

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

光活化螢光基團之光物理機制與生物分子次繞射極限造影與定位之研究(1/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫  
計畫編號：NSC 97-2112-M-009-006-MY3  
執行期間： 97年8月1日至 98年7月31日

計畫主持人：黃中焄  
共同主持人：  
計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：交通大學光電工程系(所)

中華民國 98 年 5 月 31 日

**中文摘要** 利用光束可主動改變光活化螢光基團之螢光放射特性，若每瞬間只有少量螢光基團被光活化，這些被活化的螢光基團就可被精確的定位而突破繞射極限。然而在次繞射極限造影方面目前面臨的最大瓶頸也是光活化螢光基團，因此本計畫以探討光活化螢光基團之光物理機制與其次繞射極限造影與定位為研究目標。希望能對光活化螢光基團的問題提出有效解決方案，進而對一些次細胞結構的重要問題：如具侵入細胞能力之縮氨酸 (cell-penetrating peptides)與脂質雙分子層(lipid bilayer)之相互作用，和細胞膜磷脂筏結構與動態等研究建立次繞射極限造影與定位之前瞻研究工具。

**關鍵詞** 螢光基團、光活化、次繞射極限造影、侵入細胞能力之縮氨酸、磷脂筏

**Abstract.** By using optical means, we can actively control the fluorescence emission properties of photo-activatable fluorophores. One can modulate the fluorescence emission profile of individual fluorophores in time such that only an optically resolvable subset of fluorophores are activated at any moment, allowing their localization with high accuracy. It has been well known that photo-activatable fluorophores are the major obstacle in the wide-field sub-diffraction imaging technique. This research project is therefore aimed to yield a refined understanding of the photo-switching mechanisms, including the identification of all states and intermediates involved, and to help the development of new improved molecular photo-switches. Important issues on subcellular organelles, such as the interaction between cell-penetrating peptides and a cell membrane, structures and diffusion process of lipid rafts in a cell membrane, will be investigated to verify the functionality of the frontier sub-diffraction imaging and localization tool established.

**Keywords** fluorescent chromophore, photoactivation, subdiffraction-limited imaging, cell penetration peptide, lipid raft

## I. 前言與研究目的

單分子特性偵測技術是單分子生物物理的重要工具。若使用光學過程作為探測手段，不但擁有單分子偵測靈敏度，也具低侵入性，因此光學探測技術已成為單分子生物物理的重要科研工具。

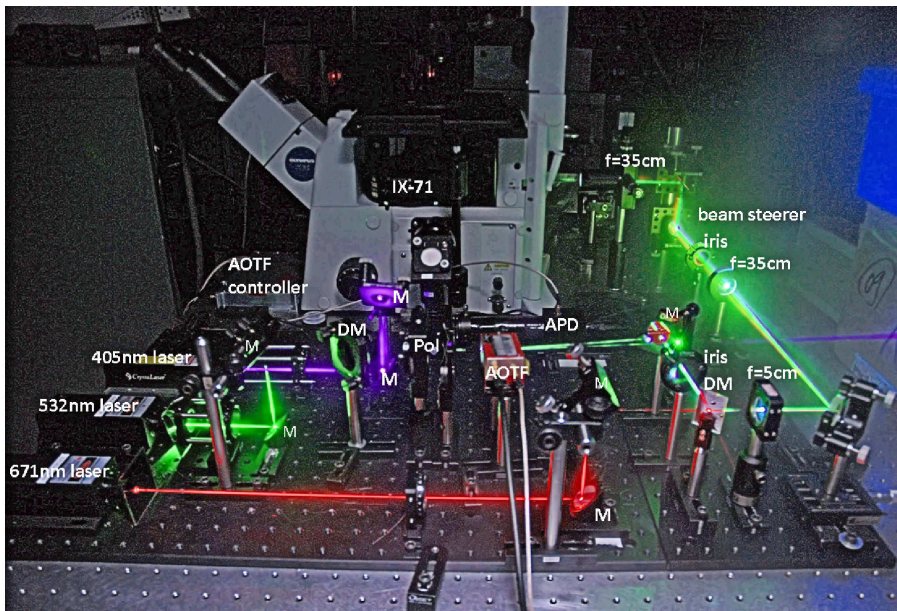
光活化螢光基團之螢光放射行為可用光束來操控改變，因此如果每瞬間只有稀疏的少量螢光基團被光活化，這些被活化的螢光基團就可被精確定位而產生突破繞射極限之造影。在次細胞結構的次繞射極限造影目前面臨的最大瓶頸是光活化螢光基團，因此本計畫以探討光活化螢光基團之光物理機制與其次繞射極限造影與定位為研究目標。希望能對光活化螢光基團的問題提出有效解決方法，進而對一些次細胞結構的重要問題：如具侵入細胞能力之縮氨酸(cell-penetrating peptides, CPP)與脂質雙分子層(lipid bilayer)之作用，和細胞膜磷脂筏結構(lipid raft structure)與動態等深入研究，並建立有效之次繞射極限造影與定位之前瞻研究技術。

