

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

子計畫一：創新之螢光奈米噴射液滴研究與近場全反射量測

(I)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2212-E-002-088-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學應用力學研究所

計畫主持人：黃榮山

共同主持人：王安邦

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫年度報告

奈米液滴產生器計劃-子計畫一:創新之奈米螢光噴射液滴研究 與近場全反射量測

計畫編號：NSC 92-2212-E-002-088

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：黃榮山 台灣大學應用力學研究所

Email: lshuang@mems.iam.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本文整合全反射螢光顯微術與微機電製程技術，利用全反射光場以漸逝波激發螢光，使全反射螢光顯微術具有離玻璃基材 150 至 700 奈米尺寸等級以內的觀測功能，並且其影像的訊號背景比遠高於其他的顯微技術；而在橫向尺寸的功能也藉著量測 1 微米的螢光粒子得到了驗證。另外，配合速度每秒 30 張畫面的影像擷取系統，可對標定螢光之抗原分子 Anti-IgG，進行即時偵測了解其從運動至與抗體鍵結時之狀態，並加以分析。在單分子偵測上，本文首次利用全反射螢光顯微鏡即時觀察到在固液相單一抗原分子 Anti-IgG 結合於抗體的狀態；同時也觀察到分子在流體邊界層運動行為，並成功地追蹤並分析抗原分子在流體邊界層的三度空間運動軌跡(空間範圍間距: X 軸 14.7 微米; Y 軸 1.3 微米; Z 軸 0.24 微米)與速度表現。

Abstract

TIRF microscopy is a well-suited technique for real-time imaging and monitoring of a single protein molecule in nano-layer fluidics due to its unique evanescent wave at the optically index-mismatch interface that may excites fluorescences at the transparent near-wall region. Recent advances in charge coupled device (CCD) camera detection efficiency and speed have enabled the microscopy of temporal and spatial resolutions to be

far-reaching 0.033 s and 0.3 μm , respectively. Based on the fluorescent beads analysis, which are 1.1 μm in size, the capability of TIRFM for single molecules monitoring and tracking, even the measurement in lateral size of molecules was demonstrated.

二、計畫緣由及目的

由於一般的光學顯微鏡受限於光波長的物理極限因素，使得光學顯微鏡的解晰度約在微米等級，也因此當本計畫中的液滴大小欲由十微米推向一微米甚至到零點一微米時，目前用來觀測液滴的光學顯微鏡技術均會現瓶頸，也因此勢必需要開發一種新的技術，用來觀察到小於微米尺度下之液滴現象。

而在觀察液滴從奈米噴頭噴出之動態影像部分，由於光學顯微技術在高放大率下，其工作區之景深也相對地變短，實際上對實驗觀測技術是一大挑戰，因此文獻上很少探討或觀測約微米等級的液滴，因此若要將觀測技術從目前的 10 μm 往下推展到 10⁻¹ μm ，則必須採用新的觀測技術與物理原理。

在本計畫中，提出利用全反射螢光顯微鏡技術的概念，來觀察液滴撞擊在基板上之現象，並由此推測其噴出的液滴是否成功。由於此技術比傳統的螢光檢測技術更高效的檢測出奈米等級的微小分子，不論是在解析度上或是雜訊比上，皆能獲得

有效的改善。此外由於螢光訊號是由 CCD 所接收，因此收訊號的頻率可以達到 200Hz，而一般掃描式的顯微鏡如共軛或雙覺子顯微鏡大約只到達 0.1~5Hz，因此全反射螢光顯微鏡技術的接收的頻率比共軛焦或雙光子顯微鏡高出非常多，而擁有顯影快速的優點使得此技術更能有效的觀察出奈米液滴的表現。

三、研究方法

對於進入生物分子這種微奈米等級尺寸領域的研究，須要有適當的儀器設備以及符合其尺寸的技术配合，方能進行研究並深入探討生物分子的微妙現象，以及發現其實際在學術與產業上的應用。

