

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 化學科

最佳創意獎

040203

酸鹼反應誘發之中空微球釋放一氧化氮用於克
服細菌抗藥性問題之研究

學校名稱：國立新竹女子高級中學

作者： 高二 吳欣儒 高二 吳宜珈 高二 連翊淳	指導老師： 戴孟倫
---	------------------

關鍵詞：一氧化氮、抗藥性細菌、中空微球

摘要

抗藥性細菌的感染是日漸普遍的問題，常造成臨床上治療的困難。一氧化氮帶有不配對的電子，為具有高氧化活性的分子。本實驗希望直接藉由一氧化氮的氧化力殺死細菌，克服細菌抗藥性問題。人體組織受到細菌感染後，發炎組織環境呈現弱酸性。藉由此項特性，我們設計一能區分發炎與健康組織的酸鹼反應中空微球系統，以有效治療抗藥性細菌感染的問題。我們利用微流道系統製備以 PLGA 為球殼的中空微球結構；中空微球內部裝載 DETA NONOate。經實驗發現，此一載體系統處於發炎酸性環境下，DETA NONOate 會與氫離子反應產生一氧化氮撐破球殼並釋出，有效殺死抗藥性細菌；而在健康中性環境下，一氧化氮無法有效釋出，因此可以減低一氧化氮對健康組織的傷害及克服抗藥性問題。

壹、 實驗動機

高二課程中，介紹許多現今人類面臨的醫學問題。當今社會醫療技術日新月異，許多抗生素被人們發現或製造。然而，在醫師治療病患的過程中投入各種大量的抗生素，雖然有效的殺死病原體，但也造成病原體增加主動運輸的作用將抗生素自菌體內排除，或是藉由酵素改變抗生素的化學結構使其失去效用，而導致病原體產生抗藥性的問題。因此，如何降低抗藥性，便成了醫療領域的重要課題之一。

根據期刊資料，發現免疫系統產生的一氧化氮分子，不僅能攻擊侵入人體的微生物，還能在一定程度上阻止癌細胞的繁殖，阻止腫瘤細胞擴散，更具有血管擴張等治療心血管疾病的效用，有機會適用於人體作為藥物。另外，在高三化學課程「酸鹼反應」中，我們學到以緩衝溶液調控 pH 值，並且於高二化學課程「常見的有機物質」中學到於不同 pH 值下，許多化學結構也會隨之改變。針對抗藥性問題，我們將 DETA NONOate 包覆於中空微球中，此一載體系統處於細菌感染患處的發炎環境下，DETA NONOate 會與氫離子反應並產生一氧化氮而撐破球殼，釋放出來的一氧化氮能夠有效殺死抗藥性細菌。

貳、 實驗目的

- 一、 了解 NONOate 溶於水後釋出一氧化氮的能力。
- 二、 探討不同濃度、酸鹼值的 NONOate 抑制大腸桿菌之效果。
- 三、 將 NONOate 包於微球內，探討其釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之效果。
- 四、 探討不同濃度 NONOate 之微球釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之影響。

參、 實驗設備及器材

一、 實驗儀器

儀器名稱	廠牌/規格	數量
烘箱	裕德科技 DK500	一台
pH 測量儀	METTLER TOLEDO Seven Compact™	一台
滅菌釜	FD Uniclave	一台
多功能微盤分析儀	科羅耐國際科技有限公司 Spectra Max® M5e	一台
無菌操作台	海天科學股份有限公司 3BC-24	一台
電子秤	Mettler Toledo MS205DU	一台
雙注射器輸液泵	KD Scientific KDS200	三台
複式顯微鏡	上宸光學 MICROTECH D1500	一台
震盪培養箱	裕德科技 LM-420	一台
磁石攪拌器	東光玻璃	一台

二、 實驗藥品

LB Agar 粉末	LB Broth 粉末	二氯甲烷
PBS	5% PVA	PLGA
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits 【附件三】	Diethylenetriamine NONOate 【附件四】	大腸桿菌(pGL4.13)

