

東海大學物理學系
碩士論文

指導教授：林宗欣

論文題目

(中文) 螢光光譜顯微技術分析白痣珈蟪翅脈之螢光現象

(英文) An analysis of fluorescence of veins of *Matrona cyanoptera* by fluorescence microscopy

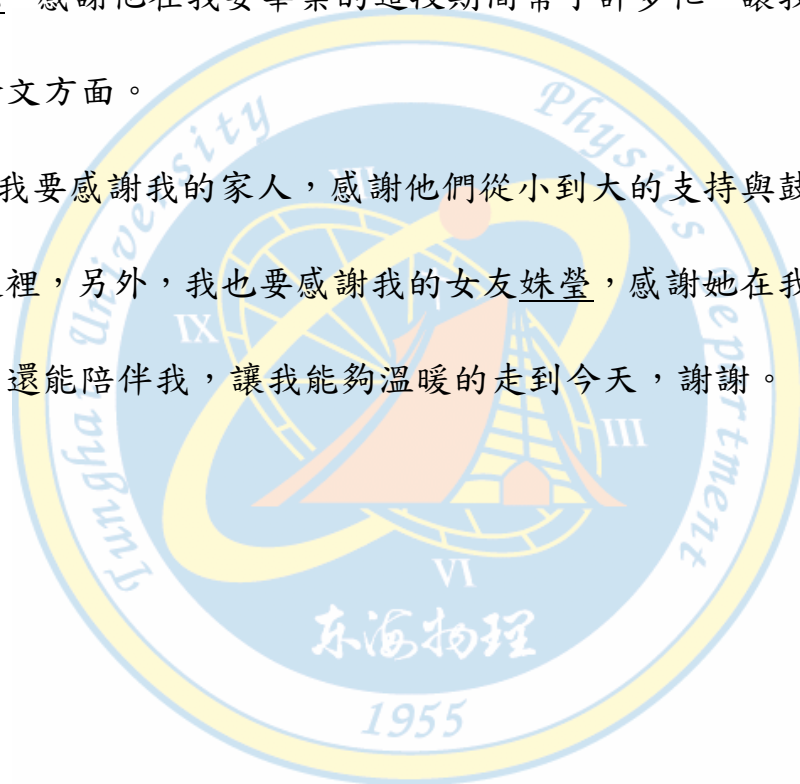
研究生：蔡展志

中華民國九十九年七月二十六日

誌謝

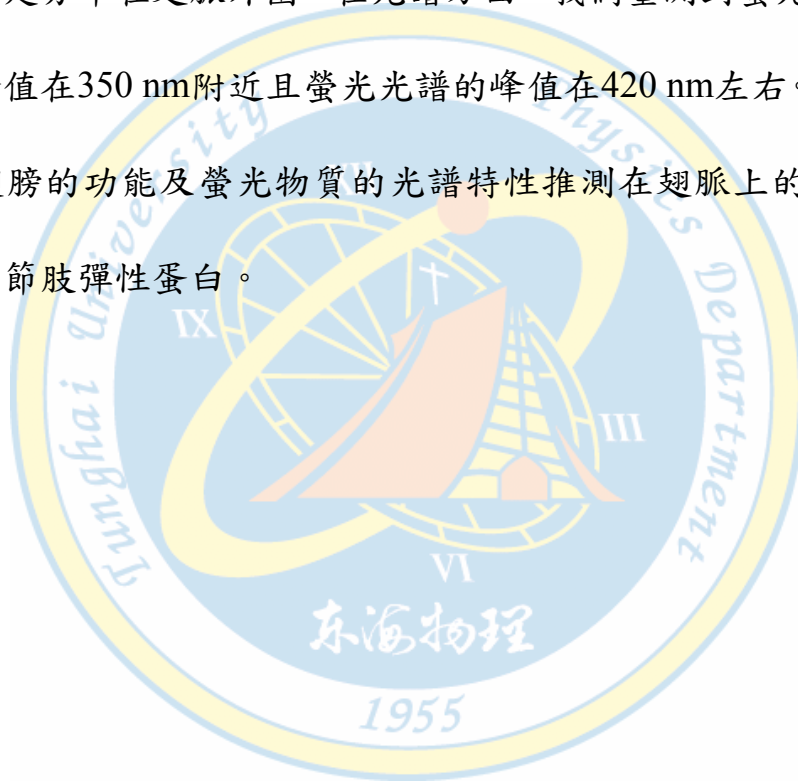
在讀碩士班的這兩年當中，我首先要感謝的是林宗欣老師，感謝他在這兩年當中教了我許多知識與做學問的態度，除了仔細的講解原理之外，老師也會告知從哪裡可以加強我們的知識，讓人感覺老師不是單純的傳授知識，而是在提升學生的自主能力。再來要感謝的是學弟陳論鉉，感謝他在我要畢業的這段期間幫了許多忙，讓我有更多一點心力在論文方面。

最後我要感謝我的家人，感謝他們從小到大的支持與鼓勵，我才能走到這裡，另外，我也要感謝我的女友姝瑩，感謝她在我人生最低潮的時候還能陪伴我，讓我能夠溫暖的走到今天，謝謝。



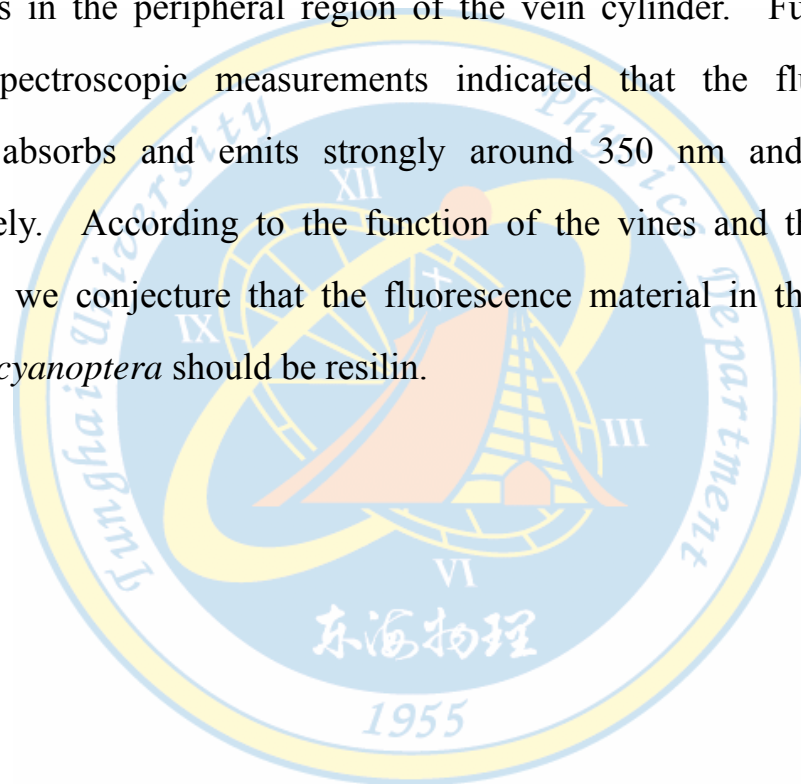
中文摘要

在本篇論文中我們使用螢光光譜顯微技術研究台灣本島的特有種昆蟲白痣珈蟪翅脈的螢光特性，包括螢光影像及光譜。我們以雷射激發螢光物質並觀察在翅膀及翅脈上螢光物質分布情形，我們發現在翅膀上越接近翅基的地方螢光物質分布越密集，而在單一根翅脈上螢光物質則是分布在翅脈外圍。在光譜方面，我們量測到螢光物質的吸收光譜峰值在350 nm附近且螢光光譜的峰值在420 nm左右。我們根據翅脈在翅膀的功能及螢光物質的光譜特性推測在翅脈上的螢光物質有可能為節肢彈性蛋白。



Abstract

In this thesis, we study the fluorescence characteristic of the veins of the Taiwan endemics insect *Matrona cyanoptera* by fluorescence microscopy, including imaging and spectroscopy. We used lasers to excite fluorescence material in the veins to inspect the distribution of fluorescence material both on a wing and in a vein. We found that it has denser distribution around the base of the wing. Within a vein it distributes in the peripheral region of the vein cylinder. Furthermore, optical spectroscopic measurements indicated that the fluorescence material absorbs and emits strongly around 350 nm and 420 nm, respectively. According to the function of the vines and the spectral evidence, we conjecture that the fluorescence material in the vines of *Matrona cyanoptera* should be resilin.



目錄

誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	vii
第一章 簡介.....	1
1.1 白痣珈蟪.....	2
1.1.1 白痣珈蟪基本資料.....	2
1.1.2 型態.....	3
1.1.3 翅脈.....	4
1.2 生物螢光.....	7
1.2.1 螢光素(luciferin).....	7
1.2.2 螢光蛋白(Florescence protein).....	8
1.2.3 節肢彈性蛋白(resilin).....	10
第二章 實驗系統裝置.....	14
2.1 激發光源.....	14
2.1.1 雷射.....	14
2.1.2 白光光源系統.....	15

2.2 顯微鏡系統.....	18
2.2.1 螢光顯微鏡(con-focal fluorescence microscope)	18
2.2.2 濾鏡(FILTER)	18
2.3 量測系統.....	24
2.3.1 電子增益 CCD.....	24
2.3.2 光譜儀.....	26
2.3.3 紫外線/可見光光譜儀.....	26
2.3.4 螢光光譜儀.....	27
第三章 樣品備製與實驗量測.....	32
3.1 樣品的備製.....	32
3.1.1 翅膀樣品.....	32
3.1.2 蛋白質萃取.....	32
3.2 巨觀影像量測.....	34
3.2.1 白光影像.....	34
3.2.2 螢光影像.....	35
3.3 螢光光譜.....	36
3.3.1 直接光譜量測.....	36
3.3.2 蛋白質光譜.....	37
第四章 實驗結果與討論.....	40

4.1 全景圖.....	40
4.1.1 穿透影像.....	40
4.1.2 螢光影像.....	41
4.2 局域影像.....	45
4.2.1 翅膀表面上的局域影像.....	45
4.2.2 翅脈橫切面的影像.....	46
4.3 直接光譜量測.....	50
4.4 蛋白質螢光光譜.....	53
4.4.1 吸收光譜.....	53
4.4.2 光激螢光光譜.....	54
4.4.3 光激螢光激發光譜.....	54
4.5 與節肢彈性蛋白的比較.....	57
第五章 結論與展望.....	58
參考文獻.....	60

圖表目錄

圖1.1 白痣珈蟪a.雄蟲b.雌蟲.....	5
圖1.2 豆娘(上)與蜻蜓(下)成蟲形態圖.....	6
圖1.3 翅脈分類圖，a. 珈蟪科 b. 絲蟪科 c. 細蟪科 d. 蜓科 e. 赤蜻 科 f. 基紋蜻科.....	6
圖1.4 a.一般發光與b.螢光示意圖.....	12
圖1.5 物質受光激發圖.....	12
圖 1.6 吸收光譜：(A)胺基酸 I 在酸性溶液(1)與鹼性溶液(2)；(B)胺基 酸 II 在酸性溶液(1)與鹼性溶液(2).....	13
圖1.7 螢光光譜：胺基酸I(●)、II(○)與天然的resilin(+)在鹼性溶液下 用253.7nm激發的螢光光譜.....	13
圖 2.1 儀器裝置圖.....	16
圖 2.2 (氫/氬)混合氣體離子雷射.....	16
圖 2.3 半導體雷射.....	17
圖 2.4 實驗用藍紫光雷射模組.....	17
圖 2.5 OLYMPUS U-LH100L-3 在不同強度下的光譜.....	17
圖 2.6 OLYMPUS IX-71.....	20
圖 2.7 顯微鏡濾鏡組分光示意圖.....	20
圖 2.8 488 nm 雷射光所搭配的分光鏡(Z488RDC).....	21

圖 2.9 430 nm 雷射光所搭配的分光鏡(455DCLP)	21
圖 2.10 405 nm 雷射光所搭配的分光鏡(425DCXR)	22
圖 2.11 488 nm 雷射光所搭配的接收光濾鏡(HQ520LP)	22
圖 2.12 430 nm 雷射光所搭配的接收光濾鏡(460ALP)	23
圖 2.13 405 nm 雷射光所搭配的接收光濾鏡(HQ412LP)	23
圖 2.14 CCD 上一個像素的結構圖.....	28
圖 2.15 CCD 成像原理.....	28
圖 2.16 EMCCD 成像原理.....	28
圖 2.17 EMCCD (Cascade 1K).....	29
圖 2.18 EMCCD (Cascade 1K) 量子效率圖.....	29
圖 2.19 EMCCD (Cascade 系列) 規格資料圖.....	30
圖 2.20 光譜儀 Acton SP2156 系列.....	30
圖 2.21 光譜線路示意圖.....	31
圖 2.22 800 nm 閃耀光柵效率圖.....	31
圖 3.1 wide-field 激發示意圖.....	39
圖 3.2 吸收光譜示意圖.....	39
圖 3.3 螢光光譜示意圖.....	39
圖 4.1 使用白光燈源所拍攝的穿透影像全景圖(4X 物鏡)：a.偏橘紅色 光，b.偏白色光.....	42

圖 4.2 翅膀透光光譜,其中 T 為穿透率.....	43
圖 4.3 以 405 nm 雷射光激發樣品的螢光影像全景圖(4X 物鏡).....	44
圖 4.4 圖 4.1 右方 A 區局域圖 (4X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	47
圖 4.5 圖 4.1 左下 B1 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	47
圖 4.6 圖 4.1 左下 B2 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	47
圖 4.7 圖 4.1 左下 B3 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	48
圖 4.8 圖 4.1 左上 C 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	48
圖 4.9 圖 4.1 左上 C 區局域圖(10X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	48
圖 4.10 圖 4.1 左上 C 區局域圖(40X 物鏡):左為螢光影像,右為穿透影 像.....	49
圖 4.11 488 nm 雷射激發兩處翅脈橫切面:左為 40X,右為 100X.....	49
圖 4.12 以不同波長雷射激發的螢光光譜.....	51
圖 4.13 488 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜.....	51

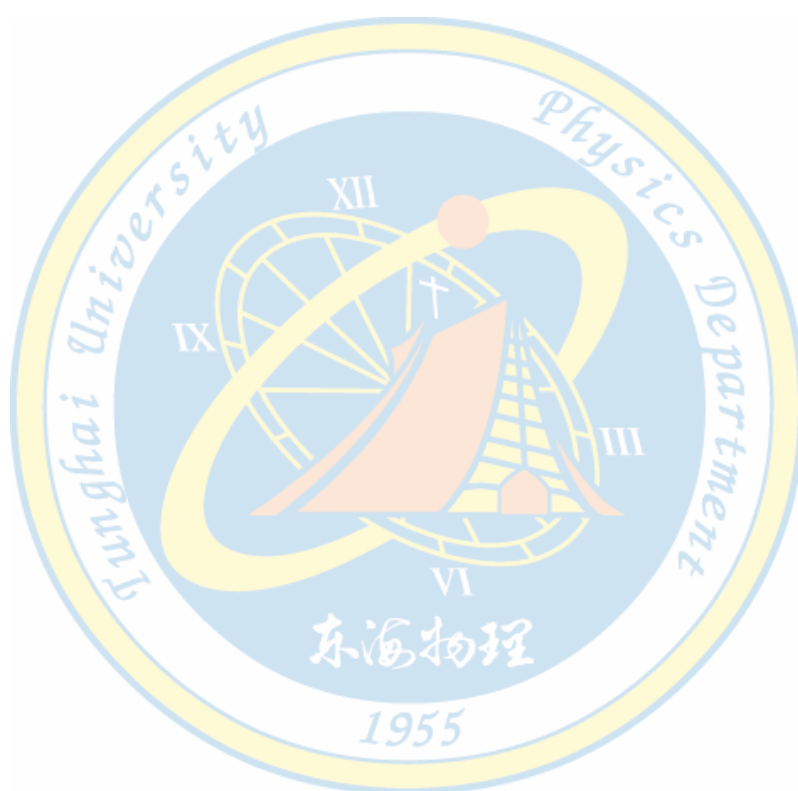
圖 4.14 430 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜.....52

圖 4.15 405 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜.....52

圖 4.16 蛋白質溶液的吸收光譜.....55

圖 4.17 螢光光譜(photoluminescence, PL)55

圖 4.18 螢光激發光譜(photoluminescence excitation, PLE)分析56



第一章 簡介

在自然界中，光是生物存活的重要元素之一，撇開通常與光伴隨的熱不講，單單光就能讓我們辨別方向，沒有光的話，或許人類連文化都沒辦法傳承下去，而為了能夠辨別方向，動物們都發展了接收光的器官：眼睛，更甚者有某些生物發展出能發出光的器官，來為自己或其他生物辨別方向。科學家們研究發光生物多年[1-4]，對某些生物的發光的機制都有一定的了解[4]，並利用了螢光光譜技術分析其螢光物質種類及特性[5]。在某些生物中，科學家發現了一些會發光的蛋白質，雖然科學家尚不完全知道這些蛋白質發光的意義[6]，但因為其具有發光的特性，使得科學家除了以傳統的分析方式以外還可以透過光譜量測技術來分析研究這些物質[5]，藉此獲取更多的資訊，以對這些蛋白質的功能及特性有更進一步的了解。我們透過東海大學生命科學系林仲平老師的研究知道白痣珈蟪的翅脈有發螢光的現象，因此在此工作中，我們與林仲平老師合作，以螢光光譜技術分析研究白痣珈蟪翅脈發螢光的現象，希望能對其組成成分及功能有更進一步的了解。在本章中我們首先將對白痣珈蟪的基本特性及生物螢光的相關機制做簡介。

1.1 白痣珈蟪

白痣珈蟪是一種豆娘，在分類上與蜻蜓是近親。在本節中，我們將先針對白痣珈蟪的基本資料及型態做介紹。另外，由於在本研究中我們發現白痣珈蟪發螢光的部份為其翅脈，因此我們也將對翅脈作介紹，冀望能從其在翅膀上的功能中，探討其發螢光的原因。

1.1.1 白痣珈蟪基本資料

白痣珈蟪或稱白痣色蟪，俗名：豆娘；學名：*Matrona cyanoptera*，屬於均翅亞目(Zygoptera)珈蟪科(Calopterygidae)，棲息地位於海拔 1000 公尺以下的山區至低平地區的緩流水域。在西元 2000 年以前，牠們一直被誤認為是某個分布在亞洲大陸的相近種，直到西元 2000 年才確定是屬於台灣本島的特有種。珈蟪科是均翅亞目中體色最為鮮艷的一群，因此有時又稱為色蟪科[6]，而其雄蟲全身豔綠跟深藍翅膀的外表，為自己贏得非常傳神的雅號：「青肌琉璃豆娘」、「琉璃色蟪」。

白痣珈蟪雄蟲(圖 1.1-a)一般體長在 6.8 公分左右，全身深綠色具金屬光澤，有時會因為光線照射角度的不同而呈現深藍色，除此之外並沒有明顯的斑紋；至於翅膀，則為深藍色，靠近邊緣的顏色較深，接近黑色。而白痣珈蟪雌蟲(圖 1.1-b)體色較為黯淡，不像雄蟲色彩鮮豔，但翅膀尖端前緣的翅痣為一個明顯的白色斑點，這個特徵是在野

