

雙偏極化干涉術—生物分子奈米量測

Dual Polarisation Interferometry for Measurement of Biomolecule at Nanometer Scale

林雲漢、陳吉良、王裕銘、王安邦、黃榮山、李世光、林世明

Yun-Han Lin, Ji-Liang Chen, Yu-Ming Wang, An-Bang Wang, Long-Sun Huang, Chih-Kung Lee, Shiming Lin,

近十幾年以來，以表面電漿共振技術即時量測分子動力學之應用已非常廣泛，而英國 Fairfield Sensor 公司所研發生產的最新量測儀器，藉由雙偏極化干涉法的分析技術，可量測分子直徑、厚度、密度、表面濃度和動力學參數等多種固-液介面薄膜即時的反應和變化，解析度達原子層級 (Å)，其應用範圍包括單分子結構及構形變化、分子-分子間相互作用、奈米分子醫學診斷以及奈米科技之應用等。雙偏極化干涉儀之發明有助於突破現階段蛋白質結構與小分子研究之瓶頸。

From decade the application of surface plasmon resonance technique was broadly on molecular dynamics, however, Fairfield Sensor invented the new method, dual polarisation interferometry, which is used on analysis of changes of diameter, thickness, density, surface concentration, and dynamics on solid-liquid interface at real time. The application of dual polarisation interferometer includes single molecule structure and conformation change, interactions between molecules, nanomedicine diagnosis, and nano-technology etc. The invention of dual polarisation interferometer proves the study on molecular structure conformation change.

一、導論

近十年來生物感測器開始應用於生物醫學的動力學和系統作用機制⁽¹⁾，大部分較靈敏的檢測技術均是以漸逝波 (evanescent wave) 的概念為原理基礎。以表面電漿共振⁽²⁾ (surface plasmon resonance, SPR) 現象為例，在金屬感應的表面漸逝波場 100 奈米以內的位置，具有極高的靈敏度，此舉對於生物樣品的檢測提供有效且具選擇性的分析方法。在

各類以 SPR 為理論基礎的生物感測器中，以瑞典商法瑪西亞公司所推出的生物分子交互作用分析系統⁽³⁾ (bimolecular interaction analysis, BIAcore) 最具代表性，由於 SPR 不需任何螢光標示，且對於生物分子間動態的結合 (association)、解離 (dissociation) 等機制均可即時觀測其反應。

雖然 SPR 藉由激發之共振角度位置的差異，可獲得晶片表面生物分子的構形改變，但就其物理性質而言，量測仍會受限於單一的 TM (transverse

magnetic) 偏極化，無法獲得完整的光學幾何參數⁽⁴⁾。因此部分研究開始著眼於雙偏極化干涉法⁽⁵⁾ (dual polarisation interferometry) 的分析技術，藉由漸逝波在生物感測器的概念，以傳統光學的干涉理論為基礎，同時進行 TE (transverse electric) 和 TM 的雙偏極化的量測方式，經馬克斯威爾方程式 (Maxwell's equations) 的運算，可有效地在固-液相界面獲得包括厚度與折射率等完整光學幾何參數的研究資訊。

隨著生命過程的演進，包括 DNA、RNA 及蛋白質等生物分子已陸續被解析研究，在這些生物分子的構形及分子內 (間) 相互作用會決定生理之功能及特性。以蛋白質為例，複雜的三、四級結構是決定人體生理功能的最主要成分，此結構通常會視外界因子，如 pH 值、離子強度或小分子鍵結的影響，產生摺疊 (folding)、開環 (open loop) 或閉環 (close loop) 等構形改變，導致功能的異常。因此蛋白質的 3D 立體結構的解析和序列中特定活性位置 (binding site) 的研究，立即成為生化學家、藥學家亟欲突破之研究方向。

傳統上，蛋白質的結構解析，主要藉由高解析度的 X 射線結晶法⁽⁶⁾ (X-ray crystallography) 得到 X 射線的繞射圖，來判斷蛋白質晶體內的電子密度分布，配合核磁共振法 (nuclear magnetic resonance, NMR) 測定水溶液中蛋白質的立體構造，決定每個