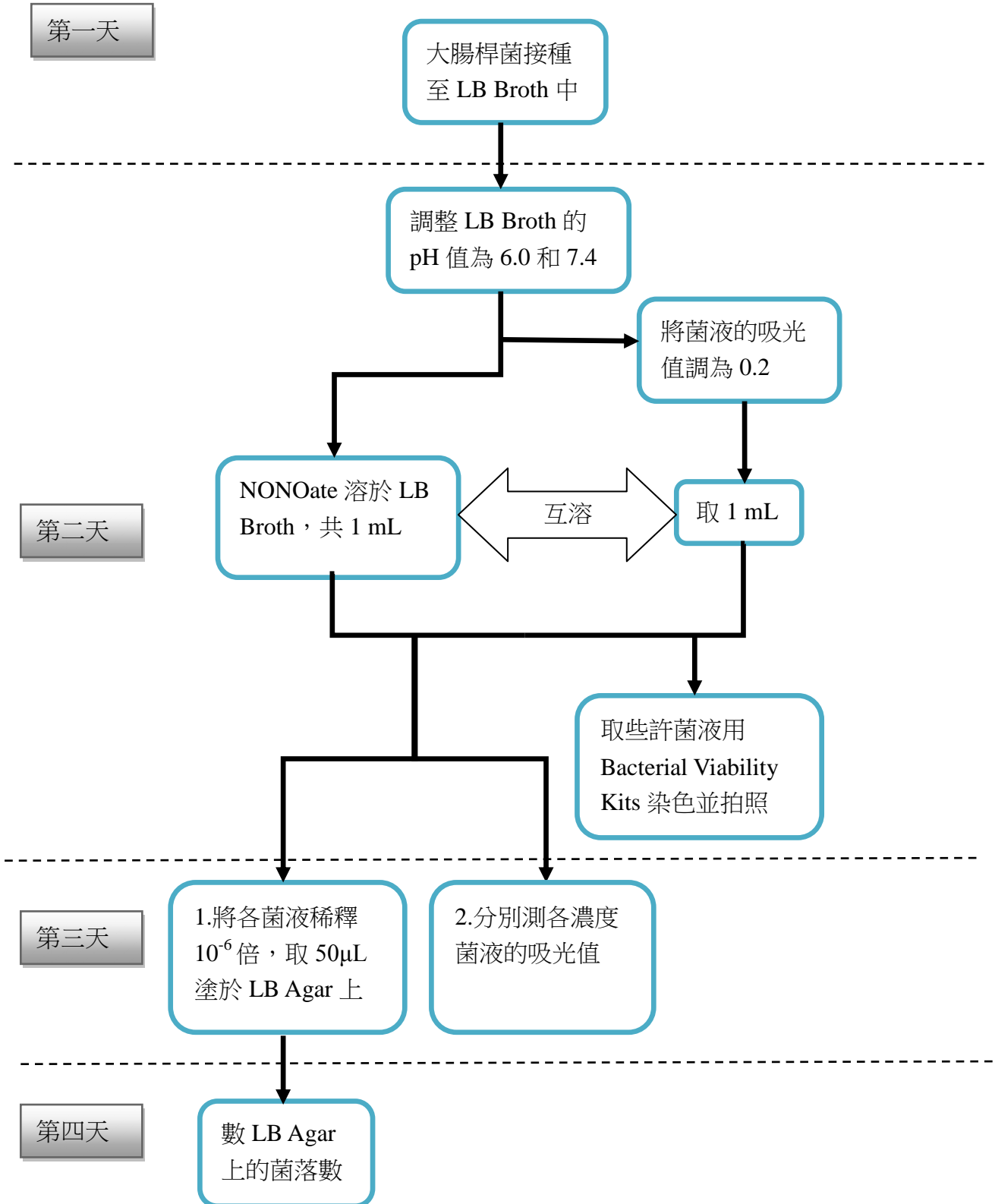
三、 實驗器材

針筒	針頭	微量吸量管	刮勺	Parafilm 封口蠟膜
血清瓶	接種環	塑膠培養皿	AB 膠	石英微量比色皿
離心管	毛細管	三角玻棒	塑膠軟管	滅菌指示帶

肆、實驗過程與方法

一、探討不同濃度、酸鹼值的 NONOate 抑制大腸桿菌之效果 (實驗以四天為一週期)

【流程圖】:



(一)、 第一天：培養大腸桿菌。

1. 在無菌操作台內將大腸桿菌接種於一管 LB Broth。
2. 將已接種完大腸桿菌的菌液置入震盪培養箱，以 37°C、200rpm 恆溫培養一日。

(二)、 第二天：調配不同濃度的 NONOate 置入菌液中。

1. 以 pH 測量儀將 2 管未接種過菌的 LB Broth 之 pH 值分別調為 6.0 以及 7.4，並以其稀釋第一天於震盪培養箱培養之菌液，使菌液的吸光值在波長為 600nm 的情況下為 0.2。
2. 稱取 8.16 mg 的 NONOate，溶於 5 mL 的 pH6.0 LB Broth 中，分別於 1.5 mL 的離心管中調配【表一】的濃度，並另取 1000 μ L pH 7.4 的 LB Broth。

【表一】

pH	6.0						7.4
濃度(mM)	0	1	3	5	7	10	0
NONOate(μ L)	0	100	300	500	700	1000	0
LB Broth(μ L)	1000	900	700	500	300	0	1000

3. 將配好濃度的 1mL 溶液分別加入裝有 1 mL 菌液的離心管中，放入震盪培養箱，以 37°C、200rpm 培養一日。
4. 另分別配製 pH 6.0 與 pH 7.4 之 0 mM、2mM、10mM 菌液，以 Bacterial Viability Kits 染色，並將其置於螢光顯微鏡下，拍照觀察細菌的死亡程度。

(三)、 第三天：將含 NONOate 的菌液塗至 LB Agar。

1. 以 pH 測量儀將未接種過菌的 LB Broth 之 pH 值調為 6.0 以及 7.4，於無菌操作台中以其將 pH 6.0 與 7.4 的菌液稀釋 10^{-6} 倍，並取 50 μ L 菌液滴在 LB Agar 上，以三角玻棒均勻塗抹。每種濃度各塗 3 盤 LB Agar。
2. 以蓋子在下的方式放入烘箱，以 37°C 培養一日。
3. 另取第二天培養的菌液，測其吸光值並記錄。

(四)、 第四天：數菌落數。

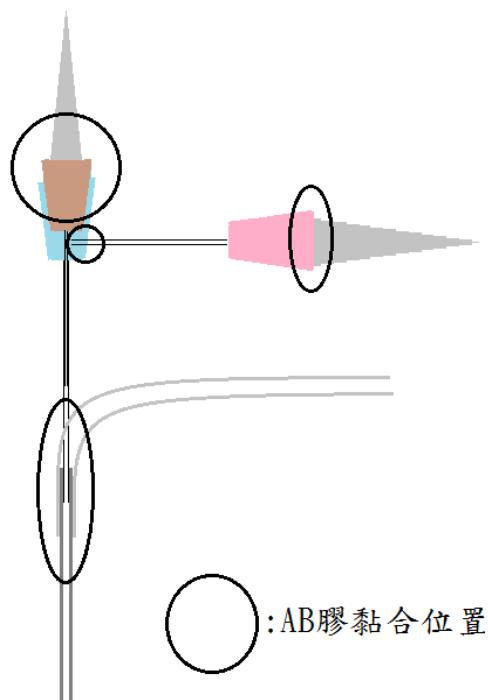
二、 將 NONOate 包於微球內，探討其釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之效果。

(一)、 第一天：培養大腸桿菌。

(二)、 第二天：製作微球。

1. 製作微流道

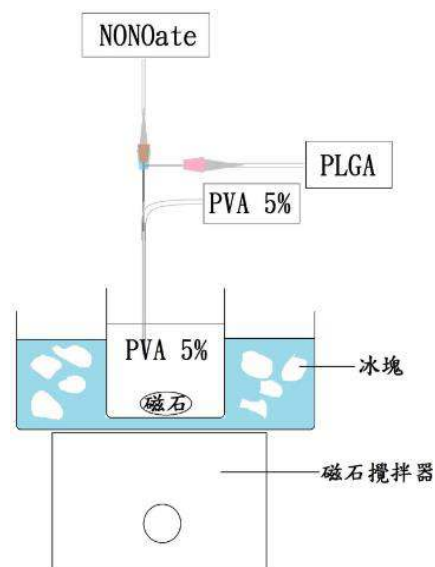
- (1). 以銼刀分別將 18、23、30G 之針頭磨平。
- (2). 將微量吸量管管頭剪至適當長度後，將其鈍方塞進 18 與 30G 針頭的開口處。
- (3). 如【圖一】所示，將針、微量吸量管管頭與毛細管組合起來，並以 AB 膠封起、固定接合處。



【圖一】微流道示意圖



【圖二】微流道系統



【圖三】微流道系統示意圖

2. 製作微球

(1). 調配各溶液之 pH 值

- i. 以 pH 測量儀將過濾後的 5% polyvinyl alcohol (PVA)、PBS 與 D.I. water 之 pH 值皆調至 8.0。

(2). 秤量藥品

- i. 秤取 30 mg 的 NONOate，溶於 2 ml 的 pH 8.0 D.I. water。
- ii. 秤取 600 mg 的 PLGA，溶於 15 ml 的二氯甲烷。

(3). 如【圖二】【圖三】所示，搭組完整微流道

- i. 取 200 ml PVA 裝於燒杯，並將燒杯置於冰塊中。
- ii. 將磁石放入 PVA 中，並將磁石攪拌器放在 PVA 下方，以最低轉速緩緩攪拌 PVA。
- iii. 設定雙注射器輸液泵輸出速率：NONOate 相為 0.1 ml/min、PLGA 相為 0.2 ml/min、PVA 相為 2.5 ml/min。