外分辨雌雄最快的方法，也是其中文名稱的由來。

1.1.2 型態

豆娘與蜻蜓的型態相類似，但體型變化很大。某些微小的豆娘從頭到腹部末端長度只有 1.5 公分，而全世界最大的種類體長則可超過 15 公分，其型態上如圖 1-2 所示，可分為頭部、胸部和腹部。胸部是控制飛行的主要部位，由三個胸節所組成，即前胸、中胸和後胸，每個胸節各有一對胸腳，而中胸和後胸分別是前翅和後翅著生的位置 [6]，其中豆娘的腹部偏向細長型且前後翅的形狀相近；蜻蜓的腹部則較粗且前後翅形狀差異較大。在豆娘的翅膀著生的關節處具有特別的結構使豆娘能執行許多高難度的飛行動作，而在文獻記載中則有提到生物體上有一系列具有彈性的彈性蛋白(elastic proteins)可以幫助生物體運動[7]，更有科學家在豆娘翅膀關節處發現一種較常在昆蟲的腳上[8] 及前後翅著生的關節處[9]出現且彈性超強的節肢彈性蛋白(resilin)。這種彈性蛋白在紫外光照射下，會發出微微的藍光，因此，鑑別這種彈性蛋白的方法之一是使用螢光光譜分析[9, 10]，也是本實驗所用的方法。

1.1.3 翅脈

在分類上，豆娘與蜻蜓都是屬於蜻蛉目的一種，蜻蛉目的翅膀屬於相當原始的型態，在翅脈之間圍出許多微小的「翅室」，而根據翅膀的形狀及翅脈的走向，可再細分為豆娘類的均翅亞目、蜻蜓類的不均翅亞目、介於兩者間的間翅亞目以及在亞目之下的各個科名(圖 1.3)。均翅亞目珈蟪科的翅膀形狀及翅脈走向如圖 1.3-a，前後翅的形狀差異甚小，且翅脈是屬於比較密集的。另外，絲蟪科(圖 1.3-b)、細蟪科(圖 1.3-c)也是屬於前後翅差異小的均翅亞目；蜓科(圖 1.3-d)、赤蜻科(圖 1.3-e)、基紋蜻科(圖 1.3-f)則是屬於前後翅差異較大的不均翅亞目。

在蜻蜓及豆娘剛破殼而出時，牠的外骨骼尚還柔軟脆弱，兩對翅膀還只不過是小小的翅芽。當血液注進翅芽後，翅膀才完全伸展開來，同時腹部也伸展開來。當蜻蜓整個身軀都伸展開後，牠會攀扶在幼蟲殼上休息幾個小時之久，耐心等待體表的外骨骼乾燥硬化[6]。因此翅脈除了可供血液注入，本身也負責翅膀的支撐力。在本工作中我們使用螢光光譜分析白痣珈蟪翅脈上之螢光物質，其結果顯示與節肢彈性蛋白的螢光光譜相近。因此，從其功能及光譜特性我們猜測翅脈上的螢光物質有可能是節肢彈性蛋白。



圖 1.1 白痣珈蟪 a.雄蟲 b.雌蟲[11]

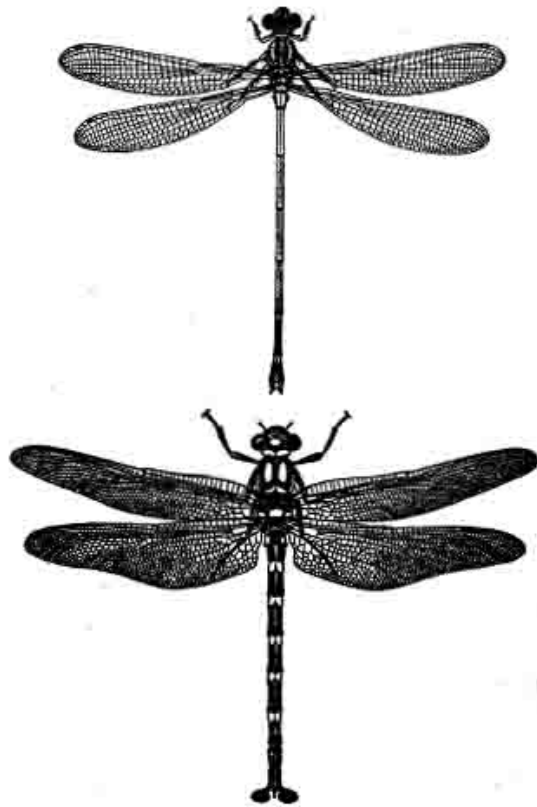


圖 1.2 豆娘(上)與蜻蜓(下)成蟲形態圖[6]

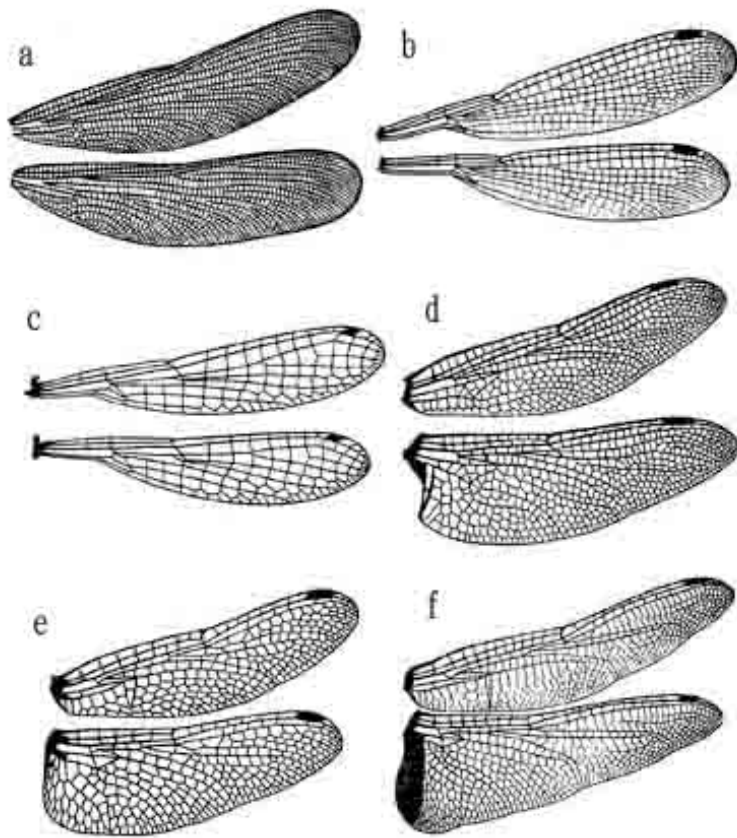


圖 1.3 翅脈分類圖[6]，a. 豆娘科 b. 絲蟪科 c. 細蟪科 d. 蜓科 e. 赤蜻科 f. 基紋蜻科

1.2 生物螢光

在自然界中，有些生物體上會有發光的現象，例如：細菌、真菌、螢火蟲、和魚類等等[3, 12]，我們統稱這種光為生物螢光。科學家依據生物體發光之機制不同(圖 1.4)，將所發出來的光分為一般發光與螢光[12, 13]。其中一般發光以細菌的螢光素(Lase)發光為主，而螢光則以螢光蛋白發光為主[14-18]，包括以彈性為主要功能的節肢彈性蛋白[8, 10, 15]也是以螢光蛋白發光。在本篇論文中，我們以螢光光譜顯微技術分析、量測白痣珈螳翅脈上的螢光物質，我們發現其光譜特性與節肢彈性蛋白相類似[15]，因此我們亦將在此節對節肢彈性蛋白的螢光特性做介紹。

1.2.1 螢光素(luciferin)

螢光素(luciferin)是一種生物體的發光物質；螢光酵素(luciferase)則是參與其發光反應的酵素[12]。細菌中的螢光酵素(luciferase)會產生氧化還原反應，利用氧分子氧化螢光素(luciferin)[4]，當螢光素被氧化時先處於氧化激發態，隨後返回氧化態，而氧化激發態返回氧化態的過程中，原先增加的非輻射性之能量會轉移釋出光能[19, 20]。由於大部分的能量為轉換成光而非熱能，因此稱這種光為冷光。簡單來說，螢光素發光現象是化學反應產生冷光的現象，為了與螢光蛋白區分，化學發光的螢光素也稱為冷光蛋白。而螢光素的缺點在於發光

之後，需經過一連串的化學反應才能再次與螢光酵素參與反應(圖1.4-a)。

1.2.2 螢光蛋白(Florescence protein)

當原子或分子接收高能量光子後使電子被激發到激發態，之後電子會以放出不同的能量方式(光、熱、電子、化學變化等等)衰退回到基態(圖1.5)，若以光子衰退則稱為光致發光(Photoluminescence, PL)，而光致發光現象依據激發態的不同，可分為螢光(Fluorescence，持續約 10^{-5} 到 10^{-8} 秒)或磷光(Phosphorescence，持續約 10^{-4} 到數秒)。在實用上，大部分會只是直接以發光持續時間來分辨螢光或磷光。

螢光蛋白是一種受到特定波長的激發光照射後，就能發出不同波長放射光的蛋白質。當蛋白質被光激發之後，會因為電子躍遷到高能階而從基態跳到較高的激發態，並經由一些非輻射的能量損失降到第一激發態後，再以發光、熱輻射或化學變化的方式釋出能量，其中藉由輻射發光的方式釋出能量而回到基態[21]的方式為光致發光，而科學家稱這種光致發光方式所產生的光為螢光，光致發光的蛋白質則為螢光蛋白(圖1.4-b)。

螢光蛋白中最先被發現的是綠色螢光蛋白 (Green Florescence Protein)，瑞典皇家科學院於2008年的10月8日，把一年一度的諾貝爾化學獎頒給日本籍的下村脩 (Osamu Shimomura)、美國籍的馬丁查

爾菲 (Martin Chalfie) 及美籍華裔的錢永健 (Roger Y. Tsien) 3 位科學家，表彰他們對於綠色螢光蛋白 (Green Florescence protein, GFP) 研究方面的貢獻 [13]。綠色螢光蛋白最初是由發光水母 (Aequorea Victoria) 細胞中，隨著另一種發光蛋白水母素 (aequorin) 一起被純化出來 [13]。Aequorin 是一種可以將儲存於 ATP 內的化學能轉換成光能的冷光蛋白 (Chemilluminescent protein)，而 GFP 則是屬於吸收短波長激發光而釋放長波長螢光的光致發光螢光蛋白。在海水中，水母裡的 Aequorin 在鈣離子存在下會產生藍光冷光，其發光原理與之前所提之 Luciferin 相似，而 Aequorin 所發出之藍光則擔任能量提供者 (donor) 的角色，讓 GFP (accepter) 吸收能量後發出綠光，這兩種蛋白質的優點在於本身發完光之後，還是原本的基態，而水母則依靠這兩種蛋白質依序活化產生綠色螢光 [13, 21]。

由螢光素與螢光蛋白比較可將發光原理分為主動式與被動式，分別為在基態被光激發而躍遷到激發態，再經由輻射發光而返回原本基態的主動式，以及在基態被氧化到氧化態，在經由輻射發光返回到氧化基態的被動式，這兩種發光模式，一種是用光源作激發，而本身會恢復成原來狀態；一種是需要外來物質做化學反應，而本身會氧化成氧化態，我們用這兩種方式來區別螢光與發光，而兩者皆為冷光。

1.2.3 節肢彈性蛋白(resilin)

彈性結構是動物身上一種重要的組成物，例如肌腱與韌帶，並已被證明在週期性的運動中可以擔任彈簧的角色達到儲存與釋放能量的效果[22]，並且在某些運動系統中擔任肌肉的對立者，以達到簡化機制的作用並得到更快的運動速度[23]。彈性蛋白(elastin)與節肢彈性蛋白(resilin)都是屬於橡膠類(rubber-like)的蛋白質，功能在於能夠儲存彈性應變能量，且透過生物技術可以將resilin製造成相當完美的彈性材料[7]。昆蟲是最早被承認具有特定結構組成的彈性蛋白，並且由Weis-Fogh等人發現一種可協助昆蟲飛行且具有非常完美彈性的節肢彈性蛋白[9]，加上之後的科學家研究對節肢彈性蛋白的特性建立了幾項檢驗的標準，包括：

- (1) 以紫外光照射會產生最大波長為420 nm的藍色螢光[9]。
- (2) 加入甲苯胺藍(toluidine blue)的resilin會呈現深藍色[9]。
- (3) pH值的依賴性：pH會影響節肢彈性蛋白的特性，包括分子取向、堆積密度、結構特性及吸附特性等[15]，並且在中性及鹼性時的最佳吸收光波長在330 nm，在酸性時為285 nm，而螢光波長皆為420 nm[10]。

但在Neff等人的研究中[8]，甲苯胺藍的試驗結果卻沒有預期中的結果產生，因此我們對(2)的檢驗方法予以保留。而科學家們發現節肢彈

性蛋白之所以會發光，是因為其中包含了兩種螢光的胺基酸(I、II)。他們將節肢彈性蛋白的水解液做紙層析(paper chromatograms)將這兩種胺基酸分離，對其做吸收光譜及螢光光譜分析，得到這兩種螢光胺基酸在不同pH時有相類似的吸收光譜。如圖1.6所示，在酸性溶液中兩種胺基酸的吸收峰值都在285 nm附近而在鹼性溶液中的峰值則在320 nm附近。另外，以及兩種胺基酸與天然的節肢彈性蛋白在鹼性溶液下用253.7 nm激發而得到的螢光光譜(圖1.7)[24]，螢光光譜的峰值則在420nm附近。

科學家根據不同來源的節肢彈性蛋白研究認為節肢彈性蛋白主要為隨機捲曲的結構[25, 26]，並且在Haas等人在Forficula auricularia的研究中，發現這種前翅短且硬化，而後翅可以摺疊的昆蟲的翅脈上有resilin的成分[27]，使後翅得以展開，因此我們相信，昆蟲除了可在活動的關節上面可能有resilin的物質外[8]，在薄弱的翅膀上也需一定的彈性物質(如resilin)作為保護機制。

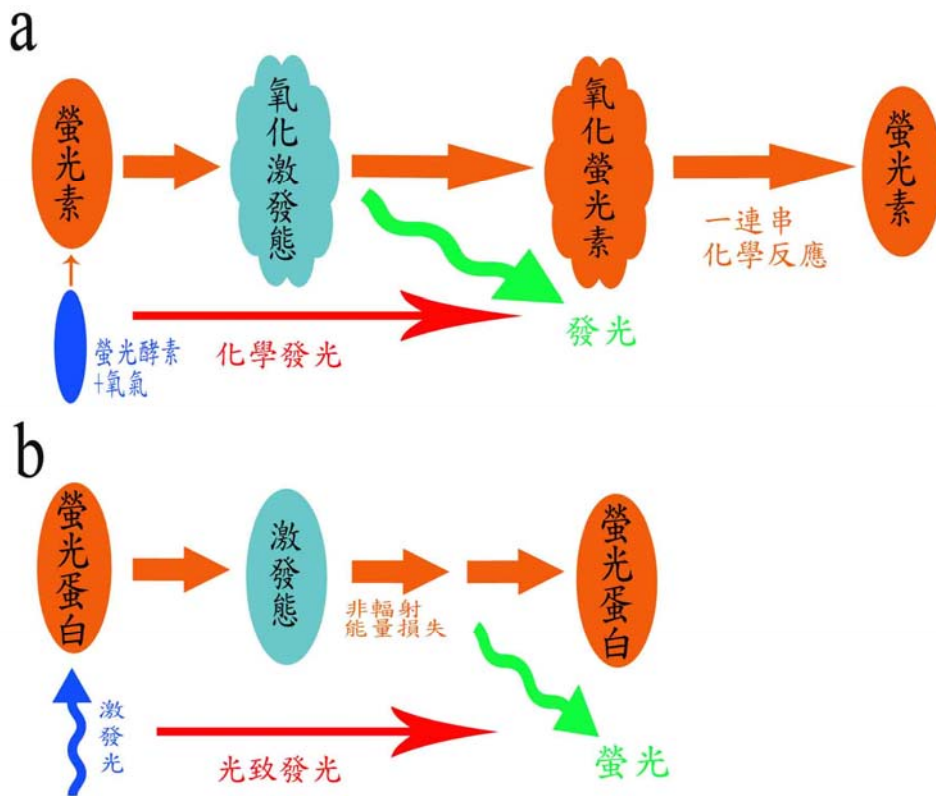


圖1.4 a.一般發光與b.螢光示意圖

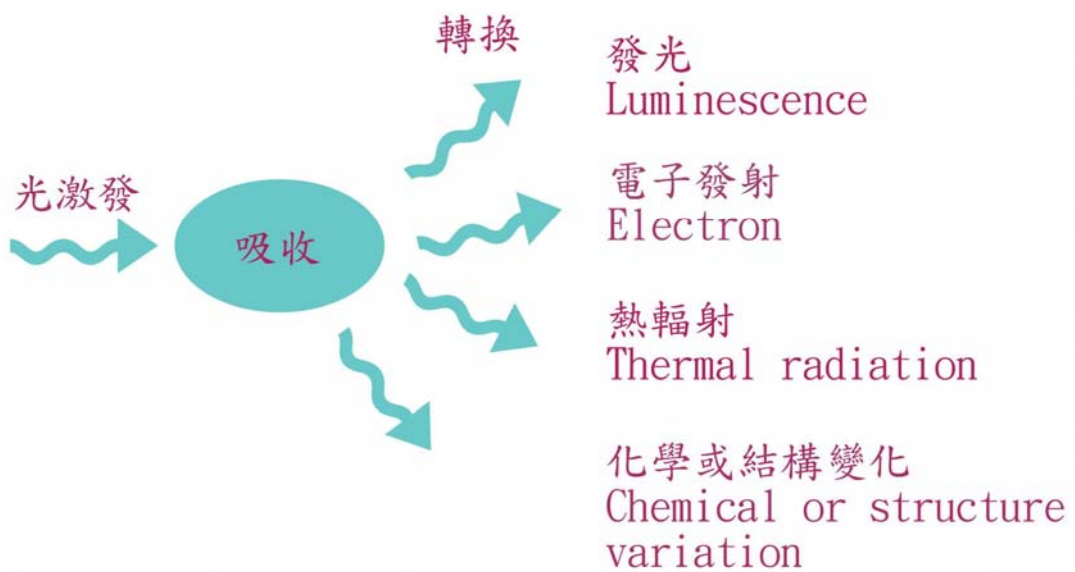


圖1.5 物質受光激發圖

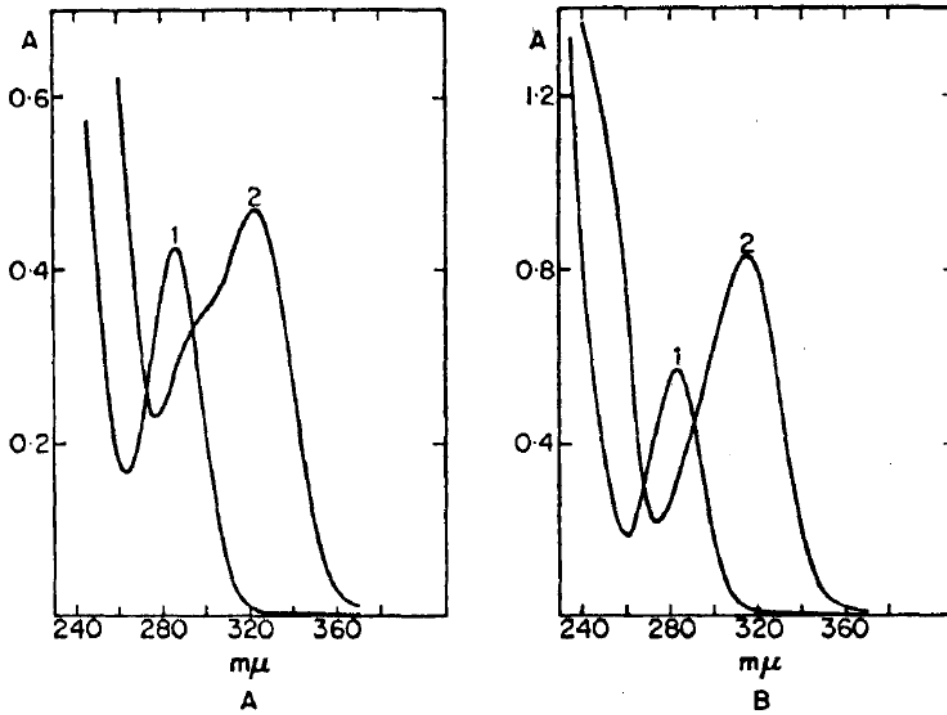


圖 1.6 吸收光譜：(A)胺基酸 I 在酸性溶液(1)與鹼性溶液(2)；(B)胺基酸 II 在酸性溶液(1)與鹼性溶液(2)[24]

