

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	030010
參展科別	化學
作品名稱	複合葡萄糖氧化酶的金奈米團簇應用於葡萄糖 檢測

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	姚月雲 張煥宗
作者姓名	洪郁恩

關鍵詞	<u>金奈米團簇、葡萄糖氧化酶、血糖檢測</u>
-----	--------------------------

作者簡介



我是就讀北一女中數理資優班高二的洪郁恩。很榮幸能在長庚大學生物醫學系的實驗室學習有關奈米材料的知識並進行實驗。感謝張煥宗教授指導，讓我得以踏進研究奈米材料的領域，另外感謝李宛柔學姐帶領我學習實驗的相關技巧，以及祝瀚崑學長培養我科學研究的思考能力。最後感謝姚月雲老師無時無刻的關照與指導，與家人的支持與陪伴，給我繼續在科學研究向前邁進的動力。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別： 北區

科別：化學科

作品名稱：複合葡萄糖氧化酶的金奈米團簇應用於葡萄糖檢測

關鍵詞：金奈米團簇、葡萄糖氧化酶、血糖檢測

編號：

摘要

本研究使用牛血清白蛋白 (BSA)、穀胱甘肽 (GSH)、金離子合成金奈米螢光團簇，並修飾上葡萄糖氧化酶 (GOx)。此金奈米團簇上的葡萄糖氧化酶與葡萄糖反應，製造出過氧化氫，改變金奈米螢光團簇表面特性使螢光強度減弱，偵測葡萄糖濃度。

本研究探討不同條件金奈米團簇和不同濃度的葡萄糖反應，知道此材料可檢測到最低濃度的葡萄糖，且金奈米團簇在血液中對葡萄糖具有專一性，可穩定進行血糖檢測。另外，與不同濃度的人體血清樣本反應，發現血清濃度越高的螢光訊號下降明顯，因此可知修飾上葡萄糖氧化酶的穀胱甘肽輔助之牛血清白蛋白金奈米團簇 (BSA/GSH-Au NCs) 可用於人體血糖檢測。本研究開發出靈敏、快速、穩定的葡萄糖檢測材料，並期待未來能運用於實際的人體血糖檢測上。

Abstract

In this study, bovine serum albumin (BSA), glutathione (GSH), and gold ions were used to synthesize gold nanoclusters, which were subsequently modified with glucose oxidase (GOx). The glucose oxidase on the gold nanoclusters reacts with glucose, producing hydrogen peroxide, which alters the surface characteristics of the nanoclusters, leading to a decrease in fluorescence intensity, thereby enabling glucose detection.

This study investigates the reaction between the gold nanoclusters under different conditions and varying glucose concentrations, revealing that the lowest concentration of glucose the material can detect. The gold nanoclusters also demonstrate specificity for glucose in blood, enabling stable blood glucose detection. Furthermore, reactions with human serum samples of varying concentrations show that higher serum concentrations lead to a more significant decrease in fluorescence signal. These findings suggest that the glucose oxidase-modified, glutathione-assisted BSA gold nanoclusters (BSA/GSH-Au NCs) can be used for blood glucose detection in humans. This research has developed a sensitive, rapid, and stable glucose detection material, with the potential for future application in practical human blood glucose monitoring.

壹、前言

一、研究動機

世界衛生組織估計，每年有 150 萬人死於糖尿病，而且這個數字還在不斷上升，然而病人往往會對扎感到害怕與痛苦，能快速準確地檢測血糖是糖尿病患者控制糖尿病病情的重要方法之一。近年奈米材料因為其特性，像是有良好的強度與韌性、特殊的表面特性等，而應用在生醫、環境、能源、材料科學、食品農業應用等領域，尤其是奈米金團簇因為有良好的發光性質、低毒性與生物相容性、高化學穩定性等，在檢測方面有許多應用。本研究想開發一種更快速且靈敏的複合材料試劑能檢測血液中的葡萄糖，藉由複合材料中的葡萄糖氧化酶與葡萄糖作用產生過氧化氫，並利用過氧化氫淬滅金屬奈米團簇之螢光而達到檢測血糖的濃度。本研究將以少量牛血清白蛋白及穀胱甘肽輔助合成螢光奈米團簇與葡萄糖氧化酶來合成金奈米團簇，能有效縮短反應時間，也不會有太多蛋白質參與合成反應，期望能快速檢測葡萄糖，同時開發出簡易、穩定性佳且成本較低的血糖檢測試劑。本研究擬選用最佳化製備的金奈米團簇為材料，進行探討金奈米團簇修飾上葡萄糖氧化酶後檢測葡萄糖反應的螢光效果。運用了螢光靈敏的特性，可以減少檢測時需抽取的血量，能降低患者抽血時的恐懼與時間，同時快速檢測。

二、研究目的

- (一) 研發合成出牛血清白蛋白／穀胱甘肽金奈米螢光團簇 (BSA/GSH-Au NCs)。
- (二) 探討修飾上不同濃度的葡萄糖氧化酶 (GOx) 的金奈米團簇的螢光光譜，並找出最佳的 GOx 濃度。
- (三) BSA/GSH-Au NCs、複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 的材料鑑定
- (四) 探討複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測葡萄糖的最佳條件 (反應時間、溫度、pH 條件) 和其檢測葡萄糖的效果。
- (五) 探討複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 和葡萄糖反應的酵素動力學。
- (六) 在仿生理環境下及人體血清樣本中複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測葡萄糖的效果。

三、 文獻回顧

(一) 葡萄糖偵測簡介：

1. 葡萄糖偵測之目的

近年來人類追求高品質的生活的同時，隨著人口老化、生活型態及飲食方式改變，慢性病已取代了急性傳染病，成為世人最主要的死因。慢性病中包含高血壓與糖尿病，而糖尿病是全球的通病。聯合國世界衛生組織預測，西元 2025 年全世界糖尿病患將是西元 1995 年的一倍以上，預估有三億三千萬病患。以台灣為例，依據行政院衛生署統計資料顯示，民國 75 年，每年有 2970 人死於糖尿病。至民國 112 年，有 11625 人死於糖尿病，表為 112 年台灣慢性疾病十大死因排名，糖尿病現居第五名。

2. 葡萄糖之生理意義

葡萄糖(glucose)在生物能量的製造中扮演重要的角色，是呼吸作用的反應物，人體血液中最主要醣類即為葡萄糖，簡稱血糖，葡萄糖經糖解作用(glycolysis)後，產生 ATP 提供細胞所需的能量。正常人的血糖濃度範圍介於 3.9- 6.1 mM，而糖尿病患者血糖濃度則介於 9- 40 mM。

