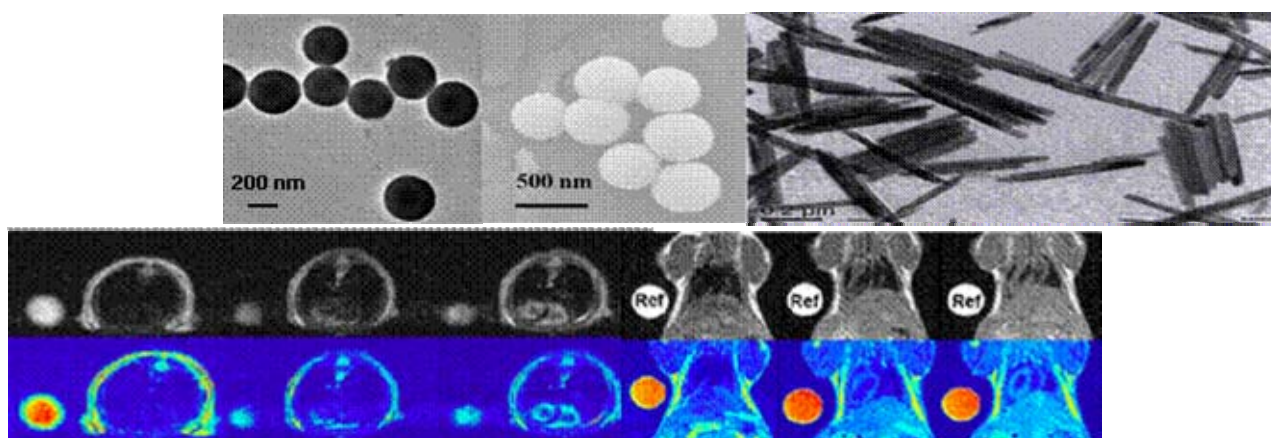


教育部「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

生醫奈米技術



生醫奈米科技教學資源中心 主編

教育部顧問室 補助

中華民國九十六年十一月出版

序

在人類基因體計畫完成後，生物技術科技邁入了一個新的紀元，成為二十一世紀最具發展潛力的科技，各科技大國莫不投入大量人力及經費從事教育、研究及產業開發。為因應生物科技突破發展與應用，行政院推動「挑戰2008—國家重點發展計畫」，由經濟部擬定「兩兆雙星產業發展計畫」，明確勾勒出我國核心與新興產業政策方向。其中生物科技產業就是雙星產業之一，是政府規劃的未來明星產業。為配合政府推動「加強生物技術產業推動方案」，培育生物技術產業人才，教育部顧問室於八十七年七月提出「生物技術科技教育改進計畫」，輔導補助各大學院校提升生物技術教育之內容與層次，全力培育生物技術人才。在第一階段「生物技術科技教育改進計畫」執行四年的成果之基礎上，教育部顧問室從九十年度起推動第二階段的教育改進計畫，期望能引進後基因時代之基因體與蛋白質體，將我國生物技術科技教育與國際接軌。根據生技中心資料，2005年我國生技人才畢業生高達6,876人，其中包括碩士2,382人及博士237人，但產業需求的是要跨領域、具高度創造力及產業實務經驗的研發人才仍需強化培育。因為生物技術係利用分子生物學及細胞生物學方法，經由生物體或生物程序生產製造可應用的產品，包括一系列關鍵技術如基因工程技術、細胞工程技術、酵素及蛋白質工程技術及生化工程技術的整合。隨著基因體學及蛋白質體學研究的進展，生醫工程、生物光電與奈米科技的興起，以及利用幹細胞改善人類疾病治療，跨領域以及尖端的生物技術人才培育已被認為是二十一世紀生物科技產業創新最重要之關鍵。為確保我國在二十一世紀生物科技競賽的人才優勢，從民國九十三年度起教育部擬在現有的成果上推動第三階段「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」。為加強第三階段計畫的推展，故整合第二階段「生物技術科技教育改進計畫」之六大資源中心，並加入新興領域，如生醫奈米及幹細胞與組織工程，成

立七大領域之教學資源中心，此七大領域分別為基因體與蛋白質體醫學、農業與海洋生物技術、生醫奈米科技、幹細胞與組織工程、生技中草製藥、生物資訊與系統生物學及醫衛分子檢驗等，總目標為培育具有前瞻性、跨領域、加強產業經驗及國際觀之尖端生技人才，並特別針對新興領域生醫奈米科技及幹細胞與組織工程兩項主題，邀請學界及產業界之專家學者規劃課程並編撰教材。在計畫辦公室及各資源中心主持人努力下完成具特色之教材，這些教材內容涵蓋各項新的技術原理、操作實驗及應用，將提供全國大學院校及國、高中學校作為教學之重要參考。在這關係我國生物技術科技教育發展之教材付梓之時，本人在此感謝各位撰稿的先進賢達辛苦的付出與努力，同時也感謝諸位諮議委員與顧問們的熱心指導以及教育部顧問室同仁的鼎力協助，使得這些專書能順利出版，特以為序。

「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」總計畫主持人

中央研究院細胞與個體生物學研究所 特聘研究員 吳金洌

吳金洌

中華民國九十六年八月三日

教育部顧問室「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

生醫奈米技術

總編輯 葉晨聖

助理編輯 王渝珊、魏伊君、陳怡蓁、辜瑜倩、葉子慈、顏莉慈、
余亭岑

作者 曾厚、張佑民、何佳安、黃世宏、李明威、陳志宏、
方偉峰、孫啟光、王國禎、張立惠、黃暄益、吳信毅、
陳東煌、吳炳慶、徐瑋玲、李國賓、黃志嘉、鄭豐裕、
陳昭瑜、盧陽明、張富雄、廖韋晴、葉晨聖、楊宗翰、
陳敏慧、楊智強、謝達斌、楊鏡堂、蘇家豪、蕭俊龍

(依姓名筆劃為序)

生醫奈米科技教學資源中心主編

教育部顧問室補助出版

中華民國九十六年十一月出版

生醫奈米科技

目錄

第一部份 專論	頁碼
第一章 緒論.....	1
第二章 金奈米的制備與生物醫學上的應用..... (作者：葉晨聖、黃志嘉)	3
第三章 磁性奈米材料之生醫檢測及應用..... (作者：葉晨聖、鄭豐裕)	18
第四章 量子點在生醫之應用..... (作者：王國禎)	60
第五章 一維奈米材料—奈米碳管—在生醫方面的應用..... (作者：李明威)	66
第六章 生醫奈米材料的生物功能化..... (作者：陳東煌、黃世宏)	75
第七章 奈米微脂體技術及生醫應用..... (作者：何佳安、廖韋晴)	97
第八章 奈米藥物傳輸..... (作者：楊智強、曾厚)	119
第九章 奈米材料在組織工程的應用..... (作者：陳敏慧)	131
第十章 奈米材料於分子造影技術之應用..... (作者：蘇家豪、陳志宏)	145
第十一章 微奈米機電技術在生物醫學上的應用..... (作者：盧陽明、吳信毅、蕭俊龍)	164
第十二章 奈微米生醫晶片..... (作者：吳炳慶、謝達斌)	183
第十三章 奈米的健康、危害與保護..... (作者：何佳安、張立惠)	195

第十四章 生醫奈米的科技產業觀.....	224
(作者：吳炳慶、謝達斌)	
第十五章 新穎性螢光標的方法與應用.....	235
(作者：孫啟光、張富雄)	
第十六章 奈米技術在組織工程上之應用.....	246
(作者：曾厚)	

第二部分 實驗	頁碼
實驗一 金奈米顆粒與棒狀材料製作及其在生物檢測的應用.....	261
(作者：何佳安、黃暄益、徐瑋玲)	
實驗二 合金奈米中空球製作與體外光熱治療試驗.....	268
(作者：葉晨聖、黃志嘉)	
實驗三 磁性奈米粒子與DNA的吸附與脫附測試.....	272
(作者：葉晨聖、鄭豐裕)	
實驗四 一維材料—奈米碳管—之製程.....	277
(作者：李明威)	
實驗五 以熱裂解法及官能基轉換法生長水相硒化鎘(CdSe).....	282
(作者：王國禎)	
實驗六 抗體於生物技術的應用.....	284
(作者：張富雄、陳昭瑜)	
實驗七 奈米粒子的體外毒性測試.....	295
(作者：張佑民、謝達斌)	
實驗八 奈微流體晶片之實作.....	298
(作者：李國賓)	
實驗九 微流體生物晶片實作與應用.....	304
(作者：謝達斌、楊鏡堂、楊宗翰、方偉峰)	
作者簡歷.....	323
索引.....	326

第一部分
專論

第一章 緒論

葉晨聖教授 國立成功大學化學系

追求人類生命的延續，造就了生物醫學的發展。從診療、偵測、分析到組織工程等方面的研究，隨著科技的發展，將有無限的前景。生物醫學被列為2008年政府發展的重點科技之一，並致力培育化學、化工和生物醫學跨領域結合的人才和積極推動研究成果，共同為創造出對人類醫學更遠大的貢獻。

奈米為一種尺度，奈米材料的定義是指特徵長度在100 nm以下的材料都稱為奈米材料。^[1]奈米材料依維度可分為零維(奈米粒子)、一維(奈米線、奈米棒)、二維(奈米薄膜)和三維(奈米塊材)四種。奈米粒子的製備方法可分為物理和化學兩種製備方法。物理製備方法有氣相冷凝法、機械球磨法、物理粉碎法、熱分解法和超臨界流體法等；化學製備法則可區分為化學氣相沈積法、溶膠凝膠法、微乳液法、聚合物接枝法、化學沈澱法、水熱合成法、電弧電漿法等。奈米材料的特性為小尺寸、高表面積和懸浮分散性等，具發展在生物醫學上的潛力。

生醫材料可分為植入式和非植入式兩種，早期的材料大致分為、金屬、陶瓷及高分子。金屬材質大多使用在生醫器具的製造，陶瓷材質為植入式補材，而高分子材料由於其易加工生產、本身又具強韌的機械強度及良好之生物相容性等特色，被廣泛應用於拋棄式之醫療器材，及植入式生醫材料等醫用產品。近期因奈米科技的迅速發展，在各個領域都有嶄新的突破，在醫療方面也很受人關注。透過微小化的治療，可以方便偵測材料進入體內正確地到達目的地，改善因尺寸關係而受到限制的醫療技術，因此在臨床上提供了一種新型的治療方式。其中又以腫瘤的標定、治療及追蹤為主要方向。生物醫學上較常用的金屬性奈米材料依性質可分為金屬與金屬氧化物及金屬化合物。奈米金屬以金為例^[2]，因不同的形狀有不同的特性和應用，如棒型奈米金在熱治療上的作用為在近紅外光區藉由光激發產生熱而殺死癌細胞。金屬氧化物中又以磁性奈米粒子(氧化鐵)常被使用於核磁共振影像和細胞標定。^[3]金屬化合物(螢光奈米粒子-量子點)在顯影上具有很卓越的表現。另外有機材料方面奈米碳管^[4]和碳60被富勒烯發現後，奈米碳管被用於生醫方面的研究可藉其表面修飾提高親水性使易於進入細胞，另外，藉著分子與離子在奈米碳管上可以自由遷移，所以亦適用於生物分子感應器。

奈米材料雖然具有很小的體積易進入生物體進而細胞，但是生物相容性和生物毒性也不容忽視，因此在材料的衍生化上，可將奈米粒子與生物分子結合形成複合體，以方便進入細胞並利用生物分子間的

特性達到生物標識、生物偵測、基因治療、藥物傳輸、藥物標的、免疫分析、酵素固定化及生物選擇性分離等方面。例如，接上DNA生物試劑的金奈米粒子，可用於偵測炭疽病毒；接上氧化鐵磁性奈米粒子的藥物、酵素、或其它生物分子，可應用於藥物標的、藥物傳輸、酵素固定化、及生物分離上。同時藥物傳輸上微脂粒在1965年由Bangham和他的學生在英國劍橋發現，原本用來作為膜生物學的研究，在1970年代大量應用在藥物傳輸，因其特性可均勻分散在水溶液中。脂質雙層膜主要由磷脂質分子所構成。^[4]其磷酸端為親水性；脂肪酸鏈為疏水性，同時又據生物相容性和生物降解性，所以微脂粒被應用在藥物傳輸和基因治療的臨床實驗中。奈米生醫材料可作為組織再生及組織工程之發展基礎，生醫材料須具有可達到人體相容性與降解性的純度的做用，同時利用奈米材料的特性做基材發展再生組織。

本書中的章節包含以化學和生醫不同領域的觀點針對奈米在生醫上的發展和應用做詳述的說明，另外在談奈米材料對生醫的貢獻的同時也認真的思考奈米材料對人類反向的作用。奈米科技在生醫上的發展並無太多書籍可供參考，但是致力於此方面研究的先進、同伴很多，因此邀請研究先進，不吝惜的將自己的研究成果和心得與大家分享，編列此書的目的更是希望除共享外更能將此成果提供給對奈米生醫材料有興趣的後進參考。本書因完稿日期倉促，雖已力求嚴謹，但難免有疏漏之處，尚祈諸先進不吝指正，以利日後修正。

參考文獻

1. 馬振基。奈米材料科技原理及應用。全華科技圖書股份有限公司。
2. Kuo, Y. C., C. P. Jen, Y. H. Chen, C. H. Su, S. H. Tsai and C. S. Yeh. 2006. Assembly of Hybrid Oligonucleotide-Modified Au and Alloy Nanoparticles Building Blocks. *J. Nanosci. Nanotech.* 6:95-100.
3. Shieh, D. B., C. H. Su, F. Y. Chang, Y. N. Wu, W. C. Su, J. R. Hwu, J. H. Chen and C. S. Yeh. 2006. Aqueous Nickel-Nitrilotriacetate Modified $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}^{3+}$ Nanoparticles for Protein Purification and Cell Targeting, *Nanotechnology* 17:4174-4182.
4. Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56-58.
5. New, R. R. C. 1990. *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, U.K.

第二章 金奈米的制備與生物醫學上的應用

葉晨聖教授 國立成功大學化學系

黃志嘉 國立成功大學化學系

一、前言

第一瓶金膠體溶液是在19世紀英國科學家法拉第的手中誕生，經過了兩個世紀，這瓶保存在大英博物館的金膠體溶液依然保存鮮豔的葡萄紅顏色，在當時的科學界，並沒有人料想到，這瓶金溶液會對往後的科學界產生革命性的衝擊。金屬奈米顆粒(過去稱為膠體溶液)具有許多獨特的性質，除了未知的物理化學特性外，高的比面積，使得表面具有活潑的催化性質，此外藉由表面改質的處理，修飾過後的奈米顆粒更可適用於不同應用，在傳統的製備上，化學法製造是較常被採用，其優點是可大量生產，但是需要的時間不如雷射剝削的物理法來的快速。在各種金屬奈米材料中，金奈米粒子是最為廣泛研究，其原因不外乎是其特殊的光學性質與好的生物相容性，如可進一步調控金奈米的外觀型態，更可使金奈米材料應用於各種不同領域，如生化感測、光學偵測、藥物投遞、催化反應、疾病治療、電子工程以及模版結晶等…；目前使用金奈米粒子於生物醫學上的研究已逐步開花結果，計有：(一)基因辨識、(二)熱治療、(三)生物檢測、(四)活體影像觀測等相關領域最為熱門。

二、金奈米粒子之基本性質與光學特性

(一)基本性質：

金奈米粒子具有許多獨特的物理化學特性：1.體積效應、2.量子侷限效應(Quantum size effect)與3.表面積效應，以下我們將做簡單的描述：

1. 體積效應：

當固體金奈米化後，其粒徑大小與光波波長等物理特徵尺寸相當或更小時，將導致奈米粒子於聲、光、電、磁、熱、力學等特性，呈現奈米小體積效應，例如：奈米微粒的熔點可遠低於塊狀金屬，例如2nm的金奈米粒子熔點為600K，隨粒徑增加，熔點迅速上升，塊狀金熔點為1337K；由於奈米粒子大小介於原子與巨觀材料之間，其電子能階密度會隨尺寸大小之不同而改變。

2. 量子侷限效應：

當粒子尺寸於巨觀相時，由於巨觀物體包含無限個原子，能階能量相近的能階會漸漸合併而形成一連續的態。而粒子尺寸逐漸下降至原子級能階時，其軌域能隙為最大。對於介於巨觀相與原子級的奈米粒子，其所包含的原子數有限，其軌域能階仍處於不連續態；故金屬粒子在奈米級時會具有半導體的性質，當金奈米粒子大小遠小於光波波長時，金屬表面的自由電子會隨電磁場振盪而運動以反抗外在電磁場的穿透，這是一種稱為「表面電漿子共振」的物理現象，在特定的頻率下會引發整體金屬奈米粒子內自由電子的集體運動，造成極強的遠場散射與極強的近場電場放大。

3. 表面積效應：

若粒子尺寸減少至奈米等級時，表面原子比率驟增，粒子中原子比率少而表面原子比率大，使得微小粒子的物性異於巨相，因此物質內部的原子或分子，受到來自各方向相等的作用，保持平衡狀態。但物質表面的原子或分子，由於只受單方面的淨作用力，因而比內部的原子或分子具有較高的能量，此過多的能量，稱為表面能量。粒子為降低表面能量，其外形可能改變；也由於表面能量高，表面原子極不穩定，很容易與其他原子結合，使其穩定。此種表面原子的活性可能是引起奈米粒子表面構型改變及熔點下降的原因。

(二)光學特性：

金奈米粒子另外一項吸引人的是具有特殊的光學活性，其中最為人所熟知的是表面電漿共振吸收，這種在奈米級才產生的特性，與巨觀相的金截然不同，巨相的金呈現亮黃色澤，但當金的顆粒大小縮小至奈米尺度時(大約小於可見光波長)，會產生強烈的吸收光特性，這是因為金的外層電子易受電磁輻射的激發而產生週期性的震盪^[1]，可分為尺寸效應與形狀效應：

1. 尺寸效應：

通常大小為3nm的金奈米粒子，吸收波長大約座落在509nm，當尺寸增加至13nm，吸收波長會位移至520nm，見圖一，隨著金奈米的尺寸增至35nm，此時的金奈米的吸收展現有較尺寸13nm時有些微的紅位移(紅位移：波長往較長波長移動稱之)，吸收峰大約落在530nm，簡單的說，奈米金的吸收光譜圖是受大小所支配。

2. 形狀效應：

吸收光譜除了受尺寸大小影響外，也會受形狀的不同而改變，見

圖二，圖二上方的照片是藉由穿透式電子顯微鏡觀察不同形狀的奈米金材料，如球型、棒型與中空球型；球型的奈米金因為形狀對稱，所以展現單一的光吸收峰(520nm)，而棒型的奈米金(長36nm和寬8nm)則因為受光激發時，產生兩個不對稱的長短軸極化吸收，所以除了在520nm有吸收外，在長波長的位置約760nm的位置波也會有吸收，依據Mostafa A. El-Sayed教授的研究^[2]，金奈米柱在長波長的吸收峰會隨著棒形的長度/寬度比率增加而紅位移，吸收強度也漸趨增強。為了得到各式各樣的奈米金材料，常常在反應中添加可控制形狀的導引試劑，如陽離子型界面活性劑(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)或是中性高分子(Poly (vinyl pyrrolidone), PVP)，在適當濃度下，可合成出六角板、星狀等非等向性成長的金奈米粒子，這些已經成功被合成出來的奈米金材料，展現多樣性的光學特性^[3,4]，更達到對吸收波長有精準的控制；近幾年奈米材料在形狀上的控制，除了傳統的方法外，利用特殊的合成途徑，可開發出更多元的奈米金粒子，例如利用金離子易還原的性質($\text{AuCl}_4^-/\text{Au}$ (0.99 V vs SHE))，經由電化學反應中的氧化還原觀點，合成出具有中空球狀的金銀奈米合金空球(hollow)^[5]，我們可由圖二中的電子顯微鏡照片觀察出每顆球均有深黑色的線圈狀外緣，證明高電子密度的殼結構，經由計算中空球的直徑約52nm；這種中空球材料含有金銀雙金屬的成分，可藉由調控氯金酸溶液的體積而得到不同的金銀元素組的奈米空球，根據實驗結果顯示，不同金銀成份比的奈米空球也會影響到奈米粒子的吸收波長，在金銀比例為7:3的金銀奈米空球(圖二)的吸收光譜圖中，我們發現空球型的奈米粒子具有強且單一吸收峰波長約在850nm，此性質異於棒型奈米金的兩個吸收峰，這種在紅外光區有強吸收性質的空球材料，已廣泛應用於生物標定與熱治療研究。

直至目前為止，科學家們已經積極的研究不同光學特性的奈米金粒子應用於生物醫學，具有近紅外光區吸收的奈米金粒子更是首選，主因是避免皮膚組織的吸收干擾，以達到深層組織偵測與治療，近年來熱門的研究是，利用棒形奈米金與金銀奈米空球應用於癌細胞的光熱治療法。

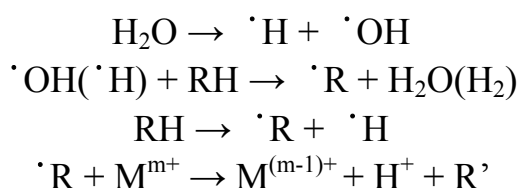
三、奈米金粒子之合成

自從19世紀法拉第首次合成奈米金以來，便有許多科學家陸續合成不同尺度的奈米金粒子、雖然奈米金粒子的製造方法很多種，大致上可分為兩種合成方式，一種是由小到大(bottom-up)，而另一種為由大而小(top-down)的方式(如圖三)，大而小的方法最初是將大塊材料利用機械力將其細化至所要求之粒徑，但缺點為不易高效率獲得1微米

(μm)以下的粒子；所以科學家轉而嘗試新的製造方法，以期得到不同粒徑或性質的金奈米粒子；我們將之分為化學方法與物理方法兩大類，以下將簡介現在常用的幾種製備方式：

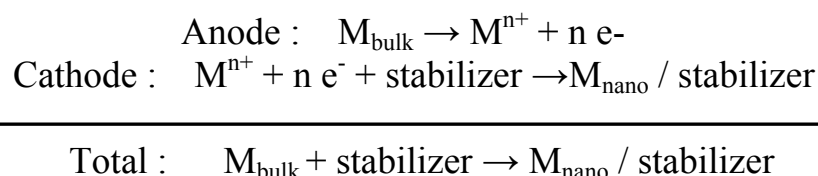
(一)化學方法(Chemical Method)：

化學方法是一種以小到大的合成方式，主要控制化學反應生成膠體粒子過程中的析出條件，即為將各種具有保護基或不具有保護基的溶液中之各種氧化態的金屬離子，藉由還原劑或電化學系統，在自由空間或侷限空間(如：微胞，樹枝狀聚合物等)中還原成粒子，往往會額外添加界面活性劑或其他保護劑，目的是用以防止凝聚及控制成長，常見的有：1.氧化還原法、2.光化學法(Photochemical Method)、3.聲波化學法(Ultrasonic Irradiation Method)和4.電化學法(Electrochemical Method)。以上四種方式均是採用化學還原的方式將金離子還原成金原子，在經由原子慢慢的聚集凝結成金奈米粒子，我們可簡述合成步驟，首先添加適當的分散劑(surfactant)於預先準備好的離子態之金鹽溶液(常見的試劑是氯金酸)，攪拌均勻後，再施以一特定的還原方式，將原本離子態的金離子還原成0價的奈米金，例如氧化還原法(1)中添加具有還原能力的化學試劑。(2)光化學法和(3)聲波化學法則是經由外加力場的方式提供還原性電子來源，光化學法是藉由高能光源(常為紫外光或 ^{60}Co 的 γ 射線)，反應中，光所提供的能量會使水產生水合電子(e_{aq}^-)或有機溶劑產生有機自由基(radical)等還原性物質，而將溶液中的金屬鹽類還原，進而聚集為膠體粒子，同時在界面活性劑的保護下，防止繼續聚集而沈澱，而聲波化學法是以頻率極高(1~2 KHz)的超音波來產生高頻的震動，這種高頻的震動在溶有金屬鹽類與其他反應試劑的溶液中，形成許多微小氣泡的渦流，且由於氣泡震動極為快速，由震波所產生之氣穴或氣穴與溶液間介面所生成之 $\cdot\text{OH}$ 或 $\cdot\text{H}$ ，還原溶液或介面中之碳鍊分子，使其產生 $\cdot\text{R}$ 自由基；或由介面間的RH受震盪而形成 $\cdot\text{R}$ 自由基，與周圍環境進行少量的能量交換，故受到壓縮的小氣泡具極大的熱能，所以氣泡因高能震動而爆炸，因而誘發還原反應生成金屬膠體粒子^[6]，其可能之還原機構如下：



採用電化學方法(方法4)合成奈米粒子則是一種採用直流電源方提供

還原電子來源的方式。1994年，M. T. Reets與Helbig, W.採用簡單的二電極電化學電解方式來製備奈米粒子^[7]，經由溶液中的界面活性劑(Surfacants)直接電解而在溶液中得所欲得之金屬奈米粒子，而其粒徑大小可以簡單地藉由控制電解裝置的電流來調整，此方法的特點是製備過程容易、有較佳的經濟效益、產率高以及副產物少。而國內C. R. C. Wang，亦採用電化學的方式，藉由控制微胞形狀成功的製造出形狀均勻金的奈米棒(Nanorod)。^[8] 其簡易的化學反應見於下：



(二) 物理方法(Physical Method)：

1. 氣體蒸汽法(Gas Evaporation Method)和2. 雷射剝削法(Laser-Ablation Technique)是兩種極為常見合成金奈米的物理法，氣體蒸氣法主要是利用熱(Thermal)或將物質汽化成氣體，並利用氣體的分散性質，而急速冷凍再解凍的過程，而得到分散在基板的金屬粒子；或直接將分散良好的氣相金屬原子通入溶劑中，金屬原子因而迅速冷卻聚集成固體，使其成核長晶並控制其大小在奈米尺度內，因此得到奈米粒子^[9]，使用這種方法研究的實驗裝置有些不同，將之歸納成三種裝置，分別為：

(1) 基質分離法(Matrix Isolation Method)

(2) 氣體-冷卻收集法(Gas Flow-Cold Trap Method)

(3) 氣體-溶液收集法(Gas Flow-Solution Trap Method)

這種方法雖然可得到無其他干擾物的膠體溶液，但裝置複雜、昂貴，所以並不普遍。使用液相雷射剝削製備金奈米粒子屬於一種快速的合成方式，其基本觀念的來源，起於Smally以雷射汽化金屬與非金屬，並以分子束冷卻，而得到在氣相中穩定的原子團簇(Cluster)。^[10] 在Smally之後，雷射剝削方法普遍用在真空中，且因脈衝式雷射已應用在氣相中合成出金屬或非金屬的粒子，如：結晶網狀半導體(Crystalline semiconductor nanowires)和單層的奈米管狀物(Single shell nanotubes)等，所以雷射剝削法引起科學界的重視與廣泛的研究。然而雷射剝削法方法應用於溶液中，乃起於1993年Henglein使用694nm的紅寶石雷射(Ruby laser)，聚焦後打在浸於純溶劑中的金屬或非金屬薄膜上，成功得到金、鎳及碳-60奈米粒子分散於溶劑中。^[11] 經過幾年的研究努力，以雷射剝削的方式擊發金屬鈮材，合成金屬奈米粒子

的技術已經相當成熟，目前正朝向多金屬合金的製程開發，如金銀(AuAg)、金鈮(AuPt)、銀鈮(AgPt)合金奈米粒子的膠體溶液，之後金銀鈮(AuAgPt)三合金奈米粒子亦成功的被製造出來，並在催化反應方面有驚人的催化效果。^[12,13]

四、金奈米粒子應用於生物檢測

金奈米粒子結合蛋白質分子或是基因可應用用於免疫分析，金奈米有明顯的呈色的特性(分散的金奈米為紅色，聚集的金奈米為藍紫色)，可達到快速的分析測試，日常生活中的驗孕片即是其中一項商品化成果，藉由尿液的檢測，即可立即用肉眼觀察顏色變化，便知道受孕與否是相當便捷，因此如何設計快速呈色的分析方式就考驗研究者的智慧了。由表面電漿共振的原理我們可以知道^[11]，分散性佳的金奈米粒子具有鮮豔的紅色，但是如果將原本分散在溶液中的金奈米粒子產生聚集，聚集的金奈米粒子彼此間會產生強烈的耦合，在肉眼辨識上，我們可觀測到溶液呈現藍紫色，若是聚集的程度相當嚴重，則會看到紫黑色的沉澱物析出，溶液上層轉為澄清，由上述奈米金顏色可轉換的現象，許多科學家利用金奈米具有立即色變的性質，發展出許多不同的生物檢測(例如蛋白質與去氧核糖核酸辨識^[14,15])平台。

儘管我們可由一條鹼基序列為AATTCGC的DNA分子，推測出其互補序列就是TTAAGCG，但是在實際檢測上，如何在最短時間快速的進行比對分析，則是一項值得我們深思的問題。美國西北大學化學系莫金(Chad Mirkin)教授所領導的研究團隊，利用金奈米粒子顏色上的變化，發展出利用肉眼即可辨識的DNA感測方式^[14]，見圖四，Mirkin研究群利用化學修飾的方法，將金奈米分別接在兩種可互補的DNA分子上，在未互補時，個別的DNA-金奈米粒子溶液呈現鮮豔的紅色，當兩個溶液混合後，顏色瞬間變為藍色，此經由DNA雙股螺旋互補使金奈米聚集的技術，已在應用DNA分子的檢測上發展成熟，直至目前研究的努力，DNA分子的辨識法，已經可由熱去互補DNA-金奈米溶液的溫度統計數據中，預測無法配對的鹼基數目；探究其原理，不難理解^[14]：

當DNA序列完全互補吻合，其間氫鍵吸引的力量最強；相對的，即使只有一個鹼基無法配對(基因缺陷)，就會使結合力減弱，在此種狀況下可以藉由增高溫度或是改變其所處溶液中的離子濃度，使錯誤配對的DNA序列脫離，此時脫離的DNA-金奈米粒子則會回復分散的紅色溶液，在含30個鹼基對的DNA片段中，即使只有一個鹼基與金奈米粒子上的DNA不互補，也可以被這個方法辨識出。

金奈米的於基因的檢測技術搭配微晶片系統將可大大提升分析

的效率^[16]，簡而言之，先利用DNA合成儀製造一些特定的單股DNA序列，再藉由其互補配對的特性就能「抓住」欲檢測樣品中可與其專一配對的DNA序列，利用金奈米的光學特性，配合金奈米易修飾固定於基材的技術，發展出快速DNA序列感應器與基因檢測晶片，其敏感度與選擇性均有重大突破。

五、表面增強拉曼效應

表面增強拉曼光譜(surface-enhanced Raman scattering; SERS)可使訊號增強至 10^6 倍，意指低的分析物濃度即可獲得高品質的光譜訊號，而其效應是由多重效應組合而成的機制，可簡單分為兩種機制，一為電磁(electromagnetic; EM)效應、另一為化學效應(chemical; CHEM)。^[17]所謂電磁效應，是指金屬表面的粗糙島區(island)產生電磁共振及針尖效應。而化學模型則是意謂著吸附分子與金屬基質間之化學作用，此一作用是由電荷轉移或化學吸附而來的，由化學吸附鍵結而產生新的電荷轉移能階，如此即會由於共振現象而增大分子於可見光區的極化率，而發生SERS之效用。不同的金屬表面粗糙程度，會產生不同表面結構與化學環境的金屬基材，因此金屬會與沉積物質之間產生不同化學效應的SERS。目前金與銀奈米粒子均是常用來進行拉曼光譜實作的研究。在樣品的準備中，金奈米溶液可預先沉積在待測區位置上，基板的選擇上，應避免使用具有螢光性的基板材料，隨後將欲分析的物質滴在金奈米上，一般而言分析物的濃度可低於 10^{-6} M即可做拉曼分析，為了使組織、DNA與蛋白質分子於偵測時受機發光源的損傷降至最低，理想的使用於生物樣品分析的雷射擊發波長為近紅外光區光源，以低於 μ M濃度的亞甲基藍分子作試驗，將亞甲基藍分子沉積在金奈米粒子上(待測區)，由拉曼光譜的數據指出拉曼震動的訊號放大為純分子訊號的數千至數萬倍，值得注意的是，在無奈米金沉積的基板上，是無法測得分子的訊號。

2004年Murphy等研究團隊設計八種不同形狀的金奈米粒子，並對表面增強拉曼效應進行研究^[18]，其結果發現，形狀具有尖端的金奈米顆粒，有較強的增幅效應，使用棒型奈米粒子搭配近紅外光雷射也可獲得高品質的偵測訊號。拉曼應用於活體細胞體內與體外的實例相當多，Janina Knipp教授在2006利用30-50nm的金奈米做活體細胞的拉曼光譜偵測，配合細胞切片，我們可觀測到金奈米隨時間在細胞內的流動行為，經由光譜標定，初步分析金奈米在細胞可能的座落位置^[19]；配合吸收光譜與雷利散色偵測，金奈米棒也可用來偵測人類口腔癌細胞。^[20]另外利用金奈米粒子於拉曼光譜，也已成功開發出不同的菌種辨識技術。^[21]

六、雷利散色應用於生物檢測與影像

Resonance Light Scattering(RLS)具有高選擇性及高靈敏度(比螢光的靈敏度高出數個數量級^[22]),若將其應用在生物晶片或其他生醫方面的偵測上,不僅可取代固有同位素對人體健康造成不良影響的缺點,還可提供比螢光更高的靈敏度,是一項具發展潛力的偵測方法。

物質皆會散射光線,但當粒子小到微米或奈米尺寸時,則會有特殊的RLS訊號產生。現有的RLS研究約可分為兩個方面,一個是針對有機物,一個則是針對金屬,有機物要能達到較好的RLS效果,其分子大小至少要達微米,而金屬最有效的散射光線的粒徑分佈則大約在40~120 nm之間,因此金奈米粒子是相當適合應用於RLS影像學的研究。以奈米粒子為例,當白光照射到奈米粒子時,依粒子的大小、形狀、成分之不同,會和特定波長的光線產生共振,進而對散射光有增強的效果,如圖五所示。由於RLS只是藉由與入射光共振而發光,因此不像螢光分子的螢光強度會隨時間而減弱,只要奈米粒子夠穩定,在照射實驗後,並不會產生不穩定聚集沈澱,可再重複使用,且此顯影影像具有高度的再現性。早期醫學方面的in-situ hybridization是用同位素作為標定物,但考慮其對健康的影響,故近年來多用螢光分子取代。現在Genicon Sciences公司^[23]將RLS的技術應用於此,提供了比螢光更低的偵測極限。歷年來已有許多在金奈米粒子上修飾各種生物分子的研究,已知金奈米可以和DNA^[24]、蛋白質^[25]、抗體^[26]等形成穩定的鍵結。如圖五所示,在RLS奈米粒子上修飾特定的生物分子(eg. 抗體),使其與待測的組織或樣品混合,若樣品中有特定親和力的生物分子(eg. 抗原)存在,則RLS粒子會鍵結於該處,而沒有作用力的部分則在清洗時被去除,接著經由照光偵測,呈現出RLS亮點的區域即為該生物分子存在之處。RLS粒子除了本身會有特殊的訊號外,兩個RLS粒子鍵結後,相互共振的結果也會使散射出的光線發生改變,藉此進行偵測。例如,40nm的金奈米粒子會散射綠光,而80nm的金奈米粒子則散射黃光。^[22]當兩個40nm的金粒子靠近,相互共振的結果(可視為一個80nm的金粒子),其散射光則會由原本的綠光變成黃光,如圖三所示。因此RLS的方法不但可由偵測訊號的有無,亦可由偵測訊號顏色波長的改變來獲得所要的訊號。在實驗的設計上提供了多重的選擇性。

總而言之,RLS不但靈敏度比螢光高,且可重複使用,具有高度的再現性,未來更可發展到蛋白質體學、基因學、免疫學、臨床診斷等方面,為奈米生醫的研究開拓了一個嶄新的未來。

七、光熱治療法

歐美許多國家，在癌細胞的治療過程中，為了使身體的器官組織傷害達到最小，選擇使用光敏劑來殺癌細胞，這類的方式可避免外科手術所帶來的傷痛與創傷。光治療的原理是藉由可將光轉為熱的物質作為媒介，在光熱轉換的過程中殺死鄰近的癌細胞，常見的光敏劑材料來源大多是有機分子，然而當1-30天的治療期間，有機光敏劑在長時間曝露光照之下，會因過多的熱能產生，使得癌細胞周圍的身體組織也會受到影響，事實上，為了減少正常器官在熱治療時可能受傷害的風險，具有高效能的光熱轉換的奈米材料，將可大幅度縮短治療時間。為了改善光熱治療時，正常細胞可能遭受損害的缺點，在近幾年的研究中，可對癌細胞專一性標定的金奈米粒子，是一個相當好的光熱治療材料，金奈米粒子具可調性的光學性質與強的吸光係數，還可針對特定的癌細胞有專一性的目標攻擊，以目前的認知，具有近紅外光吸收的金奈米粒子較可見光區吸收的來較有潛力，除此之外，在金奈米顆粒的表面修飾上對癌細胞有專一性接收器的技術也相當成熟，因此在金奈米粒子導入體內後，可高效率的集中在癌細胞上，進行光熱治療時，只需及短的時間即可將癌細胞殺死，減少療程中對正常細胞的傷害。

常用來做為光治療的光源處理範圍是使用紅外光波長的雷射，原因是為了要避免皮膚或是組織對可見光區的光源吸收，而使得吸收效率變低，減少治療的效果，所以球型的金奈米的吸收位置約在520nm，並不適用於光熱治療，目前有兩種方式可獲得具有近紅外光的金奈米粒子，使金奈米的吸收位置產生紅位移，常見方式有：

(一)控制金奈米的形狀(如圖二)。

(二)製備不同介電質的金奈米複合材料，如二氧化矽-金核殼材料。

我們在前面介紹過金奈米的吸收波長會隨著形狀的不同，而會有非對稱性的表面電漿共振吸收，非對稱性的形狀差異，常伴隨著紅位移的產生，此外，除了形狀的調控外，金奈米的吸收波長也會強烈的受到介質的干擾，因此複合材料的製備也是一類，新的金奈米複合材料也有報導指出可應用於光熱治療上，常見的是二氧化矽-金核殼材料和二氧化鈦-金核殼材料，經由實驗證實，此策略確實已在體內與體外的生物實驗上，達到相當好的熱治療成效。^[27,28]

八、電腦斷層掃描影像照影

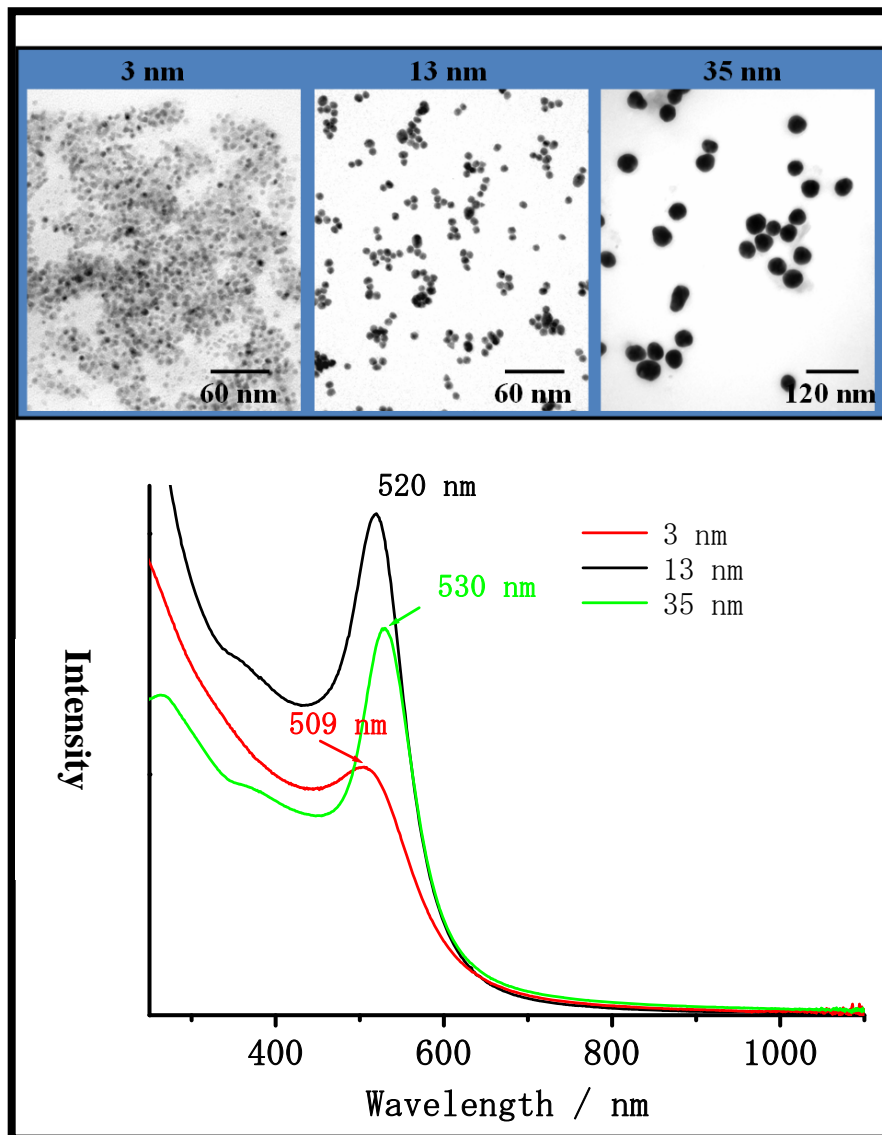
電腦斷層掃描影像照影(computed tomography scan)，CT，或稱X射線斷層成像，是一種影像診斷學，這一技術曾被稱為電腦軸切面斷層影像(Computed Axial Tomography)。X射線斷層成像是一種利用數

碼幾何處理後重建的三維放射線醫學影像。該技術主要通過單一軸面的X射線旋轉照射人體，由於不同的生物組織對X射線的吸收力(或稱阻射率Radiodensity)不同，可以用電腦的三維技術重建出斷層面影像，經由窗值、窗位處理，可以得到相對的灰階影像，如果將影像用電腦軟件堆疊，即可形成立體影像，能分辨組織間不同密度的差異。使用金奈米粒子在CT顯影上，除了可提供高效率的顯影品質外，還有另外一項優點是可同步進行X-ray吸收法治療癌細胞。^[29]

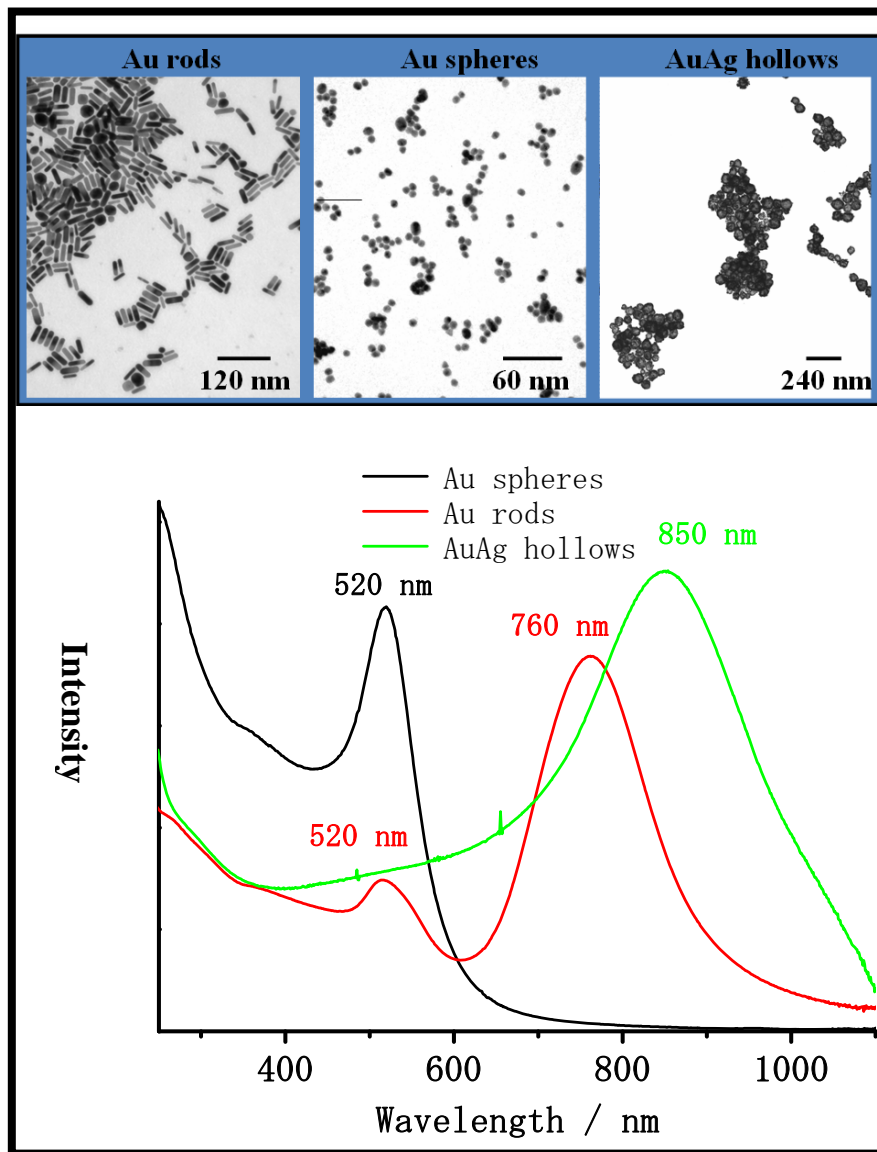
金(Au)、碘(I)、鋇(Ba)和銻(Bi)等高原子序的元素，已被報導可用來做CT的顯影劑^[29,30,31]，其中碘型的化合物較為常見，是醫療商品化的產品。就化學觀點而論，上述四種元素均有對X-ray有很好的吸收係數，金的吸收值($5.16\text{cm}^2/\text{g}$)高於碘的吸收值($1.94\text{cm}^2/\text{g}$)，因此我們可知道金是相當有潛力可應用於電腦斷層掃描的新興材料。隨著材料微小化，奈米級的金可導入生物體，而不會產生明顯的免疫排次，世界上許多醫療團隊已經成功展示金奈米粒子於CT顯影的研究^[29,31]，報導更指出，使用金奈米於CT顯影將可大大提升金奈米在生物醫學上的應用，如可額外配合金奈米表面易衍生化的特性，將可增強在某個欲觀察器官或是血管的空間解析度成像，在這些研究中，最為重要的是如何利用金奈米粒子作癌細胞的標定劑，以期達到及早發現及早治療的遠景，在實際的策略上，利用抗體-抗源的反應，將具有專一性的標定的金奈米CT顯影劑導入動物體，經過一段時間後，讓金奈米自發性的辨識專屬的癌細胞，而能高效率的鍵結在癌細胞上，這使得使用金奈米作為CT顯影劑，將使癌細胞的位置標定更為可靠。在臨床診斷上，為了避免金奈米經由注射後在體內聚集，而被快速代洩的缺點(經由尿液代洩出體外)，額外修飾上PEG高分子是必須性，經由研究指出，表面具有有PEG高分子的物質，將可延長外來物在體內循環的半生期^[32]，最近Sangyong Jon研究團隊發表了一篇利用金奈米作為CT顯影劑的報導^[31]，其內容指出包裹PEG分子的30nm金奈米具有高的生物相容性(實驗最高值為 $1\text{mg}/\text{mL}$)，包裹PEG後的金奈米粒子在體循環的半生期更長達4小時，除了增長觀測時間的優點外，在實際的動物體實驗中，也明顯觀察到心室與心血管的高對比影像，量化其顯影效果的成效，包裹PEG分子的金奈米粒子約比傳統顯影試劑(Ultravist，一種含碘的化合物)高了5.7倍的X-ray吸收係數，也比Oded Babin發表的硫化銻(Bi_2S_3)顯影材料好^[33](金奈米高於兩倍硫化銻的吸收係數)，其研究團隊另外一重大的發現是，使用金奈米粒子在診斷患有肝癌疾病的老鼠動物實驗中，CT影像在患病的器官有較強的對比顯影影像(對比高於正常的器官)，因此我們可知，金奈米粒子是相當值得發展的CT顯影材料。

九、結論

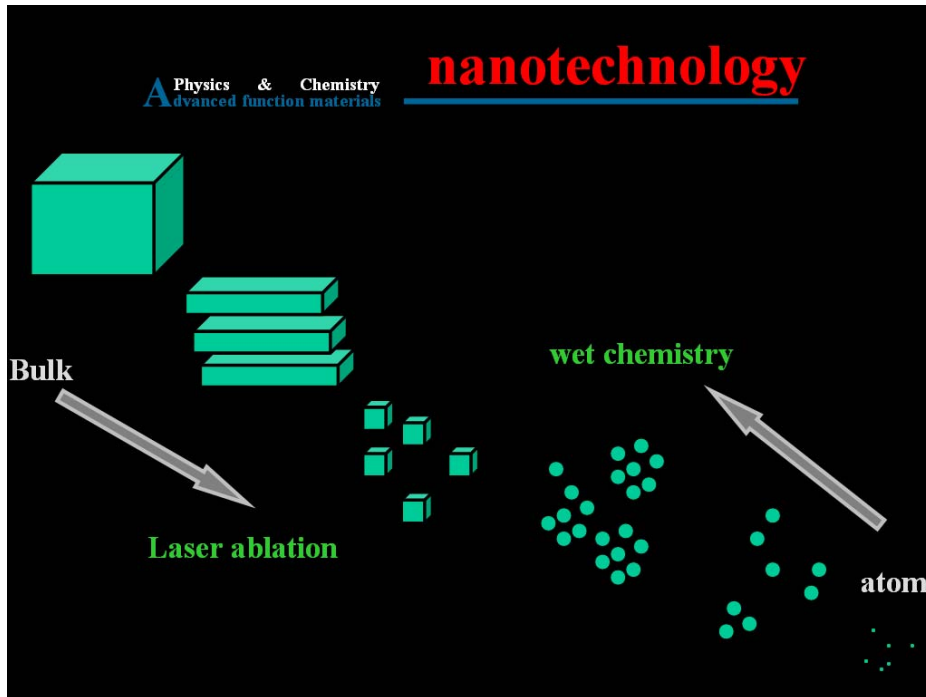
金奈米的多功能性，以成功應用於生物檢測、檢體分析、熱治療和CT影像上，為了使金奈米粒子能更廣泛的應用於生醫領域，除了材料的基本性質需要更深入的了解外，仍需具有：(一)尺寸與形狀的可調性、(二)高分散性、(三)穩定性、(四)大量合成的技術，為了適應不同的分析或是治療環境系統，表面改質(modification)的修飾技術將可使奈米金可作衍生化處理，在未來，多功能型複合的金奈米材料將隨之開發^[27,28]，如與磁性奈米粒子結合可具有磁導引的性質，可更精準的標定患病區域，再利用光或是電磁輻射方式進行熱治療；與螢光型奈米粒子結合，可使原本具有CT顯影的與金奈米具備雙顯影的功能，未來我們預期多功能性的金奈米子將大量的應用於生物檢測與臨床治療領域上。



圖一 不同尺寸(3nm、13nm和35nm)的金奈米粒子之穿透式電子顯微鏡圖(上)和吸收光譜圖(下)

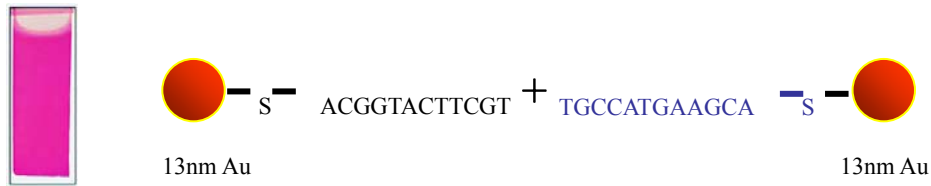


圖二 球型、棒型、中空型奈米金材料之穿透式電子顯微鏡圖(上) 和吸收光譜圖(下)

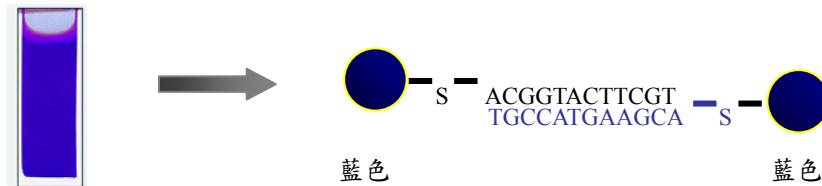


圖三 由小到大(bottom-up)和由大而小(top-down)的製備奈米材料方式示意圖

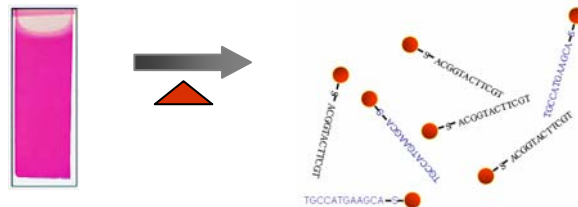
混合前



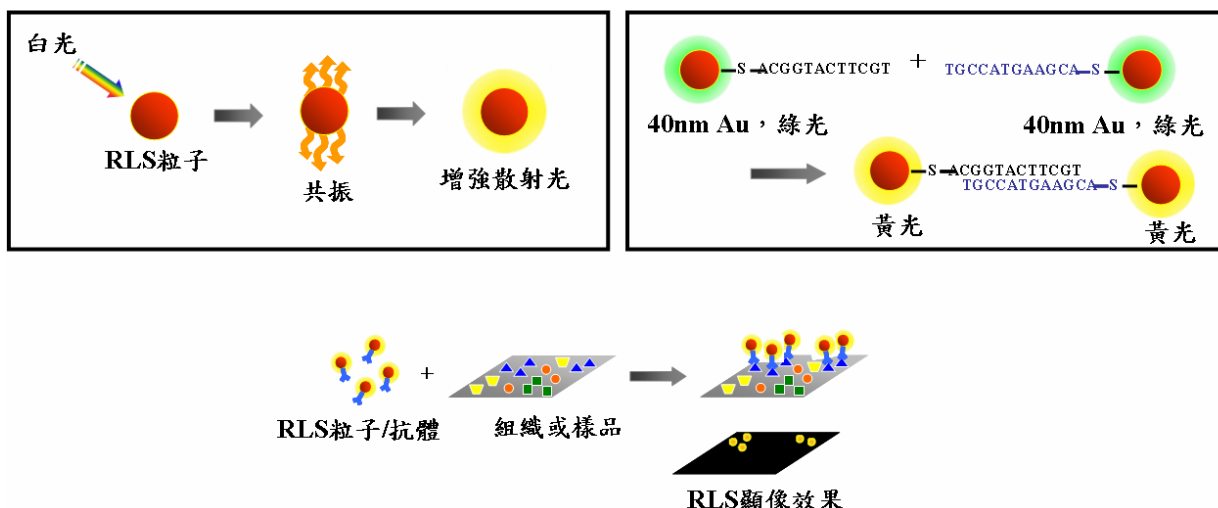
混合



加熱



圖四 金奈米溶液應用於基因辨識之示意圖。接上DNA分子的奈米金溶液為鮮紅色，當混合兩個可互補的DNA-金奈米溶液時，金奈米會產生聚集使得溶液呈現藍色，經由加熱後，溶液可回復成原本紅色



圖五 奈米粒子經白光照射產生RLS共振，對散射光有增強的效果(左上)，奈米粒子藉由PLS顏色的改變來偵測DNA分子互補所獲得的訊息(右上)，RLS奈米粒子上修飾特定的抗體，與特定親和力的抗原結合經由照光偵測，呈現出亮點的區域即為特定抗體－抗原存在之處

十、主要參考文獻

- 1.Kelly, K. L., E. Coronado, L. L. Zhao and G. C. Schata. 2003. J. Phys. Chem. B 107:668.
- 2.Link, S., M. B. Mohamed and M. A. El-Sayed. 1999. J. Phys. Chem. B 103:3073.
- 3.Ah, C. S., Y. J. Yun, H. J. Park, W. J. Kim, D. H. Ha and W. S. Yum. 2005. Chem. Mater. 17:5558.
- 4.Jana, N. R. 2005. Small. 8-9:875.
- 5.Sun, Y. and Y. Xia. 2002. Science 298:2176.
- 6.Su, C. H., P. L. Wu and C. S. Yeh. 2003. J. Phys. Chem. B 107: 14240-14243.
- 7.Reetz, M. T. and W. Helbig. 1994. J. Am. Chem. Soc. 106:2473.
- 8.Yu, Y. Y., S. S. Chang, C. L. Lee and C. R. Wang. 1994. C. J. Phys. Chem. B 101:6661.
- 9.張立德、牟季美。奈米材料和奈米結構。滄海書局。
- 10.Kroto, H. W., J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smally, 1985. Nature 318:162.
- 11.Guo, T., P. Nikolaev, A. Thress, D. Colbert and T. R. Smalley. 1995. E. Chem. Phys. Lett. 243:49.
- 12.Tsai, S. H., Y. H. Liu, P. L. Wu and C. S. Yeh, 2003. J. Mater. Chem.

- 13:978.
- 13.Chen, Y. H. and C. S. Yeh. 2001. Chem. Comm. 371.
 - 14.Mirkin, C. A. 2000. Inorg. Chem. 39:2258.
 - 15.Nam, J. M., S. J.Park and C. A. Mirkin, 2002. J. Am. Chem. Soc. 124:3820.
 - 16.Nam, J. M., C. S. Thaxton and C. A. Mirkin. 2003. Science 301:1884.
 - 17.Kneipp, K., H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari and M. S. Feld. 1999. Chem. Rev. 99:2957.
 - 18.Orendorff, C. J., A. Gole, T. K. Sau and C. J. Murphy. 2005. Anal. Chem. 77:3261.
 - 19.Huang, X., I. H. El-Sayed, W. Qian and M. A. El-Sayed. 2007. Nano Lett. 7:1591.
 - 20.Kneipp, J., H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown and K. Kneipp. 2006. Nano Lett. 6:2225.
 - 21.Jarvis, R. M. and R. Goodacre. 2004. Anal. Chem. 76:40.
 - 22.Bao, P., A. G. Frutos, C. Greef, J. Lahiri, U. Muller, T. C. Peterson, L. Warden and X. Xie. 2002. Anal. Chem. 74:1792.
 - 23.<http://www.geniconscience.com/>
 - 24.MacBeath, g. and S. L. Schreiber. 2000. Science 289:1760.
 - 25.Nath, N. and A. Chilkoti. 2002. Anal. Chem. 74:504.
 - 26.Wang, S., N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen and J. Studer. 2002. Nano Lett. 2:817.
 - 27.Chen, J., D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsn, Z. Y. Li, H. Zhang, Y. Xia and X. Li. 2007. Nano Lett. 7:1318.
 - 28.Kim, J., S. Park, J. E. Lee, S. M. Jin, J. H. Lee, I. S. Lee, I. Yang, J. S. Kim, S. K. Kim, M. H. Cho and T. Hyeon. 2006. Angew. Chem. Int. Ed. 45:7754.
 - 29.Kattumuri, V., K. Katti, S. Bhaskaran, J. B. Boote, S. W. Casteel, G. M.Fent, D. J. Robertson, M. Chandrasekhar, R. Kannan and K. V. Katti. 2007. Small 3:333.
 - 30.Krause, W. 1999 Adv. Drug Delvery Rev. 37:159.
 - 31.Kim, D., S. Park, J. H. Lee, Y. Y. Jeong and S. Jon. 2007 J. Am. Chem. Soc. 129:7661.
 - 32.Papahadjopoulos, D., T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann and F. J. Martin. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 11460.
 - 33.Rabin, O., J. M. Perez, J. Grimm, G. Wojtkiewicz and R. Weissleder. 2006. Nat. Mater. 5:118.

第三章 磁性奈米材料之生醫檢測及應用

葉晨聖教授 國立成功大學化學系

鄭豐裕 國立成功大學化學系

一、前言

奈米科學在近幾十年來發展的非常迅速，除了學術領域上的研究之外，在日常生活當中亦可見到奈米材料的應用，例如銀奈米材料的抗菌功能、奈米塗料和二氧化鈦(TiO_2)奈米材料的光觸媒殺菌效果。由於奈米材料的尺寸效應和量子效應，其獨特性質受到各個領域所重視，例如奈米粒子的光學性質、表面活性和催化效應。在所有領域當中，以生物醫學結合奈米科學進行跨領域的合作研究是目前最受到重視的課題，同時也是與奈米材料關係最密切的一個領域，其利用奈米材料的各種特性，改善了過去的醫療技術並提升醫療效果，此外也發展新型的檢測、診斷及醫療技術，尤其是在腫瘤偵測方面有很大的進步，可以在更早期偵測到腫瘤，對於腫瘤預防提供莫大的助益。在影像診斷方面，藉由奈米材料的輔助可以提供更高的解析度、更精確的定位，讓醫師可以更準確的了解病情程度，以提供醫療方式，例如磁共振造影(MRI, magnetic resonance imaging)是目前擁有最強功能性的影像診斷系統，除了對各個組織都能提供良好的影像對比，更能提供三維空間影像，針對病徵能迅速準確的定位並治療。

磁性奈米材料在過去的各個領域中已發展相當的時間，例如工業上的應有馬達中密封用的磁性流體、銀行支票上的磁性墨水和磁性儲存材料。在不同的應用方面，磁性材料被要求的性質也都有所差異，比如在資料儲存方面，磁性粒子需要擁有良好的穩定性，以及可調控式的磁區狀態以進行位元變換的訊息，且這些性質亦不能隨著溫度變化而有所改變。這些磁性材料主要都是微米級的大小，因此在早期能應用在生物醫學領域的磁性材料非常有限，最大的原因就是在於體積太大，要進行體內研究是相當的困難。磁性奈米粒子的種類非常的多，能應用在生物醫學領域的種類則相當的有限，而被應用最多的磁性奈米材料就是氧化鐵奈米材料，因為氧化鐵對生物體的毒性是所有磁性奈米材料裡頭最低的，同時也是生物相容性最好的。雖然利用高分子或是生物相容性之物質的包覆可以解決對生物體毒性的問題，但進到生物體內後所面臨的消解反應，可能來自於體內酵素的催化、體內環境導致高分子的降解反應，當磁性奈米粒子經由某些反應被還原成金屬離子時，不同的金屬離子對生物體的影響差別很大，比如含鎳、鈷成份的磁性奈米材料可能會有產生鎳離子與鈷離子的機會，這兩者離子都具有強烈毒性；而對於週期表同一族的鐵離子則沒有毒

性，因此氧化鐵材料一直以來都是生物醫學所選擇的材料。

在奈米生物醫學的領域當中，磁性奈米材料的應用遠大於其他非磁性奈米材料，因為磁性提供了一種非侵入式和非接觸式的性質。對於奈米材料的量測系統，大部分為光學及電學偵測，而磁性奈米材料除了具有與光、電學相同的量測系統外，還可以提供磁性偵測。磁性偵測對於溶劑、溫度、濃度…等因素所造成的干擾較不受到影響，因此在量測上比起光學或電學偵測即來的簡單以及靈敏許多，最重要的是磁性偵測的靈敏度甚至比光學或電學更高。例如在生物體中，欲利用光學或電學針對奈米材料做檢測，是有其困難度的，必須考量組織的影響或者是儀器的限制，而磁性奈米材料則較無此問題，因此磁性奈米材料在生物醫學領域中是個不可忽視的角色。磁性奈米材料在生物醫學上的研究已經有許多成果，例如生物分子的純化分離、奈米生化反應和生物光電檢測系統…等都是利用磁性奈米材料所發展出來的技術。

奈米化的時代在各個領域都有嶄新的突破與發展，在醫療方面是最受人關注的一點，微小化治療透過磁性奈米粒子的特性，可以正確地到達目的地，並達到所預期的效果，改善了以往因為尺寸關係而受到限制的醫療技術，因此在臨床上提供了一種新型的治療方式。其中以腫瘤的標定、治療及追蹤是占最大部份。但在某些方面還是遭遇到棘手的問題，例如腦部的顯影是MRI目前較困難的一個部份，原因是來自於大部分的顯影劑無法通過腦血管壁障礙(blood-brain-barrier, BBB)所以無法有效顯影，加上腦部血管細微，因此顯影劑的要求會更加嚴格。而幹細胞的研究也有人嘗試以MRI來做觀測、追蹤的工具，透過MRI的強大優勢來揭開生命中扮演著最重要角色的行為，這將是未來的一大突破。然而實際上，能用在生物醫學領域的磁性材料是相當有限的，比如氧化鐵材料是少數能夠使用在生物醫學領域的磁性材料之一，原因是它是已知的非毒性物質、具有生物相容性以及對生物體是影響非常的小。因此磁性奈米材料在生物醫學上的重要性及應用性是不可忽視的，生物醫學與磁性奈米材料的結合將是一種具有相當潛力的新領域。

二、磁性奈米粒子之簡介

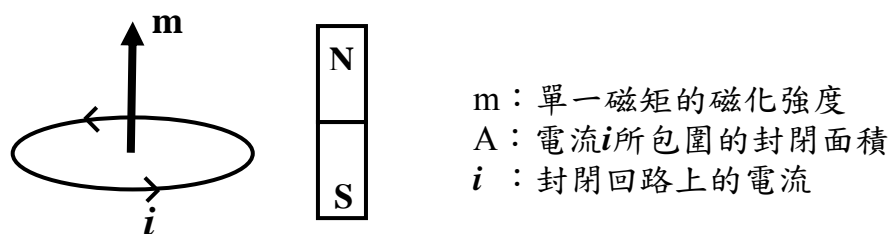
金屬奈米粒子的種類相當的多，性質都各不相同，其中有一類是比較特別的奈米粒子就是「磁性奈米粒子」，顧名思義即是擁有磁性的性質，因此以磁性來做為分類的話，可以將金屬奈米粒子分成非磁性奈米粒子和磁性奈米粒子。磁性及非磁性奈米粒子兩者的基本性質本質上沒有很大的差異，唯一的差別就是在磁場環境之下是否會受到影響。而磁性材料具備磁性性質則是因為擁有不成對電子的元素存在

化合物當中，一般物質的組成成分當含有鐵、鈷、鎳這三種元素時，通常都會有磁性性質的表現，而且這三個元素也是目前自然界中主要構成磁性物質的成分之一，例如常見的磁性物質有鎳、鈷、氧化鐵…等。若將這三個元素與其他元素結合或取代，則可以形成各種不同特性的磁性材料，這些材料隨著磁性的差異都有不同的應用價值。而磁性奈米粒子又可稱為「磁流體(ferrofluid)」，這是因為從外觀看起來像是一種擁有磁性的流體。微觀之下，這是磁性奈米粒子穩定的分散在溶劑中且沒有產生聚集的現象，在磁鐵靠近時因為產生吸引力所以可以看到被吸引的現象。因此外加磁場存在時，磁性奈米粒子即展現出磁性的性質；當沒有外加磁場時，磁性奈米粒子就與一般的液體狀態相同。

氧化鐵磁性材料已經在體外試驗的發展已經有四十多年，直到最近二十年來才有奈米級的氧化鐵(主要為 Fe_3O_4 和 Fe_2O_3)被發展出來，雖然陸續也製備出鎳、鈷系列等比氧化鐵磁性還高的磁性材料，但礙於鎳與鈷的高度毒性，因此較不被採用作為生物醫學領域所需的材料。由於更小尺寸的奈米材料不容易有沉降作用，且容易在組織內擴散，因此相較於早期的微米尺寸可以更深入組織部位，藉此達到細微組織的診斷與治療。

(一)磁矩 (Magnetic Moment)

磁矩是磁學中最基本的單位，又稱為「磁偶極矩」，是一個不可切割的最小組成。原子藉由電子的自旋及環繞著原子核運動而產生磁偶極矩，即類似一根小磁棒，如圖一所示：



m ：單一磁矩的磁化強度
 A ：電流*i*所包圍的封閉面積
 i ：封閉回路上的電流

$$m = A \cdot i \quad \text{單位：安培} \cdot \text{平方公尺}$$

圖一 磁偶極矩示意圖

當磁矩受到一外加磁場 B 作用時，其所產生的能量 E 的關係式如式1-1，

$$E = -m \cdot B \quad \text{(式1-1)}$$

對於任何一種磁性物質而言，產生磁矩的最小單位是原子，由於單一

原子所產生的m值極為微弱，因此在巨觀下的磁化強度定義為總體積內所有磁矩的總和(式1-2)：

$$M = \frac{\sum m}{V} \quad (\text{式1-2})$$

M：巨觀下的磁化強度(淨磁化強度)

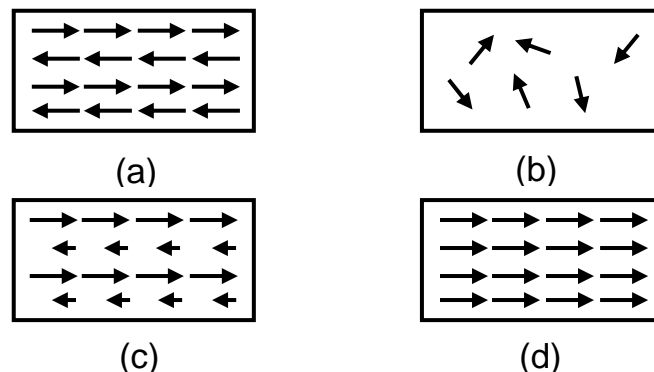
V：總體積

m：單一磁矩的磁化強度

式1-2中的淨磁化強度是以所有磁矩之磁化強度來計算的，若所有的單一磁矩之總向量和為零，則此物質即使含有無數的磁矩也仍然沒有磁性的表現；而當所有磁矩的總向量不為零，則此物質的磁性決定於總向量的大小，因此最大的磁化強度則是所有單一磁矩都以同一個方向排列時所產生。因此依據磁矩在外加磁場作用時的不同表現，可以將物體區分成下列三種不同的磁性性質：

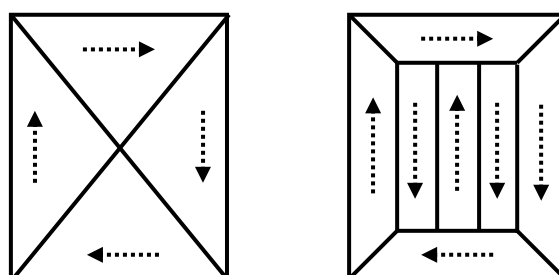
1. **反磁性(Diamagnet)**：當外加磁場作用時，物體本身所產生的微弱磁化量的方向與外加磁場相反。
2. **順磁性(Paramagnet)**：當外加磁場作用時，物體本身所產生的微弱磁化量與外加磁場相同。
3. **鐵磁性(Ferrimagnet)**：當外加磁場作用時，物體本身產生極強的磁化量且方向與外加磁場相同。

除了這三種磁性性質之外，尚有另一種性質稱為「強磁(Ferromagnet)」，強磁是表示不論有無外加磁場時，其所有的磁矩都是同一個方向，為磁性性質裡頭擁有最強磁化量的狀態。此四種磁特性在物質內的磁矩排列現象如圖二所示：



圖二 (a)反磁，由相反方向的磁矩所組成。(b)順磁，為零磁矩或是總磁矩為零。(c)鐵磁，由兩種不同的磁矩所組成。(d)強磁，所有的磁矩都是同一個方向。以上均為無外加磁場的作用

在磁性奈米粒子的研究當中，主要以鐵磁與順磁的性質為主。在磁性性質的描述有所謂的磁區(magnetic domain)的概念，具有鐵磁性的物質根據本身的能量分佈狀態會將晶體結構區分成幾個不同的區域，而在同一個磁區內的磁矩方向都是同一個方向，此即是磁區的概念(圖三所示)。然而各磁區間的方向不盡相同，因此會有相互抵消的現象，若淨磁矩剛好為零，則此時物質將不具磁性。當物質的尺寸從塊材縮小至奈米時，磁區的數目亦會減少，因此當奈米尺寸減少到某個尺寸時，會出現單一磁區(single domain)，即沒有磁區間相互抵消的現象。



圖三 磁區的示意圖，物質內隨能量分佈不同，磁區的排列也不相同

在塊材(bulk phase)時，因原子的穩定性較高，不易受到溫度因素的影響而導致磁矩方向被改變，此時仍然可以維持鐵磁性質；但隨著尺寸漸漸縮小至奈米尺寸，原子的穩定性會越來越低，甚至連室溫時的熱能即能擾動原子，這些經由熱運動所造成的原子擾動因此就破壞了原本磁矩的排列方向。當達到奈米尺寸之後，所有原子都產生擾動現象而導致磁矩隨時都在變更方向且沒有一定的固定方向時，就是所謂的「順磁」性質，意謂著在順磁性的狀態中其磁矩的排列是任意分佈的。當順磁性物質接近磁鐵或有外加磁場存在時，原本分佈混亂的磁矩會受磁場影響而傾向以同一個方向排列，但隨著溫度的提高，這些磁矩又開始會被熱能影響而造成自身擾動，導致磁矩的排列又再度被破壞，造成磁性的降低，因此順磁性物質的磁性表現分別與溫度以及外加磁場的大小都有密切的關係。

(1)溫度對鐵磁性、順磁性物質的關係

順磁性物質的磁化率會隨著溫度升高而降低；反之，溫度降低時，其磁化率會升高。磁化率升高這是由於磁矩受熱運動的影響而降低，故較容易維持在原本的方向，但溫度降到某個臨界點以下時，則會由順磁性轉變成為鐵磁性，其原因是因為物質週遭的環境溫度降到臨界溫度以下時，磁矩再也不受熱能的影響，所以仍然保持原本的方向且不會受到改變，故形成了鐵磁性質。這個臨界溫度稱為居禮溫度

(curie temperature, T_c)，是順磁與鐵磁性質互相轉換的一個臨界溫度，一般的順磁性物質的磁化率都遵守居禮-衛斯定律(Curie-Weiss law，式1-3)，其磁化率(χ)為：

$$\chi = \frac{C}{T - T_c} \quad \begin{array}{l} C: \text{常數} \\ T: \text{溫度} \\ T_c: \text{居禮溫度} \end{array} \quad (\text{式1-3})$$

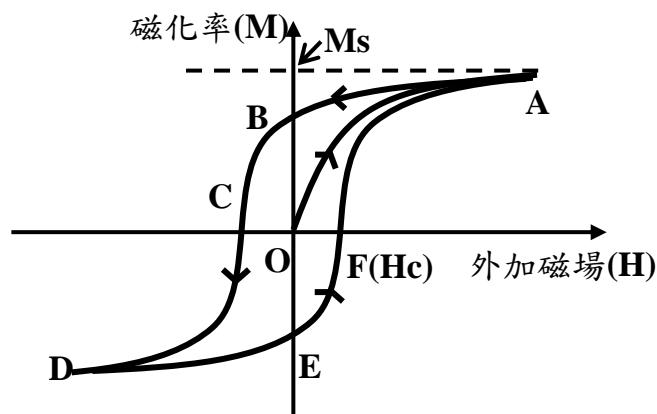
但當粒徑小到一個程度或是呈現超順磁性質時，磁化率不會再遵守居禮-衛斯定律。相同地，鐵磁性物質亦可能轉變成順磁性物質，只是鐵磁性物質的 T_c 都遠大於順磁性物質且也都高於室溫，所以在室溫時還有磁性的存在，一般常看到的磁鐵就是一個例子。大部分的順磁性物質的 T_c 都低於室溫，甚至接近絕對零度，例如70奈米的鎳奈米粒子的居禮溫度會比塊材時低了 40°C 。

(2) 外加磁場對鐵磁性、順磁性物質的關係

外加磁場的強度對於磁矩而言，就是一個改變磁矩方向的外力，尤其是針對順磁性物質的影響特別大。當外加磁場夠大的時候，其影響足以抵抗因熱運動所產生的擾動現象，此時若欲改變磁矩的方向就必須提高溫度。因此一般使用的磁鐵其抗熱性越高越好，表示不會在高溫環境下被消磁，因為經過高溫再回到低溫時的狀態後通常會比原來的磁性差，其原因與磁矩的重新排列有關。但實際上，外加磁場對於順磁性物質的影響也有其限制，主要是來自於物質本身的性質所引起，因此物質不同對於外加磁場的感受與反應也都截然不同。

(二) 磁性奈米粒子的磁滯曲線

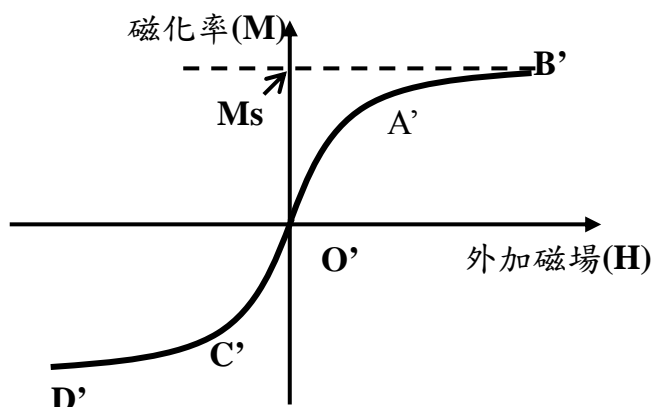
磁滯曲線(hysteresis curve)是磁性材料中相當重要的一種資訊，是呈現磁性物質對於外加磁場的變化所反應出來的一種行為，是磁性材料性能的參考值之一，同時亦決定了此物質在磁性應用上的範圍。圖四即是一般鐵磁性物質的磁滯曲線：



圖四 鐵磁性物質的磁滯曲線示意圖

從圖中可以看出飽和磁化量(M_s)與外加磁場(H)的相互關係，當一個磁性物質受到一個逐漸增強的外加磁場作用時，其磁化現象亦隨之增強，即從O到A這個過程。在外加磁場增強到某程度之後，磁化量即不再增加，此時即達到該物質的「飽和磁化量或最大磁化量」，而不同狀態的磁性物質其最大的飽和磁化量(M_s)都不盡相同。接著磁場會慢慢減少一直到零(即A到B的過程)，此時外加磁場為零時其磁化量並不為零，而是維持在某一定的值，即圖四中的B點，此時在零外加磁場時所得到的磁化量則稱為「殘磁量」。若此時開始改用相反方向的外加磁場，則發生B到C的過程，磁性物質內部磁矩因受到相反方向的磁場影響，造成了部份磁矩的方向改變且剛好互相抵消，因此完全沒有磁性，此時的外加磁場大小稱為「矯頑磁力(coercivity, H_c)」，亦即C點或是F點的值。當反向磁場繼續增強(即C到D的過程)，則達到另一次的飽和磁化量，此時與A點有一樣的值但方向完全相反。之後，由D經由E、F到A的過程則是與由A經由B、C到D的過程一樣，最後會形成一個週期性的循環(ABCDEF)就是所謂的磁滯曲線。

鐵磁性物質在無外加磁場時即擁有磁性，是因為有殘磁量的緣故，從磁滯曲線圖即可看出此現象；然而順磁性物質在無外加磁場下是沒有磁性的，但當有足夠的外加磁場存在時，順磁性物質便開始擁有磁性，其現象與鐵磁性物質類似，因此順磁性物質的磁滯曲線如圖五所示：

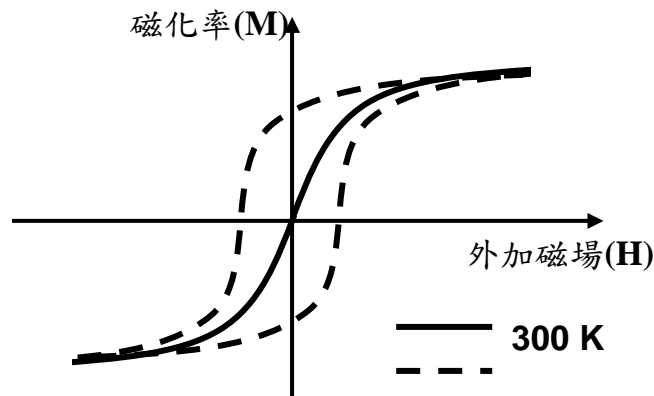


圖五 順磁性物質的磁滯曲線示意圖

很明顯地，順磁性物質在無外加磁場時，其磁化率為零，對於磁滯曲線的變化過程與鐵磁性物質相似，即 $O' \rightarrow A' \rightarrow B' \rightarrow C' \rightarrow D' \rightarrow C' \rightarrow O'$ 為一個完整的循環。因此對於順磁性物質，其矯頑磁力是零而且沒有殘磁現象，這是與鐵磁性物質最大不同的特性。

溫度對於磁滯曲線的影響可以從磁性物質所表現出來的行為來了解。當溫度升高，鐵磁性物質和順磁性物質基本上仍維持本身的狀

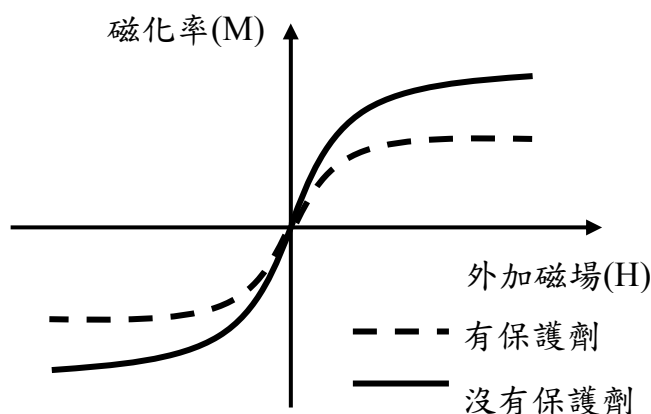
態，只是磁化率會有所變化，但鐵磁性物質可能因此喪失磁性或者是轉變成順磁性；反之，若溫度下降，對鐵磁性物質而言並不會有很大的影響，不過在順磁性物質方面，則會有很大的影響，即從順磁性轉變成鐵磁性，圖六即是溫度對順磁性物質的關係圖：



圖六 溫度對順磁性物質的影響

由圖六可以看到溫度對順磁性物質的磁性表現之影響，因此欲判斷物質在某固定溫度下是屬於順磁或鐵磁性時，只需要觀察固定溫度下的磁滯曲線即可，若有殘磁現象或是圍出一個區域面積，表示此物質在該溫度下是呈現鐵磁性的性質，且區域面積越大者磁性越強，表示同方向的磁矩數目越多。

磁滯曲線除了與溫度有關之外，尚有幾個因素同時亦會影響磁化率的變化，分別是保護劑種類、奈米粒子本身的大小和晶體結構組成等因素為主。保護劑會吸附或鍵結在金屬奈米粒子表面，不同的保護劑對於晶格面的能量影響都有所差異，從微觀的角度來看，位於表面的磁矩很容易受到保護劑的影響，其自由轉動的程度相較於內部磁矩較為受到限制，而此限制程度與保護劑的種類有關。由於物質表面的磁矩表現會受到保護劑影響，因此導致磁滯曲線的變化，這個變化通常都是飽和磁化率的降低。而奈米粒子本身的大小關係到磁區的數目與排列，不同粒徑的奈米粒子其表面磁區的能量亦不相同，故對於週遭環境的感受度也就不同，因此也會影響到磁矩的穩定度，磁滯曲線也因而產生差異性。故相同大小、相同組成的磁性奈米粒子可能因為晶格結構不同，所以磁滯曲線亦會不同，這是因為不同結構裡，原子的排列位置是不一樣的，加上保護劑的因素，磁滯曲線的改變也是與此項因素有關。圖七是保護劑對飽和磁化率的影響，一般表面有保護劑修飾的磁性物質，其磁化率都會因此而下降。



圖七 保護劑對飽和磁化率的影響

(三) 順磁性與超順磁性

隨著奈米技術的發展，當奈米的尺寸越做越小，對於磁性奈米粒子而言，是從塊材的鐵磁性進入到奈米尺寸時的順磁性，當尺寸在繼續縮小至數個或十幾奈米時，即出現所謂的「超順磁」性質。例如 α -鐵、四氧化三鐵、 α -三氧化二鐵分別在小於5奈米、16奈米、20奈米時會開始擁有超順磁的性質且此時其磁化率不再遵守居禮-衛斯定律，而產生超順磁的臨界尺寸是隨著不同材料而有所不同。其實超順磁與順磁的性質都很相近，最主要是超順磁是發生在尺寸更小的狀態下，因此其磁區幾乎是單一磁區，對於熱擾動的干擾比順磁性還敏感，即使溫度降低還是會受到熱擾動的影響。在磁滯曲線方面，超順磁物質幾乎沒有鐵磁性質，縱使在溫度接近絕對零度時，仍然表現出順磁的性質，這是超順磁與順磁較大的差別。

無論順磁或超順磁性質基本上都是尺寸進入到奈米層級時所展現出來的現象。如前述所提，超順磁在接近絕對零度時磁矩還是會受到擾動的影響而方向產生偏移，造成此種偏移現象的因素除了低溫下的微量熱能之外，真正的主要因素是量子擾動。當溫度越來越低時，熱能的干擾逐漸減小，在溫度極低時幾乎可以被省略，此時量子擾動的貢獻會被突顯出來，形成磁矩干擾的來源，因此超順磁物質可以在低溫時仍呈現順磁的現象。

(四) 磁性奈米粒子的穩定度

磁性奈米粒子的穩定性除了凡得瓦爾力、排斥力的因素之外，尚須考慮磁吸引力，在一個外加磁場存在的系統中，磁性奈米粒子是否會受外加磁場影響而產生吸引作用是與本身的粒徑有關。當系統中的熱能所產生的布朗運動(brownian motion)可以抗衡磁場所產生的吸引作用時，磁性奈米粒子即可穩定的懸浮在溶液中。穩定性除了取決於磁性奈米粒子本身的因素及系統因素之外，外在因素如pH值、離子強度和溶劑效應也都會影響。pH值的因素對於含有能接受或脫附氫

離子的官能基之保護劑較為明顯，通常這些官能基會牽涉到氫鍵的形成，氫鍵的形成是一種屬於可逆性的聚集現象，最常見到的官能基就是氨基(-NH₂)和羧基(-COOH)，透過pH的改變不僅可以控制氫鍵的形成，同時也影響到離子電雙層的穩定度。而離子強度的因素與pH值的變化類似，主要是破壞離子電雙層而導致失去電荷排斥的穩定性，因此若選擇本身即可抵抗高鹽類濃度的保護劑做為修飾分子，則奈米粒子本身也就可以穩定的在高鹽類系統中分散。最後溶劑的因素是所有因素最為簡單的，只要視其極性或非極性程度是否與奈米粒子接近即可，極性相近時則可以穩定的分散在溶劑中。綜合所有因素，磁性奈米粒子的穩定度來自本身的粒徑與外加磁場、溫度和系統環境等有關，雖然尚有pH值、離子強度和溶劑因素等之外在因素，但磁性奈米粒子的粒徑若大於穩定粒徑(指穩定懸浮的磁性奈米粒子在溶液中的最大粒徑)太多，則受到外加磁場與重力場的影響將遠大於其他因素，因此此時奈米粒子的行為主要是以外加磁場的影響為主。

三、磁性奈米材料的製備方法

製備磁性奈米粒子的方法有許多種，常見的製備方法有熱分解法^[1-3](thermal decomposition)、水熱法^[4](hydrothermal method)、微乳化法^[5](microemulsion)、以及化學共沉澱法(co-precipitation)。其中以化學共沉澱法是最普遍採用的方式，是因為此製備方法操作簡單、可大量製備、成本便宜和製備時間短等四個優點。

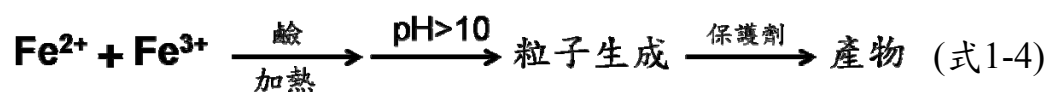
熱分解法主要是在非水溶性溶劑中合成磁性奈米粒子，反應時間從幾小時到幾天則視條件而定，此製備方式對於粒徑與形狀都可以控制，尤其在有保護劑的高溫(通常為100~320°C)分解條件下，可以製備出非常小的粒徑，而常用的保護劑則有脂肪酸(fatty acid)、油酸(oleic acid)和十六烷氨(hexadecylamine)。用熱分解法製備奈米粒子的前驅物通常使用零價金屬的羰基(CO)或乙醯基丙酮(acac, acetylacetonate)化合物為主，例如Fe(CO)₅和Fe(acac)₃都是常用的前驅物之一。前驅物在高溫時會先分解成金屬態，然後再產生氧化反應形成奈米粒子，而前驅物的種類、溶劑種類和保護劑種類都是影響粒徑和形狀的參數，其最大的優點是粒徑分佈非常的小，但由熱分解法製備的奈米材料都是非水溶性的，在應用上會受到限制。

水熱法是一個主要以水作為溶劑且在高溫高壓下進行反應的一種過程，例如X. Wang等利用金屬亞麻酸根(metal linoleate)化合物(固態)、乙醇-亞麻酸(液態)和乙醇-水作為溶劑，在水熱法的條件下經由不同反應溫度藉由液態-固態-溶劑(liquid-solid-solution reaction)反應得到奈米粒子。^[6]由於水熱法是屬於非暴露的反應系統，因此製備出

來的純度相當的高，奈米粒子在形成之前幾乎沒有被氧化的機會，但產量僅屬於中等，不像熱分解法和共沉澱法可以大量的製備。水熱法的溶劑之選擇與其他製備方法不同，須選擇高沸點的溶劑，例如乙二醇(ethylene glycol)即是最常用的溶劑之一。水熱法製備磁性材料的反應機制在目前尚未完全了解，原因在於反應的過程複雜，牽涉到不同相態的轉移與反應，但水熱法所提供的優點是適用於大部分的金屬，且粒徑的分佈也非常的窄小。

微乳化法是常用的奈米粒子製備法，主要是利用兩個互不相溶的溶劑界面間所形成的微胞(micelle)內進行反應，其反應溫度約在20~50°C之間。以油中水滴型(water in oil)的系統而言，水溶液相在有界面活性劑的油相中會以直徑為1~50nm的液滴穩定的存在，而水、油和界面活性劑的比例決定了液滴的大小。微乳化的產率相對於其他製備方式是低的需多，且粒徑的分佈範圍也比較大，但對於粒子形狀的控制則與其他製備方式(除了共沉澱法外)相當。界面活性劑的使用是微乳化法所必須的，通常是使用長碳鏈的有機酸化合物，例如溴化十六烷基三甲銨(CTAB, cetyltrimethylammonium bromide)或十二烷基硫酸鈉鹽(SDS, sodium dodecyl sulfate)，有時候還添加1-丁醇作為共乳化劑。與微乳化法相似的「逆相微胞法(reverse micelle)」則是水中油滴型(oil in water)的反應系統，其原理與油中水滴型類似，兩者製備出來的奈米粒子差別在於一個是水溶性，另一個則為油溶性的差別。

化學共沉澱法是所有製備方法中最方便的，反應時間也最短，但形狀的控制則是較不理想的，其主要原理是利用金屬離子在鹼性環境下生成金屬氧化物的過程，但用此方法製備出來的磁性奈米粒子通常不甚穩定，因此容易產生沉澱，在一些應用領域(比如生物醫學領域)是不允許沉澱的現象發生，所以許多改良的製備方法陸續被發表出來，但改善的效果仍然有限。目前為了有效改善共沉澱法的奈米粒子沉澱現象，因此在製備好的奈米粒子中加入保護劑以避免聚集或沉澱的發生，但這個保護過程都是在粒子成長完全之後才加入的，所以粒徑的大小都已達到某一種程度，此時雖然有保護劑的保護作用，實際上有可能還是發生沉澱現象，這是因為粒子較大所受到的重力影響程度也變大所造成的。共沉澱法的反應機制可以用式1-4簡單表示：



以製備氧化鐵奈米粒子為例子，反應中的使用的鹼主要以氨水或氫氧化鈉為主，兩者的作用有些許不同，但最後的結果是一致的，其

反應是分別為式1-5和式1-6：



生成的四氧化三鐵若沒有保護劑可能會被氧化成三氧化二鐵，因此保護劑的選擇通常是會避免會氧化四氧化三鐵的化合物，目前最常用的是四級銨鹽(NR_4^+)，四級銨鹽是屬於陽離子型之界面活性劑且帶有相當強的正電荷，不僅作為保護劑同時也維持四氧化三鐵的穩定性。

共沉澱法主要都是以水溶液作為反應系統，反應的同時必須隔絕氧氣，是為了避免形成三氧化二鐵，因此會在氮氣或是氬氣環境下進行；另外加熱步驟通常也是必須的，溫度範圍多半在 85°C 到 95°C 之間，目的在於有利四氧化三鐵的生成。若條件控制的不佳，則產物就會得到四氧化三鐵和三氧化二鐵的混合物，這是因為部分的四氧化三鐵被氧化成三氧化二鐵。由於水相的氧化鐵奈米粒子因為應用性較為廣泛，因此共沉澱法是最為常用的製備方式，而熱分解法所製備的氧化鐵奈米粒子則是有機相的，一般以油酸(oleic acid)作為保護劑，在高溫下將鐵化合物裂解然後生成氧化鐵奈米粒子，其粒徑也很均勻，但礙於有機相的緣故，被利用來應用的機會因此較少。

磁性奈米材料發展以來主要都以奈米粒子為主，而近年來已有其他型態的磁性奈米材料備發表出來，例如空球型態的Co和 Co_3O_4 奈米材料^[7]、奈米管(nanotube)的磁性奈米材料^[8]、奈米棒(nanorod)的磁性奈米材料^[9]、螺旋槳型磁性奈米材料^[10]和孔洞型磁性奈米材料^[11]，以上例子都是屬於型態上的控制。另一方面，許多複合磁性奈米材料也被製備出來，例如核殼(core/shell)結構、雙成份材料和三成份材料，這些材料都有其目的與獨特的性質。

四、磁性奈米粒子在生物醫學的應用

(一)磁性奈米粒子在生物醫學上的條件限制

生物醫學是目前相當熱門的領域之一，而奈米科學、先進技術和儀器功能三者之間的配合在生物醫學上可以提供另一種新型醫療技術。在奈米技術受到重視之前，微米材料是最為常被使用的材料，在生物醫學上有許多的相關應用，不論是作為偵測用途、材料用途、診斷用途和醫療器具用途等都有一定的表現，由於粒徑較大，對於更微小的範圍則無法有有效的使用，或者是提供所要求的標準。近年來，奈米技術的崛起提供了能觀察到極細微部份的能力以及研究其相關

領域的優勢，因此奈米生物醫學的跨領域合作逐漸成型，但要應用在生物體內(*in vivo*)方面則必須符合三大基本條件，分別是無生物毒性、水溶性以及生物相容性。無生物毒性是首要考量的因素，當奈米材料本身會對生物體任何部份產生毒性或是引起負面效應時，則不予考慮可成為應用在生物醫學的選擇。水溶性的問題是第二考量的因素，因為生物體內的水分占了重要的比例，所以欲應用在生物醫學上也必須是屬於水溶性的物質，否則生物體內若有非水溶性的奈米粒子會造成排斥或是阻塞。最後考量的是生物相容性，若奈米粒子擁有無生物毒性且又是水溶性的話，但卻缺少生物相容性，則此材料仍然不被採用。沒有生物相容性的物質，進入到生物體內會被視為外來物而引發過敏或是免疫反應，這對生物體並不是一個適合的生醫材料，因此生物毒性、水溶性和生物相容性是應用在生物醫學上的限制條件，故對於奈米粒子的性質也就有較嚴格的限制。為了解決應用在生物醫學所面臨的限制，使用高分子來作為包覆奈米粒子的外層是目前所採取的方式，因為高分子可以同時兼顧生物毒性、水溶性及生物相容性三種要求，例如：二氧化矽(silica)、聚乙二醇(PEG)、聚醚醯亞胺(PEI)、聚離氨酸(Poly-lysine)··等都是常被利用作為保護劑的高分子。高分子化合物的分子量一般而言會遠比單一個分子的分子量來的大，所以利用高分子包覆的磁性奈米粒子其粒徑會變大，且隨著高分子包覆的厚度越厚則粒徑相對增加的越多，甚至可以達到微米的大小。藉由高分子化合物包覆的磁性奈米粒子，磁性是來自於核心的磁性粒子，而提供無生物毒性、水溶性及生物相容性則是外層的高分子。此外，對於高分子包覆之奈米粒子的要求必須還要達到穩定性的分散，否則在生物體內會產生聚集的現象，對於血管或是細微的組織區域可能因為阻塞而造成很大的傷害。

想要應用在生物醫學並進行生物體內試驗的材料，除了上述的條件必須符合之外，在粒徑上也是有限制的，一般認為需要小於15奈米以下才能適合地使用在體內試驗，例如僅有幾個奈米大小的粒子可以避開胞飲(endocytosis)的途徑並成功地到達其目的地，也可以進到更微小的組織達到目標，因此在奈米粒子的粒徑上是相當的要求，故包覆高分子的磁性奈米粒子雖然符合生物醫學的限制條件，但粒徑是一個實際限制的問題，導致限制了相當多的應用，最大的限制是無法順利進行體內的相關研究，因此利用高分子包覆磁性奈米材料在粒徑上需要控制的。因為生物醫學邁向細胞層級、分子生物層級是目前也是未來的趨勢，所以同時具有粒徑小、無生物毒性、水溶性和生物相容性的條件才能有機會應用到生物醫學領域。

生物醫學領域又可分為「體外」和「體內」兩個方面，體外應用由於未直接進入生物體內，因此對於磁性奈米粒子在粒徑上的要求就

不像體內應用那般的嚴格要求，故在缺乏外加磁場且長時間後會產生沉澱現象的較大粒徑之奈米粒子(100~1000 nm)是可以被接受的，所以在某方面的應用對於分散性的要求並不是必須的。至目前為止，這些對磁性奈米粒子所要求的條件通常還是以應用層面來區分為主，例如在純化分離方面，為了快速的收集樣品，此時磁性奈米粒子通常希望擁有很大的磁性，以方便快捷被磁鐵所吸引；因此分散性太好的磁性奈米粒子在此時就較不適當，因為分散性好的磁性奈米粒子通常擁有的磁性均不會很大，故要花更多的時間將全部粒子吸引過來。在體內應用方面，通常是將磁性奈米粒子注射進入生物體內，但生物體內的環境與生理系統對於奈米粒子是一種未知的變數，因此在奈米粒子上的選擇以安全性為優先考量。不穩定且容易沉澱的磁性奈米粒子，可能會造成血管或細微組織的阻塞，因此在使用上是絕對的禁止，以目前被允許的磁性奈米粒子而言，均是氧化鐵為主，例如Resovist[®]即是少數之一被允許上市販售的MRI顯影劑。

(二)磁性奈米粒子在生物醫學上的應用

1. 固定化技術

生物分子固定化提供一種在生物醫學方面有用的工具，將特定的生物分子固定在磁性奈米粒子表面，同時保持其活性並進行催化作用。在Ansil Dyal的研究中，將脂肪分解酵素(*candida rugosa lipase*)固定化在氧化鐵磁性奈米粒子上，進行活性測試時仍保持相當的活性，甚至放置一個月後依然保有一半的活性。^[12] 在另一個研究中，一樣將脂肪分解酵素固定在磁性奈米粒子表面，發現可以增加酵素的溫度忍受程度及酸鹼的改變，且其活性也不會因為固定化而受到影響。^[13] 固定化的好處在於可以做一個回收利用的過程，提高蛋白質的重覆使用率，尤其是使用昂貴或來源不易取得的蛋白質。從反應的觀點來看，一般的生物分子與磁性奈米粒子表面是任意連接的，無法控制特定的位置去反應，因此會牽涉到活性位置是否會被干擾到，這個因素也就影響了活性的表現。早期的固定化技術都是在微米粒子上，這是因為微米粒徑大且可以接較多的酵素分子，但後期有文獻表示奈米粒子的酵素固定化其效率不見得比微米粒子差，這是因為牽涉到酵素的活性表現問題以及催化過程中的立體障礙所造成的影響。

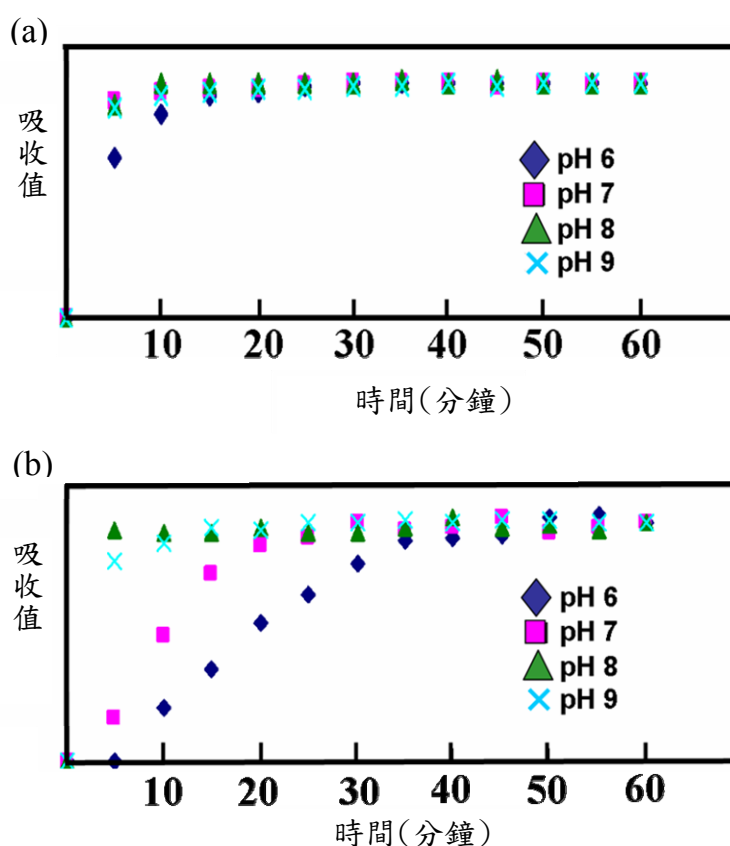
一般酵素的催化反應，酵素與受質之間是必須有一定的空間位向才能順利反應，因此當修飾酵素時所挑選的比例關係則有一定程度的影響，當越多的數目修飾在奈米粒子表面，則相對地酵素分子彼此之間的空間就越擁擠，對於後續的催化反應則未必有利，因為是受到立體障礙的影響，所以其活性的表現就會反而降低，但一般來說，修飾在奈米粒子表面的酵素活性雖然不一定會比修飾在微米粒子上有顯

著的差異性，但在酵素的壽命週期方面則有明顯的增加趨勢。另外對於不同大小的蛋白質而言，能修飾的數目與其本身的分子量有關，基本上是分子量越大則能修飾上去的數目越少，表一即是各種不同分子量的蛋白質修飾至氨基型四氧化三鐵奈米粒子的數目比較。從表一可以了解到分子大小與接合數目的關係，而接合數目越多的通常表現出來的催化效果不一定會比較好(以每單位奈米粒子做比較)，這是因為催化反應還需要考慮其他的因素。

表一 蛋白質分子量與接合數目之關係

	Trypsin (胰蛋白酶)	α -chymotrypsin (α -胰凝乳蛋白酶)	Protein A	Antibody (抗體)
分子量(kDa)	23.8	25	42	150
每顆奈米粒子的 連接數目	23	22	17	6

註：以上均以1：30(蛋白質：奈米粒子)的比例進行測試。
以trypsin修飾的四氧化三鐵奈米粒子與單純trypsin的活性測試為例，其結果如圖八：



圖八 酵素活性測試圖。(a)單純酵素 (b)接合至四氧化三鐵奈米粒子的酵素。兩者在系統中的濃度均相同，實驗條件亦都相同

對於單純酵素的催化結果來看，不同pH值的催化效率都差別不大，但當接合到四氧化三鐵奈米粒子之後，其催化效果會受到pH值的影響，對於trypsin此酵素的基本性質來看，trypsin在pH 8的環境下其催化效果是最好的，從圖八比較可以知道在pH 8的時候兩者的效率是差不多的，在pH 9的條件也是一樣的結果，而pH 6跟pH 7對於連接到奈米粒子表面的trypsin就明顯的降低催化效果。因pH改變所造成的催化效率改變，最大的因素在於酵素本身是透過共價鍵的方式連接在奈米粒子表面，因此對於蛋白質的空間結構會造成些微的影響，而此影響在鹼性環境下並不會對催化效率有任何改變，但在中性或弱酸性環境則會對催化效率有不同程度的改變。蛋白質本身在不同酸鹼值時，其空間結構可能就會產生調整的行為，一般稱為構形改變，這樣的些微變化有時候就會影響到本身的活性表現，在此研究當中，又多了強迫性的共價鍵連接，因此最後所表現出來的結果就如圖八的(b)。

將酵素接合到奈米粒子上的活性表現會比接合到微米粒子上來的好，這是許多文獻都已經發現到的結果。^[12,14-16] 將酵素固定至一個固態載體上，其活性一定會比自由型態的酵素來的低一些，但接合到微米粒子的酵素活性會降低的更多，因為微米的粒子太大，會阻礙到酵素催化反應所需的空間，甚至阻礙了受質進入活化中心的過程，雖然每顆微米粒子上的酵素數目比奈米粒子多，但實際上所表現出來的整體活性並不會比奈米粒子來的好，而奈米粒子表面的酵素分子雖然少，但因為體積小所以不會影響到催化反應，導致最後的表現是奈米粒子略勝一籌。雖然酵素固定化會減少酵素原本的活性，但固定化的結果卻增加了酵素的穩定性，使得酵素的壽命週期延長，也使得酵素的利用價值提高。酵素固定化另一個最大的優勢就是可以回收並再次的使用，對於不容易取得的酵素或是價格昂貴的酵素利用固定化來回收並重複使用，在成本上可以減少許多，文獻指出固定化的酵素期重複使用後，並不會大幅的降低其活性，因此可以有效地節省成本。

酵素固定化除了上述的應用方面之外，近年來開始結合MALDI-MS(基質輔助雷射脫附游離質譜法)進行研究。Chen等人^[17]利用酵素固定化與磁性奈米粒子結合並利用微波進行催化反應，結過發現接合上奈米粒子的催化反應會比單純只有酵素的催化反應來的快，原因在於磁性奈米粒子會吸收微波，使得本身溫度提高，因此加速了磁性奈米粒子上的酵素催化反應。另外Lin等人^[18]則利用具功能性之磁性奈米粒子在MALDI-TOF MS中直接測量小分子，或是藉由固相萃取來萃取小分子，再針對小分子進行偵測。磁性奈米粒子因為接合上雷射吸收介質而提供高游離效率和乾淨的背景值，利用介質連接磁性奈米粒子的方式提供了一個快速、簡單、並可定量的優點，同時不需要內標準品的添加或是同位素的標定即可利用MALDI-TOF MS

測量各種小分子。

固定化技術目前以抗體、酵素和DNA這三種生物分子為主，抗體可用來純化特定的抗原或是做為檢測的目的；酵素則是可以提高使用率及增加經濟效益；而DNA被利用作為生物探針的工具，利用其專一性親合力的特性來做為檢測的方法之一。另外蛋白質也有人利用固定化技術連接至奈米粒子，但至目前為止仍屬於少數部份。

2. 藥物導引治療

藥物治療目前主要以口服或注射為主，但實際上在人體內的治療效率有限，因為藥物會被血液稀釋掉，或者是會引起免疫反應而受到干擾及破壞，因此使用的藥量都遠大於實際有效藥量。藥物導引治療提供一種新的方式解決了這些效率問題，並可以用更少量的藥物即可達到治療效果。磁性導引的好處是可以避免藥物經過體內循環而可能引起的副作用，且治療完畢後也可直接導引至體外，對生物體的影響盡量降低到最小。將藥物分子連接到磁性奈米粒子的技術目前已經很成熟，可利用化學鍵結、正負電吸引力和高分子吸附/脫附等方式連接，再利用外加磁場將磁性奈米粒子導引固定在目標位置進行治療。Suzuki曾發表對患有癌症的兔子利用藥物導引技術進行治療^[19]，其存活率在使用此導引技術前後分別為27.4%和70%，其他相關的文獻也都有相同的趨勢，顯示藥物導引的確提高治療的效果。

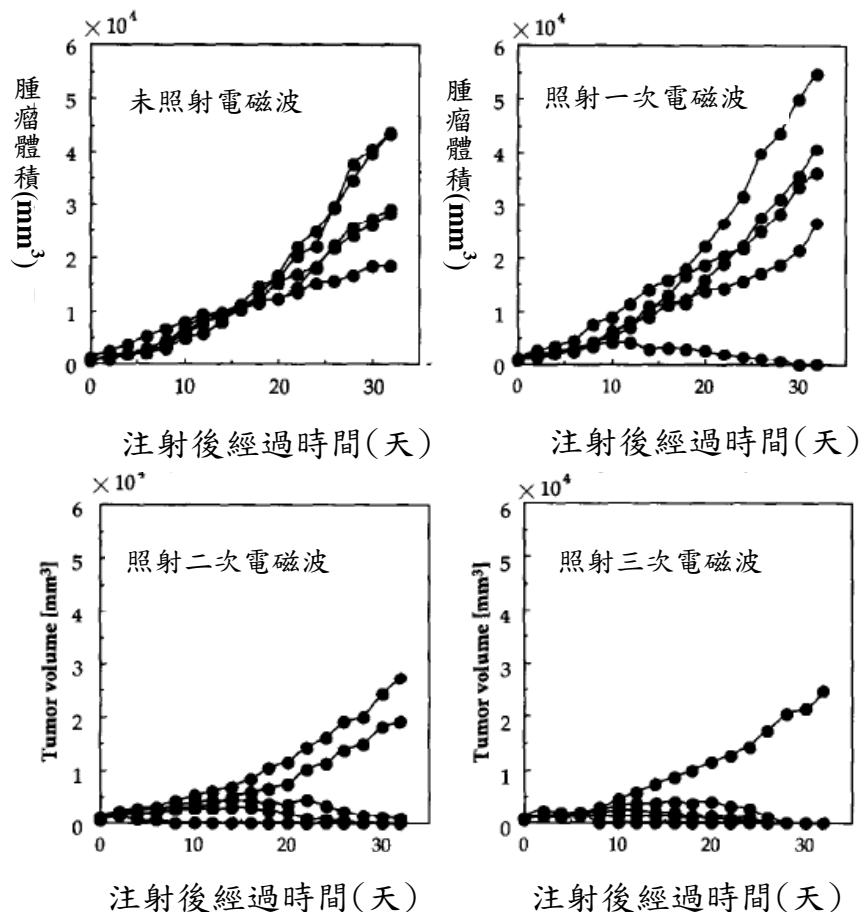
在四氧化三鐵磁性奈米粒子表面連接抗癌藥物(mitoxantrone)，並以磁場控制奈米粒子大量集中在腫瘤區域進行治療，由此研究顯示利用導引治療的方式是相當有效率的，尤其是針對快速生長的腫瘤細胞可以發揮一定程度的療效；另外在基因治療方面也是目前熱門的課題之一，利用藥物導引技術的概念，將藥物分子以生物分子(DNA或蛋白質)代替，再用外加磁場導引至置目標處，然後釋放這些分子以進行治療或是提供偵測標定的功能。以四氧化三鐵作為載體攜帶DNA進入到細胞達持基因轉殖的目的，或是表面修飾特定的蛋白質，幫助通過細胞膜進入到細胞內部，這些相關的研究目前也正積極的進行當中。這些藥物或擁有特殊功能的物質固定化在磁性奈粒子上，除了提供原有的功能之外，同時也提供了影像偵測的優點，在醫療上可同時達到偵測與治療的目的。

