

# 單一粒子追蹤系統在單分子分析上的應用

## The Application of Single Particle Tracking Technique in Single Molecule Analysis

張宜仁、邱祈翰、黃煜彥、周家復

Yi-Ren Chang, Chi-Han Chiou, Yu-Yan Huang, Chia-Fu Chou

相較於傳統的群體分子量測，單分子檢測技術提供觀察分子間互動現象的機會，同時也可以從中獲得更多統計上的訊息。單一粒子追蹤技術正是單分子檢測技術中最強力的量測方式之一。本文介紹一個即時的單一粒子追蹤系統，其藉由分析微粒子的白光影像，而達到自動回授追蹤的能力。此一系統的軸向解析度小於 50 nm (受限於目前硬體規格)，系統反應頻率為 50 Hz。藉由 DNA 拉扯的實驗，也證實結合磁鑷夾與單一粒子追蹤技術，可以在單分子的觀測中提供足夠的解析與應用。

Comparing to ensemble measurement, single molecule analysis allows us to truly observe the interaction between single molecule pair, and provides more detailed statistical information of the static and dynamic behaviors of individual molecules. Single particle tracking is one of the most powerful techniques in single molecule study. In this article, we introduce a real-time single particle tracking system which provides automatic feedback tracking of a magnetic microsphere based on its bright field diffraction patterns. The axial resolution of this tracking system is less than 50 nm, limited by our current hardwares, and its response rate is 50 Hz. We demonstrated, using DNA tethering experiment combined with magnetic tweezers, our system provides the capability of measuring molecular interactions in single molecule level.

### 一、前言

在生物化學及分子生物領域的研究中，如何觀察與驗證分子折疊與分子間互動的情形，一直是生化反應裡很重要的課題。以傳統一次觀察整個群體分子反應的方式來說，由於只能觀察到分子群體平均的響應，若要解析分子變化的細節，便須控制每一個分子的狀態，讓分子同步地進行反應<sup>(1)</sup>。應用

這樣的方式，若在反應時間很短的時候，由於熱擾動的影響，便相當不容易。而且即使每一個分子能在起點同步，由於其變化過程可能有多種路徑可以進行，訊息混雜一起的結果，也就更加深了觀察細部反應變化的困難度。為了克服這項困難，單分子的觀察與檢測技術便逐漸受到重視與應用。

藉由可以單一地觀察分子個別反應情形的觀察方式，在觀察上就不再需要面對同步分子反應的問

題，而可以直接得到較高時間解析的訊息。同時由於所獲得資訊不再僅是平均響應的結果，而是單一分子各自的變化，於是便可以針對該反應進行更細部的分析與瞭解，例如：分子參與反應的分布、各反應路徑的比率與反應速率<sup>(2, 3)</sup>。而在各種單分子檢測技術中，單一粒子追蹤便是最廣泛應用的技術之一。

## 二、單一粒子追蹤技術

簡單來說，單一粒子追蹤的技術便是將所觀察的分子連接上可供顯微鏡下觀察的標記物，藉由觀察標記物動態移動的情形，便可進一步瞭解所觀察分子與環境互動的情形。針對被觀察分子所處的環境，以及所觀察的現象，標記物與追蹤方式也有許多變化。其中可以將之概略地分為藉由螢光或非藉由螢光的標記追蹤兩種類型。

在藉由螢光觀察的方式中，可以由螢光標記物位移所造成螢光影像上螢光點的成像位置與強度變化，反推出螢光標記物的軌跡<sup>(4-7)</sup>，其優點是由於只有標記的分子會產生螢光，可以很輕易地區分標定物與環境。而且螢光標記物通常本身體積較小，例如：奈米尺寸的螢光分子與量子點 (quantum dots)，也比較適合於觀察小分子或甚至是細胞內的狀態。但由於在單分子檢測觀察時，螢光標記的數量會受到限制，甚至也僅是一個螢光分子，於是便需要減低背景雜訊的螢光照明技術與非常靈敏的偵測器，甚至必須累積較長的觀察時間，才能夠取得高訊噪比的螢光影像。於是也就限制了觀察的條件與時間解析度。