## II. 研究方法、結果與討論

有鑑於單分子光譜顯微術對單分子生物物理未來發展之重要性，而此發展的瓶頸在光活化螢光基團，因此本研究計畫第一年首先以探討光活化螢光基團之光物理機制為目標，希望能對相關主題提出有效解決方案。

本計畫第一年研究之執行進度詳述如下：

### (1) 建立進行研究所需之全內反射式單分子光學顯微鏡基礎設施



過去一年我們設計並建立一進行研究所需之全內反射式單分子光學顯微鏡基礎設施。此科研工具之實體配置如圖一(左圖)所示，包括一倒立式光學顯微鏡(IX-71)、雷射光源、光束啟閉控制與整形光學元件和單光子訊號偵測系統。雷射激發光源目前配有405nm, 532 nm, 和671 nm，足於進行某些螢光基團之光活化與螢光激發放射研究。雷射光束

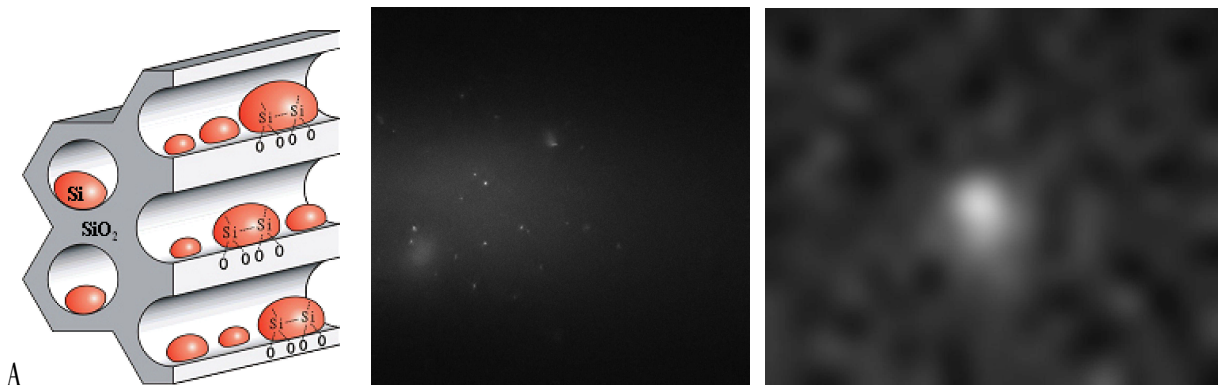
啟閉以AOT模組F控制，時間控制精密度至1 $\mu$ sec，對於螢光基團之光活化與螢光激發能量精密控制非常有用。光訊號偵測方面目前我們已能達到單光子偵測與造影的程度，對進行下一階段研究相當有幫助。雷射光源未來希望能加入470nm和600nm光源以擴充可進行研究的螢光基團種類。

