

國立交通大學
應用化學系碩士班

碩士論文

螢光奈米鑽石的特性和生物應用：
專一性、光毒性和能量轉移研究

Characterizations and biological applications of fluorescence
nanodiamonds: specifically targeting, phototoxicity,
and energy transfer

研究生：翁茂峯

指導教授：王念夏 博士

江素玉 博士

中華民國一〇〇年六月

螢光奈米鑽石的特性和生物應用：
專一性、光毒性和能量轉移研究
Characterizations and biological applications of fluorescence
nanodiamonds: specifically targeting, phototoxicity,
and energy transfer

研究生：翁茂峯

Student : Mao-Feng Weng

指導教授：王念夏

Advisor : Niann-Shiah Wang

江素玉

Su-Yu Chiang

國立交通大學
應用化學系碩士班
碩士論文

A Thesis

Submitted to M. S. Program, Department of Applied Chemistry

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

in

Applied Chemistry

June 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一〇〇年六月

螢光奈米鑽石的特性和生物應用：專一性、光毒性和能量轉移研究

學生：翁茂峯

指導教授：王念夏 博士

江素玉 博士

國立交通大學應用化學系碩士班

摘 要

近來奈米鑽石在生物醫學上的應用極具潛力，因為螢光奈米鑽石具有良好的光學特性和生物相容性。本研究主要分為三部份：(1)將 140 nm 紅光奈米鑽石製成專一性的探針，利用螢光影像研究運鐵蛋白和海拉細胞膜表面受體的作用力；(2)探討不同表面官能基 40 nm 和 140 nm 奈米鑽石對胞吞作用的影響，以及觀察奈米鑽石大量進入細胞後的毒性，並利用光熱效應選擇性殺死癌細胞；(3)首次探討綠光和紅光奈米鑽石間是否有螢光共振能量轉移，以拓展生物醫學上的應用。實驗結果顯示，透過運鐵蛋白和受體的作用力，螢光奈米鑽石成功變成專一性的探針並進入細胞，其螢光光譜和螢光生命期特性亦不受外在環境影響。利用流式細胞儀的分析，發現螢光奈米鑽石-運鐵蛋白複合物的胞吞作用效率，約是胺化奈米鑽石的 2 倍。奈米鑽石有效率的進入細胞後，我們觀察到細胞的生長速度變慢。此外，在 532 nm 的雷射照射下，專一性進入細胞的奈米鑽石可產生光熱效應，選擇性將被標靶的癌細胞殺死，使用的照射能量是低於殺死未被標靶細胞所需能量的二分之一。綠光奈米鑽石的螢光範圍，和紅光奈米鑽石的吸收範圍有良好的重疊，可形成很好的螢光共振能量轉移配對。我們分別將抗體和抗原固定在綠光和紅光奈米鑽石表面，利用抗原-抗體作用力相結合，其螢光共振能量轉移的效率約是 18%。本研究結果顯示螢光奈米鑽石在生醫應用的可能性，有潛力變成專一性探針和扮演成光熱治療試劑去殺死癌細胞。

Characterizations and biological applications of fluorescence nanodiamonds: the studies of targeted imaging, phototoxicity, and energy transfer

Student : Mao-Feng Weng

Advisor : Dr. Niann-Shiah Wang

Dr. Su-Yu Chiang

M. S. Program, Department of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

ABSTRACT

Recently, fluorescent nanodiamonds (FNDs) have attracted considerable attention as optical probes in biological and medicinal applications because of their special optical properties and great biocompatibility. In this study, we investigated FNDs as specifically targeted probes to image the interactions of transferrins (Tf) with transferrin receptors (TfR) on HeLa cells, the mechanisms involved in the cellular uptake of surface-modified FNDs, the effects of particle size on the specificity of cellular uptake, and evaluated their cytotoxicity and phototoxicity following particle internalization, and the efficiency of fluorescence resonance energy transfer (FERT) between green and red fluorescent nanodiamonds (gFND and rFND). With Tf immobilized on the surface of rFNDs, we demonstrated that rFND-Tf bioconjugates successfully targeted HeLa cells through Tf-TfR interactions and the surface effects of chemical interactions on the emission of rFND are negligible. Through an analysis of the efficiency of internalized rFND-Tf and rFND-NH₂ by flow cytometry, the endocytosis of rFND-Tf particles was highly effective and nearly twice as efficient as that of rFND-NH₂ particles. The cytotoxicity of internalized particles resulted in

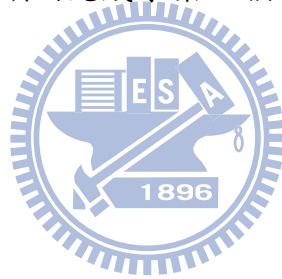
decreasing the rate of proliferation of rFND-treated cells. An examination of the photothermal effect of internalized rFND-Tf particles under irradiation using a 532 nm laser revealed that the rFND-treated cells could be killed selectively using less than half the energy required for untreated cells. gFND and rFND could be a proper FRET pair because the emission of gFND overlaps well with the absorption of rFND. With antibody and antigen immobilized on the surface of gFND and rFND, we observed that the efficiency of FRET was 18 % after the combination of gFND and rFND through antigen-antibody interactions. Our results demonstrated that bioconjugated FNDs could be highly effective in the targeting of cancer cells for fluorescence imaging and photokilling with a minimum of collateral cell damage.



誌謝

感謝多年來指導教授與實驗室夥伴們的包容和陪伴，得以在國家同步輻射研究中心完成此論文。在我一踏進實驗室，特別感謝宜鋒學長的指教，以及感謝博睿學長和俐君給予論文撰寫的寶貴意見。還有要感謝的人太多，在此獻上我最深的謝意。

最後要感謝我的親愛的家人：我的父母以及由女朋友變成我太太的秣玫，在我最艱難的時刻，給予我最大的支持和包容。在七年的博士研究中，雖然已達到畢業的所有條件，但是卻無法獲得博士學位，感謝你們大大的體諒我和安慰我，並告訴我人的一一生中，若沒有健康和快樂，一切都是枉然。你們安定了我的心，最後我作出長久以來讓我痛苦的決定：降轉碩士班。再次感謝你們在生活以及精神上給我的支持，讓我可以順利完成學業，願將此份榮耀與你們共享。



目 錄

	頁次
中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iv
目錄	v
圖目錄	viii
表目錄	xiv

	頁次
第一章 緒論	1
1-1 螢光奈米鑽石	1
1-2 研究動機和方法	5
第二章 實驗技術和步驟	13
2-1 實驗原理	13
2-1-1 范氏加速器	13
2-1-2 共焦雷射掃描螢光顯微術	13
2-1-3 螢光生命期影像顯微術	14
2-1-4 螢光共振能量轉移	15
2-1-5 流式細胞儀	16
2-1-6 動態光散射儀	17
2-1-7 界面電位	18
2-1-8 細胞活性測試-MTT 檢驗	18

2-2	實驗系統.....	19
2-2-1	共焦雷射掃描螢光顯微鏡.....	19
2-2-2	螢光生命期顯微鏡.....	19
2-2-3	拉曼和螢光光譜儀.....	20
2-3	實驗步驟.....	20
2-3-1	螢光奈米鑽石的製備和表面修飾.....	20
2-3-2	細胞培養和專一性標靶.....	22
2-3-3	細胞螢光影像.....	23
2-3-4	流式細胞儀的樣品處理.....	23
2-3-5	螢光奈米鑽石的細胞毒性.....	24
2-3-6	螢光奈米鑽石的毒光性.....	24
2-3-7	螢光共振能量轉移.....	25
第三章	紅光奈米鑽石的螢光特性和專一性標靶影像應用.....	37
3-1	奈米鑽石螢光特性.....	37
3-2	專一性標靶鑑定.....	40
3-3	結論.....	42
第四章	紅光奈米鑽石的胞吞作用和毒性研究.....	54
4-1	表面性質鑑定.....	54
4-2	胞吞作用細胞螢光影像.....	55
4-3	胞吞作用效率分析.....	57
4-4	奈米鑽石細胞毒性.....	60
4-5	奈米鑽石光毒性.....	63
4-6	拉曼光譜.....	65

4-7	結論.....	67
第五章	奈米鑽石的螢光共振能量轉移.....	84
5-1	綠光奈米鑽石.....	84
5-2	螢光共振能量轉移.....	84
5-3	結論.....	87
參考文獻	92



圖 目 錄

	頁次
圖 1-1 綠光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 488 nm 氬離子雷射。...	8
圖 1-2 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射。	8
圖 1-3 「氮-空缺」中心模型圖。.....	9
圖 1-4 細胞活性測試的 MTT 檢驗結果，藍、黑、紅、紫和黃色分別代表奈米鑽石、碳黑、多壁奈米碳管(Multi-Walled Carbon Nanotubes，簡稱 MWNT)、單壁奈米碳管(Single-Walled Carbon Nanotubes，簡稱 SWNT) 和氧化鋇，添加物和細胞的反應時間是 24 小時。.....	10
圖 1-5 運鐵蛋白進入細胞的示意圖。.....	11
圖 1-6 專一性標靶探針製作的示意圖。.....	11
圖 1-7 專一性標靶實驗示意圖。.....	12
圖 1-8 螢光奈米鑽石間 FRET 實驗設計示意圖。.....	12
圖 2-1 加速器設計圖，奈米鑽石放置在輸出端接受撞擊。.....	27
圖 2-2 加速器的現場照片，(a)離子源和射束輸出方向，(b)靶端，紅色框是奈米鑽石試片放置靶。.....	28
圖 2-3 共焦的基本架構，(A)光源針孔，(B)偵測針孔，(C)集光透鏡，(S)待測樣品，(O)物鏡，(P)光電管。.....	29
圖 2-4 一般共焦雷射掃描顯微鏡的架構，藍色曲線是激發雷射路徑，橘色曲線是螢光路徑。.....	29
圖 2-5 時間相關單光子計數系統之概念圖。.....	30
圖 2-6 螢光共振能量轉移概念圖。.....	30
圖 2-7 螢光共振能量轉移效率計算方法。(a)測量作用力結合前後，供	

	體的螢光生命期變化，(b)經由作用力結合，測量受體光褪色前後，供體螢光生命期的變化。·····	31
圖 2-8	流式細胞儀的流動室剖面圖，利用流體動力聚焦，使單一細胞通過雷射激發區。·····	31
圖 2-9	典型流式細胞儀的實驗結果，黑色曲線是控制實驗，即細胞不經染色，代表細胞自身的背景值，紅色曲線是被染色細胞的螢光強度。·····	32
圖 2-10	光動態散射儀基本架設圖。·····	33
圖 2-11	界面電位分析儀基本原理。·····	33
圖 2-12	MTT 檢驗的還原化學反應方程式。·····	34
圖 2-13	本實驗室共焦雷射掃描螢光顯微鏡的架設。·····	34
圖 2-14	APC 光纖接頭示意圖。·····	35
圖 2-15	Nikon C1 掃描系統設計圖，(1)平行光透鏡，(2)分色鏡(dichroic mirror)，(3) x-y 掃描鏡系統，(4)掃描透鏡，(5)集光透鏡，(6)針孔。藍色和橘色分別代表雷射和螢光路徑。·····	35
圖 2-16	本實驗室螢光生命期顯微鏡之架設。·····	36
圖 2-17	本實驗室拉曼和螢光光譜儀架設圖。·····	36
圖 3-1	140 nm 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，(a)文獻條件，退火條件是真空 800 °C 退火 2 小時，(b)本實驗室最佳化條件，退火條件是真空 800 °C 退火 4 小時，以及大氣下 600 °C 退火 2 小時。·····	44
圖 3-2	40 nm 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，退火條件是真空 800 °C 退火 4 小時，以及大氣下 600 °C 退火 2 小時。·····	45
圖 3-3	140 nm 紅光奈米鑽石和海拉細胞的螢光光圖譜，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射，紅色曲線代表紅光奈米鑽石，綠色曲線代表海拉細胞自體螢光，紫色區域是擷取細胞螢光影像時，螢	

	光訊號的收集範圍。.....	46
圖 3-4	海拉細胞的明視野和共焦螢光影像，(a)明視野影像，(b)和(c)是共焦雷射掃描螢光影像，螢光收集範圍：(b)大於 550 nm，(c) 663 – 738 nm。細胞和 140 nm rFND-Tf 作用 1 小時，反應濃度是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射。.....	47
圖 3-5	140 nm 紅光奈米鑽石螢光光圖譜，(a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf，(c)細胞質中的 rFND-Tf。.....	48
圖 3-6	140 nm 紅光奈米鑽石螢光生命期，(a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf，(c)細胞質中的 rFND-Tf。.....	49
圖 3-7	專一性標靶細胞影像圖，(a)細胞的明視野影像，(b)紅光奈米鑽石的共焦螢光影像，(c)明視野和共焦螢光影像的重疊圖。左欄是細胞和 140 nm rFND-COOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，中間欄是細胞和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，右欄是細胞先和運鐵蛋白(10 mg/mL)作用 1 小時，再和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時。.....	50
圖 3-8	單色縱向截面共焦螢光影像，每個截面間隔距離是 200 nm。海拉細胞和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時。	51
圖 3-9	雙色縱向截面共焦螢光影像，藍色螢光代表是細胞核，激發光源是 405 nm 雷射，螢光收集範圍 420 – 500 nm。紅色螢光代表 140 nm rFND-Tf，激發光源是 514.5 nm 雷射，螢光收集範圍 650 – 750 nm。xz 和 yz 的 z 軸深度是 20 μm 。.....	52
圖 3-10	不同截面的雙色縱向截面共焦螢光影像，藍色螢光代表細胞核，激發光源是 405 nm 雷射，螢光收集範圍是 420 – 500 nm，紅色螢光代表 140 nm rFND-Tf，激發光源是 514.5 nm 雷射，螢光收集範圍是 650 – 750 nm。.....	53

圖 4-1	細胞螢光影像，(a) 140 nm rFND-COOH，(b) 140 nm rFND-COOH，不含胎牛血清，(c) 140 nm rFND-Tf，(d) 140 nm rFND-NH ₂ 。反應濃度皆為 10 μg/mL，反應時間 6 小時。第一、二欄分別是 rFND 和細胞核染劑的螢光影像，第三欄是螢光影像和微分干涉對比影像的重疊圖。.....	69
圖 4-2	細胞螢光影像，(a) 40 nm rFND-COOH，(b) 40 nm rFND-COOH，不含胎牛血清，(c) 40 nm rFND-Tf，(d) 40 nm rFND-NH ₂ 。反應濃度皆為 10 μg/mL，反應時間 6 小時。第一、二欄分別是 rFND 和細胞核染劑的螢光影像，第三欄是螢光影像和微分干涉對比影像的重疊圖。.....	70
圖 4-3	不同表面官能基 rFND 的流式細胞儀分析結果，紅色和綠色分別是 140 nm 和 40 nm rFND，反應濃度是 10 μg/mL，反應時間 6 小時，40 nm rFND 的螢光強度乘以 37 倍之後加以比較，每組實驗都是統計 5×10^3 個細胞的結果。.....	71
圖 4-4	紅光奈米鑽石反應濃度的流式細胞儀分析結果，紅色和綠色分別是 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH ₂ ，反應時間 6 小時，反應濃度是 1、2、5、10 和 20 μg/mL，每組實驗結果皆是統計 5×10^3 個細胞的結果。.....	72
圖 4-5	細胞螢光影像和流式細胞儀對 rFND 反應濃度分析的比較圖，黑色和紅色曲線分別代表螢光影像分析 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH ₂ 的結果，綠色和藍色分別代表流式細胞儀分析 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH ₂ 的結果。.....	73
圖 4-6	紅光奈米鑽石反應時間的流式細胞儀分析結果，(a) 140 nm rFND-Tf，(b) 140 nm rFND-NH ₂ ，反應濃度皆是 10 μg/mL，反應時間是 0.5、1、1.5、2、3、4 和 5 小時，每組實驗是統計 $5 \times$	

	10 ³ 個細胞的結果。.....	74
圖 4-7	不同表面官能基的 140 nm rFND 對細胞毒性的細胞影像，分別是(a) 140 nm rFND-COOH，反應濃度是 0、10 和 100 μg/ mL，(b)和(c)分別是 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH ₂ ，反應濃度皆為 0、1 和 10 μg/mL。rFND 和細胞作用 48 小時。.....	75
圖 4-8	不同表面官能基的 40 nm rFND 對細胞毒性的細胞影像，(a)和(b)分別是 40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH ₂ ，反應濃度皆是 0、1、10 μg/ mL。rFND 和細胞作用 48 小時。.....	76
圖 4-9	不同表面官能基 rFND 對細胞活性的 MTT 檢驗結果，紅色是控制實驗，綠色、藍色和青綠色分別是 140 nm 的 ND-COOH、ND-Tf 和 ND-NH ₂ 和細胞作用的結果，粉紅色和黃色分別是 40 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH ₂ 和細胞作用的結果，奈米鑽石的反應濃度皆是 10 μg/mL，分別在第 0、24、48 和 72 小時進行 MTT 檢驗。.....	77
圖 4-10	不同表面官能基 rFND 和細胞作用的細胞計數結果，紅色是控制實驗，綠色和藍色分別是 140 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH ₂ 和細胞作用的結果，青綠色和粉紅色分別是 40 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH ₂ 和細胞作用的結果，奈米鑽石的反應濃度皆是 10 μg/mL，別在第 0、24 和 48 小時計算細胞的數目。.....	78
圖 4-11	奈米鑽石的光毒性測試細胞影像結果，(a)控制實驗，細胞不和 140 nm rFND-Tf 作用，(b)細胞和 1 μg/mL 的 140 nm rFND-Tf 作用 6 小時。照射光源是 100 W 高壓汞燈，照射光的波段是 510 – 560 nm，功率密度是 7 W/cm ² ，連續照射 1 小時。.....	79
圖 4-12	照射光毒性測試細胞影像結果，微分干涉對比和螢光影像重疊圖。(a)和(b)皆是控制實驗組，細胞不和 140 nm rFND-Tf 作	

	用。照射光源是 532 nm 雷射，照射時間是 10 分鐘，黃色區域是照射範圍，雷射的功率密度分別是(a) 50 W/cm ² 和(b) 75 W/cm ² 。.....	80
圖 4-13	奈米鑽石的光毒性測試細胞影像結果，微分干涉對比和螢光影像重疊圖。細胞和 10 µg/mL 的 140 nm rFND-Tf 作用 6 小時後進行光照射。照射光源是 532 nm 雷射，照射時間是 10 分鐘，黃色區域是照射範圍，雷射的功率密度分別是(a) 25 W/cm ² 和(b) 50 W/cm ² 。.....	81
圖 4-14	奈米鑽石拉的曼光譜和溫度分析結果，激發光源是 532 nm 雷射，激發功率範圍是 0.69 – 2.67 mW。(a)不同激發功率下的拉曼光譜，將史托克拉曼(1332 cm ⁻¹)訊號的強度歸一化，觀察反史托克拉曼(-1332 cm ⁻¹)訊號強度的變化，中間的影像是測量時的奈米鑽石。(b)不同功率激發下，計算所得到的奈米鑽石溫度，以及線性適解曲線。.....	82
圖 5-1	「氮-空缺-氮」中心模型圖。.....	88
圖 5-2	綠光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 488 nm 氬離子雷射。...	89
圖 5-3	(a) gFND-anti-Tf IgG 螢光影像，(b) rFND-Tf 螢光影像，(c)螢光影像重疊圖，(d)螢光生命期影像，紅色和黃色框是螢光生命期適解區域。(a)和(d)的螢光訊號收集範圍是 510 – 530 nm，(b)的螢光訊號收集範圍是 650 – 730 nm。.....	90

表 目 錄

	頁次
表 4-1 40 nm 和 140 nm 螢光奈米鑽石的粒徑大小和表面電位。·····	83
表 5-1 綠光和紅光奈米鑽石的粒徑大小。·····	91
表 5-2 綠光奈米鑽石螢光生命期適解結果。·····	91



第一章 緒論

1-1 螢光奈米鑽石(Fluorescent nanodiamonds，簡稱 FND)

奈米技術已廣泛被應用在生物醫學的範疇，例如細胞螢光影像、藥物輸送和診斷治療 [1 – 6]。舉例來說，在生物醫學實驗中，常用染料(dye) [7]、螢光蛋白質(fluorescent protein) [8] 或量子點(quantum dots) [5] 作為螢光標記，跟生物分子或蛋白質結合後，製作成專一性的探針，以進行標靶螢光影像。但是這些應用仍有些問題須克服，例如染料和螢光蛋白質的螢光穩定性不佳，容易產生光褪色(photobleaching) [9, 10]。量子點雖然改善螢光穩定性的問題，但是生物相容性不高，具有細胞毒性 [11, 12]，這些缺點限制生物醫學上的應用。其他的奈米材料方面，惰性金屬(noble metal)形成的金奈米粒子，具有較高的生物相容性和低細胞毒性，也可進行散射光影像(scattering imaging)實驗，且散射光不會有光褪色的現象 [13, 14]。雖然金奈米粒子改善生物相容性和光褪色的問題，但要製作成專一性探針，則需進行較複雜的化學表面修飾。

近年來螢光奈米鑽石(fluorescent nanodiamonds，簡稱FND)逐漸嶄露頭角，FND具有以下特性：(1)高度的螢光穩定性 [15]，不會有光褪色的現象，利用汞燈連續激發8小時，FND的螢光強度不會衰減；(2)生物相容性佳和細胞毒性低 [16, 17]，細胞和高濃度100 µg/mL的奈米鑽石作用，仍然維持良好的細胞活性；(3)容易進行表面化學修飾，可利用吸附或共價鍵的方式，將生物分子或蛋白質固定在表面，製作成專一性的探針 [18]。這些特性改善了上述染料、螢光蛋白和量子點的缺點，可成功扮演生物螢光標記的角色，所以螢光奈米鑽石是極具發展潛力的奈米材料。接下來將對奈米鑽石的分類、特性和應用作介紹。

鑽石主要分為兩大類，分別是型式I (type I) 和型式II (type II)，型式I鑽石是含有氮的成分，自然界中99 %是型式I鑽石，型式II鑽石是不含有氮的成分。型式I鑽石又細分為兩大類，分別是型式Ia (type Ia)和型式Ib (type Ib)，型式Ia鑽石的氮

含量較高，濃度範圍大約是100 – 1000 ppm，氮原子在晶格中的排列，主要呈現兩兩相鄰，98 %的天然鑽石是型式Ia。型式Ib鑽石的氮含量較低，濃度範圍大約是50 – 300 ppm，氮原子在鑽石晶格中的排列，主要是以孤立(isolated)的形式存在。型式Ib鑽石在自然界中的含量很少(< 1 %)。合成方式製造的鑽石幾乎是型式Ib，無法有效合成型式Ia鑽石，所以要研究型式Ia和Ib鑽石的特性，取材分別是以天然跟合成鑽石為主。

鑽石本身並不會放出螢光，螢光奈米鑽石的螢光源自於鑽石晶格中的缺陷中心(defect center)，主要是利用高能量粒子撞擊鑽石，例如電子、中子或質子等等，在鑽石晶格中產生空缺(vacancy)，再經由真空高溫退火(anneal)，使晶格重新排列，就可創造出缺陷中心。型式Ia的天然奈米鑽石，所形成的缺陷是「氮-空缺-氮」中心(N-V-N center)，可發出波長範圍500 – 600 nm的綠色螢光 [19]，稱作綠光奈米鑽石(green fluorescent nanodiamonds，簡稱gFND)。圖1-1是「氮-空缺-氮」中心的螢光光譜，激發光源是488 nm氬離子雷射，螢光譜線峰值約是520 nm。文獻記載其光吸收波長範圍是400 – 520 nm，吸收峰約470 nm [19]。合成鑽石是型式Ib，所形成的缺陷是「氮-空缺」中心 (N-V center)，可發出波長範圍是550-800 nm 的紅色螢光 [15]，稱作紅光奈米鑽石(red fluorescent nanodiamonds，簡稱rFND)。圖1-2是「氮-空缺」中心的螢光光譜，激發光源是514.5 nm氬離子雷射，螢光譜線峰值約是660 nm。文獻記載其光吸收波長範圍是400-650 nm，吸收峰約560 nm [20]。圖1-2光譜中有兩條零聲子線(zero phonon line，簡稱ZPL)，位置在576 nm和638 nm，是(N-V)⁰和(N-V)⁻發光中心分別對應的電子躍遷¹E→¹A₁和³A₂→³E [21, 22]。

紅光奈米鑽石的研究和應用較普遍，主要原因有兩個：(1)合成鑽石較易取得，價格較低；(2)螢光波長範圍可避開細胞自體螢光的干擾。第二個原因對於生物影像的應用性最佳，因為細胞在激發光300–500 nm的照射，會產生波長範圍450 – 650 nm的螢光，稱作細胞自體螢光 [23, 24]，會造成影像背景螢光的干擾。紅光奈米鑽石的螢光範圍是550 – 800 nm，可利用濾光片收集大於650 nm的螢光，

就可避開細胞自體螢光，增加影像的訊雜比。相對地，綠光奈米鑽石的螢光範圍跟細胞自體螢光重疊，無法利用光學方式分離，所以細胞自體螢光的干擾較為顯著。因此，在生物醫學上的應用，是以紅光奈米鑽石較為常見。張煥正老師實驗室進一步測量「氮-空缺」和「氮-空缺-氮」中心的吸收截面(absorption cross section)，分別在532 nm和488 nm激發波長下，其吸收截面分別是 $(1.7 \pm 0.5) \times 10^{-17}$ 和 $(3.1 \pm 0.8) \times 10^{-17}$ [19, 20]，所以rFND的發光強度約是gFND的2倍。

紅光奈米鑽石的「氮-空缺」中心模型如圖1-3所示，氮原子和相鄰的空缺，形成鑽石晶格中的發光中心。1997年，Gruber等人利用電子撞擊型式Ib鑽石，電子的能量是2 MeV，撞擊粒子總量是 10^{12} – 10^{15} electron/cm²，在900 °C真空下退火2小時產生「氮-空缺」中心 [25]，並首次利用共焦雷射掃描螢光顯微鏡，觀察「氮-空缺」中心放光特性。他們利用高功率密度(5 MW/cm²)的514.5 nm雷射激發，並無觀察到光褪色的現象，證明「氮-空缺」中心具有高度螢光穩定性。除了高能電子撞擊之外，張煥正老師實驗室也相繼發展出利用質子(H⁺)或氦離子(He⁺)撞擊來製造「氮-空缺」中心 [15, 26]。一般質子撞擊能量是3 MeV，撞擊粒子總量是 10^{15} – 10^{16} ion/cm²；氦離子的質量較大，單一粒子可產生較多的空缺，所以氦離子撞擊能量是40 keV，撞擊粒子總量是 10^{13} ion/cm²，就可產生足夠的「氮-空缺」中心。相較於電子撞擊，質子和氦離子撞擊產生空缺的效率較好；平均一顆2 MeV電子、3 MeV質子和40 keV氦離子，可產生的空缺分別是0.1、13和40個。但是穿透深度方面，分別是2 mm、50 μm和0.2 μm，所以電子的穿透距離較深 [19, 20, 26, 27]。上述製造螢光奈米鑽石的方式，無法在單一次撞擊實驗就大量生產，Curmi和Treussart實驗室等人於2009年發展出有效率大量製造螢光奈米鑽石的技術 [28]。主要是利用10 MeV的電子撞擊直徑150 – 200 μm的合成鑽石，經過高溫800 °C退火2小時產生「氮-空缺」中心，再利用研磨的技術，將直徑150 – 200 μm鑽石研磨成10 nm的螢光奈米鑽石，即可產出大量的螢光奈米鑽石。

奈米材料在生物方面的應用，首重生物的相容性和毒性。文獻報導奈米鑽石具有生物相容性佳和細胞毒性低的特性，很適合應用在生物體中。Schrand等人，

利用 MTT 檢驗(MTT assay)比較奈米鑽石和其他奈米材料的細胞毒性 [16, 17]，發現奈米鑽石的細胞毒性最低。圖1-4是奈米鑽石、碳黑(carbon black)、奈米碳管(carbon nanotubes)和氧化鎘(CdO)對細胞的毒性測試 [16]，因為鑽石是由碳原子所組成，所以將不同形式的碳材加以比較，例如碳黑和奈米碳管。常使用的量子點，其所釋放的氧化鎘亦列入考量。圖1-4的結果顯示，奈米鑽石的細胞毒性最低，而量子點釋放出來的氧化鎘毒性最高。因此，奈米鑽石的在生物體上的應用性較高。許多實驗室已成功展現奈米鑽石能夠成為專一性探針，應用在生物影像上 [29–38]。鄭嘉良老師實驗室，將不發光的奈米鑽石製作成標靶探針，將生長激素(growth hormone)利用共價鍵固定在奈米鑽石表面，可專一辨認肺上皮細胞(lung epithelial cells)膜表面的受體 [31]，再利用奈米鑽石的史托克拉曼(Stokes Raman)訊號位置在 1332 cm^{-1} ，對應是鑽石晶格中碳-碳鍵的伸縮振動(C-C stretching vibration)波數，不會和細胞所產生的拉曼訊號重疊，所以在擷取拉曼影像時，只收集鑽石的 1332 cm^{-1} 史托克拉曼訊號，即可得知奈米鑽石在細胞上的分布。在標靶螢光影像方面，張煥正老師實驗室，將螢光奈米鑽石製作成標靶探針，利用葉酸(folic acid，簡稱FA)固定在rFND表面，跟海拉細胞(HeLa cells)膜表面的葉酸受體(folate receptor)作用 [35]，可得到rFND的標靶細胞螢光影像。並也利用螢光奈米鑽石的高度螢光穩定性，將rFND送入細胞質中，長時間觀察rFND在細胞質中隨時間變化的相對位置，可應用在藥物的追蹤 [26, 32]。除了奈米鑽石在拉曼和螢光影像的應用之外，Curmi和Treussart實驗室等人，將奈米鑽石的應用拓展到散射光影像 [36]。鑽石的折射率是2.4，約略是細胞折射率的2倍大，可產生較大的散射光訊號，所以奈米鑽石送入細胞後，可成功得到奈米鑽石的散射光影像，因此，不用經過粒子撞擊和高溫退火製作成螢光奈米鑽石，就可應用在細胞影像。但是奈米鑽石的尺寸越小，散射光強度就會降低，當奈米鑽石尺寸小於37 nm，就無法獲得清楚的散射光影像，所以在應用上仍有限制。

綜觀以上螢光奈米鑽石的優良特性和研究，本研究首次將人體中重要的運鐵蛋白(transferrin，簡稱Tf)，利用共價鍵固定在紅光奈米鑽石表面，製作成專一性

的探針，探討和細胞膜表面受體的作用力。除此之外，我們也研究不同大小和表面官能基的奈米鑽石，對於胞吞作用(endocytosis)的特性，觀察是否會影響專一性和效率。我們也進一步期望奈米鑽石能夠變成抗癌藥物，利用光熱效應將被標靶的癌細胞殺死，以拓展其生物醫學上的應用。

1-2 研究動機和方法

本研究希望利用奈米鑽石的優越特性，將其製作成專一性的探針，研究人體細胞中重要的胞吞作用。我們也進一步研究不同表面官能基的奈米鑽石，觀察是否會影響胞吞作用的專一性和效率，可作為探針設計上的參考。除了設計使奈米鑽石能夠專一性標靶癌細胞，我們更期望直接將被標定的癌細胞殺死，使奈米鑽石不只可作為螢光標記，自身就可變成抗癌藥物，提供癌症治療上更多的選擇。

運鐵蛋白是人體中很重要的蛋白質，攜帶血液中的鐵離子，專一性透過細胞膜表面的運鐵蛋白受體(transferrin receptor, 簡稱 TfR)，將鐵離子帶進細胞，以維持正常的機能 [39, 40]。圖 1-5 是運鐵蛋白進入細胞的示意圖，運鐵蛋白可專一性辨認細胞膜表面的運鐵蛋白受體，再藉由胞吞作用進入細胞，此進入細胞的過程，已知稱作受體媒介胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)。本研究使用海拉細胞進行實驗，已知其細胞膜表面有大量的運鐵蛋白受體。一般癌細胞的細胞膜表面會有大量的運鐵蛋白受體，著名的乳癌化療藥物“小紅莓”(Adriamycin)，亦是藉由專一性的 Tf-TfR 作用力，將藥物帶進癌細胞，以達治療目的 [40]。我們將首次把運鐵蛋白固定在紅光奈米鑽石表面，將 rFND 製作成專一性的探針，圖 1-6 是製作專一性標靶探針的示意圖，利用共價鍵結將運鐵蛋白固定在 rFND 表面。圖 1-7 是專一性標靶實驗的示意圖，rFND-Tf 可專一辨認細胞膜表面的 TfR，進而因胞吞作用進入細胞。因為一般螢光物質的螢光特性很容易受外在環境影響，所以我們亦將觀察 rFND 辨認細胞後，螢光特性是否會受影響。我們利用共焦雷射掃描螢光顯微鏡，鑑定專一性標靶影像，並藉由螢光光譜和螢光生命期的測量，分析 rFND 的螢光特性是否改變。

奈米粒子是透過胞吞作用進入細胞，而奈米粒子的表面性質，會影響胞吞作用的效率和專一性 [41–43]。目前鮮少研究報導奈米鑽石的表面官能基特性，是否對於胞吞作用產生影響。已知細胞膜表面是負電，所以我們設計三種不同表面官能基的 rFND，表面分別是修飾羧基(-COO⁻)、胺基(-NH₃⁺) 以及運鐵蛋白，觀察對於胞吞作用的效率。除此之外，我們也進一步觀察不同表面官能基的 rFND，是否會產生細胞毒性，這對於生物的應用也相當重要。我們利用動態光散射儀(dynamic light scattering, 簡稱 DLS)和界面電位分析儀(zeta potential), 鑑定 rFND 的表面特性，確認是否成功製作出三種表面官能基的 rFND。螢光影像和流式細胞儀(flow cytometry), 分析 rFND 對胞吞作用的效率。細胞毒性的試驗是利用細胞影像、MTT 檢驗和細胞計數，作為判別細胞活性的依據。

奈米粒子在癌症標靶治療方面，角色通常是攜帶藥物，進行專一性標靶和藥物輸送。光熱治療(photothermal therapy)近年來廣泛被研究，主要原理是奈米粒子吸收照射光轉換成熱能，有效將癌細胞殺死 [44, 45]，不需另外攜帶抗癌藥物，這樣的治療方式，具有很小副作用和容易操作的優點。主要的缺點是對於體內的治療，照射光無法到達，因此，僅限於表皮的治療。金奈米和碳材是最常被應用在標靶光熱治療的奈米粒子 [45–57]，而奈米鑽石在光熱治療上的應用，目前尚未有文獻報導。文獻記載 rFND 光吸收波長範圍 400–650 nm [21]，根據光熱治療的原理，我們推測 rFND 有機會將小於 650 nm 的光轉換成熱能。我們設計將運鐵蛋白固定在 rFND 表面後，專一性進入細胞，再給予大於 500 nm 的照射光，期望產生光熱效應，選擇性將癌細胞殺死。

螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, 簡稱 FRET)常應用在生物系統，觀察蛋白質間的作用力 [58–61]。FRET 過程需要兩個螢光物質，在定義上一個稱作供體(donor)，另一個稱作受體(acceptor)，供體所發螢光波長範圍剛好和受體吸收範圍有相當重合，當此兩螢光物質因作用力結合，才會有能量轉移的機會，此時供體的螢光生命期會縮短。生物系統 FRET 的應用中，常用的螢光物質是螢光蛋白質(fluorescent protein)，但是螢光蛋白質的螢光穩定性不佳，

在應用上有所限制。綠光奈米鑽石的發光範圍，恰好和紅光奈米鑽石的吸收範圍有良好的重疊，可組成適合的 FRET 配對。目前螢光奈米鑽石間 FRET 的效應尚未被報導，所以我們好奇螢光奈米鑽石間是否會有 FRET 的可能性，如此一來，因為螢光奈米鑽石的螢光穩定性高，可改善螢光蛋白質在應用上的缺點。因此，我們將進行簡單的實驗，測試螢光奈米鑽石間是否有 FRET 的現象。圖 1-8 是螢光奈米鑽石間 FRET 的實驗設計示意圖，我們分別將抗體和抗原固定在綠光和紅光奈米鑽石表面，利用抗原-抗體作用力將兩種螢光奈米鑽石結合，觀察綠光奈米鑽石的螢光生命期變化，即可得知螢光奈米鑽石間是否有 FRET 的現象。



