



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201428295 A

(43) 公開日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 16 日

(21) 申請案號：102100526

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 08 日

(51) Int. Cl. :

G01N33/52 (2006.01)

B01J13/22 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

B82Y40/00 (2011.01)

(71) 申請人：國立交通大學 (中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72) 發明人：劉典謨 LIU, DEAN MO (TW)；周輔宣 CHOU, FU HSUAN (TW)；洪維陽 HUNG,

WEI YANG (TW)；顏廷祐 YEN, TIN-YO (CA)

(74) 代理人：林火泉

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：7 共 21 頁

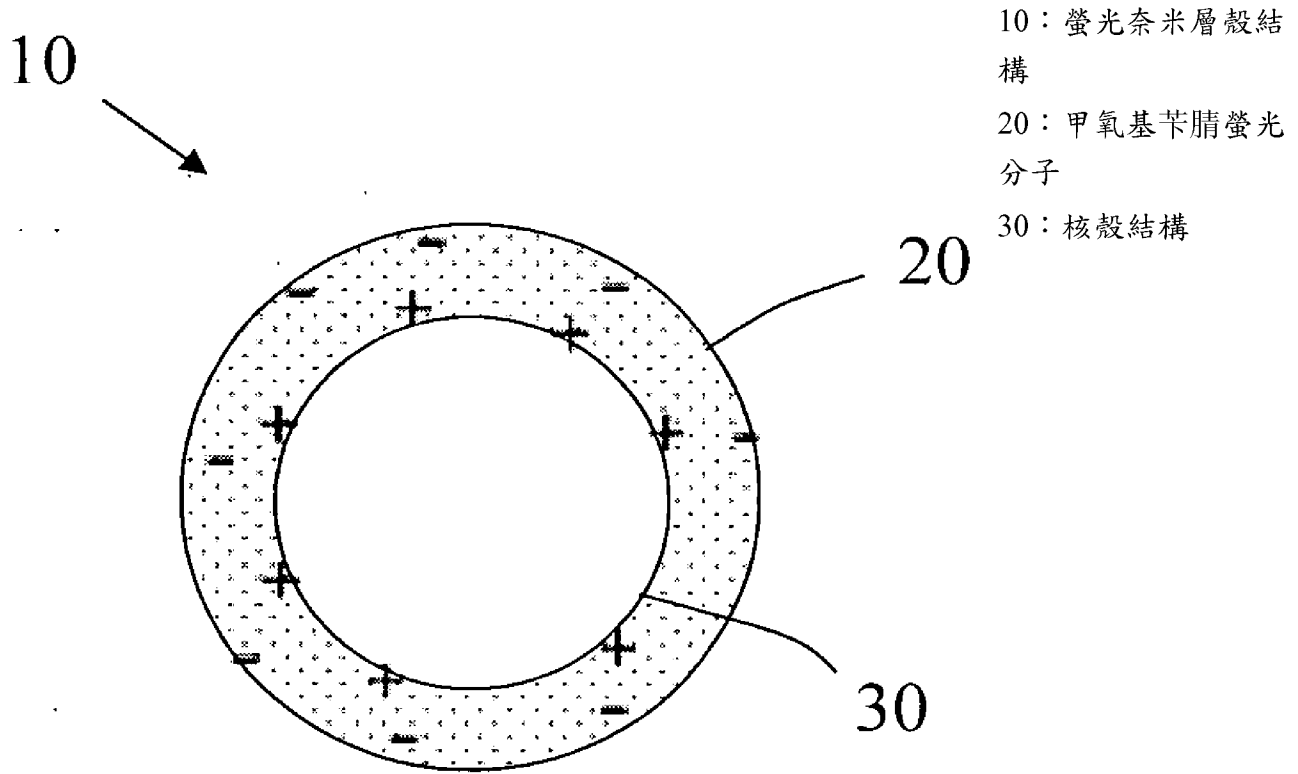
(54) 名稱

螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途

LAYER-SHELL FLUORESCENCE NANOSTRUCTURE, THE FABRICATING METHOD AND THE UTILIZATION THEREOF

(57) 摘要

一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，乃將兩性改質之幾丁聚醣高分子自組裝形成的奈米微胞，以層接層技術，使甲氧基苄腈螢光分子透過靜電作用力吸附並覆蓋於奈米微胞表面，以形成螢光奈米層殼結構，此螢光奈米層殼結構可以將甲氧基苄腈螢光分子良好地運送至細胞內，並藉由甲氧基苄腈螢光分子具有酸鹼敏感及螢光的特性，可用來量測細胞內酸鹼值而推測癌細胞之存在，並兼顧有細胞顯影之能力，可用於癌細胞之定位。



第2圖

發明摘要

※ 申請案號：102/00526

G01N33/52 (2006.01)

※ 申請日：102.1.8

※IPC分類：B01J13/02 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

B82Y40/00 (2011.01)

【發明名稱】(中文/英文)

螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途 / layer-shell fluorescence nanostructure, the fabricating method and the utilization thereof

