

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030022

參展科別 化學

作品名稱 球狀銀奈米粒子結合金屬離子所誘導出之
仿生物酵素活性與其應用

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 張煥宗、陳祖望

作者姓名 王若彤、李家穎

關鍵字 仿生物酵素活性、銀奈米粒子、金屬離子

作者簡介



我是王若彤，目前就讀北一女中二年級。因為喜歡科學、喜歡探索世界而加入數理資優班，並且憑著一顆想動手做實驗的心，我選擇了化學專研，也因此得到至大學的實驗室中做實驗的機會，看到很多精密的儀器，也學到許多實驗的方法。很感謝實驗室學長姐、教授、老師以及很多人的協助與鼓勵，讓我有機會能進到國際科展的舞台，也從中開拓自己的視野。



我是李家穎，目前就讀北一女中二年級數理資優班。喜歡科學，也喜歡動手去嘗試，所以很高興有機會在高中就能進入實驗室做有興趣的實驗。在過程之中，我第一次跳脫課文的框架，純粹是因為好奇心和興趣而去探索，在過程中，很感謝周圍的人們的幫助，讓我學習到很多，也讓我有機會能參加國際科展。

摘要

近年來新的仿生物酵素奈米材料，尤其是雙金屬奈米粒子或混合奈米材料如許多貴金屬奈米粒子，包括金鈹、金鉑、金汞、金鉛、銀金和銀鉑雙金屬合金奈米粒子表現出高的催化活性。金奈米粒子的仿生物酵素活性（氧化酶、過氧化酶和過氧化氫酶）可以經由與不同的金屬離子反應進行調整，例如金奈米粒子分別加入鈹離子、銀離子和汞離子後，在粒子表面分別會形成金鈹、金銀和金汞奈米層，表現出過氧化酶、氧化酶以及過氧化氫酶活性。

本研究藉由加入不同金屬離子誘導出 13 nm 球狀銀奈米粒子的仿生物酵素活性(氧化酶、過氧化酶)。銀奈米粒子與金離子於 pH 9.0 的環境中反應後會誘導出氧化酶活性。銀奈米粒子和鈹離子於 pH 9.0 的環境中反應後會誘導出過氧化酶活性。我們用葡萄糖氧化酶作為模型酶催化葡萄糖以產生過氧化氫 (H_2O_2)，其與 Amplex red (AR) 在鈹/銀奈米粒子催化劑存在下反應形成螢光產物。由於 AR 產物-試鹵靈的螢光強度與葡萄糖濃度呈正比。未來期望能將金/銀奈米粒子用於抑菌實驗，鈹/銀奈米粒子結合葡萄糖氧化酶可用於血糖偵測。

Abstract

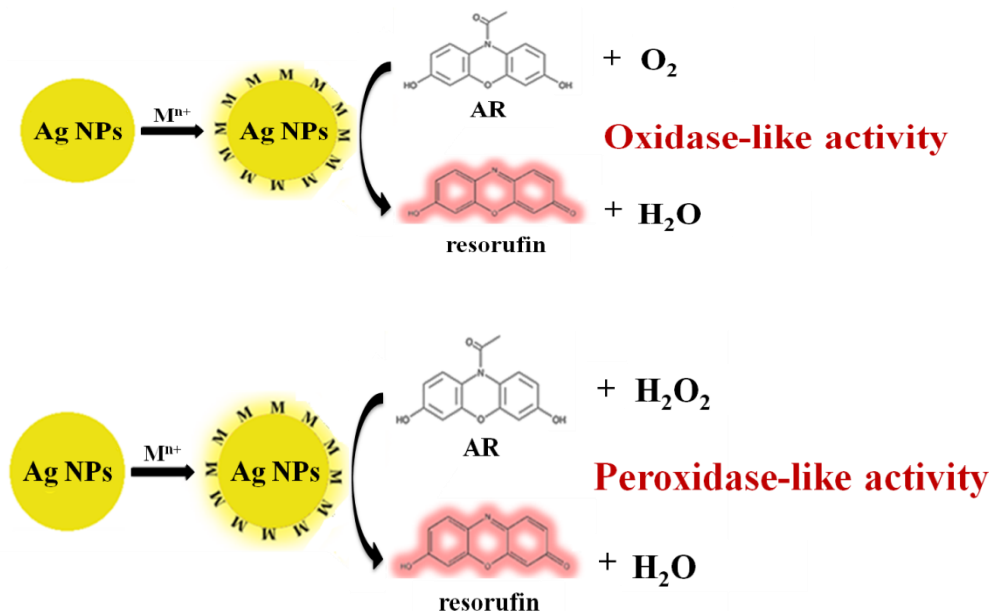
In recent years, new enzyme mimetic nanomaterials, specifically bimetallic nanoparticles (NPs) and hybrid nanomaterials, including AuBi, AuPt, AuHg, AuPb, AgAu, and AgPt bimetallic alloy NPs, exhibit high catalytic activity. The enzyme-like activity (oxidase, peroxidase, and catalase) of Au NPs can be induced by reaction of different metal ions. For example, Au NPs in the presence of Bi^{3+} , Ag^+ , and Hg^{2+} exhibit peroxidase-, oxidase-, and catalase-like activities by forming AuBi, AuAg, and AuHg alloy nanolayers on particle surfaces, respectively.

