

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030011

參展科別 化學

作品名稱 利用適合體金奈米棒修飾氧化石墨烯於癌
細胞檢測

得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立中山女子高級中學

指導教師 張煥宗

作者姓名 何亭萱、林佳樺

關鍵字 金奈米、適合體、癌細胞

作者簡介



我是何亭萱，就讀於台北市立中山女高，LIYSF 第 56 屆成員，對大多數自然科學的領域都很有興趣，拋下升高三暑輔參加了 LIYSF，除了這份與癌細胞檢測相關的化學專研外對程式設計小有涉獵；從高一開始的專題生活在兩年過程中慢慢學習，在廉班的這段時期帶給我很多成長，感謝在路途中幫忙的學校老師、實驗室學姊與台大化學系溫暖的 B370。

我是林佳樺，目前就讀於台北市立中山女高數理資優班，在校成績普普。興趣是聽音樂跟唱歌，看電影和逛街。喜歡一切新的事物，分析事情發生的原因，最近對金融業興趣十足。偶像是賈伯斯，但沒有非常喜歡 Apple。高一年的時候很幸運可以進到台大化學系的實驗室，學到很多東西，對我們的專題很有信心，也很謝謝一年多來教授、學長姐給的種種支援。現在有點想念之前假日去沒有人的實驗室，自己在裡面邊做實驗邊放歌的日子。但是更嚮往當個財務工程師。



Abstract

The purpose is to create a material that can simply and quickly detect cancer cells. First, we synthesize gold nanorods (Au NRs) and graphene oxide (GO), combine aptamer MUC1 with the Au NRs, modify the Apt-Au NRs with GO, then add GO/MUC1-Au NRs to target cancer cells for an hour. Because of the obvious red light of Au NRs, we can track the targeted cancer cells under the dark-field microscopy by naked eye. We have successfully made the material and use it to observe cancer cells. We also found the most suitable concentration of GO to fully modify MUC1/Au NRs. Our research has put the purpose in reality –detect cancer cells. The future goals of the experiment is to find another aptamers which can solely attach on specific cancer cells, and combine the material with anti-cancer drugs, enlarging the usage of the material.

摘要

本實驗主要開發出快速簡單的癌細胞檢測系統。利用氧化石墨烯(graphene oxide, GO)搭配修飾上適合體(aptamer)的金奈米棒(gold nanorods, Au NRs)，藉由適合體對於癌細胞的專一性鍵結，可以使石墨烯氧化物/適合體-金奈米棒(GO/apt-Au NRs)鍵結到癌細胞表面，由於金奈米棒本身具有很強的散射光，因而可以直接於暗場顯微鏡下，以肉眼觀察及辨認癌細胞。此方法具有快速、簡單、便宜和選擇性佳等優點，且搭配上不同的適合體，即可以選擇性偵測不同細胞，因此未來期望能夠開發為可市售的癌症檢測套組。

