

同步輻射圓二色光譜實驗站與應用

Synchrotron Radiation Circular Dichroism End Station and Its Applications

江素玉、李政怡、馮學深、蔡宛霖、羅祥文

Su-Yu Chiang, Cheng-I Lee, Hok-Sum Fung, Wan-Lin Tsai, Shiang-Wen Luo

圓二色光譜是一個快速且簡易研究具有圓二色性物質之結構變化的重要技術，常應用於鑑定蛋白質的結構與變化、判別藥物的鍵結性、探討醣類反應性和生物薄膜功能等生物化學和結構生物的研究。同步輻射圓二色光譜利用同步輻射在真空紫外光區的良好線偏振性、高光通量和連續調變波長的特性，具有樣品需求量低，且可提供短波長光區的重要資訊等優點，可開拓新的應用領域，特別是在結構和功能基因體的研究。國家同步輻射研究中心於 2008 年 8 月在 SEYA 光束線完成圓二色光譜實驗站的建造，並開放用戶使用，特撰文介紹實驗站與應用。

Circular dichroism spectroscopy is a simple and quick method for studying structural alterations of optical materials in aqueous solution under various experimental conditions, for example, as a function of temperature or chemical denaturant. Applications in biochemistry and structural biology include characterization of proteins and their conformation changes and dynamics, as well as examining macromolecular interactions and functions of biological membranes. Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectroscopy requires small amount of samples and can provide new information in shorter wavelength region by taking advantages of synchrotron radiation-highly linear polarization, high photon flux and continuous tunability in the vacuum ultraviolet region; accordingly, this spectroscopic method can further explore new research areas, particularly in structural and functional genomics. In this article, we will introduce the new SRCD end station at SEYA beamline in NSRRC and its applications.

一、前言

圓二色光譜 (circular dichroism spectroscopy, CDS) 是鑑定具圓二色性生物分子結構的重要光譜技術之一。1969 年 Greenfield⁽¹⁾ 成功地以圓二色光譜估計出蛋白質的二級結構，之後，隨著結構生物學的迅速發展，生物大分子結構的鑑定成為生命科學研究領域的熱門課題，圓二色光譜的重要性與使

用率隨之增加，已成為生物物理與生物化學研究上的標準配備。當然，圓二色光譜的解析度較差，所提供的結構資訊有限，無法和目前常用的核磁共振光譜 (nuclear magnetic resonance spectroscopy) 和 X 射線結晶學 (X-ray crystallography) 等高解析生物結構研究方法的資訊相提並論，但是具有提供少量樣品於水溶液中隨溫度、pH 值等參數變化的資料，以及光譜掃描時間快速等優點，配合近年來建立的

免費光譜分析資料庫，如 DichroWeb (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>)，可與 X 射線結晶學或核磁共振光譜等耗時且數據處理複雜的技術達相輔相成之效⁽²⁾。

圓二色光譜測量具有光學活性 (optically active) 或對掌性 (chiral) 樣品對左旋 (left-) 與右旋圓偏振 (right-circularly polarized light) 吸收度的差異，主要分為紫外光區 (ultraviolet region, 190–300 nm) 的電子躍遷圓二色光譜 (electronic circular dichroism, ECD) 與紅外光區 (infrared region, 400–4000 cm^{-1}) 的分子振動圓二色光譜 (vibrational circular dichroism, VCD)。目前在生物分子結構的研究中，以電子躍遷圓二色光譜為主，特別是蛋白質、去氧核糖核酸等有機物質，其光學構型常常隨環境之溫度、酸鹼值的不同而變化，研究圓二色光譜的變化，有機會觀察到光學構型改變的過程與特性。以蛋白質分子為例，分子中各個氨基酸殘基 (amino acid residue) 本身的不對稱中心具光學活性外，蛋白質分子的複雜結構如蛋白質的骨幹勝肽鍵 (peptide bond)、芳香氨基酸殘基 (aromatic amino acid residues) 以及雙硫鍵 (disulfide bond)，也會影響不對稱中心的光學活性，提供不同圓二色的光譜訊號。

實驗室的圓二色光譜儀主要使用氬氣電弧燈為光源。由於氬氣燈短波長的光強度低，加上光譜儀的光學元件本質並非針對短波長實驗而設計，因此進行樣品水溶液光譜測量時，受限於水分子的強吸收，不易測得波長短於 190 nm 的圓二色訊號。短波長訊號的重要性在於可提供更多電子躍遷的新資訊，而這些資訊和骨幹勝肽結構有關，有助於更準確地鑑別不同的二級結構。同步輻射圓二色 (synchrotron radiation circular dichroism, SRCD) 光譜利用同步輻射在紫外光區具有良好的線偏振性、高光通量和連續調變波長等特性，相對地，不僅克服了樣品量少和短波長光區的限制，提供新電子躍遷的資訊與良好的訊雜比 (signal-to-noise ratio)，更可縮短測量的時間，降低樣品被破壞的可能性，而有機會測得低吸收度樣品的光譜，開拓新的應用領域，特別是在藥物篩檢、結構和功能基因體的研究^(2,3)。

