

國立交通大學

生物科技學系研究所

碩士論文

Mn,Zn-MTGFP 融合蛋白磁性與結構分析

**Magnetic and metal binding structural
analysis of Mn, Zn-metallothionein-green
fluorescence fusion protein**

研究生：陳廷楷

指導教授：張家靖

中華民國一百零一年七月

Mn,Zn-MTGFP 融合蛋白磁性與結構分析

Magnetic and metal binding structural analysis of Mn,

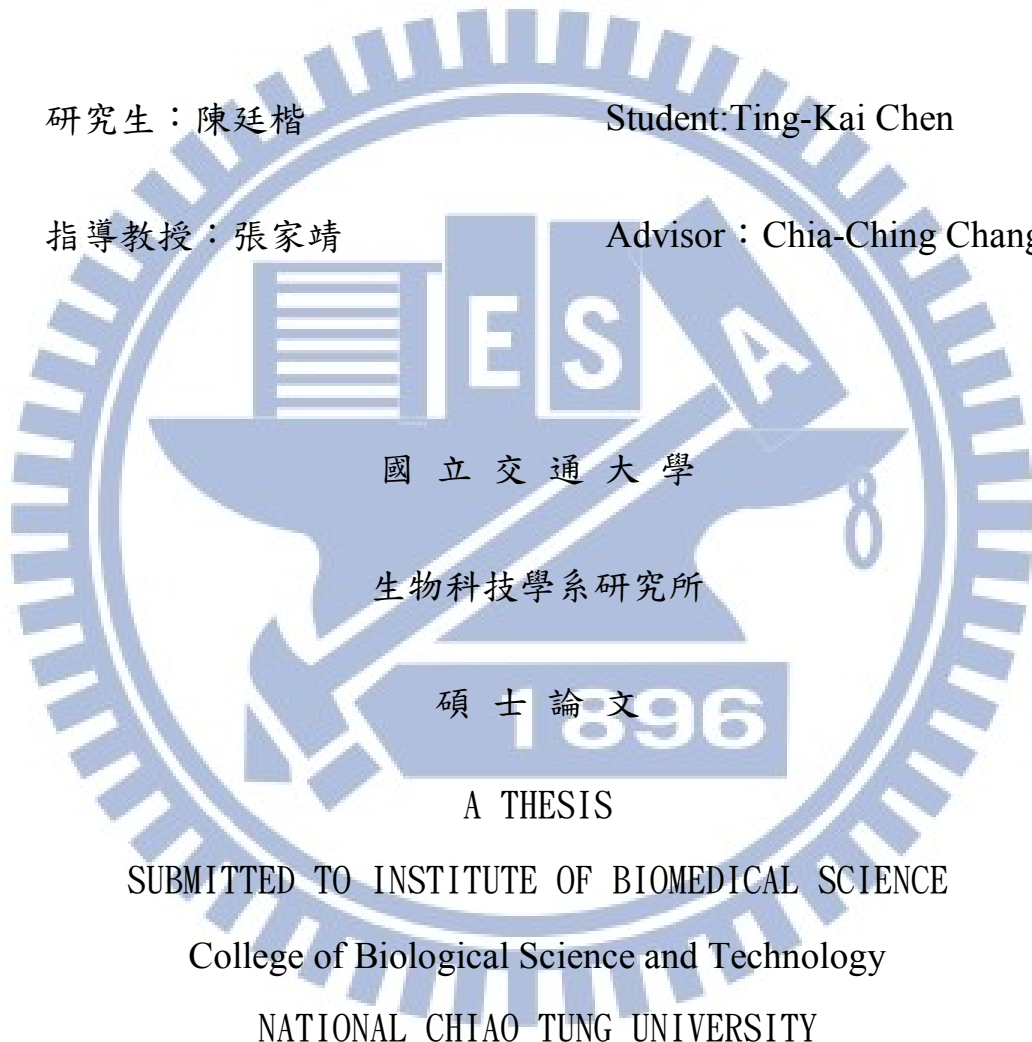
Zn-metallothionein-green fluorescence fusion protein

研究生：陳廷楷

Student: Ting-Kai Chen

指導教授：張家靖

Advisor : Chia-Ching Chang



國立交通大學

生物科技學系研究所

碩士論文

A THESIS

SUBMITTED TO INSTITUTE OF BIOMEDICAL SCIENCE

College of Biological Science and Technology

NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

In partial Fulfillment of Requirement for the Degree of Master in Science

JULY 2012

HSINCHU, TAIWAN, REPUBLIC OF CHINA

中華民國一百零一年七月

Mn,Zn-MTGFP 融合蛋白磁性與結構分析

學生：陳廷楷

指導教授：張家靖教授

國立交通大學生物科技研究所 碩士班

摘要

金屬硫蛋白與綠色螢光蛋白所形成的融合蛋白 (MT-GFP) 是一個內含金屬鍵結的蛋白質，此蛋白質含有 20 個高度保留的半胱氨酸(cysteine,Cys)容易與重金屬離子形成硫金屬鍵結。其中含有七個二價過渡性金屬離子和兩個類似 Zinc-Blende 金屬鍵結基團。在這項研究中，我們將 Zn^{2+} 以及 Mn^{2+} 取代 MT-GFP 原有的結合金屬形成錳鋅螢光金屬硫蛋白，並且發現錳鋅螢光金屬硫蛋白經由超導量子干涉儀測量，在 10K 到 300K 的範圍中展現出弱鐵磁性的特性。再經由拉曼光譜儀的檢測，可以發現鋅離子和錳離子係藉由與金屬硫鍵結結合在蛋白質中，分別在 288 cm^{-1} 和 355 cm^{-1} 有 Zn-S 以及 Mn-S 之 Bending mode 拉曼光譜訊號。經由延伸 X 射線吸收精細結構 (EXAFS 光譜) 的分析更加確定 Mn^{2+} 經由硫與 MT-GFP 結合。Mn,Zn-MT-GFP 更可以用 TEM 的影像圖以及電子繞射圖形推測其結構。

Magnetic and metal binding structural analysis of Mn, Zn-metallothionein-green fluorescence fusion protein

Advisee: Ting-Kai Chen

Adviser: Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Biomedical Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract

Metallothionein-green fluorescence fusion protein (MT-GFP) is a zinc binding protein, which binds seven divalent transition metal ions through its 20 conserved cysteines and forms two metal binding clusters with Zinc-Blende structure. In this study, Mn^{2+} ions has substituted for Zn^{2+} at M_3 , M_4 metal binding sites in the β -domain of MT-GFP. We found this Mn, Zn binding protein exhibits weak ferromagnetic properties at temperature range from 10K to 300K by SQUID measurement. By micro-Raman spectroscopy analysis, the Zn-S and Mn-S bending modes can be observed clearly at 288 cm^{-1} and 355 cm^{-1} , respectively. These evidences indicate that the Zn^{2+} and Mn^{2+} ions are bound with Cys residues of MT-GFP. Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) analysis also indicats Mn^{2+} ions bond to MT-GFP via the Mn-S bond of Cys. The conformation of Mn,Zn-MT-GFP can be characterized by TEM and the its intermolecular interactions can be determined by its electron diffraction pattern.

誌 謝

首先要感謝我的指導教授張家靖老師，永遠都會記得剛剛踏進交大的那一天，以及在面試時的老師，因為我是物理系畢業的學生，生物科技對我來說真的是一個全新的領域，就在我不知道該如何抉擇的時候，老師很大方的向我介紹他的實驗室，也告訴我說我們現在正準備要組裝拉曼光譜儀是否有興趣要不要一起來看看？當時引起了我許多的興趣以及希望，讓我知道我大學所學有機會可以在生物科技的領域中運用，進了老師的團隊後，真的很謝謝老師的用心栽培、耐心的解釋以及讓我有許多的機會可以到不同的學校機構與不同的科系合作，在這之中成長了不少也學習到許多新的技術，老師更教導了我許多做人處事的道理以及解決問題的能力，永遠會記得您的教導，如果有機會真的很希望可以跟老師以朋友的形式繼續相處下去。接著要感謝在這個實驗室的每一個人，謝謝你們對我的容忍以及教導、磨練和幫助，實驗室就像一個小型的社會，謝謝你們讓我學習到該怎麼樣在社會中生存，也謝謝你們在實驗上的指導。

接下來要感謝清大的陳福榮老師以及蘇雲良老師以及兩位老師的實驗室的所有的同學以及學長姐們，你們總是耐心的教導我以及與我討論著實驗的細節，來自不同科系的我們常常一起做實驗做到凌晨三四點，常常聚在一起討論實驗，一起分享著來自不同科系不同實驗室的酸甜苦辣，也許是因為實驗的關係有了長時間的相處，慢慢的大家都成了最要好的朋友，在這兩年間給予了我莫大的鼓勵與祝福，在許多時候更帶給了我一種溫暖的感覺，讓我在遇到問題時更有勇氣的走下去，真的很感謝你們。

最後要非常感謝的是我的家人，以及我分散在其他實驗室中的好朋友們，真的很感謝你們願意聽我說話，常常幫我想著事情該怎麼解決，給予了我許多的溫暖以及依靠。我的家人、女朋友不管我實驗做的再晚都會等我，在我心情低落甚至想放棄時總是給予了莫大的溫暖以及鼓勵，也謝謝林昆亮學長總是耐心的陪著我給予我許多重要的建議，真的很感謝你們在許多重要的時刻給予了我依靠的肩膀以及莫大鼓勵，沒有你們我可能無法堅持到現在！

謝謝張家靖老師、陳福榮老師、蘇雲良老師、李志甫老師的指導，謝謝我的家人，林昆亮學長、鍾偉賢學長、吳泰興學長、蔡俊穎學長、劉柿誼學長、巫偉融學長、林盈志學長，真的很謝謝你們的鼓勵以及陪伴，真的很謝謝你們！

目錄

摘要.....	i
Abstract.....	iii
誌謝.....	iv
目錄.....	v
第一章 緒論.....	1
1-1 研究動機.....	1
1-2 “稀磁性半導體”(DMS).....	2
1-3 zinc-blende 結構.....	3
1-4 超自旋互換作用(super exchange interaction).....	4
1-5 雙自旋互換作用(double exchange interaction).....	5
1-6 分子內超自旋互換作用(intramolecular superexchange interactions).....	6
1-7 綠色螢光蛋白(Green Fluorescence Protein,GFP)介紹.....	7
1-8 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)介紹.....	13

第二章 實驗原理：	17
2-1 拉曼光譜術(Raman spectroscopy)	17
2-2 超導量子干涉磁量儀涉元件(SQUID)	22
2-3 穿隧式電子顯微術 Transmission Electron Microscope (TEM)	26
2-4 延伸 X 射線吸收精細結構 Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS)	30
第三章 實驗方法	33
3-1 實驗材料的製備	33
3-1-1 蛋白質表現	33
3-1-2 破菌取得目標蛋白質	32
3-1-3 蛋白質純化	36
3-1-4 金屬離子置換	38
3-1-5 將樣品透析以及冷凍乾燥以利分析及保存	39
3-2 拉曼光譜術(Raman spectroscopy)光譜分析	40
3-3 超導量子干涉磁量儀涉元件(SQUID)磁性分析	41
3-4 穿隧式電子顯微術 Transmission Electron Microscopy (TEM) 影像分析	42

3-5 延伸 X 射線吸收精細結構 Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS)

Mn,Zn-MT-GFP Mn 離子週圍結構分析.....44

第四章 實驗結果46

4-1 磁性蛋白製備方法及結果.....46

4-2 拉曼光譜術(Raman spectroscopy)光譜分析.....51

4-3 超導量子干涉磁量儀涉元件(SQUID) 磁性分析.....56

4-4 穿隧式電子顯微術 Transmission Electron Microscope (TEM)影像分析.....63

4-5 延伸 X 射線吸收精細結構 Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS)

Mn,Zn-MT-GFP Mn 離子週圍結構分析.....75

第五章 討論82

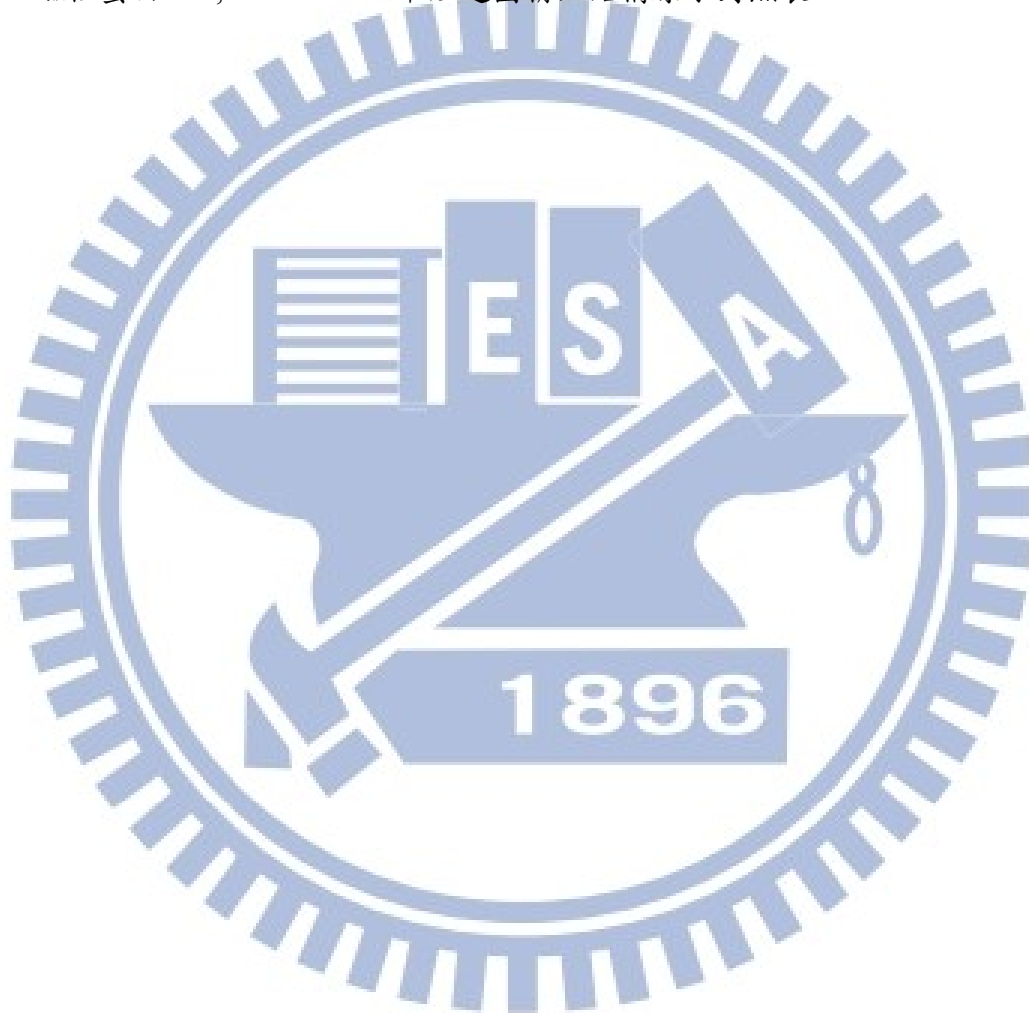
第六章 參考文獻90

表目錄

表 1. 為 MTGFP protein 定序結果..... 50

表 2. Mn,Zn-MT-GFP 之 Zn-S 以及 Mn-S 拉曼光譜訊號對照表 55

表 3. 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 中錳週圍精細結構原子對照表 81



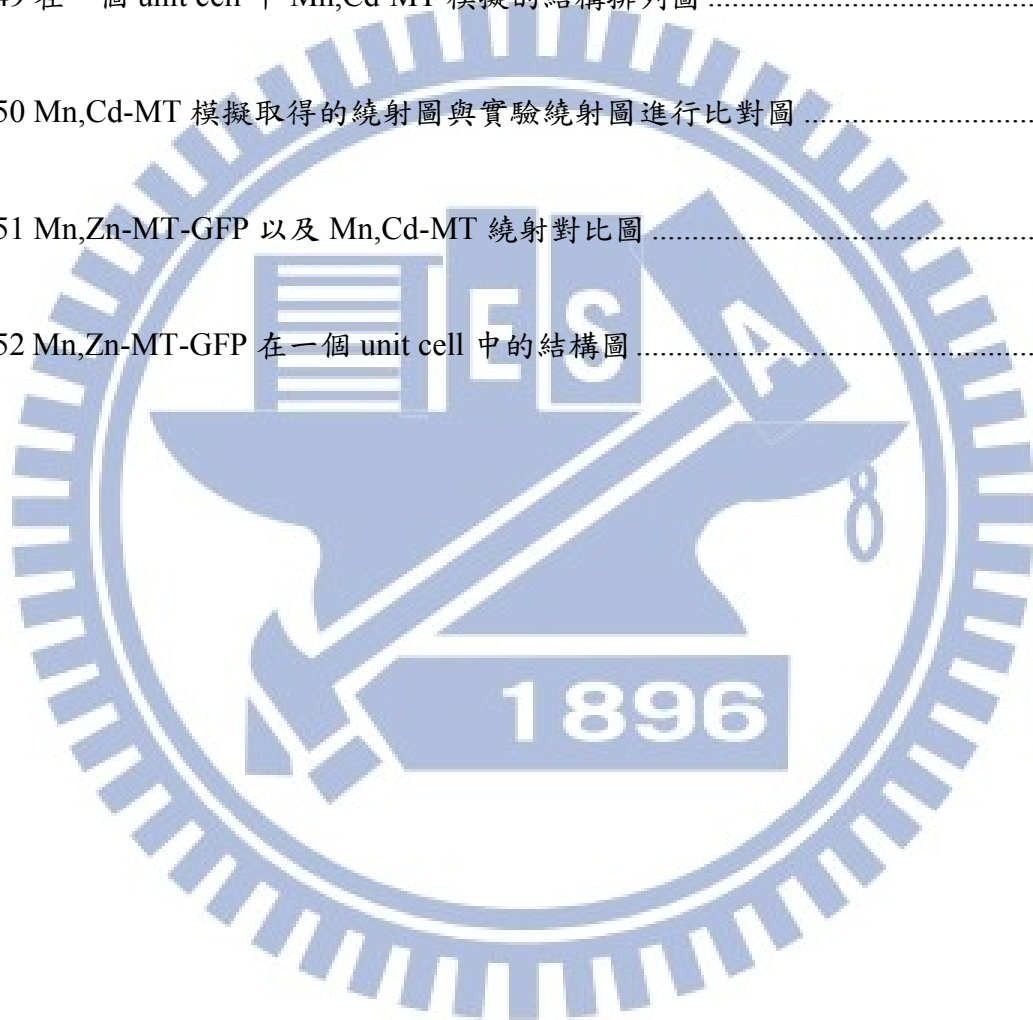
圖目錄

圖 1 Zinc-Blende 結構示意圖.....	3
圖 2 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 的晶體為鈣鈦礦結構以及超自旋互換作用示意圖.....	4
圖 3 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 的價電子雙自旋互換作用原理示意圖.....	5
圖 4 磁性以及電子自旋分類圖.....	6
圖 5 Aequorin 的發光機制示意圖.....	8
圖 6 GFP 的結構示意圖.....	9
圖 7 GFP 二維結構示意圖.....	10
圖 8 GFP 的結構與其 chromophore.....	10
圖 9 GFP 的發光基團結構示意圖.....	11
圖 10 GFP 衍生物的發光基團結構示意圖.....	13
圖 11 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)結構示意圖.....	15
圖 12 各種不同拉曼散射能量示意圖.....	18
圖 13 本實驗室所使用之自組裝拉曼光譜儀系統.....	21
圖 14 本實驗室拉曼光譜儀系統架構圖.....	21
圖 15 超導量子干涉磁量儀系統結構.....	24

圖 16 SQUID 系統圖.....	25
圖 17 穿隧式電子顯微鏡系統圖.....	27
圖 18 光電子與折返的光電子產生干繞現象(Interference)示意圖.....	32
圖 19 Mn K-edge 吸收限之 X 光吸收光譜.....	32
圖 20 Mn,Zn-MT-GFP 樣品製作步驟流程圖.....	38
圖 21 MTGFP 之 SDS-PAGE 分析.....	48
圖 22 MT-GFP 以及置換金屬離子後的 Mn,Zn-MT-GFP.....	48
圖 23 MT-GFP Western 的結果.....	49
圖 24 矽片拉曼光譜訊號.....	51
圖 25 拉曼光譜儀訊號接收處.....	52
圖 26 Mn,Zn-MT-GFP 理想結構示意圖.....	53
圖 27 Mn,Zn-MT-GFP 拉曼光譜.....	54
圖 28 SQUID 裝置樣品示意圖.....	56
圖 29 SQUID 樣品輸送室.....	56
圖 30 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP M.H 圖量測結果.....	58
圖 31 Mn,Zn 化合物在 10K 量測結果.....	59

圖 32 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起.....	61
圖 33 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起並相互開始連接.....	61
圖 34 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起並連接在一起.....	62
圖 35 實驗室先前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖.....	63
圖 36 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP TEM 影像圖.....	66
圖 37 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP TEM 繞射圖.....	67
圖 38 Liposome 包覆錳鋅化合物 TEM 圖.....	69
圖 39 較大的錳鋅化合物 TEM 影像及繞射圖.....	70
圖 40 較大的錳鋅化合物 TEM EDX 光譜圖.....	71
圖 41 錳鋅化合物溶液弛緩率量測結果圖.....	74
圖 42 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 裝至於 EXAFS 示意圖.....	76
圖 43 EXAFS 儀器的架設示意圖.....	77
圖 44 不同價態的錳的吸收光譜示意圖.....	78
圖 45 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 之 Mn 離子的吸收光譜圖.....	79
圖 46 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 之 Mn 離子 X 光近緣結構光譜圖.....	80

圖 47 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 之 Mn 離子延伸 X 光吸收精細結構吸收光譜實驗數據 與 fitting 示意圖	81
圖 48 Mn,Cd-MT 假設結構示意圖	85
圖 49 在一個 unit cell 中 Mn,Cd-MT 模擬的結構排列圖	86
圖 50 Mn,Cd-MT 模擬取得的繞射圖與實驗繞射圖進行比對圖	86
圖 51 Mn,Zn-MT-GFP 以及 Mn,Cd-MT 繞射對比圖	88
圖 52 Mn,Zn-MT-GFP 在一個 unit cell 中的結構圖	88



第一章 緒論

1-1 研究動機

蛋白質、去氧核糖核酸、生物膜皆屬於生物巨分子，這些生物巨分子具有自我組織 (Self-organization) 的特性，而自動形成穩定結構的能力。當生物巨分子處在開放系統的環境中，系統內部的分子會與外在環境產生交互作用，而改變構形，使分子趨於能量最低態的特殊構形[1,2]。

金屬硫蛋白 (Metallothionein, MT) 具有 α -， β - 兩個金屬鍵結團簇 (metal cluster/domain)[3-7]。2006 年研究指出，螯合金屬後的 MT，其 α -， β - metal cluster 形狀類似兩個環狀結構，當 β -metal cluster 形成 $(\text{Mn}_2\text{CdS}_3)^{3-}$ 類似 Zinc-Blende 結構時，可形成磁矩，使此蛋白質從 10K 至 300K 有鐵磁性的現象[8]。

此種類似稀磁性半導體的元件可以運用在磁性感測元件上，另一方面由於此具有磁性的材料主體為蛋白質，因此具有良好的生物相容性，可以與生物醫學技術結合，開發為生物磁性感測元件，或將其放入藥物及生物體中，利用磁性控制其位置提升藥物精準度。但是由於此蛋白中含有鎘[8]，還是有環境危害性，因此我們試著開發出一樣具有磁性特性的蛋白質，並將鎘金屬離子排除，選用毒性較弱的鋅金屬離子來取代鎘金屬離子形成新一代低環境危害性的稀磁性蛋白質。

1-2 “稀磁性半導體” (Diluted Magnetic Semiconducto DMS)

自從1980年左右開始，許多研究者注意到所謂的“稀磁性半導體”(DMS)，亦即在半導體中摻雜少量的磁性元素。大多數磁性過渡金屬的價數與II族陽離子的價數相同，所以剛開始的焦點放在以II-VI族化合物為主的DMS [9-10]，例如： $(\text{Cd},\text{Mn})\text{Te}$ 、 $(\text{Zn},\text{Mn})\text{Te}$ 、 $(\text{Zn},\text{Co})\text{S}$ 、 $(\text{Hg},\text{Fe})\text{Se}$ 等。雖然它們在製備方面比較容易達到高密度的磁性原子以及量子結構的製作，但是卻不易摻雜為n型或p型的半導體。此外在磁性方面，由於局域化自旋(localized spins)之間的反鐵磁超交換作用(antiferromagnetic super-exchange)，隨著磁性離子濃度與溫度的變化，它們僅表現出順磁(paramagnetic)、自旋玻璃態(spin-glass)或是反鐵磁性(antiferromagnetic)的行為[11]。雖然在1994年II-VI族化合物DMS的摻雜技術(利用MBE方式)有所突破後，陸續在p型的 $(\text{Cd},\text{Mn})\text{Te}$ 、 $(\text{Zn},\text{Mn})\text{Te}$ 以及 $(\text{Be},\text{Mn})\text{Te}$ 中發現其具有鐵磁性[11-13]，然而它們的居禮溫度 T_c 都低於10K，這對於元件室溫操作的必要條件而言，仍然是相當明顯不利的缺點[14]。

1-3 Zinc-Blende 結構

閃鋅礦(zincblende)的結構為面心立方晶體結構 (Face-Centered Cubic Crystal

Structure) FCC 型(如圖 1)，閃鋅礦(zincblende)的結構與許多金屬的晶體結構一樣具有立方幾何 (cubic geometry) 的單位晶胞，其原子位置排列於每一個角和所有立方面的中心位置，此種結構稱為面心立方(FCC)晶體結構，在閃鋅礦結構中其中 4 個陽離子位在正常 FCC 結構的格子點上，而 4 個陰離子佔據 8 個四面體位置的一半。由離子半徑比預測出配位數為 4 之離子可有此種結構。

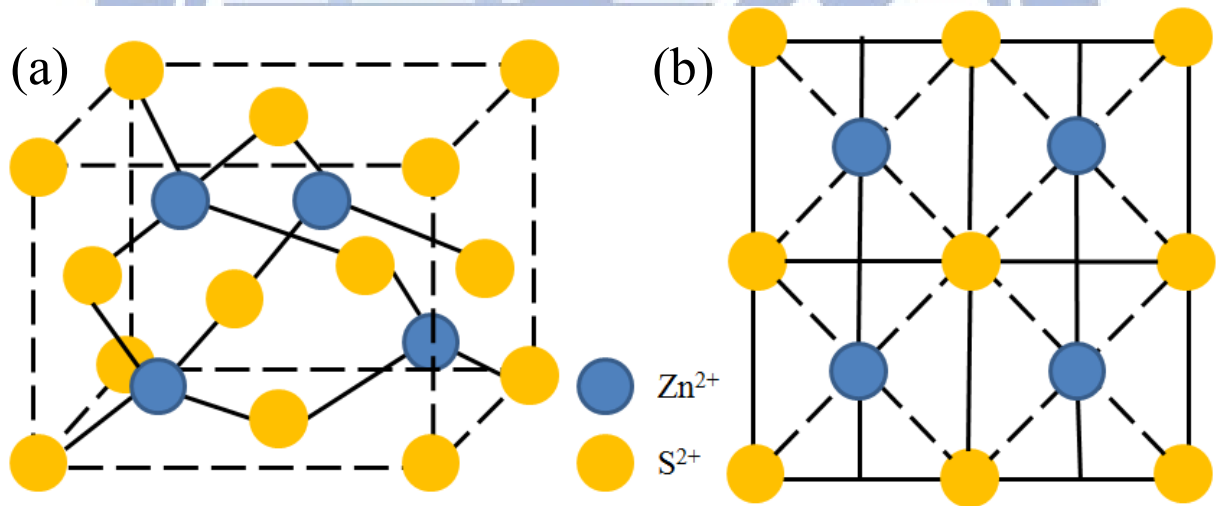


圖 1 立方 ZnS “Zinc-Blende”結構示意圖 (a)晶體結構 (b) (001)面上投影圖

(本圖參考自網路” Prof. Dr. Helmut Föll Semiconductor Technology”

http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/semitech_en/index.html)

1-4超自旋互換作用(super exchange interaction)

以較簡單的例子來說，例如 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 的晶體結構為鈣鈦礦(perovskite)結構，如圖 2 所示[15]，其中 Mn 位於立方體的中心，O 位於立方體的六個面心，La 或 Sr 位於立方體的六個角， $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 是摻雜錳氧化物，未摻雜的”母化合物”是 LaMnO_3 ，若某一定比例的 La 被 Sr 取代，即可得到 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 。 LaMnO_3 中的 Mn^{3+} 離子有四個 3d 價電子，其中三個是 t_{2g} 電子、一個是 e_g 電子，當 Mn^{3+} 的 e_g 電子與鄰近 Mn^{3+} 的 e_g 電子具有反向的自旋方向時， e_g 電子可以透過中間 O 的 2p 軌道在極短時間內，跳至鄰近 Mn^{3+} 的 e_g 軌道然後再跳回原來 Mn^{3+} 的 e_g 軌道，發生所謂的虛擬跳動(virtual hopping)，我們稱這種作用為超自旋互換作用(super exchange interaction)，因此 LaMnO_3 是反鐵磁材料[15]。

