

硬 X 光吸收光譜在生命科學之應用

Applications of Hard X-Ray Absorption Spectroscopy in Life Science

李志甫、許益瑞、俞聖法、羅鳳君、李美儀、許瑛珍

Jyh-Fu Lee, I-Jui Hsu, Steve Sheng-Fa Yu, Feng-Chun Lo, Meiyi Li, Ying-Jen Shiu

因得力於同步輻射高強度且能量連續可調的特性，X 光吸收光譜 (XAS) 現已成為探測各類物質電子及局部原子結構的常用技術。本文將概略描述 XAS 技術之相關原理與數據的處理步驟，並介紹目前國家同步輻射研究中心之 XAS 光束線及實驗站設施，最後以一些實例說明其在生命科學中之應用成效。

Thanks to the high intensity and energy tunability of synchrotron radiation, X-ray absorption spectroscopy (XAS) has become a powerful tool for probing the electronic and local atomic structures of various materials. In this article, we briefly introduce the principles and data analysis procedures of XAS. Besides, several XAS beamlines and endstations at National Synchrotron Radiation Research Center are described. Some examples serve to illustrate the applications of XAS in life science.

一、前言

在傳統 X 光產生器所釋出的能量光譜中，除了陽極靶材的特徵螢光之外，其背景的連續能量分布曲線強度甚低，極不適合作為需要能量掃描的實驗用光源。因此 X 光吸收光譜 (XAS) 一般是利用同步輻射高強度且能量連續可調之特性，藉由單光器進行入射能量的掃描，記錄樣品吸收係數隨光子能量而變化的情形。其中 X 光吸收近邊緣結構 (X-ray absorption near edge structure, XANES) 可反映出吸收原子的電子性質，例如：氧化價數及 *d*-軌域的電子填滿率，並可據以分辨吸收原子所在之晶位對稱性；而延伸 X 光吸收精細結構 (extended X-ray absorption fine structure, EXAFS) 則提供了中心吸收

原子周圍之局部結構訊息，包括：各配位層的原子種類、個數、與中心原子的平均距離 (鍵長)，以及其排列的雜亂程度等。由於待測樣品可以是晶型或非晶型固體，甚至為液體或氣體，因此應用範圍十分廣泛，尤其是各元素的吸收邊緣能量少有重疊，可調節入射能量至各個元素的吸收區進行掃描，以分別偵測，充分發揮其元素選擇性之探測功能，非常適於量測含有多種元素的樣品系統。

在生物體內約有 30% 的蛋白質含有金屬原子，雖然金屬原子在這些蛋白質分子中的含量普遍而言相當低，但其氧化價數與周圍原子間的鍵結狀態卻對蛋白質的功能表現以及所參與的生化反應機制具有決定性的影響，而這些相關的結構訊息十分容易經由 XAS 數據分析而獲得。再者，X 光吸收

光譜所提供之短程有序結構與蛋白質晶體繞射所得之長程有序結構經常互補，亦即可先由中、低解析度之蛋白質晶體繞射數據建立圍繞金屬鍵結中心的配位基空間架構，再進行 XAS 的數據分析，以確保其結果的真實性，而 XAS 所產生的結構參數亦有助於繞射數據的最終精算。何況 XAS 所量測的樣品並不一定為結晶狀態，即便是處於溶液中或生物膜上亦皆可行，因此對於不易長晶的蛋白質樣品更可展現獨特的探測能力。

二、X 光吸收光譜之原理與數據分析

一般而言，較高能量的 X 光具有較強之穿透力，因此物質對於 X 光的吸收係數大致上隨著 X 光能量的提高而遞減。但是當 X 光的能量大到足以將物質中某一特定元素原子的內層電子激發時，便會在吸收光譜（吸收係數對入射能量所作之圖）中造成突然的躍升，發生躍升的能量稱為吸收邊緣（absorption edge），其值隨元素種類及電子所處的能階而異。若被激發的電子原先處於 $1s$ 軌域，亦即所謂的 K 層電子，則對應的激發能量稱為 K -邊緣；至於 $2s$ 、 $2p_{1/2}$ 、 $2p_{3/2}$ 軌域電子的激發能量分別稱為 L_1 、 L_2 、 L_3 -邊緣；另有 M_{1-5} 、 N_{1-7} 等邊緣對應於更外層的電子激發能量。由於吸收係數在 K -邊緣及 L -邊緣處的躍升較為鮮明且相互重疊的情

形不嚴重，因此其對應之光譜特徵較常在各種研究中有所討論與應用。

圖 1 所示為 $K_2Cr_2O_7$ 粉末樣品的 Cr K -邊緣全幅吸收光譜，在相對於吸收邊緣能量 -200 eV 至 -30 eV 的區域稱為吸收前緣區，除非有吸收邊緣能量相近的元素並存，通常吸收前緣區的譜圖特徵皆呈現單調的平滑趨勢。自吸收邊緣 -30 eV 至 $+40$ eV 的區域內經常可見到一些明顯的吸收峰或肩狀突起，這些譜圖特徵統稱為 X 光吸收近邊緣結構 (XANES)，常起源於內層電子躍遷至較高能階，此類躍遷對於圍繞吸收原子的第一配位層之對稱性相當敏感，因此 XANES 可反映晶位的對稱性。

在 $Cr_2O_7^{2-}$ 複合陰離子中，兩個 Cr^{6+} 離子分別位於由七個氧原子形成之兩個四面體中心（其中一個氧原子由兩個四面體所共用），由於四面體結構並非中心對稱，可允許 $1s \rightarrow 3d$ 電四極躍遷發生，造成在約 5993 eV 處之尖銳吸收峰。至於吸收邊緣的位置（通常是取吸收光譜躍升段的反曲點能量，此例約為 6007 eV）則深受吸收原子的氧化價數所影響，亦即愈高的氧化狀態會使吸收邊緣往高能量偏移，不過實際的化學偏移量仍會因配位基的種類及其陰電性而異。另外，吸收曲線上的主峰（俗稱「白線 (white line)」）強度亦常被用來判斷吸收原子 d 軌域之電子填滿程度。由此可知，XANES 主要提供了吸收原子的電子結構訊息。