因此，在本研究中，首先建立一套可觀測在微奈米尺寸之活體生物分子的系統 - 全反射螢光顯微技術。此技術雖已普遍被應用於各領域的研究，但仍須要以光學的知識，並對於系統中各元件的特性進行深入了解，才得架設完成。配合實驗上的需要，對於每一元件都須經過仔細的選用與調整，並且整個光場的設計也相當的重要。

再者，由於受到尺寸限制的需要，研究中使用微機電技術製作晶片，達到微小化的需求。所使用的材料以及製作方法都需要考慮到是否能與生物分子結合，因此其中有許多生物化學之相關知識是須要了解的。根據研究目的，使用軟體設計適合的電極與微流道，利用微機電技術製作完成後，並以化學處理方法與生物結合。

兩項技術發展完畢，就需要生物的知識來協助接下來的研究，如何以工程的角度來進行對生物分子一些特別現象作探討，須要一些知識的累積。例如生物分子親合力、動力常數、以及生物物理與化學等，都是在本研究中相當基礎的。因此，研究的結果中，藉此探討在生物科學的發現，並且討論其是否能實際在醫學或製藥臨床有應用。

四、結論與成果 訊號背景比

高訊號背景比(SBR)是全反射螢光顯微鏡的特性之一，因此也是驗證整個系統是否已經架設完全的其中一項指標。為此以微米或奈米尺寸的螢光珠樣本來作實驗，製作流程如圖 4-1。開始實驗時，可以先就所得影像做觀察，根據漸逝波的特性，螢光珠一旦不在漸逝波的電磁場範圍裡，就不會被激發。由於布朗效應的影響，螢光珠會不斷地進出漸逝波的電磁場範圍，因此所得到的即時影像，應該是呈現光點閃爍的現象。

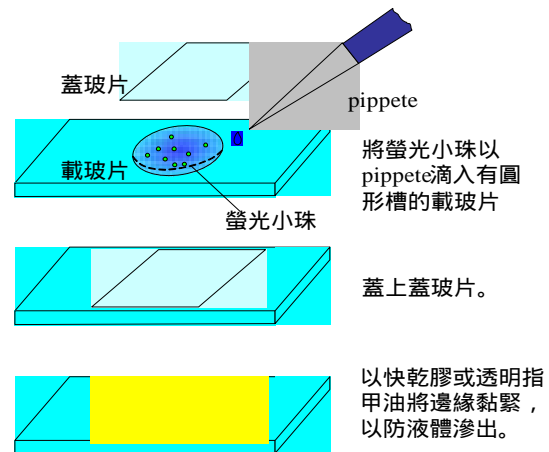


圖 4-1 螢光珠樣本試片製作流程圖

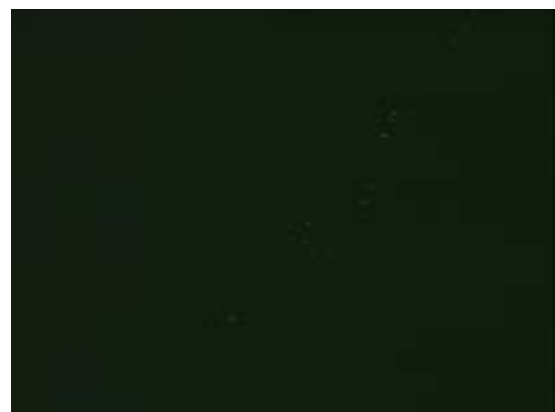


圖 4-2 TIR 激發狀態下 0.2 μm 螢光珠 (SBR=11.8)

橫向尺寸量側

為了測試全反射螢光顯微鏡在橫向(xy 平面)的解析度，進行了對於 1.1 μm 的螢光珠

作量測。因此，首先需要將螢光珠固定蓋玻片上，否則若螢光珠隨意漂動，會增量測的困難度與誤差。螢光珠固定後，進行全反射實驗，所得到影像為圖 4-3，在圖上取三個點來作分析，觀察其尺寸是否與實際相符。因此，在這實驗之前，先利用掃描式電子顯微鏡(SEM)拍下(圖 4-5)，來作實驗的對照組。



