

觀察群體裡的個體行為— 單一粒子追蹤技術和應用

Observing Behaviors of Individuals in an Ensemble— The Technique and Application of Single Particle Tracking

邱長儒、楊子萱

Chang-Ju Chiu, Tzyy-Schiuan Yang

單一粒子追蹤技術獨特的地方在它能使我們親眼目睹個別分子在空間上運動的方式、行進的快慢及移動的區域範圍等，這個技術已使我們了解許多有趣的生物過程，例如分子馬達運動的方式、病毒穿透細胞膜的過程、蛋白質接收器及磷脂分子在細胞膜上運動的情形。為了能加以利用這個技術，在本文中筆者介紹這個技術的細節，包括了儀器架設、偵測上的考量及標定物的選擇，並比較不同方法的優缺點。同時以偵測磷脂質在細胞膜上擴散運動的實驗為例，介紹實驗的影像及數據處理的方法。

The peculiar aspect of the single particle tracking technique is that it enables us to visualize the temporal movements of individual molecules in space and therefore to know the type of movement, the velocity, and motional areas. This technique has illustrated many interesting biological processes such as the transportations of molecular motors, the penetration processes of a virus through cell membrane, the diffusion of protein and lipid molecules on membrane and etc. In this report, we describe the details about this technique, including the experimental setup, the detection concerns, the choices of labeling fluorophores, and the comparison of different methods. We use the experimental results of single dye tracking of lipid motions on an artificial membrane for demonstration of this technique.

一、前言

2003 年年底，美國「科學」期刊 (Science) 依慣例選出十項當年最具突破性的科學工作⁽¹⁾，單一粒子追蹤在生物上的應用名列第五。其中主要的成就包括了單一螢光染料分子偵測肌球蛋白 (myosin)

於肌動蛋白上 (actin) 的移動模式、單一量子點追蹤氨基乙酸受體 (glycine receptors) 在神經細胞膜上的運動，以及單一螢光微珠追蹤運輸蛋白 (kinesin) 在微管 (microtubes) 上的行走方式等。單一生物分子偵測濫觴於 1985 年，從以金奈米粒子做為標示生物分子的物質，演進到目前以螢光染料分子與量

子點為標定的主流，並配合上現代化高偵測效率的光學元件，使得這個方法對生物體系研究的卓越貢獻受到肯定。

生物分子本身的結構複雜，存在多樣性的動態結構，且受到環境影響。若對樣品進行群體 (ensemble) 平均的測量，無法得到分子個別狀態的變化。單一分子偵測乃是對凝態和生物樣品的非同質性 (heterogeneous)、非均勻性 (inhomogenous)、或動態非同步性 (nonsynchronization) 問題發展出來的技術。

在單分子偵測技術上，單分子光學顯微鏡除了具備空間上解析能力外，另一項很重要的優勢是動態變化的偵測能力，特別是生物分子的結構動力學以及擴散現象等的偵測。雖然光學顯微鏡的解析度受限於光繞射極限，解析能力遠不及電子顯微鏡、原子力顯微鏡等，但是光學顯微鏡因為結構簡單、具直觀的特性、對樣品破壞較小等優點，在單分子偵測領域上並未失去其重要的地位。

單一粒子追蹤是單分子光學顯微技術的一種，其運用在生物科學領域上包括生物分子馬達運動觀測^(2,3)、單一病毒入侵細胞追蹤⁽⁵⁾、膜分子於細胞膜上的擴散現象偵測^(4,6,7)等。

單一粒子追蹤最大的功用是能看清楚複雜系統內的個體行為。例如在生物體中細胞膜負責細胞與外界代謝運輸、生物訊息傳遞等生物機能運作。然而細胞膜的組成相當複雜，若進行傳統群體平均測量方式不易釐清問題的癥結，必須訴諸於單分子的觀測方法。傳統上偵測膜分子的擴散速率是利用光漂白後螢光復原技術 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)，但是 FRAP 的方法是平均數百到數千個分子的結果，實驗上的缺點包括⁽⁸⁾：

1. 實驗發現磷脂分子在真實細胞膜上的擴散係數比在人造細胞膜小 5–100 倍，推測其原因包括磷脂分子被膜蛋白、細胞骨架 (cytoskeleton) 內或細胞胞外基質 (extracellular matrix) 限制住，以及受制於流體力學作用等。有時候是上述各種變因同時作用，而各種變因的相對重要性會隨著細胞類型的不同而改變。FRAP 無法區分這些阻力，另外，人造細胞膜的螢光恢復程度可達 100%，但是真實細胞僅 25–80%。該現象代表有些磷脂分子被固定住，無法自由移動。而單分子追蹤方

