

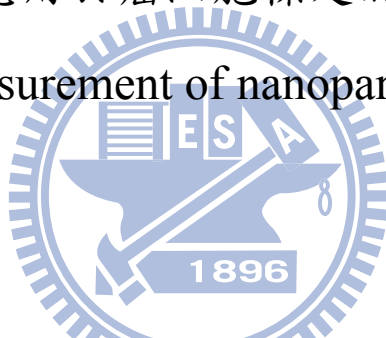
國立交通大學

分子科學研究所

碩士論文

奈米粒子應用於癌細胞標定的拉曼光學量測

The Raman measurement of nanoparticles on cancer cells



研究生：江宇涵

指導教授：孫建文 博士

中華民國九十九年八月

奈米粒子應用於癌細胞標定的拉曼光學量測

The Raman measurement of nanoparticles on cancer cells

研究生：江宇涵

Student : Yu-Han Chiang

指導教授：孫建文 博士

Adviser : Dr. Kien-wen Sun

國立交通大學



A Thesis

Submitted to Department of Institute of Molecular Science
College of Science
National Chiao Tung University
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the degree of
Master of Science
In
Institute of Molecular Science
August 2010
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十九年八月

利用奈米粒子標定癌細胞的拉曼光譜量測

學生：江宇涵

指導教授：孫建文 博士

國立交通大學

分子科學研究所碩士班

摘要

近年來，越來越多研究團隊將奈米粒子運用於生醫檢測與治療上，追蹤奈米粒子在有機體內的流向，甚至當作藥物傳輸的載體。一般而言，一個好的生物標記子需具有低生物毒性、高強度特徵峰、表面易改質等特性。本篇論文研究兩種不同的奈米粒子，第一部份是將奈米金球修飾孔雀綠，電穿孔送入Hep G2細胞後，量測其拉曼訊號和在細胞內分佈的情形，接著用hGH改變與細胞的连接方式，和前種方法相互比較。第二部份則是改用奈米鑽石標定細胞，偵測其在細胞內分佈的情形，第三部份進一步利用PDMS翻模法製作微流道，並將奈米金球與奈米鑽石分別送進微流道裡，觀測其流速與訊號的變化，期望未來能將此兩種奈米粒子與微流道結合發展成快速且自動化的生物晶片。

關鍵字:奈米鑽石、奈米金球、拉曼光譜、細胞

The Raman measurement of nanoparticles on cancer cells

Student : Yu-Han Chiang

Adviser : Dr. Kien-wen Sun

Institute of Molecular Science
National Chiao Tung University

Abstract

Recently, more and more researches focus on using nanoparticles for biomedical detection and as therapeutic tools, tracing their fate in organisms, or even used them for drug deliver. Generally speaking, a good biomarker should have the characteristics of low cytotoxicity, high emission intensity and specific peaks and easily surface functionalization, etc....

This thesis studied two different nanoparticles in bio applications. In the first part of the work, we applied malachite green to modify gold nanoparticle surface and transferred them into Hep G2 cell by electroporation. Then the Raman signal mapping were taken from the cells to determine the nanoparticle distribution inside the cells. We also used hGH to change the connection path with Hep G2 cells and compare the results with the malachite green. And the second part is that the entire experiment processes were repeated with the gold nanoparticles replaced with nanodiamonds.

The third part was to construct a microfluidic channel by using PDMS replica molding method. We investigated the correlation between the flow rate and the Raman signals when gold nanoparticles and nanodiamonds were pumped into the microfluidic channel respectively. It is possible to combine these two different nanoparticles with microfluidic channel to develop an automation biochip and to achieve real time detection in the near future.

keywords : Nanodiamonds, Gold nanoparticles, Raman spectrum, cells

目錄

頁次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
表目錄.....	VI
圖目錄.....	VII
第一章 緒論.....	1
1-1 前言-奈米科技.....	1
1-2 實驗室晶片.....	3
1-3 奈米金粒子.....	8
1-4 奈米鑽石.....	11
1-5 研究動機與目的.....	16
第二章 實驗技術與原理.....	17
2-1 微影技術與電子束微影.....	17
2-1-1 微影技術簡介.....	17
2-1-2 電子束微影系統.....	20
2-2 拉曼散射光譜和表面增顯拉曼光譜.....	24
2-2-1 拉曼散射光譜.....	24

2-2-2 表面增顯拉曼光譜.....	28
2-3 共軛焦顯微技術.....	34
第三章 實驗方法與微流道製作.....	37
3-1 實驗藥品與儀器.....	37
3-1-1 實驗材料與樣品.....	37
3-1-2 實驗儀器.....	40
3-2 細胞培養與金球表面修飾.....	42
3-2-1 細胞繼代培養操作.....	42
3-2-2 奈米金修飾上孔雀綠步驟.....	43
3-2-3 奈米金球結合人類生長激素步驟.....	44
3-2-4 金球電穿孔送入細胞過程.....	45
3-3 奈米鑽石酸化與表面修飾.....	47
3-3-1 奈米鑽石酸化.....	47
3-3-2 奈米鑽石修飾上 hGH 步驟.....	49
3-4 PDMS 翻製法製作微流道.....	50
3-5 樣品注入與光學量測.....	53
4-1 金球量測分析.....	54
4-1-1 金球修飾孔雀綠之拉曼光譜量測分析.....	54
4-1-2 金球修飾人類生長激素和孔雀綠之拉曼光譜分析.....	70

4-2 奈米鑽石量測分析.....	81
4-2-1 奈米鑽石之拉曼光譜量測分析.....	81
4-2-2 奈米鑽石修飾上 hGH 之拉曼光譜量測分析.....	85
4-3 結合微流道偵測流速與時間之關係.....	90
第五章 結論.....	97
參考文獻.....	99



表目錄

表 2.1 各種微影技術比較.....	19
表 2.2 不同發射原的比較.....	22
表 4.1 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表.....	60
表 4.2 含金球的 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表.....	62
表 4.3 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表.....	65
表 4.4 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞做 xz 平面的 mapping 點數表.....	66
表 4.5 修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表.....	73
表 4.6 修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞作 xz 平面 mapping 點數表.....	74
表 4.7 對照組 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表.....	76
表 4.8 對照組 Hep G2 細胞作 xz 平面 mapping 點數表.....	77
表 4.9 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表.....	79
表 4.10 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表.....	80
表 4.11 含奈米鑽石的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表.....	83
表 4.12 含奈米鑽石的 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 點數表.....	84
表 4.13 對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表.....	87
表 4.14 實驗組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表.....	89

圖目錄

圖 1.1 微流道的製作過程.....	5
圖 1.2 Katrin R. strehle 等人設計的微流道示意圖.....	6
圖 1.3 Sangyeop Lee 等人設計的鋸齒形微流道示意圖.....	6
圖 1.4 Ly Xuan Quang 等人設計的微陣列柱狀微流道示意圖.....	7
圖 1.5 38nm 奈米金粒子的螢光光譜.....	9
圖 1.6 奈米金連接孔雀綠和保護基之示意圖.....	10
圖 1.7 金球連接上頭頸癌細胞示意圖.....	10
圖 1.8 天然鑽石的拉曼譜線峰值.....	13
圖 1.9 在 533nm 激發波長下,不同大小奈米鑽石的拉曼光譜.....	13
圖 1.10 不同雷射激發光源下量測 2 μm 鑽石薄膜的拉曼光譜.....	14
圖 1.11 奈米鑽石進入細胞的過程.....	14
圖 1.12 酸化後的奈米鑽石在 A549(人類肺上皮細胞)的細胞毒性測試.....	15
圖 1.13 單一酸化奈米鑽石聚集在 A549 細胞裡的 x,y 軸掃描式拉曼光譜圖.....	15
圖 1.14 具磁性的奈米鑽石表面官能基改變示意圖.....	15
圖 2.1 光源波長與製程微小化的趨勢圖.....	18
圖 2.2 電子束微影基本製程示意圖.....	21
圖 2.3 電子光學柱的組成.....	22
圖 2.4 電子束微影系統(ELS-7500EX).....	23
圖 2.5 拉曼光譜示意圖.....	26
圖 2.6 Rayleigh 散射、anti-Stokes 散射和 Stokes 散射的能階躍遷.....	27
圖 2.7 金屬奈米球受到外加電磁場作用下所產生的電漿子振盪示意圖.....	32
圖 2.8 金屬球團簇的 SERS 示意圖.....	32
圖 2.9 電磁波增顯拉曼的示意圖.....	33
圖 2.10 分子吸附在金屬表面的能階圖.....	33
圖 2.11 共軛焦顯微鏡原理及組成.....	36
圖 3.1 奈米鑽石的強氧化酸洗步驟.....	48

圖 3.2 形成醯胺鍵的反應機制.....	49
圖 3.3 流道製作流程.....	52
圖 3.4 轉速(rpm)和光阻厚度比較圖(μm).....	52
圖 3.5 KDS 100 注射幫浦.....	53
圖 4.1 13nm 大小金球的 TEM 圖.....	57
圖 4.2 13nm 金球的拉曼光譜圖.....	58
圖 4.3 溶劑 DMSO 的拉曼光譜圖.....	58
圖 4.4 接上金球前後的孔雀綠拉曼光譜比較圖.....	59
圖 4.5(a)Hep G2 細胞的 OM 圖.....	59
圖 4.5(b)Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	60
圖 4.5(c) 對 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping OM 圖.....	60
圖 4.5(d)相對應於 om 的 xy 平面與訊號強度圖.....	61
圖 4.6(a)以電穿孔法送入金球的 Hep G2 細胞 OM 圖.....	61
圖 4.6(b)摻雜金球的 Hep G2 細胞拉曼光譜圖.....	62
圖 4.6(c)以電穿孔法送入金球的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping OM 圖.....	62
圖 4.6(d)與 OM 相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	63
圖 4.7(a)以電穿孔法送入金球修飾孔雀綠的 Hep G2 細胞 OM 圖.....	63
圖 4.7(b)以電穿孔法送入金球修飾孔雀綠的 Hep G2 細胞拉曼光譜圖.....	64
圖 4.7(c)含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 OM 圖.....	64
圖 4.7(d) 與 OM 相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	65
圖 4.7(e)含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 的 OM 圖.....	65
圖 4.7(f)與 OM 相對應的 xz 平面與訊號強度圖.....	66
圖 4.8(a)含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞明視野影像.....	67
圖 4.8(b)疊加上金球螢光影像,可看出金球在細胞裡的分佈情形.....	67
圖 4.8(c)疊加上金球螢光影像的 Z 軸切面圖.....	68
圖 4.9(a)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞之 om 圖.....	72
圖 4.9(b)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	72
圖 4.9(c)修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om 圖.....	73

圖 4.9(d)與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	73
圖 4.9(e)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖.....	74
圖 4.9(f)與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖.....	74
圖 4.10(a)對照組 Hep G2 細胞 om 圖.....	75
圖 4.10(b)對照組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	75
圖 4.10(c)對照組 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om 圖.....	76
圖 4.10(d)與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	76
圖 4.10(e)對照組 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖.....	77
圖 4.10(f)與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖.....	77
圖 4.11(a)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞之 om 圖.....	78
圖 4.11(b)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	78
圖 4.11(c)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om.....	79
圖 4.11(d)與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	79
圖 4.11(e)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖.....	80
圖 4.11(f)與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖.....	80
圖 4.12(a)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 om 圖.....	82
圖 4.12(b)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞拉曼訊號.....	82
圖 4.12(c)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖.....	83
圖 4.12(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	83
圖 4.12(e)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 的 om 圖.....	84
圖 4.12(f)和 om 相對應的 xz 平面與訊號強度圖.....	84
圖 4.13(a)對照組 Hep G2 細胞 om 圖.....	86
圖 4.13(b)對照組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	86
圖 4.13(c)對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖.....	87
圖 4.13(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	87
圖 4.14(a)實驗組 Hep G2 細胞 om 圖.....	88
圖 4.14(b)實驗組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖.....	88
圖 4.14(c)對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖.....	88

圖 4.14(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖.....	89
圖 4.15 製作完成的微流道示意圖.....	92
圖 4.16 6nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖.....	92
圖 4.17 60nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖.....	93
圖 4.18(a)600nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖.....	93
圖 4.18(b)600nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖.....	94
圖 4.19 1500nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖.....	94
圖 4.20 $5 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 奈米鑽石的訊號對時間圖.....	95
圖 4.21 $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 奈米鑽石的訊號對時間圖.....	95
圖 4.22(a)施加電壓前的流道 om 圖.....	96
圖 4.22(b)施加電壓後的流道 om 圖.....	96
圖 4.22(c)捕捉在金電極中間的奈米鑽石拉曼光譜圖.....	96



第一章 緒論

1-1 前言-奈米科技

「底下還有廣大空間」(There's plenty of room at the bottom)是物理學家理查·費曼(Richard P. Feynman)在1959年美國加州理工學院物理學年會上所發表的專題演講，他預言人類將製造出微小尺寸的元件和機器，可以將二十四大本的大英百科全書全寫在一個針尖上，甚至可達到操縱原子的可能，發展出新的科學領域，至此開啟了人們對於奈米科技的興趣，而在一九八二年，G. Binning和H. Rohrer發明了可觀測原子尺度的掃描穿隧顯微儀(Scanning Tunneling Microscope, STM)，使人類的觀察視野更進一步到達原子等級的物質，也更加促進了奈米科技的發展。

「奈米」(nanometer)為十的負九次方米(10^{-9} m)，約為人類頭髮直徑的八萬分之一，相當於十個氫原子之直徑長(10^{-10} m)[1]。當一物質結構的特徵尺寸介於1-100 nm時，定義為奈米材料，此時已不能再用巨觀現象來解釋，物質會受到表面效應、小尺寸效應、量子尺寸效應、量子侷限效應(quantum confinement effect)、量子穿隧效應等影響，而產生許多新的特性，例如熔點、磁性、光性、導熱性、導電性以及化學性質等皆不同於傳統材料，且具有顆粒尺寸小、比表面積大、表面能高、表面原子所占比例大等特點，以此為基礎，操作、控制原子或分子組合成新的奈米尺度結構，以展現新功能和用途，並加以應用，此即為奈米科技的意義，而有別於傳統科技由

大縮小(top down)的製程，奈米科技則是由小作大(bottom up)。

奈米科技包含的領域非常廣泛，從基礎科學乃至應用科學，包括物理、化學、材料、光電、生物、微電子、環境及醫藥等，其對產業衝擊之大，也被視為是第四波的工業革命，妥善應用奈米科技，將大幅增進人類生活福祉和科技水平。



1-2 實驗室晶片

近年來微機電(Micro-electro-mechanical systems, 簡稱MEMS)製程技術蓬勃發展, 利用小尺寸效應等現象製造出來的產品, 具有縮小化、高效率以及低耗能等優點, 除了半導體製程領域外, 實驗室晶片(lab-on-a-chip, 簡稱LOAC)也逐漸成為微機電發展的一個主要研究重點。實驗室晶片的概念是由Manz和Ciba Geigy在1989年所提出, 希望將原本在實驗室裡操作的不同流程, 例如樣品前處理、試劑混合、化學反應和生化分析等步驟微小化並整合製作在一片晶片上。利用這種自動化的平行操作技術, 可以取代昂貴的儀器設備、節省操作的人力資源和時間、減少樣品使用量、即時獲得偵測結果和增加實驗信賴度。我們也可以依照需求而設計出不同種具有強大功能的實驗室晶片, 例如偵測食物裡的病原菌或血液篩檢等[2]。

實驗室晶片的表面佈滿毛細管管道, 藉由幫浦推動, 使液體在管道中進行流動、混和、分離等反應, 而毛系管道的製作通常和微流體技術(microfluidics technology)有關, 在此系統中施以電壓或氣壓, 利用電滲透(electroosmosis)、電泳(electrophoresis)或壓力平衡原理, 使微量溶液可在晶片表面的毛細管道內流動。為了能夠在顯微鏡下觀察, 實驗室晶片通常都具有由聚二甲基矽氧烷(Polydimethyl siloxane, 簡稱PDMS)所建構的流道, PDMS是一種軟性的高子材料, 其製程簡易且耗費時間短, 且可抗絕大部分酸鹼和有機溶劑並具有透光性佳、生物相容性好、表面修飾容易等優點,

故PDMS翻製法廣泛應用在實驗室晶片的製程上[3]，微流道的製作過程見圖1.1[4]，一開始先以光學微影或電子束微影製造出欲翻製的母模(template)，並在表面旋塗脫模劑後，把PDMS倒入母模並進行加熱固化，完成之後剝除，利用氧電漿處理將表面修飾成親水性，最後和基版黏合即完成密閉式的流道結構。

實驗室晶片可應用在細胞的觀察，取代傳統培養細胞所使用的培養皿，例如Rhee等人利用電漿輔助乾式蝕刻法把細胞培養在微流道元件上，這種方法可模擬細胞貼附和未貼附在玻璃以及聚苯乙烯基版上的情形，並提供一個更加方便的途徑使細胞選擇性附著在基版上[5]。另外一個研究團隊則藉由在微流道裡模仿白血球補充到血管壁的生理過程來蒐集並且分離不同種類的細胞[6]。此外，Inoue團隊觀察了一系列的單一獨立細胞培養在晶片系統上的情況[7]。Palkova則是用微流道技術來分析染色過的酵母菌、真菌孢子和哺乳細胞[8]。

實驗室晶片也可運用在生物粒子的即時偵測，例如Cheng等人設計了一種三維的介電泳動(dielectrophoretic)流道，利用不同生物粒子的介電泳動常數不同，而達到連續過濾、集中、分類、捕捉和偵測大腸桿菌、乳酸菌、乳膠粒子等[9]。Hou團隊則是利用高電場在液體表面會產生渦流，集中大腸桿菌到滯留點來進行快速偵測[10]。此外，Katrin R. Strehle等人製造了一種分段式的微流道系統，可得到具有高再現性的結晶紫的表面增顯拉曼光

譜，並且成功解決常見的記憶效應(memory effect)的問題[11]。南韓的 Sangyeop Lee 團隊用 PDMS 建構了鋸齒形的微流道，可以有效的混和孔雀綠 (malachite green) 和膠狀的奈米銀粒子，最後再用表面增顯拉曼光譜進行定量分析[12]。而 Ly Xuan Quang 等人打造了一種微陣列柱狀晶片即時感測系統，並分別對孔雀綠和啞二羧酸(dipicolinic acid)作定量偵測，這種方法可以有效的解決再現性差和訊號靈敏度低等問題[13]。

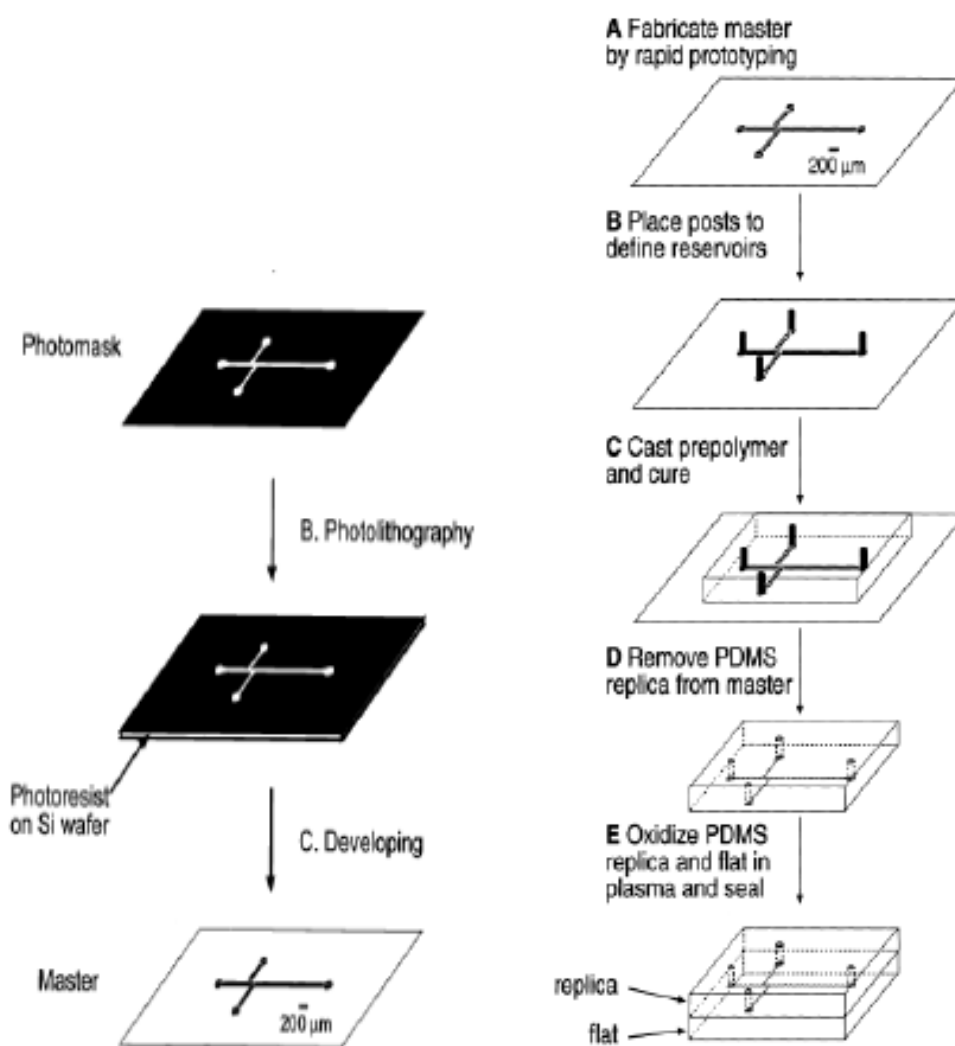


圖 1.1 微流道的製作過程[3]。

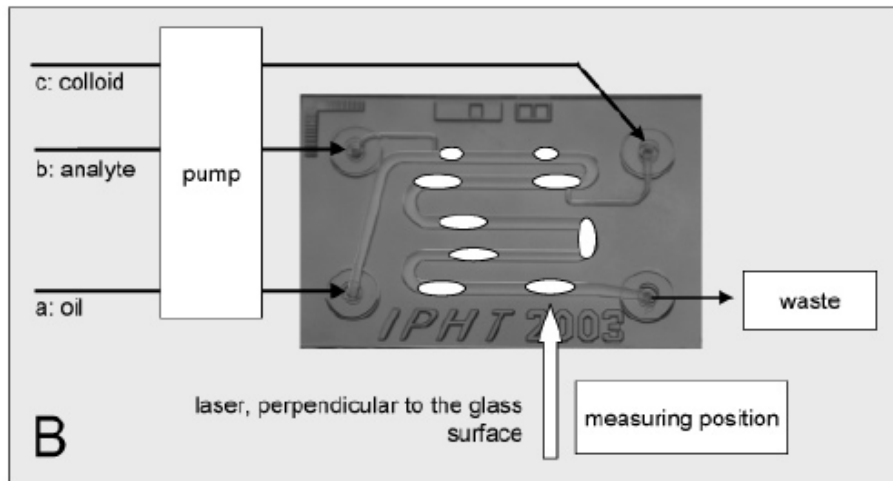


圖 1.2 Katrin R. strehle 等人設計的微流道示意圖[11]

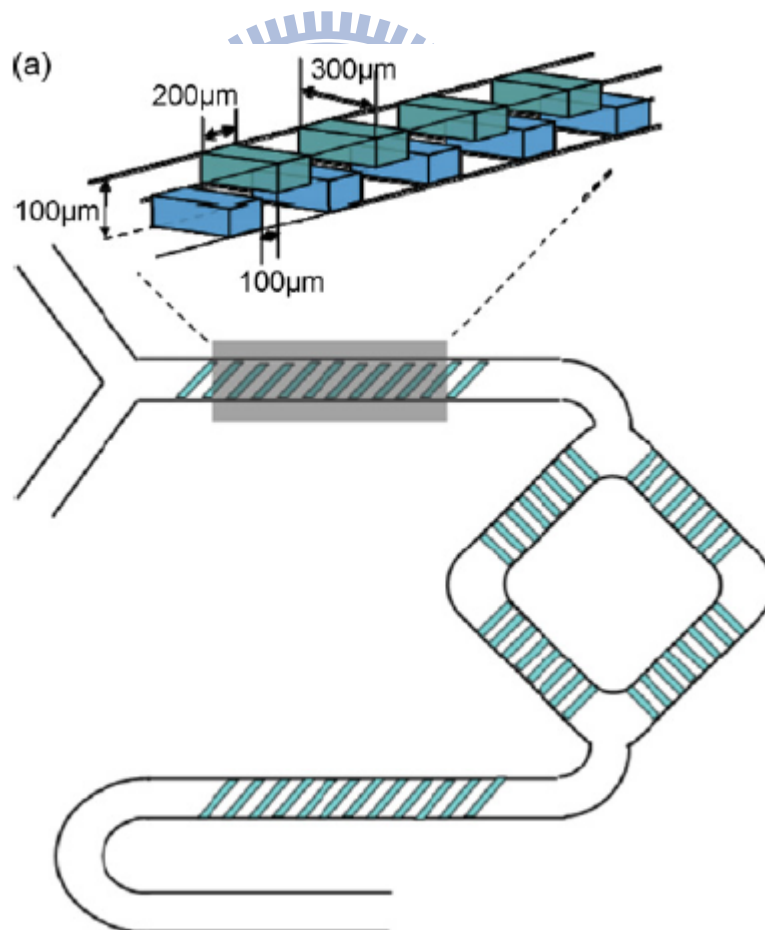


圖 1.3 Sangyeop Lee 等人設計的鋸齒形微流道示意圖[12]

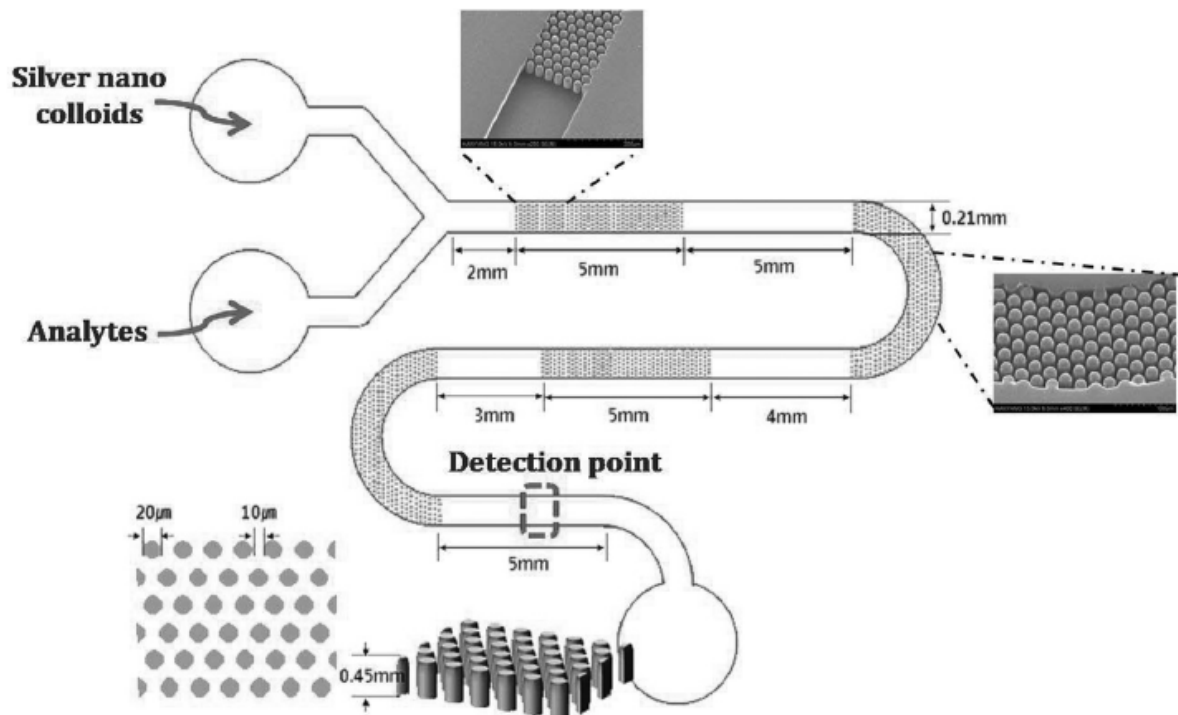


圖 1.4 Ly Xuan Quang 等人設計的微陣列柱狀微流道示意圖[13]



1-3 奈米金粒子

金是一種常見的貴重金屬，原子序是79，具有金屬光澤及高延展性。金的陰電性是2.4，是陰電性最高的金屬之一，因此很容易與其他金屬形成合金，或是和銅、鋁、錫、鈦等金屬形成介金屬化合物。並且很少與氟以外的高陰電性元素如硫或氧等直接反應，故金具有高抗氧化與高抗腐蝕的特性，此外，金的活性低，不易與周圍物質反應。但在1987年，日本的春田正毅(Masatake Haruta) 博士發現把奈米級的金粒子承載到金屬氧化物上，所製得的觸媒即使在攝氏零下73度仍可催化一氧化碳的氧化反應。這個結果改變了以往認為金不具活性的印象，也立刻引起了科學家的注意[14]。

當金的尺寸縮小到1-100nm的超微顆粒時，會受到小尺寸效應、穿隧效應和表面效應等影響，具有與原尺寸不同的光性、磁性、力學性質、熱力學性質和化學性質等，舉例來說，金原本為黃色，但隨著尺寸縮小，會慢慢變成紅色，當到達4 nm時，則會完全轉變為紅色。此外，奈米金具有良好的生物相容性，並易與硫氫基結合，故常與DNA、蛋白質結合以用來做基因檢測與疾病診斷。較常見的例子是驗孕棒的應用，因懷孕的女性會分泌一種特殊的荷爾蒙hCG (human Chorionic Gonadotropin，人類絨毛膜促性腺激素)，把懷孕女性的尿液滴在含有奈米金試劑的驗孕棒上，hCG 荷爾蒙便會與奈米金結合反應呈紅色，如此一來就可得知是否懷孕[15]。

Hua等人的研究團隊測量了38nm大小奈米金球的放光光譜，見圖

1.5[16]，並利用金球不具有光漂白(photobleaching)特性，經過5分鐘以上的照光，使癌細胞的自體螢光消失，但金球螢光仍存在的狀況下，當作子宮頸癌細胞的生物探針。

由於奈米金的表面電漿共振(surface plasma resonance)特性，目前也有許多科學家用奈米金吸附奈米粒子，增加其拉曼訊號的強度，以得到高品質的光譜，或用奈米金結合特殊抗體來標定癌細胞。例如Ximei Qian等人[17]使用孔雀綠(malachite green)吸附60nm尺寸的奈米金，再加入thiol-polyethyleneglycol(thiol-PEG)當作保護基，見圖1.6[17]，利用ScFv抗體和EGFR可專一性鍵接在頭頸癌細胞Tu686的方式，見圖1.7[17]，偵測小白鼠體內的癌細胞。

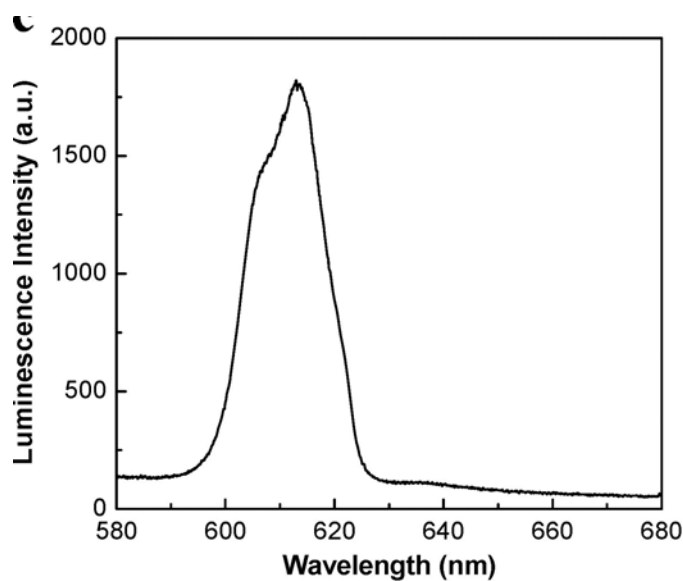


圖1.5 38nm奈米金粒子的螢光光譜[16]

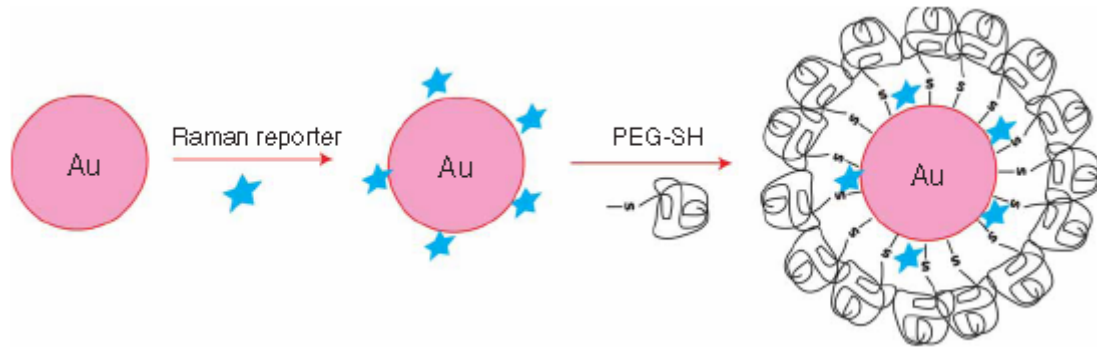


圖1.6 奈米金連接孔雀綠和保護基之示意圖[17]

