

原子力顯微術及其在微生物學上之應用

Atomic Force Microscopy and Its Application in Microbiology

陳吉良、林世明、林良平

Ji-Liang Chen, Shiming Lin, Liang-Ping Lin

繼掃描電子顯微鏡之後，又一可用以觀測奈米等級的利器以及表面量測分析技術—原子力顯微鏡，其由 Binnig 等人於 1986 年所發明，已廣泛應用於各項科學之研究。在生物學應用方面，樣品不需前處理，在生理狀況下可即時觀察，非常適合觀察生物性樣品，除此之外，亦可量測生物分子的吸附力、彈力、黏滯力等作用力。由於微生物的大小及表面形態具多樣性，非常適合使用原子力顯微鏡觀察。

The atomic force microscopy (AFM), invented by Binnig *et al.* in 1986, was a technique for surface analysis at nanometer scale. This technique not only provides, in real time, three-dimensional information of the bio-specimen surface under physiological conditions, but also can be used to probe the physical properties of the specimen, *e.g.*, molecular interaction force, surface topograph, surface charge distribution, and various mechanical properties. The measurements performed by AFM provide the information on related structure and function of a variety of microbial surfaces.

一、前言

十七世紀中葉 Leeuwenhoek 發明顯微鏡，讓人可以探究微小世界的奧秘，然而光學顯微鏡的解析度有限，其解析度僅 $0.2 \mu\text{m}$ ，直到 1932 年 Ruska 發明電子顯微鏡，才解決解析度的問題。掃描電子顯微鏡 (SEM) 是以背向散射電子與二次電子來呈像的顯微技術，生物樣品需要固定、脫水、乾燥、覆膜等處理，並於真空中觀察，整個製備過程破壞生物原有結構。到了 1980 年初期，Binnig 和 Rohrer 發明了掃描式穿隧顯微鏡 (scanning tunneling microscope, STM)，可將顯微鏡的解像力提高到原

子等級，其原理是利用電子穿隧效應偵測樣品，但樣品也需具導電性質，並不利於生物樣品觀察。

而於 1986 年，Binnig 等人發明了原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM)⁽¹⁾，使用微小探針掃描樣品，可在各種狀態下操作，使得觀察生物樣品更加容易且方便。繼 AFM 之後，有許多相關的掃描探針顯微鏡 (scanning probe microscope, SPM) 技術被應用於各領域之研究，涵括有磁力顯微鏡、掃描近場光學顯微鏡、掃描熱力顯微鏡、側力顯微鏡、掃描電容顯微鏡等。目前，AFM 已廣泛應用於生物化學、分子生物學及微生物學等生物相關領域⁽²⁾。

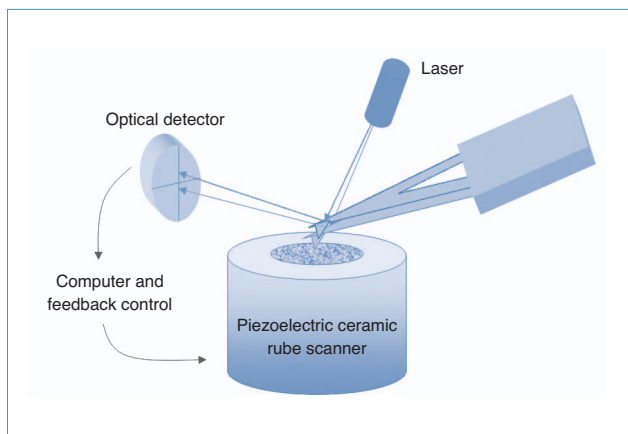


圖 1. 原子力顯微鏡基本原理示意圖。

原子力顯微鏡具有高解析的能力，一般橫向解析度大約 2 nm 或更小，而縱向解析度可達約 0.1 nm。其優點為樣品不需前處理、只需極少量樣品、可在生理狀況下即時觀察。AFM 不僅可獲得表面影像，它還是力學量測的最佳工具，可檢測樣品表面物理性質，例如分子之間交互作用、表面疏水特性、表面帶電性和力學特性，這些資訊可提供生物表面結構與功能的參考依據。本文將介紹有關 AFM 之基本架構及偵測原理、量測技術及其在微生物學上之應用。

二、基本架構及原理

原子力顯微鏡主要是由懸臂 (cantilever) 與其末端上之探針 (tip)、光感測器、壓電掃描機台、回饋控制系統以及電腦影像編輯所組成，如圖 1 所示。探針之成分一般是由矽或氮矽化合物所組成，其針尖半徑約在 5 至 40 nm 左右，懸臂長約 100 至 250 μm 。樣品需固定或黏附於基盤 (substrate) 表面，基盤可以是玻璃、雲母片、塑膠或其他較硬且平坦之材質。AFM 是以懸臂上探針尖與樣品之間作用力來測量，探針針尖在樣品表面來回掃描，將一微小之雷射光束聚焦於懸臂尖端鍍有高反射率金屬薄膜的背面，偵測懸臂的偏移，反射光束由位移敏感的感光二極體 (position sensitive photo-diode, PSPD) 所感測，再透過軟體運算並分析而轉換成樣品高度。