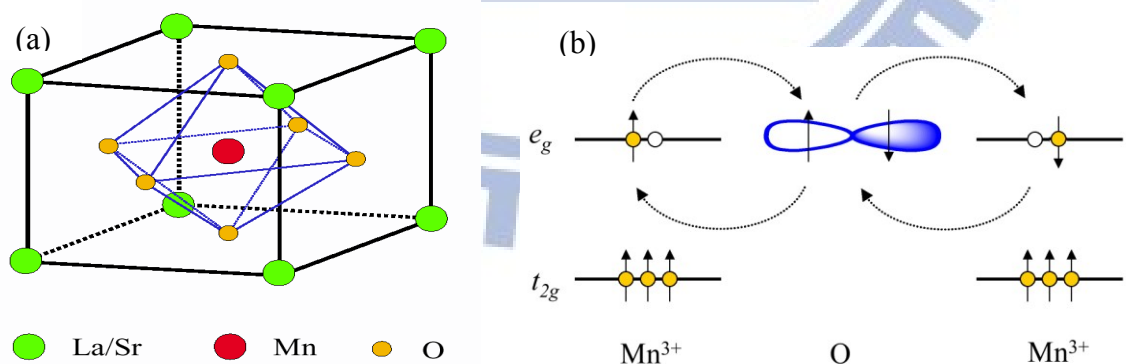


圖 2 圖(a) $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 的晶體為鈣鈦礦結構圖[15]。圖(b)超自旋互換作用示意圖， Mn^{3+} 離子有四個 3d 價電子，其中三個是 t_{2g} 電子、一個是 e_g 電子，當 Mn^{3+} 的 e_g 電子與鄰近 Mn^{3+} 的 e_g 電子具有反向的自旋方向時， e_g 電子可以透過中間 O 的 2p 軌道在極短時間內，跳至鄰近 Mn^{3+} 的 e_g 軌道然後再跳回原來 Mn^{3+} 的 e_g 軌道，我們稱這種作用為超自旋互換作用(super exchange interaction)。

1-5 雙自旋互換作用(double exchange interaction)

$\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 是混合價化合物，由於摻雜作用，若某一定比例的 Mn^{3+} 被 Mn^{4+} 取代，而 Mn^{4+} 有三個 3d 價電子，全部具有 t_{2g} 對稱性，並沒有 e_g 電子，在某一定摻雜範圍內，如果 Mn^{3+} 的 e_g 電子與鄰近 Mn^{4+} 的 e_g 電子具有同向的自旋方向時， e_g 電子可以透過中間 O 的 2p 軌道跳至鄰近 Mn^{4+} 的 e_g 軌道，而降低整個系統的能量，因此 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 是鐵磁材料而且也是導體，我們稱這種作用為雙自旋互換作用(double exchange interaction) [15](如圖 3 所示)。此種現象普遍存在於“稀磁性半導體”(DMS)中，尤其更以用錳做為摻雜離子所形成的“稀磁性半導體”(DMS)為主[16]。

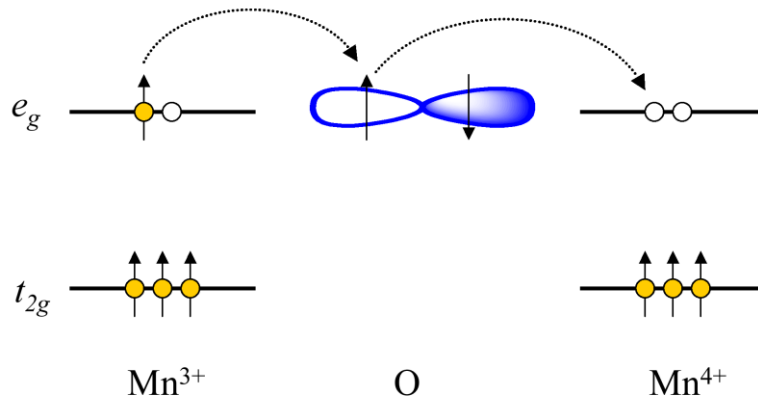


圖 3 $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ 的價電子雙自旋互換作用原理示意圖 Mn^{3+} 的 e_g 電子與鄰近 Mn^{4+} 的 e_g 電子具有同向的自旋方向時， e_g 電子可以透過中間 O 的 2p 軌道跳至鄰近 Mn^{4+} 的 e_g 軌道，而降低整個系統的能量，因此讓此材為鐵磁材料而且也是導體，我們稱這種作用為雙自旋互換作用(double exchange interaction) [15]。

1-6 分子內超自旋互換作用(intramolecular superexchange interactions)

一般來說此現象是用來形容在低溫下有微小的分子團簇結構，因為在沒有熱擾動的干擾下，分子內部的交互作用會就為明顯，使的分子內部的電子自旋方向相較於在一般常溫下，較容易改變為同一方向，使的再分子團簇結構形成長程且有序的磁性序列(long range magnetic order, LRMO)。由於 LRMO 是形容長程有序的磁性序列，也就是說，當分子團簇一旦形成 LRMO 時，此分子團簇內部電子自旋方向在一定的範圍內有了相同的方向，當電子自旋分向有了相同的方向後便會產生鐵磁性(ferromagnetic，如圖 4)，所以使的此此分子團簇便具有了鐵磁性的現象(ferromagnetic)形成單分子磁鐵[17]。目前已確定會有此種現象可以形成分子磁鐵的分子團簇有 Fe_{19} , [18] Mn_4Br , [19] Mn_4Me , [20] and Fe_{14} . [21]，這些分子團簇在低溫下均會產生 LRMO 使的這些分子團簇形成分子磁鐵。此一現象可以延伸到分子間 LRMO 形成磁域。

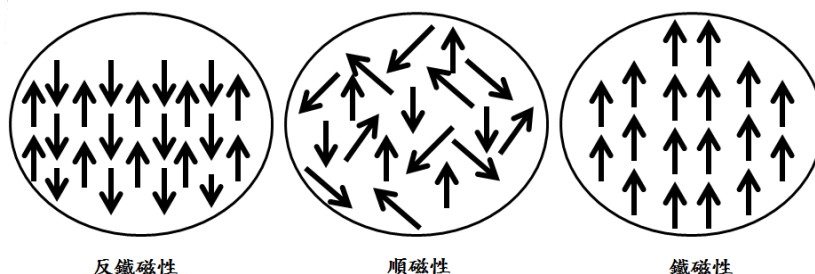


圖4磁性以及電子自旋分類圖：圖中所試的分別為一般常見的三種不同的電子自旋方向導至不同磁性種類的分類圖，在反鐵磁性中，電子自旋方向互相相反導至沒有磁性，在順磁性中，電子自旋採隨機分部的方式分部在分子中，當有外加磁場時，電子自旋方向如一延著磁場分向旋轉，導製具有磁性，此磁性稱為順磁性。最後為鐵磁性，在分子中，電子自旋方向相同，

且長程有序排列，導至分子產生鐵磁性。(本圖參考自網路”highwaydata.com.cn”)

1-7綠色螢光蛋白(Green Fluorescence Protein,GFP)介紹

綠色螢光蛋白起源及發展

綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein) ，簡稱 **GFP** ，這種蛋白質最早是由下村脩等人在 1962 年在維多利亞多管發光水母中發現。其基因所產生的蛋白質，在藍色波長範圍的光線激發下，會發出綠色螢光。這個發光的過程中還需要冷光蛋白質水母素 (Aequorin) 的幫助，且這個水母素與鈣離子 (Ca^{2+}) 可產生交互作用發出波長 470 nm 的藍色冷光[22]。

由維多利亞多管發光水母中發現的野生型綠色螢光蛋白，395nm 和 475nm 分別是最大和次大的激發波長，它的發射波長的峰點是在 509nm，在可見光綠光的範圍下是較弱的位置。由海腎 (sea pansy) 所得的綠色螢光蛋白，僅有在 498nm 有一個較高的激發峰點 [22-27]。

在細胞生物學與分子生物學領域中，綠色螢光蛋白基因常被用作為一個報導基因 (reporter gene)。一些經修飾過的型式可作為生物探針，綠色螢光蛋白基因也可以轉殖到脊椎動物(例如:兔子上進行表現，並拿來映證某種假設的實驗方法。)2008 年 10 月 8

日，日本科學家下村脩、美國科學家馬丁·查爾菲和錢永健因為發現和改造綠色螢光蛋白而獲得了當年的諾貝爾化學獎。[22-27]

Aequorin 這種會將化學能轉換形式成光能的冷光蛋白(Chemilluminescent protein)可與鈣離子結合，將儲存於 Aequorin 中的 ATP 化學能進行發生化學反應產生光能。此過程為 Aequorin 中的 coelenterazine 氧化成 coelenteramide，並釋出 470 nm 的藍光，而此時 GFP 吸收 Aequorin 釋出的藍光後，放出 508 nm 的綠光螢光[28-30] (圖 5)，後來發展應用於偵測細胞體內鈣離子的濃度[31]。

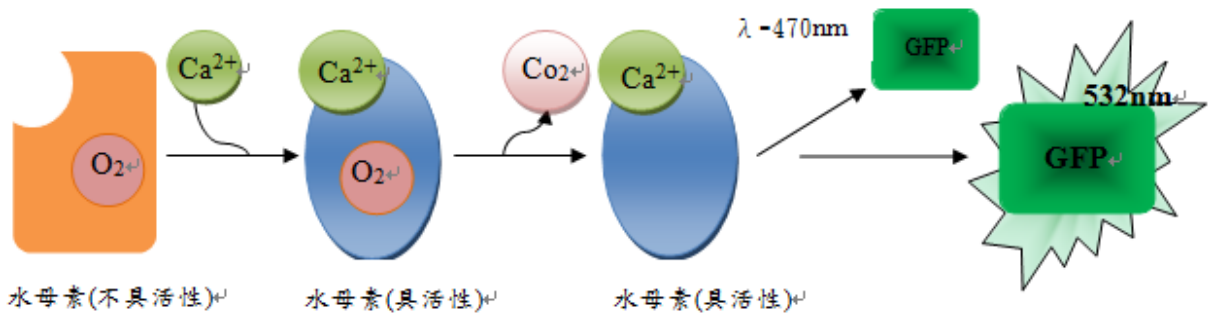


圖 5 Aequorin 的發光機制示意圖 "Aequorin" 在經過鈣離子的催化後，經過氧化反應，會釋放波長 470nm 的藍色螢光。此色螢光會傳遞能量激發 GFP，使 GFP 釋放波長 508nm 的綠色螢光。

1980年華人化學家錢永健(Roger Y. Tsien)發展出能發出各種顏色的螢光蛋白質，錢博士首先針對綠色螢光蛋白的發光機制進行研究。由過去的研究，已知發光基團來自於 65~67號胺基酸分子的摺疊、環化和脫水。錢博士進一步證實這些分子還需經過最後的氧化反應，才有辦法形成真正能產生螢光反應的發光基團。接著他利用點突變的技術改變GFP的基因，進而產生不同胺基酸組合的GFP。研究結果證實藉由這種方法，可以使

原本綠色的GFP轉變為發出青綠色、藍色、黃色等不同顏色的GFP類似物而獲得2008年諾貝爾化學獎[22, 23, 26, 32]。

綠色螢光蛋白結構及發光機制

結構

GFP 最早是在 *Aequorea Victoria* 中發現。GFP 的結構是三級結構的蛋白質，內含有 238 個胺基酸[33]。如圖 6 與圖 7 所示，其結構主要是由 4 條 α -helix 和 11 條 β sheet 所構成一個桶狀型態 (barrel) 的結構並包圍著其發光基團(chromophore)，此種結構會保護其 chromophore 使其在高溫或強酸強鹼的情形下，仍能夠受到激發放光[34,35]。



Green Fluorescent Protein

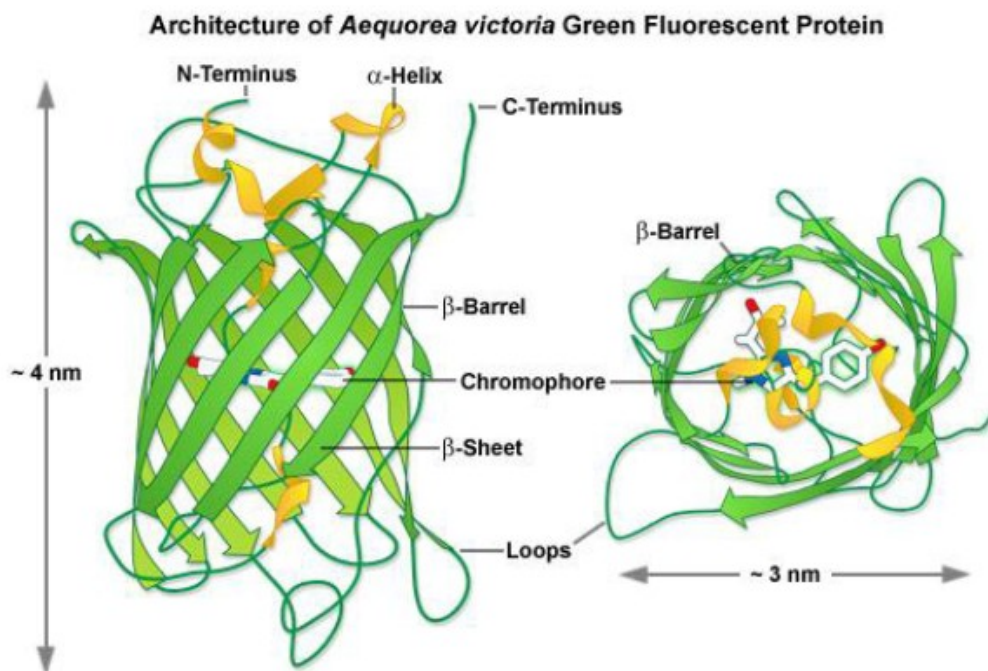


圖 6:GFP 的結構示意圖 GFP 主要是由 4 條 alpha-helix 和 11 條 beta sheet 所構成一個罐狀型態 (barrel) 的結構長約 4nm 寬約 3nm 並在中間包圍著其發光基團(chromophore) [36]。

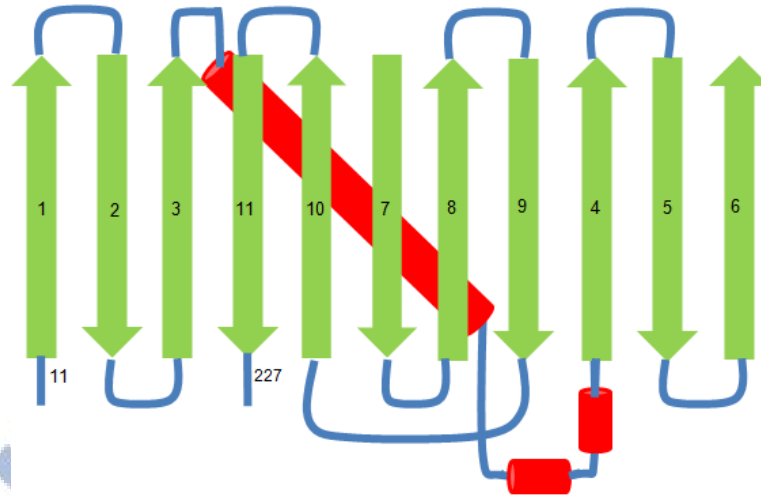


圖 7:GFP 一維結構示意圖 把 GFP 的構造攤開，圖中綠色為十一條為 beta-sheet，紅色四條為 alpha-helix (本圖參考自網路”Green fluorescent protein” <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>)

發光基團

GFP 的 chromophore 是由 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 三個胺基酸組成(如圖 8)，需經過摺疊、環化、脫水與氧化四個步驟的後轉譯修飾，使其成為可發光之集團。此反應不需要酵素參與，稱為自催化反應 (autocatalytic reaction)。

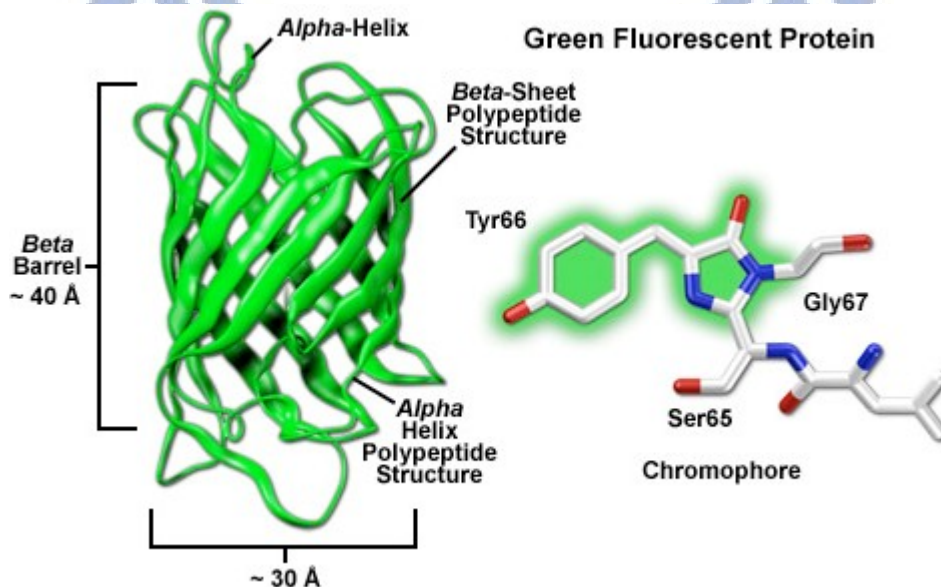


圖 8 GFP 的結構與其 chromophore，chromophore 是由 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 三個胺基酸組成，並藉由鄰近 Glu222 及 Arg96 可以協助穩定 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 結構[36]。

發光機制

如圖 9 所示，首先 Tyr66 兩側的醯胺鍵互相靠近，接著 Ser65、Tyr66 之間的醯胺鍵上的 α -C (electrophile) 與 Tyr66、Gly67 之間上的 N (nucleophile) 互相吸引形成新共價鍵，造成新的五碳環。形成新的五碳環後，五碳環上的 -OH 與 -H 並列，隨即進行脫水反應脫去一分子的水，此時五碳環上的 C、N 原子因此形成雙鍵。最後 Tyr66 側鏈上並排的兩個 H 與 O₂ 反應，脫去 H₂O₂ 並形成雙鍵。此雙鍵溝通了兩個圓環結構內的雙鍵，形成完整可互相溝通的共軛雙鍵群。chromophore 的共軛雙鍵擁有足夠多的 π 鍵，堆疊足夠多的 bonding orbital 與 anti-bonding orbital，使 HOMO 和 LUMO 間能階差落在可見光的能量範圍內[36]。

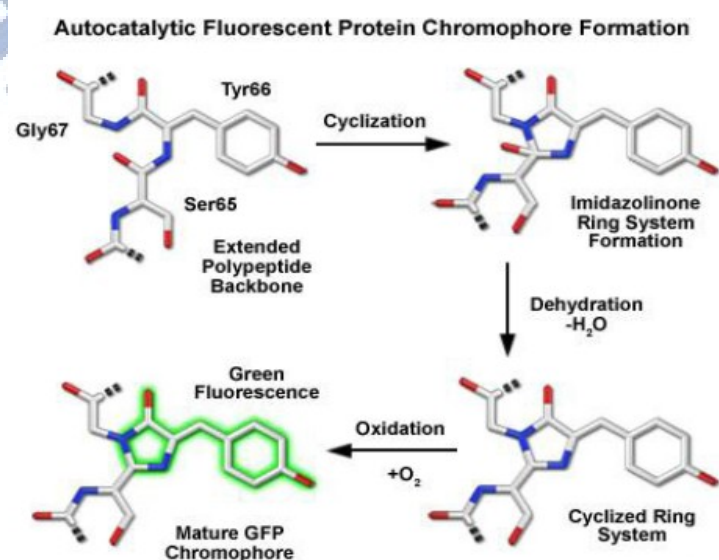


圖 9 GFP 的發光基團結構 GFP 是一個筒狀結構，由 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 三個胺基酸組成，鄰近 Glu₂₂₂ 及 Arg₉₆ 可以協助穩定 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 結構[31]。Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 經由環化、脫水、氧化產生螢光的步驟[36]。本圖引用自網路”蔡司學院:淺談螢光蛋白” <http://www.ticgroup.com.tw/menu/products/sci/School/GFP/GFP.asp>

綠色螢光蛋白的穩定性

GFP 本身對溫度具有高穩定性，在溫度達到 65°C 時，仍可保持其結構並具有活性 [37,38]；並且 GFP 在 pH5.5 到 pH12 的範圍均可保有較佳螢光強度，小於 pH4 及高於 pH12 會有螢光失活現象發生[38]。

GFP 的衍生物

在生物的檢測與標記上，常常需要各種不同顏色的螢光，所以科學家開始致力研究如何製造出發光強度更強與不同顏色的螢光蛋白。

由於 wild-type 的 GFP 的穩定性比較差，所以 2008 年諾貝爾獎得主錢永健藉由 GFP 一次一次的點突變，製造出許多 GFP 的衍生物（如圖 10）。

點突變的胺基酸，隨著 chromophore 的序列有變化外，也有改變外殼 beta-sheet 的序列。因為 GFP 是三級的立體結構蛋白質，所以外面的 beta-barrel 的胺基酸會和中心 chromophore 的胺基酸產稱氫鍵或凡得瓦力，進而影響其分子之構型。Chromophore 裡的 Gly₆₇ 一直都沒被修改的原因是：他是構造最簡單的蛋白質，使得其發光反應可以持續進行不受外在分子的影響[24,32,34,39-43]。

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants

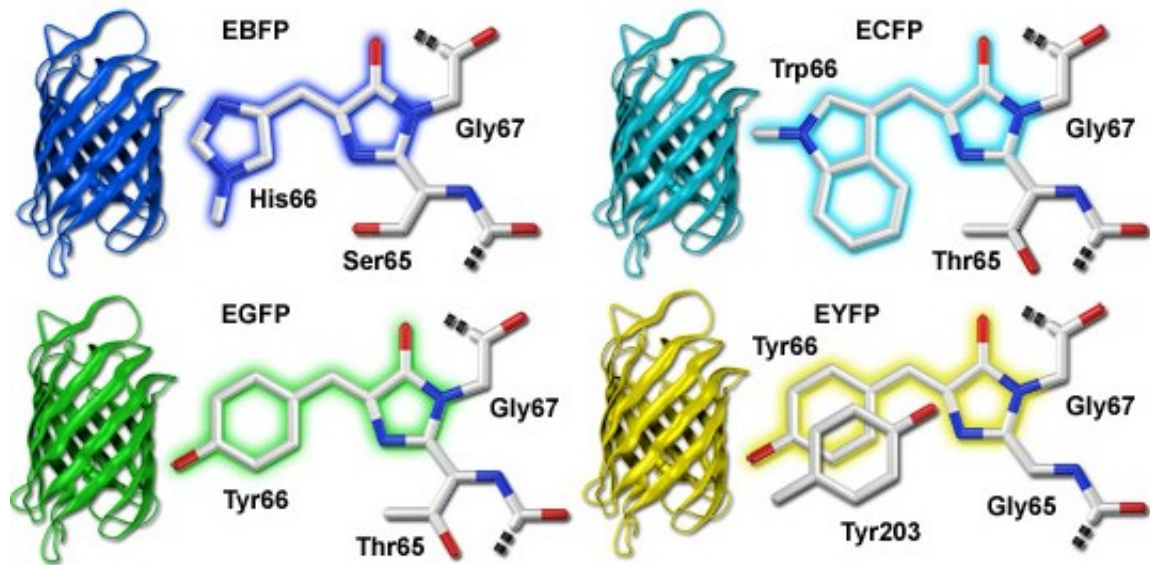


圖 10 GFP 衍生物的發光基團結構示意圖，藉由突變原本綠色螢光蛋白的核苷酸序列，製造出藍色 (EBFP)、青綠色 (ECFP)、和黃色 (EYFP) 不同螢光放光蛋白的變種基因，以及胺基酸的轉譯後修飾形成的增強綠色螢光蛋白 (EGFP) (本圖引用自網路“OLYMPUS The Fluorescent Protein Color Palette”
<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>)

1-8 金屬硫蛋白 (Metallothionein, MT) 介紹

金屬硫蛋白 (Metallothionein, 簡稱 MT) 是一種廣泛存在於生物界中低分子量並富含半胱氨酸的金屬結合蛋白，其分子量約 6-7 kDa [44]，最早於馬腎臟中純化得到的鎘結合蛋白質 [5,7]，普遍存在於原核與真核生物中。

金屬硫蛋白 (Metallothionein, MT) ，有 61-68 個氨基酸 (amino acid) ，有 20 個高度保留的半胱氨酸 (cysteine, Cys) 約佔其 23-33% ，其保守序列為 Cys-X-Y-Cys (X 為任意的胺基酸) ， Cys-X-Cys 或 Cys-Cys ，半胱氨酸硫氫基與一價或二價的過渡金屬元素形成硫金屬鍵結 (金屬親合性為 $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^+ < Ag^+ = Hg^{2+} < Bi^{3+}$ [45]) ，形成高金屬含

量(4-12 atoms/mole)的金屬硫氫基團(metal thiolate cluster) [3-6]，造成兩個金屬鍵結團簇(α -、 β -Cluster) 如圖 11 所示。MT 可以與體內必須之重金屬（鋅、銅）做調節、在毒性重金屬的解毒作用以及清除活性氧化物中扮演相當重要之角色[46-50]。MT 為熱穩定蛋白質，無苯環(Aromatic)胺基酸、疏水性(hydrophobic)胺基酸、無 α -helix 或 β -sheet 等結構

金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)形成兩個金屬鍵結團簇(α -、 β -Cluster)，含 20 個高度保留的半胱胺酸(cysteine,Cys)容易與重金屬形成硫金屬鍵結。MT 的 C 端(Carboxyl terminal) 由 31 到 61 個胺基酸組成含 11 個半胱胺酸，形成 α -金屬鍵結團簇(α -Cluster)，鍵結 4 個二價金屬離子的(M4S11)₃-的團簇；MT 的 N 端(amino terminal)由 1 到 30 個胺基酸組成含 9 個半胱胺酸，形成 β -金屬鍵結團簇(β -Cluster)，鍵結 3 個二價金屬離子，形成了(M3S9)₃-的團簇。這兩個離子結合的團簇整體的大小約 3-4nm，其結構如“metal semiconductor, MS”的複合結構[50-54]。

Metallothionein protein (MT)

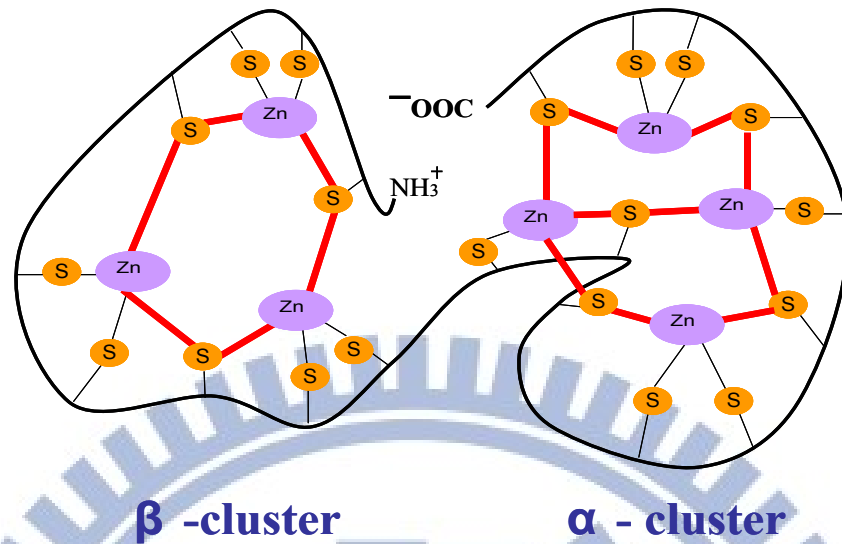


圖 11 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)結構示意圖[50]

MT 依結構特性分為三類[55]:Class I:半胱胺酸結構位置與馬的 MT 類似,如哺乳類動物的 MT [56-59];Class II:半胱胺酸結構與來自馬的 MT 相似度低,例如酵母菌的 copper-thionein[60,61];Class III:大部分存在植物或微生物體如植物的 phytometallothionein[50,56,62-65]。

Binz 和 Kägi 在 1999 年提出新的分類方式[56,66],新分類系統是依據序列的相似度以及親緣關係進行分類,分類包括 16 個 MT 家族 (families) [67]、10 個 MT 亞家族 (subfamilies)、MT 群 (groups) 及 MT 同分異構物 (isoforms) [68]。舉例來說, MT 家族 (families) 分出的 16 個 MT 家族,其中 MT 家族 (Families)I 為脊椎動物的 MTs,其親源遺傳特徵再分為 10 個亞家族 (subfamilies),分別是哺乳類 MT-1、

MT-2、MT-3、MT-4[69-71]及哺乳類未區分之 MT；鳥類 MT-1、MT-2 及鳥類未區分之 MT；兩棲類 MT 及硬骨魚類 MT [72,73]。而 MT 家族 II 為軟體動物類、MT 家族 III 為甲殼類、MT 家族 IV 為棘皮動物類、MT 家族 V 為雙翅類、MT 家族 VI 為線蟲類、MT 家族 VIII 為纖毛蟲類、MT 家族 IX~XIII 為黴菌類 MT 家族、MT 家族 XIV 為原核動物類、MT 家族 XV 為植物類[68]。

