

單分子光譜與螢光影像的介紹與應用

Introduction and Application of Single Molecule Spectroscopy and Fluorescence Microscopy

張大釗、徐瑞鴻、楊屹沛、張健忠

Ta-Chau Chang, Jui-Hung Hsu, Yih-Pey Yang, Cheng-Chung Chang

傳統的光譜方法是基於量測群體分子的表現，所得到的平均值。而單分子光譜則提供吾人單一分子的光譜特質，經由量測單一狀態值的分布曲線，完全不同於群體平均值，特別是將一些模糊、甚至極微小的重要現象分辨顯明出。單分子光學實驗可針對在空間和時間的非均質系統，提供更深入的觀察與研究。本文中，僅簡略介紹本實驗室的單分子量測之裝置、時間解析單分子量測與螢光影像的初期結果。希望能經由單分子光學技術提供 DNA 四股結構的結構變化與機制的資訊。將進行單分子光譜顯微技術追蹤藥物進入細胞的途徑，與監視藥物與目標物的作用。

Conventional spectroscopic methods provide the average values of an ensemble of probe molecules. Single molecule (SM) spectroscopy enables to give the spectral properties of individual molecule and to completely eliminate the ensemble averaging. The SM measurement provides new insights into any system with spatial or temporal inhomogeneity. Here we begin with two examples, exciton dynamics and quadruplex structure of telomeric DNA, to emphasize the importance of SM methods. We will briefly describe the setup of single molecule spectroscopy and fluorescence microscopy, some preliminary results of time-resolved SM lifetime measurements and fluorescence images. Currently, we study the structural conversion of guanine-rich DNA by using SM-FRET method. In addition, we plan to apply SM imaging to trace the pathway of the drug delivery into cell and to monitor the function of drug upon interacting with the target.

一、前言

分子間的認知與交互作用是長久以來的重要研究主題。從事分子認知機制 (recognition mechanism)、鍵結位置 (binding sites)、構形變化 (structural change) 以及其動態活性 (dynamical activity) 間的關

係研究，對於基礎科學的深根、生命科學的探討、新的材料分子或是藥物分子的研發是非常重要的。近幾年本實驗室利用高解析燒孔光譜，研究主客分子間的交互作用；諸如：探針分子與 DNA 間的作用位置與機制⁽¹⁾。但是燒孔光譜提供的是量測群體的平均值 (ensemble average)。為了達到更高的光譜

解析能力，在美國加州的 Moerner 研究群嘗試逐漸降低客分子的濃度 (10^{-5} M – 10^{-9} M)，以期量測到單一分子的燒孔光譜。終於在 1989 年，Moerner 與 Kador 發表第一篇單分子吸收光譜⁽²⁾。由於當時的訊噪比過低，法國玻爾多的 Orrit 與 Bernard 在 1990 年發表第一篇相同系統的單分子螢光光譜，大幅的增加了訊噪比⁽³⁾。這一系列的實驗都是在非常低溫下 (1.4 K) 進行。這是由於傳統吸收光譜的譜線 (line) 會因溫度升高而均相增寬 (homogeneous broadening)，或因電子聲子耦合 (electron-phonon coupling) 隨溫度的升高而增寬，進而掩蓋電子 (或稱零聲子) 躍遷譜線而成為譜帶 (band)。另外，由於各個染料分子在溶劑中所處的環境不相同，造成躍遷譜線有程度不一的漂移，導致譜線增寬為譜帶，這是常見的非均相增寬 (inhomogeneous broadening)，這些增寬的原因都會降低雷射光的單一選擇性。為了可以在室溫下進行單分子量測，科學家進而研發出近場光學與遠場掃描光學影像⁽⁴⁾。再由於 CCD 相機的研發成功，促使單分子量測在許多研究中成為非常有用的偵測方法⁽⁵⁾。

