

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

雷射鑷夾應用在生物晶片上基因序列雜交速率控制的研究：
水溶液局部濃度控制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2215 - E - 009 - 011

執行期間： 88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：徐琅

共同主持人：

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

執行單位：交通大學電子物理系

中華民國 89年 10月 30日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2215-E-009-011

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：徐琅 E-mail：c2654@ms19.hinet.net

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

計畫參與人員：張博睿 E-mail:bojui.ep88g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

一、中文摘要

雷射鑷夾利用非機械接觸的光梯度力捕捉及搬運能力^{1,2}已在生物界上被大量的應用。生物晶片則是二十一世紀生物科技的一個重大技術^{3,4}。本計畫將嘗試利用雷射鑷夾捕捉與搬運基因，以促進生物晶片上待測基因與標準基因序列的雜交速率與精準度，提昇生物晶片的比對效率。

關鍵詞：雷射鑷夾、生物晶片、DNA 序列、雜交

Abstract

Via a gradient dipole force without any mechanical contact of optical tweezers, the amazing application of optical tweezers has developed in biology. Meanwhile, biochip is becoming an important technique of biotechnology in 21st century. In this proposal, we will study the feasibility of the application of laser tweezers on the manipulation of patient's gene to hybridize with the standard gene micro-fabricated on a biochip. The success of this proposed technique may improve the accuracy and speed of the DNA hybridization.

Keywords: Optical Tweezers, Biochip, DNA Hybridization

二、緣由與目的

雷射鑷夾利用非機械接觸的光梯度力捕捉及搬運能力已在生物界上被大量的應用。生物晶片則是二十一世紀生物科技的一個重大技術。

過去，雷射鑷夾一直被運用在搬運及捕捉微小的 Beads 或生物體上。並藉著其可被量化的特性，量測出許多生物屆中微小的力；如肌動蛋白運動大小的作用力^{5,6}或細胞與細胞間的作用力大小⁷等等。

事實上，在我們的觀察中發現，雷射鑷夾不僅能捕捉及搬運單一個物體，當物體相較於雷射光焦點非常小時，雷射鑷夾甚至可一次捕捉一群小物體(fig.1)。藉由這個發現，我們聯想到這樣的特性是否可運用在生物晶片上。

以一個為基因為檢測對象的生物晶片而言(以下簡稱基因晶片)，必須讓檢體能夠到晶片上每個探針的位置雜交，才能保證基因晶片的準確度。然而，若僅靠擴散運動使檢體與晶片上的每個探針雜交，則須耗時十幾小時甚至一天。目前關於這方面的改進多以 DNA 帶負電的特性為研究對象^{8,9}。在晶片下面預先鋪設好電極，將有助於吸引 DNA 到晶片上各探針雜交。如此可大大提高基因晶片檢驗的效率達到僅需半小時至數小時的時間。

因此，我們計畫結合雷射鑷夾捕捉一群粒子及移動捕捉物體的特性，測試是否能改變水溶液中 DNA 的濃度變化，亦即捕捉一群 DNA。如此一來，我們即可吸引 DNA 至基因晶片的各各探針位置。這樣的技術或可成為生物晶片新的檢驗技術。

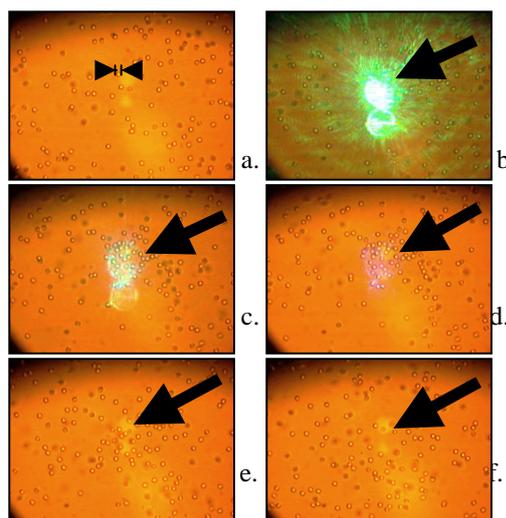


fig.1：圖 a，我們還未開雷射前，可以發現直徑約 $2\mu\text{m}$ 的 beads 是 random 分布，即濃度是均勻的，並且會有布朗運動(照片中看不出來)。圖 b，我們將雷射打開，為 Ar-ion 雷射，波長經過一些 filter 僅剩下 514nm，且 power 大約僅剩下 300mW。箭頭所指為雷射光焦點位置。圖 c~圖 d 為我們漸漸把雷射關掉的照片。我們發現在原來雷射光焦點位置(箭頭位置)有許多 beads 聚集。代表著這局部位置上的 beads 濃度較高。圖 e~圖 f 為雷射關閉後情形，有趣的是，到了雷射關閉後約 3mins，在原來雷射光焦點位置(箭頭位置)的 Beads 又散開了，並沒有特別集中的情形。Beads 的分部又呈跟

