

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳分離金奈米粒

子

Separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis

with objective – type dark field scattering

林也唐

Yeh-Tang Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳分離金奈米粒

子

Separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis

with objective – type dark field scattering

林也唐

Yeh-Tang Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月

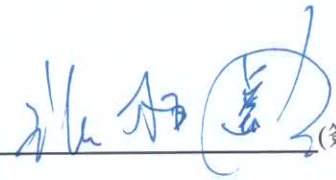
東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 林也唐 君所提之論文

以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳分離
金奈米粒子

Separation of gold nanoparticles by capillary
electrophoresis with objective-type dark field
scattering.

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

105 年 7 月 2 日

東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

化學系 碩士班 林也唐 君所提之論文

以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳
分離金奈米粒子

Separation of gold nanoparticles by capillary
electrophoresis with objective-type dark field
scattering

論文口試委員會 召集人 莊曼傑 (簽章)

委員 孫柏達

林泱蔚

中華民國 105 年 7 月 2 日

謝誌

時光飛逝，轉眼間兩年的碩士生涯即將告一段落，在這段期間有歡樂也有苦悶，但也十分珍惜在碩士生涯中所學習到的一切。此篇論文之完成承蒙許多人幫助與鼓勵，讓我在遇到挫折時能夠保持正面思考，持續地將實驗進行。首先，感謝我的指導教授張柏齡老師，在實驗方面所給予之教導及督促，並且從中學習到對研究的態度及執著。而在口試期間，也特別感謝林泐蔚老師及莊旻傑老師所給予的意見與指正，讓此篇論文能更加完善。

在求學時間時，要特別感謝已畢業學長鍾宜安，學長在我剛進入研究所期間，總是耐心地指導我，讓我能盡快的融入實驗室之環境，也要特別感謝同窗好友瑋諭及涵鈺在求學期間所給予之意見及日常生活上之幫助，此外，也要特別感謝中正大學的李秉軒同學在拍攝 TEM 上所給予之幫助。謝謝實驗室成員肇宣、心媛、雅琳、蔚青、珮綺及芋蓁一起處理實驗室之相關事務，也要感謝系上其他老師對我的關心，也非常感謝系辦藍小姐幫忙我許多在碩士期間所遭遇的問題，亦要感謝東海大學化學系，在我求學期間所給予的資源及教導，讓我在碩士生涯能夠毫無顧忌的完成此篇論文。最後，要感謝我的家人，在我求學期間遇到低潮時所給予的鼓勵，且讓我能無後顧之憂地專心念書，並完成碩士學業。

中文摘要

近年來由於奈米科技蓬勃發展，奈米粒子對於環境及生物的影響也更受人矚目，因此我們有必要開發一些方法來偵測環境中的奈米粒子，其中金奈米粒子的應用也是較為廣泛的一種。本實驗則是利用金奈米粒子本身具有雷利散射 (rayleigh scattering) 訊號作為偵測，並以物鏡式暗視野之裝置結合毛細管電泳，來偵測金奈米粒子。學生所使用之毛細管為方形毛細管，並非傳統圓形毛細管，藉由方形毛細管的特性能夠有效降低不必要的背景散射光。分離條件上，學生選擇在毛細管內通入 50 mM Glycine，為了增加其解析度，學生在近樣前端添加十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)，經過優化後之裝置及實驗條件下，能成功偵測到金奈米粒子之散射光，為了達到更好的偵測極限，學生運用了樣品堆積，使此系統能夠偵測到 10 pM 的金奈米粒子訊號。學生更進一步在無電滲流之條件下，分離電壓- 5 Kv，並藉由 1% PVP 做為篩分介質，且將修飾於金奈米表面之 MPA 替換為 MUA，在此條件下，學生能夠成功的將 13 nm 及 32 nm 之金奈米粒子從毛細管電泳中分離開來，並利用標準添加法來確定其訊號位置，亦能夠成功確認兩種不同大小之金奈米粒子。因此，學生所開發出此套系統，不僅有好的偵測極限，並且還能夠成功的將 13 nm 及 32 nm 之金奈米粒子分離開來。

Abstract

In recent years, due to the vigorous development of nanotechnology, the impact of nanoparticles on the environment and the biology attracted much more attention. Therefore, we need to develop some methods to detect nanoparticles in the environment, which the application of gold nanoparticles is more widely used. In this study, we take advantage of gold particles which themselves have a Rayleigh scattering characteristic as a detection signal, and also collect the signal of gold nanoparticles by capillary electrophoresis with objective-type dark field scattering. We choose the square capillary instead of circular capillary. With the square capillary's unique characteristics can effectively reduce unwanted background scattering. The separation condition of gold nanoparticles is 50 mM Glycine and in order to improve the separation efficiency, we add sodium dodecyl sulfate in the capillary. Under experimental conditions and apparatus through optimized, it can successfully detect the gold nanoparticle's scattering. In order to have better detection limit, we use the on line sample stacking. The limits of detection of gold nanoparticles were 10 pM. We investigate in non- electroosmotic flow condition and separation voltage is -5 kV. We also modify the gold nanoparticles by MUA. Under this condition, we can separate 13 nm and 32 nm successfully by capillary electrophoresis. We even use the standard addition method to determine exactly peak location. Therefore, we develop this set of system not only have good detect limits but also can separate the different size of gold nanoparticles.

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
參與會議.....	95
第一章 毛細管電泳與核醣核酸簡介	
1.1 毛細管電泳緒論.....	1
1.1.1 分離原理.....	5
1.1.1.1 淌度(mobility).....	5
1.1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)產生.....	6
1.1.1.3 流動式毛細管凝膠電泳.....	10
1.1.1.4 DNA 於毛細管凝膠電泳中之分離機制.....	11
1.1.1.5 毛細管內壁塗覆.....	16
1.1.1.6 樣品注射方式.....	17
1.1.1.7 線上濃縮技術.....	19
1.1.1.8 偵測系統.....	20
1.1.2 毛細管電泳之應用.....	21

1.2 奈米粒子 (gold nanoparticle, Au NPs) 之簡介	23
1.2.1 緒論	23
1.2.2 奈米粒子的定義及性質	24
1.2.3 金奈米粒子的偵測方法	26
1.2.4 雷利散射應用於生物檢測及影像	29
1.2.5 暗視野顯微鏡之構造	30
1.2.6 金屬奈米粒子 (metal nanoparticles) 的製備	31
1.2.7 金屬奈米粒子 (metal nanoparticles) 的應用	32
1.3 參考資料	34

第二章 以物鏡式暗視野之散射光學偵測金奈米粒子

2.1 緒論	44
2.2 實驗部分	48
2.2.1 實驗試藥	48
2.2.2 毛細管電泳結合散射光學儀器裝置圖	48
2.2.3 金奈米粒子及銀奈米粒子製備	52
2.2.4 毛細管前處理	60
2.2.5 聚合物溶液製備	60

2.2.6 實驗流程.....	61
2.3 結果與討論.....	62
2.3.1 緩衝溶液濃度對金奈米粒子偵測的影響.....	62
2.3.2 加入不同濃度之界面活性劑.....	64
2.3.3 分離電壓對金奈米粒子訊號高度的影響.....	66
2.3.4 利用樣品堆積偵測金奈米粒子之偵測極限.....	68
2.3.5 利用優化後之實驗條件偵測銀奈米粒子.....	71
2.3.6 加入聚合物溶液進行金奈米粒子之分離.....	71
2.3.7 改變金奈米粒子表面修飾來進行分離.....	73
2.4 結論.....	76
2.6 參考文獻及資料.....	77

第三章 以物鏡式暗視野之散射光學分離金奈米粒子

3.1 實驗部分.....	79
3.1.1 實驗試藥.....	79
3.1.2 金奈米粒子製備.....	79
3.1.3 毛細管前處理.....	80
3.1.4 聚合物溶液製備.....	81
3.1.5 實驗流程.....	81

3.2 結果與討論.....	82
3.2.1 改變系統及金奈米表面修飾來進行分離.....	83
3.2.2 改變篩分介質濃度及分離電壓對分離的影響.....	86
3.3 結果與討論.....	92
3.4 未來展望.....	93
3.5 參考文獻及資料.....	94

圖目錄

圖 1-1 電雙層的結構及 ζ 電位.....	7
圖 1-2 電滲流及層流的比較圖	9
圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖	12
圖 1-4 毛細管凝膠電泳在無電滲流存在下分離金奈米粒子示意圖	18
圖 2-1 初始儀器裝置圖.....	49
圖 2-2 以散射光學為基礎結合毛細管電泳之儀器裝置圖	51
圖 2-3 金奈米粒子之吸收圖以確保合成之金奈米粒徑分布	55
圖 2-4 銀奈米粒子之吸收圖	56
圖 2-5 金奈米粒子高解析度穿透電子顯微鏡圖	57
圖 2-6 緩衝溶液濃度對金奈米粒子之訊號影響	63
圖 2-7 SDS 濃度對分離金奈米之影響.....	65
圖 2-8 分離電壓對金奈米粒子訊號高度之影響	67
圖 2-9 利用樣品堆積進行 32 nm Au - MPA 之測試其偵測極限.....	69
圖 2-10 利用樣品堆積進行 13 nm Au - MPA 之測試其偵測極限.....	70
圖 2-11 利用正電系統偵測不同大小之銀奈米粒子	72
圖 2-12 加入聚合物來進行金奈米之分離	74

圖 2-13 金奈米粒子表面修飾 MUA 對分離的影響	75
圖 3-1 利用無電滲流之系統分離金奈米粒子	84
圖 3-2 利用無電滲流之系統進行金奈米粒子訊號之標幟	85
圖 3-3 電場對金奈米粒子分離的影響	88
圖 3-4 電場及篩分介質對金奈米粒子分離的影響	89
圖 3-5 電場及篩分介質對金奈米粒子分離的影響	90

表目錄

表 1-1 比較不同方法偵測奈米粒子之優缺點	28
表 2-1 利用 Scan pro 3 進行粒徑平均值之計算	58
表 2-2 利用莫耳消光係數來計算金奈米粒子之濃度	59
表 3-1 不同 PVP 濃度及不同電壓之解析度	91
表 3-2 不同 PVP 濃度及不同電壓之平均理論平板數	91

第一章 毛細管電泳及其應用之簡介

1.1 毛細管電泳之簡介

電泳 (electrophoresis) 技術至今發展已有百年的歷史，而電泳是受到電場的作用力，分散在液體中之粒子發生移動之現象，且溶液中之物質所帶電荷不同，而產生了不同質荷比 (m/z)，進而造成不同物質會有不同的遷移速度^[1]，使得溶液中不同之物質能分離開來，而此技術即為電泳分離。電泳此一名詞由 Michaelis 所提出於 1909 年^[2]，直到 1937 年之後 Tiselius 才藉由電泳技術，從血漿蛋白中成功分離出白蛋白及 α 、 β 、 γ 三大類的球蛋白^[3]，並於 1948 年獲得諾貝爾化學獎。

早期電泳是在自由溶液下進行，當施加高電壓時會產生高焦耳熱之問題，如此會對分離的解析度造成嚴重影響，因此後來科學家發展出平板凝膠電泳 (slab gel electrophoresis)，將原本在自由溶液下所進行之實驗改為使用流動性較差凝膠做為篩分 (sieving) 樣品的物質，平板凝膠電泳能同時分離多種樣品，其中最常使用的樣品有蛋白質 (protein)、胜肽 (peptide)、去氧核糖核酸 (DNA) 等生物樣品。但由於製備平板凝膠不易且散熱效果不佳，使得進行平板凝膠電泳時所能給予的電壓較低，所以在分離時會造成分析時間較久。

因此瑞典科學家 Hjérten 於 1967 年，使用 3 mm 的玻璃管柱來進行自由溶液下區帶電泳的實驗，並結合 UV 吸收光譜儀來偵測分析物，可成功地分離蛋白質、核酸、病毒以及無機離子^[4]。此外，因玻璃管柱變小可減少焦耳熱所產生的熱對流影響，所以接著 Virtanen 於 1974 年以相同方法將毛細管內徑縮小至 0.2~0.5 mm，成功地在 10 分鐘內分離 16 種陰離子^[5]。雖然已經大幅降低熱對流的影響，但是當施加高電壓時還是會有熱對流的問題存在，而造成分離時間較長、波峰變寬、低靈敏度等多項缺點，使得毛細管電泳無法成為當時主要的分析方法。直到 1981 年由 Jorgenson 及 Lukacs 等人使用內徑 75 μm 毛細管成功地分離衍生化的胺基酸^[6-8]，並且結合螢光系統完成了線上偵測。此方法不僅提高實驗靈敏度，也因為內徑變小，使表面積與體積比值變大，散熱效果大幅提升，因此可使用更高的電場來進行電泳分離，進而能將分離時間減少許多，其理論板數可達到數十萬以上，且為毛細管區帶電泳(capillary zone electrophoresis, CZE)^[9]奠定基礎，也為日後毛細管電泳相關之研究打下根基。毛細管電泳發展至今大致可分為六大類：毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)^[10]為毛細管電泳中最常使用且最簡單的一種方法、毛細管等電聚焦法 (capillary isoelectric focusing, CIEF)^[11]、毛細管等速電泳法 (capillary isotachopheresis, CITP)^[12]、毛細管凝膠電泳 (capillary gel

electrophoresis, CGE)^[13]、毛細管電層析法 (capillary electrochromatography, CEC)^[14]及用來分離中性分子和帶電粒子的微粒電動力層析法 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)^[15]等方法。由於科技日漸發展，科學家也將電泳技術應用於微晶片上，利用蝕刻在微晶片上刻出小型通道 (channel)^[16,17]，其優點有分析時間快、樣品消耗量少以及具有高通量等，並朝著可在單一晶片上完成樣品前處理、分離及偵測等步驟來發展，亦即實驗室晶片 (lab-on-a-chip)^[18]。

上文已提到平板凝膠電泳是使用流動性較差的凝膠作為篩分介質來改善電泳的解析度。凝膠的篩分原理是根據聚合物分子量大小來達到分離效果，而平板凝膠電泳最常使用的樣品為生物巨分子。但因為使用平板凝膠電泳最大的困難點就是焦耳熱的影響使得解析度不佳，所以後來發展出毛細管凝膠電泳 (capillary gel electrophoresis) 此分離技術^[19]，發展初期使用的凝膠為交聯性聚丙烯醯胺 (cross-linked polyacrylamide, CPA)^[20]和當初平板凝膠電泳使用的凝膠相同，但因製備繁瑣、黏性高，難以利用壓力方式注入到毛細管中，所以利用管內聚合方式注入到毛細管中。但由於毛細管徑小，要在管內聚合其製備的困難度比製備平板凝膠來的高，且管內聚合常遇到凝膠產生體積變化而產生氣泡、聚合的再現性低及毛細管使用壽命短等問題存在，

因此發展可用的凝膠或聚合物溶液成為當時毛細管電泳的重要目標。

1989年，Zhu和Colbum找到可以替代交聯性聚丙烯醯胺的凝膠，利用非交聯性的線性聚合物成功分離DNA片段^[21,22]，而線性聚合物的優點在於黏度低，先在毛細管外完成聚合，再利用壓力方式注入毛細管，因使用黏度低的凝膠提升了實驗的再現性，也增加了毛細管的使用壽命，現今毛細管凝膠電泳使用的凝膠還是以線性聚合物為主，常見的線性聚合物包括，聚環氧乙烷（poly(ethylene oxide), PEO）^[23,24]、線性聚丙烯醯胺（linear polyacrylamide, LPA）^[25,26]、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol）^[27]、各種纖維素（cellulose）衍生物^[28-30]以及瓊脂膠（agarose）^[31]等。

近年來毛細管電泳已經成為良好的分析工具之一，可適用於帶電分子、中性分子、無機分子及有機分子，近幾年來更廣泛運用於生物分子，例如：DNA^[32]、RNA^[33]、胺基酸（amino acid）^[34,35]、蛋白質^[36]及醣類（carbohydrates）^[37]等。毛細管電泳具有分離效率高、所需樣品少、分析時間短、高偵測靈敏度、高通量以及可自動化等優點^[38,39]。

1.1.1 分離原理

1.1.1.1 淌度 (mobility)

毛細管電泳分離的原理是利用不同物質在施加電場時會因為遷移速率不同而達到分離，帶電粒子在電場中會以一個速度(v_{ep})前進，而且與電場強度 (E) 成正比，其關係式為：

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (1-1)$$

μ_{ep} 為電泳淌度 (mobility)，為單位電場下粒子的電泳遷移速度。當施加一電場時，帶電粒子因庫倫作用力 (F) 而加速移動^[33]，其庫倫作用力會與有效電荷 (q) 和電場強度 (E) 成正比，其關係式為：

$$F = q E \quad (1-2)$$

帶電粒子在運動過程中會與介質碰撞而產生摩擦力 (f) 造成移動速率變慢，但是當帶電粒子加速到某個程度時，庫倫作用力與摩擦力會達到一個平衡，此時帶電粒子不再做加速運動而變成等速運動。從 Stokes 定律中，假設帶電粒子為剛性球體，當受到摩擦力時，其關係式為：

$$f = f v = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-3)$$

f 為剛性球體的動摩擦係數， η 為緩衝溶液黏度，而 r 為粒子半徑。

當帶電粒子作等速運動時，其庫倫作用力與摩擦力相等，其關係式為：

$$F = q E = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-4)$$

由以上公式代入方程式 (1-1) 可得：

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1-5)$$

以上公式可以說明電泳淌度與有效電荷成正比關係，並且與粒子半徑成反比關係。因此可得知電泳淌度會受粒子電荷及半徑影響。

1.1.1.2 電滲流 (electrosmotic flow, EOF)

電滲流為毛細管電泳中驅動力的其中一種，因毛細管的主要材質為熔融矽 (fused silica)，毛細管中溶液的離子在電場作用下移動而產生電滲流，當電解質溶液 pH 值大於 3.0 時，管壁的矽醇基 (SiOH) 會解離變成矽醇陰離子 (SiO⁻)，使得管壁帶負電荷，當溶液中陽離子通過毛細管時會被 SiO⁻ 吸引，而在毛細管內壁產生雙電層 (electrical double layer)。被 SiO⁻ 所吸引的陽離子為固定層 (stern layer)，固定層外則是擴散層 (diffusion layer)，如圖 1-1 所示。當施加正電壓時，擴散層中的陽離子會受到庫倫吸引力而往負極移動，此作用力會帶動溶液中的整體溶液 (bulk solution) 一起往負極移動而產生電滲流。毛細管內固定層與擴散層的電荷分布不均勻，導致整體溶液與電雙層之間產生一電位差，稱之為 ζ 電位 (zeta potential)。其關係式為^[40]：

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad (1-6)$$

δ 為電雙層之厚度， e 為單位面積之總電荷，而 ε 為緩衝溶液之介電

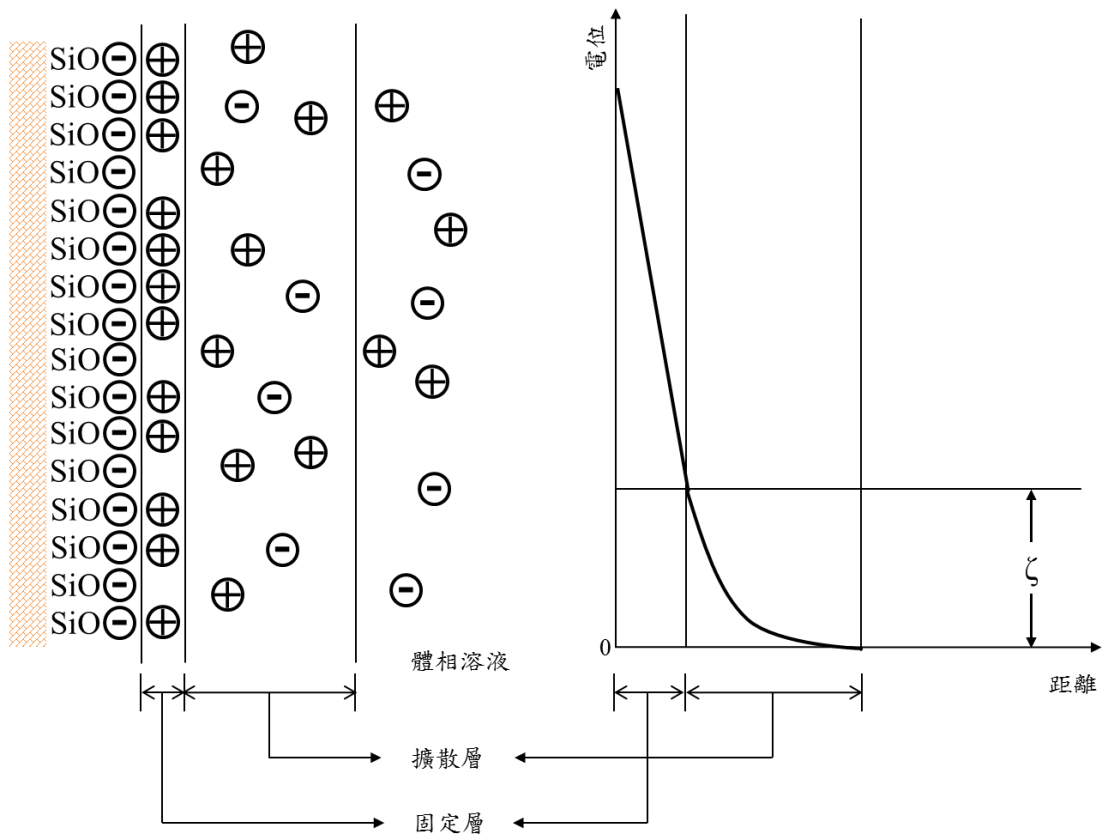


圖 1-1 電雙層的結構及 ζ 電位

常數。電滲流與 ζ 電位，其關係式為：

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (1-7)$$

μ_{eo} 為電滲流之遷移速率， η 為緩衝溶液之黏度。由此公式可看出，電滲流之遷移速率與 ζ 電位和緩衝溶液之介電常數（ ε ）成正比關係，與緩衝溶液之黏度成反比關係。而 ζ 電位的大小與毛細管內壁矽醇基的解離程度有關，假設毛細管內壁的矽醇基解離愈多，就會吸引愈多的正離子，形成的電雙層厚度也會愈厚， ζ 電位也會變大，使電滲流之遷移速率變快了。緩衝溶液的選擇也會造成電滲流之遷移速率不同，包括緩衝溶液之pH值、離子強度、種類及添加物。緩衝溶液之pH值大於3.0時，電滲流值也會明顯增加，且隨著pH增加而變大，直到pH值大於8.0時，電滲流才會趨於一個定值。而緩衝溶液的離子強度也是影響電滲流的因素之一，當離子強度增強時，毛細管壁上所吸附的陽離子會與溶液中陽離子的數目相近，使電雙層變緊密， ζ 電位變小，相對的電滲流也會變小，另外改變溫度或將毛細管內壁進行改質也會影響電滲流之大小^[41]。電滲流是因擴散層中對離子受電場影響而產生移動，不會在毛細管壁施予額外的壓力，所以理論上毛細管內壁的每一個地方的流速幾乎相同，如圖1-2所示，毛細管電泳中內壁溶液之形狀趨近於一平面。相較於其他管柱層析法，管柱中的動相是利用幫浦產生壓力來推動，受到溶液與管壁間的摩擦力及剪切力的影