3. 葡萄糖偵測

檢測葡萄糖的方法主要分為兩大類，分別為以光學原理以及電化學為基礎的分析方式。以光學原理為基礎的葡萄糖感測器，大多利用過氧化氫與其他基質之間的反應，形成具有光學活性的產物，再分別以吸收光譜法或螢光光譜法偵測，此方法提供高靈敏度、專一性、快速檢測的優點。電化學葡萄糖感測器的原理是在系統中外加適當的電壓，提供電極接觸面有足夠的能量進行電子的轉移，以測量葡萄糖在電極表面進行氧化還原反應時所產生之電流，待測物濃度與電流大小成正比即可進行量測。

(二) 金奈米團簇為什麼會發出螢光：

1. 量子限制效應 (Quantum Confinement Effect)：

當金屬奈米團簇的尺寸接近金屬的費米波長時，能階變為不連續的分子狀態，導致特有的光學和電子特性。這些簇由少量到數百個原子組成，展現出分子狀的電子能級結構，導致強烈的光吸收和發射。

2. 內帶 (sp-sp) 和跨帶 (sp-d) 躍遷：

當金屬奈米簇的尺寸縮小到 2 奈米或更小時，金屬奈米團簇的電子於內帶 (sp-sp) 和跨帶 (sp-d) 躍遷，就是發光的來源。

3. 配體到金屬電荷轉移 (LMCT)：

金屬奈米團簇上的配體 (包圍金屬的分子) 可以把電子傳給金屬核心，這樣的電子轉移會改變發光的特性，像是改變光的顏色或亮度。

4. 配體-金屬-金屬電荷轉移 (LMMCT)：

由於相對論效應而產生的金屬與金屬間的相互作用，這種電荷轉移機制解釋過渡金屬有機化合物的光致發光。金屬奈米團簇的內帶 (sp-sp) 和跨帶 (sp-d) 躍遷可能充當一個中間態 (或暗態) 來決定電子轉移。

(三) 影響金奈米團簇螢光的因素：

1. 優化配體：改變配體的種類和結構以增強螢光效率，和增強配體或保護殼的剛性以減少非輻射鬆弛，因此本研究選擇 BSA 當作其保護殼。
2. 修改合成過程：優化奈米團簇的合成過程，以獲得更高螢光效率。
3. 環境條件的優化：調整環境條件如溶劑、pH 值、溫度等以增強螢光。

(四) 葡萄糖氧化酶 (GOx) 之介紹與應用

GOx 專門催化葡萄糖氧化，並在氧氣存在的環境下產生葡萄糖酸和 H_2O_2 。鑑於其高功效的葡萄糖催化，GOx 可以作為檢測葡萄糖水準物，所以設計為各種生物感測器。根據 GOx 催化反應的化學計量，可以透過測量氧氣消耗或 H_2O_2 的產生來計算葡萄糖濃度。

貳、研究方法或過程

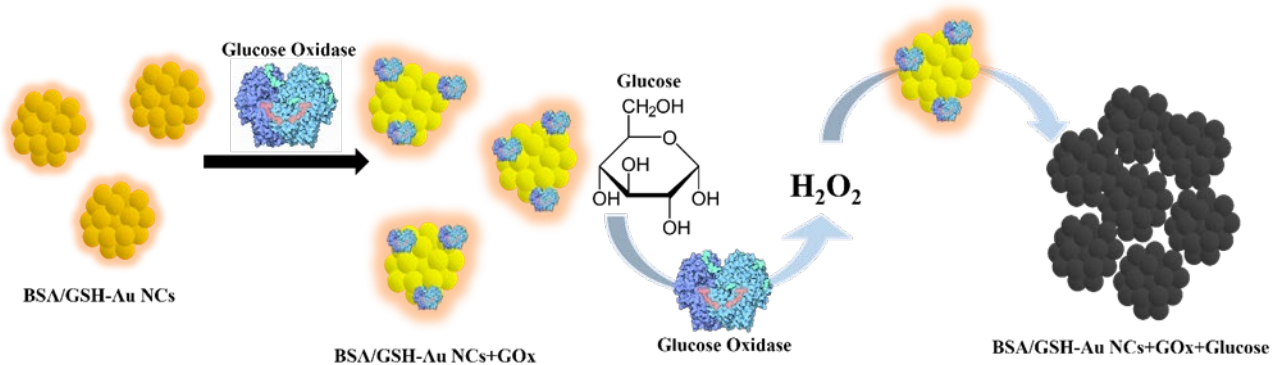
一、實驗流程圖



二、研究原理

(一) 複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 如何檢測葡萄糖

本研究中的金奈米團簇具有螢光特性，修飾 GOx 後仍保有 GOx 原來的活性，催化葡萄糖與溶解的 O_2 反應生成 H_2O_2 ，能改變金奈米團簇表面特性，定量能淬滅金奈米團簇的螢光，為葡萄糖檢測奠定了基礎。可經由量測其螢光值變化達到檢測葡萄糖濃度之目的，如圖一所示。



圖一、BSA/GSH-Au 和葡萄糖反應猝滅金奈米團簇的螢光機制(研究者自行繪製)

