

全反射螢光顯微術於生物單分子研究的樣品簡易處理

A Simple Process in Single Biomolecule Analysis by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

胡書銘

Su-Ming Hu

全反射螢光顯微術 (TIRFM) 的奈米等級解析度和高訊號／背景值的特性，可觀察溶液態中的單分子螢光影像和光譜。本文主旨在說明生物單分子分析在顯微鏡之外的其他設備和處理可以很簡單。生物樣品和玻璃表面經過簡單處理，配合流體幫浦，這種簡易組合就可以利用全反射螢光顯微鏡研究生物單分子；最後，以蛋白質－核酸的交互作用做為例子，說明這種簡易組合在生物單分子動力學的應用。

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) can produce an image and spectrum at a nanometer resolution and with a high signal/noise ratio. This technique is applied to single biomolecule analysis in a growing trend. This text will introduce the basic principle of TIRFM and the techniques combined to TIRFM. In addition, the interaction of protein-nucleic acid will demonstrate the application of TIRFM to single-molecule assay in biological research.

一、前言

奈米科技的單分子 (single molecule) 技術應用在生物分子的研究上，近年來快速增加。以生物和醫學相關研究文獻常用的美國國家生物資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 資料庫 PubMed⁽¹⁾ 所收錄的期刊為例，單分子相關研究的論文近年來持續增加中 (圖 1)。傳統生物化學量測的是眾多分子的平均行為，因為各分子的行為並不同步發生，所以沒法瞭解單一分子的動態行為

和參數。生物單分子技術可以解決這個需求。單分子技術主要分為兩大類：螢光技術和力的操作。生物單分子技術是在生化研究的試管中 (*in vitro*) 反應和活細胞系統的基礎上，以生物物理方法量測基本物理量，其中一項關鍵技術是全反射螢光顯微術 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)。

全反射螢光顯微術是單分子研究的基礎關鍵技術，除了直接觀測單一分子影像之外，可加以變化量測螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)、螢光半衰期成像 (fluorescence

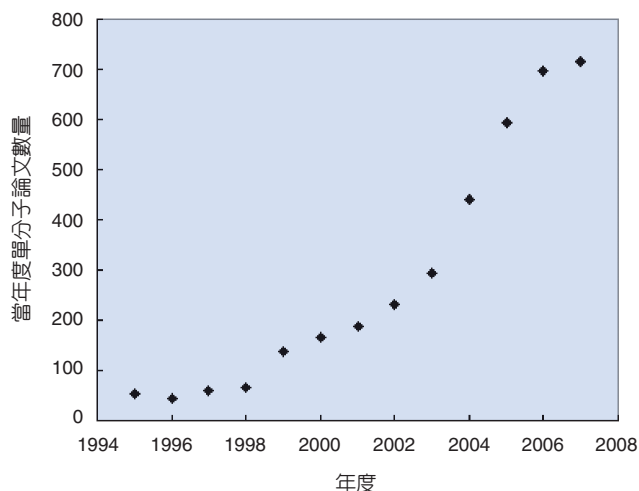


圖 1. 以單分子「single molecule」當關鍵字搜尋 NCBI 的 PubMed 文獻資料庫，統計 1995—2007 年每年發表的單分子論文數量。

lifetime imaging, FLIM) 及一奈米準確度螢光成像 (fluorescence imaging with one-nanometer accuracy, FIONA) 等；也可搭配其他技術，比如原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM)、光鉗 (optical tweezer)、磁鉗 (magnetic tweezer) 及微流體 (microfluidics) 等技術，讓生物單分子成像的應用層面更寬廣⁽⁴⁾。

螢光顯微鏡常用在生物研究，螢光分子 (fluorophore) 結合在樣品目標區，也存在於周圍的水溶液中。當激發螢光分子時，傳統螢光顯微鏡不只激發樣品目標區的螢光分子，也同時激發溶液中或其他區域的螢光，而造成雜訊遮蔽了目標區訊號。全反射螢光顯微鏡可以克服這項困擾。利用全反射現象的漸逝波 (evanescent waves)，全反射螢光顯微術只激發玻璃和水溶液之間介面附近的螢光分子，大大地提高了信號／背景值 (signal to noise ratio)，進而可以偵測到單一螢光分子。

