

奈米金屬結構的表面電漿子在螢光分子與奈米粒子之檢測應用

Detections of Fluorescent Molecules and Nanoparticles by Using Surface Plasmons in Metallic Nanostructures

張偉國、曾繁根、魏培坤

Wei-Kuo Chang, Fan-Gang Tseng, Pei-Kuen Wei

奈米金屬結構產生的局域表面電漿共振，可以達成高敏感度的生物檢測，在生醫光電領域有很高的應用潛能。本文介紹利用銀奈米結構所產生的局域增益光場應用於螢光分子之檢測，不同幾何結構所造成的螢光增益效應不同，我們發現奈米圓柱在相同的條件下，對螢光亮度提升有最佳效果。另外，使用銀奈米孔洞所產生之局域表面電漿場，可以捕捉液體內隨機分布之奈米金顆粒，進一步配合理論模擬，驗證奈米顆粒進入奈米孔洞時產生之暗場光學變化。

Localized surface plasmons in metallic structures can sensitively detect biomolecules and have very high potentials in the biomedical applications. In this text, we introduce our research of using silver nanostructures to enhance the detection of fluorescent molecules. Different shapes of nano structures were studied by the dark-field optical microscopy. Comparing with the triangular and rectangular structures, the rod-like structure has the best efficiency in the fluorescence enhancement. In addition, the localized plasmons generate optical traps that can increase the immobilization of nano-objects. Using theoretical simulations and the optical microscopy, we verified the trapping effect of gold nanoparticles in the metallic nanoholes.

一、簡介

要準確地瞭解生物分子的功能，需要能知道與此生命組成分子相同大小下的生化反應，這種關於單一分子的研究，可以顯示許多在巨觀條件下因整體 (ensemble) 與時間平均 (time-average) 效應被隱藏的分子反應行為^(1,2)。但是單分子研究需要非常小的量測體積與非常靈敏的光學偵測系統才足以紀

錄微弱的螢光分子訊號^(3,4)。目前主要的研究工具是利用複雜光學顯微技術，如共軛焦顯微術與近場光學顯微術來侷限量測體積。

近來另有一種方法^(5,6)，利用金屬奈米結構產生之侷限光學近場 (localized optical near-field)，將量測空間侷限在此金屬結構附近，此結構製作成陣列形式如圖 1 所示，這樣的架構除了可以縮小量測空間至光學繞射限制以下，而且利用靈敏的 CCD

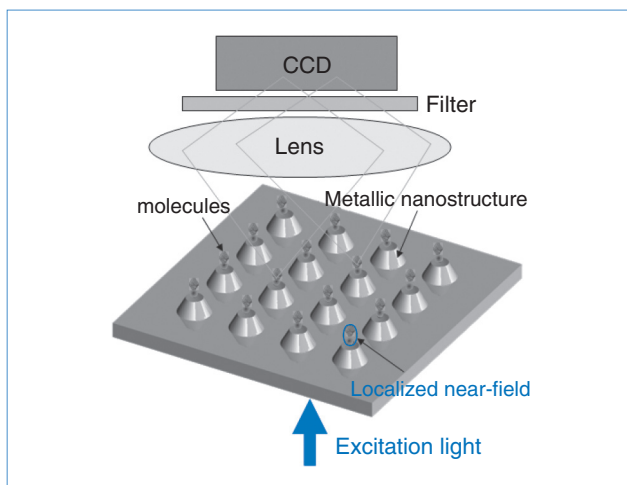


圖 1. 金屬奈米結構陣列用在單分子螢光偵測之示意圖。

檢測，可以達到高通量、同時多點的量測功能。本文中探討此奈米金屬結構中因表面電漿子 (surface plasmon) 作用產生的螢光增強 (fluorescence enhancement) 與光捕捉 (optical trapping) 效果。螢光增強可以增加微弱的螢光分子訊號，而光捕捉效應可以將單顆粒束縛在奈米金屬結構中，兩者皆可進一步輔助單分子之偵測。