(4). 啟動雙注射器輸液泵，開始製作微球

- i. 初期，毛細管內出現混濁氣泡。待氣泡呈現透明清澈時，取數滴流出的微球至玻片上，於複式顯微鏡下觀測。
- ii. 確定流出的微球確實包裹 NONOate 後，將毛細管底部沒至 PVA 液面下，

開始蒐集微球。

- iii. 在微球滴入 PVA 的過程中，以滴管吸取去除漂浮於 PVA 上層製作失敗的微球。

(5). 結束製作微球，簡單處理微球

- i. 當微球滴入 PVA 中 3~5 分鐘後即停止雙注射器輸液泵。
- ii. 靜置 PVA 1 小時待微球沉澱，並以鋁箔紙蓋住杯口。
- iii. 經過 1 小時後，微球會沉在 PVA 底部。此時倒掉 1/2 瓶的 PVA，再次靜置。待其沉澱後，再將上層 PVA 倒掉，並將剩餘微球和 PVA 倒至 50ml 離心管。
- iv. 以 PBS 加滿離心管。待微球沉澱後，將 1/2 瓶的溶液倒掉。此步驟需重複 3 次。

(6). 秤取微球

- i. 取出清洗完的微球，以拭鏡紙輕輕將水分吸乾，分別秤取【表二】各毫克數並置於 2ml 離心管中。

【表二】

pH	6.0			7.4
濃度(mM)	2	5	10	2
NONOate 微球(mg)	6.73 mg	16.82 mg	33.65 mg	6.73 mg

- ii. 將裝有微球的離心管置於無菌操作台內以紫外光殺菌 30 分鐘。

3. 探討微球殺菌之效果

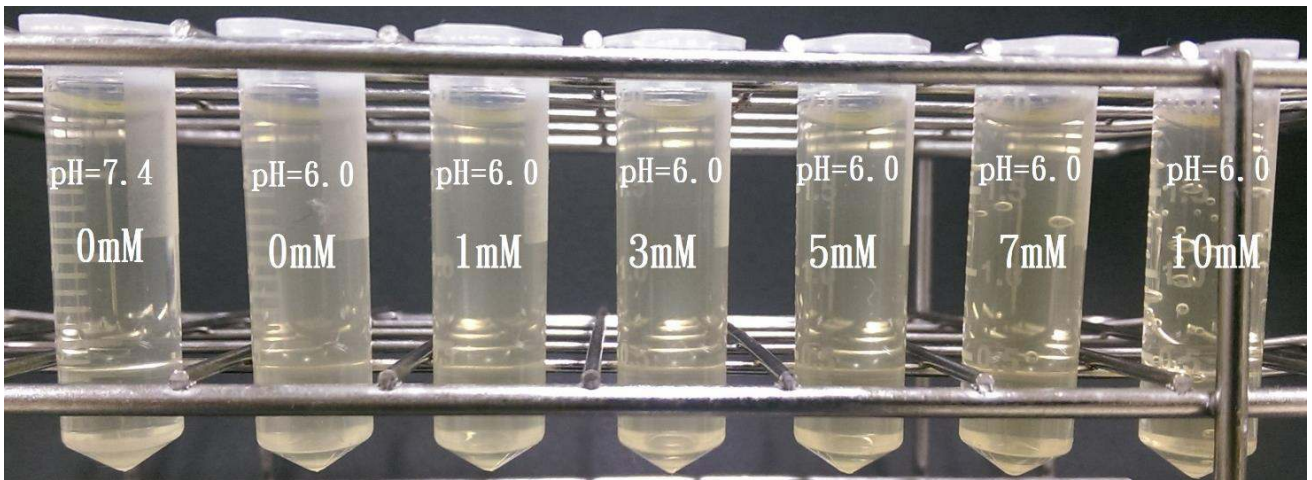
- (1). 以 pH 測量儀將未接種過菌的 LB Broth 之 pH 值調為 6.0 與 7.4，並以其稀釋第一天所培養之菌液，使菌液的吸光值在波長為 600nm 的情況下為 0.2。
- (2). 將裝有 1ml 的稀釋菌液分別加入微球。
- (3). 置入震盪培養箱，以 37°C、200rpm 培養一日。

(三)、 第三天：將菌液塗至 LB Agar。

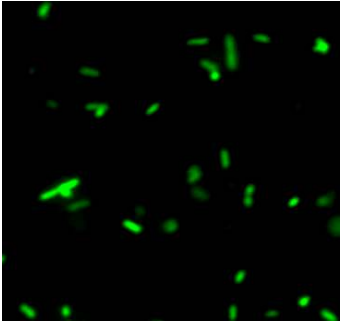
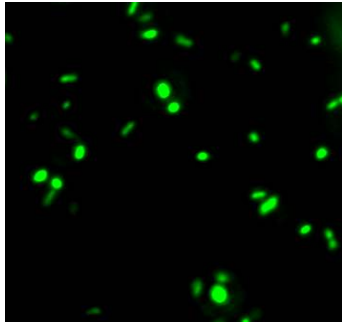
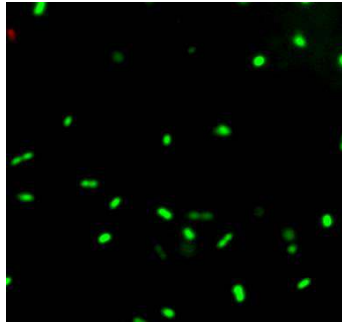
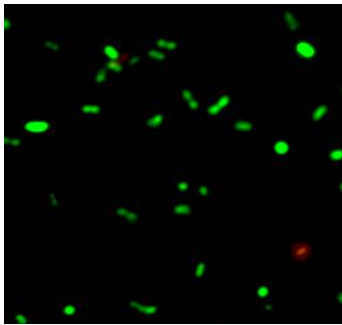
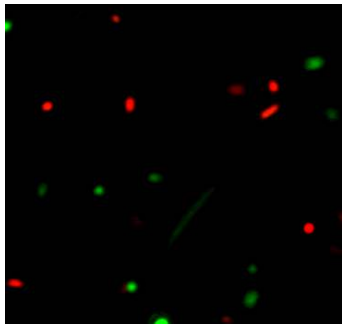
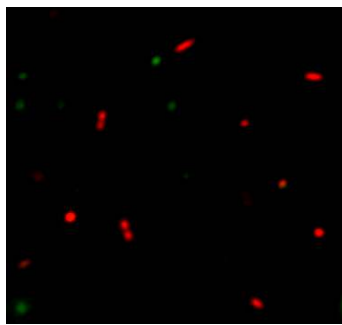
(四)、 第四天：數菌落數。

