\epsilon bc}) \quad (16)$$

上式的  $\epsilon$  為吸收係數或稱為消散係數 (extinction coefficient)， $c$  為螢光分子的濃度， $b$  則為入射光路徑長<sup>(24)</sup>。吸收係數和量子效率均是螢光分子的本質特性，由公式 16 可知，當溶液的濃度越高或入射光路徑越長，則螢光分子受到激發的機會就越大，其螢光發光的強度也就越強。

不同的螢光分子，具有不同的激發波長 (excited wavelength) 和螢光輻射波長 (emission wavelength)，螢光分子藉由吸收特定波長的激發光能量，使得螢光分子中的電子躍遷到較高能量的激發態 (excited state) 上，當再自然消逝地回到基態 (ground state) 時，此時能量即以螢光的形式輻射出來。因此螢光輻射的波段會比原激發光的波長還要來的長，而這兩個波段在光譜圖上表現出一個位移量，稱為 Stokes shift 位移量。

若是採用 Molecular Probe 公司所生產的 Alexa Fluor<sup>®</sup> 633 螢光分子為例，其吸收係數  $\epsilon$  為 100000，量子效率  $\phi$  為 0.55，而且假使螢光分子的濃度  $c$  為  $1 \mu\text{M}$ ，入射光路徑長  $b$  取較長的距離 5 mm。因此可得到螢光受激初始發光的空間強度分布，如圖 7 所示。

### 四、螢光在待測物中的散射效應

接著則是考慮由螢光分子所初發出的螢光，在微流通道的水溶液中所造成的散射效應，使得建立的螢光光源更能趨近於實際狀況，進一步更可在後續架設一系列的光學元件。以下將利用前述所得到

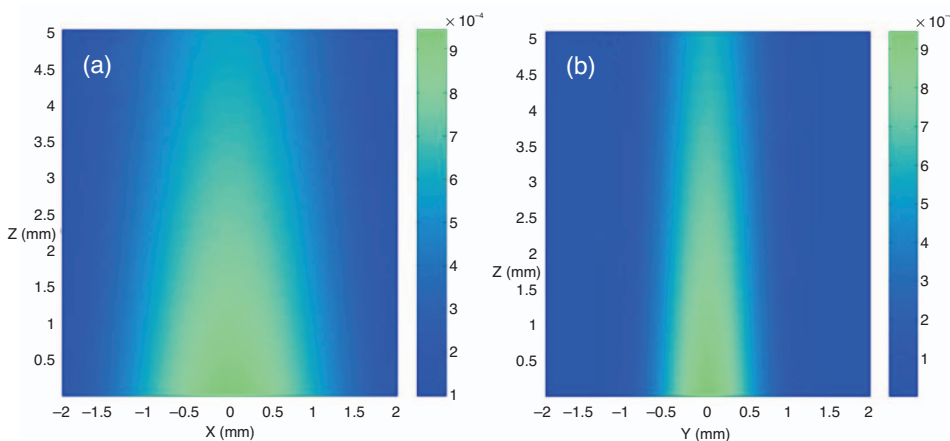


圖 7. 螢光受激初始發光的空間強度分布，(a) X-Z 平面上，(b) Y-Z 平面上。

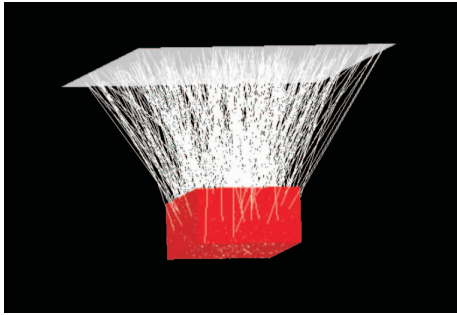


圖 8. 螢光散射模型，其中紅色立方體中的介質包含待測溶液 (折射率 = 1.33)、和對螢光造成散射的 DNA 分子 (折射率為 1.75)，周圍黑色的部分則是石英 (折射率為 1.4565)，藉由灰色的偵測面可得知其螢光能量分布。

的螢光初始發光的空間強度分布，並載入光學模擬軟體 ASAP 中當成新式的光源模型，進行散射過程的模擬。

當待測溶液中受激發的螢光分子發出螢光時，其螢光會再受到水溶液中各式分子的影響而有散射 (scattering) 的現象，進而影響到最後從微流道發出的螢光光場分布。粒子會造成光散射的因素包括粒

子本身的折射率、粒徑的大小、粒子的形狀和粒子在溶液中的濃度等。隨著上述條件的改變，其所造成的散射效應也有所不同，依照 Mie theory<sup>(25)</sup> 所描述不同粒徑圓球粒子 (spherical particle) 造成之散射現象，來描述螢光在水溶液中受到散射的情形。由於實驗型生物晶片目前仍多以 DNA 的相關實驗為主，所以假設考慮 DNA 分子是造成散射的主要來源之一。一般 20 bp 的 DNA 長度大小約為 6.8 nm<sup>(26)</sup>，而 DNA 的折射率約為 1.75<sup>(27)</sup>，DNA 濃度設定為 1  $\mu\text{M}$ ，而微流道的基板材質一如前往，仍為石英 (quartz)。