對於非藉由螢光的追蹤方式來說，則是利用白光照明的成像像差，或是標記物對特定的波長或照明方式下的散射變化來推定標記物的位置<sup>(8-10)</sup>。使用這樣的偵測方式，由於在光學繞射極限的限制下，標記物的尺寸通常較被標記分子為大，常見的像是微米與次微米尺寸的塑膠、磁性與金屬微粒子。由於標記物尺寸較大的關係，通常不會應用在細胞內的研究，而侷限在細胞表面或是其他非細胞內的觀察。由於白光或是散射影像的訊號通常較螢光強許多，所以也就較為適合觀察一些反應時間很

短暫的現象。而且對於這些微米與次微米的微粒子，若結合光學鑷夾 (optical tweezers) 與磁鑷夾 (magnetic tweezers) 的技術，便可以主動地施加力量在微粒子上，而達到對於所觀察分子進行操控的能力，因而便能獲得更多關於被觀察分子的訊息。

在下文中將介紹藉由觀察微米尺寸微粒子的白光影像，而達到三維追蹤微粒子位移，並由這樣的概念建立一個可以自動追蹤且重建微粒子三維軌跡的系統。最後，也將示範該系統與磁鑷夾的結合，並將此應用在 DNA 單分子受力變化的觀察。

## 三、單一粒子三維追蹤的原理與系統

### 1. 追蹤原理與演算方式

在此將簡單介紹藉由微粒子的白光影像分析微粒子三維位移的現象。圖 1 是在顯微鏡下直徑為 1 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 的磁性微粒子在像平面附近軸向位移時所拍攝下來的一系列影像。由圖中可以發現，當微粒子隨著軸向遠離像平面時，在微粒子離焦影像的周圍會形成一個繞射亮環。其中繞射亮環的直徑則隨著離焦距離的不同而有所改變，尤其當微粒子的位置較成像平面靠近遠離物鏡時，其繞射亮環直徑和離焦距離呈線性關係。藉由該特性，只要以影像分析的方式，將亮環的中心位置與大小計算出來，再配合預先量測的同樣尺寸之微粒子繞射亮環直徑和離焦距離的變化關係，就可以獲得微粒子的三維位置。

關於實際圖形分析計算繞射亮環的中心位置，通常也有幾種方式，例如計算圖片的質心或是利用圖片間的相關函數 (correlation function)<sup>(11)</sup> 進行推測。至於繞射亮環的直徑，則可以藉由分析強度剖面或是利用已知的繞射函數進行曲線擬合<sup>(12)</sup> 的方式得出。一般來說，雖然利用相關函數計算與曲線擬合的計算方式會得到比較準確的數據，但是這兩種方式都需要較長的運算時間。在實驗中為了達到即時追蹤的效率，同時兼顧準確性，便採用圖形質心運算與分析強度剖面交互彼此迴圈修正的方式，計算出繞射亮環的中心位置和直徑。藉由這樣的方式可以利用一般的個人電腦，在小於 1 ms 的時間內就得到繞射亮環的中心位置和直徑。

