

掃描式探針顯微鏡於生物樣本的量測與應用

顯微鏡的發明有助於人們對微小物體結構的觀察，傳統上常用來觀察生物樣本之分子級或細胞級結構的方法，大都採用電子顯微鏡法。在處理適合電子顯微鏡觀測的樣本時，需經固定、切片、脫水、鍍金等步驟，但一般生物樣本在正常生理狀況下是富含水份的，若經這些步驟，將會使生物樣本原本的形狀、尺寸或結構產生變化，而所量得的影像將不再是生物樣本真正的形態。掃描式探針顯微鏡 (SPM) 具有高解析率與在液相操作的能力，使生物樣本在正常生理環境下不需經前處理也能被觀測，此優點使 SPM 逐漸被應用在生物樣本的量測上。特別是在此政府大力推行各項的奈米計畫 (主要分奈米電子、奈米材料、奈米生物、奈米檢測與設備開發四大主題) 之際，SPM 其簡便性與原子級解析力實為觀測奈米結構的利器，將在奈米生物領域之研究中獨領風騷。本文將對 SPM 的基本原理、常用在生物樣本量測的功能與目前實際在生物樣本之表面微觀或微小特定部位力學相關之量測時的應用，作一

吳靖宙、張憲彰

一、緒論

可藉以描述表面微結構之量測儀器的發展，關係到人類對生物樣本的認識程度。早在 17 世紀虎克發明了第一台的光學顯微鏡 (optical microscope)，觀察到植物細胞的構造，並經過長久的光學發展，可以將生物樣本的結構看得更清楚。其後再藉助電腦與壓電掃描器製作技術的進步，更有共軛焦顯微

吳靖宙先生現為國立成功大學醫學工程研究所博士候選人。

張憲彰先生為日本國立東北大學化工博士，現任國立成功大學醫學工程研究所教授。

鏡 (confocal microscope) 的發明，大大提升了光學顯微鏡在 Z 軸上的解析度，且配合螢光染色技術可對細胞膜上或胞內的分子做定性與定量上的量測，但其解析度仍受到 Abbe 障礙 (Ernst Abbe, 1840 - 1905, 解析度為觀測光源波長之半) 的限制，只能達到 $0.2 \mu\text{m}$ 。此光學的極限在 1934 年 Ernst Ruska 發明了以電子束為光源的電子顯微鏡才得以解決，並得以擷取許多極微觀世界的資料與分子結構的觀察。但這種必須以一次電子穿透 (穿透式電子顯微鏡，TEM) 或二次電子反射 (掃描式電子顯微鏡，SEM) 的顯微技術，須透過將試樣乾燥後鍍金甚至切片的前處理後，置於真空中才能觀

	Resolution X, Y	Resolution Z	Circumstance	Pretreatment	Magnification required
Optical Microscope	0.2 μm	1 μm	air, liquid	none	10^3
Confocal Microscope	170 nm	500 nm	air, liquid	none	10^4
SEM	2 nm	N/A	vacuum	hard, drying, coating	10^7
AFM	0.1 nm	0.01 nm	air, liquid, vacuum	none	10^9

表 1.
四種主要顯微鏡對表面量測的
特性比較。

測，顯然這樣的試片製備程序在在會破壞生物樣本
的原有結構，而無法得到生物樣本在含水狀態下的
真實特性。

到了 1980 年初期，掃描式穿隧電流顯微鏡
(scanning tunneling microscope, STM) 的發明則將顯
微鏡的解析度提高到原子等級，其後更有利用原子
間作用力呈像的原子力顯微鏡 (atomic force
microscope, AFM) 被發明，由於 AFM 具有可在液
相、氣相中操作，且樣本不需複雜前處理的特性，
被廣泛的應用在生物樣本型態學的研究，且其力學
量測的功能更被視為量測軟組織或分子間機械特性
的利器。近年更有多種利用不同原理開發出來藉以
評估樣本表面電性與磁性分布的顯微鏡問世，這些
利用探針掃描樣本表面的顯微鏡都統稱為掃描式探
針顯微鏡 (scanning probe microscope, SPM)。表 1
列出四種主要顯微鏡對表面量測的特性比較。

二、發展歷史

最早被發明的 SPM 儀器是 STM，其設計的概念
早在 1979 年由 IBM 公司的 Binnig 和 Rohrer 提
出，並在 1982 年付之實現，其原理是利用探針與
導體間的穿隧電流來做呈像訊號，利用這儀器可在
一般空氣中得到原子級的解析度，此發明亦打開了
樣本表面原子排列研究之門，他們兩人也因為此貢
獻得到了 1986 年的諾貝爾物理獎。由於 STM 應用
的是穿隧電流，所以樣本必須為導體才能量測。其
後為免除樣本僅止於導體的限制，1985 年 Binnig、
Quate 和 Gerber 發明了 AFM，其原理是利用一極
柔軟懸桿上探針與試片之間微小的原子力 - van der

Waals 力 (約為數個 nN 左右) 做呈像訊號，遂使非
導體也可用掃描式探針顯微鏡來觀測。此舉非但大
大的減少樣本觀測前的處理，並可於液相中直接觀
測微觀的樣本，進而亦可用於生物樣本上的觀察⁽¹⁾。
此類的發明瓶頸大開，之後更有利用不同電性、
磁性的探針以偵測樣本表面電力或磁性變化的 SPM
被開發，一再促進了 SPM 在表面量測上史無前
例的應用性。

自 1990 年後電腦運算與控制技術的提升，SPM
更具有了原子操縱術、奈米級的微影蝕刻術與奈米
結構製作等功能，更開闊了 SPM 應用的範圍。

三、呈像原理

SPM 中被應用最廣泛的是原子力顯微鏡，許
多其他功能的 SPM 儀器大都架構在 AFM 原理之
基礎上，以下就 AFM 的基本原理與呈像模式作一
簡介。

1. 基本原理

根據 Lennard-Jones pair-potential energy
function 的描述，原子之間的位能與原子間距離呈
現著如下的關係⁽¹⁾。

$$E^{\text{pair}}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

ϕ ：原子直徑

r ：兩原子間距離

ϵ ：電容率

圖 1. 兩原子間的距離與相對位能的關係圖。凡得瓦力隨兩原子之間的距離而改變，當兩原子的電子雲互相接觸時會產生排斥力，當距離拉遠時，會因彼此的電子與原子核相吸而產生吸引力。

