

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

應用雷射鑷夾於腸壁細胞之活體奈米三維影像掃描及皮牛
頓黏附力之量測(I)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2215-E-009-044-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立交通大學電子物理學系

計畫主持人：徐琅

共同主持人：彭慧玲，張晃猷

計畫參與人員：張宜仁、詹佳翰、張愛堂

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 19 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

應用雷射鐳夾於腸壁細胞之活體奈米三維影像掃描 及皮牛頓黏附力之量測

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：徐 琅

共同主持人：彭慧玲

共同主持人：張晃猷

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：

中 華 民 國 93 年 10 月 25 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- 92-2215-E-009-044

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 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：張宜仁 E-mail：yrchang.eo91g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學光電工程研究所

計畫參與人員：詹佳翰 E-mail：han.ep90g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

計畫參與人員：張愛堂 E-mail：howard.ep91g@nctu.edu.tw

執行機構及單位名稱：交通大學電子物理系

說明：本計劃「應用雷射鑷夾於腸壁細胞之活體奈米三維影像掃描及皮牛頓黏附力量之量測」，第一年目標可分為兩部份：一為架設具次微米級解析度三維影像即時重建功能的掃描式捕捉探針光學顯微鏡。另一目標為強度在皮牛頓數量級的宿主與細菌間黏附力量的量測。

一、中文摘要

本計劃「應用雷射鑷夾於腸壁細胞之活體奈米三維影像掃描及皮牛頓黏附力量之量測」，於第一年之成果可分為兩部份：一為架設具次微米級解析度三維影像即時重建功能的掃描式捕捉探針光學顯微鏡 (Scanning Trapped-probe Optical Reflective Microscope, STORM)。我們並利用此系統掃描一個製作在玻片表面上大小為15 μ m的方形光阻凹槽圖形，我們將展示此方形凹槽的三維掃描的成果。另一目標為強度在皮牛頓數量級的宿主與細菌間黏附力量的量測。其中，做為前期測試，我們選擇克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 與膠原蛋白之間黏附力量的研究為本計劃前期的目標。

關鍵詞：雷射鑷夾、腸壁細胞、黏附力、光子力顯微鏡、影像處理、布朗位移、四象限光偵測器、掃描式捕捉探針光學顯微鏡、活體立體形態顯微術

二、簡介

病原體感染致病是對於人類健康的一大威脅，其中黏附於寄主細胞是許多微生物病原體感染寄主細胞的第一個步驟。除了單純的附著之外，微生物也可能造成寄主細胞的形態改變，甚至損害。目前生物學家並不清楚微生物附著於寄主細胞力量的強度，也無法在活體系統中觀察寄主細胞接觸微生物後在不同時間的形態變化。因此本計劃的第一年目標可分為兩部份：一為架設具次微米級解析度三維影像即時重建功能的掃描式捕捉探針光學顯微鏡。另一為強度在皮牛頓腸內菌對腸壁細胞黏附力量大小的研究。

掃描式捕捉探針光學顯微鏡類似原子力顯微術，可以掃描並重建樣品表面的三維影像。我們利用雷射鑷夾捕捉一微粒子當作掃描探針，藉由四象光偵測器追蹤此一微粒子探針在樣品表面的微量偏移反應，據此回授控制移動樣品的壓電平台進行反向補償位移，同時將回授信號輸入影像重建系統，即時重建樣品表面的三維影像。我們利用此系統掃描一個製作在玻片表面上方形光阻凹槽圖形，本計劃第一年目標將展示此方形凹槽的三維掃描的成果。

在腸內菌對腸壁細胞黏附力量大小的研究方面，於前期實驗中，我們利用第五型膠原蛋白代替腸壁細胞，量測克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白之間的黏附力。因為第五型膠原蛋白普遍在小量且大多有空隙的組織中存在，是細胞纖維的膠質，人體大部分的組織均有這種成分，而我們也利用臨床上重要的伺機性感染細菌 克雷白氏肺炎桿菌作為主要研究課題。我們利用雷射鑷夾進行黏附力量的量測，比較克雷白氏肺炎桿菌「mrk A 纖毛」的有無，對其黏附力的影響。利用分子生物及細胞培養技術結合光電物理方法，分析克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附因子在致病機制中所扮演的角色。