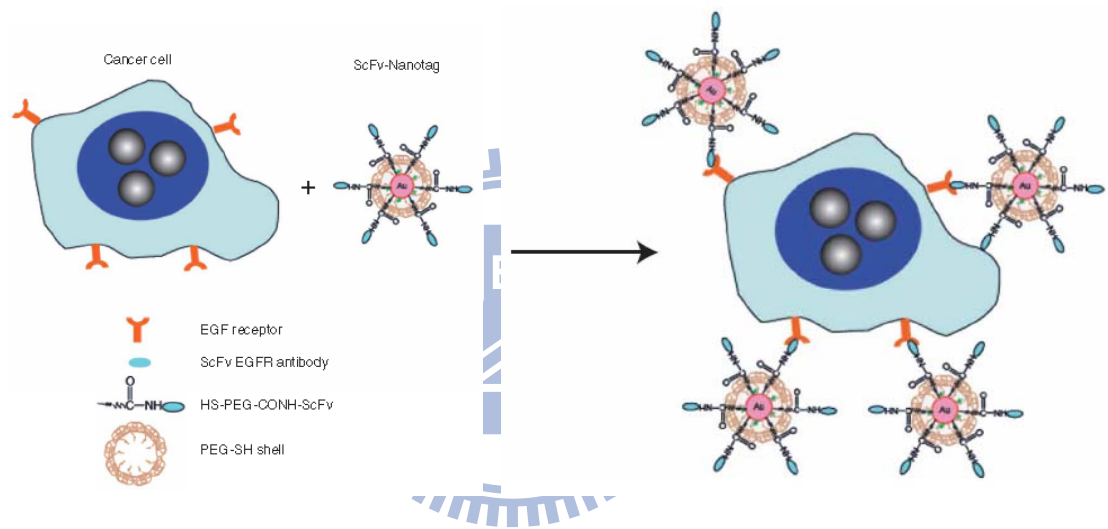


圖1.7 金球連接上頭頸癌細胞示意圖[17]

1-4 奈米鑽石

大部分的生物分子不能自己發螢光，故無法以光學方式偵測，因此找尋一種能夠與生物分子結合的材料，並以光學方式量測分析，對生物系統的檢測是一種相當大的突破。有機染料和螢光分子(fluorophores)是目前最為廣泛使用的生物分子螢光標定物，但它們在連續放光下會產生光漂白(photobleach)現象，光學穩定度低[18]。近年來，量子點(quantum dots, QDs)也常被用來當作生物標記的材料，因其具有較好的光學穩定度和低光漂白性，此外，量子點會隨著尺寸的不同，而被激發出不同顏色的螢光，且螢光强度高[19]。然而，量子點也具有致命性的缺陷，像是生物毒性(cytotoxicity)和光閃爍性(photoblinking)[20],[21]。

和以上這些奈米粒子相比，奈米鑽石(nanodiamonds, NDs)是一種較為優越的生物標定材料，因其不具生物毒性、生物相容性佳、表面官能基化容易、光穩定度好以及化學活性低。此外，在製作奈米鑽石的過程中，會產生晶格缺陷(defects)，使其被激發後易產生螢光[22],[23]。而奈米鑽石的表面一般覆蓋著一層疏水性的C-H 鍵結，在強氧化酸性處理下($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3 = 3:1$)，鑽石表面生成羧基-COOH(carboxyl groups)或其他含氧的官能基(例如 C=O、C-O-C等)，因而產生親水性，並且可與核酸(nucleic acids)、蛋白質(protein)和DNA等鍵結，產生良好的吸附性[24],[25]。

奈米鑽石和生物分子之間的交互作用可以藉由拉曼光譜來量測並研究，

目前已經有許多的研究團隊觀察得知鑽石的 sp^3 結構會導致在 1332 cm^{-1} 的位置產生一根尖銳且高強度的峰值，如圖1.8[26],[27]所示，此峰值不會受到表面改質或連接的生物分子所影響，並且通常伴隨著兩根由鑽石表面的 sp^2 石墨結構所造成的峰一起出現(1355 cm^{-1} 的D-band和 1575 cm^{-1} 的G-band)，幸運的是，D-band和G-band通常可藉由酸化的步驟移除，因此 1332 cm^{-1} 峰可獨立出現並可當作鑽石位置的指標。然而，當鑽石尺寸慢慢減少，表面石墨結構便會成為優勢，故 1332 cm^{-1} 的峰值強度也隨之下降[28]。已有團隊針對不同大小的鑽石作量測，並發現當鑽石大小為5nm或50nm時，同時在 1600 cm^{-1} 的位置也會產生拉曼訊號，見圖1.9[29]。此外，May團隊也發現用不同雷射光源量測鑽石薄膜會在 500 cm^{-1} 的位置有拉曼訊號，如圖1.10[30]。

近幾年來，越來越多團隊將鑽石的優異特性應用在治療與診斷的研究上，舉例來說，Huang等人利用奈米鑽石當作攜帶藥物的載子，他們成功的把抗癌藥物吸附在奈米鑽石表面並且聚集成團簇，經由胞吞作用進入到細胞內並藉由靜電和物理性交互作用到目的地釋放藥物[31]。另外一組團隊則是藉由脂質體(liposome)把鑽石送進細胞裡作為光學標記，見圖1.11[32]。Chao等人說明奈米鑽石可以當作探針用來偵測奈米粒子與生物體(例如細菌或細胞)間的交互作用，並證明了奈米鑽石不具有生物毒性，見圖1.12、1.13[28]。此外，Chang等人經由微波並加熱鍛燒將二茂鐵和奈米鑽石粉末的混和物製造出具有螢光的磁性奈米鑽石，並於來標定子宮頸癌細胞，見

圖1.14[33]。而台灣的團隊Wee等人利用高能質子束撞擊製造出具有高濃度缺陷的奈米鑽石，在488 nm雷射激發下，會放出高強度的綠色螢光，利用螢光影像來當作子宮頸癌細胞的生物標定[34]。Lim等人則是將奈米鑽石沈積在銀薄膜上，以增加其螢光強度[35]。

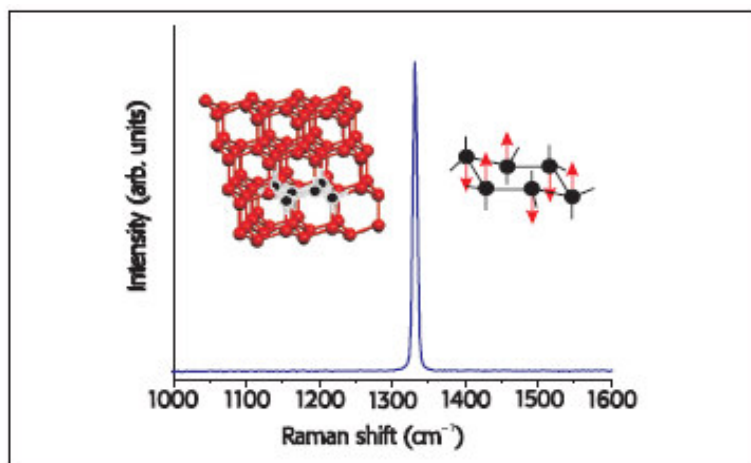


圖1.8 天然鑽石的拉曼譜線峰值 [27]

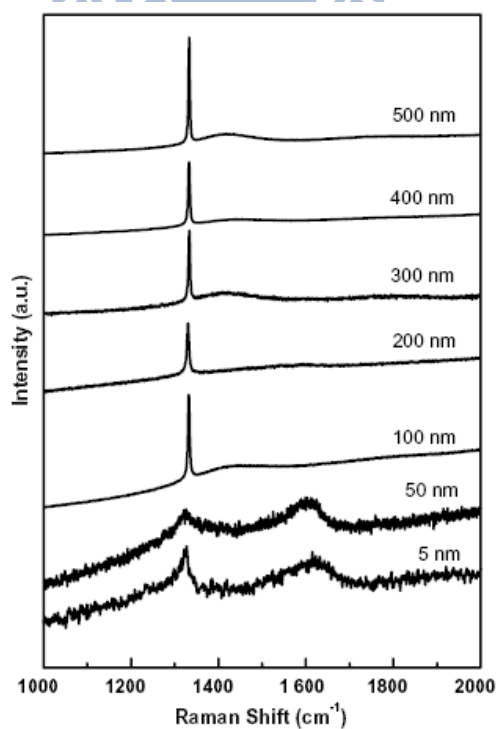


圖1.9 在533nm激發波長下，不同大小奈米鑽石的拉曼光譜[29]

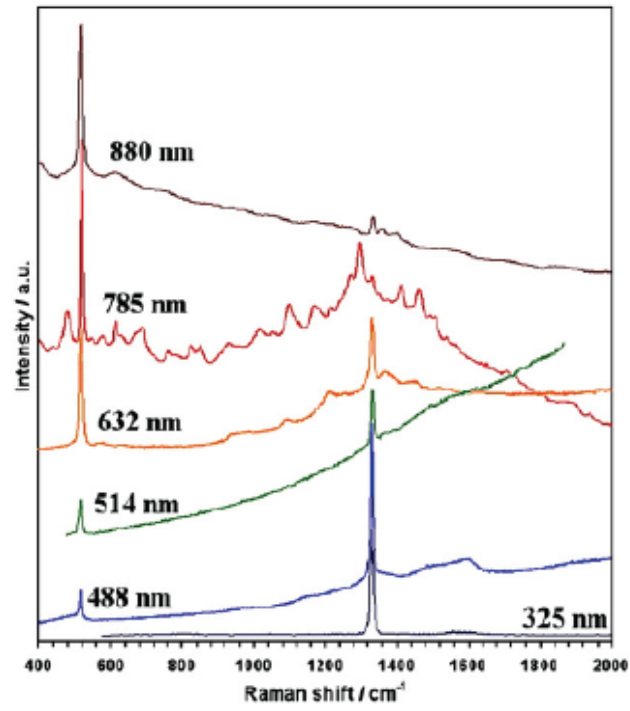


圖1.10 不同雷射激發光源下量測2 μm 鑽石薄膜的拉曼光譜[30]

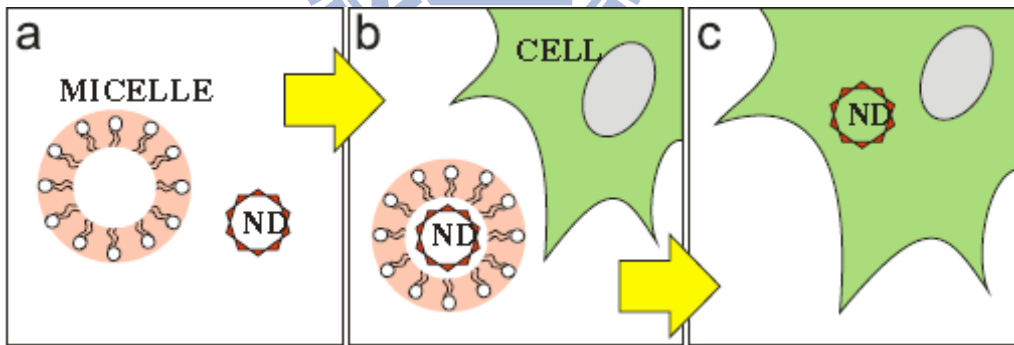


圖1.11 奈米鑽石進入細胞的過程[32]。

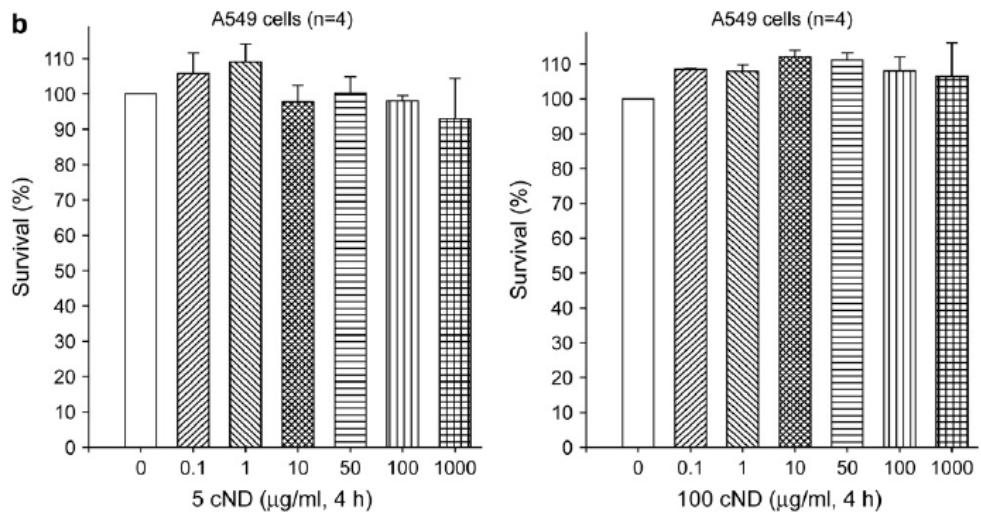


圖1.12 酸化後的奈米鑽石在A549(人類肺上皮細胞)的細胞毒性測試[28]。

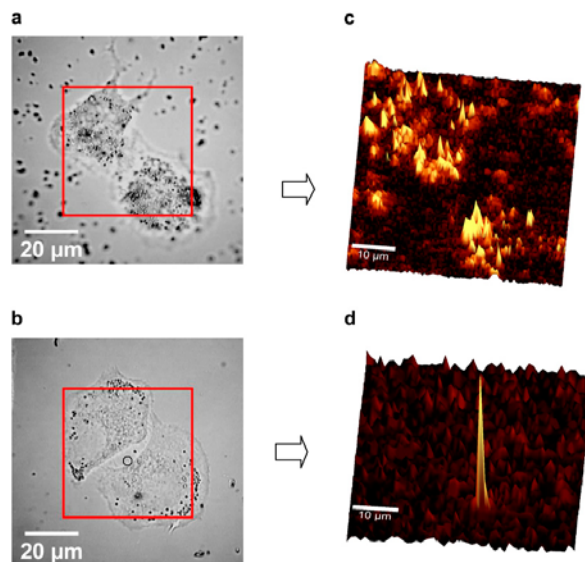


圖1.13 單一酸化奈米鑽石聚集在A549細胞裡的x、y軸掃描式共軛焦拉曼光譜圖[28]。

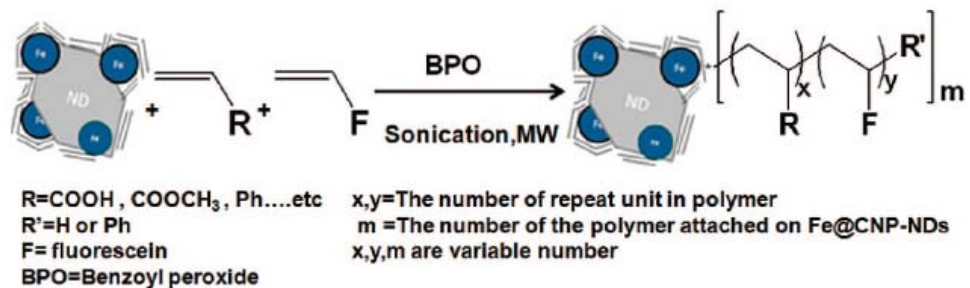


圖1.14 具磁性的奈米鑽石表面官能基改變示意圖[33]。

1-5 研究動機與目的

將奈米技術和生物科技結合是現今很受歡迎的議題，奈米粒子可用來當作生物體的探針或感測器，為了達到這個目的，具有生物相容性和不具細胞毒性是不可或缺的條件，此外，表面易官能基化和修飾，以利於和生物體連接也是極為重要的因子。

本實驗室對於奈米鑽石的光性量測上具有相當程度的探討與瞭解，並期望能在生醫領域有更深入的應用。故我們以具有拉曼訊號的奈米粒子結合生物體做為標定，量測其訊號並觀察奈米粒子的分佈情形。另一方面，我們嘗試用PDMS翻製法建構出微流道系統。接著，把奈米粒子注入流道，定點偵測奈米粒子的拉曼訊號。這種方法的優點有減少樣品使用量、即時獲得偵測訊號、低偵測極限以及不會破壞樣品。在未來，希望能夠建構一整套全自動化的光學即時偵測系統，並能發展成為實際可應用的晶片。

第二章 實驗技術與原理

2-1 微影技術與電子束微影

2-1-1 微影技術簡介

微影(Lithography)、氧化(Oxidation)、蝕刻(Etching)、擴散(Diffusion)、沉積(Deposition)，是一般半導體製程的幾個主要步驟，而微影製程是其中最為關鍵的技術，定義了圖案的精確度和微小化，根據統計，一家晶圓廠內跟微影製成相關的經費超過全部預算的百分之三十，可看出微影技術對整個積體電路製程的重要性。如果我們能在有限大小的晶圓寫出更多圖案，不僅可以提高元件密度，更能增進產值，故微影技術也是整個半導體工業發展水平的指標。傳統的光學微影需選用適當的曝光光源、光罩(mask)以及步進系統來完成，光學微影具有產量大、良率高以及低成本等優點，故為現今微影技術的主流。根據雷利準則(Rayleigh criterion)，光學系統所能區分的最小寬度為解析度(resolution)，和波長(λ)以及數值孔徑(NA)有關， $\text{Resolution} = K1\lambda/\text{NA}$ ($K1$ 為製程參數)，故我們可藉由選擇更短的波長和較大的數值孔徑來增加解析度，但因數值孔徑的大小有一定的限制，較好的方法是選擇短波長的曝光光源，舉例來說，光學微影所選用的曝光波長，已經從G-line(436 nm)、I-line (365 nm)、KrF(248 nm)、ArF(193 nm/DUV)、F₂ (157 nm/VUV) 發展到Ar₂(126 nm)，見圖2.1[36]

但由於曝光波長的限制，傳統的光學微影即將到達極限，故需開發新的

微影技術來取代原本的光學微影，一些更適合小尺寸的微影技術不斷被開發，例如極紫外光微影(extreme UV lithography)、聚焦式離子束(focus ion beam, FIB)、X光微影(X-ray lithography, XRL) 和奈米壓印微影(nanoimprint lithography)、電子束微影(electron beam lithography)和離子束微影(ion beam lithography)等，見表2.1[37]。其中，電子束微影的波長為深紫外光的數千分之一，因而具有極高解析度，且不需使用光罩，故電子束微影在下個世代的微影技術中占有不可或缺的角色。

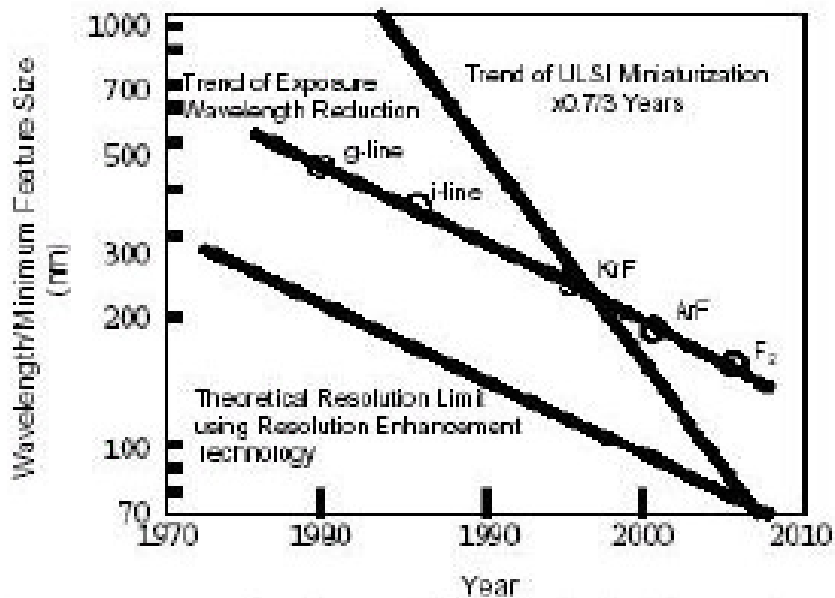


圖 2.1 光源波長與製程微小化的趨勢圖[36]

表2.1 各種微影技術比較[37]

	技術	圖案產生	曝光模式	曝光範圍	光阻材料	特徵尺寸	產量 (晶圓/時)
寫入	微影	光罩	紫外線 深紫外線 極紫外線	晶圓/10 mm	光敏性	250 nm 180 nm 100 nm	10~50
	全相術	週期性	深紫外線	晶圓掃描	光敏性	150 nm	45~
	聚焦離子束	直寫	離子	0.1~10 mm	薄膜	10 nm	0.1
	X光	光罩	X光	晶圓	光敏性	50 nm	10~40
	電子束	直寫	電子束	0.1~10 mm	光敏性	2 nm	0.1
轉印	奈米壓印微影	模板	熱與壓力	晶圓	熱塑性	10 nm	12~60
	紫外線奈米 壓印微影	模板	紫外線	3.5x3.5 mm	光敏性	10 nm	60
	軟微影	PDMS	墨水	晶圓	自組裝	60 nm	10~20



2-1-2 電子束微影系統

電子束微影(Electron Beam Lithography)是利用高能電子群，經電磁裝置控制方向後，照射於塗布光阻的基版上，經過軟烤和顯影等步驟，使圖案顯現出來，基本製程見圖2.2。根據德布洛伊(de Broglie)物質波公式，

$$\lambda = h / P = h / (2mE_K)^{1/2} = h / (2mqV)^{1/2}$$

$$= 6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s} / (2 \times 9.11 \times 10^{-31} \text{ kg} \times 1.6022 \times 10^{-19} \text{ C} \times \underline{X} \text{ eV})^{1/2} = 1.23 \text{ nm} / (\underline{X})^{1/2}$$

其中 λ 為電子束的波長， h 為浦朗克常數， P 為動量， q 為電子電荷， m 為電子質量， V 為加速電壓。當電子的加速電壓為10kV時，物質波波長0.012 nm，解析度遠比傳統光學微影系統高出許多。

電子束微影的主要組成為電子光學柱，包含電子槍 (Electron Gun)、開關 (Blanking)、聚焦透鏡 (Condense Lens)、像差校正器 (Stigmator)、物鏡 (Objective Lens)、偏折器 (Deflector)、電子偵測器 (Electron Detector) 及移動平台 (Stage Driver) 等，見圖2.3[38]，電子光學柱為高真空狀態，主要用來產生均勻分布的電子束，經由適當的成像系統控制電子束大小及位置後，投射至基版上。而電子束的發射原有熱游離發射 (Thermoionic Emission)、場發射 (Field Emission) 與蕭特基(Schottky)發射，其中蕭特基發射結合了熱游離發射和場發射的優點，且電子束小、穩定度高、雜訊低，故為現今主要的電子束發射原，不同電子束發射原的比較見表2.2[39]。

在此我使用國立交通大學奈米科技中心的電子束微影系統(Electron

Beam Lithography System), 型號為ELS-7500EX, 由日本ELIONIX Inc.所製造, 電子槍為氧化鋯/鎢(ZrO/W)蕭特基場發射源, 加速電壓可達50 kV, 最小線寬可至10 nm, 見圖2.4[40]。

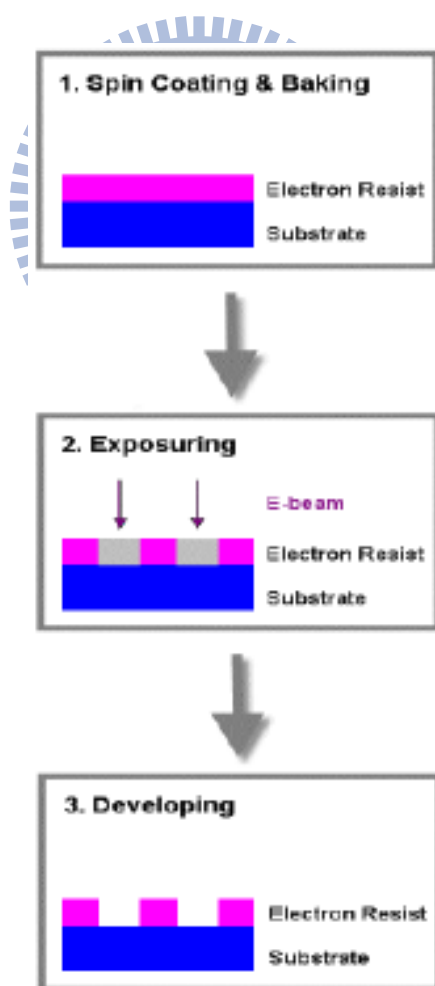


圖2.2 電子束微影基本製程示意圖

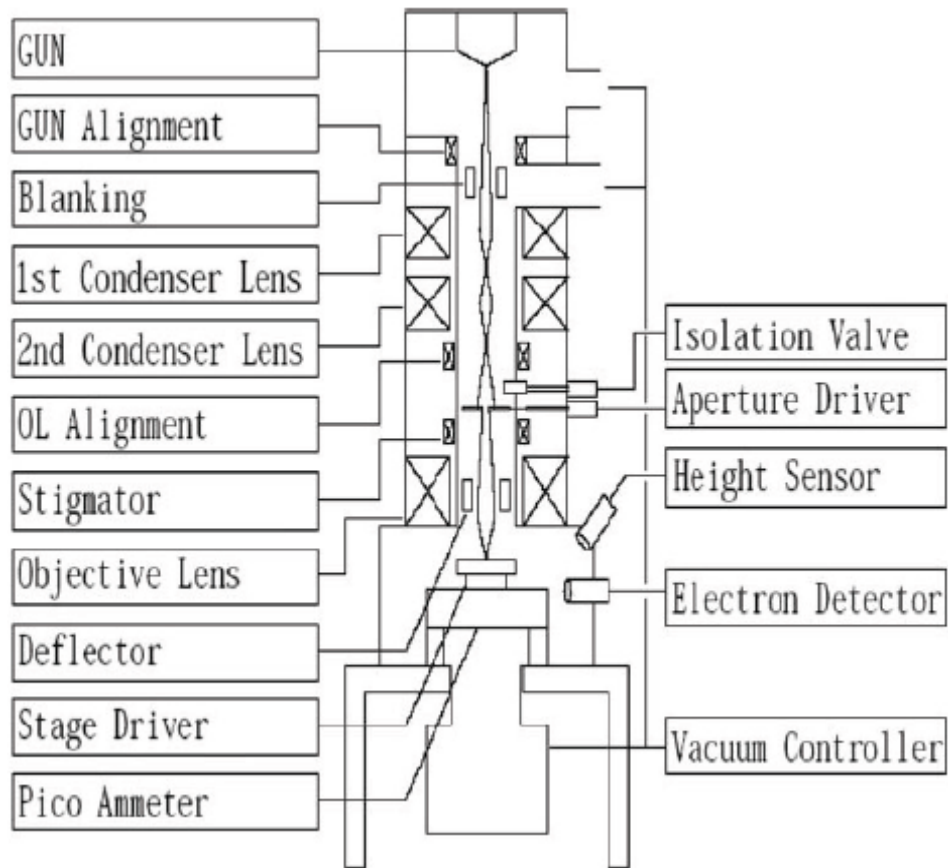


圖2.3 電子光學柱的組成 [38]

表2.2 不同發射原的比較[39]

	SCHOTTKY	COLD FIELD	LaB6	TUNGSTEN
Source Size(nm)	15	3	104	>104
Energy Spread(eV)	0.3-1.0	0.2-0.3	1.0	1.0
Brightness(A/cm25R)	5×10^8	10^9	10^7	10^6
Short-term Beam Current Stability(%RMS)	<1	4-6	<1	<1
Operating Vacuum(Torr)	10^{-9}	10^{-10}	10^{-7}	10^{-5}
Typical Service Life(hrs)	6000	2000	1000	100



圖2.4 電子束微影系統(ELS-7500EX)[40]



2-2 拉曼散射光譜和表面增顯拉曼光譜

2-2-1 拉曼散射光譜

當入射光束照射到某物質，入射光子與分子碰撞，光子因動量改變而向四面八方散射。大部分光子都是發生彈性碰撞，也就是說散射光子的頻率和入射光子相同，並沒有發生能量交換，這種散射稱為瑞利散射(Rayleigh scattering)。然而，有一小部份的散射光子會和入射光子的頻率不同，當碰撞發生時，聲子和光波發生交互作用，有些光子會將部份能量給予分子，使分子處於轉動、振動或是純轉動、純振動的狀態，因此光子的頻率就會減小，散射光的頻率小於入射光；然而如果分子一開始便處於轉動、振動或是純轉動、純振動的狀態，則與光子碰撞後將會把能量給予光子，使得分子本身回復到基態，如此一來，散射光的頻率會大於入射光，這種因能量不足而使分子發生電子能階躍遷的非彈性碰撞現象稱為拉曼散射(Raman scattering)，是由印度科學家V. C. Raman在1928年發現，並於1931年獲得諾貝爾物理獎。

我們可以用古典力學的觀點來說明拉曼散射，當一個等方性(isotropic)的分子置於電場 \vec{E} 時，分子會產生偶極矩 \vec{P} ： $\vec{P} = \alpha \vec{E}$ 。此時，電場和偶極矩之方向均指向同一方向，極化率 α 為一純量。但如果電場是由頻率 ν_0 之電磁波所產生，則 $E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ ， $p = \alpha \times E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ ， E_0 為電場之振幅。如果分子的極化率隨時間改變（分子以頻率 ν_k 轉動或振動），則極化率變為：

$\alpha = \alpha_0 + (\Delta\alpha) \cos 2\pi\nu_K t$ ，其中 α_0 為平衡時的極化率，而 $\Delta\alpha$ 則為其最大改變量。

帶入極化率並積化和差後，偶極矩變為

$$\begin{aligned} p &= [\alpha_0 + (\Delta\alpha) \cos 2\pi\nu_o t] E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} (\Delta\alpha) E_0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_K) t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_K) t] \end{aligned}$$

其中 ν_0 、 $\nu_0 + \nu_K$ 、 $\nu_0 - \nu_K$ 分別表示瑞利散射、反史托克散射(anti-Stokes scattering)和史托克散射(Stokes scattering)，見圖2.5所示。

反史托克散射和史托克散射都屬於電磁輻射受物質的分子散射所產生的拉曼散射現象。史托克散射是當入射光子激發低能階的聲子時，光子給予聲子能量，使聲子躍遷到高能階，並放射出能量變小、波長變長的光子；而反史托克散射則是聲子原本處在高能階狀態，與入射光子碰撞後，聲子失去能量而躍遷至較低的能態上，如圖2.6[41]所示。

一般來說，反史托克散射發生的機率比史托克散射小很多，故反史托克線強度也相對弱很多，因此我們量測一般只看史托克光譜的部份。拉曼散射的譜線位移量通常是以 cm^{-1} 的波數(wave number) 來表示，其中拉曼譜線的波數值和入射光譜線波數值的差值就稱為拉曼位移(Raman shift)。而值得一提的是，不論是史托克譜線或是反史托克譜線，同類的聲子的拉曼譜線移位量是一個固定的數值，不會隨著不同的入射光頻率而有所不同。

拉曼光譜初期由於光源不佳、光譜強度低，導致量測困難，故並未普及，直至1964年，開始將雷射應用於拉曼散射光譜的測定，雷射的可聚焦特性使拉曼光譜可運用在定量分析極小的樣品。又因電子儀器的進步，使

微弱信號得以放大，光譜可以即時顯示，此外，新型偵測器、顯微技術、光纖導光系統、高性能電腦系統的引入，更使拉曼光譜具有更多的發展的空間。使用拉曼光譜的優點包括樣品需求量少、對於水的訊號干擾不靈敏、具有環境靈敏度和對樣品不具破壞性，故目前拉曼光譜也已被廣泛的運用在生物系統的量測上。