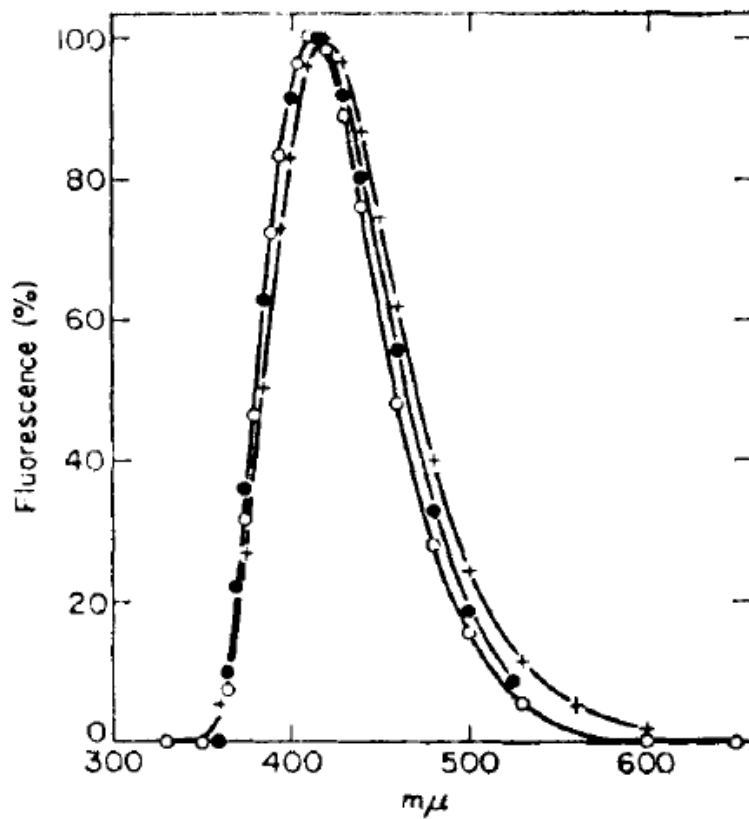


圖 1.7 螢光光譜：胺基酸 I(●)、II(○)與天然的 resilin(+)在鹼性溶液下用 253.7nm 激發的螢光光譜[24]

第二章 實驗系統裝置

本研究主要以廣視野螢光顯微鏡觀測白痣珈璉翅膀的影像及光譜，另外我們也萃取翅膀內的蛋白質，以紫外線/可見光光譜儀及螢光光譜儀取蛋白質溶液的吸收光譜及螢光光譜。圖 2.1 為本實驗所用到的儀器裝置圖，本章將分別就激發光源部分，顯微鏡部分，及量測系統部分所用到的主要儀器做介紹。

2.1 激發光源

本實驗主要以螢光顯微鏡觀測，但除了用螢光顯微技術觀測外，也使用了一般的顯微技術做搭配，因此除了螢光顯微技術所需要的雷射光源之外，我們也利用了白光光源做一般的顯微觀察。

2.1.1 雷射

本實驗使用了以下幾種雷射：

1. (氫/氬)混合氣體離子雷射(圖 2.2)：COHERENT 公司所生產的(氫/氬)混合氣體離子雷射，此雷射具有可見光中全色系的輸出能力，包含紅(647.1 nm)、黃(568.2 nm)、綠(520.8 nm，514.5 nm)、藍 (488.0 nm)、紫(457.9 nm)，我們利用稜鏡選擇其中輸出功率最大的藍光(488 nm)做為雷射光源之一。

2. 半導體雷射(圖 2.3)：同樣是 COHERENT 公司所生產的半導體雷射，波長為 430 nm。

3.實驗用藍紫光雷射模組(圖 2.4):唐裕有限公司生產的實驗用藍紫光雷射模組，波長為 405 nm。

2.1.2 白光光源系統

白光光源我們使用了 OLYMPUS 的 100W 鹵素燈具(U-LH100L-3)來做為穿透與反射光源，因其本身為 OLYMPUS 顯微鏡的外接式光源，我們可利用顯微鏡前方的旋鈕做光源強度的控制。我們發現在光源強度較小的時候，其輸出光偏橘紅色；光源強度較大的時候，輸出光偏白色(圖 2.5)，因此我們正好可以利用此特性做翅膀對這兩種情況的光源的穿透性的比較。



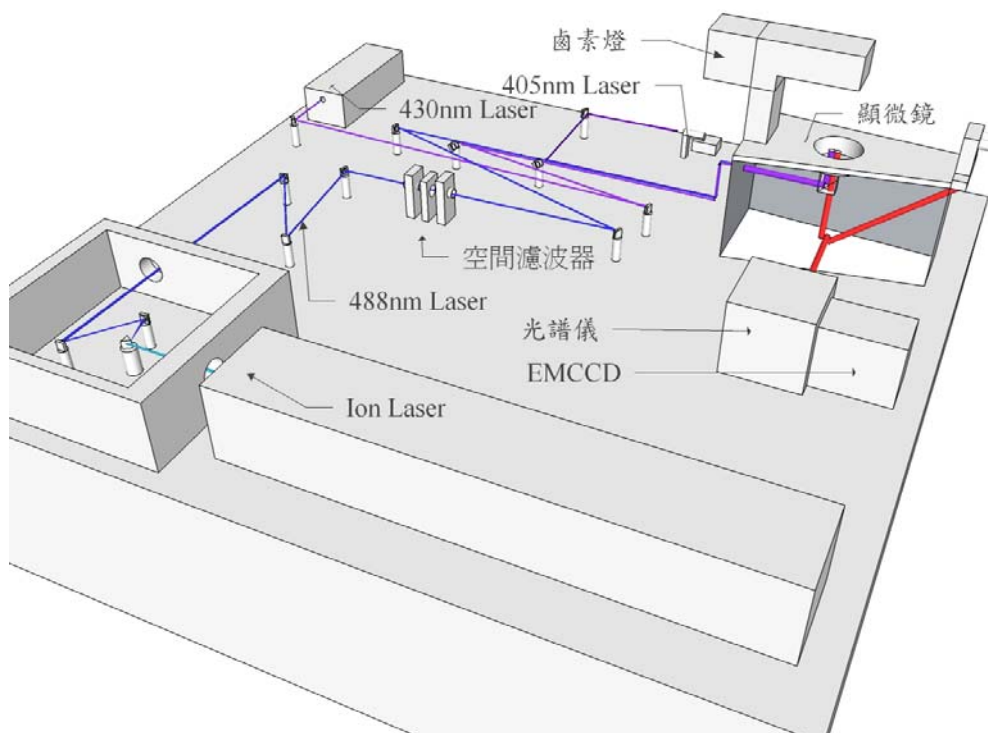


圖 2.1 儀器裝置圖



圖 2.2 (氫/氬)混合氣體離子雷射



圖 2.3 半導體雷射



圖 2.4 實驗用藍紫光雷射模組

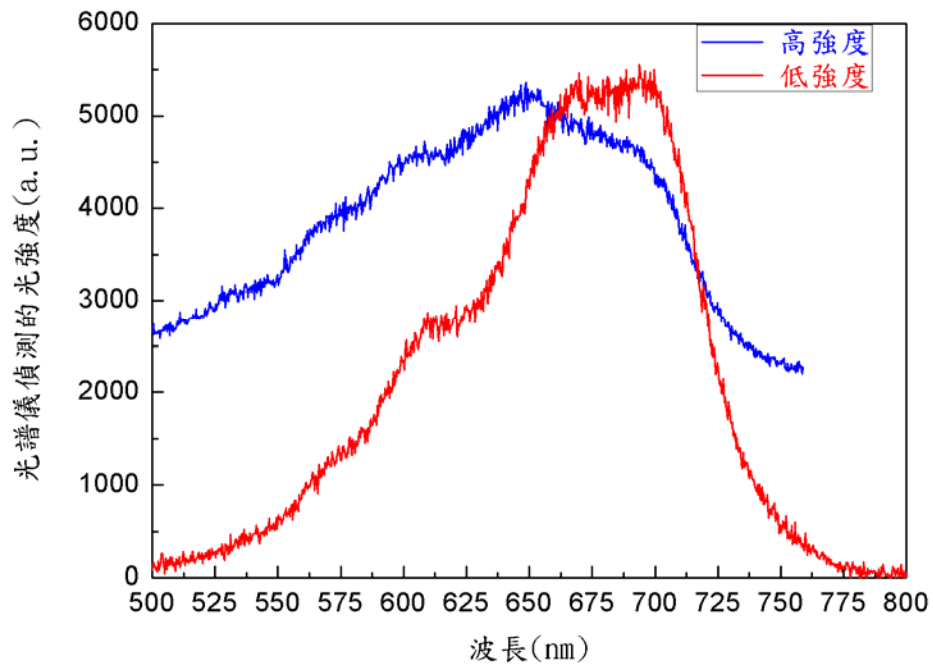


圖 2.5 OLYMPUS U-LH100L-3 在不同強度下的光譜

2.2 顯微鏡系統

顯微鏡系統包括了螢光顯微鏡主體以及螢光顯微鏡中重要的元件—濾鏡。本節將針對螢光顯微鏡主體的架構及其特性做介紹，另外也將介紹濾鏡種類及其在螢光顯微鏡中所扮演的角色。

2.2.1 螢光顯微鏡(con-focal fluorescence microscope)

我們實驗室使用 OLYMPUS 公司生產的 IX-71 型的螢光顯微鏡(圖 2.6)，因為此型的螢光顯微鏡結構簡單有效且具有多開口的設計，搭配雷射便是單光子共焦式螢光顯微鏡，並可加裝多光源系統，且所使用的光學元件有極高之雙光子相容性，未來也可改裝成雙光子共焦式螢光顯微鏡(Two-photon confocal microscope)。螢光顯微鏡與一般顯微鏡比較之下，須具備有 1. 無干擾光源的作業環境； 2. 窄波長光源或雷射；3. 合適的濾波片組：濾鏡(Filter)、分光鏡(Beam Splitter)。如圖 2.6 所示，當激發光(藍色線條)進入顯微鏡後，可以經由顯微鏡內的濾波片組進行反射及過濾螢光(紅色線條)的作用，以達到螢光顯微鏡的功能。

2.2.2 濾鏡(FILTER)

要觀察螢光影像除了要有純粹激發光源的環境避免螢光影像與一般影像同時產生之外，也需要區別激發光與螢光，因此需要合適的激發光與合適的濾波片組，因為螢光物質受光激發會產生螢光，當用

特定波長的激發光(雷射)激發螢光物質時，可以選用特定波長的濾片(filter)隔離激發光及散射光，使觀察者得到純螢光影像的螢光顯微鏡(圖 2.7)。螢光物質被激發後，被激發的螢光物質都會釋放出較長波長的螢光，而螢光能通過選定的濾鏡組與激發光分離(圖 2.7)，而濾鏡組則包括以下幾種：

1. 激發光濾鏡 (Excitation Filter)

一般燈泡式的光源(包含汞燈、鹵素燈)所產生的光，都涵蓋全波長(300-1100 nm)，因此使用時必須搭配激發光濾鏡來篩選激發螢光物質所須的光譜範圍，若光源是雷射光，則無需激發光濾鏡。

2. 分光鏡(Beam Splitter)

分光鏡可以將較短波長的激發光反射至樣品，而較長波長的螢光可以通過，通常會再搭配接收光濾鏡做二次過濾。圖 2.8、圖 2.9、圖 2.10 分別是我們選擇用來對應 488 nm、430 nm、405 nm 雷射光所用的分光鏡穿透光譜。

3. 接收光濾鏡 (Emission Filter)

接收光濾鏡一般放在螢光穿透分光鏡之後的位置，接收光濾鏡同樣可使較長波長的螢光通過，搭配分光鏡可以提高螢光與激發光的分離效率。圖 2.11、圖 2.12、圖 2.13 分別是我們選擇用來對應 488 nm、430 nm、405 nm 雷射光所用的接收光濾鏡穿透光譜。

Two-tier multi-ports design ensures input/output flexibility.

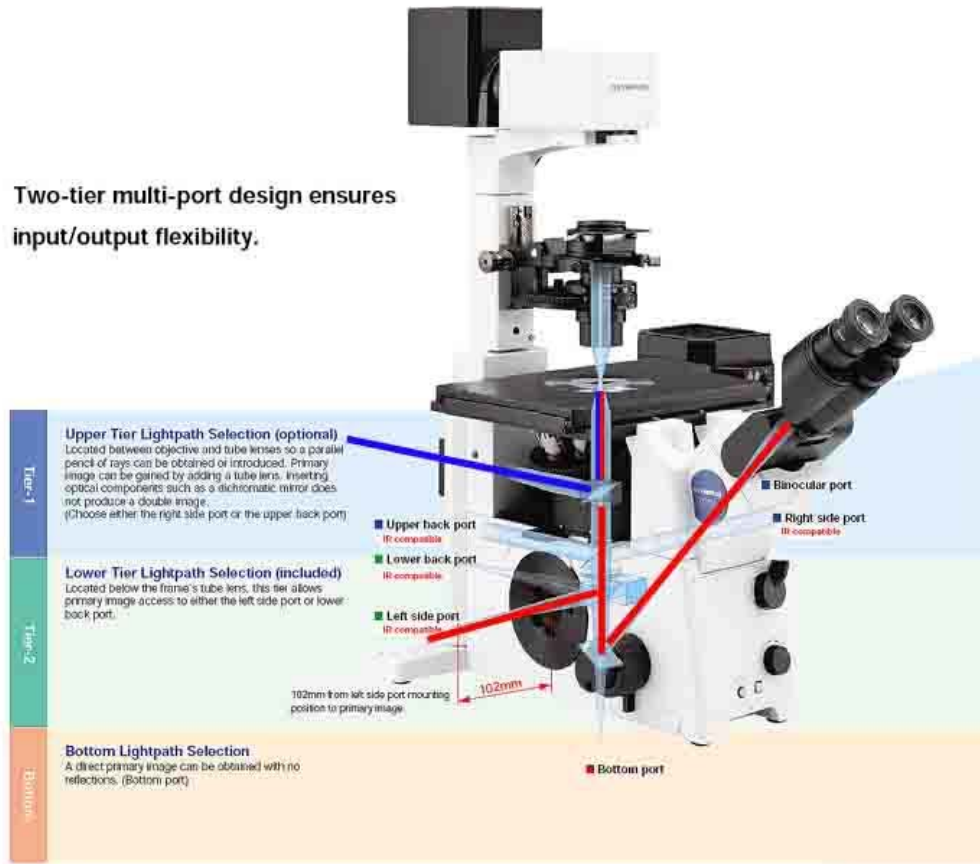


圖 2.6 OLYMPUS IX-71[28]

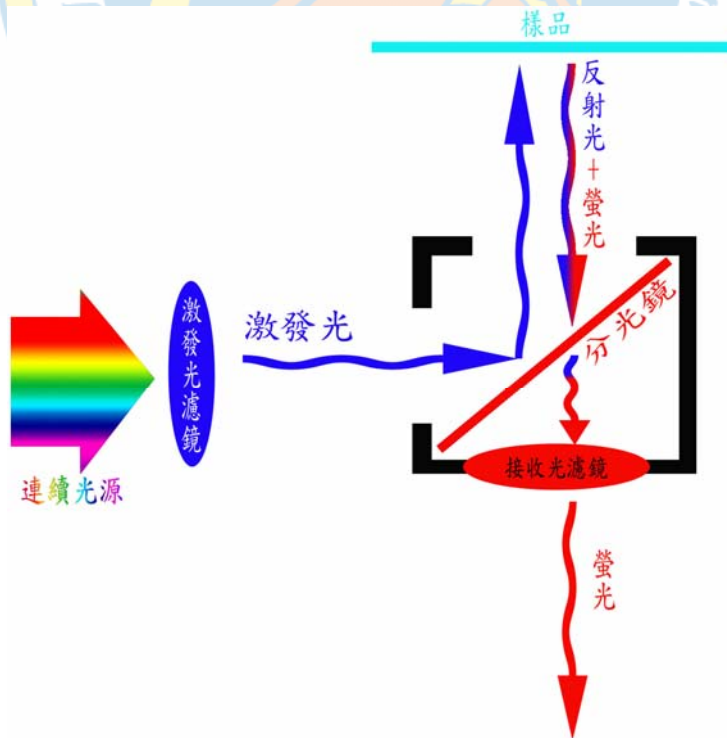


圖 2.7 顯微鏡濾鏡組分光示意圖

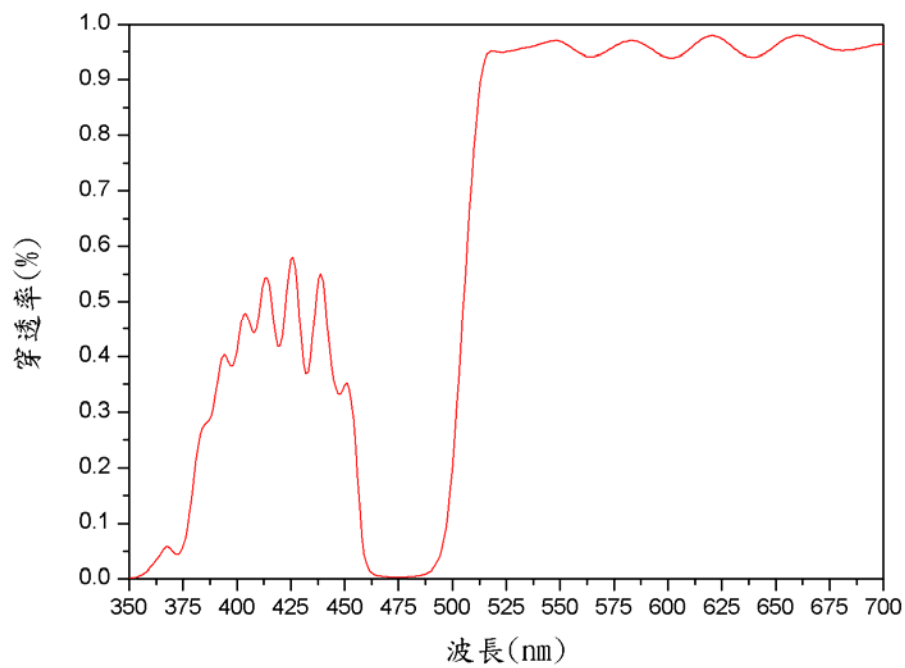


圖 2.8 488 nm 雷射光所搭配的分光鏡(Z488RDC)