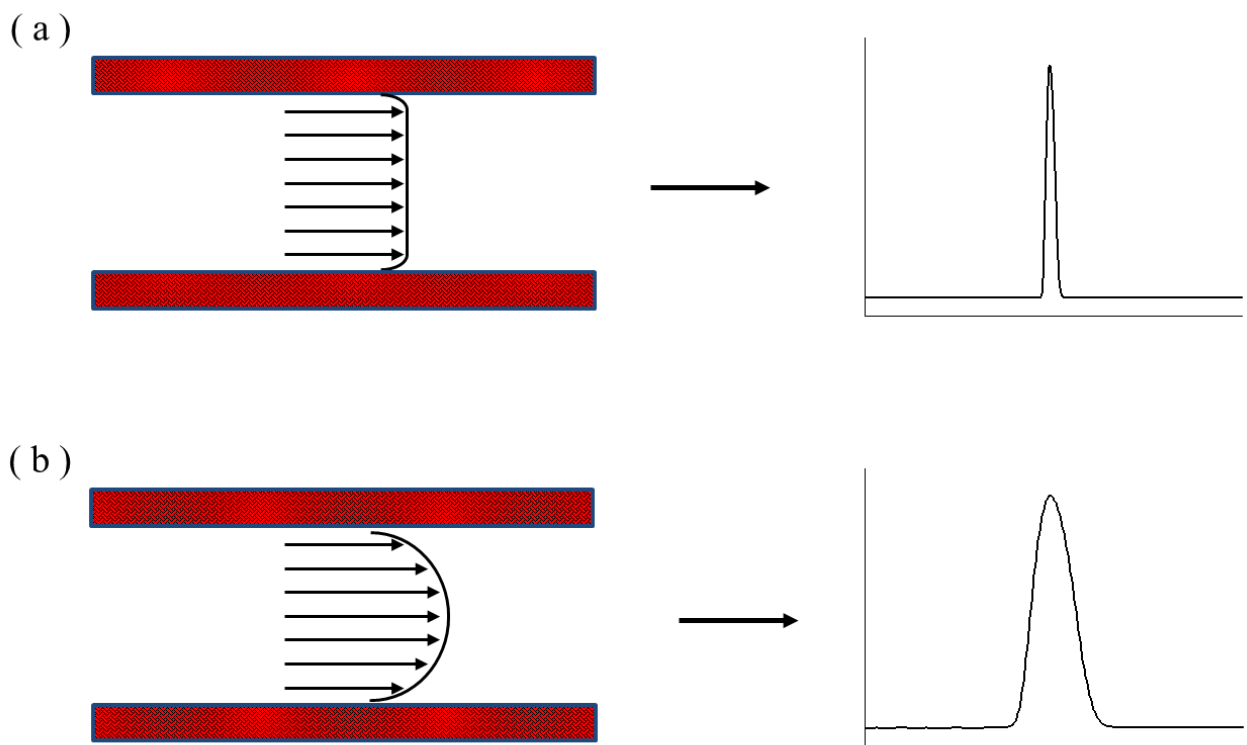


圖 1-2 (a) 電滲流及 (b) 層流之比較圖

響而產生層流 (laminar flow)，使管柱中的溶液形狀呈現拋物狀。層流會造成樣品注入後區帶分散，致使解析度不佳，因此具有電滲流之毛細管不會使樣品區帶變寬，其理論平板數還能提高至數百萬以上。雖毛細管電泳本身具有電滲流之特性，但一般於分析 DNA 或蛋白質時，常會有樣品吸附於管壁的問題發生，所以通常要進行電泳分析時，會於毛細管內壁塗覆聚合物來減少樣品的吸附^[42,43]，但毛細管壁塗覆聚合物後其本身的 ζ 電位也消失了，所以通常分析生物樣品時都會在電滲流很微小的情況下進行，此時後生物分子的遷移則是利用自身的電荷受到電場影響而移動。

1.1.1.3 流動式毛細管凝膠電泳

到目前為止，使用毛細管凝膠電泳分離 DNA 片段，為了避免 DNA 分子和聚合物溶液易吸附於毛細管壁電滲流隨時間改變，及電滲流隨時間改變，造成再現性不佳。所以實驗前必須先進行毛細管壁的塗覆，抑制電滲流產生，因此過去在分離 DNA 片段時，皆是在無電滲流情況下進行。但由於經過塗覆的毛細管生命期較短、製備昂貴及塗覆的聚合物容易隨時間改變，所以過去已有許多研究者開發多種在電滲流存在下分離 DNA 片段的技術^[44,45]，先把樣品注入到充滿高濃度聚合物之 TB (tris-borate) 緩衝液中，並直接將電滲流引入毛細管中，因為 DNA 分子在系統中的移動方向與電滲流反向，且較大片

段之 DNA 在聚合物溶液中的淌度較小，所以大片段之 DNA 會先被偵測到，DNA 於毛細管凝膠電泳在電滲流存在下的分離過程，如圖 1-3 所示。進行實驗的聚合物溶液包括纖維素衍生物 (cellulose derivatives)、聚環氧乙烷、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 會在毛細管壁進行動力學之塗覆 (dynamic coating)，因此減少 DNA 分子毛細管壁之作用，電滲流也隨著時間而減少^[46,47]。為了使得實驗的再現性佳，於每次實驗完後，以 0.5 M 的氫氧化鈉溶液在 1 kV 電壓下清洗毛細管壁，並持續 10 分鐘使毛細管壁再次充滿負電荷。過去已有學者在電滲流存在下以毛細管區帶電泳方法成功地分析大體積 DNA 分子量標準液 (DNA markers) 及聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 產物^[48]。

1.1.1.4 DNA 於毛細管凝膠電泳中之分離機制

毛細管凝膠電泳因具有高解析度及所需樣品少等優點，近年來已成功地應用於分析 DNA。其中影響分析 DNA 的實驗參數包括：溫度、毛細管表面、電場強度、凝膠介質、進樣及偵測系統等。DNA 在自由溶液下會以隨機盤繞的方式存在，但當受到電場的影響時會展開成長鏈狀，使得 DNA 的每一處都會接觸到溶液，而 DNA 分子中鹼基對 (base pair) 之數目 (N) 會與摩擦力成正比，其關係式為：

$$f \propto N \quad (1-8)$$

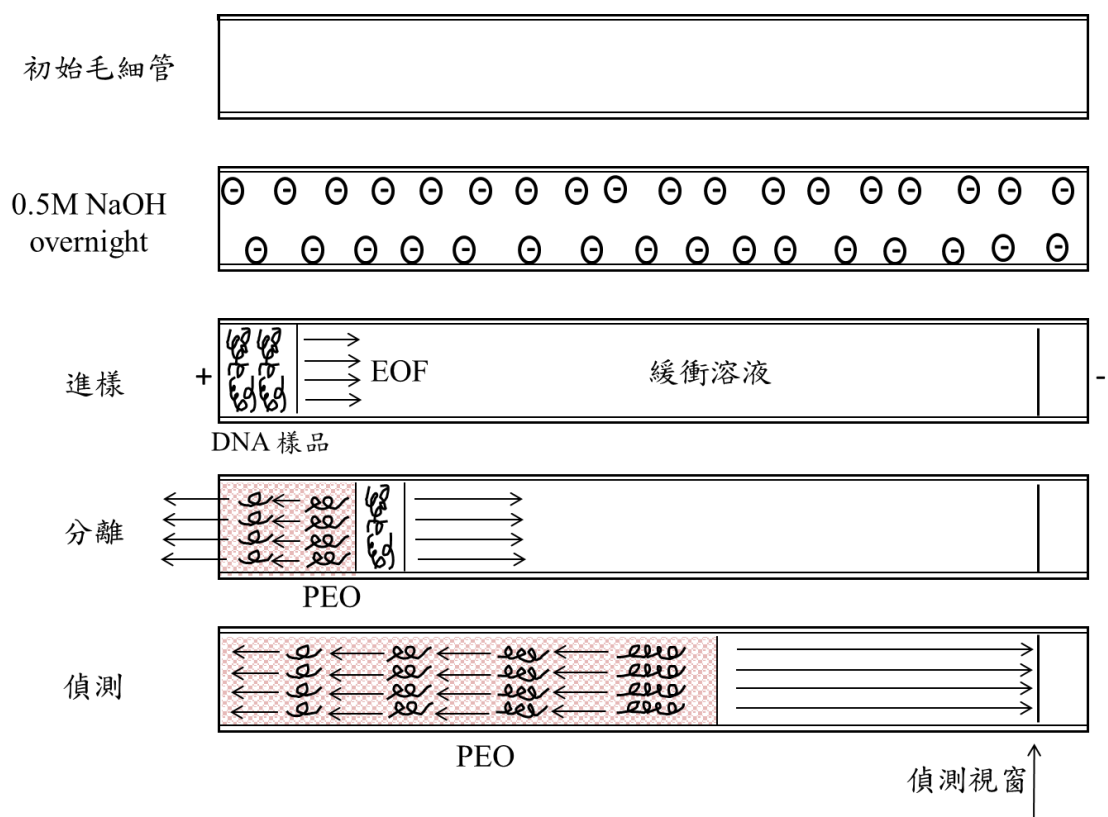


圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖

且 DNA 分子中的磷酸根之負電荷 (Q) 也會與鹼基對之數目成正比，其關係式為：

$$Q \propto N \quad (1-9)$$

所以在自由溶液中的 DNA 之淌度為一定值^[49]：

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Q}{f} \propto \frac{N}{N} = \text{constant} \quad (1-10)$$

由以上推論可得知 DNA 在自由溶液下是無法進行分離的，到目前為止 DNA 分離皆著重在凝膠的選擇，凝膠具有非傳導性的介質，減低樣品於毛細管中擴散導致區帶變寬的現象，且凝膠具有網狀結構之特性可對 DNA 進行篩分的動作進而分離，不同長度 DNA 分子利用通過網狀結構困難程度不同而得到不同淌度，達到分離的效果。長度較短之 DNA 容易通過凝膠孔隙中，所以分離時間短，相對的長度較長之 DNA 則分離時間較長。

凝膠為聚合物是以單體的形式存在，當聚合物分子在濃度低時，分子間碰撞機率較低彼此之間也較難產生任何作用，聚合物溶液的黏度也較低，當濃度增加至某一程度時，分子間碰撞機率增加了，彼此之間作用產生糾結，則會開始形成網狀結構，當聚合物的濃度超過糾結界限 (entangled limit) 時網狀結構就會形成孔隙。糾結界限的定義是假設每個聚合物分子的體積都相同時，所有聚合物所佔的總體積與

溶液體積相同時的濃度。可表示為：

$$\phi^* \approx \frac{3 M_w}{4 \pi N_A R_g^3} \quad (1-11)$$

或

$$\phi^* \propto N^{-0.8} \quad (1-12)$$

ϕ^* 為糾結界限， M_w 為聚合物分子量， N_A 為亞佛加厥常數， R_g 為聚合物分子的迴旋半徑 (radius of gyration)，而 N 為聚合物分子所含的單體數目。但因為聚合物的分子量不是定值而是以平均分子量表示，所以如果要得知其實際的糾結界限必須透過實驗才能得知^[50]。

凝膠為一分離介質，是利用凝膠之網狀結構所形成的孔隙(mesh)來篩分分析物進而達到分離效果，當聚合物濃度高於糾結界限時就會形成網狀結構，而網狀結構之孔隙大小與聚合物濃度有關，其關係式為：

$$\xi = R_g \left(\frac{C}{\phi^*} \right)^{-0.75} \quad (1-13)$$

$$\xi \propto a \phi^{*0.75} \quad (1-14)$$

ξ 為孔隙大小， C 為聚合物濃度，而 a 為常數^[51]，不同聚合物溶液可得不同的值。由以上公式可得知凝膠的孔隙大小與聚合物的濃度及特性有關，而聚合物單體濃度越高形成的孔隙就越小。

毛細管凝膠電泳可以有效的分離 DNA 分子，研究者探討生物分子在凝膠網狀結構中的遷移行為上，從早期的 Ogston 模型 (Ogston

model) [52] 及爬行模型 (reptation model) [53]。這兩種模型可以解釋 DNA 於毛細管凝膠電泳中的分離機制。Ogston 模型適合用來解釋小片段的 DNA 分子 (< 3000 bp) 之遷移，但前提必須先假設 DNA 分子為剛性球體，並利用較小片段之 DNA 分子能通過網狀結構中大孔隙之理論，使小片段之 DNA 分子能被篩分出來，而大片段之 DNA 分子則沒辦法通過，其 DNA 之淌度關係式為：

$$\mu = \mu^* P \quad (1-15)$$

μ^* 為 DNA 在自由溶液下之淌度， P 為 DNA 分子小於網狀結構之孔隙的機率。

P 可表示為：

$$P = \exp [-KC (r + R_g)^2] \quad (1-16)$$

K 為比例常數， C 為聚合物濃度， r 為聚合物分子鏈厚度，而 R_g 為假設 DNA 分子為剛性球體時的半徑，結合了上述兩公式，其 DNA 之淌度關係式為：

$$\mu = \mu^* \exp [-KC (r + R_g)^2] \quad (1-17)$$

爬行模型適合用來解釋大片段之 DNA 分子，當 DNA 剛性球體的直徑大於網狀結構之孔隙時，DNA 會以隨機變形的長鏈分子的形式存在，並以蛇行方式通過聚合物往前移動，所以 DNA 的移動不會受限於孔隙的大小，此時 DNA 之淌度與 DNA 分子大小其關係式為：

$$\mu \propto \frac{N}{N^2} = \frac{1}{N} \quad (1-18)$$

以上兩種模式一開始皆建立於平板凝膠電泳上，但毛細管凝膠電泳是在高電壓下進行實驗的，所以必須考慮 DNA 的構型會受到電場而改變。此外毛細管內的線性聚合物，形成之網狀結構可能會隨著時間而改變，並非永久性的 (permanent)，所以若要深入探討 DNA 分子於毛細管凝膠電泳之分離機制則必須考慮電場強度及聚合物溶液之網狀結構這兩個問題，目前 DNA 分子於聚合物溶液中之分離機制都以上述兩個模型作解釋，但實際上詳細的分離機制到目前為止已經有許多學者致力於研究膠體相關之力學，期望未來學者們可以利用更精確的儀器及電腦模擬分析才能有較完整之分離機制的理論出現。

1.1.1.5 毛細管內壁塗覆

毛細管內壁於 pH 大於 2 的時候會開始解離並帶負電荷，此時容易吸引正電荷之分析物，因此蛋白質、DNA 等分析物皆可能吸附於毛細管壁上，而影響分離的解析度，因此在分離蛋白質或 DNA 時，往往會在毛細管壁上塗覆一層聚合物，來抑制 EOF 的產生防止分析物吸附。以往抑制 EOF 的方式是降低 pH 值、高離子強度之陽離子介面活性劑^[54]或於背景電解質中加入有機溶劑^[55]。但是這些方法不適合用於分離金奈米粒子，因為在這些條件下會造成金奈米粒子聚集。因此利用管壁內徑塗覆聚合物的方法可以有效的抑制 EOF 的產生也可

以降低樣品的吸附，塗覆是聚合物與毛細管內壁之矽醇基以共價鍵結而成。圖 1-4 為在沒有 EOF 的狀態下，將毛細管塗覆一層聚合物抑制 EOF 的產生，並利用適合的聚合物緩衝溶液分離經表面修飾之金奈米粒子。

1.1.1.6 樣品注射方式

毛細管電泳中最常使用之樣品進樣方法有以下幾種分別為：壓力進樣（hydrostatically）、虹吸進樣（siphoning）及電動進樣（electrokinetically）。壓力進樣為在樣品端施加壓力或是末端抽真空（pump），將樣品引入毛細管中，但此方法較不方便使用；虹吸進樣是將樣品放置於一高度，利用重力差方式，驅使樣品吸入毛細管中。壓力及虹吸進樣之優點為不會受到離子之移動力使進樣總量改變；電動進樣，樣品進樣是將毛細管末端與其電極一起放置於樣品中，對其施加電場藉由離子移動與電滲流兩現象，使得樣品進入毛細管中。最後再將毛細管末端及電極放回緩衝溶液中，即可進行分離。電動進樣之優點為注射之體積量較多。一般而言虹吸進樣，使用 75 μL 內徑的毛細管，維持 5 公分高度差進樣 10 秒時，進樣總量約為 6 nL；電動進樣，注射之體積量約為 5 至 50 nL。

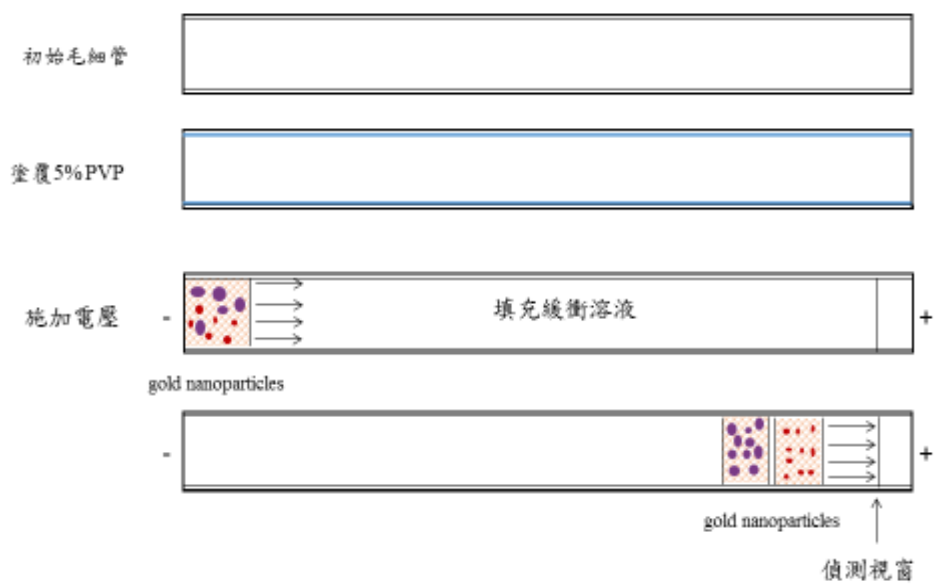


圖 1-4 毛細管凝膠電泳在無電滲流存在下分離金奈米粒子之示意圖

1.1.1.7 線上濃縮技術

線上濃縮技術 (on-line concentration) 於 1979 年由 Mikkers 在實驗過程中發現樣品堆積 (sample stacking) 的現象^[56]，當增加分析物注射的時間時，樣品區帶亦會隨著增加。其原理為樣品溶液與緩衝溶液之間的導電度不同，產生的電場強度也不同，使分析物在此兩種環境中的遷移速度有所改變，造成樣品區帶堆積，並稱此方法為樣品堆積技術。於 1989 年 Chien 和 Burgi 等人進一步研究樣品堆積，才成為毛細管電泳線上濃縮的重要技術之一^[57-59]。學者亦成功開發了在電滲流存在下，使用聚環氧乙烷溶液分離 DNA，並進行線上濃縮技術^[44, 45, 60, 61]。樣品進樣最高注入量約為 5 μL ，藉由此技術可降低偵測極限且提高靈敏度。於具有電滲流的系統下，電滲流的方向與 DNA 剛好為反向，當施加電場時樣品會開始移動進入聚合物溶液中，受到高濃度的聚合物溶液阻擋，樣品具有堆積作用。線上濃縮技術中，又有運用不同原理之方法，如：電場放大堆積 (Field-amplified sample stacking)、掃掠式線上濃縮 (Sweeping-MEKC)。電場放大堆積之原理是根據歐姆定律得知，由於樣品區帶為低導電性之緩衝溶液，所受到的電場強度較強，因此分析物會快速通過樣品區帶，當進入到緩衝溶液區帶時，由於緩衝溶液為高導電性，所受到的電場強度較弱，形成遷移速度改變，使得分析物會在樣品區帶前方介面處濃縮堆積。而掃

掠式線上濃縮是利用分析物在含有界面活性劑微胞與不含界面活性劑微胞溶液遷移速度不同，而形成樣品堆積。

1.1.1.8 偵測系統

毛細管電泳之偵測系統有許多種類，包括螢光 (fluorescence) 放射法^[62]、質譜儀 (mass spectroscopy, MS)^[63, 64]及紫外光-可見光吸收 (ultraviolet-visible absorption)^[65]。而螢光放射法又可以分為傳統光源激發螢光及雷射誘發螢光，其中以雷射誘發螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 偵測器的靈敏度最高。雷射可輕易聚焦至微米 (micrometer) 大小的直徑，可減少訊號峰因偵測器造成的譜帶變寬。已有文獻發表利用雷射誘發螢光的偵測極限可達 50 yoctomoles (1 yoctomole = 1 ymol = 1×10^{-24} M)^[64]，且此系統可應用於偵測單分子及單細胞^[66, 67]。

雷射波長的選擇也極為重要，一般都使用氦氖雷射 (He-Ne laser)、固態雷射 (solid-state laser)、氬離子雷射 (argon ion laser) 及紅寶石雷射 (Nd: YAG laser)，以上這些都可作為毛細管電泳之激發光源^[68-72]，由於生物分子絕大部分都不具有螢光，所以生物分子必須使用染料進行衍生化或將染料加入至緩衝溶液中快速與 DNA 嵌合^[73]後進行分析，到目前為止毛細管電泳結合了雷射誘發螢光偵測系統廣泛地被應用於 DNA 定序^[74]及基因突變^[75]等研究。