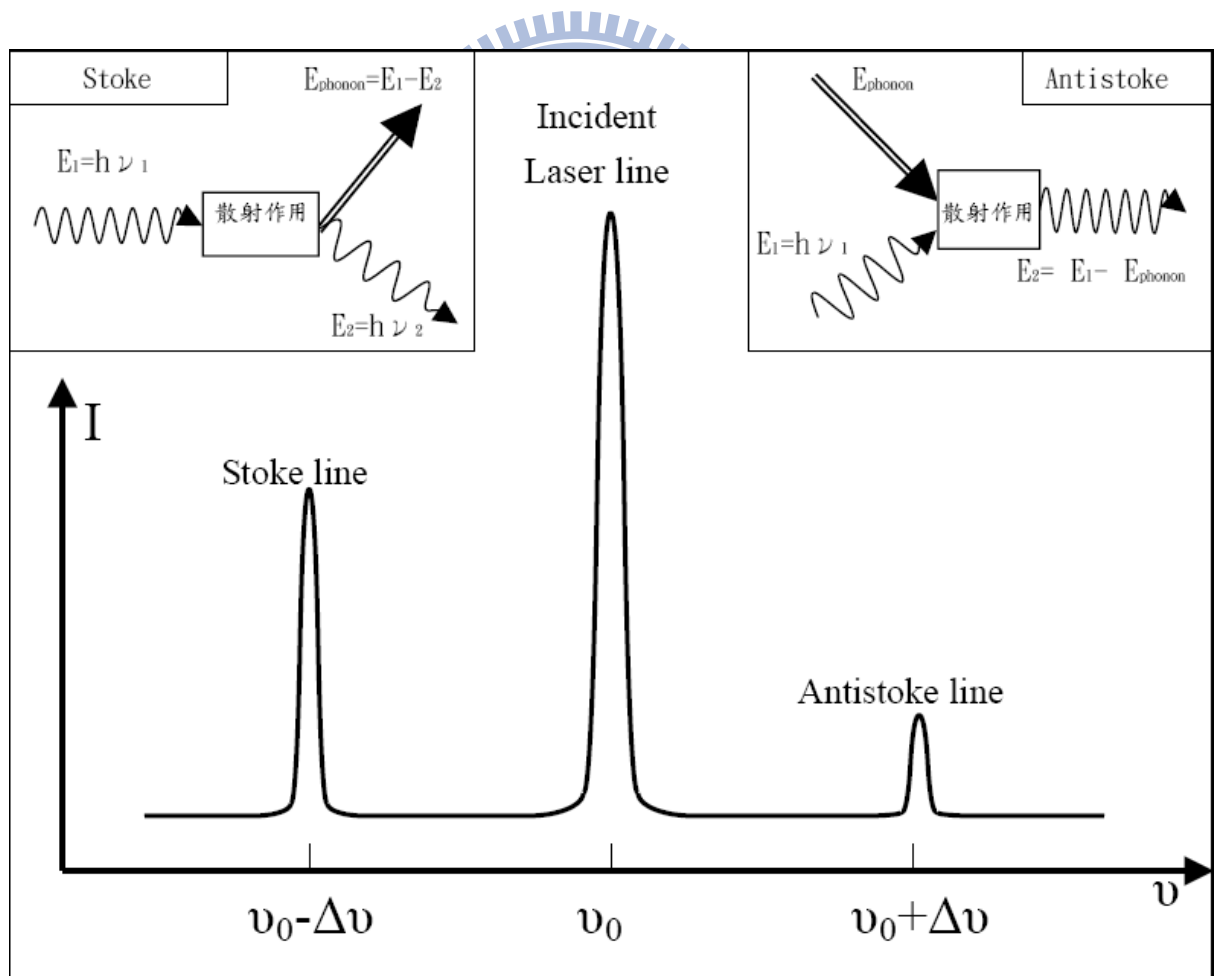


圖2.5 拉曼光譜示意圖

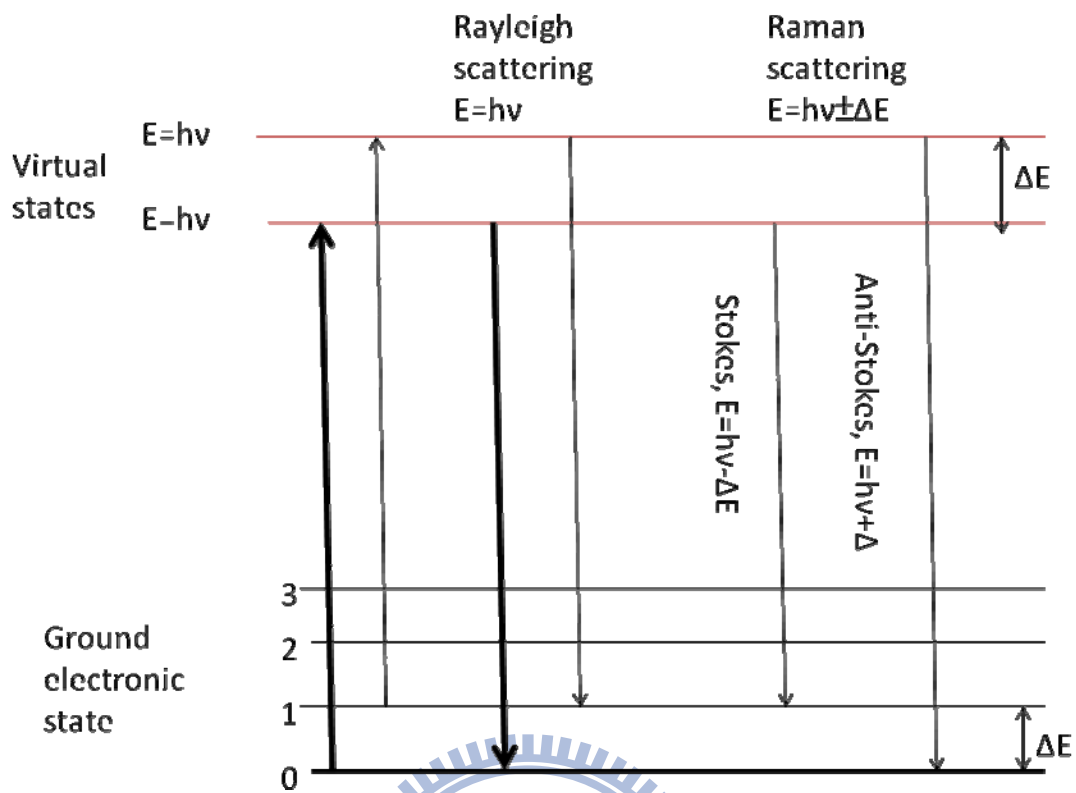


圖2.6 Rayleigh散射、anti-Stokes散射和Stokes散射的能階躍遷 [41]



2-2-2表面增顯拉曼光譜

表面增顯拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering)是在1974年由 Fleischmann 等人觀察到pyridine吸附在粗糙銀電極表面會產生增強數百萬倍的強大拉曼譜線[42]；且經由Van Duye 等人通過實驗和計算發現，吸附在銀電極的表面pyridine分子對拉曼訊號的貢獻是溶液中分子的 10^6 倍，之後許多團隊陸續證明訊號增強不只是因為粗糙表面使表面積增加，更因貴重金屬(如金、銀)的奈米結構而造成訊號強度顯著提昇。一般而言，表面增強機制主要涉及兩種要素。第一種為電磁效應(electromagnetic effect)，又稱為場效應(field effect)，通常會發生在接近金屬表面，分子偶極矩驅動產生表面電漿共振(surface plasmon resonance)導致分子獲得極大的局部電磁場，當發生電磁效應時，SERS的拉曼譜峰位置並不會改變，第二種為化學效應(chemical effect)又稱為分子效應(molecular effect)，主要是由於分子與金屬表面發生交互作用導致分子極化率受到影響，化學效應的產生通常伴隨拉曼譜峰的位移。一般來說，電磁效應和化學效應幾乎同時存在，但分子的種類、表面性質、環境條件甚至鍵結都會影響何者才是主導因素。

以下分別介紹電磁效應和化學效應的原理：

(一)電磁效應：

電漿原本是用以描述熔融狀態的帶電離子系統，但因金屬內部的自由電子可視為限制在金屬體積範圍內的高密度電子流體(electron liquid)，故可

將金屬視為一種電漿系統。由古典理論來看，光是可以誘發分子偶極矩的電磁波，而所誘發的偶極矩會變成分子的振動能。我們考慮一半徑 a 遠比入射光波長 λ 要小的圓球形金屬奈米粒子，因為奈米粒子非常小，金屬粒子的集膚效應(Skindepth effect)可以忽略。因金屬中的自由電子可任意移動的特性，自由電子會隨著電場的驅動而振盪。當電磁波通過一金屬奈米球，產生電場會使金屬奈米球表面電子電荷規律性振盪，其頻率與外加電磁波振盪頻率相同。也就是說，外加電磁波可使原本金屬奈米球內的不規律自由電子轉變成規律振盪的電子運動，而形成電漿子共振(Plasmon resonance)，見圖2.7[43]

一般正常拉曼散射之輻射功率可表示為：

$$P^{RS}(\omega_s) = N \cdot \sigma_{free}^R \cdot I(\omega_0)$$

其中， N 為所探測分子數目， σ_{free}^R 為探測分子的正常拉曼散射截面， $I(\omega_0)$ 為入射光強度。

而考慮到表面增顯拉曼散射的情況則複雜許多，見圖2.8[44]，為探測分子在聚簇的金屬球粒子中的情形。我們在此暫時先只計算吸附條件相同的表面分子，其拉曼散射截面相同；並且假設這些表面分子所感受到的電磁強化條件也會一樣。則表面增顯拉曼散射之輻射功率可表示為：

$$P^{SERS}(\omega_s) = N' \cdot \sigma_{ads}^R \cdot |A(\omega_0)|^2 \cdot |A(\omega_s)|^2 \cdot I(\omega_0)$$

其中， N' 為吸附在金屬粒子上所探測分子數目， σ_{ads}^R 為探測分子的表面強化



拉曼散射截面， $A(\omega_0)$ 、 $A(\omega_s)$ 分別為入射場及散射場的場強化因子，其與環境介電常數、金屬球介電常數、金屬球半徑、及分子與金屬球的距離有關， $I(\omega_0)$ 為入射光強度。

圖2.9[44]為電磁波增顯拉曼之示意圖，其中，奈米金屬球的介電常數為 ε ，周圍介質的介電常數為 ε_0 ，分子與最鄰近奈米金屬球的距離為 d ，入射電磁場強度為 E_0 ，所感受的電磁場強度為 E_M ，而感受電磁場與入射電磁場之比值即為場強化因子 $A(\omega)$ ，可表示為：

$$A(\omega) = \frac{E_M(\omega)}{E_0(\omega)} \propto \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} \left(\frac{R}{R+d}\right)^3$$

當 $\varepsilon(\omega)$ 的實部等於 $-2\varepsilon_0$ 且虛部極小時， $A(\omega)$ 有極大值，此時可達到金屬奈米球表面電漿共振激發，其共振頻率 $\omega_R = \omega$ ，共振波長 $\lambda_R = \frac{2\pi c}{\omega}$ 。而當史托克斯散射發生時，也會受到奈米金屬球團簇之電磁強化產生輻射，因此史托克斯散射強度之總電磁強化可表示為：

$$G_{em}(\omega_s) = |A(\omega_L)|^2 \cdot |A(\omega_s)|^2 \propto \left| \frac{\varepsilon(\omega_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\omega_s) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_s) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left(\frac{R}{R+d}\right)^{12}$$

以上結果敘述了電磁效應增顯拉曼散射光譜有幾個必要條件：

1. 拉曼散射電磁強化為入射場強化因子與放射場強化因子的平方相乘，會正比於場強化因子之四次方。
2. 當入射頻率等於表面電漿共振頻率時，其低拉曼頻率較接近共振頻率，故低拉曼頻率之拉曼散射電磁強化因子略大。
3. 入射波長與散射波長同時激發表面電漿共振時，拉曼散射電磁強化為最

大值。

4. 電磁效應不需金屬奈米粒子與分子直接接觸即可發生表面增顯拉曼散射。但一旦距離增加時，強化因子會急劇衰減，其值正比於 $(\frac{R}{R+d})^{12}$ ，故吸附分子不能跟表面距離太遠。
5. 金屬奈米粒子內徑需小於入射光波長。

(二)化學效應：

我們可由圖2.10[45]來說明化學增顯的機制，其中吸附分子的最低未填滿分子軌域(Lowest unoccupied molecular orbital, LUMO)會和最高填滿分子軌域(highest occupied molecular orbital, HOMO)對稱分佈在金屬的費米能階(Fermi level)之間。一般共振拉曼散射過程中，當光子消逝後，能量會轉為電子所需的激發能，使熱電子經由最高填滿分子軌域躍遷到最低未填滿分子軌域。而表面增顯拉曼散射則是需要分子極靠近金屬奈米結構的表面，使激發後的熱電子直接由金屬導帶(conduction band)躍遷到最低未填滿分子軌域，再由最低未填滿分子軌域回到金屬，使電子回到基態時，能量轉為stokes光子，並以拉曼散射的形式放出能量，故化學增顯效應的必要條件為在金屬奈米粒子表面做出粗糙化結構，以增加局部電子密度，藉此使躍遷熱電子數目遞增。

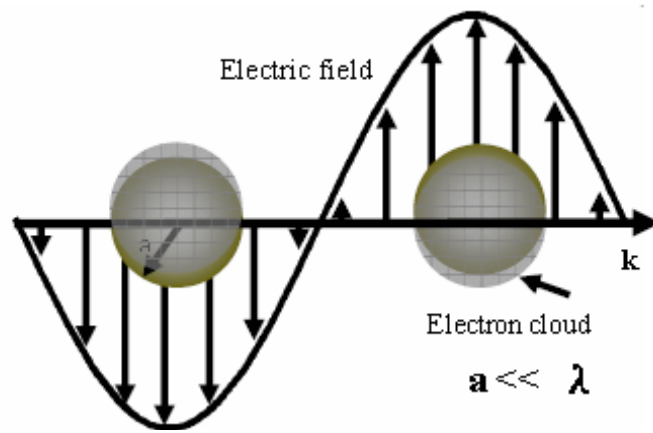


圖2.7 金屬奈米球受到外加電磁場作用下所產生的電漿子振盪示意圖[43]

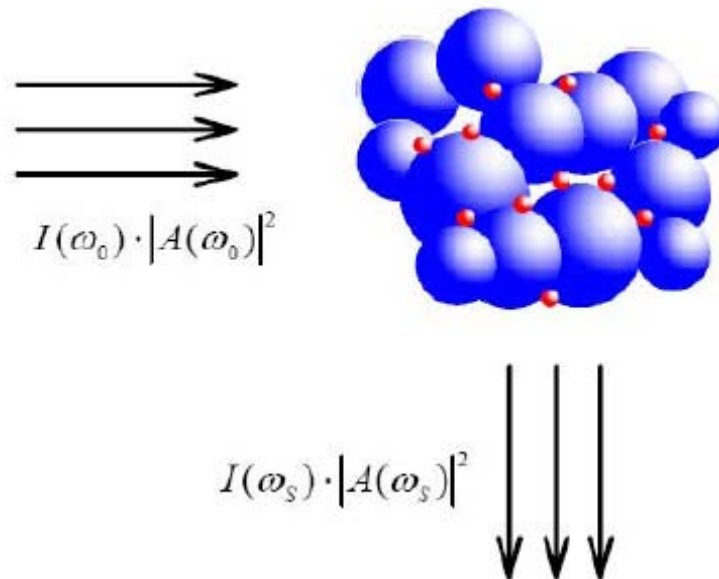


圖2.8 金屬球團簇的SERS 示意圖[44]。

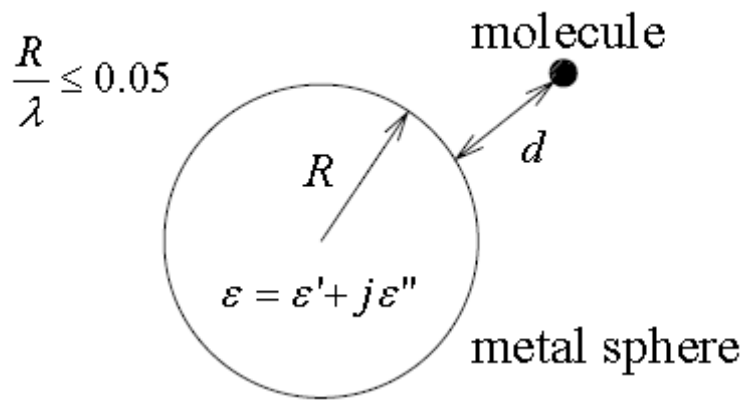


圖2.9 電磁波增顯拉曼的示意圖。其中， ϵ 為金屬球的複介電常數， ϵ_0 為週圍介質的介電常數，金屬球之半徑 $R \ll \lambda$ [44]

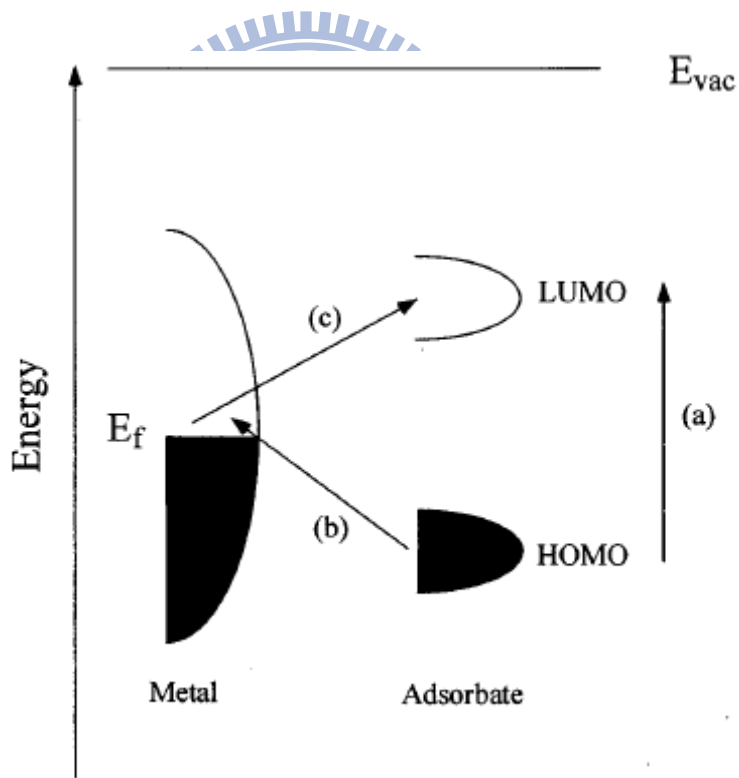


圖2.10分子吸附在金屬表面的能階圖[45]

2-3 共軛焦顯微技術

早在1884年Ernest Abbe就已提出因光波繞射的限制，使傳統光學顯微鏡的解析力有限[46]，而Marvin Minsky在1957年提出「共焦」可以有效提高光學顯微鏡的解析力，但當時由於沒有適當的光源以及相呼應的電腦系統，故一直無法付諸實行。直到1969年，Paul Davidovits和M. David Egger使用5 mW的He-Ne雷射當光源，建構了第一台可以應用的共軛焦顯微鏡系統[47]，之後經過不斷的嘗試與改進，才於1987年推出商業化的共軛焦顯微鏡。

我們由Fraunhoffer繞射條件可以計算出傳統光學顯微鏡的最小解析範圍 d ，必須符合：

$$d \geq \frac{1.22 \cdot \lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \theta} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

其中 λ 是光波長、 n 為折射係數、 θ 是光孔徑半角，而 NA 則是透鏡數值孔徑 (numerical aperture, NA)，所以對於傳統顯微鏡，要提高解析度就必須採用較短波長的光源和增大數值孔徑。又數值孔徑 $NA = n \sin \theta$ ，所以提使用高折射係數的介質以及選用光孔徑半角大的物鏡，都可以提高 NA 值。

共軛焦指的是顯微鏡的物鏡(objective)焦點和聚焦透鏡(focusing lens)的焦點位置互相對稱，樣本與影像的聚焦為點對點對稱，如圖2.11[48]。一雷射光束經由物鏡聚焦於焦平面後，再自焦平面產生反射光，反射光經分光鏡 (beam splitter) 分光和聚焦透鏡的聚焦，通過光路中的共焦針孔(confocal

pin hole)將反射光導入光偵測器(photon detector)中以偵測反射光強度，進行光譜分析。而雷射光源在激發聚焦平面(Focus plane)樣品的同時，也會照射到物鏡聚焦平面以外的區域(Reference plane)並且產生訊號，其中共焦針孔的設置可以有效阻擋來自物鏡聚焦區域以外的反射光源，並更加精確的取得聚焦平面上的訊號，如此一來，可得到比傳統光學顯微鏡更加清晰的訊號及更好的鑑別率。經過計算共焦顯微鏡的橫向解析力 d 表示為：

$$d = 0.5 \frac{\lambda}{NA}$$

共焦顯微鏡的橫向解析力優於傳統的光學顯微鏡，主要是由於共焦針孔的裝置，可以排除聚焦平面以外的訊號，並提高影像的鑑別度，而共焦顯微鏡的縱向解析力主要來自光源在縱軸方向的深度，以下式表示之：

$$Z_{\min} = \frac{2\lambda\eta}{(NA)^2}$$

其中 η 為聚焦面介質的折射係數。以傳統顯微鏡對樣品作觀測，當其偏離焦平面時，會產生散焦的情況，對焦平面所產生的影像造成干擾，而此時影像中心的強度亦會隨著降低，但經共焦顯微鏡所取得影像的強度隨散焦距離的變化則比傳統顯微鏡劇烈得多。並配合掃描式共焦顯微鏡系統獨特的共焦針孔僅擷取聚焦面上所產生的影像及訊號，若我們逐步移動聚焦平面，則可得到樣品其深淺不同的切面影像及訊號，將這些切面的影像訊號經過電腦處理之後，即可重組出相對應的三度空間影像訊號。

在此我使用的是國立交通大學奈米科技中心的共軛焦顯微鏡，型號為LabRAM HR800，由法國HORIBA JOBIN YVON公司所製造，內建633 nm He-Ne雷射，光偵測器有兩種，一是SYMPHONY公司的CCD(Charge Coupled Device)偵測器，另一個是In/Ga/As photo diode。CCD是屬於液態氮冷卻(LN₂ cooling)，工作的範圍從200 nm~1000 nm，工作效率最佳的位置在700 nm附近，而最低可偵測至200 nm的UV光波段。而In/Ga/As photo diode所針對的量測波段是900 nm~1700 nm的近紅外光(NIR)波段。透過兩台光偵測器讓我們可以蒐集200 nm~1700 nm的訊號，提供我們做為分析的依據。另外還搭配了一個步進式的移動平台，再加上用壓電材料控制Z軸的物鏡，可做XY二維平面掃描或XYZ三維深度切片的掃描，並配合電腦處理即可在不破壞樣品的情況下得到三度空間形貌或是分析樣品深度切面的訊號。

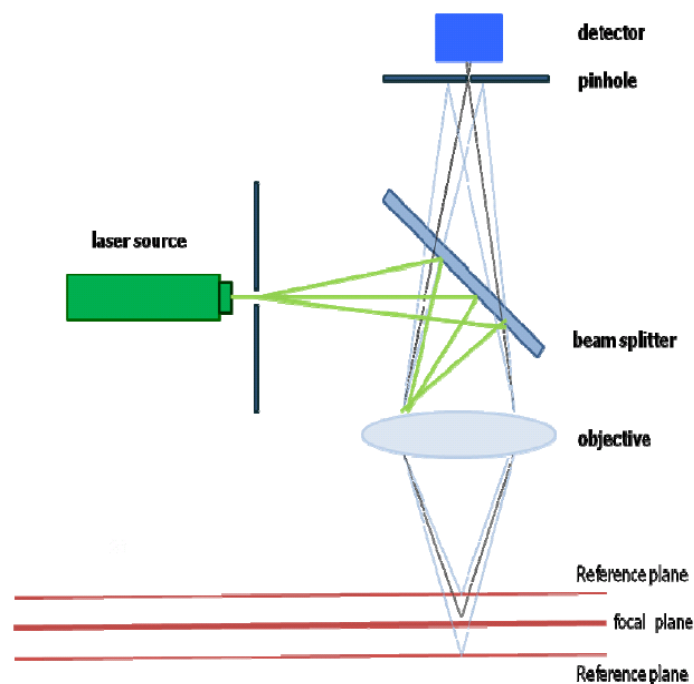


圖2.11 共軛焦顯微鏡原理及組成[48]

第三章 實驗方法與微流道製作

3-1 實驗藥品與儀器

3-1-1 實驗材料與樣品

(1) Acetone

$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ，MW:58.08，購自TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(2) Isopropanol(IPA)

$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ，MW:60.10，購自TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(3) Nanodiamond

Size:0-0.25 μm ，購自BAOO WEI International Co., Ltd.

(4) Sulfuric Acid

H_2SO_4 ，MW:98.08，購自TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

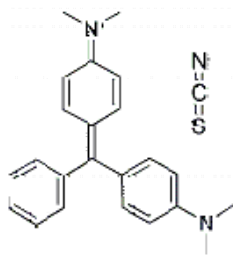
(5) Nitric Acid

HNO_3 ，MW:63.012，購自TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(6) Ethanol

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ，MW:46.07，95%，購自UNI-WARD Corp.

(7)malachite green



，購自 invitrogen

(8)Au particle

Size: 13nm，購自 sigma

(9) dimethyl sulfoxide(DMSO)

購自 sigma

(10) trypsin-EDTA solution

0.05% trypsin-0.53mM EDTA.4Na, 購自 invitrogen

(11) Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS)

購自 invitrogen

(12) Trypan blue

0.4% w/v, 購自 GIBCO

(13) culture medium

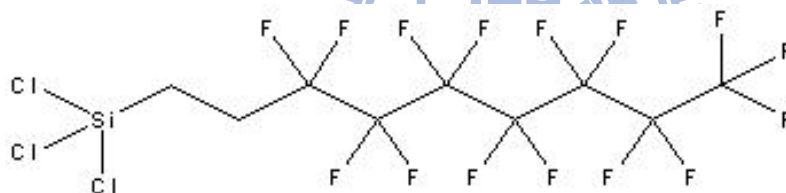
購自 invitrogen

(14) SU-8 2015

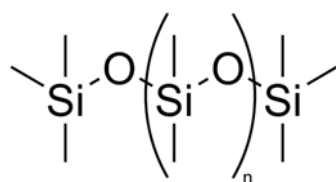
(15) SU-8 development

購自 MicroChem

(16) 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane (FOTS)



(17) Polydimethylsiloxane (PDMS)



(18) Phosphate buffered saline (PBS)

pH:7.4, 購自 Bio basic Inc.

(19) EDC (or EDAC; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$, MW:191.71, 98+%, 購自 Alfa Aesar

(20) N-hydroxy succinimide (NHS)

$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, MW:115.09, 98+%, 購自 Alfa Aesar

(21) 2-(4-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate(MES)

$C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$, MW:213.26 , 98% , 購自 Alfa Aesar

(22)Human Growth Hormone (hGH)

MW : 22.2k , 購自 Abcam



3-1-2 實驗儀器

(1)旋轉塗佈機(Spin coater)

(2)微量離心機(Micro- centrifuge)

DENVILLE的桌上型離心機260D

(3)加熱板(Hot plate)

(4)電子束微影系統(Electron Beam Lithography System , ELS-7500EX ,

ELIONIX Inc.) , 交通大學奈米科技中心

(5)共軛焦顯微鏡(Confocal microscopy , LabRAM HR800 , HORIBA JOBIN

YVON) , 交通大學奈米科技中心

(6)培養箱 (incubator)

COCONO恆溫培養箱 , 型號HR-80396

(7)氧電漿處理器

All real 的plasma cleaner , 型號PCD150

(8)血球技術盤

(9)計數器

(10)二氧化碳培養箱(CO₂ incubator)

(11) 場發射穿透式電子顯微鏡(Field Emission Transmission Electron

Microscope, FETEM) , 交通大學奈米科技中心

(12)振盪器



(13)電穿孔儀

BTX 電穿孔儀，型號為ECM830

(14)恆溫水浴槽(water bath)

(15)離心機(centrifuge)

BECKMAN的桌上型離心機，型號為Allegra X-12R

(16)無菌操作台 (laminar flow)

REVCD的垂直循環落地型無菌操作台，型號TBH-420

(17)試管振盪器(maxi-mixer)

Scientific industries的試管振盪器，型號vortex-genie2

(18) 共軛焦顯微鏡(Confocal microscopy)

OLYMPUS公司生產的共軛焦顯微鏡，型號為FLUOVIEW™ 1000



3-2 細胞培養與金球表面修飾

3-2-1 細胞繼代培養操作

本實驗使用的細胞為Hep G2，屬於附著型(adherent)細胞，ATCC編號為60025，cell type為Human hepatoblastoma，是人類肝癌細胞的一種。當細胞培養至高濃度，導致佔滿平面生存空間時(confluence)，需進行繼代培養(subculture)，收集細胞分殖進入新的培養皿中，操作步驟如下：

- (1) 吸去舊的培養液。
- (2) 用BPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)清洗兩次。
- (3) 加入1 ml的trypsin-EDTA溶液(0.05% trypsin-0.53mM EDTA.4Na)，並放入37°C的CO₂培養箱作用2分鐘。
- (4) 放置於倒立顯微鏡下觀察，可看到將要分離而成圓粒狀浮起的細胞或已剝落的細胞，此時輕敲培養皿，使更多細胞脫落，並加入1ml含血清之新鮮培養基(90% Minimum essential medium with non-essential amino acids and Earle's BSS+10% fetal bovine serum)，血清中的trypsin inhibitor可終止trypsin的作用，用吸管吸放數次以打散細胞團塊，並依稀釋比例轉移至添加新鮮培養基之培養皿，繼續放置CO₂培養箱中培養。

3-2-2 奈米金修飾上孔雀綠步驟

奈米金球可藉由表面電漿共振來增強吸附於其表面上的奈米粒子訊號，此篇論文使用孔雀綠吸附在13 nm大小的奈米金上，修飾方法參考文獻[33]，步驟如下：

- (1) 取40 μl 的孔雀綠(20 μM) 和160 μl 的DMSO混和，將孔雀綠濃度稀釋成4 μM 。
- (2) 取420 μl 的金球和430 μl 的滅菌水混合，再加入150 μl 的4 μM 孔雀綠，在25 $^{\circ}\text{C}$ ，速度120 rpm下shaking10分鐘。
- (3) 加入10 μl 的hexanthiol，在25 $^{\circ}\text{C}$ ，速度120 rpm下反應1小時，此步驟為了防止金球聚集。
- (4) 在轉速8rpm下離心5分鐘，去除上清液，取100 μl 的DMSO回溶，並加入100 μl 的FBS，此步驟為了保護金球，使其不易聚集。

3-2-3 奈米金球結合人類生長激素步驟

人類生長激素(Human growth hormone, hGH)是一種蛋白質荷爾蒙，由腦下垂體所分泌，含有192個胺基酸分子，分子量為22.2 kDa。而癌細胞含有許多生長激素受器(Human growth hormone receptor, hGHR)，分佈在細胞膜上，一旦與生長激素結合，形成激素-受器複合體，引發一系列的生化反應，造成癌細胞的壯大[43]，也可以說，生長激素受器的多寡代表某些癌細胞的發展情況，在此我使用奈米金和奈米鑽石分別結合生長激素，當作生物探針，觀察生長激素受器在Hep G2肝癌細胞的分佈情形，奈米金球結合hGH的步驟如下：

1. 取420 μl 的13 nm金球，加入420 μl 的滅菌水，均勻混和
2. 加入濃度為1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的10 μl hGH，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應2小時
3. 加入濃度為4 μM 的150 μl 孔雀綠，在室溫下反應10分鐘
4. 加入10 μl 的保護基hexanethiol，在室溫下反應1小時
5. 以轉速8000 rpm，離心8分鐘
6. 去除上清液，取100 μl 的PBST回溶，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存

3-2-4 金球電穿孔送入細胞過程

細胞膜或是平面的脂雙層膜，如果在極短時間內施加高電場，會造成細胞膜的導電性和滲透性雙雙增加，如果電場增強至某種程度，則會造成細胞形成孔洞結構，這種現象稱為電性破裂 (electrical breakdown)，屬於可恢復的破裂。而電穿孔(electroporation)就是利用此種原理，在兩片距離極近的電極板通以瞬間高壓，使置於其中的生物體之細胞膜膜電位改變，形成可逆性孔洞，欲傳送物質經由細胞膜孔而進入細胞中，當電場消失後細胞膜可再回復，使傳送物質保留在細胞內，此方法可適用於大部分細胞，操作步驟如下所示：

- (1) 用trypsin把細胞打下，離心(800rpm、25°C、5分鐘)，去上清液並加入2-8 ml純MEM回溶，吸放數次，使細胞均勻分佈。
- (2) 取10 μ l的細胞懸浮液和10 μ l的trypan blue等體積混和均勻。
- (3) 取10 μ l的混和液自血球計數盤chamber上方的凹槽加入，並蓋上蓋玻片，放置於倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色(活細胞的細胞膜完整，故染料無法滲入細胞而不會呈色)。
- (4) 計算五大格細胞總數，再除以5，乘以稀釋倍數，最後乘以 10^4 (血球計數盤內每個大正方形體積為 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$)，即為每ml中細胞懸浮液的細胞總數。

$$\frac{5 \text{大格細胞總數} \times 2 \times 10^4}{5} = \text{細胞數} / \text{ml}$$

- (5) 取50 μl 的Au-MGITC溶液和750 μl 的細胞懸浮液混和，進行電穿孔，電壓600 V，施加時間100 μs ，間隔100 ms，進行8次。
- (6) 把滅菌過的矽基板放置於6-well的培養皿內，將電穿孔完成的細胞滴在基板上，並加入2 ml的新鮮培養基，放入CO₂培養箱內一天，等待細胞貼附。
- (7) 在倒立顯微鏡下觀察細胞有無貼附，吸起舊培養液，並用外用PBS沖洗三次，再加入paratromaldehyde固定細胞，反應20分鐘。
- (8) 去除paratromaldehyde，用外用PBS清洗三次。

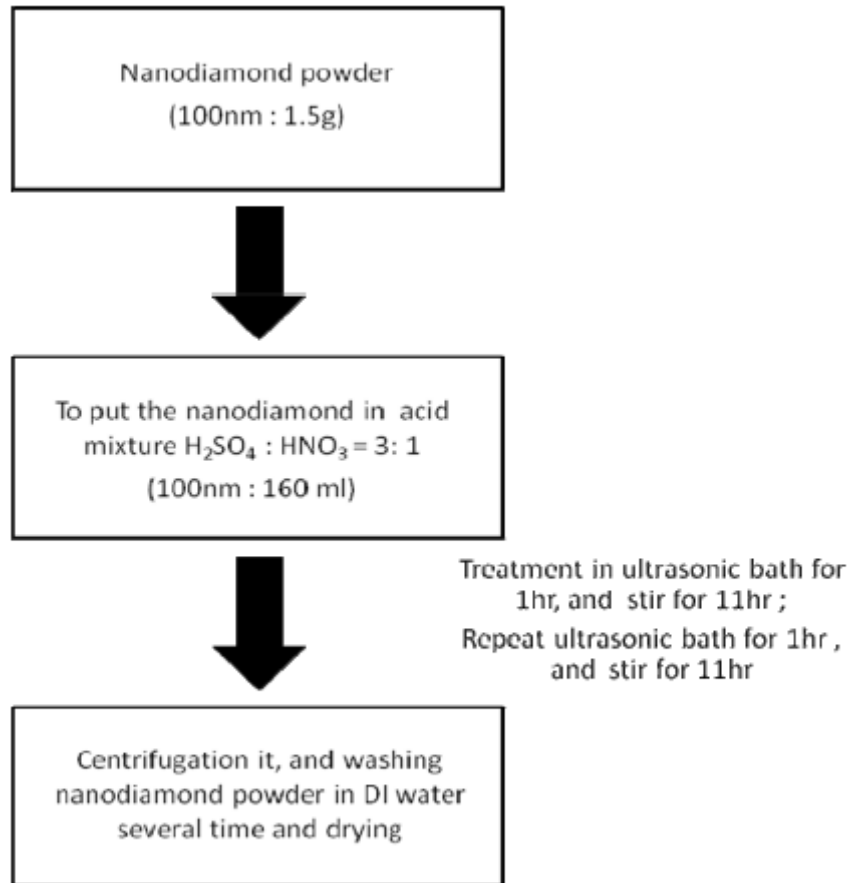


3-3 奈米鑽石酸化與表面修飾

3-3-1 奈米鑽石酸化

經由酸洗過程可去除奈米鑽石表面的 sp^2 結構，產生羧基-COOH，並可和含有胺基-NH₂的生物分子相互鍵結，強氧化酸洗奈米鑽石的方式則是參考本實驗室林柏凡學長的論文，見圖3.1[48]，酸洗步驟如下：