單分子光譜與螢光影像現今被廣泛應用在不同的領域中，在此先介紹兩項基礎應用來強調單分子光譜的重要功能。(1) 光合作用的重要性是無庸置疑的。在藻類或細菌中的光合作用，一般相信光被光接受體 2 (light harvest, LH2) 吸收後，經由能量傳遞至 LH1 中的反應中心，進而誘導電荷分離，將光能轉為化學能。在細菌中的 LH2 含有兩組不同的蛋白質體，B800 環與 B850 系統分別吸收 800 與 850 nm。在傳統的光譜中它們呈現兩個寬頻的譜帶。1999 年，荷蘭萊登 (Leiden) 的 Schmit 研究群發現在 B800 與 B850 的單分子光譜中有顯著的不同⁽⁶⁾。B800 的單分子光譜中呈現系列窄頻寬的譜線，主要是由於區域性的耦合作用。但是在 B850 的單分子光譜中則呈現一個寬頻的譜帶，主要是由於同步激發分子在環上的非區域性耦合作用。這項結果不但說明能量傳遞的機制，同時也顯示單分子光譜可用來鑑定分子聚合體的電子結構。單分子光譜的重要是可以顯明被群體平均值量測所模糊的重要現象。(2) DNA 端粒 (telomere) 在生命科學上是極重要的研究領域⁽⁷⁾。特別是 DNA 端粒

與生物的老化或癌症有相當的關聯性^(7b)。DNA 端粒通常是由重複的 guanine (G)-rich 序列所組成。例如，人類的端粒序列是具有重複的 T₂AG₃ 序列所組成。重要的是有一小段單股約 150–200 鹼基的重複 G-rich 序列懸在染色體的 3' 端，這小段的序列有可能形成特殊的四股結構。在 *in vitro* 實驗中，具有四個重複 T₂AG₃ 單鏈的 DNA 序列可以聚集形成四股結構，特別是在具有鈉或鉀離子之溶液中⁽⁸⁾。這是由於四個 G-鹼基可經由 Hoogsteen 氫鍵形成一環狀的平面 G-四方結構 (G-quartet)^(8a)。然而有趣的問題是：直到 2003 年都還沒有文獻證實人類的 DNA 端粒有 G-四股結構的存在。其中的原因可能是：在染色體中絕大部分的 DNA 是雙股結構，假設有四股結構的存在，也只是由非常少的 G-rich 序列所形成。因此傳統方法所量測的群體平均值無法顯明微少的四股結構特質。我們最近利用本實驗室所合成的 BMVC 探針分子對四股結構的特殊螢光性質，經由共軛焦單分子光譜的原理，首次提出人類染色體端粒具有四股結構的實驗證據⁽⁹⁾。單分子光學技術的另一項重要功能就是揭開一些少數極微小、但極關鍵性的生物現象。

偵測單分子光譜的條件可從降低雷射光激發體積與降低樣品濃度開始。一般在立方公分的有機固態分子中約有 10^{22} 個分子。假設光激發體積是 10^{-11} 立方公分 ($10 \mu\text{m}^3$)，平均偵測一個單一分子的樣品濃度需為 10^{-11} 莫耳濃度。然而在低溫 (1.4 K) 下的光譜中，由於非均勻波寬約為均勻波寬的 10^4 倍，因此樣品濃度可提昇到 10^{-7} 莫耳濃度。另外使用窄頻寬的雷射激發紅邊的吸收譜線，可以再增加雷射光對激發單一分子的選擇性。然而要在 10^7 個分子中偵測到單一探針分子的螢光訊號，顯然該探針分子需具有一定的光學性質。而現今可以用來進行單分子量測的探針分子相當有限，因此發展或鑑定新的螢光探針分子將會是另一重點發展。通常探針分子需要較高的吸收係數 (absorption extinction coefficient)、高螢光量子產率 (quantum yield) 與承受長時間光照射下的穩定特質。一個剛性的平面大分子 (如 perylene derivatives)，同時具有較小的電子聲子耦合作用，比較有機會成為單分子光譜中的探針分子。

在本文中，將簡略的介紹本實驗室的單分子量測之實驗裝置、初期的實驗結果、進行中的實驗與未來的研究方向。

二、實驗裝置

根據 Wild 教授在瑞士 ETH 中心的單分子量測實驗架構，我們在原分所也架設了單分子光譜與廣場 (wide-field) 螢光影像的裝置，如圖 1⁽¹⁰⁾。實驗裝置基本上可以分為三部份：雷射光源、顯微技術及偵測系統。本實驗室所使用的雷射包括連續式 Ar⁺ 雷射的 514 與 488 nm 波長或 100 皮秒 (10^{-10} s) 鎖模脈衝式 Nd:YAG 雷射的 532 nm (coherent)。一個倒置式 Zeiss 顯微鏡用來觀測單分子系統，螢光訊號則經由高靈敏度的 CCD 相機 (Andor) 或是雪崩式的光二極體 (avalanche photodiodes, APD) 量測。激發光與放射光都是經由同一個放大倍率 $100\times$ 、 $NA = 1.3$ 的顯微物鏡所進行。一個雙色鏡片 (dichroism mirror, Omega) 將雷射光導向樣品，同時能將放射 (螢) 光導向偵測系統。一組 Oriel 的濾光片用來擋住雷射的散色光或選擇特定的波長區域。這個裝置只需切換一個發散透鏡就可以交互進行單分子光譜與廣場影像的實驗。由 APD 所偵測的訊號，經由電腦 SPC-630 (Becker-Hickl) 卡的單光子計數器收集處理。影像面積大約是 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ，而單分子量測光點的直徑約為 $0.5 \mu\text{m}$ 。