原子力顯微術基本原理是根據 Lennard-Jones pair-potential energy function 所描述原子之間的位能與原子間距離的關係，如圖 2 所示，依據探針與樣品之間淨作用力，AFM 影像模式可分為三種作用模式⁽³⁾。

1. 非接觸式 (Non-Contact Mode)

探針於吸引力區域下操作 (圖 2)，探針屈向樣品，在樣品上方以微小振幅擺動，偵測探針尖與樣品之間的相互作用。在非接觸模式下操作，不會破壞樣品，因解析度比較差，一般較少用於量測生物樣品 (圖 3(a))。

2. 接觸式 (Contact Mode)

這是標準 AFM 獲取影像模式，探針於排斥力區域下操作 (圖 2)，懸臂上的探針施壓於樣品表面，解像力跟施予壓力大小有關；施予壓力越大，探針量測樣品表面多樣性的敏感度越高，若施予壓力過大將會破壞樣品表面結構，適合較硬的樣品量測 (圖 3(b))。

3. 輕敲式 (Tapping Mode)

探針於吸引力與排斥力區域下操作 (圖 2)，此模式之發展是為了能在無摩擦力下得到高解析影

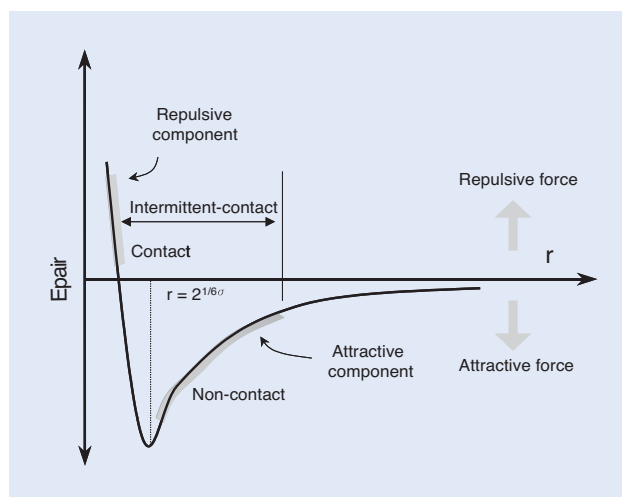


圖 2. 根據 Lennard-Jones pair-potential energy function 所描述原子之間的位能與原子間距離的關係。

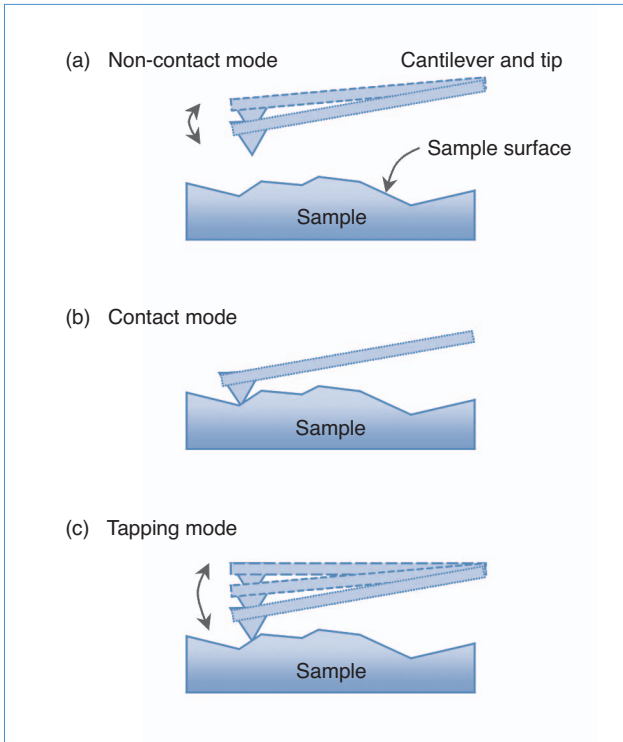


圖 3. 原子力顯微鏡三種操作模式。

像。懸臂以接近它的共振頻率擺動，輕敲樣品表面來回掃描，因為探針尖與樣品接觸屬於間歇性的，所以探針尖施加於樣品上的摩擦力極小，可減少樣品表面之破壞 (圖 3(c))。

三、原子力顯微術

原子力顯微鏡是可應用於高解析度、即時及三度空間的顯微鏡，在顯像技術上是相當新穎的領域。因其偵測原理是靠探針針尖與樣品表面之間的作用力來回掃描，所以又稱為掃描作用力顯微鏡 (scanning force microscope, SFM)。