In this study, we investigated the enzyme-like activities (oxidase and peroxidase) of the spherical silver nanoparticles (Ag NPs; 13 nm) in the presence of different metal ions. The Ag NPs exhibited oxidase-like catalytic activity in the presence of Au^{3+} (pH 9.0). The Ag NPs exhibited peroxidase-like catalytic activity in the presence of Bi^{3+} (pH 9.0). We have used glucose oxidase as model enzymes to catalyze the substrate, glucose, in order to produce H_2O_2 , which reacts with Amplex Red (AR) in the presence of Bi/Ag NPs catalyst to form a fluorescent product. Since the fluorescence intensity of the AR product, resorufin, was proportional to the concentration of glucose. In the future, we hope we can use Au/Ag NPs as antimicrobial material and glucose oxidase/Bi/Ag NPs detection of blood glucose.

一、前言

利用自然界酵素例如 DNAzymes 可以快速且有專一性的用來催化物質的反應，但其容易被環境中的因子例如 pH 值（極高或極低）、溫度、高離子強度（ionic strength）影響而失去活性。近期，奈米科技在這個領域有蓬勃發展的趨向；目前有眾多的奈米材料，如金奈米粒子，因其與特定重金屬離子結合後具仿生物酵素活性，而得以偵測 H_2O_2 。於是，我們試想不同種類的奈米粒子是否也具有不同的仿生物酵素活性。另外銀離子具有抑菌功能，而被廣泛應用於抗菌材料之中，所以本研究嘗試利用不同金屬離子沉積於銀奈米粒子表面，期待其能誘導出不同的仿生物酵素活性，以得到更廣泛的應用。

本研究針對兩種仿生物酵素活性(氧化酶活性、過氧化酶活性)進行測試，我們期待透過不同金屬離子的修飾，分別調控出具備過氧化酶（peroxidase-like activity）及氧化酶活性（oxidase-like activity）之銀奈米粒子。藉由過氧化酶能催化 H_2O_2 與試劑 Amplex Red (AR)，形成具有螢光的物質試鹵靈 (resorufin)的特性，搭配經葡萄糖氧化酶作為模型酶催化反應出的 H_2O_2 ，便可偵測葡萄糖濃度，將得以應用於血糖偵測上；此外，AR 和 O_2 經由具氧化酶活性之銀奈米粒子的催化形成 resorufin，其在催化 AR 形成 resorufin 時會產生氫氧自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）、超氧化物（ O_2^- ）等物質，將能增加細胞的氧化壓力，得以擴展至抑菌等方面的應用。



