

電場對蛋白質(Hen Egg White Lysozyme)晶體成長機制以及形貌的影響

Crystal Growth Mechanism and Morphology of Hen Egg White Lysozyme

under Electric Field.

研究 生：李姿玲

Student : Tzu-Ling Lee

指導教授：吳耀銓

Advisor : YewChung Sermon Wu

國 立 交 通 大 學

材料科學與工程研究所



Submitted to Department of Materials Science and Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Materials Science and Engineering

July 2004

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

電場對蛋白質(Hen Egg White Lysozyme)晶體成長機制以及形貌的影響

研究生：李姿玲

指導教授：吳耀銓博士

國立交通大學材料科學與工程研究所碩士班

摘要

為了瞭解蛋白質結構與功能的對應關係，以及根據蛋白質結構設計新藥物的開發，以 X-ray 繞射方法得到其結構是達成此目的的第一步。而其中 X-ray 繞射的瓶頸又在於難以得到足夠大且結構完美的生物巨分子晶體。各類關於生物巨分子結晶的研究－包括實驗操作以及原理推論兩部分－也因應而生。使生物巨分子晶體學從 80 年代早期起成為獨立的研究學門。

1999 年始有團隊開始研究電場對於生物巨分子結晶的影響。本實驗利用微影製程於矽晶圓上設計一小尺寸系統，觀察 Hen Egg White Lysozyme (HEWL) 分子在外加電場下的結晶狀況，以光學顯微鏡(Optical Microscopy)和原子力顯微鏡(AFM)，分別得到巨觀形狀和微觀形貌的影像，與一般無電場條件下所得之結晶不同之處如下所列，並於文中嘗試推測所列結果的形成機制。

巨觀上，相較於無電場條件下所得之結晶，外加電場條件下所得之結晶具有以下特徵：

1. pH~4.6 時，相較於一般條件下未達飽和度無結晶出現的現象；外加電場的系統下，即使在

整體溶液未達飽和，也有結晶在陰極析出。2.外加電場系統中所得之 HEWL 晶體形狀上較一般 Tetragonal 形式之 HEWL 結晶多出一未知平面。3.外加電場系統中 HEWL 晶體之[-110]方向有沿著電場方向排列的趨勢。

在微觀上，相較於一般無電場條件下所得之結晶，外加電場下所得之 HEWL 結晶{110}面上之 step 除沿[-110]方向排列外，同時也存在沿[001]方向排列的 step。



Crystal Growth Mechanism and Morphology of Hen Egg White Lysozyme under Electric Field

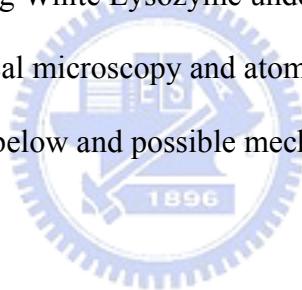
Student : Tzu-Ling Lee

Adviser: Dr. Yew-Chung Sermon Wu

**Department of Materials Science and Engineering
National Chiao Tung University**

ABSTRACT

This experiment use lithography and etching to fabricate a device on Si wafer to manipulate and observe the crystal growth of Hen Egg White Lysozyme under external electric field. Image and morphology were taken by both optical microscopy and atomic force microscope. The difference with respect to normal growth is list below and possible mechanisms are proposed in the text.



Macroscopically, the crystal growth in external electric field shows the following characteristics:

1. At pH~4.6, crystals precipitate near cathode even when the solution is undersaturated.
2. An unknown face appears on the crystal of the tetragonal form HEWL crystal.
3. The [-110] direction of the HEWL crystal appears to be align with the electric field.

Microscopically, besides steps parallel to [-110] direction that is also observable on the crystal without external electric field, there exist steps parallel to [001] direction under electric field.

第二章 前言

首先要感謝指導教授吳耀銓老師，給我機會挑戰這樣新興的題目。一個人要從選定題目、實驗設計到整個實驗的執行和討論委實不易，但因此碩士班所學得的東西比我想像多很多。實驗過程之中要感謝楊裕雄老師在實驗設計之前提供建議；李志偉老師、黃仁清老師提供原子力顯微鏡的協助；呂宗育、周重光兩位同學在他們自己課餘的時間能夠撥空跟我討論；還有林其慶學弟在專題期間跟著我忙東忙西；以及實驗室的諸位學長同學們，平常的照顧和幫忙，才得以讓我得到現有的結果。

當然最重要還是要感謝我親愛的爹娘，扶養他們女兒到二十幾歲，還在我最後寫論文時期提供生活上完全的支持。

一個實驗的開始實在很不容易，在這期間受到許多人的幫忙也讓我學到許多處理事情的方法。目前實驗已有階段性的成果，歸功於大家的協助，不管這個實驗能否繼續承傳，我想開始一項新研究的好奇心和做實驗應俱備的嚴謹性都更應該承傳下去。

目錄

第一章 摘要.....	1
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第二章 前言.....	4
第三章 文獻回顧.....	12
3-1 蛋白質結晶.....	12
3-1-1 簡介.....	12
3-1-2 常用方法簡介.....	15
3-1-2-1 Vapor Diffusion.....	16
3-1-2-2 Batch Method.....	18
3-2 蛋白質結晶的成長機制以及其他物理參數導入的影響.....	19
3-2-1 成核.....	20
3-2-1-1 量測儀器.....	21
3-2-1-2 成核機制.....	21
3-2-2 成長.....	22
3-2-2-1 量測儀器.....	22
3-2-2-2 成長機制.....	24
3-2-2-3 成長機制 – 以 hen egg white lysozyme 為例.....	27

3-2-2-3 導入物理參數的影響.....	32
3-2-2-4 關於本文實驗.....	37
第四章 實驗設計及流程.....	38
4-1 結晶.....	38
4-2 原子力顯微鏡(AFM)檢測.....	40
第五章 實驗結果.....	44
5-1 溶解度.....	44
5-2 由光學顯微鏡(OM)所得之照片.....	45
5-2-1 一般狀態下所得之晶體巨觀形狀.....	45
5-2-2 外加電場下所得之晶體巨觀形狀.....	46
5-2-3 電流導通時所得之晶體巨觀形狀 → 意外的發現.....	47
5-3 由原子力顯微鏡(AFM)取得之數據.....	50
5-3-1 一般狀態下所得之晶體微觀形貌.....	50
5-3-2 外加電場下所得之晶體微觀形貌.....	51
5-4 小結.....	53
第六章 結果討論.....	54
6-1 電位及電場在水溶液中之分布情形.....	54
6-2 成核.....	57
6-2-1 陰極附近溶液與氧化層的界面(50~100nm)，直接受電場影響	

的分子.....	57
6-2-2 遠離溶液與氧化層的界面(距界面 100nm 以上的)的 HEWL 分子.....	59
6-2-3 小結.....	59
6-3 成長.....	62
6-3-1 由 OM 所觀察得到 HEWL 晶體巨觀形狀上的變.....	62
6-3-2 由 AFM 所觀察得到 HEWL 晶體微觀形貌上的變化.....	71
第七章 結論.....	73
第八章 展望.....	74
參考資料.....	75



圖目錄

圖 3-1 hanging drop 示意圖.....	16
圖 3-2 Linbro plate.....	17
圖 3-3 過飽和度與巨分子晶體成長的關係圖.....	20
圖 3-4 成核數目與驅動力關係圖.....	21
圖 3-5 dense fluid 示意圖.....	22
圖 3-6 原子力顯微鏡裝置示意圖.....	23
圖 3-7 原子力顯微鏡操作模式.....	24
圖 3-8 晶體成長模式整理.....	24
圖 3-9 Growth Sites(step 以及 screw dislocation 上的 kink 位置).....	25
圖 3-10 HEWL 晶體巨觀形狀.....	27
圖 3-11 過飽和度對 HEWL 晶體各 facet 成長速度的影響.....	28
圖 3-12 HEWL 晶體表面微觀形貌.....	29
圖 3-13 HEWL 晶體{110}分子結構圖.....	30
圖 3-14 以蛋白質分子表示 HEWL 晶體{110}鍵結圖.....	31
圖 3-15 HEWL 表面 dangling bond 分佈示意圖.....	31
圖 3-16 晶體成長反應步驟圖.....	32
圖 3-17 反應決定步驟與晶體品質的影響.....	33
圖 3-18 以平行金屬板蛋白質結晶系統外加電場之裝置示意圖.....	35

圖 3-19 電場下析出 HEWL 結晶在溶液中之分佈圖(光學顯微鏡).....	36
圖 4-1 實驗流程圖.....	39-40
圖 4-2 AFM 試片架設裝置示意圖.....	41
圖 5-1 不同析出劑濃度下所對應的溶解度.....	44
圖 5-2 無外加電場下所得 HEWL 之 OM 影像.....	45
圖 5-3 有無外加電場 HEWL 晶體巨觀形狀比較圖.....	47
圖 5-4 外加電流時所得 HEWL 晶體之 OM 影像.....	48
圖 5-5 外加電流時所得 HEWL 晶體之連續 OM 影像.....	49
圖 5-6 無外加電場時 HEWL{110} 上之 AFM 影像.....	50
圖 5-7 外加電場時 HEWL{110} 上之 AFM 影像(1).....	51
圖 5-8 外加電場時 HEWL{110} 上之 AFM 影像(1)局部放大.....	51
圖 5-9 外加電場時 HEWL{110} 上之 AFM 影像(2).....	52
圖 6-1 35V，鄰近界面部份，HEWL 溶液中電位的變化.....	55
圖 6-2 35V，鄰近界面部份，HEWL 溶液中電場的變化.....	55
圖 6-3 100V，鄰近界面部份，HEWL 溶液中電位及電場的變化.....	56
圖 6-4 電場(電位)在溶液中的分佈示意圖.....	56
圖 6-5 有無外加電場下，擴散之化學位能示意圖.....	57
圖 6-6 隨距離改變，電場誘導 HEWL 產生偶極的能力.....	58
圖 6-7 外加電場下，溶液中分子受各類作用力示意圖.....	61

圖 6-8 有無外加電場時, HEWL 晶體巨觀形狀比較示意圖.....	62
圖 6-9 未知平面(x0z)示意圖.....	63
圖 6-10 外加電場下 HEWL 晶體成長過程示意圖.....	66
圖 6-11 高過飽和度之 HEWL 晶體之巨觀形狀 OM 影像以及示意圖.....	68
圖 6-12 有無外加電場時，各平面形成之能障以及自由能差比較示意圖.....	69
圖 6-13 HEWL 晶體{110}面之分子鍵結以及有無外加電場時表面形貌比較示意圖.....	71



表目錄

表 5-1 不同外加電場下所得 HEWL 之 OM 影像 46

表 5-2 有無外加電場與電流所得之 HEWL 晶體，巨觀和微觀上的特徵比

較 53

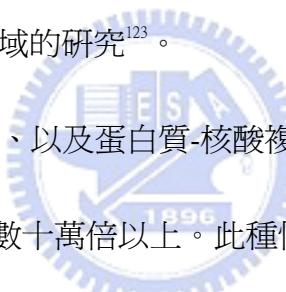


第三章 文獻回顧

3-1 蛋白質結晶

3-1-1 簡介

蛋白質是建構所有生物體的基本單位，而且是活體系統中能量和訊息傳遞過程中(information and energy processing)必備的構成要素。為了瞭解基因組(genome)對應於蛋白質(可能是未知性質的一連串胺基酸或是核苷酸(nucleotide)序列)的“結構-功能”關係、探討巨分子如何在一個生物系統中作用，甚至是新藥物(抑制劑)的開發，而開啓了近年來在蛋白質結晶這領域的研究¹²³。



不同蛋白質、核酸(nucleic acid)、以及蛋白質-核酸複合物(complex)的數量，相較於已知無機物可能組成的相(phase)，可能是數十萬倍以上。此種情況造成我們至今無法以定量的方式預測一種新的生物巨分子的結構或是結晶狀況²。另一方面，雖然逐漸進步的核磁共振(NMR)技術正提高可接受蛋白質分子尺寸的上限；以繞射方法，包括：X-ray、電子以及中子繞射，仍然是現今檢測蛋白質結構的主流⁴。

與一般無機材料不同的是蛋白質的結晶中還納入了溶液中大量的水分子、離子以及少量的中性分子²，而且晶體中蛋白質巨分子互相接觸用以穩定晶體結構的鍵結，比起一般無機物或是簡單有機物複合物的結晶顯得相對脆弱且為數稀少，且晶體之中存在大量不規則排列的溶質通道，由於以上原因，使得在 X-ray 繞射圖形下才會發現，即使巨觀上看起來是各晶面整齊漂亮的蛋白質晶體，實際上並不一定是高度組成以及結構統一之巨分子秩序排列的晶體

³。為了提高解析度至 $1.5\text{~}2\text{\AA}$ ⁴，X-ray 等各類繞射方法需要足夠大(通常是 $0.3\text{~}1.3\text{mm}$)、低缺陷、高組成統一，以及結構統一的單晶。目前蛋白質的表達(expression)、純化、檢測儀器發展以及繞射數據的電腦分析系統，都有快速的成長以提高解(solve)蛋白質結構的速度。最大的瓶頸惟獨存在於：製備高品質的蛋白質晶體以提供 X-ray 繞射的素材^{3,4}。

在結晶的過程之外，許多生物化學或是生物醫學方面的研究，常常受限於因為無法完全透視蛋白質成核成長的機制而窒礙難行。例如在藥物釋放方面，因為晶體較為緩慢的溶解速率，可以達成較穩定長時間藥物治療的目的，已被使用在胰島素和其他蛋白質藥物上⁴。在這方面的需求上，體積大且等體積而數量少的晶體能夠達成緩慢且穩定之溶解速率的要求，當然遠遠勝過體積較小而數量多的晶體。為了達成這樣的目的，需要縮短成核時間，並使所有晶體都於相同遞減的過飽和度下成長⁴。



其他結晶在生物醫學上相關的研究包括：在人體內因為蛋白質結晶或是其他規則性的固體聚集造成的疾病，例如鐮刀型貧血症以及白內障⁴；蛋白質工程以及合成疫苗的設計³。

蛋白質的分子大(幾個 nm)、成長速度慢(成長速率可以秒計算)，滿足於現今表面檢測工具的限制，可以直接檢測出成長實況。因此蛋白質晶體的成長，也為傳統基礎的晶體學和成長機制的研究提供理論或是實證上的貢獻⁴。

綜合以上各項因素，蛋白質結晶大約於 80 年代早期成為一門獨立的研究領域⁴。如前所述，受限於此系統龐大的複雜性，目前尚無方法可以預測一未知蛋白質可能的結構或是可能被結晶的狀況，除此之外由於生物性材料取得不易，只能以少量的方式進行研究等因素，使

得蛋白質結晶逐漸成為一門較偏向經驗性(empirical search)的學門，眾多回顧蛋白質結晶的文獻，常常以“蛋白質結晶是一門藝術而非科學…”作為開端³。而此經驗性的研究方法大致可分為兩步驟⁵：

1. 從錯誤中嘗試找到適當的溶液，使蛋白質能夠結晶而不是非晶質的析出物。
2. 調整溶液的比例和濃度，使晶體長到適合的大小，足以提供 X-ray 繞射檢測結構。

雖然以目前的狀況看來，從嘗試錯誤中個別找出適合不同蛋白質的結晶條件，似乎能達到較佳的結晶效率。但是如何將蛋白質結晶在藝術之外，真正納入科學可以接受的領域？部分相信，實驗結果顯示，由於蛋白質結晶是一種過於龐雜的過程和系統，很難歸納出有系統的基本原則；然而近十年來，眾多研究開始著重於各情況下成核以及成長機制的推演。在眾多研究中，推衍出一個合理的規則系統，才是這些方法背後迫切需要³而且最終應該達成的目的。深度的理論研究和實驗技術上操作的同時並進，才能真正促成一門學問的發展與演進²。

在蛋白質成長機制的研究中，以 Hen Egg White Lysozyme (HEWL)作為實驗材料者，佔有相當顯著的比例^{4 6}。HEWL 這種糖類的水解酵素，是最早利用 X-ray 解出結構的蛋白質之一⁷。除了因為長期的研究使得這個蛋白質累積相較於其他種類蛋白質為多的實驗經驗和參數外，不少實驗已證實以 HEWL 為基礎所推衍出的成長機制適用於其他廣大範圍的蛋白質⁴。HEWL 也常使用於蛋白質 folding dynamic 以及其他蛋白質相關的基礎研究中⁴。

本實驗的目的是觀察在外加電場環境下，蛋白質晶體成長機制的變化—以 HEWL 為例。在接下來的章節中，本文將陸續回顧蛋白質晶體各類技術上的成長方法，以及現今所知的結

構、成長機制和檢測技術，接著導入本實驗進行的流程設計。

3-1-2 常用方法簡介

與一般傳統的結晶方式相同，要開始蛋白質結晶的第一步驟即是使溶液中的溶質濃度達到足夠的過飽和度。當溫度、pH 值或其他因素改變時，巨分子靜電特性、表面型態以及結構都可能隨之改變，同時也影響蛋白質溶液的溶解度。除了溫度和 pH 值，蛋白質結晶系統中另外一個較為常用的參數是析出劑(precipitant)。析出劑通常是鹽類或高分子：鹽類會跟蛋白質競爭水分子；高分子，如 PEG (polyethylene glycol) 會在溶液中與水作用，逐漸擴大體積而迫使水中的巨分子擠在一起，在其他條件相同的狀況下，使蛋白質溶液的濃度提高。基本的巨分子結晶方法就是在定溫下調控 pH 值以及嘗試找出可能的析出劑，不斷的試驗之中，慢慢降低溶解度，提高巨分子濃度，以達到足夠的過飽和度。

目前可用以結晶巨分子的方法如下所列：

1. Bulk Crystallization
2. Batch Method
3. Evaporation
4. Bulk Dialysis
5. Concentration Dialysis
6. Microdialysis
7. Liquid Bridge
8. Free Interface Diffusion
9. Vapor Diffusion
10. Sequential Extraction
11. pH-Induce Crystallization
12. Temperature-Induced Crystallization
13. Crystallization by effector addition

一般最常使用且成功率最高的兩者為 2. Batch Method 以及 9. Vapor Diffusion。在本小節中僅就此兩方法的原理、操作方法以及優缺點作一介紹。

3-1-2-1 Vapor Diffusion

Vapor Diffusion 是目前最廣為使用的方法，適合用來篩檢(screen)大量、不同溶液的各類結晶情形，從中選取適合的溶液，再加以調整濃度，成長出可以用來做 X-ray 繞射試驗大小的晶體。

Vapor Diffusion 依支撐液體方式的不同可分為 hanging drop、sitting drop 以及 sandwich。右圖 3-1 所示為 hanging drop。

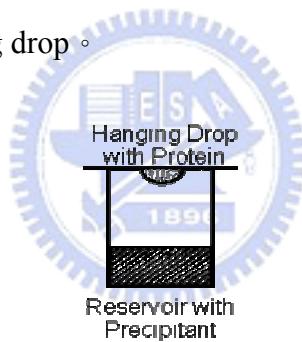


圖 3-1 C_{drop} (圖中 drop 的濃度)不能達到足以析出結晶的過飽和度。且 $C_{\text{析出劑 in drop}} < C_{\text{析出劑 in reservoir}}$ 。因蒸汽壓隨鹽類析出劑的濃度增加而降低，所以液滴中的水氣會逐漸揮發(液滴中的析出劑濃度一定相對 reservoir 為高)，直到最終系統內液滴和 reservoir 的蒸汽壓達到平衡。驅使液滴發生過飽和現象。(C: concentration)

雖然支撐方法不同，但這三種方式的基本原理是類似的。首先必須將固定 pH 值之緩衝溶液(buffer solution)內加入析出劑。析出劑和緩衝溶液的混和溶液稱為 reservoir。如上圖 3-1 所示。希望結晶出現的液滴(drop)中可能由極小量的蛋白質溶液，reservoir，或是其他析出劑所組成，液滴內析出劑的量必須少於可以在溶液中析出蛋白質的量，也就是液滴濃度不能達到足以析出結晶的過飽和度。整個 vapor diffusion 的系統必須是密閉的，避免系統中的溶劑揮發，只准

許 reservoir 和液滴中的水或其他揮發性溶劑進行交換。因蒸汽壓隨鹽類析出劑的濃度增加而降低，所以液滴中的水氣會逐漸揮發(液滴中的析出劑濃度一定相對 reservoir 為高)，直到最終系統內液滴和 reservoir 的蒸汽壓達到平衡。這樣的過程激發了至少兩項行爲驅使液滴發生過飽和現象：

