

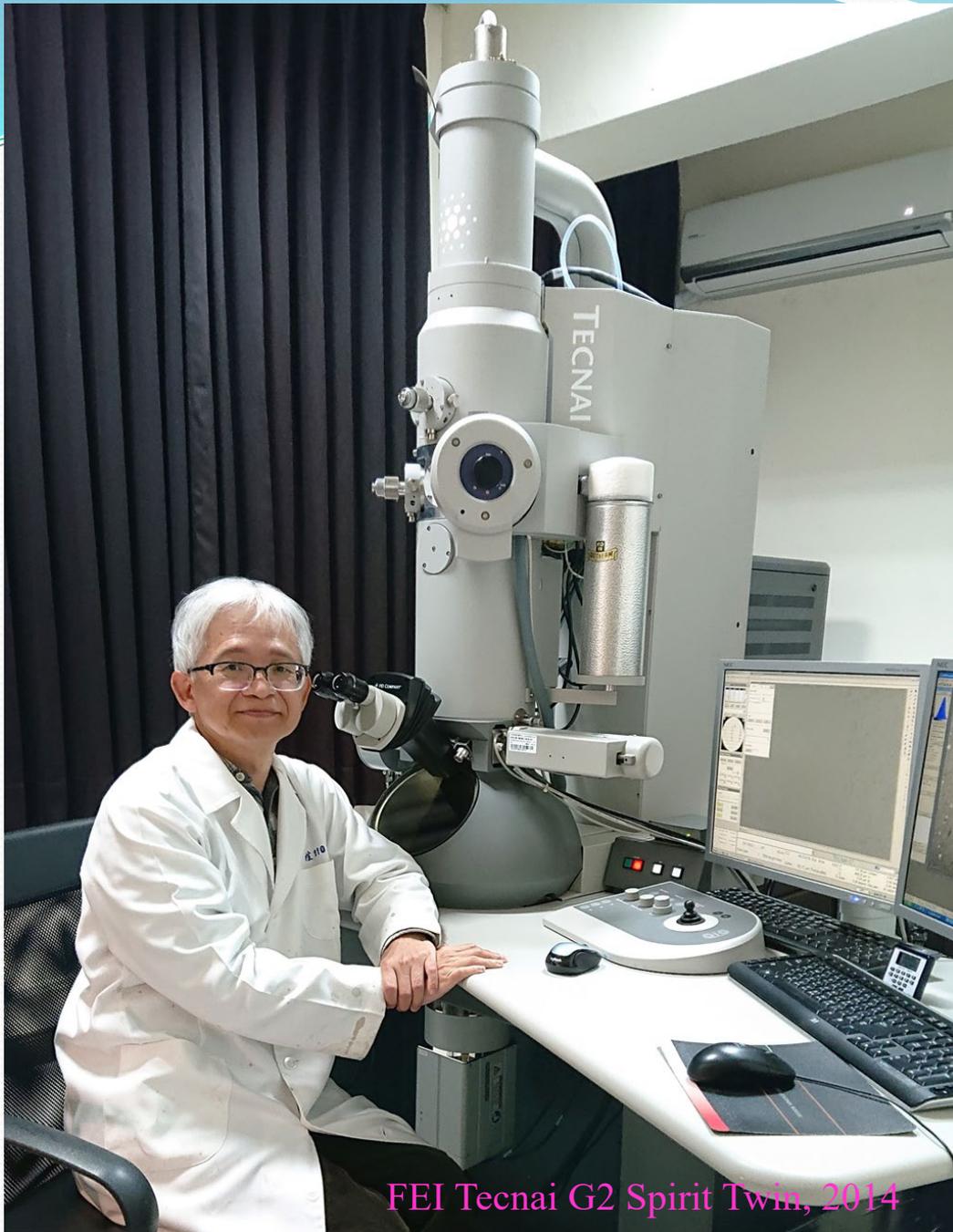
基礎實驗測量觀念

簡萬能

中央研究院 植物暨微生物學
研究所

wnjane@gate.sinica.edu.tw

2023.11.18



FEI Tecnai G2 Spirit Twin, 2014

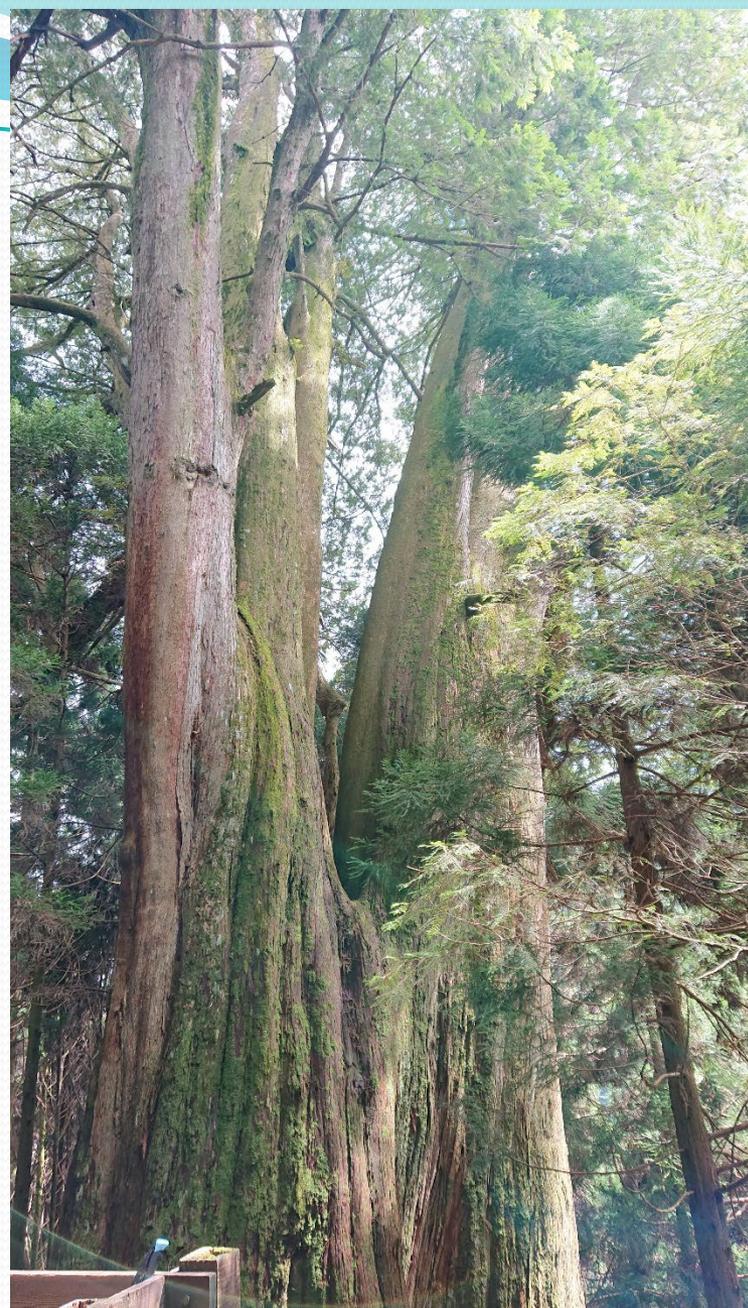
簡 萬 能

職稱：研究技師

現任：
植微所 細胞生物學核心
實驗室 電子顯微鏡部門
負責人

專長：
植物形態學
植物解剖學
生物電子顯微鏡學

興趣：
研究植物發育過程中超
微結構的變化



觀霧國家森林遊樂區



日本立山黒部



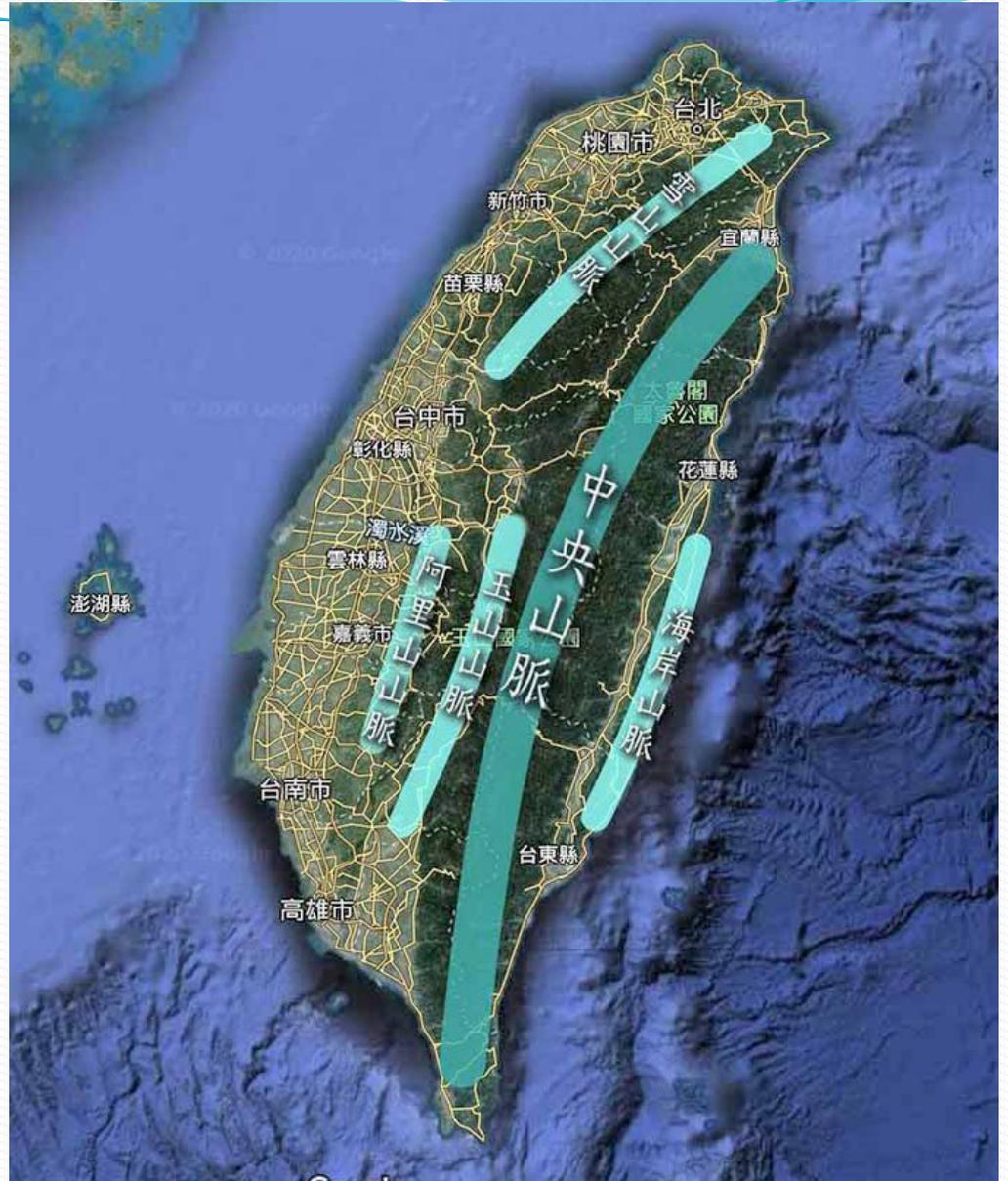
日本白馬八方池



日本上高地&穂高連峰

台灣的山脈

1. 中央山脈
2. 雪山山脈
3. 玉山山脈
4. 阿里山山脈
5. 海岸山脈
6. 大屯火山彙



聖稜線



自由時報記者王元鴻攝

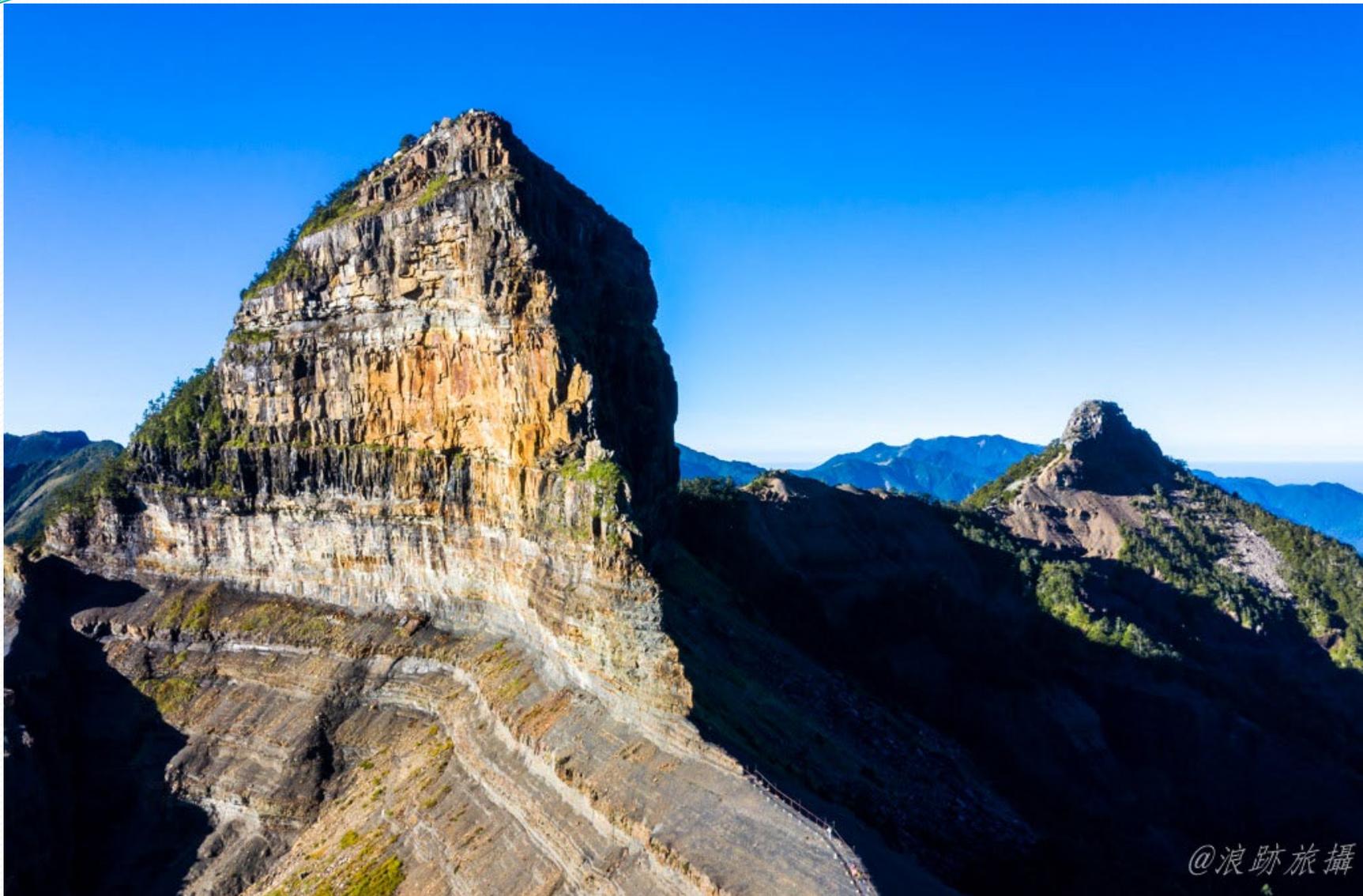
雪山聖稜線，何其優美引人入勝的名字啊！

這條連結雪山山脈雪山主峰與大霸尖山的稜脈，不僅海拔高度均在3,100公尺以上，從雪山主峰到雪山北峰之間的稜脊，更在3,580公尺上，在這條壯麗巍峨的巨嶺之上，岩峰嶙峋峭拔，巉巖突兀的高峰縱列，愛山人必須戰戰兢兢地克服險阻，橫越萬難，才能安全地完成縱走聖稜的心願，岳界有句話：走完聖稜，終於可以結婚了！意思就是說：走過這一條困難重重的路線，年輕人才能有擔當，可以擔起家庭的重任。

聖稜之名，緣於西元1928年(昭和3年)，也就是大霸尖山首登(昭和2年)後的一年，當時的台灣山岳會總幹事沼井鐵太郎，在發表關於「關於攀登大霸尖山之考察與實行」乙文中，描述了這一段稜線：「．．．為了縱走這條岩稜，需要相當於首登大霸尖山的準備．．．這神聖的稜線啊，誰能真正地完成這大霸尖山至雪山的縱走，戴上勝利的榮冠，述說首次完成縱走的真與美！．．．」。從此之後，這條神聖的稜線即深深地烙印在愛山人的心靈裡。昭和六年(西元1931年)，聖稜線這條大霸尖山、雪山之間險峻無雙的高連山脈，才真正首次被純粹登山家以繩索隊伍橫斷完成，開啟了聖稜線輝煌的山岳歷史。