圖 4-3 固定化螢光珠之全反射圖

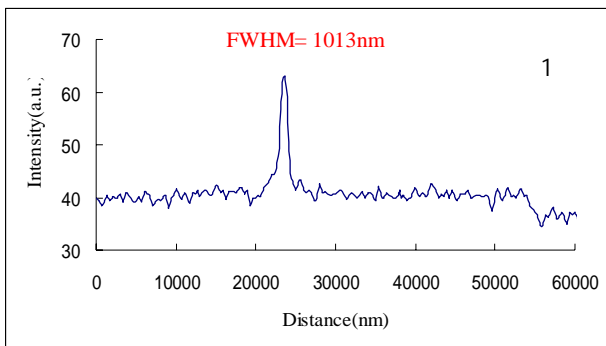


圖 4-4 螢光珠 FWHM 分析圖

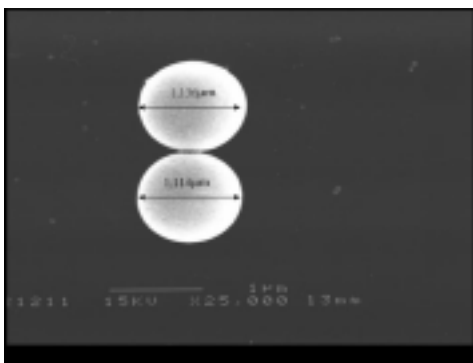


圖 4-5 螢光珠之 SEM 圖

分析結果顯示，在全反射圖中，經三個點分析平均值為 $1.146 \mu\text{m}$ ，而在 SEM 圖中螢光珠的平均直徑為 $1.125 \mu\text{m}$ ；與廠商所提供的資料 $1.1 \mu\text{m}$ ，標準差為 2.5% 作比較，其誤差值分別是 1.9% 與 4.2%，顯示全反射螢光顯微鏡的確有能力可作橫向尺寸的量測。然而，受限於光學的解析度(約 200nm)的限制，雖仍可偵測到螢光訊號，但真實的橫向尺寸就已經很難辨認。

粒子即時偵測與影像分析

微小粒子的即時偵測是全反射螢光顯微鏡的強大功能，配合影像處理軟體，可對粒子在加電壓後其動態運動的偵測，並且可分析粒子的運動軌跡，以及其運動速率等。在實驗中，在流道兩端加電壓，觀察微粒子的運動狀態，利用 CCD 以 33 微秒(每一秒鐘擷取 30 個畫面)的擷取速度，拍下其動態變化，如圖 4-6 所示。從圖中可以觀察到，相對於參考點，螢光珠從圖右上角移動至左下角；並且其螢光強度從弱轉強，再從強轉弱，這是因為螢光珠漸進入漸逝波的激發範圍裡，此後又漸漸離開，又根據螢光強度與界面距離 z 有關，可以就著螢光強度的不同，推算螢光珠距離界面的不同位置。

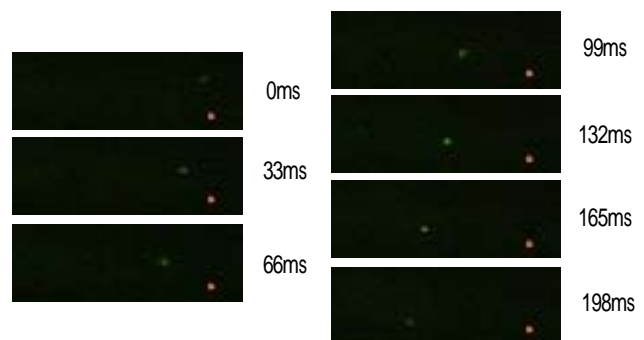


圖 4-6 螢光珠受電壓驅動後在每一時間位置變化圖

利用影像處理軟體中，追蹤粒子軌跡的功能(圖 4-7)，可以得到粒子在每一時間的位置，以及每一時間的速度，如圖 4-8

所示。然而，粒子運動軌跡追蹤的探討，對於蛋白質分子加電壓後，所產生的行為變化，便顯得相當重要。例如，蛋白質分子因所加電壓改變，可藉此功能得知其運動行為，並討論蛋白質的電性特性，以及蛋白質分子間之鍵結作用等。