1. 提高液滴中析出劑的濃度。
2. 提高液滴中蛋白質的濃度。

以此原理在可商業取得的 Linbro plate (如下圖所示)的每個凹槽中，設計不

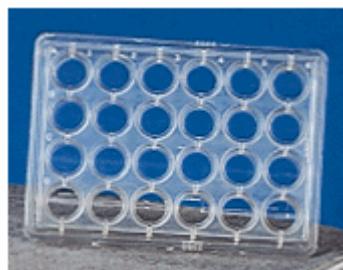


圖 3-2 Linbro plate。每個凹槽中，設計不同種類溶液混合的 reservoir，即可初步檢索出最適合於某種巨分子晶體生長的容易條件

同種類溶液混合的 reservoir，進行養晶實驗，即可初步檢索出最適合於某種巨分子晶體生長的容易條件。完成初步的檢索後，再微調溶液濃度，培養體積和品質足以使用於 X-ray 繞射的巨分子晶體。

但是在絕大多數的 Vapor diffusion 系統中，液滴和 reservoir 之間必定存在空氣，而當操作的液滴體積在幾個微升(micro Liter、uL)時，即使是少量的空氣也會使液滴中的水氣揮發，由於操作的速度快慢和其他人為因素影響，即造成了每次實驗的結果不一定能定量再現⁵。

3-1-2-2 Batch Method

Batch Method 是結晶和蛋白質晶體最古老的結晶法。此種方法的基本原理即是：直接把未飽和的蛋白質溶液混入析出劑。析出劑加入後會調整原來蛋白質溶液的濃度使巨分子達到足夠的過飽和度而析出成核。因為他的方便性，常用於設計觀察蛋白質晶體成長過程的影像攝錄裝置中，或是用於粒徑分析(light scattering)、干涉式光學顯微鏡(interferometric optical microscopy)、原子力顯微鏡 atomic force microscopy 等各類分析時的操作⁵。此法中所需的蛋白質溶液少則幾微升(uL)多則可達幾百毫升(mL)。小體積的 Micro Batch Method 為了避免水分揮發，常搭配礦物油的使用⁵。近期也發展出利用不同密度的礦物油將小體積液滴置於兩種不同密度的油之間，以懸浮不碰觸器壁的方式結晶。但此種方法不適用於需要緩慢地增加濃度以達到足量過飽和度的某些蛋白質。



此外，micro batch method 由於析出劑和未飽和之蛋白質溶液接觸時，立即造成蛋白質溶液濃度提高，故無論是將析出劑注入蛋白質溶液或是將後者注入前者混合時，微量分注器(micropipette)滴入的速度以及注入溶液分佈都有可能造成不同的局部過飽和狀況，導致同樣變因的不同組別實驗可能發現不同的成核數目或是晶體數目，此現象容易發生於低濃度的蛋白質溶液²，造成定量再現的困難。

本實驗中為了方便原子力顯微鏡的觀察，以及維持系統的密閉性，使用 Micro Batch Method 養晶，並配合礦物油的使用。

以上介紹兩種方法是目前最廣為使用且最有效率能取得蛋白質晶體的養晶方式。但是如前所述，此兩法成功地培養出蛋白質晶體基礎均憑依於實驗經驗，以及由嘗試錯誤所得到的

資訊之上。一門較為成熟的科學領域中，深度的理論探討和實驗技術理應是並進前趨的。另一方面，近十年來也有許多研究開始著眼於各物理條件對於巨分子晶體成長的影響，得利於其他現有的量測儀器的發展，同時觀察巨分子晶體的成長並歸納其機制。在下一節中，本文將回顧現今已建構之巨分子晶體成長機制，以及部分物理參數對巨分子晶體成長系統所帶來的影響。

3-2 蛋白質結晶的成長機制以及其他物理參數導入的影響

過飽和

溶質加入可使之溶解的溶劑之中，溶質即會在此環境下開始溶解，直到溶解進入溶劑之溶質的速率與由溶液析出之溶質速率相等。系統達到平衡的狀態，此時之濃度稱為此種溶質在此溶液以及其他此時之物理參數下的溶解度。溶質濃度低於溶解度稱為未飽和溶液(undersaturated)；若溶質濃度高於溶解度則稱為過飽和溶液(supersaturated)。本文定義之過飽和度為：溶液濃度(C) / 此條件下溶解度(C_s)

巨分子結晶學與一般傳統結晶學仍存在許多相似的地方：首先必須要達成過飽和的條件，使得成核得以發生，成核之後接著則是晶體的成長。下文將分節討論成核以及成長。

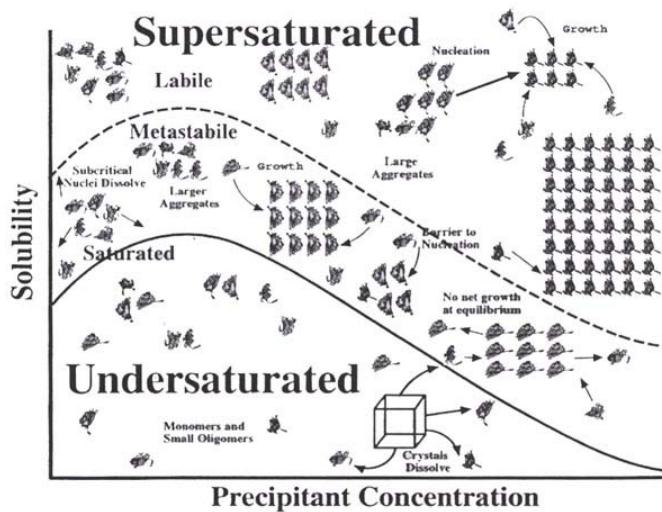


圖 3-3 過飽和度與巨分子晶體成長的關係圖⁵。橫軸為析出劑濃度，縱軸為飽和度。當溶液於未飽和狀態時($C/C_s < 1$)，不會有結晶析出；隨溶液濃度提高逐漸達到過飽和的狀態，始有成核與晶體成長的現象發生。

3-2-1 成核

溶質濃度必須超過飽和度為成核的必要條件之一。當驅動力(driving force)，此時為過飽和度)大到足以讓溶質析出而聚集，並可以繼續存在、或是成長成晶體，而不溶解回溶液中(成長所降低的自由能可以克服成長時體積增加造成表面增加所引發的自由能提高)，此時析出聚集之溶質稱為“核(nucleus)” ，溶質凝聚的過程稱為 “成核(nucleation)” 。

因為能取得高純度的生物巨分子材料數量較少，也較難成長出結構完美缺陷低的晶種(seed)。與一般成長半導體、金屬或是其他傳統晶體不同的是，巨分子結晶是由自發性(spontaneous)成核開始，而不是藉由晶種的引導成長²。又由前述架構於經驗法則上的養晶方式已可以得到好的晶體，目前的研究現況多專注於巨分子自動成核的事實，而不是如何造成這樣成核結晶的過程。如此對成核系統薄弱的了解與控制，也削弱了對整個結晶系統的控制：成核數目對應最後晶體的大小(核數目多，晶體較小)；又因為巨分子晶體的塑性(plasticity)較

差，成核時造成的缺陷將無法在續成長過成中彌補²。

3-2-1-1 量測儀器

成核時的動態分析多使用粒徑分析儀(static or dynamic light scattering)來進行^{5 8 9 10}。其原理為利用雷射光行經溶液中，粒子產生之散射造成的波程差，求得平均粒徑¹¹。應用在此，可以測得核的數目及平均大小。

3-2-1-2 成核機制

另外 1999 年 Galkin 和 Vekilov 發表的論文中¹²，將量測傳統成核速率的方法移植於蛋白質的成核過程。此種稱為“development”的方式，是將同條件的溶液至於同樣足夠大的過冷度(相關於過飽和度)下，持續不同時間(Δt_1 ，下圖 3-4 之橫軸)，再將溶液升高至某一特定溫度(此溫度因過冷度過小，以不足以誘發新的核產生)，使在方才高過冷度時產生的核尺寸得以生長至可觀察的大小。如下圖所示

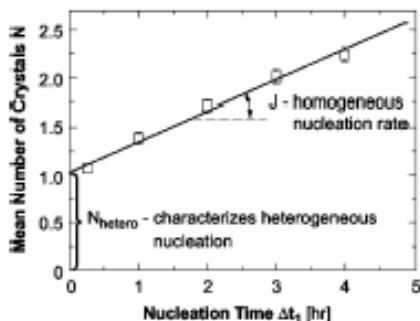
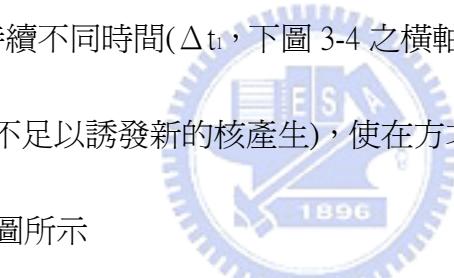


圖 3-4 成核數目 v.s. 在大過冷度下提供之成核時間(驅動力)。斜率為成核速率。(ref 11)

斜率即為成核速率(J)。在均質成核(homogeneous nucleation)的區域，成核速率與過飽和程度($\sigma=(C-S)/S$)的關係為 $J \sim \exp(-\text{const} \frac{\gamma^3}{\sigma^2})$ ，其中 C 為溶液濃度， S 為溶解度， γ 為晶體與溶液間之表面能(約 0.6mJ/m^2)。此與傳統之晶體學中成核速率相較¹³，得到類似的結果，均與正比

於 $\exp(\gamma^3/\sigma^2)$ ：其中 N_{hom} 為均質成核速率， ΔG_{hom}^* 為成核時所需越過的臨界自由能能障。

$$N_{hom} = f_0 C_0 \exp\left(-\frac{\Delta G_{hom}^*}{KT}\right)$$

$$\Delta G_{hom}^* = \left(\frac{16\pi\gamma_{SL}^3 T_m^2}{3L_v^2}\right) \frac{1}{(\Delta T)^2}$$

與傳統小分子結晶學不同的是，蛋白質或是其他巨分子溶液在成核前，液體中存有相分離 (liquid-liquid phase separation) 的現象，如圖 3-5¹⁴ 所示，

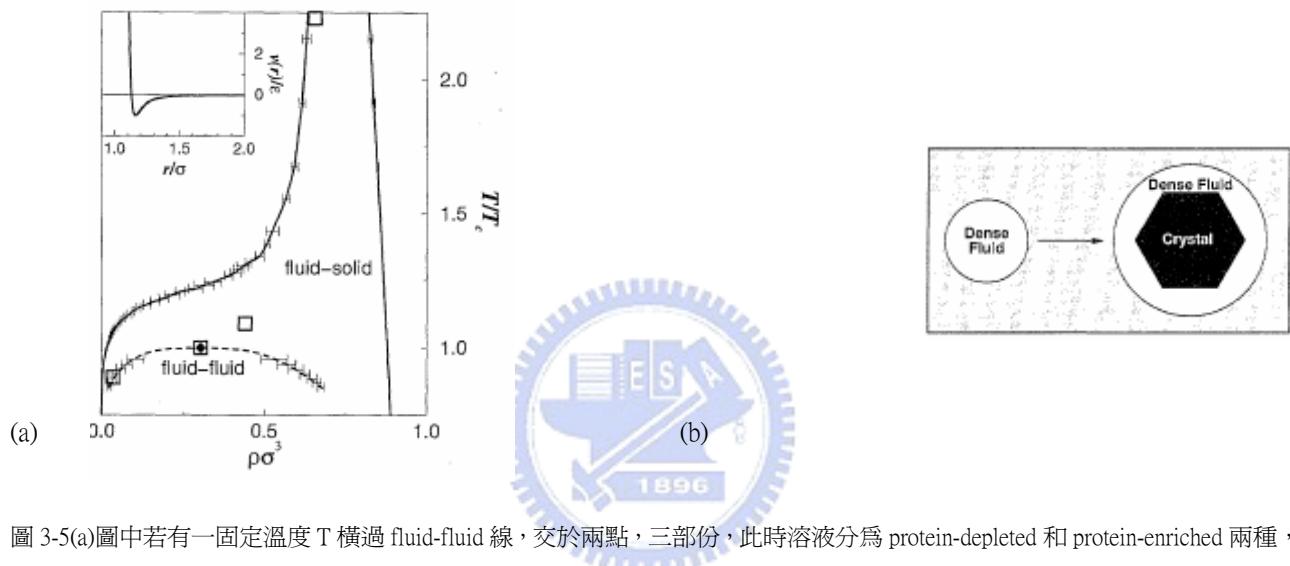


圖 3-5(a)圖中若有一固定溫度 T 橫過 fluid-fluid 線，交於兩點，三部份，此時溶液分為 protein-depleted 和 protein-enriched 兩種，即 liquid-liquid separation。(b)表示 dense fluid 的現象出現於成核前，並有助於晶體成長。

近年來的研究顯示，相分離中較溶質密集的溶液(dense fluid)可能在成核之前先形成，並有助於成核過程的發生^{3 14 15 16}。

3-2-2 成長

溶液中的溶質按一定秩序吸附於已穩定存在的核上，使晶體尺寸變大的過程稱為成長 (growth)。

3-2-2-1 量測儀器

相較於成核，成長時的晶體尺寸較大，影像也可利用現有的儀器觀察。由早期的光學顯微鏡(optical microscopy)^{17 18 19}，電子顯微鏡(electric microscopy)^{20 21}開始，至晚近被廣為使用的原子力顯微鏡 atomic microscopy^{8 22 23 24 25}和干涉式顯微鏡(interferometric microscopy)^{26 27 28 29}逐漸累積豐富的資訊可供參考。

干涉式顯微鏡

干涉式顯微鏡是利用表面高低不同，光程差可能造成相消或相加的效果成象。由於其可觀察範圍較大，遍及整顆晶體(數百 um)，常使用於觀察晶體成長速度(step rate)，下文將作較詳細解釋)以及成長動力學上的探討。

原子力顯微鏡

原子力顯微鏡利用試片表面高低不同時，探針尖端與試片表面原子間凡得瓦力作用也隨之改變的原理成像，使探針與試片表面距離(const. force mode / contact mode) 改變，

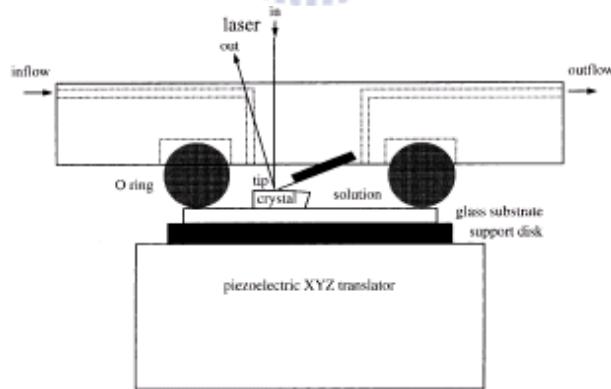


圖 3-6 原子力顯微鏡(AFM)在液態中檢測生物巨分子的裝置(ref.8)。當圖中探針掃過表面高低不同的區域時，打在探針上的雷射光束會隨之偏移，再由系統轉換成表面形貌的圖像。

或是探針與試片作用力(const. height mode/ non-contact mode)改變，由於巨分子晶體成長速度較慢(以秒為單位)，由 AFM 即時掃瞄的成像可以提供晶體成長過程中表面形貌的資訊；晚近

更有敲拍法(tapping mode)的發明，盡量減低了探針對試片物理性的傷害，又由於可在常溫常壓的空氣或是液態中進行觀察，更使原子力顯微鏡成為生物性樣本檢測上的利器⁸。

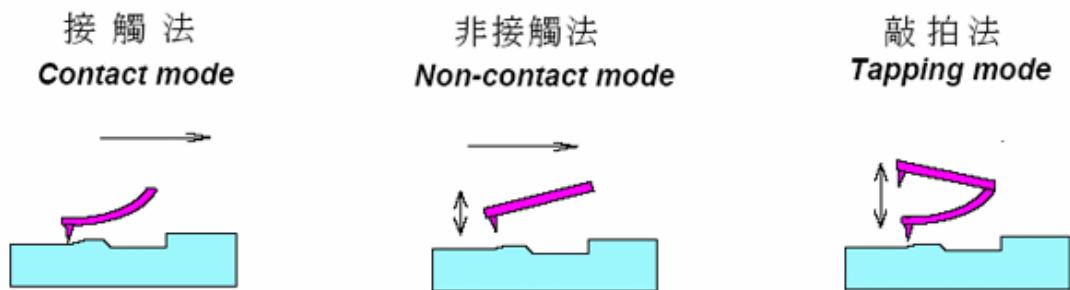


圖 3-7 三種原子力顯微鏡(AFM)的操作模式³⁰。接觸法時，探針直接接觸試片表面並施予一固定力，故探針將隨表面高低起伏。非接觸法時，探針與試片表面固定高度，依探針與試片表面作用力間接得到表面形貌。敲拍法時，探針以一固定頻率敲拍試片表面，得到表面形貌資訊。

3-2-2-2 成長機制



由目前的文獻資料得知，所有的晶體成長模式約可以下圖表示：

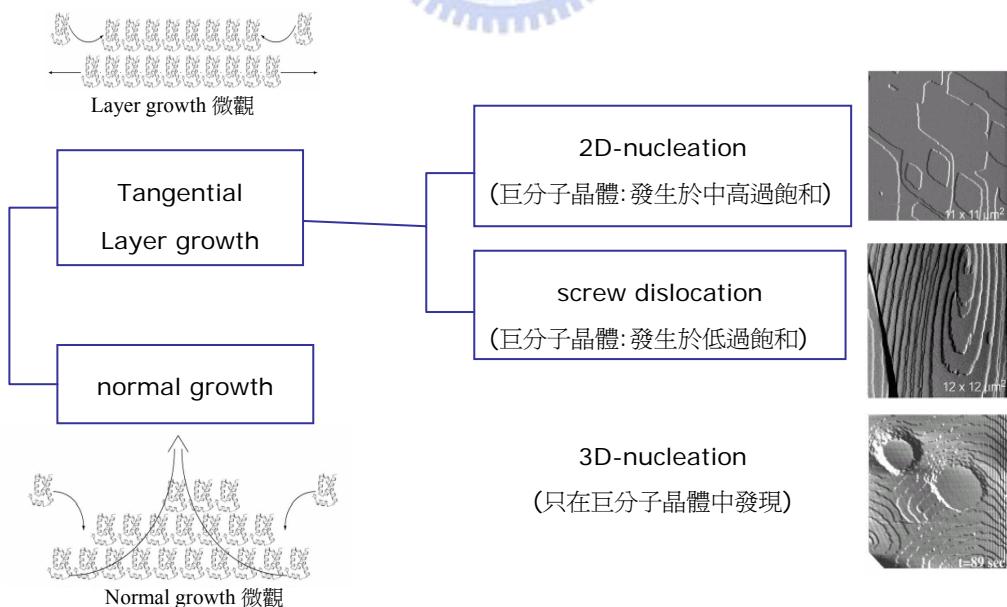
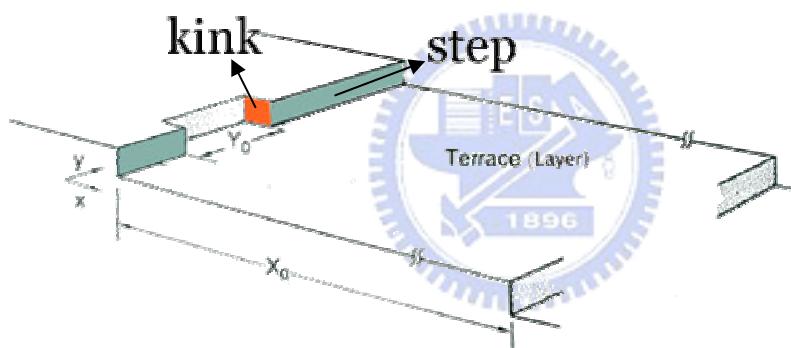


圖 3-8 晶體成長模式整理。右側照片以及左側微觀 2 圖片部分參照 Ref 8

無論是巨分子或是一般小分子晶體，當驅動力(例：過飽和度)小時，分子傾向以減少表面能的方式附著在 step 上 kink, step 的成長形成成整層 terrace/layer，表面相較於 normal growth 顯得相當平滑。