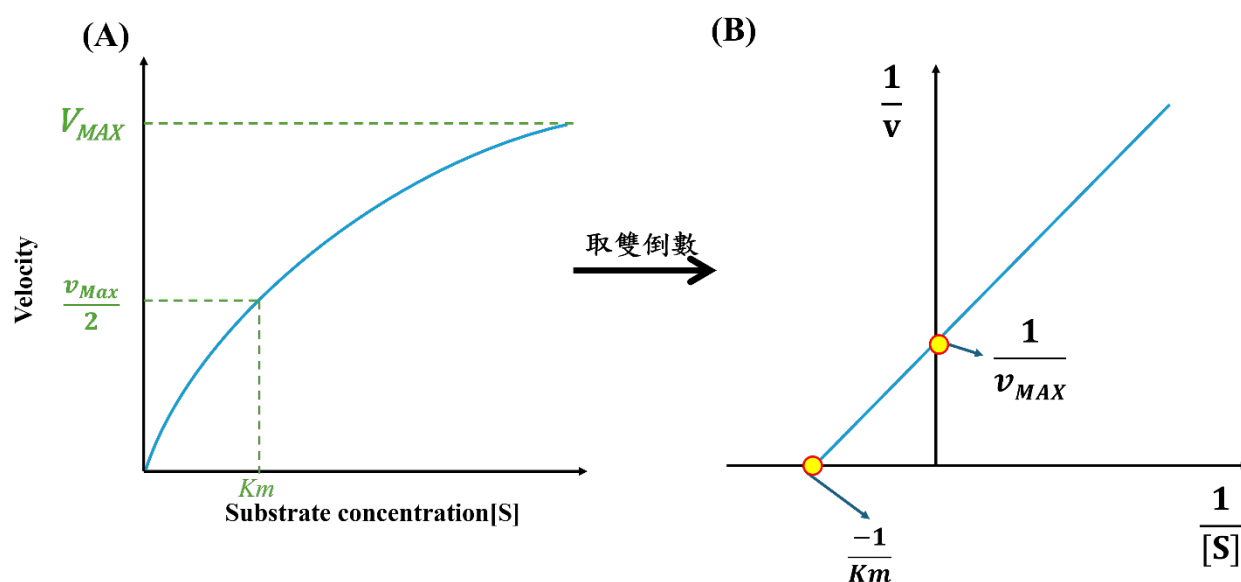
(二) 酵素動力學

利用下列參數，比較不同酵素間催化反應的能力

K_m ：酵素與受質間親和力的指標， K_m 值越大代表親和力越小

V_{max} ：在足夠的受質濃度下，一定量的酵素能催化的最高反應速率

K_{cat} ($= V_{max}/\text{酵素濃度}$)：單位時間內每莫耳酵素所能催化的受質數



圖二、(A)反應速率對受質濃度作圖(B)Lineweaver-Burk 雙倒數之圖形(研究者自行繪製)

三、研究設備與藥品

(一) 實驗設備及儀器：

螢光光譜儀	恆溫反應槽	凝膠電泳槽	超音波震盪器
電子天平	試管	振盪器 vortex	恆溫培養箱
穿透式電子顯微鏡		奈米粒靜電位分析儀	

(二) 藥品：

牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)
穀胱甘肽 (Glutathione, GSH)	葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOx)
葡萄糖 (Glucose)	氫氧化鈉 (NaOH)
四氯合金酸 (Tetrachloroauric acid)	磷酸緩衝溶液(Phosphate Buffer)

四、實驗步驟

(一) 探討最佳的 BSA/GSH-Au NCs 合成條件

1. BSA 濃度對 Au NCs 的合成影響

- (1) 配置 0.4、0.3、0.2、0.16、0.12、0.1、0.04 mM, 250 μ L 的 BSA 溶液，再加入 625 μ L 的水。
- (2) 靜置反應 10 分鐘後，分別加入 20 mM, 100 μ L 的 Au、1 M, 25 μ L 的 NaOH。
- (3) 反應 60 分鐘並加熱後，再取 200 μ L 測螢光光譜。

2. 不同穀胱甘肽(Glutathione, GSH)濃度

- (1) 配置 0.12 mM, 250 μ L 的 BSA 溶液，4、8、12、20、40 mM, 250 μ L 的 GSH 溶液，再加入 375 μ L 的水。
- (2) 靜置反應 10 分鐘後，分別加入 20 mM, 100 μ L 的 Au、1 M, 25 μ L 的 NaOH。
- (3) 反應 30 分鐘並加熱後，再取 200 μ L 測螢光光譜。

3. 不同 Au 濃度

- (1) 配置 0.12 mM, 250 μ L 的 BSA 溶液、12 mM, 250 μ L 的 GSH 溶液，再加入 375 μ L 的水。
- (2) 靜置 10 分鐘後，分別加入 10、20、250、300、500、1000 mM, 100 μ L 的 Au、1 M, 25 μ L 的 NaOH。
- (3) 反應 30 分鐘並加熱後，再取 200 μ L 測螢光光譜。

4. 合成最佳化螢光訊號條件的 BSA/GSH-Au NCs

- (1) 配置 0.12 mM, 250 μ L 的 BSA 溶液、12 mM 250 μ L 的 GSH 溶液，再加入 375 μ L 的水。
- (2) 靜置 10 分鐘後，加入 20 mM, 100 μ L 的 Au、1 M, 25 μ L 的 NaOH。
- (3) 加熱反應 30 分鐘，探討 BSA/GSH-Au NCs 和 BSA-Au NCs 檢測葡萄糖的效果

(二) 探討 BSA/GSH-Au NCs、BSA-Au NCs 檢測葡萄糖的效果

1. 加入 900 μL 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μL 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au，並以 vortex 震動混勻。
2. 分別加入加入不同濃度 50 μL 的 glucose 溶液，使得溶液中的 glucose 濃度分別為 100、10、1、0.1、0.01mM，並以 vortex 震動混勻。
3. 靜置反應 30 分鐘後，再取各溶液 200 μL 測螢光光譜。

(三) 探討 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au 修飾上 GOx 後的螢光訊號變化

1. 配置磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、1.25 mM 的 GOx 溶液。
2. 加入 940 μL 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μL 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au，並以 vortex 震動混勻。
3. 分別加入加入不同濃度 10 μL 的 GOx 溶液，使得溶液中的 GOx 濃度分別為 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mM 的 GOx 溶液，並以 vortex 震動混勻。
4. 靜置反應 10 分鐘後，再取各溶液 200 μL 測螢光光譜。

(四) 材料鑑定

1. 製備待測樣品，如下表一所示。
2. 使用穿透式電子顯微鏡(TEM)、奈米粒徑電位分析儀(Zeta sizer)檢測。

表一、 PB buffer 體積、BSA/GSH-Au NCs、GOx、glucose(研究者自行繪製)

樣品	10mM PB (μL)	BSA/GSH-Au NCs (μL)	GOx (μL)	200mM glucose (μL)
BSA GSH-Au NCs	950	50	0	0
複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs	940	50	10	0
複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs+glucose	890	50	10	50

(五) 比較有無 BSA 合成的 Au 奈米團簇 (BSA/GSH-Au NCs 或 GSH -Au) 對偵測 Glucose 的效果。

1. 配磷酸鹽緩衝溶液 pH 4.0、2.0 M 的 Glucose 溶液、10 μ M 的 GOx 溶液
2. 加入 890 μ L 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μ L 的 BSA/GSH-Au NCs 或 GSH -Au，並以 vortex 震動混勻。
3. 加入 10 μ M, 10 μ L 的 GOx 溶液，並靜置反應 10 分鐘。
4. 加入 8 mM, 50 μ L 的 Glucose 溶液，並以 vortex 震動混勻。
5. 靜置反應 30 分鐘後，取各溶液 200 μ L 測螢光光譜。

