

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(2/3)

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：98年8月1日至99年7月31日

計畫主持人：黃中堯

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 99 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。然而在次繞射造影方面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與脂質雙分子層之相互作用，和細胞膜磷脂筏結構與動態等研究建立有效之次繞射造影與定位研究工具。

關鍵詞 螢光基團、光活化、次繞射造影、侵入細胞能力之縮氨酸、磷脂筏

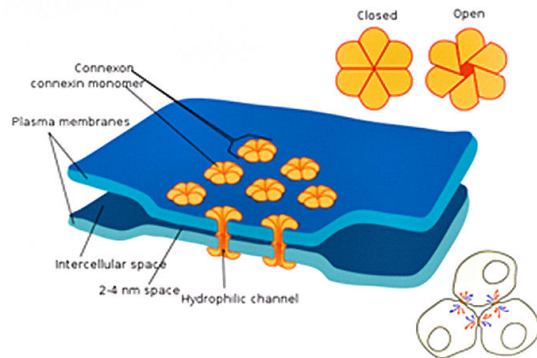
Abstract. By using optical means, we can actively control the fluorescence emission properties of photo-activatable fluorophores. One can modulate the fluorescence emission profile of individual fluorophores in time such that only an optically resolvable subset of fluorophores are activated at any moment, 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 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。基於



於光活化螢光基團之單分子顯微術已在細胞生物學之研究產生深遠之影響，以圖一所示聯繫細胞的 gap junction (GJ) 為例，研究員運用光活化螢光基團已發現 GJ 處形成 Connexon 動態結構之機制 (see doi:10.1186/1471-2121-11-15)。

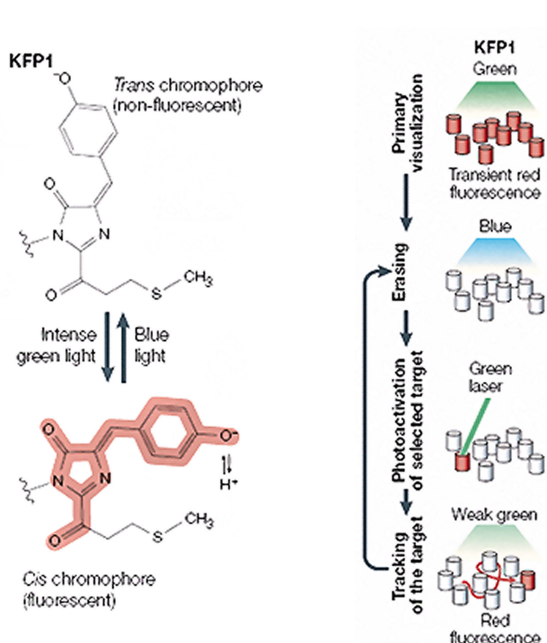
Fig. 1: Schematic showing the structure of gap junction forming at the contact areas of cells.

次細胞結構的次繞射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 (lipid raft) 動態結構等深入研究，建立有效之次繞射極限造影之前瞻研究技術。

II. 研究方法、結果與討論

(1) 探討光活化螢光基團之光物理機制

本計畫第二年之首要研究目標在探討一些光活化螢光蛋白之光物理機制。因 KFP1 之紅色螢光亮度高，不易光漂白且具備光控可逆性，因此我們首先選用 KFP1 為研究目標 (see: doi:10.1038/nrm1741)，並作為下階段進行活細胞內生物分子之次繞射定位研究之基礎。



根據已知之螢光蛋白螢光放射特性，我們猜測 KFP1 之光控可逆性螢光放射機制如圖二(a)所示。基本上是處於桶狀蛋白質中心之發色團從暗態 (trans configuration) 因吸收一綠色光子而變成質子化 cis 結構之亮態。在亮態之 KFP1 可再吸收綠色光子而發出紅色螢光。在適當條件下，KFP1 可吸收一藍色光子而回至 trans 結構之暗態。利用此光控可逆性螢光放射特性，我們不但進行次細胞結構的次繞射極限造影。運用圖二(b)所示之原理，我們亦能進行如前述之 gap junction 次細胞動態結構機制研究。

Fig. 2. (a) Photo switching process of KFP1 fluorescent protein, and (b) the schematic illustrating the idea of using the photoswitchable KFP1 for molecular biology research.