1980 年美國國家同步輻射光源 (National Synchrotron Light Source, NSLS) 開啟了同步輻射在圓二色光譜的應用。爾後，歐洲的同步輻射研究中心如英國 SRS、德國 BESSY2、法國 SOLEIL 和丹麥 ISA 等也陸續建造同步輻射圓二色光譜實驗站，或設計專屬的高光通量光束線，發展新的應用領域，其中英國投入許多的資源，現居世界的領導地位。至於亞洲方面，日本 HiSOR 和中國 BSRF 同步輻射中心已分別在既有光束線建造圓二色光譜實驗站，中國 NSRL 和澳洲 ASL 同步輻射中心興建專屬光束線和實驗站的計畫也正在規劃中。

有鑑於同步輻射圓二色光譜的迅速發展，國家同步輻射中心於 2006 年 11 月舉辦了一場同步輻射圓二色光譜研討會，會中邀請英國 Bonnie A. Wallace 教授和國內三位圓二色光譜研究的學者甘魯生博士、呂平江教授與楊裕雄教授，介紹同步輻射圓二色光譜的最新發展，以及圓二色光譜應用於蛋白質、核酸和生物膜的研究。該中心實驗系統的設計人員也於會中報告在 SEYA 光束線建立同步輻射圓二色光譜實驗站的規劃。最後，與會人員討論新實驗站所帶來的研究契機及未來相關設施的建造，並成立圓二色光譜用戶群，共同參與未來的研究發展和相關事宜^(4,5)。2008 年 8 月圓二色光譜實驗站經過一年半的規劃、設計、建造和測試，已在 SEYA 光束線完成建造，開放用戶使用，特撰文介紹實驗站與應用。

二、電子躍遷圓二色光譜基本原理

化學分子電子躍遷所涵蓋的波長範圍很廣，主要包括近紫外光區 (near ultraviolet region, 250–300 nm)、遠紫外光區 (far ultraviolet region, 190–250 nm)，以及真空紫外光區 (vacuum ultraviolet region, VUV, < 190 nm)。以蛋白質分子為例，圓二色光譜可分為 300 nm 以下的勝肽鍵和側鏈芳香基團之電子躍遷，以及在 300–700 nm 之間由蛋白質輔基等在發色基團所誘發產生的訊號。其中 250 nm 以下的圓二色光譜包含蛋白質二級結構的詳細資訊，例如 α -螺旋結構在約 222 和 208 nm 處有兩個分別屬於 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 電子躍遷的負值譜帶，於

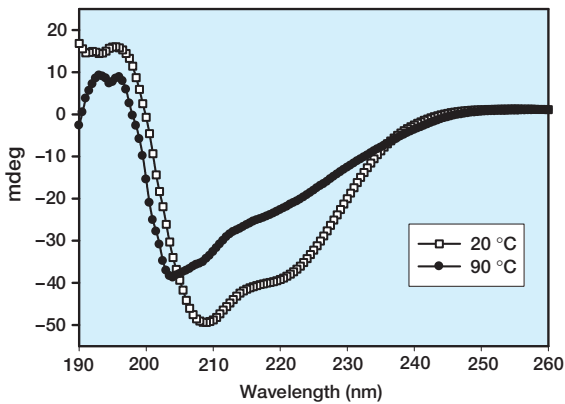


圖 1. 小鼠普昂蛋白質的傳統圓二色光譜，蛋白質濃度為 0.6 mg/mL，置於 pH = 5 之醋酸鈉 (sodium acetate) 緩衝溶液中。兩光譜分別為樣品 20 °C 及 90 °C 時，經五次掃描疊加而成的。此蛋白質在正常狀況下是 α -螺旋為主的二級結構，升溫至 90 °C 時，則呈現 α -螺旋與 β -摺疊的綜合表徵。

~192 nm 附近有一個高正值的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 電子躍遷譜帶，又 β -摺板的蛋白質在約 217 nm 有一個小且負值的 $n \rightarrow \pi^*$ 電子躍遷譜帶，於約 195 nm 附近有一個正值的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 電子躍遷譜帶，但強度僅約 α -螺旋結構的一半。也因此利用蛋白質二級結構的特徵光譜 (characteristic spectra)，且具有加成性 (additive) 的特性，可以各種數學演算法解析圓二色光譜得到二級結構的組成，也可改變實驗條件研究結構組成變化的情形⁽⁶⁾。圖 1 為 α -螺旋結構為主的小鼠普昂蛋白質 (mouse prion protein) 的傳統圓二色光譜。此蛋白質在正常狀況下是 α -螺旋為主的二級結構，當受熱或受其他因素變性時，二級結構會產生明顯的變化，如升溫至 90 °C 時， α -螺旋的表徵明顯減少，且呈現 α -螺旋與 β -摺板的綜合表徵。

圓二色光譜是測量具有光學活性或對掌性樣品對左旋與右旋圓偏振吸收度的差異。一般在特定波長的吸收度差值與樣品濃度和光徑的關係，可用 Beer's law 表示如下：

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) Cl = \Delta \epsilon Cl \quad (1)$$

其中 ΔA 是左旋和右旋圓偏振吸收度的差值， ϵ_L 和 ϵ_R 是左旋和右旋圓偏振的莫耳消光係數 (molar extinction coefficient，單位： $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)， C 是莫耳濃度 (molar concentration，單位： M)， l 是路徑長度 (pathlength，單位： cm)， $\Delta \epsilon$ 是左旋和右旋圓偏振莫耳消光係數差值，稱作莫耳圓二色性 (molar circular dichroism，單位： $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)。