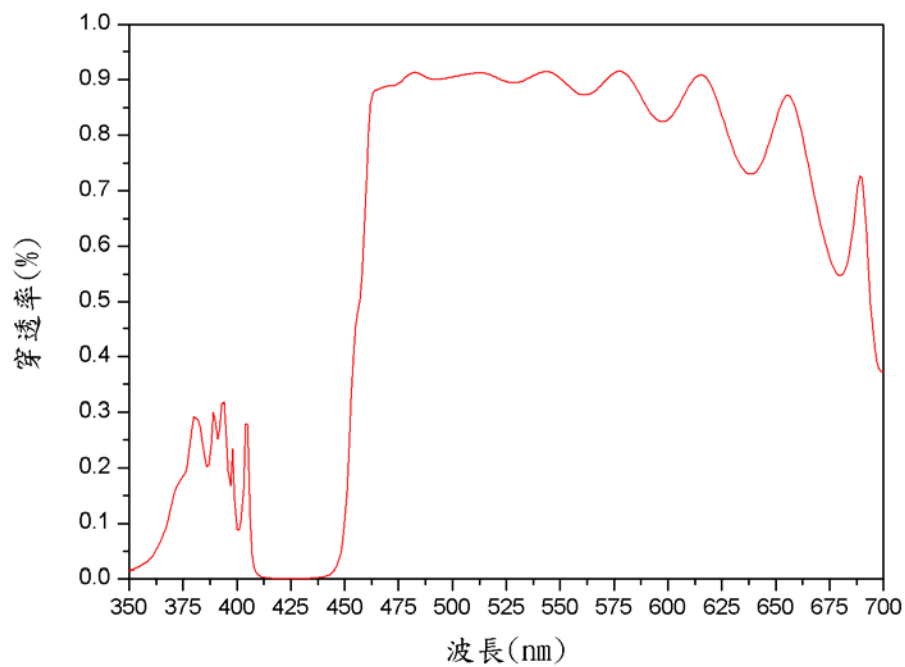


圖 2.9 430 nm 雷射光所搭配的分光鏡(455DCLP)

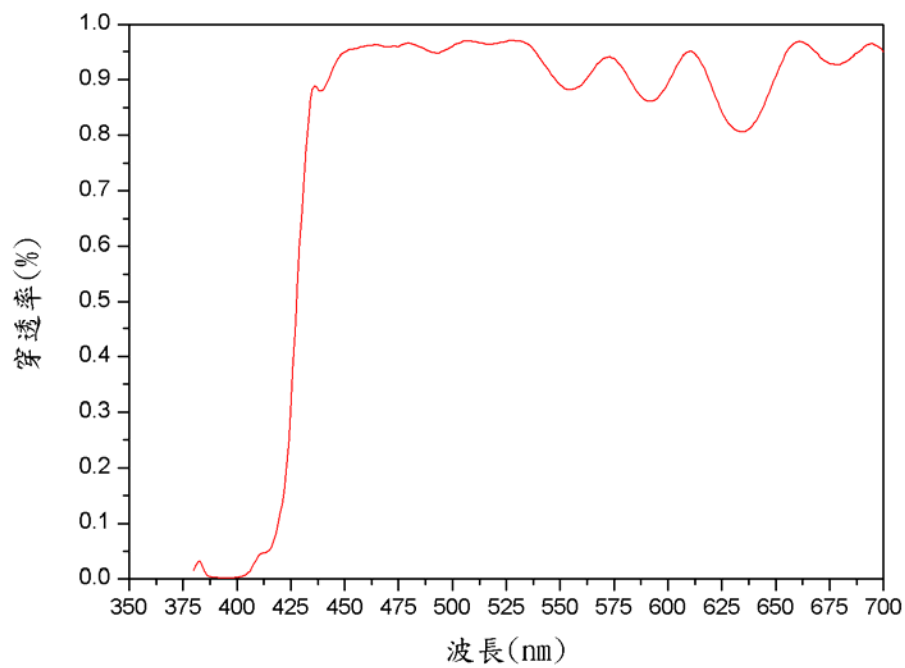


圖 2.10 405 nm 雷射光所搭配的分光鏡(425DCXR)

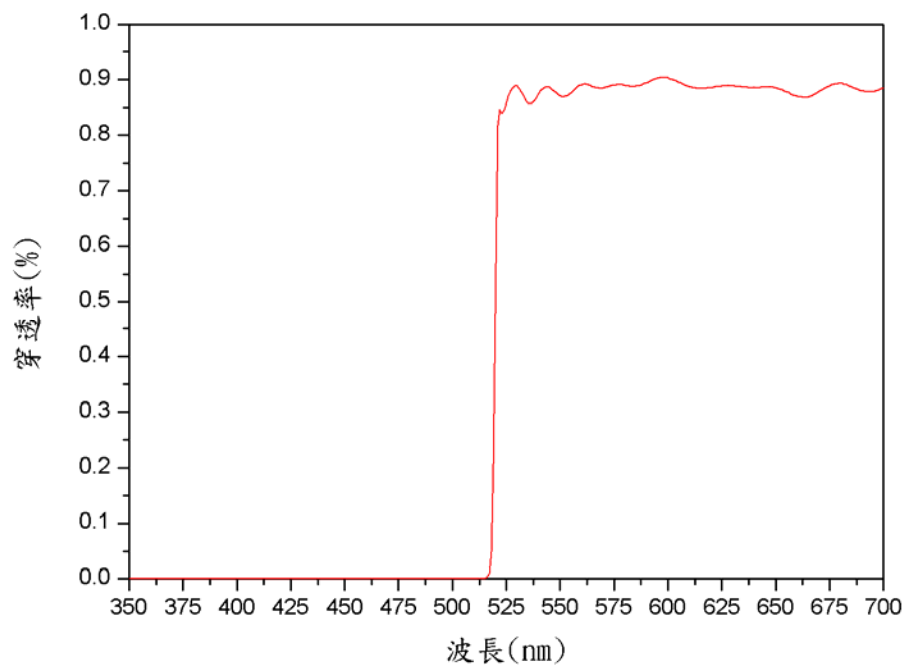


圖 2.11 488 nm 雷射光所搭配的交流光濾鏡(HQ520LP)

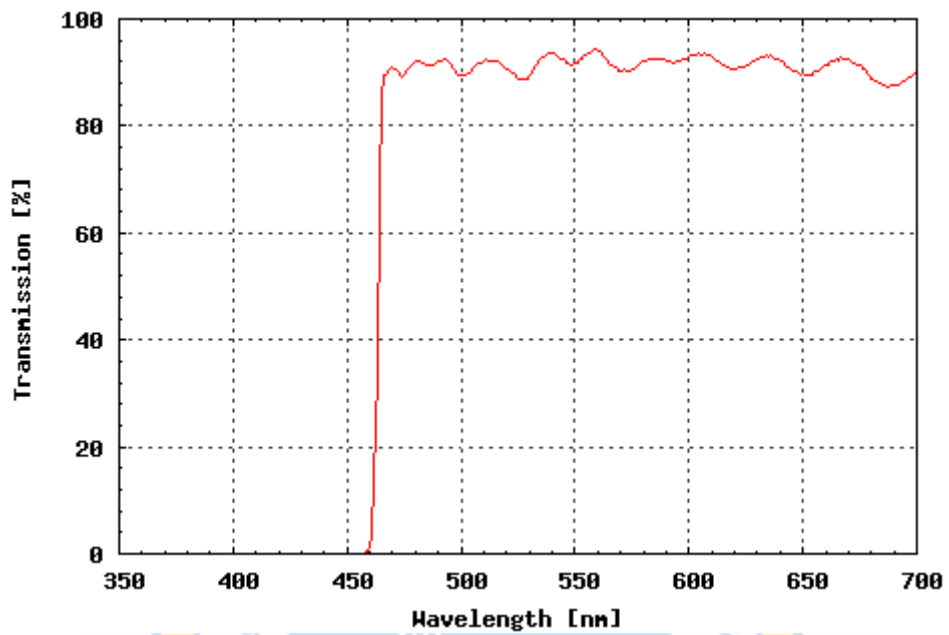


圖 2.12 430 nm 雷射光所搭配的交流光濾鏡(460ALP)[29]

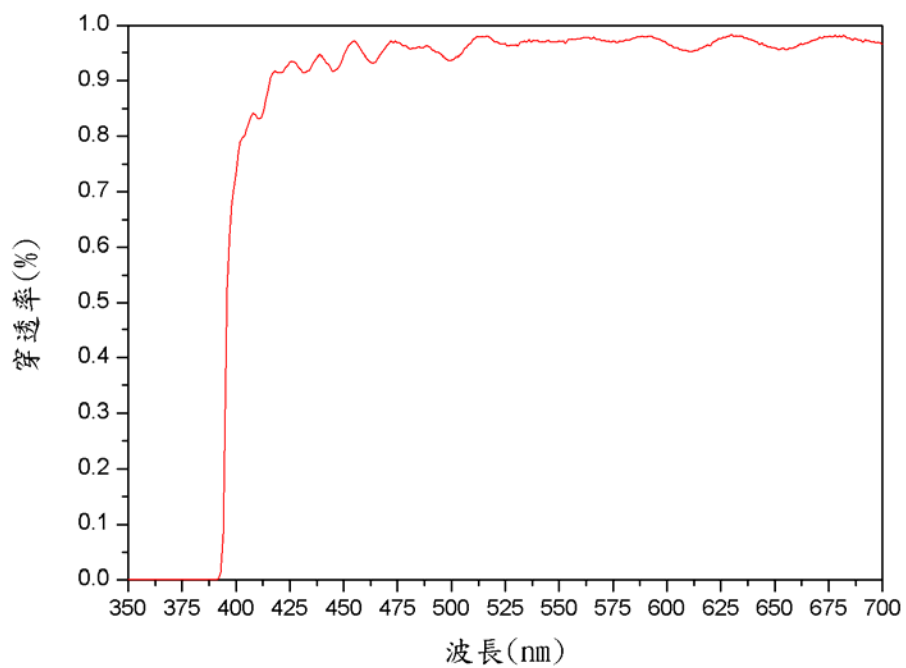


圖 2.13 405 nm 雷射光所搭配的交流光濾鏡(HQ412LP)

2.3 量測系統

我們以電子增益 CCD(EMCCD)擷取白痣珈蟪翅膀的穿透及螢光影像，並以光譜儀量測翅脈的螢光光譜。另外，我們也使用紫外線/可見光光譜儀及螢光光譜儀量測萃取後的蛋白質溶液的吸收及螢光光譜。在此節中，我們將針對我們使用的 EMCCD、光譜儀、紫外線/可見光光譜儀、螢光光譜儀做介紹。

2.3.1 電子增益 CCD

影像擷取系統發展到現在，實驗上已經普遍的使用 CCD 作為紀錄影像的工具之一，為了滿足實驗上所需要的解析度與應用範圍，製作 CCD 的技術持續在進步，以下我們介紹傳統的 CCD 與我們實驗中所用的 EMCCD 的內容。

CCD (Charge Coupled Device, 電荷耦合元件)

CCD (Charge Coupled Device)是近幾年來發展相當快速的影像擷取系統，CCD 基本上是將金屬氧化物半導體 (metal-oxide-semiconductor, MOS)(圖 2.14)串聯形成的整齊線路當做是排列整齊的像素，利用半導體受光照射而產生電荷的原理，並使電荷停留在轉移寄存器後，讀取轉移寄存器上的電荷還原影像(圖 2.15)。

EMCCD (Electron Multiplication CCD, 電子增益 CCD)

CCD 經過各式各樣的改良後已漸趨成熟，其中為了解決讀取速

度增快時，伴隨而來的雜訊，e2v 公司發展了電子增益 CCD(Electron Multiplication CCD，EMCCD)。EMCCD 採用了類似雪崩二極體概念的片載增益(ON-Chip-Multiplication gain)設計，在轉移寄存器後再加裝一連串的增益寄存器，利用增加高電壓於增益寄存器，使光電子移動時可以撞擊出二次電子，增加訊號電子的數目(圖 2.16)，此技術的好處在於直接在 CCD 上增益電子，使訊號電子數目超越雜訊電子後輸出，而不是在電腦上同時增益輸出後的訊號與雜訊，此項設計也使 EMCCD 可以應用在光子計數(photon counting)與極弱低光影像擷取應用。

我們實驗室使用普林斯頓(Princeton Instruments)公司生產的 Cascade 系列的 EMCCD(1K)(圖 2.17)，是一台無需外接冷卻系統就可以達到工作溫度(-30 °C)的 EMCCD，能夠有效的增強實驗中所得到的數據，可偵測的波長範圍從 400nm 到 1100nm，並且在可見光的範圍可達到 40%到 60%的量子效率(圖 2.18)，在同系列的 EMCCD 中為解析度最高的，具有 1004×1002 個像素，且每個像素大小為 8×8μm，其他相關資料如圖 2.19。

2.3.2 光譜儀

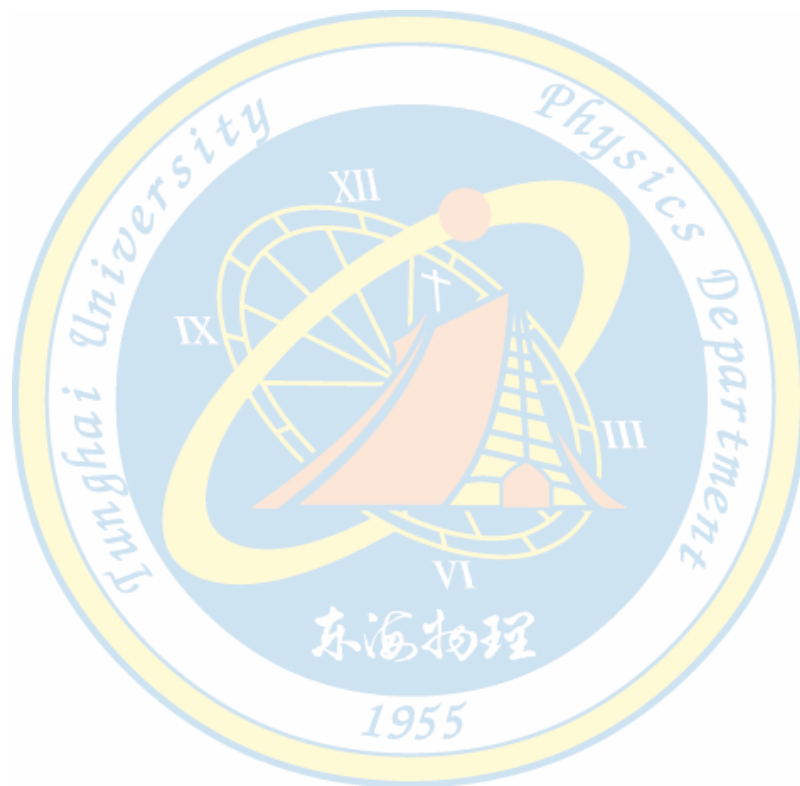
我們實驗室使用的同樣是普林斯頓(Princeton Instruments)公司旗下光譜儀分部 Acton 公司所生產的 SP2150i 型系列中，使用 CCD 紀錄光譜的 SP2156 型光譜儀(圖 2.20)。再搭配上同公司的 Cascade 系列的 EMCCD(1K)，因為像素的寬度(8 μ m)及橫向數量(1004 個)的關係，在量測光譜時能夠一次取得一定範圍(320 nm)的光譜。另外，因為內部的光柵載台使用的是雙面式的設計(圖 2.21)，我們在光柵載台上裝設了一光柵(800nm blaze)與一反射鏡(mirror)，使我們能迅速的切換光譜與影像畫面。其中，我們量測光譜所使用的是溝槽(groove)密度為 150g/mm，閃耀波長為 800 nm 的反射式閃耀光柵(blaze grating)，圖 2.22 為該光柵的效率曲線，其主要適用在紅光到紅外波段(500 nm-1200 nm)，在 500 nm 以下效率劇烈減小。

2.3.3 紫外線/可見光光譜儀(Ultraviolet-Visible Spectrophotometer)

除了在實驗室中用雷射激發取得螢光光譜及影像之外，我們也前往台大借用儀器做翅膀蛋白質的吸收光譜，這是一台應用在芳香族及共軛結構的有機化合物和無機錯離子的定性或定量分析儀器，型號為 GBC Cintra 202，儀器規格具有穿透式及反射式，波長範圍 190 nm ~ 1100 nm，我們使用該儀器做穿透式的蛋白質吸收光譜的量測。

2.3.4 螢光光譜儀(spectrofluorometer)

除了做蛋白質的吸收光譜之外，我們同樣在台大做蛋白質的螢光光譜，我們使用的是 Jobin Yvon 公司所生產的 FL3-21 型螢光光譜儀，這種螢光光譜儀在激發光與接收光的地方皆有光柵做分光，因此可以用來做光激螢光光譜及光激螢光激發光譜的實驗。



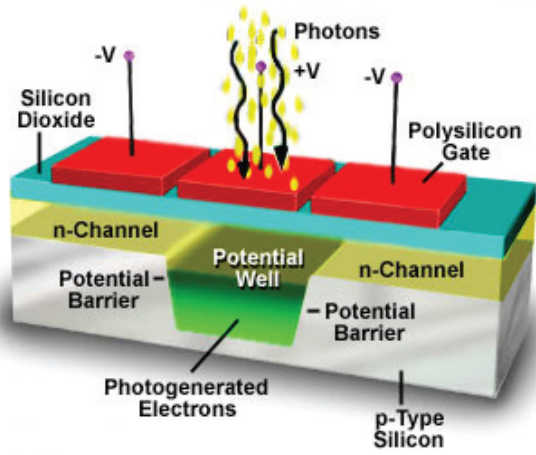


圖 2.14 CCD 上一個像素的結構圖[30]

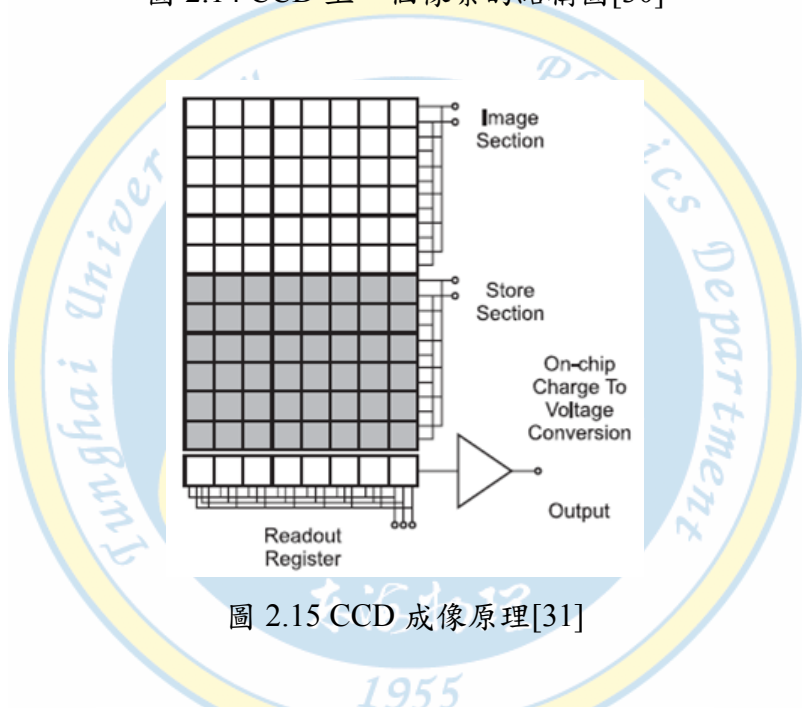


圖 2.15 CCD 成像原理[31]

