# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 永續生物技術之開發、應用及教育--永續生物技術之開 發、應用及教育(子計畫一)(1/3) 期中進度報告(精簡版)

計	畫	類	別	:	整合型
計	畫	編	號	:	NSC 96-2627-M-002-014-
執	行	期	間	:	96年08月01日至97年07月31日
執	行	單	位	:	國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人:張焕宗

處理方式:本計畫可公開查詢

中華民國 97年05月26日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 □ 成 果 報 告

永續生物技術之開發、應用及教育-永續生物技術之

### 開發、應用及教育(子計畫)(1/3)

計畫類別:■ 個別型計畫 □ 整合型計畫 計畫編號:NSC 96-2627-M-002 -014 -執行期間:96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日

- 計畫主持人:張煥宗
- 共同主持人:
- 計畫參與人員:邱泰嘉、黃志清、黃銘峰、林泱蔚、李昆鴻、劉已維、 林宗宏、藍國毓、江政剛、陳詩茹、廖皓瑩、林哲安、 高毓言、項燕君、江妮蓁

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交):■精簡報告 □完整報告

- 本成果報告包括以下應繳交之附件:
- □赴國外出差或研習心得報告一份
- □赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- □國際合作研究計畫國外研究報告書一份
- 處理方式:除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、 列管計畫及下列情形者外,得立即公開查詢

□涉及專利或其他智慧財產權,□一年□二年後可公開查詢 執行單位:台灣大學化學系

中華民國97年5月13日

在本計劃第一部份,我們利用表面先修飾上血小板原生長因子 AA (platelet-derived growth factor AA, PDGF AA)之發螢光金奈米粒子(PDGF AA-LAUND)與修飾 PDGF AA 適合體 (apatmer,Apt)之 13 nm 金奈米粒子(Apt-QAUNP)之間的螢光能量轉移原理,應用於偵測 PDGF 分子與 PDGF α-受體(PDGF α-receptor),其偵測極限可達 80 pM 與 0.25 nM 之偵測極限。在 第二部份中我們利用修飾適合體(aptamer)的金奈米粒子(Apt-Au NP),作為選擇性偵測三磷 酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)分子之生物感測器。Apt-Au NP 在高鹽類情況下,若 ATP 分子存在時則不易聚集,故可以藉由 Apt-Au NP 聚集的顏色變化來得知 ATP 濃度,本實驗 在最佳化的條件中對於 ATP 分子的偵測極限可達 10 nM。在第三部分,我們利用會與雙股 DNA 鉗合(chelating)之染料分子 TOTO-3 與寡聚核苷酸其組成是由 33 個胸線嘧啶所形成之 單股 DNA (poly-T33),在添加汞離子時會使此 DNA 折疊成雙股 DNA, TOTO-3 分子的螢光 會因為汞離子的濃度上升而增加,藉由測量螢光的變化可定量汞離子的濃度,其偵測極限 為3nM。在第四部份中,我們合成了一些新穎的一維半導體奈米結構,其原理主要利用種 晶促進成長方式有效於室溫水相溶液中合成具螢光之(t-Te)三角結晶碲奈米線。以及利用碲 奈米線作為模版,加入 sodium tetrachlolaurate 與十六烷基三甲溴化銨反應不同時間後,可 分别得哑鈴、豌豆、珍珠鍊之不同構形奈米複合材料。

First part of this report describes the use of FRET mechanism between platelet-derived growth factor AA (PDGF AA) modified photoluminescent Au nanodots (PDGF AA-LAUND) and PDGF binding aptamers (Apt) protected 13-nm spherical Au NPs (Apt-Q<sub>AuNP</sub>) to detect the concentration of PDGF or PDGF  $\alpha$ -receptor, within 80 pM and 0.25 nM of LOD, respectively In the second part, we developed a colorimetric sensing approach for the determination of adenosine triphosphate (ATP) using aptamer-modified gold nanoparticles (Apt-Au NPs). The aggregation between those Apt-Au NPs was reduced by binding of the ATP molecules to the Apt-Au NPs. As a result, the change of Apt-Au NPs solution could be deduced the concentration of ATP, within the limit of detection for ATP was 10.0 nM. At the third part, TOTO-3 and the polythymine oligonucleotide  $T_{33}$  were used for the highly selective and sensitive detection of  $\mathrm{Hg}^{2^+}$  in aqueous solution. After T<sub>33</sub> interacts specifically with Hg<sup>2+</sup> ions, its conformation changes to form a folded structure that preferably binds to TOTO-3. As a result, the fluorescence of a mixture of  $T_{33}$  and TOTO-3 increases in the presence of  $Hg^{2+}$ , and the LOD for  $Hg^{2+}$  was 3 nM by the fluorescence measurement. In the forth part, some novelty one dimensional (1D) semiconductor nanostructures, including the synthesis of fluorescent trigonal tellurium (t-Te) nanowires in aqueous solution were synthesized at room temperature. Otherwise, under the reaction of Te nanowires (NWs) served as template, three different shapes of Te nanowires (NWs) can be prepared by the addition Te NWs solution of sodium tetrachloroaurate into in the presence of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) over different reaction times, three different Te nanowires, such as gold-tellurium nanodumbbells can be prepared easily.