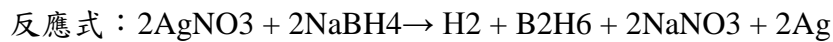
圖一 銀奈米粒子展現氧化酶/過氧化酶活性之示意圖

二、研究方法或過程

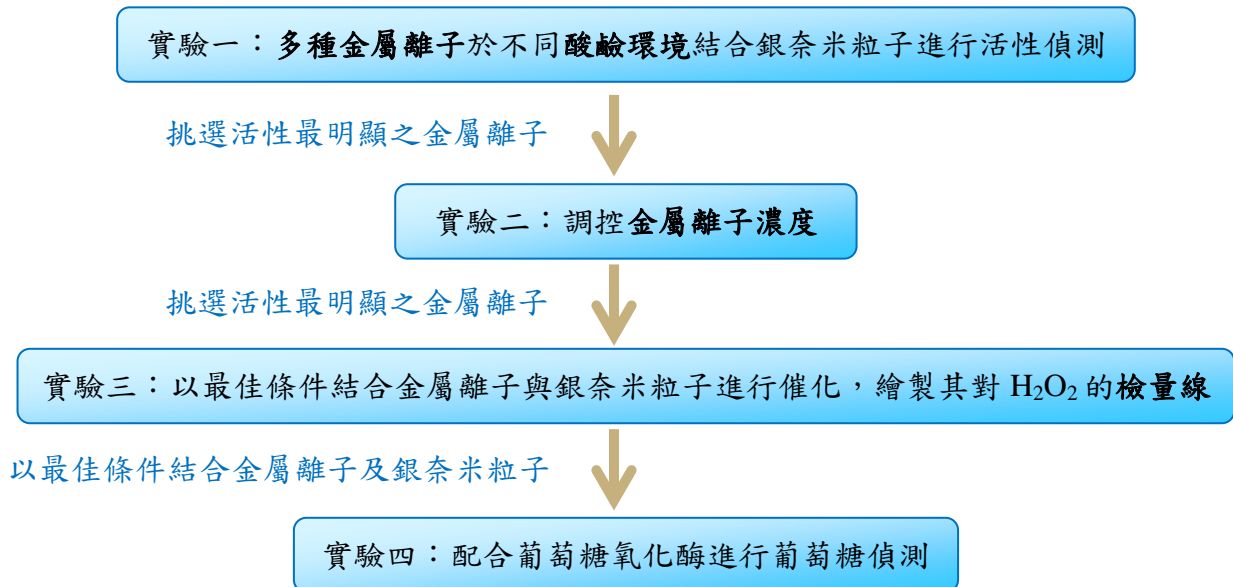
(一) 研究原理

1. 銀奈米粒子的合成

本實驗採用氧化還原法，並以硝酸銀、檸檬酸鈉及 NaBH_4 溶液做為合成銀奈米粒子的材料；其中，硝酸銀提供銀離子 (Ag^+)，做為還原劑的 NaBH_4 會將其還原成單分散 (monodisperse) 的金屬銀 (Ag^0) 小球；而為了避免金屬微粒長的過大或彼此凝聚，我們使用檸檬酸鈉做為穩定劑，其會解離出檸檬酸根吸附在金屬微粒的晶面上，抑制銀奈米粒子的凝聚。



2. 銀奈米粒子的仿生物酵素活性偵測



(1) 金屬離子對銀奈米粒子的修飾

利用銀奈米粒子的穿隧效應 (Tunneling Effect) 提高電子傳遞的特性，我們再將不同種類金屬離子修飾於銀奈米粒子的表面；並偵測是否誘導出仿生物酵素活性，而有助於反應速率的提升。

(2) 銀奈米粒子的作用環境探討

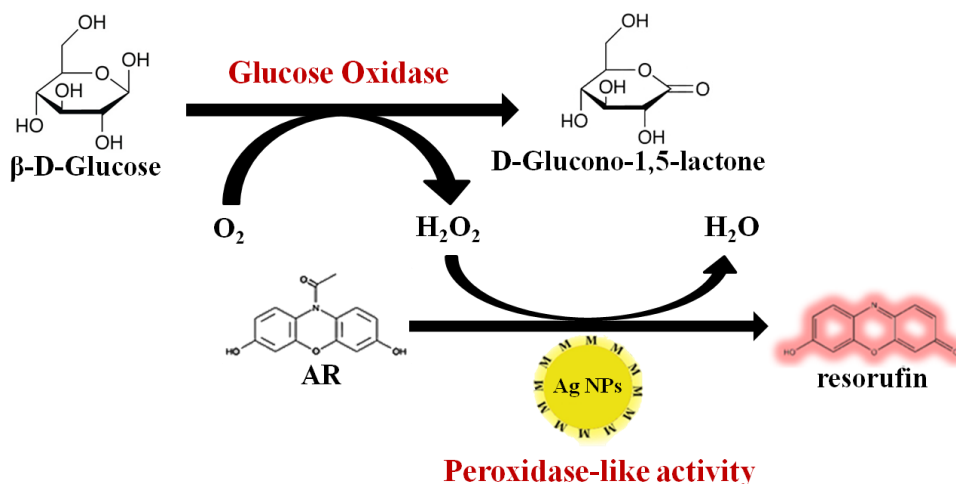
金屬離子沉積於銀奈米粒子表面時，可能受到環境酸鹼值的影響，而形成氧化物或氫氧化物，進而改變穿隧效應的能力；因此，我們針對銀奈米粒子的作用環境探討，以瞭解環境酸鹼值對銀奈米粒子活性的影響。

(3) 過氧化酶/氧化酶活性的定量

在過氧化酶與氧化酶活性偵測的部分，我們利用銀奈米粒子催化 H_2O_2/O_2 以及 AR，形成具有螢光的物質 resorufin（見圖一），利用盤式螢光儀測定其螢光值，即可偵測奈米粒子之氧化酶及過氧化酶活性。

(4) 葡萄糖的偵測

在葡萄糖偵測的部分，我們首先利用葡萄糖氧化酶催化葡萄糖形成 H_2O_2 ，再利用過氧化酶活性最強的銀奈米粒子催化 AR 以及由葡萄糖產生的 H_2O_2 形成 resorufin，利用盤式螢光儀測定其螢光值，即可偵測葡萄糖濃度。



圖二 銀奈米粒子結合葡萄糖氧化酶進行葡萄糖偵測之示意圖

(二) 研究方法

1. 銀奈米粒子的前處理

- (1) 取 10 mL 之 DI 水、25 μL 之 500 mM 檸檬酸鈉溶液、25 μL 之 100 mM 硝酸銀溶液，倒入塑膠瓶中，以磁攪拌子攪拌溶液 3 分鐘。
- (2) 加入 600 μL 的 50 mM NaBH_4 溶液，並持續攪拌 8 分鐘。
- (3) 取出瓶內溶液，即可得 13 nm 之黃色球狀銀奈米粒子。