### (2) 探討光活化螢光基團之光物理機制

我們已運用上述全內反射式單分子光學顯微鏡基礎設施研究奈米螢光粒子之光激螢光

放射行為，其目的之一方面藉此測試此單分子光學顯微鏡之性能，另一方面為此樣品有其研究價值。

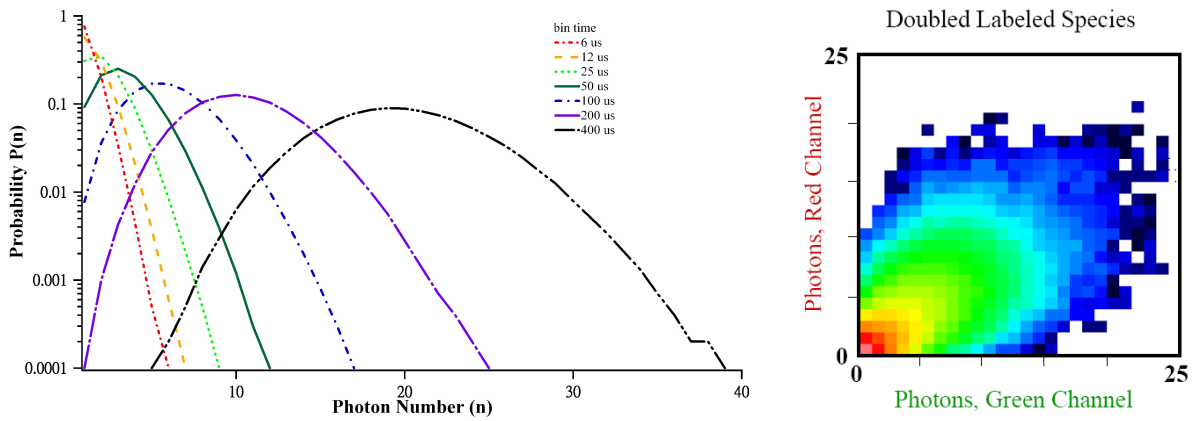
首先製備之樣品為多孔隙氧化矽奈米粒，其結構示意圖如圖二(左)所示。我們在直徑80nm之多孔隙氧化矽奈米粒之porchannels(孔徑10 nm)內成長矽量子點，或填入螢光染料分子。螢光染料分子能以離子鍵或氫鍵鍵結方式吸附於porchannels。改變pH值或其他環境變因可達到控制性釋出效果，在藥物釋放方面有其應用潛力。另外目前光活化螢光基團之螢光放射行為只發現在少數螢光蛋白、cy3-cy5螢光分子對或具光控氧化還原/電荷轉移之螢光分子上。將能量轉移性能之螢光染料分子對填入多孔隙氧化矽奈米粒之porchannels內，也許能產生類似光活化螢光基團之光控螢光放射行為，對光活化螢光基團研究提供另一設計自由度。



**Fig. 2:** (Left) Schematic drawing illustrating the polar bonding geometry of Si nanocrystals in porchannels of mesoporous silica network (MSN). (Middle) Image of MSN:FITC particles bound to the surface of a glass slide. The diameter of one MSN is about 80nm. (Right) Zoom-in image showing one bright point. The effective spot size is about 250nm, which is about three times of the particle size of MSN.

我們將FITC染料分子鍵結上直徑80nm之多孔隙氧化矽奈米粒之porchannels內，將此奈米螢光粒子置於乾淨玻璃表面。上述全內反射式單分子光學顯微鏡可清晰呈現每一奈米螢光粒(圖二:中)。深入觀察每一亮點(圖二:右)發現其尺寸約為光學顯微鏡之Point Spread Function (PSF)大小250nm。

我們進一步觀測奈米螢光粒子之螢光放射動態行為，以6-400  $\mu\text{sec}$ 不同的時間區間(bin time)分析其螢光放射之統計行為，結果如圖三所示。此類螢光放射統計分析技術稱為photon counting histogram (PCH)，可反映光束照射區域之奈米螢光粒子數目、螢光粒子亮度與粒子之螢光放射機制。定量分析聚集在多孔隙氧化矽奈米粒porchannels內的FITC染料分子的螢光放射機制正在進行中。下階段將以雙通道(雙色)偵測技術(2D PCH, 圖三右)更深入分析侷限在porchannel內具能量轉移之螢光染料分子對的螢光放射機制。



**Fig. 3:** (Left) Photon detection probabilities with different bin times from several photon streams measured on [MSN:FITC](#). (Right) 2D PCH analysis with two channels (two colors) PCH measurements on a protein doubly labeled with two fluorophores in red and green color.