伍、 實驗結果

一、 探討不同濃度的 NONOate 抑制大腸桿菌之效果


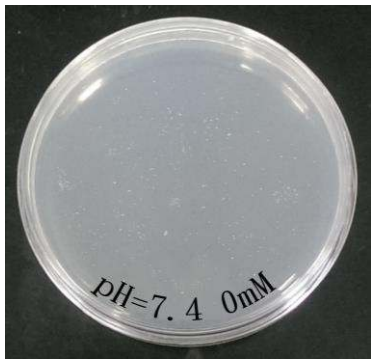
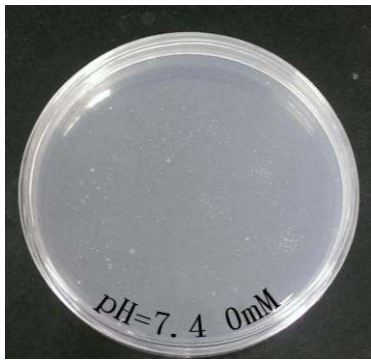











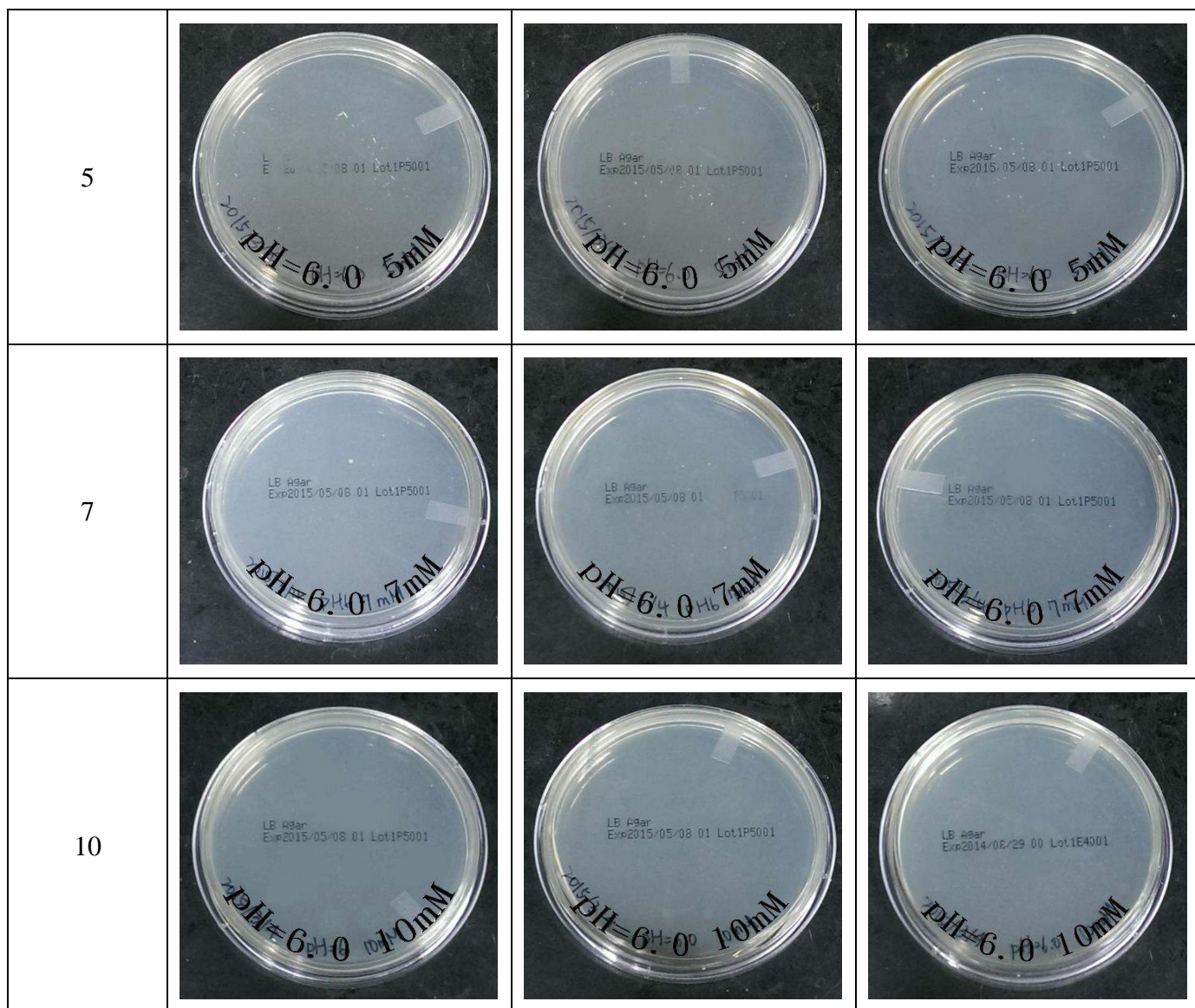
【圖四】含 NONOate 的菌液培養一日後

pH	7.4		
濃度(mM)	0	2	10
照片			
pH	6.0		
濃度(mM)	0	2	10
照片			

【圖五】用 Bacterial Viability Kits 染色後，菌液置於螢光顯微鏡下之照片

(照片中綠色為活菌，紅色為死菌之殘骸)

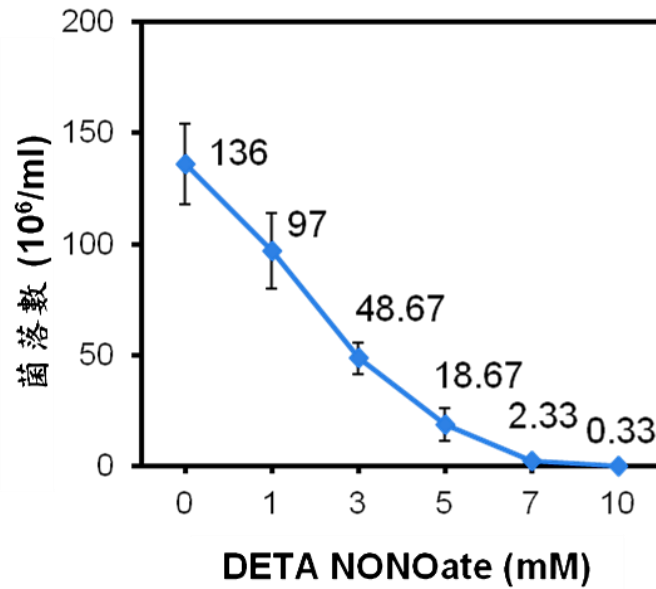
pH	7.4		
濃度(mM)	編號一	編號二	編號三
0			
pH	6.0		
0			
1			
3			