力－距離曲線 (force-distance curve) 是紀錄懸臂的偏移量與壓電掃描器垂直移動距離之間的關係 (圖 4)，也是描述探針與樣品之間作用力的形成過程。利用虎克定律 (Hooke's law) 可計算作用力的大小，其中 F 為作用力， k 為懸臂彈性係數， d 則為懸臂的偏移量。

$$F = -k \times d$$

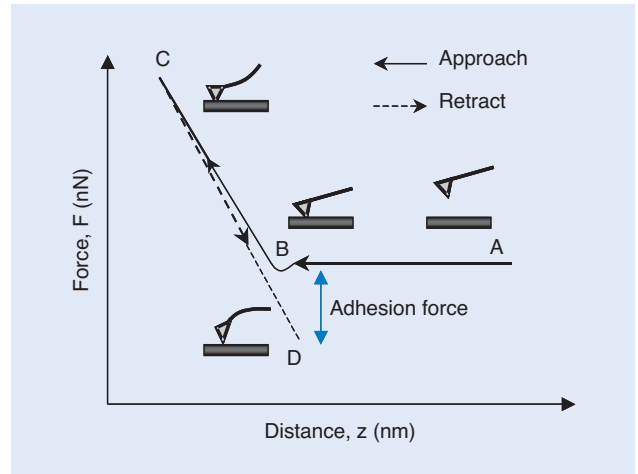


圖 4. 力與距離曲線圖。

在氣相中當探針接近樣品時，探針與樣品之間還有一段距離，所以作用力為零 (圖 4 中之 A 點)，當距離非常接近時，因樣品表面含有水層就產生所謂毛細現象，使懸臂下彎，所以懸臂偏移曲線呈現下降狀態 (圖 4 中之 B 點)，此時探針與樣品處於接觸狀態。此時當探針與樣品之間排斥力愈來愈大時，懸臂向上偏折的彎曲度也就愈大，所以曲線圖紀錄到上升的曲線 (圖 4 中 B 至 C 點)。探針縮回離開樣品表面時，懸臂所受的力也會下降，當探針與樣品之間有作用力存在時，探針繼續縮回時懸臂開始下彎，可下彎至最低點處 (圖 4 中之 D 點)，當探針繼續往回縮時，探針會彈離樣品表面，懸臂回復至未接觸狀態 (圖 4 中之 A 點)，可求得懸臂的偏移量 (d)，再乘上懸臂彈性係數 (k)，即可求得作用力 (F)⁽²⁾。

以力－距離曲線量測比只取得樣品表面形貌可以獲得更多資訊，當探針觸及樣品時，可測得探針與樣品表面之間凡得瓦力、靜電力及彈性；當探針縮回離開樣品表面時，可測得探針與樣品表面之間吸附力 (adhesion force) (圖 4)。利用作用力繪製 (force mapping) 來記錄樣品影像每一點的力－距離曲線，所繪製成之圖稱為作用力容積圖 (force volume plots)，可以描述樣品表面之力學特性。

生物學上分子與分子之間的相互作用，在訊息傳遞上扮演重要角色，像抗體－抗原 (antibody-antigen)、配位體－接受器 (ligand-receptor) 及互補 DNA 序列。經修飾之 AFM 探針可以作為定量力

學量測，可透過自組裝單層 (self-assembled monolayers) 之方法在 AFM 探針上修飾具功能性化學物質或生物分子，能與相對應分子之間專一性結合，透過力-距離曲線計算其之間作用力。例如在探針尖上固定抗體分子，而在基盤上固定相對應之抗原，二者之間的作用力約 $244 \text{ pN}^{(4)}$ 。其他生物分子之間交互作用見表 1 所列。

四、整合型原子力顯微鏡

現今 AFM 常結合其他偵測設備輔助操作，以便觀察及量測，以下介紹三種常用於量測生物樣品時所結合之設備⁽²⁾。

1. AFM 結合光學顯微鏡

原子力顯微鏡最常結合的設備就是光學顯微鏡 (圖 5(a))。AFM 其主要缺點之一就是獲得影像速度緩慢，一般掃描一張影像需要 1 至 2 分鐘。在肉眼無法觀察之下，想要尋找有興趣的樣品觀察並不容易，而 AFM 結合良好的光學顯微鏡，可以節省許多時間，不會阻礙樣品取得且能即時觀察。同時樣品不需特別處理，即可固定於玻璃片或培養皿在液

表 1. 生物分子與生物分子之間作用力。

System	Force	reference
Antibody/antigen	$244 \pm 22 \text{ (pN)}$	4
Avidin / biotin	$160 \pm 20 \text{ (pN)}$	5
Streptavidin / biotin	$257 \pm 25 \text{ (pN)}$	6
DNA	$1.52 \pm 0.19 \text{ (nN)}^a$	7
Con A/mannose	$75 - 250 \text{ (pN)}$	8
Proteoglycans	125 (pN)^b	9