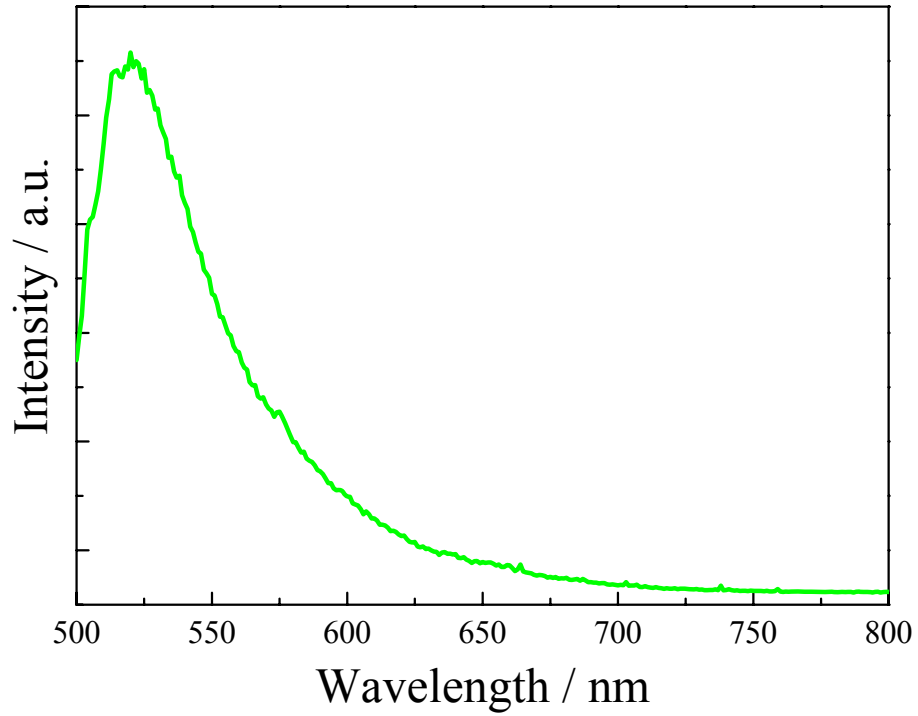


圖 1-1 綠光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 488 nm 氬離子雷射。

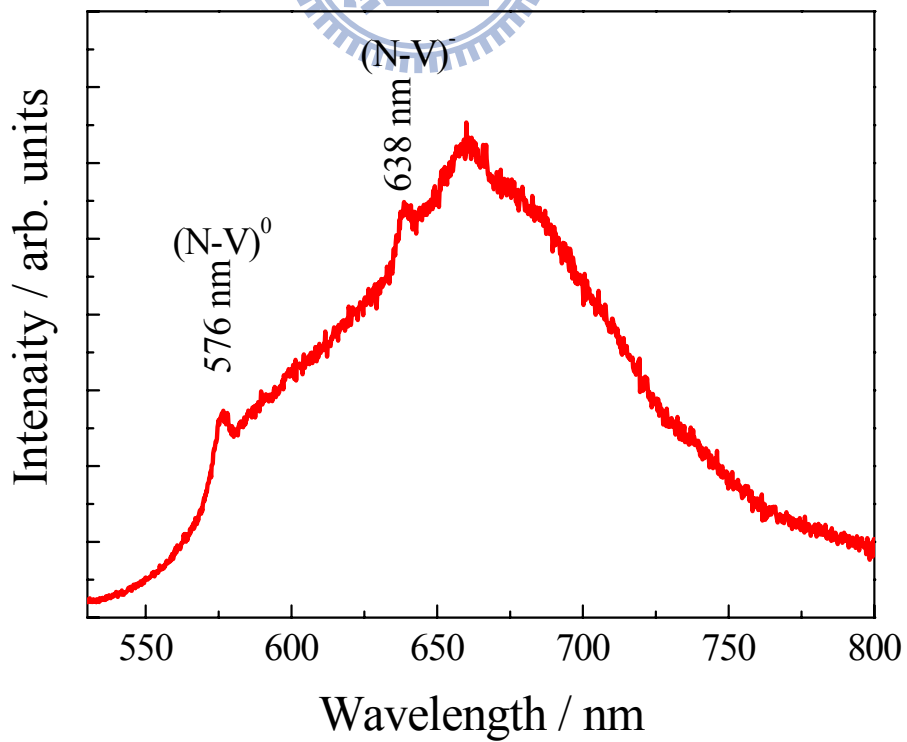


圖 1-2 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射。

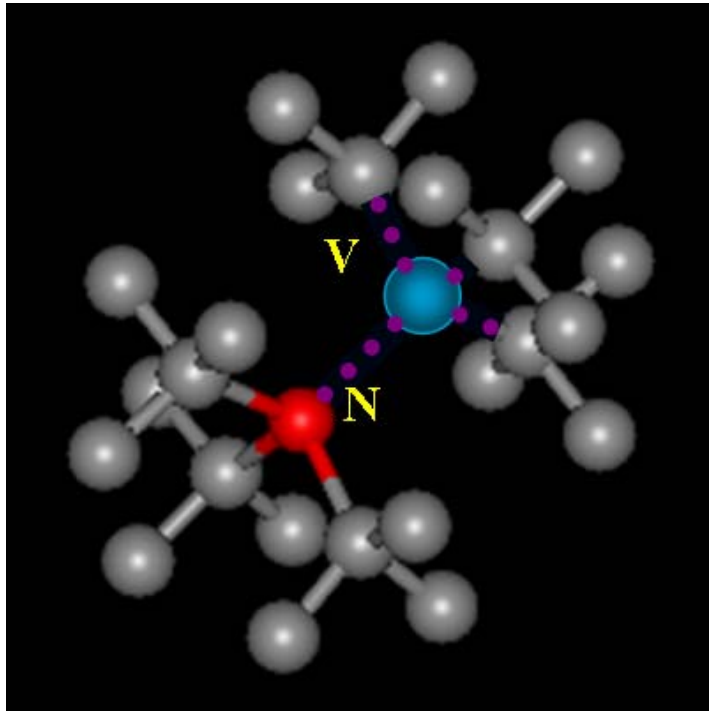
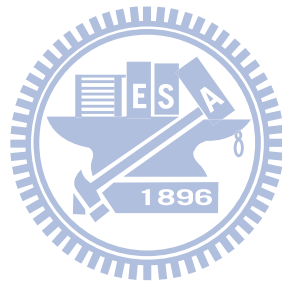


圖 1-3 「氮-空缺」中心模型圖。



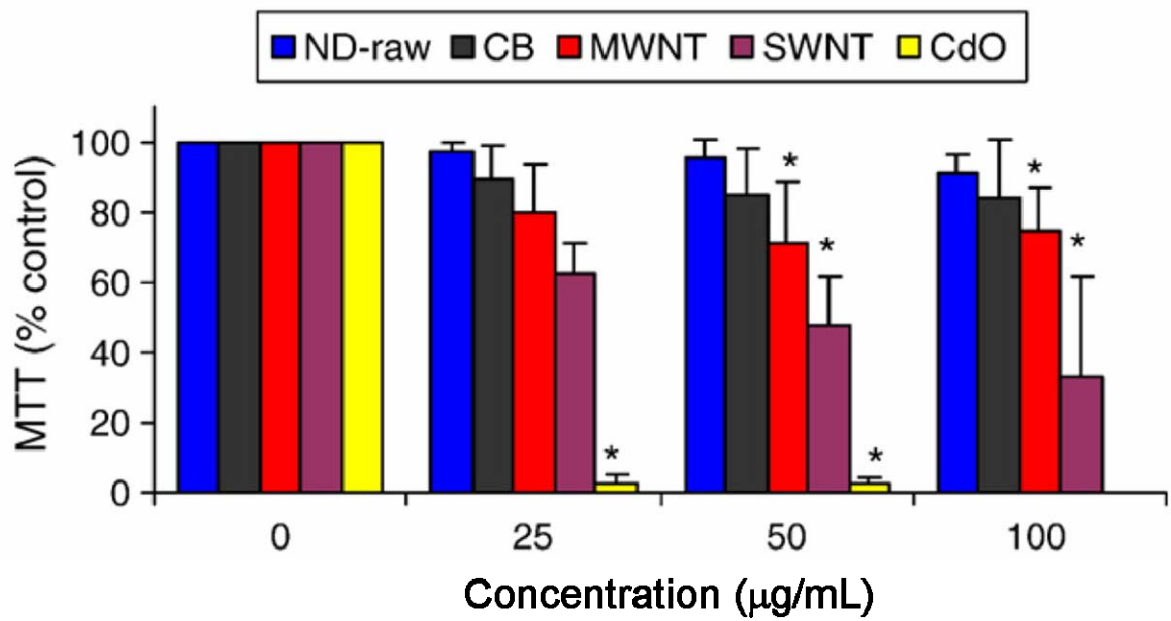


圖 1-4 細胞活性測試的 MTT 檢驗結果，藍、黑、紅、紫和黃色分別代表奈米鑽石、碳黑、多壁奈米碳管(Multi-Walled Carbon Nanotubes，簡稱 MWNT)、單壁奈米碳管(Single-Walled Carbon Nanotubes，簡稱 SWNT) 和氧化鋇，添加物和細胞的反應時間是 24 小時。

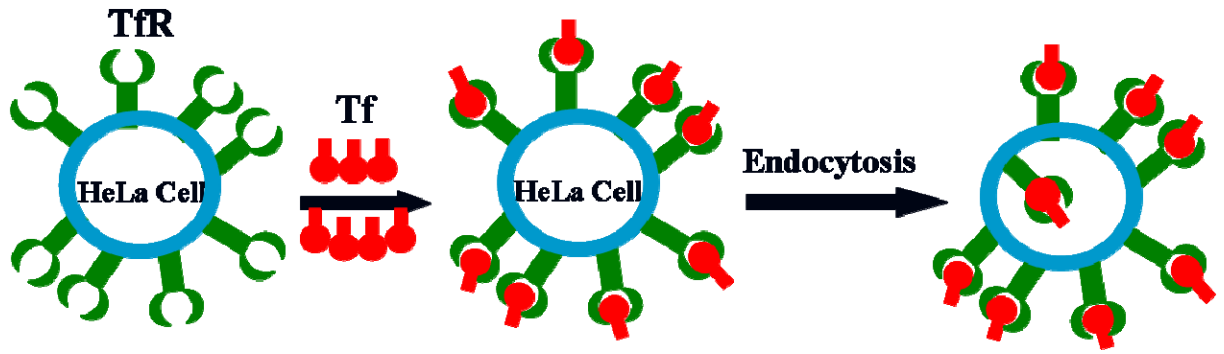


圖 1-5 運鐵蛋白進入細胞的示意圖。

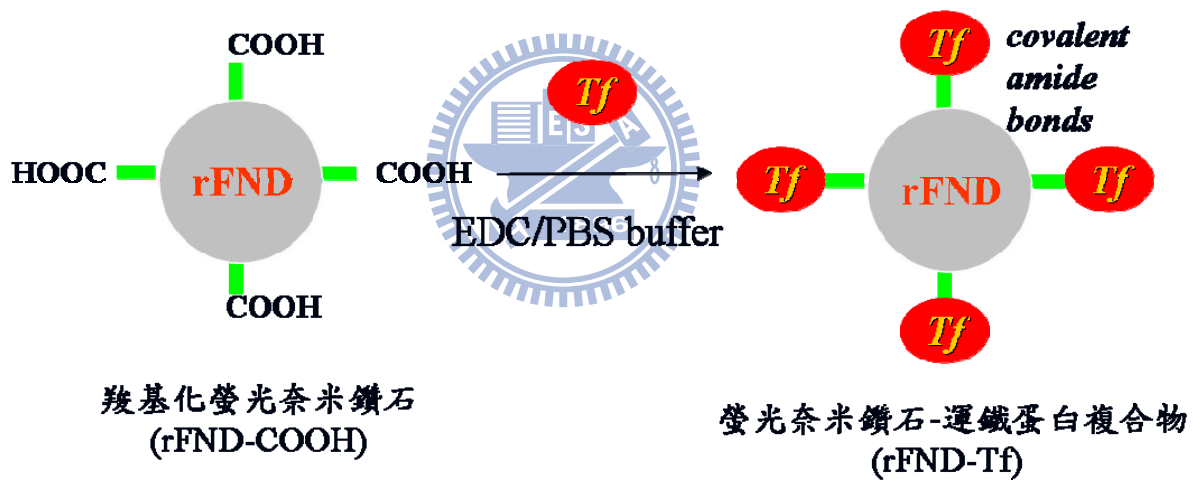


圖 1-6 專一性標靶探針製作的示意圖。

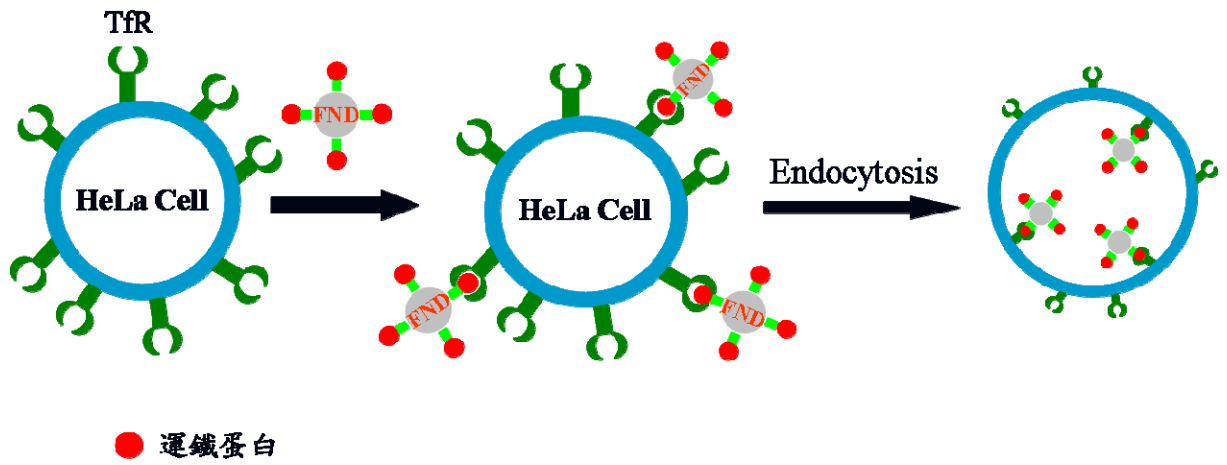


圖 1-7 專一性標靶實驗示意圖。

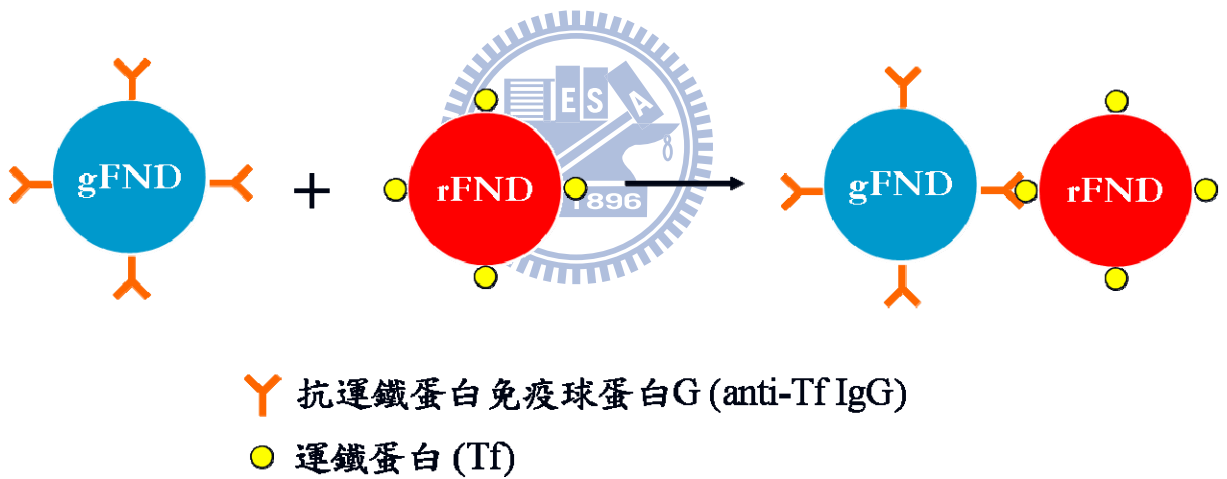


圖 1-8 螢光奈米鑽石間 FRET 實驗設計示意圖。

第二章 實驗技術和步驟

2-1 實驗原理

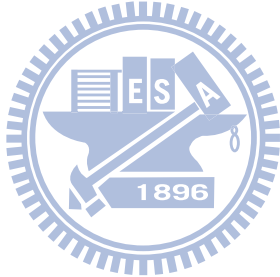
2-1-1 范氏加速器(Van der Graaf accelerator)

我們使用質子束撞擊型式 Ib 奈米鑽石薄膜，在鑽石晶格中產生「氮-空缺」中心。范氏加速器(Van der Graaf accelerator，型號 KN，廠商 High Voltage Engineering Europa B.V.)位於國立清華大學原子科學中心加速器實驗室，可提供終端電壓是 1-3 MV，圖 2-1 是加速器的設計圖，其工作原理如下。范氏加速器是靜電式加速器，利用電荷累積達到實驗所需的終端電壓。直流高壓電源供應器給予電刷 50 kV，電荷(正電或負電皆可選擇)由電刷轉移到滾動的橡膠皮帶上，最後轉移到球面導體(spherical conductor)表面，經由電荷累積達到實驗所需的終端電壓。質子由射頻離子源產生，經由萃取器吸出後通過加速管，質子在加速管中的終端電壓獲得能量。圖 2-2 分別是(a)加速器的離子源和(b)靶端，圖 2-2(a)的照片中，圓筒狀是加速器的離子源，藍色箭頭是質子束輸出方向，圖 2-2(b)照片中，紅色框是奈米鑽石試片的放置靶，在真空中接受 2.5 MeV 質子撞擊。

2-1-2 共焦雷射掃描螢光顯微術(Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy，簡稱 CLSFM)

1957 年 Marvin Minsky 提出共焦顯微鏡(confocal microscope) [62, 63]，提高影像的清晰度和雜訊比，克服傳統螢光顯微術的平面成像上，無法觀測某一截面，造成螢光影像模糊的缺點。時至今日，配合個人電腦以及雷射技術的發展，共焦雷射掃描螢光顯微術(Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy，簡稱 CLSFM)可得到特定層面影像，並將不同層面影像重疊，進而得到三維立體影像 [64, 65]。共焦(confocal)源自於顯微鏡的物鏡焦點，和集光透鏡的焦點位置相互重疊，就是照明點和探測點在光學成像上共軛，兩鏡焦點同時落在觀察樣品。圖 2-3

是共焦的基本概念 [63]。早期光源經由集光透鏡聚焦在樣品上，物鏡收集此焦平面的訊號並成像在偵測器上。為了只收集焦點上的訊號，偵測器前面放置一個針孔(pinhole)，阻擋非焦平面產生的訊號，可提高螢光影像的清晰度。若要得到二維影像的螢光強度分佈，則須移動樣品或改變光聚焦的位置。現今共焦顯微鏡已將集光透鏡與物鏡合而為一，光源由物鏡聚焦在樣品上，同一物鏡收集焦點上的訊號。圖 2-4 是一般共焦雷射掃描螢光顯微鏡的架設圖。雷射光通過 x-y 掃描鏡改變聚焦位置，經由物鏡激發樣品產生螢光，相同物鏡收集放射的螢光，透過螢光濾光片除去散射的雷射光，並選取欲偵測的螢光波長範圍，再由透鏡聚焦在針孔上，移除非焦平面螢光的干擾，螢光強度由光電倍增管(Photomultiplier Tube，簡稱 PMT)偵測。一般常使用的針孔大小範圍是 50 – 150 μm ，共焦雷射掃描螢光顯微術所能達到的平面解析度是繞射極限(diffraction limit) [62]，其公式如下：

$$r = 0.61 \frac{\lambda}{NA_{obj}} \quad (2-1)$$


其中 λ 是放射螢光的波長， NA_{obj} 是物鏡的數值孔徑(numerical aperture)， r 是平面上可分辨出兩點的最小距離。共焦雷射掃描螢光顯微術相較於傳統螢光顯微術，有以下的優點：(1)降低背景螢光干擾，增進影像清晰度，提高訊雜比；(2)可擷取不同截面的螢光影像，得到三維立體影像；(3)可進行多通道測量，例如兩個以上螢光物質可同時偵測。缺點則是：(1)以雷射作為激發光源，無法適用所有螢光物質；(2)雷射激發處的功率密度(power density)很高，螢光物質有光褪色的顧慮。

2-1-3 螢光生命期影像顯微術(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy，簡稱 FLIM)

當螢光分子被激發到激發態(excited state)，能夠以放出螢光的形式回到基態(ground state)，螢光生命期(fluorescence lifetime)定義是被激發的螢光分子，停留

在激發態的時間。不同螢光物質的螢光生命期不盡相同，即使是單一螢光物質，在不同的外在環境下，自身的螢光生命期也會有所改變 [66]。結合螢光生命期和共焦顯微術，其影像中每個像素(pixel)所記錄的是螢光生命期，而非螢光強度，此項技術就稱為螢光生命期影像顯微術(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy，簡稱 FLIM) [58, 67]。目前最常用時間相關單光子計數系統(Time-correlated Single Photon Counting，簡稱 TCSPC)測量螢光生命期。圖 2-5 是時間相關單光子計數系統的概念圖。激發光源是脈衝式雷射，常見的脈衝寬度(pulse width)範圍是皮秒(ps)-飛秒(fs)，重複頻率(repetition rate)範圍是 1 – 80 MHz。當測量啟動時，雷射脈衝對應是時間起始點，光子偵測器偵測到螢光光子對應時間終點，計算此螢光光子和相鄰雷射脈衝的時間差，在經過大量的計數之後，就會得到時間和螢光出現次數分佈圖，就相當於螢光強度隨時間衰減曲線，再經由適解就可得到螢光生命期。在測量的過程中，有許多的脈衝是沒有光子產生，在這種情況下，光子計數會持續記錄到下一個脈衝有光子進入偵測器為止。所以這種測量方法需要收集訊號一段時間，才能得螢光強度隨時間衰減曲線。螢光生命期適解公式如下：

$$A(t) = A_0 \exp(-t/\tau) \quad (2-2)$$

其中 $A(t)$ 是隨時間變化的螢光強度， A_0 是起始的螢光強度， τ 是螢光生命期。

2-1-4 螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer，簡稱 FRET)

此法常應用在生物系統，觀察蛋白質間的作用力。圖 2-6 是螢光共振能量轉移的基本概念 [58]。FRET 的過程需要兩個螢光物質，在定義上一個稱為供體(donor)，另一個稱為受體(acceptor)，供體所放射的螢光波長範圍，須和受體的吸收範圍有良好重合，當此兩螢光物質因作用力結合後，距離在 1 – 10 nm 範圍才

會有 FRET 的機會。能量轉移的效率可由供體的螢光生命期變化得到，圖 2-7 是計算能量轉移效率的兩種方法 [58]，分別是圖 2-7(a)測量作用力結合前後，供體螢光生命期的變化，圖 2-7(b)是兩螢光物質經由作用力結合，測量受體光褪色前後，供體螢光生命期的變化，計算能量轉移效率的公式如下：

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2-3)$$

其中 E 是能量轉移的效率， τ_{DA} 是發生能量轉移時，供體的螢光生命期， τ_D 是能量轉移前，供體自身的螢光生命期。

2-1-5 流式細胞儀(Flow cytometry) [68, 69]

流式細胞儀是以流體(flow)帶動細胞(cyto)，進行細胞特性檢測(-metry)的一種分析技術。主要特色是以單一細胞作為偵測基礎，可在短時間內分析大量細胞數，例如一分鐘內可偵測 10^4 以上的細胞。依實驗目的，使用各式染劑在細胞上，利用雷射激發偵測螢光。流式細胞儀主要包括三部份：(1)流體系統(fluidics)、(2)光學系統(optics)和(3)電子系統(electronics)。流體系統的主要功用是將細胞依序送到測量區，圖 2-8 是流體系統的流動室(flow cell)設計概念。流動室內充滿鞘液(sheath fluid)，細胞樣品被高於整個液流系統的壓力推出去，並藉由流體動力聚焦(hydrodynamic focusing)原理，使單一細胞通過雷射激發區，偵測個別細胞的螢光特性。光學系統包括兩部份：(1)激發光學系統(excitation optics)和(2)收集光學系統(collection optics)。雷射、光纖、稜鏡和透鏡組成激發光學系統，將雷射聚焦通過流動室，激發細胞上的染劑。螢光由收集光學系統收集，經由光柵、各式光學濾片、透鏡和反射鏡，選取並收集欲觀察的螢光波長範圍。電子系統主要是將光子轉換成電子訊號，由光電倍增管接收光子轉換成電子訊號，即代表個別細胞的螢光強度，數位化後由電腦進行分析。圖 2-9 是典型的流式細胞儀實驗結果，黑

色曲線是控制實驗，代表細胞未被染色時的自體螢光強度分佈，紅色曲線是細胞被染色後的螢光強度分佈，單一細胞內染劑的螢光強度，即為紅色和黑色曲線平均螢光強度的差值。流式細胞儀的實驗結果是以對數座標呈現，其平均值的計算公式是幾何平均數(geometry mean)，其公式如下：

$$\overline{X}_{geo} = 10^{(\sum_{i=1}^n \log X_i) / n} \quad (2-4)$$

其中 \overline{X}_{geo} 是幾何平均數， X_i 是每個細胞所偵測到的螢光強度， n 是偵測的細胞總數。

2-1-6 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering，簡稱 DLS) [70, 71]

動態光散射法常用來檢測奈米等級的粒子，具備測量快速的優點。粒子在溶液中作布朗運動，粒子越大，運動越慢，反之則越快，所以可從擴散速率求出奈米粒子的尺寸。圖 2-10 是光動態散射儀的基本架設，當雷射通過懸浮的奈米粒子溶液，雷射光碰到奈米粒子產生散射光，偵測器紀錄散射光的強度變化，即可得到隨時間變化的散射光強度，藉由自相關函數(autocorrelation function)推演，可得到奈米粒子的擴散係數，再經由 Stokes- Einstein equation 的推算獲得粒徑大小，Stokes- Einstein equation 的公式如下：

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta a} \quad (2-5)$$

其中 D 是粒子的擴散係數， k_b 是波茲曼常數， T 是絕對溫度， η 是溶劑的黏滯係數， a 是待測粒子的半徑。

2-1-7 界面電位(Zeta potential) [72]

奈米粒子的表面電性，在生物系統的應用中，會影響胞吞作用的專一性和效率 [41 – 43]。界面電位是用來估量奈米粒子的表面電位，圖 2-11 是界面電位分析儀的基本原理。主要是藉由電場下，測量正負電極間奈米粒子的電泳速度。當雷射光打在帶電的奈米粒子上產生散射光，偵測隨時間變化的散射光強度，藉由自相關函數的推演，即可得到奈米粒子在電場下的電泳速度，再利用 Smoluchowski equation 計算求得界面電位，其公式如下：

$$\zeta = \eta \mu / \varepsilon \quad (2-6)$$

其中 ζ 是界面電位， η 是溶劑的黏滯係數， μ 是奈米粒子在電場下的電泳速度， ε 是溶劑的介電常數。



2-1-8 細胞活性測試-MTT 檢驗 [73]

MTT 檢驗是常用來判定細胞活性的方法之一，主要是檢驗細胞內粒線體 (mitochondria) 的還原能力，圖 2-12 是 MTT 還原化學反應方程式。MTT 試劑是水溶性分子，化學命名是 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide。MTT 試劑經過粒線體中的琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase，簡稱 SDH)的還原，在細胞質內形成不溶解的紫色結晶顆粒(formazan)，在特定的反應時間後，加入二甲亞砜(Dimethyl sulfoxide，簡稱 DMSO)破壞細胞膜，並使 formazan 溶解，formazan 溶解後會有 540 nm 的吸收，因此，測量溶液中 540 nm 的吸收度，可得知細胞的還原能力。每隻細胞的還原能力相近，所以當活細胞數目越多，還原能力就會越強，540 nm 的吸收度就會越大，表示細胞活性高。

2-2 實驗系統

2-2-1 共焦雷射掃描螢光顯微鏡

圖 2-13 是本實驗室自製共焦雷射掃描螢光顯微鏡的架設圖，以 Nikon TE2000 倒立式顯微鏡為主體，配備有 Nikon C1 共焦掃描系統、雷射和偵測器。雷射光未經擴束直接由透鏡導入 Nikon 的激發光纖，激發光纖的接頭是 APC 形式，圖 2-14 是 APC 光纖接頭示意圖，其光纖頭呈現 8° 的倒角，可降低光源的反射次數，以提高穿透效率。此光纖會保有雷射的偏振(polarization)方向，雷射在導入光纖時，其偏振方向需和標記平行，如圖 2-14 所示。雷射光導入激發光纖後，再接到 Nikon C1 掃描系統，圖 2-15 是 Nikon C1 掃描系統的設計圖。激發光纖將雷射導入掃描系統，先經過平行光透鏡，將雷射光變成平行光。再經過分色鏡(dichroic mirror)反射到 x-y 掃描鏡系統，可進行二維的平面掃描，最後通過掃描透鏡進入顯微鏡中。光源經由物鏡將樣品激發，放射的螢光由原物鏡收集並導回 Nikon C1 掃描系統。螢光經由集光透鏡聚焦在針孔上，最後導入螢光收集光纖到達光電倍增管(型號 H5783-02，廠商 Hamamatsu)偵測螢光強度。本實驗室雷射光源有連續波 473 nm 固態雷射(總功率 25 mW)、氬離子雷射(主要波長 488 nm 和 514.5 nm，總功率 65 mW)以及氬-氬綠光(波長 543 nm，總功率 1 mW)和紅光(波長 632.8 nm，總功率 22 mW)雷射，可作為單光子激發光源，脈衝式鈦-藍寶石雷射(波長範圍 700 – 1000 nm，最大功率 1 W，重複頻率 80 MHz)可做為雙光子激發光源。Nikon C1 的針孔大小方面，有四種大小可供選擇，分別是 30、60、100 和 150 μm 。

2-2-2 螢光生命期顯微鏡

圖 2-16 是本實驗室螢光生命期顯微鏡架設圖，以共焦雷射掃描螢光顯微鏡為主體，配備脈衝式雷射和 PicoQuant 的時間相關單光子計數系統。脈衝式雷射光源經由透鏡導入 APC 光纖，並接到 Nikon C1 掃描系統，可進行二維的影像掃描。除此之外，TCSPC 數據卡上要輸入兩個訊號：(1)雷射的脈衝訊號，可由雷射本身的輸出訊號獲得，將訊號接在數據卡上的 sync 位置；(2)螢光光子的訊號，可

由光子偵測器獲得，將訊號接在數據卡上的 start 位置。此兩訊號經由 TCSPC 數據卡處理，計算此螢光光子和相鄰雷射脈衝的時間差，在經過大量的計數之後，就會得到時間和螢光出現次數分佈圖。本實驗所使用的脈衝式雷射是 470 nm 二極體雷射(總功率是 1 mW，重複頻率是 10 MHz)，另有脈衝式鈦-藍寶石雷射可做為雙光子激發光源。光子偵測器方面，本實驗室有光子計數式光電倍增管(photo counting mode PMT，型號 H5783P-03，廠商 Hamamatsu)，以及雪崩光電二極體(avalanche photodiode，簡稱 APD，型號 SPCM-AQR-14-FC，廠商 Perkin Elmer)。

2-2-3 拉曼和螢光光譜儀

拉曼和螢光光譜儀的架設相同，利用顯微鏡系統擷取拉曼或螢光訊號，圖 2-17 是拉曼光譜的架設圖。雷射光小角度(小於 10 度)打在刻槽濾光片(notch filter)並反射進入顯微鏡，若雷射光打在刻槽濾光片的角度大於 10 度，其反射率和阻隔雷射光的效率會大為降低。激發光源透過物鏡聚焦在樣品上，拉曼或螢光訊號由相同物鏡收集，依循原路徑穿透刻槽濾光片，訊號經由透鏡聚焦在光纖上，再導入單光儀(型號 iHR320，廠商 Jobin-Yvon)進行光譜解析，電荷耦合元件(Charge-Coupled Device，簡稱 CCD，型號 DU970N-UVB，廠商 Andor)作為偵測器，即可得到拉曼或螢光光譜。本實驗室的刻槽濾光片所對應的雷射波長有 488 nm (型號 NF01-488U-25，廠商 Semrock)、514.5 nm (型號 NF01-514U-25，廠商 Semrock)、532 nm (型號 NF03-532E-25，廠商 Semrock)和 633 nm (型號 NF03-633E-25，廠商 Semrock)。

2-3 實驗步驟

2-3-1 螢光奈米鑽石的製備和表面修飾

140 nm 型式 Ib 合成奈米鑽石由 Element Six 購得，40 nm 型式 Ib 合成鑽石，以及 70 nm 型式 Ia 天然奈米鑽石由 Micro Diamant 購得。我們先將奈米鑽石懸浮在去離子水(deionized water)中，配製成濃度 10 mg/mL，取 50 μ L 滴在矽晶片

(silicon wafer)上使其自然乾燥，即完成奈米鑽石薄膜製作，再送到國立清華大學原子科學中心加速器實驗室，進行質子撞擊。質子撞擊的能量是 2.5 MeV，撞擊的粒子總數約是 10^{16} ions/cm²，撞擊時的電流依奈米鑽石的大小而有所不同，140 nm 型式 Ib 和 70 nm 型式 Ia 奈米鑽石的撞擊電流是 6 μ A，40 nm 型式 Ib 奈米鑽石撞擊電流是 1 μ A，因為 40 nm 型式 Ib 奈米鑽石在較低的撞擊電流下，製作出來的螢光奈米鑽石可得到較強的螢光，所以 40 nm 型式 Ib 奈米鑽石的撞擊電流較小。撞擊後結束後，放進真空高溫爐進行退火，流程如下：在真空中 800 °C 退火 4 小時，壓力是 6×10^{-3} torr，接著在大氣下 600 °C 退火 2 小時，即完成螢光奈米鑽石的製作。合成奈米鑽石可發出波長範圍 550 – 800 nm 的紅色螢光，稱作紅光奈米鑽石，天然奈米鑽石可發出波長範圍 500 – 600 nm 的綠色螢光，稱作綠光奈米鑽石。

若 FND 表面要固定蛋白質，需有羧基(-COOH)在奈米鑽石表面，可和蛋白質的胺基(-NH₂)形成醯胺鍵結(amide bond)。螢光奈米鑽石經過強酸處理，表面會生成羧基，實驗流程如下：FND 懸浮在濃硫酸和硝酸(硫酸：硝酸 = 9：1)中，在室溫下反應 24 小時，接著在 0.1 M 氫氧化鈉水溶液中，90 °C 反應 2 小時，以及 0.1M 氯化氫水溶液中，90 °C 下反應 2 小時，羧基化螢光奈米鑽石(FND-COOH)製備完成 [38, 74]。

為了將 FND 製作成專一性探針，我們把運鐵蛋白(型號 T4382，廠商 Sigma-Aldrich)利用共價鍵固定在 FND-COOH 表面。因為 rFND 的螢光範圍可有效避開細胞的自體螢光，所以選用 rFND 來做專一性探針。運鐵蛋白(0.1 mg)和 rFND-COOH (0.2 mg)溶解懸浮在 1 mL 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate Buffer Saline，簡稱 PBS) 中，加入 5 mg 的 N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (簡稱 EDC，型號 E7750，廠商 Sigma-Aldrich)反應試劑活化反應，在室溫下反應 24 小時，運鐵蛋白和奈米鑽石間形成共價鍵的醯胺鍵結，即完成 rFND-Tf 複合物的製作。表面帶正電的胺化螢光奈米鑽石(rFND-NH₂)的製作，是將 rFND-COOH (0.2 mg)懸浮在 1 mL 的(3-aminopropyl) triethoxysilane (簡稱

