

非遷徙式單分子螢光共振能量轉移 在分子生物學上的應用

Application of Immobilized Single Molecular Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) in Molecular Biology

章為皓

Wei-hau Chang

近年來單分子螢光造影和分析已經躍升為解決生物系統中的動態與非均質性的利器。其中的非遷徙式單分子螢光能共振光譜造影方法，藉著把核酸固定在玻片上，大大簡化對於蛋白質與核酸的作用的造影與分析，使得像是蛋白質的構型變化或在核酸上的遷移都可被即時觀察到。我們在此介紹單分子螢光能共振的原理簡單的全反射式螢光顯微鏡的架設，和其成功地應用於解決核糖核酸聚合酶上核糖核酸通道的案例。

In recent years, single molecule optical imaging and analysis has emerged as a powerful way to unfold the dynamic and heterogeneous behavior of numerous biological systems. Among all single molecule technique, single-molecule fluorescence resonance energy transfer (smFRET) spectroscopic imaging in an immobilized fashion is particularly suitable for following the interactions between nucleic acids and proteins to 1 nm resolution with time resolution ranging from 10 ns to second. Here, we describe the principle of smFRET and a simple version of total internal reflection instrumentation and provide a successful application to the study of RNA exit channel on a transcribing RNA polymerase II.

一、前言

隨著光學物理技術的演進，單分子生物物理的研究在最近十年間，於北美、歐洲和日本蓬勃發展，以單分子為標題的論文以指數速度成長⁽¹⁾。如同當年蛋白質結晶學和水溶液核磁共振一般，單分子量測最終必然成為許多生物學家的必備工具。在單分子螢光發展的早期，筆者很幸運地便加入朱棣文的

團隊，發展以單分子螢光研究神經細胞釋出傳導物質的方法，而進入這項領域。在中央研究院化學研究所的這些年時間，建立了單分子螢光共振能系統。在此撰寫此一短文，簡單介紹單分子螢光的一般實用知識，作為提倡單分子螢光生物物理之用。