【中文】

一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，乃將兩性改質之幾丁聚醣高分子自組裝形成的奈米微胞，以層接層技術，使甲氧基苒睛螢光分子透過靜電作用力吸附並覆蓋於奈米微胞表面，以形成螢光奈米層殼結構，此螢光奈米層殼結構可以將甲氧基苒睛螢光分子良好地運送至細胞內，並藉由甲氧基苒睛螢光分子具有酸鹼敏感及螢光的特性，可用來量測細胞內酸鹼值而推測癌細胞之存在，並兼顧有細胞顯影之能力，可用於癌細胞之定位。

【英文】

A layer-shell fluorescence nanostructure, the fabricating method and the utilization thereof are provided. The amphoteric modified chitosan polymer (CHC) is self-assembled to form a nano-micelles. Via electrostatic attraction force, the pyranine fluorescent molecules are adsorbed and covers on the surface of the CHC nano-micellar to form the layer-shell fluorescence nanostructure based on layer-by-layer deposition. The pyranine fluorescent molecules may be favorably transported into the cell. Due to the pyranine fluorescent molecules have pH-sensitive and fluorescent characteristics, the layer-shell fluorescence nanostructure may be utilized to measure intracellular pH to speculate the presence of cancer cells. Also, the ability of developing the cells may be used to locate the cancer cells.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- 10 螢光奈米層殼結構
- 20 甲氧基苄腈螢光分子
- 30 核殼結構

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途 / layer-shell fluorescence nanostructure, the fabricating method and the utilization thereof

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種酸鹼敏感之螢光結構，特別是指一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和應用於細胞內酸鹼值量測與螢光顯影之用途。

【先前技術】

【0002】 癌症雖然是高死亡率的疾病，但是若能早期發現癌症或其癌前病變，經治療後可以降低死亡率外，還可以阻斷癌前病變進展為癌症，由此可突顯癌症檢驗的重要性。簡單、精確的檢驗癌症，可大幅地提高癌症篩檢的正確性並減少誤診，目前已陸續研發出許多和癌症檢驗相關的研究及產品。

【0003】 而有關細胞內酸鹼值 (pH 值) 的測定，細胞內酸鹼值是反映生物有機體內環境穩定性的一項指標，它在調節細胞新陳代謝中起了重要作用，現今已發展為可望用來成為癌症診斷的輔助工具。過去進行細胞內酸鹼值量測的方法，主要有微電極法、核磁共振 (NMR) 光譜法及螢光光譜法三類。首先，微電極法是最被普遍使用的方法，此方法靈敏度高，但其設備準備困難，可使用之細胞大小受到限制，且有損傷細胞的危險性。而核磁共振光譜法之缺點在於靈敏度過低，且操作步驟繁瑣，所需設備昂貴，取得資料耗時過久。至於螢光光譜法，雖然具有高靈敏度，但其螢光分子多數不夠穩定，無法長期保存使用；其中，甲氧基苄腈螢光分子具有酸鹼敏感性，而且能夠穩定及長期保存，然而，它不容易進入細胞內，往往必須藉著注射或打孔等侵入式方法，會對細胞造成損傷。

【0004】 因此，本案發明人則積極開發一種簡單、靈敏、穩定之細胞內酸鹼值量測之方式，並針對原本不易進入細胞內的甲氧基苄腈螢光分子，尋求可承載此種螢光分子之載體，能良好地將此螢光分子運送至細胞內，而不需使用侵入式方式。

【發明內容】

【0005】 鑒於以上的問題，本發明的主要目的在於提供一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，藉由層接層技術，將甲氧基苄腈螢光分子靜電吸附於兩性改質之幾丁聚醣奈米微胞表面形成螢光奈米層殼結構，藉此，可改善甲氧基苄腈螢光分子進入細胞的方式，不需使用注射法等侵入方式，不會損傷細胞。

【0006】 本發明的另一目的在於提供一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，乃利用甲氧基苄腈螢光分子因細胞內酸鹼值的不同，而顯示在其激發光譜上之改變，以此做為量測細胞內酸鹼值之依據，並可用來推測癌細胞之存在，進一步用於癌症檢驗之用途。

【0007】 本發明的又一目的在於提供一種螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，由於甲氧基苄腈螢光分子具有螢光的特性，能用於細胞內之螢光顯影，可應用於癌細胞之定位。

【0008】 為達以上之目的，本發明提供一種螢光奈米層殼結構，包含做為核心之核殼結構以及覆蓋於殼心周圍之外層兩個部分，其中核殼結構是由經兩性改質之幾丁聚醣高分子於水溶液中自組裝所形成之奈米微胞所構成，而外層則包含複數甲氧基苄腈螢光分子並藉由靜電作用力吸附及覆蓋於奈米微胞表面，且甲氧基苄腈螢光分子所構成之外層數量可以為單一層或複數層，其濃度係可決定螢光奈米層殼結構之粒徑大小。

【0009】 再者，本發明也提供一種螢光奈米層殼結構之製備方法，其步驟是先將經兩性改質之幾丁聚醣高分子溶解於水溶液中，即可自組裝形成具有核殼結構之奈米微胞，然後，加入複數甲氧基苄腈螢光分子，使甲氧基苄腈螢光分子藉由靜電作用力吸附及覆蓋於奈米微胞表面，即製得螢光奈米層殼結構，此螢光奈米層殼結構乃具有由幾丁聚醣核殼結構構成之核心和由甲氧基苄腈螢光分子構成之外層。

