

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 化學科

第三名

最佳創意獎

050210

水中嬌龍-奈米金水(AuNT water)創新應用

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高二 黃楷晴 高二 李玟締 高二 陳品洋	指導老師： 馬瑪宣 張閔勛
---	-----------------------------

關鍵詞：奈米金水(AuNT water)、透析、直腸癌細胞

摘要

為了瞭解 AuNT water 對生物生長以及分子擴散速率的影響，本實驗比較分析了奈米金水(Au nanoparticles(NPs)-treated water, AuNT water)及去離子水(Deionized Water, DI water)對於綠豆、螺的生長觀察實驗，以及細胞實驗。結果顯示，以 AuNT water 加養分種植綠豆及養殖螺的組別生長情形較佳，推測 AuNT water 可以提高水中養分進入生物體的效率，使其生長情形較好。而在培養 HCT15 直腸癌細胞的實驗當中，我們以兩種不同水培養細胞，加入癌細胞藥品 cisplatin(CDDP)。由數據分析，AuNT water 加入藥物比 DI water 更能夠抑制細胞生長。在以自製透析儀器探討 AuNT water 對擴散速率的影響方面，模擬血液透析過程的實驗結果顯示，物質在 AuNT water 中擴散速率較快。本實驗研究結果可作為 AuNT water 是否可以作為營養物質、藥物的輔助吸收工具之應用參考，也可在血液透析方面做延伸性的研究。

壹、 研究動機

近年來媒體大篇幅報導關於著名的「長壽村」，此位於日本沖繩的大宜味村「長壽村」與其他地區最為不同的是，在地居民的平均壽命高於一般普遍民眾。由網路、書籍、報紙得知，這些居民有可能生活習慣、飲食與他人不同，更有可能就是因村子地下岩層的關係使當地村落的地下水變為 AuNT water，生物課堂上也學到了，病患利用血液透析的方式進行洗腎，其透析液更是用 DI water 所組成。這些資訊引起了我們的興趣，並經由文獻[1][2]探討可以得知，AuNT water 相較於一般的水，分子團較小，且能改善血液透析效率，使病人不會有噁心感，於是我們想共同著手進行究竟 AuNT water 是否真如資訊所說的，對生長方面有如此神奇的影響，或者在現實生活中可以有實際的應用價值。

貳、研究目的

實驗前我們做了以下假設：AuNT water 分子團大小較一般含氫鍵的水小，是否可以使動植物吸收更為快速？是否擴散速率較一般水快速？是否通過半透膜做擴散實驗分子通過速率加快？以上等等為我們實驗探討的主軸。

主要研究目標

- 一、種植綠豆及螺來觀察 AuNT water 對於生物生長的影響
- 二、自製擴散儀器進行半透膜擴散實驗
- 三、自製透析儀器模擬血液透析實驗
- 四、直腸癌細胞 HCT15 培養實驗

參、研究設備及器材

一、以 AuNT water 養殖生物

(一)研究設備與材料

1.實驗生物

(1)綠豆 75 顆。來源:一般超市販售的綠豆。

(2)蘋果螺 10 隻。來源：台北醫學院生化實驗室 (重量平均約 553.04 mg/隻)。

2.設備與器材

(1)培養皿

(2)檯燈

(3)水族箱 2 個(長 18.5 公分,寬 14.5 公分 ,高 15.5 公分)

(4)陶瓷顆粒 (約 200 顆)

(5)有奈米金附著的陶瓷顆粒 (約 200 顆、半徑 10 nm)

(6)LED 綠光燈條 (2 條)

3.藥品

- (1)液態肥料（水、硝酸化合物、硫酸化合物、EDTA-Fe）
- (2)AuNT water（3000 mL）
- (3)DI water（3000 mL）
- (4)日光燈 20 瓦
- (5)蘋果螺飼料。來源：JPD 日本動物製藥小型魚健康飼料

二、自製儀器實驗

1.自製擴散儀器（半透膜擴散實驗）

- (1)滴定管 25mL
- (2)圓形黑色橡膠圈（直徑 4 公分）
- (3)壓克力管柱
- (4)橡皮塞 x2
- (5)半透膜（容許分子量 40~12000 道爾吞的分子通過）
- (6)尿素 1g
- (7) AuNT water（125mL） DI water（125 mL）

2.自製透析儀器(模擬血液透析實驗)

- (1)壓克力版 15x13x22.5cm
- (2)橡皮管
- (3)半透膜 10.5cm
- (4)密封膠帶
- (5)棉線

- (6)橡皮筋 x3
- (7)尿素 5g
- (8)磁鐵 x2
- (9)抽水馬達 x1
- (10)攪拌子(磁石) 6x1cm 一顆
- (11)磁力攪拌器(來自台北醫學大學醫學科學研究所)
- (12)尿素測定組(urea kit) (來自台北醫學大學醫學科學研究所)

三、HCT15 直腸癌細胞培養實驗

1. HCT15 直腸癌細胞培養實驗

- (1)直腸癌細胞 HCT15(來源：台北醫學大學醫學科學研究所)
- (2)胰蛋白酶 Trypsin
- (3)胎牛血清 FBS
- (4)12-well-plate
- (5)RPMI 粉末
- (6)NaHCO₃
- (7)pH meter 酸鹼測定儀
- (8)AuNT water
- (9)DI water
- (10)癌細胞藥品 Cisplatin(CDDP)
- (11)無菌操作台
- (12)酒精
- (13)MTT reagent (MQX200)

- (14) 螢光光譜儀 fluorescent reader
- (15) 二甲基亞砜 DMSO
- (16) 生長箱 (incubator) (Bio-Hazard)
- (17) 離心機 (KUBOTA 8420)
- (18) 6-well plate
- (19) 抗生素盤尼西林-鏈黴素 P/S(Penicillin-Streptomycin)

肆、研究過程或方法

預備實驗-AuNT water 製備

一、原理

運用一個特殊的裝置讓水分子通過由等離子體引起的熱電子轉移處理，減少水分子內相互作用能提供更低的過電位和更高的效率電解氫生產。另外，這些增強催化活性可用 DI water 混合。且大部分這些活動呈線性正比，非氫鍵合的結構，這是衍生自 O-H 拉伸卷積拉曼光譜。經由奈米金的過濾及綠光的照射，能使水分子維持小分子的狀態。

將 DI water 流經充滿奈米金（半徑 15nm）吸附的陶瓷顆粒，以 3mL/min 流速，在外加波長 532nm 的綠光 LED 照射下，取得之水，稱之為 AuNT water (如圖.1 圖.2)。且從[2]可知，DI water 和 AuNT water 中，沒有氫鍵的水分子 (DNHBW non-hydrogen-bonded water)比例分別為 21.94 和 30.31%。AuNT water 中 DNHBW 的比例隨時間減少，0,1,2,3 和 5 天中的比例分別為 24.11,23.11,22.11,21.39 %。

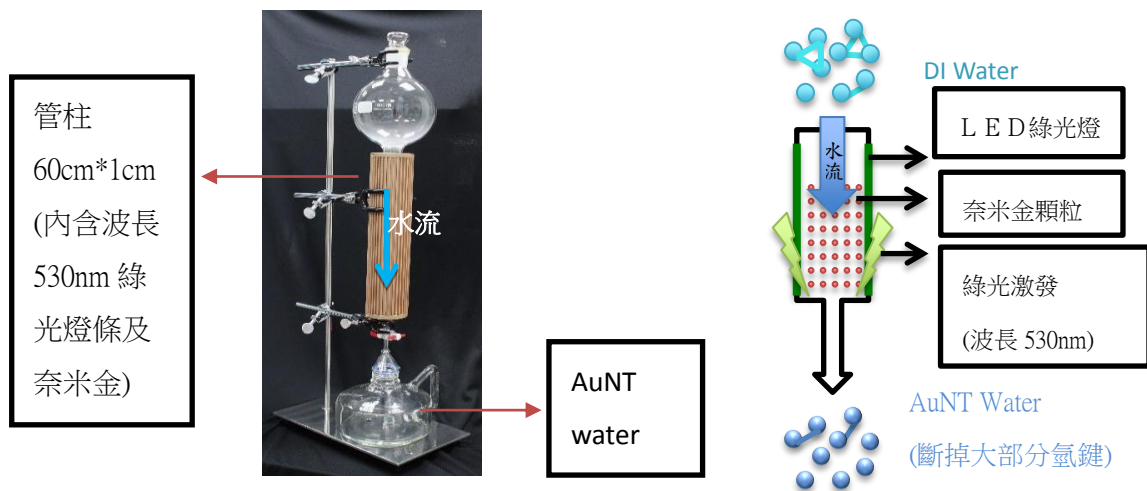


圖. 1 製備 AuNT water 儀器

圖. 2 AuNT water 產生流程

圖片來源: 台北醫學大學醫學科學研究所

二、 AuNT water 的特性

AuNT water 的沸點、熔點皆和一般水相同，但水分子間的聚合力較低，能維持小分子團的狀態時間也有限，水分子間團會逐漸重新聚合，在大約 7 天後會完全恢復為一般水的狀態。因此我們實驗用的 AuNT water 皆為 24 小時內製作完成的。