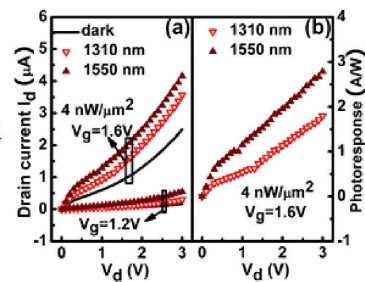
### (3) 其他配合計畫執行之相關研究成果

[a] **建構式光子學** 如上所述我們亦可在多孔隙氧化矽奈米模版生長矽量子點極性鍵結構(polar Si QDs/MS)，利用此極性鍵結介面之非對稱結構產生類鐵電性 P-E 遲滯交換行為，可作為新型矽基非揮發記憶元件(圖四)。同時利用介面鍵結能階，可賦予此矽基奈米材料在近紅外光區域之光電響應特性，而可製成近紅外光偵測元件。此類藉奈米尺度加工技術賦予材料新光電應用功能，我們稱之為建構式光子學新構想，相信未來應有極大之應用潛力。

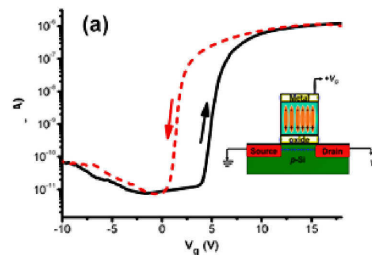
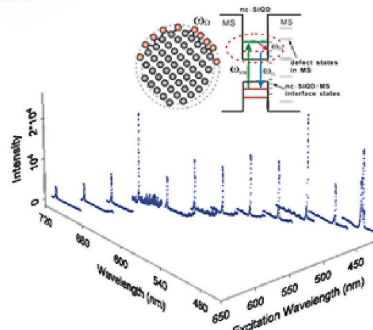
## 建構式光子學 (architectural photonics)

- R. P. Feynman: **There's Plenty of Room at the Bottom** (at the nanometer scales)
- We are exploring the new room at the interface.

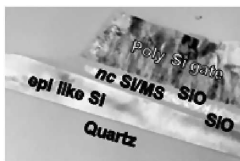
**I. Engineering optoelectronic response to beyond the limitation of Si crystal.**



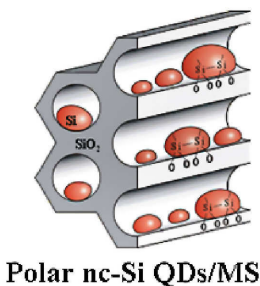
**II. Producing enhanced interface e-phonon coupling for new functionality.**



**III. Producing new functionality with Si-based ferroelectric-like nonvolatile memory.**



Device Structure



Polar nc-Si QDs/MS

**Fig. 4:** New demonstrations of architectural photonics concept with polar Si QDs/MS nanostructured material. The new applications include near IR photodetection, nonvolatile memory, and enhanced electron-interface phonon coupling.

See also:

Jung Y. Huang, Jia-Min Shieh, Hao-Chung Kuo, and Ci-Ling Pan: “Interfacial polar bonding induced multifunctionality of nano silicon in mesoporous silica”, *Adv. Funct. Mater.* (2009, in press). [<http://www.jyhuang.idv.tw/publi.php.html>]