哺乳類動物具有多 MT 基因家族，泛稱 MT 異構型(iso-metallothionein)，可分成四個次群:MT-1，MT-2，MT-3[58]，MT-4 [74-78]；MT-1 及 MT-2 被認為可能分別各在重金屬的代謝與在細胞生長中扮演重要之生理角色，最主要是普遍存在各種組織中，例如肝、腎、胰臟、腸道等組織[75]。因為 MT-1 及 MT-2 受到如重金屬、醣腎上腺皮質素、氧化壓力及細胞激素以及冷、熱的生理性緊迫因子等刺激會被誘導而表現，這兩型金屬硫蛋白其主要功能為[79]：細胞的生長及增殖、自由基的清除、維持必須重金屬的體內平衡以及減低重金屬毒性[79,80]。

而 MT-3 及 MT-4 對生理性的緊迫因子的反應較不敏感，MT-3 主要存在神經系統中，由人類的由腦皮層星狀細胞所分泌，原本命名為生長抑制因子 (growth inhibitory factor) [81-86]；MT-4 主要存在鱗狀上皮組織中[50,86]。

第二章 實驗原理：

2-1 拉曼光譜術(Raman spectroscopy) 光譜分析

拉曼光譜可以直接觀察分子結構振動模式。甚至任何在結構上的微小變化皆會反應在敏感拉曼光譜的峰值上。此外，拉曼光譜是一種非接觸式和非破壞性的光學技術，因此此技術是一個非常合適研究生物分子的物理和化學性質的方法。

拉曼光譜術是用來研究晶格及分子的振動模式、旋轉模式和在一系統裡的其他低頻模式的一種分光技術[87]。拉曼散射為一非彈性散射，通常用來做激發的雷射光其範圍為可見光、近紅外光或者在近紫外光範圍附近。雷射光與系統聲子做交互作用，導致最後光子能量增加或減少，而由這些能量的變化可得知聲子模式。這和紅外光吸收光譜的基本原理相似，但兩者所得到的數據結果是互補的。通常，一個樣品被一束雷射光照射，照射光點被透鏡所聚焦且通過分光儀分光。波長靠近雷射的波長時為彈性雷利散射。

當光線照射到分子並且和分子中的電子雲及分子鍵結產生交互作用，就會發生拉曼效應。對於自發性拉曼效應，光子將分子從基態激發到一個虛擬的能量狀態。當激發態的分子放出一個光子後並返回到一個不同於基態的旋轉或振動狀態。在基態與新狀態間的能量差會使得釋放光子的頻率與激發光線的波長不同。

如果最終振動狀態的分子比初始狀態時能量高，所激發出來的光子頻率則較低，以確保系統的總能量守衡。這一個頻率的改變被名為 Stokes shift[88]。如果最終振動狀態的分子比初始狀態時能量低，所激發出來的光子頻率則較高，這一個頻率的改變被名為 Anti-Stokes shift(圖 12) [88]。拉曼散射是由於能量透過光子和分子之間的相互作用而傳遞，就是一個非彈性散射的例子。

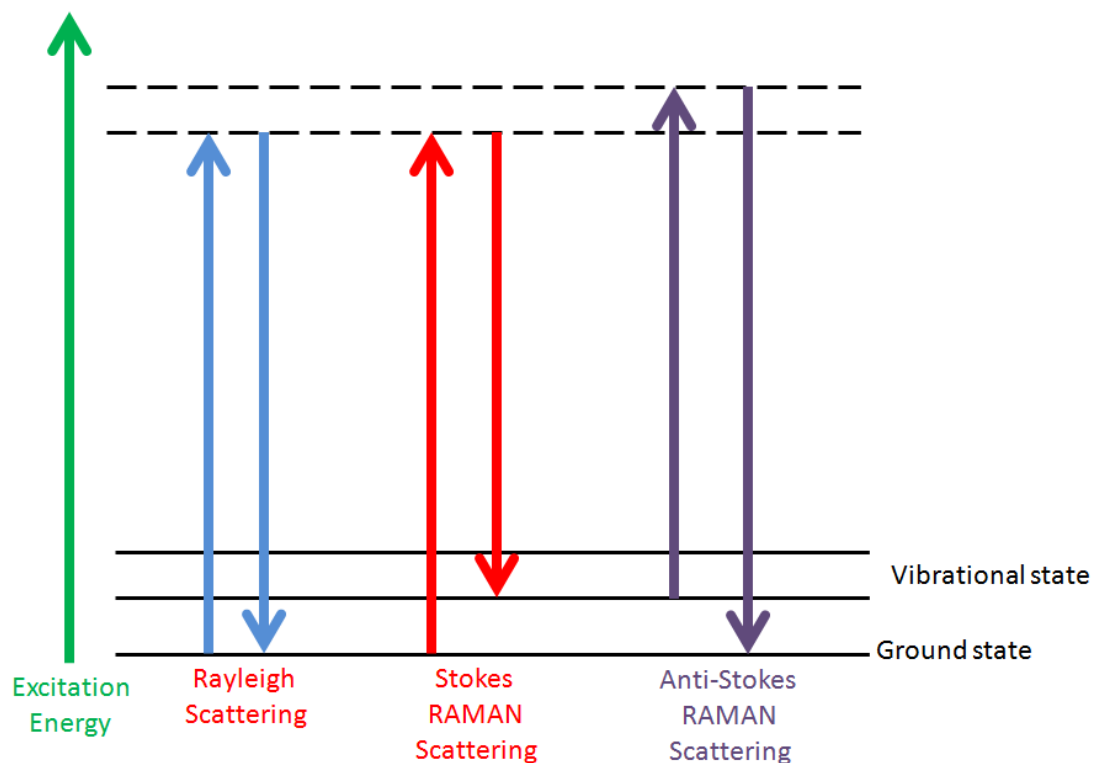


圖 12 各種不同拉曼散射能量示意圖，散射光中除了頻率不變的雷利散射外，還有高於和低於雷利頻率(即入射光頻率)的散射光，這就是拉曼散射。[88]

關於振動的配位，分子極化電位的改變或稱電子雲的改變量，是分子拉曼效應必定的結果。極化率的變化量將決定拉曼散射強度。該模式頻率的改變是由樣品的旋轉和振動狀態決定[88]。

自發性的拉曼散射是非常微弱的，並且自發性拉曼散射的強度相對於雷利散射弱許多，因此很難從光譜中去分辨出自發性拉曼散射，使得得到的結果是光譜微弱，導致自發性拉曼散射測定困難。歷史上，拉曼分光儀利用多個光柵去達到高度的分光，去除雷射光，而可得到能量的微小差異。過去，光電倍增管被選擇為拉曼散射訊號的偵測計，但其需要很久的時間才能得到結果。而現今的技術，帶阻濾波器 (notch filters) 可有效的去除雷射光。而隨著光譜儀或傅立葉變換光譜儀和電荷耦合元件 (CCD) 偵測計的進步，在科學研究中，利用拉曼光譜研究材料特性越來越廣泛[87-88]。

本實驗室的拉曼光譜儀 (圖 13) 的系統架構圖如圖 14 所示，系統中包含 laser、Mirror(反射鏡)、beam splitter、camera、Notch filter、shutter、focusing mirror(聚焦鏡)、pinhole、SMA 接頭、Optic fiber、grating 和 CCD。本實驗試所使用的雷射光為單頻連續式綠光雷射，波長為 532nm，雷射光出光後先經過聚焦鏡第一次聚焦後藉由 SMA 接頭進入 Optic fiber，經過 Optic fiber 雷射光會在進入顯微鏡前通過第二面聚焦鏡再次聚焦在進入顯微鏡中，進入顯微鏡後，雷射光會先通過 Notch filter 反射至 beam splitter (分光鏡)，經由 beam splitter 的雷射光會被分為兩道光線，一道光線直接進入 camera 可以方便觀察雷射以及樣品聚焦狀況，另一道光澤是直接進入 objective(物鏡)將雷射光聚焦至樣品表面。

聚焦至樣品表面的雷射光與樣品表面分子中的電子雲及分子鍵結產生交互作用，就會產生拉曼光，拉曼光經由 objective(物鏡)進入顯微鏡再進入 Notch filter 中，此時 Notch filter 會將雷射光從原本含有反射雷射光的拉曼光中去除，使得通過 Notch filter 的光線只有乾淨的拉曼光。經過 Notch filter 的光束會再經由反射鏡進入 focusing mirror(聚焦鏡)，聚焦鏡會將光線聚焦至 pinhole，pinhole 會將額外外界干擾的光線擋住，減少訊號受到外界光線干擾，接著光線透過 SMA 接頭進入 Optic fiber，進入 Optic fiber 的光線受到完全的保護不會再受到外界光線的干擾，接著透過 shutter 進入 grating，經過 grating 後便可以將我們要量測的拉曼光分辨出來，最後再將光線送至 CCD，便可以得到我們要量測的光譜訊號。

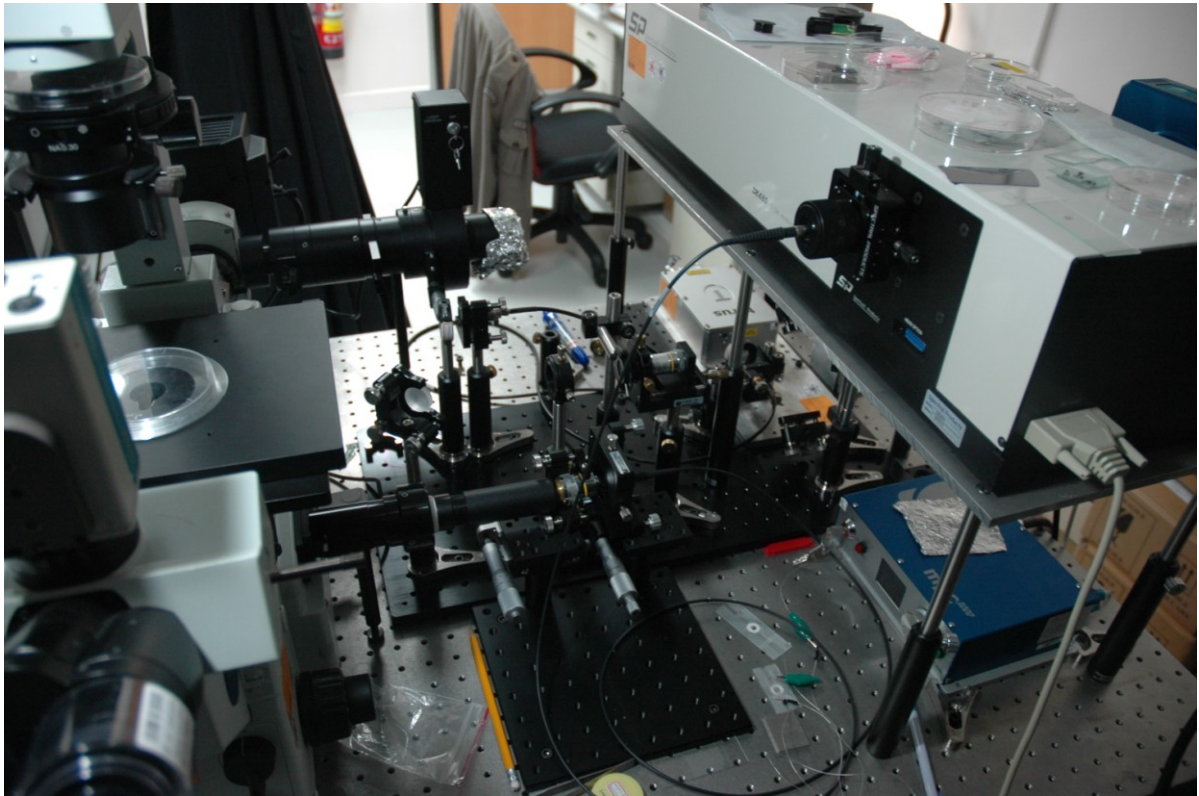


圖 13 本實驗所使用之自組裝拉曼光譜儀系統

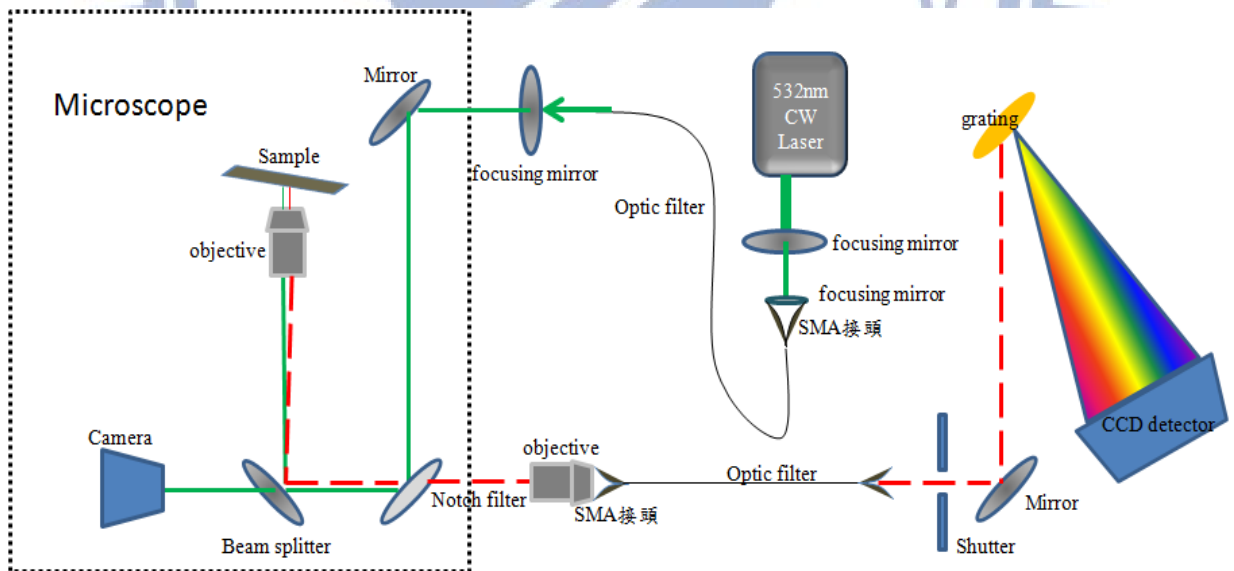


圖 14 本實驗室的拉曼光譜儀系統架構圖

2-2 超導量子干涉磁量儀磁性分析

(Super-conducting Quantum Interference Device magnetometer (SQUID))

超導量子干涉元件 (Superconducting Quantum Interference Device, 簡稱 SQUID) 是目前所知最敏感的磁通偵測器，其獨特的磁通與電壓的週期特性，使得 SQUID 已被用在精密測量，成為微弱物理量如磁場、磁場梯度、電流、電壓、電阻、電感及磁化率等測量上最靈敏的感測元件。在生物醫學應用上 SQUID 更可組成心磁波及腦磁波掃描儀，可立即顯示生物的心磁或腦磁圖像，以做為醫學在心臟功能或腦功能臨床輔助診斷工具。在材料的非破壞性檢測等方面，SQUID 已被研發來檢測橋樑鋼骨結構、飛機起輪框等缺陷；甚至最近已有人利用高溫超導 SQUID 做地震或考古等的研究。另外，SQUID 可製成的磁通顯微鏡從事基礎研究，及其在生物科技的抗體檢測等的研究上也有很廣的前景。由以上看來，SQUID 是一種非常有前瞻性之精密超導電子元件[89-90]

超導量子干涉磁量儀是一種精密的磁性量測系統。SQUID 是由內部有一小部分且非常薄(約 10~20nm)的絕緣層稱之為弱連接(weak link)的超導線圈構成，這弱連接被稱為接合，即是由一或二個 Josephson 接合連接於超導性電線環路中而成。這種裝置對周遭電磁場的變化非常敏感，就算是非常微弱的磁場變化也可以被偵測出來。目前已可以運用在探測生物體內的微小磁場，如腦波、神經訊號等，解開生理上的謎題。

其原理是可探測到在超導性環路內的量子化磁通量，出現的數值必為一個基本單位磁通的整數倍，一個磁通量子約為 $2.07 \times 10^{-7} \text{gauss-cm}^2$ 。在 SQUID 中的電流為環路中所含總磁通量子的週期性函數，對磁通量的變化極為敏感。一具 SQUID 可測量到小至 10^{-18} 伏特的電壓差異、電流可以量測小至 10^{-18} 安培的變化以及磁場可以量測小至 10^{-14} 特斯拉，因此 SQUID 可測量低溫下微弱的磁性訊號。

約瑟夫效應是英國約瑟夫森發現夾有薄絕緣層的兩塊超導體間，即使不加電壓也可通過定值的直流隧道電流，這一現象被稱為“約瑟夫森效應”，約瑟夫森因此獲得 1973 年度諾貝爾物理獎。Josephson 效應可分為直流和交流 Josephson 兩種。其中直流 Josephson 效應為在沒有任何電場或是磁場下有直流電流通過接合；而交流 Josephson 效應為外加一直流電壓於接合的兩端，則會產生頻率為 $2eV/h$ 的振盪電流通過接合[89-90]。

超導線圈於超導態時對外在磁場的改變會有相對應的電流變化，此種變化較一般磁性物質都來的靈敏，因此可利用來感測外部磁場的變化。超導量子干涉儀(Superconducting Quantum Interference Device ; SQUID)即是利用此種原理所製成的磁量測儀器，其設計為將樣品置於超導線圈內(圖 15)，施加一磁場，而後讓樣品往復進出線圈。樣品若對磁場有所感應，則會對週遭的磁場產生影響，而這種影響可由超導線圈的電流變化得知，進而得知樣品的磁特性。Quantum Design SQUID-MPMS-5s 超導量子干涉儀的內部結

構，其內部有超導磁鐵，磁場最高可加到 5T，溫度範圍在 2K-350K 之間，需要用液態氦去降溫來保持超導性，可用來測量樣品的磁滯曲線及磁化曲線等磁性質和電性。

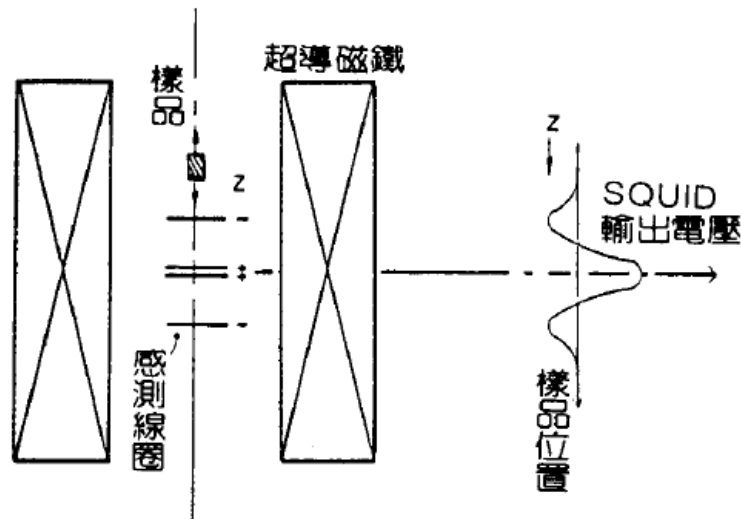


圖 15 SQUID 系統圖磁性物質移動時會有磁通量的變化，依照安培定律可知在線圈上會有感應電流產生縱軸為樣品位置，橫軸為輸出電壓大小變化，再由儀器本身去作運算而得到樣品的磁化強度值[89]

磁化強度的量測是將樣品在線圈內以步進的方式移動，以收集磁訊號，其原理為磁性物質移動時會有磁通量的變化，依照安培定律可知在線圈上會有感應電流產生，再由儀器本身去作運算而得到樣品的磁化強度值，其磁化強度至少可量測到 10^{-7} emu (cgs 電磁單位)。所以我們可由這些磁化強度對溫度或磁場變化去判斷它的磁特性[89-90]。

圖 16 為超導量子干涉磁量儀之結構，其中磁化儀中之超導磁鐵可以提供的磁場大小為 1~5 Tesla，量測溫度範圍為 2~350K。超導量子干涉磁量儀可以做磁化率與溫度、磁化率與磁場以及磁化率之時間鬆弛等的研究。

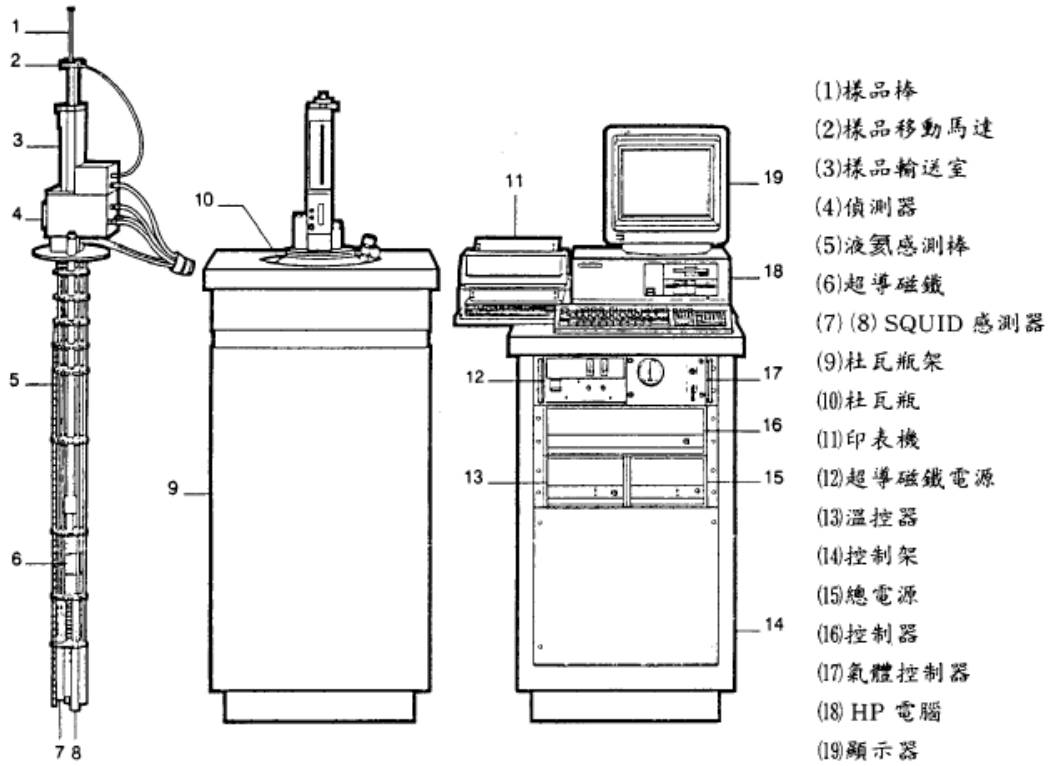


圖 16 超導量子干涉磁量儀 Quantum Design SQUID-MPMS-5s 系統結構[89]

2-3 穿隧式電子顯微術 Transmission Electron Microscope (TEM)影樣分析

穿隧式電子顯微術，在真空系統下利用電子槍產生之電子束通過一晶体薄膜，平行於入射線之晶面會產生繞射在繞射圖中繞射束與直接穿透電子束點間之距離剛好反比於某晶面間距，由不同之繞射圖形，可精確決定晶格常數及晶体格子結構，是研究材料內部結構很有利之工具[86]。

一般基本穿透式電子顯微鏡(TEM)的結構分為：燈絲、電子槍、加速電場、會聚透鏡、物、試片座、中間透鏡、投射透鏡、螢幕室等(如圖 17 所示)。另外，還可加裝 X 光能量發散光譜分析儀 (x-ray energy dispersive spectrometer ; XEDS) 和電子能量損失光譜分析儀 (electron energy loss spectrometer ; EELS) 。目前較大眾常用的為 STEM 與 HRTEM，因為其分析功能強且解析度高[91]。

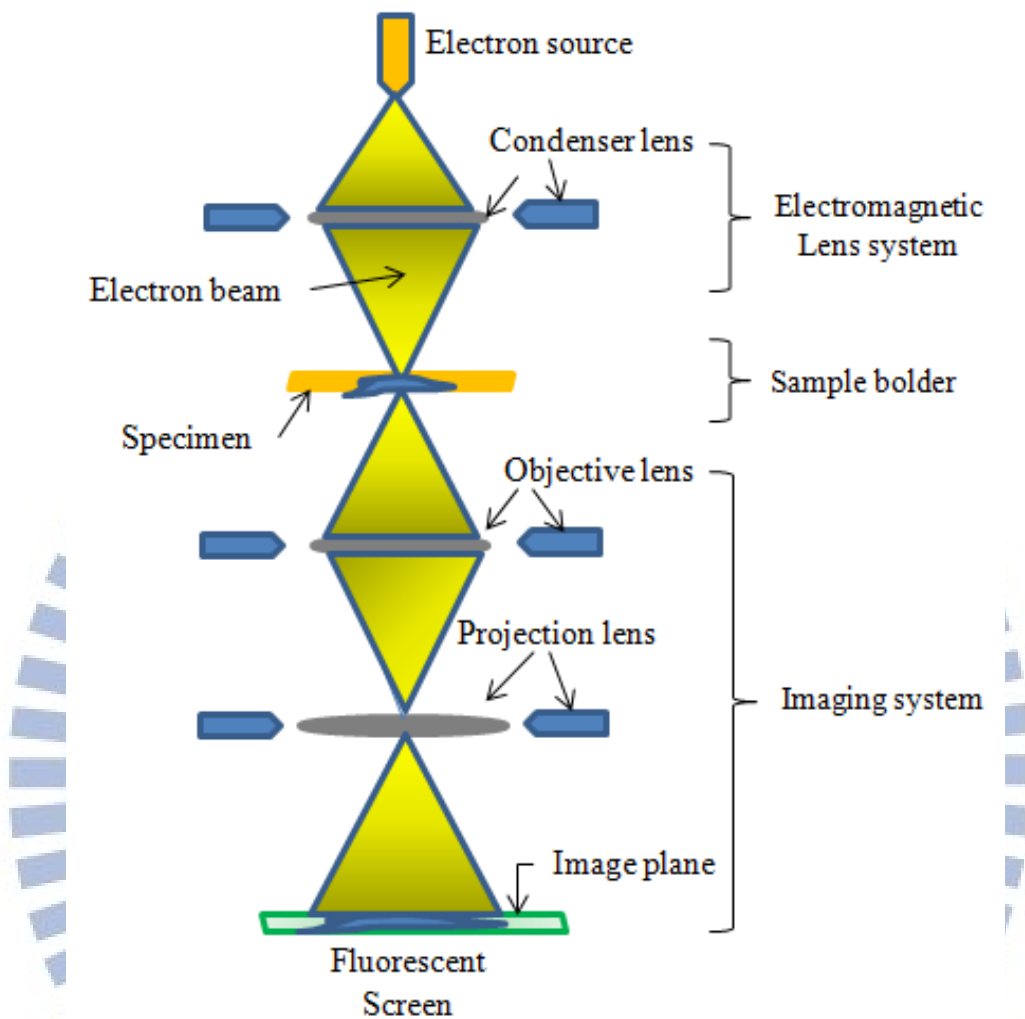


圖 17 穿隧式電子顯微鏡系統圖，電子源：受熱的鎢絲線發射電子，並為帶正電壓的陽極所加速。磁透鏡產生磁場，把電子聚焦成一電子束。電磁磁透鏡系統：可將電子式為「波包」電子擁有特定的「波長」。提高陽及電壓，會使電子獲得更高的速度。根據 $\lambda = h/mv$ ，這代表電子擁有更小的德布羅伊波長。樣本架：樣品放置處。成像系統：電子通過樣品後，背投影磁透鏡再次聚焦，然後投在成像螢光屏上產生樣本影像。

特點與限制[91]：

由於 TEM 具備超高解像能力，在一般影像觀察上即比其他分析工具優越許多，而依實際操作時可放大的倍率範圍來看，TEM 也具有相當大的彈性，應用到半導體材料研究。

TEM 分析具有以下的優點[91]：

(a)在形象觀察方面，對材料有敏銳的分析力：

(1)晶粒方向。(2)同質異型結構。(3)異質異型結構。(4)同質同型結構。

(b)原子結構的觀察-晶格影像：

(c)搭配試片基座的傾斜功能，可以進行結構性缺陷的特性分析：

(1)離子佈置後的殘餘缺陷。(2)製程的損傷。(3)結構性加強的缺陷增長。

(d)藉著電子繞射圖樣分析，在試片觀察時擁有方向感可以確認：

(1)晶體結構 (FCC, BCC, HCP, ...)。(2)化學組成。

(e)在有限厚度內的多層次結構具有透視能力，能得到重疊影像-商用產品分析的逆向工程。

(f)配備冷卻/加熱/可變電性的試片基座，即可在顯微鏡內同步觀察材料微區結構的變化。

TEM 分析也有其限制，缺點包括[91]：

(a)試片的大小必須在 3 mm 以下，因為通用的樣品載台大小只有 3 mm。

(b)因為電子束的穿透力有限，所以通常理想的觀察厚度在 500-1000 Å 之間。

(c)試片內的缺陷不是來自試片製備的過程，不然會難以判斷缺陷來形成的原因，因此

試片製備困難度高，成功率相對降低。

(d)樣品處理通常有下列幾種方法：

(1)切割薄片法：用於生物體。(2)劈裂法：用於玻璃，取其薄的裂緣。

(3)粉碎微粒法：用於陶瓷、玻璃等瓷碎的材料。(4)化學腐蝕法：用於玻璃、陶瓷、

金屬。(5)電解打薄法：用於金屬。



2-4 Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS 結構分析

同步輻射是一種光源，其本質與傳統之 X 光相同，均為電磁波，它的產生是由電子束在光速下進行圓周運動而發射出來的。其產生之高亮度 X 光(或 UV 光)，已被廣泛地應用在物理化學等各研究領域上。利用同步輻射光源對材料進行 X 光吸收光譜研究，主要包括 X 光近緣結構(X-ray Absorption Near-Edge Structure，簡稱為 XANES)及延伸 X 光吸收精細結構(Extended X-ray Absorption Fine Structure，簡稱為 EXAFS)。其中 XANES 可以用來檢測材料中特定原子之電子組態，而 EXAFS 可被用來測定原子之區域結構(Local Structure)，得知原子與其鄰近原子間之距離、種類及數目等。X 光吸收光譜可發揮其在原子短程結構及電子組態上之優點，與傳統 XRD 長程有序分析及 TEM 等結果相互配合，可使我們更加了解奈米材料之結構特性[92]。