1. 何謂單分子

原子與分子最早的概念可以追溯自幾千年前，

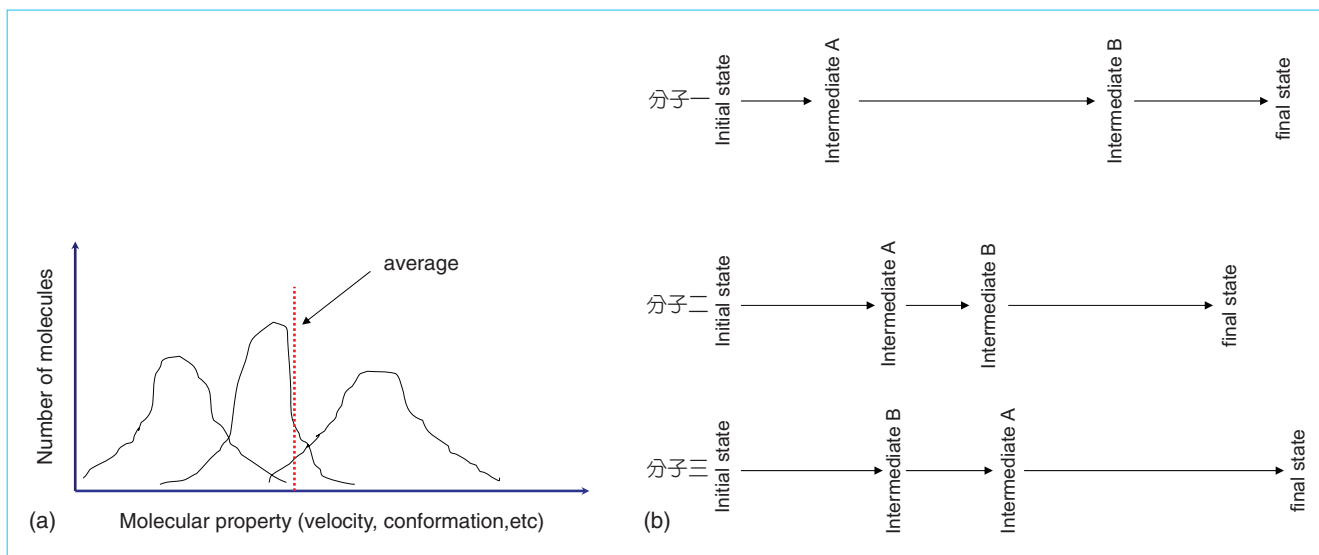


圖 1. (a) 分子物理量分布圖，(b) 分子反應時序圖。

希臘人猜測物質是由不可分割的最小單元所組成的。他們將這個單元稱為「阿騰 (atom)」，就是不可再分割的意思。這樣的觀念對人類早期的文明進展並沒有太大幫助，一直到上世紀，有一位稱為亞佛加厥 (Avogadro) 的人，重新提出氣體是由氣體分子組成的概念，成為近世原子與分子科學的濫觴。其實我們對這位亞佛加厥先生並不陌生，還記得國中所學的波以耳定律嗎？其中有個亞佛加厥常數是「六乘以十的二十三次方」。不過，若使用肉眼是看不見單一的分子，關於分子的知識都是由總體量測獲得的。比方說，氣體分子的運動速度是靠測量一大罐氣體的溫度所推得，並非用一個雷達對著分子作測速而得。溫度的測量便是一個總體測量，因此所求得的分子速度只是個平均速度 (圖 1(a))。一大罐的氣體裡面總有些分子跑得快，有些跑得慢。那麼分子速度的分布是如何呢？而當分子裡面含有許多原子時，它除了會跑，還會旋轉和振動。所以當一個分子大到像酵素一般，它含有成千個原子，它工作起來可能比引擎還複雜，其中涉及了許多可能的路徑和時序 (圖 1(b) 時序圖)。這些機制往往要借助於模型的推演，才能由總體量中導出。然而模型是真的嗎？如果我們能看見單一分子的動作，豈不能直接觀察到這些路徑和時序？

2. 單分子能否看得見

讓我們來想像怎樣看得見天上的星星和森林旁的螢火蟲。條件一：分子周圍背景必須要低。台灣的光害相當嚴重，特別是在台北市裡，如果迷路了，靠著小時候所學習的星座知識來判斷東西南可能派不上用場。因為實在太亮了，抬起頭來連一等星都不易看見。不過往市郊移動，冬季可以看見獵戶座 (Orion) (圖 2)，夏季可以看見夏季大三角 (summer triangle)。我有一次觀星的特別經驗是在美國的太浩湖畔 (Lake Tahoe)，在十月底漆黑的夜空中充滿了密密麻麻的星星，以致於辨識星座成為一項高挑戰性的活動。條件二：分子本身必須很亮或是被一個很亮的標記所附著。台北的近郊因最近生態保育的成功，螢火蟲又出現了。在沒有路燈的山徑旁可以看到數以百計的光點。然而一旦螢火蟲沾到衣服或手臂，反而不見了蹤跡，原因是牠不發光了。螢火蟲不發光時，只是一隻約一公分的有翅黑蟲，所以我們不能直接看見螢火蟲本身，卻可以藉著牠發出的光來追蹤牠。

3. 單分子生物物理的里程碑

如同蛋白質結晶學的發展，單分子造影也是一個被物理科技所引導的領域。它的濫觴起源於九零年代初期。當時在 IBM 的 W. E. Moerner 成功地使

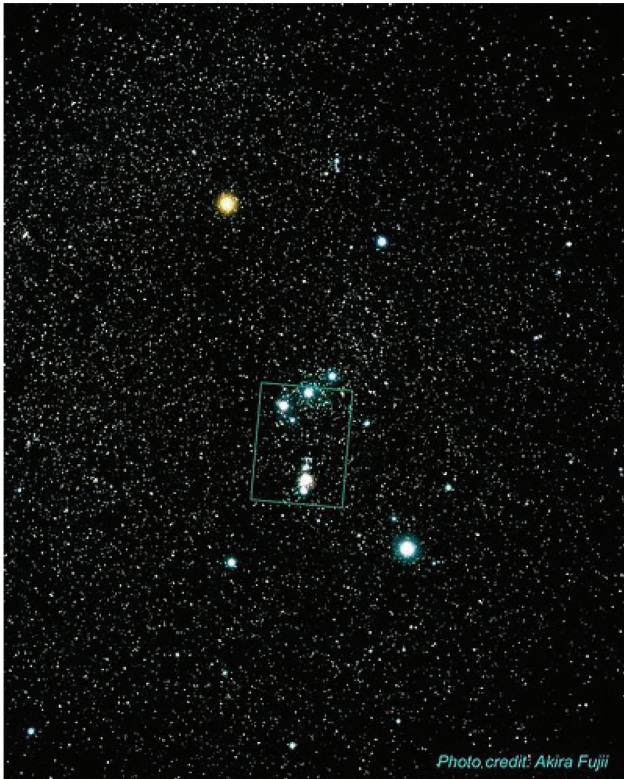


圖 2. 冬季天空的獵戶座。

用低溫光譜方法在固態物質的表面首次看見單分子，算是單分子的鼻祖，於 2008 獲頒 Wolf Prize。九零年代中期，市面上出現了 Cy 染劑，日本專攻分子馬達的生物物理學家柳田敏雄 (Toshio Yanagida) 使用 Cy 染劑標記了 F_0-F_1 ATPase，並把它固定在玻片的表面上，用全反射式顯微術 (total internal reflection microscopy) 選擇性激發靠近玻片表面的 Cy 染劑，發現 F_0-F_1 ATPase 每消耗一個 ATP 可以轉 120 度⁽²⁾，為單分子生物物理建立了架構。