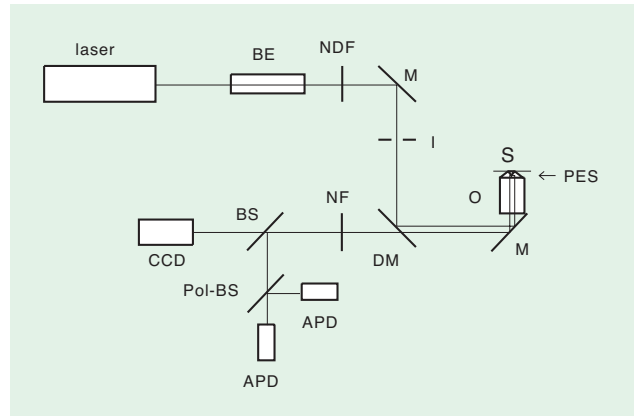


圖 1. 單分子量測實驗裝置。

三、時間解析單分子量測

我們將 10^{-10} M 的染料分子 (DiI) 溶於含 5% PMMA 的甲苯中，將溶液經由旋轉鍍膜 (spin-coating) 在多重清潔處理後的蓋玻片上。殘餘物或雜質會嚴重干擾實驗準確度。圖 2(a)、2(b) 顯示 DiI/PMMA 分別在通氮氣與空氣下，經由 CCD 量測的廣場螢光影像。在連續的影像數據中，我們清晰觀測到探針分子放射光的閃爍 (blinking)，特別是在空氣中與通氮氣下有明顯的不同。圖 2(c) 顯示一些 DiI 單分子放射光的閃爍時間軌跡，閃爍間距可從數十秒到一百毫秒 (系統解析時間)，最終造成光漂白 (photobleaching)。閃爍的可能原因是光誘導結構變化，如 DiI 分子中間鍵橋 (conjugated bridge) 的扭曲或是 isomerization^(11a)。

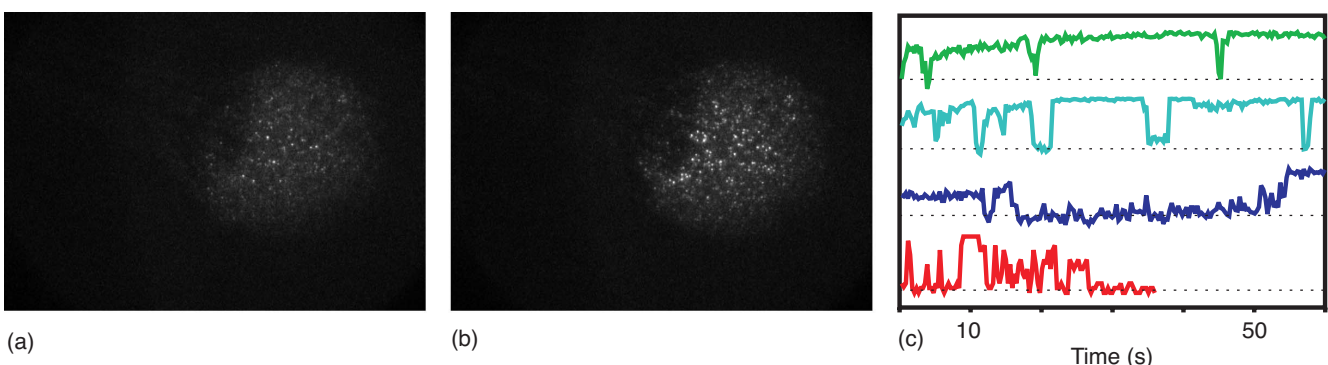


圖 2. DiI/PMMA 分別在 (a) 通氮氣與 (b) 空氣下，經由 CCD 量測的廣場螢光影像。(c) 四個 DiI 單分子單分子放射光的閃爍時間軌跡，時間解析為 0.1 秒。

