

國立臺灣大學工學院高分子科學與工程學研究所



碩士論文

Institute of Polymer Science and Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

視紫紅質用於 ITO 表面修飾及與共軛高分子間的能量

轉移研究

Utilization of Rhodopsin in ITO Surface Modification and

Study on the Energy Transfer between Rhodopsin and

Conjugated Polymers

黃郁翔

Yi-Hsiang Huang

指導教授：賴育英 博士

Advisor: Yu-Ying Lai, Ph.D.

中華民國 108 年 2 月

February 2019

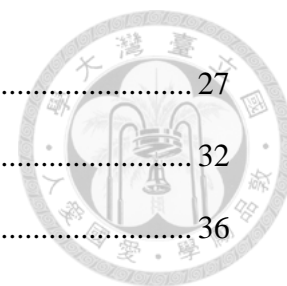


# 目錄



目錄.....	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	vi
中文摘要.....	vii
Abstract.....	viii
第一章：緒論.....	1
第一節：細菌視紫紅質 HmBRI.....	1
1.1：HmBRI 的基本介紹.....	1
1.2：HmBRI 的運輸機制.....	3
1.3：研究動機.....	5
第二節：螢光共振能量轉移(FRET).....	6
2.1：FRET 的原理及相關應用.....	6
2.2：雙光子激發螢光的應用.....	9
第三節：氧化銦錫(ITO)的表面修飾.....	12
3.1：ITO 修飾的基本介紹.....	12
3.2：Histidine-Tag 與 Ni <sup>2+</sup> 的非共價性鍵結.....	15
3.3：EDC/NHS 的交叉鍊接.....	17
第二章：結果與討論—蛋白質的能量傳遞.....	19
第一節：高分子的合成與性質.....	19
1.1：PPESO <sub>3</sub> 的吸收光譜與螢光光譜.....	19
1.2：PFBT 的吸收光譜與螢光光譜.....	23

第二節：PPESO <sub>3</sub> 與 HmBRI-D94N 的能量轉移實驗 .....	27
第三節：PFBT dots 與 HmBRI-D94N 的能量轉移實驗 .....	32
第三章：結果與討論—蛋白質的固定修飾 .....	36
第一節：ITO 表面修飾的實驗概述.....	36
第二節：Histidine tag 非共價鍵結的光電化學測試.....	38
第三節：EDC-NHS 共價鍵結的光電化學測試.....	41
第四章：總結 .....	44
第五章：實驗細節 .....	46
第一節：試藥 .....	46
第二節：實驗儀器 .....	46
2.1：核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance，NMR) .....	46
2.2：凝膠滲透層析儀(Gel Permeation Chromatograph，GPC).....	46
2.3：紫外線與可見光光譜儀(UV-Vis Spectrophotometer) .....	47
2.4：螢光光譜儀(Fluorescence Spectrophotometer).....	47
2.5：粒徑/介面電位分析儀(Particle Sizing and Zeta Potential).....	47
2.6：光電化學實驗裝置(Photocurrent Device).....	48
2.7：X 光電子能譜分析儀(X-ray Photoelectron Spectroscopy).....	48
第三節：合成 .....	48
第四節：ITO 表面修飾.....	51
參考資料 .....	54
附錄：NMR 光譜 .....	58
附錄：X 電子能譜分析圖 .....	66




# 圖目錄



圖 1：四個種類的 TypeI 視紫質的示意圖。BR 為光驅動氫離子幫浦，HR 為光驅動氯離子幫浦，SRI 跟 SRII 為對應不同波長的感光型受器 2,6。 .....	2
圖 2：(A) Retinal 的結構圖以及其在光照下的結構改變。氮碳雙鍵即為希夫鹼鍵結，retinal 用此鍵結跟 Lysine 216 結合在一起。(B) HsBR 分子結構圖(Pdb ID: IC3W)，與質子運輸和光週期相關的重要胺基酸。(C) Arg82, Glu194, Glu204 之中形成，將質子向外運輸的 $H_5O_2^+$ 集團。 <sup>10</sup> .....	3
圖 3：HsBR 光週期各中間態的轉換關係。 .....	4
圖 4：用來表示 FRET 現象的雅布隆斯基圖(Jablonski Diagram) <sup>21</sup> 。其中 $k_{DA}$ 是代表從供體到受體的 FRET 能量轉移。 $k_F$ 為供體本身的螢光， $h\nu_{acc}$ 則是受體藉由轉移過來的能量所放出的螢光。 .....	6
圖 5：表示雙光子吸收的雅布隆斯基圖(左)。同時以紅外光雷射跟紫光雷射照射的螢光溶液(右) <sup>24</sup> ，可以看到紫光雷射產生的單光子激發螢光會平均出現在光徑上，而紅外光雷射產生的雙光子激發螢光只出現在雷射聚焦點上。 .....	10
圖 6：ITO 的電動勢與 pH 值的線性關係圖(左) <sup>32</sup> 。ITO 與 HmBRI 結合成的光電元件示意圖(右) <sup>33</sup> 。 .....	12
圖 7：ITO 表現修飾的範例。(A)圖為使用矽烷類的修飾。(B-D)圖為使用羧酸修飾可能產生的幾個結果。(E)圖為使用磷酸類的修飾 <sup>34</sup> 。 ...	14
圖 8：NTA，鎳離子與組氨酸標籤所形成的螯合物之示意圖 <sup>39</sup> 。 .....	15
圖 9：使用咪唑取代組氨酸標籤，使蛋白質脫離表面之示意圖 <sup>42</sup> 。 ....	16
圖 10：EDC/NHS 反應圖 <sup>44</sup> 。 .....	17
圖 11：PPESO <sub>3</sub> 的合成步驟。 .....	19
圖 12：PPESO <sub>3</sub> 的 UV 吸收光譜。其中黑線為 PPESO <sub>3</sub> 在甲醇溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其吸收度都做過標準化的處理。 .....	20
圖 13：PPESO <sub>3</sub> 螢光光譜。其中黑線為 PPESO <sub>3</sub> 在甲醇溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其螢光強度都做過標準化的處理。 ....	21
圖 14：PPESO <sub>3</sub> 在不同 pH 值下的螢光光譜。可看見在酸性環境下(紅線)的螢光強度有大幅降低。 .....	22
圖 15：PFBT 奈米粒子的合成步驟。 .....	23
圖 16：PFBT 奈米粒子經由 DLS 測量所得之粒徑分布圖。 .....	24
圖 17：PFBT 的 UV 吸收光譜。其中黑線為 PFBT 在四氫呋喃(THF)溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其吸收度都做過標準化的處	

理。.....	25
圖 18：PFBT 的螢光光譜。其中黑線為 PFBT 在四氫呋喃(THF)溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其螢光強度都做過標準化的處理。.....	25
圖 19：PFBT 奈米粒子在不同 pH 值下的螢光光譜。基本上無論 pH 值為多少，有沒有加緩衝物質 MES 都不影響其螢光強度跟峰型。.....	26
圖 20：PPESO <sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 的吸收光譜。PPESO <sub>3</sub> 的濃度為 20 μg/ml，HmBRI-D94N 的濃度為 0.5 mg/ml。HmBRI-D94N 在 550 nm 的吸收峰並沒有受到 PPESO <sub>3</sub> 的影響，而 PPESO <sub>3</sub> 在 450 nm 的吸收峰沒有因為 HmBRI-D94N 的存在而偏移，但吸收度有些微下降。.....	27
圖 21：PPESO <sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 的螢光光譜。PPESO <sub>3</sub> 的濃度固定為 20 μg/ml，隨著 HmBRI-D94N 濃度升高，PPESO <sub>3</sub> 的螢光強度也隨之減弱。.....	28
圖 22：光電化學實驗之裝置圖。產生的奈米安培等級的電流會經過增幅器，以電壓的形式放大訊號並反應在示波器上。.....	29
圖 23：單一 HmBRI-D94N (上)跟 HmBRI-D94N 和 PPESO <sub>3</sub> 混合溶液(下)的光電化學實驗結果。綠線為 532 nm 綠光雷射下的光電流訊號，藍線為 473 nm 藍光雷射下的光電流訊號。可以看到左圖在藍光雷射下的訊號明顯比右圖還要低。.....	30
圖 24：PFBT 跟 HmBRI-D94N 的吸收光譜(上)跟螢光光譜(下)。PFBT 的濃度固定為 10 μg/ml，左圖 HmBRI-D94N 的濃度為 0.5 mg/ml。雙方的吸收峰都沒有受到另一方的影響。而從螢光光譜可以看出隨著 HmBRI-D94N 的濃度增加，PFBT 的螢光強度隨之減弱。.....	33
圖 25：單一 HmBRI-D94N (上)跟 HmBRI-D94N 和 PFBT 混合溶液(下)的光電化學實驗結果。綠線為 532 nm 綠光雷射下的光電流訊號，藍線為 473 nm 藍光雷射下的光電流訊號。.....	34
圖 26：本實驗採用的三種 ITO 修飾方式的流程圖。.....	36
圖 27：NTAA 的合成流程圖。.....	37
圖 28：光電化學實驗之裝置圖。產生的奈米安培等級的電流會經過增幅器，以電壓的形式放大訊號並反應在示波器上。.....	37
圖 29：修飾 ITO 跟一般 ITO 所做的光電化學實驗結果。修飾 ITO(紅線)有比未修飾的 ITO(黑線)帶來大約 40% 的增幅。.....	38
圖 30：ITO 所帶來的光電流訊號隨著用水清洗的次數而降低之線狀圖。每次清洗都以滴管取固定量的去離子水去清洗 ITO 表面。雖然實驗次數只記錄到 4 次，但在使用大量水清洗後，兩者的訊號都會趨近於零。.....	39
圖 31：修飾 ITO 在用咪唑水溶液處理前後的光電化學實驗結果。可以看到在使用咪唑水溶液處理後的光電流大幅降低。.....	40

- 
- 圖 32：使用 EDC/NHS 試劑將 HmBRI-D94N 和修飾 ITO 以化學共價鍵接合之流程圖。..... 41
- 圖 33：經過 EDC/NHS 處理的 ITO 所得到的光電化學實驗結果。紅線為用咪唑水溶液處理後的結果。可以看到處理前後的光電流訊號相近。..... 42
- 圖 34：三種修飾方式得到的 ITO，分別用 EDC/NHS 接上 HmBRI-D94N 後所做的光電化學實驗結果。可以得知方式 A(黑線)比方式 B(紅線)和方式 C(藍線)相比，得到的光電流訊號更高。..... 43

# 表目錄

表 1： <i>H. marismortui</i> 之六個感光視紫質基因，對應蛋白質名稱與其功能概述 <sup>2-4</sup> 。 .....	1
表 2：經過數據處理後，各個光電化學實驗的平均最大電流。 .....	31
表 3：經過數據處理後，各個光電化學實驗的平均最大電流。由於實驗參數的變化，HmBRI-D94N 的數據與表 2 不同。 .....	35



## 中文摘要

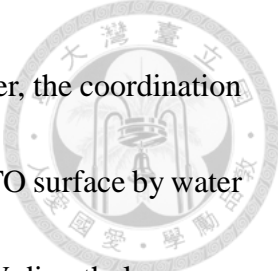


從嗜鹽古細菌的細胞膜上發現的細菌視紫紅質 HmBRI 之突變種 HmBRI-D94N 是一種由光驅動的氫離子幫浦。HmBRI-D94N 內部的全反式 retinal 在吸收光能之後改變構形，進而使 HmBRI-D94N 依序放出和吸收一個氫離子。這個光敏感蛋白質可以在光照下瞬間酸化周遭環境，造成一個短時間的 pH 值變化。這在生醫領域裡可以做為感光裝置元件，藥物傳遞材料和偵測元件等應用。本實驗分成兩部分，第一部分為利用具有螢光性質的共軛高分子去改變 HmBRI-D94N 氫離子幫浦功能所需使用的驅動波長。HmBRI-D94N 是吸收波長為 550 nm 附近的綠光而受驅動，結合會放出綠色螢光的共軛高分子，理論上可以在其他波長的光照下驅動 HmBRI-D94N，延伸 HmBRI-D94N 的應用範圍。本實驗使用兩種高分子，poly(p-phenyleneethynylene)的離子性高分子 PPESO<sub>3</sub>，以及 poly[2,7-(9,9-dihexylfluorene)-alt-4,7-benzothiadiazole]] (PFBT)的奈米粒子。這兩種共軛高分子都具有藍光的吸收波段以及綠光的螢光波段，並且都有著吸收紅外光的雙光子吸收的性質。以高穿透跟低傷害的紅外光激發高分子，藉由螢光共振能量轉移(FRET)間接激發 HmBRI-D94N 為此實驗的目標。第二部分為氧化銦錫(ITO)導電玻璃的表面改質，目的是讓 HmBRI-D94N 能夠依附在導電玻璃之上。首先使用三乙酸基胺(NTA)跟鎳離子，跟 HmBRI-D94N 上的組氨酸標籤(histidine tag)形成錯合物。這方法雖然能成功固定 HmBRI-D94N 在 ITO 上，但不夠穩定，容易在水中解離。因此在形成錯合物之後，再用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺 (3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amine，簡稱 EDC) 跟 N-羥基琥珀醯亞胺 (N-Hydroxysuccinimide，簡稱 NHS)使 HmBRI-D94N 跟 NTA 之間形成更穩定的醯胺鍵結。結合 HmBRI-D94N 的氫離子釋放能力跟 ITO 因為環境酸鹼值改變電動勢的性質，可以作成偵測蛋白質交互反應的元件。

# Abstract



A new kind of bacteriorhodopsin HmBRI was found in *Haloarcula marismortui*. HmBRI-D94N is a light driven proton pump, which is functioned by a series of conformational changes of the retinal inside the protein in the presence of light illumination. It can pump out a proton and change the pH value of environment in a very short time. HmBRI-D94N can be engineered for application for biotechnology, including molecular memory devices, light-triggered drug delivery, and a protein sensor. The first part of this study focuses on changing the wavelength of stimulating light to drive HmBRI-D94N, by introducing water-soluble conjugated polymer. The proton-pump functionality of HmBRI-D94N is triggered by absorbing primarily green light. Theoretically speaking, a polymer which can convert other wavelengths into green fluorescence should be capable of activating HmBRI-D94N by Förster resonance energy transfer (FRET). PPESO<sub>3</sub> (conjugated polyelectrolyte) and poly(fluorine-*alt*-benzothiadiazole) (PFBT, water-soluble nanoparticles) are examined for this purpose. The results indicate that the FRET can take place between PFBT and HmBRI-D94N. The second part is the surface modification of indium tin oxide (ITO) glass by HmBRI-D94N, aiming at stably fastening HmBRI-D94N onto the ITO glass. A combination of nitrilotriacetic acid and nickel ion was employed to absorb HmBRI-D94N by establishing the coordination between polyhistidine-tag of



HmBRI-D94N and nickel. This modification can be achieved; however, the coordination is not stable enough. HmBRI-D94N can be easily removed from the ITO surface by water and in the presence of imidazole. (3-(Ethyliminomethyleneamino)-*N,N*-dimethyl-propan-1-amine (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were then utilized to build covalent bond between HmBRI-D94N and NTA. The corresponding device performs good stability against water and even imidazole, validating that HmBRI-D94N can be stably fastened on the ITO glass by our approaches.



# 第一章：緒論

## 第一節：細菌視紫紅質 HmBRI

### 1.1：HmBRI 的基本介紹

HmBRI 是從死海中分離出來的一株嗜鹽古細菌(*Haloarcula marismortui*)上的六個感光視紫紅質(rhodopsin)的其中一種(表 1)<sup>1</sup>。如同典型的視紫紅質，其結構為七個穿膜  $\alpha$  螺旋組成，利用其中心的全反式維他命 A 醛(all-trans retinal)吸收光能改變構型，進而發揮功用。

視紫紅質分成 typeI 和 typeII 兩種，前者主要出現在微生物之中，後者則出現在動物的眼睛之中。TypeI 又根據其功能性可以分成光驅動控制離子運送跟感光型受器兩種(圖 1)，HmBRI 則是前者之中的光驅動氫離子幫浦，其性質與更早進行研究的同源蛋白質 bacteriorhodopsin 相近，在吸收光之後會將氫離子從細胞膜內側運輸到外側，調節氫離子濃度梯度以合成 ATP，提供生物體的能量所需。

表 1：H. marismortui 之六個感光視紫質基因，對應蛋白質名稱與其功能概述<sup>2-4</sup>。

基因名稱	蛋白質名稱	功能概述
<i>bop</i>	HmBRI	光驅動氫離子幫浦
<i>hop</i>	HmHR	光驅動氯離子幫浦
<i>sop1</i>	HmSRI	感光型受器
<i>sop2</i>	HmSRII	感光型受器
<i>xop1</i>	HmBRII	光驅動氫離子幫浦
<i>xop2</i>	HmSRM	無法歸類 <sup>5</sup>



本實驗所使用的 HmBRI-D94N，其為 HmBRI 的人工突變。相對於 HmBRI，在大腸桿菌細胞內有著更高的表達量，對光跟熱有更好的穩定性，並能在無水環境下保存，因此更適合大量生產<sup>2,6</sup>，符合生醫材料應用的條件。

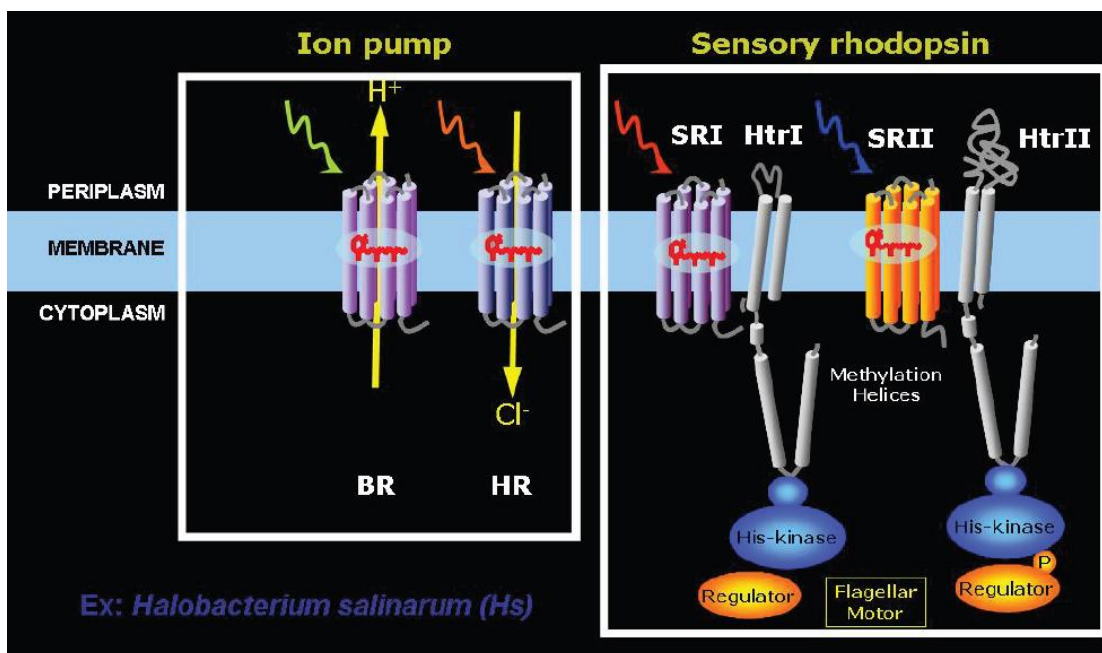


圖 1：四個種類的 TypeI 視紫質的示意圖。BR 為光驅動氫離子幫浦，HR 為光驅動氯離子幫浦，SRI 跟 SRII 為對應不同波長的感光型受器<sup>2,6</sup>。



## 1.2 : HmBRI 的運輸機制

*Halobacterium salinarum* 的光驅動氫離子幫浦蛋白 HsBR 在 1970 年被發現<sup>7</sup>，因為能經過人工點突變可轉變成感光型受器或其他類型的視紫質，被認為是視紫質較早期的型態<sup>8,9</sup>，在此以 HsBR 為例去解釋同源的 HmBRI 的運作機制。HsBR 的分子量為 26kD，具有 248 個胺基酸，由七個穿膜式的  $\alpha$  螺旋蛋白(Helix A-G)組成，而 Helix G 上方的 lysine 216 以希夫鹼鍵結(Schiff base)的形式，將 all-trans retinal 連接於七個螺旋蛋白的中間區域。All-trans retinal 會在光照下改變構型，變成 13-cis retinal，而這個構型的改變驅動蛋白質的結構改變，進而產生作用(圖 2-A)。

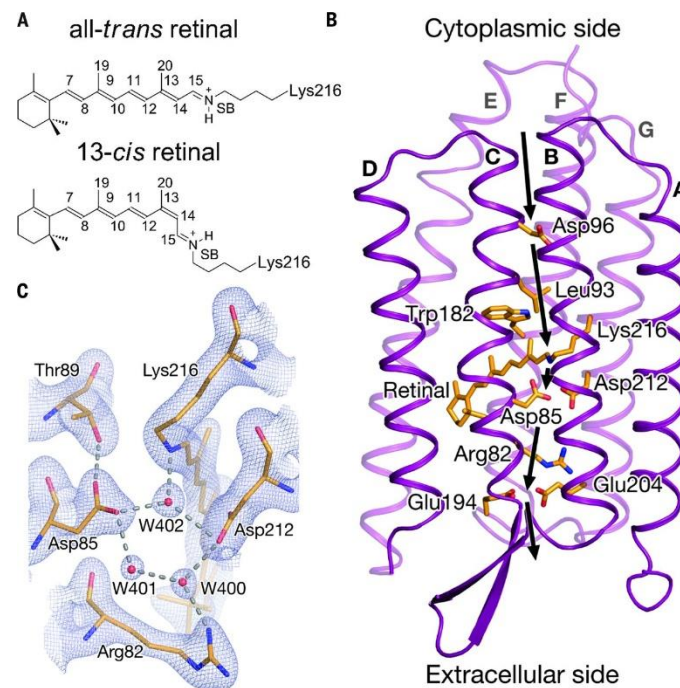


圖 2:(A) Retinal 的結構圖以及其在光照下的結構改變。氮碳雙鍵即為希夫鹼鍵結，retinal 用此鍵結跟 Lysine 216 結合在一起。(B) HsBR 分子結構圖(Pdb ID: IC3W)，與質子運輸和光週期相關的重要胺基酸。(C) Arg82, Glu194, Glu204 之中形成，將質子向外運輸的  $H_5O_2^+$  集團。<sup>10</sup>

HsBR 在光照下會週期性的變化，大致分成 B, K, L, M, N, O 六個狀態(圖

3), 這些狀態被稱為光週期, 光週期之間的轉變約 10 毫秒, 能從光學, 拉曼光譜跟 NMR 光譜去鑑定區別各個光週期。其狀態轉變如以下步驟敘述<sup>11, 12</sup>:

1. 在光照下, retinal 由 all-trans 轉變為 13-cis, 從 B 狀態(基態)進入 K 狀態。
2. Helix C 朝 Helix G 靠攏, retinal 轉動, 將希夫鹼鍵結的 N-H 鍵指向 Asp85, 進入 L 狀態<sup>13</sup>。
3. 希夫鹼鍵結上的氫離子轉移到 Asp85 上。驅使在 Arg82, Glu194, Glu204 之中形成的  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  集團將氫離子釋放至胞外(圖 2-C), 進入 M 狀態<sup>14, 15</sup>。氫離子釋放後, Helix F 向 Helix G 靠攏, 區域內的水分子增加, 希夫鹼鍵結重新指向胞內, 這過程為不可逆, 在最近的文獻會再將 M 狀態細分成 M1 跟 M2<sup>16, 17</sup>。
4. Asp96 上的氫離子轉移到希夫鹼鍵結上, 進入 N 狀態。
5. Asp96 從胞內吸收一個氫離子, retinal 從 13-cis 變回 all-trans, 進入 O 狀態
6. Asp85 上的氫離子轉移到 Glu204 的水基團上, 回到 B 狀態。

本實驗所使用的 HmBRI-D94N, Asp94 的位置突變成 Asn94, 由於 Asn94 對氫離子的親和力下降, 使得從 M 狀態回到 B 狀態的時間被延長。HmBRI-D94N 的光週期在酸性環境下(pH 5.5)則長達 500 毫秒左右, 在鹼性環境下會延長其光週期。跟 HmBRI 相比, D94N 突變的氫離子幫浦速率較慢, 能造成的 pH 值變化也相對較小。

