

# 原子力顯微鏡在單分子力量測的應用

## Application of Atomic Force Microscopy in Single Molecule Force Measurement

黃偉瀚、莊曜瑛、吳丞偉、章為皓

Wei-Han Huang, Yao-Yin Chuang, Cheng-Wei Wu, Wei-Hau Chang

掃瞄式顯微鏡是上個世紀最重要的發明之一，其中的原子力顯微鏡能夠在室溫和水相的條件下測量物件的形貌，因而成為生物學家和化學家手中的利器。近年來，原子力顯微鏡更被直接用來操縱和量測單分子，與光學鑷子有異曲同工之妙。單分子量測能幫助研究者看見傳統巨觀量測看不見的細節，解開一些迷團或發現新現象，將帶給複雜生物系統研究革命性的突破。筆者於本文中縱覽原子力顯微鏡在單分子方面的應用，文中將不詳述原子力顯微鏡的物理原理和樣品製備的化學手段，而將焦點集中於生物單分子力量測方面的發展。出於個人偏好，選擇詳述以下三方面：原子力顯微鏡測量肌蛋白質舒展力的經典範例，新一代螢光輔助原子力顯微鏡的發展，以及結合螢光量測與原子力顯微鏡而成的力感測器。

Scanning microscopy is one of the most important inventions in last century. Atomic force microscopy is one kind of scanning microscopy that is capable of detecting near-atomic features in liquid phase and at ambient temperature, hence, has become a very powerful tools for biologists and chemists. Recently, like optical tweezers, atomic force microscopy has been applied to perform force measurement at single molecule level. Single molecule measurement can reveal detailed information hidden in bulk measurement and is expected to bring revolutionary impact to researches on complicated biological systems. Here, we choose to introduce three areas in single molecule atomic force measurement. They are: a classical example of single protein folding and unfolding force study on titin, a new generation of atomic force microscope combined with a confocal microscope and a fluorescence aided force biosensor.

### 一、原子力顯微鏡

原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM) 是在 1986 年由 Binnig、Gerber 和 Quate 一同發明<sup>(1)</sup>，現已經成為生物和化學研究領域中廣泛應用的

儀器之一。原子力顯微鏡是使用光學槓桿 (lever) 系統，它能夠測得到奈米 (nano-meter) 解析度的影像及奈牛頓 (nano-newton,  $10^{-9}$  N) 的微作用力<sup>(2)</sup>。不同於傳統顯微鏡，懸臂是儀器中最重要的部分，它的尾端被固定在取樣裝置上，而另一端附有與樣

品接觸的精緻微米探針，它的尖端是由  $\text{Si}_3\text{N}_4$  或  $\text{Si}$  的晶體製成<sup>(3)</sup>。就影像而論，原子力顯微鏡的解析能力取決於探針尖端的物理特性，愈鋒利的尖端會產生愈清楚的影像。就力的測量而論，樣品和懸臂之間的作用力通常是在奈牛頓範圍<sup>(2)</sup>。原子力顯微鏡尖端與樣品間所產生的微小作用力會使懸臂上下的移動，造成照射至懸臂板面的雷射光束的反射角度有所改變<sup>(2,4)</sup>。被反射的雷射光束位置是由一支雙元素光二極管 (dual element photodiode) 偵測，對位置敏感的光電探測器是將光信號轉換成電信號，而測出作用力<sup>(4)</sup>。

原子力顯微鏡測量樣品的形貌分布有三個最基本的方式：接觸、非接觸和輕擊。接觸方式應用得最廣泛。雖命名為接觸方式，但實際上樣品和尖端並未接觸，它是使用排斥力約奈牛頓去推擠懸臂使尖端靠著樣品表面，而樣品與尖端的距離通常被調整在一恆定的高度<sup>(4)</sup>。探針經光柵掃描穿過樣品表面，形成一概略的影像<sup>(5)</sup>。但在這個方式下，探針尖端施加過度追蹤力量可能損壞樣品及探針本身，