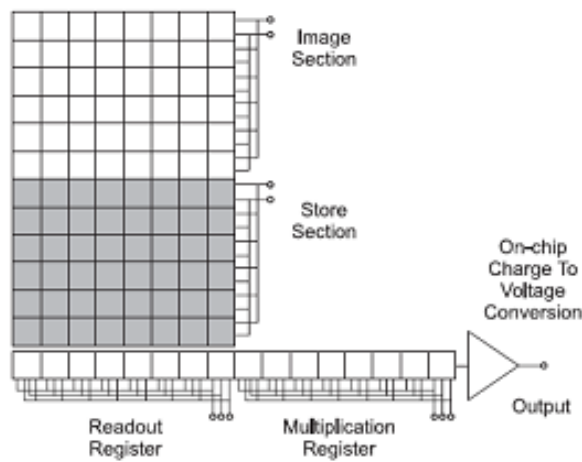


圖 2.16 EMCCD 成像原理[31]



圖 2.17 EMCCD (Cascade 1K) [28]

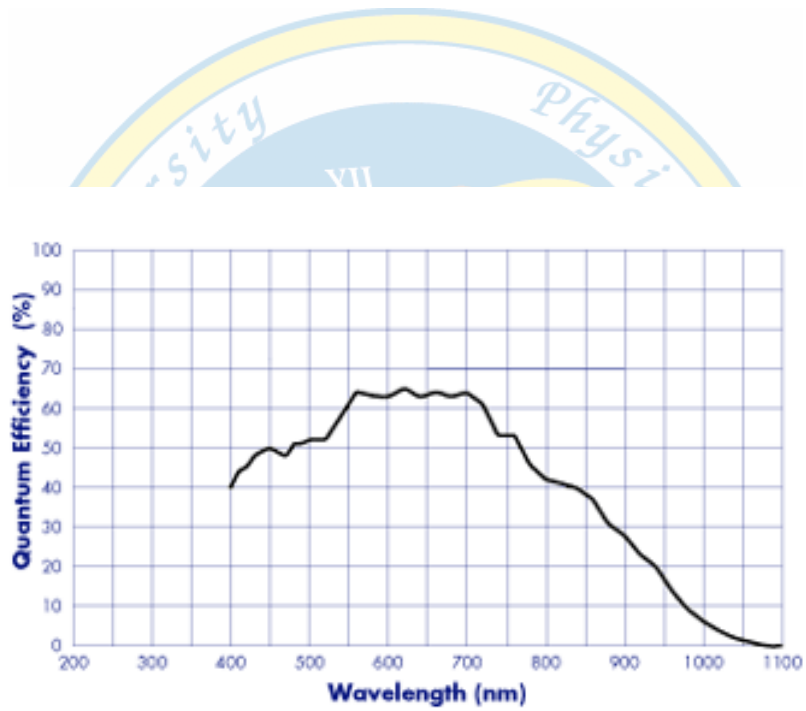


圖 2.18 EMCCD (Cascade 1K) 量子效率圖[28]

機型	Cascade 1K	Cascade 128+	Cascade 128	Cascade 512B	Cascade 512F	Cascade 650
On-Chip Multiplication Gain	V	V	V	V	V	V
	min. gain 200x	1000X (4096 step)	1000X (4096 step)	1000X (4096 step)	1000X (4096 step)	min. gain 200x
Frame Transfer	V	V	V	V	V	V
Sensor	TC285	e2v CCD60	e2v CCD60	e2v CCD97	e2v CCD87	TC253
CCD Chip	Front-illuminated	Back-illuminated	Back-illuminated	Back-illuminated	Front-illuminated	Front-illuminated
CCD format	1004 x 1002	128 x 128	128 x 128	512 x 512	512 x 512	653 x 492
Linear full well	30,000 e ⁻	750 K e ⁻	750 K e ⁻	800 K e ⁻	800 K e ⁻	27,000 e ⁻
Pixel size	8 x 8 μm	24 x 24 μm	24 x 24 μm	16 x 16 μm	16 x 16 μm	7.4 x 7.4 μm
Imaging area	8 x 8 mm	3.072 x 3.072 mm	3.072 x 3.072 mm	8.2 x 8.2 mm	8.2 x 8.2 mm	4.9 x 3.7 mm
Digitizer	16 bits @ 10 Hz	16 bits @ 12 Hz	16 bits @ 10 Hz	16 bits @ 10 Hz, 5 MHz, 1 MHz.	16 bits @ 10 Hz, 5 MHz, 1 MHz.	16 bits @ 10 Hz, 5 MHz,
Readout noise (on-chip)	< 1 e ⁻ rms	< 1 e ⁻ rms	< 1 e ⁻ rms	< 1 e ⁻ rms	< 1 e ⁻ rms	< 1 e ⁻ rms
Readout noise	< 15 e ⁻ rms @ 10 MHz	< 65 e ⁻ rms @ 12 MHz	< 60 e ⁻ rms @ 10 MHz	< 60 e ⁻ rms @ 10 MHz	< 60 e ⁻ rms @ 10 MHz	25 e ⁻ rms @ 10, 5 MHz
Frame readout	110 ms/frame, 1 ms	83 nsec / row	100 nsec / row	2 μsec / row	2 μsec / row	36.2 ms/frame, 210 ms
Binning	1 - 4 binning	1 - 4 binning	1 - 4 binning	1 - 4 binning	1 - 4 binning	1 - 4 binning
Max. frame rate	103 fps	4149 fps	3226 fps	329 fps	329 fps	555 fps
CCD Temperature	- 30°C	- 30°C	- 5°C	- 30°C	- 30°C	- 25 - 35°C
Dark current	0.5 e ⁻ /p/s @ - 30°C	< 1 e ⁻ /p/s @ - 30°C	11 e ⁻ /p/s @ -5°C	1.0 e ⁻ /p/s @ - 30°C	1.0 e ⁻ /p/s @ - 30°C	1 e ⁻ /p/s @ -35°C
C-Mount	V	V	V	V	V	V
PCI interface	V	V	V	V	V	V
PVCAM	V	V	V	V	V	V
Software	V	V	V	V	V	V

圖 2.19 EMCCD (Cascade 系列) 規格資料圖[28]



圖 2.20 光譜儀 Acton SP2156 系列[32]

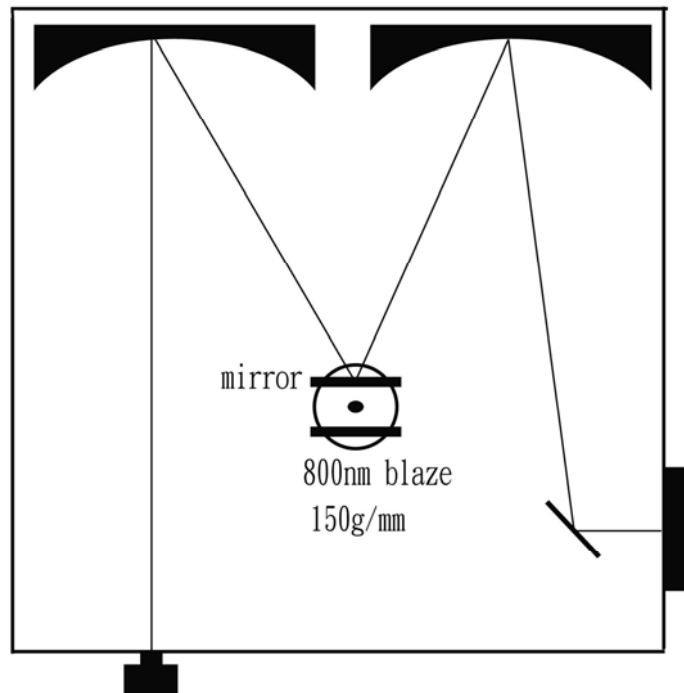
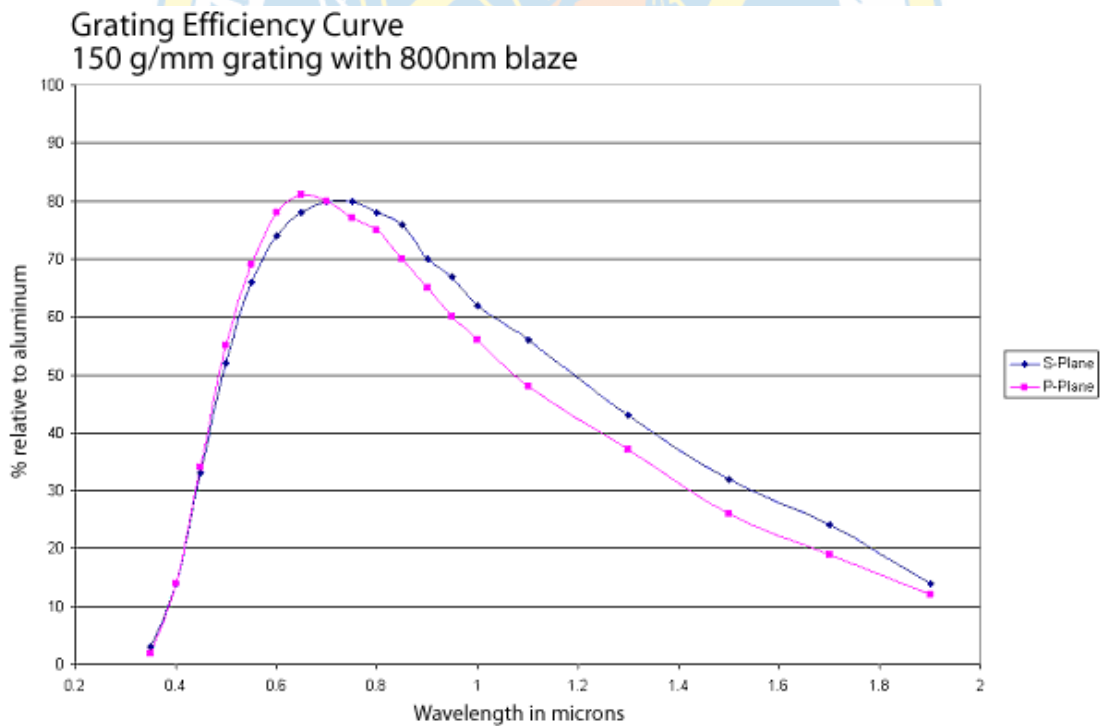


圖 2.21 光譜線路示意圖



Note: Efficiency curves shown are relative (not absolute), are only representative, and can vary significantly depending on use, geometry, and measurement technique. Two masters with the same catalog number may have different efficiency curves. The uncertainty band on the data in the above relative efficiency curve is +/- three percentage points. Maximum Ruled Area is expressed as L x W, where L is the length of the grooves and W is the ruled width.

© 2007 Newport Corporation. Used by permission. All rights reserved.

圖 2.22 800 nm 閃耀光柵效率圖[28]

第三章 樣品備製與實驗量測

在本研究中，我們首先以倒立式顯微鏡及 EMCCD 檢視白痣珈螳翅膀的穿透影像及螢光影像，並使用光譜儀量測螢光部位的在不同波長的激發光激發下的螢光光譜。另外，為找出翅膀上螢光物質的最佳吸收光波長，我們更進一步嘗試使用蛋白質萃取技術提取蛋白質，並對提取出來的蛋白質溶液樣品做吸收光譜、螢光光譜及螢光激發光譜測量。本章將詳述我們如何備製樣品及進行上述的各種量測。

3.1 樣品的備製

在本實驗中使用了乾燥的白痣珈螳翅膀以及利用蛋白質萃取技術萃取整片翅膀的蛋白質作為樣品。以下介紹實驗中用到的翅膀樣品以及我們所用的蛋白質萃取方法。

3.1.1 翅膀樣品

本研究中使用東海大學林仲平老師實驗室所提供的白痣珈螳翅膀，在檢測之前已對樣品做乾燥的處理，避免樣品發霉以維持樣品的完整性。而在此研究中我們選擇的樣品是雄白痣珈螳翅膀，因其翅脈產生螢光的現象較為明顯，有利於我們做進一步的測量。

3.1.2 蛋白質萃取

在此研究中，除了直接以光譜儀量測光譜外，我們也嘗試將翅膀上的蛋白質提取出來，以量測蛋白質溶液的吸收及螢光光譜，以下詳

述蛋白質萃取過程的步驟及所使用到各項化學藥品的成分及作用。

步驟

1. 取兩片豆娘翅膀磨成粉狀以破壞組織。
2. 加入 250 μ l 裂解緩衝液(lysis buffer)使細胞破裂溶解，釋出蛋白質。
3. 加入 3.5 μ l 蛋白酶抑制劑(proteinase inhibitor)，目的使蛋白質穩定。
4. 先以 6000rpm 轉速轉 10 分鐘後取第一次上清液。
5. 再將第一次的上清液以 12000rpm 轉速轉 20 分鐘取第二次上清液做為樣品的實驗組。
6. 取相同的裂解緩衝液做為對照組。

裂解緩衝液(Lysis buffer)藥品成分

裂解緩衝液的作用為分解蛋白質，根據樣品的種類需調配不同的緩衝液，我們使用的緩衝液配方為：

1. Tris-base (Tris)：緩衝液

分子式： $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$

作用：穩定 pH 值(控制在 pH8.0 利於 DNA 溶解)

重量：0.304g

2. Sucrose：蔗糖

作用：利用滲透壓破壞細胞膜

重量：8.556g

3. EDTA：螯合劑(抑制劑)

作用：萃取過程中抑制 DNase 的活性以達到保護 DNA 的目的，且待測物中含有過多的離子時，可用 EDTA 去螯合其他的金屬離子

重量：0.7445g

4. Salt：鹽

作用：使結合於 DNA 上的蛋白質完全脫離 DNA，使蛋白質不受 DNA 影響

重量：0.4g

5. RDW：二次水

體積：100ml

3.2 巨觀影像量測

首先我們對豆娘翅膀做巨觀上的量測，我們分別觀察了白光的穿透及雷射激發下的螢光影像。

3.2.1 白光影像

在 OLYMPUS 的 100W 鹵素燈具(U-LH100L-3)的操作上，我們分別使用燈源強度較小的偏橘紅色光與燈源強度較大的偏白色光(圖 2.5) 在 4X 的物鏡下做穿透影像的擷取，並利用光圈與 Filter 控制照

射在樣品上的光強度，在放樣品前用 CCD 測光照強度並控制在八千單位強度，使兩者照射光強度相近，再利用光譜儀上的狹縫控制光譜儀上的偵測光強度在五千單位光強度左右，紀錄兩者在峰值強度相近時的光譜比較圖(圖 2.5)。而在樣品的放置上，由於乾燥後的白痣珈蟥翅膀有一定的支撐力，因此我們選擇用最不影響樣品的半懸空不加玻片的方式進行實驗，並利用 EMCCD 擷取約一百八十張的 4X 穿透影像後，再用 Photoshop 軟體將影像接合成全景圖。

3.2.2 螢光影像

在擷取螢光影像方面，我們使用波長 405 nm 的藍紫光雷射模組搭配擴束器，且在雷射光進入顯微鏡前加裝一片透鏡，使雷射光在物鏡的後焦點(back focal point)附近聚焦以呈 wide-field 方式激發樣品(圖 3.1)，並做以下的影像擷取。

局域影像

在顯微鏡的使用上，我們取螢光影像與穿透影像作對比，用 4X 的倍率觀察不同位置翅脈的結構，以及 4X、10X、40X 的倍率觀察相同處的影像以觀察螢光物質在翅脈上的分佈情形。

全景圖

利用 EMCCD 拍攝約兩百張 4X 物鏡的局域螢光影像後，同樣再用 Photoshop 軟體將影像結合成全景圖，以觀察螢光物質在翅膀上的

分佈情形。

翅脈橫切面影像

除了在局域影像中觀察螢光物質在翅膀及翅脈上的分佈外，我們選擇切翅脈截面的方式觀察翅脈內的螢光物質，以翅脈為參考物將翅膀橫切後用玻片夾住使其直立，再用 488 nm 波長的雷射激發，取得翅脈的截面螢光影像，以從側面觀察螢光物質在翅脈內的分佈情形。

3.3 螢光光譜

為了得到完整的螢光光譜，我們在本實驗中使用了數種量測光譜的方式，以下介紹本實驗中蛋白質萃取前後所量測的光譜種類及原理說明。

3.3.1 直接光譜量測

為了要知道螢光物質在雷射激發下的螢光波長，在本實驗中使用了 405 nm、430 nm、488 nm 三種波長的雷射光激發樣品。我們以 Princeton Instruments 公司的軟體(Win Spec)操作光譜儀與 EMCCD，先將光柵載台旋轉至鏡子的部份，並將光譜儀的開口狹縫開到最大。用 EMCCD 找到要量測光譜的影像位置後調整樣品的位置，使要量測的翅脈置中，然後將光譜儀的狹縫關小，再將光柵載台旋轉至光柵的部份，利用光譜儀分光後，用 EMCCD 量測不同雷射所激發的螢光光譜。

3.3.2 蛋白質光譜

當我們使用雷射激發卻得到不完整的螢光光譜後，我們試著提取翅膀的蛋白質成為液態樣品後並前往台大做實驗，針對這份樣品做光譜分析，包括吸收光譜、螢光光譜(PL)和螢光激發光譜(PLE)。在前往台大之前，我們將蛋白質萃取之後將樣品保存在 -80°C 的冰箱，並留存一份裂解緩衝液做為對照組。在前往台大的路上，我們以液態氮保存蛋白質樣品，並以冰塊保存裂解緩衝液，保存時間約四個小時。實驗過程中分別對對照組與樣品取數據，將樣品數據扣除掉對照組的影響後即為下一章的實驗數據。以下為光譜原理說明。

吸收光譜

在做螢光光譜前，我們需要先測量該樣品對光的吸收度，以便知道哪一個波長容易被吸收而激發樣品。為了減少激發光的散射，通常吸收光譜都在溶液的狀態下進行測量，因此包括後續的螢光光譜實驗也需用相同的蛋白質溶液樣品進行。首先，一個連續光源經過光柵分成不同波長的光後，根據各個波長的光經過樣品後的強度變化情形，可以得到對應各個波長的吸收光譜，圖 3.1 為吸收光譜量測示意圖。

螢光光譜(photoluminescence, PL)

當取完吸收光譜的資料後，再利用固定波長的光(選擇吸收光譜的相對極大值位置)激發樣品，檢查此激發光所激發出來的螢光光譜(圖

3.2)，稱為螢光光譜。此目的在於檢查當使用最容易被樣品吸收的光做激發時，所產生的螢光光譜。首先，一個連續光源經過光柵分成不同波長的光後，我們選取在吸收光譜中所出現的較明顯波峰的波長來激發樣品，並從側面量測螢光光譜。側面加裝光柵進行分光，避免量測螢光光譜時接收到激發光的散射光。

螢光激發光譜(photoluminescence excitation, PLE)

當取完螢光光譜後，鎖定螢光光譜的極大值位置，同樣使用螢光光譜儀做實驗(圖 3.2)，但這次我們利用連續光源分光後的不同波長激發樣品，檢查會發出該鎖定螢光的螢光分子所吸收的激發光波長大小，稱為螢光激發光譜。由於分子吸收了光，可能轉成熱量或者螢光，因此我們要檢查最佳吸收波長與最大螢光波長是否一致，因此 PLE 可以用以了解某特定波長的螢光所對應激發光波長為何。