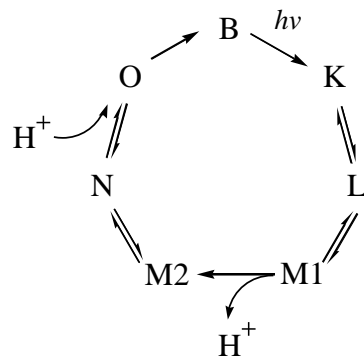


圖 3: HsBR 光週期各中間態的轉換關係。



### 1.3：研究動機

楊啓伸教授的實驗團隊研發出 HmBRI-D94N 大量表達的方法<sup>2,6</sup>。以 *Escherichia coli* strain C43(DE3)作為保存 HmBRI 質體跟表達用的菌種，用 LB 培養液培養隔夜，再加入 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)跟 retinal 去誘導 HmBRI 蛋白質生成，使用超高速離心機得到含有 HmBRI 蛋白質的細胞膜後用介面活性劑 DDM 把蛋白質置換出來。最後通過 Ni-NTA 親合管柱進行純化，獲得被介面活性劑包圍住的蛋白質。

HmBRI D94N 跟 HmBRI 相比，具有十倍以上的表現量，而且因為對溫度的穩定性，純化過程中能藉由加熱剷除其他會因此變性的蛋白質。其一次的生產量超過傳統用原生菌種生產的 HsBR 的生產量。而且表達菌種 *E.coli* 的生長速度比原生嗜鹽古細菌還要快，培養和純化所需的成本也較低，更適合大量生產並有助於 BR 裝置的研發。

HmBRI 具有受光驅動並造成周圍環境 pH 值變化的性質，可以製作出光感應的生醫材料。然而，HmBRI 的吸收光區段落在可見光波段，而可見光的穿透性侷限了藥物傳遞材料的應用。本實驗的目標之一就是利用可以吸收紅外光的螢光高分子去間接激發 HmBRI，使 HmBRI 能在人體內透過穿透性高的紅外光激發而產生作用。

此外，氧化銦錫(ITO)導電玻璃因為周遭 pH 值改變電動勢的特性，結合 HmBRI 可以作成感光的電化電池元件，進而衍伸出光色材料或偵測會與視紫質產生作用的蛋白質的偵測元件。本實驗的目標之二為將 HmBRI-D94N 固定在 ITO 表面上，形成更便利的元件組成。





## 第二節：螢光共振能量轉移(FRET)

### 2.1：FRET 的原理及相關應用

螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)，為兩個生色團(chromophore)之間發生的能量轉移現象<sup>18, 19</sup>。當供體生色團的激發態與受體生色團因為有著相近的振動頻率而產生共振，形成長程的偶極耦合(long range dipole coupling)時，能將能量從供體轉移到受體上。此現象由德國科學家特奧多·福斯特命名，又被稱為福斯特共振能量轉移(Förster resonance energy transfer)<sup>20</sup>。

FRET 過程中，供體會先吸收光子的能量並躍昇到激發態。激發態的供體會與受體形成偶極耦合，將能量轉移到受體上，使供體回到基態，受體躍昇到激發態。受體大多以螢光的形式放出能量。能量轉移的過程中不涉及光子的放出，跟輻射型的能量傳遞相比，更不容易受到供體跟受體之間介質的影響。

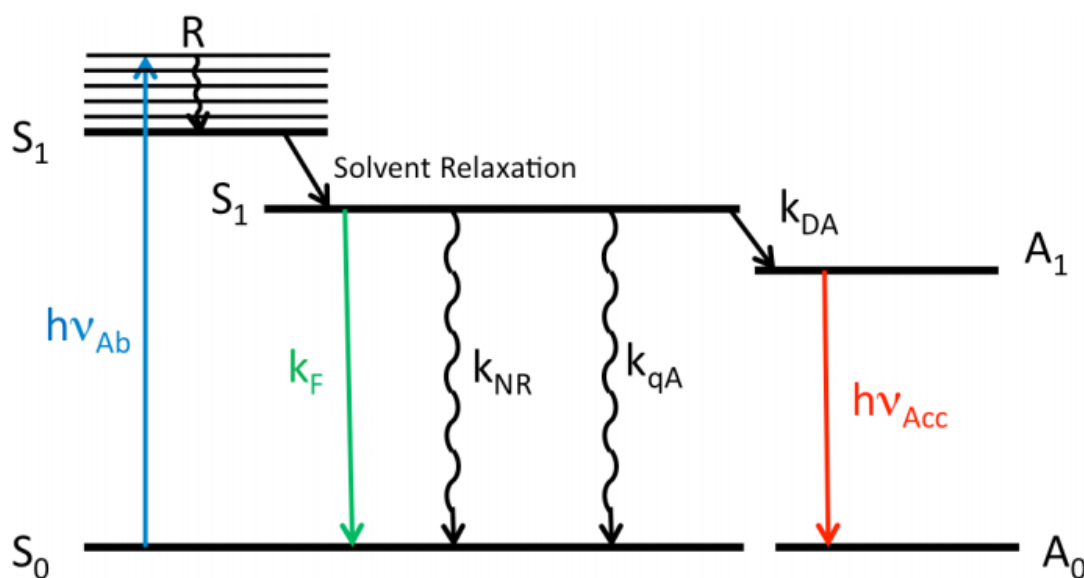


圖 4：用來表示 FRET 現象的雅布隆斯基圖(Jablonski Diagram)<sup>21</sup>。其中  $k_{DA}$  是代表從供體到受體的 FRET 能量轉移。 $k_F$  為供體本身的螢光， $h\nu_{acc}$  則是受體藉由轉移過來的能量所放出的螢光。



FRET 的發生條件受限於以下幾個關鍵。第一，供體從激發態回到基態時放出的能量需要符合受體躍遷到激發態所需的能量。也就是說，供體的螢光光譜跟受體的吸收光譜需要重合，重合的比例會影響到 FRET 的效率。第二，FRET 的效率會與供體和受體之間的距離的六次方成反比，供體跟受體彼此之間需要夠接近，一般都是在 1 到 10 奈米以內才能夠傳遞能量。第三，供體跟受體的躍遷偶極矩必須相互平行。第四，供體的螢光半生期需要長到足以有時間把能量傳遞給受體。

從以上的條件可以整理出與 FRET 效率有關的公式<sup>19</sup>：

$$K_T = \frac{1}{\tau_D} \left[ \frac{R_0}{r} \right]^6$$

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)}$$

$K_T$  為能量傳遞的速度， $\tau_D$  為供體的螢光半生期， $r$  為供體跟受體之間的距離，而  $R_0$  為 FRET 效率為最大值的一半時的距離，稱為福斯特半徑(Förster radius)。福斯特半徑與供體與受體之間的光譜重合度，躍遷偶極矩的方向，介質的折射率，供體的量子產率有關，可整理出以下公式<sup>19</sup>：

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 \times [\kappa^2 \cdot J(\lambda) \cdot \eta^{-4} \cdot Q_D]^{\frac{1}{6}} (\text{Å})$$

$\kappa^2$  為描述躍遷偶極矩之間的相對向量的因素，在供體跟受體都是動態隨機排列的假設下，這個數值定為  $\frac{2}{3}$ 。 $J$  為光譜重疊的積分面積， $\eta$  是介質的折射率， $Q_D$  是供體的量子產率。總結以上公式，FRET 的效率主要取決於分子間的距離，供體的螢光光譜跟受體的吸收光譜的重合度，以及供體本身放出螢光的能力。

因為對於分子間距離相當敏感，因此 FRET 也經常用於作為偵測分子間距離的依據<sup>22</sup>。特別是在生醫領域，在兩個蛋白質上分別接上螢光的供體跟受體，假如兩個蛋白質之間有產生反應，互相結合的話，供體跟受體之間的距離也會拉近，引發 FRET 現象，進而改變螢光的波長。利用相關應用便可以測量分子的構造，構型改變跟分子間的交互作用，更是在生醫領域中研究蛋白質之間的交互反應機制的重要應用<sup>23</sup>。



## 2.2：雙光子激發發光的應用

雖然 FRET 能有助於以不同波長的入射光去間接激發 HmBRI，但在一般情況下，必須使用更高能量的入射光去激發供體，而更高能量的入射光代表其對生體組織的穿透度較小，對細胞的危害性也比較大。因此為了對應需求，我們需要一個能夠吸收低能量入射光而放出高能量發光的螢光劑，具有雙光子吸收(two-photon absorption，簡稱 TPA)特性的材料符合這個需求

跟單光子吸收(one-photon absorption，簡稱 OPA)不同，分子在吸收兩個低能量的光子並藉此躍遷到高能階上，如圖 5 所示<sup>24</sup>。由於實際上不存在只吸收一個低能量光子的能階，必須在極短的時間(約  $10^{-15} \sim 10^{-16}$  秒)內同時吸收兩個光子，因此 TPA 的吸收能力與入射光的光密度的平方成正比關係。如下列公式<sup>19,25</sup>：

$$\frac{dI(z,\lambda)}{dz} = -\beta(\lambda) \cdot I^2(z,\lambda) = -\sigma_2(\lambda) \cdot h\nu \cdot N_0 \cdot I^2(z,\lambda)$$

$I$  為入射光強度， $z$  為光在物質中行進距離，而  $\beta$  為雙光子吸收係數。這係數是一個受入射光波長影響的函數，除上分子的密度與光子的能量後可以得到該物質分子的雙光子吸收截面(two photon absorption cross section)。雙光子吸收截面的單位為 GM 或  $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}^{-1}$ ，而大部分報導的具有 TPA 性質的分子則有著  $10^2 \sim 10^4$  GM 的吸收能力。另外因為 TPA 與入射光強度平方成正比的性質，TPA 會主要發生在雷射光的聚焦點而不像 OPA 會平均發生在雷射光的光徑上。這個性質使 TPA 對於雷射的強度，聚焦程度跟脈衝寬度的要求以 OPA 來的高，但也能利用這特性減少聚焦點之外的地方所產生的光致退色跟光致傷害<sup>19</sup>。

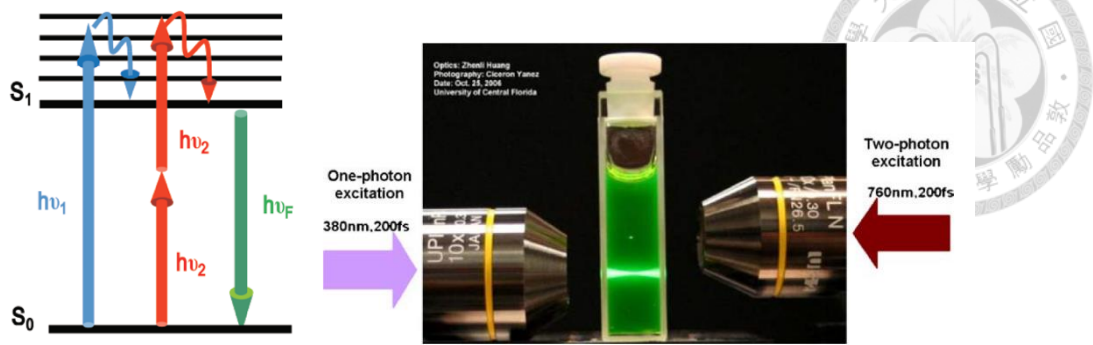


圖 5：表示雙光子吸收的雅布隆斯基圖(左)。同時以紅外光雷射跟紫光雷射照射的螢光溶液(右)<sup>24</sup>，可以看到紫光雷射產生的單光子激發螢光會平均出現在光徑上，而紅外光雷射產生的雙光子激發螢光只出現在雷射聚焦點上。

TPA 跟 OPA 的選擇律(selection rule)並不相同。以中心對稱的分子為例，其基態時的軌域一般為對稱性(gerade)，而根據 Laporte rule，對稱性軌域在經過光子的極化後只能躍遷到反對稱性(ungerade)的激發態軌域，因此一般 OPA 只會吸收符合對稱性跟反對稱性的軌域間能階差的光子。但在 TPA 的情況中，連續受兩次光子的極化，會從對稱性的基態躍遷至同樣是對稱性的激發態。這個選擇律與拉曼光譜跟紅外線光譜的選擇律相似<sup>26</sup>。

因為選擇律的不同，即使是同樣分子，TPA 吸收光譜的形狀不會完全與 OPA 吸收光譜相同，以羅丹明 B 為例，在 OPA 吸收光譜中，羅丹明 B 在入射光 400 nm 時的吸收律小於 500 nm，但在 TPA 吸收光譜中，在 800 nm 時的吸收率卻是大於 1000 nm<sup>19</sup>。然而，即使躍遷至不同的激發態，目前已知物質的 TPA 的螢光光譜卻都與 OPA 的螢光光譜相同，這件事實無論是 TPA 還是 OPA，在經過內部非輻射的能量釋放後都會到達同樣的激發態並放出螢光回到基態。

根據目前研究，具有平面性跟相當的共軛長度的分子，或者是內有電子供體(electron donor)跟電子受體(electron acceptor)，在激發時會產生密集的電子轉移的分子，這些分子會具有比較明顯的 TPA 性質。在設計具有 TPA 性質的分子時，一般會設計成 D- $\pi$ -A 的雙極分子或是 D- $\pi$ -A- $\pi$ -D 的四極分子。一般這些分子都只溶於

有機溶劑中，但藉由側鍊的修飾或合成奈米粒子，可以提高這些分子的親水性而擴展在生醫方面的應用<sup>26</sup>。

TPA 的現象由 Maria Goepfert-Mayer 在 1931 提出假設，並在 30 年前藉由當時最新的雷射技術獲得證實。近年來已經有眾多的應用。包括但不限於，利用紅外光去激發螢光劑來進行顯影的雙光子激發顯微鏡<sup>27</sup>，用雙光子現象去驅動的頻率高轉換雷射<sup>28</sup>，3-D 雷射列印技術<sup>29</sup>以及光動力療法<sup>30</sup>。



### 第三節：氧化銦錫(ITO)的表面修飾

#### 3.1：ITO 修飾的基本介紹

在楊啓伸教授和其學生黃元祈的研究中，以朱立岡教授所寫有關於視紫質作為光化電池應用的文獻作為基礎，設立一套使用氧化銦錫(Indium tin oxide, 簡稱 ITO)鍍膜玻璃為電極去測量視紫質感光能力的實驗元件<sup>6,31</sup>。利用 ITO 會因為環境 pH 值而改變電動勢的特性，使接觸視紫質的 ITO 跟沒有接觸視紫質的 ITO 產生電位差，進而產生電流。假如對於 ITO 表面作進一步改質，理論上應該能拓展此元件的應用性，像是以 ITO 跟 HmBRI 為基礎的蛋白質偵測晶片，只要將樣品滴在 ITO 片上照光就能從微小電流的訊號有無去判斷蛋白質之間有沒有交互關係。

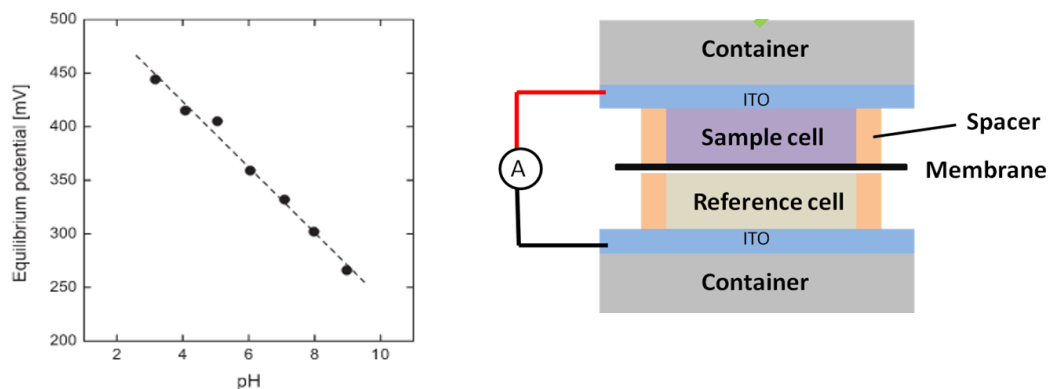



圖 6：ITO 的電動勢與 pH 值的線性關係圖(左)<sup>32</sup>。ITO 與 HmBRI 結合成的光電元件示意圖(右)<sup>33</sup>。

本實驗所使用的 ITO 為 90%的氧化銦跟 10%的氧化錫的混合物以 100~300 奈米的厚度鍍膜在玻片表面上。因為透明無色的特性跟良好導電度，使其能同時滿足本實驗對於電學跟光學上的要求。而由於其泛用性，目前已有許多關於 ITO 改質相關的文獻，在本論文中僅列出幾個例子。



ITO 一般具有氫氧化的表面。這個性質使 ITO 暴露在空氣中時，會因為跟水氣產生反應而使導電度下降，導致表面上有著不均一的鈍化。但是氫氧化基團的活性跟更多化學試劑產生反應，因此均一的氫氧化也是許多表面改質所需要的前置步驟。主動使用氧電漿，紫外光表面處理或其他具有強力的氧化作用的試劑能夠使表面產生均一的氫氧化基團<sup>34</sup>。

最常使用的修飾方案為使用矽烷類作為交聯劑。ITO 表面的氫氧基團會跟矽烷形成共價鍵，又由於矽烷多有著自組裝的性質，能在 ITO 表面上形成均一而穩定的膜層。矽烷類的交聯劑有著結合有機分子跟無機表面的作用，能夠將功能性高分子穩定的接合在 ITO 表面，像是在設計發光二極體時，將電洞傳導層固定在陰極的 ITO 上<sup>34-36</sup>。

除了矽烷類，也能使用羧酸與 ITO 以化學吸附的形式進行改質。羧酸能跟 ITO 表面以氫鍵，靜電力以及酯化鍵結的形式結合。羧酸能夠在蝕刻掉 ITO 表面不具功能的氫氧化銻的同時，提升電子傳遞到其他介質的速度，降低起始電壓，進而改進整體發光二極體的效率<sup>34,37</sup>。

另外也有使用磷酸，能有效的在 ITO 表面形成緻密的單層結構。藉由各種磷酸基的分子，能夠降低 ITO 的表面能，使非極性的有機分子更容易在 ITO 表面上鍍膜，改進發光二極體跟有機太陽能電池的效率<sup>34,38</sup>。



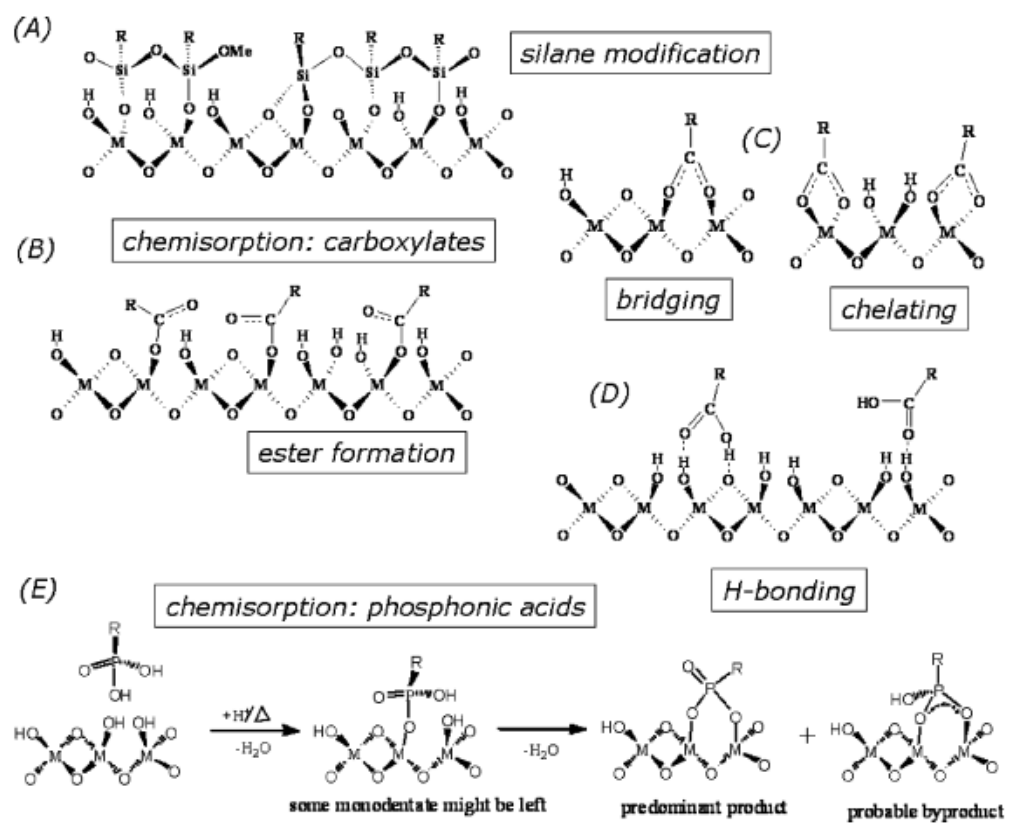


圖 7：ITO 表現修飾的範例。(A)圖為使用矽烷類的修飾。(B-D)圖為使用羧酸修飾可能產生的幾個結果。(E)圖為使用磷酸類的修飾<sup>34</sup>。



### 3.2 : Histidine-Tag 與 $\text{Ni}^{2+}$ 的非共價性鍵結

本實驗對 ITO 的改質目的為將 HmBRI-D94N 吸附並固定在 ITO 表面上，因此我們使用 HmBRI 純化過程中所使用的方法，利用蛋白質上的組氨酸標籤(histidine tag)跟 Ni-NTA 形成螯合物，以配位共價鍵固定 HmBRI(圖 8)。

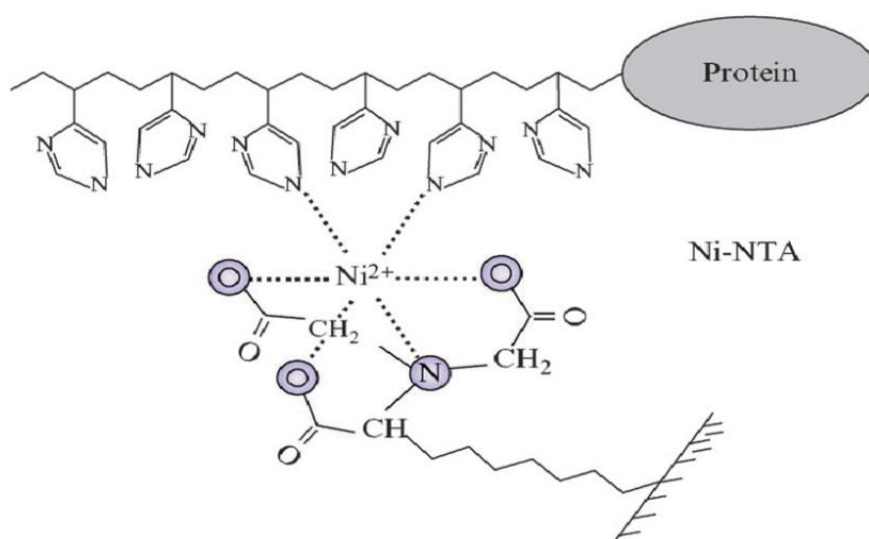


圖 8：NTA，鎳離子與組氨酸標籤所形成的螯合物之示意圖<sup>39</sup>。

組氨酸標籤為六個組氨酸結合而成的一段胺基酸序列，由 Roche 公司所發明<sup>40</sup>。藉由基因工程，能將這段胺基酸的質體插入目標蛋白質的 RNA 中，在蛋白質的 C 端或 N 端上接上組氨酸標籤。

組氨酸標籤帶有局部的負電荷，會跟一些二價或三價的金屬離子形成配位共價鍵。因此在樹脂上接上螯合劑，例如亞氨基二乙酸(iminodiacetic, 簡稱 IDA)或氮三乙酸(nitrilotriacetic acid, 簡稱 NTA)，用這些螯合劑抓住金屬離子並以此吸附帶有組氨酸標籤的蛋白質。由於這個配位共價鍵很容易斷開，像是使用咪唑(imidazole)去跟組氨酸標籤行競爭反應(圖 9)，解除蛋白質在樹脂表面上的吸附，因此能輕易將被純化出來的蛋白質從樹脂表面上清洗下來<sup>41</sup>。