九零年代末期在美國加州大學柏克萊分校 Daniel Chemla 實驗室來自以色列的高級研究員 Shimon Weiss 開始將雙色比例譜學 (two color ratiometric spectroscopy) 導入單分子的世界，成為使用單分子方法研究螢光能量轉移的始祖。Weiss 與 Chemla 共同指導的研究生河太極 (Taekjip Ha) 後來進入美國史丹福大學，加入朱棣文 (Steven Chu) 的研究團隊，研發出非遷徙式單分子螢光能量轉移的方法⁽³⁾，為核酸與蛋白質交互作用的單分子測量開啟了新紀元。

二、單分子螢光共振能轉移原理和儀器

1. 非遷徙式單分子

要能有效觀測一個特定單分子的時序，如果可以把單分子固定，會避免因為單分子移動所造成的許多麻煩。而固定單分子有許多手段，比方藉著分子上的生物素 (biotin) 黏在玻片上方的卵白素 (streptavidin) 上，或是將單分子嵌在洋菜凍中 (agarose gel) 或囊泡 (vesicle) 中。實現非遷徙式的單分子螢光能量轉移實驗系統必備的要件有：光學系統、單分子標記和固定化學、影像處理三項要素。因此一個實驗室要從事單分子螢光能量轉移的實驗，就得同時擁有光電、化學和生物不同專長的成員，是一個不折不扣的跨領域研究。接下來要逐一介紹這幾項要素。

2. 低背景光學系統

背景來源有幾項，一個是來自物鏡、鏡油、甚至玻片，或是溶液或細胞液中含有自發螢光的雜質，或是來自於標定的染劑。因此要實現低背景的螢光造影，除了使用沒有自發螢光的光學系統和溶液，最好再設法只激發單一分子所在的奈米尺度小體積。目前有幾個方法可導致單一分子的激發，全反射 (TIR) 可以造成漸逝波，只激發距界面 150 nm 的空間；共軛焦 (confocal) 只激發一個奈米尺度的小體積，並利用置於共軛焦平面的小孔可以濾去激發體積附近由非焦平面所發出的雜光。比較複雜的方法，像是德國 Stephan Hell 發明的激發輻射清除法 (STED)，甜甜圈形狀的清除激發輻射 (stimulated-emission depleting beam) 使得該分子附近的螢光分子的激發受到抑制。這個方法需要用到複雜的非線性光學技術和梯度式光學相位片。或是 Harvard 莊小薇 (Xiaowei Zhuang) 所開發的隨機光啟動顯微術 (STORM or PALM)，該方法涉及設計並合成可被較短波長活化的特殊染劑，因此較不易推廣到一般實驗室。

3. 全反射顯微術

一般而言，實現全反射有兩種方法：一種是物

鏡式全反射 (圖 3)，激發光從倒立顯微鏡的側面，由下往上進入高數值孔徑的油鏡，在下玻片的內表面與水溶液的界面造成全反射，激發固定於下玻片的樣品。該模式的好處是樣品上方有足夠的空間，可以搭配微流道、電生理測量裝置、細胞培養與操縱器，甚至原子力顯微鏡；壞處是激發光的雜光 (stray light) 會導入物鏡，造成背景的提升，因此為了濾掉來自激發光折回的雜光，會犧牲掉一部分想要收集的螢光。物鏡式全反射顯微鏡主要由四家光學顯微鏡廠商 Leica、Zeiss、Nikon、Olympus 提供套裝可立即啟用的系統 (turn-key system)。然而套裝系統並不一定提供合適的雙色分光系統，卻附上一些多餘的模組，索價多在二十萬美金之上。另一種方式是稜鏡式全反射 (圖 3)，做法是在樣品的上玻片上架設稜鏡，激發光由稜鏡導入在上玻片的內表面與水溶液的界面造成全反射。要實現稜鏡式全反射，得用機械加工的方式車出一個架子支撐稜鏡，因此樣品上面的空間被稜鏡和鏡架所佔據，沒有搭配微流道、電生理測量裝置等可能。