【0010】 另外，本發明也提供一種螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其步驟是先提供如前所述之螢光奈米層殼結構，然後，將此螢光奈米層殼結構由細胞吞噬，使甲氧基苄腈螢光分子得以進入細胞內，再藉由量測甲氧基苄腈螢光分子之激發光譜，利用甲氧基苄腈螢光分子於吸收光波長分別為 460 奈米與 405 奈米的強度比值，進行細胞內酸鹼值之推

算。

【0011】 此外，本發明也提供一種應用於細胞內之螢光顯影螢光奈米層殼結構，其結構如前所述，包含有幾丁聚醣奈米微胞所構成之核殼結構、以及包覆於核殼結構周圍之甲氧基苝睛螢光分子所構成之外層。

【0012】 爲使對本發明的目的、特徵及其功能有進一步的了解，茲配合圖式詳細說明如下：

【圖式簡單說明】

【0013】

第 1 圖係本發明實施例所提供之螢光奈米層殼結構之製備方法的流程圖。

第 2 圖係本發明實施例所提供之螢光奈米層殼結構之示意圖。

第 3 圖爲本發明於不同酸鹼值（pH 值）環境下甲氧基苝睛螢光分子的激發光譜。

第 4 圖爲本發明實施例所提供之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法之流程圖。

第 5A~5C 圖分別爲羅丹明染料分子於乳癌細胞中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片。

第 6A~6C 圖分別爲本發明螢光奈米層殼結構於乳癌細胞 MCF-7 中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片。

第 7A~7C 圖分別爲本發明螢光奈米層殼結構與羅丹明染料分子於乳癌細胞 MCF-7 中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片。

【實施方式】

【0014】 本發明係以兩性幾丁聚醣（carboxymethyl hexanoyl chitosan, CHC）及甲氧基苝睛（pyranine, PY）螢光分子所形成之螢光奈米層殼結構作爲較佳實施例，來說明該螢光奈米層殼結構之製程，以及利用該螢光奈米層殼結構進行細胞內酸鹼值量測與螢光顯影確實爲具體可行之概念。

【0015】 請參照第 1 圖，說明本發明實施例所提供之螢光奈米層殼結構之製備方法之流程，其包含有下列步驟：

【0016】 首先，如步驟 S100，將經由羧酸基與長碳鏈改質其親、疏水端之兩性幾丁聚醣高分子溶解於水溶液中，待其溶解數小時後，即自組

裝形成具有核殼結構之奈米微胞。

【0017】 如步驟 S110，再加入複數甲氧基苄腈螢光分子，使甲氧基苄腈螢光分子藉由分子間的靜電作用力吸附及覆蓋於奈米微胞表面。之後，可再利用去離子水清洗數次，以除去未吸附在奈米微胞表面之甲氧基苄腈螢光分子。

【0018】 最後，如步驟 S120，即可製得一螢光奈米層殼結構。

【0019】 上述製程可控制在室溫或 50°C 以下進行。

【0020】 如第 2 圖所示，為本發明藉由分子間之靜電作用力所形成層接層 (layer-by-layer) 的螢光奈米層殼結構 10，其核心部份為表面帶正電之兩性幾丁聚醣核殼結構 10，而外層部份為表面帶負電之甲氧基苄腈螢光分子 20。其中，兩性幾丁聚醣核殼結構 30 的直徑約為 50 至 500 奈米 (nm)，而甲氧基苄腈螢光分子所構成之外層數量可為單層或複數層，其厚度約為 1 至 50 奈米。

【0021】 表一列示不同甲氧基苄腈螢光分子比例之螢光奈米層殼結構的物理特性，包含表面電荷、粒徑與甲氧基苄腈螢光分子之吸附率。其中，樣品編號 CHC-PY0.3、CHC-PY0.2、CHC-PY0.15、CHC-PY0.1、CHC 分別代表使用兩性改質的幾丁聚醣高分子含量為 0.1%wt，以及甲氧基苄腈螢光分子含量分別為 0.3 毫克/毫升 (mg/ml)、0.2 mg/ml、0.15 mg/ml、0.1 mg/ml、0 時，所製得的螢光奈米層殼結構。

【0022】 表一

樣品編號	甲氧基苄腈螢光分子吸附率 (g/ml)	界面電位 (Zeta Potential) (mV)	平均粒徑 (nm)
CHC-PY0.3	260.4 ± 7.2	8.7 ± 1.8	132.6 ± 0.5
CHC-PY0.2	162.2 ± 6.2	18.5 ± 2.7	123.7 ± 2.7
CHC-PY0.15	119.9 ± 3.8	25.3 ± 2.3	119.6 ± 1.5
CHC-PY0.1	70.4 ± 3.6	32.1 ± 1.4	113.5 ± 2.9
CHC	0	34.3 ± 0.7	107.7 ± 1.9