3. 溫熱療法(Hyperthermia or Thermotherapy)

溫熱療法主要是利用溫度的升高，使病變細胞無法承受高溫而導致死亡，因為癌細胞對高溫的承受度較正常細胞承受度來的低，此方式通常都是在組織的某個區域做局部加熱，但這過程無可避免的也同時會對正常細胞造成傷害，因此對組織的傷害是有一定的風險，導致

治療效果有其限制。當磁性奈米粒子在接受電磁波能量後，本身會產生旋轉運動而釋放熱能提高局部溫度，若控制電磁波強度和照射時間則可控制溫度的升高程度。因此利用四氧化三鐵磁性奈米粒子進行溫熱療法，優點在於尺寸只有數個奈米、無毒性、生物相容性及穩定性，再配合固定化技術及藥物導引技術，使得磁性奈米粒子只會分布在腫瘤的區域，這是目前其他治療方式也希望達到的目標之一。

當磁性奈米粒子集中在腫瘤區域之後，再施加一電磁波使磁性奈米粒子產生熱能而提高自身周圍溫度，位於磁性奈米粒子周圍的腫瘤細胞便會受到溫度升高的影響而死亡，但對正常細胞僅有很少的傷害與影響，這是因為磁性奈米粒子可以很容易深入到腫瘤細胞的位置，因此提高了治療效率。Shinkai利用四氧化三鐵磁性奈米粒子在患有腫瘤的老鼠的體內進行溫熱療法^[20]，其結果如圖九所示，在接受電磁波照射之後腫瘤部位的體積不再明顯增加，甚至有減少的現象，在三個月後腫瘤幾乎完全消失且沒有再度生長的跡象。

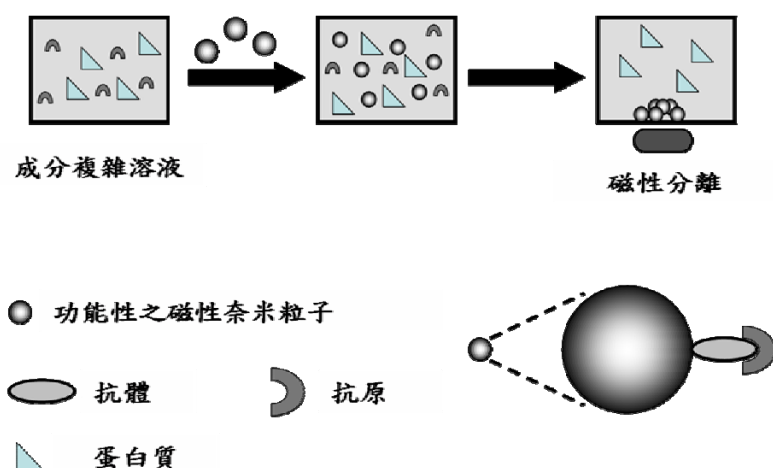


圖九 利用四氧化三鐵磁性奈米粒子對患有腫瘤的老鼠進行溫熱療法之實驗結果(Reprinted with permission from ref^[20])

溫熱療法在目前的研究主要都是磁性材料的開發和體外試驗，例如如何在最短時間內可以提升到41~45°C(此溫度為溫熱療法利用的溫度範圍)，或者是如何用最少的磁性材料可以達到最大的溫度效益。不同的磁性材料在每單位時間以及每單位重量，可以提升的溫度值都不相同，因此文獻對於不同粒徑的磁性奈米粒子所展現的溫度提升能力^[21]有進一步的研究。為了能更精準的僅在患部做溫熱治療，在磁性奈米粒子上連接抗體進行專一性的辨識，使得治療效果更有成效。^[22]除了專一性的生物分子，磁性奈米粒子的表面修飾是另一個增加溫熱治療效果的方式^[23]，透過表面修飾可以將一些藥物或是有功能性的分子連接到磁性奈米粒子，在進行溫熱治療的同時也發揮其作用。

4.純化、分離及檢測技術

在純化分離的技術方面，固相萃取與液相萃取是主要的純化方式，而固相萃取所花費的時間通常比液相萃取來的短，但純度方面則以液相萃取較佳。固相萃取主要是從一個複雜成份的溶液系統中將目標物先分離或初步濃縮的一個動作，其使用的步驟以離心或是管柱的方式來進行，相較於液相萃取，在所有的步驟上都只需要較短的時間即可完成，因此固相萃取至今仍受到相當的重視。而磁性分離技術同樣擁有與固相萃取的優勢，但它們花費的時間比離心或是管柱分離的時間來的更短，因為磁性奈米粒子可以用磁鐵很快速地吸引並集中收集，這個步驟比其他的分離步驟簡單上許多。磁性奈米粒子的分離技術主要概念如圖十所示，從一個成分複雜的溶液將目標物分離出來，其相關的研究顯示出目標物的種類可以是藥物、細胞、蛋白質和DNA…等，僅需在改變磁性奈米粒子的功能性即可。

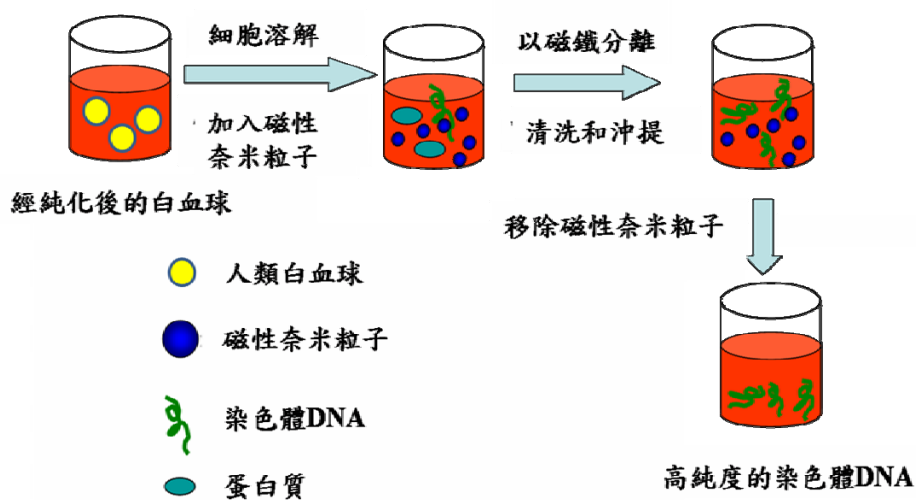


圖十 利用磁性奈米粒子做為磁性分離技術之示意圖

(1)DNA的純化分離

DNA的分離技術當中，主要是分離染色體DNA(genomic DNA)

為主，因為它提供了許多有關基因的遺傳訊息。至目前為止，染色體DNA的分離技術已經發展出快速且高純度的套件(kit)，與普遍使用的氯仿/苯酚(chloroform/phenol)萃取法相較之下，新發展的分離技術主要是利用磁珠在混雜系統中將DNA吸附在上面，然後轉移到另一個新的容器再將DNA從磁珠上脫附，例如Zhang利用孔洞性矽氧化物包覆的氧化鐵奈米粒子，從酵母菌細胞(*Saccharomyces cerevisiae* cells)分離出染色體DNA。^[24] 利用磁性奈米粒子分離DNA僅需要很少量的體積且很簡短的時間即可完成，且中間步驟所使用到的溶劑為水或是緩衝液；但一般的氯仿/苯酚萃取法需要花費數小時到一天的時間去分離並純化DNA，且使用到有機溶劑會對人體造成傷害，因此利用磁性奈米粒子來分離純化DNA對操作者是較為方便且安全的。圖十一是從人類的白血球細胞中純化染色體DNA的示意圖，利用表面以矽氧化物包覆的磁性奈米粒子在高鹽環境下吸附DNA，然後在低鹽或水的環境下將DNA脫附磁性奈米粒子表面，在吸附的過程中蛋白質也可能會吸附到磁性奈米粒子表面，但在清洗的過程中即可將蛋白質去除而只留下DNA，因此達到分離純化之效果。

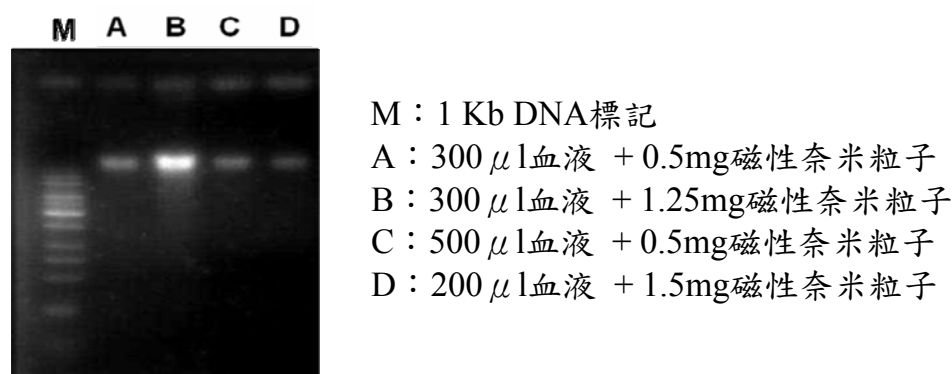


圖十一 利用磁性奈米粒子從人類白血球純化染色體DNA之流程示意圖

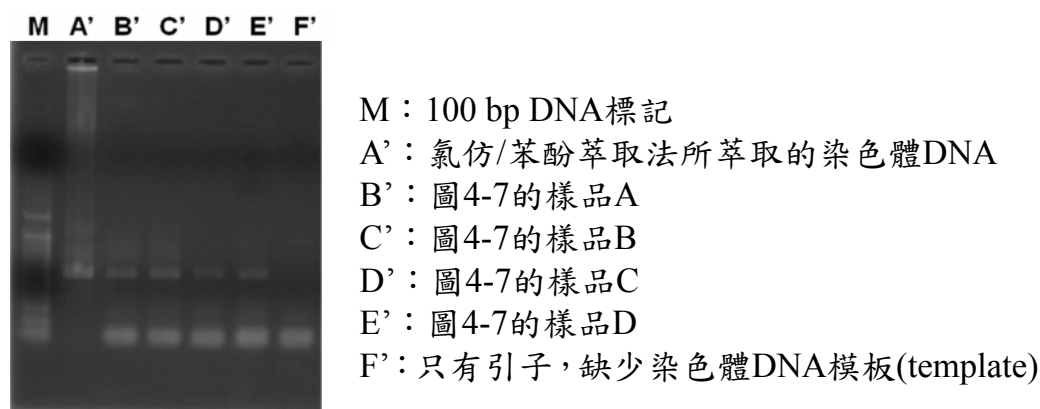
以圖十一整個流程所花費的時間不超過四十分鐘，這是磁性分離技術相較於氯仿/苯酚萃取法所提供最大的優勢，不僅操作時間短，最重要的是純化出來的DNA之純度也相當的高，可以直接進行PCR(鏈聚合反應)。圖十二是以磁性奈米粒子將染色體DNA分離出來後以電泳分析之結果，不同的條件所萃取出來的染色體DNA濃度不同；而圖十三是將圖十二所純化的染色體DNA直接進行PCR後的電泳

分析結果，進一步確認純化出來的DNA確實是染色體DNA，而不需要進行去除干擾物這個步驟，再加上圖十二的電泳確認結果，顯示出磁性奈米粒子的分離純化技術可以提供相當乾淨的樣品。矽氧化物包覆之磁性奈米粒子是利用高鹽環境時核酸吸附，低鹽環境脫附的原理進行DNA之分離純化。在高鹽環境下蛋白質本身較不易吸附至奈米粒子表面，因此當白血球被打破後僅有染色體DNA會吸附至奈米粒子表面，以及在高鹽環境下還有能力吸附在粒子表面上的少部分蛋白質，蛋白質在以70%的乙醇水溶液清洗的過程中即可被洗掉，因為乙醇可以破壞掉高鹽吸附蛋白質的作用力，讓蛋白質脫離表面，因此到最後僅有染色體基因核酸留在粒子表面。

磁性奈米粒子除了可以從人類血液中純化出染色體DNA之外，亦可以從其他複雜系統中進行類似的純化技術，例如可以從細胞(口腔黏膜細胞或唾液)、組織(老鼠尾巴、老鼠肝臟或植物組織)和細菌等將染色體DNA分離純化出來。對於基因檢測，染色體DNA的快速純化可以提供即時檢測的優勢，對於急性病症的診斷是一項莫大的助益。



圖十二 利用磁性奈米粒子從人類白血球純化染色體DNA之電泳圖



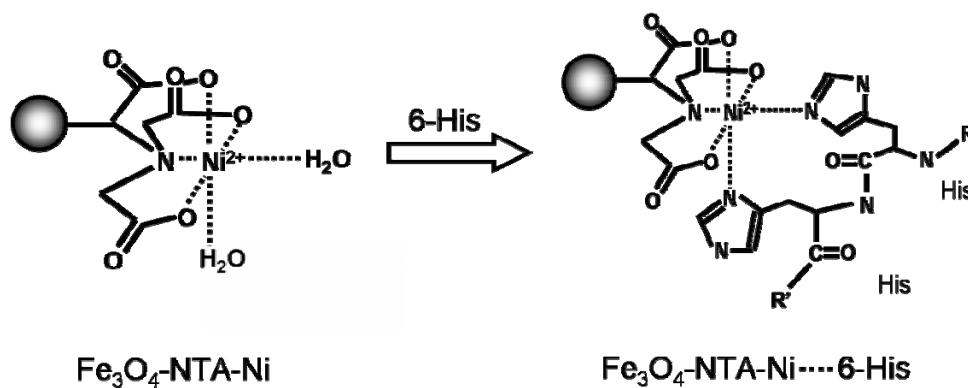
圖十三 以PCR確認純化出來的染色體DNA之電泳圖。被放大的片段序列約為500~600 bp(鹼基對)

(2)蛋白質的純化分離

蛋白質的純化與分離在蛋白質學上是一個很重要的步驟，因此如何一個複雜的系統中將目標蛋白質分離出來是蛋白質研究的首要工作，以及如何短時間內得到高純度蛋白質的方法也是一個研究熱門方向，若欲純化的蛋白質在正常條件無法維持長時間的穩定狀態，那短時間的快速純化就顯得很重要。目前用來分離及純化蛋白質的方式主要有管柱分離、膜分離(membrane)和磁珠分離，雖然管柱分離可以得到大量的蛋白質，但需要花費的時間可能從數小時到半天；而膜分離所使用的體積比管柱分離少了許多，而且時間上也縮短的很多，但缺點是非目標蛋白質的分子量與目標蛋白質接近時，兩者會一起被分離出來而造成純度降低，且有不純物存在的蛋白質，可能會影響了後續的實驗；磁珠分離(目前磁珠系統所使用的磁珠都是微米大小)則沒有類似膜分離因分子量相近而導致純度不純的問題，且所使用的樣品體積與膜分離是差不多的，同時操作時間也相當的短，因此常被用來作為蛋白質樣品的預分離或預純化工具。近幾年來，奈米級大小的磁珠才開始被使用做為磁性分離的介質^[25-28]，磁性分離中最重要的角色即是磁珠，而磁珠部分主要提供兩大功能，第一個是磁性的提供，當磁鐵靠近時馬上就可以被吸引並收集；第二個則是經過表面修飾的專一性分子，提供僅針對目標蛋白質的專一性連接。除了在特定兩個分子間有特殊的作用力(例如抗體/抗原或是avidin/biotin)之外，沒有其他類似的自然作用力可以適用於大部分的蛋白質，因此與目標蛋白質要產生高作用力的結合，為了解決此問題就必須靠修飾的動作來達到此目的，因此磁性奈米粒子表面通常會修飾胜肽鏈(peptide)、抗體或有功能性的分子探針(probe)以針對目標蛋白質進行專一性的結合。利用抗體來抓住目標蛋白質是目前最普遍使用的方式，例如用已知的蛋白質protein A或protein G來純化IgG(免疫球蛋白,immunoglobulin)，其最大的優勢是較沒有其他的生物分子會產生干擾，但缺點是當目標蛋白質不同的時候，就相對的要改變對應的抗體，也因為這個因素導致表面用抗體修飾的磁性奈米粒子較少被使用。

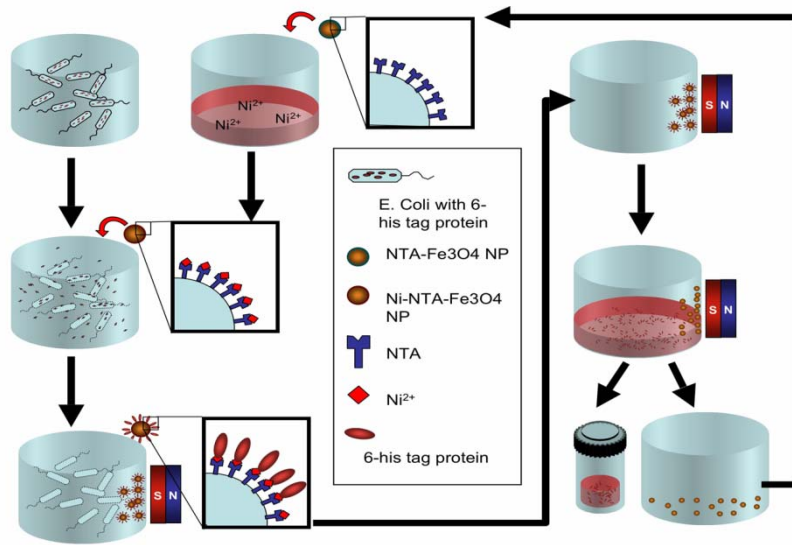
除了以生物分子間的高作用力做為分離純化的系統之外，另一個常用的系統就是(N^{α},N^{α} -Bis(carboxymethyl)-L-lysine)NTA/nickel(Ni)系統，此NTA/Ni系統是將磁性奈米粒子修飾上NTA，而目標蛋白質則須擁有6-His(組氨酸, histidine)的融合蛋白部分，由於6-His與鎳離子之間有很強的作用力，因此在大部份的環境都可以進行專一性的結合，圖十四即是修飾NTA的磁性奈米粒子與6-His蛋白質的作用示意圖。在環境中沒有6-His存在，NTA會與鎳離子形成四配位的錯合，剩下的兩個配位位置會與水分子配位；當環境中有6-His的時候，6-His的其中兩個相鄰的His分子會取代水分子與鎳離子配位，這樣的配位關

係讓鎳離子穩固地不會產生脫附的現象，且與6-His還有一定程度的作用力，當鎳離子與6-His全部配位時其作用力很強，甚至不容易再使其脫離。在圖十四的右圖，雖然僅有兩個His分子與鎳離子配位，但此時的作用力有一定的程度，在實驗條件下不容易自動脫離，因此可以穩定的存在；當然只有一個His產生配位的情況也有，但此時的結合力不夠強，在實驗條件或是一般的條件就很容易產生脫附，因此不會造成非特異性的影響。在高濃度的imidazole(咪唑)環境，咪唑分子會競爭His分子的配位位置，當兩個His分子被競爭掉後就會使蛋白質脫離粒子表面，而且咪唑的濃度越高則置換蛋白質的效率越高，但為了避免有類似結構蛋白質的非特異性結合，所以在清洗溶液中加入低濃度的咪唑，洗去非特異性吸附的結合蛋白質，然後再以高濃度咪唑作為釋放溶液將目標蛋白質從粒子表面釋放出來。



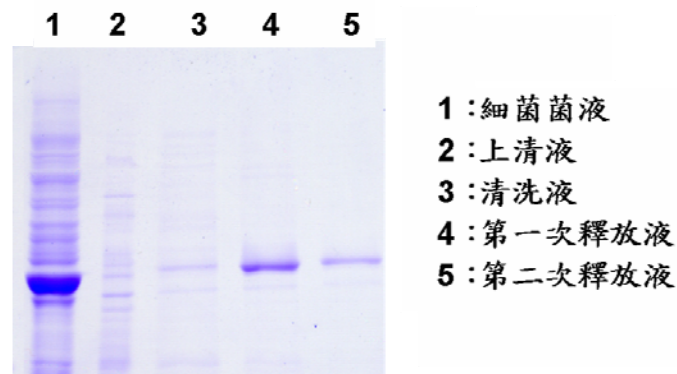
圖十四 NTA-Ni與6-His的作用示意圖。在環境中沒有6-His分子存在時，鎳離子會與兩個水分子配位，如左圖；當有6-His分子存在時，則水分子會被His分子所取代，如右圖。R、R'表示蛋白質其他部分

圖十五是利用四氧化三鐵奈米粒子結合NTA-Ni對6-His融合蛋白的分離純化示意圖：



圖十五 從大腸桿菌菌液中，以四氧化三鐵奈米粒子結合NTA-Ni對6-His融合蛋白的分離純化示意圖

此流程花費時間很短，比管柱分離方式所需要的時間少了很多，對於不穩定的蛋白質提供不錯的快速純化方式，可盡量縮短環境對蛋白質的影響。唯一注意的是利用此方法做分離純化時，需要蛋白質融合一段6-His的胜肽才能夠進行，圖十六是在複雜成份的菌液中對目標蛋白質的分離純化結果。

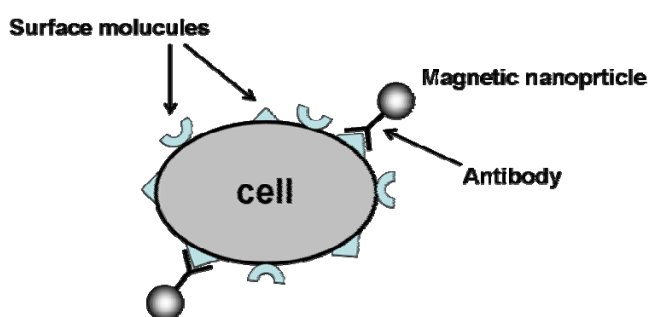


圖十六 從細菌菌液中純化目標蛋白質(分子量42 KD)的SDS-PAGE電泳圖結果

利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NTA-Ni}$ 純化分離的方式其抓取效率與目標蛋白質之分子量大小有關，分子量越大則抓取的數目越少，反之分子量越小則抓取的數目越多。利用奈米粒子的優勢是抓取效率會比微米粒子好，但在磁性方面會略差於微米粒子，因此在用磁鐵吸取磁性粒子時所花的時間會比微米粒子稍長(奈米粒子需要數分鐘，微米粒子僅需要數十秒至一分鐘)，但整體上還是比管柱分離快上許多，雖然兩種不同大小的粒子之所需時間不同，但奈米粒子的純化效率是較高的，因此整體上的優勢是奈米粒子的報酬率會比較好。

(3)細胞的純化分離

磁性分離在生物分子(蛋白質和DNA)的分離純化是一種很方便的技術，類似的概念在細胞分離方面也是有著顯著的效果，尤其是針對要從複雜系統中將稀少數目的目標細胞分離純化出來，例如Shinkai利用磁性奈米粒子從一個複雜系統中分離出目標細胞，比較其分離效率是未使用磁性分離技術的七倍。^[29]細胞的分離純化對於生物醫學上的診斷與治療是不可或缺的，典型的細胞分離技術都是在磁性奈米粒子上修飾針對目標細胞有專一性的抗體，然後透過此抗體的作用將磁性奈米粒子標記在細胞表面(圖十七所示)。不像DNA與蛋白質分離，細胞分離的效率會受到目標細胞本身在系統環境中的條件影響，以及系統中非目標細胞的種類影響。^[30,31]利用抗體分離細胞的缺點就是針對的抗原通常不只單一表現在目標細胞，因此在使用抗體進行細胞分離時，需要特別注意抗原是否在非目標細胞也會表現，否則會有兩種或以上的細胞被分離出來而造成干擾。具有特殊性質的胜肽(指針對細胞表面的某一特定分子具有專一性的結合能力)通常被用來取代抗體進行細胞分離，因為胜肽的專一性有時候比抗體更高(對於細胞分離方面而言)。



圖十七 磁性奈米粒子利用表面修飾之抗體針對細胞表面的特定抗原進行專一性的結合

近年來，癌細胞的研究非常熱門，因此對於癌細胞的分離與偵測是特別受到注意的，例如Herr就成功地利用磁性奈米粒子選擇性的將癌細胞先分離出來，然後再進行偵測的步驟^[32]，與早期使用微米大小所進行的磁性分離來做比較，Herr的結果^[33]顯示奈米粒子的分離效率及偵測結果優於微米粒子，原因是因為奈米粒子的高表面積對體積比之特性，以及尺寸小而較容易進入細胞內。細胞分離技術至目前為止已有相當成熟的發展，而類似的分離技術其實也可以用於細菌的分離，都是透過磁性分離技術將其分離出來，而磁性奈米粒子表面修飾的特殊分子之選擇與細胞分離相同，都是決定是否具有專一性將目標細菌分離的關鍵。

(4)磁性檢測應用-磁性奈米標記(探針)

磁性標記檢測是一種新穎檢測方式^[34-36]，是利用分散在水中之帶有生物探針的磁性奈米粒子來與目標生物分子結合成磁簇(cluster)後，再藉由量測這些磁簇的磁性大小來檢測目標分子在系統中的含量。因為形成磁簇之後，磁性奈米粒子結合至目標分子上所共同呈現的磁性行為與未結合到目標分子的磁性奈米粒子之行為是不相同的，未結合目標分子的磁性奈米粒子會在外加磁場消失之後，便因為熱擾動而使得磁矩的方向開始變動，而造成總磁偶極矩的減少(總磁偶極矩在有外加磁場存在時最大)，而與目標分子結合的磁性奈米粒子則因為穩定結合關係，其磁矩較不容易受到影響，因此透過總磁偶極矩的減少即可計算出結合量與未結合量，這種測量方式主要是透過磁鬆弛(magnetic relaxation)。除了磁鬆弛之外，以磁性性質偵測的常用方法還有「殘磁量偵測法」^[37]，主要是將已結合在一起的目標分子與磁性奈米粒子分離出來，將樣品抽乾製成粉末狀，然後給予外加磁場後再測量其殘磁量即可知道目標分子的數量，因為未結合目標分子的磁性奈米粒子之殘磁量為零，而與目標分子結合的奈米粒子則會有殘磁的產生，這是因為形成的團簇所造成磁矩的部份穩定化。上述提到的磁性量測主要都是以超導量子干涉儀(SQUID)來進行，此儀器對磁性強度具有非常高的敏感度，其最小可量測到 10^{-15} T(特斯拉)的磁場強度，對於樣品之解析度可達 10^{-12} 克，這也是為何磁性測量的靈敏度高於其他量測法的原因。

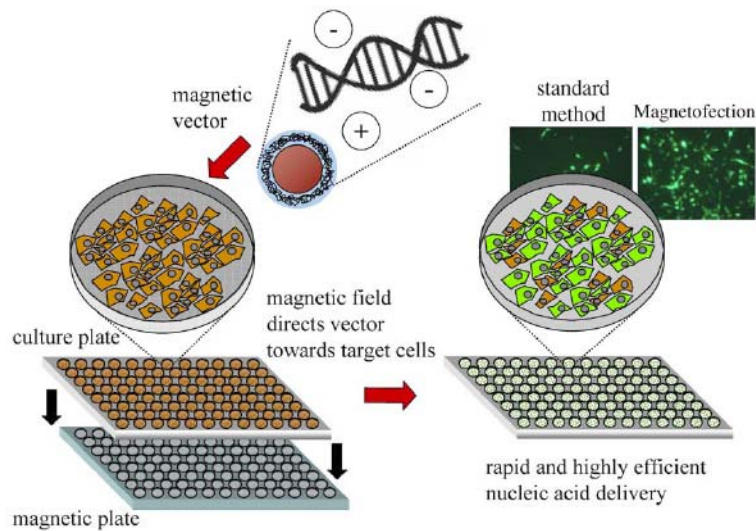
磁性檢測技術與磁性分離技術是類似的，最重要的步驟在於如何對目標分子擁有專一性的結合，但磁性檢測的專一性要求比磁性分離還要嚴格)，透過這穩固的結合，磁性奈米粒子也就牢牢地附在目標分子，提供磁性偵測的目的。磁性奈米粒子的磁性由於較不會受到環境的影響，而且很容易就可被偵測到，就好像一個標記，因此稱之為磁性標記或磁性探針，通常這些磁性標記主要都是做為生醫影像系統

的顯影劑，對於特定細胞的偵測及觀察都有相當成功的應用。要成為一個專一性良好的磁性探針，就必須在磁性探針上修飾一個具有高度專一性的物質，可能是針對細胞表面的某個特定接受器。^[38]最近幾年，因為幹細胞的生理功能而成為相當熱門的研究課題，而幹細胞目前亦可以用磁性奈米標記來做追蹤與觀察。^[40]除了幹細胞之外，神經移植^[41]、白血球細胞、單核細胞(monocyte)^[42]和T細胞^[43]也都成功地利用磁性標記作為觀察工具，其中透過單核細胞和T細胞的觀察，有助於了解各種疾病所反應出之免疫系統行為是具有很大的幫助。

5. 磁性轉殖

磁性轉殖是利用外加磁場將帶有質體(vector)DNA的磁性奈米粒子，以磁力誘導方式幫助進入細胞內部(細胞核)而達到轉殖目的。基因轉殖是生醫組織工程的一個重要課題，因為透過轉殖可以改造或是活化細胞內的染色體DNA，以達到消除疾病或缺陷的目的。為了達到此目的，磁性奈米粒子表面可能會修飾一些有助於質體DNA吸附的物質，例如具有正電荷的高分子PEI(聚乙烯亞胺，polyethylenimine)。一般的非破壞性轉殖方法主要是利用高分子聚合物、正電荷的微脂粒(liposome)或病毒的外殼^[44](已不具有高度危險性)，都是利用正、負電荷相吸的原理將質體DNA與上述物質結合在一起，以增加轉殖效率，但無論是那轉殖方式，磁性轉殖的轉殖效率都是比一般方式好上數千倍。^[45]磁性轉殖的優勢在於轉殖時間短、簡單和高轉殖效率，並且僅需要很少量的磁性奈米粒子即可有很高的轉殖效率^[46]，且磁性奈米粒子的尺寸夠小，很容易就可以以胞飲或以其他方式進入到細胞內部，較不會受到細胞的限制而無法進入，這即是轉殖效率優於其他轉殖方式的原因。^[47]

轉殖效率與表現效率是基因治療所關切的兩個項目，雖然非病毒式的轉殖方式是目前最普遍使用的方式，原因是使用上相當的安全，因為利用病毒轉殖法會有造成感染或引起免疫反應的機會，而電擊法(electroporation)則對細胞的傷害太大且轉殖效率也未能有顯著提升。然而非病毒式的轉殖法之轉殖效率也相當有限，因此帶正電荷性質的PEI或是具離胺酸(poly-lysine)被使用來增加質體DNA的吸附量，以增進轉殖效率，但這些物質進入細胞後的量超過某一程度後，就開始會顯現出毒性，對細胞會造成傷害^[48]，因此低轉殖效率及毒性的問題是基因治療上的一個難題。Xiang利用聚離胺酸包覆的磁性奈米粒子做為載體，提供保護與吸附質體DNA的功能，增加了轉殖效率。^[49]Schillingera則利用聚電解質包覆的磁性奈米粒子進行磁性轉殖，與一般的轉殖方式比較，其轉殖效率是高出很多^[50](圖十八所示)。



圖十八 磁性奈米粒子在細胞培養皿(96-well)進行磁性轉殖之流程與結果。(Reprinted with permission from ref. ^[50] Copyright Elsevier (2007))

6. 磁性奈米之生物感測技術(Magnetic nano-biosensor)

生物電子學(bioelectronics)是一門正快速發展的領域，主要是可以應用於生物感測器的製作，例如以酵素設計的感測器^[51]、免疫感測器^[52] (immunosensors)和DNA感測器^[53]；Willner發展出許多磁性感測系統，例如以具功能性之磁性奈米粒子來控制在電極界面上的電化學轉移過程或是固態支撐體(solid supports)的化學反應^[54]；另一個例子則是以外加磁場搭配生物感測器、免疫放大感測器或DNA感測器，設計成「磁控式開關」來控制電催化反應和生物電催化反應之過程。^[55] 這些磁性感應技術都是在一個複雜的系統中，利用磁性奈米粒子同時做為分離純化目標分子的工具以及與目標分子結合的測量媒介，再透過外加磁場控制磁性奈米粒子的運動行為，來控制與檢測系統中的目標分子含量。Willner等人發展出一系列的磁性感測技術平台^[55]，例如當外加磁場靠近底部的金電極時，磁性奈米粒子會因為磁性關係而被吸引至金電極表面附近，系統中因為酵素進行催化作用後會釋放一個電子，這個電子會與磁性奈米粒子上的物質(PQQ-NAD⁺)進行作用然後再釋放出另一個電子，此電子因為靠近金電極而可以經由金電極傳導出去，故可得到電流訊號或電壓訊號；反之，若將外加磁場置於系統的上方，磁性奈米粒子此時則被吸引至系統上方，此時酵素因接近

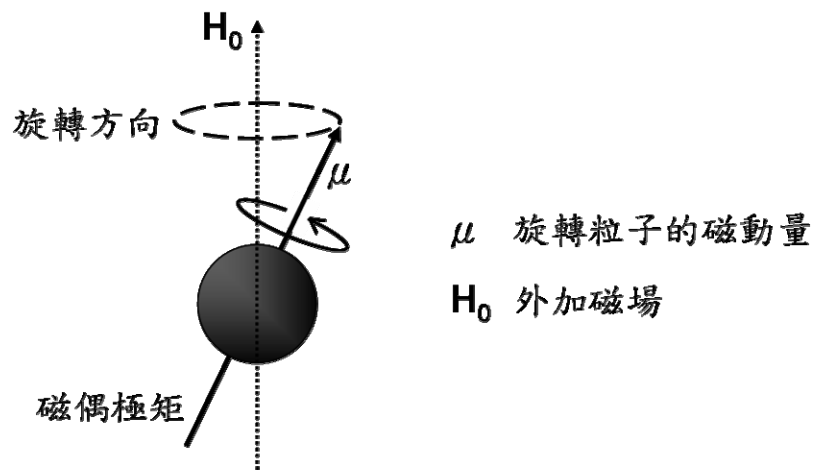
磁性奈米粒子表面上的PQQ-NAD⁺，而直接從酵素本身提供一個電子給予PQQ-NAD⁺，因此酵素無法進行催化反應，受質(substrate)將維持原來的狀態，但由PQQ-NAD⁺釋放出的電子因為距離金電極太遠，導致無法經由金電極形成一個迴路，故完全沒有電流訊號。這個例子的設計僅需要移動外加磁場的位置，即可控制電流訊號的有無，形成了所謂的開關，間接地受質的催化與否也就受到外加磁場的控制，相對所產生了電流或電壓的變化值。

7.磁共振造影(Magnetic Resonance Imaging)

磁共振造影簡稱「MRI」，在1973年時由Lauterbut所發明的，自MRI發明以來，目前已成為醫學界臨床診斷上的利器。由於照射能量低，對人體掃描並無任何副作用，而且在影像的擷取過程中可以自由選擇，獲得各種不同影像的效果，其中最重要的是提供了可以任意觀察立體影像的莫大優勢，這個優勢帶給醫生更容易診斷病情，尋找出病因以對症下藥，這些優勢是電腦斷層掃描(CT)所無法辦到的，故MRI已漸漸完全取代電腦斷層掃描在醫學臨床診斷上的地位。以目前的MRI技術已經可以偵測到單一細胞，其進步的速度相當驚人，同時MRI也是目前很熱門的研究方向，相關的研究發表每一年增加的非常迅速，不論是針對人體的那個部位都有相當多的研究發表，同時也設計許多新穎的偵測技術為達到更好、更靈敏、更準確的影像診斷。MRI對於人體的任何部位幾乎都可以量測，甚至還可以做到只針對某組織區域顯影，這個優點對於癌細胞的偵測是相當有幫助的，甚至有可能在很早期就可以發現並予以治療或預防。

(1)磁共振造影的基本原理

氫核的自旋在MRI原理中佔很重要的部份，MRI的基本原理是先利用外加磁場使原子磁矩具有相同的極化方向，接著引入磁場脈衝觀察原子磁矩的對磁場的反應。人體內含有大量的蛋白質、脂肪、水等，因此人體內的氫原子數目有無數個，每個氫原子核都只有一個質子，質子帶有電荷且不停的旋轉，電荷旋轉就好像電磁鐵的運動，會產生感應電流，因此氫原子擁有一個磁動量。圖十九是氫原子核的轉動示意圖：



圖十九 氫原子核的自旋

在無外加磁場的狀況下，氫核本身會有一個磁偶極矩或是磁動量，會與中心軸線偏斜一個角度。當有外加磁場 H_0 的作用，氫核會吸收能量而磁矩的方向會開始排列成與磁場方向相同；當磁場關掉後氫核釋出能量，磁矩又會慢慢恢復至原來的位置，這個過程的變化可透過訊號收集器並轉換成影像呈現，這就是MRI影像的基本呈像原理。由於氫原子對於核磁共振現象具有高度的靈敏度，而人體各部位器官與組織又有高度的水含量，因此水分子的訊號即成為磁共振造影所偵測的主要對象。

(2) 影響MRI訊號強度的因素

在MRI中有幾個重要的基本參數，都與影像的呈現有相對的關係，這些參數分別敘述如下：

A. 弛緩時間 T_1 和 T_2 (Relaxation Time):

MRI的影像因為訊號不同而有強弱之分，其中以遲緩速率的關係最為密切。在熱平衡的狀況下，氫原子核皆以波茲曼分佈定律分佈，其淨磁矩的方向與外加磁場相同，經過另一外加磁場的干擾，磁矩的方向會偏離成一個角度，此時將干擾之磁場關閉，淨磁矩會慢慢釋放多餘的能量，並恢復至熱平衡的狀態，這個過程即稱為「弛緩」。

(Relaxation)」。

(A)自旋—晶格弛緩(Spin-Lattice Relaxation, T_1)

這一遲緩過程中，受到激發的原子核將多餘的能量放出，使其轉成晶格的運動能並回復到原狀態。

(B)自旋—自旋弛緩(Spin-Spin Relaxation, T_2)

受激發的原子核與其他原子核之間的能量會互相轉讓，因此核的能量可以在短時間內分散而回復到熱平衡系統。

不論 T_1 或是 T_2 其本身的倒數稱為遲緩速率(Relaxivity)，分別以 r_1 和 r_2 表示。 T_1 與 T_2 的單位是時間，但 r_1 與 r_2 的單位通常是以秒與體積莫耳濃度的乘積倒數($S^{-1}M^{-1}$)來表示，這是將濃度因素的影響也考慮進來，因為濃度不同時也可能會得到不同的 T_1 和 T_2 。

B. T_1 加權影像與 T_2 加權影像

T_1 加權影像即是 T_1 -weighted image、 T_2 加權影像即是 T_2 -weighted image，因為 T_1 與 T_2 是屬於與時間有關的時間參數，在意義上只是一個時間數字，從數字來辨別訊號的差異會較不方便，因此將 T_1 與 T_2 轉換成影像參數，就是所謂的 T_1 和 T_2 加權影像，呈現出來的結果就是顏色深淺不同、對比明顯的影像，透過影像可以比利用時間參數更容易判斷。

(3)顯影劑(contrast agent)

所謂的顯影劑乃是能夠增加不同組織間的明暗對比，或是可以使病變組織與其週遭環境之對比突顯出來，以增加影像判斷之助益。顯影劑的作用是藉由本身的順磁性性質改變了某特定組織內水分子的弛緩時間、增加與其他組織間弛緩時間的差異性、增加訊號強度的強弱差別、增強明暗對比效果，以達到突顯組織間分界的目的。近年來超順磁材料慢慢被發產成為顯影劑的主要成分，並以四氧化三鐵或是三氧化二鐵磁性奈米粒子為主，其優點在於氧化鐵磁性奈米粒子在體內沒有產生毒性的高風險，而且顯影效果亦相當的好。由於氧化鐵磁性奈米粒子本身即擁有順磁性，因此可以在表面進行修飾或是官能基衍生的動作，在針對某些特定組織欲做觀察時，便可以達到有選擇性顯影的效果。

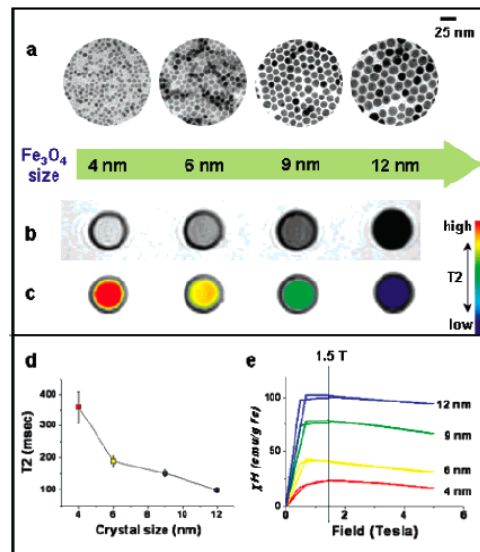
根據顯影劑的特性可以分成正相顯影劑(positive contrast agent)和反相顯影劑(negative contrast agent)兩種，正相顯影劑會使影像比正常狀態下更為明亮變白，而反相顯影劑會使影像轉為灰暗變黑。這是因為正相顯影劑主要是影響 T_1 的值，而反相顯影劑是影響 T_2 的值，而欲成為MRI的顯影劑主要須具備下列一些條件：

- A. 高順磁性
- B. 穩定、不易分解
- C. 容易排出體外且不會殘留體內

- D.無毒性
- E.對人體不會產生不良影響
- F.僅需很少量即可有效增加影像對比
- G.價格便宜

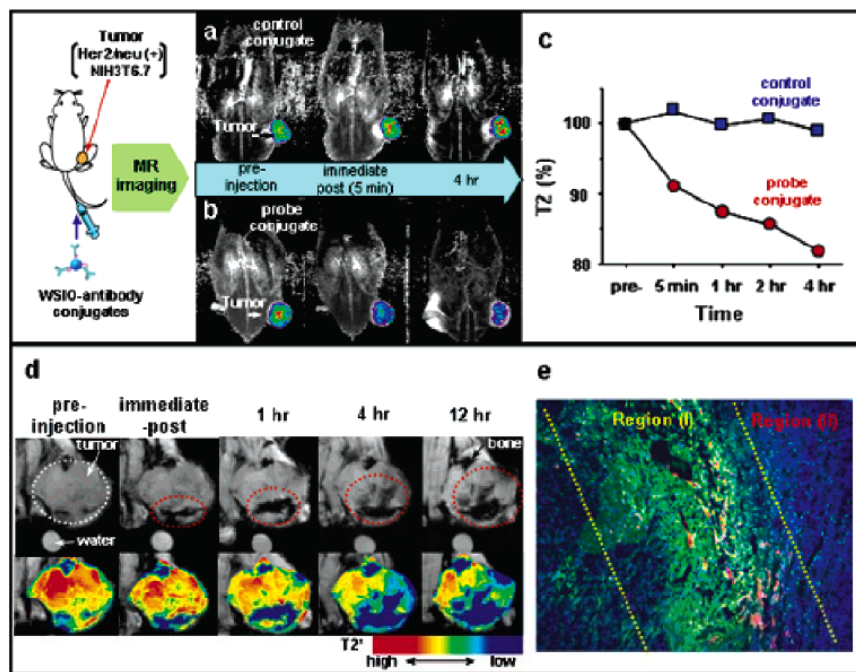
目前發展的顯影劑除了上述幾項主要條件外，另外也開始著重顯影劑本身的多樣性和變化性，目的在於做到專一性的顯影以及同時具有治療的功能。^[56-62]

MRI目前使用的磁性奈米粒子主要都是氧化鐵奈米材料，其中更以四氧化三鐵為主，因為氧化鐵具有無毒性和生物相容性，對於生物體提供相當的安全性。為了增加氧化鐵奈米粒子的生物相容性或水溶性，利用高分子包覆在其表面是很常用的方法，但包覆後的粒徑通常不超過50nm才是適合，因為粒徑大小會影響到在體內的行為模式，例如組織分佈或是藥物動力學行為，而典型的高分子有葡萄聚醣(dextran)、澱粉、白蛋白(albumin)、矽化合物(silicon)或聚丙烯醯胺(polyacrylamide)。氧化鐵奈米粒子是屬於影響 T_2 參數的顯影劑，因此氧化鐵奈米粒子的粒徑大小將影響到 T_2 的變化，在使用上將必須考慮粒徑之因素，Jun等人提供一系列不同粒徑的水溶性四氧化三鐵，研究其對 T_2 加權影像與 T_2 遲緩時間的尺寸效應^[63](圖二十所示)。



圖二十 (a)四氧化三鐵奈米粒子(4nm、5nm、9nm、12nm)之TEM圖。(b)各粒徑之四氧化三鐵在磁場1.5T下的 T_2 加權影像。(c)四氧化三鐵之尺寸效應對 T_2 的影響，根據量測的 T_2 值所轉換之 T_2 色碼圖。(d) T_2 值對四氧化三鐵粒徑變化之關係圖。(e)以SQUID測量不同粒徑之四氧化三鐵的磁化率。(Reprinted with permission from ref. ^[63] Copyright(2007) American Chemical Society)

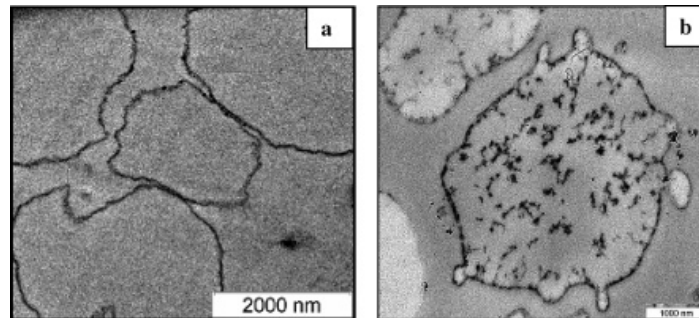
利用MRI來偵測大分子的分子影像是目前熱門的應用之一，而為了達到此目的，在顯影劑上就必須連接特定分子，這些特定分子會針對特定的目標物進行專一性的連結，導致在目標處的訊號與非目標處的訊號有明顯的差異；類似的方式，細胞的MR顯影也是可以透過顯影劑的修飾，來凸顯目標細胞與其他區域的對比。Huh等人^[64]利用相同的策略偵測異種皮移植(xenograft)老鼠的癌細胞，主要是利用有修飾Herceptin(anti Her2/neu的抗體)的磁性奈米粒子於高磁場下(9.4T)來觀察體內目標癌細胞的行為過程；圖二十一即是Huh的實驗示意圖，利用兩個抗體，一個是對NIH3T6.7癌細胞沒有專一性的抗體做為控制組，另一個是對NIH3T6.7癌細胞有專一性的抗體(Herceptin)作為實驗組，比較圖二十一(a)與圖二十二(b)可以清楚看到針對目標癌細胞偵測的專一性；此專一性的結合對於 T_2 的變化量有很大的影響，圖二十一(c)為分別在不同時間點所量測的 T_2 值；在顯影方面隨著時間的不同，相同的也可以看到累積在目標癌細胞區域的磁性奈米粒子，隨著時間的增加，顯現目標癌細胞區域的範圍也隨之增加，因此可以了解整個癌細胞組織的大小(圖二十一(d))。圖二十一(e)是將癌細胞組織切片利用免疫螢光法來偵測的結果，區域I是癌細胞組織的主要區域，而區域II是正常組織，因為標記螢光分子的抗體僅對目標癌細胞有專一性，因此僅區域I可以看到有螢光反應。



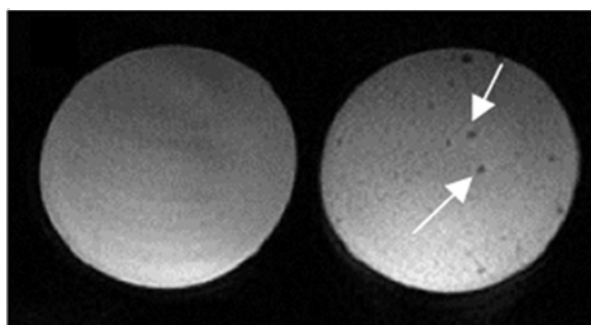
圖二十一 利用抗體修飾之磁性奈米粒子以MR檢測癌細胞組織之實驗示意圖及其結果。(a)、(b)非專一性與專一性抗體之磁性奈米粒子在不同時間點(注射前、立即注射後5分鐘、注射4小時後)的MR圖，顏色表示 T_2 加權影像值的

高低，紅色到藍色表示數值高到數值低。(c)非專一性與專一性抗體之磁性奈米粒子在不同時間點所量測的 T_2 值。(d)專一性抗體之磁性奈米粒子在不同時間點所量測的 T_2^* 加權影像及色溫圖。(e)螢光免疫偵測法偵測癌細胞組織切片之影像圖，區域I有大量的螢光(綠色)反應，區域II為正常組織因此沒有螢光反應。(Reprinted with permission from ref.^[64] Copyright(2007) American Chemical Society)

許多研究已經建立起以MR來偵測癌細胞組織的平台，可以準確的將癌細胞組織的大小及分佈都顯現出來，並觀察其行為模式，這有助於診斷與治療的參考資料，相同的概念，不僅癌細胞組織可以被偵測，幹細胞^[65]、目標分子^[66]或目標病變組織^[67]都可以透過MR做偵測，例如Jendelova等人^[66]以磁性奈米粒子標記在幹細胞上，即可以MR來觀察其移動行為模式。而Brahler等人^[67]則將氧化鐵奈米粒子送入到紅血球細胞(RBCs)內部(圖二十二)，發現正常紅血球細胞的 T_2 值是210毫秒，而內含氧化鐵奈米粒子的紅血球細胞之 T_2 值為12毫秒，而 T_1 的變化則由1790毫秒(正常紅血球細胞)減少至55.4毫秒(內含氧化鐵奈米粒子的紅血球細胞)。從圖二十三中可以看到被植入氧化鐵奈米粒子的紅血球細胞在MR下的顯影，而自然的紅血球細胞則沒有明顯訊號，這些含有氧化鐵奈米粒子的紅血球細胞會隨著血液循環經過全身，因此可以做為追蹤或觀察其生理行為的媒介。

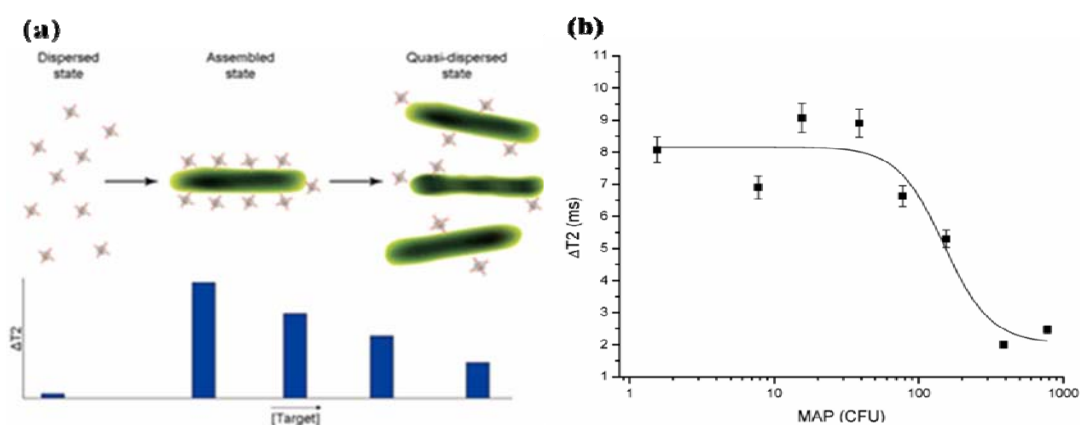


圖二十二 紅血球細胞之TEM圖。(a)自然的紅血球細胞；(b)被植入氧化鐵 奈米粒子的紅血球細胞。(Reprinted with permission from ref^[68]. Copyright(2007) American Chemical Society)



圖二十三 紅血球細胞之MRI顯影。左圖為自然的紅血球細胞；右圖箭號指的部分為被植入氧化鐵奈米粒子的紅血球細胞。
(Reprinted with permission from ref.^[68] Copyright(2007) American Chemical Society)

MRI的應用除了提供影像之外，有部分研究以磁性奈米粒子做為探針，並利用MRI做為檢測工具，例如Kaittanis等人^[68]利用磁性奈米粒子來偵測鮮奶(whole milk)中的MAP(鳥分枝桿菌副結核亞種)細菌，此細菌被證實在隆氏症(Crohn's disease)或菌血症(bacteremia)患者的血液中被發現。因為磁性奈米粒子會自動的吸附在細菌表面而形成聚集狀態，此聚集狀態會影響到 T_2 值，因此若細菌的量越多，則聚集的程度越大，故 T_2 的改變量也隨之增加。圖二十四(a)即是以MRI偵測細菌的示意圖；而圖二十四(b)則是細菌數目對 T_2 改變量的關係圖，其結果微細菌數目需有15.5 CFUs才能有效地被偵測出來。



圖二十四 (a)以磁性奈米粒子利用MRI偵測細菌之示意圖。(b)磁性奈米奈針-細菌濃度對 T_2 改變量之關係圖(樣品為鮮奶，溫度為37°C)。
(Reprinted with permission from ref.^[68] Copyright(2007) American Chemical Society)

MRI顯影是目前最有潛力的影像診斷儀器，除了提供三度空間的影像系統之外，最重要的是可以偵測到分子級的影像，當結合磁性奈米粒子所提供的獨有特性，對於偵測、診斷與醫療三部分都可以同時辦到，給予醫療的判斷提供很大的助益。MRI的相關研究相當的廣，不論是組織的顯影、生物分子的偵測和觀察都是熱門的課題，因此MRI將是現在與未來生物醫學所重視的一門領域。

五、結論

磁性奈米粒子的發展在近十年來進步的相當迅速，從早期的材料製備到現在的應用發展，同時間內也是從材料領域跨足到生物醫學、微機電、機械…等不同領域的成長，尤其是在生物醫學方面，是所有領域中發展最快且也最受到重視的一環。目前最熱門的研究方向是MRI的相關領域，不僅結合當前的生物技術也同時發展出嶄新的技術。現今的MRI不再只是單純影像的觀察，而是追求同時兼具治療、標定與功能性的目標，例如結合螢光分子的優勢，可以同時做到顯影以及光學偵測的目的，提供影像的準確性。各種不同目的、不同功能的顯影劑陸續被發表出來，針對各種組織、部位的顯像都有許多的研究成果顯示其優異性，幹細胞的偵測也是MRI很受到矚目的研究之一。MRI儀器目前漸漸成為醫院的必備儀器之一，不論是治療診斷或是學術研究都提供了相當大的幫助。

氧化鐵磁性奈米粒子在其他方面的應用也是值得注意的，從早期蛋白質等生物分子的純化分離，到現在做為生物感應器(biosensor)，甚至做為分子元件(molecular device)或是分子電腦等的概念都已經有初步的研究顯示其應用性，Williner在此方面的研究非常有經驗，發展出一套偵測系統並進行一系列的生物感測器模型測試，並在最近發展出分子邏輯的類電腦元件。Williner將氧化鐵磁性奈米粒子結合生催化反應以及光反應來設計感應器系統，透過電流值的改變或是電壓值的改變作為輸出訊號，並搭配懸臂系統來轉成並放大訊號值，完成了許多生物分子反應的感測系統。不同功能性的氧化鐵磁性奈米粒子仍不斷的被發表，設計的目的也趨向於多元化，應用在各個領域的例子不勝枚舉。

奈米化的時代在各個領域都將有嶄新的突破與發展，在醫療方面是最受人關注的一點，微小化治療透過磁性奈米粒子的特性，可以正確地到達目的地，並完成所賦予的使命，改善了以往因尺寸關係而被限制的技術層面，在臨床上提供了一種新型的治療方式。研究腫瘤的標定、治療及追蹤是佔最大部份，基因治療也是重點之一，但在某些方面還是遭遇到棘手的問題，例如腦部的顯影是MRI目前較弱的一個

部份，原因是來自於大部分的顯影劑無法通過腦血管壁障礙 (blood-brain-barrier, BBB) 所以無法有效顯影，加上腦部血管細微，因此顯影劑的要求會更高。幹細胞的研究也有人嘗試以MRI來做觀測、追蹤的工具，透過MRI的強大優勢來揭開生命中扮演著最重要角色的行為，這將是未來的一大突破。

六、主要參考文獻

1. Stephen, O., L. Brus and C. B. Murray. 2001. Synthesis of Monodisperse Nanoparticles of Barium Titanate: toward a generalized strategy of oxide nanoparticle synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 123:12085-12086.
2. Sun, S., H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang and G. Li. 2004. Aligned inclusion of hemicyanine dyes into silica zeolite films for second harmonic generation *J. Am. Chem. Soc.* 126: 673-682.
3. Redl, F. X., C. T. Black, G. C. Papaefthymiou, R. L. Sandstrom, M. Yin, H. Zeng, C. B. Murray and S. P. O. Brien. 2004. Insight into G-T mismatch recognition using molecular dynamics with time-averaged restraints derived from NMR spectroscopy *J. Am. Chem. Soc.* 126: 583-590.
4. Deng, H., X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen and Y. Li. 2005. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres. *Angew. Chem.* 117:2842-2845.
5. Paul, B. K. and S. P. Moulik. 2001. Uses and applications of microemulsions. *Curr. Sci.* 80:990-1001.
6. Wang, X., J. Zhuang, Q. Peng and Y. Li. 2005. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature.* 437:121-124.
7. Ohnishi, M., Y. Kozuka, Q. L. Ye, H. Yoshikawa, K. Awaga, R. Matsuno, M. Kobayashi, A. Takahara, T. Yokoyama, S. Bandow and S. Iijima. 2006. Phase selective preparations and surface modifications of spherical hollow nanomagnets. *J. Mater. Chem.* 16:3215-3220.
8. Jia, C. J, L. D. Sun, Z. G. Yan, L. P. You, F. Luo, X. D. Han, Y. C. Pang, Z. Zhang and C. H. Yan. 2005. Single-crystalline iron oxide nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:4328-4333.
9. Woo, K., H. J. Lee, J.-P. Ahn and Y. S. Park. 2003. Sol-gel mediated synthesis of Fe₂O₃ nanorods. *Adv. Mater.* 15:1761-1764.
10. Yang, W. H., C. F. Lee, H. Y. Tang, D. B. Shieh and C. S. Yeh. 2006. Iron oxide nanopropellers prepared by a low-temperature solution approach. *J. Phys. Chem. B.* 110:14087-14091.
11. Wu, P. C., W. S. Wang, Y. T. Huang, H. S. Shen, Y. W. Lo, T. L. Tsai,

- D. B. Shieh and C. S. Yeh. 2007. Porous iron oxide-based nanorods developed as nanocapsules for delivery purposes. *Chem. Eur. J.* 13:3878-3885.
12. Ansil, D., L. Katja, N. Mayumi, W. Seung, C.S. Chang, V. P. M. Kurikka, U. Shafi, C. Mary and AG. Richard. 2003. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 125:1684-1685.
 13. Huang, S. H., M. H. Liao and D. H. Chen. 2003. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 19:1095-1100.
 14. Hari, M. R. G., M. Deendayal, D. S. Philip, Y. Max and G. Yong. 2005. Superparamagnetic nanoparticle-supported enzymatic resolution of racemic carboxylates. *Chem. Commun.* 35:4432-4434.
 15. Meldum, F. C., B. R. Heywood and S. Mann. 1992. Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein. *Science.* 257:522-523.
 16. Bahar, T. and S. Celebi. 2000. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). *Enzyme. Microb. Technol.* 26:28-33.
 17. Chen, W. F. and Y. C. Chen. 2007. Acceleration of microwave-assisted enzymatic digestion reactions by magnetite beads. *Anal. Chem.* 79:2394-2401.
 18. Lin, P. C., M. C. Tseng, A. K. Su, Y. J. Chen and C. C. Lin. 2007. Functionalized magnetic nanoparticles for small-molecule isolation, identification, and quantification. *Anal. Chem.* 9:3401-3408.
 19. Suzuki, M., M. Shinkai, M. Yanase, A. Ito, H. Honda and T. Kobayashi,. 1999. Enhancement of uptake of magnetoliposomes by magnetic force and hyperthermic effect on tumor. *Jpn. J. Hyperthermic. Oncol.* 15:79-87.
 20. Shinkai, M. J. 2002. Functional magnetic particles for medical application. *J. Biosci. Bioeng.* 94:606-613.
 21. Baker, I., Q. Zeng and C. R. Sullivan. 2006. Heat deposition in iron oxide and iron nanoparticles for localized hyperthermia. *J. Appl. Phys.* 99:08H106-08H109.
 22. Ito, A., Y. Kuga, H. Honda, H. Kikkawa, A. Horiuch, Y. Watanabe and T. Kobayashi. 2004. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Letters.* 212:167-175.
 23. Kim, D. H., S. H. Lee, K. H. Im, K. N. Kim, K. M. Kim, I. B. Shim, M. H. Lee and Y. K. Lee. 2006. Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Current. Applied. Physics.* 6S1:e242-e246.
 24. Zhang, Z., L. Zhang, L. Chen, L. Chen and Q. H. Wan. 2006. Synthesis of novel porous magnetic silica microspheres as adsorbents

- for isolation of genomic DNA. *Biotechnol. Prog.* 22:514-518.
25. Nagatani, N., M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayashi. 2000. Gene delivery for genetically engineered mucosal cells with enhanced function. *Biotechnol. Lett.* 22:999-1002.
 26. Davids, M. J., J. I. Taylor, N. Sachsinger and I. J. Bruce. 1998. Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent. *Anal. Bioch.* 262:92-94.
 27. Tong, X. D., B. Xue and Y. Sun. 2001. A novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification. *Biotechnol. Prog.* 17:134-139.
 28. Gu, H., K. Xu, C. Xu and B. Xu. 2006. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun.* 941-949.
 29. Shinkai, M. J. 2002. Functional magnetic particles for medical application. *J. Biosci. Bioeng.* 94:606-613.
 30. Comella, K., M. Nakamura, K. Melnik, J. Chosy, M. Zborowski, M. A. Copper, T. A. Fehniger, M. A. Caligiuri and J. J. Chalmers. 2001. Effects of antibody concentration on the separation of human natural killer cells in a commercial immunomagnetic separation system. *Cytometry.* 45:285-293.
 31. Nakamura, M., K. Decker, J. Chosy, K. Comalla, K. Melnik, L. Moore, L. C. Lasky, M. Zborowski and J. J. Chalmers. 2001. Separation of a breast cancer cell line from human blood using a quadrupole magnetic flow sorter. *Biotechnol. Prog.* 17:1145-1155.
 32. Herr, J. K., J. E. Smith, C. D. Medley, D. Shangguan and W. Tan. 2006. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer Cells. *Anal.Chem.* 78:2918-2924.
 33. Gu, H., P. L. Ho, K. W. T. Tsang, L. Wang and B. Xu. 2003. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture vancomycin-resistant enterococci and other gram-positive bacteria at ultralow concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 125:15702-15703.
 34. Bauer, J. 1999. Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J. Chrom. B. Biomed. Sci. Appls.* 722:55-69.
 35. Jiang, W. Q., H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C. Chen and C. Y. Hong. 2004. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J. Magn. Magn. Mater.* 283:210-214.
 36. Horng, H. E., C. Y. Hong, S.Y. Yang, H. C. Yang, S. H. Liao, C. M. Liu and C. C. Wu. 2006. Magnetic nanoparticles and their applications in immunoassay. *J. Korean Phys. Soc.* 48:999-1003.
 37. Enpuku, K., T. Minotani, T. Gima, Y. Kuroki, Y. Itoh, M. Yamashita, Y. Katakura, and S. Kuhara. 1999. Detection of magnetic

- nanoparticles with superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometer and application to immunoassays. *Jpn. J. Appl. Phys.* 38:L1102-L1105.
38. Bulte, J. W., D. L. Kraitchman. 2004. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR. Biomed.* 17:484-499.
 39. Weissleder, R., A. S. Lee, B. A. Khaw, T. Shen and T. J. Brady. 1992. Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. *Radiology.* 182:381-385.
 40. Horak, D., M. Babic, P. Jendelova, V. Herynek, M. Trchova, Z. Pientka, E. Pollert, M. Hajek and E. Sykova. 2007. D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate. Chem.* 18:635-644.
 41. Hawrylak, N., P. Ghosh, J. Broadus, C. Schlueter, G. Carol and T. William et al. 1993. Nuclear magnetic resonance (NMR) imaging of iron oxide-labeled neural transplants. *Exp. Neurol.* 121:181-192.
 42. Zelivyanskaya, M. L., J. A. Nelson, L. Poluektova, M. Uberti, M. Mellon, H. E. Gendelman and M. D. Boska. 2003. Tracking superparamagnetic iron oxide labeled monocytes in brain by high-field magnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Res.* 73:284-295.
 43. Anderson, S. A., E. K. Jordon, A. S. Arbab, R. Martin, H. Mcfarland and J. A. Frank. 2004. Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 55:654-659.
 44. Felgner, J. H., R. Kumar and C. N. Sridhar. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 269:2550-2561.
 45. Scherer, F., M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, G. Gansbacher and C. Plank. 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene. Ther.* 9:102-109.
 46. Krotz, F., C. Wit, H. Y. Sohn, S. Zahler, T. Gloe, U. Pohl and C. Plank. 2003. Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 7,:700-710.
 47. Marshall, J. 1995. The trouble with vectors. *Science.* 269:1015-1055.
 48. Liu, F., H. Qi and L. Huang. 1997. Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum. Gene. Ther.* 8:177-185.
 49. Xiang, J. J., J. Q. Tang, S. G. Zhu, X. M. Nie, H. B. Lu, S. R. Shen, X. L. Li, K. Tang, M. Zhou and G. Y. Li. 2003. IONP-PLL: a novel non-viral vector for efficient gene delivery. *J. Gene. Med.* 5:803-817.
 50. Schillingera, U., T. Brilla, C. Rudolphb, C. Huthb, S. Gerstingb, F. Krotzc, J. Hirschbergerd, C. Bergemanne and C. Plank. 2005.

- Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* 293:501-508.
51. Willner, I. and E. Katz. 2000. Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern - Systeme für bioelektronische Anwendungen. *Angew. Chem.* 112:1230-1269.
 52. Willner, I. and E. Katz. 2000. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:1180-1218.
 53. Warsinke, A., A. Benkert and F. W. Scheller. 2000. Electrochemical immunoassays. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366:622-624.
 54. Willner, I. and B. Willner. 2001. Biomaterials integrated with electronic elements: en route to bioelectronics. *Trends. Biotechnol.* 19:222-230.
 55. Willner, I. and E. Katz. 2003. Magnetic control of electrocatalytic and bioelectrocatalytic processes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4576-4588.
 56. Hun, Y. M., Y. W. Jun, H. T. Song, S. Kim, J. C. Choi, J. H. Lee, S. Yoon, J. S. Shin, J. S. Suh and J. Cheon. 2005. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 12387-12391.
 57. Jun, Y. W., Y. M. Hun, J. C. Choi, J. H. Lee, H. T. Song, S. Kim, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Suh, J. Cheon, 2005. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 5732-5733.
 58. Veishe, O., C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbonge, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson and M. Zhang. 2005. Optical and MRI multifunctional Nnanoprobe for targeting gliomas. *Nano. Lett.* 5:1003-1008.
 59. Perez, J. M., F. J. Simeone, A. Tsourkas, L. Josephson and R. Weissleder. Peroxidase substrate nanosensors for MR imaging. 2004. *Nano. Lett.* 4:119-122.
 60. Son, S. J., J. Reichel, B. He, M. Schuchman and S. B. Lee. 2005. Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 127:7316-7317.
 61. Kohler, N., G. E. Fryxell and M. Zhang. 2004. A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. *J. Am. Chem. Soc.* 126:7206-7211.
 62. Hode, K., M. Luck, W. Schroder, W. Semmler, T. Blunk, R. H. Muller and M. Kresse. 1997. The influence of the sample preparation on plasma protein adsorption patterns on polysaccharide-stabilized iron oxide particles and N-terminal microsequencing of unknown proteins. *J. Drug. Target.* 5:35-43.

63. Lu, C. W., Y. Hung, J. K. Hsiao, M. Yao, T. H. Chung, Y. S. Lin, S. H. Wu, S. C. Hsu, H. M. Liu, C. Y. Mou, C. S. Yang, D. M. Huang and Y. C. Chen. 2007. Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling. *Nano. Lett.* 7:149-154.
64. Lee, J. H., Y. W. Jun, S. I. Yeon, J. S. Shin and J. Cheon. 2006. Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:8160-8162.
65. Hu, F., L. Wei, Z. Zhou, Y. Ran, Z. Li and M. Gao. 2006. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. *Adv. Mater.* 18:2553-2556.
66. Jendelova, P., V. Herynek, J. DeCroos, K. Glogarova, B. Andersson, M. Hajek and E. Sykova. 2003. Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 50:767-776.
67. Brahler, M., R. Georgieva, N. Buske, A. Muller, S. Muller, J. Pinkernelle, U. Teichgraber, A. Voigt and H. Baumler. 2006. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano. Lett.* 6:2505-2509.
68. Kaittanis, C.S.A. Naser and J. M. Perez. 2007. One-step, nanoparticle-mediated bacterial detection with magnetic relaxation. *Nano. Lett.* 7:380-383.

第四章 量子點在生醫之應用

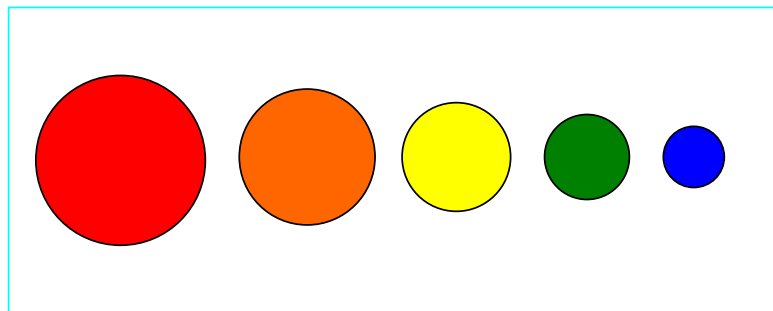
王國禎教授 國立中興大學機械系

奈米科技與生物及醫學之整合將對醫學診斷、治療、分子生物、生物工程等領域帶來巨大之影響。^[1,2] 近年來，相關研究人員在功能性奈米顆粒(電子、光學、磁性)之研發已有相當大之進展^[3-14]，此些功能性奈米顆粒能以共價方式與蛋白質、核酸、peptides等生物分子相連結。由於顆粒之尺寸大小與生物巨分子相似，加上隨粒徑大小不同而改變之光電特性，功能性奈米顆粒已被公認最適合做為磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)之對比標誌^[15-17]、藥物輸送(drug delivery)載體、醫學植入與組織工程之奈米結構塗層與支架(scaffold)。^[18, 19] 在本章中，我們將進一步探討奈米量子點(quantum dots)在奈米生醫之應用。

一、奈米量子點

奈米量子點為乃是一種奈米晶體(nanocrystals)，由於受到能量屏障之作用，其三個維度皆被限制在100 nm以下(零維奈米材料)，電子與電洞會被侷限在微小晶體內，再結合之機率大，發光效率亦相對增加。

對單一原子而言，最外層電子與最內層電子佔據軌域間之能量差即是原子之能隙(band gap)，當塊材大幅減小至奈米尺度時，其所含原子數大幅減少，能階密度(density of states)降低，能階間隔增大，有效能帶增大。半導體量子點在光之激發能超過其能隙時會吸收光子，電子由共價帶(valence band)跳至導電帶(conduction band)，當導電帶之電子回到共價帶時，則會放出螢光。有效能帶增大之奈米粒子，其相對應之吸收光譜與螢光光譜會發生藍移(blue-shift)，因而在能帶中形成一系列分離之能階，顆粒變小能隙變寬，其吸收光往短波長移動^[20, 21]，如圖一所示。



圖一、CdSe顆粒尺寸變小，能隙變寬，螢光光譜朝短波長移動

量子點能隙與其顆粒尺寸之線性關係可以“被侷限於盒中之單一粒子”來進一步說明。盒外之位能接近無限大，因此，可移動之帶電質點(類似盒中之粒子)將被侷限於奈米晶格(類似盒子)中，而具有離散之波函數與能階，當盒子縮小後，其能隙將增加，例如大小為2.5nm與5.5nm之CdSe顆粒，其激發螢光波長分別為500nm與620nm。材料不同其螢光激發波長亦不同，例如InP與InAs之激發螢光為遠紅外光與近紅外光^[22-25]，CdS與ZnSe之激發螢光為藍光與近紫外光。

二、量子點製備

半導體量子點(例如CdSe、CdTe、CdS、ZnSe、InP、InAs)基本上是週期表中I-VII、II-VI、III-V等不同族元素之組合，其製程與一般奈米材料相似，分述如下。

(一)氣相凝結法(Vapor phase epitaxy, VPE)

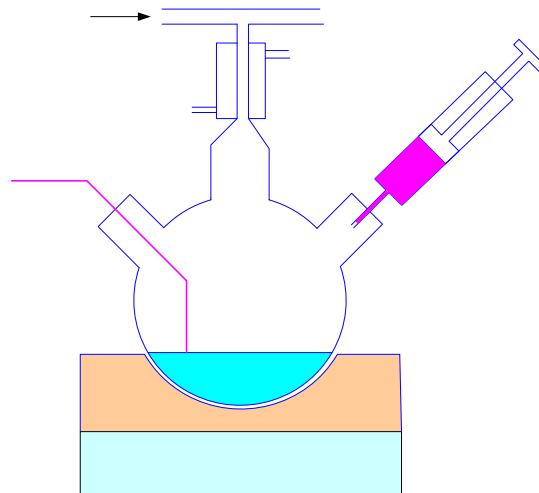
此法乃是目前最常被使用之方法，其原理乃是於充滿惰性氣體之反應腔中將材料加熱至沸點之上而蒸發，材料之蒸汽與惰性氣體碰撞而損失能量，凝結聚集並生長，進而由液態氮冷卻陷阱(cold trap)所捕捉，形成3-20 nm之量子點，量子點之大小由惰性氣體之氣壓決定，壓力愈大則尺寸愈大，故小壓力可製備尺寸小且均勻分佈之量子點。

(二)分子束磊晶成長法(Molecular beam epitaxy, MBE)

在超高真空腔體中，材料之氣態分子自蒸發後至基板之行進過程，較少與其他分子碰撞，能量損失較小，到達基板後先形成薄膜，在於基板上形成寬約20-50 nm，高約4-6 nm之島狀或金字塔狀之量子點結構。

(三)液相化學反應合成法

液相化學反應合成之設備如下圖所示，其粒子結晶、成長、最終顆粒大小及分佈均由反應動力學控制，優點乃是產率與尺寸均勻度可由精確之濃度與溫度控制來達成，缺點則是量子點表面會吸附未反應之單體或溶劑分子，使得純化較為繁瑣，而一次反應容量少亦是待克服之問題。



氫氣

圖二、液相化學反應合成設備示意圖

溫度感測器

為改善量子點之光學特性，通常會在其表面塗佈一層高能隙材料之薄膜，例如於CdSe表面塗佈一層至二層之Zns時，其量子轉換效率(quantum yields)可由5%提升至50%。^[26-28] ZnS與CdS乃是最常應用於CdSe之塗佈材料，CdS塊材之能隙約較CdSe塊材高約0.9eV，而CdS與CdSe之分子鍵長相似，以致能在CdSe表面長出平滑之CdS層。

三、奈米量子點於生物分子螢光標示之應用

如前述，奈米量子點能以共價化學鍵結方式與蛋白質、核酸、peptides等生物分子相連結，用於追蹤特定蛋白質在細胞內之活動。然而以有機螢光染料進行單一染色，仍是目前最常用於做為生物分子標定之方法。與有機染料及螢光蛋白質相較，半導體量子點乃是新穎且具有獨特優點與應用面之螢光標定工具。例如量子點之光電特性由分子之大小決定，單一波長之光源即可用來同時激發不同大小之量子點，表面鈍化之量子點在光漂白(photobleaching)作用下相當穩定，且具有夾窄對稱之光譜頻寬(full width half maximum, FWHM)，其大小約為25-30 nm。以硒化鎘(CdSe)為例，其亮度與穩定度分別是紅色染劑若丹明(Rhodamine 6G)分子之20與100倍^[5]，外包ZnS之CdSe奈米量子點可持續發光4小時，而Rhodamine 6G卻僅能維持6分鐘。^[29] 此外；因光源與反射光之光譜重疊限制，以致不能同時使用不同顏色之染劑，而不同有機染料需以不同波長之雷射光激發。奈米量子點只要在單一光源激發下，即可因大小差異而被激發出不同顏色之螢光，而可用於區分不同之生物分子。若能精確掌控奈米粒子大小與螢光顏色之關係，則奈米量子點可用於標示大量之蛋白質或基因序列。

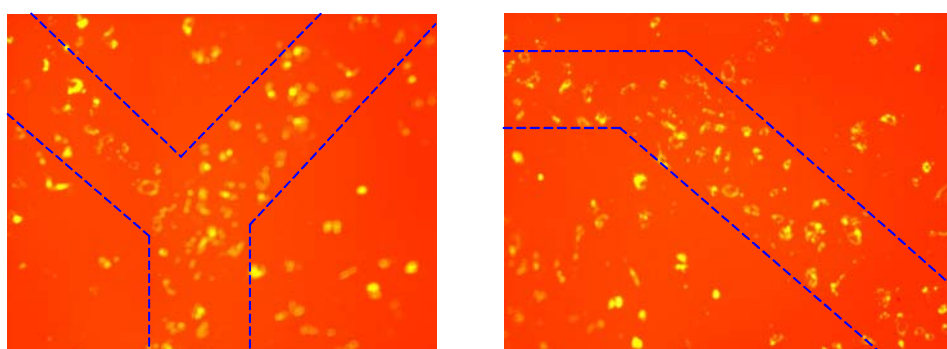
奈米量子點能提供及時而長期之生物分子追蹤，對於醫療診斷與治療有極大之應用空間^[30, 31]，例如腫瘤細胞標定、DNA 轉植(DNA

電磁攪拌

hybridization)、免疫分析(immunoassay)、receptor-mediated endocytosis、纖維囊化(cystic fibrosis)分析、阿茲海默症(Alzheimer's disease) 追蹤。

四、奈米量子點於組織工程上之應用

組織工程之定義乃是：應用生物與工程原理發展活組織取代物，用以修復、維持或改善人體組織之功能。組織工程之基本步驟是：由人體取出細胞；在體外將細胞培養至足夠數量；將細胞注入人工支架中培養成組織或器官；最後將人工組織或器官移植至體內。由於人工組織最終需移植至體內，故用以生長組織之人工支架需以諸如PLA(poly(L-Lactic))、PGA(poly(glycolide))、PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid))等生物可降解材料來製造，生物可降解材料在培養液中因水解而變成澎潤狀，不易以顯微鏡觀察細胞生長與貼附情形。半導體量子點即可用來標定人工支架中生長之細胞。圖三乃是以半導體量子點標定PLGA人工微血管支架中之牛頸動脈內皮細胞(BEC)貼附情形。



圖三、量子點標定PLGA人工微血管支架中之牛頸動脈內皮細胞貼附情形

五、奈米量子點做為光敏材料(Quantum dots as photosensitizers)^[32,33]

除了於生物標定之應用外，奈米量子點亦有極大潛力當作光動力治療(photodynamic therapy)之光敏材料。由於奈米量子點為能量捐輸者，其與細胞分子間可能之能量傳輸(做為triplet oxygen，減少equivalents與pigment)極可能導致reactive oxygen specie之產生，進而在細胞中產生一個poptosis。奈米量子點之光誘導毒化(light-mediated cytotoxicity)與能量捐輸特性使其有極佳之潛力成為光動力治療之光敏材料，或者是做為傳統光敏介質(photosensitizing agents)之輔助材料。

所謂光動力治療乃是將光、氧氣、光敏介質(例如porfirmer sodium與temporfin)結合，用以選擇性破壞組織之一部分，通常是特定區域

之癌細胞，目標範圍與癌細胞中之selective retention以及光敏材料濃度、光敏癌組織中之雷射紫外光方向相關。僅有同時暴露於光、氧氣、光敏材料之組織才會產生毒化作用。與傳統外科手術相較，此法無太大之侵入性，能精確控制作用點，能重複應用而不需考慮化療之劑量限制，且治療後不留下疤痕。

五、結論

奈米量子點具有傳統有機染料與螢光蛋白所沒有之超敏感與穩定性，已逐漸被應用於生物分子之標定與疾病診斷上，亦有極佳之潛力成為光動力治療之光敏材料，在不久之將來，對單一細胞之影像標定與治療應可藉由奈米量子點來達成。

六、主要參考文獻

1. W. C. W. Vhan, D.J. Maxwell, X. H. Gao, R. E. Bailey, M. Y. Han, S. M. Nie. 2002. *Curr. Opin. Biotech.* 13: 40-46.
2. C. M. Niemeyer. 2001. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4128-4158.
3. S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara and A. M. Belcher. 2000. *Nature*, 405: 665-668.
4. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos. 1998. *Science*. 281: 2013-2016.
5. W. C. W. Chan and S. M. Nie. 1998. *Science*. 281: 2016-2018.
6. H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi. 2000. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 12142-12150.
7. G. P. Mitchell, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger. 1999, *J. Am. Chem. Soc.* 121: 8122-8123.
8. S. Pathak, S. K. Choi, N. Arnheim and M. E. Thompson. 2001. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 4103-4104.
9. R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger and C. A. Mirkin. 1997. *Science* 277: 1078-1081.
10. R. A. Reynolds, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger. 2000. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3795-3796.
11. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff. 1996. *Nature* 382: 607-609.
12. J. J. Storhoff and C. A. Mirkin. 1999. *Chem. Rev.* 99:1849-1862.
13. A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. G. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez and P. G. Schultz. 1996. *Nature* 382: 609-611.
14. B. Dubertret, M. Calame and A. J. Libchaber. 2001. *Nature Biotechnol.* 19: 365-370.
15. L. Josephson, C. H. Tung, A. Moore and R. Weissleder. 1999.

- Bioconjug. Chem. 10: 186-191.
16. J. W. M. Bulte and R. A. Brooks. 1997. Magnetic nanoparticles as contrast agents for MR imaging. in: Scientific and clinical applications of magnetic carries. Plenum Press, NY, U.S.A..
 17. J. W. M. Bulte, T. Douglas, B. Witwer, S. C. Zhang, E. Strable, B. K. Lewis, H. Zywicke, B. Miller, P. Van Gelderen, B. M. Moskowitz, I. D. Duncan and J. A. Frank. 2001. Nature Biotechnol. 19: 1141-1147.
 18. A. Curtis and C. Wilkinson. 2001. Trends Biotechnol. 19: 97-101.
 19. R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer. 1994. Science. 263: 1600-1603.
 20. B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi. 1997. J. Phys. Chem. B. 101: 9463-9475.
 21. X. G. Peng, J. Wickham and A. P. Alivisatos. 1998. J. Am. Chem. Soc. 120: 5343-5344.
 22. J. A. Prieto, G. Armeeles, J. Groenin and R. Cales. 1999. Appl. Phys. Lett. 74: 99-101.
 23. O. I. Micic, H. M. Cheong, H. Fu, A. Zunger, J. R. Sprague, A. Mascarenhas and A. J. Nozik. 1997. J. Phys. Chem. B. 101: 4904-4912.
 24. M. A. Hines and P. Guyot-Sionnest. 1996. J. Phys. Chem. B. 100: 468-471.
 25. X. G. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich and A. P. Alivisatos. 1997. J. Am. Chem. Soc. 119: 7019-7029.
 26. B. Schreder, T. Schmidt, V. Ptatschek, U. Winkler, A. Materny, E. Umbach, M. Lerch, G. Muller, W. Kiefer and L. Spanhel. 2000. J. Phys. Chem. B 104: 1677-1685.
 27. J. Z. Shi, K. Zhu, Q. ZZheng, L. Zhang, L. Ye, J. Wu and J. Zuo. 1997. Appl. Phys. Lett. 70: 2586-2588.
 28. D. Gerion, F. Pinud, S. C. Willimas, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss and A. P. Alivisatos. 2001. J. Phys. Chem. B. 105: 8861-8871.
 29. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss. 2005. Science. 307: 538-544.
 30. X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie. 2004. Nature Biotechnol. 22: 969-976.
 31. T. M. Jovin. 2003. Nature Biotechnol. 21: 32-33.
 32. R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa and Y. Baba. 2004. Nature Biotechnol. 22: 1360-1361.

第五章 一維奈米材料—奈米碳管—在生醫方面的應用

李明威教授 國立中興大學物理系

一、前言：

奈米(nm, nanometer) 為長度單位，一奈米為 1×10^{-9} 公尺，大約是一根頭髮粗的千分之一。通稱尺度小於100nm的材料才稱為奈米材料。奈米材料依維度可分為零維、一維與二維三種。零維材料所指的是材料本身長、寬、高三個均在奈米尺度內，形狀為點狀。而一維材料則指長、寬、高其中有兩個在奈米尺度內，形狀為線狀。同理二維材料長、寬、高僅有一個在奈米尺度內，形狀為面狀。一維材料的結構包括奈米線、奈米管、奈米柱等。其材料又包括金屬線，半導體線、氧化物線等。奈米線在生醫方面的應用非常廣泛，已經開發成功的技術包含診斷醫療工具、感測器、奈米鑷子、及作為植入性混合材料。尚未開發出來但具有潛力則有奈米機械人、奈米手術工具等。未來在生醫應用將扮演重要的角色。

本文將以目前研究最為廣泛的一維奈米結構—奈米碳管—為例，來說明一維奈米結構在生醫方面的應用。首先我們將介紹奈米碳管的發現，其基本物理性質，合成的方法，然後我們再介紹其各種已經發展出來，或仍待開發的各種應用。

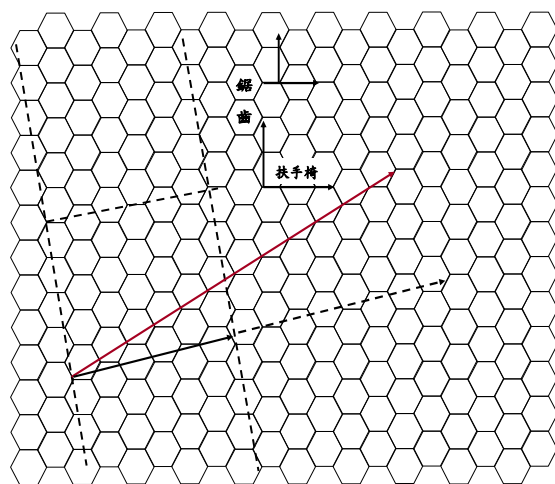
二、奈米碳管的發現：

奈米碳管首次發現歸功於NEC公司的飯島(S. Iijima)博士。繼碳60被富勒烯(fullerene)被發現後，飯島決定用高解析度透射電子顯微鏡(HRTEM)仔細研究由這一技術同時副產出的碳黑粉末，但並無所獲，他轉而考查電弧蒸發後在石墨陰極上形成的硬質沉積物，觀察時發現，陰極炭黑中含有一些針狀物，由直徑為4~30nm、長約 $1 \mu\text{m}$ 、由2到50個同心管構成。該結果發表在Nature雜誌上^[1]。1992年，Ebbesen和Ajayan等人發現用氦代替氬作緩衝氣體，增加電弧蒸發室的氦壓時，可改善奈米碳管在陰極炭黑中的收集率，每次生產的奈米碳管有milligrams，大大促進全球奈米碳管的研究步伐。^[2] 1993年，飯島^[3]和IBM公司的貝蘇(D. Bethune)^[4]分別用Fe和Co混在石墨電極中，各自獨立的合成了單壁奈米碳管，又一重大進展。

三、奈米碳管的幾何結構：

單壁奈米碳管可看成是石墨烯平面映射到圓柱體上，在映射過程中保持石墨烯片層中的六邊形不變，因此在映射時石墨烯片層中六角形網格和奈米碳管軸向之間可能會出現夾角。根據奈米碳管中碳六邊

形沿軸向的不同取向可將其分成鋸齒型(zigzag)、扶手椅型(armchair)和螺旋型(helix)3種。

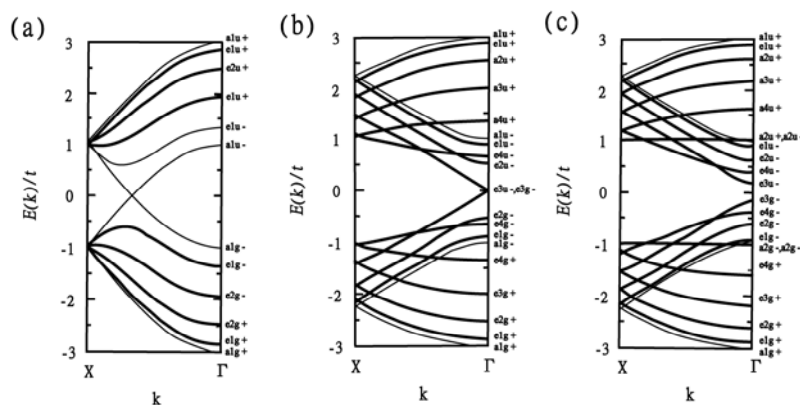


圖一、單壁奈米碳管參數的幾何意義

多壁奈米碳管一般認為是同心圓柱結構，其層與層之間間距為0.34nm。用密度函數理論(density function theory, DFT)研究多壁奈米碳管層與層之間相互作用，計算結果顯示，層間距為0.339nm，層與層發生滑移(slip)及旋轉(orient)所需能量分別為0.23eV及0.52eV，說明在室溫條件下，多壁奈米碳管層間容易發生滑移和旋轉^[5]，但存在的缺陷會限制層間的滑移和旋轉。多壁奈米碳管結構較複雜、不易確定，需3個以上參數來表示(除直徑和螺旋角外，需考慮管壁間距及不同片層間六邊形排列的關係)。

四、奈米碳管的能帶結構：

奈米碳管依其不同幾何排列，會呈現金屬，或半導體性質。圖二顯示不同的扶手椅型(armchair)、鋸齒型(zigzag)結構，其能帶(energy dispersion)圖。(a)圖為扶手椅型，無energy gap，為金屬。(b)圖為鋸齒型(9,0)，導帶與價帶相接，嚴格而言為semimetal。(c)圖為鋸齒型(10,0)，為窄能階半導體。



圖二、能帶結構

(a)扶手椅型(5,5)，(b)鋸齒型(9,0)，半金屬，(c)鋸齒型(10,0)，半導體

五、奈米碳管的拉曼表徵：

拉曼光譜對碳質材料結構中的偏移對稱性反應很敏感，還具有所需樣品量少、對樣品無損傷等優點，是一種理想的探測奈米碳質材料微觀結構資訊的方法。

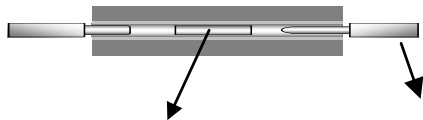
從拉曼光譜可判斷單壁奈米碳管的振動模式，可標定樣品中單壁奈米碳管的直徑分佈，奈米碳管的結構特徵、取向(orientation)效應、彈性模量等資訊。

六、奈米碳管的合成：

常用的合成方法有三種：

(一) 雷射蒸發法(Laser vaporization)：

裝置如下圖所示，在一個高溫真空爐內放置一個石墨靶(target)，用脈衝雷射（通常為excimer laser）照射石墨靶，石墨經照射後蒸發，其蒸汽會由承載氣體 (argon) 帶走，凝結在有水冷卻的銅極上，經過收集，即可得到奈米碳管。一般的實驗參數是真空爐溫度 1200°C ，如果在石墨靶驟入少量的過度金屬(1.2% Co-Ni)，產生的碳管即為單層奈米碳管。有時候也可以採用紅外線，Nd-YAG雷射($\lambda = 1.064\mu\text{m}$)。

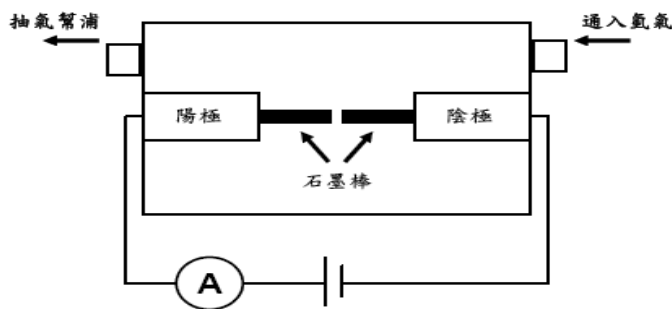


圖三、Laser vaporization的裝置圖

(二)電弧放電法(Arc-discharge)：

使用裝置是在真空腔體內，裝置兩根直徑5mm以上之石墨棒作為正負電極，在腔體中通入氬氣，壓力約500Torr，當碳棒電極通過100~200A的電流時，石墨蒸發，並且形成電漿，當反應持續進行時，奈米碳管會沉積在陰極碳棒上，最後變成一根圓柱狀的固體，中間部份充滿奈米碳管。如果想要成長單層奈米碳管，可以在石墨棒靶鏢入少量的金屬，例如過度金屬Co、Ni、Fe，稀土金屬Y、Gd，或合金Fe/Ni、Co/Ni、Co/Pt。電弧放電法的特點是可以產生大量的奈米碳管，每次可以達到1公克以上。

銅極

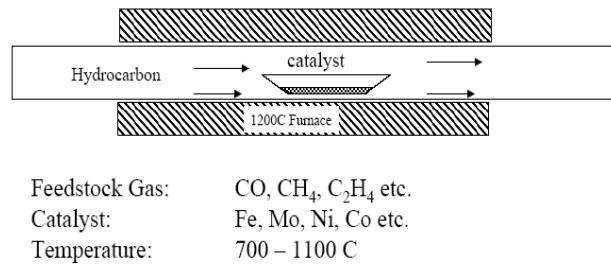


圖四、Arc-discharge的裝置圖

(三)蒸氣成長法(Vapor Growth)：

裝置包括一個管狀高溫真空爐，溫度約~1000°C，通入碳氫化合物氣體，例如CH₄、C₆H₆、C₂H₂...；在基板上預先準備金屬催化劑：Fe、Co、Ni，奈米碳管就會成長在基板上。蒸氣成長法的優點是只要氣體的供應源源不絕，就可連續生長、因此可以產生大量的碳管、適合大規模生產。

Thermal CVD Method



圖五、Vapor growth的裝置圖

七、奈米碳管的應用

奈米碳管在生醫的應用包含作為醫學診斷工具、以偵測腫瘤或量測血壓，或作為生藥物傳輸的載具、或作為植入性材料，甚至細微的手術工具。以下我們就各種不同的用途作更詳細的說明。

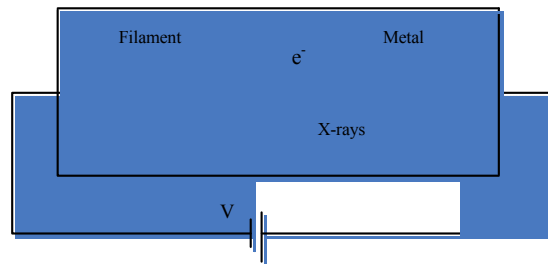
(一)醫學診斷工具(Diagnostic tools):

1. 輻射腫瘤診斷(Radiation oncology)：目前最常用的輻射診斷工具是X-ray攝影。其發光原理是以一鎢絲作為陰極。通電後鎢絲電極溫度升高，發射出熱游電子，隨後以加速電壓將電子朝正極加速，電子撞擊金屬靶(例如銅靶)後產生X-ray，即可用來作X-ray攝影，以便做於腫瘤之診斷。這種傳統的X-ray攝影的優點是不需要高真空即可運作。缺點是：(1)反應時間慢、(2)耗電、(3)儀器壽命短。最近的研究發現奈米碳管是優良的場發射電子源，可以用來產生X-ray。奈米碳管的優良電子場發射特性原因有：(1)碳管尖端為奈米級，電場強化因子大，尖端放電容易產生；(2)碳管的功函數低；(3)可耐高溫。奈米碳管的場發射電流與電壓可以Fowler-Nordheim公式來描述。

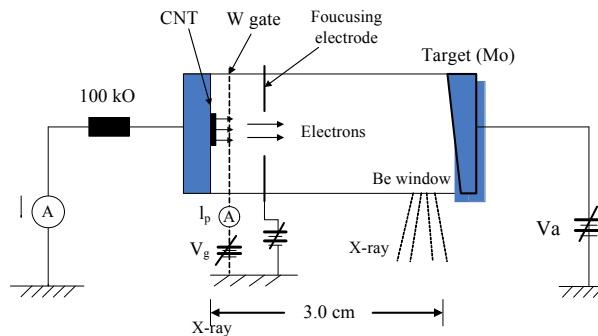
$$J = aV^2 \exp\left(-\frac{b}{V}\right)$$

其中V為正負電極間之外加電壓，a、b為常數。目前實驗已經可以在面積0.2cm²的碳管產生28mA的電子電流，而單根奈管的電流也可以達到mA以上。以人體器官診斷而言，大約需要14kVp與180mAs。最近Cheng已經開發出一套以奈米碳管為X光源的放射攝影設備，可進行動態攝影。其裝置如圖所示，此系統可以產生10⁻⁹ sec的X-光脈波。而且陰極的直徑只有1mm。CNT的X光源的優點是：(1)快速反應時間；(2)可聚焦到小點；(3)低耗電；(4)

裝置可微小化；(5)無須冷卻。其中以可微小化最具吸引力。微小化的X-光源可以用內視鏡插入人體進行小範圍的X光檢查，而且不會傷害到周圍的組織。



圖六、傳統產生X-ray的設備圖



圖七、奈米碳管產生X-ray的設備圖

2.感測器(sensors)：

感測器的功能是當外在環境例如溫度、壓力等發生變化時，會產生一個訊號。感測器依照用途有許多不同的種類。

A.壓力感測器(Pressure sensors):

目前醫學用的許多壓力感測器是以Si晶片利用壓電阻(piezoresistor)的方式製作的，當壓力變化時電壓或電阻產生變化，這種感測器的缺點是溫度效應大，易產生誤差。最近發現以奈米碳管製成的感測器可以偵測壓力變化，且具有溫度效應低的優點。壓力感測器可用於眼睛手術、病床、呼吸系統、病人監控、循環系統與洗腎機。在眼睛手術過程中，需要將液體自眼球移除清潔或更換。壓力感測器監視控制液體的真空幫浦。在燒傷病人的病床，為減輕病人的痛苦或增進傷口癒合，需要將部分病床充氣，也是以壓力控制器來達成。還有睡眠窒息症，在充氣墊上監測壓力，如果患者長時間沒有動作，壓力檢測器就會以鬧鈴的方

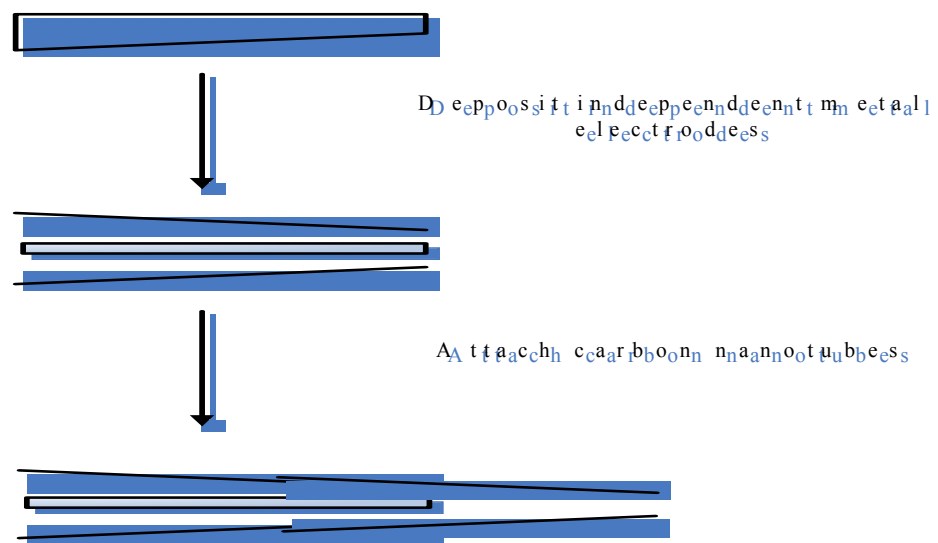
式叫醒病患。還有病患使用人工呼吸器時，如果啟動的時間不對，則吸入的藥劑量不足，利用壓力偵測器偵測病人呼吸的頻率可以準確釋出正當藥量。在洗腎機中，血液中的廢物透過滲透膜排除，壓力計可以精確的控制血液的流速。

B.DNA生物感測器:

奈米碳管製成之生物感測器可偵測某一特定的DNA種類，可用於診斷跟DNA相關的疾病，每次測量只需用到幾個DNA分子，而且無須抽血。目前所用的生物感測器體積較大，易造成傷口腫大。奈米碳管感測器就不會有這些問題。

3.探針(probes)：奈米鑷子(nanotweezer)

探針的用途是從一個遠距處得到需要的訊息。奈米碳管已經被製成許多種類的探針，其中最長見的是AFM(原子力顯微鏡)探針，可用於偵測奈米尺寸的影像。另一種奈米碳管探針是奈米鑷子，其結構是用一隻斜口的微米玻璃管(如圖八所示)，在其上鍍上金電極，將奈米碳管黏接至其頂端。利用碳管尖端的靜電力與彈性恢復力之平衡，可以控制鑷子張開或閉合。奈米鑷子可以用來夾取DNA分子，測量其導電性質，或作為機電感測器，以量測壓力、黏性(藉用測量共振頻率)。其應用的前景頗被看好。



圖八、奈米鑷子的基本原理

(二)生物藥學(Biopharmaceutics):

- 1.藥物傳輸(drug delivery):藥物傳送的的基本要求是藥物的釋放速率需適當，釋放太快會導致藥物吸收差，腸胃不適及其他副作用。而且藥物在輸送過程中不能分解，因為某些藥物是具有毒性的。因此目前藥物(在傳送過程中)都是包在容器內。奈米碳管是

一個適合作為藥物載體的材料。透過將奈米碳管功能化，即可使奈米碳管穿過細胞膜。奈米碳管容易進入細胞核，而且奈米碳管的尺寸小，細胞不會將其誤認為入侵者。使用奈米碳管作為藥物傳送之載體有幾個優點：(1)碳管內部具有大表面積，可以在內部填入需要的化學或生物藥劑；(2)內部與外部可分別予以不同的功能化，使外部不帶生化載體而內部則帶生物相容的載體；(3)奈米碳管的尖端可開口，將藥物分子置入碳管內部。這些植入過程與凡得爾力及排水力有關。

(三)植入性材料及元件(Implantable materials and devices):

1. 植入性奈米感測器及奈米機器人(Implantable nanosensors and nanorobots): 患有糖尿病的並病人經常需要定期自我檢測血糖以控制血糖，這對小孩及老人有時無法做到。另一種情形是經常暴露在輻射線或有害物質中的人需要經常檢查，以便能早期發現疾病。這些工作可以用植入的感測器或元件來達成。CNT作成的感測器較微機電感測器尺寸小一千倍以上，而且耗電量少，最適合做植入性感測器。可能用途包括監控脈搏、體溫、血糖及心臟功能。至於奈米機器人可能的功能有^[6]：

(1)治療皮膚病：奈你機械人可以先去除死去皮膚，去除多於油脂，加入需要的油脂，再加上適量的保濕化合物。

(2)保護身體之免疫系統：辨識入侵細菌及病毒，將其細胞膜破壞並消滅。

(3)涑口水：將會致病的口腔細菌消滅，將牙齒之牙斑移除。

2. 致動器(人工肌肉)(actuators, artificial muscles): 致動器的功能是將電能轉換成機械能，產生機械運動。這對許多生醫應用是很重要的，例如微手術元件，人工肌肉，人工眼球肌肉，人工心臟等。人工肌肉的要求是重量輕，運作電壓低，位移量大，反應快與使用壽命長。目前使用之致動器材料有壓電陶瓷，形狀記憶合金與高分子聚合物等。這些材料均有其限制，例如陶瓷之機電耦合係數低，且有硬度上的問題。Baughman是第一個揭示奈米碳管具有致動器功能的人。^[7]他們用整片的單層奈米碳管，當通以電壓時，碳管產生壓力，目前最成功的例子，可以觀察到奈米碳管的紙張，因變形產生的彎曲可用肉眼觀察到。奈米碳管與高分子聚合物之混合物製成之致動器具有高強度、硬度、低操作電壓。當通電時，CNT製成的電極會產生膨脹或收縮的現象，原因是奈米碳管的表面產生充電的現象，而導致長度的變化。奈米碳管致動器適合在人體之生理環境中運作，而且產生的應力可以超過自然肌肉。

3. 奈米流體系統(Nanofluidic systems): 生醫界常用流體系統來進行藥物配方如果液體注射裝置體積太大對鄰邊的組織會造成傷害, 因此若能縮小液體裝置體機會有許多好處, 包括微幫浦, 奈米流體, 液體儲存槽等。使用微流體系統可以解決這個問題, 但是目前為止, 有關奈米流體的開發還在起始階段, 尚未有很多實驗結果發表, 這是一個未來有很大發展空間的領域。

(四) 手術輔助設備(Surgical aids):

在外科開刀過程中, 手術的刀具如果大, 病人傷口自然大, 手術需要的時間長, 傷口癒合時間久, 更不用說病人的痛苦增加, 而且大型手術刀, 也不適合用於心臟、腦、眼、耳等開刀。腹腔鏡手術解決了一部分問題, 但腹腔鏡手術需要有技術熟練的醫生進行。如果開發以奈米碳管為基礎的奈米開刀設備, 可以進行微小傷口的手術, 進行奈米開刀所需要的微小裝置, 包括鑷子、刮刀、具有感應器的夾子。目標是感測器可以偵測特殊病因的細胞並予切除, 而且不影響到其他正常的組織, 這對腫瘤的醫療最有幫助。另一種選擇是在手術中使用分子奈米技術或奈米機器人。例如在奈米機械人手術中, 外科醫生以搖桿控制包含微小手術裝置機器手臂, 另一個機械手臂包含一個廣角鏡頭攝影裝置, 這對醫生的工作壓力可以減少。分子奈米科技(molecular nanotechnology: MNT)的目標是可以切除單顆細胞, 可能的應用範圍包括膽、心臟、前列腺、直腸、食道及婦科等手術。但是, 在奈米機器人手術達到實用之前, 相關的技術包括分子尺寸的致動器, 馬達都有待開發。如前所述, CNT的奈米鑷子已經開發出來, 而CNT的人工肌肉也已完成, 另外CNT已有低摩擦力的軸承, 各種相關的零件技術逐漸完成。當然, 如何將這些仍在實驗室階段的技術整合成實際的手術裝置, 仍有待科學界未來繼續努力。

八、主要參考文獻

1. Iijima, S. 1991, Nature. 354: 56.
2. Ebbesen, TW. and PM. Ajayan. 1992, Nature. 358: 220.
3. Iijima, S. and T. Ichihashi. 1993, Nature. 363: 603.
4. Bethune, DS. CH. Kiang, and MS. Devries, 1993, Nature. 363: 605.
5. Charlier, JC. and JP. Michenaud, 1993, Phys Rev Lett. 70: 1858.
6. Bhargava, A. Nanorobots: Medicine of the future. [online]. Available: <http://www.ewh.ieee.org/r10/Bombay/news/page4.html>
- Bandow, S., S.Asaka and Y. Saito. et al. 1998. Phys Rev Lett. 80:3779.
7. Baughman, R. H. et al. 1999. Carbon nanotube actuators. Science, 284 :1340

第六章 生醫奈米材料的生物功能化

陳東煌教授 國立成功大學化工系

黃世宏 國立成功大學化工系

一、前言

近年來無論是奈米技術或是生物與生醫技術的發展，均極受全球科技及產業界的重視。尤其是奈米技術與生物或生醫技術結合時，更產生了許多有趣與神奇的特性、產品、與技術，創造出奈米生技與奈米生醫的新領域。其中，由奈米粒子與生物分子所形成的複合體，可廣泛用於生物標識、生物偵測、基因治療、藥物傳輸、藥物標的、免疫分析、酵素固定化及生物選擇性分離等方面，極具發展與應用價值。例如，接上DNA生物試劑的金奈米粒子，可用於偵測炭疽病毒；接上氧化鐵磁性奈米粒子的藥物、酵素、或其它生物分子，可應用於藥物標的、藥物傳輸、酵素固定化、及生物分離上。^[1]

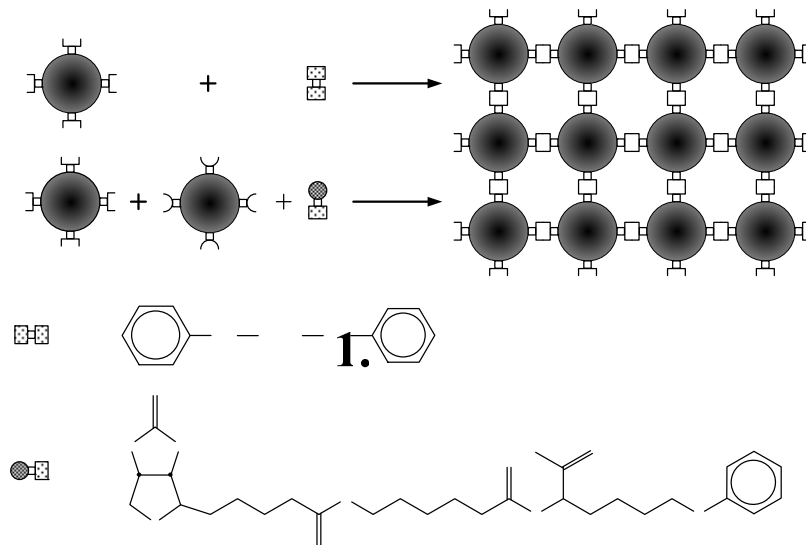
就結合目的而言，奈米粒子可藉由生物功能化來提升其生物相容性與生物選擇性，或藉由生物辨識性自組織具規律性之結構材料；而生物分子或藥物則可能利用奈米粒子作為其載體，或者提供生物分子及藥物本身所缺乏的其它功能。

奈米粒子之尺寸與生物巨分子接近，因此由奈米粒子與生物分子所形成的複合體應用於生物體內時，較不易受到生物體的排斥。不過，要將奈米粒子與生物分子或藥物結合，其間存有異質界面相容性的問題，通常必需透過適當的表面化學技術才能達成。本文的目的即在簡介奈米材料如何透過表面化學技術，達到生物功能化的目的。

適用於生物或生醫用途的奈米材料種類不少，限於篇幅，本文僅針對較新穎之金奈米粒子、磁性奈米粒子、螢光量子點、及碳奈米管等的生物功能化進行介紹，其餘已較為人所熟知（如微脂體）或較不新穎常見的生醫奈米材料則不作敘述。