1.1.2 毛細管電泳之應用

毛細管電泳具有、高靈敏度、樣品需求量少、分析時間短及易於自動化等優點。到目前為止，毛細管電泳在許多領域中都已作為主要的分析工具包括分析化學、臨床化學、生物化學及有機化學等等。尤其在近幾年，在生物學中廣泛的被應用於短序列重複（short tandem repeats, STRs）的偵測及分析上^[76, 77]。而其他應用包括植物或病毒 DNA 的基因突變偵測^[78]、定量聚合酶連鎖反應產物^[79]、單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphisms, SNPs）^[80, 81]、粒腺體 DNA 定序及 Y 染色體^[82]，並於 DNA 定序中發現不同個體間的序列幾乎都只有改變單一核苷酸，且已知 SNPs 可能與疾病的表現有關，其單一核苷酸之微小差異已成為日後研究的目標。此外，毛細管電泳也常被應用於人體體液的定量分析^[83-85]，例如：唾液^[86]、血漿^[86-88]、尿液^[89, 90]、腦脊髓液^[91, 92]等。在人體體液中含有大量的胺基酸^[93-95]與無機鹽類^[96-98]等小分子，在傳統的體液檢體檢測是使用酶聯吸附免疫測試（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）^[99-101]，但是此法主要是檢測人體體液中含有抗原抗體^[102, 103]之大小分子。而在近期有許多醫學文獻顯示出人體體液中的胺基酸濃度與手術後患者之調養^[104]以及許多疾病有著密切的關係^[105-107]，包含癌症^[108-110]。例如：在肝癌患者身上所取出之血漿中的支鏈胺基酸(Branched-chain amino acid, BCAA)

與酪胺酸(tyrosine, Tyr)的比值^[111, 112]相較於正常人的比值有著明顯的差異。毛細管電泳擁有快速、高解析度、高理論板數、也具有極高的再現性等優點。因此，毛細管電泳除了用於 RNA 與 DNA 的檢測之外，也被用來檢測人體體液中胺基酸^[113]或無機鹽類^[114]之濃度並定量。

1.2 奈米粒子 (gold nanoparticle, Au NPs) 之簡介

1.2.1 緒論

在自然界中的蓮花效應，即是蓮葉表面的奈米結構，使葉片上之水滴形成晶瑩剔透的圓形水珠，而不會攤平。近代奈米技術的發展源自 1950 年代，美國物理學家費曼提出奈米科技的概念，從單一分子或原子開始組裝，以達到奈米等級，並於 1965 年獲得諾貝爾物理獎。而後日本科學家谷口在其論文中首度提出奈米科技 (nanotechnology) 一詞，用以描述小於微米的機械。

隨著尺寸的減小，一系列的物理現象會顯現出來，許多物理性質會改變，最明顯的例子為材料的表面積比，當材料的尺寸降至奈米等級時，因其接觸表面機會大幅提升，所以能夠造成其催化性或反應效果大幅提升，由於這些優點，在化學、光電、物理、材料及醫學等方面的研究，都試圖將儀器及元件縮小至奈米等級的尺寸，以增加應用的功能性。將基礎科學結合奈米材料，應用於光電材料、藥物篩選、奈米感測材料及生物疾病檢測等領域，都已經成為相當熱門的研究目標 [115, 116]。

1.2.2 奈米粒子的定義及性質

奈米 (nanometer, nm) 為一度量單位，一奈米為一公尺的十億分之一，奈米粒子通常指的是尺寸介於 1-100 nm 的物質，其形狀可分為線狀、棒狀、球狀或是層狀。當物質小至奈米尺寸時，可能會出現小尺寸效應 (small size effect)、量子效應 (quantum effect)、表面效應 (surface effect) 等，導致奈米粒子之光學、物理及化學性質都有明顯改變，由於這些特殊的性質，奈米材料目前已被應用在各領域，包括感測器、催化劑、新能源及醫藥等。

當奈米粒子的粒徑越小，包含的原子數目越少，表面原子數目相對於總原子數目的比例大幅增加，表面原子的熱力學穩定性差且具有較大的化學活性，容易與其他原子結合，可以應用於奈米催化或微粒觸媒，被稱為表面效應^[117]。小尺寸效應是指當奈米粒子粒徑變小時，所導致光學、電學及磁性等物理性質，以及其他化學性質的變化^[118]。奈米粒子的粒徑比一般的紫外光、可見光及紅外光的波長來得小，對光的反射量及散射降低，可以應用於光電及光熱轉換材料或透明材料。在金屬能帶理論 (energy band theory) 中，金屬塊材的電子能階在費米能階 (Fermi energy level) 附近為連續性的能帶，隨著奈米粒子粒徑的減小，導致能階的間距增加，電子能階會轉變為不連續的獨立能階，使能導電的金屬在奈米等級時變成絕緣體，即為量子效應。

在感測器中最常使用的奈米材料為金奈米粒子，其具有製備簡易、生物相容性高、無毒性、穩定性好、特殊光學活性及符合經濟效益等優點^[119]。最重要之特性為巯基修飾之探針 (probe) 可藉由金硫 (Au-thiol) 鍵自組裝方式固定於金奈米粒子表面，以及金奈米表面吸附能力強之特性將生物分子附著。

常用的金奈米粒子尺寸通常為幾奈米到 30 奈米左右，在可見光波長 510-550 nm 之間有特徵吸收峰，稱之為局部表面電漿共振 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)^[120]。此 LSPR 吸收峰位置隨粒子大小改變，其原因為金奈米粒子受到可見光源擾動，造成粒子內部之電子產生變動，瞬間極化，而受到極化之電子為抵抗其外力，而使電子在奈米粒子內部產生簡諧震盪，因此奈米粒子粒徑愈小，震盪頻率愈快，所吸收的可見光波長愈短，相反地，奈米粒子粒徑愈大，震盪頻率愈慢，所吸收的可見光波長愈長，因上述原因金奈米粒子隨著粒徑增加，特徵吸收峰也會往長波長位移 (red shift)，且溶液顏色隨著粒子大小的不同而不同。此外，奈米粒子的形狀和周圍環境也會影響其 LSPR 吸收波長。

由於上述那些特殊性質，使得金奈米粒子已廣泛地應用於重金屬分析、免疫分析^[121, 122]、DNA 分析^[123, 124]、胺基酸分析及生物晶片^[125, 126]等研究。

1.2.3 金奈米粒子之偵測方法

以金奈米粒子作為感測器材料之偵測方法有很多種，其中包括吸收，使用可見光吸收光譜判定金奈米粒子大小及聚集程度、螢光消光，藉由金奈米粒子的消光係數 (extinction coefficient)比其它有機染料大千倍，當螢光試劑分子接近或吸附於金奈米粒子表面時，能有效透過能量或電子轉移方式使螢光消光，利用金奈米粒子具有雷利 (rayleigh) 散射訊號，粒徑及聚集程度愈大散射光愈強，表面增強拉曼散射 (surface enhanced raman scattering, SERS)，當分子吸附於金奈米表面時，因表面電漿共振造成局部電場增加，使原本較微弱的拉曼散射訊號增強 10^4 至 10^7 倍，以及表面電漿共振法 (surface plasmon resonance, SPR) 利用分析物吸附於金奈米表面引起介電常數的變化來進行偵測。而本實驗則是利用金奈米粒子本身具有雷利散射 (rayleigh scattering) 訊號作為偵測。奈米粒子之散射訊號與粒徑的六次方成正比，但吸收訊號只與粒徑三次方成正比，意指當奈米粒子粒徑變大時，散射強度也愈強。因此可利用此特性應用於生物分析，當未加入分析物時散射光強度較弱，而加入分析物時造成金奈米粒子聚集且粒徑變大，因此報導銀奈米粒子 (silver nanoparticle) 其共振雷利散射效率相當於螢光團 10^6 倍^[127]。近年來偵測金奈米粒子之方法也隨著科技進步變得更多元，如穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope)，此技

術能夠讓我們能夠直接觀測到奈米粒子之精確粒徑大小，但其缺點為穿透式電子顯微鏡是藉由電子束打至試片上，再經放大而成像，所以試片之薄度必須達到電子束能穿透的等級，因此試片之耗費相對昂貴，且儀器之價格也較為昂貴且須要在高度真空之環境。另一種方法為，雷射粒徑分析儀 (Laser diffraction particle size analyzer)，此儀器所利用之原理為，光線在無阻礙物之情況下，會一直筆直延伸，一旦遇到阻礙物後，便會產生偏離，此時則會產生散射光偏往不同的偵測器。因此，當奈米粒子之顆粒較小時，所產生散射光之偏離角度就會較小，而較大的奈米粒子所產生之散射光偏離角度就會較大，之後再透過特定的數學公式進行計算，就能夠算出粒子的粒徑大小，但此處所計算出的粒徑大小並非單一顆奈米粒子之粒徑，而是平均值，此原因是由於樣品的尺寸都非常的小，難以一個一個分離出來，因此樣品通常都是分散在溶液裡。此方法不僅能夠量測粒徑之大小，有些機型甚至能夠測量奈米粒子之介面電位 (Zeta potential)，由於奈米粒子表面帶有電荷的原因，因此會進行布朗運動，為了瞭解奈米粒子之行為就必須量測其介面電位，如此便能了解粒子與粒子間之作用。但此方法一樣受限於儀器價格較為昂貴之問題，且其儀器所量測之奈米粒子粒徑為平均值，無法如穿透式電子顯微鏡量測出一顆奈米粒子之真實粒徑大小。另外一種方式，是藉由感應耦合電漿串聯質譜儀來偵測不同元素

	優點	缺點
紫外/可見光分光光譜儀	儀器操作簡單、偵測所需時間短	偵測極限差、測得為平均粒徑
感應耦合電漿質譜儀	偵測極限低、可同時偵測多種元素	儀器價格高
穿透式電子顯微鏡	精準得知粒徑大小、能觀測粒子之形貌	無法達到高通量、儀器價格昂貴
雷射粒徑分析儀	能測量奈米粒子介面電位	儀器價格昂貴、測得為平均粒徑
物鏡式暗視野結合毛細管電泳	高靈敏度、所需樣品量少	無法測其精準粒徑

表 1-1 比較不同方法偵測奈米粒子之優缺點

之奈米粒子大小，其方法是由於懸浮在霧化液滴中的顆粒，被導入至進樣口時，液滴會被脫溶，其分析物會被原子化和離子化後進如質譜儀中，能透過質荷比(m/z)進行分離。此方法有一重要的調控因素是取樣時間，若取樣時間不正確則可能會擷取到一個不完整的顆粒訊號，此方法之好處是有好的偵測極限，但缺點為儀器十分昂貴，且質譜儀之使用也須在高度真空之環境。

1.2.4 雷利散射應用於生物檢測及影像

雷利光散射具有高選擇性以及高靈敏度，當其應用在生物晶片或其他生物分析和檢測上，由於生物分子不需要進行螢光標記 (labeling)，因此雷利散射具備快速、即時 (real time)、不需事先標定生物分子 (label-free)、高靈敏度 (high sensitivity)、定性 (qualitative)、定量 (quantitative) 以及可大量平行篩選 (high throughput screening) 等優點，成為具發展潛力的一種偵測方法。

當可見光照射到金奈米粒子時，受粒子的形狀及大小不同影響，會和特定波長產生局部表面電漿共振，使得雷利散射強度增強。由於雷利散射是藉由入射光共振而發光不會因為時間而減弱，所以可以長時間觀察金奈米粒子之運動，但前提是金奈米粒子必須足夠穩定，在進行可見光照射實驗後不會因為不穩定造成聚集，而影響實驗的再現

性。近年來已有許多文獻利用增強雷利散射偵測各種生物分子。Mirkin 等人將探針 (probe) DNA 固定於基板上，當目標 (target) DNA 存在時，修飾上互補之 probe DNA 金奈米粒子固定於基板表面，再利用銀放大試劑將銀沉積於金奈米粒子表面以增強散射訊號^[128]。Sang 等人在金奈米粒子表面修飾 SH-(OEG)₆-COOH 與抗體形成醯胺鍵，當特定抗原接上金奈米粒子時，再利用暗視野顯微鏡可觀察到雷利散射增強^[129]。

由於金奈米粒子雷利散射靈敏度比螢光高，又具有較高的再現性且可重複使用等優點，相信在未來可以應用於基因學、免疫學、臨床診斷等研究。

1.2.5 暗視野顯微鏡之構造

暗視野顯微鏡主要是在普通光學顯微鏡的基礎結構上改造而成，利用一個折射聚光鏡 (condenser lens) 及一個擋光片 (field stop) 所組成。擋光片將直射光 (zero-order light) 擋住，只允許未聚焦的散射光由周圍空隙通過，再經由聚光鏡將光柱聚焦於一點並投射在樣品上。進光量與物鏡之數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 成正比，物鏡數值孔徑愈大表示可通過光量愈大。在暗視野顯微鏡中，通常使用的物鏡數值孔徑略小於聚光鏡，因此將樣品置於觀測平台時，物鏡所產生

空心光錐入射至樣品上，利用物鏡收集物體所產生之光線散射，最後以目鏡進行觀測。當無任何樣品置於觀測平台時，其空心光錐聚焦後發散，由於物鏡孔徑數值小於聚光鏡，使得空心光錐無法被物鏡所收集，產生深暗背景。暗視野顯微鏡主要利用樣品邊緣輪廓所產生之散射光且背景視野暗黑，與樣品產生較高對比以利於觀測。因此暗視野顯微鏡常用於觀測未染色或金屬奈米粒子等樣品。除了此傳統暗視野成像方法之外，Brown 等人利用偏振技術，只偵測物體其邊緣所反射的散射光，原理與傳統暗視野顯微鏡相同^[130]。而 Yao 等人使用 Axicon 透鏡取代擋光片，保留大部分的光源亮度，藉此得到較高訊號雜訊比 (Signal to Noise Ratio, S/N)，以增強粒子散射光^[131, 132]；亦有學者利用拋物線形狀之反射面作為聚光鏡，獲得較高的孔徑數值及消除因折射光產生的像差現象^[133]。

1.2.6 金屬奈米粒子 (metal nanoparticles) 的製備

金屬奈米粒子的製備分為三種方法，第一種為雷射消融法 (laser ablation method)，第二種為金屬氣相合成法 (metal vapor synthesis method)，第三種為本實驗所使用的化學還原法 (chemical reduction method)。藉由控制反應的試劑及條件，即可合成出不同大小及形狀的奈米粒子，例如奈米球、奈米棒及奈米立方。

雷射消熔法，將雷射聚焦並射入含有金屬塊材的溶液中，利用雷射光的高能量對金屬產生消熔，溶液所處環境為低溫且作為穩定劑，有助於金屬奈米粒子均勻分散於溶液中，避免進一步發生融合^[134]。

金屬氣相合成法，因為氣態的金屬原子本身容易形成聚集，藉由惰性氣體將金屬原子導入低溫之環境，使其在奈米尺度內成核長晶，並可藉惰性氣體的壓力及溫度來控制金屬奈米粒子的粒徑大小^[135]。

利用還原劑或電化學系統，將溶液中各種氧化態的金屬離子，在自由空間（free space）或侷限空間（confined space）中還原成零價金屬，並控制反應及還原劑之條件，例如試劑濃度、pH值及反應的溫度，合成出不同大小及形狀的金屬奈米粒子，此方法被稱為化學還原法。

本實驗使用化學還原法合成金奈米粒子，利用還原劑檸檬酸鈉將含有金離子的溶液還原成大小約為13 nm及32 nm的金奈米粒子，反應過程中檸檬酸鈉也作為保護劑，使金奈米粒子間不會發生聚集，保持金奈米粒子的穩定狀態，均勻分散於溶液中。

1.2.7 金奈米粒子（gold nanoparticles）的應用

由於金奈米粒子有許多特殊的光學性質、分子識別性質，與良好的生物相容性，因此被廣泛地運用在各個領域。金奈米粒子也運用在環境檢測方面，近年來的研究指出，汞為一種廣為人知的污染物，在

自然環境中，微生物能將浮於水面上的汞轉換為甲基汞，而水中之魚類又以微生物為食，進而造成了甲基汞侵入食物鏈中，且甲基汞進入生物體後能造成其神經受損，進入人體後會造成汞中毒^[136]。因此有研究利用金奈米粒子作為汞離子之偵測器，在其表面接上許多的DNA，利用 T-Hg-T 的原理^[137]，會使得金奈米粒子產生聚集，並能夠從金奈米聚集程度之不同，隨著汞離子濃度提高，金奈米之顏色會愈趨深藍色，藉由此顏色變化並能夠偵測汞離子之濃度。除此之外，金奈米更能夠應用在增強免疫傳感(Immuno-Sensing)之技術上，在過去的研究中，他們將金奈米粒子標幟在抗原上以進行檢測^[138]，並利用抗體抗原之反應來進行特定分子之測定。金奈米粒子除了在小分子及環境檢測上被大量使用外，也能夠被用為反應中的催化劑，在 1970 年代時，Parravano 的研究團隊就已發現，金在氫/氧轉移反應中活性的研究^[139]。

1.3 參考資料

1. Kohlrausch F: *Ann Phys Chem* 1897, **62**:209.
2. Michaelis L: **Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **17**:231.
3. Tiselius A: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J* 1937, **31**(9):1464-1477.
4. Hjerten S: **Free zone electrophoresis.** *Chromatogr Rev* 1967, **9**(2):122-219.
5. Virtanen R: *Acta Polytechnica Scand* 1974, **123**:1.
6. Jorgenson JW, Lukacs KD: **High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis.** *J Chromatogr* 1981, **218**(1-3):209-216.
7. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries.** *Anal Chem* 1981, **53**(8):1298-1302.
8. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**(4621):266-272.
9. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives.** *Journal of Chromatography* 1991, **542**(2):459-471.
10. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives.** *J Chromatogr* 1991, **542**(2):459-471.
11. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.
12. Smith RD, Fields SM, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR, Edmonds CG: **Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins.** *Electrophoresis* 1990, **11**(9):709-717.
13. Cohen AS, Karger BL: **High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1987, **397**:409-417.
14. Freeman HC, Guss JM, Kumar V, McIntire WS, Zubak VM: **Purification, crystallization and preliminary X-ray crystal structure analysis of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 1996, **52**(Pt 1):197-198.
15. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromatogr* 1989,

- 465(2):331-343.
16. Jacobson SC, Ramsey JM: **Microchip electrophoresis with sample stacking.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):481-486.
 17. Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ: **Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):271-276.
 18. Hutt LD, Glavin DP, Bada JL, Mathies RA: **Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration.** *Anal Chem* 1999, **71**(18):4000-4006.
 19. Zhang N, Yeung ES: **On-line coupling of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for automatic DNA typing and HIV-1 diagnosis.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998, **714**(1):3-11.
 20. de Gennes JL, Truffert J, Dairou F: **[Contribution of lipoprotein electrophoresis in polyacrylamide gel in the study of idiopathic hyperlipidemias].** *Ann Med Interne (Paris)* 1977, **128**(8-9):677-680.
 21. Zhu M, Hansen DL, Burd S, Gannon F: *J Chromatogr* 1989, **480**.
 22. Chin AM, Colburn JC: **Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis.** *American Biotechnology Laboratory* 1989, **7**(10A):16-16.
 23. Chang HT, Yeung ES: **Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995, **669**(1):113-123.
 24. Lu XD, Yeung ES: **Optimization of excitation and detection geometry for multiplexed capillary array electrophoresis of DNA fragments.** *Applied Spectroscopy* 1995, **49**(5):605-609.
 25. Chiari M, Nesi M, Roncada P, Righetti PG: **Preparative isoelectric focusing in multicompartement electrolyzers: novel, hydrolytically stable and hydrophilic isoelectric membranes.** *Electrophoresis* 1994, **15**(7):953-959.
 26. Carrilho E, Ruiz-Martinez MC, Berka J, Smirnov I, Goetzinger W, Miller AW, Brady D, Karger BL: **Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions.** *Anal Chem* 1996, **68**(19):3305-3313.
 27. Kleemiss MH, Gilges M, Schomburg G: **Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(5-6):515-522.
 28. Strege M, Lagu A: **Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries.** *Anal Chem* 1991, **63**(13):1233-1236.

29. Grossman PD, Soane DS: **Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):257-266.
30. Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tsuchiko M: **High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions.** *J Chromatogr A* 1993, **653**(2):329-335.
31. Chrambach A, Aldroubi A: **Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1-2):18-22.
32. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
33. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
34. Dolnik V, Novotny MV: **Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 1993, **65**(5):563-567.
35. Chang PL, Lee KH, Hu CC, Chang HT: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electro-chemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
36. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Analytical biochemistry* 1989, **179**(2):404-412.
37. Honda S, Suzuki K, Kakehi K: **Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis.** *Analytical biochemistry* 1989, **177**(1):62-66.
38. Xu XH, Yeung ES: **Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution.** *Science* 1997, **275**(5303):1106-1109.
39. Xu XH, Yeung ES: **Long-range electrostatic trapping of single-protein molecules at a liquid-solid interface.** *Science* 1998, **281**(5383):1650-1653.
40. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.** 1993.
41. Colyar CL, Tang T, CHien N, Harrison DJ: *Electrophoresis* 1997, **18**:1733.
42. Hjerten S: **High-Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption.** *J Chromatogr* 1985, **347**(2):191-198.
43. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *J Capillary Electrop* 1995, **2**(4):191-196.
44. Chen HS, Chang HT: **Capillary electrophoretic separation of 1 to 10 kbp sized dsDNA using poly(ethylene oxide) solutions in the presence of electroosmotic counterflow.** *Electrophoresis* 1998, **19**(18):3149-3153.