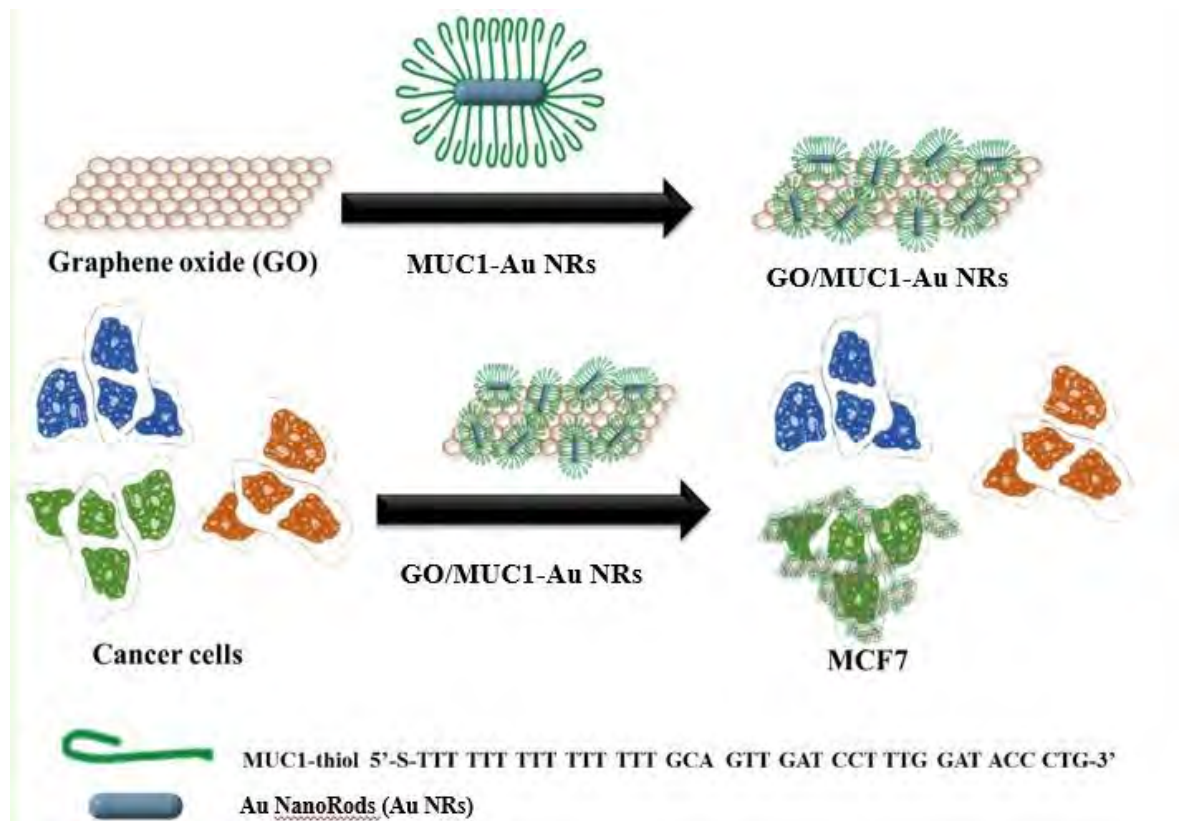
一、研究動機：

癌症為目前國人十大死因之首。因此癌症的檢測及治療，是現今科學家努力的目標。而我們涉獵多方面資料，發現奈米材料的應用性非常有潛力，所以對於奈米材料這個領域很有興趣。而近年來利用金奈米棒(gold nanorods, Au NRs)或氧化石墨烯(graphene oxide, GO)進行癌症治療的使用也相當廣泛。因此本研究藉由結合金奈米棒、氧化石墨烯及適合體(aptamer)，開發出能夠偵測、標定癌細胞之材料，期望未來能使用此材料偵測並標定癌細胞，同時利用金奈米棒具有強烈散射光的特性，在暗場顯微鏡底下觀察被標記之癌細胞。

二、研究目的：

- (一) 將金奈米棒(gold nanorods, Au NRs)和氧化石墨烯(graphene oxide, GO)、適合體(Aptamers,我們採用標定 MCF-7 的適合體 MUC1(5'-HS -TTT TTT TTT TTT TTT GCA GTT GAT CCT TTG GAT ACC CTG G-3'))結合，在適合體的目標分子存在的情況下，適合體能與結合並進行自我剪切的動作，作為標定細胞之材料。
- (二) 利用將來自製最佳的 GO/MUC1-Au NRs 為標定癌細胞之工具，並更進一步的利用此工具之特殊性質與癌症藥物結合。

三、研究過程或方法：



圖一:利用 GO/MUC1-Au NRs 選擇性標定細胞。

(一)奈米材料合成：

首先合成 250 pM 的金奈米棒(gold nanorods, Au NRs)、濃度為 1.64 mg/mL 的氧化石墨烯(graphene oxide, GO)，將 Au NRs 和 GO、MUC1 結合作為標定細胞之材料。最後利用 GO/MUC1-Au NRs 為標定癌細胞之工具

金奈米棒以及氧化石墨烯的合成方式及結合方式如下

1. 金奈米棒(Au nanorods, 250 pM)：

(1) Gold Seed Solution

以 200 mM,5 mL 的 CTAB 為保護劑，加入 0.5 M,5 mL 的 HAuCl₄，超音波震盪 15 秒後加入 10 mM,600 μL 的 NaBH₄ 並靜置半小時。

(2) Gold/silver Growth Solution

以 200 mM, 5 mL 的 CTAB 做為保護劑，接著再加入 1 mM, 5 mL 的 HAuCl_4 ，超音波震盪 15 秒後加入還原劑 78.8 mM, 70 μL Ascorbic Acid，以及 10 mM, 100 mL 的 AgNO_3 。