組成胺基酸原子的位置。然而此方法需經過一冗長的實驗程序，如果有一種能在自然環境中即時量測生物分子構形改變的偵測方法，即可以得知有關蛋白質功能的訊息。來自英國的 Farfield Sensor 公司結合生物感測和雙偏極化量測的理論，所提出的雙偏極化干涉儀 (dual polarisation interferometer, DPI)，將蛋白質固定於一矽基材，量測蛋白質結構包括直徑、厚度、密度、表面濃度和動力學參數等多種固-液界面薄膜即時的反應和變化，解析度達原子層級 (Å)，確實有助於突破現階段蛋白質結構研究之瓶頸。

二、操作原理

DPI 感測理論的基礎是來自 200 年前 Thomas Young 的干涉實驗，見圖 1。當光源通過雙狹縫後，兩道光束會產生波峰相加的建設性干涉和波谷相消的破壞性干涉，即亮、暗的條紋。倘若將兩光波導管⁽⁷⁾ (waveguide) 取代兩狹縫 (slit)，和光波導管光纖一樣可導引光波的行進，當光經波導管在感應晶片末端溢出，同樣會在遠場的光學螢幕或光檢測器上得到明、暗兩種干涉圖形。

任何光波導管的結構中，光並非不會受限於導管介質的邊界，在表面漸勢波場所產生的折射率變化，會影響光在導管中的行進速度。將此觀念導入

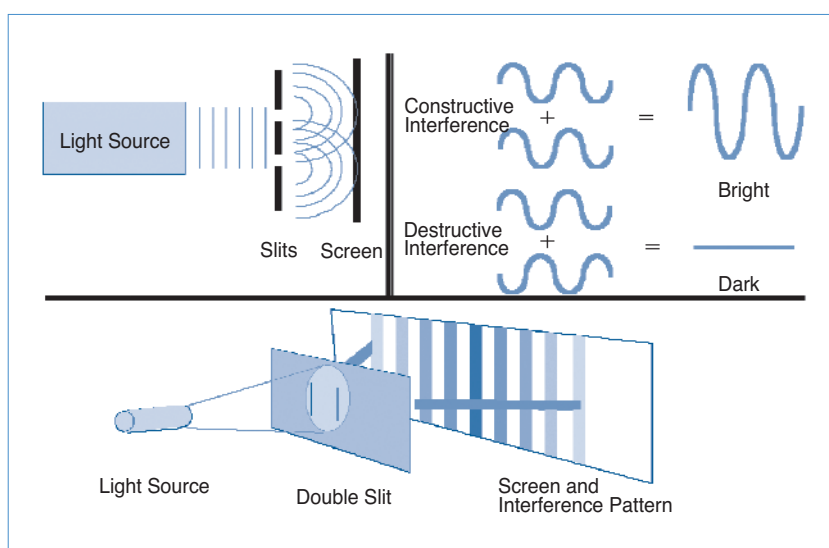


圖 1. 楊氏干涉術之基本架構圖⁽¹⁰⁾。

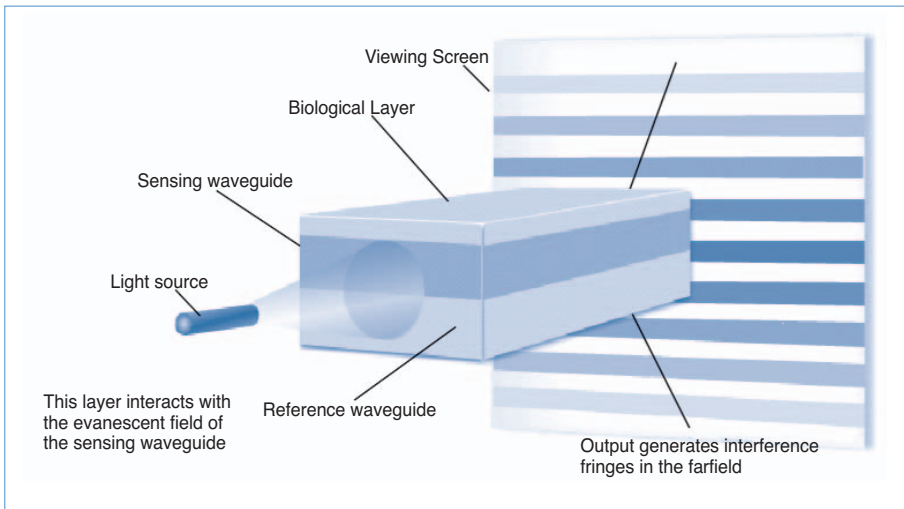


圖 2. 雙光波導干涉現象示意圖⁽¹⁰⁾。