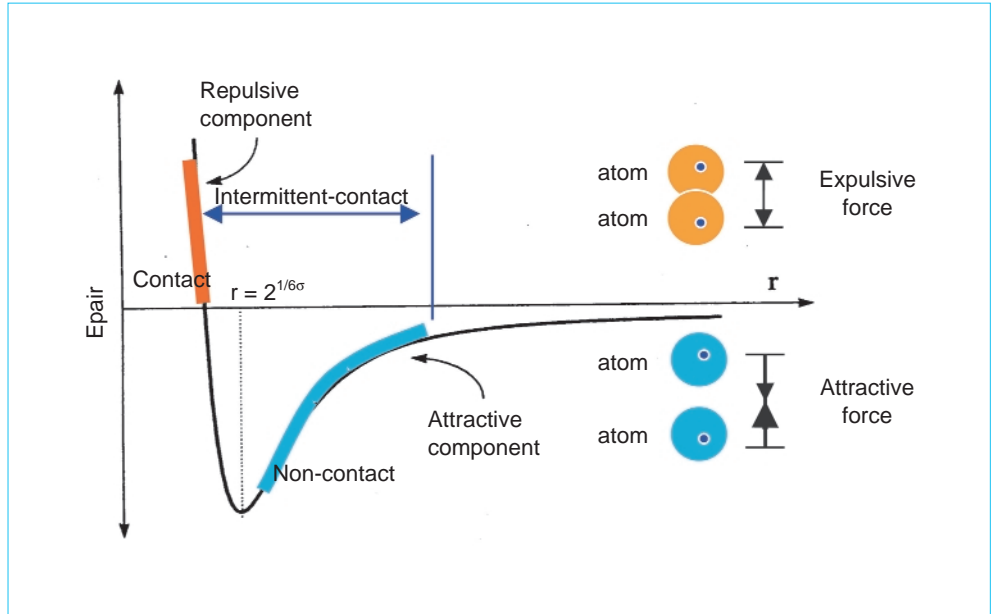
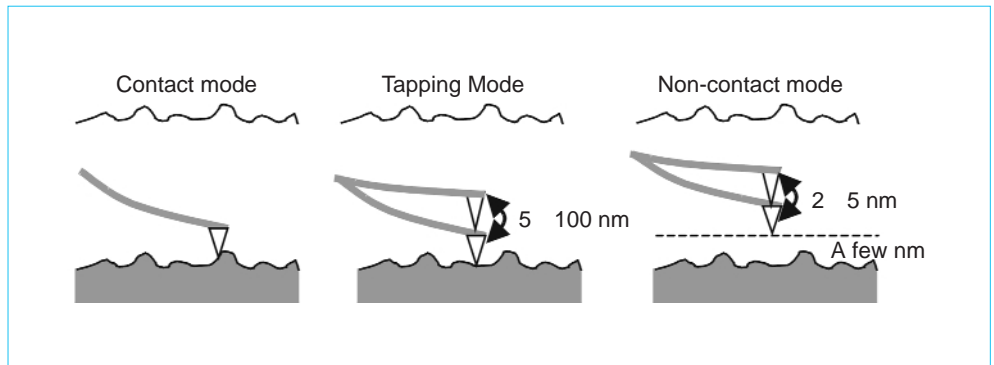


圖 2. 原子力顯微鏡操作模式示意圖。



其兩原子間的距離與位能的關係圖如圖 1 所示，利用原子間的吸引力與排斥力的作用，可得三種基本的操作模式^(2,3)。

- (1) 利用原子斥力的變化而產生表面輪廓的稱為接觸式 (contact mode)，探針與試片的距離約為數個 Å，其能量的大小主要與原子間距倒數的十二次方成正比。
- (2) 利用原子吸引力的變化而產生表面輪廓的稱為非接觸式 (noncontact mode)，探針與試片的距離約為數十個到數百個 Å，其吸引力的大小主要與原子間距倒數的六次方成正比。
- (3) 若使懸桿產生上下擺動輕拍於樣本表面，並藉由振幅的改變而呈像的稱為輕觸式 (tapping mode)，由於受到吸力與斥力的交互作用，也稱

為間歇接觸模式 (intermittent-contact mode) 或半接觸模式 (semi-contact mode)。其不同操作模式下探針掃描樣本表面的示意圖如圖 2 所示。

2. 系統架構

接觸式原子力顯微鏡的呈像原理如圖 3 所示，我們可將系統區分成三個部分：(1) 原子間作用力感測器 - 懸桿 (cantilever)，感測懸桿尖端的原子與相對應在樣本表面原子之間的作用力；(2) 懸桿偏移量感測器，主要由光學式雷射對焦系統與位移敏感的感光二極體 (position sensitive photo-diode, PSPD) 組成；(3) 位移掃描系統，由回饋線路與壓電晶體掃描器 (piezoelectric scanner) 所組成。