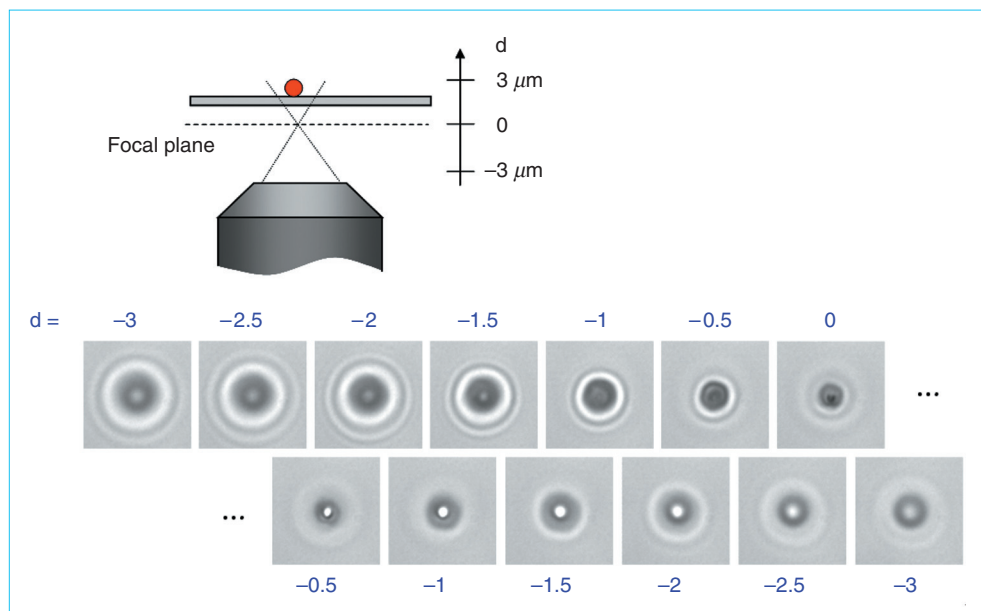


圖 1. 直徑  $1 \mu\text{m}$  的微粒子繞射亮環與離焦距離變化圖。

圖 2 便是利用所提出的演算方式計算出直徑為  $1 \mu\text{m}$  的磁性微粒子離焦距離與亮環直徑的關係。在量測過程中，每一次微粒子的離焦位移步伐為  $50 \text{ nm}$ ，而發現亮環直徑的量測誤差都小於每次位移步伐所產生的亮環直徑變化。也就是說，利用我們的演算方式，在軸向的位移上可以得到低於  $50 \text{ nm}$  的空間解析度。原則上，經由追蹤系統硬體元件的升級 (如下節所述之壓電移動平台)，一般可以得到十奈米以下的空間解析度。

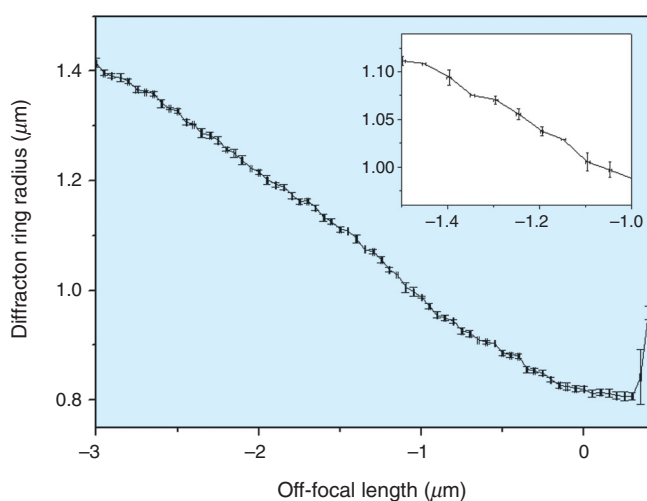


圖 2. 直徑  $1 \mu\text{m}$  的微粒子繞射亮環之直徑與離焦距離關係圖。

## 2. 追蹤系統

由前所述，筆者所使用的追蹤方式是藉由分析微粒子的白光影像作為追蹤的依據，該系統架構主要是建構在一台普通的倒立式光學顯微鏡 (DMI 4000B, Leica) 上，如圖 3 所示。其中所使用的物鏡是  $100\times$  的油鏡 (PH3 CS, Leica)，藉由顯微鏡內部的額外光學放大，可以得到  $200$  倍的放大影像。另外，白光影像藉由 CCD 攝影機 (XC-ST30, Sony) 拍