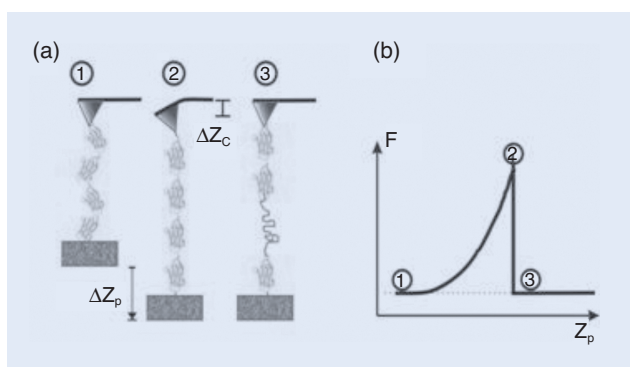


圖 1. (a) 單分子 AFM 實驗組成在 AFM 的尖端懸臂和基體之間獲得單一設計的巨蛋白質 polyprotein 和其舒展。舒展蛋白質基體的位移 ( $\Delta Z_p$ ) 造成懸臂偏轉的淨力量 ( $\Delta Z_c$ )。這偏折能被校準在微微一牛頓 (pico-Newtons) 力量。(b) 舒展巨蛋白質 polyprotein 導致最初完全的熵彈性<sup>(1-2)</sup>。但是在典型的蛋白質被有計畫的指定力量模塊展開<sup>(3)</sup>。未展開放鬆舒展的力量造成典型鋸齒。多次未展開情形造成目前典型鋸齒樣式。從這些實驗能詳細研究蛋白質的機械性能，譬如肌肉蛋白質 titin。

因此限制了掃描的樣品類型。由於尖端接觸某些樣品會使樣品改變，故使用非接觸方式來測量。探針尖端盤旋在樣品上約 5–15 奈米。形貌分布影像的形成是測量尖端與樣品之間的凡得瓦爾力。但因吸引力非常小，故根據懸臂共振頻率的變動或高度來偵測。

輕擊的測量方式即為動力力學的測量方式 (dynamic force mode)，在樣品表面得到高解析度的影像。對於容易損壞的樣品、較軟的基質，輕擊的測量技術特別有用。這個掃描方式通常是使用較硬的懸臂。與非接觸方式比較，探針尖端較逼近於樣品而實際上尖端是輕微接觸樣品表面。在掃描期間，探針尖端以每秒 50,000–500,000 次的頻率上下振動。因為探針尖端碰撞到凸出表面，使得懸臂振動空間少因而振幅減少。相反的，當探針尖端有更多的移動空間時，則振幅增加。這資訊能用來形成影像表面的形貌<sup>(4)</sup>。

## 二、單分子力的測量

單分子研究方法能夠提供傳統巨觀量測 (ensemble measurement) 所不能看見的細節資訊，因此崛起成為研究細胞中蛋白質分子作用的新手段。在巨型肌肉蛋白質的逆向工程學 (titin reverse engineering) 研究中，研究者顯示如何使用原子力顯微鏡研究肌肉蛋白質 (titin) 的功能。肌肉蛋白質 (titin) 存在所有肌肉細胞裡的 A-band 和 I-band 之間，它的收縮和彈性在肌肉細胞中扮演重要的角色。研究者決定分別探討肌肉蛋白質中具彈性區域的四個彈性結構模塊：類免疫球蛋白前端 (Ig-like proximal domain)、N2B、PEVK 和類免疫球蛋白末端 (Ig-like distal domain)。利用分子生物技術可分別表達各區域，表達的蛋白質區域藉疏鍵的形成吸附在金箔載玻片上<sup>(5)</sup>。吸附上的樣品可由探針尖端拾起及舒展，測量蛋白質展開的力量 (圖 1)<sup>(6)</sup>。測量類免疫球蛋白前端的模塊可得到一力量伸展曲線 (圖 2(a))，在 150–200 微微牛頓 (pico-newton) 之間為一個典型的鋸齒狀；因類免疫球蛋白模塊是逐個展開，所以每一個力量峰對應到一單個未完全展開的類免疫球蛋白模塊。