表面電漿子⁽⁷⁾是一種於金屬表面上與入射光頻率一致的集合震盪電子，其表面電子的共振模態、強度與金屬材料、金屬幾何結構及外圍環境有關。利用金薄膜的表面電子共振已被廣泛地使用在不需標定的抗體抗原等反應的檢測上。然而利用奈米金屬結構，可以不需使用光柵或三稜鏡等耦合方法，其表面電漿子可直接被激發出來⁽⁸⁾。而且此表面電

漿子會侷限在奈米金屬結構中，造成光學近場的增強效果。銀具有最佳的表面電漿子效果，我們於此實驗中使用不同的銀奈米結構，利用暗場光學技術，研究此增強近場對發光分子的螢光增強能力。另外，在光捕捉效應上，我們研究此銀奈米結構對於奈米金顆粒的捕捉效果。

二、奈米金屬結構之製作

利用電子束微影術製作不同的奈米結構，在製作上，利用電子束先將奈米圖案定義在 PMMA 阻劑上，再利用反應式離子蝕刻術將圖案轉移至金屬薄膜上，圖 2 是凹型奈米金屬結構的製作流程圖，分為六項步驟：基板清洗、基板蒸鍍、阻劑塗佈、定義圖案、圖案轉移與阻劑去除。

首先將玻璃基板放入硫酸雙氧水混合液燒杯中，再利用超音波震洗機震洗，震洗完畢，取出基板，並以去離子水清洗。接著使用丙酮及乙醇震洗基板各二十分鐘，最後將基板置於加熱板，以去除基板表面水氣。完成清洗後，接著將基板放入電子槍蒸鍍機腔體內抽真空，當真空度小於 2×10^{-6} Torr，開始進行蒸鍍，鍍上厚度 100 nm 的銀膜於鈦上，鍍率控制在 $8-10 \text{ \AA/s}$ 左右。接著利用塗佈機將 PMMA 正阻劑均勻塗佈於基板上。在阻劑上，使用適當光圈大小、電子束劑量與間距等參數控制圖案的寬度。書寫完畢，將基板泡入體積比 3:1 的異丙醇與 MIBK 混合液中約兩分鐘，進行顯影程序，接著浸泡入異丙醇一分鐘，再以氮氣槍吹乾，並完成定義圖案的步驟。完成圖案書寫步驟