1. 取0.15克的100 nm奈米鑽石粉末。
2. 取12 ml硫酸、4 ml硝酸，混合之後加入奈米鑽石粉末。
3. 超音波振盪1小時，攪拌11小時，接著再振盪1小時，攪拌11小時。
4. 離心5分鐘，去掉酸液。
5. 加入D.I. water，離心5分鐘，去掉上清液，重複此步驟兩次。
6. 加入D.I. water，超音波振盪5分鐘，接著全部裝入20 ml樣品瓶中，置於90°C烘箱中烘乾。
7. 刮下，即可得到酸化過的奈米鑽石粉末。



The procedure for the functionalization of nanodiamond

圖3.1 奈米鑽石的強氧化酸洗步驟[48]

3-3-2 奈米鑽石修飾上hGH步驟

在此部份我使用EDC/NHS試劑[49]活化奈米鑽石表面的羧基，讓羧基容易與hGH形成醯胺鍵(Amide bond)而連接，反應機制如圖3.2[50]所示，試劑比例是參考實驗室林柏帆學長的論文(MES buffer : ND : DI water : EDC : NHS = 3 ml : 6 ml : 3 ml : 6 ml : 6 ml)，故我將0.1 mM的MES buffer : 30 μ l、0.025 M的EDC : 60 μ l、0.025 M的NHS : 60 μ l、100 μ g/ml的鑽石:60 μ l加入濃度1 μ l/ml的hGH:10 μ l，在常溫下反應2小時，以轉速12000 rpm離心12分鐘，去除上清液後加入100 μ l的滅菌水回溶。

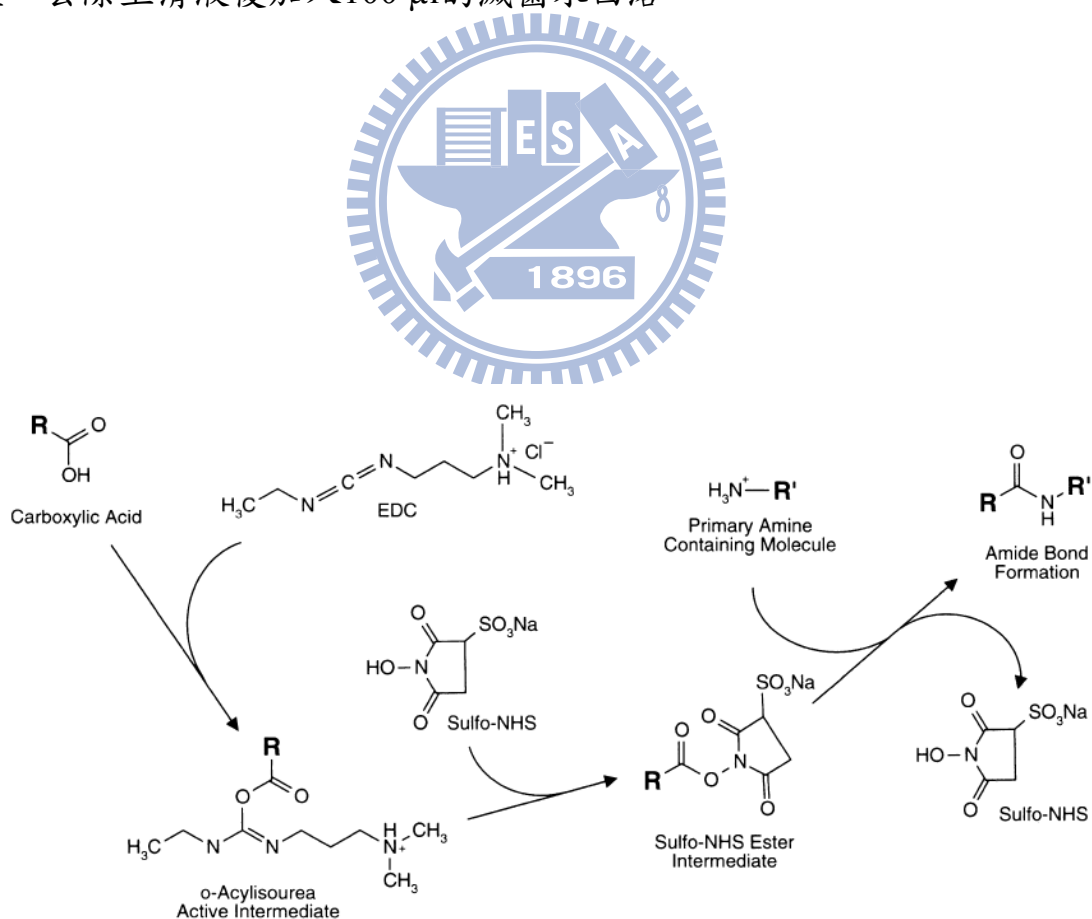


圖3.2 形成醯胺鍵的反應機制[50]

3-4 PDMS翻製法製作微流道

本實驗中微流道成型是利用聚二甲基矽氧烷(PDMS)翻製法，參考文獻[3]，其優勢有製作時間短、成本低、生物相容性佳、易與多種材質在室溫下接合等，目前已是生醫微機電中最主流的製程技術，製作PDMS的流程圖見3.3，實驗步驟如下所示：

1. 將六吋晶圓切成 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小的正方形破片，並進行清洗的動作，清除破片表面的微粒，可使光阻分布較均勻。準備三個乾淨的燒杯，分別加入丙酮(Acetone)、異丙醇(Isopropanol, IPA)以及去離子水(DI water)，依序將破片放入清洗並配合超音波振盪五分鐘，最後用氮氣槍吹乾。
2. 利用旋轉塗佈機(spin coater)將電子阻劑塗佈在清洗好的破片上，在此選用的是SU-8 2015是一種可產生高圖像縱橫比(aspect ratio)結構的負光阻，在顯影完後會把未曝光區域去除，已曝光部份則因分子形成鍵結而留下圖案。參考MICROCHEM所提供的旋塗參數，見圖3.4[51]，我們選用的旋塗參數為前10秒500 rpm，後50秒2000 rpm，可得到厚度約 $21\text{ }\mu\text{m}$ 的阻劑層，之後以 95°C 軟烤3分鐘， 180°C 硬烤30分鐘，此步驟為了減少光阻中的溶劑含量，使光阻平坦化並增加光阻的附著力。
3. 使用weacas繪圖程式設計圖型，為三條寬度不同的溝槽結構，寬度分別是 $30\text{ }\mu\text{m}$ 、 $45\text{ }\mu\text{m}$ 、 $60\text{ }\mu\text{m}$ 。
4. 把晶片置於電子束微影的移動平台，推進電子光學柱的真空腔體中，進

- 行曝光。加速電壓固定在50 kV，電流大小為600 pA，並利用電腦來控制曝光時間、座標位置等得到製作圖形的最佳化參數。
5. 把曝光完成後的樣品浸於顯影液中1分鐘，將未曝光區域的光阻去除，以完成圖案轉移，並用異丙醇沖洗，最後用氮氣槍吹乾。
 6. 將晶片置於加熱板上，以180°C硬烤三分鐘，此步驟可將光阻內溶劑含量降至最低並增加對酸的抵抗力，完成欲翻製的母模(template)。
 7. 將母模放入氣密容器內，滴入10 μm 的FOTS並置於加熱爐管，在250°C下加熱一小時，使FOTS蒸發吸附於模板表面做為脫模用，降低高分子沾黏上模板。
 8. 將由Dow Corning公司所生產之矽膠樹酯(Sylgard 184 silicone elastomer)和固化劑(Sylgard 184 elastomer curing agent)以重量10:1的比例混合，倒於母模上，並用真空幫浦抽真空至150 mTorr，以去除混合時所產生的氣泡。
 9. 放置於加熱板上，以150°C加熱15分鐘使其固化，即可將PDMS從母模上剝除並用針頭鑽孔，完成流道結構。
 10. 將製作好的流道和清洗過的矽晶圓破片以氧電漿處理使表面改質，成為親水性而接合，在此所使用的氧電漿機台是由交通大學奈米所許証宗老師實驗室所提供，在打電漿前先抽真空至100 mTorr，之後以16 W的強度進行30秒的氧電漿處理，處理完後要儘快將流道和矽基板黏合，避免接

觸空氣太久而恢復成疏水性。

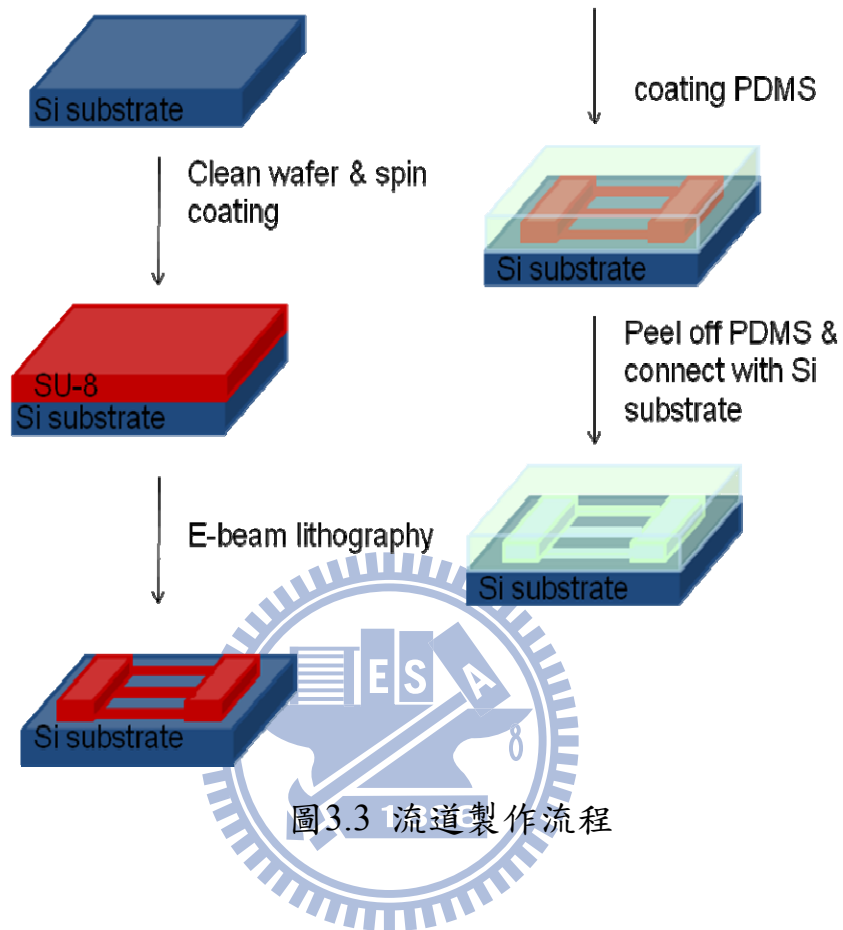


圖3.3 流道製作流程

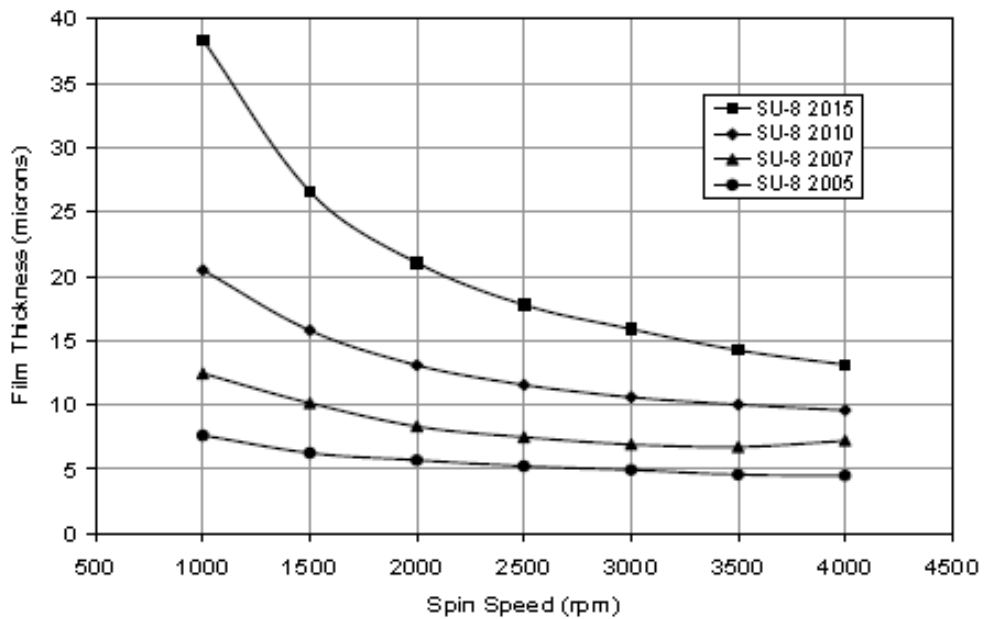


圖3.4 轉速(rpm)和光阻厚度比較圖(μm)[51]

3-5 樣品注入與光譜量測

本篇論文分成三大主題，第一部份是用修飾上孔雀綠的奈米金球，標定人類肝癌細胞(Hep G2)，偵測其拉曼訊號，並建立距離對強度的二維圖譜，以觀察金球在細胞裡的分佈空間，之後接上hGH，改由標定細胞膜位置，同樣偵測其拉曼訊號，並比較與前一種方式在細胞裡分佈位置的不同。第二部份則是改用奈米鑽石來標記Hep G2細胞，第三部分則分別把奈米金球和奈米鑽石注射進入微流道系統，量測其不同濃度和流速的拉曼訊號變化情形。注射幫浦使用的是KDS100，見圖3.5，流速範圍可從0.1 $\mu\text{l/h}$ ~426 ml/h。

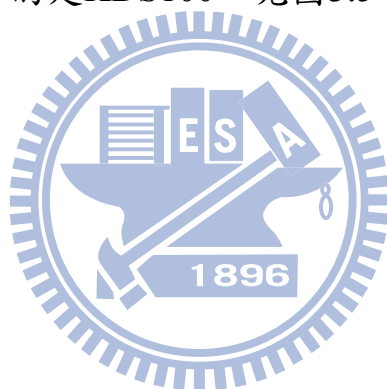


圖3.5 KDS 100注射幫浦

第四章 量測結果與討論

4-1 金球量測分析

4-1-1 金球修飾孔雀綠之拉曼光譜量測分析

在第一部份我所使用的是 13 nm 大小尺寸的奈米金球，一般而言，金球大小在 60 nm 左右時，表面增顯效應最明顯，但經過實驗之後發現，隨著金球尺寸越大，聚集情形也會越嚴重，而難以進入細胞中，故在此我使用 13 nm 大小的金球作為拉曼增顯因子，如圖 4.1 所示。

接著將金球撒在矽基板上，對其進行拉曼光譜量測，所使用的是實驗室的共軛焦顯微鏡 LabRAM HR800，而使用矽基板的原因是在我所想量測的波段，訊號值很低，故不用扣掉背景訊號。我使用 633 nm 的氦氖雷射光源，雷射強度為 20 mW，並設定共焦針孔的大小、選擇的光柵、CCD 接受訊號的積分時間以及量測波段範圍等參數，得到圖 4.2 (光柵 600、共焦針孔 200 μm 、積分時間 10 秒、量測波段 1100-1800 cm^{-1})，可看出金球在此波段沒有特別明顯的拉曼訊號。

為了要量測孔雀綠的拉曼光譜訊號，需先對其溶劑 DMSO 做量測，以避免溶劑訊號和孔雀綠訊號相互混淆，DMSO 的拉曼光譜如圖 4.3 所示 (量測參數：雷射光源 633 nm、光柵 600、共焦針孔 200 μm 、積分時間 10 秒、量測波段 200-2000 cm^{-1})，其中 521 cm^{-1} 為矽基板之訊號，其餘的峰值為 DMSO 的特徵峰 (306 cm^{-1} , 334 cm^{-1} , 381 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 953 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} , 1421 cm^{-1})。接著

量測4 μM 孔雀綠的拉曼訊號，並跟接上金球和保護基的孔雀綠做比較(量測參數：雷射光源633nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間1秒、量測波段200-1800 cm^{-1})，如圖4.4所示。孔雀綠在單獨存在情形下特徵峰不明顯，反倒是溶劑DMSO的訊號強度較大，接上金球後可看出孔雀綠的特徵峰(435 cm^{-1} ，732 cm^{-1} ，799 cm^{-1} ，915 cm^{-1} ，1169 cm^{-1} ，1165 cm^{-1} ，1590 cm^{-1} ，1615 cm^{-1})，其中，1615 cm^{-1} 是孔雀綠強度最強的特徵峰，是由phenyl C-C鍵所造成。

之後將修飾上孔雀綠的金球以電穿孔的方式送進Hep G2細胞(電穿孔參數：施加電壓600 V、施加電壓時間100 μs 、間隔時間100 ms，總共進行8次)，穿孔完成後養在培養皿內一天，用paratromaldehyde固定細胞和經過PBS的反覆沖洗，即可對貼附在矽基板上的細胞進行光譜量測。首先需量測純Hep G2細胞和只有送入金球的Hep G2細胞，以建立背景值訊號的圖譜並做為對照組，先用100倍物鏡在光學顯微鏡下找到Hep G2細胞，如圖4.5(a)所示，接著就可進行拉曼量測(量測參數：雷射光源633 nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間10秒、量測波段1100-1800 cm^{-1})，Hep G2細胞的拉曼光譜圖見圖4.5(b)，可看出在1100-1800 cm^{-1} 的範圍內並無明顯訊號，接著我們對其做xy平面的mapping圖，其OM見圖4.5(c)，掃描範圍見表4.1，鎖定1617 cm^{-1} 做xy平面與訊號強度圖，如圖4.5(d)所示，也可看出並無特殊訊號。同樣以100倍物鏡找到送入金球的Hep G2細胞，對其進行光學量測(量測參

數：雷射光源633 nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間5秒、量測波段1100-1800 cm^{-1})，其OM圖如圖4.6(a)所示，拉曼光譜圖見圖4.6(b)，並無明顯的訊號，對其做xy平面的mapping，OM如圖4.6(c)所示，掃描範圍見表4.2，鎖定1617 cm^{-1} 峰值，對其做距離和訊號強度的2D圖，可發現訊號極弱，並無孔雀綠訊號，見圖4.6(d)。最後，對送入修飾上孔雀綠金球的Hep G2細胞做光學量測(量測參數：雷射光源633 nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間5秒、量測波段1100-1800 cm^{-1})，OM見圖4.7(a)，拉曼光譜圖見4.7(b)，可看出在1171 cm^{-1} 、1364 cm^{-1} 和1615 cm^{-1} 附近有明顯的孔雀綠特徵峰，接著對其進行xy平面mapping，OM如圖4.7(c)所示，掃描範圍見表4.3，並鎖定1617 cm^{-1} 峰值，對其做距離和訊號強度的2D圖，見圖4.7(d)，發現在座標(-4,-9.7)的位置，有很強的孔雀綠訊號(~6000 cnt)，此訊號界定出金球在細胞裡的分佈位置，對y軸在-9.7 μm 的位置，做xz平面的mapping，OM如圖4.7(e)所示，掃描範圍見表4.4，並鎖定1617 cm^{-1} 峰值，對其做距離和訊號強度的2D圖，見圖4.7(f)，發現z軸深度在0~15 μm 的位置，有較顯著的孔雀綠拉曼訊號，顯示出金球分布在細胞中間層的位置。

而根據文獻指出[16]，奈米金球在532 nm波長激發下，會放光，範圍在600~630 nm之間，但隨著金球大小改變，放光強度也跟著改變。在此我使用共軛焦顯微鏡FLUOVIEW™ 1000得到金球在Hep G2細胞裡的螢光影像，印證金球確實有進入細胞，修飾孔雀綠金球的Hep G2細胞明視野影像如圖

4.8(a)所示，圖 4.8(b) 則是疊加上金球的螢光影像，紅色螢光為金球在 532 nm 波長激發下所放出，可看出金球在細胞裡的分佈情形，而圖 4.8(c)則是疊加上金球螢光影像的 z 軸深度切面圖，每 0.5 μm 遞增一次，總共深度為 6 μm ，可看出金球在細胞內不同深度的分佈情形。

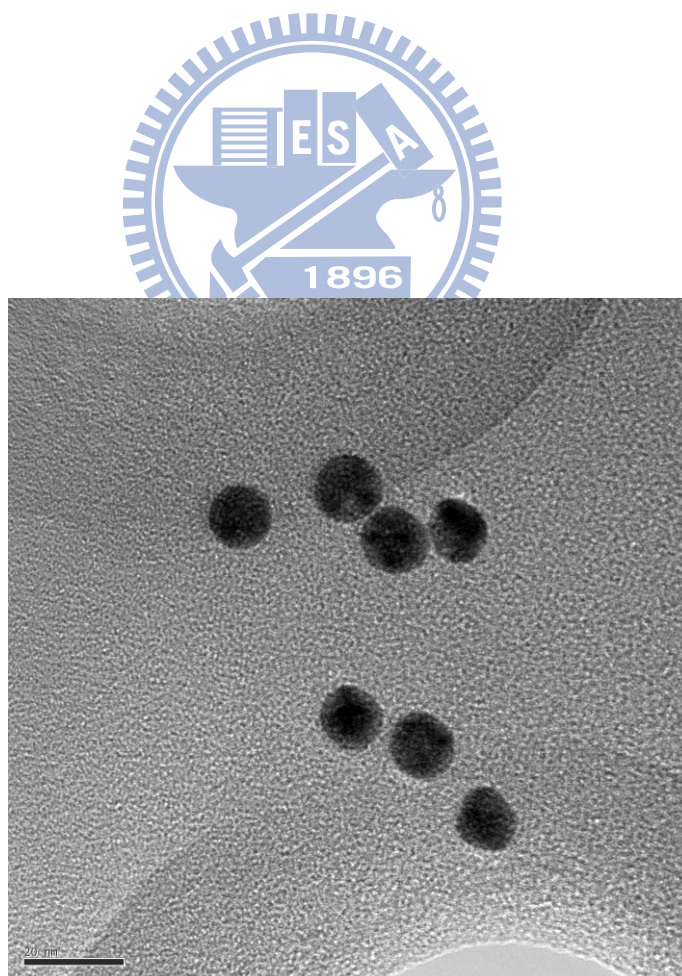


圖 4.1 13 nm 大小金球的 TEM 圖，圖中尺標為 20 nm

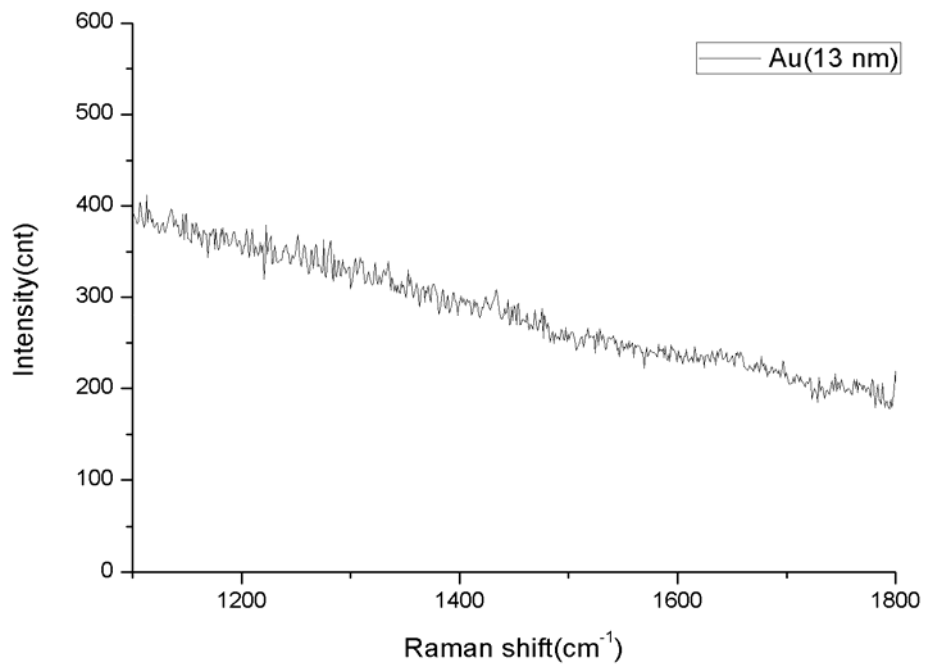


圖 4.2 13 nm 金球的拉曼光譜圖

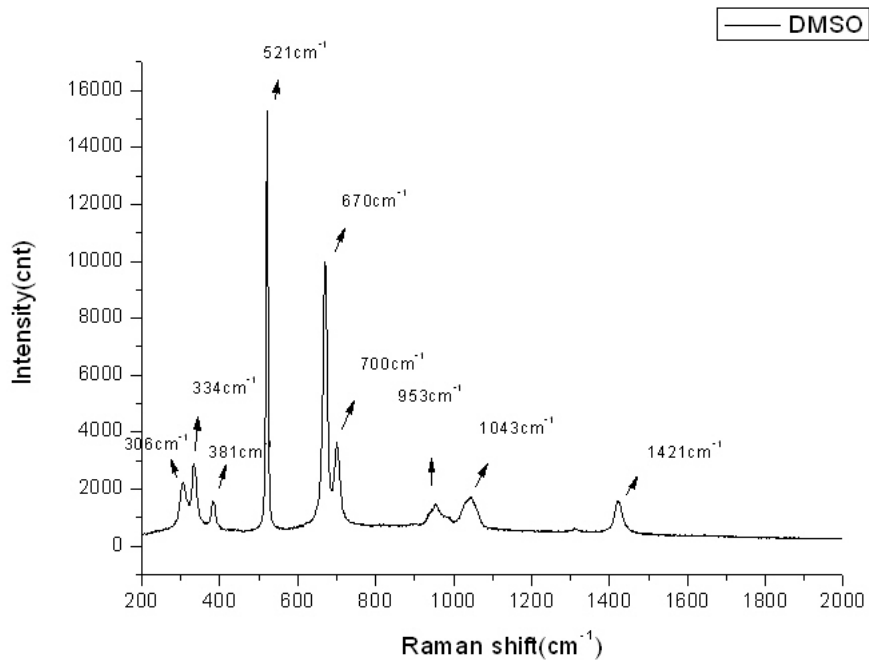


圖 4.3 溶劑 DMSO 的拉曼光譜圖

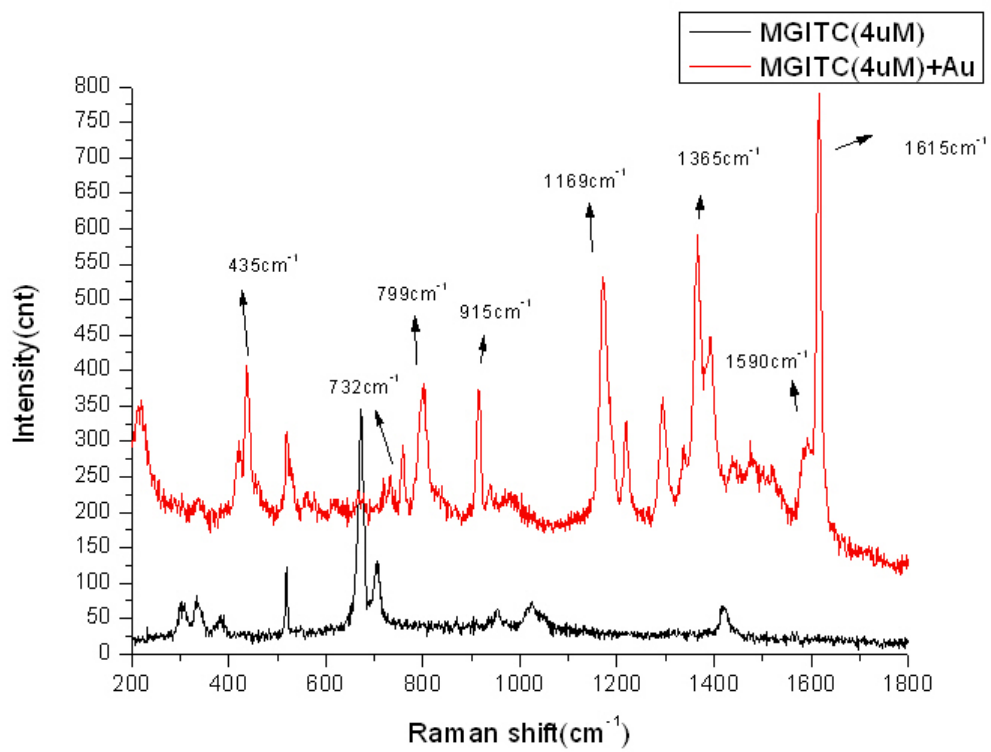


圖 4.4 接上金球前後的孔雀綠拉曼光譜比較圖

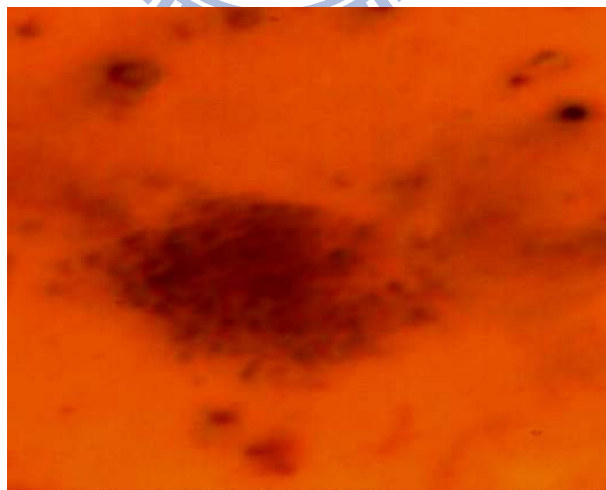


圖 4.5(a) Hep G2 細胞的 OM 圖

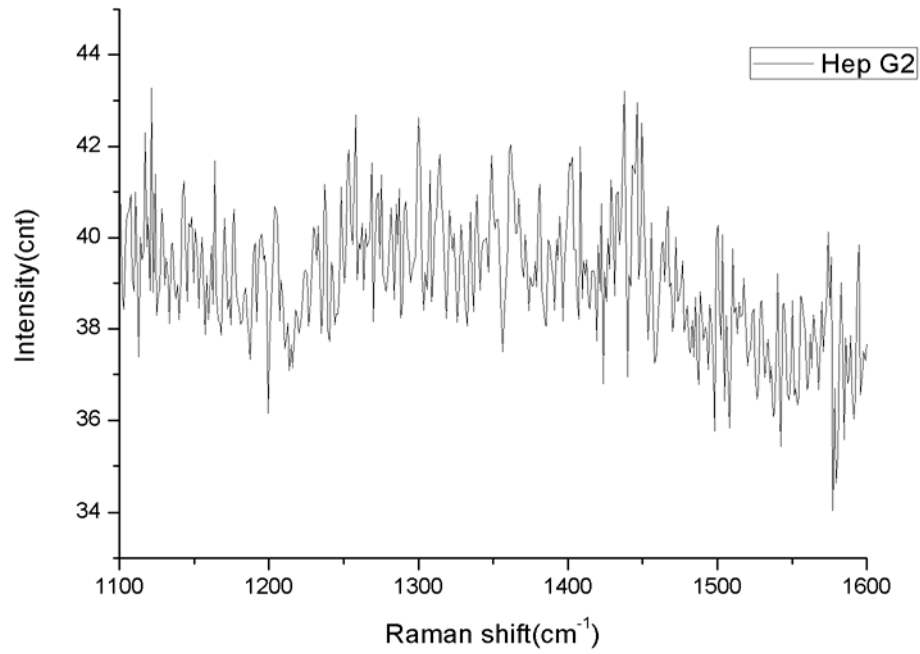


圖 4.5(b) Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

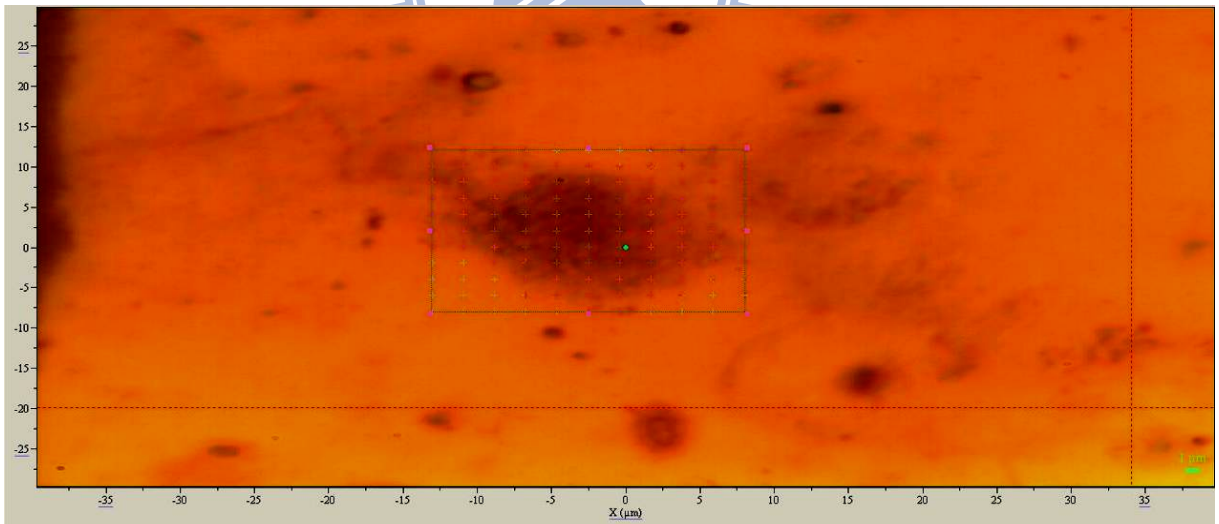


圖 4.5(c) 對 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping OM 圖

表 4.1 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y-axis	11	12	-8	2
X-axis	11	8	-13	2