實驗室的圓二色光譜則常以微度 (mdegrees) 或橢圓性 (ellipticity, θ) 表示訊號強度，主要以樣品 camphorsulphonic acid (CSA) 已知的莫耳消光係數 $34.52 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ 和莫耳圓二色性 $2.36 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ 分別進行樣品濃度和圓二色訊號的校正。常用的基準是濃度 1 mg/mL 和路徑長度 1 cm 的 CSA 水溶液，可在 290.5 nm 位置測得 335 微度的圓二色訊號。另外，為了容易進行光譜比對，圓二色光譜常除去濃度和路徑長度的因素，以樣品的莫耳橢圓性 (molar ellipticity，單位： $degrees \cdot cm^2 / dmol$) 表示，兩者的關係如下：

$$[\theta] = \frac{100\theta}{Cl} \quad (2)$$

圓二色光譜也常用莫耳消光係數差值表示，其與莫耳橢圓性的關係如式 (3)。

$$[\theta] = 3298.2 \Delta \epsilon \quad (3)$$

另外，均單位橢圓性 (mean unit ellipticity，單位： $degrees \cdot cm^2 / dmol \cdot residue$) 常用於歸一化高分子圓二色光譜為單位組成，對蛋白質而言，均殘基橢圓性 (mean residue ellipticity, MRE，單位： $degrees \cdot cm^2 / dmol$) 也可以由均殘基重量 (mean residue weight, MRW) 求得：

$$MRE = \frac{(MRW)\theta}{10cl} \quad (4)$$

其中 c 是濃度 (單位： mg/mL)。一般 α -螺旋結構蛋白質的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 譜帶的均殘基橢圓性約 25000 – 65000 $degrees \cdot cm^2 / dmol$ ，相當於莫耳消光係數差值 8 – 20；相對地， β -摺板蛋白質的均殘基橢圓性較小，約 10000 – 16000 $degrees \cdot cm^2 / dmol$ ，相當於莫耳消光係數差值為 3 – 5⁽²⁾。

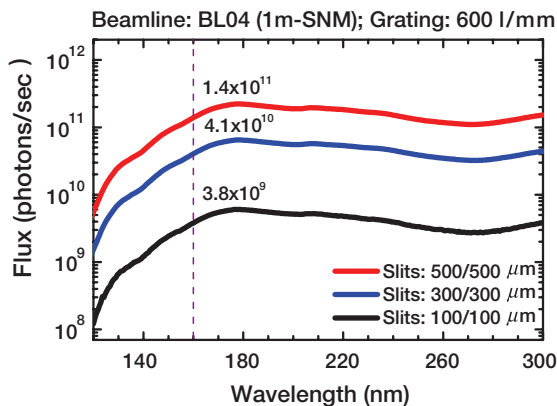


圖 2. SEYA 光束線在狹縫高度分別為 0.1、0.3 和 0.5 mm 時，波長 120–300 nm 的光通量。

三、國家同步輻射圓二色光譜實驗站

國家同步輻射研究中心在現有的 SEYA 光束線終端架設圓二色光譜實驗站。SEYA 光束線由一組聚焦鏡、1 m 的 Seya-Namioka 單光儀和一組狹縫組成，利用三個不同光區的光柵 (600 lines/mm：100–300 nm, 1200 lines/mm：60–120 nm, 2400 lines/mm：30–80 nm) 分光，可提供波長 30–300 nm 連續調變的激發光。配合圓二色光譜實驗，我們在 SEYA 光束線的出光口，先利用上下兩片擋板選取白光中心線偏振的部分，再利用 600 lines/mm 光柵分光，提供波長 100–300 nm 的線偏振激發光。圖 2 是光電二極體偵測器測得狹縫高度 0.1、0.3 和 0.5 mm 時，波長 120–300 nm 的光通量；狹縫高度 0.5 mm 時，波長 160 nm 以上的光通量皆大於 1×10^{11} 光子/秒，波長 105 nm 以下的光通量會受限於隔絕真空的氟化鋰光窗吸收而無法測得。激發光的線偏振性佳 (高於 90%)，可直接利用光彈

調變器 (photoelastic modulator, PEM) 以 50 kHz 的頻率轉換為圓偏振光，再經由聚焦鏡聚焦到樣品上 (照射截面積約為 $2 \times 1 \text{ mm}^2$)，進行圓二色光譜測量。光彈調變器由氟化鋰晶體組成 (PEM 100, UHV, Hinds)，適用的最短波長是 120 nm，最長的波長受限於光柵只能達到 300 nm。圖 3(a) 是光彈調變器將線偏振光轉換為左旋或右旋圓偏振光的機制；圖 3(b) 是光彈調變器在波長 130、160 和 220 nm 輸出的弦波訊號，其中波長 130 nm 的弦波訊號有些微變形，會造成些微測量誤差。