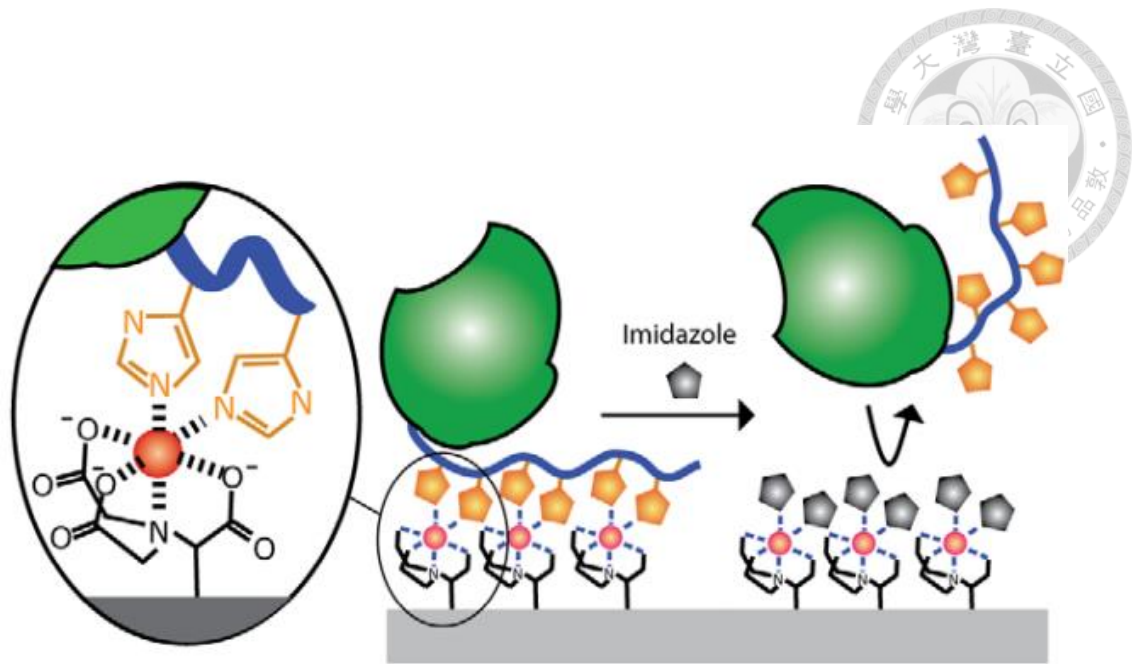


圖 9：使用咪唑取代組氨酸標籤，使蛋白質脫離表面之示意圖<sup>42</sup>。

實驗中，我們在 ITO 表面上接上 *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (簡稱 NTA-NH<sub>2</sub>)作為用來固定帶有組氨酸標籤的蛋白質的官能基。但因為配位共價鍵的鍵結強度不夠，很容易因為環境 pH 值的變動或是物理性的接觸導致蛋白質的脫落。因此我們使用 EDC/NHS 的搭配使 NTA-NH<sub>2</sub> 跟組氨酸標籤之間形成共價鍵結。



### 3.3 : EDC/NHS 的交叉鍊接

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺 (3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amine, 簡稱 EDC)跟 N-羥基琥珀醯亞胺(N-Hydroxysuccinimide, 簡稱 NHS)為蛋白質結合技術時常用的試劑之一，能將羧酸基跟胺基接合在一起。因為兩者間沒有接合劑的存在，這反應又稱為 zero-length crosslinking<sup>43</sup>。

詳細反應圖見圖 10。EDC 會和分子上的羧酸基反應形成更具有活性的 O-acylisourea 中間體。這個中間體容易跟一級胺和二級胺行親核取代反應，使原來的羧酸跟一級胺接合在一起。然而，O-acylisourea 中間體並不穩定，容易跟水產生水解，還原成原來的羧酸基團，而且。因此一般會再使用 NHS 或是 sulfo-NHS 跟 O-acylisourea 中間體行反應，使 NHS 取代掉 EDC，形成更穩定的 NHS-ester 中間體。這個中間體不會與水起反應，更容易與胺基結合。

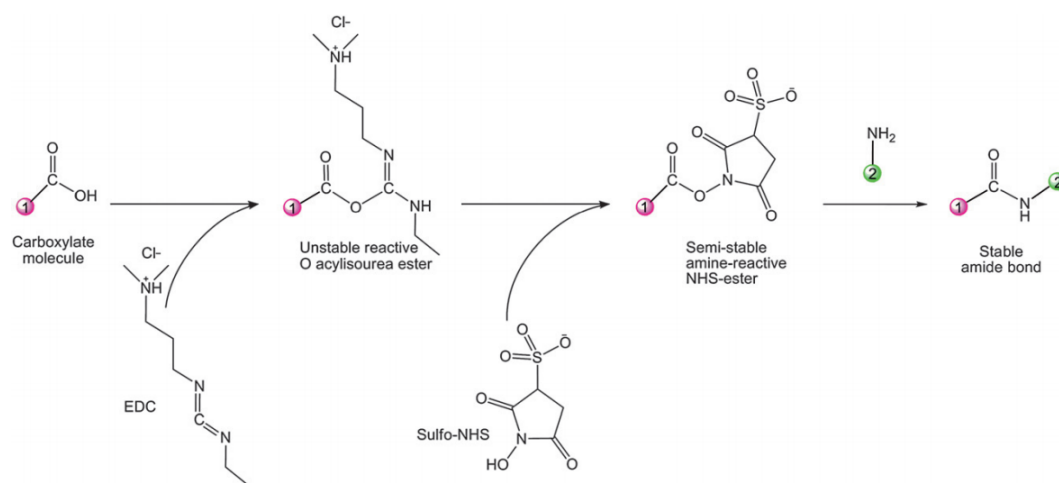



圖 10 : EDC/NHS 反應圖<sup>44</sup>。



由於 EDC 跟 NHS 反應時最適合的酸鹼度不同，一般會分成兩步驟，第一步是在酸性環境下，將含有羧酸基的蛋白質，EDC，NHS 混合在一起，形成能夠跟胺基反應的中間體。第二步在除去多餘的 EDC 之後，加入含有胺基的蛋白質，然後將溶液的酸鹼度調配成中性或鹼性，使中間體能夠跟胺基反應並接合在一起。本實驗因為蛋白質與 NTA 形成的螯合物對於酸鹼度的變化敏感，所以全程都在 pH 7.0 的緩衝溶液下反應。



## 第二章：結果與討論—蛋白質的能量傳遞

### 第一節：高分子的合成與性質

#### 1.1：PPESO<sub>3</sub> 的吸收光譜與螢光光譜

PPESO<sub>3</sub> 是這實驗第一個嘗試的 TPA 高分子<sup>45</sup>，其離子化的側鏈帶給高分子良好的水溶性，其螢光光譜也跟 HmBRI-D94N 的吸收光譜重疊，有著產生 FRET 現象的可能性。其雙光子吸收截面積有 400 GM，在眾多 TPA 高分子中有著相當程度的 TPA 性質，雙光子吸收光譜也在近紅外光的範圍內。更重要的是，此高分子對於身體組織的危害經過驗證而確認沒有危害性，很適合未來的生醫方面的應用。

合成步驟如圖 11，先將 p-hydroquinone 用 1,3-propane sultone 作磺酸化，得到單體 A，目的是產生離子性官能基，提升高分子的水溶性。得到的單體 A 與碘跟碘酸鉀進行反應，在苯環上接上碘原子，形成單體 B。單體 B 跟 p-diethynylbenzene 行菌頭耦合反應(sonogashira coupling reaction)，形成最終產物-PPESO<sub>3</sub>。產物經過 MWCO 為 3.5kD 的 regenerated cellulose dialysis membranesy 做透析處理，濾除掉分子量在 1kD 以下的高分子。所有化合物皆經由 NMR 光譜學鑑定，其相對應光譜列於第七章。

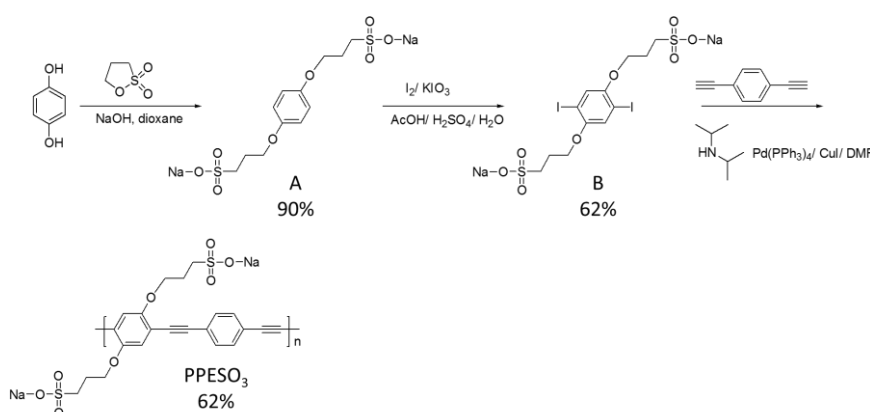


圖 11：PPESO<sub>3</sub> 的合成步驟。



PPESO<sub>3</sub> 的吸收光譜(圖 12)跟螢光光譜(圖 13)與參考文獻上的光譜圖一致<sup>45</sup>。從圖中可以看出 PPESO<sub>3</sub> 在水中的吸收光譜，跟在甲醇溶液中的吸收光譜相比有紅移的現象，最大吸收峰從 415 nm 偏移到 450 nm。紅移的原因在於 PPESO<sub>3</sub> 溶於水中時會出現聚集(aggregation)的現象，使能階降低，由波長紅移來推斷，此聚集應為 J 聚集(J aggregation)。而從螢光光譜更能看出凝聚現象對 PPESO<sub>3</sub> 的影響。在甲醇溶液中，最大放出峰在 450 nm，為一個明顯的尖峰。但在水溶液中會產生明顯的紅移，最大放出峰移動到 520 nm。需要注意的是，在水溶液中的 PPESO<sub>3</sub> 的螢光強度會大幅減弱，有可能是凝聚現象造成螢光的消光效應(quench effect)<sup>45</sup>。

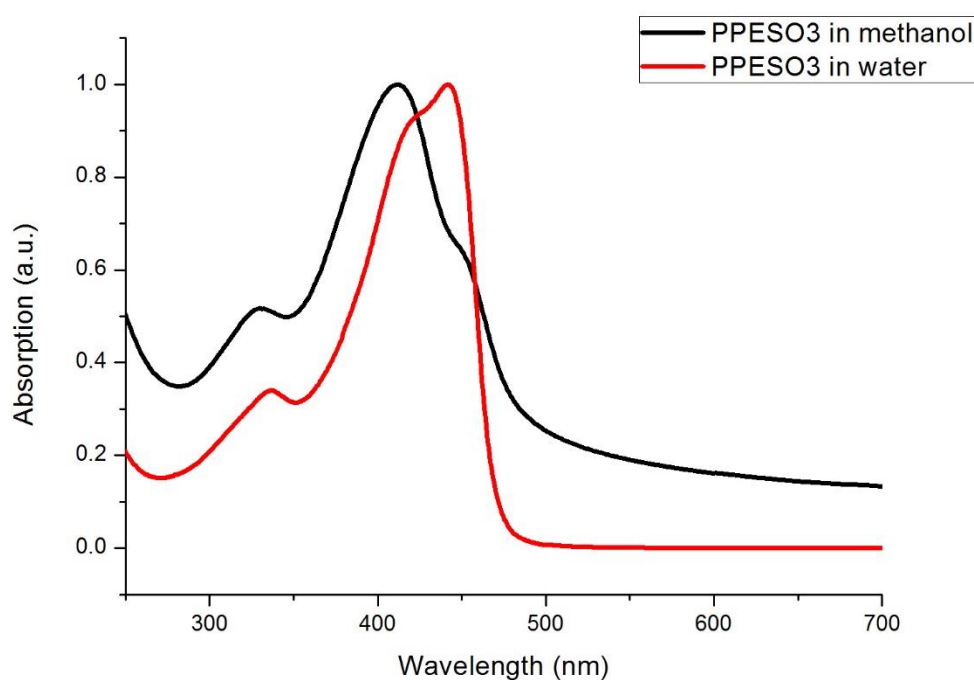


圖 12：PPESO<sub>3</sub> 的 UV 吸收光譜。其中黑線為 PPESO<sub>3</sub> 在甲醇溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其吸收度都做過標準化的處理。

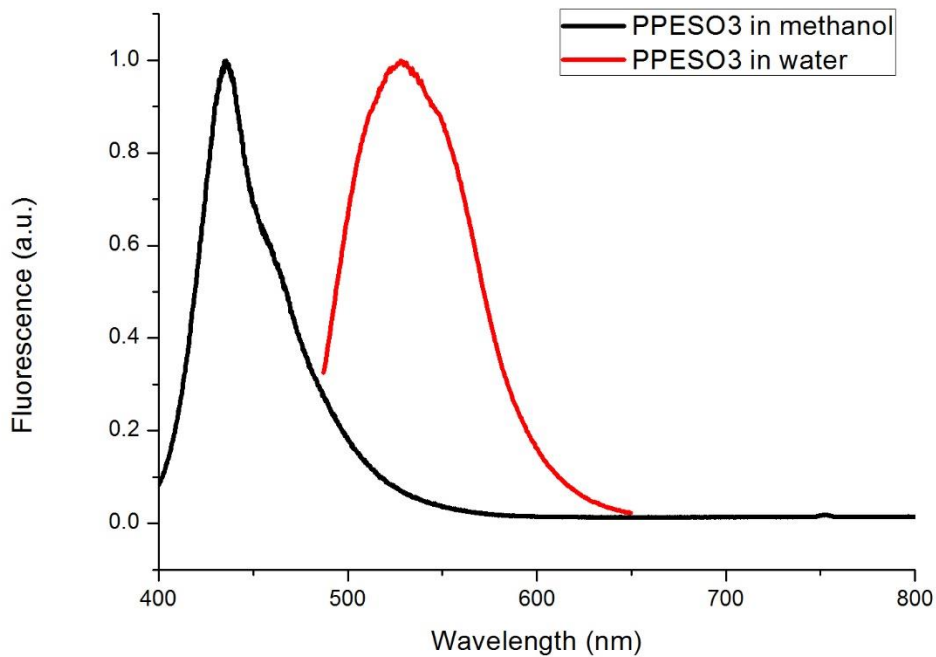


圖 13：PPESO<sub>3</sub> 螢光光譜。其中黑線為 PPESO<sub>3</sub> 在甲醇溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其螢光強度都做過標準化的處理。

為了調查 PPESO<sub>3</sub> 受 pH 值的影響，使用緩衝溶液 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(簡稱 MES)跟鹽酸和氫氧化鈉去調整溶液的 pH 值後再去測螢光。發現 PPESO<sub>3</sub> 在酸性環境下會有明顯的消光現象(圖 14) 作為對照組，有測量有加 MES(藍線)跟沒有加 MES(黑線)時在相同 pH 值下的螢光強度，結論是 MES 並沒有對 PPESO 的螢光有明顯影響，與消光現象無關。推測是因為 PPESO<sub>3</sub> 為帶負電的高分子，因為氫離子的增加而加強凝聚的效果，這被稱為 amplified quenching effect。這可能是影響之後蛋白質交互實驗結果的原因之一。



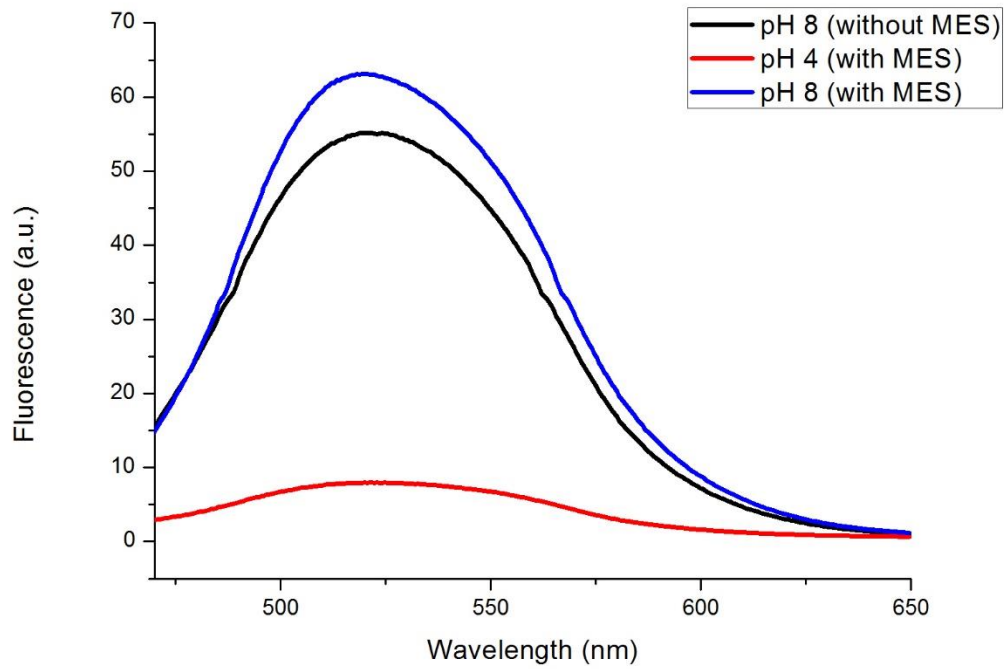
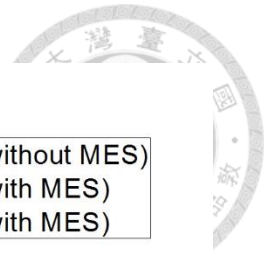


圖 14：PPESO<sub>3</sub> 在不同 pH 值下的螢光光譜。可看見在酸性環境下(紅線)的螢光強度有大幅降低。



## 1.2：PFBT 的吸收光譜與螢光光譜

第二個合成的高分子為 PFBT，從利用 TPA 性質做血管顯影的文獻中獲得參考<sup>46</sup>。除了螢光範圍與 HmBRI-D94N 的吸收光譜重疊以外，其水溶性奈米粒子有著高達 75% 的量子產率以及 1085 GM 的雙光子吸收截面積，在醫學上的應用也減少對人體危害的顧慮，是相當適合這次實驗的 TPA 高分子材料。

合成步驟如圖 15。首先將 4,7-二溴芴與 1-溴己烷在二甲基亞砷跟氫氧化鈉水溶液中加熱反應，形成帶有正己烷側鍊的芴單體 C。之後使用雙聯頻哪醇硼酸酯 (Bis(pinacolato)diboron) 去取代單體上的溴原子，加入催化劑後在 1,4-二噁烷(1,4-dioxane)溶劑中反應，形成帶有硼酸酯的芴單體 D。單體 D 跟苯并噻二唑 (benzothiadiazole) 行鈴木聚合反應(Suzuki coupling polymerization)，在四(三苯基膦)鈀的催化之下，形成交替共聚物 PFBT。

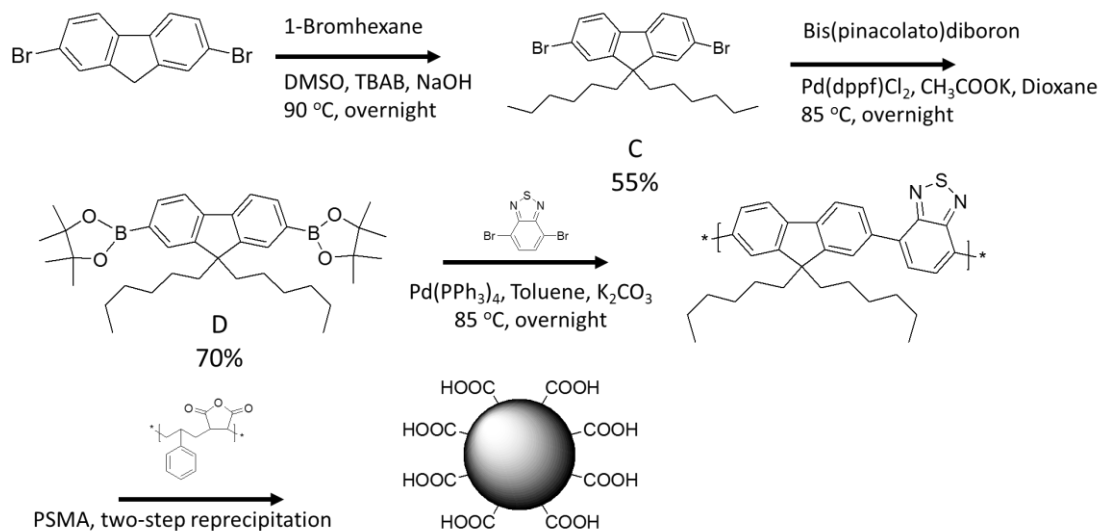


圖 15：PFBT 奈米粒子的合成步驟。

PFBT 溶於有機溶劑，卻不溶於水，因此要再多一個步驟，使其形成水溶性的高分子奈米粒子。首先將 Poly(Styrene-co-Maleic Anhydride) (簡稱 PSMA) 與 PFBT 的 THF 溶液混合在一起。然後一次性倒入進行超音波震盪的去離子水中。環境極性的劇烈變化會導致疏水性的 PSMA 跟 PFBT 凝聚在一起，在超音波震盪下形成一顆一顆極小的高分子顆粒。而 PSMA 高分子鍊上的順丁烯二酸酐會在水環境下水解，在奈米粒子表面形成羧酸基團，使奈米粒子能溶於水中。奈米粒子經過動態光散射粒徑分析儀(Dynamic light scattering, 簡稱 DLS)的測量得知其平均粒徑為 131 nm，polydispersity(PDI)為 0.638(圖 16)。

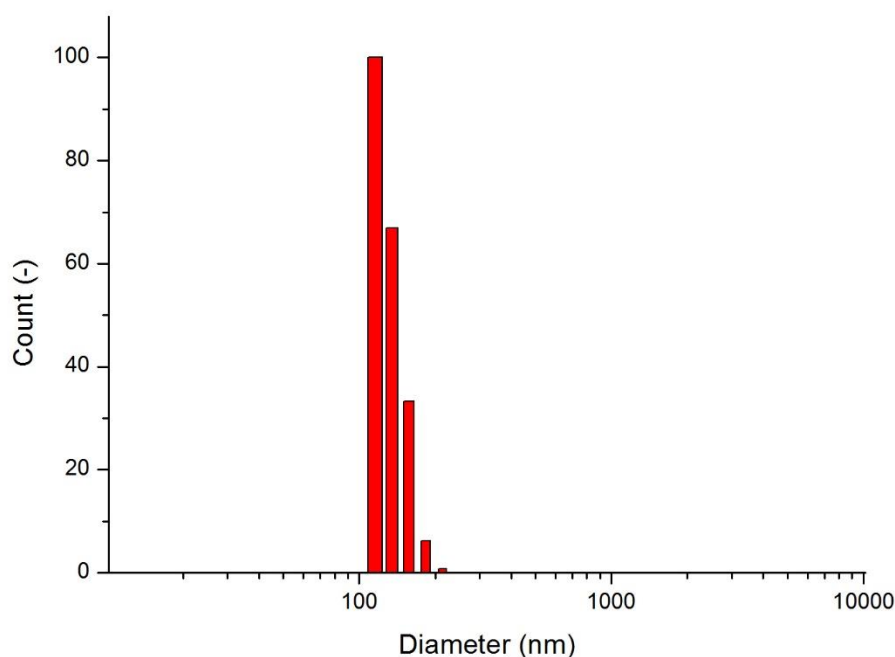


圖 16：PFBT 奈米粒子經由 DLS 測量所得之粒徑分布圖。

以下為 PFBT 的吸收光譜(圖 17)與螢光光譜(圖 18)。在水溶液中的奈米粒子的吸收跟螢光光譜跟有機溶液中的光譜相比都有微弱的紅移現象，但偏移幅度不大。吸收光譜的峰值僅從 449 nm 紅移至 455 nm，而螢光光譜的峰值僅從 536 nm 紅移至 537 nm。