APTS，型號 A3648，廠商 Sigma-Aldrich)水溶液中，使 APTS 包覆在 rFND-COOH 表面 [75]，反應 30 分鐘即完成 rFND-NH₂ 的製備。rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的純化程序是先經過離心，將上層液除去，再加入 PBS 溶液使 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 重新懸浮，此程序進行 3 次，最後配製在 PBS 溶液中以備使用。

2-3-2 細胞培養和樣品製作

進行各種細胞實驗之前，海拉細胞是培養在 10 公分培養皿，培養基是 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)，其中添加 10 %胎牛血清(Fetal Bovine Serum，簡稱 FBS)和 1 %青黴素/鏈黴素(Penicillin/Streptomycin，簡稱 PS)。專一性標靶的實驗方面，10⁴細胞種在直徑 12 毫米蓋玻片上，使細胞貼附 12 小時後進行實驗。實驗組是 rFND-Tf (10 µg/mL)和細胞作用 1 小時，另有兩組控制實驗：分別是(1)細胞和 rFND-COOH (10 µg/mL)反應 1 小時，觀察是否有非專一性作用；(2)細胞先和運鐵蛋白(10 mg/mL)作用 1 小時，再和 rFND-Tf (10 µg/mL)反應 1 小時，目的是阻塞(block)細胞膜表面的運鐵蛋白受體，觀察 rFND-Tf 是否仍會辨認細胞。細胞和 rFND 反應結束後，先用 PBS 將未反應的 rFND 洗掉，總共清洗三次，再加入 4 %三聚甲醛(paraformaldehyde，型號 P6148，廠商 Sigma-Aldrich)固定細胞，反應 15 分鐘後用 PBS 清洗三次，即完成細胞樣品的製備，就可擷取共焦雷射掃描螢光影像。

在探討三種表面官能基 rFND 的胞吞作用方面，三片直徑 12 毫米的蓋玻片上各種 5 × 10⁵細胞，培養基含有 10 %胎牛血清，分別和三種不同表面官能基的 rFND 作用 6 小時，反應濃度是 10 µg/mL。有一個控制實驗是細胞在不含胎牛血清的培養基中，和 rFND-COOH 的反應 6 小時。此實驗目的是觀察使細胞飢餓的情況下，是否會增加非專一性的胞吞作用。反應結束後，將未反應的 rFND 用 PBS 清洗 3 次，再用 4 %三聚甲醛固定細胞，接下來進行細胞核染色。在細胞固定結束之後，和稀釋 1000 倍的細胞核染劑(Hoechst 33342，原液濃度是 10 mg/mL，型號 H3570，廠商 Invitrogen)反應 30 分鐘，再用 PBS 清洗三次，即完成細胞核染色。

2-3-3 細胞螢光影像擷取

螢光影像的擷取分為三種：分別是(1)共焦雷射掃描、(2)螢光生命期和(3)廣視野(wide field)螢光影像。共焦雷射掃描螢光影像方面，使用 60 X 物鏡(NA 1.2)，rFND 和細胞核染劑的激發光源，分別是 514.5 nm 氬離子雷射和 405 nm 二極體雷射，分別收取 663 – 738 nm 和 420 – 500 nm 的螢光訊號，針孔大小設定是 60 μm 。rFND 螢光生命期的測量方面，激發光源是 470 nm 二極體雷射(PicoQuant)，重複率(repetition rate)設定是 10 MHz，螢光訊號收集範圍是 663-738 nm。廣視野螢光影像方面，激發光源是 100 W 高壓汞燈，利用濾片選取激發和螢光的波段，rFND 和細胞核染劑的激發波段分別是 510 – 560 nm 和 340 – 380 nm，螢光的收集範圍分別是大於 590 nm 和 435 – 485 nm。

2-3-4 流式細胞儀的樣品處理

我們利用流式細胞儀分析單一細胞內 rFND 的螢光強度，探討不同表面官能基的 rFND 對胞吞作用的效率。實驗設計有兩種：分別是(1)反應濃度和(2)反應時間的探討。細胞培養在含 10% 胎牛血清的培養基中，細胞種在 12 孔盤(12 well plate)中，每個孔皆約有 5×10^5 細胞，和不同表面官能基的 rFND 作用。在反應濃度分析方面，不同表面官能基的 rFND 分別和細胞反應的時間固定是 6 小時，反應濃度分別是 1、2、5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。反應時間分析方面，rFND 的反應濃度是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，反應時間分別是 0.5、1、1.5、2、3、4 和 5 小時。反應結束後，未反應的 rFND 用 PBS 沖洗細胞三次，在加入 0.05% 胰蛋白酶(trypsin，型號 25300054，廠商 Invitrogen)50 μL 和細胞作用 1 分鐘，使細胞不再貼附，再用 1 mL 細胞培養基將細胞沖下，放在的 1.5 mL 的離心管中。接下來使用離心機(型號 5424，廠商 eppendorf，轉速設定 1500 rpm，時間是 3 分鐘)將細胞離心下來，取走上層細胞培養基，加入 0.3 mL 的 PBS 溶液，充分搖盪使細胞懸浮，再加入 70% 酒精溶液 0.6 mL，完成流式細胞儀樣品製備，並存放在 -20°C 中儲存，等到要測量時再取出。在上機進行測量之前，含酒精的溶液先需經過離心，將溶液置換

成 PBS，才可打入流式細胞儀(型號 FACS Array，廠商 BD)進行分析。本研究測量的細胞總數是 5×10^3 。

2-3-5 螢光奈米鑽石的細胞毒性

我們利用細胞影像、細胞計數和 MTT 檢驗，觀察奈米鑽石對細胞的毒性。在細胞影像和細胞計數的部分，細胞種在 12 孔盤中，每個孔皆有約 5×10^4 細胞，培養基含有 10 % 胎牛血清，細胞分別和三種表面官能基的 rFND 作用。rFND-COOH 的反應濃度是 0、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的反應濃度範圍是 0、1 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。細胞影像和細胞計數是各別的兩組細胞樣品，在反應第 48 小時後，利用 10 X 相位對比(phase contrast)顯微鏡和細胞計數器，分別擷取細胞影像和計算細胞數目，以觀察細胞的型態以及數量的變化。在 MTT 檢驗方面，96 孔盤的每個孔皆種約 5×10^3 細胞，分別和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rFND-COOH、rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 反應，在第 0、24、48、72 小時測量 MTT 的結果。MTT 的測量方式如下：MTT 試劑(型號 M5655，廠商 Sigma-Aldrich)配製成 12 mM，在 96 孔盤中各加入 10 μL ，和細胞反應 4 小時，最後再加入 50 μL 的 DMSO 反應 10 分鐘，就直接利用免疫酵素分析儀(ELISA reader，型號 EMax，廠商 Molecular Devices)測量 540 nm 的吸收，檢定細胞的存活率。

2-3-6 螢光奈米鑽石的光毒性

rFND-Tf 透過細胞膜表面的運鐵蛋白受體，專一性進入細胞後，我們將給予照射光測試 rFND 的光毒性。細胞培養在含 10 % 胎牛血清的培養基中，8 孔腔體玻片(8 well chamber coverglass，型號 155411，廠商 Lab-Tek™)上的每個孔皆有 5×10^4 細胞，和 140 nm rFND-Tf 反應 6 小時，反應濃度是 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。反應結束後，將未反應的 rFND-Tf 用培養基洗去，置換成新的培養基。將細胞樣品放在顯微鏡上的細胞培養箱(incubator)中，接受光照射並觀察細胞形態的變化。照射光源分為兩種：一為 100 W 高壓汞燈，另一是 532 nm 雷射。汞燈作為光源方面，用濾

片選擇兩個波段，分別是 510 – 560 nm 和 590 – 650 nm，經由 40 X 微分干涉對比 (Differential Interference Contrast，簡稱 DIC)物鏡(NA0.75)照射在細胞上，功率密度(power density)皆是 7 W/cm^2 ，照射時間是連續 3 小時，紀錄細胞形態的變化。532 nm 雷射由 20X 微分干涉對比物鏡(NA0.75)照射在細胞上，功率密度範圍 25 – 75 W/cm^2 ，照射時間是 10 分鐘，除了紀錄細胞形態的變化之外，還利用染劑輔助判斷細胞的存活。細胞經由照射結束後，隨即加入活細胞染劑 Calcein AM，以及死細胞染劑 ethidium homodimer-1 (EthD-1)。這組細胞染劑是由 Invitrogen 購得，型號是 L3224。Calcein AM 和 EthD-1 皆可由 495 nm 激發，所放出的螢光峰值分別是 515 nm 和 635 nm，藉由觀察螢光顏色輔助判斷細胞存活。Calcein AM 和 EthD-1 的作用機制如下：

活細胞染劑：Calcein AM 是疏水性(hydrophobic)物質，不發螢光，容易穿過細胞膜進入細胞，經由活細胞質內的酵素代謝，轉換成親水性(hydrophilic)物質，會被侷限在細胞質中，經由激發放發出綠色螢光，所以是利用酵素的活性，判定活細胞與否。

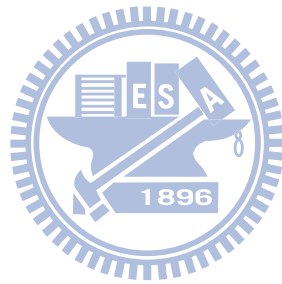
死細胞染劑：當細胞死亡，細胞膜會受損而破洞，EthD-1 會穿過細胞膜並進入細胞核，跟核酸結合後，經由激發放發出紅色螢光。活細胞的細胞膜完整，EthD-1 不會進入細胞，就不會觀察到紅色螢光。

觀察活和死細胞染劑的螢光，激發光源是 100 W 高壓汞燈，激發波段都是 460 – 500 nm，螢光收集波段分別是 510 – 560 nm 和 618 – 675 nm。

2-3-7 螢光共振能量轉移

為了觀察螢光奈米鑽石間的螢光共振能量轉移，我們利用抗體-抗原作用力，將 rFND 和 gFND 相結合。運鐵蛋白和抗運鐵蛋白免疫球蛋白 G (anti-Tf IgG，型號 T6265，廠商 Sigma-Aldrich)分別固定在 rFND 和 gFND 表面，製作成 rFND-Tf 和 gFND-anti-Tf IgG，固定方法亦是利用 EDC 的反應，使蛋白質和 FND 表面形成共價鍵的醯胺鍵結。我們將 rFND-Tf 和 gFND-anti-Tf IgG 溶液混合，濃度皆是

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，混合的體積比是 1：1，使總體積是 0.4 mL。反應環境是 $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 溶液，反應時間是 1 小時，讓兩種螢光奈米鑽石複合物在溶液中相互結合。反應結束後，將 0.4 mL 反應溶液均勻滴在蓋玻片上，靜置 30 分鐘讓 rFND-Tf 和 gFND-anti-Tf IgG 吸附在蓋玻片表面。30 分鐘後洗掉上層液，即完成螢光共振能量轉移樣品。在螢光影像擷取方面，激發光源是 470 nm 脈衝式雷射(PicoQuant)，重複率(repetition rate)是 10 MHz，gFND 和 rFND 的螢光收集範圍，分別是 510 – 530 nm 和 650 – 730 nm。FLIM 影像的擷取方面，螢光訊號收集範圍是 510 – 530 nm，以觀察能量轉移前後 gFND 螢光生命期的變化。