【0023】 本發明是利用表面靜電作用力以進行層接層製程，將已知表面帶負電之甲氧基苄腈螢光分子吸附於表面帶正電之兩性幾丁聚醣核殼結

構。由表一可知，隨著甲氧基苜睛螢光分子吸附率的增加，螢光奈米層殼結構的之表面電荷也由正 34.3 逐漸減少至正 8.7 左右，且其粒徑大小也逐漸的增加，可以證明甲氧基苜睛螢光分子的確吸附於幾丁聚醣核殼結構之外層形成螢光奈米層殼結構。

【0024】 接著，為確認甲氧基苜睛螢光分子吸附於幾丁聚醣核殼結構上之穩定度，本發明利用螢光奈米層殼結構於不同酸鹼值之環境，測量長時間下甲氧基苜睛螢光分子之吸附量，以證明甲氧基苜睛螢光分子能穩定吸附於兩性幾丁聚醣核殼結構的表面。表二列示不同酸鹼值環境中螢光奈米層殼結構之穩定度。其中 t 表示經過時間。

【0025】 表二

pH 值	t=0	t= 0.5 小時	t=24 小時	t=120 小時
pH 4.5	100	97.62	95.24	92.86
pH 5.5	100	92.77	90.36	87.95
pH 6.5	100	86.08	82.28	79.75
pH7.5	100	78.75	75.00	71.25

【0026】 由表二可知，於偏酸環境之中，甲氧基苜睛螢光分子吸附量經過 120 小時大約減少 8~29%。而 pH6.5 及 pH7.5 的環境下，在前半小時雖然減少約 14~22%，但 0.5 小時至 120 小時其改變量只有 7%左右，可證明甲氧基苜睛螢光分子可長期吸附於幾丁聚醣核殼結構外層。

【0027】 再者，本發明所採用之甲氧基苜睛螢光分子乃是一種酸鹼敏感的螢光物質，甲氧基苜睛螢光分子的激發光波長為 405 至 460 奈米(nm)，放射光為 514 奈米，而其激發光譜會隨著週圍環境酸鹼值不同而有顯著的變化。如第 3 圖所示，為不同酸鹼值 (pH 值) 環境下甲氧基苜睛螢光分子的激發光譜，且圖中之 a 曲線、b 曲線、c 曲線分別為 pH5.5、pH6.5、pH7.5 之環境；當酸鹼值增加時，波長 405 奈米的波峰會逐漸降低，取而代之的是波長 460 奈米的波峰會逐漸增強，利用兩波長之強度比值 R_{ex} ($R_{ex} = R_{460}/R_{405}$) 即可推算環境之酸鹼值。

【0028】 由第 3 圖之結果，可得知甲氧基苜睛螢光分子的確具有量測酸鹼值之能力，但因甲氧基苜睛螢光分子不易進入細胞內，因此本發明利

用兩性幾丁聚醣核殼結構作為載體，將甲氧基苒脲螢光分子吸附於其表面，利用兩性幾丁聚醣核殼結構易於被細胞吞噬之效果，讓甲氧基苒脲螢光分子能順利進入細胞內，進而量測細胞內酸鹼值。

【0029】 請參照第 4 圖，說明本發明實施例所提供之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法之流程，其包含有下列步驟：

【0030】 首先，如步驟 S200，提供如前所述之螢光奈米層殼結構，此螢光奈米層殼結構包含經過兩性改質之幾丁聚醣高分子自組裝形成之奈米微胞的核殼結構，以及藉由分子間之靜電作用力將複數甲氧基苒脲螢光分子吸附並覆蓋於奈米微胞表面之外層。

【0031】 如步驟 S210，提供此螢光奈米層殼結構由細胞吞噬，並藉由兩性幾丁聚醣核殼結構作為載體，將甲氧基苒脲螢光分子帶入細胞內。

【0032】 最後，如步驟 S220，量測甲氧基苒脲螢光分子之激發光譜，並利用甲氧基苒脲螢光分子於吸收光波長分別為 460 奈米與 405 奈米的強度比值，可用來推算出細胞內之酸鹼值。本發明螢光奈米層殼結構對於細胞內之酸鹼值的量測範圍大致上為 pH5~8，能有效對應至正常細胞與癌細胞之範圍，因此，可以利用正常細胞與癌細胞之酸鹼值差異，來推測癌細胞之存在，並進一步用於癌症檢驗之用途。

【0033】 表三列示本發明螢光奈米層殼結構對於不同細胞之細胞內酸鹼值之量測結果。以小腸上皮細胞 IEC-6、人類乳癌細胞 MCF-7 與非小型肺癌細胞 A-549 為樣本，比較正常細胞與癌細胞之間細胞內酸鹼值之差異。結果顯示，正常細胞 IEC-6 細胞內酸鹼值約為 7.1，而兩株癌細胞皆在 6.5 左右，與已知結果符合。由此結果可證明本發明螢光奈米層殼結構的確能測量細胞內酸鹼值。