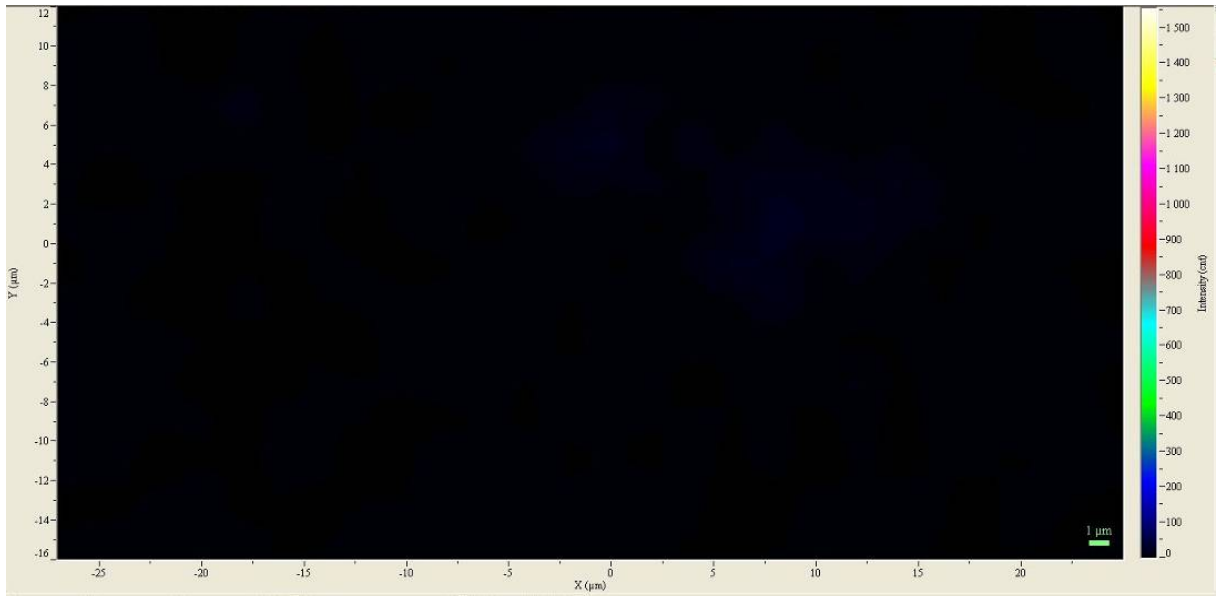


圖 4.5(d) 相對應於 ω_m 的 xy 平面與訊號強度圖

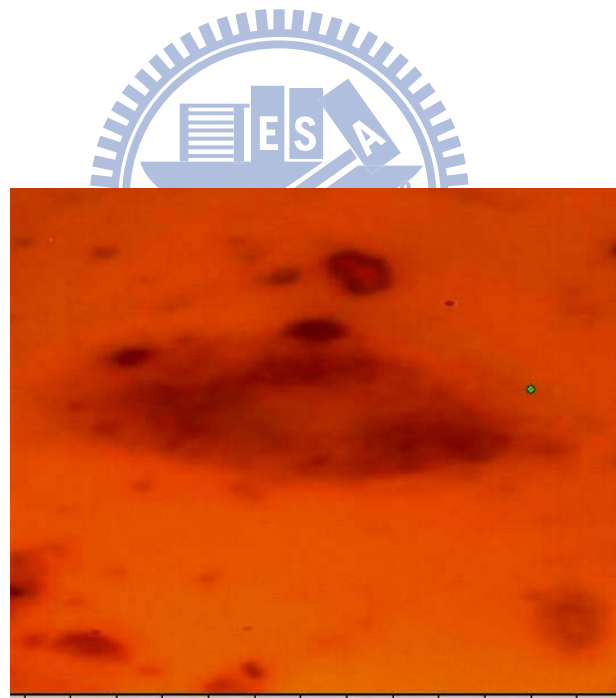


圖 4.6(a) 以電穿孔法送入金球的 Hep G2 細胞 OM 圖

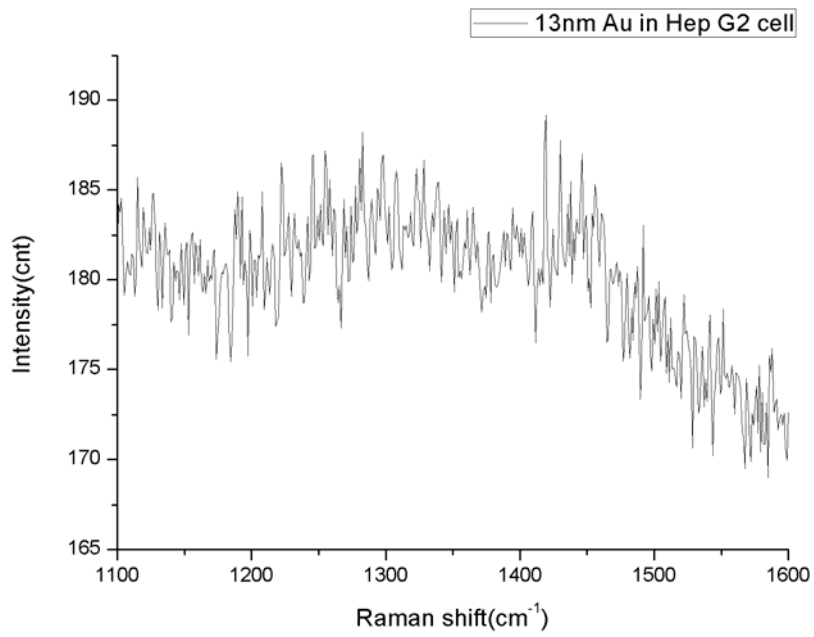


圖 4.6(b) 摻雜金球的 Hep G2 細胞拉曼光譜圖

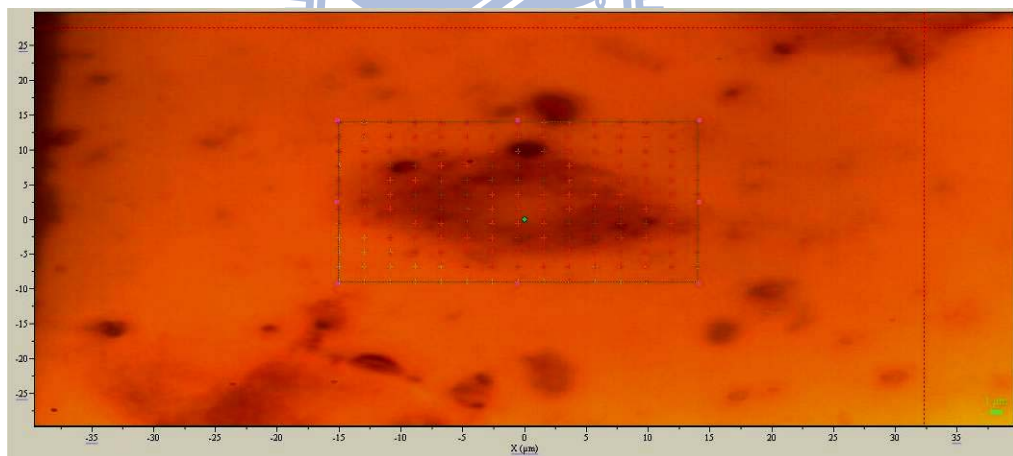


圖 4.6(c) 以電穿孔法送入金球的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping OM 圖

表 4.2 合金球的 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y-axis	12	14	-9	2
X-axis	15	14	-15	2

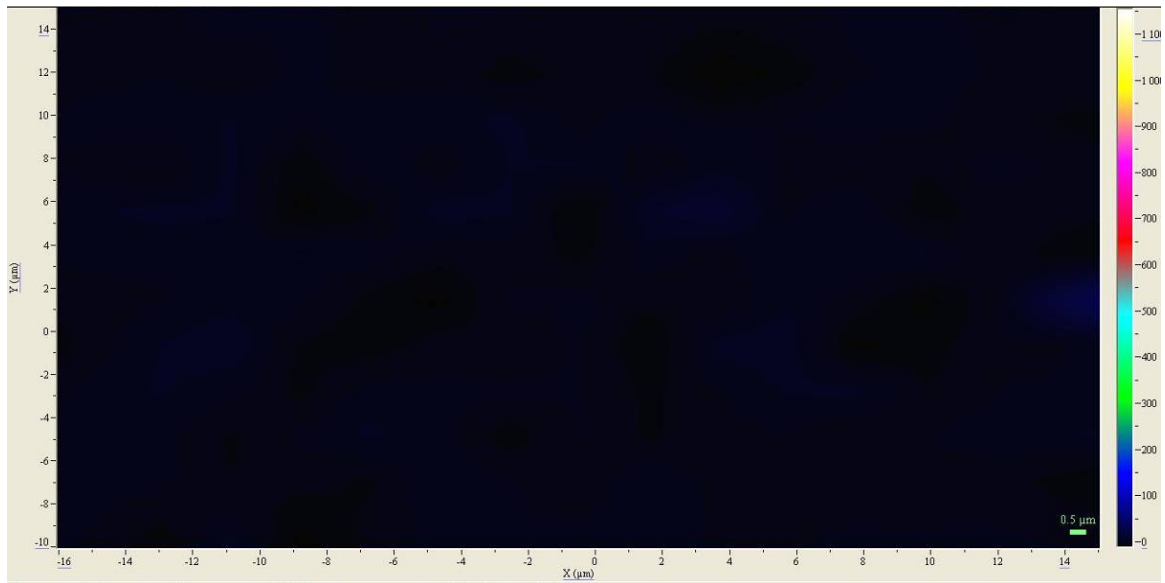


圖 4.6(d) 與 OM 相對應的 xy 平面與訊號強度圖

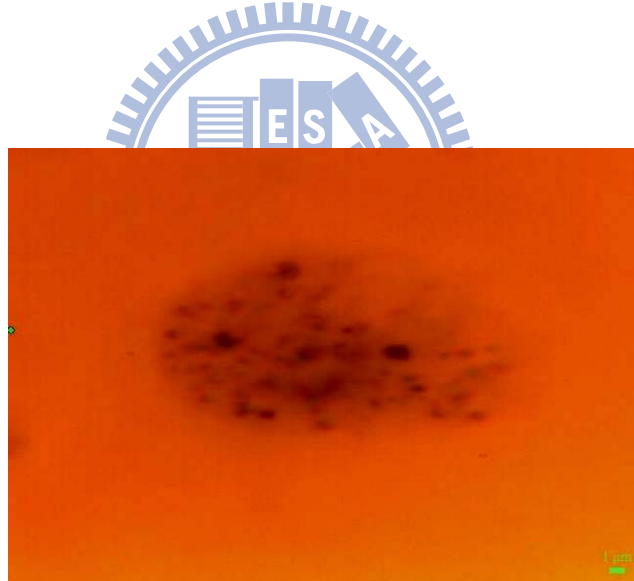


圖 4.7(a) 以電穿孔法送入金球修飾孔雀綠的 Hep G2 細胞 OM 圖

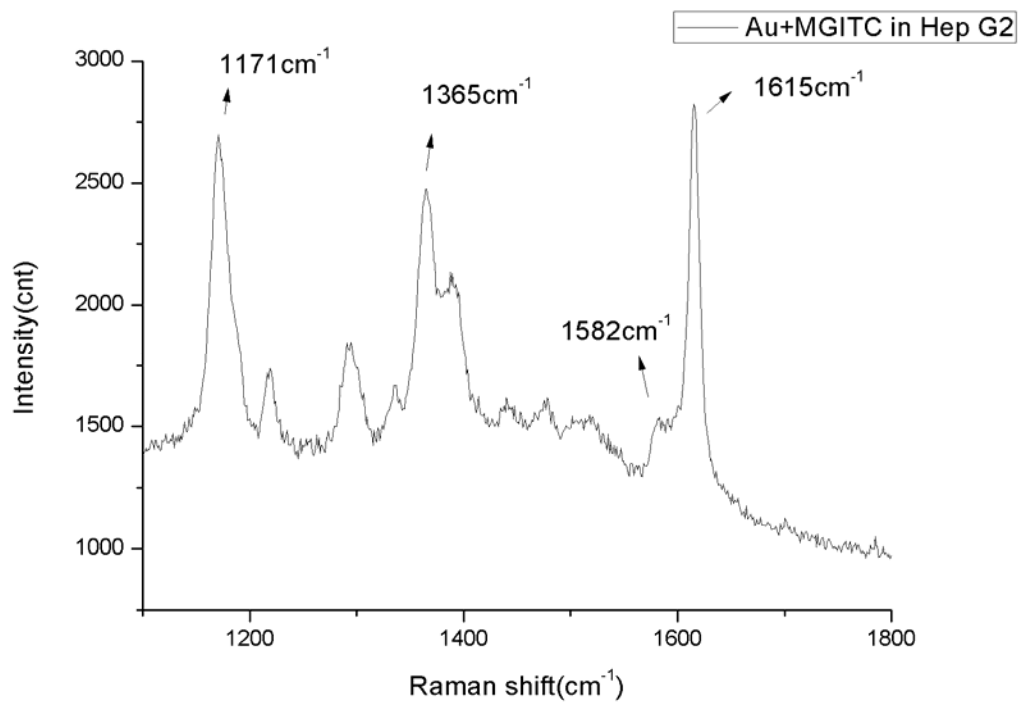


圖 4.7(b) 以電穿孔法送入金球修飾孔雀綠的 Hep G2 細胞拉曼光譜圖

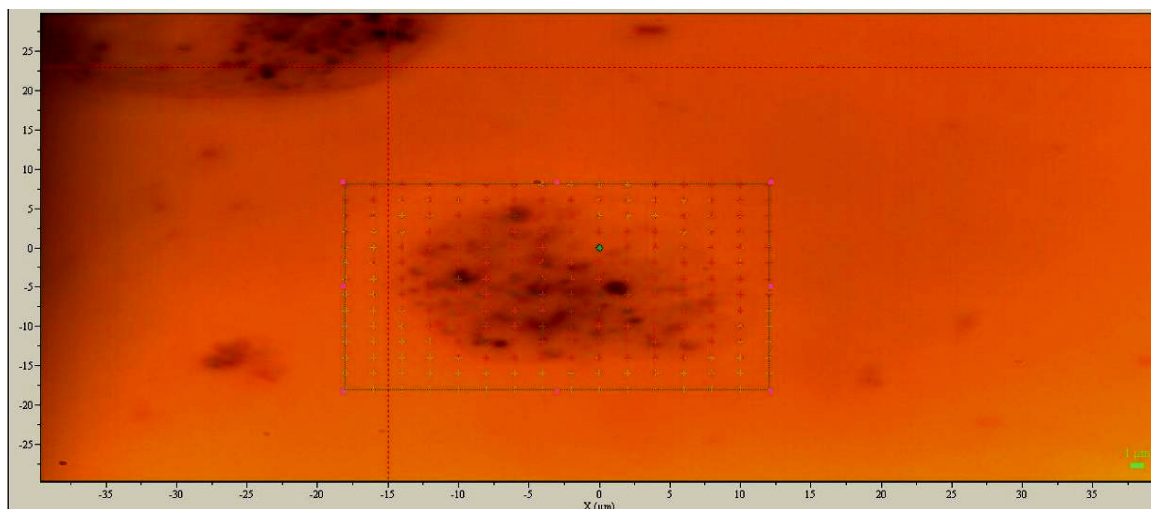


圖 4.7(c) 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 OM 圖

表 4.3 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞做 xy 平面的 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y-axis	14	8	-18	2
X-axis	16	12	-18	2

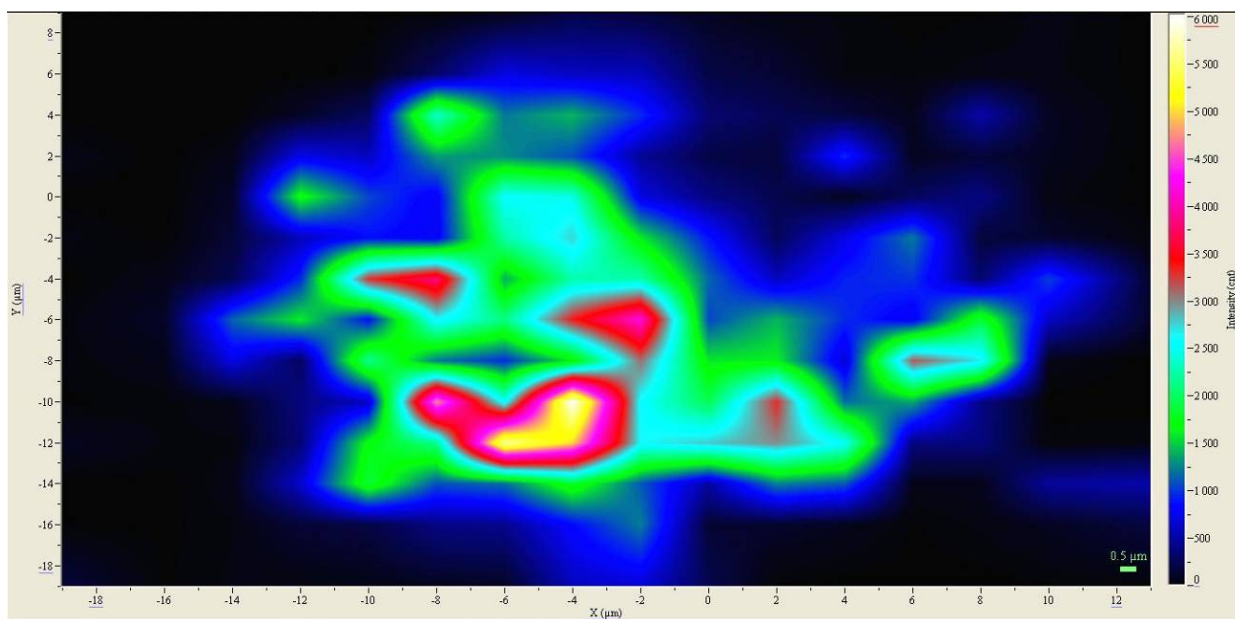


圖 4.7(d) 與 OM 相對應的 xy 平面與訊號強度圖

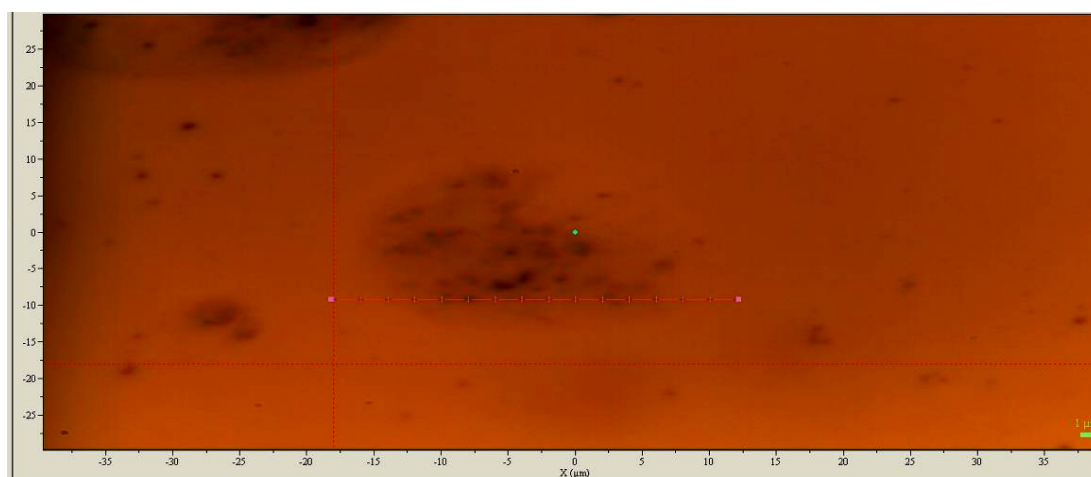


圖 4.7(e) 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 的 OM 圖

表 4.4 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞做 xz 平面的 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
x-axis	14	12	-18	2
z-axis	16	20	-10	2

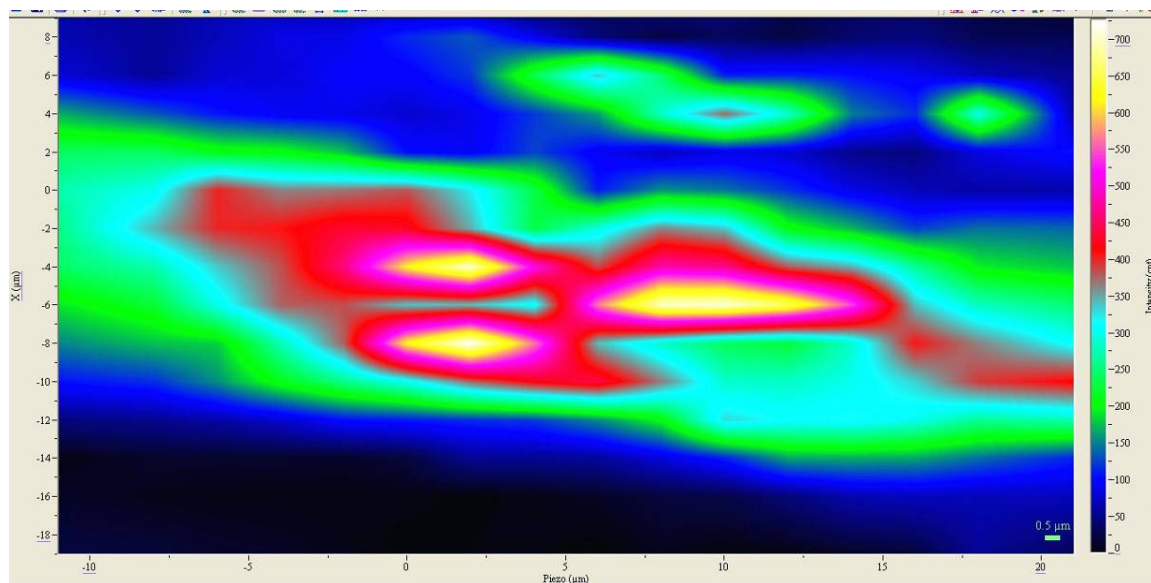


圖 4.7(f) 與 OM 相對應的 xz 平面與訊號強度圖

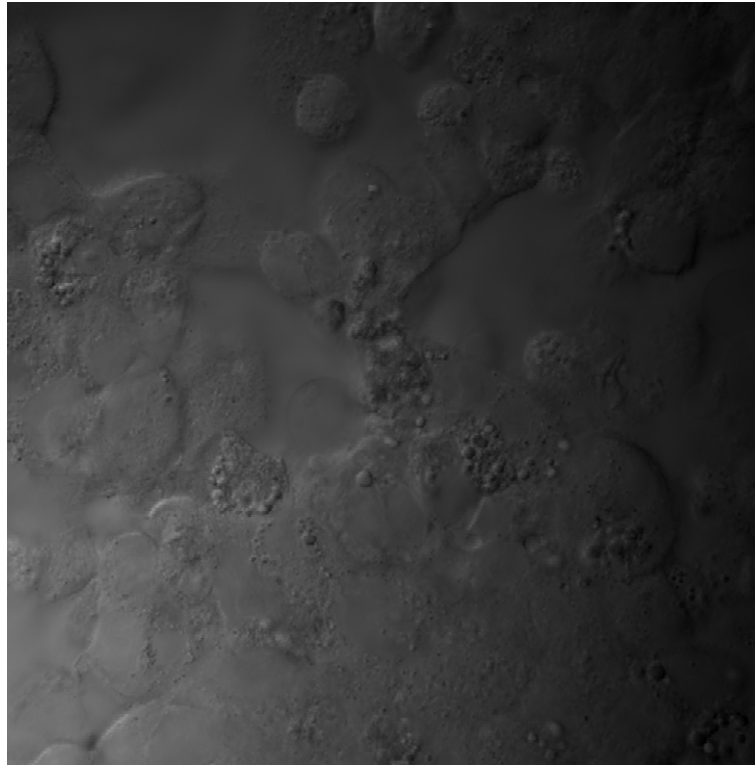


圖 4.8(a) 含修飾孔雀綠金球的 Hep G2 細胞明視野影像

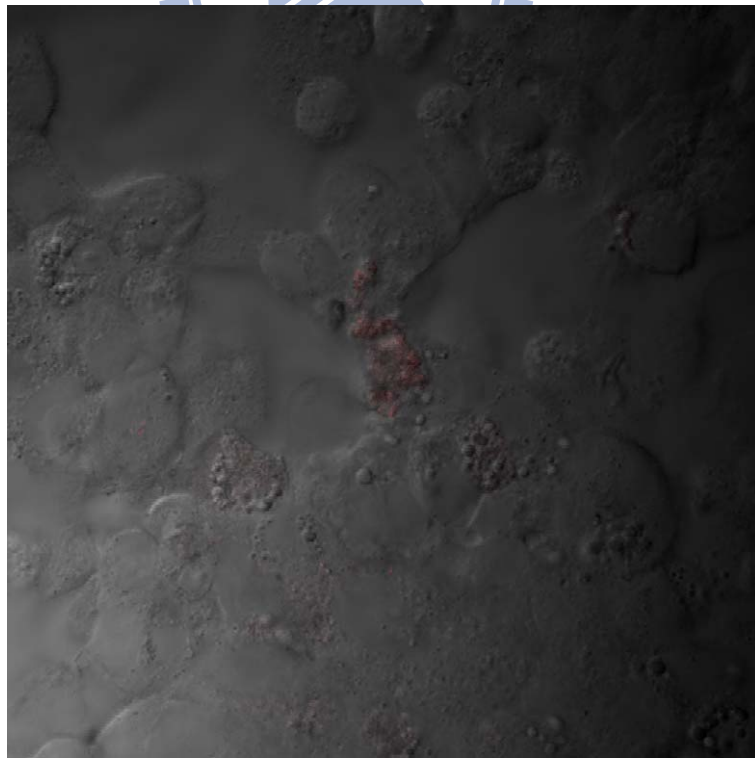
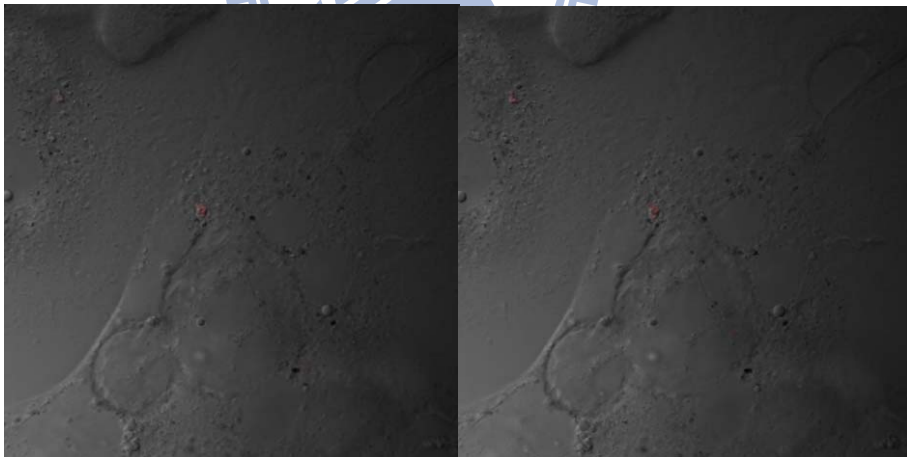
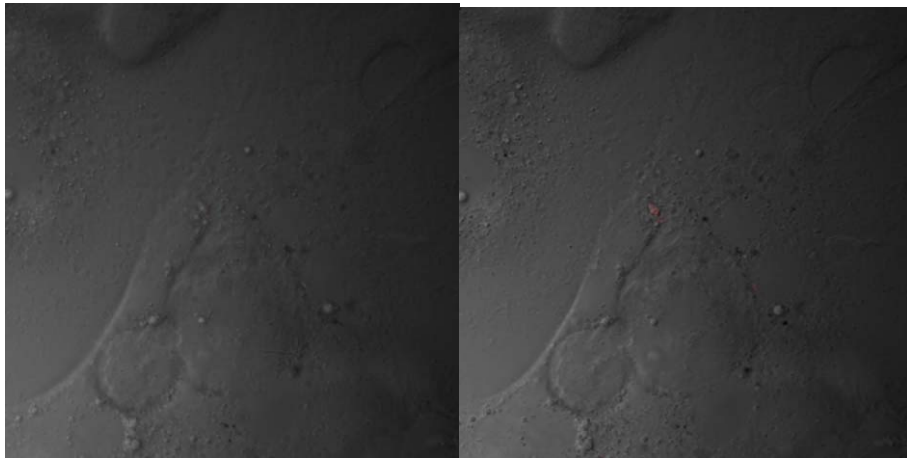
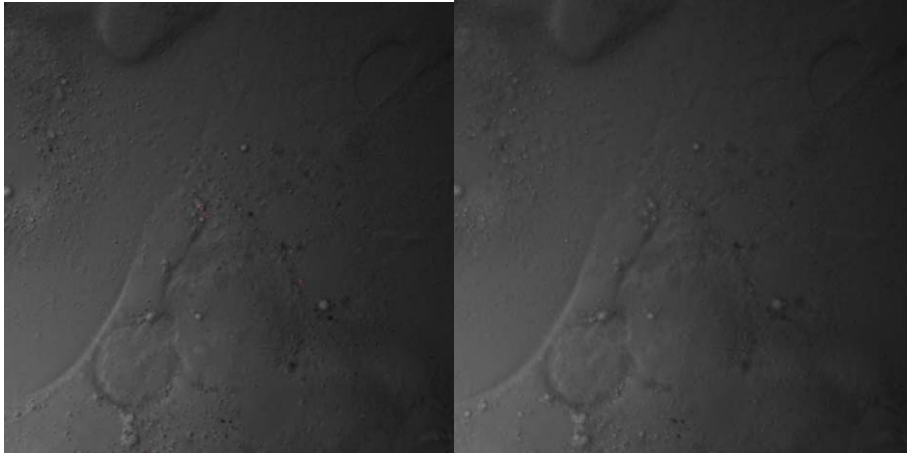


圖 4.8(b) 疊加上金球螢光影像，可看出金球在細胞裡的分佈情形



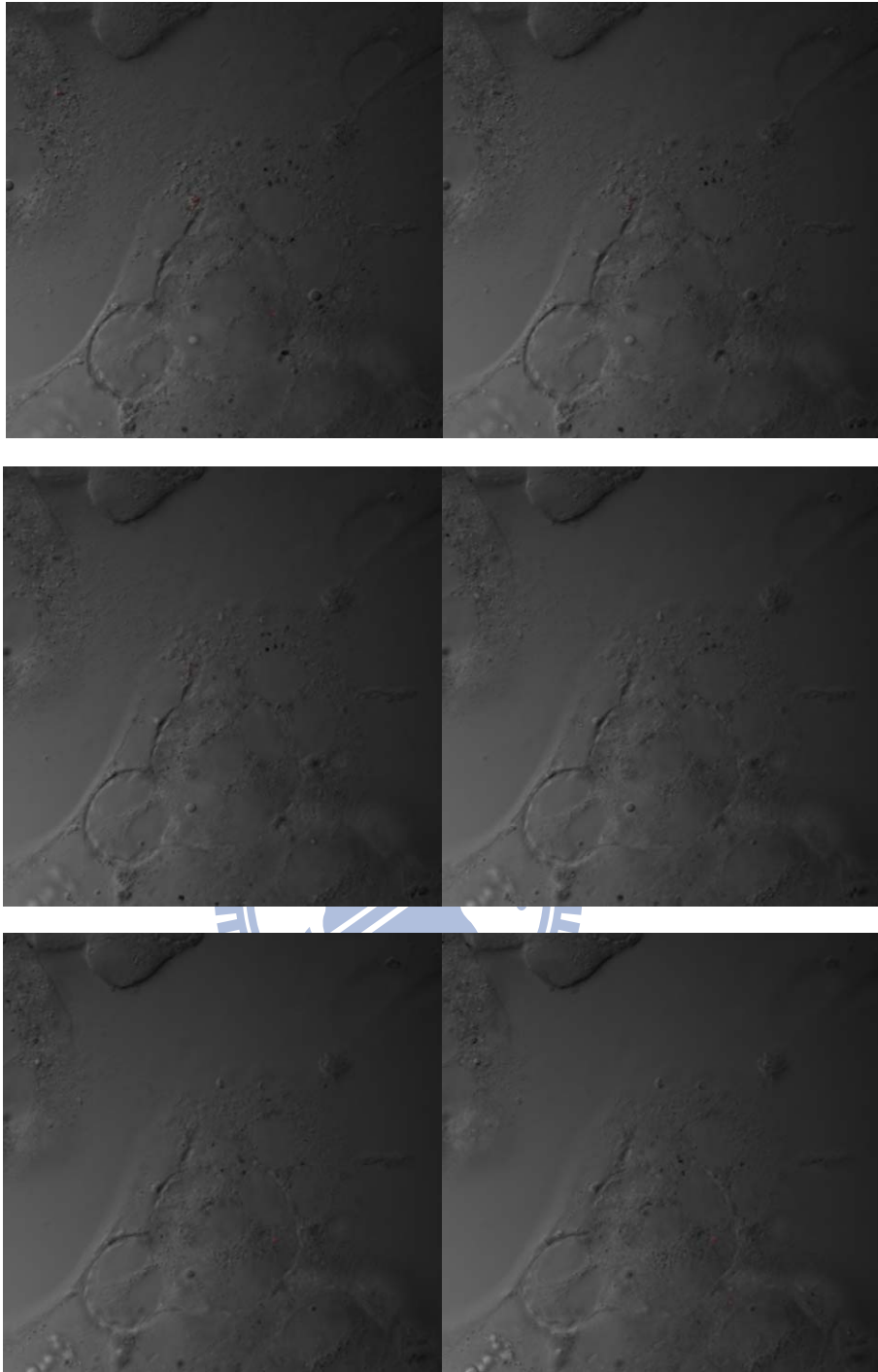


圖 4.8(c) 疊加上金球螢光影像的 Z 軸切面圖

4-1-2 金球修飾人類生長激素和孔雀綠之拉曼光譜分析

人類生長激素(Human growth hormone, hGH)，分子量為 22.2 kDa，具有 192 段胺基酸，會對細胞膜有專一性而接於細胞膜上。此部份同樣以 13 nm 的金球當作表面拉曼增顯因子，先接上 hGH 之後，再修飾上孔雀綠以及保護基 hexanthiol，加入前一天先分在 6 well 培養皿內的 Hep G2 細胞裡，對照組則是直接將修飾上孔雀綠的奈米金粒子加入 Hep G2 細胞裡，兩組一起放入 CO₂ 培養箱培養三小時，之後以 PBS 反覆沖洗以及加入 paratromaldehyde 固定細胞後，就可進行後續光譜量測的步驟。