45. Chen HS, Chang HT: **Electrophoretic separation of small DNA fragments in the presence of electroosmotic flow using poly(ethylene oxide) solutions.** *Anal Chem* 1999, **71**(10):2033-2036.
46. Horvath J, Dolnik V: **Polymer wall coatings for capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):644-655.
47. Bean SR, Lookhart GL: **Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries.** *Journal of agricultural and food chemistry* 1999, **47**(10):4246-4255.
48. Tseng WL, Hsieh MM, Wang SJ, Huang CC, Lin YC, Chang PL, Chang HT: **Analysis of large-volume DNA markers and polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis in the presence of electroosmotic flow.** *J Chromatogr A* 2001, **927**(1-2):179-190.
49. Olivera BM, Baine P, Davidson N: **Electrophoresis of the nucleic acids.** *Biopolymers* 1964, **2**:245.
50. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
51. De Gennes PG: **Scaling concepts in polymer physics.** Ithaca, New York: Cornell University Press; 1979.
52. Ogston AG: **The spaces in a uniform random suspension of fibres.** *TRANSACTIONS OF THE FARADAY SOCIETY* 1958, **54**:1754.
53. De Gennes PG: *J Chem Phys* 1971, **55**:572.
54. Chang HT, Yeung ES: *Anal Chem* 1993, **65**:650-652.
55. Sebastiano R, Mendieta ME, Antonioli P, Bossi A, Righetti PG, Citterio A: **Organic and inorganic di-cations for capillary silica coating and EOF modulation in CE: Example of application in PEG analysis.** *Electrophoresis* 2006, **27**(8):1495-1501.
56. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen PEM: *J Chromatogr A* 1979, **169**:11-20.
57. Chien RL, Helmer JC: **Electroosmotic properties and peak broadening in field-amplified capillary electrophoresis.** *Anal Chem* 1991, **63**:1354-1361.
58. Burgi DS, Chien RL: **Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis.** *Anal Chem* 1991, **63**:2042-2047.
59. Burgi DS, Chien RL: **Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis.** *Analytical biochemistry* 1992, **202**(2):306-309.
60. Tseng WL, Hsieh MM, Wang SJ, Chang HT: **Effect of ionic strength, pH and polymer concentration on the separation of DNA fragments in the presence**

- of electroosmotic flow. *J Chromatogr A* 2000, **894**(1-2):219-230.**
61. Chang H-T, Chen H-S, Hsieh M-M, Tseng W-L: **Electrophoretic separation of DNA in the presence of electroosmotic flow.** *Reviews in Analytical Chemistry* 2000, **19**(1):45-74.
 62. Zhang T, Fang Q, Wang SL, Qin LF, Wang P, Wu ZY, Fang ZL: **Enhancement of signal-to-noise level by synchronized dual wavelength modulation for light emitting diode fluorimetry in a liquid-core-waveguide microfluidic capillary electrophoresis system.** *Talanta* 2005, **68**(1):19-24.
 63. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **721**(1):109-125.
 64. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994, **657**(2):265-269.
 65. Caslavská J, Gassmann E, Thormann W: **Modification of a tunable UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds.** *J Chromatogr A* 1995, **709**(1):147-156.
 66. Fister JC, Jacobson SC, Davis LM, Ramsey JM: **Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices.** *Anal Chem* 1998, **70**(3):431-437.
 67. Kang SH, Yeung ES: **Dynamics of single-protein molecules at a liquid/solid interface: implications in capillary electrophoresis and chromatography.** *Anal Chem* 2002, **74**(24):6334-6339.
 68. Lee IH, Pinto D, Arriaga EA, Zhang Z, Dovichi NJ: **Picomolar analysis of proteins using electrophoretically mediated microanalysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Anal Chem* 1998, **70**(21):4546-4548.
 69. Coble PG, Timperman AT: **Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor.** *J Chromatogr A* 1998, **829**(1-2):309-315.
 70. Harvey MD, Bandilla D, Banks PR: **Subnanomolar detection limit for sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis using a fluorogenic, noncovalent dye.** *Electrophoresis* 1998, **19**(12):2169-2174.
 71. Moody ED, Viskari PJ, Colyer CL: **Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*

- 1999, **729**(1-2):55-64.
72. Kelly JF, Locke SJ, Ramaley L, Thibault P: **Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 1996, **720**(1-2):409-427.
73. Kuo IT, Chiu TC, Chang HT: **On-column concentration and separation of double-stranded DNA by gradient capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2003, **24**(19-20):3339-3347.
74. Chen DY, Swerdlow HP, Harke HR, Zhang JZ, Dovichi NJ: **Low-cost, high-sensitivity laser-induced fluorescence detection for DNA sequencing by capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):237-246.
75. Siles BA, O'Neil KA, Tung DL, Bazar L, Collier GB, Lovelace CI: **The use of dynamic size-sieving capillary electrophoresis and mismatch repair enzymes for mutant DNA analysis.** *J Capillary Electrop* 1998, **5**(1-2):51-58.
76. Miscicka-Sliwka D, Grzybowski T, Wozniak M: **Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci.** *Electrophoresis* 1997, **18**(9):1627-1632.
77. Marino MA, Devaney JM, Davis PA, Girard JE: **Optimization of intercalation dye concentration for short tandem repeat allele genotyping using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **732**(2):365-374.
78. Day IN, Spanakis E, Chen X, O'Dell SD: **Microplate array diagonal gel electrophoresis for mutation research in DNA banks.** *Electrophoresis* 1999, **20**(6):1250-1257.
79. Stojkovic M, Uda NR, Brodmann P, Popovic M, Hauser PC: **Determination of PCR products by CE with contactless conductivity detection.** *Journal of separation science* 2012, **35**(24):3509-3513.
80. Choi JY, Kim YT, Ahn J, Kim KS, Gweon DG, Seo TS: **Integrated allele-specific polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for single nucleotide polymorphism genotyping.** *Biosensors & bioelectronics* 2012, **35**(1):327-334.
81. Chen HC, Chang YS, Chen SJ, Chang PL: **Determination of the heterogeneity of DNA methylation by combined bisulfite restriction analysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2012, **1230**:123-129.
82. Ranade SS, Chung CB, Zon G, Boyd VL: **Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and quality control for massively**

- parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection.** *Analytical biochemistry* 2009, **390**(2):126-135.
83. Thormann W, Minger A, Molteni S, Caslavská J, Gebauer P: **Determination of substituted purines in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection.** *J Chromatogr* 1992, **593**(1-2):275-288.
84. Prochazkova A, Krivankova L, Bocek P: **Quantitative trace analysis of L-ascorbic acid in human body fluids by on-line combination of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis.** *Electrophoresis* 1998, **19**(2):300-304.
85. Tim RC, Kautz RA, Karger BL: **Ultratrace analysis of drugs in biological fluids using affinity probe capillary electrophoresis: analysis of dorzolamide with fluorescently labeled carbonic anhydrase.** *Electrophoresis* 2000, **21**(1):220-226.
86. Tseng HM, Li Y, Barrett DA: **Profiling of amine metabolites in human biofluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **388**(2):433-439.
87. Kitagishi K, Shintani H: **Analysis of compounds containing carboxyl groups in biological fluids by capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1998, **717**(1-2):327-339.
88. Michalke B, Schramel P: **Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing-inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation.** *J Chromatogr A* 1998, **807**(1):71-80.
89. Jumppanen J, Siren H, Riekkola ML: **Screening for diuretics in urine and blood serum by capillary zone electrophoresis.** *J Chromatogr A* 1993, **652**(2):441-450.
90. Sun H, Li L, Wu Y: **Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for simultaneous determination of proline and fleroxacin in human urine.** *Drug Test Anal* 2009, **1**(2):87-92.
91. Takahama K, Seo Y, Tomono S, Yukawa N: **Capillary tube isotachopheresis of proteins in early postmortem serum, cerebrospinal fluid and pericardial fluid.** *Nihon Hoigaku Zasshi* 1989, **43**(3):246-250.
92. Petersen JR, Okorodudu AO, Mohammad A, Payne DA: **Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory.** *Clin Chim Acta* 2003, **330**(1-2):1-30.
93. Rada P, Tucci S, Teneud L, Paez X, Perez J, Alba G, Garcia Y, Sacchettoni S, del Corral J, Hernandez L: **Monitoring gamma-aminobutyric acid in human**

- brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **735**(1):1-10.
94. Zunic GD, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z: **Capillary electrophoresis of free amino acids in physiological fluids without derivatization employing direct or indirect absorbance detection.** *Methods Mol Biol* 2012, **828**:243-254.
 95. Strieglerova L, Kuban P, Bocek P: **Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection.** *J Chromatogr A* 2011, **1218**(37):6248-6255.
 96. Buchberger W, Winna K, Turner M: **Applications of capillary zone electrophoresis in clinical chemistry. Determination of low-molecular-mass ions in body fluids.** *J Chromatogr A* 1994, **671**(1-2):375-382.
 97. Timerbaev AR: **Inorganic analysis of biological fluids using capillary electrophoresis.** *J Sep Sci* 2008, **31**(11):2012-2021.
 98. Galli V, Garcia A, Saavedra L, Barbas C: **Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples.** *Electrophoresis* 2003, **24**(12-13):1951-1981.
 99. Singh AK, Makker SP: **A rapid tube ELISA for human IgG in body fluids using Staphylococcus aureus.** *Clin Chim Acta* 1983, **129**(3):271-277.
 100. Homsy J, Thomson-Honnebier GA, Cheng-Mayer C, Levy JA: **Detection of human immunodeficiency virus (HIV) in serum and body fluids by sequential competition ELISA.** *J Virol Methods* 1988, **19**(1):43-56.
 101. Lauwers S, Vander Heyden Y, Rombaut B: **Screening of an enterovirus specific RT-PCR ELISA method for the quantification of enterovirus genomes in human body fluids by means of a three-level experimental design.** *J Pharm Biomed Anal* 2001, **25**(1):131-142.
 102. Terai I, Kobayashi K, Fujita T, Hagiwara K: **Human serum mannose binding protein (MBP): development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and determination of levels in serum from 1085 normal Japanese and in some body fluids.** *Biochem Med Metab Biol* 1993, **50**(1):111-119.
 103. Albrechtsen M, Bock E: **Quantification of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human body fluids by means of ELISA employing a monoclonal antibody.** *J Neuroimmunol* 1985, **8**(4-6):301-309.
 104. Vinnars E, Bergstrom J, Furst P: **Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue.** *Ann Surg* 1975, **182**(6):665-671.
 105. Roth E, Muhlbacher F, Karner J, Hamilton G, Funovics J: **Free amino acid**

- levels in muscle and liver of a patient with glucagonoma syndrome. *Metabolism: clinical and experimental* 1987, **36**(1):7-13.**
106. Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP, Sherlock S: **Plasma amino-acid patterns in liver disease.** *Gut* 1982, **23**(5):362-370.
107. Montanari A, Simoni I, Vallisa D, Trifiro A, Colla R, Abbiati R, Borghi L, Novarini A: **Free amino acids in plasma and skeletal muscle of patients with liver cirrhosis.** *Hepatology* 1988, **8**(5):1034-1039.
108. Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzigmann H, Thiery J, Fiedler GM: **Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer.** *Metabolomics* 2012, **8**(4):643-653.
109. Kao YY, Liu KT, Huang MF, Chiu TC, Chang HT: **Analysis of amino acids and biogenic amines in breast cancer cells by capillary electrophoresis using polymer solutions containing sodium dodecyl sulfate.** *J Chromatogr A* 2010, **1217**(4):582-587.
110. Cheng PN, Leung YC, Lo WH, Tsui SM, Lam KC: **Remission of hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma.** *Cancer Lett* 2005, **224**(1):67-80.
111. Nakamura Y, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Harada K, Ota S, Hirata K: **Cluster analysis of indicators of liver functional and preoperative low branched-chain amino acid tyrosine ration indicate a high risk of early recurrence in analysis of 165 hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy.** *Surgery* 2011, **150**(2):250-262.
112. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Harada K, Kukita K, Hirata K: **Prognostic impact of preoperative the branched-chain amino acid to the tyrosine ratio in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy.** *J Gastrointest Surg* 2011, **15**(8):1433-1439.
113. Deng YH, Wang H, Zhang HS: **Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *J Sep Sci* 2008, **31**(16-17):3088-3097.
114. Mori M, Yamamoto T, Kaseda M, Yamada S, Itabashi H: **Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012, **887-888**:1-7.
115. von Helmolt R, Wecker J, Holzapfel B, Schultz L, Samwer K: **Giant negative**

- magnetoresistance in perovskitelike La₂/3Ba₁/3MnO_x ferromagnetic films.** *Phys Rev Lett* 1993, **71**(14):2331-2333.
116. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ: **A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials.** *Nature* 1996, **382**(6592):607-609.
 117. Biella S, Rossi M: **Gas phase oxidation of alcohols to aldehydes or ketones catalysed by supported gold.** *Chemical communications* 2003(3):378-379.
 118. Ph. Buffat J-PB: **Size effect on the melting temperature of gold particles.** *PHYSICAL REVIEW A* 1976, **13**:2287-2298.
 119. Wang Z, Ma L: **Gold nanoparticle probes.** *Coord Chem Rev* 2009, **253**:1607-1618.
 120. Villiers MB, Cortes S, Brakha C, Marche P, Roget A, Livache T: **Polypyrrole-peptide microarray for biomolecular interaction analysis by SPR imaging.** *Methods in molecular biology* 2009, **570**:317-328.
 121. Faulk WP, Taylor GM: **An immunocolloid method for the electron microscope.** *Immunochemistry* 1971, **8**(11):1081-1083.
 122. Liu Y, Liu Y, Mernaugh RL, Zeng X: **Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay.** *Biosensors & bioelectronics* 2009, **24**(9):2853-2857.
 123. Harpster MH, Zhang H, Sankara-Warrier AK, Ray BH, Ward TR, Kollmar JP, Carron KT, Meham JO, Corcoran RC, Wilson WC *et al*: **SERS detection of indirect viral DNA capture using colloidal gold and methylene blue as a Raman label.** *Biosensors & bioelectronics* 2009, **25**(4):674-681.
 124. Zhang D, Carr DJ, Alocilja EC: **Fluorescent bio-barcode DNA assay for the detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis.** *Biosensors & bioelectronics* 2009, **24**(5):1377-1381.
 125. Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, Hagenow S, Mehta H, Lucas A, Garimella V, Patno T, Buckingham W, Cork W *et al*: **Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system.** *Biosensors & bioelectronics* 2004, **19**(8):875-883.
 126. Wang Z, Lee J, Cossins AR, Brust M: **Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes.** *Anal Chem* 2005, **77**(17):5770-5774.
 127. Yguerabide J, Yguerabide EE: **Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications.** *Anal Bioanal Chem* 1998, **262**:157-176.
 128. Thaxton CS, Hill HD, Georganopoulou DG, Stoeva SI, Mirkin CA: **A bio-bar-**

- code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release. *Anal Chem* 2005, **77**(24):8174-8178.**
129. Cao C, Sim SJ: **Resonant Rayleigh light scattering response of individual Au nanoparticles to antigen-antibody interaction.** *Lab on a chip* 2009, **9**(13):1836-1839.
130. Biss DP, Youngworth KS, Brown TG: **Dark-field imaging with cylindrical-vector beams.** *Appl Opt* 2006, **45**(3):470-479.
131. Noda N, Kamimura S: **A new microscope optics for laser dark-field illumination applied to high precision two dimensional measurement of specimen displacement.** *Rev Sci Instrum* 2008, **79**(2 Pt 1):023704.
132. Lei M, Yao B: **Multifunctional darkfield microscopy using an axicon.** *J Biomed Opt* 2008, **13**(4):044024.
133. Debus C, Lieb MA, Drechsler A, Meixner AJ: **Probing highly confined optical fields in the focal region of a high NA parabolic mirror with subwavelength spatial resolution.** *J Microsc* 2003, **210**(Pt 3):203-208.
134. Mafuné F, Kohno J-y, Takeda Y, * TK: **Formation of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution of Surfactant.** *J Phys Chem B* 2001, **105**:5114-5220.
135. Ponce AA, Klabunde KJ: **Chemical and catalytic activity of copper nanoparticles prepared via metal vapor synthesis.** *Journal of Molecular Catalysis A* 2005, **225**:1-6.
136. Lee JS, Han MS, Mirkin CA: **Colorimetric detection of mercuric ion (Hg²⁺) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, **46**(22):4093-4096.
137. Tanaka Y, Oda S, Yamaguchi H, Kondo Y, Kojima C, Ono A: **15N-15N J-coupling across Hg(II): direct observation of Hg(II)-mediated T-T base pairs in a DNA duplex.** *J Am Chem Soc* 2007, **129**(2):244-245.
138. Zhang C, Zhang Z, Yu B, Shi J, Zhang X: **Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Anal Chem* 2002, **74**(1):96-99.
139. Daniel MC, Astruc D: **Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology.** *Chem Rev* 2004, **104**(1):293-346.

第二章 以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳偵測金奈米粒子

2.1 緒論

近年來由於奈米粒子的蓬勃發展，許多的應用也因應而生，在研究方面如金奈米粒子能夠增強表面增顯拉曼^[1]，或是運用硫金鍵結來修飾金奈米表面以做為生物標識物^[2]，也有運用金奈米粒子其靈敏的特性來作為偵測汞離子之感測器^[3]，近年來更是廣泛運用來做為生物感測器^[4,5]、胺基酸分析及生物晶片^[6,7]，能夠利用金奈米之聚集程度來辨別 DNA 甲基化程度等其他應用^[8]。而在生活應用方面，也有許多標榜使用奈米科技之產品，如奈米衣料、奈米襪、奈米化妝品、奈米塗料等應用，由此我們可以知道奈米科技的應用已經十分的廣泛且普及，但隨著奈米科技的發展，我們需要更進一步的探討，奈米粒子對環境的影響，以及對人體或生物體是否會產生危害。

最近有許多研究報告指出，當一般無害物質其尺寸縮減至奈米等級時，會產生一系列不同的物理、化學變化，且也有可能產生細胞毒性。在一般情況下，奈米粒子進入人體的途徑有四種：吸入、吞嚥、經由皮膚吸收或是醫療過程注入體內，進入人體後，奈米粒子的大小及形狀皆會影響周圍組織的相互作用活動性，它們可

能會引起巨噬細胞的過載，引發出許多防禦性的發燒或甚至降低了自體免疫力，且在器官中它們無法降解或其速度十分緩慢，會持續堆積於器官中，進而影響了各器官的功能，因此現階段許多科學家，致力於研發偵測不同奈米粒子之偵測方式，甚至希望能訂定奈米粒子對環境危害的標準。所以開發不同的方法來偵測奈米粒子的課題也為十分重要，在過去用來偵測奈米粒子之方法，多為使用放射性同位素或利用吸收光譜來進行奈米粒子^[9]之檢測。而近年來也有研究運用感應耦合電漿串連質譜儀^[10]來進行檢測，但不同之方法都有各自之優缺點，如放射性同位素，其優點為專一性高，不容易與其他物質產生干擾，但其缺點為所產生之放射線有可能對環境產生污染。而吸收光譜儀之優點為操作簡便，且能夠透過不同之吸收值來確定不同大小奈米粒子，缺點為偵測極限較差，無法偵測到低濃度之金奈米粒子。感應耦合電漿串連質譜儀則是在偵測極限上有好的表現，且也有較寬的線性範圍，缺點為儀器的價格十分昂貴。另外也還有利用雷射粒徑分析儀 (Particle size distribution analyzer) 來偵測奈米粒子，其原理利用光在行進中遇到不同大小之奈米粒子，所產生之偏離之散射光角度不同，經由軟體計算後，能獲得其樣品中之平均粒徑，並可藉由此機器測出奈米粒子之介面電位，但其缺點為無法量測出精確的奈米粒子顆粒大小，且儀器之價格也是較為

昂貴。想偵測更準確的奈米粒子大小可以藉由穿透式電子顯微鏡來獲得其數據，其原理藉由電子束打至試片上，再經放大而成像，所以能夠經由影像中清楚的計算出精確的奈米粒子顆粒大小，但缺點也是儀器價格十分昂貴。因此學生希望能開發出一套操作簡便，且具有高偵測極限之系統，並可藉由此系統分離出不同大小之金奈米粒子。

學生實驗部分是利用金奈米粒子之光學特性，當可見光照射到金奈米粒子時，受粒子的形狀及大小不同之影響，而產生不同之雷利散射光強度，並利用方形毛細管採用物鏡式暗視野之方式，來有效降低背景散射光，並可成功偵測到金奈米粒子之訊號，且其偵測極限利用樣品堆積可達到 10 pM，且所需之樣品極少，分離所需時間也僅需 5 分鐘，即可偵測到金奈米粒子之訊號。

2.2 實驗部分

2.2.1 實驗試藥

四氯金酸鈉 (sodium tetrachloroaurate (III) dihydrate)、PEO (poly(ethylene oxide), M_{ave} 4,000,000 Da) 係向美國 Alfa - Aesar 購買。檸檬酸鈉 (sodium citrate tribasic)、3-硫醇丙酸 (3-mercaptopropionic acid MPA)、三羥甲基氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, tris)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 係向美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 購買。氨基乙酸 (glycine)、係向美國 J.T.Baker 購買。十二烷基硫酸鈉 (Sodium Dodecyl Sulfate) 係向美國 UniRegion Bio-Tech 購買。

2.2.2 毛細管電泳結合散射光學儀器裝置圖

最初始的儀器裝置首先要克服的問題是如何將方形毛細管建置在 2 維移動平台上，以往的方式是裝入鐵氟龍管中固定，但如果依照此方法，學生將無法確認聚焦後的光點能否打在方形毛細管的表面，且在更換毛細管時也要以方便校光為前提。學生經過思考後想出可以將方形毛細管使用 AB 膠黏於玻片上，並將中間接觸到偵測視窗之玻片切除，此步驟能避免毛細管與玻片間產生的散射光，如此不僅可固