【0034】 表三

細胞種類	經過 24 小時後的培養之 pH 值
IEC-6	7.02 ± 0.11
MCF-7	6.66 ± 0.10
A-549	6.51 ± 0.06

【0035】 又，根據本發明所揭露之螢光奈米層殼結構，由於甲氧基苒

脞螢光分子除了可用於酸鹼值量測之外，其本身所具備之螢光能力亦可用於細胞內之螢光顯影之上。如第 5A~5C 圖所示，為羅丹明（Rhodamine）染料分子於乳癌細胞 MCF-7 中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片；如第 6A~6C 圖所示，為本發明螢光奈米層殼結構於乳癌細胞 MCF-7 中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片，綠色部份即為甲氧基苄脞螢光分子之螢光；及如第 7A~7C 圖所示，為本發明螢光奈米層殼結構與羅丹明染料分子於乳癌細胞 MCF-7 中經過 4 小時、8 小時、24 小時之螢光顯微鏡照片。可證明本發明之螢光奈米層殼結構的確具有細胞內螢光顯影的功用。

【0036】 綜上所述，根據本發明所揭露之螢光奈米層殼結構及其製備方法和用途，結合自組裝兩性幾丁聚醣高分子及層接層技術，藉由分子間靜電作用力在已形成核殼結構之表面進行覆蓋甲氧基苄脞螢光分子，以形成螢光奈米層殼結構。

【0037】 並且，本發明乃使用兩性幾丁聚醣核殼結構作為載體，讓原本不易進入細胞內之甲氧基苄脞螢光分子能順利進入細胞內，不需使用侵入式注射法等損傷細胞之方式。而且，此螢光奈米層殼結構具有細胞內酸鹼值量測能力，其穩定性高，可長期保存，可量測之酸鹼值範圍大，能有效對應至正常細胞與癌細胞之範圍，因此，將可應用於癌細胞檢測之領域。同時，由於酸鹼敏感之甲氧基苄脞螢光分子兼具顯影之能力，亦可應用於癌細胞定位，可增進本發明螢光奈米層殼結構之應用性與價值。

【0038】 雖然本發明以前述之實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明。在不脫離本發明之精神和範圍內，所為之更動與潤飾，均屬本發明之專利保護範圍。關於本發明所界定之保護範圍請參考所附之申請專利範圍。

【符號說明】

【0039】

- 10 螢光奈米層殼結構
- 20 甲氧基苄脞螢光分子
- 30 核殼結構

申請專利範圍

1. 一種螢光奈米層殼結構，其包含：
一核殼結構，係一經兩性改質之幾丁聚醣（carboxymethyl hexanoyl chitosan, CHC）高分子於一水溶液中自組裝所形成之奈米微胞；及
一外層，包含複數甲氧基苝菁（pyranine, PY）螢光分子並藉由靜電作用力吸附及覆蓋於該奈米微胞表面。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之螢光奈米層殼結構，其中該幾丁聚醣高分子係經由羧酸基改質其親水端及長碳鏈改質其疏水端。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之螢光奈米層殼結構，其中該核殼結構之直徑為 50 至 500 奈米（nm）。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之螢光奈米層殼結構，其中該外層之數量為單層或複數層。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之螢光奈米層殼結構，其中該外層之厚度為 1 至 50 奈米（nm）。
6. 一種螢光奈米層殼結構之製備方法，其步驟包含：
將一經兩性改質之幾丁聚醣（carboxymethyl hexanoyl chitosan, CHC）高分子溶解於一水溶液中，以自組裝形成至少一奈米微胞，該奈米微胞具有一核殼結構；
加入複數甲氧基苝菁（pyranine, PY）螢光分子，使該些甲氧基苝菁螢光分子藉由靜電作用力吸附及覆蓋於該奈米微胞表面；及
製得一螢光奈米層殼結構，該螢光奈米層殼結構係具有該核殼結構構成之核心和該些甲氧基苝菁螢光分子構成之外層。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，其中該幾丁聚醣高分子係經由羧酸基改質其親水端及長碳鏈改質其疏水端。
8. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，其中該核殼結構之直徑為 50 至 500 奈米（nm）。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，其中該外層之數量為單層或複數層。
10. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，其中該外層之厚度為 1 至 50 奈米（nm）。

11. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，更包含一清洗未吸附於該奈米微胞表面之甲氧基苝睛螢光分子之步驟。
12. 如申請專利範圍第 6 項所述之螢光奈米層殼結構之製備方法，係於 50°C 以下進行。
13. 一種螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其步驟包含：
提供一螢光奈米層殼結構，該螢光奈米層殼結構具有一核殼結構和一外層，該核殼結構係為一經兩性改質之幾丁聚醣（carboxymethyl hexanoyl chitosan, CHC）高分子於一水溶液中自組裝所形成之奈米微胞，該外層包含複數甲氧基苝睛（pyranine, PY）螢光分子並藉由靜電作用力吸附及覆蓋於該奈米微胞表面；
提供該螢光奈米層殼結構由一細胞吞噬，使該些甲氧基苝睛螢光分子進入該細胞內；及
藉由量測該些甲氧基苝睛螢光分子之激發光譜，推算出該細胞內之酸鹼值。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該推算該細胞內之酸鹼值之步驟，係利用該些甲氧基苝睛螢光分子於吸收光波長分別為 460 奈米（nm）與 405 奈米（nm）的強度比值來推算該細胞內之酸鹼值。
15. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該細胞內之酸鹼值的量測範圍為 pH5~8。
16. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該幾丁聚醣高分子係經由羧酸基改質其親水端及長碳鏈改質其疏水端。
17. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該核殼結構之直徑為 50 至 500 奈米（nm）。
18. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該外層之數量為單層或複數層。
19. 如申請專利範圍第 13 項所述之螢光奈米層殼結構之細胞內酸鹼值量測方法，其中該外層之厚度為 1 至 50 奈米（nm）。
20. 一種應用於細胞內之螢光顯影之螢光奈米層殼結構，其結構係如申請專