使用全反射式所激發的範圍是直徑大約為 100 微米的寬場，收集螢光所使用的是高感度的電荷耦合照相機。筆者的實驗室採用物鏡式全反射加上自製雙色分光裝置，配上高感度的電荷耦合照相機，花費不到十萬美金。寬場造影的時間解析度受限於電荷耦合照相機對於高化速資料轉移的效率，時間

解析度約在十到一千毫秒之間。如果是使用共軛焦掃描系統，配上崩潰式光二極體，可以達到十奈秒的解析度。崩潰式光二極體比起電荷耦合照相機便宜很多，然而逐點掃描式的資料收集速率比起寬場方法慢一千到一百倍左右。

4. 非遷徙式單分子螢光能量轉移的螢光收集與處理

光路的架設如圖 4 所示，以雙色分光裝置為核心 (圖 4(c))。假若一個生物分子上同時標記兩個染劑，一個是螢光給予者，一個是螢光接受者。如果用給予者的激發光照射樣品，螢光給予者所發出的螢光因為分光器的作用會落在電荷耦合照相機的上半部 (圖 4(d))，同理如果使用接受者的激發光照射樣品螢光接受者所發出的螢光，因為分光器的作用會落在電荷耦合照相機的下半部 (圖 4(d))。電荷耦合照相機的上半部每一個畫素坐標都會映射到下半部某一個畫素的坐標。由於將單分子固定在玻片上，某一個單分子在某一時刻所在的畫素坐標和下一個時刻所在的畫素坐標應該是一樣的，因此可以輕易地從電荷耦合照相機所收到的電影中取得某一個生物分子上兩個顏色的強度對時間的關係，亦即時序圖 (圖 5(b))。當給予者的放射光譜和接受者的激發光譜有好的重疊 (圖 5(a))，並且兩者的距離在 1 至 8 奈米之間，螢光能量轉移就有條件發生。我