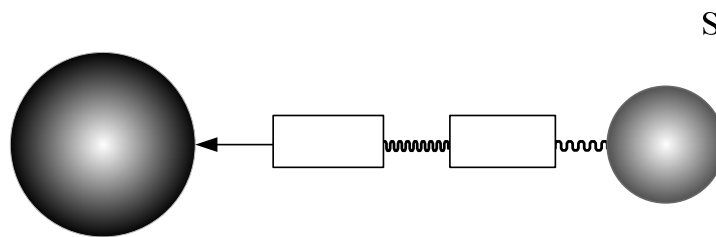
二、金奈米粒子

金奈米粒子由於在可見光範圍具有特定的光學吸收性質，且生物相容性佳，故常應用於免疫分析、生物晶片、生物標識、及光學元件上。由於金易與硫產生鍵結，因此本身具有硫醇基或經過硫醇化的生物分子通常可直接與金奈米粒子連結產生複合體。例如Shenton等人^[2]將具有HS-Cys官能基的抗體直接接在金奈米粒子上，可藉由抗體與抗原之間作用的專一性形成二維或三維的網狀結構，如圖一所示。



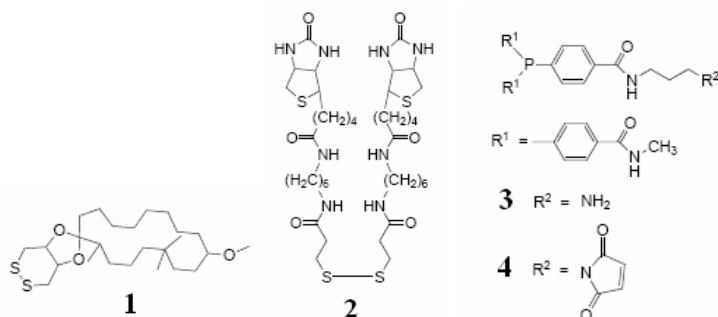
圖一 藉由抗體-抗原間的作用將金奈米粒子交聯成形網狀結構之示意圖^[2] (經作者同意轉載)

如果生物分子缺乏可與金奈米粒子鍵結之官能基，則通常必需使用適當的連結劑，將兩者連結在一起，如圖二所示。^[3]連結劑可能是金奈米粒子產生時即存於表面，例如以檸檬酸法製得的金奈米粒子，表面即吸附一層檸檬酸分子，可作為連結劑，藉由靜電作用力，將金奈米粒子與具有H₂N-Lys官能基的蛋白質連結。^[4]為提高辨識性，也可生物分子作為連結劑，例如以鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)為連結劑鍵結於金奈米粒子表面，可與具有生物素(biotin)官能基的去氧核糖核酸(DNA)或免疫球蛋白複合。^[5]又如以HS-(CH₂)₆-修飾之寡核苷酸為連結劑，與金奈米粒子鍵結後，即可與具有互補序列之DNA結合。^[6]



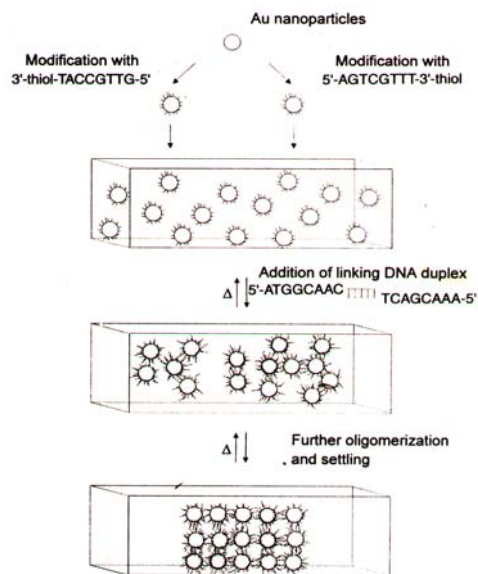
奈米粒子	連結劑	官能基	生物分子
Au	—	HS-Cys	immunoglobulins, serum albumins
Au	—	HS-(CH ₂) ₆ -	DNA
Au	—	(HS-PO ₃ R ₂) ₅ -	DNA
Au	citrate	H ₂ N-Lys	Proteins

Au	streptavidin	biotin-(CH ₂) ₆ -	immunoglobulins, serum albumins
Au	streptavidin	biotin-(CH ₂) ₆ -	DNA
Au	1		DNA
Au	2		immunoglobulin, streptavidin
Au	3	HOOC-Glu	Proteins
Au	4	HS-Cys	Proteins



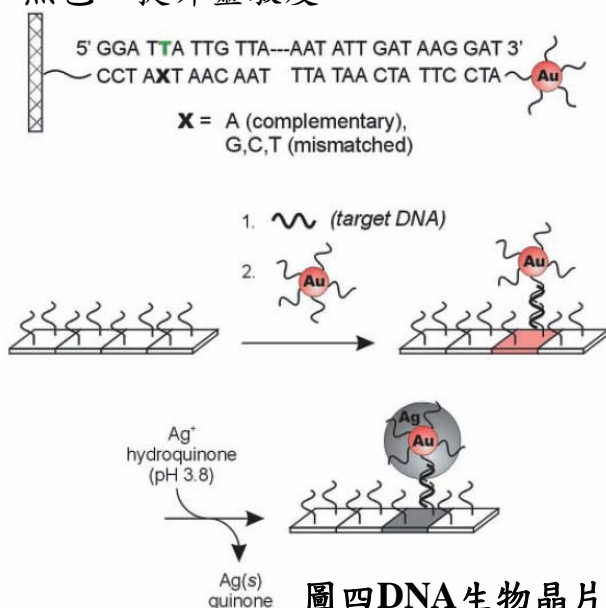
圖二 生物分子與奈米粒子結合之示意圖^[3]

表面修飾DNA之金奈米粒子，藉由DNA序列的專一選擇性與適當設計，在自組裝奈米結構材料及生物與生醫上有許多的應用。例如，Mirkin等人^[7]首先將兩股經硫醇修飾但不互補的DNA序列(3'-thiol- TACCGTTG-5')與(5'-AGTCGTTT-3'-thiol)分別鍵結至金奈米粒子表面，然後將兩混合。由於兩股DNA序列並不互補，因此金奈米粒子不會因DNA的雜交反應而產生凝集。但當加入具有可分別與上述兩股DNA序列互補的雙股DNA(5'-ATGGCAAIIIIITCGGCAA-5')，則DNA序列會進行雜交反應，使金奈米粒子溶液由紅色轉成紫色，並且有沉澱產生，顯示兩組金奈米粒子已藉互補之DNA序列的作用而連結在一起。進一步研究發現，如果在0°C到80°C間反覆循環，當加熱超過金奈米粒子表面之DNA與雙股DNA的解離溫度($T_m=42^\circ\text{C}$)時，相互連接的DNA序列會分離重新溶回溶液中，使溶液又變回原本的紅色，可見此自組裝過程為可逆反應。整個過程得示意圖如圖三^[7]所示



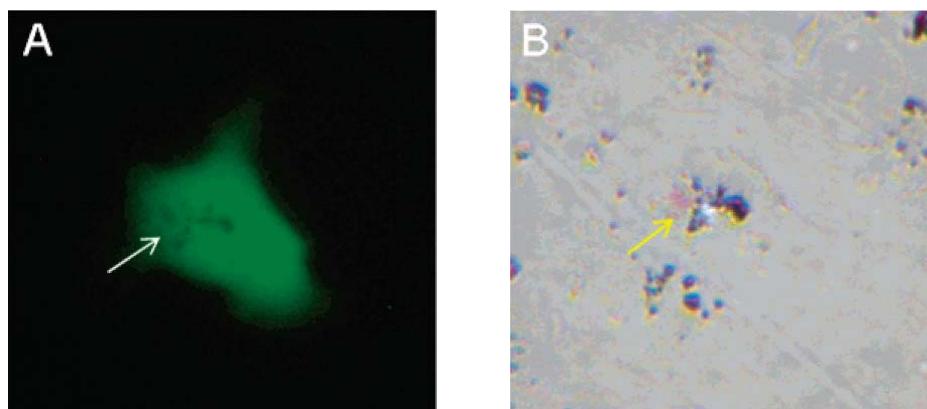
圖三 金奈米粒子藉由DNA序列之修飾進行可逆之自組裝^[7]
 (IIIII代表duplex雜交後的DNA序列，△代表加熱超過duplex解離的溫度)(經作者同意轉載)

DNA生物晶片為金奈米粒子另一重要的應用，如圖四所示，Taton等人^[8]將兩條不同的單股DNA(-CCTAXTAACAAT與TTATAACTATTCCTA-)分別修飾在載玻片與金奈米粒子上，當與標的DNA(炭疽病毒的DNA序列)相遇時，即可將金奈米粒子連接在載玻片上。以緩衝溶液將未配對或多餘的DNA序列清除後，若標的DNA序列的濃度夠高，則會顯出淡淡的粉紅色；如果標的DNA序列的濃度很低，便不易用肉眼看出。為了增強其訊號，通常可加入銀離子溶液，並使用對苯二酚作為還原劑，將銀沈積在金粒子的表面上，使其呈現黑色，提升靈敏度。



圖四DNA生物晶片的偵測原理^[8](經作者同意轉載)

此外，金奈米粒子在基因治療上也有很大的應用潛力。Wu等人^[9]首先利用兩階段酵素策略製備增強綠色螢光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因與金奈米粒子之複合物(conjugate)Au:EGFP，然後與聚乙醯亞胺(polyethyleneimine, PEI)水溶液混合形成Au/EGFP/PEI複合物，進行基因傳遞研究。結果發現，Au/EGFP/PEI複合物確實能有效地進入猴子腎臟Cos-7細胞，此乃因Au/EGFP帶負電，PEI的加入可使Au/EGFP/PEI複合物的淨電荷由負轉正，有助於增加轉殖(transfection)的效果。圖五係在螢光顯微鏡下觀察到EGFP在轉殖之Cos-7細胞中所發出的螢光，顯示連接到金奈米粒子表面之EGFP，在哺乳類動物的細胞中，依然可以展現出DNA片段的生物活性。



圖五 利用(A)螢光顯微鏡與(B)亮場(bright field)顯微鏡觀察轉殖之Au/EGFP複合物在Cos-7細胞中展現出EGFP之螢光特性^[9](經作者同意轉載)

三、磁性奈米粒子

磁性粒子可廣泛應用於細胞/蛋白質的生化分離、藥物分子的化學/生化合成、生物體內磁性藥物標的、核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)、及磁性溫熱腫瘤治療(magnetic hyperthermia tumor therapy)等方面。近年來由於奈米科技的快速進步，對磁性粒子微結構，如被覆性、結晶性、及尺寸均一性等，皆有了更好的控制^[10-23]，透過適當的表面功能化，更加擴展其在生物與生醫領域的應用。

磁性奈米粒子與蛋白質的尺寸範圍相近，能與生物分子更緊密的結合。因此，磁性奈米粒子不僅可作為生物分子的載體，且因這些奈米載體對於表面負載之生物分子有較小的立體障礙，故也可以應用於

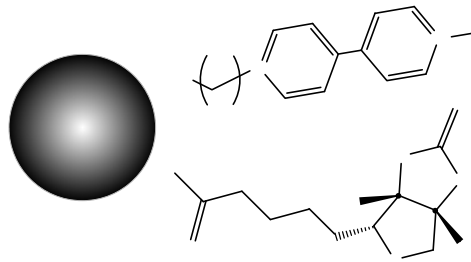
生物分離和生物標識。此外，磁性奈米粒子由於尺寸較小，在生物體內的應用遠比微米粒子更具優勢。例如，當磁性奈米粒子的尺寸小於20nm時，具有較高的組織穿透率。^[24]且小尺寸有助於磁性奈米粒子躲過生物體內之單核細胞吞噬系統(mononuclear phagocyte system (MPS))的偵測，避免被肝臟代謝掉，可增加磁性奈米粒子在血液中的半生期，提高其到達體內目的地的機率。^[25]

磁性奈米粒子在生醫領域上的應用，通常必須具有核/殼型結構。內部的核是無機物(如氧化鐵)，環繞在外面的殼層則為長鏈的有機配位基或是有機/無機高分子。在許多生醫應用方面，核需要具有超順磁性，此乃因超順磁的核會回應外在的磁場，當外在磁場被移除時，其磁性也會消失，缺少殘留磁化量將可使磁性物質重複地在水溶液中分散與集中，而不會形成磁性團簇。核/殼型磁性奈米粒子的殼層對於生物應用或是奈米複合物的穩定性和磁性相當重要，而殼層性質也能決定奈米複合粒子在水溶液中的分散性，並提供一個奈米團簇官能化的平台。具有生物活性的分子，如抗體和蛋白質，可固定化在殼層表面，並且能與水溶液中的生物體產生作用。^[25]

最常用於生物與生醫應用之磁性奈米粒子為氧化鐵，其表面具有-OH基可供鍵結。也可藉表面交換反應或於共沉澱製造過程中加入表面修飾劑以產生-SH或-NH₂等官能基。近年來FePt奈米粒子也頗受重視，因屬金屬，一般可與具巯基的分子鍵結。以下分別針對幾項不同的應用，舉例簡述磁性奈米粒子的生物功能化。

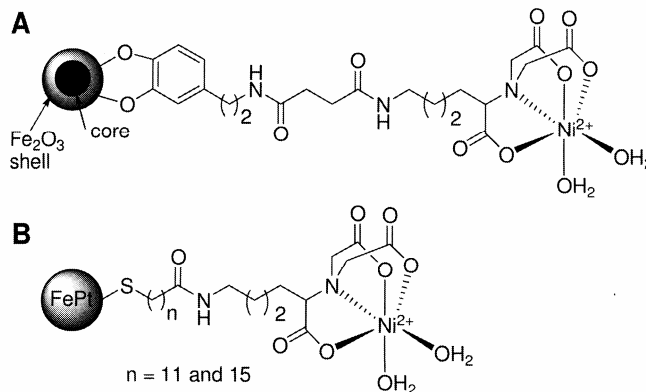
(一)體外生物分離用磁性奈米粒子的功能化^[25]

以磁性奈米粒子作為吸附劑分離生物分子或生物體，因無孔內質傳阻力且比表面積大，通常具有吸附容量高且吸附速率快的優點。關於磁性奈米粒子的生物功能化，一般可將長鏈型有機配位體鍵結於粒子表面，藉由疏水性交互作用力防止臨近粒子間的凝聚。不過，為了生物與生醫的應用，粒子必須在水溶液中有很好的分散性。為解決此一問題，Fan等人^[26]將bipyridinium carboxylic acid與biotin一起鍵結在氧化鐵粒子表面，如圖六所示，可改善因biotin鍵結所導致的疏水性，應用於螢光素標識蛋白之avidin的親和性分離。



圖六 氧化鐵磁性奈米粒子同時被覆bipyridinium carboxylic acid與 biotin之結構圖^[26] (經作者同意轉載)

尾端接有組氨酸之蛋白質(histidine-tagged protein)的分離一直頗受重視，Xu等人^[27-28]分別以dopamine及硫將nitrilotriacetic acid接於氧化鐵與FePt奈米粒子表面，如圖七所示^[25]，藉由與Ni²⁺離子的錯合，可有效的將histidine-tagged protein自細胞溶解液中選擇性分離出來。



圖七 利用dopamine及硫將nitrilotriacetic acid分別接於氧化鐵(A)與 FePt(B)奈米粒子表面以分離histidine-tagged protein之磁性複合奈米粒子的結構圖^[25] (經作者同意轉載)

(二)病原體偵測用磁性奈米粒子的功能化

Xu等人^[29-30]將含有bio(vancomycin) cystamine之水溶液與含有FePt奈米粒子之正己烷溶液強力攪拌，藉由Pt-S和Fe-S鍵的形成，將萬古黴素(vancomycin, Van)連接到FePt奈米粒子表面。同樣的，利用cystamine dihydrochloride也合成FePt-NH₂奈米粒子。^[29]經過Vancomycin修飾的FePt粒子因能與革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacterium)細胞壁前質末端的D-Ala-D-Ala產生氫鍵，可用於病原體的偵測。FePt-Van可選擇性抓取革蘭氏陽性菌，但FePt-NH₂則無此功效，

顯示FePt-Van奈米粒子上對革蘭氏陽性菌具有高度的選擇性，除了分離的目的外，也能夠偵測到水相中非常低的細菌濃度。^[30]

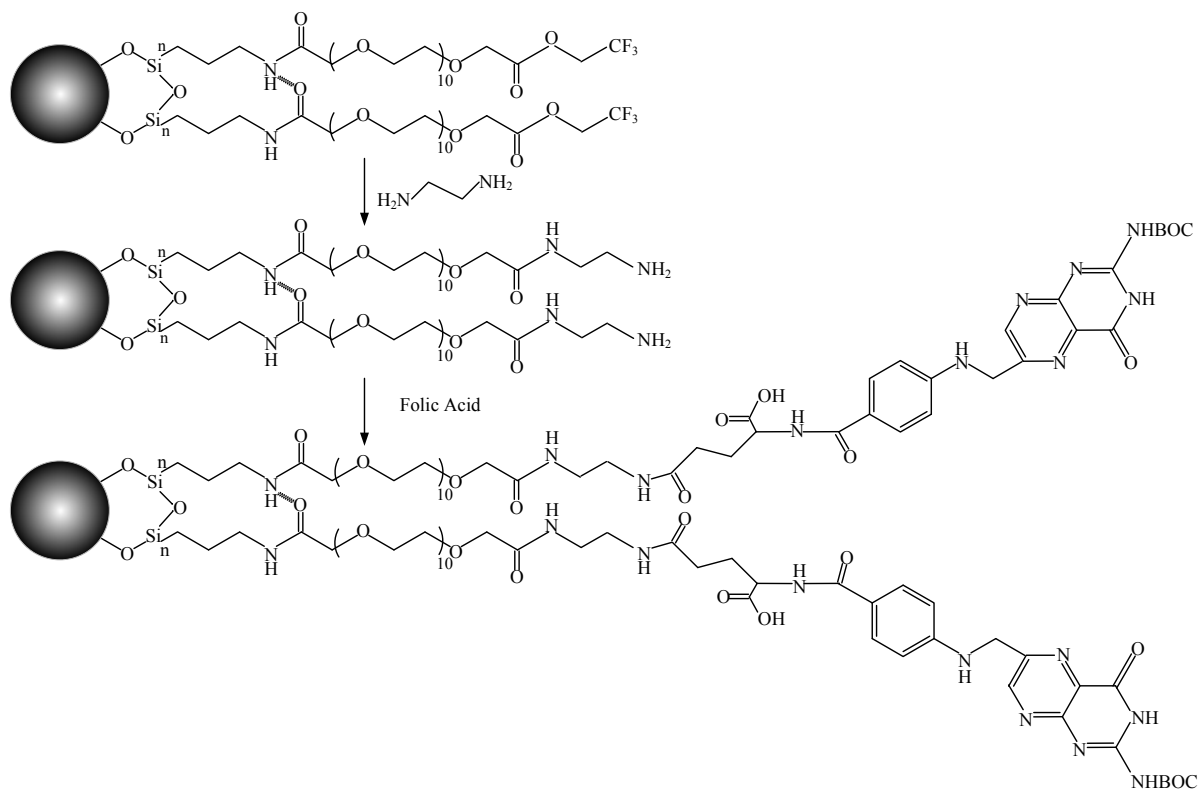
(三)生物觸媒反應用磁性奈米粒子之功能化

以磁性奈米粒子作為固定化酵素的載體，具有比表面積大、無孔內質傳阻力、且易以外加磁場回收等優點。氧化鐵奈米粒子表面因有-OH基或常見修飾之-NH₂與-SH基，可與酵素之-COOH基產生鍵結而將酵素固定化。Huang等人^[31]利用碳二醯胺活化酵素之羧酸基後可與氧化鐵奈米粒子表面之-OH或-NH₂基產生醯胺鍵(-CONH-)的機制，將脂肪酶(lipase)固定化於磁性奈米粒子的表面。結果發現，固定化後的酵素活性為游離態的1.4倍，且貯存穩定性也有明顯的改善，貯存時間超過800小時，活性仍維持原來的95%。

(四)體內生物影像、藥物標的、及腫瘤溫熱治療用之磁性奈米粒子的功能化

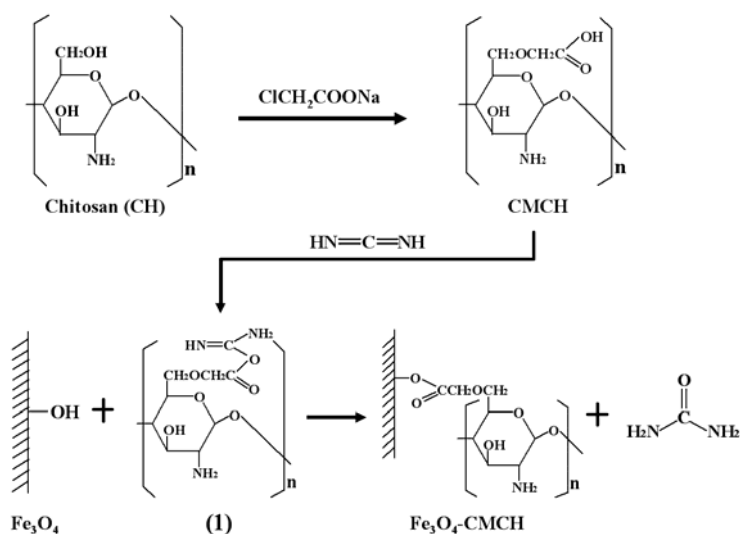
氧化鐵磁性奈米粒子除了本身的磁性可作為藥物磁性標的載體外，也可以作為核磁共振造影(Magnetic Resonance Imaging, MRI)的顯影劑^[32]及熱療法(Hyperthermia)^[33-34]的材料，可說是集治療、診斷、標的等功能於一身之多功能性奈米載體。因此，其生物功能化通常可同時適用於這些目的。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)因生物相溶性佳且可增加在血液中循環的時間，因此常用於許多載體的表面被覆。Kohler等人^[35]先製備trifluoroethylester polyethylene glycol silane，然後將其鍵結於氧化鐵奈米粒子表面，其次將末端修飾為-NH₂基，最後將葉酸(folic acid)接枝其上，如圖八所示。葉酸因時常作為癌症治療時的標的藥劑^[36]，故此葉酸接枝的磁性奈米粒子可較有效的凝集在癌細胞週遭，有助於核磁共振造影與熱療法的進行。



圖八 氧化鐵磁性奈米粒子表面被覆PEG與葉酸之流程與結構示意圖^[35] (經作者同意轉載)

幾丁聚醣為另一常見的天然多醣體，Chang等人先將幾丁聚醣羧甲基化，其次在碳二醯胺的活化下，將羧甲基化之幾丁聚醣鍵結於氧化鐵磁性奈米粒子表面，如圖九所示。^[37]然後以此作為藥物載體，將抗癌藥物epirubicin吸附其上。經由口腔癌細胞毒殺的體外試驗得知，epirubicin與磁性奈米載體所形成的複合物對癌細胞具有與epirubicin單獨存在時相似的毒殺效果，而單純的磁性奈米載體則幾乎不具有毒殺性，證實結合epirubicin與磁性奈米載體所形成的複合物，確實具有治療癌症的功效。^[38]由於係以氧化鐵奈米粒子為核，此負載藥物的複合物同時兼具了磁性標的、藥物治療與核磁共振顯影的功能，在生醫上頗有應用價值。



圖九 製備幾丁聚醣被覆之氧化鐵磁性奈米粒子的示意圖^[37] (經作者同意轉載)

MRI為醫學臨床診斷上的重要技術，為了增加影像對比的差距，必需加入顯影劑。有關顯影劑的發展，最早係使用具有高磁矩的釷離子(Gd³⁺)，但由於釷離子具有毒性，故需配合螯合劑使用。近年來，隨著奈米科技的發展，逐漸改採具有超順磁性的奈米粒子作為顯影劑，其中氧化鐵磁性奈米粒子最受重視。不僅無毒性，顯像效果好，且易於進行表面修飾以提高粒子的分散性、生物相容性與特異性，可用於觀察特定的組織或器官。例如Kim等人^[32]以化學共沉法，在澱粉水溶液中製得平均粒徑約42 nm、表面被覆澱粉的Fe₃O₄超順磁奈米粒子。表面的澱粉修飾有助於提高粒子的生物相容性，促進細胞外輸送的成功率。此外，將此粒子注入老鼠腦部後，可由MRI影像觀察到注入位置周圍會與周圍組織有對比明顯的灰黑色區域，即為氧化鐵奈米粒子造成的訊號差異所致。

四、螢光量子點

在生物醫學應用上，目前科學家最普遍用於觀察蛋白質或細胞體動態分佈的方法係是以傳統的螢光染料為主。但此法存有許多限制，主要是螢光消失的速度極快，不僅限制其應用，也造成觀察時的不便。此外，每種有機染料須以不同波長的光激發，造成無法在同時使用不同顏色的染料觀察，也是一項困擾。半導體量子點不但可以同時依據不同的波長激發不同的螢光以區分不同的生物分子，與有機染料相較，但因粒徑分佈較窄而使得光譜頻寬較窄，且發光強度與持久性也明顯比有機染料好。^[39]因此，半導體量子點極可能取代傳統的螢光

染料在生醫光電影像、活性細胞監測、臨床診斷與等方面的應用。量子點的螢光效果較明顯，且只要在單一光源的激發下，量子點間因大小稍微的不同即可被激發出不同顏色的光，以區分不同的生物部位。以下針對CdSe/ZnS與Si兩種較具代表性的半導體量子點分別作進一步介紹。

(一)CdSe/ZnS量子點

II-VI族化合物半導體均屬於直接能隙，其放光效率佳，且分佈能量由1.56 eV到3.68 eV，波長範圍涵蓋了整個可見光區，因此相關材料的研究發展備受重視。為了改善其穩定性及量子產率(quantum yield)，通常必需進行表面修飾。雖然在表面被覆有機材料可改善表面缺陷並增加發光量子效率^[41]，但也容易導致表面原子的配位不足，造成不飽和鍵和懸鍵(dangling bond)增多，進而使得表面原子活性增高，粒子因而變的不穩定。相反的，表面若是被覆無機材料，形成核殼結構，則不僅可減少表面相關缺陷狀態，也因為能隙補償電位(band offset potential)，可同時提升量子點的發光效率與穩定性^[42]。例如CdS/Cd(OH)₂、CdSe/ZnSe、CdSe/ZnS、CdS/HgS/CdS、及CdSe/CdS等量子點。

核殼型量子點的特性依據核、殼材料的性質而定，被覆不同的無機物可產生不同的特性。當能隙夠大時，被覆的殼有助於提高核的穩定度。無機物被覆的核殼型半導體量子點可藉由較高間隙能的殼層材料，如ZnS(3.2 eV)、ZnSe(2.72 eV)、CdS(2.42 eV)等，被覆在較低間隙能的CdSe(1.76 eV)上，可有效侷限電子-電洞對，增加其復合的機率，有效提昇其發光效率。^[42-44]

在II-VI族半導體量子點中，CdSe因發光範圍在可見光波段而最常被研究與使用，其合成方法很多，其中最為著名且被廣泛使用者為熱裂解法。^[45-46]不過，所得三辛基氧化膦(trioctylphosphin oxide, TOPO)安定化之量子點具有疏水性表面，若要應用於水相系統，特別是生物與生醫相關領域，則需進行表面親水化修飾。常見的方法有四種^[47]，第一是以含硫醇基及親水端(如羧基)的雙官能性分子取代疏水性的TOPO層，硫醇基與CdSe或ZnS表面鍵結，親水端則自量子點向外伸展至水溶液中。不過，因硫醇與ZnS的鍵結較弱，鍵結與未鍵結者之間有一動態平衡，導致其長時間的水相安定性變差。第二種方法則是使用含超過一個硫醇基的分子有助於平衡趨於鍵結。第三種方法是藉由鍵結分子的表面架橋來增強其鍵結，如在ZnS被覆之量子點表面藉著添加矽烷分子再被覆一層SiO₂，即可變成水溶性。所用矽烷

分子包括兩類，其一為具有在中性pH值下為帶正價或負價的表面官能基，另一為具聚乙烯醇鏈者。第四種方法不取代被覆之TOPO，藉著兩性分子(如 lipo-polymer 或 amphiphilic diblock copolymers)的加入，使其疏水端安定TOPO層，親水端延伸至水相中而達到親水性的目的，具有不需於表面交換步驟中曝露量子點敏感表面的優點。

親水化的量子點，即可與生物分子或藥物作進一步的複合。例如以第一種方法將 mercaptoacetic acid 修飾至 CdSe/ZnS 量子點表面後，即可再與蛋白質共價鍵結。^[39]又如以第四種方法將量子點包埋在磷脂質嵌段式共聚物(phospholipid block-copolymer)後，將此量子點-微胞表面連接DNA，即可提高其生物專一性。^[48]當與互補的螢光DNA混合時，則會產生連結，反之則否。同樣的，將分別修飾有互補之DNA的量子點-微胞混合時，粒子也會透過互補之DNA的連結而凝集在一起^[48]。此外，使用量子點-微胞在生物體內進行生物標定時，也發現量子點-微胞在細胞內有較低的生物毒性、較好的穩定性、較慢的光漂白效應(photobleach)，能夠用以標定各類的胚胎細胞。更者，即使被生物體的顏色干擾或是有很強的背景螢光，在胚胎發展初期，量子點-微胞的螢光也很快就能被偵測到。^[48]這對於在生物體內與體外的應用，皆甚具吸引力。

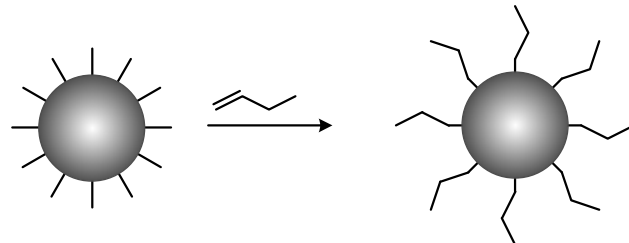
(二)Si奈米粒子

雖然II-VI族半導體量子點具有優良的螢光特性，但他們本身的毒性及化學不穩定性，使其在與生物分子或藥物鍵結前需要有良好的表面包覆與修飾，在活體動物試驗上仍頗有疑慮。尤其未來Cd可能因其毒性而被禁用，將使目前應用最為廣泛的CdSe/ZnS量子點也無法再使用。

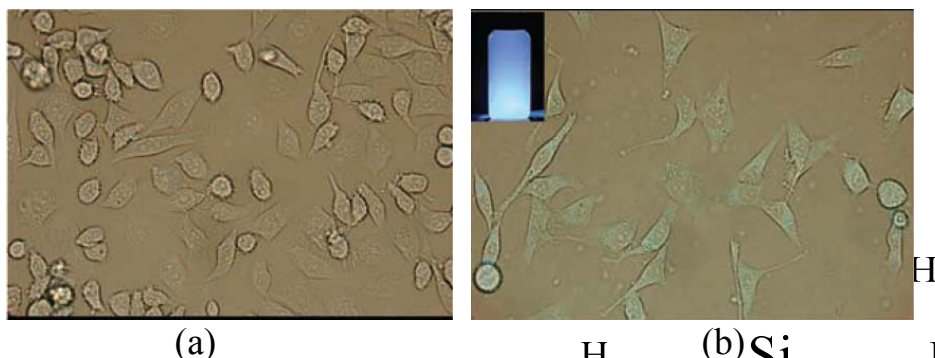
IV族的矽(Si)原屬間接能隙半導體，但當其奈米化後，內部的電子能帶因量子侷限效應而變為分離的能階，使原來的間接能隙變為接近直接能隙的能帶結構，且其能隙隨著粒徑減小而變大^[49]，展現相當典型的量子侷限效應，不僅可發出強光，且可藉由尺寸的調整而發出紅、綠、藍等單色光，甚至白光。此外，Si奈米粒子具有低毒性、高穩定化學性質、可發出與II-VI族和III-V族半導體奈米粒子相似的螢光、及因能與碳形成共價鍵而可與無機和有機物質進行分子層面的整合等優點，因此近年來也相當受到重視。又Si本身便宜、易形成氧化物絕緣層、且在積體電路工業早已是最普遍使用的半導體材料，更使得Si奈米粒子的研發更具有前瞻性與實用潛力。^[50-51]

為了避免氧化，合成的Si奈米粒子表面通常為疏水性。若要應用於生物與生醫領域，則需先進行表面親水化處理。例如，Warner等人^[52]先在逆微胞系統中，以LiAlH₄將SiCl₄還原形成表面具有Si-H基之

疏水性Si奈米粒子。然後在isopropanol及allyamine中藉由 H_2PtCl_6 的催化，將表面修飾成為親水的 $-NH_2$ 基，如圖十所示。^[52]結果顯示，allyamine被覆之Si奈米粒子，其螢光穩定性可長達數月之久。^[52]進一步將allyamine被覆之Si奈米粒子加至HeLa cell中，在螢光顯微鏡下可觀察到HeLa cell發出明顯的藍色螢光，如圖十一所示，顯示可以使用親水化之Si奈米粒子作為生物螢光影像中之發色團。



圖十 疏水性Si奈米粒子之表面親水化示意圖^[52] (經作者同意轉載)

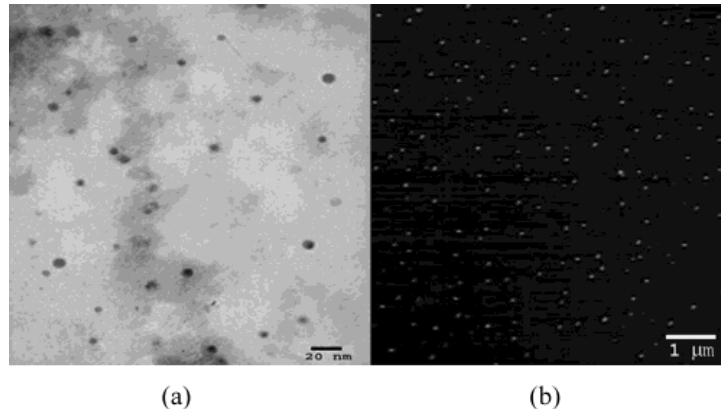


圖十一 未含(a)及含(b)allyamine被覆之Si奈米粒子的HeLa cells的螢光顯微鏡圖^[52] (激發波長 365nm, 放射波長480nm) (經作者同意轉載)

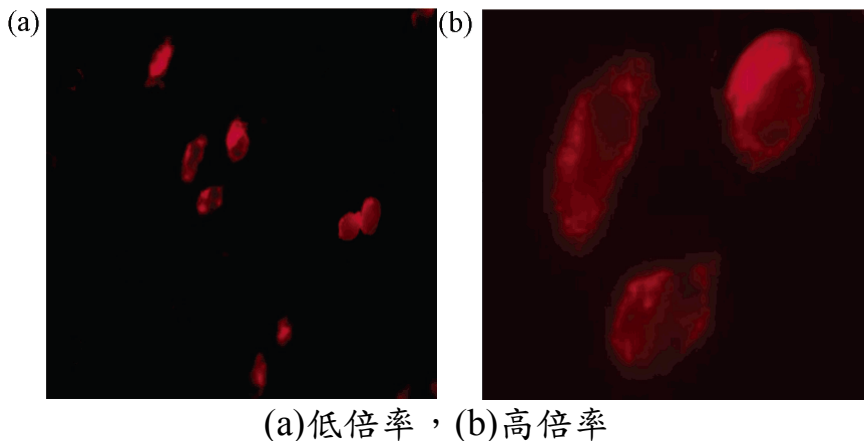
NH_2
Pt Catalyst

H H H
H H H

又如Li與Ruckenstein兩人^[53]，曾利用物理法加熱Si之前驅物而製得Si奈米粒子，並加入 HNO_3 和HF的混合溶液，藉蝕刻作用減小Si奈米粒子的粒徑並使其表面鈍化。為了增加粒子表面Si-H鍵的數量，加入5wt% HF水溶液，經超音波震盪數分鐘後過濾收集並加清洗。然後，加入親水性之丙烯酸(acrylic acid, AAc)乙醇溶液，以UV光照射方式，在Si-H位置上產生接枝聚合，形成水溶性的Si奈米粒子，能穩定地分散在水和乙醇中長達數月之久。圖十二為PAAc-被覆之Si奈米粒子的TEM(a)與AFM(b)圖，顯示其確實具有高度的分散性。^[53]進一步以PAAc-被覆之Si奈米粒子來標識中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary (CHO) cells)，由圖十三可清楚地看見亮紅色之Si奈米粒子在細胞的表面上。



圖十二 PAAc-被覆之Si奈米粒子的TEM(a)與AFM(b)圖^[53] (經作者同意轉載)



(a)低倍率，(b)高倍率

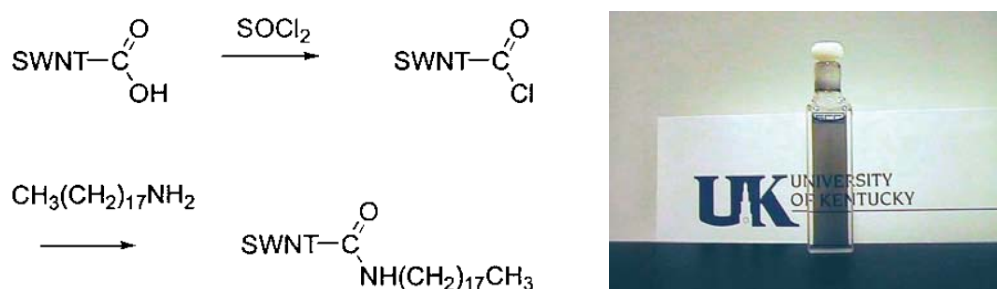
圖十三 以PAAc-被覆之Si奈米粒子標識CHO細胞之螢光顯微鏡圖^[53] (經作者同意轉載)

五、碳奈米管[54]

奈米碳管(Carbon nanotube, CNT)是由石墨層捲曲所構成的單層或多層中空管狀結構，通常可以電弧法、雷射剝除法、化學氣相沈積法等製得。單壁奈米碳管可分為扶手椅形(*armchair*)、鋸齒型(*zigzag*)和對掌型(*chiral*)三種。其電子特性因石墨層捲曲的方向不同可分為金屬和半導體性質，所有的扶手椅形(*armchair*)的單壁奈米碳管皆為金屬性質，而鋸齒型(*zigzag*)和對掌型(*chiral*)奈米碳管，部分為金屬性質，部份為半導體性質^[55]。

單壁奈米碳管(SWNTs)會因彼此間的凡得瓦爾力而自組裝成六方最密堆積的結構，加上碳管本身的石墨結構非常不活潑且缺乏官能基，使得碳管在溶液中的直接分散並不容易。最常使用的化學方法是

用強氧化劑($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$)或($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$)的混合酸氧化碳管，使管壁或末端生成羧酸基。^[56]酸化處理後能進行不同的化學反應，如醯胺化和酯化。如圖14^[57]所示，經過酸化後的奈米碳管，由於表面含有羧酸基，可以經由thionyl chloride (SOCl_2)加以氯化形成更具反應性的醯氯基(SWNT-COCl)，再與octadecylamine ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$)，進行醯胺化反應。醯胺化後的碳奈米管能分散在不同的有機溶劑中，如 CS_2 。



圖十四 表面醯胺化之單壁奈米碳管製備流程及其分散在 CS_2 溶劑中之影像圖^[57] (經作者同意轉載)

奈米碳管若要能應用在生物與生醫領域，表面的親水化也是同樣不可避免。奈米碳管的親水化可透過界面活性劑、水溶性高分子、及生物分子的使用而達成。以下分別簡述之。

(一)使用界面活性劑

界面活性劑能將奈米碳管分散於水溶液中，主要是藉由界面活性劑的疏水段可吸附在奈米碳管的管壁上，且同時其親水基可朝向水溶液而達成。使用不同類型的陰離子、非離子和陽離子型的界面活性劑皆可分散奈米碳管。^[58]其中離子型界面活性劑以sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS)和sodium dodecyl sulfate (SDS)最為有效，非離子型界面活性劑因有較大的分子量，可有效分散大量的奈米碳管。關於其操作程序，通常先將界面活性劑水溶液與奈米碳管混合，使用均質機、超音波震盪進行分散，然後再以離心機收集即可。

(二)使用水溶性高分子

使用水溶性高分子與表面氧化處理之奈米碳管產生共價鍵結，即可將奈米碳管分散在水中。^[54]常使用的水溶性高分子有poly-*m*-aminobenzene sulfonic acid(PABS)、polyethylene glycol(PEG)、monoamine-terminated polyethylene oxide(PEO)、diamine terminated polyethylene glycol(PEG_{1500N})、poly(propionylethylenimine-*co*-ethylenimine) (PPEI-EI)、poly(vinyl

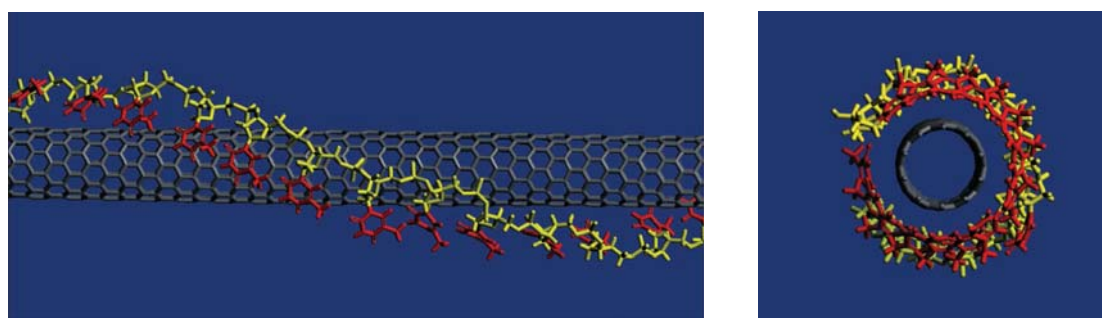
alcohol) (PVA)及glucosamine(GA)。

(三)使用生物分子

利用奈米碳管與生物分子間的交互作用，不僅可有效將奈米碳管分散於水相，且同時達到生物功能化的目的。交互作用的形式可分為非共價鍵結和共價鍵結兩種，前者是優先保留奈米碳管的電子特性的方法，通常發生在側邊，而後者則會擾亂碳管上的 π -network結構，並且在連接處缺陷的地方導致電子局部化，通常發生在兩端。不過，共價鍵結雖然可能導致奈米碳管內部性質和生物分子功能的改變，但在奈米碳管大致仍然能維持其電子特性，並且有能力去連接生物分子。以下分別進一步簡介之。

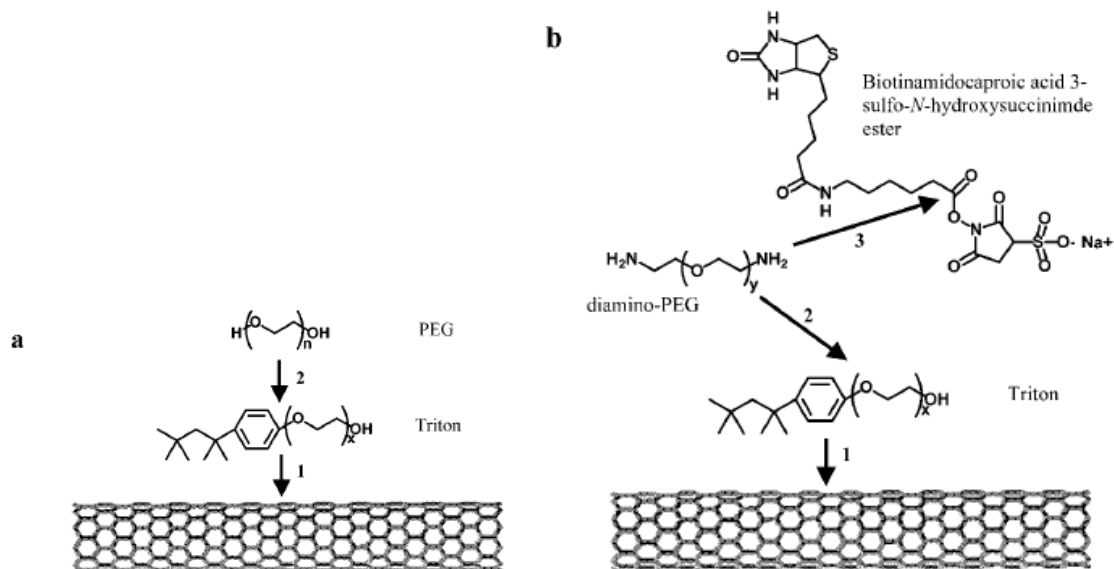
1.非共價鍵結的生物功能化

奈米碳管對不同的脂質和蛋白質(包括酵素、peptides和核酸)有很強的吸附能力，因此奈米碳管與生物分子結合後，在水中的分散性比使用界面活性劑和水溶性高分子還要良好。^[59-64]例如，單鏈的脂肪鏈段自組裝在奈米碳管的壁上，可形成超分子自組裝結構。圖15^[65]可以清楚看到單股DNA利用 π -堆疊(π -stacking)和奈米碳管產生非共價鍵結，並且以右手螺旋環繞在奈米碳管的表面。紅色和黃色部份分別為DNA的鹼基(bases)、醣-磷酸骨架(sugar-phosphate backbone)。由於DNA上鹼基和奈米碳管的表面有很強的作用力，造成DNA螺旋環繞在奈米碳管的表面。而藉著DNA的親水性，可將奈米碳管穩定地分散在水相中。在分離具有金屬或是半導體特性的奈米碳管方面，可利用強陰離子型管柱和DNA-CNTs複合物上帶負電的磷酸根來進行離子交換，使DNA-CNTs能吸附在管柱上。當DNA分別和金屬、半導體性質的奈米碳管複合後，因其表面的負電荷密度不同，可用不同濃度的硫氰化鈉(NaSCN)去沖提出不同的DNA-CNTs複合物，藉此分離出金屬、半導體性質的奈米碳管。^[65]



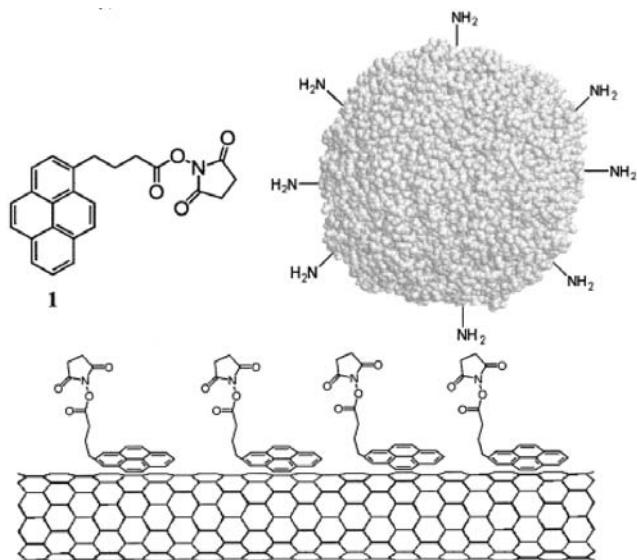
圖十五 單股DNA吸附在奈米碳管的橫面圖與末端俯視圖^[65] (經作者同意轉載)

Shim等人^[66]利用streptavidin/biotin系統探討蛋白質在單壁奈米碳管側邊的吸附行為時發現，在奈米碳管表面被覆界面活性劑Triton與PEG時，可防止蛋白質非專一性的鍵結。而如果先將奈米碳管以Triton和diamino-PEG被覆，然後再引入biotin-NHS共價鍵結，則可在避免非專一性鍵結的同時與streptavidin選擇性鍵結，如圖十六^[66]所示。顯示適當的表面修飾策略，將有助於奈米碳管對生物分子的辨識性。



圖十六 (a)單壁奈米碳管為防止蛋白質非專一性鍵結之表面被覆及 (b)在避免非專一性鍵結的同時引入streptavidin選擇性鍵結的策略^[66] (經作者同意轉載)

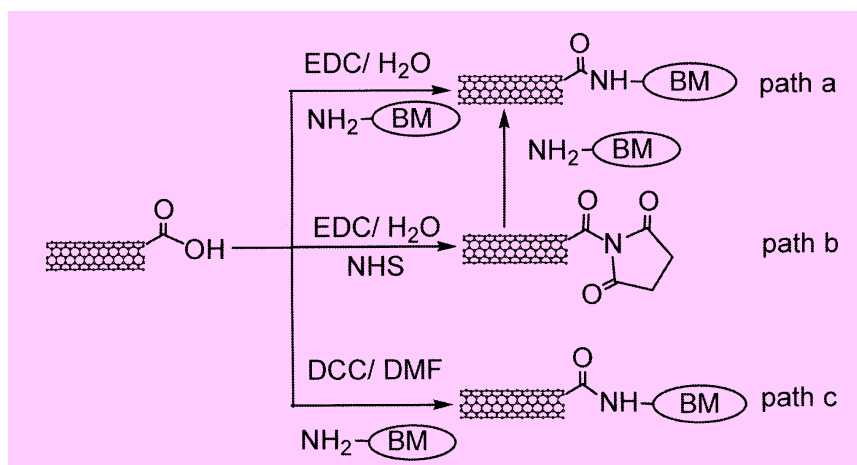
此外，Chen等人^[67]也提出單壁奈米碳管之側邊非共價鍵修飾，以固定化蛋白質。如圖十七所示，先將1-PBA(1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester)藉由 π -堆疊(π -stacking)的交互作用力穩定地吸附在奈米碳管的表面上，再利用蛋白質上的氨基與1-PBA產生親核性取代反應，形成醯胺鍵結。^[67]由此可知，生物分子若能與官能化的奈米碳管產生親核性取代反應，即可藉此使生物分子和奈米碳管產生共價鍵結。



圖十七 單壁奈米碳管藉由吸附1-PBA而固定化蛋白質之示意圖^[67]
(經作者同意轉載)

2. 共價鍵結的生物功能化

奈米碳管共價鍵結的生物功能化，多數發生在預先經酸處理而具有羧酸基的碳管兩端。因此，可以carbodiimide將碳管上的羧酸基活化，然後與生物分子上的氨基進行共價鍵結，如圖十八所示。^[54]通常奈米碳管上可以藉此方式修飾蛋白質^[68]或是尾端帶有氨基的DNA^[69]，達到生物功能化的目的。



BM: biomolecule (protein, NH₂-terminated DNA)
 EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
 NHS: N-hydroxysuccinimide
 DCC: dicyclohexyl-carbodiimide
 DMF: dimethylformamide

圖十八 單壁奈米碳管藉carbodiimide活化其羧酸基以與生物分子之氨基共價鍵結的示意圖^[54] (經作者同意轉載)

在奈米碳管上修飾生物分子，除了上述方法外，也可以藉由氨基的引入而達成。例如單壁奈米碳管經過酸處理後，可在尾端或壁上產生羧酸基。接著以 SOCl_2 處理，再與乙二胺(ethylenediamine)反應，形成尾端或壁上帶有氨基的奈米碳管。然後藉由氨基，可再與succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)反應，最後與尾端帶有硫醇基的DNA進行共價鍵結，形成DNA-CNT複合物，提高其生物專一性。^[70]

而奈米碳管除了以酸處理產生羧酸基以進行後續之生物功能化外，也可在其管壁上產生1,3環化加成反應，經此方式共價鍵結N防護之氨基酸(*N*-protected amino acids)，形成水溶性的奈米碳管。例如可先將氨基酸和三聚甲醛(paraformaldehyde)加入含有奈米碳管的DMF(dimethylformamide)溶劑中，加熱至 130°C 並持續96 h，反應產生尾端含有Boc(*N*-tetrabutoxycarbonyl)之官能基。其次，通入HCl氣體進行酸處理，以移除Boc，產生尾端為氯化銨之官能基。最後，經由HOBT(*N*-hydroxybenzotriazole)和DIC(diisopropylcarbodiimide)的活化，再與Fmoc-Gly-OH進行偶合反應，達到親水化與氨基酸化的目的。^[71]

六、主要參考文獻

- 1.H. Gu, K. Xu, C. Xu, and B. Xu. 2006. Chem. Commun. 941.
- 2.W. Shenton, S. A. Davis, and S. Mann.1999. Adv. Mater., 11, 449.
- 3.C. M. Niemeyer, Angew. 2001. Chem. Int. Ed., 40, 4128.
- 4.J. E. Gestwicki, L. E. Strong, and L. L. Kiessling.2000. Angew. Chem. Int. Ed., 39, 4567.
- 5.X. Yang, L. A. Wenzler, J. Qi, X. Li, and N. C. Seeman, 1998.J. Am. Chem. Soc.,120, 9779.
- 6.S. J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kanneurf, and R. L. Letsinger, 2000. Angew Chem. Int. Ed.,39, 3845.
- 7.C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, 1996. Nature, 382, 607.
- 8.T. A. Taton, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, 2000.Science,.289, 1757.
9. C. Y. Tsai, A. L. Shiau, P. C. Cheng, D. B. Shieh, D. H. Chen, C. H. Chou, C. S. Yeh, and C. L. Wu, 2004. Nano Lett., 4, 1209.
- 10.A. F. Puentes, K. M. Krishnan, and A. P. Alivisatos, 2001. Science, 291, 2115.
- 11.J. Park, K. An, Y. Hwang, J. G. Park, H. J. Noh, J. Y. Kim, J. H. Park, N. M. Hwang, and T. Hyeon, 2004. Nat. Mater., 3, 891.
- 12.F. X. Redl, K. S. Cho, C. B. Murray, and S. Óbrien, 2003. Nature., 423, 968.
- 13.Q. Song and Z. J. Zhang, 2004. J. Am. Chem. Soc., 126, 6164.

- 14.S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, and G. Li, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 273.
- 15.P. Tartaj and C. J. Serna, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15754.
- 16.X. Teng and H. Yang, 2003. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 14559.
- 17.T. Ji, W. B. Jian, and J. Fang, 2003. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8448.
- 18.E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, H. Schnablegger, A. Kornowski, Ö. Festin, P. Svedlindh, M. Haase, and H. Weller, 2003. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 9090.
- 19.T. Fried, G. Shemer, and G. Markovich, 2001. *Adv. Mater.*, 13, 1158.
- 20.J. L. Lyon, D. A. Fleming, M. B. Stone, P. Schiffer, and M. E. Williams, 2004. *Nano Lett.*, 4, 719.
- 21.S. Vaucher, J. Fielden, M. Li, E. Dujardin, and S. Mann, 2002. *Nano Lett.*, 2, 225.
- 22.H. Gu, R. Zheng, X. Zhang, and B. Xu, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 5664.
- 23.K. E. Elkins, T. S. Vedantam, J. P. Liu, H. Zeng, S. Sun, Y. Ding, and Z. L. Wang, 2003. *Nano Lett.*, 3, 1647.
- 24.D. Portet, B. Denizot, E. Rump, J. J. Lejeune, and P. Jallet, 2001. *J. Colloid Interface Sci.*, 238, 37.
- 25.Y. Gao, In *Biofunctionalization of Nanomaterials* (C. Kumar ed.), Ch. 3, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- 26.J. Fan, J. Lu, R. Xu, R. Jiang, and Y. Gao, 2003. *J. Colloid Interface Sci.*, 266, 215.
- 27.C. Xu, K. Xu, H. Gu, R. Zheng, H. Liu, X. Zhang, Z. Guo, and B. Xu, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 9938.
- 28.C. Xu, K. Xu, H. Gu, X. Zhong, Z. Guo, R. Zheng, X. Zhang, and B. Xu, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3392.
- 29.H. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, C. W. Yu, and B. Xu, 2003. *Chem. Commun.*, 1966.
- 30.H. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, L. Wang, and B. Xu, 2003. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15702.
- 31.S. H. Huang, M. H. Liao, and D. H. Chen, 2003. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1095.
- 32.D. K. Kim, M. Mikhaylova, F. H. Wang, J. Kehr, B. Bjelke, Y. Zhang, T. Tsakalakos, and M. Muhammed, 2003. *Chem. Mater.*, 15, 4343
- 33.M. Yanase, M. Shinkai, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, and T. Kobayashi, 1998. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 775.
- 34.A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, and T. Kobayashi, 2005. *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 1.
35. N. Kohler, G. E. Fryxell, and M. Zhang, 2004. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 7206.
- 36.J. A. Reddy and P. S. Low, 1998. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 15, 587.

37. Y. S. Chang, S. W. Chang, and D. H. Chen, 2006. *React. Funct. Polym.*, 66(3), 335.
38. Y. C. Chang, D. B. Shieh, C. H. Chang, and D. H. Chen, 2005. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 1(2), 196.
39. W. C. W. Chan and S. Nie, 1998. *Science*, 281, 2016.
40. X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, and S. Nie, 2004. *Nature Biotechnol.*, 22, 969.
41. D. J. Norris, A. Sacra, C. B. Murray, and M. G. Bawendi, 1994. *Phys. Rev. Lett.*, 72, 2612.
42. M. A. Hines and P. Guyot-Sionnest, 1996. *J. Phys. Chem.*, 100, 468.
43. X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich and A. P. Alivisatos, 1997. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 7019
44. M. Han, X. Gao, J. Z. Su, and S. Nie, 2001. *Nature Biotechnol.*, 19, 631.
45. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, 1998. *Science*, 281, 2013.
46. S. Jaffar, K. T. Nam, A. Khademhosseini, J. Xing, R. S. Langer, and A. M. Belcher, 2004. *Nano Lett.*, 4, 1424.
47. M. J. Murcia, C. A. Naumann, In *Biofunctionalization of Nanomaterials* (C Kumar ed.), Ch.1, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
48. B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, and A. Libchaber, 2002. *Science*, 298, 1759.
49. J. H. Warner, A. Hoshino, K. Yamamoto, and R. D. Tilley, 2005. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 550.
50. L. Wang, V. Reipa, and J. Blasic, 2004. *Bioconjugate Chem.*, 15, 409.
51. F. Hua, M. T. Swihart, and E. Ruckenstein, 2005. *Langmuir*, 21, 6054.
52. J. H. Warner, A. Hoshino, K. Yamamoto, and R. D. Tilley, 2005. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 550.
53. Z. F. Li and E. Ruckenstein, 2004. *Nano Lett.*, 4, 1463.
54. E. Bekyarova, R. C. Haddon, and V. Parpura, In *Biofunctionalization of Nanomaterials* (C. Kumar ed.), Ch. 2, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
55. E. Bekyarova, Y. Ni, E. B. Malarkey, V. Montana, J. L. McWilliams, R. C. Haddon, and V. Parpura, 2005. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 1, 3.
56. J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T. R. Lee, D. T. Colbert, and R. E. Smalley, 1998. *Science*, 280, 1253.
57. J. Chen, M. A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A. M. Rao, P. C. Eklund, and R. C. Haddon, 1998. *Science*, 282, 95.
58. V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, R. H. Hauge, R. E. Smalley, J. Schmidt, and Y. Talmon, 2003. *Nano Lett.*, 3, 1379.
59. F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbesen, and C. Mioskowski, 1999. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 1912.
60. B. F. Erlanger, B. X. Chen, M. Zhu, and L. Brus, 2001. *Nano Lett.*, 1,

465.

61. K. Besteman, J. O. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering, and C. Dekker, 2003. *Nano Lett.*, 3, 727.
62. C. Richard, F. Balavoine, P. Schultz, T. W. Ebbesen, and C. Mioskowski, 2003. *Science*, 300, 775.
63. M. Zheng, A. Jagota, M. S. Strano, A. P. Santos, P. Barone, S. G. Chou, B. A. Diner, M. S. Dresselhaus, R. S. Mclean, G. B. Onoa, G. G. Samsonidze, E. D. Semke, M. L. Usrey, and D. J. Walls, 2003. *Science*, 302, 1545.
64. V. Zorbas, A. Ortiz-Acevedo, A. B. Dalton, M. M. Yoshida, G. R. Dieckmann, R. K. Draper, R. H. Baughman, M. Jose-Yacamán, and I. H. Musselman, 2004. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 7222.
65. M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson, and N. G. Tassi, 2003. *Nature Mater.*, 2, 338.
66. M. Shim, N. W. S. Kam, R. J. Chen, Y. Li, and H. Dai, 2002. *Nano Lett.*, 2, 285.
67. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, and H. Dai, 2001. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 3838.
68. W. Huang, S. Taylor, K. Fu, Y. Lin, D. Zhang, T. W. Hanks, A. M. Rao, and Y.-P. Sun, 2002. *Nano Lett.*, 2, 311.
69. K. A. Williams, P. T. M. Veenhuizen, B. G. de la Torre, R. Eritja, and C. Dekker, 2002. *Nature*, 420, 761.
70. S. E. Baker, W. Cai, T. L. Lasseter, K. P. Weidkamp, and R. J. Hamers. 2002. *Nano Lett.*, 2, 1413.
71. V. Georgakilas, N. Tagmatarchis, D. Pantarotto, A. Bianco, J. P. Briand, and M. Prato, 2002. *Chem. Commun.*, 3050.

第七章 奈米微脂體技術及生醫應用

何佳安副教授 國立清華大學化學系

廖韋晴 國立清華大學化學系

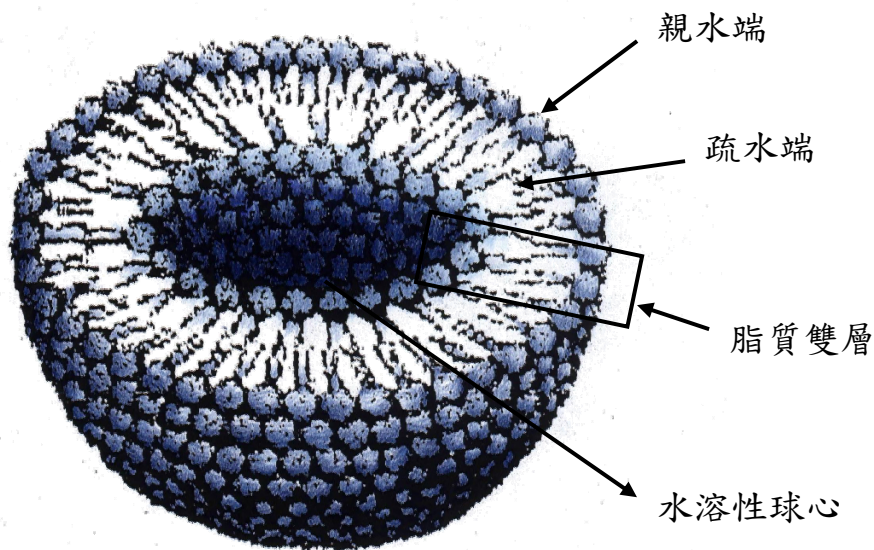
一、前言

微脂體於西元1965年由英國劍橋巴布拉漢研究中心(Babraham Institute)的 Alec Bangham首次發現。^[1] 西元1970年代，微脂體首先被認為可以當做藥物載體，並進行動物活體實驗，隨即引起研究熱潮。但由於技術上之種種困難，難以達到實用的理想，而在1980年代中期漸漸沒落。所幸仍有部份研究團隊鍥而不捨地研究改進，在1990年微脂體劑型藥物Amphotericin B (Ambisome®) 首獲愛爾蘭認可，用於全身性黴菌感染之治療。隨著生物技術之蓬勃與進步，微脂體在生物醫學科技方面之應用漸漸受到重視，使得微脂體的研究又在二十一世紀的現今熱門起來。

二、微脂體簡介

(一) 微脂體之構造

微脂體(liposome)是脂質空心微球，可均勻分佈於水溶液中。脂質雙層膜 (lipid bilayer) 主要由磷脂質分子所構成。其磷酸端為親水性；脂肪酸鏈為疏水性，構造與生物膜類似^[2](圖一)。正因為微脂體之類細胞膜構造，加上具有生物相容性和生物可分解性，因此被陸續應用在基因治療^[3]及藥物傳遞^[4-5]的臨床試驗。水溶性物質或藥物可被包裹在球心溶液中；油溶性物質或藥物則可夾在脂雙層內。微脂球可當作水溶性物質或油溶性物質的載體，也因此被廣泛應用在化妝品工業及檢測試劑。^[6-18]



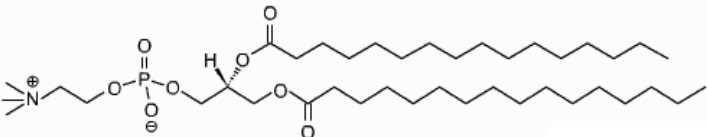
圖一 微脂體結構圖 ^[19] (本圖經作者同意轉載)

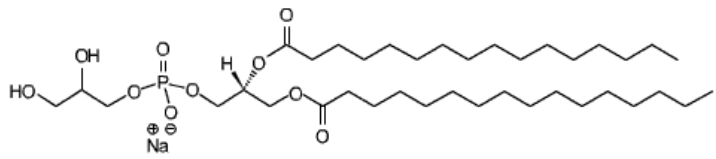
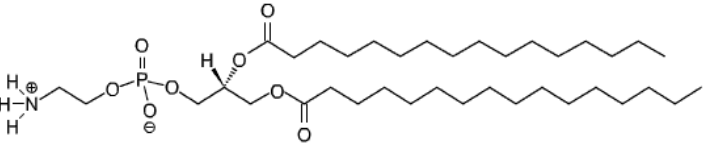
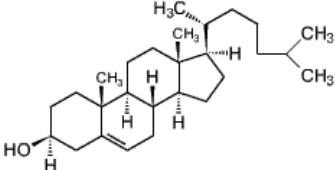
(二) 微脂體的組成

O'Connell 等人在1985年指出由二棕櫚酸磷脂醯膽鹼(dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC)、二棕櫚酸磷脂醯甘油(dipalmitoyl phosphatidyl glycerol, DPPG)、二棕櫚酸磷脂醯乙醇胺(dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine, DPPE)及膽固醇(cholesterol)組成的脂質混合物可以形成穩定微脂球,相似的配方也已成功地應用在微脂體免疫分析法(liposome immunoassays, LIA)之開發。^[11,13-15,17-18] 磷脂質的長鏈飽和脂肪酸經由空間立體障礙(steric hindrance)及凡得瓦作用力(van der Waals interactions),是維持膜之穩定以及碳氫鏈緊密排列的穩定作用力。

上述四種磷脂質之性質簡述如下 ^[2] (表一):

表一 四種磷脂質之結構圖

	磷脂質名稱 / 結構圖	分子量
1	dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC 	734.05

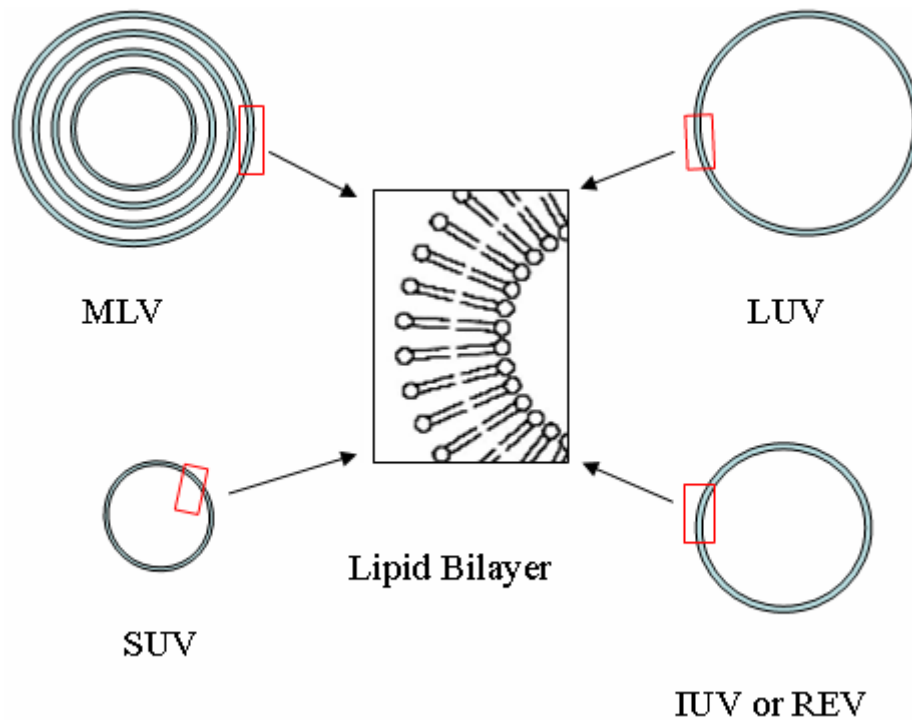
2	dipalmitoyl phosphatidyl glycerol, DPPG	744.96
		
3	dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine, DPPE	691.97
		
4	cholesterol	386.68
		

1. 二棕櫚酸磷脂醯膽鹼(DPPC):不溶於水,在水相中會緊密地排列成平面的雙層平板(planar bilayer sheet),使水相與疏水性的脂肪酸鏈不相容的交互作用減低到最小程度。
2. 二棕櫚酸磷脂醯甘油(DPPG):帶負電的磷脂質,利用立體障礙(steric hindrance)、氫鍵以及靜電荷(electrostatic charge)調節脂雙層膜親水基之間的引力。
3. 二棕櫚酸磷脂醯乙醇胺(DPPE):在親水端的磷酸基頭多一個一級胺基(primary amine group),常用來做為修飾微脂體表面的重要官能基,共價鍵結分析物或抗體。
4. 膽固醇(cholesterol):自然界大部分的細胞膜中都含有膽固醇。膽固醇本身不能形成脂雙層的結構,但會造成脂雙層膜性質的改變。例如:增加了脂肪酸鏈排列的密度,使得膜的堅硬度(rigidity)增加;相對的減低了膜的流動性,降低包裹在最內層的水溶性物質之漏損率。

(三) 微脂體的分類

微脂體依其大小、形狀不同而有各種名稱。依型態分類最常見者為:MLV (multilamellar vesicle,多層微脂粒),粒徑0.4~3.5 μm ,一顆微脂粒內包有數個同心球,有如洋蔥。LUV (large unilamellar vesicle,單層大微脂粒),粒徑0.2~1 μm 。SUV (small unilamellar vesicle,單層小微脂粒),粒徑0.02~0.05 μm 。各型微脂粒有其適用特性,MLV有層

層釋出包容物之特性(sustained release)；LUV的包容性最大，可包含高分子水溶性物質；SUV很小，可穿過血管壁。



圖二 微脂球之種類^[19] (本圖經作者同意轉載)

1. 多層微泡 (Multilamellar vesicles, MLV) ;
2. 單層大微泡 (Large unilamellar vesicles, LUV)
3. 單層小微泡 (Small unilamellar vesicle, SUV) ;
4. 中間尺寸單層小微泡 (Intermediate-size unilamellar vesicles, IUV)

(四) 微脂體與細胞膜的交互作用

微脂體與細胞膜間的交互作用^[20]，主要可以分為四種類型，第一種為膜間轉換作用(Inter-membrane transfer)：是只發生在磷脂層的現象，因為細胞膜有流動性，當微脂體與細胞膜的距離很近時，會受專一性的蛋白質或脂蛋白作用，而使彼此的磷脂質成份發生互相轉換的情形，是單純的磷脂間交換。

第二種是吸附作用 (Adsorption)：包含物理吸附，以及與細胞膜表面專一性蛋白質受器有關的吸附。一般情況，微脂體與細胞膜間的交互作用在低溫下即可進行；但若與表面專一性蛋白受器結合，而將微脂體攝入細胞內的反應則須在攝氏37度才會進行。

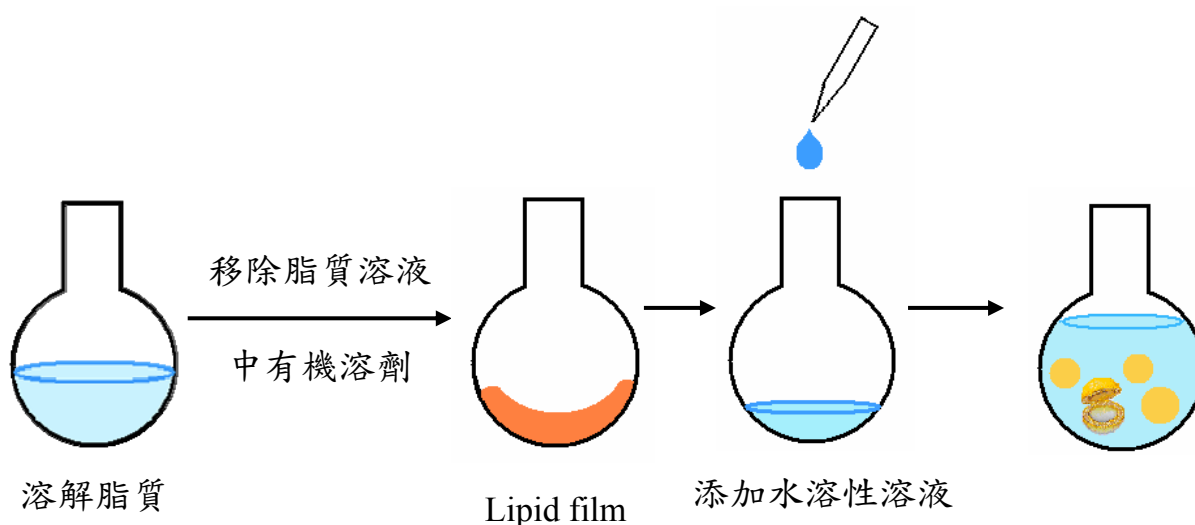
第三種是融合作用 (Fusion)：當微脂體與細胞膜極近時，微脂體的脂質與細胞膜發生融合，而使得包裹在微脂體中的物質釋放至細

胞中，有時其融合受到一些媒介的輔助，所以如果在微脂體的表面接上一些融合媒介，便可以促使微脂體與細胞的融合。

第四種是內吞作用 (Phagocytosis/Endocytosis)：生物體內有些特定細胞具有吞食的作用，例如：巨噬細胞 (macrophage)、樹突狀細胞 (dendritic cell)，可將微脂體攝入細胞內形成內質體，再藉由溶酶體 (lysosome) 將其融合後再分解而釋出內部物質，另有部分表面具有特殊專一性受器之細胞，也可在接受特殊物質後，將其吞噬，所以利用此點，我們可在微脂體表面修飾特殊物質，使其為特定細胞所吞噬，增加特異性。

(五) 微脂體的製備

製作微脂體的方法，依據脂質分散 (lipid dispersion) 的模式可分為三大類：機械性分散 (mechanical dispersion)、溶劑分散 (solvent dispersion) 以及界面活性劑溶解 (detergent solubilization)。^[1] 製備流程不外乎四步驟：溶解脂質、移除脂質溶液中有機溶劑、添加水溶性溶液、純化微脂球。



圖三 微脂體製備流程

機械性分散法之原理是將脂質溶解後去除溶媒形成脂薄膜，再將欲包裹於球心的水溶性物質加入，搖晃混合而成。此類技術中最常見的有薄膜法 (film method) 及冷凍-融解法 (freeze and thaw method)。薄膜法則為Bangham用來製備生物膜模型-微脂體的方法。

溶劑分散技術中最常見的方法有逆相蒸發法 (reverse-phase evaporation method)^[1,13,21]及溶劑注射法 (solvent-injection method)。逆

相蒸發囊泡(reverse-phase evaporation vesicles, REV)多為異質性的單層大微泡，其直徑範圍由100至1000 nm。直徑 150-200 nm的REVs普遍用在微脂球免疫分析法上。^[22,23] 溶劑注射法則是將脂質先溶在有機溶劑(如:乙醚或乙醇)中，接著將之注入至水溶性溶液裡。所得到的單層小微泡有高體積的包覆能力。^[1,24]

第三類為界面活性劑溶解(detergent solubilization)法，先將界面活性劑與磷脂質混合均勻而形成的微胞(micelles)溶液系統，後將界面活性劑從系統中移除，微脂體族群逐漸增加，最後進而結合合併成封閉式單一脂雙層(closed single-bilayer vesicles)的微脂體。^[1]

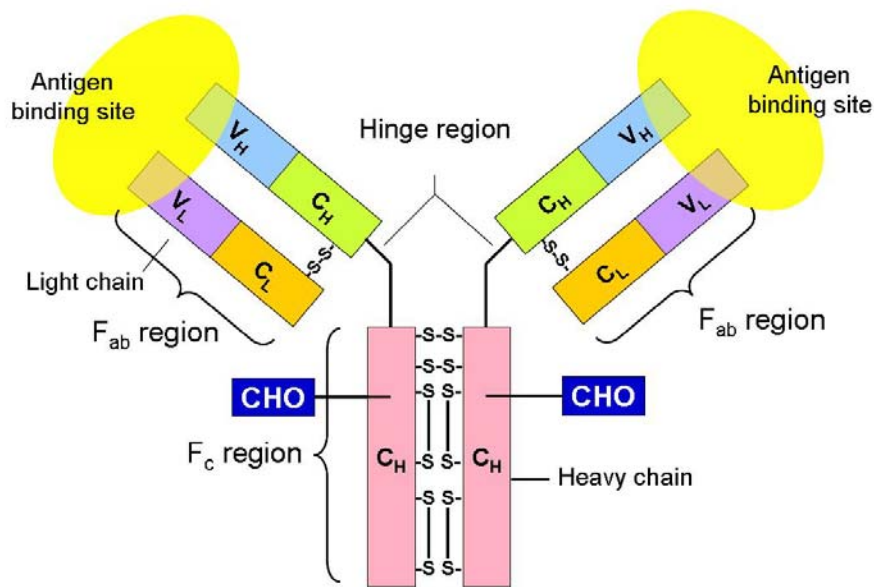
二、免疫分析法介紹

(一) 免疫分析之簡介

免疫分析法(immunoassay)是利用抗原，及其對應的抗體間具有專一性結合能力為基礎，進而運用到分析檢驗上。免疫分析法被喻為是最具特異性的分析方法之一，除了提供低偵測極限外，還適用於不同性質物質之檢測。例如:生化分子-胰島素；食品毒素-黃麴毒素、福馬鐮孢毒素；農藥殘留...等。加上僅需極少量樣品(大多只需~ μ L)，且大部分的樣品無需前處理清除雜質或純化濃縮的步驟，使得免疫分析法已普遍用在臨床檢驗(clinical testing)、藥物分析(pharmaceutical analysis)、環境監控(environmental monitoring)及食品安全檢測(food safety testing)等方面。^[25]

(二) 抗體及其特性

抗體(antibody)屬於醣蛋白中的一類，為人體免疫系統對抗外來物，例如:細菌、病毒或其他外來蛋白...等時，所產生的蛋白質大分子，在任何免疫分析法中均為最重要的因子之一。圖四為抗體的基本結構。



圖四 抗體的基本結構

抗體由兩條重鏈(heavy chains or H chains)及兩條輕鏈(light chains or L chains)所組成，彼此之間由雙硫鍵連接而成Y字狀的蛋白質分子。抗體Y字型底部稱為F_c region，每個抗體在此處都具有相同的胺基酸序列，因此又稱不可變區(constant region)。Y字型上方的兩臂處稱為F_{ab} regions，具有兩個相同的鍵結位置(identical binding sites)，不同的抗體在此區域的胺基酸序列也有所不同，因此又稱可變區(variable region)。正因為此特性，使得每種抗體與其相對應之抗原具有獨特的親和(binding affinity)及特異性 (specificity)。抗體的種類繁多，單體如IgG (immunoglobulin)、IgD及IgE；而IgA、IgM則以Fc聯合多胜肽(Fc-linked polypeptide)，稱為J (joining) 鍵，所連結(2或5個)Y字型單體而成。

構成抗原-抗體(由抗體上的抗原結合位置處結合)結合基礎的非共價交互作用包括氫鍵(hydrogen bonds)、離子鍵(ionic bonds)、疏水性交互作用 (hydrophobic interaction)及凡得瓦力(van der Waals interaction)。其中疏水性交互作用力佔抗原-抗體間非共價鍵結力的50%。^[26]

(三) 單株抗體與多株抗體

抗體是B淋巴細胞分泌產生之蛋白質分子。^[27] 可分為單株抗體與多株抗體兩類。多株抗體(polyclonal antibody)之製作是將抗原打入老鼠體內，而含1個以上抗原決定基(antigenic determinant，又稱epitope)的抗原分子，刺激老鼠體內的免疫反應而誘導出針對不同epitopes的抗體，稱之多株抗體。多株抗體之製作容易又快速且反應性高，但其

缺點來自於實驗用的老鼠會有個體差異問題，因此很難確保每一批血清所含之多株抗體皆有相同力價。

單株抗體(monoclonal antibody)之製作乃由Kohler和Milstein在1975年所發明。其製作方法是在老鼠經過抗原誘發免疫反應後，分離出針對特定epitope可產生抗體之B淋巴細胞(B lymphocytes, B cells)，並將之與骨髓瘤細胞(myeloma cells)融合。經由篩選獨立含融合瘤的細胞株 (hybridoma cells)並加以培養繁殖，而得到具特異性，且只針對抗

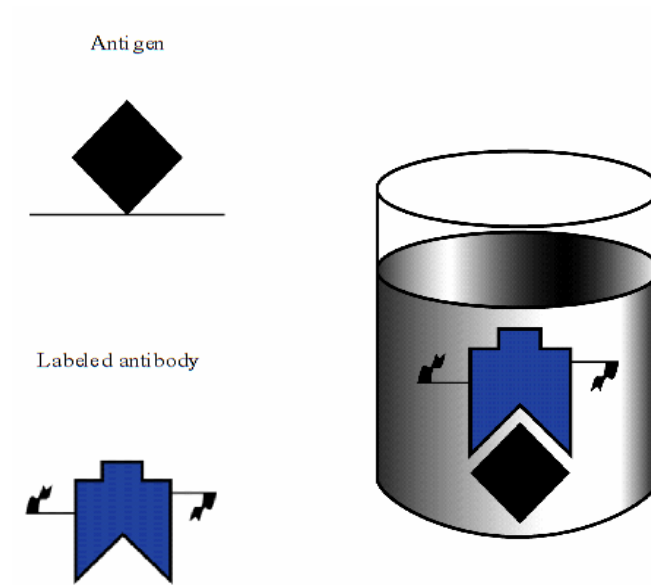
原上的特定單一epitope具結合力的單株抗體。^[28]

(四) 免疫分析法之分類及型態

免疫分析法可概略分為兩種:使用標識物質(label)的系統及無標識物質 (unlabel)的系統。而免疫沉澱法(immunoprecipitation)及免疫凝集法 (immunoagglutination)技術的發展比放射免疫法(radiometric immunoassay) 還早，並可直接以肉眼觀察到抗體-抗原作用。然而這些技術所使用的抗體及抗原分子必須是多價數的(multivalent)，易於形成可沉積的大型複合物 (cross-linked complexes)以利肉眼觀察。在使用標識物的系統中，放射線同位素、酵素、螢光物質以及化學發光物質皆可做為免疫分析法中抗體—抗原反應的訊號放大器。1959年由Yalow和Berson兩人所發明的放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)，首次將放射線同位素類標識物用在免疫分析法。但由於安全性之考量，又因其所使用試劑昂貴價位，放射線同位素的使用遠不如酵素型標識物廣泛，亦不常用在食品、農業及環境分析之領域。^[29]

免疫分析法的形式又可依據直接(direct)(圖五)或間接(indirect)(圖六、圖七)偵測標識物質(detectable label)做為分類標準。^[30]其原理分述如下:

1. 直接偵測法: 利用一級抗體(primary antibody)直接與抗原反應，標識物可共價連接在抗原或抗體上。
2. 間接偵測法: 利用接有標識物的二級抗體與已形成之一級抗體和抗原複合物作反應；亦可使用抗生物素蛋白(avidin)或鏈黴抗生素蛋白 (streptavidin)與生物素(biotin)之間的親和反應來作放大偵測。鏈黴抗生素蛋白具有四個高親和性結合位(high-affinity binding sites)可供生物素所結合。標有生物素的一級抗體 (biotinylated primary antibody) 可以與接有標識物之(鏈黴)抗生物素蛋白((strept)avidin-conjugated label) 反應結合，再間接作偵測。



圖五 免疫分析直接偵測法^[31](本圖經作者同意轉載)

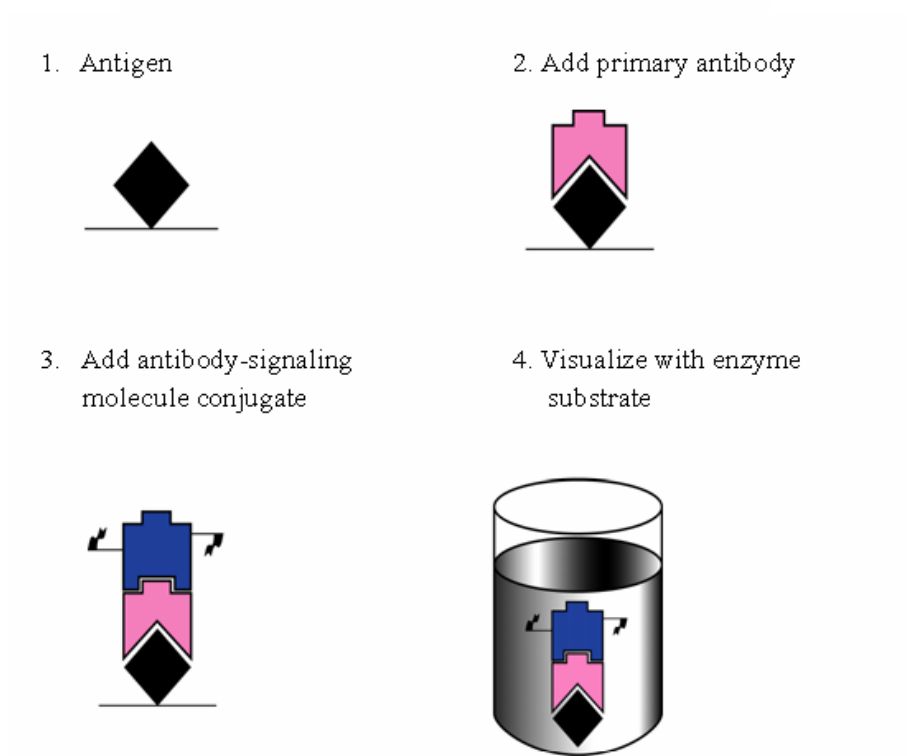


圖 2-2 b：免疫分析間接偵測法

圖六 免疫分析間接偵測法^[31](本圖經作者同意轉載)

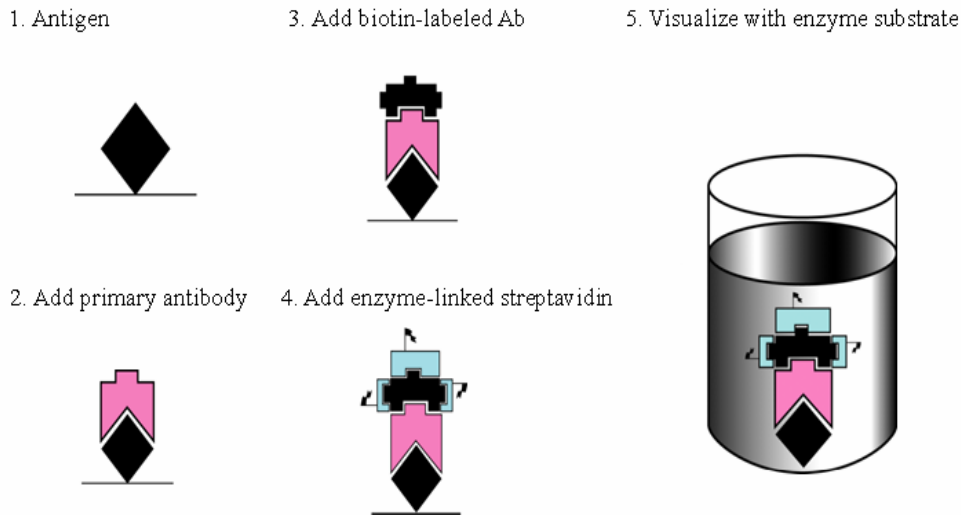


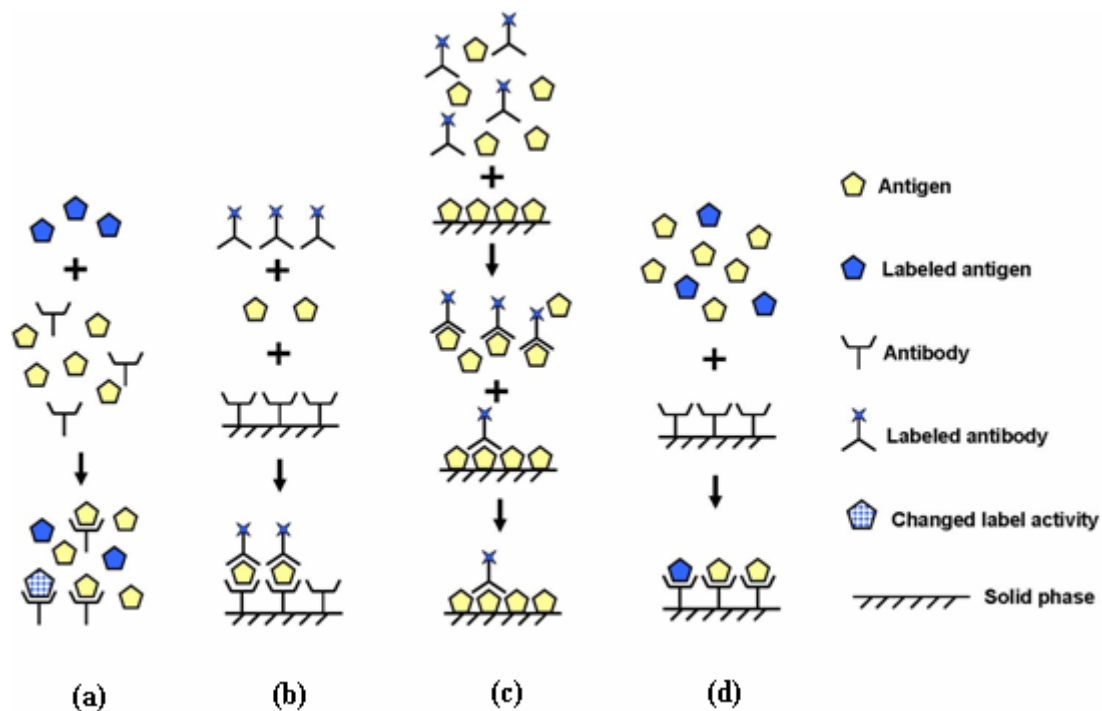
圖 2-2 c: 利用 streptavidin 及 biotin 間的親和反應之免疫分析間接法

圖七 利用 streptavidin 及 biotin 間的親和反應之免疫分析間接法^[31](本圖經作者同意轉載)

免疫分析法亦可依據是否需要“分離”步驟，分類為均質性 (homogeneous) 分析法或異質性 (heterogeneous) 分析法。均質性分析系統中，不需將抗原與抗體複合體與非複合部分加以分離；而異質性分析法則需要移除過量未產生辨識結合反應的試劑，再偵測訊號。^[30] 一般來說，異質性分析為最簡易且最廣泛的系統，通常應用在固相分離法 (solid phase) 上。其原理為將抗原或抗體固定於固相支持物的表面，如多苯乙烯試管 (polystyrene tube)、微孔盤 (microtiter wells)、微顆粒 (microparticle) 或耐龍、硝化纖維膜 (membrane) 上，由於辨識結合反應在固相支持物上發生，故易藉由清洗步驟達到分離的目的。

免疫分析方法可依據抗原性質之不同而分為競爭型 (competitive) 及非競爭型 (non-competitive) 分析法，或稱三明治法 (sandwich assay)。非競爭型的典型例子為抗原由兩個抗體以三明治夾法所辨識分析。所用之一級抗體被固定在固定相上；而二級抗體則被共價連接上標識物，以為偵測用 (圖八 a)；在競爭型分析系統中，抗原 (樣品) 及標有標識物的抗原，同時競爭固定數目的抗體結合位置故稱之 (圖八 b)。競爭型分析系統中除了可以將抗體標識 (圖八 c) 或可標識抗原 (圖八 d) 以為分析訊號之來源。

大部分的免疫分析型式皆以酵素或放射性元素作為標識物，亦有結合微脂球研發新型之免疫分析檢測系統。^[8,9,11,12,13,14,16,32,33,34,35,36]



圖八 免疫分析法依據抗原性質不同的分類型式^[30]

- (a) a homogeneous competitive immunoassay
- (b) a heterogeneous non-competitive immunoassay(sandwich assay)
- (c) a heterogeneous competitive immunoassay
- (d) a heterogeneous competitive immunometric assay

三、微脂體型(Liposomal)體外檢驗試劑組(in vitro diagnostic kits)的研發

在整體投資環境回歸商業基本面後，國內對生技產業的期待由高風險高技術的生技製藥業，逐漸轉向投入全球市場僅次於生技製藥業但回收期短、且易進入市場面的醫療器械設計與檢驗試劑等產業。2001年全球檢驗試劑市場約為330億美元，預估每年將以7%以上成長。在檢驗試劑市場中，又以快速檢驗試劑成長最快達到13%，成為現在及未來市場發展之主流之一。

(一) 微脂體型免疫分析法

有別於酵素連結免疫吸附法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)需要更換試劑並耗時等待酵素與基質作用改變顏色以產生訊號。^[38,39,40,41] 微脂體免疫分析法利用微脂體包裹訊號物質，如螢光染劑或其他具光學活性或電化學活性的標識物，提供立即式訊號

放大之量測。常用在微脂體免疫分析之螢光染劑有 carboxyfluorescein(CF)及 sulforhodamine B (SRB)兩種，可用紫外光-可見光光譜儀 (UV-VIS spectrophotometer) 或螢光光譜儀 (spectrofluorometer)偵測之。^[42] 通常一個好的標識物需具備高的螢光值或高莫耳吸收度、化學穩定性高及易溶於較廣的pH範圍水溶液中。^[23]

在微脂體免疫分析法(liposome immunoassays)中，包裹標識物的微脂體的表面必須攜帶一個可行免疫辨識反應(immunorecognition reaction)的分子，此分子可為分析物本身或與分析物相對應的抗體。一般來說，小分子抗原(small-molecular-weight target analyte)會先行與磷脂質共價鍵結，再與其他脂質混合以製備攜有抗原的微脂體(analyte-tagged liposomes)。另一種則是將單株抗體或多株抗體連結在微脂體的表面，形成所謂的免疫微脂體(immunoliposomes: antibody-coupled liposomes)。

攜帶抗原或抗體微脂體已被證實可成功地應用於微脂體免疫分析法及微脂體型體外檢驗試劑組的開發。微脂體免疫分析法可分為兩種型式：一為試紙型微脂體免疫檢驗法(liposome immunomigration assay, LIA)；另種為自動式流體注入微脂體免疫檢測系統(Flow Injection Liposome ImmunoAnalytical system, FILIA)。前者適合在實驗室外做現場(on-site)快速偵測；後者則適合在實驗室裡使用，以處理大批樣品。^[43]

(二) 試紙型免疫層析法

試紙型免疫層析法的原理是將特異性的抗體先固定於硝化纖維膜(nitrocellulose membrane)的某一區帶，當液體樣品導入或浸漬至試紙一端處，樣品會因為毛細現象沿著該膜橫向往前遷移，當移動至固定有抗體的區域時，樣品中相對應的抗原與該抗體發生了特異性結合，若再搭配連結抗體的膠體金(colloidal gold)或乳膠微粒(latex bead)，可使該區顯示顏色，由肉眼即可判讀結果。試紙型微脂體免疫分析法便是將上述的膠體金或乳膠微粒以包裹訊號分子之微脂體取代。懷孕檢測試紙(pregnancy test)便是運用試紙型免疫層析法成功研發出的第一個商業化檢測試劑商品，用以檢測人類尿液中是否含有絨毛膜性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)。^[44,45]

(三) 流體注入微脂體免疫檢測系統

流體注入分析(FIA)為一種連續流動的分析系統，分析物在細小管道中流動，利用空氣氣泡作區隔，使每次樣品注入之體積有極高的

再現性。^[46]在FIA系統中，於一窄小管道內，輸送一定流速的載流體，並於載流液中注入精確、微量體積的液體樣品。在載流體運送樣品的過程中會進行線上物理及(或)化學反應。^[47]反應後產物隨著載流體被送至偵測器收集訊號。而流體注入微脂體免疫分析(FILIA)系統改進一般的流體注入分析，伴隨免疫反應管柱之連接，此管柱填充物之材質多為玻璃、矽膠或洋菜凝膠，並在其表面固定抗體分子，成為所謂的免疫反應區。其分析之原理則利用固定相上之抗體分子與分析物之間的專一性，並使用包裹螢光染劑之微脂體為標識物以產生抗體與分析物特異性結合後的訊號。藉由再生溶液的沖洗，破壞了抗體與分析物的結合，因此抗體上的抗原結合位置可被還原並重覆使用。

使用微脂體於試紙型體外檢驗試劑組的實例，包括偵測農藥殘留、環境毒物、病原菌、黃麴毒素及霍亂毒素的試紙型免疫檢測法(immunomigration strip format)^[11,14,15,16,24,38,43]；而流體注入競爭型微脂球免疫法(Flow-injection competitive liposome immunoassay, FILIA)則已被證實量測藥物、農藥殘留、殺蟲劑殘留及福馬鐮孢毒素的可行性。^[13,17,33,39,40,41]

四、微脂體在藥物傳遞的應用

(一) 藥物傳遞系統

許多藥物經由口服，很快地被腸胃道的酵素或特殊的pH環境消化分解，往往很難到達患部，因此藥物傳遞系統的終極目標是希望，將治療藥物傳送到生物體中，藉由不同的給藥型態與方式，達到最佳的生物利用率，及治療的效果。藥物傳遞系統須具備幾項特點：1.可控制藥物釋放的方式與時間^[48,49,50]；2.使藥物進行全身或是局部的循環治療^[51]；3.並可將藥物帶到特定的組織或是器官進行靶向性給藥(targeted drug delivery)。^[52]

(二) 藥物傳遞系統之載體類型與優缺

對藥物傳遞系統而言，除了傳遞藥物之外，基因或是小分子核酸片段的投遞也是屬於藥物傳遞系統的範圍。目前將基因或藥物送至細胞或生物體內的方式，依其使用的載體類型，大致可分為兩種：一類是病毒載體系統^[53,54]，另一類則是非病毒載體系統。

1. 病毒載體系統

用於治療的病毒載體系統應具有下列的基本條件：(1)可攜帶外源基因並能包裝成病毒顆粒；(2)可使外源基因轉殖和表達；(3)不

會造成生物體致病。目前被利用為載體系統的病毒有反轉錄病毒 (Retrovirus)、慢病毒 (Lentivirus)、腺病毒相關病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV)、皰疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV), 以及腺病毒 (Adenovirus)。這類病毒載體雖有較高的轉染效率, 但卻有殘留的病毒外膜蛋白的存在, 引發人體產生免疫反應的隱憂。況且這類病毒載體對標的基因的載量小、目標特異性差、製備複雜、費用高...等不足, 因此非病毒載體的發展越來越受重視。

2. 非病毒載體系統

非病毒載體的優點為^[55]: (1) 不需要組裝細胞, 製備容易且省時; (2) 不限制基因大小或核酸類型; (3) 免疫性低、毒性小, 對生物體較安全; (4) 具有特異標靶性並能有效表達; (5) 符合人工合成及大規模生產的可能性。

非病毒載體可分為: A. 金奈米殼: 以磁場引導金奈米殼至特定位置, 可利用紅外線加溫直接殺死腫瘤細胞, 或間接透過加溫使金奈米殼解體, 定點釋放藥物; B. 裸DNA (naked DNA): 透過直接的物理或機械方法(如直接注射、電擊或基因槍)導入特定部位進行基因表達; C. 有機樹狀體(dendrimer): 以人造聚合物構成外殼, 內部空腔可填充藥物; D. 微脂體(liposome): 由磷脂質組裝成具雙層膜的空心微粒, 內部可裝載藥物; E. 智慧奈米載體: 利用溫度與酸鹼度控制載體釋放藥物; F. 人工胰島膠囊: 以矽薄膜製成膠囊外殼, 內含 β 細胞可持續分泌胰島素。^[56] 若與病毒載體相比, 非病毒載體具有下列的缺點: (a) 效率仍低於病毒載體, 基因表達持續時間短暫, (b) 部分非病毒的方式不能直接應用在活體內的基因傳遞。多數文獻報導^[57,58,59], 在非病毒載體的轉染方式中, 以微脂體的效果較好, 本實驗室的研究並證明, 微脂體的轉染方式可應用於生物體的基因傳遞。

(三) 微脂體藥物傳遞

由於微脂體由單層或多層磷脂質構成, 類似於細胞膜的結構, 與細胞膜有相似的特性, 所以具有生物相容性和生物可分解性。生物相容性(Biodegradation)意指在生物系統中進行特殊應用時, 不會對生物體造成毒性或有害的影響; 而生物可分解性(Biodegradation)意指在生物體中, 最後經生物活動可被消化分解, 不造成體內的累積。構成微脂體的磷脂質是兩性分子, 具有親水端和疏水端, 因此可視需要在親水部位包入親水藥物, 或是利用疏水夾層包覆親油物質, 這樣的特性使得微脂體可以同時作為水溶性或油溶性藥物的載體; 而藥物包在微脂體內, 會改變藥物的動力學(pharmacokinetics), 延長藥品半衰期, 增加藥物在腫瘤組織或發炎組織的濃度, 增加療效; 並且依應用

的不同，可以調整微脂體的大小（可小至奈米等級），故在生物醫學應用上有極大的潛力。

微脂體在藥物傳遞系統的應用上，除了本身具有的生物相容性、生物可分解性，及可同時包覆疏水性與親油性物質之特性外，它還具備保護藥物，使包裹藥物的微脂體輸入生物體後，不會立即受到新陳代謝系統之分解，因而提高藥物的可利用率。早期製作微脂體^[60]，常使用天然脂質作為原料，由於天然脂質中常含有帶負電荷的磷酸脂，所以製成的微脂體表面帶負電，這種帶負電荷的微脂體很類似細胞凋亡後產生的分解顆粒，在進入血液循環時，會迅速地被單核吞噬系統（monocytes）或網狀內皮系統（RES）之細胞吞噬。因此早期的微脂體只能運送藥物至巨噬細胞（macrophage）等免疫細胞中，嚴重限制其應用，用途也僅限定於治療一些吞噬細胞的感染疾病，如萊什曼病（Leishmaniasis）等。此外，血液中的高密度脂蛋白也會將天然脂質構成的微脂體的磷酸脂質移除，使微脂體崩散，造成藥物由微脂體內漏出，影響藥物循環的半衰期。

為了增進微脂體載運藥物的應用範圍，在多年的研究後，發現下列幾項因素影響包裹藥物之微脂體在血液中的循環時間^[60]：1. 中性脂質組成的微脂體較不易被網狀內皮系統清除；2. 顆粒較小的微脂體較不易被免疫細胞清除；3. 由高過渡溫度（high T_m ）脂質和高含量膽固醇組成的微脂體較穩定；4. 微脂體表面以polyethylene glycol(PEG)保護可以延緩在血液中的清除速度。因此最新一代的微脂體製劑，便是利用高過渡溫度脂質和高含量膽固醇做成直徑100 nm左右的微脂體包裹doxorubicin，因而提高微脂體—Doxorubicin的血液循環半衰期，而且這樣大小的微脂體具備穿透腫瘤新生血管壁的漏洞，使包裹抗癌藥物的微脂體能大量累積在腫瘤組織中，增進治療效果。

Doxorubicin (Dox) 是一種被廣泛使用及對多種癌症均有治療效果的抗癌舊藥，其主要作用機制是經由螯合DNA、抑制topoisomerase II和產生氫氧自由基等作用來毒殺癌細胞。因此除了一般常見的化療副作用：如嘔吐、噁心、黏膜組織發炎和脫髮外，由於心肌對氫氧自由基的傷害特別敏感，使doxorubicin容易對心臟產生累積性的傷害而致命。因而限制這個藥物的長期使用。臨床實驗中證明，若改變投藥方式，使Dox藥物在血中的濃度降低，可以降低對心臟的毒性。因此，利用微脂體包裹doxorubicin，使free Dox（未被包裹之藥物）的血中濃度降低，避免藥物與正常組織直接作用，應可有效減緩副作用並可能減低doxorubicin的累積性心臟毒性。

微脂體包裹抗癌藥物，在實際的臨床應用研究上，已有數種新型藥物通過美國食品藥物管理局的審核，像是Doxil®、Evacet®、DaunoXome®、Liposome-5FU等。

五、微脂體的其他應用

(一) 微脂體在醫學顯影的應用

1. 超音波對比劑

超音波的原理是利用發射波穿過不同密度的組織界面產生反射，經由儀器重組而成影像，來判斷病灶所在。

任何能增強反射音波的物質都可以作為超音波對比劑，但可以應用於臨床治療的超音波對比劑必需是有效、安全，且易於注射。^[61] 理想的超音波對比劑，通常具有下列幾個特性^[62]：(1) 無毒性，無副作用；(2) 容易操作：最常使用的方式是由周邊靜脈注射進入體內；(3) 穩定度佳：以提供充份的時間進行完整的檢查，亦不受或僅輕微的受到超音波音束的影響；(4) 對比劑的顆粒大小均勻：一般而言，若要使對比劑能通過肺循環，其大小應在7 μm以下；(5) 不造成假影：理想的對比劑應該要能增強影像之清晰度或都卜勒訊號，而且不宜造成太多雜訊或導致太多假影，以致干擾標的臟器的觀察。

在超音波對比劑的種類當中，有一種是利用可被生物分解材質外殼包覆微小氣泡注入人體，因為空氣與血液對於聲波阻抗不同，因此增強音波的回音及合諧影像(harmonic image)，使其組織間影像的對比增強，提高其臨床診斷的正確性，目前較新型的超音波對比劑Aerosome (ImaRx, Tucson, AZ, USA)便是以微脂體作為微小氣泡之包膜，將其充滿氮氣，而此類微脂體能持續經歷多次心肺循環，延長顯影時間。本實驗室亦已成功研發包裹微小空氣氣泡之微脂體，初步實驗證實可增強超音波生醫影像技術的解析度。

2. 核磁共振顯影

許多研究希望借助微脂體之載體功能，藉由其包覆顯影劑，並在微脂體表面修飾抗體，使其進入體內後，與癌細胞表面之特殊受體接合，再以核磁共振顯影技術觀測。由於導向目標的準確性，大大改善顯影效果。

(二) 微脂體在美容的應用

一般的美容方式，是將美容成分直接塗抹在皮膚上，經由滲透而吸收。皮膚的結構由外而內可分為三層：表皮、真皮和皮下組織。表皮最外層是角質細胞，還有一層不透水的油脂膜，因此皮膚基本上是不透水的。由於角質細胞間隙不到100奈米，像是一道自然的防護壁，讓外界的物質很難進入真皮層內被吸收利用。如何使美容物質能

夠有效地到達美容目標，依需求釋放美容物質發揮最大效用，是目前非常熱門的研究課題。

微脂體之磷脂質組成結構與人體皮膚細胞相似，若依狀況調整微脂體尺寸(約 20 至 100 奈米)，則可輕易穿越表皮細胞間隙、毛囊或汗腺，將養分帶到肌膚裡層，在不受肌膚自然保護機制影響，讓活性成分到達底層釋放。由於微脂粒可被設計控制釋放活性成分，而將美容產品的功效放大。因此，微脂粒的傳輸運用，使得一些不容易為肌膚吸引的成分，如抗氧化成分、美白成分、玻尿酸成分、維他命 C、維他命 B5、酵母等，可以確實被肌膚吸收。^[63]

然而並非所有美容成分均適合被奈米化後包入微脂體。例如大分子的膠原蛋白(約數百奈米)是表皮細胞的良好保濕成份，但欲使之進入真皮層以發揮填補、修復的作用，則需將其分子切小，然而此舉有可能破壞了原有的立體結構，以致影響其生物活性，使保養效果大打折扣。另外像是奈米化的潔膚用品，有可能讓原本不會進入皮膚空隙的成份滲透到肌膚裡層，造成不良反應或副作用。故化妝品的奈米化須依使用目的及對象有所區別，才可有效發揮其奈米化之功用。^[64]總括而言，「奈米化」產品不是「萬靈丹」，必須「因地制宜」，方可使其「隱蔽揚善」，將其功能發揮到極限。

六、結論

雖然微脂體已經被研究了三十幾年，但隨著時代進步伴隨科技的發展，微脂體除了上述的應用之外，也結合其他相關的技術，呈現出新的面貌。本實驗室研究的主要方向之一，則是將微脂體運用於生醫感測，利用微脂體之中空微粒性質包覆訊號分子，而微脂體表面修飾有可與分析物特異性接合的物質，並在適當情況下釋放出訊號分子，藉由偵測訊號分子之吸收光譜、螢光光譜或電化學訊號，獲得分析物定量上的重要訊息。另外藉由和國內其他研究團隊的合作，微脂體型基因傳遞系統及靶向藥物傳遞系統的研發也是本實驗室的努力研究方向。

微脂體不僅可應用在醫學領域，在藥學、化學、材料學、藥妝用品及生化分析檢測上更是佔有一席之地。微脂體來自一顆顆小油滴，但卻蘊含著許多的可能，等待被國際間諸多研究團隊挖掘。

七、主要參考文獻

1. Bangham, A. D., M. M. Standish, and G. Weissmann. 1965. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. Mol. Biol.* 13: 253-259.

2. New, R. R. C. 1990. *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, U.K.
3. Lurquin, P. F. 1984. *Liposome Technology: Entrapment of Drugs and Other Materials*, Vol. II, Chapter 8, Greroriadis, G. Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL.
4. Shum, P., J. M. Kim and D. H. Thompson. 2001. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Advan. Drug Del. Rev.* 53: 273-284.
5. Chen, D., D. L. Cole and G. S. Srivatsa. 2000. Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 791-801.
6. Park, S. 1999. Development of immunoliposome-enhanced assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y.
7. Rongen, H. A. H., A. Bult and W. P. van Bennekom. 1997. Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 204: 105-133.
8. Ho, R. J. Y., B. T. Rouse and L. Huang. 1986. Target-sensitive immunoliposomes: preparation and characterization. *Biochem.* 25: 5500-5506.
9. Reeves, S. G., S. T. A. Siebert, M. A. Roberts and R. A. Durst. 1995. Liposome immunosensing devices for environmental contaminant screening. *Trends Anal. Chem.* 14: 351-355.
10. Singh, A. K., S. H. Harrison and J. S. Schoeniger. 2000. Gangliosides as receptors for biological toxins: development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. *Anal. Chem.* 72: 6019-6024.
11. Esch, M. B., A. J. Baeummer and R. A. Durst. 2001. Detection of viable *Cryptosporidium parvum* on using oligonucleotide-tagged liposomes in a competitive assay format. *Anal. Chem.* 73: 3162-3167.
12. Alfonta, L., I. Willner, D. J. Throckmorton, A. K. Singh. 2001. Electrochemical and quartz crystal microbalance detection of the cholera toxin employing horseradish peroxidase and GMI-functionalized liposomes. *Anal. Chem.* 73: 5287-5295.
13. Ho, J-a A. and R.A. Durst. 2000a. Preparation of reagents for the determination of fumonisin B1 by flow-injection immunoanalysis. *Anal. Chim. Acta.* 414: 51-60. 2000b. Development of a flow-injection liposome immunoanalytical (FILIA) system for fumonisin B1. *Anal. Chim. Acta.* 414: 61-69.
14. Ho, J. A. and R. D. Wauchope. 2002. A rapid strip liposome immunoassay for aflatoxin B1. *Anal. Chem.* 74: 1493-1496.
15. Ho, J-a A. and H.W. Hsu. 2003. Procedures for preparing *Escherichia coli* O157 : H7 immunoliposome and its application in liposome immunoassay. *Anal. Chem.* 75: 4330-4334.