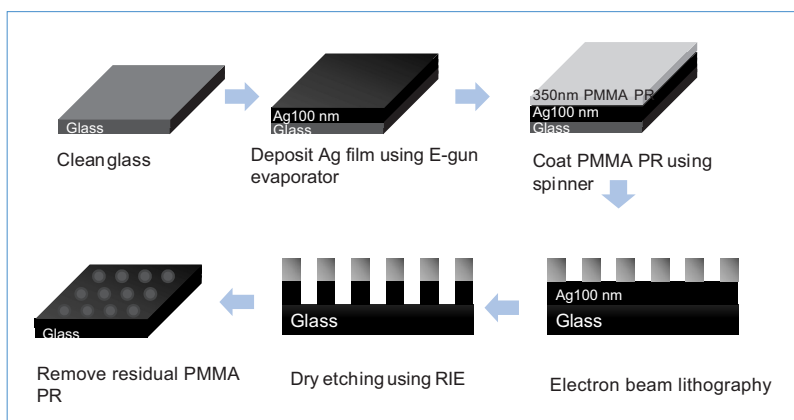


圖 2. 奈米金屬結構製作流程圖。

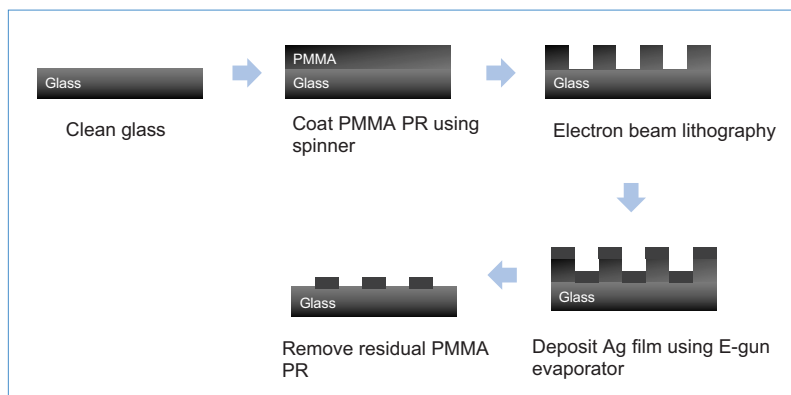


圖 3. 奈米金屬凸型結構的製作流程圖。

後，接著將基板放入反應式離子蝕刻機腔體內抽真空，將氬氣導入腔體，以產生離子化氣體，再利用此離子化氣體對金膜產生物理性濺擊，將定義在阻劑上的圖案轉移到銀膜上，在 RIE 蝕刻步驟完成後，將基板泡入丙酮中震洗數小時，以去除基板表面的殘餘阻劑。為了確認金屬表面的潔淨度，進一步使用臭氧濺擊金屬表面，接著將基板放入去離子水中震洗 20 分鐘，最後再利用氮氣槍吹乾。

在奈米凸型結構製作上，利用電子束微影術先將奈米圖案定義在 PMMA 阻劑上，再利用舉離的方式將圖案轉移至玻璃基板上，圖 3 是奈米金屬結構的製作流程圖，分為五項步驟：基板清洗、阻劑塗佈、定義圖案、基板蒸鍍與阻劑去除。

首先在清洗玻璃完成後，利用塗佈機將 950 PMMA A4 正阻劑 (MicroChem Corp.) 以兩階段轉速 500 rev/s 與 1500 rev/s (時間為 5 秒與 45 秒) 將阻劑均勻塗佈於基板上，並利用 170 °C 加熱板加熱基板 90 秒。接著利用一場發射電子顯微鏡加裝奈米圖案產生系統，將設計的圖案書寫在阻劑上，使用適當光圈大小、電子束劑量與間距等參數控制圖案的寬度。

待書寫完畢，將基板泡入體積比 3 : 1 的異丙醇與 MIBK (methylisobutyl ketone) 混合液中約兩分鐘進行顯影程序，接著浸泡入異丙醇一分鐘，再以氮氣槍吹乾，並完成定義圖案的步驟。接著將基板放入電子槍蒸鍍機腔體內抽真空，當真空度小於 2×10^{-6} Torr，開始進行蒸鍍，鍍上厚度約 100 nm 的金屬銀於基板上，鍍率控制在 5 Å/s 左右。在基板蒸鍍步驟完成後，將基板泡入丙酮中震洗數分鐘，以去除基板表面的殘餘阻劑，為了確認金屬表面的

潔淨度，進一步使用臭氧 (O_3 plasma) 濺擊金屬表面，接著將基板放入去離子水中震洗 2 分鐘，最後再利用氮氣槍吹乾。圖 4 為所製作的奈米金屬凸型結構之電子顯微鏡圖。

三、奈米金屬結構對螢光分子之增強效應

圖 5 為此實驗中所使用的暗場光學顯微系統之架構示意圖。光經由光纖導入半球型透鏡，成為以球面角分布的環狀光，斜向投射至樣品。為了降低光進入空氣介面所造成的損失，樣品與半球晶體間需滴入折射率與玻璃相當的折射率油。短波濾光片將入射光波長大於 450 nm 的光濾掉，入射的紫光能帶高於螢光材料的綠光能帶，故螢光材料在吸收紫光能量後，電子躍遷至高能階而後降回低能階放出綠光。為了觀測螢光材料的螢光訊號，利用窄波濾光片 (bandpass filter) 將波長介於 500 nm 至 600 nm 的光於 100 倍的物鏡。