(3) 合成與純化

將 12 μL 的 Gold Seed Solution 加入上述合成 gold/silver Growth Solution，在 37 $^\circ\text{C}$ 反應 12 小時後，再以濃度為 100 mM 的 CTAB 置換兩次(12000 rpm, 10 min, 24 $^\circ\text{C}$)。

(4) 鑑定

利用紫外光-可見光吸收光譜儀測定 Au NRs 之特徵吸收峰，紫外光-可見光吸光度測定法是測定物質對特定波長光的吸收程度，當光通過樣品時，透射光的強度會因吸光物質(即待測物)的濃度和光線在樣品中行徑距離而定，而透射光強度與入射光強度之比值為穿透率，穿透率倒數的常用對數則為吸收度，因此能藉測定吸收光譜來判斷我們合成的材料是否為金奈米棒；並以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察其形狀及大小。

2. 氧化石墨烯(Graphene Oxide, 1.64mg/mL)：

(1) 合成

將 10 mL H_3PO_4 (85 %)和 90 mL H_2SO_4 (95.0%) 在雙口瓶內混合(上接冷凝管)，持續攪拌，並加入 0.75g Graphite (石墨粉)，將混合液隔水加熱至 50 $^\circ\text{C}$ ，再緩慢加入 4.5 g KMnO_4 於 50 $^\circ\text{C}$ 下反應 12 小時，停止加熱後，在冰浴下緩慢加入 100 mL DI Water，再加入 32% H_2O_2 以除去多餘的 KMnO_4 ，實驗裝置如圖二。

圖二:實驗裝置



(2) 純化

以磷酸緩衝溶液(PB buffer, pH7)將溶液置換至 pH 值接近 7。

(離心 35000 g, 40 min) 並去除上清液，回補磷酸緩衝溶液。

(3) 鑑定

以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察其形狀及大小。

3. Au NRs 與 MUC1 的結合(MUC1-Au NRs)：

(1) 結合

將 1 mM, 10 μ L 的 MUC1 加入 250 pM, 1000 μ L 的 Au NRs，完成後每 10 分鐘進行超音波震盪 15 秒，持續 1 小時，再使其持續搖晃 23 小時。接著加入 2% 的 SDS (Sodium dodecyl sulfate)，使其最終濃度為 0.015 M。最後在 55 $^{\circ}$ C 下，連續 14 小時慢慢加入含 2.5 M NaCl 的 10 mM PB buffer，使 PB buffer 的最終濃度為 0.5 M。

(2) 純化

以含 0.1M NaCl 的 10mM PB buffer 置換其溶液，將多餘的 MUC1 移除。

(3) 鑑定

利用紫外光-可見光吸收光譜儀測定 MUC1-Au NRs 之特徵吸收峰，並以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察其形狀及大小。

4. 適合體金奈米棒修飾氧化石墨烯：

(1) 結合

首先我們將氧化石墨烯進行超音波震盪一小時，再將其置於離心機中(15000g,30min)，完成後取上半部液體使用吸收光譜儀進行濃度定量；接著再以固定濃度已與 MUC1 結合的金奈米棒修飾不同濃度之氧化石墨烯，尋找其最佳濃度。

氧化石墨烯最終濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
100
120
140
160
180
200

MUC1-Au NRs 之最終濃度：25pM

PB buffer 之最終濃度：5mM

總體積：400 μL

(2) 尋找最適結合濃度

將結合完畢的材料置於離心機中純化 10 分鐘 (12000g)，並抽出 300 μL 的上部清澈液體，於紫外光-可見光吸收光譜儀中測量其上部清澈液體是否含有殘餘氧化石墨烯(氧化石墨烯之特徵吸收峰值約位於 229nm)來判定結合狀況。

(三) 細胞培養：

人類乳腺癌細胞(MCF-7; MDA-MB-231)、人類肝癌細胞(Hek293T)皆購自 American Type Culture Collection (Manassas, VA)。全部細胞株皆培養於 DMEM 培養基，其中含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum)、1% 抗生素(antibiotic-antimycotic)、2.0 mM L-谷氨酰胺(L-glutamine)與 1% 非必需胺基酸，細胞生長溫度調控在 37 °C，含有 5% CO₂ 培養箱中。