圖 4 是同步輻射圓二色光譜實驗站，主要包括線性偏極片 (polarizer)、光彈調變器、樣品真空腔、光電倍增管 (photomultiplier, Hamamatsu R6836) 和訊號控制器。線性偏極片是用來確認激發光的偏振性，作為控制擋板開口的基準，測量時會移開光軸。樣品真空腔由不鏽鋼腔體組成，前後利用氟化鋰光窗隔離真空，進行光譜測量時，可以配合樣品槽的特性，填充氮氣或利用真空幫浦維持在小於 5×10^{-3} Torr 真空度；又真空腔底座加裝電子加熱系統 (peltier thermoelectric unit)，可進行室溫到 90 °C 的變溫實驗。光電倍增管以氟化鎂為視窗，適用於真空紫外光區。光譜測量時，利用自動回饋控制器即時調變光電倍增管的高電壓可維持定值的輸出直流電，以降低不同波長光的強度變化所造成的吸收差異。

圖 5(a) 是圓二色訊號擷取處理系統，包括訊號處理器 (signal-conditioning unit, SCU-100, Hinds) 和鎖相放大器 (lock-in amplifier, 5210, Signal Recovery)。功能是將光電倍增管輸出的訊號經前置放大器放大後，傳送到訊號處理器進行交流和直流訊號分離，而當直流訊號維持固定值時，交流訊

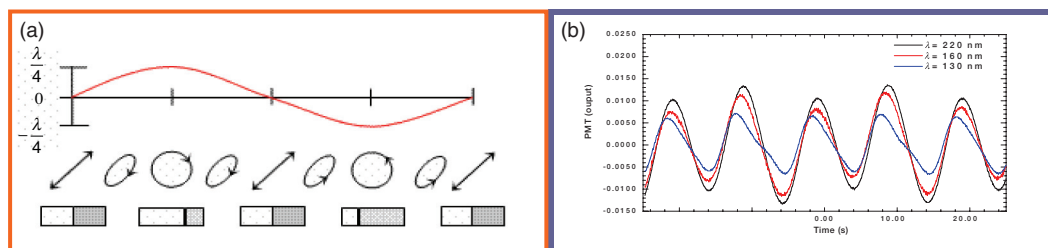


圖 3.(a) 光彈調變器將線偏振光轉換為左旋或右旋圓偏振光的機制；(b) 光彈調變器在波長 130、160 和 220 nm 輸出的弦波訊號。

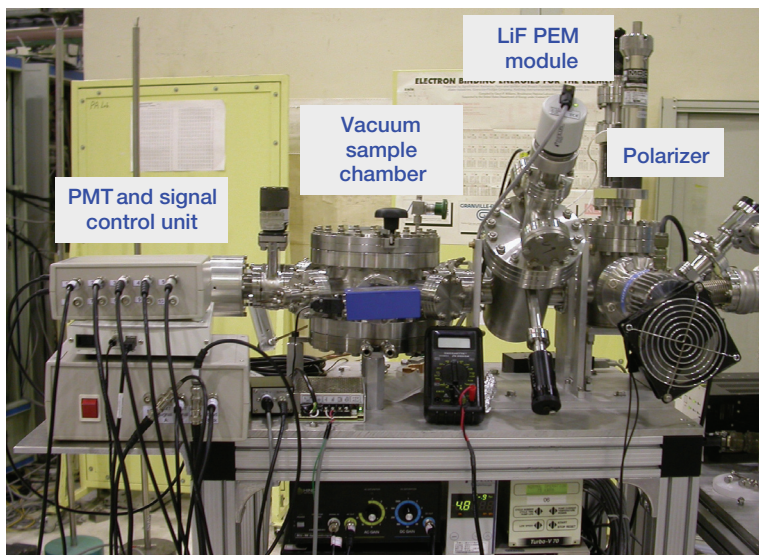


圖 4. 同步輻射圓二色光譜實驗站，主要包括線性偏極片、光彈調變器、樣品真空腔、光電倍增管及訊號控制器。

號會和圓二色吸收強度成正比，可利用鎖相放大器積分特定時域的交流訊號和濾除雜訊，再傳送到電腦進行數據處理，得到圓二色光譜。除了利用鎖相放大器進行訊號處理，我們也得到圓二色光譜儀 Aviv 公司的協助，設計專用的閘式積分器累加特定時域的交流訊號，希望省去鎖相放大器複雜的操作程序，使研究人員能輕鬆且正確的進行光譜量測。圖 5(b) 是光電倍增管和閘式積分器組合圖。不過，新的閘式積分器由於設計的積分時間短，對光源的穩定度和強度的要求較高，目前測得的光譜品質較差，正努力研究積分時間和光譜特性的關係，希望在兩者之間取得平衡，找出最適當的積分時間。

設計短路徑樣品槽是發展同步輻射圓二色光譜技術的另一項重點。同步輻射光強度強，樣品需求量少，但因生物樣品大多是水溶液，水分子對波長短於 180 nm 的紫外光吸收很強，採用短光徑可減少水分子的吸收，測量更短波長的光譜⁽⁷⁾。短路徑樣品槽主要由兩片厚度 2 mm 的氟化鈣片組成，可通過波長 140 nm 以上的激發光。至於樣品的光徑則以不同厚度的鐵弗龍墊片調變，最小的厚度為 0.007 mm，若需更短的光徑，則以氟化鈣片上塗佈的金屬薄膜或光阻厚度控制，圖 6(a) 是塗佈厚度 0.002 mm 金屬薄膜的氟化鈣片。圖 6(b) 是樣品槽的不鏽鋼固定座，利用固定座外圍的精密切度，可準

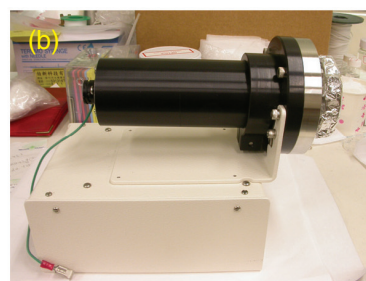
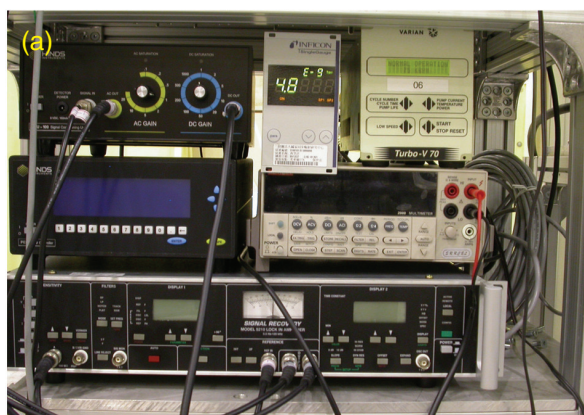


圖 5.(a) 圓二色訊號擷取處理系統，包括訊號處理器和鎖相放大器。功能是将光電倍增管輸出的訊號進行交流和直流訊號分離，然後利用鎖相放大器積分和去除雜訊，再傳送到電腦進行數據處理，得到圓二色光譜。(b) 光電倍增管和閘式積分器組合圖，目的在取代鎖相放大器。

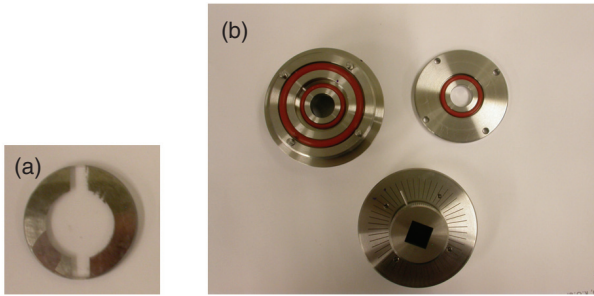


圖 6. (a) 塗佈厚度 0.002 mm 金屬薄膜的氟化鈣片。(b) 樣品槽的不鏽鋼固定座，可準確的調整光徑，維持多次裝置樣品的一致性。

確的調整光徑，維持多次裝置樣品的一致性。

圓二色光譜實驗站的性能和短波長極限測試，分別以 CSA 和 myoglobin 水溶液的圓二色光譜加以驗證說明。首先，以標準樣品 CSA 水溶液 (濃度 1 mg/mL、路徑長度 1 cm) 進行 185–330 nm 範圍的光譜校正。我們測得譜帶 291 和 192.5 nm 的比值為 2.0 ± 0.2 ，和文獻結果一致，但短於 190 nm 的訊號和文獻值有差異，原因是 SEAY 光束線的光通量遠低於英國 CD12 光束線 (約 100–1000 倍)，大部分的光子被長路徑的水分子吸收，造成 CSA 吸收低，光譜誤差大。提高樣品濃度以增加吸收度和縮短光徑來減少水分子吸收是克服低光通量限制的可行方法。圖 7 是 CSA 水溶液 (濃度 20 mg/mL、路徑長度 0.5 mm) 的圓二色光譜，和英國 SRS 光束線 CD12 (濃度 10 mg/mL、路徑長度 0.1 mm) 測得的光譜一致⁽⁸⁾。

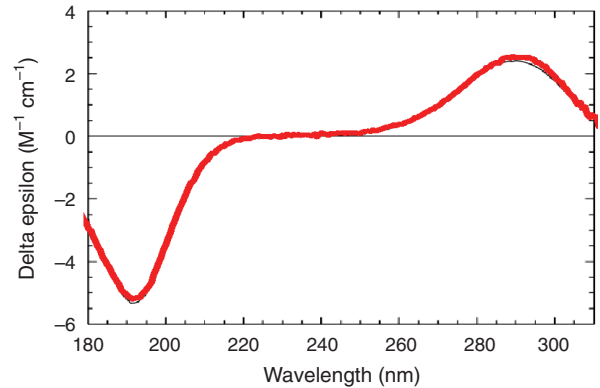


圖 7. CSA 圓二色光譜在國家同步輻射中心 SEYA 光束線 (紅色譜線，濃度 20 mg/mL，路徑長度 0.5 mm) 和英國 SRS 光束線 CD12 (黑色譜線，濃度 10 mg/mL，路徑長度 0.1 mm) 測得的光譜一致。

測試短波長極限，我們測量 myoglobin 水溶液 (H_2O 與 D_2O) 的圓二色光譜，並和 CD12 光束線測量的光譜作比較。重水 (D_2O) 的吸收波長比水 (H_2O) 的短約 5 nm，選擇 D_2O 為溶液，可到達更短的波長極限，但樣品溶液的準備不容易，且價格高。圖 8(a) 與 (b) 分別為 myoglobin 水溶液 (80 mg/mL in H_2O ， ~ 0.001 mm 光徑) 和重水溶液 (80 mg/mL in D_2O ， ~ 0.002 mm 光徑) 的圓二色光譜；圖中黑色譜線是 CD12 光束線測量的光譜，波長 200–330 nm 範圍的實驗條件是 10 mg/mL in H_2O 和 0.01 mm 光徑，波長 160–200 nm 範圍則是 10 mg/mL in D_2O 和 0.001 mm 光徑。由光譜比較得知，我們的

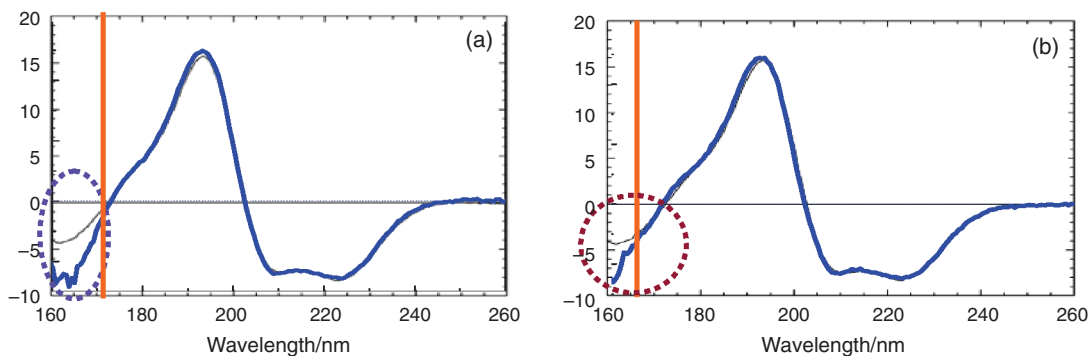


圖 8. (a)–(b) 藍色譜線是在 SEYA 光束線測量的 myoglobin 水溶液 (80 mg/mL in H_2O ， ~ 0.001 mm 光徑) 和重水溶液 (80 mg/mL in D_2O ， ~ 0.002 mm 光徑) 圓二色光譜；黑色譜線是 CD12 光束線測量的光譜。我們的 myoglobin 水溶液圓二色光譜在 172–260 nm 和 CD12 的光譜一致，myoglobin 重水溶液光譜則可到達更短波長 166 nm。

myoglobin 水溶液圓二色光譜在 172–260 nm 範圍和 CD12 的光譜一致，myoglobin 重水溶液光譜的一致性，則如預期，可到達更短波長 166 nm。

綜合測試的結果，現階段利用本中心新實驗站可以進行波長 166–300 nm 圓二色光譜的測量。短波長的極限 166 nm 雖然比英國高光通量 CD12 光束線的 160 nm 略高，卻遠優於傳統圓二色光譜儀的 185 nm。目前也完成樣品變溫系統的測試，正進行 myoglobin 的變溫實驗，至於更進一步降低樣品濃度和得到更短波長光譜，則需要高光通量的光束線。今年初本中心光束線設計人員已初步完成新光束線的概念設計，未來將積極與圓二色光譜用戶群共同討論如何提升實驗站功能和發展新研究領域。

四、同步輻射圓二色光譜於生物研究之應用

同步輻射圓二色光譜由於在真空紫外光區的光強度增強，相對於傳統圓二色光譜，具有樣品量少、測量時間短、對微小變化的靈敏度高、有機會研究不同緩衝液的效應等優點，因此不僅可以擴展光譜資訊的波長範圍，更可以增加資訊的廣度與深度，開拓新應用領域。例如結構和功能基因體學隨著基因序列的完成而日益蓬勃發展，其中鑑定蛋白質的立體結構，進而判斷蛋白質的折疊情形，以及相對應的功能性，是一個重要的研究課題，利用同步輻射圓二色光譜進行這方面的研究，已漸漸發展為可與 X 射線結晶和核磁共振光譜相輔的重要資訊。下面將針對同步輻射圓二色光譜於生物研究之應用介紹，將著重在蛋白質的研究，特別是在結構和功能性的應用性^(2,3,6)。

1. 蛋白質結構體鑑定

就蛋白質而言，提供蛋白質二級結構的詳細資訊以 250 nm 以下的圓二色光譜為主，尤其要研究 β -摺板蛋白質的形成和反摺板的特性，分辨 α -螺旋和 β -摺板蛋白的效應，或是研究兩結構之間的轉變。圖 9 是 α -螺旋與 β -摺板的同步輻射圓二色光譜。應用同步輻射光源可增加真空紫外光區的訊號，如 α -螺旋在 ~175 nm 屬於電荷躍遷的正值訊號， β -摺板蛋白質分別在 ~180 和 ~170 nm 有負值

雙峰訊號，將可以更明確地辨認這兩項結構的光譜特徵，清楚地解析蛋白質二級結構的資訊。另外，蛋白質三級結構也會造成真空紫外區圓二色光譜的差異，若能建立參考資料庫，也有機會進行三級結構的研究⁽⁹⁾。

2. 蛋白質摺板研究

鑑定並且描繪蛋白的表現情形是蛋白質體研究的一個重點，其中蛋白質摺板變化的情形與蛋白質的表現或是疾病變化的過程息息相關，更是一個重要的研究課題。一般 X 射線結晶技術較容易應用於結晶的蛋白質，核磁共振光譜則較適合研究低分子量的蛋白質，相對地，圓二色光譜可以輕易地應用於研究蛋白質二級結構特性和溫度、pH 值或時間的關係，瞭解蛋白與蛋白間的摺板情形，並應用於預測相關的功能。應用同步輻射圓二色光譜的短波長和高靈敏度優點，有較高的機會得到蛋白質 α -螺旋與 β -摺板之外的超二級結構 (motif)，提高結構分析和研究結構變化的準確度，也可更清楚地觀察溫度、pH 值或時間效應所造成的細微圓二色訊號之變化。Wallace 教授由同步輻射圓二色光譜得到多種 β 超二級結構，如 β -螺旋、 β -三明治等⁽⁹⁾。文獻也曾報導應用同步輻射圓二色光譜研究 *Candida antarctica* lipase 在不同 pH 值的 α -螺旋組成，結果發現在極酸或鹼性的環境下， α -螺旋的組成有很大的改變，進而影響到它的活性⁽¹⁰⁾。

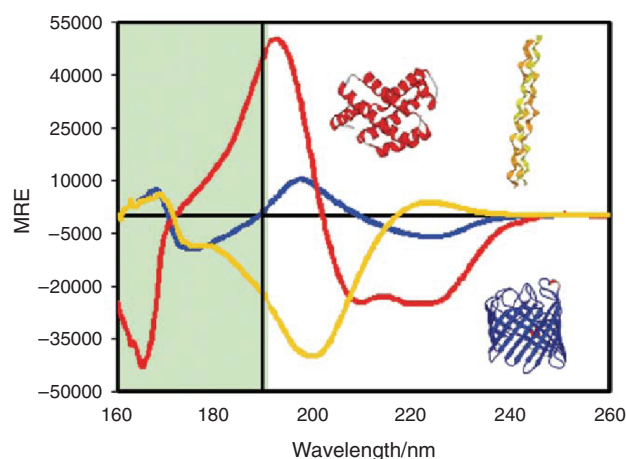


圖 9. α -螺旋與 β -摺疊結構的同步輻射圓二色光譜，其中紅色主要為 α -螺旋蛋白質，藍色主要為 β -摺疊蛋白質，黃色主要為膠原蛋白。

3. 功能基因質體學和蛋白質體學的應用

功能基因質體學 (functional genomics) 研究的一個主要目標是鑑定所有單一蛋白質的特性，進而利用這些資訊增進基因序列決定結構的準確性，也因此，如何有效且快速鑑定未知蛋白質的特性，成為一個重要的關鍵。同步輻射圓二色光譜擁有的優點，配合建立的資料庫，將有機會在這方面扮演重要的角色，特別是在目標的選擇，可與生物資訊預測結果相輔，達到快速篩檢的目的。至於蛋白質體學 (proteomics)，一個重要目標是鑑定和特徵化未知結構與功能的表現蛋白質。目前常用生物資訊技術去選取未知功能的蛋白質，經表現後，用圓二色光譜快速篩檢。同樣地，同步輻射圓二色光譜也可提供較佳的優勢，不僅對蛋白質特性結構的鑑定有助益，對研究蛋白質和配合體 (ligand)、鍵結配對或不同緩衝溶液等的作用也可提供重要的資訊⁽²⁾。

4. 藥物與配合體的鍵結

應用同步輻射圓二色光譜，有機會觀測到待測蛋白質與其他分子作用後的細微結構變化，可應用於蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸、蛋白質-脂質等研究。一個重要的應用是研究蛋白質與配合體的鍵結，幫助判斷藥劑是否作用在藥用蛋白目標，同時可建立藥物資料庫，達到快速篩檢的功能。文獻報導應用同步輻射圓二色光譜可確認藥劑和蛋白的鍵結，以及研究添加其他化學物質的效應，也可成功地分辨出某一原生和變種眼蛋白在殘基的差異，至於傳統圓二色光譜，由於靈敏度差、訊雜比低，並無法辨別兩者的差異⁽³⁾。

5. 醣類結構

醣類 (saccharides) 在生化反應的過程中扮演著非常重要的角色，因此研究醣類構型間的轉換和特性成為一個重要的議題。醣類的圓二色光譜主要在 200 nm 以下，傳統圓二色光譜幾乎無偵測到訊號，進行相關研究。相對地，利用同步輻射光，日本研究群成功地測得多種單醣 (monosaccharides) 和雙醣 (disaccharides) 在 160–200 nm 的圓二色光譜，並藉此解析出單醣在水溶液中存在著多種平衡構型，求得各平衡構型的光譜特徵⁽¹¹⁾。

五、結論

國家同步輻射中心現階段在 SEYA 光束線完成圓二色光譜實驗站的建造和測試，並於 2008 年 8 月開放用戶使用。目前可以進行波長 166–300 nm 圓二色光譜的測量，遠優於傳統圓二色光譜儀的短波長極限 185 nm，樣品變溫系統也完成測試，可進行室溫到 90 °C 的變溫實驗，此外，也添購一台傳統圓二色光譜儀 (model 410, Aviv)，提供用戶進行前置實驗測量。歡迎圓二色光譜研究專家、學者申請計畫，利用同步輻射圓二色光譜樣品量少、測量時間短、對微小變化的靈敏度高和進行水溶液測量的優點，共同帶動台灣同步輻射圓二色光譜的發展。