三、 AuNT water 的性質測試

AuNT water 製備完成時，即可開始進行其特性的實驗。由實驗動機衍生我們對 AuNT water 的假設與問題：AuNT water 是否使物質被吸收速率更為快速？植物是否因以 AuNT water 培養生長情形更為佳？AuNT water 的通透、擴散速率是否更為快速？為了求得以上問題的解答，我們將實驗分為以下三部分：

- (一)以不同性質的水養殖綠豆、螺。
- (二)進行擴散實驗。
- (三)設計半透膜實驗裝置，並測試尿素在不同性質的水中擴散速率是否相同。
- (四) AuNT water 對直腸癌細胞 HCT-15 生長影響的探討。

實驗一-AuNT water 對動植物生長的探討

1.種植綠豆

- (1)準備綠豆，分為二組（DI water 組、AuNT water 組），一組五個培養皿，分別種植五顆綠豆於室溫的環境下，且每日維持 12 小時的日光燈照射。
- (2)使用 DI water、AuNT water 各約 10cc，每日早晨 10:00 澆水。
- (3)觀察其生長情形，以十一日為一觀測時間，測量發芽的長度。

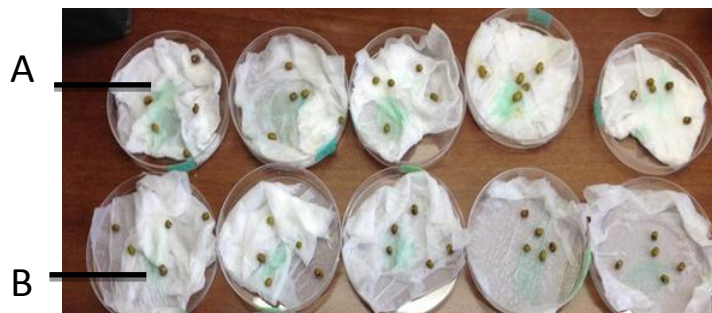


圖. 3 以 AuNT water 種植綠豆
A：DI water 5 組
B：AuNT water 5 組

2.加入養分種植綠豆

- (1)準備綠豆，分為二組（DI water 組、AuNT water 組），一組五個培養皿，分別種植五顆綠豆於室溫的環境下，且每日維持 12 小時的日光燈照射。
- (2)使用 DI water、AuNT water 各約 10cc，每日加入 3mL 的液態肥料並於每日早晨 10:00 澆水。
- (3)觀察其生長情形，以十一日為一觀測時間，測量發芽的長度。

3.養殖螺

- (1)準備兩缸魚缸，一為奈米金作為底層，一為陶瓷顆粒做底層（如圖. 4）。
- (2)兩者皆以綠色光照，頻率約為 530nm，僅為以維持其 AuNT water 的狀態，避免回復至大分子團的狀態（如圖. 5）。
- (3)奈米金底層組以 AuNT water 養殖、陶瓷顆粒則以 DI water 養殖，分別加入約三公升在缸中養殖、並於每缸中加入 2 顆飼料，每星期一次。飼料中內含維生素 A、維生素 D3、維生素 E、維生素 C、礦物質等，故我們可以以螺的生

長顆數以及重量界定不同水搭配養分使螺生長的情形。(如圖.6)。

(4)以一個半月為觀測時間，每七日秤重一次，並算總蘋果螺顆數數量及秤重，觀察其繁殖與成長情形(如圖.8)。



圖.4 左為奈米金顆粒組、右為陶瓷顆粒組

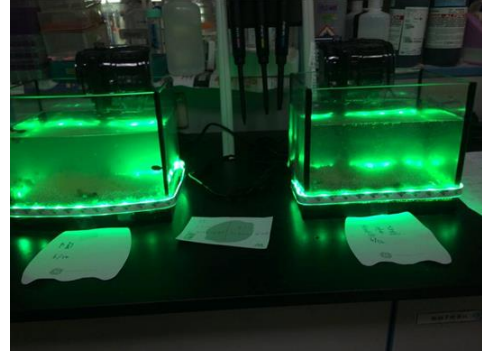


圖.5 下方照射綠光，維持(左)奈米金 AuNT water

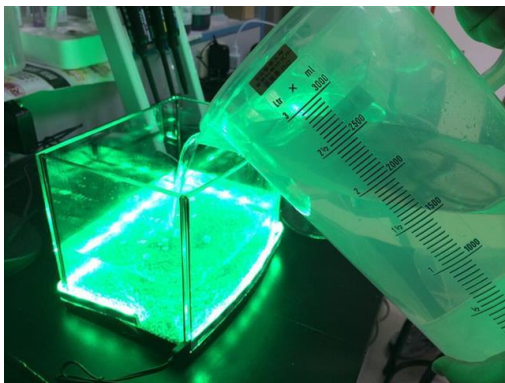


圖.6 分別加入三公升的 DI water 和 AuNT water



圖.7 奈米金顆粒



圖.8 取出的螺首先觀察、再秤重，算總數量

實驗二-自製儀器實驗

1.設計半透膜實驗裝置

(1)半透膜

半透膜的孔徑能使膜內外的溶質無法自由通透，而兩邊溶液為達成濃度的平衡便產生一種壓力，這次實驗我們使用的半透膜是能使分子量 40~12000 μm 的溶質大小可以通過的膜。

(2)自製擴散儀器

(a)設計理念：利用壓克力板及半透膜製造簡易的擴散裝置（如圖. 9、圖. 10）

(b)材料：壓克力版、O-Ring、螺絲*4、半透膜

(c)製作過程：

I. 克服漏水問題，利用 O-Ring、螺絲 使其連接處無縫隙

II. 克服產生氣泡問題：利用細針，將氣泡吸出

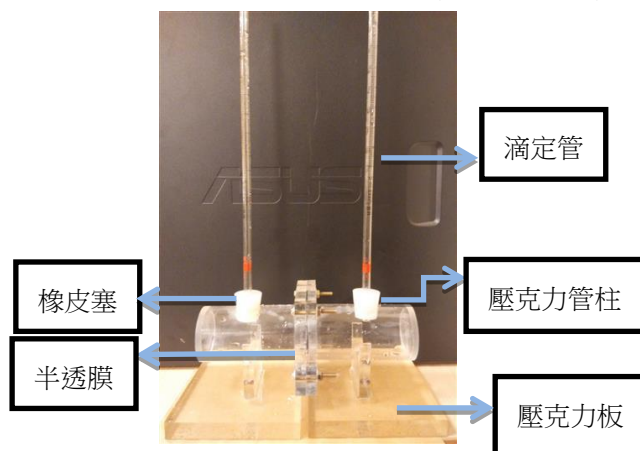


圖. 9 裝置正面圖

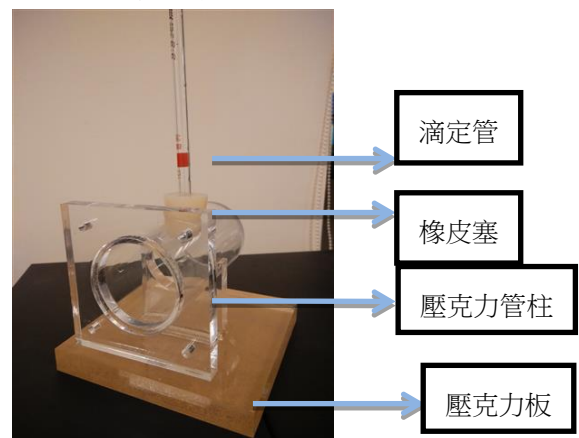


圖. 10 裝置側面圖

(兩壓克力管住中間夾一半透膜)

(兩壓克力管住
中間夾一半透膜)