【圖六】塗盤結果

【表三】菌落數統計表

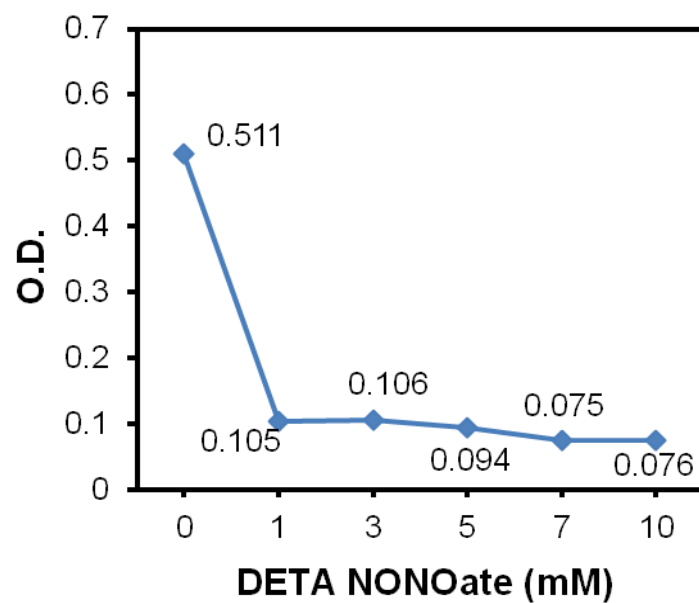
pH	7.4	6.0					
濃度(mM)	0	0	1	3	5	7	10
編號一	246	157	116	56	27	4	1
編號二	237	127	92	48	16	2	0
編號三	207	124	83	42	13	1	0
平均菌落數	230	136	97	48.67	18.67	2.33	0.33
殺菌百分率	-	-	28.68%	64.21%	86.27%	98.29%	99.76%



【圖七】不同濃度 NONOate 下之平均菌落數

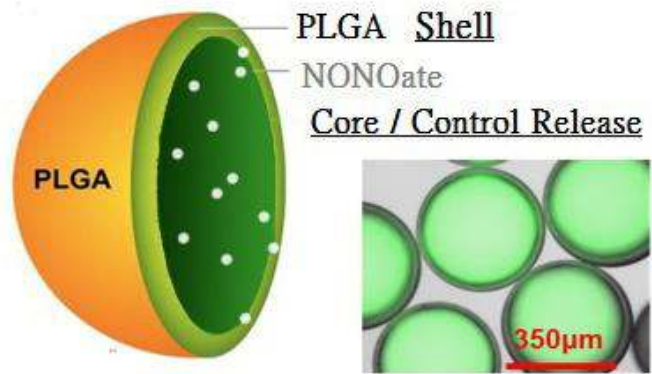
【表四】不同濃度 NONOate 對吸光值與菌落數之關係表

pH	7.4	6.0					
濃度(mM)	0	0	1	3	5	7	10
吸光值	0.631	0.511	0.105	0.106	0.094	0.075	0.076
平均菌落數	230	136	97	48.67	18.67	2.33	0.33






【圖八】加入不同濃度 NONOate 對吸光值影響之關係圖

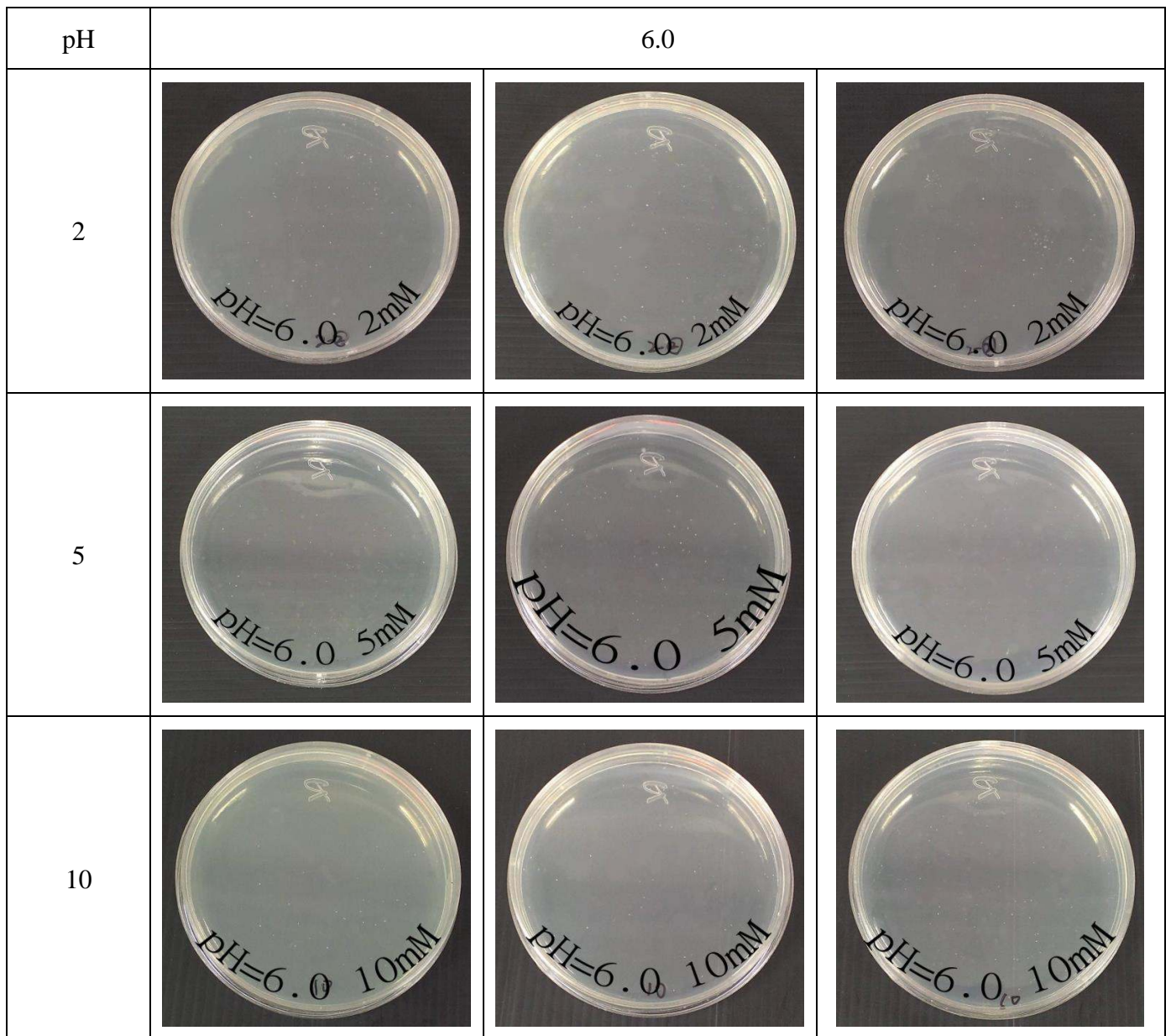
二、 將 NONOate 包於微球內，探討其釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之效果



【圖九】微球在 PBS 中之情形

【圖十】微球剖面示意圖

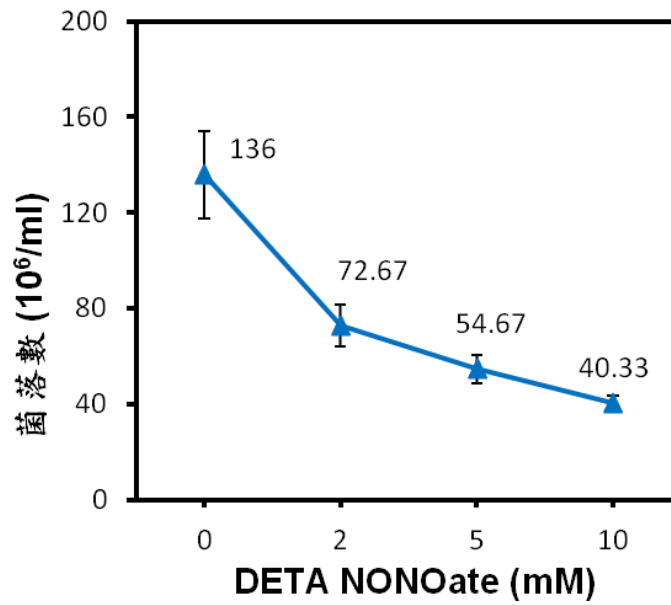
pH	7.4		
濃度(mM)	編號一	編號二	編號三
2			



【圖十一】塗盤結果圖

【表五】菌落數統計表

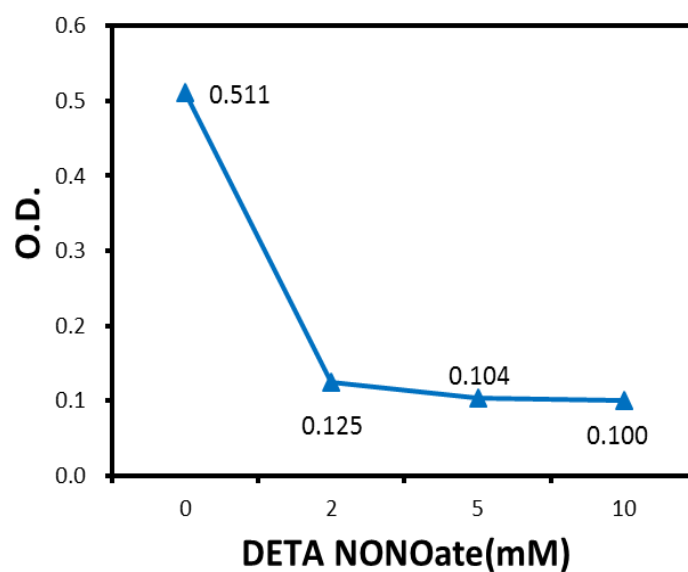
pH	7.4		6.0			
濃度(mM)	0	2	0	2	5	10
編號一	246	213	157	63	54	37
編號二	237	198	127	75	61	41
編號三	207	235	124	80	49	43
平均	230	215.33	136	72.67	54.67	40.33
殺菌百分率	-	6.37%	-	46.57%	59.8%	70.35%



【圖十二】不同濃度微球下之平均菌落數

【表六】含微球之菌液置於第三天之吸光值

pH	7.4		6.0			
	濃度(mM)	0	2	0	2	5
吸光值	0.631	0.217	0.511	0.125	0.104	0.100
平均菌數	230	215.33	136	72.67	54.67	40.33



【圖十三】放置不同濃度微球對吸光值影響之關係圖

陸、 討論

一、 實驗過程

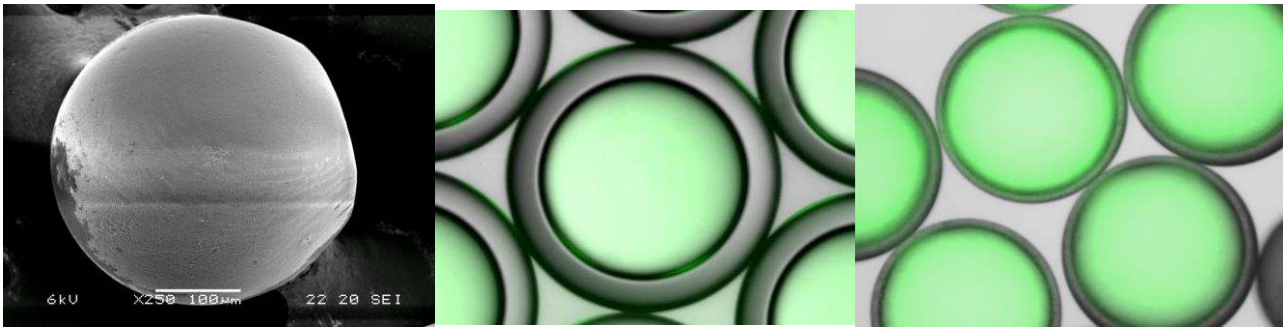
(一)、 探討不同濃度的 NONOate 抑制大腸桿菌之效果

1. 一氧化氮具有不成對的電子，結構不穩定，是種強氧化劑。因此我們運用一氧化氮的強氧化力，進而破壞細菌的結構，不但能達到抑菌的效果，還能減少細菌發生抗藥性的相關問題，以期改善現今抗生素濫用的情形。
2. 根據文獻記載，因細菌侵入人體引起發炎反應時造成的酸性環境約為 pH 6.0 上下，因此我們以 pH 6.0 LB Broth 培養大腸桿菌以模擬相同環境。而人體血液 pH 值約 7.3~7.4，因此我們選用 pH 6.0 與 7.4 之環境作為此實驗的探討對象。
3. 避免大腸桿菌沉底部而無法與 NONOate 接觸，影響實驗結果，培養時需放入震盪培養箱，使菌液能與 NONOate 均勻混合。
4. 用 pH 6.0 與 pH 7.4 的 LB Broth 來稀釋第一日所培養菌液到吸光值為 0.2。
5. 若直接取 50 μ L 菌液塗在 LB Agar 上，會因濃度太高而無法數出確切菌落數。因此我們嘗試將菌液稀釋 10^{-3} 以及 10^{-6} 倍，經實驗後發現，稀釋 10^{-6} 倍之菌液濃度適當，塗出的效果較佳，能更準確數出數目。
6. 將 LB Agar 以蓋子在下的方式放入烘箱培養，能避免盤子的上蓋的水氣或雜菌不慎掉入 LB Agar 上而影響實驗結果。

(二)、 將 NONOate 包於微球內，探討其釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之效果

1. PLGA 是一種無毒性、生物適應性良好的生物可吸收性高分子材料，可隨著人體內的新陳代謝排出體外，不會殘留於體內，且美國食品藥品監督管理局(FDA)許可這材料的使用，目前已被廣泛應用在醫學上或是藥學上。我們選用 PLGA 當作包覆微球的材料，此微球表面非常的完整、無孔洞(如【圖十四】)，不會造成藥物釋放。
2. PVA 是一種用途廣泛的水溶性高分子聚合物，因其同時具有親水基與疏水基兩種官能基，因此具有界面活性劑的特性。我們將它作為 NONOate 溶液與 PLGA 間的界面活性劑，幫助形成完整的微球。

3. 因實驗後發現 NONOate 於鹼性環境下較安定而不易釋出氣體，故為避免 NONOate 在製作過程中釋出一氧化氮，將 D.I. water 之 pH 值調為 8.0，用以溶解之。
4. 微球滴入 PVA 後，為避免二氯甲烷揮發過快造成中空微球的破洞，故 PVA 四周需放置冰塊，以維持低溫環境。
5. 微球滴入 PVA 時，為降低撞擊力，避免微球爆裂，毛細管底部需沒入液面。
6. 為避免微球滴入 PVA 後 PLGA 黏在一起而無法形成單顆獨立完整的微球，將磁石放入 PVA 中，並將磁石攪拌器放在 PVA 下方，以最低轉速緩緩攪拌 PVA。隨著 PVA 中的漩渦而轉動，從毛細管滴入 PVA 的微球可形成穩定的球體。
7. 靜置 PVA 待微球沉澱時會以鋁箔紙蓋住杯口，是為了防止灰塵掉入，以免灰塵黏於微球上。
8. 二氯甲烷具有毒性，不可直接注入人體，故要讓 PVA 中的微球靜置 1 小時，讓 PLGA 相的溶劑二氯甲烷揮發掉。因此，靜置後微球之 PLGA 相(如【圖十五】)會較剛製作完成時(如【圖十六】)薄。
9. 由於 PVA 不符合美國食品藥品監督管理局規定，無法應用於人體，而 PBS 的濃度與人體相匹，對細胞也無毒性，且符合美國食品藥品監督管理局規定，因此我們以 PBS 洗去微球表面的 PVA。
10. 為避免微球於製作過程中受雜菌污染，我們以紫外光照射 30 分鐘後，再讓其與菌液混合培養。
11. 由微流道製作之微球，其內均含有等量之 NONOate，因此，我們秤取不同重量之微球，再加入等體積之菌液，相當於調配不同濃度之 NONOate 以互相比較。
12. 為研究微球包裹 NONOate 之效果，我們除了挑選殺菌百分比約為 50% ([NONOate]=2mM) 與殺菌百分比近 100% ([NONOate]=10mM) 之 NONOate 濃度之外，亦另外挑選 NONOate 濃度為 5mM 做參考值。同時也加做於 pH=7.4 環境下，殺菌百分比約為 50% ([NONOate]=2mM) 之數據，並將以上數據與直接將 NONOate 加至菌液做比較。



【圖十四】微球的 SEM 照片 【圖十五】載體剛製成時照片 【圖十六】二氯甲烷揮發後照片
(二氯甲烷未揮發前)

二、實驗結果

(一)、探討不同濃度的 NONOate 抑制大腸桿菌之效果

1. 根據【圖四】，當 NONOate 溶於菌液的濃度越大時，釋出一氧化氮越多，菌液培養一日後顏色會越清澈，顯示殺菌的效果更好。
2. 根據【表三】和【圖六】推論，當 NONOate 溶於菌液的濃度越大時，釋出一氧化氮越多，殺菌的效果越好。在 pH 6.0 環境下，2 mM NONOate 之殺菌百分率接近 50%，10mM NONOate 之殺菌百分率接近 99.67%，殺菌效果佳。顯示殺菌率隨濃度提高而增加。
3. 根據文獻記載，吸光值與菌落數約呈正比關係。經實驗結果發現，大部分實驗數據有遵從「菌數越多，吸光值相對也較高」的趨勢，但我們發現【表四】中仍有些數據不符合此規則，因此我們推斷吸光值僅能用來簡單推估細菌多寡的程度，不能當作判斷細菌數的依據。有可能是因為菌液中一些已死亡的細菌還未進入自我分解階段，其存在的殘骸影響了該菌液的吸光值，因此不可只以吸光值斷定一氧化氮殺菌的效果。為了確定一氧化氮確實有殺死細菌，我們用 Bacterial Viability Kits 將菌液染色，觀察細菌的死亡程度。
4. 根據【表三】和【圖六】，我們推測 2mM 的 NONOate 約具有 50% 的殺菌率，因此我們選用加入 0、2、10mM NONOate 的菌液進行染色，以觀察細菌的死亡程度。根據【圖五】菌液螢光照可發現，pH7.4 0、2、10mM 的 NONOate 菌液幾乎都呈現螢

光綠，看不到螢光紅，可見 NONOate 在 pH7.4 的環境下無法釋放出足夠的一氧化氮，導致其殺菌效果均不佳。而 pH6.0 2mM NONOate 菌液呈現一半螢光綠一半螢光紅，又濃度增加至 10mM 時幾乎全呈現螢光紅，可見 NONOate 在 pH6.0 的環境下能釋放出大量的一氧化氮，進而提高其殺菌效果。從照片中我們可明顯確定大腸桿菌確實被一氧化氮的氧化力所殺死，且當 NONOate 溶液濃度提高，殺菌效果明顯增加。我們不需用大量的藥物，只需少量的 NONOate 產生的一氧化氮即可輕易地將大腸桿菌殺光。

(二)、將 NONOate 包於微球內，探討其釋出一氧化氮抑制大腸桿菌之效果

1. 根據【表五】，同樣是 2mM 的菌液，但 pH 7.4 的菌落數明顯比 pH 6.0 多，殺菌效果差 40.20%，可確定 NONOate 在酸性環境下較易釋出一氧化氮。當 NONOate 溶於菌液的濃度越大時，釋出一氧化氮越多，殺菌的效果更好。
2. 根據【圖十一】、【圖十二】，以及【圖十三】，符合 NONOate 在酸性環境下較容易釋出一氧化氮，故可推知當將其包進微球，接觸到酸性菌液時，便會產生大量一氧化氮，撐破 PLGA，並以一氧化氮之氧化力達到殺菌效果。當較多微球溶於菌液時，相當於溶於菌液之 NONOate 濃度較高，釋出一氧化氮較多，因此殺菌效果更好。
3. 含微球之菌液分別於 pH 7.4 與 pH 6.0 環境下進行實驗，在前者環境下，因環境酸鹼值不夠低，釋出一氧化氮不夠多，難將 PLGA 撐破，因此其殺菌效果較差。
4. 微球在 pH7.4 的環境下，較難釋出一氧化氮，在 pH 6.0 時較易釋出大量的氣體。因此，當微球注射進人體時，流經正常組織(pH 7.4 左右)不會隨意釋出一氧化氮；流經發炎部位時會因環境偏酸，大量一氧化氮生成而撐破微球，針對特定部位來殺死細菌。我們所製作的簡易微球，雖然殺菌效果不比直接將 NONOate 溶入菌液殺菌效果佳，但其最大優點是「針對小部位做出最大的治療效果」，能視環境而選擇性地釋出一氧化氮，避免毒殺正常的細胞。