我們首先將KFP1螢光蛋白分子嵌入agar gel內，再以全內反射式螢光顯微術探測KFP1因照射綠色光子逐漸從暗態轉變成亮態之過程。圖三為所使用的實驗裝置圖。我們使用一聲波調控器(acoustic optical modulator AOM)精確控制綠光照射量，並從紅色螢光亮度得知KFP1螢光蛋白在亮態 S_1 能階之佔據數。紅色螢光強度由EMCCD記錄，曝光時間2.5ms。嵌入圖為固定在agar gel內之單KFP1螢光蛋白分子的紅色螢光照片。每一畫素大小對應顯微鏡point spread function，約為200nm。

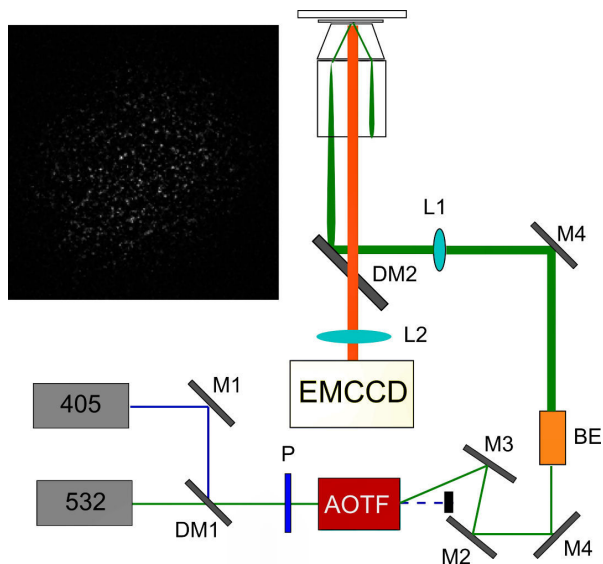


Fig. 3: Experimental setup used in this project to acquire the photo physical data of KFP1.

圖四(a)為AOM所產生之光束啟閉圖。圖四(b)為綠色光束開啟時間固定為 $1\mu s$ ，週期從 $1.1\mu s$ 、 $2\mu s$ 、改變至 $6\mu s$ 之實驗結果；圖四(c)為綠色光束開啟時間固定為 $10\mu s$ ，而週期從 $10.1\mu s$ 、 $11\mu s$ 、改變至 $15\mu s$ 之實驗結果。

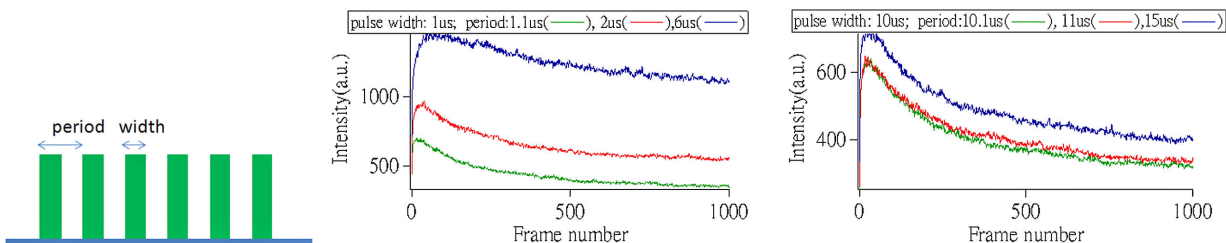


Fig. 4: (a) Excitation pattern, (b) and (c) the red fluorescent intensity of KFP1 excited by green light (@532nm) with a variety of excitation patterns.