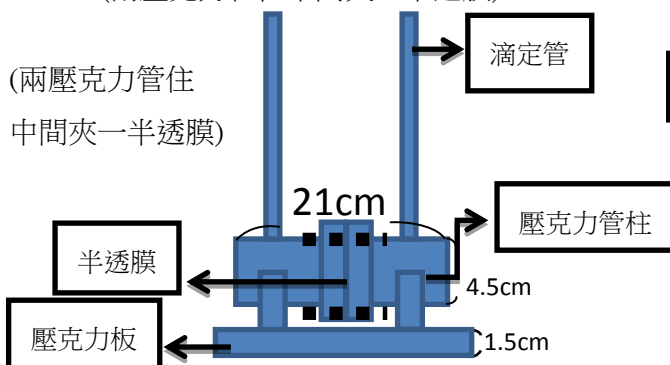


圖. 11 裝置正面設計

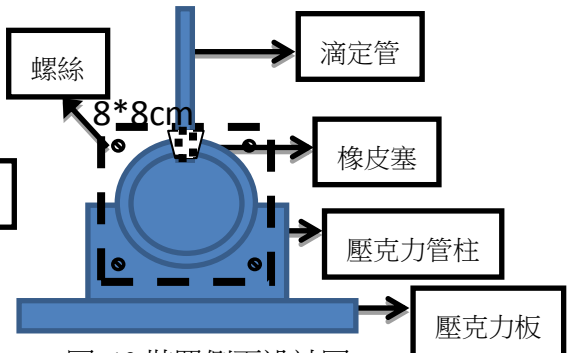


圖. 12 裝置側面設計圖

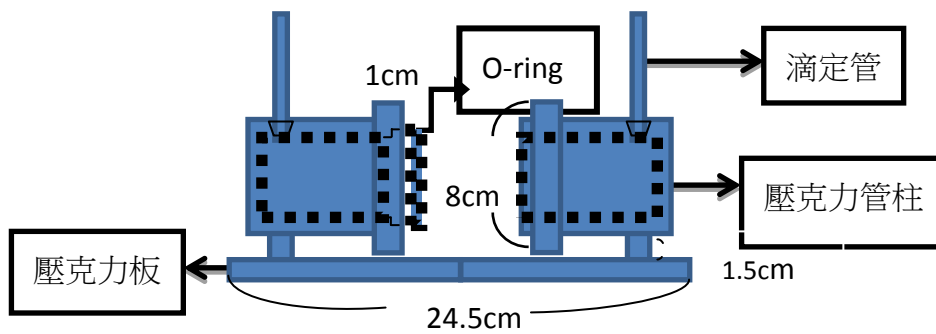


圖. 13 裝置分離設計圖

2. 自製透析儀器模擬血液透析實驗

(1) 原理

利用抽水馬達帶動含尿素之溶液通過半透膜管柱，再藉由濃度梯度差使尿素通過半透膜，造成膜外濃度上升。

(2) 半透膜

半透膜的孔徑能使膜內外的溶質無法自由通透，而兩邊溶液為達成濃度的平衡便產生一種壓力，這次實驗我們使用的半透膜是能使分子量 40~12000 μm 的溶質大小可以通過的膜。

(3) 自製儀器

(a) 設計理念：利用壓克力板及半透膜製造簡易的透析裝置

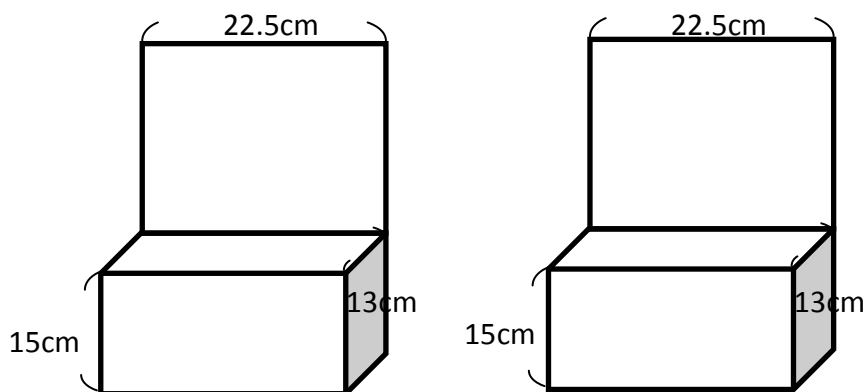


圖. 14 裝置分解圖

分兩種實驗- 以 DI water 當溶劑或以 AuNT water 當溶劑，左側壓克力盒為置放 2 公升 DI water/AuNT water，右側裝 1 公升含尿素的 DI water/AuNT water。

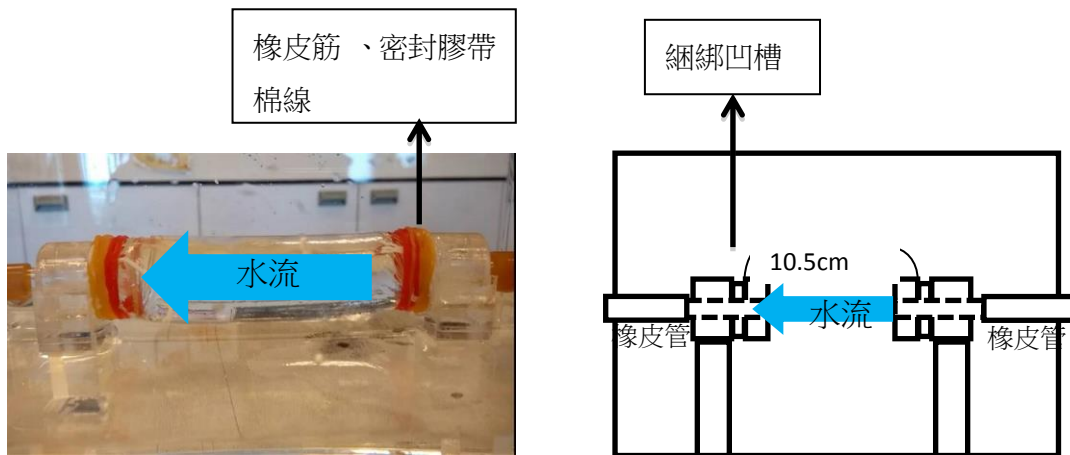


圖. 15 半透膜管裝置組裝圖

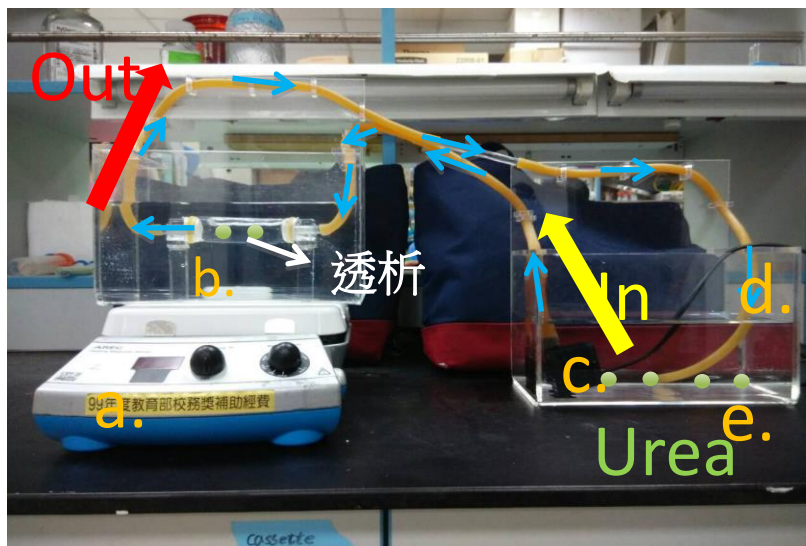


圖. 16 透析儀器裝置透析流程圖

a.磁力攪拌器 b.攪拌子 c.抽水馬達 d.橡皮管 e.綠色點為尿素示意圖(實際溶在水中)

尿素經由抽水馬達及橡皮管由右側向左側通過，流經透析管時會因為濃度梯度差而擴散至透析管外側，再經由攪拌子的轉動使其外側濃度趨於一致，未擴散的尿素則繼續由水帶離透析管，再藉由橡皮管由左側流到右側。

半透膜泡開後，兩端分別套上左右兩個套組上用橡皮筋、密封膠帶及棉線網綁，使其密封於裝置上。水流會從右側橡皮管通過半透膜管進行透析，再由左側離開。

(4)實驗步驟:

- (a)準備 3 公升的 DI water 及 AuNT water 。
- (b)分別倒入 2 公升至左水槽，1 公升至右水槽。
- (c)剪取 10.5 公分的半透膜，用熱水泡開。
- (d)裝置分別利用密封膠帶纏綁數圈，再將半透膜套上，利用兩條橡皮筋及棉線纏綁，以避免漏水。
- (e)取 1 公克的尿素，放置於右水槽，並使用攪拌子及磁力攪拌器，使其均勻混合，達到濃度 100mg/dL 。
- (f)開啟抽水馬達。
- (g)每隔 10 分鐘，在半透膜外 2 公分處，用 pipette 抽取 2cc 溶液，實驗時間 50 分鐘，共收集 5 次自製儀器模擬血液透析實驗溶液，DI water 及 AuNT water 共 10 組。

3.尿素溶質測定

(1)標準曲線的製備：

利用 5 μ l 的 100 mM 尿素標準液滴入 995 μ l DI water，將尿素稀釋至 0.5mM 後攪拌均勻。分別添加 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l 到每個 well。每個 well 分別利用 Assay Buffer 調整濃度至 50 μ l/well 來配置標準液。

(2)樣本製備

1-25 μ l 的樣品(血清,血漿,尿液,提取物或其它液體)可直接添加到 96 well plate。例如,我們實驗的樣本為尿素溶液,就如後者利用 Assay Buffer 使體積達到 50 μ l/well。對於未知樣品,我們建議測試幾個劑量的樣品,以確保讀數均在標準曲線範圍內。

(3)反應物

依照所測定的數目混合足夠試劑。對於每個 well，準備 50 μ l/well 反應物進行測定，反應物的內容如下所示:

樣品	樣品控制組
42 μ l Assay Buffer	44 μ l Assay Buffer
2 μ l OxiRed Probe	2 μ l OxiRed Probe
2 μ l Enzyme Mix	2 μ l Enzyme Mix
2 μ l Developer	2 μ l Developer
2 μ l Converter Enzyme	

添加 50 μ l 的反應物至標準溶液和待測試樣品。加入 50 μ l 的樣品控制組到對應的 well。拌勻後，要避光並放置在 37°C 的恆溫箱 60 分鐘。

(4)測量：利用微板讀數器(micro plate reader)，在 O.D. 570nm 的光譜測定吸光值。

(5)計算：減去所有讀數為 0 的 well。套用正確的樣品讀數至標準曲線然後計算。

$$C = Sa/Sv \text{ nmol}/\mu\text{l or mM}$$

Sa 取自標準曲線上樣品未知的尿素濃度 (nmol)

Sv 是樣品加入 well 的體積(μ l)

尿素重 60.07g/mol.