圖 4 - 7 粒子運動軌跡追蹤

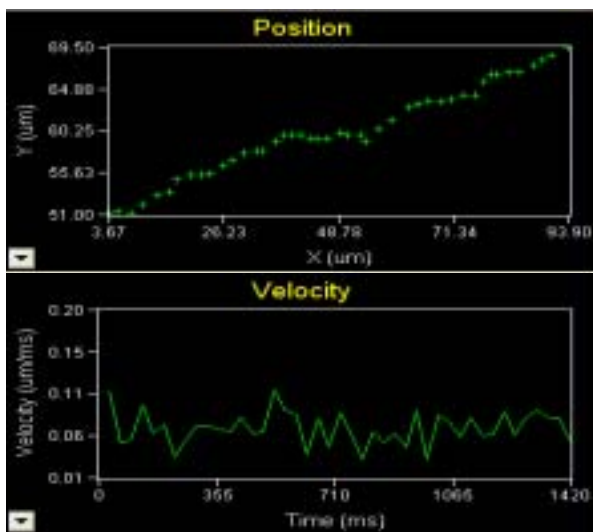


圖 4 - 8 粒子軌跡追蹤位置圖與速率圖

五、結論

本研究成功地以物鏡式的架設法完成全反射螢光顯微鏡的架設。從原理到每一個元件的設計選用，並配合冷卻式的 CCD 攝影機以及生物界常用的影像軟體 (Metamorph)，使整個系統卻是有即時偵測的功能。以高訊號背景比測試，證明系統的確架設成功；並成功地對 $1.1\mu\text{m}$ 螢光珠進行量測，驗證系統有橫向尺寸測量的功

能；再者對於在被加電壓的單粒子之動態偵測與追蹤，在位置與速度上都能計算出來，顯示全反射螢光顯微鏡的確有對單分子偵測與分析的能力。

六、參考文獻

- [1] <http://www.digitalgene.com.tw/bioapplication.htm>
- [2] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, and T. Yanagida, "Single-Molecule Imaging of RNA Polymerase-DNA Interactions in Real Time," *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 709-715, 1999.
- [3] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Salto, and T. Yanagida, "Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single myosin Molecules in Aqueous Solution," *Nature*, vol. 374, pp. 555-559, 1995.
- [4] Y. Ishii, and T. Yanagida, "Single Molecule Detection in Life Science," *Single Mol.*, vol.1, pp. 5-16, 2000.
- [5] M. Oheim, and W. Stühmer, "Tracking Chromaffin Granules on Their Way Through the Actin Cortex," *Eur. Biophys. J.*, vol. 29, pp. 67-89, 2000.
- [6] J. Schmoranzner, M. Goulian, D. Axelrod, and S. M. Simon, "Imaging Constitutive Exocytosis with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy," *J. Cell. Bio.*, vol. 149, pp. 23-32, 2000.
- [7] S. Nishida, Y. Funabashi, A. Ikai, "Combination of AFM with TIRFM for

Nanomanipulation of Single Cells,”
Ultramicroscopy, vol. 91, pp. 269-274,
2001.

- [8] P. L. Edmiston, J. E. Lee, L. L. Wood, S. S. Saavedra, “Dipole Orientation Distributions in Langmuir-Blodgett Films by Planar Waveguide Linear Dichroism and Fluorescence Anisotropy,” *J. Phys. Chem.*, pp. 775 – 784, Jan 1996.