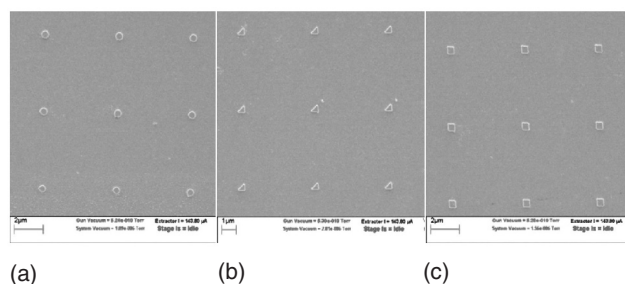


圖 4. 奈米金屬凸型結構電子顯微鏡圖。(a) 圓柱、(b) 三角柱、(c) 正方柱。

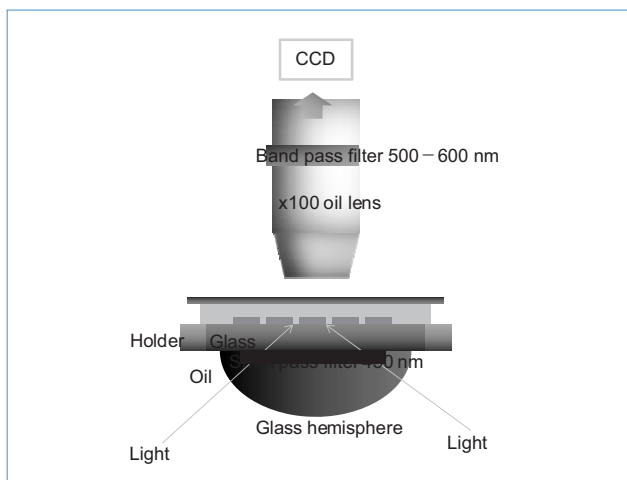


圖 5. 暗場顯微鏡架構示意圖。

1. 凹型結構量測

實驗中覆蓋厚度 50 nm 的螢光材料下 (Alq_3)，孔洞直徑 550 nm 大於光學繞射極限，藉由螢光訊號凸顯由孔洞側壁傳遞上來的表面電漿在孔洞頂端形成局域性場增強效應，螢光亮度在孔洞頂端相對於 Alq_3 在玻璃上的螢光增強約 223%，形成一光環，如圖 6(b) 所示，圖 6(d) 為其對應的統計灰階強度分布。而當銀質孔洞直徑縮小至 380 nm 時，其小於光學繞射極限，所量測的螢光訊號在光學解析度下形成以中心為峰值的分布。

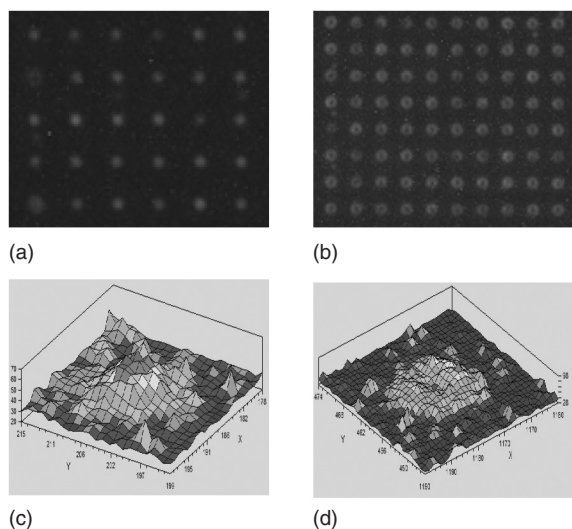
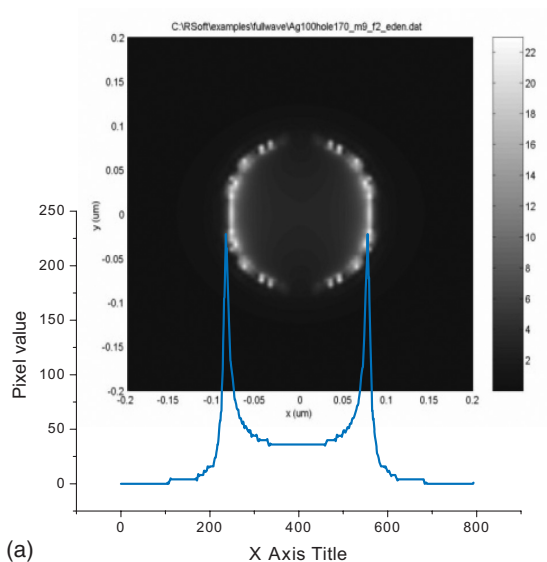
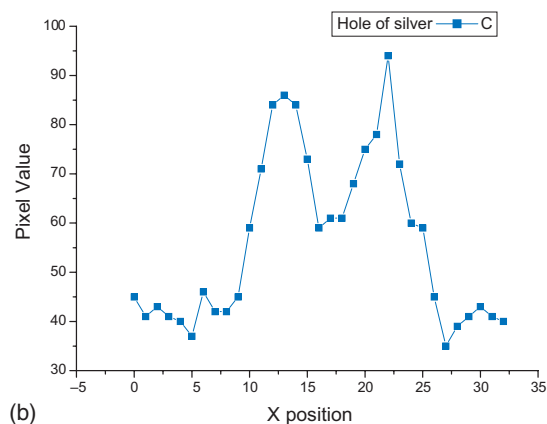