Con A: concanavalin A; ^a20 base pairs; ^baverage force

相 (in liquid) 中觀察，可觀察多種生物樣品，例如整個細胞或生物組織，配合染劑和螢光標定處理，可針對特定的部分作觀察。

2. AFM 結合表面電漿共振

雖然 AFM 可以獲得分子層次的動力學影像圖，但受限於掃描區域的大小，單位時間內掃描次數的限制，所以無法提供可靠之定量資訊。表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 是屬於光學生物感測器 (biosensor) 的一種技術，偵測生物分子之間交互作用的動力學定量分析，以及樣品大小區域表面折射的改變，可記錄分子於流動狀態下與固

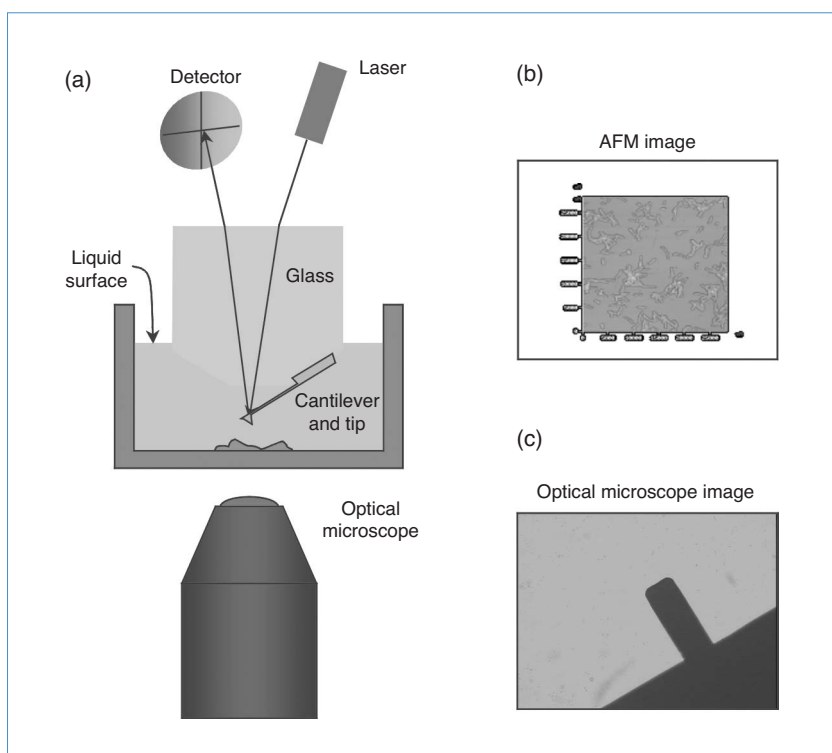


圖 5. (a) AFM 結合光學顯微鏡示意圖，(b) AFM 影像圖及 (c) 在光學顯微鏡下懸樑臂與生物樣品影像圖。

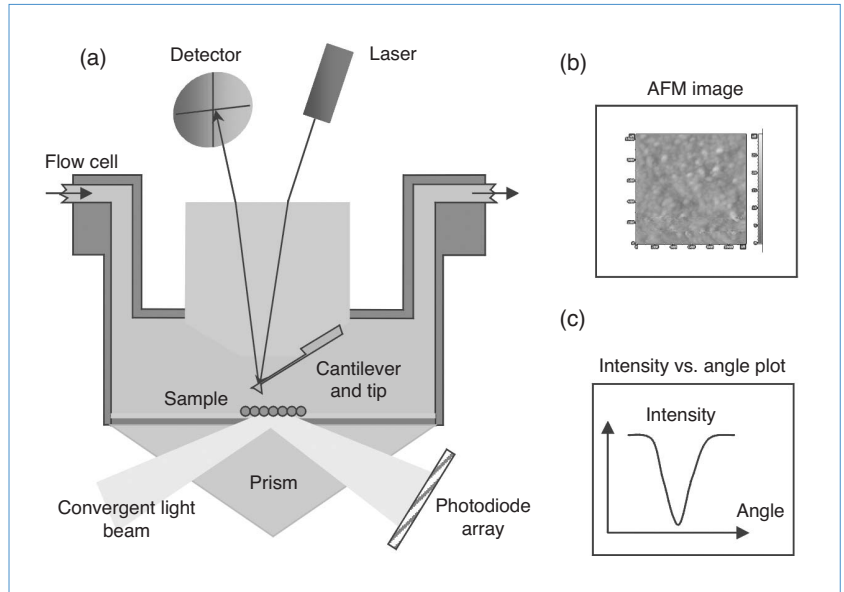


圖 6. (a) AFM 結合 SPR 示意圖，(b) AFM 影像圖及 (c) SPR 量測訊號。

相之間結合 (association) 和解離 (dissociation) 的過程。AFM 結合 SPR (圖 6(a))，既可將生物分子影像擷取下來分析，又可偵測生物分子之間交互作用的動力學，可謂相輔相成。