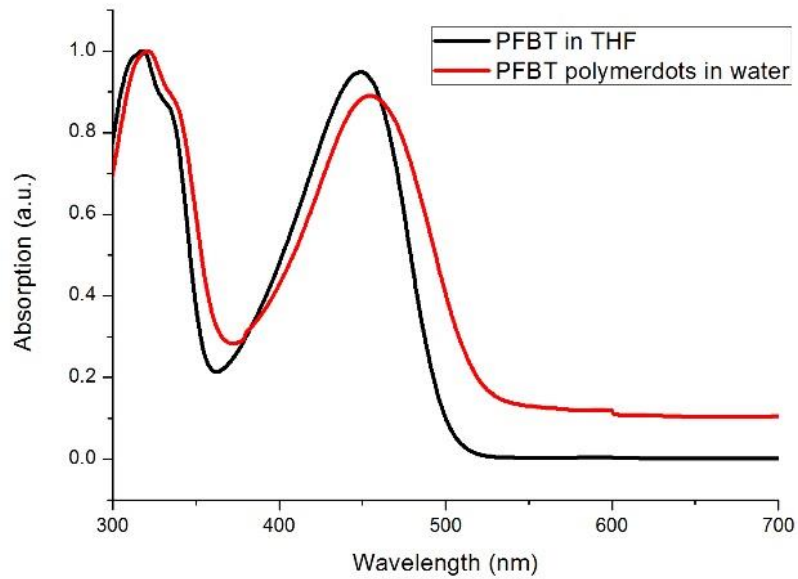


圖 17:PFBT 的 UV 吸收光譜。其中黑線為 PFBT 在四氫呋喃(THF)溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其吸收度都做過標準化的處理。

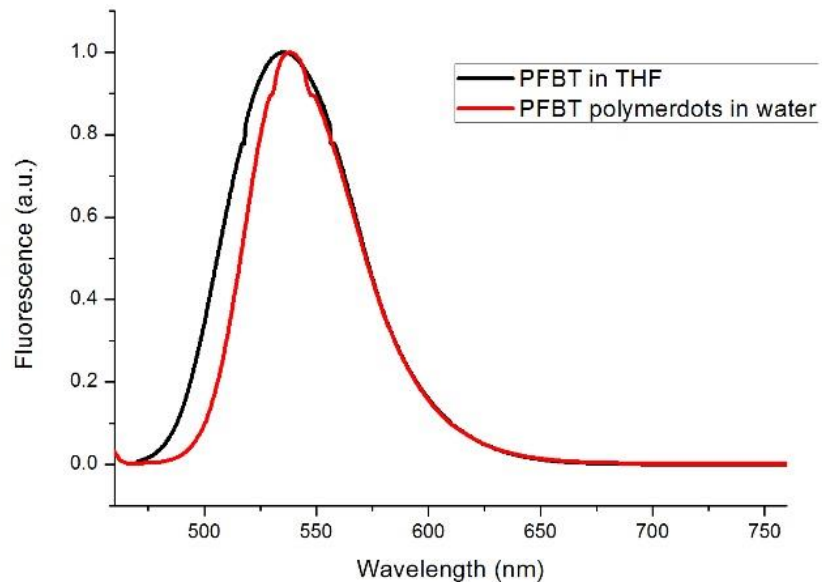


圖 18:PFBT 的螢光光譜。其中黑線為 PFBT 在四氫呋喃(THF)溶液中的表現，而紅線為在水溶液中的表現。其螢光強度都做過標準化的處理。



另外針對 PFBT 的螢光光譜對於 pH 值的敏感度，其結果如圖 19。可以看出 PFBT 的螢光幾乎沒有受到環境 pH 值的影響。這個因素可以減少受到 HmBRI-D94N 瞬間酸化環境的能力的影響。

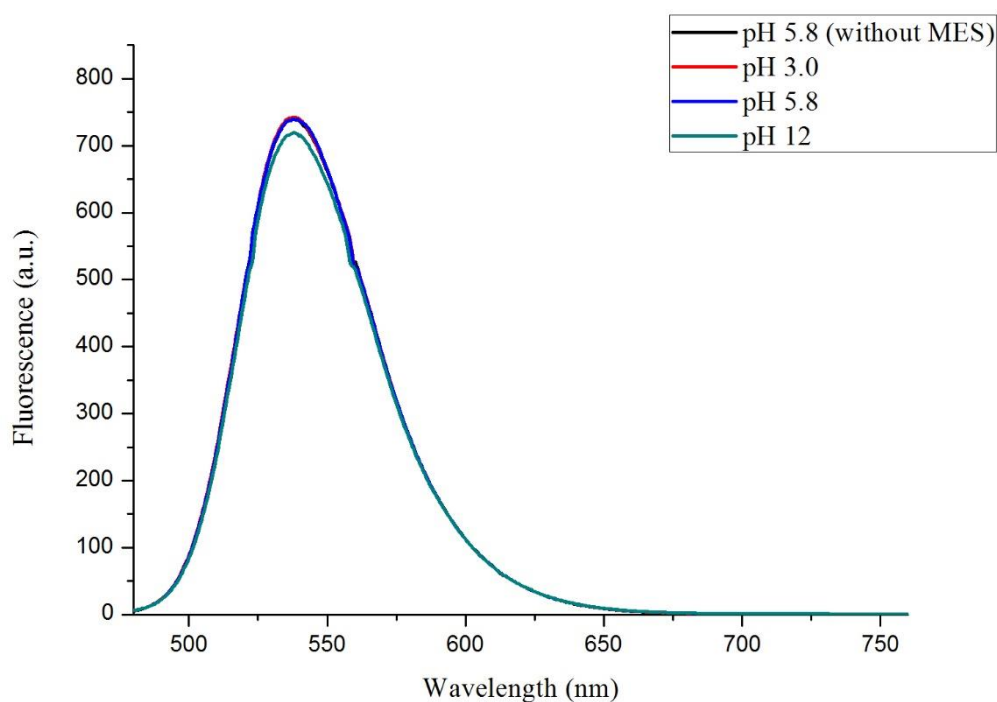


圖 19：PFBT 奈米粒子在不同 pH 值下的螢光光譜。基本上無論 pH 值為多少，有沒有加緩衝物質 MES 都不影響其螢光強度跟峰型。

## 第二節：PPESO<sub>3</sub>與 HmBRI-D94N 的能量轉移實驗

為了研究 PPESO<sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 之間的交互作用，首先調查其混合溶液的吸收跟螢光光譜。由圖 20 所示，PPESO<sub>3</sub> 的吸收峰形在 HmBRI-D94N 存在的情況下並沒有顯著變動，暗示著 PPESO<sub>3</sub> 的構型沒有明顯的變化。然而，把 HmBRI-D94N 的背景光譜去掉後，可以發現 PPESO<sub>3</sub> 最大吸收峰的吸收強度有 15% 的些微下降。

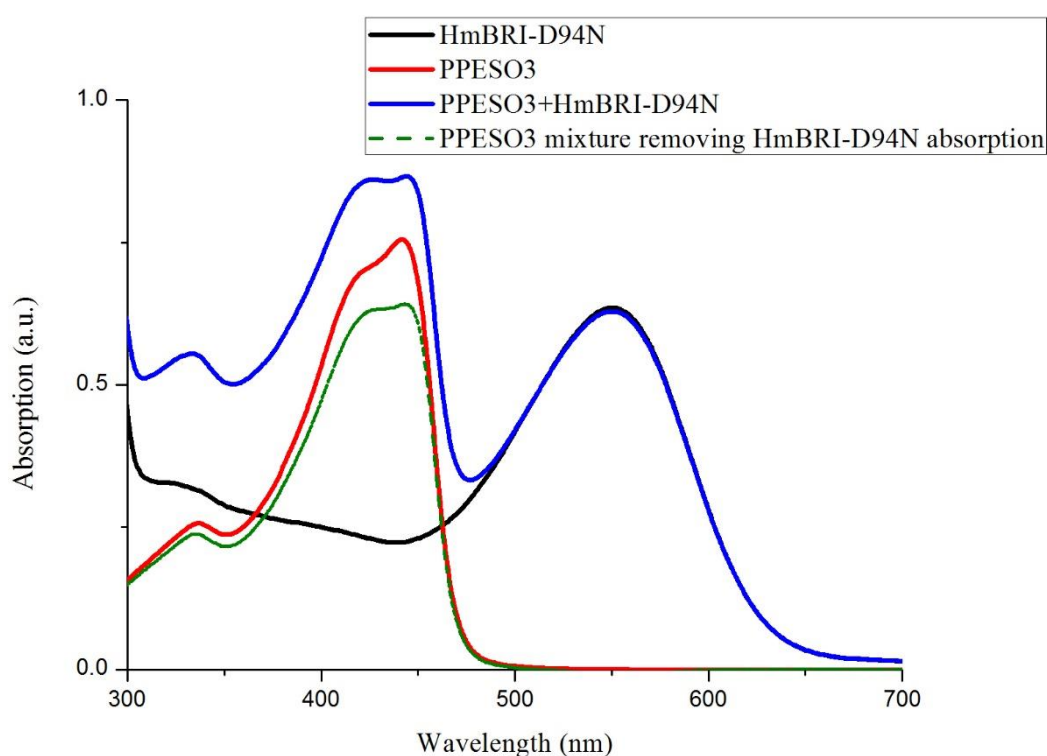


圖 20：PPESO<sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 的吸收光譜。PPESO<sub>3</sub> 的濃度為 20  $\mu\text{g/ml}$ ，HmBRI-D94N 的濃度為 0.5  $\text{mg/ml}$ 。HmBRI-D94N 在 550 nm 的吸收峰並沒有受到 PPESO<sub>3</sub> 的影響，而 PPESO<sub>3</sub> 在 450 nm 的吸收峰沒有因為 HmBRI-D94N 的存在而偏移，但吸收度有些微下降。

PPESO<sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 的混合溶液的螢光光譜(圖 21)可以看出，隨著 HmBRI-D94N 濃度的上升，PPESO<sub>3</sub> 的螢光強度不斷在減弱。這說明 HmBRI-D94N 對於 PPESO<sub>3</sub> 也有著消光作用。消光作用的因素有很多種，其中包括 FRET，因此實驗初步判斷 PPESO<sub>3</sub> 與 HmBRI-D94N 間的 FRET 有可能產生。

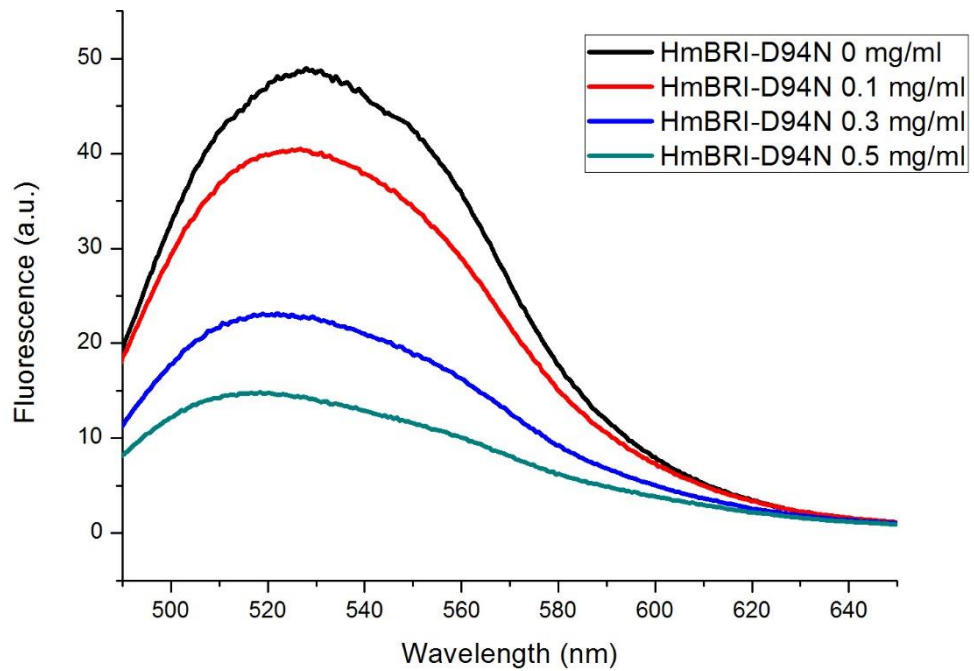


圖 21：PPESO<sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 的螢光光譜。PPESO<sub>3</sub> 的濃度固定為 20  $\mu\text{g/ml}$ ，隨著 HmBRI-D94N 濃度升高，PPESO<sub>3</sub> 的螢光強度也隨之減弱。

為了做進一步驗證，我們採用楊啟伸教授實驗室所提供的方式去測量 HmBRI-D94N 在光照下的表現<sup>33</sup>。用兩片 ITO，矽膠墊片跟透析膜組成如圖 22 的元件，元件內有兩個腔室，其中一個腔室加入 HmBRI-D94N 水溶液，而另一邊則加入對照組的水溶液。兩片 ITO 會分別接上示波器的正負極，當兩片 ITO 處在不同 pH 值的環境時，會產生電位差而形成電流訊號。從電流訊號的大小可以判斷 HmBRI-D94N 在雷射光照下所產生的反應。

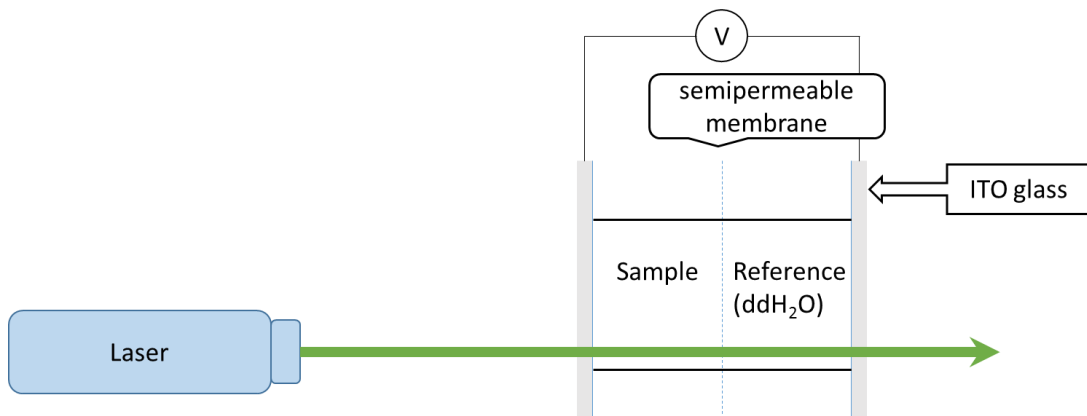


圖 22：光電化學實驗之裝置圖。產生的奈米安培等級的電流會經過增幅器，以電壓的形式放大訊號並反應在示波器上。

圖 23 即為一般 HmBRI-D94N 水溶液以及與 PPESO<sub>3</sub> 的混合溶液所得到的光電化學測試結果。由於該裝置會產生固定周期的雜訊，為了去除這影響，圖 21 的數據為實際測得的數據取 81 個週期的移動平均後得到的結果，其最高值紀錄為表 2。可以看到在綠光雷射下，HmBRI-D94N 都有著強度相近的電流訊號，這說明 HmBRI-D94N 做為氫離子幫浦的能力並沒有受 PPESO<sub>3</sub> 影響，能夠帶來同等的 pH 值的變化。然而，在藍光雷射的照射下，兩邊 HmBRI-D94N 都沒有展現突出的電流訊號。在我們的理論中，假如 HmBRI-D94N 跟 PPESO<sub>3</sub> 之間有 FRET 現象的話，藍光雷射的能量應該會經由 PPESO<sub>3</sub> 傳到 HmBRI-D94N 上並表現出氫離子幫浦的能力。然而實驗結果卻與推論相反，證明了 PPESO<sub>3</sub> 跟 HmBRI-D94N 之間沒有 FRET 現象產生。



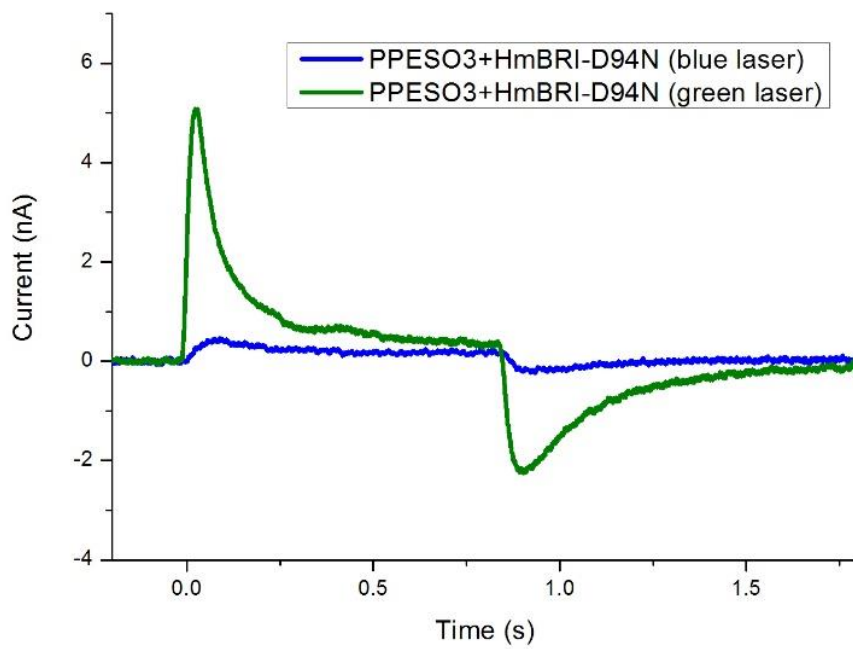
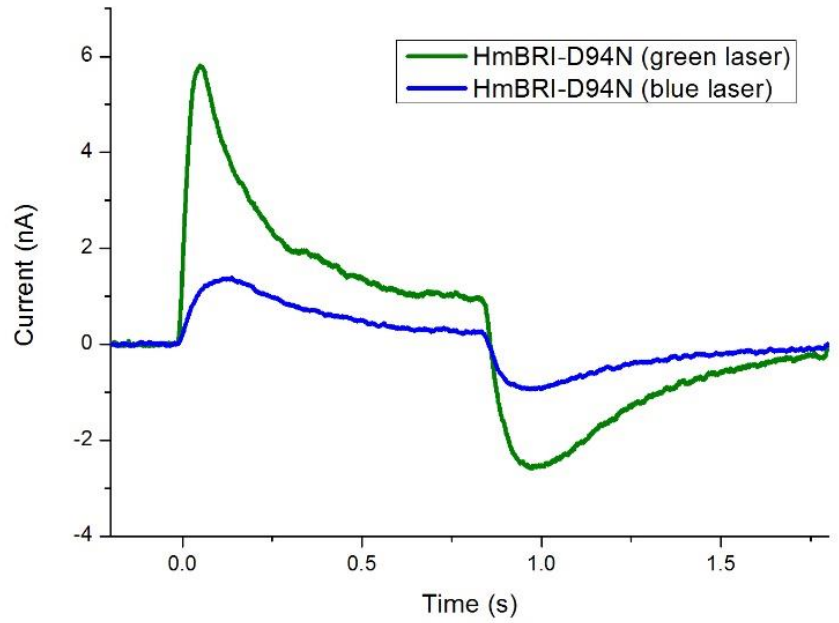


圖 23：單一 HmBRI-D94N(上)跟 HmBRI-D94N 和 PPESO<sub>3</sub> 混合溶液(下)的光電化學實驗結果。綠線為 532 nm 綠光雷射下的光電流訊號，藍線為 473 nm 藍光雷射下的光電流訊號。可以看到左圖在藍光雷射下的訊號明顯比右圖還要低。

表 2：經過數據處理後，各個光電化學實驗的平均最大電流。

光電流訊號 / nA	532 nm 綠光雷射	473 nm 藍光雷射
HmBRI-D94N 0.5 mg/ml	5.8	1.4
HmBRI-D94N 0.5 mg/ml + PPESO <sub>3</sub> 0.5 mg/ml	5.0	0.5

我們開始探討 PPESO<sub>3</sub> 沒有產生 FRET 現象卻有消光現象的原因。在排除掉其他可能的能量散發或傳遞到 retinal 以外的能量傳遞途徑之後，認為是 HmBRI-D94N 所帶電荷跟改變 pH 值的特性造成 PPESO<sub>3</sub> 的自我聚集，降低 PPESO<sub>3</sub> 的量子產率。PPESO<sub>3</sub> 的螢光強度因此不足以去激發 HmBRI-D94N 內部的 retinal。另外在 PPESO<sub>3</sub> 自我聚集時也因此拉開與 HmBRI-D94N 之間的距離，這也可能是導致對於分子間距離敏感的 FRET 沒有表現的原因。

### 第三節：PFBT dots 與 HmBRI-D94N 的能量轉移實驗

圖 24 是 PFBT 奈米粒子跟 HmBRI-D94N 的混合水溶液的吸收光譜跟螢光光譜。可以從吸收光譜看出 PFBT 的吸收光譜並沒有受到 HmBRI-D94N 影響，代表其構型並不因為 HmBRI-D94N 的存在而改變。而從螢光光譜中也能看到 PFBT 在 HmBRI-D94N 的存在下的螢光強度有減弱的趨勢，代表 HmBRI-D94N 一樣會使 PFBT 產生消光現象。值得注意的是，同樣濃度的 HmBRI-D94N 並沒有使 PFBT 的螢光強度完全減少到接近零的程度，如果消光現象是源自於 FRET 的話，那代表著 PFBT 的能量並沒有完全被 HmBRI-D94N 所吸收，可能需要進一步提高 HmBRI-D94N 的濃度。

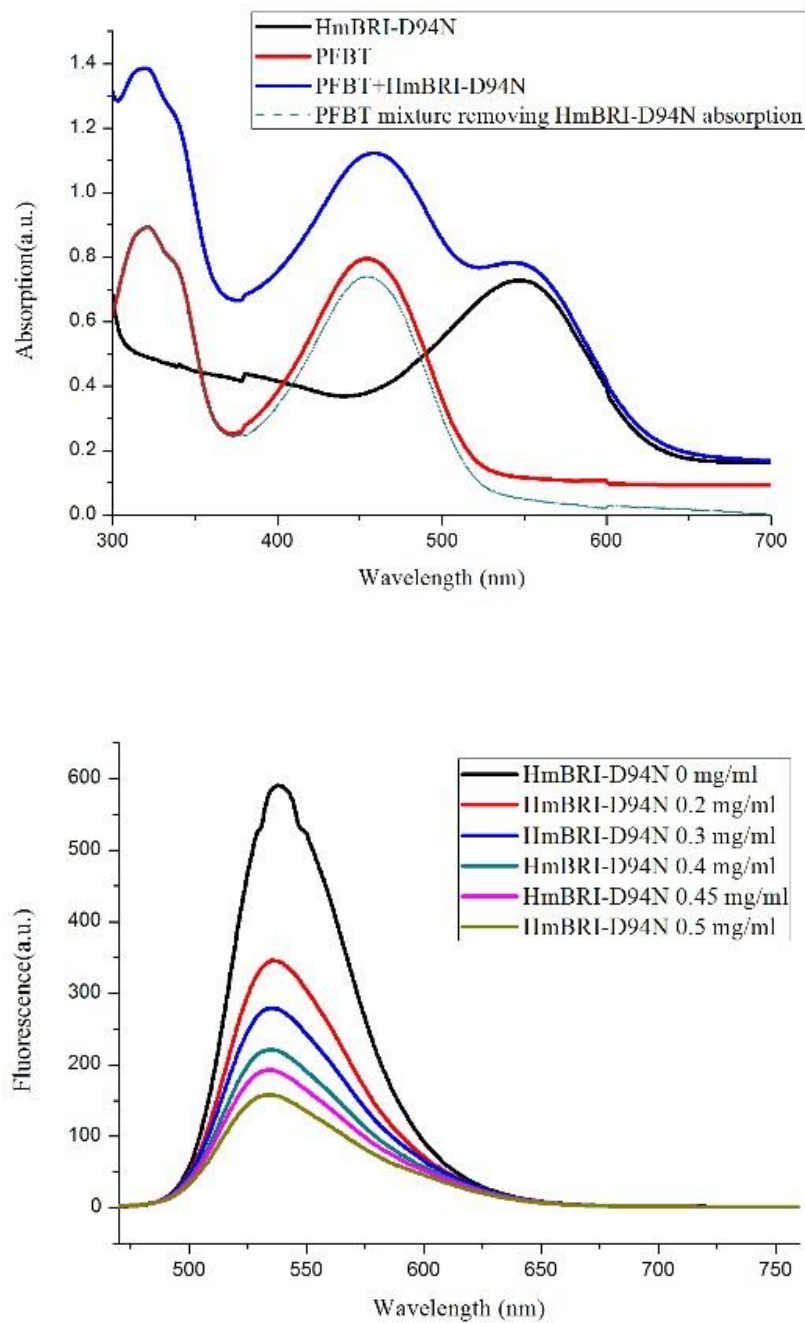


圖 24：PFBT 跟 HmBRI-D94N 的吸收光譜(上)跟螢光光譜(下)。PFBT 的濃度固定為  $10 \mu\text{g/ml}$ ，左圖 HmBRI-D94N 的濃度為  $0.5 \text{ mg/ml}$ 。雙方的吸收峰都沒有受到另一方的影響。而從螢光光譜可以看出隨著 HmBRI-D94N 的濃度增加，PFBT 的螢光強度隨之減弱。