以上述的條件即可建立出如圖 8 的模型，圖中紅色的立方體代表微流道中的水溶液部分，立方體中的介質包含待測溶液 (折射率為 1.33) 和對螢光造成散射的 DNA 分子 (折射率為 1.75)，周圍黑色的部分則是石英 (折射率為 1.4565)，同時加入考量石英的反射率為 8.2%，透射率為 91.2%，但暫不考慮其吸收的情況。

假設固定的原始螢光發光通量 (flux)，而經由 DNA 分子散射後出微流道的螢光能量分布，如圖 9 至 11 所示，從而得到螢光的發光模型。

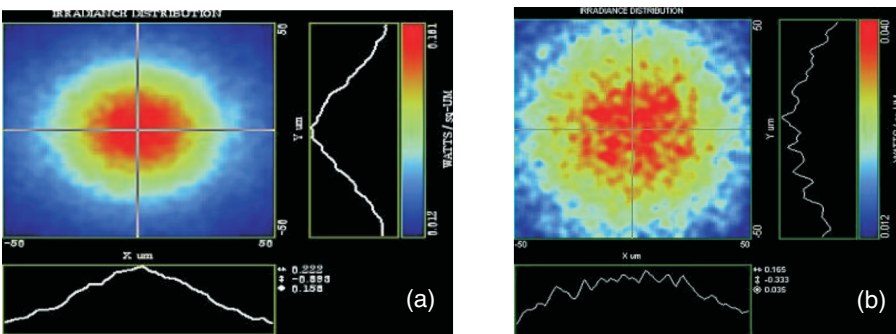


圖 9. 螢光經過散射後的能量分布，(a) 離微流道 35 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 遠處的觀測結果，(b) 離微流道 85 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 遠處的觀測結果。

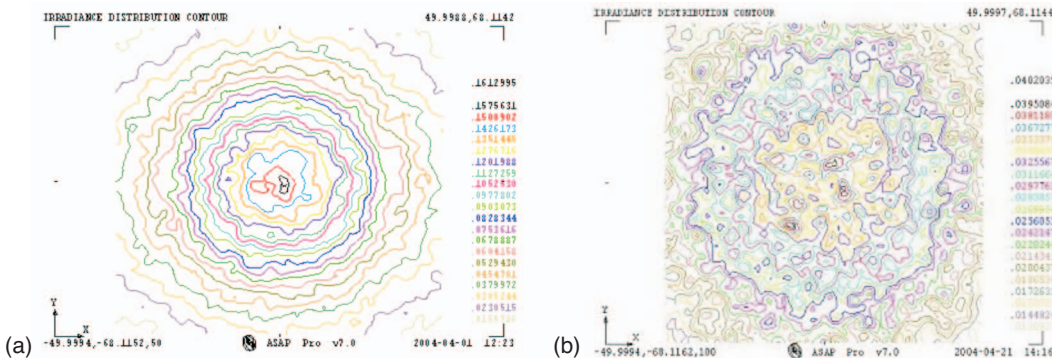


圖 10. 螢光經過散射後的能量分布等高線圖。(a) 離微流道 35  $\mu\text{m}$  遠處的觀測結果，(b) 離微流道 85  $\mu\text{m}$  遠處的觀測結果。

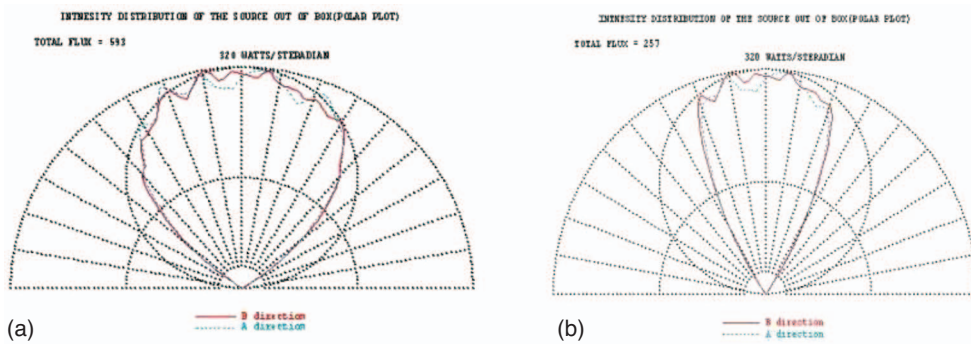


圖 11. 原始螢光被散射後在整個空間的強度分布。(a) 離微流道 35  $\mu\text{m}$  遠處的觀測結果，(b) 離微流道 85  $\mu\text{m}$  遠處的觀測結果。

在圖 11 中，紅色曲線和藍色曲線分別代表著整個觀測半球空間中，經線和緯線方向的光強度分布，並且徑向代表著光強度的大小。同時可和圖中 Lambertian 光源 (圓形虛線) 的情形比較可知，事實上螢光的發光分布較集中在正中央的方向，距離越遠處越偏離點光源的狀況。