柒、 結論

- 一、 藉實驗可知 NONOate 釋出的一氧化氮殺菌效果佳。
- 二、 NONOate 在酸性環境下比中性偏鹼的環境還易釋出一氧化氮。
- 三、 將 NONOate 包於微球內，其殺菌效果雖不如直接使 NONOate 溶入菌液為佳，但仍具有殺菌效果。
- 四、 NONOate 在鹼性環境下釋出的氣體不夠多，較難將 PLGA 撐破，達到殺菌的效果。而微球於發炎部位(酸性環境下)附近，NONOate 較易釋出大量的氣體，使一氧化氮針對發炎部位進行毒殺，不會誤殺其他部位正常的細胞。
- 五、 微球會依環境的酸鹼度而選擇性地釋出氣體，一旦微球爆裂便有許多一氧化氮釋出。能針對特定部位釋出大量一氧化氮來殺菌，是此微球的最大優點。
- 六、 運用一氧化氮的氧化力來殺菌，不會有抗藥性細菌的產生。

捌、 未來展望

從這次實驗中，我們找出 NONOate 抑制大腸桿菌的關係，並成功製作出簡易型、具選擇性的中空微球。希望未來能將包覆 NONOate 之微球應用到人體或動物身上，取代現今濫用的抗生素，用於醫療第一線，非但沒有環境污染，更能解決細菌抗藥性的問題，並期許未來能研發出更多種簡易的智慧型中空微球，在不開刀的情況下，針對傷患部位做出最簡便、最有效的治療方式。未來有機會可探討至少要多少濃度的 NONOate 包於微球內，釋出的一氧化氮才會能衝破 PLGA 的殼層，成功將一氧化氮釋出球外。或是可以改釋放其他氣體，治療其他疾病。

玖、 參考資料

- 一、 H. Sung, K. Sonaje, Z. Liao, L. Hsu, E. Chuang, “pH-Responsive Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Delivery of Insulin: From Mechanism to Therapeutic Applications”, ACS Nano, Vol.45, No.4, P.619, 2012.
- 二、 K. Chen, H. Liang, H. Chen, Y. Wang, P. Cheng, H. Liu, Y. Xia, H. Sung, “A Thermoresponsive Bubble-Generating Liposomal System for Triggering Localized Extracellular Drug Delivery”, ACS Nano, Vol.7, No.1, P.438, 2013.
- 三、 C.-J. Ke, T.-Y. Su, H.-L. Chen, H.-L. Liu, W.-L. Chiang, P.-C. Chu, Y. Xia, H.-W. Sung, “Smart Multifunctional Hollow Microspheres for the Quick Release of Drugs in Intracellular Lysosomal Compartments,” Angewandte Chemie-International Edition, vol.50, issue 35, pp.8086–8089, 2011.
- 四、 M.-F. Chung, W.-T. Chia, H.-Y. Liu, C.-W. Hsiao, H.-C. Hsiao, C.-M. Yang, H.-W. Sung, “Inflammation-induced drug release by using a pH-responsive gas-generating hollow-microsphere system for the treatment of osteomyelitis,” Advanced Healthcare Materials, vol. 3, issue 11, pp.1854–1861, 2014.
- 五、 李郁君(2012)。發展溫度敏感性產氣式抗癌微脂體。國立清華大學化學工程學系碩士論文。
- 六、 黃培傑(2009)。具酸鹼敏感性可快速釋放藥物之微球系統。國立清華大學化學工程學系碩士論文。
- 七、 劉泓奕(2013)。酸鹼敏感中空微球釋放一氧化氮用以克服癌細胞抗藥性探討。國立清華大學化學工程學系碩士論文。

壹拾、附件

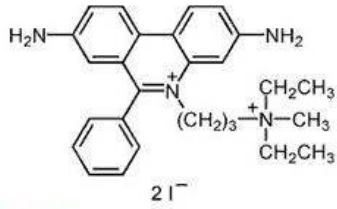
一、配製 LB Broth

- (一)、秤取 25g 的 LB Broth 粉末溶解至 1L 的水中，裝入血清瓶。
- (二)、在血清瓶瓶蓋上蓋上鋁箔紙、貼上滅菌指示帶後，放入滅菌釜，以 121°C 高溫滅菌 15 分鐘。
- (三)、取出血清瓶待冷卻後，於無菌操作台將 LB Broth 分裝進 15mL 的離心管，並用 Parafilm 封口蠟膜封住管口。完成後放入 4°C 冷藏櫃保存備用。

二、配製 LB Agar

- (一)、秤取 40g 的 LB Agar 粉末溶解至 1L 的水中，裝入血清瓶。
- (二)、在血清瓶開口上蓋上鋁箔紙、貼上滅菌指示帶後，放入滅菌釜，以 121°C 高溫滅菌 15 分鐘。
- (三)、取出血清瓶待冷卻後，於無菌操作台分裝進塑膠培養皿中，並用 Parafilm 封口蠟膜封住培養皿。完成後放入 4°C 冷藏櫃保存備用。

三、 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits

CAS 名稱	Phenanthridinium,3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl-, diiodide 25535-16-4	 <p>2 I⁻</p> <p>圖片引用自： http://www.lifetechnologies.com/search/support/supportSearchAction.action?supportSearchArea=Chemical+Structures&initialSearch=true&refineSearch=true&mode=and&query=47</p>
分子式	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄ (分子量：668.4)	
綠色螢光染劑	SYTO [®] 9 nucleic acid stain	
紅色螢光染劑	propidium iodide (nucleic acid stain)	
染色原理	<p>不管細菌是活著還是死亡，SYTO[®]9 stain 均可以進入細菌體內，使細菌在螢光顯微鏡下成綠色螢光；而 propidium iodide 只能穿透細胞膜有受損的細菌。當細菌內兩個染劑同時出現時，propidium iodide 會使 SYTO[®]9 的量減少而呈現紅色螢光。因此染色後置於螢光顯微鏡下，被認為已死、將死或細胞膜受損的細菌會染成紅色，而細胞膜完好的細菌會呈綠色。</p>	

四、 Diethylenetriamine NONOate

正式名稱	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate	<p>圖片引用自： https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/82120</p>
中文名稱	乙烯三胺親核複合體	
保存條件	-21°C，乾燥	
顏色	白色	
分子式	C ₄ H ₁₃ N ₅ O ₂	
特色	溶於水時會釋出一氧化氮	

【評語】 040203

學生們利用新的 PLGA 形成大的微米球體，並將會放出 NO 的 NONOate 包於微球裡利用其釋出的一氧化氮，可抑制大腸桿菌，雖然微球尺寸極大，但此 NO 釋出方法具有創意，有進一步開發的可能性。