Van de Graaff Accelerator

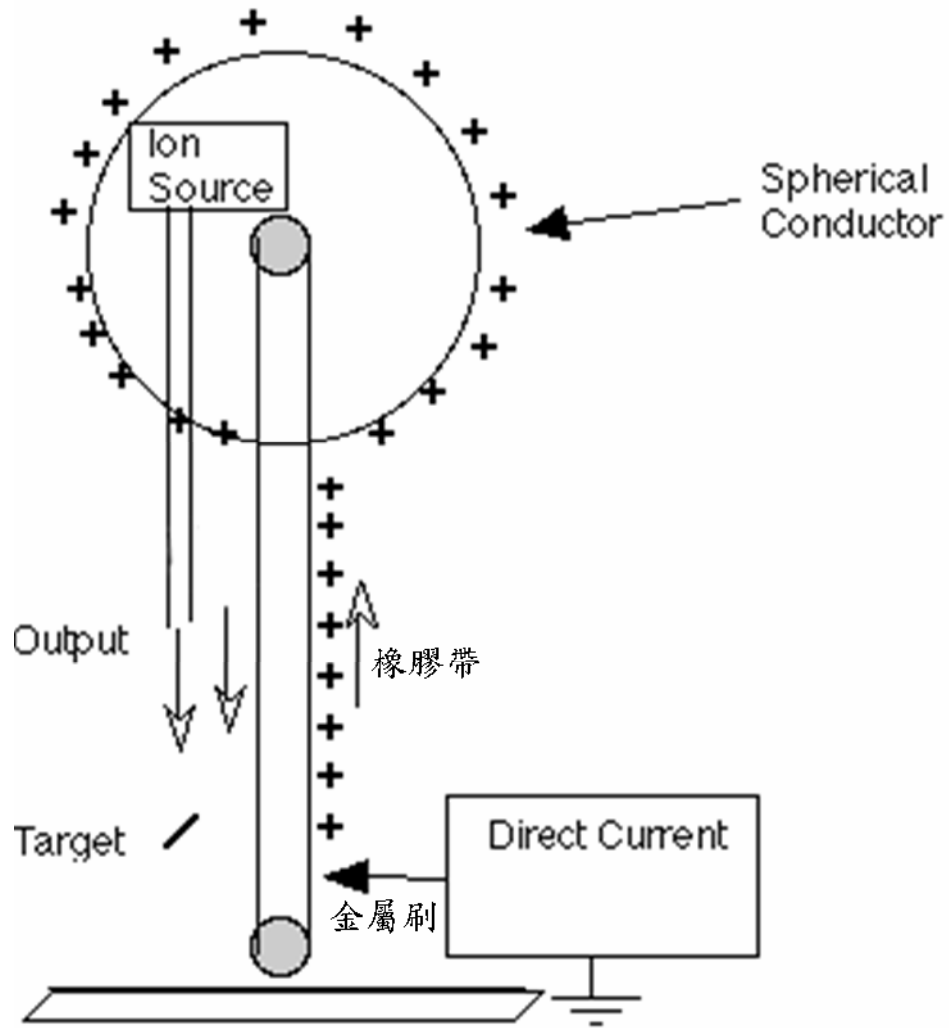


圖 2-1 加速器設計圖，奈米鑽石放置在輸出端接受撞擊。

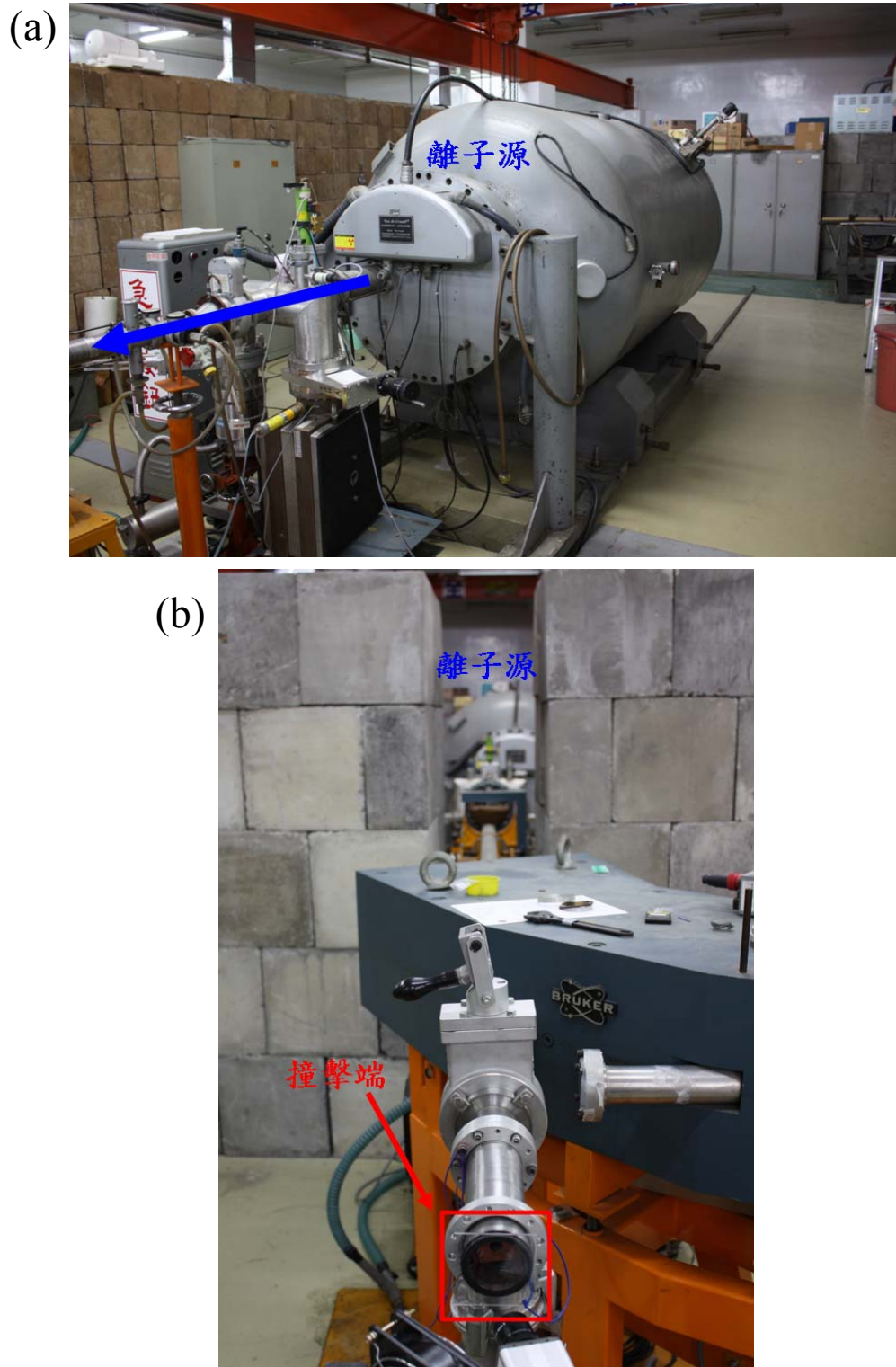


圖 2-2 加速器的現場照片，(a)離子源和射束輸出方向，(b)靶端，紅色框是奈米鑽石試片放置靶。

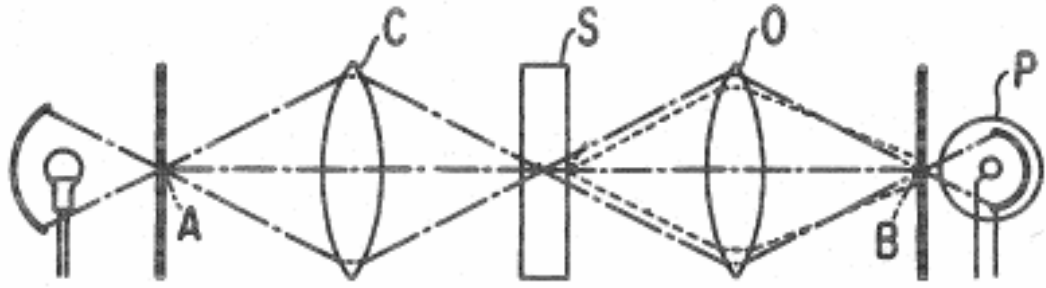


圖 2-3 共焦的基本架構，(A)光源針孔，(B)偵測針孔，(C)集光透鏡，(S)待測樣品，(O)物鏡，(P)光電管。

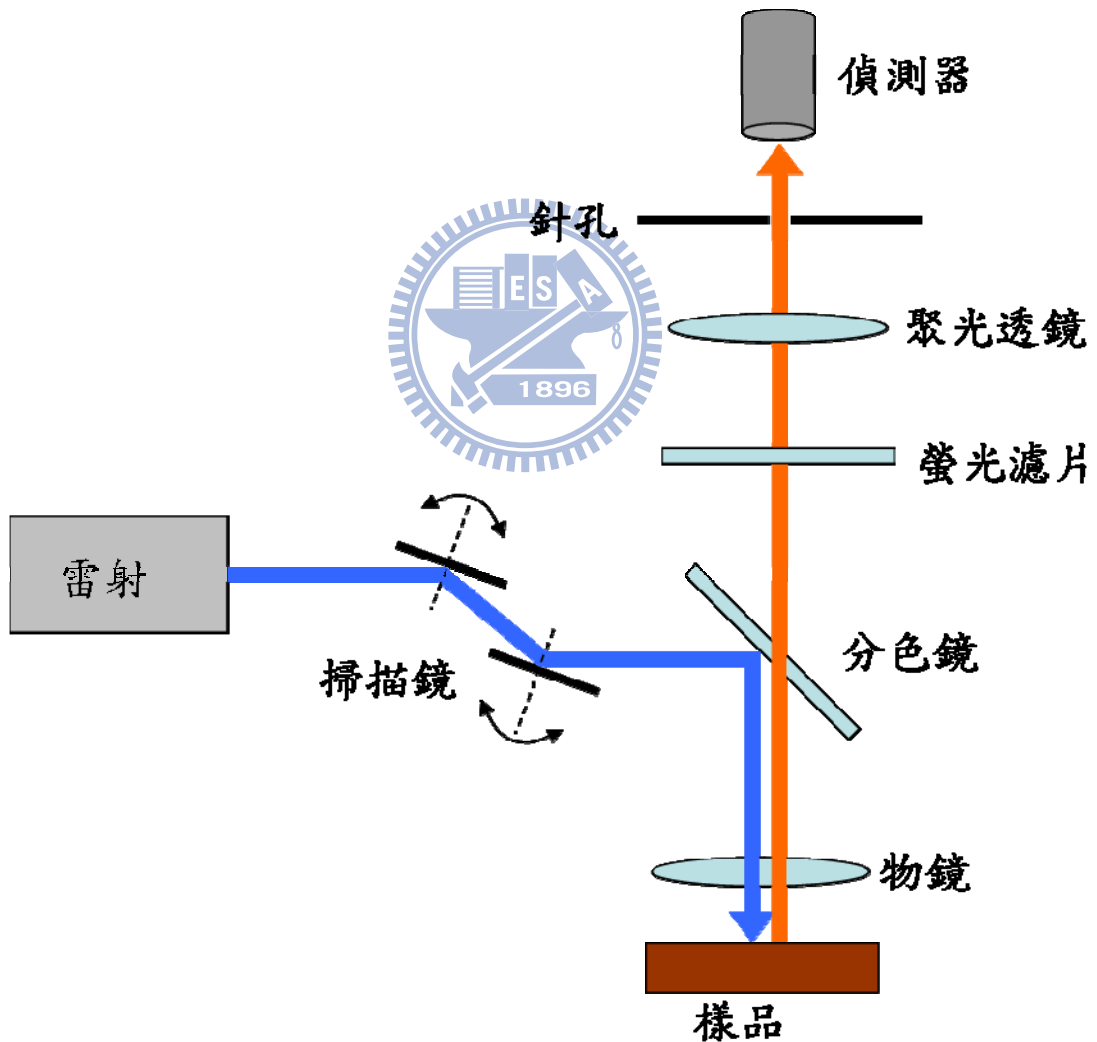


圖 2-4 一般共焦雷射掃描顯微鏡的架構，藍色曲線是激發雷射路徑，橘色曲線是螢光路徑。

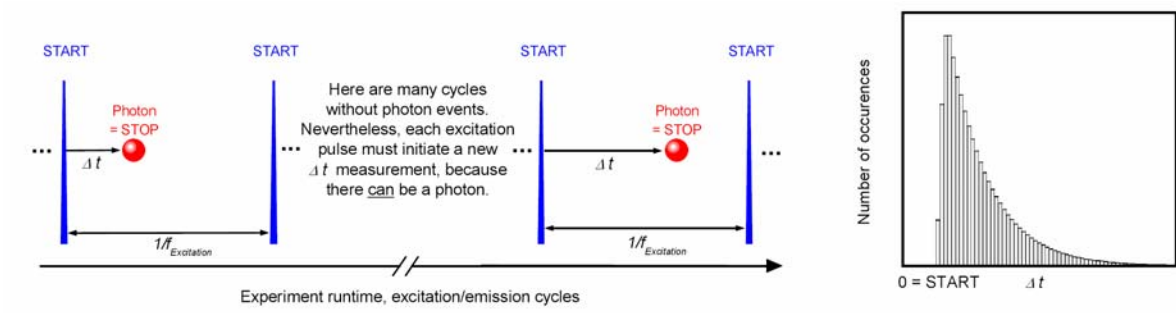


圖 2-5 時間相關單光子計數系統之概念圖。

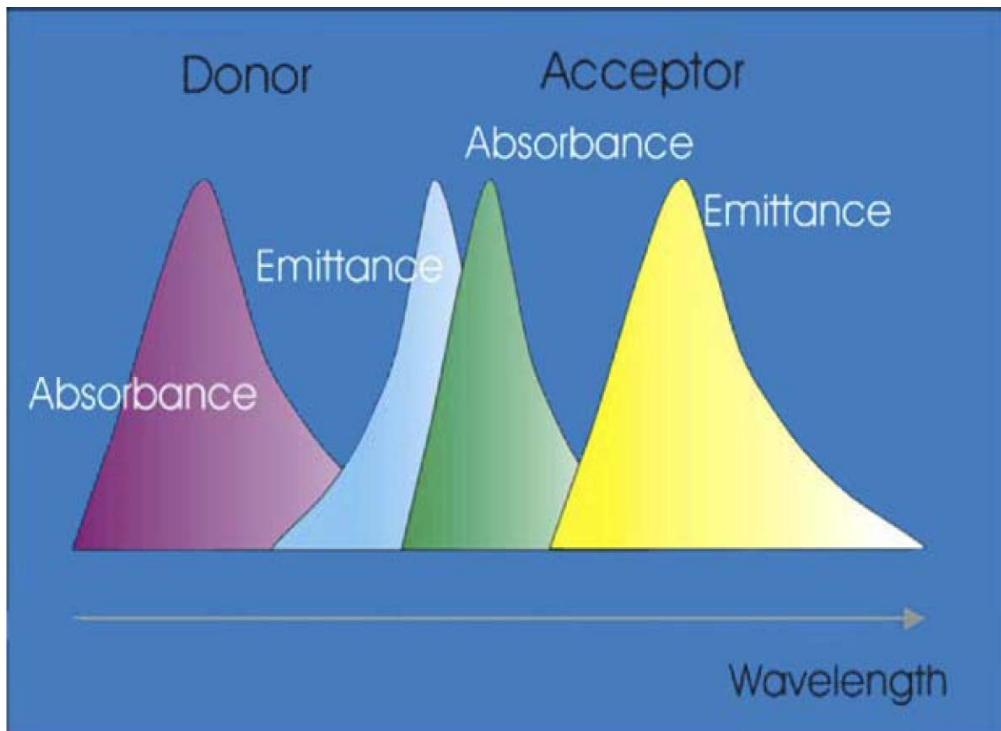


圖 2-6 螢光共振能量轉移概念圖。

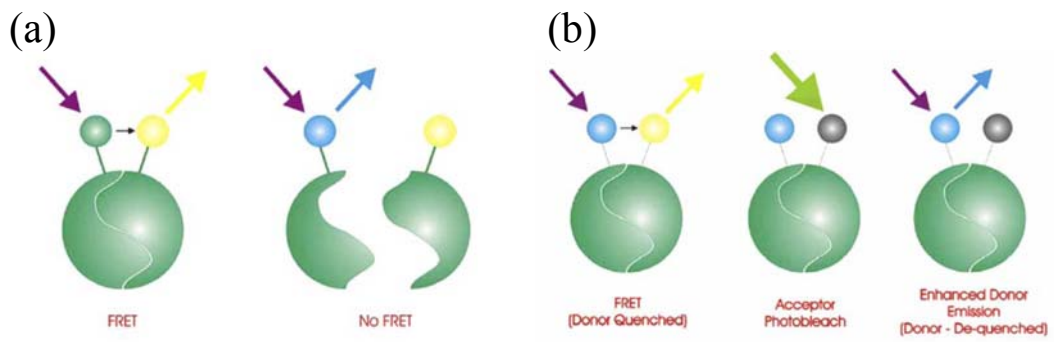


圖 2-7 螢光共振能量轉移效率計算方法。(a)測量作用力結合前後，供體的螢光生命期變化，(b)經由作用力結合，測量受體光褪色前後，供體螢光生命期的變化。

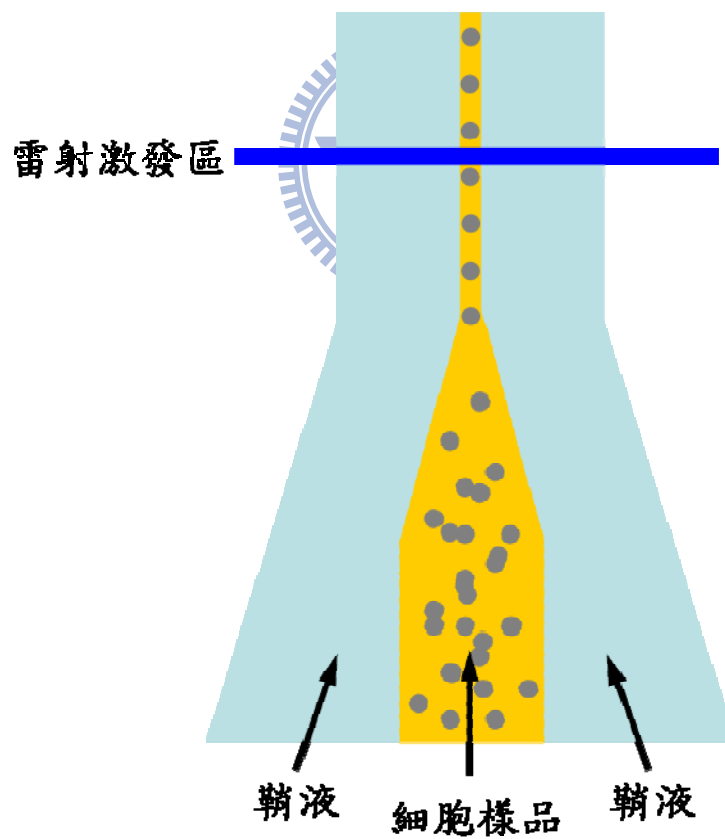


圖 2-8 流式細胞儀的流動室剖面圖，利用流體動力聚焦，使單一細胞通過雷射激發區。

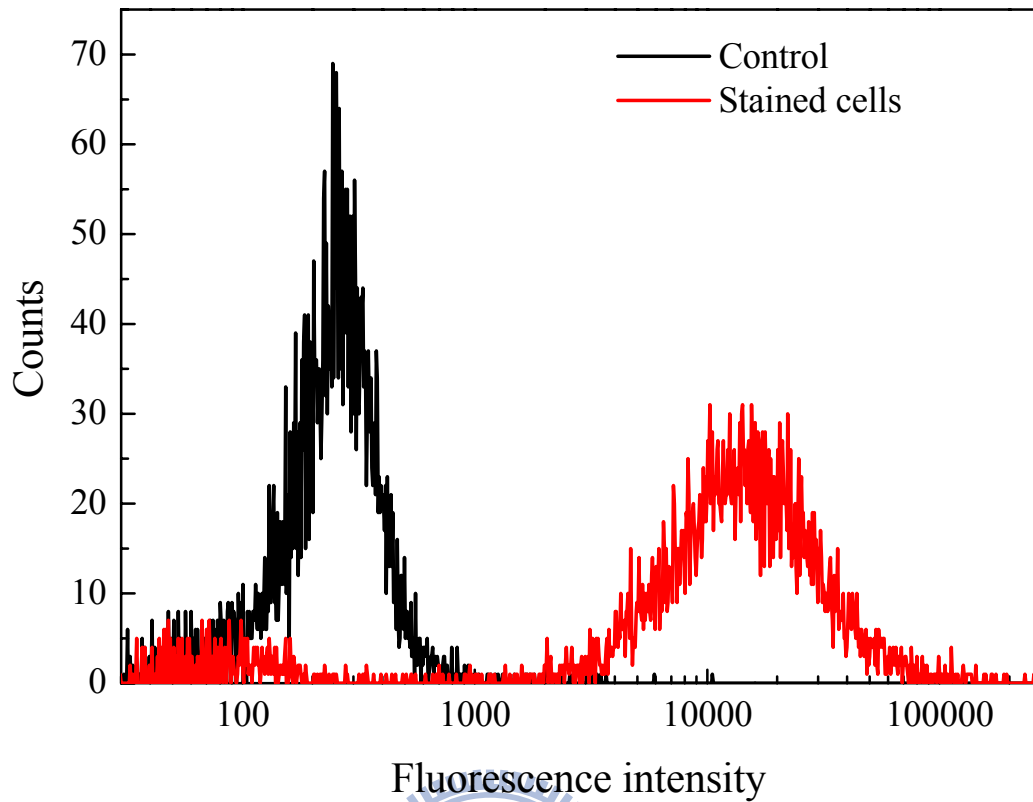


圖 2-9 典型流式細胞儀的實驗結果，黑色曲線是控制實驗，即細胞不經染色，代表細胞自身的背景值，紅色曲線是被染色細胞的螢光強度。

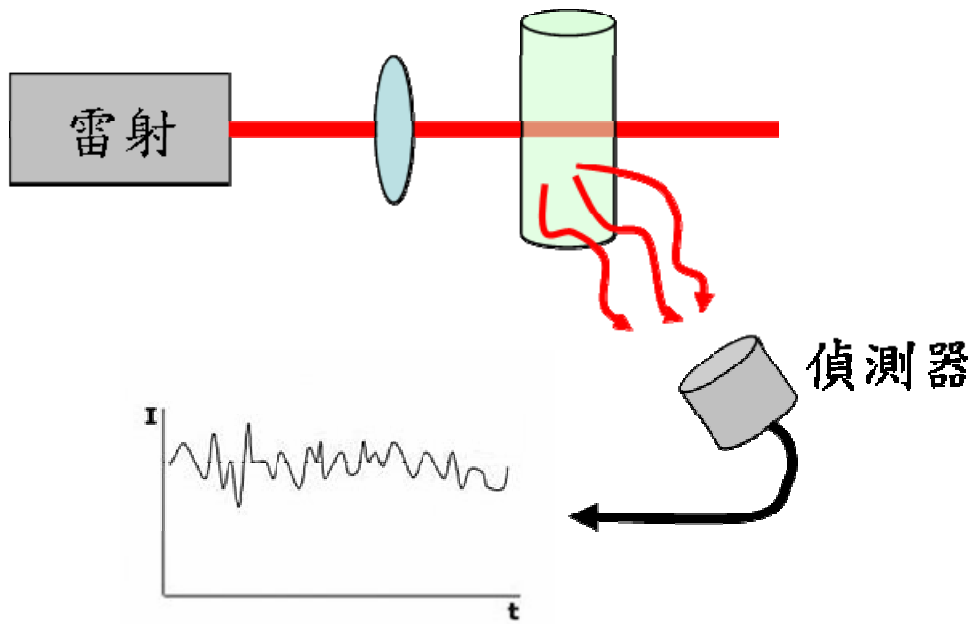


圖 2-10 光動態散射儀基本架設圖。

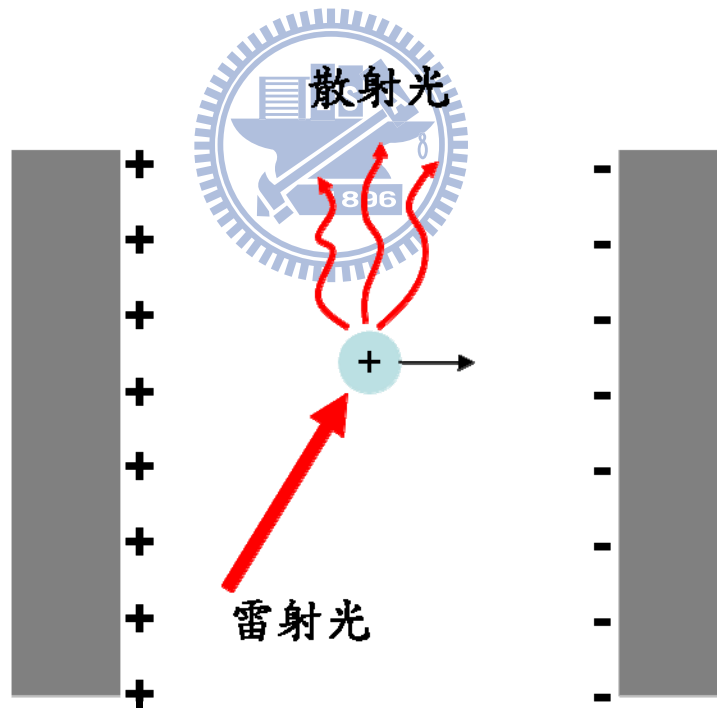


圖 2-11 界面電位分析儀基本原理。

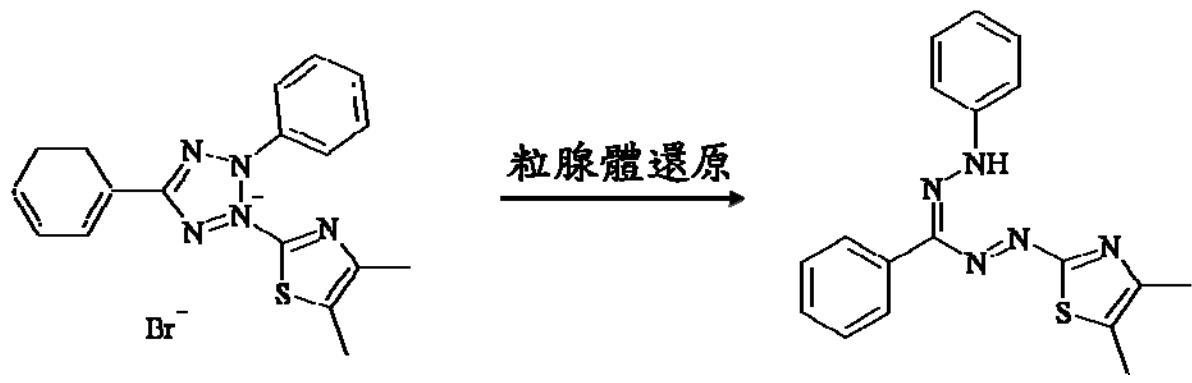


圖 2-12 MTT 檢驗的還原化學反應方程式。

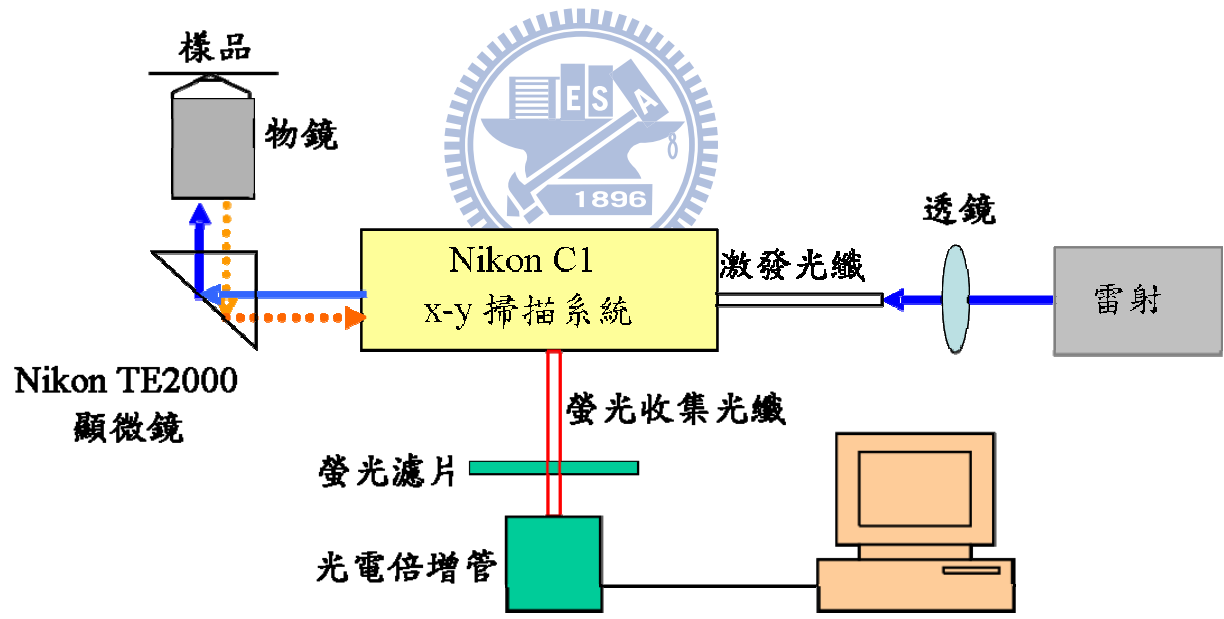


圖 2-13 本實驗室共焦雷射掃描螢光顯微鏡的架設。

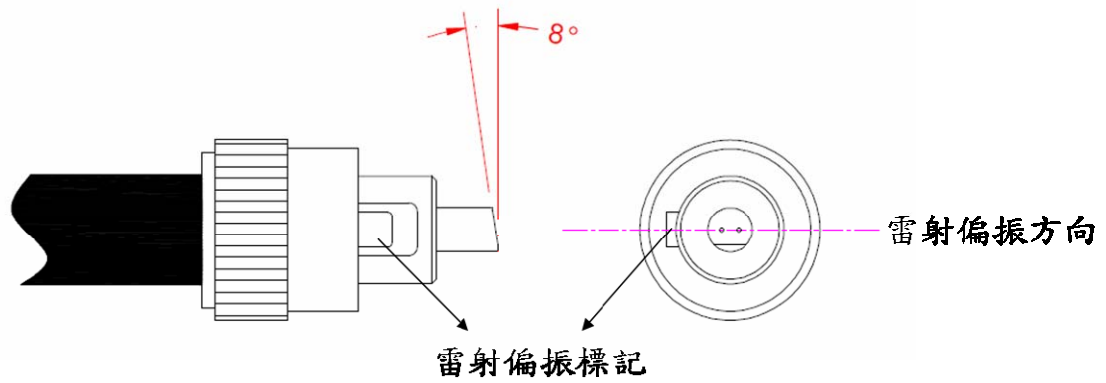


圖 2-14 APC 光纖接頭示意圖。

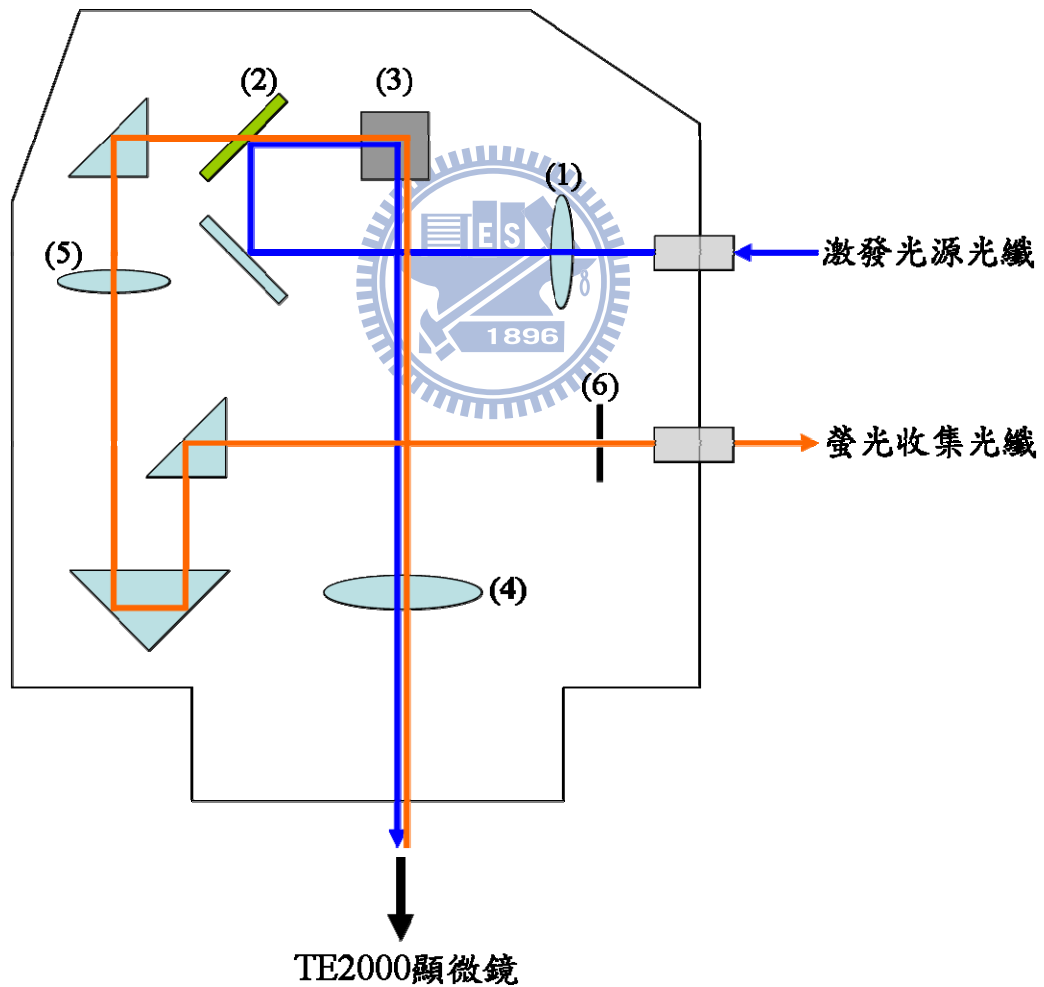


圖 2-15 Nikon C1 掃描系統設計圖，(1)平行光透鏡，(2)分色鏡，(3) x-y 掃描鏡系統，(4)掃描透鏡，(5)集光透鏡，(6)針孔。藍色和橘色分別代表雷射和螢光路徑。

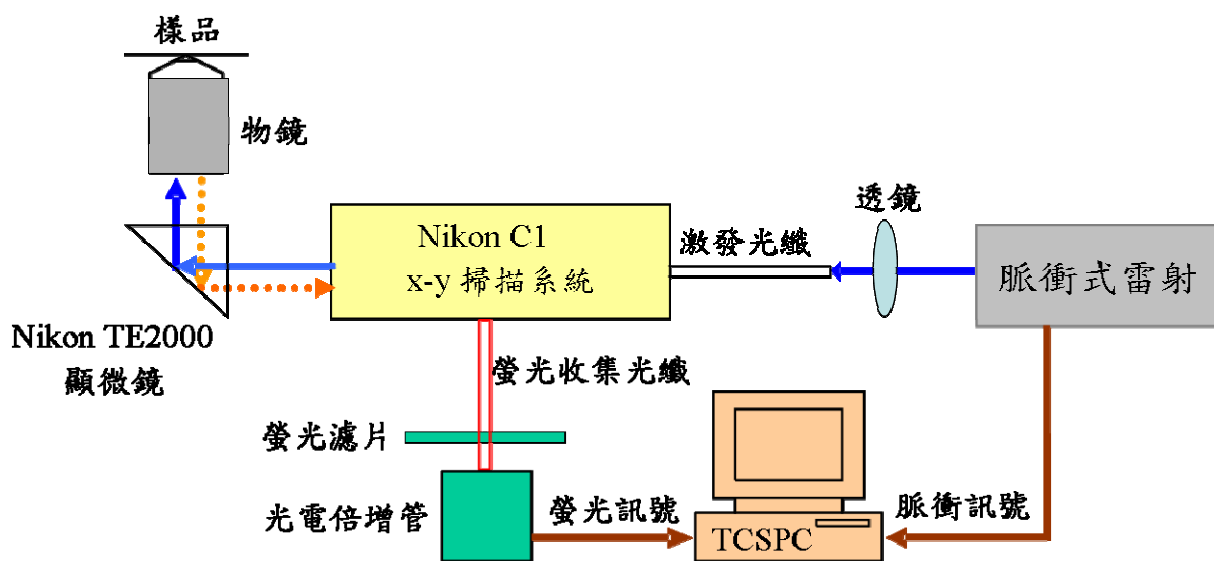


圖 2-16 本實驗室螢光生命期顯微鏡之架設。

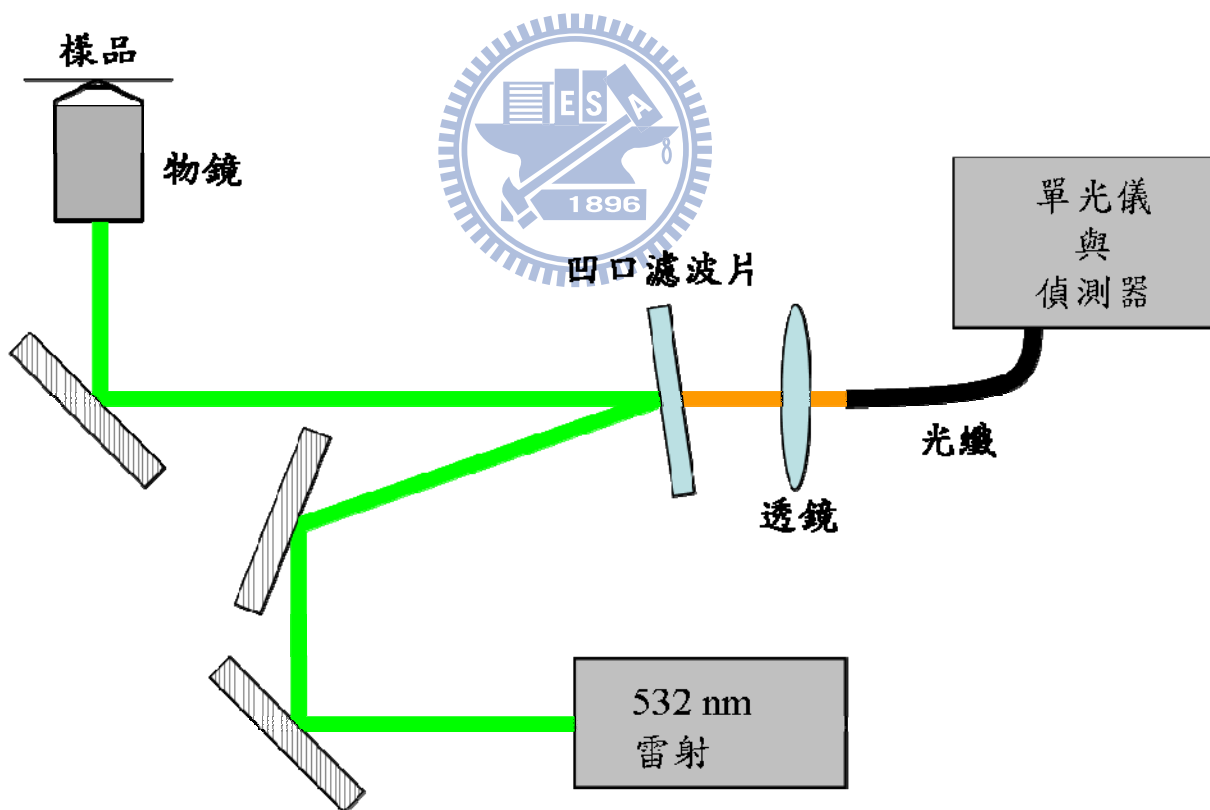


圖 2-17 本實驗室拉曼和螢光光譜儀架設圖。

第三章 紅光奈米鑽石的螢光特性和專一性標靶影像應用

3-1 奈米鑽石螢光特性

本研究使用直徑是 40 nm 和 140 nm 的型式 Ib 合成奈米鑽石，製作成紅光奈米鑽石進行研究。型式 Ib 奈米鑽石的氮含量濃度約 50 – 300 ppm，氮原子在晶格中主要是取代碳的位置，以孤立的形式存在。紅光奈米鑽石的發光中心是「氮-空缺」中心，主要利用清華大學原子科學發展中心加速器實驗室的加速器，2.5 MeV 質子撞擊奈米鑽石薄膜，在晶格中產生空缺，再經由真空 800 °C 退火，使晶格重新排列，形成「氮-空缺」中心。濃度 10 mg/mL 的奈米鑽石水溶液，取 50 μ L 滴在矽晶片上，使其自然乾燥，形成奈米鑽石薄膜。2.5 MeV 質子撞擊的粒子總數約是 10^{16} ion/cm²，40 nm 和 140 nm 的撞擊電流分別是 1 μ A 和 6 μ A，撞擊所需的時間分別約是 90 和 15 分鐘。我們發現 140 nm 奈米鑽石的螢光強度和撞擊電流大小無關，撞擊電流越大，越快到達撞擊的粒子總數，可節省撞擊的時間，但若電流太大，撞擊處產生的熱能會過高，撞擊靶無法承受，所以撞擊電流設定在 6 μ A。相反地，40 nm 奈米鑽石的螢光強度會受撞擊電流影響，撞擊電流大於 1 μ A，會使奈米鑽石螢光強度降低，所以 40 nm 奈米鑽石的撞擊電流設定在 1 μ A。

真空高溫退火的條件，會影響螢光奈米鑽石的發光強度，文獻的退火條件是真空 800 °C 退火 2 小時。圖 3-1(a) 是我們依文獻的退火條件，所得到的 140 nm rFND 螢光光譜範圍 550 – 800 nm，其中零聲子線位置在 576 nm 和 638 nm，分別代表 (N-V)⁰ 和 (N-V)⁻ 對應的電子躍遷 $^1E \rightarrow ^1A_1$ 和 $^3A_2 \rightarrow ^3E$ [21, 22]，所量測的位置跟文獻結果吻合。為了最佳化 rFND 的螢光強度，我們改變真空退火的條件。最佳化條件是在真空爐壓力 6×10^{-3} torr 下，溫度 800 °C 退火 4 小時，接下來在大氣下 600 °C 退火 2 小時(文獻條件並無在大氣下退火)，得到的螢光光譜如圖 3-1(b) 所示。比較圖 3-1(a) 和圖 3-1(b)，最佳化條件所得到的螢光光譜，零聲子線較明顯，且平均螢光強度約高於 8 倍，推測的原因有兩個：(1) 退火時間較長，有足夠的時

間可產生較多的「氮-空缺」中心；(2)大氣下 600 °C 退火 2 小時，因氧化作用清除奈米鑽石表面的石墨，使螢光的穿透性變佳。我們嘗試加長真空高溫退火的時間，大於 4 小時的退火，螢光強度並無明顯差別，所以真空高溫退火的時間設定在 4 小時。圖 3-2 是經由最佳化條件所得到的 40 nm rFND 螢光光譜，相較於 140 nm rFND 的螢光光譜，並無觀察到兩條明顯的零聲子線，且 40 nm rFND 的螢光強度很微弱，要從光譜直接比較單顆 rFND 的螢光強度，準確性會降低。為了比較出兩種尺寸 rFND 的螢光強度，我們測量相同濃度 rFND 水溶液(10 µg/mL)的螢光強度，以推算出單顆 rFND 間的螢光強度比。我們測得相同濃度的 140 nm rFND 螢光強度是 40 nm rFND 的 37 倍，而 40 nm 和 140 nm rFND 的體積比是 1 : 43，所以單顆的強度比是 1 : 1591。此兩種尺寸 rFND 的螢光強度差異很大，推測原因如下，40 nm 和 140 nm 的奈米鑽石來源，是不同公司所購得，推測氮的含量差異很大，或者是尺寸小的奈米鑽石接受撞擊時，產生空缺的效率較差，所以造成如此大的差距。

為了要將螢光奈米鑽石應用在生物系統上，本研究選用海拉細胞來進行專一性標靶細胞影像實驗，首先必須克服細胞自體螢光的干擾。圖 3-3 的紅色和綠色曲線分別代表 rFND 和海拉細胞的螢光光譜，經由氬離子雷射波長 514.5 nm 的激發，海拉細胞自體螢光範圍在 520 – 650 nm，紅光奈米鑽石的螢光範圍在 550 – 800 nm，譜線峰值約是 660 nm。所以我們可利用 rFND 的螢光寬廣性，在螢光影像擷取時，收集如圖 3-3 的紫色區域，此處已無細胞的自體螢光，可單純得到紅光奈米鑽石的訊號，以避免細胞的自體螢光的干擾。接下來我們將實際進行實驗，以確認使用 rFND 作為螢光標記，是否可有效避免細胞自體螢光的干擾。

海拉細胞已知其細胞膜表面會有大量的運鐵蛋白受體，所以我們將運鐵蛋白固定在 140 nm rFND 表面，製作成 rFND-Tf 複合物，和細胞膜表面的 TfR 作用。細胞培養在含 10 %胎牛血清的培養基中， 10^4 細胞種在直徑 12 毫米的蓋玻片上，海拉細胞在活著的時候，和濃度是 10 µg/mL 的 140 nm rFND-Tf 反應 1 小時，使 140 nm rFND-Tf 辨認細胞膜表面的 TfR。反應結束後，用 pH = 7.4 的磷酸鹽水溶

液洗去未反應的 rFND-Tf，並用 4% 的三聚甲醛將細胞固定。我們利用共焦雷射掃描螢光顯微鏡，觀察 rFND-Tf 是否可避免細胞自體螢光的干擾。圖 3-4 分別是 (a) 海拉細胞明視野 (bright field image)，(b) 和 (c) 是共焦螢光影像，螢光收集範圍分別是 (b) 大於 550 nm 和 (c) 663 – 738 nm。比較圖 3-4(a) 的明視野影像，圖 3-4(b) 的螢光影像是收集大於 550 nm 的螢光訊號，會同時偵測到 rFND 和細胞的螢光，所以螢光影像可看出整隻細胞的輪廓，顯示有背景螢光的干擾，即來自於細胞的自體螢光。圖 3-4(c) 的螢光影像是收集 663 – 738 nm 的螢光訊號，顯示背景螢光干擾明顯降低，只觀察到 rFND-Tf 的螢光影像。由圖 3-4 的結果顯示，利用 rFND 螢光寬廣的特性，收集大於 650 nm 螢光，成功降低細胞自體螢光的干擾，可增加螢光影像的清晰度。

一般螢光分子的螢光光譜和螢光生命期，容易受官能基的置換或外在環境的影響，會改變其原有的螢光特性。1959 年，Kaiser 和 Bond 利用 X-ray 繞射和紅外光吸收的分析，確認氮原子是佔據鑽石晶格中碳的位置 [76]，所以「氮-空缺」中心是在鑽石的晶格中。因此，我們欲探討 rFND 的螢光特性，是否會受表面官能基特性或外在環境的影響。我們利用螢光光譜和螢光生命期，觀察 rFND 的螢光性質是否改變。

本實驗設計分為三種：兩種表面官能基 (1) 羧基 (rFND-COOH) 和 (2) 運鐵蛋白 (rFND-Tf)；以及外在環境的探討：(3) 細胞質內的 rFND-Tf。在樣品的製作方面，將 (1) 和 (2) 分別配製成濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水溶液，取 2 μL 滴在蓋玻片上使其自然乾燥，即完成樣品的製作。細胞質內的 rFND-Tf，就是圖 3-4 中所使用的細胞樣品。圖 3-5 分別是 (a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf 和 (c) 細胞質中 rFND-Tf 的螢光光譜。每個螢光光譜中有黑、紅、綠三條曲線，代表測量三顆不同的 rFND，其螢光強度上的差異，源自於待測 rFND 的顆粒大小不同。依樣品的製備方式，所測量的顆粒應為 rFND 聚集的形態。比較圖 3-5(a) 和圖 3-5(b)，rFND 的螢光光譜並無明顯差異，仍可清楚看到兩根零聲子線，位置分別在 576 nm 和 638 nm，表示運鐵蛋白固定在 rFND-COOH 表面後，光譜特性並不受影響。圖 3-5(c) 是 rFND-Tf 在

細胞質中的螢光光譜，我們發現零聲子線較不明顯，推測在複雜的細胞質環境中，嚴重的散射造成零聲子線較不明顯，但是整個螢光光譜的強度比例，跟圖 3-5(a) 和圖 3-5(b) 相較，並無明顯差異。在螢光生命期分析方面，所測量到 rFND 的螢光強度隨時間衰退曲線，經由適解可得到 rFND 的螢光生命期數值，螢光生命期的適解公式如下：

$$A(t) = A_0 \exp(-t/\tau) \quad (3-1)$$

$A(t)$ 是隨時間變化的螢光強度， A_0 是起始的螢光強度， τ 是螢光生命期，圖 3-6 分別是 (a) rFND-COOH, (b) rFND-Tf 和 (c) 細胞質中 rFND-Tf 的螢光強度隨時間衰減曲線和適解結果，螢光生命期分別是 (a) 11.8 ± 0.1 ns, (b) 11.6 ± 0.1 ns 和 (c) 12.1 ± 0.1 ns，所得數值皆為測量三顆不同 rFND 的平均值。比較圖 3-6(a) – (c) 的結果，我們發現 rFND 的螢光生命期，受表面官能基或外在環境的影響很小。根據文獻記載，塊材狀態的螢光鑽石，螢光生命期是 11.6 ns [77]。其他相關文獻對於奈米尺寸 rFND 的報導，直徑範圍在 5 – 140 nm，其單顆 rFND 的螢光生命期範圍寬廣，約略在 10 – 30 ns [78, 79]。「氮-空缺」中心的螢光生命期，在塊材和奈米尺寸的鑽石中有差異，主要是「氮-空缺」中心周圍的折射率產生改變 [80]，所以當奈米鑽石的尺寸小於激發光源的繞射極限，「氮-空缺」中心的螢光生命期會變長。我們的實驗結果非常接近塊材狀態的螢光鑽石，表示我們所測量的顆粒是 rFND 聚集的形態，顆粒大小約是在數個 μm 。由圖 3-5 和圖 3-6 的結果顯示，我們證明 rFND 的螢光光譜和螢光生命期受表面官能基或外在環境影響很小，間接證明「氮-空缺」中心主要分佈在鑽石晶格內。

3-2 專一性標靶鑑定

由圖 3-4 的結果已知 140 nm rFND-Tf 可辨認細胞，我們將設計兩組控制實

驗，以確認 140 nm rFND-Tf 辨認細胞的途徑，是專一性透過細胞膜表面的運鐵蛋白受體。兩組控制實驗分別是(1)細胞和 rFND-COOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，觀察是否有非專一性作用，以確認 rFND-Tf 辨認細胞是和 rFND 表面的運鐵蛋白有關聯。(2)細胞先和運鐵蛋白(10 mg/mL)作用 1 小時，再和 rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，目的是阻塞細胞膜表面的 TfR，觀察 rFND-Tf 是否仍會透過運鐵蛋白受體辨認細胞。實驗組則是細胞和 rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時。圖 3-7 分別是(a)明視野影像，(b)共焦螢光影像和(c)明視野和共焦螢光影像的重疊圖，左、中、右欄分別是第一組控制實驗、實驗組和第二組控制實驗。圖 3-7 的第一組控制實驗結果顯示，並無觀察到 rFND-COOH 的螢光影像，表示 rFND-COOH 和細胞之間的非專一性作用力很小。推測 rFND-COOH 表面的羧基是負電，和細胞膜表面的負電間產生電荷斥力，降低 rFND-COOH 和細胞間的作用力，不易辨認細胞。圖 3-7 的實驗組觀察到 rFND-Tf 的螢光影像，相較於第一組控制實驗的結果，顯示 rFND-Tf 能夠標靶細胞，是和運鐵蛋白有直接關聯。圖 3-7 的第二組控制實驗結果顯示，細胞膜表面的運鐵蛋白被阻塞後，並無觀察到 rFND-Tf 螢光影像，表示細胞膜表面並無可用的運鐵蛋白受體，所以 rFND-Tf 無法透過 Tf-TfR 作用力辨認細胞。由圖 3-7 的結果驗證，140 nm rFND-Tf 能夠辨認細胞，確實透過 Tf-TfR 的專一性作用力。

為確認 140 nm rFND-Tf 是否會進入細胞質，我們進行單色縱向截面共焦螢光影像掃描(single color vertical cross-section confocal fluorescent image)，觀察整個細胞的厚度範圍中，是否有 140 nm rFND-Tf 螢光訊號的分佈。一般細胞的厚度約是 10 μm ，我們設定縱向深度的掃描範圍是 20 μm ，每個螢光影像的截面間隔距離是 200 nm，以涵蓋整個細胞的厚度。圖 3-8 是單色縱向截面共焦螢光影像的結果，螢光影像侷限在 10 μm 內，顯示在整個細胞的厚度中，都可觀察到螢光奈米鑽石的分佈，表示 140 nm rFND-Tf 已進入細胞質。此進入細胞的途徑，已知稱作受體媒介胞吞作用。此外，我們將細胞核染色，透過細胞核定義出細胞質的範圍，再疊加上 rFND-Tf 的螢光影像，可進一步確認 rFND-Tf 已進入細胞質。細胞核染劑

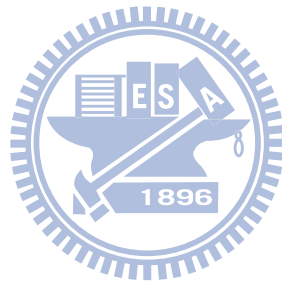
(Hoechst 33342)經由 405 nm 雷射激發，會放出藍色螢光範圍在 420 – 500 nm，所以我們進行雙色縱向截面共焦螢光影像掃描，結果如圖 3-9 所示。有三個方向的投影，分別是 xy、xz 和 yz，z 軸的深度是 20 μm ，紅色和藍色分別代表 rFND-Tf 和細胞核染劑的螢光。在 xz 和 yz 的投影中，顯示整個細胞核厚度的範圍內，有 rFND-Tf 的螢光影像，表示 rFND-Tf 已進入細胞質。從三個不同方向的投影中，rFND-Tf 看起來似乎進入細胞核內，但是經由不同縱向截面的分析，發現 rFND-Tf 是在細胞核的周圍，並無進入細胞核。圖 3-10 是不同截面的雙色共焦螢光影像，從 0 – 6 μm 的深度中，細胞核區域內皆無觀察到 rFND-Tf 的螢光影像，表示 140 nm rFND-Tf 並沒有進入細胞核。我們亦使用 40 nm rFND-Tf 進行細胞標靶的實驗，仍無看到細胞核有 40 nm rFND-Tf 的螢光影像。推測 40 nm 和 140 nm rFND-Tf 的粒徑太大，亦或是 rFND-Tf 滯留在細胞質的核內體(endosome)中，所以無法進入細胞核。我們利用共焦雷射掃描螢光顯微術，證實 rFND-Tf 可標靶細胞，並且進入細胞質內，製作成專一性探針。



3-3 結論

相較於文獻的真空退火條件是 800 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 小時，我們改變真空高溫退火的條件，使 rFND 的螢光強度提高約 8 倍。我們的真空退火最佳化條件，是真空 6×10^{-3} torr 下 800 $^{\circ}\text{C}$ 退火 4 小時，以及在大氣下 600 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 小時。推測有兩個原因使 rFND 的螢光強度增加：(1)較長的退火時間可產生較多「氮-空缺」中心；(2)大氣下退火產生氧化作用，清除奈米鑽石表面的石墨，使螢光的穿透性變佳。利用 rFND 螢光範圍寬廣在 550 – 800 nm，擷取細胞螢光影像時，收集大於 650 nm 螢光，可有效避開細胞自體螢光 520 – 650 nm 的影響，降低背景螢光的干擾。在 rFND 螢光特性的研究方面，對於兩種表面官能基(1) rFND-COOH，(2) rFND-Tf 和外環境(3)細胞質中 rFND-Tf 的探討，我們發現 rFND 的螢光光譜和螢光生命期皆無明顯差異，推測「氮-空缺」中心在鑽石晶格內，rFND 的螢光受表面官能基或外環境影響很小。

在專一性標靶細胞螢光影像方面，rFND-COOH 的非專一性作用力很小，推測 rFND-COOH 和細胞膜間的電荷斥力，降低和細胞間的作用力，不易辨認細胞。rFND-Tf 可有效的標靶癌細胞，並由阻塞細胞膜表面的運鐵蛋白受體，使 rFND-Tf 受阻而無法辨認細胞，證實 rFND-Tf 是經由 Tf-TfR 作用力，變成專一性的探針。我們利用縱向截面共焦雷射掃描螢光影像，進一步確認 rFND-Tf 已進入細胞質，此途徑是已知的受體媒介胞吞作用。本研究已成功將 rFND 製作成專一性探針，增加標靶細胞螢光影像的應用性。



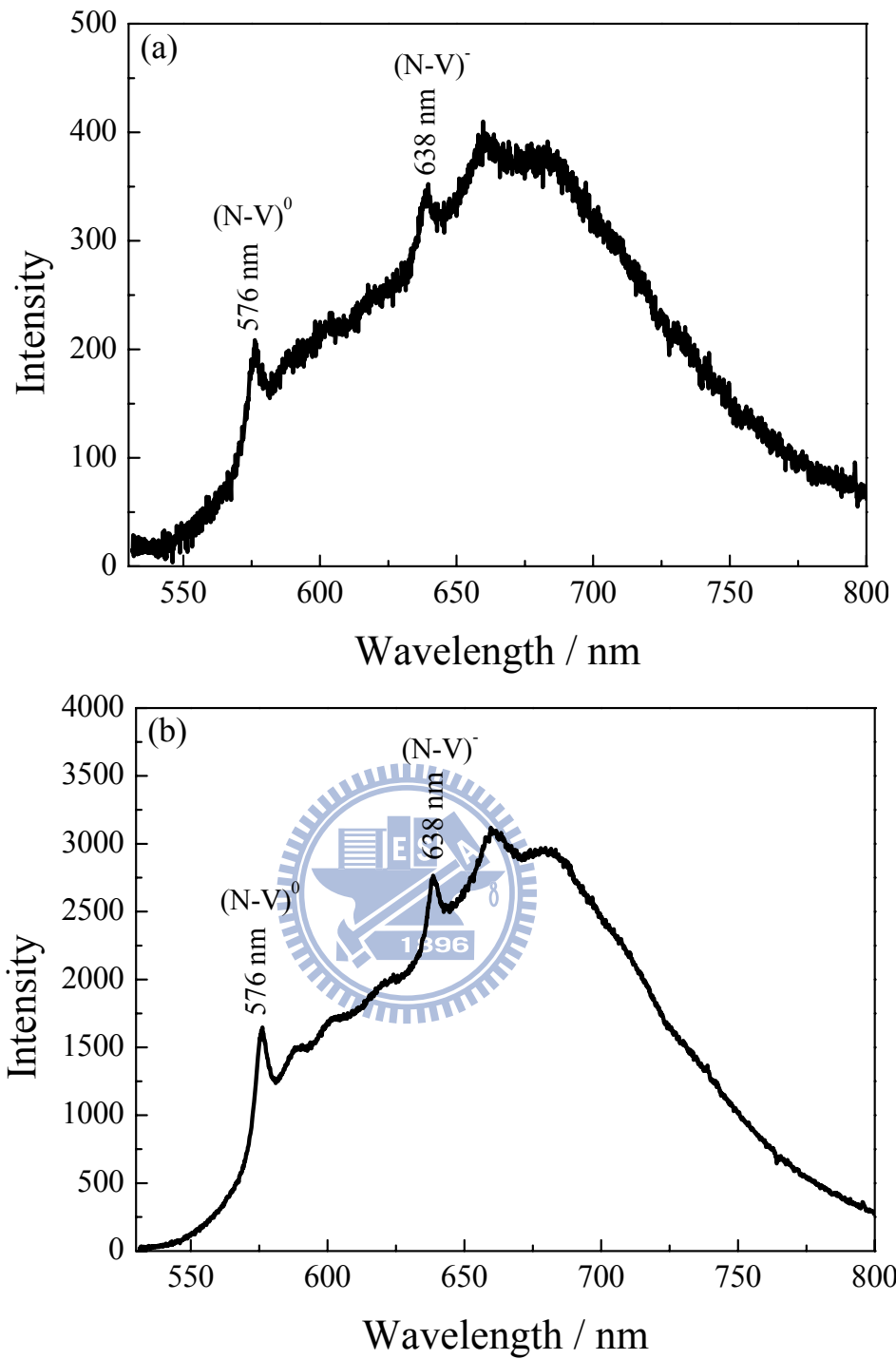


圖 3-1 140 nm 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，(a)文獻條件，退火條件是真空 800 °C 退火 2 小時，(b)本實驗室最佳化條件，退火條件是真空 800 °C 退火 4 小時，以及大氣下 600 °C 退火 2 小時。