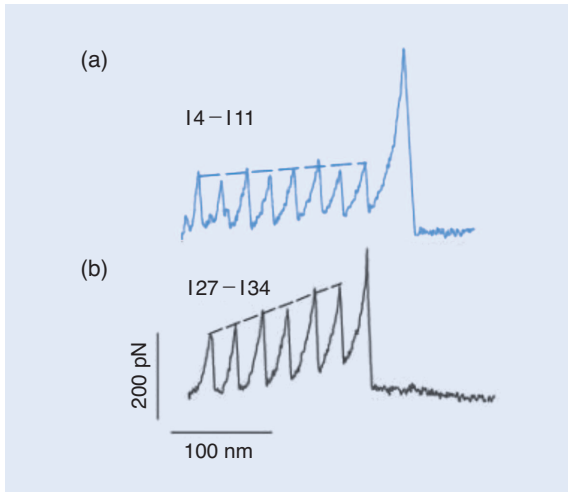


圖 2.(a) 力量伸展曲線獲得是由設計的蛋白質構成份圖在前端縱排 Ig 區域的 I4 到 I11。(b) 力量伸展曲線獲得是由蛋白質構成份圖在末端縱排 Ig 區域的 I27 到 I34。

研究者在展開峰頂繪製平均值，顯示出在微弱的階層中每一力量峰頂的平均值為 12 微微牛頓。所以在類免疫球蛋白前端模塊中類似的模塊有相似的機械穩定。然而相同的實驗執行在類免疫球蛋白末端模塊顯示了一個非常不同的模式。未展開力量顯示一個更加寬廣的範圍，在 150 到 330 微微牛頓 (圖 2(b))。繪製未展開峰頂的平均值。由線性資料得到斜率為 31.5 微微牛頓。由這個結果知道，類免疫球蛋白末端模塊與類免疫球蛋白前端模塊形成對比，前者為依序展開而後者為非依序展開。研究者使用幾個模型來解釋樣品的機械行為。由類免疫球蛋白前端的力量伸展曲線 (force-extension curve) 中顯示，最能代表類免疫球蛋白前端機械行為的模型是蠕蟲鏈 (worm-like chain) 模型 (圖 3)。這意味著，類免疫球蛋白前端區由未展開到完全展開是未經過中間態的二狀態系統。在 7.7 微微牛頓的固定力量之下展開或未展開的機率是 50%<sup>(5)</sup>。對比於類免疫球蛋白前端模塊，類免疫球蛋白末端模塊的力量伸展曲線不符合蠕蟲鏈模型，因為類免疫球蛋白末端力量伸展曲線上顯露的一個小丘。

研究者猜測小丘對應於未展開的中間態<sup>(5)</sup>。如果研究者忽略中間狀態而使用二態模型從事計算，對應 50% 展開機率的力為 21.6 微微牛頓。如果考慮當中間狀態而使用簡化的三態模型，對應

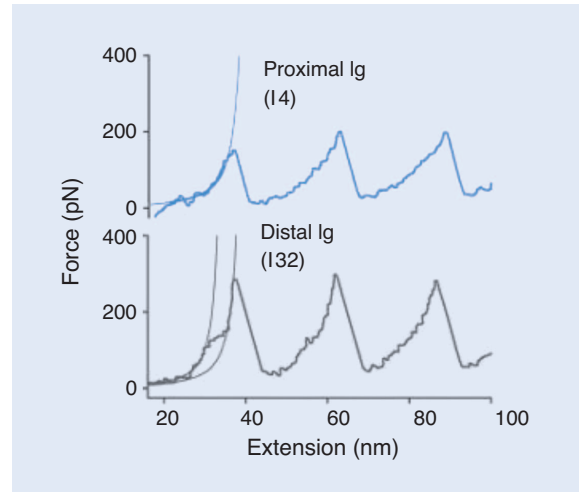


圖 3.(a) I4 巨蛋白質 (I4<sub>8</sub>) 的力量伸展關係。最初的力量部份，在第一未展開峰頂之前，是敘述蠕蟲鏈模型 (薄的線)。(b) 力量伸展關係在 I32 巨蛋白質 (I32<sub>8</sub>) 從肌肉蛋白質 titin 的末端縱排 Ig 區域。在力量伸展曲線初期上升的階段，一個突出的「小丘」出現，表示未展開中間體的存在。

50% 展開機率的力量必須上升到 29.2 微微牛頓 (圖 4)，而類免疫球蛋白末端結構可能存在一中間轉換狀態，有待進一步動力學實驗驗證。目前猜測這個中間轉換狀態可用來緩衝展開和折疊的過程<sup>(5)</sup>。測量肌蛋白質舒展力的經典範例說明原子力顯微鏡可藉測量單分子力量伸展曲線，探討蛋白質分子的拓撲結構和蛋白質的展開過程。