(四) 利用 GO MUC1-Au NRs 標定癌細胞：

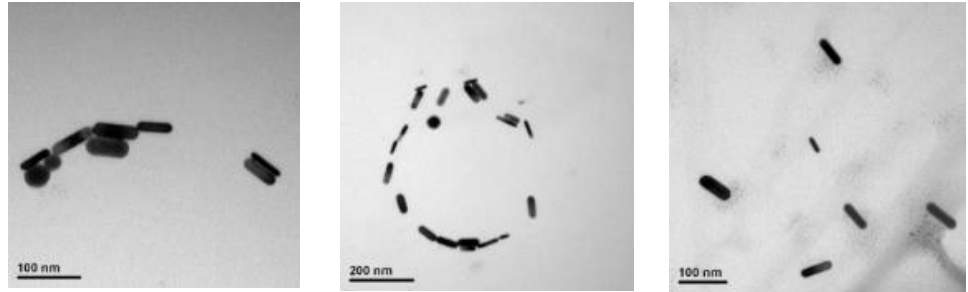
利用細胞會貼附於底部的特性，將 10 mm 之圓形蓋玻片放置於 24 孔盤再加入細胞液與 DMEM(500 μ L)，於細胞培養箱(37 °C，5% CO₂)培養 8 小時後，再加入 GO/MUC1-Au NRs (40 μ L)進行細胞標定 1 小時，之後將細胞置於離心機中純化 10 分鐘(300g)以取得完成細胞標定的細胞，取出蓋玻片使用 1X 生理緩衝溶液進行清洗，之後固定於載玻片上，利用透明指甲油封片，於室溫下風乾。