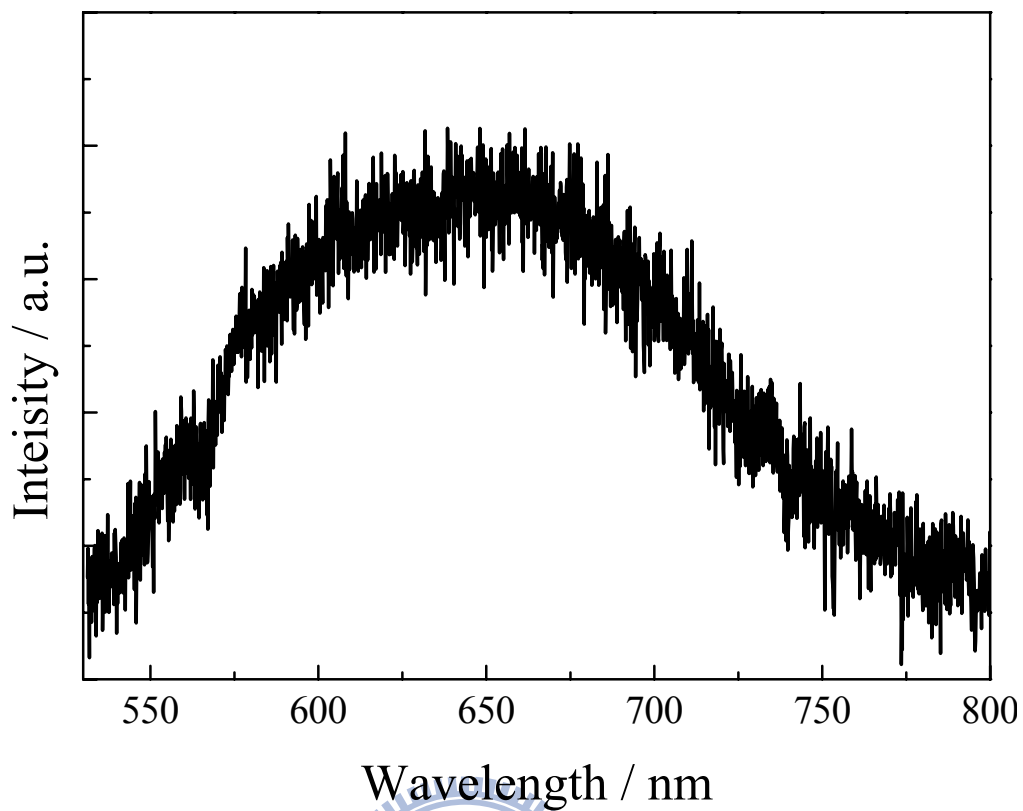


圖 3-2 40 nm 紅光奈米鑽石螢光光譜圖，退火條件是真空 800 °C 退火 4 小時，以及大氣下 600 °C 退火 2 小時。

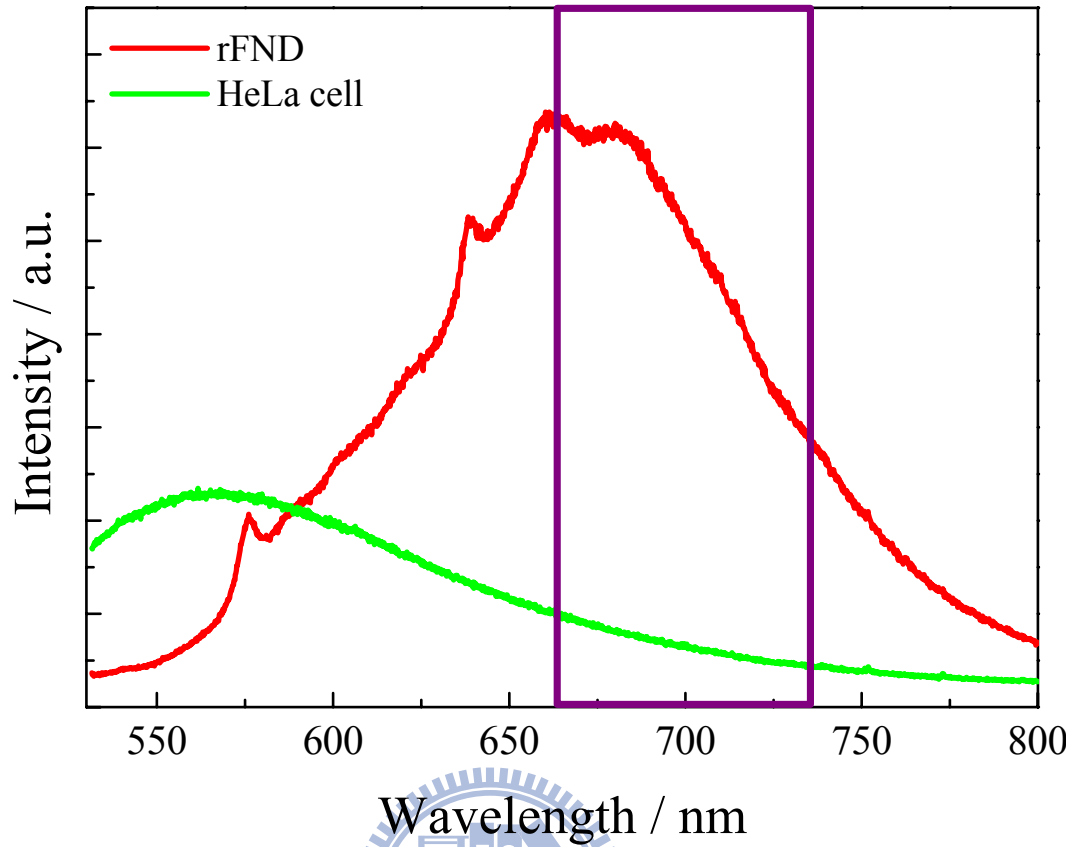


圖 3-3 140 nm 紅光奈米鑽石和海拉細胞的螢光光圖譜，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射，紅色曲線代表紅光奈米鑽石，綠色曲線代表海拉細胞自體螢光，紫色區域是擷取細胞螢光影像時，螢光訊號的收集範圍。

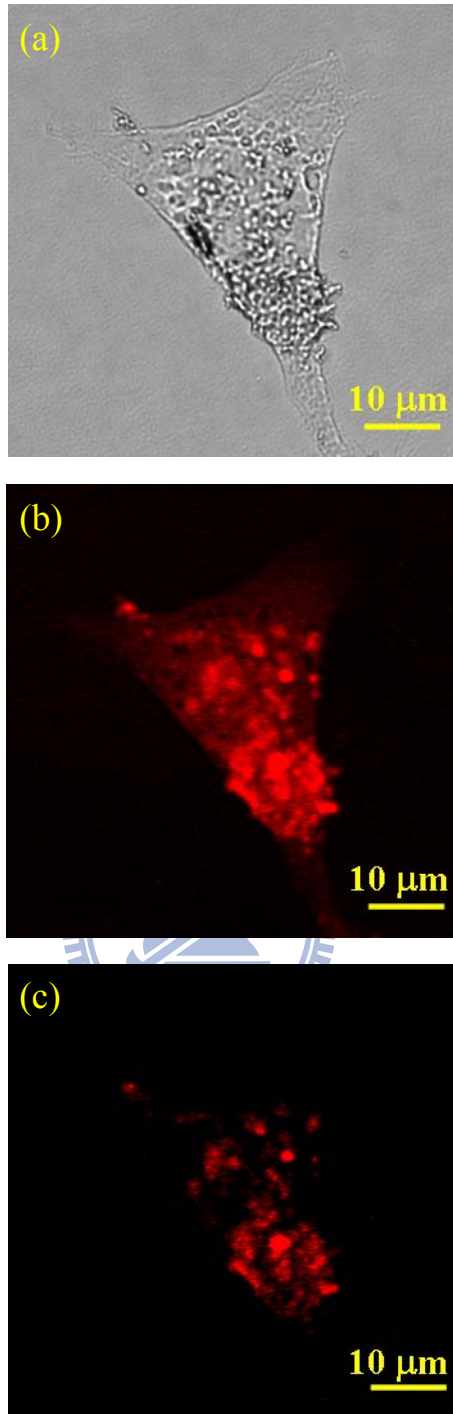


圖 3-4 海拉細胞的明視野和共焦螢光影像，(a)明視野影像，(b)和(c)是共焦雷射掃描螢光影像，螢光收集範圍：(b)大於 550 nm，(c) 663 – 738 nm。細胞和 140 nm rFND-Tf 作用 1 小時，反應濃度是 10 μg/mL，激發光源是 514.5 nm 氬離子雷射。

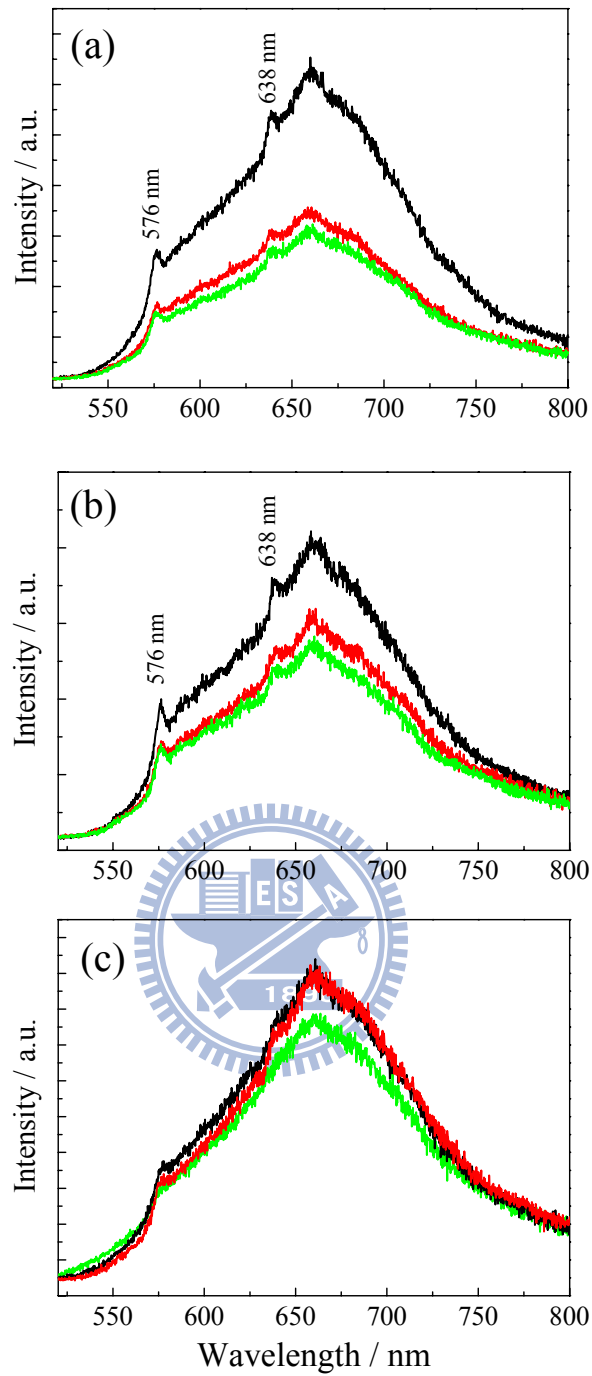


圖 3-5 140 nm 紅光奈米鑽石螢光光圖譜，(a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf，(c)細胞質中的 rFND-Tf。

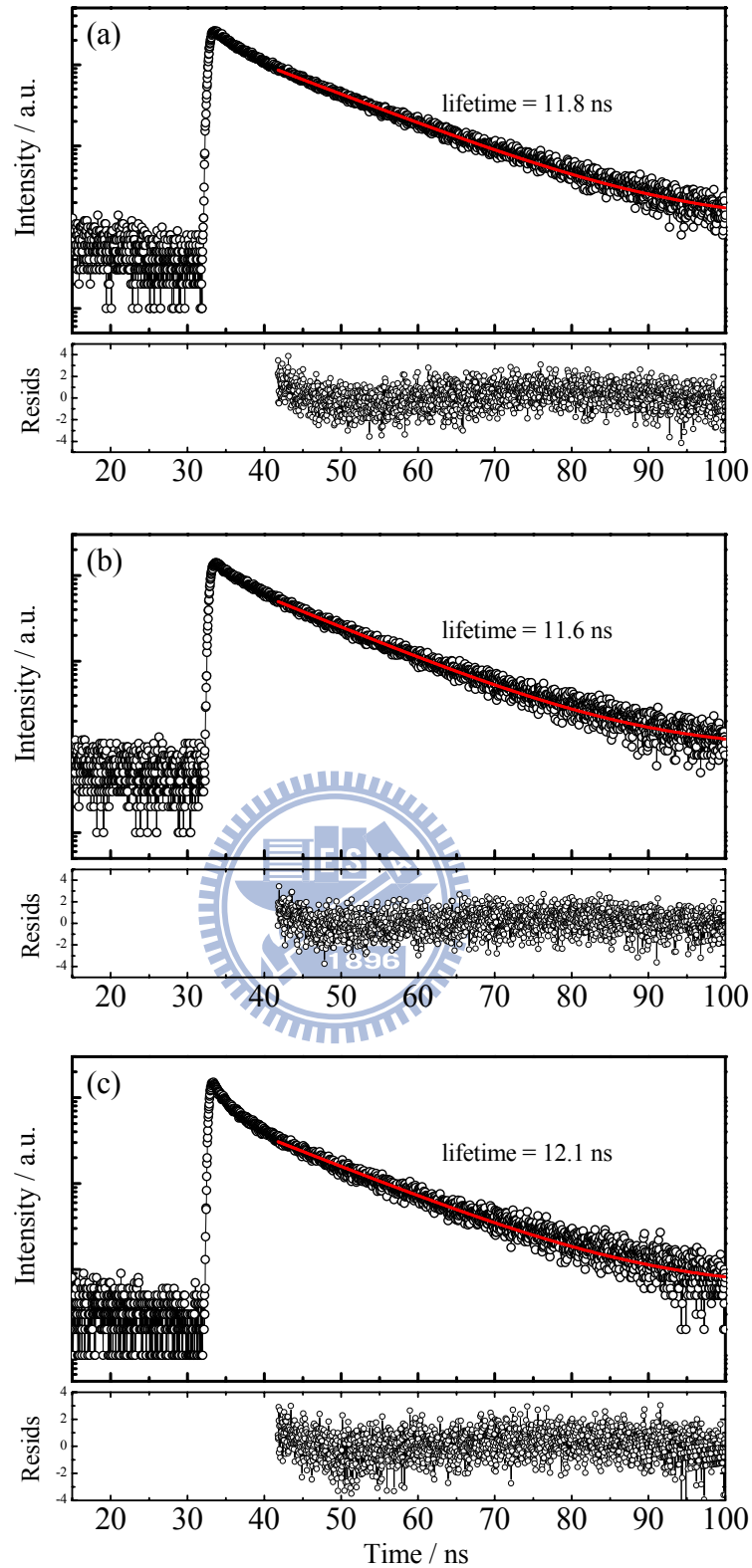


圖 3-6 140 nm 紅光奈米鑽石螢光生命期，(a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf，(c)細胞質中的 rFND-Tf。

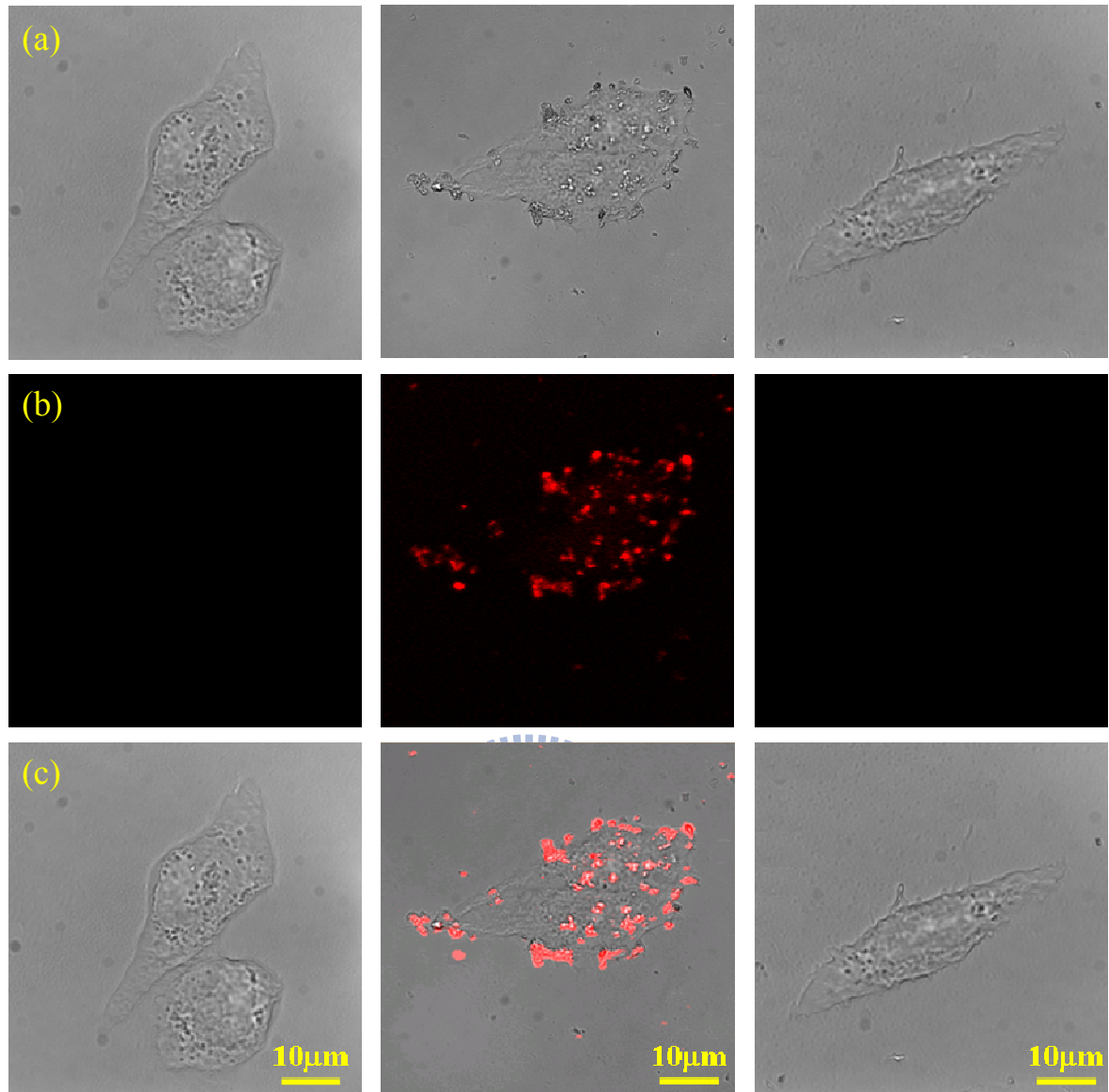


圖 3-7 專一性標靶細胞影像圖，(a)細胞的明視野影像，(b)紅光奈米鑽石的共焦螢光影像，(c)明視野和共焦螢光影像的重疊圖。左欄是細胞和 140 nm rFND-COOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，中間欄是細胞和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時，右欄是細胞先和運鐵蛋白(10 mg/mL)作用 1 小時，再和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)反應 1 小時。

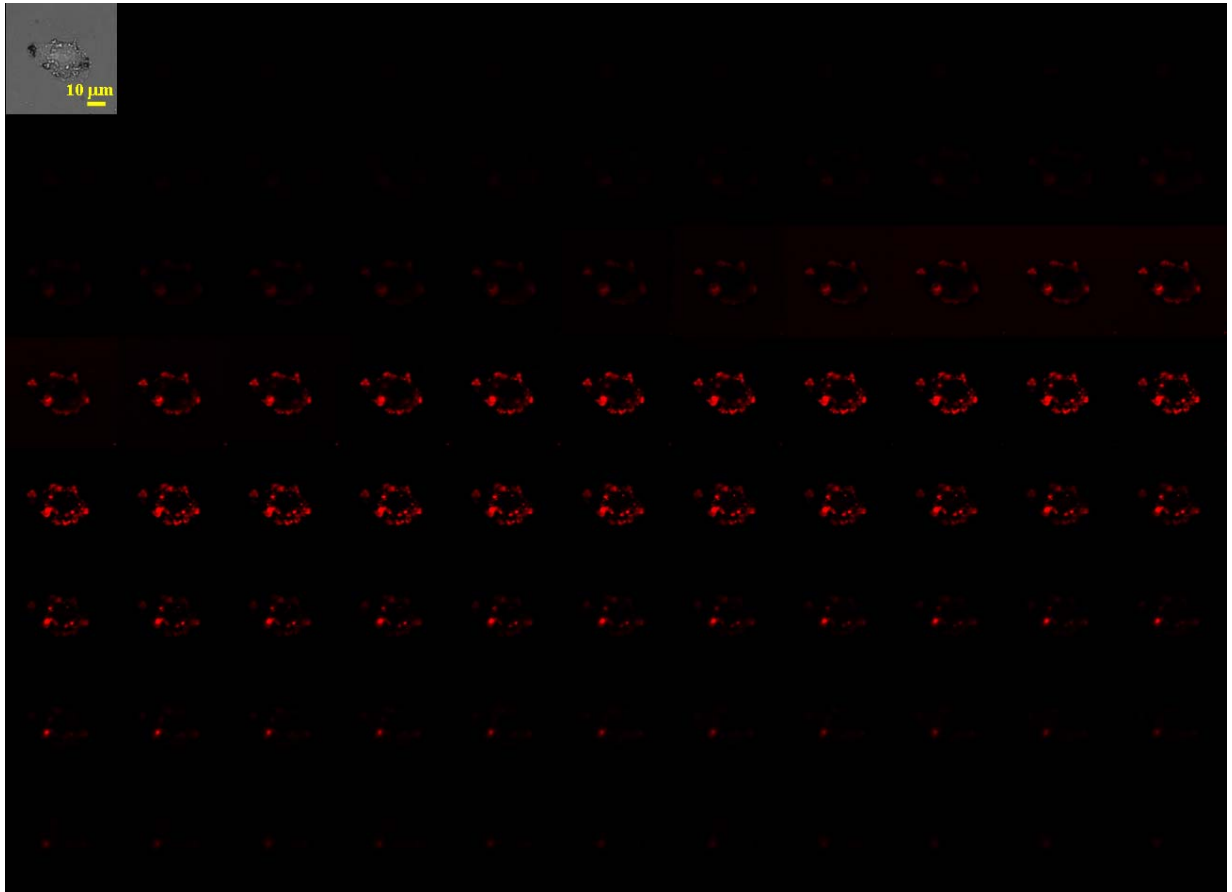


圖 3-8 單色縱向截面共焦螢光影像，每個截面間隔距離是 200 nm。海拉細胞和 140 nm rFND-Tf (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 反應 1 小時。

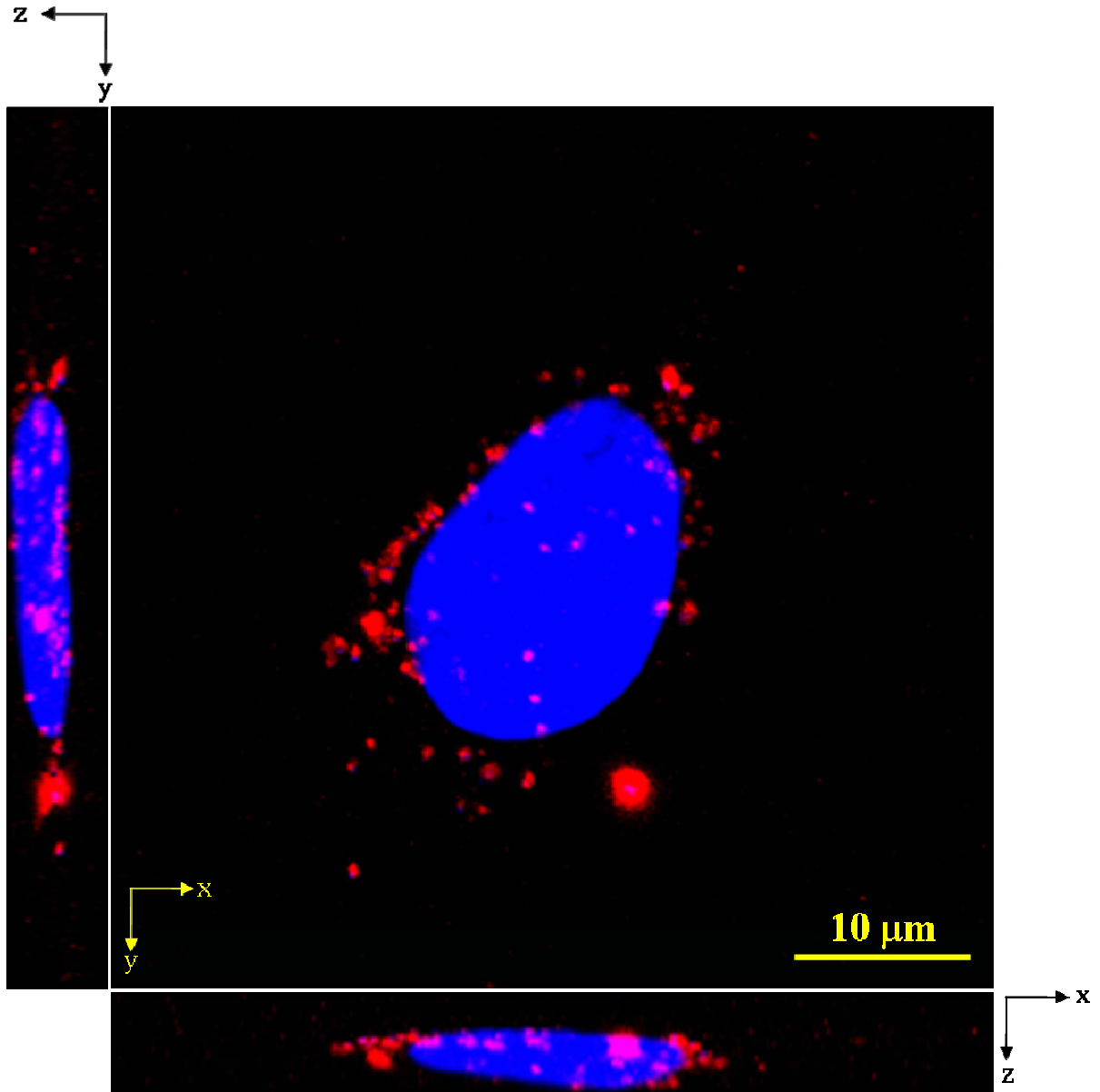


圖 3-9 雙色縱向截面共焦螢光影像，藍色螢光代表是細胞核，激發光源是 405 nm 雷射，螢光收集範圍 420 – 500 nm。紅色螢光代表 140 nm rFND-Tf，激發光源是 514.5 nm 雷射，螢光收集範圍 650 – 750 nm。xz 和 yz 的 z 軸深度是 20 μm 。

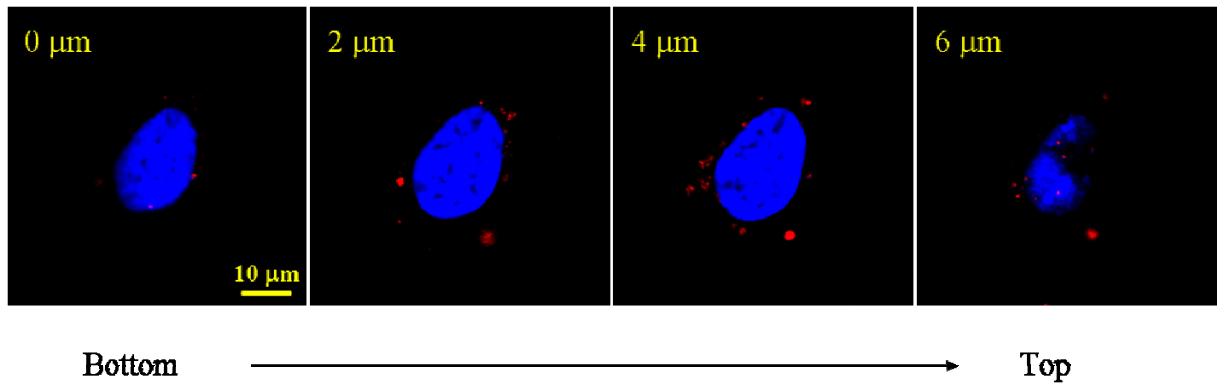
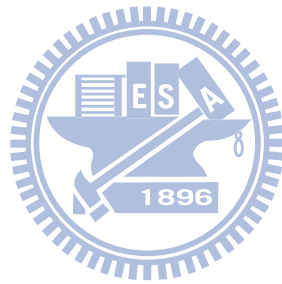


圖 3-10 不同截面的雙色縱向截面共焦螢光影像，藍色螢光代表細胞核，激發光源是 405 nm 雷射，螢光收集範圍是 420 – 500 nm，紅色螢光代表 140 nm rFND-Tf，激發光源是 514.5 nm 雷射，螢光收集範圍是 650 – 750 nm。



第四章 紅光奈米鑽石的胞吞作用和毒性研究

4-1 表面性質鑑定

奈米粒子是透過胞吞作用進入細胞，奈米粒子的表面性質，會影響胞吞作用的效率和專一性 [41 – 43]。胞吞作用是大分子物質進入細胞的方式，例如蛋白質、脂質或糖類，數個微米(μm)的粒子亦可透過此作用進入細胞。本研究使用型式 Ib 合成奈米鑽石，製作成紅光奈米鑽石進行研究。我們設計三種不同表面官能基的 rFND，分別是羧基($-\text{COO}^-$)、胺基($-\text{NH}_3^+$)和蛋白質，表面分別帶負、正電以及運鐵蛋白，以探討表面性質對胞吞作用的效率和專一性。我們利用光動態散射儀和界面電位分析儀，測量表面修飾的 rFND 大小和表面電性，以瞭解三種 rFND 的表面特性。我們選用 40 nm 和 140 nm 的 rFND，探討粒徑大小對於胞吞作用的關係。表 4-1 是三種表面官能基 40 nm 和 140 nm 的 rFND 粒徑大小和表面電位的測量結果。兩種 rFND-COOH 粒徑大小分別是 $41 \pm 3 \text{ nm}$ 和 $144 \pm 8 \text{ nm}$ ，表面電位分別是 $-38.3 \pm 1.5 \text{ mV}$ 和 $-48.3 \pm 1.3 \text{ mV}$ 。將運鐵蛋白固定在 rFND-COOH 表面，得到的 rFND-Tf 大小分別是 $187 \pm 10 \text{ nm}$ 和 $222 \pm 12 \text{ nm}$ 。相較於 rFND-COOH 的大小，運鐵蛋白在奈米鑽石表面的厚度，分別約是 75 nm 和 40 nm。運鐵蛋白在水溶液中的大小約是直徑 7 nm，實驗結果顯示多層運鐵蛋白固定在 rFND-COOH 表面。rFND-Tf 的表面電位分別是 $-43.9 \pm 1.5 \text{ mV}$ 和 $-51.6 \pm 0.9 \text{ mV}$ ，相較於 rFND-COOH 的表面電位，固定在表面的運鐵蛋白電位，分別是 -5.6 mV 和 -3.3 mV ，也反映出運鐵蛋白厚度越大電位越高。運鐵蛋白的等電點(isoelectric point, 簡稱 pI)是 5.6，在中性或鹼性的溶液中，運鐵蛋白自然狀態的淨電荷是負電，推測運鐵蛋白在 rFND 表面的結構狀態和水溶液中相近。rFND-NH₂ 是由 (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTS) 交聯(cross-linking) 包覆在 rFND-COOH 表面，粒徑大小分別是 $61 \pm 3 \text{ nm}$ 和 $166 \pm 9 \text{ nm}$ ，相較 rFND-COOH 的大小，估計 APTS 包覆在表面的厚度皆約為 10 nm，其表面電位分別是 $-17.8 \pm 0.7 \text{ mV}$ 和 -25.4

± 0.9 mV。由於 APTS 是直接包覆在 rFND-COOH 表面，內部 rFND-COOH 的表面電位特性仍在，故整體電性是負電，進一步扣減 rFND-COOH 的表面電位，得到表面 APTS 的電位分別是 +20.5 mV 和 +22.9 mV，即 rFND-NH₂ 的表面電性為正電性。

4-2 胞吞作用螢光影像

我們利用細胞螢光影像，探討三種表面官能基的紅光奈米鑽石，分別是 rFND-COOH、rFND-Tf 和 rFND-NH₂，對胞吞作用的專一性和效率。海拉細胞培養在含有 10% 胎牛血清的培養基中，三片直徑 12 毫米的蓋玻片上各種 5×10^5 細胞，分別和三種不同表面官能基的 rFND 作用 6 小時，反應濃度是 10 μ g/mL。反應結束後，將未反應的 rFND 用 pH = 7.4 磷酸鹽水溶液洗去，並用 4% 三聚甲醛固定細胞。接下來我們進行細胞核染色，以清楚辨認 rFND 螢光影像中細胞的位置。另有一個控制實驗是細胞在不含胎牛血清的培養基，和 rFND-COOH 的反應 6 小時。胎牛血清的角色是養份，此實驗目的是觀察使細胞飢餓的情況下，是否會增加非專一性的胞吞作用。在廣視野(wide field)螢光影像擷取方面，激發光源是 100 W 高壓汞燈，rFND 和細胞核染劑的激發波長分別是 510 – 560 nm 和 340 – 380 nm，螢光收集波長分別是大於 590 nm 和 435 – 485 nm。

圖 4-1 是 140 nm rFND 三種表面官能基的實驗結果，分別是(a) rFND-COOH，(b) rFND-COOH 在不含胎牛血清的培養基，(c) rFND-Tf 和(d) rFND-NH₂。比較於圖 4-1(a)和圖 4-1(b)，我們發現培養基含有 10% FBS 的情況下，140 nm rFND-COOH 不和細胞作用，在圖 4-1(a)中我們並無觀察到細胞內有 rFND 的螢光影像。我們推測 rFND-COOH 和細胞膜表面皆為負電，產生電荷斥力，降低 rFND-COOH 和細胞間的作用力，所以不易進入細胞。圖 4-1(b)是不含 FBS 培養基的結果，細胞在飢餓的情況下，140 nm rFND-COOH 和細胞的非專一性作用力增加，因而進入細胞，所以圖 4-1(b)中觀察到細胞內有 rFND 的螢光影像。文獻雖曾報導，rFND-COOH 在含有 FBS 的培養基下，仍會進入細胞，但相較於不含

FBS 的培養基，rFND-COOH 進入細胞的效率低 [15, 32, 37, 81]。考慮含 FBS 和不含 FBS 胞吞作用效率的差異，文獻結果和我們的結果並不相衝突。我們的結果顯示 140 nm rFND-COOH 在培養基含 10% FBS 的情況下，進入細胞的效率更低。許多因素會造成此差異，例如粒徑大小、表面特性、培養基的組成、奈米粒子的聚集等等，都有可能造成胞吞作用效率的差異。