利範圍第 1 項所述。

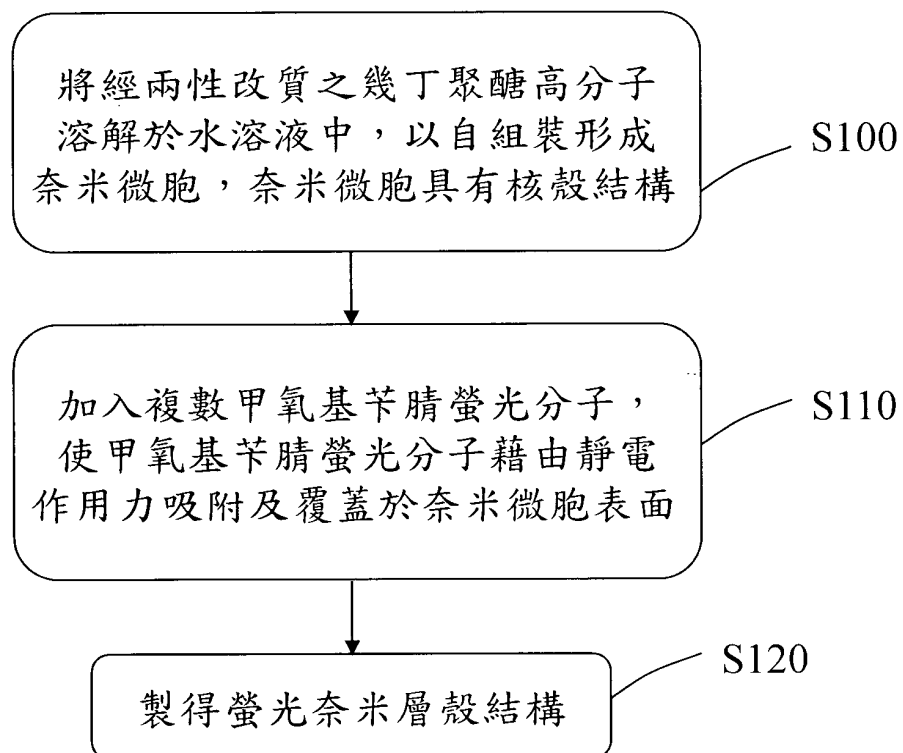
-

-

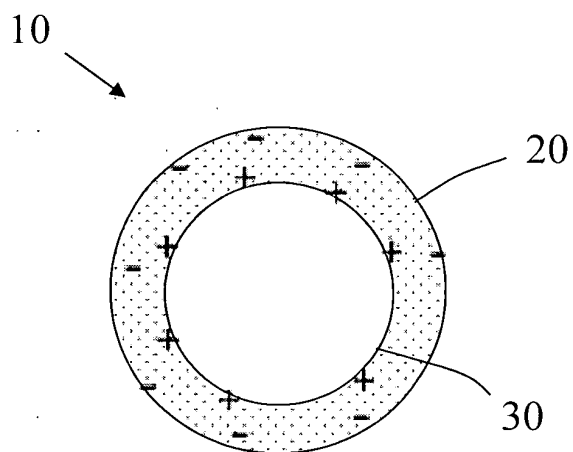
-

-

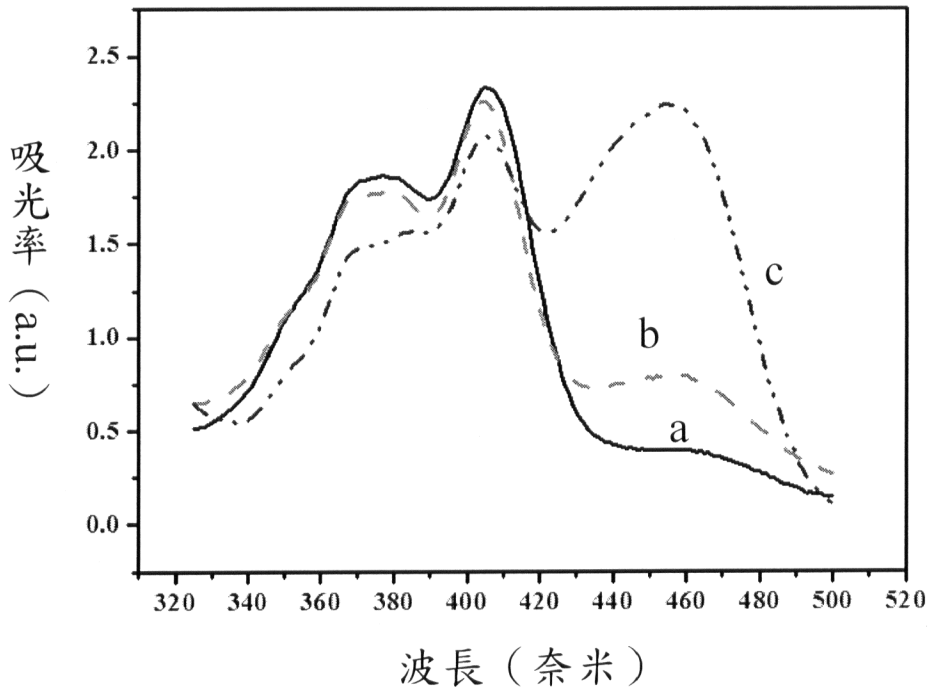
圖式



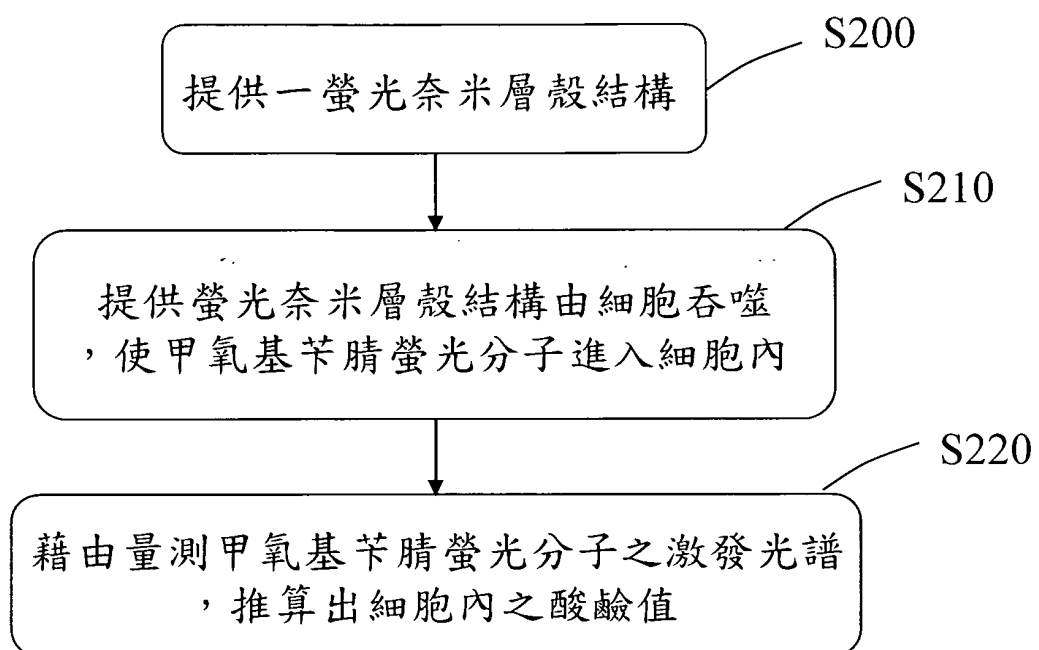
第1圖