實驗三-1：AuNT water 對細胞生長影響的探討

1. HCT-15 直腸癌細胞培養

預實驗：在進行正式 12-well-plate 細胞培養之前，首先使用 6-well-plate 培養直腸癌細胞 HCT-15，進行並無設定 n=3 的實驗，此實驗主要目的為初步推估我們的假設是否正確，故這是 12-well-plate 實驗的預先準備，在 12-well-plate 中我們設定重複性 n=3，能夠增加實驗的準確性，而此 6-well-plate 實驗的目的是取得初步觀察以便進行之後的 12-well-plate 正式實驗。

(1)將 HCT15 調整至 2×10^5 個/well。

- (2)培養 2 盤 6-well-plate，分別培養 24 小時及 48 小時。
- (3) 在 2 盤各 well 中加入對照 medium，放入恆溫培養箱中培養，待隔日觀察。
- (4)收 24 小時組，從培養箱中取出 24hr-plate，在 hood 內抽取廢液，做存活率實驗觀察(MTT)。
- (5) 再隔一日，收 48 小時組，從培養箱中取出 48hr-plate，在 hood 內抽取廢液，做存活率實驗觀察(MTT)。

2. 12-well-plate 正式實驗

- (1)原理：大分子團水在經過特殊處理後成為 AuNT water，培養直腸癌細胞 HCT-15 於 12 well-plate 中，觀察使用 AuNT water 及 DI water 配置 medium、AuNT water 及 DI water 配置藥品 CDDP (cisplatin) 經過 24、48 小時後的存活率 (MTT)。借此推測 AuNT water 是否能使物質通過細胞膜的效率更加。

(2)試劑配置：

- (a)medium 配置：1ml medium/ well (如表 1)，並使用 NaOH, HCl 調配適當到 pH 範圍內。

表 1、medium 配置分析表

試劑種類	內容物
CDDP(cisplatin)	10 micro liter 稀釋 100 倍，取 50 microliter
DI water medium	RPMI powder, NaHCO ₃ , DI water
AuNT water medium	RPMI powder, NaHCO ₃ , 小分子水 (AuNT water)
CDDP- DI water	RPMI powder, NaHCO ₃ , DI water, CDDP(cisplatin)
CDDP- AuNT water	RPMI powder, NaHCO ₃ , 小分子水 (AuNT water), CDDP(cisplatin)

- (a)調整 pH 值：使用 pH meter 測酸鹼值，將(1)配置好的試劑控制在 pH7.2~pH7.4
- (b)分裝過濾：分裝入不同 tube 中並使用 filter 過濾，最後離心 60sec 確保試劑均勻混合。

(3)實驗步驟：

- (a)將 HCT15 調整至 2×10^5 個/well。
- (b)培養 2 盤 12-well-plate 分別培養 24 小時及 48 小時。
- (c)在 2 盤各 well 中加入對照 medium，放入恆溫培養箱中培養，待隔日觀察。
- (d)收 24 小時組，從培養箱中取出 24hr-plate，在 hood 內抽取廢液，做存活率實驗。
- (e)在隔一日，收 48 小時組，從培養箱中取出 48hr-plate，在 hood 內抽取廢液，做存活率實驗觀察(MTT)。

實驗三-2-直腸癌細胞存活率 (MTT) 試驗

1.HCT-15 直腸癌細胞存活率 (MTT) 試驗

(1)存活率 (MTT) 測定：

- (a)於實驗 (一) 中的 12-well-plate 抽乾上清液後，加入 MTT reagent 150 micro liter，避光靜置 90 分鐘。
- (b)加入 150micro liter 的 DMSO 於各個 well 中，溶解結晶。
- (c)等待 well 中液體逐漸由黃轉為紫色，即送到 fluorescence reader，設定波長 570nm，取得 O.D.值。

伍、研究結果

一、以 AuNT water 及 DI water 不加養分種植綠豆

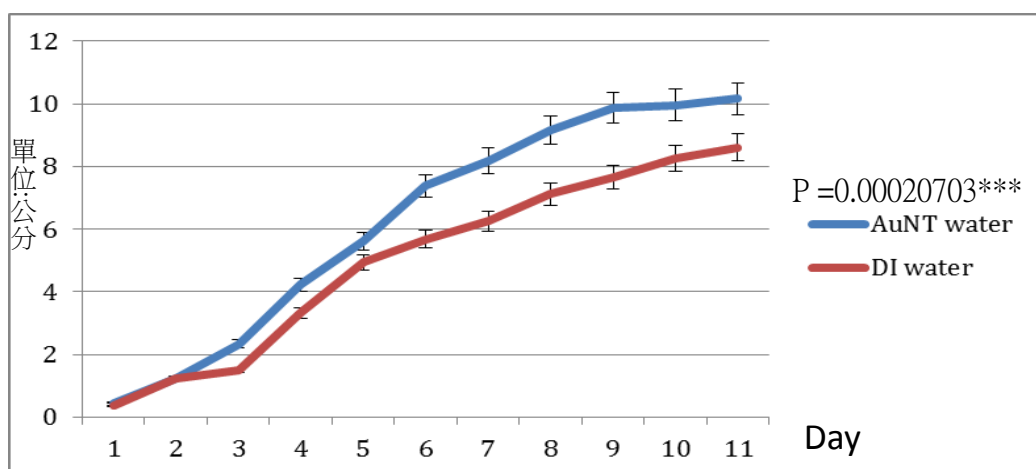


圖. 17 2 種不同性質的水種植綠豆成長差異圖

【結果】以統計學方法 ONE WAY AVONA，95 % 信賴區間，檢定二種不同性質的水種植綠豆的發芽長度差異。結果發現，比較 AuNT water 及 DI water 種植綠豆，11 天後綠豆的生長情形有顯著差異($P = 0.00020703$, $P < 0.001^{***}$)，以 AuNT water 種植綠豆的組別生長情形較佳。並且，由此結果可知，AuNT water 對綠豆生長沒有毒性。而為了測試在水中增加養分對研究結果是否有影響，我們設計了實驗二。

二、以 AuNT water 及 DI water 加養分種植綠豆

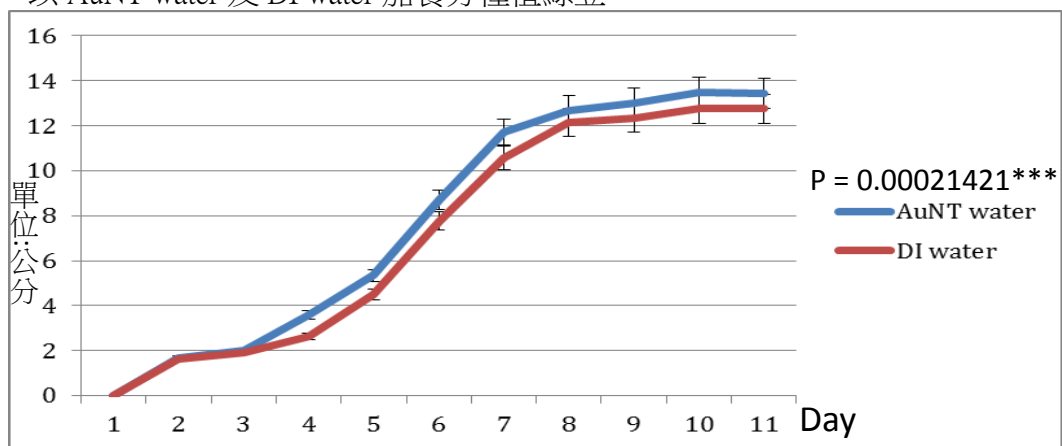


圖. 18 以 2 種不同性質的水加入養分種植綠豆成長圖

【結果】以統計學方法 ONE WAY AVONA，95 % 信賴區間，檢定二種不同性質的水加養分種植綠豆的發芽長度差異。結果發現，比較 AuNT water 及 DI water 加養分種植綠豆，11 天後綠豆的生長情形有顯著差異($P = 0.00021421$, $P < 0.001^{***}$)，以 AuNT water 加養分種植綠豆的組別生長情形較佳。初步推測，AuNT water 可以提高水中養分進入綠豆效率，使其生長情形較好。