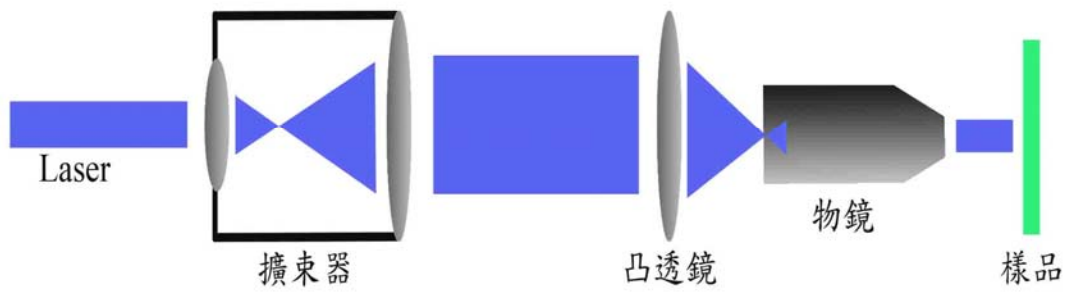


圖 3.1 wide-field 激發示意圖

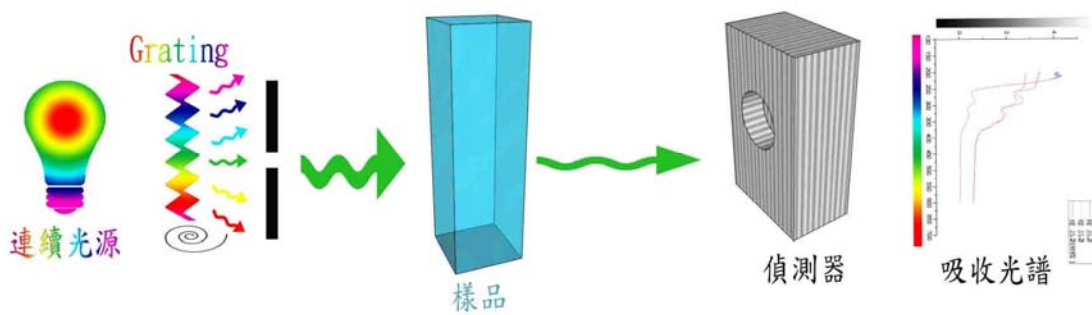


圖 3.2 吸收光譜示意圖

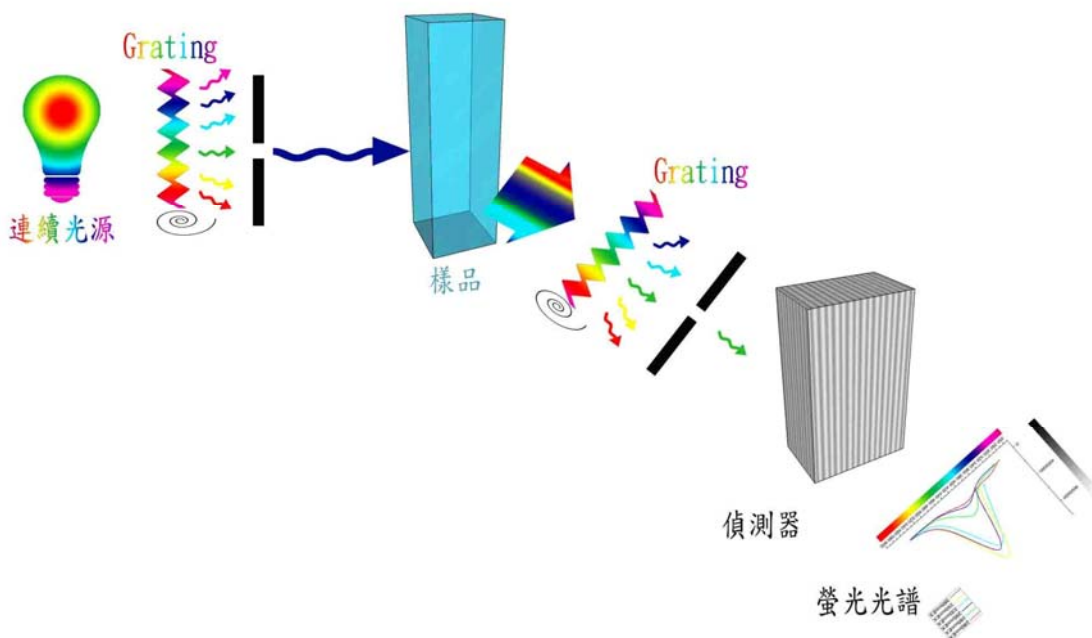


圖 3.3 螢光光譜示意圖

第四章 實驗結果與討論

為了研究白痣珈璉翅脈上未知的螢光物質的特性及其成分，我們首先從巨觀的影像上做觀察，以了解螢光物質在翅膀上分布的情況，希望能從其分布的情況推測螢光物質在翅膀上所扮演的腳色，並從其功能上推論其有可能的成分。另外，我們也試著量測螢光物質的光譜，以了解其吸收光譜及螢光光譜的分布情況，並根據其光譜的分布從文獻中找出其可能的成分。在此章中，我們將從影像與光譜兩部份顯示我們的實驗結果，並做分析以解釋我們所觀察到的現象。

4.1 全景圖

首先我們使用影像軟體將 EMCCD 自顯微鏡下所擷取的局部影像組合成全景圖，先初步對翅膀整體的外觀特性做觀察並了解螢光物質在翅膀上分布狀況，以作為推測螢光物質在翅膀中所扮演的角色的依據，目的是為了使影像還原成最初拿到樣品時的觀測狀態，試圖用從大再到小的觀測方式分析我們的研究報告。

4.1.1 穿透影像

我們使用 OLYMPUS 的白光光源照射翅膀樣品做穿透影像的量測。根據圖 2.5 的光譜我們可以知道此光源在低強度和高強度的光譜比例不同，低強度的光譜所佔紅光的比例較多，高強度光譜的比例比較趨向平均的白色光。我們分別使用燈源強度較小的偏橘紅色光與燈

源強度較大的偏白色光(圖 2.5)做光源的穿透影像全景圖(圖 4.1)，其中在放樣品之前先用 EMCCD 測光照強度，並以光圈控制在八千單位光強度後，將之後擷取的每一張影像顯色範圍固定在 1900 到 3100 單位光強度，再利用影像軟體將每一張影像結合成全景圖(圖 4.1)。由圖 4.1-a、圖 4.1-b 可明顯的比較出紅光對翅膀的穿透率較好，在相同的光強度照射之下，偏橘紅色光的穿透能力較偏白色光強，也因此我們可以看到翅膀的反射光是藍色的，但對著陽光時的穿透光是橘紅色的。並且在我們將整片翅膀用吸收光譜儀做直接透光譜的實驗中，可以得到翅膀的確對長波長的光有較高的穿透率(圖 4.2)。

4.1.2 螢光影像

我們使用波長 405 nm 的雷射激發樣品，拍攝結合成螢光全景圖(圖 4.3)。由圖 4.3 可看得出來翅脈上螢光的分布主要以翅基週圍最密，而越靠近邊緣部份的螢光越稀少，強度也越弱。另外，在下一小節中我們將選取圖 4.3 中螢光分布較不相同的三個區域(A、B、C)做局域螢光與穿透影像的觀察。



圖 4.1 使用白光燈源所拍攝的穿透影像全景圖(4X 物鏡)：a. 偏橘紅色光，b. 偏白色光

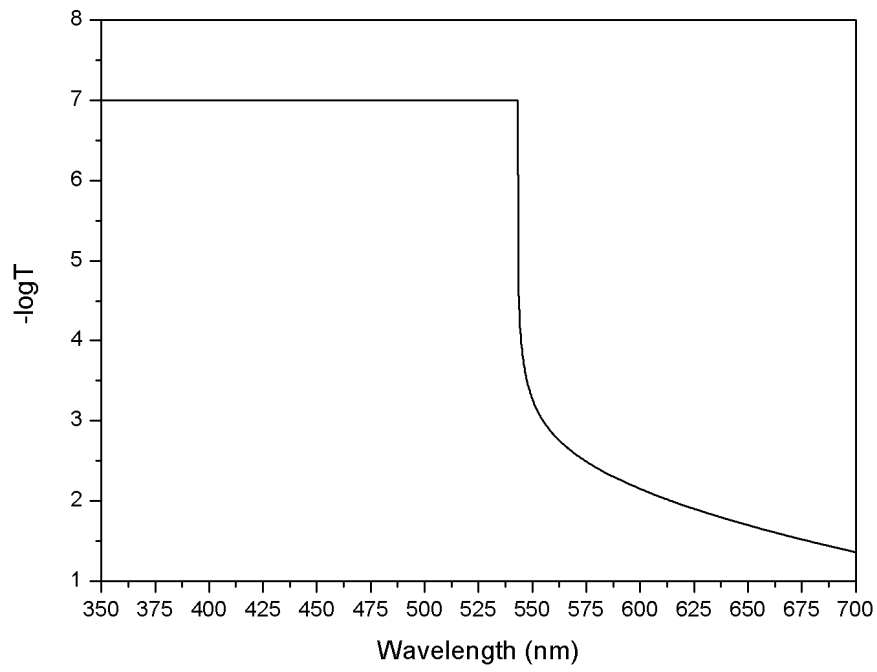


圖 4.2 翅膀透光譜，其中 T 為穿透率



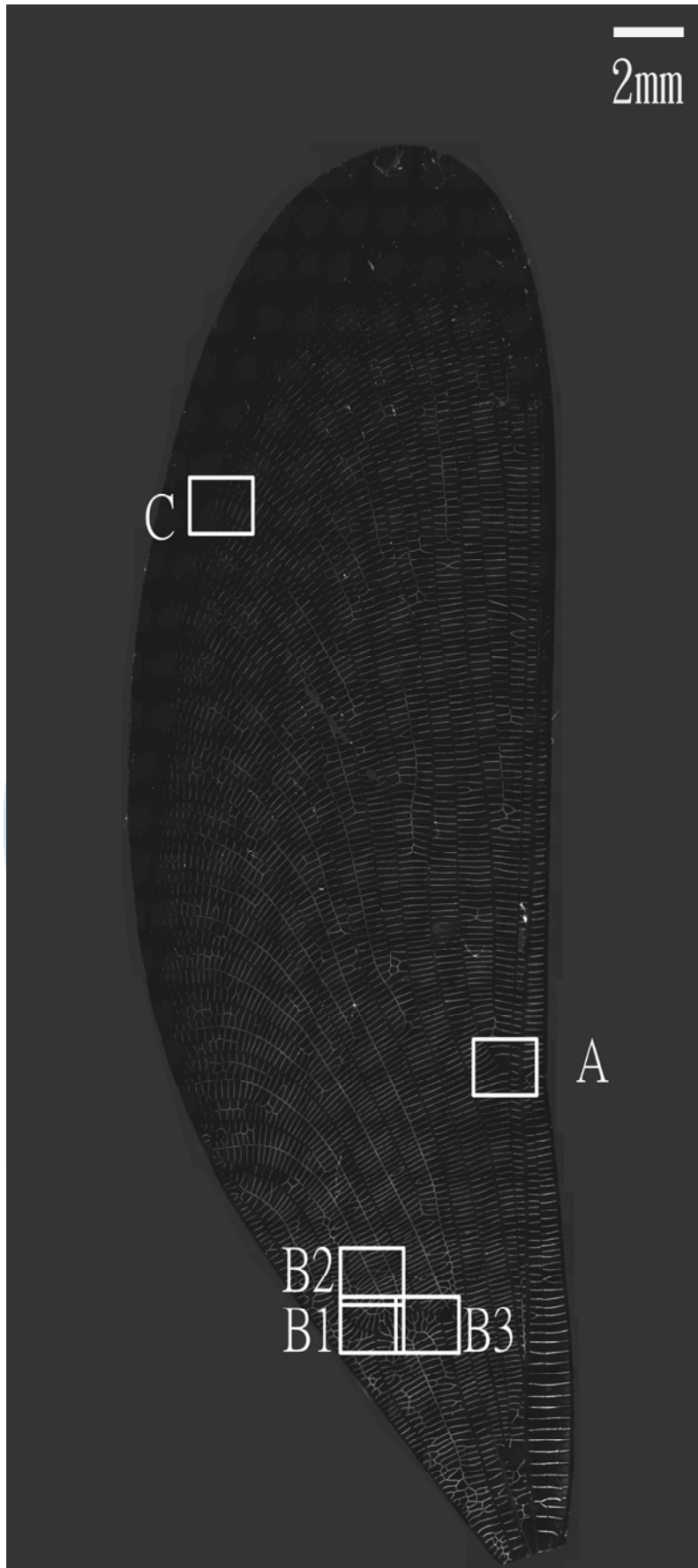


圖 4.3 以 405 nm 雷射光激發樣品的螢光影像全景圖(4X 物鏡)

4.2 局域影像

我們分別在翅膀表面三個不同的區域下取放大的局域螢光影像，藉以觀察螢光物質在翅膀上不同的部位分布的情況。另外，從上面的觀察，我們已經知道螢光物質主要分布於翅脈。因此，我們更進一步將翅脈做橫切面擷取螢光影像，以了解螢光物質在翅脈上的分布情況。

4.2.1 翅膀表面上的局域影像

我們在翅膀的螢光全景圖(圖 4.3)中，選取了三個區域(A、B、C)做局域穿透及螢光影像的觀察，我們分別在白光穿透與雷射激發下取 A 處(前緣節，nodus)的局域圖(圖 4.4)，在圖 4.4 中的螢光影像(左)與穿透影像(右)的對照下，我們可以很容易的區別有螢光的翅脈(橫)與無螢光(直)的翅脈，並且似乎是有方向性的排列方式。另外在 B1 處的局域圖(圖 4.5)，有另一種排列方式，在圖 4.5 中同樣可以很明顯的區分有無螢光的翅脈的差別，但在 B1 處上方的 B2(圖 4.6)以及 B1 處右方的 B3(圖 4.7)的翅脈都是有螢光的，因此我們知道螢光物質在翅脈的分佈一定具有某種原因，才會造成不同區域有不同的分佈情形。

另外我們分別用 4X、10X、40X 的目鏡觀察 C 處的局域圖 (圖 4.8、圖 4.9、圖 4.10)，目的是觀察螢光物質在翅脈上的分布情形，在圖 4.8 中可以看到越靠近邊緣的翅脈，其螢光物質越少。而當我們將

其放大 10X(圖 4.9)甚至 40X(圖 4.10)的時候，可以看到螢光物質的分布情形完全是在翅脈上的，且越靠近翅膀邊緣的翅脈，其螢光分布越少。另外從圖 4.10 來看，螢光影像(左)中被激發的區域在穿透影像(右)中顯示有部份的光會穿透，因此可知翅脈內部的構造有所不同。

4.2.2 翅脈橫切面的影像

從以上的觀測可以知道螢光物質在翅脈表面上的分佈是很全面的，之後我們想更進一步了解螢光物質在翅脈上分布的情況，於是我們選擇切截面的方式觀察螢光物質在翅脈內部的分佈情形，這裡我們用 488 nm 波長的雷射激發，分別擷取兩處有螢光物質的翅脈的截面螢光影像(圖 4.11)。可以看的出來翅脈是成兩個半圓形分布在翅脈的周圍，而不是整根翅脈上都有螢光物質。