而一層 terrace/layer 可填充的位置若結束時，必須產生新的 step，其上有可讓分子繼續加入的位置才能讓晶體繼續成長，產生新的 step 方式有兩種：一是以 screw 的方式；另一則是 2D-nucleation 在拓展成新的 layer。實際上由原子力顯微鏡(AFM)所拍攝的照片如圖 3-6 圖最右所示。Step 上 kink 的位置以及 screw 上可提供的空缺如下圖 3-8 所示^{5 13}：

(a)



(b)

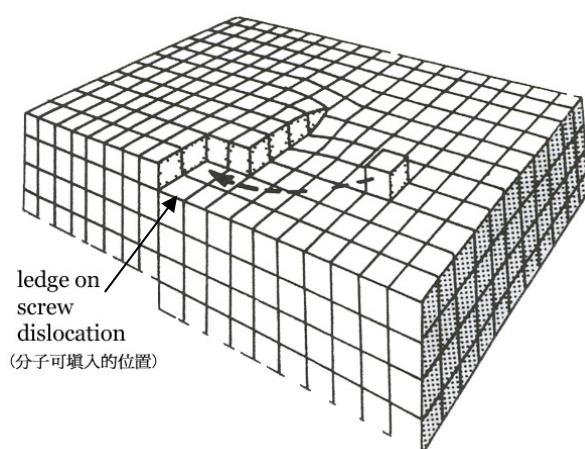


圖 3-9 (a)文中定義之 kink, step, terrace/layer 之相對關係如圖所示。當分子附著於 step 上的 kink 位置，造成 step 的成長，step 的成長則造成 terrace/layer 的完成，一層一層 layer 成長造就了晶體成長。(b) screw dislocation 上分子可填入的位置(圖:ref12)。

在尚未利用原子力顯微鏡拍攝微觀形貌的時期，即有文獻以光學顯微鏡(OM)所測得之巨觀成長速度推算蛋白質晶體之成長機制，以 lysozyme¹⁷ 為例：低過飽和度時的成長機制為依靠 screw dislocation 產生新的 layer；中高過飽和度時則以 2-D nucleation 的方式成長。類似的推算也運用於 canavalin¹⁸ 晶體。後來 AFM 的引入為前人提供了實證上的圖像資訊，而此種低濃度以 screw dislocation，高濃度憑藉 2-D nucleation 的成長模式亦可延伸套用於多數其他生物巨分子晶體上⁵。而所謂的 3-D nucleation 目前僅發現存在於少數生物巨分子晶體上，多為已有層狀(layer)結構的粒子直接附著於大的晶體上，而吸附上已有層狀結構(layer)的粒子將引導大晶體上新的 layer 的產生⁵⁸。

若驅動力大時，表面能容易被克服，晶體則以 normal growth 的方式成長，不需要憑藉 step 或是 kink。相較於 layer growth，這種有位置即可吸附的方式將使晶體表面顯得非常粗糙，成長速度也較快。但此種成長方式在目前關於生物巨分子晶體成長的研究中仍相當少見。

3-2-2-3 成長機制 – 以 hen egg white lysozyme 為例

前文中曾提到，由於 hen egg white lysozyme(HEWL)的取得和結晶容易，所以常用來做成長機制推演的模型，由此種酵素所推衍出的成長機制也廣為適用於其他種類的生物巨分子。本小節則以 HEWL 為範例由巨觀和微觀兩方面說明從低濃度到高濃度其成長機制的變化。

過飽和度(C/Cs)

根據文獻²¹，以 micro batch 方式要產生 HEWL 晶體之最低 $C/C_s = 1.25$ 。

HEWL 晶體巨觀形狀

以熱力學觀點，由各個 miller index 平面表面能所繪出之 γ -plot 可以知道：晶體最後的巨觀形狀將以表面能最低的面決定：動力學上，生長速度較緩慢的面將佔較大的存在面積，而生長較快速的面則會因逐漸消失而佔有較小比例的面積¹³。

由文獻可知，HEWL 晶體的{101}及{110}擁有相對較小的表面能²，於是光學顯微鏡(OM)可見之 HEWL 巨觀形狀如下圖 3-10 示，左側圖示為從{110}之俯視圖，右側為從{101}面之俯視圖，也就是左圖之側視圖。

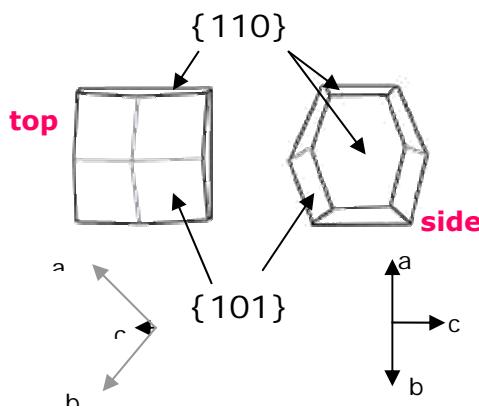


圖 3-10 HEWL 晶體巨觀形狀。{101}、{110}具有較低之表面能，為最後穩定存在的面。左側圖式為從{110}之俯視圖，右側為從{101}面之俯視圖，也就是左圖之側視圖。

由於{101}、{110}面受濃度影響程度不同，導致過飽和度變化時，晶體整體的巨觀形狀也有所不同。下圖為文獻中依過飽和度不同時，對 HEWL 晶體巨觀形狀變化所做的觀測¹⁷。

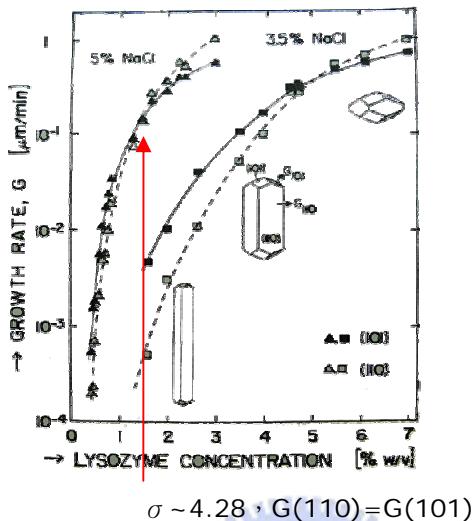


圖 3-11 {101}、{110}成長速度受過飽和度影響情形不同，濃度不同時，HEWL 巨觀形狀的變化。過飽和度低時，{101}成長速率較快；過飽和度高時，{110}成長速度較快(ref 16)。約在過飽和度 = 4.3 時 {101}與{110}之成長速率相同。

已知生長速度較緩慢的面將佔較大的存在面積，而生長較快速的面則會因逐漸消失而佔有較小比例的面積¹³。由圖中的資訊可以得知當過飽和度低時，{101}成長速率較快，由光學顯微鏡(OM)所觀察得到的晶體形狀，成長速率慢的{110}佔了大部份，而成長速率較快的{101}則佔有較小比例；過飽和度高時，{110}成長速度較快，成長速率慢的{101}佔有比例提高，而成長速率較快的{110}則變小。約在過飽和度， $\sigma = 4.3$ 時 {101}與{110}之成長速率相同。

HEWL 晶體表面微觀形貌

在微觀形貌(morphology)方面：低過飽和度時，成長依賴 screw dislocation 產生新的位置可供溶液中的 HEWL 分子附著⁵⁸，在較高的過飽和度時，2-D nucleation 的方式取而代之成為 kink 的提供者。如下頁圖示：

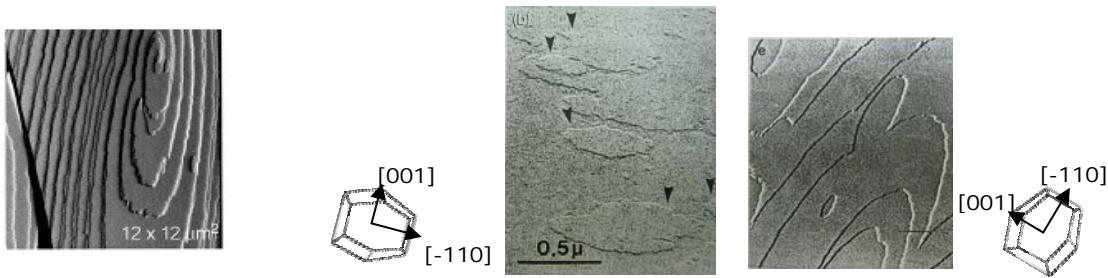


圖 3-12 左圖為低濃度時於 HEWL 晶體之 AFM 照片，以 screw dislocation 的方式成長(ref8)；中間及右邊則為較高過飽和度時{110}面的 TEM (ref20)與 AFM (ref 21)照片，晶體以 2D-nucleation 的方式成長，且 2D-nuclei 有沿著[-110]方向延長的現象(ref20)。

1. 圖 3-12 所示左圖為低濃度時於 HEWL 晶體之 AFM 照片，以 screw dislocation 的方式成長⁸；
2. 中間及右邊則為較高過飽和度時{110}面的 TEM²¹ 與 AFM²² 照片，晶體以 2D-nucleation 的方式成長。
3. 2D-nuclei 的高度是晶格常數的倍數通常為一個晶格常數高度，

(此處之 HEWL 皆視為 tetragonal 形式。space group : $P4_3212$; lattice parameter : $a=b=7.91\text{nm}$, $c=3.79\text{nm}$)

- {101} 上可約略測得一層 step 高度為沿 a 、 b 軸(垂直 4_3 軸)之晶格間距 = 7.91nm ; {110} 上可約略測得一層 step 高度為沿 c 軸(沿 4_3 軸)之晶格間距 = 3.79nm ²¹)，
4. 但如中間圖示，有時可見重疊的雙層 2D-nuclei，或是 layer 結構
 5. 且值得注意的是{110}上之 2D-nuclei 和 layer 有沿著[-110]方向延長的現象²¹。如中間圖和右圖所示。

為什麼{110}上之 2D-nuclei 和 layer 有沿著[-110]方向延長的現象？根據文獻推論²⁰，依據 Black 等人解出 tetragonal 形式的 HEWL 晶體結構⁷，要維持晶體的結構，一個 HEWL 最少需要四個半個鍵結²⁰(兩個相鄰分子的半鍵，形成一個完整的鍵結)：**X**，**Y**，以及兩個**Z**。

分別定義如下：

X：爲靜電力構成之鍵結，一個分子的 Lys 13 和另一個分子終端之 carboxyl group 產生鍵結。分子間彼此以 2-fold rotation axis 對應。

Y：第一個分子的 Asn39 and Gln41 與另一個分子之 Asp66, Gly67 以及 Cys80 形成氫鍵。分子間彼此以 2-fold 對應。

Z：Arg114 被同一個分子中之 Phe 34 與另一分子中之 Tyr23 包夾。此種鍵結因附近存在氫鍵而更穩定。兩分子間以 4-fold screw axis4 對應。

下圖爲參考 ref20 所繪之 HEWL 於{110}之分子鍵結情況：

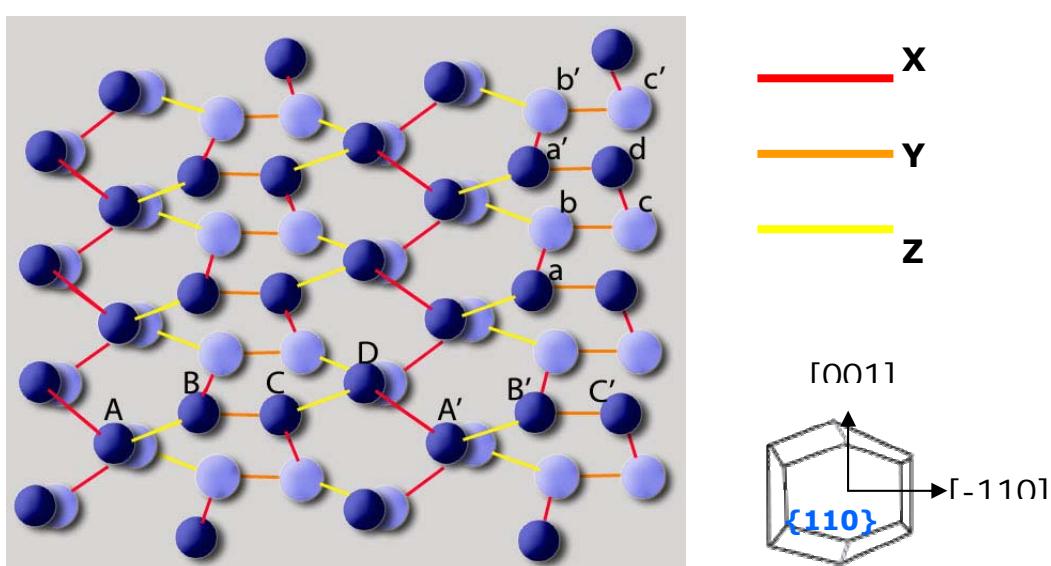


圖 3-13 左圖爲參考 ref20 所繪之 HEWL 於{110}之分子鍵結情況。右圖爲對應的平面以及方向。

根據上圖之兩層分子結構表示，淺藍色爲下層，深藍色爲上層，鍵結如圖右側所示。在{110}上若有往[-110]方向之 step，如圖中所示之 A-B-C-D；且沿[001]方向之 step 則爲 a-b-c-d 由 X, Y 鍵結交替形成之螺旋²⁰。

忽略 X、Y、Z 之外其他相對較弱之鍵結，Durbin 等人假設若鍵結涉及之範圍越大者越強，

依 Black 等人發表之結構，將是 $X < Y$ ； $X < Z$ ²⁰。又依照前述圖 3-9¹⁷所表示{101}與{110}依過飽和度不同生長速度受影響不同的結果，其人利用 Monte Carlo Method 模擬，得到結果如下，當鍵結能量：

$X < Y < Z$ 時，最能符合圖 3-12 中所顯示在{110}上之 step 有沿[-110]延伸，以及雙層之 2-D nuclei 以及 layer 結構²⁰。下圖為以蛋白質分子所表示之{110}鍵結情形，以不同 symmetry operation 對應之分子以不同顏色表示，圖中之 BCD 對應上圖 3-13 中之 BCD 分子²¹。

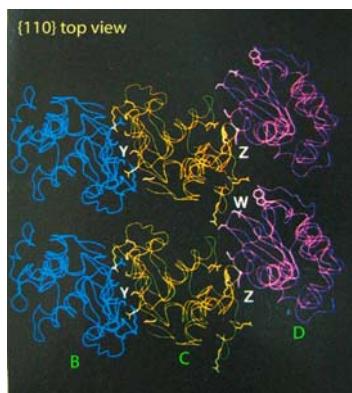


圖 3-14 蛋白質分子所表示之{110}鍵結情形，以不同 symmetry operation 對應之分子以不同顏色表示，圖中之 BCD 對應上圖 3-11 中之 BCD 分子²¹。W 為較弱之鍵結，以 2-fold 對應兩分子。

另外值得注意的是，{110}上層與層交替之 dangling bond 是 X+Y 與 Z 交替出現：一層全部都是 Z，或是一層之中兩列 X 兩列 Y，如右圖 3-15 所示。但由 Monte Carlo Method 模擬結果得知 $X < Y < Z$ ，故可以預測{110}上之 dangling bond 為兩列 X 兩列 Y，較符合實際可能發生之情形²⁵。

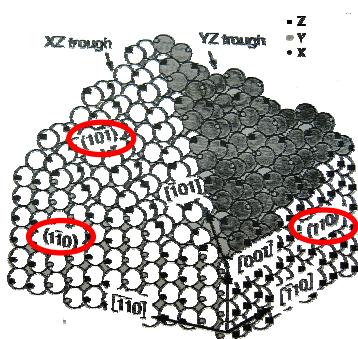


圖 3-15 {110}與{101}上 dangling bond 可能的分布狀況²⁰

結束以 HEWL 為例的晶體成長方面研究，回到一般狀況下，下一節將繼續討論當其他物理參數加入生物巨分子結晶系統時，對於晶體成長方面的影響。

3-2-2-3 導入物理參數的影響

反應決定步驟

前文提到，成長是溶液中的溶質分子加入已存在的核或是小晶體，使晶體體積擴展的過程。其中溶液中之溶質加入到已存在的核或晶體上時，大致可分為兩步驟，如下圖 3-16 示：

1. Transport：由溶液至接近晶體表面的區域，主要與擴散有關。
2. Kinetic：由接近晶體表面的區域加入到晶體上，調整適當的方位，成為晶體的一部份。主要與表面之化學反應有關，即與溶質在晶體中和溶液的化學位能差有關。

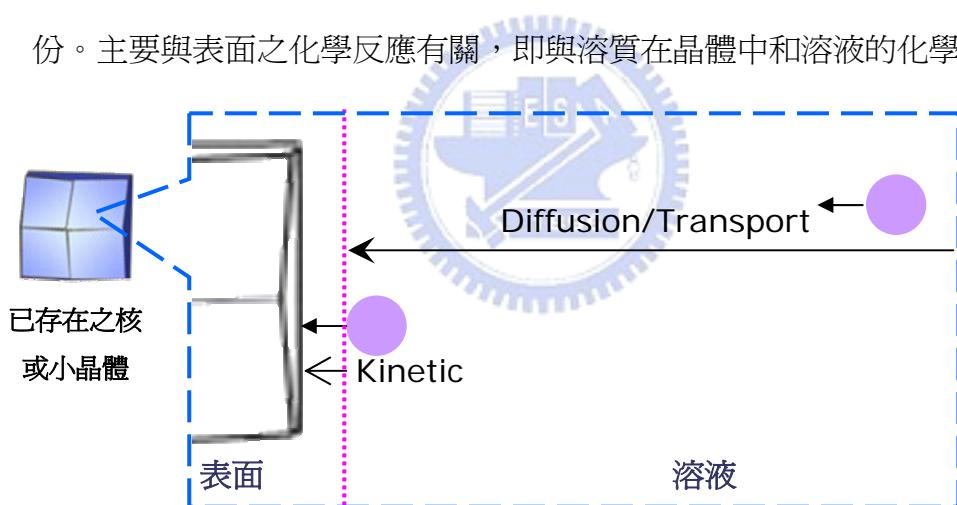


圖 3-16 溶質分子加入已存在的晶體，成長過程可分兩步驟：1. transport 2.kinetic 。速率慢的為反應決定步驟

成長過程中，速率慢的為反應決定步驟(control step)¹³。

由文獻可知，當反應趨向於某一種單一步驟控制時(transport control 或是 kinetic control)，能夠得到較好的結晶品質⁴⁵²⁶。如下圖示：

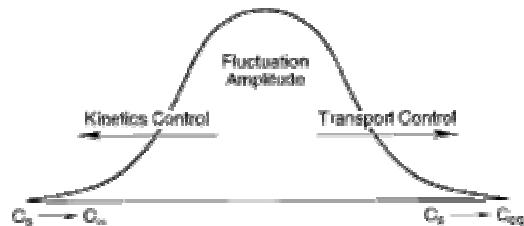


圖 3-17 溶液中之擴散步驟和靠近表面的反應，交互影響晶體成長的品質。當成長過程接近極右(完全是 transport /diffusion control)或是極左(完全 kinetic control)時，能夠達到最好的結晶品質。

當反應接近以下兩個狀態時，能夠得到品質較好的晶體：

1. 完全的 kinetic control，接近晶體表面的溶質濃度幾乎等於遠處溶液中的溶質濃度，意即擴散速度非常快，或是，

2. 完全的 transport/diffusion control，接近晶體表面的溶質濃度幾乎等於反應平衡濃度，意即表面反應速度快，一有溶質擴散過來即可加入晶體到達正確的方位和位置

換言之，若反應愈偏向於中間 transport / diffusion 和 kinetic mix control 時，得到晶體品質越差²⁶。

改變物理參數對反應決定步驟的影響

由希望得到較好品質的晶體，而將反應推向某單一的決定步驟來看，物理參數的改變，對此造成顯著的影響。

例如，在養晶系統外部加上幫浦，強制循環濃度固定的溶液¹⁷，即是將整個結晶矽統推向 kinetic control 的方向。另外，近年來相當熱門的研究方向：將整個養晶系統送上太空站。若由太空中的物體處無重力狀態觀之，在太空中進行養晶，對晶體成長的效果，可視為因減

少重力而減少溶液中擴散的現象^{26 29}，因此把整個系統的反應推向 transport / diffusion control 的一端。

但是由實驗結果顯示，相較於在一般重力狀態下，不同種類的生物巨分子晶體在外太空進行養晶實驗所得到的晶體品質優劣未趨向於一定。根據文獻推論，要解釋這樣的情形，首先必須計算在一般狀態下，某特定晶體是偏向由 kinetic control 或是 transport / diffusion control^{26 28}。