(五) 利用暗場顯微鏡觀察癌細胞：

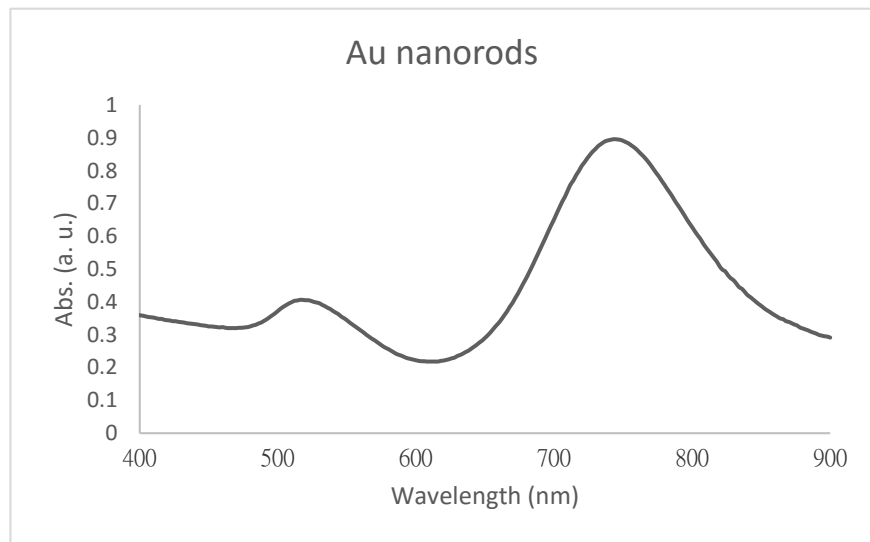
將製備好的細胞玻片放到暗場顯微鏡下，觀察其在顯微鏡下的影像。

四、研究結果：

(一)金奈米棒在吸收光譜儀下的吸收圖及 TEM 圖



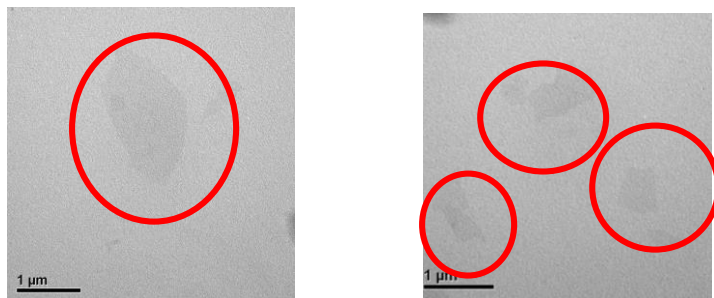
圖二：金奈米棒之 TEM 影像。



圖三：金奈米棒之可見光吸收光譜圖。

(二)氧化石墨烯的 TEM 圖

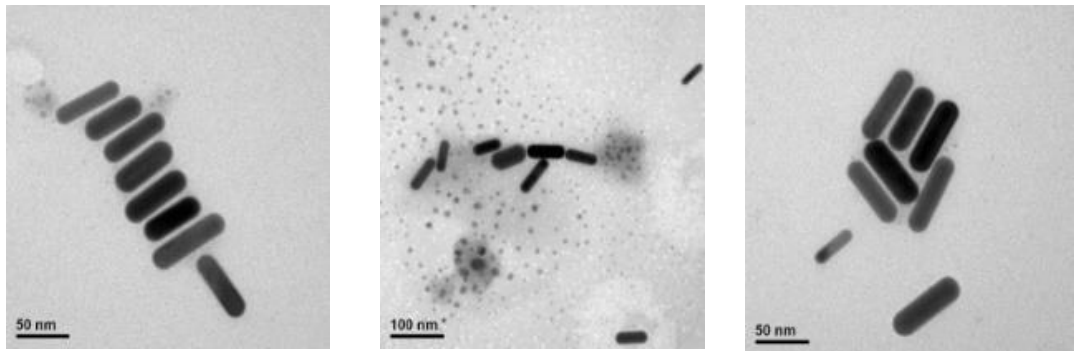
圖四為氧化石墨烯之 TEM 圖，可看出其形狀及大小。



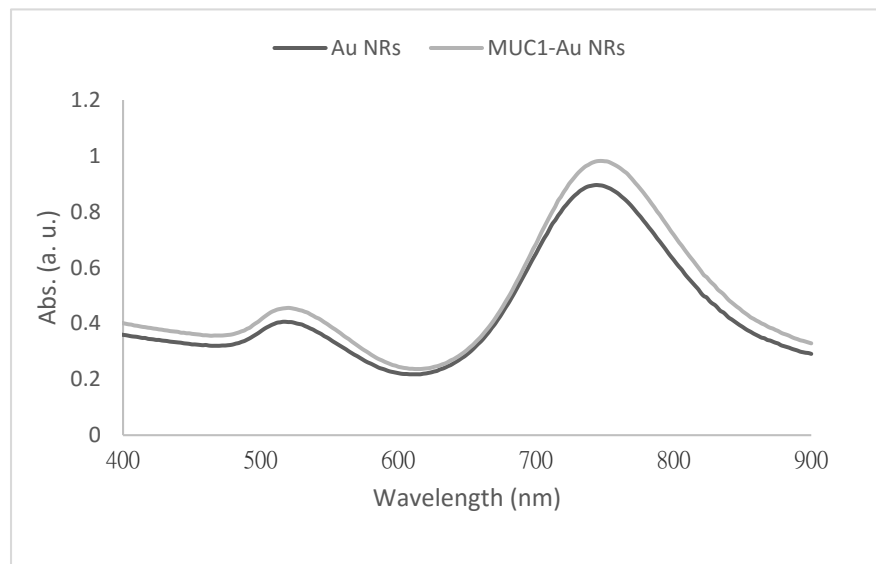
圖四：氧化石墨烯之 TEM 影像。

(三) Au NRs 與 MUC1 結合後的吸收圖與 TEM 圖

圖五為 TEM 圖，可明顯看出金奈米棒之形狀及大小。

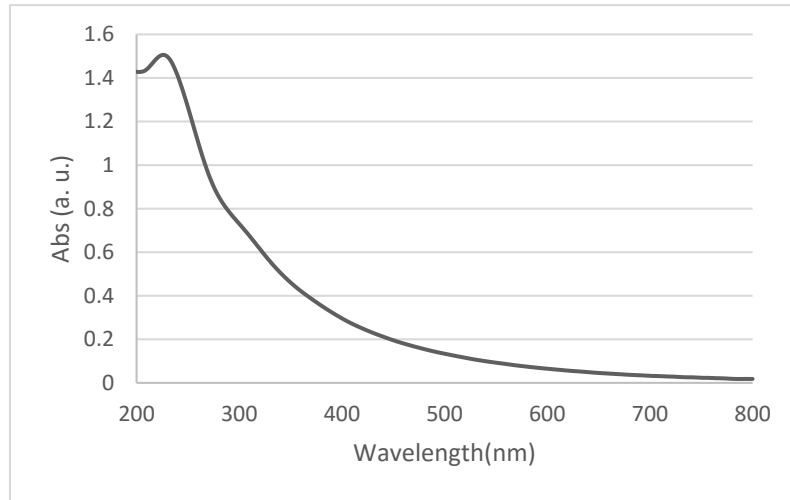


圖五: MUC1-Au NRs 之 TEM 影像。

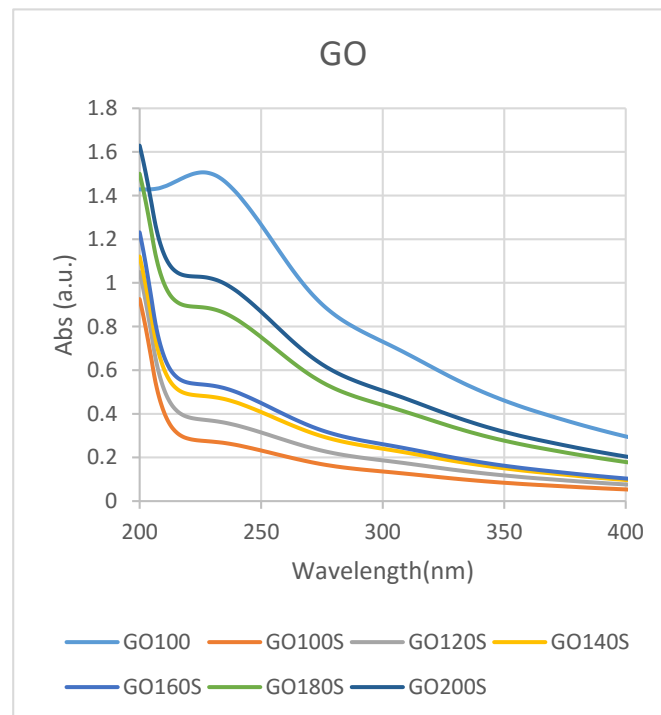


圖六: 金奈米棒之可見光吸收光譜圖。

(四)適合體金奈米棒修飾氧化石墨烯

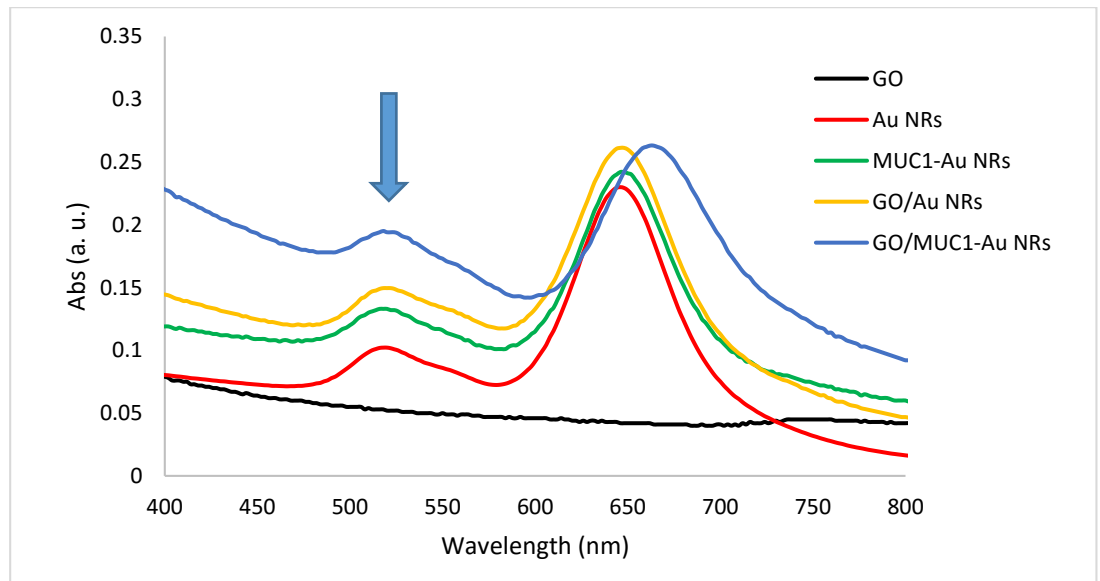


圖七: GO 之可見光吸收光譜圖。