16. Ahn-Yoon, S., T. R. DeCory, A. J. Baeumner and R. A. Durst. 2003. Ganglioside-liposome Immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Anal. Chem.* 75: 256-2261.
17. Ho, J-a A., H.W. Hsu and M.R. Huang. 2004. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* 330: 342-349.
18. Ho, J.-a. A., L.-C. Wu, M.-R. Huang, Y.J. Lin, A. J. Baeumner, R. A. Durst. 2005. Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of Cholera Toxin. *Anal. Chem.* 79: 246-250.
19. 許秀雯。2003年。研發快速檢測腸出血性大腸桿菌 O157:H7 之免疫生化感應器。國立暨南國際大學應用化學研究所碩士論文。南投縣。
20. Weissig, V. T. a. V. 2003. *Liposomes: A Practical Approach*. 2 ed., pp. 267-269. Oxford University Press: Boston.
21. Szoka, F. Jr and D. Papahadjopoulos. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75(9): 4194-4198.
22. Monroe, D. 1986. Liposome immunoassay: a new ultrasensitive analytical method. *Am. Clin. Prod. Rev.* 5(12): 34-41.
23. Monroe, D. 1990. Novel liposome immunoassays for detecting antigens, antibodies and haptens. *J. Liposome Res.* 1(3): 339-377.
24. Batzri, S. and E. D. Korn, 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298: 1015.
25. Hage, D. S.; Nelson, M. A. *Anal. Chem.*, 2001, 73, 198A-205A.
26. Goldsby, R. A., T. J. Kindt and B. A. Osborne. 2000. *Kuby Immunology* (4th edition); W. H. Freeman & Co.: New York, N.Y. Hage, D. S. and M. A. Nelson. 2001. Chromatographic Immunoassays. *Anal. Chem.* 73, 198A-205A.
27. 褚佩瑜。1998年。免疫學。藝軒出版社。台北。台灣。中華民國。
28. Mathews, C. K., K. E. Holde and K. G. Ahern. 1999. *Biochemistry* (3rd edition); Addison Wesley Longman: San Francisco, C.A.
29. Park, S. and R. A. Durst. 2004. Modified immunoliposome sandwich assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider. *J. Food Prot.* 67: 1568-1573.
30. Rongen, H. A. H.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. *J. Immunol. Methods* 1997, 204, 105-133.
31. 許秀雯。2003。研發快速檢測腸出血性大腸桿菌 O157:H7 之免疫生化感應器。國立暨南國際大學應用化學研究所碩士論文。
32. Kobatake, E., H. Sasakura, T. Haruyama, and M. L. Laukkanen. 1997. A fluoroimmunoassay based on immunoliposomes containing

- etically engineered lipid-tagged antibody . *Anal. Chem.* 69: 1295-1298.
33. Lee, M. and R. A. Durst. 1996. Determination of imazethapyr using capillary column flow injection liposome immunoanalysis. *J. Agric. Food Chem.* 44: 4032-4036.
 34. Lim, S. J. and C. K. Kim. 1997. Homogeneous liposome immunoassay for insulin using phospholipase C from *Clostridium perfringens*. *Anal. Biochem.* 247: 89-95.
 35. Locascio-Brown, L., A. L. Plant, V. Horvath and R. A. Durst. 1990. Liposome flow injection immunoassay: implications for sensitivity, dynamic range, and antibody regeneration. *Anal. Chem.* 62: 2587-2593.
 36. Singh, A. K., P. K. Kilpatrick and R. G. Carbonell. 1996. Application of antibody and fluorophore-derivatized liposomes to heterogeneous immunoassays for D-dimer. *Biotechnol. Prog.* 12: 272-280.
 37. Tseng, Y. L., R. L. Hong, M. H. Tao and F. H. Chang. 1999. Sterically stabilized anti-idiotypic immunoliposomes improve the therapeutic efficacy of doxorubicin in a murine B-cell lymphoma model. *Int. J. Cancer* 80: 723-730.
 38. Lim, C. S., J. N. Miller and J. W. Bridges. 1980. Automation of an energy-transfer immunoassay by using stopped-flow injection analysis with merging zones. *Anal. Chim. Acta* 14: 183-189.
 39. Locascio-Brown, L., A. L. Plant, R. Chesler, M. Kroll, M. Ruddel and R. A. Durst. 1993. Liposome-based flow-injection immunoassay for determining theophylline in serum. *Clin. Chem.* 39: 386-391.
 40. Locascio-Brown, L.; Plant, A. L.; Horvath, V.; Durst, R. A. *Anal. Chem.* 1996.62, 2587-2593.
 41. Yap, W. T., L. Locascio-Brown, A. L. Plant, S. J. Choquette, V. Horvath and R. A. Durst. 1991. Liposome flow injection immunoassay: model calculations of competitive immunoreactions involving univalent and multivalent ligands. *Anal. Chem.* 63: 2007-2011.
 42. Axelsson, B., H. Ericksson, C. Borrebaeck, B. Mattiasson and H. O. Sjögren. 1981. Liposome immune assay (LIA). Use of membrane antigens inserted into labeled lipid vesicles as targets in immune assays. *J. Immunol. Methods* 41: 351-363.
 43. Durst, R. A., S. T. A. Siebert, and S. G. Reeves. 1993. Immunosensor for Extra-Lab Measurements based on Liposome Amplification and Capillary Migration. *Biosens. and Bioelectron.* 8, xiii-xv.
 44. Butler, J. E. 2000. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods* 22: 4-23.
 45. Paek, S. H., S. H. Lee and J. H. Cho. 2000. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods* 22: 53-60.

46. Ruzicka, J. and E. H. Hansen. 1975. Flow injection analysis, part I, a new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta* 78: 145-157.
47. Worsfold, P. J. 1991. In: *Bioluminescence and chemiluminescence current status*, pp. 371-378 (Stanley, P. E.; Kricka, L. J., Eds) John Wiley & Sons Ltd. : West Sussex, England.
48. Allen, T. M. 1994. Antibodies-mediated targeting of long-circulating liposomes. *J. Liposome Res.* 4: 1-25.
49. Kunisawa, J., T. Masuda, K. Katayama, T. Yoshikawa, Y. Tsutsumi, M. Akashi. 2005. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J. Control. Rel.* 105: 344-353.
50. Settelen, N., O. Roch, D. Bock, R. Rooke, S. Braun and O. Meyer. 2004. Controlled plasmid gene transfer to murine renal carcinoma by hexadecylphosphocholine. *J. Control. Rel.* 94: 237-244.
51. Trentin, D., J. Hubbell and H. Hall. 2005. Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release. *J. Control. Rel.* 102: 263-275.
52. Maruyama, K., E. Holmberg, S. J. Kennel, A. Klivanov, V. P. Torchilin and L. Huang. 1990. Characterization of in vivo immunoliposome targeting to pulmonary endothelium. *J. Pharm. Sci.* 79: 978-984.
53. Gilboa, E., M. A. Eglitis, P. W. Kantoff and W. F. Anderson. 1986. Transfer and Expression of Cloned Genes Using Retroviral Vectors. *BioTechniques* 4: 504-512.
54. Hamer, D. H. and P. Leder. 1979. Splicing and the formation of stable RNA. *Cell.* 18: 1299-1302.
55. 崔福齋、王秀梅、胡堃。2006年。基因材料。新文京開發出版社。臺北縣。
56. 北區奈米科技K-12 人才培育發展中心網頁。2007年5月29日，取自 <http://k12n.nano.edu.tw/world/20050408.htm>
57. Janoff, A. S. 1999. *Liposome: Rational Design*. 1st Ed, Marcel Dekker, Inc.: New York.
58. Riché, E. L., B. W. Erickson and M. J. Cho. 2004. Novel Long-circulating Liposomes Containing Peptide Library-lipid Conjugates: Synthesis and In Vivo Behavior *J. Drug Target.* 12: 355-161.
59. Wu, C. M. H. L. Chen, W. Liou, T. L. Lin and U.S. Jeng. 2004. DNA-Induced Aggregation of Zwitterionic Oligolamellar Liposome. *Biomacromolecules* 5: 2324-2328.
60. 抗癌新藥微脂體—Doxorubicin。2007年5月29日，取自 http://www.vghtpe.gov.tw/~tcfund/news/news_990706_1.htm
61. 周定遠。超音波對比劑簡介。2007年5月29日，取自

- <http://www.sumroc.org.tw/book/echo5-6.html>
62. 周宜宏。超音波對比劑的臨床應用。2007年5月29日，取自
<http://www.sumroc.org.tw/book/echo5-6.html>
63. 啟新健康世界網頁。2007年5月29日，取自
<http://www.ch.com.tw/index.asp?chapter=IAG940701>
64. 科學人雜誌網頁。2007年5月29日，取自
<http://sa.ylib.com/book/bookshow.asp?FDocNo=337&CL=34>

第八章 奈米藥物傳輸

楊智強博士 財團法人醫藥工業技術發展中心 藥品製劑研發處
曾厚副教授 臺北醫學大學 醫學研究所

一、前言

(一) 奈米技術

奈米科技為根據物質在奈米尺寸下之特殊物理、化學和生物性質或現象，有效地將原子或分子組合成新的奈米結構；並以其為基礎，設計、製作、組裝成新材料、器件或系統，並加以利用的知識和技藝。有別於傳統由大縮小的製程，奈米科技乃由小作大，奈米科技的最終目標是依照需求，透過控制原子、分子在奈米尺度上表現出來的嶄新特性，加以組合並製造出具有特定功能的產品。

(二) 奈米材料

當一種材料縮小至奈米尺度時，便會發生「小尺寸效應」及「表面效應」。這是因為比表面積增大，位於表面及介面的原子數比例增多，表面位能大幅提高，表面原子較內層原子更活潑，所以奈米粒子具有高化學活性，導致材料特性，皆因奈米化而有所變化。奈米粒子內的原子數有限，原子間的交互影響變小，形成非連續的離散電子能階。再者，最高電子占據分子軌道與最低電子未占據分子軌道的能階差，也會隨奈米化而變寬，此即為「量子尺寸效應」。

奈米材料是奈米科學技術的基礎，現代材料和物理學家所稱的奈米材料是指固體顆粒小到奈米(1奈米=10⁻⁹米)尺度的奈米微粒子(也稱之為奈米粉)和晶粒尺寸小到奈米量級的固體和薄膜。奈米粒子(Nanoparticle)，一般是指尺寸在1~100nm間的粒子，是處在原子簇和宏觀物體交界的過渡區域，它具有表面效應、小尺寸效應和宏觀量子隧道效應。同時顯示出許多奇異的特性，和大塊固體時相比將會有顯著的不同。

(三) 奈米粒子

奈米材料依類型可大致分為奈米微粒、奈米纖維、奈米薄膜和奈米塊體四種，其中奈米薄膜和奈米塊體皆來自於奈米微粒，因而奈米微粒的製備更相當重要。奈米微粒的製備方法可分為物理和化學兩種製備方法。物理製備方法可區分為：氣相冷凝法、機械球磨法、物理粉碎法、熱分解法、超臨界流體法等，化學製備方法則可區分為：化

學氣相沈積法、溶膠凝膠法、微乳液法、聚合物接枝法、化學沈澱法、水熱合成法、電弧電漿法、聲化學方法等。

(四)藥物傳輸技術

基於新藥物傳輸系統的產品數目在這幾年明顯增加，在未來數年也將持續增加，尤其在最近基因體的研究，加速生物藥劑的研發，這類的蛋白質藥物因為特殊的性質與無法使用傳統方式來進行藥物投與，因此，最近針對這種分子正進行不同給藥途徑，包括：口服，經鼻，吸入性，陰道或肛門等路徑投藥。

二十一世紀，製藥工業有價格降低與新藥開發成本上升的壓力，平均一個上市的新化合物需要五億美元及10-12年，而發展一個新的藥物傳輸劑型，僅需要二至三千萬美元及3-4年。在新的藥物傳輸系統，可以給現有藥物分子一個新的生命，因此增加其市場價值與競爭力，因而延長專利期間。面臨專利過期後，學名藥的競爭，及藥廠本身的垂直整合，目前約有350家藥物傳輸技術公司，及1000家醫療器材設計公司，投入在設計與發展新的藥物傳輸方法，在過去數年，新的藥物傳輸系統通過核准有明顯增加，而且在可以預見的未來將持續增加，藥物傳輸產品在全世界銷售額已超過220億美元，而本世紀將持續增長，預估到2007年整體藥物傳輸市場將達1200億美元。

應用新的藥物傳輸系統，可以明顯地增加其有效性與安全性，同時增加病人的方便性。為了提高藥效與降低副作用，跨國性藥廠致力發展新的藥物傳輸系統。現在藥物傳輸系統已發展許多平台技術，如：控制釋放技術、微脂粒、藥物矯味技術、口服速溶劑型、難溶性藥物技術，以及經由鼻腔、肺部、皮膚、陰道、直腸及黏膜等藥物傳輸技術亦有相當發展。

口服為傳統給藥的投與途徑，提供有效達成局部與全身性的治療方便之方法，在傳統口服藥物傳輸系統，僅在藥物釋放進行控釋，在標的部位的有效濃度，可以透過超量的藥物來達到，但也會導致明顯的副作用。理想的口服藥物傳輸系統，應該可以將藥物在一定的效期，把藥物送到作用部位。控制釋放傳輸系統，提供藥物吸收部位的一定濃度，因此維持一定的藥物血中濃度在治療範圍內，因此減少藥物副作用及服用藥物的次數。這些產品提供下列優點：提高治療慢性病的功效，減少藥物副作用，提供較大的使用方便性，及更簡單的治療方式。因為這些優點，這些傳輸系統成為藥品劑型的主力產品。

可以在口腔快速崩散的固態劑型，不需飲水服用，即可化成溶液或懸浮液，稱為快速分散劑型，亦稱為速溶或速崩錠劑。其優點為使吞嚥困難的病人可以服藥，也使旅行中的病人方便服用，特別對於老人與小孩的藥物治療有相當大的幫助。此技術的產品已有成功上市，

主要是運用傳統打錠方法加以修改，冷凍乾燥法及團塊製造技術來製造。藥物溶解度是藥物吸收的決定性因子之一，也會影響藥物生體可用率，40%以上的藥物有水溶性差的問題，也將導致因藥效不足而無法上市，目前有許多技術用來解決此一問題，奈米技術也是其中之一。

小腸為主要的藥物吸收部位，經由許多控制釋放技術，可以將藥物控制於胃腸道的特定部位吸收。最近幾年在結腸的藥物標的研究逐漸受重視，主要是結腸的蛋白分解減少，有可能用來作為蛋白藥物的傳輸，而且亦可用來治療結腸癌及大腸發炎疾病。最近數年，結腸標的劑型被開發頗多，包括前驅藥物、交聯水合膠、間質及包覆劑型。包覆劑型因為技術寬廣且設計多樣，成為主要發展的產品，其主要是經由以下兩種控制釋放的機制：(1) 酸鹼控制、(2) 時間控制：為使藥物到達結腸而釋出，藉由交互利用酸鹼與時間控制藥物的溶解與釋出；其延後釋放的時間，取決於包衣厚度與滲透壓驅動核心的膨脹。口服黏膜系統是一個傳統非侵入的藥物傳輸載體，提供快速致效及允許藥物達到治療效果，藥物在口腔釋出，可以透過口腔黏膜快速吸收。

在基因體學的研究成果促進下，新的治療效果的生物分子逐漸被發現，也增加這類藥物傳輸系統發展的需要，這類藥物分子量大，分子不安定而且半衰期短，通過細胞膜的能力有限。這些性質，使生物製劑的藥物投與方式，及其治療的疾病應用有限，而且僅能以注射方式投與，目前許多公司從事此一方面的開發，開發出許多用來傳輸此類分子的技術。

經由皮膚投與的全身性治療，在近二十年來被投入相當的關注，經皮吸收藥物傳輸系統，可以避免藥物經由口服而造成胃腸道與肝臟代謝，因此經皮藥物傳輸系統，提供1-7天的穩定血中藥物濃度，而增加病人的方便性。雖然經皮吸收系統有許多優點，但是許多藥物因為不易穿透皮膚而難以發展成此類產品，使用經皮吸收促進劑及前驅藥，可以增加藥物經皮吸收穿透度，最近有許多物理方法可以增進藥物經皮吸收，其中微奈米針陣列(Microneedle Array)最受矚目。

經鼻藥物傳輸有以下的優點，鼻腔可以提供快速吸收達到全身性的作用，提供快速效果，降低劑量，減少副作用，及增進病人服藥方便性，這個投藥途徑可以使蛋白進行有效傳輸，鼻腔劑型主要是用噴藥進入鼻腔，液體經由計量噴霧器進入鼻腔。

肺部傳輸直到現在仍然是治療呼吸疾病的主要方式。最近，肺部的與生自有能力可以將藥物運送到血中，因此這種非侵入式的投藥方式，可以替代注射，減少疼痛與加快藥效速度，及提高生物體可用率。吸入性器材有三類：壓力式定量吸入器，噴霧器，及乾粉吸入器，壓力式定量吸入器含有溶液及細顆粒的懸浮於液化的推進劑中，以高壓進行噴出，藥物透過定量閥進行噴霧。而噴霧器，則不需要推進劑，

而且可以產生大量的小液滴，可以穿透肺部，最近有許多在乾粉吸入器的研究，藥物因為以乾粉形態儲存，可以有較長的儲存時間及無菌度。

陰道也是局部及全身性投與藥物的重要部位，此途徑提供藥物避免腸胃道與肝臟的首渡代謝，減少胃腸道與肝臟的副作用。陰道投與藥物及配方主要用來進行避孕及對抗微生物的感染，包括愛滋病及性病，這也適合用來開發尿道首渡代謝的藥物，如：progesterone及danazol等藥物。

有效藥物傳輸的目標之一，是使藥物控制及最適化於標的部位釋出，而且可以在非標的器官快速清除。在過去數年，藥物傳輸系統在釋出於高度選擇的局部，這些傳輸系統可以推算藥物在標的器官之量，而在全身循環的量減少，將減少藥物副作用，目前有許多專一部位的傳輸系統被開發。

總而言之，藥物傳輸系統的市場已經成為藥品開發主流，而且將以明顯的速率持續增長，現代的藥物傳輸技術使藥物可以應用這些創新技術，提供許多治療及商業的利基，許多公司投入藥物傳輸系統的開發，增加市場的產品與專利數目，未來藥物在傳輸系統將有更多的挑戰，而藥物科學家將必須準備克服困難。

二、奈米藥物傳輸系統

奈米技術也提供藥物傳輸系統嶄新的機會，由奈米材料所構成的奈米粒子，因為分散佳，對於難溶性藥物可以提高溶解度，對於受限於溶解度的藥物(生物藥劑分類系統第二類)，將因奈米技術而提高生體可用率。而透過奈米粒子的傳輸載體設計，藥物可以達到治療部位，透過被動與主動標的，藥物可以達到較佳的治療效果，進而降低藥物副作用。以材料來分類，奈米藥物顆粒包括微脂粒(直徑小於100nm者)，固態脂質奈米微粒，高分子奈米微粒，磁性奈米微粒，透過表面修飾與化學結合，可以作為標的藥物傳輸，透過與傳統製劑技術結合，則可以改善劑型，如提高生體可用率與降低藥物副作用。以下將逐步介紹各種奈米載體在藥品開發的應用：

(一)微脂粒作為藥物傳輸的應用

微脂粒為磷脂質的自組裝膠體微粒，在1965年由Bangham和他的學生在英國劍橋發現，原本用來作為膜生物學的研究，在1970年代才大量應用在藥物傳輸，或化妝品及診斷試劑，而近年來更應用於食品科學，但是因為成本的考量，仍以藥物傳輸為主要的應用範疇。在微脂粒發展的早期，因為物理化學性質與生物體內的不安定，而且包覆

效率不佳，因此並不被看好，但隨著基礎研究與物理化學安定性的了解，許多藥廠在1980年代投入微脂粒產品商業化，許多產品於1990年代逐步上市，這些抗真菌與抗癌藥物的微脂粒配方，降低原來藥物的毒性，使微脂粒的研究又逐漸風行，主要是研究50-150nm的微脂粒，其載藥量，穩定性及穿透微血管壁等均為主要開發的考量。到了1980年代，大體積穩定的微脂粒製備技術成熟，這些原料也建立安全的資料，而架儲期的問題也被克服，使得微脂粒產品上市成為可能。

微脂粒作為藥物傳輸載體，起源於IGI Farben Industrie (1934)，到1970年初期，Bangham、Ryman及Gregoriadis開始進行微脂粒的研究，然而經過二十年的研究，藥物分子漏出與血液中停留的時間使其無法應用於癌症的藥物，在藥物傳輸的應用上，微脂粒可以作成懸浮液、氣懸膠、及半固態的凝膠或霜劑，或形成乾粉，可以局部或注射使用。在全身性投與(通常是靜脈注射)，微脂粒會被肝臟與脾臟的吞噬細胞所胞飲，為了防止被胞飲，以聚乙二醇進行微脂粒包覆，表面修飾的微脂粒，可以延長微脂粒在血液中循環的時間。

基於微脂粒的特性，許多藥物傳輸的模式被應用，主要的作用有增加藥物溶解度(例如：amphotericin B, minoxidil)，保護藥物活性分子(例如：cytosine arabinose, DNA, RNA, antisense oligonucleotides, ribozymes)，及增強細胞吸收(如：抗癌藥，抗生素及抗病毒藥劑)，並改變包覆藥物的藥物動力學及生體分布，因為微脂粒通常不能進入心臟，腦部與腎臟的器官，因此可以降低藥物的毒性。但是微脂粒在某些情況僅能作為分散藥物，而非藥物傳輸載體，例如：taxol, cyclosporin, prostaglandins及小分子的非固醇類抗發炎藥物，這類的分子既非親水性也非疏水性，會附著在微脂粒表面。

全身性抗真菌感染，所選擇的藥品為amphotericin-B，因為水溶性差，通常以界面活性劑作成微胞的配方，但在全身性藥物投與，會產生嚴重的神經與腎臟的副作用。目前有三種脂質的配方：AmBisome (NeXstar, Boulder, CO, USA) 是含有藥物帶負電的小型微脂粒，Amphotec (Sequus, Menlo Park, CA, USA)則是與膽固醇及界面活性劑複合的微胞，而Abelcet (The Liposome Co., Princeton, NJ, USA) 則是一均質化的藥物與脂質混合的液晶懸浮液。

另外兩個被FDA(美國食品藥物管理局)核准的產品，用來治療與愛滋病有關的卡波西氏腫瘤，Doxil (Sequus)為doxorubicin以表面修飾的微脂粒，而DaunoXome (NeXstar)是daunorubicin包覆在微脂粒，而其有特別的力學安定性，含有distearoylphosphatidylcholine-cholesterol (2:1)以酸鹼梯度進行藥物包覆，因為減少電荷誘導及疏水性交互作用，因此沒有帶電的微脂粒配方，比帶電的微脂粒配方更安定。

Doxil產品是一種大小約80-100nm微脂粒(2000PEG-distearoyl-

phosphatidylethanolamine hydrogenated-soya-bean phosphatidylcholine-cholesterol)含有doxorubicin HCl (2mg/ml)，藥物以硫酸胺的梯度技術進行包覆，這些微脂粒在體內可以進行長期循環，因為表面聚乙二醇的修飾，及穩定的脂質雙層，本產品為美國FDA第一個核准上市的微脂粒產品，而另一個產品DaunoXome在六個月後被核准，目前這兩種配方均被用來治療卡波西氏腫瘤，而其他的固體腫瘤也在進行臨床試驗中。

微脂粒用來作為基因治療，也成為許多高科技公司開發的重點，如：Vical (San Diego, CA, USA), Genzyme (Farmington, MA, USA), Gene Medicine (The Woodlands, TX, USA)及Megabios (Burlingame, CA, USA)均有產品進行臨床試驗。而微脂粒的疫苗應用已經在瑞士有成功上市的經驗，瑞士血清研究所已經成功上市A型肝炎疫苗的微脂粒配方，以純化的抗原蛋白，透過混合磷脂質與界面活性劑，在除去界面活性劑後，含有抗原蛋白的微脂粒形成，微脂粒作為疫苗佐劑與抗原分子傳輸載體，這家公司也發展另一上市的複合疫苗，可對抗流行性感冒，B型肝炎，百日咳及破傷風。另一家公司Orasomal Technology (Chicago, IL, USA)以高分子進行微脂粒表面修飾，發展口服疫苗。

(二)奈米微粒作為藥物傳輸的應用

奈米微粒在藥物傳輸的主要應用為解決疏水性藥物的難溶性問題。大約40%的新藥化合物均有難溶性的問題，因此也較難去進行配方開發，因此許多研究運用此一技術進行促進藥物溶解度的開發。這種技術明顯提高表面積，透過研磨與高壓均質，均可以使粒徑減少，當粒徑減少後，加入穩定劑來防止奈米顆粒的凝集則是必要的。除了研磨與高壓均質，將藥物分散在奈米結構的多孔性矽，也被發展成為藥物傳輸系統，奈米結構的多孔載體，形成的過程可以增加載體的表面積，藥物分子被分散在奈米孔徑的結構中，這些結構因為生物降解，而增加藥物的溶解度。

這些方法可以用來增強藥物的生體可用率，而且可以減少藥物的毒性；亦可增加口服藥物溶解度，以減少因飲食所造成的變異性。而奈米顆粒也廣泛應用在不同劑型的產品，如口服、注射、經鼻及吸入性投藥。某些奈米顆粒可以經過生物膜而傳輸，如Advectus Life Sciences (Vancouver, Canada)發展含有doxorubicin高分子奈米微粒，可以穿透血腦障壁以治療腦癌，而NanoCarrier (Chiba, Japan)發展高分子微胞奈米顆粒，作為血液中穩定的藥物載體系統，可以累積於癌症組織，該公司也發展許多抗癌藥物的奈米顆粒產品，如paclitaxel及鉑化合物。而奈米結構的多孔載體，為pSivida (Perth, Australia)發展來作為

藥物控制釋放的載體，藥物被分散在奈米結構，而以生物降解的方式釋出藥物。

許多奈米技術用來作為疫苗的傳輸，而且可以增強免疫反應。奈米顆粒主要的好處為使抗原分子可以有效地進入抗原呈現細胞，最有效的抗原呈現細胞為樹枝狀細胞，可以激起較強的免疫反應，其特別可以激起體液性與細胞性的免疫反應，細胞性的免疫反應對於病毒性病原有治療與預防反應。許多技術被發展來增強蛋白及基因疫苗的傳輸，抗原被鑲入奈米顆粒，BioSante's (Lincolnshire, IL, USA) CAP技術已被發展為佐劑，可以用來結合傳統蛋白抗原及基因疫苗配方。

(三)固態脂質奈米微粒作為藥物傳輸的應用

以固態脂質取代液態油脂來達到控制藥物釋出。因為藥物在固態脂質的移動，比在液態更慢，固態脂質早就用於圓粒製劑，可以使藥物經由口服投與，而達到延遲藥物釋放(如Mucosolvan緩釋膠囊)，自1980年代開始，已開始用噴霧乾燥發展固態脂質微粒及微圓粒進行口服投與。

高剪力均質及超音波震盪是用來生產固態脂質分散系的技術，但分散的品質則因微粒的存在而不佳，而使用超音波則有金屬殘留問題。高壓均質技術是生產固態脂質奈米微粒的重要技術，這種設備已經被用來生產營養輸注液的奈米乳液，比起其他方式，此方法在製程放大較無問題。相對地，冷卻均質技術也用來生產固態脂質微粒，在懸浮液系統的高壓研磨，對於均質過程中溫度升高而造成的脂質未融態，有效的溫度控制與調節是必要的。藥物包覆於固態脂質的基質，但是許多不同的包覆方式，與脂質複雜的物化狀態有關，但目前此方面的研究尚不清楚。

固態脂質奈米微粒的口服投與，包括水溶液分散系，與含固態脂質奈米微粒的劑型，如：錠劑，圓粒及膠囊，在胃中的酸度與離子強度會造成顆粒凝集，而食物也會影響固態脂質奈米微粒的吸收，但仍未有研究報告發表；而胃與胰臟所分泌的脂質酵素，在體內對於固態脂質奈米微粒的分解仍然未知。

固態脂質奈米微粒也透過靜脈投與進行動物實驗，將doxorubicin包覆於固態脂質奈米微粒，以靜脈注射進大鼠，比注射一般溶液的對照組，其藥物血中濃度較高，以藥物全身性分布來看，固態脂質奈米微粒經過靜脈注射投藥，在腦部、肺部與脾臟有較高的藥物濃度，而注射一般溶液，則集中在肝臟與腎臟，血液蛋白吸附於固態脂質奈米微粒表面，將使奈米微粒與血腦障壁的內皮細胞接觸，而被腦部吸收。

化妝品領域也提供固態脂質奈米微粒一個有開發價值的應用。這種奈米微粒可以反射紫外線，紫外線的反射與脂質的固態性質有關，

但與奈米乳劑成分則無明顯關係。這個結果提供固態脂質奈米微粒作為紫外線保護的製劑之可能，使用生理成分發展固態脂質奈米微粒，比二氧化鈦作為紫外線的保護劑更適合，因為對皮膚的穿透性較好，毒性較低。固態脂質奈米微粒也被發現可以調節藥物在皮膚的釋出，而促進藥物傳遞到特別的皮膚層。

接下來的研究工作，將會是了解固態脂質奈米微粒在投藥後的吸收，分解及與體內脂質的交互作用，最有挑戰的仍然是靜脈注射，需要粒子大小的絕對控制，這些結果顯示經皮製劑將是固態脂質奈米微粒的主要應用。

(四)奈米懸浮粒子作為藥物傳輸的應用

藥物奈米懸浮粒子為膠體分散系統，透過界面活性劑形成穩定系統，在製造奈米懸浮粒子，可調節沉澱的情況，將粒徑縮小。這個過程包括兩個階段，一為晶核的形成，及其隨後的晶格成長。穩定的懸浮液形成需要高結晶速率，及低結晶成長率，這兩個過程均與溫度有關，最佳的溫度將低於晶格成長，也將允許結晶選擇性最適化，高度超飽和情況下，以快速混合可以使藥物快速結晶。而此情況下的快速稀釋，將使隨後結晶成長減少，這與工業化生產大型結晶不同，而以快速結晶得到非晶相或非穩定的晶型，需要後續步驟用來修飾晶型。另一個生產奈米懸浮粒子的方法是濕磨法，在藥物、界面活性劑與分散介質一起研磨下，粒徑的大小由壓力強度及接觸點將決定粒徑大小，壓力強度為研磨球體的動能函數，藥物晶體接觸旋轉盤，其粒徑減少視為壓力所造成的剪力作用。奈米懸浮粒子的冷凍乾燥，可以使其克服物理與化學的不安定性，使其再溶解以後，可以恢復為原來的性質。滅菌過程可以使用膜過濾方式，及其他無菌操作技巧，如果藥物化學安定性允許，使用蒸氣滅菌或 γ 照射滅菌亦可。無菌結晶的單元操作，將滅菌的藥物經過無菌研磨，用以生產微懸浮粒子，如：Testosterone, Insulin, Dexamethasone acetate及Penicillin G等藥物，均應用此類技術。

一般而言，口服懸浮液用來作為藥物苦味遮蔽，用以針對老人或幼兒等難以吞嚥藥物的病人，或克服溶解度的問題，而口服奈米懸浮粒子則主要突破藥物溶解度的限制，進而增加藥物吸收量與吸收速率。難溶性藥物的注射劑，其配方通常含有多量的共溶劑，會導致過敏反應，疼痛或藥物在血液中沉澱。為建立一種更適合的配方系統，奈米懸浮粒子的注射配方被開發，這種配方可以用來進行抗癌藥、麻醉藥、抗真菌藥及抗菌藥物的配方開發，用以治療惡性感染及癌症疼痛等疾病。

奈米懸浮粒子技術開發，乃因應新藥開發所需，透過應用經驗，

許多仍未預料的問題將會開啟新的領域，透過開發新的技術以解決這些問題，也透過改變藥物動力學性質，而提高藥物的安全性與有效性。

(五)磁性奈米微粒作為藥物傳輸的應用

磁性奈米粒子提供藥物傳輸系統新興的機會，因為這類的奈米粒子可以被量產，及進行特別的功能設計，在外加磁場的情況下，可以由血液吸引載藥的磁性奈米微粒，透過此種方式可以使藥物集中於腫瘤或其他病理部位，減少藥物的毒性，及提高藥物的治療效果。使用磁性奈米粒子進行藥物傳輸，須注意載藥能力，藥物釋出的曲線，水相分散的安定性，及與細胞與組織的生物相容性，與經過高分子修飾的奈米粒子之磁性的維持。磁性奈米粒子表面常以親水性高分子(如：澱粉或糊精)來修飾，可以促進此類粒子分散在水溶液中，而藥物通常以化學鍵結或離子結合的方式，接在奈米粒子的外層，這種生產步驟繁複，導致載藥量有限，而使藥物在數小時內就分解脫落，不利於進行標的組織的治療。而將磁性奈米微粒包覆於持續性釋出的高分子藥物載體系統，如PLGA (poly-DL-lactide- coglycolide)微粒，或 polylactides(PLL) 12和dendrimers等其他高分子，將使磁性減少，這將使磁性標的傳輸能力大大減小，限制磁性奈米粒子應用於其他傳輸系統的可能。

超順磁氧化鐵奈米粒子(SPION)是合成的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 粒子以10nm大小為核心進行有機或無機的表面修飾，當去除外在磁場，粒子不再展現其磁性，目前有以微脂粒包覆磁性氧化鐵，稱為magnetosomes，或由糊精或澱粉與奈米級氧化鐵結合者，稱為超順磁性微球。

以有機分子進行磁性奈米粒子的表面修飾，可使奈米粒子在生理狀態下安定，提供進行表面進一步反應的能力，及避免網狀內皮系統的吸收，藥物標的為藥物傳輸的現代技術之一，超順磁氧化鐵奈米粒子結合外加磁場，將使粒子傳輸到標的部位，因此可以減少劑量及全身性的毒性。最近幾年，超順磁氧化鐵奈米粒子的研究急遽增加，臨床醫學上，超順磁氧化鐵奈米粒子用於基因治療，核磁共振造影，惡性發燒及放射治療等，在研究上超順磁氧化鐵奈米粒子則用來分離細胞、蛋白、核酸、細菌及病毒等。超順磁氧化鐵奈米粒子的體內降解，與核心和表面包衣材質有關，含有氧化鐵的奈米粒子，因對身體的毒性較低而且有較好的磁性，而較喜歡被採用。在上市的产品中，含有超順磁氧化鐵奈米粒子的微粒，其可以被分為三種，包括：未進行修飾的超順磁氧化鐵奈米粒子，有特殊化學修飾的超順磁氧化鐵奈米粒子，及結合特殊分子的超順磁氧化鐵奈米粒子。

超順磁氧化鐵奈米粒子在醫療的應用，開啟局部組織治療的新途

徑，透過增加藥物在局部組織的濃度，將使得副作用可以被避免，除了核磁共振造影，目前其他應用仍然屬於研究階段，新的生產與表面修飾技術將使得所有醫療應用更具吸引力，而其應用在全身性的診斷與治療，將會使其安全性資料日益完善，也將使其應用在醫療上的可能大大提高。

(六)奈米微粒作為標的藥物傳輸之應用

主動藥物標的傳輸是透過將特殊的分子結合在藥物傳輸載體表面，增強結合力，而使粒子與標的細胞的結合，某些含有結合分子如：單株抗體或蛋白分子，這些結合分子的選擇是基於其對標的細胞之專一性、安定性、可用性與選擇性。微脂粒有許多在此方面的研究，主要針對藥物高載量，防止藥物分解及改善藥物動力學性質。

將藥物在特定部位激活，可以用雷射、磁場、超音波或其他方式，控制藥物的釋出，磁性粒子可以集中在腫瘤部位，再以雷射或超音波進行熱治療，含有doxorubicin磁性的微脂粒在帶有骨癌的倉鼠進行試驗，可以提高四倍的治療效果。含磁鐵性質微粒也被用來作為核磁共振造影的顯影劑，含顯影劑的微脂粒則被用來進行肝臟、脾臟、腦部、心血管、腫瘤、發炎部位及感染組織，使用含有金屬的高分子，增強信號強度。使用膠體金的奈米粒子，將可以使其集中在腫瘍周圍的血管，特別是在肝臟和脾臟附近。另外的奈米粒子，如以聚乙二醇修飾的超順磁氧化鐵奈米粒子與量子點，也用來研究細胞內部與腫瘤標的傳輸之途徑。

(七)其他奈米微粒作為藥物傳輸之應用

奈米技術所衍生的藥物傳輸技術，其治療優點逐漸顯現，而且也很快與各種藥物投與路徑的劑型結合，雖然奈米技術的未來看似可行，但奈米顆粒的毒性考量則是相當重要，奈米技術產品的毒性篩選，應包括奈米材料的物化性質，體外測試及體內測試，以確保這些材料不會影響人體內細胞的反應。

自微乳化藥物傳輸系統或油性配方，可以在胃腸道快速分散，形成小於50nm的液滴，對於脂溶性的藥物，這些系統可以提供促進藥物吸收的速率。這種方法提供一個可行的藥物口服乳液的替代方式，因為其高度的物理安定性及可以用來充填於軟膠囊。目前，許多配方被開發出來，包括：自微乳化配方，界面活性劑分散系，微包覆乳劑，脂質—高分子分散系，自乳化圓粒與固態自乳化系統，這些配方均會在水溶液中形成細油滴或微胞的分散系，目前包括Cyclosporin A、ritonavir及saquinavir均被設計為自微乳化藥物傳輸系統，而且即將上市，大約40%的新藥是疏水性，未來將有更多藥品以此種系統上市。

三、結語

奈米技術在藥物傳輸的應用，由早期的長效注射，與藥物溶解度的提高，到最近標的藥物傳輸載體的發展，奈米技術將對藥物治療的傳輸系統與新藥發展有更多的影響，也顯現奈米技術驅動藥物傳輸時代的來臨。使用奈米技術進行診斷與造影，也日益重要，而微機電技術可以用來模仿荷爾蒙的分泌，進行人工臟器開發，此外，止痛藥物的植入器材可以作成微小化，以利藥物投與，量子點在未來可以用於診斷、造影及細胞應用，將來可能用於靜脈注射，作為癌症組織之標的，這些奈米級次的顆粒可以用來作為核磁共振造影、正子造影與電腦斷層掃描的顯影劑，以觀察惡性腫瘤組織。奈米粒子的藥物傳輸系統，能夠被用來治療惡性腫瘤，且使得副作用降到最小，而其他治療也將使用此一技術，為了管理奈米技術在醫學上的應用，由基礎到臨床研究將會持續以達到持續的創新，許多臨床的研究人員將與材料科技人員，工程師及高分子專家共同合作，將奈米技術發展到治療病人最適化的程度，也將使得奈米技術成為下一波醫學研究之前沿。

四、主要參考文獻

1. 川合知二, 圖解奈米應用技術, ed. 工業技術研究院編譯. 2002, 新竹: 工業技術研究院奈米科技中心.
2. Verma, R.K. and S. Garg. 2001. Current Status of Drug Delivery Technologies and Future Directions. *Pharmaceutical Technology Online* 25(2): 1-14.
3. Lian, T., J. Rodney, and Y. Ho. 2001. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(6): 667-680.
4. Kingsley, J.D., H. Dou, J. Morehead, B. Rabinow, H.E. Gendelman, and C.J. Destache. 2006. Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of NeuroImmune Pharmacology* 1(3): 340-350.
5. Mehnert, W. and K. Mäder. 2001. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47(2-3): 165-196.
6. Neuberger, T., B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. Von Rechenberg. 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 483-496.
7. Rabinow, B.E. 2004. Nanosuspensions in Drug Delivery. *Nature*

- Reviews Drug Discovery 3(9): 785-796.
8. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* 53(2): 283-318.

第九章 奈米材料在組織工程的應用

陳敏慧副教授 台大醫學院臨床牙醫研究所

一、前言

生物奈米技術是21世紀的關鍵技術，生物奈米技術將增進經濟、醫療和技術領域的發展，而應用於生物醫學領域上必須整合化工、材料、與生醫領域之技術。同時奈米技術的浪潮衍生出醫學技術革命及新的醫學分支，如奈米醫學、奈米生物學、奈米生物化學、奈米生物能量電子學、奈米生物醫學材料等等。奈米材料是一群原子和分子的組合，主要是發展針對尺度在1~100nm材料的製造技術和新材料性質的研究，奈米材料是現今奈米科技領域當中相當重要的一支，最早利用奈米材料來命名材料開始於20世紀的80年代，此時也將奈米材料的顆粒尺寸定義為1~100nm。1990年7月在美國巴爾的摩舉辦國際第一屆奈米科學技術學術會議，正式將奈米材料科學劃分為材料科學的另一全新分支。奈米材料是將傳統材料經奈米技術處理，而獲得具有化學上的表面與介面效應、光電磁學上的量子尺寸效應和小尺寸效應等獨特特性的材料。奈米材料在全球各應用領域上均被視為前瞻材料，為新材料和次世代之光、電、磁元件的建構基石。組織工程乃是在實驗室利用生長因子及生物材料支架促使細胞得以發展生長為組織或局部器官，以取代或輔助體內因受傷或退化而失去功能的組織或器官。因生物奈米技術的發展，使得奈米材料也在組織工程的研究與應用上，扮演了極重要的角色。

二、奈米材料的定義

奈米材料是指固體顆粒小到奈米(1奈米= 10^{-9} 米)尺度的奈米微粒子(也稱之為奈米粉)和晶粒尺寸小到奈米量級的固體和薄膜。奈米材料又稱為超微顆粒材料，由奈米粒子組成。奈米粒子也叫超微顆粒，一般是指尺寸在1~100nm間的粒子，它具有表面效應、小尺寸效應和宏觀量子隧道效應。同時顯示出許多奇異的特性，即它的光學、熱學、電學、磁學、力學以及化學方面的性質和大塊固體時相比將會有顯著的不同。

三、奈米材料的特性

(一) 特殊的光學性質

當黃金被細分到小於光波波長的尺寸時，即失去了原有的富貴光澤而呈黑色。事實上，所有的金屬在奈米微顆粒狀態都呈現為黑色。尺寸越小，顏色越黑，銀白色的鉑變成鉑黑，金屬鉻變成鉻黑。由此可見，金屬奈米微顆粒對光的反射率很低，通常可低於1%，大約幾微米的厚度就能完全消光。利用這個特性可以作為高效率的光熱、光電等轉換材料，可以高效率地將太陽能轉變為熱能、電能。

微粒尺寸縮小時，光吸收度或微波吸收度都顯著增加，並且產生吸收峰等離子的共振頻移，產生新的光學特性，如對紅外線有吸收和發射作用，但對紫外線有遮蔽作用等，不同粒徑材料的遮蔽力將隨光波長大小而有所不同。

(二) 特殊的熱學性質

固態物質在其形態為大尺寸時，其熔點是固定的，超細微化後卻發現其熔點將顯著降低，當顆粒小於10奈米量級時尤為顯著。例如，金的常規熔點為1064度C，當顆粒尺寸減小到10奈米尺寸時，則降低27度C，2奈米尺寸時的熔點僅為327度C左右；銀的常規熔點為670度C，而超微銀顆粒的熔點可低於100度C。因此，超細銀粉製成的導電漿料可以進行低溫燒結，此時元件的基片不必採用耐高溫的陶瓷材料，甚至可用塑膠。

奈米材料表面原子的振幅約為內部原子的1倍，著粒徑逐漸減小，表面原子的比例也逐漸日增，奈米材料的熔點將會降低。奈米微粒在低溫時，其熱阻很小，熱導性極佳，可做為低溫導熱材料。

(三) 特殊的力學性質

陶瓷材料在通常情況下呈脆性，然而由奈米微顆粒壓製成的奈米陶瓷材料卻具有良好的韌性。因為奈米材料具有大的介面，介面的原子排列是相當混亂的，原子在外力變形的條件下很容易遷移，因此表現出甚佳的韌性與一定的延展性，使陶瓷材料具有新奇的力學性質。

由於奈米材料表面原子的配位不足，再加上極強的凡得瓦力的作用下，使得奈米複合材料的強度、耐磨性、韌性、耐壓性、抗老化性、緻密性與防水性等特性大為增加和改善。

(四) 特殊的磁學性質

人們發現鴿子、海豚、蝴蝶、蜜蜂以及生活在水中的趨磁細菌等生物中存在奈米微的磁性顆粒，這生物在地磁場導航下能辨別方法，使這類生物在地磁場導航下能辨別方向，具有回歸的本領。磁性奈米微顆粒實質上是一個生物磁羅盤，生活在水中的趨磁細菌依靠它游向營養豐富的水底。通過電子顯微鏡的研究表明，在趨磁細菌體內通常含有直徑約為20奈米的磁性氧化物顆粒。

由於奈米材料的小尺寸效應，使得磁有序態轉變成磁無序態，超導相轉變為正常相，因而產生新的磁學特性。當顆粒粒徑減小時，其磁化率隨溫度降低而逐漸減少。像是鐵—鈷—鎳合金這樣的強磁性材料的奈米微粒，其信號雜訊比極高，可供做為記錄器使用。

四、奈米材料的物理效應

(一) 小尺寸效應

指當材料隨奈米化，大小趨向奈米尺寸，導致其對光、電磁、熱力學、聲等物性展現跟其塊材(bulk materials)時不同的效應。諸如大多數的金屬材料為之光吸收顯著增加、矯頑力(coercive force)增加、熔點下降。

(二) 表面效應

指當材料隨奈米化，大小趨向奈米尺寸，其表面原子數隨之增多，比表面積隨之增加，為之表面能亦增加而活性提高的效應。諸如一些金屬或金屬氧化物為之很容易跟其他原子結合，曝露在空氣中會吸附氣體，並進行反應，甚而自燃。

(三) 量子尺寸效應

指當材料隨奈米化，大小趨向奈米尺寸，一材料如金屬和半導體其價帶(valence band)和能帶(energy band)的帶隙會為之變寬的效應，向展現絕緣性。

(四) 量子穿隧效應

指當材料隨奈米化，大小趨向奈米尺寸，一些材料的奈米粒子而具有貫穿能障(barrier)能力的效應。

(五) 庫倫堵塞效應

指當材料隨奈米化，大小趨向奈米尺寸，一些材料如金屬和半導體呈現充放電和放電過程是不連續的效應。換言之，電流隨電壓的上升不再呈現直線上升，而階梯式上升。

五、組織工程的定義

組織工程就一般定義而言，乃是在實驗室利用生長因子及生物材料支架促使細胞得以發展生長為組織或局部器官，以取代或輔助體內因受傷或退化而失去功能的組織或器官。隨著基因體資訊的發展與生物材料的研發，帶來組織工程的發展潛力。以目前的發展，幹細胞與組織工程的應用已可進行多種組織的再生了，包括肌肉、軟骨、骨組織、肝臟、心臟、腦神經、肺臟、小腸血液細胞等，牙齒再生更開啟了器官再生的契機。

六、奈米科技在組織工程的應用

(一) 奈米材料在組織工程的應用

組織工程發展的三大要素是(一) 細胞，包括由組織分離的細胞或幹細胞可進行體外培養，以促進組織的再生；(二) 生物材料，是構成細胞生長的基質或支架；(三) 生物因素，例如生長因子等可在細胞培養時加入的各種促進組織再生的因子，因此，奈米材料在組織工程的研究可包括：1. 利用各種細胞標定及奈米造影及藥物遞送技術進行組織工程細胞互動機制之探討，進一步可利用奈米造影術探討組織再

生之成效。為了探討幹細胞組織再生，可以利用細胞奈米分子標記進行細胞活體追蹤。細胞活體追蹤必備的主要條件是(1)能高效率轉入細胞(2)具生物相容性，減低藥物毒性(3)可長效性偵測。日前利用奈米粒子研發高效率、低毒性、長效性的幹細胞標記分子，可以使幹細胞在活體狀態仍可檢測，進一步植入人體內後可以進行追蹤，有別於一般螢光細胞標記分子殺死細胞才能在鏡下觀測。此外，亦可以利用MRI非侵入性的偵測體內物質，因此標記分子使用鐵與氧化鐵等MR contrast agents。將前述MR nanoparticles 以適當的材料塗覆便可增加其轉入效率進而可以減少使用量，達到降低細胞毒性的目的；(二)發展奈米智慧型生醫材料支架之研究，將生物訊息分子結合在生醫材料上以模擬細胞外基質，塗佈高分子以促進細胞貼附或控制生長因子以促進組織再生；以及(三)探討生物活化分子訊息，以奈米技術探討再生過程的分子作用機轉，發展可適時釋放蛋白質，縮氨酸(peptide)，與基因的類似生物訊息之系列裝置，利用最高劑量與釋放機制作成無侵犯性傳輸系統。

(二)奈米造影及藥物遞送在組織工程的應用

奈米科技正開始改變血管造影以及藥物遞送的規模及技術，甚至NIH Roadmap的「Nanomedicine Initiatives」中更指出在未來十年內，奈米等級的技術將會在醫療上開始產生許多的利益，這中間包括了奈米等級的實驗室診斷及藥物研發平台的發展，如：奈米等級的懸臂樑(nanoscale cantilevers)，可應用於化學力顯微鏡(chemical force microscope)、微晶片設備(microchip device)、nanopore sequencing等等。

同樣的，在National Cancer Institute也有相關的計畫，希望建立一個能夠應用於診斷、遞送治療藥物以及監控癌症治療進展的多功能平台，這其中也包括了：對顯影劑的設計加工，改進解析度到「單一」細胞的程度，與設計、建立能夠分析「單一」癌細胞生理及演化差異性的奈米儀器(nanodevices)，能夠對一個腫瘤內單一的癌細胞進行各別的分析。

也因此，要能夠在生物體內(in vivo)實現並應用奈米科技所具有的導向顯影及藥物遞送潛力，就必須設計更為聰明的奈米載體(nanocarriers)。而要實現這個目標最適當的方法，就是要深入的瞭解奈米載體與它周圍的微環境(microenvironment)之間複雜的交互作用，這包括了物理性的、化學性的，以及生理學上的過程。舉例來說，如奈米載體本身的安定性及在不同病理環境細胞內與細胞外的藥物

釋放速率；奈米載體與生理周圍環境間的交互作用，如：巨噬細胞的吞噬、以及一些種種阻礙載體到達作用標的位置的因素（包括解剖學上的、生理學上的、免疫學上的或是生化學上的問題）；以及是不是可以利用到疾病本身所提供的一些有利條件，如：一些特殊受器的表達或是腫瘤周圍血管組織的途徑。而在根本上，載體的設計以及導向的策略也可能因為疾病的種類、發展階段的不同、以及疾病所在部位的差異而有很大的變異性。

另外，很重要的毒性問題卻也是容易被忽視的，所以想讓這些奈米醫療科技能夠成功的應用於臨床，基礎的研究必須對毒性問題這方面下更多的功夫。奈米醫療的未來倚靠的，應該是對於奈米科技的材料及工具的一些詳細生理反應過程的瞭解，並據此以做合理的設計，而不是盲目的運用一些時下熱門的材料。

1. 核酸點陣臺架

不同於雙股螺旋DNA，核酸可以自發性地以微陣列與奈米等級結構的形式聚集。有兩種例子分別是「棒狀立方體」(stick cube)與截面DNA八面體。例如來自DNA片段所自行形成的立方體被設計來與其他DNA黏附。DNA接合酶(ligase)會將立方體六面的DNA片斷的游離末端做成封閉的環狀DNA(loop)。由於DNA具有形成雙股螺旋的天然特性，每一個loop會與其側面的loop相互扭轉。以上的結構可以使生物分子保持陣列的形式，進而可以應用X-光結晶繞射。此研究適用於無法做出結晶結構的物質，例如某些可以當藥物標的之細胞受體。這樣的結構也可以拖住分子大小的電子裝置或應用在材料工程製作精密的分子結構。未來努力的方向在於設計可以複製DNA的裝置，與可以當作奈米化學感應器的可動式DNA機器、開關電閘或奈米大小的鉗子。

2. 奈米纖維生物材料

應用分子自行聚集的特性可以使奈米纖維形成不同的結構與化學形式。奈米纖維可以設計應用在高密度的生物活性分子，例如可以促進細胞貼附與生長的分子。例如具有laminin氨基酸序列(IKVAV)的兩性分子可以促進神經貼附，此分子在液態培養液中會自行聚集，若是直接注射進入組織中會形成直徑5-10nm的纖維。如此建構出的平台可以在星狀細胞發育不良時，快速引發神經細胞分化。推測此合成的物質可以調節基因的篩選（見毒性的章節）。另一個有趣的研究是設

計合成膠原蛋白取代物，包括一端長鏈疏烷基團與另一端親水胜肽(peptide)，可以自行聚集成奈米圓筒狀結構。此奈米圓桶狀的物質會引導氫氧磷酸鈣(hydroxyapatite)結晶，且其方位與大小類似天然的骨頭。

3. 奈米碳管

奈米碳管是片狀石墨捲曲而成的管狀物。其結構可以由單一一個或重複多個片狀石墨單元捲曲而成。一個單元的直徑與長度分別介於0.3-3.0nm以及20-1000nm；而多單元則是藉於1.5-100nm以及1-50 μ m。奈米碳管可以修飾表面以達到水溶的效果。分子與離子可以在奈米碳管上遷移，所以可以應用於適當的分子感應器構造與帶電的核苷酸序列。奈米碳管可以奈米微針的型式穿越細胞膜到達細胞質與粒腺體而不擾亂細胞膜，但是機制未知。

有一些奈米碳管衍生物，例如衍生自tris-maloni acid之球烯(fullerence C₆₀)，具有模擬超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)的特色，可以保護培養中的細胞與傷口動物模式，包括帕金森氏病之多巴胺退化的神經細胞與神經系統局部缺血。其機制可能是球烯可以催化過氧化物的分解。也有進一步發現直徑0.9-1.3nm的單一單元奈米碳管可以阻斷鉀離子通道。然後奈米碳管在活體實驗中的毒性與在細胞中的命運卻屬未知。因為缺乏詳細的藥物動力學與毒性的研究，與其不良的藥物包裹與釋放特性，奈米碳管應用於藥物、抗原與基因的遞送仍不切實際。

(三)奈米微粒在組織工程的應用

1. 超順磁氧化鐵結晶

其製備方法是以鹼性共同沉澱法，透過適當比例的Fe²⁺與Fe³⁺溶於含有適當親水性聚合物的水中，例如糊精醣素(dextran)或poly(ethyleneglycol)。如此會形以鐵離子為中心，外環糊精醣素或poly(ethyleneglycol)的結晶結構，形狀為六角型，直徑4-5nm。此結晶若置於磁場中，可以控制其分佈的位置。如此會告成此結晶與其週遭質子磁化率的差異性，快速造成自旋去相(dephasing of spin)，導致減少T2遲緩時間(T2 relaxation times)，與失去局部訊號強度。但是T1遲緩時間(T1 relaxation times)卻受到很少的影響。所以此結晶可以當作「negative enhancers」。

氧化鐵結晶也可以修飾表面的功能性基團或多價的小分子，蛋白

質、抗體或寡聚核苷酸(oligonucleotides)，應用於in vivo的標定功能或in vitro的診斷步驟。近來已有一些氧化體奈米顆粒合成出來。這些奈米顆粒標示螢光物，利用N-succinimidyl3-(2-pyridyldithio)propionate活化之後含硫的表面修飾物作用。如此螢光標示的方法可實現(high-throughput)高效能大規模篩選。

2. 量子點

量子點會吸收白光波長，並在奈米秒的短時間放出特定的光波長。不同大小與組成的量子點會放出藍色到遠紅外光的波長，例如2nm的量子點會放出綠色光，而5nm的量子點會放出紅色光。量子點與其他螢光物質比較更具有應用性。更適合應用於建立奈米級計算(nano-scale computing)。如此的結構提供多色光學辨識應用於基因表現的研究、大規模篩選與活體影像分析。

3. 樹枝狀高分子

樹枝狀高分子是一種大分子，以一個中心分支出許多單元的立體聚合物。精確的控制聚合物反應，即可控制樹枝狀高分子大小。其中心的空腔結構與分支聚合物的摺疊可以使整體結構形成籠子或通道的形狀。其表面可以修飾或裁剪成特殊用途。利用化學修飾可以將治療與診斷試劑貼附於樹枝狀高分子的表面基團。

4. 聚合體微胞

微胞在水中聚集形成，親水性官能基朝外，疏水性官能基朝內，疏水性官能基朝內形成中心，其直徑約50nm，可以用來遞送非水溶性的藥物。藥物可以包裹在疏水性中心或與微胞共價鍵結。

5. 微脂體

將乾燥的磷脂質介面以適當的溫度進行水合作用可以形成一種封閉式的囊泡狀脂質，稱為微脂體。根據大小與脂質雙層數目可以將微脂體分成三類：多層微脂粒(Multilamellar vesicles)、單層小微脂粒(small unilamellar vesicles, SUVs)與單層小微脂粒(large unilamellar vesicles, LUVs)。多層微脂粒具有以水相所隔開的多個脂肪雙層；反之SUVs與LUVs只具有一層脂肪雙層，中央包覆一個水相空間。SUVs的直徑大小低於100nm，LUVs則大於100nm。根據藥物的特性，藥物可以被包裹在水相或嵌入脂肪雙層。微脂體表面可以修飾聚合物或標

的配合體。

6. 奈米球

由天然聚合物膠原蛋白或白蛋白所形成的圓球狀物，直徑介於數十到數百奈米。藥物溶解後可以包裹入奈米球。根據置備的方法不同可以控制藥物的釋放。如同微脂體，奈米球也可以有相同的表面修飾。

7. 磷脂囊，碳水—陶瓷奈米微粒(Aquasomes, carbohydrate-ceramic nanoparticles)

其顆粒中心含有磷酸鈣結晶或陶瓷鑽石(ceramic diamond)，外面覆有polyhydroxyl oligomeric film，直徑60nm，可遞送藥物或抗原。藥物或抗原會吸附在此粒子的表面。

8. Polyplexes / Lipopolyplexes

核苷酸與陽離子聚合物或陽離子微脂體自發性的聚集，應用於基因轉殖。此複合物的形狀、大小、基因轉殖效果與其組成份、核苷酸與陽離子脂肪電荷比有關。陽離子聚合物應用於基因轉殖的例子有poly-L-lysine、直線或分支型polyethylenimine、polyamidoamine、poly- β -amino esters與cationic cyclodextrin。

(四)奈米材料應用於組織工程的機轉研究、多功能奈米載體系統之研發及其作用於組織機轉之研究

牙齒美白、牙齒知覺過敏症和含氟牙科材料等一直是亟待材料研發與改進的領域，現行的牙齒美白治療主要是利用高濃度過氧化氫(30%)，除了可能導致齒頸部外吸收、牙髓神經過活化、牙本質敏感等副作用，其作用時間需長達3-4小時，顯示漂白反應進行的效率不彰。因此應用攜帶催化劑之奈米載體，除可作為過氧化氫自由基反應的奈米反應器，藉由所攜帶之催化劑將可大幅促進過氧化氫自由基反應的進行。在另一方面，氟化物在預防齲齒以及緩解牙本質過敏症疼痛已經證實有正向的療效，可研發奈米孔洞材料製程技術、奈米層列黏土製備技術、牙齒硬組織動態觀測研究技術、牙科材料生物相容性評估技術以及美白材料對於牙齒結構影響機轉的研究能力。對於發展奈米級多功能奈米載體系統以及其對牙齒組織作用機轉的研究，具備足夠的能力與技術。

1. 奈米介穩生物活性牙科水泥材料製程研發與其調控材料硬化反應機轉之研究

介穩生物活性牙科水泥材料 (PSC) 乃是以 C_3S ($3CaO \cdot SiO_2$)、 C_2S ($2CaO \cdot SiO_2$)、 C_3A ($3CaO \cdot Al_2O_3$) 與 C_4AF ($4CaO \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$) 為主要成分之無機混合物，具有生醫活性，可藉由溶解再沈澱析出形成立體交織網狀結構的水合反應機轉而硬化為固態的結構，主要水合產物為 Calcium Silicate Hydrate (C-S-H) 與 Portlandite ($Ca(OH)_2$)。活體外與動物實驗都證實 PSC 的高度生物相容性與生物活性特質以及封閉能力，因此 PSC 是一個相當具有潛力發展的生醫活性材料。然而長達三到四小時的硬化時間卻是一個潛在性的缺點，這使得要維持 PSC 最佳的材料性質變得十分的困難，同時也讓許多的因素得以在這段時間對 PSC 水合產物的性質造成影響，而且臨床上已有治療失敗的病例報告出現。因此縮短硬化時間已經成為 PSC 相關研究的重心與方向，但是截至目前為止仍沒有一個有效的方法可以縮短硬化時間同時維持材料生物相容性的表現。

基於過去牙科材料之成果，得知這些牙齒治療材料在口腔中或牙齒表面所進行之反應機構為“溶解 → 再固化”之程序，達到具生物活化和封閉能力之固體。就固體溶解之動力學而論，材料之尺寸是最主要之決定因素。微米尺度之粒子因粒徑過大表面積小之原因，使得其溶解速率無法達到短療程之理想目標，因此奈米化牙科治療材料以大幅提高溶解速率，在未來快速治療的時代，絕對有必要性。未來可以研發奈米介穩生物活性牙科水泥材料的製程，應用奈米粉粒材料高度反應活性的特質來促進材料的水合硬化反應速率，藉此探討當奈米粉粒材料應用於牙科材料硬化行為調控時，對於硬化行為化學反應作用的機轉。

2. 牙科奈米骨複合生醫材料之研發以及其與生物組織交互作用機轉之研究

長久以來，對於根管感染導致的根尖骨病變、牙周病造成的骨缺損、以及因囊腫或腫瘤手術後留下的齒槽骨缺損，一直沒有很好的增進骨癒合材料，近年來，由於組織工程學的發達，無機奈米氫氧磷灰石與膠原蛋白之複合材料已被研發，然而此複合材料之機械強度不如人體骨骼，增進骨癒合的能力尚待證實。齒槽骨主要由有機膠原蛋白和無機奈米缺鈣性氫氧磷灰石所組成，其中有機成份尚包括微量生長因子，這些微量因子在骨組織的癒合上扮演著重要的角色，如果只是

單純的混合無機奈米氫氧磷灰石與膠原蛋白，促進骨組織的生長效果有限。查閱文獻上的相關研究，無機與有機高分子複合生醫材料已有許多文獻報告，例如曾經被使用的無機材料包括 hydroxyapatite 和 calcium phosphate，已有報告指出骨母細胞(osteoblast)在小於 100 nm 的氫氧磷灰石環境下比大於 100 nm 的環境下增殖及貼附的效果較佳。常用的有機材料則包括 PLGA、PLLA、polycaprolactone、collagen、chitosan、gelatin 等，然而至今仍沒有一種臨床適用的材料，可以有效地增進骨組織的癒合，其主要之原因為生物體的反應相當的複雜，細胞與材料之交互作用不僅受材料本身的影響，還有如 growth factors、cytokines 等的作用。

藉著奈米無機陶瓷製程相關技術與研究設備、有機高分子生物支架之製造與性質分析技術、高分子複合材料製造技術、材料表面改質、藥物控制釋放技術、材料性質分析測試技術、材料生物相容評估技術等，可製成模仿齒槽骨結構之奈米骨複合生醫材料，並利用孔洞控制技術製作不同降解速率之高分子基質，而後加入生長因子及利於細胞貼附之 peptides，並達到緩慢之釋放，以促進細胞之貼附與骨組織之增生。將可對骨組織之癒合提供一個完整且深入之治療方法，並探討細胞與奈米複合生醫材料之交互作用以及在促進齒槽骨癒合的影響與作用。

3. 牙齒礦物化過程與琺瑯質表面奈米結構之研究

生物礦化，是指在生物體內礦物質的形成過程。通過體內的有機巨分子，生物體可在奈米的尺度上精確地控制著體內無機礦物的結晶行為。在生物體中形成的礦物質與一般的天然礦物無論在大小、晶體、化學成份以至同位素含量等都有極大差異。到目前為止，我們知道有多達六十多種的礦物質，在生物界中被廣泛地用於外殼、牙齒和骨骼等硬組織的構成。生物礦化的研究，與生物材料的發展可說息息相關，但目前學術界對生物礦化的機制所知甚少。研究的主要困難，在於生物體中的礦物質一般都是與蛋白質基質摻雜在一起，以致我們甚難以繞射方法研究它們在分子尺度上的結構。可喜的是這方面的研究最近取得重大突破。根據2003年於「科學」雜誌上發表的論文，美國哈佛大學醫學院的小組利用固態核磁共振技術，首次鑑定出骨骼組織中的氫氧磷灰石有20%含有氫氧根離子，此報告結束了長久以來有關骨骼中氫氧磷灰石化學成份的爭論，也突顯了固態核磁共振學在生物硬組織研究上的獨特優勢。

牙齒的生物源礦物包括有琺瑯質、象牙質與牙骨質，其中琺瑯質與人體骨骼的結構相距甚遠，當中的缺鈣性氫氧磷灰石的形成機制學

術界仍然未有共識，目前僅知道可能是從某些磷酸鈣的相轉化而成。事實上不單是琺瑯質，我們對象牙質與牙骨質形成機制的認識也相當有限。由於牙齒的生物源礦物有大量的磷元素，而磷-31有極佳的核磁共振性質，因此早在民國七十年左右便有人嘗試以磷-31固態核磁共振光譜學研究骨骼組織，但因儀器的靈敏度與及技術條件的限制，所得的結果未符理想。過去十年，固態核磁共振光譜學經歷高速的發展，確立了這技術在非晶態生物系統研究的可行性。觀乎固態核磁共振學在骨骼研究上的成功，我們當可應用最前沿的多量子與雙共振技術，以之探討牙齒的生物源礦物在早期的形成過程包含了那些磷酸鈣的相。另一方面，在成熟牙齒中的琺瑯質，其結構亦異常複雜，初步估計有超過三十種不同的元素摻雜其中。由於在核磁共振的實驗中我們可選定特定元素作測量對象，不同元素之間不會構成干擾，因此固態核磁共振學在琺瑯質的結構研究上有具大潛力。氟有極佳的核磁並振特性，故此我們會集中研究在琺瑯質表面上的氟離子如何進入氫氧磷灰石的結構中，這對牙齒保健材料的開發至關重要。

利用固態核磁共振技術，可研究牙齒中的氫氧磷灰石的形成機制，及與成熟牙齒中琺瑯質表面的化學結構，亦將促進對於牙齒再生機制的探討。

4. 生物電漿共振元件於奈米生醫材料之安全與作用機轉之研究

生物組織反應與材料交互作用的測試為奈米生醫科技中重要的一環，而體外的細胞毒性傷害是快速瞭解材料與生物組織交互作用表現的重要評估工作。一般而言，體外細胞毒性傷害評估包括細胞活性與增殖分析、發炎反應因子的分析與細胞貼附分析，目前針對醫療用途之生醫材料已有諸多不同的測試模型，但多著眼於人體全身組織系統生物反應的考量，並不適用於牙科材料的評估研究，目前仍缺乏一個符合牙科醫療需求且標準化的測試評估技術平台。而且現今評估材料與組織交互作用的研究技術與模型，均為單一時間點的靜態觀測，對於牙科材料依循不同機轉硬化而使用於牙科醫療的特性，便無法確實反應材料硬化過程可能釋放的化學產物、材料硬化時產生收縮或是內應力以及不同硬化程度之牙科材料與口腔組織實際的交互作用，只能測量材料初期硬化後對組織細胞的作用與影響。因此研發即時動態的材料與組織交互作用觀測系統，於臨床醫學研究有其重要的價值與意義。而DP-生醫玻璃為本研究團隊林俊彬教授與林峰輝教授之專利，其除了應用於牙本質敏感症的治療外，也可以應用於牙根斷裂的修復，為一個良好封閉性與骨組織相容的材料。目前已知奈米化後可以提供更理想的細胞貼附環境 (Thomas J. Webster, 1999,2000)，但是

其機制不明。而材料表面的奈米結構究竟透過什麼樣的機制或路徑控制細胞的貼附與功能，而驅使這些細胞變動的因子為何？是局部化學結構差異、表面能不同、機械應力集中還是表面坑洞造成的，而對於細胞訊號的傳遞與調控是否有所差異。這些問題需要更多的相關研究以釐清奈米材料或是奈米結構材料對於生物組織交互作用的模式與機轉，藉此掌握材料生物相容性亦或是誘發生物活性表現的決定控制因子，作為研發各種生醫材料的重要參考依據。

利用生物電漿共振元件(Bio-Plasmonics)，可經由材料的選擇、奈米結構的設計、模擬計算以實現奈米感測並應用於生物組織反應評估。包括生物分子與奈米材料之製備與特性檢測，在具有奈米等級的結構或材料之特性下評估其光學特性所代表之材料能階與表面電漿共振之關係，更進一步利用其與分子在近距離作用下之局部反應現象進行感測之應用。其表現將可利用可見光與近紅光範圍之變化進行快速與靈敏之檢測。

七、結論

從醫學近數十年發展的趨勢著眼，醫療技術與治療器材的研發和創新是基礎與臨床醫學研究躍進的重要關鍵。幹細胞與組織工程的應用已可進行多種組織的再生了，包括肌肉、軟骨、骨組織、肝臟、心臟、腦神經、肺臟、小腸血液細胞等，牙齒再生更開啟了器官再生的契機，其發展所帶來治療方式的革新及效果將是令人興奮而可預期的。組織工程研究領域中，支架材料與細胞的相互作用是主要的研究課題。支架材料表面的微觀結構對細胞的生物調控作用更為重要。奈米材料因具有一些獨特的效應，如體積效應和表面效應，有利於細胞的貼附、增殖和功能的增強，因而作為組織工程支架有良好的應用前景。藉著奈米材料在組織工程的研究與應用，也將落實學術研究和產業研究及生產應用。相信對於醫學基礎與臨床研究的提昇以及帶動相關產業的發展，都有極大的契機。

八、主要參考文獻

1. Alsberg E, Feinsein E, Joy MP, Prentiss M, Ingber DE. Magnetically-guided self-assembly of fibrin matrices with ordered nano-scale structure for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006 Nov;12(11):3247-56.
Buyukdereli G, Guney IB, Ozerdem G, Kesiktas E. Evaluation of vascularized graft reconstruction of the mandible with Tc-99m MDP

- bone scintigraphy. *Ann Nucl Med*. 2006 Feb;20(2):89-93
2. Ciocca L, Caldari M, Baldissara P, Scotti R. The prosthetically guided osteodistraction of the mandible in the microvascular bone reconstruction after cancer surgery. *Minerva Stomatol*. 2006 Mar;55(3):145-9.
 3. De Riu G, Meloni SM, Raho MT, Tullio A. Complications of mandibular reconstruction in childhood: Report of a case of Juvenile Aggressive Fibromatosis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2006 Apr;34(3):168-72. Epub 2006 Mar 20.
 4. Guyot-Sionnest P, Yu D, Jiang PH, Kang W. Spin blockade in the conduction of colloidal CdSe nanocrystal films. *J Chem Phys*. 2007 Jul 7;127(1):014702.
 5. Hallermann W, Olsen S, Bardyn T, Taghizadeh F, Banic A, Iizuka T. A new method for computer-aided operation planning for extensive mandibular reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7):2431-.
 6. Chang H.H. , Tseng Hi, Hsieh TMH, Huang CY, Chen Y-H, Hsu C-Y, Cheng W-M, Chen MH, Chen S-R, Yao C-C J. The Effects of Distraction Osteogenesis on Mandibular Growth in Growing Minipigs:A Report on 3-D Morphological Changes. *Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* 2004;115:2014-2020. (SCI)
 7. Moiola EK, Clark PA, Xin X, Lal S, Mao JJ. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May 30;59(4-5):308-24
 8. Park K, Ju YM, Son JS, Ahn KD, Han DK. Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(4):369-82
 9. Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(21):3217-27.
 10. Rindzevicius T, Alaverdyan Y, Dahlin A, Hook F, Sutherland DS, Kall M.
 11. Plasmonic sensing characteristics of single nanometric holes. *Nano Lett*. 2005;5(11):2335-9
 12. Slotkin JR, Chakrabarti L, Dai HN, Carney RS, Hirata T, Bregman BS, Gallicano GI, Corbin JG, Haydar TF. In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev Dyn*. 2007 Jul 11; [Epub ahead of print]

第十章 奈米材料於分子造影技術之應用

蘇家豪博士 臺灣大學電機工程學系

陳志宏教授 臺灣大學電機工程學系

一、前言

在過去的數十年間，非侵入式的生醫分子影像技術提供了許多新的契機，讓對於醫學影像技術相關研究人員可以利用疾病的動物模式來偵測人類的相關疾病檢測。然而，“分子影像”並非單指分子結構的影像技術，於此則更為廣泛的定義為偵測活體生物中於一群細胞之間訊息傳遞或分子活動的影像，並將傳統的解剖影影像的造影技術推向分子層級^[1]，而這些分子或訊息傳遞的過程主要是由對於細胞上之受器(receptor)進行活化或抑制的行為，或是生物體內的酵素反應，以及細胞間訊息傳遞所釋放或產生的。

為可以藉由造影技術偵測細胞間分子作用來達到疾病或是了解組織變異的過程，於此，分子影像技術需要結合多方領域的科學，如：分子生物、臨床藥學、及各種影像技術與儀器設備。簡單來說，生醫分子影像的研究有下列三項優點：第一、利用生醫分子影像的技術可以將基因表現或是訊息傳遞的過程利用影像技術加以觀察，並且在未來醫學影像診斷上，可以了解疾病發生的過程與機制；第二、生醫分子影像技術的發展可以達到疾病的早期偵測與組織或生理變化過程的觀察；第三、利用活體的動物模式可應用於基因治療與藥物治療的機制研究。因此，為達到上述的優點，生醫分子影像整合了如前所述領域外，以可結合資訊與影像處理技術、奈米材料科技冀以得到高解析影像偵測、更好的偵測靈敏度、及超高的空間解析能力，以達到疾病的早期偵測與治療的目的。

在生醫分子影像技術當中，為了可以使影像呈現較佳的對比以區分病灶與正常組織或是明顯標示其細胞間訊息傳遞的過程，一具有特異標定之分子探針則扮演一相當重要的研究工具。然而，隨著奈米材料與應用之相關技術的發展，具有良好生物相容性或是利於修飾生物分子之奈米材料往往可以被設計成為藥物傳遞或是特異分子標定的媒介。^[2]

在過去的研究中指出，當物質或材料製備成為奈米(nm)等級的大小時，其材料或物質會展現出新穎的化學、物理、或是生物應用上之特異表現。其主要造成奈米材料與一般巨相(bulk phase)材料的性質特異的因素有二：一為奈米材料具有相當高的體積/表面積的比率，另一則是奈米材料具有特殊的量子效應。也由於奈米材料具有上述性

質，使得此類新穎的物質材料得以藉由表面修飾、改質的方式，使其廣泛地應用於醫學治療^[3-6]及臨床醫學診斷的工具。^[7-10]除了上述的醫學應用，奈米材料的科技發展最大的貢獻之一就是分子藥物(molecular medicine)的應用，也就是擁有特異標定功能的藥物傳遞。在近年來的免疫治療研究上，有學者利用奈米材料的表面修飾，將單株抗體(monoclonal antibodies)修飾其粒子表面，而此項方式只需要0.001-0.01%的抗體修飾比例就可以使粒子於活體的動物實驗中達到標定特異細胞的細胞膜^[11-13]，因此奈米材料與生醫分子的結合可為生醫分子影像技術帶往新的領域。

為了可以更明瞭奈米技術於生醫分子影像的角色與重要性，本章內容則將以深入淺出的方式分下列兩大主題來加以介紹：簡介醫學影像中所使用的顯影劑的發展；奈米材料餘生醫分子影像上的應用與實例。

二、醫學影像對比顯影劑的發展

在奈米醫學診斷(nanodiagnostic)上，其終極目標是希望於疾病初期即可加以診斷分析，並且可以於細胞分子層級上加以偵測。為了可以達到這個目標，在探針(probes)的設計上就必須找到一個具有智慧偵測的奈米藥物，用於自動導向標定活體內或活體外的細胞上之相關訊息。^[14-16]因此奈米科技的發展與方法的建立在疾病診斷上與藥物開發的過程佔有相當重要的地位與影響。^[17, 18]

因此，作為影像醫學的顯影劑為了可以正確標定與偵測，故應具備下列的特性：

(一)高靈敏度：

顧名思義當作標定探針的分子應具有高靈敏度的標定表現。由於往往於細胞或組織間分子釋放或表現其單位濃度較低，且並非所有的細胞或組織內可偵測的特異分子是均勻分佈，因此作為理想的標定探針的藥物均希望可以偵測到次微莫爾濃度(sub-micromolar)或是次奈莫爾(sub-nanomolar)濃度的偵測範圍。也因此需要運用到高靈敏度的偵測受器或分子及高靈敏度的偵測設備。

(二)高特異性：

由於有興趣的分子均需要有一個特異性高的標定才能將我們所希望看到的訊號與背景加以分別並達到一個高訊號-背景的比值。而要達到此一目的，可以利用具有特異結合的分子，如：抗原-抗體等，即可區分特異結合與背景訊號的差異，而且高特異標定的分子亦可以

減低非特定標定所產生的訊號干擾。

(三)良好的生物相容性：

無論是何種藥物或是奈米材料，為了可以做為分子探針，生物相容性高是一個必要的條件。就研究與藥物開發而言，其研究對象多為生物體，因此，為求實驗的準確與安全性，高生物相容性是十分重要。具有高生物相容性的藥物或奈米材料可以於實驗偵測的過程成不會改變生物體內組織的功能性，亦不會因此而造成影像對比的錯誤診斷。

在過去的文獻中，有許多的學者對於生物標定的探針與應用有著相當多的發展與設計策略，以使預期的分子探針可以運用於生醫分子影像中偵測蛋白質層級的訊號變化。而這些策略可如以下所示：1.增進標定及被標定物的結合，如利用avidin-biotin兩分子之間的特異結合^[19]，增進藥物於實驗體內的藥物動力學的分佈^[20]；2.利用特殊的細胞功能，如擷取或抓取細胞上特定的ligands^[21, 22]，3.藉由標定探針本身性質上的變化，尤其是當該分子探針與目標發生特異結合的情形下，如螢光分子探針的quenching或dequenching^[23]，或是於磁振造影中改變分子探針的性質，如 r_2 ^[24] or r_1 ^[25]的變化。而這些方式的利用與發展可以增加生醫分子影像技術研究，亦可使我們達到偵測基因表現與細胞間蛋白質等訊息傳遞的訊號偵測。

奈米材料應用於生醫分子影像技術於此將針對光學與磁振造影之分子影像做一系列的介紹。

三、奈米材料於生醫分子影像的應用

如同前一章所描述，作為生醫分子影像中所使用的顯影劑需要對於被偵測物，無論是細胞或是組織區域需具備有高靈敏度、高特異結合的表現、以及良好的生物相容性。因此，當奈米材料或物質應用於此一研究領域，為了使其奈米材料可以達到上述的條件以達到作為分子影像中所使用的分子探針，其材料或粒子的修飾或表面改質就變得相當的重要。也因如此，許多的研究學者為了朝向這個目的，他們會利用一些低分子量的ligands或是一些巨分子的結構，如：寡核酸結構(oligonucleotides)、抗體(antibodies)等對於欲被標定之細胞膜上之特定受器或是反應區域有良好的特異吸附的分子，使其修飾於分子探針的表面，如此策略的應用可以使其分子探針成為一具有導向性標靶型材料，以達到特異標定的目的。此外，為增加其分子探針的生物相容性，亦可於粒子或材料的表面修飾上提高生物相容性的聚分子，如：聚電解質的PEI (polyethyl imide)、PAA (polyacetic acid)，或是高分子聚合物，如：PEG(polyethyl glycol)等分子，以期欲成為分子探針之材

料可以避免於生物體中引急性的生物毒反應或是免疫反應。然而，利用這些以抗體或是小分子寡核酸修飾而成的分子探針顯影劑，往往有兩間重要的課題是必需要注意與了解：一為分子探針顯影劑的非特異性結合造成影像訊號上無法與欲標定的區域做有效的訊號區隔，以及修飾於分子探針上的抗體或是特異分子只能接觸與標定在分布於被標定物的表面受器，以致於訊號無法大量放大。二為偵測靈敏度亦是相當重要的關鍵因子，若是與分子探針標定的過程可以在小量標定時造成有效的訊號放大以增加訊雜比(signal to noise ratio)則可更精確的區分訊號與背景的背景的差異。因此，為增進分子探針的標定效率與訊號鑑別的提升，下列幾項策略是有助於分子探針的應用與發展：

(一) 增加修飾於分子探針粒子表面的特異分子，此一方是可以藉由polymers、dendrimers、liposomes等化合物的結合，使其欲修飾的分子，如：抗體等於粒子表面增加其修飾的數目，此外亦可利用具多重修飾位置的分子，如：avidin，其分子具有四個可與biotin結合的反應區域，如此的結合方式亦可增加該特異分子於奈米粒子表面上的修飾。

(二) 利用細胞上特殊的受器來增加特異分子標定與結合。

(三) 設計可以酵素反應之分子探針。由於酵素反應的過程可與特異的介質(substrate)反應，因此當該分子探針是利用特異的反應活化區與酵素作用，其幫可反應之介質越多，其酵素反應後則可增加大量訊號，使其增加訊號鑑別的能力。

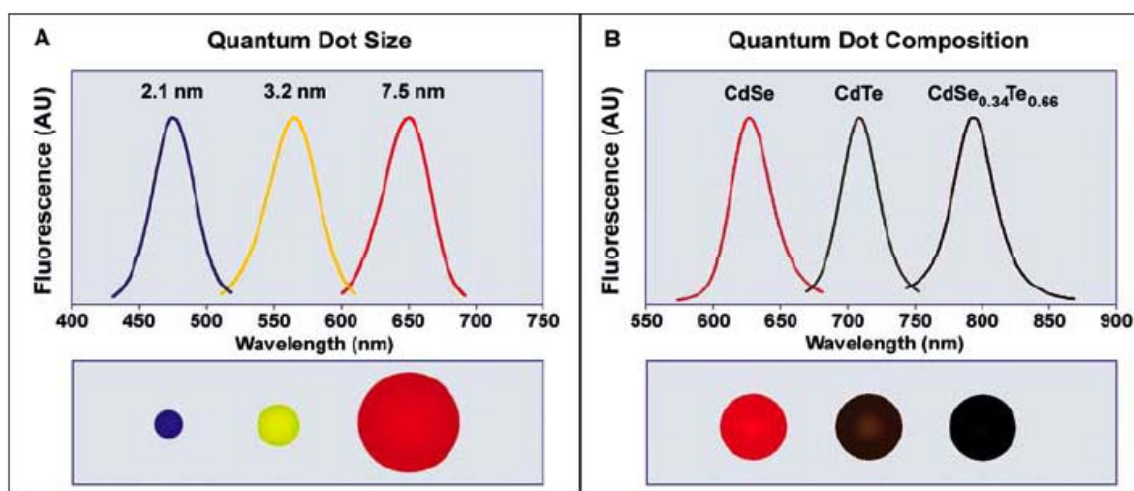
(四) 利用生理影響的方式增加訊號方大的機制。由於細胞表面的受器與受質之間的反應往往與其係報的生理活性或因子有關，因此改變反應或標定的生理參數，可改變或增加細胞與分子探針間反應的活性，如此亦可改變分子探針標定的效率，冀以可以造成偵測訊號的放大。

由以上幾項增加及放大訊號的策略，我們可以清楚的了解，分子探針的設計必須結合多門領域科學的貢獻，由此可以看出生醫分子影像技術是一跨領域的研究。

四、光學生醫分子影像探針：螢光奈米晶體 (Fluorescent nanocrystals)；量子點(quantum dots)

無機螢光半導體的奈米材料(亦稱為量子點)原是發展作為光電材料上的應用^[26]，但由於其放光的特性與表面修飾的應用發展下，量子點也逐漸在生化分析增加其應用與重要性。^[27-29] 在量子點的合成，為了是其有放光的現象產生，其大多是以CdSe(cadmium selenide)或是CdTe(cadmium telluride)作為量子點合成時的核種。在以往的研究中

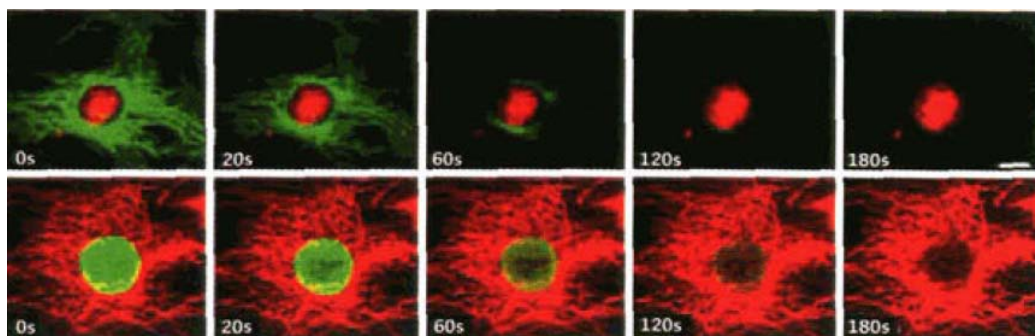
可以了解，量子點的粒子大小可以藉由化學合成的反應條件加以控制，並且其量子點的放光波長又與量子點的粒徑有關，例如：當CdSe的量子點，其粒徑大小為3 nm時，放光波長為520nm，當粒徑增加至5.5nm時，其放光波長則往長波長的區域移動的，變成630nm^[27]。因此，許多科學家藉由控制量子點的粒徑變化進而去調整齊放光波長的改變，而此一操控機制亦增加了量子點於光學影像上的應用。如圖一所示，研究人員利用量子點的粒徑變化及化學合成中摻雜不同的元素，便可以置備出具有不同放光波長的量子點^[30]。



圖一 藉由粒子粒徑與成份組成調整CdSe與CdSeTe量子點的放光波長的變化。A：不同粒徑大小的CdSe量子點(如圖中粒徑變化所示)其放光波長的改變。B：固定量子點的粒徑大小，改變其量子點的組成($CdSe_xTe_{1-x}$)對於放光波長改變的影響(經作者同意轉載)

由圖一可以發現，當CdSe量子點的粒徑改變時，隨著粒徑的增加，其放光波長會有紅位移的現象。此外，圖一B也指出當固定量子點的粒徑(5 nm)下改變其量子點的組成份($CdSe_xTe_{1-x}$)時，其放光波亦隨之改變。

量子點除了具有藉改變粒徑大小而產生不同的放光波長之外，它也具有相當高的 quantum yield，並且亦具有保留的放光效益的能力(如圖二所示)。^[29] 這種特殊的物性可以應用於長時間的觀測，對於即時影像追蹤則帶來相當大的助益。



圖二 量子點(紅色的部份)與一般螢光染劑(綠色的部份，Alexa 488)對於放光穩定度的比較(經作者同意轉載)

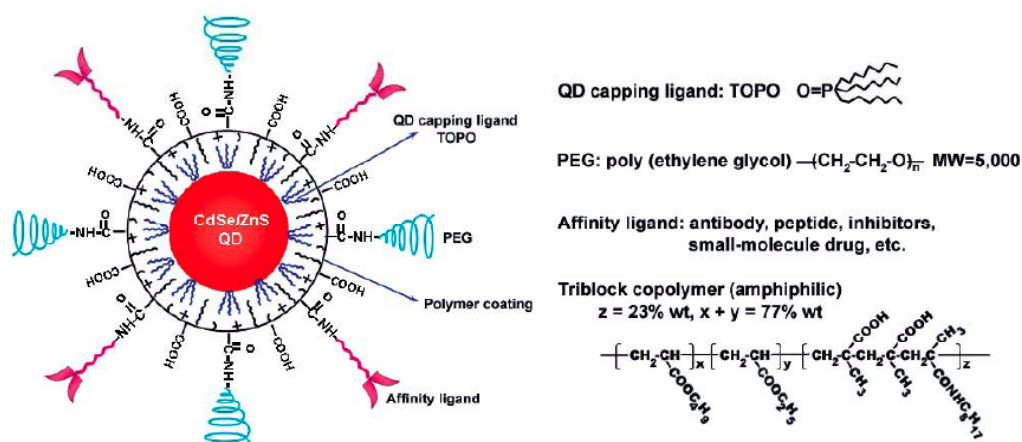
從圖二我們可以明顯的發現，隨著觀測時間的增加(0秒至180秒)，當3T3細胞株利用綠色螢光染劑Alexa 488與anti-human IgG結合而細胞核的部份則是利用Qdot 605來加以染色(紅色的部份)；或是相反的方式，Qdot 605與anti-human結合，而Alexa 488用於細胞核的染色。實驗觀測的結果發現，利用量子點染色標定的區域並不會因為時間的增加而使得螢光的放光效率降低。反觀利用一般有機螢光染劑則是會因為實驗時間的增加而逐漸的消退，這項重要的性質也加重了量子點於分子影像上的應用。

此外，在生物體內影像的標定應用上，除了放射螢光的時間的延長外，增加在生物體內循環的時間也是相當的重要。由於生物體會對於外來的物質進行排出或是消滅的保護機制，因此若是想要增加量子點分子探針的標定機會與效率，則可利用表面修飾上生物相容性的分子以增加該物質於生物體內循環的時間，如此既可增加分子探針標定的機會外，對於非特异性結合的部份也會因體內循環的機制將其帶離，以減少非特异性結合的機會。針對量子點的表面修飾與生物體內循環時間的變化，Ballou等人利用了親水性高的poly-(acrylic acid) (Amp)聚合物及不同分子量的mPEG (mPEG-750與m-PEG-5000)去包覆一具有殼-核結構的量子點，ZnS(CdSe)，在他的研究中發現當ZnS(CdSe)分別包附上Amp、Amp-Mpeg-750、及Amp-Mpeg-5000時，其量子點的放光波常會隨之變化(ZnS(CdSe)：606nm；ZnS(CdSe)@Amp：635nm；ZnS(CdSe)@Amp-mPEG-750：645nm；ZnS(CdSe)@Amp-mPEG-5000：655nm)，此外改變表面性質的量子點，其在血液中的停留時間也有不同(ZnS(CdSe)@Amp：4.6±1.0min；ZnS(CdSe)@Amp-mPEG-750：3.2±0.6min；ZnS(CdSe)@Amp-mPEG-5000：71.0±20min)。^[31] 由此可知，利用生物相容性高的分子進行表面修飾時，除了使其奈米粒子的生物相容性得以提高之外，亦可改變該奈米粒子於生物體內循環的半衰期。除了

利用聚合物分子修飾量子點之外，也可以利用liposomes的方式將量子點或奈米粒子包覆於其空腔結構體中。^[32]

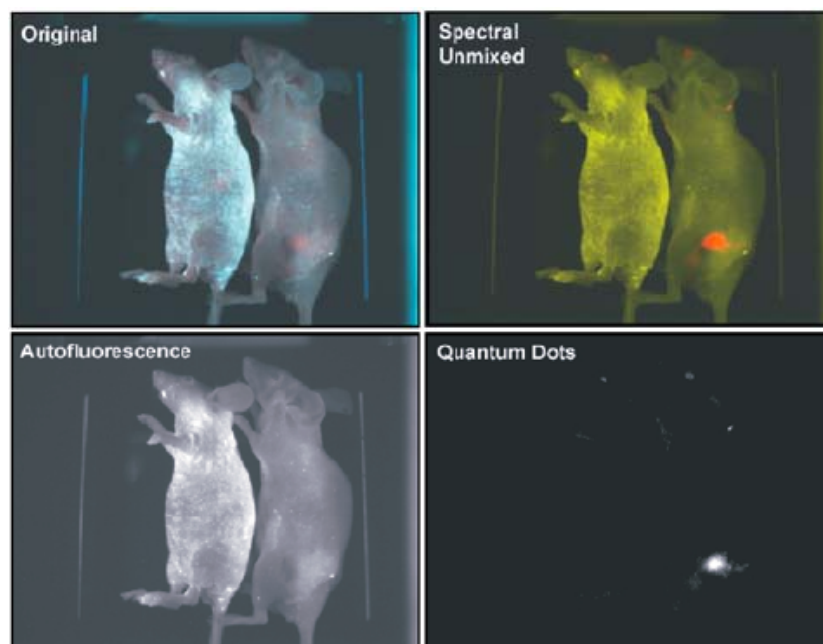
雖然利用生物相容性高的聚合物或是聚電解質的巨分子進行量子點的表面改質可以增加生物相容性及改變於體內停留的時間，但是對於非特異型的結合仍是個相當難以完全消除或避免。^[31, 33, 34] 2002年，Akerman等人為了瞭解分子探針標定與非特異性結合的問題，該研究團隊利用(CdSe)ZnS做了一系列相關的實驗。^[33] 在他們的研究中指出，當量子點的表修飾上可以特異標定組織的分子(tissue-specific peptides)並注射至具疾病模式的實驗動物時，這些量子點則為標定在肺部、腫瘤區域的血管、以及腫瘤組織的淋巴管，但非特異性標定結合的部份則是會經由RES吸收，而造成分子探針非特異性病定的結果。此外，Kim等人於2003年的時候發表利用會放出近紅外光(Near-IR)的量子點(CdTe)CdSe用於淋巴結的標定影像實驗中發現，這些被注射進入動物體內的量子點會被Dendritic cell經由巨噬作用吞噬，先造成非特異性吸收，然後在經由淋巴結的傳遞移動到達標定的位置，並可以在皮下一公分的深度被偵測到。^[35] 因此，作者認為雖然會有非特異性的標定的結果造成影像上的誤導，但是只要分子探針可以躲避RES或是早一步於RES吸收之前達到欲標定的組織或細胞，則非特異性的吸收或吞噬則不會有過多的影響。

經上述的研究之後，在2004年Gao等人的研究團隊利用量子點的標面修飾成功的標定到於小鼠上的人類攝護腺癌腫瘤(human prostate tumors)並取的光學的生醫分子影像。^[36] 而該團隊的策略則是於CdSe/ZnS的量子點表面上修飾poly(ethylene glycol)後，在修飾上可以標定攝護腺癌細胞膜上的特定抗元(antigen)的相對應抗體，如圖三所示。於圖中可以瞭解在CdSe/ZnS的表面上有包覆的分子TOPO外，也修飾了增加生物相容性的PEG以及用於標定腫瘤細胞的抗體分子。



圖三 量子點探針功能性修飾的結構圖(經作者同意轉載)

此外，由上述的結構圖亦可指出這樣的修飾測略不單單只有應用於這些分子，而是可以延伸至藥物或是小分子的修飾，如此便可將量子點的應用由光學標定染記得角色拓展至藥物搭載與傳遞的工具，如此便可於藥物輸送的同時做即時的影像觀察。在這個研究策略下，該團隊除了藉由抗體-抗原結合的特性標定腫瘤細胞外，他們也藉由生物體本身的enhanced permeability and retention (EPR)效應來偵測因轉移而形成的新生腫瘤，如圖四所示。



圖四 利用修飾攝護腺癌細胞表面抗原之抗體的量子點 (prostate-specific membrane antigen ; PSMA)偵測植入於小鼠的C4-2腫瘤(經作者同意轉載)

由圖中的影像結果可以看到其中橘紅色的螢光訊號是由注射進入老鼠體內的量子點所產生的訊號，且指出攝護腺腫瘤的確有在動物體內生成(圖四中兩隻老鼠的右邊那隻)。而對照實驗的動物(圖四中兩隻老鼠的左邊那隻)同樣施予相同的劑量，其中可以明顯的發現對照組的動物並無量子點所產生的螢光訊號。除了影像標定的結果，作者亦利用組織切片與免疫染色的方式去證明量子點所在的位置的確是腫瘤的區域。此外，在做光學影像的標定時仍需要注意的一點是光學影像的穿透深度有限，容易被生物體的組織所阻擋，因此，偵測的深度是一個相大大的限制條件之一。為了解決這個問題，在一些的文獻報導利用會放出近紅外光的量子點來作為光學分子影像的標定放光物質，主要就是希望藉由生物體對於近紅外光的吸收較低以增加穿透的深度，並可得到較好的影像訊號與靈敏度。此外量子點還有的優點

是相較於一般螢光發光團或是螢光蛋白質具有較長的激發態半衰期(excited-state lifetimes)，量子點是20~50 ns，而發光團或是螢光蛋白則是1~10 ns。如此的差異可以使量子點的訊號與自體螢光的訊號做一個區別，並可以增加影像的對比。因此，經過修飾與標定設計，可以使量子點廣泛的應用於生物系統中的影像偵測以達到生醫奈米技術發展的目標。

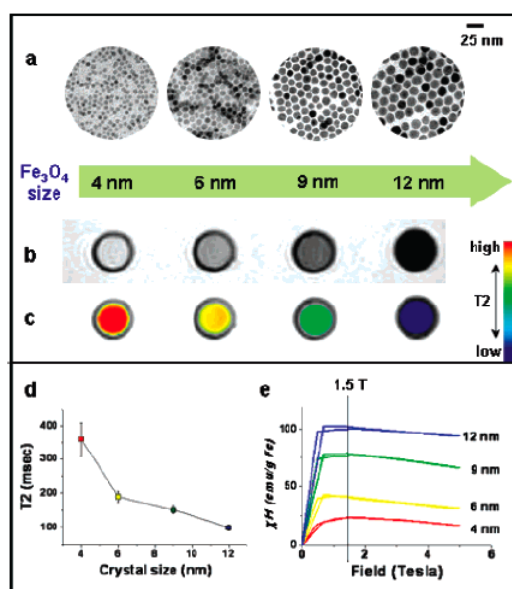
五、核磁共振造影技術的應用：磁振造影顯影劑的發展

核磁共振造影技術近年來以廣泛地應用於生分子影像的研究上，其主要的優點是一非侵入式的偵測取像，且沒有任何放射性物質的疑慮，此外，磁振造影相較於光學生醫分子影則具有相當良好的空間解析及深度解析的取像能力，若搭配磁振光譜(Magnetic Resonance Spectrum；MRS)便可將偵測的極限推至分子層級，因此磁振造影技術的發展於生醫分子影像是相當重要的。在磁振造影的技術中，其偵測的對象為spin quantum number為奇數的原子核，如：氫(^1H)、碳-13(^{13}C)、氧-17(^{17}O)、磷-31(^{31}P)等原子，然而在生物體中，水佔了大約70%，且不同的組織其含水程度均不相同，故影像上則多偵測水分子中的氫原子或是氧-17原子，且也因為含水量的不同，可以造成不同組織或器官在磁振造影的解剖影像上即可有相當的區別，於此我們多針對氫原子及顯影劑的使用來加以討論。

基本上，磁振造影中造成影像亮、暗的變化與該組織或器官中氫原子的緩解時間(relaxation time)的不同所致，其又可分為自旋-晶格緩解時間(spin-lattices relaxation time； T_1)及自旋-自旋緩解時間(spin-spin relaxation time； T_2)，這兩個重要的參數也是之後發展磁振造影顯影劑必須考量的因素。而若要成為磁振造影顯影劑，其必須對氫原子的 T_1 、 T_2 有相當的影響，於此可以分成兩大類來加以說明，一類為順磁性(paramagnetic)的核種或物質，如： Gd^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等元素，其主要的作用是該核種與水分子中的氫原子交換結合時，會使氫原子的 T_1 縮短，這樣的結果會造成影像上的對比變亮的變化趨勢，亦稱為正向顯影劑(positive contrast agents)。但是這類的核種對生物的毒性也較高，因此在臨床使用上均是利用螯合劑將Gd等核種包覆以減低生物毒性影響。而另外一類則是超順磁(superparamagnetic)的物質，如氧化鐵奈米粒子，其主要的作用機制是改變水分子的 T_2 或是造成磁場梯度的不均勻，進而使受影響的區域的影像有變暗的趨勢，此類顯影劑亦稱為負向顯影劑(negative contrast agents)。為了更深入的了解，於此我們針對磁性奈米的應用來加以說明。

應用於磁振造影的超順磁性粒子可以為奈米級尺寸或是次毫米

級尺寸，且依照粒徑的大小可以分成下列解類：superparamagnetic iron oxide (SPIO)，ultrasmall SPIO (USPIO)，及monocrystalline iron oxide nanoparticles (MION)。^[37, 38] 由於這些奈米粒子於外加磁場下可以視為一個小型的磁鐵，因此粒徑大小對於 T_2 或 r_2 有這相當程度的影響。因此Jun等人的研究團隊曾發表一系列的磁性奈米粒子的粒徑變化對於 r_2 的影響，如圖五所示。^[39]



圖五 水溶性磁性奈米粒子的粒徑與MR訊號的關係。(a) 4、6、9、以及12nm的Fe₃O₄奈米粒子的穿透是電子顯微鏡下的影像。(b)在1.5T下不同粒徑大小的T₂-weighted磁振造影。(c)在1.5T下不同粒徑大小的T₂-weighted磁振造影利用由紅到藍的顏色編碼加以分析的結果。(d)T₂量測值與磁性奈米粒徑大小的關係圖。(e)利用SQUID量測磁性奈米粒子的magnetization(經作者同意轉載)

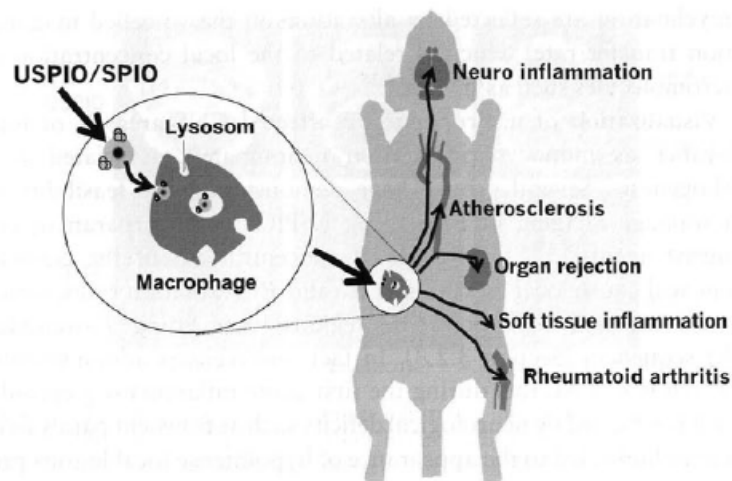
由圖五我們可以發現Jun等人所製備的水溶性氧化鐵奈米粒子(water-soluble iron oxide; WSIO)於1.5T的儀器下，其奈米粒子的粒徑大小的確會影響T₂-weighted imaging的訊號大小及T₂緩解時間，而且隨這粒徑的增加，其T₂-weighted imaging的訊號強度會往變暗的方向移動且T₂緩解時間也因此而越來越短。就如前面所提過的，為了生物相容性的考量，我們亦可於磁性奈米粒子的表面上修飾生物相容性的分子，如：carboxydextran、starch、albumin、silicon^[40]、或polyacrylamide^[41]，這類的表面修飾可以改變磁性奈米粒子於生物體內的分布情形，亦可改變一些藥物動力學上的參數，以增加或是改變於生物體內的循環代謝時間。

在其他文獻中也指出，磁性奈米粒子的毒性測試以證明該奈米粒

子是相當安全的顯影劑材料。Cheng等人就利用細胞存活率以及血液中溶血測試來驗證該研究團隊所製備水溶性磁性奈米粒子的生物相容性，在細胞存活的毒性測試中，利用了MTT與WST-1的實驗分析方式，其結果證明了磁性奈米粒子在不同濃度的條件下並無明顯的毒性反應，且細胞存活率良好^[38]，由此可以看出氧化鐵磁性奈米粒子是一具有相當生物相容性的顯影劑材料。

因此為了可以利用磁振造影來偵測特異的巨分子或是分子影像，就如同光學影像中所使用的量子點，針對有興趣的細胞、組織使其與磁振造影的顯影劑做選擇性的結合，造成在磁振造影下影像訊號上的差異，藉以鑑別未與顯影劑結合的組織區域。為了可以輕易的進行表面修飾的工作，超順磁的氧化鐵奈米粒子(Superparamagnetic iron oxide nanoparticles; SPIO)則是近年來於磁振造影中常被研究的材料。然而，除了奈米粒皆議進行標面修飾之外，利用SPIO有這下列幾項主要的目的：(一) SPIO相對於Gd-chelated對訊號改變在每單位金屬原子有這較大程度的改變，尤其是在 T_2^* -weighted磁振造影上；(二) SPIO的主要成份是氧化鐵且容易於生物體內分解成鐵原子，並且這些鐵原子則是可以參與生物體的鐵代謝循環機制，因此是一相當高生物相容性的物質；(三) SPIO的表面修飾相當的容易，可輕易地將具有標定功能性的分子或是抗體利用化學鍵結的方式將其修飾於SPIO的表面，以達到分子導向探針的目的；(四) SPIO可以藉由一些染色的方式加以呈現，如普魯士藍等，使其可以再利用光學或是電子顯微鏡的方式加以偵測、觀察；(五) SPIO可以巧妙的利用化學合成的方式操控其粒徑大小的變化，以呈現不同的結構及磁性的性質。

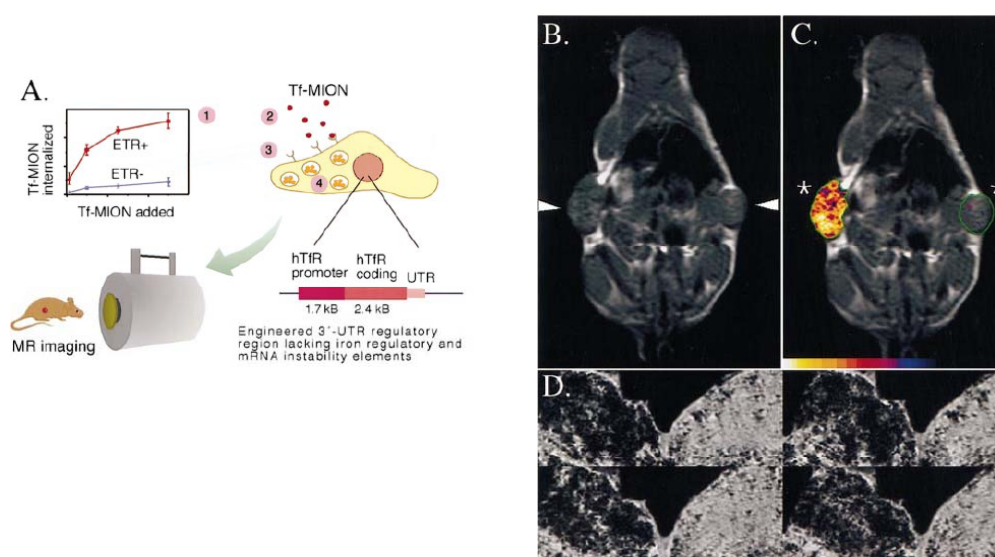
上述的論點，我們可以了解氧化鐵奈米粒子具有相當多的優點，無論是WSIO、MION、USPIO、或是SPIO，當我們在其表面修飾或包覆上藥物、抗體、或是具有標定功能的小分子時，這些磁性奈米材料就會像是“導彈”一般去標定我們想要觀測的細胞或是疾病區域。



圖六 利用奈米粒子影像探針標定巨噬細胞(經作者同意轉載)

在圖六中，展示了一種策略就是利用巨噬細胞(blood-borne macrophages)對於USPIO/SPIO的吞噬作用將USPIO/SPIO包覆於巨是細胞內，再藉由巨噬細胞將USPIO/SPIO帶至生物體產生發炎反應的疾病區域，以達到對於發炎疾病區域的標定，如：神經發炎、心血管疾病、軟組織發炎、或是關節炎…等，如此便可以達到導向標定的作用。

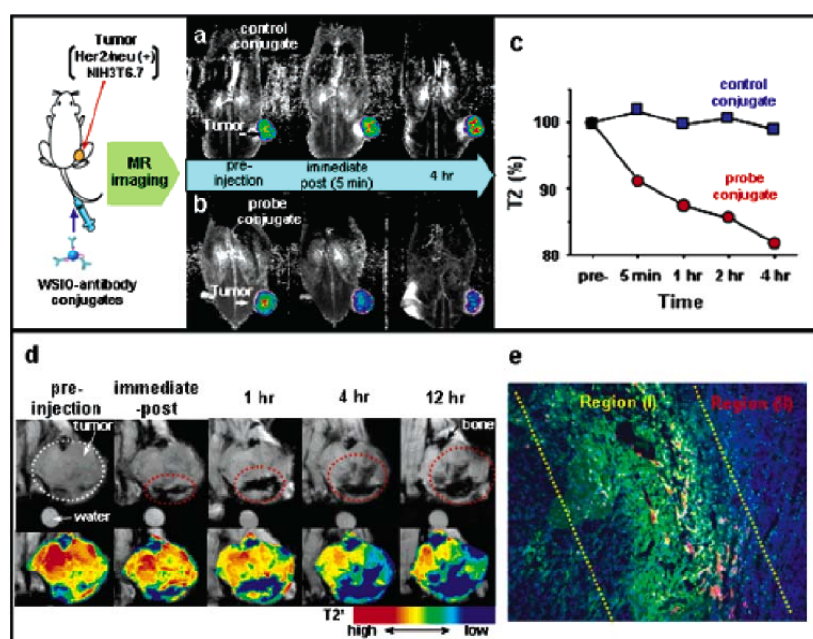
藉由巨噬細胞將氧化鐵磁性奈米粒子帶至發炎區域或是疾病組織的發室外，也可以利用生物工程的方式來增加分子探針大量標定的過程。就如圖七所示，作者利用基因工程的方式使欲被標定的腫瘤細胞膜的表面上大量表達engineered transferring receptor(ETR)，並且在磁性奈米粒子(MION)的表面修飾上 human transferrin receptor(hTfR)。由於hTfR會與ETR做特異性的結合，因此當腫瘤細胞大量表達某一種受器時，相對的就可以增加分子探針標定的數量，以達到訊號放大的目的，因此這是一種可用於偵測生物體或是疾病組織基因表現的生醫分子影像技術^[26]。



圖七 利用磁振造影技術偵測基因表現。圖中的ETR為engineered transferring receptor, hTfR為human transferrin receptor, mRNA為messenger RNA, Tf-MION為transferrin - monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles，以及UTR為untranslated region。(A)利用基因轉植技術作為基因大量表達且增加分子探針標定及訊號放大的流程圖。(B)利用coronal spin-echo磁振造影的方式取像(1.5T MR系統)，其中老鼠的左側腫瘤細胞為ETR+，而右邊則是ETR-的腫瘤細胞。(C)利用coronal T₂-weighted spin-echo MR影像去偵測注射hTfR-MION之後，左、右兩區腫瘤細胞的R2變化並以色彩的方式呈現，其中，左側為ETR+，而右側為ETR-的腫瘤區域。(D)藉由高解析的MR影像來加以偵測，其中掃描厚度為39 mm於7.1T MR系統(經作者同意轉載)

上述的實驗結果，我們可以發現，做這利用基因轉植的技術始腫瘤細胞大量表達一個可被偵測且與正常細胞有所差異的受器，且這種方式的確可以利用分子探針的模式於磁振造影下被鑑別出來，如此可以了解這種標定策略同樣可以應用於對於單一生物標靶(Biomaker)基因表現有所差異的疾病模式中。

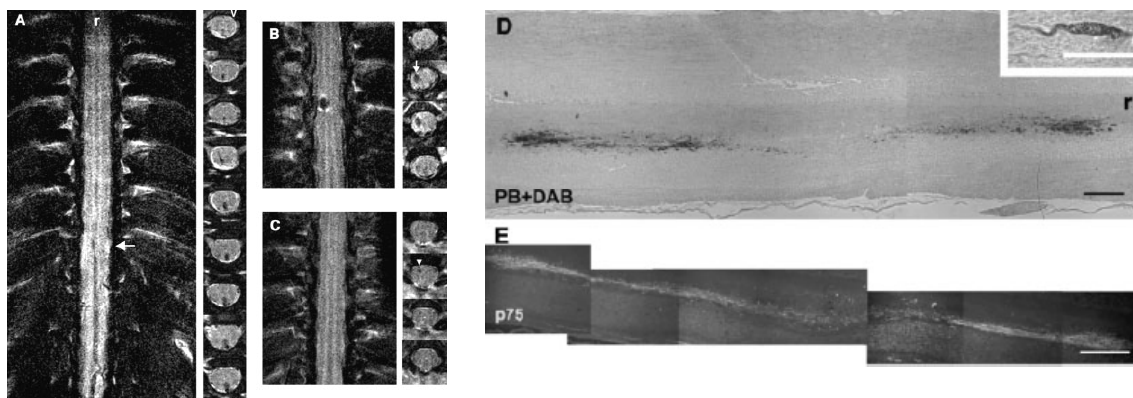
除了利用基因工程的方式去觀測基因表現的變化外，我們也可以藉由疾病組織與正常組織之間的差異，如：biomaker或是receptor表現的不同來利用分子探針標定，並於MR量測下影像訊號上的差異來加以鑑別。Huh等人的研究團隊曾經發表利用乳癌細胞上Her2/neu receptor的表現量與動物體內正常組織的差異來作為標定的分子標靶⁴²。而這種研究方式與策略也是目前大多數在進行腫瘤疾病模式的標定與分子影像常用的方法之一。由於Her2/neu receptor會與Herceptin進行特異性的結合，因此該團隊利用WSIO-Herceptin作為分子探針並藉由此探針去標定植入於動物體內的腫瘤組織，並利用高場的9.4 T MR系統加以偵測追蹤。如圖八所示。



圖八 利用WSIO-antibodies標定小鼠體內腫瘤的磁振造影。(a與b)在不同時間點下追蹤分子探針於腫瘤組織上標定的T₂-weighted MR影像的結果，並以顏色變化表示訊號強度。(c)於不同時間點量測T₂訊號變化的圖表。(d)在不同時間點下追蹤分子探針於腫瘤組織上標定的T₂-weighted MR影像的結果，並以顏色變化表示訊號強度，並以水當作影像參考。(e)腫瘤組織切片的免疫染色與氧化鐵染色，其中region I是腫瘤細胞區域，而region II則是正常組織的區域，紅色的點則是氧化鐵染色的區域(經作者同意轉載)

由圖八中的(a)、(b)、(c)可以明顯的發現WSIO-Herceptin對於腫瘤組織區域的標定比未修飾Herceptin的WSIO要好，且影像上訊號的變化中，注射WSIO-Herceptin的動物其腫瘤組織會因為體內循環時間的增加使得其影像訊號逐漸變暗。此項結果在圖八(d)也有同樣的結果。為了確定WSIO-Herceptin的確會標定於腫瘤區域，作者將組織切片作螢光免疫染色與氧化鐵染色的實驗，在組織切片染色的結果中，氧化鐵的確有標定於腫瘤細胞的位置，因此，將其結果統整分析可以發現，利用磁性奈米粒子表面修飾可以有效的達到標定與影像偵測的目的。

奈米分子探針除了基因表現與腫瘤生物學的應用，亦可以用於細胞追蹤的研究。如先前的研究，我們可以發現磁性奈米粒子可以被細胞吞噬或是標定於細胞膜的表面，因此利用這種已建立的研究平台，亦可以使磁性奈米粒子做為細胞追蹤的標定物。在以往的研究中，若是想要瞭解細胞於生物體內移動的過程，大都必須將動物犧牲組織免疫染色的方式觀察，然而分子探針的技術平台的建立讓這項研究可以利用非侵入式的影像擷取方式針對同一隻動物進行長時間的研究追蹤，而且利用MR具有較高的空間解析的能力，可以進行不同深度偵測，尤其是幹細胞的追蹤與組織修復的相關領域。圖九就是利用磁性奈米粒子做為追蹤的標靶，偵測幹細胞移動的情形。^[43]

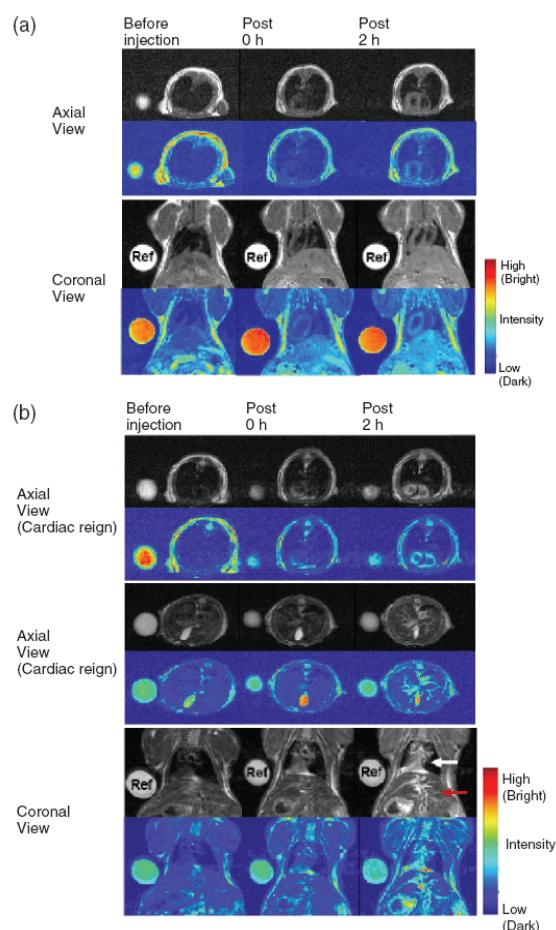


圖九 利用磁振造影技術於生物體內進行細胞追蹤。(A-C)olfactory ensheathing cells (OECs)標定MD-100氧化鐵磁性奈米粒子於脊髓內移動的磁振造影結果。(D-E)該細胞移動區域的組織切片影像 (r = rostral, v = ventral)(經作者同意轉載)

圖九(A)中，作者發現於大鼠的脊髓注射已標定磁性奈米粒子的OECs後，經過八週的觀察其帶有奈米粒子的細胞會移動至相距注射點(白色箭頭處)9 mm，且於縱向切面的MR影像中可以觀察到在不同的連續切面下都可以觀察到因磁性奈米造成MR影像變暗的結果。相較於圖九(B)利用以標定磁性奈米粒子的OECs且死亡的細胞注射進

入脊髓內，作者發現作為控制組的實驗中，由於細胞已經死亡，因此經過相同的時間仍不會有細胞移動的現象，且於該注射區域仍一直保持因磁性奈米粒子所造成的影像訊號變暗的結果。此外，作者也利用未標定磁性奈米的OECs注射於大鼠的脊髓內，如圖九(C)所示，在此控制實驗中作者發現經過一週的追蹤，由於沒有標定磁性奈米粒子，因此並沒有辦法看到細胞移動的現象，但是在縱向切面的MR影像中有發現一處訊號較低的位置，其作者判定那是注射細胞時所造成的損傷而使其在MR影像中造成訊號下降。為了可以更加確定於磁振造影下所觀測到的結果確實是OECs移動的結果，作者亦同時利用組織切片染色的方式作為比對實驗，如圖九(D)與(E)所示。作者分別於取出的組織切片分別做普魯士藍的鐵離子染色(D)與OECs細胞表面特異標靶；p75；的免疫染色(E)。在組織切片染色的結果中，的確同時染到氧化鐵與OECs，計算其細胞移動的距離約為8 mm，此結果與利用MR影像追蹤所得到距離相似，由此亦可得知利用分子探針的標定於磁振造影中可作為活體內長時間細胞追蹤的偵測工具。

除了上述磁性奈米粒子的應用，仍有許多可以應用於磁振造影技術的奈米級顯影劑陸續的發展。Su等人的於2007年發表一雙金屬之磁振造影顯影劑，該顯影劑的結構為一個銅金合金的奈米空球，為求其生物相容性的提高，於奈米空球的表面修飾上聚電解質之高分子材料，並且於細胞及動物存活的毒性分析上發現該修飾聚電解質的奈米膠囊空球並無急性毒的現象。於磁振造影的應用中發現銅金奈米空球不只可於T₁-weighted MR影像中於心臟血管區域有影像增強的效果外，亦可於T₂-weighted MR影像針對相同的區域及肝臟血管有著正向顯影對比的能力^[44]，如圖十所示。



圖十 Au_3Cu_1 奈米膠囊的動物磁振造影測試，(A)和(B) 分別為 T_1 和 T_2 影像(

注射 Au_3Cu_1 奈米膠囊後馬上觀察(0小時)，發現 T_1 在心臟的室中的影像馬上出現增亮效果，隨著時間增長至兩小時，小鼠體內循環累積的量增加而使得影像更加明顯增亮。彩色影像的呈現更能說明其變化。而 T_2 的影像則清楚呈現出血管的影像明顯增強(如箭頭所指)。彩色的圖像也同樣說明增強的效果。活體上測試的結果說明 Au_3Cu_1 奈米膠囊可作為正像的顯影劑同時有血管顯影的功用。

光學或是磁振造影的生醫分子影像發展其主要的目標是希望藉由分子探針的特異標定去觀測生物體中基因表現或是疾病的區域。而由以上的說明，可以了解奈米粒子的修飾與發展在生醫分子影像上扮演了相當重要的角色，藉由這些奈米探針的獨特性質，可以使醫學影像系統由單純的解剖影像進入分子與細胞層級的功能性影像之領域，無論是疾病與腫瘤組織的標定、或是細胞轉移、治療的追蹤，這些主動性的奈米探針均可展現其功效。雖說目前的研究大多停留在疾病動物模式或是臨床前研究，總觀生醫分子影像與奈米技術的發展，針對臨床疾病的早期診斷與主動式藥物傳遞或治療均提供了一有力的研究平台與方向。

六、主要参考文献

1. Luker, G. D. & Piwnica-Worms, D. Molecular imaging in vivo with PET and SPECT. *Acad. Radiol.* 8, 4-14 (2001).
2. Pison, U., Welte, T., Giersig, M. & Groneberg, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 341-50 (2006).
3. Roco, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 337-46 (2003).
4. Wilkinson, J. M. Nanotechnology applications in medicine. *Med. Device Technol.* 14, 29-31 (2003).
5. Vinogradov, S. The second annual symposium on nanomedicine and drug delivery: exploring recent developments and assessing major advances. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 1, 181-4 (2004).
6. Shaffer, C. Nanomedicine transforms drug delivery. *Drug Discov. Today* 10, 1581-2 (2005).
7. Bulte, J. W. et al. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 15256-61 (1999).
8. Winter, P. M. et al. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha v\beta 3$ -integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* 108, 2270-4 (2003).
9. Krause, M. H., Kwong, K. K., Gragoudas, E. S. & Young, L. H. MRI of blood volume with superparamagnetic iron in choroidal melanoma treated with thermotherapy. *Magn. Reson. Imaging* 22, 779-87 (2004).
10. Anderson, S. A. et al. Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood* 105, 420-5 (2005).
11. Coons, T. Monoclonal antibodies: the promise and the reality. *Radiol. Technol.* 67, 39-60; quiz 61-4 (1995).
12. Goldenberg, D. M. Perspectives on oncologic imaging with radiolabeled antibodies. *Cancer* 80, 2431-5 (1997).
13. Bischof Delaloye, A. Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy: will these be routine procedures? *Semin. Nucl. Med.* 30, 186-94 (2000).
14. Czernin, J. & Phelps, M. E. Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annu. Rev. Med.* 53, 89-112 (2002).
15. Hogemann, D. & Basilion, J. P. "Seeing inside the body": MR imaging of gene expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 29, 400-8 (2002).
16. Kim, E. E. Targeted molecular imaging. *Korean J. Radiol.* 4, 201-10 (2003).
17. LaVan, D. A., Lynn, D. M. & Langer, R. Moving smaller in drug discovery and delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 77-84 (2002).
18. Rudin, M. & Weissleder, R. Molecular imaging in drug discovery and

- development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 123-31 (2003).
19. Goodwin, D. A., Meares, C. F. & Osen, M. Biological properties of biotin-chelate conjugates for pretargeted diagnosis and therapy with the avidin/biotin system. *J. Nucl. Med.* 39, 1813-8 (1998).
 20. Hu, S. et al. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-C_H3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 56, 3055-61 (1996).
 21. Tjuvajev, J. G. et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. *Cancer Res.* 56, 4087-95 (1996).
 22. Gambhir, S. S. et al. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 2333-8 (1999).
 23. Weissleder, R., Tung, C. H., Mahmood, U. & Bogdanov, A., Jr. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat. Biotechnol.* 17, 375-8 (1999).
 24. Weissleder, R. et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat. Med.* 6, 351-5 (2000).
 25. Moats, R. A., Fraser, S. E. & Meade, T. J. A "smart" magnetic resonance imaging agent that reports on specific enzymatic activity. *Angewandte Chemie International Edition* 36, 726-731 (1997).
 26. Yoffe, A. D. Semiconductor quantum dots and related systems: electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems. *Advances in Physics* 50, 1-208 (2001).
 27. Chan, W. C. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 40-6 (2002).
 28. Watson, A., Wu, X. & Bruchez, M. Lighting up cells with quantum dots. *Biotechniques* 34, 296-300, 302-3 (2003).
 29. Wu, X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 21, 41-6 (2003).
 30. Bailey, R. E. & Nie, S. Alloyed semiconductor quantum dots: tuning the optical properties without changing the particle size. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7100-6 (2003).
 31. Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P. & Waggoner, A. S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug. Chem.* 15, 79-86 (2004).
 32. Dubertret, B. et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298, 1759-62 (2002).
 33. Akerman, M. E., Chan, W. C., Laakkonen, P., Bhatia, S. N. & Ruoslahti, E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 12617-21 (2002).

34. Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631-51 (2002).
35. Kim, S. et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22, 93-7 (2004).
36. Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 22, 969-76 (2004).
37. Harisinghani, M. G. et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 2491-9 (2003).
38. Cheng, F. Y. et al. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials* 26, 729-38 (2005).
39. Jun, Y. W. et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 5732-3 (2005).
40. Bonnemain, B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J. Drug Target* 6, 167-74 (1998).
41. Jung, C. W. Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn. Reson. Imaging* 13, 675-91 (1995).
42. Huh, Y. M. et al. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12387-91 (2005).
43. Lee, I.-H. et al. In vivo magnetic resonance tracking of olfactory ensheathing glia grafted into the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 187, 509-16 (2004).
44. Su, C. H. et al. Nanoshells magnetic resonance contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2139-46 (2007).

第十一章 微奈米機電技術在生物醫學上的應用

盧陽明教授 國立台南大學光電工程研究所

蕭俊龍 國立台南大學光電工程研究所

吳信毅 國立台南大學光電工程研究所

一、新穎的微奈米生物醫學技術

人類歷經18世紀的工業革命，逐漸使用機械取代人力，使得科技一日千里。早在1959年諾貝爾物理獎得主Prof. Richard P. Feynman就曾發表“*There is Plenty of Room at the Bottom*”的演講中，早已預言奈米科技發展的可能性。1970年代末期以來，美國、日本、西歐、俄國等先進國家早已開始致力於超微粒子的研究，並觀察到一些異於傳統物理化學的奈米現象。到了1980年代以後原子力顯微鏡（Atomic Force Microscope, AFM；圖一）、近場光學顯微鏡（Near-Field Microscope, NFM；圖二）、掃描穿隧顯微鏡（Scanning Tunneling Microscope, STM；圖三）等分析儀器陸續的被發明、應用與普及化，提供了奈米尺度下的觀察、分析、物理化學性質的研究及原子、分子的操控工具與能力。到廿一世紀的今天，人們逐漸具備可以著手研究近分子尺度的設計和製造條件或原子等級的物質操控，未來在此原子、分子尺寸等級科技的衝擊下，相信將引發下一次重大的工業革命。



圖一 原子力顯微鏡
(Atomic Force Microscope)

【圖片節錄自國立虎尾科技大學光電工程系】

[已獲得作者同意轉載]



圖二 近場光學顯微鏡
(Near-Field Microscope)

【圖片節錄自工研院奈米共同實驗室】

[已獲得作者同意轉載]

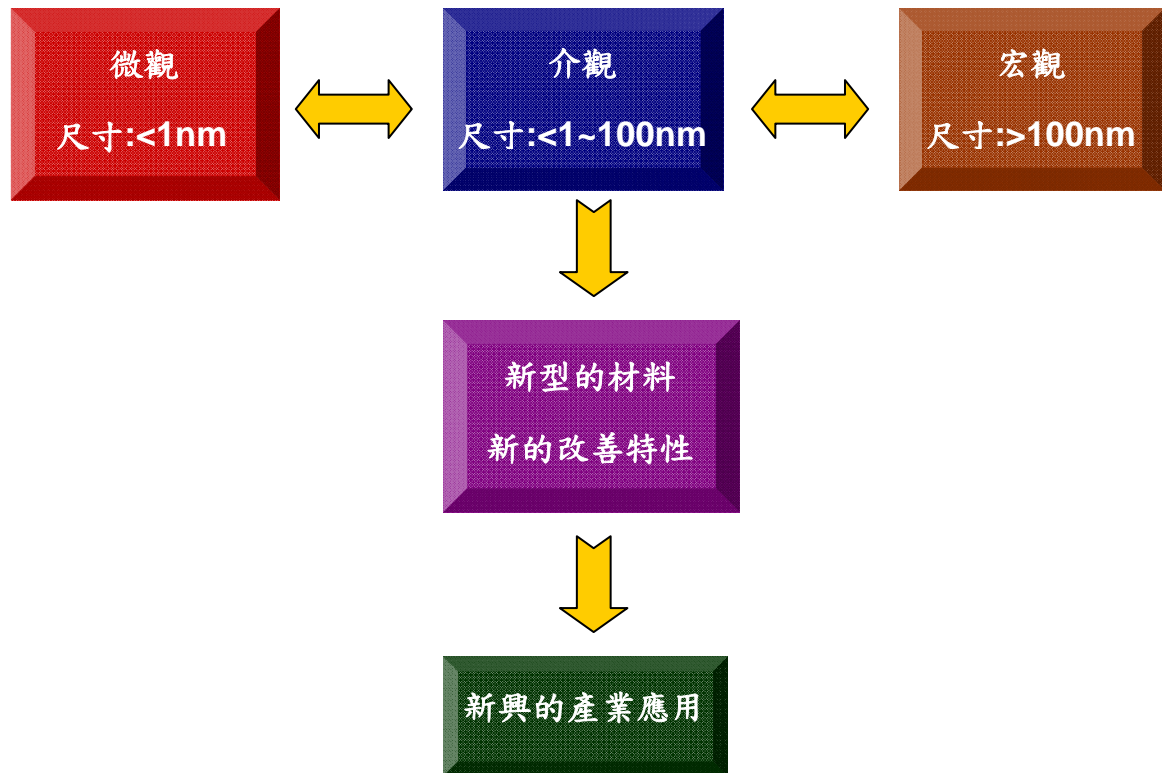


圖三 掃描穿隧顯微鏡 (Scanning Tunneling Microscope)

【圖片節錄自東海大學物理系】

[已獲得作者同意轉載]

近幾年來「奈米科技」逐漸與我們的生活產生密切的關係，何謂奈米(nano)？所謂奈米(nanometer)為一量測單位，等於十億分之一米(10^{-9} m)，具體比喻說明此概念，如果一個人是一公尺高，那一奈米就像是人體內DNA的大小，又或大約等於人類頭髮的八萬分之一，嚴緊定義為尺度在1-100nm的介觀範圍。而何謂奈米科技(nanotechnology)呢？學者專家有不同看法，簡單的說，奈米科技係指在奈米尺度下之製程技術；而奈米科技之所以受到如此矚目，一為在實體的製造上要較從前縮小許多，更重要的是，在奈米尺寸下，物質之性質(諸如熔點、磁性、導電性等)將迥異於傳統普通尺寸時之性質，會產生新的特性和現象，例如：金在奈米尺寸大小時，熔點大幅下降；在奈米尺寸下的二氧化鈦其導電性倍增等，這些特殊現象將對產業創造了應用上的新契機，其關係如圖四所示。



圖四 奈米尺度與產業關係圖

奈米科技技術是依靠構想決勝負的智慧型技術產業，且著重於企業獨特之高科技領域，因此，若能有效掌控奈米技術，將可引發新一波的材料革命。此二十一世紀的新紀元，影響本世紀科技之主流為何？一般認為：生物科技、奈米科技及資訊科技三者為首，而所發展的奈米生醫技術(nano-biomedics)已在現實世界逐漸實踐，例如可以利用奈米磁性顆粒與藥劑或DNA結合，從事目標導彈的治療。麻省理工學院的研究團隊過去在一段去氧核糖核酸(DNA)上接金奈米晶體做的天線，當無線電頻率傳送至這個小天線時，這段DNA就會受驅動等。利用微機電及分子馬達技術來製作奈米機器，進入人體去修復有疾病的器官、去除癌細胞、清除受阻的血管、更換有缺陷基因等都已可能實現。

隨著人類基因圖譜初步解碼工作的完成，「個人醫學」(Personal Medicine)的願景將可能逐步的實現，而接著面臨的挑戰在於，為能達到蛋白質體學、基因體學與藥物作用篩選等重要領域，大量樣本檢測與分析的要求，必須發展高敏感度、高通量、與微量樣本消耗等特性之檢測方法及針對個體差異所須之奈米藥物與組織結構的設計與製作，而在臨床上的應用更須針對奈米科技的生物安全性(Nano Biosafety)作為深入的探討與及早因應。

目前把奈米科技列為重大國家發展目標的國家，包括澳洲、南

韓、比利時、印度、保加利亞、俄羅斯、新加坡、芬蘭、西班牙、法國、瑞典、德國、瑞士、荷蘭、台灣、中國大陸、日本、以色列、英國等。西元1998年，歐洲和日本對奈米科技的政府支出都分別超越美國政府。美國在人造合成、組合和高表面積材料（high surface-area material）等方面領先各國；在生物方法、應用和傳播、覆層等方面則和歐洲不相上下。日本則在奈米設備和整合式奈米材料居領導地位。整體來說，全球開始愈來愈注意奈米科技知識，使許多國家紛紛投入這個新興產業。

台灣過去廿年來，積極投入半導體的研發與製造，創造了經濟奇蹟，也成功帶動半導體產業躋身全球第三的佳績。過去的矽導產業的發展是從上而下（Top-down）、由大做到小，也就是線寬愈做愈細，往0.1微米以下的製程發展；而奈米科技則是由下往上（Bottom-up），改變以往產業的發展模式，也改變研發人員對物質材料結構的思維。因為當物質小到奈米尺寸時，會產生新的特性，包括量子效應及表面效應等。

奈米結構一方面是一個令所有科學家們充滿了無限想像的空間，其整體的發展使我們得以踏上解開大自然及生物的奧秘。另一方面，電子元件微小化所面臨的材料及技術瓶頸，也將因奈米科技的應用研發而有所突破。在奈米尺度下，由於光子、電子、聲子自身與彼此之交互作用，材料、元件及系統會展現出顯著改善或全然不同的物理、化學及生物特性和現象。奈米技術主要目標即是藉由掌控原子、分子、或巨分子尺度的結構或裝置來探討這些特性，並且有效率的製造或使用這些裝置。因此，奈米科技正在逐步創造新一波的技術革命與產業，它不僅將改變我們製作事物的方法，也對人類的生活將有全面性的改變，同時也會改變我們所能製作事物的本質。預測未來奈米科技所產生的新材料、新特性及其衍生之新裝置、新應用及所建立之精確量測技術的影響，將遍及儲能、記錄媒體、光電、電腦、機械工具、基因工程、醫學醫藥、化學工業、環境與資源等產業，對我們日常生活影響甚鉅。如何將奈米科技的特性，轉成實際應用進而產生具體經濟成效，是今日所有科技發展先進國家重視奈米科技最主要因素。

從以上的一些論述我們可以了解隨著奈米技術不斷的研究發展，以及在各方面的應用，人類的生活將會產生革命性的變化。奈米科技不僅是最尖端的技術，也是最尖端的思考，當人類可以操控原子及分子，理論上就能做出任何東西，甚至可以「操控」生命，只要下指令就可以要生物按照人類的旨意來進行。

二、生物晶片的種類與在醫學上的應用

微機電系統 (Micro-Electro-Mechanical-System, MEMS) 為一跨領域整合技術，被視為下世代重要的核心科技，美、日、歐洲等先進國家均已投入大量人力與物力於此技術領域並積極研發。微機電系統技術是一種包括光、機、電、生醫、材料、化學、控制等多重科技整合的技術，利用此一新的製造技術可使產品因微小化並提高其性能、可靠度、品質及附加價值，同時可降低其製造成本。繼微電子技術帶來輕薄短小的電子系統產品後，微機電技術將對通訊、資訊、消費性電子、農林水產、生醫保健、國防工業、環保工安、工業生產、太空航空等領域造成革命性的衝擊，可見微機電技術應用範圍廣泛且影響層面深遠。

微機電技術和生化分析結合的產物生醫晶片 (Biochip)，是利用分析化學和基因資訊等進行構思和設計。研究顯示將儀器設備微小化後往往可增加其分析速度與簡化操作程序。由於微機電系統製程技術已相當成熟，可以利用矽晶片、玻璃及高分子材料等來製作出微小的元件。因此這種極具潛力的技術有將大型生化分析或檢測設備微小化之特性，利用微機電系統製程技術將分析儀器微型化整合於一小面積之生醫晶片上，和傳統生化分析裝置比較起來，不但可降低製程的成本，還可以大幅降低試劑的用量和人為的誤差，並且可以平行、快速地處理大量的生物資訊。因此微機電系統製程技術應用在生化分析將是有一定發展潛力的一種關鍵性技術。

目前晶片技術已廣泛的應用於生物醫學領域，如癌症、藥理、毒理學、感染、細胞分化、發育及生殖醫學等，亦將直接或間接的應用於疾病之診斷、分類、預後評估，並改善疾病之治療，且生物晶片被運用在分子生物學、分析化學、生化反應等設計，以矽晶片、玻璃或高分子為基材，結合精密微機電製造技術與生物醫學技術而製作之微小化、快速、平行處理之生物及醫療用檢測元件，可在微小面積上同步快速進行大量生化感測或反應的晶片。

微流體晶片利用微機電系統技術將取樣、樣品前處理、樣品分離、偵測等複雜功能整合於一小面積晶片上，以獲得降低成本、快速得到檢測結果及減少樣品消耗等優點，並可應用於新藥研發、基因工程、環境監督及臨床疾病檢測等相關應用。微機電系統加工技術可將傳統生化分析中所需的微幫浦、微閥門、微過濾器、微混合器、微管道、微感測器及微反應器等元件集中製作於生化晶片上，以進行樣品前處理、混合、傳輸、分離和偵測等程序，這樣的微流體生醫晶片又可以稱為微全程分析 (Micro-Total-Analysis-System, μ -TAS)。利用微流體生醫晶片進行生物醫學檢測或分析具有降低人工操作的實驗誤差、提高系統穩定性、降低耗能及樣品用量、節省人力和時間等優

點。若能配合開發出低成本和可大量生產的製程，將可成為未來的新興產業。目前微流體晶片技術在生物醫學方面應用的主要領域包括基因表現分析、疾病診斷、藥物篩選、基因定序、蛋白質分析等相關應用，圖五為商用表面電漿共振流道晶片量測儀。

BIACORE® 3000



圖五 Biacore®3000 之表面電漿共振流道晶片量測儀

【圖片節錄自BIACore AB公司】

[已獲得作者同意轉載]

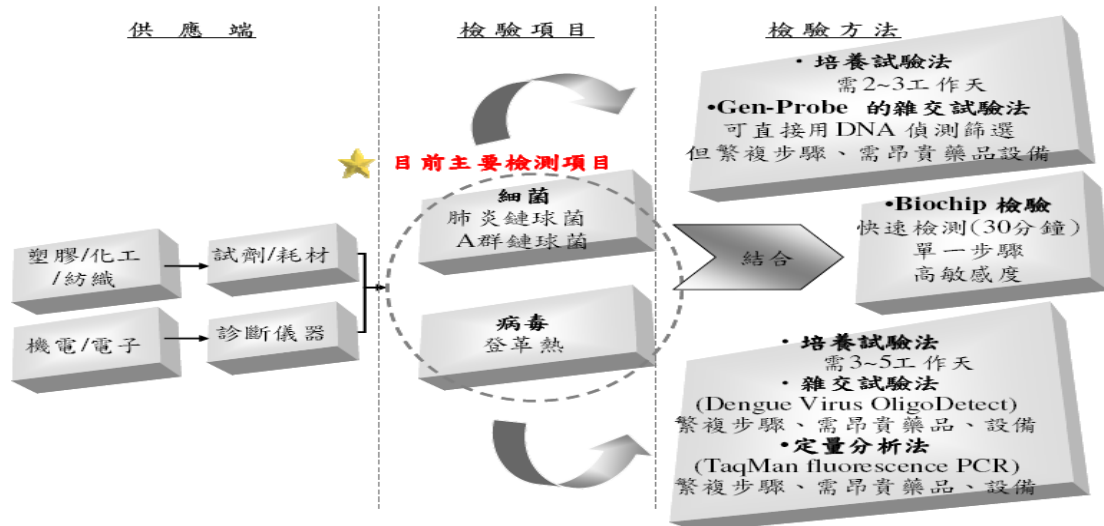
生醫技術的研發重點在於蛋白質體 (proteomics) 之研究，此一研究隨著人類基因體解碼完成，生物技術開發人員開始把焦點轉向蛋白質體的研究，方向上大致為蛋白質的辨識工作及與蛋白質之功能分析。與基因體研究相比，蛋白質體學的研究更加困難，因人體內這些化合物有數十萬甚至數百萬之多，而且在研究過程中將會產生大量的資料。蛋白質體學發展的目的是在於瞭解基因與蛋白質表現、功能和疾病三者之間的關係，並用來研發新藥物以治療疾病。

蛋白質體的研究重點是去分析了解蛋白質在生物發育的各時期，於各組織器官、正常細胞與腫瘤細胞間的表現程度，以及蛋白質在細胞內的表現位置，譬如說，在細胞核或在細胞質之不同，是否會影響其功能。目前主要的技術為利用雙向電泳 (2D gel electrophoresis)，在找到特定之蛋白質後，利用質譜儀來分析。但目前有些重大的瓶頸，在許多狀況下，不是有DNA的表現，RNA就一定表示會有表現，而且RNA的表現也不一定完全能代表蛋白質的表現。因此解析蛋白質之間相互結合之關係作用，也成為蛋白質體研究的重點之一。

隨著基因體研究與蛋白質體研究的發展，生物晶片、生物資訊與生物微機電也逐漸興起。在生物晶片的產業領域，包括有晶片製程、生物晶片定性與量測、生物晶片製程、生物晶片診斷應用、生物晶片偵測系統，以及生物晶片的生物資訊等，這些發展為標準的科技整合。若單以生物晶片之產值而言，於市場的規模不大。但若將生物晶片定位為具有衍生性價值之產業，並利用生物晶片之開發加以縮短生命科學之研究、新藥開發之時程以及改變現有的醫療檢驗方式，在人類基因組定序完成後，用以了解大量的基因序列中所具有之意義，以及如何應用生物晶片技術在基因和蛋白質結構與功能的解釋，仍有努力空間。

生物資訊是有系統地收集、分類、比對、整理、歸納生物資料，來加以了解生物分子的基因序列與生物各層次的構造間之互動機制。因此，生物資訊可將生物基因解碼後的核酸序列及其胺基酸序列做關連、歸類及比較，使解碼之核酸序列具有生物意義。生物晶片則應用生物資訊所得的資訊來進一步分析，進而了解基因—蛋白質—疾病的關係。再者，由台灣高科技電子及半導體產業蓬勃發展所奠定的雄厚基礎，結合生物晶片與微機電製程的生物微機電系統 (Bio-MEMs)，將會是生物技術產業的明日之星。

生物晶片是生物技術中的微小生物處理器 (Bioprocessor)。我們可以在指甲般大小的晶片上佈滿大量的生物探針 (Probe)，利用半導體晶片輕、薄、短、小，但可容納大量資訊的特性，來從事各種實驗與新藥的開發、生命科學的基礎研究、臨床醫療診斷、法醫檢定犯罪等用途，特別是針對台灣發生率較高的疾病，例如：B、C型肝炎、肝癌、鼻咽癌及胃癌和對抗藥性細菌的檢驗。目前生物晶片的發展主要是取代傳統檢驗及開發新應用範圍為主。「基因晶片」發展用以加速基因的分析與確認，LOAC (Lab-On-A-Chip) 晶片開發以替代現有檢驗分析與流程；並研發低成本、縮短檢測時程、同時進行多項測試、少試劑、操作安全等優點的生物晶片，疾病傳統檢測與晶片檢測比較如圖六所示。



圖六 疾病傳統檢測與晶片檢測比較關聯圖

【圖片節錄自國立台南大學科技管理研究所-王建忠碩士論文】

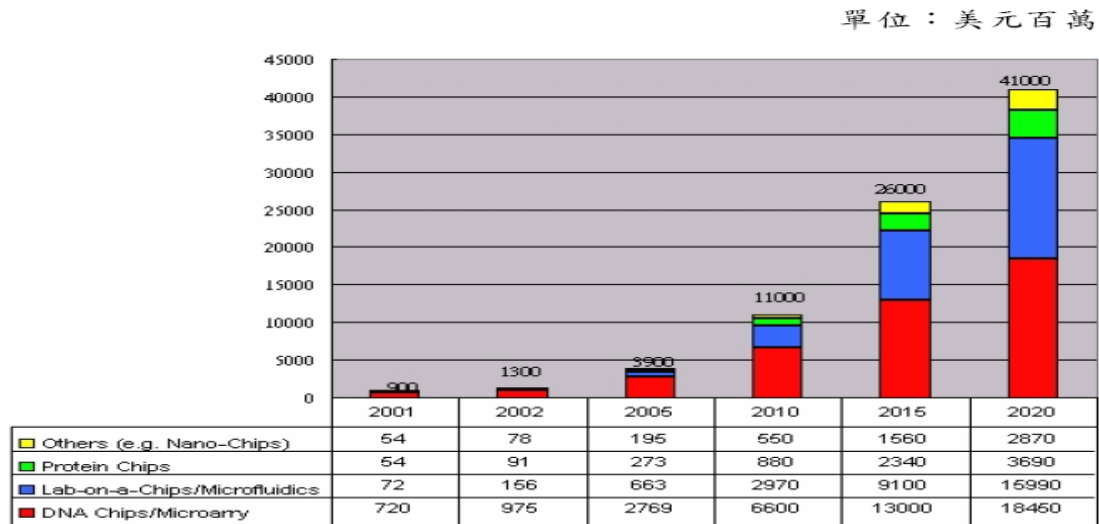
[已獲得作者同意轉載]

生醫晶片發展多年來，多數晶片系統一直沿用ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)之量測技術，於晶片基材表面製作反應陣列，進行檢測之前，試劑必須事先結合於晶片上再將量測之樣本加入進行反應，這樣的反應必須經過數個小時至數十個小時，確保結合在晶片上的欲檢測之生物分子數量足夠，如此經由訊號收集或檢出系統判讀出之訊號為有效，此一方法同時可以探測多項反應，並進行配方篩選工作此架構已廣泛應用在基因晶片DNA 特性之研究。從1990年來，由瑞典的BIAcore AB公司發展出新的生物反應檢測架構，利用表面電漿共振技術為基本原理，感測器晶片表面先固定特殊之生物連結物，檢測式樣經由連續微流體之方式流經感測器晶片產生生化反應，同一時間利用訊號檢出系統讀出訊號強弱對反應時間的感測圖(sensorgram)，經由此一圖形不僅可對生化反應進行結果判讀，更可藉此計算生物反應的親和力大小，是為即時的檢測技術，稱為real-time BIA(Biomolecular Interaction Analysis)。

生物科技產業是二十一世紀最具發展潛力的高科技產業之一。生技產業實為一技術密集、資本密集、高報酬、高風險、回收期長的產業。其涉及了許多不同領域的項目，包括(一)特用化學品(二)中藥草、生物性農藥、動物用疫苗(三)生物晶片、檢驗試劑與儀器(四)環保產業(五)原料藥、藥品疫苗(六)食品等…。

以台灣過去發展半導體代工產業的經驗及發展，台灣有能力建立包括生物晶片設計開發、系統整合、元件製造、及晶片試劑藥品等完

整的生物晶片產業分工體系。生物晶片科技的前景可期，且政府積極的投入研究與輔導，相信在過不久台灣生物科技產業必將迎頭趕上。全球生物晶片產業市場預估如圖七所示。



圖七 全球生物晶片產業市場(2001-2020)
 【圖片節錄自Helmut Kaiser Consultancy，2004】
 [已獲得作者同意轉載]

三、奈米醫學影像的應用

醫療影像是現行醫院資訊系統中使用最頻繁，資料量最龐大，臨床需求度最高項目之一，並由於醫療影像學逐步數位化，配合進步快速的資訊科技，結合檢查設備(Modality)、數位資料儲存媒體(Archive)及網路(Network)，建構醫院內部之影像儲傳系統(Picture Archiving and Communication System, PACS)，使得醫療數位化影像在醫院資訊系統中扮演極重要角色。



圖八 數位化醫學影像
【圖片節錄自台灣電腦公司】
[已獲得作者同意轉載]

醫學影像是醫生經常使用來判斷病症的一個重要依據，使醫生對於複雜的人體結構、鄰近器官的相關位置與病變組織的體積能有更準確的診斷與判定，因此體積型醫學影像在醫學上確實有很大的需求與診斷價值。

醫學影像是醫生經常使用來判斷病症的一個重要依據，大致上可分類如下：超音波掃瞄(Ultrasound)、X光(Radiography)、電腦斷層掃瞄(Computed Tomography，簡稱CT)、核磁共振影像(Magnetic Resonance Image，簡稱MRI)、一般核子醫學掃瞄和單光子射出斷層掃瞄(Single Photon Emission Computed Tomography，簡稱SPECT)、正子射出斷層掃瞄(Positron Emission Tomography，簡稱PET)。

隨著資訊科技的進步，各種造影檢查設備功能不斷提昇，使得原本已經是數位式之電腦斷層、磁振造影掃描等影像，透過電腦運算功能提供三度空間影像之服務，使得放射線醫學領域透過電腦輔助，得以將二度空間之平面影像轉換成立體影像，取代醫師慣用的利用二度空間影像，運用想像方式重組影像(Mental Integration)，提供更精確之影像診斷。

在研發先進醫學影像設備時，由於可見光無法順利的穿過組織，因此以光線分析血管與深部組織，會遭遇障礙。最新研究發現將長約60奈米、寬約20奈米的金奈米柱注入老鼠的血管中，當金奈米柱流經

耳部時，再以雷射掃描皮膚偵測奈米柱，能較傳統式(例如使用 rhodamine 的螢光染劑法)獲得更明亮的影像，甚至亮度可達到近60 倍的影像，這乃因金奈米柱適合於雙光子螢光(two-photon fluorescence)影像法，應用於先進影像法的研發上，能較傳統的螢光影像法提供更高的對比以及更明亮的影像。

而利用碳奈米管陣列(carbon nanotube array)能製造體積小又節省能源的新一代X光源。傳統醫學或工業用的X光源，其原理大抵上是利用陰極射線管發出的電子撞擊特定的金屬靶然後發出X光。由於要將陰極管加熱到攝氏一千度以上的高溫，以及必須提供加速電子空間，往往需要消耗不少能量以及佔有一定的體積。

碳奈米管陣列(carbon nanotube array)製造出新一代的X光源可以在室溫底下操作，因此整個儀器的操作溫度遠低於現有的設計，而且體積也大幅縮小。此外研究人員也發現新的X光源具有更優良的聚焦性、更短的反應時間，X光脈衝的波形也可以根據需要而加以修改，以利於追蹤移動的目標。這項發明將可以提供一般或高解析度醫學用X光影像，並可應用於小型可攜式X光機的製造。

奈米人造磁性晶體，可以全新的方式應用在生物醫學研究上，選擇合適的抗體，可與特定的目標結合。例如使用磁性奈米顆粒來偵測引起疾病的微生物。磁性顆粒的作用像標籤一樣固定在抗體上，然後加入待測樣本中。為了檢測加入的抗體是否與標的產生結合，施予強力磁場(造成顆粒暫時磁化)，然後將樣本置於可以偵測微弱磁場的精密儀器中。帶磁性顆粒的抗體要是沒有與樣本產生結合，會在溶液中快速旋轉，因而無法產生磁性訊號。與樣本結合的抗體則不能夠旋轉，它們的磁性標籤也就協同一致地發出可以偵測到的磁場。由於沒有與樣本結合的抗體探針不會產生訊號，因此這種做法就不需要經過耗時的清洗步驟，那是傳統的檢測法通常都必須要做的。該項試驗技術的靈敏度有可能比標準檢測法增加數百倍的靈敏度。雖然有這些好處，但利用磁性的做法可能無法完全取代目前廣泛使用的螢光標籤。螢光標籤通常是一些受到特定色光激發後會發出特殊顏色的有機分子。在許多檢驗及研究方法中，顏色是很有用的工具，特別是需要追蹤不只一種探針時。

應用改良式或全新的對比劑，可加強醫學影像偵測，將可在疾病更早期就發現，譬如可以找出只有幾個細胞大小的腫瘤，即早治療。

許多偵測是否有某分子或病原菌存在的檢驗法，都是利用抗體與標的物結合的方式達成。帶了磁性奈米粒子的抗體與標的物結合之後(圖九下方的前景)，經短暫暴露於磁場之下，將造成這些探針集體放出強烈的磁性訊號。至於沒有與標的物結合的抗體，則會朝不同的方向打轉，而不會產生訊號。因此無需經過清洗的步驟將未結合的抗

體除去，就可直接讀出結果。



圖九 奈米生物磁性標籤

【圖片節錄自2002年10月號「小而美的醫學世界」】

[已獲得作者同意轉載]

四、奈米技術在醫療與基因工程領域的應用

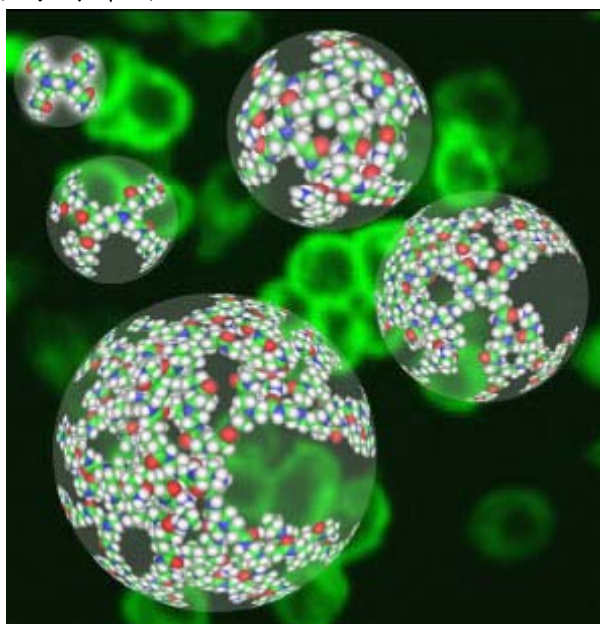
奈米生物技術對生物學而言有二個含義，一個是應用奈米技術這一新工具、新技術來促進對生物系統的理解；同時，奈米生物技術也代表著一個新的概念、新思路，即如何在奈米水準上微觀地、定量地研究生物問題。應用掃描隧道微鏡(STM)和原子力顯微鏡(AFM)等奈米顯微技術，單個生物大分子可直接成像和操縱。研究奈米技術在生命醫學上的應用，可在奈米尺度上了解生物大分子的精細結構及與功能的關係，獲取生命訊息。近年來，在單個DNA分子的奈米操縱方面有突破性發展，應用AFM可對單個DNA進行奈米操縱，形成奈米圖案或結構。因此這對深入研究和操縱基因組、蛋白質、奈米生物感測器等，甚至延伸至奈米生物系統都十分重要。

在過去若不幸得了癌症、先天性基因缺陷，或是患了其他重大傷病，即使有一連串的醫療措施，但治療結果往往令人遺憾。如今隨著科技的進步，不斷革新的醫療技術結合奈米科技的應用，給人們帶來了斬新的希望！例如：以人工合成分子直接傳遞藥物至腫瘤細胞、微小感測器監測血氧狀態、分子手術(molecular surgery)去除有缺陷的基因等，由於奈米技術的發展，使研究人員成功製造出比人體細胞還更小的物質，可以輕易進入細胞裡，使細胞原來的運作產生微妙的變化。因此，奈米生物醫學將對人類的社會、經濟與醫療保健產生革命性的影響。

奈米乳劑是一種無毒的脂肪滴，它是從表面活性劑(surfactant)研製而來，直徑只有數百奈米。許多研究指出，奈米乳劑可抵抗細菌、“套膜”類病毒(enveloped viruses)、真菌、原生動物(protozoa)

和孢子，產生溶解作用。另一方面，奈米乳劑作用在動物的皮膚和黏膜可達到高相容性。此結果為某些疾病的治療提供了良好的典型治療指標，如唇皰疹(herpes labialis)、皮膚黴菌感染(cutaneous fungal infections)、陰道炎(vaginitis)及呼吸道感染(respiratory infections)。

科學家使用直徑小於5奈米的聚合體(polymer)合成樹枝狀高分子，它非常微小，可輕易地滑過細胞膜上的間隙，利用此特性，(dendritic polymer)設計了一個藥物的載體分子，繞過健康的細胞，直接輸送藥物對抗癌細胞，因而成功抑制腫瘤細胞的生長，而且有效地降低藥物的副作用。



圖十 聚合物依附在細胞表面

【資料來源：Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences】
[已獲得作者同意轉載]

「基因工程」一詞已經使用了至少30年，DNA重組也成為大部份生技專家研究的重點，但生技科技還是很少和工程學有交集，原因之一是我們目前製造生物「零件」的工具，還尚未達到標準化的程度，應用性也不能和其他工程領域並駕齊驅；再者，雖然生物學會受到科技的影響，但其研究方法和觀念仍與工程學有差距。如果能把各種特殊的DNA當成元件，可以製造許多生物性的標準裝置，讓科學家可以組裝出能執行特殊功能的生物。

今日的基因工程尚缺乏標準化的DNA序列組合技術，生物工程使用的方法和零件如果能夠標準化，就能建立相容組件的設計庫，並將系統製程外包。特定DNA序列構成的基因，就相當於電路中的電晶體，

是生物工程的最基本元件，如果想用基因組裝出先進的生物儀器，首先我們必須能夠可靠、快速的合成長段的DNA。DNA是由四種核酸所組成，這四種核酸內分別含有不同的鹼基：腺嘌呤（adenine, A）、胞嘧啶（cytosine, C）、鳥糞嘌呤（guanine, G）和胸腺嘧啶（thymine, T）。鹼基之間由於親和力，會形成特定的配對：A對T，C對G，構成梯子狀雙股DNA分子的梯級。固相亞磷胺化學法（solid phase phosphoramidite chemistry），是大部份商業用DNA合成儀器的基礎方法。在合成反應開始時，溶液中懸浮的固體圓珠（聚苯乙烯）上會黏附著一個核酸分子；當溶液接觸到酸，第一個核酸可與新加入的核酸形成鍵結，然後當第二個核酸接觸到酸，又可以和下一個核酸連接起來，如此核酸鏈就會變得越來越長；不斷重複這個步驟，就可以製造出任何想要的核酸序列，誤差為每100個核酸中會有一個錯誤。生物細胞內有由酵素（聚合）組成的機具，以每秒500個核酸的作用速度，製造以及修補DNA分子，而且平均在10億個核酸中才有一個錯誤。目前最好的DNA人工合成儀器，加長一個核酸需要300秒。相較之下，自然生物機具的效能（產量除以錯誤率）是人造DNA機器的數兆倍，因此我們需要其他產量較高、錯誤率較低的合成方法。方法之一是利用現有的微陣列技術來效法生物機具的平行處理。做法是在一塊大玻片上，每平方公分放置數十至百萬個小點，每個小點都含有長度為50~70個核酸的單股DNA（也稱為寡核酸），這些DNA都是利用亞磷胺化學法在微陣列上同步製造出來的，所用的微陣列每個點約有30微米寬。和傳統技術一樣，我們也在序列之前加上了可切割的连接分子，讓微陣列可釋出特定的寡核酸。此法可以製造出能和構造寡核酸鏈互補的DNA序列。

近年來，由於生物科技的進步，不斷地研發出許多新型生物檢測方法，其中用來檢驗特定基因中去氧核糖核酸（DNA）序列的技術更是蓬勃發展。科學家可由一股已知的DNA鹼基序列，推測出互補的另一股DNA鹼基序列。例如，一條DNA序列為AATTCGC，則其互補序列就是TTAAGCG。當二者序列完全吻合時，其間氫鍵吸引的力量最強；相對的，即使只有一個鹼基無法配對，就會使結合力減弱，在此種狀況下可以藉由增高溫度或是改變其所處溶液中的離子濃度，使錯誤配對的DNA序列脫離。在長鏈DNA骨架中，以每三個鹼基為一密碼組，一個密碼組隱藏著一個特定胺基酸的信息。特定的基因在細胞核內先轉錄成信使核糖核酸（mRNA），mRNA即可攜帶錄自DNA的訊息經由核膜上的核孔到達細胞質，利用細胞質中的核糖體轉譯合成出特定的蛋白質，進而執行其在細胞中的生理功能而完成該基因的指令。有時即使僅有一個鹼基異於正常的基因序列，都有可能造成嚴重的生理缺陷。某些遺傳疾病，可藉由DNA的檢驗早期發現，及時治療。科學家往往

藉著此種DNA互補配對的特性，應用於基因檢測上。簡而言之，可先利用DNA合成儀製造一些特定的單股DNA序列，再藉由其互補配對的特性就能「抓住」欲檢測樣品中可與其配對的DNA序列。美國西北大學化學系莫金（Chad Mirkin）教授所領導的研究團隊已發展出三種以奈米科技為基礎的DNA檢測方法，這些方法首次將奈米科技與DNA序列結合應用於感應器上，其敏感度與選擇性均有重大突破。應用此觀念之延伸已經開發出掃描式DNA感應器、電子式DNA感應器、彩色DNA感應器電子式DNA感應器等。

五、跨領域融合中的奈米科技

奈米生物醫學是一門需要跨領域整合的科學。一方面它將運用奈米技術所創造出來的新穎材料與科學性質及檢測方法應用到生物醫學的領域；而另一端的生物技術將是許多超微的生物分子元件和胞器及蛋白質技術與基因工程技術帶入奈米技術的製程當中。在這相互作用的跨領域交互交流中，奈米生物醫學獨樹一格，成為具有創造力與想像空間，又有實質應用潛力的一門新學問。

近年來科學家們利用由下往上(bottom-up)的組裝方式，逐步開發出生醫材料、生物晶片、藥物等豐富的生物科技，例如：人造胰臟是奈米生物科技的一個產物及「奈米金」具有活潑的催化能力，劇毒的一氧化碳可以在奈米金催化作用下，轉化為無毒的二氧化碳，因而可用來製造防毒面具濾毒罐中德科學家聯合進行的一項研究，成功地用單個DNA分子鍵寫出「DNA」三個字母。這是繼美國加州IBM實驗室成功用單個原子寫出「IBM」字母後，人類首次對單個生物分子的奈米操作。這種全新的奈米操作技術，還可以用單個DNA分子鍵建構複雜的奈米圖案，如用DNA分子的彈性特徵建構波浪結構，將單個DNA分子折疊成奈米顆粒或奈米圓柱形的有序結構等。

奈米技術還可用於進行DNA或單基因的切割組裝。奈米技術可對生物分子元件的任何確定部位進行物理切割組裝，去除缺損的分子元件，進行分子組裝，為基因修復、更換、人工組裝基因提供更先進技術。目前，科學家們已用原子力顯微鏡實現對DNA分子鍵任何確定的部位的切割。據美國《商業週刊》報導，美國加州一個噴射機推進器實驗室正在研製「奈米麥克風」的微型擴音器。利用這新產品除了可用於探測地球上是否生命存在，甚至可探測到生物體內單個細胞的生長發育時發出的聲音及單個細胞正在游動的聲音，以及細胞液體流動的聲音。這種人造奈米麥克風由奈米碳管製成，直徑為1nm。正因為構成單元極小和靈敏度極高，才能在受到非常小的壓力下做出反應，使進行監測研究人員獲得相關的聲音訊息。美國太空總署(NASA)表

示：「在其他星球上極可能有生命存在，而生物體細胞的生成和發育正是生命的主要呈現，如果能夠利用這一儀器探測到單個細胞的生長，將是尋找太陽系中其他生命的一大技術突破。」

在微電子醫療組件，從70年代起，科學家推出以心律調節器為主的醫學微電子系統，由於技術及材料的進步，使的醫學電子系統微小化成為事實。藉由這些技術的發展，現在醫學微電子系統已能到達更多的領域，特別是應用於醫療儀器設備上。未來將會有更多的微電子化研究之產品可取代人體功能，成為人體的一部分；漸漸地醫學微電子系統產品在許多病例中，已成為最重要的治療方法。

(一) 心血管系統使用之治療器材：如心律調節器、人工心臟等。

神經系統使用之治療器材：如神經刺激器等。

(二) 癌症使用之治療器材：如用來做為化療藥品的傳輸，使其能控制最少量毒性藥品注入體內。

(三) 糖尿病使用之治療器材：如植入式幫浦用來注入胰島素藥品。

(四) 其他治療器材：如電子耳、電子眼等感覺治療器材

在奈米機械對於未來的醫療世界，猶如進入人體的世界的一群部隊，以抵抗病菌入侵並確保人體健康為目的。奈米機械人主要的成分是以奈米級碳原子所構成的，如C60、鑽石結構或奈米碳管等成分，因為碳原子的能量和化學結構適合以這種形式存在。美國麻省理工學院曾研發奈米機械人的相關技術，他們期望機械探頭在醫療領域做出貢獻，因為奈米機械人，可以爬行、轉圈甚至在人體內擷取影像並診斷出隱藏於使用傳統掃描技術下的疾病。奈米機械人的成功與否尚充滿各種挑戰，在正式提供醫療服務前，仍需克服許多的挑戰。

人體的排斥問題：無論奈米機械人做的再精巧，對人體而言還是外來物質，很難避免免疫系統的攻擊。目前科學家認為使用鑽石塗層是材料中最好的選擇。

機械人操作問題：機械人一旦進入體內，能否製造出具有自動辨識環境的感測器成為最大的關鍵。或是可使醫生從體外追蹤體內奈米機械人的蹤跡，並且對其下達各種指令。

(一) 機械人能源問題：如何能讓機械人使用生物體內的葡萄糖，或是其他新陳代謝物來做為能量來源，同時產生的廢物不會造成生物體的負擔。

(二) 機械人排出問題：機械人完成任務後，必須排出體外，如何設計成可由體內排泄系統自行排出，是技術上需克服的。

微奈米機電技術的研究涉及微電子、材料、物理(力學及流體力學等)、化學、生物、機械等諸多學科領域。其學科面也擴大至微尺度下的力、電、光、磁、聲、原子等物理現象，乃至化學、生物、醫學和儀器等各領域，此一跨學科領域研究之特性，使得技術應用更為

廣泛，例如在微機電中，微流體系統之流速量測，生醫流體量測(血液流速、血壓)，及不同液體黏滯係數、密度與導電率之量測是相當常見且必須之量測項目。壓電流體感測器是應用壓電感測原理，因液體不同流速對壓電薄膜施以不同之作用力，對機械波傳遞造成影響，利用微機電工業技術所製作之檢測元件，可利用機械波傳遞的差異而分析液體不同流速。壓電流體感測器主要特點是其分析可信度及精確性高、且可利用微機電製程積體化，縮小體積、降低成本。壓電晶片對於微流量變化相當敏感，目前商品化之壓電感測晶片為石英晶體振盪器，其優點為量測精準、溫度穩定度高，但其缺點為操作頻率低且無法利用半導體製程大量生產。同樣敏感度(Sensitivity)的感測器，操作頻率越高，其準確度與鑑別率便相對提升。因此結合微奈米機電技術，將可增進生醫檢測的靈敏度與方便性，使得醫療檢測更為快速與精確。

六、微奈米生物醫學技術未來之趨勢

奈米技術並不是近來才發展出來的，中古世紀歐洲教堂中的彩色玻璃，原料有一部分實際上為奈米材料，是利用金奈米顆粒特殊的表面能漿共振效應所產生的特殊吸收光譜而能產生穩定持久的瑰麗色彩。而自然界中更有許多因天然的超微結構而產生的神奇效應，例如蛋白石、蝴蝶翅膀的絢麗色彩、蓮葉的出淤泥而不染，以及牙齒的超微結構導致的機械性質增強效應等。

生命的世界中也有很多奈米級的構造來維護生命的繁衍與其一生中眾多的功能需求。未來科學及產業之發展，其變化之速度，將比以往增進許多。例如幹細胞之發展，當今之速度，也是過去難以相比較的。所以「奈米生醫」相關之技術發展走向是可預期的。

奈米微粒的尺寸一般比生物的體內的細胞、紅血球小得多，這就為生物學研究提供了一個新的研究途徑，即利用奈米微粒進行細胞分離、細胞染色等；換句話來說，奈米科技就是利用技術來操縱分子或原子的運作，來達到我們想像的功能。另外由於量子效應，許多金屬到了奈米化後，具有敏感的光學性質，例如奈米金，當金粒子因檢體中的DNA或蛋白質的結合而改變其間距，原有的酒紅色會立即轉呈藍色，以金奈米之奈米特質為基礎的分子檢測技術在近年發展成許多不同的平台。奈米粒子當粒徑縮小的時候總表面活潑的原子數大增，化學反應增加，同時因表面上的原子之電子的束縛減少，會有一些催化的性質產生，一些研究顯示這類催化特性有可能得以應用在治療與檢測上。然而，許多奈米粒子在活體中的毒性、過敏性、突變性等特性尚未被仔細評估，更遑論其對環境之長期影響，這些都是未來奈米生物

醫學研究上仍需要努力的地方。

仿生學是一種研究生物系統的結構和性質，為工程技術提供新的設計思想及工作原理的科學。仿生學一詞是1960年由美國J. E. 斯蒂爾根據拉丁字“bios”（“生命方式”的意思）和字尾“nic”（“具有…的性質”的意思）構成的。他認為“仿生學是研究以模仿生物系統的方式、或是以具有生物系統特徵的方式、或是以類似於生物系統方式工作的系統的科學”。仿生學橫跨了化學、物理、數學、生物等基礎學門，並和航太、通訊、複合材料、奈米技術、生態等應用科學相映成輝，仿生已經逐漸在各科學領域逐漸形成一門顯學或價值核心。以大自然為師正是科學的起源，因絕大多數的科學都以觀察為起點，而大自然界的動物、植物及礦物提供了源源不絕的觀察對象，也啟發了人類無限的創意；例如生物的骨骼構造比鋼鐵強硬；啄木鳥的腦殼有最緊密組織的抗震骨骼；蜘蛛絲有五倍鋼鐵的硬度與延展性；蜂鳥飛行600哩旅程耗費不到十分之一盎司的能量；蝙蝠的回音定位使用促進了雷達開發改進；自然生命世界蘊藏所有科技的奧秘與答案，在歷經數千年以大自然為師的過程後，人工產品具有質佳價廉的絕對優勢，師法自然的必要性也漸為人們所淡忘。但在許多科學的發展遇上了瓶頸時，師法自然的重要性則又慢慢浮現，尤其是目前進入奈米科技的時代，大自然已有許多天然奈米材料發揮其優異之特性，例如貝殼、蛋殼、海膽脊椎等的微結構，這些有系統的研究發現生物體內的無機物大都以碳酸鈣為主，而有機物則以蛋白質為主。以海螺的貝殼為例，它是一種層狀堆疊的複合材料，其中碳酸鈣占九十九重量百分比，蛋白質只占有重量的百分之一。碳酸鈣的晶粒大小只有兩百奈米長，一百奈米寬，且其中有大量的雙晶存在，而位於碳酸鈣晶界上的蛋白質尺寸更小，只有10奈米左右。碳酸鈣強度低且極脆，但是貝殼的強度卻可高達100 M Pa，破壞韌性更可達10 M Pa 以上，此韌性是玻璃的十倍以上，也是一般工程陶瓷的兩倍。海螺在室溫下，以便宜的原料碳酸鈣製造了性質優異的奈米複合材料。貝殼之所以具有高韌性，與其特殊微結構有密不可分的關係。貝殼具層狀堆疊的組織，層與層之間的強度較碳酸鈣更低，在貝殼承受外力時，破壞裂縫會沿著層與層間移動，這種能量釋放的方式，裂縫較難快速傳遞，而使貝殼不易破裂。類似結構在人造骨骼應用發展上提供了提供新的觀念與方法。

結合微奈米技術，以大自然為師，發展替代性人造組織與新的醫療檢測與治療方式，將是未來微奈米生物醫學技術之趨勢。

七、主要參考文獻

1. 王彥迪。2005。醫學影像之無失真動態壓縮技術的研發。國立成功大學電機工程學系碩士論文。
2. 王建忠。2006。生物晶片產業之競爭優勢與競爭策略建構—以微流體生醫晶片為例。國立臺南大學科技管理研究所碩士論文。
3. 林彥亨。2002。利用介電泳力操控細胞之生物晶片研究。國立成功大學工程科學系碩士班碩士論文。
4. 林宏墩。2004。功能性醫學影像之影像分割與動態生理參數分析。中原大學電機工程學系博士學位論文。
5. 周宗慶。2002。醫學影像輸出膠片自動轉換陣列型數位影像資料。中原大學電機工程學系碩士學位論文。
6. 南區奈米科技 K-12 教育發展中心。奈米科技—基礎、應用與實作。
7. 陳家俊。奈米生技之技術地圖。
8. 徐維良。2004。光學與電子生醫檢測技術之開發—多功光電生醫晶片儀與新式電化學量測方式。國立台灣大學應用力學研究所碩士論文。
9. 張榮華。2004。x 光射束跟效應下醫學影像改善之探討。中原大學醫學工程學系碩士學位論文。
10. 黃樹棍。2003。建立醫學影像儲傳系統 (PACS) 績效指標—以台中榮民總醫為例。國立中正大學資訊管理研究所碩士論文。

第十二章 奈微米生醫晶片

吳炳慶 國立成功大學基礎醫學研究所

謝達斌副教授 國立成功大學口腔醫學研究所

一、前言

繼蒸汽機、微電腦等重大的科技革命之後，奈米科技已被視為全球第四波工業技術革命，並預期將成為許多新興科技之致能性技術基礎(enabling technology infrastructure)而成為下一階段之核心技術群(core technology platform)。許多國家已將奈米科技列為國家重點發展領域，將決定這一世紀世界高科技競爭的版圖的消長，並在總體上影響人類二十一世紀的生活方式及未來發展。奈米工程技術已然成為世界科技的新潮流與經濟發展及未來人類健康及能源議題的新希望。美國、日本及歐洲各國早已積極投入奈米工程技術的研發以及在各科技領域的整合性研究。尤其是生物醫學領域。

台灣亦已投入大量政府資源在奈微科技之發展。並視奈微科技為我國未來產業競爭力更上層樓的關鍵契機。奈微科技的創新發展將能把台灣生技醫療產業從初期萌芽與代工層次升級到下一個關鍵層次，引領新一波產業升級。工研院於2002年指出，奈米尺度之量子與表面特性與新物理化學效應，對傳統產生醫檢測產業將產生革命性影響；而經濟部亦宣示將在未來六年內將投入一百九十二億元之經費從事奈米科技之研發，並列為奈米國家型科技計劃，其中重點之一即在奈微生醫檢測晶片系統。在研發結構上，奈微生醫晶片上承「農業生物技術」、「製藥與生物技術」、「基因體醫學」三項國家型科技計畫之基礎，標定出許多重要疾病之分子基因學基礎與檢體庫、分子銀行等。而在製藥科技方面，新發現之化學合成與生化藥物與更能支援生物晶片在傳輸釋放控制之模型系統(model system)。因此可以看見的未來，奈微晶片技術與生物醫學科技發展之相互結合將能獲得更大的產出效應。本文將對生醫晶片之發展以及奈微技術在生醫晶片整合之利基與應用作一深入淺出之說明，期能令讀者對此一重要新興領域有一初步了解。

二、何謂生醫晶片？

生物晶片在分類上原本屬於生物感測器之一種，然而隨者後續發展之時程漸漸發展為一涵蓋生物、化、光、電學以及奈微機電系統等技術於醫體之整合性平台技術，而愈具獨樹一格之技術領域特性。

奈微生物晶片之狹義範圍係指具微結構晶片樣式之生物性分析裝置。在廣義上則包括上述生物晶片裝置之周邊及上下游設備與軟硬體裝置。生物晶片技術的主要訴求在其分析系統之靈敏度及高專一性、更快的檢測分析速度、更便宜的製程與更舒適方便的簡體採集及使用操作等。並且其使用的檢體樣品及試劑少能更少，以及能在一次檢測中平行進行多種實驗而已同樣檢體量獲得更多的生理與生化資訊並且更整體性的數據評估依據已達到更好的臨床診斷與治療或生物學研究。而在材質及結構上之定義，奈微生物晶片(biochip)係指在玻璃、矽片、塑膠等基質材質上或流體系統中，利用奈微粒子製程技術、奈微電子、奈微機械、奈微光電等技術來製造應用於生化分析及診斷治療的產品。其作用分析對象可以為基因、蛋白質或細胞組織等等。奈微生醫晶片之應用範圍非常廣泛，諸如基因及蛋白質表現與功能之研究、新藥篩選開發、臨床檢驗、菌種檢測、流行病學研究、法醫學驗證及軍事偵防等。生物晶片技術的主要訴求重點在於分析之高靈敏度及高專一性、快速檢體處理與分析、使用更少之檢測樣品及試劑、更舒適非侵入性之取樣系統設計，以及可以平行化處理多重分析之能力並能以人工智慧做實驗數據分析提供更正確之解讀報告。

三、奈微生醫晶片之定位與分類

生醫晶片相對於傳統檢測具有相當大的應用優勢，但不可諱言地，也有其研發上的瓶頸需要一一克服。隨著科學家與工程師不斷將晶片製造技術的極限往下推進，傳統生醫晶片已經悄悄跨入了奈米尺度的領域。

nano是希臘字「侏儒」的意思，當這個字根與任何計量或計時單位合用時則為十億分之一該單位之意。因此，奈米亦即十億分之一米的長度。一奈米約略是十個氫原子並肩排在一起的長度，十奈米大約為是人類頭髮直徑的千分之一，而目前最先進的積體電路最窄線寬約為六十五至九十奈米。而當物質的結構尺寸小到奈米尺度時，其物理、化學及生物性質可能會與該物質在較大結構尺寸時大相逕庭。此乃由於表面效應與體積效應所導致的。物質的表面原子，因所接觸的外在環境不同於內部原子，其性質理當不同於內部原子。當物質結構尺寸大時，排列在表面上的原子數目占有所有組成原子的極微比例，因此物質的特性由內部原子主宰。但是，當物質結構尺寸小到奈米尺度時，表面原子所占的比例增加到不可忽略的程度，此時物質的特性自然逐漸偏離人們所熟悉的大尺度性質。例如，物質的起始燒結溫度與熔點可能大幅下降、反應性與觸媒特性可能大幅提升、不導電且易脆的陶瓷材料可能變得既導電又具延展性、導電金屬的導電度反而可能

下降、半導體光電材料的吸光波長會往短波長偏移等。這些性質的改變，非由化學組成改變所致，純粹是由物質結構尺寸的縮小所造成的。而在奈微晶片設計上，當流體在大管道內流動時，一般皆在紊流範圍內，但在微細的血管或溝槽內，流體的流動都將變為層流而有不同之動力學行為。而熱傳現象亦由對流變為熱傳導和熱輻射為主。此時，若存在有微汽泡，則表面張力對液體之流場將產生很大的影響，有時會阻礙流動而成栓塞流(plug flow)，而由於尺度和時間之微小化，將使得微觀世界中，熱流之支配定律改變。雖然熱與溫度之關係和現象在微細尺度下尚有甚多未知現象必須了解，而引起對於微電子器件的熱控形成新的挑戰和也引起了研究熱潮。雖然有困難待克服但不可諱言的元件與系統的奈米化，產品的體積微縮與功能提升將得以透過系統性設計達成。

奈微生物晶片系統之研發在全世界現今仍處於方興未艾的初期發展階段。而依據其應用面之功能性分類，大致上可分為二大類別，即第一類之檢測型晶片(如微陣列晶片)，以及第二類之處理型晶片，例如微流體晶片系統(Microfluidics system)及縮微實驗室晶片(Lab-on-a-chip)。其中前者之實例如基因陣列晶片(Gene chip, DNA chip or DNA microarray)、蛋白質晶片(protein chip, Protein microarray)、抗體晶片(antibody chip)等。其中以微陣列晶片(Microarray)之發展最為成熟，而縮微實驗室晶片則為全球矚目之終極發展目標。藉著仿微縮影技術之光化學反應，Affymetrix公司發展出全球矚目的直立式DNA陣列晶片量產製程。將人類或其他生物上萬個基因的檢測縮小到約一至二公分見方的尺度範圍。此類生一晶片之全球市場，依據Business Communications Inc. 2001年之報告約為0.34億美元，而每年更將以45.2%的年成長率快速成長，而在2005年時市場已超越2.19億美元。全世界各國皆已積極投入此一新生技產業中，而我國亦有工研院及數家公司初期投入之中。預期奈微生物晶片產業將會是繼半導體產業後蓬勃發展的重要新興產業，並將衍生無可限量的產業利基與生物醫學衝擊。

而微流體晶片(Microfluidic chip)或縮微實驗室晶片(Lab-on-a-chip)係指利用半導體製程、奈微機電、奈微壓印等技術將小至幾個微升(microliter)甚至到奈升(nanoliter)體積的液體，導入佈滿微流管道之晶片中，以機械式或非機械式之微驅動方式，讓待檢測液體在微管道中執行混合、分離、培養、加熱、複製放大、檢測、排除等繁瑣的生化實驗。而其中微流道之直徑可能僅約一根頭髮的大小或更微細。而其中之製程尺度經常能直接或間接導入半導體工業的製程步驟以及新興之奈微壓印工程。

四、奈微系統與生醫晶片整合之利基

傳統生醫檢測技術之基礎是靠分子擴散及與分子探針之隨機碰撞結合來達成專一性標定並後續之生化反應以獲得定量性量測結果。傳統上檢體之處理多半需要人工處理，例如從細胞離心純化、破碎包膜分離生物分子乃至於檢體之純化。因此往往需經數小時至數日才能完成特定之檢測分析。而對於需要平行處理多種檢測並進行交叉比對的生醫反應，則處理過程就更費時費力了。同時，許多傳統檢測方法所使用的儀器設備不僅占據相當空間，且需要訓練有素的操作人員及人為之盼讀。同時在精確定量方面仍有勁一部提升的空間。

不僅如此，傳統檢測技術在時效性以及採樣之極限往往使其在面對威脅全世界人口之重要傳染性疾病以及惡性疾病之檢測上力有未逮。例如腸病毒、禽流感、SARS、AIDS、抗藥性結核等，使用傳統檢測技術，往往需要費時四至七天以上才可判斷，此時帶原者或許已經將病源傳播許多人或早已錯失治療防範之先機了。因此，隨著人類各式疾病的檢驗需求的增加、新藥開發速度的高速成長以及藥物篩檢、食物與環境檢測平台等需求的日益增加，對於快速、準確、可量產、經濟環保且自動化之的生物晶片平台的需求更將有增無減。

五、在生醫晶片的設計與檢測上，奈微科技具有的利基在哪裡呢？

奈微米科技是一匯集材料、機械、製造、電子、量測以及物理、化學和生物等學術領域的高技整合性平台，奈米工程在定義上係指利用製程技術將材料之特徵尺度製造在百奈米以下並藉其奈米尺度產生新物理、化學、光學、電學、或磁學等獨特性質而得以應用在廣泛之科技領域之中。生物探針分子與奈微尺度之粒子結合並與待檢分子結核時往往能改變此一尺度效應造成之現象而達到更高的偵測敏銳度。而微小化檢測反應核心(reaction core)能加速反應速率並使檢測處理平行化。而在縮小尺度的技術上，至2007年積體電路製程之最小結構尺寸已由過去之180nm製程推進至60nm，而最小、結構定位精度亦由13nm演變為4nm以下，亦即約一至二條DNA之寬度。

近20年來，奈米粒子與薄膜製造科學發展迅速，在製備技術、分析方法、結構觀察和形成機制等方面的研究都有很大進展。而許多奈微結構顆粒或薄膜可用於快速之檢體分離及催化反應功能、還有用於強化光電、磁性基礎的生醫檢測敏感度與正確性。例如表面電漿共振技術(Surface plasma resonance)，或微域流場快速溫控檢體放大技術將DNA藉由聚合酶鏈鎖反應技術在短短數十秒至數分鐘內將數量極少的DNA放大數十至數百萬倍，而大幅增加檢測靈敏度。藉由奈米金之分子條碼放大技術亦曾報導將分子檢測敏感度與正確性推至 10^{-18} M

標的蛋白質樣本之記錄。如此一來，將能大量減少檢體之需求量。而因為奈微生醫晶片使用的檢體量可顯著減少，對於不易取得或總量極少之的生醫檢體，利用奈微生醫晶片檢測，有機會能以有限的檢體量獲得相同或更佳的檢測結果，減少檢測成本及採取檢體之困難度與不適。利用這些技術在未來將可幫助醫生在最早期檢測出初期的各種病症以及早防範疾病惡化並開始有效治療。除此，生物晶片亦幫助基礎醫學研究者進一步了解疾病之致病原理與分子基因學基礎，並及早得知病人的先天性病症遺傳因子，以作先期的防範與生活型態之建議。此外，當奈微生醫晶片結合微電腦分析並採用自動化操作流程，將可節省大量的檢體處理空間與人力，並簡化處理流程。

六、生醫晶片簡介與市場

依功能用途區分，生醫晶片主要可分為微陣列晶片，如基因晶片 (Genechip, DNAchip or DNA Microarray)、蛋白質晶片 (protein chip, Proteinarray) 等，以及微處理型晶片，如微流體晶片 (Microfluidics) 及縮微實驗室晶片 (Lab-on-a-chip) 等。目前以微陣列晶片 (Microarray) 發展較為成熟，其中較常見的是DNA核酸探針晶片。傳統的DNA晶片技術是將數個微小針頭裝置在機械手臂下並控制其在試片上將將不同序列且已預先定位的核苷酸片段布成陣列。再與待檢測的核苷酸片段進行雜交配對。利用各鹼基對間的特定對應關係，藉由螢光顯微鏡成像技術觀察，即可從探針上已知排序的DNA片段推測已成功接合的待測核苷酸片段的排序及其表現量。此一技術目前已廣泛應用於DNA微陣列晶片的製作。然而這種晶片自一九九〇年代初期即因微製程概念的加入有了革命性的發展。艾菲量測 (Affymetrix) 公司將用在微機電晶片製程的微影技術結合光化學製程技術推出量產型之直立式高密度基因晶片。推出以來，不僅已席捲全球基因晶片檢測市場，同時對生化分析亦造成了革命性的影響。靠著這類生物晶片的幫助，許多生物如稻米、老鼠、人類的致病基因才能加速發展。目前基因晶片之陣列式概念已被延伸到蛋白質體晶片，抗體晶片等的檢測工作。

另一類晶片為處理型晶片，其中整合了微流體及微機電系統。微機電系統發展的觀念是由積體電路的研究開始，藉由改善傳統精密機械加工技術並應用半導體製程技術，可製作各式各樣微小元件，微機電系統加工技術可把傳統生化分析中所需的微幫浦、微閥門、微過濾器、微混合器、微管道、微感測器及微反應器等元件集中製作在生物晶片上，利用微機電設計出的微分離系統以及電場分離等原理，將各種生物樣本在微形流道中快速分離。微流道系統除了可應用於樣本的純化及分析外，也能運用在微機電分離系統中的樣本輸送。早期發展

出來的微流體晶片可溯自一九九〇年代初期，由歐洲著名藥廠汽巴嘉基(Ciba-Geigy)(現已被諾華Novartis藥廠併購)所發展出來的微電泳晶片模組為代表性產品。微電泳晶片利用樣品在電場作用下，生物分子會根據質量及電荷的多寡產生不同的位移速度因而造成分離的效果，而晶片整體大小則跟信用卡差不多。利用這個原理，安捷倫公司在一九九九年推出第一部微流體晶片儀器—2100生化分析儀。此分析儀以電泳方法分離DNA樣品後，再以螢光技術偵測。操作時，只需將樣品與試劑加入晶片上指定的樣品容器槽中，再將晶片置入儀器內大小有如CD-ROM的插槽中，儀器即會自行操作、檢測，並完成最終之數據分析。微流體生物晶片的應用領域可被區分為研究用(如新藥開發、生物及醫學研究等)、臨床檢驗(如健康篩檢及疾病檢測、感染病原檢測、血液篩檢等)、非醫學應用(如國防軍事偵測、法醫辨識鑑定、環境及食品檢驗等)，其所帶來的商機和影響力相當龐大。而未來生物醫學領域的研究人員將可在各種生醫晶片的協助下，大幅縮短數據獲得與處理的時間而加速創造出有利於全人類健康福祉的利基。近年來，國內相關研究單位在「製藥及生物技術國家型計畫」的支持下已建立了自行設計、製作微流體生物晶片模組的能力。並已有生技廠商初步投資加入此一方向。

雖然DNA的檢測，可獲得與遺傳疾病相關的資訊，但大部分疾病的判斷往往從蛋白質的表現更能反應其病理特性與臨床特質。因此蛋白質晶片，已被認為是將來生醫技術之重要的發展工具之一。利用微陣列晶片檢測DNA片段的觀念，亦可應用於蛋白質的檢測。其原理與DNA晶片類似，先將成千上萬種蛋白質植入固定在數微米見方的晶片中，檢測樣品中的各種蛋白質，會與固定在微陣列的特定蛋白質反應，而樣品中的蛋白質已事先以螢光官能基標籤以便呈色。再使用顯微鏡放大成像，完成偵測。雖然其原理類似，但是蛋白質與蛋白質之間的反應，通常是利用抗體與抗原之間特殊的辨認機制來完成，此與DNA片段利用各種鹼基對之間特定的對應關係決定序列不同。而蛋白質晶片再發展上較之核酸檢測晶片仍有許多尚待克服的瓶頸。例如蛋白質有保存不易的問題以及立體結構折疊正確性的考量，並且對於疾病發生與進展中蛋白質的表現與交互關連性，科學家尚未全然認識清楚，因此蛋白質晶片仍有其待進一步發展的空間。現在市面上除了吉歐米克斯公司為代表所生產的微陣列蛋白質晶片外，還有美國賽福基因(Ciphergen)公司利用基質輔助雷射脫附法的質譜儀技術來鑑定蛋白質結構的晶片，或是瑞典國際必亞擴(Biacore International)公司利用表面電漿共振的微流體蛋白質晶片檢測技術。

有些生醫晶片是用在生物體的監測上，例如美國Sensors for Medicine and Science公司所發展出的糖尿病患者血糖監測晶片。目前

糖尿病患者都是利用抽血的方式，進行自身的血糖濃度監測，因為需要經常性的抽血，有扎針的疼痛，往往導致病患不按照規定的次數抽血，而這種情況常常會造成病患的病情惡化而不自覺。該公司設計將一個微小的晶片植入病患的皮下，此晶片內有一個螢光反應裝置，當晶片直接偵測病患體內的血糖濃度，藉由血糖濃度的改變，驅動裝置內的螢光化學反應；因為血糖參與螢光反應後，會改變該螢光之波長，當該晶片內發光裝置的波長改變時，將會再驅動體外的控制器。如此一來，血糖的監測不再是被動的由病患自行抽血檢驗，而是主動的經由植入病患體內的晶片隨時監測，病患便不至於因為一時的疏忽或怕麻煩，而加重了自身的病情。

此外，已有研究團隊嘗試著藉由晶片將訊號傳遞到腦部，將晶片應用為感官的一部份。把聲波和光線改變等轉變成電子訊號，再轉換成人類可辨識的聲音或視覺訊號後傳送到人的腦中，讓失聰或失明者能夠重新獲得聽覺或視覺。這就是大家所熟悉的人工電子耳或是電子眼，目前人工電子耳已造福許多失聰的民眾。而成功大學與美國加州大學合作研發出人工電子眼，則能夠將晶片縮小植入眼底，視障者再帶上照相功能的特殊眼鏡，就能把外界的光覺透過電擊方式刺激到視覺神經轉換成視覺，雖然目前人工電子眼只能達到64個像素，和一般正常人的100萬像素仍有差距，因此只能看見大型物像，而眼睛視界也只能呈現黑白影像，而且失明患者必須在視神經功能正常的狀況下，才有可能藉助電子眼恢復視力，然而，此一研究方向整合奈米尖端科技未來的發展潛力將不可限量。今年十二月台灣與美國將同步展開人體試驗，這項突變將非常有可能讓盲人重新看到這個世界不再是遙不可及的夢想。

七、生醫晶片製作技術

目前生醫晶片的材質相當多元，其中以聚合物如PDMS及玻璃、矽晶片為主流。而在生醫晶片運用在醫療與篩檢上，更便宜可拋棄式的微晶片系統將能更晉於實用化。塑膠射出成型可進行大量生產製造，降低微晶片成本，實現拋棄式功能性設計之目的，將比現行矽晶片製造方法成本更低。而微元件及系統的成型方式亦可利用微射出成型技術，量產微型化流體控制元件及系統，如實驗室晶片或微流體晶片等，而微射出成型的機械元件精密加工部分，也需要應用到微機電系統的製造技術。微射出成型技術是微元件成型的方式之一，與傳統射出成型技術有顯著的差異性。目前國內所發展的快速原型晶片製作平台，可以在數小時內完成微流體生醫晶片的設計與製作。大幅降低研發時程，加速研發速度。該方法利用雷射蝕刻術，在PMMA晶片表

面製作微型流道，不需經過繁瑣的光罩設計及化學蝕刻程序，因此縮短設計、研發的時程。另外，利用此種雷射蝕刻法可以不受化學濕蝕刻的深、寬比限制，可以在同一片晶片上得到深、寬比由1/10到7以上的微流道。而在微流道系統晶片之開發時程僅需二小時，晶片上的流道可有不同的深度與寬度。

而在難以加工的玻璃材質上，國內也同樣發展出快速原型晶片製作平台，可以在數小時內完成微流體生醫晶片的設計與製作。最大的特色為其所加工的晶片材質為玻璃，且最小特徵尺寸可達5微米，而最大加工面積大於12吋晶圓。充分表現出我國優良的半導體技術。成大工程科學系李國賓教授研究團隊則以玻璃為基材，製作利用微流體聚焦之微型細胞計數器，其利用微影技術於玻璃上製作光纖軸通道及光波導結構，檢測光可在其中以全反射進行傳遞而不衰減，當細胞流中之細胞通過該光波導檢測區時，將對檢測光造成阻擋或散射而造成光強度之變化，其光訊號可由另一端之光波導結構收集而加以檢測。其細胞計數晶片的操作原理是利用水力所引發的流體集中效應(hydrodynamic focusing effect)，晶片由三條平行進樣管道、噴嘴及集中流管道組成。樣品由中間管道注入，兩側管道則注入緩衝液。控制各管道流體的注入流速，兩側管道流體在噴嘴口擠壓中間樣品流，使中間流體寬度變窄，兩側包覆流流速越快則集中效果愈佳。本研究已成功對微顆粒及全血進行流體聚焦並以該光學檢測機構完成細胞計數之功能。

由於生醫晶片上面的通道都在微米尺度，送入分析的樣品也都非常少量，如何將微量流體快速而連續式注入微流體生醫晶片一直是一項非常重要的課題。成大工程科學系李國賓教授研究團隊在晶片上設計出包含 $1 \times N$ 連續式微流體晶片以及 $M \times N$ 連續式微流體晶片二種； $1 \times N$ 連續式微流體晶片透過兩側包覆流體流速的調控，除具有集中微量樣品的作用外，還可控制樣品流的流向，更可將樣品集中流分別導入不同的出口管道以進行後續檢測之功能。 $M \times N$ 微流體晶片更可利用 $1 \times N$ 的概念擴展至多個入口槽以及多個出口槽，其中M表示樣品流入口槽數，N表示N個出口槽，可達成多功能連續式的樣品進料系統分析，且能在極短時間中，有效率地對樣品流進行檢測。建立一組可同時進行不同樣品注射之連續微量進樣裝置，此一裝置對於高產能(High-throughput)之微流體晶片是一個非常重要的模組。其研究團隊更利用微機電技術開發電灑離子化質譜偵測(Electrospray Ionization-Mass-Spectrometry, ESI-MS)晶片式微噴霧器，可應用於質譜偵測上。電灑離子化法是一種直接將溶液中的蛋白質在大氣壓力之下經由電噴灑的過程轉換為氣相蛋白質離子以供質譜儀進行偵測的技術，目前已經成為鑑定未知蛋白質化學結構的重要工具之一。此晶

片式微噴霧器具有優於現行微噴霧器之高靈敏度與耐鹽性。此微噴霧器將可應用於生物醫學檢測、蛋白質分子量測定及有機分子測定之相關研究領域。

八、應用奈米科技的生醫晶片

近年來，奈米科技已經成為各國爭相發展的重點科技，可以想見下一波的生醫晶片將是挾帶奈米科技而來的。在這裡簡單介紹如何運用金奈米粒子做成的DNA感應晶片作為範例。首先研究人員在鍍有一層氧化矽的矽版上，以光蝕刻法製造出微小電極，在電極間有一極細小的溝。在此溝中先固定一特定的DNA探針序列，再將電極浸入一種含有標的DNA序列之檢體液中並與帶有互補性特定序列的金奈米粒子的溶液混合。此標的DNA序列的兩端可分別與電極溝中的DNA及與金奈米粒子上的DNA序列配對結合，因此可將金奈米粒子固定在電極溝之兩檢測電極之間並形成緊密排列，再以含硝酸銀的顯影液加以處理。因為金奈米粒子可促進銀的還原反應，而使得銀沈積在上面，浸在顯影液中的時間愈久，所沈積的銀粒就愈多，電子便可在兩極間形成通路而產生傳導，其電極間的電阻即大幅降低。因此測量電阻即可偵測出是否有標的DNA序列的存在以及其濃度。而由於非標的DNA序列與電極間序列無法完成配對，因此使用含有特定濃度之鹽類的水溶液即可將電極間非特異的DNA洗去。研究人員並發現此方法所要求的樣品量可低至 5×10^{-13} 莫耳濃度，這是一般以螢光分子為標幟DNA偵測法所要求的樣品量的十分之一。而對於單一鹼基差異的專一性選擇性則更高達十萬倍。這些DNA感應器非常適合應用在各式生物檢測中，如細菌、病毒的感染、基因突變、遺傳篩檢，也可在戰爭中快速檢驗生物戰劑的存在與否。

另一方面，奈米結構化表面處理產生的效應中最為人知的一種常見應用特性就是“蓮花效應”，滴在荷葉上的水不會沾濕葉面，而是形成可自由移動的水珠，這是因蓮葉其有所謂的超疏水表面(水接觸角大於150度)而造成，亦即水滴在此種表面不會散開，而會形成水珠，水珠會因葉片的搖動而滾出葉片外並帶走表面污泥。這帶給科學家許多應用性研究的發展空間。目前國內在國家實驗研究院與清華大學動力機械系楊鏡堂教授合作下，製作出類似荷葉表面蓮花效應的微絨毛結構，已能使液體能在奈微結構條紋表面形成液珠狀，並能在此條紋表面控制其滾動行為。利用這個特點所製成之液珠操控晶片，具有無需外加動力、無需流道與閥門即可操控液珠之反應流程，能節省試劑與加快反應速度等優點。而液珠在晶片上可依所設定的條紋密度，漸變其表面梯度能，藉以精確控制試劑液珠與樣本液珠之自我定位、相

對移動與相互混合，即便是沾黏性極強的血液亦能自由操控。目前更導入奈微米磁珠與改進驅動電極，使液珠不但能沿預設軌跡移動，並能進行多次的結合、分離與上下、左右、旋轉及振盪，這些成果亦已獲得國內外多項發明專利。

液珠式數位流體操控晶片具有極大的應用彈性，不同檢測項目，只需在電腦上即可改變液珠傳輸軌跡與反應時序，不需重新設計晶片。而其拋棄式晶片製作方式可採用壓模、射出成型等大量生產製程，故可降低成本。為方便液珠操控晶片樣本呈色反應的量化檢測，國家實驗研究院特別量身定做發展出一套結構簡單的透光度量測儀器，可精確檢測出定位在晶片上、經過相互混合之試劑與樣本液珠的呈色透光度。這套液珠呈色檢測儀適用於會發生透光變化的生化反應、免疫反應與藥物、食品及水質等檢測，尤其在生化檢測方面，其量測方便性與準確性極具優勢。而結合液珠式生醫實驗室晶片及其呈色反應專用量測儀所開發完成之「多功能生化檢驗儀」，可快速檢驗多項生化指標，如膽固醇、三酸甘油酯、尿酸、肌酸酐等。這項儀器採用套組化生醫晶片的設計，方便醫生針對特定疾病選取需要的檢驗晶片套組。以後民眾就診時，可以在更短時間內取得可靠之檢驗數據，讓醫師更能即早採取適當的醫療措施。而另一種「自由基檢測儀」則是利用尿液與試劑液珠混合後的呈色反應顏色變化，可在數分鐘內量出尿液中自由基之含量，民眾在比較服用抗自由基等健康食品後所量得自由基含量，即可得知健康食品對降低人體自由基之效果。這兩項結合奈米顆計的生醫晶片檢測儀器所針對的檢驗市場規模約在50億美金，今年全球微流體/實驗室晶片產值約在4億美金左右，未來商機可期。

而在一些化學反應原本不易發生的情況下，藉由特殊結構產生在侷域(localized)的增強能量能使反應發生。表面電漿光子技術(plasmonic photonics)便是此種概念的應用。此類光學特性往往在奈米尺度下特別增強，當光波經過特別設計的奈米結構和材料時，將會被「局限」和「增強」，有如平靜的海面被風吹起，當滿足了某種共振條件，將有機會在某區域出現特別高的浪。藉由此觀念，得以藉由人為控制，來讓光波與特定奈米結構共振而產生超音波訊號作為檢知之放大訊號。此外，表面之奈米結構造成之表面電漿共振增強，具有指數倍率強化的效果可運用在分析分子交互作用的生物晶片上。其優點為光學解析度極高，不受制於繞射極限，其次能量相當充足，足以被遠場觀測到，因此應用端變得廣泛。例如:使用表面電漿共振之偵測以單醣包裹之奈米粒子與其lectin的吸附強弱。可藉由改變粒子大小，醣分子與粒子表面之距離及醣分子在奈米顆粒上之密度對共振波之影響而尋找出影響鍵結之重要因素，並藉由調控此因素製造出具高

吸附能力之醣包裹奈米粒子。結合生物晶片技術，預期將可開發出快速檢測病菌之新方法。現就國內外發展而言，表面電漿共振的發展分兩大類：一是著重在系統方面的設計，此類的系統比較商用化的儀器而言較具有靈活性而且造價便宜。但是對於生物檢測方面而言，尚需要穩定性以及再生性的考驗需要克服。而對於專門利用表面電將共振來研究分子間專一性研究的實驗則絕大部份利用已經商用化的產品來做研究。商用儀器的優點穩定性高以及不易受環境限制的影響，甚至已經可做到可攜帶式的儀器，缺點則是造價昂貴。而鑒於表面電將共振在生醫檢測上的潛力，國外已經有許多商用儀器問世，例如：Biacore, Texas Instrument, IBIS和GWC instrument等。

九、結論

雖然上述有些奈微生醫晶片都還在實驗室設計測試階段，但相信隨著材料科技的進步，這些生物晶片將更能整合奈微米科技的優勢，提供一個快速、精確、高輸出(high throughput)且自動化的新操作平台。將能為推動下一階段生物科技的發展，提供一定程度的貢獻。也許若干年後，門診醫生將使用生醫晶片，在幾秒鐘內就能檢驗出病患是否感染特殊疾病；而慢性病患更可在家裡自行取樣及檢測作為健康篩檢之第一關，隨時監測身體狀況。根據IEK生醫組之預測，全球生物晶片市場在2004年市值約為22.06億美元，而將在2008年達到46.9億美元。未來年成長率將高達65%。比爾蓋茲也說：「下一個世界富豪必出自生物科技界！」。1996年諾貝爾化學獎得主Robert F. Curl博士曾說：「二十世紀是化學及物理的時代，二十一世紀將是生物科技的時代。」而利用微機電技術與結合生物科技所研發出來的奈微生醫晶片，正是取兩者之長，並與全人類健康與生命息息相關的新興科技。

十、主要參考文獻

1. 王少君。2003。第二代生物晶片—微流體晶片與蛋白質晶片。科學發展。369:74-76。
2. 王大維。2005。蛋白質晶片技術發展趨勢。產業技術探索—技術趨勢分析與探索。
3. 李國賓。2005。下一波生物晶片-微流體生醫晶片。科學發展。385:72-77。
4. 李慧瑜。2004。談生物晶片產業。產經資訊。16:38-43。

5. 隋安莉。2002。奈米科技與DNA感應器。科學發展。359:62-67。
6. 曾繁根、柳克強、黃海美、錢景常、潘力誠。生醫檢測的微技術。2003。科學發展。371:67-73。
7. 楊自森。2005。分子生醫光電科學與技術。物裡雙月刊。27卷。5:670-686。
8. Bustamante, C. Z. Bryant and S. B. Smith. 2003. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*.421: 423-427.
9. Schnitzer, M. J. and S. M. Block. 1997. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*.388:386-390.
10. Wolfgang, G. and H. Peter. 1995. Interface analysis in biosensor design. *Biosens. Bioelectron*.10:854-855.