感應晶片的設計上，藉由四片高、低折射率之矽基材，形成兩個平板的光波導管 (slab waveguide) 結構。如圖 2 所示，上層為感測波導管 (sensing waveguide)，下層為參考波導管 (reference waveguide)。從生物感測的角度切入，生物分子倘若在光波導管表面產生共價鍵結、物理吸附或靜電效應，光同時進入兩光波導管後，會因表面生物膜層的折射變化，造成漸逝波波形延遲，影響光的行進速度。此相位差 (phase change, $\Delta\Phi$) 會在末端的遠場光學感測 CCD 上偵測到不同的楊氏干涉圖形⁽⁸⁾。

$$\Delta\Phi = k_0 L \Delta N_s$$

相位差的直接量測通常是經由傅立葉轉換連續監測相在圖層上位置與強度的關係。由於光徑是固定，因此可由相位差的變化推導出折射率的差異。感應波導管之有效折射率 N_s ；參考波導管之有效折射率 N_r (此數值並不會因表面漸勢波受生物分子吸附影響而有改變)； k_0 為空間中的波數； L 為交互作用的長度 (即晶片之路徑長)。同時解析 TE/TM 兩互相垂直之偏極態所得的干涉訊號，可獲得晶片表面上生物分子薄層的厚度和折射率等光學幾何參數。

舉例而言，在蛋白-蛋白間相互作用的量測中，如圖 3 所示，隨著厚度 (尺寸)、密度和質量 (absolute mass, 密度 × 尺寸) 等參數的改變，在判

斷上會有幾種結果。假如厚度和密度這兩個參數一起增加 (即矩陣之右上角)，則將是原有的質量增益；反之，若是一同減少 (即矩陣之左下角)，則將是質量耗損，此類可歸因於典型的蛋白質與蛋白質間之結合或分解之情況。因此，這個對角線稱為質量改變軸。

然而當質量訊號逐漸減低時，如小分子結合到大的蛋白質時，單單質量的變化已不再是辨認蛋白質間交互作用的可靠參數。假如厚度減少和密度增加 (即矩陣之右下角)，或厚度增加與密度減少 (即