1995 年全反射螢光顯微術被應用到肌動蛋白質 (myosin) 單分子對 ATP 水解的反應⁽²⁾。之後，這技術應用到試管中 (*in vitro*) 分子馬達 (molecular motor, 比如 F1-ATPase) 轉動的直接觀測、酵素反應、細胞骨架 (cytoskeleton) 上蛋白質的移動、DNA-蛋白質交互作用等。2000 年起，這項技術也被應用到活細胞，例如脂質 (lipid) 在細胞膜上的運

動、配體 (ligand)–受體 (receptor) 結合反應、離子通道 (ion channel) 及細胞附著 (cell adhesion) 特性⁽³⁾。

傳統生化或細胞生物學研究上，對於螢光顯微鏡並不陌生。至於 TIRFM，目前在台灣的生物領域使用較少。以下介紹樣品的簡易處理、簡易流道組裝，即可用於 TIRF 顯微鏡，從事生化研究。

二、全反射顯微鏡原理和光路設計

1. 全反射螢光顯微鏡原理

光束由一種介質進入另一種介質時，部分反射、部分折射。折射角度遵守 Snell's law：

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

在折射係數 $n_1 > n_2$ 的情形下，並且入射角 θ_1 大於臨界角 $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ 時，就沒有折射光，而產生全反射現象，並且產生漸逝波 (圖 2(a))。漸逝波不會長距離傳播，其強度隨著距離而呈指數衰減：

$$I_z = I_0 e^{-z/d}$$

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

在上列公式內 I_0 為入射光強度、 z 為縱軸距離、 λ 為波長。藉由改變入射的角度和光的強度，可以調整漸逝波強度。漸逝波隨距離急速衰減的特性，只能激發靠近介面的螢光標記，激發縱深在 50 奈米到 200 奈米之間 (圖 2(b))。這樣可以避免遠離介面附近的其他螢光分子被激發，有效提高螢光信號的訊號／雜訊比例，有利於單分子成像。

2. 全反射顯微鏡的光路設計

全反射螢光顯微鏡和一般螢光顯微鏡最大差異，在於激發光的入射角度必須大於臨界角。全反射螢光顯微鏡的激發光導入到樣品區的方式主要分為兩種，一種是稜鏡式 (prism-style TIRF)，另一種物鏡式 (objective-style TIRF)。

物鏡式全反射顯微鏡的激發光係由物鏡中導出

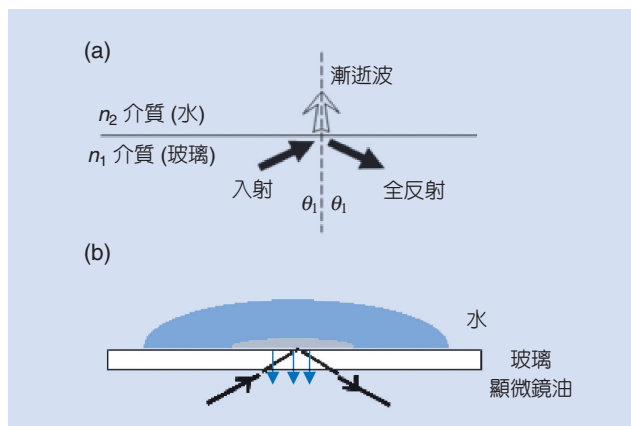


圖 2. 漸逝波隨距離衰減很快，只激發深度 50—200 nm 距離內的螢光分子。(a) 當入射角大於臨界角時，產生漸逝波。(b) 漸逝波隨著離開界面的距離衰減很快，只激發界面附近的螢光物質。黑色代表激發光，灰色代表激發範圍，藍色代表螢光。

(圖 3(b))，在樣品區靠近物鏡的一側產生漸逝波；當實驗樣品可以固定在流道表面時，流道的厚度可以不必考慮。另一好處是樣品區上方不架設稜鏡，這開放空間可以架設其他設備，比如鑽孔組合成液體儲存槽 (reservoir)；視情況需要，液體儲存槽可再接上幫浦進行微流體實驗。