當物質受到 X 光照射而吸收 X 光，我們可以用吸收係數 μ ，來表示其吸收的程度；若是以 I_0 表示入射 X 光之強度， I 表示出射光強度，樣品厚度為 x ， μ 表示材料單位厚度對 X 光之吸收，則可以下式來表示其相互之關係[92]：

$$I = I_0 \exp(-\mu x)$$

若 X 光的能量改變，即使物質中的原子不吸收，因為散射等因素，測得之出射光強度仍會比入射光強度減小，這種現象會隨 X 光能量增強而逐漸平滑地降低，構成吸收光譜的底線。當 X 光的能量逐漸增強至物質中所含原子之吸收限(Absorption Edge)，原子的內層電子開始吸收 X 光的光子，躍遷至外層之空軌域，造成吸收係數激增，即形成所謂的 X 光近緣結構(XANES)，其範圍約從原子之吸收限以上約 50 eV 左右，如圖 19 所示為 CoAl_2O_4 之 X 光吸收光譜，不同原子其吸收限之能量隨亦不同，且其近緣結構會受中心原子之對稱性、氧化數、及所鍵結之鄰近原子影響。簡而言之，X 光近緣結構(XANES)可以檢測材料中特定原子之電子組態[92]。

當 X 光的能量繼續提高，內層電子終於躍遷至連續層，形成光電子，而離開原來之吸收原子，若吸收原子的緊鄰另有原子存在，則射出之光電子與之作用而折返，因此出射的光電子與折返的光電子間即產生干涉現象(Interference)(如圖 18 所示)，吸收係數的大小隨相差的改變而逐漸變化，呈現週期性變化，這種變化從近緣區以上約 1000 eV 的範圍內都可發現，這範圍的吸收光譜即稱為延伸 X 光吸收精細結構(EXAFS)，如圖 19 所示。利用 EXAFS 技術，可以決定原子之區域結構，即一個原子與其四周緊鄰的原子之間的距離、原子的種類及數目等都可以測定[92-95]。



圖 18：光電子與折返的光電子間即產生干涉現象(Interference)示意圖

(本圖參考自” X 光吸收光譜數據分析研習營 X 光吸收光譜原理簡介” 李志甫 June 29 –July 7, 2009)

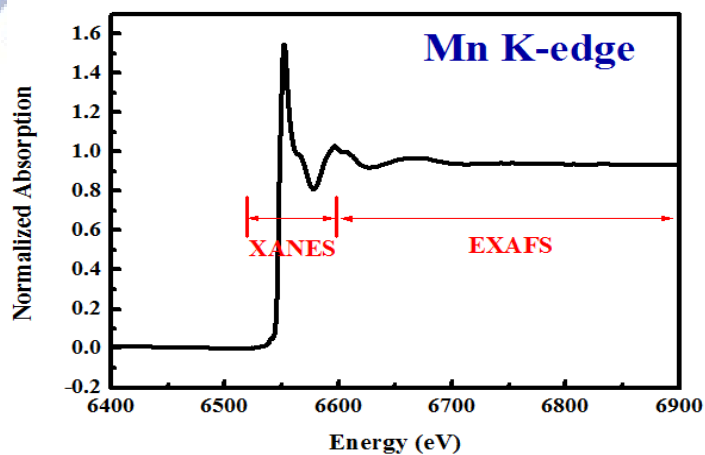


圖 19：Mn K-edge 吸收限之 X 光吸收光譜。

第三章實驗方法

3-1 實驗材料的製備

3-1-1 蛋白質的表現

目的：

將實驗室先前製備好的 MTGFP 儲存菌株表現 MTGFP 蛋白質。

方法：

將實驗室先前製備好的 MTGFP 儲存菌株，在 37 °C 環境下以 IPTG 誘導使 E. coli 大量表現所需的蛋白質，因為長時間誘導 (16 小時) 形成內涵體 (inclusion body)。等細菌培養適當時間之後再用物理性破壞方式來破菌將細胞打碎以得到所需要的蛋白質。

利用此方法誘導大腸桿菌而產生蛋白質內涵體的優點有：(1)細菌生長快速。(2)蛋白質產量高。(3)蛋白的純度也相對較高。

實驗步驟：

蛋白質小量表現：

將實驗室先前製備好的 MTGFP 儲存菌株，取出 20 μ l 菌液加入 3ml 含有抗生素 (Kanamysine, 20g/ml) 的 LB 中，於 37°C 震盪培養 16hr，使細菌活化。

蛋白質大量表現：

從已經活化的細菌中取出 250 μ l 菌液，加入 250ml LB 的培養錐形瓶中，同樣在 37°C 中震盪培養 4 小時，之後加入 IPTG (最終濃度為 1mM) 再繼續培養 16 小時。經過 16 小時後，將培養好之菌液倒入離心管中，再以 9000 rpm 於 4°C 下離心 3 分鐘得到沈澱的菌體以及上清液，將上清液去除後加入 300 μ l His-tag binding Buffer 溶解沉澱的菌體，再將此菌體利用物理性破壞方式破菌，取得蛋白質。

3-1-2 破菌取得目標蛋白質

目的:

利用破菌來得到所需的蛋白質。

實驗步驟:

將培養好之菌液倒入離心管中，再以 9000 rpm 於 4°C 下離心 3 分鐘得到沈澱的菌體以及上清液，將上清液去除後加入 300 μ l His-tag binding Buffer 溶解沉澱的菌體，再將菌液倒入破菌機(constant cell disruption systems)中，以壓力 28 kpsi 進行破菌。接著將破菌後之溶液以 9000 rpm,於 4°C下離心 10 分鐘，將破菌後上清液 (supernatant)及不溶水的內涵體(inclusion body)沉澱分開收集。

因本實驗所需之蛋白質在本實驗室之前的實驗中以及經 SDS-PAGE 確認後得知會存在於上清液之中，所以將上清液蒐集起來準備純化蛋白質。

3-1-3 蛋白質純化

目的：

將以破菌完含有所需蛋白的上清液藉由 His-Tag Column 進行純化進而得到所需的蛋白質 MT-GFP。

實驗步驟：

首先先倒入 10 倍體積的去離子水進入 His-Tag Column，將 His-Tag Column 清洗乾淨，此步驟可以重複二到三次以確保 His-Tag Column 乾淨度。接著倒入 His-Tag Binding Buffer 進入 His-Tag Column，將 His-Tag Column 的環境改為與破菌後蛋白上清液相同的環境，此步驟可以重複三次使 His-Tag Column 的環境改為與破菌後蛋白上清液完全相同。將環境改為與破菌後蛋白上清液完全相同後，便可以開始倒入破菌後的蛋白上清液，此時經過 His-Tag Column 的液體須回收，回收的液體稱為” Pass through”，其中可能還有少量目標蛋白質未被 His-Tag Column 抓住而殘留在其中，回歐後還可以再進行純化。隨後倒入 His-Tag Binding Buffer 進入 His-Tag Column，對 His-Tag Column 清洗，也可以將一些不是我們想要的東西帶出 His-Tag Column，一般而言此步驟清洗越多次純化出來的蛋白純度會越高，但是相對的在利用 His-Tag Binding Buffer 清洗 His-Tag Column 的過程中也會將目標蛋白質帶出，所以請適量的清洗即可。

清洗完畢後，倒入 3c.c Elution Buffer，將已經吸附在 Column 的目標蛋白質清洗下來，此步驟所清洗下來的蛋白質及為 MT-GFP 要回收以進行實驗。隨後倒入 His-Tag Binding Buffer 進入 His-Tag Column，將 His-Tag Column 的環境改與 His-Tag Binding Buffer 相同，此時若是樣品還未純化完，則再重第二步驟做起，直至樣品都純化完。

若樣品都已純化完成，則倒入 10 倍體積的去離子水進入 His-Tag Column，將 His-Tag Column 清洗乾淨，最後倒入 20% 的酒精來保存 His-Tag Column。純化出來的目標蛋白質可以利用 SDS-PAGE 確定 MT-GFP 是否存在以及確定 MT-GFP 純度。



3-1-4 金屬離子置換

目的：

將金屬離子置換至蛋白質內部，使其形成磁性蛋白。MT 具有 20 個高度保留的半胱氨酸(cysteine, Cys)其中，半胱氨酸硫氫基與一價或二價的過渡金屬元素形成硫金屬鍵結（對金屬親合性為 $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^+ < Ag^+ = Hg^{2+} < Bi^{3+}$ [45]）

實驗步驟：

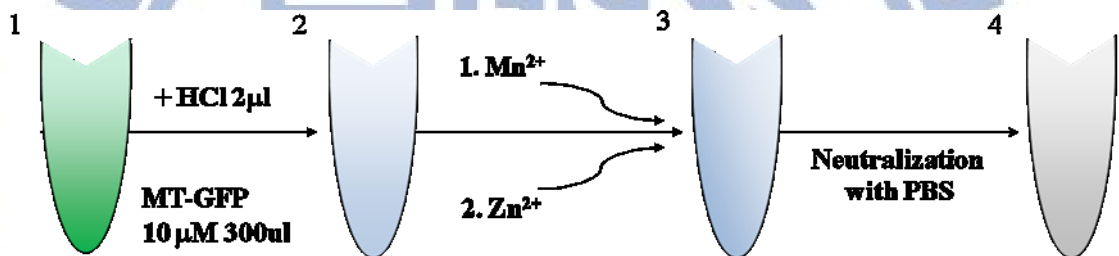


圖 20 樣品製作步驟流程圖

實驗步驟如圖 20 所示：

首先取出 $10 \mu M$ 的 MT-GFP $300 \mu l$ 加入微量離心管中。接著在 $10 \mu M$ 的 MT-GFP 加入 $2 \mu l$ HCl 將 PH 值降至 2 使蛋白質結構打開，此時要加入氮氣使環境保持在無氧狀態，以免加入金屬後金屬離子與氧反應。接著加入欲置換的金屬離子，此時需注意，因為 Zn^{2+} 的活性大於 Mn^{2+} 所以必須先加入含有 Mn^{2+} 的醋酸錳後（ $100mM$ 醋酸錳取 $2 \mu l$ ），才可以加入含 Zn^{2+} 的氯化鋅（ $9mM$ 氯化鋅取 $4.5 \mu l$ ）。

最後加入 PBS 將 PH 值回復至 PH7 附近使蛋白結構回復正常，此時蛋白質便帶有金屬離子，在內部形成 zinc blende 的結構。

3-1-5 將樣品透析以及冷凍乾燥以利分析及保存

目的：

為了讓已經製備好的磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 利於保存以及方便接下來實驗的一連串分析，我們將已經製備好的磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 所處的環境換為 Ammonian Bicarbonate，如此一來在冷凍乾燥後便只剩下磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP。

實驗步驟：

首先為確保透析模是乾淨的未含有其它金屬，一般會先將透析膜放入 0.1M 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 水溶液，再用熱水煮沸 5 分鐘，再取出膜後再用二次水清洗透析膜上殘留的 EDTA。將透稀模清洗乾淨後，再將蛋白質樣品裝入只允許小於 3kD 的蛋白質通過的透析袋內，並將半透膜置放於 5L 的 Ammonian Bicarbonate 透析兩次，每次 8 小時。最後將透析過後的蛋白質放入液態氮中將其冷凍，再利用冷凍乾燥機將樣品抽乾變成粉末方便接下的分析實驗用。

3-2 拉曼光譜儀(Raman spectroscopy)

目的:

拉曼光譜可以直接觀察分子結構振動模式。甚至任何在結構上的微小變化皆會反應在敏感拉曼光譜的峰值中。可以在不破壞樣品的狀況下得知金屬是否有進入蛋白質中。

實驗步驟:

首先先將拉曼光譜儀打開後，利用汞燈進行校正波長，設定波長為 546.07nm。汞燈校正完畢後，放上標準片進行校正。標準片為矽片，矽片的 Raman shift 為 520.5cm^{-1} ，若是矽片拉曼訊號不準確，請再利用汞燈進行校正，最後再換回矽片即可。拉曼光譜儀都校正為後，請準備兩片薄的玻片，在玻片上貼上加強環，接著將已經冷凍乾燥完後的樣品粉末小心的倒入加強環中，讓粉末集中在一起，增加樣品的厚度如此一來取得的光譜訊號會較強，也較容易分析增加準確性以及縮短實驗進行時間。樣品倒入加強環中後，將另一片玻片小心的蓋上，盡量不要讓粉末散開以保持厚度。最後用 3M 膠帶將玻片兩邊固定住，確認粉末不會散開及可以放在拉曼光譜儀上。

3-3 超導量子干涉磁量儀涉元件

(Super-conducting Quantum Interference Device magnetometer (SQUID))

目的：

超導量子干涉元件 (Superconducting Quantum Interference Device, 簡稱 SQUID)

是目前所知最敏感的磁通偵測器，可以用來分析蛋白質是否真的帶有磁性。

(本實驗 SQUID 型號為 Quanton Design MPMS-5S)

實驗步驟：

首先先將已經冷凍乾燥完成的樣品粉末裝入 SQUID 專用膠囊中(樣品約 3~4 mg)，裝入膠囊時必須很小心，因為已經冷凍乾燥完成的樣品粉末很容易因為外界的干擾而飛散開來，也容易因為靜電而吸附在不該吸附的地方，進而減少實際量測的樣品量。

接著將已裝有樣品的膠囊裝入 SQUID 專用的吸管中約四分之一處。裝入專用吸管後將已裝有樣品的吸管小心的綁在 SQUID 樣品棒上。隨後將已裝有樣品的的樣品棒小心的放入 SQUID 儀器中。

裝入儀器後，先利用軟體找尋樣品位置。SQUID 參數設定為外加磁場 3T，溫度為 10K 以及 100K。

(以上實驗與中研院物理所陳彥霖學長一同進行)

3-4 穿隧式電子顯微鏡 Transmission Electron Microscope (TEM)

目的:

利用 TEM 電子繞射圖以及影像圖，進而模擬驗證實驗室以前的磁性蛋白結構，來推得此實驗蛋白質之可能結構。

第一部分 Mn,Cd-MT 模擬結構

實驗步驟:

首先先將本實驗室先前研究之磁性蛋白質 Mn,Cd-MT 的結構輸入至模擬軟體中。接著先將碳、氫、氧等較輕的原子全部移除，留下金屬(錳、鎘)。將加速電壓設為 200KeV、一個 unit cell 的三軸 A、B、C 分別設定為 $A=192 \text{ \AA}$ $B=177 \text{ \AA}$ $C=44 \text{ \AA}$ ，參數設定完成後便開始計算模擬繞射圖形。將模擬完的金屬繞射圖形與實驗室以前製作的磁性蛋白質 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖形進行比對，先初步了解模擬的圖形是否與實際實驗圖形符合，若是不符合變要在改條件，若是符合再加入碳、氫、氧等較輕的原子在同樣的參數下再次進行模擬，將取得的繞射圖形再次與實驗繞射圖形進行比對。接著將實驗所得到的繞涉圖形利用軟體開啟再轉成 dm3 檔，以方便叫出訊號強度來與模擬圖進行進一步的對比。

(以上實驗與清華大學工科所巫偉融學長一同進行)

第二部分 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 影像以及繞射圖形取得

實驗步驟：

首先先將已經製備好的樣品（不須冷凍乾燥）滴至銅網上等待約 3 分鐘，再將多餘的液體吸除，等待的時間依照蛋白質的濃度不同而有所不同，若是濃度越高則等待的時間就越短，不然樣品會太厚，導至電子束無法穿過而取不到影像。接著將銅網小心的放在低溫試片座中。隨後將低溫試片座慢慢的插入 TEM 中，並將低溫試片座由後端加入液態氮以降溫。等待真空值到達標準後便可以開啟電子束進行影像觀察。最後在找到樣品後，先在一般模式下取得影像再切入繞射模式，進行繞射圖案的截取。

JEM -2010F JEOL

（以上實驗與清華大學工科所蔡俊穎、劉鈺誼、蔡承庭學長一同進行）

3-5 Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS

目的:

利用同步輻射光對樣品進行結構分析，可以得知錳離子以及鋅離子是否與我們所構想得結果一樣透過硫與蛋白相互連接，並形成 zinc blende 的結構。

實驗步驟:

首先先將已經冷凍乾燥完成的樣品粉末裝入將已經冷凍乾燥完的樣品粉末裝入夾鏈袋中，裝夾鏈袋時必須很小心，因為已經冷凍乾燥完成的樣品粉末很容易因為外界的干擾而飛散開來，也容易因為靜電而吸附在不該吸附的地方，進而減少實際量測的樣品量，另一方面必須盡量保持樣品的厚度讓粉末集中在一起，增加樣品的厚度如此一來取得的光譜訊號會較強，也較容易分析增加準確性以及縮短實驗進行時間。因為同步光能量強，所以須先準備氮氣槍對準樣品，在量測光譜的過程須將氮氣槍打開，持續對著樣品吹，以降低樣品溫度，避免樣品損壞。

實驗進行前必須調整光路，先確認光點位置是否有在樣品上。首先先剪一段感光紙，貼在樣品台上，出光後光點會打在感光紙上便可以得之光點位置。在找到光點位置後，先將光點移至樣品台中間，再用感光紙確認光點位置。確認光點位置後，將樣品黏上。接著調整光的能量至欲量測的原子能量。將光的能量調至欲量測的原子能量後便可以出光後，出光後開始截取數據並一邊做圖，觀察數據是到達可以分析的程度，若不行或是圖形依舊不清楚，就必須繼續掃描增加積分時間來取得好的數據。

(以上實驗與清華大學物理所陳俞辰、吳泰興學長一同進行)



第四章 實驗結果

4-1. 磁性蛋白制備方法及結果

破菌後所取得 inclusion body 以及 supernatant 先利用 SDS-PAGE 來看我們所需要的樣品的 MT-GFP 會存在哪裡，由此 SDS-PAGE 我們可以明顯看到 MT-GFP 存在於內涵體(inclusion body)以及上清(supernatant)(圖 21 MT-GFP 分子量為 39KDa)，由於由 Supernatant 純化出 MT-GFP 比從 inclusion body 純化出 MT-GFP 來的方便且容易因此我們選擇 Supernatant 來通 His-Tag Column 進行純化。內涵體是一種不可溶、密度較大、顆粒狀的無活性蛋白質[96]，內涵體不一定只在受損、突變、生長溫度偏高才會出現在細胞內，當表現蛋白質為有毒蛋白或微生物在細胞內大量表現重組蛋白質時，也會在其內形成不可溶的蛋白質堆積，即為內涵體[96-97]。但一般來說必須將破菌後的內涵體，經過離心、重複洗滌、膜過濾等方式[96-97]才可以純化出我們所要的蛋白。但是若是使用上清液的話，只需經過 His-tag Column，來純化便可以得到我們所要的蛋白，相較於內涵體而言較為方便，另一方面對於初學者也較容易進行實驗。

經過 His-Tag Column 進行純化而得到的 MT-GFP 蛋白質後，先利用 SDS-PAGE 分別將每次 Elute(E1~E4)的 MT-GFP 來確認是否成功純化 MT-GFP(圖 20 MT-GFP 分子量為 39KDa)，可以從此 SDS-PAGE 上看出在第二次以及第三次 Elute 時 MT-GFP 才會被純化下來，因此我們選用量較大的第二次 Elute 的 MT-GFP 做為樣品(圖 22(a))。

接著再利用 1 倍 PBS 緩衝液將濃度調整至 $10\ \mu\text{M}$ ，取出 $300\ \mu\text{l}$ 後，加入 $2\ \mu\text{l}$ HCl 將 PH 值降至 2 使蛋白質結構打開，並吹氮氣使環境保持在無氧狀態。再分別加入金屬離子，此時需注意，因為 Zn^{2+} 的活性大於 Mn^{2+} 所以必須先加入含有 Mn^{2+} 的醋酸錳後 (100mM 醋酸錳取 $2\ \mu\text{l}$)，才可以加入含 Zn^{2+} 的氯化鋅 (9mM 氯化鋅取 $4.5\ \mu\text{l}$)，最後加入 PBS 將 pH 值回復至 pH7 附近使蛋白結構會復正常，此時蛋白質變帶有金屬離子，在內部形成 zinc-blende 的結構，樣品完成會如下圖 22(b)，若有沉澱物析出，則代表加入的金屬量過多，但可以利用強磁鐵測試看看成沉澱物是否具有磁性。

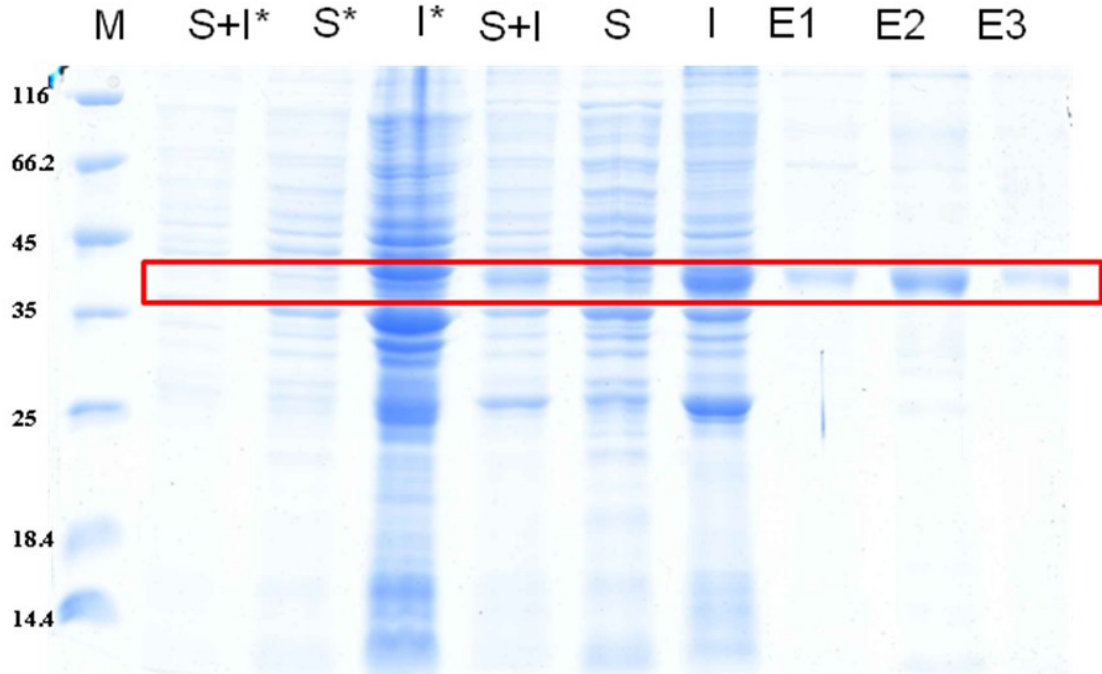


圖 21 MT-GFP 之 SDS-PAGE 分析 利用 12% SDS-PAGE 確定蛋白質利用 His-Tag Column 純化後 MT-GFP 的純度。M 代表 Marker, I 代表內涵體、S 代表上清液, S+I 代表內涵體+上清液, I*代表未加入 IPTG 之內涵體、S*代表未加入 IPTG 之上清液, S+I *代表未加入 IPTG 之上內涵體+上清液, E1-E3 為不同次數 Elute 所得到的樣品, 紅色標的的位置為 MT-GFP 蛋白質。

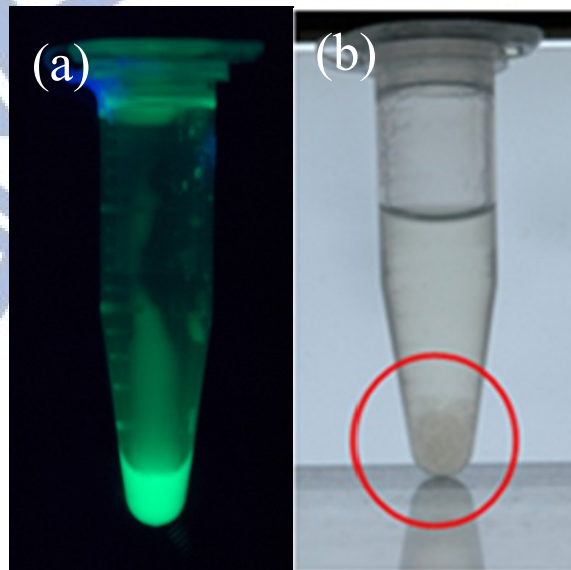


圖 22 MT-GFP 以及置換金屬後 Mn,Zn-MT-GFP 圖(a)為經過 His-Tag Column 進行純化而得到的 MT-GFP 蛋白質 圖(b)是將 MT-GFP 置換金屬離子後的結果, 此圖為金屬加過量導致沉澱的結果

本實驗所使用的 MT-GFP 也使用西方墨點法來確認 MT-GFP 蛋白質，此實驗是請本實驗室博士班朱學亮學長幫忙，利用西方墨點法來確認 MT-GFP 蛋白質，結果如圖 23 所示。MT-GFP 蛋白質為融合蛋白，在其 N 端具有 6 個 Histidine 的序列，其次連接 MT 蛋白質分子、最後才是 GFP 蛋白質分子，知道這些序列後，選用專一性抗體 rabbit-anti-MT、Mouse-anti-His 以及 Mouse-anti-GFP 來辨認特定序列，證明此為蛋白質為 MT-GFP 融合蛋白質[50]。其方法為將待驗證的蛋白質 MT-GFP 經由 SDS-PAGE 後將蛋白質轉印到 PVDF 上，接著先使用一級抗體 rabbit-anti-MT、Mouse-anti-His、Mouse-anti-GFP 進行反應，再使用二級抗體：Goat-anti-mouse 及 Goat-anti-rabbit，最後再加入 HRP 的受質在 membrane 上進行呈色。結果如圖 23 所示，若是待測蛋白質可以被此 3 種抗體辨視，且與 SDS PAGE 位置吻合，則此待測蛋白質就可以被證實為 MT-GFP 融合蛋白[50]。

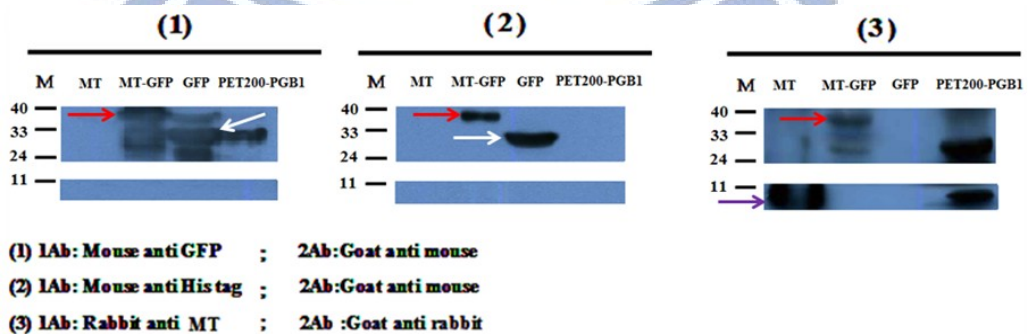


圖 23 MT-GFP Western 的結果 MT-GFP 經由 SDS-PAGE 後將蛋白質轉印到 PVDF 上，先分別使用一級抗體 rabbit-anti-MT、Mouse-anti-His、Mouse-anti-GFP 進行反應，再使用二級抗體：Goat-anti-mouse 及 Goat-anti-rabbit，最後再加入 HRP 的受質在 membrane 上進行呈色。紅色為 MTGFP，白色為 GFP，紫色為 MT，PET200-PGB1 為 non specific 此處用來作為 Control。

本實驗所使用的 MT-GFP 在先前的研究中就已經有做過蛋白質定序來確認此蛋

白質為 MT-GFP，其定序結果如下表 1[50]：

表 1 為 MTGFP protein 定序結果 紅色背景文字為 His tag 蛋白質序列(HHHHHH)、黃色背景的文字為 MT 蛋白質序列(MDPNC...SCCA)以及綠色背景的文字為 GFP 蛋白質序列(MASKG...DELYK)

MRGS	HHHHHH	GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFT	MDPNCSCATDGSCSCA
GSKCKECKCTTCKKSCCSCPVGCAKCSRGVCCKEASDKCSCCAKGQFCRYPA			
QWRPLESRMASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT			
FICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISF			
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYITAD			
KQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKD			
PNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK-			

4-2. 拉曼光譜術(Raman spectroscopy)光譜分析:

將製備好的磁性蛋白樣品，利用冷凍乾燥機抽乾形成粉末後，將樣品夾於兩薄玻片中，再放至拉曼光譜儀載物台上，將樣品面朝向物鏡並進行對焦，將雷射光焦點對在樣品表面上，因為樣品為生物性樣品，所以一定要特別注意雷射的能量，雷射最後經由物鏡射出的能量必須小於 10mW。

量測樣品前，一定先用矽片對光譜儀進行校正，如圖 24 所示，一般而言矽片的訊號會出現在 520.5 Raman Shift (cm^{-1})左右，若是矽片的訊號不在 520.5 Raman Shift (cm^{-1})的位子上，便進行校正，點選軟體中的”Auto Cal.”進行光譜儀的自動校正，一直做到矽片的訊號與 520.5 Raman Shift (cm^{-1})相同或是誤差最小處便可以進行實驗。