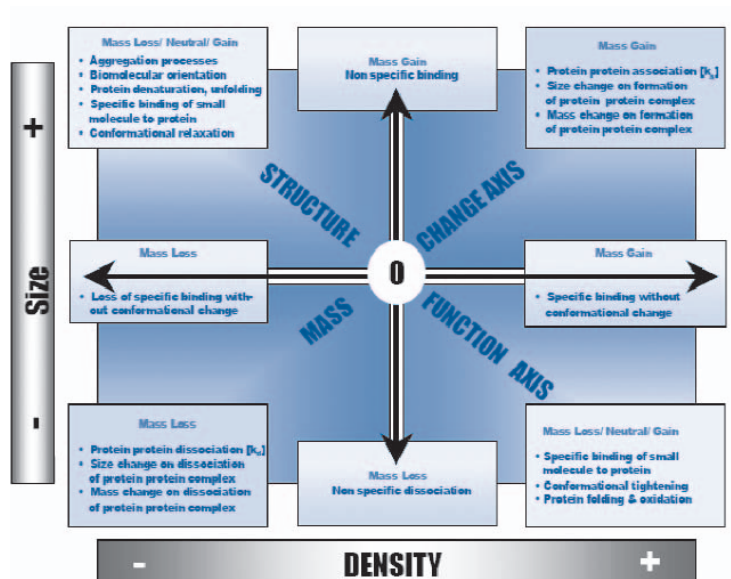


圖 3. 生物分子反應之厚度 (尺寸) 及密度量測關係圖⁽¹⁰⁾。

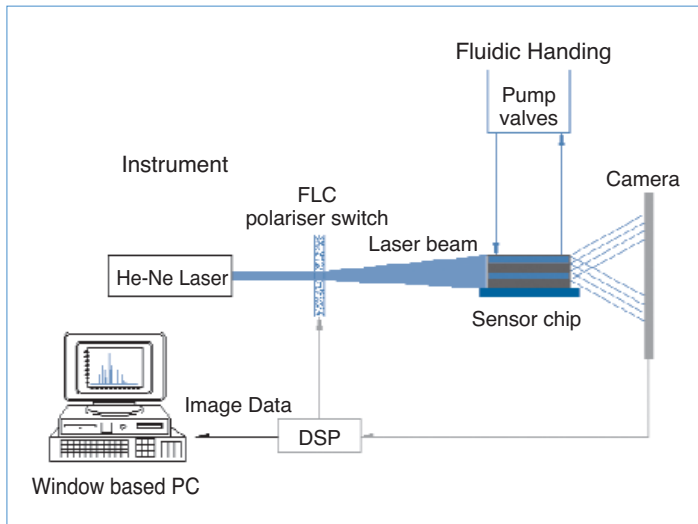


圖 4. 雙波導干涉儀基本架構圖。

矩陣之左上角) 時，此類結果可能是蛋白質發生某些性質的結構改變，或許是質量參數的增加 (即聚集過程)，也可能是質量參數減少 (ligand 或離子解離反應)，甚至是質量參數不變 (即蛋白質摺疊或非摺疊的現象)。這是屬於矩陣之「結構機能」軸，它是唯一區別蛋白質活動性之參數，而非簡單特定質量添加之情況。矩陣中剩下的四個縱、橫軸表示當尺寸或密度的變化量固定時，倘若質量仍產生增加或減少的變化，則此類結果可推斷為在非特定的鍵結下，發生物質添加 (或移除) 的情況或是樣本表面並未有結構變化，但樣品被沖洗之現象。由以上討論之結果證明，藉由不同的參數的變化，DPI 於生物醫學上的應用，確實具有能有效解析所量測蛋白質間相互作用與構形變化之能力。

三、儀器裝置

DPI (AnaLight[®] Bio200, Farfield Sensors Ltd., Salford, UK) 的儀器部分，如圖 4 所示，包括一感應晶片、流體系統、晶片載台、雷射光源與光機裝置。感應晶片的結構由一矽基材 (silicon oxynitride) 組成，經微機電製程所得的雙光波導管感應晶片，尺寸約為 24 mm × 5.8 mm × 1 mm，兩折射率較高的介質層為光行進之感測與參考光波導管，見圖 5。在晶片表面可依所需修飾各類生物樣品固定化

的生物連結分子 (linker)。流體系統為 HPLC 的邦浦 (pump)。晶片載台的部分包含兩溫控箱，能將晶片的溫度差異控制在 1 mK 以內。而銜接晶片微流道的界面設計，將死體積 (dead volume) 降低至 2 μL ，因此樣品可從流體系統有效倒入晶片表面進行即時偵測。雷射光源為波長 633 nm 之氦氖雷射，會經由一內含鐵電液晶板 (ferroelectric liquid crystal, FLC) 的偏極化裝置，將光波轉換成 TE/TM 兩偏極化態，此頻率由 DSP (digital signal processing) 晶片控制，約為 50 Hz。當 FLC 進行轉換時，會產生一小的折射偏移量，因此入射光之相對高容限可避免輸出的圖案差異形成。而繞射圖案由是 1024 × 1024 解析度的照相裝置所得後輸出至 DSP 晶片，每 20 ms (即每秒可取得十個資料點) 以傅立葉轉換更新相對的相位，可即時測得蛋白形變，並允許非常小之蛋白質形態與結構變化的即時量測。此處所得數據將傳送至個人電腦，待進一步分析，以提供即時的數據並解析每一生物分子薄層的厚度和折射率變化。方均根的雜訊值約為 ± 0.1 mrad。此表示表面濃度的誤差在 0.1 pg/mm^2 或小於 0.1 \AA 的厚度差異。

DPI 分析技術中最基本的參數是折射率，而最簡單的確認方式是測量一已知溶液的 RI 值，並和已建立的 DPI 數值做比較。在標準化的測試實驗中，使用一標準的蔗糖 (sucrose) 溶液，進行分析。首先將用乙醇/水混合溶液進行校準，再加入 0.2% (w/v) 的蔗糖標準溶液，溫度控制在 20 $^{\circ}\text{C}$ 得到的 RI 值為 1.333267，與文獻提到的 1.333270 相吻合，僅 0.0002% 的誤差值。