圖 6. 覆蓋厚度 50 nm 螢光材料之銀奈米孔洞，直徑分別為 (a) 380 nm、(b) 550 nm，(c) 與 (d) 為其所對應的 3D 強度分布圖。



(a)



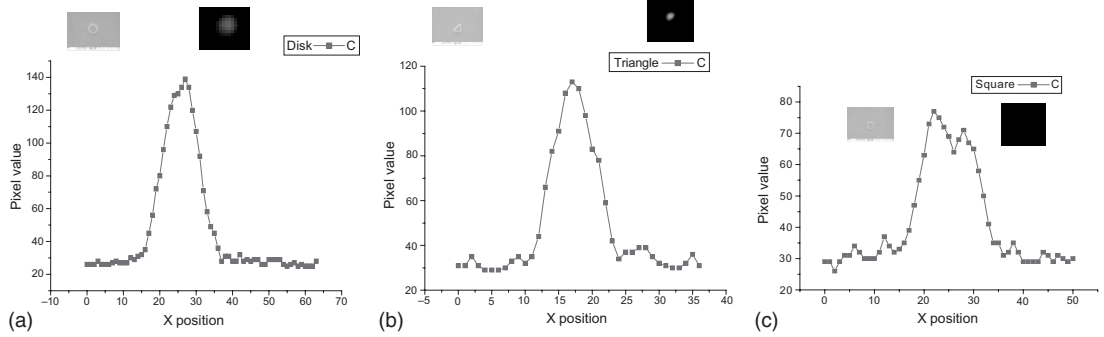
(b)

圖 7. (a) FDTD 模擬直徑 350 nm 的銀孔洞電場強度分布以及強度分布圖，(b) 直徑 550 nm 銀孔洞實際量測對應的螢光強度分布圖。

進一步螢光強度分析如圖 7 所示。孔洞直徑大於光學解析度下強度分布在周圍形成峰值，此與時域有限差分法 (finite-difference time-domain, FDTD) 模擬結果一致。表示電場強度在孔洞周圍形成峰值對螢光訊號產生增強的作用 (metal enhance fluorescence)，且由孔洞內綠光強度較孔洞外綠光强度高，此亦與模擬吻合。藉由金屬表面電漿對螢光訊號增強的效應，反映出近場光學的光場分布，且孔洞結構對螢光強度提升約為 220%。另外，380 nm 奈米銀洞所增強的螢光訊號較 550 nm 奈米銀洞佳，理論上，其場型分布也應以孔洞周圍為最高，但因為光學顯微鏡的解析度限制，其螢光訊號在 CCD 成像以中心為峰值。

圖 8.

奈米凸型結構上
螢光亮度分析。
(a) 柱狀結構、
(b) 三角形結
構、(c) 正方形
結構。



2. 凸型結構量測

同一片樣品上不同形狀奈米結構鍍上螢光材料 50 nm 的 Alq_3 作螢光強度分析，結構的長度皆為 300 nm。圖 8(a) 為 Alq_3 在奈米圓柱結構上相對於 Alq_3 在玻璃上，其螢光亮度提升 572%；圖 8(b) 直角三角形結構尖端對螢光亮度提升 368%；圖 8(c) 方形結構周圍環繞表面電漿效應對螢光亮度提升 272 %。由此可知奈米圓柱在相同條件下，對螢光亮度提升有最佳效果，主要在於圓柱形結構中心點微凸結構對場增強效應顯著，故在選擇生物樣品檢測時以奈米柱狀結構尤佳。