第十三章 奈米的健康、危害與保護

何佳安副教授 國立清華大學化學系

張立惠 國立清華大學化學系

一、緒論

奈米科技被認定為21世紀最重要的產業之一，是現今科技的當紅炸子雞，從民生消費性產業到尖端的高科技領域，都不難找到與奈米科技相關的應用。「奈米高鈣牛奶」、「奈米鞋」、「奈米衣」、「奈米銀抗菌除臭健康襪」、「奈米口罩」，甚至是「奈米空氣清淨機」、「奈米光觸媒」，都是因應奈米潮流而生的商品。似乎是只要冠上「奈米」二字，產品價格就隨之水漲船高。^[1] 經濟部工業技術研究院奈米研發中心表示，市面上利用奈米材料、技術所生產的奈米產品固然不少，但由於判定真假奈米的檢測機制、奈米產品的規格標準及認證機制尚未完全被建立，因此如何辨別市面上琳瑯滿目的奈米產品的真偽，完全依賴消費者的常識與智慧。

「奈米」，聽起來很「尖端」。但早在我們身邊眼睛可見、鼻子可聞、舌頭所嚐、雙手可摸的生活環境中，許多奈米物質，在不知不覺中介入我們的生活。例如：蜜蜂體內因存在磁性奈米粒子而具有羅盤的作用，可作為活動的導航；蓮葉由於表面的奈米結構，因而具有抗水防塵的自潔功能是相當著名蓮花效應(Lotus Effect)^[2]，這個特性能用來改善高科技的戰機雷達天線罩，也可以運用來生產環保塗料、自潔玻璃及奈米馬桶等民生用品；攜帶人類遺傳密碼的訊息的DNA，其直徑只有小小的2 nm；人類的牙齒外表排列著奈米尺寸的微小晶體，可使之歷久不壞；鯨魚的皮膚擁有奈米尺寸的孔洞，不但可以防止有害微生物的附著，還可以減少因移動所產生的磨擦力^[3]；飛蛾眼睛的角膜表面具有奈米級的細小突起，甚至小於可見光的波長，所以反光性極低，可以吸收來自四面八方的光線，這個效應可被應用於抗反光玻璃的研發，對於開發新型眼鏡鏡片、電視及電腦螢幕產業具可觀的潛力。^[4]

1959年12月諾貝爾獎得主，舉世聞名的物理學家費曼(Richard Feynman)在American Physical Society上演講專題中提到“*There is Plenty of Room at the Bottom*”，首次為奈米科技擘畫出疆界，且比「奈米」這名辭出現之前還早了很多。費曼的遠見驚人，40多年前他在演講中所預測的幾個科學和科技領域，現在都已經發展茁壯，其中包括電子束和離子束製作、分子束磊晶、奈米蝕刻、電子顯微投影、操控單一的原子、量子效應電子學，以及自旋電子學和微機電系統

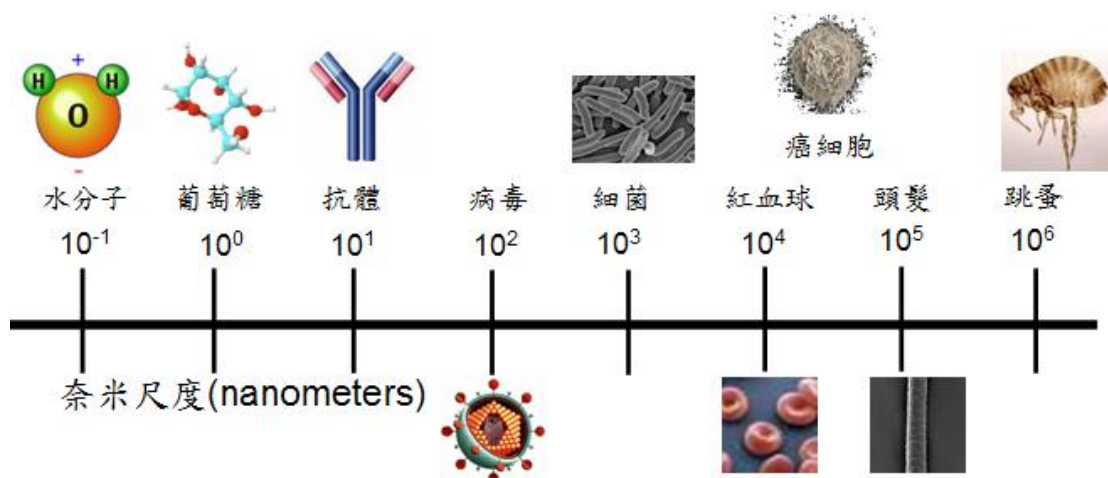
(MEMS)。Feynman的預言為奈米科技開拓了新視野和遠景。^[5]

奈米科技、生物科技、及訊息技術並列為21世紀三大基本技術。其中奈米科技更被當成是繼蒸氣機、內燃機和第三波「資訊革命」之後，第四波對人類生活型態造成嚴重衝擊的工業革命。許多應用奈米科技的民生產品，不知不覺參與人類的生活，創造出超乎想像的變化。正因為奈米產品對人類生活的息息相關，因此認識奈米的健康、危害及防護的重要性與日俱增。

二、奈米的定義及歷史

(一) 奈米的定義

奈米 (nanometer) 是長度的單位，一奈米等於十億分之一公尺 ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)。英文的字首nano，在希臘文是「侏儒」的意思，字尾meter則是英文「公尺」的意思。^[6] 奈米科技 (nanotechnology)，主要是探討在一奈米到一百奈米 ($1 \sim 100 \text{ nm}$) 尺度下所出現嶄新物理、化學等特性的科學技術。奈米尺度的比較如圖一 所示。



圖一 奈米尺度的比較(Nanotechnology size comparison)

(本圖經作者同意轉載)

(二) 奈米的歷史的演進^[7]

1959年諾貝爾物理獎得主，費曼在American Physical Society提出孕涵奈米概念的演講 ”There is plenty of room at the bottom”。



1962年日本物理學家久保亮五提出「量子限制理論」來解釋超微粒子所呈現能量不連續現象。



1974年日本科學大學谷口紀男率先著作奈米科技書，描述以極精密機械加工的技術來製造極精密產品。



1982年IBM的兩位科學家研製了世界第一臺「掃描穿隧顯微鏡」可以觀察到金屬物質表面上單個原子排列的儀器。



1984年德國科學家發現奈米級二氧化鈦，開啟了研究者對各式各樣奈米級材料的探索熱潮。



1985年英國 Sir Harold W. Kroto 和美國 Robert F. Cuil Jr. 和 Richard E. Smalley 從石墨中純化出C-60 (碳60) 並衍生許多重要的奈米材料。



1990年IBM公司研究員在低溫中利用掃描穿隧式顯微鏡 (STM) 成功地將35個氫原子於鎳基板上排出IBM三個英文字母。



1990年7月 第一屆國際奈米科技會議在美國舉行，從此奈米科技正式成為一門獨立學科並每年在各國主要城市輪流舉行年會。



1991年 D. Eigler 和同事利用Xenon/Nickel 系統製作原子開關。藉此原理，人類可藉單一原子的動力製作一種STM基記憶器材。此器材在100個原子/bit的密度將比任何磁性器材記憶容量多數百倍。

↓

1993年 D. Eigler 和同事在一磁性實驗中，利用STM觀察到銅表面的鐵原子受表面電子波影響而波動。

↓

2000年12月台灣行政院科技顧問會議與2001年1月全國科技會議結論皆指出奈米科技為我國未來產業發展重點領域的方向。2002年由國科會、行政院科技顧問組、中研院、教育部、工研院、經濟部、原子能委員會及環保署等單位二十五位代表，組成【奈米國家型科技計畫工作小組】，於2002年6月行政院國家科學委員會第157次委員會中通過奈米國家型科技計畫，並預計於2003年1月開始推動。2002年9月成立【奈米國家型科技計畫】辦公室，冀盼藉由計畫辦公室整合產學研力量，建立國內發展學術卓越和相關應用產業所需要之奈米平台技術，同時加速培育奈米科技所需人才，奠定國內奈米科技厚實之基礎。

↓

2003年5月美國國會通過「2003奈米技術研究發展法案」。在未來奈米科技研究撥款2千億美元，以期讓美國奈米科技擁有領先地位

(三) 結語

當材料尺寸縮小到奈米等級時，它所表現的若干新奇的物理、化學性質因而被發掘並利用。這些效應，不只僅能在資訊、生物或目前最迫切須要被解決的能源危機帶來重大改變，也會影響到你我的民生生活、傳統產業（包括製造業、醫療保健、農業、交通…等）。奈米科技的遠景是無限廣泛且深淵的。

三、奈米的性質

(一) 前言

在1 ~ 100奈米的尺度下，古典理論已不敷使用，量子效應（quantum effect）成為不可忽視的因素。尺寸微小的奈米結構擁有高

表面/體積比、高密度堆積，以及高結構組合彈性的特徵，由於面積的比例大增，物質會呈現迥異於巨觀尺度下的物理、化學和生物性質。以黃金為例，當它被製成金奈米粒子(gold nanoparticles)時，顏色不再是金黃色而呈紅色，而其熔點也由為1064°C變成327°C；銀是導電性最好的金屬，但是奈米銀卻從導體變成絕緣體；石墨因質地柔軟而被用來製作鉛筆的筆芯，但同樣由碳元素構成、結構相似的碳奈米管，強度竟然遠高於不銹鋼，又兼具良好彈性；鉑是惰性金屬，奈米鉑的活性高，是可以當成理想的催化劑。

奈米科技是運用人類對奈米系統的了解，將原子或分子設計組成新的奈米結構，並以其為基本「建築磚塊」(building block)，加以製備並組裝成新的材料、元件、甚至是系統。因此，若以製程的概念闡釋，奈米科技屬於「由小作大」(bottom up)，與半導體產業透過光罩、微影、蝕刻等「由大縮小」(top down)的製程不同。^[8]

(二) 表面效應

物質的表面原子與內部原子所接觸的環境不同，其性質亦不同。當物質結構尺寸大時，排列於表面上的原子數目佔所有組成原子的比例極小，此時物質特性由內部原子決定。但當物質尺寸小到奈米尺度時，表面原子所佔的比例已達到不容忽略的程度^[9]，此時物質的特性將與人們所熟悉的大尺度物質不同。若以高倍電子顯微鏡觀察金奈米粒子，會發現表面原子彷彿進入一種「沸騰」狀態，粒子並沒有固定的型態與結構，性質相當不穩定。這個特性使得原本有惰性的金居然可以被當成催化劑使用。總括來說，當物質尺寸變小，比表面積(表面積/體積)相對地增加，進而造成物質光學、熱、化學活性等性質的改變。

(三) 量子尺寸效應

六〇年代日本東京大學久保(Ryogo Kubo)教授提出著名的久保理論，認為金屬奈米粒子費米能階(Fermi level)附近的電子能階，會由連續狀態變為不連續的獨立能階。宏觀物體包含無限個原子，電子總數趨近無限大，此時能階間距為零，能階呈連續態。但在奈米粒子中，電子數有限，就會產生能階間距，能階呈現不連續狀態。美國貝爾實驗室的科學家曾經觀察到隨著硒化鎘(CdSe)的粒子變小，能隙加寬，螢光顏色會從紅轉綠、再轉為藍的現象。金屬粒子隨著粒徑減小，能階間隔增大，甚至會由導體的金屬變為絕緣體。由於粒子顆粒小、體積小、所含原子少而產生的材料性質變化稱為體積效應。能階隨著粒徑變化、能隙或能帶改變，稱為量子尺寸效應。^[10]

(四) 蓮花效應

「出淤泥而不染，濯清漣而不妖…」即使經過一場傾盆大雨，蓮葉的表面總是能保持乾燥。蓮葉上滾動的水珠總是能把灰塵污泥的顆粒一起帶走，達到自我潔淨的效果。這是由於蓮葉具有疏水、不吸水的表面，而落在葉面上的雨水會因表面張力的作用形成水珠，由於水與葉面的接觸角 (contact angle) 大於140度，因此只要稍微傾斜葉面，水珠就會滾離葉面而保持乾燥。^[11]

四、奈米的種類

(一) 碳奈米管 (carbon nanotube)

西元 1991 年日本電氣 (NEC) 公司飯島澄男 (Sumio Iijima) 無意間以電弧蒸發製造出碳奈米管。^[12] 1993年，科學家發現在石墨電極中加入鈷等金屬，就能製造出單層碳奈米管。1996年理查·司莫利 (Richard E. Smalley) 等人，則利用石墨雷射蒸發法製造出直徑一致的碳奈米管，司莫利特別把集結成束的碳奈米管稱為「奈米繩索」^[13,14]。所謂奈米碳管，就是把原本是平面結構的石墨捲成管狀，形成一種直徑小於數十奈米的圓筒形碳材料；不同的捲曲方式，會讓碳奈米管呈現金屬導體或半導體的性質。碳奈米管最大的特色，在於它的性質穩定，具有高強度、高彈性、熱傳導性、導電性等特性。由於碳奈米管的熱傳導性，與鑽石類似，若能將之做成電路，應可在緊密的空間內，有效地排出所產生的高熱量。此外碳奈米管的超強彈性，使之彎曲90度都不會折斷。^[15]

碳奈米管的應用，包括製造顯示器（例如場發射式顯示器）、飛機或太空梭的複合材料、電池、超高速電腦晶片、超導材料等。碳奈米管的專業應用正大規模地成長，等到克服量產問題、降低成本後，碳奈米管極有潛力成為繼矽之後，尖端產業的骨幹材料。

(二) 量子點 (quantum dot)

量子點是由半導體材料所製成的螢光奈米顆粒。量子點所放射的螢光波長隨著顆粒的大小而改變。當顆粒越小，顏色便會越趨近於光譜的藍色端。量子點是準零維(quasi-zero-dimensional)的奈米材料，由少量的原子所構成。粗略地說，量子點三個維度的尺寸都在100奈米 (nm) 以下，外觀恰似一極小的點狀物，其內部電子在各方向上的運動都受到侷限，所以量子侷限效應特別顯著，導致類似原子的不連續電子能階結構。量子點的可能應用包括，製成具有低起始電流及熱穩定性高的奈米量子點雷射、色板、生物造影、光感測元件、單電子電晶

體(single electron transistor, SET)、記憶儲存、觸媒以及量子計算(quantum computing)等。在醫療上，更可利用各種發光波長不同的量子點製成螢光標籤，成為生物檢測用的「奈米條碼」。量子點是目前理論上與實驗上的熱門奈米研究題目，國際間研究團隊無不積極投入研究。但由於量子點的造價昂貴，且其毒性研究尚未被評估完成，因此在商業上的應用潛力仍是未知數。^[15]

(三) 巴克球 (Buckyball)

巴克球為60個碳原子所組成的奈米球結構，包含20個六角形和12個五角形，外形像一顆英式足球，是目前已知對稱性最高的球狀分子，和石墨(graphite)及金剛石(diamond)同為碳的同素異形體(allotropic form)。由化學性質來看，C₆₀具有近似石墨的sp²混成軌域，每個碳原子僅與相鄰的三個碳原子鍵結，具有三個δ鍵和一個π鍵。其碳—碳鍵有兩種長度，分別為1.38 Å和1.45 Å；兩個相鄰六角形所共用的碳—碳鍵較短，接近雙鍵(C=C)的性質(由一個δ鍵及一個π鍵所組成)，而六角環和五角環共用的鍵較長，接近單鍵(C—C)的性質。C₆₀的化學性質相當穩定，即使在時速高達二萬四千公里的速度下撞擊鋼板也不會破裂，若在氮氣中加熱其晶體，發現在550°C會昇華。

巴克球除了可被當成工業用潤滑劑外，亦被廣泛運用在材料、電池、觸媒、半導體、癌症治療等方面，例如水溶性較佳的巴克球可作為抗愛滋藥物。由於愛滋病毒(約100奈米)需利用自身與人體細胞結合後所產生的酵素，以轉化人體細胞蛋白質成新病毒；由於特殊巴克球的大小與結構與HIV病毒酶的活性部分可發生鍵合作用，阻斷HIV酶的活性中心，改變酵素的立體構造而使之喪失催化的功能，終止病毒的增殖反應，而獲得療效。^[16]

(四) 微脂體 (liposome)

微脂體於西元1965年由英國劍橋巴布拉漢研究中心(Babraham Institute)的Alec Bangham首次發現。^[17] 微脂體(liposome)是脂質空心微球，可均勻分佈於水溶液中。脂質雙層膜(lipid bilayer)主要由磷脂質分子所構成。其磷酸端為親水性；脂肪酸鏈為疏水性，構造與生物膜類似。^[18] 正因為微脂體之類細胞膜構造，加上具有生物相容性和生物可分解性，因此被陸續應用在基因治療^[19]及藥物傳遞^[20,21]的臨床試驗。水溶性物質或藥物可被包裹在球心溶液中；油溶性物質或藥物則可夾在脂雙層內。微脂球可當作水溶性物質或油溶性物質的載體，也因此被廣泛應用在化妝品工業及檢測試劑。^[22-34] 自1970年起，微脂體即被認為是載運藥物的好劑型，其優點如下^[35]：

1. 包裹在微脂體內的藥物，會改變藥物的動力學，延長藥品半衰

- 期，增加藥物在腫瘤組織或發炎組織的濃度，增加療效。
2. 微脂體是磷脂質組成，其成分與細胞膜相同，具生物可分解性，毒性低；免疫性也低，不像蛋白質會引起免疫反應，所以能夠多次使用。
 3. 毒性高的藥物包裹在微脂體內，可以降低用量、減少不良的副作用。
 4. 微脂體的脂質組成、顆粒大小、結構、製備方法與包裹藥物的選擇性很大，能夠符合各種不同情況，進行各種應用。

五、製備奈米物質之製備

以材料型態為依據，奈米材料可以分類為奈米塊材、粉體及奈米薄膜，其中奈米粉體的製備發展較其他為快。製備奈米材料的方法很多，大致分為化學方法及物理方法兩類，以下簡述部份常見奈米製程。^[15]

(一) 水熱法

水熱法乃利用水為介質，加上適當的溫度，在密閉的反應器內進行反應。反應後經由過濾取出產物，清洗烘乾即得成品。水熱法製造金屬氧化物的反應機制，至少有兩種，一是酸鹼反應，另一是利用凝膠原理。酸鹼反應的機制，是以有機金屬化合物為起始物，再水解為帶負電荷的氫氧化物，續與反應基質中的金屬陽離子中和而生成產物。

(二) 凝膠法

凝膠法則是先水解有機金屬化合物，再與另一個金屬氫氧化物反應形成凝膠，除水而生成產物。對於部份物質對水敏感或是在水溶液中不穩定，不適合在水溶液中反應，此時可以改用其他有機溶劑當作介質，這就是所謂的溶劑熱合成法。

(三) 機械研磨法

機械研磨法為物理法的一種。以機械方式研磨材料粒子為奈米顆粒。這方法的優勢包括操作簡單、成本低；缺點則包括粒徑分布不均，且並非所有奈米材料都能以機械研磨製得。

(四) 蒸發沈積法

在真空或惰性氣體環境中，蒸發樣品後，再讓氣態粒子沈積，以得到奈米粒子。不同的蒸發方式（電子槍、直接加熱等）、溫度，或

是使用氣體的種類及壓力，都可能影響奈米粒子的大小。

(五) 微乳液法

藉由界面活性劑的作用，使一種液體均勻分散在另一種液體內，形成熱力學穩定的澄清溶液。由於利用微乳液分散相的微滴直徑通常小於一百奈米，因此微乳液法可以應用來合成奈米粒子。

(六) 化學氣相沉積法 (CVD)

此法最早被用來製作碳纖維。目前，化學氣相沉積法是用來製備單層奈米碳管最有效率的方法之一。而反應主要原理乃是將 CH_4 、 C_2H_2 、 C_2H_4 、 C_6H_6 等碳氫化合物的氣體，通入高溫的石英管爐中反應（約 $1,000\sim 1,200^\circ\text{C}$ ），碳氫化合物的氣體會因高溫催化分解成碳，並吸附在基板催化劑表面而進行沉積成長。由化學氣相沉積法所得到的碳管直徑約 $25\sim 130\text{ nm}$ 不等，長度 $10\sim 60\text{ nm}$ 以上。此製程改善電弧放電法中碳管太短、低產率、低純度及高製作成本等缺點。

(七) 共沈澱法

在溶有各種產物離子的溶液中加入沈澱劑，使產物直接從溶液中析出、分離。鈦酸鋇、鈦酸鉛及氧化鋯等奈米粉體的製備多用此法。

六、奈米的健康應用

(一) 前言

奈米科技涵蓋領域甚廣，在學術方面，包括物理、化學、材料、光電、生醫應用等跨領域的研究；在產業方面，則從民生消費到走贊時代尖端的高科技領域，在在都是奈米科技的相關應用。由於奈米物質的獨特性質使得傳統物質擁有更多元的應用。哈佛大學及麻省理工學院的研究人員設計出一種新型的奈米顆粒，它可以超越生物學的限制，鑽入癌細胞當中，放出先前攜帶的毒素殺死癌細胞。^[36] 另一位科學家則設計新型的奈米裝置，以大鼠為模式，治癒了第一型糖尿病；該裝置擁有 7 nm 大小的孔洞，可調節胰島素的釋放，並阻斷胰島素抗體的侵犯。^[36]

(二) 生物技術產業

1966年的科幻電影(Fantastic Voyage, 聯合縮小軍)描述5名醫療人員為了替患者進行腦部血塊移除，搭乘一艘縮成微型大小潛水艇，經靜脈注射至患者體內…。這在40年前被視為不可思議的微型手術概念劇情，如今透過奈米科技已經化不可能為實際。奈米材料的健康應

用分述如下：

1. 生物晶片

生物晶片多以玻璃、矽晶片或高分子為基質，以微小化技術整合生物有機分子（核酸或蛋白質）為生化探針(bio-probe)，可用來檢測生物性分子。由於其體積小、所需樣品及試劑量極低，反應快速並且能夠平行分析大量樣品，適用於生化分析檢驗、新藥開發、生物醫學及環境檢測等用途上。這個微小化之生物分析裝置的型態將包羅萬象，若就其技術及產業的發展而言，可以分成二大類，一為著重於功能整合的處理型生物晶片 (lab-on-a-chip)，二為能獲得大量資訊的微陣列型晶片(microarray)。^[37]

2. 基因療法

基因治療是靠醫藥傳遞系統將相關的基因材料(即DNA or siRNA)傳送到需要破損修復的體內細胞。目前將基因或藥物送至細胞或生物體內的方式，依其使用的載體類型，大致可分為兩種：一類是病毒載體系統^[38,39]，另一類則是非病毒載體系統。

用於治療的病毒載體系統應具有下列的基本條件：(1)可攜帶外源基因並能包裝成病毒顆粒；(2)可使外源基因轉殖和表達；(3)不會造成生物體致病。目前被利用為載體系統的病毒有反轉錄病毒 (Retrovirus)、慢病毒 (Lentivirus)、腺病毒相關病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV)、皰疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV)，以及腺病毒 (Adenovirus)。這類病毒載體雖有較高的轉染效率，但卻有殘留的病毒外膜蛋白的存在，引發人體產生免疫反應的隱憂。況且這類病毒載體對標的基因的載量小、目標特異性差、製備複雜、費用高等不足，因此非病毒載體的發展越來越受重視。

非病毒載體系統的優點為^[40-42]：(1)不需要組裝細胞，製備容易且省時；(2)不限制基因大小或核酸類型；(3)免疫性低、毒性小，對生物體較安全；(4)具有特異標靶性並能有效表達；(5)符合人工合成及大規模生產的可能性。非病毒載體的例子包括^[43]：(1)金奈米殼：以磁場引導金奈米殼至特定位置，可利用紅外線加溫直接殺死腫瘤細胞，或間接透過加溫使金奈米殼解體，定點釋放藥物，(2)裸DNA (naked DNA)：透過直接的物理或機械方法(如直接注射、電擊或基因槍)導入特定部位進行基因表達，(3)有機樹狀體(dendrimer)：以人造聚合物構成外殼，內部空腔可填充藥物，(4)微脂體(liposome)：由磷脂質組裝成具雙層膜的空心微粒，內部可裝載藥物，(5)智慧奈米載體：利用溫度與酸鹼度控制載體釋放藥物，(6)人工胰島膠囊：以矽薄膜製成膠囊外殼，內含β細胞可持續分泌胰島

素。多數文獻報導^[44-46]，在非病毒載體的轉染方式中，以微脂體的效果較好，本實驗室的研究並證明，微脂體的轉染方式可應用於生物體的基因傳遞。另外，Mark E. Davis 發展出一種高分子叫做 β -cyclodextrins (CDs)做為導子，並與DNA結合成為均勻的奈米級分子。此種奈米載體不易與血液中的蛋白質凝結，可安全地將DNA遞送到患部細胞。Davis正用這種醫藥遞送系統醫治各種癌症及肝病等疾病。^[42]

3. 生物感應器

麻省理工學院(MIT)研究人員製出一種新型的生物感應器，這種感應細胞一旦接觸危險病毒或細菌，就會在數秒內發出警訊，以協助第一線應變人員迅速警覺生物恐怖武器的攻擊。這類的生物感應器可在公共場所(如，街上、地下鐵或機場或戰場勘測)被應用來檢驗可疑物質。樣品不必送到實驗室檢驗，更不需等待幾小時才可有結果。^[47]

(三) 民生產業

1. 奈米化妝品

奈米化妝品意指利用奈米技術研發所生產的化妝品。皮膚由上至下分為表皮、真皮及皮下組織，化妝品中要能達到其宣稱的效果都必須要進入真皮才能發揮作用。表皮細胞間距大約為 5×10^{-6} 公尺，傳統乳液的有效成份須經漫長的滲透作用才會到達作用部位；而奈米化妝品是指粒子大小在100 nm以下保養品成份，因此運用奈米科技處理包覆之保養品有效成分，能輕易穿透角質層滲透至真皮，特別是需要深層吸收才有效的美白、防皺與塑身等功效性成份。這類奈米載物通常必備生物相容性，卵磷脂(Lecithin)及微脂體(Liposome)都是可能的材料。化妝品業者將氧化鋅ZnO 或二氧化鈦TiO₂製成80-100 nm大小，應用於防曬乳液的製備。和一般利用有機分子形成紫外線隔離層之防曬乳液不同，奈米防曬乳液的ZnO或TiO₂奈米粒子很緊密地排列在一起，他們不會沉入皮膚的皺褶中，除了可以有效隔離紫外線外，也不容易對造成皮膚的敏感。曾被使用於製作奈米化妝品或防曬隔離乳液的奈米載體，如liposome(微脂體), micelle(微胞), nanocapsule(奈米膠囊), 及solid nanoparticle aggregate (TiO₂)。^[48]

2. 奈米中藥

由於藥性植物的細胞構造非常堅實，包在細胞內的藥效物質不易被萃取出來為人體所吸收。因此過去所使用的中藥微米技術是指破碎

萃取法，先破壞中藥材的細胞壁，再萃取其細胞組織，當細胞壁的破損率達70~80%時，中草藥中的有效成分利用率可提高至60~70%，藥效則增加8倍。以奈米化製程取代微米化製程，不但可使中草藥節省大量原料成本，特別在貴重藥材方面更是重要，另一方面還可大幅提高中藥材的利用率。^[49]

3. 奈米馬桶

源自於「蓮花效應」的概念，將奈米級微細藥塗覆於陶瓷表面，使得陶瓷表面顆粒隙縫極小，污垢無法附著。奈米技術處理後的表面顆粒和未經處理的表面相差百倍以上，將該二種陶瓷基材以高倍數的點子顯微鏡觀察。傳統的基表面凹凸不平，山丘林立，容易藏汙；但塗上奈米藥的基材表面十分平坦，不易納垢。這就是所謂的「防污、抗菌」的原因。

(四) 國防軍用

「麻雀衛星」是美國於1995年所提出，利用奈米材料製造奈米衛星概念下的產品。採用最先進的微機電一體化集成技術整合，具有可重組性和再生性、成本低、質量輕、可靠性高。一枚小型火箭一次就可以發射數百科奈米衛星。^[50]

「蚊子導彈」乃利用奈米元件提高武器控制系統的訊息傳輸、存儲和處理能力，所製造出智慧型微型導航系統。利用奈米技術製程所生產如蚊子的微型導彈，可以神出鬼沒潛入目標，達到神奇的戰鬥效能。^[51]

「螞蟻士兵」是一種藉由聲波控制的微型機器人，體積雖比螞蟻還小，但卻具有驚人的破壞力，可以通過各種途徑鑽進敵方武器裝備中長期潛伏。一經啟用，這些奈米士兵就會各顯神通，制敵機先。^[52]

(五) 能源

石油短缺的危機、溫室氣體所引發的全球暖化、汽機車排放的廢氣污染是全球性的問題。而各國政府在過去幾年內投入大筆經費，催生潔淨又有效率的動力系統之研發，以期能取代內燃機引擎。最乾淨的能源——燃料電池或許可以解決能源問題，但是燃料電池尚有許多技術上的問題需要被克服，氫氣的儲存方法就是其一。^[53]

奈米碳管是以奈米尺寸存在的碳材，單位體積材料的表面積增大，有鑑於此，奈米碳管可以成為很好的吸附材料，特別是氫的儲存與吸附。將有足夠容量吸附大量氫的奈米碳管，可以做為燃料電池所需的儲氫材料，增加單位面積的儲氫量。再者，若將奈米碳管當成燃料電池中的電極，或許可使電池發揮更大的效能，成為次世代新的乾

淨能源。^[53]

(六) 環境保護

奈米光觸媒能有效處理液相污染物中的氯苯有機物、氯酚化合物、氰化物、金屬離子等污染物質；在空氣污染方面，光觸媒技術也可以有效處理分解如氧化氮(NO_x)、氧化硫(SO_x)等污染物質。藉由紫外光或太陽光的照射，使觸媒表面的電子吸收足夠能量而脫離，而在電子脫離的部位形成帶正電的電洞。電洞將附近水分子游離出的氫氧基 (OH^-) 氧化，使之成為活性極大的氫氧自由基 (OH radical)；氫氧自由基一旦遇上有機物質，便將電子奪回，使有機物分子因鍵結潰散而分解。由於一般的污染物或病原體多為碳水化合物，分解後的產物多為沒有危害性的水及二氧化碳，因而達到除污及滅菌的目標。^[54,55]

七、奈米的危害與防護

(一) 前言

奈米科技被喻為是衝擊人類生活型態的第四波工業革命，先進國家莫不如火如荼的展開其研究、拓展其可能的各方面應用。當奈米科技的研究熱烈地展開時，卻有不少人士以不同的觀點開始審慎的反向思考，評估奈米科技可能造成的負面影響。昇陽電腦(Sun Microsystems)公司創辦人之一比爾喬伊(Bill Joy)，極力反對無約束性的奈米發展，於其刊登於2000年4月Wired magazine中的文章“Why the future doesn't need us”。^[56] Bill在文中表示，奈米科技具有使人類絕滅的威脅性，擔心人類所製造具備自我複製功能的微型機器人(nano-robots)會因為失控，造成世界的混亂。「侏羅紀公園」與「急診室的春天」作者麥克克萊頓(Michael Crichton)也出版一本大賣的著作「奈米獵殺」，書中描寫在未來的世界裡，人類對能自我演化的微型機器人逐漸失去控制，而使之成為足以引爆全球恐慌的災難元兇。^[57]

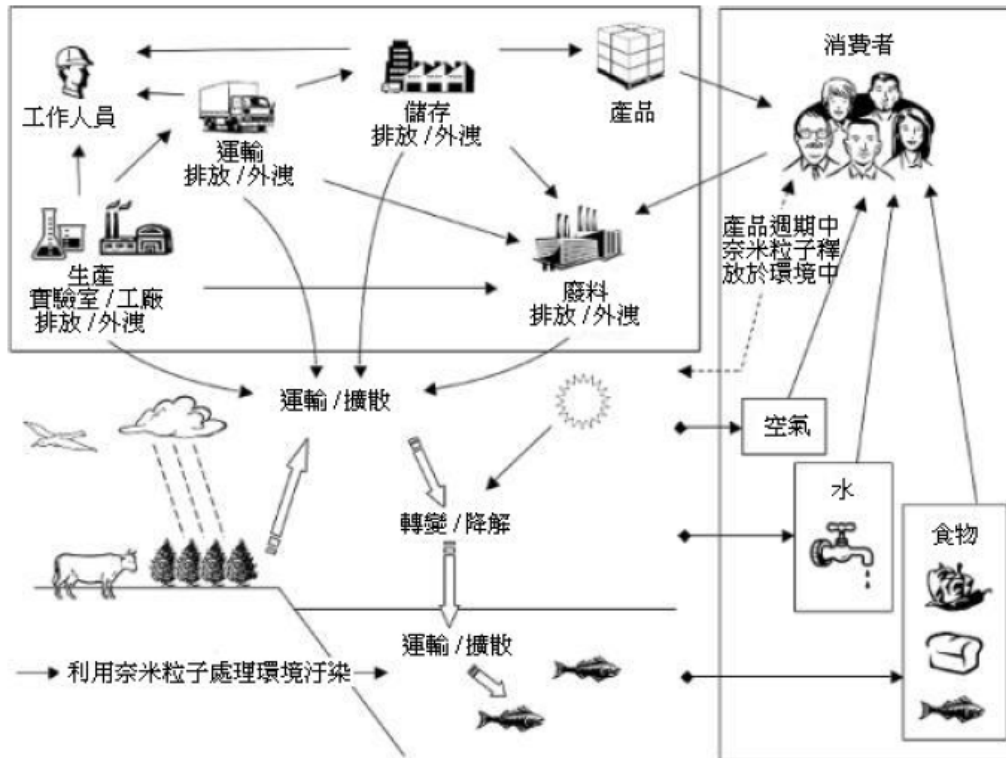
奈米科技可謂現在科技的顯學，科學家無不絞盡心智進行各式奈米材料的研發與應用，冀期造福人群。美國德州休士頓Rice大學研究人員卻注意到此種新穎、微小的材料對環境與人類健康可能帶來的負面影響。Rice大學的Wiesner教授以氟氯碳化物(CFCs)和DDT為例，強調這兩種物質初被發明時，被視為科技應用上的奇蹟，科學家無不寄予厚望，然而最終卻成為自然環境的最大殺手。因此Rice大學的研究人員開始思索奈米材料是否危害人類及環境的安全。水溶性較好的奈米級物質常被應用於運送藥物或其他生物醫學技術，然而這類奈米微

粒是否也將不受拘束的在飲用水系統中自由活動。因此在奈米材料進入量產前，及早進行研究奈米材料對環境與健康影響，方能即時找出對應之策，確保奈米材料應用的安全。

行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所的調查指出，國內許多奈米科技廠商都曾發生過粉塵爆炸事故，當以研磨方式生產奈米粒子時，將會產生大量粉塵，因其粒子小，所需的引爆能量相對變小，因此僅需微小的摩擦火花或靜電，便可引爆研磨機內粉塵。此外，大量粉層造成粒子飛揚於空氣中，奈米粒子容易經由呼吸道侵入人體組織，或是經因不當處理而引發中毒事故，造成勞工健康上的危害。為改善上述問題，部份廠商則改以加濕的液相操作方式來降低製程的危害性。普查結果顯示，大部份的廠商均未訂定奈米粉體作業安全與衛生標準、安全衛生工作守則及標準作業程序；也未提供勞工相關危害資訊並提供奈米粒子危害相關的教育訓練。為保障勞工的安全與健康，國內奈米產業的製程、設備及安全衛生知識仍有待改善與提升。^[58]

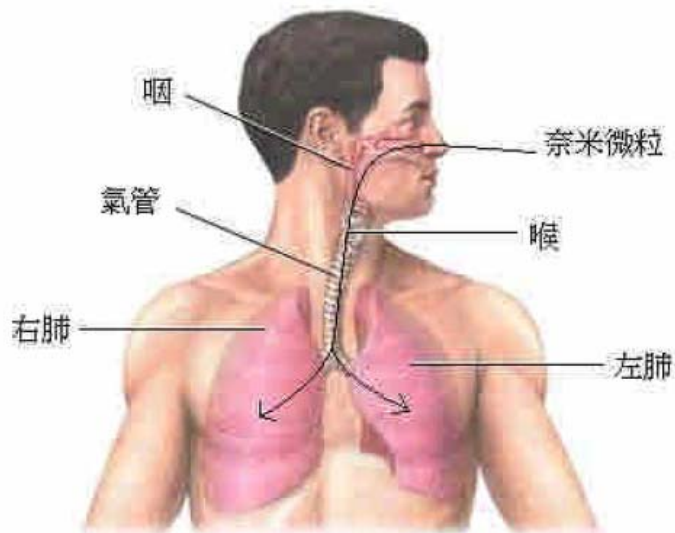
勞工安全衛生研究所為提升國內奈米科技產業的安全衛生，結合國外經驗及本土現況調查，提出「奈米工業安全指針」供國內奈米製造廠商進行風險評估及改善安全衛生參考。此外，經濟部在對奈米產品進行標章驗證時，已考慮加入工廠安全衛生考量，並於將於近期進行奈米產業普查，制定奈米產業安全衛生規範。如此的行政措施目的主要是期望國內奈米科技產業不僅在製程技術上能領先全球，更希望在製程的安全衛生上亦能與國際接軌。^[58]

實驗室或奈米工廠中所生產的奈米粒子，可以因運輸不慎漏出或儲存不當而外流，被當成廢棄物也是外洩原因之一。奈米粒子在進入自然界後，借由水、空氣的運輸而進一步擴散，或是因風吹雨打日曬而行化學反應改變其性質，最後可能在定點沉積。生物的介入為奈米粒子的污染產生不可預料的變數，微生物利用含有奈米粒子的塵泥，小型魚類也可能食用，奈米粒子因此由食物鏈散佈至各種生物，最後也將影響到消費者大眾。圖二顯示了奈米粒子在環境中可能的擴散途徑與傳輸情形。^[59,60,61]



圖二 奈米粒子在環境中的傳輸^[60](本圖經作者同意轉載)。

2004 年 7 月底英國皇家協會與皇家工程師學院發佈了奈米科技有關的報告，報告題目為「奈米科學與奈米科技的機會與不確定性」^[2]，並預估奈米粒子的傳擴途徑為：呼吸道吸入(圖三)、食入、飲入、皮膚滲透等，吸入的奈米粒子也可能由肺部轉移至血液中^[62]，甚至進入腦部。^[63,64,65]「水能載舟，亦能覆舟」，奈米科技雖為人類帶來無窮的希望，但奈米科技所帶來的新風險，對於人體和環境的危害，極需去做考量評估。唯有及早的預防和妥善的管理措施，才可讓奈米科技發揮出它最大的功效性。^[66]



圖三 奈米粒子能經由呼吸道進入人體中，可能引起肺部發炎。若干研究也指出，吸入肺部後的奈米粒子可能直接擴散進入微血管中，經由循環系統移向全身各處^[63](本圖經作者同意轉載)。

(二) 奈米碳材的毒性檢測

奈米碳管具有獨一無二的電學、熱學、和機械的性質，使之在電子學、電腦、或航太方面有很重要的應用。因為未經修飾的奈米碳管質量輕，所以很容易經由呼吸道吸入而累積在肺臟。美國國家航空和航太管理局 (NASA) 協同美國Wyle實驗室和美國德州大學的聯合調查結果顯示，碳奈米管對肺的危害比當今被視為職業性危害物的石英粉末更高。另外，美國國立衛生研究所 (NIOSH) 和美國西維吉尼亞大學以及NASA的調查結果認為碳奈米管有可能傷害人的皮膚。由於碳奈米管呈細長形，形似石綿，極有可能對肺部產生影響。

美國德州醫學大學病理與藥物實驗室和NASA等團隊，將單層奈米碳管灌注至老鼠體內並觀察其對肺臟的毒性。他們將老鼠分別灌注0、0.1、0.5 mg的奈米碳管，並以碳黑(carbon black)和石英粉末當控制實驗。結果顯示奈米碳管會導致肺部上皮狀的肉芽瘤，且肉芽瘤的大小會隨灌注老鼠體內的奈米顆粒的劑量而增大；若以碳黑處理的老鼠肺臟則屬正常，而灌注石英粉末的老鼠肺臟也只顯現輕微的發炎現象。另外，支氣管發炎以及壞疽延伸肺泡膜的現象也在這個研究被觀察到。此研究結果提出警訊：當奈米碳管進入動物體內到達肺臟時，其毒性將大於碳黑和石英，這對於長期暴露在類似環境的工作人員可能會造成嚴重的職業健康危害。^[67] 在NIOSH等單位的研究中，把人的皮膚細胞與磨碎的單層碳奈米管的液體共同培養18個小時。結果發現皮膚細胞抗氧化機能衰退及細胞死亡等現象。^[68]

來自美國太空總署休士頓太空中心的John T. James與其同僚，將奈米碳球噴入老鼠的呼吸道，並於一週與三個月後進行檢驗。結果發現儘管類似煤煙的奈米碳球不會對動物體造成傷害，但卻會顯著的損及肺部組織，甚至因此導致老鼠的死亡。美國西維吉尼亞州國家職業安全與健康協會的Petia Simeonova與其同事，也觀察到接受一定劑量碳奈米管的老鼠會產生富含微粒的肺肉芽腫(granulomas)，由於粒線體傷害為動脈硬(atherosclerosis)的先兆，因此研究人員也對心臟與主動脈細胞的粒線體DNA進行損害檢查。^[69]

羅徹斯特大學Alison Elder教授的研究結果顯示，吸入碳奈米球的兔子，其血液凝塊的敏感性大為增加。研究人員首先以雷射照射對照組兔子的耳朵血管(在呼吸新鮮空氣的條件下)，發現兩天之後血液會凝塊；為了模擬都市空氣微粒污染，研究人員將兔子暴露於每立方米70微克奈米球體微粒的空氣超過三小時，再觀察發生血液凝塊的時間。結果發現攝入奈米微粒的兔子，在一天內即發生血液凝塊現象。^[70]

(三) 氧化鈦奈米粒子導致老鼠肺損傷

二氧化鈦奈米粒子被廣泛地使用在空氣清淨機或奈米光觸媒口罩。然而，當這些奈米粒子進入動物體內時，卻極有可能會造成肺部的損傷。Chen et al在2006年發表在*FASEB Journal*的文章^[71]，主要以研究奈米二氧化鈦的肺部毒性，研究結果發現二氧化鈦奈米粒子去確實會引發實驗老鼠的肺損害(emphysema-like lung injury)。美國癌症研究協會的科學家將老鼠暴露在0.1或0.5mg奈米二氧化鈦(19-21 nm)環境中，分別在三天、一周、二周後收集其肺臟組織作微陣列基因表現和途徑分析。結果顯示奈米二氧化鈦會導致嚴重地肺氣腫、巨噬細胞累積、肺泡隔膜大規模分解、胎盤生長因子 (PIGF)活化及發炎現象。

(四) C₆₀造成DNA畸形

巴克球(Buckyball)在生物學和藥理學上有許多重要的應用，可視為奈米科技應用的建築塊材之一。但是近年越來越多研究^[72,73]顯示巴克球也可能對動物體或自然環境造成傷害。由美國田納西州Vanderbilt大學Oak Ridge國家實驗室的電腦模擬顯示^[74]，巴克球對動物DNA有強烈的吸引力，能夠破壞DNA中鹼基對的氫鍵而造成DNA分子的變形。這將會嚴重地影響生物體的正常運用，造成DNA複製錯誤、自我修復失調，進而導致基因缺陷疾病的形成。Eva Oberdorster教授的研究數據顯示，池水中的巴克球殺死了水跳蚤，並損傷了魚的大腦。在解剖魚腦組織時發現從魚腮流入的巴克球，導致魚腦損壞增加了17倍。^[72]

(五) 量子點的危害

量子點是半導體奈米晶體(2~100nm)，具有獨特的光、電特性。於近期應用在生醫影像技術和電子工業。雖然此新穎的奈米物質提供了高價值的科學利益，但是量子點亦可能造成人體健康與環境上的潛在危機。

量子點可能藉由吸收、擴散、代謝等方式累積在動物組織或器官。雖然並非所有的量子點都會危害動物體，其毒性和個別的物理化學性質以及週遭環境條件有關；量子點的大小、表面電荷分析、使用濃度、表面是否塗佈生物活性物質(如氨基酸或蛋白質)、氧化性、光分解性、和機械穩定性，都與量子點的毒性有關。^[75]

由於量子點的主要成分為鎘(Cd)和硒(Se)，或其他的過渡金屬。這類成分對人體健康和環境的影響甚鉅。^[75] 例如鎘金屬是可能的致癌物質，它在人體的半生期為15-20年，故可長期累積在生物體內。鎘金屬被發現可以穿越血腦屏障(Blood Brain Barrier)和胎盤，藉由系統性擴散到全身的組織，尤其是肝臟和腎臟。硒曾被報導為人體不可缺少的微量元素；在生物體內，尤其是人體內發揮著十分重要的生物學功能和免疫功能，適量補充硒的攝入量對維持身體健康，防治某些疾病。然而硒也被發現會對環境造成污染。在美國加州Lake Belevs，被發現有嚴重的硒污染。而棲息在此地區的Kesterson (隼)，被發現有大量的硒累積於體內，當地的生態系統破壞。^[76]

(六) 奈米銀對土壤、水、和人體健康的威脅

銀奈米粒子的抗菌特性使之被普遍應用在民生產業。市面上出現越來越多奈米銀的相關產品，例如食品包裝、家庭用具、醫療設備等。銀奈米粒子到底會不會對人體健康和環境帶來風險或危害？

當奈米銀作為抗菌劑時，會對以細菌為基礎的生態產生威脅。自然界中的細菌可大致分為益菌及壞菌。土壤細菌在固氮上扮演重要的角色，細菌和豆科植物形成共生的關係提供固氮的重要來源，益菌對於土壤、植物和動物健康是重要且必須的。然而以奈米銀當抗菌劑的氾濫潮流的確潛藏著增加壞菌的抵抗性，同時也威脅自然界中的益菌的生存。

使用奈米銀的尺寸範圍多集中在1~50 nm，在如此小的尺寸下使得奈米銀的比表面積(表面積/體積)值相對增大。當比表面積增大也將同時增加奈米物質的活性、及潛在的毒性。例如，Elechiguerra et al 在2005年發表一篇文章在Journal of Nanobiotechnology期刊上，研究結果證明當奈米銀尺寸在1-10 nm下，會與HIV-I virus交互作用。可以抑制病毒與宿主細胞相結合。^[77]

即使尺寸大於奈米等級，銀對於魚類、海藻、甲殼綱動物、部份植物、真菌及細菌，也有很大的毒性。相較於其他貴重金屬，銀在低濃度下具有抑制微生物的生長的能力^[78]，而奈米銀的毒性又高於非奈米等級的銀。In vitro 研究證實奈米等級的銀會對哺乳動物的肝細胞、幹細胞、甚至是腦細胞產生毒性。^[78,79,80]

美國食品和藥物檢驗局(FDA)在1999年發出警示，若攝取膠體銀溶液被發現造成銀中毒，皮膚表面或深層組織將出現藍灰不正常的變色(“use of colloidal silver solutions has resulted in cases of argyria, a permanent blue-gray discoloration of the skin and deep tissues.”)^[81] 此外另有文獻報導，若攝取膠體銀溶液(微米或奈米銀粒子在膠體溶液中懸浮)會導致神經方面的疾病、腎臟損害、腸胃不適、頭痛、疲勞、甚至是皮膚發炎。^[82,83]

(七) 奈米錳粒子對中樞神經系統的傷害

大量生產錳金屬或粉末的工業包括，鋼和非鋼合金工業、電池製造、著色劑、催化劑、焊接液、金屬塗佈等。報導指出，暴露在錳奈米粒子環境下可能造成神經毒害。^[84,85] 據研究指出，若將錳奈米粒子(40 nm)與PC-12細胞(為神經內分泌細胞株，可分泌神經傳導素，多巴胺(dopamine))一起培養12小時。結果證實奈米錳氧化物粒子明顯消耗釋出的多巴胺和它的代謝物(dihydroxyphenylacetic (DOPAC), homovanillic acid(HVA))。此外，40 nm大小的錳奈米粒子被發現誘發大量活性氧物種(reactive oxygen species, ROS)的產生。這代表和錳奈米粒子共同培養的PC-12 細胞必須承受來自ROS的氧化壓力(oxidative stress)。^[80]

(八) 總結

加拿大ETC Group藉由所收集到之奈米材料對人體健康危害之相關資訊，呼籲全球重視奈米技術或材料可能對人體健康和環境產生的危害。ETC Group主張，在政府無法有萬全的法規防範，及能力回應此新科技潛在的風險之前，全球應該暫緩奈米技術或奈米材料的發展；更重要的是急需發展一套新技術評估國際公約(International Convention for the Evaluation of New Technology, ICENT)。

目前已知奈米材料毒性特性，可分項簡述如下^[86]：

1. 奈米微粒會累積於有機體中，容易被活細胞吸收。如果連細菌可以吸收奈米材料，則會隨之進入食物鏈中。
2. 奈米微粒如果存在血液中，血液中的蛋白質將有機會包覆於奈米微粒的表面，進而造成蛋白質形狀與功能的改變。

3. 奈米碳管在自然環境中傾向於聚集成塊，而非呈纖維狀。然而一但在特殊的環境中解離成單一的纖維狀，有可能和石棉一樣引起嚴重的呼吸系統問題。

4. 純碳的奈米級產品(奈米碳管或微粒)進入細胞時，並無法觀察到細胞釋放一氧化氮而引發發炎反應。免疫反應也並沒有伴隨而生。

八、奈米的防護

(一) 前言

奈米物質之所以會對人體健康或環境造成危害，很可能是因為它們與生俱來的化學組成(如，重金屬)或僅因為奈米的尺寸造成其性質與塊材的改變。我們若能在奈米物質的表面作某些化學修飾，不但可以增加奈米物質的生物相容性(Biocompatibility)或生物可分解性(Biodegradability)。更有利於其與生物分子的鍵結。在生物標識和偵測上將更具應用性。

(二) 奈米碳管的表面修飾

單層奈米碳管的熱門，不僅限於其在電子學、光學、機械材料上的應用，還包含它在生物醫學科技上的應用，例如影像及藥物傳遞。^[87] 但是奈米碳管對環境和健康的危害仍在爭議中。因為奈米碳管的非水溶性，導致其易累積在細胞、組織、或器官中。溶解度的問題可以藉由多種非共價鍵或共價鍵的方法進行表面官能化修飾而解決^[88,89,90,91]，官能基修飾後的奈米碳管作可以獲得生物相容性的改善。^[92,93,94] 義大利 *Triest e* 大學藥學系的研究團隊利用 1,3-dipolar cycloaddition reaction 和 oxidation/amidation treatment 分別修飾奈米碳管，並觀察修飾後的奈米碳管對於老鼠免疫細胞的機能影響。結果顯示，官能化的奈米碳管並不會影響細胞的生存能力。^[92]

(三) 氧化鐵奈米粒子的衍生化

不同大小(10~500nm)、不同種類塗佈物質(dextran, starch, albumin, silicones, PEG)的磁性奈米粒子經常被合成，這類的細胞標識磁性奈米粒子被應用於細胞分離或動物影像技術。因為氧化鐵奈米粒子可以提高核磁共振影像(MRI)的訊號，所以長期以來磁性奈米粒子皆被使用於核磁共振照影用的造影劑。氧化鐵奈米粒子當作造影劑使用時，將被細胞捕捉攝入，因此氧化鐵奈米粒子的安全性極為重要。研究報導，使用不同的技術觀察葡萄聚糖(Dextran)衍化之磁性奈米粒子與未衍生化粒子葡萄聚糖(Dextran) 與人類皮膚纖維組織母細胞的

交互作用。結果指出，衍生過的氧化鐵奈米粒子改變細胞行為和形態。由此可知，細胞對於奈米粒子的反應將隨粒子塗佈的不同而不同。^[95]

(四) 複合奈米粒子

奈米粒子的性質取決於大小、組成和形狀，單一成分的奈米粒子只能藉由大小或結構的改變限制其應用範圍。若能結合其他材料進行表面或內部成分的調整，便有機會滿足各式各樣新穎的應用。^[96]

複合奈米粒子就是結合兩種或兩種以上的物質形成單粒，除了可以將多種功能結合，也可能產生新的特性以達成其他需求。例如，二氧化鈦和氧化鋅都是著名的紫外光遮蔽劑，最廣為人知的就是應用在化妝品中的防曬乳液的有效成份。由於二氧化鈦同時具有光觸媒的功效，在陽光照射下，所產生的電子電洞會和空氣中的氧氣或水分反應產生自由基。對於應用在殺菌或污染物分解固然有意義；但若使用於與皮膚接觸的化妝品，則有傷害人體健康的疑慮。目前市面上的奈米防曬產品為了改善上述問題，便在二氧化鈦或氧化鋅表面被覆二氧化矽奈米薄層，把照光時所產生的電子電洞侷限在粒子內部，降低自由基的形成。^[96]

把生物巨分子被覆在奈米粒子的表面上，稱為奈米粒子的生物官能基化，可以提高奈米粒子的功能性和生物辨識性，並廣泛地應用在生醫偵測和診斷治療上。例如，接上特定序列的去氧核糖核酸金奈米粒子可用以偵測炭疽病毒，在基因治療上也頗具潛力。此外，金奈米粒子獨特的光學性和生物相容性，可作為藥物或其他生物分子的載體。但這些微小粒子極難操縱和回收，如果在它們的內部埋藏一顆磁鐵，就能以外加磁場予以操控。像是在鐵或鎳等磁性奈米粒子表面被覆金奈米殼層，就是兼具有磁性和生物相容性的複合奈米粒子。增加了磁性標的功能和操控能力，延伸其應用性。^[97]

此外，若把金奈米粒子被覆於二氧化矽奈米粒子的表面上。當其厚度較大時，其特性吸收峰接近原本金奈米的520 nm；但隨著被覆厚度的降低，特性吸收峰會逐漸遷移到較長波長的近紅外光區。利用此一特性，可將之當成近紅外光的吸收物材。當複合奈米粒子受到近紅外光的激發後會產生足夠的熱量以殺死癌細胞。此法對人體傷害性低，因此可應該於光熱治療法。^[96,97]

(五) 量子點的防護

相較於有機染料或螢光蛋白，量子點具有獨特的光學與電子特性，藉由量子點大小可控制放光波長、增強訊號亮度、抗光漂白功能 (photobleaching)，以及加寬激發光譜波長範圍。由於單一波長可同

時激發不同放光波長的量子點，對生物醫學造影領域而言，是一道曙光，冀期增進生醫影像的解析度、及疾病診斷的靈敏度。但是，量子點的主要組成成分為重金屬鎘，具有已知生物毒性，所以需要藉由防護衍生反應對量子點進行外部修飾^[98,99]，以增進生物相容性。

Xiaohu Gao研究團隊以硫化鋅(ZnS)作外殼，包住中心的硒化鎘(CdSe)，形成直徑約 5 nm 的量子點，再包覆三團聯共聚物(triblock copolymer)及聚乙二醇(pol(ethylene glycol))聚合物。這些聚合物保護層可將量子點與酵素及其他生化分子隔離，有效防止具毒性的鎘(cadmium)及硒(selenium)金屬離子滲出，以減少生物毒性。

(六) 結語

奈米物質種類繁多、性質特殊。以金奈米粒子為例，當粒子的大小或形狀不同可分為金奈米粒子(Au nanoparticle)、金奈米線(Au nanowire)和金奈米桿(Au nanorod)等，又可因特殊需求而參雜各式官能基。因此即便是來自同源的奈米粒子，其毒性可能有極大的差異。若干動物實驗研究顯示，奈米物材可能透過不同途徑—呼吸、進食、皮膚吸收而進入體內。由於奈米微粒相當細小、佔據的表面積很大，所引發的發炎反應的程度或氧化壓力也可能顯著增加。面對如此多變且複雜的奈米物質，若純粹以容許濃度(PEL)為基準之管理模式，或單純建立各物質的物質安全資料表(MSD)似乎已不再適用。現階段急需政府相關單位輔同業界人士盡速建立一套創新的管理模式。在積極發展奈米科技的同時，必須謹慎且小心看待、審慎評估奈米產業對生物體或環境的危害。

九、主要參考文獻

1. 網頁資料，取自
<http://memo.cgu.edu.tw/yun-ju/CGUWeb/SciKnow/PhyNews/NanoMeter.htm> (accessed April 2007).
2. 網頁資料，取自 <http://www.nanotec.org.uk/Health%20final.pdf> (accessed March, 2007).
3. 網頁資料，取自
<http://tw.myblog.yahoo.com/leeaimei2/article?mid=3&prev=4&next=-1> (accessed April 2007).
4. 網頁資料，取自
<http://www.macdermidautotype.com/autotype.nsf/webfamiliesasia/AUTOFLEX%20OPTICAL%20FILMS> (accessed June 2007).
5. Roukes, M. 2001. Plenty of Room, Indeed. *Scientific American*. 9: 48-57.

6. 網頁資料，取自
http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/index_html/howsmall_html (accessed May 2007).
7. 林建中。2006年。奈米科技-基礎與實務 新文京開發出版社。台北。台灣。
8. 網頁資料，取自 http://nano.nchc.org.tw/dictionary/lotus_effect.html (accessed May 2007).
9. 呂世源。2002年。奈米新世界。科學發展。359 期，4-7 頁。
10. 網頁資料，取自
<http://www.chemtech.com.tw/Column.php?mode=detail&id=53> (accessed April 2007).
11. 網頁資料，取自
<http://nano-taiwan.sinica.edu.tw/HeadLineNewsDetailBig5.asp?NewsNo=2&DetailNo=865> (accessed April 2007).
12. Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56-58.
13. Dai, H., A. G. Rinzler., P. Nikolaev., A. Thess., D. T. Colbert. and R. E. Smalley. 1996. Single-Wall Nanotubes Produced by Metal-Catalyzed.
14. Tans, S. J., M. H. Devoret., H. Dai, H., A. Thess., R. E. Smalley., L. J. Geerligs. and C. Dekker. 1997. Individual single-wall carbon nanotubes as quantum wires. *Nature*. 386: 474 – 477.
15. 高逢時。2005年。奈米科技。科學發展。386 期。66-71 頁。
16. Zhu, Z. and D. I. 2003. Schuster. Molecular dynamics study of the connection between flap closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease. *Biochem*. 42: 1326-1333.
17. Bangham, A. D., M. M. Standish. and G. Weissmann. 1965. The action of steroids and Streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. Mol. Biol.* 13: 253-259.
18. New, R. R. C., Ed. 1990. *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, U.K.
19. Lurquin, P. F. 1984. In *Liposome Technology: Entrapment of Drugs and Other Materials*, Greroriadis, G. Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL. Vol. II, Chapter 8.
20. Shum, P., J. M. Kim. and D. H. Thompson. 2001. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 273-284.
21. Chen, D., D. L. Cole. and G. S. Srivatsa. 2000. Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 791-801.
22. Ahn-Yoon, S., T. R. DeCory., A. J. Baeumner. and R. A. Durst. 2003. Ganglioside-Liposome Immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Anal. Chem.* 75: 2256-2261.

23. Alfonta, L., I. Willner., D. J. Throckmorton. and A. K. Singh. 2001. Electrochemical and quartz crystal microbalance detection of the cholera toxin employing horseradish peroxidase and gM1-functionalized liposomes. *Anal. Chem.* 73: 5287-5295.
24. Esch, M. B., A. J. Baeumner. and R. A. Durst. 2001. detection of cryptosporidium parvum using oligonucleotide-tagged liposomes in a competitive assay format. *Anal. Chem.* 73: 3162-3167.
25. Ho, J-a A., H. W. Hsu. and M. R. Huang. 2004. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7. *Anal. Biochem.* 330: 342-349.
26. Ho, J-a A. and R. A. Durst. 2000a. Preparation of reagents for the determination of fumonisin B1 by flow-injection immunoanalysis. *Anal. Chimica Acta.* 414: 51-60.
27. Ho, J-a A. and R. A. Durst. 2000b. Development of a flow-injection liposome immunoanalysis system for fumonisin B1. *Anal. Chimica Acta.* 414: 61-69.
28. Ho, J-a A. and M. R. Huang. 2005. Application of a liposomal bioluminescent label in the development of a flow injection Immunoanalytical system. *Anal. Chem.* 77(11): 3431-3436.
29. Ho, J-a A. and H. W. Hsu. 2003. Procedures for preparing escherichia coli O157:H7 immunoliposome and its application in liposome Immunoassay. *Anal. Chem.* 75: 4330-4334.
30. Ho, J. A. and R. D. Wauchope. 2002. A strip liposome immunoassay for Aflatoxin B₁ *Anal. Chem.* 74: 1493-1496.
31. Ho, R. J. Y., B. T. Rouse. and L. Huang. 1986. Target-Sensitive Immunoliposomes: Preparation and Characterization *Biochem.* 25: 5500-5506.
32. Park, S. 1999. Development of immunoliposome-enhanced assays for detection of Escherichia coli O157:H7 in foods. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y.
33. Reeves, S. G., S. T. A. Siebert. M. A. Roberts. and R. A. Durst. 1995. *Trends Anal. Chem.* 14: 351-355.
34. Singh, A. K., S. H. Harrison. and J. S. Schoeniger. 2000. Gangliosides as receptors for biological toxins: Development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. *Anal. Chem.* 72: 6019 -6024.
35. 網頁資料，取自
http://www.liposome.com.tw/p_Liposome.asp?DisplayClass=1&Headrfnbr=12&Node=7 (accessed March, 2007).
36. Kurzweil, R. 2006. Reprogramming Biology: Tinkering with our genetic programs will extend longevity, *Scientific American.*
37. Xing, W. and J. Cheng. (Eds). 2003. *Biochips.* Springer Publishing Company, New York, USA.

38. Gilboa, E., M. A. Eglitis., P. W. Kantoff. and W. F. Anderson. 1986. Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques*. 4: 504-512.
39. Hamer, D. H. and P. Leder. 1979. Splicing and the formation of stable RNA *Cell*. 18: 1299-1302.
40. 崔福齋、王秀梅、胡堃。2006年。基因材料。新文京開發出版社。臺北縣。
41. 蔡信行、孫光中。2004年。奈米科技導論—基本原理及應用。181~182 頁，新文京開發出版社，台北，台灣。
42. 林建中。2004年。奈米科技—基礎與實務。新文京開發出版社，台北，台灣。
43. 北區奈米科技K-12 人才培育發展中心網頁。2007 年5 月29 日，取自 <http://k12n.nano.edu.tw/world/20050408.htm>.
44. Wu, C. M., H. L. Chen., W. Liou., T. L. Lin. and U. S. Jeng. 2004. DNA-Induced Aggregation of Zwitterionic Oligolamellar Liposome. *Biomacromolecules*. 5: 2324-2328.
45. Janoff, A. S. 1999. *Liposome: Rational Design*. 1st Ed, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA.
46. Riché, E. L., B. W. Erickson. and M. J. Cho. 2004. *J. Drug Target*. 12: 355-161.
47. Rider, T. H., M. S. Petrovick., F. E. Nargi., J. D. Harper., E. D. Schwoebel., R. H. Mathews. D. J. Blanchard., L. T. Bortolin., A. M. Young., J. Chen. and M. A. Hollis. 2003. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science*. 301: 213-215.
48. Nohynek, G. J., J. Lademann., C. Ribaud. and M. S. Roberts. 2007. Grey Goo on the Skin Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety, *Crit Rev in Toxicol*. 37: 251-277.
49. 網頁資料，取自 <http://www.ntrc.itri.org.tw/dict/content.jsp?newsid=618> (accessed June, 2007).
50. 網頁資料，取自 <http://www.ntrc.itri.org.tw/dict/content.jsp?newsid=347> (accessed March, 2007).
51. 網頁資料，取自 <http://www.ntrc.itri.org.tw/dict/content.jsp?newsid=348> (accessed March, 2007).
52. 網頁資料，取自 <http://www.ntrc.itri.org.tw/dict/content.jsp?newsid=350> (accessed March,2007).
53. Subramoney, S. 1997. Novel Nanocarbons - Structure, Properties, and Potential Applications. *Adv. Mater*. 10(5): 1157-1171.

54. Lin, C., Y. Lin., C. Chang., W. Chen., S. Cheng. Y. Wang., S. Lin. and S. Lee. 2007. Photodecomposition of methylene-blue by highly-dispersed nano TiO₂/Ag catalyst. *React Kinet Catal Lett.* 90(2):267-273.
55. Mao, L., H. Dang., and Z. A. Zhang. 2005. Study on the Photodecomposition of Active Dye in a Baffled Fixed-Bed Reactor. *Environ. Engineering. Sci.* 22 (5): 660 –665.
56. Joy, B. Why the future doesn't need us, 2004, 8.04 (source: <http://www.wired.com/wired/archive/8.04/joy.html> 13may04).
57. Crichton, M. 2002. *Prey*. HarperCollins, UK.
58. 網頁資料，取自 <http://www.iosh.gov.tw/data/f5/news941031.htm> (accessed April 2007).
59. July, 2004. The Royal Society and The Royal Academy of Engineering, Possible adverse Health Environmental and Safety impacts..
60. 劉佩嘉、俞宗欽、麥富德。2005年。奈米粒子暴露對生物體及環境的可能影響。化工資訊與商情。29期: 51-53頁。
61. 網頁資料，取自 <http://www.nanotec.org.uk/report/chapter5.pdf>。
62. Nemmar, A., P. H. Hoet., B. Vanquickenborne. D. dinsdale. M. Thomeer., M. F. Hoylaerts., H. Vanbilloen., L. Mortelmans. and B. Nemery. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 105: 411-414.
63. 劉佩嘉、俞宗欽、麥富德。2005年。奈米粒子對人體健康的可能影響。化工資訊與商情，28期: 52-55頁。
64. Oberdörster, G., Z. Sharp., V. Atudorei., A. Elder. R. Gelein. and W. Kreyling W. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 16: 437-445.
65. Brown, J. S., K. L. Zaerman. and W. D. Bennett. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the health and obstructed lung, *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 1240-1247.
66. 網頁資料，取自 http://www.sciscape.org/news_detail.php?news_id=651 (accessed April, 2007).
67. Lam, C. W., J. T. James., R. McCluskey. and R. L. Hunter. 2003. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77: 126-134.
68. Shvedova, A., V. Castranova., E. and D. Kisin. 2003. Schwegler-Berry; Murray A.; Gandelsman, V.; Maynard, A.; Baron, P. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. *J Toxicol. Environment. Health, Part A.* 66(20): 1909-1926.
69. Li, Z., T. Hulderman., R. Salmen., R. Chapman., S. S. Leonard., S.

- Young, A. Shvedova., M. I. Luster. and P. P. Simeonova. 2007. Cardiovascular Effects of Pulmonary Exposure to Single-Wall Carbon Nanotubes. *Environ Health Perspect.* 115(3): 377–382.
70. 網頁資料，取自
http://www.sciscape.org/news_detail.php?news_id=1742 (accessed June,2007).
71. Chen, H., S. Su., C. Chien., W. Lin., S. Yu., C. Chou., J. J. W. Chen. and P. Yang. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice .*The FASEB Journal.* 20: 2393-2395.
72. Oberdorster, E. 2004. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile large mouth Bass. *Environ. Health Perspect.* 112: 1058–1062.
73. Bosi, S., L. Feruglio., T. D. Ros., G. Spalluto., B. Gregoretti., M. Terdoslavich., G. Decorti., S. Passamonti, S. Moro, and M. Prato. 2004. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *J. Med. Chem.* 47: 6711–6715.
74. Zhao, X., A. Striolo., and P. T. Cummings. 2005. C60 Binds to and Deforms Nucleotides. *Biophys. J.* 89: 3856-3862.
75. Hardman, R. 2006. A Toxicologic Review of Quantum Dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *environ health perspect.* 114 (2): 165-172.
76. Steven, P.C.; Van Derveer W.D. 1997. Selenium toxicity to aquatic life: An argument for sediment for sediment-based water quality criteria, *Environ. Tox. Chem.*, , 16(6), 1255–1259.
77. Elechiguerra, J. L., J. L. Burt., J. R. Morones., A. Camacho-Bragado., X. Gao., H. H. Lara. and M. J. Yacaman. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotech.* 3: 6-17.
78. Braydich-Stolle, L., S. Hussain., J. J. Schlager. and M. Hofmann. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells *Toxicol. Sci.* 88(2): 412–419.
79. Hussain, S. M., K. L. Hess., J. M. Gearhart., K. T. Geiss. and J. J. Schlager. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro.* 19: 975–983.
80. Hussain, S. M., M. K. Javorina., A. M. Schrand., H. M. Duhart., S. F. Ali. and J. J. Schlager. 2006. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells Induces dopamine depletion. *Toxicol. Sci.* 92(2): 56–463.
81. 網頁資料，取自FDA issues final ruling on OTC products containing colloidal silver (1999).
<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00971.html> (accessed March 2007).
82. White, J. M., A. M. Powell. and K. Brady. 2003. Severe generalized

- argyria secondary to ingestion of colloidal silver protein. *Clin. Experiment. Derm.* 28(3): 254-256.
83. Hori, K., T. G. Martin. and P. Rainey. 2002. Believe it or not--silver still poisons. *Vet. Human Toxicol.* 44(5): 291-292.
 84. Aschner, M., K. M. Erikson. and D. C. Dorman. 2005. Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 35: 1-32.
 85. Jayakumar, A. R., K. V. Rama Rao., P. Kalaiselvi. and M. D. Norenberg. 2004. Combined effects of ammonia and manganese on astrocytes in culture. *Neurochem. Res.* 11: 2051-2056.
 86. 網頁資料，取自
http://ivy2.epa.gov.tw/out_web/cooperation/nanotech/ch_db/04_Paper/data%20/papre_05/paper_05_01.htm (accessed January 2007).
 87. Cherukuri, P., S. W. Bachilo., S. H. Litovsky. and R. B. Weisman. 2004. Near infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc.* 126:15638-15639.
 88. Sun, Y. P., W. Huang., Y. Lin., K. Fu., A. Kitaygorodskiy., L. A. Riddle., Y. J. Yu. and D. L. Carroll. 2001. Soluble dendron-functionalized carbon nanotubes: preparation, characterization, and properties. *Chem. Mater.* 13: 2864-2869.
 89. Peng, H., L. B. Alemany., J. L. Margrave. and V. N. Khabashesku. 2003. Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 15174-15182.
 90. Bandow, S.; A. M. Rao., K. A. Williams., A. Thess., R. E. Smalley., P. C. Eklund. 1997. Purification of Single-Wall Carbon Nanotubes by Microfiltration. *J. Phys. Chem. B.* 101: 8839-8842.
 91. O'Connell, M. J., P. Boul., L. M. Ericson., C. Huffman., Y. Wang., E. Haroz., C. Kuper., J. Tour., K. D. Ausman. and R. E. Smalley. 2001. Reversible watersolubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chem. Phys. Lett.* 342: 265-271.
 92. Sayes, C. M., F. Liang., J. L. Hudson., J. Mendez., W. Guo., J. M. Beach., V. C. Moore., C. D. Doyle., J. L. West. W. E. Billups. K. D. Ausman., V. L. Colvin. 2006. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol. Lett.* 161: 135-142.
 93. Nimmagadda, A., K. Thurston., M. U. Nollert. and P. S. McFetridge. 2006. Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions. *J. Biomed. Mater. Res.* 76A: 614-625.
 94. Murugesan, S., T. J. Park., H. Yang., S. Mousa. and R. J. Linhardt. 2006. Blood Compatible Carbon Nanotubes - Nano-based Neoproteoglycans. *Langmuir.* 22: 3461-3463.
 95. Berry, C. C., S. Wells., S. Charles., G. Aitchison. and A. S. G. Curtis. 2004. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles

- post internalization. *Biomaterials* 25: 5405-5413.
96. 陳東煌。2006年。複合奈米粒子—有趣的人造原子。科學發展，408期，40-45頁。
 97. Ge, Z., Y. Kang., T. A. Taton., P. V. Braun. and D. G. Cahill. 2005. Thermal Transport in Au-Core Polymer-Shell Nanoparticles. *Nano Lett.* 5(3): 531-535.
 98. Gao, X.; Y. Cui., R. M. Levenson., L. W. K. Chung. and S. Nie. 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotech.* 20: 969-976.
 99. Derfus, A. M., W. C. W. Chan. S. N. Bhatia. 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots *Nano Lett.* 4: 11-18.
 100. 網頁資料，取自 Joy, B. 2004. Why the future doesn't need us. 8.04 (source: <http://www.wired.com/wired/archive/8.04/joy.html> 13may04)
 101. 網頁資料，取自 <http://www.sciam.com/article.cfm?chanID=sa006&colID=32&articleID=0002DDF5-EE0C-1492-A7CE83414B7F0000>, (accessed May 2007)
 102. Canton, S. P., Van Derveer, W. D. 1997. Selenium toxicity to aquatic life: An argument for sediment for sediment-based water quality criteria, *Environ. Tox. Chem.* 16(6): 1255–1259
 103. Disproportionation of Carbon Monoxide. *Chem Phys Lett.* 260: 471-475
 104. Rongen, H. A. H., A. Bult. and W. P. van Bennekom. 1997. Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 204: 105-133

第十四章 生醫奈米的科技產業觀

吳炳慶 國立成功大學基礎醫學研究所

謝達斌副教授 國立成功大學口腔醫學研究所

一、前言

人類擁有追求新知和改進生活品質願望的能力，造成了文明演化和經濟成長的動力。過去幾個世紀由於科學家積極不斷的努力，使得人類開始擁有像自然一般由巨觀到微觀的嶄新科技發展模式--奈米科技。奈米科學是一個充滿想像力的領域，當今每個人幾乎都聽過奈米機器人、奈米藥物或是治療等等的方法，事實上我們在不知不覺中已經把奈米科技定位成一個長程的遠大理想。而其實也已經有很多實用的奈米技術被運用到如紡織品、塗料、金屬、塑化產品等產業；更不用說運用在攸關國家競爭力的資訊與通訊產業。奈米科技的迅速發展產生了推動這些產業往前推進的爆炸性力量，在接下來的幾年內，我們就會進入奈米科技的蓬勃發展時代，這種趨勢已經使得各國不敢輕忽其所帶來的巨大市場，更可以看成決定著一個國家競爭力的重大因素。我們何其有幸的處在這個可以開始探索奈米奧妙的時代。

奈米(nanometer)是一個長度的單位。1奈米=十億分之1米(10^{-9} meter)，約為分子或DNA的大小，或是頭髮寬度的十萬分之一。根據量子力學與量子統計學的法則，任何物質皆存在著粒子與波的雙重性。在巨觀中，這些特性皆可以忽略不計，但在微觀的世界裡，當尺寸縮小到奈米尺度時，其所含的原子數只約在幾十到上百萬個之間，此時，物質不再具有週期性的結構特徵，量子效應將會主導其物性行為。而奈米的幾何結構與表面積之間的相互作用，將會展現出全然不同的物理、化學特性或現象。以大家都熟悉的金銀為例，奈米化後，金在水溶液中變成紫紅色，銀則變成棕褐色，吸收光譜的特性峰分別落在波長520與410奈米附近。如果把金、銀製成屬於內部混合型結構的合金奈米粒子，發現隨著金含量的增加，特性吸收峰會由400偏移至520奈米並以線性方式移動，這說明了光學性質因尺度與組成成份的不同而有所變化。又如石墨因質地柔軟而被用來製作鉛筆筆芯，但同樣由碳元素構成、結構相似的碳奈米管，強度竟然遠高於不銹鋼，又具有良好的彈性，因此成為顯微探針及微電極的絕佳材料。如何掌握並明確的了解運用這些奈米結構，並進一步將其發展成具有特殊功能的材料或零件，將會是奈米科技產業發展的一個重大目標。

二、從生醫科技到生醫奈米科技

雖然奈米科技已經日益成熟，各種不同大小、形狀的奈米尺度金

屬已經可以製備出來，但這些奈米粒子都屬於無機物，與生物體間須考慮相容性。而另一方面，以現時技術而言，要合成出像自然界活生生存在的奈米元件如：濾過性病毒，具有複雜的辨識功能與自我重組能力的奈米元件仍然非常困難。所以奈米科學家轉而向大自然取材。舉例而言，例如M13噬菌體。這種瘦長的病毒寄生在細菌內，但對人類無害。M13的直徑約六奈米，長約一微米，其單股DNA包覆在蛋白質外殼裡。病毒的纖長外殼是由2700個一樣的蛋白質所構成，外殼兩端各連接著數個其他種蛋白質。科學家利用基因工程技術使M13兩端的幾種蛋白質都可加以改造，讓原來單一種病毒衍生為具有不同頭尾蛋白質的病毒群，而此種變異的排列組合方式可高達數十億種，並且每一種都擁有特定的化學親和力，如此便得到所謂的「噬菌體呈現技術庫」(phage display library)，裡面含有各式各樣的噬菌體變異株。在此一病毒群中，單一個病毒可能以變異端與特定物質結合，以某一端與另一種物質結合，而再以另一端與再另一種物質結合形成奈米尺度下的橋接。生物學家運用這種化學專一性已經有一段時日，他們利用M13與特定的有機物質結合，辨識未知之樣本。近年來也證明了這種病毒工程也能標示並操作無機分子。例如位於眾多實用產品核心地帶的金屬與半導體科技的應用。首先在燒杯裡固定好特定物質，再把「噬菌體呈現技術庫」中幾億種的噬菌體置入混合，加以沖洗，將結合力較弱的病毒移除，而留下能緊密與這物質結合的病毒株。再藉由改變反應環境降低這些病毒表面與特定物質的交互作用，而把結合在該物質上的病毒分離下來。接著以感染宿主細菌，變成能將與特定物質具專一結合力的噬菌體增殖。利用病毒高速增值的特性，噬菌體能在短時間內由少量增殖為數兆個，供下一階段之結合力強化篩選。最後得到單一噬菌體變異株，也就是對特定物質附著力最強的一株。利用這個方法，美國的貝契博士曾得到一株專門吸附黃金的噬菌體，當置於內含金離子的溶液，病毒就會把自己鍍成一條一微米長的黃金線，並成為適合用來連接奈微電路裡相鄰元件的導線。而另外有一變異株，會與同伴彼此相連，組成長達數公分的黃金奈米絲線。若與其他對化學物質敏感的接收器相接，也許可用來偵測有毒或具生物威脅性的物質。神奇的是，不管是什麼元素和化合物，似乎都有特定病毒株能辦法加以區別。例如有一種病毒就對砷化鎵半導體具有專一性，但對其近親氮化鎵卻毫無反應，這種辨識力或許可用來偵測晶片的瑕疵。再舉一例，晶片廠商有時會在一種半導體上建構另一種物質的晶體，由於兩種物質的晶格間距略有差異，所以會產生機械應變，並改變電子的行為。但晶體之間若無法適當嚙合，有些原子可能凸出到它原本不該出現的位置，從而成為可與病毒結合的缺陷處。如果有個病毒帶有螢光標記，在適當的狀況下會發光，這時只要一部顯微鏡，就

能定位出缺陷所在。利用大自然的工具連接奈米材料，正為生醫奈米發展的潛力開啟新的道路。

三、生醫奈米產品及市場分析

近十年來，科學家結合生物分子技術，將其結合到dendrimer、奈米碳管、奈米有機或無機微粒、量子點等等奈米材料後，將其運用到醫療檢測、藥物釋放、基因治療、磁振造影等等領域。另外，仿生物感測元件更是結合奈米材料發展後不可限量的新興領域，其中令人矚目的成就有像人造肌肉、人工神經等元件。根據陳家俊教授所著的“奈米生醫之技術地圖”之分類，奈米生醫依市場分類方式分為生醫分析、生醫檢測、生醫材料、生醫藥等四個大市場。依照功能性來看，則可以分為診斷、治療及生醫組織工程等三大領域。本章將就這三大領域簡單介紹幾個重要的生醫奈米應用概念，來讓讀者知道為什麼生醫奈米的科技會對我們以後的生活造成革命，及建立生醫奈米的科技產業關是多麼的重要。

四、奈米生醫技術在疾病診斷方面的發展

(一)金奈米與DNA的結合

在奈米科技領域中，其中一研究方向是以奈米材料與生醫檢測技術整合為出發點，利用各種形狀不同、大小相異的奈米粒子，經過特定化學物修飾後，可與特定之生物分子反應，或與特定生物物質結合後，藉由生物物質的專一辨識特性，達到特定的生物標識物辨識，上述之奈米微粒藉由本身所具備之物理特性，如光性、磁性、電性，提供偵測之訊號，此即為分子感測。就生醫領域應用範疇而言，奈米微粒之分子感測目標物，由細胞核中之DNA、到細胞質中之RNA、蛋白質、特定細胞與細胞外之分子等，因而提高診斷與檢測的正確度與靈敏度。而利用奈米粒子所具備的特性，將不需要太精密的儀器，甚至用肉眼就可以判斷出檢測的檢果。這方面的生醫產品包括有生醫檢測儀器、生醫檢測試劑、生物晶片等等。以生物晶片而言，結合奈米技術平台的發展，可以縮小晶片體積，結合奈米微粒的量子點具多種顏色效應，有助於提高檢測的靈敏度，將其應用至基因單一核甘酸的檢測，將可以提供更確實且迅速的結果。在1997年美國西北大學的Mirkin教授實驗團隊則利用金奈米粒子與在不同長度的DNA序列上修飾發光團，藉著發出不同光的特性使其變成生化感測器。在1998年提出如果分別將不互補的DNA序列修飾至金奈米粒子表面，再加入互補的DNA序列，此時DNA的雜交特性會行成自組裝結構，也就是

說原本的奈米顆粒將會自組裝成為大分子而改變其顏色，你將可以用肉眼就觀察出DNA的存在，非常適合發展為基因篩檢的生物檢測晶片。2003年Mirkin教授實驗團隊則將抗體修飾在金奈米粒子與帶有磁性的氧化鐵奈米粒子的表面，將其變成探針，成功的偵測到前列腺特異抗原，進而可以分析出是否罹患前列腺癌。另人驚訝的是這種方法即使是在 $3 \times 10^{-18} \text{M}$ 這麼低的濃度下也可以偵測到蛋白質，顯示其優異的靈敏度。如今已有廠商把DNA與金奈米粒子做成微陣列，目前已是新藥開發的主力。

(二)磁性奈米顆粒在體內造影的應用

自1980年後，磁振影像(MRI)之成像方法因為可以觀察活體三度空間的斷層影像而普遍地應用於醫學領域上。除此之外，磁振影像擷取影像時可以適當控制而得到不同參數下的影像，如溫度、流場(flow)、水含量、分子擴散(diffusion)、灌注(perfusion)、化學位移(chemical shift)、功能性(functional MRI)及不同核種如氫、碳、磷等影像。新型MRI掃描儀更能在短時間內將全身從頭到腳一次「看透透」，此一重要發明令MRI發明人獲得2003年度諾貝爾醫學獎。MRI能呈現具體的多方向切面影像。它對腦部、頸部、脊椎脊髓、心臟血管、腹部器官、關節…等處的病變，包括腫瘤、退化、萎縮、損傷、發炎、先天性異常…等狀況，都有優良診斷功能。新型MRI掃描儀更不需要用到導管手術，就能明確評估和腦中風有關的頸動脈狹窄，或會隨時爆裂的腦動脈瘤。近年來，MRI技術之發展，除了掃描儀器設備之改善進步外，另一個重要發展方向即為顯影劑之開發。早期發展的顯影劑幾乎都具有高毒性，其市場價格亦居高，因此近年來，一直不斷嘗試發展新的顯影劑，其中尤以超順磁性顯影劑發展最為突出。其磁性僅存在於外界具有磁場時，外界磁場消失時即不具有磁性，顯影劑粒子不會產生聚集現象，因而降低顯影劑本身之偽陽性訊號產生，目前市面上已有超順磁性氧化鐵顯影劑開發成功。

超順磁性氧化鐵顯影劑(superparamagnetic iron oxide agents, SPIO)在過去幾十年來一直被廣泛的研究，其主要特性是以氧化鐵分子晶體作為顯影劑分子，其晶體內之磁力總和等於零，唯有外界磁場存在時，才具有同方向之磁性，當外界磁場消失時因為其大小不足以維持各氧化鐵分子之一致磁向量因此不具有總和之磁性，可減少偽訊號之產生，增加造影之準確性以及靈敏度。而隨著這些顯影劑中氧化鐵的顆粒於奈米尺寸之中，隨其顆粒大小不同，具有不同的藥物動力學性質，而適用於不同器官及組織織造影，因而在臨床上的應用也有所不同。超順磁性氧化鐵晶體結構具有 $\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3\text{M}^{2+}\text{O}$ 之化學通式，其中 M^{2+} 是泛指兩價之金屬離子，例如：鐵、錳、鎳、鈷及鎂等金屬離

子。一般而言，隨著奈米技術的進步，單晶體氧化鐵奈米粒子(MION)已經在實驗開發成功。MION為一種單晶體氧化鐵奈米粒子，其顆粒大小非常小，約為 $2.8 \pm 0.9\text{nm}$ ，極容易於細胞間通透移動，適用於帶有特定分子之細胞組織之造影，例如：用於具有特定分子之腫瘤細胞組織造影；MION技術其應用將會擴大造影診斷範圍，提高準確度及可靠性，並可能透過造影了解體內特定分子之代謝途徑，輔助治療，將造影診斷醫學帶入另一境界。

2007年台灣國家衛生院合成了以氧化鐵奈米粒子為核心(core)，外圍再以矽為外殼包裹形成一個約50奈米大小的超順磁性奈米粒子。在此超順磁性奈米粒子表面又以螢光分子修飾，形成了一個兼具螢光特性及超順磁性的雙效(bifunctional)可偵測性粒子，簡稱為SPIO@SiO₂(FITC)。該團隊將SPIO@SiO₂(FITC)用於幹細胞的標定研究，發現SPIO@SiO₂(FITC)可在低濃度而且很短的作用時間進入人類幹細胞中，而經由SPIO@SiO₂(FITC)標定過的幹細胞可在極少的細胞數條件下，以臨床上最常用的低磁場強度(1.5T)的磁振造影系統進行活體外甚至是動物體內的偵測。同時，這些標定過的幹細胞的細胞存活度、細胞生長情況，以及細胞分化能力，並不受其內部SPIO@SiO₂(FITC)的影響。這是第一個以人類幹細胞為研究模式，可以同時達到低奈米粒子濃度、作用時間短、偵測所需細胞數少並且是以臨床可用之磁振造影系統偵測等諸多高細胞標定率的條件，又符合目前細胞安全標準的超順磁性奈米粒子。這些研究進展，不只將有助於日後幹細胞用於臨床治療時的追蹤，以利評估療效鑑定，也可提供一個新契機，發展更合用之超順磁性奈米粒子；同時，也能在其他奈米醫學研究上，開拓新的應用價值。這些研究發現已發表於Nano Letters 7: 149-154, 2007。

由於MRI造影技術在影像診斷醫學上日漸普及，MRI顯影劑市場在近幾年來正不斷地快速成長中，伴隨著分子醫學的發展，以不同器官組織具有之不同特定分子辨識所進行造影技術也蓬勃發展中，如Advanced Magnetism, Inc.研發之器官特異性(organ-specific)顯影劑在2001年上半年度銷售總額即達六千一百萬美元，較2000年成長50%。此外，隨著MRI顯影劑市場的市場的蓬勃發展，在可預見的未來，會有愈來愈多的公司投入研發進而進入市場，也需要朝向發展更安全、更準確、更靈敏及成本更低之顯影劑，而超順磁性氧化鐵顯影劑即具有上述這些優點，加上積極研發單晶體氧化鐵奈米粒子(Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles, MION)修飾上一些與特異蛋白質、酵素能結合之結合子或抗體化基因探針，將可以偵測一些病變組織所產生的特異性核酸和蛋白質，能夠呈現特定組織活動時所產生的活性影像，這不僅對疾病的早期偵測有很大的幫助，對於新藥的

研發也有莫大的幫助。相信接下來的幾年裡，很快就可見到超順磁性氧化鐵的亮麗表現。

其他如在國內的工研院生醫工程中心則自行設計與合成新型磁性奈米微粒，並能合成親水性螢光半導體奈米微粒及攜帶Gd離子之枝狀體(dendrimer)，將新型磁性奈米微粒做為磁振造影劑；將螢光奈米微粒鍵結脂質蛋白ApolipoproteinE，可為心血管疾病以及阿茲海默症(Alzheimer's Disease)之檢測開發新方向；在奈米微粒上修飾可與感應葡萄糖分子進行可逆反應之技術，則成為血糖監測之創新技術。國內糖尿病患者眾多，血糖檢測具有廣大的市場，開發可長期與即時檢測並減少侵入程度的檢測方式，市場商機無可限量。

五、奈米生醫技術在疾病治療方面的發展

近年來全球之新藥物開發的速度已大幅加快，特別是在進入基因體圖譜計畫後期及生物資訊的蓬勃發展的當今，許多從前未知的蛋白質分子的功能，得以迅速發現與判別分類，無形中大大增加了藥物開發標的(Targets)的篩選效率。而各種高速篩檢的工具的層出不窮，也使得找到可能的新藥機率大增。這些新方法所開發出的藥，因為有學理上的依據，通常具有更佳的藥效。奈米技術的熱潮中，奈米化使藥物傳送系統的開發更精緻更能達到臨床理想的療效與藥物動力學。也自然而然變成炙手可熱的新課題，目前各大藥廠競相研發的目標導向藥劑，其中一支便是利用奈米作為運輸載體。舉例而言，運用磁性奈米顆粒作為藥物載體(Drug carriers)(多使用磁性氧化物，如 Fe_3O_4 和 Fe_2O_3)。將具有超順磁性功能之 Fe_3O_4 奈米顆粒以化學方法合成，再以保護劑作表面處理使其充分離散，此類保護劑包含飽和脂肪酸或脂肪酸混合物、以超音波震盪得到之脂族微乳液、甲基丙烯酸、聚苯乙烯等高分子、以及近年來快速發展的生物巨分子等，包覆住磁性顆粒後，繼而再將脂族或高分子包覆的磁性顆粒與特定用途的藥物、抗體或蛋白結合形成複合粒子。將這種載有高分子和蛋白的磁性奈米粒子做為藥物載體，注射入生物體內，因載體表面的抗體而能追蹤標定到疾病之病灶產生顯影或局部治療的功效，而得以大幅降低患者療程之副作用。

這類「磁性靶向藥劑」在醫療臨床使用的優點在於能控制藥物在病變部位聚集，以提高其醫療作用於局部患處達到更加之局部治療劑量病降低非患處之副作用，亦大幅減少肝或腎等由於藥物累積產生的毒性。除了作為藥物載體的功能外，功能磁性奈米顆粒還可用於熱療法(Hyperthermia)腫瘤醫治，文獻中曾報導使用陽離子脂族包覆磁性顆粒(Magnetite cationic liposomes, MCLs)注射入癌腫瘤區，施以射頻

電磁輻射，磁性顆粒吸收電磁波能量而升高腫瘤局部區域之溫度，因癌腫細胞對高溫承受程度較正常細胞為低，控制輻射強度與時間，可使溫度達到癌腫細胞受損而不影響正常細胞之範圍，因而得以有效控制癌腫瘤生長，此一概念在小老鼠和白兔等動物體內的前臨床實驗已獲得局部熱療效果的證實。

另一個蓬勃發展的新趨勢是將奈米技粒子結合高分子，運用到生物醫學上。高分子本身能受環境中之酵素或物理化學因素而進行降解，高分子鏈斷裂而導致寡聚合物(oligomers)游移離出，最後導致單體(monomer)出現。高分子是否會降解的定義則將依靠其降解的時間而定。必須要具有低毒性而且能夠讓人體代謝等特性。目前以奈米技術製備之奈米小球的材料大多趨向於採用高生物降解性高分子，如聚乳酸(PLA)、聚乳酸共聚(PLGA)、聚幾內酯(PCL)、幾丁聚醣(chitosan)…等，有些國外研究團隊以利用PCL為基材發展奈米級粒子。近年來，高分子奈米粒子在藥物控制釋放的應用大部分都趨於包覆蛋白質、低分子量之治療製劑或抗生素…等，控制釋放速率與延緩釋放時間及包覆效率皆是研究之重點。2002年Vila學者即分別以PLA、PEG-PLA、CS-PLGA、CS等奈米粒子包覆破傷風類毒素(tetanustoxoid)設計具降解性粒子之蛋白質釋放系統。該研究更進行各種粒子於溶菌酶(lysozyme)中之穩定度測試，發現有PEG披覆在粒子浸入lysozyme兩小時後粒徑變化很小，粒子可更趨穩定。另外，為增加粒子的滲透能力以及更廣泛之應用，近年來有部分研究將藥物包覆於小於200nm之聚酯類奈米粒子，2003年Konan et al.學者將感光性藥物p-THPP包覆於sub-200nm之PLGA奈米粒子應用於腫瘤細胞的感光性治療，研究結果發現奈米粒子具有高藥物包覆效率且置於各種不同之緩衝液中，如PBS、FBS、Distilled water或Human plasma…等仍可維持其穩定性，其粒徑並無太大改變。此類製劑之離散性及生物降解性雖然適合應用在靜脈注射，但要應用在藥物攜帶還必須避免體內reticuloendothelial system(RES)的非特異性吞噬；因為奈米粒子於體內易被巨噬細胞快速的清除，尤其是肝臟之kupffer cell。因此，為了減少免疫系統之不良反應並增加其穩定性，必須藉由表面性質的修飾延長奈米粒子於體內循環的時間進而達到適當之藥物釋放功能。1998年Tobio以PLA奈米粒子接枝PEG包覆蛋白質應用於鼻組織的治療。結果發現有接上PEG比沒有接上PEG之奈米粒子於血液中的含量明顯較高。2003年Farasen學者在Poly(L-Lysine)薄膜表面接枝PEG發現可減少細胞的對奈米粒子的吸收，並以Poly(L-Lysine)製備之微小球接枝PEG做巨噬細胞的胞飲實驗，發現有接枝PEG之PLL微小球可減少細胞的胞飲(endocytosis)。除了在體內能夠隱形不被免疫系統過早清除之外，我們更希望奈米粒子能夠像“導向飛彈”一般攜帶藥物朝著特

定目標聚集，在特定地點釋放藥物並一舉殲滅敵人。在這方面早期曾報導的作法是藉由改變粒子之物理性質如：表面電位、粒徑、親疏水性、釋放特性…等來增進粒子對特定組織之專一性；研究者在奈米粒子表面加入帶正電荷之材料或誘導劑使粒子具有主動式吸收能力，例如：1998年 Labhasetwar et al. 即加入正電荷誘導劑 didodecyldimethylammonium (DMAB) 作表面修飾，當細胞或病變組織之表面帶負電荷時，利用電荷作用可使粒子具有增強之吸收能力。而國內研究單位開發之高分子奈米微粒(Nanosized Polymeric Micelles) 包覆藥物配方技術，可控制奈米載體大小在50-200nm範圍，並證實能改變藥物在體內的分佈；未來可能發展於改善疏水性藥物的溶解度，以及改變藥物在體內代謝，降低藥物毒性並增加藥效。另外，在心血管疾病或某些癌症中會產生病變之新生血管的異常結構，並且在組成細胞的表面出現較高表現之整合素(integrin)的蛋白質分子。RGD peptide是一種短鏈的蛋白質，能特別辨認細胞上的整合素，由於具有此特性，將RGD接枝於奈米粒子上可使粒子具有標的化能力，在2002年Lestini et al.學者即在微脂體表面接枝RGD進行細胞標的研究。在眾多研究結果中，製備出具有標的能力之奈米粒子，能使藥物傳輸更具效能，在包覆抗癌藥或心血管藥物應能針對癌症或是產生病變之血管進行更有效之治療。在未來，我們應可以樂觀期待奈米科技所研發出之新藥物系統或可治療現在無法治癒的特殊疾病。

六、奈米生醫組織工程

奈米科技乍看之下似乎無法與組織工程有任何聯想，但是從另一個觀點來看，身體裡面的各種細胞內的蛋白質與次胞器之功能性結構單元其實天生上就是在奈米等級尺度。胞外之基質與訊息傳導分子也在奈米尺度範疇。因此，隨著奈米技術的進步，與組織工程及再生醫學的整合將具有加乘性的幫助。例如：普渡大學的學者Thapa等人利用腐蝕法在基質上做出不規則的奈米小孔，意外發現可以促進膀胱平滑肌的生長。根據Dalby與Curtis等人研究發現，不同的奈米尺寸材料對細胞有不同的影響，例如：13nm孔洞會造成細胞某些調控基因的表現，而27nm則有利於纖維母細胞的貼附。最近哈佛大學Vacanti 研究團隊利用奈米纖維培養骨髓間葉幹細胞，一個月之後能長出骨細胞與合成type I膠原蛋白，並開始進行礦化現象。另外有Virginia研究團隊則利用膠原蛋白做出奈米纖維支架。雖然目前奈米材料與組織工程的應用研究還在方興未艾的時期，但可以預期將有大幅躍進的發展潛力，奈米材料已證實會影響細胞組織之功能並與之產生交互作用，而奈米材料最終目的並不只是把產品尺度縮小而已，更希望能藉著奈米

材料的物化及生物特性優勢達到控制細胞行為與組織工程的目的，以增進人類對微觀生物系統之相互反應的了解並進行操控。奈米科技應用於組織工程大概可以分為三種策略：(一)發展植入式可分解的活性奈米基質；(二)利用奈米技術發展出人造組織或器官；(三)利用奈米技術支援或增強身體自行修復的能力。奈米科技將能讓智慧型義肢如具神經微控功能之義肢和醫藥傳送之可移植微晶片等得以早日實現。而目前這些技術都還在萌芽階段，甚至有些技術都還停留在實驗室階段，如果國內可以在這方面有所突破，相信在國際間能佔有一席之地。也將能為相關產業帶來利基。

七、奈米市場趨勢分析

奈米科技挾帶而來巨大的科技發展與產業經濟影響力，使得各國都全力投入該科技之研發工作，依相關統計顯示，2004年奈米科技之研發，各國政府(僅指中央政府)投入的經費是1997年的8倍之多，美國於2004年的研發預算總共1,270億美元中，而投入奈米科技研發則有9.6億美元，投資金額雖不大，但較2001年已成長107%，美國各州每年投入奈米科技的研發資金，大約會有2至3億美元左右。日本與歐盟已做出奈米科技的投資規劃，將投入2.4至3百萬美元來發展奈米技術的新製程。

根據Lux Research之估計，2004年全球奈米科技之投資(包括政府、私人企業、大學和其他來源)為86 億美元，其中政府投資(包括地方政府)為46億美元，美國和亞洲各為16億美元(占35%)，歐洲則為13億美元(28%)；私人企業投資則為38億美元，其中，大部分來自美國企業有17億美元(46%)，亞洲次之，有14億美元(36%)，歐洲則為6.5億美元(17%)。Lux Research進一步預測2005年私人企業投資將超過政府投資，主要將從對奈米科技的基礎研究轉入應用開發。

就投資的額度來看，以美國與日本投入奈米研發最為積極，佔全球50%以上，而日本投資已超越美國。就全球投資之趨勢而言，自1997至2002年，全球奈米投資已增加了4倍，美國、日本及歐盟以外地區的投資金額更增加了6倍，突顯當前各國對奈米產業的重視。美國、日本與歐盟政府對奈米投資占全球的比重為75%以上，自西元1997年至2002年的六年之間，美日兩國投資總額成長了四倍。日本近兩年在奈米科技的投資已超過美國之事實顯示日本政府對奈米科技發展的高度信心與期許。相對之下，歐盟則對奈米技術的研發較保守，投資的金額僅為美國的三分之二，並且對奈米科技對環境之影響提出警訊。除了美日在投資上較為領先，各國對奈米科技研發投入也日益增加。其中以亞洲最為突出，包括南韓、中國大陸、台灣、新加坡等國

的投資總額已達全球的14%，顯示亞洲各國對奈米科技之重視。瑞士、芬蘭、荷蘭等國家的投入程度不低於英德，新加坡、南韓和台灣自2001年起高度投入奈米科技發展，投資金額相對於人口比例已超越德、英、法等先進國家。

八、結論

根據D&MD刊物於2002年發表的奈米生物技術產值資料，2005年奈米微粒在奈米生物技術領域的應用將會達到1億4千5百萬美元的產值。美國國家科學基金會(NSF)也表示，2015年估計將有14%的產品運用奈米技術輸送藥物，產值達600億美元。另外，預計有50%以奈米科技製造的顯影劑產品，產值高達500億美元。奈米微粒在藥物載體方面的成長雖然是最緩慢的，但預測未來將會成為最大的需求市場。綜觀這些產值的表現，顯示奈米生技未來商機可期。身為一個奈米時代的現在人，你還能忽略奈米科技所帶來的巨大衝擊嗎？

九、主要參考文獻

1. 黃東明。2007。以矽包裹的磁性奈米粒子有效標定幹細胞。國家衛生研究院電子報。第194期。
2. 江佩馨。2002。“超順磁性氧化鐵顯影劑於磁振造影診斷醫學上之技術發展及產業概況”。工業技術研究院核心技術編碼：E002。
3. 徐善慧。2003。台灣奈米科技。339-342。揚日昌。新竹縣。
4. 王先知。2003。台灣奈米科技。326-327。揚日昌。新竹縣。
5. 陳家俊。2003。台灣奈米科技。328-331。揚日昌。新竹縣。
6. 陳家俊。2004。奈米生醫之技術地圖。國科會科資中心 957-619-104-1。
7. 傅昭明、王昱豐。2003。“奈米磁顆粒之放射性標化及應用簡介”。物理雙月刊25卷3期。
8. 隋安莉。2002。“奈米科技與DNA感應器”。科學發展359期 62~67頁。
9. 林玉娟。2005。“生物診斷的新利器—奈米微粒探針”。工研院生醫工程中心 第124期。
10. 陳東煌。2006。“複合奈米粒子—有趣的人造粒子”。科學發展。408期 40~45頁。
11. 李喬賓。2004。“PLGA奈米粒子之製備及表面修飾對細胞標的化能力之探討”。國立雲林科技大學化學工程系碩士班碩士論文。
12. 楊正義、陳吉峰、葉怡均、陳正龍、陳家俊。2001。“金屬、半

- 導體奈米晶體在生物檢測及分析上的應用”。物理雙月刊23卷6期。
13. M. Tobio, R Gref, A. Sanchez, R. Langer, and M. J. Alonso. 1998. Stealth PLA-PEG nanoparticles as Protein Carriers for Nasal Administration. *Pharmaceutical Research*. Vol. 15, 2, 270-275。
 14. S. Faraasen, J. Voros, G. Csucs, M. Textor, H. P. Merkle, and E. Walter, Ligand. 2003. Specific Targeting of Microspheres to Phagocytes by Surface Modification with Poly(L-Lysine)-Grafted Poly(Ethylene Glycol) Conjugate, *Pharmaceutical Research*. Vol. 20, 2, 237-246。
 15. V. Labhasetwar, C. Song, W Humphrey, R. Shebuski, R. J. Levy. 1998. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J. Pharm. Sci.* 87, 1229-1234。
 16. B. J. Lestini, S. M. Sagnella, Z. Xu, M. S. Shive, N. J. Richter, J. Jayaseharan, A. J. Case, K. K.-Marchant, J. M. Anderson, R. E. Marchant. 2002. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery, *Journal Controlled Release*. 78, 235-247。

第十五章 新穎性螢光標的方法與應用

孫啟光教授 臺灣大學光電工程學研究所

張富雄教授 臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

近年來，由於科技日新月異，一日千里，研究者為了讓臨床醫學與基礎檢測有更簡便、確實的工具得以使用，不斷在有機化學、材料科學與影像硬體設備等領域上探求新技術與新發展，從傳統的X光射線影像，電腦斷層到核磁共振影像，以及目前正在發展的光學系統，影像的解析度加強，一直是研究者努力的方向，以下將針對光學上的應用與目前生醫研究上所使用的螢光分子做介紹。

一、近代光學技術

(一)近場光學技術

原子力顯微鏡可以感應表面的高低起伏、軟硬質地，具有奈米等級的解析度且可以了解空間內的表面結構。而近場光學顯微鏡可以利用錐形光纖來感測局部空間的光場變化以呈現奈米解析度的光場分布，結合兩者的優勢則可進行高時間、高空間解析度的實驗。

(二)奈米超音波技術

聲波一直以來在探測影像上都具有極大貢獻，像是聲納、超音波技術。目前廣泛應用的聲波頻率小於十億赫茲 (GHz)，波長大於1微米。而音波的缺點則是解析度稍嫌不足，無法偵測奈米等級的物質，因此短波長、超高頻聲波的發展便也成為受注目的焦點之一。

利用奈米音波取得的超音波影像可以達到奈米解析度，對樣品破壞極低，並可以取得三維影像，因此具有極大的應用潛力，除了可用在奈米材料的觀察檢測上，生物上的應用也應可期。

(三)量子點及奈米電漿子的應用

在過去通常都是以塊材應用在光學探討或材料的實驗研究上。但是當物質尺寸改變縮小至奈米層級時，其特性便會有所改變而有差異。

因量子點具有量子侷限效應(quantum confinement effect)，因此透過這項性質，當量子點與不同物質或塊材結合時，會有不同的特性會在聲學與光學上顯現出來，故可以加以深入研究之。而在奈米粒子部分因其表面積相對於總體積的比例有差異，因此電場共振，放大等效應行為可以透過奈米粒子之表面積與總體積比例的差異進一步來觀

察，因此特性可用來發展電漿子體光學。

(四)非線性顯微技術

雷射光源和顯微掃描系統是組成非線性顯微術的兩大主角。因此顯微術的成相原理即是利用高尖峰功率的雷射脈衝於其欲觀察的生物體內產生非線性光學信號進而成像，此種方式即為非線性光學顯微術。此顯微術乃因是於焦點上產生足夠光強度，因此具有高三度空間解析度、對生物體傷害小等優勢，且若可同時搭配雷射光源則可以大幅提升在生物體內的穿透度。而非線性顯微術以二倍頻、三倍頻及多光子顯微鏡為主，各種顯微鏡可用來觀察不同物質及發展不同用途，例如生物體內非對稱中心的結構可藉由二倍頻來取得清晰的影像，三倍頻顯微鏡則是用以觀察各種組織與次細胞結構型態，然而多光子則可用來觀察生物體內各種分子的分佈狀況。然而倍頻式原理並不同於多光子顯微鏡，不需依靠螢光與儲存能量而是將雷射光的頻率加倍，即可產生清晰的掃描影像，而多光子是則是需要同時吸收多個雷射光子以激發產生螢光，經由能量儲存後再經轉換螢光影像，而此法將會有許多問題產生，例如光毒性及光漂白等。另外利用紅外光的非線性光學顯微術具有三維高解析度以及高穿透深度的特性，未來將利用光纖束或微光機電鏡來建立非線性內視鏡系統。

(五)多光子影像技術

雙光子顯微鏡用次微米的解析度去觀測活體細胞，已經變成了最受歡迎的方法。雙光子顯微內視鏡的雛形已能夠追蹤生物體內的螢光蛋白，而且有趣的是，第一個商業化的多光子斷層儀 DermaInspect 已可應用於人類皮膚診斷，以次細胞解析度來進行活體影像研究。這項新穎的影像工具主要應用包含了早期癌症的診斷，組織工程產物與人類組織交互作用的研究及原位藥物的篩選。

(六)多峰性影像技術

此技術在活體中以解剖形式同時紀錄螢光影像，諸如MRI和X光斷層掃描，能有助於橫切面的螢光影像，其像是光子的有限穿透組織和低三維的空間解析度，並提供完整的資訊。這項多功能探針的發展正引起注意並且已經有許多研究開始進行-從氧化鐵-和樹狀高分子為基礎，作成MRI-螢光顯微鏡影像的顯影劑。而這能夠應用在 Kodak 所發展的X光斷層掃描螢光影像系統上。

(七)FLIM影像技術

活體螢光影像研究目前主要著手於測量螢光強度的研究。不像強

度的測量，螢光衰減影像技術(FLIM)較不需要探針定位上的濃度，而且本身會以強烈的吸收和散射呈現，雖然它對環境的變化具有極高的敏感性。目前已有數個研究，開始致力於經由三維螢光影像衰減斷層儀的發展來探討在活體小型動物中全身螢光影像的可行性，和以NIR胜肽探針來對移植腫瘤造成影像。

二、螢光分子的應用

螢光是指一種由光導致的冷發光現象。當某種常溫物質經特定波長的入射光(又稱激發光)照射，吸收光能後的螢光物質進入激發態，並且立即退激發並發出比入射光的波長長的出射光(又稱放射光)，一旦停止激發光，發光現象也隨之立即消失。具有這種性質的就被稱之為螢光。

適合應用於生醫研究上的螢光物質，主要被考量的特性包括亮度、消光係數、量子效率、小體積、酸鹼值耐受度、光穩定度等等，在實際運用上更需考慮在進行兩分子的鍵結或融合時，螢光分子的螢光特性不會消失等等。

(一)有機螢光分子

有機螢光小分子可經由工業上的製程，共價標定其他分子來調整波長、亮度，並提升光穩定性和減少自體消光性。大部分的方法通常是藉由雙鍵接合的延伸，或是經由增加額外的環基，並且加一些氟和硫酸基等拉電子基團來使分子更緊密。在目前，已有數百種有機螢光小分子出現在市場上。而因為大部分的組織能產生少量的NIR螢光，因此那些能夠吸收近遠紅外光(NIR)區域，也就是吸收波長在700-1000奈米的分子，能有效率的被當成分子標的去觀察和探索。最常用的有機NIR螢光分子是聚甲炔類分子。在這其中，五碳聚甲炔和七碳聚甲缺氫構成的苯並吡啶和苯硫並吡啶，芴，2-苯並吡啶或4-苯並吡啶已被發現最有用。他們典型的特性，生物分佈，藥物動力學和活體內螢光應用已經在最近的兩篇評論被報導。

(二)螢光蛋白

第一個在細胞生物學中具實用性的螢光蛋白是從藍綠藻的天線色素中萃取出來的藻藍蛋白。當時因為亮度可達一般有機螢光小分子的百倍而備受矚目，然而其大小對擴散有所限制，所以主要應用在流體細胞儀的樣品標定和酵素連結免疫吸附分析(ELISA)上。而當複製及基因工程技術蓬勃發展以後，來自水母的綠色螢光蛋白(Aequoria victoria green fluorescence protein, avGFP)開始被廣泛思考用來作為細胞標的可能，除了利用突變的方式得到更穩定的水母螢光蛋白，甚至

經由螢光放光波長的調節，使研究者有了更多選擇。在之後，更陸陸續續有許多來自海洋無脊椎動物的螢光蛋白質被複製，也更加強其物化特性，而利於研究應用。目前已有超過100種的螢光蛋白或能自催化之發色團(chromophore)基因被找到與複製。

螢光蛋白	放射光(nm)
GFP	500-530
further mRFP-derived mutants	up to 649
KillerRed	610
Kaede	518/580
Dendra	505/575
DsRed-Express/DsRed.T4	586
DsRed-E5NA	450/500/590
EosFP	516/581
eqFP611/618	611/618
ReAsH	580-620
mRFP (DsRed-derived)	607
PS-CFP	468/511

除此之外，也有技術利用分子的自體螢光取得影像，此處列出自體螢光分子的吸收和螢光最大量。

螢光分子	激發波長 (nm)	放射波長 (nm)	螢光衰減期 (ns)
NAD(P)H	340	450-470	0.3
核黃素	370, 450	530	5.2
SHG	720-960	360-480	0
膠質蛋白	300-340	420-460	0.2-0.4/0.4-2.5
彈性蛋白	300-340	420-460	0.2-0.4/0.4-2.5
角質蛋白		525	
脂褐質	UV/VIS	570-590	
黑色素	UV/VIS	440,520,575	0.2/1.9/7.9
PPIX	405....630	635, 710	11

(三)半導體晶體

半導體結晶，亦即所謂的量子點(QDs)是一種新的探針，在近十年內成為新興的研究範疇，是為奈米等級的無機材料，能應用於活體

內螢光影像的分析。量子點的合成有數種方法，包括：自組合法、化學溶膠法、蝕刻法以及分閘法等等，目前在實驗室中廣泛被使用的方法主要為自組合法，此法較為簡單，且產量較大，品質較易控制，用這種方法合成出來的量子點大多介於2到10奈米，典型的量子點具有奈米核心(core)和外殼(shell)的結構，依據核及外殼的組合，可大略分為兩種，型式一(type I)及型式二(type II)，型式一的量子點外殼的導電帶與價電帶分別較核為高與低，而型式二者，外殼的導電帶及價電帶可能皆較核為高或皆為低，不論哪種量子點，皆具有特殊的光學特性，包括了高吸收性，吸收光譜較寬，高量子產率，放射光波段間距小，極大的史托克平移和對螢光退色的高抵抗性。由於為無機基材，較不易被破壞，光穩定度高，不易因激發光波照射產生光漂白現象(photobleaching)，再加上量子點依據組成材質獲粒徑大小不同會產生不同波長之放射光，理論上，可以得到各種形形色色不同放射光之成品，可以拓展在檢測上的利用。在活體的光學影像中，量子點具有獨特的光學活性，量子點能已單一波長激發而放射出數種不同的波長，並且在單一實驗中適合作多數目標的偵測。也因此，逐漸有科學家將這樣的材料應用於生物醫學領域上，不論是體外、細胞內、體內的研究都有一定的進展，尤其是用於長時間觀察分子運動、作用的可能性也已被證實，其中包含體內細胞追蹤、細胞表面蛋白追蹤，甚至細胞內蛋白追蹤等，這些都是結合了合成、生物共價接合化學、光學特色進而在活體影像中將量子點實際應用。

但由於量子點的組成包含重金屬，其毒性不免受人詬病，但也有研究者提出利用其毒性進行癌症治療的可能，使其同時兼具藥物與檢測劑的功能，不論如何，這些都還有待研究推展。

三、生醫研究上的應用

(一)高通量篩選

因為螢光具有容易觀察的特性，所以被廣泛運用在生物科技中的影像照影，螢光顯微照影被廣泛的使用在細胞生物學的研究，因為其優點相當的多，像是：不需破壞細胞、對於次細胞膜結構的觀察相當敏感、也可以用來監測細胞內部蛋白質在細胞內部的移動。在最近幾年，藥物公司也慢慢的將藥物測試由疾病相關的分析轉向細胞測試。特別是新穎科技一般都趨向高通量篩選 (High-content screening; HCS)，推行高解析螢光顯微術結合自動畫影像分析以達到高效率的藥物發現分析。

在高通量篩選中，在貼附在多孔盤底部的貼附型細胞通常會被標記上許多螢光型物質以及有意義的生物分子，像是標記有螢光染劑或

是本身具有自體螢光之螢光蛋白之目標蛋白，再利用螢光顯微鏡觀察由不同波長激發之螢光訊號。利用適當的影像分析演算法可以用來定量細胞中由不同螢光物質標記之生物分子的螢光亮度。在活細胞實驗中不論是藥物影響的動力學或是細胞內蛋白運送事件都是可以被監測的。以蛋白質運送來說，高通量篩選提供了一些資訊像是目標蛋白的磷酸化狀態、細胞增生或是程式性凋亡、型態上的改變、細胞骨架的修飾、細胞的移動及其他種種螢光的改變都是可以利用螢光蛋白進行研究。

與一般的高效能篩選相較之下，高通量篩選有許多優勢，一般來說高效能篩選反應出的是整個細胞群的平均反應，而高通量篩選反應出的則是獨立細胞的反應。獨立的細胞可能在細胞週期、分化、轉染時期上與其他細胞有所不同。藥物對混合的細胞群落的異源性影響可能在單一個多空盤的孔洞中觀察到。因此，高通量篩選提供了一個新穎性分析的方法，而這種方法不需要依賴整群細胞的螢光強度或是冷光強的改變。除此之外，高通量篩選提供了目標藥物與其他現象，像是細胞毒性的關聯性。人為操作的瑕疵像是自體螢光或細胞破碎皆很容易被發現。

為了要使用螢光顯微術來定位細胞內特別的生物分子，所以需要將生物分子標記上螢光物質。一般來說分子會藉由將有機染劑結合至配體或是抗體來辨識目標結構。然而若是標記上螢光的配體或是抗體不要顯露在細胞外，則必須在加入螢光偵測試劑之前先將細胞固定，這個固定的步驟限制的細胞影像的測量終點。另一方面，DNA編譯出的螢光蛋白可以被複製至目標蛋白之基因閱讀區，再藉由細胞表現產生具有螢光的融合蛋白，這些融合蛋白在細胞內的移動是可以直接在活細胞內觀察的。在最近幾年，螢光蛋白發展成一個強而有力的螢光顯微術的工具。的一個被發現的螢光蛋白即是在水母中發現的綠色螢光蛋白，其將冷光酵素產生的生物冷光能量藉由能量共振轉換成綠色螢光。許多種突變型的綠螢光蛋白被發展出來，展現出由藍到黃不同種波長的放射光。

舉例來說：蛋白質內的PH domain會專一性的與細胞膜上的脂質成份PIP₂結合，因此利用遺傳工程設計將EGFP-PH-KillerRed三種蛋白質融合成融合蛋白質(fusion protein)主要座落在細胞膜上因為其當光刺激KillerRed時其會產生ROS破壞PH domain使其由細胞膜上離開散布到細胞質中。

(二)雙光子顯微鏡與活體多光子斷層儀

Maria Goppert-meyer在1931年於他的博士論文中預測雙光子的影響。30年後她的論點得到證明並在之後30年這些影響被應用在觀察

活體細胞上。Denk, strickler和webb建立了第一個雙光子顯微鏡並觀察細胞內的螢光探針。

就雙光子激發螢光的方法來說，雙近遠紅外光 (NIR) 光子在800~1200奈米的波長範圍內會被同時吸收。每個光子提供一半的能量，這能讓螢光分子正常的被激發到較高的電子狀態。因此，螢光分子所放射的藍、綠、黃和紅光能被低能量的NIR光子所誘導。基於三光子的過程，NIR光子也能誘導紫外光範圍的螢光。波長範圍呈現在細胞和組織中的“光學框架”中，這是由於低的吸光和散射係數能造成高穿透深度的特色所致。此外，光譜的範圍能對應於鈦-藍寶石雷射的波長範圍。

多光子的程序需高光子濃度存在於空間和時間的範疇內，並且需至少每平方公分1億瓦紅外光強度。雖然在瞭解到微小的聚焦量下具有高強度時，100毫瓦的連續波雷射輻射結合高數值孔徑 (NA) 的物鏡是必要的，但飛秒雷射脈衝仍是最好的選擇。當使用具高百萬赫茲的重複性雷射時，平均少於2毫瓦的飛秒雷射能量是足夠的。而他們能在極短的時間間隔內短暫的提供每平方公分高達十億的強度，並且避免受到陷落和熱的影響。一般來說，80/90百萬赫茲的鈦-藍寶石雷射在有大約100飛秒的脈衝頻率下能應用於雙光子掃描式顯微鏡。

雙光子能夠激發多種自體螢光。其中一種主要的螢光分子就是還原輔酶 NAD(P)H，其放射最大波長可到460奈米的藍綠光，而氧化態的NAD(P)不會產生在可見波長下的螢光。因此未染色的細胞可經由雙光子激發出影像。雙光子自發螢光影像即是以粒線體和黃素蛋白的螢光特性所致，但細胞膜和細胞核無法產生影像。此外，當以飛秒的NIR脈衝雷射時，表皮的基底色素細胞、頭髮和黑色素細胞會放出最大為黃色波長的冷光。當以超短NIR雷射脈衝激發膠質蛋白時可發現一特殊冷光。在某些情況下，胞外基質(ECM)蛋白放射的光是入射雷射光的一半，而此過程就稱為單光子計數(TCSPC)。一般解析度在側邊約0.4微米而軸心是1-2微米。這短暫的解析度當使用快速光電倍增管(PMT)可達150皮秒，而用多通道平板偵測器(MCP)則是30皮秒。這額外的特色允許了每像素平均螢光衰減期的計算而能建構螢光衰減影像技術 (FLIM)。螢光衰減期 τ 是螢光分子和微環境間所造成的特定參數。目前，DermaInspect 是唯一能用多光子影像系統來用於活體內的皮膚診斷。

多光子影像科技能夠在活體外和活體內將各種天然和組織工程的組織產生影像。在歐洲第一個多光子斷層儀用來產生皮膚影像已用於市場和臨床上。目前，多光子微內視鏡正在發展。這新穎的工具對組織疾病的早期診斷，原位藥物的監測和活體內移植組織工程構造的分析，將掀起一股革命。

(三) 螢光影像標的方法

設計螢光影像探針的一般策略大致可分成非標定和標定。標定探針能被進一步歸納成活化或非活化的特性。

1. 非標定探針

吡啶青綠是一種非標定性的NIR探針常用於臨床鑑定血流以及清除。量子點亦可被作為一種非標定性的探針，常被用於作為偵測成鼠血管影像的顯影劑。Kim等人置備第二型的量子點其為新穎的核-殼模式(此處大部分電子結合青色素及量子點常用於偵測活體體內的腫瘤影像)。

2. 可活化標定探針

可活化標定探針常用於分析酵素活性功能性的分析影像。他們通常包含有大於兩種相同或是相異的發色團，藉由酵素專一性胜肽連接者將發色團連接在一起並相鄰很近。由於消滅效應(quenching effect)是由鄰近的(相同發色團)或是經由共振能量轉移(不同發色團)而引起。當胜肽連接者被酵素切斷時，此時會有螢光團被釋放出來，進而復原原本的螢光團的放射。然而，可活化探針引起的背景訊號很低，但是其對比效果以及偵測的靈敏度較活化探針來的高。有些可活化探針曾經被在課堂上教授並且廣泛的被評論查核。而酵素標定主要限制在蛋白水解酶上，其中包括組織口蛋白酶、caspase、基質金屬蛋白水解酶、凝血酶、HIV及HSV之蛋白水解酶以及尿激酶型血纖維蛋白溶酶原活化者。

3. 新穎的螢光探針

(1) 有機螢光小分子

化學家持續的研發能提升螢光量子產率、高化學和光學穩定性、低聚集傾向並低毒性的新穎NIR螢光分子。舉例來說，Dehaen和他的同事利用鈀催化偶合的反應，合成數種放射光譜能從綠光到近遠紅外光範圍的 BODIPY衍生物。Zhao和Carrera報導結構上受限制的Aza-BOBIPY染色劑能夠提升物理特性，還有化學和光學的穩定性。Tung和他的夥伴設計了一連串的Nile Blue類似物，其激發光近640奈米而放射光接近680奈米。但這些新的有機小分子染劑尚未衡量其在活體螢光影像上的價值。此外Gremlich和他的同事描述了一種NIR螢光噁環的染劑AOI987，在血清中能放射的最大波長為670奈米，而最大激發波長為650奈米。AOI987能完整的穿透血腦障蔽(blood-brain

barrier)並允許活體基因轉植鼠體內的淋巴塊發出NIR螢光影像。

(2)有機螢光奈米粒子

像是微脂體，樹狀高分子和聚合化合物這類大群的有機奈米粒子已經用於藥物傳遞的研發，但也可應用於活體中的光學影像。Therien和他的同事報導了利用雙性區塊的聚合體協同式的自組性組裝，並且結合多porphyrin的NIR 螢光分子來合成NIR放射性聚合物的方法（聚合物載體直徑為50奈米到50微米）。樹狀高分子在先前被用於MRI影像顯影劑的載體。而在最近，McIntyre 等人設計一種聚銨醯胺樹狀高分子的螢光基質，其能將matrix metalloproteinase-7相關的腫瘤顯像。內皮血管生長因子(VEGF)標定一種硼酸化的數狀高分子和一種NIR染劑Cy5已經被展現能夠選擇性的連接老鼠腦瘤中未受調控的VEGF受體。

(3)具有螢光的生物奈米粒子

當多種螢光染劑連接到相同的分子上時，螢光強度會因為染劑之間的消光作用降低。然而，當在病毒顆粒的骨架上標記時，多於40個Cy5染劑可以藉由化學偶合的方式被標記在同一個病毒顆粒上，而不會有螢光消光作用發生，因為病毒顆粒具有大約30nm的直徑。在牛痘鑲嵌病毒顆粒上標記Alexa染劑可以成功的在血管及血流中觀察到，也在老鼠及雞胚中用來研究纖維瘤導致的血管新生作用。

(4)自體螢光無機奈米粒子

螢光量子點需要外界的光源來達到螢光，這個會造成他應用上的限制，原因是由於自體螢光的背景造成影像觀察上的干擾。為了解決這樣的困擾需要設計新形式結合冷光的量子點，如此一來便不需要由外界提供激發光，這種可以自發光的量子點是藉由含有碳酸根的量子點與突變的海葵發光酶(生物冷光蛋白)結合而製備。發光酶催化受質所造成的能量釋放可經由共振能量轉移至量子點使量子點發光。這些自發光的量子點可以在活細胞及活生物體內放射出長波長(由紅光至紅外光)即使在深處的組織也可取得螢光影像，因此可以適用於體內影像擷取。這類的量子點也可再結合其他蛋白質而不影響其發光，因此可有更多的應用可能性。

四、結論

不論是從分子生物學或材料化學的領域切入，研究者皆已發產出多種新形式的螢光探針，用以探討蛋白質的表達、表現分佈、活性狀態等議題，不論小分子有機螢光染劑、奈米結晶、自發螢光蛋白、小型發光胜肽等發光機團，其實都各自扮演其重要角色，以下圖表為各種螢光分子的適用範圍和其優缺點。

螢光分子在蛋白偵測上的應用。應用程度分為最合適(++)，最不合適(--)，而(-/+)為只適合某些情況

測試的 螢光分子	有機小分子 (抗體標的)	量子點	螢光蛋白	有遺傳標籤 的小型染劑
自體蛋白	++	+	-	-
臨床物種	++	+	-	-
動物	活體外	活體外	轉植基因生 命體	活體外的轉 植基因
主要優點	有廣泛的特 性	明亮且夠穩 定	用於活細胞 內且有專一 性	用於活細胞 內且夠小
主要限制	不能標的活 細胞	不能標的和 穿透	不能異位表 現	不能異位表 現和背景染 色

螢光影像之所以會被認為功能強大且快速被接受的主要原因便在於螢光探針可結合標的策略、硬體設備、資料分析，達到綜效，因而可以被使用於快速高效能篩選(high-throughput screens)、單分子偵測、多分子及活體影像。來自天然的螢光蛋白，加上之後經由基因工程計設或隨機突變產生的各類有效螢光蛋白，幾乎可以提供適用在各種蛋白分析上，可惜的是，至今仍未有單一蛋白具有所有優點者。但利用基因操作的方式並非單一方法，尚有許多其他方法可供選擇，例如利用鍵結的方式，將螢光分子接於蛋白質或抗體上，再進行檢測分析。而量子點則可降低檢測的障礙，提高同時檢測多蛋白行為的可能性，更可以使其樣品成為EM可偵測樣品，目前也有報導將量子點與酵素活性做結合，產生耕多組合變化。

儘管目前只有應用於病人的蛋白質活性圖譜與切片樣品，相信不久的將來，螢光檢測方式也將可推向於實際臨床醫學檢測，甚至用於了解藥物對個體病人的影響。利用螢光做藥物篩選、蛋白質微陣列分析、活細胞及動物之功能性分析的好處已是眾所皆知。雖然活體螢光

影像不像螢光顯微鏡，活體中螢光攝影從數以千計的細胞中以非常低的解析度偵測大量的訊號。相反地，螢光微內試鏡使用小型的光學探針(直徑約0.25到1毫米)能以最小的侵入方式插入固體的組織中而能達到深層組織的高解析度。結合螢光探針，這項科技能夠探討在活體組織中單一細胞或其層級的生物學。

活體螢光影像能在活體小型動物中觀測全身螢光分子放射出的螢光。隨著螢光探針和訊號物實用性的增加，其逐漸成為一種在基礎研究和臨床應用之間重要的轉譯工具。雖然傳統小分子的NIR染色劑持續在使用，有機的，生物性的和無機的奈米螢光粒子的發展對於活體的螢光影像提供了一個強而有力的工具，和一些令人興奮的應用上。這些奈米粒子提供了一個建立多功能探針和多峰性影像的平台。新穎性影像的策略和訊號物科技的發明將大大的提升探針的專一性和靈敏度。以高解析度和衰減期為基礎來發展的優勢能更進一步的增強活體螢光影像這項技術。故螢光在活體上的三度空間及時間軸之解析能力可說是有目共睹，這些新科技將允許更多的分子標的和活體中疾病的探討以及系統生物學的探求，而將持續的掀起一連串革命。

五、主要參考文獻

1. Giepmans, B. N. G., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217-224.
2. Rao, J. H., A. Dragulescu-Andrasi and H. Q. Yao. 2007. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 17-25.
3. Schenke-Layland, K., I. Riemann, O. Damour, U. A. Stock, and K. Konig. 2006. Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs - Powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 878-896.