### 三、聯合的原子力顯微鏡掃描／共軛焦顯微鏡設計

單分子原子力顯微鏡力量測的困難在於先找到並辨識單分子。這樣的困難可以靠光學的手段來克服。原因是原子力顯微鏡和光學影像能互補其短：原子力顯微鏡有優良的空間解析力及粗糙的辨識力，而光學影像有粗糙的空間解析力及優良的辨識力。所以綜合兩個方法產生一個聯合顯微鏡技術，使得原子力顯微鏡可以確認所量測的對象為單分子。然而，由於原子力顯微鏡的雷射光束會散射進入光學顯微鏡干擾螢光訊號，而傳統使用光學帶通濾波器來過濾原子力顯微鏡雷射的作法，會導致光

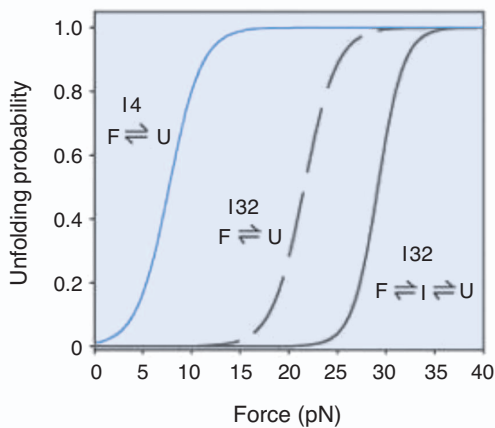


圖 4. 繪製在 I4 和 I32 模塊的穩定狀態未展開可能性力量函數。I4 是計算一個簡單的二狀態未展開系統。I32 模塊是計算存在 (實線) 和缺乏 (虛線) 未展開中間體。

學顯微鏡所收集螢光的損失，並阻攔光譜有用的波段以及使光路複雜化。為了解決這些技術瓶頸，研究者結合一個市售原子力顯微鏡和一個掃描共軛焦光學顯微鏡，以及用一臺外部掃描器替換市售原子力顯微鏡的壓電掃描器 (piezo-scanner)，並且增加一條簡單的電路來控制原子力顯微鏡雷射和共軛焦顯微鏡資料收集的非同步性，而解決了原子力顯微鏡雷射干擾螢光訊號的問題。

由於原子力顯微鏡的懸臂阻斷了探針邊大多數的收集路徑。所以為了達到良好的偵測效率，需要從探針尖端下方收集能通過樣品的光學信號。另外，原子力顯微鏡的探針必須和光學焦點在空間重疊。因此一旦探針和光學焦點對準在固定位置，以不動探針而移動樣品來掃描樣品為最好的方式。由於原子力顯微鏡和光學影像系統共用一掃描器，使得兩類型影像自然地同步發生，而達到高效率資料收集。儀器的設計 (圖 5) 是根據一個市售原子力顯微鏡的結構 (BioScope AFM) 來改造。原子力顯微鏡是裝架在一個自製的顯微鏡架上，再裝在一個倒置式的光學顯微鏡上。這個自製的顯微鏡架容納一閉環的三軸壓電掃描器 (three-axis piezo-scanner)，並有三個良好傾斜度 (fine-pitched) 的螺絲作為原子力顯微鏡探針對顯微鏡光學軸的粗調對準。使用外在壓電驅動 (piezo-drive) 改良原始原子力顯微鏡 (BioScope AFM) 控制器，達成以低壓壓電驅動。壓電信號在內部放大之前，被輕擊及灌輸閉環壓電掃描器 (piezo-scanner) 來控制。

另外，在原始的原子力顯微鏡 (BioScope AFM) 的設計中，壓電掃描器 (piezo-scanner) 驅動信號是分離的。研究者連接壓電掃描器和手控高壓，來適當地對準原子力顯微鏡探針。收集光學信號的掃描共軛焦顯微鏡使用水冷式的氬離子雷射激發樣品。