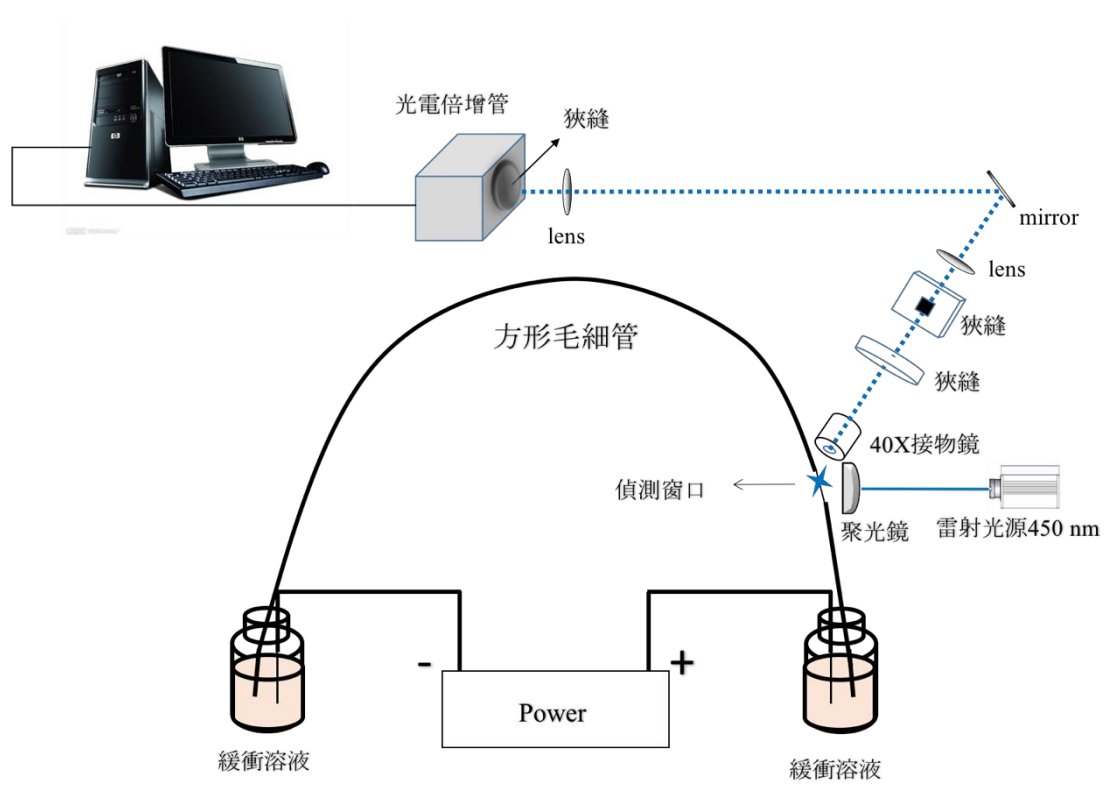


圖 2-1 初始儀器裝置圖

定方形毛細管的平面與光源垂直，來減少散射光的產生，接著是收光裝置的架設，最一開始的方式是使用垂直收光如圖 2-1 但此一方法無法有效降低背景值，且雜訊也較多，導致金奈米的訊號不明顯。因此改為以物鏡式暗視野的方式來收集訊號，如圖 2-2，利用此裝置能有效的降低背景，所以最後學生選擇以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳偵測金奈米粒子。

此系統整合不同元件所組裝之儀器裝置，如圖 2-2 所示，此為自組裝之儀器架構，進行毛細管電泳之高電壓電源供應器購自 Gamma High Voltage Research 公司(Ormond, FL, USA)，電壓範圍 0~20 kV。裝置所使用之激發波長為 445 nm 的固態雷射作為激發光源，功率為 10 mW，本實驗所使用之毛細管為內徑 45 微米的方形毛細管，接著通過一聚焦鏡（ $F = 25 \text{ cm}$ ）將光束集中後再進入 $20\times$ 高數值接物鏡（numerical aperture = 0.75），利用物鏡式暗視野之方式收光後再使用一個小的反射鏡呈 45 度角將金奈米粒子之散射光反射到後方。接著經過一擋板先過濾大部分的散射光干擾，之後再經過一直徑約 0.5 公分之針孔，過濾純化金奈米粒子散射光，接著將奈米粒子之散射光經過一反射鏡上，此一目的是由於實驗空間之受限，再將散射光通過一聚焦鏡（ $F = 15 \text{ cm}$ ），並通過一針孔直徑為 1000 微米之孔洞後進入光電倍增管，訊號經光電倍增管放大後，經由 10Ω 的電阻將產生的

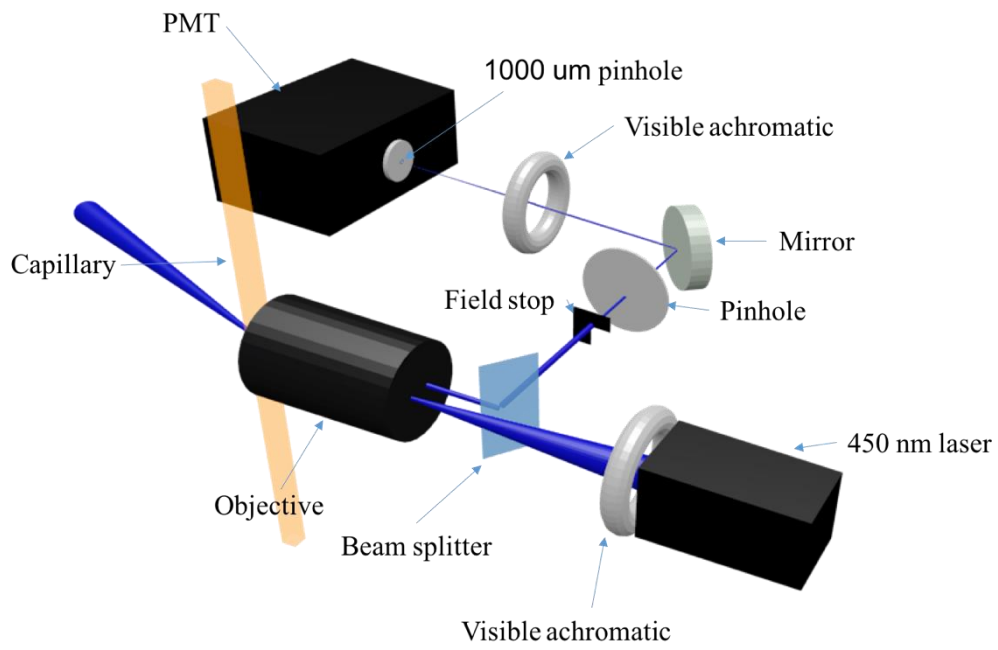


圖 2-2 以散射光學為基礎結合毛細管電泳之儀器裝置圖

電流訊號轉換成電壓訊號，並由 24-bit 數位類比轉換器(A/D converter, JMBS Development) 以 10 Hz 的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中。最後運用層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將訊號轉換成電泳圖。本實驗是在一密閉的黑箱裡進行以避免環境光源的干擾。

2.2.3 金奈米粒子及銀奈米粒子之製備

本實驗是使用化學還原法來合成金奈米粒子，利用還原劑 sodium citrate tribasic 將 AuCl_4^- 溶液中的三價金離子還原成零價的原子態^[11]。製備 32 nm 金奈米粒子首先須在圓底燒瓶中加入 249.75 mL 去離子水，再加入 250 μL AuCl_4^- (0.25 mM)，加熱迴流至完全沸騰。接著加入 2.5 mL 還原劑 sodium citrate tribasic (0.85 mM)，等溶液變紫色開始計時 8 分鐘，移開加熱器後用冰塊降溫，即完成製備。此時溶液顏色為紫色，在 528 nm 有最大吸收峰。而本實驗合成 13 nm 金奈米粒子，其製備方法大致與 32 nm 金奈米粒子相同，只改變 AuCl_4^- 及還原劑的濃度，製備步驟為在圓底燒瓶中加入 249 mL 去離子水，再加入 1 mL AuCl_4^- (1 mM) 加熱迴流至沸騰，接著加入 5 mL 的 sodium citrate tribasic (3.88 mM)，待溶液完全變黑色開始計時十五分鐘，其餘步驟與製備 32 nm 金奈米粒子相同，此

合成完之溶液為酒紅色，在 518 nm 有最大吸收峰，而本實驗合成 56 nm 金奈米粒子，其製備方法大致與 13 與 32 nm 金奈米粒子相同，也是藉由改變 AuCl_4^- 及還原劑的濃度，製備步驟為在圓底燒瓶中加入 99.882 mL 去離子水，再加入 117.6 μL AuCl_4^- (0.294 mM) 加熱迴流至沸騰，接著加入 600 μL 的 sodium citrate tribasic (0.204 mM)，待溶液完全變黑色開始計時八分鐘，其餘步驟與製備 32 nm 金奈米粒子相同，此時溶液為紫褐色，在 533 nm 有最大吸收波長，學生所合成完後的金奈米粒子，皆有去測其吸收值，先初步藉由最大吸收值來判定合成的金奈米粒子粒徑分布是否符合預期^[9]，如圖 2-3。

為了進一步計算學生所合成之金奈米粒子之平均粒徑，學生將金奈米粒子滴至銅網上以進行電子顯微鏡的觀測，圖 2-5 (a) 為 13 nm 金奈米粒子的穿透式電子顯微鏡 (TEM, transmission electron microscopy, JEM-2010, jeol Ltd., Japan) 影像圖，平均粒徑大小為 12.493 ± 1.455 nm，13 nm 金奈米粒子濃度約為 8.81 nM。圖 2-5

(b) 為 32 nm 金奈米粒子穿透式電子顯微鏡影像圖，平均粒徑大小為 31.624 ± 4.272 nm，32 nm 金奈米粒子濃度約為 0.36 nM。圖 2-5

(c) 為 56 nm 金奈米粒子的穿透式電子顯微鏡影像圖，平均粒徑大小為 53.068 ± 6.614 nm，56 nm 金奈米粒子濃度約為 0.03 nM。此三

種奈米粒子之平均粒徑，皆是透過 scan pro 3 分別圈選 100 顆奈米粒子進行計算，如表 2-1。而此三種金奈米粒子濃度之換算則是透過表 2-2 所提供之莫耳消光係數或稱為莫耳吸光度，並藉由比爾定律： $A = \epsilon bc$ ，分別能計算出學生所合成之金奈米粒子溶液之濃度。

為了避免製備完成的金奈米粒子聚集及維持其穩定的狀態，須將金奈米粒子進行表面修飾。於上述溶液製備好的 250 mL 金奈米粒子溶液中加入 250 μ L MPA (1 mM) 攪拌一晚，即完成 Au NPs-MPA 溶液的製備。

而 12 nm 之銀奈米粒子之製備步驟如下，首先先配置 30 mL 之 NaBH_4 (2 mM) 於冰浴下及 10 mL 之 AgNO_3 (1 mM)，接著將硝酸銀以滴定之方式加入，並且在三分鐘內滴定完畢，且立即停止磁石攪拌，此時溶液顏色會成黃色，在 397.5 nm 有最大吸收值。

而 30 nm 之銀奈米粒子之製備步驟為配置 50 mL 之 AgNO_3 (1 mM) 並將其煮至沸騰，並以滴定方式加入 5 mL 1% 之檸檬酸鈉，當溶液變色為黃色時，計時十分鐘後停止加熱攪拌，此時溶液呈墨綠色，在 407.5 nm 下有最大吸收值。此兩種銀奈米粒子之吸收圖為圖 2-4

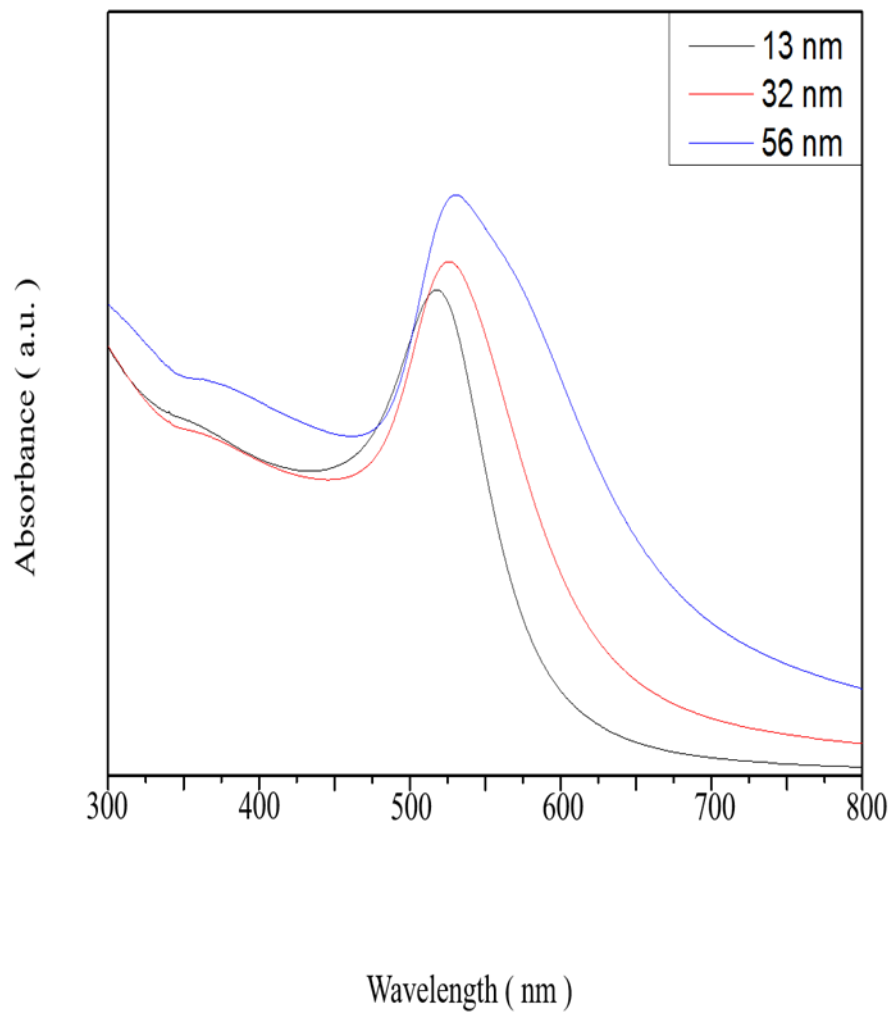


圖 2-3 金奈米粒子之吸收圖以確保合成之金奈米粒徑分布

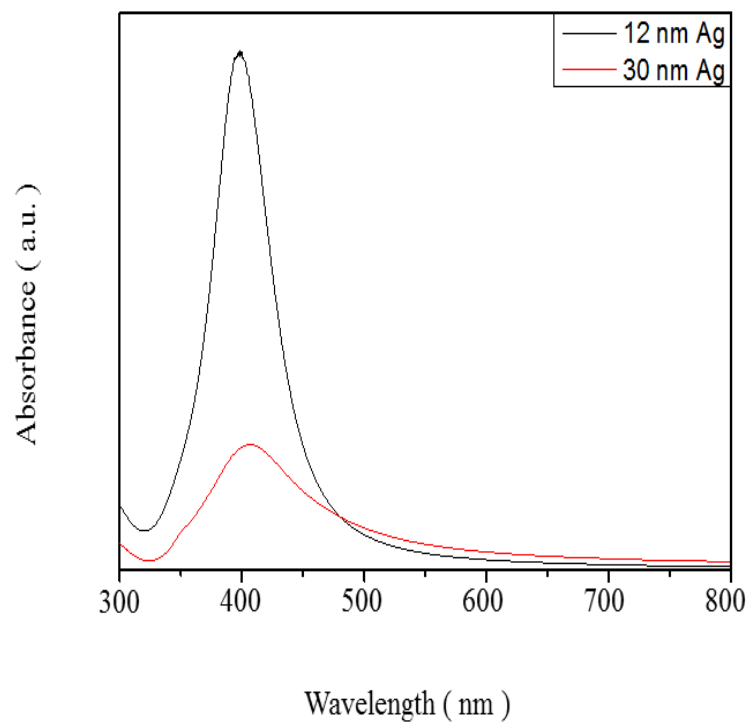


圖 2-4 銀奈米粒子之吸收圖

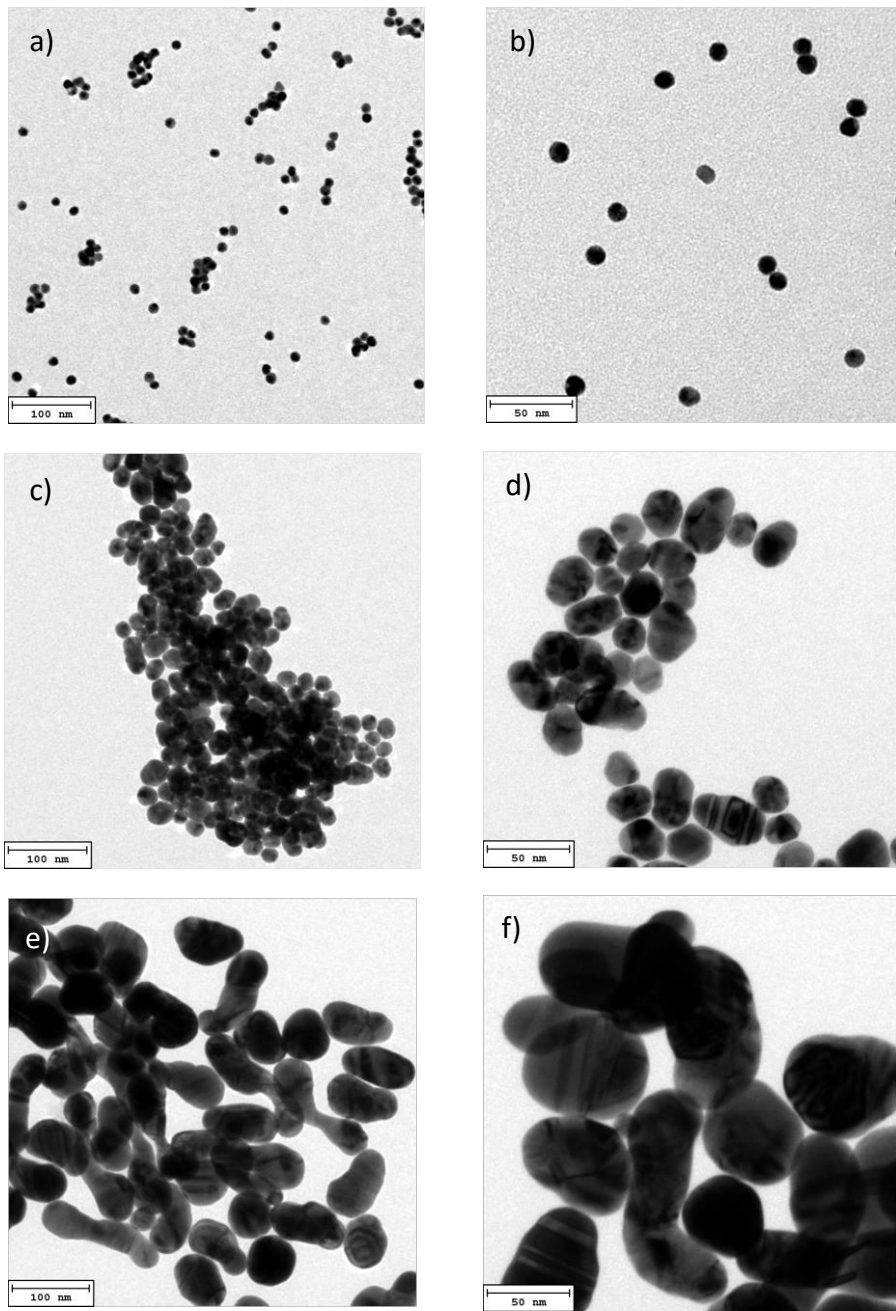


圖 2-5 金奈米粒子高解析度穿透電子顯微鏡圖。a)13 nm。b)為 13 nm 之放大圖。c)32 nm。d)為 32 nm 之放大圖 e) 56 nm。f)為 56 nm 之放大圖。

	N Total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum
13 nm	100	12.493	1.4555	7.9	17.08
32 nm	100	31.624	4.27255	21.57	47.63
56 nm	100	53.068	6.61405	37.29	70.51

表 2-1 利用 Scan pro 3 進行粒徑平均值之計算

Diameter (nm)	Peak SPR Wavelength (nm)	NPS/ml	Wt. Conc (mg/ml)	Molar Ext (M-1cm-1)	Size Dispersity (+/-nm)	Particle Volume (nm ³)	Surface Area (nm ²)	Surface/Volume Ratio	Particle Mass (g)	Molar Mass (g/mol)	Molar Concentration
5	515-520	5.47E+13	6.94E-02	1.10E+07	<15%	6.54E+01	7.85E+01	1.200	1.27E-18	7.64E+05	9.08E-08
10	515-520	5.98E+12	6.07E-02	1.01E+08	<15%	5.24E+02	3.14E+02	0.600	1.02E-17	6.11E+06	9.93E-09
15	520	1.64E+12	5.61E-02	3.67E+08	<12%	1.77E+03	7.07E+02	0.400	3.43E-17	2.06E+07	2.72E-09
20	524	6.54E+11	5.31E-02	9.21E+08	<12%	4.19E+03	1.26E+03	0.300	8.12E-17	4.89E+07	1.09E-09
30	526	1.79E+11	4.91E-02	3.36E+09	<12%	1.41E+04	2.83E+03	0.200	2.74E-16	1.65E+08	2.98E-10
40	530	7.15E+10	4.65E-02	8.42E+09	<12%	3.35E+04	5.03E+03	0.150	6.50E-16	3.91E+08	1.19E-10
50	535	3.51E+10	4.45E-02	1.72E+10	<10%	6.54E+04	7.85E+03	0.120	1.27E-15	7.64E+08	5.83E-11
60	540	1.96E+10	4.30E-02	3.07E+10	<10%	1.13E+05	1.13E+04	0.100	2.19E-15	1.32E+09	3.25E-11
70	548	1.20E+10	4.17E-02	5.03E+10	<10%	1.80E+05	1.54E+04	0.086	3.48E-15	2.10E+09	1.99E-11
80	553	7.82E+09	4.06E-02	7.70E+10	<10%	2.68E+05	2.01E+04	0.075	5.20E-15	3.13E+09	1.30E-11
90	564	5.37E+09	3.97E-02	1.12E+11	<8%	3.82E+05	2.54E+04	0.067	7.40E-15	4.46E+09	8.92E-12
100	572	3.84E+09	3.89E-02	1.57E+11	<8%	5.24E+05	3.14E+04	0.060	1.02E-14	6.11E+09	6.37E-12

表 2-2 利用莫耳消光係數來計算金奈米粒子之濃度。此表格是摘錄自

<http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Gold-Nanoparticle-Properties-d2.htm>