圖 9 為將此圓柱結構應用在 DNA 的檢測結果。首先，帶有 SH 官能機的单股 DNA 置入，SH 會固著在金膜上，經清洗後，將帶有 Cy5 螢光分子的另一互補 DNA 置入，經一段時間雜交 (hybridization) 後，帶有 Cy5 螢光分子的 DNA 會附著在奈米金柱上。經由暗場顯微術量測，可以看出在有 Cy5 螢光分子的奈米柱上有清楚的紅光螢光訊號出現在奈米柱周圍。此紅色螢光訊號為 Cy5 之螢光被局域表面電漿子增強的結果。

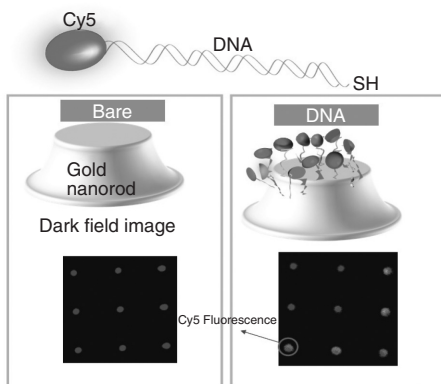


圖 9. 奈米金圓柱結構應用在 DNA 檢測之光學影像。

四、金屬孔洞對奈米粒子之作用

我們研究金奈米球與奈米銀洞 (200 nm) 之交互作用情形，使用之奈米小金球直徑，其尺寸小於入射光波長與銀孔洞。光波引致的電場施於小金球時，形似一靜電場，而導引出電偶極，其極化率 p 約為：

$$p = 4\pi\epsilon_m a^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 \quad (1)$$

而當帶有特定極化方向的電偶極進入有局域性表面電漿的奈米孔洞時，就有機會進入最低能量的穩定態。在此使用 FDTD 軟體對此做出驗證，如圖 10 所示，自孔洞結構下方入射一線偏振的单頻光 (532 nm)，由於奈米結構的影響而產生散射現象，進而給予足夠大的平面波向量，而產生局域性表面電漿。當金球進入孔洞結構內時，金球兩側受到偏

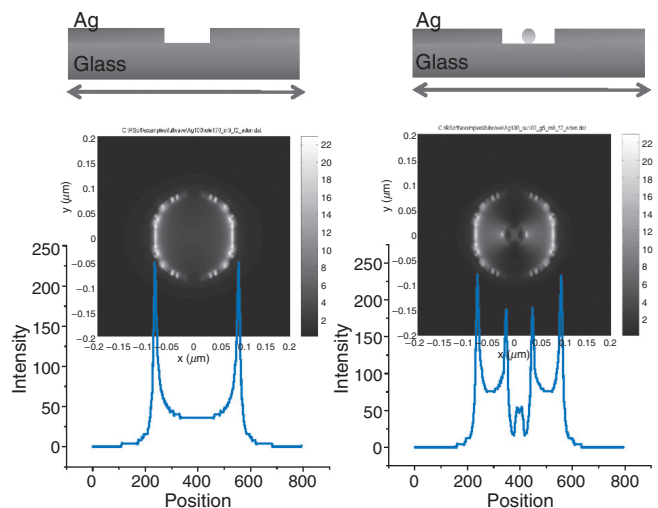


圖 10. 孔洞內電場強度分布。

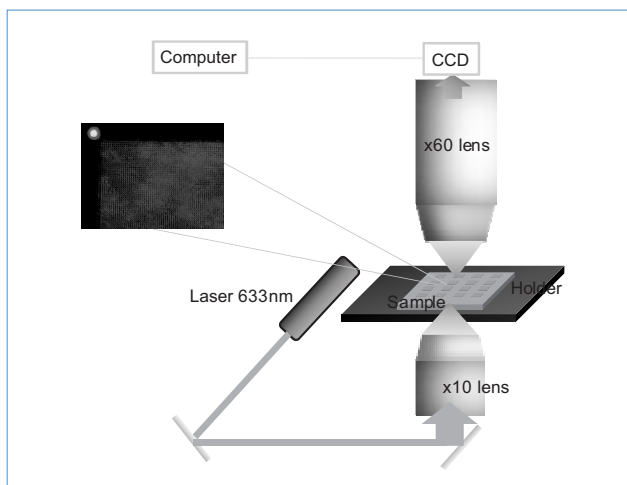


圖 11. 光捕捉系統架設。

振光激發所產生的局域性表面電漿，將孔洞內原本無法出來的光透過表面電漿的型式導引出；且金球與銀質孔洞間的表面電漿共振在金球與孔洞間產生交互作用使金球所在位置則進入了能量低點，利用此局域表面電漿場，可以對待測物體進行類似光捕捉 (optical trapping) 的效果。