節錄自雪霸國家公園聖稜線說明

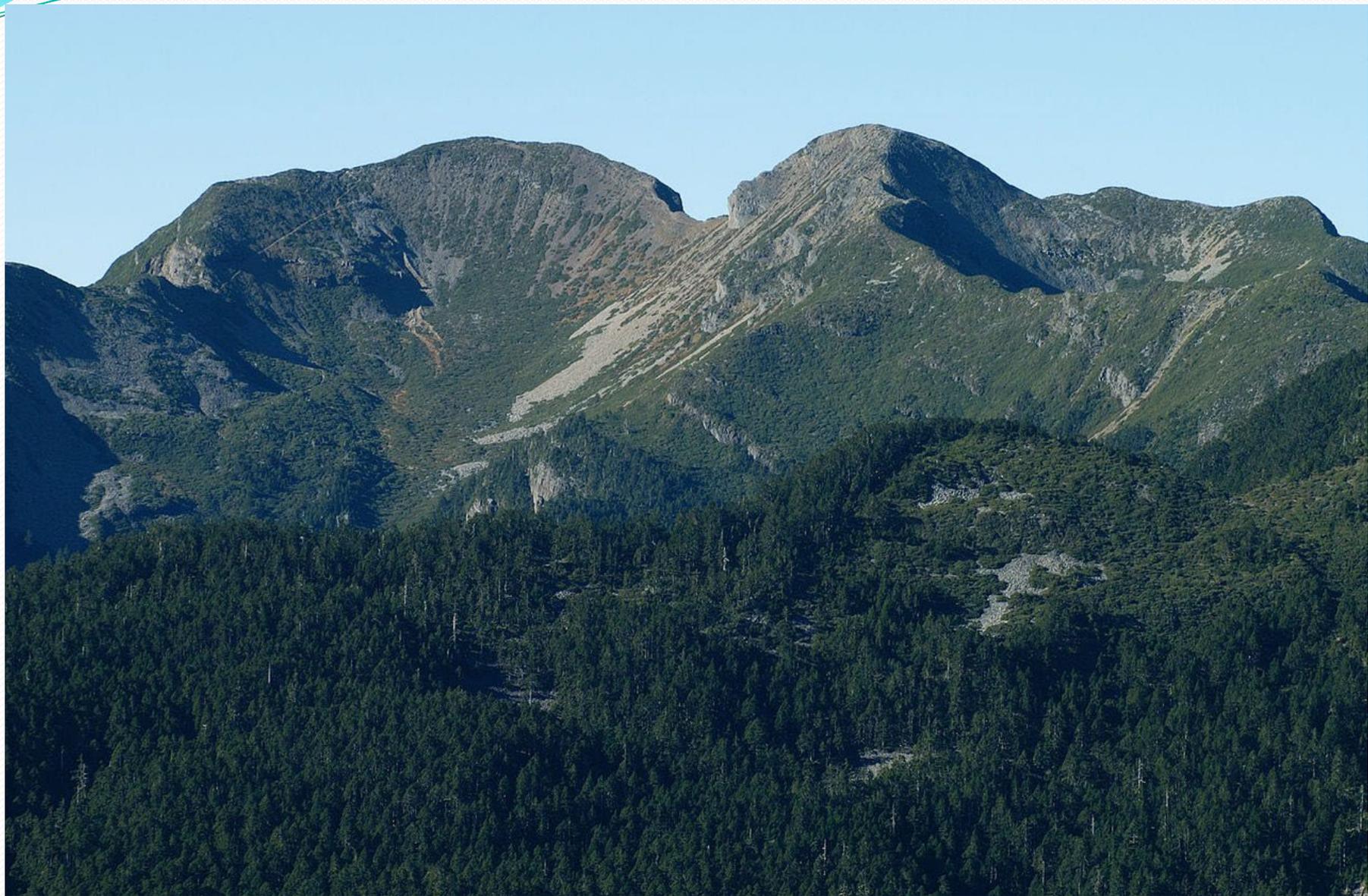
大小霸尖山



@浪跡旅攝

攝影師 康康

雪山主峰 & 北稜角





CHUJY PHOTO

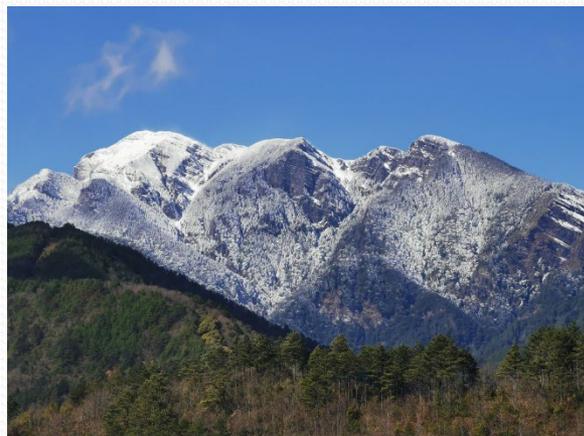


雪山翠池 攝影師 康康

台灣五岳三尖一奇



玉山



雪山



南湖大山



秀姑巒山



北大武山

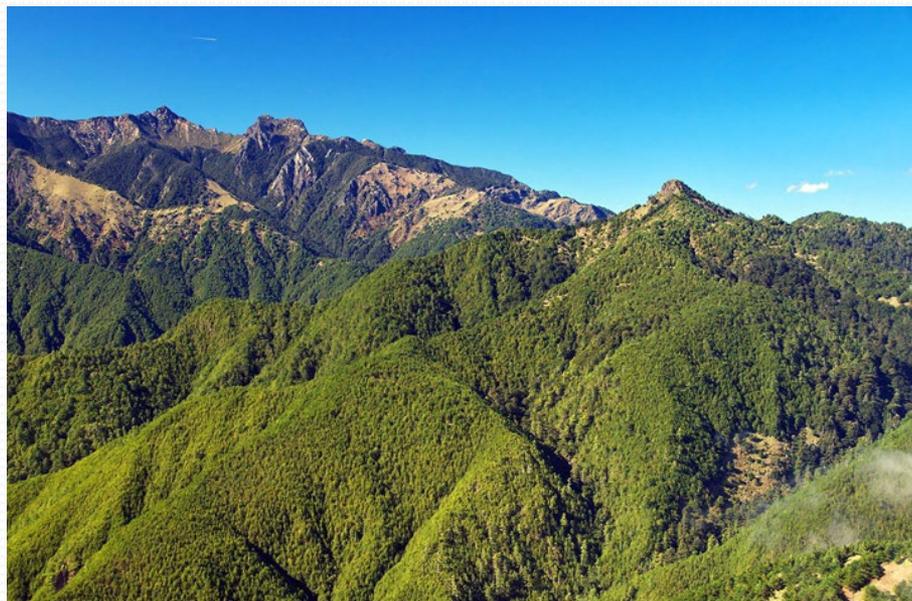
台灣五岳三尖一奇



大霸尖山

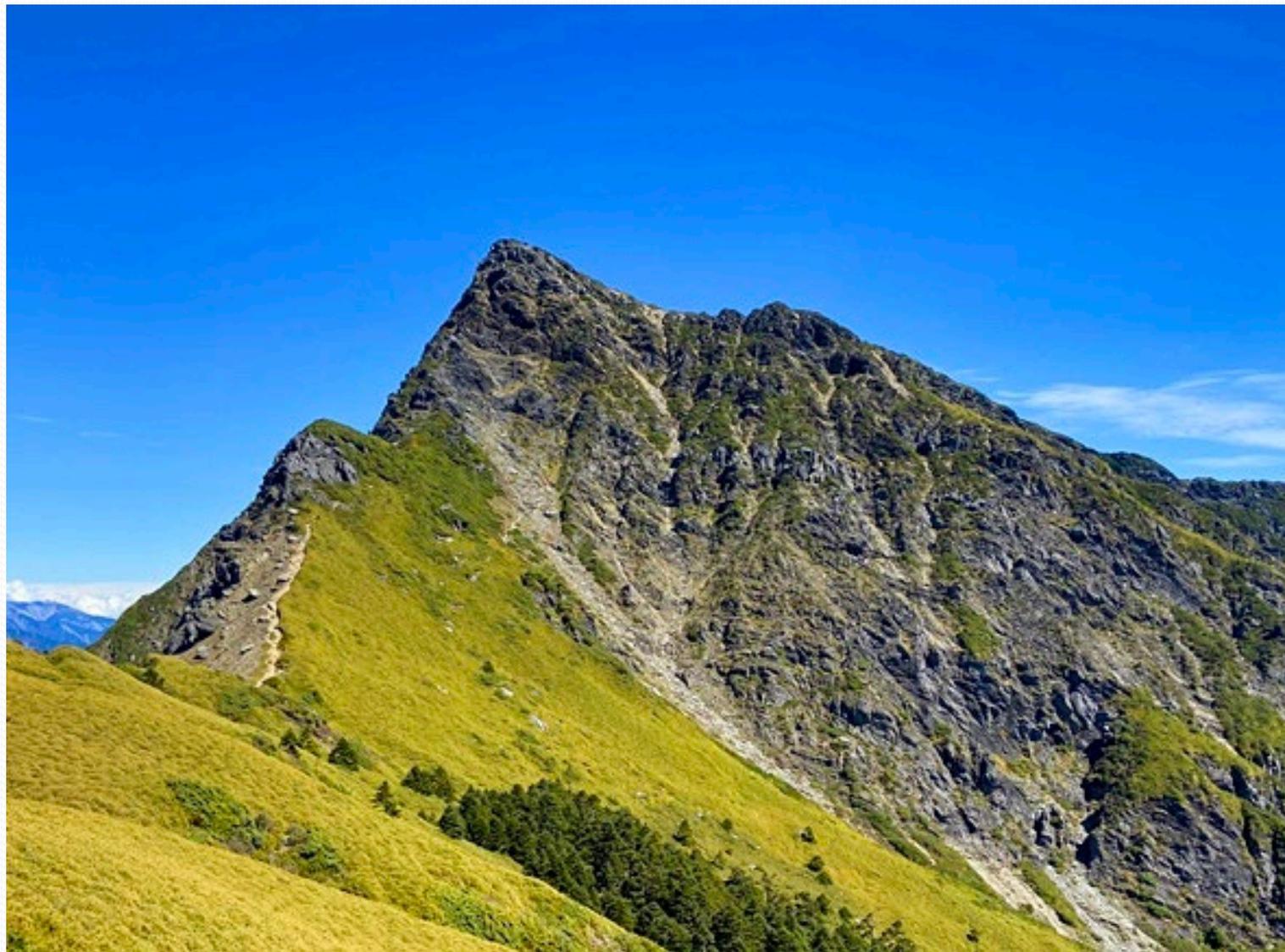


中央尖山



達芬尖山

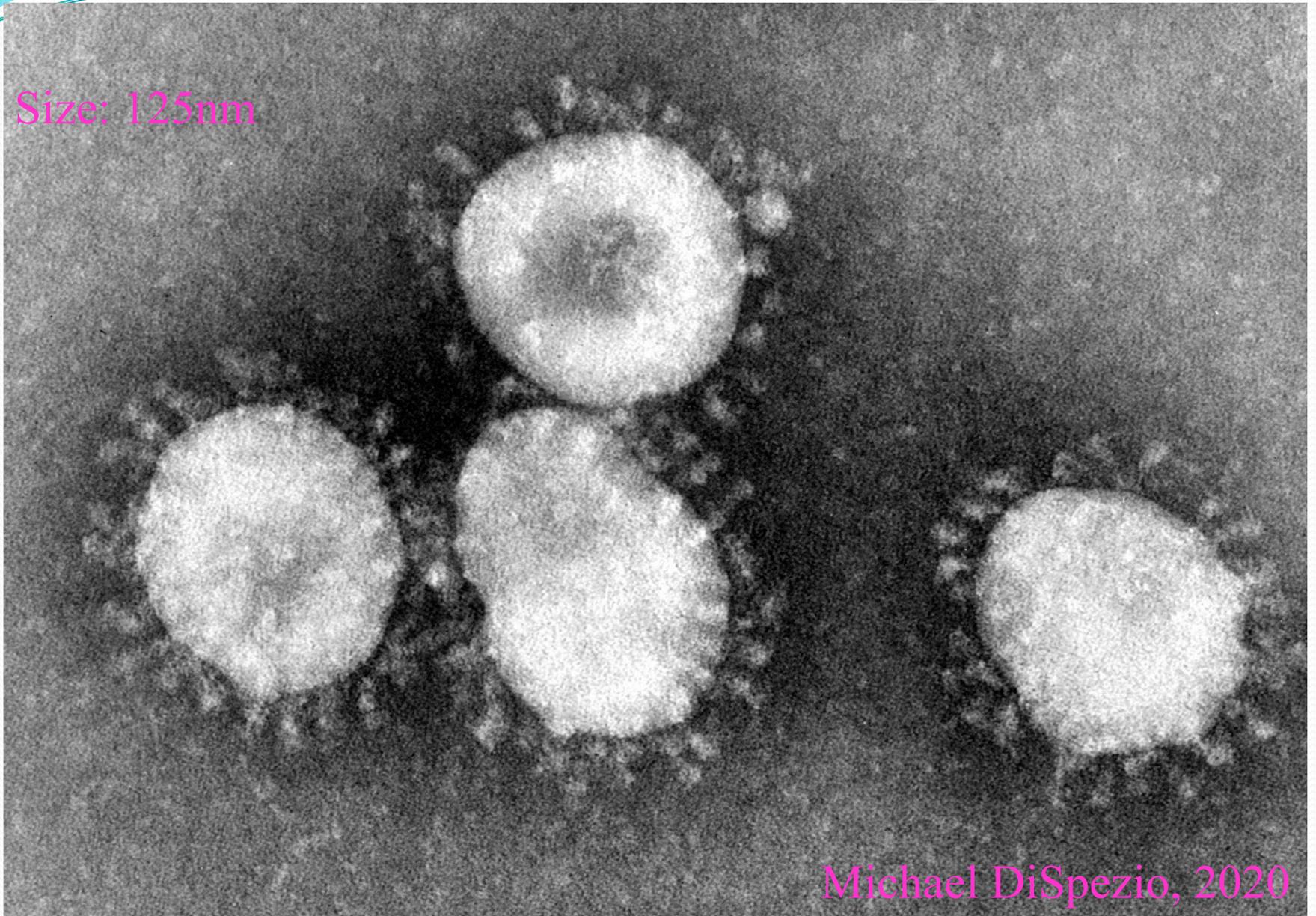
台灣五岳三尖一奇



奇萊山北峰

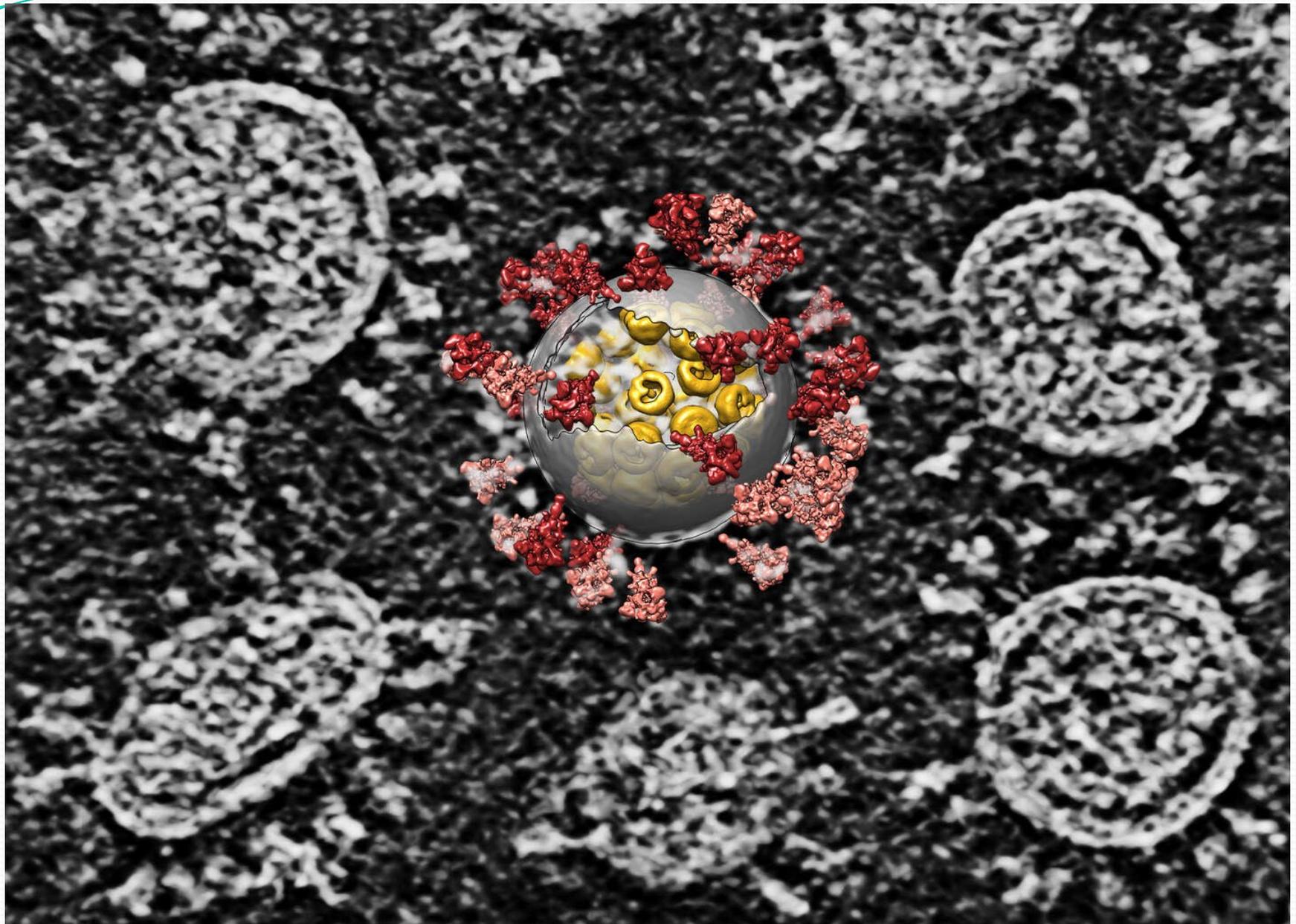
Coronavirus (冠狀病毒) covid-19, 穿透式電子顯微鏡, 負染色

Size: 125nm



Michael DiSpezio, 2020

Coronavirus covid-19, 冷凍穿透式電子顯微鏡, 斷層掃描



E-protein

外套膜蛋白

Spike glycoprotein (S)

棘蛋白

M-protein

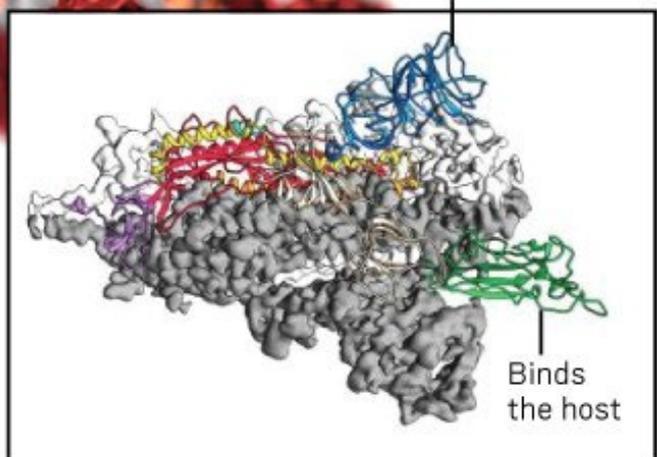
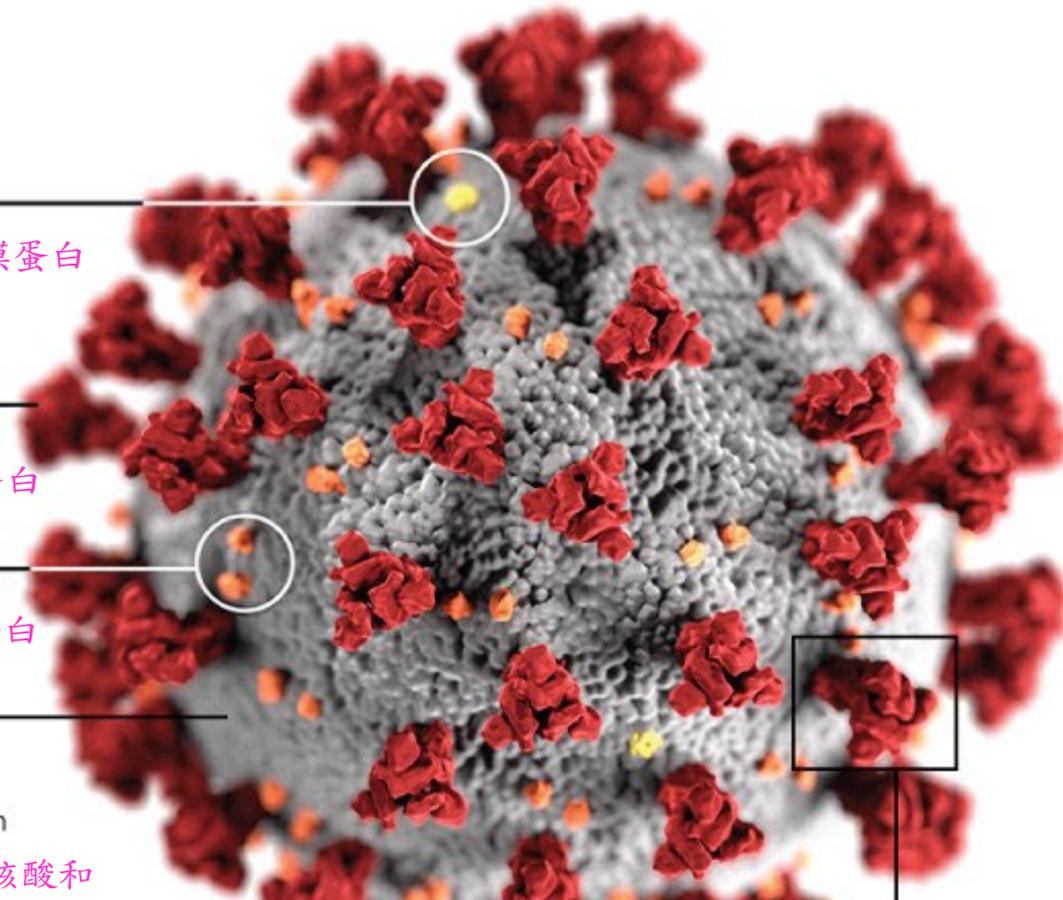
膜蛋白

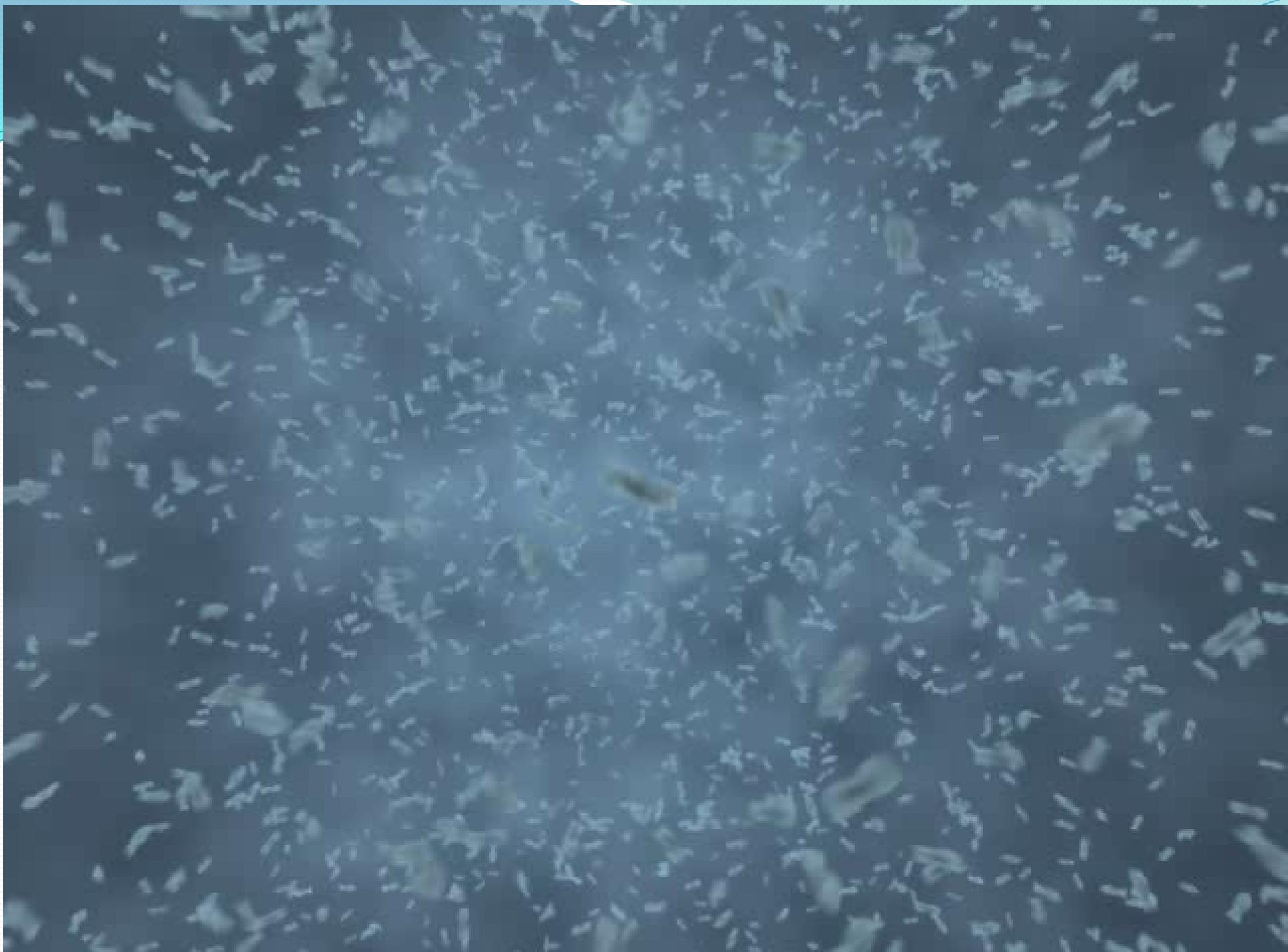
Envelope

Inside: RNA
and N protein

核糖核酸和
核蛋白鞘蛋白

CDC and University of Texas





FEI Titan Krios Cryo Transmission Electron Microscope





2017

諾貝爾化學獎得主

開發出提供高解析度生物分子結構的
冷凍式電子顯微鏡



Jacques
Dubochet

瑞士



Joachim
Frank

德國

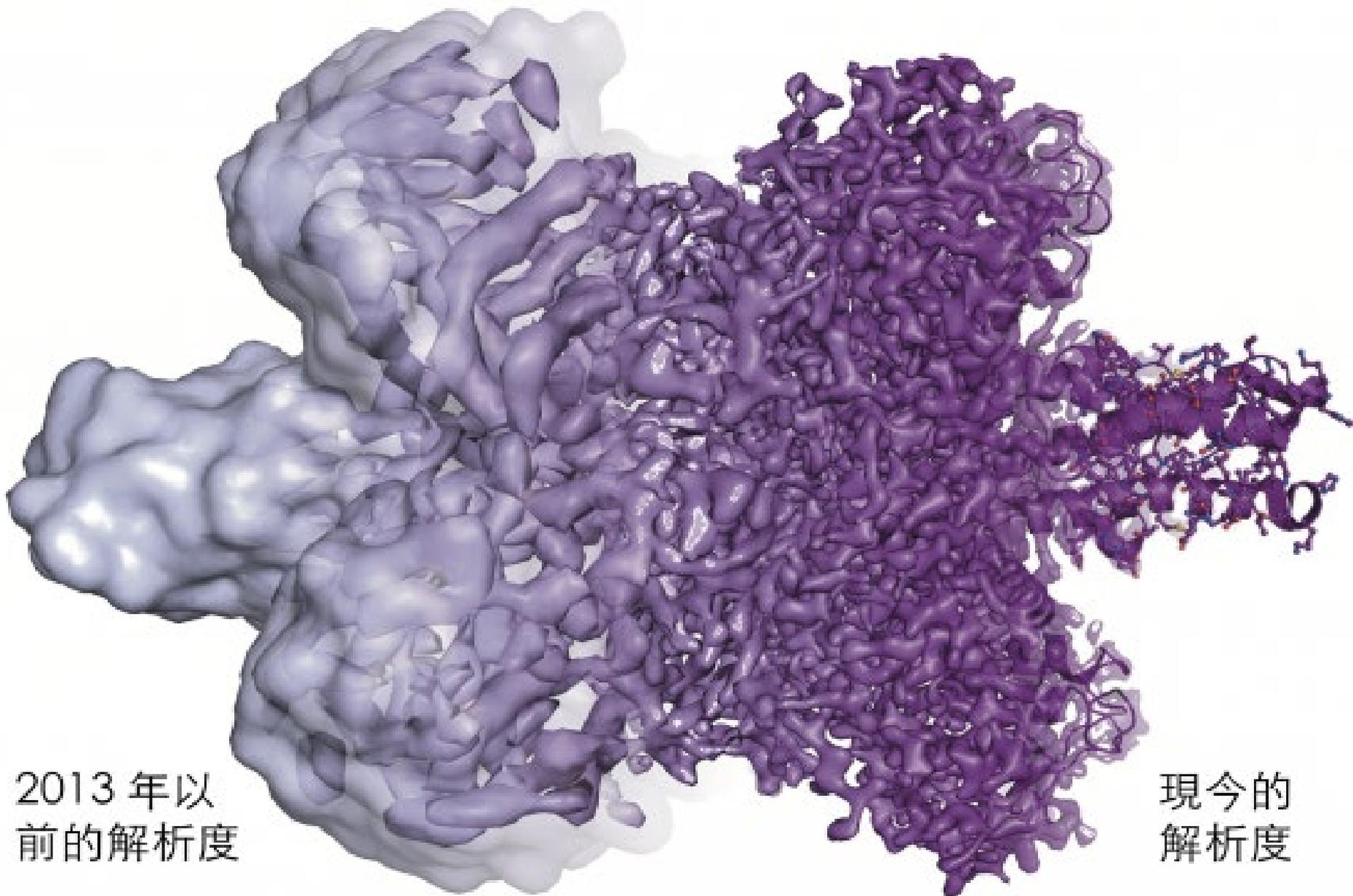


Richard
Henderson

蘇格蘭

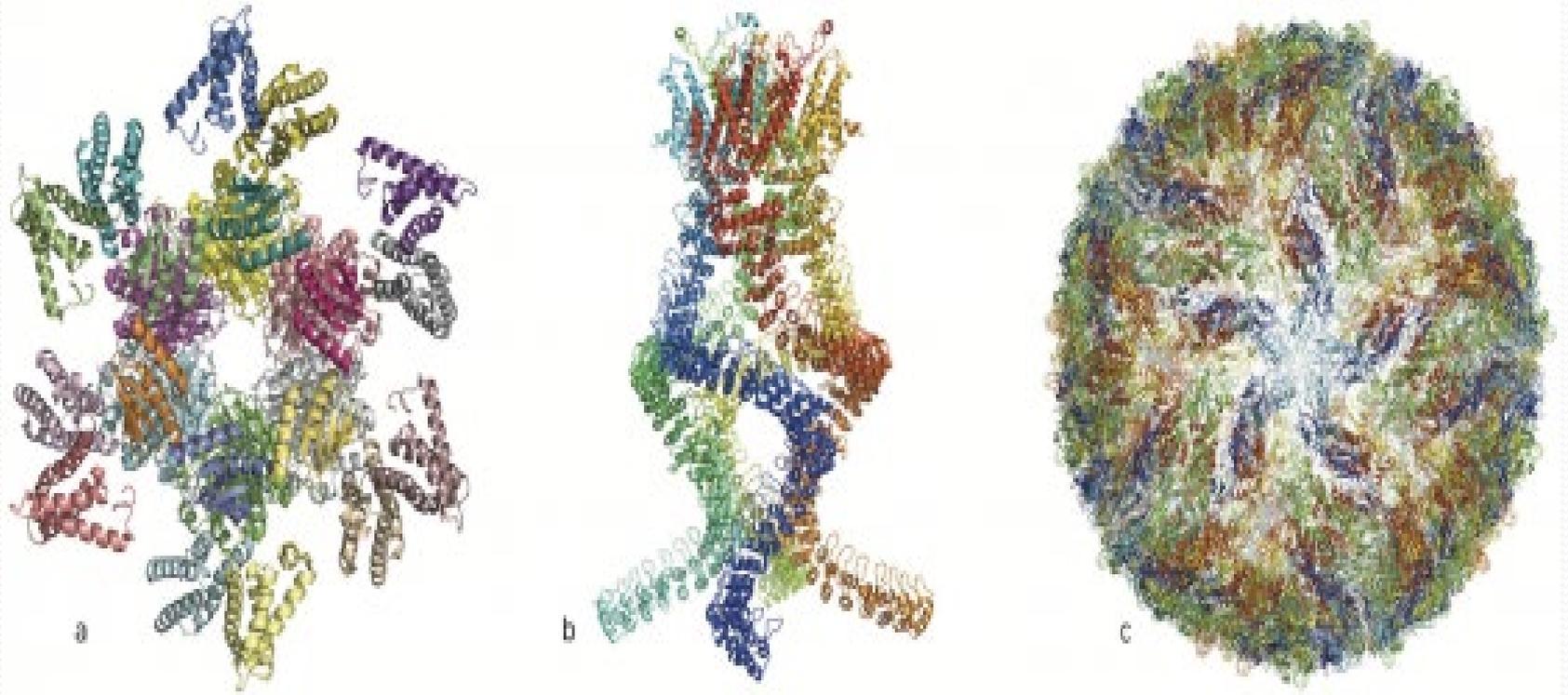


Jacques Dubochet (杜布克特)、Joachim Frank (法蘭克)
與Richard Henderson (韓德森)