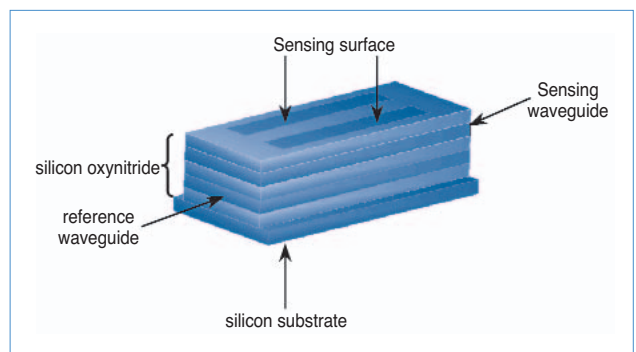


圖 5. DPI 感應晶片結構圖。

四、應用

由於 DPI 在分子交互作用的定性分析、結構的量測和動態系統的平衡機制，均具有極高的準確性，即時的量測和高解析度更大幅增進在生物醫學的應用性。因此，英國的 Farfield Sensor 公司，所發表的 AnaLight® Bio200，見圖 6。已成功地在蛋白質、脂質及核酸等生物分子上，進行包括介質、表面特性和奈米醫學等各方面突破性的研究。以下舉例說明並探討。

1. 單分子結構及構形變化量測

以蛋白質分子為例，基本上由二十種胺基酸所組成的一級結構，會經由折疊後形成二級、三級結構，甚至是蛋白質單體 (monomer) 與單體間組合成的四級結構。由於組成非常複雜，因此蛋白質要有正確的分子構形，才能有效執行其生理功能。一般而言，pH 值、離子濃度、溫度、界面活性劑或劇烈震盪等條件，會破壞蛋白質分子各級構造，稱之為變性 (denaturation)。變性後的蛋白質大多會失去其生理活性，因此量測蛋白質的構形，可推測其在生理上的功能活性。

Cross 等人⁽⁵⁾ 使用 AnaLight® Bio200 量測抗-HAS (anti-HSA)，測得其厚度為 5.02 nm，此量測值低於以往典型 IgG 抗體的偵測數值⁽⁹⁾，並且抗體分子最短軸的長度約 6 nm。然而在實驗中，抗-HAS 分子在晶片上僅有一半的覆蓋率 (51.6%)，經計算得其密度為 0.366 g/cm³。因此有許多因素會影響偵測結果，例如分子在晶片上之分布情形、分子本身是否均質化、分子在晶片上的撓性 (flexible) 等，皆可能影響抗體分子構形改變。

2. 分子—分子間相互作用

大部分酵素也是由蛋白質所組成，分子量介於 12—1000 kDa 之間，甚至超過，其中有些酵素需要輔基 (prosthetic group)，例如金屬離子、coenzyme A、NADPH 等輔助維持其活性。例如轉麩胺醯胺酶 (transglutaminase，分子量 77 kDa) 需要鈣離子才有活性，首先在晶片上固定 transglutaminase 分子，經量測獲得其厚度為 3.8

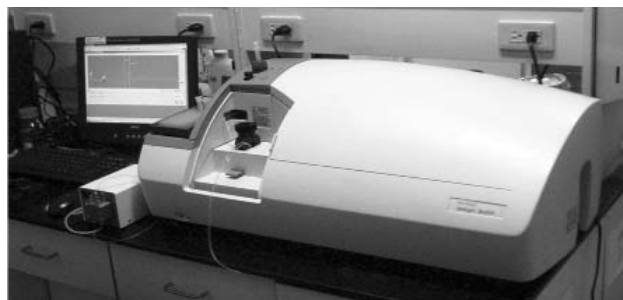


圖 6. AnaLight® Bio200 儀器圖。

nm，氯化鈣溶液 (含有鈣離子) 流經晶片後，transglutaminase 分子厚度減少約 0.3 nm，若在控制組中加入氯化鈉溶液 (含有鈉離子)，並不產生構形改變。由此可知鈣離子與 transglutaminase 結合，並產生構形改變，此外，氯化鈣與氯化鈉中含有相同的氯離子，有關折射率的改變可計算出鈣離子與 transglutaminase 之間的親合常數 1.72 mM⁽¹¹⁾。