圖 11 為光捕捉系統示意圖，在此將功率為 4 毫瓦、波長為 633 奈米的雷射光導入 10 倍物鏡，聚焦於樣品底部，並以 60 倍物鏡將穿過樣品的散射光成像於 CCD 上。樣品表面的結構為銀孔洞陣列，孔洞直徑為 200 奈米，孔洞之間的距離為 1.5 微米，大於系統的光學繞射極限。接著在孔洞陣列上塗佈含有直徑為 60 奈米金球的水溶液。紅光在銀孔洞底端散射所激發出的表面電漿波，沿著金屬孔洞側壁傳遞至孔洞頂端，並在洞頂端邊界匯聚成一光環，形成電能量密度高的局域性場增強效應。

懸浮於液體中作布朗運動的金球，將被此局域性場增強所造成的位能梯度牽引，而導致進入孔洞內的機率增加。圖 11 左上圖為雷射光聚焦於銀孔洞捕捉金球後的影像。

圖 12 為以 SEM 拍攝的結果。以雷射光聚焦於銀孔洞陣列上時，金球會被捕捉到孔洞內。在無雷射下，金球自然沉積，幾乎都位於孔洞外。金球在雷射光照射孔洞下，被捕捉進入洞內的比例相較於沒有雷射光照射孔洞的比例明顯來得高許多。故知雷射光激發表面電漿，其在孔洞頂端邊緣產生的局域性增強場，捕捉金球的能力佳，形成孔洞內含有金球的奈米結構。

對於圖 12(a) 與 (b) 兩圖作數量分析，經仔細計算，光固定後，金球進入奈米孔洞機率約為 116%，而未經過光捕捉，機率則大幅降至 8%，亦即是在局域性表面電漿的影響下，單顆孔洞甚至有埋進二至三顆金球的情況發生。而為了進一步驗證金球進入奈米孔洞的光學現象，藉由暗場的 CCD 影像進行分析。如圖 13 所示，當孔洞內無金球存在時，穿透光顏色整體偏綠；隨著孔洞內金球數的增加，穿透的紅光也隨之增加，藍光則是相對減少。

此現象亦可由 FDTD 的模擬中驗證，採用如圖 9 的模擬架構，藉由改變孔洞內金球的直徑大小，來評估孔洞內金球所占比例對穿透光譜的影響。如圖 14 所繪，隨著奈米孔洞中金球所占比例越高，整體的穿透度降低且紅移。由此現象提供了我們一個更為簡單且快速的方法，驗證金球是否進入奈米孔洞，而不需藉由繁瑣的 SEM 實驗即可得知。藉由此方法亦可進一步得到金球進入奈米孔洞