細胞中分子成份(如誘發致癌基因)的改變會導致正常細胞演化成癌細胞,進而轉變 成惡性顯型組織<sup>1-3</sup>。誘發癌症基因的轉變一般認為與易導致癌症的遺傳性體質和動物與細 胞培養過程中誘發有機體突變化合物的致瘤基因活性有關。癌症的演化與其顯型的改變亦 有關。例如:成長過程中由於免疫系統的監控疏漏而導致維持成長訊號的缺乏,會誘導局 部新生血管的產生。一般認為細胞中所表現的蛋白質(例如:成長因子與成長因子受器<sup>4-5</sup>、 生物反應調節劑和各式各樣結構性與調控性分子)之改變和癌症細胞顯性行為的表現有 關。除此之外,各種蛋白質分子的次要變體和癌症調控基因之突變、基因多型性以及後轉 譯修飾亦有關。通常,單一胺基酸的改變(例如:老鼠癌基因產物)<sup>6</sup>、少數具選擇性胺基酸 的改變(p53 腫瘤抑制基因產物)<sup>7、</sup>選擇性的胺基酸磷酸化(c-fos 癌基因產物)<sup>8</sup>或者特定蛋白 質分子中不同異型態相對含量的改變(PDGF)<sup>9</sup>和致癌過程皆有相關性。由於細胞中蛋白質 成份的改變通常是難以預測、具時間性且細胞與細胞間的表現會有差異(特別是固態腫瘤細 胞或者血液腫瘤細胞)<sup>10-11</sup>,因此迫切需要發展高靈敏度與具專一性的分子辨識方法偵測與 定量蛋白質。

本實驗室利用具螢光性質的小金奈米粒子來作為蛋白質感測器,以能量轉移的觀念將 螢光金奈米粒子作為施體(donor),以大尺寸的金奈米粒子作為受體(acceptor),將蛋白質修 飾於螢光金奈米粒子表面,再將蛋白質適合體(aptamer)修飾於較大尺寸的金奈米粒子表 面,由於較大的金奈米粒子不具有螢光性質且其莫耳吸收係數大,當此兩種奈米粒子混合 後,蛋白質與蛋白質適合體結合後,大尺寸的金奈米粒子將可作為消光劑(quencher),吸收 螢光金奈米粒子所發出的螢光。此時若加入欲檢測的蛋白質,其將與螢光奈米粒子表面的 蛋白質形成競爭式反應,被取代的奈米粒子所發出的螢光將不被消光,由螢光強度的變化 即可偵測並定量蛋白質。

本計畫並合成其他有潛力作為生物感測器的一維奈米材料,一維奈米材料是指長、寬、 高三維尺度中有二維在奈米尺度的材料。如奈米棒(nanorods)、奈米線(nanowires)、奈米管 (nanotubes)等。研究人員發現,當金屬的尺寸小到某個程度時,其性質有很大的改變。一 維奈米材料具有極小尖端曲率半徑及極高之深寬比,這些先天上之物理特性使得在低電壓 下場發射之現象得以實現。已知合成金屬奈米線的方法有奈米模板、階梯沉積及液相成核

4

法;其中液相成核法是最為簡便及迅速之合成方法,也是一項發展極為成熟之技術。

【一】以不同大小金奈米粒子作為蛋白質感測器:先前實驗室已經成功開發出會發螢光之 金奈米粒子(L<sub>AuND</sub>),其尺寸為 2.0 nm,在本次實驗中我們主要利用此種表面先修飾 上血小板原生長因子 AA (PDGF AA)之奈米粒子作為螢光的施體,再利用修飾 PDGF AA 適合體之 13 nm 金奈米粒子作為受體,若在一般情況下將此兩種金奈米子混合 時,13 nm 金奈米粒子會作為消光分子使 AuNDs 所發出的 520 nm 螢光消失。當溶 液中存在 PDGF 時,PDGF AA-L<sub>AuND</sub>與 Apt-Q<sub>AuNP</sub>之間的作用力會因為 Apt-Q<sub>AuNP</sub>與 PDGF 之間會有鍵結而減弱,PDGF AA-L<sub>AuND</sub>所發出的螢光將會增加;此外,當添 加 PDGF α-受體時(PDGF α-receptor),此兩種不同尺度的奈米粒子也會因為 PDGF α-receptor 與 PDGF AA-L<sub>AuND</sub>鏈結而使螢光增加。結果如圖一所示,在本實驗中對於 PDGF AA 與 PDGF α-receptor 之偵測極限可達 80 pM 與 0.25 nM,並且此種分析方 法,也可以有效分析尿液中與細胞培養基(cell medium)中 PDGF 的含量。