生物學上分子與分子之間的相互作用，在訊息傳遞上扮演重要角色，像抗體—抗原 (antibody-antigen)、配位體—接受器 (ligand-receptor) 及互補 DNA 序列等。其間的相互作用往往會改變本身的構形，使其間更相互緊密的結合，而這中間的變化也以原子等級的層次改變。舉例 streptavidin 與 biotin 之間相互作用，在 AnaLight® Bio200 分析儀量測到 streptavidin 的厚度為 6 nm，與 X-ray 結晶圖譜結構相符合，之後加入一定量的 biotin 分子 (能與 streptavidin 專一性結合)，streptavidin 與 biotin 結合後密度 (density) 增加而厚度 (thickness) 減少，接著再加入一定量的 biotin 分子，這時因 streptavidin 分子因為沒有多餘的位置可以讓 biotin 分子結合，所以只是非專一性的碰觸，而且密度並未改變。

在蛋白質專一性結合當中，一般來說，密度的增加跟質量的獲取以及厚度的減少有關，而產生些微的構形改變。相反的，非專一性結合的情形，其密度持平，而質量與厚度增加。而且非專一性的結合，算是外加入的分子，因此厚度的減少或構形的改變，只跟專一性結合有關。密度與厚度可以當作蛋白質功能很好的指標，不僅可以偵測到非常小的分子結合到較大的蛋白質分子 (上述例子，244 Da 結合至 55 kDa)，還可以得到分子結合的相關資訊。

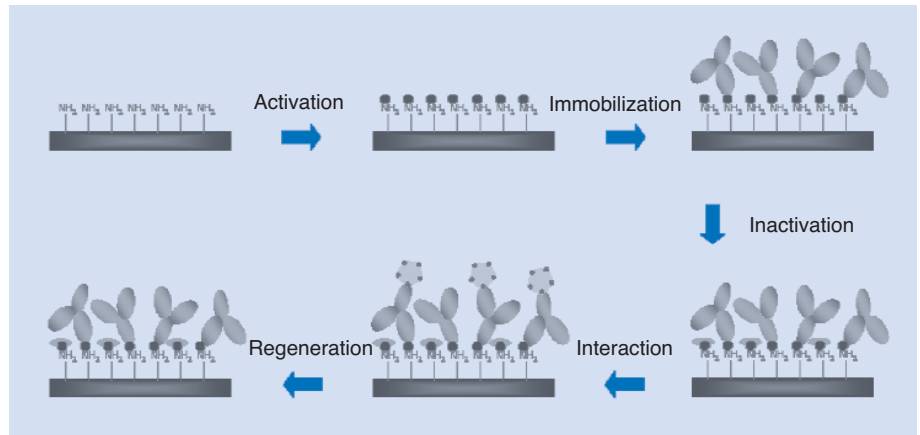


圖 7.
例用 DPI 進行蛋白-蛋白間交互作用之研究。

另外，本實驗室將 C-反應蛋白 (C-reactive protein)⁽¹⁰⁾，此一心臟血管疾病發危險指標，導入生物晶片的概念，在 AnaLight® Bio200 中進行抗體-抗原間交互作用的實驗。感應晶片表面的蛋白質分子反應過程如圖 7 所示，實驗結果之一如圖 8 所示。再次證明 DPI 於生物樣品應用的高度潛力。

3. 奈米分子醫學診斷及藥物篩選

AnaLight® Bio200 在醫學診斷量測可以說是很重要的應用之一，能即時且精確診斷出標的分子並觀察其演變 (例如分子聚合)。例如本實驗室將會感染結核病的結核桿菌抗原當作品片表面感測探針，可以探測結核病人血液中的抗體，達到檢測目的

(如圖 9 所示)。除此之外，還可以即時觀察抗體與抗原分子間構形的變化。目前估計約有五十種神經退化疾病，有異常蛋白質聚合的現象，包括阿茲海默症、帕金森氏症等，這些蛋白質聚合已知具有毒性，然而真正的作用機制仍不清楚，目前分析聚合過程的方法需要一段很長的時間，而神經毒性的產生與一些較短的單元體在早期發生聚合過程有關，所以透過 DPI 技術可以觀察到蛋白質初期聚合的過程。