實驗結果可發現綠色光束開啟時間固定為 $1\mu s$ ，duty cycle從50%改變至14%(圖四(b))可使亮態 S_1 能階之佔據數增加，以 $1-\mu s$ 開啟時間duty cycle14%之照射量之最高亮態發生時間約為180ms。之後進一步照射綠光將使部份KFP1螢光蛋白分子陷入dark state，導致紅色螢光逐漸變弱。若將綠色光束開啟時間增加為 $10\mu s$ ，duty cycle從50%改變至40%(圖四(c))亦可使亮態 S_1 能階之佔據數增加，以 $10-\mu s$ 開啟時間duty cycle40%之照射量之最高亮態發生時間提前至100ms。亮態開啟時間與KFP1光活化螢光蛋白分子在次繞射造影速度有極密切關係，但文獻上對此亮態開啟機制尚未有深入探討。實際上圖三之光學並行化數據收集亦含有單分子螢光放射動態資訊。圖五所示為經空間解析萃取出其中一單KFP1分子之螢光放射動態圖。

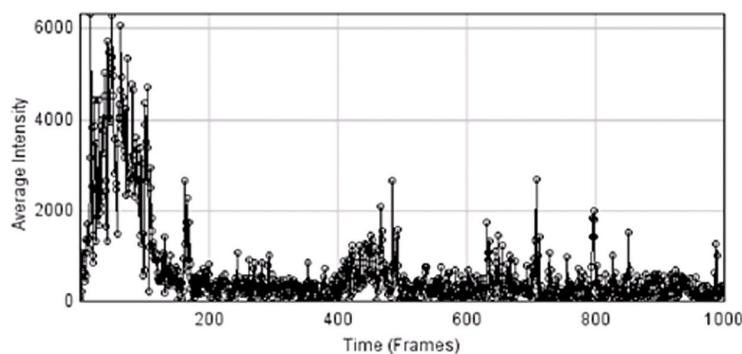


Fig. 5: Time trace of the red fluorescent intensity from single KFP1 molecule excited by green light (@532nm).

為進一步分析 此結果 我們 根據 一 已發表於文獻上之或然率數學模型 (DOI: 10.1103/PhysRevLett.98.250601), 經適當修改並推導出適合本研究之coupled master equations

$$\begin{aligned}\partial_t S_{0,i}(t) &= -(k_{01} + \frac{1}{\tau_{i,S}})S_{0,i} + (k_{10} + \frac{q_{i+1,S}}{\tau_{i+1,S}})S_{1,i} + k_T T_i \\ \partial_t S_{1,i}(t) &= (k_{01} + \frac{1-q_{i-1,S}}{\tau_{i-1,S}})S_{0,i} - (k_{10} + k_{isc} + \frac{1}{\tau_{i,S}})S_{1,i} + \frac{q_{i+1,T}}{\tau_{i+1,T}} T_i \quad , \\ \partial_t T_i(t) &= \frac{q_{i+1,S}}{\tau_{i+1,S}} S_{0,i} + (k_{isc} + \frac{1-q_{i-1,S}}{\tau_{i-1,S}})S_{1,i} - (k_T + \frac{1}{\tau_{i,T}})T_i\end{aligned}$$

此處X代表KFP1分子之singlet states (S_0 和 S_1)或triplet state (T); $\tau_{i-1,X}$ 為KFP1分子在X-sate時穿越能障 $E_{i,X}$ 所需時間; $q_{i,X} = 1/[1 + e^{(E_{ext}/2kT)}]$ 為KFP1分子脫離一能量陷阱之或然率, E_{ext} 為施加 在分子上之光場 導致分子總能變化量 ; KFP1分子遭遇能障 $E_{i,X}$ 之或然率為 $e^{-E/E_{trap,X}} / E_{trap,X}$ 。

根據上述coupled master equations與單分子之螢光放射動態觀測, 我們發展出如圖六(a)所示之數值分析流程, 得出如圖六(b)所示之初步結論: KFP1螢光蛋白分子在亮態(p=1)與光漂白前置暗態(dark state, p=0)間應存在一quenched trap state。此一結論不但對KFP1螢光蛋白分子光物理之理解頗有助益, 也對單分子物理研究提供一有效方法。進一步數據收集與分析將對此課題之深入理解產生更大貢獻。