3. Cryo-AFM

原子力顯微鏡若於低溫下操作 (圖 7)，應用於生物系統上能提高樣品的解析度。在低溫下操作的好處是生物分子具有較高的機械強度，例如含水蛋白質比在室溫下強約 1000 至 10000 倍，所以大大減少探針引起樣品變形的問題；以液態氮所提供之操作環境，允許的溫度範圍介於 77 至 200 K，當溫度低於 100 K 時，掃描抗體、DNA 及紅血球時可獲得較高的解析度。

五、AFM 在微生物學上之應用

原子力顯微鏡的樣品需固定於適當固體基盤上，微生物也是一樣。一般可由物理性吸附於平的基盤上，像雲母片、玻璃片或二氧化矽之材質基盤。在空氣乾燥法方面，將濃縮細胞懸浮液滴於包覆 poly-L-lysine 的雲母或玻璃基盤上，並於空氣中乾燥，也可以使菌體共價鍵結合至玻璃上。為避免空氣乾燥和化學處理過程中破壞細胞，也已發展一種利用多孔滲透膜來固定細胞，但只適用於球狀細

胞，桿狀細胞並不適用。病毒可固定在包覆 poly-L-lysine 的雲母片上，可以在空氣中、丙醇或液態培養液中觀察⁽¹⁰⁾。

1. 微生物型態之觀測

細菌的形狀常分為球狀、桿狀及螺旋狀，菌體大小變化較大，一般長度約 1 至 5 μm 。菌體表面之組成也非常複雜；若以革蘭氏染色法來分類，因細菌細胞壁組成不同 (圖 8)，一般可將細菌分成革蘭氏

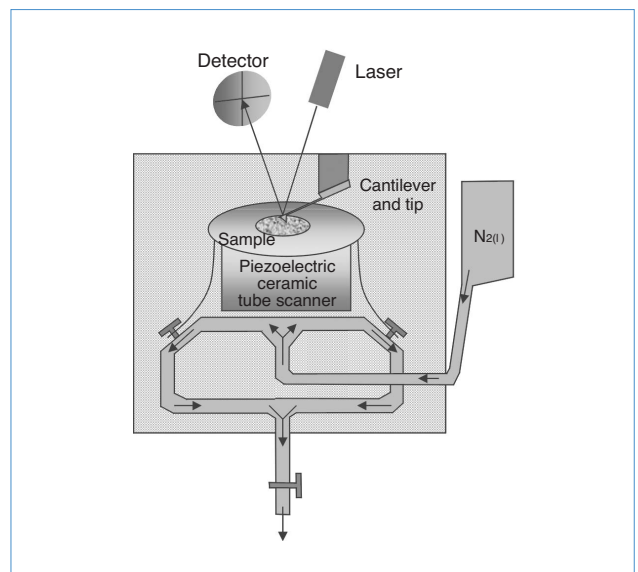


圖 7. Cryo-AFM 示意圖。

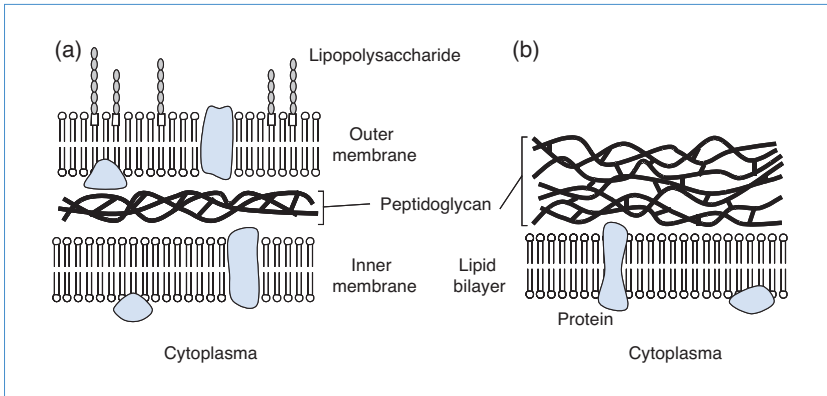


圖 8.

(a) 革蘭氏陰性及 (b) 革蘭氏陽性細菌之細胞壁組成。

陰性及革蘭氏陽性菌，在 AFM 量測下，革蘭氏陰性及陽性菌表面呈現不同形貌⁽¹¹⁾。在空氣中以 AFM 量測細菌 *Serratia marcescens* 之立體圖 (圖 9(a))，長約 $2\ \mu\text{m}$ ，寬約 $800\ \text{nm}$ ，高約 $280\ \text{nm}$ ，表面有波狀結構 (圖 9(b))。還有一些表面特殊結構，例如 *Lactococcus lactis* 的菌體表面均勻分布著似海綿狀帶有小孔洞之網狀物；*Bacillus subtilis* 的孢子表面有直徑 7 至 $20\ \text{nm}$ 的突起結構⁽¹²⁾。真菌 *Aspergillus oryzae* 休眠狀態下的孢子表面有直徑約 $10\ \text{nm}$ 桿狀結構排列，以不同方向成束並排；而酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的菌體表面就非常平滑⁽¹⁰⁾。