圖八: 不同濃度 GO 與 MUC1-Au NRs 結合後未結合上之 GO 可見光吸收光譜圖 (GO100 之線段, 即表中特徵吸收峰最明顯者為濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氧化石墨烯, 其餘線段由上往下之實驗組濃度分別為 200、180、160、140、120、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(五)不同細胞標定系統(即 Au NRs ; GO ; MUC1-Au NRs ; GO-Au NRs ; GO/MUC1-Au NRs)之吸收圖

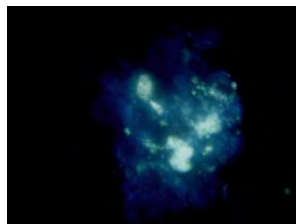


圖九: 不同材料的可見光吸收光譜圖

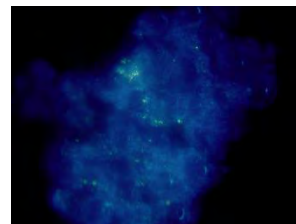
圖中箭頭所指區塊向下之線段依序為 GO/MUC1-Au NRs、GO/Au NRs、MUC1-Au NRs、Au NRs、GO

(六)利用不同細胞標定系統(MUC1-Au NRs ; GO-Au NRs ; GO/MUC1-Au NRs)

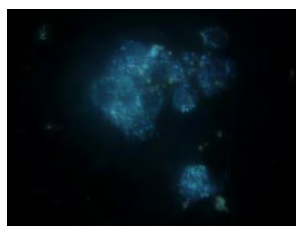
於暗場顯微鏡觀察癌細胞



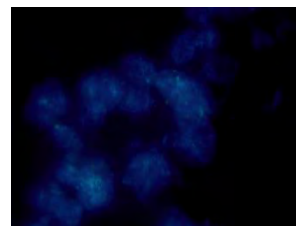
圖十: 利用 GO/MUC1-Au NRs 標定 MCF-7



圖十二: 利用 MUC1-Au NRs 標定 MCF-7



圖十一: 利用 GO/MUC1-Au NRs 標定 Hek293T



圖十三: 利用 GO/Au NRs 標定 MCF-7

五、討論：