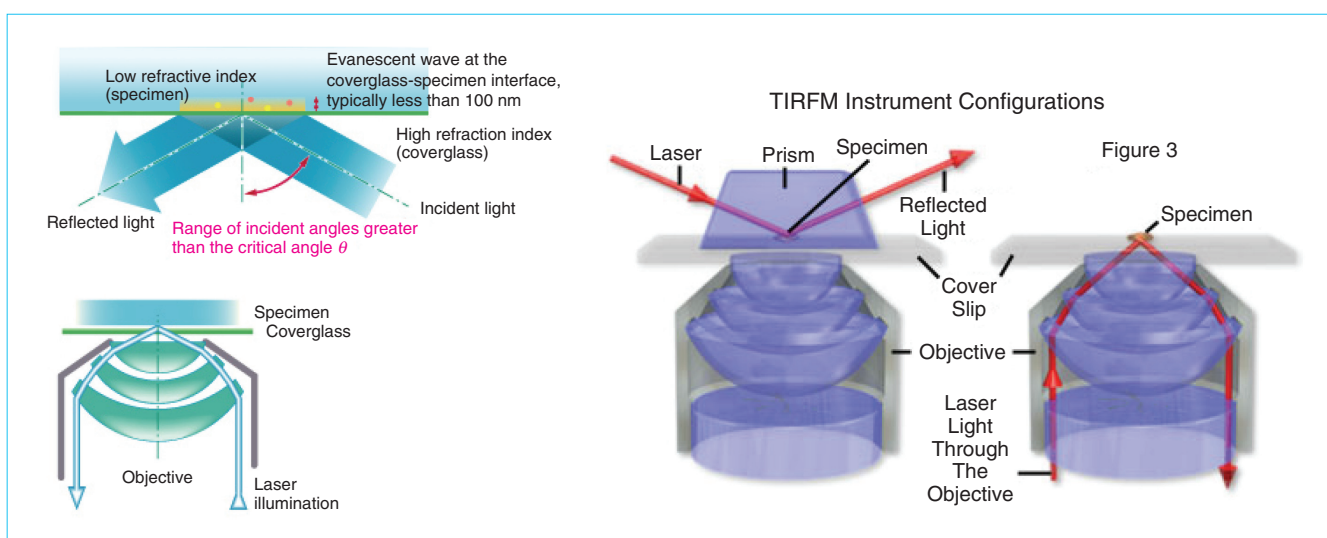


圖 3. 物鏡式和稜鏡式全反射 (取自 www.nikon.com 與 www.olympusmicro.com)。

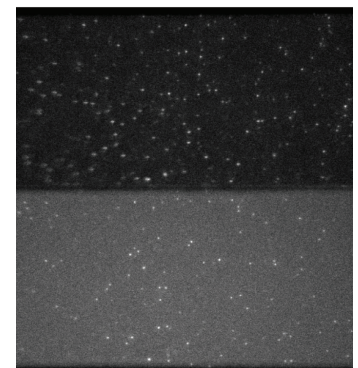
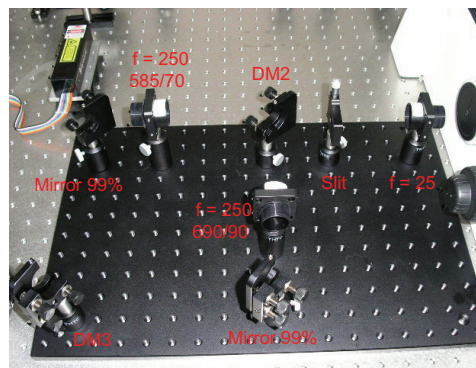
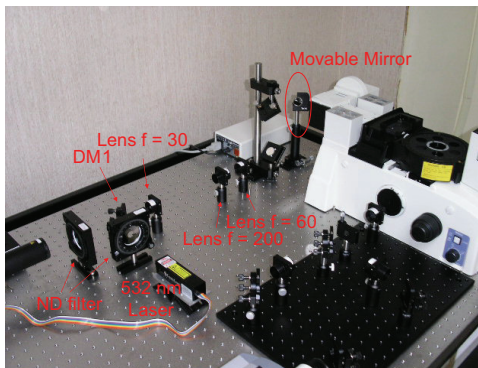
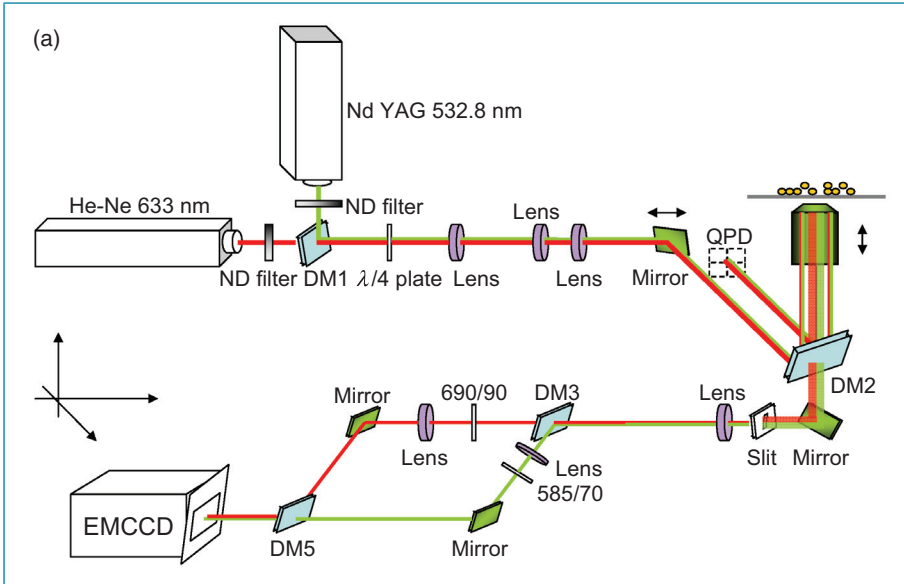


圖 4. (a) 單分子雙色螢光顯微鏡光路設計，(b) 單分子雙色螢光顯微鏡實體圖，(c) 單分子雙色螢光顯微鏡分光單元，(d) 分光後攝于電荷耦合相機的像：上半部為螢光給予者，下半部為螢光接受者。

們如何知道這是一個單一螢光接受者和給予者發生螢光的事件呢？很簡單，可以用雷射把螢光接受者光漂白，這時螢光能必須立時還給螢光給予者，導致螢光給予者的亮度突然上升(圖 5(b))。

三、單分子螢光能量轉移在核醣核酸聚合酶的應用⁽⁴⁾

細胞最重要的功能之一是把藏在基因庫中的資訊表達出來。基因表達的中間產物是核醣核酸，而製造核醣核酸的酵素正是核醣核酸聚合酶。真核生物的核醣核酸聚合酶是由十二個不同的蛋白質藉由非共價鍵所組成，它的原子結構是由筆者的博士論