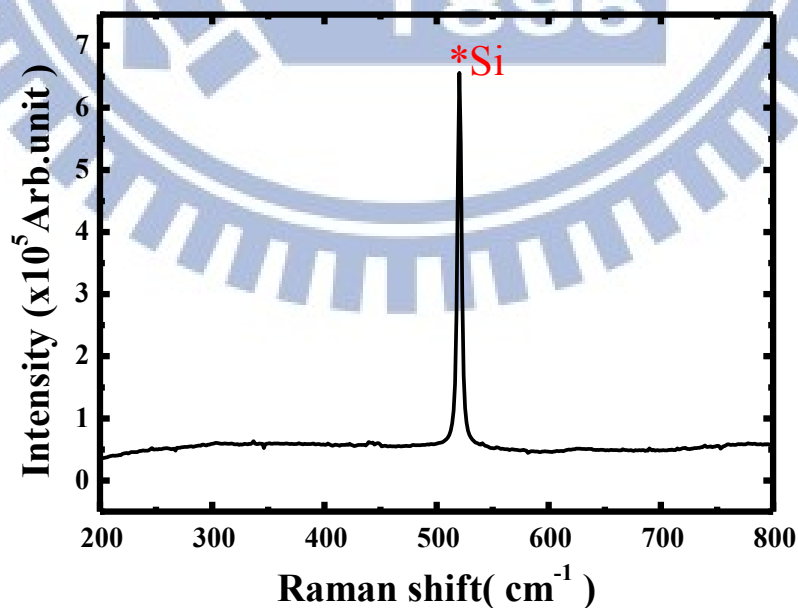


圖 24 矽片拉曼光譜訊號

若是希望實驗取得的光譜可以更加準確以及減少雷射照射時間，可以進行收光處(圖 25)的校正，此處的校正較為精密且複雜，所以在校正前請先縮短矽片取光譜的時間，從 30 秒鐘開始取光譜一次，再變更時間為 20 秒、10 秒、3 秒、最後為 1 秒，在其間觀察矽片訊號的變化，一般來說，隨著時間縮短，訊號會成比例的下降，若是在 3 秒鐘還可以清楚的分辨出矽片訊號的位置，那便可以進行實驗，若是 3 秒鐘無法辨識，才進行校正。

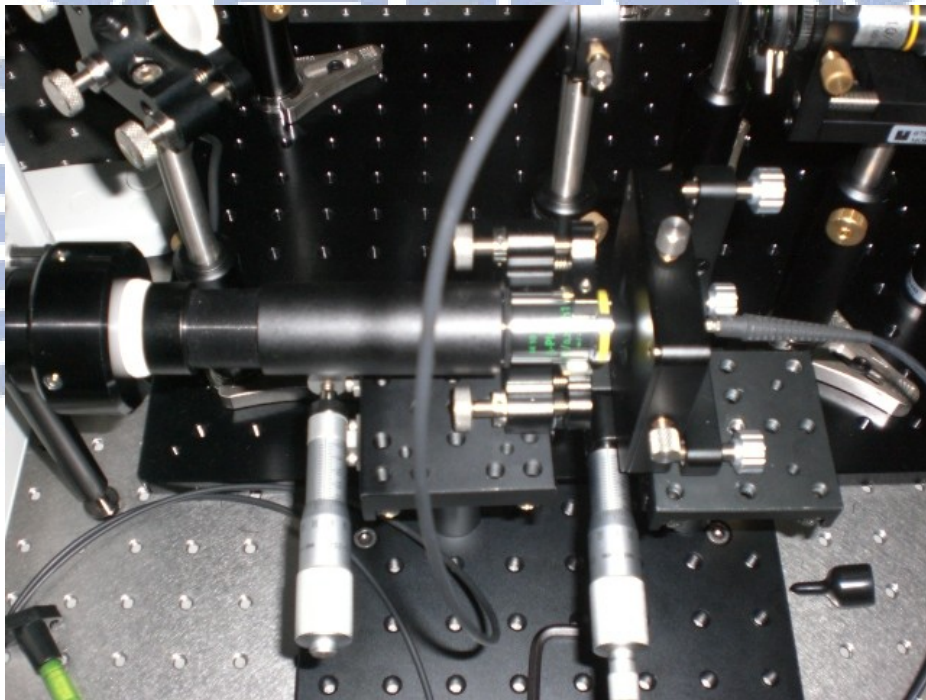


圖 25 拉曼光譜儀訊號接收處

校正步驟，先將矽片取下，將汞燈放上樣品台，並將汞燈出光處對準物鏡，因為汞燈的訊號較強也較準確因此校正收光處時利用汞燈可以有效的縮短校正所花的時間。將收光時間改為 0.1 秒，另外利用軟體將予測波長改為以及 546.07 nm 並將 X 軸單位改為 Wavelength (nm)，調整將”Shutter”開啟，如此一來儀器便會在不關閉 Shutter 的狀況下不斷的取光譜，這樣便可以一邊調整後端收光處的光纖位置、物鏡位置一邊觀察及時光譜訊號的改變情況，校正只要進行到可以取的汞燈光譜之最大值即可，最後將 Shutter 關閉，再換回矽片以及將單位換回 Raman Shift (cm^{-1})再次進行矽片的量測及校正便可以量測樣品。



將分別將 MT-GFP 以及磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 利用拉曼光譜儀分析其光譜特性，可以初步的確認是否與我們所假設的結構相互附符合(圖 26)。

經實驗後發現兩者在光譜上有所差異(圖 27、表 1)，經由查閱文獻後得知，若是錳離子與硫有相接的話，會在 350 Raman Shift (cm^{-1})處會有拉曼訊號的產生(如圖 27 示)，若是金屬含量較高會使得此訊號的半高寬變寬，以及這附近多出較平滑的訊號(如圖 27 示)，此訊號是因錳離子與硫互相鍵結並形成 bending mode 所產生[98]，如次一來便可以證明此實驗方法確實有將錳至入到 MT-GFP 蛋白質中，而 MT-GFP 蛋白質中只有 Cys 上磁有硫，因此也間接說明了錳是藉由 Cys 與 MT-GFP 蛋白質相互合。另外我們也在光譜中發現鋅與硫原子鍵結的訊號如圖 26 以及表 1 所示。

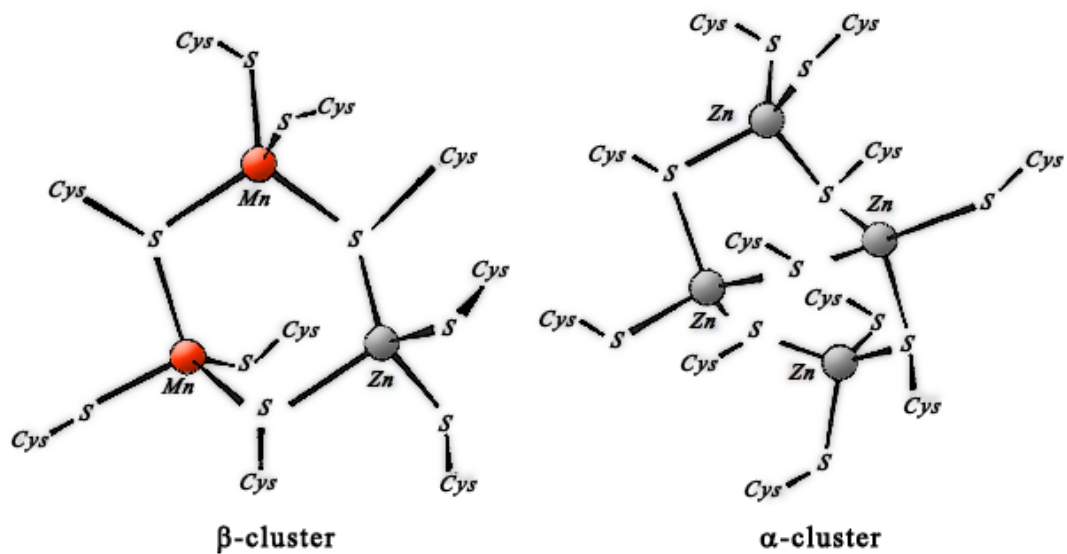


圖 26 Mn,Zn-MT-GFP 理想結構示意圖

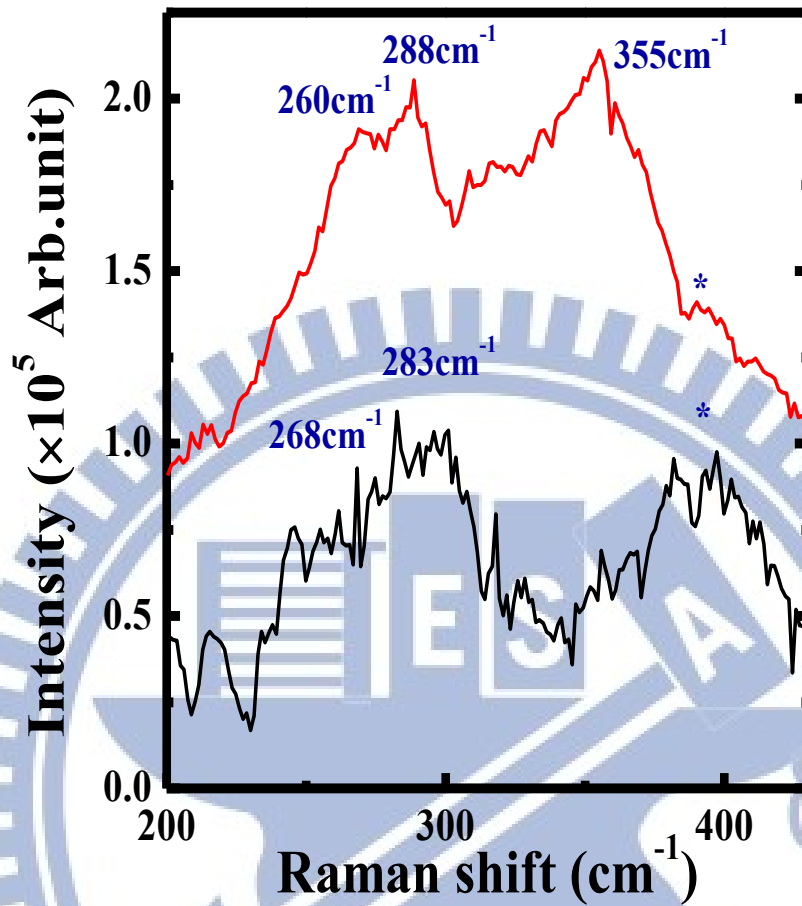


圖 27 Mn,Zn-MT-GFP 拉曼光譜

紅色線為 Mn,Zn-MT-GFP 的 Raman 光譜圖可以看到在 355cm^{-1} 有錳硫鍵結的訊號，而黑色線為 MT-GFP 的 Raman 光譜圖，在 355cm^{-1} 就沒有錳硫鍵結的訊號。

表 2.Mn,Zn-MT-GFP 光譜訊號對照表

Standard peaks(cm^{-1})	admeasure peaks (cm^{-1})	meaning
260-288	286	Zn-S (TO)
350	355	Mn-S
410	388	skeletal bending

由表 1. 中可以明顯得知分別在 268 cm^{-1} 和 355 cm^{-1} 有 Zn-S 以及 Mn-S 之 Bending mode 拉曼光譜訊號。

4-3 超導量子干涉磁量儀磁性分析

(Super-conducting Quantum Interference Device magnetometer (SQUID))

超導量子干涉元件 (Superconducting Quantum Interference Device, 簡稱 SQUID)

是目前所知最敏感的磁通偵測器，其獨特的磁通與電壓的週期特性，使得 SQUID 已被使用在精密測量，成為微弱物理量如磁場、磁場梯度、電流、電壓、電阻、電感及磁化率等測量上最靈敏的感測元件。

先將已經冷凍乾燥完的磁性蛋白粉末裝入膠囊中(約使用 3~4 mg)，再將膠囊裝入超導量子干涉磁量儀專用的吸管中，並將膠囊用細線綁在約吸管四分之一處(如圖 28 所示)，接著再將裝有膠囊的吸管裝入超導量子干涉磁量儀專用的樣品載棒上，也是一樣要先利用細線將吸管及樣品載棒綁緊以免在量測時因為快速的上下震動而使的樣品以及吸管掉入儀器中。

放入樣品前，先讓樣品輸送室破真空回到大氣狀態才可以將樣品送進樣品輸送室中。樣品進入輸送室(如圖 29 所示)，先讓樣品輸送室抽回真空狀態，因為儀器內部為真空狀態，若是樣品輸送室沒有抽回真空狀態，那會導致兩者壓力差太大進而損壞儀器，所以此步驟一定要非常小心，至少利用軟體讓樣品輸送室抽真空三次，才可以將樣品從樣品輸送室中緩慢的送入儀器中。

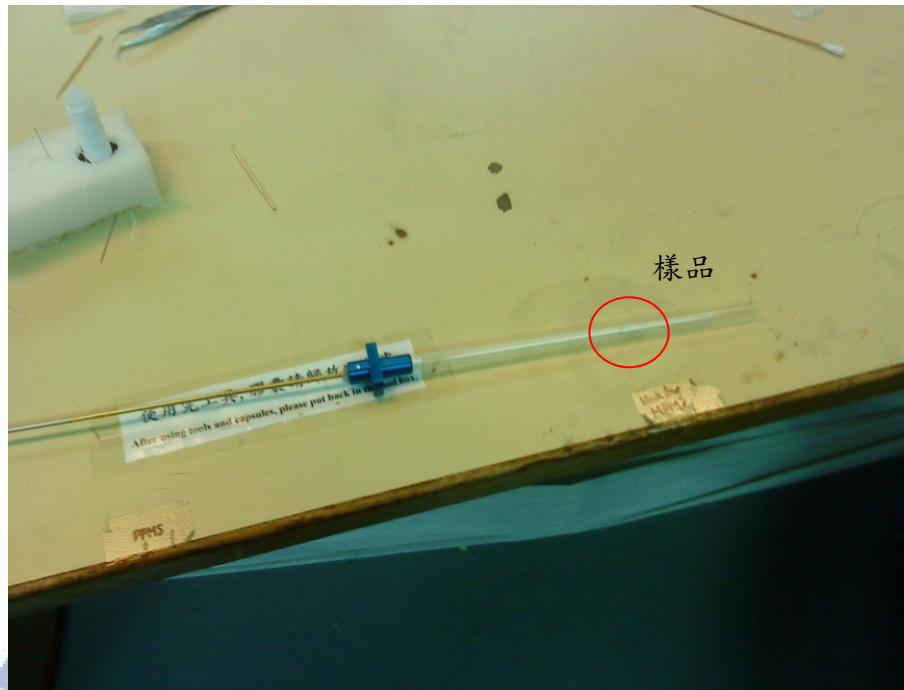


圖 28 SQUID 裝置樣品示意圖

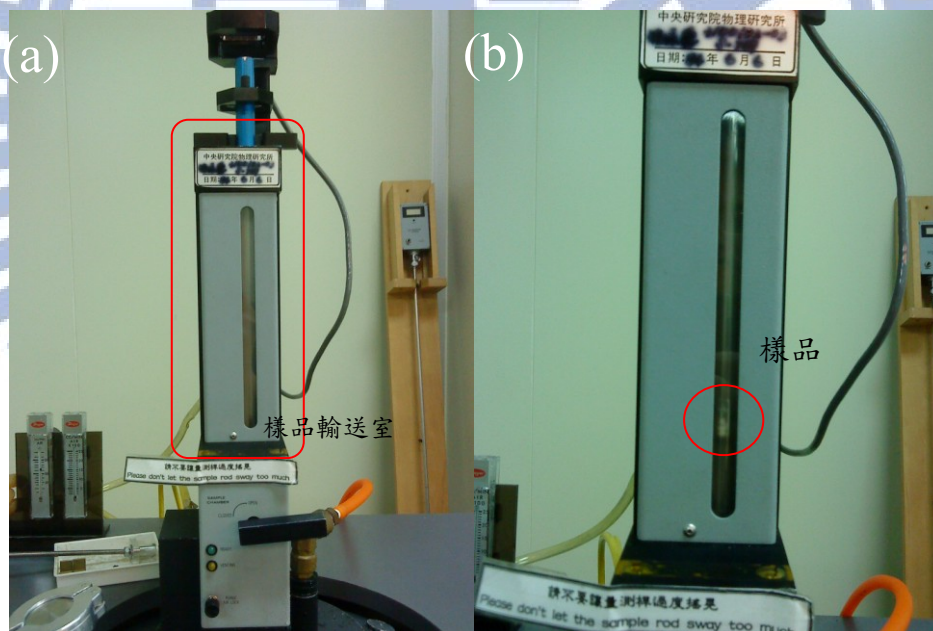


圖 29 (a)樣品輸送室 (b)樣品裝入樣品輸送室示意圖

樣品進入儀器後，先利用軟體找尋樣品的位置，進入軟體後先選擇軟體中的”center”並選擇為使用直流電模式” DC “後，按照順序點選軟體中的選項操作即可，第一選項為先將步進馬達歸零，再使用第二個選項設定掃描量測的吸管長度範圍，一般建議質設定為 6 cm，表示以樣品為中心，上下各可移動的距離為 3 cm，掃描點數一般設定為 33 個點。接著在軟體中設定量測中心位置所需要的外加場的大小，一般而言由小磁場慢慢的向上加，所以從 500 O.e 開始做起。設定完成後等磁場穩定，便可以使用第三個選項進行粗略的掃描樣品中心位置，此時會出現一個量測圖形，若是圖形有極大及小值，那代表此樣品初步判斷為有具有磁性的物質，若是為極大值，代表為順磁性物質，若是為極小值則為逆磁性物質。緊接著先使用第五個選項試著將量測出來的圖形以及儀器自動 fitting 的調整至最接近，最後則是用第四個選項正式完成量測樣品位置。

等到儀器抓到樣品位置後，先確認設定量測的條件是否正確，此實驗中設定的條件為，外加場為 3T，量測溫度為 300K 以及 10K，確認完畢後及可以開始進行量測，每次量測一個溫度得磁性時間約為 7 個小時。

實驗結果如圖 30 所示，由量測結果可以得知，我們的磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP

具有鐵磁性的性質，在 300K 所具有得磁性約為 4×10^{-5} emu，其飽和磁化量約為 1000

O.e，而在 10K 時所具有得磁性約為 8×10^{-5} emu，其飽和磁化量約為 1000 O.e。

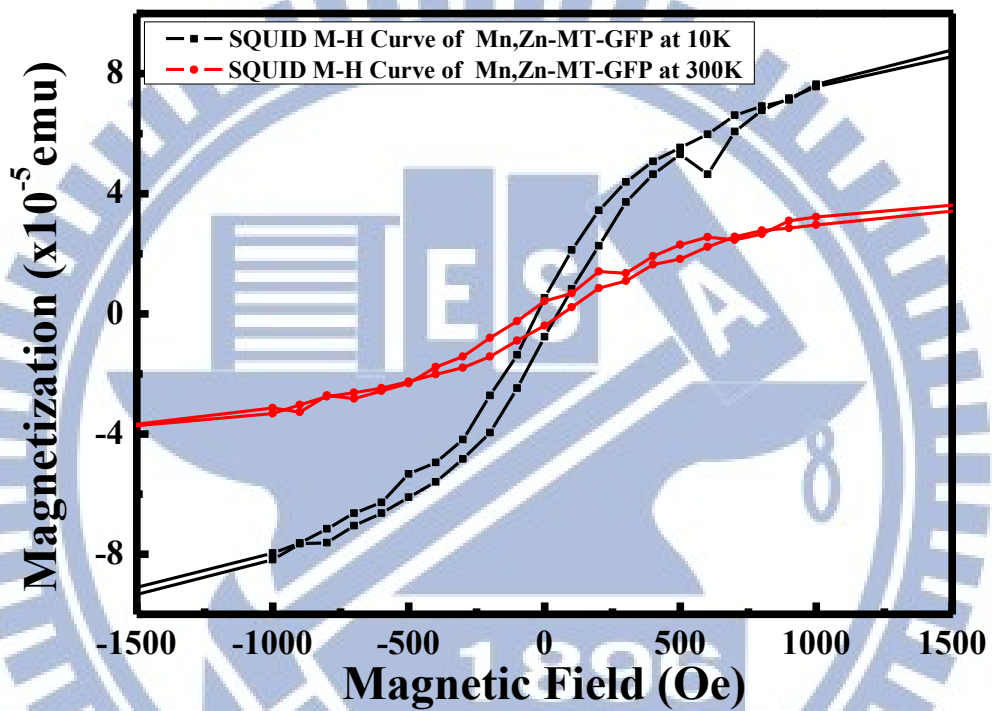


圖 30 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP M.H 量測結果，紅色的線為在 300K 所量測的結果，黑色的現為在 10K 所量測的結果

如圖 31 為此實驗的對照組，一般而言蛋白質有機物為不具有鐵磁性的物質，由本實驗室前輩的研究中得知 MT 本身也不具有鐵磁性[99]，所以此實驗中直接檢驗我們所加入的含金屬的藥品在沒有蛋白質將兩者結合的狀態下以及在極低溫沒有熱擾動干擾的情況下是否具有磁性，來加以探討此磁性蛋白所具有的鐵磁性的現象是否是因為錳以及鋅原子和蛋白質相互結合後產生類似 Zinc-Blende 結構所導致。由實驗結果的圖上我們可以很明顯的發現，若是只有錳以及鋅所結合的化合物不具有鐵磁性，但是卻具有順磁性的現象，而此現象也更加強了我們的假設，讓因為錳以及鋅離子和蛋白質相互結合後產生類似 Zinc-Blende 結構使的原本不帶有磁性的有機物蛋白質出現了鐵磁性的假設更具有說服力。

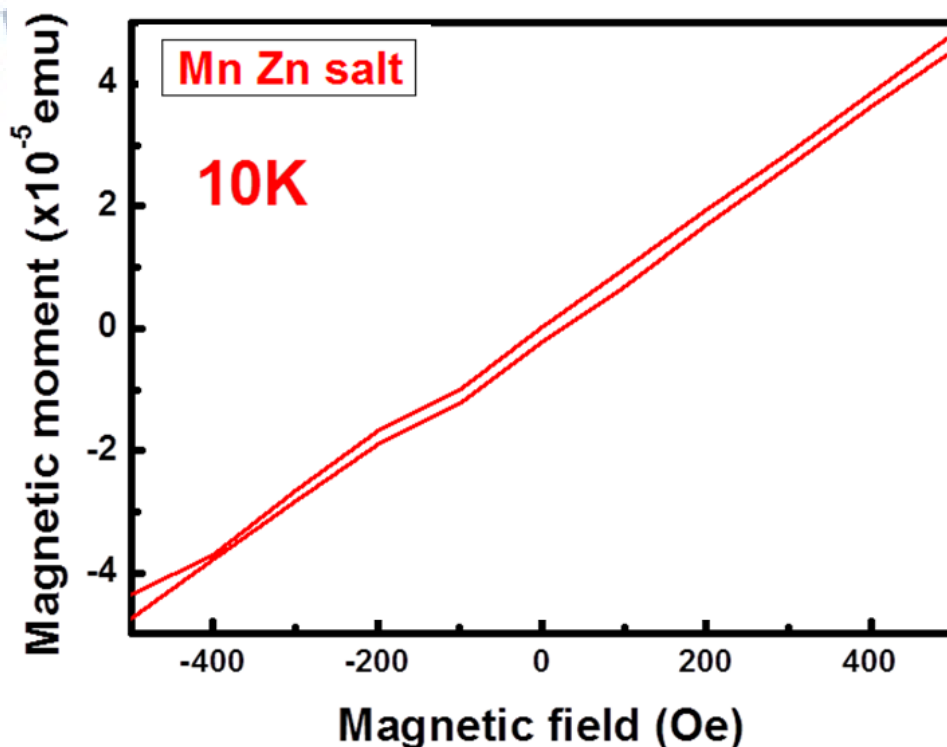


圖 31 Mn,Zn 化合物在 10K 量測 M.H 結果，由圖中可知此樣品並沒有鐵磁性的訊號。

另一方面具有順磁性的化合物可以利用來當作 MRI 的顯影劑，因此我們也嘗試著做出此化合物，並故意加入大量的金屬故意讓其沉澱，再利用強磁鐵來吸此化合物，結果發現，在液體中，此化合物會沿著磁力線方向排列（如圖 32~34 所示）。我們也利用 liposome 將其包附其中並利用 TEM 進行影像以及成分分析，詳細結果會在討論中加以詳談。

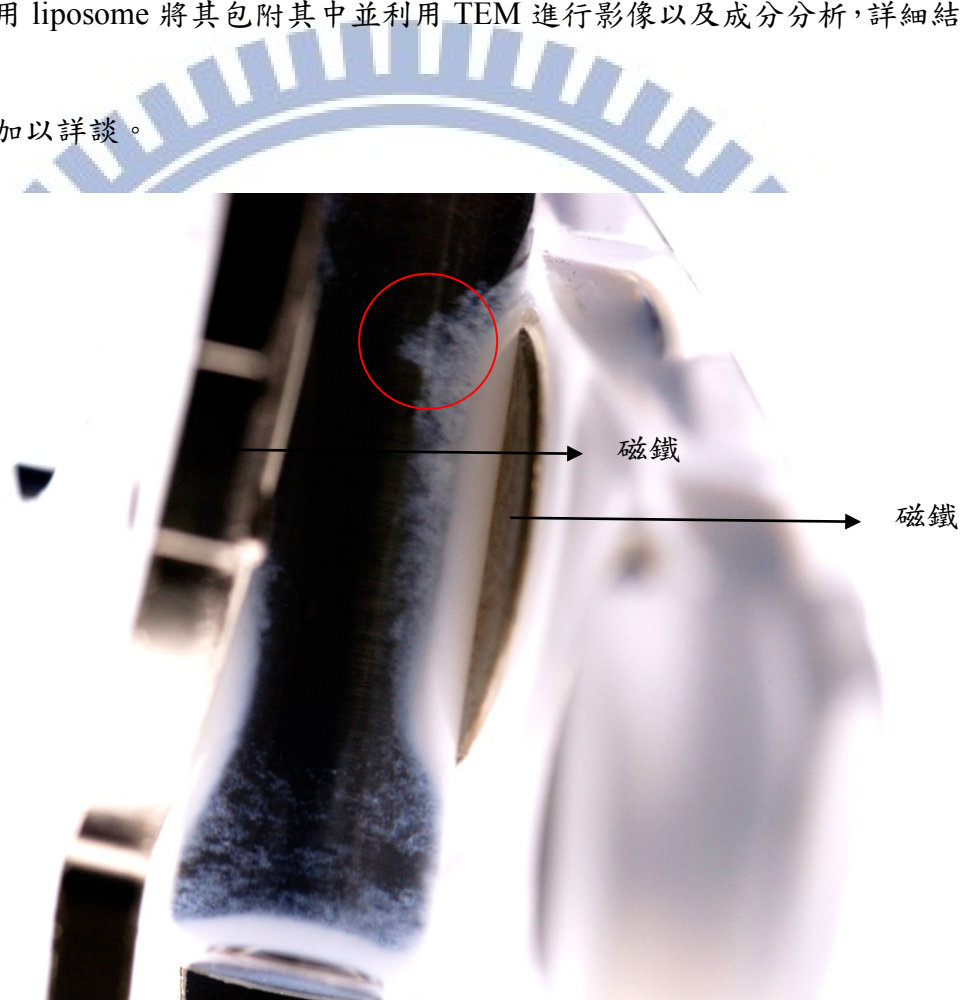


圖 32 利用強磁鐵吸在 Mn,Zn 化合物的兩端，可以明顯看見已經有部分 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起

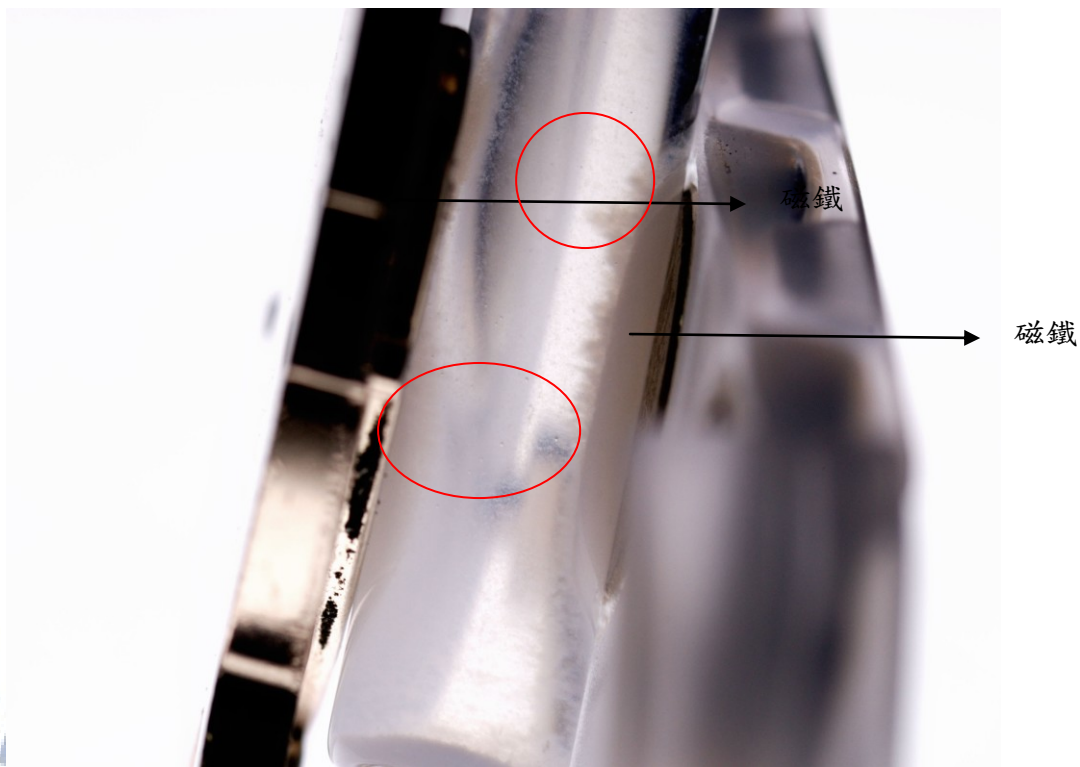


圖 33 利用強磁鐵吸在 Mn,Zn 化合物的兩端，可以明顯看見已經有部分 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起並相互開始連接