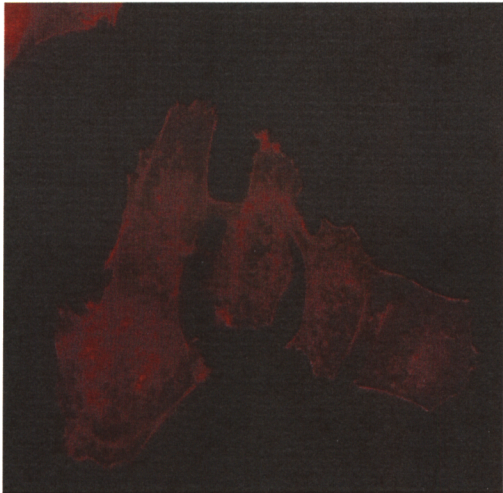
第2圖



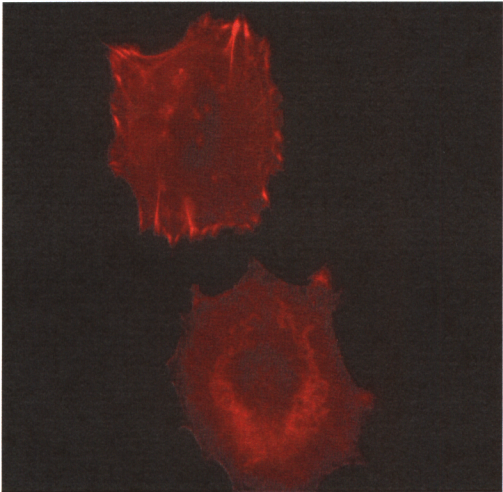
第3圖



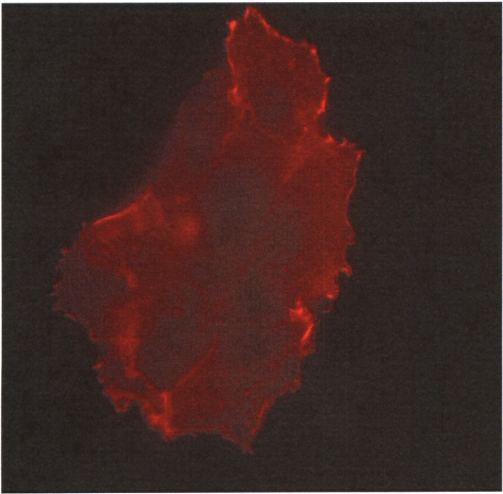
第4圖



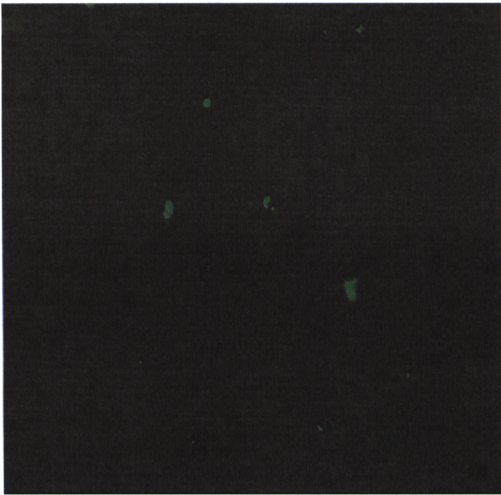
第5A圖



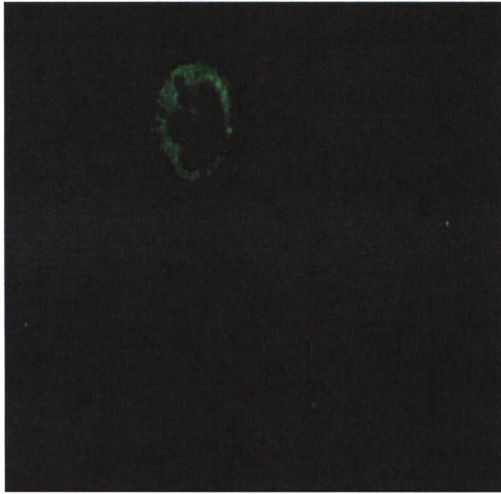