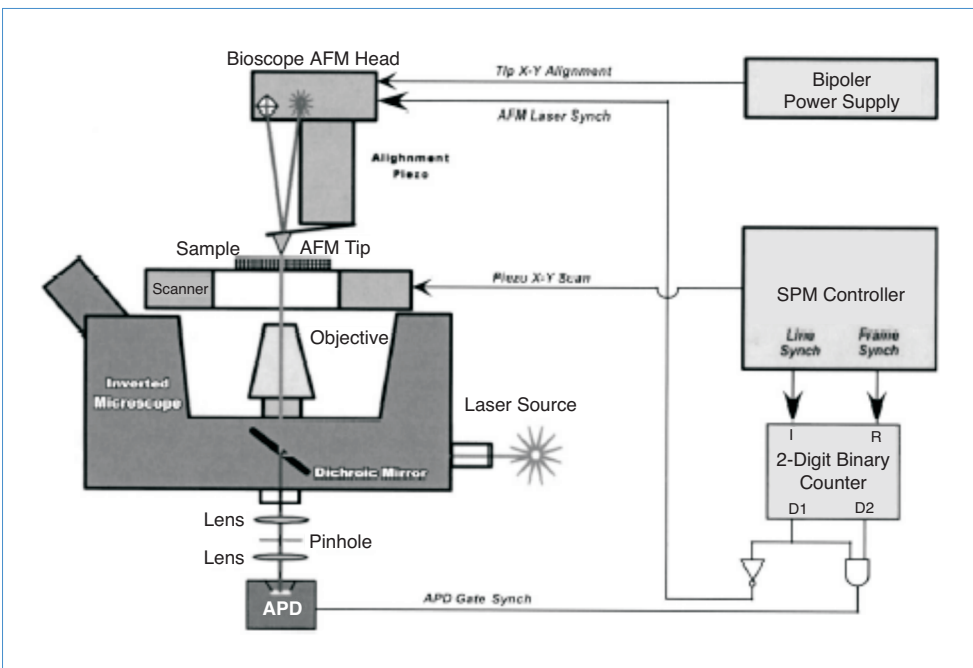


圖 5. 儀器設定和時間電子的概要。

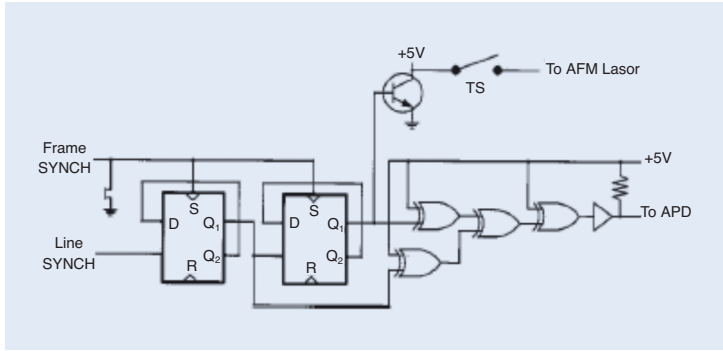


圖 6. 同步力量和光學圖像的彙集電路的概要。

氬離子雷射從顯微鏡後面進入，由一個雙色鏡反射，然後由一個高倍數物鏡聚焦在樣品表面，再由同一個物鏡收集樣品螢光。

螢光信號聚焦後，經過半徑 100 毫米針孔，將散射光排除在外。剩餘激發光由過濾器消除。信號被聚焦在一個雪崩式 (avalanche) 單光子計數器。這個設計充分結合一個原子力顯微鏡和掃描共軛焦顯微鏡的能力和靈活性；它充分的保留以上兩種儀器的優點。且再增加一條簡單的數位電路，加以設定來達到原子力顯微鏡和光學探測器的同步化 (圖 6)。

為了證明系統的共軛焦光學部分的影像能力和敏感性，研究者將螢光染料 (tetramethylrhodamine, TMR) 的單分子放置在蓋玻片表面。以光漂白的手段顯示幾個單分子的典型特點。這個結果證明，儀器具有測出單分子的敏感性。研究者進一步用尼羅紅染色的小珠 (latex beads, 直徑 43 毫微米) 分散在玻璃表面，同時收集光學和形貌影像，測得乳珠的形貌分布及光學影像。由這些影像證明，非同步時間的手段是有效的。而且，二個影像重疊可得到一致的特點。排列原子力顯微鏡尖端和顯微鏡光學軸需在 150 毫微米之內，不然影像可能會有不適當的配合。使用迭代對準 (iterative alignment) 可改進其精確度。