2.2.4 毛細管前處理

實驗用的毛細管材質為熔融矽 (fused silica)，購自於美國 PolymicroTechnologies 公司，毛細管內徑為 46.7 μm ，外徑為 354.4 μm ，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺 (polyimide)，每根新的熔融矽毛細管先以石英片切割成總長度為 40 公分，並於 33 公分處燒出約 1 公分的偵測視窗，接著注入 0.5 M 的 NaOH 溶液浸泡十二小時以上，使毛細管內壁矽醇解離。在每次實驗之間，先以高壓氮氣將毛細管內的 PEO 溶液沖出後，注入 100 mM Tris-HCl pH 9.0 + 20 mM SDS 緩衝溶液，推出殘餘的 PEO。接著再通入 0.5 M 的 NaOH 溶液，以 1 kV 電壓清洗毛細管壁 10 分鐘，將毛細管內壁殘餘的 PEO 洗淨，使得毛細管內壁再度矽醇解離以進行下次實驗。

2.2.5 聚合物溶液製備

緩衝溶液及聚合物溶液配製前，都須先用沙拉脫將容器刷洗乾淨，接著用容器裝滿去離子水，再以超音波震盪器震盪五分鐘來清洗容器。首先配製 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 緩衝溶液 (100 mM Tris 加入 HCl 將 pH 調至 9.0 即可得到緩衝溶液)。配製聚合物溶液時先將攪拌子放入錐形瓶中，再放置於攪拌器上，可幫助聚合物溶液能攪拌均勻。接著取 50 mL 配製好的 100 mM Tris-HCl pH 9.0 緩衝溶液倒入量筒再倒

入錐形瓶中，慢慢增強攪拌速度使緩衝溶液成漩渦狀。取 0.25 g 的 8 M PEO，配製 0.5 % 8 M PEO 聚合物溶液，將聚合物粉末緩慢倒入錐形瓶，配製過程中應避免倒入速度太快而導致粉末無法均勻分布於溶液中。溶液須攪拌至少十二小時確定聚合物粉末已完全溶解且均勻分布。將配製好的聚合物溶液倒入乾淨的 50 mL 離心管中，大約可保存一週。若放置時間過久，PEO 溶液在高 pH 值會水解而無法使用。

2.2.5 實驗流程

每次實驗前會先將分離所使用的膠體溶液或緩衝溶液置於 50 mL 之離心管以 15000 xg 15 分鐘先將溶液中的雜質去除，接著再將膠體溶液取出並裝入 1.5 mL 之離心管，並將膠體溶液放入真空幫浦抽真空 15 分鐘後再以 15000x g 15 分鐘使其膠體溶液不會再受氣泡或其他雜質干擾產生散射光。

在進行分離不同大小之金奈米粒子時所需進行的前處理，我們須先將 13 nm、32 nm、56 nm 之金奈米粒子分別以 10000 xg、1000 xg、500 xg 離心 30 分鐘，接著將上清液去除後回溶於二次水中，以去除在合成金奈米粒子時，所加入之檸檬酸鈉及進行金奈米表面修飾時所加入過量的 MPA 所造成的基質干擾。

2.3 結果與討論

本實驗以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳來進行金奈米粒子之偵測，在偵測金奈米粒子的實驗條件是以 50 mM Glycine pH 8.0 + 20 mM SDS 在有 EOF 的條件下，其原理是運用 SDS 之疏水端與金表面會產生作用力，進而能改善分離解析度，並且學生增加進樣時間，達到線上樣品濃縮的效果來進行金奈米粒子的偵測極限之實驗，可偵測的最低金奈米濃度為 10 pM，實驗將欲分析之金奈米樣品利用虹吸方式引入毛細管中，在施加正電壓時，金奈米粒子由於所修飾之 MPA 所帶的負電荷不足以拉動金奈米粒子，因此在此條件下金奈米的遷移時間，幾乎與 EOF 的遷移時間相同。

2.3.1 緩衝溶液濃度對金奈米粒子偵測的影響

在毛細管電泳中緩衝溶液的選擇對金奈米粒子分離是十分之重要，由於緩衝溶液的濃度會影響電滲流之強度且樣品與毛細管間會有吸附力，因此需要選擇適當的緩衝溶液來防止電流過大，或是金奈米粒子與毛細管內壁之吸附力過強。因此學生選擇了 Glycine 來進行電泳分離的分離緩衝溶液，選擇此溶液是希望不要產生過大的電流，避免產生過高的焦耳熱而影響電泳分離，且希望金奈米粒子在此緩衝溶液條件下不會產生聚集。學生測試了 3 種不同濃度的 Glycine 緩衝溶

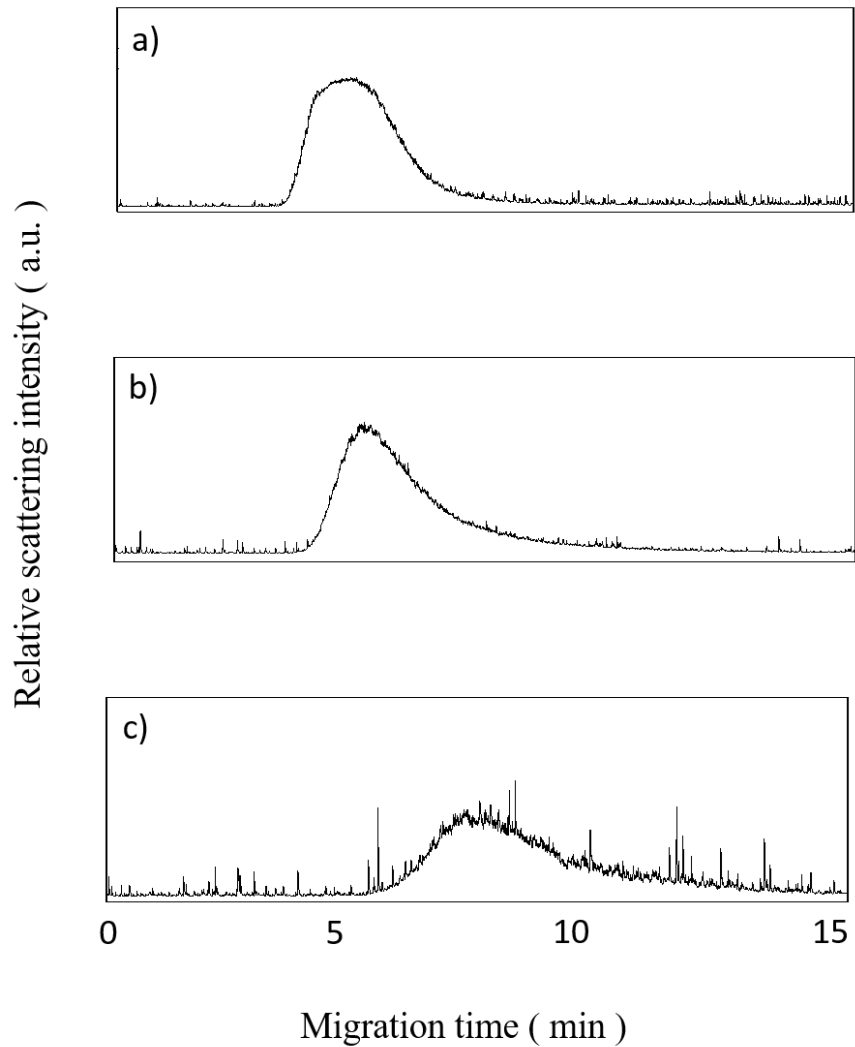


圖 2-6 緩衝溶液濃度對金奈米粒子之訊號影響，實驗條件為 1X 32 nm Au - MPA 分離電壓+ 10 kV。a) 1 M Glycine pH 8.0。b) 100 mM Glycine pH 8.0。c) 10 mM Glycine pH 8.0

液，從圖 2-6 中學生能發現隨著緩衝溶液濃度的降低，在 10 mM Glycine 緩衝溶液下金奈米粒子之訊號高度會降低許多，此現象的造成是由於金奈米粒子與毛細管壁產生了吸附的作用力，導致訊號時間延遲且高度下降，而沒有選擇 1 M Glycine 緩衝溶液則是不想使緩衝溶液的離子強度過高，且消耗試劑的使用量過高，最後我們選擇了濃度為 100 mM Glycine pH 8 的條件進行實驗。

2.3.2 加入不同濃度之界面活性劑

從過去的文獻中能發現，在分離金奈米粒子時能在緩衝溶液中加入 SDS 來改善金奈米粒子之分離效率^[12]，其原理是因為當我們加入 SDS 的濃度提高時也同時能夠增加金奈米粒子的電泳淌度，這顯示在加入 SDS 後金奈米粒子在分離過程中會產生電荷尺寸比(charge to ratio)的改變，此原因是由於 SDS 的疏水端長鏈會與金奈米表面產生吸附力，因此能有效地改善圖譜波寬，我們能從圖 2-7 能看到隨著 SDS 濃度的增加從 5 mM 增加到 50 mM 我們能發現能有效的改善分離時間過長的缺點，但 SDS 在高濃度下時會發現訊號高度的驟減，此原因的造成是由於當高濃度的界面活性劑通入毛細管中時，會產生較高的離子強度，進而產生焦耳熱，使得訊號高度驟降，但在低濃度時 SDS 的作用力卻不足以完整改善金奈米粒子的波寬，因此學生將緩衝溶液

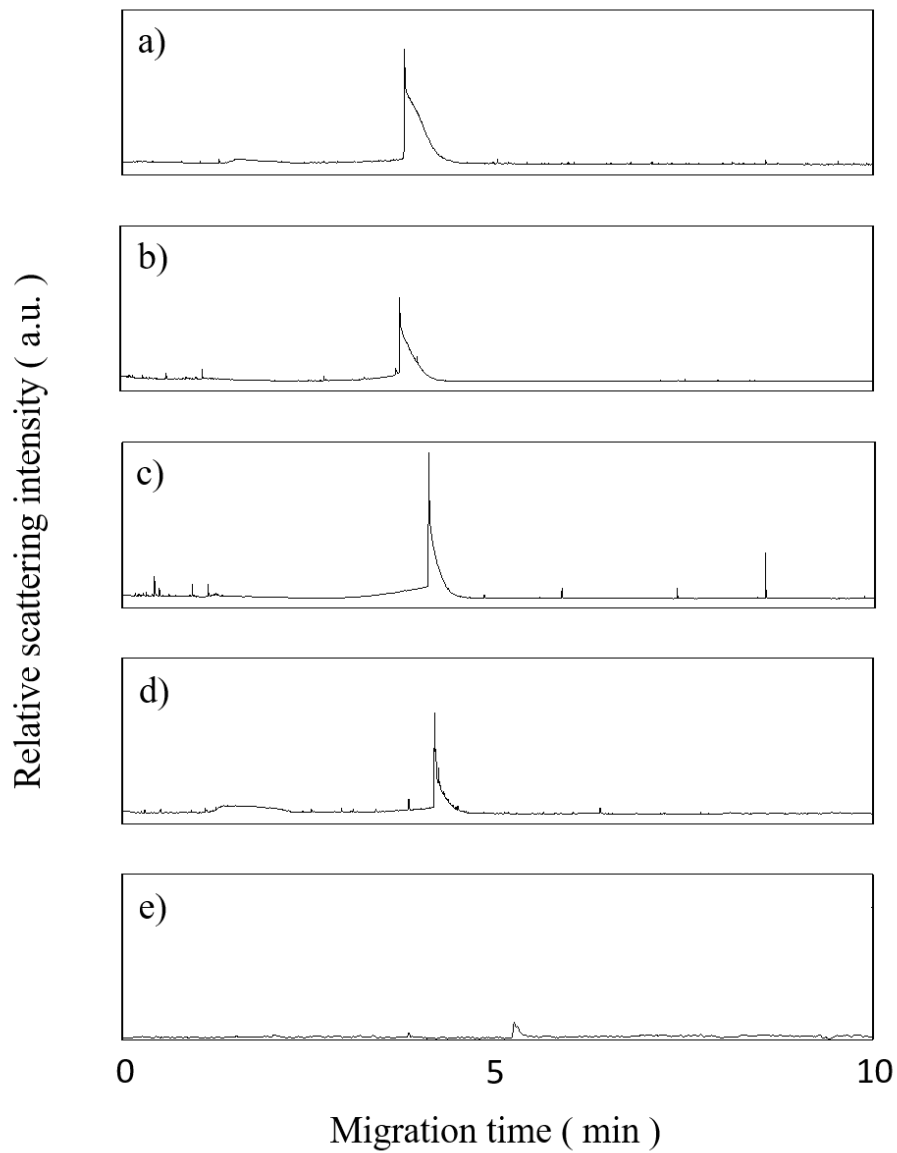


圖 2-7 SDS 濃度對分離金奈米之影響，實驗條件為 Inlet, outlet 為 50 mM Glycine pH 8.0，SDS 只添加於毛細管內，而樣品為 1X 32 nm Au - MPA。a) SDS 之濃度為 5 mM。b) SDS 之濃度為 10 mM。c) SDS 之濃度為 15 mM。d) SDS 之濃度為 20 Mm。e) SDS 之濃度為 50 mM

濃度稍微降低為 50 mM Glycine pH 8.0 此目的也是為了降低電流值，進而能夠在 20 mM SDS 進行金奈米粒子之偵測訊號的實驗。

2.3.3 測試不同電壓對訊號高度之影響

在電泳分離的過程中，分離電壓對金奈米分離的選擇也是一個重要的分離變因，在不同的電壓情況下所產生的電流也會有所不同。在高電場的條件下，所產生的電流會較高，所以會造成緩衝溶液的溫度產生變化進而改變了分析物訊號高度或其解析度，也可能會造成學生所修飾於金奈米表面之 MPA 由於高電場的環境而被扯離金奈米表面。因此在分離圖譜中能看到訊號的變化，從圖 2-8 中，我們測試了三種分離電壓分別為: 10 kV、15kV 及 20Kv，從電泳圖中能看出，在高電場的條件下，金奈米粒子之訊號會遞減的十分嚴重，造成此現象的原因可能就是修飾於金奈米表之 MPA 受到高電場影響而脫離金奈米表面，可能造成金奈米吸附於毛細管內壁，因此我們選擇了+10 kV 來進行偵測金奈米粒子訊號之實驗條件。

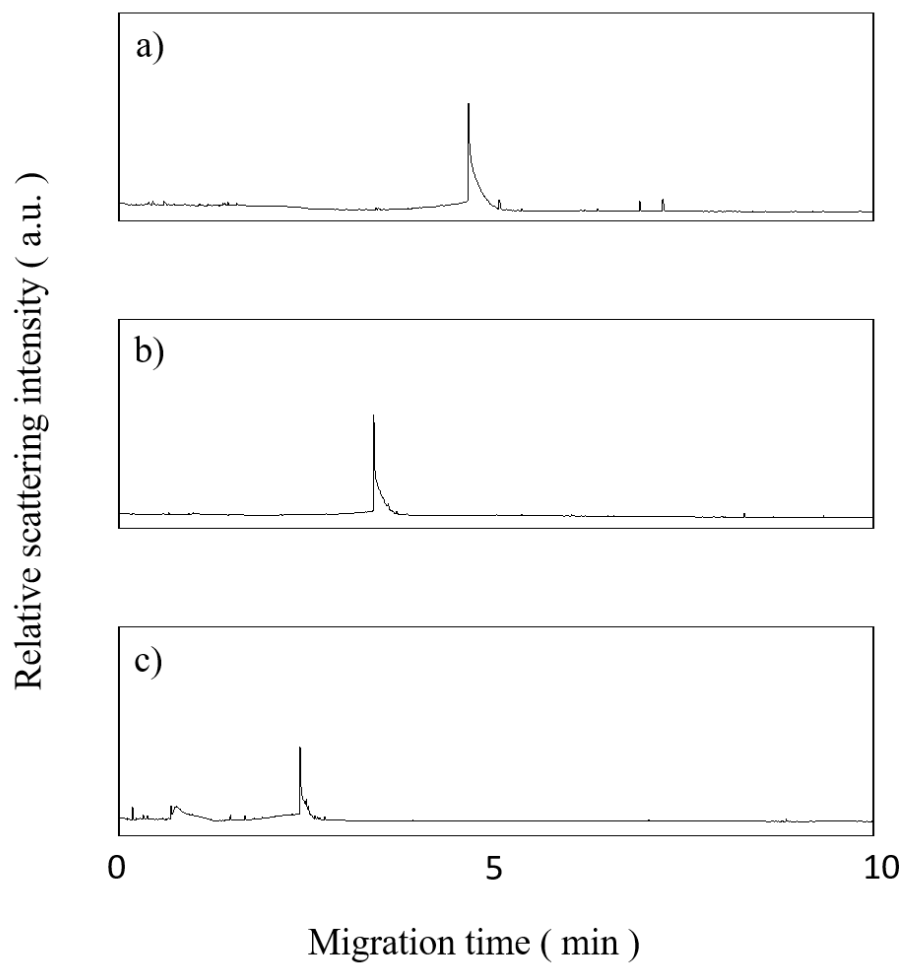


圖 2-8 分離電壓對金奈米粒子訊號高度之影響，實驗條件為毛細管內為 50 mM Glycine pH 8.0 + 20 mM SDS，Inlet, outlet 為 50 mM Glycine pH 8.0 樣品為 1X 32 nm Au – MPA。a) + 10 kV。b) + 15 kV。c) + 20 kV。

2.3.4 利用樣品堆積偵測金奈米粒子之偵測極限

在毛細管電泳中，樣品堆積時常被用來增加偵測極限，其原理是藉由增加分析物進樣的時間，透過溶液黏度不同或是緩衝溶液中離子強度不同，造成單位電場不同，使分析物能在毛細管的區間內堆積濃縮，並大幅的增加毛細管電泳之偵測極限。經學生優化之實驗條件，利用樣品堆積來提高偵測極限，學生將樣品堆積時間堆積至五分鐘，從圖 2-9 中能看到學生分別將 32nm - MPA 之金奈米由一倍稀釋至千分之一倍，從圖中依然能看到在 32 nm - MPA 稀釋至千分之一倍時，光電倍增管依然能夠偵測到金奈米粒子之散射光。依照同樣的步驟，學生也進行了 13 nm - MPA 偵測極限的測試，從圖 2-10 中同樣也能看出將 13 nm - MPA 稀釋至千分之一倍時，我們依然能從電泳圖中看到 13 nm - MPA 之散射光訊號，因此在我們的系統中不僅能夠成功偵測到金奈米粒子之散射光，且還能將偵測極限提高至 10 pM。

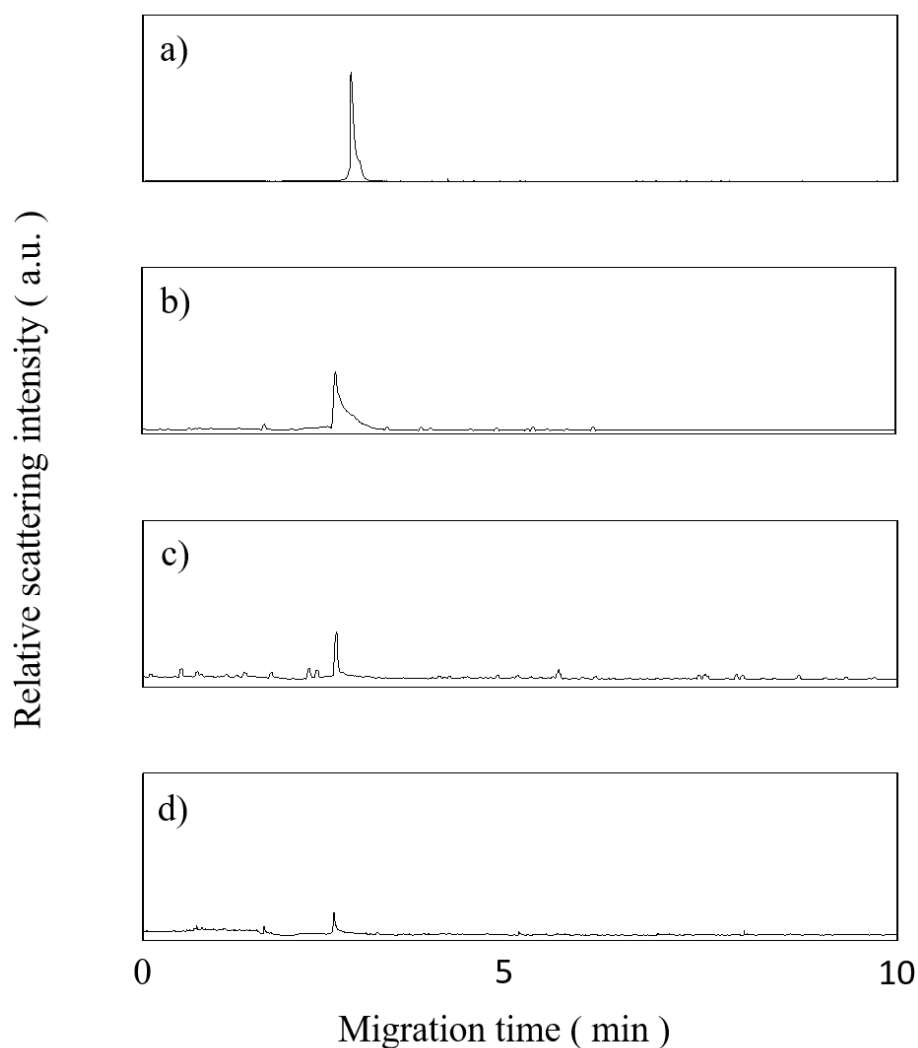


圖 2-9 利用樣品堆積測試 32 nm Au – MPA 其偵測極限，樣品堆積時間為五分鐘，可偵測最低濃度為 0.001X 32 nm Au – MPA，實驗條件為毛細管內為 50 mM Glycine pH 8.0 + 20 mM SDS，Inlet, outlet 為 50 mM Glycine pH 8.0 分離電壓+ 10 kV。a) 1X 32 nm Au – MPA。b) 0.1 X 32 nm Au – MPA。c) 0.01 X 32 nm Au – MPA。d) 0.001 X 32 nm Au – MPA。