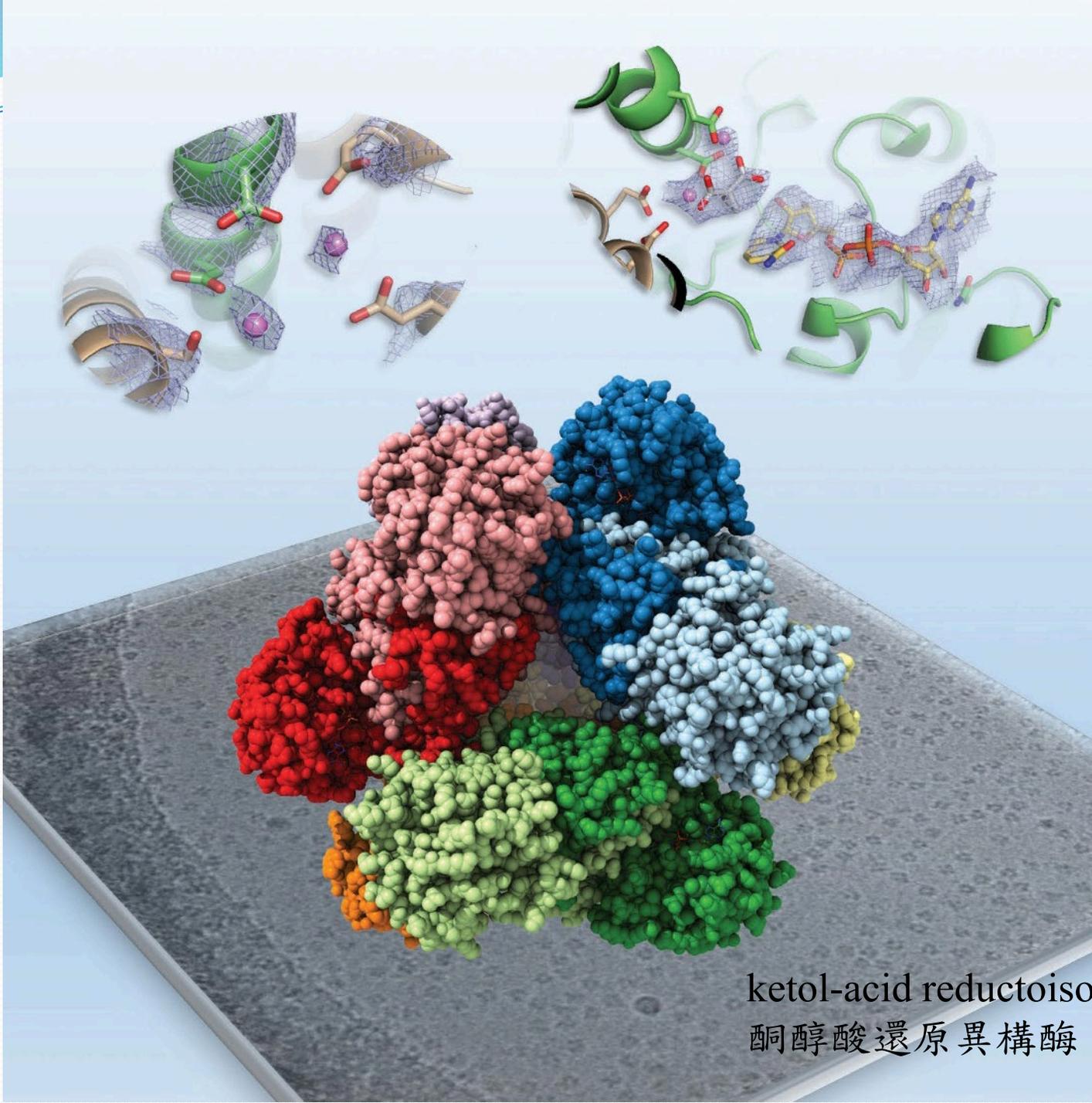


2013 年以
前的解析度

現今的
解析度

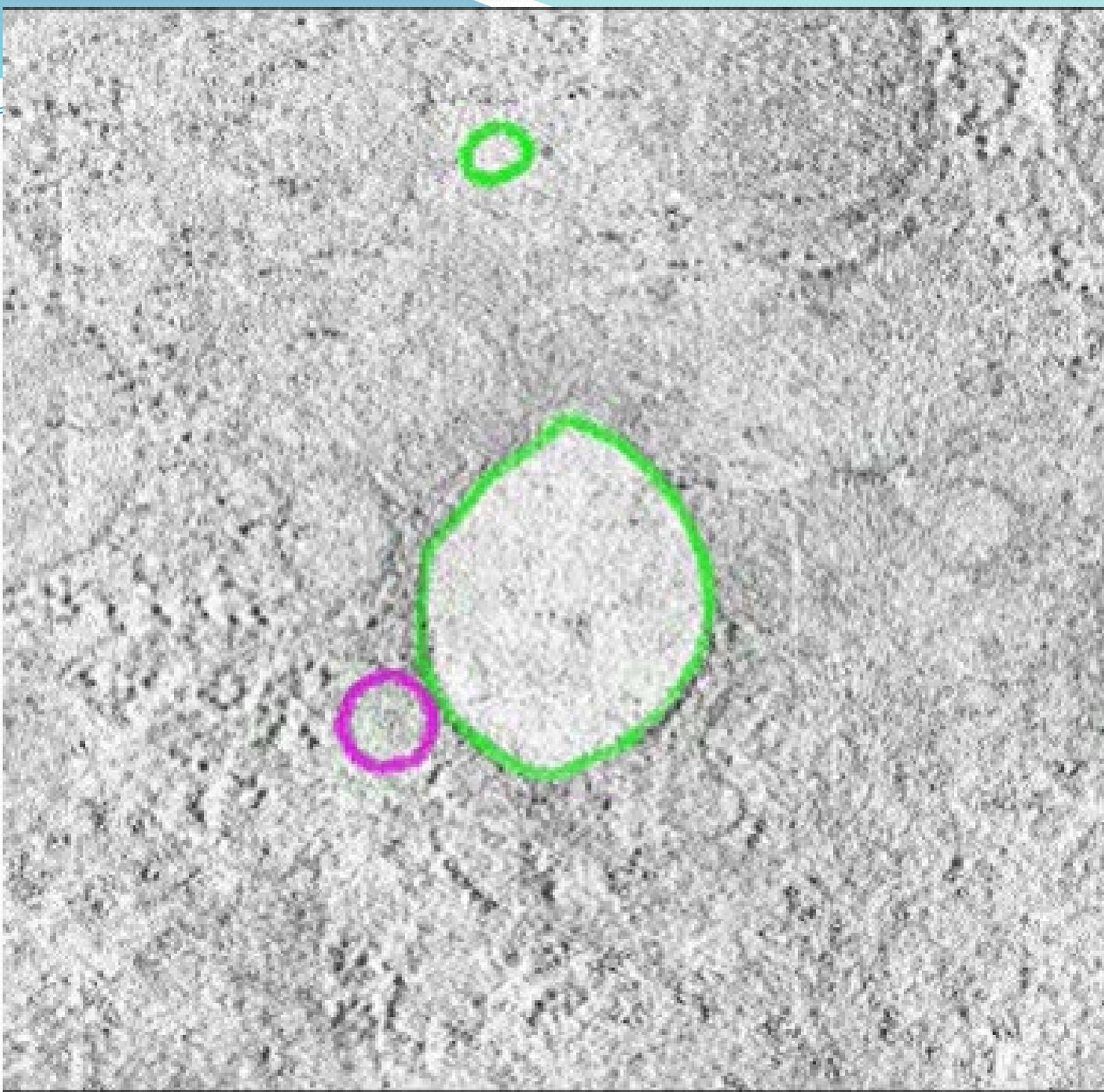


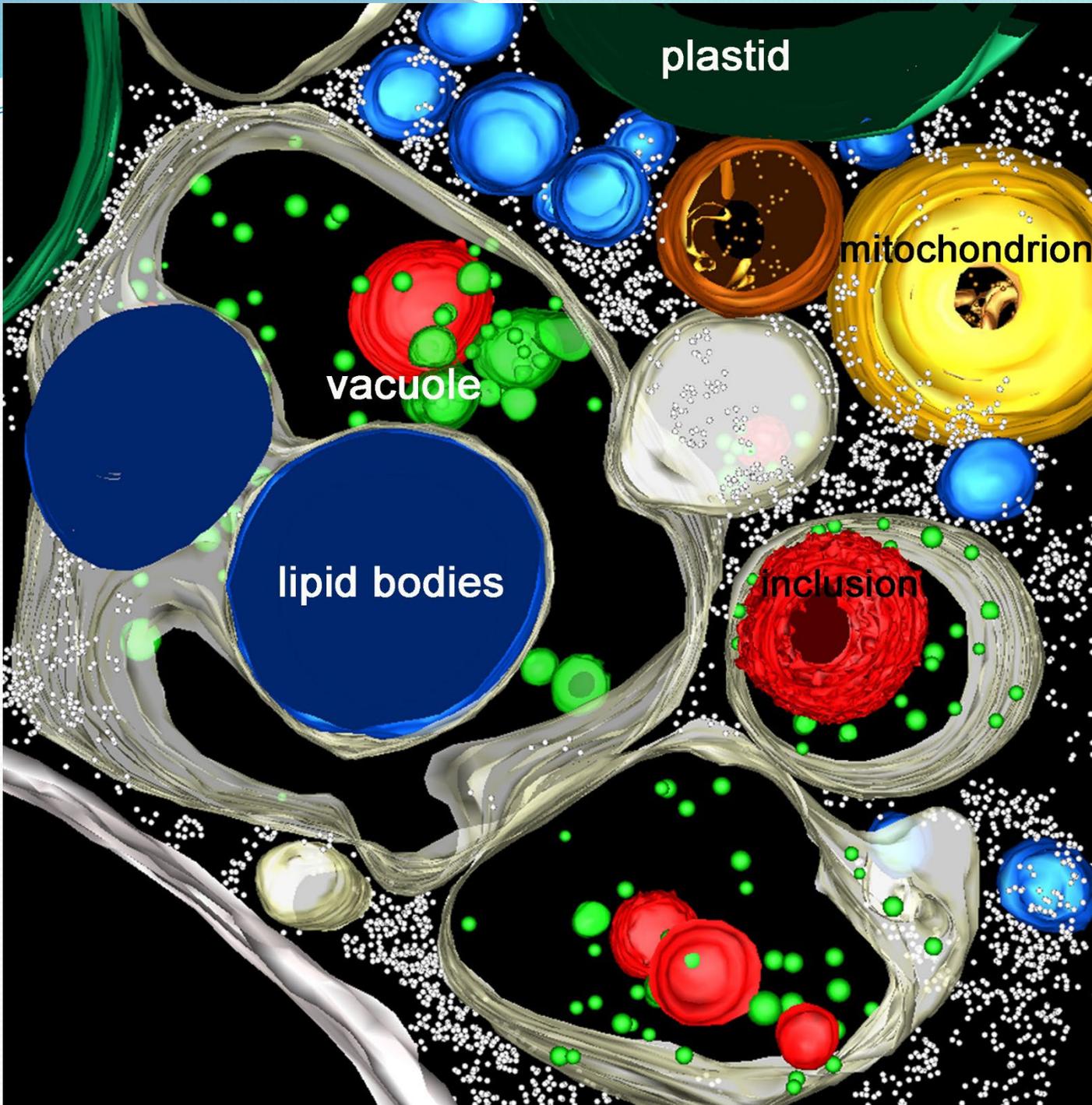
過去這幾年研究工作者發表了許多複雜的蛋白質錯合物結構 a. 一個控制晝夜節律的蛋白質錯合物 b. 一個讀取耳內壓力變化的感測器，讓我們聽到聲音 c. 茲卡（Zika）病毒。



ketol-acid reductoisomerase

酮醇酸還原異構酶





科學研究者具備的能力

- 1. 邏輯推理
- 2. 想像力
- 3. 印證能力
- 4. 堅定的意志力

量(一)：度、量、衡、溫度與時間

長度單位：公尺(meter, m)

面積單位：平方公尺(square meter, m²)

體積單位：立方公尺(cube meter, m³)

容量單位：公升(liter, l or L)

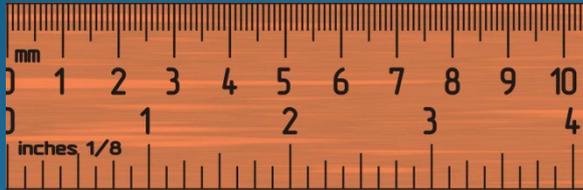
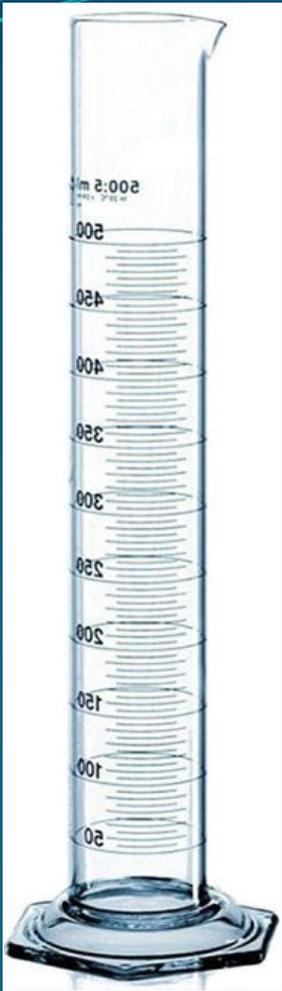
重量單位：公克(gram, g)

溫度單位：攝氏度(celsius equals, °C)

華氏度(fahrenheit equals, °F)

時間單位：時、分、秒(hour, minute, second)





1光年 = $9.46 \times 10^{15} \text{m}$



meter (m) 公尺 ps. litre (l) 公升

p (pico) 皮米	10^{-12}
n (nano) 奈米	10^{-9}
μ (micro) 微米	10^{-6}
m (milli) 公釐	10^{-3}
k (kilo) 千米 公里	10^3 (1000)
M (Mega) 百萬 米	10^6 (1,000,000)
G (Giga) 吉米	10^9 (1,000,000,000)
T (Tera) 兆米	10^{12} (1,000,000,000,000)

d (deci) 公寸 and c (centi) 公分

飛米(fm 10^{-15} m) ; 阿米(am 10^{-18} m) ; 介米(zm 10^{-21} m) ; 攸米(ym 10^{-24} m)



公升定義為一立方公寸或是10公分見方的立方體的體積 ($1\text{ L} \equiv 1\text{ dm}^3 \equiv 1000\text{ cm}^3$)

倍數	名稱	單位符號		等量的體積		小數	名稱	單位符號		等量的體積	
10^0 L	公升	l (ℓ)	L	dm^3	立方公寸						
10^1 L	公斗	dal	daL	10^1 dm^3	10立方公寸	10^{-1} L	分升	dl	dL	10^2 cm^3	100立方公分
10^2 L	公石	hl	hL	10^2 dm^3	100立方公寸	10^{-2} L	釐升	cl	cL	10^1 cm^3	10立方公分
10^3 L	公秉	kl	kL	m^3	立方公尺	10^{-3} L	毫升	ml	mL	cm^3	立方公分
10^6 L	兆升	Ml	ML	dam^3	立方十米	10^{-6} L	微升	μl	μL	mm^3	立方公釐
10^9 L	京升	Gl	GL	hm^3	立方百米	10^{-9} L	奈升	nl	nL	$10^6\text{ }\mu\text{m}^3$	百萬立方微米
10^{12} L	垓升	Tl	TL	km^3	立方公里	10^{-12} L	皮升	pl	pL	$10^3\text{ }\mu\text{m}^3$	千立方微米
10^{15} L	拍升	Pl	PL	10^3 km^3	千立方公里	10^{-15} L	飛升	fl	fL	μm^3	立方微米
10^{18} L	艾升	El	EL	10^6 km^3	百萬立方公里	10^{-18} L	阿升	al	aL	10^6 nm^3	百萬立方奈米
10^{21} L	澤升	Zl	ZL	Mm^3	立方百萬米	10^{-21} L	介升	zl	zL	10^3 nm^3	千立方奈米
10^{24} L	堯升	Yl	YL	10^3 Mm^3	千立方百萬米	10^{-24} L	攸升	yl	yL	nm^3	立方奈米

質量單位用於計量質量的標準，國際單位制的基本質量單位為「千克」，又名「公斤」，符號是kg

名稱	符號	與 <u>千克</u> 的換算
佑克、堯克 (yottagram)	Yg	10^{21}
皆克、澤克 (zettagram)	Zg	10^{18}
艾克 (exagram)	Eg	10^{15}
拍克 (petagram)	Pg	10^{12}
兆克、太克	Tg	10^9
吉克	Gg	10^6
<u>公噸</u> 、兆克	Mg	10^3
<u>公斤</u> 、 <u>千克</u>	<u>kg</u>	<u>1</u>
<u>公克</u>	g	10^{-3}
<u>毫克</u>	mg	10^{-6}
微克	μg	10^{-9}
奈克	ng	10^{-12}
皮克	pg	10^{-15}
飛克	fg	10^{-18}
阿克	ag	10^{-21}
介克	zg	10^{-24}
攸克	yg	10^{-27}



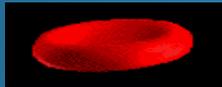
0.05~0.1 μm

viruses



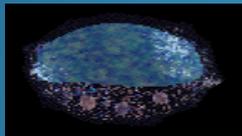
0.5~1.5 μm

bacteria



~5 μm

red blood cells



5~8 μm

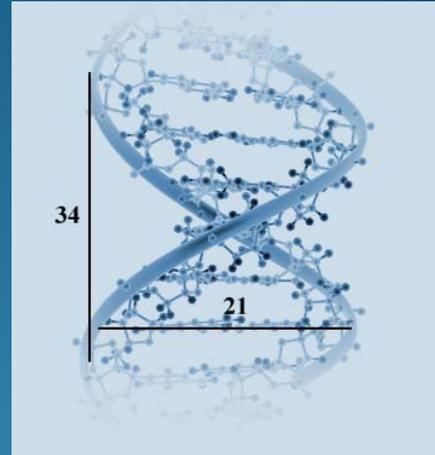
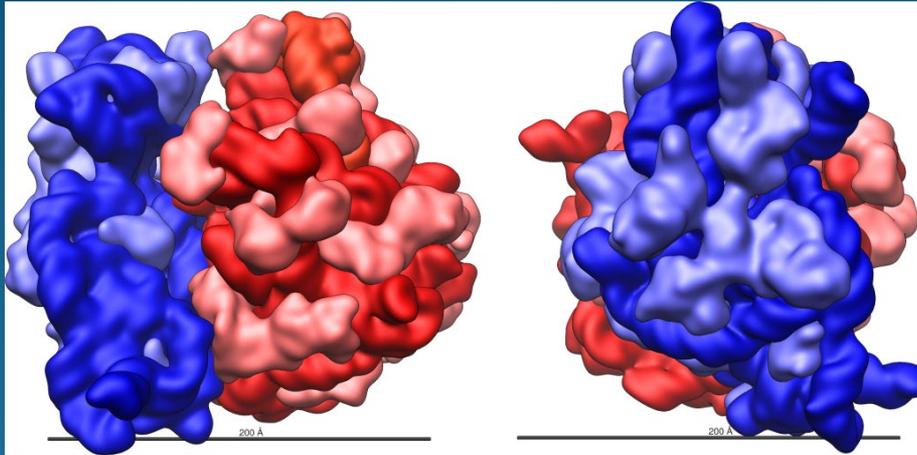
lymphocytes



60 μm

sperms

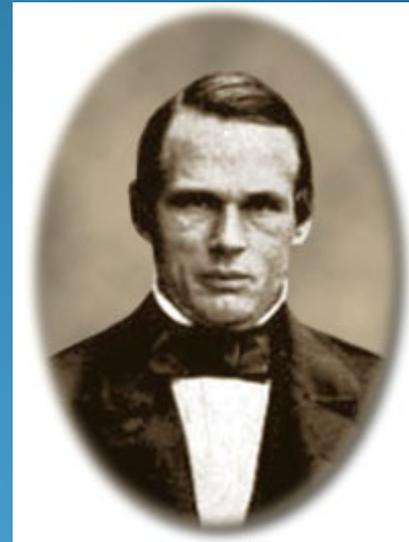




$$\text{Å} = 10^{-10}\text{m} = 0.1 \text{ nm}$$

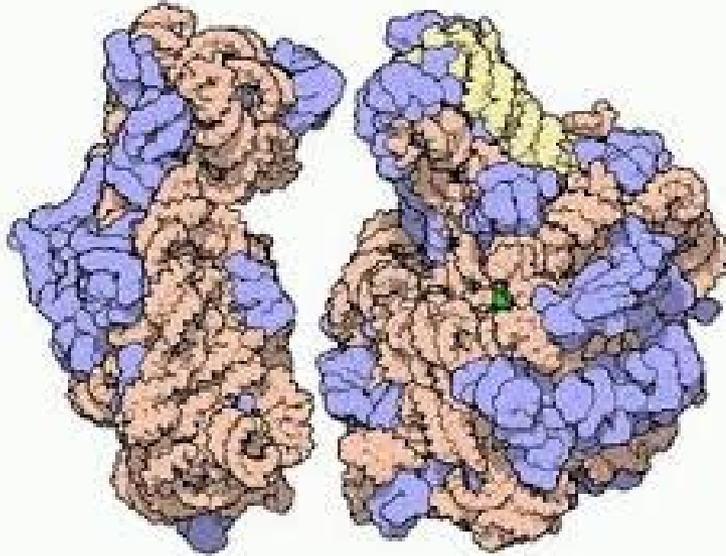
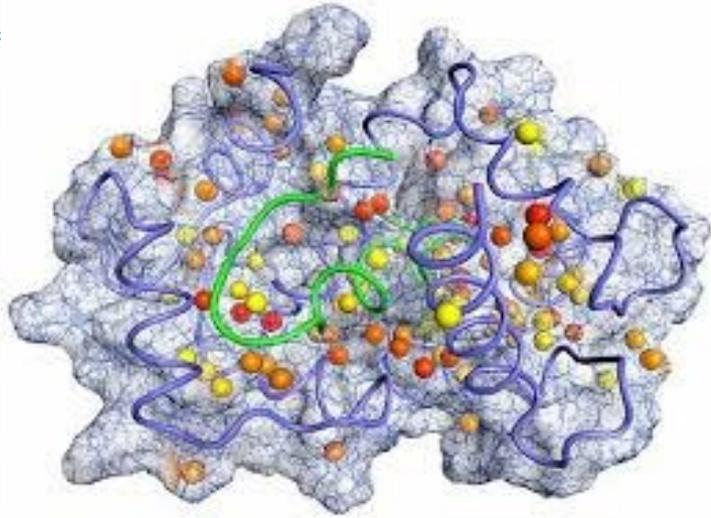
核糖體大小： $\sim 20 \times 20 \times 20 \text{ nm}^3$

DNA寬： $\sim 2 \text{ nm}$



Anders Jonas Ångström





分子質量指分子的實際質量，而非比值。國際單位制中的單位為kg，但由於分子質量很小，所以常用道爾頓（Dalton，Da, D）或原子質量單位（amu，u）或阿佛加德羅常數（ 6×10^{23} ）作為原子或分子質量的單位，大分子（如蛋白質）的分子質量通常使用kDa。

例如二氧化硫（ SO_2 ）的相對分子質量（分子量）為64.06，但分子質量為 $0.06406 \text{ (kg/mol)} \div$ 阿佛加德羅常數 $=1.06374 \times 10^{-25} \text{ kg} = 64.06 \text{ Da}$ 。

核糖體(ribosome)為數十個蛋白質的集合體，不用kDa表示而用S(沉降係數)表示，如70s(原核生物)和80s(真核生物)

量(二)：濃度

克分子濃度：莫耳 (molar, M)

百分濃度：% 重量百分比(w/v)、體積百分比(v/v)

其它：ppm (parts per million)(百萬分之, 10^{-6})

ppb (parts per billion)(十億分之, 10^{-9})

ppt (parts pre trillion)(兆分之, 10^{-12})

重量莫耳濃度(molality)也可稱質量莫耳濃度或重量克分子濃度，用b或m表示)

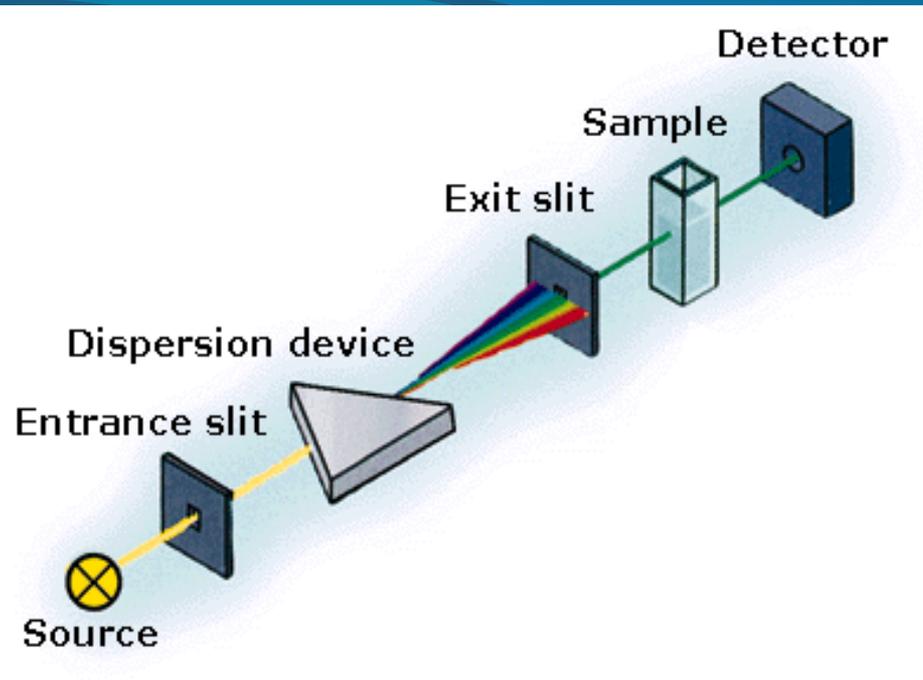
$b = \frac{\text{溶質物質的量}}{\text{溶劑的質量}} \text{ (mol/kg)}$

體積莫耳濃度 (molarity)，化學的一種通用濃度單位，定義為指構成溶液的某組分的物質的量/溶液的體積 (mol/V)



國際單位制前綴常用於表示體積莫耳濃度。以下表格中列出了常用單位：

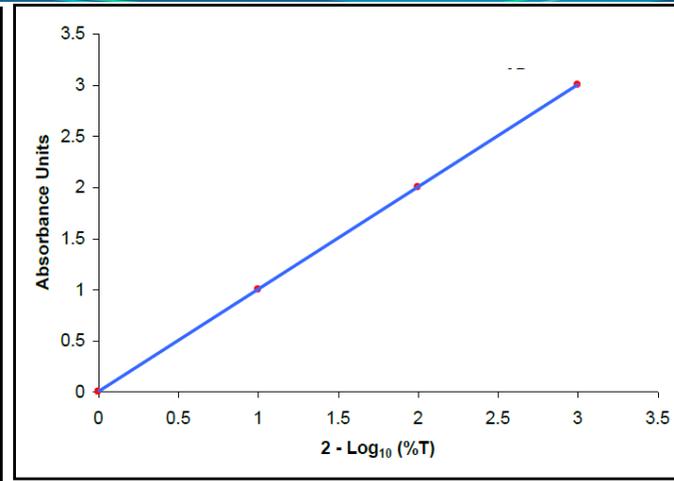
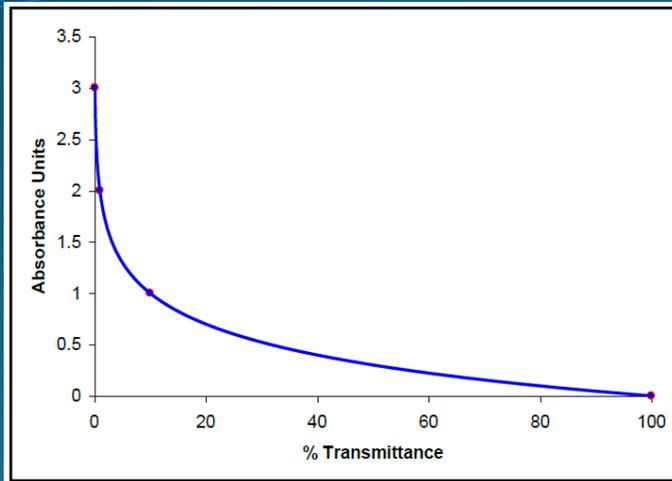
名稱	縮寫	濃度	濃度（國際單位制）
毫莫耳每升	mM	10^{-3} mol/dm^3	10^0 mol/m^3
微莫耳每升	μM	10^{-6} mol/dm^3	10^{-3} mol/m^3
奈莫耳每升	nM	10^{-9} mol/dm^3	10^{-6} mol/m^3
皮莫耳每升	pM	$10^{-12} \text{ mol/dm}^3$	10^{-9} mol/m^3
飛莫耳每升	fM	$10^{-15} \text{ mol/dm}^3$	10^{-12} mol/m^3
阿莫耳每升	aM	$10^{-18} \text{ mol/dm}^3$	10^{-15} mol/m^3
介莫耳每升	zM	$10^{-21} \text{ mol/dm}^3$	10^{-18} mol/m^3
攸莫耳每升	yM	$10^{-24} \text{ mol/dm}^3$	10^{-21} mol/m^3



分光分度計



$$\%T = [(Transmitted\ Light) / (Incident\ Light)] * 100$$



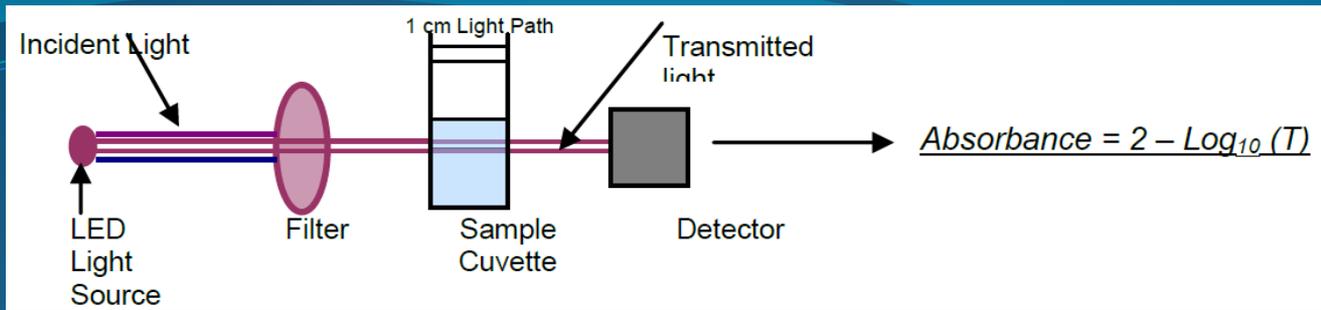
Beer-Lambert Law

$$Absorbance = 2 - \log_{10}(T)$$

穿透率的定義即是射出樣品的光線佔所有入射光線的比例, $T = (\text{射出光} / \text{入射光}) \times 100\%$. 可以依此來判斷待測樣品對於不同波段的光源之阻隔效果為何.

假設某一化學物質(或溶液)可吸收某一波長的光, 則該化學物質在溶液中的濃度, 會與溶液對該波長的吸光值成一正比關係. 其原理就是利用該物質對某特定光線的吸收程度, 比例推算之(亦稱吸光法). 若濃度愈高, 則對光線吸收的程度愈高.