本實驗一開始原本是餵食一天而非三小時，細胞的 om 圖如圖 4.9(a) 所示，拉曼光譜圖見圖 4.9(b)(量測參數：雷射光源 633 nm、光柵 600、共焦針孔 200 μm 、積分時間 5 秒、量測波段 1100-1800 cm^{-1})，可看出孔雀綠的特徵峰，接著對其進行 xy 平面的 mapping，om 圖見圖 4.9(c)，掃描範圍見表 4.5，並鎖定 1617 cm^{-1} ，作距離對強度的二維平面圖，見圖 4.9(d)，可發現在座標(2,-7)的位置有強度 ~ 7000 cnt 的孔雀綠訊號，分佈在細胞的外圍，接著固定 y=7.5 的位置，做 xz 平面 mapping，發現訊號最強的位置是在深度-6~-10 μm 的地方，已在細胞內部，具推測可能是作用時間太長，導致部份的 hGH 被細胞自然代謝，並吞噬部份金球，故之後調整作用時間，改以培養三小時。

單獨修飾上孔雀綠的對照組細胞 om 見圖 4.10(a)，拉曼光譜圖如圖

4.10(b)所示，量測參數如前述。對其做 xy 平面的 mapping，om 圖見圖 4.10(c)，掃描範圍見表 4.6，並鎖定 1617 cm^{-1} ，作距離對強度的二維平面圖，見圖 4.10(d)，可看出在座標為(-3.5, -4)的地方有比較明顯的拉曼訊號，但強度不強，大概在 1100 cnt 左右，與圖 4.7(d) 以電穿孔送入細胞的金球相比，訊號弱了將近六倍。固定 $y = -4\text{ }\mu\text{m}$ 位置，做 xz 平面掃描，om 圖見圖 4.10(e)，掃描範圍見表 4.8，相對應 om 的距離對訊號強度圖見圖 4.10(f)，指出金球訊號最強的地方在深度為 $-7.5\text{ }\mu\text{m}$ 的位置，強度 $\sim 190\text{ cnt}$ ，和圖 4.7(f)以電穿孔送入細胞的金球相比，訊號弱了將近四倍。對照組訊號較弱的原因推測是由於培養時間不夠久，大部分的金球還來不及被細胞吞噬，故訊號也相對較弱。

先加入 hGH 再以孔雀綠修飾的實驗組 Hep G2 細胞 om 圖見圖 4.11(a)，拉曼光譜圖如圖 4.11(b)所示(量測參數：雷射光源 633 nm 、光柵 600 、共焦針孔 $200\text{ }\mu\text{m}$ 、積分時間 1 秒 、量測波段 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)，發現所有特徵峰都往右 shift 60 cm^{-1} ，推測是因為校正的步驟沒做好。對其做 xy 平面的 mapping，om 圖見圖 4.11(c)，掃描範圍見表 4.9，並鎖定 1617 cm^{-1} ，作距離對強度的二維平面圖，見圖 4.11(d)，可看出細胞的外圍有較強的拉曼訊號，固定在 $y = 6\text{ }\mu\text{m}$ 的位置，做 xz 平面 mapping，om 圖見圖 4.11(e)，掃描範圍見表 4.10，相對應 om 的距離對訊號強度圖見圖 4.11(f)，發現不僅在細胞表層 $z = 14\text{ }\mu\text{m}$ 的地方有金球分佈，連在細胞內部 $z = -2\text{ }\mu\text{m}$

的地方也有金球訊號，表示金球除了靠 hGH 辨認細胞膜而接在細胞表面外，還會同時進行胞吞作用，推測是因為金球表面連接上的 hGH 數目不夠多，故部份金球還是以胞吞作用進入細胞內。

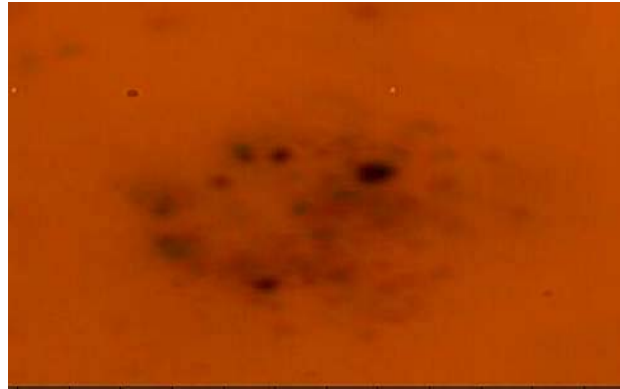


圖 4.9(a)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞之 om 圖

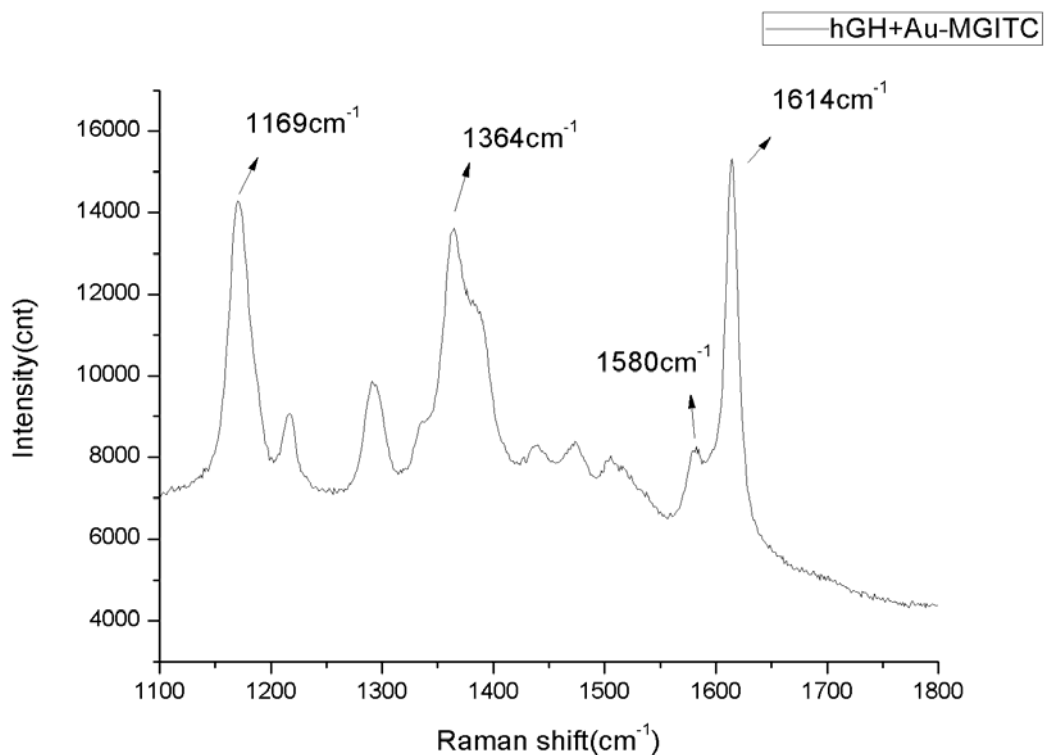


圖 4.9(b)修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

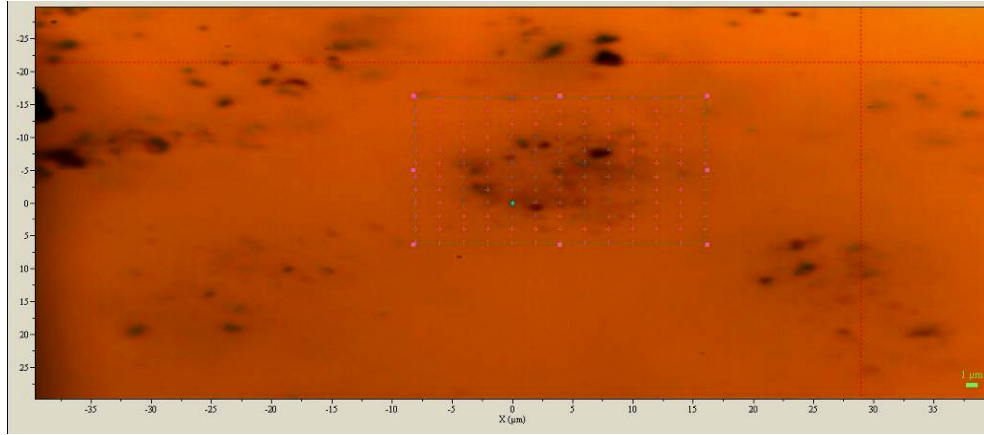


圖 4.9(c)修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om 圖

表 4.5 修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y axis	11	6	-16	2
X axis	12	16	-8	2

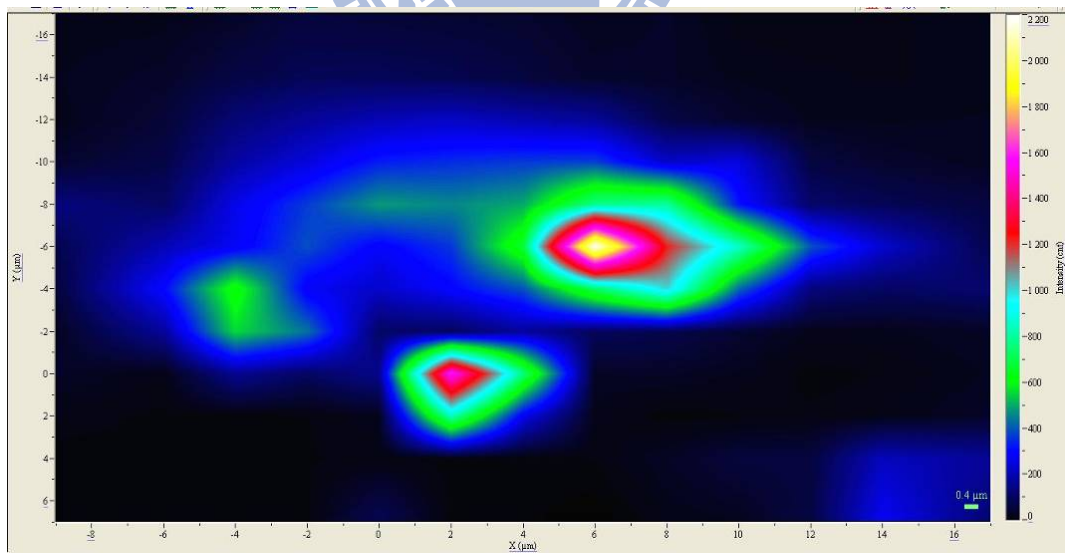


圖 4.9(d)與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖

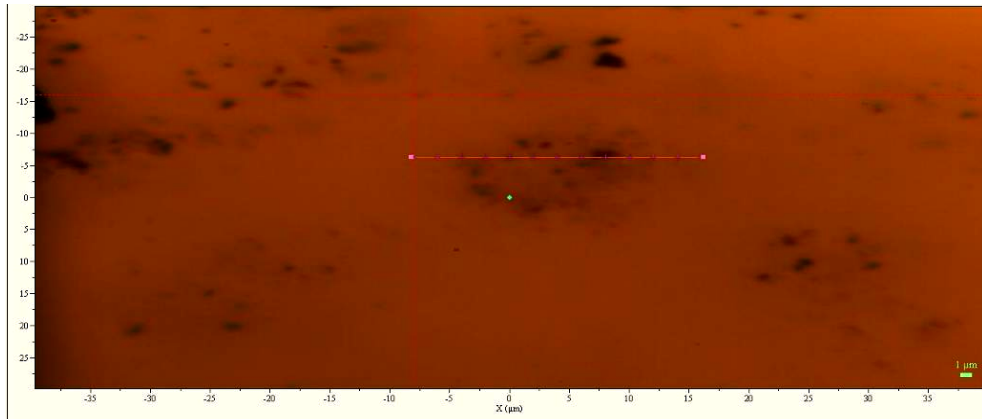


圖 4.9(e)修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖

表 4.6 修飾上 hGH 的的金球送入 Hep G2 細胞作 xz 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(µm)
Y axis	10	8	-10	2
X axis	16	20	-10	2

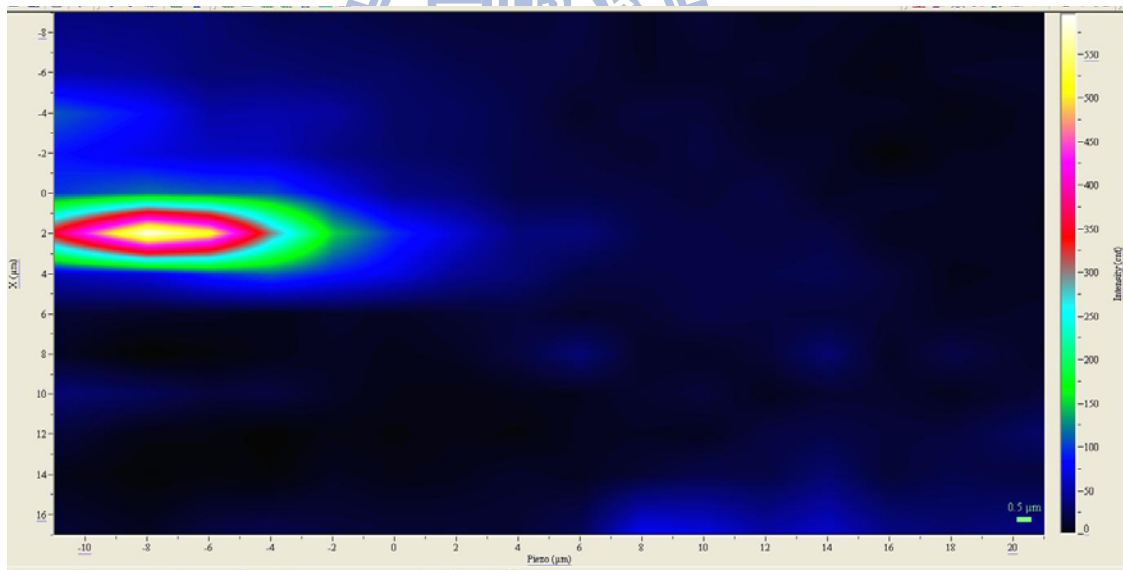


圖 4.9(f)與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖



圖 4.10(a)對照組 Hep G2 細胞 om 圖

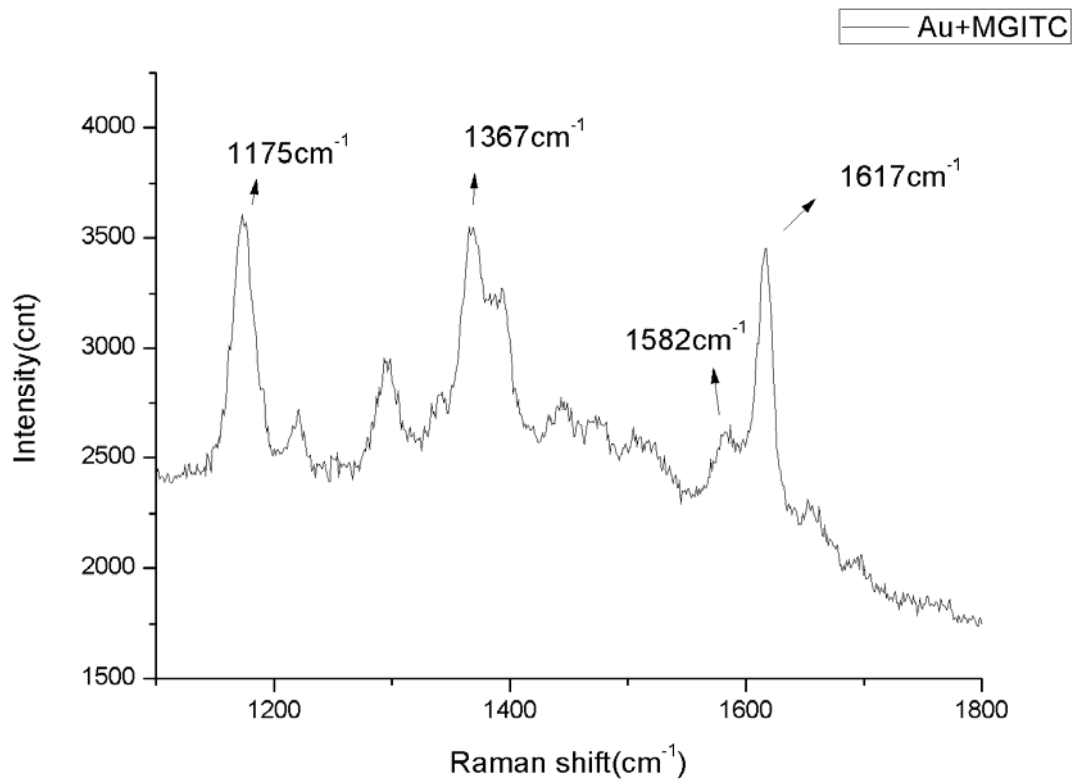


圖 4.10(b) 對照組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

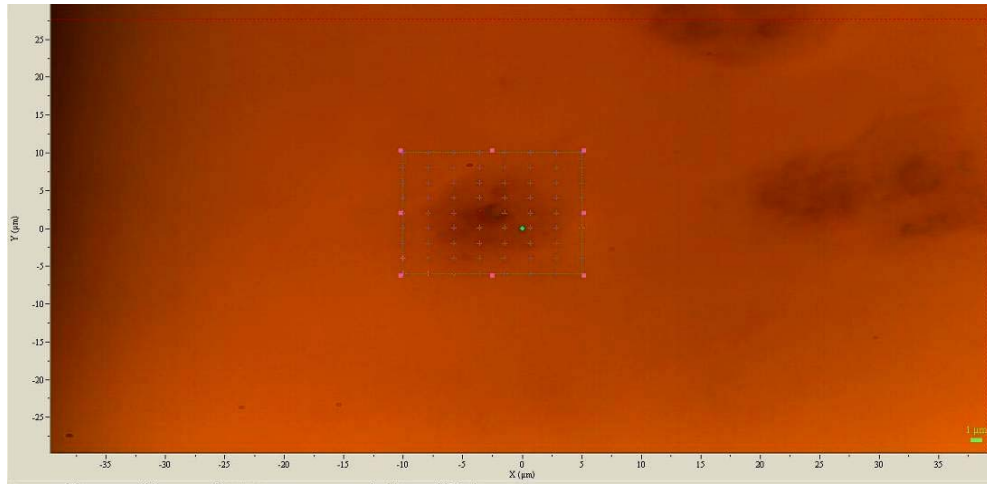


圖 4.10(c)對照組 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om 圖

表 4.7 對照組 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y axis	9	10	-6	2
X axis	8	5	-10	2

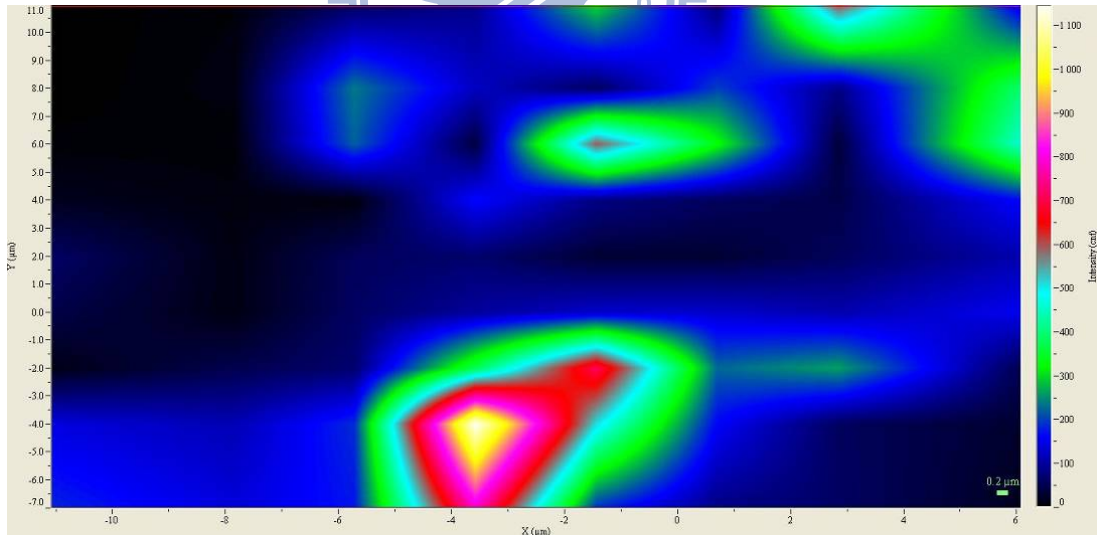


圖 4.10(d) 與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖

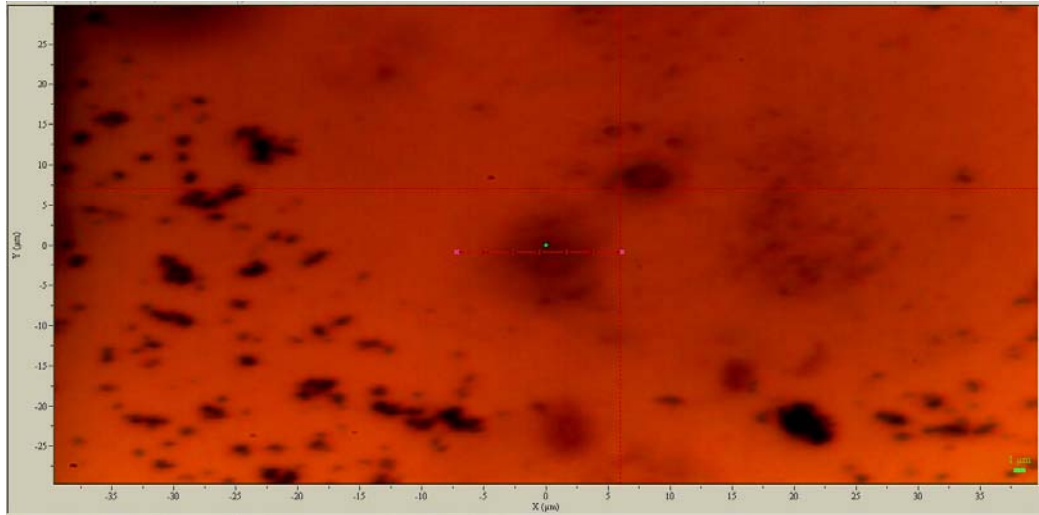


圖 4.10(e)對照組 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖

表 4.8 對照組 Hep G2 細胞作 xz 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Z axis	16	-20	-10	2
x axis	8	5	-10	2

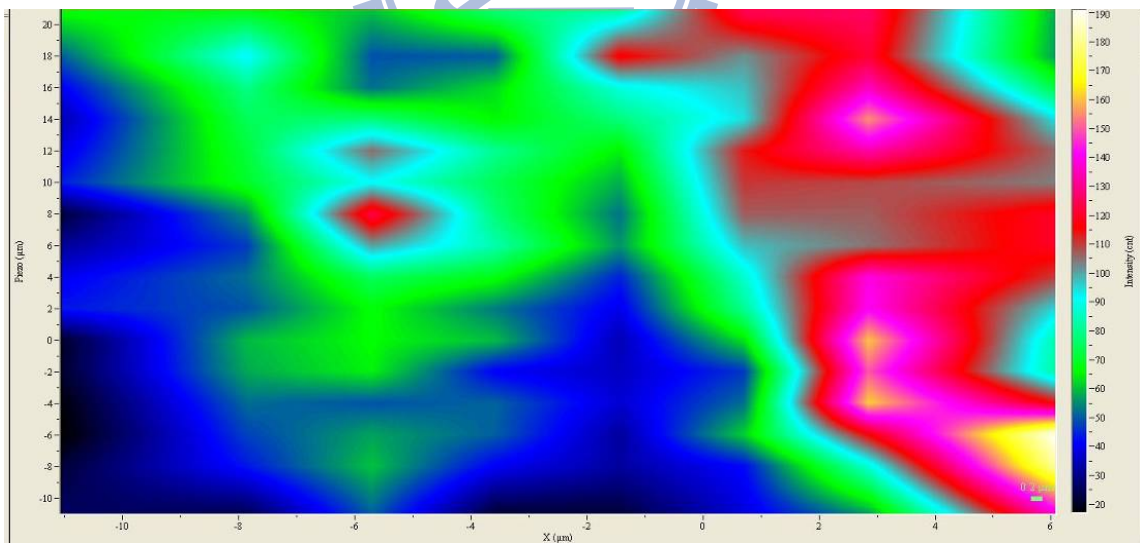


圖 4.10(f) 與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖

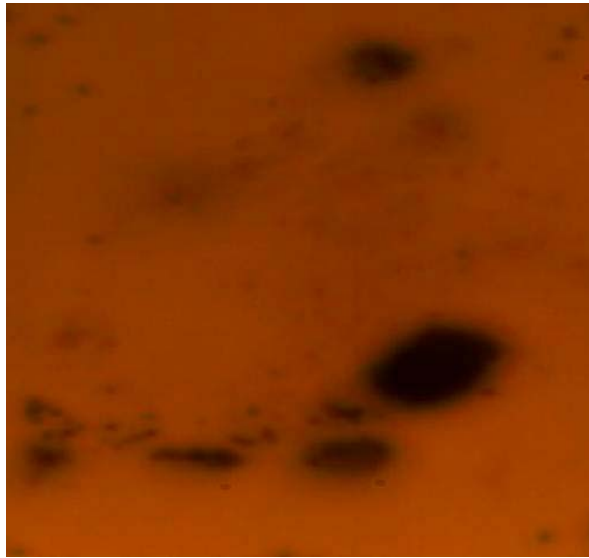


圖 4.11(a) 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞之 om 圖

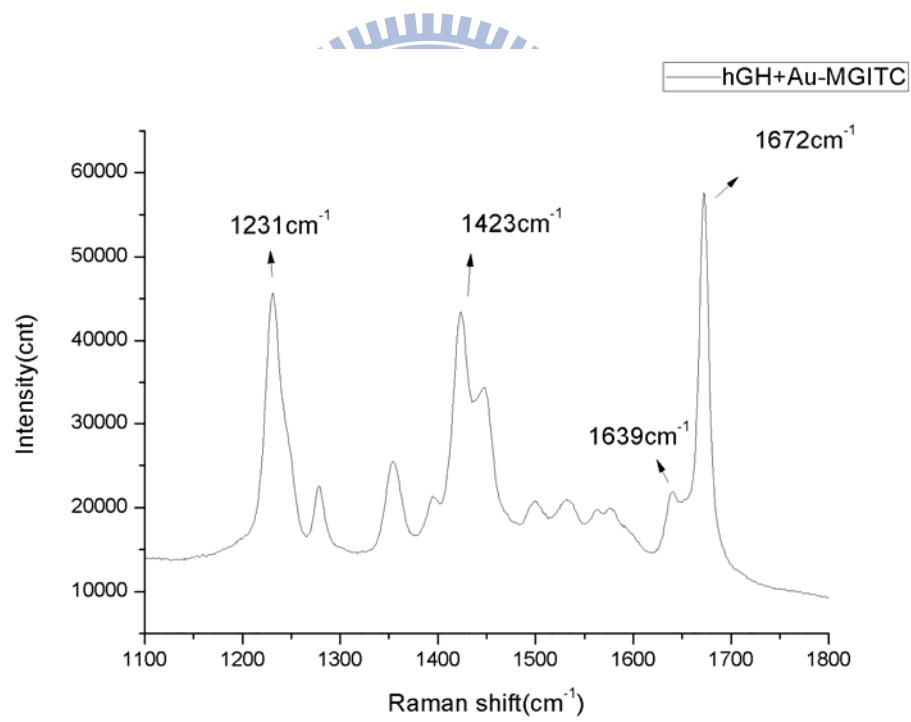


圖 4.11(b) 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

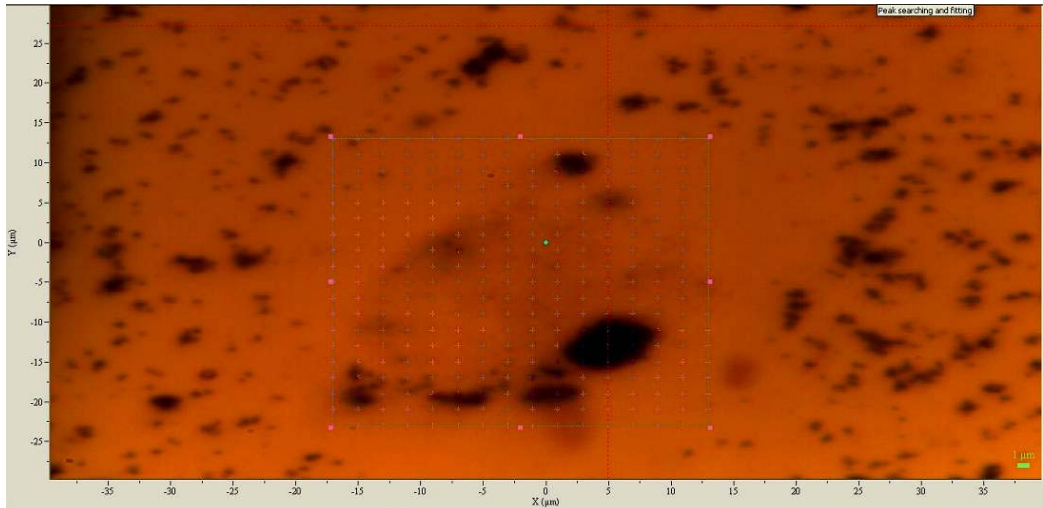


圖 4.11(c) 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的 xy 平面 mapping om 圖

表 4.9 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
y axis	19	13	-23	2
x axis	16	13	-17	2

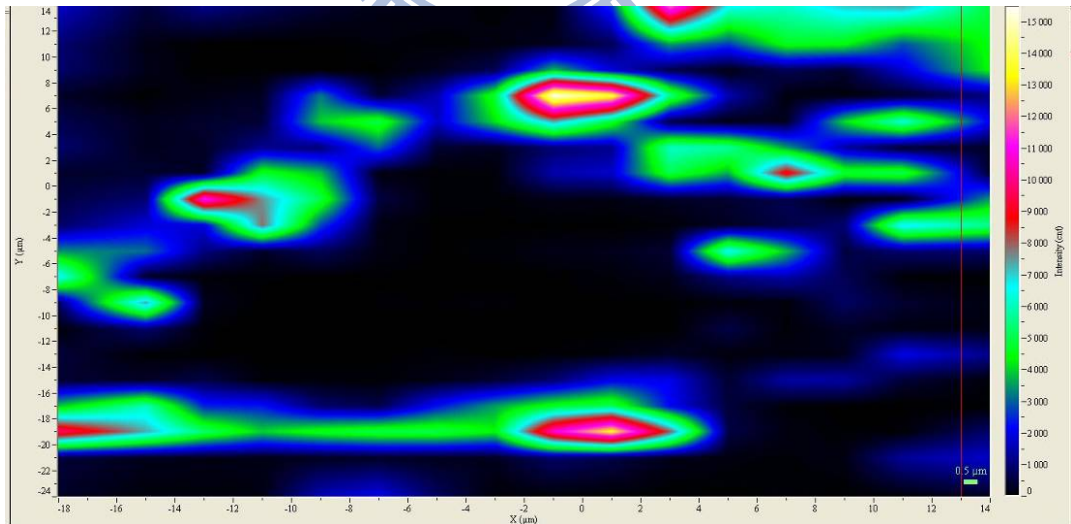


圖 4.11(d) 與 om 圖相對應的 xy 平面與訊號強度圖

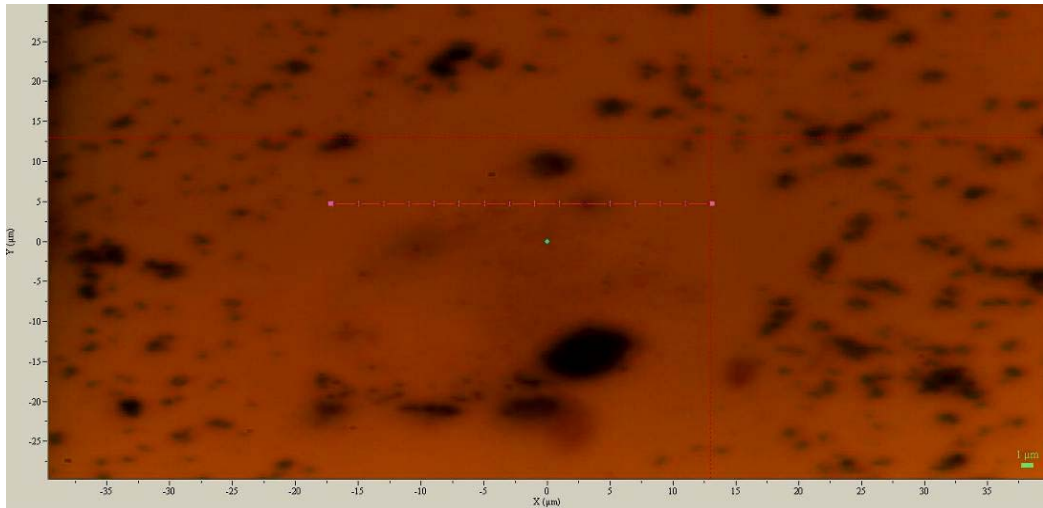


圖 4.11(e) 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞的 xz 平面 mapping om 圖