在之後的內容中，我們將分別介紹此兩部分 - 「掃描式捕捉探針光學顯微鏡之三維影像即時重建」與「克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白之間黏附力研究」之研究理論、儀器架設、與成果進行報告與討論。

三、掃描式捕捉探針光學顯微鏡之三維影像即時重建

掃描式捕捉探針光學反射顯微鏡的工作機制和原子力顯微鏡非常類似。在本計劃第一年的成果中，我們利用已捕捉微粒子的雷射鐳夾探針，並結合影像即時重建系統成為一套自動回授控制系統。最後，利用此一系統對一個玻片表面的微米級方形凹槽進行掃描，並呈現出方形凹槽表面的三維影像形態。以下介紹實驗方法、裝置以及結果。

1. 掃描方法

圖一為回授掃描控制系統掃描方法的示意圖[3]。在圖一(a)中，我們首先校正四象光偵測器的功率變化 ΔP_{QPD} 與微粒子的偏移 Δz 的關係，並且設定四象光偵測器於此一高度時所量測的微粒子背向散射光強度為標準值。接著我們開始掃描樣品表面。於圖一(b)中，在操控壓電平台移動樣品的過程中，微粒子探針會隨樣品表面凸起，造成微粒子於光軸方向上偏移 Δz 。此時，四象光偵測器所偵測到的背向散射光訊號會隨微粒子向上偏移而變大，而此一訊號透過信號截取卡被傳送至電腦。然後在圖一(c)中，電腦根據背向散射光訊號的變化量，自動將被動式步進平台下降 Δz ，使得背向散射光訊號恢復到標準值，並做紀錄。同時，電腦根據所記錄的被動式步進平台的三維移動軌跡，即時重建此樣品表面的三維影像。



圖一 回授掃描控制

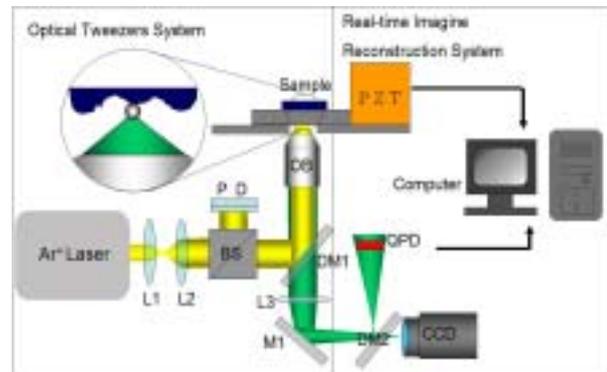
2. 實驗裝置

如圖二所示，本實驗所架設的儀器可分為兩部份：一為雷射鐳夾系統，另一為影像即時重建系統[4]。影像即時重建系統的主要功用是將微粒子所掃描的樣品表面，以即時的方式重建出來。

雷射鐳夾系統

在雷射鐳夾系統中，我們導引一氬離子雷射光束通過一擴束透鏡組(L1、L2)。接著，將擴束光束經過分光鏡(BS)分為兩道雷射光束，一道雷射光束入射光偵測器(PD)以即時監測雷射光功率，另一道雷射光束經由雙色分光鏡(DM1)反射進入物鏡(OB)，最後聚焦並捕捉樣品平面上的微粒子。本實驗所採用的微粒子為直徑大小約 $1\mu\text{m}$ 的乳膠珠作為捕捉探針。我們為了捕捉並觀察此一微粒子，而使用高數值孔徑 (N.A.=1.25)、倍率為 100X 的油鏡作為顯微物鏡。另外，我們使用三軸步進平台