文指導教授孔恩伯格所解出。因為這份工作使孔恩伯格獨得 2006 年的諾貝爾化學獎。在 2007 為了慶祝孔恩伯格六十歲所舉行的真核轉錄會議上，孔恩伯格獲知筆者的實驗室已自製了單分子螢光能量轉移光譜儀，於是建議我們實驗室解決核醣核酸聚合酶上核醣核酸的出口通道。這一項工作其實在德國的克拉梅爾 (Cramer) 也正在進行，但是尚未發表。我們決定採取與克拉梅爾不同的實驗方法來探索核醣核酸聚合酶上核醣核酸的出口通道。當時關於核醣核酸的出口通道有兩個猜測(圖 6(a))。猜測的根據是核醣核酸聚合酶的表面有兩條帶正電、寬約 1.5 奈米的溝槽，足以容納一個單股的核醣核酸。如果核醣核酸是從第一個猜測的溝槽通過，它就必

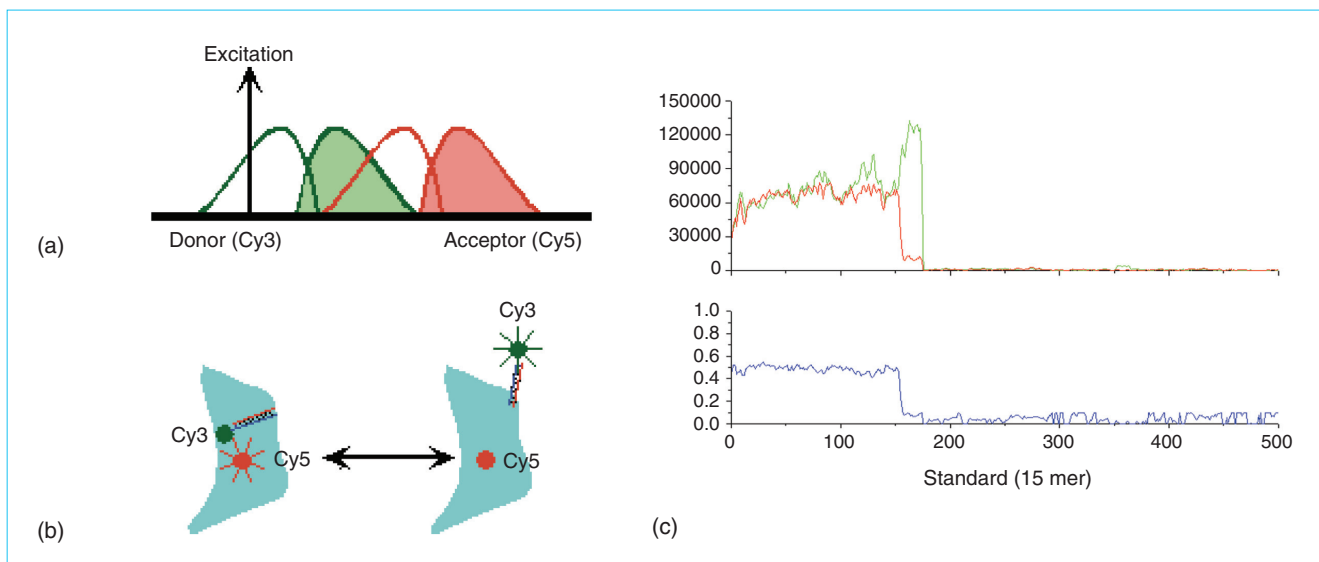


圖 5. (a) 螢光共振能量轉移之光譜條件，(b) 螢光共振能量轉移時序圖：綠色為給予者，紅色為接受者。

須經過核醣核酸聚合酶的第四個單元體。然而這一條路徑要求核醣核酸轉彎九十度，這樣的結構在能量上較不穩定。如果第二個猜測是正確的，核醣核酸必須經過核醣核酸聚合酶的第三個單元體。我們設計了兩組對等實驗。在第一組實驗中，將一個螢光給予染劑標記在核醣核酸聚合酶的第四個單元體上，把一個螢光接收染劑固定於核醣核酸的五碳端。如果第一個猜測是正確的，將預期看見延長的核醣核酸會導致螢光轉移率的上升，反之，就不會。在第二組實驗中，我們將單一螢光給予染劑標記在核醣核酸聚合酶的第三個單元體上，把一個螢光接收染劑固定於核醣核酸的五碳端，如果第二個猜測是正確的，將預期看見延長的核醣核酸會導致螢光轉移率的上升，反之，就不會。較早的時候，我們打算在玻片上做即時轉錄，期待隨著時間的增加，延長的核醣核酸將從螢光轉移率連續的上升被證實。這個策略後來受限於核醣核酸聚合酶的標記率太低而作罷。所以我們選擇三個不同長度的核醣核酸引子片段，分別是十個核苷酸、十七個核苷酸、二十六個核苷酸，以定義轉錄時的三個時間點。我們得到的單分子時序圖，由每個情況下數十個單分子的螢光轉移率，我們建構了分布圖 (圖 6(b))。由分布圖上的螢光轉移率，可以求得十個核苷酸、十七個核苷酸、二十六個核苷酸的核醣核酸