圖一般 random 分布 可見得此時 beads 的濃度又是均勻了。由以上的圖我們可以驗證，在 Optical Tweezers 雷射焦點處，確實會把 Beads 吸引過去，而達到在局部位置濃度較高的情形。

三、結果與討論

1.成功捕捉 1 μ m 及 ABSL :

由於有了如 fig.1 的經驗，我們發現了雷射鐳夾對一群 2 μ m beads 的捕捉力，我們開始對雷射鐳夾抓取一群微小物體感到興趣。之後也陸續抓取了 1 μ m beads 及我們所喝優酪乳裡的乳酸菌(ABSL) (fig.2)

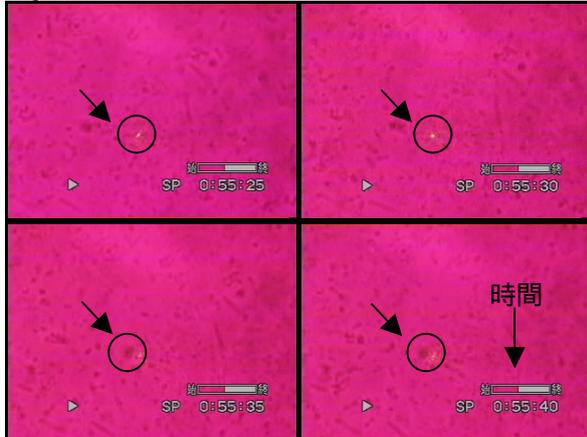


fig.2: 仔細觀察左下方亮點位置。其亮點表示雷射鐳夾聚焦位置。而隨著時間變化，可發現焦點附近聚集越來越多的乳酸菌(ABSL)。

2.捕捉 DNA

a.setup:

有了以上的初步結果，我們決定實驗是否可抓取一群 DNA。由於 DNA 分子相當小必須以螢光做記號才能予以觀察。因此需要一台螢光顯微鏡。然而由於經費的關係，我們並沒有辦法購得一台螢光顯微鏡。因此我們以實驗室一台舊有的氬離子氣體雷射為螢光光源組裝了一台具有螢光功能及捕捉能力的顯微鏡(fig.3)。

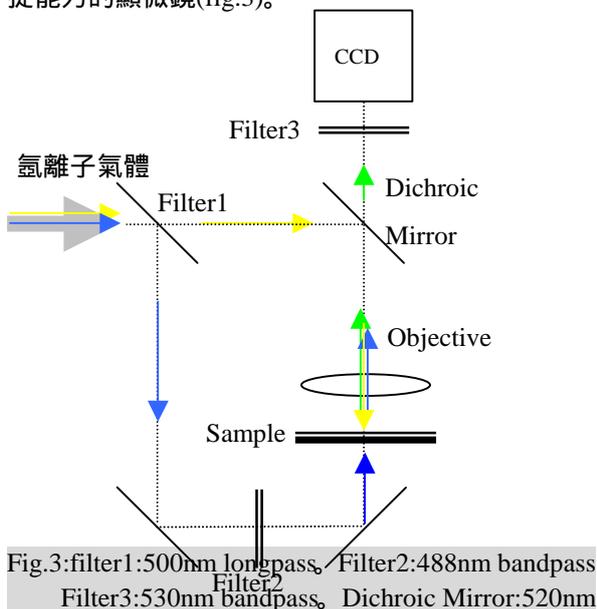


Fig.3:filter1:500nm longpass, Filter2:488nm bandpass, Filter3:530nm bandpass, Dichroic Mirror:520nm