第5B圖



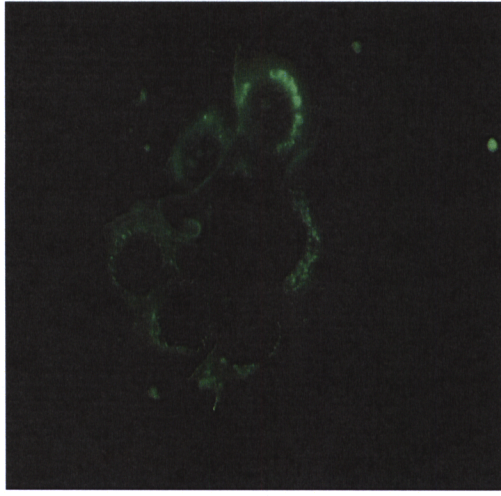
第5C圖



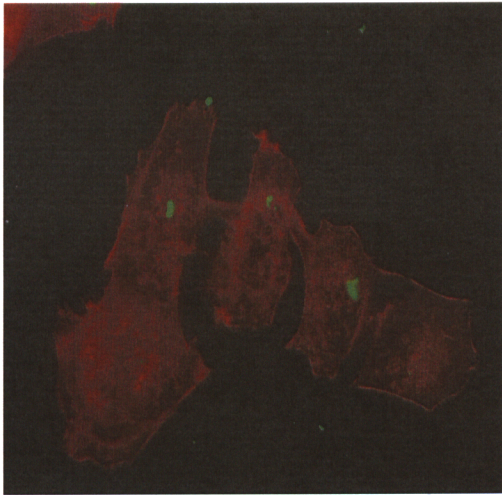
第6A圖



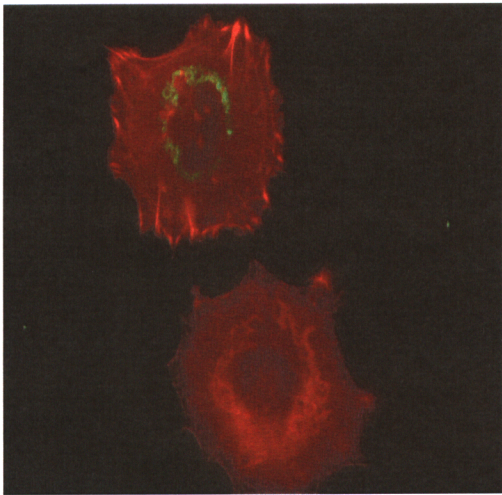
第6B圖



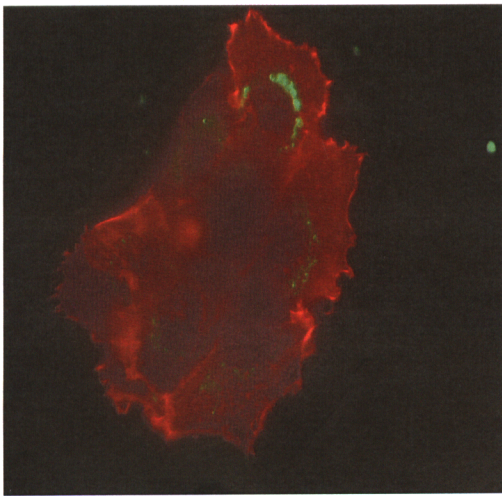
第6C圖



第7A圖



第7B圖



第7C圖