假若某生物巨分子 A 在一般重力，且無其他特殊物理參數介入的狀況下，其晶體成長反應是 transport / diffusion control，那麼，將此系統移至外太空進行實驗，將會得到更佳品質的晶體，因為外太空無重力系統使整個反應更推向 transport / diffusion control 的一端。

反之若某生物巨分子 B 在一般重力，且無其他特殊物理參數介入的狀況下，其晶體成長反應是 kinetic control，那麼，將此系統移至外太空進行實驗，則會得到相較於地球上品質為差的晶體 !! 因為外太空無重力系統將使整個反應更推向 transport / diffusion control，對於 B 系統而言，就是把整個反應推向圖 3-17 中所示之 mix control 的部份，反而使晶體品質變差。

其他物理參數的導入

除了上一節所提到的：強制溶液循環，或是減少重力影響之外，尚有許多針對改變物理參數所做的研究，例如：控制溫度，以達到小區域的局部過飽和¹⁸，觀察蛋白質的成核成長；或是研究磁場對於生物巨分子結晶所造成的影響，此項研究也促成了核磁共振(NMR)技術的進步⁵，發展出可在液態中量測蛋白質結構的方法。

在本節的最後將討論的物理參數是電場的加入。雖然 80 年代已有學者提出，利用電場穩

定提供小於解離能的能量，得到品質較佳之蛋白質晶體的想法³¹；也有文獻以靜電力的觀點討論生物巨分子間的作用力³²。但一直到晚近才有研究團隊開始真正著手實驗電場對生物巨分子結晶的影響。下一節本文將針對目前電場影響蛋白質結晶系統的結果做一介紹。

電場對蛋白質結晶系統的影響

由於蛋白質在不同 pH 值時，residue 解離程度不同，會帶有不同的電性。當 pH=pI 正負總帶電量相消，不帶電。pH<pI 時蛋白質分子總帶電量為正，反之則為負。

1999 年，M. Taleb 的團隊始發表第一篇關於電場對蛋白質結晶的研究成果³³。並以下圖的裝置進行外加電場的蛋白質結晶實驗：

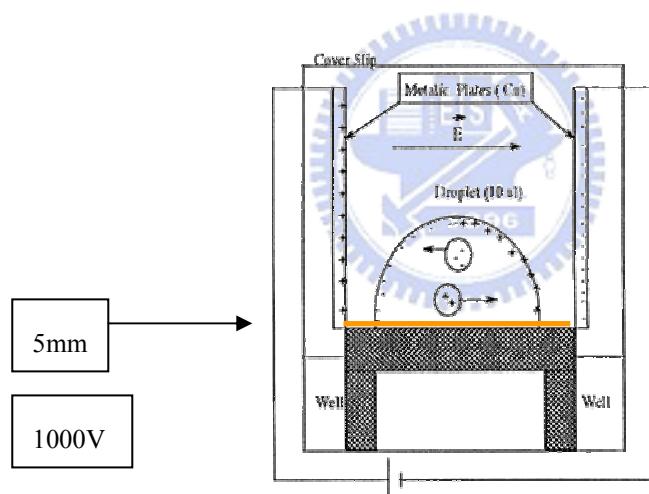


圖 3-18 所示為兩片相隔 5 毫米(mm)之平行金屬版，以 micro batch 的方式混合 pH=4.5，10ul 的 HEWL 溶液，且與金屬版間隔有空氣。施與系統 1000 伏特(V)的直流電壓

圖 3-18 所示為兩片相隔 5 毫米(mm)之平行金屬版，以 micro batch 的方式於 pH=4.5 混合 10ul 的 HEWL 溶液，且與金屬版間隔有空氣。施予系統 1000 伏特(V)，的直流電壓，意即造成 5000V/cm 的電場。

上述文獻所得之重要結論可分下列兩點：

- 由於 HEWL 的 pI~10.5，故 pH=4.5 時，HEWL 分子上約帶有 10~12 個正電，造成 HEWL 晶體陰極析出。以下為有外加電場與一般狀況下的光學顯微鏡(OM)照片比較：

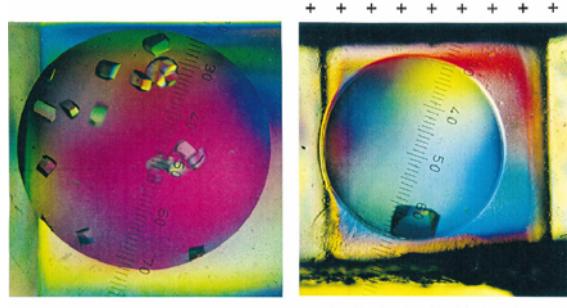


圖 3-19 左圖為無外加電場的正常狀況，HEWL 晶體散亂分佈於溶液中；右圖為有外加電場的系統，帶正電的 HEWL 晶體於陰極析出。

- 另一個重要結論則是：上述文獻由含有自由離子的介電材料遵守的 Poission-Boltzmann 方程式 ($\nabla(\epsilon\nabla\phi) - \epsilon\lambda^2 \sinh(\phi) = -4\pi\rho_{fix} / kT$)，計算出因為電雙層的屏蔽效應，電位能在水溶液中幾乎完全集中在靠近水溶液的邊緣，急速以的形式衰退。以一維的觀點，水溶液中央為圓點，其中 x 為水溶液中之任意位置， L 為水溶液和空氣接處的邊界， λ 為 HEWL 分子之德拜長度(Debye length)。

兩年後，同一組團隊又發表另一實驗結果：在外加電場下，pH=4.5，HEWL 尚未成核前，帶正電的 HEWL 分子將在陰極聚集，使得陰極之蛋白質濃度高於陽極，此實驗也說明了前述實驗中，HEWL 晶體是由於被吸引到陰極，形成局部過飽和才析出³⁴。

3-2-2-4 關於本文實驗

本實驗是利用黃光微影製程，於矽晶圓上設計小尺寸的溶液儲存槽，以及各式金屬電極，觀察在電場作用下，HEWL 晶體巨觀形狀以及微觀形貌的變化，以及不同電力線方向分布下，對於晶體成長方向的影響。

下一章將介紹本實驗的設計以及操作流程。



第四章 實驗設計及流程

4-1 結晶

結晶部分的實驗採用前述 micro batch 結晶法。分外加電場的實驗組以及不加電場之對照組，結果分別以光學顯微鏡觀察。實驗使用之溶液、裝置以及流程如下文敘述。實驗全程於室溫下進行。

溶液

- A. 0.1M PH=4.6 醋酸鈉水溶液
- B. 10% 氯化鈉溶於 0.1M PH=4.6 之醋酸鈉水溶液中
- C. 8% 及 20% HEWL 溶於 0.1M PH=4.6 之醋酸鈉水溶液中

裝置

為觀察電場對於 HEWL 晶體成長的影響，本實驗利用微影技術設計一可施加電場並可承載液體之裝置於矽晶圓上。並設計各類形狀的電極以觀察在不同電場分佈下，HEWL 晶體成長的變化情形。實驗裝置及流程如下頁圖示。

實驗流程



矽晶圓



以乾氧方式成長約 3000Å 之氧化矽薄膜



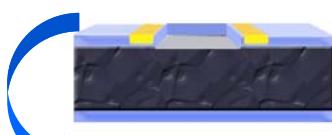
利用微影技術在氧化矽薄膜上定義溶液承載器皿的位置及大小(1.5mm 平方)。並利用乾式蝕刻法完成此蝕刻部分。



再次利用微影技術以及乾式蝕刻法定義金屬電極的位置

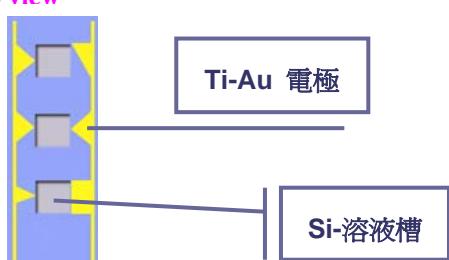


利用電子槍鍍覆不同形狀之鈦-金電極。且金屬電極與矽晶圓、與先前定義之溶液承載器皿之間皆留有氧化矽薄膜作為絕緣之用。



氧化矽上設計16 組不同形狀的電極，用來測驗不同電力線分布時，對晶體成長的影響

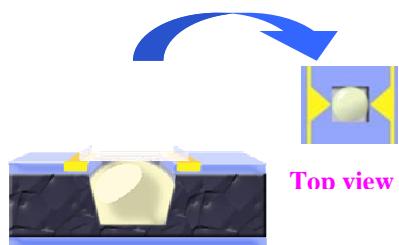
Top view



利用濕式蝕刻法完成一可施加電場並可承載液體之裝置的製作



採用 micro batch 結晶法。混合適量之醋酸鈉以及氯化鈉水溶液，加上等體積之 HEWL 水溶液。總體積約為 0.4 微升(uL)



將蓋玻片切成小塊並以丙酮清洗，蓋住溶液。



用礦物油封住玻璃片，避免水蒸氣揮發。

(不外加電場的對照組，結晶部分實驗到此告一段落，等待結晶。)



施加直流電場，等待結晶。



圖 4-1 實驗流程

4-2 原子力顯微鏡(AFM)檢測

目前雖有人提出生物巨分子成核機制與傳統結晶學之成核理論有所差異¹⁵，但是因為此理論尚未獲得廣泛的證實，在本文中不列為討論範圍。故不論一般傳統無機物或是生物巨分子的結晶過程，大致皆可分為成核和成長兩部分。成核部分難以由影像直接觀察，目前多以小角度 X-ray 散射⁸或是 Light scattering^{5 8 9 15}作為檢測方法。成長部分由於可在晶體表面可預測的位置進行觀察，原子力顯微鏡(AFM)在近年來已逐漸成為直接觀察生物巨分子成長及相關現象的有力工具⁸。關於原子力顯微鏡(AFM)在生物巨分子晶體檢測方面的文獻已於前一章節介紹，本小節將著重於本實驗中原子力顯微鏡(AFM)使用時有別於文獻的樣品準備方式以及操作。

樣品準備及數據收集

1. 加入礦物油於上述裝置中覆蓋第一部分取得的已存在結晶之溶液

雖然如 HEWL 一般的標準品已可由商業管道取得，但是一般蛋白質的取得仍須自經過自行純化的步驟，實屬得來不易。另外由文獻資料可以得知利用原子力顯微鏡作為檢測工具時，樣品準備多依據以下兩種方法：其一，先長出晶種在移至蓋玻片上以適當濃度的蛋白質溶液潤濕^{22 23 24}，或是直接於蓋玻片上直接成長晶體，然後挑選一方位適當的晶體作為檢測之用^{8 25}（各約 50uL）²³。為節省蛋白質溶液的使用量，本實驗僅使用第一部分結晶所需的溶液量（約 0.4uL），實驗至結晶出現之後即利用礦物油（密度~0.8g/cm³）覆蓋於溶液上，避免溶液在檢測時蒸發。由於 AFM 檢測可在液態中進行，不若掃描式顯微鏡(SEM)須經過脫水以及鍍金的處理²¹。此舉不但可如文獻中所期待在不使晶體表面接觸到空氣，盡量維持晶體自然的狀況下檢測^{8 22 23 24 25}，相較於文獻中兩法（各約 50uL），皆減少了蛋白質溶液的使用量。

樣品準備好之後即置於 AFM 所配備之 standard liquid cell 之下，利用氣壓吸附上述裝置於 AFM 之壓電平台，配置如下圖 4-2 所示。

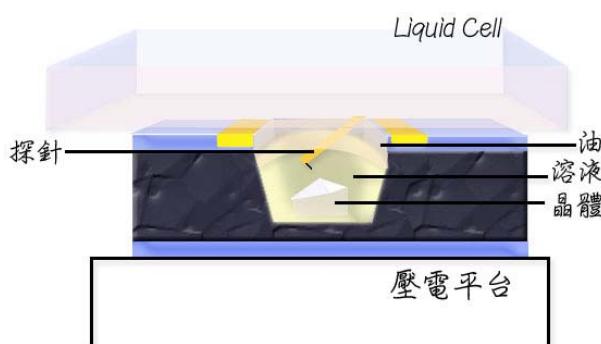


圖 4-2 試片架設於 AFM 掃描平台收集數據之裝置

2. 原子力顯微鏡(AFM)之數據收集

本實驗收集數據時所使用的 AFM 機型為 Digital Nanoscope IIIa (Digital Instruments) 。

難題

由於生物巨分子易碎和柔軟的特性，在利用 AFM 檢測時，常常遭遇一些實際操作上的困難。

- i. 第一個難處是因為檢測必須在液態中進行，首先要克服的就是如何將待測的晶體固定於基材上，避免因為晶體漂浮在溶液之中造成滑動而無法檢測的情形⁸。
- ii. 其二則為前述溶液暴露在空氣造成揮發的問題。
- iii. 利用 AFM 探針掃描成像的過程中，最困難的部分則是礙於生物巨分子晶體的過於柔軟以及對探針的敏感⁸。甚至有可能因為探針的掃描而對晶體表面產生物理性的傷害⁸。

解決方案

根據文獻，晶體難以固定的問題可以依賴直接在基材，通常是蓋玻片，上直接成長巨分子晶體來解決^{8,25}；或是在檢測時使用彈性的碳纖維將晶體“鉗”(clamp)住⁸。在實作經驗中，我們也曾經嘗試直接將晶體成長於蓋玻片上，但是並未因此得到良好的固定效果，同時在水中漂流的晶體嚴重干擾了 AFM 懸臂(cantilever)的移動。但嘗試將晶體成長於上述設計的裝置中時，由於溶液的體積減少，成長出的晶體減少，而觀察所得全部的晶體都成長於矽晶圓表

面，而且附著良好，不至於因為探針掃描而移動位置，倒是適切地解決了晶體飄動的問題。

對於生物巨分子晶體的過於柔軟，不易檢測，且為了避免探針和晶體表面的其他交互作用，懸臂之彈性係數(spring constant)須小於 $1\text{N/m}^{8,25}$ 。根據文獻，AFM 的 tapping mode 雖然可能造成獲得的影像較 contact mode 不清晰，但在某種程度上已經稍微克服了巨分子晶體過於柔軟不易檢測的困難⁸。但在本實驗實際操作過程中，這仍然是一個相當棘手的問題。即使在以拍敲式掃瞄(tapping mode)的情況下，為了獲得較清晰的影像，我們必須施加一個較大的力量於 AFM 探針，增加探針對待測物表面高低起伏的敏感度。但是過大的力量即會對生物巨分子晶體造成物理性的傷害。得到清晰的影像實為不易，在這方面的實驗技術仍需要更加改進。



第五章 實驗結果

5-1 溶解度

本文實驗結果中過計算飽和度所依據的溶解度為：Pascal Retailleau 等人於 1997 年在 Biophysics Journal 上發表的結果。其於室溫，pH~4.6 條件下，依析出劑(此處為 NaCl)濃度不同，所得之 Hen Egg White Lysozyme (HEWL)溶解度如下圖 5-1，右表中即為原始數據³⁵。

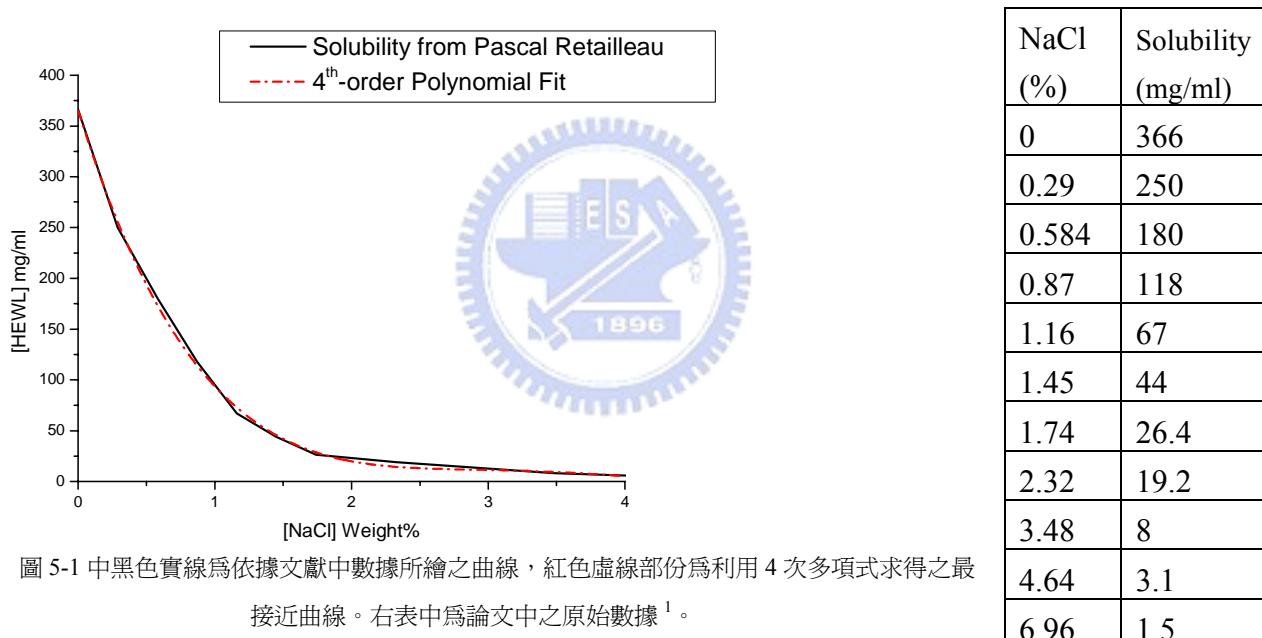


圖 5-1 中黑色實線為依據文獻中數據所繪之曲線，紅色虛線部份為利用 4 次多項式求得之最接近曲線。右表中為論文中之原始數據¹。

圖 5-1 中黑色實線為依據文獻中數據所繪之曲線，紅色虛線部份為利用 4 次多項式求得之最接近曲線。與黑色實線部份已相當接近。下文實驗結果中計算過飽和度的溶解度依據即為此紅色虛線。(本文所定義之過飽和度為： C/C_s ，其中 C 為溶液濃度； C_s 為此條件下之溶解度)

5-2 由光學顯微鏡(OM)取得之照片

5-2-1 一般狀態下所得之晶體巨觀形狀

下圖 5-2 為一般無外加電場狀況下，OM 所攝得 Hen Egg White Lysozyme (HEWL) 晶體的照片。

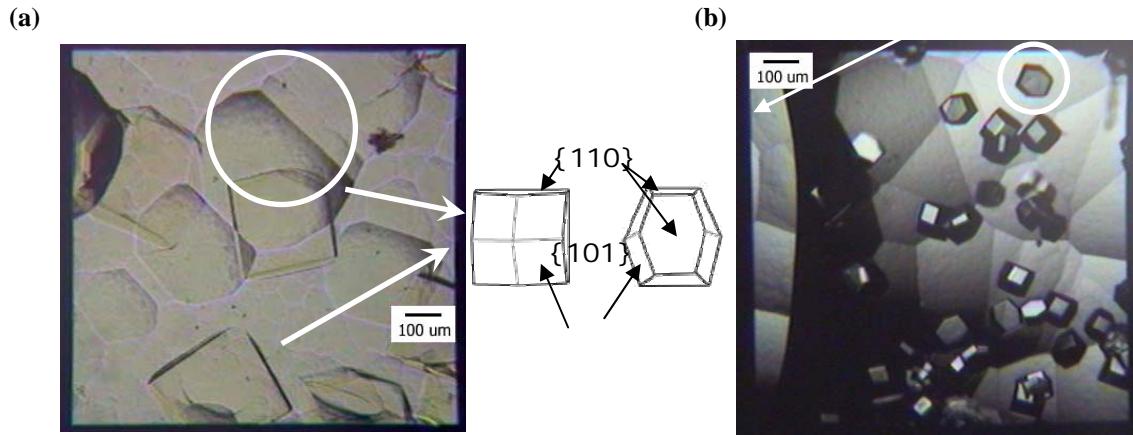


圖 5-2 為一般無外加電場狀況下，OM 所攝得 Hen Egg White Lysozyme (HEWL) 晶體的照片，均可見異質成核的晶體貼近 Si-溶液槽之邊緣成長。(a) $C/Cs = 3.5$ ，(b) $C/Cs = 5.03$