(六) 透過凝膠電泳探討是否因為加入 GOx 使蛋白質結構或大小改變影響其螢光訊號的變化

1. 製備膠體，以 1.5 g 1 % 的 Agarose Gel，加入 0.1 M 150mL 的 1X TAE buffer，並放入微波爐中加熱至 Agarose 溶解。倒出溶化後的 Agarose 至膠體製備槽中，並立即插入梳板。待 Agarose 在膠體製備槽冷卻凝固約 20 分鐘後，輕輕將梳板移開，凝膠製備即完成。
2. 將製備好的凝膠放入電泳槽中，並倒入 1X TAE buffer 至液面蓋過凝膠本體。
3. 將 1X TAE buffer、甘油和樣品混合。

表二、 樣品、甘油、TAE buffer 體積(研究者自行繪製)

樣品	樣品 (μ L)	甘油 (μ L)	染色劑 (μ L)	TAE buffer (μ L)
BSA/GSH-Au NCs	50	50	0	900
BSA/GSH-Au NCs+GOx	50	50	0	900
BSA/GSH-Au NCs+GOx	50	50	10	890

4. 用微量吸管將混和後的樣品取 15 μ L 注入凝膠凹槽中。
5. 設定電泳槽的電壓為 100 伏特，時間 30 分鐘，並待有加入染色劑的樣品移動至距離凝膠底部約 1.5 公分處，即停止電泳。
6. 將凝膠放置在透射光源板上，開啟紫外燈，於紫外燈下觀察並拍照紀錄結果。

(七) 探討複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測葡萄糖的最佳條件

1. 探討反應溫度、時間

- (1) 配磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、2.0 M 的 Glucose 溶液、10 μ M 的 GOx 溶液
- (2) 加入 890 μ L 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μ L 的 BSA/GSH-Au NCs 或 GSH-Au，並以 vortex 震動混勻。
- (3) 加入 10 μ M, 10 μ L 的 GOx 溶液，並靜置反應 10 分鐘。
- (4) 分別加入不同濃度 50 μ L 的 glucose 溶液，使得溶液中的 glucose 濃度分別為 100、10、1、0.1、0.01 mM，並以 vortex 震動混勻。
- (5) 取兩個 96 孔盤分別取 200 μ L 的樣品，並將兩個 96 孔盤包上鋁箔紙，一個放置於室溫環境，另一個放置於 37 $^{\circ}$ C 的環境。
- (6) 於反應 20、40、60、80、100、120 分鐘時，測螢光光譜。

2. 探討反應的 pH 條件

- (1) 配磷酸鹽緩衝溶液 pH 4.0, 7.0, 11.0、2.0 M 的 Glucose 溶液、10 μ M 的 GOx 溶液。
- (2) 加入 890 μ L 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μ L 的 BSA/GSH-Au NCs 或 GSH-Au，並以 vortex 震動混勻。
- (3) 加入 10 μ M, 10 μ L 的 GOx 溶液，並靜置反應 10 分鐘。
- (4) 分別加入不同濃度 50 μ L 的 glucose 溶液，使得溶液中的 glucose 濃度分別為 100、10、1、0.1、0.01mM，並以 vortex 震動混勻。
- (5) 置於 37 $^{\circ}$ C 的環境下 40 分鐘。
- (6) 取 200 μ L 測螢光光譜。

(八) 探討修飾上 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au NCs 偵測不同濃度 Glucose 的螢光變化

1. 配置磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、2.0 mM 的 Glucose 溶液、10 μ M 的 GOx 溶液。
2. 加入 890 μ L 磷酸鹽的緩衝溶液 (pH 4.0)、50 μ L 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au，並以 vortex 震動混勻。
3. 加入 10 μ M, 10 μ L 的 GOx 溶液。

4. 靜置反應 10 分鐘。
5. 分別加入不同濃度 50 μL 的 Glucose 溶液，並以 vortex 震動混勻，使得溶液中的 Glucose 濃度分別為 10、5、1、0.75、0.5、0.4、0.2、0.01、0mM。
6. 在 37°C 的環境下靜置 40 分鐘後，取各溶液 200 μL 測螢光光譜。

(九) 酵素動力學

1. 配磷酸鹽緩衝溶液 pH 4.0、2.0 M 的 Glucose 溶液、4 μM 的 GOx 溶液
2. 在 15 毫升的離心管中加入 1450 μL 的磷酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0)、250 μL 的 BSA/GSH-Au NCs，並以 vortex 震動混勻。
3. 加入 4 μM , 50 μL 的 GOx 溶液，並靜置反應 10 分鐘。
4. 取上述溶液 175 μL 分別於 96 孔盤中加入不同濃度 25 μL 的 glucose 溶液，使得溶液中的 glucose 濃度分別為 25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78 mM，並以 vortex 震動混勻。每隔 2 分鐘測一次螢光光譜。

(十) 在仿生理環境下複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測 Glucose 的效果

1. 配置仿生理環境的溶液(含有 100 μM 的 BSA 溶液)的 1X PBS、2.0M 的 Glucose 溶液、10 μM 的 GOx。
2. 加入 890 μL 仿生理環境溶液、50 μL 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au，並以 vortex 震動混勻。
3. 加入 10 μM , 10 μL 的 GOx 溶液。靜置反應 10 分鐘。
4. 分別加入不同濃度的 Glucose 溶液，並以 vortex 震動混勻，使得溶液中的 Glucose 濃度分別為 10、5、1、0.75、0.5、0.4、0.2、0.01、0mM。
5. 在 37°C 的環境下靜置 40 分鐘後，取 200 μL 測螢光光譜。

(十一) 使用複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 偵測人體血清樣本

1. 配置仿生理環境的溶液(含有 100 μM 的 BSA 溶液)的 1X PBS、2.0 mM 的 Glucose 溶液、10 μM 的 GOx 溶液。
2. 將人體血清樣本進行高速離心，轉速 5000 g RCF，離心 10 分鐘。
3. 將離心後的人體血清樣本取出上層液體，並做為後續實驗用的原溶液。

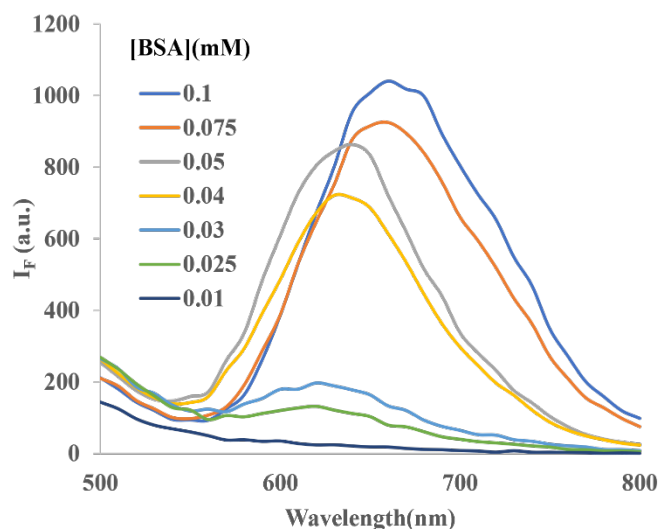
4. 加入 200 μL 的血清樣本、245 μL 仿生理環境的溶液(含有 100 μM 的 BSA 溶液)的 1X PBS、25 μL 的 BSA/GSH-Au NCs、10 μM , 5 μL 的 GOx 溶液，並以 vortex 震動混勻，靜置反應 10 分鐘。
5. 分別加入不同濃度的 Glucose 溶液，並以 vortex 震動混勻，使得溶液中的 Glucose 濃度分別為 10、5、1、0mM。
6. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的環境下，反應 40 分鐘後，再取各溶液 200 μL 測螢光光譜。