圖一: PDGF AA-L<sub>AuND</sub>與 Apt-Q<sub>AuNP</sub> 感測器於(A)細胞培養基、(B)尿液中添加不同濃度的 PDGF AA 存在下(0-2 nM)之螢光光譜圖。

【二】開發偵測 ATP 分子之金奈米粒子感測器:在本次實驗中,我們利用修飾適合體的 金奈米粒子(Apt-Au NPs),作為選擇性偵測三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP) 分子之生物感測器。這種金奈米粒子在沒有 ATP 存在時,在高鹽類的濃度下會因為 表面電荷中和的緣故而開始聚集,溶液的顏色會由酒紅色變成紫色,其吸收光譜的 最大波長,也會由原先的 520 nm 躍遷至 650 nm。但是溶液中若有 ATP 分子的存在, 由於修飾的適合體分子在 ATP 分子存在下會改變其構形,形成一種 G-quartet 的四 極結構,使得金奈米粒子的表面電荷增加,所以在相同的高濃度鹽類下金奈米粒子 的表面電荷中和的程度較少,溶液也較不易呈現金奈米粒子聚集的紫色。本實驗在 最佳化的條件中對於 ATP 分子,如圖二所示,其偵測極限可達 10 nM,此種簡易與 便宜的分析方法,也可以有效檢驗尿液中 ATP 分子的含量。



圖二: Apt-Au NPs 感測器於不同濃度的 ATP 分子存在下(0.2 - 10.0 uM)於 650 nm / 520 nm 之吸收光譜圖。

【三】利用募聚核苷酸螢光感測器來偵測汞離子:由於胸線嘧啶(thymine)與汞離子之間有 良好的鍵結能力,可以形成 Thymine-Hg-Thymine 之結構,本實驗利用寡聚核苷酸其 組成是由 33 個胸線嘧啶所形成之單股 DNA(poly-T<sub>33</sub>),在添加汞離子時會使此 DNA 折疊成一雙股 DNA,若我們加入一種會與雙股 DNA 鉗合之染料分子 TOTO-3, TOTO-3 的螢光會因為汞離子的濃度上升而增強,我們就可以利用 TOTO-3 螢光的強 弱來得知樣品中汞離子的濃度。由實驗結果(圖三)發現,此種生物感測器對於汞離子 的偵測極限可達 3 nM (0.6 ppb),比一般開發的汞離子感測器更為靈敏,並且對於一 般常見金屬離子而言,對汞離子的專一性有 256 倍以上。我們也將此種分析方式應 用於偵測一般常見鈕扣鹼性電池。



圖三: TOTO-3/T33 感測器在不同濃度的汞離子存在下(0-500 nM)之螢光光譜圖。

【四】利用種晶促進成長方式有效於室溫水相溶液中合成具螢光之(t-Te)三角結晶碲条米 線:本實驗所合成的碲奈米線其成長機制如圖四所示,於高濃度聯氨溶液中還原二 氧化碲(TeO<sub>2</sub>)分子,逐漸沈積碲原子與溶解(a-Te)不定型之碲奈米粒子於(t-Te)三角結 晶之奈米晶體表面。藉由仔細控制成長時間(40~120 分鐘),可分別合成出長度為 251~879 nm,寬度僅為 8~19 nm 數種不同尺度之(t-Te)三角結晶碲奈米線。藉由測量 300 nm 以下的最大吸收波長位移可以得知(t-Te)三角結晶碲奈米線的寬度差異,而長 度可藉由 600 nm 以上的吸收波長之變化得知。隨著(t-Te)三角結晶碲奈米線尺度之 增加,吸收光譜會有紅位移(red shift)現象產生。(t-Te)三角結晶碲奈米線尺度之 增加,吸收光譜會有紅位移(red shift)現象產生。(t-Te)三角結晶碲奈米線也具有螢光 性質,其螢光特性的奈米線藉由解析技術,可得 334, 397, 460, 507 nm 之螢光特性。 選擇長度為 547.7±111.6 nm,寬度為 15.1±2.7 nm 之碲奈米線為模版。加入四氯金酸 鈉(sodium tetrachlolaurate)與十六烷基三甲溴化銨,分別反應 10、20 與 60 分鐘,可 得金-碲嘎鈴、豌豆、珍珠鍊之不同構形,圖五為其穿透式電子顯微鏡照片。所得之 金-碲複合奈米材料具有良好的調控性,且運用於表面增強拉曼戏應有顯著的效果, 以 R6G 分子修飾於金-碲奈米粒子表面測量表面增強拉曼光譜,其增強因子最大可 達為 5.6×10<sup>9</sup>(圖六)。