圖(a)為過飽和度 $3.5(C/Cs = 3.5)$ ，圖(b) $C/Cs = 3.5$ ，均為無外加電場下的照片。晶體接近透明，如圖中所圈起的部份。由於晶體呈現透明，故可見到由下方於 TMAH 濕蝕刻不均勻所造成的塊狀微突物。由 OM 照片可以得知一般無外加電場狀況下，所得之 HEWL 晶體巨觀形狀有下列特徵：

1. 未飽和($C/Cs < 1$)時，無結晶發生。
2. 圖中可見到如文獻中 HEWL 晶體的 $\{101\}$ 面及 $\{110\}$ 面，如圖中卡通圖所示。
3. 圖中可見，HEWL 在 Si-溶液槽中並無特定分布或秩序，但由於異質成核(heterogeneous nucleation)所需要越過的能障較低，所以可以見到可能由異質成核成長的晶體在 Si-溶液槽的邊緣出現。

5-2-2 外加電場下所得之晶體巨觀形狀

下表 5-1 為外加電場狀況下，OM 所攝得 Hen Egg White Lysozyme (HEWL) 晶體。

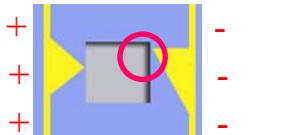
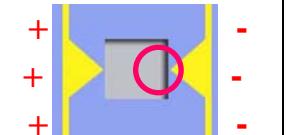
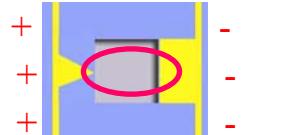
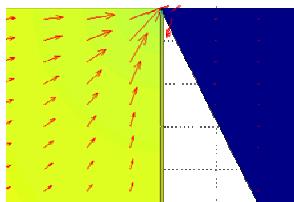
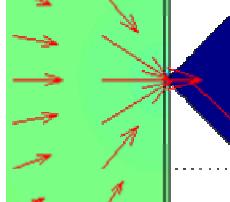
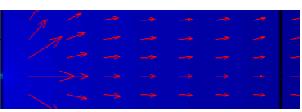
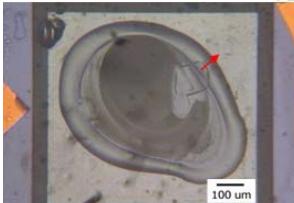
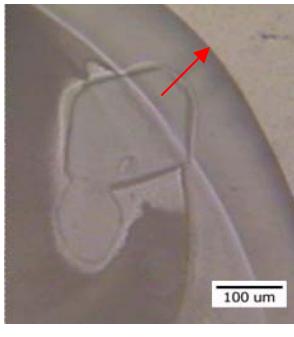
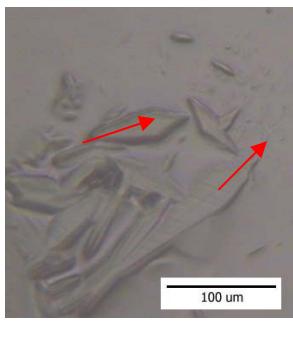
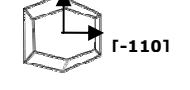
電極圖案 、陰陽極位置			
靠近陰極之 電場模擬(上 圖圓圈部分)			
結晶條件	$C/C_s = 0.15$ $35V$ 5 小時	$C/C_s = 0.37$ $35V$ 5 小時	$C/C_s = 5.02$ $100V$ 3 小時
OM 照片			
陰極附近之 OM 照片： 1. 結晶多 在陰極析出 2. 形狀與 無電場情形 不同 3. [-110]沿 電力線方向 排列			  <p>有電場之{110}</p> <p>比較</p>  <p>無電場之{110}</p>
陽極附近之 結晶情形	無結晶	無結晶	有結晶但數目較少， 且排列較不規則

表 5-1 外加電場下，OM 攝得之三種不同電力線分布之 HEWL 晶體成長狀態。

由上表 5-1 的結果可以將外加電場下，由 OM 所得之 HEWL 晶體成長在巨觀上(形狀、分布、排列)的特徵，定性陳述如下：

1. 不論溶液整體是否已達飽和($C/C_s > 1$ 以及 $C/C_s < 1$)，均有晶體出現。唯當未飽和時，晶體僅存在於陰極附近；過飽和時，溶液內部均有晶體出現，但仍屬靠近陰極的地方為多。
2. 晶體巨觀形狀從{110}觀之，相較於無電場的情形，有菱形晶體，或多出一未知斜面(下圖 5-3 中左圖之灰色部份)，與已知之{101}在{110}上夾角 160° ，將於討論中詳述。



圖 5-3 從{110}觀之，有無外加電場時，HEWL 晶體巨觀形狀的比較。有外加電場較無電場時多產生一未知斜面，為圖示之灰色部份。此現象將於討論章節分析。

3. HEWL 晶體之[-110]方向有沿電力線方向排列的趨勢。

5-2-3 電流導通時所得之晶體巨觀形狀 → 意外的發現

施加電流本來並非計畫中的實驗。但在施予外加電場實驗過程中，偶然發現若電流導通(1~2 秒即切斷電流供應)，但施加之能量不至於使蛋白質變質的情形下，所得之 HEWL 晶體，巨觀上的形狀，與施加電場組別所得之晶體，有某些相似性：

1. 不論溶液整體是否已達飽和($C/C_s > 1$ 以及 $C/C_s < 1$)，均有晶體出現。
2. 巨觀形狀從{110}觀之，相較於無電場的情形，亦多出一未知斜面 (上圖 5-3 中圖左之灰

色部份)。下圖 5-4 即為一例：

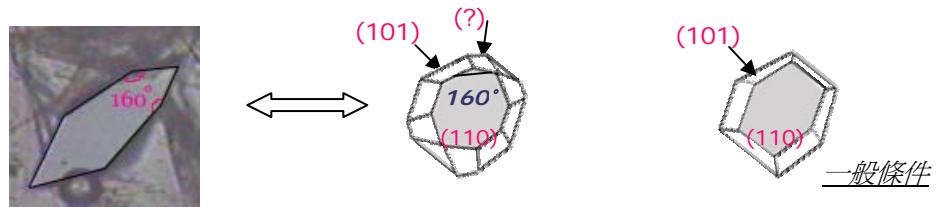


圖 5-4 左圖為施加電流 1 秒，靜置約 30 分後的 HEWL 晶體 OM 照片。與上表所示外加電場之晶體同樣擁有無電場時所沒有的斜面。與已知之 $\{101\}$ 夾 160° 。將於討論中詳述。中間圖為參照，圖中灰色部份為左圖中所見之 $\{110\}$ 。右圖為一般條件下所得之晶體形狀。

施加電流與施加電場的組別所得到的晶體相異之處則為：

1. 電場下 HEWL 晶體生長時所具有之方向性和分布，在電流導通的狀況下全無。包括：
 - i. 晶體無沿電力線方向排列的趨勢，
 - ii. 以及 $C/C_s < 1$ 時，OM 可觀察得到的晶體散布於溶液各處。
2. 且晶體產生的速度較施加電場時更為快速。
3. 但移除電流供應之後，晶體繼續成長的速率，巨觀上而言(由 OM 量測晶體大小變化)，與無電場時之成長速率相同。
4. 另一點有趣的則是，由施加電流而快速產生的晶體，經過一段長時間(~ 12 小時)靜置後，有些晶體會逐漸消失。

電流和電場影響 HEWL 晶體成長系統之推論與假設

由上述電流與電場對於 HEWL 晶體成長系統影響相異之處的 3、4 兩點，本文推測：電流的能量對於 HEWL 晶體成長系統，提供了短時間且動態的變化，

導致系統在電流剛移除的時間內仍處於不平衡的狀態。但經過長時間的靜置，系統趨向平衡態，原先存在的晶體才會消失。

但在本文中暫不討論基於何種原因或參數，導致部份晶體存在，部份晶體消失的結果，以及存在或消失的選擇性。而是借力於：在電流影響下晶體成長變化的資訊，可以在短時間內取得，這項優點。又由於所得之晶體巨觀上與施加電場所得之晶體相同，故將電流影響下晶體巨觀形狀變化的過程與機制，引申為與電場影響下的方式相同。下一章將討論：在電場影響下，晶體成長之動態變化過程，其推論即是建立於：電場與電流影響下之晶體成長巨觀形狀上的變化過程是相同的假設之上。

電流影響下，HEWL 晶體動態成長過程

下圖為電流影響下，時間連續之 HEWL 晶體成長過程，參照圖下文字說明：

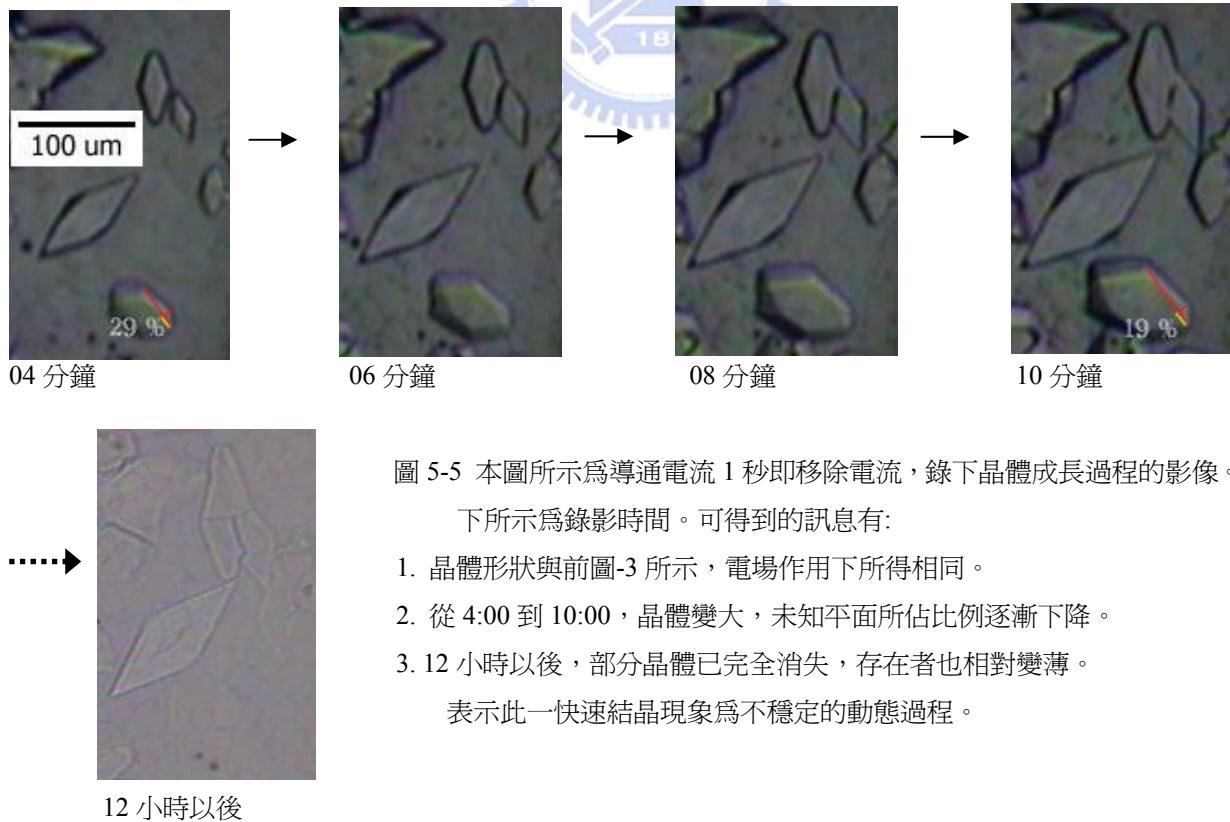


圖 5-5 本圖所示為導通電流 1 秒即移除電流，錄下晶體成長過程的影像。各圖下所示為錄影時間。可得到的訊息有：

1. 晶體形狀與前圖-3 所示，電場作用下所得相同。
2. 從 4:00 到 10:00，晶體變大，未知平面所佔比例逐漸下降。
3. 12 小時以後，部分晶體已完全消失，存在者也相對變薄。

表示此一快速結晶現象為不穩定的動態過程。

5-3 由原子力顯微鏡(AFM)取得之數據

以下結果中所說的晶格常數或是晶體結構皆以 HEWL 最常見之 Tetragonal 結構為討論對象。

($a=b=7.91\text{nm}$, $c=3.79\text{nm}$, $P4_32_12$)

5-3-1 一般狀態下所得之晶體微觀形貌

下圖為 $C/\text{Cs}=2.3$ 時，於 $\{110\}$ 面上得到之 AFM 圖像。

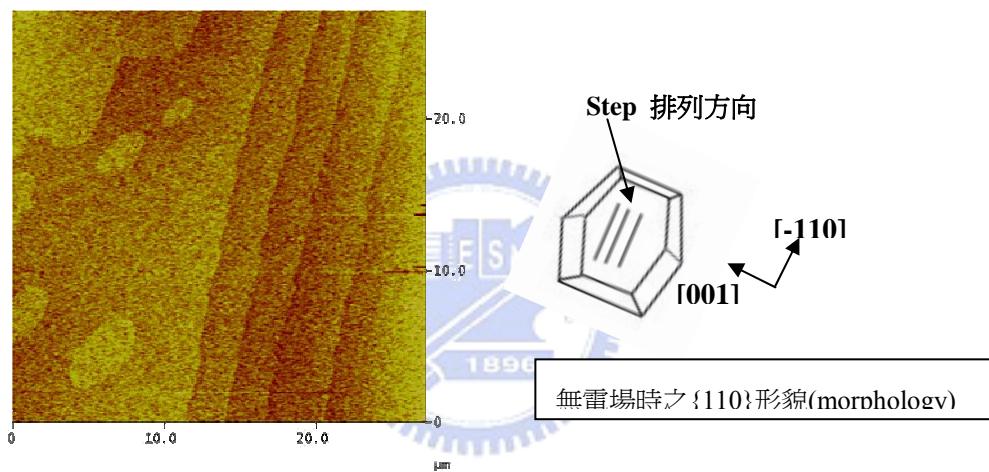


圖 5-6 左圖為 $C/\text{Cs}=2.3$, $\{110\}$ 面上得到之 AFM 圖像。2D nuclei、step 平行[-110]方向排列；高度約 0.4 奈米(nm)，約是平行 C 軸之晶格間距。上述現象與文獻上記載者相同²¹。右圖為參照，圖中 $\{110\}$ 面上之條紋表示 step 沿[-110]方向排列

如圖 5-6 所示：

1. $\{110\}$ 面上的 2D nuclei 沿[-110]方向拉長，且 step 平行[-110]方向排列。
2. 一層 step 與 2D nucleation 的高度約 0.4 奈米(nm)，約是晶格中沿 C 軸(平行 4_3)之晶格常數。

上述現象與文獻上記載者相同²¹。

5-3-2 外加電場下所得之晶體微觀形貌

下圖為 $C/C_s=0.15$ ，施加 35 伏特(V)，5 小時，於{110}面上得到之 AFM 圖像

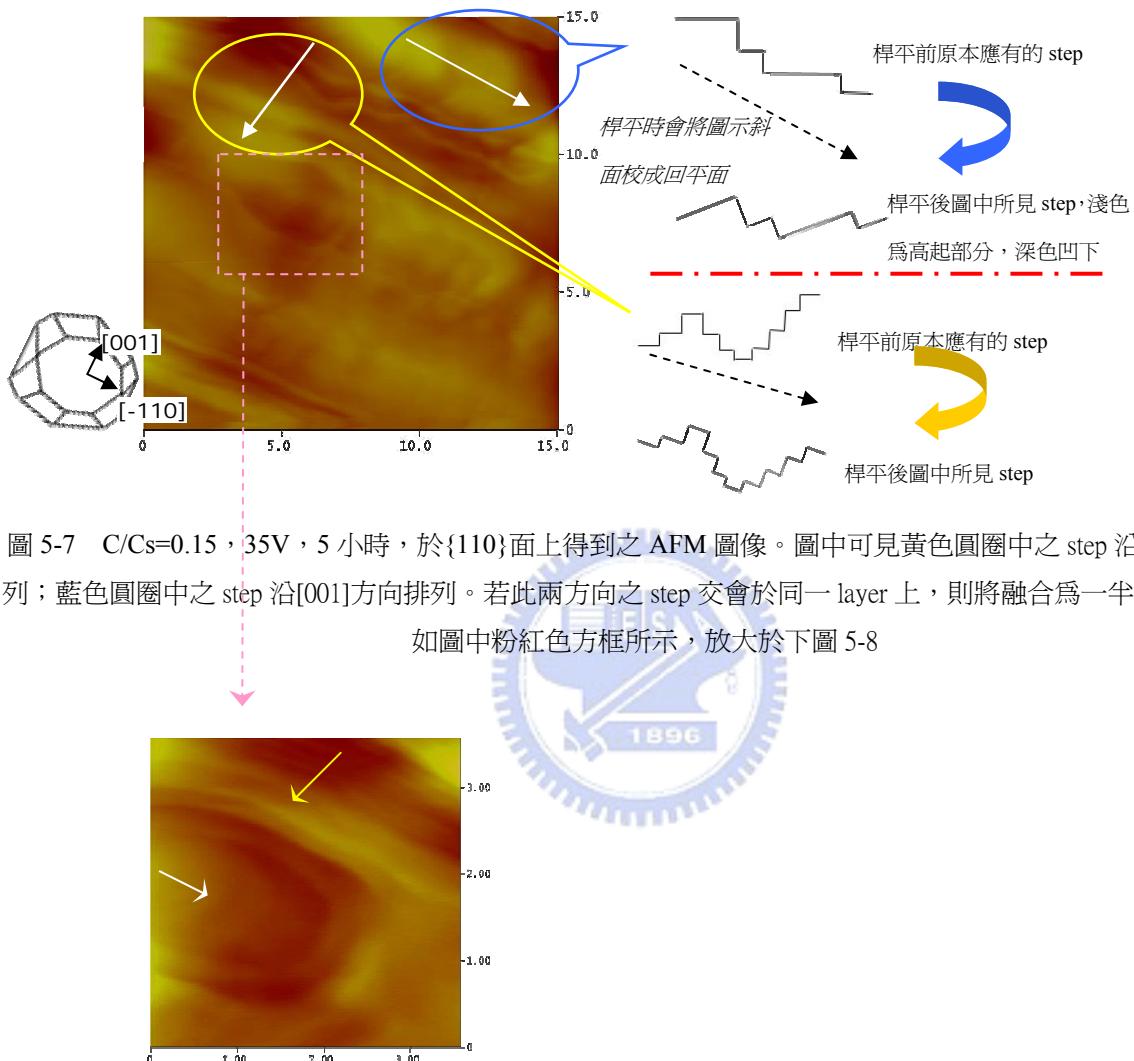


圖 5-7 $C/C_s=0.15$ ，35V，5 小時，於{110}面上得到之 AFM 圖像。圖中可見黃色圓圈中之 step 沿[-110]方向排列；藍色圓圈中之 step 沿[001]方向排列。若此兩方向之 step 交會於同一 layer 上，則將融合為一半月形之 step，如圖中粉紅色方框所示，放大於下圖 5-8

由於不能保證試片在接受 AFM 檢測時，放置的平台是完全水平的，所以通常在數據處理時，會加入一步桿平(flatten)的動作，此動作的目的為假設存在一平面，利用斜面或是曲面方程式(是掃出的圖像需要)，將掃出的圖像由 x, y 兩方向校正回平面上。但是由於本張圖像上的 step

數目較多，導致桿平的校正動作 step 本身高低(圖中所見顏色的深淺)受到影響。參照圖 5-7 中文字敘述。圖中可見黃色圓圈中之 step 沿[-110]方向排列；藍色圓圈中之 step 沿[001]方向排列若此兩方向之 step 交會於同一 layer 上，則將融合為一半月形之 step，如圖中粉紅色方框所示，放大於圖 5-8。如圖 5-8 中白色箭號所示，仍可見到半月形 step 內部有平行[001]方向之 step，外部則有平行[-110]方向之 step，如圖中黃色箭號所示。

下圖 5-9 為另一外加電場下所得之 HEWL 結晶的 AFM 圖。圖中仍可同時見到沿[001]及[-110]兩方向排列之 step。圖右所示為原本未桿平之前應有之 step。

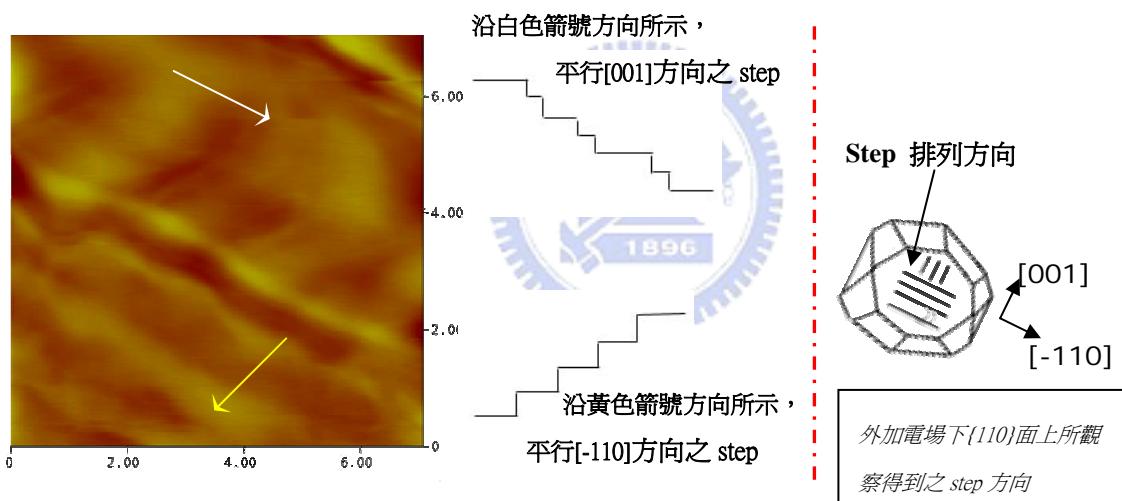


圖 5-9 圖中白色箭號所示，可見到平行[001]方向之 step；圖中黃色箭號所示，則是平行[-110]方向之 step。圖右卡通圖為外加電場下{110}面上所觀察得到之 step 方向。

由上面幾張圖片，外加電場下 HEWL 晶體{110}面上之形貌特徵可歸納如下：

1. 平行[001]與[-110]方向排列之 step，同時在外加電場下 HEWL 晶體{110}面上共存。
2. 當平行此兩方向之 step 交會於同一層 layer，兩方向之 step 將融為一半月形之 step。
3. 一層 step 的高度約 0.4 奈米(nm)，約是晶格中沿 C 軸(4_3 軸)之晶格常數。

5-4 小結

在本章最後，本文將實驗所得無外加電場，外加電場與電流所得之晶體，巨觀和微觀上的特徵整理如下表 5-2：

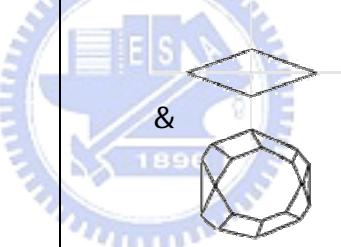
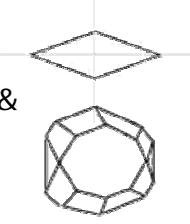
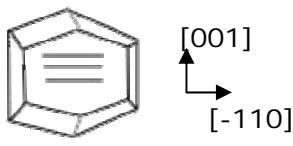
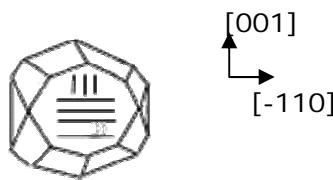
	無外加電場 , 一般條件	外加電場	外加電流
成核	1. $C/Cs < 1$ ，無晶體出現 2. 除異質成核於 Si-溶 液槽器壁外，晶體無特殊分布狀況	1. $C/Cs < 1$ 、 $C/Cs > 1$ ，均有 晶體出現 2. $C/Cs < 1$ 時，晶體於陰 極附近析出 3. $C/Cs > 1$ 時，溶液中均 有晶體出現，但陰極附 近數目較多	1. $C/Cs < 1$ 、 $C/Cs > 1$ ，均有 晶體出現 2. 晶體無特殊分布狀況
OM 所得 晶體巨觀形 狀，由{110} 面觀之			
方向性	無	[-110]沿電場方向排列	無
AFM 所得 晶體{110}表 面 微觀特徵	僅觀察得到沿[-110]方向排 列之 step		

表 5-2 無外加電場，外加電場與電流所得之晶體，巨觀和微觀上的特徵

第六章 結果討論

本章討論就上一章實驗所得到的結果，並由理論上嘗試推測可能的機制。首先將由計算水溶液中電位、電場的分布以及大小開始討論。

6-1 電位及電場在水溶液中之分布情形

由文獻可知，兩介質間電流量密度連續。

$$\varepsilon_1 E_1 = \varepsilon_2 E_2 \quad \dots \dots \dots \text{eq(1)}$$

其中 ε 為介電常數， E 為電場。

且知在有自由離子之介電材料(本實驗之的 HEWL 溶劑%)中，電位將自邊界以 $e^{\frac{x-L}{\lambda}}$ 的形式衰退。  eq(2)

其中， L 為：一維狀況下，此欲求電位分布之 HEWL 溶液中心設為原點時的邊界座標。(意即中心為原點，此介電材料(溶液)總長 $2L$)。 x 為此一維狀況下，溶液中欲知電位點的坐標； λ 為 HEWL 分子的德拜長度(Debye length)。

$$E = d\phi / dx \quad \dots \dots \dots \text{eq(3)}$$

今，假設 HEWL 與絕緣用氧化層接處之電位為 ϕ ，外加電位 V ，氧化層厚度 d ，由 eq(2)(3) 可得絕緣氧化層與溶液附近之 eq(1)可表示成：

$$\frac{V - \phi}{d} \cdot \frac{\xi_1}{\xi_2} = \frac{d}{dx} \phi \cdot e^{\left(\frac{x-L}{\lambda}\right)} \quad \dots \dots \dots \text{eq(4)}$$

當外加 35V 時，代入實際參數：

$$V=35/2 \text{ V}, \quad \varepsilon_{\text{oxide}}=3.9, \quad \varepsilon_{\text{HEWL}}=3.5, \quad d=5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}, \quad L=0.75 \text{ mm}, \quad \lambda=1 \cdot 10^{-6} \text{ mm}$$

得到氧化層和 HEWL 溶液界面($x \sim L$)附近的電位為(以 V 單位)：

$$\xi_1 \cdot \lambda \cdot \frac{V}{\left[\xi_1 \cdot \lambda + \exp \left[\frac{(x - L)}{\lambda} \right] \cdot d \cdot \xi_2 \right]} = 3.899 \times 10^{-3}$$

鄰近此界面 HEWL 溶液中，電位衰退的趨勢以 eq(5) 表示：

$$f(y) := \phi \cdot e^{\left(\frac{y-L}{\lambda} \right)} \quad \text{..... eq(5)}$$

將描述電位衰退的方程式 eq(5) 在接近界面的 HEWL 溶液中作圖，即可得到鄰近界面部份，

HEWL 溶液中電位的變化：

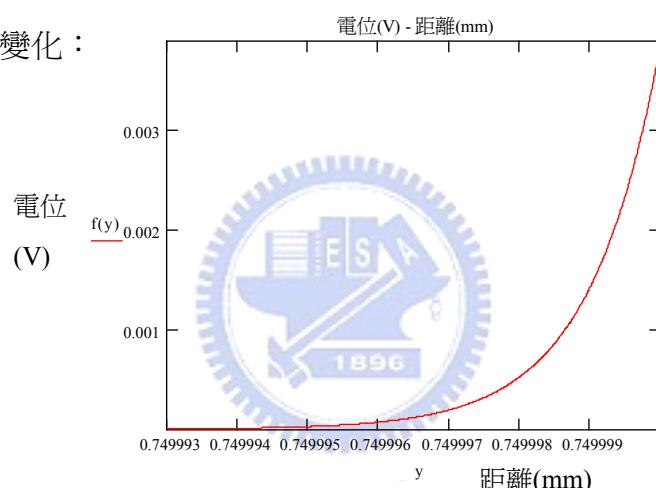


圖 6-1 鄰近界面部份，HEWL 溶液中電位的變化。電位在 50~100 nm 的距離內衰退至接近零。

再將電位對距離微分，可得到鄰近界面部份，HEWL 溶液中電場的變化。

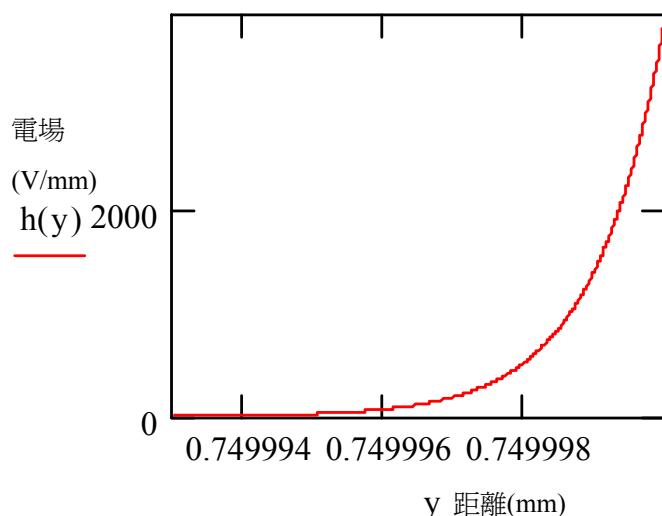


圖 6-2 鄰近界面部份，HEWL 溶液中電場的變化。極大的電場在 50~100nm 短距離內衰退接近零。

在外加 100V 時，也得到類似的情形，電位和電場都在短距離內急速衰減，惟 100V 時的界面

$$\xi_1 \cdot \lambda \cdot \frac{V}{\left[\xi_1 \cdot \lambda + \exp \left[\frac{(x-L)}{\lambda} \right] \cdot d \cdot \xi_2 \right]} = 0.011$$

電位比 35V 時更高出許多()。

施加 100V 時，界面附近電位和電場的分布分別如下圖所示：

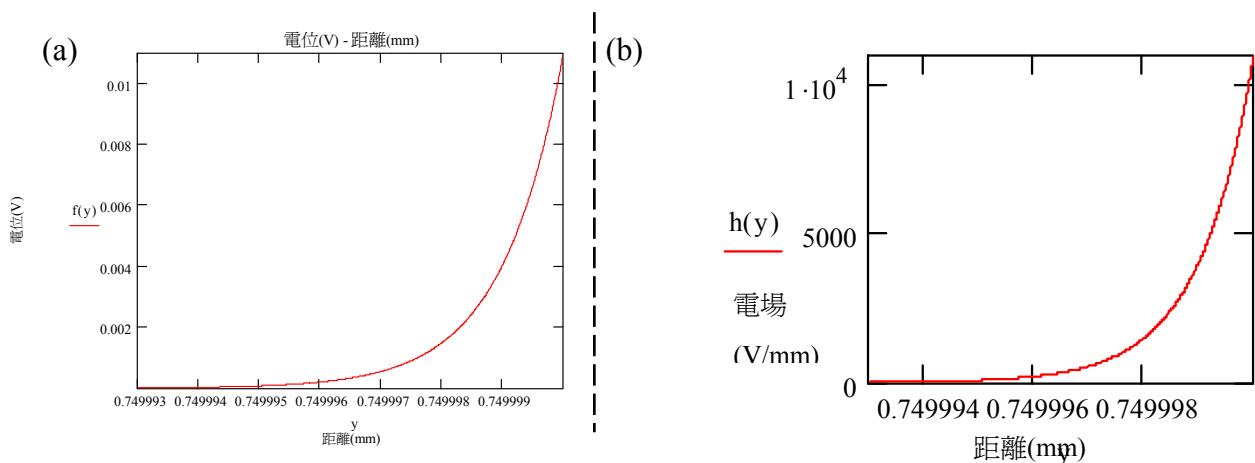


圖 6-3 施加 100V 時，界面附近(a)電位和(b)電場的分布。與 35V 時相比，界面電位及電場都較大，但仍都在 50~100 nm 內衰減至接近零。

將上述計算之電位、電場橫跨整個 Si-溶液槽的分布狀況整理如下圖所示：

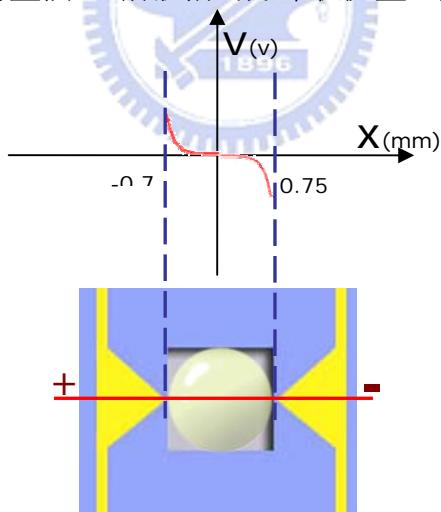


圖 6-4 電場橫跨整個 Si-溶液槽的分布狀況，縱軸亦可為電場強度(V/mm)

比較計算所得兩種外加電位下，電位和電場在溶液中大小及分布特徵如下：

1. 外加電位大時，界面電位越大。但無論外加電位為何，溶液中之電位、均集中於與絕緣層的交界，且於 50~100 nm 的短距離內衰減至幾乎無電場電位效應。
2. 因電位分布於極小的範圍內，造成界面產生極大電場。

6-2 成核

本節將以化學位能差的觀點，推測以下現象的機制：實驗觀察中發現，在外加電場的狀況下，即使未達飽和($C/C_s < 1$)，也有 HEWL 晶體集中於陰極析出。

首先，將水溶液中之 HEWL 分子分為：靠近溶液與氧化層的邊界(50~100nm)，直接受電場影響；以及較遠離邊界者(>100nm)，未直接受電場影響者，兩部分來討論。

6-2-1 電極附近溶液與氧化層的界面(50~100nm)，直接受電場影響的分子

1. $F = qE$

因 pH~4.6 時，HEWL 分子表面帶有約 10~12 個正電。且在接近界面 50~100nm 的範圍內，有強大的電場，使系統內存在一強作用力，將帶有正電荷之 HEWL 推往陰極。 $F = qE$ 為造成部份 HEWL 分子往陰極聚集，且陽極附近的分子將遠離陽極的第一個原因。

2. 電場造成的非等向擴散

一般常態下討論的擴散行為，建立於一物質往各方向擴散所需越過的能障是相等的，即是一物質往各方向的最鄰近位置跳躍機會相等(random walk)。如下圖 a 示：



圖 6-5 (a) 若 A 點有一原子或分子，在一維空間上，往左跳或往右跳至最近位置所須越過的能障均為 E_m ，機會相等。(b)由於電場的作用，對化學位能造成梯度。從 A 點跳到 B 點，跟 A 點跳到 C 點之能障和化學位能差均不同，造成非等向性的擴散。

但若在外加電場的狀況下，由於電場的作用，對化學位能造成梯度，如圖(b)所示。從 A 點跳

到 B 點，跟 A 點跳到 C 點之能障和化學位能差均不同，

- i. 就跳躍所需越過的能障(E_m)而言， $E_{mc} < E_{mA}$
- ii. 就驅動力(化學位能差： ΔE)而言， $\Delta E_{AC} > \Delta E_{AB}$ 。

以上兩點都有利從 A 往 C 跳躍(/擴散)，造成非等向性的擴散。

圖中 C 可視為因靠近陰極而較穩定(對於帶正電之 HEWL 分子能量較低)的位置。**電場造成非等向的擴散**為 HEWL 分子往陰極聚極，且遠離陽極的第二個原因。

3. 誘導偶極(induce dipole)

最後對於直接受電場影響的分子，仍有電場誘導偶極的考量。根據文獻，將帶有正負電之蛋白質分子誘導產生偶極所需的能量為 10^4 kT eV^{16} 。以外加 35V 時為例，假設將分子由電位為零處，移至實驗給予系統中各電位所對應之位置得到的能量(以分子一個電子視之，即為電位能分布)，除以誘導偶極所需之能量，得到下圖：

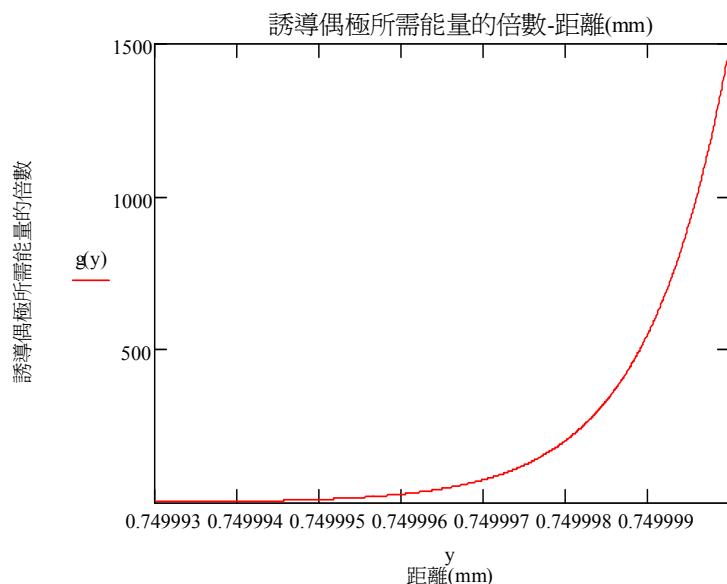


圖 6-6 隨距離改變，縱軸為電場提供能誘導 HEWL 產生偶極的能力，以誘導偶極所需要的能

量的倍數表示。在接近界面的範圍，確能提供強大的力量誘導 HEWL 產生偶極。

由圖可知，在接近界面的範圍(50~100nm)，電場的確能提供強大的力量，足以誘導 HEWL 產生偶極。需注意的是，此現象在陰極或陽極的都有可能發生。

6-2-2 遠離溶液與氧化層的界面(距界面 100nm 以上)的 HEWL 分子

1.化學位能差造成的非等向擴散

靠近陰極

溶液中距離氧化層和溶液界面 100nm 以上的 HEWL 分子，已不會直接受到外加電場的影響，但仍有可能受前述因在電場作用範圍內而形成的偶極分子影響，而造成非等向擴散，原理如 6-2-1 中第二項所述，請參照圖 6-5。亦不排除此區域的分子也有誘導偶極現象發生的可能性。更遠離陰極的分子受偶極造成化學能梯度的影響，已類似模式往陰極聚集。

靠近陽極

如前文所述，同樣地在電場影響範圍內，陽極附近也可能有誘導偶極的現象發生，但由於在實驗所選擇之 pH~4.6 條件下，HEWL 帶正電，所以在陽極發生誘導偶極的現象反導致化學能差變小(相較於無電場、等向擴散的狀況)、需要越過的能障也較高(如圖 6-5 中由 A 往 B)，對於較遠離陽極的分子產生不利於往陽極條件，更不會在陽極析出。更遠離陽極之後的分子將恢復原有的等向擴散。已不受外加電場及電場誘導偶極影響。

6-2-3 小結

綜合 6-2 所述，將電場對溶液中 HEWL 分子的影響整理如下：

A. 陰極

a. 靠近界面的分子

- i. 因電場對帶電分子產生的力， $F = qE$ ，將溶液中之 HEWL 分子推向陰極聚集。
- ii. 因電場使化學位能差(驅動力)增加，能障減低，使此處 HEWL 分子往陰極擴散。
- iii. 電場誘導 HEWL 分子產生偶極。

b. 遠離界面的分子

- i. 因受界面附近的分子產生偶極現象的影響，而使化學位能差(驅動力)增加，能障減低，使此處 HEWL 分子往陰極擴散。



- ii. 更遠離陰極的分子受偶極造成化學能梯度的影響，以類似模式往陰極聚集。

B. 陽極

a. 靠近界面的分子

- i. 因電場對帶電分子產生的力， $F = qE$ ，將溶液中之 HEWL 分子推離陽極
- ii. 因電場造成化學位能梯度，導致溶液中 HEWL 分子更不易往陽極擴散
- iii. 電場誘導 HEWL 分子產生偶極

b. 遠離界面的分子

- i. 因受界面附近的分子產生偶極現象的影響，而造成化學位能差(驅動力)減少，能障提高，導致此處 HEWL 分子更加遠離陽極。
- ii. 更遠離陽極之後的分子將恢復原有的等向擴散。不受外加電場及電場誘導偶極影響。

由上述對陰極部分的整理可知，在所列原因下，可能使 HEWL 分子在陰極聚集，濃度增加，故即使整體溶液 $C/C_s < 1$ ，溶液中 HEWL 分子仍會在陰極發生過飽和現象，析出結晶。而上述理論推測，外加電場時，HEWL 分子於陰極濃度較陽極為高的現象亦與文獻之實驗結果吻合³⁴。下為上述推導之示意圖：

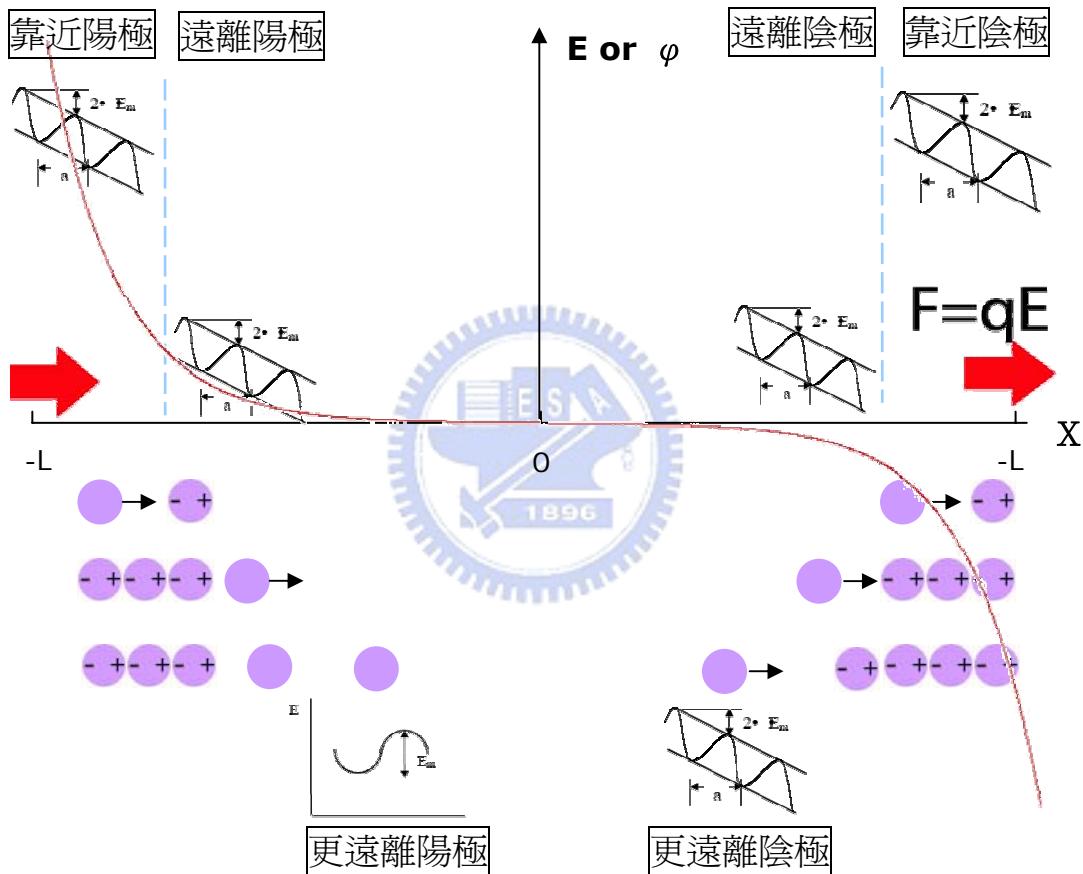


圖 6-7 外加電場對溶液中分子影響，以及使 HEWL 在陰極過飽和析出晶體之機制示意圖。

1. 靠近陰/陽極區域的分子受到 $F=qE$ ，以及電場造成化學能梯度的影響，往陰極聚集/遠離陽極，並在陰/陽極都誘導分子成為偶極。
 2. 遠離陰/陽極的區域分子受前述偶極造成化學能梯度的影響，往陰極聚集/遠離陽極。
 3. 更遠離陰極的分子受偶極造成化學能梯度的影響，仍往陰極聚集，更遠離陽極的分子恢復等向擴散的形式。
- 以上三點的結果使得即使整體溶液 $C/C_s < 1$ 時，溶液中 HEWL 分子仍會在陰極發生過飽和現象，析出結晶。而上述理論推測，外加電場時，HEWL 分子於陰極濃度較陽極為高的現象亦與文獻之實驗結果吻合³⁴

6-3 成長

討論電場對晶體成長影響的部份，本文依據實驗觀察所得數據，分光學顯微鏡(OM)和原子力顯微鏡(AFM)兩大部份討論。又，因為眾多原因不及以 X-ray 繞射量測實際結構，但依照無電場時所得到的結晶跟文獻比較的結果，本文的討論皆假設不論在有無電場的狀況下，HEWL 晶體結構沒有改變，均為最常見之 HEWL 結構： $a=b=7.91\text{nm}$, $c=3.79\text{nm}$, space group $P4_32_12$ 。

6-3-1 由 OM 所觀察得到 HEWL 晶體巨觀形狀上的變化

根據前一章實驗結果內容所述，由 OM 所得照片，有外加電場時，晶體在外觀形狀上與一般條件下得到的 HEWL 晶體最大的不同在於，有外加電場得到的晶體較一般晶體多出一本不會出現的平面，如下圖示：

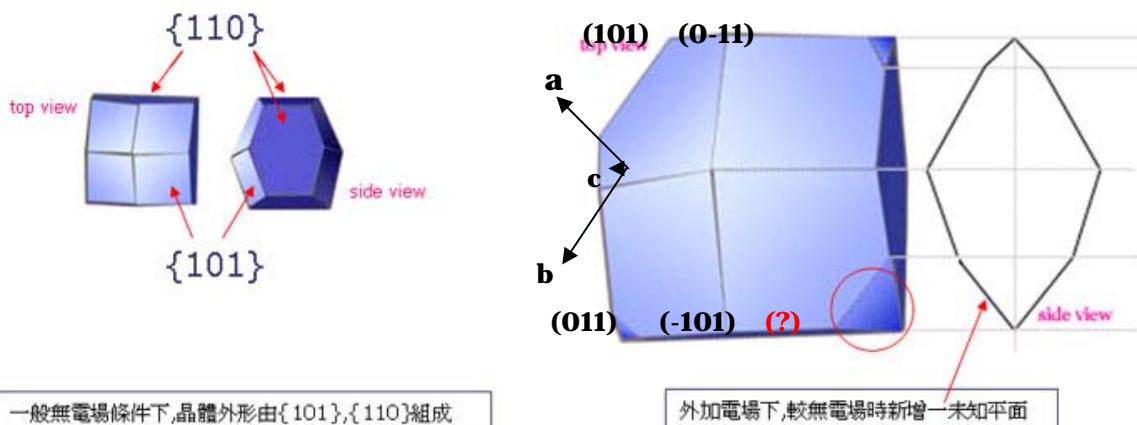


圖 6-8 左圖為無電場時觀察到的 HEWL 形狀，右圖為外加電場下的結果。最大不同為相較左圖，右圖除原有之 $\{110\}$ 及 $\{101\}$ 外，新增一未知平面，如右圖 top view 中圓圈以及 side view 中箭頭所指之平面所示。兩圖皆由實際照 OM 照片描繪。C 軸垂直二圖中 $\{101\}$ 中心交點向紙面外

且此平面由{110}觀之，此平面與{101}平面在{110}面上的夾角為 160° 。下圖為實驗所的之OM照片：

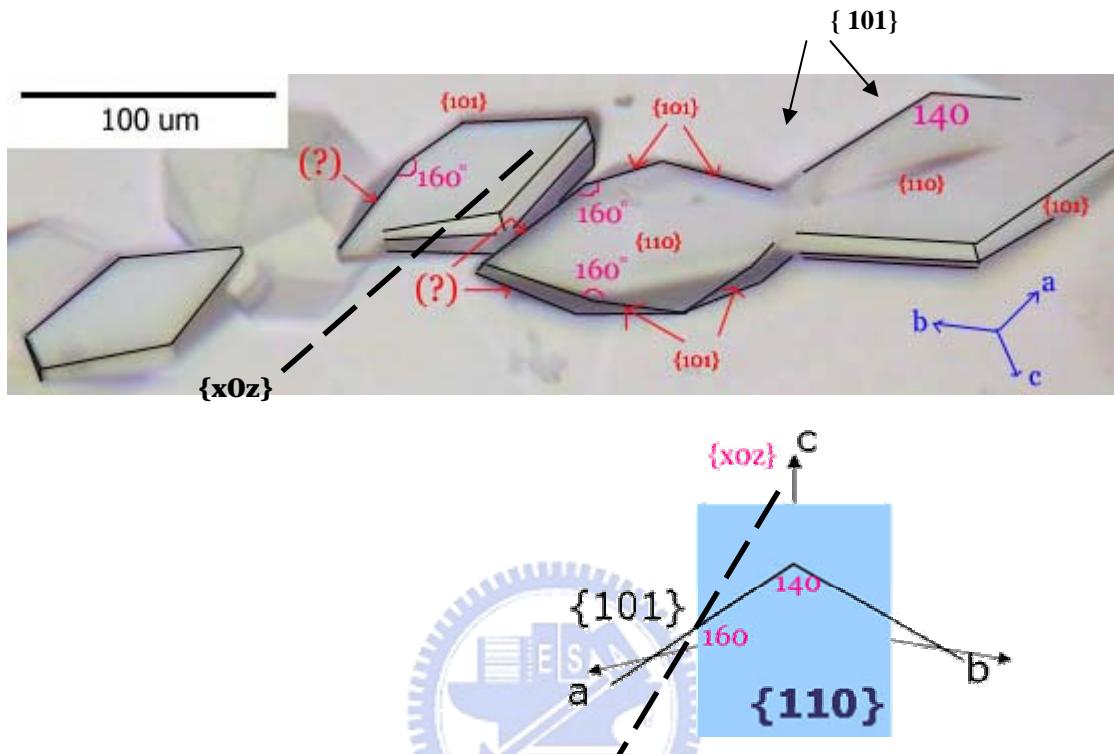


圖 6-9 上圖為實驗得到 $C/C_s = 5.02$ 之 OM 照片。由 $\{110\}$ 面來看，正常 $\{110\}$ 在 $\{101\}$ 的投影上，夾角為 140° 如圖中所示，但由圖中可見，從 $\{110\}$ 面來看，有一加電場/電流條件下才會出現的平面，與 $\{101\}$ 夾角 160° 。右圖為 $\{101\}$ 與未知新平面在 $\{110\}$ 面上夾角的卡通示意圖。照片與卡通圖中黑色粗虛線即為未知平面，假設為 $\{xOz\}$ 。

求未知平面坐標

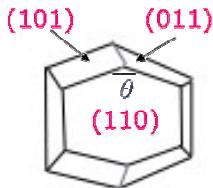
未知平面假設爲{x0z}

圖-8 右圖爲由實際外加電場時得到沿 C 軸方向看下去{101}以及未知平面的 OM 照片描繪，由圖中可看出未知平面與(101)面均與 b 軸無交點，故可假設未知平面坐標爲{xOz}。

假設實驗中 HEWL 結構為 *space group P4₃2₁2* , $a=b \sim 2c$

1. 計算由(110)面觀之，(101)與 (011)之夾角。即(101)與(110)相交之向量，和(011)與(110)

相交向量，兩向量之夾角。



a) (101) 與 (110)兩平面相交之向量：

將 c 軸單位長度化做與 a、b 軸相同: $(101) \rightarrow (102)$; $(110) \rightarrow (110)$

(101) 與 (110) 兩平面相交之向量 : $[\bar{2}21]$

b) (011) 與 (110)兩平面相交之向量：

將 c 軸單位長度化做與 a、b 軸相同: $(101) \rightarrow (012)$; $(110) \rightarrow (110)$

(011) 與 (110) 兩平面相交之向量 : $[2\bar{2}1]$

c) 由(110)面觀之，(101)與 (011)之夾角，即為 $[2\bar{2}1]$ 、 $[\bar{2}21]$ 兩向量之夾角

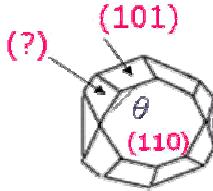
$$[2\bar{2}1] \bullet [\bar{2}21] = 3 \cdot 3 \cdot \cos \theta$$

$$\cos \theta = -\frac{7}{9}$$

$$\theta = 141^\circ$$

正如圖 6-9 上所得之兩{101} 面之夾角(在此選擇(101)與(011)面)！

2. 選擇(xoz)爲(201)面。以同樣方法計算由(110)面觀之，(101)與(201)之夾角。即(101)與(110)相交之向量，和(201)與(110)相交向量，兩向量之夾角。



a) (201) 與 (110) 兩平面相交之向量：

將 c 軸單位長度化做與 a、b 軸相同: $(201) \rightarrow (101)$; $(110) \rightarrow (110)$

(101) 與 (110) 兩平面相交之向量 : $[\bar{1}11]$

b) $[\bar{1}11]$ 與 $[\bar{2}\bar{2}1]$ ((101) 與 (110) 之相交向量) 之交角，即爲

右圖中所求 θ :

$$[\bar{1}11] \bullet [\bar{2}\bar{2}1] = 3 \cdot \sqrt{3} \cdot \cos \theta$$

$$\cos \theta = 5 / 3\sqrt{3}$$

$$\theta = 164^\circ$$



爲圖 6-9 中未知平面與 {101} 在 {110} 上之夾角，推測未知平面爲 (201) !

外加電場下 HEWL 成長機制－由巨觀形狀改變推測

現象

由 OM 得到各階段 HEWL 晶體形狀變化的照片如下圖所示：

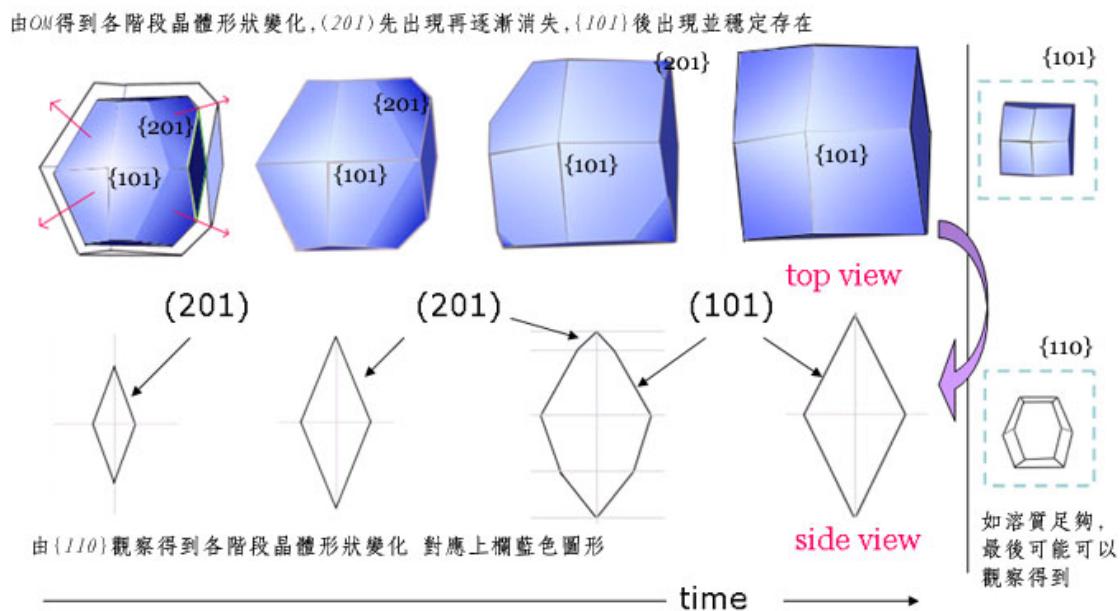


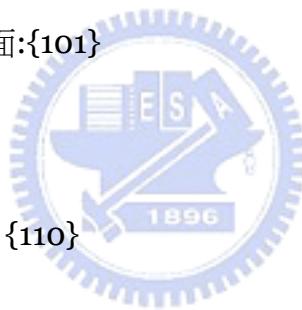
圖 6-10 剛開始時, $\{201\}$ 佔大部分, 但隨時間增加晶體成長, $\{101\}$ 逐漸取代 $\{201\}$, 而 $\{201\}$ 逐漸消失。而 $\{110\}$ 始終存在, 但因成長速度快, 面積相較於 $\{201\}$ 或 $\{101\}$ 小。下部表示對應上方藍色圖形, 為外加電流時晶體 $\{110\}$ 面錄影所觀察得影像連續的變化, 可以見到 $\{110\}$ 面隨時間增加晶體成長而成長, 也可見到成長過程中 $\{101\}$ 逐漸取代 $\{201\}$ 。右方的圖形表示的是如果溶液中含有足夠的 HEWL 分子時, 最終可能可以得到的結果, 也是一般高濃度時無電場所得到的結晶外型, 但外加電場的實驗中並不常見到。

如圖所示, 從面對 $\{101\}$ 、 $\{201\}$ 平面, top view 看(圖中上部藍色部份)。一開始時, $\{201\}$ 所佔面積較大, 隨時間增加, 晶體成長, $\{201\}$ 所佔比例逐漸變小(可參考第五章圖 5-5)。反觀 $\{101\}$ 面, 一開始時所佔比例較小, 隨時間增加, 晶體成長, 所佔比例越來越大, 最終 $\{201\}$ 面可能完全消失或僅殘留一小部分, 留下 $\{101\}$ 面。而 $\{110\}$ 面始終存在, 但以整個晶體外型看來, 其所佔面積小於 $\{101\}$ 或是 $\{201\}$, 可推測由於其成長速度快所導致。圖 6-10 中下部表

示對應上方藍色圖形，為外加電流時晶體 $\{110\}$ 面錄影所觀察得影像連續的變化(可參考第五章圖 5-5)，可以見到 $\{110\}$ 面隨時間增加晶體成長而成長，也可見到成長過程中 $\{101\}$ 逐漸取代 $\{201\}$ 。最右方的圖形表示的是如果溶液中含有足夠的 HEWL 分子，最終可能可以得到的結果，也是一般高濃度時無電場所得到的結晶外型($\{110\}$ 成長速度> $\{101\}$ 時， $\{101\}$ 面積較大，成長速度快的 $\{110\}$ 面逐漸消失，面積較小)，但在本文討論外加電場或電流的實驗中，大多見到圖 6-10 中縱線左方圖形所表示的晶體形狀。

簡單敘述上文中，外加電場情形下巨觀上晶體成長的變化：

1. 成長速度較快且先出現的面： $\{201\}$ ， $\{110\}$
2. 成長速度較慢且慢出現的面： $\{101\}$
3. 逐漸消失的面： $\{201\}$
4. 最終穩定存在的面： $\{101\}$ 、 $\{110\}$



機制

本文嘗試推測上述外加電場下 HEWL 晶體成長現象的機制。在一般條件下，根據文獻所述， $\{101\}$ 及 $\{110\}$ 為表面能最低的兩個面，所以穩定存在構成最後巨觀所觀察到 HEWL 晶體的形狀。但在外加電場的情形下，造成本來一般條件下不存在的 $\{201\}$ 面出現但又消失的可能機制有二：

1. 分子平均能量提高。
2. $\{201\}$ 面出現所需要越過的能障降低。

1.首先考慮平均分子量提高。

如果是因為平均分子能量提高，驅動力提高，造成溶液中 HEWL 分子附著到已存在的核或是小晶體上時，不考慮表面能特別低的方位，而造一般狀況下不會出現{201}面出現。那在一般條件下，過飽和度較高時，驅動力提高，應該也會有類似的狀況出現。下圖(a)是一般條件下，過飽和度較高($C/C_s=8.5$ ，比本文第五章實驗結果中所操作的最高過飽和度 5.2 高)時所得的照片。圖中並沒有發現{201}面出現。且關於 HEWL 晶體形狀的文獻，也未提出此現象。而僅提出在高過飽和度時，{110}面的成長速度大於{101}面。如下圖(b)¹⁷。故因施加電場使分子所擁有的平均能量提高，造成不會出現的{201}面出現的可能性，應予排除。