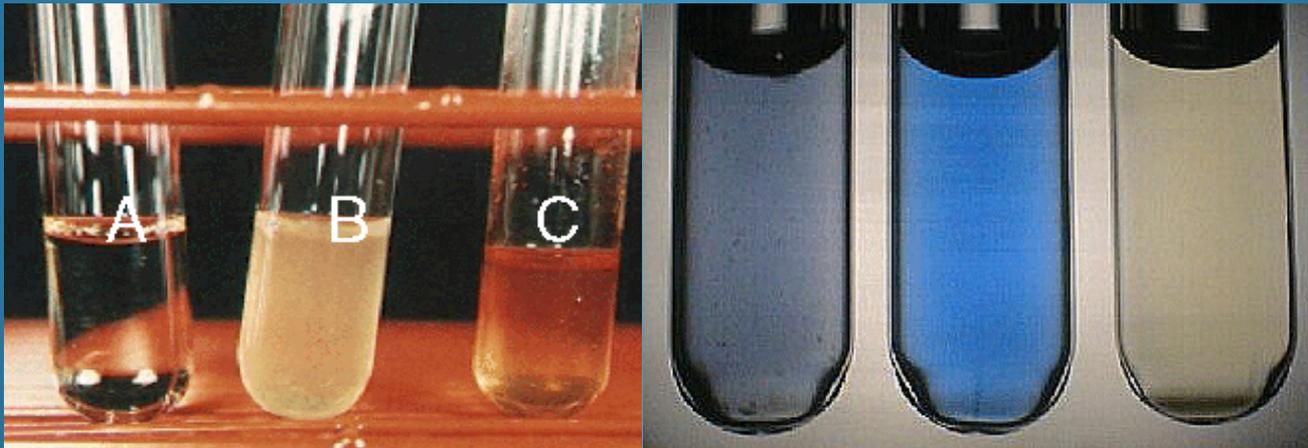
$T = I / I_0$ Transmittance (透光度)

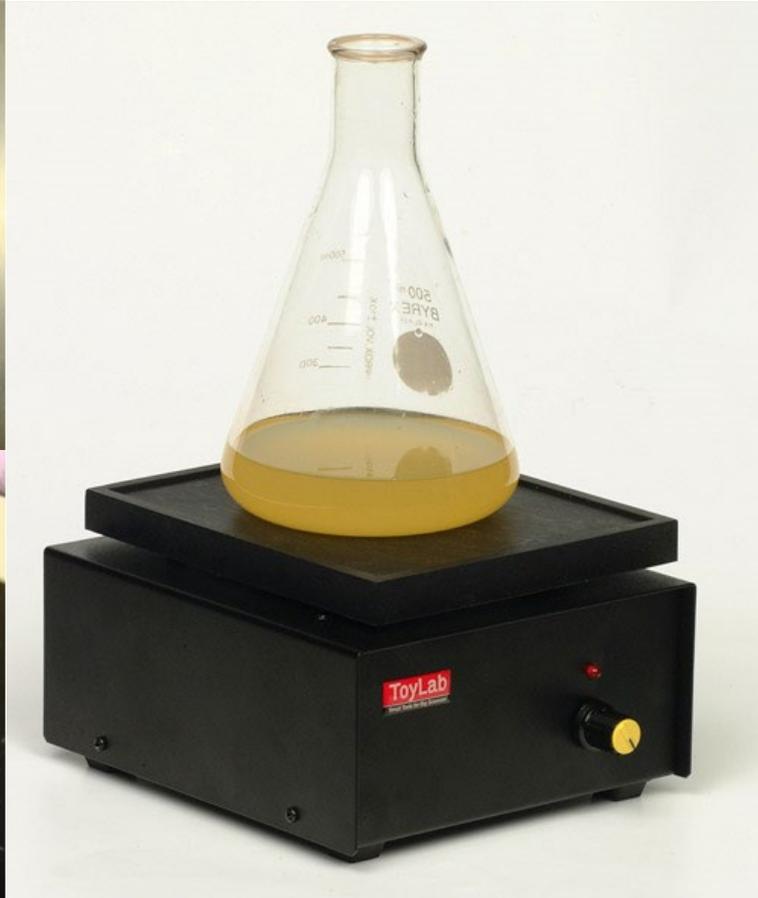
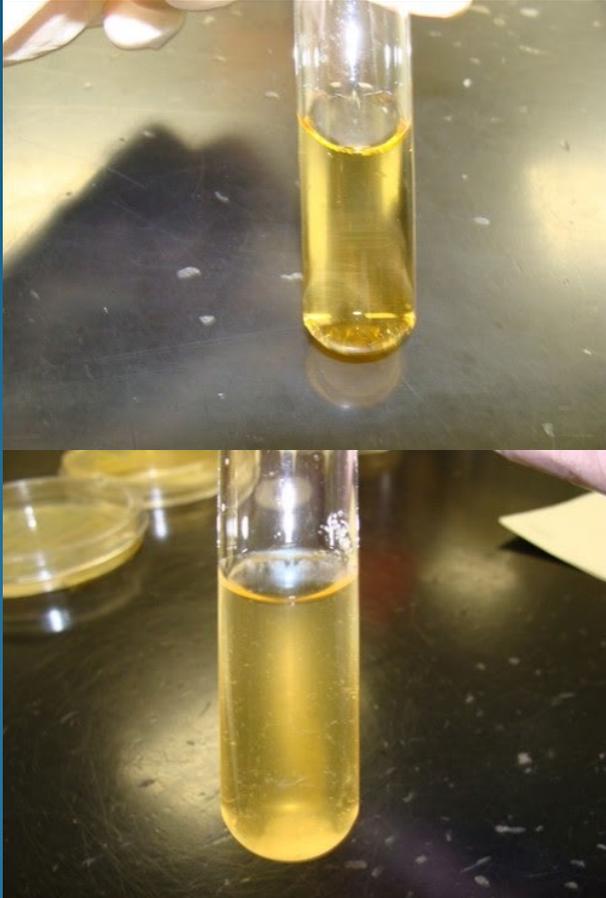
O.D. = $-\log T = \log (1/T)$

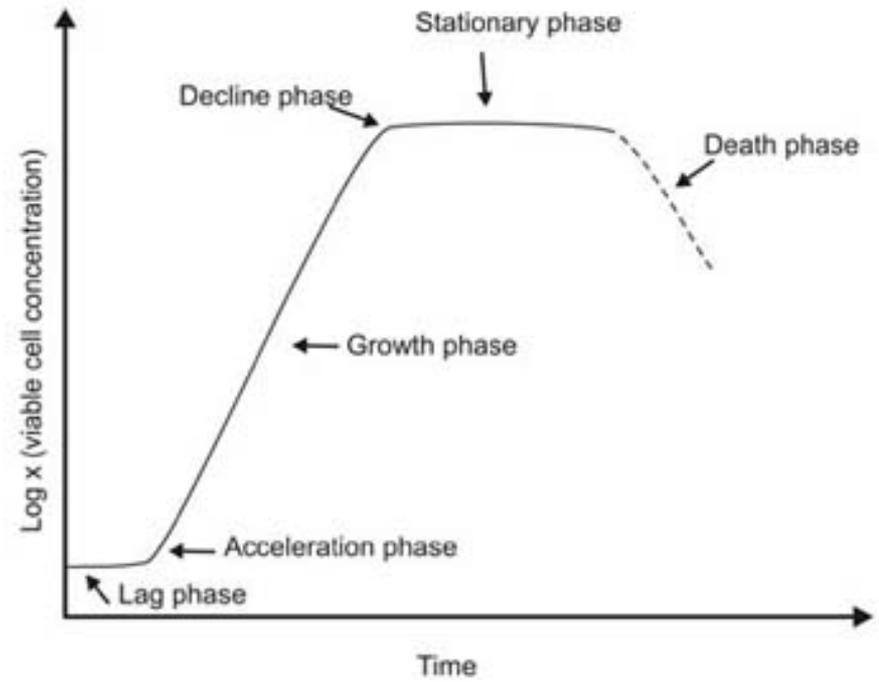
O.D. (optical density, 光密度)

A (absorbance, 吸光率)

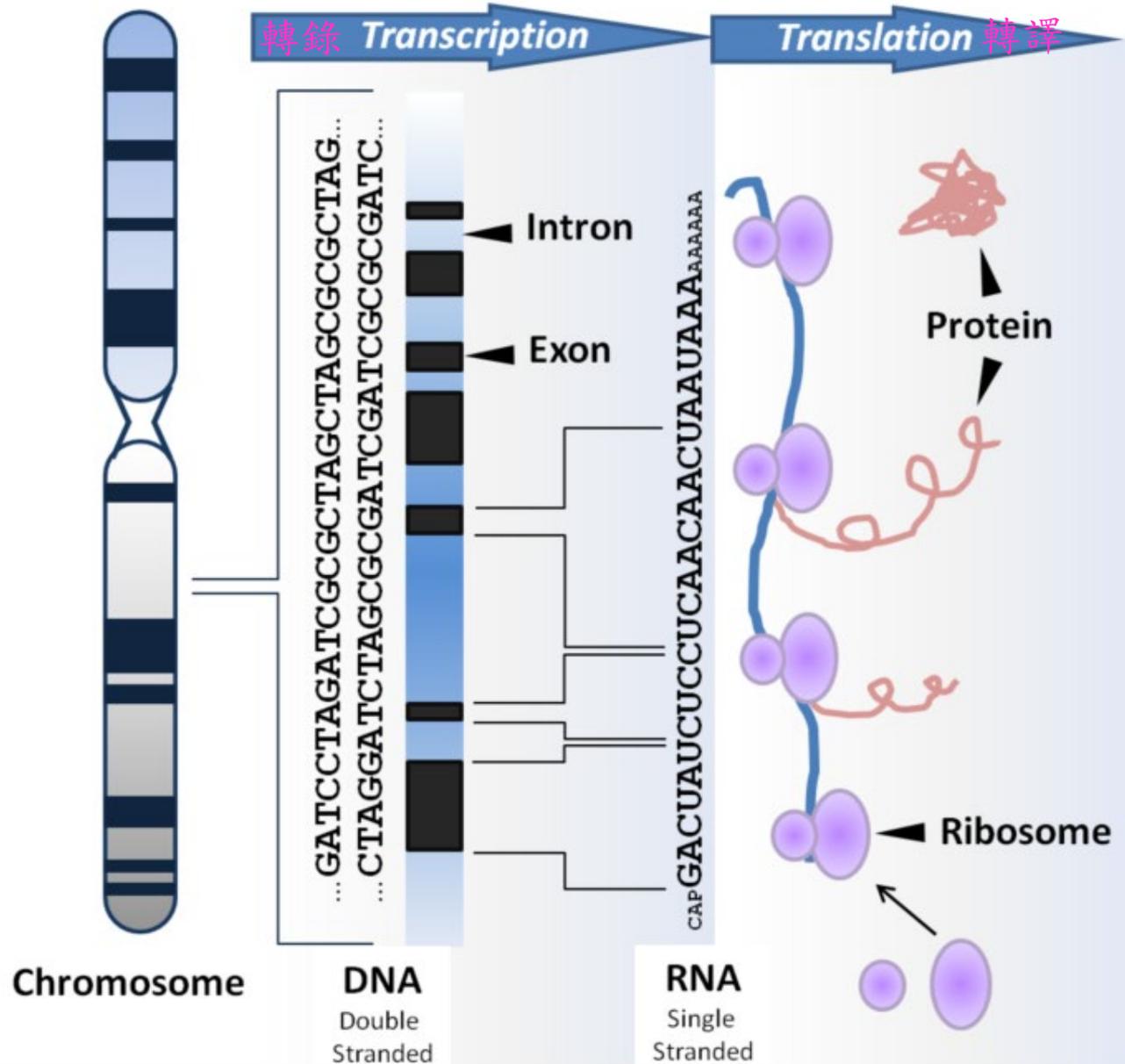
$A = -\log T = \log (1/T)$

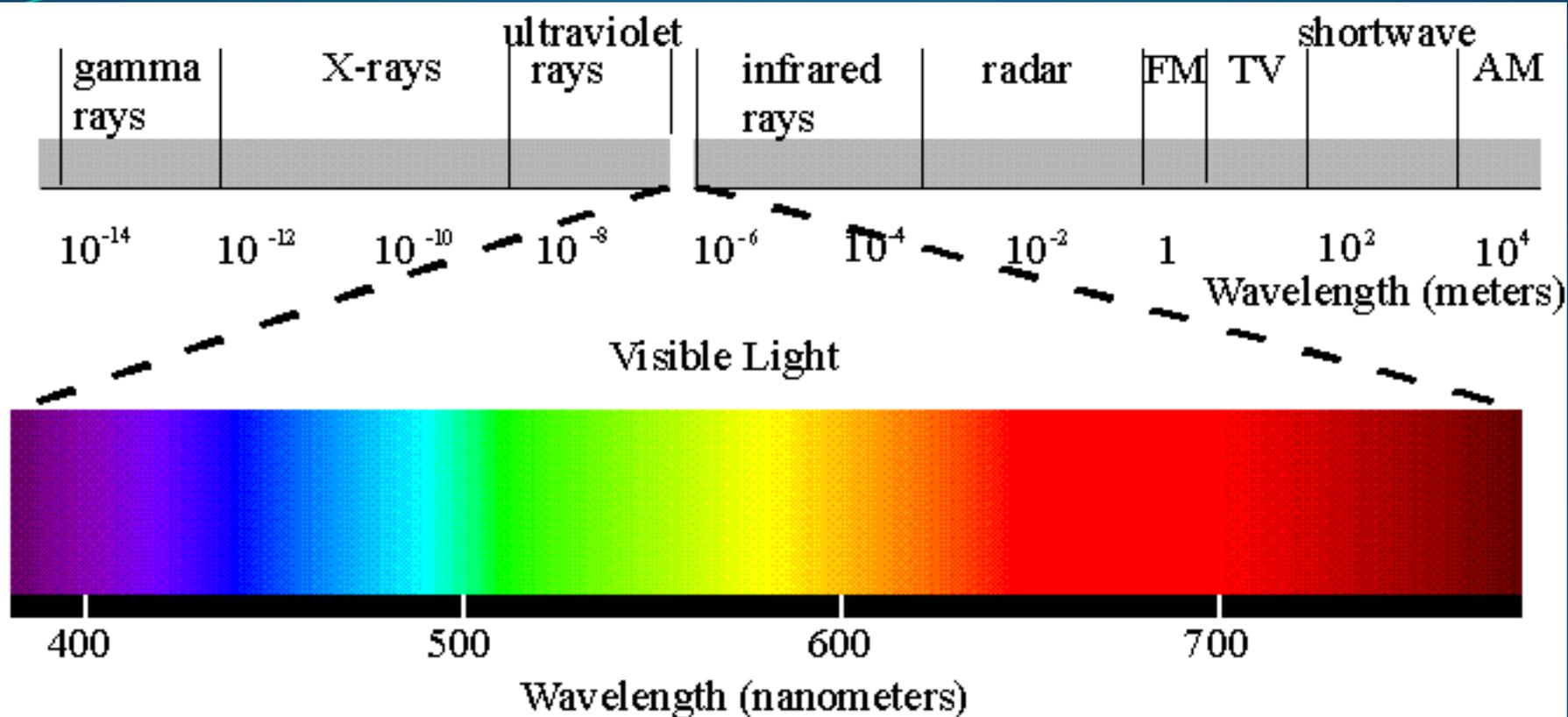






生物運作的原則: Central Dogma of Biology



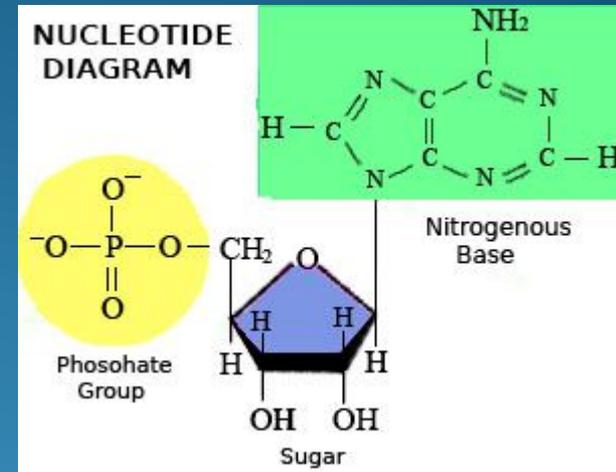


[Table of Contents](#)

[Visual Stimulus](#)



核苷酸由組成：氮鹽基+五
碳糖+磷酸根



核苷酸的含氮鹽基又可分為
五類：腺嘌呤(A)、鳥糞嘌
呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧
啶(C)、尿嘧啶(U)

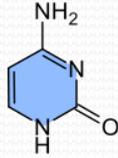


單股螺旋

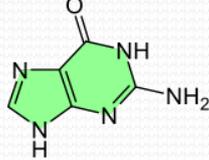
雙股螺旋

腺嘌呤(A)
鳥糞嘌呤(G)
胸腺嘧啶(T)
胞嘧啶(C)
尿嘧啶(U)

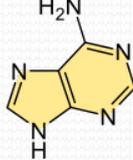
Cytosine **C**



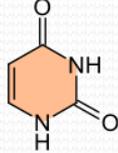
Guanine **G**



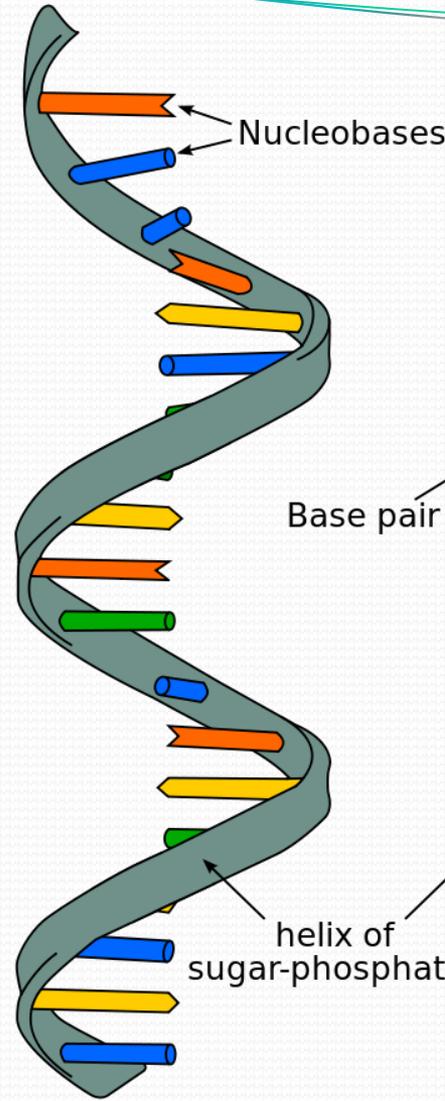
Adenine **A**



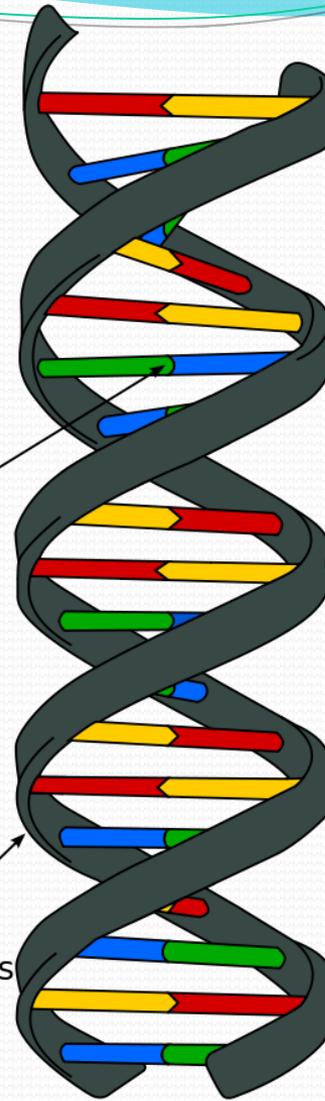
Uracil **U**



Nucleobases
of RNA

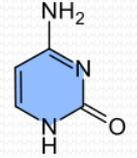


RNA
Ribonucleic acid
核糖核酸

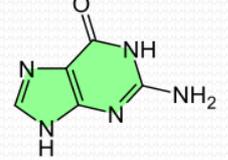


DNA
Deoxyribonucleic acid
去氧核糖核酸

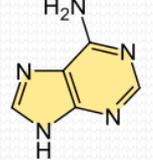
Cytosine **C**



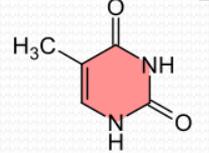
Guanine **G**



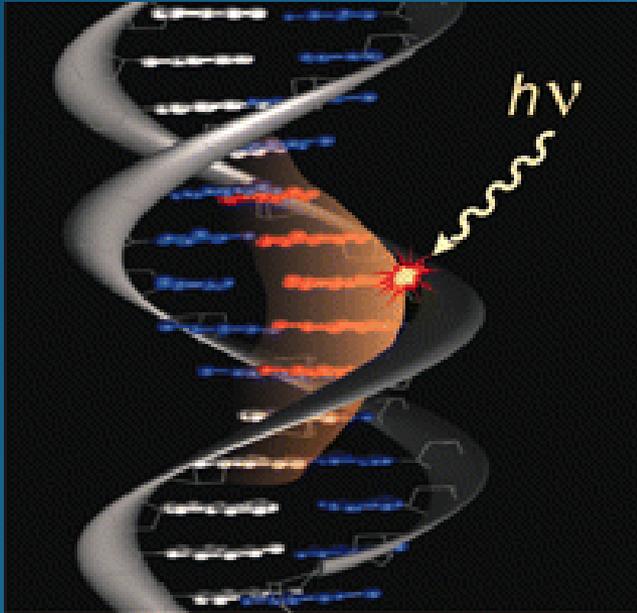
Adenine **A**



Thymine **T**

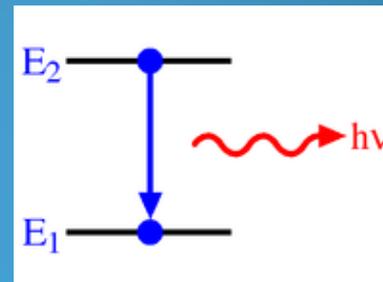
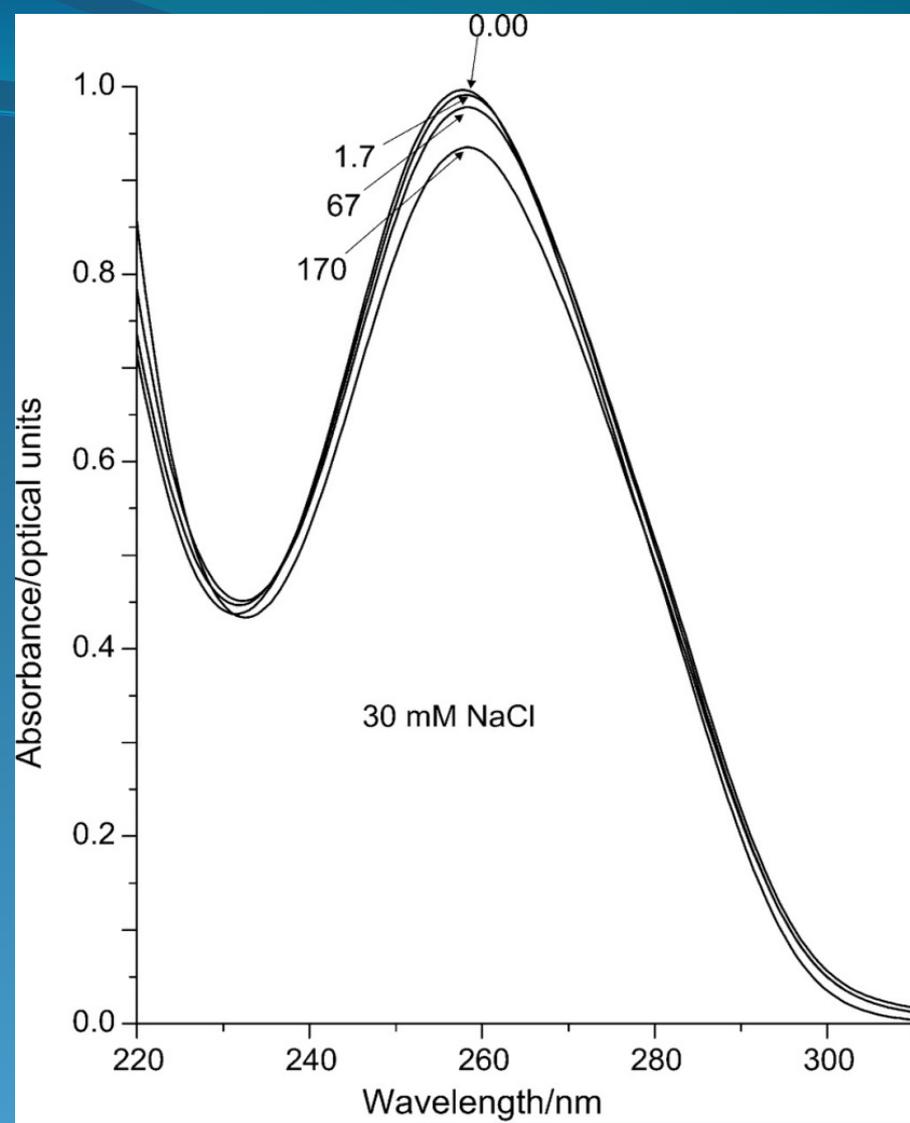


Nucleobases
of DNA



核酸定量

1OD吸光值 = 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA
= 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA
= 33 $\mu\text{g/ml}$ RNA



- 核酸的吸光質主要是在230 nm、260 nm和280 nm的波長。
 - 230 nm由殘留的有機鹽類貢獻、260 nm是核酸的濃度，而280 nm則是由蛋白質貢獻出來的。因此 $A_{260/280}$ 的比值可預估樣本中的核酸純度， $A_{260/230}$ 的比值則告訴我們是否有殘留鹽類的汙染。
- 1 O.D.在不同種類核酸中代表不同的濃度，以雙股DNA來說，1 OD = ~50 $\mu\text{g/ml}$ 、單股DNA, 1 OD = ~40 $\mu\text{g/ml}$ 、單股RNA, 1 OD = ~33 $\mu\text{g/ml}$ 。依照以上之濃度，依算式可以計算出核酸的濃度。如: DNA濃度 = OD₂₆₀ x 50 $\mu\text{g/ml}$ x 稀釋倍數。測量DNA濃度時， $A_{260/280}$ 的理想值介於1.7~1.9； $A_{260/230}$ 理想值介於2.0~2.4。測量RNA濃度時 $A_{260/280}$ 理想值介於1.8~2.0

蛋白質定量：

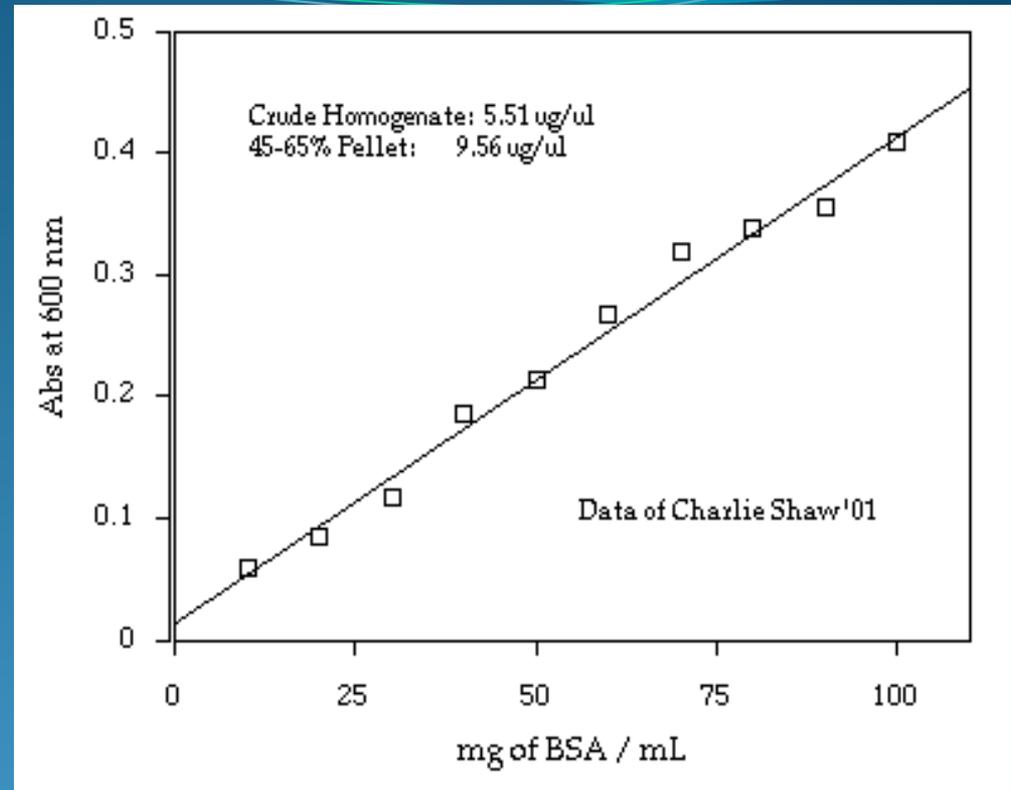
1. 直接測量，UV法
280nm wavelength

2. 比色法

Lowry method

BCA method

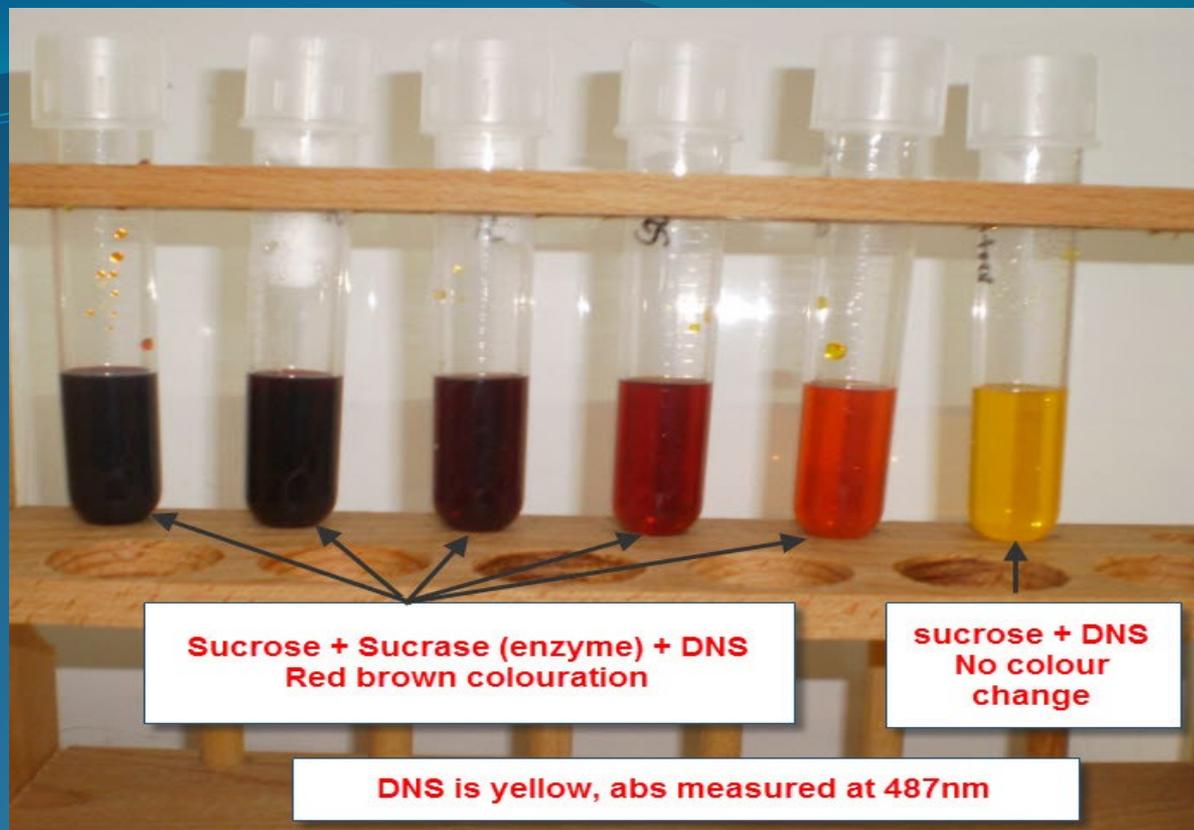
Bradford method



Lowry method (蛋白質定量法之一)