longpass。

我們製作的具捕捉能力之螢光顯微鏡原理為：將氬離子氣體雷射主要兩個波長利用 filter1 分開(一為 514nm(黃色)、一為 488nm(藍色))。為配合我們的激發光源，所選擇的 sample 為 20 個鹼基的 DNA 序列，在其上帶有 FITC 的螢光分子。其激發光主要是利用 480nm 發射光為 530nm。因此 488nm 的雷射光再經過 filter1 及 filter2 後應該成為相當純的 488nm 激發光。激發 sample 後，sample 放出 530nm 的螢光(綠色)。另外，雷射鐳夾則以 514nm 的光源為主，期望不會變成激發螢光的光源。最後，所有的光以 filter3 加以濾掉 期望只看到 530nm 的螢光。

b.螢光影像：

我們成功的建立的一螢光顯微鏡的系統，並比較過我們所看到的螢光影像及傳統螢光顯微鏡的效果是極為相似的(fig.4)。

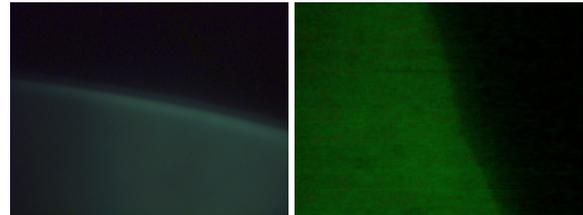


fig.4:左圖為利用生科所袁俊傑老師實驗室的螢光顯微鏡曝光 2.5sec 後所得之螢光圖。右圖則為我們的系統利用 CCD 所拍得的之照片(曝光時間為 1/30sec)。

雖然由以上的圖比較我們的螢光系統似乎是成功的，然而卻有一個致命的缺點：

由於我們的 CCD 曝光時間無法如一般螢光顯微鏡的數位照相機那麼久，因此無捕捉相當微弱的螢光。因此，我們必須加大激發光的 Power。然而在加大激發光 Power 的情形下，螢光卻由於強光照射而有非常大的 Decay。幾乎在數秒內便 decay 至 CCD 無法觀察的亮度。

c.捕捉 DNA :

由於觀察 DNA 螢光非常不利的情形，我們加大 DNA 的濃度至其 decay time 大約可達數 minutes(fig.5)。

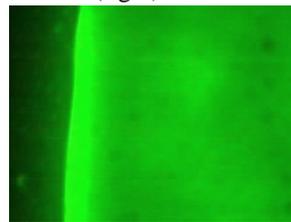


fig.5

有了如此清楚的影像，我們將雷射鐳夾的光打入，得到如 fig.6 的連續照片。fig.6a 同 fig.5，是雷射鐳夾光還未開啟前。fig.6b 及 fig.6c 則是雷射鐳夾開啟時的影像。最後，fig.6d 表示雷射關閉後情形。