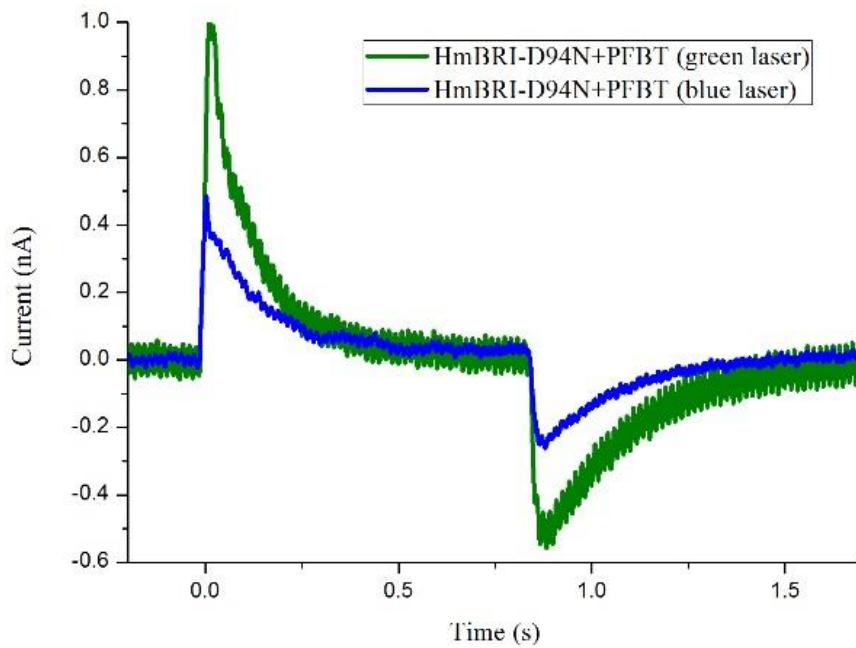
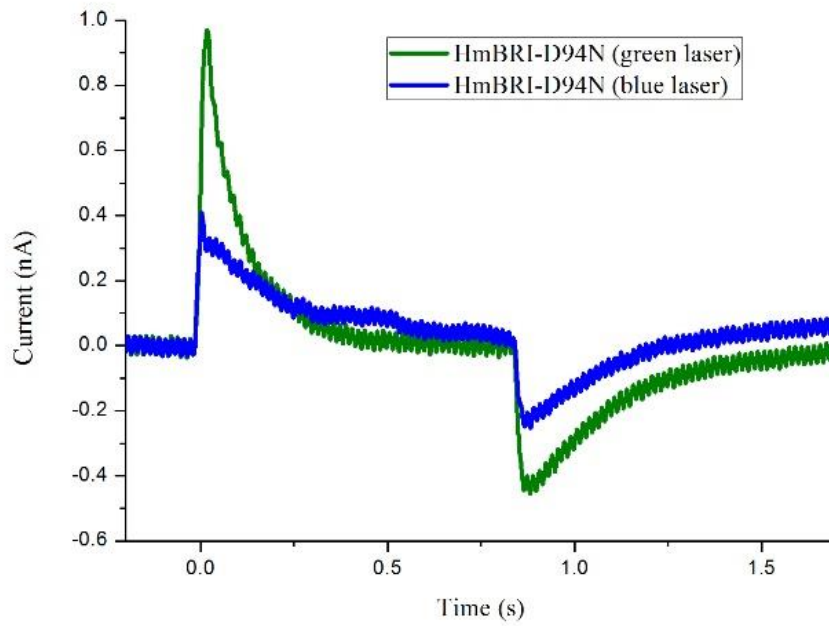


圖 25：單一 HmBRI-D94N(上)跟 HmBRI-D94N 和 PFBT 混合溶液(下)的光電化學實驗結果。綠線為 532 nm 綠光雷射下的光電流訊號，藍線為 473 nm 藍光雷射下的光電流訊號。



圖 25 即為一般 HmBRI-D94N 水溶液以及與 PFBT 的混合溶液所得到的光電化學測試結果，同樣取 81 個週期的移動平均去做數據處理，最大數值紀錄在表 3。在綠光雷射的照射下有著相近的電流訊號，可以看出 PFBT 並沒有影響到 HmBRI-D94N 放出氫離子的能力。但在藍光雷射下，PFBT 與 HmBRI-D94N 的混合溶液有著比單一 HmBRI-D94N 水溶液高 20% 的電流訊號。從實驗結果來看，PFBT 的確能夠在藍光雷射下增幅 HmBRI-D94N 帶來的電流訊號，證明有 FRET 現象的產生。不過電流訊號的增幅不如螢光強度的下降來的明顯，除了有其他因素導致能量以其他路徑散發之外，主要原因可能是本實驗所使用的藍光雷射的頻率並沒有對應到 PFBT 的最大吸收頻率所導致的。

表 3: 經過數據處理後，各個光電化學實驗的平均最大電流。由於實驗參數的變化，HmBRI-D94N 的數據與表 2 不同。

光電流訊號 / nA	532 nm 綠光雷射	473 nm 藍光雷射
HmBRI-D94N 0.5 mg/ml	0.97	0.40
HmBRI-D94N 0.5 mg/ml + PFBT 10 µg/ml	1.00	0.50

由於實驗裝置的限制，並沒有進一步調查紅外光飛秒雷射對於 PFBT 跟 HmBRI-D94N 的影響。理論上若藍光雷射能激發 PFBT 跟 HmBRI-D94N 之間的 FRET 現象，因為單光子吸收與雙光子吸收的螢光光譜相同，紅外光雷射應該也能激發 PFBT 並將能量傳遞到 HmBRI-D94N 上，但還欠缺實驗結果的驗證。



### 第三章：結果與討論—蛋白質的固定修飾

#### 第一節：ITO 表面修飾的實驗概述

如圖 26，我們使用三種 ITO 表面修飾的方式。所有方式都會先用氫水跟雙氧水的混合溶液去清洗 ITO，接著將其浸泡在含有氫氧化鉀的 2-丙醇溶液中，最後浸泡在 piranha 溶液一分鐘，使 ITO 表面上有均勻的氫氧基團。

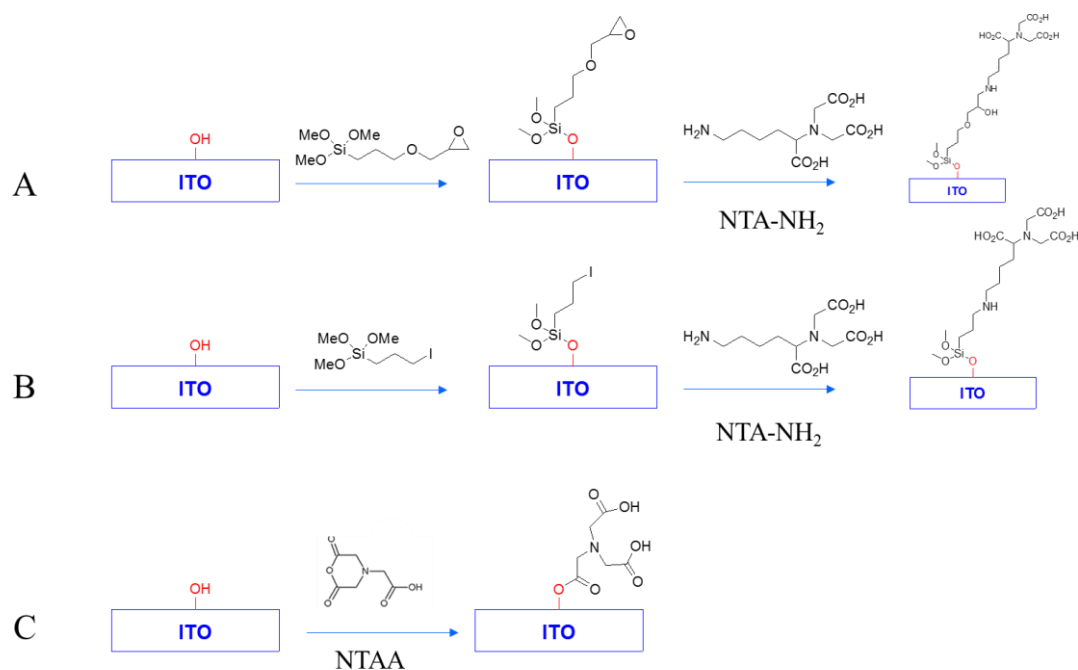


圖 26：本實驗採用的三種 ITO 修飾方式的流程圖。

第一個方式(A)是參考文獻，使用有環氧基團的三甲氧基矽烷作為交聯劑，將 NTA-NH<sub>2</sub> 固定在 ITO 表面上。

第二個方式(B)是改用末端有碘原子的三甲氧基矽烷去取代文獻的交聯劑。

第三個方式(C)是不用 NTA-NH<sub>2</sub> 跟交聯劑，直接使用 NTA 去跟 ITO 表面上的氫氧基團行酯化反應，這個反應是先將 NTA 脫水形成反應性更強的氨基三乙酸酐 (nitrilotriacetic acid anhydride，簡稱 NTAA)，再加入 ITO 玻片(圖 27)。

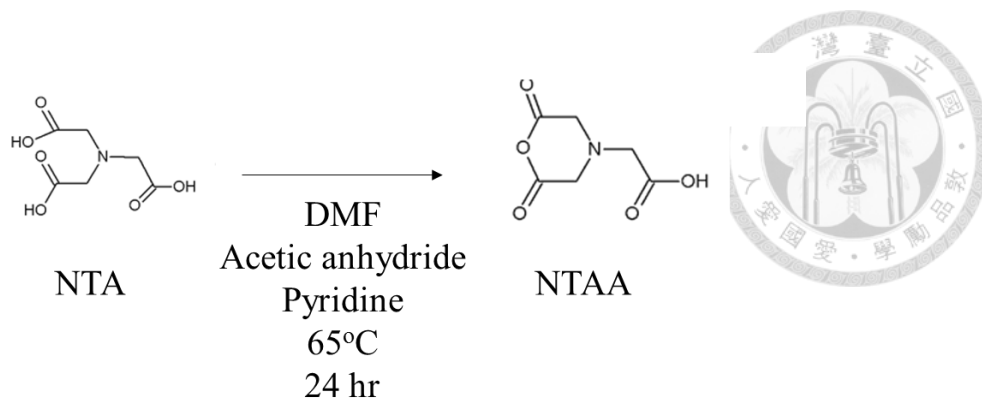


圖 27：NTAA 的合成流程圖。

三種方式得到的 ITO 都經過 X 光電子能譜的分析後，從氮元素的訊號確認到修飾的結果成功。但因為缺乏能夠定量的指標，所以無法確切計算三種方式的反應程度。從氮元素的含量判斷第一種方式會比較適合我們後續的實驗，在之後的光電流實驗結果也證實這個判斷。X 光電子能譜分析圖位於附錄。

表面修飾完成的 ITO 會先浸泡在氯化鎳溶劑中，使鎳離子跟 NTA 形成配位鍵結。浸泡一個小時後取出 ITO 並用去離子水清洗，之後在表面上滴上 HmBRI-D94N 溶液(用矽膠墊片跟玻片覆蓋住，以避免水分蒸發)。在經過 24 小時後，用少量的去離子水清洗即得到表面上吸附 HmBRI-D94N 的 ITO 玻片。

光電化學實驗如上述所提的相近，如圖 28 所示，因為表面上已經有 HmBRI-D94N 附着，所以裝置從用透析膜隔開的雙腔室結構變成單腔室的結構，中間只加入含有氯化鈉跟分散劑的去離子水溶液作為導電的介質。除此之外跟上一章提及的光電化學實驗相同。

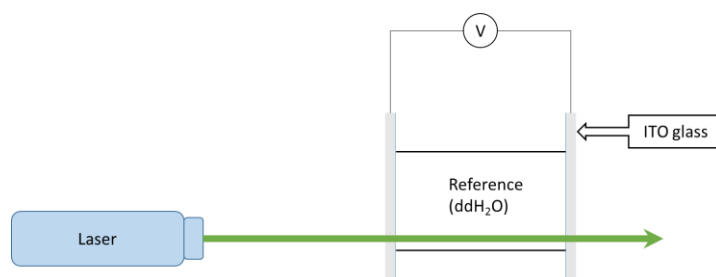


圖 28：光電化學實驗之裝置圖。產生的奈米安培等級的電流會經過增幅器，以電壓的形式放大訊號並反應在示波器上。



## 第二節：Histidine tag 非共價鍵結的光電化學測試

圖 29 為以第一種方式修飾而成的 ITO 所進行的光電化學測試的結果與其對照組。可以看出修飾後的 ITO 跟沒有修飾的一般 ITO 相比能產生更多的電流，代表 HmBRI-D94N 在修飾 ITO 表面上的覆蓋面積較大。如同一般 ITO 表面上的 HmBRI-D94N 一樣，修飾 ITO 上大部分的 HmBRI-D94N 還是依靠物理吸附而存在於表面上的。

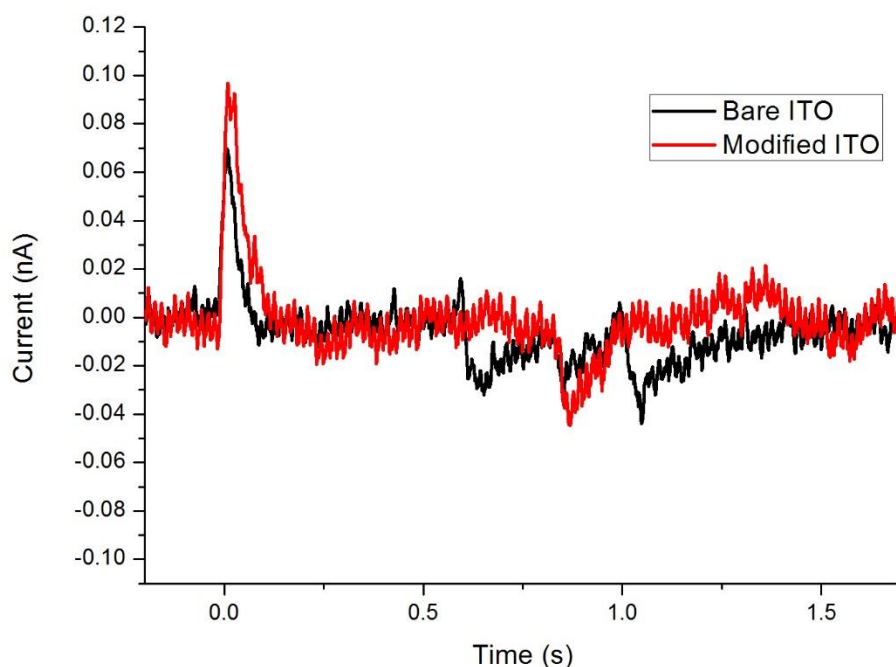


圖 29：修飾 ITO 跟一般 ITO 所做的光電化學實驗結果。修飾 ITO(紅線)有比未修飾的 ITO(黑線)帶來大約 40%的增幅。

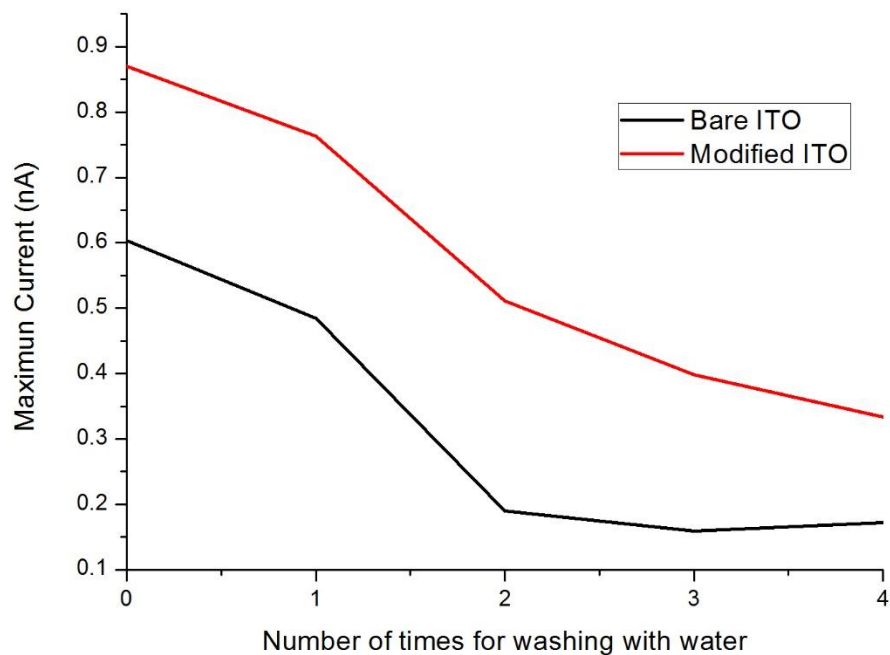


圖 30：ITO 所帶來的光電流訊號隨著用水清洗的次數而降低之線狀圖。每次清洗都以滴管取固定量的去離子水去清洗 ITO 表面。雖然實驗次數只記錄到 4 次，但在使用大量水清洗後，兩者的訊號都會趨近於零。

實驗中，在經過去離子水沖洗後就會使得修飾 ITO 產生的電流訊號減弱，最終會趨近於無訊號，如圖 30 所示。從這項結果來判斷，鎳離子跟組氨酸標籤之間的配位共價鍵也會在清洗過程中被斷開，因此不能用去離子水的清洗去區別物理吸附跟化學吸附的 HmBRI-D94N。另外，將能跟組氨酸標籤產生競爭反應的咪唑水溶液滴在 ITO 表面上十分鐘後，能發現電流訊號大幅降低(圖 31)。這可以做為 HmBRI-D94N 確實有跟 ITO 表面產生配位鍵的證明。

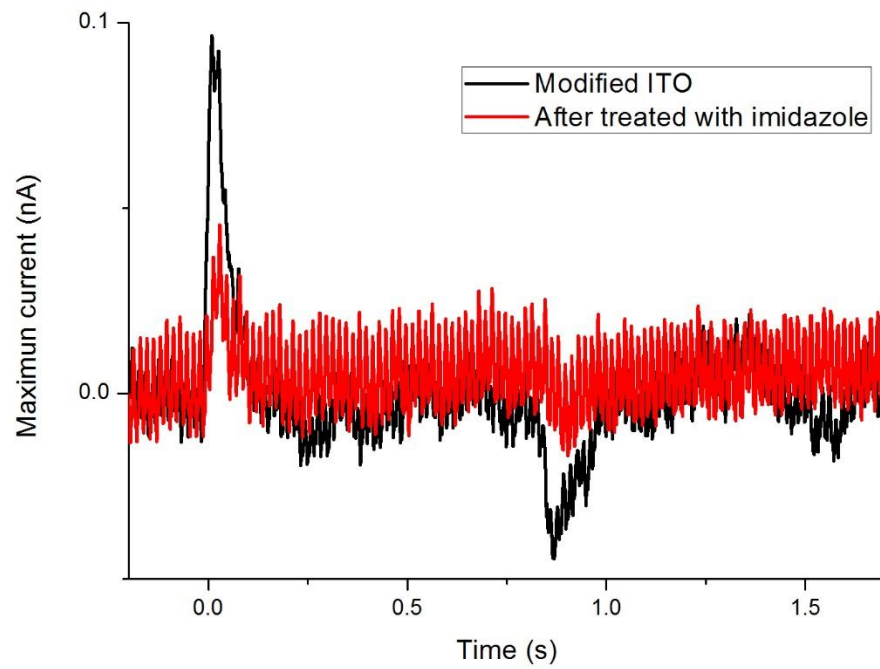
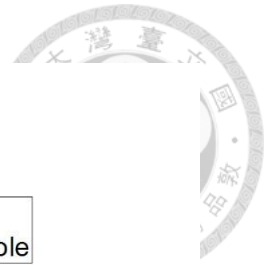


圖 31：修飾 ITO 在用咪唑水溶液處理前後的光電化學實驗結果。可以看到在使用咪唑水溶液處理後的光電流大幅降低。

### 第三節：EDC-NHS 共價鍵結的光電化學測試

因為配位鍵不夠穩定，因此我們在將 HmBRI-D94N 附著在 ITO 表面上後，使用 EDC/NHS 試劑，使組氨酸標籤上的一級胺基團跟 NTA 的羧酸基反應，接合在一起(圖 32)。

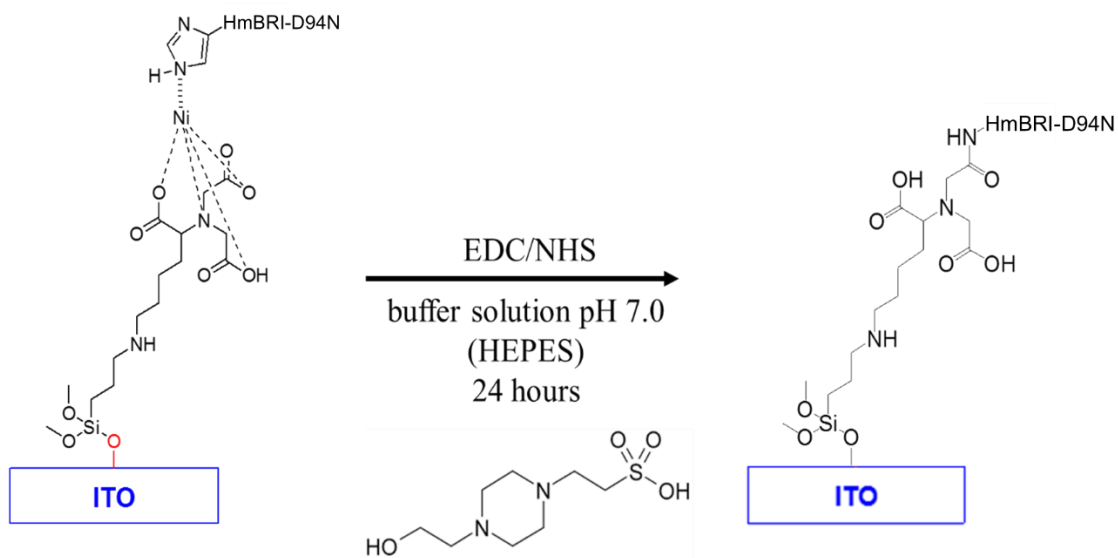


圖 32：使用 EDC/NHS 試劑將 HmBRI-D94N 和修飾 ITO 以化學共價鍵接合之流程圖。

得到的光電化學測試結果如圖 33，在經過去離子水跟咪唑水溶液清洗後，依然有穩定而微弱的電流產生。這個結果證明 EDC/NHS 能有效將 HmBRI-D94N 固定在 ITO 表面上且不影響 HmBRI-D94N 的性質。電流訊號只有平均 0.1 nA，從咪唑水溶液的清洗造成的電流訊號下降程度來判斷，微弱訊號的原因是出於 EDC/NHS 反應度的不足。