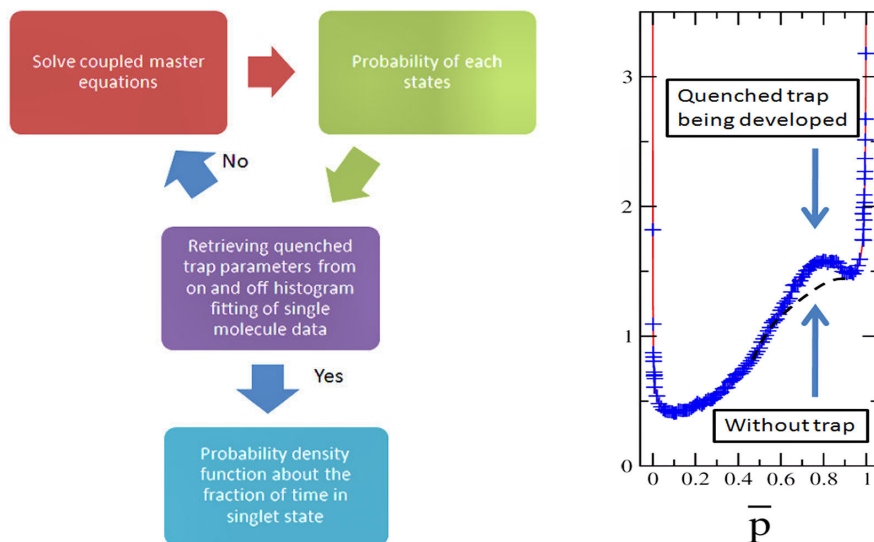


Fig. 6: (a) Flow chart of the mathematical modeling and (b) the retrieved probability density function from the single molecular experimental result presented in Fig. 5.

(2) 研究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

具侵入細胞能力之縮氨酸(cell-penetrating peptides, CPP)可將生物活性分子送入活體細胞, 因此吸引相當大注意。近十五年來CPP研究主要著重在三方面: (一)找出CPP之所以能穿越細胞膜障壁之分子結構特徵; (二)使用各種分析工具, 找出CPP進入細胞之機制; (三)利用CPP將各式非滲透性高分子(macromolecules)送入細胞以改變細胞功能等。然而儘管近十五年的努力, CPP如何能被細胞內化仍然是尚未解決的問題。主要因素在用於研究此問題之分析工具僅能記錄細胞對CPP的總攝取量, 無法直接量測CPP穿越細胞膜之效率。

我們對CPP如何穿越細胞膜之理解如下: CPP在穿越細胞膜時首先與膜上之醣蛋白(proteoglycan)接觸, 而膜上之醣蛋白主要功能為調控細胞膜微型構造。因此CPP與膜上之醣