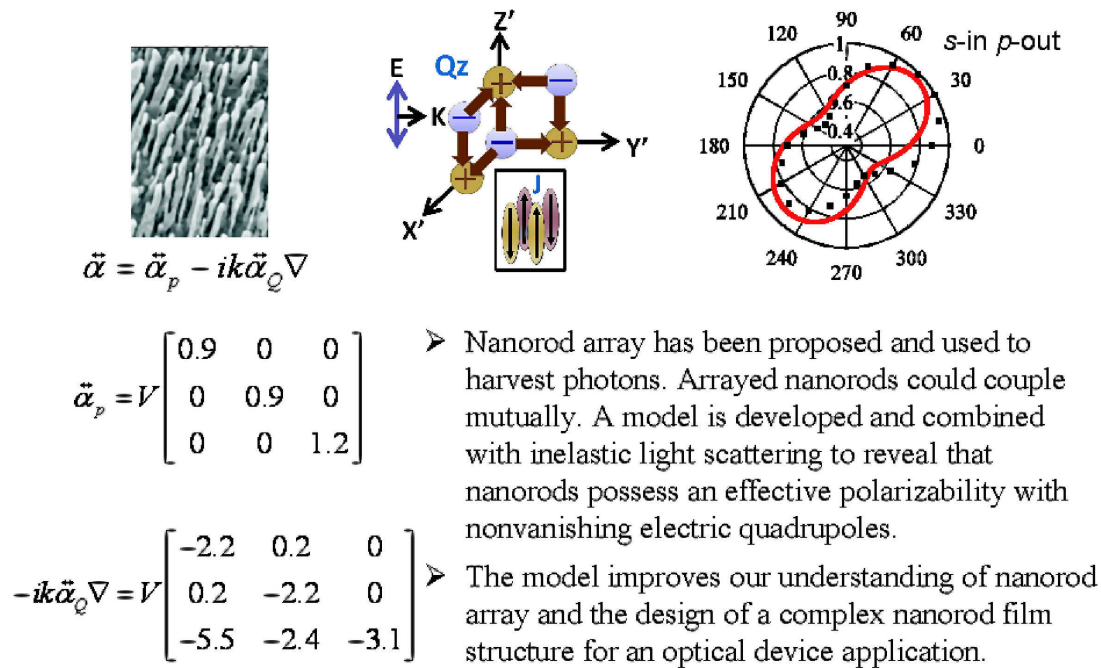
Jia-Min Shieh, Wen-Chien Yu, Jung Y. Huang, Chao-Kei Wang, Bau-Tong Dai, Huang-Yan Jhan, Chih-Wei Hsu, Hao-Chung Kuo, and Ci-Ling Pan: “Near Infrared Silicon Quantum Dots MOSFET Photodetector”, *Appl. Phys. Lett.* (2009, in press) [<http://www.jyhuang.idv.tw/publi.php.html>].

**[b] 奈米銀柱陣列之多極耦合效應** 偵測單分子光學特性是件相當困難的工作，解決之道除了增加光學系統之 light throughput 和提昇光偵測器靈敏度外，只有增強單分子光學放射效率。奈米銀柱陣列可有效匯聚局部光場而增強單分子光放射訊號，因此廣泛用於分子之表面增強拉曼光散射(surface-enhanced Raman scattering)研究。

大入射角度斜向蒸鍍技術可有效製備高密度奈米銀柱有序陣列，故被建議用為單分子偵測基片。然而在高密度奈米銀柱有序陣列內，奈米銀柱間互相耦合，其光學響應不能再視為局部反應(local response)。加上每一奈米銀柱直徑約 100nm，長度可高達 900 nm，也不能視為光偶極。因此如何正確描述高密度奈米銀柱有序陣列之光學響應一直是一大難題。加上最近奈米柱陣列被採用為捕捉入射光子，降低光學反射損失，以增進太陽電池之效率受到極大注目。如何正確設計奈米柱陣列抗反射層與如何正確描述高密度奈米柱陣列之光學響應問題息息相關。

我們發展一理論模型可正確考量高密度奈米銀柱有序陣列內，奈米銀柱間互相耦合效應。用於分析奈米銀柱有序陣列之非彈性光散射行為，結果與實驗觀測相當一致。理論與實驗結果比對指出奈米銀柱有序陣列之奈米銀柱除電偶極外，含有電四極響應。使用本理論分析模型可將奈米銀柱有序陣列之複雜的非局部反應以一有效介電矩陣來描述。據此正確而有效的設計奈米柱陣列光學元件變為可能。

## Revealing new optical response in a dense array of nanorods



**Fig. 5:** Schematic showing the asymmetric electron oscillation modes induced by an incident

optical field with polarization along the principal axis of the nanorods. The arrows and "+" and "-" signs are the current and charge distributions, respectively. The azimuthal pattern of the inelastic Mie scattering from tilted Ag nanorods was measured (filled squares) and the fittings to the model is presented in red solid curve. The fitting yields polarizability tensors with both the electric dipole and quadrupole.

The details can also be seen in

Chien Y. Lin, Yun H. Wang, **Jung Y. Huang**, Yongjun Liu and Yiping Zhao: "Probing optical response of a dense array of silver nanorods and adsorbed configuration of molecules with surface-enhanced Raman scattering", *Journal of Chemical Physics* (2009, submitted ).  
[\[http://www.jyhuang.idv.tw/publi.php.htm\]](http://www.jyhuang.idv.tw/publi.php.htm)