因為 140 nm rFND-COOH 在含有 10 % FBS 的培養基下，和細胞間的作用力較小，無明顯的非專一性作用力，所以 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 跟細胞的反應是在 10 % FBS 的培養基進行，以降低非專一性的作用。圖 4-1(c) 有很強的 rFND 螢光，顯示大量的 140 nm rFND-Tf 進入細胞。我們也利用共焦螢光顯微鏡進行縱向截面掃描，確認 140 nm rFND-Tf 進入細胞。此外，對應細胞核的螢光影像，我們發現 140 nm rFND-Tf 主要分佈在細胞質中，並無在細胞核中。我們進一步利用阻塞細胞膜表面的運鐵蛋白受體，以證明 rFND-Tf 是透過 Tf-TfR 進入細胞。圖 3-7 的結果顯示，當胞膜表面的 TfR 被阻塞後，140 nm rFND-Tf 就無法進入細胞，我們已證實此現象。Li 等人利用競爭抑制檢驗(competitive inhibition assay)，亦證實 rFND-Tf 進入細胞是藉由受體媒介胞吞作用 [82]。他們在培養基中加入蔗糖(sucrose)中斷受體媒介胞吞作用，發現進入細胞內的 rFND-Tf 大為減少 80 %。圖 4-1(d) 螢光影像顯示，140 nm rFND-NH₂ 會和細胞作用。我們也進一步利用共焦螢光顯微鏡，進行縱向截面掃描，確認 rFND-NH₂ 也會進入細胞質中。由表 4-1 的表面電位結果得知，140 nm rFND-NH₂ 表面帶正電，表面電位估計是 +22.9 mV，推測藉由電荷引力，吸附在細胞膜表面，再透過胞吞作用進入細胞。我們初步經由 rFND 螢光影像的強度，估計 140 nm rFND-Tf 進入細胞的數量約是 140 nm rFND-NH₂ 的 2 倍，顯示受體媒介胞吞作用相較於電荷引力的胞吞作用效率高 2 倍。

我們也進行三種表面官能基的 40 nm rFND 的胞吞作用實驗，以比較 rFND 大小是否會影響專一性和效率，結果如圖 4-2 所示。圖 4-2(a) 和圖 4-2(b) 的結果顯示，40 nm rFND-COOH 在 10 % FBS 培養基，無非專一性的作用力，我們沒有觀

察到胞吞作用效率因粒子尺寸縮小而提高。根據表面電位的結果，40 nm rFND-COOH 表面電位是 -38.3 ± 1.5 mV，雖然較 140 nm rFND-COOH 表面電位 -48.3 ± 1.3 mV 小，仍會和細胞膜表面有電荷斥力，降低和細胞間的作用力，因此，減小 rFND-COOH 的尺寸，我們並無觀察到胞吞作用效率的提高。圖 4-2(b) 是 40 nm rFND-COOH 在無 FBS 培養基和細胞作用的結果，和 140 nm rFND 的結果相同，40 nm rFND-COOH 進入細胞是因為細胞飢餓，增加無選擇性的胞吞作用。圖 4-2(c) 和圖 4-2(d) 的結果顯示，40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 進入細胞，分別透過受體媒介胞吞作用和細胞膜間的電荷引力進入細胞，也都是分佈在細胞質中，結果和 140 nm 的 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 相同。由表 4-1 結果得知，40 nm 和 140 nm rFND-Tf 的大小差異不大，分別是 187 ± 10 nm 和 222 ± 12 nm，顯示粒子大小對於胞吞作用的效應不明顯。40 nm rFND-NH₂ 的表面電位是 $+20.5$ mV，相較於 140 nm rFND-NH₂ 表面電位 $+22.9$ mV 的差異不大，表示 40 nm 和 140 nm rFND-NH₂ 皆有非專一性作用力。比較圖 4-1 和圖 4-2 的結果，得知 rFND 的大小對於胞吞作用的效率無影響，而是表面官能基對於胞吞作用影響較大。

4-3 胞吞作用效率動力學

我們已知不同表面官能基的 rFND，對胞吞作用有不同的效率。我們利用流式細胞儀分析單一細胞內 rFND 的螢光強度，以得到其胞吞作用效率動力學。因為 40 nm rFND 的螢光微弱，不容易偵測低反應濃度時單一細胞內的螢光，所以不同表面官能基的 40 nm rFND，我們只測量高反應濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ ，以提高螢光的強度。培養基含 10% FBS 情況下，rFND-COOH 不易進入細胞，所以只分析 rFND-Tf、rFND-NH₂ 和 rFND-COOH 在不含 FBS 情況下，對胞吞作用效率的差異。我們進行兩種實驗，分別是測量反應濃度(concentration dependent)和反應時間(reaction time)對胞吞作用的效應。細胞培養在含 10% 胎牛血清的培養基中，細胞種在 12 孔盤中，每個孔皆約有 5×10^5 細胞。在反應濃度分析方面，不同表面官能基的 rFND 分別和細胞反應的時間固定是 6 小時，反應濃度分別是 1、2、

5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。反應時間分析方面，rFND 的反應濃度是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，反應時間分別是 0.5、1、1.5、2、3、4 和 5 小時。反應結束後，先將未反應的 rFND 用 $\text{pH} = 7.4$ 鄰酸鹽水溶液洗去，再加入胰蛋白酶將細胞取下，細胞懸浮在 PBS 中就可進行流式細胞儀的分析。每組實驗皆分析 5×10^3 個細胞，以達到統計上的可信度。

圖 4-3 是不同表面官能基的 40 nm 和 140 nm rFND 在反應濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的螢光強度比較圖，綠色和紅色分別代表 40 nm 和 140 nm rFND，表面官能基分別是 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 在含 10 % FBS 的培養基，以及 rFND-COOH 在無 FBS 的培養基。為了比較 40 nm 和 140 nm FND 進入細胞的重量，須先得知相同重量下，40 nm 和 140 nm rFND 的螢光強度比例。在濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液中，我們測得 140 nm rFND-COOH 的螢光強度是 40 nm rFND-COOH 的 37 倍，所以將圖 4-3 中 40 nm rFND 的螢光強度乘以 37 倍，以得到 40 nm 和 140 nm rFND 進入細胞的重量比較。由圖 4-3 的結果顯示，40 nm rFND 的螢光強度乘以 37 倍之後，相同表面官能基的 40 nm 和 140 nm rFND 有相近的螢光強度，顯示進入細胞的重量幾乎相同。由此實驗結果推論，奈米鑽石進入細胞的總重和顆粒大小無關。不同表面官能基的比較方面，進入細胞的重量比例如下，rFND-Tf : rFND-NH₂ :

rFND-COOH(不含 FBS)的比例約是 1 : 0.6 : 0.2，顯示 rFND-Tf 的胞吞作用效率最高。圖 4-4 是 140 nm rFND 螢光強度隨濃度改變的分析圖，紅色和綠色分別代表 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂。兩者螢光強度大約依濃度增加呈線性成長，皆於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 達到飽和。當物質藉由胞吞作用進入細胞，其進入細胞的數量會跟反應濃度呈正比，反應物到達特定濃度之後，即使增加反應濃度也不會增加進入細胞的數量，到達飽和狀態，此現象是胞吞作用的主要特徵 [83 – 86]。我們的實驗結果符合此現象，顯示 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 進入細胞是透過胞吞作用。rFND-Tf 飽和時的螢光強度，約是 rFND-NH₂ 的 2 倍，顯示 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的胞吞作用可能是透過不同的途徑。我們已確認 rFND-Tf 的途徑是受體媒介胞吞作用，rFND-NH₂ 能夠藉由電荷引力進入細胞，此途徑稱作巨胞飲作

用(macropinocytosis) [87, 88]。巨胞飲作用屬於胞吞作用的一種，是非專一性進入細胞的胞吞作用途徑。我們也利用細胞的廣視野螢光影像，分析單一細胞內 rFND 的螢光強度，跟流式細胞儀的分析結果作比較。螢光影像中測量到的 rFND 螢光強度，是包含細胞自體螢光和 rFND 本身的螢光，所以扣減細胞的自體螢光，就可得到單一細胞內的 rFND 螢光強度。圖 4-5 是螢光影像分析 rFND 螢光強度的實驗結果，每組螢光影像分析的結果是平均 20 隻細胞內 140 nm rFND 的螢光強度。黑色和紅色曲線分別代表螢光影像分析的 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的結果，綠色和藍色曲線分別代表流式細胞儀分析 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的結果。我們發現螢光影像分析的結果和流式細胞儀的結果相同，rFND 螢光強度一開始也隨反應濃度增加呈線性成長，並在 10 μg/mL 達到飽和，以及 rFND-Tf 飽和時的螢光強度近似 rFND-NH₂ 的 2 倍。流式細胞儀可在短時間分析大量的細胞，達到統計上的可性度。螢光影像的分析方面，儘管在統計的分析數量上不夠多，但仍然可提供很好的可性度。然而，資料處理過程較為耗時，需要較長的時間去計算單一細胞內的螢光強度，無法在短時間內分析大量的細胞。所以接下來的反應時間分析，主要是用流式細胞儀的分析結果。

圖 4-6 分別是(a) rFND-Tf 和(b) rFND-NH₂ 螢光強度隨反應時間改變的曲線，和經由適解得到的反應的半生期(half-life)，反應半生期適解公式如下：

$$I(t) = A[1 - \exp(-k(t - t_c))] \quad (4-1)$$

其中 $I(t)$ 是隨時間變化的螢光強度， A 是 rFND 在特定反應濃度的飽和螢光強度， k 是反應速率常數，代表胞吞作用的速率， t_c 是奈米鑽石擴散到細胞表面的遲滯時間。rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 分別在第 3 和 4 小時後達到飽和，適解的半生期是由 $(\ln 2)/k$ 計算得到是 0.8 和 1.4 小時。rFND-Tf 的半生期較短，表示 rFND-Tf 是較有效率的途徑。rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 在半生期數值上的差異，亦顯示 2 種不同胞吞作用途徑。總結圖 4-4 和圖 4-6 的結果，可得知 rFND-Tf 的胞吞作用效率，

約是 rFND-NH₂ 的 2 倍，胞吞作用的途徑分別是受體媒介胞吞作用和巨胞飲作用。比較相關文獻對受體媒介胞吞作用的研究結果，張煥正老師實驗室將葉酸固定在 140 nm rFND 表面，透過細胞膜表面的葉酸受體進入細胞，在反應濃度是 25 μg/mL 的情況下，測定 140 nm rFND-FA 的半生期是 0.7 小時 [35]。他們得到的結果，和我們測定 140 nm rFND-Tf 的半生期是 0.8 小時非常相近，顯示 rFND-Tf 和 rFND-FA 的受體媒介胞吞作用，有相似的反應半生期相似。Li 等人報導 140 nm rFND-Tf 在反應濃度 25 μg/mL 的情況下，其半生期是 1.3 小時 [82]，較長於我們的結果。根據 Li 等人的 140 nm rFND-COOH 表界面電位結果推算，相較於 140 nm rFND-COOH 的表面電位，140 nm rFND-Tf 表面的運鐵蛋白電性是正電。先前有提到運鐵蛋白在水溶液中自然狀態是負電性，我們 140 nm rFND-Tf 表面的運鐵蛋白也是負電性，因此，我們推測 Li 等人的運鐵蛋白的結構和我們的不同。雖然我們預期 Li 等人的 140 nm rFND-Tf 胞吞作用效率，會因表面的運鐵蛋白是正電性而增加，但是他們測定的半生期較長，意味著運鐵蛋白結構的改變，扮演很重要的角色，降低了 140 nm rFND-Tf 進入細胞的效率。

4-4 奈米鑽石的細胞毒性

奈米粒子的細胞毒性，在生物系統中非常重要。奈米粒子本身若具有毒性，亦或是經過表面修飾後產生毒性，將難以應用在生物醫學上。因此，我們針對三種表面官能基的 rFND，探討其細胞毒性。我們利用細胞影像、MTT 檢驗以及細胞計數，觀察 48 或 72 小時後的細胞活性。細胞影像是直接利用顯微鏡觀察細胞的形態，以判別細胞是否被毒殺而改變形態。MTT 檢驗是加入試劑以觀察細胞內粒線體的還原能力。每隻細胞的還原能力約略相同，MTT 試劑經由粒線體還原後，可測得 540 nm 的吸收度，就可作為細胞活性的憑據。細胞計數可直接得到細胞的數量，以瞭解細胞數目是否因加入 rFND 而減少。在細胞影像和細胞計數方面，細胞種在 12 孔盤中，每個孔皆有約 5×10^4 細胞，培養基含有 10 % 胎牛血清，三種表面官能基的 rFND 分別和細胞作用。rFND-COOH 的反應濃度範圍是 0

- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的反應濃度範圍是 0 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。細胞影像和細胞計數是各別的兩組細胞樣品，在反應第 48 小時後，分別擷取細胞影像和計算細胞數目。MTT 檢驗的部份，96 孔盤的每個孔皆種約 5×10^3 細胞，分別和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rFND-COOH、rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 反應，在反應第 0、24、48 和 72 小時，分別跟 MTT 試劑反應 4 小時後，測量 540 nm 的吸收度；細胞的數目越多，吸收度就越大，代表細胞的活性高。

圖 4-7 分別是 140 nm (a) rFND-COOH，(b) rFND-Tf 和 (c) rFND-NH₂ 毒性測試細胞影像，140 nm rFND-COOH 反應濃度分別是 0、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的反應濃度是 0、1 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。圖 4-8(a)的結果顯示，rFND-COOH 反應濃度在 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 情況下，細胞的形態無明顯差異，表示 rFND-COOH 在高反應濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 情況下的細胞毒性很低。細胞的數量相較於控制實驗也無差別，表示細胞維持正常的分裂週期。圖 4-7(b)和圖 4-7(c)的細胞影像結果，顯示 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 在反應濃度 1 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的情況下，細胞數目皆明顯減少，但細胞的形態不受影響。若細胞是直接被毒殺，細胞形態會呈現萎縮變形。圖 4-7(b)和圖 4-7(c)的結果顯示，細胞形態並無改變，表示細胞並不是直接被毒殺，我們推測是細胞的生長被抑制，導致細胞的數量減少。因此，140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 大量進入細胞後，可能會影響細胞分裂的週期，減緩細胞分裂的速度。rFND-COOH 的胞吞作用效率低，不易進入細胞，所以不會影響細胞的分裂週期。rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的胞吞作用效率高，在反應濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即有大量螢光奈米鑽石進入細胞，會抑制細胞的生長。相較於不添加 rFND 的控制實驗，rFND 大量進入細胞後，細胞數目雖然減少，但是形態並無改變，代表奈米鑽石本身的細胞毒性低，不會直接毒殺細胞，亦顯示奈米鑽石的細胞相容性高。

我們也進行 40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 細胞毒性測試。圖 4-8 分別是 40 nm (a) rFND-Tf 和 (b) rFND-NH₂ 毒性測試細胞影像，40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的反應濃度是 0、1 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。圖 4-8(a)和圖 4-8(b)的結果顯示，40 nm rFND-Tf

和 rFND-NH₂ 在反應濃度 1 µg/mL 的情況下，相較於控制實驗，細胞形態並無改變，但是細胞數目皆明顯減少，表示 40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 大量進入細胞後，也具有抑制細胞生長的效果。由圖 4-3 流式細胞儀的分析結果得知，在相同反應濃度下，相同表面官能基的 40 nm 和 140 nm rFND 進入細胞的重量約略相同，所以我們也預期此兩種大小的 rFND 大量進入細胞後，都會有抑制細胞生長的效果。

為了量化細胞生長抑制的程度，MTT 檢驗以及細胞計數可作為量化的依據。在 MTT 檢驗方面，我們選用不發螢光的奈米鑽石(ND)進行實驗，因為 rFND 在 540 nm 有吸收，會造成 MTT 檢驗的干擾，所以使用不發螢光的奈米鑽石進行實驗。除質子撞擊之外，ND 亦進行退火和酸洗的步驟，以確保表面特性和 rFND 相同。圖 4-9 是不同表面官能基 40 nm 和 140 nm ND 和細胞作用後的 MTT 檢驗結果，兩種大小的 ND 反應濃度是 10 µg/mL，反應時間分別是 0、24、48 和 72 小時。圖 4-9 的 MTT 檢驗結果顯示，細胞和 40 nm 和 140 nm ND-COOH 作用 72 小時後，細胞活性和控制實驗的結果並無差異，顯示 ND-COOH 不具細胞毒性。40 nm 和 140 nm ND-Tf 和 ND-NH₂ 和細胞作用 48 小時後，相較於控制實驗，細胞活性明顯減少 50%，顯示 ND-Tf 和 ND-NH₂ 進入細胞後，抑制細胞的生長，使得細胞的數目大量減少。此外，我們也利用細胞計數的方式，直接估計細胞的數目。圖 4-10 是不同表面官能基 40 nm 和 140 nm ND 和細胞作用後的細胞計數的結果，細胞和 40 nm 和 140 nm 的 ND-Tf 和及 ND-NH₂ 作用 48 小時後，細胞數目確實減少 50%。

奈米鑽石大量進入細胞產生細胞生長抑制的現象，跟 Nan 等人的報導相符 [89]。200 nm 二氧化矽奈米管(silica nanotube，簡稱 SNT)在反應濃度 5 µg/mL 的情況下，和細胞反應 72 小時後並大量進入細胞，利用 MTT 檢驗亦觀察到抑制細胞生長的現象，細胞活性減少 63%。此外，Faklaris 等人顯示 ND-COOH 在很高的反應濃度 480 µg/mL，觀察到細胞活性降低 20% [37]。雖然 ND-COOH 的胞吞作用效率很低，但是在高的反應濃度下，亦會有抑制細胞生長的效應。儘管奈米

鑽石大量進入細胞後，會產生細胞生長抑制的現象，但是製作成標靶探針，專一辨認癌細胞，可抑制其生長速度，在治療方面仍有很大的應用價值。

4-5 奈米鑽石的光毒性

螢光奈米鑽石透過 Tf-TfR 作用力，製作成標靶探針，可專一性大量進入細胞，並觀察到明顯的抑制細胞生長現象，但是被標靶的癌細胞仍然存活。若此時被標靶的癌細胞能選擇性且有效地被殺死，在標靶治療方面，將有很大應用的價值。紅光奈米鑽石的光吸收範圍是 400 – 650 nm [20]，我們預期 rFND 有潛力吸收此範圍的光轉換成熱能，產生光熱效應，將被標靶的癌細胞經由光照射後被殺死。細胞自體吸收的範圍是 300 – 500 nm [90]，所以我們將選用大於 500 nm 的照射光，以降低照射光對細胞的傷害。我們用濾光片選擇 100 W 高壓汞燈兩個波段，分別是 510 – 560 nm 和 590 – 650 nm，照射的功率密度皆是 7 W/cm^2 ，以測試 rFND 是否產生光毒性。細胞培養在含 10% 胎牛血清的培養基中，8 孔腔體玻片上的每個孔皆有 5×10^4 細胞，和 140 nm rFND-Tf 反應 6 小時，反應濃度是 $1 \mu\text{g/mL}$ ，使 140 nm rFND-Tf 進入細胞。反應結束後，將未反應的 rFND-Tf 用培養基洗去，置換成新的培養基。細胞樣品放在顯微鏡上的細胞培養箱(incubator)中，進行連續照光 3 小時，觀察細胞形態的變化，以判別 rFND 是否產生光毒性。

圖 4-11 分別是(a)控制實驗組和(b)細胞和 140 nm rFND-Tf 作用的光毒性測試結果，照射光的波段是 510–560 nm。圖 4-11(a)的控制實驗組結果顯示，細胞形態不因連續照射 1 小時而改變，表示在此照射波段 510 – 560 nm 和功率密度 7 W/cm^2 的情況下，照射光不會造成細胞的傷害。我們進一步連續照射 3 小時，亦無觀察到細胞形態的改變。比較圖 4-11(a)和圖 4-11(b)的結果，被 140 nm rFND-Tf 標定的細胞經由照射 1 小時後，細胞形態明顯萎縮，顯示細胞因 rFND 而被毒殺。我們也進行照射光波段 590 – 650 nm 的光毒性測試，我們發現細胞無論是否和 140 nm rFND-Tf 反應，連續照射細胞 3 小時後，細胞的形態都不改變，表示 rFND 在波段 590 – 650 nm 的照射下，不會產生光毒性。由圖 4-11 的結果歸納，rFND

吸收波段 510 – 560 nm 會產生光毒性，而此波段的吸收源自於鑽石晶格中的孤立氮原子，在吸收不轉換成光能的情況下，而是轉換成熱能將癌細胞殺死。波段 590–650 nm 的吸收源自於 rFND 內的「氮-空缺」中心，其螢光的量子產率(quantum yield)接近 1 [91]，推測將吸收轉換成螢光，所以對細胞不造成傷害。

連續照射 1 小時對治療的應用性不佳，我們將提高照射光源的功率密度，以縮短照射的時間。我們選用 532 nm 雷射作為光源，功率密度範圍是 25 – 75 W/cm²，照射時間設定是 10 分鐘。我們除了觀察細胞形態的變化來判別細胞是否死亡，也利用染劑輔助判別細胞的存活。細胞在照射結束後，隨即加入染劑 Calcein AM 和 EthD-1，分別是代表活細胞和死細胞的染劑。Calcein AM 會進入細胞質，和活細胞質內的酵素作用後發出綠色螢光。死細胞的細胞膜會破損，EthD-1 會穿透進去到達細胞核，跟核酸作用後發出紅色螢光。圖 4-12 是雷射 532 nm 照射細胞的控制實驗結果，照射功率密度分別是(a) 50 W/cm² 和(b) 75 W/cm²，黃色區域是照射範圍。圖 4-12(a)的結果顯示，細胞接受 532 nm 功率密度是 50 W/cm² 照射 10 分鐘，細胞的形態在射結束後 30 分鐘和 3 小時並無改變，且細胞內可觀察到綠色螢光，表示細胞是存活的。圖 4-12(b)是將照射功率密度提高至 75 W/cm² 的控制實驗結果，照射結束後 30 分鐘，細胞的形態明顯萎縮，顯示細胞已被照射光殺死。但是染色 3 小時後仍觀察到細胞質內的綠色螢光，且細胞核並無觀察到紅色螢光。從細胞的形態可判定細胞已死亡，但是染劑的判定卻顯示為活細胞。為了確認細胞已死亡，我們將細胞繼續培養 24 小時，以觀察照射區的細胞是否會繼續增生，結果發現照射區的細胞並無細胞增生的現象，表示細胞已經死亡。此外，細胞接受 75 W/cm² 照射結束後 12 小時才進行染色，細胞核就可觀察到紅色螢光，且細胞質內並無觀察到綠色螢光，顯示細胞是死亡的狀態。我們推測細胞接受 75 W/cm² 照射 10 分鐘後，細胞已進入死亡程序，但細胞膜保持完整，且細胞質內的酵素活性仍在，所以染色 3 小時後，仍然觀察到細胞質內的綠色螢光，而細胞核無紅色螢光。因為細胞在 50 W/cm² 照射 10 分鐘可繼續存活，所以被標靶的癌細胞的照射功率密度是低於 50 W/cm²。圖 4-13 是 140 nm rFND-Tf 和細胞

作用 6 小時後，在不同功率密度照射下的結果。rFND-Tf 的反應濃度是 $\mu\text{g/mL}$ ，照射功率密度分別是(a) 50 W/cm^2 和(b) 25 W/cm^2 。圖 4-14(a)和圖 4-14(b)的結果顯示，在 50 W/cm^2 和 25 W/cm^2 的照射結束後的 30 分鐘和 3 小時，細胞的形態明顯萎縮。細胞染色 3 小時後，細胞質內已無綠色螢光，細胞核可觀察到紅色螢光，表示細胞已經死亡。比較圖 4-13(a)的控制實驗結果，照射功率密度降低至一半，仍可有效殺死被標靶的癌細胞，並促使細胞質內的酵素活性消失。我們進一步將 140 nm rFND-Tf 的反應濃度降低至 $1 \mu\text{g/mL}$ ，在照射功率密度 25 W/cm^2 的情況下，仍可有效殺死細胞，顯示 140 nm rFND-Tf 反應濃度降低 10 倍後，依然產生足夠的熱能來殺死細胞。

在光熱治療的研究中，金奈米粒子(gold nanoparticles)是最常使用的材料。rFND 殺死細胞的效率和球型金奈米粒子相近 [46]，都是吸收小於 550 nm 的波段，照射功率密度皆在 $20 - 80 \text{ W/cm}^2$ ，可在 10 分鐘內殺死被標靶的癌細胞。小於 550 nm 的波段是屬於可見光範圍，對於細胞的穿透性較差，無法提供較深層的治療。其他型態的金奈米粒子將吸收波段位移到近紅外光(near infrared，簡稱 NIR)，例如柱狀金奈米粒子(gold nanorod)、核殼金奈米粒子(core-shell gold nanoparticle)和籠狀金奈米粒子(gold nanocage) [48, 92, 93]，在相同的功率密度下可有效殺死被標靶的癌細胞，因為近紅外光對細胞的穿透性較佳，所以可提供更深層的治療。雖然 rFND 在光熱治療方面無法提供較深層的治療，相較之下的優勢在於：表面功能化(surface functionalized)較容易，不需進行複雜的表面化學處理，就可將蛋白質固定在螢光奈米鑽石表面，製作成專一性的探針。除此之外，rFND 同時具備螢光影像和光熱治療的能力。

4-6 拉曼光譜

我們推測奈米鑽石的光毒性是光熱效應，將吸收光轉換成熱能。我們利用拉曼光譜技術，觀察在不同雷射的激發功率下，奈米鑽石的史托克拉曼(Stokes Raman)和反史托克拉曼(anti-Stokes Raman)訊號是否有改變，便可推算出奈米鑽

石的溫度是否因照射而上升。拉曼實驗的激發光源是 532 nm 雷射，奈米鑽石的史托克拉曼訊號的位置在 572.6 nm，而 rFND 的螢光範圍落在 550 – 800 nm，所以 rFND 的螢光會覆蓋史托克拉曼訊號。因此，我們選用不發螢光的奈米鑽石進行拉曼實驗，主要是避免螢光的干擾。樣品製作是將濃度 1 µg/mL 的奈米鑽石水溶液 10 µL 滴在蓋玻片上，使其自然乾燥。測量拉曼訊號的情況有兩種，分別是 (1) 大氣室溫下，是為了直接觀察溫度是否會上升，(2) 37 °C 水中，是模擬活體細胞中的狀況，溫度由顯微鏡上的細胞培養箱來設定。激發光源的功率範圍是 0.69 – 2.67 mW，測量奈米鑽石的史托克拉曼和反史托克拉曼訊號在不同激發功率下的強度，以用來估計奈米鑽石被照射下的溫度，計算奈米鑽石溫度的公式如下：

$$I_{anti-stokes} / I_{stokes} = [(v_l + v_{vib})^4 / (v_l - v_{vib})^4] \exp(-hv_{vib} / kT) \quad (4-2)$$

其中 $I_{anti-stokes}$ 和 I_{stokes} 分別是奈米鑽石的反史托克拉曼和史托克拉曼訊號的強度， v_l 是雷射的波數(wavenumber)， v_{vib} 是鑽石晶格中碳-碳鍵的伸縮振動(C-C stretching vibration)波數，其數值為 1332 cm^{-1} ， k 是波茲曼常數， T 是絕對溫度。由公式可看出，當溫度升高， $I_{anti-stokes}/I_{stokes}$ 的比值會變大。所以在不同激發功率下，將測得拉曼光譜的 I_{stokes} 強度歸一化後，預期會觀察到 $I_{anti-stokes}$ 的強度隨激發功率變大而增加。圖 4-14 分別是不同的激發功率的(a)拉曼光譜和(b)溫度推算。圖 4-14(a)中的影像是測量時的奈米鑽石，粒子的大小約 5 µm，和 rFND 聚集在細胞內的大小相似。由圖 4-14(a)的拉曼光譜可發現，將 I_{stokes} 的強度歸一化後， $I_{anti-stokes}$ 的強度確實隨激發功率增加而變大，顯示奈米鑽石的溫度隨之上升，亦證實奈米鑽石能將吸收轉換成熱能。圖 4-14(b)是奈米鑽石的溫度推算結果，顯示奈米鑽石的溫度隨雷射的激發功率增加而線性成長。經由線性適解可得到兩種實驗狀態的起始溫度，溫度的線性適解的公式如下：

$$y = A + Bx \quad (4-3)$$

其中 y 是特定激發功率時的溫度， A 是起始溫度， B 是斜率，代表溫度隨激發功率的變化程度， x 是激發功率(mW)。兩種測量狀態所得到的線性適解結果分別如下：

$$(1) \text{大氣室溫下：} y_1 = 28.8 + 33.5x_1 \quad (4-4)$$

$$(2) \text{37 }^\circ\text{C 水中：} y_1 = 37.4 + 23.7x_1 \quad (4-5)$$

適解得到的室溫約是 29°C ，水中的溫度約是 37°C ，皆和實際的溫度相符，亦顯示測量的準確性。由圖 4-14 的拉曼光譜測量的結果，證實奈米鑽石有光熱效應。我們亦嘗試測量細胞中奈米鑽石的拉曼訊號，因細胞內的散射嚴重，造成 $I_{anti-stokes}$ 的訊號微弱，所以無法獲得可靠的溫度計算。



4-7 結論

利用動態光散射儀和界面電位分析儀，成功鑑定製作的 40 nm 和 140 nm 三種表面官能基 rFND，表面分別是帶負、正電的 rFND-COOH 和 rFND-NH₂，以及蛋白質複合物 rFND-Tf。在含有 10% 胎牛血清的培養基中，40 nm 和 140 nm 的 rFND-COOH 和細胞膜間有電荷斥力，降低胞吞作用的效率，也顯示較小的奈米鑽石不會增加胞吞作用的效率。相反地，不含胎牛血清的培養基使細胞飢餓，40 nm 和 140 nm 的 rFND-COOH 因非專一性作用而進入細胞。40 nm 和 140 nm 的 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 在含 10% 胎牛血清的培養基中，可有效率的進入細胞，途徑分別是受體媒介胞吞作用和巨胞飲作用。利用流式細胞儀的分析，我們發現 rFND-Tf 的胞吞作用效率約是 rFND-NH₂ 的 2 倍。

我們發現 40 nm 和 140 nm 的 rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 有效率的進入細胞，可抑制細胞的生長。在反應 48 小時後，利用 MTT 檢驗和細胞計數的方法，觀察到

細胞的數目減少 50 %。此外，我們首次發現奈米鑽石的光熱效應，可吸收小於 550 nm 的光轉換成熱能，將被標靶的癌細胞有效殺死。我們利用拉曼光譜觀察奈米鑽石的光熱效應，直接證實奈米鑽石因光的照射而溫度上升。總歸以上奈米鑽石的特性，專一性進入細胞後，不僅可抑制癌細胞的生長，還可藉由光熱效應選擇性的將癌細胞有效殺死，在標靶治療方面，提供新的平台。



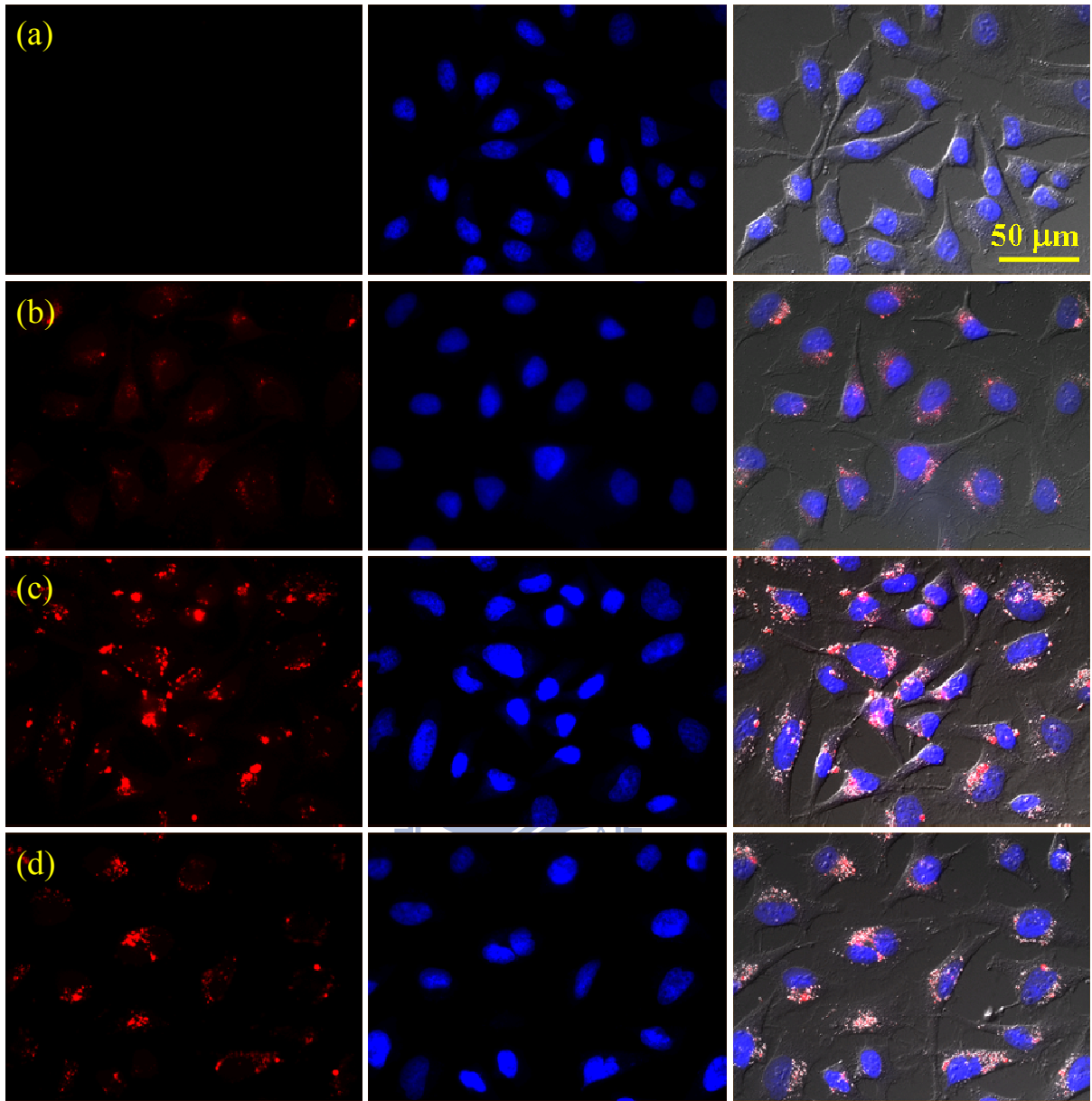


圖 4-1 細胞螢光影像，(a) 140 nm rFND-COOH，(b) 140 nm rFND-COOH，不含胎牛血清，(c) 140 nm rFND-Tf，(d) 140 nm rFND-NH₂。反應濃度皆為 10 μg/mL，反應時間 6 小時。第一、二欄分別是 rFND 和細胞核染劑的螢光影像，第三欄是螢光影像和微分干涉對比影像的重疊圖。