蛋白接觸改變了富含膽固醇之磷脂筏奈米尺度動態結構之控制力，進而重構膜內之細胞骨架與活化包括GTPase和PKC在內之訊息傳遞路徑。

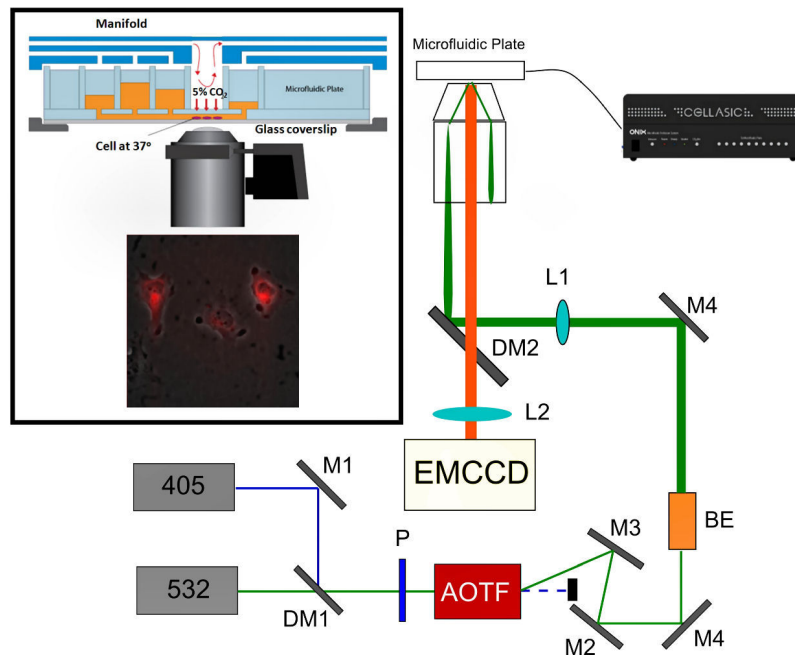


Fig. 7: Experimental setup to be used in this project for probing the interaction process of CPP with a living cell.

根據上述理解我們設計一實驗，其裝置如圖七所示，其結合具偵測單分子靈敏性之廣域光學顯微鏡(widefield optical microscope)與培養操控細胞之微流體系統(Dynamic Cell Culture Platform)。此一技術結合讓我們可以追蹤單一分子與單一細胞作用的動態過程。相關研究策略簡述如下：

1. 研究過程之參數控制: (a) 為探討CPP在穿越細胞膜與膜上磷脂筏動態結構之關係，我們將使用nystatin控制膜上膽固醇之含量，以抑制磷脂筏結構之形成；(b) 為探討膜內F-actin與膜上磷脂筏之關係，我們將使用cytochalasin-D，以抑制F-actin之形成。
2. 細胞膜上磷脂筏結構標定(Labeling the lipid raft): (a) 我們將使用Molecular Probes公司生產之 Vybrant Lipid Raft Labeling Kits，以標識細胞膜上磷脂筏結構。此Lipid Raft Labeling Kits主成份為與磷脂筏之ganglioside G_{M1} 分子極具親和性之 Alexa dye-conjugate of cholera toxin subunit B (CT-B)。
3. CPPs之螢光標識 (ANASPEC Inc.: 886-2-89720201, Kelowna@ms29.hinet.net)。
4. Cav-1 Knock Down: 為探討cav-1在磷脂筏內化過程扮演的角色，我們將使用以cav-1為目標之siRNA 來抑制cav-1之表現。
5. 細胞株: He-La Cell, CHO-K1 from Neuromics。

(3) 其他配合計畫執行之相關研究成果

[a] 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 與提昇光偵測器靈敏度外，只有增強單分子光學放射效率。最近 Alivisatos 小組(www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0907367106)發展一自組裝金奈米顆粒團簇可長時間追蹤活細胞內與細胞凋亡有關之 caspase-3 活化過程，並發現五顆金奈米粒團簇之光散射能力大於五顆總合，顯示金奈米粒間的光激交互作用不可忽略。

我們發展一嚴格之理論模型可正確考量高密度奈米物件間互相耦合效應，並以實驗驗證其

正確性。此理論模型將奈米物件間之複雜的非局部反應以一有效介電矩陣來描述，因此提供更透明而有效之策略來設計奈米探針或其他光電用之新奇 metamaterials。相關資料可參考

Chien Y. Lin, Yun H. Wang, [Jung Y. Huang](#), Yongjun Liu and Yiping Zhao: "Impact of electric quadrupolar coupling on the optical response of an array of nano-objects" --- J. Phys.: Condens. Matter 22 (2010) 225301 (6pp).

[b] 液晶奈米科學(Liquid Crystal Nanoscience) 細胞與細胞核內有相當多處介質應具備液晶相，奈米探針在此液晶介質內的行為，包括自組裝、奈米粒間的異向交互作用、奈米粒誘導之液晶介質特性變化等，已發展成液晶奈米科學之新領域。最近我們對此課題作了一系列深入的實驗與理論研究。其研究成果除了期刊論文發表外，並總結成一 book chapter，相關資料可參考

Jung Y. Huang (2010), *Seasoning ferroelectric liquid crystal with colloidal nanoparticles for enhancing application flavors*, to be published in the book of "Nanocrystals", 978-953-7619-X-X (SCIYO.COM, <http://sciyo.com/>).