表 4.10 修飾上 hGH 的金球送入 Hep G2 細胞作 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
z axis	21	30	-10	2
x axis	16	13	-17	2

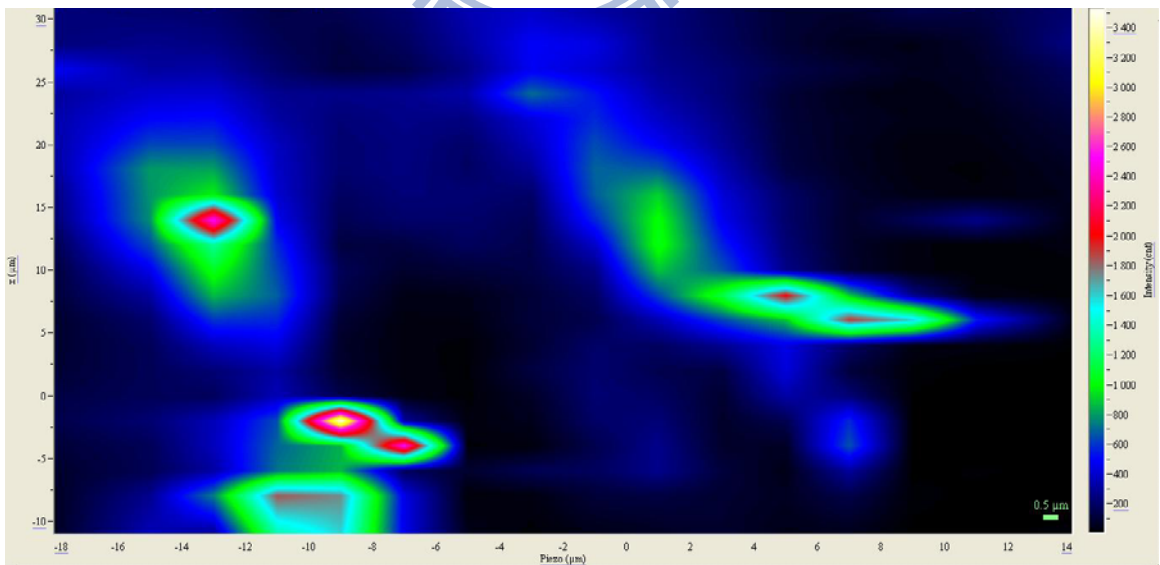


圖 4.11(f) 與 om 圖相對應的 xz 平面與訊號強度圖

4-2 奈米鑽石量測分析

4-2-1 奈米鑽石之拉曼光譜量測分析

在此部份我使用奈米鑽石當作拉曼偵測因子，因奈米鑽石本身具有獨特的拉曼訊號，在 1332 cm^{-1} 附近的位置會產生一根尖銳且高強度的峰，可用來當作生物體的標定物質。

參考文獻得知[28]，將奈米粒子送入細胞可直接餵食、電穿孔或用 liposome 當作載體，經胞吞作用送入細胞質，在此我先嘗試用電穿孔的方法(施加電壓 600 V、施加電壓時間 100 μs 、間隔時間 100 ms，總共進行 8 次)，但試了幾次後，發現進入細胞的奈米鑽石甚少，故我後來就改用餵食的方式，先將細胞養在 6 well 的培養皿中一天，之後加入體積為 100 μl 、濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 100 nm 奈米鑽石，培養一天之後取出，以 PBS 反覆沖洗以及加入 paratromaldehyde 固定細胞後，即可進行光譜量測。在 100 倍物鏡下找到欲量測之細胞，OM 圖如圖 4.12(a)所示，以 633 nm 雷射光源測量(光柵 600、共焦針孔 200 μm 、積分時間 10 秒、量測波段 1100-1600 cm^{-1} ，後續量測參數皆同上)，得到鑽石的拉曼光譜，如圖 4.12(b)所示，可看出在 1332 cm^{-1} 附近有單一且尖銳的訊號，強度~90 cnt。欲得知鑽石分佈在細胞裡的情形，對其做 xy 平面 mapping，om 圖見圖 4.12(c)，掃描範圍見表 4.11，並鎖定鑽石的特徵峰，做訊號強度對距離的 2D 圖，見圖 4.12(d)，可發現鑽石最強的訊號在圖上座標為(-10,4)的位置，為了要看鑽

石在深度切面分佈的位置，固定 $y=4$ ，做 xz 平面 mapping，om 圖見圖 4.12(e)，掃描範圍見表 4.12，相對應的訊號強度圖如圖 4.12(f)所示，可看出鑽石分佈在深度為 $-5\ \mu\text{m}$ 附近，表示其進入細胞，而非吸附在細胞表層。

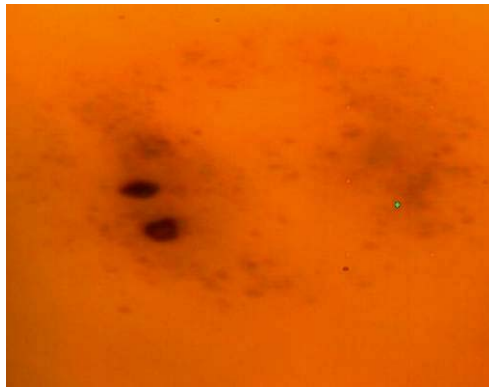


圖 4.12(a)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 om 圖

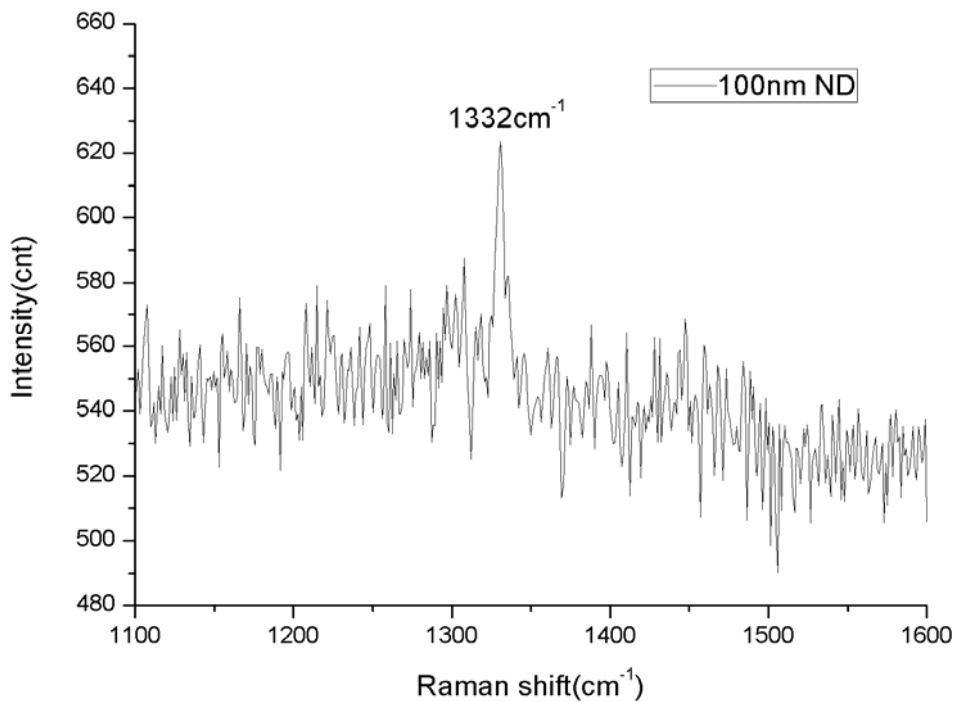


圖 4.12(b)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞拉曼訊號

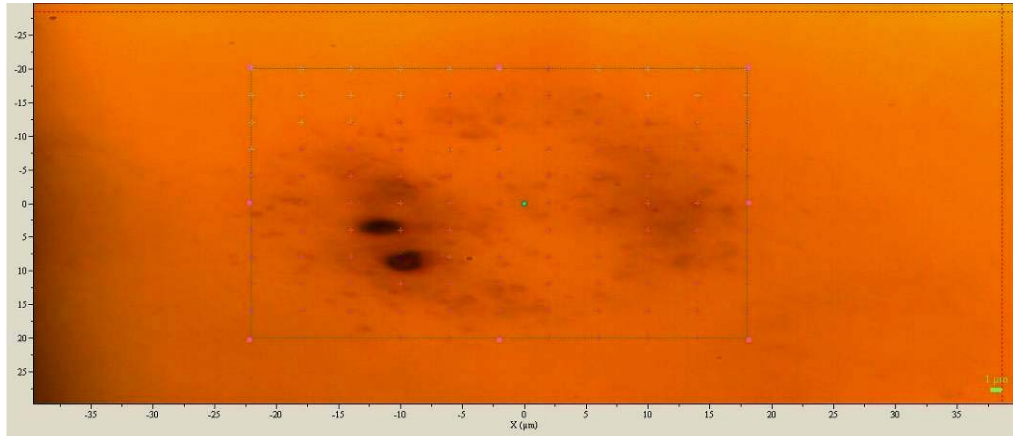


圖 4.12(c)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖

表 4.11 含奈米鑽石的 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
Y axis	11	20	-20	4
X axis	11	18	-22	4

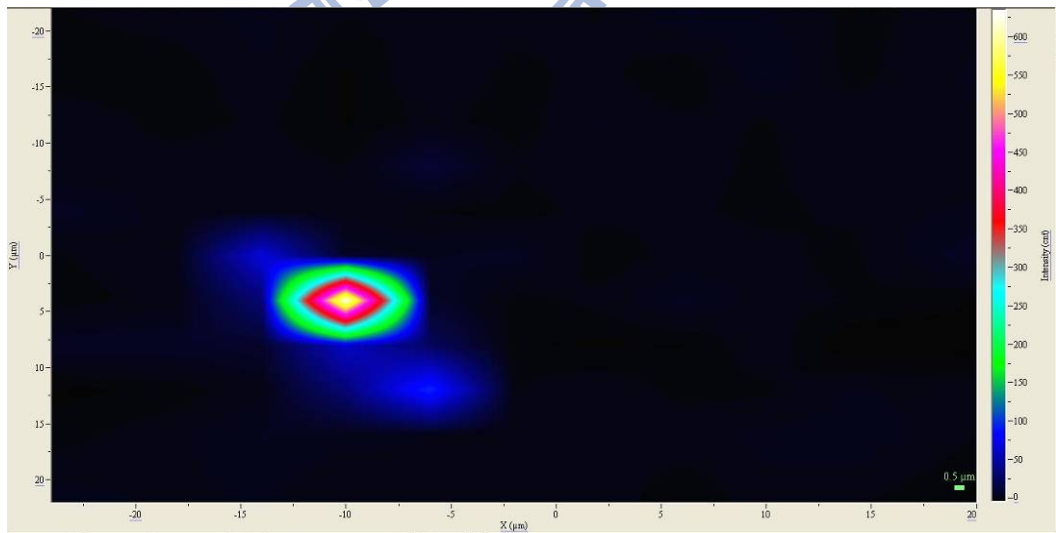


圖 4.12(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖

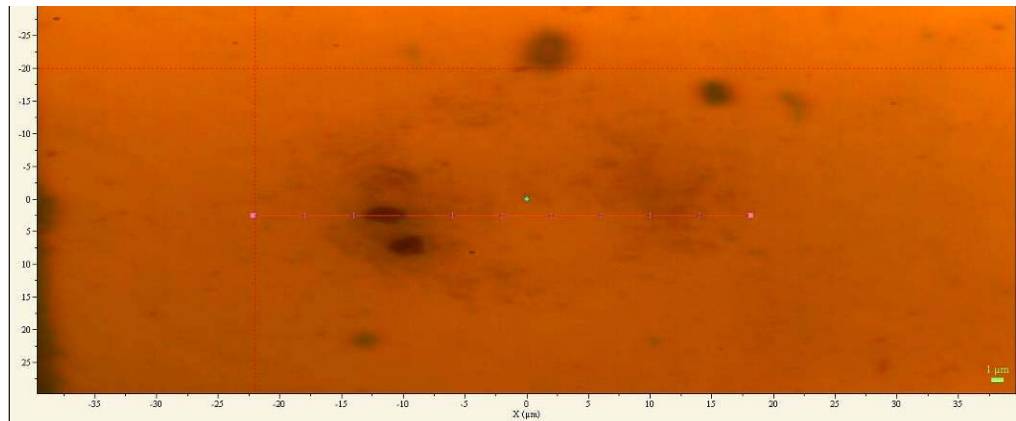


圖 4.12(e)含奈米鑽石之 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 的 om 圖

表 4.12 含奈米鑽石的 Hep G2 細胞 xz 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
z axis	8	20	-10	4
x axis	11	18	-22	4

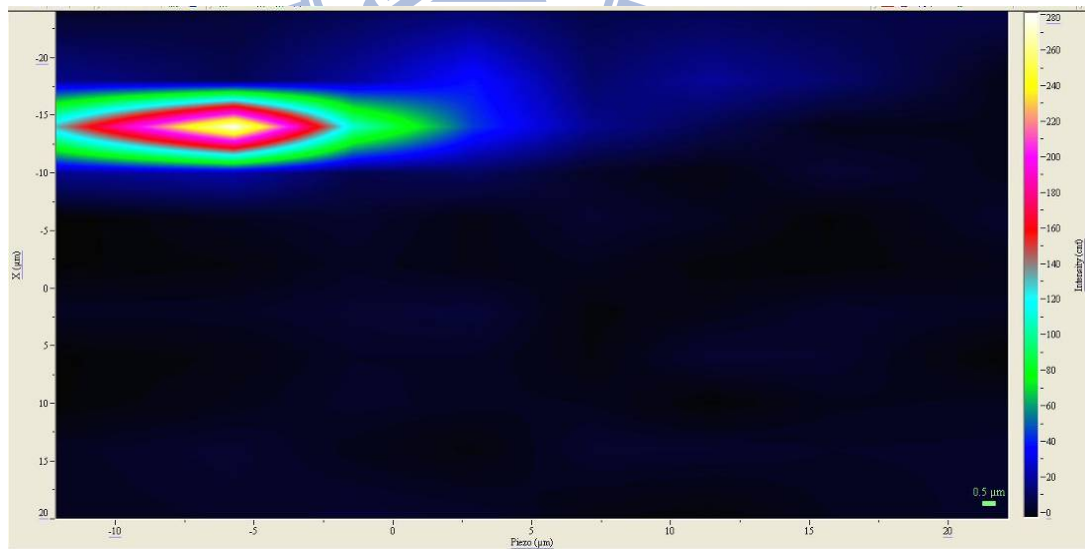


圖 4.12(f)和 om 相對應的 xz 平面與訊號強度圖

4-2-2 奈米鑽石修飾上 hGH 之拉曼光譜量測分析

此部份對照組為直接餵食三小時的100nm鑽石，濃度為100 $\mu\text{g/ml}$ 、體積100 μl ，而實驗組則是加入EDC/NHS 試劑，使奈米鑽石表面的羧基活化，讓羧基易與hGH形成醯胺鍵(Amide bond)而連接，之後餵食三小時，用PBS反覆沖洗以及加入paratromaldehyde固定細胞後，即可進行光譜量測。在這裡只餵食三小時而非一天的原因一樣是希望盡量減少以胞吞作用進入到細胞質的奈米鑽石數量。在om下找到欲量測之細胞，對照組如圖4.13(a)所示，以633nm雷射光源偵測(量測參數如上)，拉曼光譜圖見圖4.13(b)，其訊號極弱，且無奈米鑽石的特徵峰，對其做xy平面mapping，om如圖4.13(c)，掃描範圍見表4.13，鎖定 1332 cm^{-1} ，做訊號強度對距離的2D圖，見圖4.13(d)，可看出並無明顯的奈米鑽石訊號，推測由於作用時間太短，鑽石來不及被細胞所吞食。連接上hGH的實驗組om如圖4.14(a)所示，以633 nm雷射光源偵測(量測參數如上)，拉曼光譜圖見圖4.14(b)，可在 1332 cm^{-1} 附近看見有一根尖銳的拉曼訊號，此為奈米鑽石特徵峰，表示細胞上有奈米鑽石，為了進一步得知其在細胞分佈的位置，對其做xy平面mapping，om圖如圖4.14(c)所示，掃描範圍見表4.14，以程式鎖定 1332 cm^{-1} ，做訊號強度對xy平面的二度空間圖，見圖4.14(d)，發現在座標(12,10)和(17,8)的位置附近有較強的訊號，顯示出奈米鑽石藉由hGH辨認細胞膜而吸附在細胞上。

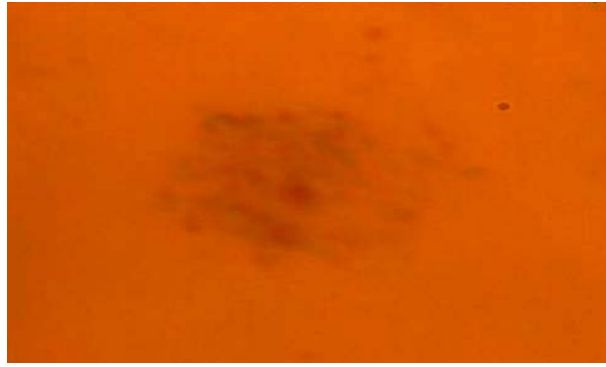


圖 4.13(a)對照組 Hep G2 細胞 om 圖

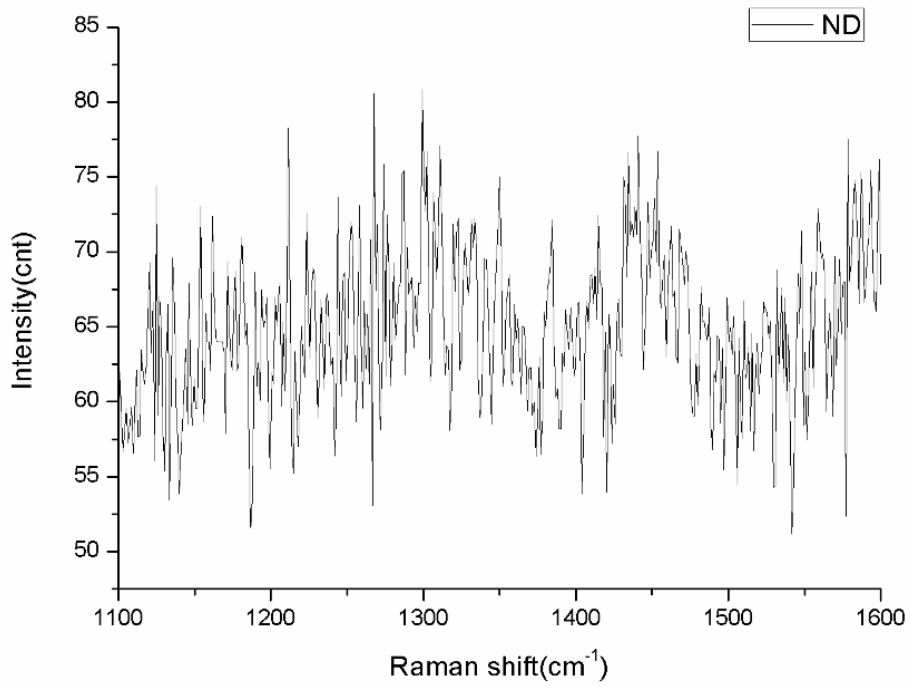


圖 4.13(b)對照組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

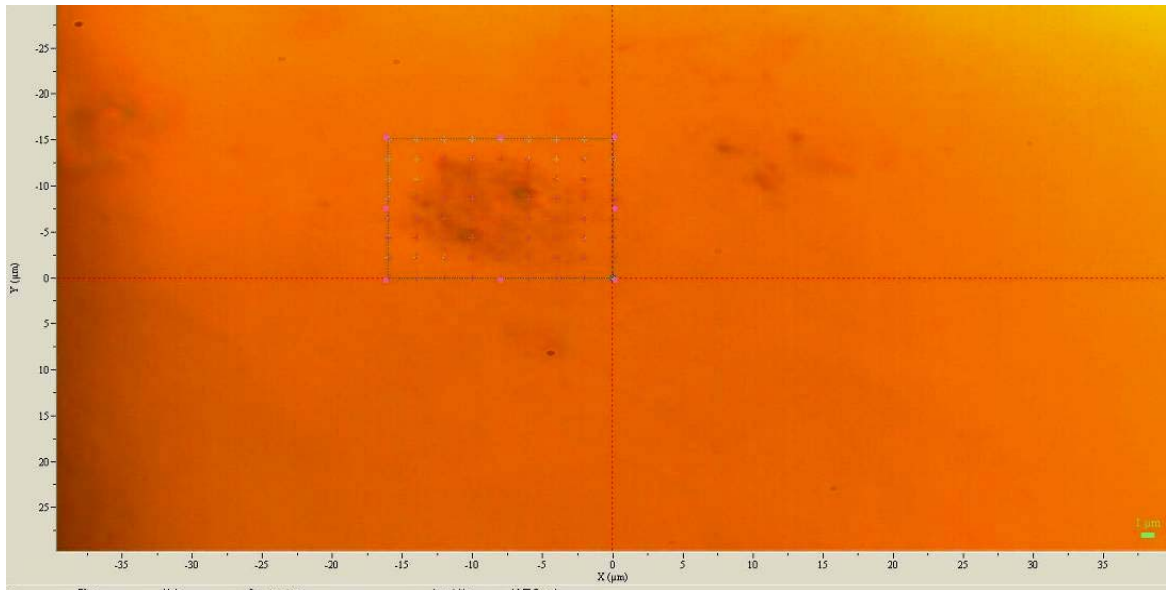


圖 4.13(c)對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖

表 4.13 對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
y axis	8	0	-15	2
x axis	9	0	-16	2

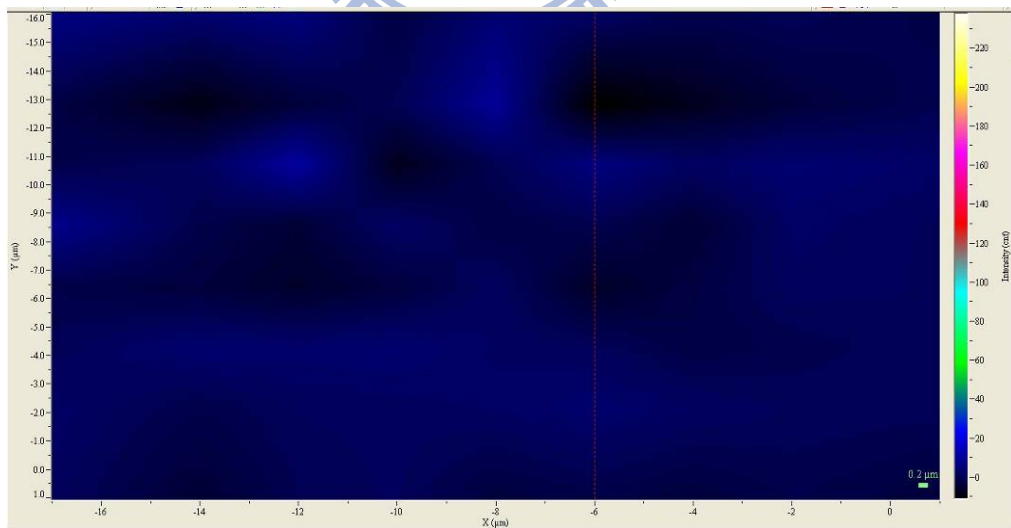


圖 4.13(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖



圖 4.14(a)實驗組 Hep G2 細胞 om 圖

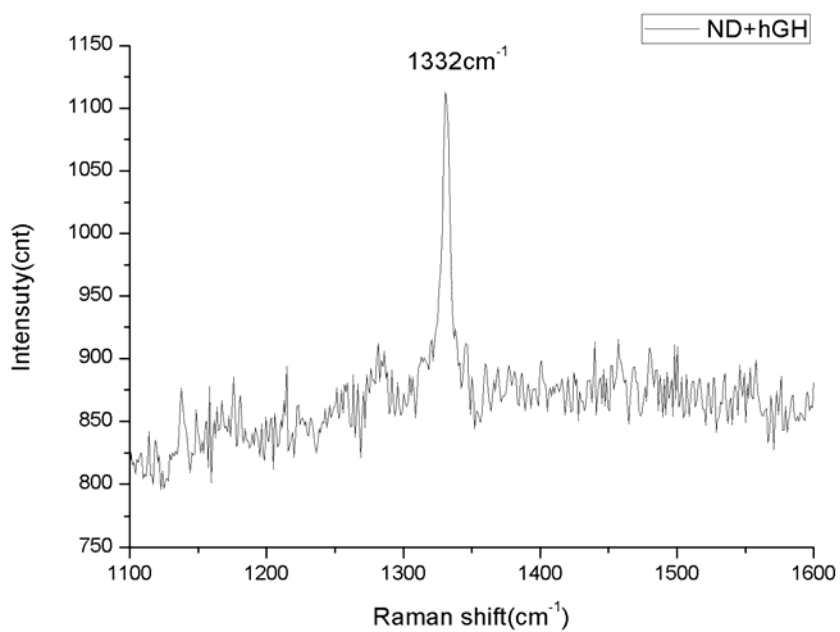


圖 4.14(b)實驗組 Hep G2 細胞的拉曼光譜圖

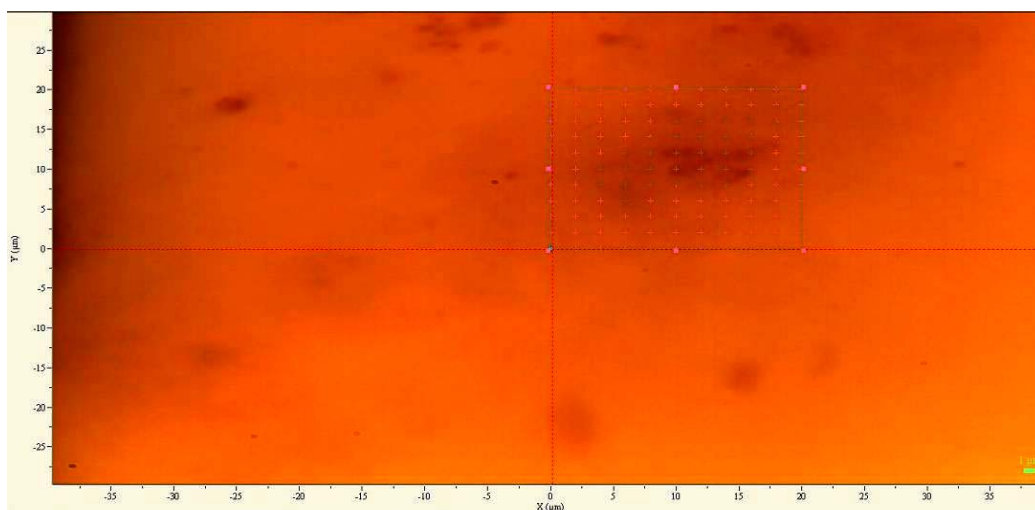


圖 4.14(c)對照組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 的 om 圖

表 4.14 實驗組 Hep G2 細胞 xy 平面 mapping 點數表

	Array size	from	to	Increment(μm)
y axis	11	0	20	2
x axis	11	0	26	2

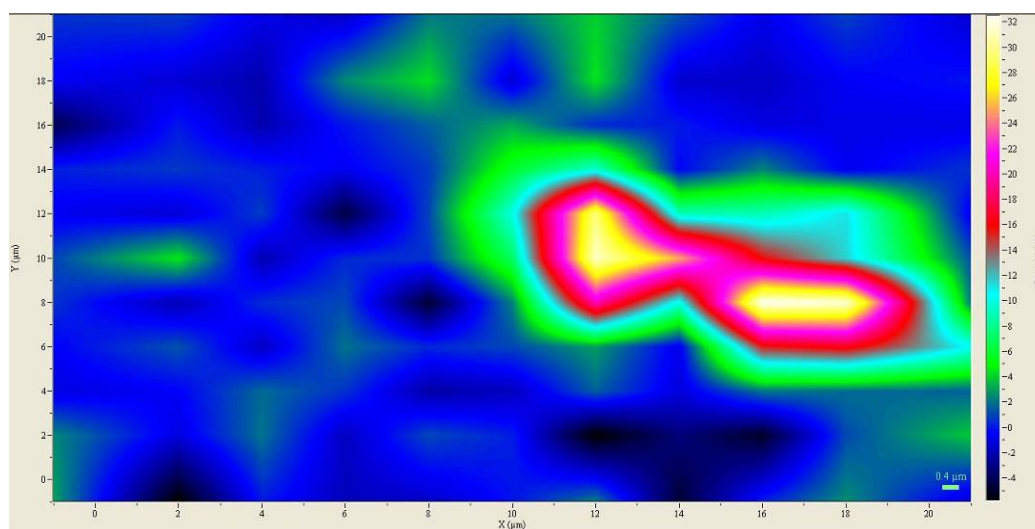


圖 4.14(d)和 om 相對應的 xy 平面與訊號強度圖

4-3 結合微流道偵測流速與時間之關係

此部份配置好不同濃度的奈米金球與奈米鑽石，分別抽進以PDMS翻模製法製成的微流道內，再以633 nm雷射光源偵測不同時間、流速下，其訊號的變化情形，微流道的成品圖與其架設在xy stage下示意圖見圖4.15，由側面看微流道外觀呈現凹字型，其中兩側突起是為了讓塑膠軟管方便插入，而中間凹陷則是為了使對焦容易。金球的部份我配置了6 nM、60 nM、600 nM、1500 nM幾種不同的濃度，進行時間軸掃描拉曼光譜量測(量測參數：雷射光源633 nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間5秒、量測波段1100-1800 cm^{-1})，時間從0秒~300秒，每8秒遞增一次，並鎖定1617 cm^{-1} 特徵峰，做訊號強度對時間變化圖，6 nM修飾孔雀綠金球的變化圖如圖4.16所示，可明顯發現當流速為10 $\mu\text{l/h}$ (黑色條狀圖)時，強度幾乎是流速為100 $\mu\text{l/h}$ (紅色條狀圖)的兩倍，而60 nM、600 nM、1500 nM修飾孔雀綠金球的變化圖如圖4.17、4.18、4.19所示，也都出現同樣情況，可見當流速變快時，趨向偵測效率降低的走勢。奈米鑽石的部份我用100 nm大小的鑽石粉末配置了 5×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ 和 2.5×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ 兩種不同的濃度，同樣進行時間軸掃描拉曼光譜量測(量測參數：雷射光源633nm、光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間10秒、量測波段1100-1600 cm^{-1})，時間從0秒~300秒，每13秒遞增一次，並鎖定1332 cm^{-1} 特徵峰，做訊號強度對時間變化圖， 5×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ 奈米鑽石的變化圖如圖4.20所示，在流速為10 $\mu\text{l/h}$ 時強度較100 $\mu\text{l/h}$ 和1000 $\mu\text{l/h}$ 高，但

後兩者則差異不大，至於濃度為 $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 的奈米鑽石則無論流速快慢時，強度變化都不大，且偵測到的訊號強度都很低。為了改善奈米鑽石的量測效率，我嘗試鍍一層厚度約100 nm的金電極在氧化矽基板上，經過氧電漿處理後與PDMS接合，以 $10 \mu\text{l/h}$ 的流速將濃度 $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 的奈米鑽石注入流道內，其在10倍物鏡下的om圖如圖4.22(a)所示，此時以633 nm雷射光源偵測，訊號極微弱，與雜訊無法區分，我們在金電極兩端施加100 kHz、10 Vpp的交流電，其om圖見圖4.22(b)，可明顯看見鑽石被捕捉在金電極中間，以633 nm雷射光源偵測(量測參數：光柵600、共焦針孔200 μm 、積分時間20秒、量測波段1100-1600 cm^{-1})，得到拉曼光譜圖4.22(c)，在1332 cm^{-1} 附近有鑽石的特徵峰。