銅離子在鹼性溶液中，與peptide bonds形成複合物後，可進一步的將Folin reagent內的phosphomolybdate-phosphotungstate 還原而使溶液變為藍色



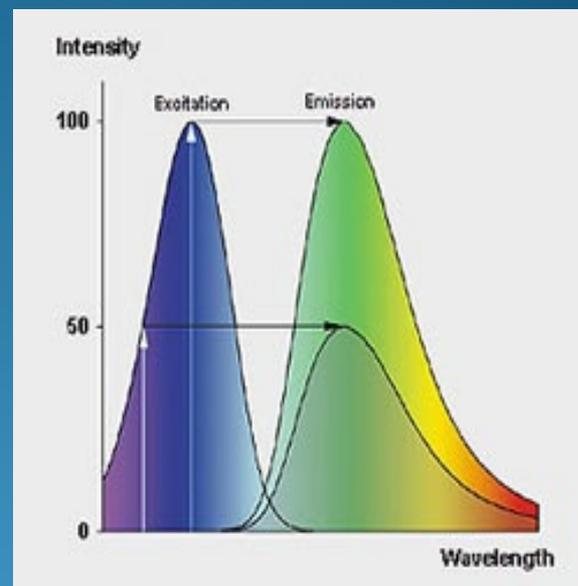


DNSA method (還原糖定量法)

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑之反應是利用DNS具還原力之特性，因此碳水化合物只要具有游離或游離趨勢之醛或酮基，即能在鹼性溶液下有還原的能力而進行以下反應：

Reduction

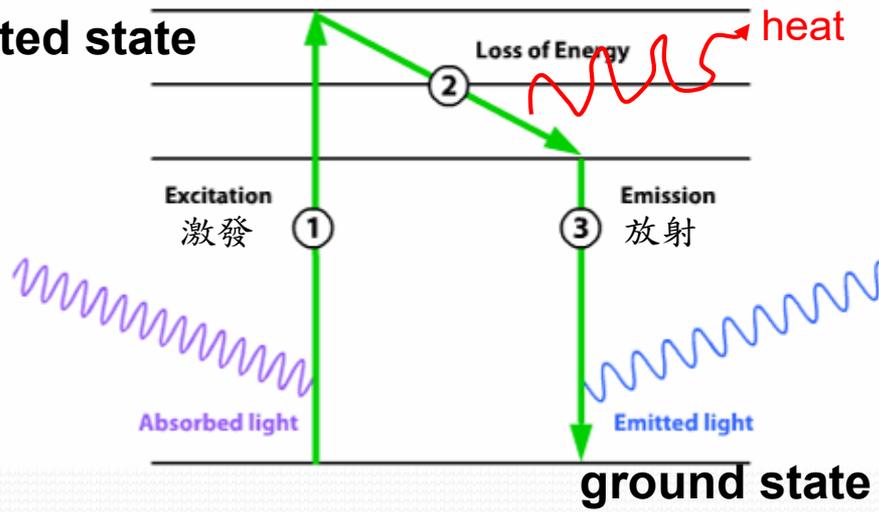
3,5-dinitrosalicylic acid (**yellow**) → 3-amino-5-nitrosalicylic acid (**orange-red**)
於一定範圍內，顏色的深淺強度和還原糖濃度成正比，故以標準葡萄糖檢量線來定量樣品中還原糖的比例。(測540 nm波長之吸光值)



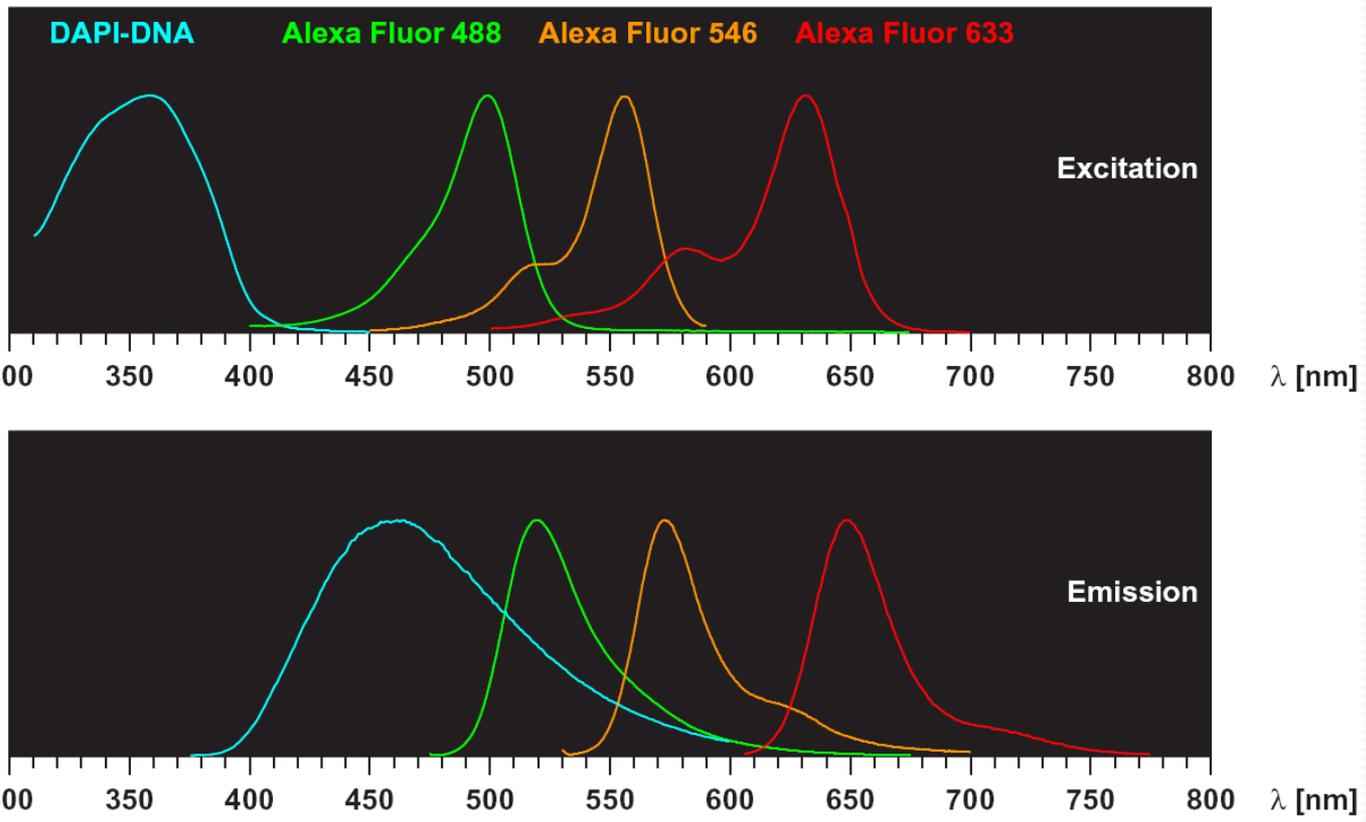
簡易螢光儀、激發光(excitation)與放散光(emission)



excited state



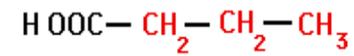
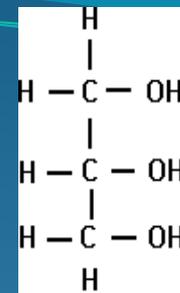
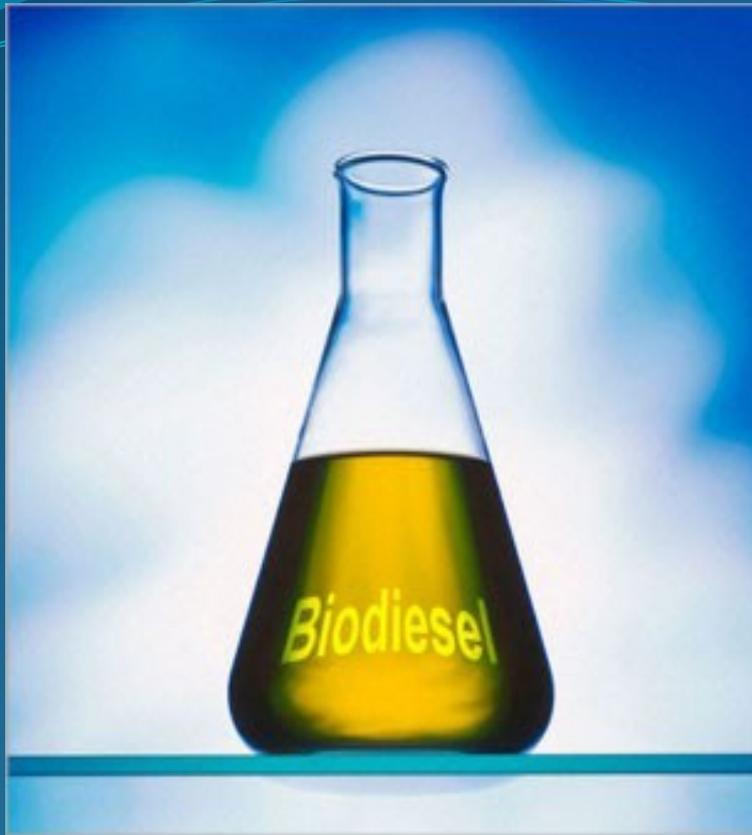
ground state





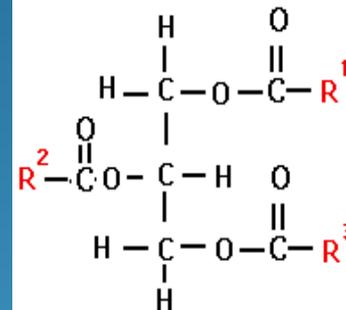
Agricultural waste and algae culture



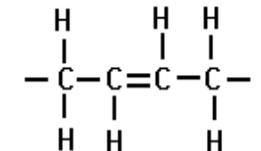


Saturated Fatty Acid (Butyric acid)

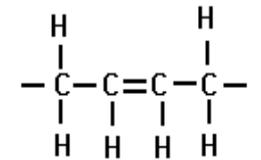
Glycerol



Triglyceride



Trans double bond

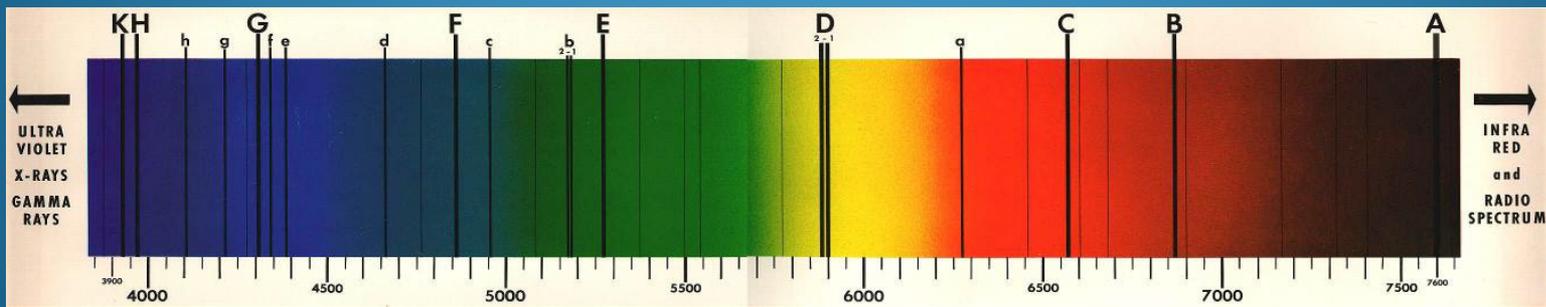
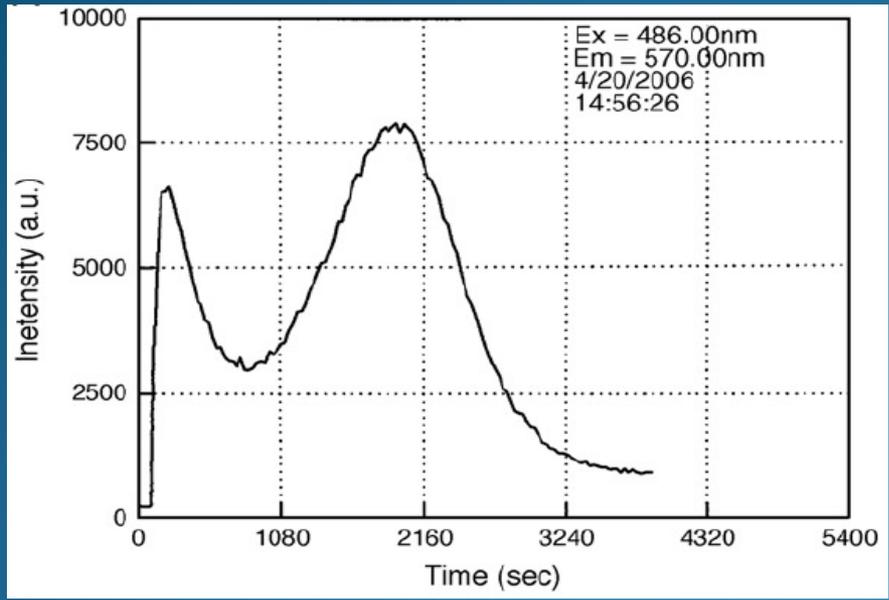


Cis double bond

Unsaturated



以分光儀混濁度配合尼羅紅(Nile red)螢光計算單位體積含油量，並以索氏油脂萃取儀檢驗實際含油量。



評估方法





Geiger counter (輻射測量儀)
劑量(Dose)：物質吸收輻射之能量
單位：西弗(Sv)、侖目(rem)
自然背景值約為 $0.05-0.2\mu\text{Sv/hr}$

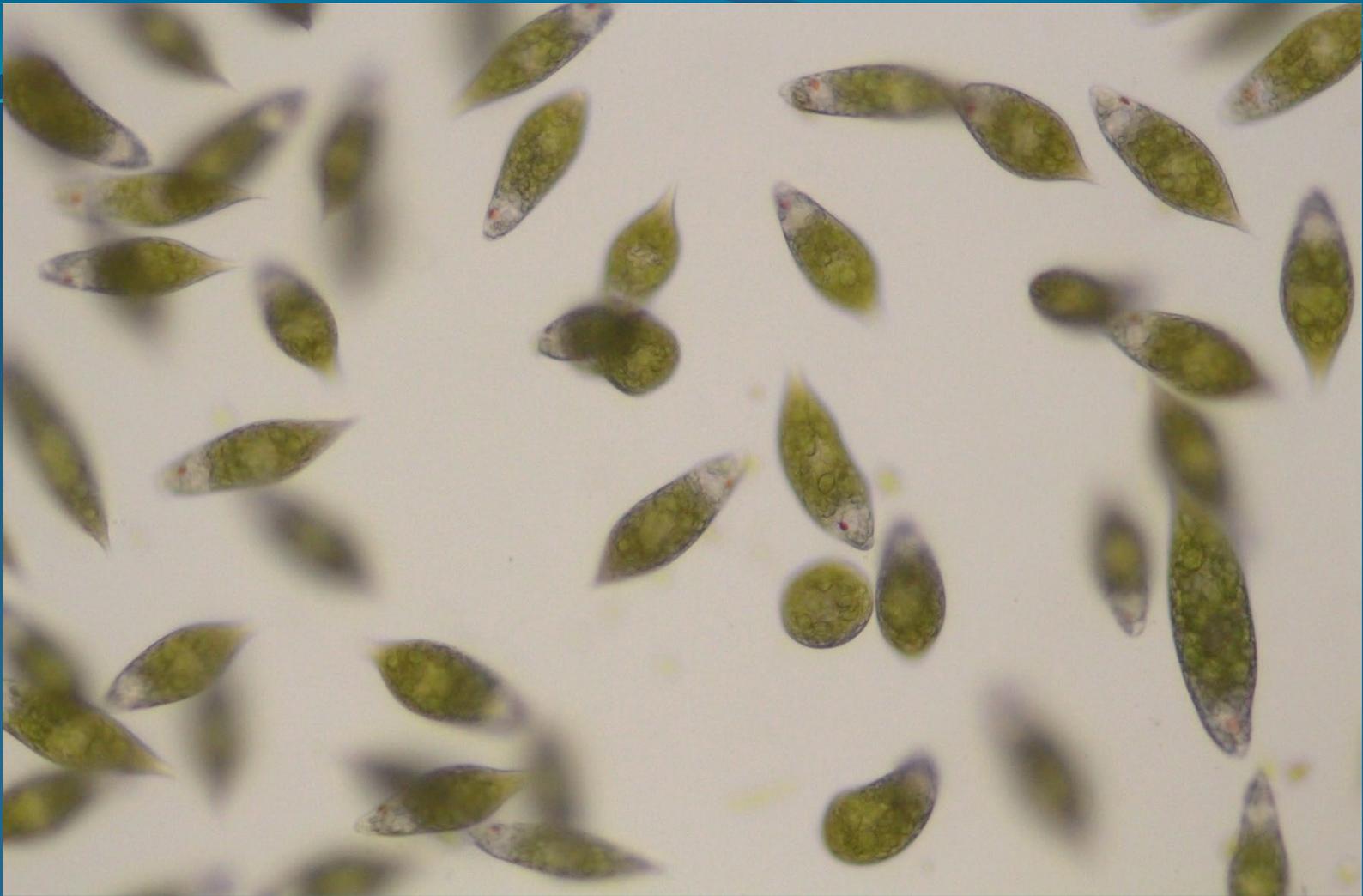


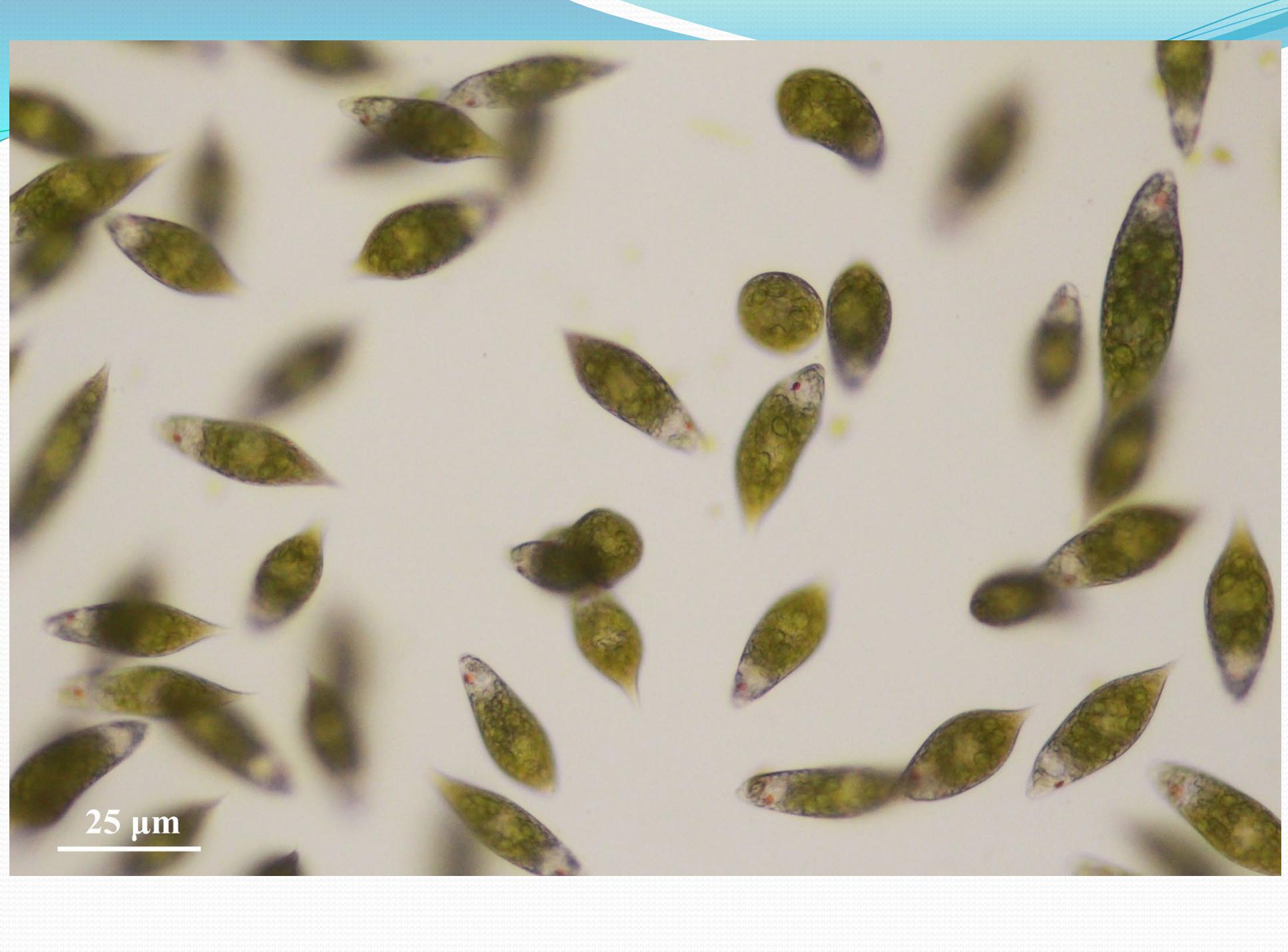
Liquid Scintillation counter
(液態閃爍計數器)

利用閃爍材料如螢光劑將放射性同位素之輻射能轉變為光能再由光電管將光能轉為電脈衝進而測定輻射線的數量及能量。光電管可將閃爍脈衝所輸出微弱的光轉變成電子訊號且不會產生大量的雜訊而使閃爍計數法廣泛應用於輻射偵測。

顯微鏡概論

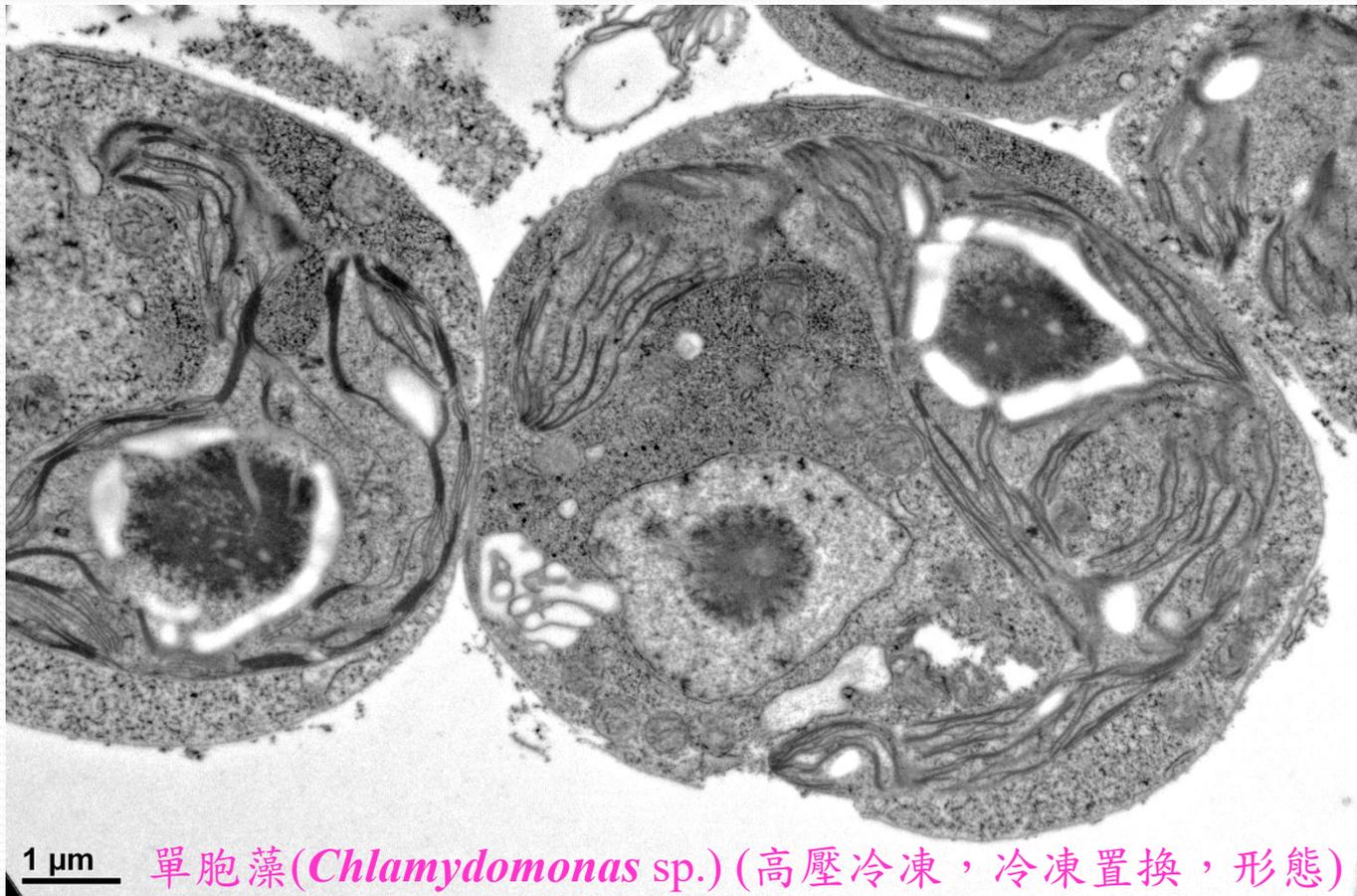
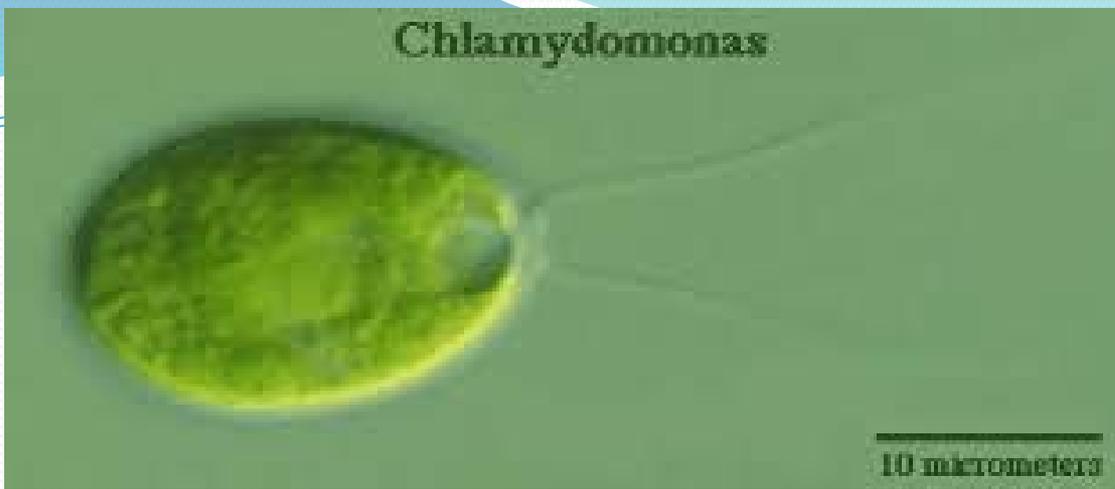
Introduction to Microscope