參、 研究結果與討論

一、 BSA/GSH-Au NCs 最佳合成條件

(一) 牛血清白蛋白 (BSA) 濃度對金奈米團簇合成的影響

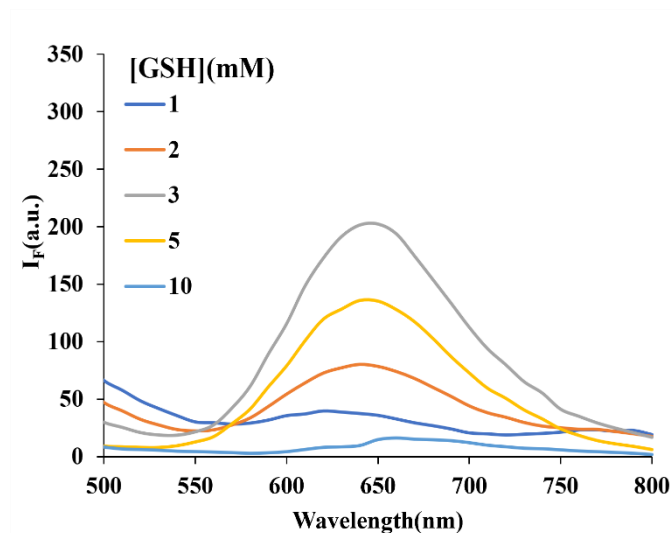
牛血清白蛋白 (BSA) 通常用作金團簇合成中的穩定劑，這是由於其蛋白質結構和功能基團的緣故。當 BSA 與金離子 (Au^{3+}) 相互作用時，它可以將離子還原為單質金 (Au^0)，進而形成金簇。這些金簇由 BSA 穩定，防止它們聚集成更大的顆粒。由圖三可看出在 BSA-Au 在波長為 650~680 奈米時有明顯放光光譜，且顯示出 BSA 濃度越高，螢光的強度越高，由此可見 BSA 濃度於合成金奈米團簇的重要性。



圖三、 不同 BSA 濃度合成材料的螢光光譜圖(研究者自行繪製)

(二) 不同穀胱甘肽 (GSH) 濃度

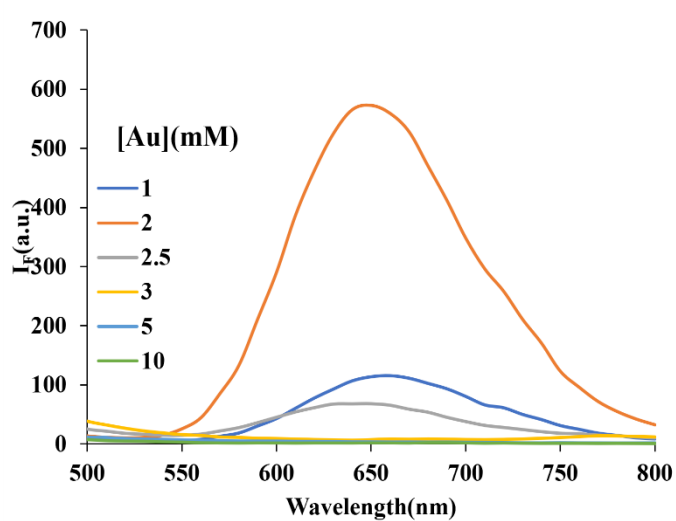
雖然 BSA 是一種廉價的蛋白，但其他可用於合成 Au NCs 的功能性蛋白質可能價格昂貴，且很難獲得較高濃度。為了要降低使用 protein 的使用量，我們的先測試 GSH 與金是否能有效形成 Au NCs。在不同濃度的 GSH 下，圖四可看出 BSA/GSH-Au NCs 在放光波長為 650 奈米時皆有明顯放光高峰，顯示出 GSH 就在少量牛血清白蛋白下，還是可以使材料發出具有一定強度的螢光，因此加入 GSH 可能減少 BSA 使用的量，可以降低成本還有降低時間。由於 3 mM 能產生之螢光值最高，本研究後續使用 3 mM 的 GSH 進行後實驗。



圖四、不同 GSH 濃度合成材料的螢光光譜圖(研究者自行繪製)

(三) 不同金濃度合成材料

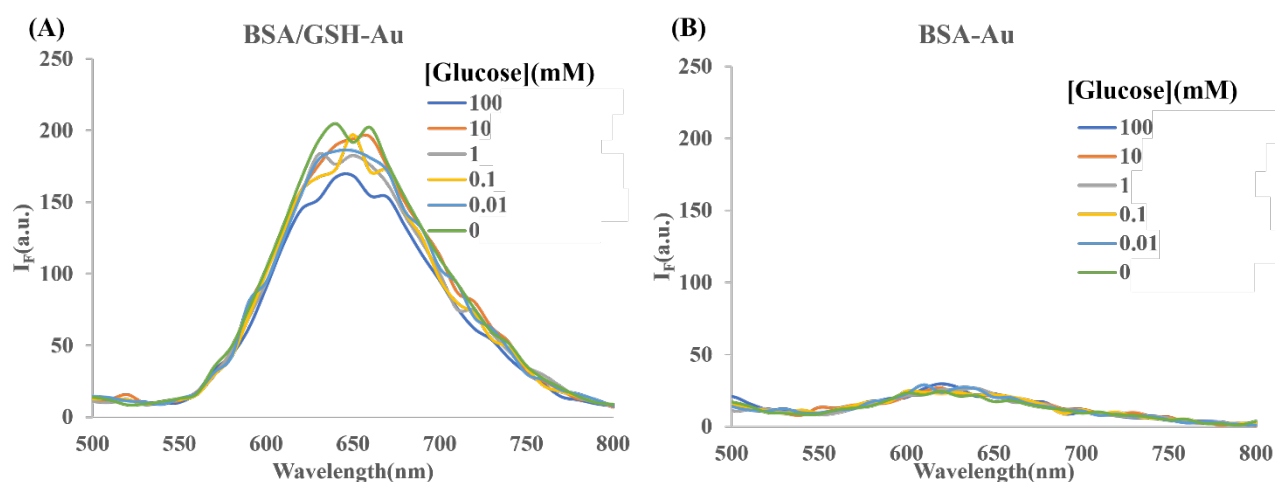
由圖五可看出在 BSA/GSH-Au NCs，在放光波長為 650 奈米時有放光高峰，顯示出就算在以不同濃度的金濃度的牛血清白蛋白金奈米螢光團簇中，還是可以使材料發出具有一定強度的螢光。本研究後續使用 2mM 的 Au 進行後續實驗。