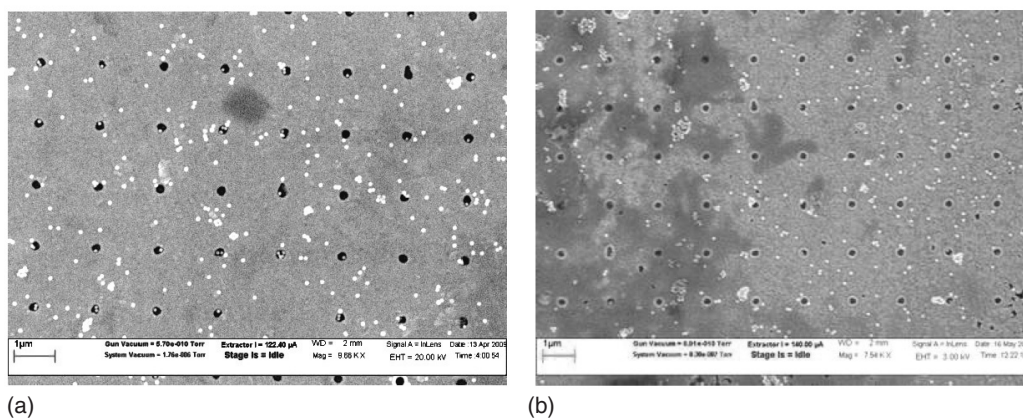


圖 12.
(a) 光捕捉後與 (b) 光捕捉前 SEM 圖。

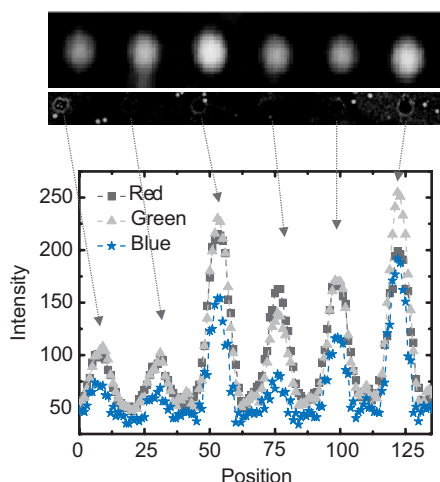


圖 13. 個別奈米孔洞暗場 CCD 影像分析。

的動態資料，對於未來研究局域性表面電漿抓住奈米粒子的實驗將有很大的助益。

五、結論

金屬奈米結構在單分子偵測上，可以利用表面電漿子作用，將量測空間侷限在奈米區域中，大幅縮小偵測體積至光學繞射限制以下。同時由於奈米金屬中表面電漿子作用產生增強性光學近場，進一步可以增加微弱的單螢光分子訊號與束縛分子在此奈米金屬結構中提升單分子之偵測能力。我們於此研究中證實奈米金屬結構對於螢光分子有顯著的亮度提升，而奈米圓柱在相同條件下，對螢光亮度提升有最佳效果。在奈米金顆粒／孔洞研究中，發現表面電漿子作用可大幅提高奈米顆粒進入奈米孔洞之機率達到 14.5 倍，而隨著奈米孔洞中金球所占的比例越高，整體穿透度會降低且紅移。此現象對於後續修飾生物分子於奈米顆粒與奈米金屬結構提供一簡單靈敏且即時觀測的方法。

誌謝

感謝國科會計畫 NSC96-2120-M-007-010、NSC97-2120-M-007-007 的支援，使本研究得以順利進行，特此致上感謝之意。

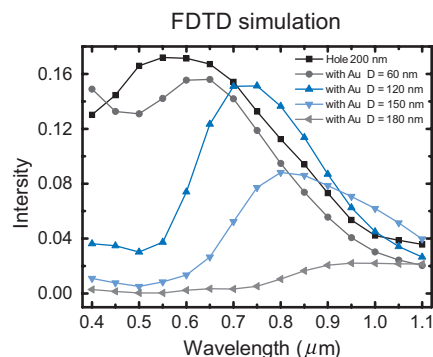


圖 14. FDTD 模擬不同金球大小於金屬孔洞的光學穿透率。

參考文獻

1. H. P. Lu, L. Xun, and S. Xie, *Science*, **282**, 1877 (1998).
2. Q. Xue and E. Yeung, *Nature*, **373**, 681 (1995).
3. T. Funatsu, *et. al.*, *Nature*, **374**, 555 (1995).
4. M. J. Levene, *et al.*, *Science*, **299**, 682 (2003).
5. Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, and H. Noji, *Nature Biotechnology*, **23**, 361 (2005).
6. H. Craighead, *Nature*, **442**, 387 (2006).
7. S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer (2007).
8. P. K. Wei, H. L. Chou, and W. S. Fann, *Optics Express*, **10**, 1418 (2002).

- 張偉國先生為國立清華大學工程與系統科學系碩士班學生。
- 曾繁根先生為美國加州大學洛杉磯分校機械工程博士，現任國立清華大學工程與系統科學系教授。
- 魏培坤先生為國立台灣大學電機工程博士，現任中央研究院應用科學研究中心研究員。
- Wei-Kuo Chang is a M.S. student in the Institute of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.
- Fan-Gang Tseng received his Ph.D. in mechanical engineering from The University of California, Los Angeles, USA. He is a professor in the Institute of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.
- Pei-Kuen Wei received his Ph.D. in electrical engineering from National Taiwan University. He is a research fellow in Research Center for Applied Sciences at Academia Sinica.