由光學和形貌二個影像的比較，可以清楚地顯示原子力顯微鏡和共軛焦螢光顯微鏡影像的優越分辨能力。實際上，原子力顯微鏡圖像清楚地表示在光學影像的繞射極限特點：一個光學影像可能對應了一個以上的小珠形貌分布，這是因兩個小珠過於接近。研究者將染色及未染色的小珠以 80 和 20

的比例摻雜混合物分散在蓋玻片表面，以聯合的原子力顯微鏡掃描共軛焦顯微鏡獲取這個樣品的分布形貌和光學影像。單獨根據形貌圖是無法區別有染色和無染色標記的小珠。

影像特點是光學影像必定有一對應的形貌分布點，而在一些形貌影像的分布點，則缺乏一個對應的光學影像點。所以我們能說形貌分布點有對應到一個光學影像點的是有染色標記的小珠，而沒對應到的是無標記的小珠。這個實驗顯示出聯合的原子力顯微鏡掃描共軛焦顯微鏡，具有毫微米量測位置的準確性和光學辨識能力。

#### 四、可編輯去氧核糖核酸力感測器 (Programmable DNA Force Sensor)

力量的測量使科學家獲得關於分子的結構和功能。但是，可測的力量範圍 (dynamical range) 限制了可被測試的樣品類型。例如：目前還以單分子力量測量單點突變 (single-base pair mismatch) 的報告。得到最佳的原子力顯微鏡測試資料是使用 10 個基本對 (圖 7)。在去氧核糖核酸力量計測器的研究中，研究者嘗試使用不適當的鹼基配合，比較二分子化合物的分離力量資料。實驗中，研究者以聚合物錨 (polymeric anchor) 取代原子力顯微鏡的懸臂。這聚合物錨附有已知道的參考鍵 (reference bond) 裝載螢光標籤。該參考鍵作為力量標準。在測試期間，測試的樣品直接與參考鍵作用。

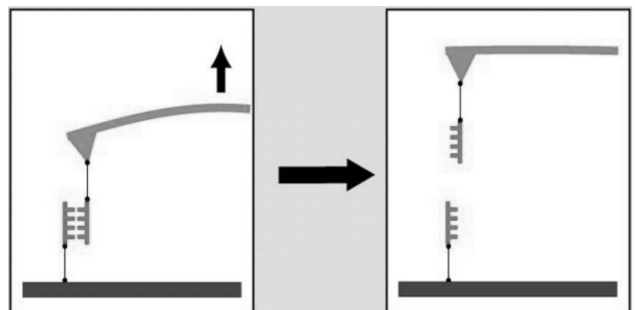


圖 7. 在傳統 AFM 基礎的單分子力光譜中，是需要拉力來打斷雙股 DNA 的分子鍵，用測量懸臂來測量。

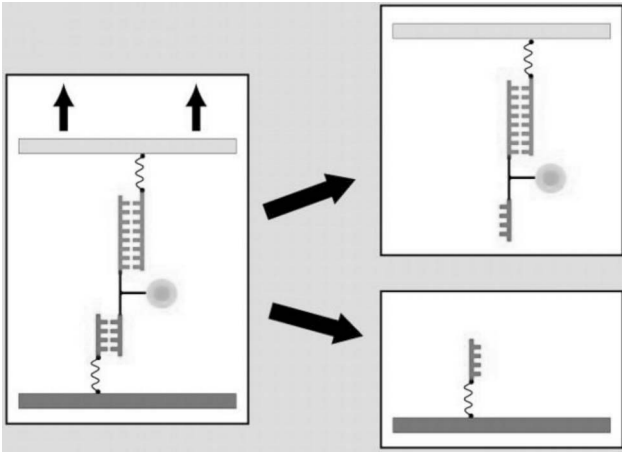


圖 8. 在力的區別測試中，量測打斷樣品鍵所需要的力量是由比較已知分子標準力的參考鍵而得。經由一連串的聚合物空間子、樣品鍵和參考鍵置入，較弱的分子鍵有著較高的斷裂機會相較於較強的分子鍵，因此當分開兩個聚合物錨負面大多數的螢光標籤會留在較強的分子鍵。

