

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(總計畫)(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-002-013-
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：張煥宗
共同主持人：吳立真、林家慶

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
☒ 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(總計畫)(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 -013

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：吳立真、林家慶

計畫參與人員：

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

一、中文摘要：

在本計劃第一部份，我們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三角結晶碲(t-Te)奈米線。藉由高濃度聯氨溶液中還原二氧化碲(TeO_2)，同時逐漸沈積碲原子與溶解的過程中，不定型之碲奈米粒子(a-Te)於三角結晶(t-Te)之奈米晶體表面附著，我們可合成出不同尺度之(t-Te)三角結晶碲奈米線。藉由控制種晶成長的時間，我們可以合成出具有不同放光波長的不同大小之三角結晶碲奈米線。此外，我們也可以利用碲奈米線作為模版，添加金的前驅物四氯金酸鈉(sodium tetrachloroaurate)與十六烷基三甲溴化銨(CTAB)反應不同時間後，可分別得啞鈴、豌豆、珍珠鍊不同構形之金-碲奈米材料。此方法合成之金-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效應有顯著的效果。在第二部份中我們利用修飾適合體(apptamer)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慢慢變成紫色。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，而形成一種 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，溶液也較不易呈現有金奈米粒子聚集的紫色，本實驗在最佳化的條件中對於 ATP 分子的偵測極限可達 10 nM。第三部分中，則開發以聚丙基丙烯醯胺作為靜相的毛細管電泳層析方法來分離固醇類分子，因控制溫度即可改變聚丙基丙烯醯胺極性，藉由改變毛細管內的溫度，達到毛細管內靜相具有親疏水性質的變化，預期可以達到分離中性樣品的效果。

二、英文摘要：

In the first part of our report, we have demonstrated a simple approach to the synthesis of fluorescent trigonal tellurium (t-Te) nanowires in aqueous solution at room temperature. The t-Te nanowires were prepared from the reduction of tellurium dioxide (TeO_2) with concentrated hydrazine solution through deposition of Te atoms that were reduced from telluride ions (Te^{2-}) and dissolved from amorphous tellurium (a-Te) nanoparticles onto t-Te nanocrystallines. By carefully controlling the growth time, these difference sizes of nanomaterial appeared various of photoluminescence wavelength. Otherwise, under the reaction of Te nanowires (NWs) served as template, three different shapes of Te nanowires (NWs) can be prepared by the addition of sodium tetrachloroaurate into Te NWs solution in the presence of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) over different reaction times. These three different SERS-active Te nanowires, such as gold-tellurium nanodumbbells, gold-tellurium nanopeapods, and gold pearlnecklace, having different SERS signal enrichment. At the second part, we developed a colorimetric sensing approach for the determination of adenosine triphosphate (ATP) using aptamer-modified gold nanoparticles (Apt-Au NPs). In the absence of the analytes, the color of the Apt-Au NPs solution changed from wine-red to purple as a result of salt-induced aggregation. Binding of the analytes to the Apt-Au NPs induced folding of the aptamers on the Au NP surfaces into four-stranded tetraplex structures (G-quartet) and/or an increase in charge density. As a result, the Apt-Au NPs solution was wine-red in color in the presence of the analytes under high salt conditions. Under the optimum condition, the limit of detection for ATP was 10.0 nM. In the third part, capillary electrochromatography based on temperature-sensitive polymer (such as Poly(N-isopropyl acrylamide), PNIPAAm) as stationary phase was investigated. The hydrophile of PNIPAAm was decreased by temperature dropped. The performance of the temperature-sensitive polymer as a stationary phase was evaluated by use of electrochromatographic experiments and showed potential for analysis of steroids.