25 μm

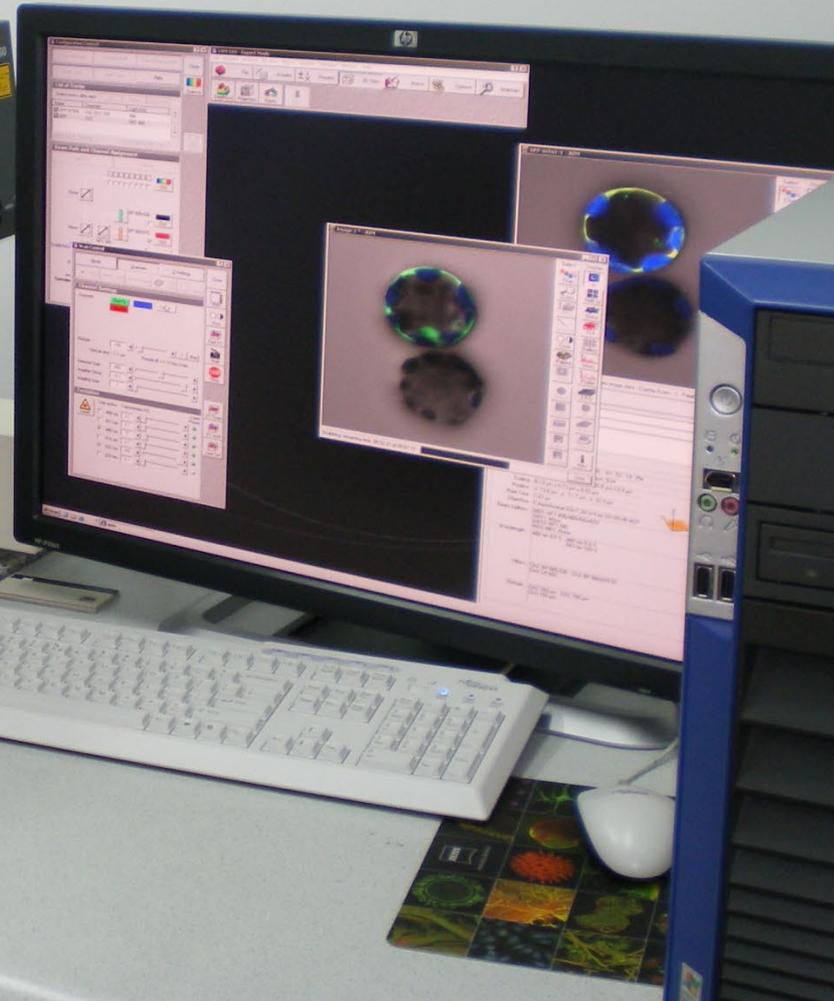
Chlamydomonas



1 μm

單胞藻(*Chlamydomonas* sp.) (高壓冷凍, 冷凍置換, 形態)

正立雷射共軛焦 掃描顯微鏡



Resolution

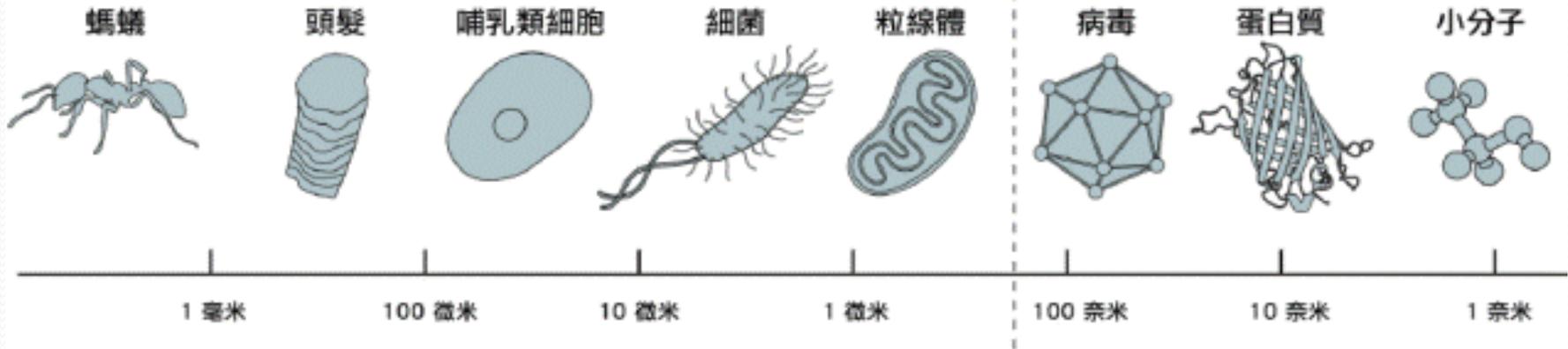
Naked eyes 0.2mm

LM $0.2\mu\text{m} \rightarrow 40\text{nm}$

EM $0.2\text{nm} \rightarrow 0.1\text{nm}$

Resolution(Resolving power)(解析率)：
區分兩點的最小距離

阿貝繞射極限 (0.2 微米)



阿貝(Abbe)方程式 繞射極限
解析度(R)= $0.61\lambda / NA (n\sin\theta)$

λ : 入射光波長

n: 環境折射率

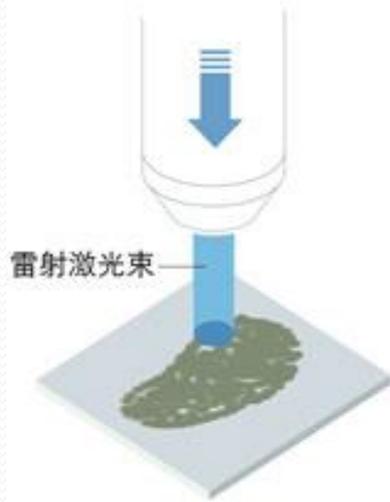
θ : 物鏡最大收光角度的一半

2014年的諾貝爾化學獎

- 艾瑞克·貝齊格(Eric Betzig)
藉著影像的重疊超越阿貝繞射極限
- 史蒂芬·海爾(Stefan W. Hell)
受激放射消去法(stimulated emission depletion, STED)
- 威廉·莫納(William E. Moerner)
首先觀測到單一的螢光分子

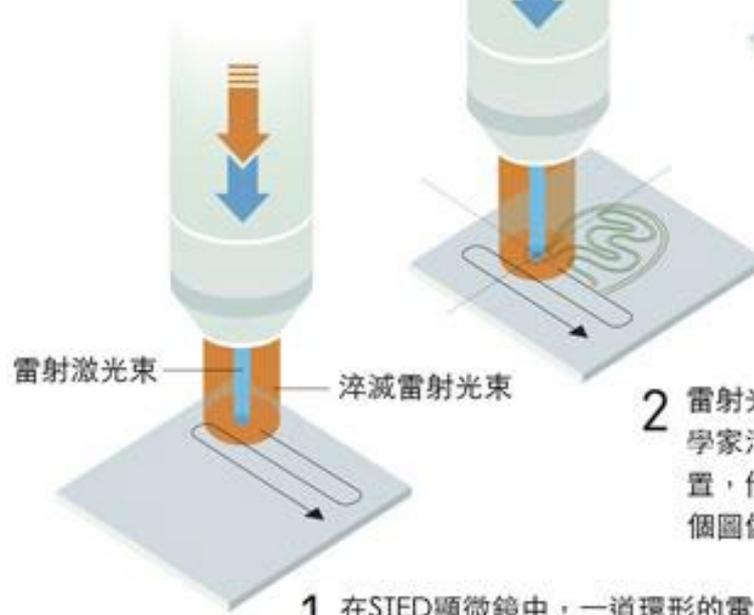
STED顯微鏡術的原理

尋常的光學顯微鏡



在尋常的光學顯微鏡中，可以辨別一個粒線體的輪廓，但其解析度卻永遠無法好過0.2微米

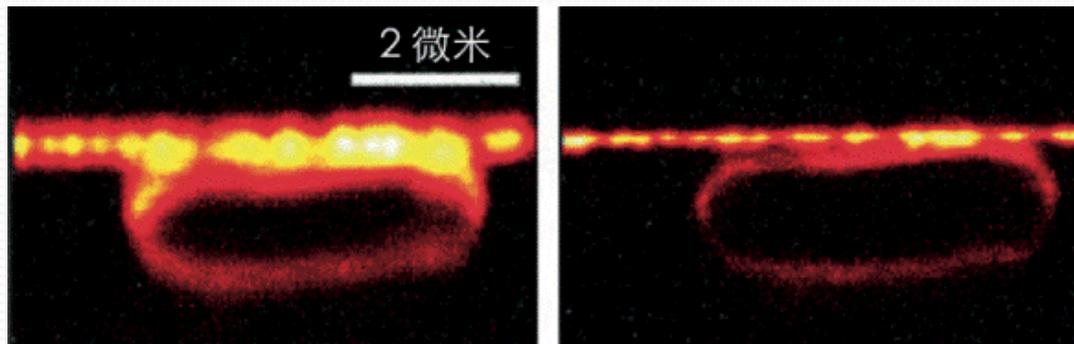
STED顯微鏡



1 在STED顯微鏡中，一道環形的雷射光束，淬滅了一個奈米尺度大小的體積之外之所有螢光。

2 雷射光束掃瞄過整個樣品，因為科學家清楚的知道雷射光束照射的位置，他們可以利用這個資訊，對這個圖像取得更高的解析度。

3 最後取得之圖像，其解析度可以好過0.2微米。



轉載自台大化學網站

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8206-8210, 2000

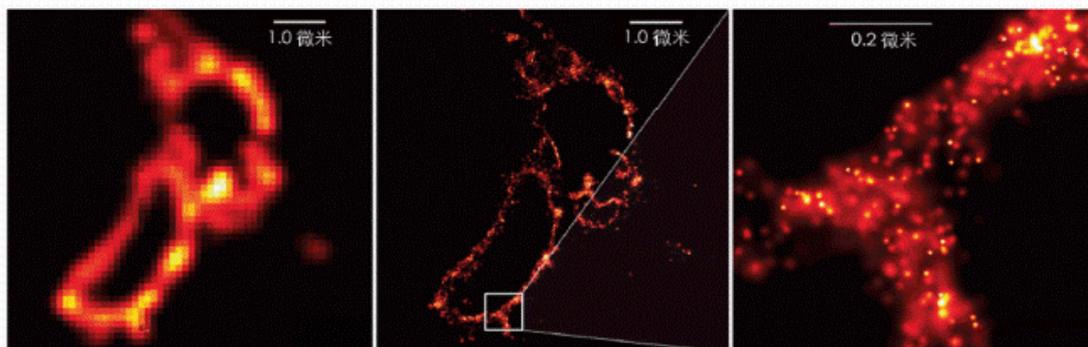
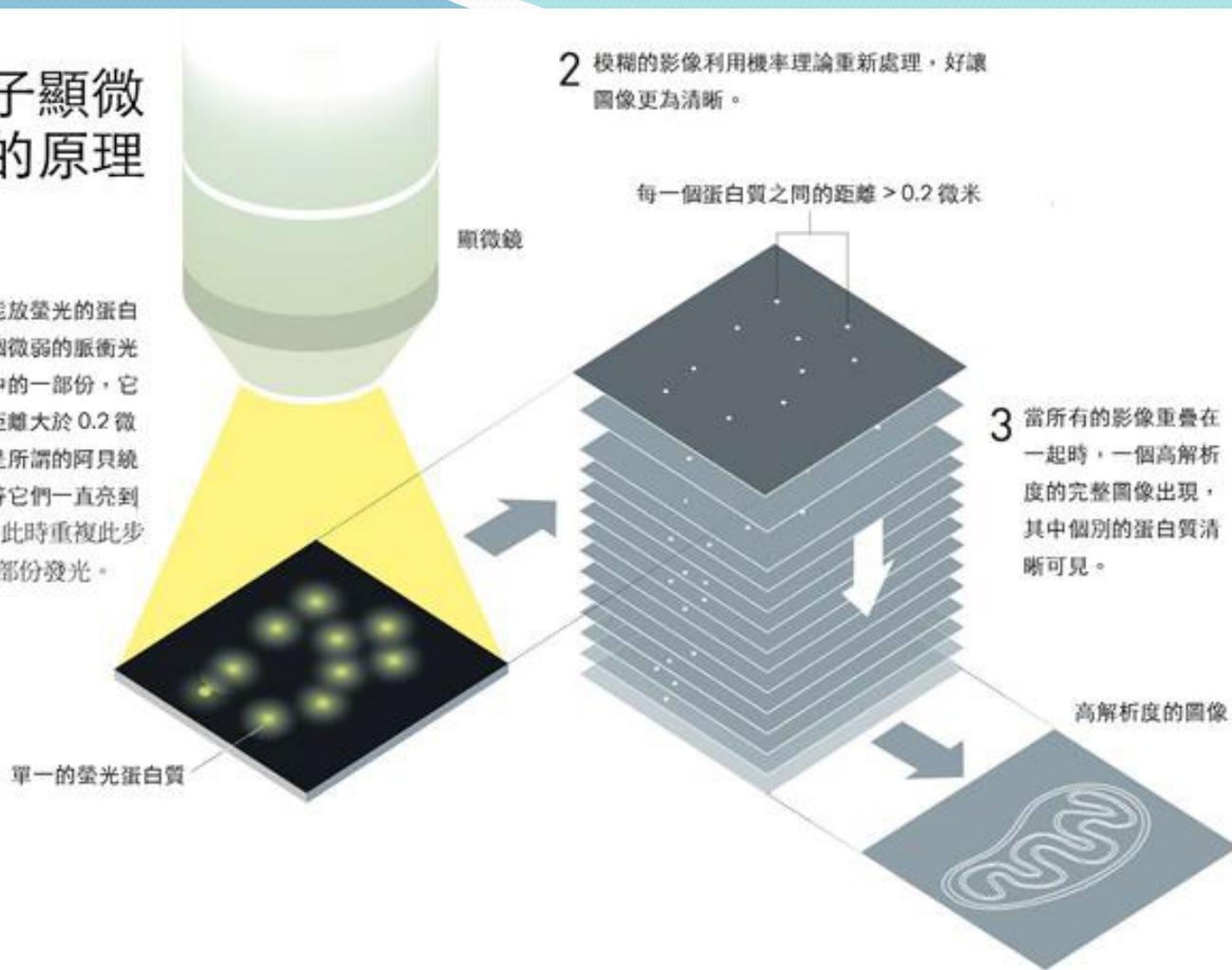
圖四

單分子顯微鏡術的原理

1 對一群都能發熒光的蛋白質，以一個微弱的脈衝光活化了其中的一部份，它們之間的距離大於 0.2 微米，也就是所謂的阿貝繞射極限，等它們一直亮到淬滅為止，此時重複此步驟讓另一部份發光。

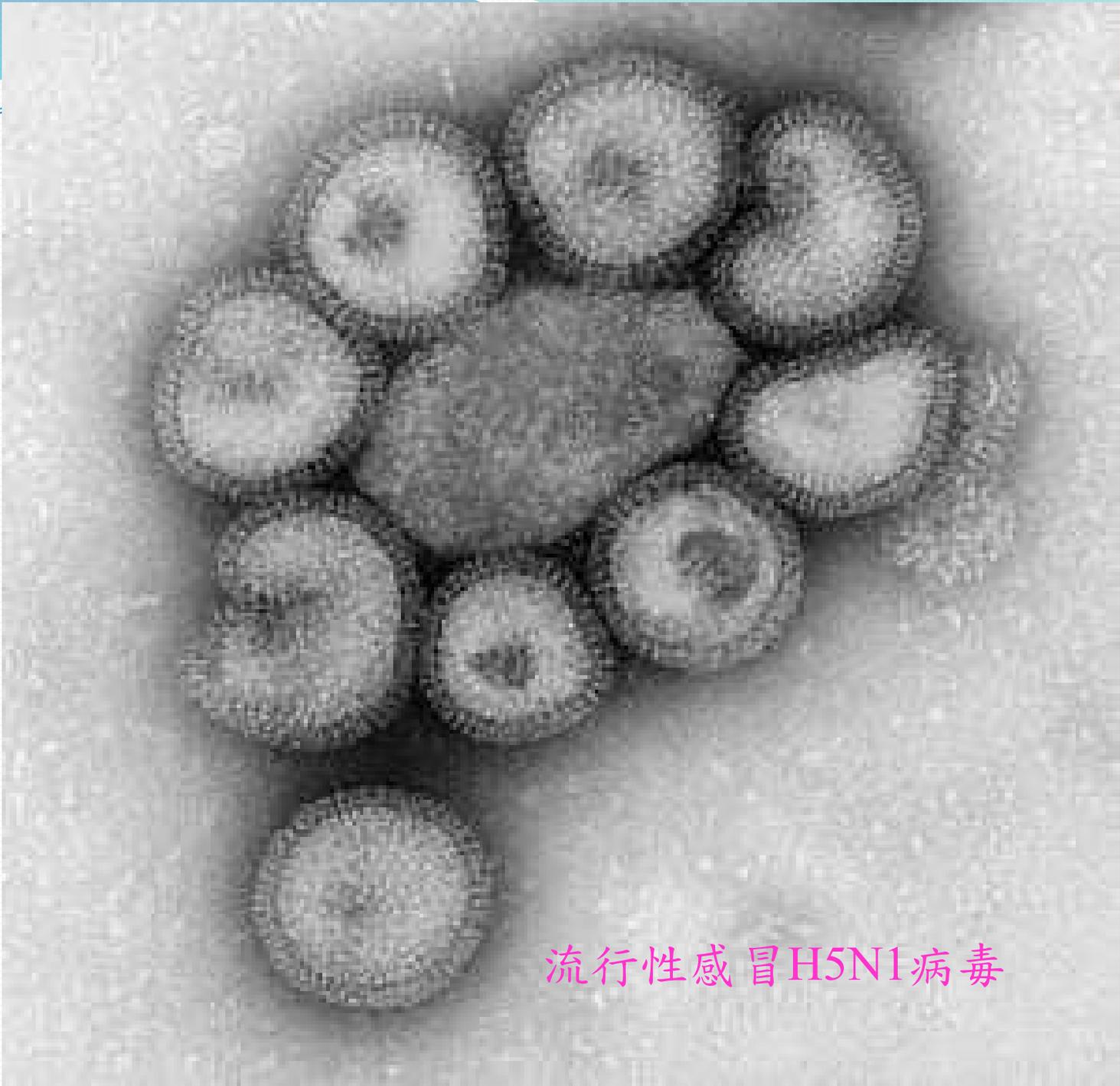
2 模糊的影像利用機率理論重新處理，好讓圖像更為清晰。

3 當所有的影像重疊在一起時，一個高解析度的完整圖像出現，其中個別的蛋白質清晰可見。



轉載自台大化學網站

Science 313:1642-1645, 2006

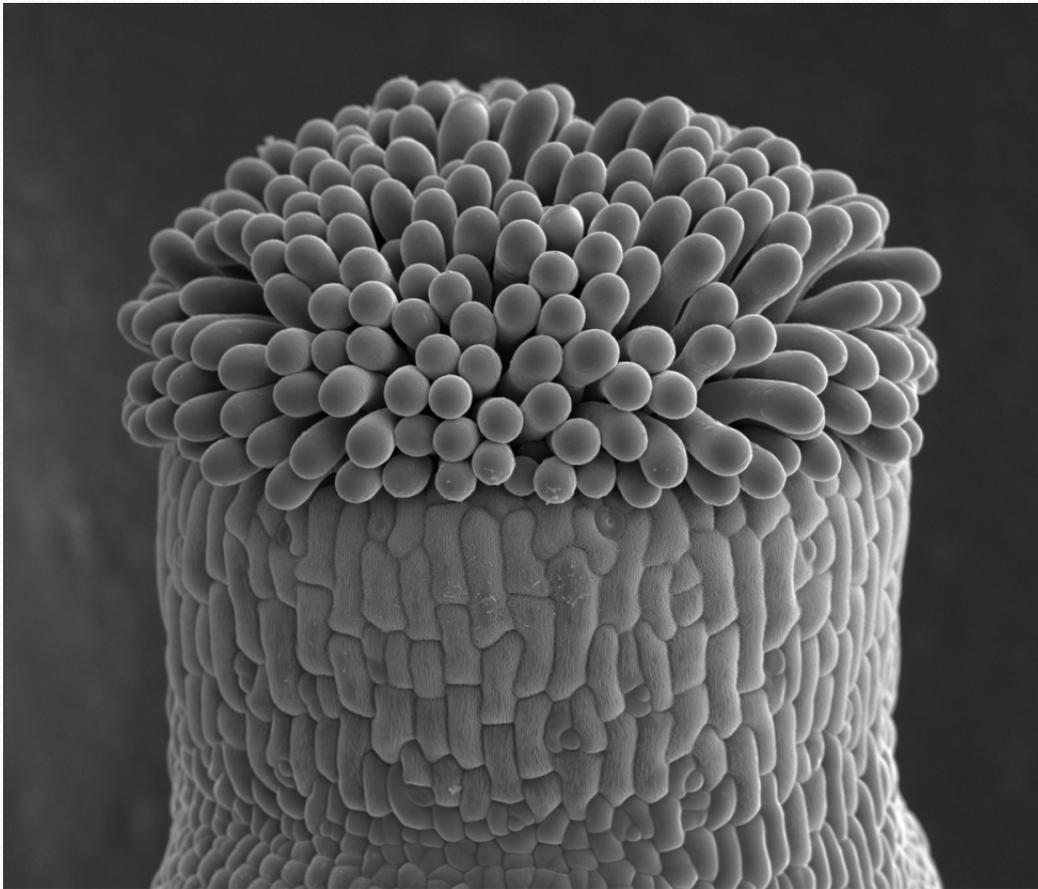


流行性感冒H5N1病毒

電子顯微鏡家族

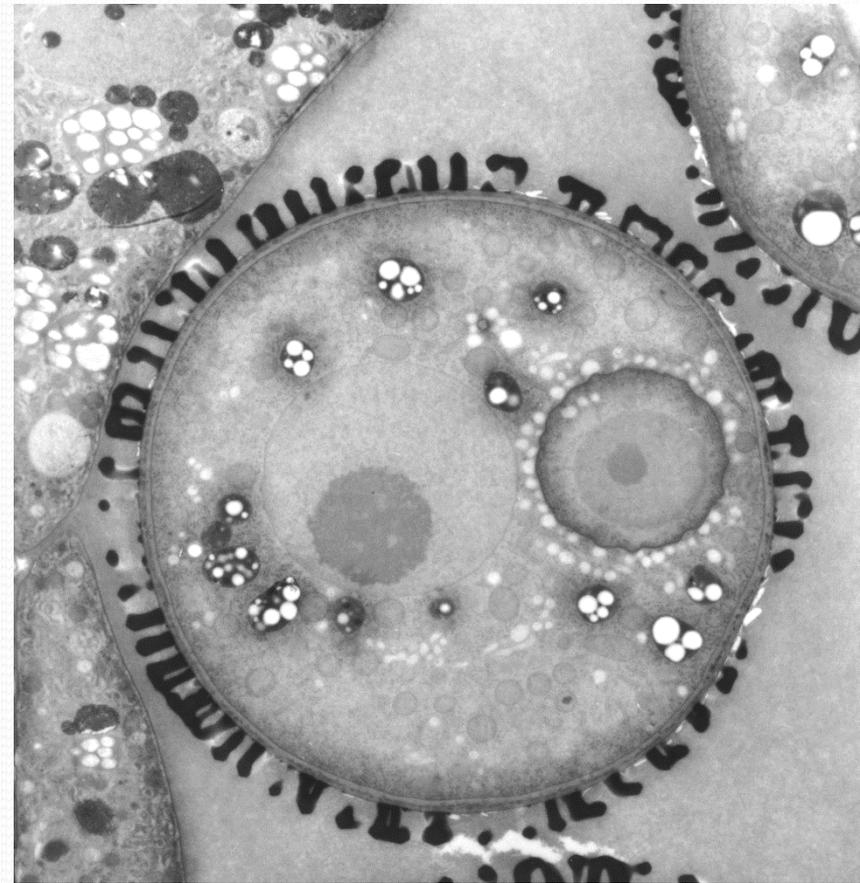
1. 穿透式電子顯微鏡
(Transmission Electron Microscope)
2. 掃描式電子顯微鏡
(Scanning Electron Microscope)
3. 掃描穿透式電子顯微鏡
(Scanning Transmission Electron Microscope)
4. 電子微探儀
(Electron Probe X-ray Microanalyzer, EPMA)
5. 歐傑電子能譜儀
(Auger Electron Spectroscopy, AES)

掃描式電子顯微鏡 外部形態



阿拉伯芥年輕的雌蕊

穿透式電子顯微鏡 內部構造



阿拉伯芥雙細胞花粉

掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM)

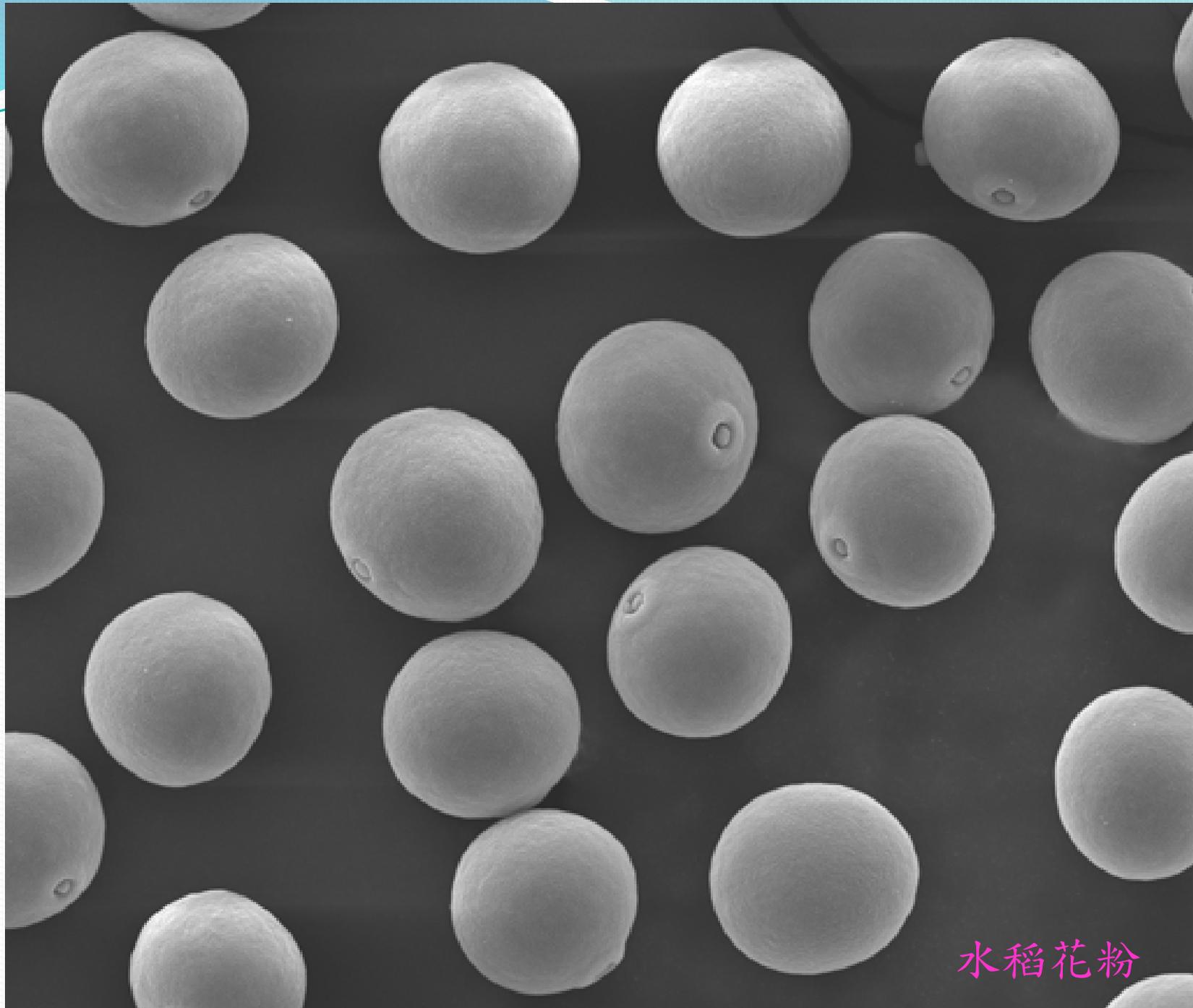




穿透式電子顯微鏡
Transmission Electron
Microscope (TEM)