我們進而轉換為共軛焦 (confocal) 的方式，利用兩個 APD 分別量測單一的 DiI 分子在 PMMA 薄膜中的平行與垂直極化光強度的總和與比值之軌跡，如圖 3(a)、3(b)。雖然其兩組光強度的總和有明顯的擾動 (fluctuation)，但是其比值卻無明顯變化，說明 DiI 分子在 PMMA 薄膜中沒有明顯的轉動。若是將 APD 所量測的單光子計數以 0.2 ms 為累積單位展開時，可以量測到放射光在毫秒的閃爍時間軌跡，如圖 3(c)。這個閃爍現象是歸因於 intersystem crossing (ISC) 的機制所造成^(11b-d)。當分子被激發後經由 ISC 停留在 T_1 態時，此時無法產生螢光；只有當該分子回到基態 S_0 後，才能重新開始產生螢光。因此這段黑暗期的時間分佈可以提供該分子在 T_1 態的生命期。由於空氣中的氧分子會經由氧猝滅 (oxygen quenching) 而縮短分子在 T_1 態停留的時間，因此 Wild 研究群利用通氮氣來去除氧猝滅的影響^(11d)。他們根據 248 組實驗數據，經由 Poisson-分布的確認後的結果，得到 DiI 分子在 PMMA 薄膜中的 T_1 態生命期在氧氣中是 0.32 ms，在氮氣中則增長為 40 ms。這項結果不但證實了 ISC 反應機制，同時也可以用來說明圖 2(a) 的螢光影像變化。

當使用的光源是 100 皮秒的鎖模脈衝 Nd:YAG 時，利用單一脈衝輸出為座標的時間解析單光子計數可以量測分子在激發態 S_1 的生命期，如圖 4(a)。在改變激發光的強度約一個級數的實驗中，仍得到相同的螢光半衰期。根據 64 個單分子數據的分析結果，DiI 分子在 PMMA 薄膜中的 S_1 態生命期主要分布在 3.3–4 ns，如圖 4(b)。這項結果與文獻中的報導相符合。不同時間解析的單分子量測，可用來探討不同的反應動力機制。

我們進而計劃將時間解析單分子量測應用在研究 DNA 之結構變化。這是因為 DNA 的二次結構之多元性，從單鏈到不同的四股結構^(8c)。再加上 DNA 不同結構間的轉換⁽¹²⁾，更增加 DNA 形態的複雜性。佛斯特 (Forster) 理論預測能量經由供給者 (donor) 的螢光傳遞到接受者 (acceptor) 的效率 (E)，是與兩者間距離 (R) 的六次方倒數有關； $E \sim [1 + (R/R_0)^6]^{-1}$ 。 R_0 是佛斯特距離，對一般常使用配對分子的距離約在 50 Å。這個特質特別適用於探

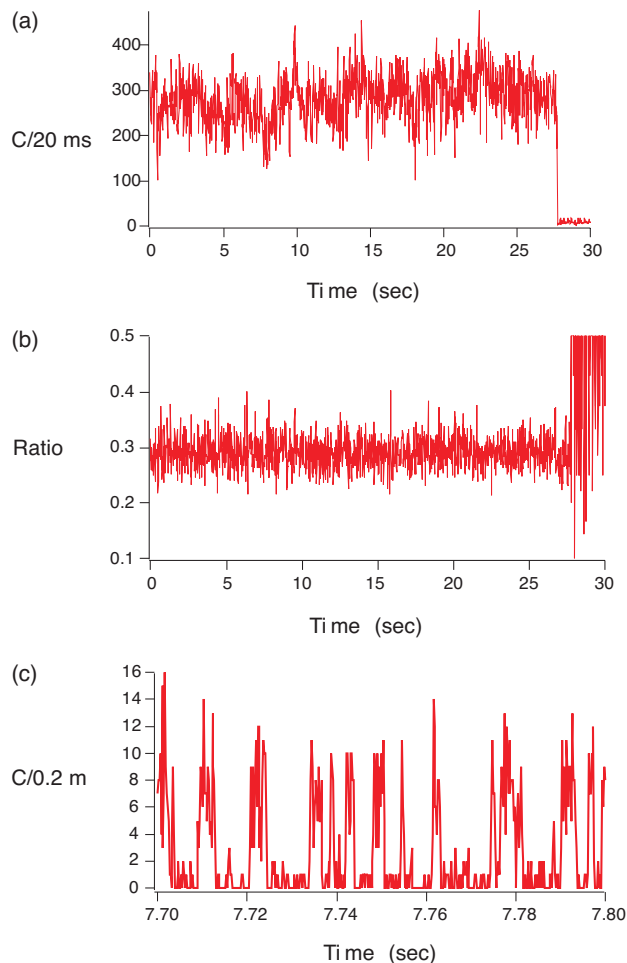


圖 3. DiI 在 PMMA 薄膜中，經兩個 APD 量測的平行與垂直極化光強度的 (a) 總和與 (b) 比值之軌跡，累積時間為 20 毫秒。(c) APD 直接量測的光強度變化，累積時間為 0.2 毫秒。

測距離在 20–100 Å 間的生物分子結構變化。現任職於美國 UCLA 的 Weiss 教授將探針分子鏈接在 DNA 或蛋白質上，經由單分子光譜量測供給者—接受者間的佛斯特能量傳遞之效率，研究生物分子的結構變化⁽¹³⁾。

由於一些探針分子可能會因與 DNA 作用而影響其生命期。諸如 Edman 研究群發現 tetramethyl rhodamine (TMR) 分子共價鏈接在 18-mer 的 DNA 序列時會出現兩個生命期值：0.86 ns 與 3.70 ns⁽¹⁴⁾。前者是由於 TMR 與 G-鹼基間快速的電子轉移所造成，而後者是 TMR 在水分子環繞下的生命期。Sauer 研究群在研究 oxazine MR121 與 G-鹼基

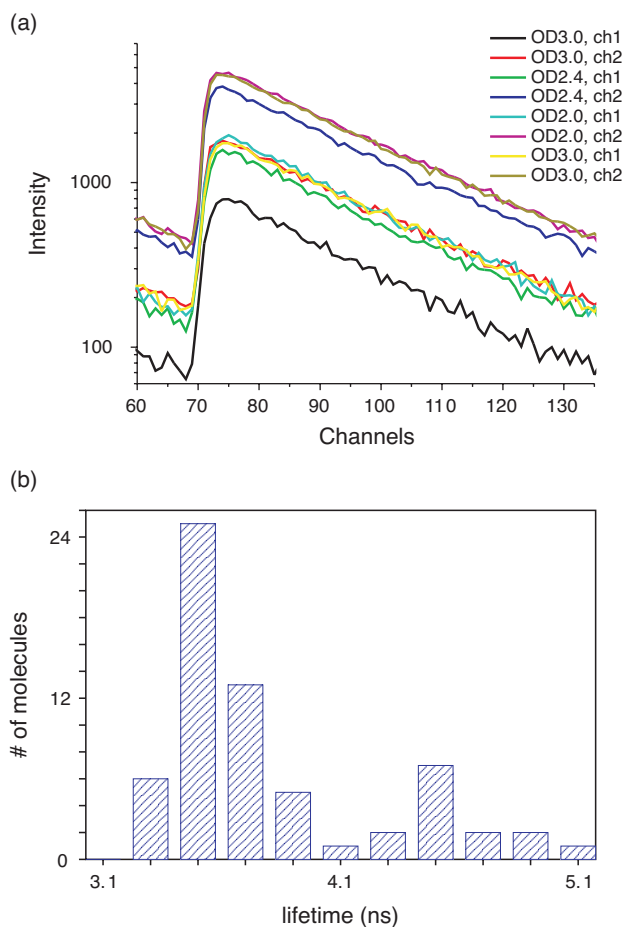


圖 4. (a) 改變激發光的強度一個級數，DiI 分子在 PMMA 薄膜中激發態 S_1 的生命期。(b) APD 所量測 64 個單分子的 S_1 態生命期的分布圖。

作用時，也發現類似結果⁽¹⁵⁾。因此在使用佛斯特能量傳遞探測 DNA 的結構變化前，需要先確定探針分子與 DNA 的作用關係。

一般探針分子可分別經由嵌入 (intercalation)、溝槽 (groove binding) 與共價鍵接 (covalent binding) 等不同方式與 DNA 作用。但是環狀有機分子對於 G-rich 四股結構的作用方式，則可能是平躺 (external stacking) 在四方結構的外面。因此藉由不同探針分子對特定 DNA 結構之研究，有助於探討分子結構變化與耦合機制的相關性，進而可以研究耦合模式對反應功能之影響，或許能夠提供藥物設計的資訊。目前我們正在量測 PTCD (perylene derivative) 與 PTCD- $d(T_2AG_3)_4$ 複合物的生命期。這是因為 PTCD 是非常好的單分子探針分子^(16a)，並

且可以外躺在四方結構上^(16b)。筆者計劃將另一探針分子鍵接在 $d(T_2AG_3)_4$ 的五端，利用能量傳遞的變化探討 DNA 四股結構在不同狀況下的結構變化與機制。

四、單分子螢光影像

2001 年底，德國慕尼黑的 Brauchle 研究群將螢光分子 Cy5 經由 adeno 接在病毒體上，利用單分子螢光影像的時間追蹤，觀察單一病毒體進入活體細胞的軌跡與動力學⁽¹⁷⁾。Brauchle 研究群的成功範例，促使筆者計劃嘗試觀察藥物分子進入活體細胞的路徑。首先為了確定可以追蹤單分子在液態中的移動，我們觀察 DiI 分子溶在凝膠中的螢光影像。清晰觀測到大部分的分子只是繞著原點的小幅度位移，但有少數分子卻游走八方。圖 5(a) 顯示兩個 DiI 分子的長距離在單一平面上的移動軌跡。假設其移動是單純由於擴散作用，統計它們在平面上的連續位移，則 DiI 在凝膠中的擴散係數分布如圖 5(b) 所示，它們的平均值約為 $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。若是使用兩個 APD 量測 DiI 分子在凝膠中不同極化光強度的比值軌跡，則呈現明顯的擾動。經比對總和值的軌跡變化，不同的擾動現象可能是由於該分子在溶液中的轉動所造成。

接著為了確定能觀測到藥物分子可以進入細胞內，將約 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 高濃度的小紅莓 (doxorubicin) 滴在細胞培養皿中。數小時後取出玻片經過 PBS 清洗，在螢光影像中可以觀察到小紅莓均勻分布在細胞核內，如圖 6(a)。若是將濃度降低至 10^{-7} M ，就非常難以分辨小紅莓的螢光，當然就更不用提量測小紅莓的單分子螢光。

本實驗室合成的 BMVC 分子具有抑制 DNA 端粒酶活性的功能，因此有可能成為抗癌的藥物⁽¹⁸⁾。這是因為在高於 85% 的癌細胞中，發現有端粒酶的存在。但是在絕大多數的正常細胞中，卻沒有端粒酶的存在^(7b)。端粒酶的功能是維持 DNA 端粒的長度，使細胞可以持續分裂複製。因此若能抑制端粒酶的活性，可以恢復細胞的衰老凋零，進而抑制癌細胞的成長。另外 BMVC 分子是非常有潛力的螢光探針分子^(18c)。這是因為

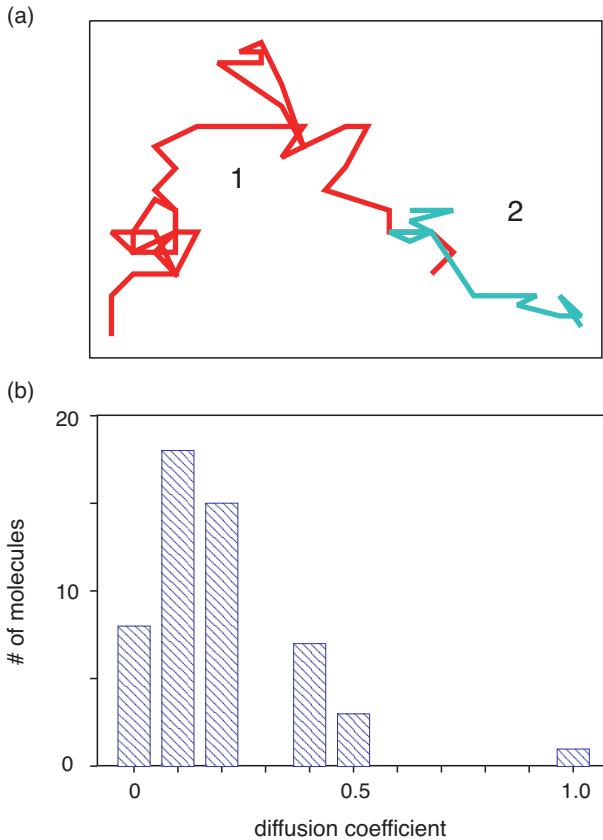
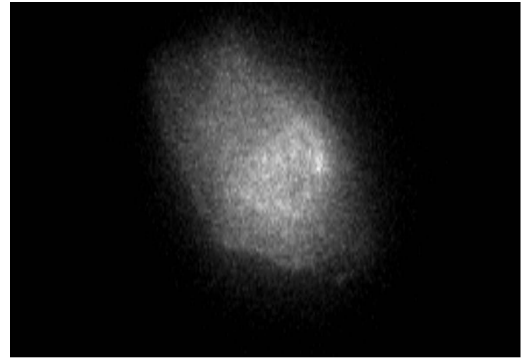