3. 光漂白和光閃爍的改善方法

螢光分子的光漂白 (photobleaching) 和光閃爍 (photoblinking) 現象造成螢光無法長時間觀測，一直對螢光光學技術造成困擾。前者螢光分子被破壞，是不可逆的反應；後者是在可發螢光和不發螢光兩種狀態轉換。為延長單分子螢光影像時觀察時間，樣品溶液中常加入抗氧化劑 (β -mercaptoethanol 或 dithiothreitol) 和氧氣清除系統 (oxygen scavenging system，包含 glucose, glucose oxidase 和 catalase)。螢光技術也持續尋求延長螢光時間的方法，例如以 trolox 取代 β -mercaptoethanol⁽⁵⁾，或加入奈米銀例子⁽⁶⁾ 可以改善 cyanine (Cy3 和 Cy5) 螢光漂白和光閃爍的現象。

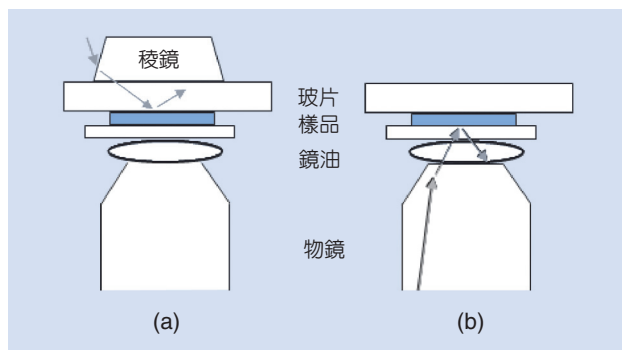


圖 3. 兩種 TIRF 顯微鏡的入射光路，(a) 稜鏡式與 (b) 物鏡式。其中物鏡式 TIRF 適合架設本文中的幫浦。

三、全反射顯微鏡樣品的簡易處理

以化學方法處理玻璃／石英等表面，加上簡易流道組裝，即可搭配 TIRFM 從事單分子研究。

1. 化學修飾、簡易流道和 DNA 固定

把 DNA 一端固定在基材表面，以微流加以伸展，可以作為 DNA-蛋白質交互作用研究之基本設計。以下介紹一個簡易的方法，不需要複雜儀器，可以簡單的把 DNA 一端固定在流道表面，接上幫浦，以微流將 DNA 伸展開。

(1) 基材表面化學修飾和簡易流道組裝

當需要把生物分子固定在玻片表面時，流道尺寸不是主要考量，而是玻片的表面化學修飾。此時使用工業雙面膠製作簡易流道，是最方便的選擇。

生物分子要固定在基材表面 (比如玻璃)，可以用非特定性 (non-specific) 附著方法，而更常利用高親合連結 (affinity binding) 的組合，比如 biotin vs. streptavidin 和 DIG vs. DIG 抗體。streptavidin 對 biotin 有四個結合位，而 DIG 抗體對 DIG 分子有兩個結合位。當生物分子和基材表面都修飾，而都帶有 biotin 或都帶 DIG 時，streptavidin 和 DIG 抗體的多結合位特性，就可以一個結合位連結到生物分子，另一個結合位連結到基材表面。

玻璃表面化學修飾攜帶 biotin，先把玻片用食人魚溶液 (piranha solution，成分是硫酸和雙氧水)