例如在過去十幾年認為 β -amyloid 是造成阿茲海默症神經毒性有關的胜肽，使用 DPI 技術可以研究聚合成長的過程，從纖維新生到成熟的澱粉狀蛋白狀態，可即時觀察 β -amyloid (1-40) 於晶片上

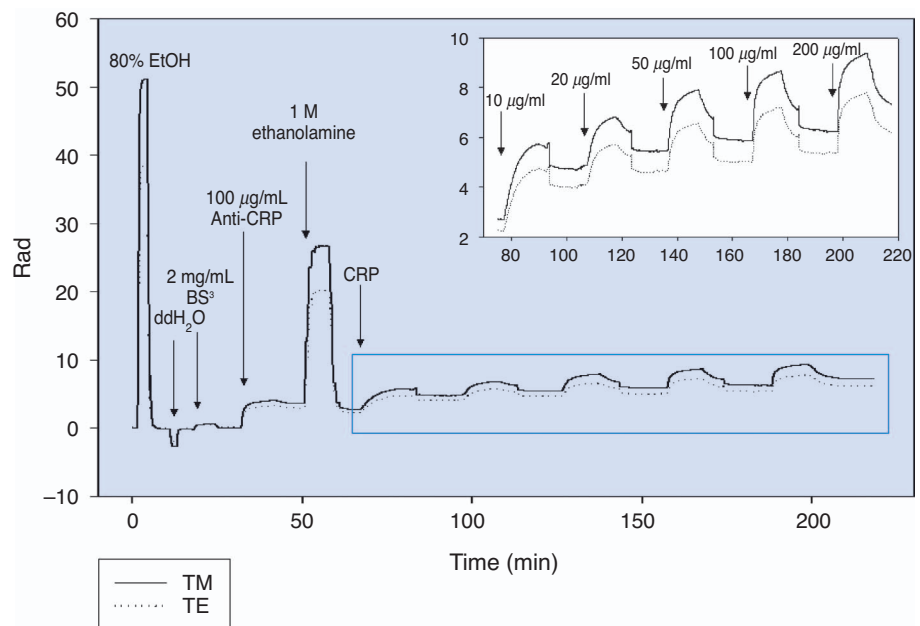


圖 8.
CRP 分子與 anti-CRP 分子於 DPI 中於固-液間相互作用所得之動力學研究 (林世明老師實驗室提供)。

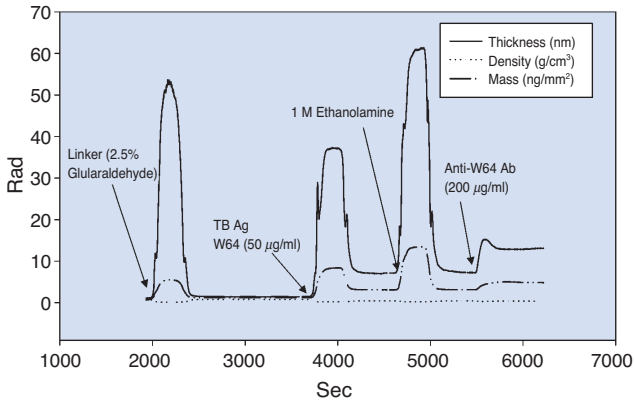


圖 9. 結核菌抗原與其抗體於 DPI 晶片上之相互作用。經由 DPI 計算可得知分子之厚度、密度以及質量的變化 (林世明老師實驗室提供)。

聚合的情形，經過 72 小時的聚合之後量測到厚度達 20 nm，並將晶片上形成的澱粉狀纖維作掃描式電顯掃描之後，證實 β -amyloid 聚合的情形。聚合的過程當中可以加入抑制物，俾觀察到 β -amyloid 聚合被抑制的情形，達到初期藥物篩選的目的⁽¹¹⁾。

4. 奈米科技之應用

在奈米材料量測上，DPI 也提供即時且準確之量測。例如量測 80 nm 大小的矽材質圓球，首先在矽晶片上固定一層 polyethyleneimine，量得厚度為 0.74 nm，折射率為 1.4799，並有 79% 的覆蓋率，覆蓋質量為 0.619 ng/mm²，加入矽圓球之後測得厚度為 78.19 nm，折射率為 1.3646，覆蓋質量為 41.532 ng/mm²⁽¹¹⁾。所以可以提供奈米研究以及表面量測科學家清楚了解表面分子即時變化的過程、原子等級的高解析的能力、比較其他量測儀器 (例如中子反射、橢偏儀) 所檢測之結果。