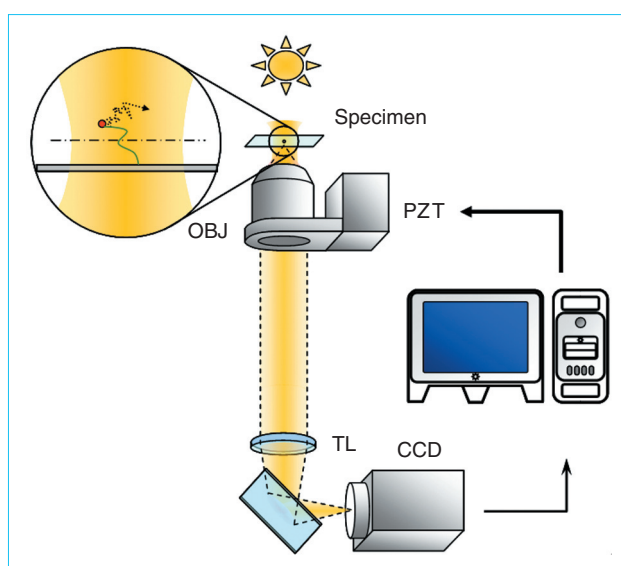


圖 3. 單一粒子追蹤系統架設圖。

攝之後，經由影像擷取卡 (PCI-1045, National Instruments) 傳送至電腦。另外，為了實現即時三維追蹤的能力，在物鏡的下方安置一個壓電移動平台 (MIPOS 100, Piezosystem Jena)，並藉由數據擷取卡 (USB M-6251, National Instruments) 量測與控制壓電移動平台的移動。在本系統中我們利用自行撰寫的自動控制程式 (LabVIEW, National Instruments)，自動化地進行即時影像擷取與分析，以計算出微粒子三維的空間位置。同時藉由回授的方式，量測控制壓電平台以移動物鏡，使微粒子持續維持在相同的離焦距離，並記錄實驗過程中影像的變化、壓電平台的位置與微粒子運動的軌跡。此一系統的反應頻率主要受到影像擷取頻率與壓電平台操作頻率的限制，其整體反應頻率大約為 50 Hz。

### 3. 微粒子追蹤測試

為了驗證與測試我們的三維追蹤系統的能力，利用該系統追蹤一個直徑為  $1\ \mu\text{m}$  的磁性微粒子在水中進行布朗運動 (Brownian motion) 的情形。如圖 4(a) 所示便是一個典型微粒子的運動軌跡，追蹤的時間長約 45 秒。同時也計算微粒子平均平方位移 (mean square displacement) 隨時間變化的情形，如圖 4(b)。讀者可以發現其為一個線性變化，證實其運動情形是一個未受外力限制的布朗運動。而從此線性變化的斜率得到此一微粒子的擴散係數 (diffusion coefficient) 為  $0.48\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。藉由愛因斯坦關係式 (Einstein relation) 可以證實該擴散係數確實

符合一個直徑為  $1\ \mu\text{m}$  的微粒子在水中移動的運動狀態。另外，藉由分析微粒子離焦距離變化的分布，也就是微粒子偏離軌跡的距離分布 (如圖 4(c))，可以發現離焦距離變化主要分布在  $\pm 0.2\ \mu\text{m}$  之內。若考慮到微粒子的擴散係數是  $0.48\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ ， $0.2\ \mu\text{m}$  的位移大約需要 41 ms 的時間，其約為系統反應週期 (20 ms) 的兩倍。換句話說，我們的單一粒子三維追蹤系統大約可以將微粒子的位移控制在兩次反應時間所產生的變化之內，因此該系統的反應與演算方式已經足夠迅速，也忠實地反映出系統特性已主要受到硬體的限制。

## 四、單一粒子三維追蹤應用在單一分子 DNA 的觀察

在單分子的應用上，筆者將追蹤系統與磁鑷夾進行結合，並觀察單一 DNA 分子在一端固定在玻片上、另一端固定在磁性微粒子上時，對微粒子運動所造成的影響。如圖 5(a) 所示，我們分別記錄同一個受 DNA 牽引的微粒子之運動軌跡，其中橘色與綠色分別為外加斜向磁場前後的軌跡。另外，也分析微粒子運動時在空間中橫向位置的機率分布 (如圖 5(b) 與 5(c) 所示)，可以很明顯的觀察到微粒子的運動與單純的布朗運動不同。由於 DNA 的牽引限制，微粒子只在特定的範圍內運動。且在外加磁場出現時，微粒子會受到磁力的影響而發生位移，同時也拉長了 DNA 的長度，也就增加施加在