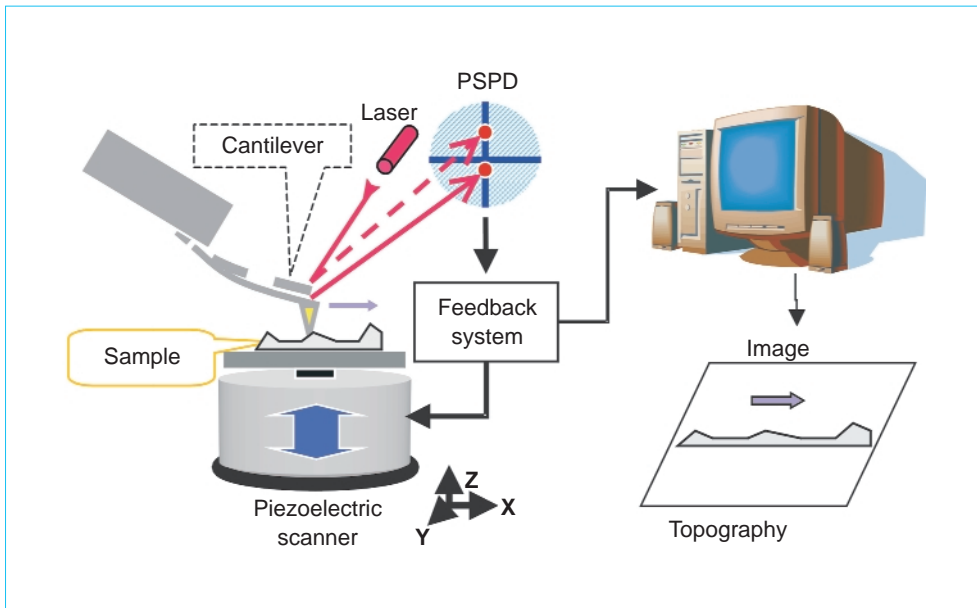


圖 3. 原子力式顯微鏡呈像架構示意圖。

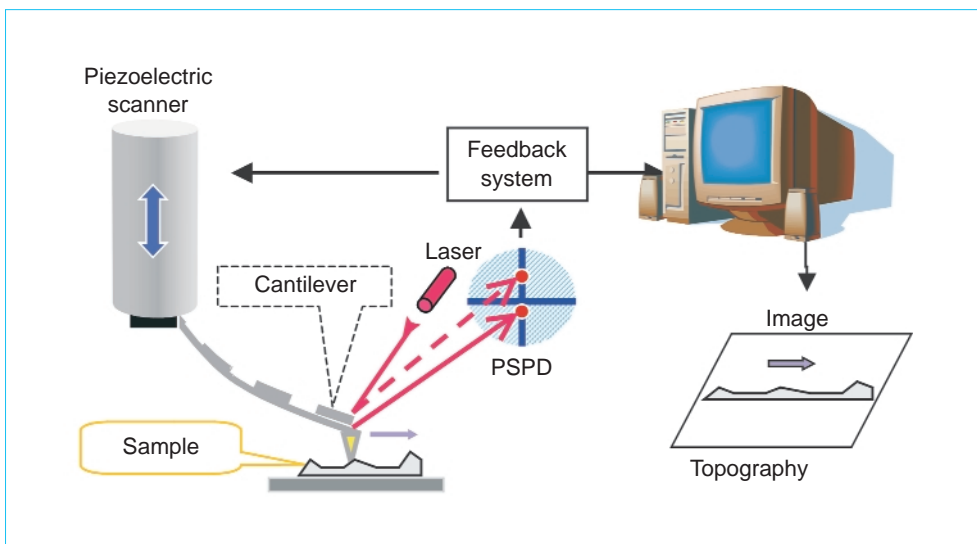


圖 4. 原子力顯微鏡懸吊式的架構圖。

在 SPM 的操作中，起先調整雷射光使之聚焦在懸桿的背面，然後調整 PSPD 的位置使反射光點投射至 PSPD 的中心，當開始掃描後，懸桿會因尖端的原子與樣本間所產生的原子作用力（排斥力或吸力），隨著輪廓的改變而上下移動，使反射的雷射光束改變其角度，並藉由 PSPD 感測雷射光束的偏移量。經 PSPD 傳遞變動的訊號至掃描器，掃描器為一壓電晶體的裝置，藉由施加的電壓訊號回饋壓電晶體的位移，使懸桿的施力維持固定，系統並利用此電壓訊號呈像。

在架構上依掃描器與懸桿附著的位置，可分為底置式（如圖 3）與懸吊式（suspension model）（如圖 4）。在底置式設計中，懸桿量測部分與掃描器是分開的，具有較高的儀器穩定性，可做到原子級的量測，但由於樣本需置放在掃描器上，所以樣本有重量與大小的限制。懸吊式則將量測用的懸桿附著於掃描器，由掃描器帶著懸桿進行掃描的動作，使量測雜訊較底置式的大，但樣本是置放在載台上，適合大樣本或液相中的量測。

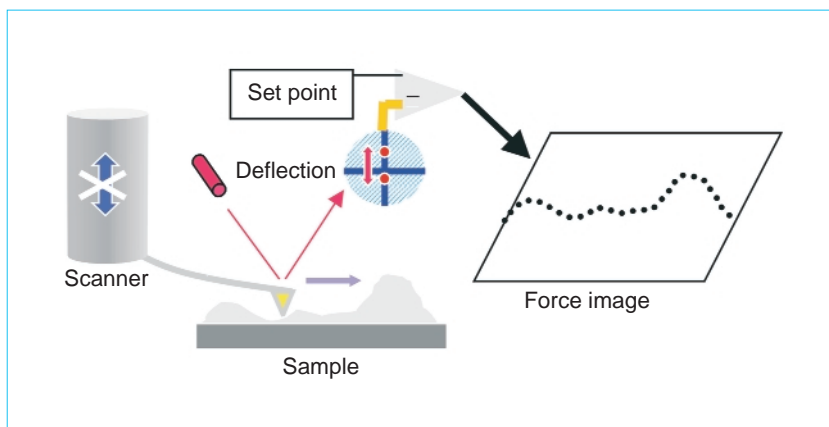


圖 5. SPM 定高模式於表面輪廓量測的架構圖。

四、SPM 常用在生物樣本上的功能

1. 表面輪廓的量測

(1) 定力模式

定力模式 (constant force mode) 也就是使探針與樣本表面的作用力維持恆定的模式。其架構如圖 4 所示，當開始掃描時，懸桿會因樣本表面輪廓的改變而產生偏移，使反射雷射光束改變在 PSPD 上的位置，之後經 PSPD 與回饋系統傳遞變動的訊號至掃描器，使掃描器利用延展與縮回的動作，維持探針與樣本間作用力恆定，利用此回饋訊號呈像的圖稱為地形 (topography)。此模式適合具有較粗糙表面樣本的觀測。

(2) 定高模式

定高模式 (constant height mode) 架構如圖 5 所

示。使掃描器主要做 X、Y 軸的移動而不做 Z 軸的回饋運動，此時探針會以固定的高度掃描樣本，懸桿會因樣本的高低起伏產生不同的偏移量，使反射雷射光點在 PSPD 上的訊號與設定點 (set point) 之間產生差異值，利用此訊號而得的影像稱為誤差訊號影像 (error signal image) (Park Scientific Instruments Corp., PSI) 或懸桿力影像 (force image) (NT-MDT) 等。由於掃描器沒有 Z 軸上的運動，所以量測系統的穩定度較定力模式好，較適合進行需高解析度或平滑樣本表面的微小變化觀測。

2. 力學特性的量測

(1) 定性分析

側向力顯微術 (lateral force microscopy, LFM)