2. 物理化學特性之研究

微生物於環境之中，能附著於物體表面對微生物來說相當重要，可增加其存活機會，可以利用細胞探針法 (cell probe method)⁽¹³⁾ 量測，如圖 10 所示。在 AFM 探針上固定細菌，量測菌體與物體表面的黏附力。將細菌固定於基盤上，使用矽或氮化

矽材質的探針，可量測帶負電荷細菌表面之靜電及空間上之交互作用，量測結果發現其作用力會受溶液中 pH 值和離子強度的影響⁽²⁾。

使用 OH^- (親水性) 及 CH_3^- (疏水性) 或離子性分子修飾後的 AFM 探針，可以輔助傳統實驗方法，以評估微生物表面的疏水性或表面帶電性質。在 AFM 探針上修飾一種植物凝集素 concanavalin A (ConA)，ConA 會與酵母菌細胞壁上組成分甘露聚糖 (mannan) 之甘露糖 (mannose) 結合 (圖 11)，透過作用力繪製 (force mapping) 來偵測探針上之 ConA 與酵母菌細胞壁上組成分甘露糖之間作用力，其作用力為 75 至 $250\ \text{pN}$ ，並可推測甘露聚糖在酵母菌表面分布狀況⁽⁸⁾。

3. 菌體表面彈性之量測與分析

要瞭解微生物的表面有多硬，可以使用 AFM 探針施壓於菌體細胞壁某部位或純化菌體表面組成分來量測 (圖 12)。測量細菌 *M. gryphiswaldense* 細

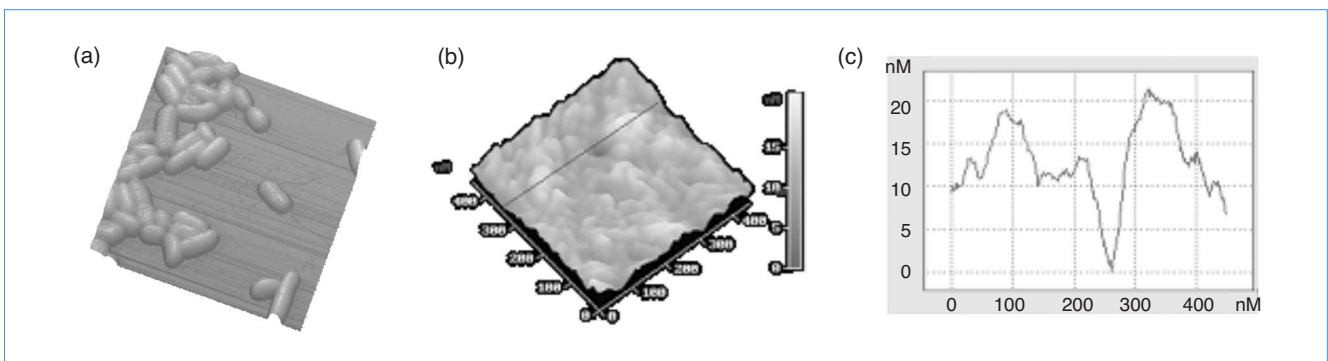


圖 9. (a) 在空氣中 AFM 量測細菌 *Serratia marcescens* 之立體圖，(b) 其表面呈波浪狀結構，(c) 並分析其表面高度變化。(掃描面積為 (a)： $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ；(b)： $450\ \text{nm} \times 450\ \text{nm}$)

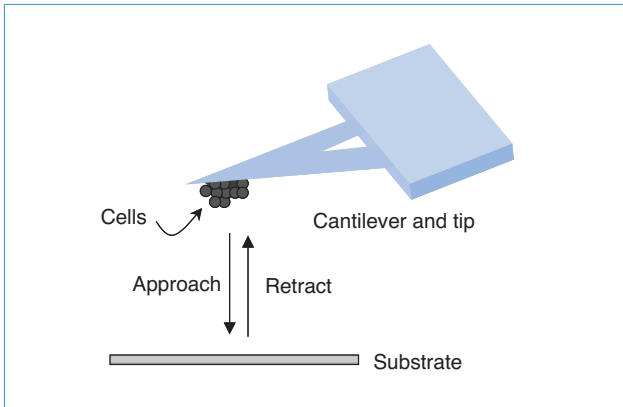


圖 10. AFM 細胞探針法。

胞壁的有效壓縮性大約為 42 mN/m，因為有細胞壁的關係⁽¹⁴⁾，即使外在滲透壓改變也不影響其彈性，並量測到膨壓值介於 85 至 150 kPa 之間⁽¹⁵⁾。有些腸內乳酸菌因其菌體表面含有 S-layer (由蛋白質或醣蛋白所組成) 而較硬，有些則富含多醣 (polysaccharides) 而較軟⁽¹⁶⁾。除了細胞壁之外，菌體表面的附屬物也控制了菌體表面的柔軟度。