圖五、不同 Au 濃度合成材料的螢光光譜圖(研究者自行繪製)

二、BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au NCs 檢測葡萄糖的效果

部分 Au NCs 已被發現具有仿酵素的活性，其中包括仿氧化酶活性，若 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au NCs 可以藉由這個特性氧化葡萄糖產生過氧化氫使螢光值下降就可以檢測葡萄糖。由圖六(B)可知，BSA-Au NCs 的螢光訊號很微弱，且加入 glucose 後螢光幾乎沒有下降。雖然圖六(A)中 BSA/GSH-Au NCs 的螢光訊號較 BSA-Au NCs 強，且加入 glucose 後螢光訊號有下降，但是下降幅度不大，所以不是一個好的偵測 Glucose 的材料，因此需要尋找一種材料複合在金奈米團簇上以提升靈敏度。

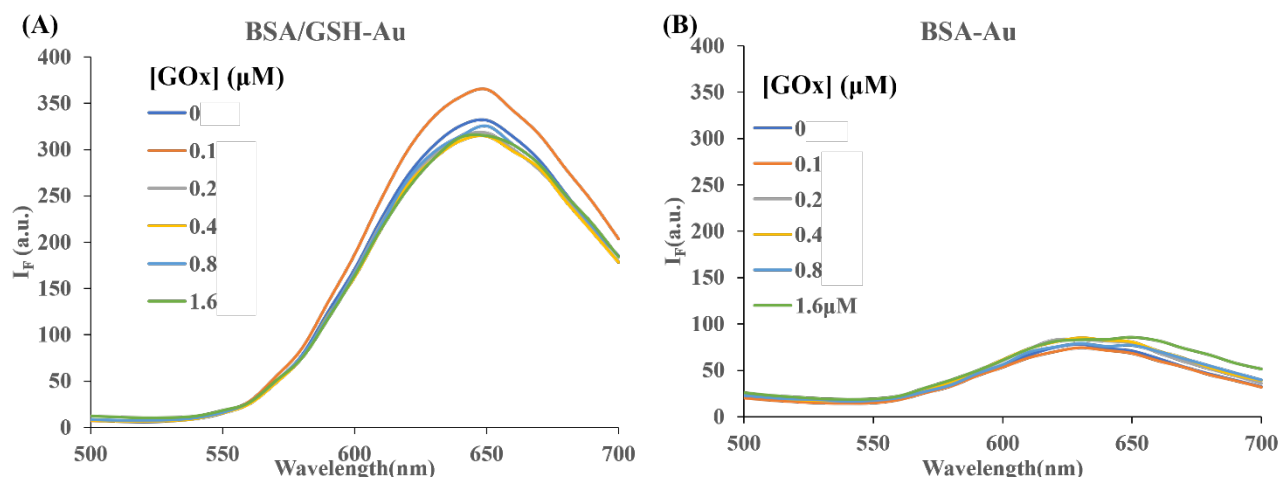


圖六、 (A)BSA/GSH-Au NCs (B)BSA-Au NCs 加入 Glucose 的螢光光譜(研究自行繪製)

三、探討 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au NCs 修飾上 GOx 後的螢光訊號變化

葡萄糖氧化酶 (GOx) 是一種在氧氣存在下催化葡萄糖氧化為葡萄糖酸內酯和過氧化氫 (H_2O_2) 的酶。此反應對葡萄糖具有高度特異性，使 GOx 成為葡萄糖檢測應用中的熱門選擇，特別是在糖尿病患者的血糖監測儀中。GOx 催化葡萄糖氧化為葡萄糖酸內酯，並生成過氧化氫作為副產物。我們預期過氧化氫副產物可以氧化金奈米簇 (Au NCs)，導致其螢光強度下降。

我們首先將 BSA/GSH-Au NCs 和 BSA-Au NCs 與 GOx 結合。由圖七(A)可看出在波長 650 奈米時，BSA/GSH-Au NCs 在與一定濃度 GOx 反應後，有螢光的訊號提升。圖七(B)中 BSA-Au NCs 則較無明顯螢光變化。而且在加入濃度為 0.1 μM 時，螢光訊號提收最多，因此之後實驗選擇以 0.1 μM 的 GOx 進行實驗

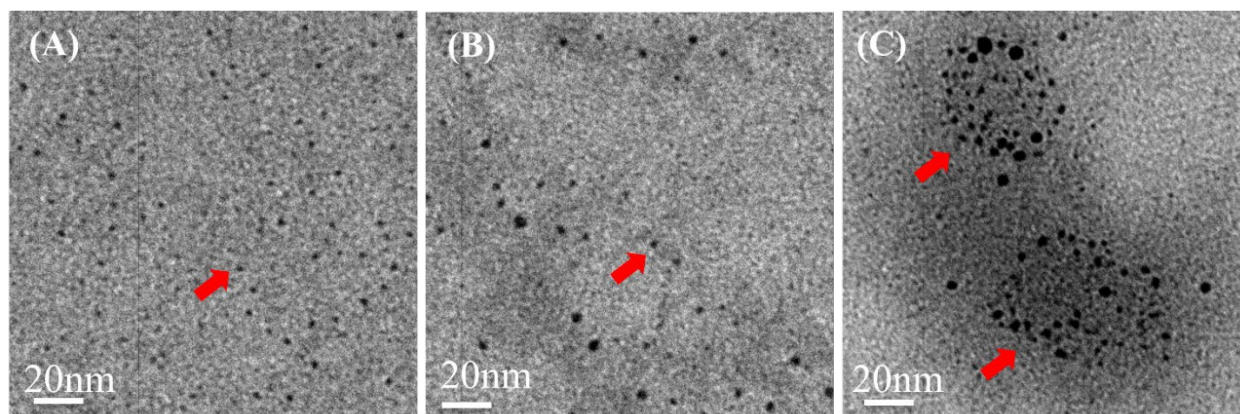


圖七、 (A) BSA/GSH-Au NCs (B)BSA -Au 複合上不同濃度 GOx 的螢光光譜(研究者自行繪製)