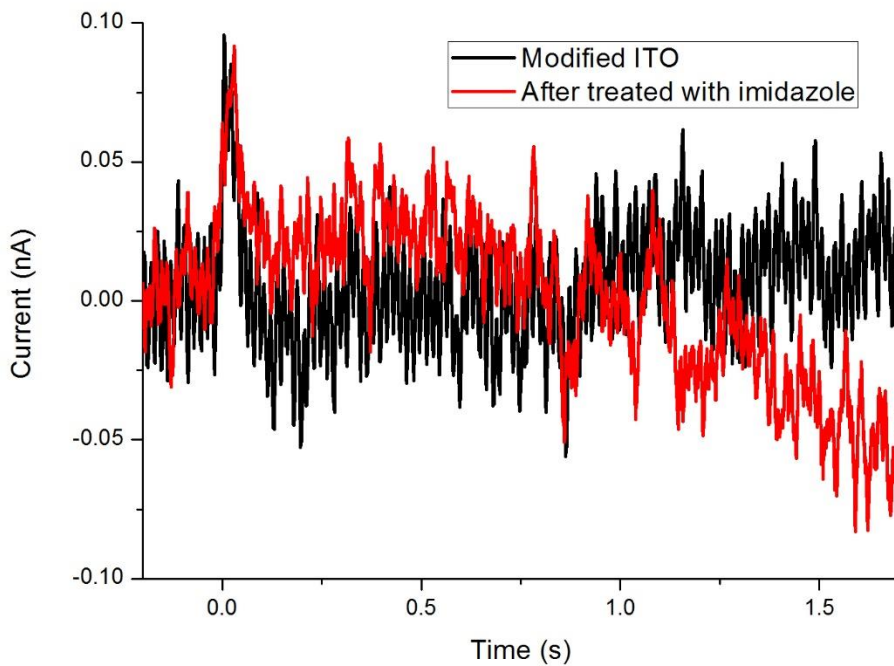


圖 33：經過 EDC/NHS 處理的 ITO 所得到的光電化學實驗結果。紅線為用咪唑水溶液處理後的結果。可以看到處理前後的光電流訊號相近。



此外，使用另外兩種修飾方式的 ITO 也做同樣的 EDC/NHS 反應並進行光電化學測試(圖 34)，並沒有獲得更好的成果。因此就目前所使用過的修飾方法中，以環氧基團的矽氧烷交聯劑是最好的選擇。

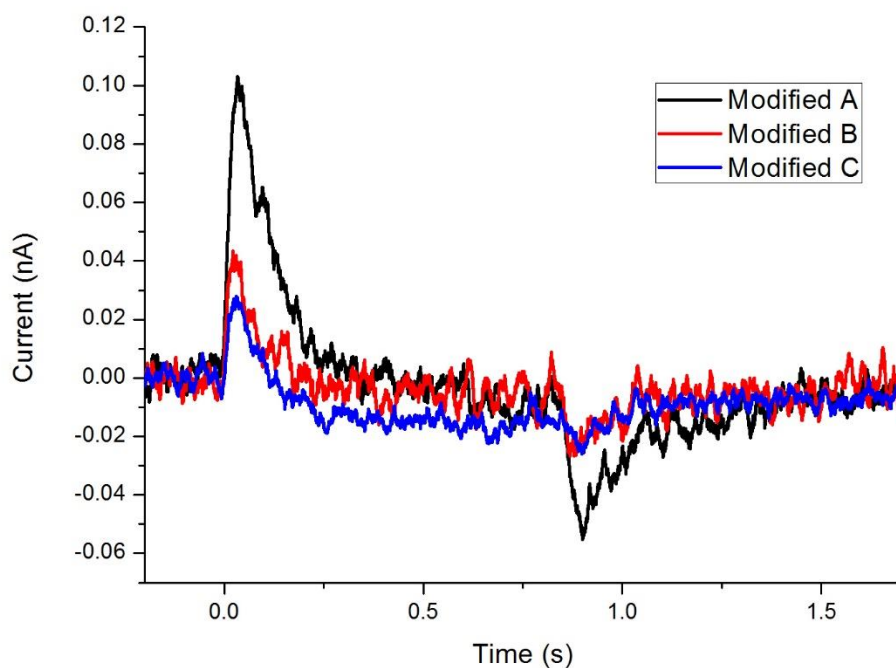


圖 34：三種修飾方式得到的 ITO，分別用 EDC/NHS 接上 HmBRI-D94N 後所做的光電化學實驗結果。可以得知方式 A(黑線)比方式 B(紅線)和方式 C(藍線)相比，得到的光電流訊號更高。



## 第四章：總結

實驗的前半部分，我們依照文獻合成出兩種具有 TPA 性質的高分子：PPESO<sub>3</sub> 跟 PFBT，並測試高分子與視紫質 HmBRI-D94N 之間的交互作用。理論上我們的高分子要能吸收藍光跟紅外光並藉由 FRET 將能量轉到 HmBRI-D94N 上，使這個光驅動氫離子幫浦能在綠光以外的波長下表現其性能。從吸收光譜可以得知 HmBRI-D94N 並不會使兩種高分子之間產生足以改變吸收波長的構型變化，從螢光光譜得知 HmBRI-D94N 會使兩種高分子的螢光強度減弱。

然而經由進一步的光化學實驗，我們推測 PPESO<sub>3</sub> 是因為 HmBRI-D94N 的存在下，導致自我聚集而消光，並非我們期望的 FRET。在藍光雷射下，HmBRI-D94N 跟 PPESO<sub>3</sub> 的混合溶液並沒有產生光電流訊號的增幅，代表沒有能量從 PPESO<sub>3</sub> 傳到 HmBRI-D94N 上。PPESO<sub>3</sub> 的消光可能源於帶有相反電荷的粒子使高分子傾向於互相堆疊聚集，使量子產率降低，造成能量以其他形式散發而沒有傳遞到 HmBRI-D94N 上。

相對於 PPESO<sub>3</sub>，PFBT 奈米粒子跟 HmBRI-D94N 的親和性更高，更不容易受到環境 pH 值的影響。我們觀測到 PFBT 奈米粒子能有助於 HmBRI-D94N 在藍光雷射下的表現，證實 PFBT 奈米粒子跟 HmBRI-D94N 之間有 FRET 的產生。

實驗的後半部分，我們對 ITO 玻片進行表面修飾，使 HmBRI-D94N 能穩定地固定在 ITO 表面上以利更多的應用。首先使用 NTA-Ni 使 HmBRI-D94N 以配位鍵的形式螯合在 ITO 表面上，我們使用三種修飾方案並成功將 NTA 鍍在 ITO 表面上，從加入咪唑前後的變化可以看出 HmBRI-D94N 成功吸附在 ITO 表面，但其附著量會隨著去離子水的清洗次數而快速降低，表示 HmBRI-D94N 的鍵結並不穩定。

因此我們進一步使用 EDC/NHS 交聯反應，使 HmBRI-D94N 以共價鍵形式固定在 ITO 表面。實驗證明無論用去離子水還是咪唑清洗表面，都能使 HmBRI-D94N

表現出定量且穩定的電流訊號。我們認為只要進一步改善 EDC/NHS 交聯反應的反應度就可以再提高電流，拓展 HmBRI-D94N 做為偵測蛋白質交互反應的應用。







## 第五章：實驗細節

### 第一節：試藥

實驗中所使用的藥品均分別採購自 Aldrich, Acros, Merck 公司的試藥級產品，都沒有做進一步的純化處理。無水四氫呋喃(tetrahydrofuran)由和航企業有限公司的溶劑純化系統除水。溶劑用水皆為去離子水，使用 Merck 公司的 DQ30 水純化系統來純化。純化用的透析膜皆使用 Spectrum 公司 Standard RC Trial Kit MWCO 3.5kD 之透析膜，透析過程每 6 小時換水一次。HmBRI-D94N 為楊啟伸教授實驗室所生產提供。

### 第二節：實驗儀器

#### 2.1：核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance，NMR)

$^1\text{H}$  NMR 使用 Bruker AVIII HD 400 NMR 核磁共振儀進行測量，化學位移單位為 ppm，d-chloroform( $\text{CDCl}_3$ )以  $\delta=7.25$  ppm，deuterium oxide( $\text{D}_2\text{O}$ )以  $\delta=4.79$ ，Dimethyl sulfoxide- $d_6$ ( $d_6$ -DMSO)以  $\delta=2.5$  ppm 作為內部標準， $^{13}\text{C}$  NMR 以 BRUKER AVIII-500MHz FT-NMR 核磁共振儀進行測量，光譜數據內：s 代表單峰(singlet)，d 代表二重峰(doublet)，t 代表三重峰(triplet)，m 代表多重峰(multiplet)。

#### 2.2：凝膠滲透層析儀(Gel Permeation Chromatograph，



## GPC)

測量分子量是使用台灣大學凝態中心王立義教授實驗室之 GPC，型號為 JASCO PU-980，JASCO UV-1570，JASCO LC-NETII/ADC，Jordi DVB mixed-bed columns，衝提液為 THF，polystyrene 為標準品，測量樣品濃度為 1 mg/mL of THF，注射前通過 0.45  $\mu\text{m}$  孔徑之針頭過濾器。

## 2.3：紫外線與可見光光譜儀(UV-Vis Spectrophotometer)

測量吸收光譜儀為使用台灣大學生化科技系楊啟伸教授實驗室之 UV-visible 光譜儀，型號為 HITACHI U-1900。

## 2.4：螢光光譜儀(Fluorescence Spectrophotometer)

螢光光譜儀為使用台灣大學生化科技系楊啟伸教授實驗室之螢光光譜儀，型號為 HITACHI f-4500。激發光波長選擇待測高分子有著最大吸收度的波長，PPESO<sub>3</sub> 為 480 nm，PFBT 為 450 nm。

## 2.5：粒徑/介面電位分析儀(Particle Sizing and Zeta Potential)

使用粒徑分析儀為台灣大學高分子所共同儀器是的 90-Plus，分析溫度為 25°C，每次分析為 3RUNS，每 RUNS 時間為一分鐘。



## 2.6：光電化學實驗裝置(Photocurrent Device)

裝置設計為楊啟伸教授實驗室之提案。包含雷射光源，訊號增幅器，示波器及實驗元件。雷射光源的型號為 VD-IIA DPSS Laser Driver 532 nm/473 nm。訊號增幅器的型號為 Stanford research system SR570。示波器的型號為 Tektronix DPO4032。實驗元件為自製，在透析膜兩面放上矽膠墊片後，用兩片鍍 ITO 玻片跟市售燕尾夾將其固定，鍍 ITO 那一面朝內。

## 2.7：X 光電子能譜分析儀(X-ray Photoelectron Spectroscopy)

X 光電子能譜分析儀為台灣大學貴重儀器中心的 Electron Spectroscopy for chemical Analysis System。

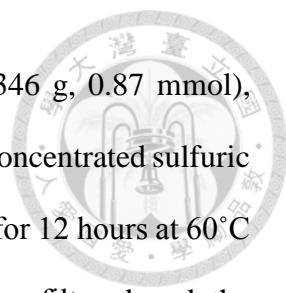
## 第三節：合成

### disodium 1,4-di(propyloxysulfonate)benzene(單體 A)之合成

To a NaOH(aq) solution (10%, 3 mL) of p-hydroquinone (0.264 g, 2.4 mmol) was added a dioxane solution (4.8 mL) of 1,3-propane sultone (0.732 g, 6.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours and cooled to 0°C. The precipitate was collected by vacuum filtration and washed by cold acetone to give a white powder as disodium 1,4-di(propyloxysulfonate)benzene (0.86 g, 90%).

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.01 (s, 4H), 4.15 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 3.10 (t,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 2.21 (m, 4H).

### Disodium 1,4-diiodo-2,5-di(propyloxysulfonate)benzene(單體 B)之合成



A mixture of disodium 1,4-di(propyloxysulfonate)benzene (0.346 g, 0.87 mmol), iodine (0.232 g, 0.91 mmol), potassium iodate (0.093 g, 0.43 mmol), concentrated sulfuric acid (0.18 mL), water (1.8 mL), and acetic acid (2.4 mL) was heated for 12 hours at 60°C under nitrogen atmosphere. After cooling to 0°C, the mixture was filtered and the precipitate was washed with cold ethanol to give disodium 1,4-diiodo-2,5-di(propyloxysulfonate)benzene as a white powder (0.350 g, 62%).

$^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ): 7.30 (s, 2H), 4.04 (t,  $J = 6.0$ , 4H), 2.61 (t,  $J = 6.8$ , 4H),  $\delta$  1.99 (m, 4H).

### PPESO<sub>3</sub> 之合成

A mixture A of dimethylformamide (9 mL), diisopropylamine (3 mL), and water (6 mL) and a mixture B of disodium 1,4-diiodo-2,5-di(propyloxysulfonate)benzene (0.265 g, 0.407 mmol), 1,4-diethynylbenzene (0.049 g, 0.388 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.044 g, 0.038 mmol), and copper(I) iodide (0.003 g, 0.016 mmol) were degassed by nitrogen for 30 minutes, respectively. The mixture A was slowly added into the mixture B. The resulting mixture was stirred and heated at 55°C for 20 hours in the dark. After being cooled to room temperature, it was slowly added to a blend of methanol (50 ml), acetone (200 ml), and ether (250 ml). The precipitate was collected and dissolved in a solution of methanol (15 ml), water (35 ml), and sodium sulphide (0.05 g). After being filtered with 0.2  $\mu\text{m}$  nylon filter, the filtrate was slowly added to a mixture of methanol (50 ml), acetone (200 ml), and ether (250 ml). The precipitate was collected and dialyzed in large amount of water with 3.5kD dialysis membrane (0.126 g, 62.4%) to furnish PPE-SO<sub>3</sub>.

$^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.61 (m, 4H), 7.21 (s, 2H), 4.17 (m, 4H), 2.72 (m, 4H), 2.09 (m, 4H).



### 9,9-dihexyl-2,7-dibromofluorene(單體 C)之合成

A mixture of dibromofluorene (1.25 g, 3.9 mmol), 1-bromohexane (3.30 mL, 24 mmol), tetrabutylammonium bromide (0.026 g, 0.08 mmol), DMSO (27.5 mL), and 50% NaOH (1 mL) was stirred and heated at 90°C overnight. After being cooled to room temperature, HCl was added to the mixture until it became clear solution. The solution was extracted by CHCl<sub>3</sub>. The collected organic layer was washed by NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated under vacuum. The crude product was further purified by column chromatography (hexane/DCM = 9:1) to afford 9,9-dihexyl-2,7-dibromofluorene as a white powder (1.39 g, 73%).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.53-7.44 (m, 6H), 1.91 (m, 4H), 1.11 (m, 4H), 1.05 (m, 8H), 0.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.58 (m, 4H)

### bis[9,9'-bishexylfluorenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1.3.2]dioxaborolane (單體 D)之合成

A mixture of 9,9-dihexyl-2,7-dibromofluorene (0.49 g, 1.00 mmol), bis(pinacolato)diboron (0.61 g, 2.40 mmol), [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) (0.05 g, 0.06 mmol), CH<sub>3</sub>COOK (0.70 g, 7.13 mmol), and dioxane (10 mL) was degassed by applying two freeze-pump-thaw cycles. The mixture was stirred and heated at 85°C for 12 hours. After evaporating dioxane under vacuum, the product was extracted with DCM/water. The collected organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The crude product was further purified by column chromatography (hexane/DCM = 2:1) to afford bis[9,9'-dihexylfluorenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1.3.2]dioxaborolane as a white powder (0.41 g, 70%).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.81-7.71 (m, 6H), 1.99 (m, 4H), 1.39 (s, 24H), 1.10-1.00



(m, 12H), 0.74 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H), 0.54 (m, 4H).

### PFBT 之合成

A mixture of bis[9,9'-dihexylfluorenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1.3.2]dioxaborolane (0.147 g, 0.25 mmol), 4,7-dibromo-2,1,3-benzothiadiazole (0.074 g, 0.25 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.005 g, 0.004 mmol),  $K_2CO_3$  (0.83 g, 6 mmol), toluene (5 mL), water (3 mL), and aliquat 336 (1 mL) was degassed by applying two freeze-pump-thaw cycles. The mixture was stirred and heated at  $85^\circ C$  for 24 hours. After being cooled to room temperature, it was poured into methanol and filtered. The precipitate was washed by hot acetone to give PFBT as a yellow solid (0.10 g, 85%).

$^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.12-7.70 (m, 6H), 2.15 (m, 4H), 1.17 (m, 12H), 0.96 (m, 4H), 0.81 (m, 6H). Mn = 14487 g/mol, PDI = 3.36.

### PFBT 奈米粒子之合成

以 THF 為溶劑，配置  $50 \mu g/mL$  的 PFBT 跟  $10 \mu g/mL$  的 polymer styrene maleic anhydride (PSMA，平均分子量為 2000，styrene 與 maleic anhydride 的比例為 2:1) 的混合溶液。將 5 mL 的混合溶液迅速倒入正處置於超音波震盪器運作下的 10 mL 去離子水中。最後將溶液置於加熱板上加熱，使溶液體積減少至 5 mL。得到的 PFBT 奈米粒子經粒徑分析儀的測量後得知其平均粒徑為 131 nm。

## 第四節：ITO 表面修飾

### 共同前置作業

所有 ITO 玻片先在氨水/30% 雙氧水/去離子水體積比為 1:4:20 的混合溶液中加熱至  $60^\circ C$ ，浸泡 30 分鐘。在使用去離子水跟丙酮清洗後，在 KOH 的飽和 2-丙醇

溶液中浸泡 24 小時。同樣用去離子水跟丙酮清洗後，在雙氧水/硫酸體積比為 1:4 的 piranha 溶液中浸泡一分鐘，然後徹底用去離子水洗去殘液。



#### 修飾方案 A

將(3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (0.72 g, 3 mmol) 溶於甲苯 (40 mL)後然後倒入反應槽中。將 ITO 玻片浸泡在上述溶液中並加熱至 60 °C，靜置 24 小時。取出後用甲苯清洗後，浸泡在 100 °C 甲苯中 10 分鐘。將 *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (0.26 g, 10 mmol)溶於 pH 10.8 的碳酸氫鈉緩衝溶液 (40 mL)中，然後將 ITO 浸泡在上述溶液中 24 小時。最後用緩衝溶液跟去離子水先後清洗。

#### 修飾方案 B

將(3-iodopropyl)trimethoxysilane (0.44 g, 3 mmol) 溶於甲苯 (20 mL)後然後倒入反應槽中。將 ITO 玻片浸泡在上述溶液中並加熱至 60 °C，靜置 24 小時。取出後用甲苯清洗後，浸泡在 100 °C 甲苯中 10 分鐘。將 *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (0.26 g, 10 mmol)溶於 pH 10.8 的碳酸氫鈉緩衝溶液 (40 mL)中，然後將 ITO 浸泡在上述溶液中 24 小時。最後用緩衝溶液跟去離子水依序清洗。

#### 修飾方案 C

在反應槽中加入 nitrilotriacetic acid (3 g, 15 mmol)，dimethylformamide (18 mL)和 pyridine (9 mL)並攪拌混合。緩慢加入醋酸酐 (9 mL)並加熱至 60 °C，靜置 24 小時。將 ITO 玻片放入上述溶液，加熱至 75 °C，靜置 10 小時。最後用醋酸酐，dimethylformamide 跟去離子水依序清洗 ITO 玻片。

#### Ni<sup>2+</sup>離子跟 HmBRI-D94N 的結合

配置 0.1 M 的氯化鎳水溶液並將 ITO 浸泡在裡面 30 分鐘。用一般玻片，矽膠

墊片跟燕尾夾，與 ITO 玻片組成有一空腔的元件。在元件中用注射器打入 0.77 mg/mL 的 HmBRI-D94N 水溶液(內含有 5 mM 的氯化鈉跟 0.02% 的 n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside)並靜置 48 小時。用注射器將 HmBRI-D94N 水溶液取出後拆解元件，用最低限量的去離子水清洗 ITO 玻片表面。

### EDC/NHS 交聯反應

配置 150 mM 氯化鈉 / 20 mM HEPES 緩衝溶液 20 mL 並將 *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.19 g, 1 mmol) 和 *N*-hydroxysuccinimide (0.17 g, 1.5 mmol) 溶在緩衝溶液中。將 ITO 玻片浸泡在上述溶液中 1 小時，最後用大量去離子水清洗。



## 參考資料

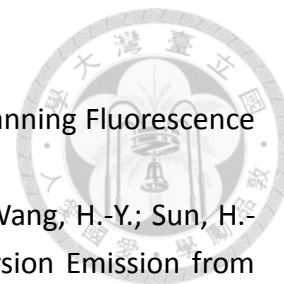


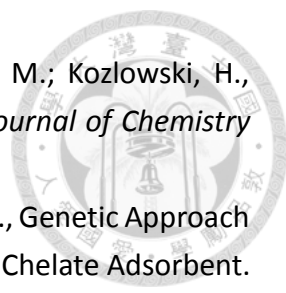
1. Lanyi, J. K., Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Physiology* **2004**, *66*, 665-688.
2. 傅熙媛 in 國立臺灣大學 微生物與生化學研究所. **2008**.
3. Spudich, J. L., The Multitalented Microbial Sensory Rhodopsins. *Trends In Microbiology* **2006**, *14* (11), 480-487.
4. Baliga, N. S.; Bonneau, R.; Facciotti, M. T.; Pan, M.; Glusman, G.; Deutsch, E. W.; Shannon, P.; Chiu, Y. L.; Gan, R. R.; Hung, P. L.; Date, S. V.; Marcotte, E.; Hood, L.; Ng, W. V., Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: A halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research* **2004**, *14* (11), 2221-2234.
5. Sharma, A. K.; Spudich, J. L.; Doolittle, W. F., Microbial Rhodopsins: Functional Versatility and Genetic Mobility. *Trends in Microbiology* **2006**, *14* (11), 463-469.
6. 黃敬啟 in 國立臺灣大學 微生物與生化學研究所. **2009**.
7. Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W., Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, *70* (10), 2853-2857.
8. Sudo, Y.; Spudich, J. L., Three Strategically Placed Hydrogen-Bonding Residues Convert a Proton Pump into a Sensory Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (44), 16129-16134.
9. Sasaki, J.; Brown, L. S.; Chon, Y. S.; Kandori, H.; Maeda, A.; Needleman, R.; Lanyi, J. K., Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride-Ion Pump. *Science* **1995**, *269* (5220), 73-75.
10. Nango, E.; Royant, A.; Kubo, M.; Nakane, T.; Wickstrand, C.; Kimura, T.; Tanaka, T.; Tono, K.; Song, C.; Tanaka, R.; Arima, T.; Yamashita, A.; Kobayashi, J.; Hosaka, T.; Mizohata, E.; Nogly, P.; Sugahara, M.; Nam, D.; Nomura, T.; Shimamura, T.; Im, D.; Fujiwara, T.; Yamanaka, Y.; Jeon, B.; Nishizawa, T.; Oda, K.; Fukuda, M.; Andersson, R.; Båth, P.; Dods, R.; Davidsson, J.; Matsuoka, S.; Kawatake, S.; Murata, M.; Nureki, O.; Owada, S.; Kameshima, T.; Hatsui, T.; Joti, Y.; Schertler, G.; Yabashi, M.; Bondar, A.-N.; Standfuss, J.; Neutze, R.; Iwata, S., A Three-Dimensional Movie of Structural Changes in Bacteriorhodopsin. *Science* **2016**, *354* (6319), 1552-1557.
11. Mathies, R. A.; Lin, S. W.; Ames, J. B.; Pollard, W. T., From Femtoseconds to Biology - Mechanism of Bacteriorhodopsins Light-Driven Proton Pump. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1991**, *20*, 491-518.
12. Jackson, M. B., *Thermodynamics of Membrane Receptors and Channels*. Taylor & Francis: **1992**.