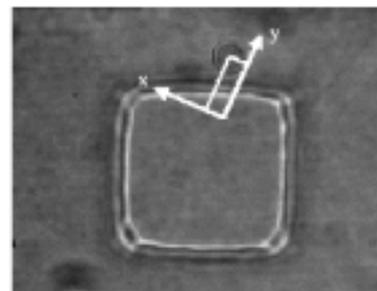
(PZT)，以移動樣品平面上的微粒子。當微粒子被雷射鐳夾捕捉時，其背向散射光經由物鏡、透鏡(L3)、以及雙色分光鏡(DM2)成像於攝影機(CCD)上。我們即利用此攝影機，監測微粒子被捕捉以及掃描時的情形。



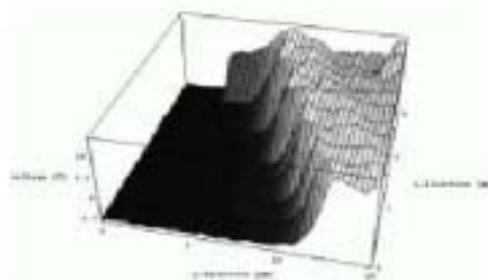
圖二 實驗裝置圖。

影像即時重建系統

影像即時重建系統包含了一個四象光偵測器(QPD)、一套資料截取系統，以及一部個人電腦。四象光偵測器置於雙色分光鏡(DM2)之後微粒子成像平面的後方，微粒子因偏移所造成背向散射光的變化，通過物鏡 透鏡(L3)，並經過雙色分光鏡(DM2)反射至四象光偵測器。另外，藉由資料截取系統將四象光偵測器訊號傳回給電腦。電腦則迴授控制步進平台(PZT)進行反向補償位移，使得背向散射光訊號恢復為標準值，電腦記錄平台移動量以即時描繪出樣品表面的三維形態的影像。



圖三 微粒子掃描方塊區



圖四 掃描影像重建

3. 結果與討論

我們先利用微機電技術 (MEMS) 在玻璃片上利用光阻顯影出格子形狀的結構，然後再利用雷射

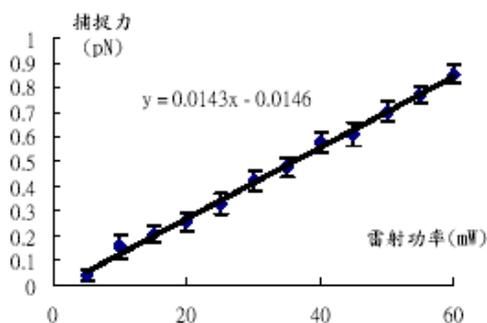
鑷夾捕捉一顆微粒子作為探針，到玻璃片格子狀結構上沿水平方向等速掃描，如同原子力顯微鏡掃描一樣。當微粒子探針通過寬度掃描一方形具有起伏之特定區域時（圖三），我們利用自製的四象限光偵測器QPD 追蹤這顆微粒子垂直高度的變化，並輸出對應的電壓訊號（圖四），最後重建其立體形態結構。根據初步的實驗結果顯示，我們目前的步進馬達掃描裝置已能達到水平方向為10nm 的解析度，我們自製的四象限光偵測器QPD 在垂直方向也有約200nm的解析度。

四 克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白之間黏附力的研究

在腸內菌對腸壁細胞黏附力量大小的研究方面，於前期實驗中，我們利用第五型膠原蛋白代替腸壁細胞，量測克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白之間的黏附力。克雷白氏肺炎桿菌在平常少量存在於健康人體腸道中，在人體免疫不全時會造成感染，引起肺炎、呼吸道感染、肝膿瘍、尿道感染、敗血症及腦膜炎等症。以下就期實驗方法與結果進行介紹。

1. 實驗方法

首先，我們利用水流的拉力（Dragging Force）來校正不同功率下，雷射鑷夾對克雷白氏肺炎桿菌的最大捕捉力。我們利用一個高解析度移動平台來移動生物樣品，改變平台移動速度，製造不同的水流，衝刷被捕捉的克雷白氏肺炎桿菌，當平台移動速度逐漸增加至克雷白氏肺炎桿菌脫離雷射鑷夾捕捉陷阱而漂走時，此時的樣品平台速度代表水流黏滯力的最大值，代入Stoke's law 所得的水流黏滯力，即為雷射鑷夾之最大捕捉力（圖五）。