2. 過氧化酶/氧化酶活性偵測

(1) 多種金屬離子於不同酸鹼環境中結合銀奈米粒子進行活性偵測

A. 將配置出之銀奈米粒子取 40 μL 至微量試管中，加入 200 μL DI 水，並加入 40 μL 之 1 μM 金屬離子溶液（種類分別為： Au^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Bi^{3+} 、 Pt^{4+} 、 Cu^{2+} ），以及 40 μL 之 Tris buffer（pH 7.0、pH 9.0、pH 11.0）中，於室溫反應 1 小時。

B. 加入 40 μL 之 10 μM AR 及 40 μL 之 10 μM H_2O_2 溶液/ DI 水，於室溫反應 1 小時。

C. 以盤式螢光儀測定其螢光強度。

(2) 調控前一實驗中與銀奈米粒子結合後活性較明顯之金屬離子的濃度，於活性最佳之酸鹼環境中結合銀奈米粒子進行活性偵測

A. 將配置出之銀奈米粒子取 40 μL 至微量試管中，加入 200 μL DI 水，並加入 40 μL Au^{3+} 、 Bi^{3+} 、 Pt^{4+} 溶液（1 μM 、10 μM 、100 μM ），以及 40 μL 之 Tris buffer（pH 9.0）中，於室溫反應 1 小時。

B. 加入 40 μL 之 10 μM AR 及 40 μL 之 10 μM H_2O_2 溶液/ DI 水，於室溫反應 1 小時。

C. 以盤式螢光儀測定其螢光強度。

(3) 挑選出與銀奈米粒子反應後活性最佳之金屬離子，調控其濃度，並與銀奈米粒子結合催化 H_2O_2 ，繪製銀奈米粒子對 H_2O_2 的檢量線

A. 將配置出之銀奈米粒子取 40 μL 至微量試管中，加入 200 μL DI 水，並加入 40 μL Bi^{3+} 溶液（1、10、100 μM ），以及 40 μL 之 Tris buffer（pH 9.0）中，於室溫反應 1 小時。

B. 加入 40 μL 之 AR（10 μM ）及 40 μL 之 H_2O_2 溶液（0、100 nM、250 nM、500 nM、1 μM 、2.5 μM 、5 μM 、10 μM ），於室溫反應 1 小時。

C. 以盤式螢光儀測定其螢光強度。

(三) 葡萄糖偵測

(1) 於微量試管中加入 40 μL 之葡萄糖水溶液（0、10 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM 、250 μM 、500 μM ），加入 280 μL DI 水，並加入 40 μL 之 Tris buffer（pH 7.0）、40 μL 之葡萄糖氧化酶於室溫反應 1 小時。

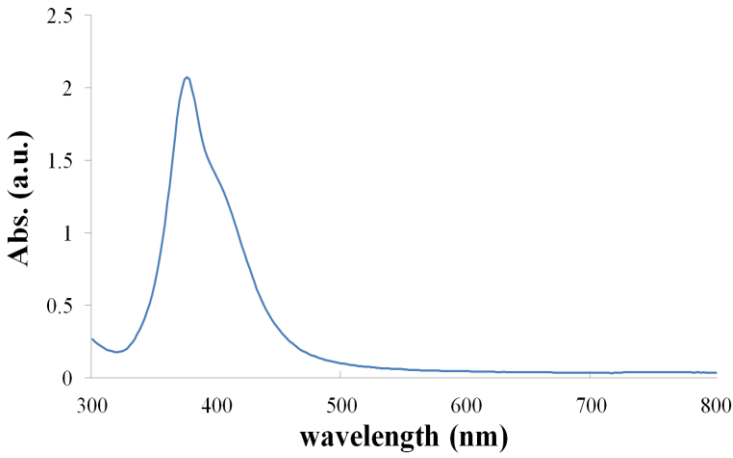
(2) 將配置出之銀奈米粒子之濃度稀釋為 1/10，加入 40 μL 至另一微量試管中，加入 200 μL DI 水，並加入 40 μL 之 10 μM Bi^{3+} 溶液、40 μL 之 Tris buffer（pH 9.0）中，於室溫反應 1 小時。

(3) 自步驟（1）中之微量試管中取 40 μL ，加入裝有銀奈米粒子之微量試管後，再加入 40 μL 之 10 μM AR，於 37 $^\circ\text{C}$ 恆溫箱反應 1 小時。