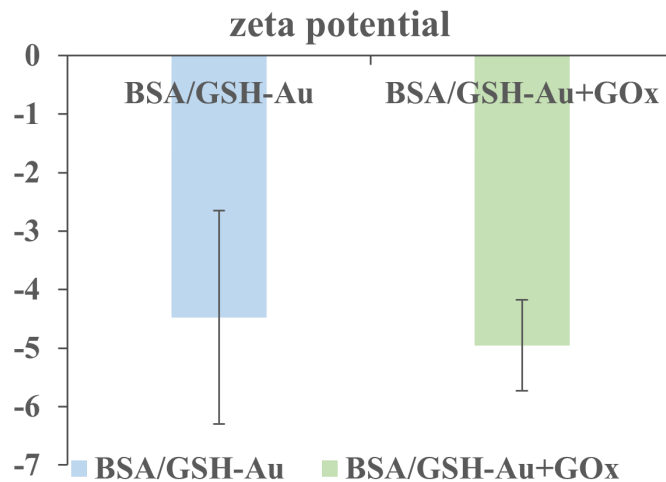
四、複合材料鑑定與分析

為確認 Au NCs 的材料性質我們透過電子顯微鏡 TEM 與奈米粒徑電位分析儀分析。由下面圖八(A)可看出 BSA/GSH-Au NCs 的大小約 1nm 左右，且比較離散。由圖八(B)可看出加入 GOx 後的粒徑大小也沒有差很多，也比較離散。但是由圖八(C)可看出再加入 glucose 後，團簇就會有聚集的現象，因此可以推測團簇的聚集可能就是使螢光訊號下降的原因。文獻也指出 GOx 將葡萄糖氧化後，產生過氧化氫會破壞金奈米團簇的配位結構，所以促使金奈米團簇聚集導致螢光的淬滅有關。

再由圖九 Zeta potential 的結果來看，因為 BSA 帶負電，所以 BSA/GSH-Au NCs 偏帶負電，且 BSA/GSH-Au NCs 的電荷與複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 的電荷沒有差很多，都是接近-4~-5 mV，可以應證以上為什麼兩者的粒徑大小與聚集程度相近。



圖八、 TEM (A)BSA/GSH-Au NCs (B)複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs (C) 複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs+Glucose. 紅色箭頭所指黑點為金奈米團簇(實驗室拍攝提供)

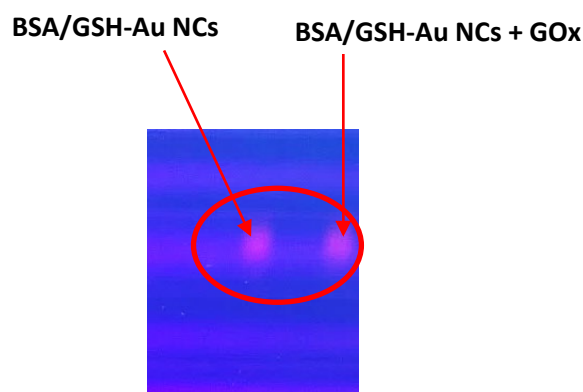


圖九、BSA/GSH-Au NCs 和複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 的 Zeta potential 值的長條圖

(研究者自行繪製)

五、透過凝膠電泳探討是否因為加入 GOx 使蛋白質結構或大小改變影響其螢光訊號的變化

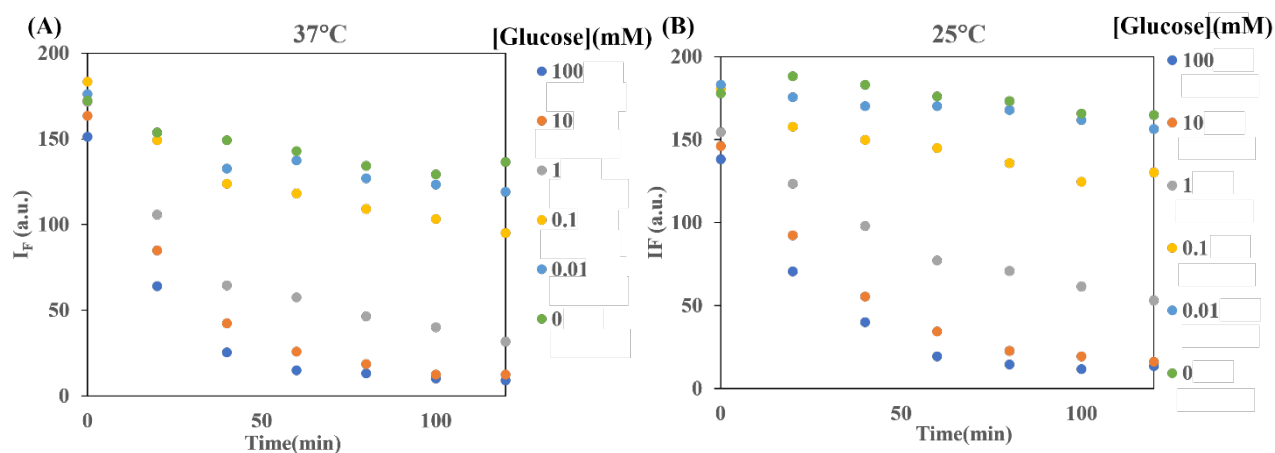
原推測添加 GOx 後，因金奈米團簇與蛋白質的相對作用力有發生一些改變才會影響其螢光特性。為確認這點，透過凝膠電泳實驗分析。凝膠電泳的實驗是透過帶電荷粒子在電場中會往相反電荷的電極方向移動，大分子根據它們的電荷、形狀、大小會有不同的移動率。若 GOx 有結合在 BSA/GSH-Au NCs 上，則 BSA/GSH-Au NCs 會有明顯遷移的距離的變化。在凝膠電泳 (圖十) 可發現有無添加 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 遷移的距離一樣，因此添加 GOx 可能不會對材料中的蛋白質結構或電性上有改變，也呼應上面 TEM、Zeta potential 的實驗結果。



圖十、在 UV 照射下的凝膠電泳圖(研究者自行攝射)