的五碳端分別至核醣核酸聚合酶的第三個單元體和第四個單元體的距離，從而定出核醣核酸的出口通道，如圖之模型 (圖 6(c))。

四、結論

筆者的實驗室未來在單分子螢光有兩個方向，一方面是用化學生物修飾法將染劑接在像核醣核酸聚合酶的巨分子上，使得核醣核酸聚合酶即時轉錄的觀測成為可能。另一方面，我們正在研發四個顏色的螢光共振能譜學，以便可同時看見核醣核酸聚合酶不同區域運動的耦合程度，以了解核醣核酸聚合酶工作時是否像核醣體般有不連續的蠕動⁽⁵⁾，請大家拭目以待。有興趣從事單分子螢光的朋友，可從河太極 (Taekjip Ha) 所編的專書中獲得許多有用的知識⁽⁶⁾，也歡迎直接與筆者聯落⁽⁷⁾。

參考文獻

1. W. E. Moerner, *PNAS*, **104**, 12596 (2007). 台灣單分子螢光生物物理的先驅者有中央研究院原分所暨台大物理系范文祥教授，他也是筆者的學長。范教授回台服務十五年，筆者認識他剛好也是十五年。去 (2008) 年九月的時候，筆者剛完成與范老師第一次正式的合作。我們補足了用生物素固定核酸的實驗，以回應物理通訊評審員對於我們單分子樣品的疑慮時，卻聽說范老師已走完了人生的最後一程。

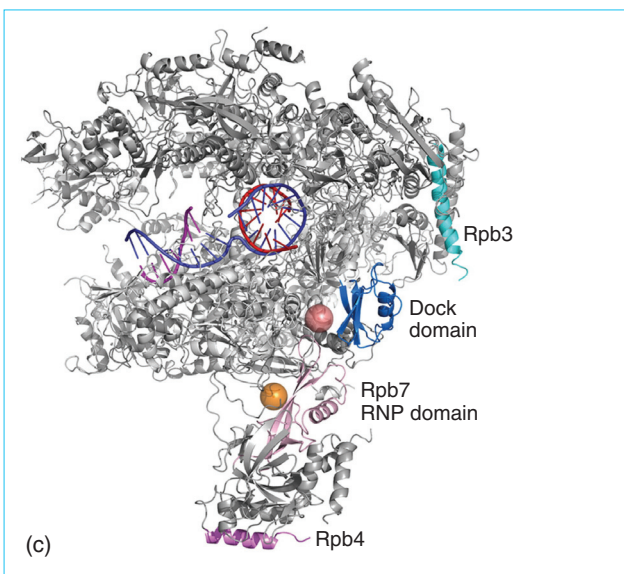
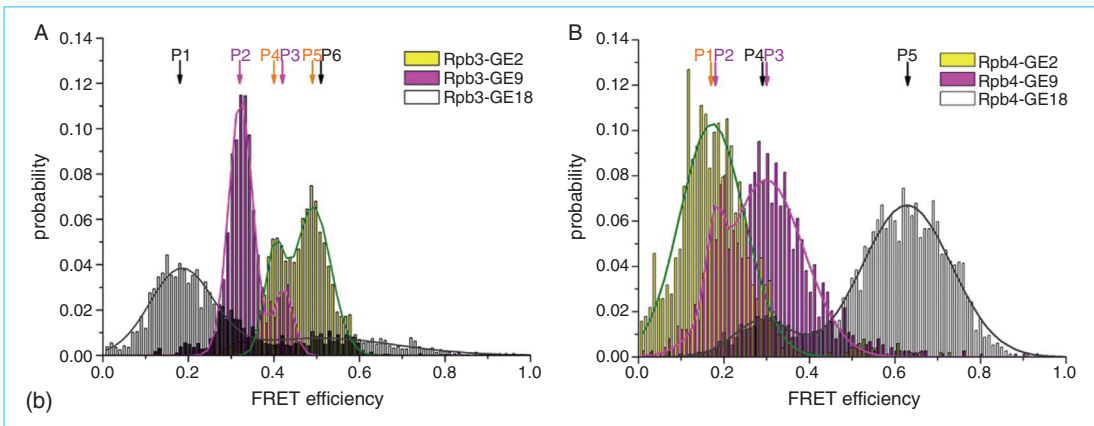
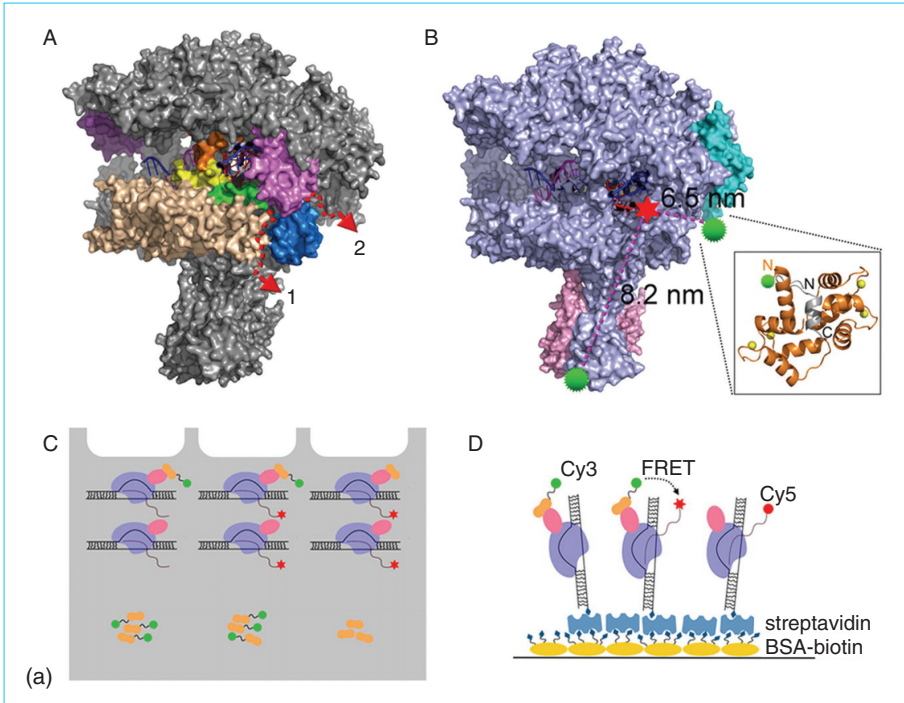