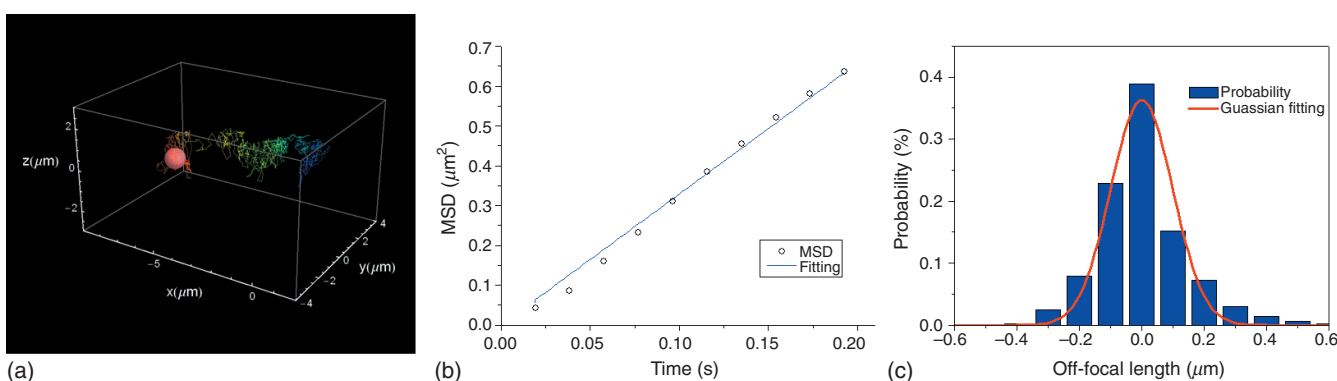


圖 4. 追蹤直徑為  $1\ \mu\text{m}$  的磁性微粒子在水中之布朗運動。(a) 軌跡圖，(b) 粒子平均平方位移與時間關係圖，(c) 微粒子軸向離焦距離變化的分布圖。

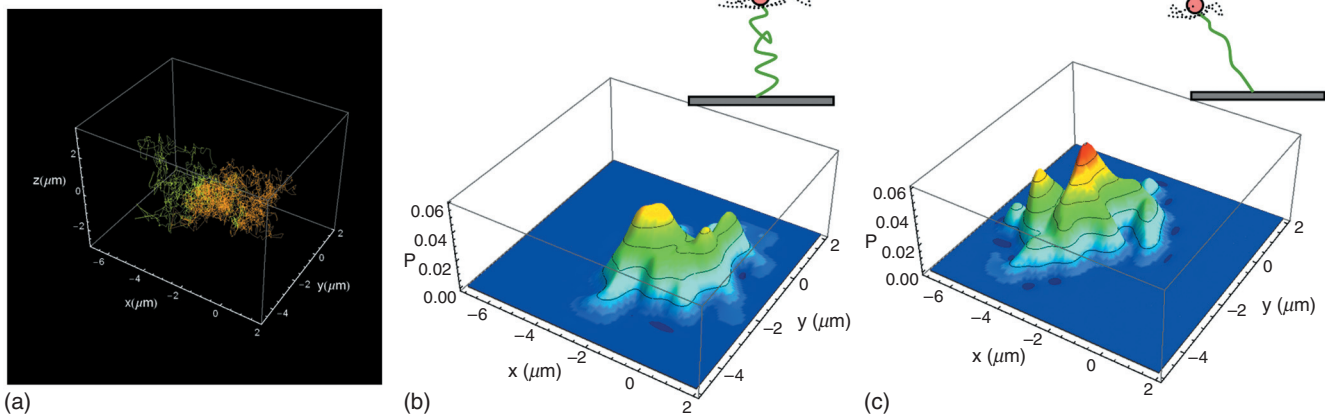


圖 5. 追蹤受 DNA 固定、直徑為  $1 \mu\text{m}$  的磁性微粒子在外加磁場下的運動。(a) 軌跡圖，橘色與綠色分別為外加斜向磁場前後的軌跡、微粒子，(b) 未受磁場與 (c) 受外加磁場時橫向位置的機率分布。