4. 病毒之研究

在一般光學顯微鏡下無法看到病毒的存在，但利用電子顯微鏡負染色法及 X-ray 結晶圖譜方法可以解析病毒結構。病毒的基本構造是由蛋白質外殼包裹核酸所組成，有些在最外層還有套模，病毒大小介於 20 至 300 nm，形態不一，有二十面體、螺旋對稱、複合形狀或不確定對稱。

原子力顯微鏡可以在自然狀態下直接觀察病毒顆粒大小、力學特性，以及表面結構，在高解析度

下也可以觀察到衣殼粒 (capsomere) 排列於病毒表面上分布情形。觀察煙草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus, TMV)，在電顯及 X-ray 繞射之下其長度約 300 nm，桿狀直徑為 18 nm，以 AFM 量測病毒粒子其桿狀直徑高度同樣為 18 nm，但其寬度約為 45 nm⁽¹⁷⁾，明顯有偽像 (artifacts) 發生，所以量測之高度可作為其真正直徑。圖 13 顯示在氣相中 AFM 量測 SARS 冠狀病毒之立體圖，可觀察到病毒的套膜以及套膜外之棘蛋白 (spike proteins)。AFM 亦可觀察病毒顆粒感染細胞的情形⁽¹⁸⁾，可說明病毒與細胞之間作用關係及建立病毒感染模式。

六、結論

由於 AFM 的發明，使得生物樣品能保持在生理狀態下，觀察其真正形貌。若 AFM 探針針尖半徑過大解析力就變差，而且會得到一偽像 (artifacts in image)，而若針尖開叉會得到雙重影像，產生所謂多探針效應 (multiple probe effects)，以及在溶液中觀察會受 pH 值和離子濃度的影響。雖然有許多因素會干擾 AFM 量測結果，但並不影響其觀察生物樣品的實用性。

除了觀察微生物形貌及力學特性之外，若使用會破壞菌體表面結構的化學物質來處理細菌，利用 AFM 量測可評估細菌表面破壞之程度⁽¹⁹⁾，或使用溶菌素或抗生素處理細菌，觀測菌體崩解死亡情形^(20,21)。另外可以使用細胞探針法，在 AFM 探針上固定病毒，偵測病毒與細胞間的作用力，再加入藥物後觀察病毒與細胞之間作用力有無變化，即可評