- 
13. Lanyi, J. K.; Schobert, B., Mechanism of Proton Transport in Bacteriorhodopsin from Crystallographic Structures of the K, L, M1, M2, and M2' Intermediates of the Photocycle. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328* (2), 439-450.
14. Rammelsberg, R.; Huhn, G.; Lubben, M.; Gerwert, K., Bacteriorhodopsin's Intramolecular Proton-Release Pathway Consists of a Hydrogen-Bonded Network. *Biochemistry* **1998**, *37* (14), 5001-5009.
15. Spassov, V. Z.; Luecke, H.; Gerwert, K.; Bashford, D., pKa Calculations Suggest Storage of an Excess Proton in a Hydrogen-Bonded Water Network in Bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *312* (1), 203-219.
16. Varo, G.; Lanyi, J. K., Kinetic and Spectroscopic Evidence for an Irreversible Step Between Deprotonation And Reprotonation of the Schiff-Base in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *Biochemistry* **1991**, *30* (20), 5008-5015.
17. Zimányi, L.; Chang, M.; Ni, B.; Needleman, R.; Lanyi, J. K., The Two Consecutive M Substates in the Photocycle of Bacteriorhodopsin are Affected Specifically by the D85n And D96n Residue Replacements. *Photochem Photobiol* **1992**, *56* (6), 1049-1055.
18. Cheng, P.-C., The Contrast Formation in Optical Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Pawley, J. B., Ed. Springer US: Boston, 2006; pp 162-206.
19. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd edition.; New York, 1999.
20. Förster, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **1948**, *437* (1-2), 55-75.
21. Ruedas-Rama, M.; Alvarez-Pez, J.; Orte, A., Solving Single Biomolecules by Advanced FRET-Based Single-Molecule Fluorescence Techniques. *Biophysical Reviews and Letters* **2014**, *08*, 161-190.
22. Stryer, L., Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47* (1), 819-846.
23. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L., Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (28), 4562-4589.
24. Li, S.; Jiang, X.-F.; Xu, Q.-H. J. S. C. C., Polyfluorene Based Conjugated Polymer Nanoparticles for Two-Photon Live Cell Imaging. *Science China Chemistry* **2018**, *61* (1), 88-96.
25. Aparicio-Ixta, L.; Rodriguez, M.; Ramos-Ortiz, G., Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications. In *Contemporary Optoelectronics: Materials, Metamaterials and Device Applications*, Shulika, O.; Sukhoivanov, I., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, **2016**; pp 25-50.
26. He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N., Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (4),

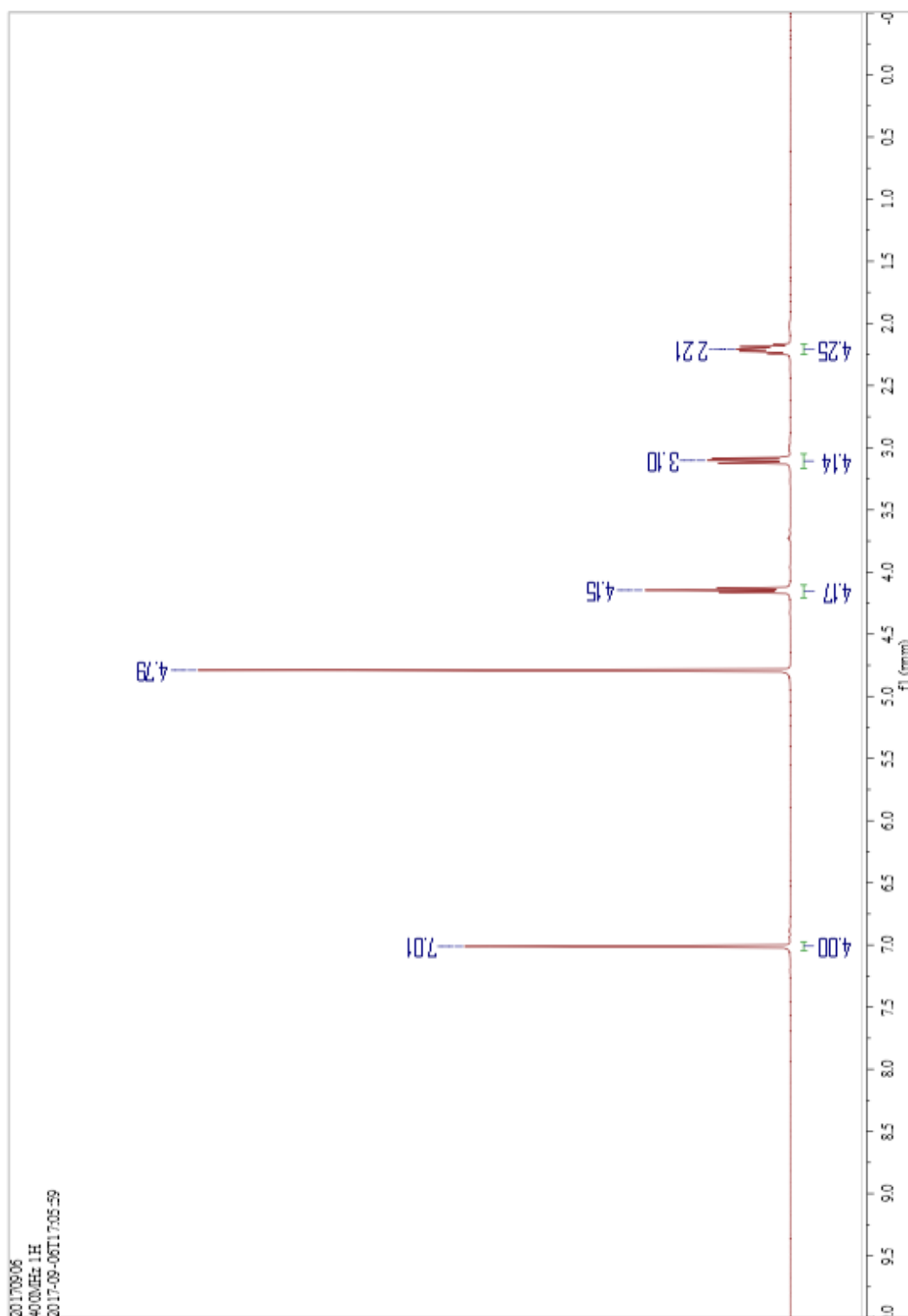
1245-1330.

27. Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W., Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73-76.
28. Fang, H.-H.; Chen, Q.-D.; Yang, J.; Xia, H.; Ma, Y.-G.; Wang, H.-Y.; Sun, H.-B., Two-Photon Excited Highly Polarized and Directional Upconversion Emission from Slab Organic Crystals. *Optics Letters* **2010**, *35* (3), 441-443.
29. Wei, P.; Tan, O. F.; Zhu, Y.; Duan, G. H., Axial Superresolution of Two-Photon Microfabrication. *Applied Optics* **2007**, *46* (18), 3694-3699.
30. Kim, S.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Pandey, R. K.; Prasad, P. N., Organically Modified Silica Nanoparticles Co-encapsulating Photosensitizing Drug and Aggregation-Enhanced Two-Photon Absorbing Fluorescent Dye Aggregates for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (9), 2669-2675.
31. Chu, L.-K.; Yen, C.-W.; El-Sayed, M. A., Bacteriorhodopsin-Based Photo-Electrochemical cell. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26* (2), 620-626.
32. Tamogami, J.; Kikukawa, T.; Miyauchi, S.; Muneyuki, E.; Kamo, N., A Tin Oxide Transparent Electrode Provides the Means for Rapid Time-resolved pH Measurements: Application to Photoinduced Proton Transfer of Bacteriorhodopsin and Proteorhodopsin. *Photochemistry and Photobiology* **2009**, *85* (2), 578-589.
33. 黃元祈 in 國立臺灣大學 微生物與生化學研究所. **2016**.
34. Armstrong, N. R.; Veneman, P. A.; Ratcliff, E.; Placencia, D.; Brumbach, M., Oxide Contacts in Organic Photovoltaics: Characterization and Control of Near-Surface Composition in Indium-Tin Oxide (ITO) Electrodes. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (11), 1748-1757.
35. Serman, S.; Marsden, J. G., Silane Coupling Agents. *Industrial & Engineering Chemistry* **1966**, *58* (3), 33-37.
36. Veinot, J. G. C.; Marks, T. J., Toward the Ideal Organic Light-Emitting Diode. The Versatility and Utility of Interfacial Tailoring by Cross-Linked Siloxane Interlayers. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38* (8), 632-643.
37. Carter, C.; Brumbach, M.; Donley, C.; Hreha, R. D.; Marder, S. R.; Domercq, B.; Yoo, S.; Kippelen, B.; Armstrong, N. R., Small Molecule Chemisorption on Indium-Tin Oxide Surfaces: Enhancing Probe Molecule Electron-Transfer Rates and the Performance of Organic Light-Emitting Diodes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (50), 25191-25202.
38. Paramonov, P. B.; Paniagua, S. A.; Hotchkiss, P. J.; Jones, S. C.; Armstrong, N. R.; Marder, S. R.; Brédas, J.-L., Theoretical Characterization of the Indium Tin Oxide Surface and of Its Binding Sites for Adsorption of Phosphonic Acid Monolayers. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (16), 5131-5133.

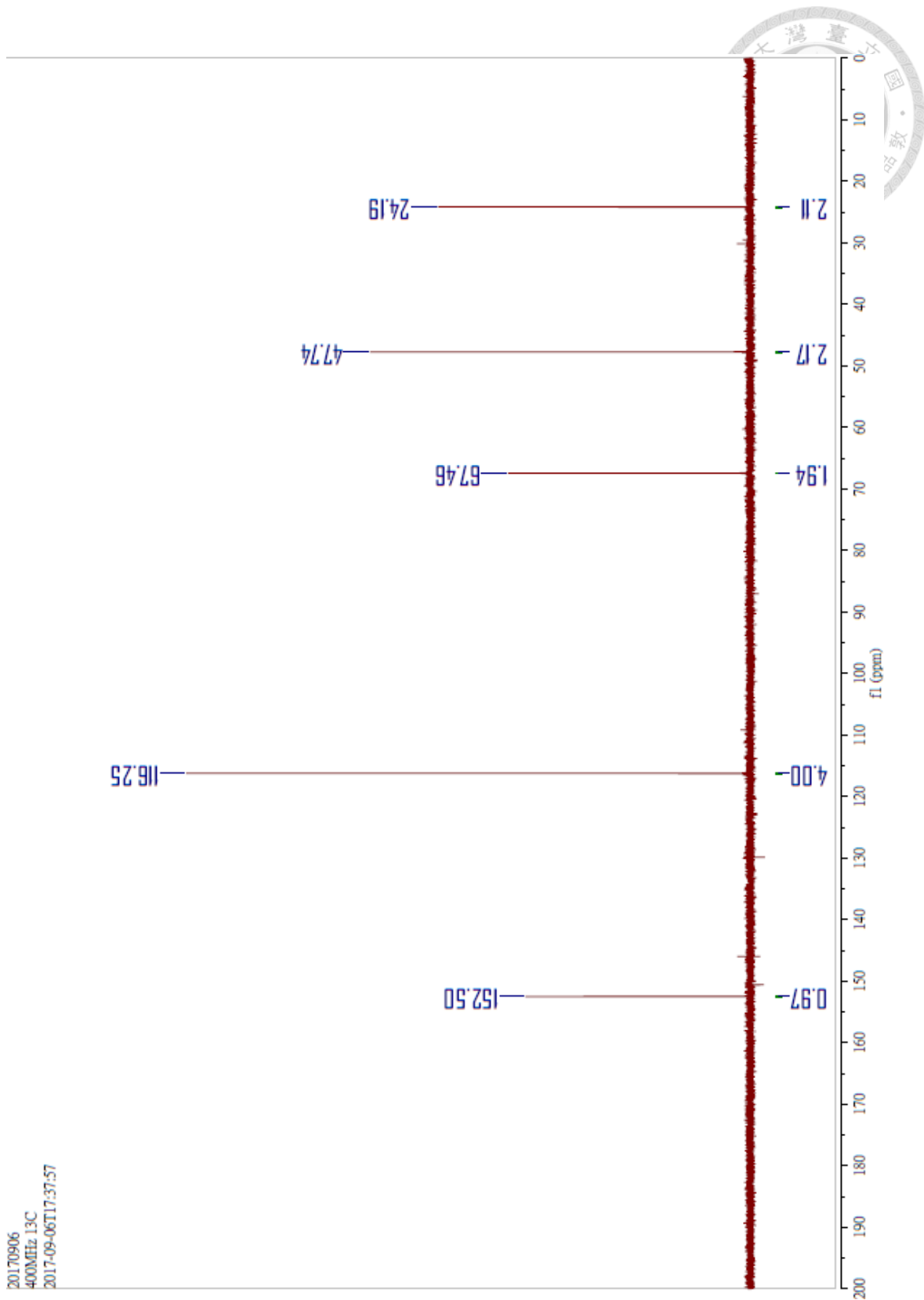


- 
39. Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Potocki, S.; Remelli, M.; Kozłowski, H., His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea? *New Journal of Chemistry* **2013**, *37* (1), 58-70.
40. Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Stüber, D., Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1321.
41. Hengen, P. N., Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20* (7), 285-286.
42. C Liu, Y.-C.; Rieben, N.; Iversen, L.; S Sørensen, B.; Park, J.; Nygård, J.; Martinez, K., Specific and Reversible Immobilization of Histidine-Tagged Proteins on Functionalized Silicon Nanowires. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 245105-245111.
43. Grabarek, Z.; Gergely, J., Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry* **1990**, *185* (1), 131-135.
44. Bart, J.; Tiggelaar, R.; Yang, M.; Schlautmann, S.; Zuilhof, H.; Gardeniers, H., Room-Temperature Intermediate Layer Bonding for Microfluidic Devices. *Lab on a Chip* **2009**, *9* (24), 3481-3488.
45. Parthasarathy, A.; Ahn, H.-Y.; Belfield, K. D.; Schanze, K. S., Two-Photon Excited Fluorescence of a Conjugated Polyelectrolyte and Its Application in Cell Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2* (10), 2744-2748.
46. Geng, J.; Goh, C. C.; Tomczak, N.; Liu, J.; Liu, R.; Ma, L.; Ng, L. G.; Gurzadyan, G. G.; Liu, B., Micelle/Silica Co-protected Conjugated Polymer Nanoparticles for Two-Photon Excited Brain Vascular Imaging. *Chemistry of Materials* **2014**, *26* (5), 1874-1880.

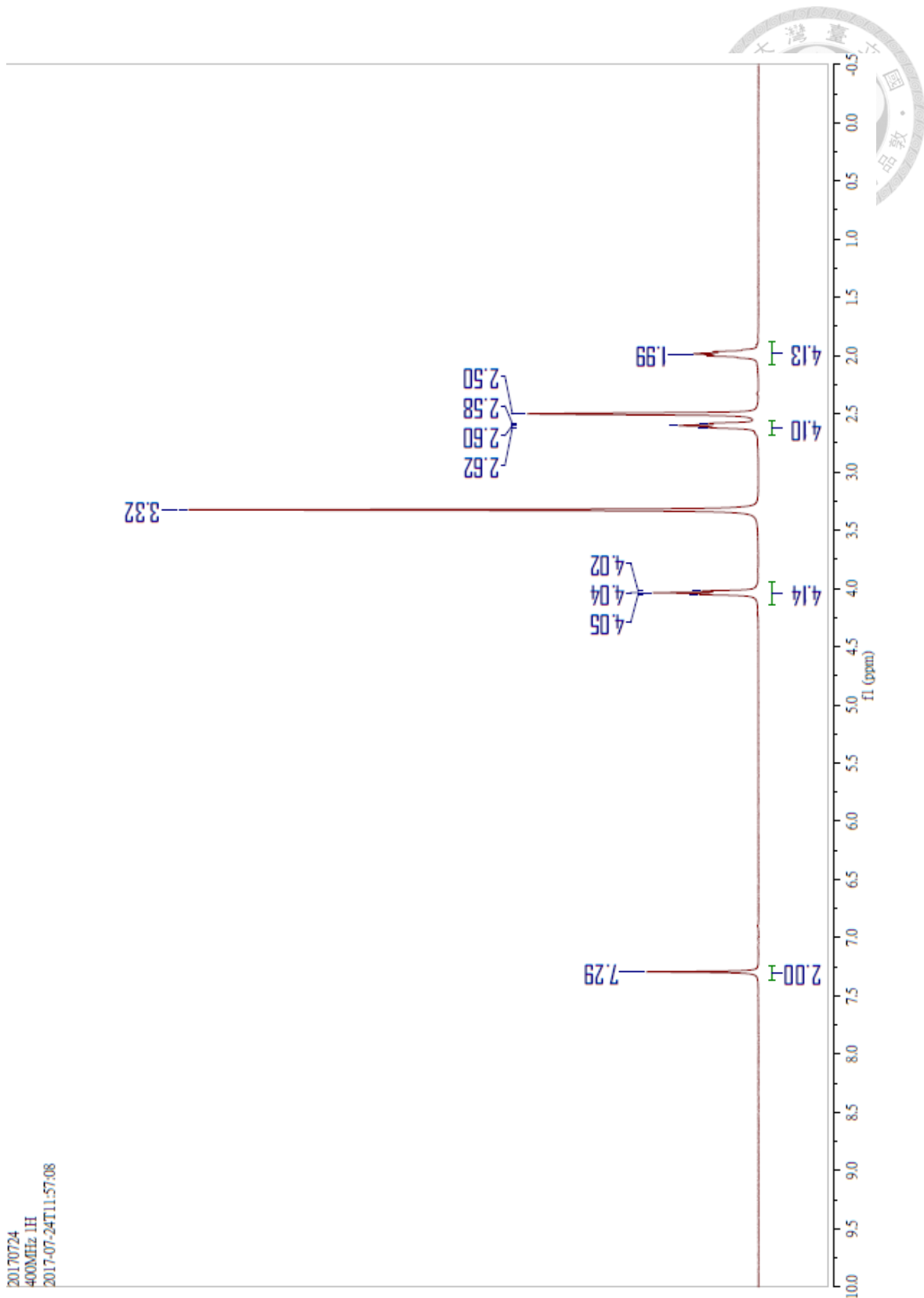
# 附錄：NMR 光譜



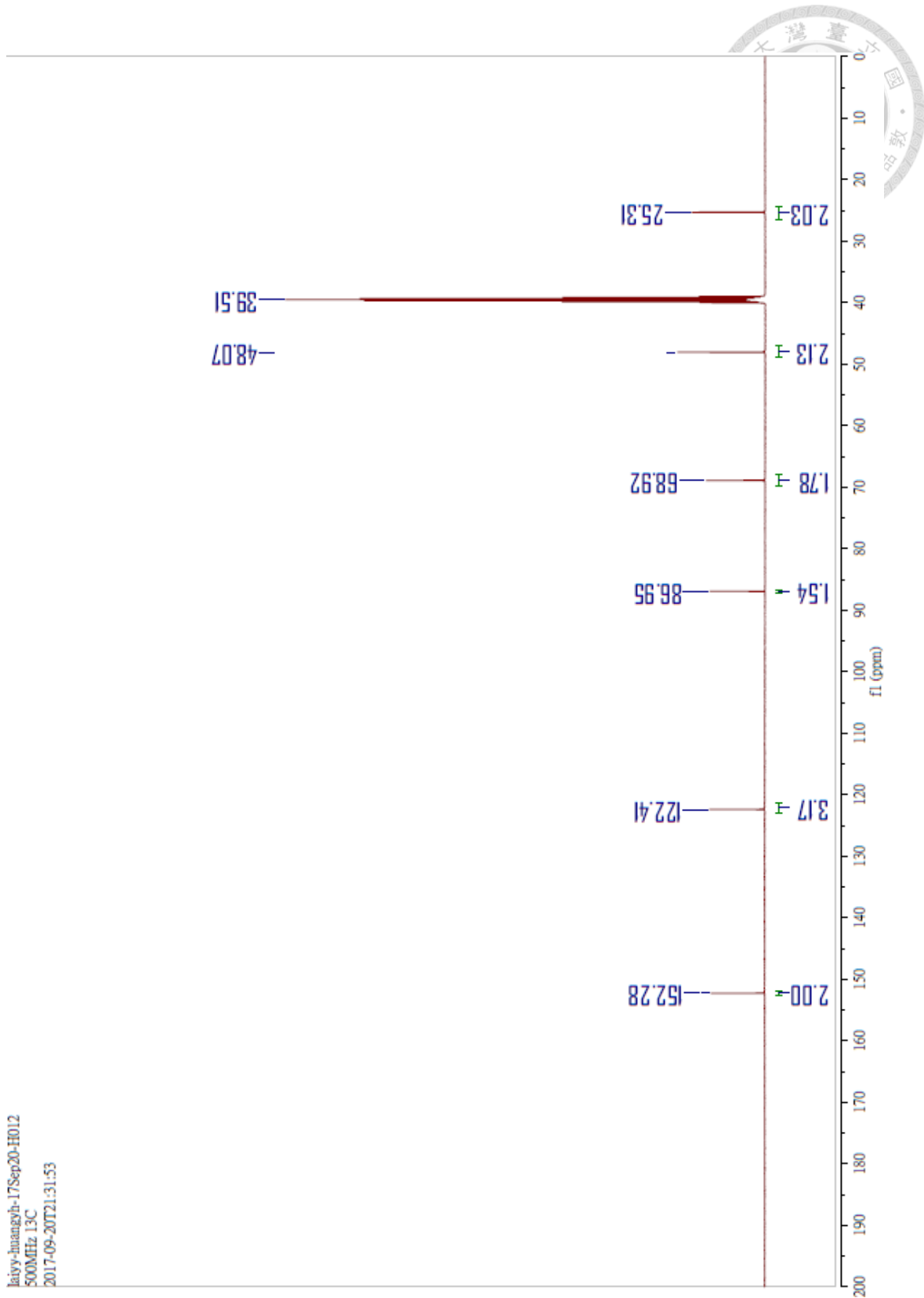
光譜 1：disodium 1,4-di(propoxysulfonate)benzene(單體 A)之  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )



光譜 2 : disodium 1,4-di(propyloxysulfonate)benzene(單體 A)之  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

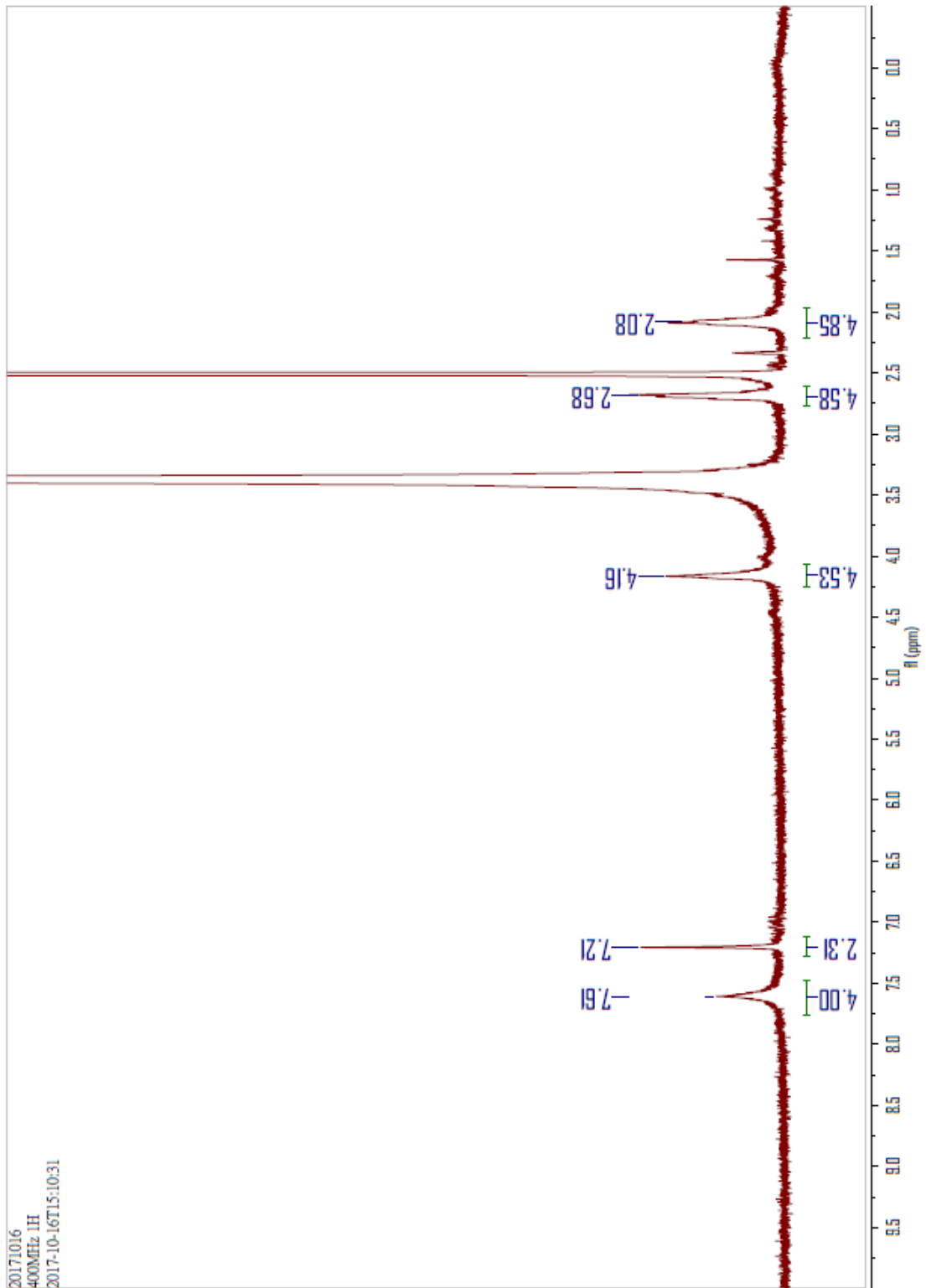
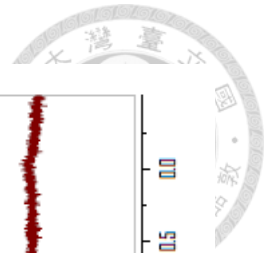