微粒子上的彈性力。這樣的情形也造成微粒子的分布較為集中，平均的分布範圍由  $0.68 \mu\text{m}$  縮小為  $0.49 \mu\text{m}$ 。這可由熱擾動環境中能量均分定理 (equipartition theorem) 的概念得到驗證。運用這樣的觀念，不僅可以藉由操縱微粒子來改變 DNA 的狀態，同樣的，可以根據觀察微粒子位置的分布情形，而推測 DNA 受到外力時產生對應的變化情形。

## 五、總結

總體而言，本文中筆者介紹一種只需要分析白光影像、簡單而足夠精確的單一粒子追蹤技術，以及如何校正與驗證系統的追蹤性能與特性。同時也示範如何藉由單一粒子追蹤結合其他如磁鑷夾等微粒子操縱技術，更有彈性地觀察單分子的特性。同時也希望藉由本文的介紹，能讓讀者對於應用單一粒子追蹤術與單分子檢測有更進一步的認識。

## 參考文獻

1. S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, and J. D. Puglisi, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1008 (2004).
2. X. Zhuang, H. Kim, M. J. B. Pereira, H. P. Babcock, N. G. Walter, and S. Chu, *Science*, **296**, 1473 (2002).
3. B. Okumus, T. J. Wilson, D. M. Lilley, and T. Ha, *Biophys. J.*, **87**, 2798 (2004).
4. M. J. Saxton and K. Jacobson, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, **26**, 373 (1997).

5. C. P. Bacher, M. Reichenzeller, C. Athale, H. Herrmann, and R. Eils, *BMC Cell Biol.*, **5**, 45 (2004).
6. I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos, *J Struct Biol.*, **151**, 182 (2005).
7. Y. -R. Chang, H. -Y. Lee, K. Chen, C. -C. Chang, D. -S. Tsai, C. -C. Fu, T. -S. Lim, Y. -K. Tzeng, C. -Y. Fang, C. -C. Han, H. -C. Chang, and W. Fann, *Nature Nanotech.*, **3**, 28 (2008).
8. J. Gelles, B. J. Schnapp, and M. P. Sheetz, *Nature*, **331**, 450 (1988).
9. A. R. Bausch, F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann, *Biophys. J.*, **75**, 2038 (1998).
10. C. Gosse and V. Croquette, *Biophys. J.*, **82**, 3314 (2002).
11. M. K. Cheezum, W. F. Walker, and W. H. Guilford, *Biophys J.*, **81**, 2378 (2001).
12. L. Holtzer, T. Meckel, and T. Schmidt, *Appl. Phys. Lett.*, **90**, 053902 (2007).

- 張宜仁先生為國立交通大學光電工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
- 邱祈翰先生為國立成功大學工程科學博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
- 黃煜彥先生為國立成功大學工程科學碩士，曾任中央研究院物理研究所研究助理，現為德州大學奧斯丁分校博士班學生。
- 周家復先生為美國紐約州立大學水牛城分校物理博士，現任中央研究院物理研究所研究員暨應用科學研究中心及基因體研究中心合聘研究員。
- Yi-Ren Chang received his Ph.D. in electro-optical engineering from National Chiao Tung University. He is

currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.

- Chi-Han Chiou received his Ph.D. in engineering science from National Cheng Kung University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
- Yu-Yan Huang received his M.S. in engineering science from National Cheng Kung University. He is currently a

Ph.D. student in the University of Texas at Austin, USA.

- Chia-Fu Chou received his Ph.D. in experimental physics from the State University of New York at Buffalo, USA. He is currently a research fellow in the Institute of Physics, and adjunct research fellow in both Research Center for Applied Sciences and Genomics Research Center, Academia Sinica.