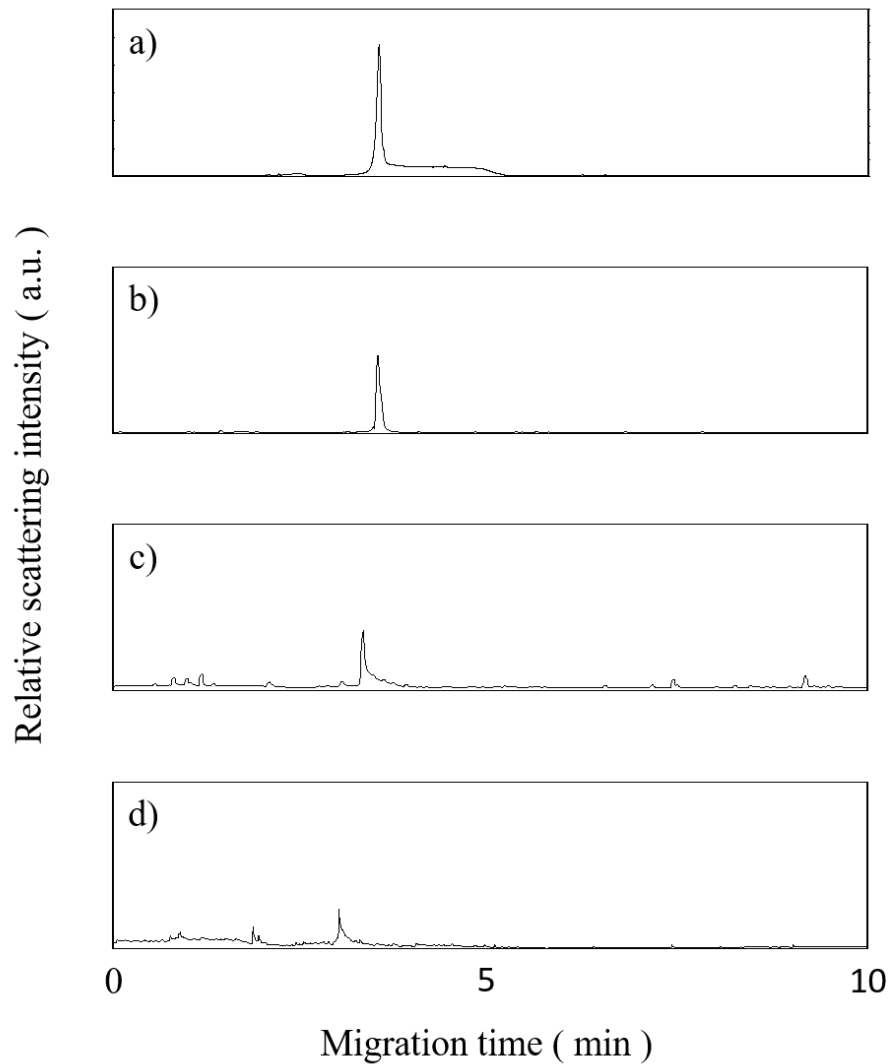


圖 2-10 利用樣品堆積測試 13 nm Au – MPA 其偵測極限，樣品堆積時間為五分鐘，可偵測最低濃度為 0.001X 13 nm Au – MPA，實驗條件為毛細管內為 50 mM Glycine pH 8.0 + 20 mM SDS，Inlet, outlet 為 50 mM Glycine pH 8.0 分離電壓+ 10 kV。a) 1X 13 nm Au – MPA。b) 0.1 X 13 nm Au – MPA。c) 0.01 X 13 nm Au – MPA。d) 0.001 X 13 nm Au – MPA。

2.3.5 利用優化後之實驗條件偵測銀奈米粒子

由以上之實驗條件，學生已能確定透過我們的系統能夠成功偵測到金奈米粒子之訊號，因此將會嘗試偵測不同之金屬奈米粒子之訊號，此部分是以銀奈米粒子作為樣品，圖 2-11 為 12 nm 及 30 nm 之銀奈米粒子，經過優化後之條件進行電泳偵測，從圖中也能明顯看到銀奈米粒子之訊號，因此藉由學生之系統，不僅能看到金奈米粒子之訊號，也能夠看到銀奈米粒子之訊號，並且希望能更進一步嘗試分離不同奈米粒子。

2.3.6 加入聚合物溶液進行金奈米粒子之分離

由以上之實驗條件，學生已能確定透過我們的系統能夠成功偵測到奈米粒子之散射光訊號，因此希望能更進一步分離不同大小的金奈米粒子在此系統中。首先學生先在有電滲流之條件下進行分離，學生選擇了較不會抑制電滲流之聚合物 PEO，並且選擇以 0.5% 之濃度來進行分離實驗，在此濃度下經學生測試是不會造成金奈米粒子之聚集，且也不易造成背景散射光，在進樣前先將聚合物溶液通入毛細管中，由於聚合物黏度過黏，不易使用虹吸進樣進行樣品進樣，因此學生使用幫浦將金奈米打入毛細管內，進樣時間為一分鐘。但從圖 2-12 中能發現儘管在各別進樣不同大小之奈米粒子能在圖譜中觀察到出現在不同之位置，但從圖譜中難

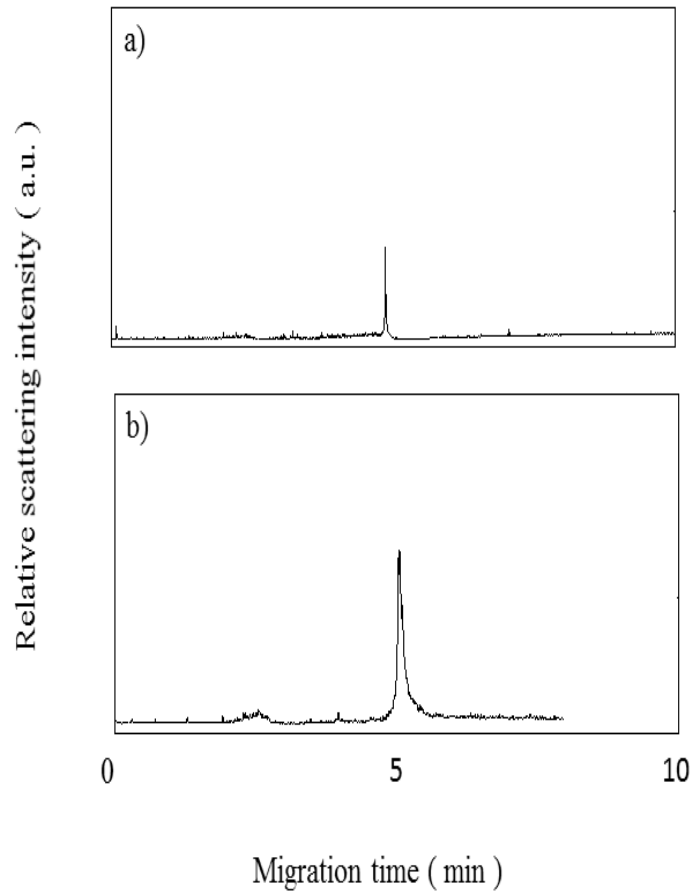


圖 2-11 利用正電系統偵測不同大小之銀奈米粒子，樣品進樣時間為 30 秒，實驗條件為毛細管內為 50 mM Glycine pH 8.0 + 20 mM SDS，Inlet, outlet 為 50 mM Glycine pH 8.0 分離電壓+ 10 kV。a) 1X 12 nm Ag。b) 1 X 30 nm Ag。

以說明其個別的時間差異，且將樣品混合後其原始的波形及遷移時間皆會改變，且無法進行訊號之標定，因此學生會將系統和金奈米表面修飾進行修正。

2.3.7 改變金奈米粒子表面修飾來進行分離

在正電系統下，學生先將金奈米粒子之表面修飾物先由 MPA 更換為 MUA，藉此比較再更換不同之表面修飾物後對分離是否能有顯著之改變，但由於在有 EOF 之條件下，從圖 2-13 中學生依然無法在電泳圖中明顯的辨別不同大小之奈米粒子，因此學生將會更進一步的將整套系統換為負電系統，並單純地藉由不同奈米粒子大小，所帶表面電荷不同來進一步進行分離。

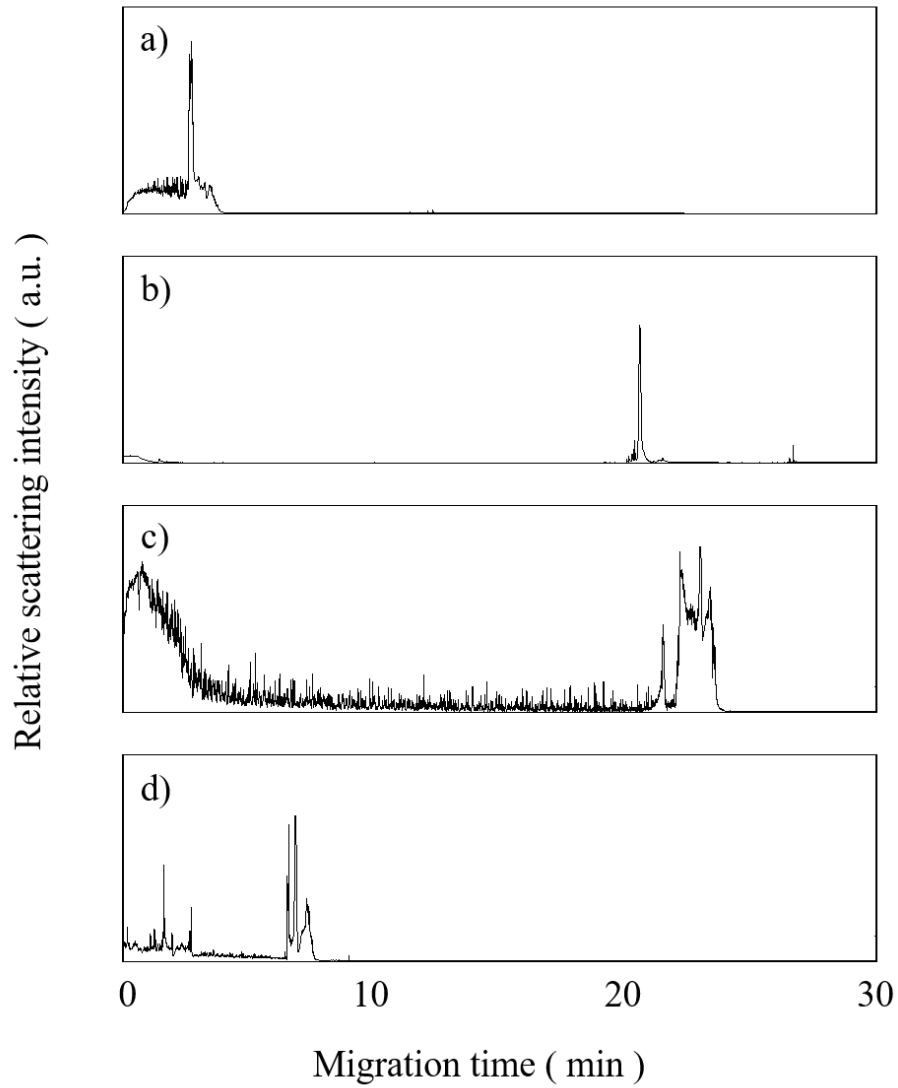


圖 2-12 加入聚合物來進行金奈米之分離，實驗條件為 100 mM Tris – HCl pH 9.0+ 20 mM SDS，電壓 + 20 kV。a) 1X 13 nm Au - MPA。b) 1X 32 nm Au - MPA。c) 1X 56 nm Au - MPA。d) 將三種金奈米以 1:1:1 之比例混合

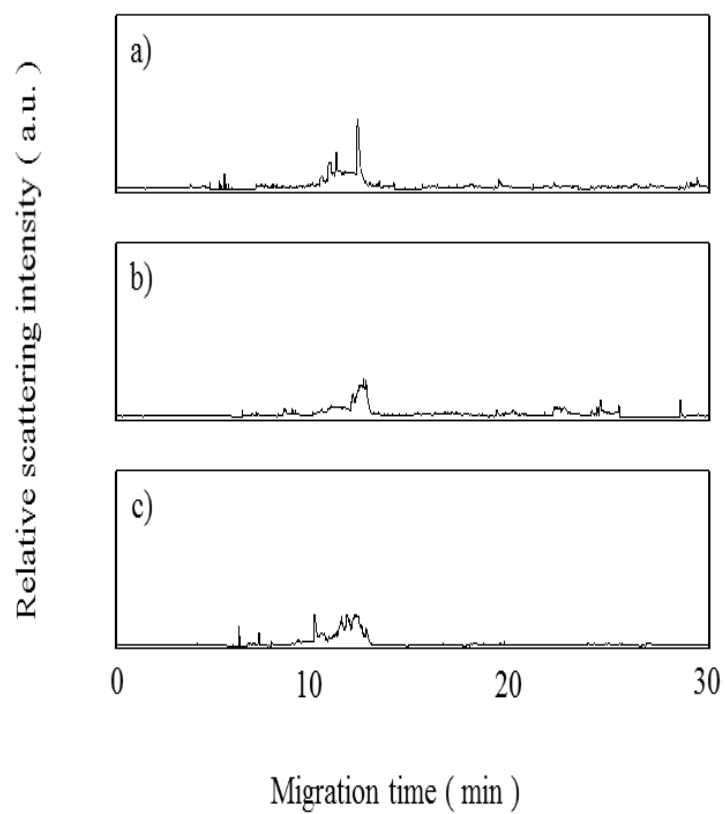


圖 2-13 金奈米表面修飾 MUA 對分離的影響，實驗條件為 0.5 % PEO in 1X TBE buffer 分離電壓+ 20 kV。a) 1X 13 nm Au -MUA。b) 1X 32 nm Au -MUA。c) 金奈米以 1:1 比例混和

2.4 結論

此實驗是以散射光學為基礎結合毛細管電泳分離金奈米粒子，並在有電滲流之條件下使用虹吸進樣進行金奈米粒子偵測，且利用樣品堆積能成功偵測到 10 pM 之金奈米粒子訊號，此方法不僅樣品消耗量少，偵測時間所需極短，僅需五分鐘即可偵測到金奈米之訊號，且在經過條件優化後，此系統亦能偵測到銀奈米粒子之散射光訊號，而將系統換為無電滲流之條件以電壓近樣，並將金奈米之表面修飾換為 MUA，學生能成功的辨別 13 nm 及 32 nm 在電泳圖中之相對位置，經過以上條件之測試，學生開發出了一套既便利且樣品消耗少之系統，此系統不僅有高靈敏度，與傳統吸收光譜之偵測極限相比較，甚至能提高兩個級數。

2.5 參考文獻及資料

1. Fleischmann M, Hendra PJ, Mcquilla AJ: **Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode.** *Chem Phys Lett* 1974, **26**(2):163-166.
2. Liu X, Dai Q, Austin L, Coutts J, Knowles G, Zou JH, Chen H, Huo Q: **A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering.** *Journal of the American Chemical Society* 2008, **130**(9):2780-+.
3. Lee JS, Han MS, Mirkin CA: **Colorimetric detection of mercuric ion (Hg²⁺) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles.** *Angew Chem Int Edit* 2007, **46**(22):4093-4096.
4. Harpster MH, Zhang H, Sankara-Warrier AK, Ray BH, Ward TR, Kollmar JP, Carron KT, Mecham JO, Corcoran RC, Wilson WC *et al*: **SERS detection of indirect viral DNA capture using colloidal gold and methylene blue as a Raman label.** *Biosensors & bioelectronics* 2009, **25**(4):674-681.
5. Zhang D, Carr DJ, Alocilja EC: **Fluorescent bio-barcode DNA assay for the detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis.** *Biosensors & bioelectronics* 2009, **24**(5):1377-1381.
6. Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, Hagenow S, Mehta H, Lucas A, Garimella V, Patno T, Buckingham W, Cork W *et al*: **Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system.** *Biosensors & bioelectronics* 2004, **19**(8):875-883.
7. Wang Z, Lee J, Cossins AR, Brust M: **Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes.** *Anal Chem* 2005, **77**(17):5770-5774.
8. Lin YZ, Chang PL: **Colorimetric determination of DNA methylation based on the strength of the hydrophobic interactions between DNA and gold nanoparticles.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, **5**(22):12045-12051.
9. Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG: **Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra.** *Anal Chem* 2007, **79**(11):4215-4221.
10. Franze B, Engelhard C: **Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS.** *Anal Chem* 2014, **86**(12):5713-5720.
11. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ: **Preparation and characterization of Au Colloid Monolayers.** *Anal Chem* 1995, **67**(4):735-743.
12. Liu FK, Ko FH, Huang PW, Wu CH, Chu TC: **Studying the size/shape**

separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2005, **1062(1):139-145.**

第三章 以物鏡式暗視野之散射光學結合毛細管電泳 分離金奈米粒子

3.1 實驗部分

3.1.1 實驗試藥

四氯金酸鈉 (sodium tetrachloroaurate (III) dihydrate) 係向美國 Alfa-Aesar 購買 Polyvinylpyrrolidone (PVP, M_{ave} 1,300,000 g / mol) 購自英國 Alfa Aesar。11-巰基十一烷酸(11-mercaptoundecanoic acid)、三羥甲基氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, tris)、硼酸 (boric acid, H_3BO_3)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、檸檬酸鈉 (sodium citrate tribasic) 係向美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 購買。乙二胺四醋酸二鈉(EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Crystal) 係向美國 J.T.Baker 購買。

3.1.2 金奈米粒子製備

本章節之金奈米粒子合成方法皆與第二章相同，唯一不同之處是修飾於金奈米表面之修飾物換為 MUA，其目的是為了增加金奈米粒子之穩定性和表面電荷。我們選擇了 MUA 修飾 13 nm 及 32 nm 此方法為參考過去文獻修飾方法^[1]，其實驗步驟為，取 100 mL 製備好的金奈米粒子溶液，將其 pH 值以 0.5 M NaOH 調整至 pH 8.4，此

目的是由於 MUA 需在高 pH 值時才會帶負電，接著加入 2 mg 11-mercaptoundecanoic acid，並以磁石攪拌，計時 20 分鐘，最後將溶液中多餘的 11-mercaptoundecanoic acid 粉末過濾後放置於 4 度冰箱中保存即可。

3.1.3 毛細管前處理

實驗用的毛細管材質為熔融矽 (fused silica)，購自於美國 PolymicroTechnologies 公司，毛細管內徑為 46.7 μm ，外徑為 354.4 μm ，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺 (polyimide)，每根新的熔融矽毛細管先以石英片切割成總長度為 40 公分，並於 33 公分處燒出約 1 公分的偵測視窗，熔融矽毛細管則是注入分子量 1,300,000 Da 的 PVP 聚合物溶液 (5 % in H_2O) 塗覆於毛細管內壁靜置至隔天。塗覆完 PVP 的毛細管以去離子水沖洗管內多餘的 PVP 聚合物溶液，最後保存於去離子水中，毛細管塗覆聚合物主要是要抑制 EOF 的產生，並提高實驗之再現性。

3.1.4 聚合物溶液製備

此負電系統之聚合物溶液製備如下，首先需配置 1X TBE 緩衝溶液其溶液所含為 Tris 89 mM、Boric acid 89 mM、EDTA 2 mM，將其混合後 pH 值為 8.3，配置聚合物時先將攪拌子放入錐形瓶中，再取配置好的 1X TBE 緩衝溶液 50 mL 到入量筒再倒入錐形瓶中，接著增強攪拌速度，取 0.5g 分子量 1,300,000 Da 的 PVP 聚合物粉末，配置 1% PVP 聚合物溶液，溶液需攪拌至少十二個小時確定聚合物粉末已完全溶解且均勻分布於溶液中。配製好的聚合物溶液倒入乾淨的 50 mL 離心管中，大約可保存一週。

3.1.5 實驗流程

每次實驗前會先將分離所使用的膠體溶液置裝入 1.5 mL 之離心管，並將膠體溶液放入真空幫浦抽真空 15 分鐘，再以 15000x g 15 分鐘使其膠體溶液不會再受氣泡或其他雜質干擾產生散射光。

在進行分離不同大小之金奈米粒子時需進行樣品前處理，我們須先將 13 nm、32 nm、56 nm 之金奈米粒子分別以 10000 xg、1000 xg、500 xg 離心 30 分鐘，將上清液去除後回溶於 1X TBE 緩衝溶液中，以去除在合成金奈米粒子時，所加入之檸檬酸鈉及金奈米表面修飾時所加入過量的 MUA 所造成的基質干擾。

3.2 結果與討論

在前一章節中，學生想藉由電滲流與不同大小之金奈米表面所帶電荷之不同來進行分離，但從其結果顯示，在有電滲流的影響下，會使得無法藉由不同奈米粒子大小間表面帶電荷不同來進行分離。為了將不同大小金奈米所分離，我們選擇了 1.0% 聚乙烯吡咯酮（ Polyvinylpyrrolidone, PVP, M_{ave} 1,300,000 g / mol ）作為篩分的介質，且將金奈米粒子表面所修飾之 MPA 取代為 MUA，分離電壓為 5 kV，在無電滲流的條件下，由於 13 nm 與 32 nm 之 m/z 不同，13 nm 所帶之電荷較高，因此其遷移時間較短，而 32 nm 質量較大所以遷移時間較晚，且從訊號高度來看也可以看出金奈米粒徑愈大，所產生之散射光也較為強，在此分離系統下可在 25 分鐘內將 13 nm 及 32nm 兩種不同大小之奈米粒子分離開來，且可藉由 peak 標定辨別出 13 nm 及 32 nm。除此之外，為了能夠分辨更多不同之金奈米粒子，學生試著測試不同濃度之聚合物以及不同的電場強度，來觀察在不同之環境下能否提高分離解析度及理論平板數。

3.2.1 改變系統及金奈米表面修飾來進行分離

在學生原先的系統下，金奈米粒子表面所修飾之 MPA 其保護性及帶電荷皆不足，造成學生在原先的系統中無法分離，因此在參考了其他文獻後^[1]，學生將修飾金奈米粒子之 MPA 替換為 MUA，且將毛細管塗覆 5% PVP 抑制 EOF 並改為負電系統，經過 MUA 修飾後的金奈米粒子不僅保護力較佳，且 13 nm 及 32 nm 之間所帶的電荷也會有顯著的不同，學生以 1% PVP in 1X TBE buffer 電壓進樣 30 秒分離電壓-5 kV 來進行分離從圖 3-1 中能看到，13 nm 及 32 nm 再分別的電泳圖中，就已出現在不同的遷移時間上，因此學生進而將 13 nm 及 32 nm 以 1:1 之比例混合後能夠偵測到兩支訊號峰。