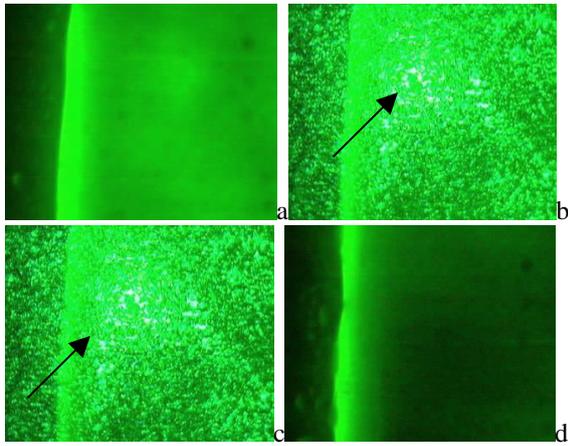


Fig.6：捕捉 DNA。箭頭所指位置為雷射鐳夾焦點位置。

由圖 6 的螢光圖，原本預期在 d 圖中，在原來光焦點位置會有較強的螢光分布。但在 fig.6 中並沒有發現類似的情形。原因推測有以下幾點：

1. 514nm 的雷射鐳夾的光事實上也會激發 FITC 的螢光。這部分事實上我們有做過控制的實驗，直接以雷射鐳夾的光線照射，的確可從 CCD 看到螢光影像。這是由於我們怕 CCD 偵測不到微弱的螢光。因此把濃度調的非常高。因此，連 514nm 所激發出的微弱的 530nm 的螢光亦可被我們觀察到。
2. 由於 514nm 的雷射鐳夾光線太強，CCD 內部自行將光強作一些變動。CCD 在感測到入射光子太強時，會自動作一些調整光強的動作。而事實上，CCD 所呈現出的影像也是根據光的強度，將光作一段時間積分所得到的結果然而，這樣的動作反而造成了我們的困擾。無法判斷出光強的真正分布。
3. 514nm 的雷射鐳夾光源不僅激發 FITC 的螢光，更造成的嚴重的螢光 Decay。由於雷射鐳夾是一高度聚焦的光點。因此在光點中心會有更高的光強。我們亦知道，激發光越強，則螢光的 Decay 也越強。原本預期會因捕捉而造成在雷射鐳夾焦點中心 DNA 濃度變高，螢光強度因此增強。現在卻反而變成非常快就 Decay 的區域。也就是說，在捕捉的過程中，螢光就已 Decay 光了。

我們亦嘗試以鐳夾光焦點附近的螢光強度是否變弱來推測 DNA 是否都被吸進鐳夾焦點位置了。然而這樣的判斷極不可靠。因此，對於本實驗的結果，還無法構成一可靠的結論。

四、計畫成果自評

1. 我們已成功地捕捉到一群 1 μ m 或 2 μ m 的 beads(fig.1)。甚至也可抓住一般我們喝的優酪乳內的乳酸菌(ABSL)(fig.2)。表示以雷射鐳夾來做水溶液中的局部濃度控制有其潛力。
2. 對於雷射鐳夾抓取時所造成的 DNA 螢光 decay

問題，將來將以不同的光源代替。以紅外光的光源作為雷射鐳夾光源將是一不錯的方法。不僅可避免產生螢光 decay 問題，亦可避免光太強時造成 CCD 對訊號的擾動。此外，比較不會被生物體所吸收。

3. 對於雷射鐳夾光源影響 CCD 感測的問題，亦曾考慮過以將鐳夾光加以偏振的方法來解決。但最終還是有會將螢光 decay 掉的問題。所以還是以更換光源為最好的方法。
4. 由於經費的問題，我們無法購得一台螢光顯微鏡，甚至連螢光顯微鏡專用的汞燈、或高感光度的數位相機亦無法購買。因此只能用不到一般螢光顯微鏡 1/30 價錢的一般 CCD 作為我們的觀察系統。徒增這次計畫的困難度。

本次計畫結果不如預期，但仍有些微的成果。另外我們著時發現經費及儀器設備的不足造成實驗上很大的困擾。在此附帶一提，吾所提之 89 年度新的計畫，亦有經費不足的問題。此外，原為兩年計畫，卻不知為何被改成一年的計畫。對此，亦將造成往後實驗上許多的困擾及壓力。盼請貴會將來盡量不要更改計畫經費及時間。

五、參考文獻

- [1] 國科會大專學生參與專題研究計畫，微物用雷射鐳夾製作，編號：NSC87-2815-c-009-013-E。
- [2] 國科會大專學生參與專題研究計畫，雷射鐳夾之電腦縱動畫控制。編號：NSC88-2815-C-009-015-E。
- [3] Graham Ramsay, "DNA chips: State-of-the art", Nature Biotechnology, 16,40-44,January 1998.
- [4] S.J.Y Tong,et al, 「基因晶片之製作與檢測」，第一屆海峽兩岸微系統科技研討會，台南，民國八十九年五月十七至十九日。
- [5] Chris M Coppin, Daniel W.Pierce, Long Hsu, and Ronald D. Vale. "The load dependence of kinesin's mechanical cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A Vol.94, pp. 8539-8544.August 1997,Biophysics.
- [6] Claudia Veigel, Lynne M. Coluccio, James D.Jontes, John C.Sparrow, Ronald A.Milligan, and Justin E.Molloy. "The motor protein myosin-1 produces its working stroke in two steps. Nature, Vol.398, pp.530-533, 8 April 1999
- [7] <http://helix.nature.com/nsu/001026/001026-1.html>. Nature scienceupdate. "Technology: Light work". Friday 20 October 2000.
- [8] Lockhart, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays [see comments]. Nat. Biotechnology. 14, 1675-1680(1996).
- [9] Hacia, J.G.&Collins, F.S. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays.J.Med.Genet. 36, 730-736(1999).