當探針的尖端掃描樣本表面時，樣本表面的摩

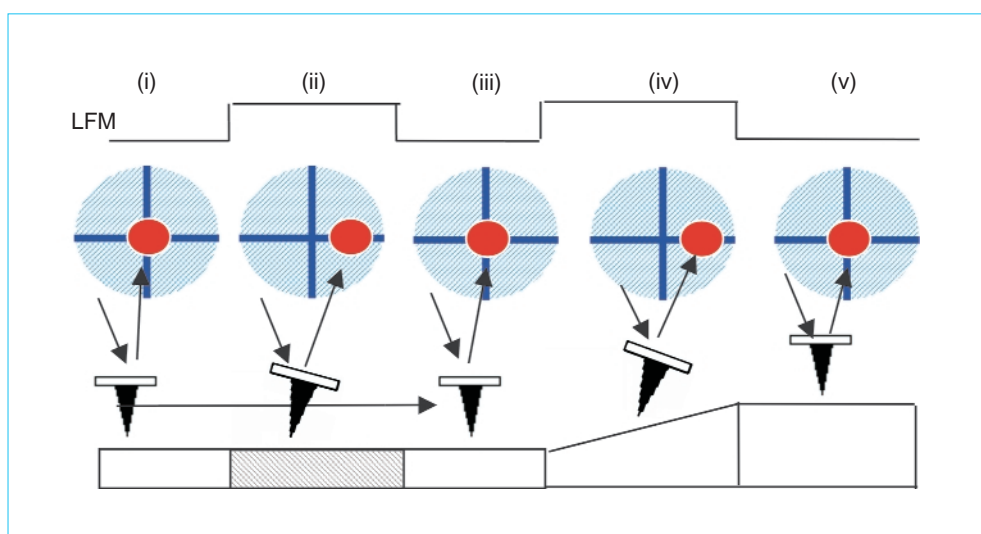


圖 6. LFM 呈像原理示意圖。

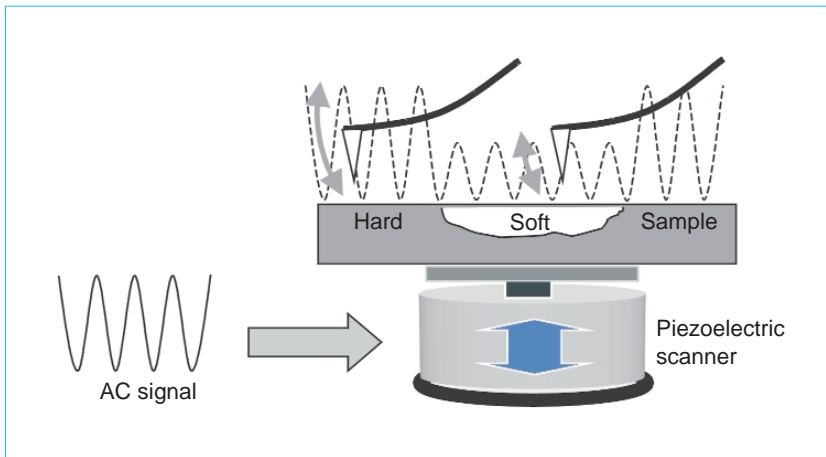


圖 7. FMM 呈像原理示意圖。

擦係數或樣本高度改變時，會使探針做左右方向的擺動，利用四象限的 PSPD 追蹤與紀錄，可測得反射光束在 PSPD 上的左右偏移量。此模式可應用於樣品結構成份區分、表面潤滑特性分析、表面摩擦力量測等等。量測模式如圖 6 所示。⁽⁴⁾

力調變顯微術 (force modulation microscopy, FMM)

如圖 7 所示，SPM 在接觸模式的操作下，施加一 AC 訊號至掃描器，使掃描器產生一小的振盪，再量測探針掃描樣本表面時的振幅。在材料較硬的區域，所得振幅較大；在較軟區域，由於探針尖端可能會沒入樣本表面和懸桿振盪能量的消散，致使振幅較小。此模式可應用於材料結構成份區分或材料彈性係數的定性分析等。

相位差顯微術

SPM 在輕觸式的操作模式下，透過貼於探針上壓電片的振盪，使懸桿在一已知共振頻率下，以固定的振幅掃描樣本表面，當經過不同黏彈特性的區域時，其懸桿擺動的相位會產生偏移，經過相位鎖定偵檢器可測得相位差的變化量，利用此相位差訊號而呈像的稱為相位差顯微術 (phase image microscopy)，可應用於材料成份區分及表面黏彈性的定性分析等，如圖 8 所示。

(2) 定量分析

力 - 距離曲線 (force vs. distance curve, force curve) 的量測

當掃描器只做 Z 軸上下運動 (圖 9(a))，記錄懸

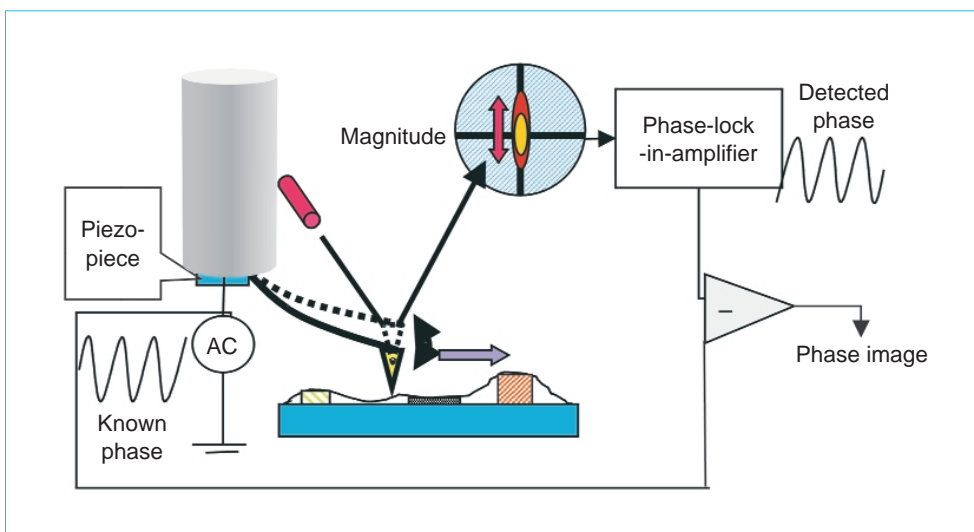
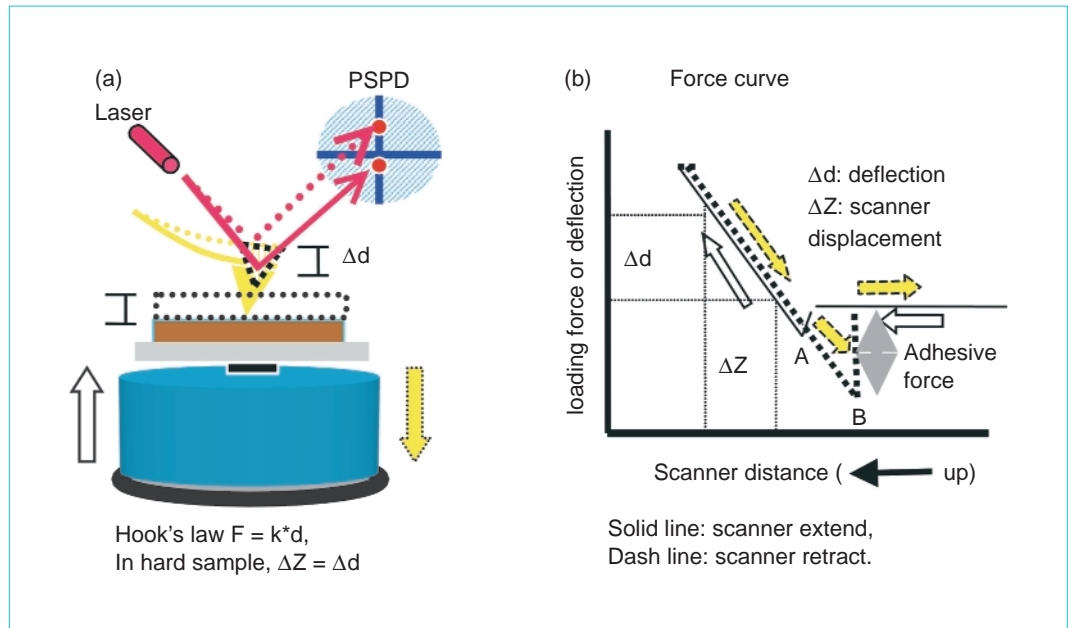


圖 8. 相位差顯微術的呈像原理示意圖。

圖 9. 力 - 距離曲線的量測示意圖。(a) 力 - 距離曲線量測架構圖, (b) 力與距離之間的關係。



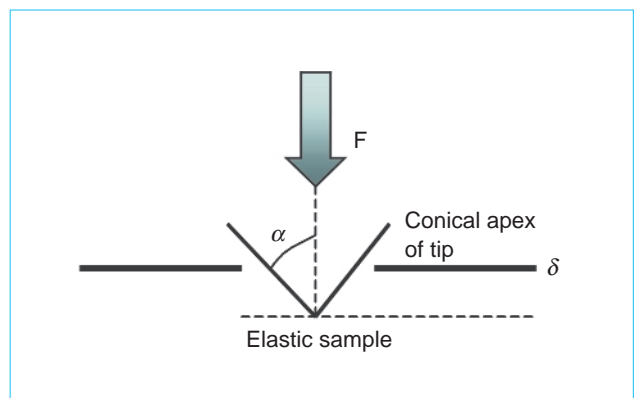
桿的垂直方向偏移量與掃描器移動距離之間的關係圖，稱為力 - 距離曲線 (force vs distance curve, force curve)，如圖 9(b) 所示。在氣相中當掃描器往上移動時，懸桿與樣本的距離縮短，但彼此間未接觸，所以受力為零。當距離小至某一程度時，樣本上的自然水層因毛細現象產生一吸引力，使懸桿下彎，所記錄到的懸桿偏移曲線就因此呈下降狀，此點為圖 9(b) 中的 A 點，也稱為折入點 (snap-in point)，此時懸桿與樣本呈接觸狀態。當掃描器愈往上升，懸桿所受的排斥力就愈大，懸桿向上偏折的彎曲度也愈大，所以紀錄到上升的曲線。當掃描器往下降時，懸桿的受力也會下降，但由於壓電晶體的遲滯現象，使得受力上升與下降曲線產生偏離。待掃描器下降超過懸桿受力總和為零位置時，若樣本對探針的吸附力大於懸桿彈性恢復力，懸桿的尖端還會黏著在樣本的表面，此時力的總和為吸附力。若掃描器繼續往下降，懸桿的彈性恢復力大於表面附着力時，懸桿會彈離物體表面，回復至原先狀態，此點為圖 9(b) 中的 B 點，也稱為折出點 (snap-out point)。由 B 點到懸桿受力為零之間的力，可算出樣本與懸桿尖端之間的吸附力。

當樣本相對於懸桿彈性無限硬時，掃描器向上移動的距離應等於探針的偏移量， $\Delta Z = \Delta d$ 。若樣本相對於探針較軟時，探針向上的偏移量會小於掃

描器向上的移動距離，此時探針會沒入樣本內，其沒入的厚度以 δ 示之， $\delta = \Delta Z - \Delta d$ 。樣本的彈性不同時， ΔZ 與 Δd 之間的比率也會不同。當樣本愈柔軟，則 Δd 愈小於 ΔZ ，若樣本愈硬時， Δd 愈接近於 ΔZ 。其樣本的楊氏係數可利用 Hertz model 或 Sneddon model 計算出^(5,6)。

$$F = \frac{2E \tan(\alpha)}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2$$

F : loading force, δ : indentation
 E : Youn module of sample,
 ν : Poison ratio (~0.5)
 α : half cone angle of tip



力曲線容積顯微術

可定量樣本彈性或探針和樣本間吸附力的量測法，如圖 10 所示⁽⁷⁾。力曲線容積顯微術 (force volume mapping microscopy) 是將影像掃描時的每一點 (pixel) 都做力 - 距離曲線的量測，藉由計算力 - 距離曲線中接近曲線 (approach line) 的斜率變化量，得知掃描器移動距離與懸桿施加的力量，並配合 Sneddon model 函數計算，可得到樣本被掃描區域每一點的彈性係數。若探針與樣本表面具有特異性的吸附力時，則可計算力 - 距離曲線中縮回曲線 (retract line) 的吸附力變化，而得樣本每一點與探針間吸附力的大小。

五、SPM 在生物樣本的應用

1. 影像量測於型態學的研究

傳統的光學顯微鏡裡雖然可以看到物體的型態，但給的是二維的影像，所以無法得知物體的高度。然而 AFM 的原理是在物體的表面掃描，因此可獲得影像上每一點的高度值，經由積分的结果我們可以算出物體的體積，再由體積的計算來判定物質的特性，例如我們可以計算細胞在乾燥的情況以及在生理環境中 (液態中) 的體積差別來了解水分對細胞的體積有多大的影響，另外也可以依物質的體積來區分他們的種類，例如染色體的判定⁽⁸⁾ 等。

(1) 分子級的觀測

欲使用 AFM 觀察分子級的生物樣本時，基盤

平整度就相對的重要，因為當觀察如此細小的樣本時，若基盤的粗糙度過大，則無法清楚分辨出樣本與基盤間高度的差別。目前常被使用來觀測分子級結構的基盤為雲母 (muscovite mica [(KAl₂(OH)₂AlSi₃O₁₀)] 與高方向性的熱解石墨 (highly oriented pyrolytic graphite, HOPG)⁽¹⁾。目前 SPM 被使用在多種生物質上的觀測，常見的有 protein、DNA、RNA、chromatin、chromosomes 與 polysaccharides 等，下面就 SPM 在蛋白質與 DNA 的量測技術與發展分別介紹之。

蛋白質

使用 AFM 來觀察分離的微小分子是極富挑戰性的，因為需要一個具原子級平整度的材料來當樣本的附著。學者 Lin⁽⁹⁾ 於 1990 年發表以雲母為基盤在磷酸鹽緩衝液生理食鹽水 (phosphate-buffered saline) 中即時觀測免疫球蛋白 G (immuno-globulin G, IgG) 的吸附狀況，他們發現當只有單一的 IgG 分子吸附時，此分子容易脫落，當很多 IgG 分子聚集在一起時，他們之間因有分子間的側向交互作用力的關係會形成一層不易脫落的 IgG 層。但因為樣本與基盤都沒有經過處理，故較不易有很緊密的吸附。III 研究群⁽¹⁰⁾ 利用基因遺傳工程將 IgG₁ 之 COOH 端加上金屬螯合肽 (metal-chelating peptide, CP = His-Trp-His-His-His-Pro)，形成 IgG₁-CP，另外在雲母基盤以氯化鎳溶液 (nickel-chloride solution) 處理過，使 IgG₁-CP 可以有高方向性且穩固的吸附在雲母上，這是利用五個氨基酸序列

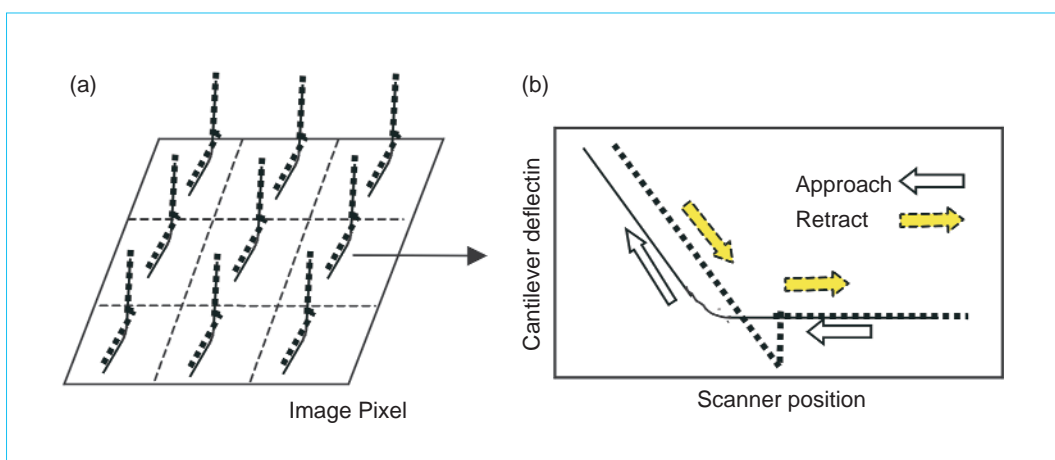


圖 10. 力曲線容積顯微術的量測示意圖。(a)全影像的每一點做力 - 距離曲線的量測，(b)在呈像時所相對應某一點的力 - 距離曲線量。

(His-Trp-His-His-His) 對鈷或鎳金屬具有良好的吸附特性，來解決液相中觀測 IgG 的方法。另外以親疏水性的結合法也是固定樣本的方法之一，Droz 等人⁽¹¹⁾ 於 1994 年發表了親疏水性固定樣本的評估，首先，疏水性的 HOPG 經火花放電 (glow-discharge) 處理後，使表面氧化增加了表面的親水性，使 IgG 親水性的部分可固定在 HOPG 上得以觀測，經 AFM 以不同接觸力大小的掃描結果證實吸附的能力加強。

Warkentin 等人也研究了 albumin、IgG 及 fibrinogen 等在不同的表面 (不同親疏水性程度) 的吸附情形⁽¹²⁾。除了親疏水性的結合之外，化學性的結合也是可行之道。Walivaara 等人研究經甲基化物處理的矽表面來看 IgG 的凝集情形⁽¹³⁾，他們使用 tapping mode 來研究 IgG 的水溶液於經 dichlorodimethylsilane 處理過的矽表面吸附情形，結果證實凝集情況與表面的甲基化 (methylation) 程度及 IgG 的濃度有關。除了使用在抗體抗原上的觀察外，SPM 也被用在細胞外基質結構上的觀測，如 Miyagawa 等人使用 AFM 觀測氣相中膠原蛋白纖維 (collagen fibril) 上的 D-period 超微結構⁽¹⁴⁾，而 Feninat 等則觀察膠原蛋白薄膜經磷酸處理後，表面被蝕刻的情形⁽¹⁵⁾。

DNA

早在 1984 年 Binnig 和 Rohrer 便以 STM 看到 DNA 的影像，當時是將 DNA 塗覆矽晶片 (Si wafer) 上⁽¹⁾，之後 Lindsay 等人於 1989 年發表使用 AFM 得到 DNA 影像⁽¹⁶⁾。很多早期的 AFM 影像雖然有足夠的解析度來顯示單獨的 DNA 分子，但是影像的再現性不好，如欲讓影像有再現性，則如前面所述的，樣本必須固定住。由於 DNA 在水溶液中具有可溶性與易懸浮於溶液中的特性，這使得 DNA 與基盤間的吸附力變小，為改善此問題，1993 年 Hansma⁽¹⁷⁾ 發表了使用丁醇 (butanol) 將 DNA 吸附在雲母上，以降低 DNA 與溶液之間的作用力。1995 他們也發現將 DNA 放在 n-propanol 中觀看時，可得到 DNA 螺旋結構 (helical structure) 比在空氣中觀察有更好的解析度⁽¹⁸⁾。此外，也可直接將 DNA 放在雲母上乾燥讓 DNA 固定住，之後

再放入水中或緩衝液中觀察。他們發現同一個 DNA 樣本在水溶液比在丙醇中觀察要來得高、寬 50 - 100%，這可能是在液相中 DNA 與探針有相斥性的靜電力作用或 DNA 含水後膨脹所致，但是量得的長度一樣 (長度只與 base pairs 有關)。此外如果事前的乾燥或烘乾不夠的話，在水溶液中觀看時，DNA 可能仍會被探針掃掉⁽¹⁹⁾。

近年來 SPM 也用在基因轉殖的相關研究上，其主題聚焦在帶正電的高分子 (如 polyethylenimine, poly-L-lysine) 與 DNA 形成的複合體 (complex) 形狀與尺寸大小的評估，如 Wolfert 使用 AFM 觀測不同分子量 poly-L-lysine 與 DNA 複合體的大小，以評估在基因轉殖的成效⁽²⁰⁾。Dunlap 等人更以 AFM 清楚的觀測到液相中 DNA 繞在 polyethylenimine 上的結構⁽²¹⁾。

(2) 細胞級的觀測

早期掃描器的工作範圍較小 (大概在 1 μm 以內)，所以進行細胞表面掃描時，往往有見樹不見林之憾，直到 1990 年後掃描器製作技術的進步，可掃描數十微米的掃描器被製作出來了，細胞級的觀測得以蓬勃發展，如紅血球、白血球、植物細胞和細菌等都利用原子力顯微鏡的觀測得到更多的資訊⁽²²⁻²⁶⁾。如 Zachee 等人利用其原子力顯微鏡的影像來研究病變的紅血球細胞⁽²⁷⁾，他們以抹片的方式分別製作正常人紅血球以及尿毒症患者的紅血球試片，後者的形態呈多棘狀，藉由影像的解析推算棘狀物的數目、體積等光學顯微鏡難以得到的資訊。

在細菌相關方面的應用有 Braga 等學者利用 AFM 觀察大腸埃希氏桿菌 (*Escherichia coli*) 細菌在經過抗生素 cefodizime 藥物作用後，細菌胞壁表面的結構變化⁽²⁸⁾。Kotra 等人則利用 SPM 高解析度的特性，觀測革蘭氏陰性菌中的大腸埃希氏桿菌表面酯多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 的大小，評估細菌經乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetate, EDTA) 處理後或與 LPS 抗體作用後，細胞壁上的 LPS 其型態的變化⁽²⁹⁾。圖 11 是本實驗室以接觸式 AFM 在空氣中觀測金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的表面輪廓圖⁽³⁰⁾，影像中的亮點代表較高的地方，暗點代表較低的地方，此菌

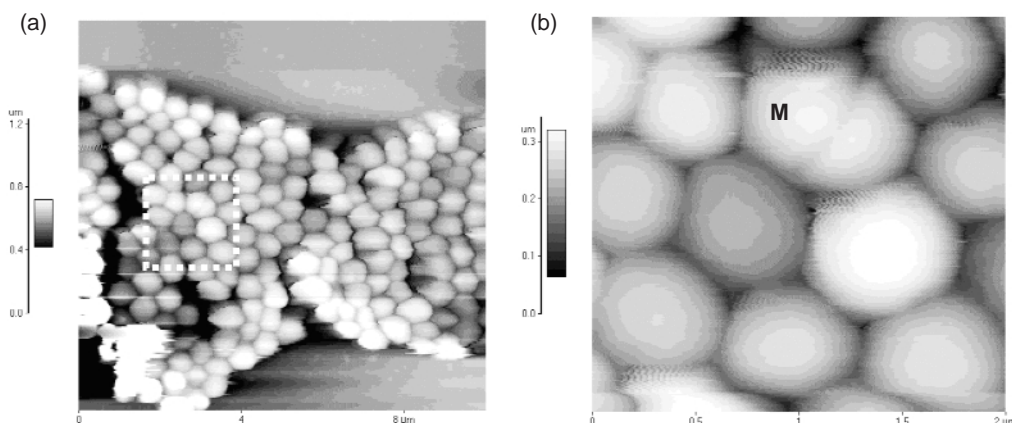


圖 11. 接觸式 AFM 在空氣中觀測金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的形狀。(b) 為 (a) 中白色方框的放大，其上標示 M 點的細菌正好在進行分裂⁽³⁰⁾。

在形狀上屬於球形，直徑大小約為 $0.8 \mu\text{m}$ 、高度 $0.3 \mu\text{m}$ 。由於 AFM 可提供樣本其高度上的資訊，有別於光學顯微鏡平面式的檢測，未來可成為微生物學家在細菌形狀辨識上更好的工具。

3. 力學上定性與定量評估

AFM 呈像的原理本來就是利用懸桿當力量感測器，透過光學系統描繪出物體表面的輪廓，若使掃描器只做 Z 軸上延展與縮回動作時，便可得到 force curve，此項功能被用做材料的彈性分析。在 J. Domke 和 M. Radmacher⁽³¹⁾ 以 AFM 的力距離曲線 (force curve) 量測不同厚度 gelatin 的研究中發現，當凝膠 (gelatin) 的厚度小於 300 nm 時，所量得的楊氏係數會隨厚度的變薄而增加，但厚度超過 300 nm 以上就不受影響，此為微小力學上的基材效應所致。其解決方法是儘量量取薄膜的上層部分做力學上的分析，或使用更軟的探針做力距離曲線，應可得到較真實的數值。此外，B. B. Akhremitchev 等人⁽⁶⁾ 提出 Sneddon equation 的校正公式，以求在有限厚度的樣本彈性量測上能更正確。另有一學者 Radmacher⁽³²⁾ 則以力距離曲線於水溶液中，實際評估細胞中不同區域的彈性特性。AFM 的力距離曲線除了能較巨觀量化受測樣本的彈性係數外，也能更微觀量測兩分子間的吸附力；學者 Lehenkari⁽³³⁾ 以非共價性鍵結的 polyethylene glycol 修飾懸桿尖端再去沾黏數種含 RGD (Arg-Gly-Asp) 的胜 或蛋白質，利用此探針來探討細胞外基質上的配體與細胞上膜的 integrin receptor (接受器) 之間的吸附力。

此外，也應用在細菌表面吸附力的量測，Fang⁽³⁴⁾ 等人使用氮化矽 (Si_3N_4) 的探針，量測細菌表面與細菌間黏膜與探針之間的吸附力與彈性。

初期的 AFM 只能進行力距離曲線的力學量測，近代的 SPM 具有 FMM 與 phase image 功能，可定性的區分樣本上不同區域內彈性與黏彈性的分布。圖 12 為本研究群利用 SPM 接觸式定力模式在生理食鹽水中對膠原蛋白的觀測之結果⁽³⁵⁾，圖 12(a) 表面輪廓圖中，白色細絲狀的纖維為膠原蛋白所組成，其底材為培養皿，且同時以 FMM 模式觀測同一試片，亮點區域代表較硬的材質為培養皿，較暗的區域為膠原蛋白纖維，但在纖維構成網狀 (network) 結構的區域 (N 區) 其亮度比單一 (single) 纖維處 (S 區) 亮，代表當纖維構成網路時，其彈性會增加。由於 FMM 只能定性的區分材料彈性的異同，若需定量得知彈性係數，則可利用 force curve 計算得知。

目前 force volume image microscopy 的技術更可將材料在影像上每一點的楊氏係數量化出來。如 Haga 研究群⁽³⁶⁾ 以此技術將活的老鼠纖維母細胞 (fibroblast, NIH3T3) 彈性分佈做成數值量化的影像，並配合共軛焦顯微鏡與螢光染色法，發現細胞骨骼中的肌動蛋白細絲 (actin filament) 是主要提供細胞張力彈性的物質。隨著此類技術的進步與應用，生物學家更能知道細胞與細胞外基材張力或彈性等物理特性因子之間的關係，且瞭解基材的特性如何影響著細胞的生長。