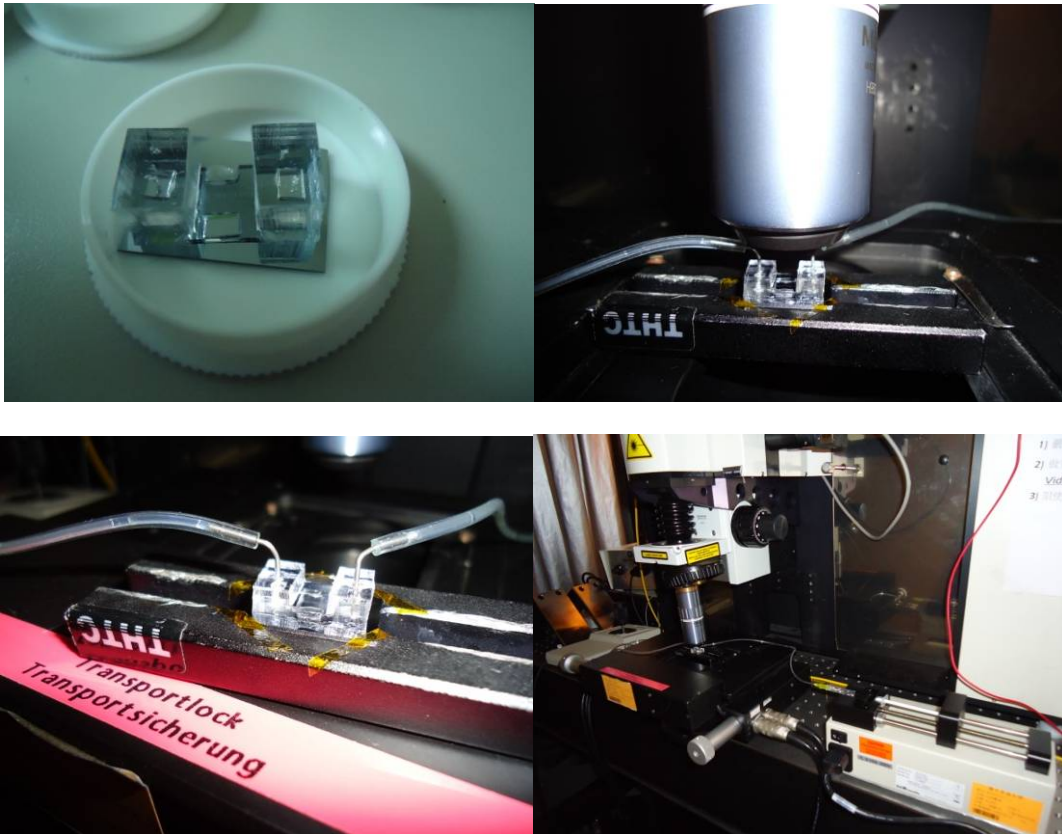


圖4.15 製作完成的微流道示意圖

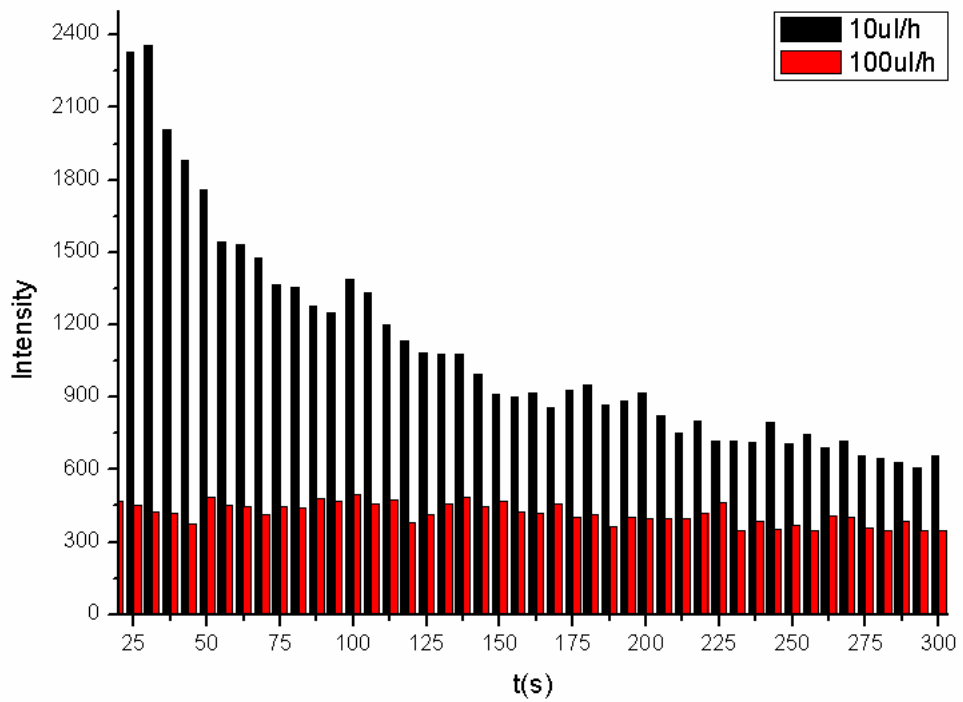


圖4.16 6 nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖

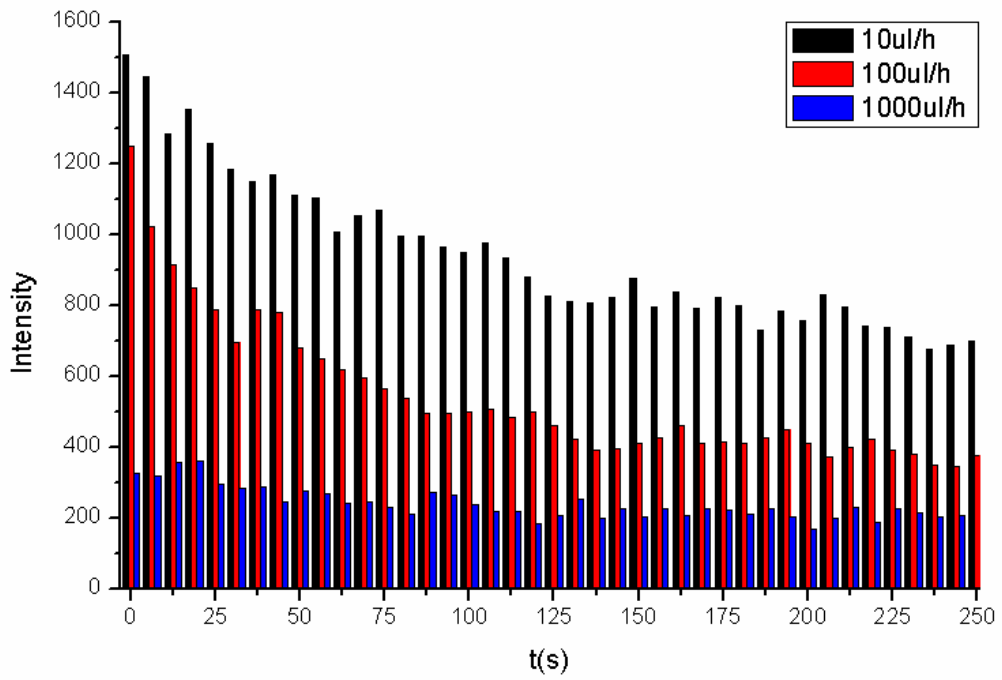


圖4.17 60 nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖

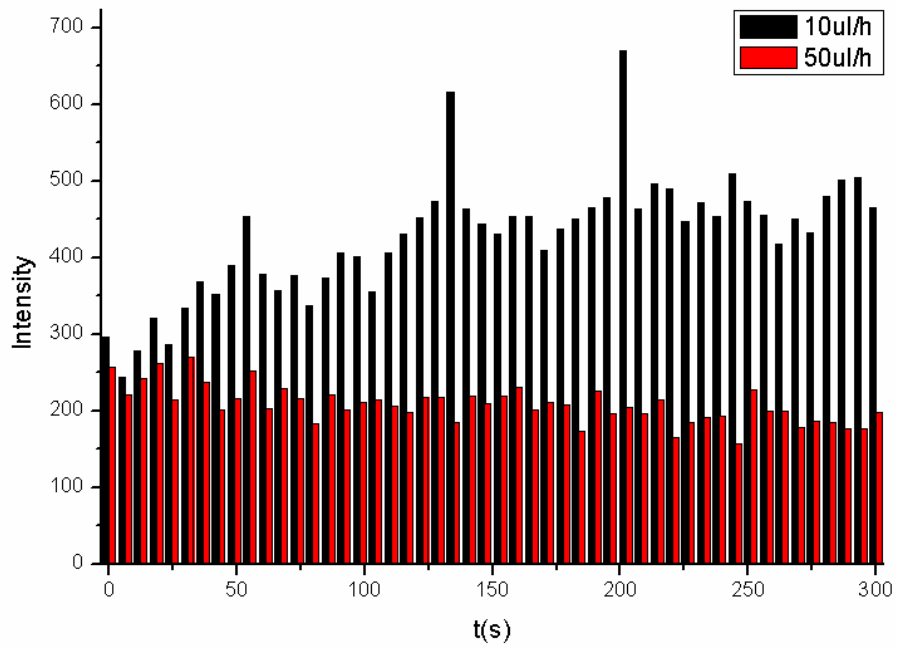


圖4.18(a) 600 nM 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖

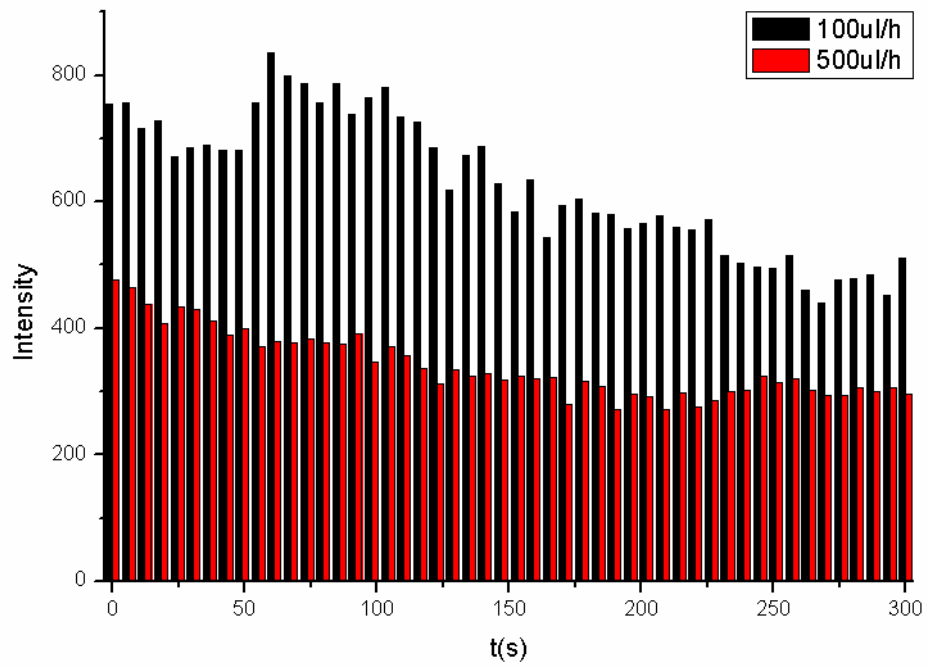


圖4.18(b) 600 nm 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖

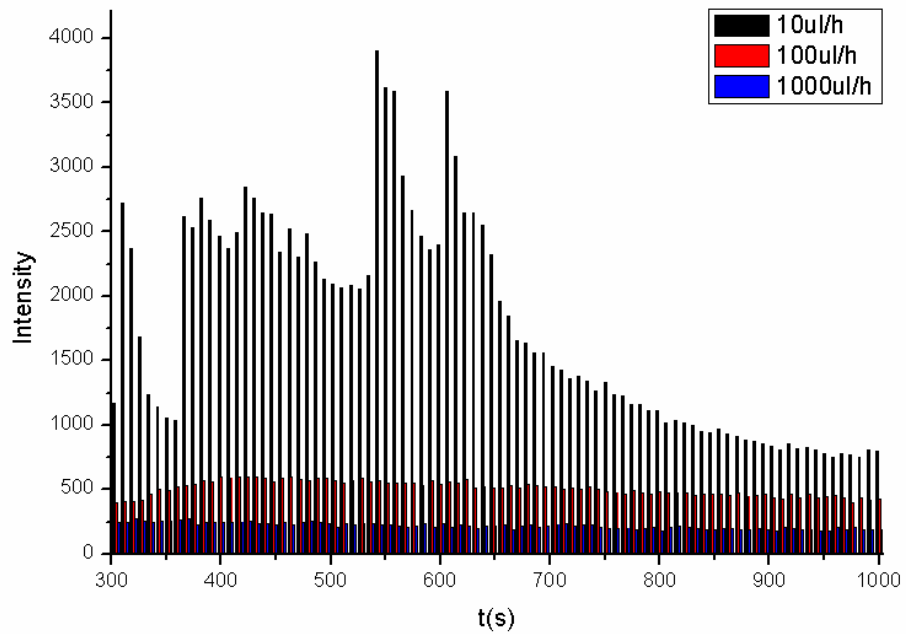


圖4.19 1500 nm 修飾孔雀綠金球的訊號對時間圖

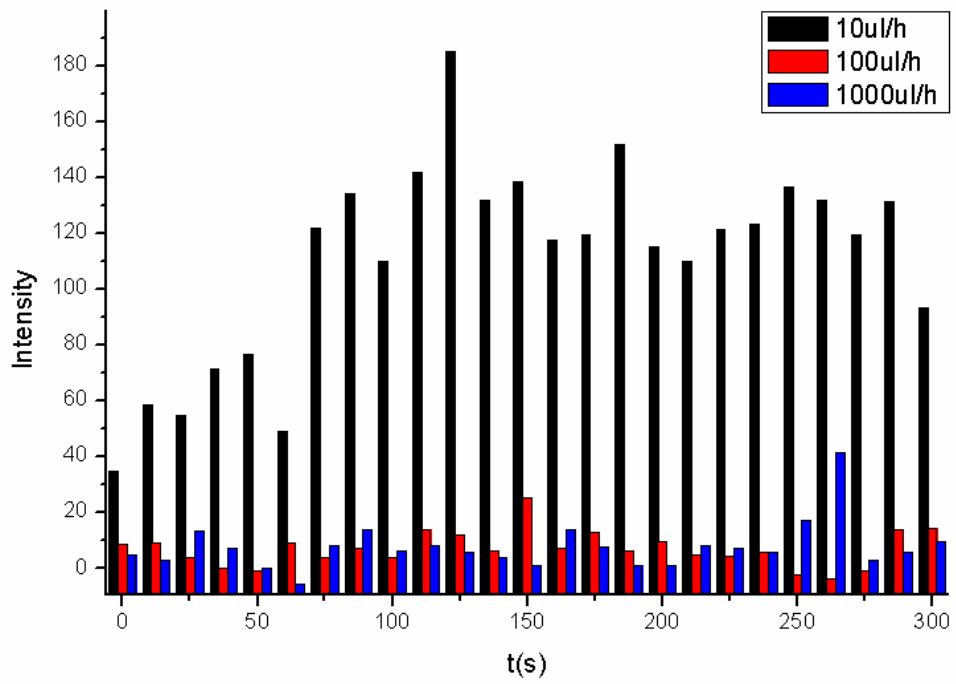


圖4.20 $5 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 奈米鑽石的訊號對時間圖

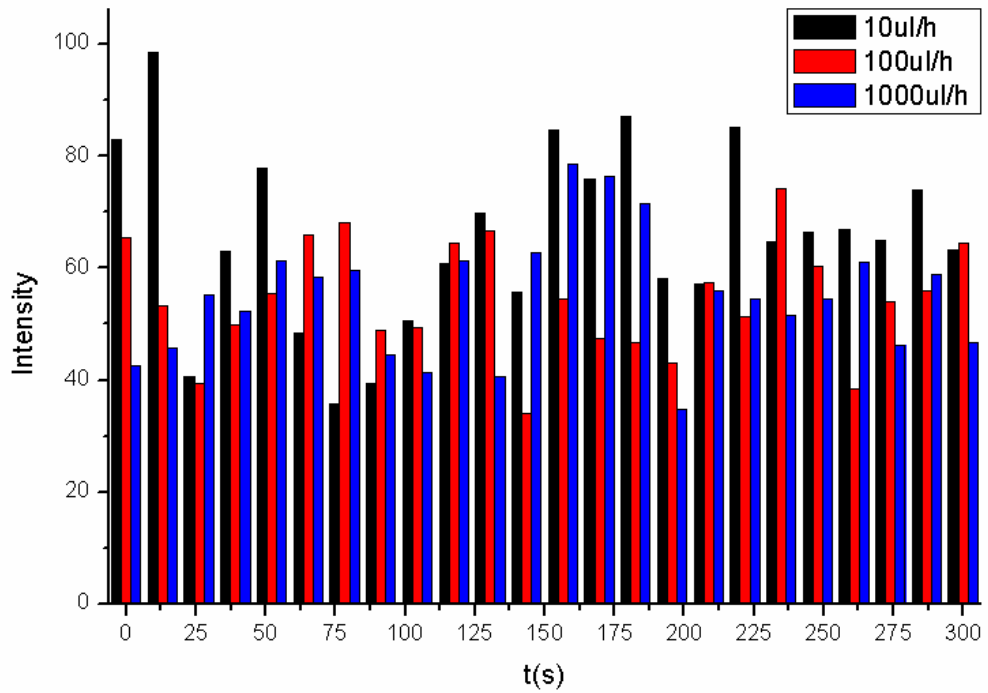


圖4.21 $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 奈米鑽石的訊號對時間圖

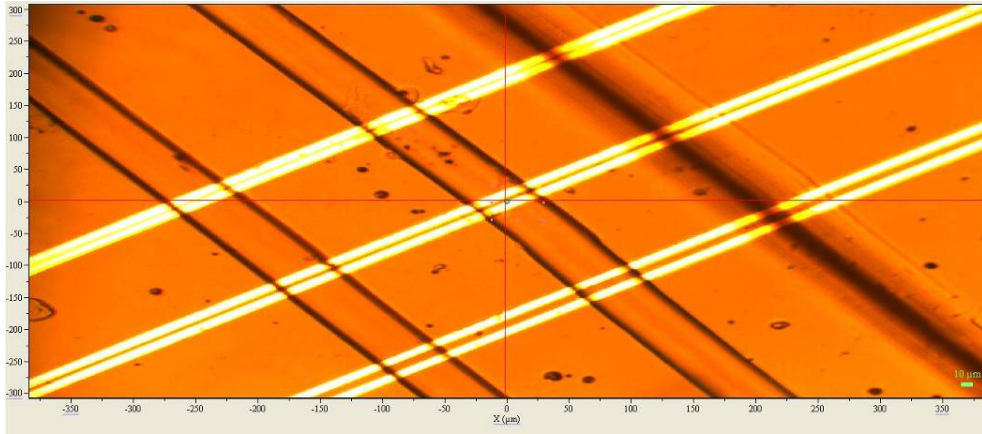


圖4.22(a) 施加電壓前的流道om圖

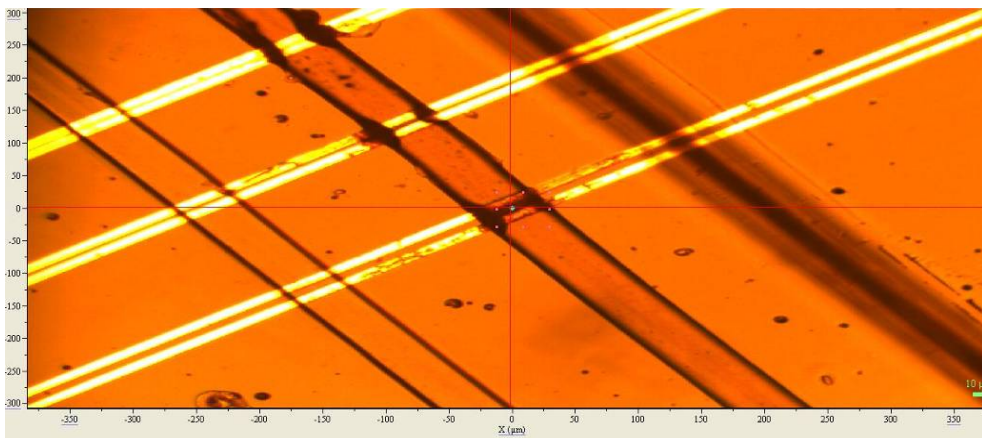


圖4.22(b) 施加電壓後的流道om圖

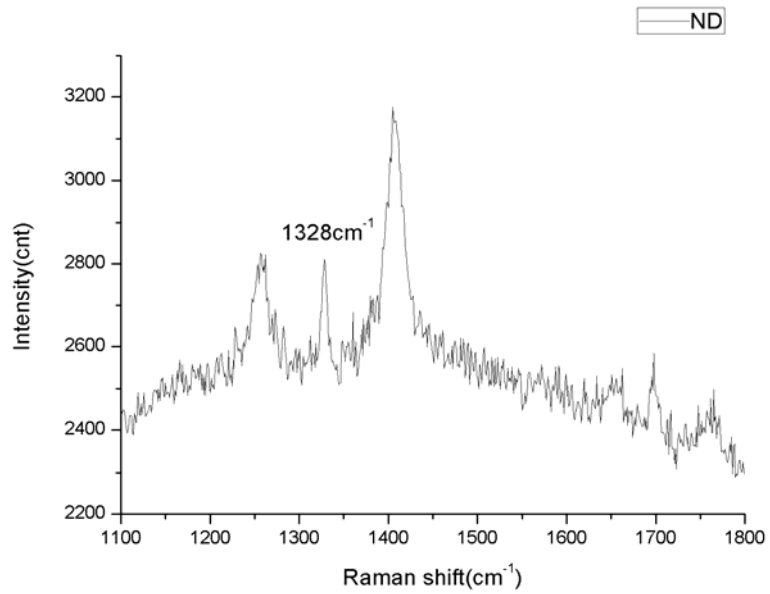


圖4.22(c) 捕捉在金電極中間的奈米鑽石拉曼光譜圖

第五章 結論

第一部份利用修飾上孔雀綠的奈米金球標定Hep G2人類肝癌細胞，藉由拉曼訊號觀察金球在細胞裡的分佈位置，並結合螢光影像，證實金球確實有進入細胞，之後將金球連接上hGH，利用激素會和其特定受器結合的原理使生長激素連接到癌細胞表面，藉此改變金球連接到細胞的位置，並結合高解析度的拉曼光譜儀，辨別金球與細胞結合的位置。第二部份則是改用奈米鑽石當作標定物質，藉由觀察鑽石獨特的拉曼訊號來建立其在細胞內分布的二維圖譜，並使用EDC/NHS試劑連接上hGH，觀察癌細胞表面的生長激素受器分佈情形。此結果證實了這兩種奈米粒子作為生物探針的可行性，希望未來可比較多種惡化程度不同的腫瘤，計算生長激素受器的多寡，同時找出對癌細胞更具專一性之蛋白質，結合非侵入性且高解析的拉曼光譜儀，運用在癌細胞檢測上。

第三部份利用PDMS翻膜法製作具微小結構之流道，將奈米金球以及奈米鑽石分別注入，改變不同流速，觀察其拉曼訊號強度的變化，證實了在流動的情況下可以量測到金球與鑽石的拉曼訊號。但在此部份實驗中，發現奈米鑽石的訊號在溶液中變得較微弱，此外，當鑽石和細胞結合注入流道後，則完全測量不到訊號，推測原因有兩點：(1)鑽石進入細胞後，訊號變得更加微弱，無法達到拉曼光譜儀的偵測極限(2)細胞尺寸太大，又易堆疊，故全部阻塞在入口處，無法被幫浦抽進流道內，此次部份問題未來可

以透過改善方法來解決。

改善的方式有(1)將細胞從培養皿取下時，重複多沖幾次，使細胞均勻掉落，而較不會有堆疊現象(2)離心後，取較多的medium稀釋細胞，使細胞數減少，並均勻分佈在溶液裡(3)在流道上製作電極，施加交流電使細胞被捕捉或誘導到某個特定的出口進行偵測。期望未來能將奈米粒子結合細胞，並在微流道上鍍電極，根據物質介電泳動力性質的不同，施加不同頻率和電壓的交流電，將細胞加以捕捉、分離、過濾等，建立一套即時且全自動化的生醫檢測系統。



參考文獻

- [1] 郭正次、朝春光，奈米結構材料科學，全華科技圖書公司
- [2] Paul Hauser, "Lab on a Chip", Berkeley Science Review 16, 2009
- [3] 徐玄修、林永昇、殷宏林、謝哲偉，生醫微流體晶片之製程平台，儀器科技研究中心，2006
- [4] McDonald J.C., Duffy D.C., Anderson J.R., Chiu D.T., Wu H., Schueller O.J., Whitesides G.M., "Fabrication of microfluidic system in poly(dimethylsiloxane)", Electrophoresis, 21, pp, 27-40, 2000
- [5] S. W. Rhee, A. M. Taylor, C. H. Tu, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon, "Patterned cell culture inside microfluidic devices", Lab Chip, 5, pp, 102 – 107, 2005
- [6] W. C. Chang, L. P. Lee and D. Liepmann, "Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel" Lab Chip, 5, pp, 64-73, 2005
- [7] I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Onako and K. Yasuda, "On-chip culture system for observation of isolated individual cells", Lab Chip, 1, pp, 50-55, 2001
- [8] Z. Palkova', L. Va'chova', M. Valer and T. Preckel, "Single-cell analysis of yeast, mammalian cells, and fungal spores with a microfluidic pressure-driven chip-based system" Cytometry Part A, 59A, pp, 246-253, 2004
- [9] I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang, Diana Hou and Hsueh-Chia Chang Diana Hou and Hsueh-Chia Chang, "An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting", biomicrofluidics, 1, 021503, 2007
- [10] Diana Hou, Siddharth Maheshwari, and Hsueh-Chia Chang, "Rapid bioparticle concentration and detection by combining a discharge driven vortex with surface enhanced Raman scattering", biomicrofluidic 1, 014106, 2007
- [11] Katrin R. Strehle, Dana Ciialla, Petra Ro1sch, Thomas Henkel, Michael Ko1 hler, and Julrgen Popp, "A Reproducible Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Approach. Online SERS Measurements in a Segmented Microfluidic System", Analytical Chemistry, Vol. 79, No. 4, pp, 1542-1547, 2007
- [12] Sangyeop Lee, Junghyun Choi, Lingxin Chen, Byungchoon Park, Jin Burm Kyong, Gi Hun Seong, Jaebum Choo, Yeonjung Lee, Kyung-Hoon Shin, Eun Kyu Lee, Sang-Woo Joo, Kyeong-Hee Lee, "Fast and sensitive

- trace analysis of malachite green using a surface-enhanced Raman microfluidic sensor”, *Analytica Chimica Acta*, 590, pp, 139–144, 2007
- [13] Ly Xuan Quang, Chaesung Lim, Gi Hun Seong, Jaebum Choo, Ki Jun Dob and Seoung-Kyo Yoo, “A portable surface-enhanced Raman scattering sensor integrated with a lab-on-a-chip for field analysis”, *Lab on a Chip*, 8, pp, 2214-2219, 2008
- [14] 董慕愷、陳郁文，奈米金觸媒，*科學發展*，2005年6月，47-49，390期
- [15] 嚴鴻仁、徐善慧，奈米金與銀的妙用，*科學發展*，431期，28-32，2008年11月
- [16] Hua He, Chao Xie, and Jicun Ren, “Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging”, *Analytical Chemistry*, 80, pp, 5951–5957, 2008
- [17] Ximei Qian, Xiang-Hong Peng, Dominic O Ansari, Qiqin Yin-Goen, Georgia Z Chen, Dong M Shin Lily Yang, Andrew N Young, May D Wang & Shuming Nie, “In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags”, *NATURE BIOTECHNOLOGY*, VOLUME 26, NUMBER 1, pp, 83-90, 2008
- [18] Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T., “Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels.” *Nat. Methods*, 9, pp, 763–775, 2008
- [19] Michalet X., Pinaud F., Bentolila L., Tsay J., Doose S., Li J., Sundaresan G., Wu A., Gambhir S., Weiss S., “Quantum Dots for Live Cells, In Vivo Imaging, and diagnostics.” *Science*, 307, pp, 538–544, 2005
- [20] Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A., Gaub H., Stoelze S., Fertig N., Parak W., “Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles.” *Nano Lett.*, 5, pp, 331–338, 2005
- [21] Nirmal M., Dabbousi B., Bawendi M., Macklin J., Trautman J., Harris T., Brus L., “Fluorescence Intermittency in Single Cadmium Selenide Nanocrystal.” *Nature*, 383, pp, 802–804, 1996
- [22] Amanda M. Schrand, Houjin Huang, Cataleya Carlson, John J. Schlager, Eiji Oh sawa, Saber M. Hussain, and Liming Dai” Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?” *J. Phys.Chem. B Letters*, 111, pp, 2-7, 2007
- [23] Shu-Jung Yu, Ming-Wei Kang, Huan-Cheng Chang, Kuan-Ming Chen, Yueh-Chung Yu”Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity” *J. Am.Chem. Soc. Communications*, 127, pp, 17604-17605, 2005
- [24] X. L. Kong, L. C. L. Huang, C.-M. Hsu, W.-H. Chen, C.-C. Han, and H.-C. Chang, “High-Affinity Capture of Proteins by Diamond Nanoparticles for

- Mass Spectrometric Analysis”, *Anal. Chem.*, 77, pp, 259-265, 2005
- [25] Xianglei Kong, L. C. Lora Huang, S.-C. Vivian Liao, Chau-Chung Han, and Huan-Cheng Chang, “ Polylysine-Coated Diamond Nanocrystals for MALDI-TOF Mass Analysis of DNA Oligonucleotides”, *Anal. Chem.*, 77, pp, 4273-4277, 2005
- [26] Knight, D. S., and W. B. White, “Characterization of diamond films by Raman spectroscopy.” *J. Mater. Res.* 4 ,pp , 385–393, 1989
- [27] Jacob Filik, ”Raman spectroscopy: a simple non-destructive way to characterise diamond and diamond-like materials ”, *SPECTROSCOPYEUROPE*, 17, 5 , 2005
- [28] Jui-I. Chao, Elena Perevedentseva, Pei-Hua Chung, Kuang-Kai Liu, Chih-Yuan Cheng, Chia-Ching Chang, and Chia-Liang Cheng” Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling”, *Biophysical Journal* Volume, 93, pp, 2199–2208, 2007
- [29] P.-H. Chung, E. Perevedentseva, C.-L. Cheng, “The particle size-dependent photoluminescence of nanodiamonds”, *Surface Science*, 601, pp, 3866–3870, 2007
- [30] P.W. May, J.A. Smith, K.N.,” Rosser 785 nm Raman spectroscopy of CVD diamond films”, *Diamond & Related Materials*, 17, pp, 199–203, 2008
- [31] Houjin Huang, Erik Pierstorff, Eiji Osawa, and Dean Ho,”Functionalized nanodiamonds as efficient transmembrane drug carriers”, 7th IEEE, pp, 570-573, 2007
- [32] Bradley R. Smith, Marcus Niebert, Taras Plakhotnik, Andrei V. Zvyagin, ”Transfection and imaging of diamond nanocrystals as scattering optical labels”, *Journal of Luminescence* 127, pp, 260-263, 2007
- [33] In Pin Chang, Kuo Chu Hwang, and Chi-Shiun Chiang, ”Preparation of Fluorescent Magnetic Nanodiamonds and Cellular Imaging”, *J. AM. CHEM. SOC.* 130, pp, 15476-15481, 2008
- [34] Tse-Luen Wee , Yi-Wen Mau , Chia-Yi Fang , Hsiang-Ling Hsu , Chau-Chung Han , Huan-Cheng Chang, ” Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications”, *Diamond & Related Materials*, 18, pp, 567–573, 2009
- [35] Tsong-Shin Lim, Chi-Cheng Fu, Kang-Chuang Lee, Hsu-Yang Lee, Kowa Chen, When-Feng Cheng, Woei Wu Pai, Huan-Cheng Chang and Wunshain Fann”Fluorescence enhancement and lifetime modification of single nanodiamonds near a nanocrystalline silver surface”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, pp, 1508-1514, 2009
- [36] L.R. Harrott, *Proceedings of the 1999 Particle Accelerator Conference*, pp,

595~599, 1999

- [37]王鏡堯, 單一奈米鑽石之光學特性研究, 國立交通大學應用化學系, 2007
- [38]ELS-7500EX Electron Beam Lithography System Instrument Manual, ELIONIX Inc.
- [39]FEI Company Beam Technology Division
- [40]Nano Science & Technology, National Chiao Tung University
- [41]SKOOG, HOLLER, NIEMAN, Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition
- [42]C. Bohren and D. Huffman, "Absorption and Scattering of Light by Small Particles", Wiley, New York, 1983
- [43]Campion A., and P. Kambhampati, "Surface enhanced Raman scattering", Chemical Society Reviews, 27, pp, 241-250, 1998
- [44]易正男"藉由奈米電漿子偵測信號強化之表面電漿共振與表面強化拉曼散射生物感測器", 國立中央大學光電工程研究所
- [45]M. Born et alibi, "Principles of Optics:"Oxford, Pergamon Press, 1980.
- [46]Paul Davidovits M. David Egger Scanning Laser Microscope Nature, 223, 831, 1969
- [47]X. Wu, M. Wan, G. Li, Z. Xu, C. Chen, F. Liu, and J. Li, Eur. J. Cancer, "EVIDENCE THAT THE GROWTH-HORMONE RECEPTOR MEDIATES DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT OF THE MAMMARY-GLAND", ENDOCRINOLOGY, 113, 4, , pp, 1602-1608, 2006
- [48]林柏帆, "利用自組裝單層膜技術製造奈米鑽石陣列晶片與其應用:奈米金粒子耦合於陣列晶片的光學量測", 國立交通大學應用化學系, 2009
- [49]Alexey Shavel, Nikolai Gaponik, and Alexander Eychmuller" Covalent Linking of CdTe Nanocrystals to Amino-Functionalized Surfaces", Chem. Phys. Chem., 6, pp, 449 -451, 2005
- [50]Hermanson, Greg T., " Bioconjugate Techniques", 2008
- [51]MICROCHEM,"SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist"