

2013 臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號 030006

參展科別 化學科

作品名稱 好「鉀」的溶液-鉀離子濃度的偵測

得獎獎項 二等獎

美國 ISEF 團隊正選代表:美國第 64 屆國際
科技展覽會

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 許名智、張煥宗

作者姓名 洪采媚、林聖敏

關鍵字 金奈米粒子、核酸適合體、鉀離子

作者簡介



洪采媚:

我開朗大方，很喜歡嘗試新鮮的事物，熱情參與許多活動。北一自由開放的學風十分吸引我，使我義無反顧離鄉背井(我在彰化長大)，報考基北區。上臺北後，很多事都要自己打理，不僅訓練我獨立自主，更讓我珍惜他人的付出。做專題研究的過程中，若沒有夥伴的支持、化學老師的關心、以及實驗室辛苦的學姊，我不可能完成這份報告，也沒有這個機會在此分享我的成長。



林聖敏：

我出生於彰化市，從幼稚園到國小，在父母的用心栽培下，我涉略不同領域的知識，直到國中就讀土城國中數理資優班，才確定自己喜歡的領域是數理科，國中三年來，我學會基本的科學研究方法和態度，因此，在高中專題研究的課程中，我能更快速的進入實驗研究，除此之外，我也熱愛運動，當疲勞於課業和專題研究之間，我總會和家人到自行車道上慢跑，享受大自然的氣息。

摘要

我們利用金奈米粒子(gold nanoparticles, Au NPs)、鉀離子核酸適合體(potassium ion-binding aptamer, Apt)和一股 5' 端修飾有硫醇基(thiol group)的去氧核糖核酸(HS-DNA)來偵測食物中鉀離子的濃度。鉀離子在人體的生理機能中扮演重要的角色，如維持細胞膜電位和調節酸鹼平衡，因此我們希望能發展出一個快速、簡便的方法來偵測鉀離子濃度。當金屬材料縮小至奈米尺寸，如: Au NPs，會具有不同於塊材的光學特性，且其光學特性會隨著 Au NPs 大小的不同而有所改變。Au NPs 大時，吸收波峰會往長波長移動，而 Au NPs 小時，吸收波峰會往短波長移動。實驗中所用的 Apt 在未形成特殊構形時，會以靜電作用力吸附於 Au NPs 表面；而當 Apt 與鉀離子結合後，Apt 能藉由鳥糞嘌呤(guanine)間的氫鍵形成一個四股(G-quartet)結構。此時 K^+ - Apt 複合物對 Au NPs 靜電作用力減弱，因而遠離 Au NPs 表面。此外，我們引入的 HS-DNA 會和 Au NPs 作用當，形成穩定的金硫共價鍵(Au - S)。當越多鉀離子加入，Au NPs 表面越容易和 HS-DNA 作用，並增加 Au NPs 的耐鹽性，其最高吸收波峰會往短波長移動(650 nm→520 nm)。在最佳化條件下([Au NPs] = 0.375 nM, [Apt] = 150 nM, [HS-DNA] = 30 nM, [NaCl] = 200 mM in [sodium phosphate] = 5 mM, pH 7.4)，偵測鉀離子濃度的線性範圍(linear range)落在 0.01 - 10 mM($r=0.98$)，且偵測極限(limit of detection)為 3 μ M。此方法具有好的靈敏度、準確性和耐鹽性，可以應用於較複雜的環境，如食物樣品、尿液、血液等，有利於生物體中鉀離子濃度的監測。

Abstract

In this project, we used potassium ion (K^+)-binding aptamer (Apt) and thiol-modified deoxyoligonucleotides (HS-DNA) to detect K^+ in food through a gold nanoparticle (Au NP)-based strategy. K^+ are involved in many biological functions, including nerve transmission and regulation of blood pressure and pH, thus we want to design a K^+ sensor which was simple and rapid. Au NPs are red colored due to their specific and size-dependent surface plasmon resonance (SPR) absorption. Addition of salt balances negative charges between Au NPs, and resulted in aggregation of Au NPs that led to red-to-purple color change. Au NPs show different affinities toward unstructured and folded aptamer, thus serving as a promising way for aptamer sensing. K^+ -binding aptamer (Apt; 5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-3') is a guanine (G)-rich single-stranded DNA with random-coil structure in solution. Upon binding to K^+ , the Apt folds to a four-stranded tetraplex structure (G-quartet) via intramolecular hydrogen bonds between guanines. In our approach, HS-DNA was used to stabilize Au NPs when high concentration salt unstabilized Apt-adsorbed Au NPs after K^+ addition leading less Apt binding to Au NP surface. As K^+ increased, more K^+ -Apt complex formed, thus less aptamer bound to Au NPs, leading more HS-DNA conjugated onto Au NPs surface. The absorption band shifted from long wavelength (650 nm) to short wavelength (520 nm) in the presence of K^+ . Under the optimum conditions ([Au NPs] = 0.4 nM, [Apt] = 200 nM, [HS-DNA] = 30 nM, [NaCl] = 200 mM in [sodium phosphate] = 5 mM, pH 7.4), the linear range of calibration curve is 0.01–10 mM ($r = 0.98$) with limit of detection (LOD) of 3 μ M. This strategy is simple, cost effective, and high salt tolerance which makes it possible for K^+ sensing in complicated matrix, such as food, blood and urine.

壹、前言

在生理機能中，穩定的鉀離子(potassium ions, K^+) 濃度扮演重要的角色，因此開發出 K^+ 濃度感測器，以快速、簡便的方法量測食物和生物樣品中 K^+ 濃度是很重要的。我們從文獻中得知，用 Unmodified-Au NPs system 偵測 K^+ 靈敏度不高。我們希望改善此系統，得到一個更為靈敏的 K^+ 感測器，因此我們在系統中引進一條 5' 端修飾有硫醇基 (thiol group) 的去氧核糖核酸 (HS-DNA)，提升實驗的再現性，增廣變化幅度，更靈敏的偵測 K^+ 濃度。。

貳、研究目的

1. Aptamer (Apt) 濃度對偵測 K^+ 濃度影響的探討
2. HS-DNA 濃度對偵測 K^+ 濃度影響的探討
3. NaCl 濃度對偵測 K^+ 濃度影響的探討

參、研究方法與過程

一、材料介紹

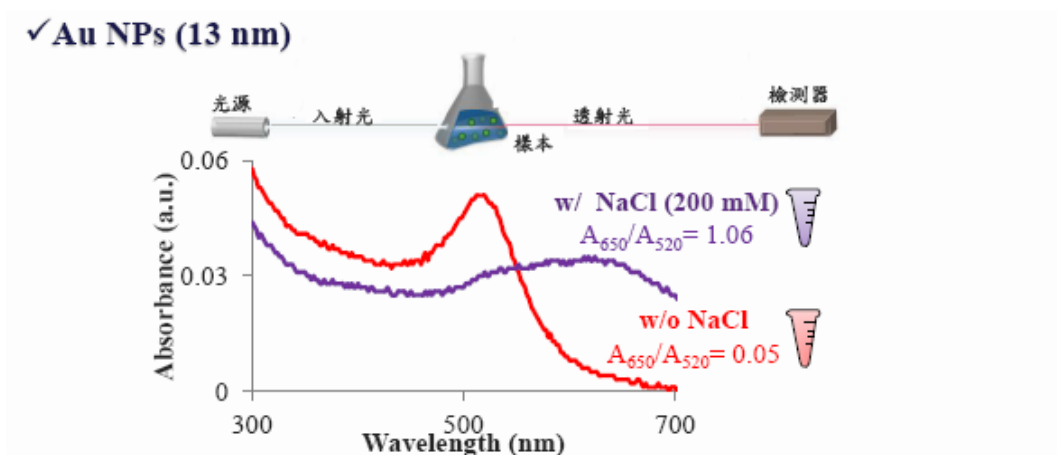


圖 1

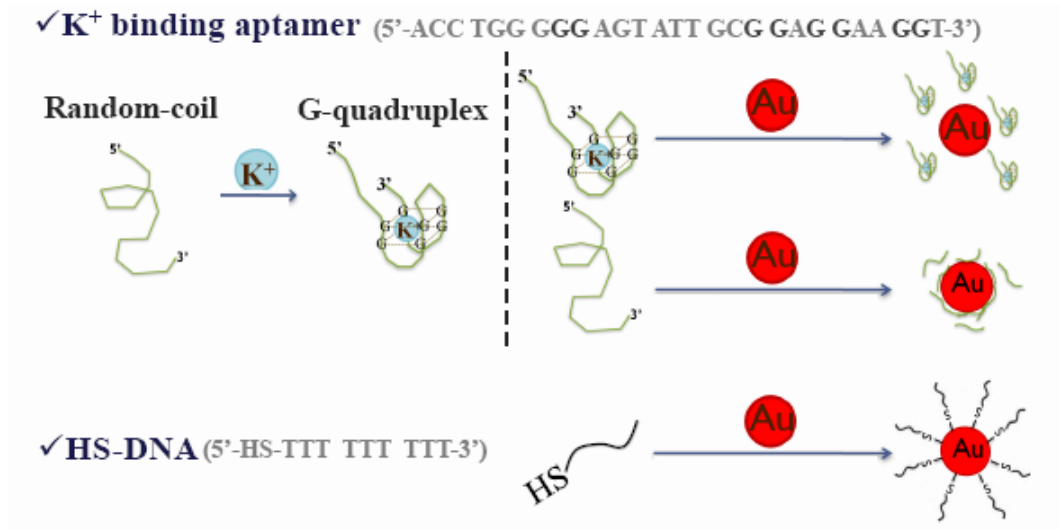


圖 2

二、實驗流程

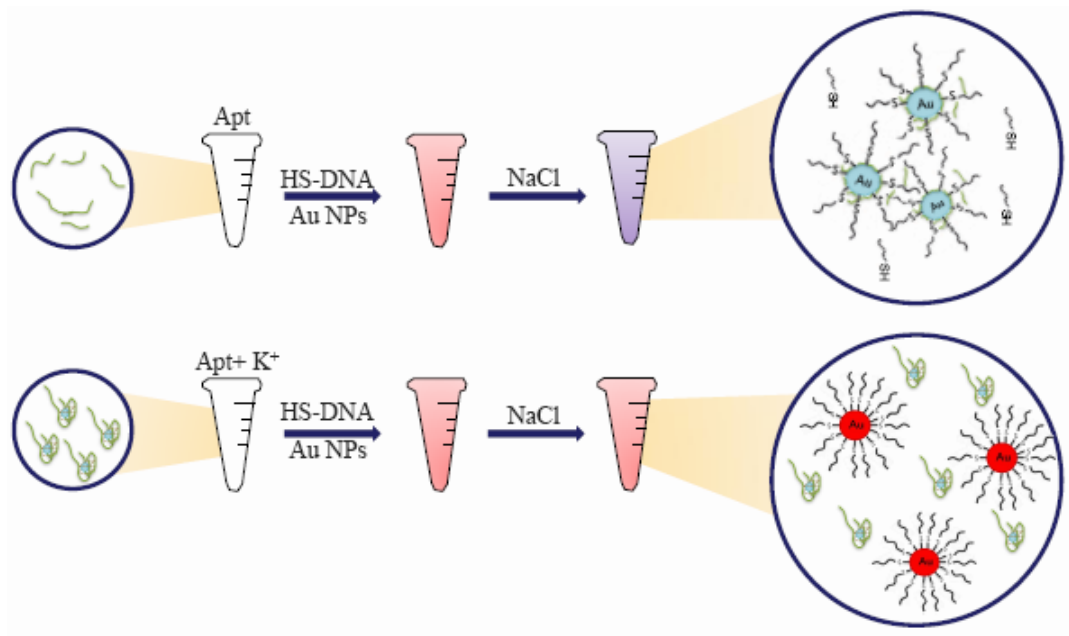


圖 3

肆、結果與討論

一、Au NPs 濃度探討角柱

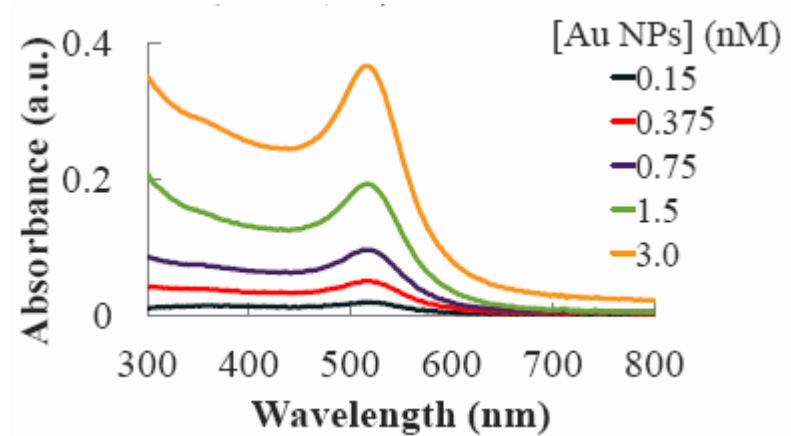


圖 4

✓ 高濃度 Au NPs 不適合偵測微量分析物；

低濃度 Au NPs (0.15 nM) 吸收值過低，故選用 $[Au\ NPs] = 0.375$ nM。

二、Apt 濃度探討

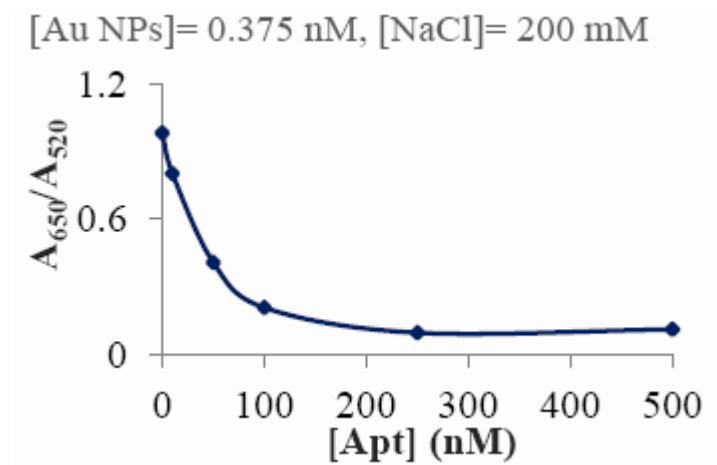


圖 5

✓ 由比值(A_{650}/A_{520})可觀察，Apt 濃度至少要 100 nM 才會使 Au NPs 穩定，故選用 $[Apt] = 100$ nM。

三、HS-DNA 濃度探討

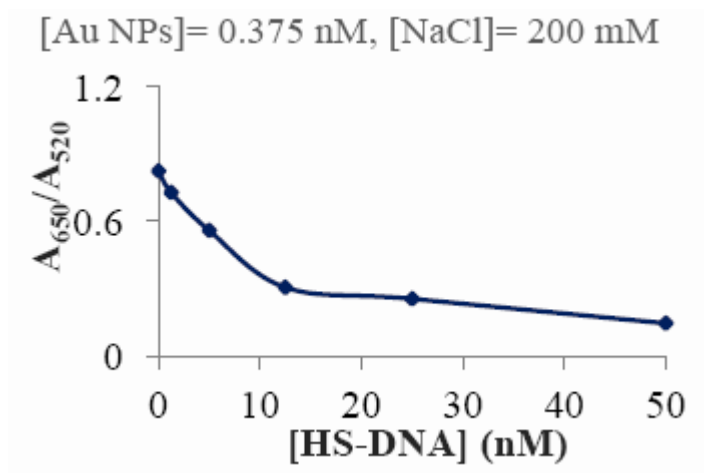


圖 6

- ✓ HS-DNA 濃度至少要 12.5 nM 才會使 Au NPs 穩定，故選用 [HS-DNA] = 12.5 nM。

四、HS-DNA 濃度探討

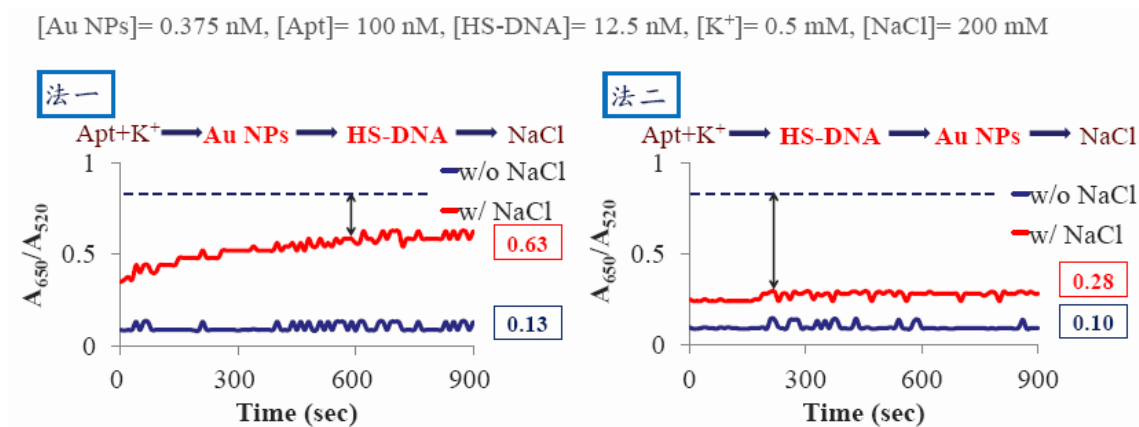


圖 7

- ✓ [NaCl] = 0 mM 時，HS-DNA 和 Au NPs 加入順序不影響吸收度。
 - ✓ [NaCl] = 200 mM 時:
 - 法一平衡時間較長 (約 10 min.)；法二平衡時間較短 (約 4 min.)。
 - 法一比值差別較小；法二比值差別較大。
- 故選用法二為實驗加入順序。

五、NaCl 濃度探討

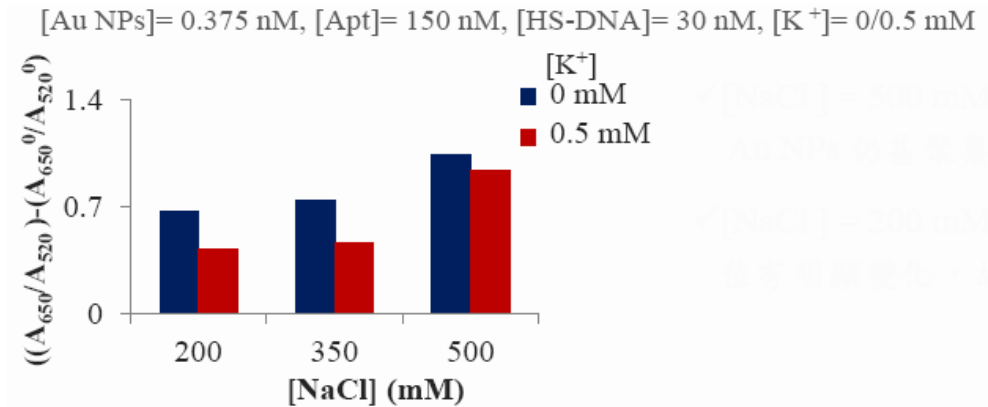


圖 8

- ✓ [NaCl] = 500 mM 時，加 K⁺ 後，Au NPs 仍甚聚集。
- ✓ [NaCl] = 200 mM 時，加 K⁺ 後比值有明顯變化，故選 200 mM。

六、Apt 濃度對偵測 K⁺ 的探討

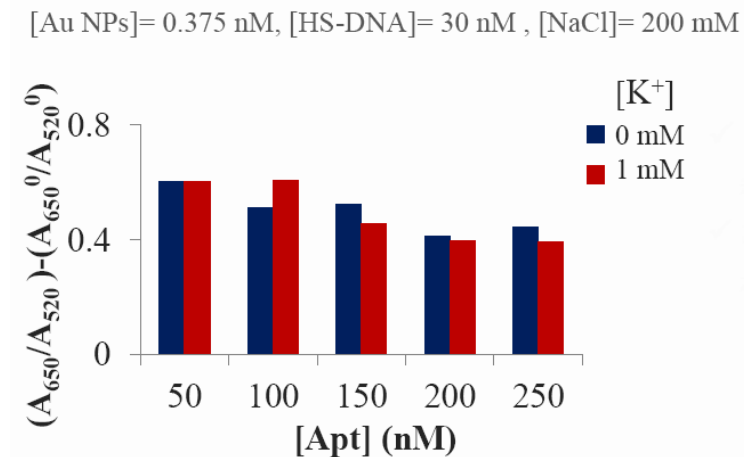


圖 9

- ✓ [Apt]= 50, 100 nM 時，加 K⁺ 後 Au NPs 沒有穩定的趨勢，故不挑選。
- ✓ 比較 [Apt] = 150, 200, 250 nM，[Apt]= 150 nM 加 K⁺ 後比值變化明顯，為最佳條件。

七、HS-DNA 濃度對偵測 K^+ 的探討

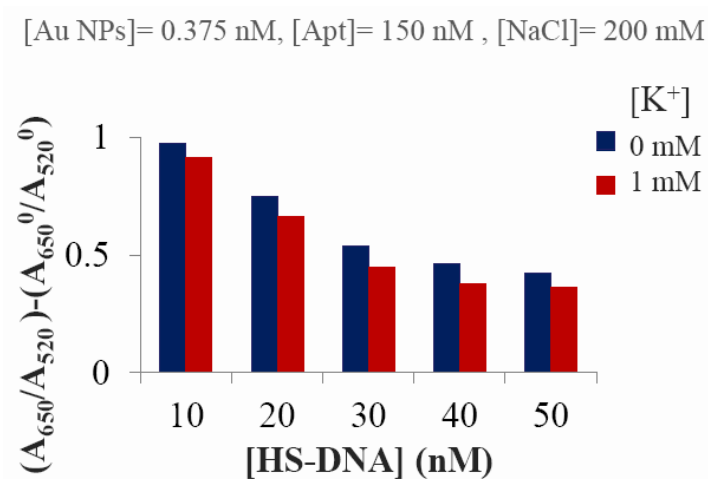


圖 10

- ✓ [HS-DNA]=10, 20 nM 時，加 K^+ 後 Au NPs 仍聚集，故不挑選。
- ✓ [HS-DNA]=40, 50 nM 時，加 K^+ 前 Au NPs 已穩定，故不挑選。
- ✓ [HS-DNA]= 30 nM 時，加 K^+ 後比值變化明顯，為最佳條件。

八、最佳化條件

[Au NPs]= 0.375 nM, [Apt]= 150 nM, [HS-DNA]= 30 nM, [NaCl]= 0/200 mM
[phosphate buffer]= 5 mM (pH=7.4)

九、最佳化條件

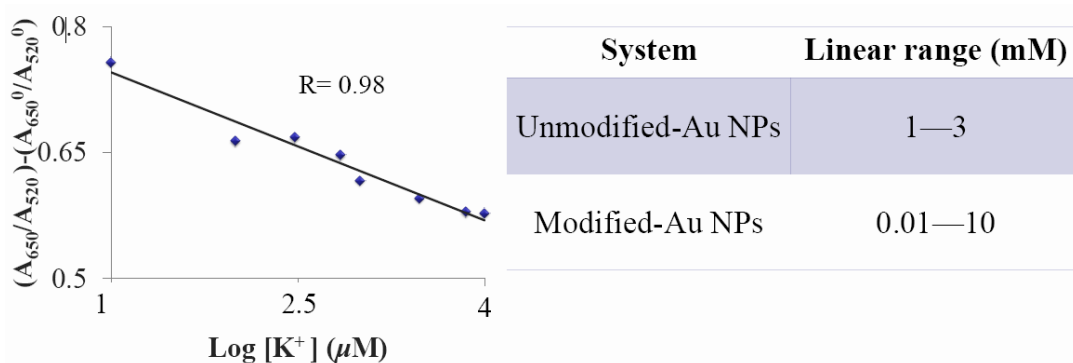


圖 11

伍、結論與應用

在本實驗設計中，Aptamer、HS-DNA 的比例會影響 Au NPs 的穩定，而 NaCl 的增加則會讓 Au NPs 聚集。我們曾藉由分析光譜圖，證實此系統能偵測 K^+ 。為了得到線性更廣的檢量線，我們有系統地修改了條件挑選的方法，依序討論各材料加 K^+ 前後的比值變化，成功找出最佳化的條件。比較 Unmodified 和 Modified 系統，也證實引入 HS-DNA 能增加 K^+ 偵測的準確性和靈敏度。此外，耗時短、價錢便宜也是本實驗設計的優點。

陸、未來展望

1. 期許未來在偵測生物樣品，能進一步使用不同前處理方式排除干擾，增廣應用範圍。
2. Modified-Au NPs system 具有準確、快速偵測 K^+ 濃度的潛力，許多條件的測試是未來重要的研究方向，如: Apt ,HS-DNA 序列設計和長短、環境 pH 值、Au NPs 大小等，希望能提升偵測的靈敏度、準確性和再現性，並增廣應用範圍至其他生物樣品。
3. Modified-Au NPs system 的開發，不僅能應用在偵測 K^+ 濃度，只要將 K^+ binding Apt 置換成其他目標分子的 Apt，就能有更廣泛的用途。

柒、參考文獻

1. L. Wang, X. Liu, X. Hu, S. Song, C. Fan, Chem. Commun., 2006, 36, 3780.
2. N. L. Rosi, C. A. Mirkin, Chem. Rev., 2005, 105, 1547.

評語

利用奈米金連接 HS-DNA 協助 Aptamer 捕捉鉀離子，進行光譜偵測的研究，基礎原理及技術、儀器、方法的原理，可再深入掌握，才能對複雜的研究題目有更深的認識與進展。