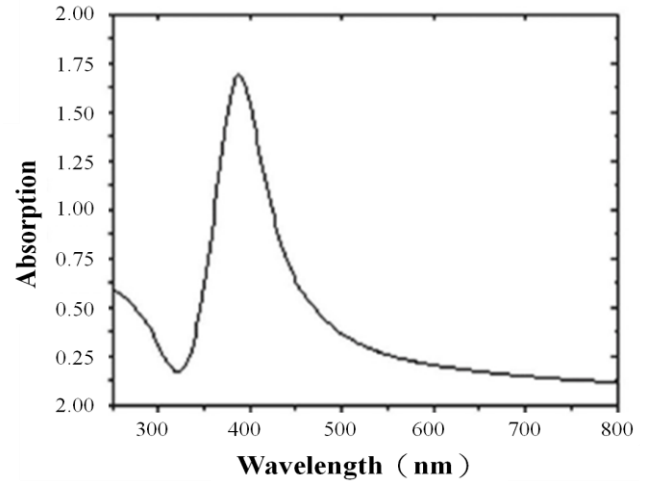
(4) 以盤式螢光儀測定其螢光強度。

三、研究結果

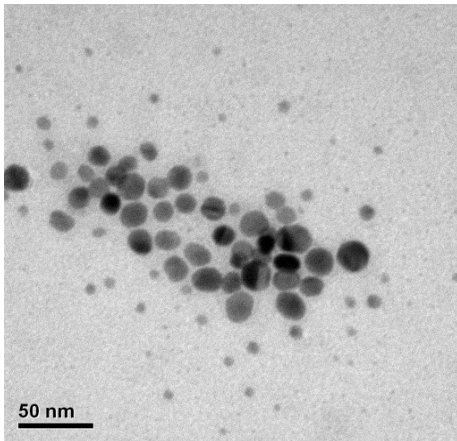
(一) 銀奈米粒子的前處理



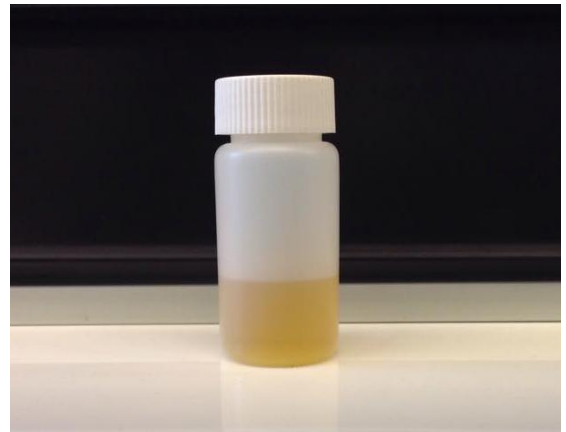
圖三 銀奈米粒子之吸收光譜



圖四 銀奈米粒子之吸收光譜 (參考資料)



圖五 銀奈米粒子的 TEM 圖

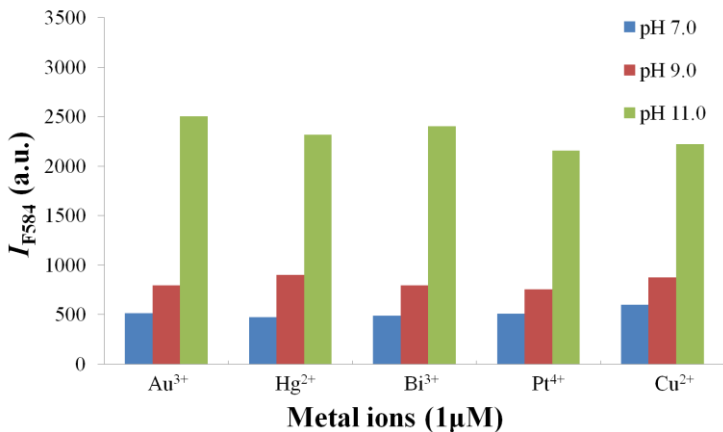


圖六 銀奈米粒子

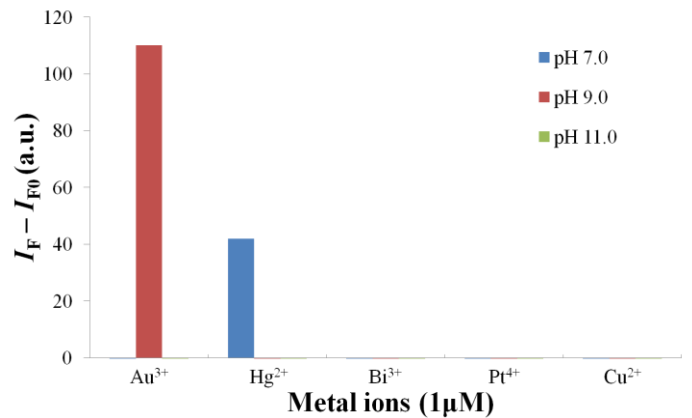
我們合成出的銀奈米粒子的表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 吸收光譜和參考資料中之高峰皆落在 400 nm 左右，並且，經由穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM) 拍攝出之圖片，顯示我們成功合成出 13nm 之銀奈米粒子。