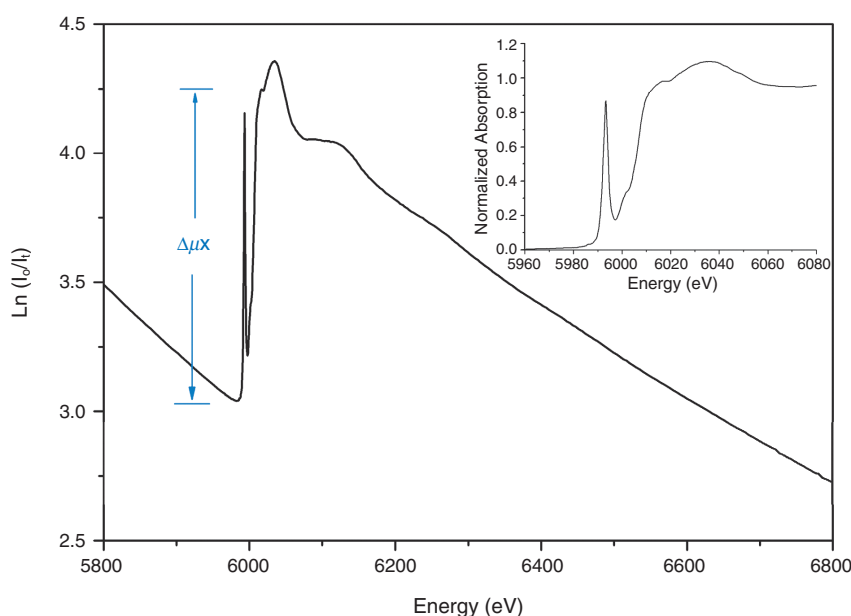


圖 1.
 $K_2Cr_2O_7$ 粉末樣品於室溫下量測所得的 Cr K -邊緣全幅吸收光譜；右上角插圖為 X 光吸收近邊緣結構 (XANES)。

值得一提的是，在略高於吸收邊緣 10–40 eV 的區域內，即使內層電子被游離成光電子，此類低動能的光電子受周遭原子散射的作用極強，使得多重散射 (multiple scattering) 成為主要的效應。雖然局部原子結構亦可由此區域的光譜特徵得之，然而在計算上相當繁雜且費時，因此即便 XANES 的理論計算近年來已有長足進展⁽¹⁾，目前於大多數的實際應用中，仍選用一系列已知價數或配位狀態的標準品作為參考，再和待測樣品進行比對，亦即多屬定性的趨勢觀察而少有定量計算。

自吸收邊緣以上 40 eV 一直延伸至約 1 keV 範圍內的吸收光譜，經常存在許多強弱不等的振盪，此類振盪稱為延伸 X 光吸收精細結構 (EXAFS)。當中心吸收原子 A 的內層電子因吸收 X 光而被游離時，此種光電子將帶著 $E - E_0$ 的動能遠離原子核 (E 為入射光子能量，而 E_0 為吸收邊緣能量)，形成一向外行進的光電子波，其波長為：

$$\lambda_e = \frac{h}{p} = \frac{h}{[2m(E - E_0)]^{1/2}} \quad (1)$$

其中 h 為蒲朗克常數， p 為電子動量， m 為其質量。當吸收原子周圍有其他原子 B 存在時，會將向外行進的光電子波予以背向散射，假設 A 與 B 兩原子相距 R ，則向外行進與背向散射的光電子波之間存在 $2R$ 的路程差，此一路程差將導致彼此的相位差為：

$$\begin{aligned} 2\pi\left(\frac{2R}{\lambda_e}\right) &= 2R\left(\frac{2\pi}{\lambda_e}\right) \\ &= 2R\left[8\pi^2m\left(\frac{E - E_0}{h^2}\right)\right]^{1/2} = 2kR \end{aligned} \quad (2)$$

其中 k 稱為光電子波向量，常以 $\text{\AA}^{-1}$ 為單位。若電子動能的單位為 eV，則

$$k = [0.2625 (E - E_0)]^{1/2} \quad (3)$$

此時向外行進與背向散射的光電子波兩者之間的相位差，將隨著原子間距離及入射光子能量而變化，並產生建設性 (同相) 或破壞性 (反相) 干涉，使得

X 光吸收程序的最終狀態產生調諧作用 (modulation)，而造成吸收曲線的振盪，此即 EXAFS，各振盪的高點對應於光電子波之建設性干涉，而振盪的低點則對應於破壞性干涉。

由以上的敘述可知，EXAFS 包含了吸收原子周圍不同距離之配位層原子的貢獻，如欲進行詳細的數據分析，首先必須將實驗所測得之吸收係數依據下式轉換成 χ ：

$$\chi \equiv \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0} = \frac{\mu x - \mu_0 x}{\mu_0 x} \quad (4)$$

其中 μ 為實驗所測得之吸收係數， x 為樣品厚度，而 μ_0 為假想獨立原子 (周圍無其他原子存在時) 之吸收係數，亦即去除 EXAFS 振盪後的平滑背景曲線。數學上經常利用分段的三次多項式擬合出 EXAFS 區域內的平滑背景，並外插至吸收邊緣；而吸收前緣區的背景則常以一直線進行適配，兩段背景在吸收邊緣處的高度差 $\Delta\mu x$ 稱為躍升梯度 (參見圖 1)。公式 (4) 中的分母常以 $\Delta\mu x$ 取代之，因此僅需將吸收係數之實驗觀測值減去平滑背景，即可分離出 EXAFS 振盪，再除以吸收邊緣處的躍升梯度，所得即為 EXAFS 函數 χ 。如此是將同一光譜圖中的兩個特徵量相除，而進行正規化處理，因此 χ 實際上是以單一原子為基礎，與實驗時的樣品用量及其濃度無關，而完全取決於吸收原子周圍的原子排列情形。至於 EXAFS 數據分析的步驟，則另有專文詳細介紹⁽²⁾。

由於 EXAFS 振幅會隨 k 值的增大而迅速衰減，因此常將 $\chi(k)$ 乘以 k^n 進行加權運算，以使整個數據範圍內的振幅維持大致相當的水平，圖 2 (a) 與 (b) 所示分別為 k^2 加權運算前後的結果。下一處理步驟則是將加權後的 $\chi(k)$ 數據由 k 空間經傅立葉變換至 R 空間，如此可將不同鍵距的配位原子層貢獻依照 R 的大小順序排開，如圖 2(c) 所示。必須留意的是，進行傅立葉變換時如未做光電子波相位偏移 (phase shift) 的修正，則圖 2(c) 中各峰位置將較實際鍵距短約 0.3–0.5 $\text{\AA}$ 。在 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 晶體結構之中，以 Cr 為中心吸收原子時，其第一配位層含有四個氧原子，因此圖 2(c) 中最強的尖峰即對應 Cr-O 鍵結，至於第二配位層中的一個 Cr