圖四:(t-Te)三角結晶碲奈米線成長機制。



圖五:金-碲複合奈米材料之電子顯微鏡照片:(A)啞鈴形狀、(B)豌豆形狀、(C)珍珠 鍊形狀。(D)為(A)之材料於高解析之電子顯微鏡底下之構形。



圖六:以 R6G 作為拉曼光譜分析物質,分別吸附於:(A)金-碲啞鈴、(B)豌豆、(C) 珍珠鍊構形之材料上,圖中 R6G 濃度分別為:8.5×10<sup>-6</sup>、9.5×10<sup>-10</sup>、1.8×10<sup>-11</sup>。

#### 五、計劃成果自評:

本年度研究計劃中,利用寡聚核苷酸螢光感測器來偵測汞離子,雙股DNA鉗合(chelating) 染料分子TOTO-3之螢光會因為添加汞離子的濃度越多而增加,我們就可以利用TOTO-3螢 光的強弱來得知樣品中汞離子的濃度,偵測極限可達3 nM (0.6 ppb),比一般開發的汞離子 感測器更為靈敏。修飾適合體的奈米粒子亦可作為選擇性偵測三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)分子之生物感測器,本實驗在最佳化的條件中對於ATP分子的偵測極限可 達10 nM,此方法也可應用於實際樣品中,有效檢驗尿液中ATP分子的含量。此外我們利用 液相成核法合成一維碲奈米線,由於產率十分理想,且所製備之材料亦十分均勻,於以後 光電產業應用上十分具有潛力。而後引進金離子於碲奈米線表面進行氧化還原反應,成功 製備出金-碲之啞鈴、豌豆、珍珠鍊之不同構形複合材料,於表面增強拉曼光譜上之增強因 子可提升至5.6×10<sup>9</sup>。在本年度我們共訓練六位博士生及五位碩士生,其中一位即將完成博 士論文;一位即將完成碩士論文。部份研究成果已發表於國際知名雜誌:

- Lin, Z. -H.; Yang, Z.; Chang, H. -T. "Preparation of Fluorescent Tellurium Nanowires at Room Temperature" *Cryst. Growth Des.* 2008, 8, 351-357.
- Lin, Z. -H.; Yang, Z.; Chang, H. -T. "Preparation of Gold-Tellurium Hybrid Nanomaterials for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy "*Langmuir* 2008, 24, 365-367.
- Chen, S. -J.; Huang, Y. -F.; Huang, C. -C.; Lee, K. -H; Lin, Z. -H; Chang, H. -T. "Colorimetric determination of urinary asenosine using aptamer-modified gold nanoparticles" *Biosens. Bioelectron.* in press.
- Huang, C. -C.; Chiang, C. -K.; Lin, Z. -H.; Lee, K. -H.; Chang, H. -T. "Bioconjugated Gold Nanodots and Nanoparticles for Protein Assays Based on Photoluminescence Quenching" *Anal. Chem.* 2008, *80*, 1497-1504.

六、參考資料:

- Floege, J.; Ostendorf, T.; Janssen, U.; Burg, M.; Radeke, H. H.; Vargeese, C.; Gill, S. C.; Green, L. S. N.; Janjic, N. Am. J. Pathol. 1999, 154, 169-179.
- 2. Creaser, S. P.; Peterson, B. R. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 2444-2445.
- Tu, S. S.; Wu, W. J.; Yang, W.; Nolbant, P.; Hahn, K.; Cerione, R. A. *Biochemistry* 2002, 41, 12350-12358.
- 4. Rickles, F. R.; Patierno, S.; Fernandez, P. M. CHEST 2003, 124, 58S-68S.
- 5. Markova, B.; Herrlich, P.; Ronnstrand, L.; Bohmer, F.-D. Biochemistry 2003, 42, 2691-2699.
- Uggeri, J.; Belleti, S.; Bussolati, O.; Dallasta, V.; Gazzola, G. C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 211, 878-884.
- 7. Feng, Z.; Hu, W.; Rom, W. N.; Beland, F. A.; Tang, M. Biochemistry 2002, 41, 6414-6421.
- 8. Liu, Y.; Chen, Q.; Zhang, J.-T. J. Proteome Res. 2004, 3, 728-735.
- Zeleny, M.; Swertfeger, D. K.; Weisgraber, K. H.; Hui, D. Y. Biochemistry 2002, 41, 11820-11823.
- 10. Simon, S. M.; de Souza, N. F. Biochemistry 2002, 41, 11351-11361.
- Jensen, M.; Tawadros, S.; Sedlacek, H.-H.; Schultze, J. L.; Berthold, F. *Immunol. Lett.* 2004, 93, 205-210.