第十六章 奈米技術在組織工程上之應用

曾厚副教授 台北醫學大學醫學研究所

一、生體的需求

若不牽涉倫理『複製』與『再生』可說是現代醫療技術中夢想；然而一般所認知的生物體組織或器官再生極限到底可以達到什麼樣的程度？蜥蜴的尾巴被切斷能再生，蠐螈(salamander)或是山椒魚(newt)切斷尾巴也能再生外，牠們的四肢及眼睛的一部份也都能具有再生能力。再者，像是水螅(hydra)與渦蟲(planaria)被切碎後，也可再生形成新個體。然而人體方面，輕微的皮膚損傷可自行修復；骨折經妥善接合與治療，可以重新接合。但如果損傷面積範圍廣大且嚴重時，譬如大面積的燒燙傷、內臟器官的受損，甚至是失去手腳時，單靠人體原有的功能，是無法讓這些器官再生的。於是器官移植就解決掉部分的器官受損問題；美中不足的是，這些器官的移植，卻存有許多的問題。如自體移植 autografting)就猶如『挖東牆，補西牆』，會造成病患部分機能產生障礙甚至功能喪失；而同種移植(allografting)終究不是自體的器官，因此必須持續地服用具有強烈副作用的免疫抑制劑(immunosuppressive drug)，況且器官來源難以尋覓；再者，在異種移植(Xenograft)方面，雖然是從動物身上取得健康組織，不過尚存在一定、且更高的潛在危險性。

為解決上述的狀況現在的再生醫療中主要的兩個研究路徑包括，一個是細胞移植；身體中構成各種組織及器官的最小單位雖然都叫做細胞，其實它們有許多的種類，但它們的源頭的同樣來自一個受精卵，而受精卵是個單細胞。當受精卵開始有絲分裂進行增生後，大約6天後形成了包含140個細胞左右的胚盤胞。而胚盤胞內部存在著叫做內部細胞塊的塊狀物，將此塊狀物取出後進行培養，經培養後可得到一種多功能細胞也就是胚胎性幹原細胞(embryonic stem cell, ES細胞)。它之所以被稱為多功能的原因在於，此細胞在分化之後具有形成組織的能力。因此，這種細胞分化應該有兩種途徑，一個是如宿命一般在體內分化成體內的某一組織(體性)幹原細胞，亦或它會進一步地分化成為某一特定細胞種別，而若將此細胞注入到組織缺損部位，則會使該部位組織再生而達到修復缺損的目的。若以這種細胞移植進行的再生醫療而言，僅能限用自己的細胞，而且要注入的細胞所需單離、分化、精製、放大(amplify)等技術的開發就變得相當的重要。而再生醫療的另一個研究路徑，就是組織工程學。狹義的組織工程所代表的是單純地將細胞注入無法再生、且大型的三維損傷使其再生的技術。這個技術中最重要的關鍵在於再生用空間或場所的建立，意即創

造一個組織再生用的適當環境。這個環境的創造不只適用於細胞而已，但是對於型態複雜的器官再生就顯得困難度相當地高。

一般而言，細胞在某一物質表面進行貼附後才會開始分裂。所以，為了使細胞增生必須提供足以貼附的空間或場所。體內本來就有的場所是細胞間質(extracellular matrix ; ECM)，但是當組織產生損傷時，損傷部位的細胞間質也必定狀況不佳。因此，在細胞本身能自行製造細胞間質前，必須給予人工的細胞間質，而人工基質的作用及其必要條件包括(1)細胞分化·分裂時貼附性、(2)再生場所的確保、(3)防止疤痕組織由外部入侵、(4)再生組織型態的決定、(5)細胞的氧及營養之補給路徑、(6)細胞成長因子的貯存及緩釋、(7)組織再生完全前的組織代替(強度保持等)、(8)代替其他的胞外間質(ECM)、(9)具有組織再生後可在體內消失的吸收性、(10)具有可讓多數細胞進入的多孔性等，而一般，人工基質是要讓細胞發揮最大功能，同時必須提供這些細胞群足夠的氧氣及養分，為滿足這樣的需求因此細胞基質大多為多孔質物體。再者，當組織再生後不會成為生長障礙，因此細胞基質也必須具有生物吸收性。如上述般，適當的基質與細胞的組合而建構出的組織，就形成組織工程學的主要目的了。

1996年，Langer等人成功地在裸鼠身上創造了“人耳”，而引起國際轟動，這實為組織工程研究上的里程碑。換言之，在人體各部分如骨組織、軟骨、肌腱、皮膚、角膜、神經與血管等不同部位，若能適當地運用組織工程技術，將可完成組織修補與再造的夢想。而利用組織工程的技術將細胞變成組織或器官，作為受損組織的替代物，單憑細胞的培養是無法形成組織或器官，還需要借助高生物相容性(biocompatible)與生物降解性(biodegradable)良好的生物材料(biomaterials)，使得細胞能在適當的材料上逐漸形成具有型態和功能的相應組織和器官。因此組織工程的核心技術主要是建立細胞(cell)、訊息(signal)與生物材料所構成的支架(scaffold)的三維空間複合體，也就是具有生命力的活體組織，用以對病損組織進行型態、結構和功能的重建並達到永久性替代。^[1]但如何利用生醫材料構築一個細胞喜歡居住的基質(scaffold)，使這些細胞分裂、成長、及分化成具有特定功能的細胞，進而繁衍成特定的組織與器官？這包含了至少兩種以上的意義，一者為選擇一個良好的生物醫學材料使其具有合宜的物理性質，以避免醫療過程中時產生坍塌崩壞的情況；良好的生物相容性，防止目的細胞凋零死亡，且其降解產物不會影響週遭細胞生理。另一則為要讓生物醫學材料經過適當的加工所產生合適組織或細胞生長的面積結構，以利細胞貼附(adhesion)、結構中具有開放的孔洞型結構，以利養分的供給。並且作為細胞住所的生物材料支架必須具備適當的降解性，以配合細胞的繁殖速率又不阻礙其增生。

因此，若要將次微米或奈米科技運用在組織工程之上，主要的著眼點便落在面對不同組織與器官乃至其所構成的細胞型態如何篩選一個良好的基質材料、並進一步瞭解基質型態(morphology)對細胞的影響，最後結合上述結果再製備一種適合組織或細胞重建的多孔質基質。

二、微構形(Micropattern)的應用—基質材料的篩選及基質型態對細胞的影響

由上述可知，組織工程的首要是在於選擇良好的生醫材料到一個合適的生醫材料。而過去在尋找一種良好的生醫材料都是靠著每一位研究人員經由高分子的合成或修飾並經純化後，至測定其生物相容性、降解性…等等性質，接著再探討與目的細胞間的行為。而傳統的生醫材料的合成與修飾大都在試管與燒杯等級的實驗室用具中進行，但生醫材料中官能機團(functional group)的不同相對地對組織。細胞也會存在不同的生理反應性，為了選擇一個更好的生醫材料因而衍生出偌大的實驗量；這是多麼煩複的過程；而現今已有研究人員以製備基因體學(genomics)及蛋白質體學(proteomics)的研究方法，將其應用至生醫材料的研究上。^[2] 實際的作法是以微構形(後述)的技術將poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA)列印到載玻片上，再將各種不同的單體(monomer)以奈升(nanoliter)級的量同時進行自由基聚合反應，如此的生醫材料合成在一個大小為25mm×75mm的玻片上可得到不同1728個微量的生醫材料高分子，並且因為每個生醫材料的點(spot)都緊貼於載玻片上，因此不僅是清洗的處理很好進行；更使得後續對包括幹原細胞等目的細胞之行為反應也可同時進行，同時也可利用免疫染色法處理後，以微陣列(microarray)等相關技術進行判讀。這樣的研究使得組織工程有關生醫材料的篩選上的研究可大步地向前邁進。而這樣的研究中無論是在載玻片上的微列印(micro-printing)，亦或後段的微陣列判讀都是屬於奈米科技的應用範圍。

如果解決了生醫材料的篩選後，接著面對的問題就包含許多因素，包括尋找合適的型態和給與合適的訊息(signal)來刺激細胞各種細胞行為。另一方面，眾所皆知的細胞縱使經長時間培養也無法直接形成器官或臟器，再者就是將生醫材料植入至生體體內也無法與組織直接結合，因此必須以三度空間的型態與訊息控制，將生醫材料的表面加以修飾對細胞的貼附、型態、遷移、增生及分化等機能進行組織化的控制。雖然貼附型細胞的大小介於十數(μm)至數十毫米間，但集合多數細胞成為組織的關鍵並不只於細胞本身，串起或黏著細胞的細胞

間質(extracellular matrix, ECM)在細胞間傳遞各種訊息且使細胞形成一個具生理功能的組織。而構成細胞間質的各種生體結構大小卻都在奈米至次微米的範疇之內；因此如何製備一個介於奈米至次微米的型態來模擬體內環境就相形顯得十分重要了。

在過去，為瞭解基質型態對細胞的影響薄膜的製備包括(1)燒結法(sintering)、(2)拉伸法(stretching)、(3)軌跡浸蝕法(track-etching)、(4)相轉變法(phase inversion)以及塗佈法(coating)。^[3] 其中相轉變法的用途最廣，可製備各種具表面微構形與內部孔洞結構型態的薄膜。相轉變是一種以某種控制方式使聚合物以液態轉變為固態的過程。換言之，以溶劑系統為連續相的高分子溶液(solution)，轉變為以高分子為連續相之凝膠(gel)，再經進一步固化形成薄膜。相轉化法的製程方式有許多，例如溶劑蒸發、控制蒸發沈澱、熱沈澱、蒸氣相沈澱及浸泡沈澱等。而溶劑蒸發又稱乾式法，浸泡沈澱又稱濕式法。其中乾式法(dry processing)是藉溫度變化，直接使高分子溶液之溶劑揮發，促使高分子之濃度增加，並沉澱形成凝膠，最後固化成薄膜。膜材結構為緻密型(dense)。而濕式法(wet processing)則是將高分子溶液浸入非溶劑中，藉由溶劑與非溶劑之擴散交換，使高分子溶液產生相分離，沉澱形成凝膠，最後形成薄膜。膜材結構是由傳質與相分離兩種共同決定，可得具有皮層的非對稱膜。為了能精確轉印微構形，或者製造具有骨架材性質的孔洞結構。一般的製備方法是首先將配製好的高分子溶液，於適當溫度下促進溶劑揮發，在固定時間後，將未完全揮發而帶有殘餘溶劑的凝膠浸入非溶劑中，進行溶劑與非溶劑之擴散交換，使高分子凝膠產生相分離。形成具有皮層結構，及孔洞層結構之非對稱型薄膜。

軟蝕刻技術最大的特點是在轉印構形的過程中，多了矽膠聚二甲基矽氧烷(PDMS, polydimethylsiloxane)當作介質，因為矽膠是軟的，故稱軟蝕刻。此矽膠介質的作用是在降低製程成本、縮短製造時間以及大量製造。轉印介質可被重複使用，所以當具有微構形的模型母模(master)被製造出來時，便可利用轉印介質無限制次數的將微構形複印在高分子基材上。^[4] 軟蝕刻有幾種不同的形式，可依照所需達成的目的，及考量其便利性，來選擇適合的製作方法。現階段所採用的製作過程，主要分為三個部份：(1)將立體微構形雕刻於母模(master)上；(2)將立體微構形複製到轉印膠片(PDMS)上；(3)將立體微構形轉印到高分子膜材上。一般來說使用來當作母膜的材料有不銹鋼、矽晶片等，材料的選擇取決於母膜製造的程序，以及要求的精度，舉例來說，以矽晶片為母膜的材質時，可以用YAG雷射雕刻的方式來製作微構形；但YAG雷射缺點是因為以雕刻的方式，將構形逐漸刻在基材上，故需要較長的時間。雖可把尺寸精確到20 μm 等級，但是非完整平面。

母模也能以金屬切削的方法進行，其作法是首先以機械工具提供動力，使欲加工的工件 (workpiece)與切削刀具間作適宜的相對運動。加工時，刃口(cutting edge)會移除一層工件材料，間歇式或連續式的脫落，以製得所需的表面。一般使用裝有微處理之數控系統(numerical control) 的切削中心機稱為—CNC(Computer Numerically Controlled)綜合切削中心機將工件經一次安裝而完成平面銑削、端面銑削、鑽孔、鉸孔、攻牙等多種操作。它具備了可定位、自動化控制、最小單位設定、與重現精度等功能。此方式最小的設計尺寸為500 μm ，但微構形的平整度不夠。

上述的方法都是早期微構形(micropattern)的研究方法，但自從導入半導體製程的光學蝕刻(lithography)，精密度就大幅上昇至奈米級，其早期的作法是首先在底片上設計構形圖案，當作光罩，放於表面有塗佈光阻劑的不銹鋼基材上，照射紫外光，沒有光罩遮住之光阻劑就會發生反應而可被去除，再置入蝕刻液中，讓蝕刻液把表面沒有光阻劑保護的部分蝕刻掉，如此便可製造出所需微構形。缺點是在具光阻劑保護區域的周圍，也會受蝕刻液的影響，因此構形會出現部分缺陷。另外此化學蝕刻液在微構形深度的控制上也有所極限，約80 μm 左右，精度雖只達100 μm ，但是微構形具有很好的平整度，可滿足此實驗的需求。利用矽膠在凝膠狀態時的可塑性，將母模的微構形轉印於其上，待矽膠固化後，便得到與母模相反的微構形。由於其材料成本低廉，可以大量製造，又可以重覆使用，非常符合經濟效益。矽膠具有化性穩定、無毒性、具有物理柔韌度…等等多種優點，尤其它可和許多高分子溶液配合使用，又易與母模或基材分離，能使微構形的轉印不易失真。

但新近使用微接觸式印刷(Microcontact printing)及奈米轉印(Nanoimprinting)則是應用電子束加工技術所製成的鑄模(mold)，在基板表面形成所需圖案，這種技術較傳統曝光微影技術(光阻塗佈、曝光、微影)簡單且鑄模可重複使用。隨著母模小型化，由於光的特性限制及高能輻射的需求，為了達到奈米級的圖案(pattern)尺寸，使得在曝光顯影(photolithography)製程上需要較微米製程更複雜及精密的製程設備及技術，這也導致高設備成本及高技術風險的缺點。因此，不論是國內外業界或是學界，在奈米級的製程投入大量資金及人力，不遺餘力開發較低的成本及較可靠技術，早日達到奈米元件量產的技術及設備需求。

印刷(printing)有其方便性及簡易性，只要製作一個印刷鑄模(mold)，快速且多次印刷或圖案轉移(pattern transfer)即可達成。印刷為一加成(additive)製程，因此材料的浪費亦可至降低。除此之外，印刷亦可運用在大面積圖案製備(patterning)過程上，大大降低生產成

本。然而就微影及蝕刻製程而言，昂貴的光罩及設備成本，為微構形導入50奈米級障礙之一。而在微小化圖案製備技術中，印刷及轉印(imprinting)已被廣泛應用在圖案製備及元件製作上。而實際的印刷技術的微接觸印刷(Microcontact printing, μ -CP)原理及相關技術，是藉由基板表面與高分子材料製程之印刷鑄模間的conformal contact，接觸式印刷(contact printing)是一種具有高經濟效益及高效率的圖案轉製的方法。在接觸式印刷第一步必須先製作一個高分子材質之印刷鑄模。其製程先利用光阻塗佈、曝光、顯影及蝕刻技術之成熟半導體製程製作一個母模，再將單體(Monomer- dimethylsiloxane, DMS)溶液倒在母模上，經UV照射後，聚合固化而形成高分子，經由此轉印過程高分子鑄模，具備母模所擁有的圖案，之後再利用此高分子鑄模來進行圖形印刷製程。以PDMS優點包括，PDMS不像矽基板為一硬且無彈性之物質，它是一彈性體(elastomer)，可以有足夠的形變，與大面積基板表面與粗糙度達微米的表面有相當好的接觸；高分子的彈性特質使得PDMS於印刷後容易與基板分離；且PDMS的低介面自由能及化學鈍性的特質，縱使塑膠基板也不易與PDMS反應；均質且透明的特性，因此可以利用UV光源($\geq 300\text{nm}$)來進行聚合反應產生PDMS鑄模；它亦具有耐磨，可重複使用的特性；它也可利用表面處理來改善PDMS表面特性。然而PDMS並非無罩門，例如因軟性物質具彈性的特性，在PDMS上的圖案受重力的影響而於印刷時產生缺陷(defect)。當圖案的長高比(l/h)(aspect ratio)介於0.2~2.0之間，可得到無缺陷的印刷鑄模。圖案中之間距也會影響到印刷的精度。此外，由於高分子本身的化學特性，PDMS易與非極性有機溶劑(如甲苯、己烷)反應而體積有膨脹。

另一種製備奈米級微構形的方法是微接觸印刷。微接觸印刷是利用此一具彈性的PDMS壓印模進行一非傳統微影的方法。藉由烷基硫化物(Alkylthiols)與金屬基板的快速化學反應，將具特殊反應官能基之分子金屬基板上形成自動組合分子單層膜(Self-assembled Monolayers, SAMs)。這整個印刷過程極為簡易，一個彈性PDMS壓印模被用來將「分子墨水(Molecular inks)」移轉至基板表面，而此分子墨水即為溶於乙醇的烷基硫化物，通常只須濃度大於10mM的溶液，接觸時間在10秒。最為廣泛應用的金屬為金與銀，因為二者與烷基硫化物可快速地形成規則的分子膜。藉由與金屬的快速化學反應，可與金屬基板上產生與壓印模相同圖案的分子單層膜。再利用此分子膜為一「蝕刻阻質(etching resist)」進行蝕刻而產生所需之圖案。另一種微構形的製備方法是奈米轉印顯影(Nanoimprinting lithography)，它是一種新的奈米級的製程技術，可製備至10nm圖案尺寸。相對於電子束顯影(e-beam lithography)，奈米轉印可減低對線路或元件的損害。奈

米轉印製程程序除了利用熱塑型高分子、紫外光聚合型高分子，亦可作為此轉印技術所須之高分子。就概念上而言，奈米轉印與微接觸印刷類似的技術。但就製程技術而言，二者卻大不相同。微接觸印刷是利用高分子鑄模及分子墨水，藉由金屬與分子墨水來形成蝕刻阻質。而奈米轉印是利用二氧化矽鑄模及具低glass transition temperature熱塑型高分子來形成蝕刻阻質。上述二種非傳統曝光顯影製程技術，至今皆已達到100nm以下，甚至50nm的圖案尺寸。

瞭解這些微構形的製備方法與簡單的原理後可發現，選擇不同方法可讓生醫材料產生的型態變化由十數奈米(nm)至數十微米(μm)，如此就可創造出不同的型態與環境來瞭解細胞的感受性。另一方面就目的而言，在組織工程的相關研究中常利用上述製備微構形的技術用來研究目標組織的細胞之貼附、型態、遷移、增生及分化等機能進行組織化的控制，而實際的作法則是非常多樣性。例如以不同材料配合各種溝槽寬度及深度來探討不同細胞對這些型態變化的感受性；或是以fibronectin、laminin...的各種生物物質(biosubstrate)披覆(coating)在微構形之上來探討細胞貼附、型態、遷移、增生及分化的影響。而這些方法在組織工程學的研究上都是十分有用的。

三、多孔質基質的製備—電氣紡絲(Electrospinning)

而累積了生醫材料的良好選擇及瞭解合適的型態與表面修飾後，接著就是製備一個合適的多孔質生物支架。以目前製作生物支架方式的部分非常多樣化，一般常見有(1)纖維鍵結(fiber bonding)：將高分子纖維進行編織、纏繞形成具有整齊的開放性孔洞型結構，然而物理性質不足，因此常用於軟組織^[5]；(2)溶劑鑄造/鹽析(solvent casting / particulate leaching)：將高分子聚合物溶解，加入鹽類攪拌均勻，置入模具中等待溶劑揮發後，即形成一定的形狀。再脫模具將支架取出，鹽類溶解析出並乾燥。此方法具有藥品廉價並且適用的聚合物種類較多等優點。但製備時間長且表層常出現皮膜，皮膜將會影響細胞的植入及移植後細胞在支架內部的生長。此外，支架內部缺乏相互聯結的構造，因此降低了植入細胞的生存能力進而造成細胞在支架內部分配不均勻^[6, 7]；(3)冷凍乾燥(freeze drying)：將高分子溶於苯中，以液態氮急速冷卻後，再以 -50°C 下抽真空乾燥。其優點在於支架製備方法簡單及製程時間短。雖然此技術可得孔隙率高達95%的支架，但孔洞的大小被侷限在13-35 μm 的範圍，並不適合細胞的生長；(4)相分離(phase separation)：將高分子聚合物與Naphthalene加熱形成均勻溶液，利用噴霧法形成霧狀累積在模具上驟冷，以低壓加熱使Naphthalene直接昇華。此做法會使原本分散相的高分子聚合物轉變為連續相，而形成孔洞。其優點為可藉由改變溶液中高分子的濃度調整孔洞尺寸。

但此方法製得的支架具有機械性質強度不佳，孔洞結構容易變形等缺點；(5)氣體發泡(gas foaming)：將高分子聚合物預先成固定型，置入耐壓器中，通入高壓惰性氣體使其滲入固定型的內部，隨後急速釋放氣體降低壓力，即形成有孔洞的支架。此方法具有製程快及步驟簡單之優點，並且可藉由改變氣體的壓力及溫度改變孔洞的尺寸。但美中不足的是無法有效的控制孔洞均勻分布，使得後續細胞植入結果呈現不均的現象。^[8, 9] 除此之外，尚有堆疊法，高分子/陶瓷複合發泡法等等，而這麼多的製作方式，大多面臨了幾個困擾，像是物理性質不佳、孔洞大小無法控制與開放型孔洞的挑戰，以致於無法為細胞打造一個舒適的家。

近幾年來，有一些學者利用電氣紡絲(electrospinning)技術，運用於生物支架製作，例如，X.M. Mo 等人用 Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) [P(LLA-CL)]並利用電氣紡絲方式製作高分子支架，觀察平滑肌細胞(Smooth Muscle Cell, SMC)與內皮細胞(endothelial cell, EC)在電紡支架(electrospun scaffold)上的增生情況。^[10] H. Yoshimoto 等人在2003年時，將 Poly(ϵ -caprolactone) [PCL] 高分子同樣利用電紡製作非編織型纖維支架，將間葉系幹原細胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 培養在這些基材上，而因為經電氣紡絲架構出來的支架，表面積比非常大，因此對於間葉系幹原細胞的貼附有相當大的幫助。^[11]

電氣紡絲最早被發現在1900年，當時人們將熔融狀態的封蠟(sealing wax)置於一個高壓電場中，便發現會有固態的纖維由高壓端被射出，最後沈積在接地點形成薄膜狀沈積物。而在1934年學者 Formhals 申請了數個電氣紡絲的專利，描述利用靜電力場製造高分子纖維之裝置^[12-14]，至此之後研究方向便著重在溶液狀態的物質上。1966年時學者 Simons 利用電氣紡絲成功製造出輕薄的不織布型態薄膜。^[15]

電氣紡絲的基本原理是利用一高壓電場作為驅動力^[16]，將含有高分子的離子溶液或熔融狀態的高分子置於毛細管中，並接上高電壓，產生一能量強大的高電壓差，利用此一高電壓差，使溶液在毛細管的一端形成泰勒錐(Taylor cone)，當電壓逐漸升高之後，電場電壓會大於溶液的表面張力(內聚力)，溶液隨即脫離泰勒錐射出形成一飛行軌跡(jet)，當高速的飛行高分子溶液逐漸接近收集板時，由於拉扯的電場面積變大，便會發生展開(splaying)的現象，使飛行的高分子分裂成更細小的纖維，沈積於收集板(collector)上。^[17] Baumgarten 更利用電紡至做出直徑只有0.05~1.1微米的纖維，更印證了電紡能達奈米尺寸的能力。^[18] 電氣紡絲的高分子纖維直徑可藉由電場強度、溶液黏度等變因精準控制在數毫米到一百奈米(1 μ m~100nm)間，平均散佈於收

集板上，形成沒有方向性的不織布薄膜，同時纖維與纖維間也會形成交錯連結的網路結構(network)，更加的提升了薄膜的張力強度，不織布的型態也消除了各方向的弱點。^[19]

利用電紡製作生物支架時，還可以藉由電紡過程中的各項參數，例如：高分子本身的親疏水性、高分子溶液黏度、電導度、電場強度與收集的時間等，去改善支架的物理性質，像是纖維直徑、孔洞率、拉伸強度等。^[20-23]

(一) 型態控制

排列纖維(Aliened Fiber)

早期的電氣紡絲大多採用平板式的收集型態，以至於得到的這些奈米級纖維堆疊形成的高分子薄膜都為非編織型態(non-novel)，也就是無法控制纖維排列方向。因此近幾年來，各式各樣的電紡設備一直出現，目的希望能控制電紡過程中產生排列纖維(aligned fiber)，讓細胞遷徙(migration)時擁有引導作用。2004年X.M. Mo等人就用Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) [P(LLA-CL)]並利用電氣紡絲方式製作具有排列型高分子支架，將肌動蛋白(actin)與肌凝蛋白(myosin)分別培養在具有順向排列的纖維支架上，發現細胞沿著纖維方向生長。

甚至也有一些研究者，改善電紡纖維的編織型態，形成交錯型或是多角型的基材(matrix)與多層次型電氣紡絲(multilayering electrospinning)製作出各式各樣的生物支架。然而這些集絲設備大致上可分為(A)滾筒型收集式(a cylinder collector)。^[10, 24-26] (B)支架式(a frame collector)。^[27] (C)電場控制式(field technique)。^[28]

本研究室另將PLLA/CH₂Cl₂ (14wt%)高分子溶液經電紡並採用滾筒型收集式，將纖維收集至內徑0.6mm的管形物外後取出管狀的PLLA管狀支架，而這樣的管型支架，因為是由許多纖維(平均直徑：10 μ m)交織形成，因此具有多孔狀(porosity)，將有助於細胞貼附與增殖。未來倘若能運用各種材料搭配的變化，如collagen或chitosan等不管是天然系高分子^[26, 29]，或是合成系高分子^[30]，進行多層次的電紡，進行細胞培養將可達管形組織再造之可能。

(二) 孔洞控制(Controlled Porosity)

由於早期在組織工程的支架製作，孔洞率與孔徑大小的調控具有相當難度，因為仍須考量整體支架的物理性質，除此之外還得讓孔洞之間有連通性，讓細胞生長與培養液供給順暢。如此孔洞的控制尤顯出在組織工程上的重要性，另外孔洞大小控制的作用，就是控制特定細胞的進出。

像是創傷敷料(Wound dressing)利用薄膜狀材料作為大面積或重

度燒傷之創傷敷料，以防止傷口水分蒸發造成脫水，同時防止細菌感染，而且提供環境讓生體組織移入繁殖^[31]，傷口表面需保持足夠的濕潤以加速治療效果，但傷口及敷料間不能有體液累積以防感染^[32]，通常創傷敷料多屬非對稱型結構，上有皮層保護傷口不受感染並防止脫水且可排出體液，下有多孔層可吸附體液並提供細胞生長及組織重建^[33]。而利用電氣紡絲此種單一加工技術，將能有效控制薄膜的孔洞大小。

本研究室利用電氣紡絲之技術，以Poly-L-lactic acid(PLLA)與Polybutylene succinate-co-adipate(PBSA)高分子為溶質，CH₂Cl₂、CHCl₃等溶液為溶劑所構成的溶液製備具備奈米結構之薄膜以作為牙科用引導組織再生(guided tissue regeneration, GTR)或骨引導再生(guided bone regeneration, GBR)等薄膜。實驗結果經由電氣紡絲過程所得之生物降解性薄膜，同時經由DSC熱分析及X-ray繞射測試發現，電氣紡絲過程不會改變或影響高分子之結構及物化性質且此組織再生膜孔洞大小能精準備控制，在離體實驗中亦發現，纖維降解應該與纖維直徑及膜孔大小有關，直徑愈小降解發生時間較晚，但降解速率較快，而膜孔愈大降解愈快，同時發現其薄膜能在PBS緩衝溶液中支撐最少5週時間，其符合臨床隔離膜或組織再生膜之要求。

(三)物質導入

除了生物支架外與薄膜性生醫材料應用外，也有一部份的學者將藥物釋放(drug delivery)概念導入電氣紡絲，將抗癌藥物(paclitaxel)、抗生素(rifampin)或是抑菌劑(tetracycline)均勻混入生物可吸收性高分子(bioresorb-polymer)溶液後，經電紡後便能這些藥物包覆於細小纖維中。^[34]形成具有特殊效果的藥物載體，讓藥物隨著高分子聚合物降解，進行釋放。如此一來，將可藉由本身高分子降解特性與電紡產生的特質(纖維直徑、空洞大小、親疏水性)，達成理想的控制釋放(controlled release)曲線。

甚至有學者將DNA質體、生長因子(growth factor)及細胞激素(cytokines)利用電紡技術將這些物質包覆在生物可吸收與生物相容性良好的高分子中，希望當這類高分子支架在體內隨時間降解時，蛋白質便能隨之釋放進行作用，加速組織再生或是器官再生。^[35]

四、結語

雖然奈米科技與組織工程兩者的範圍都極為廣泛，但兩者的交集處都是有限的。如何把奈米科技等微觀(micro domain)的觀點應用在任務導向的組織工程之上，卻是一種心思的運用。譬如，本文前段所提的微構形是將用於半導體的技術經由巧思，加上生理物質的固定

化(immobilization)技術，則可使生醫材料的篩選快速化，此與藥物、基因體或蛋白質體的篩選有著異曲同工之妙；並且能瞭解組織或細胞對於型態變化導致的影響，實在是一種好的工具。

而電氣紡絲是一種設備成本低，控制能力佳，產品附加價值高且安全的單一加工方式，可將高分子製備成特定結構尺寸的薄膜狀材料。就像是牙科中的隔離膜外，及來還可望用於創傷敷料、藥物釋放載體、過濾材甚至是生物基材上。尤其在組織工程上支架的開發，電氣紡絲帶來的優點：孔洞大小、孔洞率、高表面積比與物理性質的調控，這些優越的特質，讓組織工程上基材製備方式，又多了一項值得考量的作法。雖然電紡技術不是一件新穎的技術，但比起傳統的熔融紡絲技術：熔融、擠壓、捲曲與假捻等複雜步驟。相較而言，電紡的單一加工方式的經濟效益似乎是比較大；況且電氣紡絲具有將高分子纖維奈米化的能力，使得應用範圍更加廣泛。在工業方面，如奈米感應器(nano-sensor)^[36, 37]、衣物材料的開發^[38, 39]，像是防彈衣(protective clothing)、液晶裝置(liquid crystal devices^[36, 40, 41]、止血性繃帶，甚至於清潔用品都可藉由電紡技術進行開發。

五、主要參考文獻

1. Mikos, A. G., G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti and R. Langer. 1993. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* 14(5): 323-330.
2. Anderson, D. G., S. Levenberg, and R. Langer. 2004. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *nature biotechnology* 22(7): 863-866.
3. Mulder, M., Basic Principle of Membrane Technology. 1991. Kluwer Academic Publisher: London.
4. Deng, T., L. B. Goetting, J. Hu, and G. M. Whitesides. 1999. Microfabrication of half-wave rectifier circuits using soft lithography. *Sensors and Actuators A: Physical* 75(1): 60-64.
5. Freed, L. E., J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer. 1993. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 27(1).
6. Mikos, A. G., Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, and R. Langer. 1993. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res* 27(2): 183-189.
7. Mooney, J., D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, and R. Langer. 1996. Novel approach to fabricate porous sponges of

- poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 17(14): 1417-1422.
8. Mo, X. M., C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna. 2004. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 25(10): 1883-90.
 9. Yoshimoto, H., Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24(12): 2077-82.
 10. Formhals, A. 1934. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent No. 1,975,504.
 11. Formhals, A. 1939. Method and apparatus for spinning. US Patent No. 2,160,962.
 12. Formhals, A. 1940. Artificial thread and method of producing same. US Patent No. 2,187,306.
 13. Simons, H. L. 1966. Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics. US Patent No. 3,280,229.
 14. Larrondo, L. and R. J. Manley. 1981. Electro- static Fiber Spinning From Polymer Melts. II. Examination of the Flow Fiber in an Electrically Driven Jet. *Journal of Polymer Science* 19: 921-932.
 15. Reneker, D. H. and I. Chun. 1996. Nanometer Diameter Fibers of Polymer, Produced by Electro- spinning. *Nanotechnology* 7: 216-223.
 16. Baumgarten, P. K. 1971. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J of Colloid and Interface Science* 36: 71-9.
 17. Kim, K., M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. S. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou. 2003. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials* 24(27): 4977-85.
 18. Fridrikh, S. V., J. H. Yu, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge. 2003. Controlling the fiber diameter during electrospinning. *Phys Rev Lett* 90(14): 144502.
 19. Boland, E. D., T. A. Telemeco, D. G. Simpson, G. E. Wnek, and G. L. Bowlin. 2004. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 71B(1): 144-52.
 20. Khil, M. S., S. R. Bhattarai, H. Y. Kim, S. Z. Kim, and K. H. Lee. 2004. Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*.
 21. Kidoaki, S., I. K. Kwon, and T. Matsuda. 2005. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering

- matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* 26(1): 37-46.
22. Boland, E. D., G. E. Wnek, D. G. Simpson, K. J. Palowski, and G. L. Bowlin. 2001. Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of poly(glycolic acid) electrospinning. *Macromol Sci. Pur Appl. Chem.* A38(12): 1231-43.
 23. Bornat, A. 1987. Production of electrostatically spun products. US Patent No. 4,689,186.
 24. Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna. 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63: 2223–2253.
 25. Deitzel, J. M., J. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and T. N. C. Beck. 2001. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 42: 8163-70.
 26. Jin, H. J., S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge, and D. L. Kaplan. 2002. Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3(6): 1233-9.
 27. Fong, H., W. D. Liu, C. S. Wang, and R. A. Vaia. 2002. Generation of electrospun fibers of nylon 6 and nylon 6-montmorillonite nanocomposite. *Polymer* 43(3): 775-780.
 28. Mstsuda, K., S. Suzuki, N. Isshiki, K. Yoshioka, R. Wada, S. Hyon, and Y. Ikada. 1992. Evaluation of bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic. *Biomaterials* 13: 119.
 29. Mstsuda, K., S. Suzuki, N. Isshiki, and Y. Ikada. 1993. Re-freeze dried bilayer artificial skin. *Biomaterials* 14: 1030.
 30. Hinrichs, L., E. Lommen, C. Wildevuur, and J. Feijen. 1992. Fabrication and characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing. *J. Appl. Biomater* 3: 287.
 31. Zeng, J., X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing. 2003. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *J Control Release* 92(3): 227-31.
 32. Luu, Y. K., K. Kim, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou. 2003. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release* 89(2): 341-53.
 33. Kwoun, S. J., R. M. Lec, B. Han, and F. K. Ko. 2000. A novel polymer nanofiber interface for chemical sensor applications. In: *Proceedings of the 2000 IEEE/EIA International Frequency Control Symposium and Exhibition.* : 52-7.
 34. Kwoun, S. J., R. M. Lec, B. Han, and F. K. Ko. 2001. Polymer nanofiber thin films for biosensor applications. In: *Proceedings of*

- the IEEE 27th Annual Northeast Bioengineering Conference: 9-10.
35. Gibson, P. W., H. L. Schreuder-Gibson, and C. Pentheny. 1998. Electrospinning technology: direct application of tailorable ultrathin membranes. *J of Coated Fabrics* 28: 63.
 36. Gibson, P. W., H. L. Schreuder-Gibson, and D. Riven. 1999. Electrospun fiber mats: transport properties. *AIChE J* 45(1): 190-5.
 37. Gibson, P. W., H. L. Schreuder-Gibson, and D. Rivin. 2001. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers. *. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 187: 469-81.
 38. Waters, C. M., T. J. Noakes, I. Pavery, and C. Hitomi. 1992. Liquid Crystal Devices. US Patent No. 5,088,807.

第二部分 實驗

實驗一 金奈米顆粒與棒狀材料製作及其在生物檢測的應用

何佳安副教授 國立清華大學化學系

黃喧益副教授 國立清華大學化學系

徐瑋玲 國立清華大學化學系

一、前言

奈米材料泛指1~100nm大小的晶粒所構成的物材。當物質到達奈米等級，排列在表層的原子數相對於全部的原子數的比例較大塊材料中的比例為高。而由於在表層的原子出現高能階的不配對電子，因此奈米物質較大體積的物質具備高的表面能量，此時傳統物理學理論已經無法說明其物質行為。

由於奈米物質物理特性的改變，使奈米晶粒具備比傳統物材更優異的物理化學特性。因為物材的尺寸奈米化因而提昇其光、電、磁及能量的傳導性質。由於其表面積的增加，使得奈米物質具有較高活性，可使觸媒之催化反應加快。物質奈米化的程度也會改變其對光的吸收行為。攜帶藥物的奈米載體進入生物體內，也因為奈米化的結果增進藥物在組織中穿透的特性。^[1-2]

在檢測方面，DNA生物晶片的偵測技術即利用金奈米粒子為材料。當金以奈米粒子型式存在時，其光學性質隨著粒子大小而變化。這類的偵檢技術通常是利用DNA抓住鑲有互補DNA片段的奈米粒子而成色或是利用DNA為模板，促成奈米粒子整齊排列，進而形成電流通路，而達到偵測DNA的目的。

在影像技術方面，過去文獻指出^[3]，將金奈米柱(gold nanorods)注入老鼠血管中，並以雷射光源掃描皮膚，通常可獲得較傳統染劑所產生的影像強度增加近60倍。普渡大學(Purdue University)生醫工程與化學系研究團隊^[4]將長約60奈米、寬約20奈米的金奈米柱注入老鼠的血管中，當奈米柱流經耳部，再以雷射光掃描皮膚以定位奈米金柱。此法較傳統式(例如使用rhodamine的螢光染劑法)獲得更明亮的影像。基於紫外光對人體的殺傷力，而可見光又沒有足夠強的能量順利穿過組織，因此在研發先進醫學影像設備時，對於以光學設備分析血管或動物體深部組織時，常遭遇障礙。普渡大學研究人員^[4]發現，具有一定長寬比的金奈米柱若以800到1300nm波長的近紅外線光照射時，呈現特別明亮的影像。該研究團隊指出，金奈米柱非常適合於雙光子螢光(two-photon fluorescence)影像法，因此將雙光子螢光影像法以及其他的非線性光學(non-linear optical)效應，運用於先進影像法的研發上，可獲得較傳統螢光影像法更高的對比及更明亮的影像。對於早期癌症偵測的先進醫學影像設備研發是極大的突破。

有鑒於奈米金粒子及奈米金柱在生物醫學上的價值，本章將介紹兩個實驗，分別為(一)金奈米粒子^[5]與金奈米棒^[6]的製作，(二)金奈米粒子在生醫檢測的實作。

二、實驗一：金奈米粒子與金奈米棒的製作

(一) λ 金奈米粒子製作實驗

1. 器材：

250ml圓底瓶

冷凝管

2. 藥品：

0.01% H_{AuCl}₄

1% sodium citrate

3. 步驟：

(1) 250ml圓底瓶中加入100ml×0.01% H_{AuCl}₄，架上冷凝管加熱至沸騰。

(2) 取1ml×1% sodium citrate迅速加入沸騰的上述溶液，加入後再沸騰10min，將反應瓶移離加熱器，待反應冷卻(藉由水浴降溫)。冷卻後的溶液應呈現透明的橙紅色。

表一 金奈米粒子直徑製備比例：

0.01% H _{AuCl} ₄ (ml)	1% sodium citrate (ml)	直徑(nm)
100	5.00	10.0
100	4.00	15.0
100	1.50	25.0
100	1.00	50.0
100	0.75	60.0
100	0.60	70.0
100	0.42	98.0
100	0.32	147.0
100	0.25	160.0

(二) λ 金奈米棒製作實驗

Part I：seed solution 製備

1. 器材：

25ml錐形瓶 ×1

樣品瓶 ×1(需可容納20ml溶液)

10ml量筒 ×1

25ml燒杯 ×1

攪拌子 ×1

[註]上述器材使用前後皆須沖洗乾淨，並用超音波震盪器於去離子水中浸泡4~5分鐘

水浴槽 ×1

2. 藥品：

0.01M H_{AuCl}₄ (避光儲存)

CTAB (FW: 364.46)

NaBH₄ (FW: 37.83)

3. 步驟：

(1) 取約15ml d.d. water於燒杯中，進行冰浴。

(2) 取0.3645g CTAB於乾淨樣品瓶，並放入stir bar。

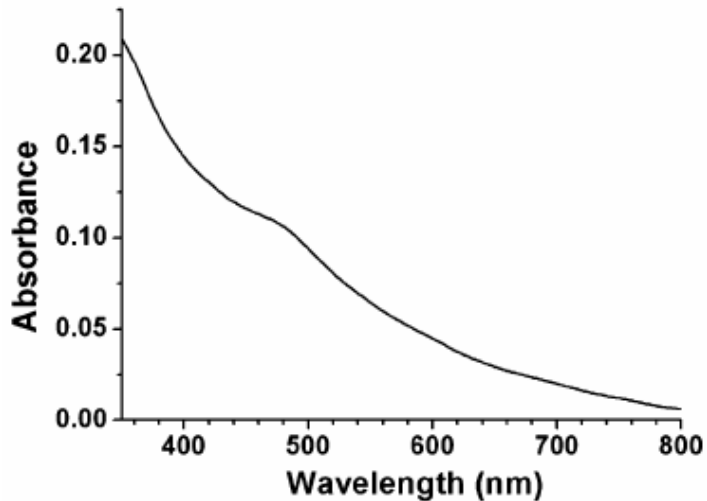
(3) 避光下，將250μl×0.01M H_{AuCl}₄加入10 ml量筒內，並加入d.d. water使溶液體積為10ml。將此溶液倒入步驟(ii)樣品瓶中，30°C水浴下攪拌，使CTAB溶解。

(4) 利用步驟(1)冰浴後的水配製10ml×0.013M NaBH₄溶液，並保存於冰浴中。

(5) 取450μl NaBH₄水溶液迅速加入步驟(3)水溶液中，此時溶液應由黃色轉變成褐色；攪拌5分鐘後於27°C水浴槽內放置2小時以上。

[註]顏色若轉為褐色帶紅，表示NaBH₄過量，則應重新製備。

(6) 取適量步驟(5)水溶液，測量其UV吸收(wavelength scan, 350 nm~1100nm)。應在400~600nm範圍出現shoulder(如下圖一)，若出現明顯波峰(peak)，表示粒子顆粒過大，建議重新製備seed solution。



圖一 UV adsorption spectrum of seed solution

Part II : growth solution 製備

(一)藥品：

0.01M HAuCl₄

CTAB

(二)步驟：

配置 55ml growth solution 含有 2.5×10^{-4} M HAuCl₄ 與 0.1M CTAB，並於 27°C 下保存。

Part III : gold nanorod (~350nm) 製備

(一)器材：

50ml 錐形瓶 ×1

25ml 錐形瓶 ×2

50ml 量筒 ×1

(二)藥品：

Seed solution

Growth solution

0.1M ascorbic acid (AA)

0.1M HNO₃

(三)步驟：

Day 1

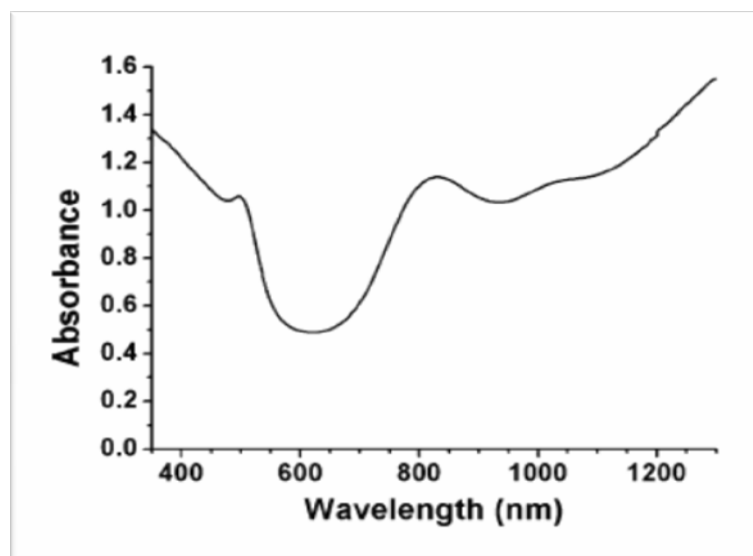
1. 按照下列表格及程序配置溶液A、B、C

	A (25ml 錐形瓶)	B (25 ml 錐形瓶)	C (50 ml 錐形瓶)	備 註
Growth solution	4.5 ml	4.5 ml	45ml	盡量避免氣泡產生
AA	25 μ l	25 μ l	250 μ l	
	Shake			溶液顏色由黃色轉無色
HNO ₃	×	×	300 μ l	

2. 400 μ l seed solution加入solution A(避免氣泡產生)，搖盪3~5秒後，取出400 μ l溶液加至solution B，再搖盪3~5秒。取出其中900 μ l捨棄不用，剩下的溶液(4ml)緩慢加入solution C(避免氣泡產生)。最後以parafilm封口，於27°C水浴槽靜置12hr。

Day 2

1. 將靜置12hr的solution C上清液倒掉，並以d.d. water沖洗錐形瓶瓶底。再將洗液移至離心管中，以2000rpm轉速進行20min離心。
2. 離心完成後，小心地移除上清液，將沉澱於底部的gold nanorods移至微量離心管中。
3. 取出20~40 μ l gold nanorod以d.d. water稀釋至體積約1ml，進行UV-near IR吸收光測量，可得結果如下圖二所示。(350~1300nm)



圖二 UV-near IR absorption spectrum of AuNR

三、實驗二：金奈米粒子在生醫檢測的實作

免疫層析試紙檢驗法(immunochromatographic test strip)具有可快速檢測、方便操作等優點，其結果多可直接用肉眼來分辨，適合一般人可直接在家檢測(如市售驗孕試劑)。由於金奈米粒子的光學性質隨著粒子大小而變化，因此本實驗設計根據Tamiya教授發表期刊“*Science and Technology of Advanced Materials*”的文章^[7]，選擇BSA(牛血清蛋白)作為model抗原，利用三明治免疫分析法，並結合免疫層析試紙技術，示範金奈米粒子在生醫檢測的應用。其實驗步驟如下：

Part I：檢測試紙製作

- (一)在試紙上離底部約3~4公分處，dot-blot上約 $2\mu\text{l}\times 2\text{mg/ml}$ anti-BSA antibody，並風乾。
- (二)準備一長方形小容器，內部加入blocking solution(約1% non-fat dry milk)，將試紙平放容器內，搖晃1hr，目的為block掉non-specific binding sites。
- (三)將試紙取出，並風乾。
- (四)再以真空抽乾。

Part II：抗體-金奈米粒子複合物製作

- (一)取出製備好的金奈米溶液2ml放入樣品瓶中，並加水稀釋至4ml。
- (二)於上液中加入anti-BSA antibody的 F_{ab} 片段200 μl ，繼續攪拌20min。

Part III：樣品BSA之偵測

- (一)取出適量的抗體—金奈米粒子複合物，於持續攪拌下與 $4\mu\text{l}\times 0.05\mu\text{g/ml}$ BSA均勻混合3min。
- (二)取出6 μl 混和液於試管內，並置入製備好的試紙。
- (三)試管內的溶液因毛細現象浸潤試紙，觀察試紙上固定有anti-BSA antibody zone的顏色變化。

四、參考文獻

- 1.莊尚餘、陳學禮、鄭旭君、王鈺元、朱鐵吉、林俊宏，奈米通訊，第十二卷，第三期。
- 2.http://www.sinphar.com/medical/no34/product_01.html (accessed May 2007)
- 3.Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W. & Webb, W. W.. 2003. *Science*. 1434–1436.
- 4.H. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, J-X Cheng. 2005. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:

- 15713- 15714.
5. Frens G. 1973. *Nature Phys. Sci.* 241, 20.
 6. H. Y. Wu, W. L. Huang, M. H. Huang. 2007. *Crystal Growth and Design.* 7: 831-835.
 7. N. Nagatani, R. Tanaka, T. Yui, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura, E. Tamiya. 2006. *Science and Technology of Advanced Materials.* 270-275.

實驗二 合金奈米中空球製作與體外光熱治療試驗

葉晨聖教授國立成功大學化學系

黃志嘉 國立成功大學化學系

一、前言

金奈米材料具有獨特的光學與化學特性，有別於巨相的金塊材，在目前有許多科學家對奈米級的金材料深感興趣並做深入的探討，金奈米粒子已廣泛的應用於生物醫學領域，在臨床治療方面，金奈米粒子的吸收光譜具有可調性，對紅外光有強的吸收特性，因此可預期作為光熱治療的反應試劑，利用金奈米粒子作熱治療有許多優點，如好的生物相容性，相較於傳統的化學療法與放射治療，金奈米粒子可針對癌細胞作專一性的目標熱治療，藉由施加雷射光照射，金奈米粒子可將光能轉為熱能再傳遞至相鄰的癌細胞，隨著這種高效率光熱傳遞機制，可使得癌細胞中蛋白質和DNA受熱而失去活性，另外一方面，為了達到有效的光熱轉換，如何製備具有近紅外光吸收的金奈米粒子，更是一大挑戰，是現在最為熱門的研究領域。

為了降低周圍組織在治療過程中，產生的過熱的現象，使用與雷射光光源相近的金奈米材料是首要考量，以期達到低的雷射光功率，因此如何選取或是合成適當的奈米金目前可採取的策略是：(一)改變金奈米的形狀，如棒狀或是具有紅外光吸收的非等向性金奈米、(二)製備金銀合金中空球。根據Xia研究團隊幾年來的努力，中空球型的金銀奈米材料良好的具有近紅光吸收，是相當有發展潛力發展成為新興的抗癌藥劑^[1]。

有鑒於奈米金銀中空球在未來研究的重要性，本章將介紹兩個實驗，分別為(一)金奈米粒子與金銀奈米中空球的製作^[2,3]、(二)金奈米與金銀奈米中空球在體外光熱治療效果的比較。

二、實驗一：金奈米粒子與金銀奈米中空球的製作。

(一)器材：

5ml & 25 ml & 100 ml 圓底瓶

冷凝管

加熱板

油浴鍋

(二)藥品：

5mM HAuCl₄ 水溶液

38.8 mM sodium citrate 水溶液

99% AgNO₃ 粉末
Mw 55000 (Poly(vinyl pyrrolidone) (PVP)) 粉末
99.8 % ethylene glycol溶液
99.9 % NaCl 粉末

(三)步驟：

1. 13nm金的製備

在100ml 圓底瓶中混合40ml的超純水與濃度5mM的HAuCl₄溶液，經由磁石攪拌使溶液混合均勻，架上冷凝管加熱至沸騰。取5ml sodium citrate 溶液迅速加入已沸騰的HAuCl₄水溶液，磁石維持強力攪拌，並在沸騰溫度下反應10 min，反應結束後，將反應瓶移離加熱器，自然冷卻至室溫。冷卻後的溶液應呈現透光性的葡萄紅色。

2. 金銀奈米空球的製備^[2,3]

- (1)將0.025g的AgNO₃與PVP高分子溶解在預先除水10ml的ethylene glycol溶液，並加熱至160°C反應1.5小時，反應過程需有磁石強力攪拌。
- (2)待反應結束後，將溶液冷卻至室溫，顏色此時呈現乳黃色，這是因為生成銀奈米粒子。
- (3)取250 μl銀奈米溶液稀釋到5ml的超純水中，並在回流管中加熱至沸騰，15分鐘後，將特定量體積的1mM HAuCl₄溶液逐滴滴入奈米銀溶液中，當所有HAuCl₄溶液加入後，繼續額外反應20 分鐘直至顏色不再變化。
- (4)以離心的方式收集反應後的產物，並以飽和食鹽水反覆清洗並重複離心的動作，以移除AgCl沉澱物，最後再用超純水洗淨產物。

(四)鑒定：

- 1.取適量的金奈米溶液或是金銀奈米空球溶液，用超純水稀釋後，測量其UV吸收(wavelength scan, 190nm~1100nm)。金奈米溶液應在400~600nm範圍出現位置在520nm的吸收峰，若吸收峰在高於520nm波長的位置有拖尾現象，則是有聚集的金奈米產生，應考慮重做。
- 2.金銀奈米空球溶液的吸收位置會隨著添加的HAuCl₄溶液量的增加而逐漸變紅位移。

(五)實驗紀錄：

按照下列表格，紀錄金奈米與金銀合金奈米溶液的反應變化與吸收光譜數值。

(i)初合成的13nm金奈米溶液。

	反應觀察變化	顏色	吸收波長	吸收強度
金奈米溶液				

(ii)紀錄不同HAuCl₄體積添加量的吸收光譜變化與顏色變化。

加入 HAuCl ₄ 體積	反應觀察變化	顏色	吸收波長	吸收強度
0.4 ml				
0.8 ml				
1 ml				
1.2 ml				

(iii)根據表(ii)以HAuCl₄體積(x軸)對吸收波長(y軸)作減量線圖，並將圖表貼在下面空白處。

三、實驗二：金奈米與金銀奈米空球在體外光熱治療效果的比較。

本實驗是一種模擬式的光熱治療實驗，稱為體外(in vitro)光熱治療法，因為限於實際活體細胞需要有無菌室的不便，以及細胞培養耗時冗長的局限，我們以簡單的體外試驗進行，藉由溫度的變化讓我們了解光熱轉換的效率。實驗步驟如下：

(一)樣品前處理：

- 1.計算13 nm金奈米溶液中金原子濃度(假設HAuCl₄為完全反應)。
- 2.(1)選取表(ii)中吸收波長最接近800nm吸收的HAuCl₄體積參數。
(2)計算金銀奈米空球中金原子的含量(假設HAuCl₄為完全反應)，並定量 溶液中金原子的濃度。
- 3.以圖(iii)中檢量線的數值，對應Xia發表的文獻值^[2,3]，找出所選取參數的吸收波長相對應的金銀元素比例，並換算溶液中金原子的濃度。

比較金銀元素比的理論值與圖(iii)檢量線所求得數值的誤差

備註：因為金的氧化還原電位高於銀(AuCl₄⁻/Au (0.99 V vs SHE)和Ag⁺/Ag (0.8V vs SHE))，所以銀奈米會被假設HAuCl₄氧化而Au離子會被還原，理論值計算可參照下列反應式：



- 4.(1)準備等重量的金奈米與金銀奈米空球，並分散於50ml的水溶液中。
- (2)配置同金原子濃度的金奈米與金銀奈米空球，並分散於50ml的水溶液中。
- (3)配置五種不同濃度的金銀奈米空球，並將之各別分散於50ml的水溶液中。

(二)體外(in vitro)光熱治療試驗:

- 1.將溫度計插入配置好的奈米溶液，紀錄雷射光照射前的水溫。
- 2.設定功率 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 的810nm雷射照射各種已配置好的溶液¹，經過8分鐘的照射後，紀錄照射後的水溫。
- 3.將功率提高至 $4\text{W}/\text{cm}^2$ ，並重複2.的動作。

(三)實驗討論:

- 1.請簡述13nm的金奈米與金銀奈米空球在經由雷射光照射後，水溫的變化，如果有差異，可能是什麼原因造成？
- 2.請問雷射光照射不同濃度的金銀奈米空球，水溫的變化情形？

四、主要參考文獻：

- 1.Chen, J., D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsn, Z.-Y. Li, H. Zhang, Y. Xia and X. Li. 2007. Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells. *Nano Lett.* 7: 1318-1322.
- 2.Sun, Y. and Y. Xia. 2003. Alloying and Dealloying Processes Involved in the Preparation of Metal Nanoshells through a Galvanic Replacement Reaction. *Nano Lett.* 3: 1569-1572.
3. Sun, Y. and Y. Xia. 2002. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science.* 298: 2176-2179.

實驗三 磁性奈米粒子與DNA的吸附與脫附測試

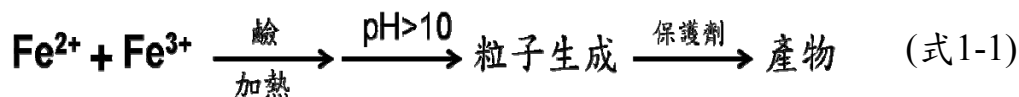
葉晨聖教授 國立成功大學化學系
鄭豐裕博士 國立成功大學化學系

一、前言

目前藥物治療目前主要以口服或注射為主，但實際上在人體內的效率有限，因為藥物會被血液稀釋掉，或是會引起免疫反應而受到干擾及破壞。藥物磁性導引治療提供一種新的方式解決了這些效率問題，並可以用更少量的藥物即可達到治療效果，磁性奈米粒子因為獨有的順磁性性質，因此可被利用作為磁性導引治療的藥物或生物分子載體，意即將藥物分子固定在磁性奈米粒子表面，再利用外加磁場控制磁性奈米粒子至目標處，然後再將藥物分子釋放出來以達到治療的效果。將藥物分子連接到磁性奈米粒子的技術目前已經很成熟，固定的方式有化學鍵結、正負電吸引力和高分子吸附等方式連接、而釋放的方式則可以利用酸鹼值的變化、鹽類濃度的變化、溫度的變化等。

製備氧化鐵奈米粒子的方法有許多種，常見的製備方法有研磨法、熱分解法以及化學共沉澱法。其中以化學共沉澱法是最普遍採用的方式，是因為此製備方法操作簡單、可大量製備、成本便宜和製備時間短等四個優點。化學共沉澱法主要原理是利用金屬離子在鹼性環境下會生成金屬氧化物的過程，但用此方法製備出來的磁性奈米粒子通常不甚穩定，因此容易產生沉澱，在一些應用領域是不允許沉澱的現象發生，所以許多改良的製備方法陸續被發表出來，但改善的效果仍然有限。目前為了有效改善共沉澱法的奈米粒子沉澱現象，因此在製備好的奈米粒子中加入保護劑以避免聚集或沉澱的發生，共沉澱法

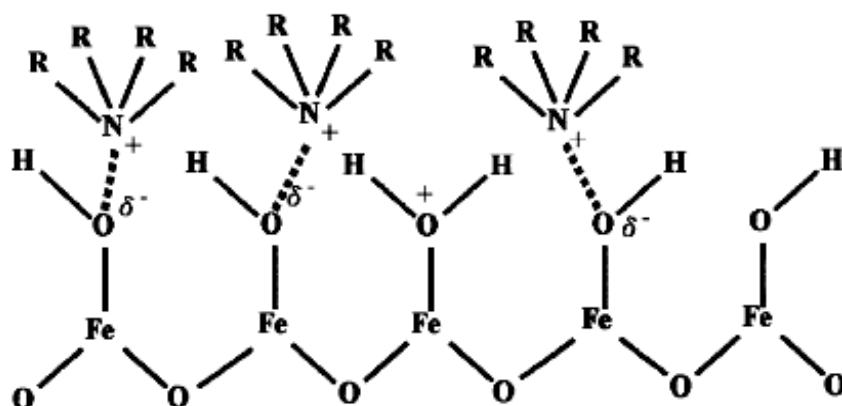
的反應機制可以用式1-1簡單表示：



反應中的使用鹼的主要以氨水或氫氧化鈉為主，兩者的作用有些許不同，但最後的產物是一致的，其反應是分別為式1-2和式1-3：

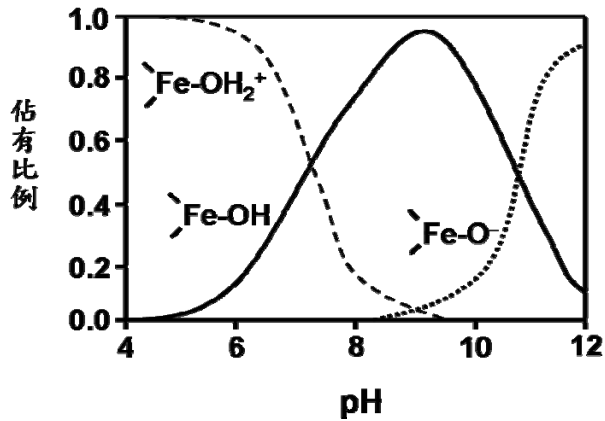


生成的四氧化三鐵若沒有保護劑可能會被氧化成三氧化二鐵，因此保護劑的選擇通常是會避免會氧化四氧化三鐵的化合物，目前最常用的是四級銨鹽(NR_4Cl)，四級銨鹽是屬於陽離子型之界面活性劑且帶有相當強的正電荷，不僅作為保護劑同時也維持四氧化三鐵的穩定性，圖一即是以 NR_4^+ 做為保護劑的示意圖。不同的保護劑會有不同的目的，四級銨鹽提供了強烈的正電性質，但缺乏可供衍生物的官能基，若當保護劑的末端暴露出功能性的官能基(比如 NH_2 和 COOH)就具有修飾外接化合物的能力。



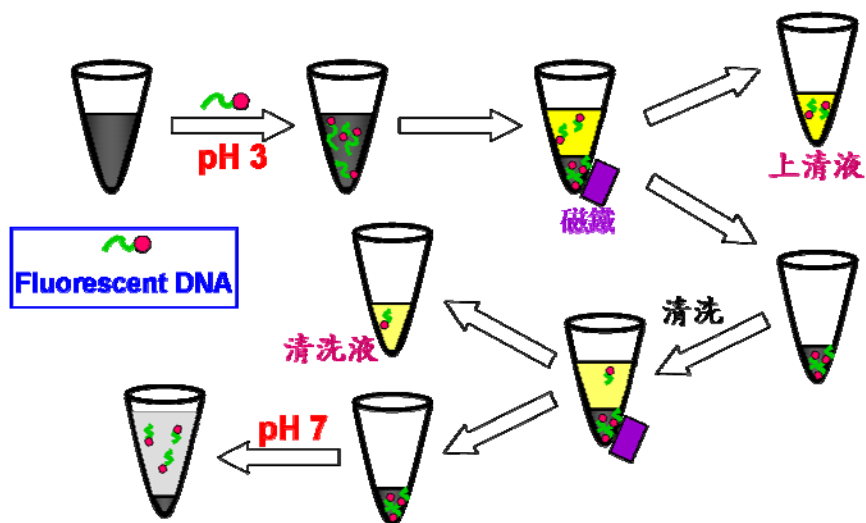
圖一 四氧化三鐵奈米粒子的表面示意圖。在中性的環境下，銨基離子透過靜電吸力吸附在表面，達到保護的效果

四級銨鹽在奈米粒子表面會隨著pH值的變化而有所反應(如圖二)，在弱酸的環境下可以穩定的在表面做為保護劑，但在較酸的環境下則會脫離表面，是因為奈米粒子表面的 O^- 會隨著pH的下降而變成 OH ，然後再變成 OH_2^+ 。當表面都變成 OH_2^+ 時則會與 NR_4^+ 開始產生排斥，因此會脫離表面，此過程中帶有負電荷的分子就會與表面產生靜電吸力而吸附到奈米粒子表面，即所謂的吸附行為。此時若加入中性或弱鹼性的溶液，奈米粒子表面的 OH_2^+ 會開始被溶液中的 OH^- 中和，會漸漸變成 OH 的狀態，當溶液的pH值慢慢增加，則將從 OH 漸漸轉變成 O^- 的狀態，因此帶負電荷的分子此時會因為負電-負電排斥力而脫離奈米粒子表面，達到所謂的脫附行為。



圖二 四氧化三鐵表面的OH基在各種pH值時的變化影響

本實驗將利用共沉澱法製備四氧化三鐵奈米粒子，利用製備出來的四氧化三鐵奈米粒子進行DNA的吸附與脫附試驗(實驗流程示意圖如圖三)，主要透過不同pH值的差異來觀察DNA的吸附狀況，並同時了解四氧化三鐵奈米粒子與DNA之間的吸附與脫附情形，以了解藥物磁性傳遞平台的設計概念雛型。



圖三 DNA吸附/脫附流程圖

二、實驗材料：

- (一) $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (三氯化鐵)。
- (二) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (二氯化鐵)。
- (三) 25%(w/w)氫氧化四甲基銨($\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$)。
- (四) 12N濃鹽酸(HCl)。

- (五) 20個鹼基的單股DNA。
- (六) 50個鹼基的單股DNA。
- (七) 磷酸鹽緩衝液(pH值為3、4、5、6、7、8、9)。

三、實驗步驟：

(一) 磁性奈米粒子的製備：

分別配製1M的三價鐵離子之鹽酸水溶液(鹽酸濃度為2M)和2M的二價鐵離子之鹽酸水溶液(鹽酸濃度為2M)。取5mL、1M的三價鐵溶液與1.25mL、2M的二價鐵溶液混合在一起，然後慢慢加入12mL、25%(w/w)的氫氧化四甲基銨($N(CH_3)_4OH$)直到pH值到達13，此過程會從澄清轉為暗棕色，最後會轉成黑色。繼續劇烈攪拌10分鐘後，在用磁鐵將黑色沉澱從溶液中分離，倒掉上清液然後用去離子水清洗黑色沉澱物，重複清洗2次以除去過量的雜質與四級銨鹽化合物，最後用去離子水將黑色沉澱物回溶即可得到四氧化三鐵磁性奈米粒子。

(二) DNA的吸附(參考圖三)：

- 1.取10 μ L製備好的四氧化三鐵奈米粒子分別與1000 μ L、10mM的各種pH值(3、4、5、6、7、8、9)之磷酸鹽/鹽酸緩衝液均勻混合，
- 2.然後加入1 μ L、100 μ M的DNA(20個鹼基的單股DNA和50個鹼基的單股DNA)反應10分鐘，反應過程中避免照光。將反應溶液以11000轉離心或用磁鐵吸引後，收集上清液，加入1000 μ L、10mM的磷酸鹽/鹽酸緩衝液(與反應時相同的pH值)且同時清洗沉澱物，再以11000轉離心或用磁鐵吸引並收集第二次上清液。
- 3.控制組的條件與實驗組均相同，但只加入等量的DNA而不加入四氧化三鐵奈米粒子。
- 4.吸附效率是以螢光光譜儀或UV-Vis光譜儀測量第一次與第二次上清液以及控制組的螢光強度或A260的變化所計算得到。(欲以螢光強度偵測時，DNA必須有螢光分子的連接)

(三) DNA的脫附(參考圖三)：

- 1.將吸附DNA的四氧化三鐵奈米粒子分別加入1000 μ L、10 mM的不同pH值之磷酸鹽/鹽酸緩衝液(pH值為7、8、9)混合10分鐘。
- 2.將反應溶液以11000轉離心或用磁鐵吸引後，收集上清液，並以螢光光譜儀或UV-Vis光譜儀測量上清液的螢光強度或A260的變化。

四、問題與討論：

- (一)本實驗利用氫氧化四甲基銨($N(CH_3)_4OH$)的目的為何，扮演何種

角色？

- (二)將各個pH值的DNA吸附量與脫附量做比較，並計算出在各個pH值時的吸附率。
- (三)比較含20個鹼基與50個鹼基的DNA之吸附效率，並試述其差異性及其原因？
- (四)利用圖二之四氧化三鐵表面對pH值變化的示意圖，試解釋問題2的現象？

五、主要參考文獻：

1. Suzuki, M., M. Shinkai, M. Yanase, A. Ito, H. Honda and T. Kobayashi, 1999. Enhancement of uptake of magnetoliposomes by magnetic force and hyperthermic effect on tumor. *Jpn. J. Hyperthermic. Oncol.* 15:79-87.
2. Stephen, O., L. Brus and C. B. Murray. 2001. Synthesis of Monodisperse Nanoparticles of Barium Titanate: Toward a Generalized Strategy of Oxide Nanoparticle Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 123:12085-12086.
3. Sun, S., H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang and G. Li. 2004. Aligned Inclusion of Hemicyanine Dyes into Silica Zeolite Films for Second Harmonic Generation. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 673-682.
4. Redl, F. X., C. T. Black, G. C. Papaefthymiou, R. L. Sandstrom, M. Yin, H. Zeng, C. B. Murray and S. P. O. Brien. 2004. Insight into G-T Mismatch Recognition Using Molecular Dynamics with Time-Averaged Restraints Derived from NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 583-590.

實驗四 一維材料－奈米碳管－之製程

李明威教授 國立中興大學物理系

一、簡介

本製程是利用TCVD(Thermal Chemical Vapor Deposition)的方法來為做奈米碳管的長成機制，而催化粒子則選用Fe奈米粒子^[2]，附著在基板上的方式為1、將Fe nano particles溶液以旋轉塗佈的方式附著。2、用電鍍的方式將Fe粒子附著於基板上。

二、儀器設備

如下圖所示。

其中閥A為真空閥門。

C、D、E、F為流量控制計，分別為 C_2H_2 、 N_2 、 H_2 的流量，F目前不使用。

Button1為總閥。

Button2、3、4、5分別為 C_2H_2 、 N_2 、 H_2 以及空氣之個別閥門。

G為活動閥門，做為取出樣品之用。

H為空壓機，破真空前確定已開啟。





三、操作步驟

- (一)將灑佈好鐵奈米粒子之基板由活動閥門G放入石英管中。
- (二)將機械PUMP啟動，並緩慢打開手動抽氣閥，至真空計上的讀數穩定為止。
- (三)通入氮氣，並注意真空計的讀數，不可超過100Torr。若壓力大於100Torr則需調整抽氣閥至適當的壓力。
- (四)將高溫爐溫度提升至500°C後注入氫氣並維持15分鐘。
- (五)關閉氫氣，並將溫度提升至700後，注入乙炔，並維持30分鐘以上。
- (六)關閉乙炔，並將高溫爐的溫度調降到30°C。待溫度冷卻後，關閉氮氣及真空pump。
- (七)破真空取樣品時，按下B5以及B1，有聽到斯斯聲即可。待壓力計上讀數回到一大氣壓即可取下活動閥門取出樣品。
- (八)實驗完成時關閉各流量計及氣體，並關閉高溫爐電源以及流量計的總電源。

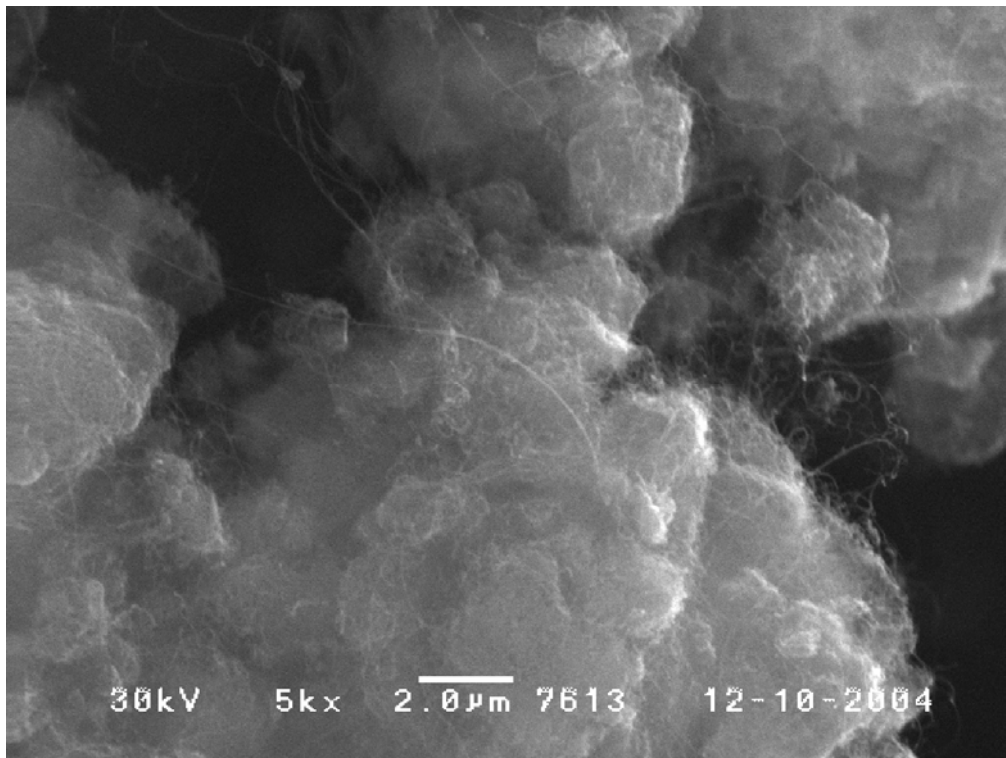
p.s.: 1. 注入氣體：以氮氣為例，調整氮氣流量計到適當的大小，並切下Gas On 以及Flow的切換鈕，按下B1以及B3注入氮氣即可。

2. 整個實驗過程中，氮氣均維持注入的狀態，且流量一定要比氫氣以及乙炔來的高，否則會有爆炸的危險。
3. 整個實驗過程中，最需注意的是加入乙炔做長成時，由於乙炔裂解會產生氫氣，因此會導致壓力上升，所以須適時的調整壓力閥來控制腔體內的壓力，不可使腔體內壓力大於100Torr。

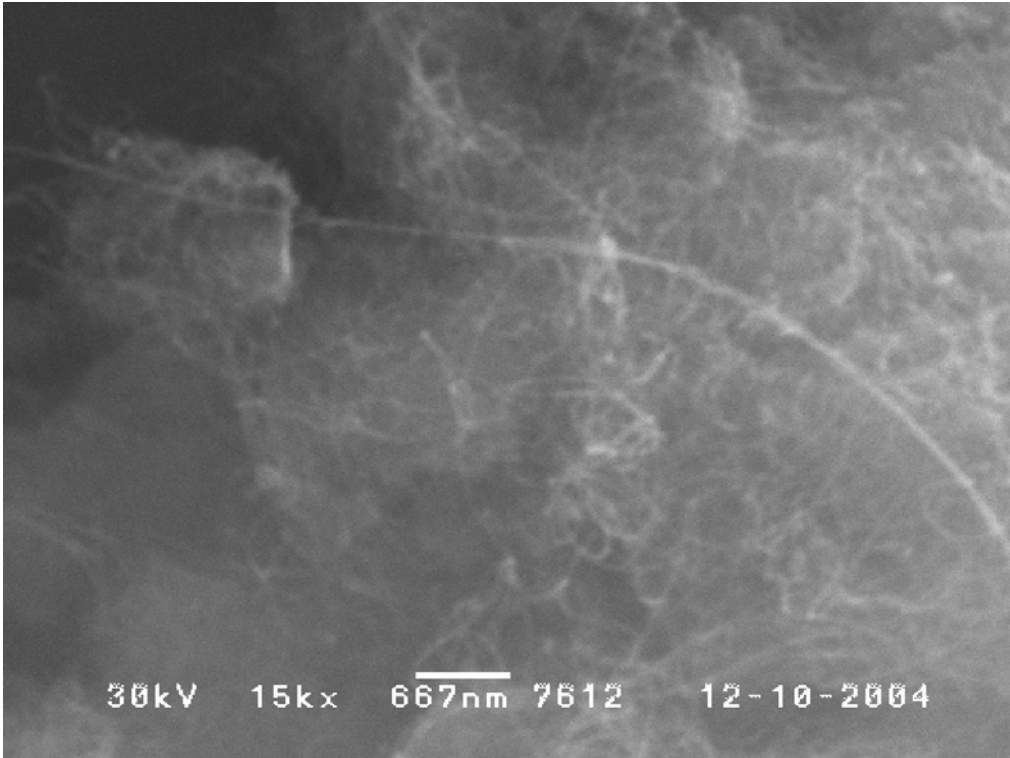
四、成品檢測

成品檢測以兩方面為主：

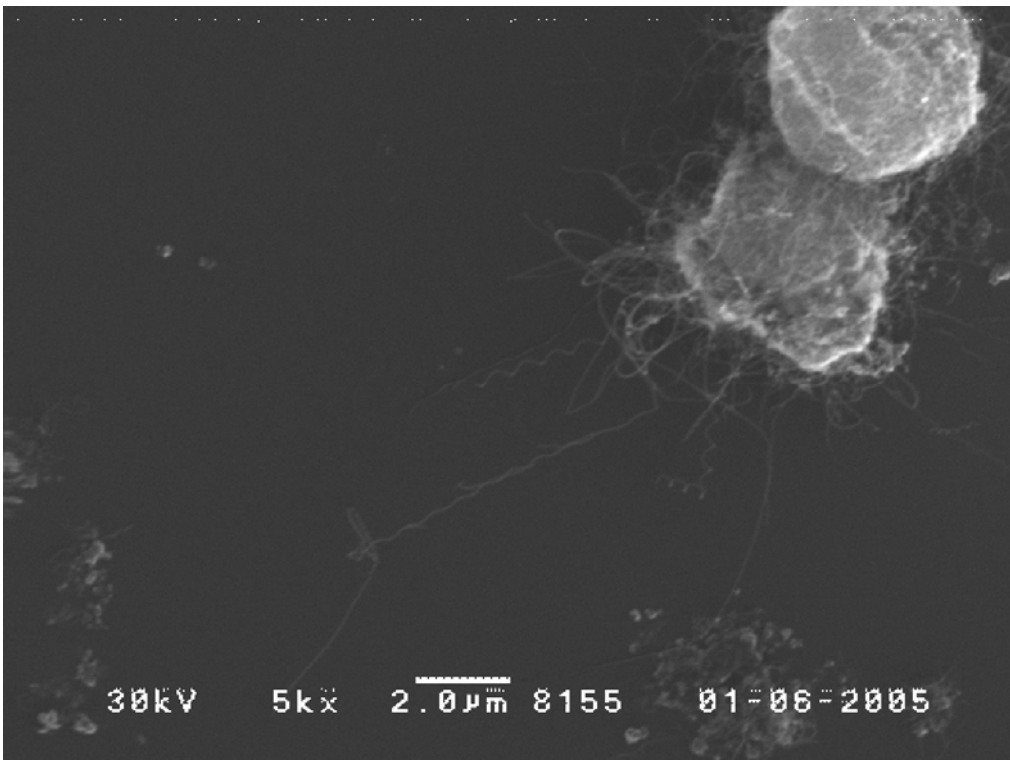
- (一) 長條形管狀結構：主要分析儀器以SEM為主，圖一到圖四為SEM之照圖。



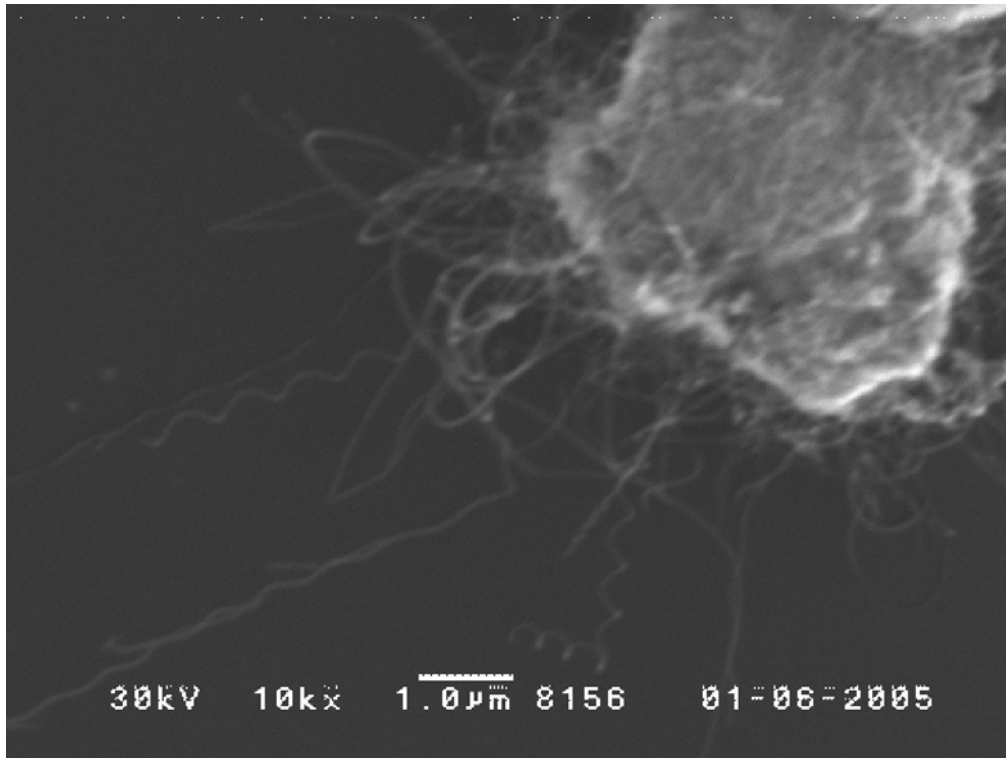
圖一、CNT的SEM照圖



圖二、CNT的SEM照圖



圖三、CNT之SEM照圖



圖四、CNT之SEM照圖

(二)奈米碳管結構：目前在測定奈米碳管結構分析上，較為常見的是使用拉曼光譜來作為結構上的檢定。

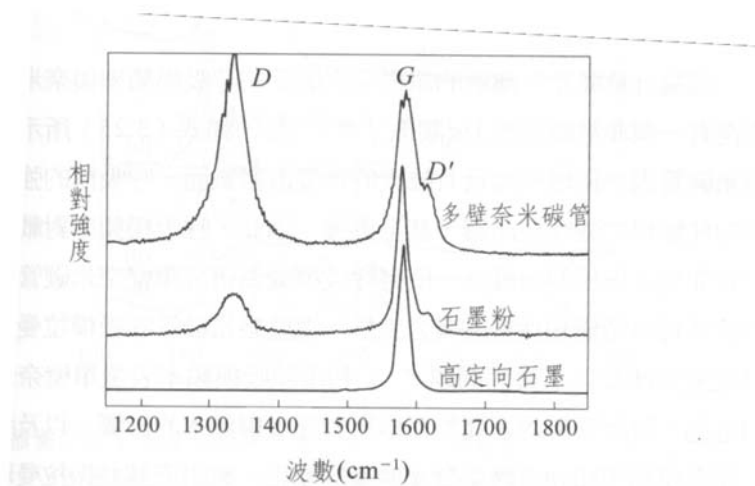


圖 3.32 採用 632.8nm 雷射激發得到的高定向石墨、石墨粉和多壁奈米碳管拉曼光譜

圖五、拉曼光譜--CNT結構正確性的檢定

實驗五 以熱裂解法及官能基轉換法生長水相硒化鎘(CdSe)

王國禎教授 國立中興大學機械系

一、實驗目的：

以熱裂解法及官能基轉換法生長水相硒化鎘。

二、實驗藥品：

Cadium nitrate tetrahydrate, Cd(NO₃)

Selenium powder, Se

Trioctylphosphine oxide (99%), TOPO

Hexdecylamine, HDA

2-aminoethanethiol hydrochloride 98%, AET

Chloroform

Methanol

三、實驗儀器

真空系統

油浴鍋

攪拌加熱器

四、實驗步驟：

實驗流程如圖(1)，分為兩部分：1.利用熱裂解法在190°C下合成油相硒化鎘溶液(CdSe-TOPO)，2.經過官能基轉換後將硒化鎘由油相轉到水相(CdSe-AET)。

(一)熱裂解法合成油相CdSe

(1)將0.18mmol硝酸鎘加入0.45g hexdecylamine中在氮氣環境下加熱到190°C一小時，並除氣數次。

(2)利用超音波震盪將0.14mmol硒粉末溶於1mL TOPO中，並除氣數次。在190°C的環境下，將Se-TOPO溶液加入CdSe-HAD溶液中，混合攪拌3分鐘後，移除油浴鍋冷卻至室溫。

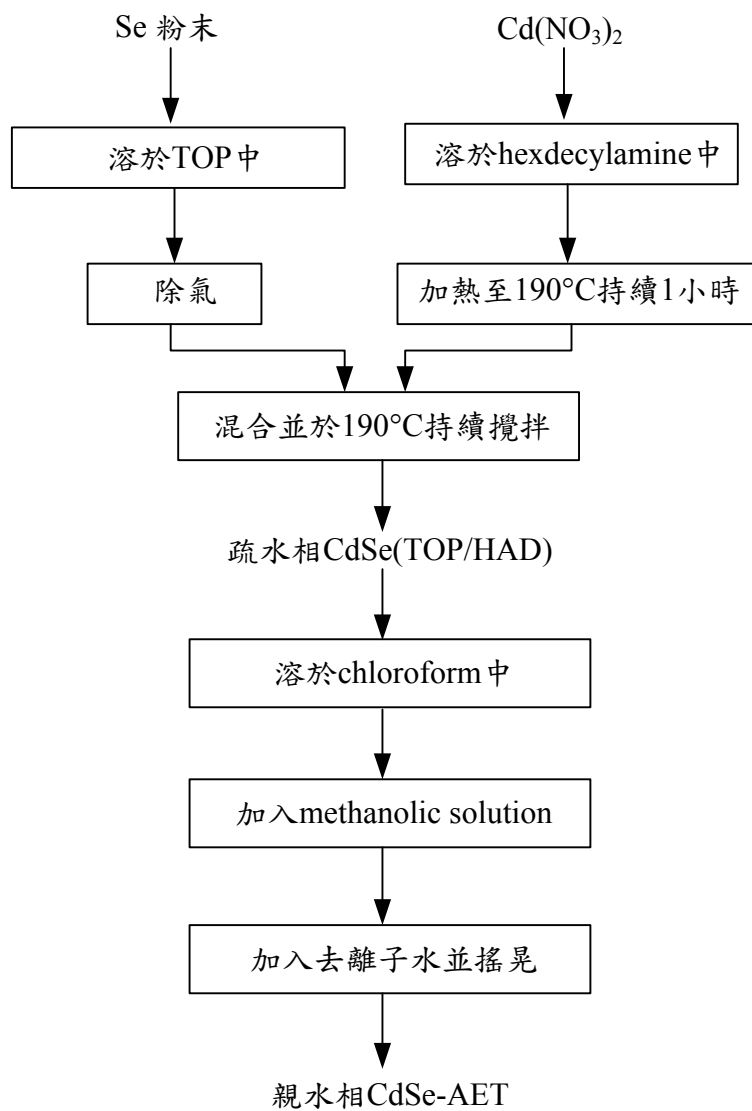
(3)以甲醇及正己烷萃取CdSe(HAD/TOPO)得到油相CdSe-TOPO。

(二)官能基轉換生成水相CdSe

(4)將半胱胺鹽酸鹽(2-aminoethanethiol hydrochloride)溶於甲醇，形成0.5M之甲醇溶液。

(5)取100 μL步驟(2)的CdSe溶液，溶於除水三氯甲烷後，一邊攪拌一邊慢慢的將步驟(4)的甲醇溶液加入。

(6)以去離子水萃取步驟(5)溶液後得到水相硒化鎘(CdSe-AET)



圖一、以熱裂解法及官能基轉換法生長水相硒化鎘實驗流程

實驗六 抗體於生物技術的應用

張富雄教授 臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

陳昭瑜 臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

一、前言

早在1890年代，Behring及Kitasato便提出抗體治療的觀念，認為抗體可以專一性有效對抗細菌毒素達到治療的目的。而像這樣具特殊性，可對抗某種微生物的分子，Paul Ehrlich在1890年代將之命名為「魔法子彈(magic bullet)」，可知這樣的治療概念對當時的生醫界帶來怎樣的震撼。

最初的抗體製備來自產生免疫力的動物或人類的血清，故稱為血清治療，這樣的方式雖然有效，但由於動物血清中蛋白質的含量過於複雜，也常常造成過敏等嚴重的副作用，直到1930年，在抗體蛋白的純化技術上有了長足發展，毒性得以降低，血清治療終於在許多感染症上成為有效的治療工具；然而，1935年後，各式抗生素漸漸問世，血清治療在細菌感染症上示微，但這樣利用抗體作治療的方式卻非但沒有被遺忘，反而開創了另一局面，而在蛇毒、毒素、病毒的治療上提供有效的良方；1975年，一個突破性的發展於焉誕生，英國分子生物的醫學研究中心實驗室發表利用永生化的B細胞可大量生產單株抗體，利用永生化的B細胞是將老鼠的白血球和癌細胞作融合，產生老鼠的融合瘤(hybridoma)細胞，這是人類史上第一次在體外大量生產單一形式之免疫球蛋白，節省成本、時間、使用動物數量，並得到無限制的抗體來源，然而，這項新方法所帶來的衝擊並沒有立刻發生，一開始的程序並不被信賴；直到實驗流程和方法在經過一些改進後，流傳於一些實驗室之間，這項技術才真正流入了科學社群中；1980年代，雖然因為具有療效的單株抗體的潛力顯而易見，而使欲供治療的純老鼠單株抗體之研究被推動進行，但發現的藥物只有3%的成功率能夠發展成新藥，卻由於病人對外來的蛋白反映出很高的免疫反應，很明顯的產生了老鼠抗體的抗體 (human anti-mouse antibody, HAMA)，導致抗體具有缺乏效力的問題，再加上老鼠的抗體不會結合人類的救助接受器(salvage receptor)導致其在血液中的半生期小於20小時，使得抗體被快速清除，執行結果實在令人失望。

然而，在一個劃時代的技術--重組基因工程，也就是遺傳工程等技術問世，成為單株抗體生產技術革命的驅動力，各種抗體的生產都不再是神話。一個需要鑑識免疫球蛋白的結構及功能，而將老鼠單株抗體中的多變性部分(variable domain)與人類抗體中的constant

domain嵌合在一起，產生由人類和老鼠所衍生的雜合單株抗體技術，甚或是人類化(humanized)或人類抗體生產方法，經由詳細了解V domain及抗原決定部位的結構，將老鼠抗體上的抗原決定環CDR轉移到人類的免疫球蛋白G上，更提供了臨床醫學研究者一個前景，使其積極開發新穎性抗體治療藥劑，也讓一開始由學術界內所產生的構想，進一步讓生技公司將它發展成具有療效的單株抗體。從1980年代，抗CD3之單株抗體被使用於臨床上以降低移植器官的排斥現象，直至今日，在美國，已有超過18種抗體藥物經FDA核可，其中17種已經在市場上銷售，這些藥物應用於臨床醫療包括腫瘤學，慢性感染性的疾病，器官移植，傳染性疾病和心血管藥物，這些被認可的抗體治療藥物中包括14種未經修飾的免疫球蛋白IgG分子，2個利用同位素標記的免疫球蛋白，1個結合抗體與藥物的複合物以及1個毛地黃抗體，更有超過150樣的產品被世界各地的公司所研究，其中也有許多已進入臨床試驗，目前，雜合和人類化的單株抗體持續的以18-29%的成功率被認可，治療型的單株抗體儼然已被發展成有益且極有利潤的產品。儘管在初期，一些重要的製藥公司並不太情願採用這項新技術，如今，先前的失敗以帶來豐碩的果實，基因改造的單株抗體已因為較小分子藥物都有較高的成功率而被認同(Chimeric antibodies約29%、人類化(humanized)之抗體約25%，一般小分子的藥物約11%)，也提供了多樣化治療方式的一個選擇。

抗體最大的特點就是具有高度專一性及低毒性，但事實上，高度專一性可能同時身為優點及缺點。可以只針對引起疾病的病原體作用，也較無抗藥性的問題，但也同時因為只對一種抗原作用，在某些疾病的治療上便可能需多種組合，以達到有效治療，在這種情況下，成本及複雜度的增加也是需被考慮的一環。目前許多發展及臨床實驗是在發展一個抗體可以應用在另外一種抗體上，以降低在藥物發展上的風險。一般來說，人類對於抗體的耐受性很高，雖然注射的量是共通的，但是通常可以藉由調整來控制。換言之，抗體可在臨床上具有治療潛力最主要的優勢即是可藉由改善現存的特性，而加強其效能。

發展出一個有潛力抗體藥物需要反覆的設計過程。產生治療性抗體的第一步就是選擇一個目標抗原，這是一個最困難的步驟。這需要考慮使用抗體介入治療的觀念、抗體的專一性設計、如何分析治療情況、如何生產抗體然後才能夠設計。不論在臨床或基礎研究中，抗體都是作為藥物或檢測不可或缺的工具。

二、抗體之生產與應用實驗

(一) 製備小鼠融合細胞以生產單株抗體(mAb)

方法：

1. 準備4隻BALB/c小鼠。
2. 以裝有24-G針的1ml針筒注射c-Met抗原(10 μ g/小鼠)/CFA乳膠(vol/vol=1/1)引起免疫反應。
3. 實驗講授及追加注射c-Met/IFA(20 μ g/小鼠)。
4. 準備血清及分析用之抗原被覆ELISA盤。以5 μ g/ml溶於0.1M Bicarbonate 緩衝液(pH8.2)[2.12g Na₂CO₃ + 2.52g NaHCO₃ + 1.25 ml 20% Azide + 500ml 2D H₂O]之c-Met於4 $^{\circ}$ C被覆ELISA盤隔夜。
5. 在37 $^{\circ}$ C用1% BSA(覆蓋緩衝液)覆蓋ELISA盤1小時。
用清洗緩衝液(0.05% Tween 20-PBS, pH7.2)清洗ELISA盤3次。
加入以覆蓋緩衝液稀釋為1/100, 1/300, 1/1000的血清於37 $^{\circ}$ C培養2小時。
清洗ELISA盤3次且加入溶於覆蓋緩衝液的AP結合山羊抗鼠IgG(AP-conjugated goat anti-mouse IgG)在37 $^{\circ}$ C培養1小時。
清洗ELISA盤4次後加入溶於緩衝液之AP基質7g NaHCO₃ + 0.65g Na₂CO₃ + 0.1g MgCl₂-6H₂O + 0.25ml 20% Azide + 500 ml 2D water 0.5至2小時後測405nm。
6. 追加注射10 μ g溶於PBS之抗原並培養X-63。
7. 取脾臟及血清。
以PEG 4000融合脾臟細胞及X-63。
8. 加入HAT培養基。
9. 更新1/2 HAT培養基。
10. 更新1/2 HAT培養基。
11. 檢查融合細胞。
12. 檢查融合細胞並準備分析用之ELISA盤。
13. 分析
14. 更新培養基為HT或一般培養基。

(二) 於兔子中製造多株抗體之抗血清

前言：

多株抗體之抗血清的製造通常是利用自然的蛋白抗原或胜肽結合攜帶蛋白。其下的實驗流程細節有關許多免疫途徑，通常是為了獲得更高量的血清。當使用大或非漸進式相關蛋白質是去重複施打將會得到5-10毫克/升的結果，但若使用小或高量的保護性蛋白質種類則僅有1-2毫克/升劑量的結果。

材料：

完全及非完全的Freunds佐劑

在PBS中之1-2毫克/升的抗原

New Zealand red 或white 成熟兔子(體重約2-5公斤)

70%酒精

凡士林

22-G針頭

含有lock hubs的3毫升的針筒

雙尾端的lock hubs connector

兔籠

照熱燈

方法：

- 1.加入2毫升的Freunds佐劑到2毫升經純化溶於PBS的c-Met抗原之中，將之乳糜化。將乳化物轉送到3毫升的針筒中，加上22-G的針頭並且移除氣體。
當使免疫化的抗原總量減少時，其反應強度將如同證據顯示，其抗體製造的總量及親合度將會隨之減少。
- 2.將兔子放在平坦的平面上，用一隻手抓緊頸背而另一隻手放在兔子的兩腳下。保定兔子使後腿肌肉不能伸展。注入70%酒精以清潔部位。每隻後腳使用約1公分的注入針注射0.5毫升的乳劑(最大量) 到大腿肌。(肌內注射，注意不要碰到腿骨)。
- 3.4週後如同步驟1和2，以1毫克乳化的抗原混合不完全的Freunds adjuvant(1：1)進行肌內注射。在開始注射兩個禮拜後進行免疫反應的追加注射。
- 4.第2次免疫反應的追加注射10天後放入保定器中。將耳朵伸展開，從耳朵的邊緣靜脈採血。以70%酒精擦拭耳朵並放置在燈光下加熱。用手指輕拍耳朵；血管在1到2分鐘內應會完全放大。用一個滅菌過的手術刀，在邊緣靜脈上快速切出一段小且乾淨，約0.5公分長的切口。收集血液在50毫升的離心管中，直到血流因自然凝集反應而停止。沿著管壁流下血液，以避免溶血反應。
- 5.用70%酒精將耳朵擦乾淨。塗上一層凡士林以減輕因酒精造成的皮膚發炎。
- 6.放在4°C 隔夜前先將血液置於室溫下數小時，輕輕的用木製塗抹器去除管邊的血塊。將血清轉移到適當的離心管並離心5000×g10分鐘，留下紅血球沉澱和碎片。

(三)純化抗體

前言：

雖然親和性管柱為純化專一蛋白的方法之一，但純化的流程有時候為不需要或不合用的(當抗原不足夠時)。這裡主要描述從複雜的混和液中利用飽和硫酸銨或藉由DEAE離子樹酯色層分析來純化免疫球蛋白。在很多例子中，運鐵蛋白將會依起被沉澱純化出來，但可以藉由膠體過濾層析法來移除。

1.藉由蛋白質G球珠管柱純化單株抗體(mAb)

材料：

清洗緩衝液(Washing buffer) 20mM 磷酸鈉(pH7.0)

蛋白質G球珠(Pharmacia)

清洗緩衝液 20mM 磷酸鈉(pH7.0, Sigma)

洗提緩衝液 0.1M氨基乙酸-HCl(pH2.7, Sigma)

透析管(12,000-14,000MW)

重碳酸鈉(Sodium Bicarbonate)(Sigma)

1mM EDTA(Sigma)

方法：

(1)裝填蛋白質G管柱

A.蛋白質G球珠(Protein G beads)儲存於20%酒精內。

B.球珠以多於15ml之ddH₂O清洗3次以除去酒精，然後將球珠再懸浮於適當體積之清洗緩衝液內。

C.將球珠裝填於管柱內(約1ml/管柱，1ml蛋白質G球珠約能結合11mg IgG)，以至少2倍球珠體積的清洗緩衝液平衡管柱。

D.製備完成之蛋白質G管柱可用含有0.02%疊氮化物的PBS溶液儲存於4°C。

(2)準備含有抗體的腹水或培養上清液

A.準備含有抗體的腹水

每隻SCID或同源老鼠的腹膜注射0.5 ml pristain。



5天後，注射 $5-10 \times 10^6$ Ab 融合瘤細胞至處理過pristin的老鼠體內。



10-14天後從老鼠腹膜收集腹水。



將腹水置於室溫約3小時後，以250g離心15分鐘，去除細胞殘骸和凝塊。



收集，分裝和儲存澄清的腹水於-80°C直至使用。

B.準備含有Ab的培養上清液
Ab融合瘤細胞以CM培養於長頸瓶中。



當約一半的融合瘤細胞死亡且CM轉變成黃色時，收集培養上清液。離心並收集上清液，分裝和儲存上清液於-80°C直至使用。

C.腹水或培養上清液應用清洗緩衝液以1：1的比例稀釋並於10,000 rpm離心10分鐘或用0.45mm濾膜過濾。

(3)抗體純化

- A.以清洗緩衝液清洗管柱，直到O.D. 280測不到訊號。
- B.將樣品注入管柱，接著以清洗緩衝液清洗管柱，直到O.D. 280測不到訊號。
- C.用洗提緩衝液(elution buffer)洗提Ab。立即用1M Tris溶液中和洗提液(約80ml的 Tris可中和1 ml洗提緩衝液)。
- D.以清洗緩衝液清洗管柱，直到O.D. 280測不到訊號。管柱用含有0.02%疊氮化物的PBS溶液儲存於4°C。
- E.洗提出的Ab必須立刻用PBS進行透析。透析的Ab用O.D. 280定量(1 mg/ml的IgG約1.3O.D. 280)。

(4)透析管之預備

- A.透析管(dialysis tube)(孔徑：12-14kDa)在2%重碳酸鈉(Sodium Bicarbonate)和1mM EDTA溶液中煮10分鐘，然後以ddH₂O沖洗。
- B.透析管在1 mM EDTA溶液中煮10分鐘，然後以ddH₂O沖洗2次。
- C.處理過之透析管可儲存於4°C。

2.利用蛋白A-sepharose管柱純化抗體(mAb)

前言：

葡萄球菌的蛋白A可連接多種哺乳類動物的免疫球蛋白。在

這個親和層吸法中，老鼠的抗體經由蛋白A-sepharose管柱基質和階段式的pH洗脫而分出。基質將會連接一些IgM，大部分的IgG1，和幾乎所有的IgG2a、IgG2b、和IgG3的單株抗體。

材料：

蛋白A-sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech)

Tris buffer, pH 8.6

腹水

Citrate buffer, pH5.5

Acetate buffer, pH4.3

Glycine buffer, pH2.3

Neutralizing buffer, pH7.7

Ultrafiltration cells和XM50 membrane (Amicon)

方法：

- (1)將蛋白A-sepharose管柱浸滿 tris buffer (超過50倍，v/v)。在室溫下倒入tris buffer來平衡2.5公分的玻璃層析管柱。(10到20毫升的腹水可用約3克乾重的蛋白A-sepharose來純化抗體)。
- (2)用3倍體積的tris buffer來稀釋腹水並以每分鐘1-5毫升的速度加入管柱。用tris buffer清洗管柱直到所有未連接的蛋白質都被流洗出來，用280nm吸光值監測。
- (3)連續用2到3倍體積的citrate, acetate和glycine buffer來洗脫出有連接的蛋白質。直接滴到管子中，其中含有四分之一收集體積的Neutralizing buffer。
- (4)用ELISA來偵測具有抗原專一性的單株抗體。
- (5)利用XM50 membrane和Ultrafiltration cells將單株抗體濃縮成每毫升1-5毫克。放置-20°C儲存。(用280nm吸光值來計算濃度。一隻含有1毫克/毫升的老鼠IgG溶液=1.44吸光值單位)。

3.利用抗原-sepharose和 抗老鼠抗體-sepharose進行純化

前言：

當有興趣的抗體無法大量的連接到葡萄球菌的蛋白A時 (如IgM和一些IgG1抗體)，可以用由抗原或抗老鼠抗體基質構成，配合CNBr-活化的sepharose親和管柱來製備。抗原-sepharose 的基質可以分離出特定的抗體，然而抗老鼠抗體-sepharose是分離出所有的老鼠抗體。

材料：

CNBr-activated Sepharose 4B

1mM HCl
Coupling buffer
Protein antigen
1M ethanolamine, pH8.0
PBS
Washing buffer
60或150毫升sintered glass funnel, medium porosity

方法：

- (1)將CNBr-activated Sepharose管柱浸滿1mM HCl。轉移到sintered glass funnel，並且連續以200到500毫升的1mM HCl和200到500毫升的Coupling buffer清洗超過30分鐘。(1克的乾燥膠體約膨脹至3毫升體積，用每毫升含有5到10毫克配體的膠體)
- (2)轉移膠體到50毫升的圓錐狀塑膠離心管。加入50到100毫克的配體(每毫升2到5毫克)。放置基座搖椅上以4°C搖晃整晚。
- (3)以250×g離心10分鐘，並去除上清液。加滿Coupling buffer，離心再去除上清液。
- (4)加入20到40毫升的1M ethanolamine, pH8.0，並且放置基座搖椅上以4°C搖晃4到5小時。離心並去除上清液。連續以PBS和Washing buffer 清洗膠狀物，然後離心。
- (5)將膠體轉移到2.5公分的玻璃管柱，並以100毫升的PBS平衡。在室溫下以每分鐘1到5毫升的流速加入三倍於腹水量的PBS以稀釋之。
- (6)用30毫升的PBS清洗管柱內未連接的蛋白質，並且以Glycaine·Cl buffer來洗脫出有連接的蛋白質。
- (7)進行基本流程的第(5)步驟。

4.藉由DEAE親合性膠體藍色層分析法分離免疫球蛋白

材料：

含免疫球蛋白之抗血清或腹水
緩衝液：20mM Tris-Cl/30 mM NaCl, pH8.0
流析緩衝液：20mM Tris-Cl/50 mM NaCl, pH8.0
NaN₃, 結晶狀
DEAE親合性膠體藍

方法：

- (1)置備DEAE親合性膠體藍並用五倍管柱體積的緩衝液來平衡管柱。執行這個步驟及其後的步驟需在4°C。
- (2)在4°C下利用緩衝液透析樣品交換兩次(每次交換約4升)40小

- 時。加到管柱中每小時10毫升的速率。利用三倍管柱體積的緩衝液以每小時10毫升的速率去沖出未結合的蛋白質。
- (3)以每小時10毫升的速率流析出結合的免疫球蛋白，收集10毫升的分餾液並且儲於4°C中直到他們全部聚集在一起。(運鐵蛋白分子量約為76kDa，通常會和免疫球蛋白一起被流析出來)。
 - (4)每管分餾液中取30-50微升出來藉由10%的SDS-PAGE還原狀態下跑電泳來鑑定每管分餾液中的免疫球蛋白。將含有免疫球蛋白的分餾液聚集在一起並且於4°C下藉由緩衝液交換兩次執行透析約40小時(每次交換約4升)。
 - (5)利用五倍管柱體積的緩衝液來重新平衡DEAE親合性膠體藍管柱，加入結晶狀的NaN₃並且存於4°C下。

(四)將抗體鍵結其他分子

前言：

為了要讓抗原專一的抗體能夠在ELISA或是免疫墨點法中被用來作為偵測的工具，所以需將酵素、其他分子或奈米粒子與抗體做連接，如山葵過氧化氫酶(HRPO, horseradish peroxidase)及鹼性磷酸酶(AP, alkaline phosphatase)的連接都可以被用在這些分析上，兩者的接合都可以偵測到1~10ng/ml的抗原，鹼性磷酸酶較穩定，近來也有許多鍵結各式奈米粒子以供檢測的方法。

1.以NHS-SS-Biotin生物素化(Biotinylation)IgG

方法：

- (1)將2mg的IgG溶解於1ml的50mM重碳酸鈉緩衝液，pH 8.5，裝在乾淨的16×125mm測試管。
- (2)加1mg的NHS-SS-Biotin(Pierce)到1ml水中，取80µl至IgG溶液。
- (3)把此測試管置於冰上2小時。
- (4)利用旋轉管柱(Spin-column)離心1000xg，15分鐘，去除未作用的生物素(biotin)。樣品離心後稀釋於10mM磷酸鈉(sodium phosphate)，150 mM氯化鈉(NaCl)，0.1疊氮化鈉(sodium azide)，pH7.2中。重覆此步驟2次以上。
- (5)蛋白質濃度可用A₂₈₀測得。蛋白質最終濃度應接近2mg/ml。
- (6)生物素化蛋白質儲存於4°C(並進行FACScan分析)。
- (7)在50mM DTT中可打斷雙硫鍵。

2.藉由maleimide將抗體鍵結至以脂質包覆的奈米粒子

方法：

- (1) 取 3mg 的抗體加入 40 倍莫耳數的 2-Iminothiolane(Traut's reagent)
- (2) 在 0.05M sodium borate/0.1mM EDTA pH8.5 的溶液中反應 1 小時
- (3) 將已經硫化的抗體以 0.05M HEPES 及 0.1mM 的 EDTA 稀釋 15 倍使用 30kDa 之濾紙去除未反應的 2-Iminothiolane 兩次，將抗體一致 HEPES 緩衝液中。
- (4) 將包有 maleimide 的氧化鐵粒子與硫化的抗體混合均勻在室溫隔夜反應。
- (5) 以磁鐵移除未連接的抗體後，以 PBS 沖洗兩到三次。

(五) 酵素消化作用(Digestion)製備 F(ab')₂ 片段

方法：

1. IgG 溶解於水中。
2. 用 0.1M 醋酸鈉(sodium acetate)緩衝液(pH3.7)透析上述溶液。
3. Ab 以胃蛋白酶(pepsin)於 37°C 作用 2 小時(Ab：胃蛋白酶=20：1 重量比)。
4. 加入 1/10 總體積的 1M Tris，pH8.0 中和反應。
5. 跑還原(reduced)和未還原(non-reduced)SDS-PAGE 確認 Ab 消化作用。

(六) 直接細胞酵素免疫分析法--檢測細胞表面抗原

前言：

此法是利用已存在的抗體或其他對細胞表面分子及受體具專一性的配體來檢測細胞表面抗原。此法的靈敏度可類比流式細胞分析，除了定性，也可定出抗原的表現量，但此法並不適用於同時檢測多種類的抗原。也可配合 biotin、avidin 的鍵結，產生更多變化。

材料：

細胞樣本

經 AP(alkaline phosphatase)標記的專一性抗體

清洗緩衝液

方法：

1. 將 $1-5 \times 10^5$ 的細胞以 ultrasmall superparamagnetic iron oxide 奈米粒子標記。
2. 將細胞置於 1.5ml 離心管，使其均勻分散於 100 μ l 緩衝液中，放

- 置冰上。若抗原不受固定步驟影響，則細胞樣本可先進行固定。
3. 加入經AP(alkaline phosphatase)標記的專一性抗體，在冰上培養1.5小時，其中，每15分鐘搖晃離心管一次，讓細胞和抗體作用均勻完全。
 4. 以磁座吸附細胞，去除上清液，再加入新的緩衝液100 μ l。
 5. 搖晃離心管5分鐘，重複步驟4。
 6. 重複步驟5。
 7. 加入100 μ l MUP或NPP受質溶液，在室溫下作用大於1小時，每15分鐘搖晃離心管一次。
 8. 以ELISA reader測定吸光，進行分析。

由於抗體對治療及檢測極具重要性及展望，以致人類抗體工程領域的研究近年來急速激增，可謂蓬勃發展，儘管在研究上的瓶頸與困難重重，不論是抗體純化技術的研發或可以表現人類抗體的基因轉殖鼠仍都不斷受到重視，每年也都有許多新方法或新抗體進入臨床或臨床前期試驗。目前為止很少專一性的醫藥能夠治癒癌症，所以對於腫瘤學來說，提高抗體效力以改善抗腫瘤的活性，最後提高病患的存活率是當前目標。另外，提高抗體的潛力或是增加其在血中的半生期以降低治療的劑量或是頻率，都可以降低抗體用在治療上面的花費。也因此，抗體的生產技術是刻不容緩的。

三、 主要參考文獻

1. Ausubel, F. E., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1999. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., pp. 10.73 - 11.30. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.
2. Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. Nature Reviews Immunology 6: 343-357.
3. Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies a laboratory manual, pp. 53-137. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A
4. Reichert, J.M., C.J. Rosensweig, L.B. Faden, and M.C. Dewitz. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. Nature Biotechnology 23: 1073-1078.
5. Reichert, J.M. and V.E. Valge-Archer. 2007. Outlook - Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery 6: 349-356.