圖 5. (a) DiI 單分子在凝膠中移動的軌跡。(b) 擴散係數分布圖，平均值約為 $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。

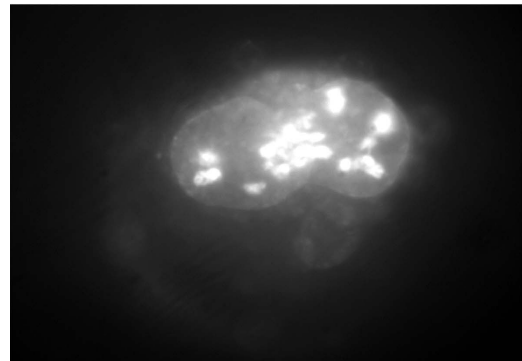
BMVC 與 DNA 的作用，具有很高的結合係數 (binding affinity)。同時它的螢光強度也會因為與 DNA 作用而增強約兩個級數。我們將約 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 濃度的 BMVC 滴在細胞培養皿中。約一小時後，在螢光影像中可以清晰觀察到 BMVC 在細胞核內的聚集螢光亮點，如圖 6(b)。目前我們嘗試克服光漂白與細胞中自體螢光的問題，希望能將濃度降低至 10^{-9} M 後，追蹤其螢光軌跡。研究藥物分子的輸送路徑可以開啟另類研發藥物分子與探討病毒與抗體的研究。

五、結語

我們建立一個單分子光學量測實驗裝置，單分子光譜可用來測量生命週期，單分子螢光影像用來追蹤單一分子的運動軌跡。單分子螢光共振能量傳遞可用來研究構型的變化，特別是 DNA 端粒四股



(a)



(b)

圖 6. (a) 約 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 的小紅莓均勻分布在 CL1-1 肺癌細胞核內的廣場螢光影像。(b) 約 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 的 BMVC 在 CL1-1 肺癌細胞核內的廣場螢光影像。

結構的組合和分解之過程與機制，以及藥物與 DNA 的結合位置。我們將應用單分子光譜顯微技術追蹤藥物進入細胞的途徑與監視藥物與目標物的作用。單分子光學量測與光鑷子 (optical tweezer)、微流體 (microfluid)、微陣列 (microarray)、PCR 等技術相結合將是可預期的。而研發適用的探針分子也是重要的。

誌謝

首先感謝中央研究院與國科會對此系列工作的支持。特別謝謝瑞士 ETH 中心的魏沃實教授 (Prof. Urs P. Wild) 所給予的專家指導與熱心幫助。並感謝實驗室中參與研究的同仁：郭怡君、邱福隆、吳偉菘。