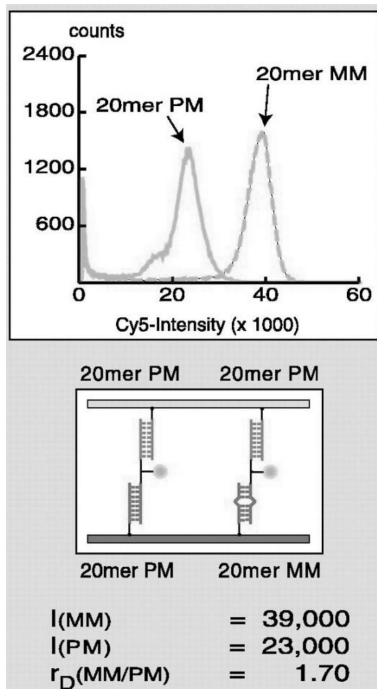


圖 9. 當兩錨負面分開時，擁有單鹼基錯誤的 DAN 較容易被拉開，因此多數的螢光標籤會附著在參考 DNA 上。而完整配對的 DNA 所需較強大的力量來拉開分子鍵，使得螢光標籤附著在完整配對 DNA 上也相同增加。當測量參考鍵上的螢光強度時，單鹼基錯誤 DNA 的螢光量會比完整配對 DNA 來得強。

實驗是讓二個由連接物作用的表面分離，當分子鏈逐漸舒展直到二個當中有一個線斷裂。因為參考鍵和樣品有另外物產，穩定度較高的一端吸附上螢光標籤的可能性較高 (圖 8)，分別定量測量在螢光標籤上的強度，可提供關於測試樣品的穩定資訊。由於各個測試樣品個別都附有參考鍵，所以眾多分子可同時測試。為了研究這個新的測試技術，研究者測量 20 鹼基對 DNA 單一基本對的不適當配合的力量減少。測量螢光強度在不配合的樣品和完善配合的樣品，鍵斷裂可能性比率是 1：7 (圖 9)，證明該項技術可單獲得高精度核酸多形性分析 (single nucleotide polymorphism, SNP)。

研究者並且探討了在能量和動力學之間相等的作用力，二個有完全相同順序的 DNA，雖有同樣的結合能，在受理解離時，不同的幾何組態有著極為不同的斷裂可能性 (圖 10)。這樣的特性在蛋白質分析應用上有顯著的優勢，能用來區別抗體抗原作用在特定和非特定的束縛。

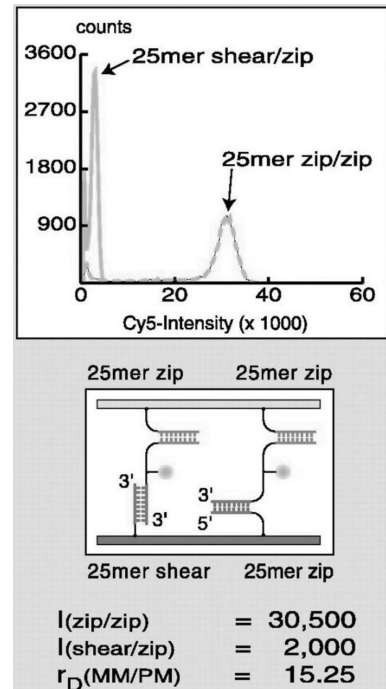


圖 10. 完全相同的 25- bp 雙股 DNA 的直方圖在剪斷 (左) 及拉開幾何組態 (右)，其中二者被偵測在完全相同的 25- bp 雙股所拉開的幾何組態。I：指螢光強度， $r_D$ ：區別比率。

在常見的測試格式中，抗體可能干擾反應而產生虛假的正面資料 (圖 11)。但是微分分析能將虛假的正面資料能減到最小。當二面板分開，那些抗體在非特定的束縛將離解而保留在頂板，因為非特定的束縛比參考鍵有較少互作用力 (圖 12)。所以使用短的 DNA 之一股作為力量計測器，可精確和可靠地區別有束縛力的抗體抗原<sup>(8)</sup>。