實驗七 奈米粒子的體外毒性測試

張佑民 國立成功大學口腔醫學研究所

謝達斌副教授 國立成功大學口腔醫學研究所

一、前言：

我們目前正處在一個奈米科技風起雲湧的新世代。奈米材料從高科技到民生工業的應用潛力是無可限量的，也預期將帶來另一波的產業革命。然而，面對將要蓬勃發展的奈米產業，其潛在的健康風險、環境影響與管理策略上都是人類立即須面對的新挑戰。而不僅一般民眾，即便知識分子對奈米粒子之生物安全性的認知也普遍相當缺乏。由於奈米粒子的大小非常小，因此它們與人體的交互作用可能與活體內的吸收、分布及代謝路徑也可能與許多傳統材料不同。例如，過去的研究即證實吸入奈米粒子時的相對大面積(比表面積)會增加其毒性。這麼小的粒子可以穿透深入肺部並可移動到身體的其它部位，包括肝臟與腦部等重要器官。

對於奈米科技產業的人體健康與環境影響，除了歐盟相當的重視之外，美國國家職業安全與健康研究所(The National Institute for Occupational Safety and Health)也正積極參與全球的研究團體、政府單位與產業界的國際合作研究，希望能了解奈米科技對健康的衝擊以及針對其潛在的風險如何進行有效的控制。而我國政府也透過資助相關研究計畫希望可見的未來能研擬一套可行的管理辦法。

在我們徹底了解如何安全的處理奈米材料之前，仍有許多基本的知識斷層待研究並納入教育體系。本研究即針對奈米粒子之體外毒性測試之基本原理與實作課程作一說明。希望能引起學子對此一議題的關心，並了解如何進行初步之生物相容性評估。

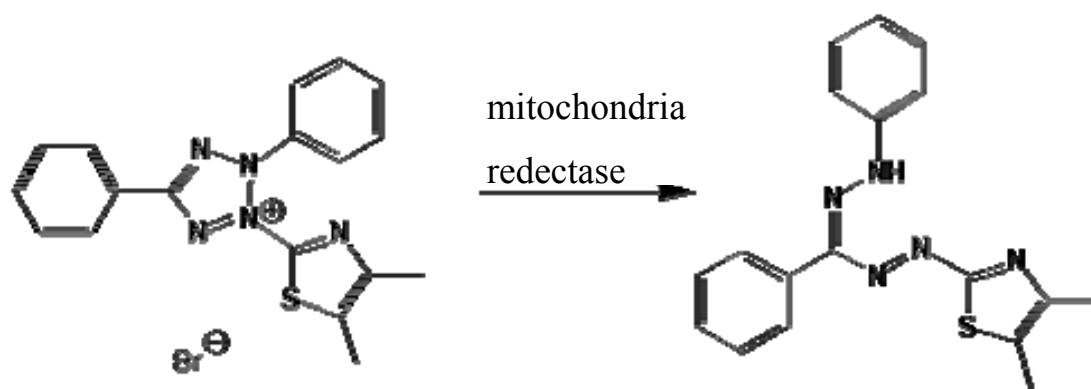
二、實驗目的(Objective)：

學習以MTT assay 來測量細胞遭遇到外來物質時的存活率，以得知外來物質使用在生醫運用方面的適用性。

三、實驗原理(Principles)：

MTT assay是一種常用以測定細胞存活率或增殖作用的方法。MTT，全名 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，是一種黃色化合物，在活細胞粒腺體內所發生的一連串呼吸作用中，需要有許多氧化還原酵素的參與，而當細胞死亡時酵素的

活性也隨即失去。MTT可以在琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)的還原作用下，變成紫藍色的formazan結晶，堆積於細胞中。因此formazan結晶的生成量與活細胞數目會成正比關係(因為死細胞中琥珀酸去氫酶失活，不能將MTT還原)。當加入有機溶劑DMSO(dimethyl sulfoxide)之後，可將formazan結晶溶解成紫藍色溶液，則可利用測量此溶液之吸光值，得知細胞還原MTT的能力(formazan形成量)，因此吸光值也就間接代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故MTT assay可用作細胞存活率的指標。MTT assay 因為擁有快速、經濟和無放射性元素污染之問題，常被使用為測量細胞存活率的實驗方法。



四、實驗材料及設備(Materials and instrumentation)：

Vero細胞
 奈米粒子
 MTT reagent
 DMSO(dimethyl sulfoxide)
 96孔細胞培養盤(96-well plate)
 分光光度計(spectrophotometer.)

五、實驗步驟(Methods)：

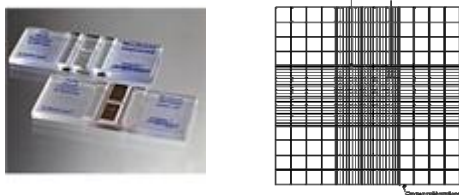
(一)細胞計數(cell counter)

血球計數盤有兩個chamber，每個chamber中細刻有九個 1mm^2 之大正方形，其中位於四個角落之正方形在細刻16個小格，深度均為 0.1mm 。每個大正方形之體積為 $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{mL}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每mL中之細胞數目。

1. 取 $10\mu\text{L}$ 細胞懸浮液與 $70\mu\text{L}$ trypan blue混合均勻。
2. 取 $10\mu\text{L}$ 至chamber內(如圖左)。
3. 計數兩個chamber內四個角落之大正方形內的細胞總數(如圖

右)。

4. 8大格細胞總數 $\times 10^4 =$ 細胞數/mL。



- (二)根據實驗步驟1的結果，在96孔細胞培養盤的每個孔之中種入 5×10^3 個細胞，注意要留下不含細胞的孔作為對照組。
- (三)分別加入濃度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} M的奈米粒子，並且使每個孔最後內含總體積為200 μ L。
- (四)把細胞培養盤放入37 $^{\circ}$ C培養箱中培養至預設之時間。
- (五)取出細胞培養盤，每個孔加入20 μ L MTT試劑溶液，放回37 $^{\circ}$ C培養箱，培養4小時讓MTT與細胞進行還原反應。
- (六)把上清液吸出，注意不要吸到底部紫色沉澱。並以phosphate buffered saline請洗三次。
- (七)每個孔加入200 μ L的DMSO，利用振盪器(vortex)或是pipette的方式，使紫色沉澱物溶解。
- (八)每個孔取出100 μ L的溶液至96孔測量盤。
- (九)利用分光光度計測量波長490nm的吸光值。

六、結果與討論(Discussion)：

- (一)試比較MTT assay與WST-1 assay兩種不同方法的差異性。
- (二)請解釋細胞毒性測試對奈米材料的重要性。
- (三)是否任何細胞都適合用來作為測試,請說出你的看法。

七、主要參考文獻

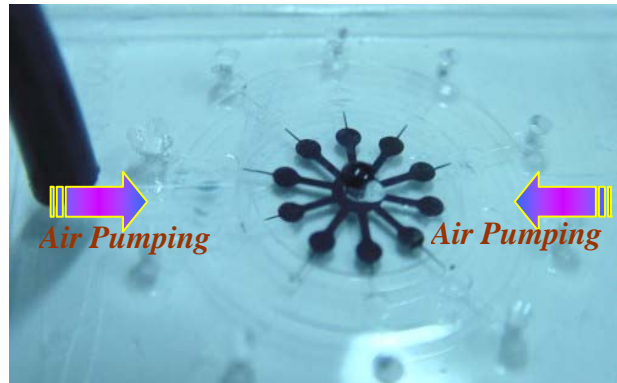
1. Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Meth. 65: 55-63.
2. Wilson, A. P. 2000 Vol. 1. Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture. : A Practical Approach. 3rd ed. pp 175-219 (ed. Masters, J. R. W.), Oxford University.

實驗八 奈微流體晶片之實作

李國賓教授 國立成功大學工程科學研究所

一、前言

微機電系統(Micro-Electro-Mechanical-Systems, MEMS)是一種結合半導體製程及微機械製作的概念，將電子電路及微機械結構整合成為一完整系統的新科技。利用此加工技術可製造出各種微元件，包括微型感測器、致動器、微流體管道及微幫浦、閥門等微流體元件、微感測



元件 (Microsensor) 及各式生物晶片如基因晶片 (DNA Chip or Microarray)、微流體晶片 (Microfluidics Chip) 等，而將這些具有進樣 (Sampling)、反應 (Reaction)、分離 (Separation) 及偵測 (Detection) 等功能整合於同一晶片上，如同將一個實驗室集合於一片晶片上，即所謂整合型實驗室晶片 (Lab-on-a-chip)，而又稱之為微型全分析系統 (Micro-Total-Analysis-System, μ -TAS)。

在整個生化分析流程中，微機電技術所製作之微流體元件在生物樣品的進樣及取樣 (Sampling) 中扮演著極為重要的角色，其設計之微閥門 (Micro-valve) 及微幫浦 (Micro-pump) 可將生物樣品導入推動至樣品反應區 (Reaction Zone) 或偵測區 (Detection Zone)，並進行樣品混合 (Mixing)、分離 (Separation)，最後將樣品推動至樣品收集區取樣 (Sampling) 並分析。因此，利用微機電系統所設計之微流體生物晶片，具有多工處理 (Multiple Processing)、樣品移動、反應、偵測並收集取樣 (Sampling) 之功能，為實驗室晶片之主要目標。

二、實驗目的

生物感測器在近年來迅速發展，許多具有特定功能之生物感測晶片被各研究單位及業界所提出，其中生物樣品的驅動、操控及感測正是生物晶片的關鍵技術。驅動生物流體之方式有很多種，包含機械方式、流體力學方式、超音波、電磁力等。其中利用微幫浦、微閥門的驅動方法乃為極佳之微流體驅動方式，其原因有：(一)可單一或大量驅動。(二)易整合於其它微流體元件。(三)不會對生物分子(如細胞、蛋白質、DNA...等)造成破壞。(四)操控模式多樣等。其中利用不同管

道及微型疏水閥門可以分隔出各種不同的反應區，各樣品反應區則具有不同種類之偵測功能，因此利用晶片上設計微型疏水閥門及微型幫浦，以操控微流體到達生化反應區域並進行感測，最後再將反應過後之微流體進行驅動到達樣品收集區收集、濃縮再進行偵測及分析。

本實驗之主要目的乃製作設計一主動式微流體幫浦及微閥門，利用高分子材料聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)進行翻模，再經由氧氣電漿處理(Oxygen Plasma Treatment)於PDMS上定義出親水及疏水區域，此後對位接合並將上方管道通入外加氣壓源即可將擠壓下方微管道之流體，進而進行微流體之驅動。這種方式製作的微閥門製程方式簡易，且可大幅降低其製作成本。

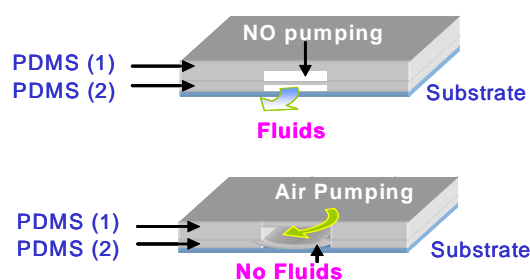
三、實驗原理

(一) 氣體驅動式微流體晶片設計原理

氣體驅動式的微流體晶片，係利用微機電製程方式製作三層的結構如圖一。此結構之上兩層利用PDMS材料及製程方式所製作，分別為PDMS(1)厚膜層及中間之PDMS(2)薄膜層，下層之底材(Substrate)可選擇玻璃或是PDMS皆可，視其應用而定。在此三層的結構中具有兩個腔體，上層之腔體為氣體驅動腔體區，下層之腔體為微流體管道區域。上層腔體可利用氣體的驅動而控制中間薄膜的振動。當氣壓驅動時中間的薄膜會下壓充塞於下層腔體，使下層之流體無法流過。當釋放氣壓時，薄膜恢復原本形狀則可使流體順利流過。因此，若依序將腔體排列如圖二，並循序控制此三條氣壓管道，則下層之微流道因薄膜之連續運動造成管道內壓力之變化，流體因此而被吸入流道並持續流動，使其成為具有微幫浦之作用。

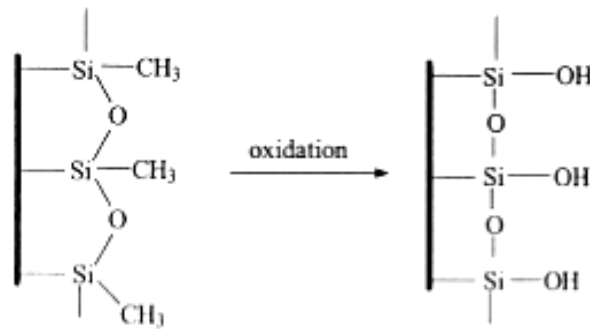
(二) 氧氣電漿改質材料表面親疏水性質

本實驗所使用之基材PDMS之性質相當特別，PDMS為極度疏水性之表面性質，水滴於PDMS表面會形成不易散開的水珠狀態，與水之接觸角度(Contact angle)約為112度。若將PDMS進行氧電漿(Oxygen Plasma)的表面活化處理，則會將PDMS表面的甲基分子取代為氫氧基



圖一 氣壓驅動式微流體元件動作示意圖。上層腔體可利用氣壓而控制中間薄膜的振動。當氣壓驅動時中間的薄膜會下壓充塞於下層腔體，使下層之流體無法流過。當釋放氣壓時，薄膜恢復原本形狀則可使流體順利流過。氣壓的驅動控制了薄膜，間接控制了流體的流動。

(OH-Group)，如圖二所示，經過活化處理之PDMS表面則會變為極度親水之性質，水滴於表面上馬上散開，水與表面之接觸角降低至10度之下。



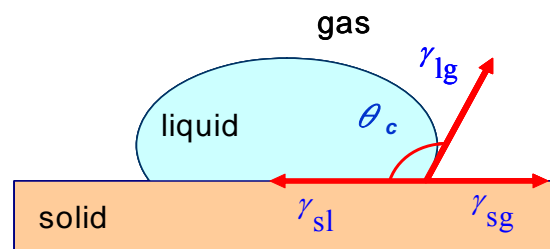
圖二 PDMS 氧電漿表面處理化學狀態表示圖。將PDMS進行氧電漿 (Oxygen Plasma)的表面活化處理，則會將PDMS表面的甲基分子取代為氫氧基(OH-Group)，經過活化處理之PDMS表面則會變為極度親水之性質。

(三)接觸角量測原理

自然界中不同的相接觸在一起時，其界面會處於特殊之能量狀態，當此能量愈高，此相基於熱力學定律會儘量減少其接觸表面積。當一液體滴在固相平面時，則會形成三種接觸表面，分別為固-液、液-氣、氣-固介面，如圖三所示。於此三相的平衡之下，此接觸面的表面張力 γ_{sl} 、 γ_{lg} 、 γ_{sg} 之平衡關係可由楊式方程式(Young's Equation)表示為：

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos\theta_c$$

θ_c 定義為此液-固界面之接觸角(Contact Angle)。以水為例，當水



圖三 氣-固-液界面張力之關係圖。當一液體滴在固相平面時，則會形成三種接觸表面，分別為固-液、液-氣、氣-固介面。於此三相的平衡之下，此接觸面的固-液界面表面張力(γ_{sl})、液-氣界面表面張力(γ_{lg})、固-氣界面表面張力(γ_{sg})會形成一平衡關係。

與表面接觸角度 θ_c 小於90度時，則稱此材料表面具親水性質 (Hydrophilic)。反之，若與表面接觸角度大於90度，則統稱此材料表

面為疏水性質(Hydrophobic)。親、疏水的性質關係著流體在此材料表面上的靜止及流動狀態，在微流體及微流管道之中，親疏水性的效應更為顯著。

四、實驗材料及設備

1. 高分子材料聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)
Dow Corning公司生產之PDMS(Sylgard 184 silicone elastomer)
固化劑(Sylgard 184 elastomer curing agent)
2. 儀器設備
高溫烘箱
氧氣電漿機
接觸角計

五、實驗步驟

(一) 氣體驅動式微流體晶片製作

PDMS因具有成本低、透光度佳、生物相容性高且容易批次製造等優點，因此常為業界、學術界及研究機構所使用。PDMS原為膠狀流體，在和其固化劑以適當比例混合之後會漸漸固化形成具彈性之固體，適合用於灌膜以製作各種結構物。

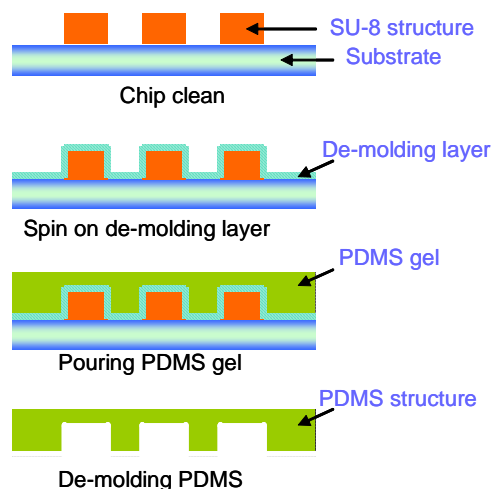
1. PDMS調製：將矽樹脂和固化劑以重量比10：1進行攪拌混合均勻。

2. 上脫膜層：在SU-8母模上以500 rpm旋轉塗佈一層十二烷基硫酸鈉(Sodium Dodecylsulfate, SDS)溶液(洗潔劑常含有之成份)，此脫膜層可避免PDMS在灌膜時黏著於矽晶片基材與SU-8結構物上。

3. PDMS灌模：將攪拌均勻之PDMS澆注於已塗佈SDS脫膜層之晶片上。

4. 真空處理：液態的PDMS膠狀物在混合時容易產生很多氣泡，氣泡通常會聚積在SU-8高深寬比結構之底部。為避免PDMS固化後在微流通道內有空洞產生，將混合均勻之PDMS置入真空罐並利用真空幫浦(Vacuum Pump)作真空處理，除去膠狀PDMS在混合攪拌時產生之氣泡。

5. 固化成型：真空處理去除氣泡之後，將晶片置入烘箱，以75°C，60分鐘加速PDMS之固化，固化後之PDMS外觀為透明並且具有彈性。



6. PDMS脫模：固化後，將PDMS直接脫模，因具有脫模層之原故，可輕易將固化後之PDMS撕下。PDMS翻模後之圖形與SU-8母模圖形之一致性。

(二) 氧氣電漿改質材料表面親疏水性質

1. 將欲接合之兩片PDMS(或PDMS與玻璃晶片)置於氧氣電漿機中，欲接合之表面朝上。

2. 開啟真空幫浦 (Vacuum Pump)，並通入純氧60秒鐘，以達到爐管內為純氧之狀態。

3. 關閉氧氣，使幫浦持續抽真空3分鐘，使真空度達到100mTorr以下，在此須注意真空度不足會使得電漿無法產生。

4. 開啟電漿強度至HIGH(29.6 W)，照射2分鐘。

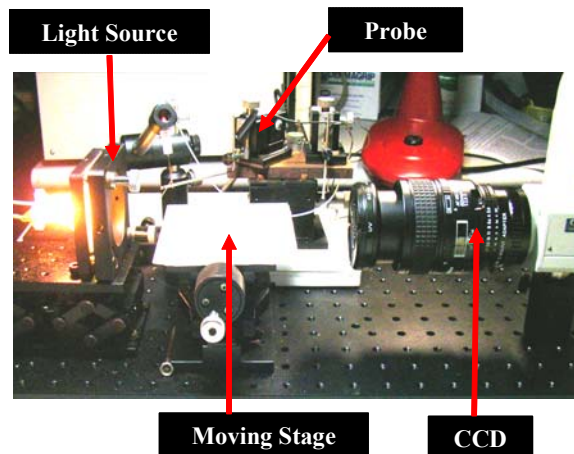
5. 照射完畢後關閉電漿並以純氧氣破真空(防止空氣中微粒附著於晶片表面)。

6. 將晶片取出後對位並進行接合。



(三) 接觸角量測

本質接觸角量測採用靜置液滴法(Sessile Drop Method)，以注射針產生一定量液滴後，移動載台向上，使液滴沾於待測表面(避免因液滴被擠壓而賦予液滴外加動能，造成量測誤差)，輕緩地將載台向下移動，由所擷取之影像利用接觸角度分析軟體 (WinDrop++, GBXInc., France)自動進行接觸角度測定。量測環境控制條件如下：



1. 實驗之液滴選用去離子水，以避免水中雜質影響量測結果。

2. 避免重力影響量測，實驗之液滴體積預計固定為4 μ L。

3. 室溫控制在20~22 $^{\circ}$ C，減少因溫度變化造成液滴表面張力改變而影響量測結果。

六、結果與討論

- (一)在設計氣體驅動式微流體晶片中，可利用高分子材料PDMS所做成的薄膜，進行流體的驅動。試想微流體在微流管道中是如何被PDMS薄膜給驅動？流體方向是否只可單一方向前進？
- (二)親疏水錶表面如何改質？若經氧氣電漿處理後，是否就不會再恢復原狀？
- (三)接觸角與表面張力之關係。

七、主要參考文獻

1. 回寶珩、林展生、李國賓。2002。PDMS表面處理技術及其在新式微閥之應用。奈米工程暨微系統技術研討會/國科會微機電系統成果發表會The 6th Nano Engineering and Micro System Technology Workshop Sec: 4C-5。
2. Beebe, D. J., Wheeler, M., Zeringue, H., E. Walters and S. Raty. 2002. Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology* 57: 123-135.
3. Vinet, F., P. Chaton and Y. Fouillet. 2002. Microarrays and microfluidic devices: miniaturized systems for biological analysis. *Microelectronic Engineering* 61-62: 41-47.

實驗九 微流體生物晶片實作與應用

謝達斌副教授 國立成功大學口腔醫學研究所

楊鏡堂 國立清華大學動力機械工程研究所

楊宗翰 國立清華大學動力機械工程研究所

方偉峰 國立清華大學動力機械工程研究所

一、背景介紹

傳統的生化醫療領域中，許多的檢驗需耗費龐大的人力、物力以及大型儀器的支援，檢測過程往往需要數十分鐘至數十小時。有鑒於此，Manz在1990提出微全分析系統(Micro Total Analysis System, m-TAS)的概念，冀望將傳統繁雜冗長的檢測流程簡化並建構於數平方公分的晶片上，亦稱此為晶片實驗室(Lab on a Chip)或是微流體生物晶片(Microfluids Biochips)，更開啟現今整合各領域所引領而生的新興範疇。以內部檢體或是流體的性徵分類，一般區分為連續流體以及數位流體，本實驗依此分別介紹連續微流體晶片以及數位流體晶片。一般的連續微流體晶片具有流道結構，可供樣品流體於其中輸送，大都為平面的立體結構，可輕易利用微機電製程加以製作，製作出的微流體元件將可應用於微流道內流體的傳輸、分離、混合與檢測等。而數位流體的涵義則視液珠為獨立之流體，實驗將利用在電潤濕微液滴操作裝置上進行磁粒操控的研究，並且不用在電潤濕裝置上外加任何電極以外的磁場產生裝置，達到分離癌細胞的檢測目的。

二、實驗目的Objectives

一般的生物晶片大都以光學方法(螢光反應或化學激光)檢測，所以晶片組成的材料必須具備高透光度的特性，半導體上的矽材料雖然有與電路上結合的優勢，但由於透明度和生物相容性等問題，實際上並不比其他材料合適。因而各種材料包含矽、SU-8、PDMS、PMMA和玻璃，廣泛出現於微流體生化元件的研製上，尤其SU-8、PDMS和PMMA等高分子材料，在光學或生化方面的性質，更有矽不能相比的優越性。第一部份實驗結合SU-8光阻的製程、聚二甲基矽氧烷(PDMS)翻製和氧氣電漿儀接合的製程來製作微混合器。採用SU-8光阻的製程製作模仁，而後以聚二甲基矽氧烷翻製成品再以氧氣電漿儀處理後，即可接合成微流道元件，使得其量產的能力大幅提高。此外，PDMS的生化相容性佳，可廣泛應用於生化微流體元件。

第二部份的實驗將利用在電潤濕微液滴操作裝置上進行磁粒操

控的研究，並且不用在電潤濕裝置上外加任何電極以外的磁場產生裝置。本實驗將針對電極的型態、幾何形狀與尺寸進行設計，使其具有理想的電磁場強度且兼顧電潤濕效應，並規劃可行的製程來整合電潤濕微液滴操作平台與磁粒操控裝置，利用修飾上抗體的磁珠能與特定癌細胞結合的特性，在所設計的系統上驗證所有電潤濕微液滴基本操作功能且進行磁珠吸附測試。

三、實驗原理Principles

第一個實驗著重於微流體晶片的製程，絕大多數晶片的製作基於成本考量，會先製作模仁而後加以翻製晶片，已是非常常見的製程手法。我們將利用厚膜光阻當做模仁，再澆注上固化前液體狀的PDMS，待固化後加以脫模，後續利用氧電漿表面改質的方式，處理PDMS的表面而後進行接合。以下將分別介紹SU-8、PDMS以及氧電漿表面改質的原理。

(一) SU-8光阻

SU-8光阻是目前使用相當廣泛的厚膜光阻，一次塗佈便能夠產生膜厚高達數百微米的材料。SU-8是一種負光阻，它是由三種主要的成份所構成的，第一種是環氧基酚醛樹脂(epoxy novolak resin)，第二種是g-丁內脂(*r*-Butyrolactone, GBL)和第三種是感光劑(triaryl sulfonium, HSbF₆)。SU-8光阻有各種型號規格，其間的差異在於黏滯係數不同。SU-8光阻的吸收波長必須小於400nm，使用波長I線(365nm)的曝光機即可。

SU-8光阻最基本的製程可分為數個步驟：

第一道步驟是前處理工作，以標準清洗流程(丙酮及異丙醇(IPA))將晶圓清洗後，放置120°C的熱板上烘烤10分鐘去除表面的水氣即可。

第二道步驟是旋轉塗佈，將SU-8光阻置放在晶圓的中間，再以旋轉塗佈機塗佈光阻。旋轉塗佈的過程分兩個階段，第一個階段設定在400~600rpm間，此一步驟的目的是將光阻旋開，接下去進行的是第二階段的高速塗佈，此一階段的轉速是影響厚度的最大因素。SU-8光阻的塗佈在晶圓的邊緣處會有凸起來的現象，此種凸起現象，在曝光時容易直接接觸到光罩，不利曝光，因而在高速塗佈時通常會使用邊緣去除劑將邊緣凸起的SU-8光阻去除。

第三道步驟是軟烤，SU-8光阻在此過程是要去除溶劑，硬化SU-8光阻，在曝光時不會沾黏到光罩。通常溫度設定在65°C和95°C。65°C時SU-8光阻的流動性很好，在塗佈的過程中，有可能產生一些氣泡，

在此溫度時可用一根相當尖的金屬棒將其戳破，光阻有機會補平。在95°C時SU-8光阻就逐漸硬化成一乾膜。軟烤完成後置放在熱板上緩冷90min，避免裂縫的產生。

第四道步驟是曝光，曝光能量與光阻厚度成正比關係，目的是將光罩上的圖案反轉印製光阻上。

第五道步驟是硬烤，硬烤的目的是讓光阻鍵結，曝光和硬烤過程都會影響鍵結，改變元件的形狀。硬烤的時間不僅與厚度有關，與型號亦有關係，型號愈大者，時間愈長。硬烤的控制非常重要，溫度的變化儘量緩慢以避免裂縫的產生。

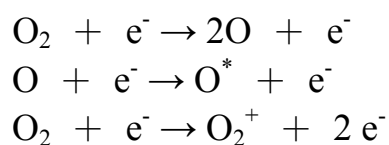
最後為硬烤完的顯影，顯影時的攪拌非常重要，顯影時的參數是顯影時間，僅與厚度和SU-8光阻上的圖案尺寸有關。

(二) 聚二甲基矽氧烷(PDMS)

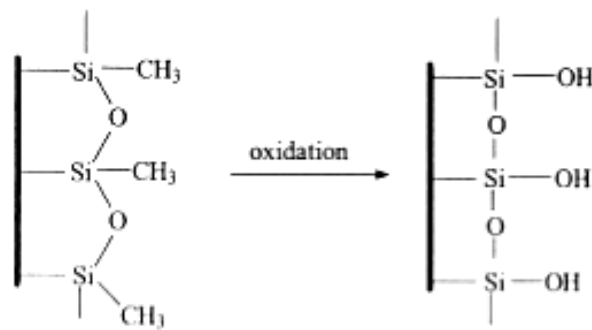
聚二甲基矽氧烷，全名為Polydimethylsiloxane (PDMS)，為一種高透光度且高生物相容性的高分子材料，是為疏水性材質，接觸角約為108度。一般使用過程必須將液體狀的主劑(A劑)與硬化劑(B劑)以10:1的重量比混合，常溫靜置約一天時間即可硬化，也可放置烤箱或加熱板上，視施加溫度的高低決定硬化所需的時間，攝氏80度下約2~4小時即可硬化完成。

(三) 氧氣電漿改質材料表面親疏水性質

電漿式包含離子、電子與中子的完全或部分游離的氣體，整體特性是為電中性。當氧氣分子被電子激發後，部分的氧氣分子會分解成氧原子，另一部分的氧原子會被激發成自由基的型態，此自由基(O*)會與高分子表面反應,造成材料表面氧化並改變其結構。oxygen species混合物在低壓放電過程產生,其過程如下：



將PDMS進行氧電漿的表面處理，會將PDMS表面的甲基分子取代為氫氧基，如圖一所示，PDMS表面將由疏水性變為親水性。



圖一 氧電漿處理PDMS表面之化學分子示意圖

第二部份實驗主要介紹電潤濕微液滴操控技術與原理，此法不需高溫高壓、適用流體種類廣泛、操作方式簡便、裝置製作簡單、流體傳輸快速、不影響流體性質且與生化應用相容性高。電潤濕現象就是利用外加電位差改變液滴與接觸表面的潤濕性，影響其接觸角進而達到液滴驅動的效果。電潤濕液滴驅動的相關研究已經發展的很完整，液滴的產生、切割、合併、傳輸都可以於同一裝置上完成，因此裝置具有多工性；而以液滴方式進行的流體混合相較於連續流體更是有顯著的效果，這點就是利用液滴進行檢測最有利的地方，因為樣本與試劑間的妥善混合，將可以大幅縮短檢測時間以及提高檢測精確度。另外，藉由電極的配置與裝置的設計，可以讓液滴完成2-D平面自由路徑運動，增加了電潤濕裝置的自由度與實用性。

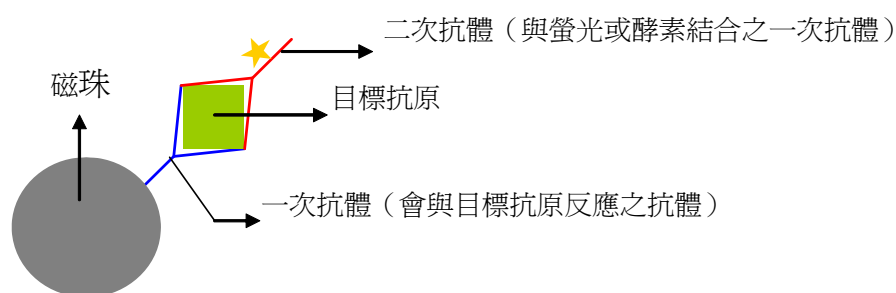
(四) 磁性分離技術之原理與機制

磁性分離法的原理乃是藉由將取樣對象附著於微小磁粒而與樣本試劑中其他非目標物質分離，並可經由磁粒運送檢測對象至指定位置。取樣的對象可為生物細胞、酵素、抗原、DNA等微小生化分子，此分離法精確且快速，在生物學、細胞學、藥物學及臨床醫療診斷等生化領域應用極廣。

磁性分離法中的磁性粒子(後稱磁粒)通常為磁珠(magnetic bead)，磁珠是一種以順磁性(paramagnetic)物質為核心，外表再披覆聚合材料的微小粒子，直徑在0.3~5.0 μm 之間，目前已經商用產品化。磁珠在外加磁場的環境中將具有高磁化性而被吸附在磁極，但是當磁場消失後卻不會有殘留磁性，因此將重新擴散於流體中，這樣的特性使得磁珠可以用來作為流體中目標粒子的分離與運送，在生醫方面應用很多，例如：細胞分離、細胞染色、藥物或抗體局部定向治療、以及發展最為成熟的免疫分析(immunoassay)。以下將概略說明以磁珠進行免疫分析的相關步驟與反應(圖二所示)。

抗體和抗原之間的反應是具有專一性的，假設現在欲檢測一待測樣本中某種抗原量為多少，首先必須將磁珠與會和該抗原反應的專一抗體(後稱一次抗體)接合，接下來將磁珠混合於樣本中，樣本中的待測抗原將與磁珠上的抗體反應接合而與樣本中的其他物質分離，由於磁珠被磁鐵吸附，因此除了待測抗原之外其餘非目標粒子皆被沖走。

此時再加入二次抗體，二次抗體即為附有酵素(AP, Alkaline Phosphatase)或是螢光的一次抗體，待二次抗體與磁珠上的抗原反應完全後，在樣本中混入PAPP(P-Aminophenyl Phosphate)溶液，二次抗體上的酵素將使PAPP反應為PAP(P-Aminophenol)。此時在樣本中施加電場，由於電場的作用將使PAP產生氧化還原反應，反應會產生4QI(4-Quinoneimine)並放出電子，因此便可以在陰陽極偵測到電流，根據電流量的大小來判斷待測抗原的量。下面即為此檢測過程的反應式。若二次抗體上附著的是螢光，則不進行這些反應，待二次抗體與磁珠上待測抗原接合完全後，沖洗過剩之二次抗體，便直接觀察螢光的量來判斷抗原量即可，較方便但是準確性較差，可作為定性觀測比較之用。本實驗不需利用二次抗體，只需一次抗體結合癌細胞，因為沒有修飾抗體的磁珠無法與癌細胞結合，可用顯微鏡觀察即可比較出差異。



圖二 磁珠與抗體抗原之間的接合原理

(五) 電潤濕現象原理機制

在微流體裝置中驅動液體的方法有相當多，例如：壓力、靜電、熱毛細、氣泡、光學等等，但是大部分的驅動法，不是限定或影響流體性質，就是操控性差可逆性低，或是需要施加高溫高壓以及裝置製程複雜，這些缺點都限制了以上驅動法的應用層面。

電潤濕(EW, electrowetting)現象是利用外加電位差來改變固液介面之間的潤濕性，達到操控表面張力的效果。表面張力是在微流體裝置中廣泛被用來驅動流體的力，原因在於表面張力是隨尺度做一次方的變化，因此在微尺度下表面張力將具有尺度優勢而成為很有效的驅動力，故以表面張力為操控機制的電潤濕原理是一種很有效率的方法。電潤濕原理不需要高溫高壓，適用流體廣泛，操控性精確可逆性高，傳輸快速，又不會影響流體性質，因此應用範圍極廣，尤其適用於生醫方面高精密度之流體操控，可謂是一極具潛力的驅動方式。

在一覆有介電層，再塗覆疏水層的表面，液滴與表面間的接觸角由於疏水層的存在而大於90度。當外加電位差於液滴和介電層之間時，將造成介電層產生電容效應而在固液表面形成一個電荷累積的薄層，這些電荷的堆積將影響原先固液界面的能量分佈，進而改變界面的潤濕性，使得原先是疏水性的表面變成親水性，液滴的接觸角也就從大於90度轉變成小於90度，這種潤濕性的改變就是電潤濕現象。在電潤濕過程中的電容效應主要是發生在介電層的上下表面，疏水層的電容效應是微乎其微的，其存在是為了使整個表面形成疏水性之故。針對電潤濕現象進行基本測試，在一覆有介電層，再塗覆疏水層的表面，施加電位差於液滴和表面下方電極之間，可明顯看出液滴由於接觸角改變而造成外型塌陷，且發現電潤濕現象是一種可以快速反覆操作的可逆反應。這種在介電層之上進行的電潤濕現象有其更嚴格明確的名詞定義，稱做「介電層上之電潤濕現象」(EWOD, electrowetting on dielectric)。

根據熱力學分析，外加電壓與固液界面表面張力的改變之間的關係可由Lippmann's方程式表示之：

$$(1) \quad \gamma_{SL}(V) = \gamma_{SL}(V=0) - \frac{C^2}{2} V^2$$

其中c是介電層單位面積之電容值(F/m²)。在固液氣三相接觸線，接觸角與介面表面張力之關係可由Young's 方程式表示之：

$$(2) \quad \cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}$$

其中 γ_{SG} 是固氣介面表面張力， γ_{LG} 是液氣介面表面張力。將(2)式代入(1)式，可得到由外加電位差所表示的接觸角變化關係式：

$$(3) \quad \cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{1}{2} \frac{1}{\gamma_{LG}} CV^2$$

其中 θ_0 表示未加電位差時之原始接觸角。

針對系統成品進行簡易探針測試，將探針碰觸液滴後於探針以及液滴下方電極間施加電壓，則表面將因電潤濕效應變為親水性，此時可觀察到液滴之外型因接觸角之改變而明顯塌陷，如圖三所示。

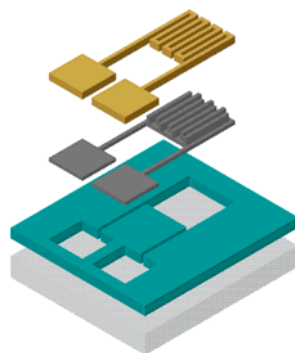
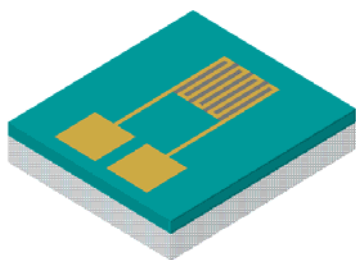


圖三 一般電極之簡易探針電潤濕現象測試

(六) 以微製程製作之磁粒操控與磁場裝置

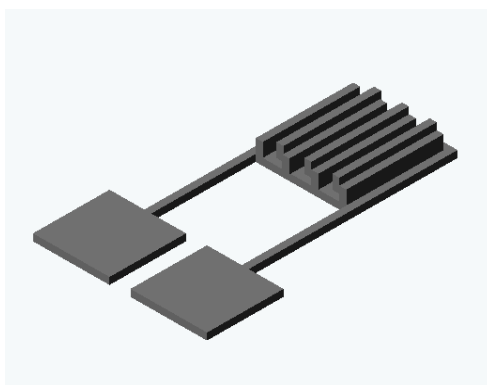
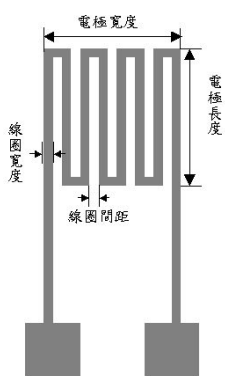
以微製程製作微型磁場產生元件之技術是由微電感元件延伸而來的。微電感元件的應用最初限制在高頻領域，例如：微波電路、訊號處理電路等等。隨著磁致動在微機電領域中的需求日增，這些微電感元件始經由型態、結構與製程上的改良，成為可以產生高磁通量與高電感的元件，進而應用在微致動器、微感測器等裝置中。這些裝置中的磁場產生元件之共同優點就是可以在流通微小電流下產生理想的電感值與磁通量密度，進而提供大位移或出力，且裝置發熱情形輕微，耗能少效率高。前述裝置中之微電感元件的種類依形狀主要可分為三種型態：螺旋型(spiral-type)、螺線管型(solenoid-type)、纏繞蜿蜒型(toroidal-meander-type)。這三種電感元件雖然形態不同，但是皆根據類似的原理與概念來設計，因此都具有高電感值、高容許電流、高磁通量密度、封閉磁力線通路、低磁干擾、低耗能的特性。在設計電感線圈時的重要幾何尺寸參數為：線圈寬度、線圈間距、電極長度與寬度，這些幾何參數都標示於圖四蜿蜒狀電感線圈之形狀示意圖中。

纏繞蜿蜒型電感的結構型態是以螺線管型電感為基礎，巧妙地改變導線與磁核之間的角色，使用磁核來纏繞蜿蜒的導線金屬層。此型電感起初被應用在微致動器、微馬達的裝置上。此型電感的設計不但可以達到和螺線管型電感同樣的結果(高電感、封閉磁通路)，卻又可以將金屬連接用在磁核結構而非導線結構，導線的金屬層都是位於同一平面，如此一來可以大幅降低電阻與耗能。另外，使用磁核來纏繞導線，將可縮短導線的長度，進一步降低電阻值。其設計原則都可以歸納為使用彎曲的導線產生電磁場，再利用輔助磁核結構來使磁力線通路封閉並做為電磁鐵，這樣的模式也成為日後各種微電感元件與微型磁場產生元件設計的基礎依據。



(a) 電感電極立體結構圖

(b) 電感電極結構分解圖



(c) 電感電極中導線結構示意圖

(d) 電感電極中磁核結構示意圖

圖四 具有磁粒操控功能之電極結構示意圖

四、實驗材料及設備 Materials and Preparation

(一) 實驗材料

高分子材料聚二甲基矽氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) Dow Corning公司生產之PDMS(Sylgard 184 silicone elastomer)

固化劑(Sylgard 184 elastomer curing agent)

SU-8負光阻 (MicroChem)

老鼠膀胱癌細胞株(MBT-2 cell lines)

順磁性磁珠(Revovist)

(二) 實驗設備

SU-8光阻所用的光阻塗佈機 (Spin Coaters) Brewer Science Inc. Cee Model 100

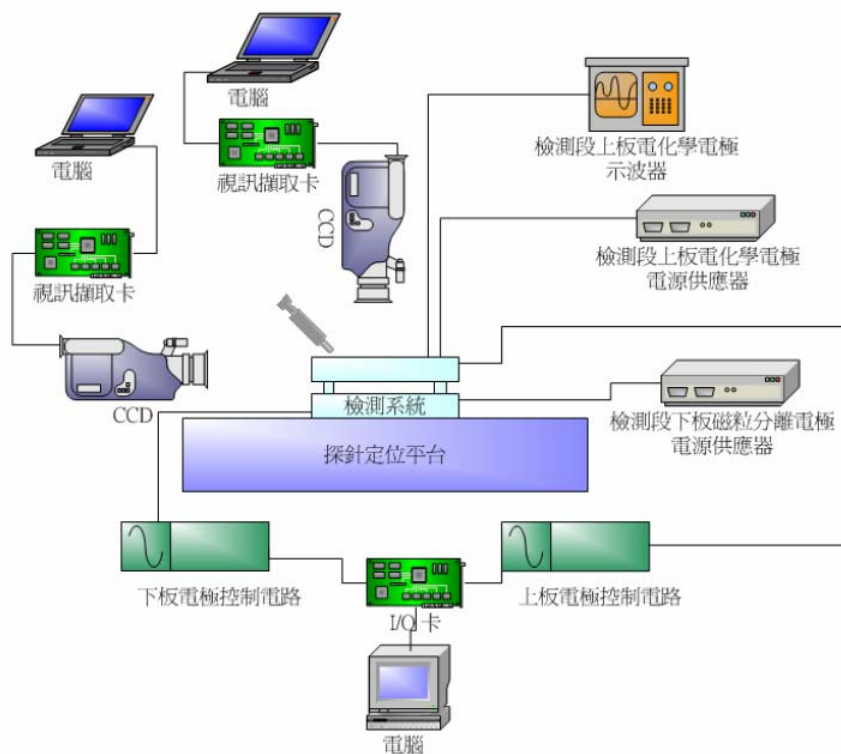
顯微鏡 Olympus BHM-313L

加熱板(新光精機 Hp-30D)

EV620雙面曝光機

無菌操作台

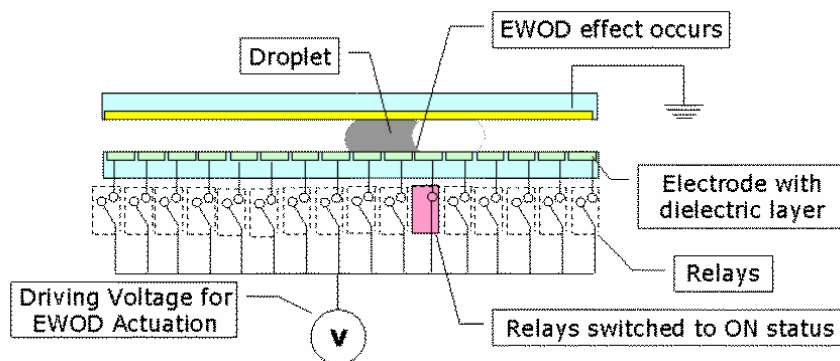
(三) 電潤濕微液滴操控平台與設備



圖五 液珠操控檢測系統架設示意圖

本實驗所設計之液珠操控檢測系統架設如圖五所示，包含了探針定位平台、檢測系統、流體注入吸量管、控制電路、訊號產生器、電源放大器、觀測裝置(數位攝影機或CCD)、量測反應訊號之示波器。

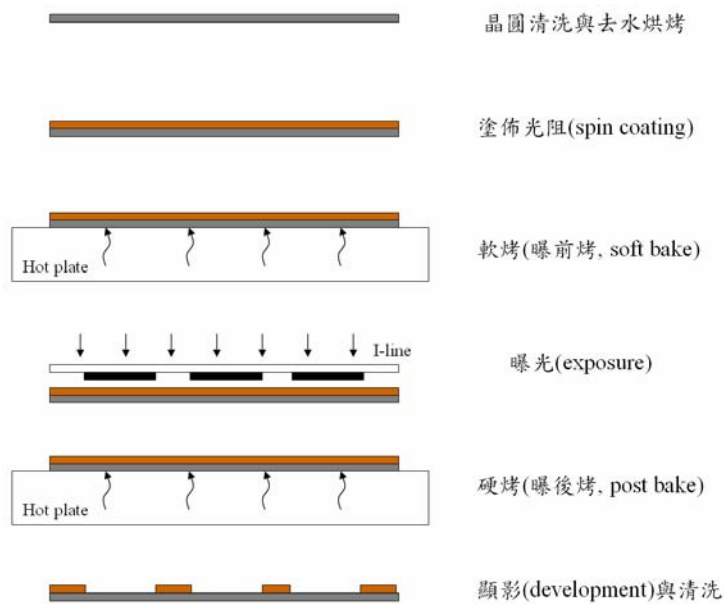
本文之實驗在電極操控方面的設計需求，乃是能夠將電潤濕平台上的電極依所要求的液滴操作方式，序列地開關切換以導入外加電壓，使電極產生電潤濕效應或磁珠吸附效果。根據此需求，本文決定採用標準繼電器一對一地與適當的電極相接，來扮演切換開關的功能，並使用硬體描述程式，來操控各個的繼電器何時該做切換的動作。將一個個的繼電器開關，一端接至適當的系統電極上，一端接至產生電潤濕效應或磁珠吸附所需的外加電壓源上，當特定的繼電器經過可程式化邏輯元件板上的接腳輸入電壓訊號、致動線圈、接通開關後，外加電壓便會導入系統中的特定電極與電感元件上以達到驅動液滴或操控磁粒的目的。圖六為電極控制電路示意圖，包括系統整體電路示意圖、外部控制系統圖、檢測段一般電極與電感電極電路操作圖。



圖六 電潤濕平台電極控制電路示意圖

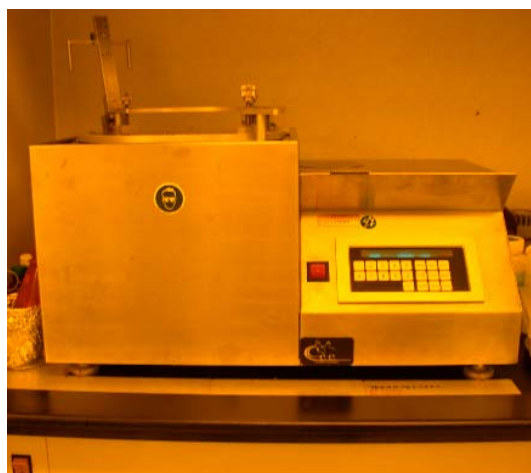
五、實驗步驟Methods

(一) SU-8模仁製作



圖七 SU-8光阻的標準製程步驟

步驟一、清潔晶圓後塗佈光阻：在矽晶圓上，先以每分鐘500轉的速度，旋轉30秒，再以每秒2800轉到3500轉的轉速旋轉30秒，塗佈第一層SU-8 2035光阻，塗佈厚度約30 nm。光阻塗佈所用的機台示於圖八，圖九顯示拍照用的顯微鏡。在塗佈其它光阻(AZ系列的光阻)時，都會加上一層HMDS，增加光阻和矽晶圓間的附著力。但這一道步驟已被證明於SU-8的製程上沒有多大的用處。

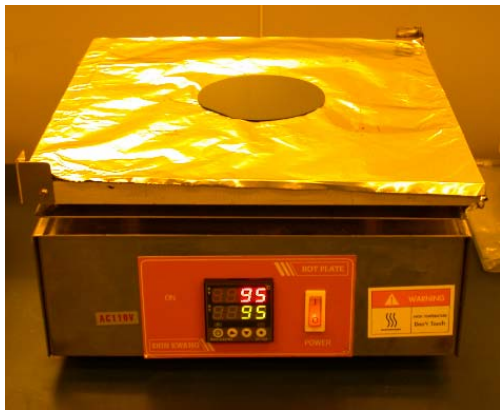


圖八 光阻塗佈機



圖九 拍照用的顯微鏡

步驟二、曝光前軟烤：將已塗佈上光阻的矽晶圓置於加熱板上，以 65°C 烤2分鐘後，加熱到 95°C 烤6分鐘。圖十顯示加熱板機台。



圖十 加熱板

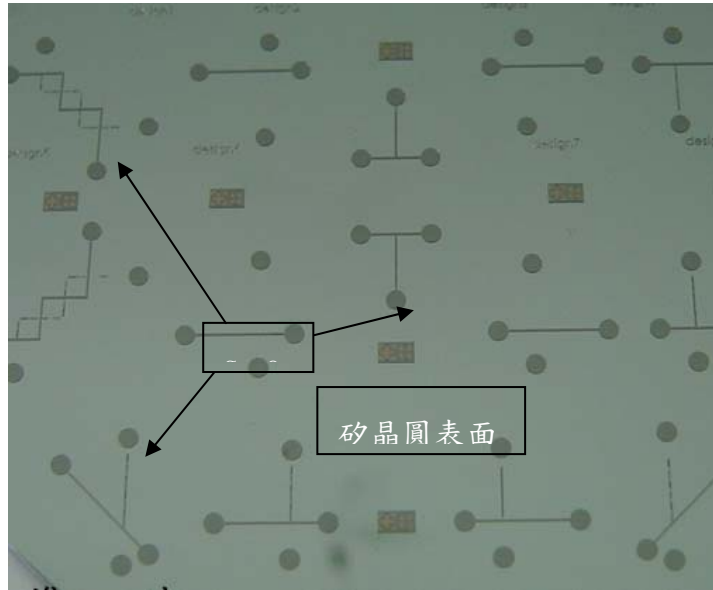


圖十一 雙面曝光機

步驟三、曝光：曝光35秒以上。曝光所用的機台為EV620示於圖十一。

步驟四、曝光後硬烤：曝光後的矽晶圓重新置於加熱板上，以 65°C 烤1分鐘，然後加熱到 95°C 烤3分鐘。

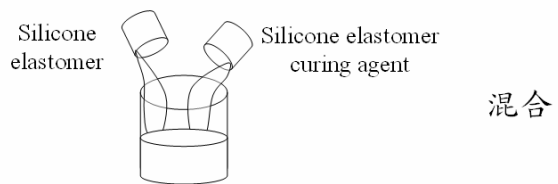
步驟五、顯影：浸泡在SU-8顯影液中顯影，待顯影完成後，取出以氮氣吹乾即完成SU-8光阻母模的製作。圖十二則顯示SU-8光阻顯影後成品。



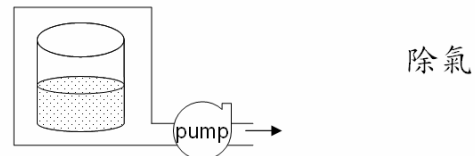
圖十二 SU-8光阻顯影後成品

(二) 聚二甲基矽氧烷(PDMS)翻製

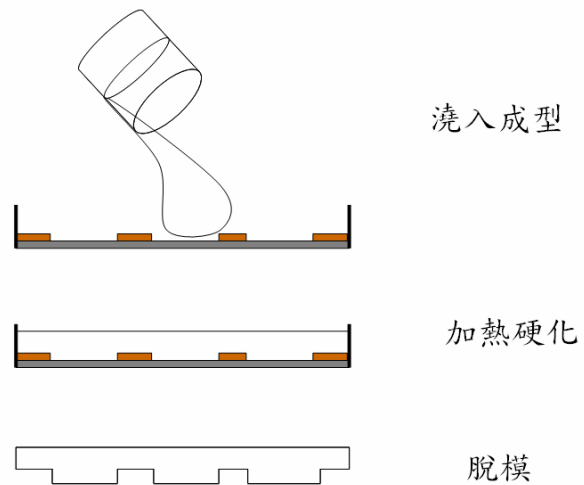
步驟一、混合：將聚二甲基矽氧烷的原材料和它的固化劑以10：1的混合比例拌均勻。



步驟二、除氣：將混合好的聚二甲基矽氧烷裝入杯中，放入除氣槽，打開真空幫浦抽真空，混合液中的空氣不斷的被抽離，混合液會不斷的膨脹和冒泡，直到大部分的氣體已被抽離，這個過程約需15~120min，視混合液的和混合的狀況而定，通常這抽氣時間愈久，成型後的成品內的氣泡數量愈少。



步驟三、成型：聚二甲基矽氧烷的製程中必須先有一個以其它製程製作出



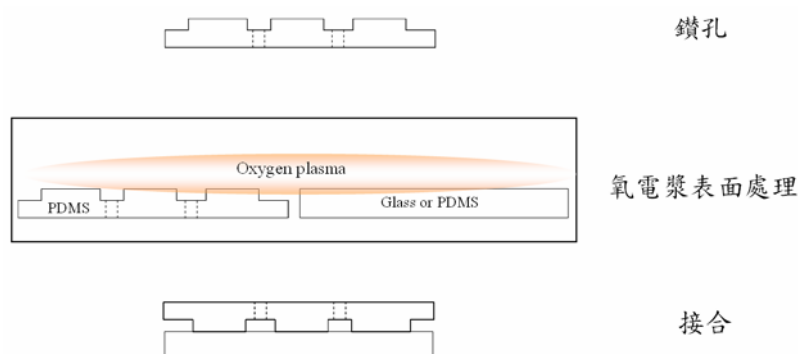
圖十三 聚二甲基矽氧烷的製程步驟

來的母模，在此母模上塗上2~5%適度的清潔劑水溶液，置放於模穴底部，將除完氣體的聚二甲基矽氧烷倒入模子中，即完成成型的工作。

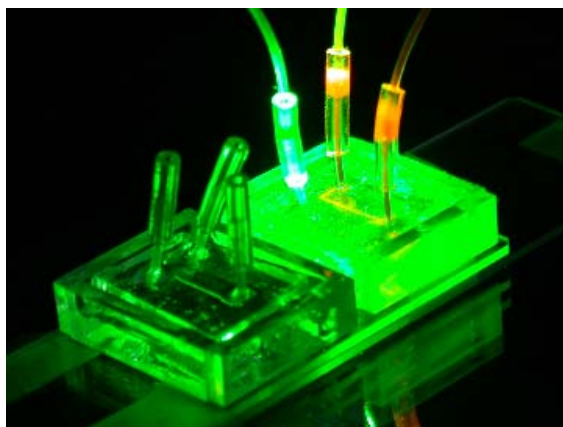
步驟四、固化：在第三步驟的聚二甲基矽氧烷仍然是黏稠狀的液體，倒入模型中，靜置不動，在25°C約需24小時才能完全固化，在65°C約需4小時，100°C則縮減至1小時，當溫度提高到150°C時，時間縮短至15min即完成固化。經過這四個步驟就完成微流道元件。溫度高時固然可縮短固化的時間，但相對的因為熱膨脹系數的不同，而使得微流道的尺寸與模仁有所不同，通常視所設計的流道形狀而定有10%左右的誤差。高溫時所需的硬化時間較短，但所翻製的聚二甲基矽氧烷會產生變型，在本文中都用室溫環境，降低變型量。

(三) 氧電漿處理後之晶片接合

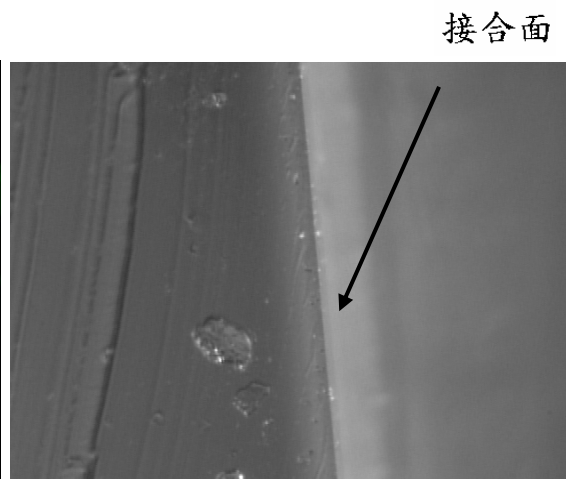
圖十四為晶片接合之步驟，將完成固化後的聚二甲基矽氧烷從模仁的表面上撕開來後，置入氧氣電漿儀上，以氧氣電漿處理後，即可將兩片聚二甲基矽氧烷對接或以聚二甲基矽氧烷與玻璃接合，通常聚二甲基矽氧烷對接所需的氧氣電漿的能量較大。與玻璃接合所需使用的能量較小且不容易漏。完成接合的微流道元件，需要再以鑽頭鑽出與外部流道相通的出入口。再膠合進出口管，即可完成整個元件的工作。完成的聚二甲基矽氧烷的微流體晶片的成品示於圖十五，其中一個元件正通入螢光染料進行實驗中，另一個則是原型。圖十六顯示聚二甲基矽氧烷的接合面，接合面的黏著性和密封性相當好，以手撕開無法從接合面剝離，會破壞整個元件。



圖十四 晶片接合步驟



圖十五 聚二甲基矽烷氧的微流體元件



圖十六 聚二甲基矽烷氧的接合面

(四) 微電感裝置製程

圖十七是製作一組電感電極與一般驅動電極的簡短製程描述。首先在玻璃基材上以電子束蒸鍍電鑄之起始層(seed layer, Ti 200 Å / Au 1000 Å)。

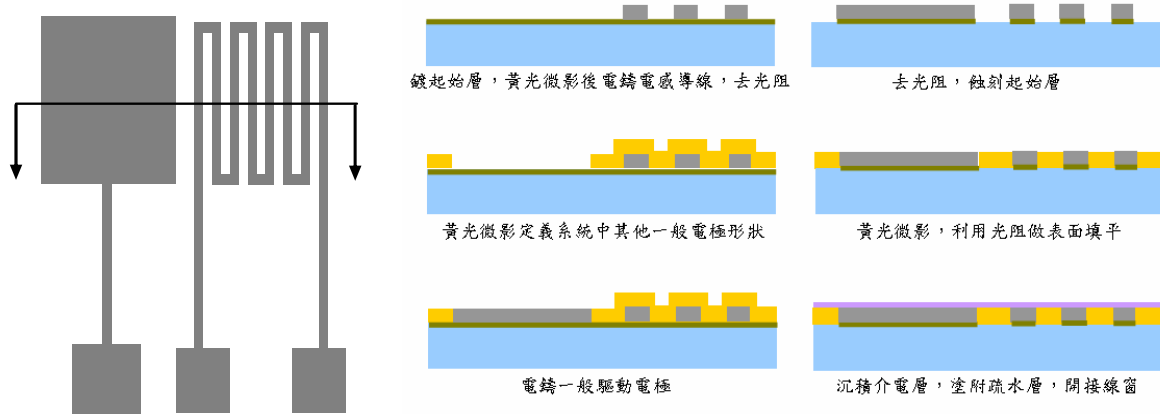
以第一道負型厚光阻(THB 130N, 10 mm)黃光微影定義系統中電感電極之形狀。以銅電鑄出電感電極結構後去除光阻。

以第二道負型厚光阻(THB 130N, 10 mm)黃光微影定義系統中其他一般電潤濕驅動電極形狀。以銅電鑄出一般驅動電極結構後去除光阻，並以濕蝕刻方式蝕刻下方起始層。

將電感電極與一般電極分開於兩次電鑄製作的原因在於減少電極間的厚度差。由於電感電極形狀為蜿蜒窄線，一般電極則為方形大面積，若一起於同一道黃光微影定義形狀之後以電鑄製作，彼此之間厚度差將難以控制，一般而言窄線處厚度將高出許多，這是電鑄製程的限制。另外，濕蝕刻去除起始層的目的是在於使各電極之間電性獨立，濕蝕刻直接採用對各金屬具有選擇性之專用蝕刻液，故不需再以黃光微影定義光阻保護。

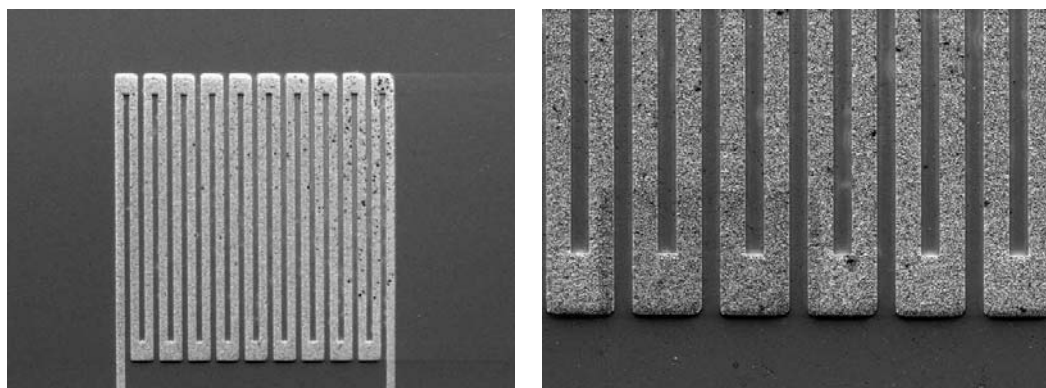
以第三道負型厚光阻(THB 130N, 10 mm)黃光微影執行表面填平動作，此光阻層不再去除，硬烤後直接作為表面填平層之用。本次黃光微影光阻顯影打開之形狀即為前兩次電鑄後晶片上所有電極形狀。

以氣相沉積方式製作介電層薄膜(Parylene C, 2500~8000Å)，再旋轉塗附疏水層薄膜(Teflon, 500~1000Å)，最後打開接線窗(bond pad)，完成製作。



(a) 製程所取截面示意 (b) 型態一電感電極與一般驅動電極製程圖

圖十七 型態一電感電極與一般驅動電極製程圖

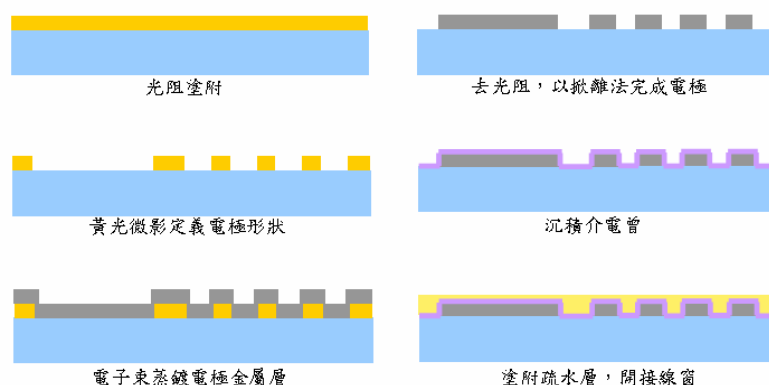


圖十八 (a) 系統電感電極之電鑄結構 圖十八 (b) 系統電感電極細部結構

(五) 電潤濕測試裝置製程

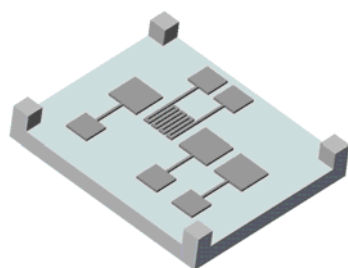
圖十九是製作一組蜿蜒形電極與一般驅動電極的簡短製程描述。其切面與圖3-19相同故不再標示。本文中用以進行電潤濕微液滴操作實驗的所有裝置，包括完全模擬實際檢測系統之「擬真系統」(即除了電極厚度之外，電極形狀與配置皆與所設計之檢測系統完全相同)，以及額外設計製作之電潤濕測試裝置，皆採用本節之製程製作。

首先在玻璃基材上以第一道正型薄光阻(AZ6112, 0.7mm)黃光微影定義檢測系統中所有電極之形狀。以電子束蒸鍍電極之金屬層(Ti 200Å/Au 800Å)。去光阻，以掀離法完成所有電極之形狀。以氣相沉積方式製作介電層薄膜(Parylene C, 2500~8000Å)，再旋轉塗附疏水層薄膜(Teflon, 500~1000Å)，最後打開接線窗(bond pad)，完成製作。

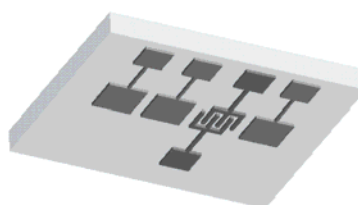


圖十九 一般電潤濕測試平台製程圖

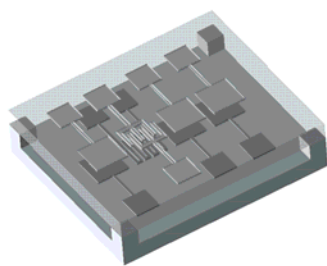
綜合以上製程，電潤濕液滴操作裝置磁珠檢測段的驅動電極因為要具有產生磁場與生化反應訊號檢測的功能，所以是蜿蜒與梳狀交錯的形狀，經由這樣的設計就可以不用在電潤濕裝置上外加任何磁場產生或反應訊號檢測裝置。檢測段的下板電極作成蜿蜒型使之具有產生磁場的功能；上板電極作成梳狀交錯型，使之具有免疫檢測酵素反應中施加電場的陰陽極功能。在這樣的電極配置設計下，電潤濕液滴操作裝置在磁珠生化檢測段的裝置示意圖與電極配置情形就如圖3-9所示。圖中省略下方電感電極之磁透金屬部分，圖二十(a)與(c)中的電感電極蜿蜒方向僅供示意。則為液珠在電潤濕平台移動、切割和合併的測試結果，如圖二十一所示。



(a) 檢測段下板電極配置圖

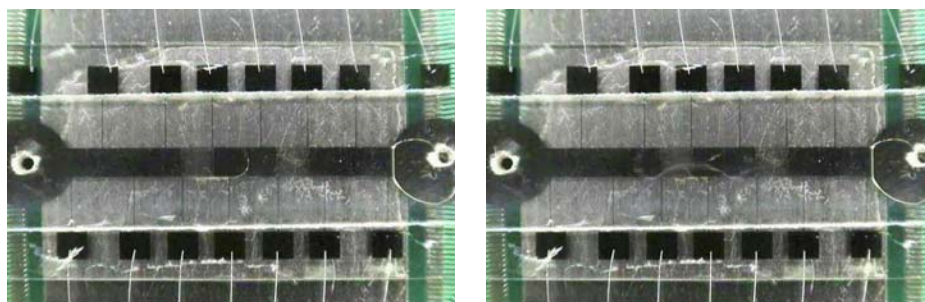


(b) 檢測段上板電極配置合

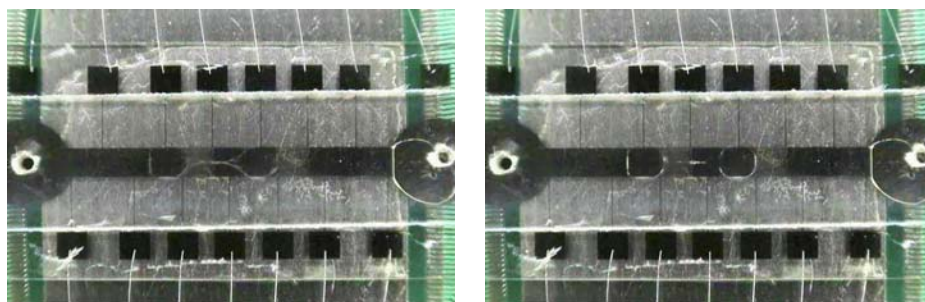


(c) 檢測段上下板裝置組

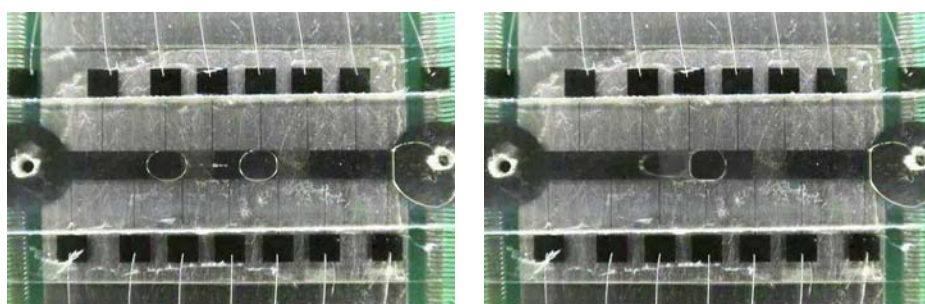
圖二十 磁珠生化檢測段的裝置示意圖與電極配置情形



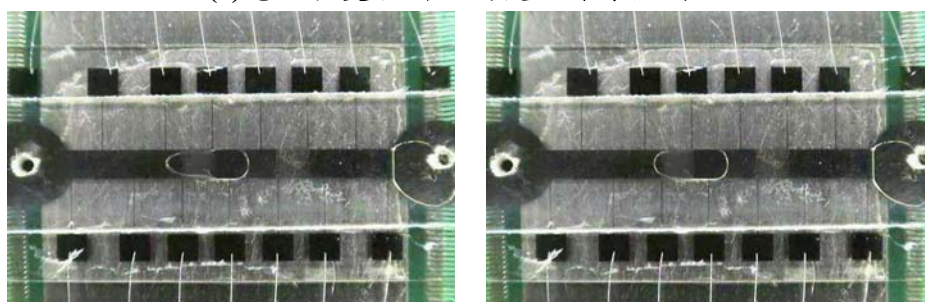
(a) 電潤濕雙液滴切割操控測試



(b) 電潤濕雙液滴切割操控測試



(c) 電潤濕雙液滴切割後合併操控測試



(d) 電潤濕雙液滴切割後合併操控測試

圖二十一 電潤濕雙液滴切割操控測試

(六) 磁珠修飾抗體

實驗組：將100 μ l磁珠置於20 μ l 3mM Her-2一次抗體中，以PBS加到1ml，加入2mg水溶性二亞胺基羰(EDC)作為連結劑，4 $^{\circ}$ C下作用一個小時。

控制組：將100 μ l磁珠置於20 μ l 3mM抗小鼠IgG抗體中，以PBS加到1ml，加入2mg水溶性二亞胺基羰(EDC)作為連結劑，4 $^{\circ}$ C下作用一個小時。

(七) 細胞培養與微晶片一株傳導及磁吸附分離觀察

將MBT-2細胞培養3~4天左右，細胞已占滿生長平面空間(confluence)將培養液吸掉，加入10ml PBS緩衝液洗細胞表面，再將PBS儘量完全吸掉。加入1ml Trypsin-EDTA(以能覆蓋細胞表面為原則)，置入37 $^{\circ}$ C細胞培養箱數分鐘，單層細胞會從培養角瓶面脫落。加入3ml培養液沖洗下細胞，在4 $^{\circ}$ C下，以4,000rpm離心1分鐘。吸掉上層液，再將細胞懸浮移至內含1ml培養液的15ml離心管，加入修飾的磁珠，4 $^{\circ}$ C下靜置半小時後，用手搖晃內含細胞與磁珠的水溶液均勻後注入晶片後以顯微鏡觀察其液珠之電控滾動傳輸以及磁吸附現象。

六、結果與討論Discussion

- (一)塗佈SU-8的過程中，為何要使用兩階段的旋轉塗佈？
- (二)經過氧電漿處理後的PDMS表面置於空氣一段時間後，為何會恢復至疏水狀態？
- (三)請問電潤濕微液珠傳輸平台中，微電感最主要的目的是為何？有哪些設計參數需要考量？
- (四)當微液珠受到上下基版外加電壓時，請問液珠與基版壁面接觸模式，是屬於親水模式或疏水模式？接觸角的變化又是為何？
- (五)請敘述加入實驗組與對照組磁珠後晶片內細胞的差異性，液珠之傳輸行為是否有變化？哪一組細胞會被吸附於磁場中？為什麼？被吸附之細胞能否再被釋放？並討論是否還有其他的模式可以應用於細胞篩選與檢測？
- (六)請自行發揮想像力設計此生物晶片可以適用的生醫用途？

七、主要參考文獻

- 1.黃科志。2006。渦漩調控式微混合器之混合機制之研究。國立清華大學動力機械工程學系碩士論文。新竹，台灣，。
- 2.袁世駿。2005。結合電潤濕微液滴操作平台之磁珠生化檢測系統。國立清華大學動力機械工程學系碩士論文。新竹，台灣。

作者簡歷

葉晨聖

國立成功大學化學系教授
教育部顧問室生醫奈米科技教學
資源中心主持人
美國喬治亞大學博士
曾任美國普渡大學博士後研究

Assistant Director of Center for
Micro/Nano Science and
Technology, National Cheng Kung
University.

E-mail: csyeh@mail.ncku.edu.tw

王國禎

國立中興大學機械系機械工程學
系教授兼奈米中心教學組組長

Ph.D., University of California,
Los Angeles, 1991 Mechanical
Engineering

E-mail: gjwang@dragon.nchu.edu.t
w

李明威

國立中興大學物理系教授
德州大學達拉斯分校物理系博士
曾任美國馬禮蘭大學物理系博士
後研究

E-mail: mwl@phys.nchu.edu.tw

陳東煌

國立成功大學化學工程系教授
國立成功大學化學工程博士

E-mail: chendh@mail.ncku.edu.tw

何佳安

國立清華大學化學系副教授
美國康乃爾大學博士
曾任美國伊利諾大學香檳校區化
學系訪問學者、美國農業部暨喬
治亞大學農業實驗站博士後研究
員

E-mail: jaho@mx.nthu.edu.tw

楊智強

財團法人醫藥工業技術發展中心
藥品製劑研發處副處長
英國倫敦大學藥學院藥物傳
輸研究中心博士
曾任榮民總醫院教研部藥效
研究

E-mail : sulinling@pitdc.org.tw

曾厚

臺北醫學大學醫學系副教授
日本國立東京工業大學生物醫學
材料博士
曾任國立清華大學 博士後研究
員、國立中興大學 博士後研究
員、中國工程師學會日本分會總
幹事

E-mail : tsenghow@tmu.edu.tw

陳敏慧

國立臺大醫學院臨床牙醫研究所
副教授

紐西蘭奧克蘭大學生物醫學材料
工程學博士 台大醫院牙科部主
治醫師、馬偕醫院分院牙科主
任、美國凱斯西儲大學醫學中心
研究員、紐西蘭奧克蘭大學工學
院指導老師、中華民國牙體復形
學會專科醫師、中華民國牙體復
形學會學術主委、中華民國齒顎
矯正學會專科醫師台大醫院牙科
部牙體復形美容牙科主任、幹細
胞及組織再生工程研發中心負責
人

E-mail:mhchen@ha.mc.ntu.edu.tw

陳志宏

國立臺灣大學電機工程學系教授
國立臺灣大學醫學工程學研究所
所長

Ph.D., Univ. of California at
Berkeley

Email:jhchen@cc.ee.ntu.edu.tw

盧陽明

國立台南大學光電工程研究所教
授兼所長

國立成功大學材料科學及工程研
究所博士

E-mail:ymlu@mail.nutn.edu.tw

謝達斌

國立成功大學口腔醫學研究所副
教授

美國哈佛大學牙醫學院分子生物
學醫學科學博士

國立成功大學微奈米科技研究中
心研究教育組組長

成大醫院牙醫部主治醫師兼口腔
診斷及一般牙科主任

曾任國立成功大學牙分子醫學研
究所合聘助理教授、美國哈佛大
學醫學院實驗醫學部研究學者、
美國哈佛大學牙醫學院研究員

E-Mail:dshieh@mail.ncku.edu.tw

孫啟光

國立臺灣大學光電工程學研究所
教授

Ph.D.Harvard University, 1995

E-mail:sun@cc.ee.ntu.edu.tw

張富雄

臺灣大學醫學院生物化學暨分子
生物學研究所教授

美國加州大學舊金山分校生理學
系內分泌學程博士

E-mail:fhchang@ha.mc.ntu.edu.tw

黃暄益

國立清華大學化學系教授

Ph.D. University of California,
Los Angeles

曾任加州大學柏克萊分校博士後
研究、UCLA博士後研究

E-mail: hyhuang@mx.nthu.edu.tw

李國賓

國立成功大學工程科學系教授
加州大學洛杉磯分校(美國)博士
曾任國科會工程處自動化學門複
審委、IEEE MEMS 2008 國際研
討會的技術委員會委員、Editor
of IET Nanobiotechnology、Editor
of IEE Proceedings of
Bionanotechnology、Editorial
Advisory Board of Recent Patents
on Nanotechnology、微系統暨微
奈米科技協會理事、國立成功大
學生醫微分析研究中心副主任、
Chair for the Technical Committee
on Nanosensors and
Nanoactuators for the IEEE
Nanotechnology Council、成功大
學微奈米科技研究中心技術推廣
組組長、UCLA講師

E-mail:gwobin@mail.ncku.edu.tw

楊鏡堂

清華大學動力機械工程研究所教
授
微機電系統工程研究所合聘教授
美國威斯康辛大學麥迪遜分校機
械工程博士
曾任中華民國實驗室認證體系
(CNLA)校正領域委員會委員、新
竹縣/市政府火災鑑定委員會委
員、國立清華大學動力機械工程
學系系主任、工業技術研究院光
電所業界合作推動委員會委員、
新竹市政府環境污染防治基金管
理委員會委員、國立清華大學高
能實驗室召集人、國立清華大學
自強科學研究中心主任、國立清

華大學自強科學研究中心綜合計
畫處長、工研院機械工業研究所
動機組顧問、三陽公司顧問、美
國威斯康辛大學機械系研究助理
/助教

E-mail:jtyang@pme.nthu.edu.tw

索引

a		Arc-discharge 電弧放電法	69
α -chymotrypsin α -胰凝乳蛋白酶	32	Archive 數位資料儲存媒體	172
A.		Argon 承載氣體	68
a cylinder collector 滾筒型收集式	254	armchair扶手椅型	67,88
a frame collector 支架式	254	aspect ratio 長高比	251
Abelcet (The Liposome Co., Princeton, NJ, USA)		atherosclerosis 動脈硬	211
一均質化的藥物與脂質混合的液晶懸浮液	123	Atomic Force Microscope 原子力顯微鏡	164
acac, acetylacetonate 乙醯基丙酮	27	Au nanoparticle 金奈米粒子	216
Acrylic acid, AAc 親水性之丙烯酸	87	Au nanorod 金奈米桿	216
actin 肌動蛋白	254	Au nanowire 金奈米線	216
actuators, artificial muscles 致動器	73	AuAgPt金銀鈇	8
additive 加成	250	AuAg金銀	8
adenine, A 腺嘌呤	177	AuPt金鈇	8
Adeno-Associated Virus ,		autografting 自體移植	246
AAV 腺病毒相關病毒	204	Au金	12
Adenovirus 腺病毒	110,204	avidin抗生物素蛋白	104
adhesion 細胞貼附	247	B.	
Adsorption 吸附作用	100	Blymphocytes, B cells B淋巴細胞	104
Aequoria victoria green fluorescence protein		Babraham Institute 巴布拉漢研究中心	97,201
綠色螢光蛋白	237	bacteremia 菌血症	52
AFM 原子力顯微鏡	72,175	band gap 能隙	60
AgPt 銀鈇	8	Band offset potential 能隙補償電位	85
albumin 白蛋白	49	barrier 貫穿能障	134
Aliened Fiber 排列纖維	254	bases 鹼基	90
Alkaline Phosphatase, AP附有酵素	308	Ba 鈇	12
Alkylthiols 烷基硫化物	251	BEC 牛頸動脈內皮細胞	63
allografting 同種移植	246	Bi2S3 硫化銻	12
allotropic form 同素異形體	201	bifunctional 雙效	228
Alzheimer's disease 阿茲海默症	63,229	binding affinity 抗原具有獨特的親和	103
AmBisome (NeXstar, Boulder, CO, USA)		biochip生物晶片	168,184
含有藥物帶負電的小型微脂粒	123	biocompatible 生物相容性	247
Amphotec (Sequus, Menlo Park, CA, USA)		biodegradable 生物降解性	247
與膽固醇及界面活性劑複合的微胞	123	biodegradation 生物可分解性	110
amplify 放大	246	bioelectronics 生物電子學	45
analyte-tagged liposomes攜有抗原的微脂體	108	biomarker 生物標靶	157
antibodies 抗體	147	biomaterials 生物材料	247
antibody 抗體	32,102	Bio-MEMs 生物微機電系統	170
antibody chip 抗體晶片	185	Biomolecular Interaction Analysis BIA	171
antigen 抗原	151	Biopharmaceutics 生物藥學	72
antigenic determinant 抗原決定基	103	Bio-Plasmo 生物電漿共振元件	143
AP, alkaline phosphatase 鹼性磷酸酶	292	bio-probe 生化探針	204
Aquasomes, carbonhydrate-ceramic		bioprocessor 微小生物處理器	170
nanoparticles		bioresorb-polymer 生物可吸收性高分子	255
磷脂囊，破水—陶瓷奈米微粒	139	biosensor 生物感應器	53
		biosubstrate 生理物質	252
		bios 生命方式	181
		biotin 生物素	76

biotinylated primary antibody 生物素的一級抗體	104	computed tomography scan 電腦斷層掃描影像照影..	11
Biotinylation 生物素化	292	Computed Tomography , 簡稱 CT 電腦斷層掃描	173
biotin 生物素	76,104	Computer Numerically Controlled 切削中心機	250
Bi 銻	12	conduction band 導電帶	60
Blood Brain Barrier 血腦屏障	212,242	-CONH- 醯胺鍵	82
blood-borne macrophages 巨噬細胞	156	Conjugate 金奈米粒子之複合物	79
blood-brain-barrier, BBB 腦血管壁障礙	19,54	constant domain	284
blue-shift 藍移	60	constant region 不可變區	103
bottom up 由小作大	199	Contact angle 觸角度	299,300
Bottom-up 下往上	167, 178	contact angle 接觸角	200
brownian motion 布朗運動	26	contact printing 接觸式印刷	251
Buckyball 巴克球	201	contrast agent 顯影劑	48
building block 建築磚塊	199	Controlled Porosity 孔洞控制	254
bulk materials 塊材	133	controlled release 控制釋放	255
bulk phase 巨相	22,145	co-precipitation 化學共沉澱法	27
C.			
cadmium 鎘	216	core 奈米核心	239
candida rugosa lipase 脂肪分解酵素	31	core 核心	228
carbon black 碳黑	210	core technology platform 核心技術群	183
carbon nanotube array 碳奈米管陣列	174	core/shell 核殼	29
Carbon nanotube, CNT 奈米碳管	88	Crohn's disease 隆氏症	52
carbon nanotube 碳奈米管	200	cross-linked complexes 大型複合物	104
CdSe 硒化鎘	62,216	Crystalline semiconductor nanowires 結晶網狀半導體..	7
CdSe 硒化鎘	199	CTAB, cetyltrimethylammonium bromide 溴化十六烷基三甲銨	28
cell 細胞	247	curie temperature, Tc 居禮溫度	23
ceramic diamond 陶瓷鑽石	139	Curie-Weiss law 居禮-衛斯定律	23
Cetyl T.4rimethyl Ammonium Bromide, CTAB 陽離子型界面活性劑..	5	cutaneous fungal infections 皮膚黴菌感染	176
chemical force microscope 化學力顯微鏡	135	cutting edge 刀口	250
chemical shift 化學位移	227	CVD 化學氣相沉積法	203
chemical; CHEM 化學效應..	9	cystic fibrosis 纖維囊化	63
Chinese hamster ovary (CHO) cells 中 國倉鼠卵巢細胞	87	cytokines 細胞激素	255
Chiral 對掌型	88	cytosine, C 胞嘧啶	177
chitosan 幾丁聚醣	230	D.	
chloroform/phenol 氯仿/苯酚	37	2D gel electrophoresis 雙向電泳	169
cholesterol 膽固醇	98, 99	Dangling bond 懸鍵	85
Chromophore 發色團	238	defect 缺陷	251
clinical testing 臨床檢驗	102	dendrimer 有機樹狀體	110,204,229
closed single-bilayer vesicles 封閉式單一脂雙層	102	dendritic cell 樹突狀細胞	101
cluster 磁簇	43	dense 緻密型	249
Cluster 原子團簇..	7	density function theory, DFT 密度函數理論	67
CO 醯基	27	density of states 能階密度	60
coating 塗佈法	249,252	dephasing of spin 自旋去相	137
coercivity, Hc 矯頑磁力	24	detectable label 偵測標識物質	104
cold trap 冷卻陷阱	61	Detection Zone 偵測區	298
colloidal gold 膠體金	108	Detection 偵測	298
competitive 競爭型	106	detergent solubilization 界面活性劑溶解	101,102
Computed Axial Tomography 電腦軸切面斷層影像..	11	development 顯影	314
		dextran 葡萄糖聚醣	49,137,214
		Diagnostic tools 醫學診斷工具	70

Diamagnet 反磁性	21	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA	
diamond 金剛石	201	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays ELISA	171
diffusion 擴散	227	epoxy novolak resin 環氧基酚醛樹脂	305
Digestion 消化作用	293	etching resist 蝕刻阻質	251
dihydroxyphenylacetic (DOPAC)	213	ethylene glycol 乙二醇	28
dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC		Ethylendiamine 乙二胺	93
二棕櫚酸磷脂醯膽鹼	98, 99	excimer laser 脈衝雷射	68
dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine, DPPE		excited-state lifetimes 激發態半衰期	153
二棕櫚酸磷脂醯乙醇胺	98, 99	exposure 曝光	314
dipalmitoyl phosphatidyl glycerol, DPPG		extracellular matrix 細胞間質	247
二棕櫚酸磷脂醯甘油	98, 99		
direct 直接	104	F.	
DNA 去氧核糖核酸	76	fatty acid 脂肪酸	27
DNA Chip or Microarray 基因晶片	298	Fc-linked polypeptide Fc聯合多胜肽	103
DNA hybridization DNA 轉植	62	FDA 美國食品藥物管理局	123
DNA 去氧核糖核酸	166, 177	Fermi level 費米能階	199
dopamine 多巴胺	213	Ferrimagnet 鐵磁性	21
Drug carriers 藥物載體	229	ferrofluid 磁流體	20
drug delivery 藥物傳輸	72	Ferromagnet 強磁	21
drug delivery 藥物輸送	60	FIA 流體注入分析	108
drug delivery 藥物釋放	255	fiber bonding 纖維鍵結	252
dry processing 乾式法	249	field technique 電場控制式	254
		film method 薄膜法	101
E.		FLIM 螢光衰減影像技術	241
e-beam lithography 電子束顯影	251	flow 流場	227
ECM 胞外基質	241	Flow Injection Liposome ImmunoAnalytical system, FILIA	
EDC 二亞胺基羧	322	自動式流體注入微脂體免疫檢測系統	109
elastomer 彈性體	251	Flow-injection competitive liposome immunoassay, FILIA 流體注入競爭型微脂球	109
Electrochemical Method 電化學法..	6	免疫法	109
electromagnetic; EM 電磁...	9	Fluorescent nanocrystals 螢光奈米晶體	148
electroporation 電擊法	44	Folic acid 葉酸	82
Electrospinning 電氣紡絲	252	food safety testing 食品安全檢測	102
Electrospray Ionization-Mass-Spectrometry,		freeze and thaw method 冷凍-融解法	101
ESI-MS 電灑離子化質譜偵測	190	freeze drying 冷凍乾燥	252
electrospun scaffold 電紡支架	253	full width half maximum, FWHM	
electrostatic charge 靜電荷	99	夾窄對稱之光譜頻寬	62
electrowetting on dielectric, EWOD		fullerence C60 球烯	137
介電層上之電潤濕現象	309	fullerence 富勒烯	66
electrowetting, EW 電潤濕	308	functional 功能性	227
ELISA 酵素連結免疫吸附分析	237	functional group 官能機團	248
embryonic stem cell 胚胎性幹原細胞	246	fusion protein 融合蛋白質	240
emphysema-like lung injury 肺損害	211	Fusion 融合作用	100
enabling technology infrastructure			
致能性技術基礎	183	G.	
endocytosis 胞飲	230	Gas Evaporation Method 氣體蒸汽法..	7
endocytosis 胞飲	30	Gas Flow-Cold Trap Method 氣體-冷卻收集法..	7
endothelial cell 內皮細胞	253	Gas Flow-Solution Trap Method	
energy band 能帶	134	氣體-溶液收集法	7
energy dispersion 能帶	67	gas foaming 氣體發泡	253
Enhanced green fluorescent protein, EGFP 綠		Gd3+ 釷離子	84
色螢光蛋白	79		
enveloped viruses “套膜”類病毒	175		
environmental monitoring 環境監控	102		

gel凝膠	249	hydrothermal method 水熱法	27
Gene chip, DNA chip or DNA microarray 基因陣列晶片	185	hydroxyapatite 氫氧磷酸鈣	137
genomic DNA 染色體DNA	36	Hyperthermia 熱療法	229
genomics 基因體學	248	Hyperthermia 熱療法	82
GHz 赫茲	235	Hyperthermia or Thermotherapy 溫熱療法	34
gold nanoparticles 金奈米粒子	199	hysteresis curve 磁滯曲線	23
gold nanorods 金奈米柱	261		
gram-positive bacterium 革蘭氏陽性菌	81	I.	
granulomas 肺肉芽腫	211	identical binding sites 相同的鍵結位置	103
graphite 石墨	201	IKVAV laminin 氨基酸序列	136
growth factor 生長因子	255	immobilization 固定化	256
guanine,G 鳥糞嘌呤	177	immunoagglutination 免疫凝集法	104
Guided Bone Regeneration 骨引導再生	255	Immunoassay 免疫分析法	63,102,307
guided tissue regeneration 引導組織再生	255	immunoliposomes: antibody-coupled liposomes 免疫微脂體	108
H.		immunomigration strip format 試紙型免疫檢測 法	109
harmonic imag 合諧影像	112	immunoprecipitation 免疫沉澱法	104
heavy chains or H chains 兩條重鏈	103	immunorecognition reaction 免疫辨識反應	108
Helix 螺旋型	67	immunosensors 免疫感測器	45
Herceptin 抗體	50	immunosuppressive drug 免疫抑制劑	246
herpes labialis 唇皰疹	176	Implantable materials and devices 植入性材料及元件	73
Herpes Simplex Virus, HSV 皰疹病毒	110	Implantable nanosensors and nanorobots 植入性奈米感測器及奈米機器人	73
Herpes Simplex Virus, HSV 皰疹病毒	204	imprinting 轉印	251
heterogeneous 異質性	106	in vitro 體外	270
hexadecylamine 十六烷氨	27	in vitro diagnostic kits 體外檢驗試劑組	107
high surface-area material 高表面積材料	167	in vitro 體外	271
high Tm 高過渡溫度	111	indirect 間接	104
high-affinity binding sites 高親和性結合位	104	Integrin 整合素	231
High-content screening 高通量篩選	239	Intermediate-size unilamellar vesicles, IUUV 中間尺寸單層小微泡	100
High-throughput 高產能	138,190	Inter-membrane transfer 膜間轉換作用	100
high-throughput screens 快速高效能篩選	244	ionic bonds 離子鍵	103
histidine 組氨酸	39	IPA 異丙醇	305
Histidine-tagged protein 組氨酸之蛋白質	81	island 島區..	9
Hollow 奈米合金空球....	5	I 碘..	12
homogeneous 均質性	106	J.	
homovanillic acid(HVA)	213	jet 飛行軌跡	P253
HRPO, horseradish peroxidase 山葵過氧化氫 酶	292	K.	
HRTEM 高解析度透射電子顯微鏡	66	kit 套件	37
human chorionic gonadotropin, HCG 人類絨毛 膜性腺激素	108	L	
human prostate tumors 人類攝護腺癌腫瘤	151	Lab on a Chip 晶片實驗室	304
humanized 人類化	285	label 標識物質	104
hybridoma 融合瘤	284	Lab-On-A-Chip LOAC	170
hybridoma cells 細胞株	104		
hydra 水螅	246		
hydrodynamic focusing effect 流體集中效 應	190		
hydrogen bonds 氫鍵	103		
Hydrophilic 親水性質	300		
hydrophobic interaction 疏水性交互作用	103		
Hydrophobic 疏水性質	301		

Lab-on-a-chip 整合型實驗室晶片	204,298	Magnetic resonance imaging, MRI	
Lab-on-a-chip, or LOC		核磁共振造影	7、82
縮微實驗室晶片	185.187	magnetic resonance imaging, MRI 磁振造影	60
large unilamellar vesicle, LUV單層大微脂粒	99	magnetic Resonance Spectrum ; MRS	磁振
Large unilamellar vesicles, LUV 單層大微泡	100	光譜	153
large unilamellar vesicles , LUVs		Magnetite cationic liposomes , MCLs	
單層小微脂粒	138	陽離子脂族包覆磁性顆粒子	229
Laser vaporization雷射蒸發法	68	master母模	249
Laser-Ablation Technique雷射剝削法..	7	matrix 基材	254
latex bead乳膠微粒	108	Matrix Isolation Method基質分離法..	7
Lecithin卵磷脂	205	MBT-2 cell lines老鼠膀胱癌細胞株	312
Leishmaniasis萊什曼病	111	MCP 多通道平板偵測器	241
Lentivirus慢病毒	110,203	mechanical dispersion機械性分散	101
ligase接合酶	136	membrane 膜分離	38
light chains or L chains兩條輕鏈	103	membrane硝化纖維膜	106
light-mediated cytotoxicity 光誘導毒化	63	Mental Integration 重組影像	173
Lipase 脂肪酶	82	mesenchymal stem cells間葉系幹原細胞	253
lipid bilayer 脂質雙層膜	97	metal linoleate 金屬亞麻酸根	27
lipid bilayer脂質雙層膜	201	micelles微胞	102
lipid dispersion脂質分散	101	micelle微胞	28、205
Liposomal微脂體型	107	micro domain微觀	255
liposome immunoassays, LIA		Micro Total Analysis System, m-TAS	
微脂體免疫分析法	98	微全分析系統	304
liposome immunoassays微脂體免疫分析法	108	Microarray 微陣列晶片	185
liposome immunomigration assay, LIA		microarray微陣列	248
試紙型微脂體免疫檢驗法	108	microarray微陣列型晶片	205
liposome 微脂體	44,97, 110	microchip device微晶片設備	135
liposome微脂體	201.204.205	Microcontact printing微接觸印刷	251
liquid crystal devices液晶裝置	256	Microcontact printing微接觸式印刷	250
liquid-solid-solution reaction		Micro-Electro- Mechanical-System, MEMS	
液態-固態-溶劑反應	27	微機電系統	168,298
lithography 光學蝕刻	250	microemulsion 微乳化法	27
Localized 侷域	192	microenvironment微環境	135
Lotus Effect蓮花效應	195	Microfluidic chip 微流體晶片	185
lysosome溶酶體	101	Microfluidics system 微流體晶片系統	185
Lysozyme 溶菌	230	Microfluidics 微流體晶片	187
M.		Microliter 微升	188
mAb 單株抗體	288	model system 模型系統	183
macrophage巨噬細胞	101	Microfluidics Chip 微流體晶片	298
macrophage巨噬細胞	111	Microfluidics Biochips微流體生物晶片	304
magic bullet 魔法子彈	284	Microneedle Array 微奈米針陣列	121
magnetic bead 磁珠	307	microparticle微顆粒	106
magnetic domain 磁區	22	Micropattern 微構形	250
Magnetic hyperthermia tumor therapy		micro-printing微列印	248
磁性溫熱腫瘤治療	79	Micro-pump 微幫浦	298
Magnetic Moment 磁矩	20	Microsensor 微感測元件	298
Magnetic nano-biosensor		microtiter wells微孔盤	106
磁性奈米之生物感測技術	45	Micro-Total- Analysis-System, μ -TAS	
magnetic relaxation 磁鬆弛	43	微型全分析系統	298
Magnetic Resonance Image, 簡稱MRI 核磁共		Micro-Total-Analysis-System, μ -TAS	
振影像	173	微全程分析	168
Magnetic Resonance Imaging 磁共振造影	46	Micro-valve 微閥門	298
		migration遷徙	254
		micelle 微胞	28

mitoxantrone 抗癌藥物	34	nanorod 奈米棒	29
Mixing 混合	298	Nanorod奈米棒..	7
Modality 檢查設備	172	nanoscale cantilevers奈米等級的懸臂樑	135
modification表面改質..	13	nano-scale computing) 建立奈米級計算	138
mold鑄模	250	nano-sensor奈米感應器	256
molecular beam epitaxy, MBE		Nanosized Polymeric Micelles	
分子束磊晶成長法	61	高分子奈米微胞	231
molecular device分子元件	53	Nanotechnology 奈米科技	165
Molecular inks分子墨水	251	nanotechnology奈米科技	196
molecular medicine 分子藥物	146	nanotube 奈米管	29
molecular nanotechnology: MNT		Nanotweezer奈米鑷子	72
分子奈米科技	74	NASA美國太空總署	178
molecular surgery 分子手術	175	NaSCN 硫氰化鈉	90
monoclonal antibodies單株抗體	104, 146	Near-Field Microscope近場光學顯微鏡	164
Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles ,		Near-IR 近紅外光	151
MION 單晶體氧化鐵奈米粒子	157,228	negative contrast agent 反相顯影劑	48
monocyte 單核細胞	44,111	negative contrast agents 負向顯影劑	153
Monomer 單體	230, 248	network 網路結構	254
Monomer- dimethylsiloxane單體	251	Network 網路	172
Mononuclear phagocyte system (MPS) 單核細		Nic具有...的性質	181
胞吞噬系統	80	NIR遠紅外光	237
morphology基質型態	248	nitrocellulose membrane硝化纖維膜	108
MRI,magnetic resonance imaging 核磁共振造		nm, nanometer奈米	66
影	18,213	non-competitive非競爭型	106
mRNA 核糖核酸	177	non-linear optical非線性光學	261
multilamellar vesicle, MLV 多層微脂粒	99,100,138	non-novel非編織型態	254
multilayering electrospinning		non-reduced 未還原	293
多層次型電氣紡絲	254	N-protected amino acids N防護之氨基酸	93
Multiple Processing 多工處理	298	NR4+ 四級銨鹽	29
multivalent多價數的	104	numerical control數控系統	250
myeloma cells骨髓瘤細胞	104		
myosin 肌凝蛋白	254		
		O.	
N.		oil in water 水中油滴型	28
naked DNA裸DNA	110,204	oleic acid 油酸	29
Nano Biosafety 奈米科技的生物安全性	166	oleic acid 油酸	27
Nano 奈米	165	oligomers 寡聚合物	230
nano-biomedics 奈米生醫技術	166	oligonucleotides 寡核酸結構	147
nanocapsule 奈米膠囊	205	oligonucleotides寡聚核苷酸	138
nanocarriers奈米載體	135	organ-specific 器官特異性	228
nanocrystals 奈米晶體	60	orient 旋轉	67
nanodiagnostic 奈米醫學診斷	146	Orientation取向	68
Nanofluidic systems奈米流體系統	74	osteoblast骨母細胞	141
Nanoimprinting lithography奈米轉印顯影	251	oxidation/amidation treatment	214
Nanoimprinting奈米轉印	250	oxidative stress氧化壓力	213
Nanoliliter 奈升	185	Oxygen Plasma Treatment 氧氣電漿處理	299
nanoliter奈升	248	Oxygen Plasma 氧電漿	299,300
nanometer 奈米	224		
Nanometer 奈米	165		
nanometer奈米	196	P.	
Nanoparticle 奈米粒子	119	Poly (vinyl pyrrolidone), PVP中性高分子...	5
nano-robots微型機器人	206		

Photochemical Method光化學法..	6	perfusion 灌流	227
Paramagnet 順磁性	21	phage display library 噬菌體呈現技術庫	223
PEG 聚乙二醇	30	PLA 聚乳酸	230
PEI 聚醯醯亞胺	30	PLGA 聚乳酸共聚	230
Poly-lysine 聚離氨酸	30	photobleaching光漂白現象	62
peptide 胜肽鏈	39	PMT快速光電倍增管	241
probe 分子探針	39	planaria渦蟲	241
polyethylenimine 聚乙烯亞胺	44	proteomics 蛋白質體學	249
poly-lysine 具離胺酸	44	phase inversion相轉變法	249
positive contrast agent 正相顯影劑	153	polydimethylsiloxane矽膠聚二甲基矽氧烷	249
polyacrylamide 聚丙烯醯胺	49	PDMS轉印膠片	249
photobleaching 光漂白	62	pattern圖案	250
photodynamic therapy光動力治療	63	photolithography曝光顯影	250
photosensitizing agents 光敏介質	63	printing印刷	250
photosensitizers 光敏材料	63	pattern transfer圖案轉移	250
Pressure sensors壓力感測器	71	patterning製備	250
Piezoresistor 壓電阻	71	phase separation 相分離	252
Probes探針	72	porosity 多孔狀	254
Polyethyleneimine, PEI 聚乙醯亞胺	79	paclitaxel 抗癌藥物	255
Polyethylene glycol, PEG 聚乙二醇	82	protective clothing 防彈衣	256
Phospholipid block-copolymer 磷脂質嵌段式 共聚物	86	Purdue University普渡大學	261
Photobleach 光漂白效應	86	Pepsin 胃蛋白酶	293
Paraformaldehyde 三聚甲醛	93	Protein G beads 蛋白質G球珠	288
planar bilayer sheet平面的雙層平板	99	Polydimethylsiloxane 聚二甲基矽氧烷	153,299,301,306,312,316
primary amine group一級胺基	99	Paramagnetic 順磁性	153
Phagocytosis/Endocytosis 內吞作用	101	Post bake 硬烤	153
pharmaceutical analysis藥物分析	102	Q.	
polyclonal antibody多株抗體	103	QDs量子點	238
primary antibody一級抗體	104	quantum computing量子計算	201
polystyrene tube多苯乙烯試管	106	quantum confinement effect量子侷限效應	235
pregnancy test懷孕檢測試紙	108	quantum dots 量子點	60,148
pharmacokinetics藥物的動力學	110	quantum effect量子效應	198
peptide胜肽	135	Quantum size effect 量子侷限效應....	3
Paramagnetic 順磁性	153	Quantum yield 量子產率	85
Probes 探針	72	quasi-zero-dimensional準零維	200
positive contrast agents 正向顯影劑	153	quenching effect 消滅效應	242
Personal Medicine個人醫學	166	R.	
Proteomics 蛋白質體	169	Radiation oncology 輻射腫瘤診斷	70
Probe 生物探針	170	radical有機自由基..	6
Picture Archiving and Communication System, PACS 醫院內部之影像儲傳系統	172, 182	Radiography X 光	173
Positron Emission Tomography , 簡稱 PET 正子射出斷層掃瞄	173	radioimmunoassay, RIA 放射免疫分析法	104
Protozoa原生動物	175	radiometric immunoassay 放射免疫法	104
Polymer 聚合體	176	r-Butyrolactone,GBL g-丁內脂	305
plasmonic photonics 電漿光子技術	192	reaction core 反應核心	186
protein chip, Protein microarray 蛋白質晶片	185	Reaction Zone 反應區	298
protein chip, Proteinarray 蛋白質晶片	187	Reaction 反應	298
photobleaching抗光漂白功能	215	reactive oxygen species, ROS大量活性氧物種	213
pol(ethylene glycol)聚乙二醇	216	Receptor 受器	145
PCL 聚幾內酯	230	reduced 還原	293

relaxation time 緩解時間	47,153,137	Sodium Dodecylsulfate, SDS 十二烷基硫酸鈉	301
Relaxation 緩解	48	solenoid-type螺線管型	310
Relaxivity 遲緩速率	48	solid nanoparticle aggregate (TiO ₂)	205
respiratory infections 呼吸道感染	176	shell 外殼	239
RES網狀內皮系統	110	solid phase phosphoramidite chemistry固相亞磷 胺化學法	177
Retrovirus反轉錄病毒	110	solid phase固相分離法	106
Retrovirus反轉錄病毒	204	solid supports 固態支撐體	45
reverse micelle 逆相微胞法	28	solution 溶液	249
reverse-phase evaporation method逆相蒸發法	101	solvent casting / particulate leaching 溶劑鑄造/鹽析	252
reverse-phase evaporation vesicles, REV逆相蒸 發囊泡	102	solvent dispersion 溶劑分散	101
Rhodamine 6G 若丹明	62	solvent-injection method:溶劑注射法	101
rifampin抗生素	255	specificity特異性	103
rigidity堅硬度	99	spectrofluorometer螢光光譜儀	108
Ruby laser紅寶石雷射..	7	Spin Coaters光阻塗佈機	312
S.		Spin-Lattice Relaxation 自旋-晶格緩解	48
Saccharomyces cerevisiae cells 酵母菌細胞	37	spin-lattices relaxation time ; T1 自旋-晶格緩解時間	153
salamander蠟螈	246	spin-spin relaxation time ; T2 自旋-自旋緩解時間	153
Sampling 進樣	298	Spin-Spin Relaxation自旋-自旋緩解	48
sandwich assay 三明治法	106	SPION 超順磁氧化鐵奈米粒子	127
scaffold 支架	68	spiral-type螺旋型	310
Scanning Tunneling Microscope掃描穿隧顯微 鏡	164	splaying 展開	253
SDS,sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸鈉 鹽	28	steric hindrance 立體障礙	98, 99
sealing wax 封蠟	253	stick cube棒狀立方體	136
selenium硒	216	STM 掃描穿隧顯微鏡	175
Self-assembled Monolayers自動組合分子單層 膜	251	Streptavidin 鏈黴抗生物素蛋白	78
Sensitivity 敏感度	180	streptavidin鏈黴抗生物素蛋白 (strept)avidin-conjugated label	104
Sensorgram 感測圖	171	標識物之(鏈黴)抗生物素蛋白	104
Sensors感測器	71	stretching 拉伸法	249
Separation 分離	298	sub-micromolar 次微莫爾濃度	146
Sessile Drop Method 靜置液滴法	302	sub-nanomolar 次奈莫爾	146
signal 訊息	247	substrate 受質	46,148
signal to noise ratio 訊雜比	148	succinate dehydrogenase 琥珀酸去氫酶	296
silica 二氧化矽	30	Sugar-phosphate backbone 糖-磷酸骨架	90
silicon 矽化合物	49	superoxide dismutase超氧化物歧化酶	137
single domain 單一磁區	22	superparamagnetic 超順磁	153
single electron transistor, SET單電子電晶體	201	superparamagnetic iron oxide agents, SPIO 超順磁性氧化鐵顯影劑	227
Single Photon Emission Computed Tomography 簡稱SPECT 一般核子醫學掃瞄和單光子射 出斷層掃瞄	173	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPIO超順磁的氧化鐵奈米粒子	154
Single shell nanotubes單層的奈米管狀物..	7	Surfactants界面活性劑..	7
sintering 燒結法	249	Surface plasma resonance 表面電漿共振技術	186
slip 滑移	67	surface-enhanced Raman scattering; SERS 表面增強拉曼光譜..	9
small unilamellar vesicle, SUV 單層小微脂粒	99,100,138	Surfactant 表面活性劑重複	4,7,174
small-molecular-weight target analyte小分子抗 原	108	Surgical aids手術輔助設備	74
Smooth Muscle Cell平滑肌細胞	253	sustained release釋出包容物之特性	100
sodium acetate 醋酸鈉	293	SWNT-COCl 醯氯基	89
		SWNTs 單壁奈米碳管	88

π -stacking π -堆疊	91	water-soluble iron oxide ; WSIO 水溶性氧化鐵奈米粒子	154
T.		wet processing 濕式法	249
target 石墨靶	68	whole milk 鮮奶	52
targeted drug delivery 靶向性給藥	109	workpiece 工件	250
Targets 標的	229	Wound dressing 創傷敷料	254
Taylor cone 泰勒錐	253	X.	
TCSPC 單光子計數	241	xenograft 異種皮移植	50
Tetanustoxoid 破傷風類毒素	230	Y.	
tetracycline 抑菌劑	255	Young's Equation 楊式方程式	300
The National Institute for Occupational Safety and Health 美國國家職業安全與健康研究所	295	Z.	
thermal decomposition 熱分解法	27	Zigzag 鋸齒型	88,67
thymine, T 胸腺嘧啶	177		
TiO ₂ 二氧化鈦	18		
tissue-specific peptides 特異標定組織的分子	151		
Top-down 上而下	167		
toroidal-meander-type 纏繞蜿蜒型	310		
track-etching 軌跡浸蝕法	249		
Transfection 轉殖	79		
triaryl sulfonium, HSbF ₆ 感光劑	305		
Trioctylphosphine oxide, TOPO 三辛基氧化膦	85		
two-photon fluorescence 雙光子螢光	174,260		
type I 型式一	239		
type II 型式二	239		
top down 由大縮小	199		
triblock copolymer 三團聯共聚物	216		
U.			
Ultrasonic Irradiation Method 聲波化學法..	4		
Ultrasound 超音波掃瞄	173		
unlabel 無標識物質	104		
UV-VIS spectrophotometer 紫外光-可見光光譜儀	108		
V.			
Vaginitis 陰道炎	176		
valence band 共價帶	60,133		
van der Waals interaction 凡得瓦力	103		
Vancomycin, Van 萬古黴素	81		
Vapor Growth 蒸氣成長法	69		
vapor phase epitaxy, VPE 氣相凝結法	61		
variable domain 多變性部分	284		
variable region 可變區	103		
vector 質體	44		
VEGF 內皮血管生長因子	243		
W.			
water in oil 油中水滴型	28		