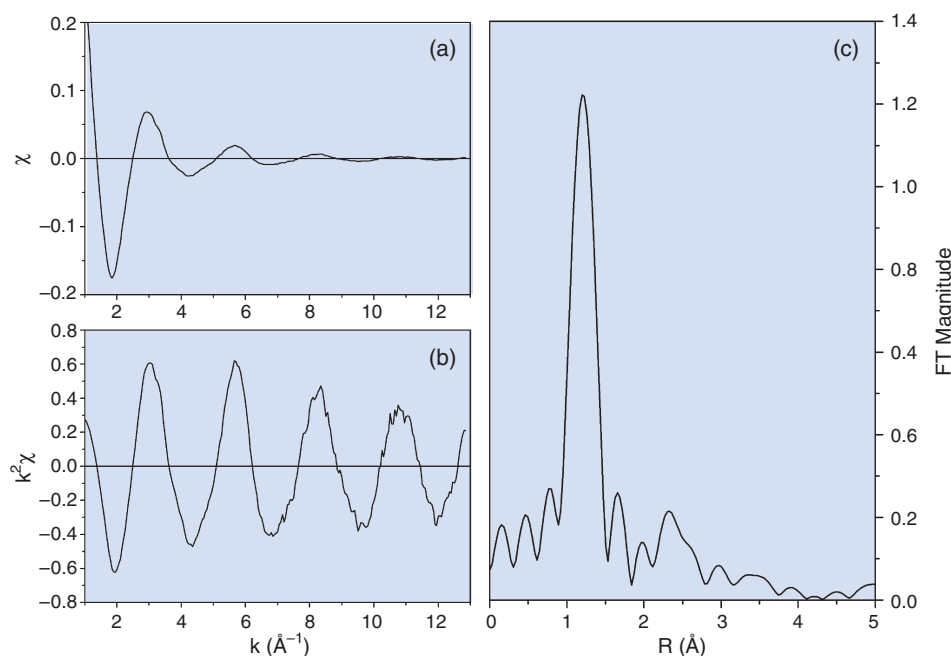


圖 2.

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 之 EXAFS 函數在 (a) 未加權之前以及 (b) k^2 加權運算後之全貌；(c) $k^2\chi$ 經傅立葉變換 (取 $\Delta k = 2.5 - 12.6 \text{ \AA}^{-1}$ 區間) 後所得之原子徑向分布函數。

原子以及第三配位層中的兩個 K 原子對 EXAFS 之貢獻並不明顯。實際上，即使將 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶解於水中，由 Cr 第一配位層的四個氧原子所貢獻之 EXAFS 振盪依然清晰可見，突顯此一短程有序的局部結構。

利用傅立葉變換將各配位層原子的貢獻予以分離之後，吾人便可直接在 R 空間或將對應於某一配位層貢獻之尖峰予以反傅立葉變換回到 k 空間詳細地求解參數。一般先利用已知結構 (鍵距及配位數) 且其化學環境與待測樣品相近的標準品，將背向散射振幅函數 (back-scattering amplitude function) 及相位偏移萃取出，再假設相同原子配對的背向散射振幅函數及相位偏移於類似系統之間可以互相轉移，最後將待測樣品的結構參數求出。由於 EXAFS 的理論計算軟體已發展得相當完備⁽³⁾，以致於現今許多研究人員在進行數據分析時皆改採理論模型，以取代真實的標準品，亦即任何原子配對的背向散射振幅函數及相位偏移皆針對預先設定的結構模型直接由理論計算出來，再於擬合實驗所取得之 EXAFS 數據時將待測樣品的結構參數適配出。由於理論模型可基於真實的標準品結構而建立，抑或出自個人的憑空想像，甚至將完全不互溶的兩種元素的原子置於同一晶格內，因此具有非常大的彈性，並且可以免除標準品不易製備或根本不存在的窘境。

雖然經由上述的數據分析步驟，可以獲得以吸收原子為中心之鄰近原子排列訊息，不過一旦原子間距離拉長時，EXAFS 振盪的頻率會提高且振幅會減小，將愈難和雜訊區分，加以存在愈來愈多的多重散射路徑需要考慮，倍增分析的困難度，因此在實際應用上，EXAFS 一般僅用來提供距吸收原子 10 $\text{\AA}$ 以內的局部結構，亦即為短程有序的結構探測工具。正因為此種特性，使得 X 光吸收光譜對於樣品形態幾乎無所限制，應用範圍十分廣泛。

總之，藉由 EXAFS 數據的分析，主要可得知樣品中某一特定吸收原子鄰近的原子排列情形，如周圍各配位層的原子種類 (由背向散射振幅函數隨 k 的變化趨勢加以判斷，原子序的準確度達 ± 4)、原子個數或稱配位數 (N ，正比於該配位層的 EXAFS 振幅大小，誤差達 $\pm 15\%$)、鍵距或稱配位半徑 (R ，主要反映於該配位層的 EXAFS 振盪頻率大小，誤差度一般小於 1%)，以及排列的雜亂度或稱 Debye-Waller 因子 (σ^2 ，其值主要影響 EXAFS 振幅隨 k 增加而衰減的速度)。其中 N 由於與其他參數之間具有高度的相關性，亦即皆對 EXAFS 振幅大小有不同的影響方式，以致於所得 N 值的不確定性遠大於 R 。另外，原子排列的雜亂度主要來自兩方面的貢獻：樣品結晶性的優劣以及原子在晶格位置上的熱振動，前者為樣品本身的特性不易改

變，但是吾人若在較低的溫度下攝取光譜，則可因原子熱振動減緩而降低結構的亂度，使得在 k 值較高的區間內亦可觀測到較大的 EXAFS 振幅，有助於提升數據品質。

三、X 光吸收光譜光束線及實驗站配置

X 光吸收光譜光束線的核心元件為單光器，一般是將兩片平行的單晶安裝於一轉角器上，依據晶體繞射的布拉格定律 (Bragg's law) $n\lambda = 2d\sin\theta$ ，當同步加速器放射出之光束與晶體表面的夾角為 θ 時，便可選取對應的單光波長 (λ) 與能量 ($E = hc/\lambda$)，因此進行能量掃描時僅需轉動晶體以逐步改變 θ 角即可。採用兩片晶體而非單獨一片的主要考量是使單光器上、下游的光束保持平行，如此樣品便不必因能量改變而大幅移動位置以遷就光束的方向。再者，高諧音光子 (亦即布拉格定律中的 $n > 1$ 時) 可藉著將兩晶體間的平行度略微調差 (detune) 而加以剔除。高諧音光子亦常利用光學鏡子過濾掉，此乃因高諧音光子能量較高，不易在鏡面上進行全反射；另外，具有曲面的光學鏡子甚至可將光束予以準直或聚焦。

圖 3 為典型的 X 光吸收光譜實驗裝置示意圖，最簡單的測量方式是採用穿透模式，其中入射光及穿透光的強度分別利用位於樣品前後的兩個偵測器測量而得，常用的偵測器為氣體游離腔，當光束通過時，會將充填於內部的氣體予以游離，而產生的電子由一施加高電壓的極板收集，所得之電流再經放大成為強度訊號。在此一測量模式下，穿透光的強度 I_t 與入射光的強度 I_0 有如下關係：

$$I_t = I_0 e^{-\mu x} \text{ 或 } \mu x = \ln \frac{I_0}{I_t} \quad (5)$$

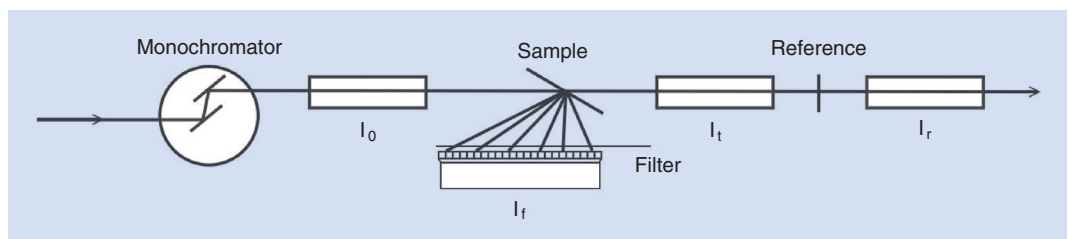
穿透模式一般用於高濃度且較薄的樣品，而在製備時最適宜的樣品用量為使吸收邊緣處的躍升梯度 $\Delta\mu x$ 接近 1.0。當樣品濃度極低或厚度極小，以致於 $\Delta\mu x < 0.1$ 時，宜改採螢光模式。螢光是因原子的內層電子受到激發離去而產生電洞，再由外層電子掉落內層軌域填補時所釋放出的次級 X 光。螢光的強度正比於入射 X 光被吸收的程度，因此螢光模式下的吸收係數為

$$\mu_f x = \frac{I_f}{I_0} \quad (6)$$

測量螢光時經常令樣品表面與入射 X 光方向呈 45° 角，而偵測器窗口法向量則與入射光束方向呈 90° 擺設。如果螢光偵測器亦為氣體游離腔型式⁽⁴⁾，由於其本身並不具備能量解析能力，因此經常在偵測器窗口之前置一過濾片，其組成元素的吸收邊緣介於待測樣品放出的特徵螢光與入射 X 光能量之間，如此可將由空氣或樣品散射而來的光子 (其能量與入射 X 光相近) 有效濾掉，以降低光譜的背景。即便如此，氣體游離腔螢光偵測器適用的樣品濃度下限約為 200 ppm 或 2 mM。

鑑於生化樣品的濃度一般相當稀薄，是故以螢光模式收取 XAS 數據時經常採用陣列式固態偵測器。基本上，固態偵測器之核心元件為超高純度的半導體元素 (主要為矽或鍺)，當其受到 X 光照射時，在晶體內部將激發出電子—電洞對，產生的數目與激發的 X 光能量有關。實際使用時，配合附屬的電子裝置，能夠在眾多不同能量的光子中「揀選」出所欲偵測的能量光子，並進行計數成為數位式的強度訊號，這種工作原理提供了極佳的能量解析力。不過欲達到理想的能量解析度，所用的半導體元素晶體最好是呈面積小 (約 1 cm^2) 而厚度稍大的形狀，如此的小面積造成接收樣品螢光的固體角

圖 3. 典型的 X 光吸收光譜實驗配置圖。



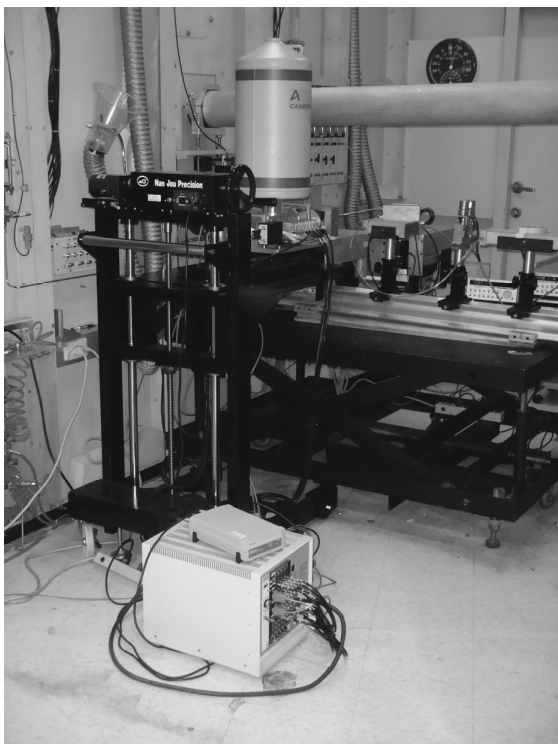


圖 4. 位於 NSRRC BL17C1 實驗站內的 13-鍺晶圓陣列式偵測器 (放在黑色推車上) 及其電子訊號處理系統 (置於地面)。

減小，是以商業化的產品大多將數個半導體元素晶體排成陣列形式，以增加涵蓋的固體角。此種安排的另一好處是：為了得到理想的能量解析度，光子的通量不宜太高，否則訊號強度的線性行為將會變差，甚至達到飽和之虞；不過強度計數若太低，又會造成實驗數據品質不佳。一旦同時使用排成陣列狀的多個晶體，雖然每個晶體收到的訊號強度計數不高，但在加總之後仍有助於提高統計上的訊噪比。

國家同步輻射研究中心 (NSRRC) 第一條硬 X 光吸收光譜光束線 BL17C1 自 1998 年底正式開放使用以來，一直是用戶數量最多且研究產出成果最豐碩的光束線，雖然用戶來自不同的研究領域，但是由於光束線使用時間極為有限，加以欠缺陣列式固態偵測器可用，因此在生命科學領域的應用成效相對而言不算突出，仍有極大的進展空間。近年來由於日本 SPring-8 同步輻射設施內的台灣專屬光束線 BL12B2 及 NSRRC BL01C1 相繼興建完成，不

但提供了更多的 XAS 實驗場所，並且因為光束線涵蓋的能量向上提升，增加可偵測的金屬元素種類。尤有甚者，NSRRC 於 2006 年中設置完成一組 13-鍺晶圓陣列式偵測器 (參見圖 4)，威信對於相關的研究將助益良多。至於 NSRRC 內另有一條已開放多年的軟 X 光吸收光譜光束線 BL16A1，其涵蓋的能量範圍為 2–7 keV，非常適合量測原子序較低且生物系統中常見的一些元素，如：磷、硫、氯、鉀、鈣等。

四、生命科學的應用實例

1. 細胞色素 *c* 在尿素環境下的結構變化⁽⁵⁾

細胞色素 *c* (cytochrome *c* 或 Cyt *c*) 是一種存在於粒腺體膜間隙 (mitochondrial intermembrane space) 的小型原血紅素蛋白質 (heme protein)，其與電子的傳遞有關，可進行氧化與還原反應。整個蛋白質含有一百多個氨基酸，分子量大約為 12000 daltons (12 kD)。從馬的心臟所純化得的氧化態 Cyt *c* 含有 104 個氨基酸，而 heme 中心的 Fe (III) 主要是一個六配位且為低自旋 (low spin) 的結構，其平面上由 porphyrin 的四個氮原子與中心鐵鍵結，至於平面的上下軸向 (axial) 與鐵鍵結者分別為一個 histidine-18 (His-18) 的氮原子與一個 methionine-80 (Met-80) 的硫原子。

為探討不同化學試劑環境對於此蛋白質結構的影響，吾人以尿素 (urea) 試劑為例，在加入 10 M 尿素試劑後，原本具摺疊 (folding) 結構的 Cyt *c* 調變成為展開未摺疊 (unfolding) 結構，並利用 Fe *K*-邊緣的 X 光吸收近邊緣結構 (XANES) 光譜比較蛋白質在此變性 (denature) 前後的溶液狀態下之結構差異，如圖 5 所示。從吸收邊緣之前的 P 區域可以得知，在加入尿素後的未摺疊結構裡，其中心 Fe (III) 的局部幾何結構與原本摺疊態的 Fe (III) 的局部幾何結構非常相近，皆為一具有六個配位原子所形成的八面體結構。此外，當比較 A、C、D 及 C₂ 等區域的變化與一般鐵自旋交叉 (spin crossover) 的化合物之 XANES 光譜後，可以推測在未摺疊結構中的鐵離子其電子組態應該是以高自旋 (high spin) 狀態存在⁽⁶⁻⁸⁾。

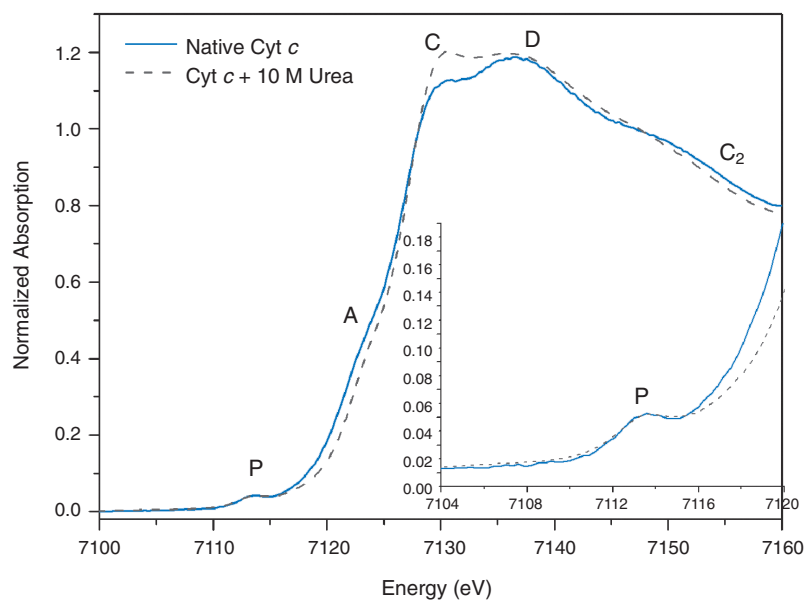


圖 5.

原始摺疊態細胞色素 Cyt *c* 及其在尿素環境下未摺疊態活性中心之 Fe K-邊緣 X 光吸收近邊緣結構 (XANES)。

圖 6 及圖 7 所示分別為原始摺疊態 Cyt *c* 及其在尿素環境溶液下未摺疊態之 EXAFS 經 k^3 加權及傅立葉變換而得的徑向分布函數。從詳細分析的結果可知：當足夠濃度的尿素加入，迫使 Cyt *c* 變成未摺疊態之結構時，其軸向的 Met-80 已經脫離活性中心 Fe (III)，使得尿素分子可以接近活性中心而與 Fe (III) 形成化學鍵。至於 His-18 是否仍與 Fe (III) 鍵結則比較難以判定，此乃因為原子序相近的氮原子與氧原子對光電子波背向散射能力差異甚小之故。在此，吾人推測軸向的 His-18 可能被水分

子取代，乃是根據一般此類結構中若有 histidine 氨基酸鍵結，則中心鐵常為低自旋組態居多，然而由 XANES 判定未摺疊態之 Cyt *c* 所含為高自旋組態的 Fe (III)，因此推測兩個軸向配位基之中一個為尿素，而另一個為水分子。

2. 轉錄因子 SoxR 轉錄機制之探討

此項研究的目標金屬蛋白質為大腸桿菌中表現於細胞質中的轉錄因子 SoxR⁽⁹⁾，SoxR 的活性中心為雙鐵六硫之金屬簇錯合物，在具備活性形式的蛋

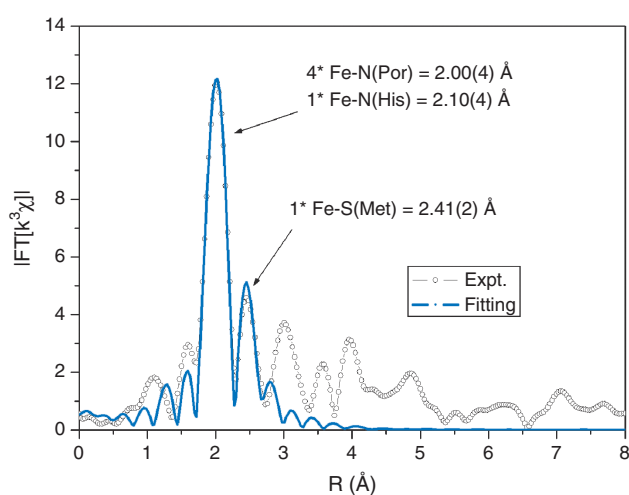


圖 6. 原始摺疊態細胞色素 Cyt *c* 溶液中，活性中心之 Fe K-邊緣的延伸 X 光吸收精細結構 (EXAFS)。

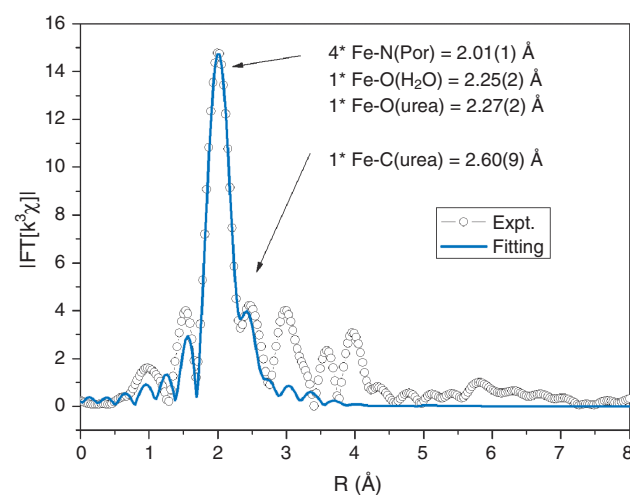


圖 7. 在尿素溶液中未摺疊態之 Cyt *c* 活性中心之 Fe K-邊緣的延伸 X 光吸收精細結構 (EXAFS)。

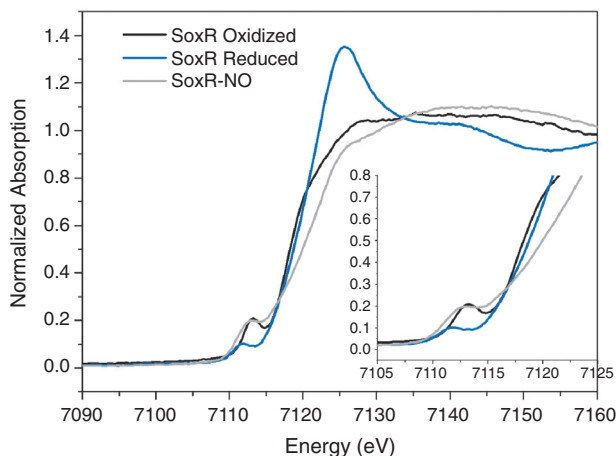


圖 8. 大腸桿菌中 SoxR 蛋白質活性中心之 Fe K-邊緣 X 光吸收近邊緣結構 (XANES)。

白質 (還原態) 中，兩個鐵金屬氧化態屬於二價及三價的混合價態。當大腸桿菌的胞內環境中有過多的超氧離子 (superoxide) 時，會將蛋白質內的雙鐵活性中心完全氧化成為鐵三價的形式，進而使得轉錄因子 SoxR 構形發生變化，而與遺傳物質中核酸或基因分子之起動子 (promoter) 區域接合，強化了抗氧化逆境 (oxidative stress) 蛋白質於胞內的表現，也因此減少了因過多超氧離子出現而伴隨含氧自由基的產生，降低大腸桿菌之菌體遭受此效應的危害。

更重要的是，當 SoxR 蛋白質感應到環境中含有一氧化氮時，會在活性中心產生雙一氧化氮含鐵錯化結構 (dinitrosyl iron complexes, DNIC)^(10, 11)，此結構的形成會造成活性中心鐵硫簇的裂解，同時在電子順磁共振 (electron paramagnetic resonance, EPR) 光譜中造成 $g_{av} = 2.03$ 非等向性 (anisotropic) 自由基之特徵訊號。有趣的是，蛋白質活性中心的崩解一般會使蛋白質失去活性，但 SoxR 蛋白質卻仍能保有作為轉錄因子的特質，讓下游的抗氧化逆境蛋白質的表現機制啟動，以減少因一氧化氮出現在胞內而造成對菌體的危害。SoxR 蛋白質是目前所知少數幾個能夠感應一氧化氮所造成影響的原核生物 (prokaryotic organism) 蛋白質之一。

實際上，相類似蛋白質的活性中心鑑定多半是以 EPR 光譜為主，輔以紫外光-可見光光譜鑑定⁽¹²⁾，但對於活性中心配位環境的精確解析，雖然目

前已有 X 光晶體繞射之數據可供參考^(13, 14)，但受限於晶體的品質，其繞射數據精確度僅達 $2.8 \text{ \AA}$ 。然而，X 光吸收光譜中的 XANES 與 EXAFS 可提供溶液相原生型態 SoxR 的鐵硫簇活性中心金屬原子的氧化狀態、鄰近原子的種類、配位數、化學鍵的長度與結構擾動的程度等資訊，可說是解析其活性中心結構的極佳利器。除此之外，在蛋白質氧化後或加入一氧化氮後的不可逆的變異上，吾人亦可從事相類似的結構解析，以提供對於相關生化調控機制極重要的訊息。

SoxR 蛋白質活性中心的鐵原子在其氧化、還原、與一氧化氮反應後的 X 光吸收光譜近邊緣結構如圖 8 所示，利用圖 8 可以很明顯區分出氧化與還原態之不同。此外，在能量約 7113 eV 處出現極明顯的 $1s \rightarrow 3d$ 躍遷 (可與圖 5 中之 P 區域相比較)，顯示蛋白質活性中心鐵的配位環境為一缺乏對稱中心之幾何形狀。

若更進一步分析延伸 X 光吸收精細結構 (如圖 9 所示)，則可得原生型態 SoxR 的鐵硫簇結構。詳細的數據分析結果顯示，每一鐵原子與四個硫原子平均距離為 $2.28 (5) \text{ \AA}$ ，配合上述鐵原子的局部環境為缺乏對稱中心之幾何形狀，可推知鐵與四個硫形成四面體的排列。此外，在 $2.78 (4) \text{ \AA}$ 之距離處有另一鐵原子的存在，由此推測最可能之鐵硫簇結構為圖 9 中所繪之鍵結方式，此結果與單晶所得結構相吻合。至於一氧化氮對鐵硫簇局部結構的影

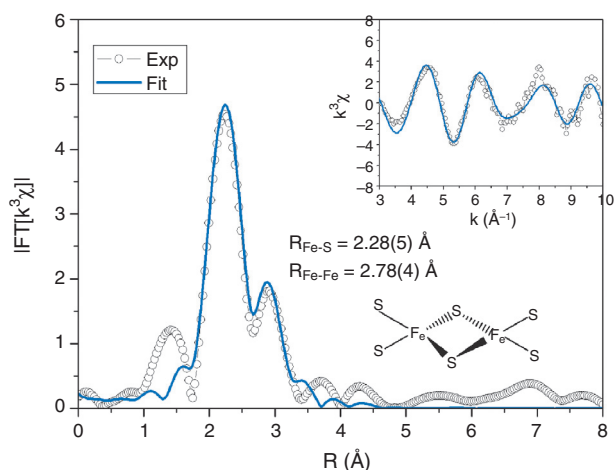


圖 9. 大腸桿菌中原生型態 SoxR 蛋白質活性中心 Fe 之延伸 X 光吸收精細結構 (EXAFS)。

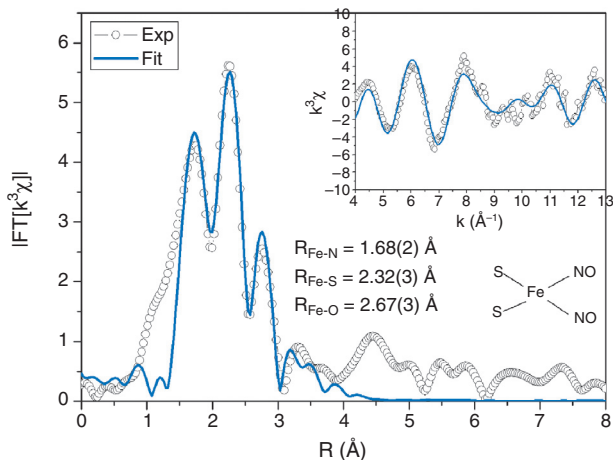


圖 10. 大腸桿菌中 SoxR 與一氧化氮反應後，蛋白質活性中心 Fe 之延伸 X 光吸收精細結構 (EXAFS)。

響，可見圖 10 所示之延伸 X 光吸收精細結構。分析結果顯示，鐵硫簇結構已經瓦解，而其中每一個鐵原子與兩個 cysteine 的硫原子以及兩個 NO 分子鍵結。由於鐵與 NO 鍵結形成 Fe-N=O 之線性排列，因此在進行 EXAFS 數據分析時，光電子在 Fe 與 N-O 間的多重散射必須加以考慮，才能達到較佳的配適結果。

3. 銅離子修飾後之金屬硫蛋白質

金屬硫蛋白質 (metallothionein, MT) 最早是在 1957 年當 Margoshes 和 Vallee 於研究鎘金屬在動物體內代謝的情形時，由馬的腎臟皮質部 (renal cortex) 所分離出來的含鎘蛋白質⁽¹⁵⁾。自然界中的金屬硫蛋白質廣泛地分布於原核細胞、原生動物、菌類、植物及動物體內，由氨基酸組成分析結果發現，其具有大量的 cysteine (Cys) 與高量的重金屬離子⁽¹⁶⁾。一般而言，哺乳類動物體內的金屬硫蛋白質分子量約 6000–7000 daltons，在含有 61 至 74 個氨基酸組成中，Cys 就佔有 20 個左右，整個蛋白質可包裹約七個金屬原子。金屬硫蛋白質在生物體內扮演著調節重金屬濃度的角色，其會與細胞中的鋅螯合，此主要是藉由 Cys 中的 -SH 官能基與金屬有相當好的鍵結能力。若生物體內有重金屬如銅、汞、鎘、銀等的出現，則會將鋅釋放出來而與其他重金屬螯合，進而在生物體內達到隔離重金屬

的效果⁽¹⁷⁾。隔離後的金屬無法進行自由基氧化還原反應，如此可作為細胞中防禦自由基傷害的一種重要機制，也可藉由自由基的清除來達到防止 DNA 傷害的發生。

從兔子的肝臟純化出來的金屬硫蛋白質，經 NMR 光譜分析及 X 光結晶解析發現，此類蛋白質分子具有一啞鈴形結構，具兩個獨立金屬鍵結功能區 (domain)，總共可與七個二價過渡金屬原子鍵結。在每個區域中，每個金屬原子是以四面體的四配位形式與硫鍵結，其鍵長約為 2.3–2.4 Å，而架橋的硫原子再與另一個金屬互相鍵結，兩金屬原子間的距離約為 3.8–3.9 Å，以此方式形成金屬硫簇。此一蛋白質可藉由變性 (denature) 方式破壞蛋白質原先結構，將原生摺疊之結構轉變成為未摺疊型態，藉此移除原本鍵結之金屬原子，然後再透過適當的化學反應調控，置入其他種類不同價數之金屬，並使原生蛋白質轉回摺疊狀態，如此之調變具有許多應用上之潛力。本研究以置換其中鍵結金屬為一價或二價的銅離子為例，說明可藉由 X 光吸收光譜實驗量測出此重新摺疊後含銅的金屬硫蛋白質 (Cu-MT) 中銅之價數，以及再摺疊過後銅離子周圍局部結構的變化。

圖 11 所示為再摺疊後的含銅離子的金屬硫蛋白質的 XANES 光譜。由 X 光吸收近邊緣結構顯示，人為的化學調控可以成功地得到一價與兩價銅的金屬硫蛋白質。若再分析其延伸 X 光吸收精細

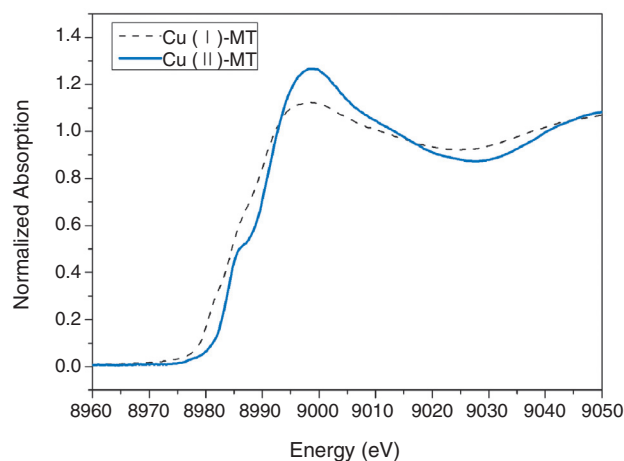


圖 11. 再摺疊後的含一價及兩價銅離子之金屬硫蛋白質的 XANES。

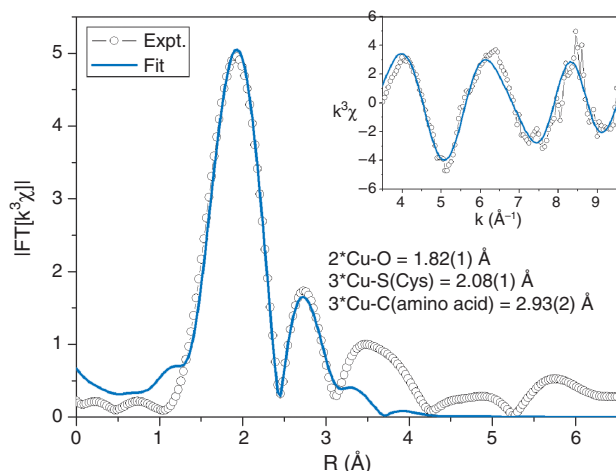


圖 12. 再摺疊後的含一價銅離子之金屬硫蛋白質的 EXAFS。

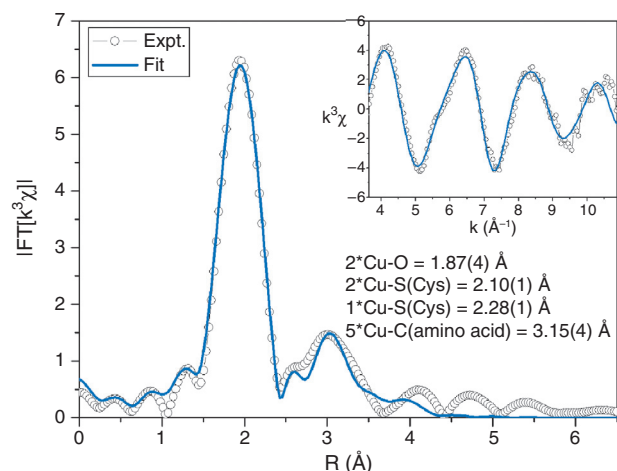


圖 13. 再摺疊後的含兩價銅離子之金屬硫蛋白質的 EXAFS。

結構 (參見圖 12 與圖 13)，則可發現銅離子並非單純地只與 Cys 的硫鍵結。平均而言，Cu (I)-MT 的每個 Cu (I) 與三個 Cys 的硫鍵結，但 Cu (II)-MT 的每個 Cu (II) 則與兩個較近的 Cys 及一個較遠的 Cys 的硫鍵結；除了硫之外，每個銅離子也都與氨基酸中的氧鍵結。由於在整個數據分析過程中皆無法加入 Cu-Cu 的貢獻，因此推測在目前的化學反應調控下，無法將銅離子重新置回原生蛋白質鍵結金屬的位置上。

五、結語

本文所舉之應用實例皆在溶液狀態下量測，對於生物系統而言，若欲瞭解含金屬之蛋白質在特定生理條件或酸鹼濃度下金屬原子鄰近之結構變化，則 X 光吸收光譜將是一項強而有力的鑑定工具。唯須注意的是，在量測過程中金屬的氧化態是否會因為同步輻射 X 光的照射而產生變化。另外，適度減低緩衝溶液中所含重原子之濃度而得到更清晰之訊號，亦為改善數據品質的有效方式。

參考文獻

1. Y. Joly, *Phys. Rev. B*, **63**, 125120 (2001).
2. 李志甫, 化學, **53**, 280 (1995).
3. S. I. Zabinsky, J. J. Rehr, A. Ankudinov, R. C. Albers, and M.

J. Eller, *Phys. Rev. B*, **52**, 2995 (1995).

4. F. W. Lytle, R. B. Gregor, D. R. Sandstrom, E. C. Marques, J. Wong, C. L. Spiro, G. P. Huffman, and F. E. Huggins, *Nucl. Instrum. Methods*, **226**, 542 (1984).
5. I. J. Hsu, Y. J. Shiu, U. S. Jeng, T. H. Chen, Y. S. Huang, Y. H. Lai, L. N. Tsai, L. Y. Jang, J. F. Lee, L. J. Lin, S. H. Lin, and Y. Wang, *J. Phys. Chem. A*, **111**, 9286 (2007).
6. F. Boffi, A. Bonincontro, S. Cinelli, A. C. Castellano, A. De Francesco, S. D. Longa, M. Girasole, and G. Onori, *Biophys. J.*, **80**, 1473 (2001).
7. A. V. Soldatov, G. E. Yalovega, G. Y. Smolentsev, A. P. Kovtun, and S. Della Longa, *Biophysics*, **46**, 564 (2001).
8. S. Della Longa, S. Pin, R. Cortés, A. V. Soldatov, and B. Alpert, *Biophys. J.*, **75**, 3154 (1998).
9. J. L. Blanchard, W.-Y. Wholey, E. M. Conlon, and P. J. Pomposiello, *PLoS ONE*, **2**, e1186 (2007).
10. H. G. Din and B. Demple, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8445 (1997).
11. H. G. Din and B. Demple, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5146 (2000).
12. B. Demple, H. G. Din, and M. Jorgensen, *Methods Enzymol.*, **348**, 355 (2002).
13. S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, Y. Takahashi, and K. Aiki, *Acta Cryst. F*, **62**, 1275 (2006).
14. S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, and K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 4121 (2008).
15. M. Margoshes and B. L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813 (1957).
16. J. H. Kägi, *Methods Enzymol.*, **205**, 613 (1991).
17. G. Meloni, P. Faller, and M. Vašák, *J. Biol. Chem.*, **282**, 16068 (2007).

-
- 李志甫先生為國立台灣大學化工博士，現任國家同步輻射研究中心研究員。
 - 許益瑞先生為國立台灣大學化學博士，現任國立台北科技大學分子科學與工程系助理教授。
 - 俞聖法先生為國立清華大學化學博士，現任中央研究院化學研究所助理研究員。
 - 羅鳳君小姐為國立清華大學化學博士，現任中央研究院化學研究所博士後研究員。
 - 李美儀小姐為國立交通大學材料工程研究所博士班學生暨國家奈米元件實驗室副技術師。
 - 許瑛珍小姐為國立台灣大學化學博士，現任國立交通大學應用化學研究所博士後研究員。
 - Jyh-Fu Lee received his Ph.D. in chemical engineering from National Taiwan University. He is currently a research scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
 - I-Jui Hsu received his Ph.D. in chemistry from National Taiwan University. He is currently an assistant professor

in the Department of Molecular Science and Engineering at National Taipei University of Technology.

- Steve Sheng-Fa Yu received his Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. He is currently an assistant research fellow in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.
- Feng-Chun Lo received her Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. She is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.
- Meiyi Li is a Ph.D. student in the Department of Material Science and Engineering at National Chiao Tung University and also an associate technician at National Nano Device Laboratories.
- Ying-Jen Shiu received her Ph.D. in chemistry from National Taiwan University. She is currently a postdoctoral fellow in the Department of Applied Chemistry at National Chiao Tung University