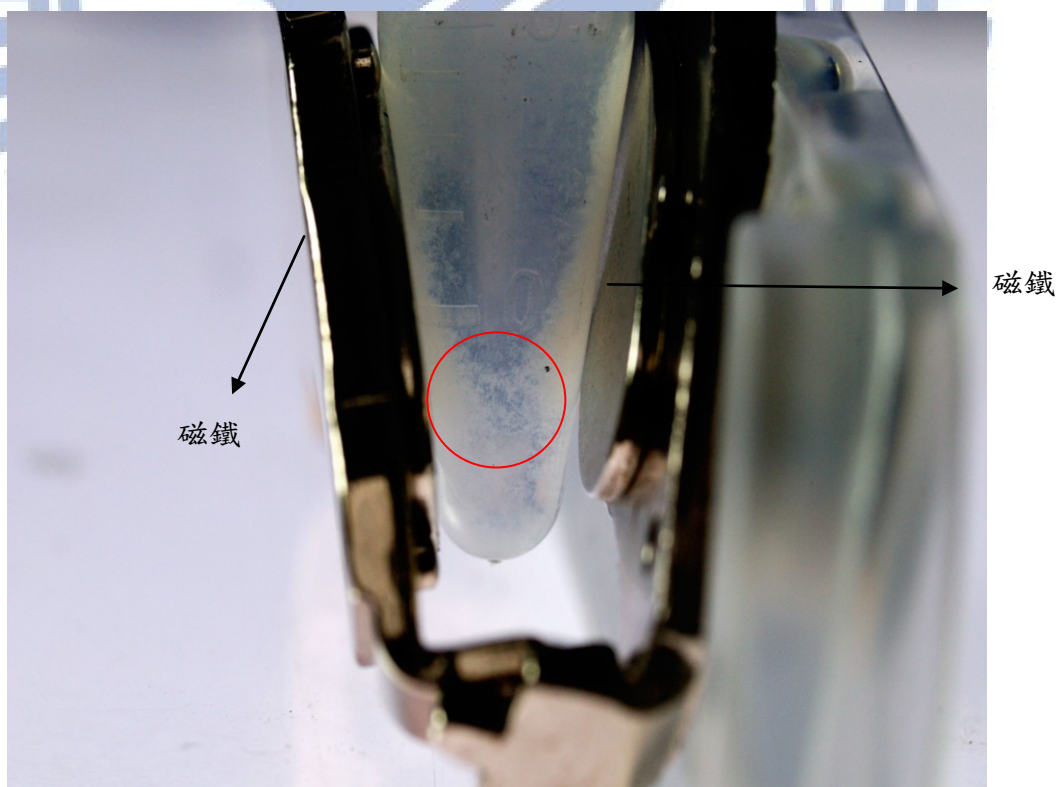


圖 34 利用強磁鐵吸在 Mn,Zn 化合物的兩端，可以明顯看見已經有部分 Mn,Zn 化合物沿磁力線方向站起並連接在一起

4-4 穿隧式電子顯微鏡 Transmission Electron Microscope (TEM) 影像分析

第一部分 模擬結構

先將本實驗室以前研究之磁性蛋白質 Mn,Cd-MT 假設結構(圖 48)輸入至模擬軟體中，先將碳、氫、氧等較輕的原子全部移除，留下金屬（錳、鎘），設定加速電壓設為 200KeV、一個 unit cell 的 A、B、C 分別設為 192 Å、177 Å、44 Å。將模擬完的金屬繞射環（圖 35）與實驗室先前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖（圖 35）進行比對，比對後發現金屬所照成的繞射環位置一致，因此更進一步加入碳、氫、氧等較輕的原子在同樣的參數下再次進行模擬，來確定我們所架設的結構的正確性，此部分詳細結果將在討論中加以討論。

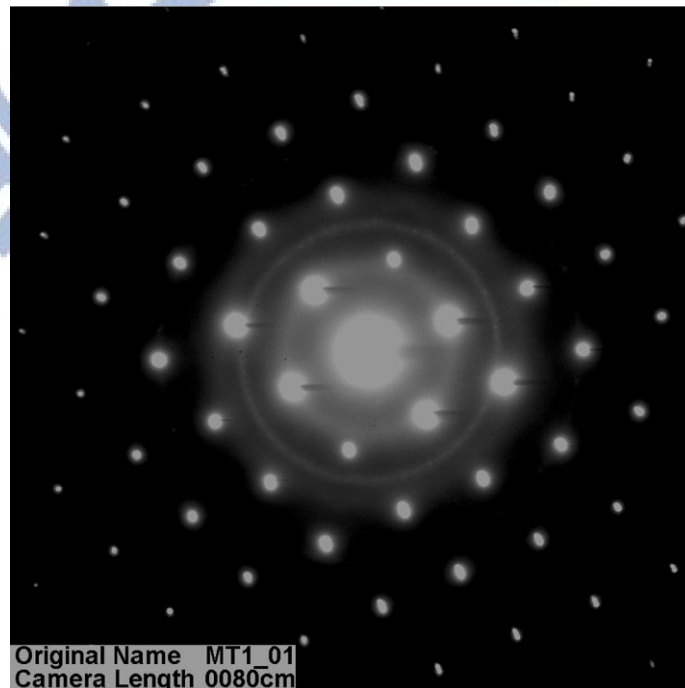


圖 35 實驗室先前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖，基板為矽基板

第二部分 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 影像以及繞射圖形取得

將已經製備好的樣品（不須冷凍乾燥）的磁性蛋白液體滴至銅網上等待約 3 分鐘，再將多餘的液體吸除。接著將銅網小心的放在低溫試片座中，將低溫試片座慢慢的插入 TEM 中，並在低溫試片座後端加入液態氮降溫。等待真空值到達標準後便可以開啟電子束進行影像觀察。找到樣品後，切入繞射模式，進行繞射圖案的擷取。

磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 的 TEM 影像圖如圖 36 所示，由圖中的橢圓形物體即為磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP，在橢圓形的外圍可以清楚的看到有明顯規則形狀的條紋，此條紋來自磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 內部有規則排列的結構所造成，其來源有可能為錳離子以及鋅離子規則排列所至。

生物標本所組成的成份均為原子量較小之碳、氫、氧等元素，因而對電子散射的能力較弱，影像之對比度相對較低，一般而言在電子顯微鏡技術上，會使用一些電子散射能力較強的金屬與生物樣品中特定的分子結合，使其呈現較好之對比度。最常作為染劑的金屬有鈾 (U) 和鉛 (Pb)，其他如銱 (Os)、銀 (Ag)、鐵 (Fe)、金 (Au) 等也常視樣品種類而為染劑[86]。

在本實驗中，我們曾經常試著將未參雜金屬離子的 MT-GFP 拿來利用 TEM 擷取其影像圖，希望可以從影像上看到兩者的差異，但是 MT-GFP 大部分的成分與一般生物樣品相通皆為原子量較小之碳、氫、氧等元素，因而對電子散射的能力較弱，影像之對比度相對較低，所以照出來的影像經過顯影或是 CCD 成像後都不會有直接在 TEM 螢光頻幕上看到的對比清楚，甚至感覺上沒有影像，但是在我們置換金屬進入此蛋白質形成磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 後，可以改善此問題，蛋白質中的金屬改善了影像對比問題，因此可以讓我們在 TEM 可找到此蛋白的影像以及取得其繞射圖形。

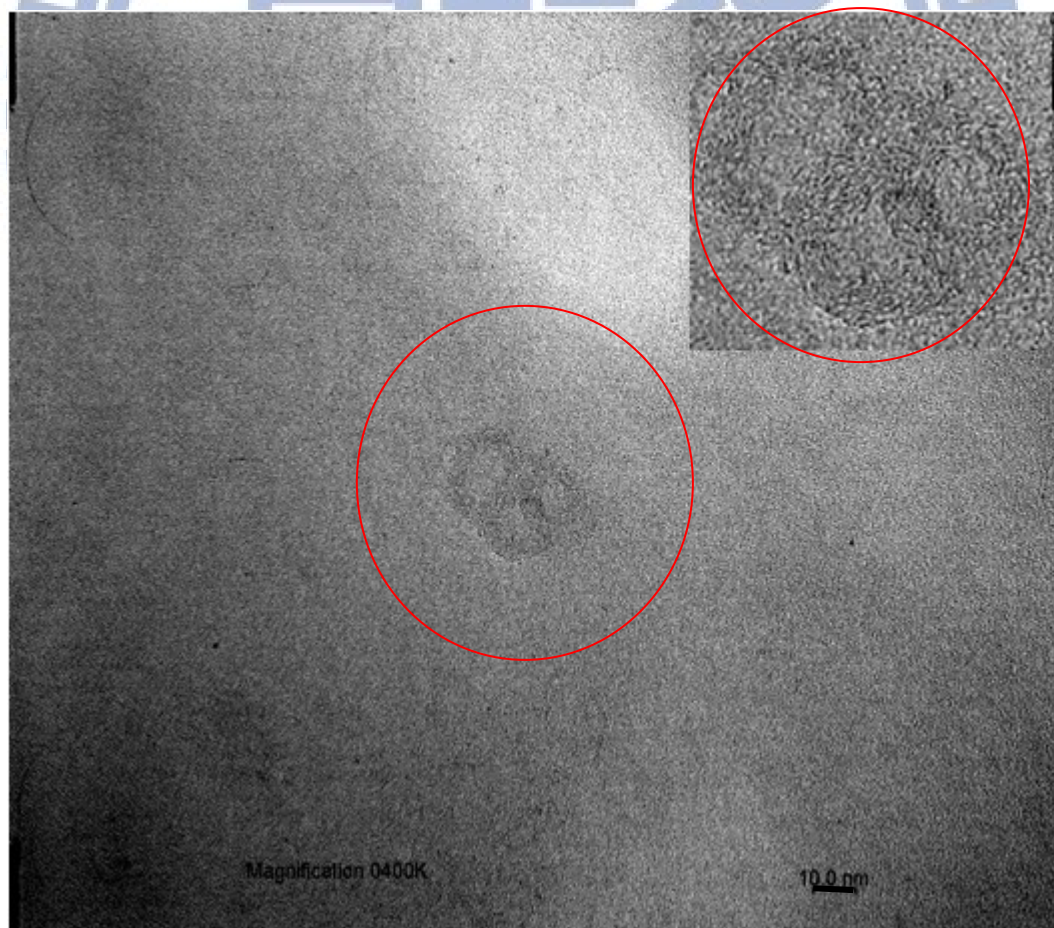


圖 36 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP TEM 影像圖，右上角為磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 放大圖

在取得磁性蛋白Mn,Zn-MT-GFP的TEM影像圖後，我們便嘗試著利用同樣的位置，並選定同樣的樣品做TEM的繞射圖形(如圖37)，並且也試著使用Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer (EDX: X光能量散佈分析儀)來分析磁性蛋白Mn,Zn-MT-GFP的成份。EDX: X光能量散佈分析儀的原理為當原子的內層電子受到外來能量源(如：電子束、離子束或者光源等)的激發而脫離原子時，原子的外層電子將很快的遷降至內層電子的空缺，並釋放出兩能階差能量。

被釋出的能量可能以X光的形式(特性X光)釋出，或者此釋出的能量將轉而激發另一外層電子(歐傑電子)使其脫離原子。由於各元素之能階差不同，因此分析此X光或歐傑電子的能量或波長，即可鑑定試片的各個組成元素。但是由於磁性蛋白Mn,Zn-MT-GFP為生物性樣品，無法承受過多的電子數以及能量照射，導致還沒將EDX Data取完整到可以分析的的程度樣品就已損壞或是溶解，因此無法使用此方法分析出成份。

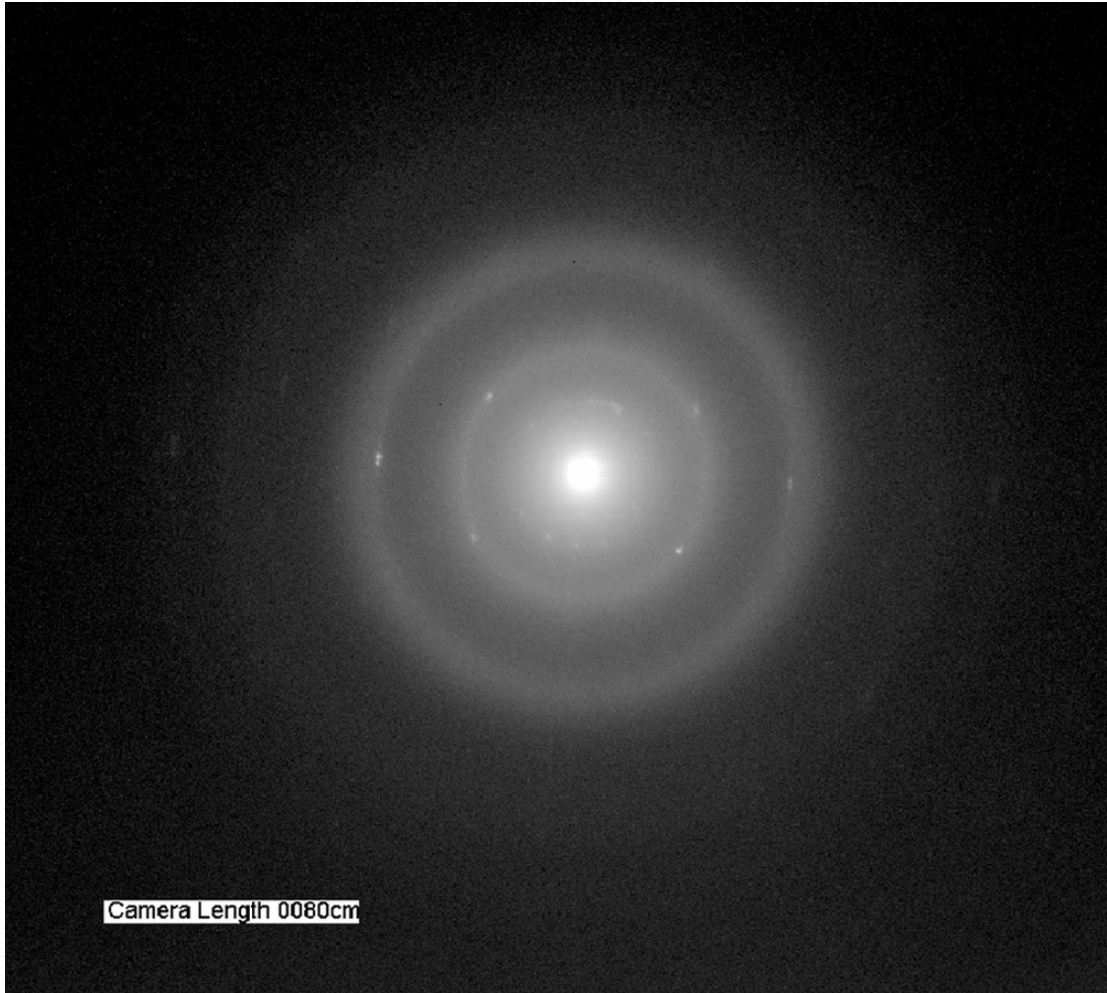


圖 37 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP TEM 電子繞射圖

本實驗中也另外製作了不含蛋白質只有錳以及鋅化合物對照組進行 SQUID 的分析，分析後發現，此對照組意外具有順磁性的特性，而此順磁性的特性若是進一步研究，也許可以成為新一代的 MRI 對比劑，有助於 MRI 的發展，因此我們也做了一點小實驗，將量測後確定有順磁性的錳新化合物為了希望可以在使用過程中避免傷害人體，因此我們將此具有順磁性的錳鋅化合物包入 liposome 中，並且利用穿隧式電子顯微鏡 TEM 進行影像分析(如圖 38)，此外我們也常試著利用 energy dispersive x-ray fluorescence

spectrometer (EDX: X 光能量散佈分析儀)來分析磁性蛋白此化合物的成份。但是很可惜此樣品與磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 一樣，無法承受過多的電子數以及能量照射，導致還沒將 EDX Data 取完整到可以分析的的程度樣品就已損壞或是溶解，因此無法使用此方法分析出成份。所以我們轉而尋找較大的錳鋅化合物在嘗試取得繞射圖(圖 39)以及使用 Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer 進行成分分析(圖 40)以及，由 EDX 的光譜圖中可以看到有錳的訊號，但是鋅的訊號太靠近零點的位置，所以訊號不可以採信，而銅的訊號是來自銅網的分此化合物的訊號。



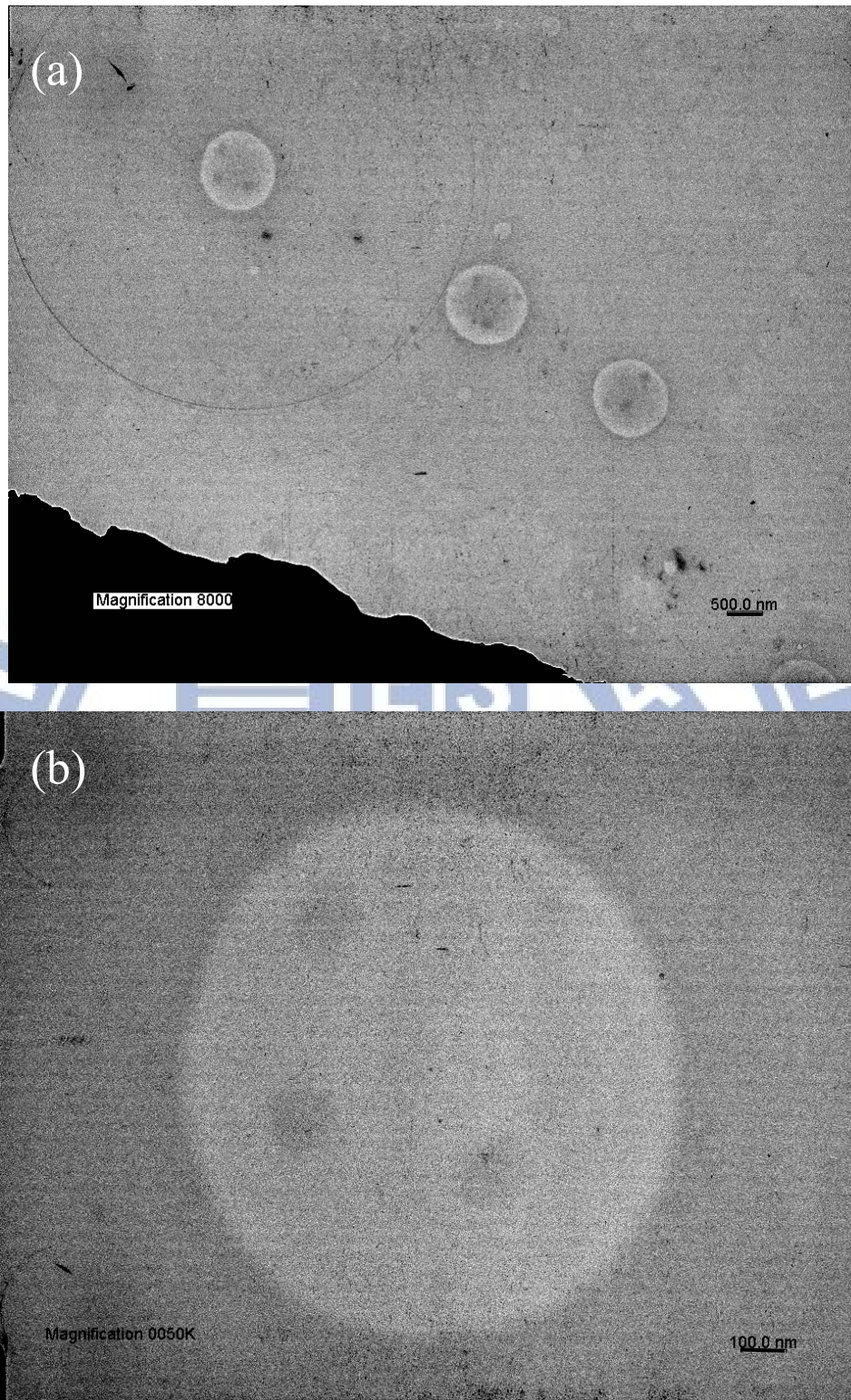


圖 38 Liposome 包附錳鋅化合物 TEM 圖

圖(a)為大範圍找尋樣品的 TEM 圖，內含三的有包附不同數量錳鋅化合物的 Liposome

圖(b)放大倍率較大觀察單一個有包附錳鋅化合物的 Liposome

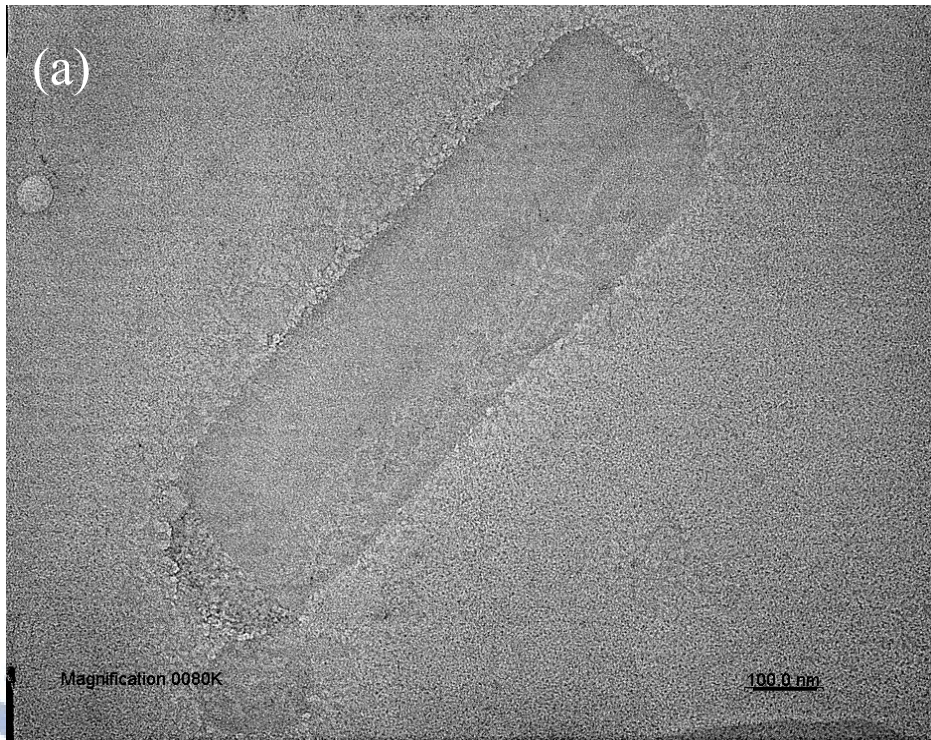


圖 39 較大的錳鋅化合物 TEM 影像及繞射圖

圖(a)較大的錳鋅化合物 TEM 影像圖 圖(b)同一錳鋅化合物 TEM 繞射圖

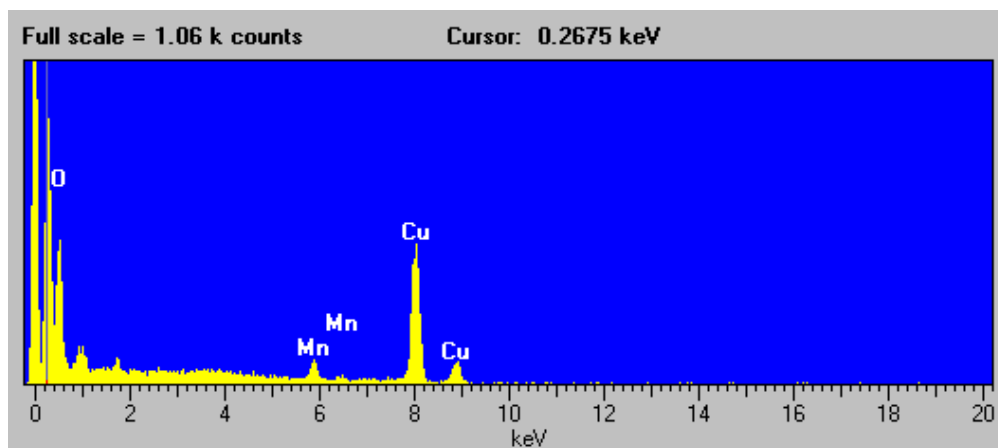


圖 40 較大的錳鋅化合物 TEM EDX 光譜圖

對於錳鋅化合物藉由以上分析只能初步確認此化合物具有順磁性、在 TEM 地下可以很容易的被觀察到，並且從繞射圖上看來可此化合物具有規則的排列方式、可以利用 liposome 將此化合物包覆於其中以及此化合物的成分中含有錳。

為了進一步測試是否可以運用到 MRI 上成為新一代的 MRI 對比劑，我們將錳鋅化合物利用 20 MHz Relaxometer(NMS-120, Minispec, Bruker)進行要判斷可做為 MRI 何種對比劑最為重要的指標弛緩率 (relaxivity) 的量測。

一般而言磁振造影(MRI)對比劑，大致可分為以下兩種類別：

(1) 順磁性磁振造影對比劑，就是所謂的 T_1 試劑，此類對比劑用鑰系元素及過渡金屬元素，因其最外層軌道有未配對電子，而具有順磁性。利用未成對電子在縱向弛緩率(longitudinal relaxivity, r_1)的卓越效果，使得標的物的訊號增強，可使影像變白(positive agent) [100]。

(2) 超順磁性磁振造影對比劑，就是所謂的 T_2 試劑，超順磁性物質的性質與順磁性物質相近，然而超順磁性物質在很弱的外在磁場存在下，就會引起很強的磁化現象，且在弱磁場下，其磁化的大小與磁場大小成線性正比。而超順磁性物質的存在主要會影響磁場的均勻度，使得磁場強度不均勻 (field inhomogeneity)，因而增加橫向弛緩率(transverse relaxivity, r_2)，藉此減弱此標的物之訊號，可使影像變黑(negative agent) [100]。

為了進行弛緩率 (relaxivity) 的測定，我們配製各種不同錳離子濃度的錳鋅化合物溶液分別為含 0.04mM、0.08 mM、0.12 mM、0.16 mM、0.2 mM、0.24 mM、0.28 mM、0.32 mM、0.36 mM、0.4 mM。 T_1 以及 T_2 之測定，是利用 20 MHz Relaxometer 來進行量測，在量測前校正 90° 及 180° 之脈衝 (pulse)，再反覆給予不同錳離子濃度的錳鋅化合物溶液脈衝量測不同錳離子濃度的錳鋅化合物溶液之 T_1 以及 T_2 ，以弛緩時間之倒數 ($R_1=1/T_1$ 以及 $R_2=1/T_2$) 對濃度作圖，所得之斜率即為弛緩率 (r_1 以及 r_2)，單位為 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。實驗結果如圖 41 所示，一般而言若是 R^2 (減量線)值小於 0.99 則此數據可信度不高，從我們的結果看來 r_1 值為 77.989， R^2 值為 0.9956，而 r_2 值為 381.74， R^2 值為 0.9934，此量次結果 R^2 值皆大於 0.99 因此可信度高，由此分析初步判斷，我們所製作的錳鋅化合物可使用來開發 MRI T2 對比劑，有待進一步的研究才可以確認是否可以進一步運用到 MRI 上。