三、養殖螺

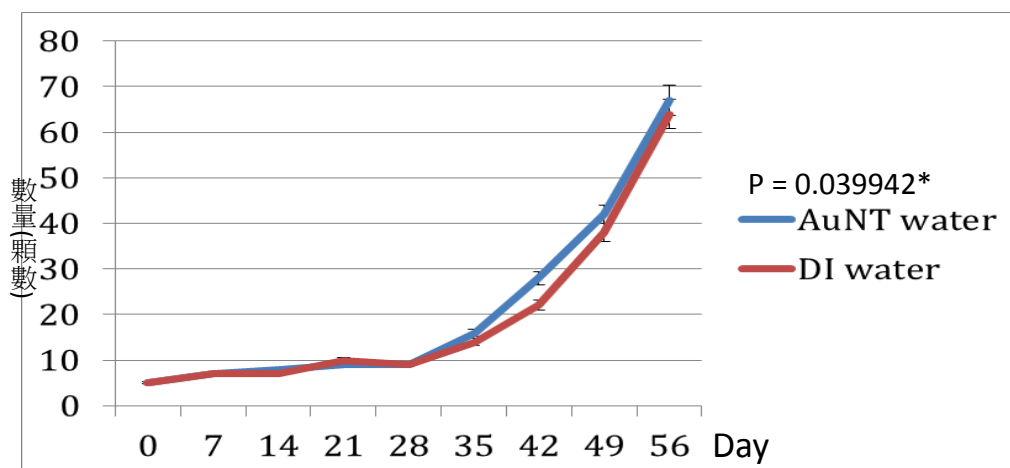


圖.19 以 2 種不同性質的水養殖螺數量差異圖

【結果】以統計學方法 ONE WAY ANOVA，95 % 信賴區間檢定兩不同性質的水養殖螺的顆數差異。結果發現，以 AuNT water 養殖螺，在生長 28 天後至 56 天，螺的數量明顯較多($P = 0.039942$, $P < 0.05^*$)。初步推測，AuNT water 較能促進螺利用環境中的養分，並且以此種水養殖，對螺無毒害。

四、自製擴散儀器實驗

結果：O ring 變形情形嚴重導致裝置嚴重漏水，開發新型的自製透析模擬血液透析實驗裝置

原因 (1) O ring 經過時間有變形問題(如圖. 20)

(2)螺絲附近有漏水問題(如圖. 21)

(3)高度差沒有明顯變化

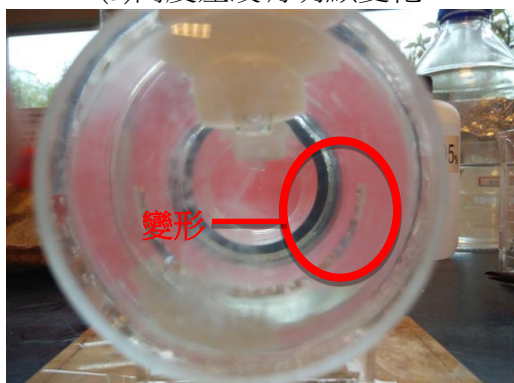


圖. 20 O ring 經過時間有變形問題



圖. 21 螺絲附近有漏水問題

五、自製透析儀器模擬血液透析實驗

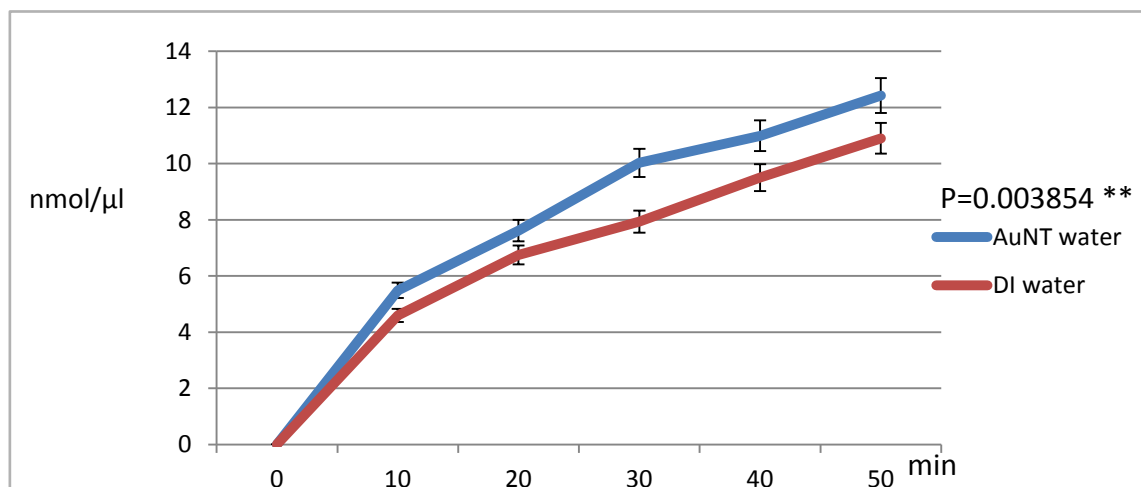


圖. 22 以自製透析儀器測試 2 種不同性質的水中尿素擴散差異圖

【結果】以統計學方法 ONE WAY ANOVA，95%信賴區間，檢定二種不同性質的水造成的透析差異。結果發現，比較 AuNT water 及 DI water 透析的多寡，有顯著差異($P = 0.003854, P < 0.01^{**}$)，AuNT water 透析的尿素較多。

六、HCT-15 直腸癌細胞培養

(一)、預實驗：

預實驗中培養了 HCT-15 直腸癌細胞，實驗中 6 個 well 中加入不同的試劑培養，但因編號⑥well 細胞數及 medium 劑量不足，故不以採計 well⑥。故總共分為 5 組：DI water+FBS+P/S、AuNT water+FBS+P/S、CDDP+DI water+FBS+P/S、CDDP+AuNT water+FBS+P/S、AuNT water

表 2 6 well-plate 內含物示意

① DI water+FBS+P/S	② AuNT water+FBS+P/S	③ AuNT water
RPMI powder	RPMI powder	RPMI powder
NaHCO ₃	NaHCO ₃	NaHCO ₃
DI water	AuNT H ₂ O	AuNT H ₂ O
FBS	FBS	FBS
P/S	P/S	P/S
④CDDP+ DI water+FBS+P/S	⑤ CDDP+ AuNT water+ FBS+P/S	⑥此組為空 well，僅含少量 medium，不以採計
Cisplatin(CDDP)	Cisplatin(CDDP)	RPMI powder 少量
RPMI powder	RPMI powder	NaHCO ₃ 少量
NaHCO ₃	NaHCO ₃	DI water 少量
DI water	AuNT water	
FBS	FBS	
P/S	P/S	

廢液顏色：使用 DI water 的組顏色與 AuNT water 組顯著不同，DI water 較黃，AuNT water

較為粉色（如圖. 23）由結果推斷，應是配置 medium 時的酸鹼度不同導致顏色差異，故之後的 12-well-plate 實驗中，我們將使用酸鹼測定儀，在配置 medium 時將試劑調整至 pH7.2-7.4 內，減少影響實驗的因素。



圖. 23 廢液顏色

- ① DI water+FBS+P/S
- ② AuNT water+FBS+P/S
- ③ AuNT water
- ④ CDDP+DI water+FBS+P/S
- ⑤ CDDP+ AuNT water+FBS+P/S
- ⑥ 量不足不採計

(二)、HCT-15 直腸癌細胞培養實驗：

實驗中分為四組（DI water、AuNT water、CDDP+DI water、CDDP+AuNT water）

(如表 3)。四組重複 3 次，在細胞盤上種滿 12 個 well。

表 3 12well-plate 內含物示意

①DI water	②AuNT water	③CDDP+DI water	④CDDP+AuNT water
RPMI powder	RPMI powder	Cisplatin(CDDP)	Cisplatin(CDDP)
NaHCO ₃	NaHCO ₃	RPMI powder	RPMI powder
DI water	AuNT water	NaHCO ₃	NaHCO ₃
		DI water	AuNT water