- (一)由圖二金奈米棒的 TEM 圖可看出我們所合成的金奈米棒長度約為 60nm，圖三為金奈米棒之金奈米棒的可見光吸收光譜圖。金奈米棒的 SPR 共振吸收共有兩個波峰，一為橫軸吸收，吸收波長約在 510–520 nm 間，另一為縱軸吸收。
- (二)由圖四氧化石墨烯的 TEM 圖可看出我們所合成的氧化石墨烯寬度約為 1 μ m。
- (三)觀察圖五及圖六適合體金奈米棒的 TEM 圖以及吸收光譜圖，原先的金奈米棒在與經硫修飾的適合體 MUC1 結合後並未聚集，呈現原本的形狀。
- (四)藉測定氧化石墨烯的吸收度，得知氧化石墨烯的特徵吸收峰位於 229nm(如圖七)，接著我們利用不同濃度的氧化石墨烯與 MUC1-Au NRs 結合，再經純化取其上清液並測定吸收度，在此只要用紫外光可見光吸收光譜儀可測出未與 MUC1-Au NRs 結合的剩餘石墨烯，而由圖八我們發現在氧化石墨烯之濃度為 180 μ g/mL 時，氧化石墨烯之特徵吸收峰值始有明顯變化。
- (五)MCF-7 細胞本身的散射光為深藍色，Hek293T 的散射光則為淺藍色。比較圖十與圖十一，我們發現使用我們的標定系統，可以標定出有具有適合體目標分子的細胞 MCF-7，呈現偏白的淺藍色；而不具有適合體目標分子的細胞 Hek293T 則無法被此標定系統成功標定，只看得到該細胞原本的散射光。
- (六)由三種不同的標定系統(GO/MUC1-Au NRs 圖十一；MUC1-Au NRs 圖十二；GO-Au NRs 圖十三)與細胞 MCF-7 及 Hek293T 標定後，在暗場顯微鏡下觀察，我們發現以 GO/MUC1-Au NRs 作為標定工具時之效果最佳，可以看到被成功標定的極明顯的癌細胞。