圖 6。

(a) A 標了兩個可能的 RNA 通道⁽⁴⁾。(b) 左圖是當螢光供應者置於核糖核酸聚合酶第三個單元體時，第三個單元體上的螢光供應者與 RNA 五端的螢光接受者的螢光共振能轉移率隨著 RNA 增長而下降；右圖當螢光供應者置於核糖核酸聚合酶第四個單元體時，螢光共振能轉移率隨著 RNA 增長而上升⁽⁴⁾。(c) 藉由螢光共振能轉移率所求得的核糖核酸聚合酶上 RNA 出口通道的模型⁽⁴⁾。

2. 全反射式顯微術早在九零年初被 Daniel Axelrod 引入生物物理，主要用於細胞膜的研究。當入射光大於臨界角： $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ ，電磁場的強度隨著離開界面的距離有指數遞減的關係， $I(z) = I_0 \exp(-z/d)$ ， $d = \lambda_0 * [n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2]^{-1/2} / 4\pi$ 。
3. 螢光能量轉移在生物分子測距上應用的鼻祖是美國史丹福大學 Lubert Stryer 先生。
4. C.-y. Chen, C.-C. Chang, C.-f. Yen, T.-K. M. Chiu, and W.-h. Chang, *PNAS*, **106**, 127 (2009).
5. P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, D. W. Staple, H. Lee, R. P. Hickerson, H. F. Noller, and T. Ha, *PNAS*, **106**, 2571 (2009).
6. P. R. Selvin and T. Ha, edited, *Single Molecule Techniques: A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2008).
7. 02-2789-8558, weihau40@gmail.com.

- 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-hau Chang received his Ph.D. in biophysics from Stanford University, USA. He is currently an assistant research fellow in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.

勘誤啟事：

第170期科儀新知第70頁右欄第三段部分文字有誤，謹更正如下：

電子微探儀中聚焦線性光譜儀的運作要點係分析單晶以其中心旋轉，並沿一直線移動，若 X 光光源 (S) 與分析晶體 (C) 距離為 l ，分析晶體與偵測器 (D) 之距離亦為 l ，Rowland circle 半徑為 R ，參見圖 2 所示，則由 Bragg's Law：

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad (3)$$

$$l = 2R \sin\theta \quad (4)$$

$$l = \frac{R}{d} \times n\lambda \quad (5)$$