三 計畫源由與目的：

奈米粒子是近幾年熱門的研究領域之一，除在材料方面的發展外，也有許多生醫檢測方面的應用。奈米粒子具有明顯的光學性質，如金或銀等貴重金屬會因其具有表面電漿共振之特性^{1,2}，因此在可見光區域有吸收譜帶；硫化鎘或硒化鎘等量子點因其量子侷限效應^{3,4}，會依其大小不同，而有不同波長的螢光。另外奈米粒子光學性質尚會因形狀、周圍環境及其表面修飾不同物質而改變，故當其與生物樣品結合之後，便能透過儀器測量出其變化，進而對生物樣品進行檢驗。

一維奈米材料如奈米線及奈米棒，因可做為各種材料在不同維度與尺寸的基礎理論研究，並具有很大的潛力應用於奈米光電與功能性奈米結構等元件，所以在發展上有越來越受重視。一維奈米線，如碲奈米線的製備，在聯氨(N_2H_4)溶液中還原的條件下，易製備出均勻且分散之碲奈米線溶液。引進金離子與碲奈米線表面進行氧化還原反應，藉由實驗參數的調控(如反應酸鹼值、金離子濃度、反應時間等等)，可分別得到金-碲啞鈴、豌豆、珍珠鍊不同構形之金-碲奈米材料；而製備出表面不平整的金-碲複合奈米材料，運用於表面增強拉曼光譜可得顯著的效果。

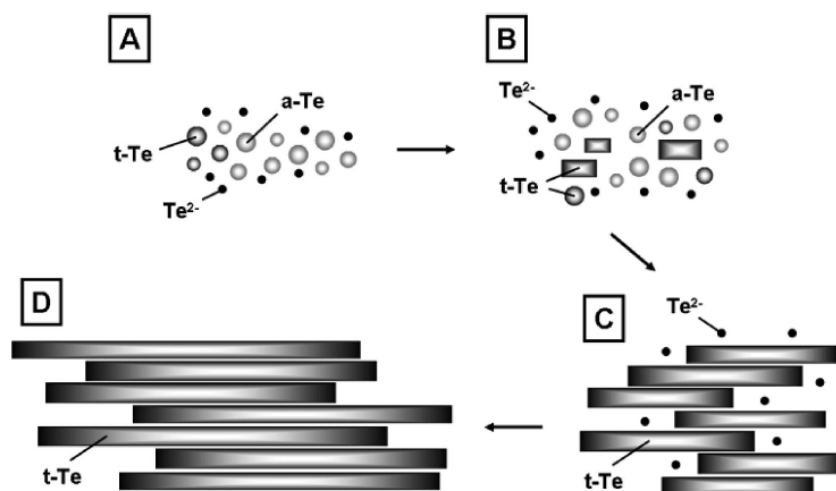
目前奈米粒子已廣泛用於生醫檢測方面，因為其與生物分子間有極強的作用力，如金、銀等貴重金屬與硫可形成共價鍵鍵結，故一些具有硫醇官能基的小分子或蛋白質等大分子，極易與金屬奈米粒子作用。而 DNA 分子與奈米粒子的結合能力，可藉由在 DNA 或奈米粒子上修飾強結合能力的分子而增加，如 DNA 末端修飾具硫醇基的分子，藉由金與硫之間的共價鍵，可讓 DNA 與金表面鍵結⁵。或是利用兩種結合常數高的分子，如 streptavidin 及 biotin 之間的結合常數高達 10^{15} ，將其分別修飾在奈米粒子及 DNA 分子上，兩者藉由 streptavidin 及 biotin 結合，便能對 DNA 進行標示。不論是利用奈米粒子的外觀顏色變化、吸收譜帶改變或是螢光的生成與波長位移，都適合作為生物感測器之用，而同樣的生物樣品，當結合不同的奈米粒子時，也會顯示出不同的物理及化學性質⁶。