因此學生接著會進行訊號的標定，從圖 3-2 中能看到 a 圖為 1:1 比例混合，而 b 圖則是將 13 nm 之比例提高至兩倍，可以從電泳圖中明顯看出在 13 nm 的位置上訊號有明顯的增高，而圖 c 則是將 32 nm 的濃度提高至兩倍，且實驗結果也符合學生之預期，同樣能在 32 nm 之位置上能看到訊號的增高，經過此兩張電泳圖證明，我們能夠成功辨別出 13 nm 及 32 nm 其在電泳圖中之相對位置。

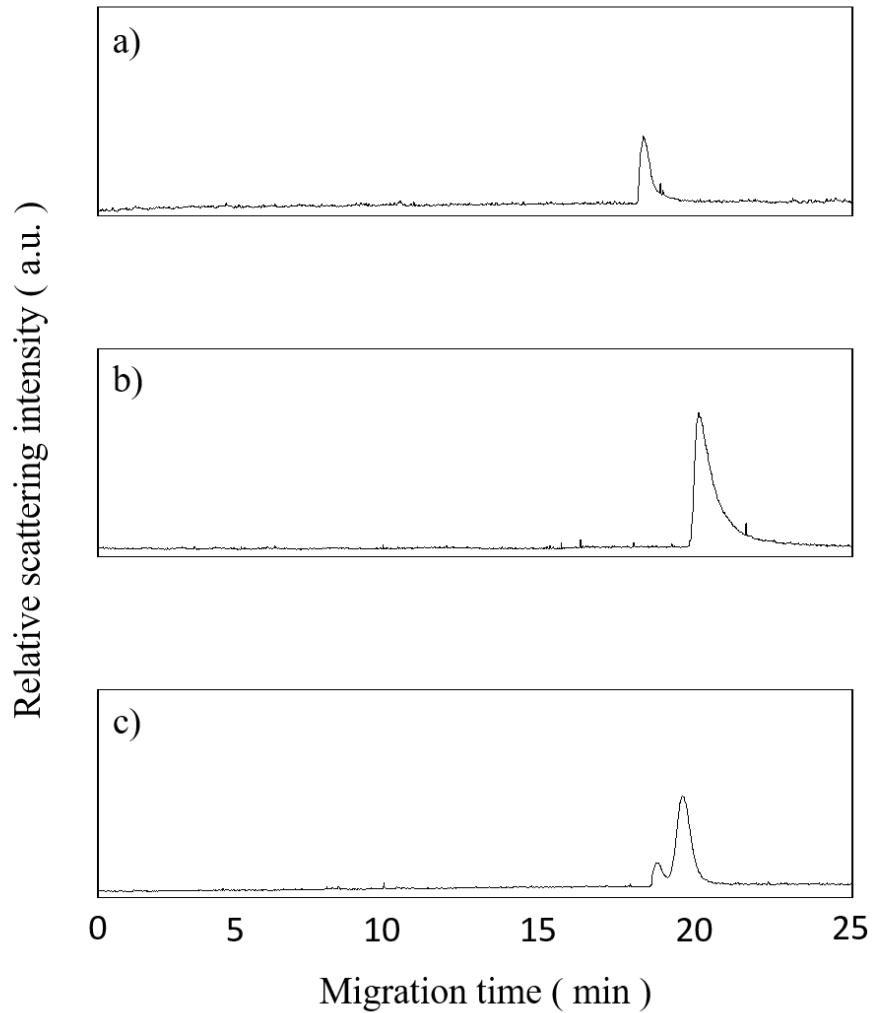


圖 3-1 利用無電滲流之系統分離金奈米粒子，實驗條件為 1% PVP in 1X TBE pH 8.3，電壓進樣 30 秒，分離電壓- 5 kV。a) 1X 13 nm Au – MUA。b) 1X 32 nm Au – MUA。c) 將兩種金奈米以 1:1 之比例混合。

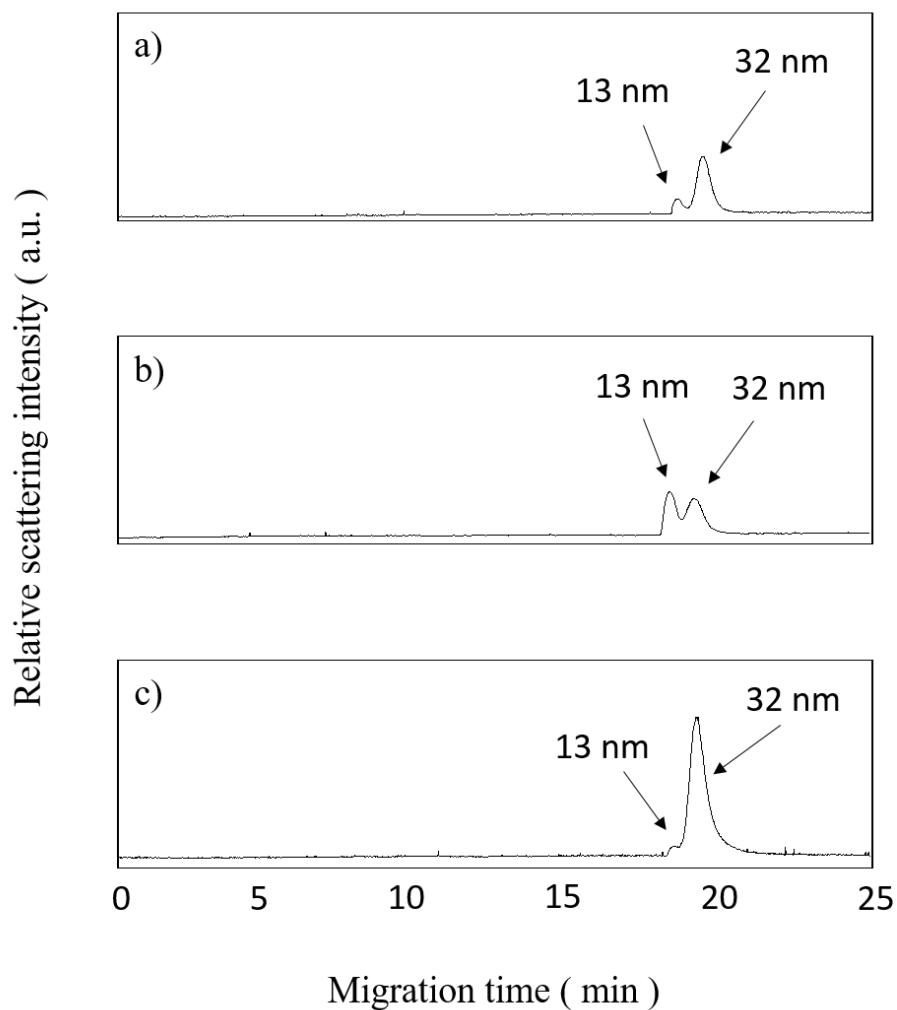


圖 3-2 利用無電滲流之系統進行金奈米粒子訊號之標幟，實驗條件為 1% PVP in 1X TBE pH 8.3，電壓進樣 30 秒，分離電壓 - 5 kV。a) 金奈米以 1:1 之比例混合。b) 2X 13 nm Au – MUA + 0.5X 32 nm Au – MUA。c) 0.5X 13 nm Au – MUA + 2X 32 nm Au – MUA。

3.2.2 改變篩分介質濃度及分離電壓對分離的影響

在確定金奈米粒子已經由我們的系統可進行分離後，學生想改變篩分介質或分離電壓來提高其訊號解析度，從圖 3-3 中學生所使用之聚合物溶液為 1%PVP 溶在 1X TBE 緩衝溶液中，改變分離電壓分別為 -5 kV、-10 kV、-15 kV、-20 kV 但從電泳圖中能發現，當我們施加高電壓後原先分開的 13 nm 及 32 nm 反倒無法分離，因此我們試著增加聚合物濃度。而圖 3-4 則是將聚合物溶液提高為 2%PVP 且分離電壓也依序由 -5 kV 增加至 -20 kV 可以從電泳圖中發現，在提高電壓的情況下 13 nm 及 32 nm 之訊號峰又能再度分開，但若再將電壓提高，則還是無法分離，因此學生又再進一步嘗試將 PVP 濃度提高至 5% 如圖 3-5，雖然在 -15 kV 的條件下時是能將奈米粒子分離，但此條件下會產生較多的背景雜訊，且將電壓進一步提高至 -20 kV 圖譜則變得完全無法分離，且在如此高的電壓下會使得毛細管容易產生 EOF，進而導致圖譜再現性不佳。因此學生將不同篩分介質濃度及分離電壓之電泳圖分別進行了其訊號解析度及平均理論平板數之計算，圖 3-3 a 圖中計算出其分離解析度為 0.968 而平均理論平板數為 8874.48，由此可知在此條件下我們訊號並未完全分離。接這計算圖 3-4 a 圖可得知此電泳圖解析度達到 3.44，已能確定訊號完全分離，而平均理論平板數為 7900.48，而 b 圖所算出之解析度為 0.463，平均理

論平板數為 1143.31。接著比較圖 3-5，a 圖之解析度也能達到 3.03，但在平均理論平板數僅有 2886.17，而圖 b 中分離解析度為 1.40，而理論平板數為 588.02，圖 c 之解析度為 0.712，平均理論平板數為 565.60。由以上之解析度及平均理論平板數計算來看，在 1% 下的 PVP 之解析度並沒有大於 1.5，這表示兩隻訊號峰並沒有完全分離，而在 2% PVP 分離電壓 -5 kV 之條件下其解析度能達到 3.44，而平均理論平板數僅略低於 1% PVP，但至少我們能確認兩隻訊號峰是完全分離，而在 5% PVP 之條件下，雖然整體解析度皆有提高，但平均理論平板數都下降的非常多，因此現階段來說，在篩分介質為 2% PVP 而分離電壓為 -5 kV 之條下，我們能有較佳的分離解析度及平均理論平板數，學生未來希望能在使用不同的聚合物來做為篩分介質，進而提高分離解析度。

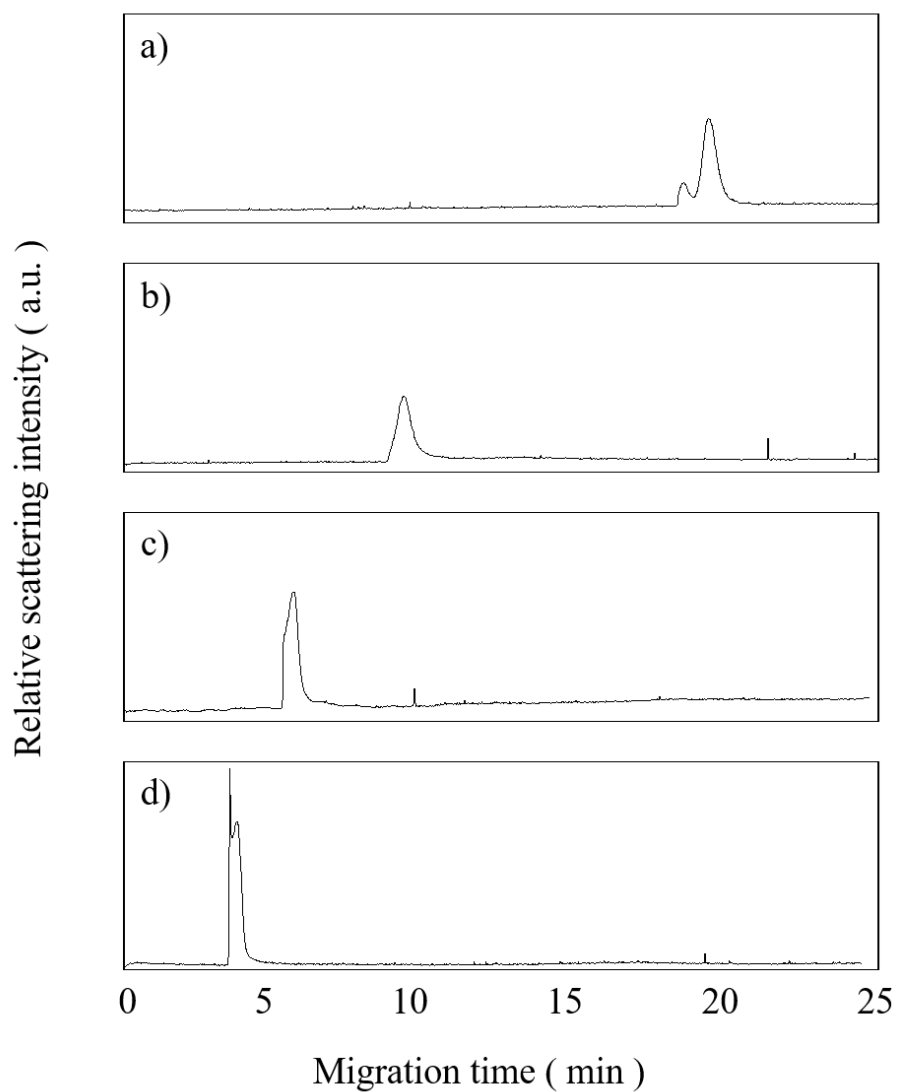


圖 3-3 電場對金奈米粒子分離的影響，實驗條件為(0.5X 13 nm + 0.5X 32 nm)Au – MUA 及篩分介質為 1.0% PVP in 1X TBE buffer pH 8.3 。 a) -5 kV 。 b) -10 kV 。 c) -15 kV 。 d) -20 kV 。

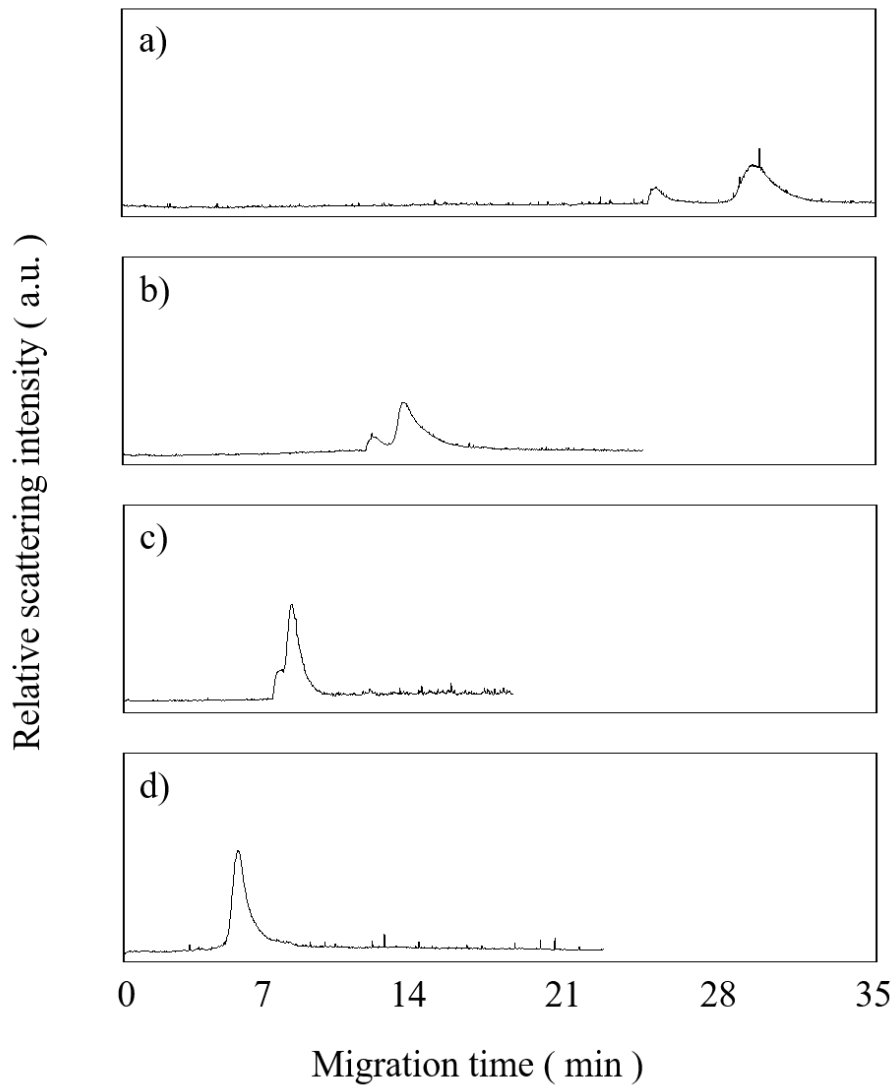


圖 3-4 電場及篩分介質對金奈米粒子分離的影響，實驗條件為(0.5X 13 nm + 0.5X 32 nm)Au – MUA 及篩分介質為 2.0% PVP in 1X TBE buffer pH 8.3 。 a) -5 kV 。 b) -10 kV 。 c) -15 kV 。 d) -20 kV 。

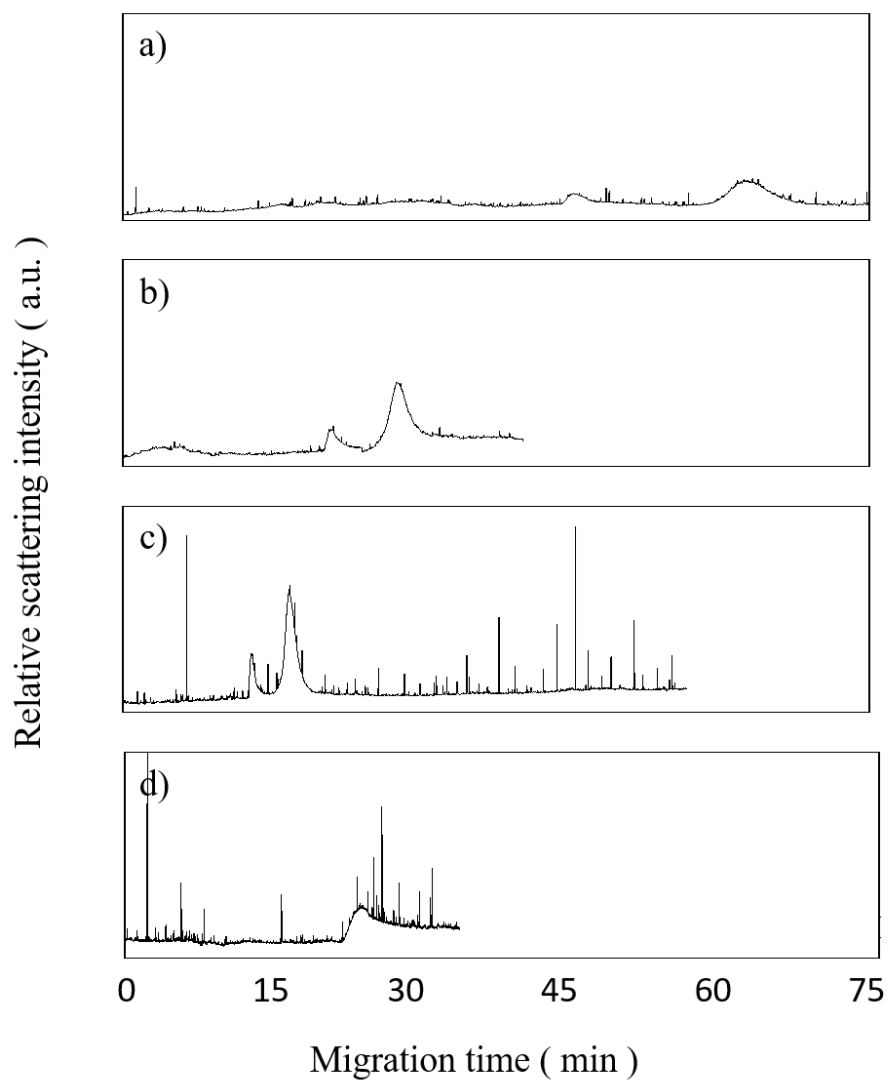


圖 3-5 電場及篩分介質對金奈米粒子分離的影響，實驗條件為(0.5X 13 nm + 0.5X 32 nm)Au – MUA 及分離介質為 5.0% PVP in 1X TBE buffer pH 8.3 。 a) -5 kV 。 b) -10 kV 。 c) -15 kV 。 d) -20 kV 。

	1% PVP	2% PVP	5% PVP
- 5 kV	0.968	3.44	3.03
- 10 kV	-	0.463	1.40
- 15 kV	-	-	0.712

表 3-1 不同 PVP 濃度及不同電壓之解析度

	1% PVP	2% PVP	5% PVP
- 5 kV	8874.48	7900.48	2886.17
- 10 kV	-	1143.31	588.02
- 15 kV	-	-	565.60

表 3-2 不同 PVP 濃度及不同電壓之平均理論平板數

3.3 結論

透過此實驗結果，學生能夠在無電滲流的條件下，使用 1 % PVP 作為篩分介質，並將金奈米粒子之表面修飾由 MPA 換為 MUA 後，能夠成功的分離 13 nm 及 32 nm 此兩種大小之奈米粒子，並藉由訊號標定能確認其精確位置，但目前僅能分辨此兩種金奈米粒子，由於 56 nm 之金奈米粒子所合成的顆粒大小，很有可能會與 32 nm 之金奈米粒子的粒徑有所重疊，因此目前還無法精確地將 32 nm 及 56 nm 給區分出來。

3.4 未來展望

在未來實驗方向，希望能合成更多不同金屬之奈米粒子來偵測並分離更多種類之奈米粒子，如：貴重金屬或過度金屬之奈米粒子，且希望也能藉由此系統來分辨不同形狀之奈米粒子，期望在此系統中看到不同奈米粒子會有不同散射光強度之變化，如同金棒子或星形等不同形狀之奈米粒子，此外希望能藉由金奈米粒子設計一段探針來取代傳統的螢光標幟物，進而應用在生物樣品中，藉由接收散射光之訊號，也能同樣達成偵測訊號的目的。

3.5 參考文獻及資料

1. Xu X, Caswell KK, Tucker E, Kabisatpathy S, Brodhacker KL, Scrivens WA: **Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2007, **1167**(1):35-41.

參與會議

1. 第二十屆分析化學技術交流研討會
2. 2014 年中國化學年會
3. 2015 年中國化學年會
4. 2015 年亞太地區微分離及分析研討會 APEC (第十五屆)
5. 2016 年分析化學小組春季研討會
6. 第二十二屆分析化學技術交流研討會