法可以觀測其侷限效應。

2. FRAP 所測得的擴散係數標準偏差很大。同一個細胞內，不同區域所得到的擴散係數不一致，結果只能說明細胞膜組成的不均勻分布現象，不能說明分布不均現象的成因。

3. FRAP 實驗方法的時間解析能力與單一粒子追蹤差不多，文獻紀錄可達 5 ms⁽⁴⁾。但是單一粒子追蹤的空間解析能力優於 FRAP 約兩個數量級，可達到數個到數十奈米的解析度 (視擴散速率快慢決定，擴散較慢的運動，CCD 偵測器累積較多的光子訊號，雜訊較低，可以較準確預測分子實際位置)。所以單一粒子追蹤方法可以偵測到更細微的結構資訊，如磷脂區塊 (lipid domain) 形狀、大小分布的情形等等。

本文介紹單一分子追蹤的偵測技術，包括偵測儀器、偵測技巧，以及螢光標定物選擇等實驗概念。並以本實驗室對單一磷脂分子於人造細胞膜上的擴散現象偵測為例加以說明。

二、偵測儀器

對成分較單純的人造細胞膜上分子擴散行為的偵測，我們使用簡單的廣場偵測架構。實驗架設如圖 1 所示。實驗所使用的激發光源是二極體激發 Nd:YAG 雷射，波長 532 nm，激發功率約 10 mW。雷射光進入顯微鏡前，以焦距為 40 cm 的透鏡使樣品激發區域放大至約 3630 μm^2 (圖 1 右圖)，並以 $\lambda/4$ 波板去極化。顯微鏡頭為放大倍率 100 \times 的油鏡 (PL-APO, NA = 1.4)。螢光經由同一物鏡收光後，經過 Raman filter 與 emission filter 濾掉散射的雷射光干擾，微弱的螢光訊號最後由 CCD 接收。

單分子追蹤的光學顯微鏡偵測架構除了本文所使用的廣場式 (wide field) 外，還包括全反射式 (total internal reflection)⁽⁴⁾。比較慢的擴散運動甚至可採用高解析度的掃描式偵測方法，如近場光源顯微鏡⁽¹²⁾ 以及共焦顯微鏡等。一般比較快的運動偵測，如磷脂分子於細胞膜的擴散現象、病毒追蹤，必須使用廣場顯微鏡或是全反射式顯微鏡，直接將分子的螢光影像投影到電荷耦合器 CCD 晶片上，對螢光標定物體直接進行運動軌跡的拍攝。由於單分子的訊號很弱，偵測概念的方向如下所述⁽⁹⁾。

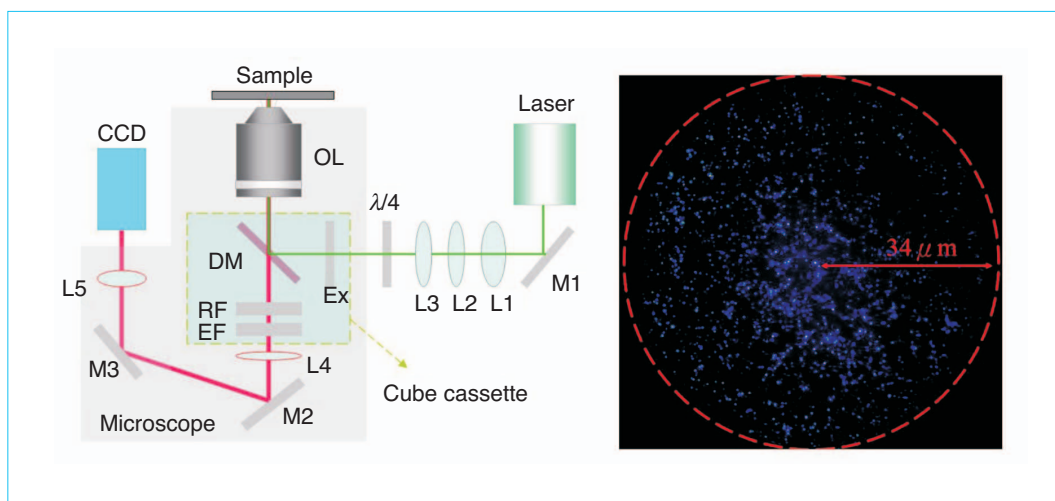


圖 1. 單分子螢光顯微鏡架構圖。顯微鏡主體為 Olympus IX70。L1 與 L2 為將雷射光擴束的鏡片。L3 為將雷射激發區域擴大的鏡片。廣場偵測範圍如右圖所示； $\lambda/4$ 為去極化波板；Ex：excitation filter；DM：dichroic mirror；RF：Raman filter；EF：emission filter；L4 與 L5 鏡片的功用是將螢光訊號投影到 CCD 晶片上。右圖是廣場影像，樣品是 10^{-10} M 的 DiI 螢光分子固定於 PMMA 薄膜中。雷射功率密度 (power density) 為 2.26×10^2 W/cm²，影像曝光時間為 300 ms。

1. 降低背景訊號

廣場偵測架構較簡單，但是背景訊號較高，改採全反射式的偵測架構可降低背景基質的曝光體積 (evanescent field 小於 100 nm)，能有效降低背景訊號的產生，但是該方法僅能觀察貼近玻片區域的現象，若要探測細胞內部區域仍必須使用其他的方法，如廣場顯微鏡等。兩種偵測方法見圖 2 所示。

另外，在真實細胞的測定中，為了避免產生來自細胞中核黃素 (flavin) 的自體螢光的產生，建議選用雷射波長大於 600 nm 當激發光源以及其相互匹配的螢光物質，來降低背景訊號。核黃素的螢光生命期為 4.5 ns，螢光物質 Cy 分子螢光生命期約為 0.9 ns，可採用時間閘影像 (time-gated image) 的技術將核黃素的訊號擋掉，增加訊號的對比。

2. 增加收集光的效率

使用高數值孔鏡 NA (numerical aperture) 的物鏡來增加收集光子的數目，因收集光子數目與 NA² 成正比，同時可得到比較好的解析度。使用高放大倍率的物鏡可放大分子的螢光亮點，可預測出較準確的位置，但是每個 CCD 矩陣單位上所得到的光

量少，訊號較弱。可選用 CCD 控制軟體來變換矩陣面積 (on-chip binning)，對訊號品質與空間解析度做調整。此外，儘量減少透鏡與反射鏡片的數目來防止光訊號的損失。偵測系統選用光損失率較小的抗反射鏡面 (antireflection coating)，每個鏡面的光損失率可降到 1% 以下。

由於大部分的螢光分子具有特定偶極方向，為了使分子在擴散運動過程中都能被均勻激發，實用 $\lambda/4$ 波板將激發的雷射極化光去極化，可降低追蹤路徑訊號停頓現象。

3. 增加偵測效率

建議使用液態氮冷卻的 CCD 來降低暗電流 (dark current)，並用高偵測效率的背照式 (back-illuminated) CCD 進行偵測。

偵測系統的總偵測效率與物鏡收集光的效率 η_o 、偵測系統中鏡片與濾光片光訊號的穿透度 η_f 、CCD 偵測器偵測效率 η_d 有關。一般而言，NA = 1.4 的物鏡 $\eta_o \sim 30\%$ ， $\eta_f \sim 50\%$ ， $\eta_d \sim 80\%$ ，總偵測效率 $\eta = \eta_o \times \eta_f \times \eta_d \approx 12\%$ 左右。所以整個系統偵測損失的最大因素為物鏡收集光的能力。

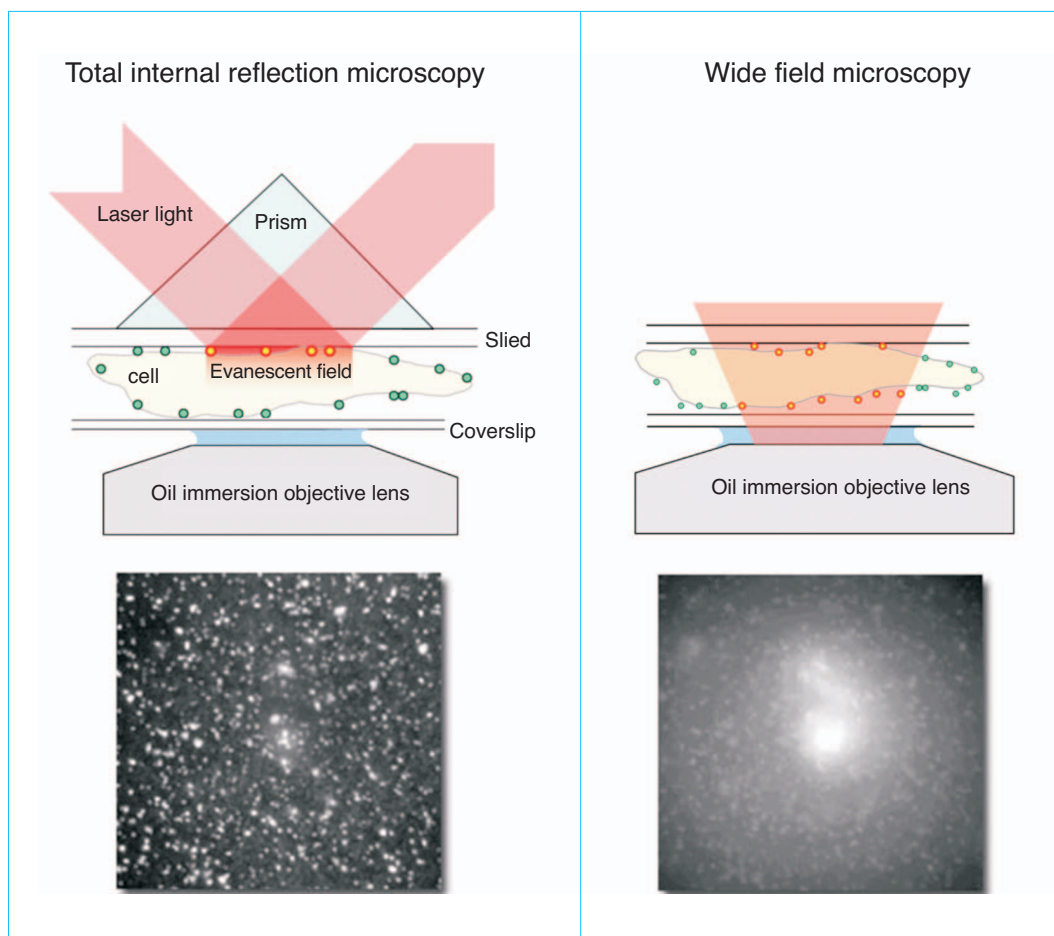


圖 2. 全反射式顯微鏡、廣場顯微鏡偵測架構比較與其偵測的效能表現。全反射式的偵測方法種類繁多，這邊所示的為稜鏡架構 (prism-type) 的全反射式顯微鏡。全反射式偵測架構僅激發 $\sim\lambda/5$ 的樣品厚度，可降低環境基質被雷射激發所產生的自體螢光 (autofluorescence)。下圖為該方法偵測螢光微球於細胞膜上的螢光影像。而廣場的偵測架構同時激發不同深度的螢光微球，造成下圖的背景訊號較高，影像對比較差。(影像資料來源：<http://micro.magnet.fsu.edu>)

三、標定物的選擇

由於大部分生物分子的螢光訊號相當微弱，除了少數分子 (如醱素分子 flavin adenine dinucleotide, FAD 本身受雷射激發能產生螢光⁽¹¹⁾)，均需額外修飾物質當作標定物才能「看」到分子。第一個測出單一生物分子的實驗係於 1985 年由 de Brabander 實驗團隊將膜蛋白標定上金奈米粒子，成功地觀測膜蛋白於細胞膜上的擴散運動⁽¹⁴⁾。1989 年時 Scheetz 實驗團隊將單顆金奈米粒子的訊號進一步運用運算分析方法，將單一粒子運動軌跡的準確度提高到數個奈米的範圍^(14,15)。

有別於螢光偵測方法，單一金奈米粒子的偵測方法是利用白光燈源對粒子進行照射。由於被白光照射的奈米粒子產生散射效應，所以分子的位置為光強度較暗的區域。這個實驗方法的優點是可做長時間的追蹤偵測，沒有螢光物光漂白的問題。該方法的缺點包括：

1. 由於產生散射效應的強度與金奈米粒子的直徑 d^6 成正比，產生足夠散射強度的最小粒徑為 ~ 15 nm，一般常用的粒徑範圍約在 30–40 nm 之間。相對於標定物體如磷脂分子大小僅數個 Å 寬，大體積的金奈米粒子可能會影響生物分子本身的擴散行為，原因是粒子受到細胞外基質作用

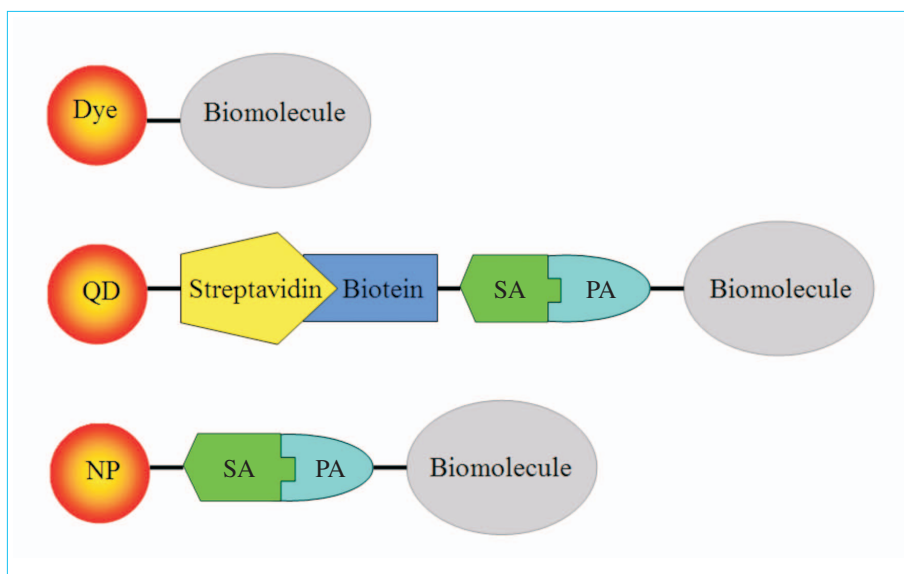


圖 3.
有機螢光分子、量子點 (QD)⁽¹⁷⁾ 與金奈米粒子 (NP)⁽¹⁶⁾ 連結生物分子的連接情形。
(PA: primary antibody, SA: secondary antibody)

與流體力學因素等。

2. 因為實驗配製關係，單一金奈米粒子表面常出現有多個欲測定的生物分子。此交聯現象會造成測量的擴散係數降低。
3. 連結金奈米粒子及生物分子的抗體 (如圖 3 所示)，與生物分子作用會影響生物分子的結構及其生物活性，如蛋白質－蛋白質交互作用的現象探討。

其他標定物質還包括高亮度的 30–100 nm 螢光微球 (fluorescent microspheres)，以及近年常使用的有機螢光染料分子與螢光蛋白質如 GFP (green fluorescent protein) 等。後兩種標定物的優點是體積小，對生物分子樣品破壞性較少，而缺點是光漂白的問題。例如 Cy3 在適當的雷射激發功率以及足夠的訊號強度下，存活時間僅 ~5 s，在這麼短的偵測時間內可能無法透露完整的訊息。如偵測單一病毒入侵細胞的機制的實驗中⁽⁵⁾，必須拼湊多個病毒的運動路徑才能得到完整實驗結果。單分子偵測的實驗，螢光標定物的特性必須符合下列條件：⁽¹⁷⁾

- (1) 螢光量子產率 (quantum yield) 大於 10%。
- (2) 消光係數 (extinction coefficient) 大於 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。
- (3) 高度光穩定性：由於單一分子偵測需要在極高的雷射電場強度 (高達 100 kW/cm^2) 環境條件，螢光分子必須具備高度光學穩定性。例如螢光

黃 (fluorescein) 分子雖然量子產率接近 100%，但光穩定差，不適用於長時間追蹤偵測。

四、螢光分子數目與體積的考量

螢光分子體積和數目越小越好，避免影響到生物分子本身的生物活性。例如在標定螢光物於蛋白質中，lysine 與 cytosine 氨基酸都有可能與 rhodamine B 產生鍵結，但是為了不影響蛋白質主體的生物活性 (例如分子的擴散係數、產成聚合體的能力)，必須萃取出標定單一個螢光分子的蛋白質作為單一生物分子偵測的實驗。

有鑑於單一有機螢光分子亮度弱與光漂白的問題，2003 年 Maxime Dahan 實驗團隊運用人造原子：量子點 (quantum dots) 當作生物分子的標定物質⁽¹⁶⁾。雖然量子點體積較有機螢光分子大 (約介於 5–10 nm)，但在適當的雷射激發強度下，發生光漂白時間長達 20 min，足夠應付長時間的觀測。另一個優點是量子點放光强度高，文獻的訊噪比高達 50 (曝光時間：75 ms)，比 Cy3 螢光分子高出約壹個數量級。所以量子點預測分子在空間位置的準確度達 5–10 nm，而 Cy3 為 40 nm。由於量子點的特性介於有機染料分子與金奈米粒子之間，利用量子點當標定物質是一個頗具有潛力的研究方向 (見圖 4)。

五、單一磷脂分子於人造細胞膜上的擴散現象偵測

1. 人造生物膜的配製

由於一般生物體內的細胞膜的成分複雜，所以在研究的初期，我們在人造細胞進行測試以簡化系統。實驗所用的細胞膜為人工製備的方式，常見的人造細胞膜 Langmuir-Blodgett (LB) 薄膜技術以及這邊所使用的小型單一雙層微包 (small unilamellar vesicles, SUV) 融合於玻片的方法來製備。人造薄膜的主成分為一般細胞含量最多的卵磷脂 PC (phosphatidylcholine)，外加極微量的 PE-rhodamine B 當作偵測追蹤物質。兩者的化學結構如圖 5 所示。樣品的配製步驟如下⁽¹⁰⁾：(1) 將 PC 與 PE 混合 (莫爾數比 = 10^8 : 1，總共 2 mg) 溶於氯仿以及丙酮的溶劑中 (體積比 1 : 1 比例混合)。(2) 通入氮氣以除去易揮發的氯仿以及丙酮溶劑，接著進一步利用凍乾方法去除殘存的溶劑。(3) 加入 1 mL 的緩衝溶液 (10 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.2)。(4) 使用脈衝式 30 mW 高功率的超音波震盪器將附著在樣品管壁的磷脂層 (lipid film) 脫附，形成粒徑約 25 nm 的單一雙層微包膜。震盪時間大約半小時，樣品顏色由原本透明無色轉變成混濁，再變回透明澄清。(5) SUV 一旦接觸到玻璃表面將立即吸附並且融合形成單一的雙層薄膜 (single bilayer)。製作方式是將 20 mL 的 SUV 樣品滴在骯髒的載玻片上，接著用洗淨過的玻片覆蓋樣品。(6) 由於一些未吸附上去的 SUV 可能殘存於玻片的樣品中，必須使用清水將樣品重複清洗多次。但是要注意樣品不可以和空氣接觸，否則生物薄膜會流失掉。

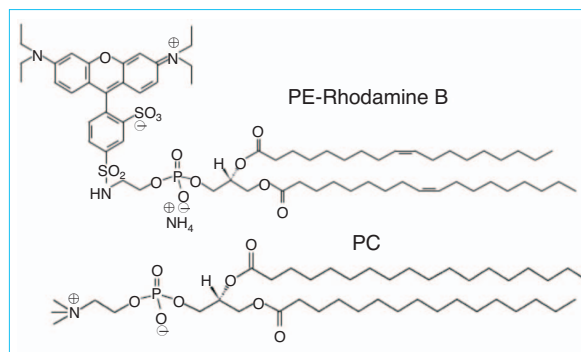
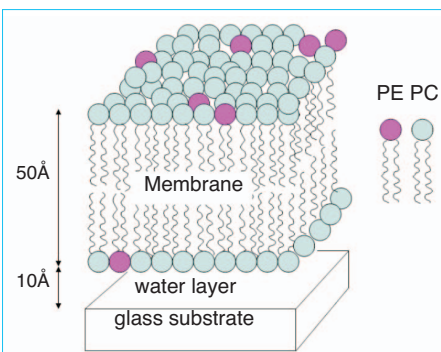


圖 5. 磷脂雙層膜示意圖與 PE-rhodamine B、PC 的化學結構。磷脂雙層膜的厚度為 5 nm，膜與玻璃基材之間間隔 10 Å 的水層⁽¹⁹⁾。

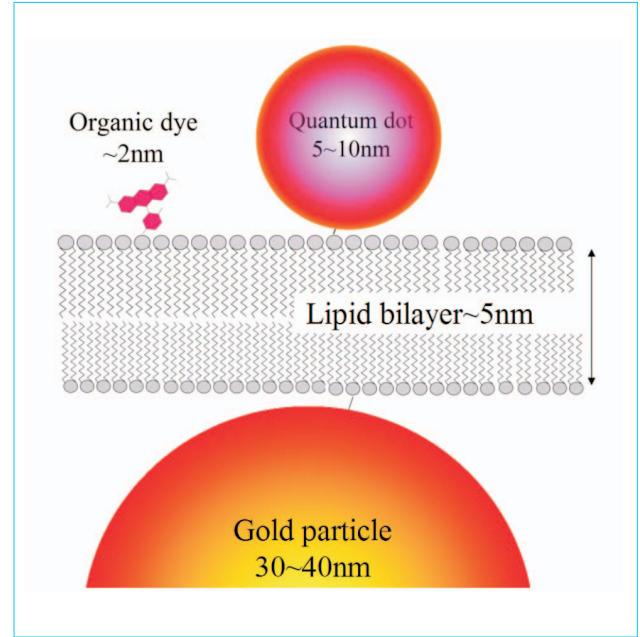


圖 4. 有機螢光分子、量子點與金奈米粒子在磷脂分子上的相對大小示意圖。

2. 實驗結果

圖 6 為單一磷脂分子追蹤影像序列圖。圖中第一張的紅色箭頭為分子擴散進入 CCD 偵測的區域內，藍色箭頭為分子光分解後消失於影像中的位置，這個分子總共存活 1.05 秒鐘。圖 7 描繪出該分子的連續擴散軌跡。

擴散係數的算法是帶入二維擴散運動公式：

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{4t}$$

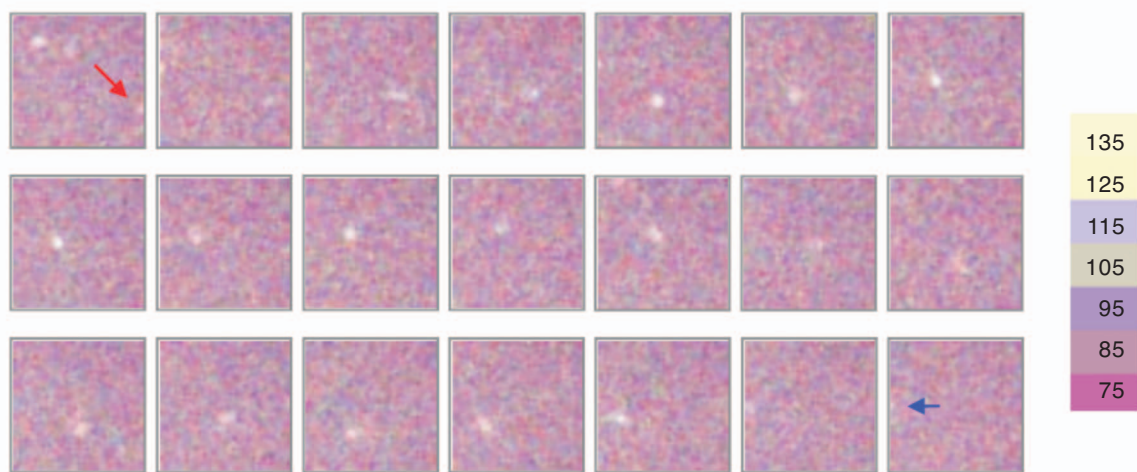


圖 6. 單一磷脂分子的影像序列圖。拍攝的時間順序由左而右，由上而下。每一張影像曝光時間為 50 ms，影像大小為 $5.9 \times 5.9 \mu\text{m}^2$ ，雷射光激發的功率密度 (power density) 為 900 W/cm^2 。螢光分子的位置從右邊移動至左邊。右邊長條圖為 CCD 像素的偵測光子數目和顏色的關係。

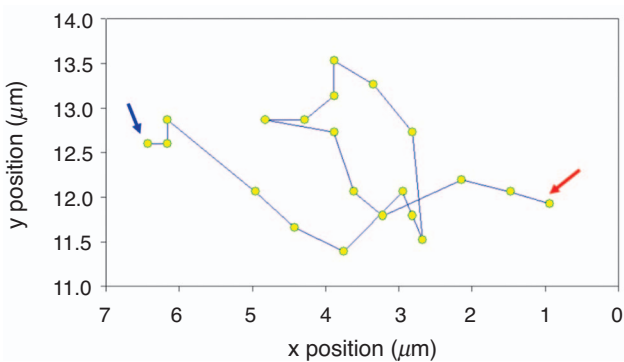


圖 7. 單一分子擴散的路徑圖。分子位置以訊號最大的 CCD 影像像素位置當分子的中心位置，而 CCD 影像對應樣品的像素大小為 134 nm。

D 為擴散係數， t 為偵測曝光的時間間隔 (50 ms)， x 為 t 時間間隔內移動的距離。實驗任意取二十個分子做路徑軌跡分析 (見表 1)，帶入公式求得擴散係數，最後得到平均值為 $2.57 \pm 0.93 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 。

Schmidt 實驗團隊曾利用 Langmuir-Blodgett 的製備方式來製作人造薄膜進行單一分子螢光的測量^(6,7)。膜的主成分為高純度的 POPC，探測分子為 rhodamine B - DOPE。該實驗對 531 個分子作追蹤得到擴散係數為 $1.42 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ，實驗的標準偏差為 $0.13 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 。與本文的實驗值相近。

表 1. 二十個磷脂分子個別的擴散係數與行走的步數。

Molecule	Steps	D	Molecule	Steps	D
#01	7	0.38	#11	10	2.69
#02	20	3.39	#12	31	2.00
#03	59	2.94	#13	11	3.56
#04	19	3.30	#14	18	3.55
#05	9	1.93	#15	19	3.23
#06	82	3.20	#16	51	1.31
#07	7	1.18	#17	17	2.46
#08	7	1.25	#18	4	2.76
#09	24	2.59	#19	7	3.18
#10	3	3.39	#20	16	3.21

目前我們更進一步利用單分子光學顯微鏡技術，偵測蛋白質在細胞膜上的運動及不同脂質在細胞膜上分布的情形，以期瞭解細胞膜上有趣的生物功能。

誌謝

感謝國立清華大學生命科學院吳文桂院長及黃維寧博士提供生物膜樣品與相關的生物知識。同時也感謝瑞士蘇黎世大學 U. P. Wild 教授、中央研究

院原子與分子科學研究所張大釗教授與國立中山大學光電研究所徐瑞鴻教授在單分子偵測技術上的指導。

參考文獻

1. The News and Editorial Staffs, *Science*, **19**, 2039 (2003).
2. A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin, *Science*, **303**, 676 (2003).
3. A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin, *Science*, **300**, 2061 (2003).
4. Y. Sako and T. Yanagida, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, SS1-SS5 (2003).
5. G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endres, H. Buning, M. Hallek, and C. Brauchle, *Science*, **294**, 1929 (2001).
6. T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, and H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2926 (1996).
7. T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, and H. Schindler, *J. Phys. Chem.*, **99**, 17662 (1995).
8. M. J. Saxton and K. Jacobson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 373 (1997).
9. Ch. Zander, J. Enderlein, and R. A. Keller, *Single Molecule Detection in Solution: Methods and Application*, WILEY-VCH (2002).
10. J. T. Groves and S. G. Boxer, *Acc. Chem. Res.*, **35**, 149 (2002).
11. P. Lu, L. Xun, and X. S. Xie, *Science*, **282**, 1877 (1998).
12. F. D. Lange, A. Cambi, R. Huijbens, B. de Bakker, W. Rensen, M. G. Parajo, N. van Hulst, and C. G. Figdor, *J. Cell. Sci.*, **114**, 4153 (2001).
13. M. de Brabander, G. Geuens, R. Nuydens, M. Moeremans, and J. Demey, *Cytobios*, **43**, 273 (1985).
14. M. P. Sheetz, S. Turney, H. Qian, and E. L. Elson, *Nature*, **340**, 315 (1989).
15. K. Ritche and A. Kusumi, *Methods Enzymol.*, **360**, 618 (2003).
16. M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller, *Science*, **302**, 442 (2003).
17. T. Ha, *Methods*, **25**, 78 (2001).

-
- 邱長儒先生為國立中正大學化學所碩士，目前是國立中正大學化學暨生物化學研究所博士班學生。
 - 楊子萱女士為美國羅徹斯特大學化學博士，現任國立中正大學化學暨生物化學系助理教授。
 - Chang-Ju Chiu received his M.S. in chemistry from National Chung-Cheng University. He is currently a Ph.D. student in the Institute of Chemistry and Biochemistry at National Chung-Cheng University.
 - Tzyy-Schiuan Yang received her Ph.D. in chemistry from the University of Rochester, USA. She is currently an assistant professor in the Institute of Chemistry and Biochemistry at National Chung-Cheng University.