適合體(apptamer)是一種以隨機序列的方式合成出來的寡聚核苷酸，可與標的分子有高親和力的特定序列即可作為該標的分子的適合體。修飾適合體的奈米粒子可用來分析特定作用之生物分子，其主要的原理為：修飾適合體後的奈米粒子與蛋白質發生反應後，會造成奈米金粒子的聚集，最後使得溶液顏色改變，顏色的改變也意味著奈米粒子的表面電漿共振波長及強度改變。利用此原理，將金奈米粒子修飾三磷酸腺苷(ATP)的適合體後，可作為選擇性偵測三磷酸腺苷分子之生物感測器。

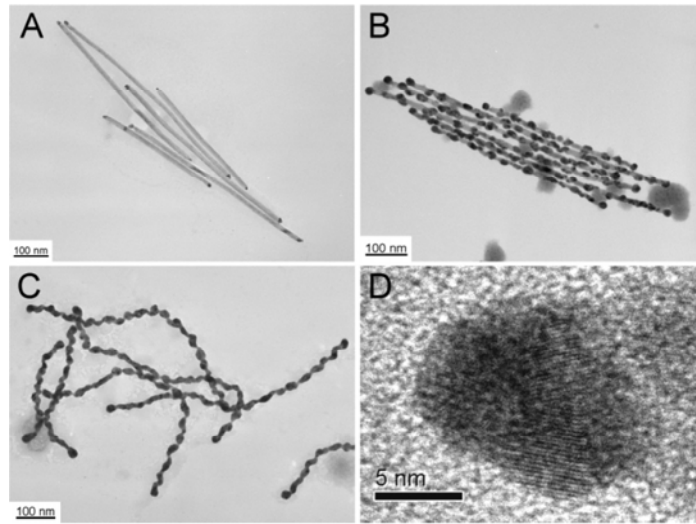
毛細管電泳(capillary electrophoresis)是一項快速分析、解析度高、易自動化的分析技術，其在蛋白質、DNA、氨基酸、藥物成分等應用上非常廣泛，相較於高效能液相層析(HPLC)，毛細管電泳所使用的樣品體積及緩衝溶液體積極為少量，具備的綠色化學基本需求。HPLC 管柱內部需填充或修飾極性與非極性的靜相，以分離極性不同的分析物，但傳統上需使用大量的有機溶劑使管柱產生極性與非極性的性質，改良方法之一是填充溫度敏感型之高分子材料，藉由溫度改變，高分子材料極性亦隨之變化，使用高分子材料作為填充物可有效減少有機溶劑使用量。在此計畫中我們將此高分子材料引入毛細管中，開發毛細管電泳層析法，分離不具電荷之中性物質。

四、結果與討論：

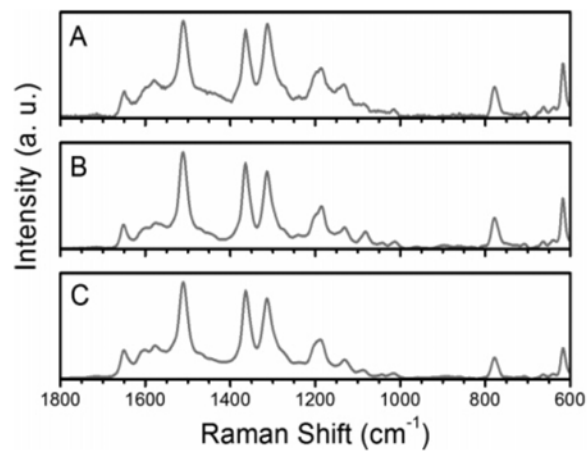
【一】以液相成核法於室溫水相溶液中合成具螢光之(t-Te)三角結晶碲奈米線：本實驗利用晶種促進成長方式來合成具螢光性質的(t-Te)三角結晶碲奈米線，利用高濃度聯氨溶液還原二氧化碲(TeO_2)分子，使碲原子逐漸沈積並同時溶解不定型之碲奈米粒子於三角結晶之奈米晶體表面，其成長機制如圖一所示。藉由控制其成長時間(40~120 分鐘)，可合成出不同尺度之三角結晶碲奈米線；長度為 251~879 nm，寬度僅為 8~19 nm。隨著(t-Te)三角結晶碲奈米線尺度之增加，吸收光譜會有紅位移(red shift)現象產生，本實驗之三角結晶碲奈米線的寬度差異可由 300 nm 以下之吸收波帶變化得知，而測量 600 nm 以上之吸收波帶變化可得知其長度差異。此具有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 sodium tetrachlorolaurate 與十六烷基三甲溴化銨分別反應不同時間，10、20 與 60 分鐘，由圖二的穿透式電子顯微鏡照片得知分別合成啞鈴、豌豆、珍珠鍊不同構形之金-碲奈米材料。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效應有顯著的效果，如金-碲珍珠鍊之增強因子為 5.6×10^9 。