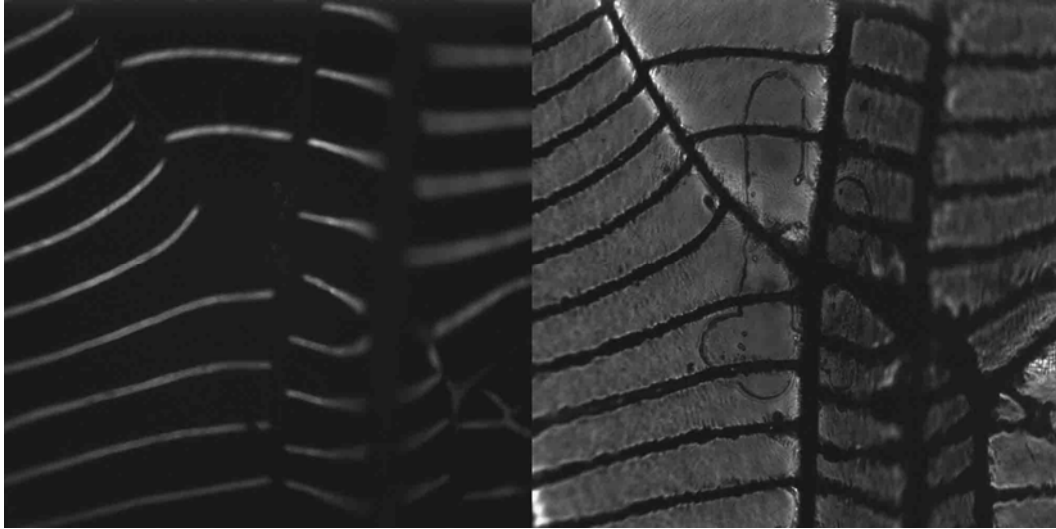


圖 4.4 圖 4.1 右方 A 區局域圖 (4X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

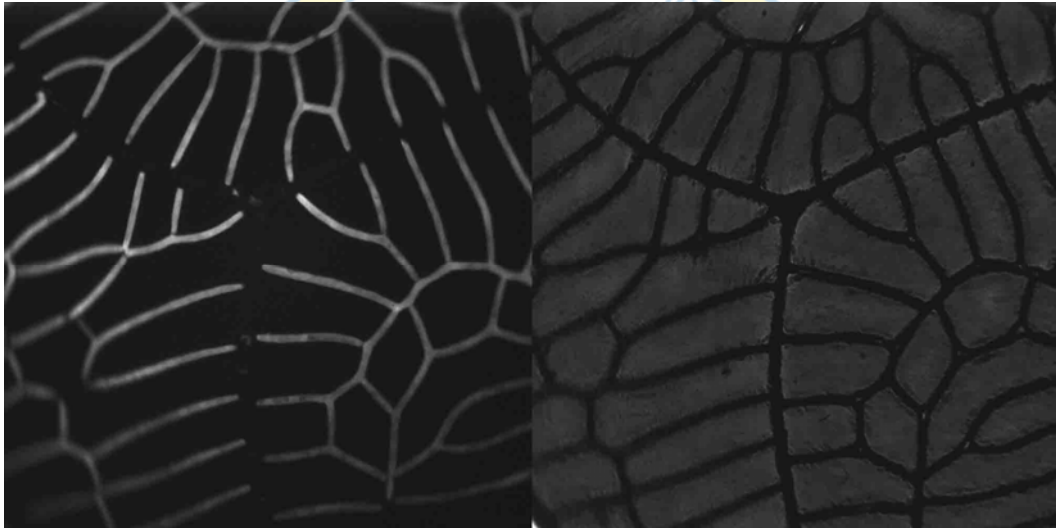


圖 4.5 圖 4.1 左下 B1 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像



圖 4.6 圖 4.1 左下 B2 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

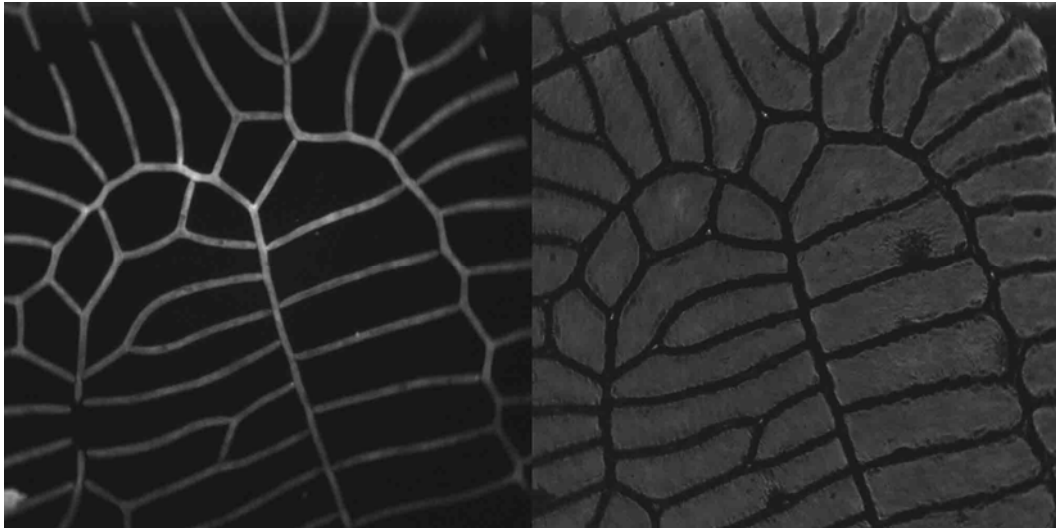


圖 4.7 圖 4.1 左下 B3 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

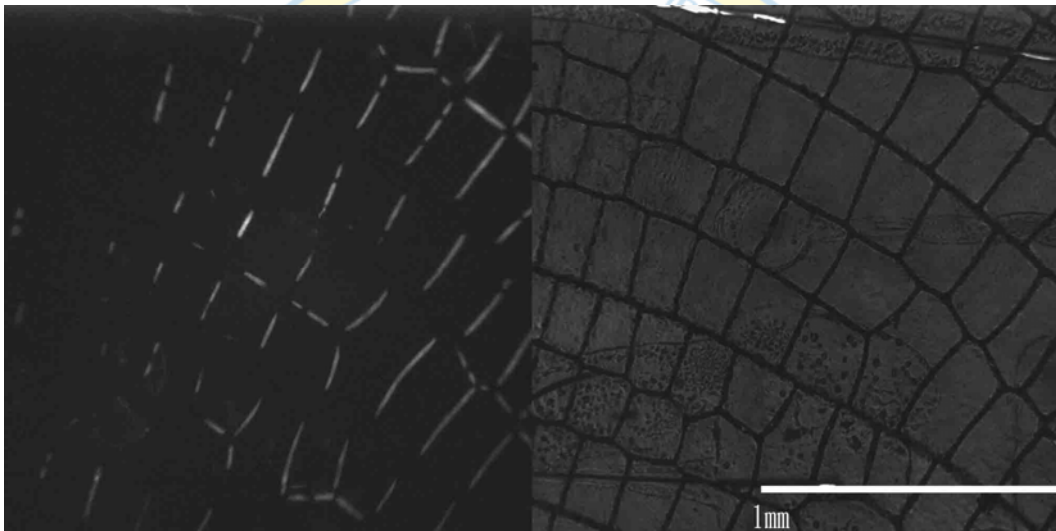


圖 4.8 圖 4.1 左上 C 區局域圖(4X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

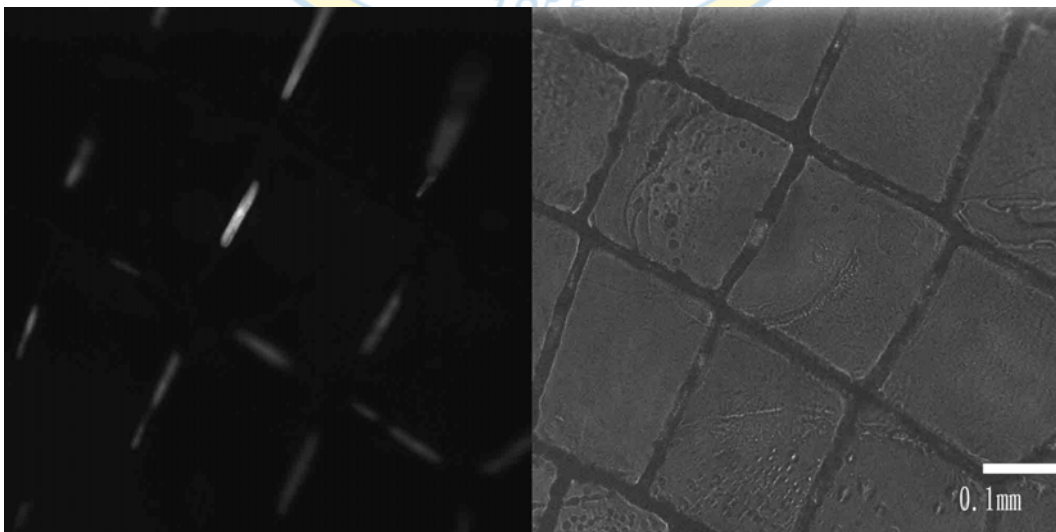


圖 4.9 圖 4.1 左上 C 區局域圖(10X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

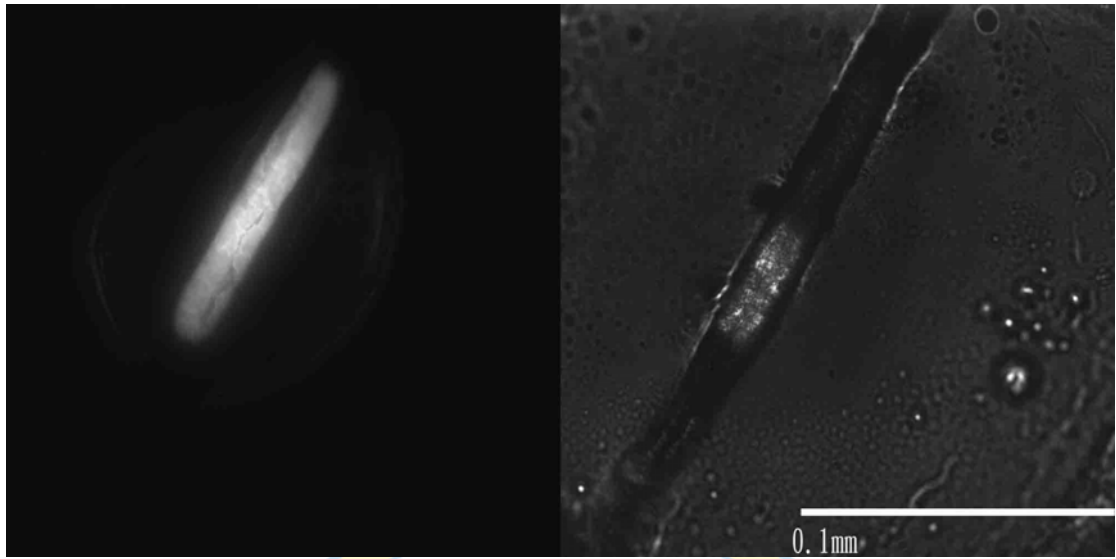


圖 4.10 圖 4.1 左上 C 區局域圖(40X 物鏡):左為螢光影像，右為穿透影像

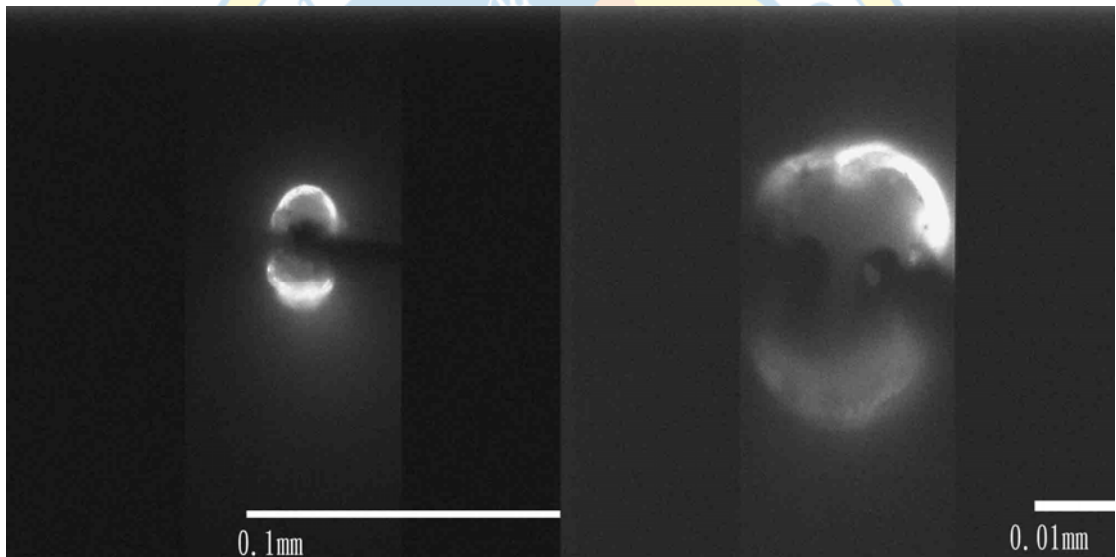


圖 4.11 488 nm 雷射激發兩處翅脈橫切面:左為 40X，右為 100X

4.3 直接光譜量測

由於目前尚不了解這種螢光物質的最佳吸收波長及螢光波長範圍，因此我們試圖以各種不同的激發波長做激發，以觀察螢光光譜的分布狀況。使用實驗室中現有的雷射光，分別用不同波長的雷射光激發樣品，包括 488 nm、430 nm、405 nm 的雷射光，檢查不同雷射所對應到的螢光波長(圖 4.12)，可以看到當激發光波長越短時，螢光光譜的峰值位置也往短波長方向移動，但是因為峰值左方的螢光強度遞減狀況極大原因為濾波片所造成的(圖 4.13、圖 4.14、圖 4.15)，因此我們無法確定其完整的螢光光譜波長為何。只能從其結果知道螢光光譜的峰值位置應該在更低的波長。雖然在圖 4.15 中我們可以看到光譜在短波長的一端的變化並沒有受到濾波片的影響，但是由於我們使用的光譜儀的光柵的閃耀波長在 800 nm，是比較適用在紅光及紅外光波段的，其反應效率(圖 2-18)會在 500 nm 以下掉下來。因此，以 405 nm 激發所得到的光譜，其短波長部份的遞減，極有可能是光柵的反應效率所造成的結果。此光譜量測的結果告訴我們白痣珈螳翅膀上的螢光物質其吸收波長應該會在 400 nm 以下，其螢光光譜的峰值也大概在 500 nm 以下。為了得到更精確的光譜資訊，我們選擇將樣品的蛋白質取出，以便使用螢光光譜分析技術尋找最佳的激發光與螢光波長，使將來能夠用適當的雷射光激發翅脈得到直接的螢光光譜。

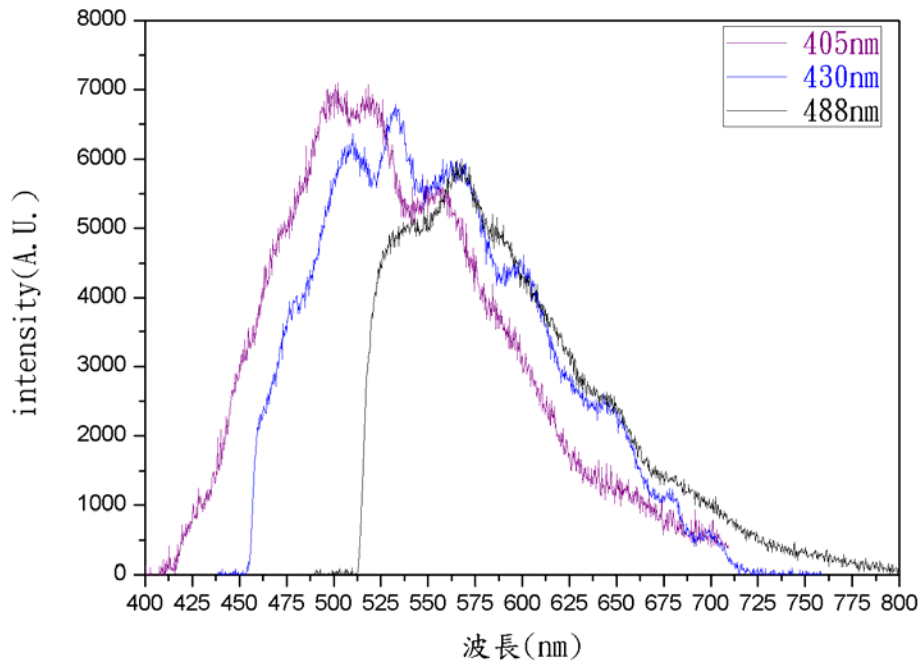


圖 4.12 以不同波長雷射激發的螢光光譜

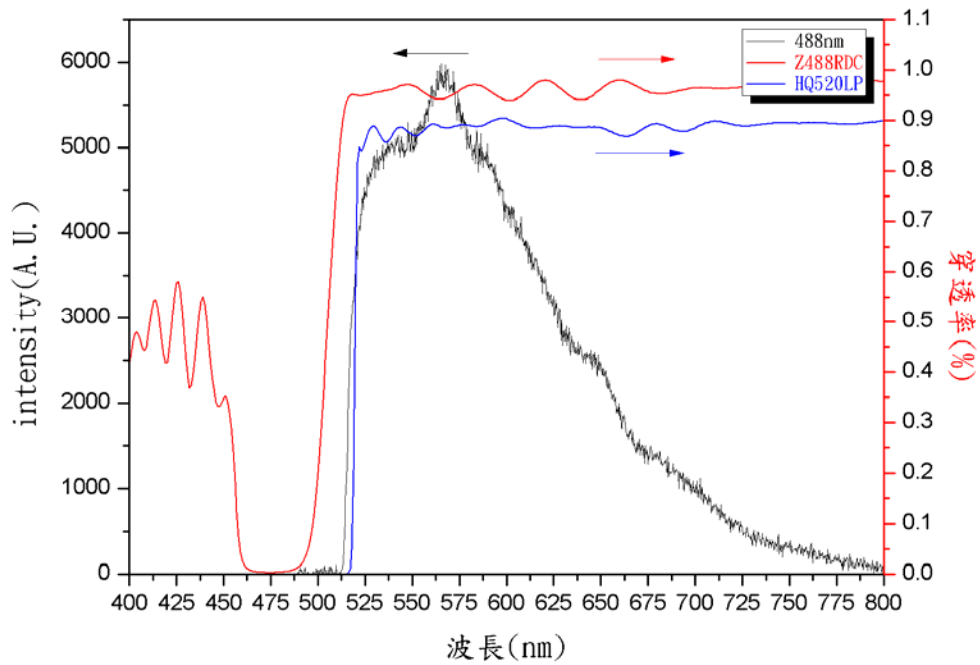


圖 4.13 488 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜

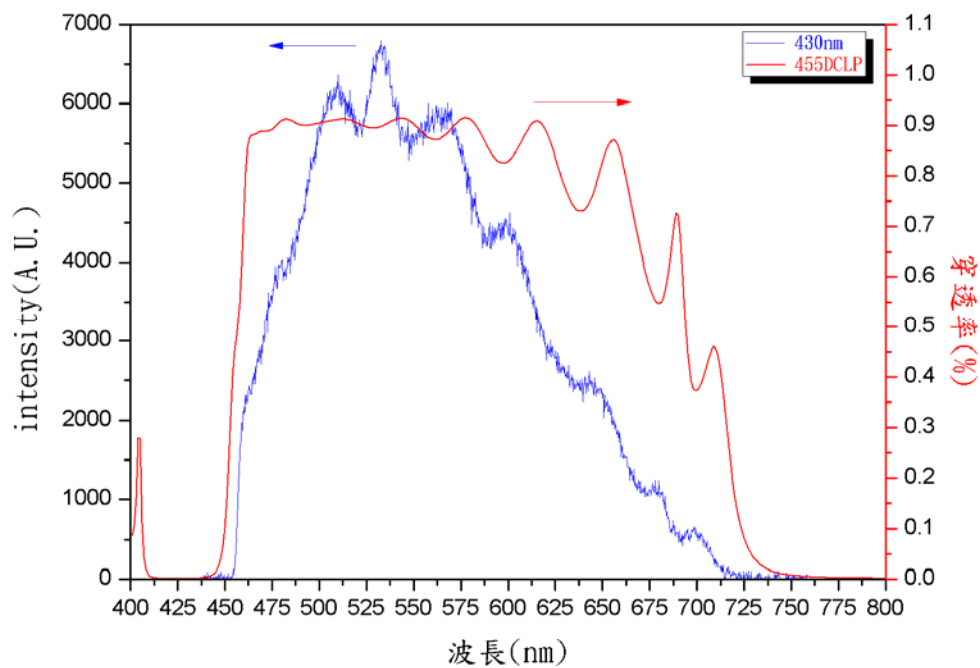


圖 4.14 430 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜

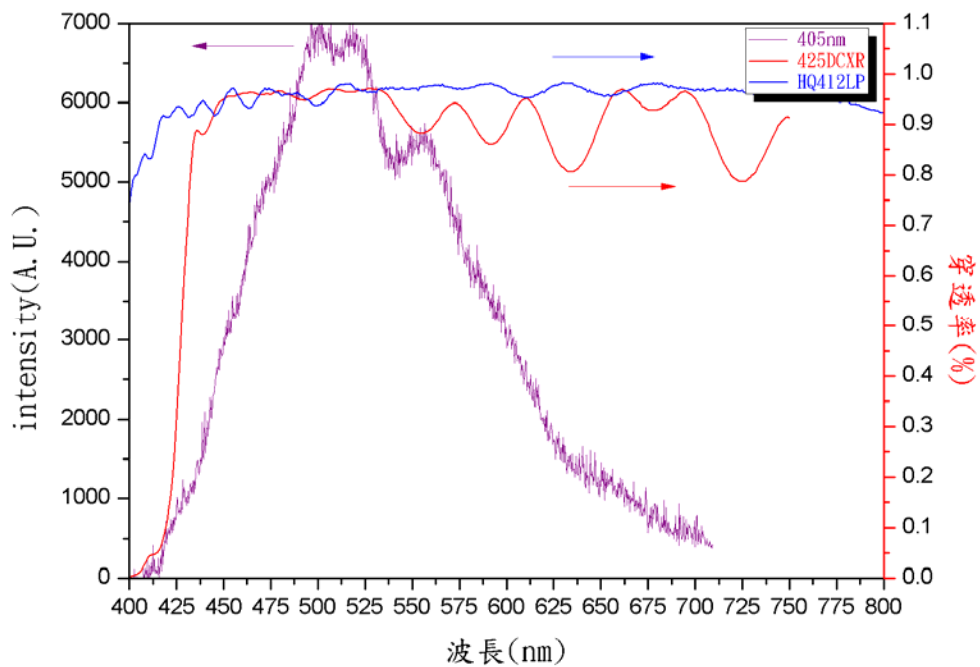


圖 4.15 405 nm 雷射激發的螢光光譜及所對應的濾片組光譜

4.4 蛋白質螢光光譜

在前一小節發現因為濾波片及光柵的因素，導致我們無法確認雷射激發光譜的準確度，所以我們必須使用分子螢光光譜儀先確定最佳激發光與螢光波段後，才能找到適合的雷射與濾波片以得到直接的螢光光譜，因此我們使用紫外線/可見光光譜儀測量其吸收光譜，以分子螢光光譜儀量測光激螢光光譜(photoluminescence, PL)及光激螢光激發光譜(photoluminescence excitation, PLE)。做吸收光譜的原因是為了找出這個螢光物質的吸收波長，但是要做吸收光譜通常需要在溶液的狀態下才能進行，因此在本節我們取兩片白瘧珈蟪翅膀利用第三章介紹的蛋白質萃取技術萃取出蛋白質後，在溶液的狀態下進行以下實驗。以下為量測光譜種類。