(a)
玻璃羥基化 (化學浸泡) → 玻璃胺基矽烷化 (化學浸泡) → 流道組裝
→ 加 NHS-biotin → 流入 streptavidin

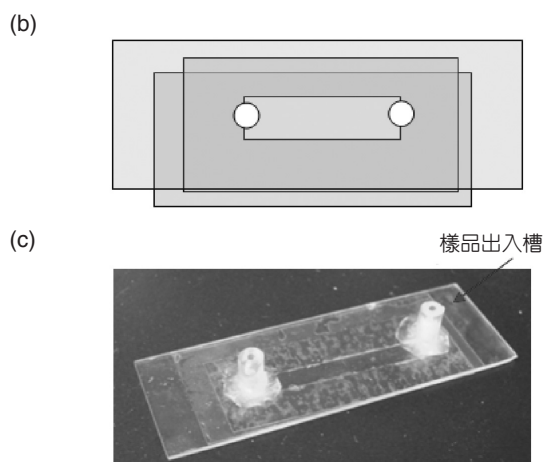


圖 4. 可以吸附修飾過的生物樣品的簡易流道設計。(a) 蓋玻片表面修飾流程，可以連結帶有 biotin 的其他分子。(b) 組裝示意圖：下層是表面修飾過的蓋玻片，中層是割了管道的工業雙面膠，上層是鑽了洞的載玻片。(c) 裝了樣品出入槽的成品，可以 pipet tip 直接滴入樣品，也可以接到幫浦。

或氧電漿 (oxygen plasma) 處理，作為清潔步驟，同時把玻璃表面羥基化 (hydroxylation)，接著以 aminopropyltriethoxysilane (APTES) 將玻璃表面胺基矽烷化 (aminosilanization)。將這樣載玻片與鑽好洞的載玻片以切割好管道的工業雙面膠 (厚度 300 – 0.02 微米) 黏貼組合，再以環氧樹脂 (epoxy) 將短水管黏在上表面的載玻片洞口，即形成有樣品導入槽的簡易流道 (圖 4)。這流道表面帶有胺基，利於後續表面化學修飾。此時先後流入 NHS-biotin (這 NHS 功能基與玻璃表面胺基結合)、streptavidin，玻璃表面即具備結合 biotin- DNA 的能力。

(2) DNA 修飾、固定與 DNA 展開 (DNA Stretching)

DNA 修飾的來源以合成的寡核酸 (synthetic oligonucleotide) 最容易，帶有小分子 (biotin、螢光分子 cy3 等) 修飾的寡核酸可以用作 PCR 引子 (primer)，嵌合到 PCR 產物中 (圖 5(a))；另外，利用 lambda DNA 兩端各有突出單股 (12 個核酸 base) 的特性，DNA ligase 也可將寡核酸嵌到 lambda 的端點 (圖 5(b))。把修飾過的 DNA 流入圖 3 的簡易流道，會和管道表面的 streptavidin 結合，而固定

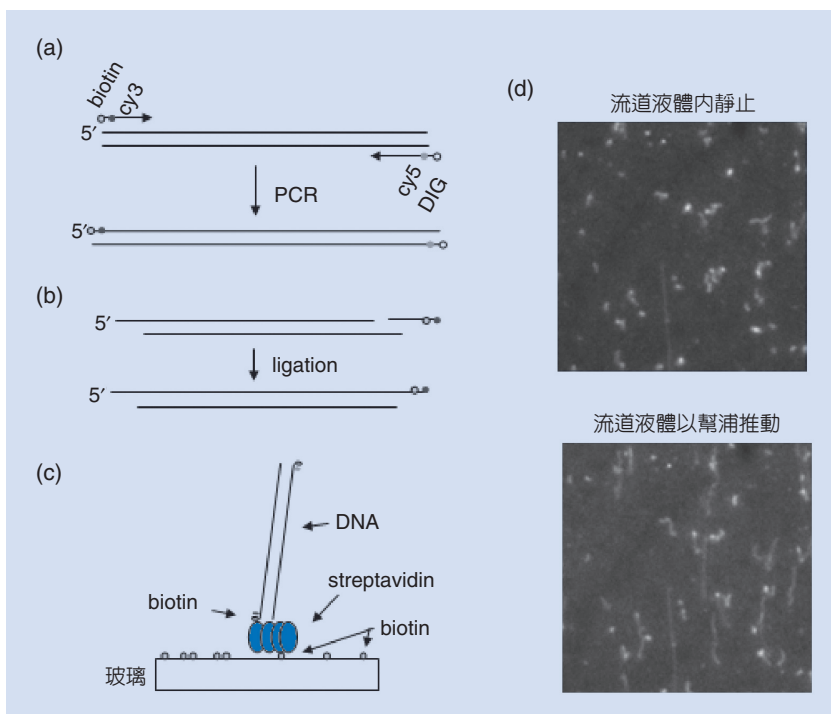


圖 5.