未來同步輻射中心計畫進一步開創新的圓二色光譜應用領域，在世界同步輻射圓二色光譜的研究領域佔有舉足輕重的地位。今年初本中心光束線設計人員已初步完成新高光通量光束線的概念設計，新光束線的光通量將高於 1×10^{13} 光子/秒，達世界一流水平，後續將積極完成新光束線的設計和建造，也計畫結合圓二色光譜用戶群，共同提升實驗站功能，例如增加樣品止流 (stopped-flow) 的功能，進行時間解析 (time-resolved) 的動力學研究，以瞭解蛋白質摺板的機制、蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸、蛋白質-脂質等相互作用的反應動力學，也計畫發展特殊膜蛋白薄膜的製備技術，開創新的圓二色光譜應用領域。

誌謝

特別感謝英國 Bonnie A. Wallace 教授在同步輻射圓二色光譜實驗站和所有相關資訊的協助、圓二色光譜儀公司負責人 Jack Aviv 博士在數據處理系統的技術支援、中央研究院化學研究所退休研究員甘魯生博士在計畫初期提供樣品和協助樣品腔體、樣品槽的設計及建造、以及儀器科技研究中心余宗儒先生和同步輻射研究中心許博淵博士在氟化鈣片加工和鍍膜的幫助。

附註

在同步輻射圓二色光譜實驗站發展的同時，圓二色光譜網站及資料庫的建立也同時在發展，幫助圓二色光譜的處理和分析。DichroWeb (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>) 是一個分析蛋白質二級結構的網站，線上可以利用各種數學演算法和參考資料庫進行數據分析，膜蛋白和短波長的資料也正陸續架構中⁽¹²⁾。CDtool (<http://cdtool.cryst.bbk.ac.uk>) 和 DichroWeb 性質相似，可在個人電腦執行，輸入數據格式不需特殊編排，輸出格式也保留所有數據擷取的資訊，並可自動建立分析數據的資料庫，使用便利，適合醫藥工業建立藥品資料庫⁽¹³⁾。英國 Bonnie A. Wallace 教授更致力於建立 PCDDDB (The Protein Circular Dichroism Data Bank) 蛋白質圓二色光譜的資料庫，目的在提供光譜、結構生物和生物資訊研究人員一個資料模擬和分析蛋白質結構的平台⁽¹⁴⁾。

參考文獻

1. N. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969).
 2. J. Miles and B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 39 (2006).
 3. B. A. Wallace and R. W. Janes, *Biochem. Trans.*, **31**, 631 (2003).
 4. 甘魯生, 盧弘捷, 魏明財, *物理雙月刊*, **29** (1), 9 (2007).
 5. 李耀昌, 陳俊榮, 馮學深, 李志甫, 黃玉山, 李明道, 宋豔芳, 鄭友舜, 江素玉, 陳慶日, 黃佩瑜, 許益瑞, 俞聖法, 吳文桂, *物理雙月刊*, **30** (1), 8 (2008).
 6. B. A. Wallace, *J. Synchrotron Radiat.*, **7**, 289 (2000).
 7. F. Wien and B. A. Wallace, *Appl. Spectrosc.*, **59**, 1109 (2005).
 8. D. T. Clarke and G. Jones, *J. Synchrotron Radiat.*, **11**, 142 (2004).
 9. B. A. Wallace and W. R. Janes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 567 (2001).
 10. R. W. McCabe, A. Rodger, and A. Taylor, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 70 (2005).
 11. K. Matsuo and K. Gekko, *Carbohydr. Res.*, **339**, 591 (2004).
 12. L. Whitmore and B. A. Wallace, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 668 (2004).
 13. J. G. Lees, B. R. Smith, F. Wien, A. J. Miles and B. A. Wallace, *Anal. Biochem.*, **332**, 285 (2004).
 14. B. A. Wallace, L. Whitmore and R. W. Janes, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **62**, 1 (2006).
-
- 江素玉小姐為國立清華大學化學博士，現任國家同步輻射研究中心副研究員。
 - 李政怡小姐為美國耶魯大學化學博士，現任國立中正大學生命科學系助理教授。
 - 馮學深先生為國立中央大學物理博士，現任國家同步輻射研究中心助理研究員。
 - 蔡宛霖小姐為中山醫學大學醫學分子毒理學碩士，現任國科會研究助理。
 - 羅祥文先生為東華大學電機工程碩士，現任國家同步輻射研究中心研究助理
 - Su-Yu Chiang received her Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. She is currently an associate scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
 - Cheng-I Lee received her Ph.D. in biophysical chemistry from Yale University, USA. She is currently an assistant professor in the Department of Life Science at National Chung Cheng University.
 - Hok-Sum Fung received his Ph.D. in physics from National Central University. He is currently an assistant scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
 - Wan-Lin Tsai received her M.S. in medical and molecular toxicology from Chung Shan Medical University. She is currently a research assistant of National Science Council.
 - Shiang-Wen Luo received his M.S. in electrical engineering from National Dong Hwa University. He is currently a research assistant at National Synchrotron Radiation Research Center.