電子顯微鏡下觀察：

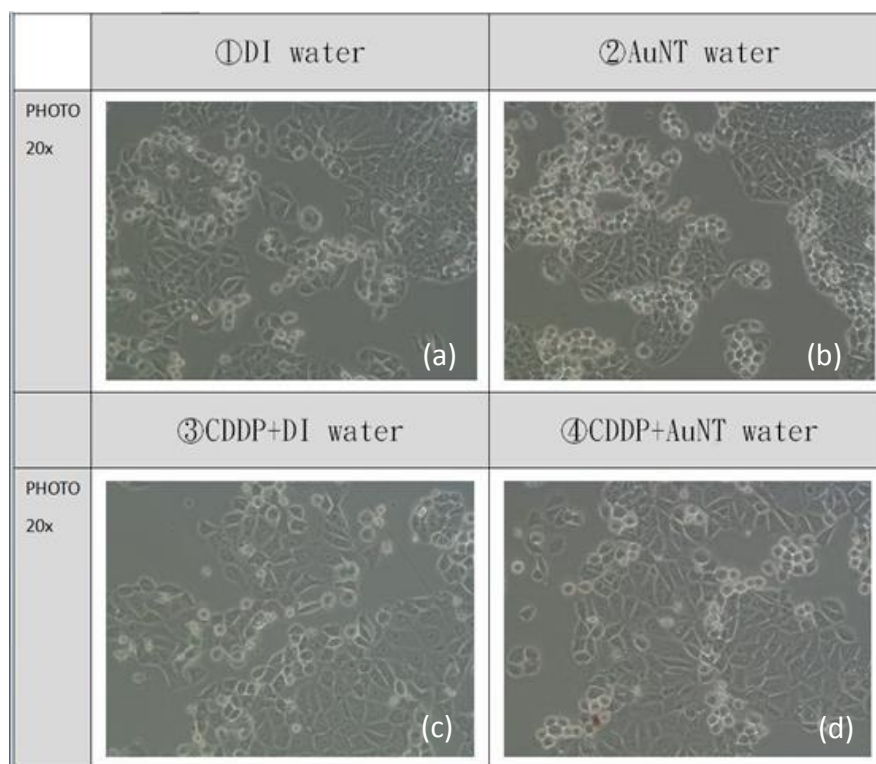


圖. 24 24 小時顯微鏡下觀察 20x

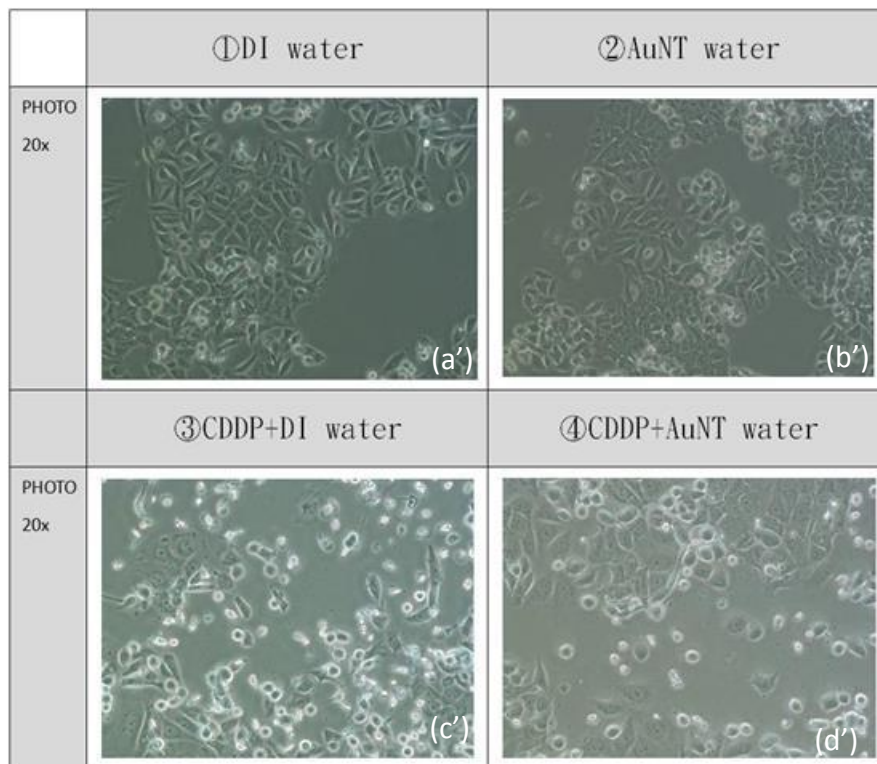


圖. 25 48 小時顯微鏡下觀察 20x

- (a) : DI water 配置的 medium 培養的細胞 24 小時情形
- (b) : AuNT water 配置的 medium 培養的細胞 24 小時情形
- (c) : DI water+CDDP 配置的 medium 培養的細胞 24 小時情形
- (d) : AuNT water+CDDP 配置的 medium 培養的細胞 24 小時情形
- (a') : DI water 配置的 medium 培養的細胞 48 小時情形
- (b') : AuNT water 配置的 medium 培養的細胞 48 小時情形
- (c') : DI water+CDDP 配置的 medium 培養的細胞 48 小時情形
- (d') : AuNT water+CDDP 配置的 medium 培養的細胞 48 小時情形

藉由細胞形狀的不同，可以觀察並初步推斷到其生長的情形，若細胞較為圓形表示其死亡。

(三)、直腸癌細胞培養實驗-2

1.存活率 MTT :

取得跑過 fluorescent reader 的 OD value，推算 HCT15 在每個 well 的存活率百分比

(如圖. 26、27)

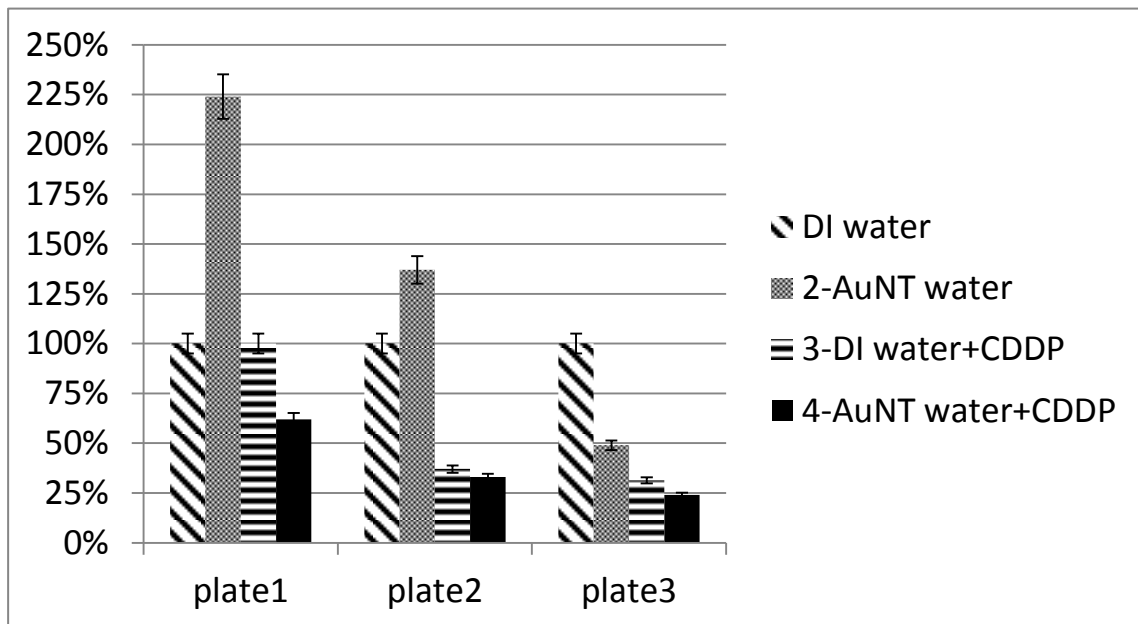


圖. 26 HCT15 於不同培養液實驗存活率百分比-24 小時

【結果】Plate1~3 為實驗重複三次的結果。以每個 plate 的 1-DI water、2-AuNT water 為一組比較，平均而言以 2-AuNT water 組細胞存活率較高，推論 AuNT water 帶養分進細胞的效率較佳。再以 3-DI water + CDDP、4-AuNT water + CDDP 為一組做比較，加入藥物 CDDP 後細胞存活率以 4-AuNT+CDDP 組較低，推論 AuNT water 帶入藥物 CDDP 效率較佳，較能抑制細胞生長。