修飾 DNA 以攜帶親和小分子，可以吸附到流道表面。修飾 DNA，最常用 PCR 引子 (primer)，製造被修飾的 PCR 產物 (a)，或者利用 DNA 黏合 (ligation) 反應，把小分子修飾加到 lambda DNA 上 (b)。(c) 修飾後的 DNA 可以藉由 biotin 吸附到修飾過的玻璃表面 (圖 4 (a) 和 (c))，藍色圖示 streptavidin 有四個 biotin 結合位。(d) DNA 在無外力時，捲縮 (recoiling) 成點狀 (上圖)。以幫浦推動微流，將 lambda DNA 伸展到大約 1.5 微米。DNA 是 SYBR Gold 染色，用螢光顯微鏡觀察。

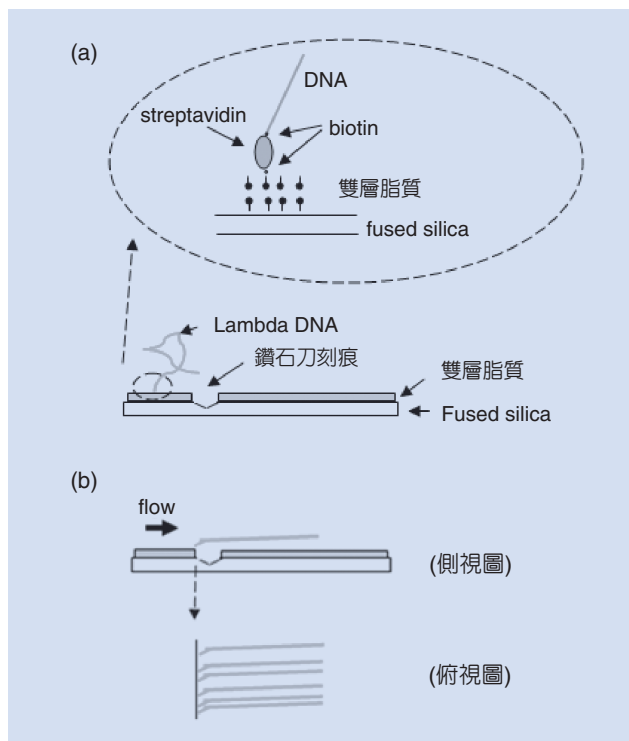


圖 6. DNA 簾幕 (DNA curtain)。(a) DNA 一端藉由脂質連結在雙層脂質上。沒有水流時，DNA 在捲縮 (recoiling) 狀態，而其位置散亂分布在雙層脂質上。(b) DNA 被水流推動，沿雙層脂質往水流方向移動；到鑽石刀刻痕時，DNA 的脂質端不再移動，而停留在刻痕邊緣。眾多 DNA 的脂質端在刻痕邊緣聚集成為一線，且被水流伸展，俯視方向成為一排平行的線條，稱為 DNA 簾幕。DNA 簾幕應用在 RecA 研究上，讓數百條 stretching DNA 平均長度的觀察變得很容易。

在管道表面 (圖 5(c))。把簡易流道樣品出入槽連接細管，並接上針筒幫浦 (syringe 幫浦)，推動管道內液體流動，可以把 lambda DNA 伸展開來 (圖 5(d))。

四、全反射顯微術在 DNA-蛋白質交互作用的應用

以下介紹兩個利用 TIRFM 從事同源重組 (homologous recombination) 相關的單分子研究，只需要簡易流道即可。同源重組是生物學重要課題之

一，牽涉到基因受損時基因的基因修復，也牽涉和產生配子 (卵子和精子) 的減數分裂 (meiosis)。同源重組最關鍵的步驟，由 RecA 蛋白質家族催化；這蛋白質家族成員包含 RecA、Rad51、Dmc1 和 RadA。這四個蛋白質執行同源重組的機制類似，(1) 先和單股 DNA 結合，形成絲狀 (filament) 的 DNA-蛋白質複合體，(2) 絲狀 DNA-蛋白質複合體侵入同源的雙股 DNA (DNA invasion)，和互補股結合，(3) 剔除非互補股，而完成基因交換 (DNA exchange)。在生化特性上，RecA 家族成員都可以結合雙股 DNA 和單股 DNA，並受到 ATP 調控。