參考文獻

- (a) J. Y. Cheng, S. H. Lin, and T.-C. Chang, *J. Phys. Chem.* **B102**, 5542 (1998). (b) K. H. Huang, J. Y. Wu, W. S. Wu, C. C. Chang, H. L. Lee, and T.-C. Chang, *J. Lumin.*, in press (2004). (c) C. Hecht, J. Friedrich, and T.-C. Chang, *J. Phys. Chem. B*, in press (2004).
 - W. E. Moerner and L. Kador, *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2535 (1989).
 - M. Orrit and J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.*, **65**, 2716 (1990).
 - (a) E. Betzig and R. Chichester, *Science*, **262**, 1422 (1993). (b) X. S. Xie and R. C. Dunn, *Science*, **265**, 361 (1994). (c) S. Nie, D. T. Chiu, and R. N. Zare, *Science*, **266**, 1018 (1994). (d) J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, and L. E. Brus, *Science*, **272**, 255 (1996).
 - (a) R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, and W. E. Moerner, *Nature*, **388**, 354 (1997). (b) W. T. Yip, D. H. Hu, J. Yu, D. A. Vanden Bout, and P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. A*, **102**, 7564 (1998). (c) T. Y. Latychevskaia, K. K. Liang, M. Hayashi, C. H. Chang, A. Renn, U. P. Wild, J. H. Hsu, T.-C. Chang, and S. H. Lin, *J. Chin. Chem. Soc.*, **50**, 477 (2003).
 - A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Kohler, T. J. Aartsma, and J. Schmit, *Science*, **285**, 400 (1999).
 - (a) E. H. Blackburn and C. W. Greider, *Telomeres*, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996). (b) N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowas, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, and J. W. Shay, *Science*, **266**, 2011 (1994).
 - (a) M. Gellert, M. N. Lipsett, and D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 2013 (1962). (b) Y. Wang and D. J. Patel, *Structure*, **1**, 262 (1993). (c) G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, and S. Neidle, *Nature*, **417**, 876 (2002).
 - C. C. Chang, I. C. Kuo, I. F. Ling, C. T. Chen, P. J. Lou, J. J. Lin, and T.-C. Chang, *Science*, in depth evaluation (2004).
 - J. H. Hsu, U. P. Wild, S. H. Lin, and T.-C. Chang, *Proceedings of APAM 2002 International Conference*, 25, Hsin-Chu, Taiwan, Dec. 9-11 (2002).
 - (a) K. D. Weston and S. B. Burratto, *J. Phys. Chem.*, **A102**, 3635 (1998). (b) J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, and N. F. van Hulst, *Phys. Rev. Lett.*, **83**, 2155 (1999). (c) D. S. English, A. Furube, and P. F. Barbara, *Chem. Phys. Lett.*, **324**, 15 (2000). (d) C. G. Hubner, A. Renn, I. Renge, and U. P. Wild, *J. Chem. Phys.*, 115, 9619 (2001).
 - (a) H. Arthanari and P. H. Bolton, *Anticancer Drug Des.*, **14**, 317 (1999). (b) H. Han, D. R. Langley, A. Rangan, and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8902 (2001).
 - (a) T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6264 (1996). (b) A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, and P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3670 (1999). (c) S. Weiss, *Science*, **283**, 1676 (1999).
 - (a) L. Edman, U. Mets, and R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6710 (1996). (b) S. Wennmalm, L. Edman, and R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10641 (1997).
 - M. Sauer, K. H. Drexhage, U. Lieberwirth, R. Muller, R. S. Nord, and C. Zander, *Chem. Phys. Lett.*, **284**, 153 (1998).
 - (a) M. Pirota, A. Renn, M. H. V. Werts, and U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.*, **250**, 576 (1996). (b) J. T. Kern and S. M. Kerwin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3395 (2002).
 - G. Seisenberger, M. U. Ried, Th. Endres, H. Buning, M. Hallek, and C. Brauchle, *Science*, **294**, 1929 (2001).
 - (a) C. C. Chang, J. Y. Wu, and T.-C. Chang, *J. Chin. Chem. Soc.*, **50**, 185 (2003). (b) C. C. Chang, J. Y. Wu, J. J. Lin, Y. C. Lu, C. T. Chen, I. F. Ling, and T.-C. Chang, submitted to *J. Med. Chem.* (2003). (c) C. C. Chang, J. Y. Wu, C. W. Chien, W. S. Wu, H. Liu, C. C. Kang, L. J. Yu, and T.-C. Chang, *Anal. Chem.*, **75**, 6177 (2003).
-
- 張大釗先生為美國愛荷華州立大學化學博士 現任中央研究院原子與分子科學研究所研究員。
 - 徐瑞鴻先生為國立台灣大學物理博士，現任國立中山大學助理教授。
 - 楊屹沛先生為國立陽明大學醫工博士，現任國立宜蘭大學助理教授。
 - 張健忠先生為淡江大學化學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所博士後研究員。
 - Ta-Chau Chang received his Ph.D. in chemistry from Iowa State University, USA. He is currently a research fellow at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
 - Jui-Hung Hsu received his Ph.D. in physics from National Taiwan University. He was a postdoctoral at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica. He is currently an assistant professor in the Institute of Materials Science and Engineering of National Sun Yat-Sen University.
 - Yih-Pey Yang received his Ph.D. in biomedical engineering from National Yang-Ming University. He was a postdoctoral at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica. He is currently an assistant professor in the Department of Biomechatronic Engineering of National I-Lan University.
 - Cheng-Chung Chang received his Ph.D. in chemistry from Tamkang University. He is currently a postdoctoral at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.