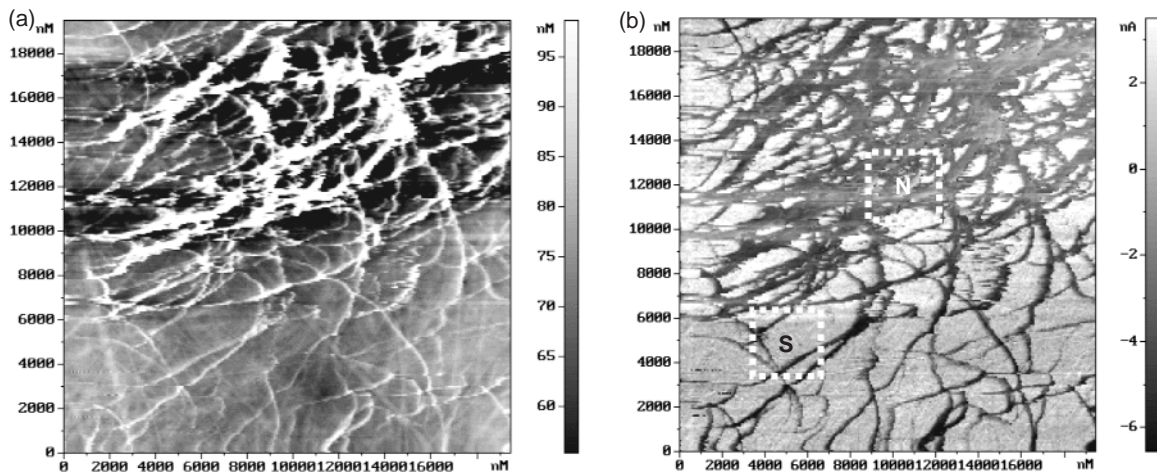


圖 12. 利用 SPM 觀測膠原蛋白的 (a) 表面輪廓圖，(b) 以力調變顯微術 (FMM) 所得的影樣⁽³⁵⁾。

六、結論

掃描式探針顯微鏡由於具有良好的影像解析度與可在液相中操作的能力，非常適合生物樣本的觀測，所得的影像接近於生物樣本真正的生理狀況，有別於傳統方式電子顯微鏡的觀測法。SPM 除提供好的影像品質外，其力學量測的能力，更可幫助了解生物結構、彈性或黏彈特性，甚至分子之間作用力的關係。此技術有助於研究學者在生理學、生物學、生物化學、生物物理學與生物微力學上的基礎研究，而本研究群也利用 AFM 的微力學量測功能，研發出一套評估含水之超薄膜（厚度小於 100 nm）的方法⁽³⁷⁾，此法可在液相中對修飾於感測器表面的薄膜辨識層，進行物理特性（如厚度、表面孔洞性、彈性等）評估，希望藉由這些特性的瞭解能有助於生醫感測器的設計與研發。

此外，近年來掃描式探針顯微鏡也結合了光學感測部分，架構成近場光學顯微鏡，使掃描式探針顯微鏡可以以光學的方式觀測生物樣本。本研究室也正著力於交流阻抗分析法的合流，期能探討細胞的貼附 (adhesion) 與展延 (spreading) 現象。基於液相中同時多情報的擷取之需要，相信在未來的生醫感測或生醫奈米以及組織工程等領域之相關研究中，將會看到愈來愈多的學者搭配掃描式探針顯微鏡，在此領域發展出更多的應用。

參考文獻

1. V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning, *Atomic Force Microscopy for Biologists*, Imperial College Press: London (1999).
2. Park Scientific Instruments Corp., *Users Guide to Autoprobe CP*, Part II.
3. B. Cappella and G. Dietler, *Surf. Sci. Reports*, **34**, 1 (1999).
4. NT-MDT Corp., *Users Guide to SPM Introduction*.
5. I. N. Sneddon, *Int. J. Engng Sci.*, **3**, 47 (1965).
6. B. B. Akhremitchev and G. C. Walker, *Langmuir*, **15**, 5630 (1999).
7. http://www.di.com/movies/movies_inhance/appnotes/forcevol/fvmain.html.
8. T. J. McMaster and M. O. Winfield, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **14**, 1438 (1996).
9. J. N. Lin, B. Drake, A. S. Lea, P. K. Hansma, and J. D. Andrade., *Langmuir*, **6**, 509 (1990).
10. C. R. Ill, V. M. Keivens, J. E. Hale, K. K. Nakamura, R. A. Jue, S. Cheng, E. D. Melcher, B. Drake, and M. C. Smith., *Biophys. J.*, **64**, 919 (1993).
11. E. Droz, M. Taborelli, P. Descouts, and T. N. C. Wells, *Biophys. J.*, **67**, 1316 (1994).
12. P. Warkentin, B. Walivaara, I. Lundstrom, and P. Tengvall, *Biomaterials*, **15**, 786 (1994).
13. B. Walivaara, P. Warkentin, I. Lundstrom, and P. Tengvall, *J. Colloid Interf. Sci.*, **174**, 53 (1995).
14. A. Miyagawa, M. Kobayashi, Y. Fujita, M. Nakamura, K. Hirano, K. Kobayashi, and Y. Miyake, *Jpn. J. Ophthalmol.*, **44**, 591 (2000).
15. F. E. Feninat, T. H. Ellis, E. Sacher, and I. Stangel, *Dent. Mater.*, **17**, 284 (2001).
16. S. M. Lindsay, L. A. Nagahara, T. Thundat, U. Knipping, and R. L. Rill, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **7**, 279 (1989).

17. H. G. Hansma and P. K. Hansma, *Proc. SPIE Int. Opt. Eng. (USA)*, **66**, 1891 (1993).
18. H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma, *Biophys. J.*, **68**, 1672 (1995).
19. H. G. Hansma and M. Bezanilla, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 505 (1993).
20. M. A. Wolfert and L. W. Seymour, *Gene Ther.*, **3**, 269 (1996).
21. D. D. Dunlap, A. Maggi, M. R. Soria, and L. Monaco, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3095 (1997).
22. H. J. Butt, E. K. Wolff, S. A. Gould, N. B. Dixon, C. M. Peterson, and P. K. Hansma, *J. Struct. Biol.*, **105**, 54 (1990).
23. S. A. C. Gould, B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, and S. Manne, *Ultramicroscopy*, **33**, 93 (1990).
24. M. Firtel and T. J. Beveridge, *Micron.*, **26**, 347 (1995).
25. A. Umeda, M. Saito, and K. Amako, *Microbiol. Immunol.*, **42**, 159 (1998).
26. L. P. Kotra, N. A. Amro, G. Y. Liu, and S. Mobashery, *ASM News*, **66**, 675 (2000).
27. P. Zachee, M. Boogaerts, J. Snauwaert, and L. Hellemans, *Am. J. Nephrol.*, **14**, 197 (1994).
28. P. C. Braga and D. Ricci, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 18 (1998).
29. L. P. Kotra, N. A. Amro, G. Y. Liu, and S. Mobashery, *ASM News*, **66**, 675 (2000).
30. C. C. Wu and H. C. Chang, in preparation (2002).
31. J. Domke and M. Radmacher, *Langmuir*, **14**, 3320 (1998).
32. M. Radmacher, *IEEE Eng. Med. Biol.*, **16**, 47 (1997).
33. P. P. Lehenkari and M. A. Horton, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **259**, 645 (1999).
34. H. H. P. Fang, K. Y. Chan, and L. C. Xu, *J. Microbiol. Methods*, **40**, 89 (2000).
35. C. C. Wu and H. C. Chang, in preparation (2002).
36. H. Haga, S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, and T. Sambongi, *Ultramicroscopy*, **82**, 253 (2000).
37. C. C. Wu and H. C. Chang, *Langmuir*, submitted (2002).