圖一：(t-Te)三角結晶碲奈米線成長機制。

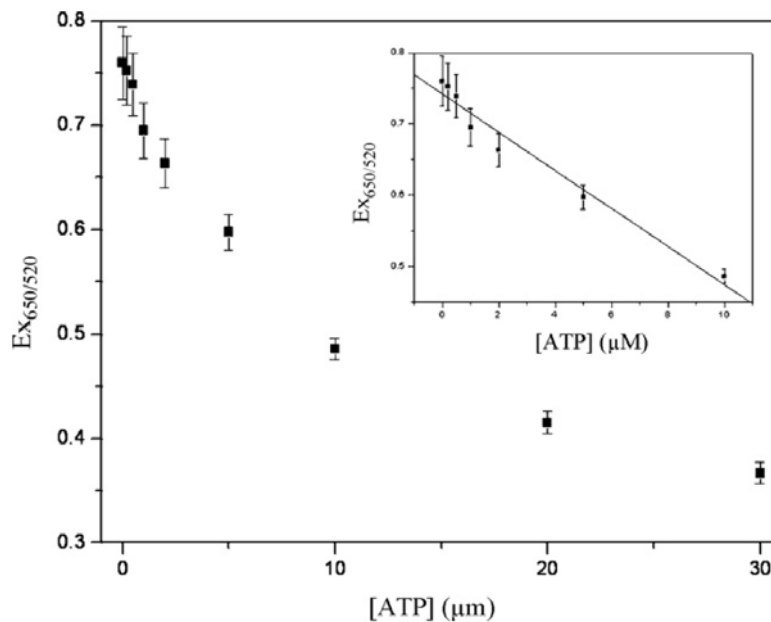


圖二：金-碲複合奈米材料之電子顯微鏡照片：(A)啞鈴形狀、(B)豌豆形狀、(C)珍珠鍊形狀。(D)為(A)之材料於高解析之電子顯微鏡底下之構形。



圖三：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^{-6} 、 9.5×10^{-10} 、 1.8×10^{-11}

【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 NP)，作為選擇性偵測三磷酸腺苷(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慢慢變成紫色，其吸收光譜的最大波長也會由原先的 520 nm 躍遷至 650 nm。但是在溶液中若有 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，而形成一種 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，溶液也較不易呈現有金奈米粒子聚集的紫色。結果如圖四所示，在最佳化的條件下，ATP 分子的偵測極限可達 10 nM，並且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。