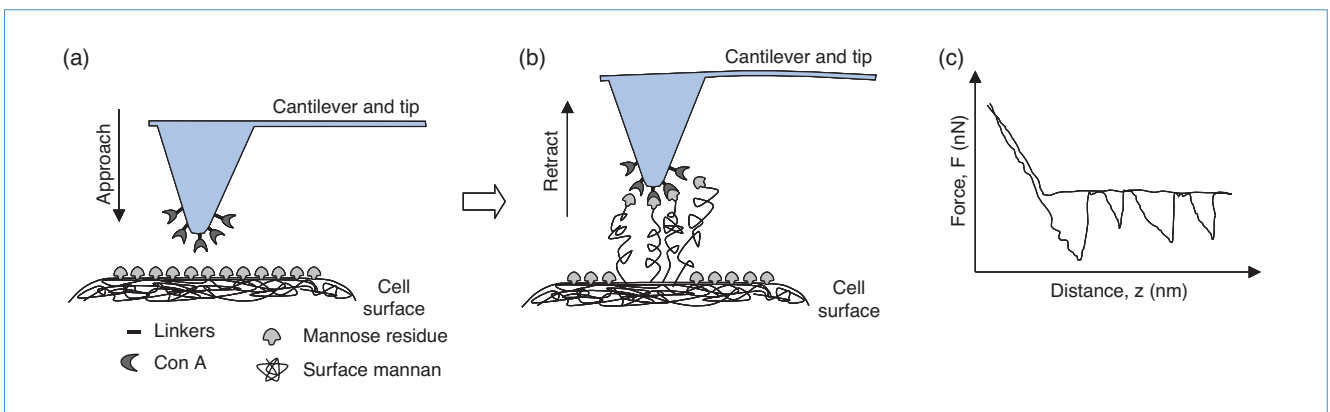


圖 11. 修飾植物凝集素的探針曲向 (a) 及縮回 (b) 菌體表面，以及所量測之力距離曲線 (c)。

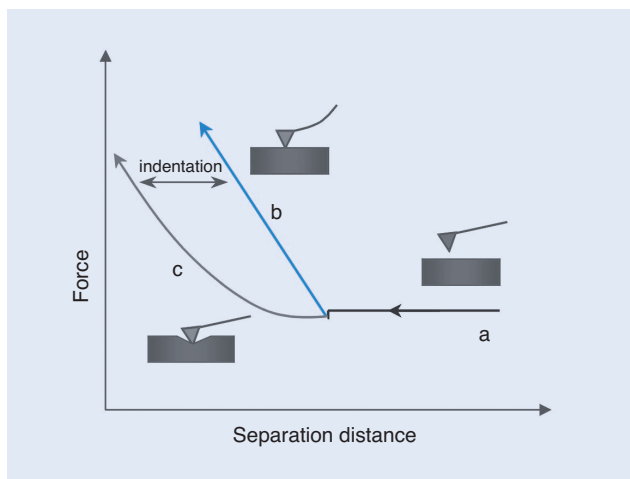


圖 12. AFM 量測堅硬 (b) 與柔軟 (c) 樣品之曲線。

估藥物之效用。AFM 量測之應用越來越多樣化，在各種研究領域上已嶄露頭角，尤其近幾年奈米科技蓬勃發展，AFM 將扮演重要且深具潛力的量測工具角色。

參考文獻

1. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
2. V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning, *Atomic Force Microscopy for Biologists*, London: Imperial College Press (1999).
3. R. Lal and S. A. John, *Am. J. Physiol.*, **266**, C1 (1994).
4. P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 3477 (1996).
5. E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, *Science*, **264**, 415 (1994).
6. V. T. Moy, E. L. Florin, and H. E. Gaub, *Science*, **266**, 257 (1994).
7. G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton, *Science*, **266**, 771 (1994).
8. M. Gad, A. Itoh, and A. Ikai, *Cell. Biol. Int.*, **21**, 697 (1997).
9. U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H. J. Guntherodt, and G. N. Misevic, *Science*, **267**, 1173 (1995).
10. Y. F. Dufrene, *J. Bacteriol.*, **184**, 5205 (2002).
11. A. Umeda, M. Saito, and K. Amako, *Microbiol. Immunol.*, **42**, 159 (1998).
12. V. G. Chada, E. A. Sanstad, R. Wang, and A. Driks, *J. Bacteriol.*, **185**, 6255 (2003).
13. A. Razatos, Y. L. Ong, M. M. Sharma, and G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 11059 (1998).
14. M. Arnoldi, C. M. Kacher, E. Bauerlein, M. Radmacher, and M. Fritz, *Appl. Phys. A*, **66**, S613 (1998).
15. M. Arnoldi, M. Fritz, E. Bauerlein, M. Radmacher, E. Sackmann, and A. Boulbitch, *Phys. Rev. E*, **62**, 1034 (2000).
16. P. Schaer-Zammaretti and J. Ubink, *Ultramicroscopy*, **97**, 199 (2003).

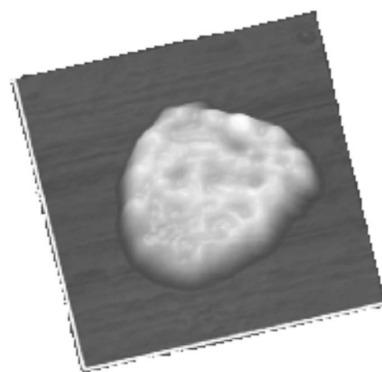


圖 13. 以 AFM 量測 SARS 冠狀病毒之立體圖 (掃描面積為 500 nm × 500 nm)。

17. Yu. G. Kuznetsov, A. J. Malkin, R. W. Lucas, M. Plomp, and A. McPherson, *J. Gen. Virol.*, **82**, 2025 (2001).
18. Y. G. Kuznetsov, S. Datta, N. H. Kothari, A. Greenwood, H. Fan, and A. McPherson, *Biophys. J.*, **83**, 3665 (2002).
19. T. A. Camesano, M. J. Natan, and B. E. Logan, *Langmuir*, **16**, 4563 (2000).
20. P. C. Braga and D. Ricci, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 18 (1998).
21. P. C. Braga and D. Ricci, *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 457 (2002).

- 陳吉良先生現就讀於國立台灣大學微生物與生化學研究所博士班。
- 林世明先生為英國劍橋大學生物技術博士，現任國立台灣大學光電生醫中心副教授。
- 林良平先生為美國路易斯安那州立大學博士，現任國立台灣大學微生物與生化學研究所教授暨中華民國電子顯微鏡學會榮譽理事。
- Ji-Liang Chen is a Ph.D. student in the Institute of Microbiology and Biochemistry at National Taiwan University.
- Shiming Lin received his Ph.D. in biotechnology from Cambridge University, UK. He is currently an associate professor in the Center for Optoelectronic Biomedicine at National Taiwan University.
- Liang-Ping Lin received his Ph.D. from Louisiana State University. He is currently a professor in the Institute of Microbiology and Biochemistry at National Taiwan University and an emeritus director at Microscopy Society, ROC.