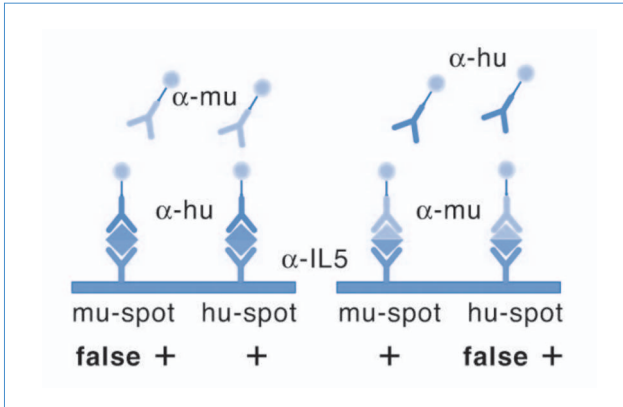


圖 11. 如果在緩衝溶液中同時使用兩個偵測抗體，如同在傳統的蛋白質陣列，捕獲抗體的交互聯合作用使得無法區分來自老鼠 (mu) 和來自人 (hu) 的抗原。

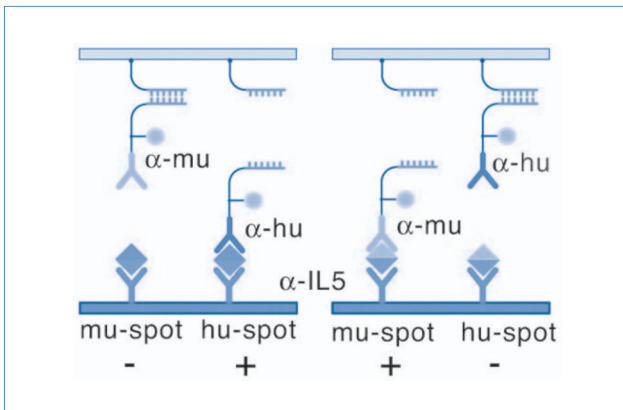


圖 12. 若把偵測用的抗體偶合在表面上通過 DNA 力量計測器,他們能局部地被應用。第二層表面提供了另一維度做為抗體與抗原專一性的結合，這定義了老鼠或人的定點列陣，區分出老鼠和人之間抗原。

## 參考文獻

1. Round, *Atomic Force Microscopy*, H. H. Wills Physics Laboratory, University of Bristol (2004).  
<http://spm.phy.bris.ac.uk/techniques/AFM/>
2. Baselt, *How AFM Works*, California Institute of Technology (2004).  
<http://stm2.nrl.navy.mil/how-afm/how-afm.html#General%20concept>
3. Sharma, *Atomic Force Microscopy*, Rutgers University, New Jersey (2004). <http://www.rci.rutgers.edu/~rsharma1/afm.html>
4. Li, *Atomic Force Microscopy*, Jan. (2004).  
<http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/afm/firstpag.htm>
5. Li *et. al.*, *Nature*, **418**, 998 (2002).
6. Fernandez, *Titin: A Giant Protein That Controls Muscle Elasticity*, Columbia University (2004).  
[http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty/fernandez/FernandezLabWebsite/learn\\_proteins/titin.htm](http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty/fernandez/FernandezLabWebsite/learn_proteins/titin.htm)
7. Noy and Huser, *Review of Scientific Instruments*, **74** (3), 1217
8. Albrecht *et. al.*, *Science*, 301, 367 (2003).

- 黃偉瀚先生畢業於加拿大 Simon Fraiser 大學生化系，現任中央研究院化學研究所專任助理。
- 莊曜瑛先生畢業於中原大學化學系，現任中央研究院化學研究所專任助理。
- 吳丞偉先生為國立清華大學生命科學碩士，現於中央研究院化學研究所服國防役。
- 章為皓先生為美國史丹福大學生物物理博士，現任中央研究院化學研究所助研究員。
- Wei-Han Huang his B.S. in biochemistry from Simon Fraiser University, Canada. He is currently a research assistant in the Institute of Chemistry, Academia Sinica.
- Yao-Yin Chuang her B.S. in chemistry from Cheng-Yuan Christian University. He is currently a research assistant in the Institute of Chemistry, Academia Sinica.
- Cheng-Wei Wu his M.S. in life sciences from National Tsinghua University. He is currently a research assistant in the Institute of Chemistry, Academia Sinica.
- Wei-Hau Chang his Ph.D. in biophysics from Stanford University, USA. He is currently an assistant fellow in the Institute of Chemistry, Academia Sinica.