圖四: Apt-Au NP 感測器於不同濃度的 ATP 分子存在下(0.2 – 10.0 μM)於 650 nm/520 nm 之吸收光譜圖。

【三】 PNIPAAm 應用於毛細管電泳層析(CEC)分離中性樣品：聚丙基丙烯醯胺，Poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm)，它具有疏水性的主鏈及親水性的支鏈，為一種溫度敏感型的高分子材料。此種高分子的特性為溶液溫度改變時，高分子在溶液中極性會隨之變化，當溫度高於 lower critical solution temperature (LCST) 32°C 時，在水溶液中會是疏水的性質，和水產生相分離的情形，低於此溫度則為親水溶解的情形，此特殊的性質可以利用來做為管柱分離分析中所使用的基材，此高分子材料應用在高效能液相層析(HPLC)中做為管柱內的填充或修飾已經發展了很久，其目的在於減少有機溶劑的使用量，而取代傳統使用大量的有機溶劑產生管柱內極性和非極性的性質。因此這種高分子在推展綠色化學方面有很大的發展空間。若能再結合毛細管電泳，相較於高效能液相層析(HPLC)，所使用的樣品量和溶劑皆較少，具備有綠色化學的基本要求。毛細管電泳為分離不同荷質比的樣品，因此在分析中導入了此種高分子材料，除了電性分離外，尚可增加分離極性不同的樣品，此即為毛細管電泳層析方法。

在以毛細管電泳系統為基礎下，實驗室利用此高分子材料分離中性樣品，如固醇類(steroids)，在沒有電性的影響下探討其分離樣品的效果。將 PNIPAAm 高分子直接添加於緩衝溶液中，填充於毛細管中，並藉由改變毛細管內的溫度，達到毛細管內靜相具有親疏水性質的變化，預期可以達到分離中性樣品的效果。但由於此高分子在溫度改變時會產生親疏水性的變化之外，還會有形狀上的膨脹收縮行為，可能會造成毛細管內分布不均，或樣品滲流的缺點，因此額外添加了二氧化矽奈米粒子作為空間上的填充物，形成一偽靜相(pseudostationary phase)改善上述情況。在這個研究中，許多參數將會對樣品分離產生影響，如環境溫度、高分子的分子鏈長、奈米粒子的大小、濃度、離子強度和 pH 值等。將針對這些參數做最佳化及討論。

五、計劃成果自評：

本年度研究計劃中，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，成功製備出啞鈴、豌豆、珍珠鍊之不同構形金-碲奈米複合材料，修飾R6G螢光分子偵測其表面增強拉曼光譜，最低可測到 1.8×10^{-11} M，表面增強拉曼光譜之增強因子可提升至 5.6×10^9 。此外，本計畫中利用修飾適合體的奈米粒子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，並且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。吳立真教授實驗室則利用聚丙基丙烯醯胺在溫度在lower critical solution temperature上下改變時，其極性會產生變化的特性，引入毛細管電泳層析方法中，並以二氧化鈦奈米粒子改善其效果，分離固醇類樣品，並探討環境溫度、高分子的分子鏈長、奈米粒子的大小、濃度、離子強度和pH值等參數影響。本年度部分研究成果尚再整理待發表，部份已發表於國際知名雜誌：

1. Lin, Z. -H.; Yang, Z.; Chang, H. -T. "Preparation of Fluorescent Tellurium Nanowires at Room Temperature" *Cryst. Growth Des.* **2008**, 8, 351-357.
2. Lin, Z. -H.; Yang, Z.; Chang, H. -T. "Preparation of Gold-Tellurium Hybrid Nanomaterials for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy" *Langmuir* **2008**, 24, 365-367.
3. Chen, S. -J.; Huang, Y. -F.; Huang, C. -C.; Lee, K. -H.; Lin, Z. -H.; Chang, H. -T. "Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles" *Biosens. Bioelectron.* in press.

六、參考資料：

1. Nath, N.; Chilkoti, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8197-8202.
2. Norman, T. J. Jr.; Grant, C. D.; Magana, D.; Zhang, J. Z.; Liu, J.; Cao, D.; Bridges, F.; Van Buuren, A. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7005-7012.
3. Yu, S.-H.; Yoshimura, M.; Calderon Moreno, J. M.; Fujiwara, T.; Fujino, T.; Teranishi, R. *Langmuir* **2001**, *17*, 1700-1707.
4. Bao, H.; Gong, Y.; Li, Z.; Gao, M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3853-3859.
5. Fritzsche, W.; Andrew T.; Taton, T. A. *Nanotechnology* **2003**, *14*, R63–R73.
6. Lyon, L. A.; Musick, M. D.; Natan, M. J. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5177–5183.