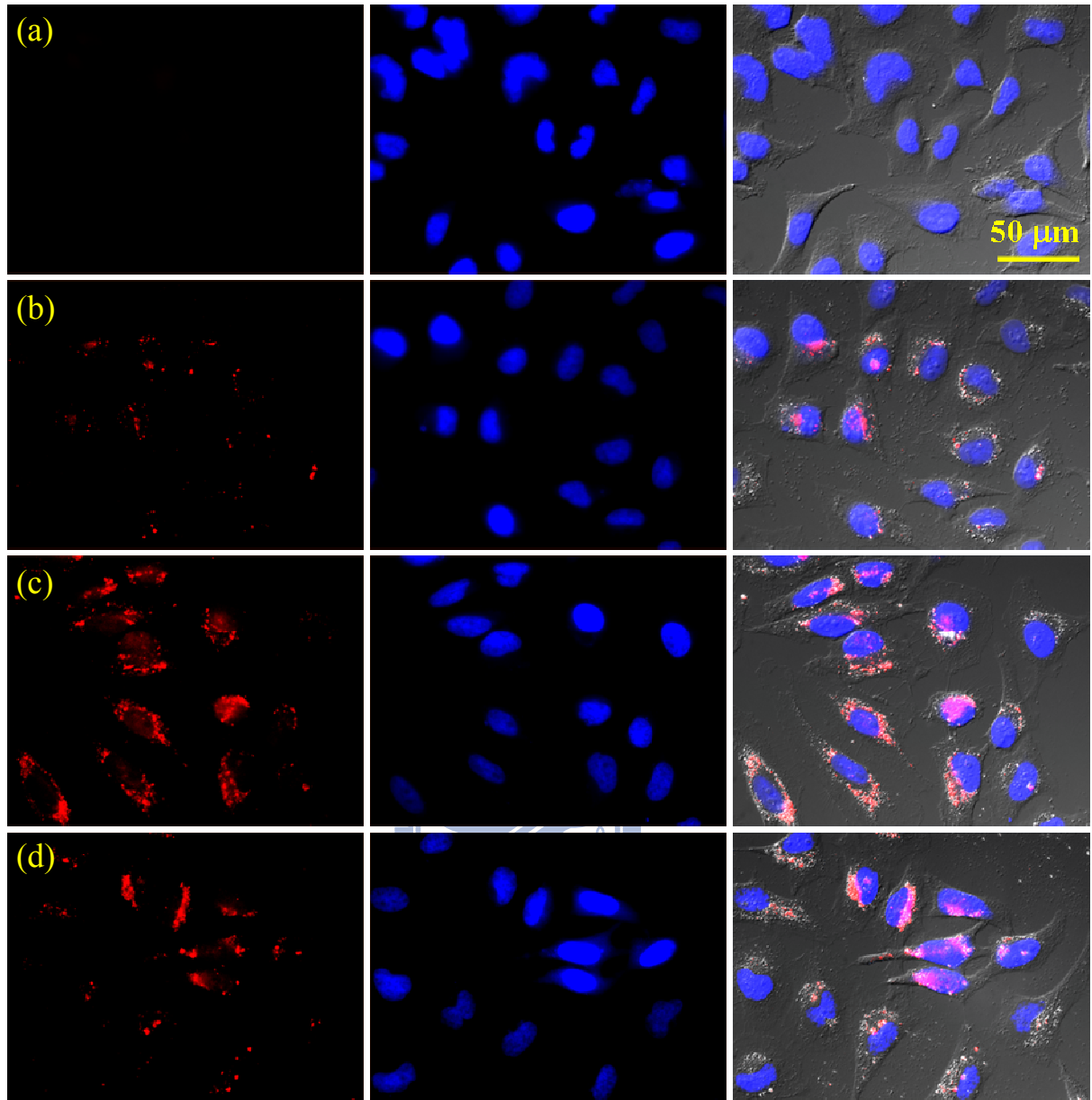


圖 4-2 細胞螢光影像，(a) 40 nm rFND-COOH，(b) 40 nm rFND-COOH，不含胎牛血清，(c) 40 nm rFND-Tf，(d) 40 nm rFND-NH₂。反應濃度皆為 10 μg/mL，反應時間 6 小時。第一、二欄分別是 rFND 和細胞核染劑的螢光影像，第三欄是螢光影像和微分干涉對比影像的重疊圖。

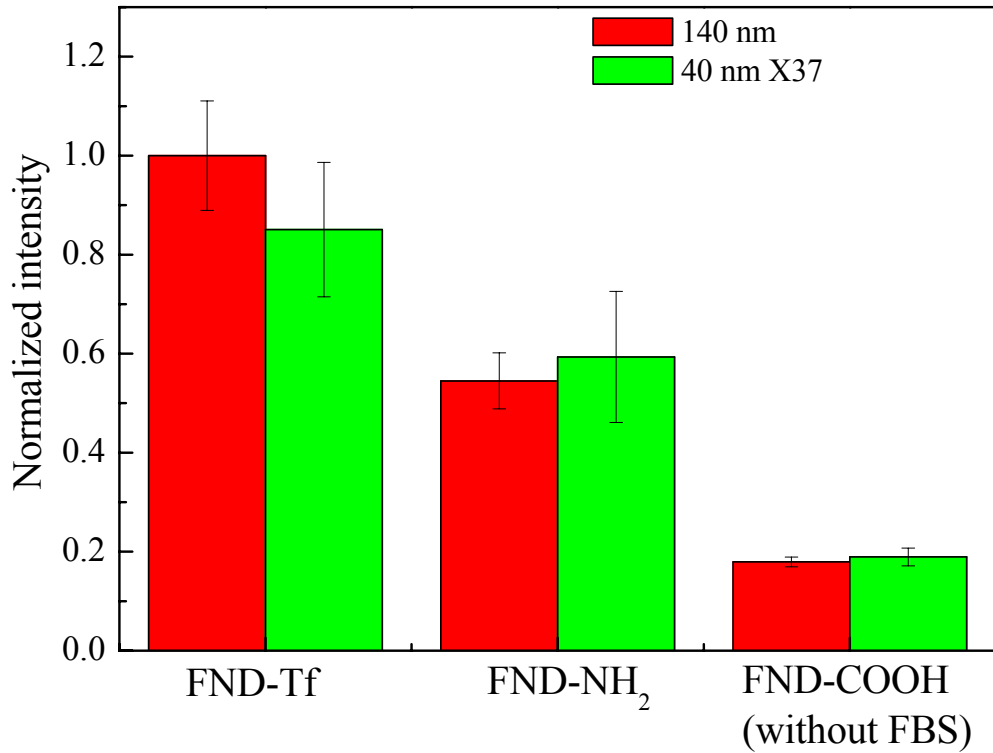


圖 4-3 不同表面官能基 rFND 的流式細胞儀分析結果，紅色和綠色分別是 140 nm 和 40 nm rFND，反應濃度是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，反應時間 6 小時，40 nm rFND 的螢光強度乘以 37 倍之後加以比較，每組實驗都是統計 5×10^3 個細胞的結果。

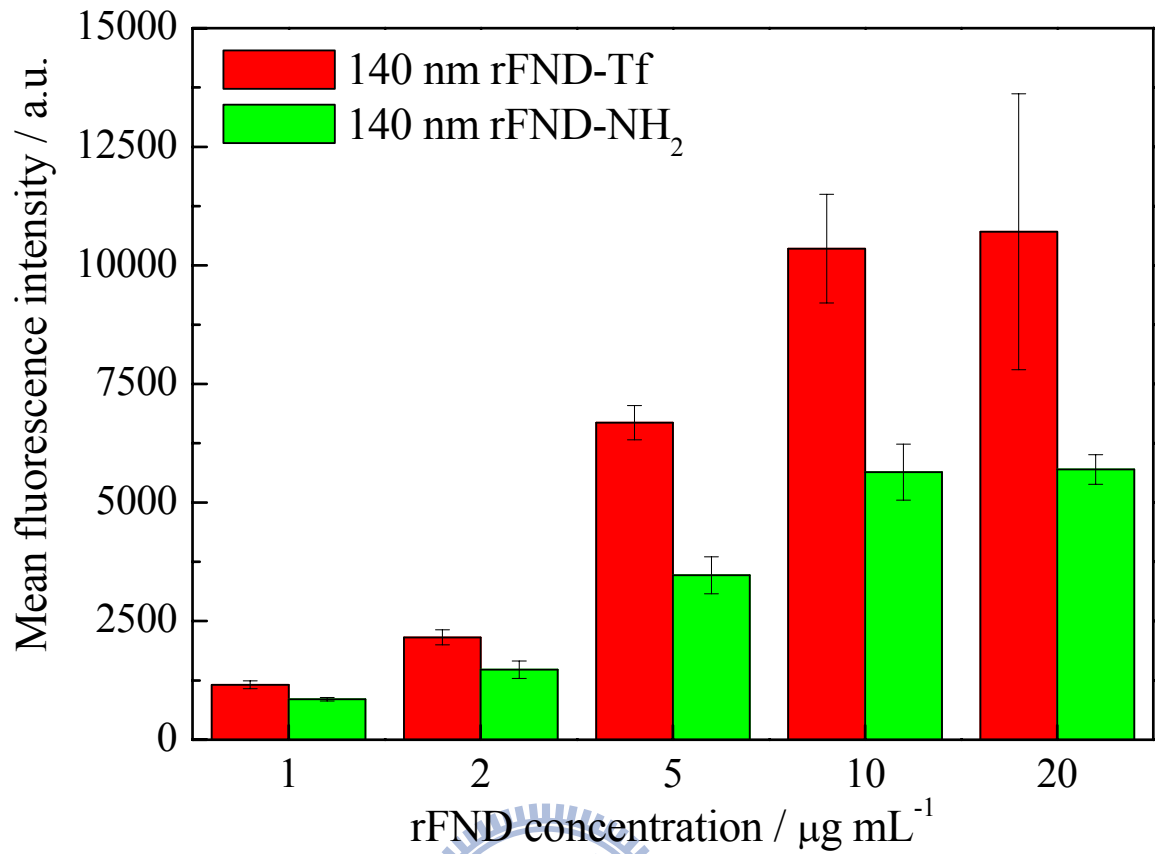


圖 4-4 紅光奈米鑽石反應濃度的流式細胞儀分析結果，紅色和綠色分別是 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂，反應時間 6 小時，反應濃度是 1、2、5、10 和 20 $\mu\text{g/mL}$ ，每組實驗結果皆是統計 5×10^3 個細胞的結果。

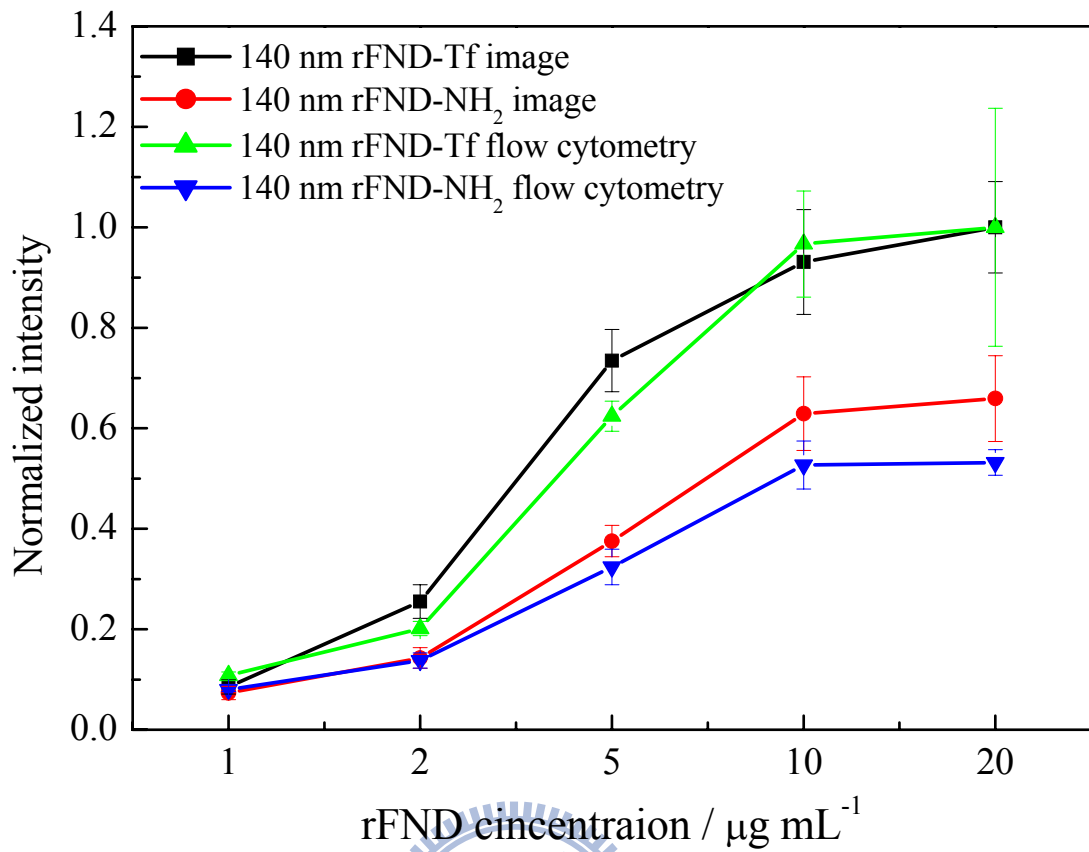


圖 4-5 細胞螢光影像和流式細胞儀對 rFND 反應濃度分析的比較圖，黑色和紅色曲線分別代表螢光影像分析 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的結果，綠色和藍色分別代表流式細胞儀分析 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂ 的結果。

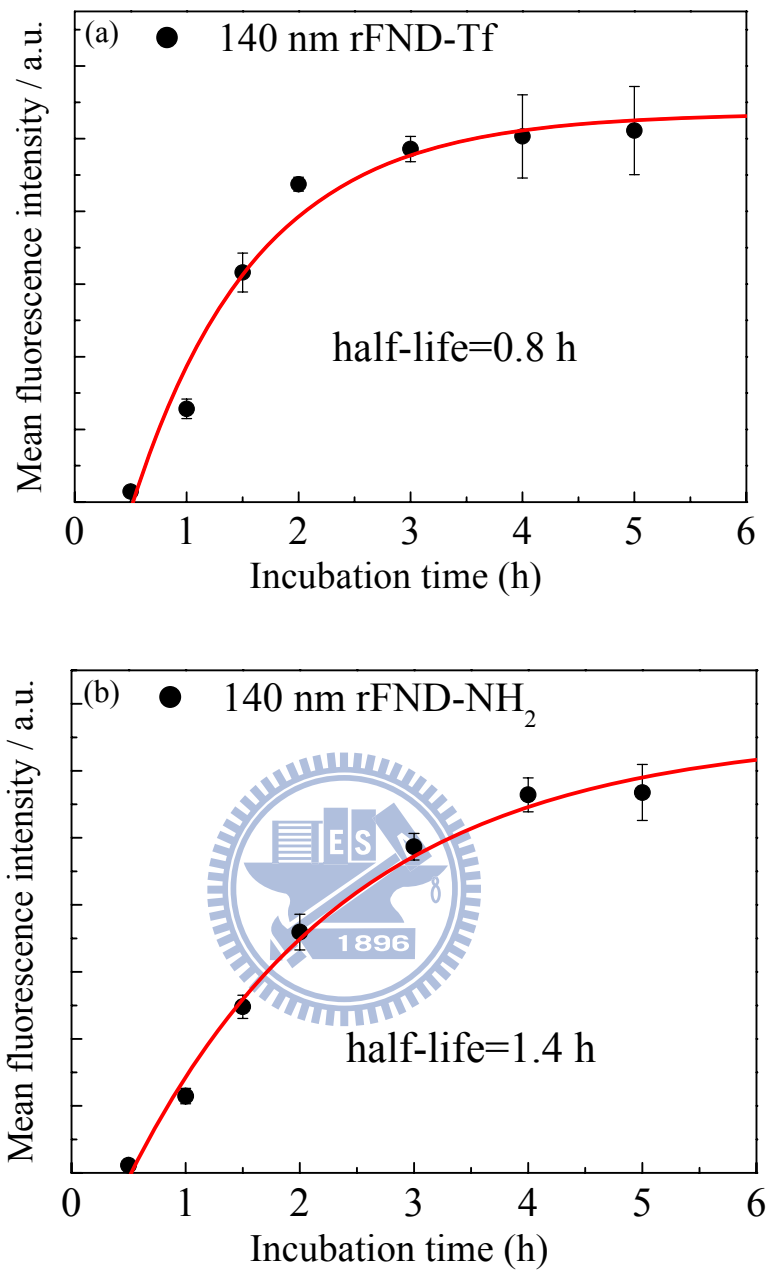
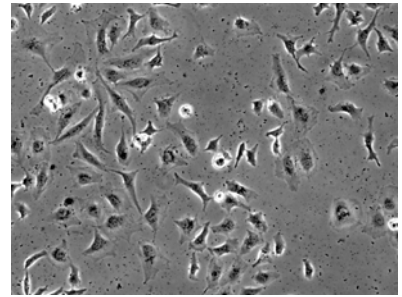
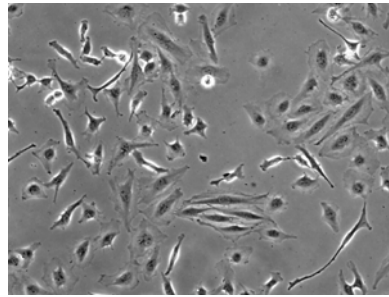
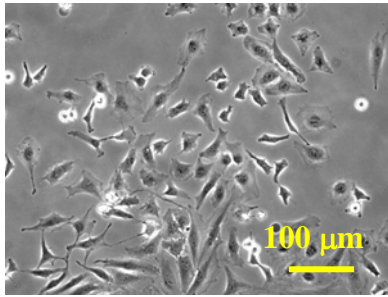


圖 4-6 紅光奈米鑽石反應時間的流式細胞儀分析結果，(a) 140 nm rFND-Tf，(b) 140 nm rFND-NH₂，反應濃度皆是 10 μ g/mL，反應時間是 0.5、1、1.5、2、3、4 和 5 小時，每組實驗是統計 5×10^3 個細胞的結果。

(a) rFND-COOH 0 $\mu\text{g/mL}$

10 $\mu\text{g/mL}$

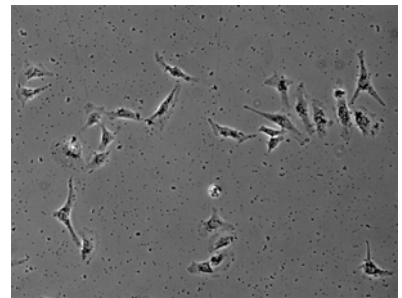
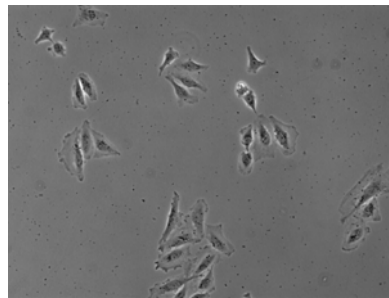
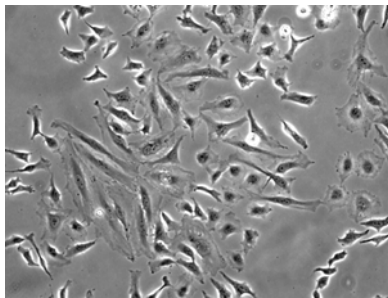
100 $\mu\text{g/mL}$



(b) rFND-Tf 0 $\mu\text{g/mL}$

1 $\mu\text{g/mL}$

10 $\mu\text{g/mL}$



(c) rFND-NH₂ 0 $\mu\text{g/mL}$

1 $\mu\text{g/mL}$

10 $\mu\text{g/mL}$

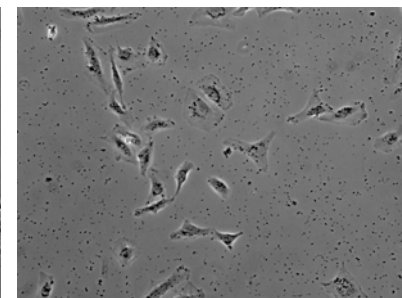
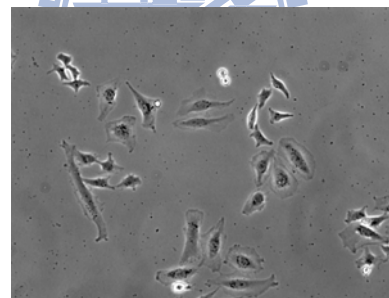
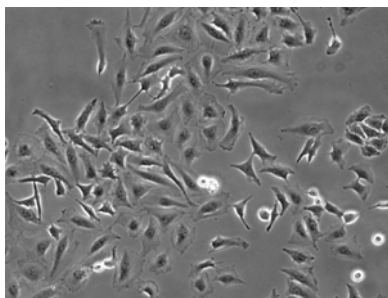
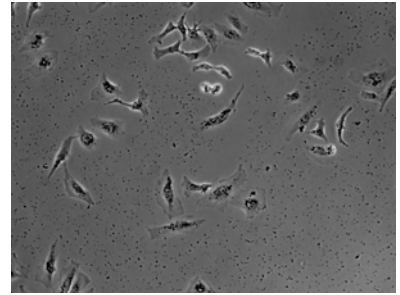
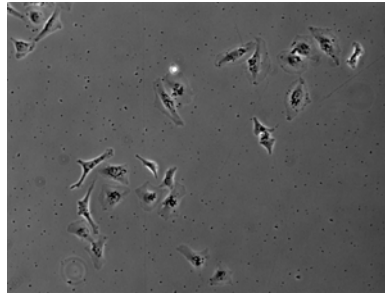
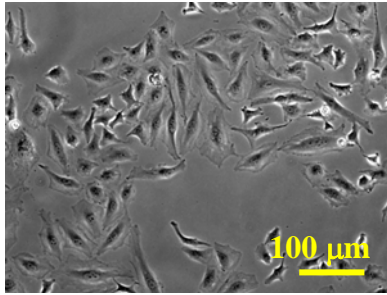


圖 4-7 不同表面官能基的 140 nm rFND 對細胞毒性的細胞影像，分別是(a) 140 nm rFND-COOH，反應濃度是 0、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ ，(b)和(c)分別是 140 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂，反應濃度皆為 0、1 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 。rFND 和細胞作用 48 小時。

(a) rFND-Tf 0 $\mu\text{g/mL}$

1 $\mu\text{g/mL}$

10 $\mu\text{g/mL}$



(b) rFND-NH₂ 0 $\mu\text{g/mL}$

1 $\mu\text{g/mL}$

10 $\mu\text{g/mL}$

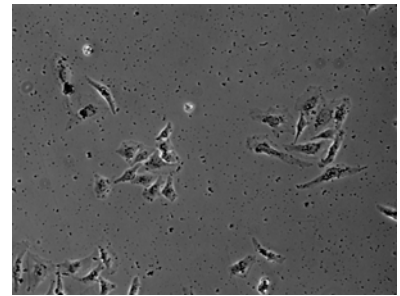
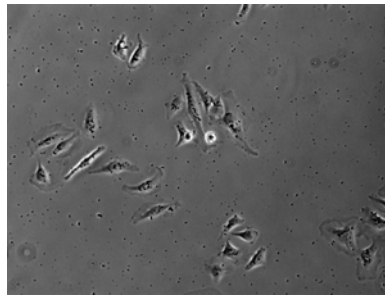
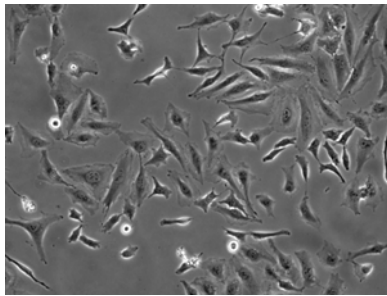


圖 4-8 不同表面官能基的 40 nm rFND 對細胞毒性的細胞影像，(a)和(b)分別是 40 nm rFND-Tf 和 rFND-NH₂，反應濃度皆是 0、1、10 $\mu\text{g/mL}$ 。rFND 和細胞作用 48 小時。

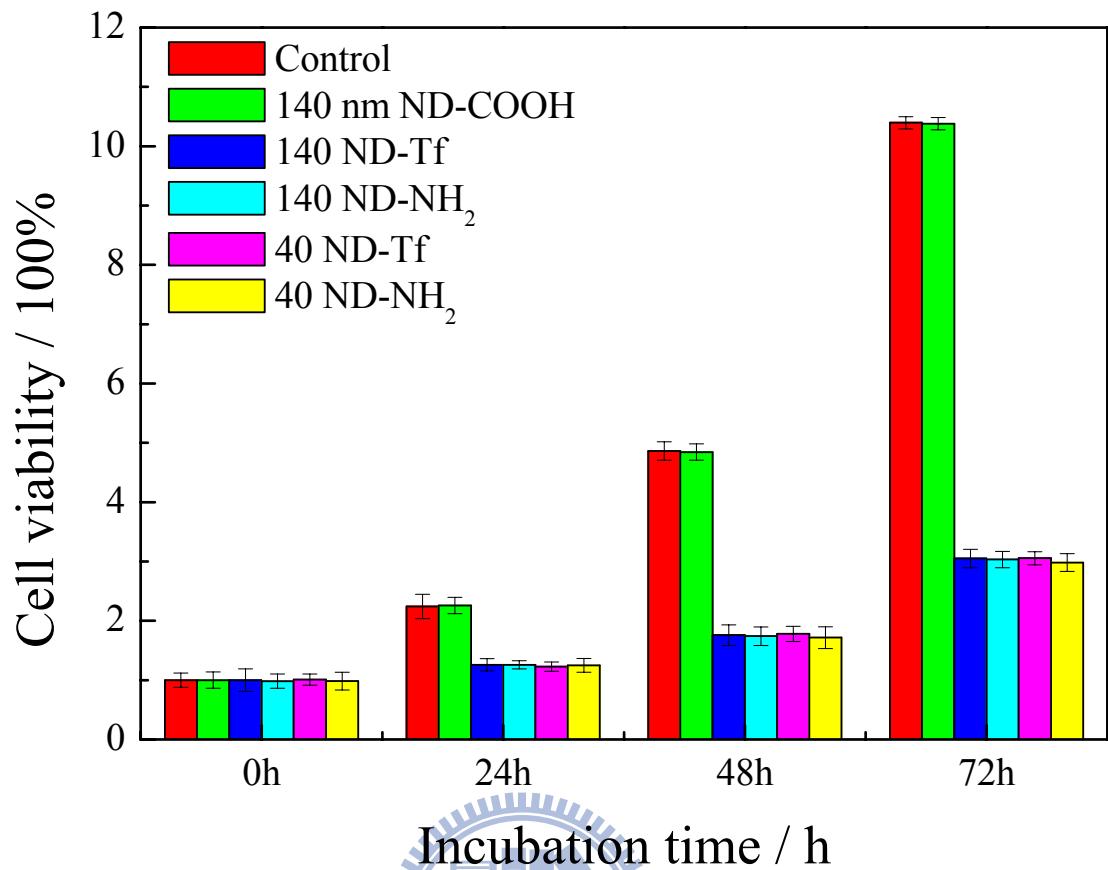


圖 4-9 不同表面官能基 rFND 對細胞活性的 MTT 檢驗結果，紅色是控制實驗，綠色、藍色和青綠色分別是 140 nm 的 ND-COOH、ND-Tf 和 ND-NH₂ 和細胞作用的結果，粉紅色和黃色分別是 40 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH₂ 和細胞作用的結果，奈米鑽石的反應濃度皆是 10 μg/mL，分別在第 0、24、48 和 72 小時進行 MTT 檢驗。

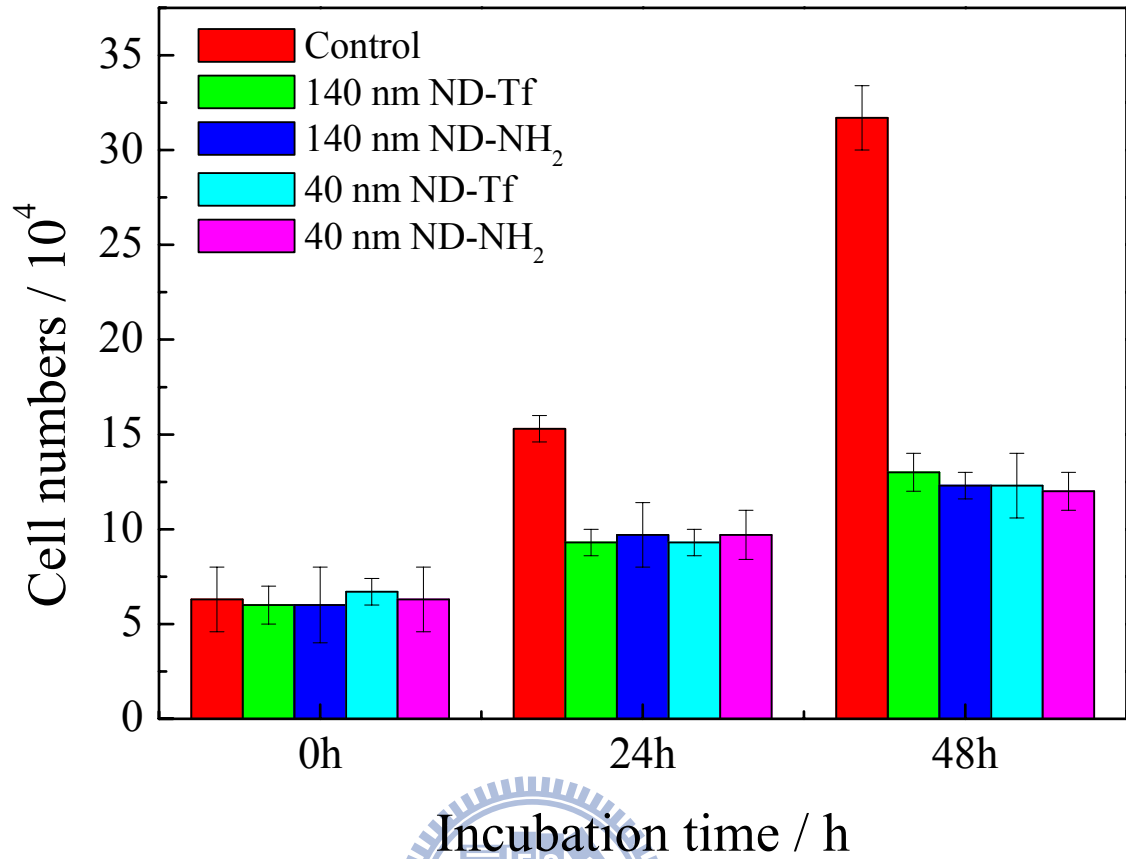
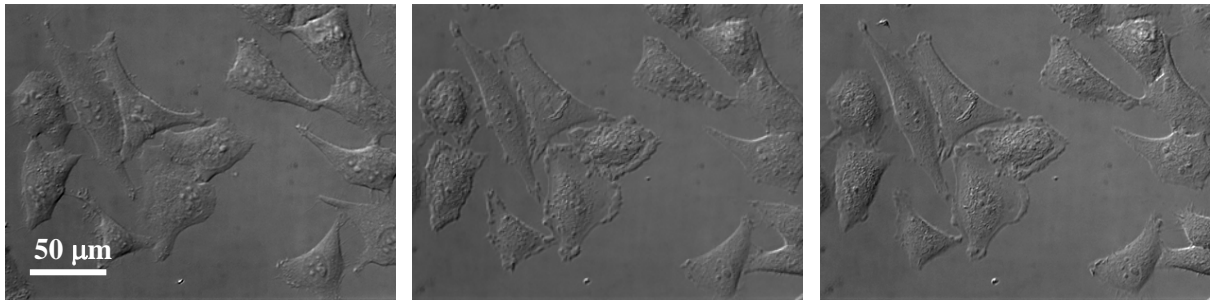
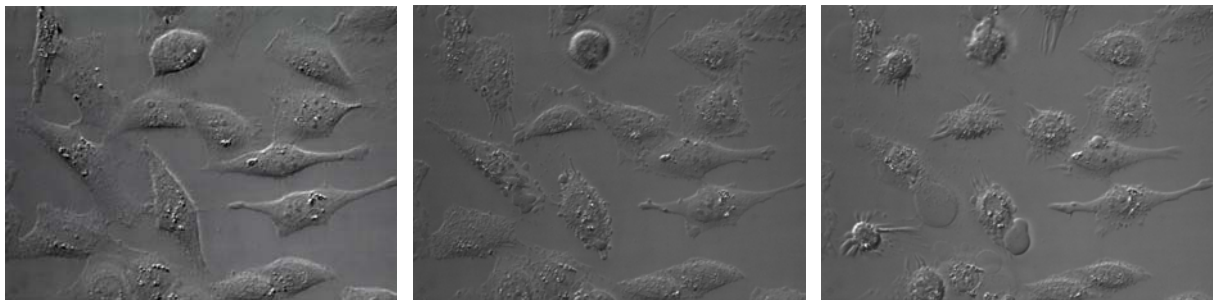


圖 4-10 不同表面官能基 rFND 和細胞作用的細胞計數結果，紅色是控制實驗，綠色和藍色分別是 140 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH₂ 和細胞作用的結果，青綠色和粉紅色分別是 40 nm 的 ND-Tf 和 ND-NH₂ 和細胞作用的結果，奈米鑽石的反應濃度皆是 10 μg/mL，別在第 0、24 和 48 小時計算細胞的數目。

(a)控制實驗，無添加 140 nm rFND-Tf



(b)添加 1 μg/mL 的 140 nm rFND-Tf



0 分鐘

30 分鐘

60 分鐘

圖 4-11 奈米鑽石的光毒性測試細胞影像結果，(a)控制實驗，細胞不和 140 nm rFND-Tf 作用，(b)細胞和 1 μg/mL 的 140 nm rFND-Tf 作用 6 小時。照射光源是 100 W 高壓汞燈，照射光的波段是 510–560 nm，功率密度是 7 W/cm²，連續照射 1 小時。

染色後 30 分鐘

染色後 3 小時

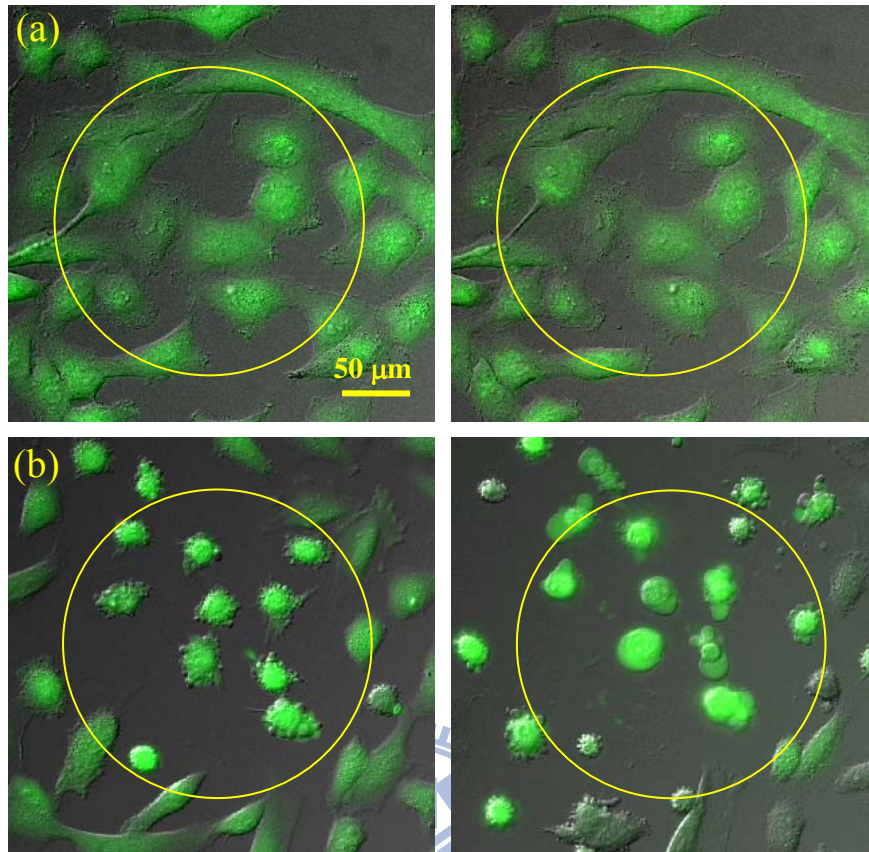


圖 4-12 照射光的毒性測試細胞影像結果，微分干涉對比和螢光影像重疊圖。(a)和(b)皆是控制實驗組，細胞不和 140 nm rFND-Tf 作用。照射光源是 532 nm 雷射，照射時間是 10 分鐘，黃色區域是照射範圍，雷射的功率密度分別是(a) 50 W/cm^2 和(b) 75 W/cm^2 。