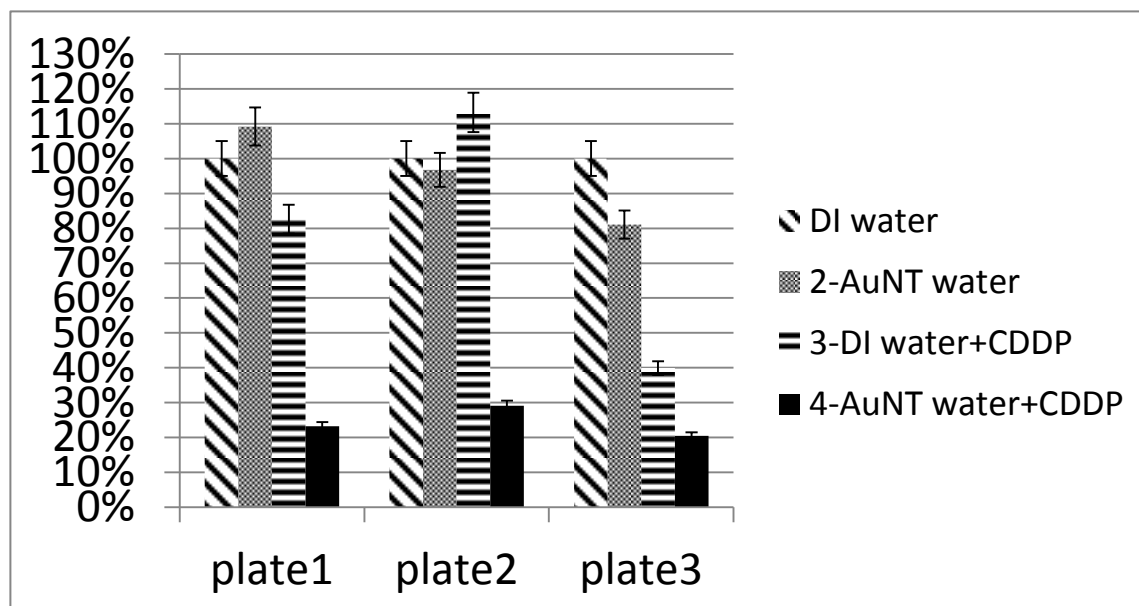


圖. 27 HCT15 不同培養液實驗存活率百分比-48 小時

【結果】第二天的細胞因在 well 中已長滿，養分已耗盡，且細胞代謝廢物累積，故存活率較 24 小時組低。比較 1-DI water、2-AuNT water 組，存活率沒有明顯的不同，初步推論是因為培養 48 小時細胞都已經長滿，難在細胞數量上明顯做比較。而比較 3-DI water + CDDP、4-AuNT water + CDDP 組，以 4-AuNT water+CDDP 組存活率較低。初步推論，AuNT water 帶入藥物 CDDP 的效率較佳，能有效抑制細胞生長。

陸、討論

一、生物實驗

(一) 奈米金水 AuNT water 的性質和製備

奈米金水 Au Nanoparticles(NPs)-treated water 指的是以奈米金粒子處理過的，分子團較小，且本身水裡不含奈米金。(處理方式如圖. 28)。由文獻資料我們發現，AuNT water 的分子團，是一般飲用水的 1/5 至 1/4 的大小，其溶氧量更是一般飲用水的 3 倍[1]，AuNT water 可以很容易將營養和氧氣帶入全身細胞，同時，也很容易將細胞和組織的廢物由排汗、排尿帶出人體。大分子團水與 AuNT water 有差異是因水分子具有群聚的特性，易形成水分子團，但是在經過酸雨、化學物、環境、農業污染水的侵入，水中的天然活磁性被削弱了，於是變成了大分子團水。大分子團水由 10-15 個水分子組成，而由 6-8 個水分子組成時稱為 AuNT water(奈米金水)，水分子團的大小則視區域污染程度而定。其中，大而凌亂的水分子團在人體內很難滲透細胞膜，而整齊密度高的 AuNT water，能輕易地滲透細胞膜進入細胞並將所攜帶的養分、氧氣充分提供給細胞。水密閉成奈米級材料也表達了不同的物理性質。另外，AuNT water 在經過大約 14 天後分子便會再度聚集成一般的水分子，為確保實驗期間大分子水團與小分子水團的穩定比例，以減少分子團之間差異所造成對實驗的影響，以如此方法製備，所製成的水中測得 AuNT water 的比例分別為 21.94 和 30.31%。然而 AuNT water 在水中的比例隨時間減少，0,1,2,3 和 5 天中的比例分別為 24.11,23.11,22.11,21.39%。

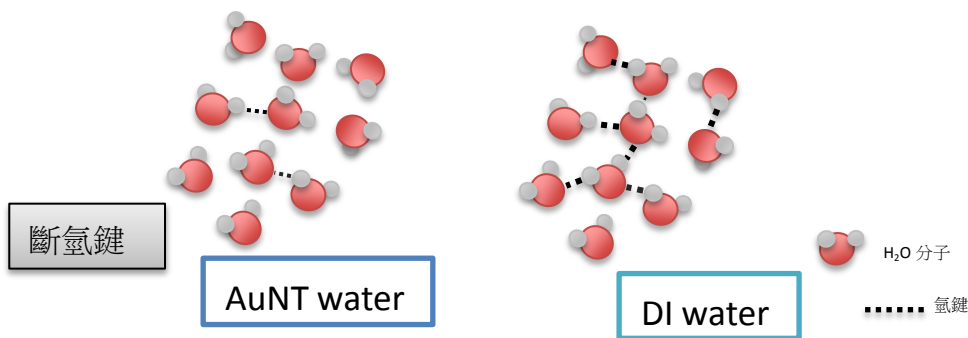


圖 28 AuNT water 和 DI water 示意圖

表 4 AuNT water 與 DI water 之比較

	AuNT water	DI water
透析速率	快	慢
帶入藥物效率	高	低
水分子數目(個)/團	6-8 個	10-15 個
室溫飽和蒸汽壓	高	低
產率 (水中小分子團水比例)	Day1:30%、Day5:21%(逐漸下降)	

(二) 奈米金水 AuNT water 的應用

目前廣泛使用的血液透析技術為利用血液幫浦由動脈穿刺抽血，每分鐘約 200~300 mL 經由人工腎臟後再經靜脈流回患者體內，而透析液由腎臟流出後排出。透過半透膜與血液互相交換物質以達到清除尿毒素、過多水分及調整電解質及酸鹼值的目的。而現階段洗腎的病人容易有複合性的疾病，例如無法去除足夠的有機廢物以及產生發炎反應。AuNT water 具弱氫鍵的特性，使其擴散作用的特定性與眾不同，加以利用後，應對於血液透析效率提升有關鍵性的影響[2][5]。

(三) 奈米金水 AuNT water 於本實驗設計的概念分析

我們藉由擴散理論，設計自製透析儀器以便模擬血液透析中的擴散情形，藉以支持我們的假設—AuNT water 相較 DI water 當溶劑，溶質的擴散作用較佳。AuNT water 因分子團小，故我們假設其能夠較易帶溶質通過半透膜孔洞，在細胞

實驗之前由文獻我們確定了 AuNT water 的安全性[2]，並以植物代表-綠豆，動物代表-蘋果螺檢驗 AuNT water 對生物利環境中養分效率的影響。在細胞層次方面，我們以直腸癌細胞-HCT-15 檢驗 AuNT water 攜帶抗癌藥物進入細胞，抑制癌細胞生長之能力[1]。

MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 的作用下四氮唑環會開裂，生成紫色的甲臍結晶，利用 DMSO 將甲臍溶解出來之後，再利用吸光度的測定去評估有多少細胞存活。因為甲臍結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中的琥珀酸脫氫酶會消失，但不能將 MTT 還原）。也可在培養基投入藥物，評估藥物對細胞的增生或死亡有無具體影響。可利用測吸光度得知細胞還原 MTT 的能力(甲臍的形成量)，此吸光度代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故此試驗可用作細胞存活率的指標之原因[5]。

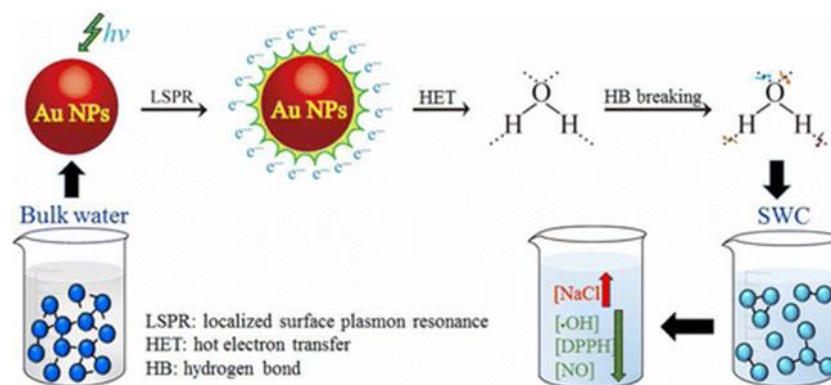


圖.29 AuNT water 的製備：以特殊光頻率破壞水分子之間之氫鍵。從原本的大分子團水 (bulk water)，通過奈米金粒子，再以 LED 燈照射，激發奈米金的電子，打斷大分子團水中的氫鍵 (HB Breaking)，以製成較小分子的 AuNT water。(圖片來源: [2])