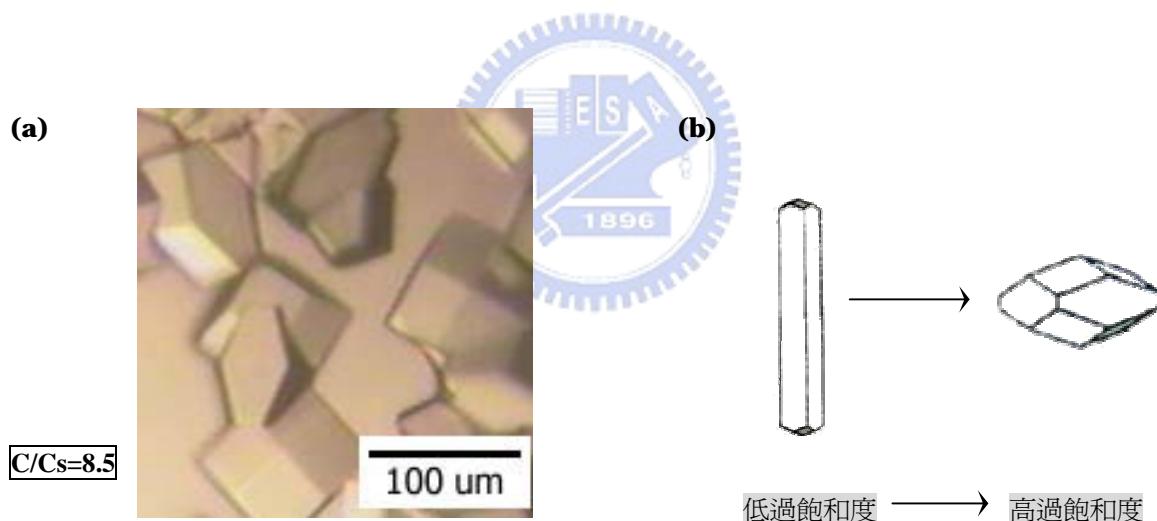


圖 6-11 (a) $C/C_s = 8.5$ ，高過飽和度，分子平均能量提高，驅動力提高。但並未發現{201}面，僅如文獻所述(見圖(b))，當過飽和度高時， $G(growth\ rate)\{110\} > G\{101\}$ ，故{101}面面積>{110}面。(b)過飽和度低時 $G\{110\} < G\{101\}$ ，{110}所佔面積大，{101}小；過飽和度高時 $G\{110\} > G\{101\}$ ，{110}所佔面積小，{101}大。

$$C/C_s \sim 4.28, G\{101\} = G\{110\}$$

2.接下來考慮電場使{201}面出現所需要越過能障降低。

因{201}面先出現而又消失，而非出現之後穩定的存在。所以本文推測電場影響的是{201}

面出現時所要越過的能障，而決定最後穩定存在與否的表面能等同一般條件下，並不改變。

如下圖所示， ΔQ 代表平面存在需要越過的能障；

ΔG 表示決定平面是否最後會以穩定形式存在的自由能差(主要受各平面表面能影響)，為 HEWL 分子在靠近晶體表面至加入某平面上所降低的能量。

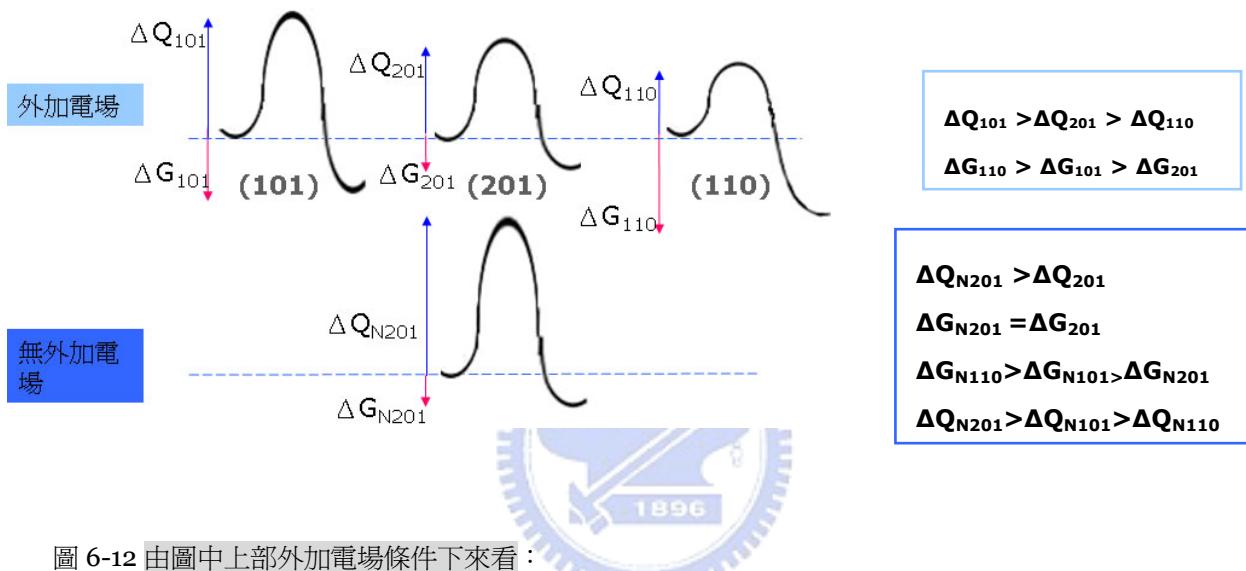


圖 6-12 由圖中上部外加電場條件下來看：

- 成長速度較快且先出現的面為 $\{201\}$ 、 $\{110\}$ ；成長速度較慢且慢出現的面為 $\{101\}$ ，且 $\{110\}$ 佔有的面積小於 $\{201\}$ 。由此推測得到 $\Delta Q\{\text{110}\} < \Delta Q\{\text{201}\} < \Delta Q\{\text{101}\}$ 。
- 最終穩定存在的面為 $\{101\}$ 、 $\{110\}$ ；逐漸消失的面為 $\{201\}$ 。由此推測： $\{201\}$ 面為不穩定的存在， $\Delta G\{201\}$ 應為三者中最小。又由文獻知道，一般情況下，水溶液中： $\gamma\{\text{110}\} < \gamma\{\text{101}\}$ 。 γ 為表面能。假設電場並不影響 γ 及 ΔG ，得到 $\Delta G\{201\} < \Delta G\{101\} < \Delta G\{110\}$ 。

由圖中下部一般無外加電場條件下：

- 雖然外加電場時雖不穩定出現，又逐漸消失，但一般條件下， $\{201\}$ 不會出現。由此推測得：
 $\Delta Q\{201\} < \Delta Q_N\{201\}$ ， $\Delta Q_N\{201\}$ 為一般無電場條件下， $\{201\}$ 面出現時所需越過的能障。
- 假設電場並不影響 γ 及 ΔG ， $\Delta G\{201\} = \Delta G_N\{201\}$ 。
- 由文獻 $\gamma\{\text{110}\} < \gamma\{\text{101}\}$ ，得到 $\Delta G_N\{101\} < \Delta G_N\{110\}$ ，且由上文推測 $\Delta G\{201\} < \Delta G\{101\} < \Delta G\{110\}$ ，在電場不影響 γ 及 ΔG 的情形下，得到 $\Delta G_N\{201\} < \Delta G_N\{101\} < \Delta G_N\{110\}$ 。
- 且高濃度時 $G\{110\} > G\{101\}$ ， $\{110\}$ 所佔晶體面積較 $\{101\}$ 小，且 $\{201\}$ 不出現。得到 $\Delta Q_N\{110\} < \Delta Q_N\{101\}$ 。
 (G: 晶體成長速度 參照第三章 文獻回顧)
- 但是由實驗結果並不能推測電場是否對 $\{101\}$ 出現所需越過的能障有所影響，因此無法比較有無電場時 $\{101\}$ 之 ΔQ ； $\{110\}$ 的情形亦同。 詳細說明請參照下頁文字敘述

i. 由以上實驗的結果知道在外加電場的狀況下：

- a. 成長速度較快且先出現的面為 $\{201\}$, $\{110\}$; 成長速度較慢且慢出現的面為 $\{101\}$, 且 $\{110\}$ 佔有的面積小於 $\{201\}$ 。

由此推測：此時 $\Delta Q_{\{210\}}$ 及 $\Delta Q_{\{110\}}$ 均小於 $\Delta Q_{\{101\}}$ ；且 $\{110\}$ 之成長速度較 $\{210\}$ 快，得到 $\underline{\Delta Q_{\{110\}} < \Delta Q_{\{210\}} < \Delta Q_{\{101\}}}$

- b. 最終穩定存在的面為 $\{101\}$ 、 $\{110\}$ ；逐漸消失的面為 $\{201\}$ 。

由此推測： $\{201\}$ 面為不穩定的存在， $\Delta G_{\{201\}}$ 小於 $\Delta G_{\{110\}}$ 與 $\Delta G_{\{101\}}$ 。

又由文獻知道，一般情況下，水溶液中： $\gamma_{\{110\}} < \gamma_{\{101\}}$ 。 γ 為表面能。

假設電場並不影響 γ 及 ΔG ，得到 $\underline{\Delta G_{\{201\}} < \Delta G_{\{101\}} < \Delta G_{\{110\}}}$

ii. 在一般無外加電場條件下：

- a. 雖然外加電場時雖不穩定出現，又逐漸消失，但一般條件下， $\{201\}$ 不會出現。

由此推測外加電場下， $\{201\}$ 面出現所需跨過的能障較一般條件下低，

得到： $\underline{\Delta Q_{\{201\}} < \Delta Q_N\{201\}}$ ， $\Delta Q_N\{201\}$ 為一般無電場條件下， $\{201\}$ 面出現時所需越過的能障。

假設電場並不影響 γ 及 ΔE ，得到 $\underline{\Delta G\{201\} = \Delta G_N\{201\}}$ 。

- b. 由文獻知道，一般情況下，水溶液中： $\gamma_{\{110\}} < \gamma_{\{101\}}$ 。 γ 為表面能。且由上文推測 $\Delta G_{\{210\}} < \Delta G_{\{101\}} < \Delta G_{\{110\}}$ ，在電場不影響 γ 及 ΔG 的情形下，得到 $\underline{\Delta G_N\{201\} < \Delta G_N\{101\} < \Delta G_N\{110\}}$ 。

c. 高濃度時 $G\{110\} > G\{101\}$ ，故 $\{110\}$ 所佔晶體面積較 $\{101\}$ 小。且 $\{201\}$ 不出現，得到

$\Delta Q_N\{110\} < \Delta Q_N\{101\} < \Delta Q_N\{201\}$ 。(G:成長速度 參照第三章 文獻回顧)

d. 但是由實驗結果並不能推測電場是否對 $\{101\}$ 出現所需越過的能障有所影響，因此無法比較有無電場時 $\{101\}$ 之 ΔQ ； $\{110\}$ 的情形亦因相同理由無法比較。

由上述的討論本文推測，但在外加電場的情形下，造成本來一般條件下不存在的 $\{201\}$ 面出現但又消失的可能機制為：電場使 $\{201\}$ 面出現所需要越過能障降低。

6-3-2 由 AFM 所觀察得到 HEWL 晶體微觀形貌上的變化

根據文獻以及實驗結果，一般無外加電場條件下所得知 HEWL 結晶由原子力顯微鏡(AFM)

在 $\{110\}$ 面上所得到的影像可以發現，此時 $\{110\}$ 面上的 steps 以及 2D-nuclei 因鍵結穩定因素均沿 $[-110]$ 方向排列，細節請參照第三章文獻回顧。有外加電場時，晶體在微觀形貌上與一般條件下得到的 HEWL 晶體最大的不同在於 $\{110\}$ 面上沿 $[001]$ 與 $[-110]$ 方向的 step 同時存在。如下圖所示

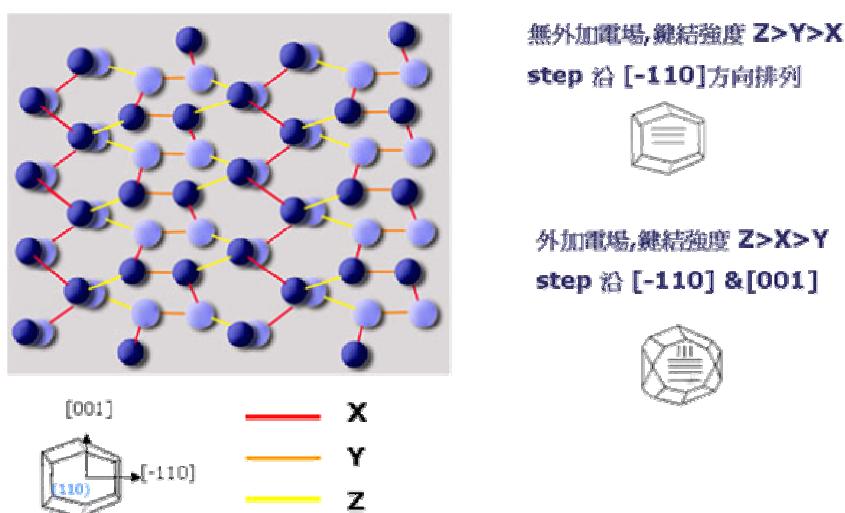


圖 6-13 圖左上為文獻中 tetragonal HEWL $\{110\}$ 之鍵結，左下為鍵結及方向對照圖。圖右上為無外加電場時 $\{110\}$ 面之 morphology，圖右下為外加電場時 $\{101\}$ 面之 morphology。

若以文獻中能形成 HEWL 晶體結構的最少鍵結考慮，本文初步推測，若電場的加入使原本範圍較小，但由靜電力所形成之 X 鍵更穩定，則當 HEWL 分子為產生新的一層 layer 時，會先考慮消除 X dangling bond 及 Z dangling bond，則有可能得到所觀察到 step 沿[001]與[-110]方向同時存在的現象。



第七章 結論

綜合前文所討論的議題，最後將本實驗設計、實驗得到的結果以及推測的機制整理如下列四點：

1. 本實驗以黃光微影技術於矽晶圓上設計一種新的裝置，利用光學顯微鏡(OM)以及原子力顯微鏡(AFM)觀察外加電場對 HEWL 結晶的影響。本裝置的優點在於可以精簡地使用蛋白質溶液，且解決原子力顯微鏡使用時 HEWL 晶體不易固定的問題。
2. 本文嘗試以電場造成的推力，電場造成的化學能梯度，以及電場誘導 HEWL 偶極的角度解釋實驗所得，即使在整體未達飽和的溶液中，pH~4.5 時帶正電的 HEWL 分子也會在陰極析出的現象。
3. 本文以幾何方法求得在外加電場下出現一般條件不存在之{201}面。並以平面出現所需越過的能障(動力學)，以及平面穩定存在的條件(熱力學)兩種方向，解釋此現象的可能原因為電場的加入使{201}面出現所需越過的能障降低。
4. 最後初步以電場穩定靜電造成之分子鍵的角度，解釋原子力顯微鏡中觀察得到在外加電場下{110}面上的 step 沿{-110}以及{001}方向並存的現象。



第八章 展望

電場對於蛋白質結晶系統的影響為晚近才開始的新議題，本實驗觀察得到一些有趣的現象，並獲得階段性的成果。但實驗之中仍有些疑點並未獲得完全的瞭解，仍可進一步思考，討論。在此僅將幾點仍未獲得適當解釋的現象以及未來可發展的實驗方向作如下建議：

1. 本文中關於晶體成長的討論均建立於 HEWL 結構為一般條件最常出現的 tetragonal 形式上。未來應實際以 x-ray 繞射量測實際結構，以確定假設的正確性。
2. 關於晶體的成長速度是考慮晶體品質以及反應決定步驟(control step)的重要參數，未來應更進一步以干涉式顯微鏡量測晶體成長速度。
3. 本文之實驗皆在常溫、直流電壓下進行，未來可考慮改變電壓參數，例如以脈衝式的電壓進行實驗。
4. 本實驗使用之蛋白質為 HEWL，未來應廣為嘗試其他種類之生物巨分子，觀察是否有類似的現象。
5. 本實驗結果中曾提及 HEWL 的[-110]方向有延電場方向排列的趨勢，但其原理仍屬未知。除應推敲其原理外，此現象可應用於製作各種需要方向性的生醫材料上，例如骨骼，肌肉等等，此方面的應用值得重視。



參考資料

¹ Darby N. J. "Protein structure" Oxford University Press ; Oxford , 1993

² Alexander A. Chernov "Protein and their growth" J. of Structure Biology 142 (2003) p3-21

³ Charles E. BUGG "The Future of Protein Crystal Growth" J. of crystal growth 76(1986) p535-544

⁴ Peter G. Vekilov and J. Iwan D. Alexander "Dynamics of Layer Growth in Protein Crystallization" Chem. Rev. 100(2000) p2061-2089

⁵ A. Mcpherson "Crystallization of Biological Macromolecules" 1999 ,Cold Spring Harbor , N.Y

⁶ P. Jolles ed. "Lysozyme : Model Enzyme in Biochemistry and Biology" 1996 , Birkhauser Verlag Basel , Switzerland

⁷ Black, C. C. F. etc. "On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule" Proc. R. Soc. London, Ser. B 167 (1967) p365-377

⁸ Alexander Mcpherson "Macromolecular crystal as revealed by atomic force microscopy" J. of Structural Biology 142 (2003) p32-46

⁹ Dennis E. Koppel "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy : The Method of Cumulants" J. of Chemical Physics 57 (1972) p4814-4820

¹⁰ Francois Thibault "Optimizing protein crystallization by aggregate size distribution analysis using dynamic light scattering" J. of crystal growth 122 (1992) p50-59

¹¹ Light scattering

¹² Galkin, O.,Vekilov, P.G. "Direct determination of the nucleation rate of protein crystals " J. Phys. Chem. 103 (1999) p10965-10971

¹³ D.A. Porter K.E. Easterling, "Phase Transformations in Metals and Alloys" second edition, 1992, Chapman & Hall

¹⁴ Pieter Rein ten Wolde and Daan Frankel "Enhancement of protein nucleation by critical density fluctuations" Science 277 (1997) p1975-1978

¹⁵ James D. Gunton "Nucleation of ordered solid phase of proteins via unstable and metastable high-density sates : phenomenological approach" 2004 MRS spring meeting symposium Q

¹⁶ Bruce Garetz "Recent developments in non-photochemical laser-induced nucleation" 2004 MRS spring meeting symposium Q

¹⁷ S.D Durbin “Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization” J. of crystal growth 76(1986) p583-591

¹⁸ R.C. DeMATTEI and R.S. FEIGELSON “growth rate study of canavalin single crystal” J. of crystal growth 97(1989) p333-336

¹⁹ R.C. DeMATTEI and R.S. FEIGELSON “Thermal methods for crystallization biologival macromolecules” J. of crystal growth 128(1993) p1225-1231

²⁰ S.D Durbin “Simulation of lysozyme crystal growth by the monte carlo method” J. of crystal growth 110(1991) p41-51

²¹ S.D Durbin “Studies of crystal growth mechanisms of proteins by electron microscopy” J. Mol. Biol 212 (1990) p.673-774

²² S.D Durbin “Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy” J. of crystal growth 122 (1992) p71-79

²³ S.D Durbin “In situ studies of protein crystal growth by atomic force microscopy” J. Phys. D : Appl. Phys. 26(1993) B128-132

²⁴ Yu .G. Kuznetsov and A.J. Malkin “In situ atomic force microscopy studies of protein and virus crystal growth mechanisms” J. of crystal growth 168 (1996) p63-73

²⁵ Toshitaka Nakada “Direct AFM observations of impurity effects on a lysozyme crystal” J. of crystal growth 196 (1999) p503-510

²⁶ Peter G. Vekilov “Nonlinear response of layer growth dynamic in the mixed kinetic-bulk-transport regime” PHYSICAL REVIEW E (54), 1996, p 6650-6660

²⁷ P.G. Vekilov, F. Rosenberger “Dependence of lysozyme growth kinetics on step sources and impurities” J. of crystal growth 158(1996) p540-551

²⁸ P.G. Vekilov, F. Rosenberger “Nonlinear dynamics of layer growth and consequences for protein crystal perfection” J. of crystal growth 196(1999) p261-275

²⁹ Peter G. Vekilov and J. Iwan D. Alexander “Dynamic of layer growth in protein crystallization” Chemical Rev. (100)2000 p2061-2089

³⁰ AFM

³¹ William A. Tiller “Thermodynamic and kinetic considerations for cystal growth of complex molecules from solution” J. of crystal growth 76(1986) p607-617

³² Felix B Sheinerman “Electrostatic aspects of protein-protein interactions”

³³ M. Taleb, “Crystallization of protein under an external electric field” J. of crystal growth 200(1999) p575

³⁴ M. Taleb, “Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field” J. of crystal growth 232(2001) p250

³⁵ Pascal Retailleau , “No salting-in of Lysozyme Chloride observed at low ionic strength over a large range of pH ” Biophysics Journal 73(1997) p2156-2163