解析率的演進

- 1932 Ruska & Knoll發明
- 1937 英國建立第一台商售TEM
- 1938 加拿大建立第二台商售TEM
解析率14nm
- 1947 TEM解析率1nm
- 1971 TEM解析率0.35nm
- 1979 TEM解析率0.2nm
- 1998 TEM解析率0.13nm(球面像差矯正器)
- 2009 TEM解析率0.1nm(單光濾光片)

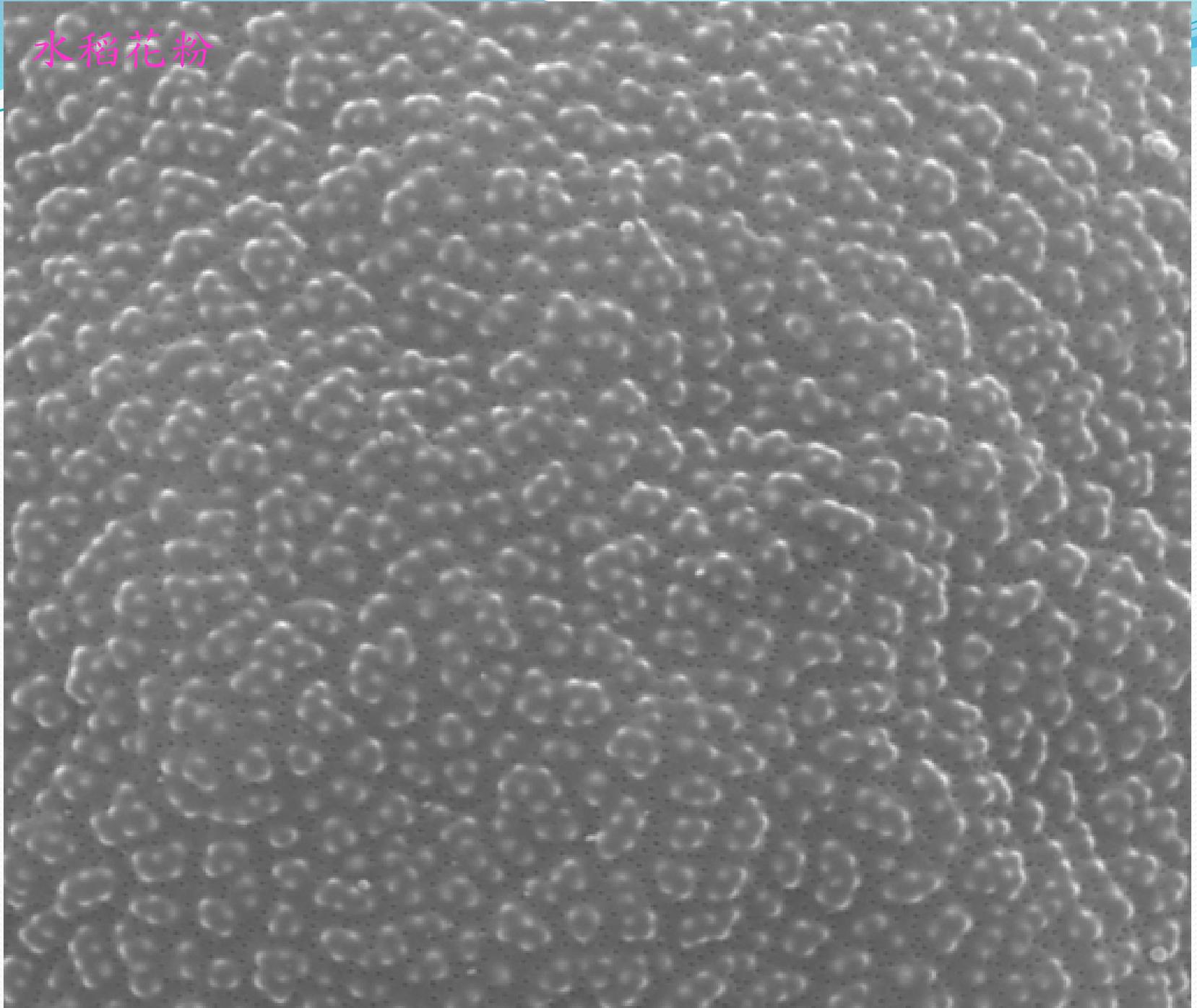


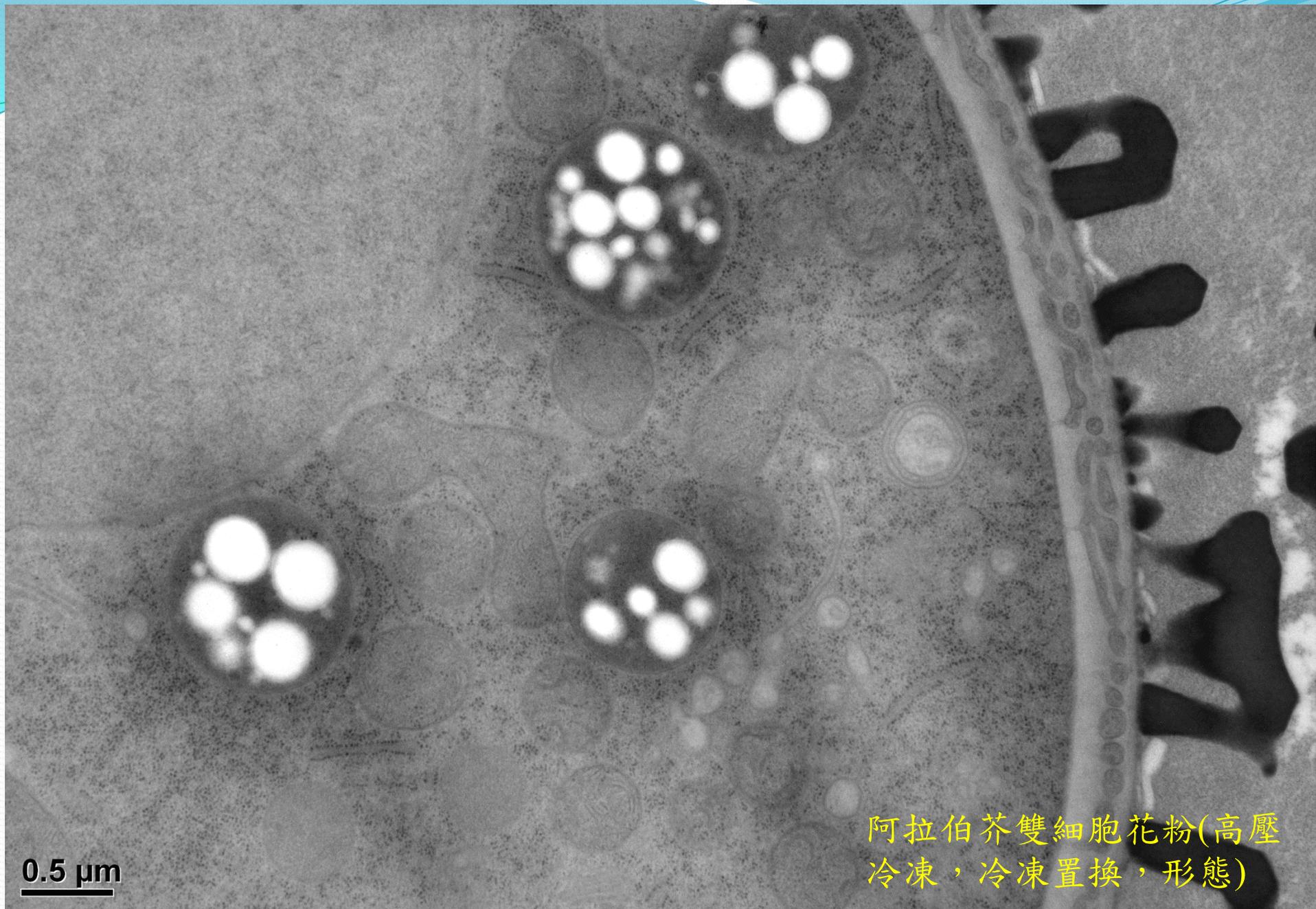
水稻花粉

水稻花粉



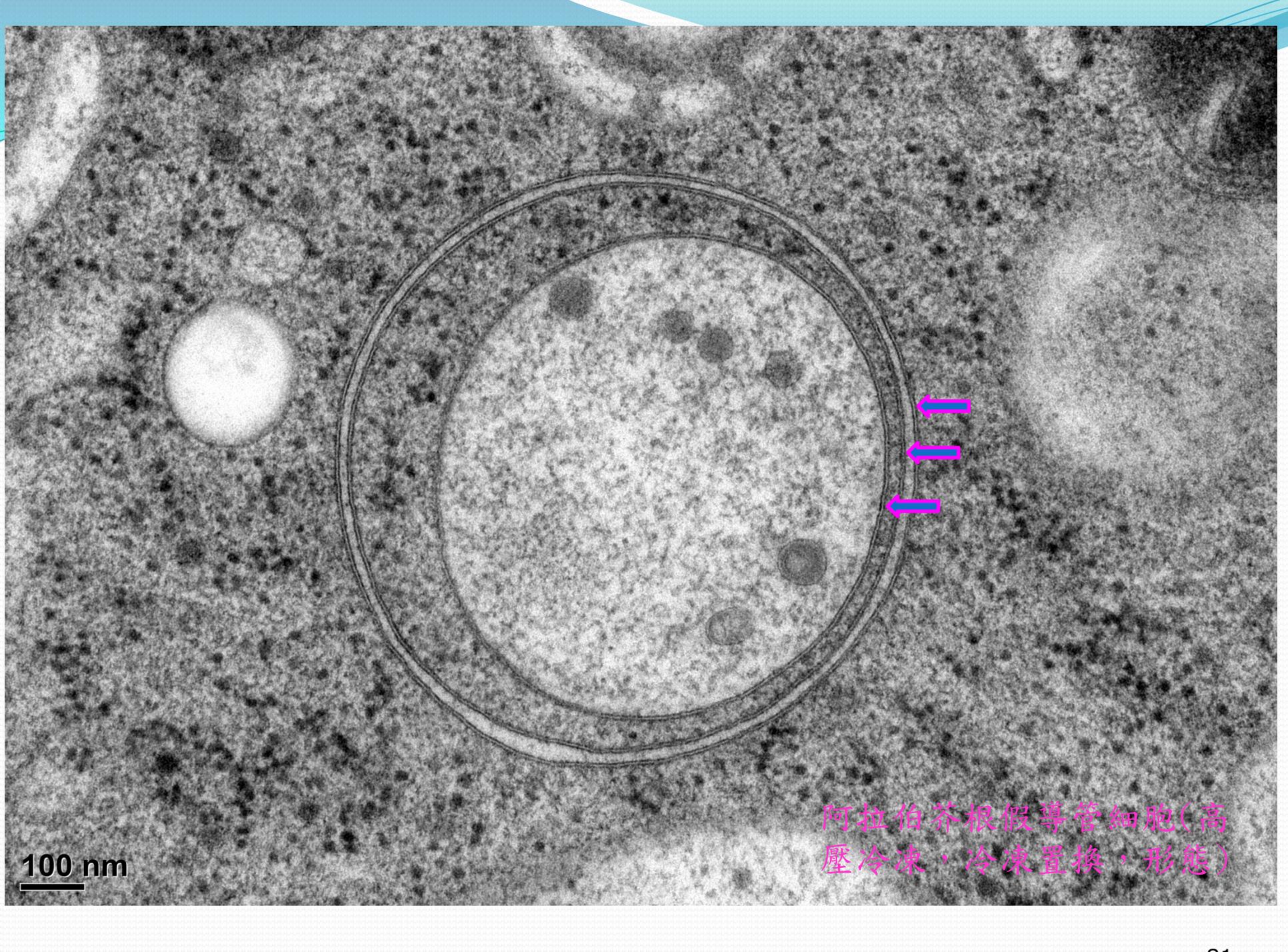
水稻花粉





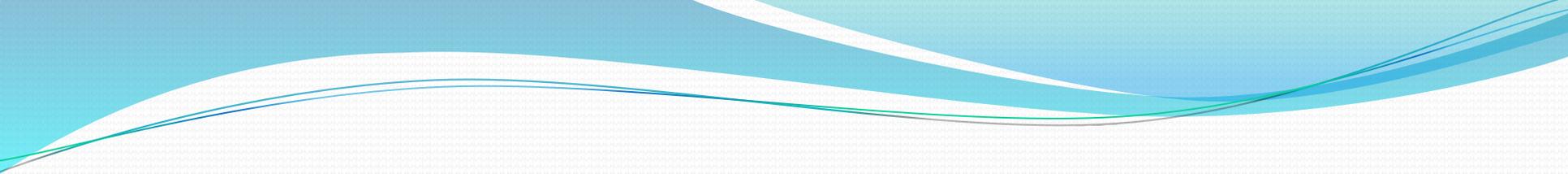
0.5 μm

阿拉伯芥雙細胞花粉(高壓冷凍, 冷凍置換, 形態)



100 nm

阿拉伯芥根假導管細胞(高壓冷凍, 冷凍置換, 形態)



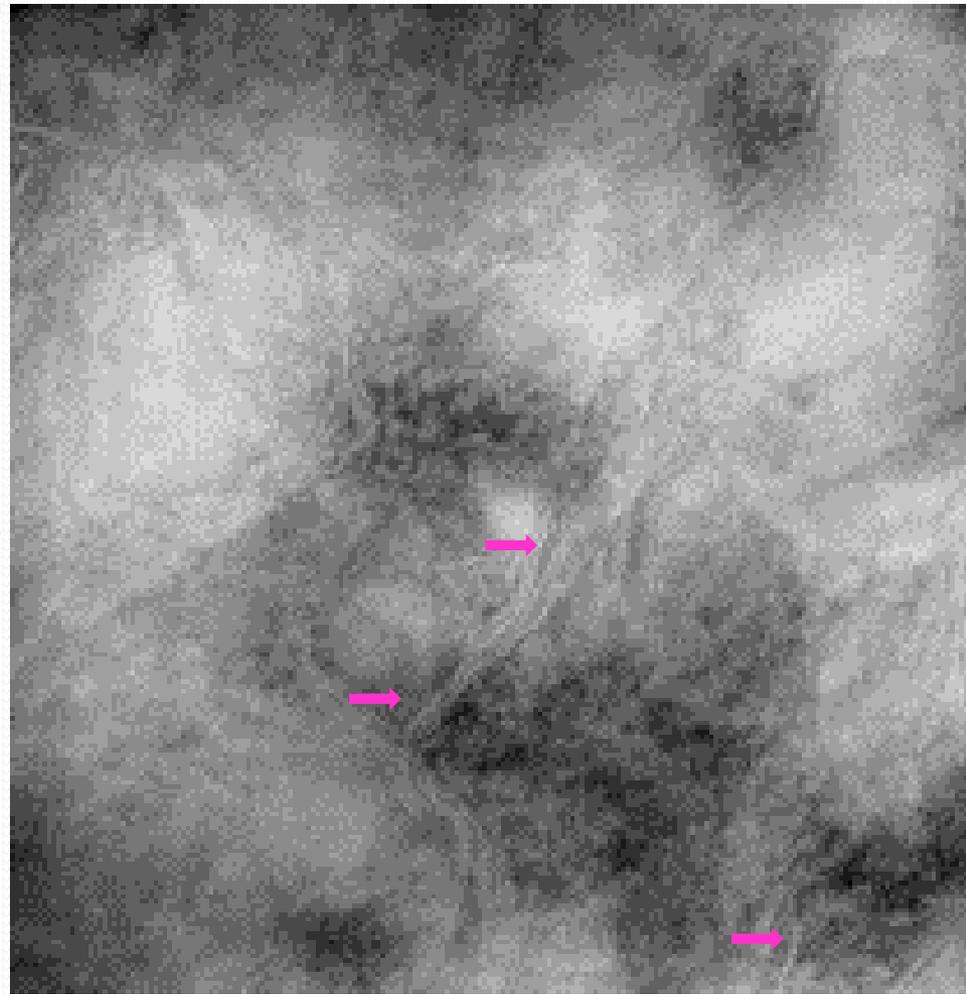
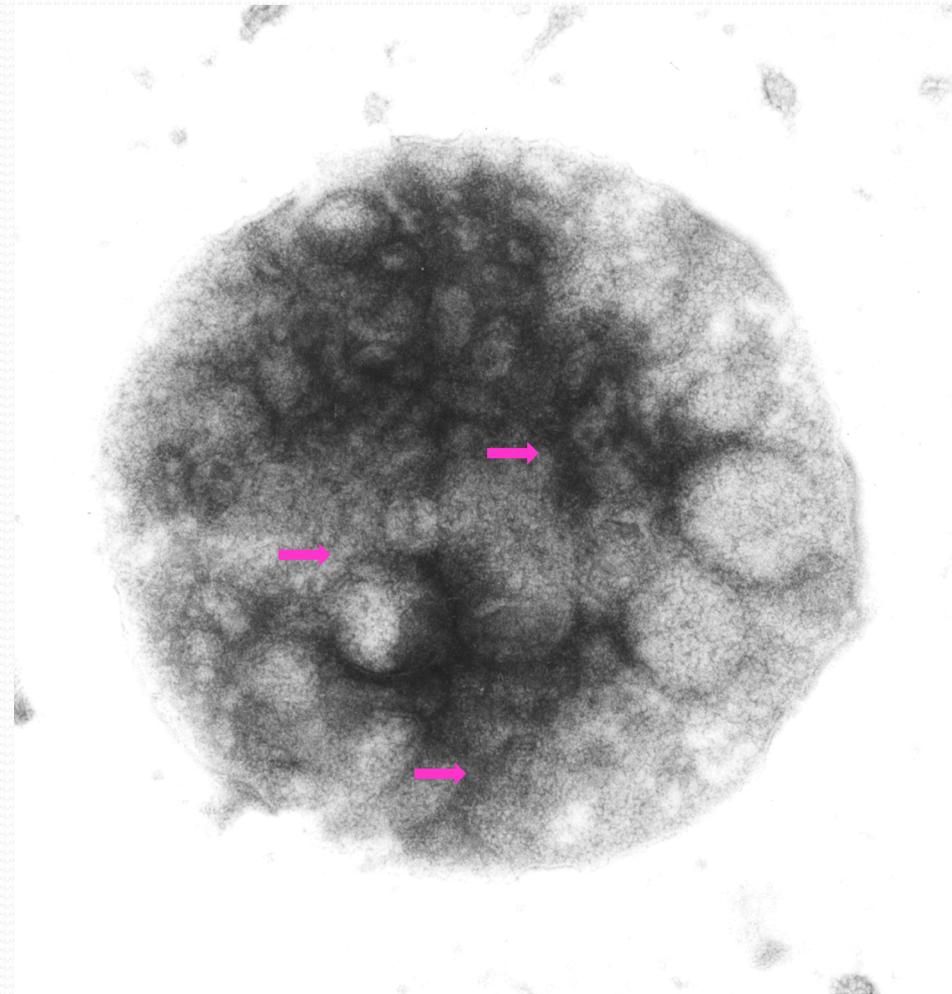
傳統技術

綠豆白化苗hook
處的皮層細胞



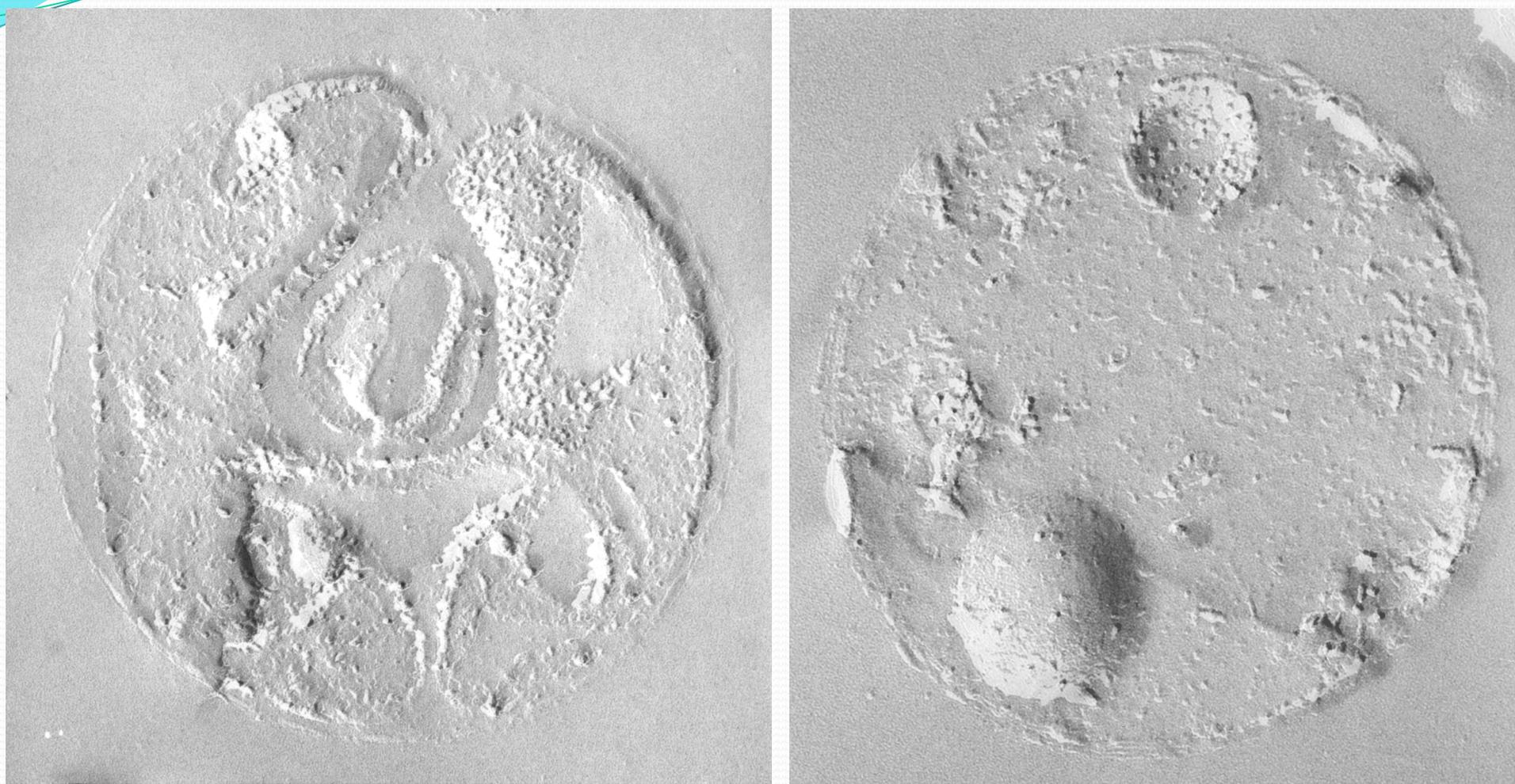
超薄切片 (Ultra-
thin sectioning)

綠豆白化苗分離粒線體



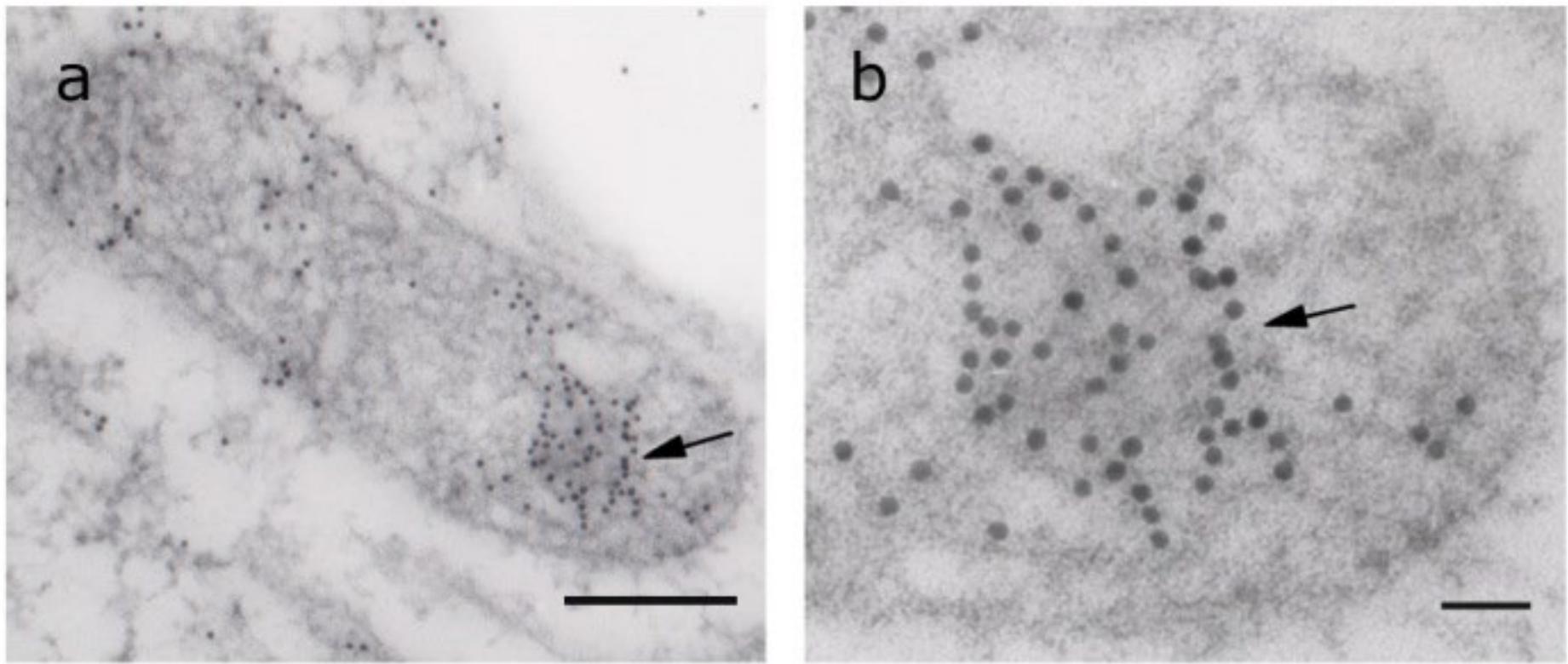
負染色 (negative staining)

綠豆白化苗分離粒線體



冷凍蝕刻 (Freeze etching)