4.4.1 吸收光譜

首先我們使用波長 200 nm 到 700 nm 的光源做為入射光源，得到波長與吸收係數的關係圖(圖 4.16)，從這個結果可看出我們的溶液對 340 nm 和 270 nm 左右有相對較高的吸收。但因為溶液中有太多東西在裡面，為了確認到底是 340 nm 還是 270 nm 才是對應到螢光物質的吸收，所以我們必需針對這兩個波長做激發螢光光譜。

4.4.2 光激螢光光譜(photoluminescence, PL)

我們針對在吸收係數的相對極大值(340 nm 與 270 nm)做光激螢光光譜(photoluminescence, PL)分析(圖 4.17)，選取波長在 340 nm 以及 270 nm 附近的光做為激發光時，得到不同的激發光波長所對應到的螢光光譜圖，這個結果可看出，不管是 340 nm 左右或 270 nm 左右激發，主要的螢光都在 410 nm 附近，可見得此溶液所發的螢光主要在 410 nm 左右。雖然根據圖 4.16 可知此蛋白質溶液對 270 nm 的光比 340 nm 的光有較高的吸收率，但是以 340 nm 的光激發所得到的螢光卻比 270 nm 的光還要強很多，可見白痣珈璽上的螢光物質所吸收的光是位在 340 nm 附近，而 270 nm 的光主要是由蛋白質溶液中非螢光的物質所吸收。然後，我們再針對主要螢光 410 nm 附近去做 PLE，找出產生 410 nm 螢光的物質對不同波長的吸收狀況。

4.4.3 光激螢光激發光譜(photoluminescence excitation, PLE)

當我們知道波長為 410 nm 左右的螢光最強時，我們在針對最強的螢光波長附近去檢查最佳的激發光波長為何。我們將螢光波長分別固定在 405 nm 及 415 nm，對樣品做光激螢光激發光譜分析(圖 4.18)，結果證明了波長 400 nm- 420 nm 的螢光，主要是由 340 nm-350 nm 的光所激發出來的，而 270 nm 左右的光可能是被核酸中的鹼基(260 nm)[33]或蛋白質(280 nm)[34]吸收所造成的。

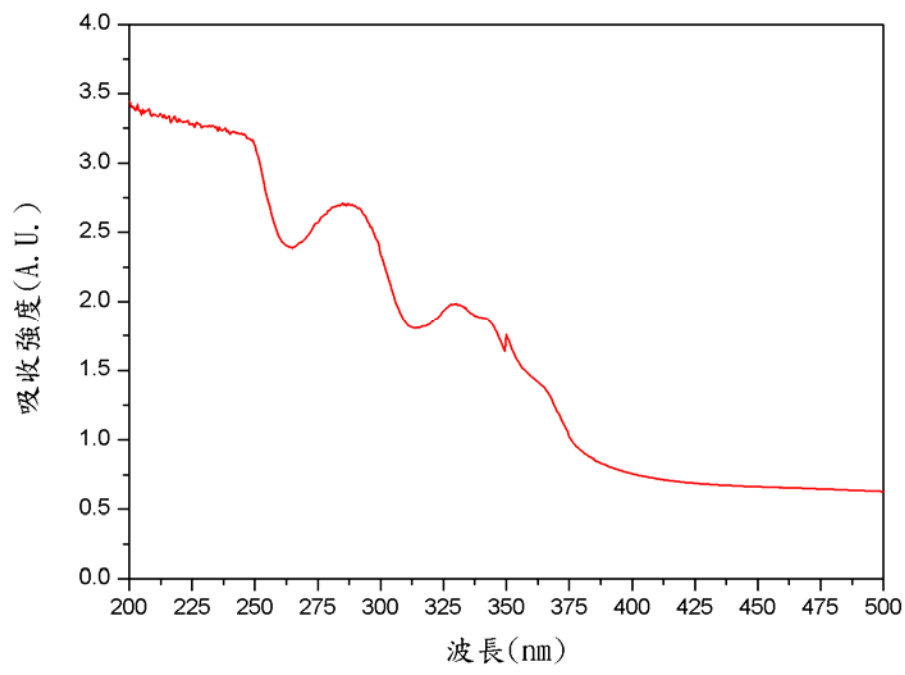


圖 4.16 蛋白質溶液的吸收光譜

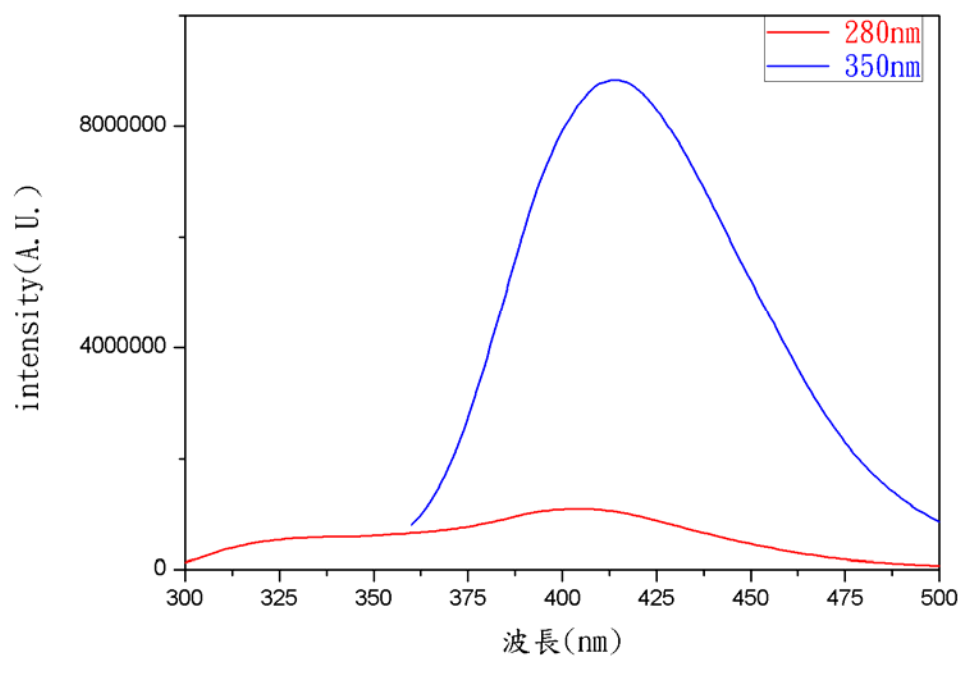


圖 4.17 螢光光譜(photoluminescence, PL)

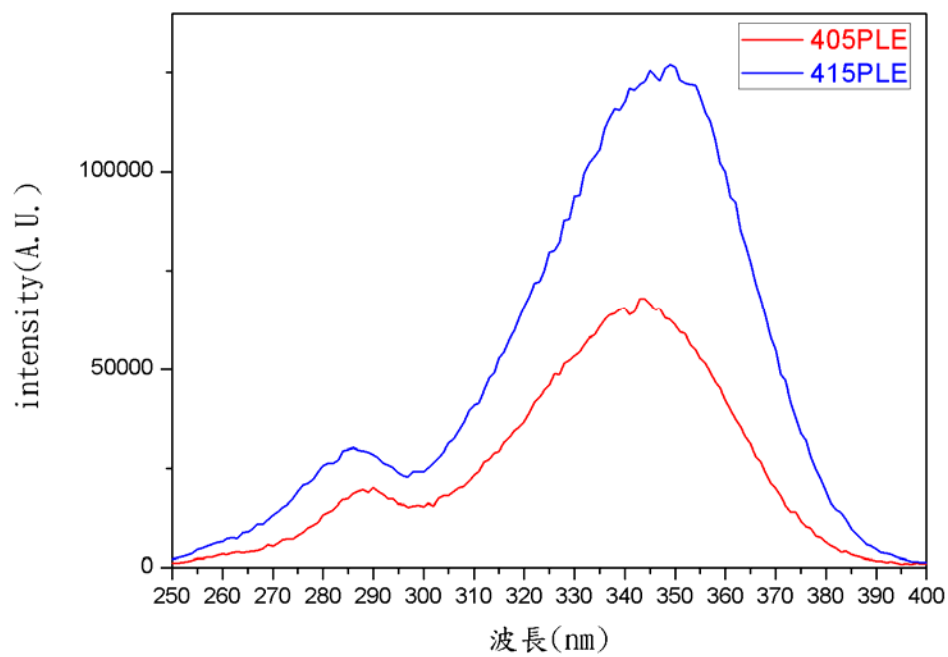
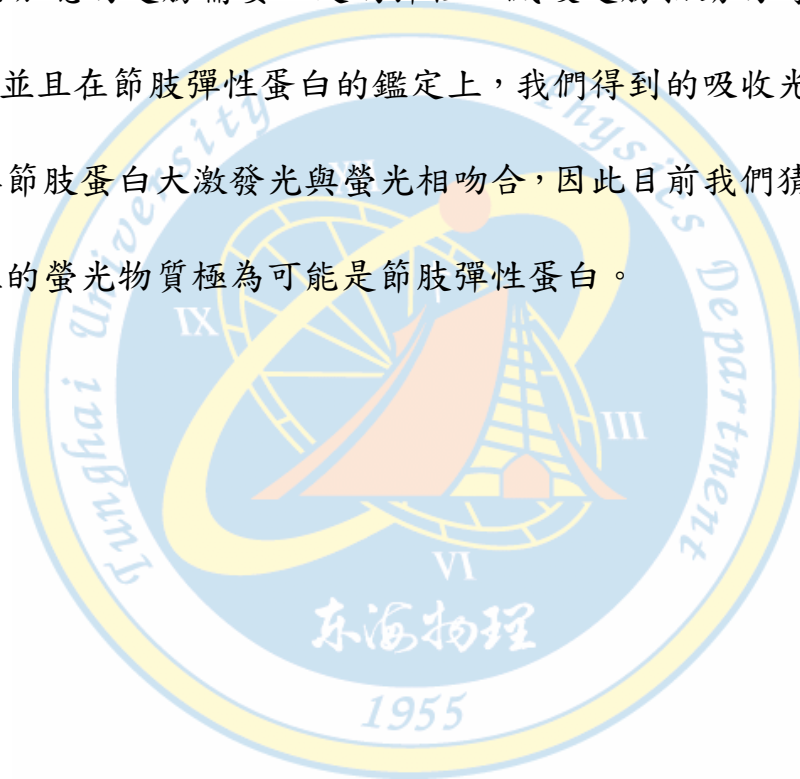


圖 4.18 螢光激發光譜(photoluminescence excitation, PLE)分析



4.5 與節肢彈性蛋白的比較

在我們得到白痣珈蟪翅膀的蛋白質光譜後，我們首先想知道的是這個螢光物質到底是什麼。在與林仲平老師討論之後，我們發現這種螢光物質有可能是節肢彈性蛋白，因為節肢彈性蛋白是一種在昆蟲身上發現的特殊蛋白質，並且節肢彈性蛋白的彈性非常好，我們有理由相信白痣珈蟪的翅膀需要一定的彈性以減緩翅膀拍動的時候所受到的壓力。並且在節肢彈性蛋白的鑑定上，我們得到的吸收光譜與螢光光譜也與節肢蛋白大激發光與螢光相吻合，因此目前我們猜測白痣珈蟪翅膀上的螢光物質極為可能是節肢彈性蛋白。



第五章 結論與展望

在本工作中我們使用白光光源及雷射觀察白痣珈蟪翅膀的穿透影像、螢光影像及全景圖，並用雷射激發翅脈上的螢光物質以量測其光譜，而為了得到該螢光物質的最佳激發光與螢光波長，我們用白痣珈蟪的翅膀萃取出蛋白質，對蛋白質溶液做相關的吸收光譜、光激螢光光譜(PL)及光激螢光激發光譜(PLE)。

在影像分析方面，我們比較出白痣珈蟪翅膀對紅光有較佳的穿透率，並取得整片翅膀的穿透影像，驗證其對長波長的確有較高的穿透性。並且利用螢光顯微技術我們發現螢光物質在翅膀上面不同的分布情形，其中在越靠近翅基的地方，有螢光物質的翅脈越密集，而螢光物質在單一根翅脈上的則是分布在翅脈的外圍。而在直接螢光光譜方面，我們得到了部份雷射的螢光光譜，但由於系統的濾波片與光柵的光譜效率的關係，我們尚無法確定其是否為最佳螢光光譜，只能從其結果找出螢光物質的吸收及螢光波長的下限。最後在量測從翅膀上萃取出來的蛋白質溶液的光譜方面，我們得到最佳的激發光波長為 340 nm，且最強的螢光波長分佈在 420 nm 左右。

為了確認螢光物質的種類，我們從昆蟲方面開始尋找。從翅膀應具有彈性且螢光光譜極值的角度上，判斷翅膀上的螢光物質應該為節肢彈性蛋白(resilin)，因為節肢彈性蛋白都是在昆蟲身上所發現，並

且在蜻蜓(不均翅亞目)的關節上也發現有 resilin 的物質。另外。在光譜上，我們也得到與節肢彈性蛋白相類似的吸收及螢光光譜，因此我們判斷在白痣珈璉(均翅亞目)翅脈上的螢光物質極有可能是 resilin。

雖然在蛋白質溶液上的光譜量測我們得到了相當不錯的結果，但由於在我們萃取出來的蛋白質溶液中有太多的東西，而且我們也無法知道在蛋白質萃取的過程中是否造成蛋白質變了性。因此，在未來我們將改良我們實驗室的光譜儀，使其比較適合藍光到紫外光波段的量測，並以更短波長的雷射光激發翅脈上的螢光物質，以直接獲取其螢光光譜。另外我們也將花更多心力於蛋白質萃取上，希望能直接將翅脈內的螢光物質與其他物質分離出來。

此外，為了驗證翅脈上的螢光物質是否就是我們猜測的 resilin，未來我們將可以更進一步嘗試用 pH 依賴性的螢光檢測法[8]，做進一步的檢驗，看看翅脈上的螢光物質是否與 resilin 一樣具有 pH 依賴性。另外，我們也可以進一步去探討有螢光的翅脈與沒有螢光的翅脈在功能上是否有其差異性。也可以進一步對翅膀的反射光做研究，分析其會有藍光反射的原因，並探討翅膀在照光之下所呈現的藍色的反射光與翅脈上藍紫色的螢光是否有關。

參考文獻

1. Campbell, A.K., *Living light: biochemistry, function and biomedical applications*. Essays Biochem, 1989: p. 24:41-76.
2. Harvey, E.N., *Bioluminescence*. Academic Press, Inc., 1952.
3. Hastings, J.W., et al., *Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria*. Adv. Microbiol. Physiol, 1985: p. 26:235-291.
4. Dubois, R., *Note sur la fonction photogénique chez les Pholades*. C.R. Soc. Biol., 1887: p. Ser. 8 3:564-568.
5. Lee, J., *The mechanism of bacterial bioluminescence*. 1985. : p. p.401-437.
6. 王效岳 and 海普納, *臺灣蜻蜓目*. 1997.
7. Gosline, J., et al., *Elastic proteins: biological roles and mechanical properties*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2002. **357**(1418): p. 121-132.
8. Neff, D., et al., *Identification of resilin in the leg of cockroach, *Periplaneta americana*: confirmation by a simple method using pH dependence of UV fluorescence*. Arthropod Structure & Development, 2000. **29**(1): p. 75-83.
9. Weis-Fogh, T., *A rubber-like protein in insect cuticle*. J. Exp. Biol., 1960. **37**: p. 889-906.
10. Andersen, S.O., *Covalent cross-links in a structural protein, resilin*. ACTA Physiologica Scandinavica, 1966. **66**((Suppl. 263)): p. 1-81.
11. 墾丁國家公園--生物資料庫查詢, <http://bio.ktnp.gov.tw/>.
12. 關崇智, *昆蟲生理學*. 1987.
13. 蕭世裕, *蛋白質中的夜明珠—綠色螢光蛋白*. 科學發展, 2009.8. **440**: p. 66-71.
14. 鍾文軒, *創傷弧菌之藍色螢光蛋白應用於大腸桿菌生物取像系統之研究*. 2004.
15. Truong, M.Y., et al., *A pH-responsive interface derived from resilin-mimetic protein *RecI-resilin**. Biomaterials, 2010. **31**(15): p. 4434-4446.
16. Jornvall, H., et al., *Short-Chain Dehydrogenases Reductases (Sdr)*. Biochemistry, 1995. **34**(18): p. 6003-6013.
17. Hsu, R.Y., and Lardy, H.A., *Cleland WW. Pigeon liver malic enzyme. V. Kinetic studies*. J Biol Chem., 1967. **242**:5315-5322.
18. Li, B. and S.X. Lin, *Fluorescence-energy transfer in human estradiol 17 beta-dehydrogenase-NADPH complex and studies on the coenzyme binding*. European Journal of Biochemistry, 1996. **235**(1-2): p. 180-186.
19. Meighen, E.A. and I. Bartlet, *Complementation of Subunits from Different Bacterial Luciferases - Evidence for the Role of the Beta-Subunit in the*

- Bioluminescent Mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(23): p. 1181-1187.
20. Schmidt, T.M., K. Kopecky, and K.H. Nealson, *Bioluminescence of the Insect Pathogen Xenorhabdus-Luminescens*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. **55**(10): p. 2607-2612.
 21. Morise, H., et al., *Intermolecular Energy-Transfer in Bioluminescent System of Aequorea*. Biochemistry, 1974. **13**(12): p. 2656-2662.
 22. Blickhan, R. and R.J. Full, *Similarity in Multilegged Locomotion - Bouncing Like a Monopode*. Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology, 1993. **173**(5): p. 509-517.
 23. Rack, P.M.H., Ross, H.F., *The tendon of flexor pollicis longus: its effects on the muscular control of force and position at the human thumb*. J. Physiol, 1984. **351**: p. 99-110.
 24. Andersena, S.O. and T. Weis-Fogh, *Resilin. A Rubberlike Protein in Arthropod Cuticle*. Advances in insect physiology, 1964. **2**: p. 1-64.
 25. Nairn, K.M., et al., *A synthetic resilin is largely unstructured*. Biophysical Journal, 2008. **95**(7): p. 3358-3365.
 26. Lyons, R.E., et al., *Comparisons of Recombinant Resilin-like Proteins: Repetitive Domains Are Sufficient to Confer Resilin-like Properties*. Biomacromolecules, 2009. **10**(11): p. 3009-3014.
 27. Haas, F., S. Gorb, and R.J. Wootton, *Elastic joints in dermapteran hind wings: materials and wing folding*. Arthropod Structure & Development, 2000. **29**(2): p. 137-146.
 28. 美嘉儀器, <http://www.major.com.tw/company.htm>.
 29. 厚利巴公司, <http://www.horiba.com/uk/>.
 30. 王祥宇, *影像技術大躍進—談 CCD 的發明*. 物理雙月刊, 2010. **32**(1): p. pp.4-8.
 31. TECHNOLOGY, http://www.andor.com/scientific_cameras/.
 32. 網址, <http://www.princetoninstruments.com/>.
 33. Kawase, Y., et al., *Studies on Nucleic-Acid Interactions .I. Stabilities of Mini-Duplexes (Dg2a4xa4g2.Dc2t4yt4c2) and Self-Complementary D(Gggaaxyttccc) Containing Deoxyinosine and Other Mismatched Bases*. Nucleic Acids Research, 1986. **14**(19): p. 7727-7736.
 34. Gill, S.C. and P.H. Vonhippel, *Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data*. Analytical Biochemistry, 1989. **182**(2): p. 319-326.