染色後 30 分鐘

染色後 3 小時

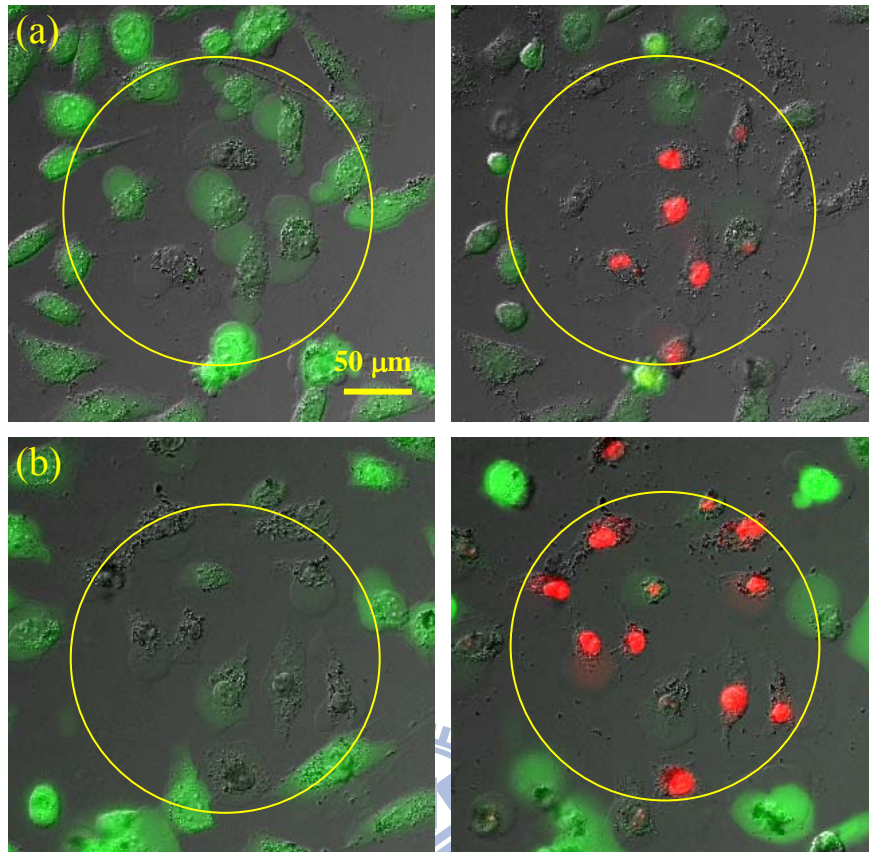


圖 4-13 奈米鑽石的光毒性測試細胞影像結果，微分干涉對比和螢光影像重疊圖。細胞和 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 140 nm rFND-Tf 作用 6 小時後進行光照射。照射光源是 532 nm 雷射，照射時間是 10 分鐘，黃色區域是照射範圍，雷射的功率密度分別是(a) 25 W/cm^2 和(b) 50 W/cm^2 。

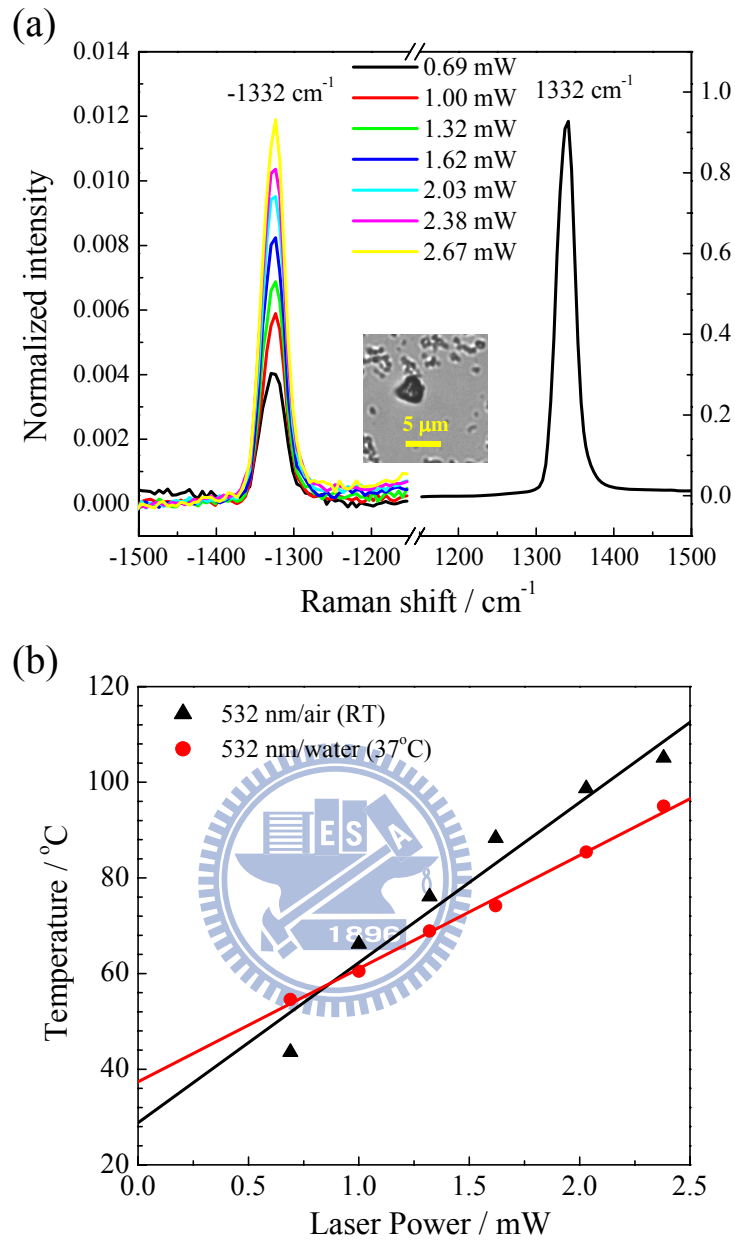
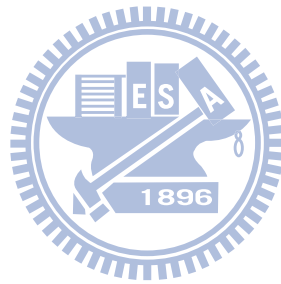


圖 4-14 奈米鑽石拉的曼光譜和溫度分析結果，激發光源是 532 nm 雷射，激發功率範圍是 0.69 – 2.67 mW。(a)不同激發功率下的拉曼光譜，將史托克拉曼(1332 cm^{-1})訊號的強度歸一化，觀察反史托克拉曼(-1332 cm^{-1})訊號強度的變化，中間的影像是測量時的奈米鑽石。(b)不同功率激發下，計算所得到的奈米鑽石溫度，以及線性適解曲線。

表 4-1 40 nm 和 140 nm 螢光奈米鑽石的粒徑大小和表面電位。

種類	140 nm rFND	140 nm rFND 表	40 nm rFND	40 nm rFND 表
	大小 (nm)	面電位 (mV)	大小 (nm)	面電位 (mV)
rFND-COOH	144 ± 8	-48.3 ± 1.3	41 ± 3	-38.3 ± 1.5
rFND-NH ₂	166 ± 9	-25.4 ± 0.9	61 ± 3	-17.8 ± 0.7
rFND-Tf	222 ± 12	-51.6 ± 0.9	187 ± 10	-43.9 ± 1.5



第五章 螢光奈米鑽石的螢光共振能量轉移研究

5-1 綠光奈米鑽石

本研究所使用直徑是 70 nm 的型式 Ia 天然奈米鑽石，製作成綠光奈米鑽石進行研究。型式 Ia 天然奈米鑽石的氮含量濃度約 100 – 1000 ppm，氮原子在鑽石晶格中，主要是以兩兩相鄰排列。綠光奈米鑽石的發光中心是「氮-空缺-氮」中心，主要利用清華大學原子科學發展中心加速器實驗室的加速器，2.5 MeV 質子撞擊天然奈米鑽石薄膜，在鑽石晶格中產生空缺，再經由真空高溫退火，使晶格重新排列，形成「氮-空缺-氮」中心。濃度 10 mg/mL 的天然奈米鑽石水溶液，取 50 μ L 滴在矽晶片上，使其自然乾燥，形成天然奈米鑽石薄膜。2.5 MeV 質子撞擊的粒子總數約是 10^{16} ion/cm²，撞擊電流是 6 μ A。再經由真空 6×10^{-3} torr 下，溫度 800 °C 退火 4 小時，接下來在大氣下 600 °C 退火 2 小時，即完成綠光奈米鑽石的製作。圖 5-1 是「氮-空缺-氮」中心的模型圖，氮原子在晶格中兩兩相鄰，和相鄰的空缺形成「氮-空缺-氮」中心。圖 5-2 是綠光奈米鑽石螢光光譜，激發光源是 488 nm 氬離子雷射，放出綠色螢光範圍在 500 – 600 nm，我們所得到的結果跟文獻吻合 [19]。根據文獻記載，「氮-空缺-氮」中心具有高度的螢光穩定性，不會有光褪色和光閃視(photoblinking)的螢光特性 [19]。

5-2 螢光奈米鑽石的能量轉移

綠光奈米鑽石放射的螢光波長範圍 500 – 600 nm，跟紅光奈米鑽石的吸收範圍 400 – 650 nm 有良好的重疊，可組成螢光共振能量轉移的配對，gFND 和 rFND 在 FRET 中的角色分別是供體和受體。我們設計將抗體和抗原分別固定在 gFND 和 rFND 表面，利用抗原-抗體作用力使 gFND 和 rFND 相結合，測量 gFND 的螢光生命期變化，以觀察螢光奈米鑽石間是否有能量轉移的效應。我們所使用的 gFND 和 rFND 的大小分別是 70 nm 和 140 nm，選用的抗體和抗原分別是抗運

鐵蛋白免疫球蛋白 G 和運鐵蛋白(Tf)，分別將其固定在 gFND 和 rFND 表面，製作成 gFND-anti-Tf IgG 和 rFND-Tf。我們利用光動態散射儀測量 gFND 和 rFND 的大小，以確認是否有將蛋白質固定在表面。表 5-1 是 gFND 和 rFND 粒徑大小的測量結果，gFND-COOH 和 rFND-COOH 的大小分別是 72 ± 7 nm 和 144 ± 8 nm，gFND-anti-Tf IgG 和 rFND-Tf 的大小分別是 210 ± 11 和 222 ± 12 ，顯示蛋白質已固定在 gFND 和 rFND 的表面，其厚度分別是 70 nm 和 40 nm。抗運鐵蛋白免疫球蛋白 G 和運鐵蛋白在水溶液中的大小約是直徑 10 nm 和 7 nm，實驗結果表示多層蛋白質固定在奈米鑽石表面。

我們將相同濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 gFND-anti-Tf IgG 和 rFND-Tf 溶液依體積比 1:1 混合，溶液的總體積是 0.4 mL，反應時間是 1 小時，反應環境是 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸鹽水溶液，在溶液中 gFND-anti-Tf IgG 和 rFND-Tf 會因抗體-抗原作用力互相結合。反應結束之後，將混和溶液 0.4 mL 滴在蓋玻片上，使其自然吸附在蓋玻片表面，吸附的時間是 30 分鐘。吸附完成後除去上層液體，即完成樣品製作，我們再利用螢光生命期影像觀察螢光共振能量轉移的現象。如此的樣品製作方式，會觀察到聚集形態的螢光奈米鑽石影像。在細胞中觀察 FRET 的效應時，螢光物質亦是在細胞質中聚集，所以我們的樣品狀態，會較為接近在細胞中的形式。圖 5-3 分別是(a) gFND-anti-Tf IgG 和(b) rFND-Tf 的螢光影像，螢光訊號收集範圍分別是(a) 510 – 530 nm 和(b) 650 – 730 nm。圖 5-3(c)是圖 5-3(a)和(b)的螢光影像重疊圖，圖 5-3(d)是螢光生命期影像，螢光訊號收集範圍是 510 – 530 nm。由圖 5-3(c)螢光影像重疊圖可判定，綠色和紅色分別代表 gFND 和 rFND，橘色則是代表 gFND 和 rFND 相互結合的地方，即為可能發生能量轉移之處。將圖 5-3(c)的綠色和橘色區域對應到圖 5-3(d)的 FLIM 影像，分別代表 gFND 發生 FRET 前後的螢光生命期。我們擷取圖 5-3(d)中紅色和黃色框的螢光強度隨時間衰減曲線，分別代表 gFND 發生 FRET 前後的區域，經由適解可得到 gFND 的螢光生命期數值，螢光生命期適解公式如下：

$$A(t) = A_0 \exp(-t/\tau) \quad (5-1)$$

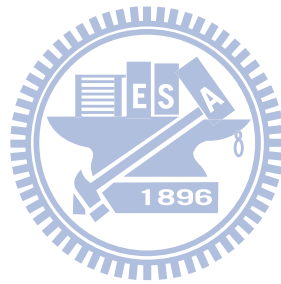
$A(t)$ 是隨時間變化的螢光強度， A_0 是起始的螢光強度， τ 是螢光生命期。表 5-2 是能量轉移前後 gFND 的螢光生命期。能量轉移前的平均螢光生命期是 19.1 ± 0.4 ns，是三個紅色框的平均值。能量轉移後的平均螢光生命期是 15.7 ± 0.4 ns，是三個黃色框的平均值。根據文獻記載，「氮-空缺-氮」中心在塊材中的螢光生命期約是 $20 \text{ ns} \pm 0.5 \text{ ns}$ [94]，我們製備的樣品是 gFND 的聚集形態，測得螢光生命期和文獻值相當接近。由表 5-2 的結果，可計算出能量轉移的效率，其計算公式如下：

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (5-2)$$

其中 E 是能量轉移的效率， τ_D 和 τ_{DA} 分別是 gFND 在能量轉移前後的螢光生命期。利用公式 5-2 計算，能量轉移的效率約是 17.8%。一般生物系統中常用的 FRET 配對是青綠色和黃色螢光蛋白質(cyan fluorescent protein，簡稱 CFP，yellow fluorescent protein，簡稱 YFP)，透過抗體-抗原作用力結合後，其能量轉移效率約是 35 – 40% [95, 96]，相較我們的實驗結果，螢光奈米鑽石間的 FRET 效率較低，推測的可能因素如下：缺陷中心在鑽石晶格中，和奈米鑽石表面的距離估計超過 10 nm，蛋白質固定在奈米鑽石表面的厚度超過 40 nm。一般發生 FRET 的距離大約在 1 – 10 nm，所以兩缺陷中心間相隔至少是 100 nm 以上，導致能量轉移效率降低。雖然 gFND 和 rFND 的距離太遠，但仍有 17.8% 的能量轉移效率，推測距離縮短之後，應可提高能量轉移的效率。

5-3 結論

我們首次觀察螢光奈米鑽石間的螢光共振能量轉移，初步透過抗體-抗原專一性作用力使 gFND 和 rFND 相結合，觀察到能量轉移效率約是 17.8 %。相較於常見的 CFP-YFP 配對，螢光奈米鑽石間的能量轉移效率偏低。推測缺陷中心間相隔太遠，距離估計至少超過 100 nm，導致能量轉移效率降低。若能將缺陷中心的距離拉近，能量轉移的效率可能會提高。目前螢光奈米鑽石的研究中，已廣泛應用在細胞螢光影像，但對於螢光生命期應用的相關報導並不多，若能將螢光奈米鑽石拓展到此區塊，對於生物醫學的研究上，將有很大的助益。所以螢光奈米鑽石在螢光共振能量轉移的應用，仍有很大的進步空間。



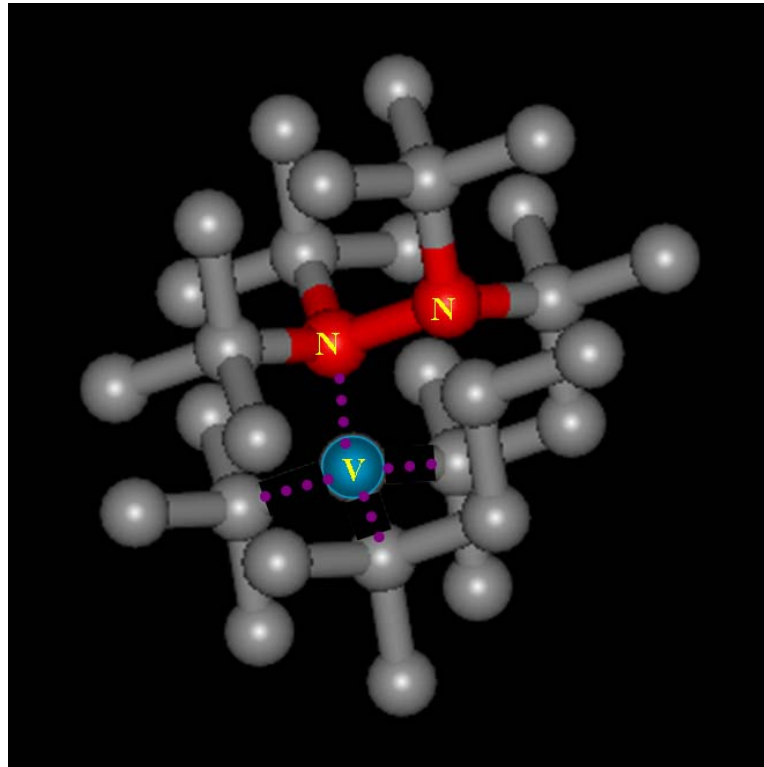


圖 5-1 「氮-空缺-氮」中心模型圖。



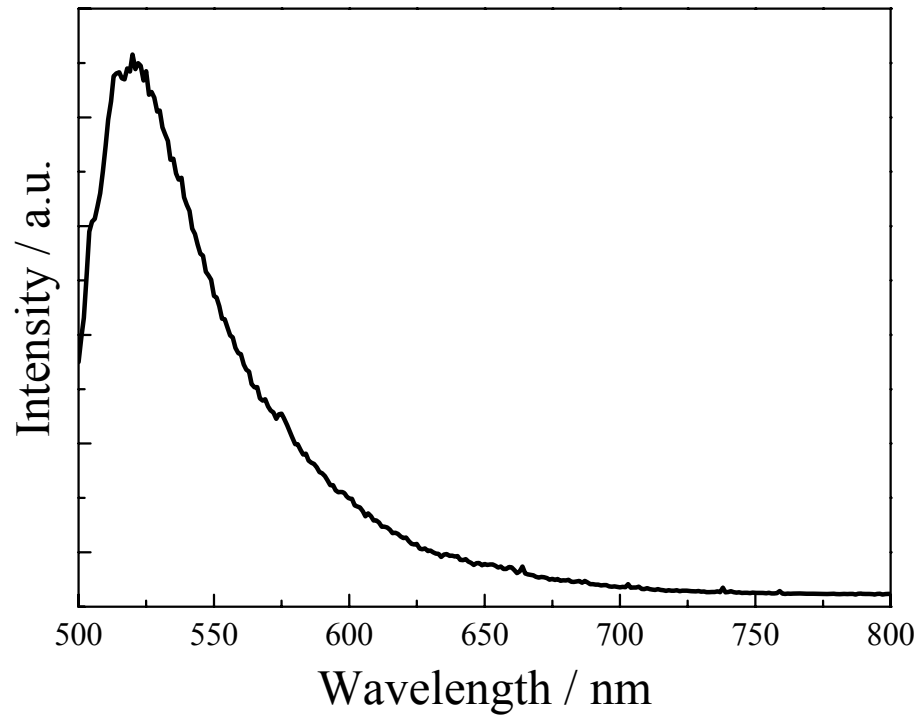


圖 5-2 綠光奈米鑽石螢光光譜圖，激發光源是 488 nm 氬離子雷射。



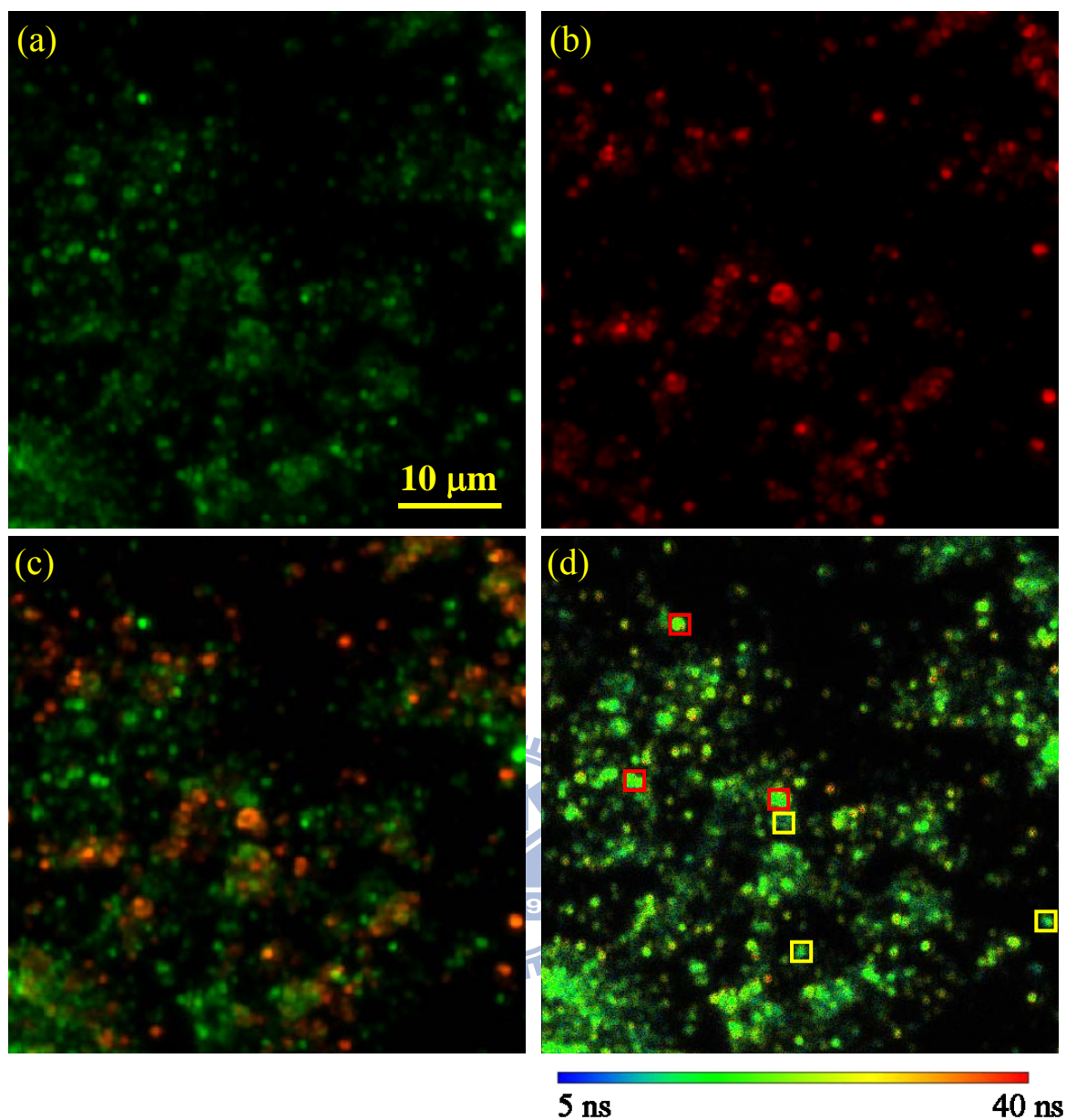


圖 5-3 (a) gFND-anti-Tf IgG 螢光影像，(b) rFND-Tf 螢光影像，(c) 螢光影像重疊圖，(d) 螢光生命期影像，紅色和黃色框是螢光生命期適解區域。(a)和(d)的螢光訊號收集範圍是 510 – 530 nm，(b)的螢光訊號收集範圍是 650 – 730 nm。

表 5-1 綠光和紅光奈米鑽石的粒徑大小。

種類	粒徑大小 (nm)
gFND-COOH	72 ± 7
gFND-anti Tf IgG	210 ± 11
rFND-COOH	144 ± 8
rFND-Tf	222 ± 12

表 5-2 綠光奈米鑽石螢光生命期適解結果。

	FRET 前 (ns)	FRET 後 (ns)
	18.8	15.4
	19.5	15.7
	19.0	16.1
平均	19.1 ± 0.4	15.7 ± 0.4

參考文獻

1. N. Sanvicens, M. P. Marco, *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*, 425–433.
2. K. C. Weng, C. O. Noble, B. Papahadjopoulos-Sternberg, F. F. Chen, D. C. Drummond, D. B. Kirpotin, D. Wang, Y. K. Hom, B. Hann, J. W. Park, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2851–2857.
3. A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.
4. L. Duchesne, D. Gentili, M. Comes-Franchini, D. G. Fernig, *Langmuir* **2008**, *24*, 13572–13580.
5. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538–544.
6. M. Ferrari, *Nature Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171.
7. J. Klohs, A. Wunder, K. Licha, *Basic Res. Cardiol.* **2008**, *103*, 144–151.
8. N. C. Shaner, G. H. Patterson, M. W. Davidson, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247–4260.
9. J. Lippincott-Schwartz, N. Altan-Bonnet, G. H. Patterson, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, S7–S14.
10. E. Herz, H. Ow, D. Bonner, A. Burns, U. Wiesner, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6341–6347.
11. C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331–338.
12. A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18.
13. W. Qian, X. Huang, B. Kang, M. A. El-Sayed, *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 046025.
14. S. H. Wang, C. W. Lee, A. Chiou, P. K. Wei, *J. Nanobiotechnology* **2010**, *8*, 33.
15. S. J. Yu, M. W. Kang, H. C. Chang, K. M. Chen, Y. C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17604–17605.
16. A. M. Schrand, L. Dai, J. J. Schlager, S. M. Hussain, E. Osawa, *Diamond Relat. Mater.* **2007**, *16*, 2118–2123.

17. A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2–7.
18. A. Krueger, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1382–1390.
19. T. L. Wee, Y. W. Mau, C. Y. Fang, H. L. Hsu, C. C. Han, H. C. Chang, *Diam. Relat. Mater.* **2009**, *18*, 567–573.
20. T. L. Wee, Y. K. Tzeng, C. C. Huan, H. C. Chang, W. Fann, J. H. Hsu, K. M. Chen, Y. C. Yu, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 9379–9386.
21. J. E. Field, *The Properties of Natural and Synthetic Diamond*, Academic Press: London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo and Toronto, 1992.
22. N. B. Manson, J. P. Harrison, M. J. Sellars, *Phys. Rev. B* **2006**, *74*, 104303.
23. J. R. Mansfield, K. W. Gossage, C. C. Hoyt, R. M. Levenson, *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10*, 041207.
24. N. Billinton, A. W. Knight, *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 175–197.
25. A. Gruber, A. Drabenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, *Science* **1997**, *276*, 2012–2014.
26. Y. R. Chang, H. Y. Lee, K. Chen, C. C. Chang, D. S. Tsai, C. C. Fu, T. S. Lim, Y. K. Tzeng, C. Y. Fang, C. C. Han, H. C. Chang, W. Fann, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 284–288.
27. S. C. Lawson, D. Fisher, D. C. Hunt, M. E. Newton, *J. Phys.: Condens. Matter.* **1998**, *10*, 6171–6180.
28. J. P. Boudou, P. A. Curmi, F. Jeleko, J. Wrachtrup, P. Aubert, M. Sennour, G. Balasubramanian, R. Reuter, A. Thorel, E. Gaffet, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 235602.
29. E. Perevedentseva, C. Y. Cheng, P. H. Chung, J. S. Tu, Y. H. Hsieh, C. L. Cheng, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 315102.
30. J. I. Chao, E. Perevedentseva, P. H. Chung, K. K. Liu, C. Y. Cheng, C. C. Chang, C.

- L. Cheng, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2119–2208.
31. C. Y. Cheng, E. Perevedentseva, J. S. Tu, P. H. Chung, C. L. Cheng, K. K. Liu, J. I. Chao, P. H. Chen, C. C. Chang, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 163903.
32. C. C. Fu, H. Y. Lee, K. Chen, T. S. Lim, H. Y. Wu, P. K. Lin, P. K. Wei, P. H. Tsao, H. C. Chang, W. Fann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 727–732.
33. V. Vaijayanthimala, Y. K. Tzeng, H. C. Chang, C. L. Li, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 425103.
34. V. Vaijayanthimala, H. C. Chang, *Nanomedicine* **2009**, *4*, 47–55.
35. B. Zhang, Y. Li, C. Y. Fang, C. C. Chang, C. S. Chen, Y. Y. Chen, H. C. Chang, *Small* **2009**, *5*, 2716–2721.
36. O. Faklaris, V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C. Gesset, J. C. Arnault, A. Thorel, J. P. Boudou, P. A. Curmi, F. Treussart, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3955–3962.
37. O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, F. Druon, J. P. Boudou, T. Sauvage, P. Georges, P. A. Curmi, F. Treussart, *Small* **2008**, *4*, 2236–2239.
38. M. F. Weng, S. Y. Chiang, N. S. Wang, H. Niu, *Diam. Relat. Mater.* **2009**, *18*, 587–591.
39. T. R. Daniels, T. Delgado, J. A. Rodriguez, G. Helguera, M. L. Penichet, *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 144–158.
40. T. R. Daniels, T. Delgado, G. Helguera, M. L. Penichet, *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 159–176.
41. N. Yamamoto, F. Fukai, H. Ohshima, H. Terada, K. Makino, *Colloids Surf. B* **2002**, *25*, 157–162.
42. S. J. Tan, N. R. Jana, S. Gao, P. K. Patra, J. Y. Ying, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 2239–2247.
43. M. Das, D. Mishra, T. K. Maiti, A. Basak, P. Pramanik, *Nanotechnology* **2008**, *19*,

415101.

44. E. Boisselier, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
45. E. S. Day, J. G. Morton, J. L. West, *J. Biomech. Eng.-T ASME* **2009**, *131*, 074001.
46. I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 129–135.
47. F. Y. Cheng, C. T. Chen, C. S. Yeh, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 425104.
48. X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2115–2120.
49. S. Ghosh, S. Dutta, E. Gomes, D. Carroll, R. Jr. D’Agostino, J. Olson, M. Guthold, W. H. Gmeiner, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2667–2673.
50. A. Bruke, X. Ding, R. Singh, R. A. Kraft, N. Levi-Polyachenko, M. N. Rylander, C. Szot, C. Buchanan, J. Whitney, J. Fisher, H. C. Hatcher, R. Jr. D’Agostino, N. D. Kock, P. M. Ajayan, D. L. Carroll, S. Akman, F. M. Torti, S. V. Torti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12897–12902.
51. R. R. Anderson, J. A. Parrish, *Science* **1993**, *220*, 524–527.
52. D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, C. M. Miller, M. B. Cortie, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3808–3812.
53. X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 681–693.
54. R. S. Norman, J. W. Stone, A. Gole, C. J. Murphy, T. L. Sabo-Attwood, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 302–306.
55. S. V. Torti, F. Byrne, O. Whelan, N. Levi, B. Ucer, M. Schmid, F. M. Torti, S. Akman, J. Liu, P. M. Ajayan, O. Nalamasu, D. L. Carroll, *Int. J. Nanomedicine* **2007**, *2*, 707–714.
56. N. W. Kam, M. O’Connell, J. A. Wisdom, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11600–11605.
57. P. Chakravarty, R. Marches, N. S. Zimmerman, A. D. E. Swafford, P. Bajaj, I. H.

- Musselman, P. Pantano, R. K. Draper, E. S. Vitetta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8697–8702.
58. R. Hallworth, B. Currall, M. G. Nochols, X. Wu, J. Zuo, *Brain Research* **2006**, *1091*, 122–131.
59. M. Dziejzicka-Wasylewska, A. Faron-Gorecka, J. Andrecka, A. Polit, M. Kusmider, Z. Wasylewski, *Biochemistry* **2006**, *45*, 8751–8759.
60. G. Cox, M. Matz, A. Salih, *Microsc. Res. Techniq.* **2007**, *70*, 243–251.
61. E. Zelazny, J. W. Borst, M. Muylaert, H. Batoko, M. A. Hemminga, F. Chaumont, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12359–12364.
62. J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press: New York and London, 1995.
63. M. Minsky, U.S. Patent #3013467, Microscopy Apparatus, 1957.
64. J. L. Lucitti, M. E. Dickinson, *Pediatr. Res.* **2006**, *60*, 1–5.
65. J. A. Conchello, J. W. Lichtman, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 920–931.
66. W. Becker, A. Bergmann, E. Haustein, Z. Petrasek, P. Schwille, C. Biskup, L. Kelbauskas, K. Benndorf, N. Klocker, T. Anhut, I. Riemann, K. Konig, *Microsc. Res. Techniq.* **2006**, *69*, 186–195.
67. E. B. van Munster, T. W. J. Gadella, *Adv. Biochem. Eng. Biot.* **2005**, *95*, 143–175.
68. M. G. Ormerod, *Flow cytometry*, Oxford University Press, 2000.
69. 美商必帝股份有限公司, 中文操作手冊,
<http://www.bd.com/tw/services/training.asp>
70. K. S. Schmitz, *An introduction to dynamic light scattering by macromolecules*, Boston: Academic Press, 1990.
71. J. T. Edward, *J. Chem. Educ.* 1970, *47*, 261–270.
72. R. J. Hunter, *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, London: Academic Press, 1981.

73. Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 581–593.
74. X. L. Kong, L. C. L. Huang, C. M. Hsu, W. H. Chen, C. C. Han, H. C. Chang, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 259–265.
75. R. P. Bagwe, L. R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir* **2006**, *22*, 4357–4362.
76. W. Kaiser, W. L. Bond, *Phys. Rev.* **1959**, *115*, 857–863.
77. A. T. Collins, M. F. Thomaz, M. I. B. Jorge, *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1983**, *16*, 2177–2181.
78. Y. Chi, G. Chen, F. Jelezko, E. Wu, H. Zeng, *IEEE Photonic Tech. L.* **2011**, *23*, 374–376.
79. J. Tisler, G. Balasubramanian, B. Naydenov, R. Kolesov, B. Grotz, R. Reuter, J. Boudou, P. A. Curmi, M. Sennour, A. Thorel, M. Borsch, K. Aulenbacher, R. Erdmann, P. R. Hemmer, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1959–1965.
80. A. Beveratos, R. Brouri, T. Gacoin, J. Poizat, P. Grangier, *Phys. Rev. A* **2001**, *64*, 061802.
81. K. K. Liu, M. F. Chen, P. Y. Chen, T. J.F. Lee, C. L. Cheng, C. C. Chang, Y. P. Ho, J. I. Chao, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 205102.
82. Y. Q. Li, X. P. Zhou, *Diam. Relat. Mater.* **2010**, *19*, 1163–1167.
83. P. de Diesbach, F. N’Kuli, C. Berens, E. Sonveaux, M. Monsigny, A. C. Roche, P. J. Courtoy, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1512–1521.
84. S. Kalgaonkar, B. Lonnerdal, *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 304–311.
85. S. Shu, X. Liu, E. D. Korn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1472–1477.
86. E. J. New, A. Congreve, D. Parker, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 111–118.
87. E. Perret, A. Lakkaraju, S. Deborde, R. Schreiner, E. Rodriguez-Boulan, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 423–434.
88. T. Fujiwara, H. Akita, H. Harashima, *Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 122–130.
89. A. Nan, X. Bai, S. J. Son, S. B. Lee, H. Ghandehari, *Nano Lett.* **2008**, *8*,

2150–2154.

90. M. L. Schipper, G. I. A. L. Koh, Z. Cheng, Y. Ebenstein, A. Aharoni, S. Keren, L. A. Bentolila, J. Li, J. Rao, X. Chen, U. Banin, A. M. Wu, R. Sinclair, S. Weiss, S. S. Gambhir, *Small* **2009**, *5*, 126–134.
91. G. Davies, *Properties and Growth of Diamond, EMIS Data Review Series No. 9*, INSPEC, The Institution of Electrical Engineers, London, 1994.
92. C. Loo, A. Lin, L. Hirsch, M. H. Lee, J. Barton, N. Halas, J. West, R. Drezek, *Technol. Cancer Res. T.* **2004**, *3*, 33–40.
93. M. Hu, H. Petrova, J. Chen, J. M. McLellan, A. R. Siekkinen, M. Marquez, X. Li, Y. Xia, G. V. Hartland, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1520–1524.
94. M. D. Crossfield, G. Davies, A. T. Collins, E. C. Lightowers, *J. Phys. C: Solid State Phys.* 1974, *7*, 1909–1917.
95. F. Waharte, C. Spriet, L. Heliot, *Cytometry Part A* **2006**, *69A*, 299–306.
96. M. Dziejzicka-Wasylewska, A. Faron-Gorecka, J. Andrecka, A. Polit, M. Kusmider, Z. Wasylewski, *Biochemistry* **2006**, *45*, 8751–8759.