光譜 3 : Disodium 1,4-diiodo-2,5-di(propyloxysulfonate)benzene(單體 B)之  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )

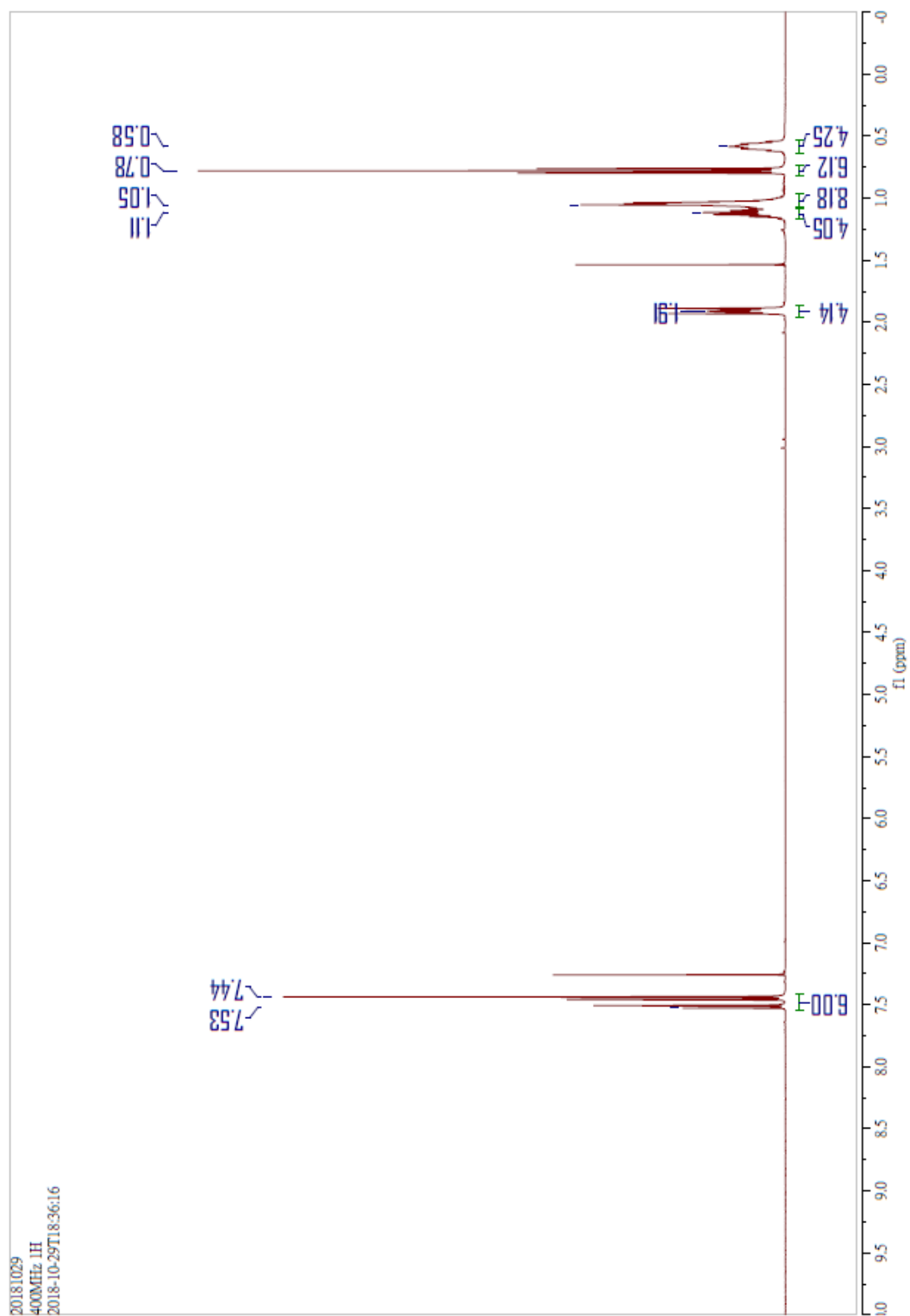


光譜 4 : Disodium 1,4-diiodo-2,5-di(propyloxysulfonate)benzene(單體 B)之 <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

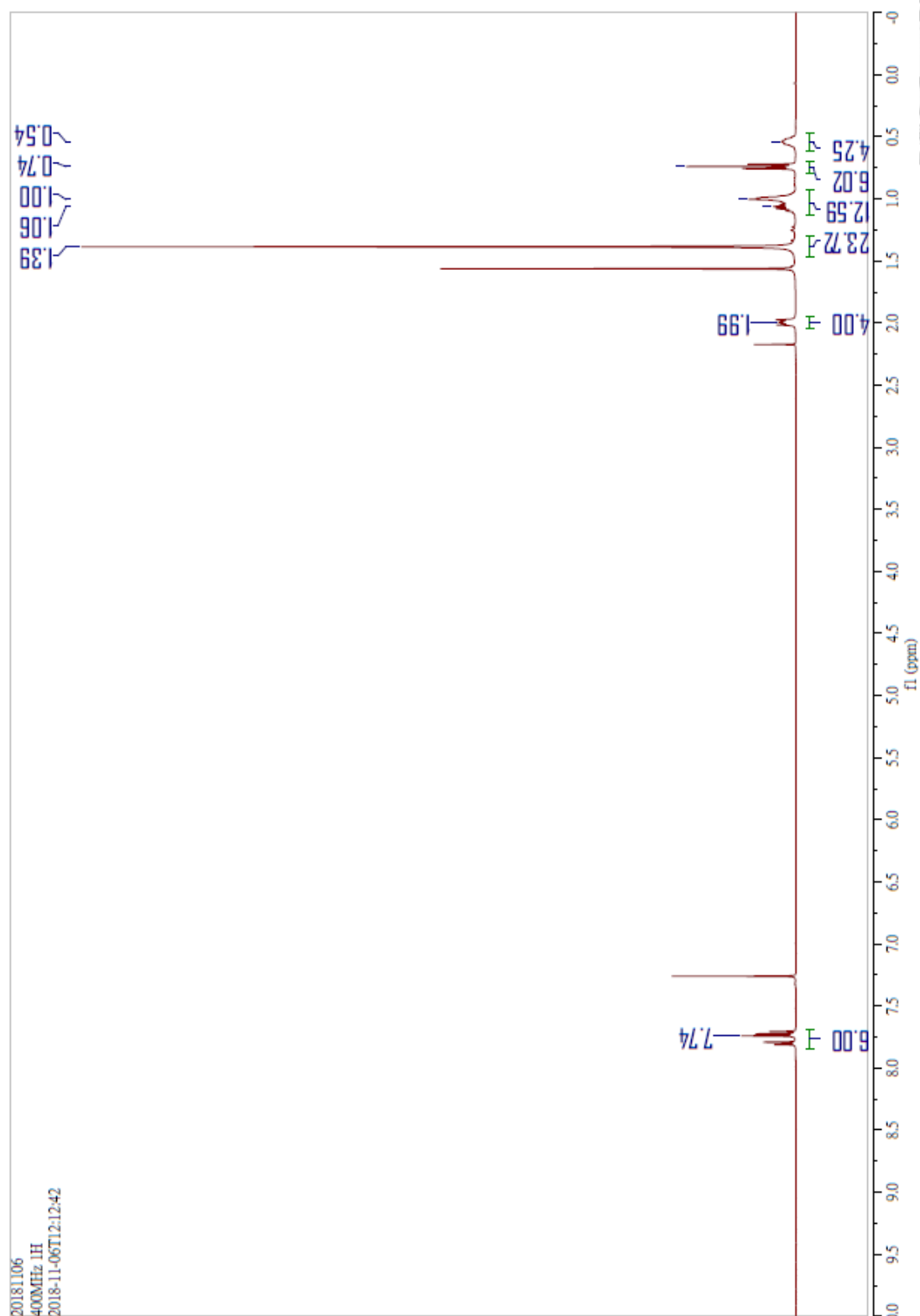




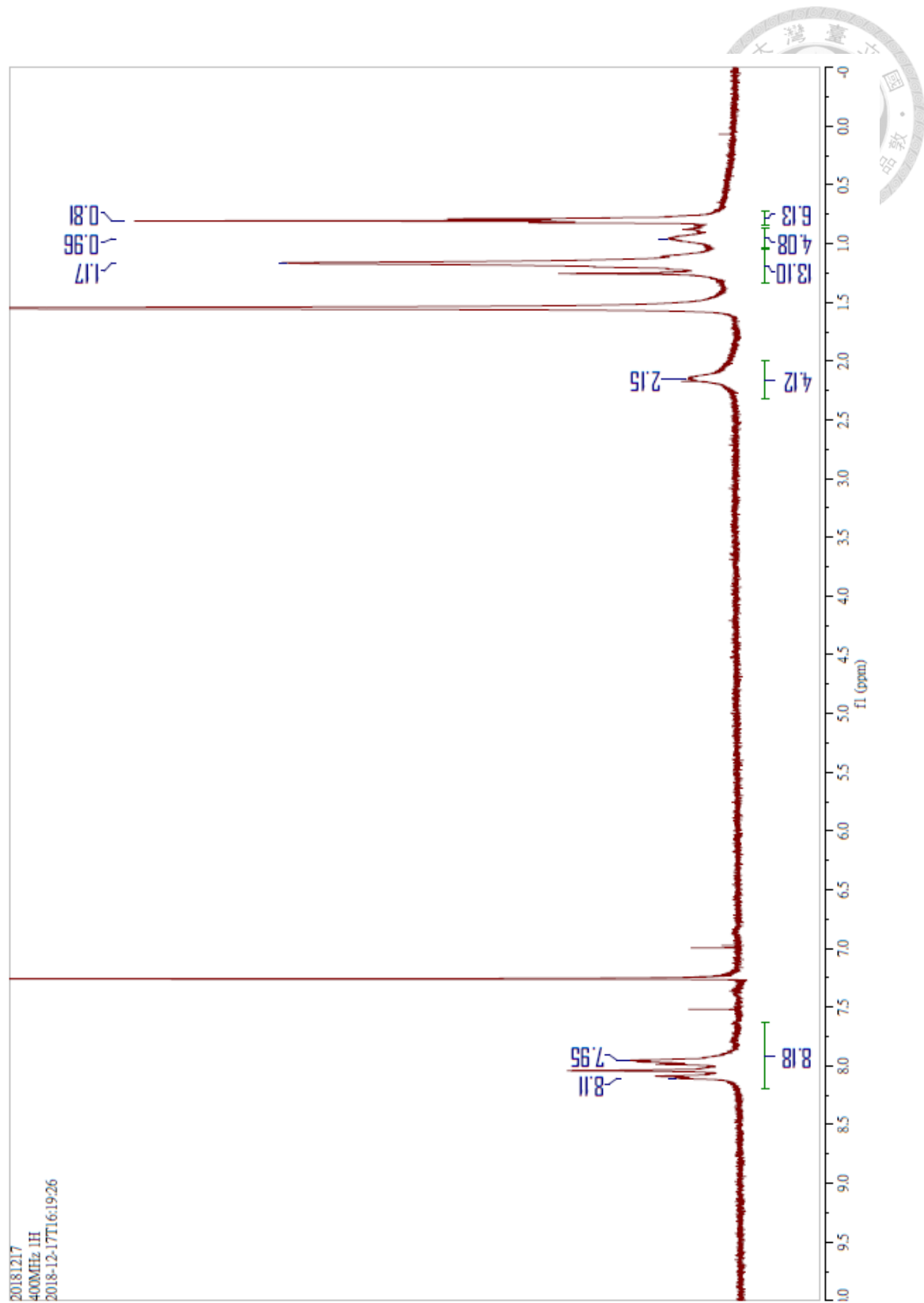
光譜 5 : PPESO<sub>3</sub> 之 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)



光譜 6 : 9,9-dihexyl-2,7-dibromofluorene(單體 C)之  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

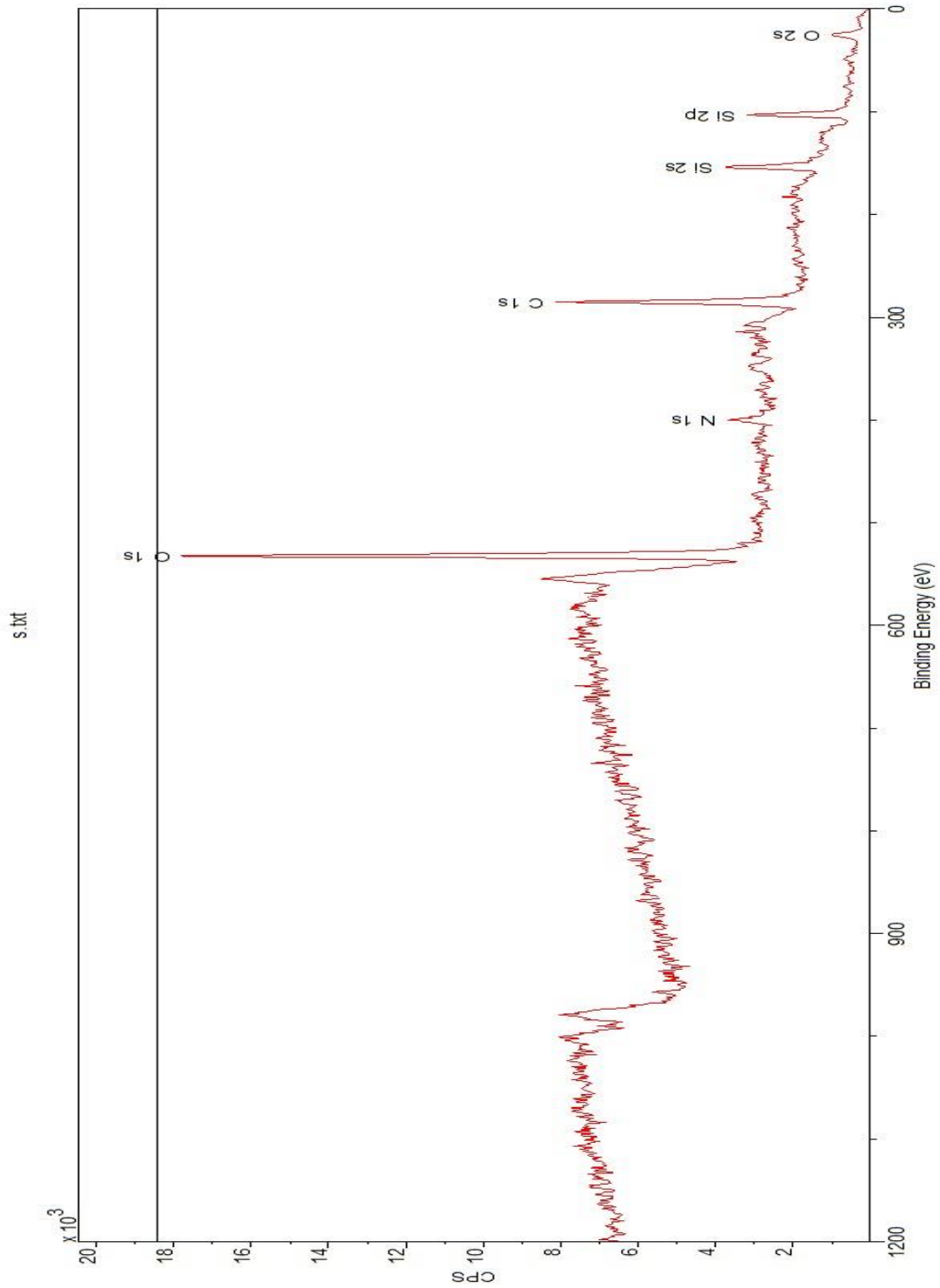


光譜 7 : bis[9,9'-bishexylfluorenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1.3.2]dioxaborolane (單體 D) 之  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

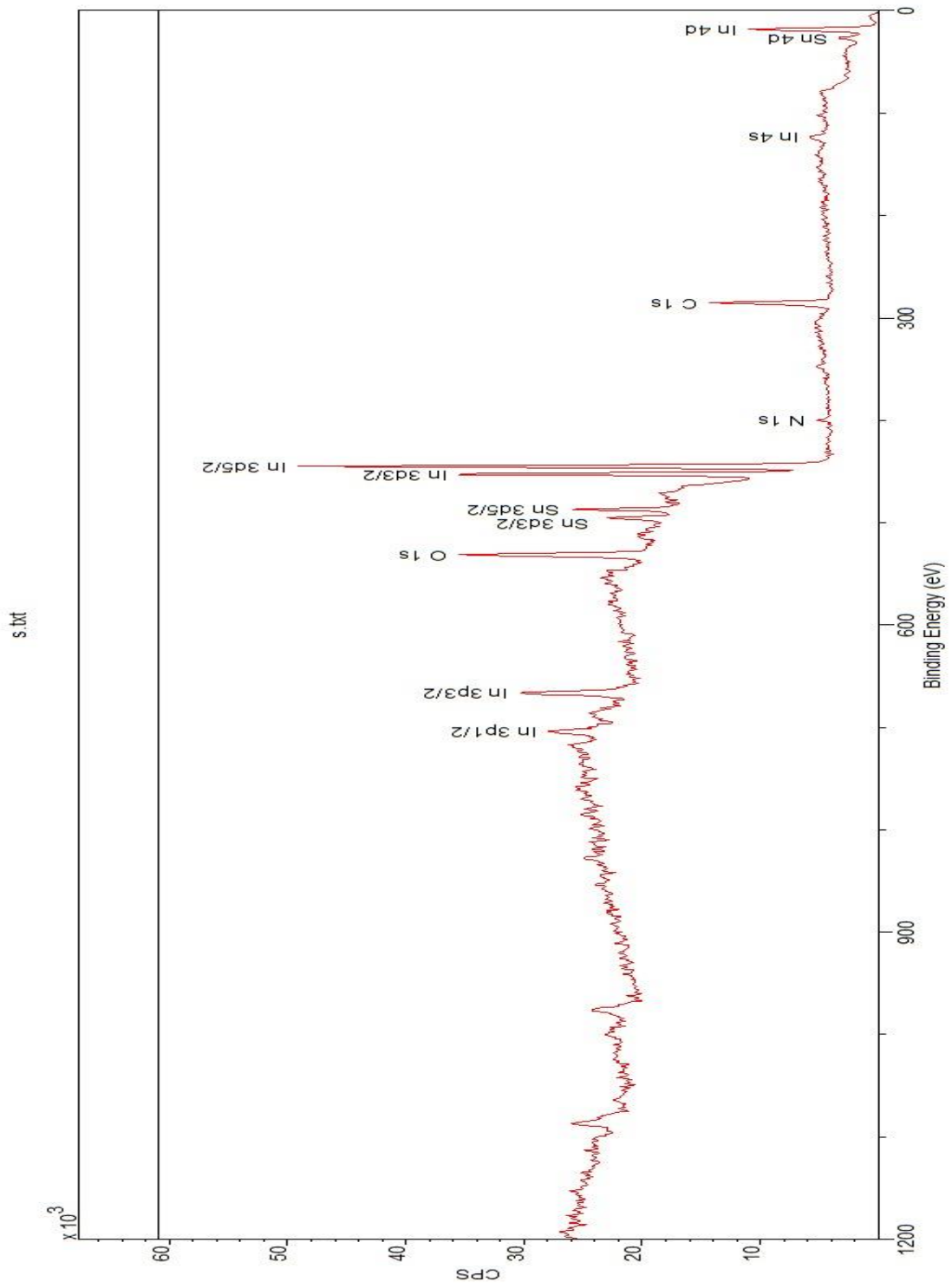


光譜 8 : PFBT 之  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

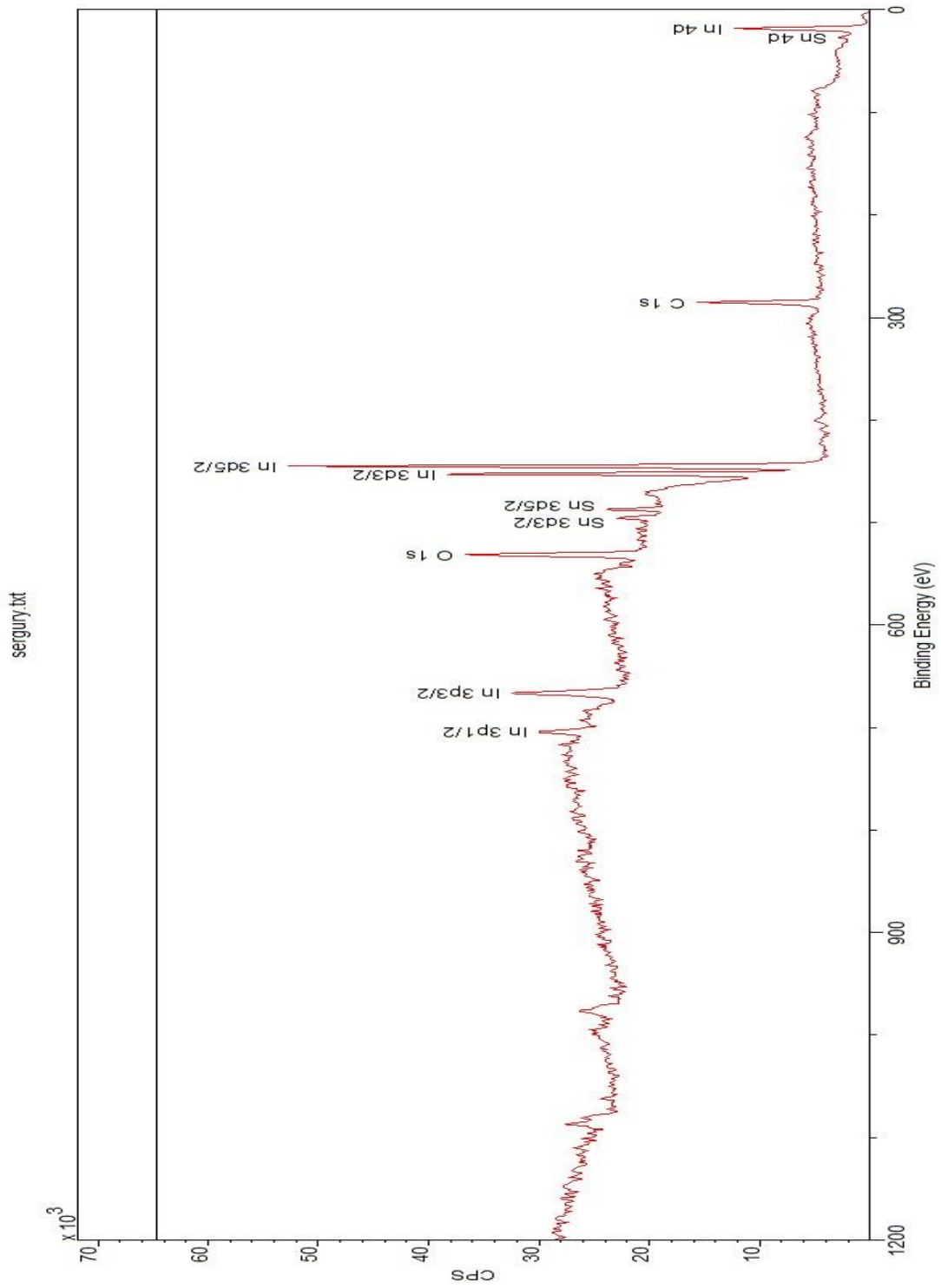
# 附錄：X 電子能譜分析圖



能譜 1：修飾 ITO(A)之 XPS 能譜圖



能譜 2：修飾 ITO(B)之 XPS 能譜圖



能譜 3：修飾 ITO(C)之 XPS 能譜圖