技術	定量分析	準確性	即時量測	接近體內狀況量測	細微結構分析
SPR	不行	---	可以	可以	低
X-ray crystallography	有	高	不行	不行	非常高
Neutron reflection	有	非常高	不行	可以	高
Dual polarisation	有	非常高	可以	可以	中等

五、結論

DPI 技術成功藉由感應晶片中雙光波導管的結構，可即時偵測晶片表面之生物分子薄膜的厚度和密度等構形改變，解析度達 0.1 Å 的原子等級，直接進行比較，如表 1。同時與一些量測單分子光學技術及分析方法如 X 射線結晶法、NMR 及中子反射 (neutron reflection) 之資料比較，具有在定量、即時以及在生理狀態下量測的優勢，若以動力學分析方法比較，像高靈敏的生物感測技術 SPR 所提供之數據內容有限，DPI 具高準確性及高解析量測分子密度與質量的優勢，因此 DPI 在生物醫學的應用上更具發展潛力。

參考文獻

1. G. Ramsay, *Commercial Biosensors*, Wiley Interscience (1998).
2. B. Liedberg, C. Nylander, and L. Lundstrom, *Sens. Actuat.*, **4**, 299 (1983).
3. *BIATechnology Handbook* (1994).
4. J. E. Gestwicki, H. V. Hsieh, and J. B. Pitner, *Anal. Chem.*, **73**, 5732 (2001).
5. G. H. Cross, A. A. Reeves, S. Brand, J. F. Popplewell, L. L. Peel, M. J. Shwann, and N. J. Freeman, *Biosensors and Bioelectronics.*, **19**, 383 (2003).
6. L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati, and M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.*, **231**, 698 (1993).
7. K. Kim, H. Minamitani, H. Hisamoto, K. Suzuki, and S. Kang, *Analytica Chimica Acta*, **343**, 199 (1997).
8. G. H. Cross, Y. Ren, and N. J. Freeman, *J. Appl. Phys.*, **86**, 6483 (1999).
9. L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, and A. McPherson, *Biochemistry*, **36**, 1581 (1997).
10. P. M. Ridker, *Eur. Heart. J.*, **19**, 1 (1998).
11. <http://www.farfield-sensors.com/keyareas.html>

表 1. 雙偏極化技術與量測單分子光學技術及分析方法之比較⁽⁵⁾。

-
- 林雲漢先生為國立台灣大學光電生醫中心博士班學生。
 - 陳吉良先生為國立台灣大學光電生醫中心博士班學生。
 - 王裕銘先生為國立台灣大學應用力學研究所所博士班學生。
 - 王安邦先生為德國 Erlangen-Nurnberg 大學流體力學博士，現任國立台灣大學應用力學研究所教授。
 - 黃榮山先生為美國加州大學洛杉磯分校機械工程博士，現任國立台灣大學應用力學研究所助理教授。
 - 李世光先生為美國康乃爾大學理論與應用力學博士，現任國立台灣大學應用力學研究所教授。
 - 林世明先生為英國劍橋大學生物技術博士，現任國立台灣大學光電生醫中心副教授。
 - Yun-Han Lin is a Ph.D. student in the Center for Optoelectronic Biomedicine at National Taiwan University.
 - Ji-Liang Chen is a Ph.D. student in the Center for Optoelectronic Biomedicine at National Taiwan University.
 - Yu-Ming Wang is a Ph.D. student in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.

- An Bang Wang received his Ph.D. in fluid mechanics from the Friedrich-Alexander-Universitat, Erlangen-Nurnberg, Germany. He is currently a professor in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.
- Long-Sun Huang received his Ph.D. in mechanical engineering from the University of California at Los Angeles, USA. He is currently an assistant professor in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.
- Chih-Kung Lee received his Ph.D. in theoretical and applied mechanics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.
- Shiming Lin received his Ph.D. in biotechnology from Cambridge University, UK. He is currently an associate professor in the Center for Optoelectronic Biomedicine at National Taiwan University.