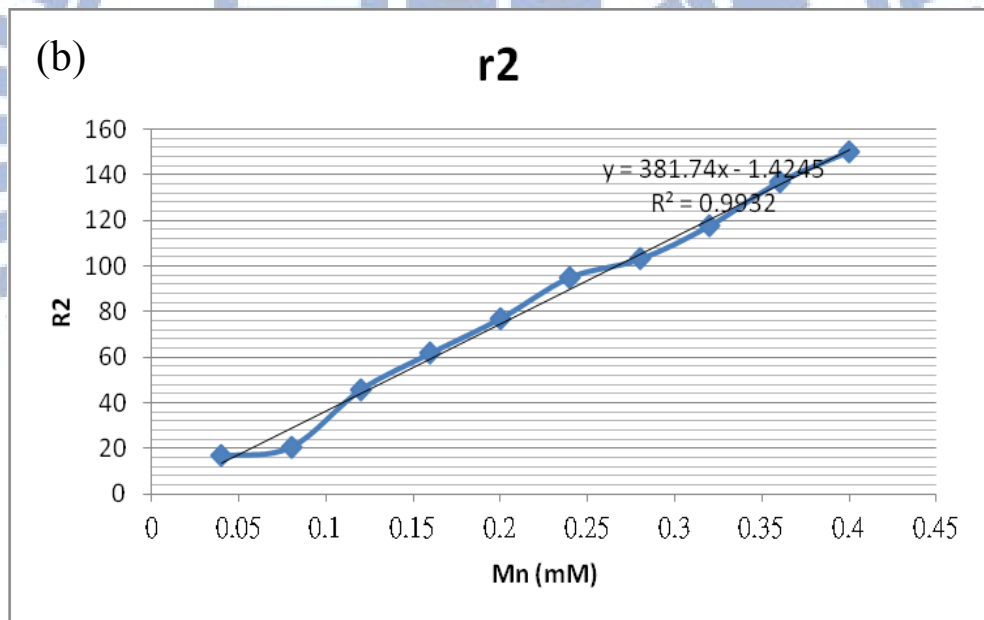
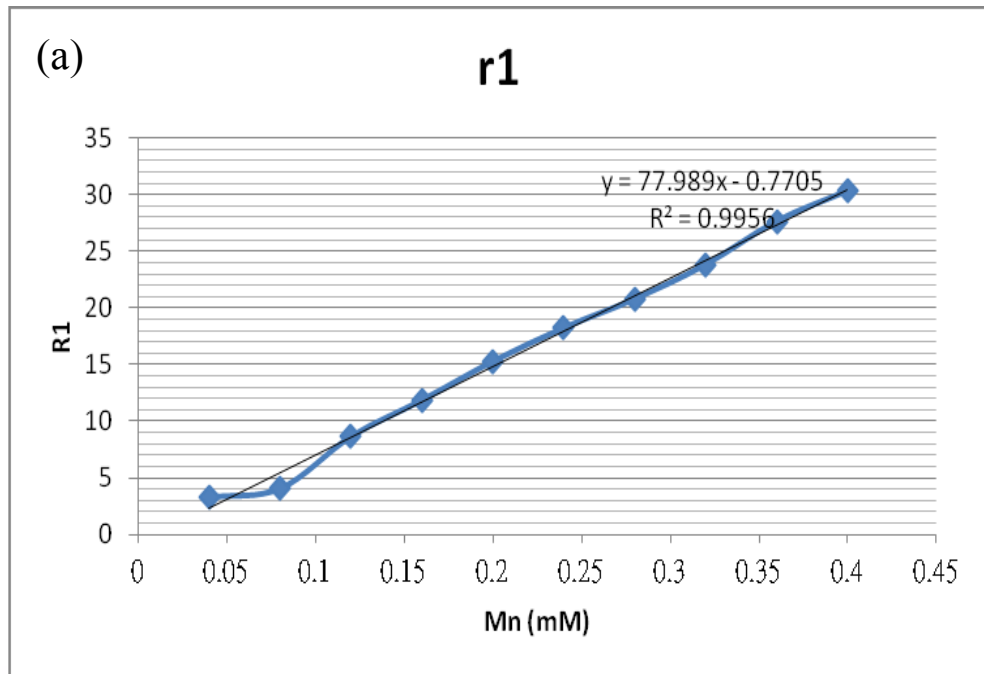


圖 41 錳鋅化合物溶液弛緩率量測結果圖 圖(a)為錳鋅化合物溶液以弛緩時間之倒數 ($R1=1/T_1$) 對濃度作圖，所得之斜率即為弛緩率 (r_1)，其 r_1 值為 77.989，單位為 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， R^2 值為 0.9956， R^2 值皆大於 0.99 因此可信度高。圖(b)為錳鋅化合物溶液以弛緩時間之倒數 ($R2=1/T_2$) 對濃度作圖，所得之斜率即為弛緩率 (r_2)，其 r_1 值為 381.74，單位為 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， R^2 值為 0.9932 R^2 值皆大於 0.99 因此可信度高。

4-5 Extended X-ray Absorption Fine Structure(EXAFS)Mn,Zn-MT-GFP Mn 離子週為

結構分析

利用同步輻射光對樣品進行結構分析，可以得知錳離子以及鋅離子是否與我們所構想得結構一樣透過硫與蛋白相互連接，並形成 Zinc-Blende 的結構。

將已經冷凍乾燥完的樣品粉末裝入夾鏈袋中，再黏貼至樣品台上如圖 42 所示，因為同步光能量強，所以須先準備氮氣槍對準樣品，在量測光譜的過程須將氮氣槍打開，持續對著樣品吹，以降低樣品溫度，避免樣品損壞。接著調整光路，先確認光點位置是否有在樣品上，首先先剪一斷感光紙，貼在樣品台上，出光後光點會打在感光紙上便可以得之光點位置，找到光點位置後，先將光點移至樣品台中間，再用感光紙確認光點位置。確認光點位置後，將樣品黏上。調整光的能量至欲量測的原子能量。出光後，開始結取數據並液邊做圖，觀察數據是到達可以分析的程度，若不行或試圖形依舊不清楚，就必須繼續掃描增加積分時間來取得好的數據。

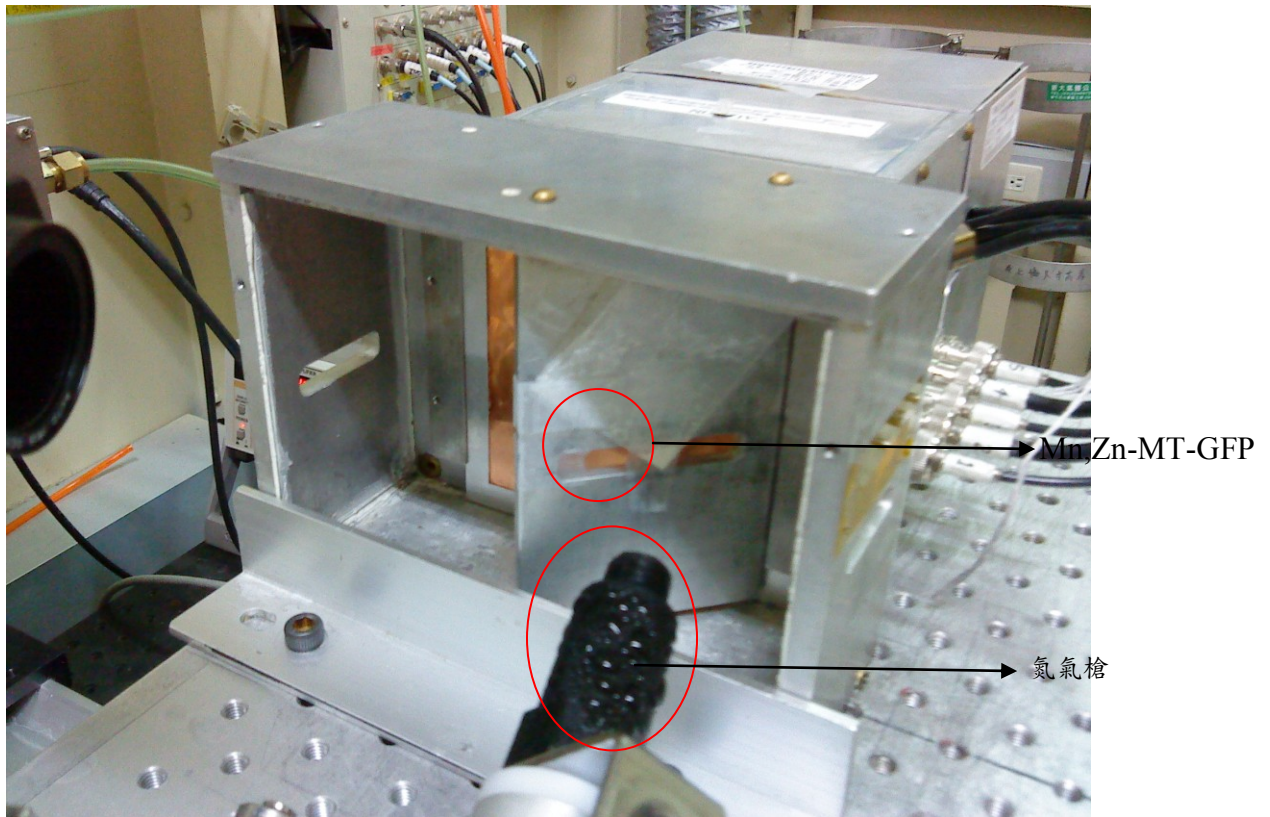


圖 42 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 裝至於 EXAFS 示意圖，將樣品磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 裝入夾鏈袋中黏貼至樣品台上並使用氮氣槍降溫。

此實驗儀器的架設圖如圖 43 所示，入射的同步輻射光經由 I_0 處來測得入射光能量，由此可以得知是否已經將入射光能量調至待測物所需的能量。樣品會放至在 I_0 以及 I_t 之間，在此可以使用兩種方法來測得吸收光譜，第一種量測穿透光 I_t 以及入射光 I_0 之間光強度的差別以及變化來測得吸收光譜，但要利用此方法量測的樣品光譜訊號必須要很強例如合金，而生物樣品訊號較為弱，因此所需的樣品量要較多、較厚，因此不適用於穿透法反而適用於螢光法量測螢光強度 I_f ，螢光法則是利用樣品所放出的特定螢光來分析樣品結構。

最後是 I_r ，在 I_r 處必須放上純的元素當作參考用，就可以在取得光譜的同時得知與純元素比較後其價態為何，如圖 44 所示，不同價態的錳有不一樣的吸收光譜圖形。

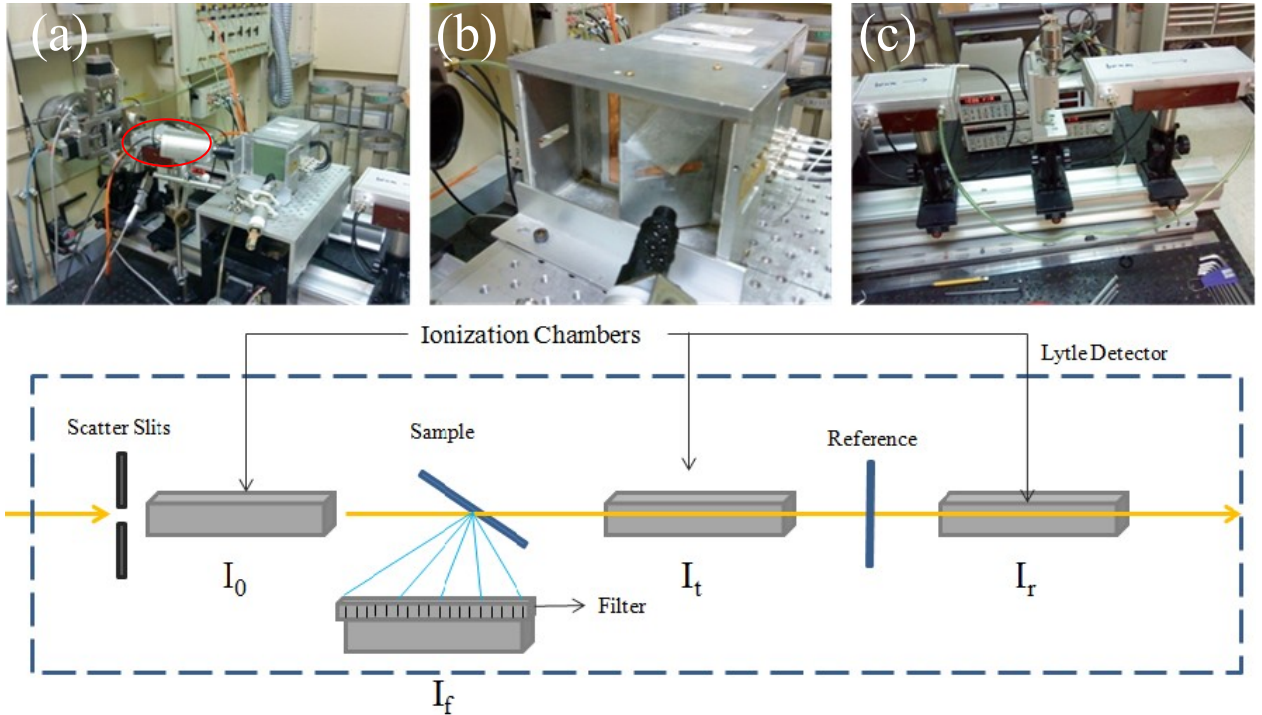


圖 43 EXAFS 儀器的架設示意圖

圖(a)為 I_0 的偵測儀 圖(b)為樣品放置處以及 I_t 偵測儀 圖(c)為 I_t 以及 I_r 偵測儀

(本圖參考自”X光吸收光譜數據分析研習營X光吸收光譜原理簡介”李志甫JUNE 29 - JULY 7, 2009)

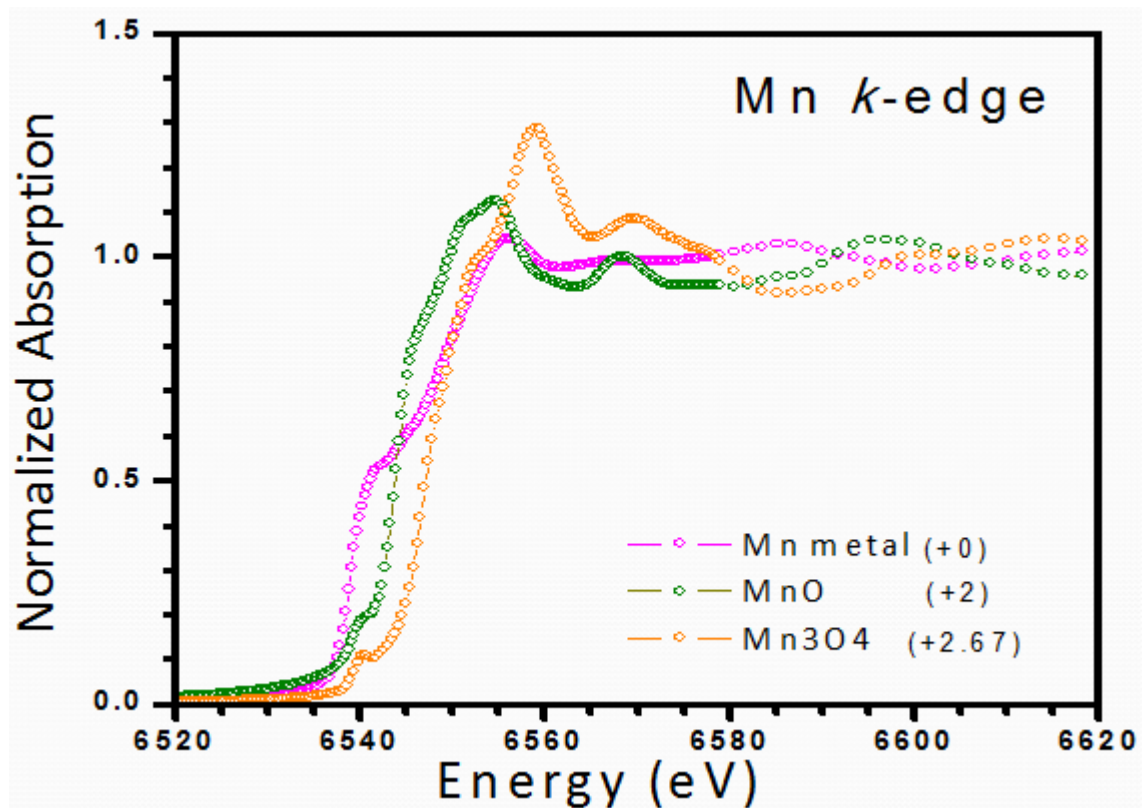


圖 44 不同價態的錳的吸收光譜示意圖

此實驗結果如圖 45 所示，我們為了要知道此實驗所製做的磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 錳離子是否與我們所假設的一樣與硫原子鍵結在一起，因此我們真對錳離子進行吸收光譜的分析，其結果如圖 45 所示，此圖為量測完畢後，包含 X 光近緣結構(X-ray Absorption Near-Edge Structure，簡稱為 XANES)及延伸 X 光吸收精細結構(Extended X-ray Absorption Fine Structure，簡稱為 EXAFS)。

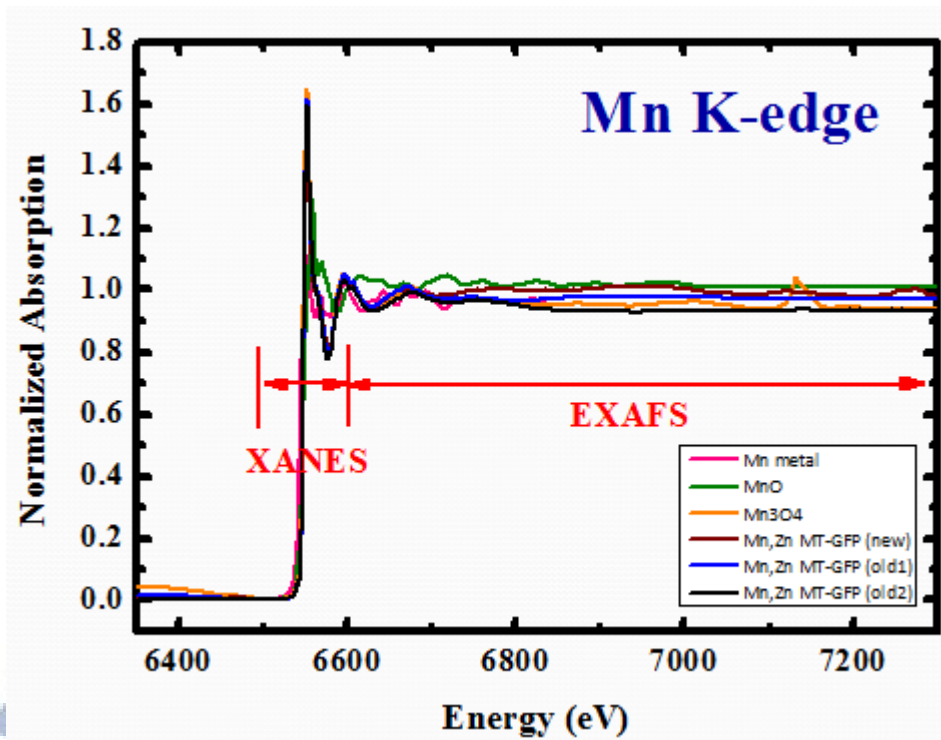


圖 45 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 針對錳所做的吸收光譜圖

將圖 45 經軟體分析以及扣掉背景值後分別為圖 46 以及圖 47，圖 46 為 X 光近緣結構(X-ray Absorption Near-Edge Structure，簡稱為 XANES) XANES 可以用來檢測材料中特定原子之電子組態，由圖中中我們可以清楚看到本實驗所使用的樣品磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 所含的錳離子的價態約為+2 左右。

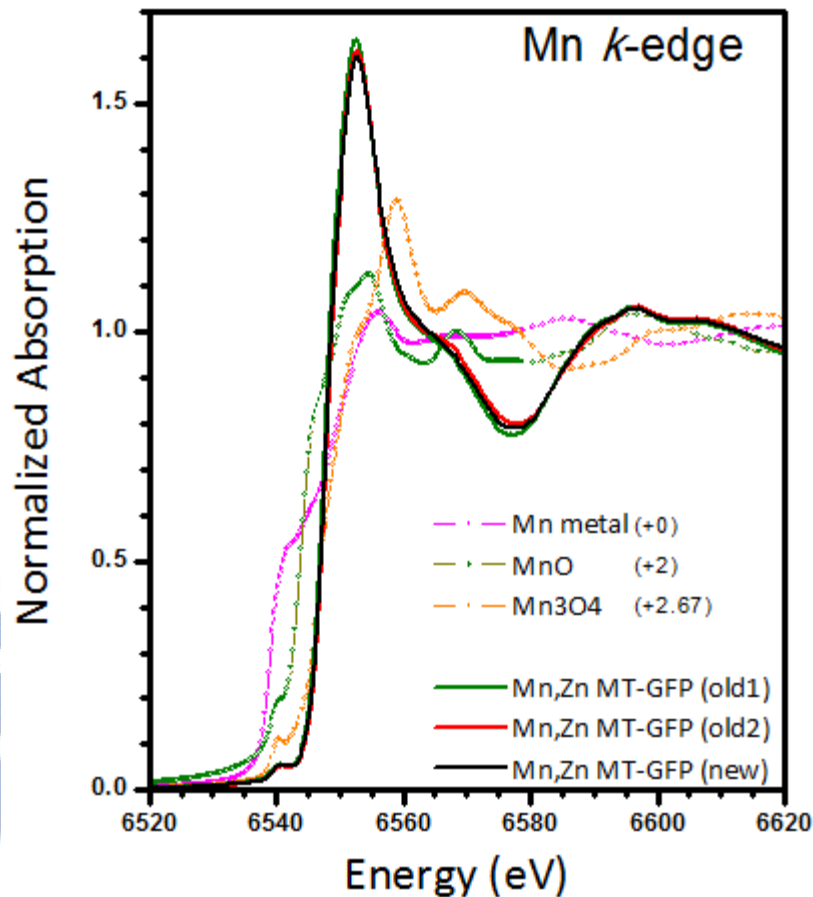


圖 46 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 針對錳所做 X 光近緣結構 (X-ray Absorption Near-Edge Structure) 光譜圖

圖 47 為延伸 X 光吸收精細結構(Extended X-ray Absorption Fine Structure, 簡稱為 EXAFS)。EXAFS 可被用來測定原子之區域結構(Local Structure), 得知原子與其鄰近原子間之距離、種類及數目等。藉由 fitting 此圖後, 可以得到表 2 錳離子周圍建結的原子以及可能的配為數, 由此表可以得知此實驗所製做的磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 的錳離子週圍的一層與錳離子互相連接的原子確實為硫, 因此我們對於我們所假設的結構更加的確定, 透過此實驗更加驗證了我們所假設的結構的真實性更高。

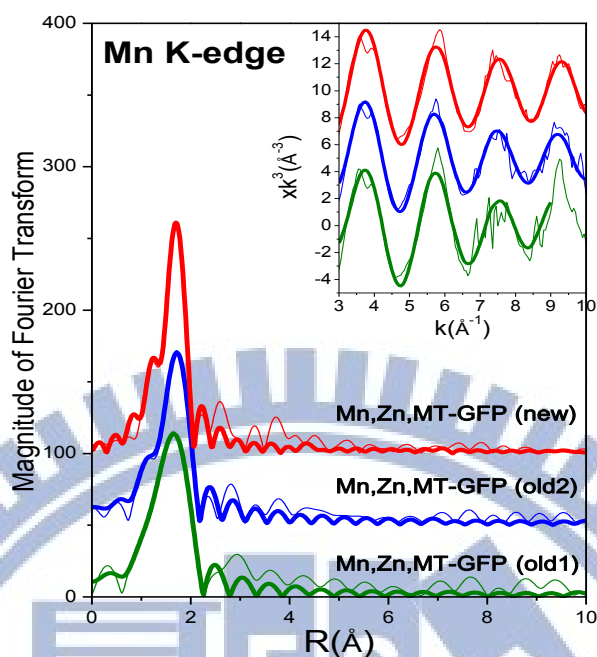


圖 47 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 針對錳所做延伸 X 光吸收精細結構(Extended X-ray Absorption Fine Structure)吸收光譜實驗數據與 χ fitting 示意圖，右上角的圖為實驗光譜圖扣掉背景值後的數據圖，橫軸為 K 動能其單位為 \AA^{-1} ，縱軸為 χ function $((I-I_0)/I_0)$ 乘上 K (動能)，然而 χ function 本身沒有單位，所以單位為動能的單位 \AA^{-1} 。在縱軸上動能的次方取決於代測元素的原子序，若是原子序越小，震盪衰減越快，因此要乘上的動能 K 就越多，成上動能 K 後可以使用的 EXAFS 震盪訊號變的比較均勻，所以就會變成 K^n ，而單位就會變成 \AA^{-n} 。上圖為右上角的圖經過 Fourier Transform 後的數據圖，其橫軸代表的為原子間距，單位為 \AA ，縱軸所代表的為 Fourier Transform 後的訊號強度。

表 3. 磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 中錳週圍精細結構原子對照表

Neighboring atom of Mn	Numbers	Distance (\AA)	σ^2 (10^{-3}\AA^2)	Photon Energy (eV)
S	3.0 ± 0.4	1.99 ± 0.01	16 ± 5	14.0 ± 1.5
C	8.4 ± 2.8	3.09 ± 0.02	6 ± 2	-11.0 ± 5.0

第五章 討論

1. 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 的鐵磁性現象：

本實驗透過降低 pH 值，漿蛋白質結構打開更利用金屬間活性的不同，參雜錳離子進入蛋白質部分取代原本 MT 中所含有的鋅離子，使得此蛋白具有磁性。而此磁性來源透過結構上的假設以及分析，我們推斷有兩種可能，第一種為雙自旋互換作用(double exchange interaction)所導致，在 MT 的 β -cluster 中含有兩個錳離子，這兩個錳離子被左右一共三個硫所包圍，而在錳離子中的電子會藉由轉移到硫上在快速的轉移到相鄰的錳離子中形成相同的電子自旋方向，在快速的藉由硫回到原位，因此導致整個 MT 的 β -cluster 中具有相同的電子自旋方向而產生弱鐵磁性。

第二種為分子內超自旋互換作用(intramolecular superexchange interactions)一般來說此現象是用來形容在低溫下有微小的分子團簇結構，因為在沒有熱擾動的干擾下，分子內部的交互作用會就為明顯，使的分子內部的電子自旋方向相較於在一般常溫下，較容易改變為同一方向，使的再分子團簇結構形成長程且有序的磁性序列 (long range magnetic order ,LRMO)。目前已確定會有此種現象可以形成分子磁鐵的分子團簇有 Fe₁₉, [18] Mn₄Br, [19] Mn₄Me, [20] and Fe₁₄. [21]，這些分子團簇在低溫下均會產生 LRMO 使的這些分子團簇形成分子磁鐵。

由於本實驗所製作的磁性蛋白存在著少量的錳，我們推斷在低溫下，因為熱擾動的干擾減小，使的在蛋白中的錳離子有了分子內超自旋互換作用 (intramolecular superexchange interactions) 雖然無法形成 LRMO，但是還是使的電子自旋方向相同，導致我們的蛋白質分子具有了弱點磁性，形成單分子磁鐵。

此外，在一般的有機物中或是蛋白質並不具有鐵磁性，經過此實驗參雜金屬離子後便具有弱鐵磁性的特性，此特性的分析也是透過對於磁性分析有高靈敏度的 SQUID 所證實，為了增加實驗的確定性，本實驗也使用過不同研究單位的 SQUID 進行量測分析，其結果都相互雷同，因此對於此弱鐵磁性的特性更加確定。

2. 磁性蛋白質 Mn,Zn-MT-GFP 的螢光性現象：

事實上本實驗一開始希望研究磁性與螢光之間是否會有不同的交互作用，或是在不同的外加場底下，因為同時具有磁性以及螢光的樣品是否會因為外加場的感變而感變螢光顏色。但是很不幸的，本實驗為了要將金屬製換入蛋白中必須改變酸鹼度，在改變酸鹼度後 GFP 變得不再發光，所以便先專注的先將磁性蛋白完成，分析其特性，此磁性蛋白比起利用鎘所製作的磁性蛋白毒性上相對的低了許多，在操作以及製作的過程中降低了實驗的風險，對於未來研究磁以及光的交互作用有很大的幫助。

另外我們推測會導致 GFP 不發亮的原因有兩個，其一，因未改變了酸鹼度等至 GFP 被破壞無法正常的進行螢光發亮。一般而言 GFP 在 pH5.5 到 pH12 的範圍均可保有較佳螢光強度，小於 pH4 及高於 pH12 會有螢光失活現象發生。但是此推論存在著少數不符合的樣品，當在大量製備磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 並且實驗參數都固定時，在冷凍乾燥後，有時會有存在著少量還具有螢光的 Mn,Zn-MT-GFP 磁性蛋白，但這些量都非常的微小，所以無法進行 SQUID 磁性量測的實驗因此無法證明可以發光的樣品是否具有磁性。

其二，本實驗室在未將 MT 接上 GFP 前希望可以降低磁性蛋白的毒性，所以也曾經有嘗試著利用錳鋅參雜來代替錳鎘參雜，但是一直都失敗，最後經過本實驗，發在若是利用已經接上 GFP 的 MT 來參雜錳以及鋅離子便可以成功製造出磁性蛋白，因此推斷 GFP 在此可能扮演了穩定結構的重要角色，當樣品一旦參雜成功後便會具有鐵磁性的現象，但卻會失去螢光的能力，若是樣品參雜失敗，則樣品不再具有鐵磁性反而具有螢光的能力。

3. 利用穿隧式電子顯微鏡 Transmission Electron Microscope (TEM)進行蛋白質結構模擬:

先將本實驗室以前研究之磁性蛋白質 Mn,Cd-MT 假設結構(圖 48、圖 49)輸入至模擬軟中，設定加速電壓設為 200KeV、一個 unit cell 的 A、B、C 分別設為 192 Å、177 Å、44 Å。將模擬完的繞射環與實驗室以前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖進行比對，比對後發現模擬完的繞射環與實驗室以前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 繞射圖大部分的繞射圖形都與實驗互相符合，但是若是只有圖像還不夠精準，因此我們將實驗所得到的繞射圖利用軟體開啟再轉成 dm3 檔後，叫出訊號強度來與模擬圖進行進一步的對比(圖 50)。



C.-C. Chang et al. / Biochemical and Biophysical Research Communications 340 (2006) 1134–1138