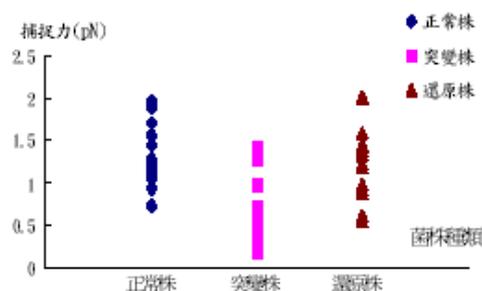
圖五 雷射鑷夾之最大捕捉力量測圖

接著，我們將已塗覆膠原蛋白的微粒子作為一個垂直的基質並固定在樣品平面上，再利用雷射鑷夾捕捉、搬運克雷白氏肺炎桿菌去黏微粒子，然後改變不同雷射功率嘗試將黏於微粒子上的細菌拔開，並記錄所需之雷射功率。

2. 實驗結果

我們使用雷射鑷夾量測黏附力的結果如圖六，橫軸分別為三種菌株，而縱軸為雷射功率的大小，功率越大代表捕捉力越大，則菌株與膠原蛋白黏附越力越強。而每一個點所代表的是單獨一隻細菌的黏附力，我們分別量測15 隻細菌的黏力，就會發現每一隻細菌的黏力大小都不同，但是去除

「mrk A」纖毛的克雷白氏肺炎桿菌黏附力有較小的趨勢。另外，實驗中我們也發現，去除「mrk A」纖毛的克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白之間的黏附力，在大部分情況下都小於與傳統塗盤數菌數的實驗方式捉力約在數個皮牛頓之間，是雷射鑷夾合適的量測範圍。以快速簡便地測量出皮牛頓（pico-Newton）數量級的微生物力。雷射鑷夾捕捉力；而具「mrk A」纖毛、以及植回纖毛的克雷白氏肺炎桿菌，在大部分情況下，黏附後都很難用雷射鑷夾移動。我們將三種菌株黏附時間控制在2 分鐘內，在菌株黏附後可以拔離的情況下進行力的量測比較，發現實驗結果與傳統塗盤數菌數的實驗方趨勢吻合，其中纖毛的桿菌黏附時間最短，黏附力也最小。



圖六 KP 與膠原蛋白之黏附力量測圖

另外，以雷射鑷夾量測法的方式，是觀測桿菌單一個體的黏附行為，確認黏附後才進行力的量測，因此可以作為客觀依據。在顯微鏡的觀測下，我們發現克雷白氏肺炎桿菌會漂浮於水中，而塗盤數菌落數法是將膠原蛋白塗抹於培養皿底部，因此，菌株與膠原蛋白的接觸機率以及黏附力的大小，都會影響量測結果，普遍上認為並不客觀。我們進一步發現克雷白氏肺炎桿菌的捕捉力約在數個皮牛頓之間，是雷射鑷夾合適的量測範圍。

五、結論

我們結合雷射鑷夾系統與影像即時重建系統，完成了即時重建三維形態影像的雷射鑷夾顯微術，而且也實驗展示了初步成果，與原子力顯微鏡掃描速度大致相同。雖然目前，還不如原子力顯微術精細，不過操作於水溶液中的雷射鑷夾掃描顯微術，極適合用來掃描並即時重建生物樣品表面的三維形態。

另外，我們利用第五型膠原蛋白與克雷白氏肺炎桿菌的系統做為在腸內菌對腸壁細胞黏附力量大小的研究方面的前期實驗中，實驗結果與傳統生物學塗盤數落菌數法的趨勢吻合。

藉於此，我們可以證實在此三年期的計畫中，第一年計畫已完成之後實驗之基礎，同時也可以做為後期實驗之驗證。

六、感謝

我們在此感謝國科會在計畫經費上的支持。同時，對於實驗中所利用到之克雷白氏肺炎桿菌與膠原蛋白樣品，我們感謝交通大學生命科技系彭慧玲教授與黃盈蓉同學的提供與幫助。