1. DNA 螢光影像長度變化觀測

Rad51 結合 DNA 後，DNA 長度會被拉長約 40–50%。美國哥倫比亞大學 E. Greence 實驗室利用此特性，以 TIRFM 量測 DNA 螢光影像長度變化，來觀察雙股 DNA 和 Rad51 的交互作用：DNA 單分子的螢光影像加入 Rad51 後，影像長度隨時間的變化。這方式可以量測不同反應條件 (Rad51 濃度、離子種類、溫度) 對 DNA-Rad51 結合的影響。他們也針對 RadA 各功能區間的氨基酸進行突變，利用同樣的 DNA 螢光影像方法，瞭解各氨基酸對 DNA-Rad51 結合的影響，並得到 Rad51 的 L1 loop 對 DNA-Rad51 結合最關鍵、而胺端區間和 L2 loop 不是關鍵的結論⁽⁸⁾。

在這項實驗中，他們引入 DNA 簾幕 (DNA curtain) 技術⁽⁹⁾，在 TIRFM 的同一視野下，可以同時觀察數百條平行的 DNA 單分子螢光影像，利於 DNA 平均長度的量測 (圖 6)。

2. 螢光共振能量轉移 (FRET) 觀測

美國伊利諾大學 T. J. Ha 實驗室利用 TIRFM 偵測 FRET 現象，以量測 RecA 在單股 DNA (ssDNA) 上核化、延伸 (extension) 和解離 (disassemble) 的動態⁽¹⁰⁾。RecA 結合 ssDNA，是先在 DNA 上形成一個短的而不穩定的結構，稱為核化 (nucleation) 現象。以這不穩定的結構作為「核」，RecA 分子往兩端繼續聚合到達一定長度後，才能形成穩定結構。這穩定結構的兩端可以繼續往外延伸，也會解離，這受 ATP 調控。

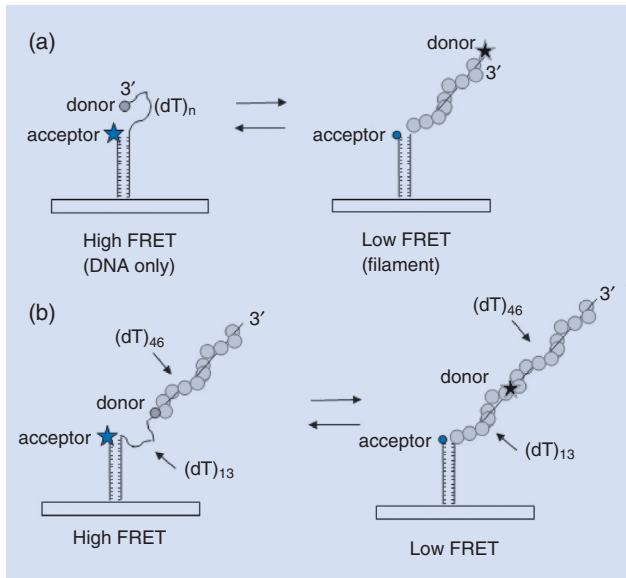


圖 7. 利用 FRET 現象，(a) 觀測 RecA 在單股 DNA 的核化 (nucleation) 現象，圖中 $n = 17-21$ ；(b) 觀測 RecA 從 3' 端往 5' 端聚合、或者 RecA 從 5' 往 3' 脫離。圖中黑色星狀代表 donor 自發螢光，沒有 FRET 現象；藍色星狀代表 acceptor 的 FRET 螢光。