六、結論：

- (一)找出 MUC1-Au NRs 在氧化石墨烯上，最大飽和吸附量為 180 μ g/mL。
- (二)使用此系統(MUC1-Au NRs-Graphene Oxide)標定時具有專一性，如適合體 MUC1 可以標定出具有目標分子的 MCF-7。
- (三)利用此系統(MUC1-Au NRs-Graphene Oxide)作為標定細胞的工具相較於其他系統(Au NRs； Graphene Oxide； MUC1-Au NRs； Au NRs-Graphene Oxide)在暗場顯微鏡下之標定效果最佳。

七、參考資料及其他：

- (一) Gendler, S. J. MUC1, the Renaissance Molecule. *J. Mammary Gland Biol.* 2001, 6, 339–353. 18. Nath, S.; Mukherjee, P. MUC1: A Multifaceted Oncoprotein with a Key Role in Cancer Progression. *Trends Mol. Med.* 2014, 20, 332–342.
- (二) Ferreira, C. S. M.; Matthews, C. S. M.; Missailidis, S. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol.* 2006, 27, 289–301.
- (三) Ferreira, C. S. M.; Papamichael, K.; Guilbault, G.; Schwarzacher, T.; Garipey, J.; Missailidis, S. DNA Aptamers Against the MUC1 Tumour Marker: Design of Aptamer-Antibody Sandwich ELISA for the Early Diagnosis of Epithelial Tumours. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 1039–1050.
- (四) Wu, P.; Gao, Y.; Zhang, H.; Cai, C. Aptamer-Guided Silver-Gold Bimetallic Nanostructures with Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering for Specific Detection and Near-Infrared Photothermal therapy of Human Breast Cancer Cells. *Anal. Chem.* 2012, 84, 7692–7699.
- (五) Hua, X.; Zhou, Z.; Yuan, L.; Liu, S. Selective Collection and Detection of

- MCF-7 Breast Cancer Cells Using Aptamer-Functionalized Magnetic Beads and Quantum Dots Based Nano-Bio-Probes. *Anal. Chim. Acta* 2013, 788, 135–140.
- (六) Marcano, D. C.; Kosynkin, D. V.; Berlin, J. M.; Sinitskii, A.; Sun, Z. Z.; Slesarev, A.; Alemany, L. B.; Lu, W.; Tour, J. M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* 2010, 4, 4806–4814.
- (七) Baouendi, M.; Cognet, J. A. H.; Ferreira, C. S. M.; Missailidis, S.; Coutant, J.; Piotto, M.; Hantz, E.; Hervé du Penhoat, C. Solution Structure of a Truncated Anti-MUC1 DNA Aptamer Determined by Mesoscale Modeling and NMR. *FEBS J.* 2012, 279, 479–490.
- (八) Spiwok, V.; Hobza, P.; Řezáč, J. Free-Energy Simulations of Hydrogen Bonding Versus Stacking of Nucleobases on a Graphene Surface. *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, 19455–19462.
- (九) Antony, J.; Grimme, S. Structures and Interaction Energies of Stacked Graphene-Nucleobase Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 2722–2729.
- (十) Varghese, N.; Mogera, U.; Govindaraj, A.; Das, A.; Maiti, P. K.; Sood, A. K.; Rao, C. N. R. Binding of DNA Nucleobases and Nucleosides with Graphene. *Chemphyschem* 2009, 10, 206–210.
- (十一) He, Y.; Lin, Y.; Tang, H.; Pang, D. A Graphene Oxide-Based Fluorescent Aptasensor for the Turn-On Detection of Epithelial Tumor Marker Mucin 1. *Nanoscale* 2012, 4, 2054–2059.
- (十二) Lu, C.-H.; Yang, H.-H.; Zhu, C.-L.; Chen, X.; Chen, G.-N. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 4785–4787.

【評語】 030011

研究的主要目的是開發簡易的癌細胞檢測系統。研究利用氧化石墨烯搭配 aptamer 及 gold nanorods 可成功地於暗場顯微鏡下，觀察 MCF-7 癌細胞。研究成果具相當的應用潛力。