(二) 過氧化酶/氧化酶活性偵測

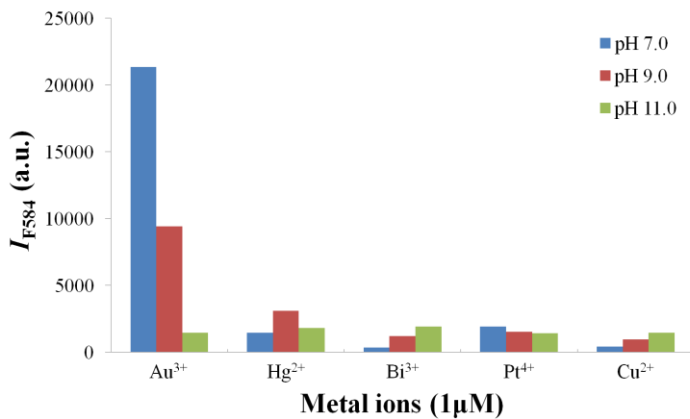
1. 多種金屬離子於不同酸鹼環境中結合銀奈米粒子進行活性偵測



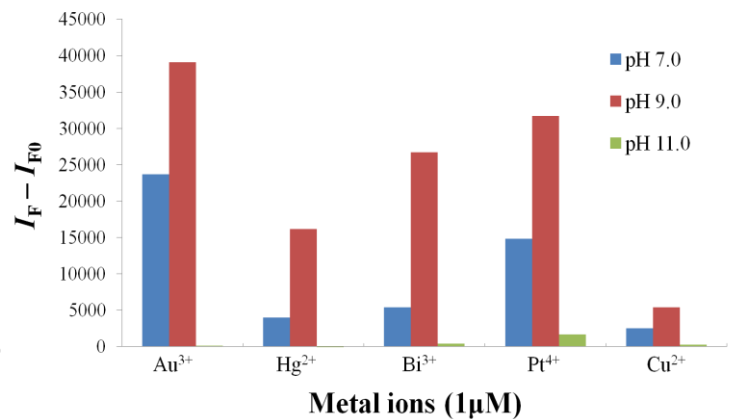
圖七 金屬離子之氧化酶活性



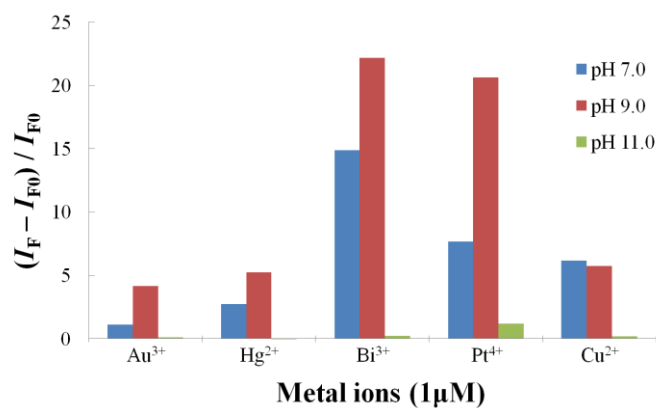
圖八 金屬離子之過氧化酶活性



圖九 銀奈米粒子與金屬離子結合後展現之氧化酶活性



圖十 銀奈米粒子與金屬離子結合後展現之過氧化酶活性

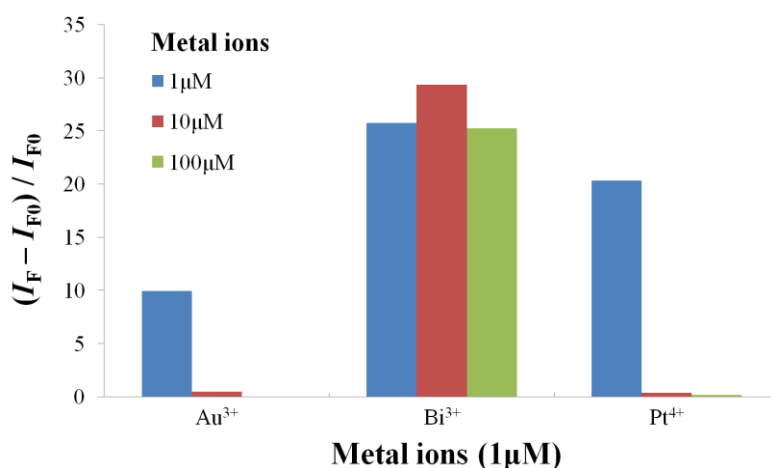


圖十一 銀奈米粒子與金屬離子結合後展現之過氧化酶活性對於氧化酶活性的上升倍率

(I_{F0} 為 H_2O_2 濃度為 $0 \mu M$ 時之螢光值； I_F 為 H_2O_2 濃度為 $10 \mu M$ 時之螢光值)

- (1) 如圖七、八，上述五種金屬離子單獨存在時，過氧化酶活性對於氧化酶活性的上升倍率皆極低，顯示金屬離子不具過氧化酶及氧化酶活性。
- (2) 如圖九，氧化酶活性最高者為 Au^{3+} ，其最佳作用環境為 pH 7.0。

- (3) 如圖十，過氧化酶活性較高者為 Au^{3+} 、 Bi^{3+} 及 Pt^{4+} ，因此使用以上三種金屬離子進行進一步的偵測。環境酸鹼值的部分，則以 pH 9.0 最佳，因此，我們在此環境中進行進一步的活性測定。
- (4) 如圖十，與銀奈米粒子反應後，過氧化酶活性對於氧化酶活性的上升倍率最高者為 Bi^{3+} ；其在 pH 7.0、9.0 環境中上升倍率皆高，在 pH 11.0 則極低。推測其在 pH 9.0 的環境中於銀奈米粒子上形成 $\text{Bi}(\text{OH})_3$ ，而增強其催化效能；在 pH 11.0 的環境中，則因為形成過多 $\text{Bi}(\text{OH})_3$ 而阻礙電子傳遞。
- (5) 如圖十， Pt^{4+} 在 pH 9.0 的環境中與銀奈米粒子結合後展現高過氧化酶活性，推測其可能在銀奈米粒子表面形成 PtO_2 ，而增強其催化效能。在 pH 11.0 的環境中，則因為形成過多 PtO_2 而阻礙電子傳遞。
- (6) 如圖十、十一， Au^{3+} 與銀奈米粒子結合後同時展現高過氧化酶活性及氧化酶活性，因此過氧化酶活性對於氧化酶活性的上升倍率不高。推測是親金作用力 (aurophilic interactions) 的影響，使金離子和銀奈米粒子鍵結較強，彼此距離縮短，使穿隧效應增強，而讓電子傳遞的速度增加，進而達到催化的效果。
- (7) 如圖十，resorufin 在極高或極低的酸鹼環境中不會發出螢光，因此在 pH 11.0 的環境中未觀察到明顯的螢光值。
2. 調控前一實驗中與銀奈米粒子結合後活性較明顯之金屬離子的濃度，於活性最佳之酸鹼環境中結合銀奈米粒子進行活性偵測

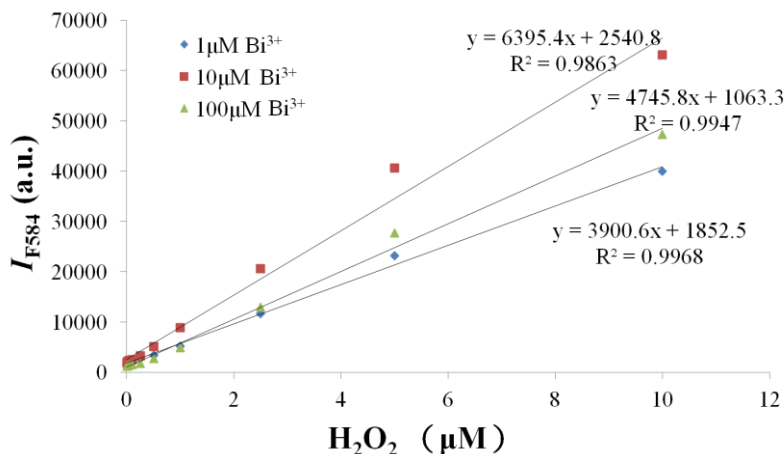


圖十二 銀奈米粒子與 Au^{3+} 、 Bi^{3+} 、 Pt^{4+} 結合後展現之過氧化酶活性 (I_{F0} 為 H_2O_2 濃度為 0 μM 時之螢光值； I_F 為 H_2O_2 濃度為 10 μM 時之螢光值)

- (1) Bi^{3+} 和銀奈米粒子反應後皆具有高活性，顯示 Bi^{3+} 的系統較 Au^{3+} 及 Pt^{4+} 穩定，因此使用 Bi^{3+} 進行 H_2O_2 的偵測。
- (2) 不同濃度的 Bi^{3+} 活性並未相差太多，因此兼採三種濃度進行 H_2O_2 的偵測。

(3) $1\ \mu\text{M}$ 的 Au^{3+} 及 Pt^{4+} 活性較 $10\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 佳，推測其在高濃度時，因活性較銀小且置於鹼性環境中，因而促使 Ag^0 釋放電子，破壞銀奈米粒子結構而失去活性。

3. 以上述實驗中之最佳條件結合金屬離子與銀奈米粒子進行活性偵測，繪製其對 H_2O_2 的檢量線



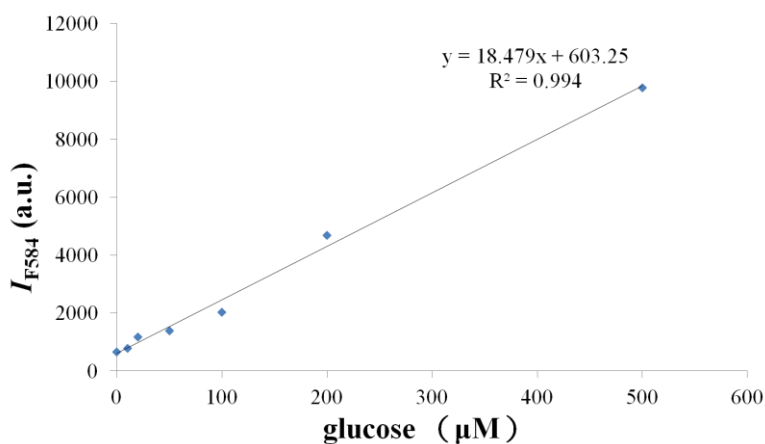
Bi^{3+} (μM)	LOD (μM)
$1\ \mu\text{M}$	259.1019
$10\ \mu\text{M}$	162.4453
$100\ \mu\text{M}$	155.3997