(五) 比較 AuNT water 及 DI water 種植綠豆

本實驗以綠豆作為測試對象是因為綠豆易取得，且適應環境，可在短時間看出不同條件下生長差異。結果發現，無論是有加養分或無加養分種植綠豆，綠豆的生長情形皆以 AuNT water 培養的組別較佳，且達到顯著差異($P < 0.001^{***}$)。在第五天之後，沒加養分的綠豆不論是 AuNT water 或 DI water 皆生長漸趨緩慢，但加養分培養的組別卻生長快速。推論其原因，綠豆本身有營養，因此不加養分時，AuNT water 能夠將其代謝產物移出細胞較快速，因此有助於其生長。而加了養分之後，在種子本身養分耗盡時，能提升種子利用環境中養分效率。因此由此實驗我們可以得到結論: AuNT water 可以提升植物對於代謝物的移除及養分的移入之效率，並且以之為培養液並不會毒害植物。

(六) 比較 AuNT water 及 DI water 養殖螺

本實驗用的蘋果螺 (*Planorbis corneus*) 屬於 Planorbidae 科，在世界廣泛分布，易於取得，且對環境適應力佳，繁殖力強，雌雄同體，只要有兩顆蘋果螺同時在一處，便可以產下為數不少的後代，因此我們選擇蘋果螺做為測試對象。因為它繁殖快速，且體型嬌小，用算數量的方式比秤重操作方便且能夠作為生長情形代表。

奈米金底層組以 AuNT water 養殖(奈米金可使 AuNT water 維持較穩定的小分子狀態)、陶瓷顆粒組則以 DI water 養殖。在實驗後 28 天 2 組蘋果螺隻數才有明顯的增多，且以 AuNT water 養殖螺，在生長 28 天後至 56 天，螺的數量明顯較多 ($P = 0.039942$, $P < 0.05^*$)。推測其原因，因為螺繁殖大約需要 15 天以上的時間，且剛開始接觸新環境必須要有一些適應期，因此我們延長養殖期至 56 天(約 1 個半月)。並且，AuNT water 能夠有效促進螺對於環境中養分的利用，因此能夠有更多的養分來源以繁殖更多後代。

二、自製擴散儀器

(一)選用尿素當溶質的原因

- 1.尿素為蛋白質代謝產物，經由尿液排出體外。血中尿素氮濃度升高，代表腎功能異常，因此我們使用尿素當作溶質進行測定。
- 2.尿素為小分子物質，不帶電且分子量小，易於擴散過半透膜。

(二)漏水問題修正

定期更換 O ring，避免 O ring 因接觸空氣氧化而受力變形，螺絲漏水部分應為 O-ring 連接面不平整所造成。

(三)高度差測定

因高度差不明顯，無法觀察其差異，透析儀器將實測 2 組不同性質水進行擴散實驗的溶質濃度，做定量分析。

三、自製透析儀器

尿素為蛋白質代謝產物，經由尿液排出體外。血中尿素氮濃度升高，代表腎功能異常，因此我們使用尿素當作溶質進行測定。正常值為 7~20mg/dl，所以們以 20mg/dl 作最初溶液的濃度。自製透析儀器設置原理是參考血液透析的裝置，因為在血液透析時，血液是快速通過半透膜與透析液進行物質交換的。因此我們設置了一具馬達抽取含尿素的 AuNT water，利用水的流速模擬血液通過半透膜，並測定其透析效率。AuNT water 具弱氫鍵的特性，使它的擴散特性與眾不同[1]。我們將尿素利用自製儀器進行透析，數據顯示，其透析速率比 DI water 顯著 ($p=0.003854, <0.01^{**}$)。我們的實驗結果，與小分子水團應用於臨床血液透析實驗的結果一致[2]。傳統血液透析中的透析液，溶劑為 DI water，若是將溶劑改為 AuNT water 其透析效果及速率便會提升。我們可以利用這種簡易的透析裝置，運用於教學課堂，將血液透析機用壓克力板及半透膜清晰的呈現，更可藉由此簡易裝置，

加上分子大小可通過半透膜的有色溶質，動態的呈現洗腎原理給學生看，完成了最簡易的模擬血液透析教學。

四、HCT-15 直腸癌細胞培養

(一)、細胞形狀的不同：DI water 所培養的細胞形狀較圓形，AuNT water 所培養的細胞較三角形（如圖. 24 圖. 25）。由目測可以推斷：AuNT water 組所呈現的三角狀，是細胞貼壁的狀態，故可以推測 AuNT water 可能使細胞貼壁，較易生長，而 DI water 組的細胞較圓，其細胞與壁之間的接觸黏著力變小，使其浮起呈圓形狀，此時懸浮的癌細胞可能是死亡的癌細胞。

(二)、廢液顏色的不同：由 well 中觀察，DI water 所培養的細胞廢液顏色偏粉色，AuNT water 所培養的細胞廢液顏色偏黃（如圖. 23）我們推測應該是由於 medium 的 pH 值不同所導致。故我們設計實驗時，配置 DI water、AuNT water 兩種不同 medium 的日期設定在同一天，且在配置時使用酸鹼測定儀控制 medium 的酸鹼度介於 pH 7.2-7.4，在每次控制的情況下已經順利解決廢液顏色不同的問題。

(三)、由 MTT 存活率實驗推斷，AuNT water 相較 DI water 之下所培養細胞後，計算出的存活率較為高（如圖. 26、27），我們比較的有：DI water medium、AuNT water medium 兩者培養的 HCT15 存活率，以及 DI water medium + CDDP、AuNT water medium + CDDP 所培養出的 HCT15 存活率，藉兩種不同組所得出的 OD value，推算存活率在比較，藉此可以得知 AuNT water 所配置的 medium 效果較佳，帶入養分及藥品的效率也較 DI water 佳。

(四)、由文獻[1]參考得知，奈米金水的化學反應所產生的因子可以清除細胞中自由基。此外，根據在 2008 提出的報告[3]顯示在奈米金粒子合成的過程中，自由基產生的高效能量能藉此轉換成合成奈米金粒子的能量，故自由基會減少。自由基的存在可以抑制癌細胞生長，而奈米金水會消耗環境中的自由基，如此的環境較適合癌細胞

生長，因此在奈米金水中培養的 HCT-15 的生長速率較好。

在本實驗中使用的直腸癌細胞 HCT15 使用 AuNT water 培養的情況下生長較好，我們推論是因為 AuNT water 帶養分進入細胞的效率較快且自由基減少的影響所導致。而綜合 AuNT water 帶養分及藥物進入細胞的結果，帶藥物的影響大於帶養分，因此以 AuNT water + 抑制癌細胞藥物能夠比 DI water 效率高。在癌症的治療方面，若我們能夠將 AuNT water 作為抑制癌症藥物的溶劑，可以更有效抑制癌細胞生長，甚至可以縮短治療時間，可說是癌症患者的一大福音。

柒、結論

- 一、AuNT water 對於動、植物的生長有幫助，且沒有毒性。若未來能夠發展出簡易製造 AuNT water 的方法，應用在高單價有機植物的栽種(如溫室植栽)，能夠增加產率且降低生產成本。
- 二、AuNT water 的透析速率較 DI water 快，可以提升透析效率，減少血液透析所需時間。更可藉由此簡易裝置，加上分子大小可通過半透膜的有色溶質，呈現動態的洗腎原理教學於課堂。
- 三、AuNT water 攜帶藥物進入癌細胞效率比 DI water 好，故未來希望能夠作為癌症病患藥物的溶劑，提升藥物抑制癌細胞的效率，縮短癌症患者的治療期。

捌、參考資料及其他

1. Chen HC *et al.* 2015 Quantitative evaluation on activated property-tunable bulk liquid water with reduced hydrogen bonds using deconvoluted Raman spectroscopy. *Anal Chem.* Jan 6;87(1):808-15. doi: 10.1021/ac5039434.
2. Chen HC *et al.* 2014 Innovative strategy with potential to increase hemodialysis efficiency

and safety. *Sci Rep.* Mar 21;4:4425. doi: 0.1038/srep04425.

3. M. Luisa Marin *et.al*, 2008 Photochemical Strategies for the Synthesis of Gold Nanoparticles from Au(III) and Au(I) Using Photoinduced Free Radical Generation. *J. Am. Chem. Soc.*130(49), pp 16572 – 16584
4. Neelakandan C. *et al.* 2011 In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory properties of genistein-modified hemodialysis membranes. *Biomacromolecules* 12, 2447 – 2455 .
5. Liang Peng *et.al.* 2005 Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Biointerfaces* 45 108 – 111

【評語】 050210

作者設計一特殊裝置讓 DI water 流經充滿奈米金粒子的表面以 3ml/min 流速及綠光 LED 照射下，可使水分子間的氫鍵減弱形成較小的分子團，利用此水可使綠豆及螺的生長情形較佳，也觀察此水對直腸癌細胞生長的影響，並提出 DI water 與 AuNT water 有所不同，實驗結果相當奇特但證據並不夠充分。