實驗設計是在長短不一樣的兩股單股寡核酸上分別標定兩個螢光分子 (donor 選用 Cy3, acceptor 選用 Cy5)，可以量測螢光分子 FRET，而得知 RecA 在 ssDNA 上的動態 (圖 7)。只有 DNA 本身存在時，螢光分子間距離小，而 FRET 高；DNA 結合 RecA 之後，螢光分子間距離增加，而 FRET 降低。利用 13–21 個鹼基的 ssDNA，其長度不足，不足以讓 RecA 夠長，以形成穩定結構，只能形成「核」結構。13 和 15 個鹼基的 ssDNA，FRET 沒有變化，也就是 ssDNA 太短，RecA 沒法結合形成「核」。在 17–21 個鹼基 ssDNA 的情況下 (圖 7(a))，FRET 幾乎只有最高和最低兩種狀態；而最高 FRET 和最低 FRET 之間的轉換時間⁽¹⁰⁾，遠比 RecA monomer 在已建立的 RecA filament 上最高 FRET 和最低 FRET 之間的轉換時間⁽¹⁰⁾ 短很多。由此可以推測，RecA 結合 ssDNA，形成「核」或由「核」上脫離，是多個 RecA monomer 同時發生，而不是一次變化一個 RecA monomer。

當 RecA filament 較長時，比起「核」結構相

較穩定。RecA 分子可以在 filament 兩端聚合或脫離。這種動態行為由 ATP 控制。與 17–21 個鹼基 ssDNA 實驗類似原理，將 ssDNA 長度增加到超過 50 個鹼基，以形成穩定 RecA filament 結構，但改變螢光標記位置，設計來量測 RecA 分子在 RecA filament 端點的動態行為。一般來說，超過 30 個鹼基的 ssDNA 足以讓 RecA filament 形成穩定。如圖 7(b) 所示，當 RecA 在穩定的 filament 端淺由 3' 向 5' 聚合或由 5' 向 3' 脫離時，會影響到相隔 13 個鹼基的兩個螢光標記的 FRET。根據 FRET 變化，推測穩定的 RecA filament 由 5' 向 3' 方向脫離時，FRET 至少有三種狀態。類似的設計也量測到 RecA 向 3' 伸展的動態⁽¹⁰⁾。

五、結論

全反射螢光顯微術是單分子研究的關鍵技術，應用在生物研究上快速增加。本文第二節和三節介紹全反射顯微鏡的基本原理和光路設計考慮，也介紹玻璃表面處理和管道製作等上機前樣品處理。第四節介紹兩個生物單分子研究，都是使用化學方法處理石英片表面，作為生物分子固定用途，加上工業雙面膠和一般蓋玻片，組裝成為長度數十毫米 (mm)、寬度數毫米、高度數十微米 (雙面膠厚度的規格) 的簡易流道，沒有使用到高精密度蝕刻的奈米技術。生物樣品固定在簡易流道之後，可以流入各種相關的分子、改變實驗條件、測量生物單分子變化的各項參數，操作上和一般生化實驗無異，可作為生化實驗的常規使用儀器。總結而言，玻片表面化學處理後組裝成簡易流道，搭配 TIRF 顯微鏡，就可以成為生化研究的有力工具。

參考文獻

1. NCBI PubMed 網址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
2. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida, *Nature*, **374**, 555 (1995).
3. H. Schneckenburger, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 13 (2005).
4. P. V. Cornish and T. Ha, *ACS Chem. Biol.*, **2**, 53 (2007).
5. I. Rasnik, S. A. McKinney, and T. Ha, *Nat. Methods*, **3**, 891 (2006).
6. Y. Fu, J. Zhang, and J. R. Lakowicz, *Langmuir*, **24**, 3429 (2008).

7. J. Gu, R. Gupta, C. F. Chou, Q. Wei, and F. Zenhausern, *Lab. Chip.*, **7**, 1198 (2007).
8. T. K. Prasad, C. C. Yeykal, and E. C. Greene., *J. Mol. Biol.*, **363**, 713 (2006).
9. A. Granéli, C. C. Yeykal, T. K. Prasad, and E. C. Greene, *Langmuir*, **22**, 292 (2006).
10. C. Joo, S. A. McKinney, M. Nakamura, I. Rasnik, S. Myong, and T. Ha, *Cell*, **126**, 515 (2006).

-
- 胡書銘先生為國防醫學院生命科學博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
 - Su-Ming Hu received his Ph.D. in life sciences from National Defense Medical Center. He is currently a postdoctor in the Institute of Physics, Academia Sinica.