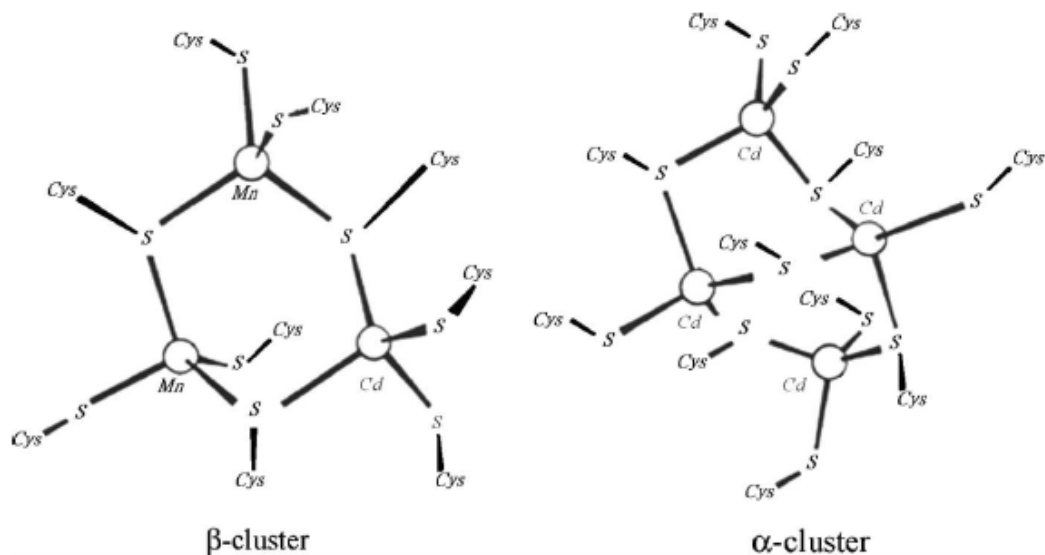


圖 48 Mn,Cd-MT 假設結構示意圖

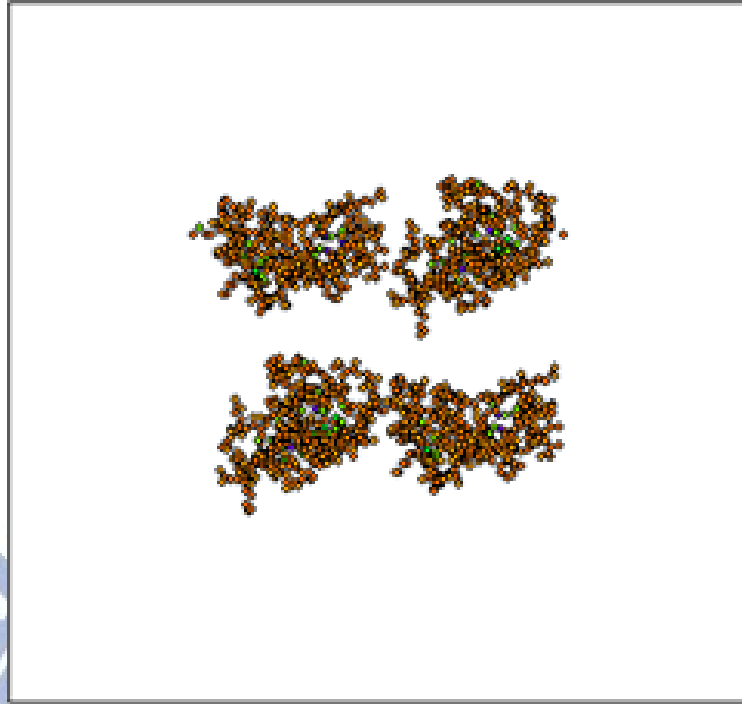


圖 49 在一個 unit cell 中 Mn,Cd-MT 模擬的結構排列圖

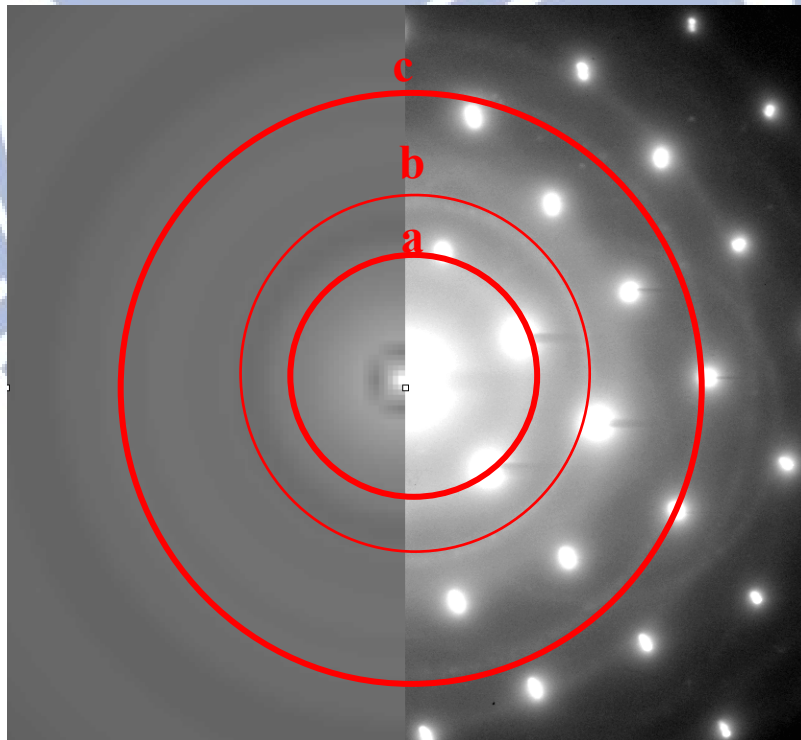


圖 50 Mn,Cd-MT 模擬取得的繞射圖與實驗比對圖

比對後發現分別在圖上 a 以及 c 的繞射環對比可以很清楚的看到是相互符合的，代表我們所模擬的結構與實際上的結構一致，因此我們更能進一步推斷，此實驗所用的 Mn,Zn-MT-GFP 在 Mn,Zn-MT 部分的結構會與我們所設定的理想結構相似，另一方面也確定了本實驗室以前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的結構即為我們所模擬的結構(圖 46)。

經由上述實驗後我們也將本實驗所製作的磁性蛋白 Mn,Zn-MT-GFP 利用 TEM 所拍攝到的繞射圖形(圖 51(c)拿來與實驗事先前所製作的 Mn,Cd-MT 磁性蛋白 TEM 繞射圖形(圖 51(b))進行對比，對比結果如圖 51(a)將兩張圖重疊後發覺此兩張圖形的繞射環也是相互符合的，其中更可以清楚的看到 Mn,Zn-MT-GFP 磁性蛋白繞射圖形中的繞射點，與 Mn,Cd-MT 繞射圖形中的繞射環是相互重合，因此我們推斷 Mn,Zn-MT-GFP 磁性蛋白的在一個 unit cell 中的結構如圖 52 所示，其中綠色部分為 GFP 綠螢光蛋白，黃色的部分為 MT 金屬硫蛋白，紅色圓形代表在金屬硫蛋白中的錳離子，藍色的圓形代表在金屬硫蛋白中的鋅離子。

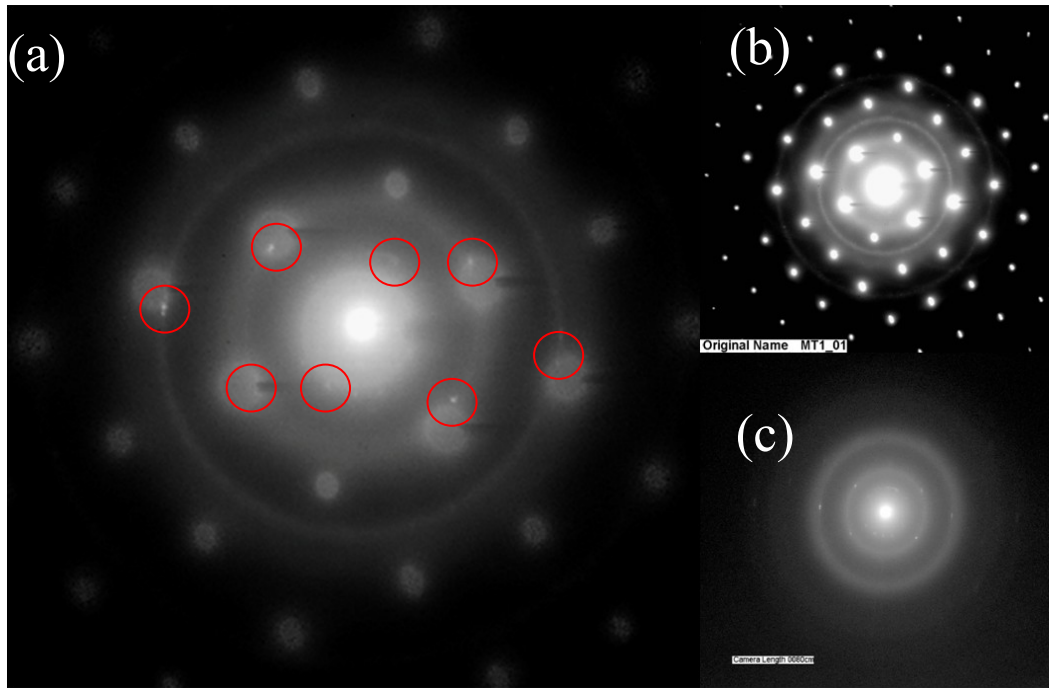


圖 51 Mn,Zn-MT-GFP 以及 Mn,Cd-MT 繞射對比圖 圖(a) Mn,Zn-MT-GFP 以及 Mn,Cd-MT 繞射對比圖，紅色處為 Mn,Zn-MT-GFP 繞射點與 Mn,Cd-MT 繞射環重疊處 圖(b)實驗室先前製作的磁性蛋白 Mn,Cd-MT 的 TEM 電子繞射圖，基板為矽基板圖 圖(c) Mn,Zn-MT-GFP TEM 電子繞射圖

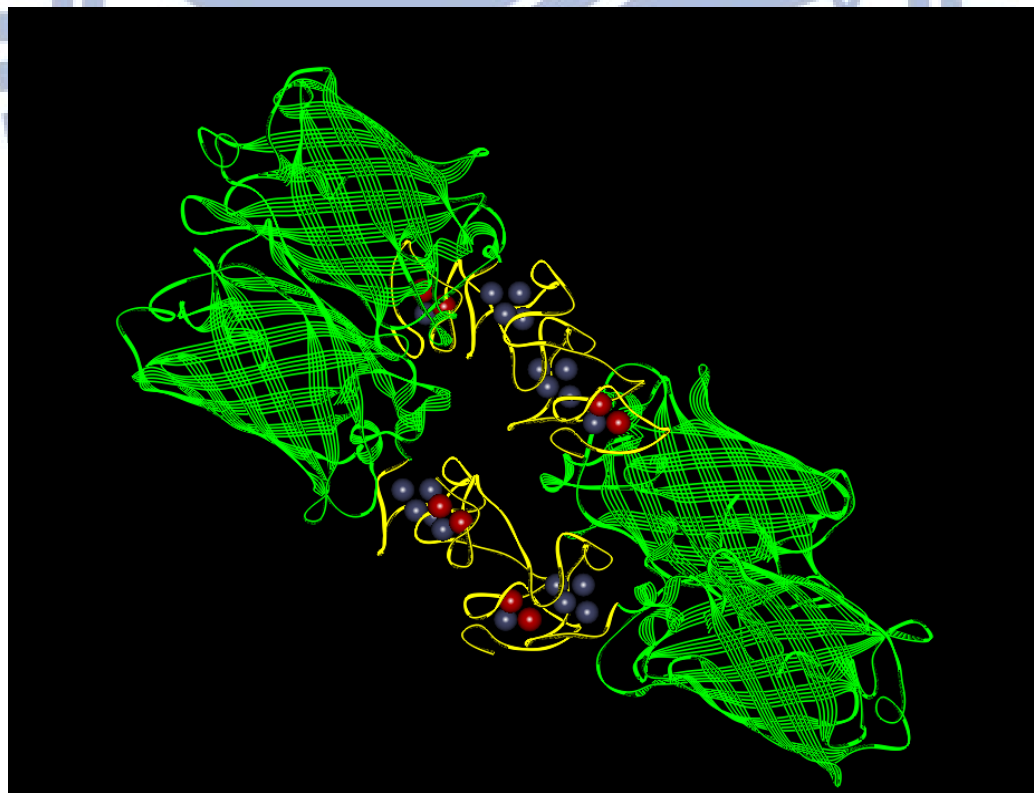


圖 51 Mn,Zn-MT-GFP 在一個 unit cell 中的結構圖，綠色部分為 GFP 綠螢光蛋白，黃色的部分為 MT 金屬硫蛋白，紅色圓形代表在金屬硫蛋白中的錳離子，藍色的圓形代表在金屬硫蛋白中的鋅離子。

結論:我們發現 MT 蛋白質本身具有金屬鍵結基團，並利用其金屬鍵結基團參雜金屬後，成功的讓此蛋白質具有磁性，並此鐵磁性的性質已經藉由對磁性具有高靈敏度的超導量子干涉磁量儀證實在 10k 以及 300k 具有弱鐵磁性。在結構方面，我們同時利用穿隧式電子顯微鏡 (TEM) 以及同步輻射光源的 X 光近緣結構 (X-ray Absorption Near-Edge Structure) 及延伸 X 光吸收精細結構 (Extended X-ray Absorption Fine Structure) 雙管齊下進行分析。藉由 TEM 的影像、繞射圖形以及結構分析後，可以初步的確認本實驗所假設的結構與事實上的結構相距不遠，更透過 X 光近緣結構以及延伸 X 光吸收精細結構瞭解到我們所參雜進入蛋白中的金屬離子的價態以及其周圍的原子種類以及配位數，也更加證實我們所假設的結構更加完整。在未來的實驗以及應用中，提供了不一樣的結構解析方法，此弱磁性物質更能進一步的被應用再弱磁性感測元件中或是利用磁性藥物移動方向以及位置等。而對照組所產生的順磁性化合物有更進一步的實驗，有機會可以應用在 MRI 對比劑上。

第六章 參考文獻

1. Rose, G. D.; Fleming, P. J.; Banavar, J. R.; Maritan, A. A backbone-based theory of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(45), 16623-16633.
2. Edelman, J. B.; Denton, M. J. The uniqueness of biological self-organization: challenging the Darwinian paradigm. *Biology and Philosophy* **2007**, 22, 579-601.
3. Bühlner R. H.; Kägi J. H. Human hepatic metallothioneins. *FEBS Lettes* **1974**, 39, 229-234.
4. Romero-Isart, N.; Vasak, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, 388-396.
5. Viarengo A.; Ponzano E.; Dondero F.; Fabbri R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* **1997**, 44, 69-84.
6. Nielson K. B.; Winge D. R. Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J Biol Chem.* **1985**, 260(15), 8698-8701.
7. Margoshes M.; Vallee B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79(17), 4813-4814.

8. Chang C. C.; Lee S. F.; Sun K. W.; Ho C. C.; Chen Y. T.; Chang C. H.; Kan L. S.
Mn,Cd-metallothionein-2: a room temperature magnetic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006**, 340(4), 1134-1138.
9. J. Furdyna and J. Kossut (eds.), *Semiconductor and Semimetals*, Vol. 25, Academic, New York (1988).
10. J. Kossut and W. Dobrowolski, in: Buschow, K. H. J. (Ed.), *Handbook of Magnetic Materials*, Vol.7, North-Hoolland, Amsterdam (1993).
11. T. Baron, S. Tatarenko et al., *Appl. Phys. Lett.*, Vol.65, pp.1284-1286 (1994).
12. A. Haury, A. Wasiela et al., *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 79, pp.511-514 (1997).
13. D. Ferrand, J. Cibert et al., *J. Cryst. Growth*, Vol.214/215, pp.387-390 (2000).
14. 胡裕民 物理雙月刊 (廿六卷四期) 2004 年 8 月
15. 黃迪靖 物理雙月刊 (廿五卷五期) 2003 年 10 月
16. Akai H. Ferromagnetism and its stability in the diluted magnetic semiconductor, *Phy.Rev. Lett* **1998**, 81, 3002-3005.

17. Belesi M.; Borsa F.; Powell A. K. Evidence for spin-wave excitations in the long-range magnetically ordered state of a Fe₁₉ molecular crystal from proton NMR. *Physical Review* **2006** B 74, 184408.
18. Affronte; M. Lasjaunias J. C.; Wernsdorfer W.; Sessoli R.; Gatteschi D.; Heath S. L.; Fort A.; Rettori A. *Phys. Rev. B* 66,064408,2002.16. HAKAI: Ferromagnetism and its stability in the diluted magnetic semiconductor in, *mnas, Phy. Rev. Lett* **1998**, 81, 3002-3005.
19. Yamaguchi A.; Kusumi N.; Ishimoto H.; Mitamura H.; Goto T.; Mori N.; Nakano M.; Awaga K.; Yoo J.; Hendrickson J.; Christou G., Ferromagnetism and its stability in the diluted magnetic semiconductor in, *mnas, Phy. Rev. Lett.* **1998**, 81, 3002-3005.
20. Evangelisti M.; Luis F.; Mettes F. L.; Aliaga N.; Aromí G.; Alonso J. J.; Christou G.; de Jongh L. J. *Phys Rev Lett.* **2004**, 93(11), 117202.
21. Evangelisti M.; Candini A.; Ghirri A.; Affronte M.; Brechin E. K; L. McInnes E. J.. Tunable dipolar magnetism in high-spin molecular clusters. *Phys Rev Lett.* **2006**, 97(16), 167202.
22. 陳燕玲、陳逸民 科學發展 2009 年 8 月，440 期. 60-64
23. 蕭世裕 科學發展 2009 年 8 月，440 期. 66-71

24. Martin C. Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, 62, 651-656.
25. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. In World Scientific. Edited by; 1006.
26. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* **2005**, 217, 3-15.
27. Coleman R. Jellyfish, fluorescent proteins, Nobel Prizes and pioneers in histochemistry. *Acta Histochemica* **2010**, 112(2), 113-117.
28. Inouye S.; Tsuji F. I. Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett* **1994**, 351(2), 211-214.
29. Shimomura O.; Johnson F. H.; Saiga Y. Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence. *Science* **1963**, 140, 1339-1340.
30. Takahashi A.; Camacho P.; Lechleiter J. D.; Herman B. Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews* **1999**, 79, 1089-1125.

31. Inouye S.; Ogawa H.; Yasuda K.; Umesono K.; Tsuji F. I. A bacterial cloning vector using a mutated *Aequorea* green fluorescent protein as an indicator. *Gene* **1997**, 189(2), 159-162.
32. Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67, 509-544.
33. Ishimura Y.; Nozaki M.; Yamamoto S.; Shimizu T.; Narumiya S.; Mitani F. (Ed). Oxygen and life: oxygenases, oxidase, and lipid mediators *Elsevier Science Health Science* **2002**.
34. Schultz C. Fluorescent Revelations. *Chemistry & Biology* **2009**, 16, 107-111.
35. Orm M.; Cubitt A. B.; Kallio K.; Gross L. A.; Tsien R. Y.; Remington S. J. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* **1996**, 273, 1392-1395.
36. Pakhomov A. A.; Martynov V. I. GFP family: Structural insights into spectral tuning. *Chemistry & Biology* **2008**, 15, 755-764.
37. William W. W.; Hugh J. P.; Amy F. R.; Chris W. C.; Sue C. R. Spectral perturbations of the *aequorea* green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, 35, 803-808.

38. Ward W. W.; Bokman S. H. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein, physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* **1982**, 21, 4535-4540.
39. Zimmer M.. Green Fluorescent Protein (GFP):Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 759-782.
40. Pakhomov A. A.; Martynov V. I. GFP family: Structural insights into spectral tuning. *Chemistry & Biology* **2008**, 15, 755-764.
41. Shimomura O.; Frank H.; Yo Saiga J. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, 59, 223-239.
42. Matz M. V.; Lukyanov K. A.; Lukyanov S. A. Family of the green fluorescent protein: Journey to the end of the rainbow. *Whitney Laboratory, University of Florida, St Augustine, USA.* **2002**, 24, 953-959.
43. Shaner N. C.; Steinbach P. A.; Tsien R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Method* **2005**, 2(12), 905-909.

44. 茹炳根，潘愛華，黃秉乾等·金屬硫蛋白〔J〕。生物化學與生物物理進展，1991，18(4): 254.
45. Kagi J. H. R.; Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **1988**, 27, 8509-8515.
46. Palmiter R. D. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 8428-8430.
47. Ceratto N.; Dondero F.; van de Loo J. W.; Burlando B.; Viarengo A. Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2002**, 131(3), 217-222.
48. Beattie J. H.; Wood A. M.; Trayhurn P.; Jasani B.; Vincent A.; McCormack G.; West A. K. Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines and zinc. *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2000**, 278, R1082-1089.
49. Kameo S.; Iwahashi H.; Kojima Y.; Satoh H. Induction of metallothioneins in the heavy metal resistant fungus *Beauveria bassiana* exposed to copper or cadmium. *Analisis*. **2000**, 28, 382-385.

50. 姜芳馨，「MTGFP 融合蛋白摺疊過程中分子內螢光能量轉移研究」，碩士論文，國立交通大學生物醫學研究所，新竹(2009)
51. Chang C. C.; Huang P. C. Semi-empirical simulation of Zn/Cd binding site preference in the metal binding domains of mammalian metallothionein. *Protein Engineering Design and Selection* **1996**, 9, 1165-1172.
52. Duncan K. E. R.; Ngu T. T.; Chan J.; Salgado M. T.; Merrifield M. E.; Stillman M. J. Peptide Folding, Metal-Binding Mechanisms, and Binding Site Structures in Metallothioneins. *Experimental Biology and Medicine* **2006**, 231, 1488-1499.
53. Furey W. F.; Robbins A. H.; Clancy L. L.; Winge D. R.; Wang B. C.; Stout C. D. Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Science* **1986**, 231, 704-710.
54. Braun W.; Vasak M.; Robbins A. H.; Stout C. D.; Wagner G.; Kagi J. H. R.; Wuthrich K. Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal-structure of rat metallothionein-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, 10124-10128.
55. Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2005**, 19(1), 13-17.

56. Binz P.A.; Kagi J.H.R.. Metallothionein: Molecular evolution and classification. In 4TH International Metallothionein Meeting (MT-97). *Edited by Klaassen CD. Kansas City, Mo: Birkhauser Verlag Ag; 1999:7-13.*
57. Cherian M. G.; Jayasurya A.; Bay B. H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research* **2003**, 533, 201-209.
58. Mizzen C. A.; Cartel N. J.; Yu W. H.; Fraser P. E.; McLachlan D. R.. Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1996**, 32(2), 77-83.
59. Pountney D. L.; Vasák M.. Spectroscopic studies on metal distribution in Co(II)/Zn(II) mixed-metal clusters in rabbit liver metallothionein 2. *European Journal of Biochemistry* **1992**, 209(1), 335-341.
60. Butt T. R., Ecker D. J. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1987**, 51(3), 351-364.

61. Shuja R. N.; Shakoori A. R.. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Molecular Biology Reports* **2009**, 36(3), 549-560.
62. Grill E.; Winnacker E. L.; Zenk M. H. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, 84(2), 439-443.
63. Hidalgo J.; Penkowa M.; Espejo C.; Martinez-Caceres E. M.; Carrasco J.; Quintana A.; Molinero A.; Florit S.; Giralt M.; Ortega-Aznar A. Expression of Metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer Disease and Animal Models of Neuroinflammation. *Experimental Biology and Medicine* **2006**, 231(9), 1450-1458.
64. Chapman G. A.; Kay J.; Kille P. Structural and functional analysis of the rat metallothionein III genomic locus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1999**, 1445, 321-329.
65. Orihuela R.; Domenech J.; Bofill R.; You C.; Mackay E. A.; Kagi J. H. R.; Capdevila M.; Atrian S. The metal-binding features of the recombinant mussel *Mytilus edulis* MT-10-IV metallothionein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13, 801-812.

66. Boulanger Y.; Goodman C. M.; Forte C. P.; Fesik S. W.; Armitage I. M.. Model for mammalian metallothionein structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, 80, 1501-1505.
67. P.-A. Binz J.H.R.K.. Classification of Metallothionein. **2003**.
68. Coyle P.; Philcox J. C.; Carey L. C.; Rofe A. M. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Science*. **2002**, 59, 627-647.
69. Kramer K. K.; Liu J.; Choudhuri S.; Klaassen C. D. Induction of Metallothionein mRNA and Protein in Murine Astrocyte Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1996**, 136, 94-100.
70. Palumaa P.; Tammiste I.; Kruusel K.; Kangur L.; Jörnvall H.; Sillard R. Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2005**, 1747, 205-211.
71. Davis S. R.; Cousins R. J. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *Journal of Nutrition* **2000**, 130, 1085-1088.

72. Auslander M.; Yudkovski Y.; Chalifa-Caspi V.; Herut B.; Ophir R.; Reinhardt R.; Neumann P.; Tom M. Pollution-Affected Fish Hepatic Transcriptome and Its Expression Patterns on Exposure to Cadmium. *Marine Biotechnology* **2008**, 10, 250-261.
73. Domitrović R.; Jakovac H.; Grebić D.; Milin Č.; Radošević-Stašić B.. Dose- and Time-Dependent Effects of Luteolin on Liver Metallothioneins and Metals in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Biological Trace Element Research* **2008**, 126, 176-185.
74. Davis S. R.; Cousins R. J. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *Journal of Nutrition* **2000**, 130(5), 1085-1088.
75. Kagi J. H. R.. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* **1991**, 205, 613-626
76. Uchida Y.; Takio K.; Titani K.; Ihara Y.; Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* **1991**, 7(2), 337-347.
77. Kagi J.H.R.: Evolution, structure and chemical activity of class-I metallothioneins - an overview. *In 3rd International Conference on Metallothionein Dec; Tsukuba, Japan, Edited by Suzuki KT, Imura N, Kimura M: Birkhauser Verlag: 1992:29-55.*

78. Koropatnick J.; Dale S.; Zalups R.. Metallothionein and Innate Activation of Primary Human and Mouse Monocytes. *In Trace Elements in Man and Animals* 10. Edited by; **2000**:47-50.
79. Miles A. T.; Hawksworth G. M.; Beattie J. H.; Rodilla V.. Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2000**, 35(1), 35-70.
80. Haq F.; Mahoney M.; Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* **2003**, 533(1-2), 211-226.
81. Palumaa P.; Tammiste I.; Kruusel K.; Kangur L.; Jörnvall H.; Sillard R. Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta* .2005, 1747(2), 205-211.
82. Rising L.; Vitarella D.; Kimelberg H. K.; Aschner M.. Cadmium chloride (CdCl₂)-induced metallothionein (MT) expression in neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Research* **1995**, 678(1-2), 91-98.

83. Erickson J. C.; Masters B. A.; Kelly E. J.; Brinster R. L.; Palmiter R. D. Expression of human metallothionein-III in transgenic mice. *Neurochemistry International* **1995**, 27(1), 35-41.
84. Masters B. A.; Kelly E. J.; Quaife C. J.; Brinster R. L.; Palmiter R. D. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91(2), 584-588.
85. Masters B.A.; Quaife C. J.; Erickson J. C.; Kelly E. J.; Froelick G. J.; Zambrowicz B. P.; Brinster R. L.; Palmiter R. D. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *Journal of Neuroscience* **1994**, 14(10), 5844-5857.
86. Quaife C. J.; Findley S. D.; Erickson J. C.; Froelick G. J.; Kelly E. J.; Zambrowicz B. P.; Palmiter R. D.. Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs during Differentiation of Stratified Squamous Epithelia. *Biochemistry* **1994**, 33(23), 7250-7259.
87. Gardiner, D. J. Practical Raman spectroscopy. Springer-Verlag. **1989**, ISBN 978-0387502540.
88. Mads Facius Lilbaek. Raman spectroscopy in photonic crystal bers December 7, **2007**
89. 楊鴻昌 物理雙月刊 (廿四卷五期) 2002 年 10 月

90. 國立虎尾科技大學電子工程系吳添全助理教授/國立彰化師範大學洪連輝教授 約

瑟夫效應的應用 (The application of Josephson effect)

91. 鮑忠興、劉思謙 近代穿透式電子顯微鏡實物, 2010 年 5 月

92. 楊宗燁、林鴻明、吳泉毅、林中魁, 物理雙月刊 (廿三卷六期) 2001 年 12 月

93. Stern E.A.; Sayers D.E.; Lytle F.W., *Phys. Rev* **1975**, B 11(12), 4836 .

94. Yeukuang Hwu.; Tung C. Y.; Lin H. M.; Moog G. M.; Goh W. C.; Lin C. K.; Cho T. S.
and Je J. H. *Engineering Chemistry & Metallurgy* **1999**, 20, 451-456.

95. Tung C. Y.; Lin H. M.; Gu J. M.; Lee P. Y. *Nanostructured Materials* **1997**, 9, 117-120

96. Batas B.; Schiraldi C.; Chaudhuri J. B. Inclusion body purification and protein refolding
using microfiltration and size exclusion chromatography. *Journal of Biotechnology* **1999**,
68(2-3), 149-158.

97. Carrió M. M.; Villaverde A.. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is
reversible. *FEBS Lett.* **2001**, 489(1), 29-33.

98. Brieler F. J.; Grundmann P.; Fröba M.; Chen L.; Klar P. J.; Heimbrod W.; Krug von
Nidda H. A.; Kurz T.; Loidl A. Formation of Zn_{1-x}Mn_xS Nanowires within Mesoporous
Silica of Different Pore Sizes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(3), 797-807.

99. Chang C. C.; Sun K. W.; Lee S. F.; Kan L. S. Self-assembled molecular magnets on patterned silicon substrates: Bridging bio-molecules with nanoelectronics *Biomaterials*.

Biomaterials **2007**, 28, 1941–1947.

100. Laurent S.; Forge D.; Port M.; Roch A.; Robic C.; Vander Elst L.; Muller R. N.

Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization,

Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications *Chem. Rev.*

2008, 108, 2064–2110