綠豆白化苗彎曲部位(hook)的皮層細胞

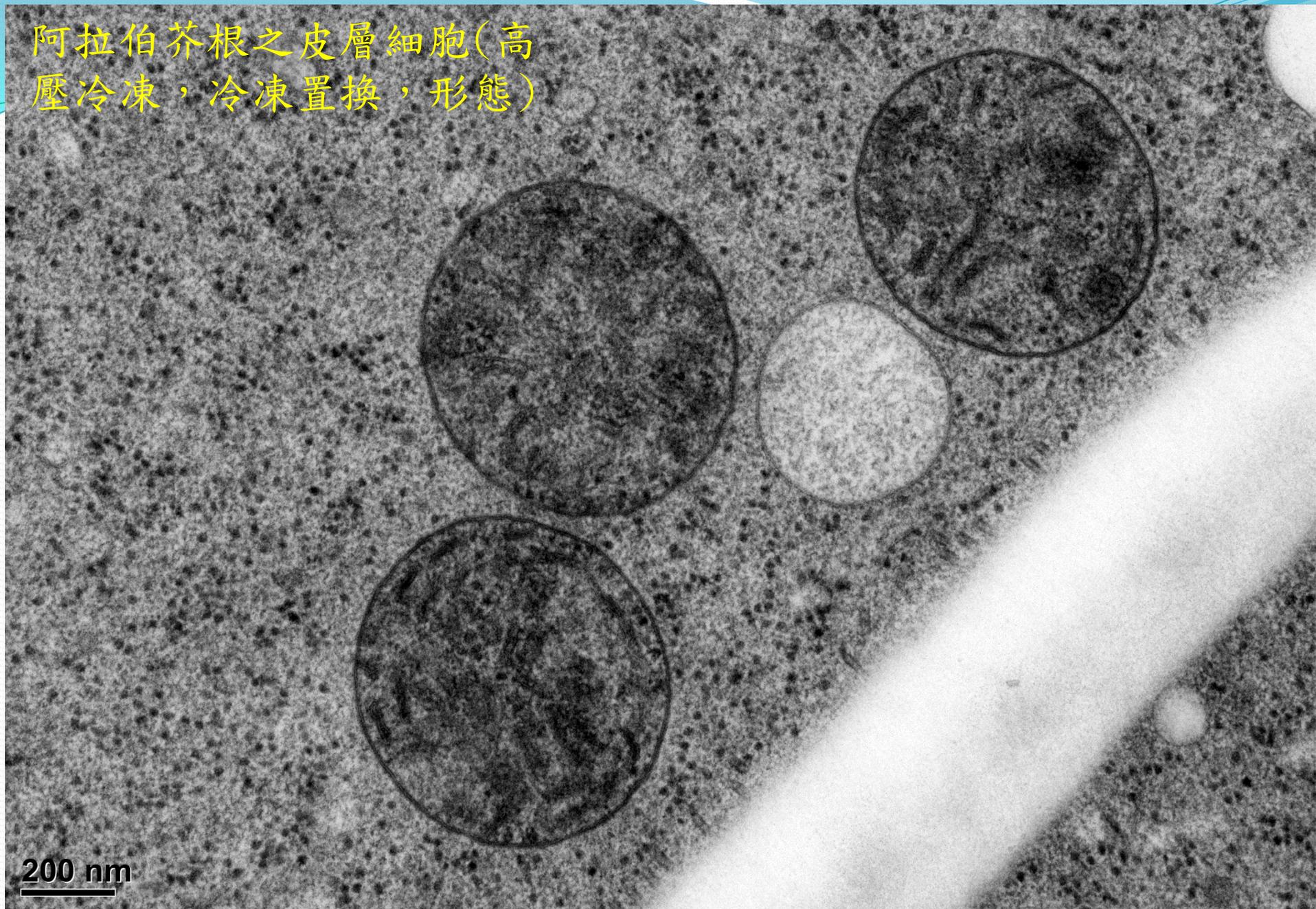


免疫定位 (Immunolabeling)

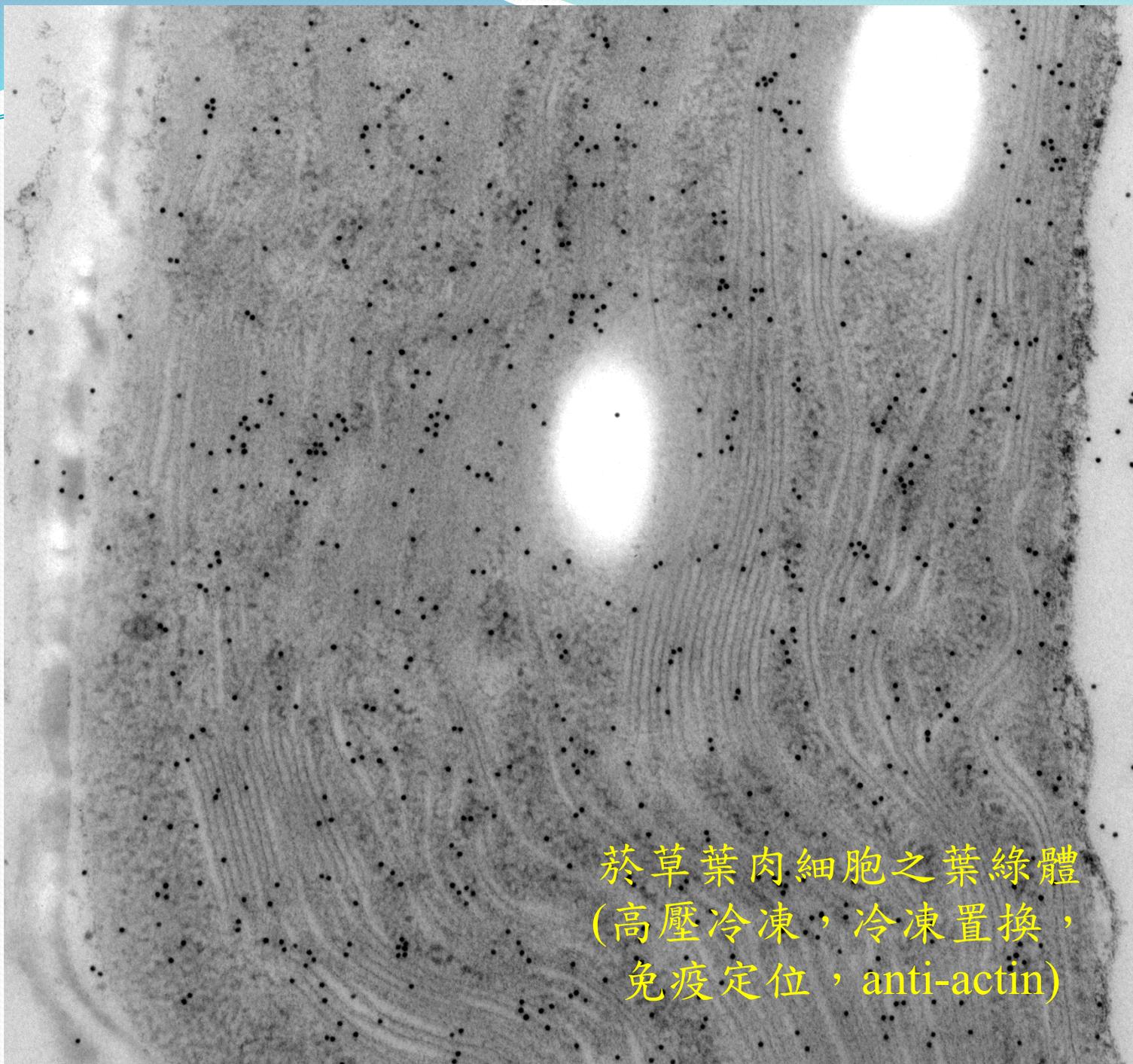
anti-actin

Plant Cell 23:3727-3744, 2011

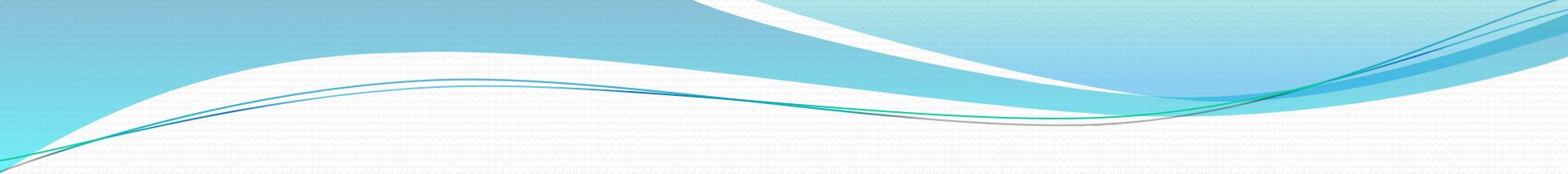
阿拉伯芥根之皮層細胞(高
壓冷凍，冷凍置換，形態)



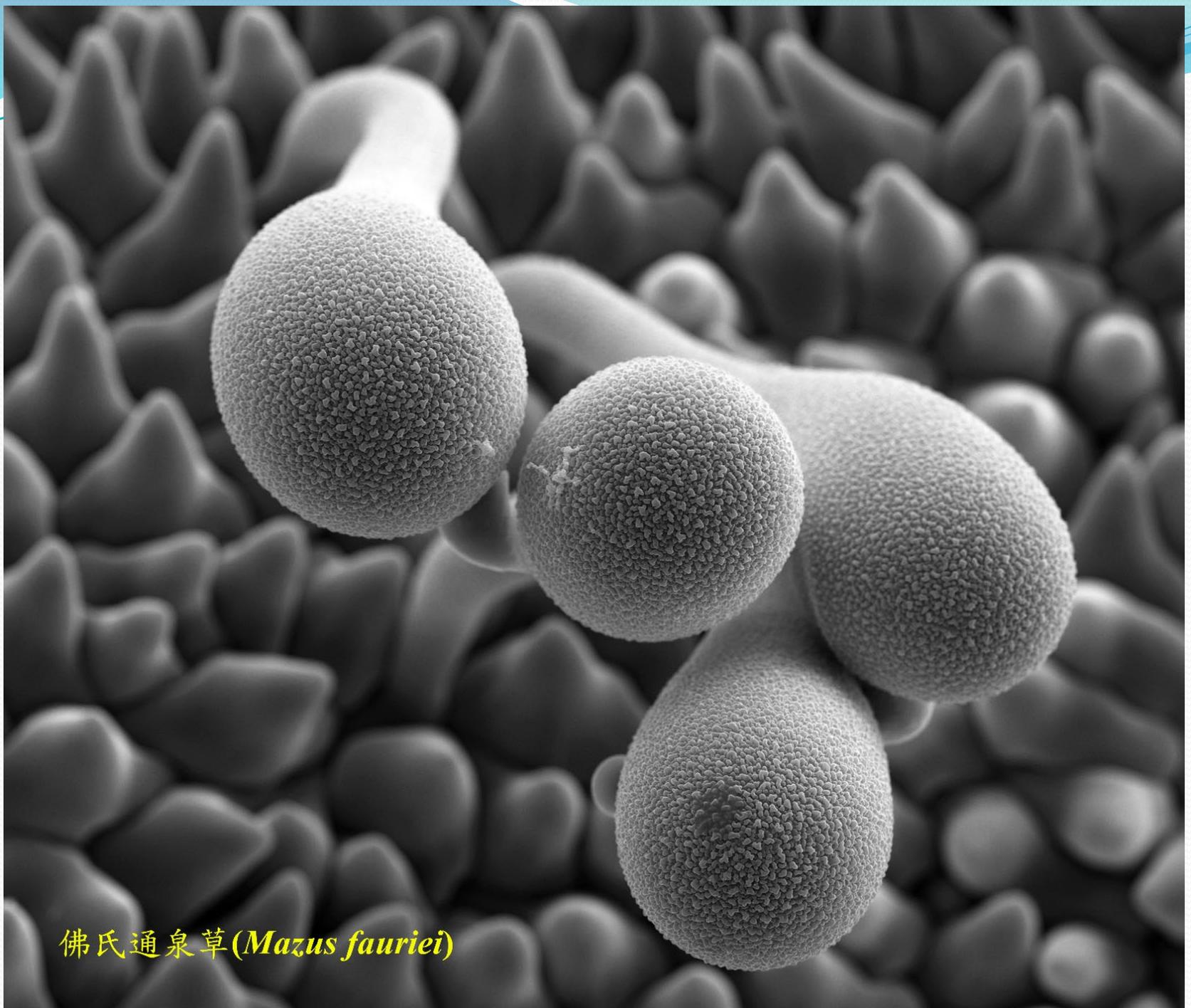
200 nm



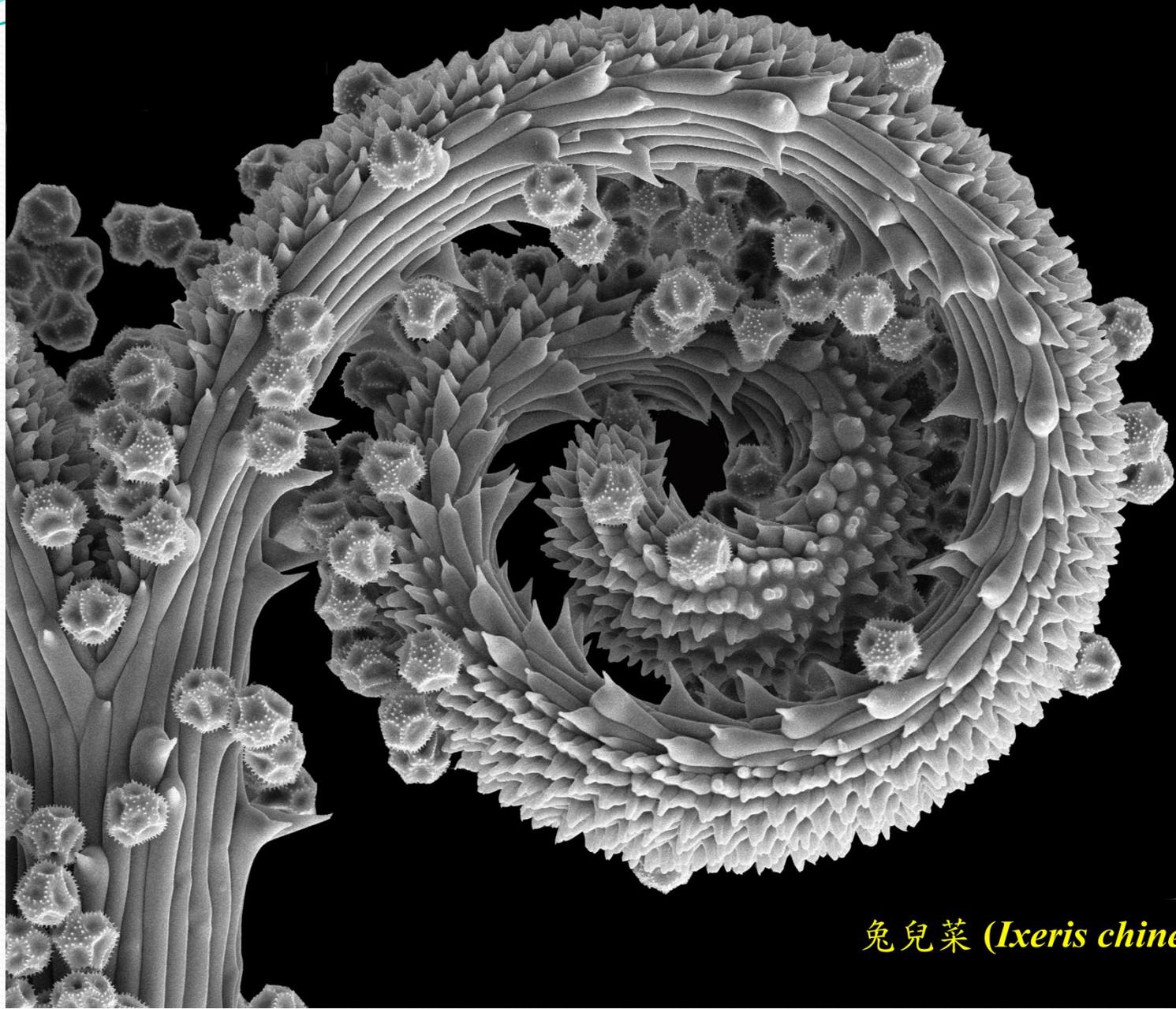
菸草葉肉細胞之葉綠體
(高壓冷凍，冷凍置換，
免疫定位，anti-actin)



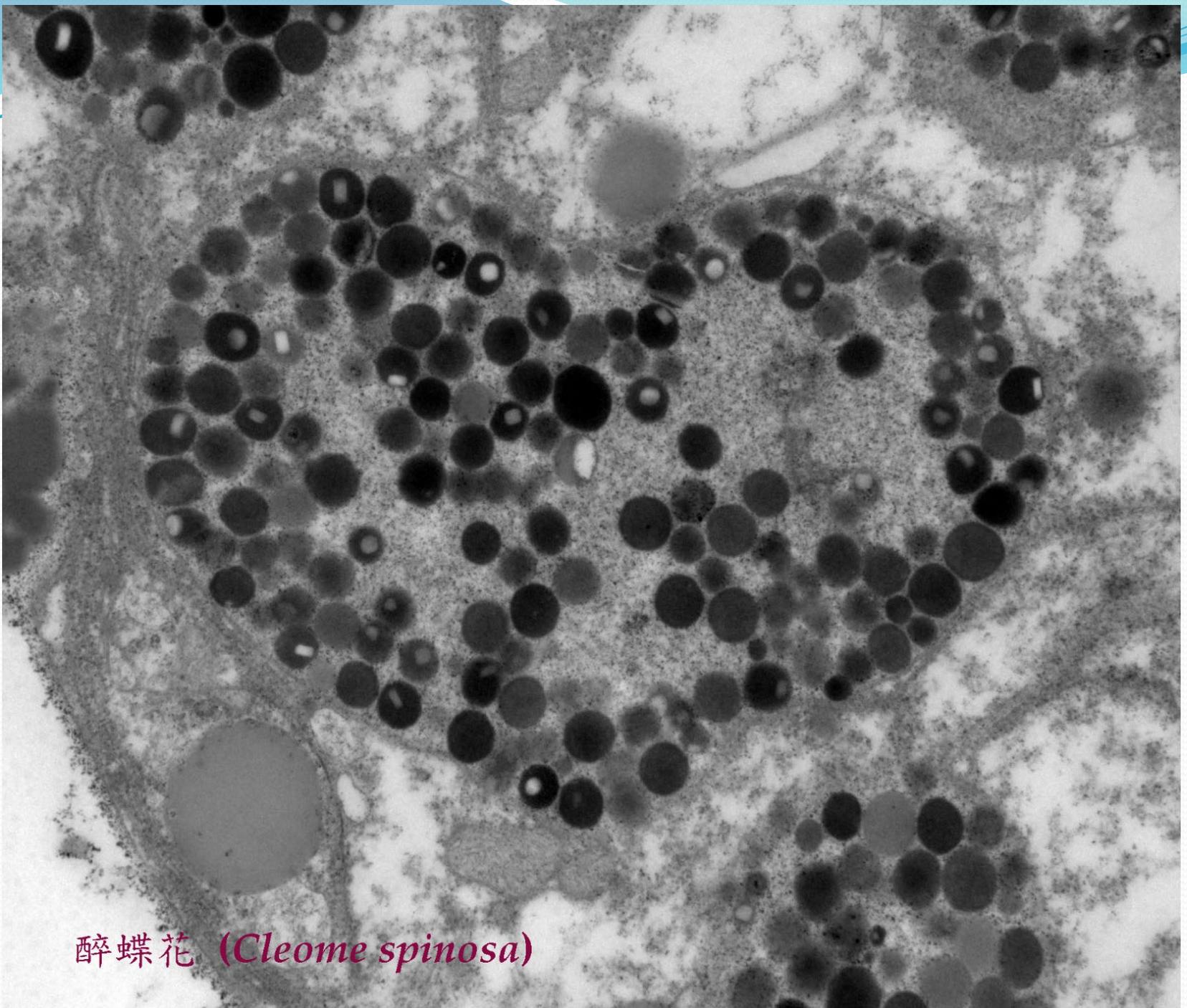
看圖說故事
有獎徵答



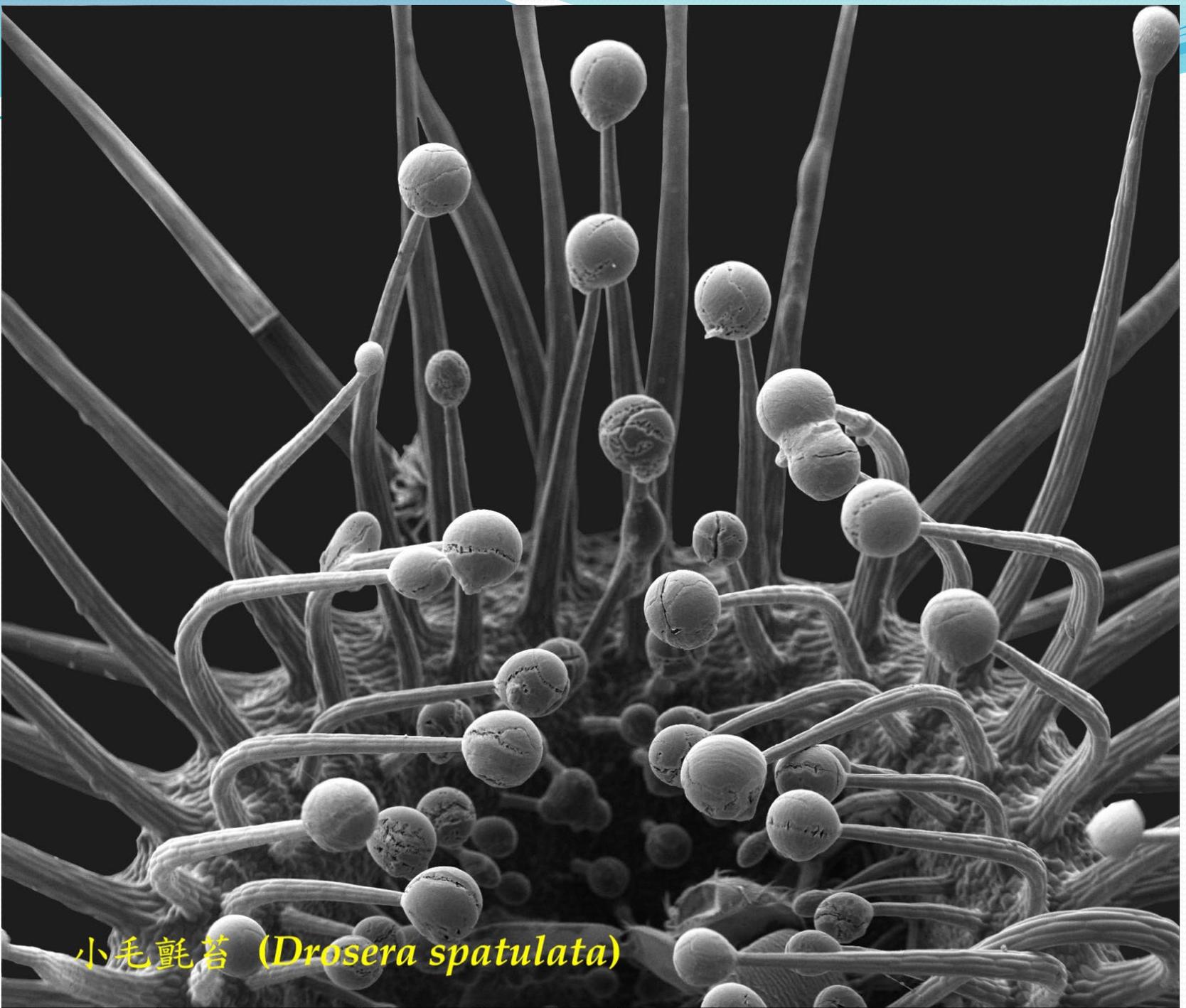
佛氏通泉草 (*Mazus fauriei*)



兔兒菜 (*Ixeris chinensis*)



醉蝶花 (*Cleome spinosa*)



小毛氈苔 (*Drosera spatulata*)



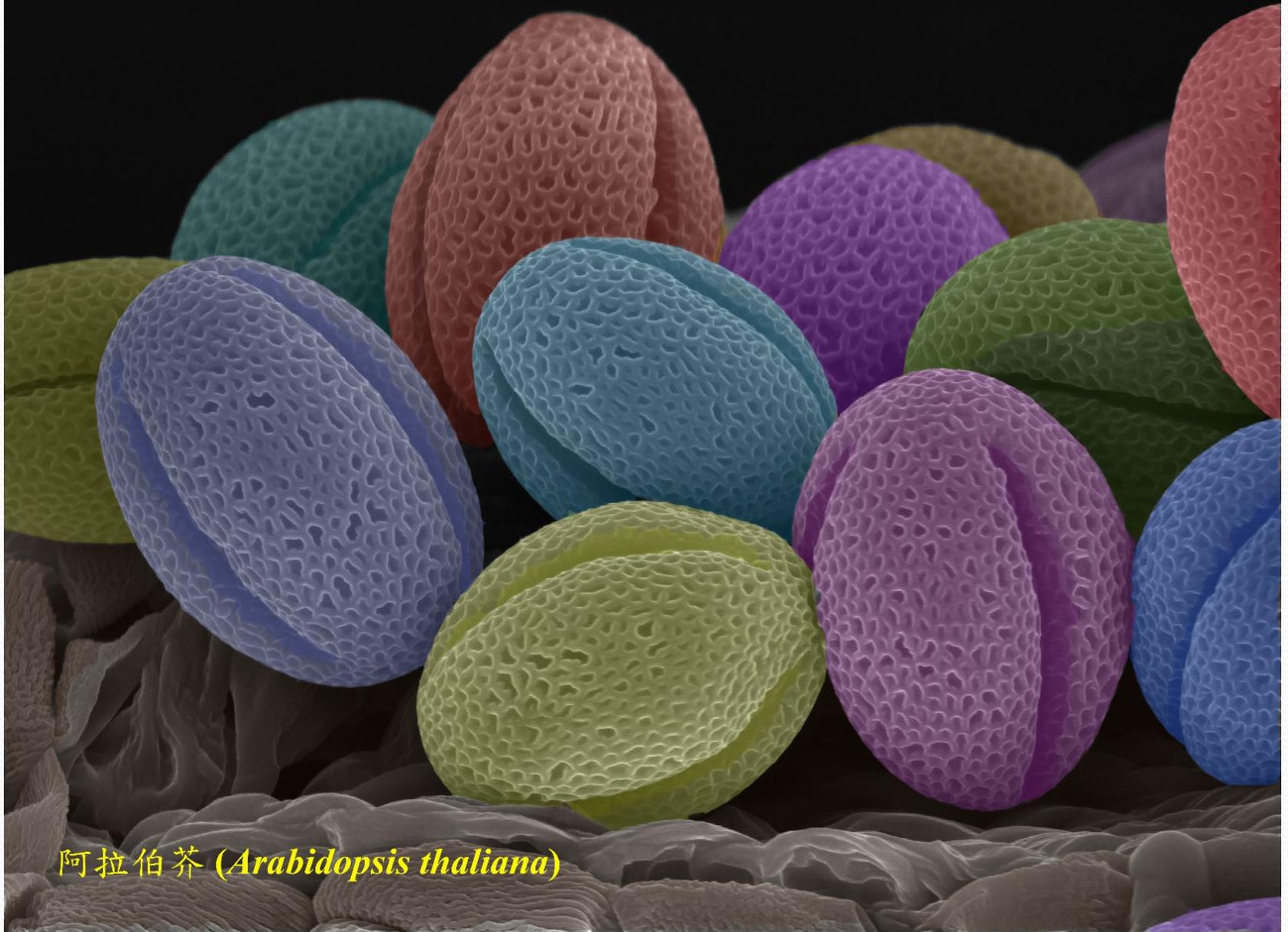
海洋鈣板藻 (*Chrysotila roscoffensis*)



富嶽三十六景 神奈川沖浪裏

葛飾北齋 画

葛飾北齋 神奈川沖浪裏



阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)



阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)