## 五、結語

本文針對光學檢測系統微小化的模型之建立作逐步的討論，由系統底層漸逝波到螢光溶液被漸逝波激發產生螢光的模擬，再考慮螢光在待測溶液中的散射行為，並分析討論其螢光射出微流道之後的情況。藉由上述的模型建立，後續即可根據所得光源模型出發，重新進行微光學元件與微光學系統的設計與製作。因為有了較為精準的光源模型，所以微光學系統的功能也得以廣泛的發展，更可能實現出監控整個生化反應的過程與其反應速率快慢的微型光學偵測功能系統，而且也更可以在應用上同時加入一種以上的螢光標定分子，增加不同的測試反應數量，進而能夠實現多功能而可攜式生物晶片的目標。

## 誌謝

筆者感謝國科會工程處的研究經費贊助 (專題研究計畫編號：NSC 92-2218-E-008-009)，並感謝國立中央大學光電科學研究所張正陽教授所提供的協助，以及國立中央大學光電中心微光電實驗室的支援。

## 參考文獻

1. M. Schena, *DNA Microarrays: A Practical Approach*, Oxford University Press (1999).
2. D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, and H. M. Widmer, *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).
3. D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, and A. Manz, *Science*, **261**, 895 (1993).
4. K. Seiler, D. J. Harrison, and A. Manz, *Anal. Chem.*, **65**, 1481 (1993).
5. C. S. Effenhauser, A. Manz, and H. M. Widmer, *Anal. Chem.*, **65**, 2637 (1993).
6. S. C. Jacobson, A. W. Moore, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **67**, 2059 (1995).
7. M. U. Kopp, A. J. de Mello, and A. Manz, *Science*, **280**, 1046 (1998).
8. K. F. Jensen, I.-M. Hsing, R. Srinivasan, and M. A. Schmidt, in *Proceedings of the First International Conference on Microreaction Technology*, Frankfurt am Main, Germany, February (1997), ed. W. Ehrfeld, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2 (1998).
9. K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263 (1986).
10. M. A. Northrup, M. T. Ching, R. White, and R. T. Watson, *Technical Digest of Transducers'93: 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators*, Yokohama, Japan, 924 (1993).
11. P. Wilding, M. A. Shoffner, and L. J. Kricka, *Clin. Chem.*, **40**, 1815 (1994).
12. R. P. Oda, M. A. Strausbauch, A. F. R. Huhmer, N. Borson, S. R. Jurrens, J. Craighead, P. J. Wettstein, B. Eckloff, B. Kline, and J. P. Landers, *Anal. Chem.*, **4361** (1998)
13. E. T. Lagally, P. C. Simpson, and R. A. Mathies, *Sens. Actuators B*, **63**, 138 (2000).
14. J. Khandurina, E. McKnight, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **72**, 2995 (2000).
15. R. Srinivasan, I. M. Hsing, P. E. Berger, K. F. Jensen, S. L. Firebaugh, M. A. Schmidt, M. P. Harold, J. J. Lerou, and J. F. Ryley, *Am. Inst. Chem. Eng. J.*, **43**, 3059 (1997).

16. M. A. Schwarz and P. C. Hauser, *Lab on a Chip*, **1**, 1 (2001).
  17. R. M. Wadkins, J. P. Golden, L. M. Pritsiolas, and F. S. Ligler, *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (3-4), 407 (1998).
  18. M. J. Feldstein, J. P. Golden, C. A. Rowe, B. D. MacCraith, and F. S. Ligler, *Journal of Biomedical Microdevices*, **1:2**, 139 (1999).
  19. C. A. Rowe-Taitt, J. P. Golden, M. J. Feldstein, J. J. Cras, K. E. Hoffman, and F. S. Ligler, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 785 (2000).
  20. H. P. Herzig, *Micro-optics: Elements, Systems and Applications*, London: Taylor & Francis (1997).
  21. S. Sinzinger and J. Jahns, *Microoptics*, Singapore: Wiley-VCH (1999).
  22. H.-Y. Chou, T.-H. Yang, and J.-Y. Chang, *Proceedings of OPT 2003*, II, FH2-2, 555 (2003).
  23. F. I. Baida, D. V. Labeke, and J.-M. Vigoureux, *J. Opt. Soc. Am. A*, **17** (5), 858 (2000).
  24. G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, 2nd edition, Marcel Dekker (1990).
  25. E. Hecht, *Optics*, Addison Wesley, four edition (2002).
  26. C. K. Mathews, K. E. van Holde, and K. G. Ahern, *Biochemistry*, third edition, 94 (1999).
  27. B. P. Maliwal, J. Kusba, and J. R. Lakowicz, *Biopolymers*, **35**, 245 (1995).
- 
- 周虹宇先生為國立中央大學光電科學研究所碩士班學生。
  - 楊宗勳先生為國立交通大學光電工程研究所博士，現任國立中央大學光電科學研究所助理教授。
  - Hong-Yuh Chou is a graduate student of Institute of Optical Sciences, national Central University.
  - Tsung-Hsun Yang received his Ph.D. in Electro-Optical Engineering from National Chiao Tung University. He is currently an assistant professor in the Institute of Optical Sciences, National Central University.