表一 不同濃度之 Bi^{3+} 與銀奈米粒子結合後對 H_2O_2 的偵測極限

圖十三 不同濃度之 Bi^{3+} 與銀奈米粒子結合後對 H_2O_2 的檢量線

- (1) 三種濃度的 Bi^{3+} 反應所得到的螢光值隨著 H_2O_2 的濃度上升而大致呈線性增加，證明其皆具有過氧化酶活性。
- (2) 三者之斜率以 $10\ \mu\text{M}$ 的 Bi^{3+} 最大，顯示其檢測能力可能較佳；其偵測極限約為 162nM 。

(三) 葡萄糖偵測



LOD (μM)
78.75024

表二 Bi^{3+} 與銀奈米粒子結合後配合葡萄糖氧化酶的催化對葡萄糖的最小偵測極限

圖十四 Bi^{3+} 與銀奈米粒子結合後配合葡萄糖氧化酶的催化對葡萄糖濃度的檢量線

1. 利用銀奈米粒子對葡萄糖氧化酶催化形成之 H_2O_2 進行檢測，其結果大致呈線性關係，顯示銀奈米粒子經由 Bi^{3+} 調控後確實具有檢測葡萄糖濃度的能力。
2. 其最小極限約為 $79\ \mu\text{M}$ 。

四、結論與應用

- (一) 利用 500mM 檸檬酸鈉、50mM NaBH_4 ，我們成功合成出 13 nm 之銀奈米粒子。
- (二) 過氧化酶活性最佳者為 Au^{3+} ，未來可結合 Au^{3+} 與銀奈米粒子，進行抑菌方面的應用。
- (三) 環境酸鹼值則是 pH 9.0 活性較佳。因此於 pH 9.0 的環境對銀奈米粒子進行修飾。
- (四) 過氧化酶活性最高者為 Au^{3+} 、 Bi^{3+} 及 Pt^{4+} 最高，其中， Bi^{3+} 的系統較 Au^{3+} 及 Pt^{4+} 穩定，且不同濃度之活 Bi^{3+} 性相差不大，因此使用不同濃度的 Bi^{3+} 進行 H_2O_2 的偵測。
- (五) 不同濃度的 Bi^{3+} 在 pH 9.0 的環境中與銀奈米粒子反應後螢光值和 H_2O_2 的濃度而呈線性關係；其中，10 μM 的 Bi^{3+} 斜率最大，顯示其檢測能力較佳。
- (六) 利用銀奈米粒子對葡萄糖氧化酶催化形成之 H_2O_2 進行檢測，其結果呈線性關係，顯示銀奈米粒子確實具有檢測葡萄糖濃度的能力。其最小極限遠低於人體血糖濃度(約為 4~6 mM)，因此未來可嘗試應用於血糖偵測。

五、參考文獻

- (一) Mark R. Langille; Michelle L. Personick; Chad A. Mirkin , Plasmon-Mediated Syntheses of Metallic Nanostructures, 2013
- (二) Kholoud M.M. Abou El-Noura; Ala'a Eftaihab; Abdulrhman Al-Warthanb; Reda A.A. Ammarb, Synthesis and applications of silver nanoparticles, 2010
- (三) Chia-Wen Lien; Ying-Chieh Chen; Huan-Tsung Chang; Chih-Ching Huang, Logical Regulation of the Enzyme-Like Activity of Gold Nanoparticles by Using Heavy Metal Ions, 2013
- (四) Chia-Wen Lien; Yu-Ting Tseng; Chih-Ching Huang; Huan-Tsung Chang, Logic Control of Enzyme-Like Gold Nanoparticles for Selective Detection of Lead and Mercury Ions, 2014
- (五) Katz E1; Privman V. , Enzyme-based logic systems for information processing, 2010
- (六) Baozhong Zhao; Kalina Ranguelova; JinJie Jiang; Ronald P. Mason, Studies on the photosensitized reduction of resorufin and implications for the detection of oxidative stress with Amplex Red, 2011
- (七) Gorris HH1; Walt DR., Mechanistic aspects of horseradish peroxidase elucidated through single-molecule studies, 2009
- (八) Hui Wei; Erkang Wang, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection, 2008

【評語】 030022

本研究是使用雙金屬奈米材料作仿生物酵素的應用。作者發現銀奈米粒子與 Au^{3+} 結合具有氧化酶的活性。研究成果豐富且具有發展潛力。以下兩點可作加強：

1. 針對所產生的銀一金奈米材料作完整的鑑定(TEM.SEM)
2. 對作為氧化酶的反應機制作合理性說明。