六、探討在室溫 25°C 及 37°C 金奈米團簇加入 glucose 不同時間的螢光變化

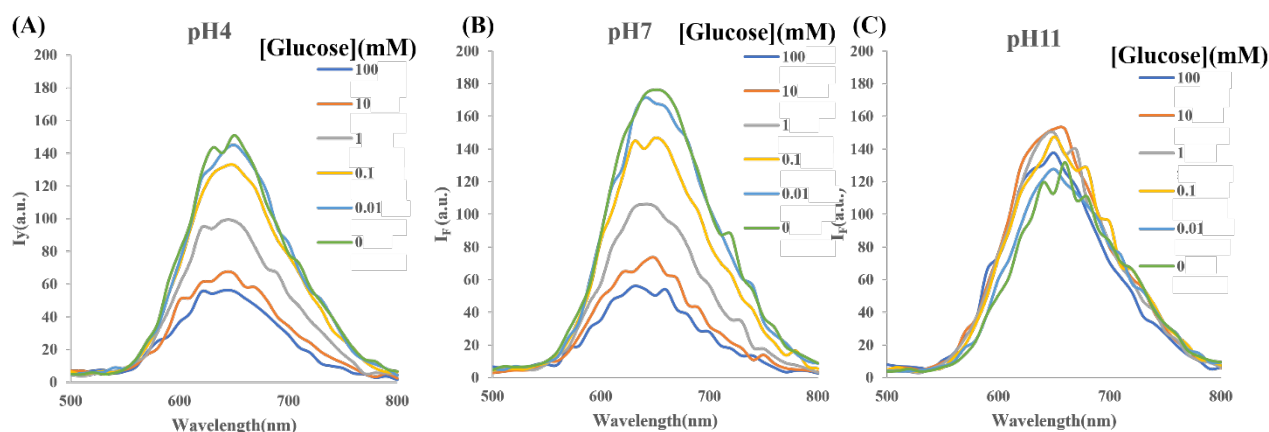
因為 GOx 最佳反應溫度是在 30°C~40°C，因此實驗設計比較在室溫以及在溫度 37°C 的環境下，看兩者檢測葡萄糖的速率。比較下面圖十一(A)(B)，在 37°C 的環境下反應時間較快，40 分鐘就反應完成，而在 25°C 下反應則需時 60 分鐘左右。因此反應溫度設定為 37°C，反應時間為 40 分鐘。



圖十一、不同時間螢光的變化(A)37°C (B)室溫(25°C) (研究者自行繪製)

七、探討 BSA/GSH-Au NCs 檢測 glucose 的 pH 值條件

由下面圖十二(A)(B)(C)可以發現在 pH11 的環境下，複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 加入 Glucose 後，螢光沒有下降很多，而在 pH4、pH7 的環境下，螢光下降程度差不多，而 GOx 因為在 pH4~7 都有活性，且人體血液環境偏鹼性，所以選擇在 pH7 的環境下進行實驗。

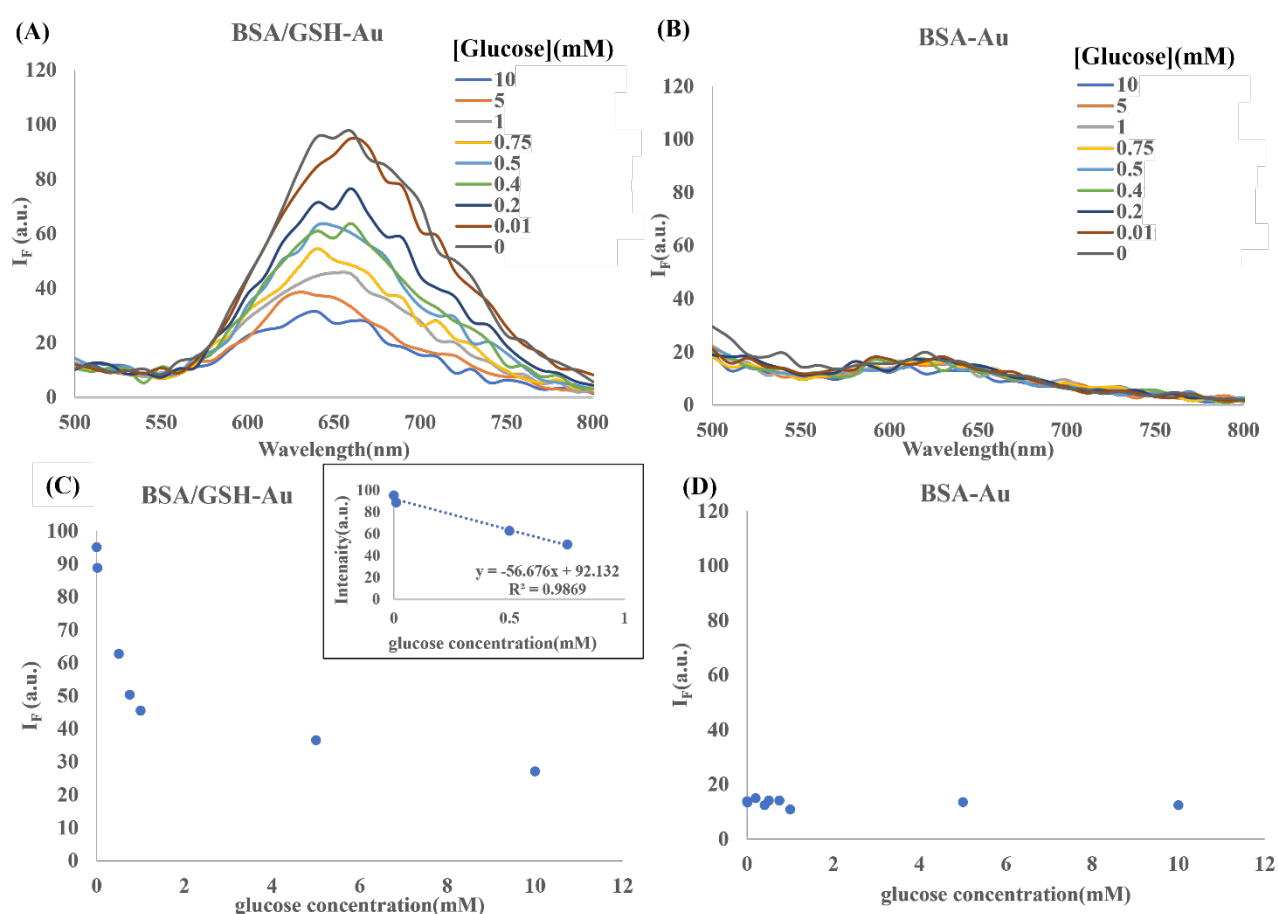


圖十二、在不同 pH 值下檢測 Glucose 的螢光光譜 (A)pH4 (B) pH7 和 (C) pH11

(研究者自行繪製)

八、探討修飾上 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 或 BSA-Au NCs 偵測不同濃度 Glucose 的螢光訊號變化

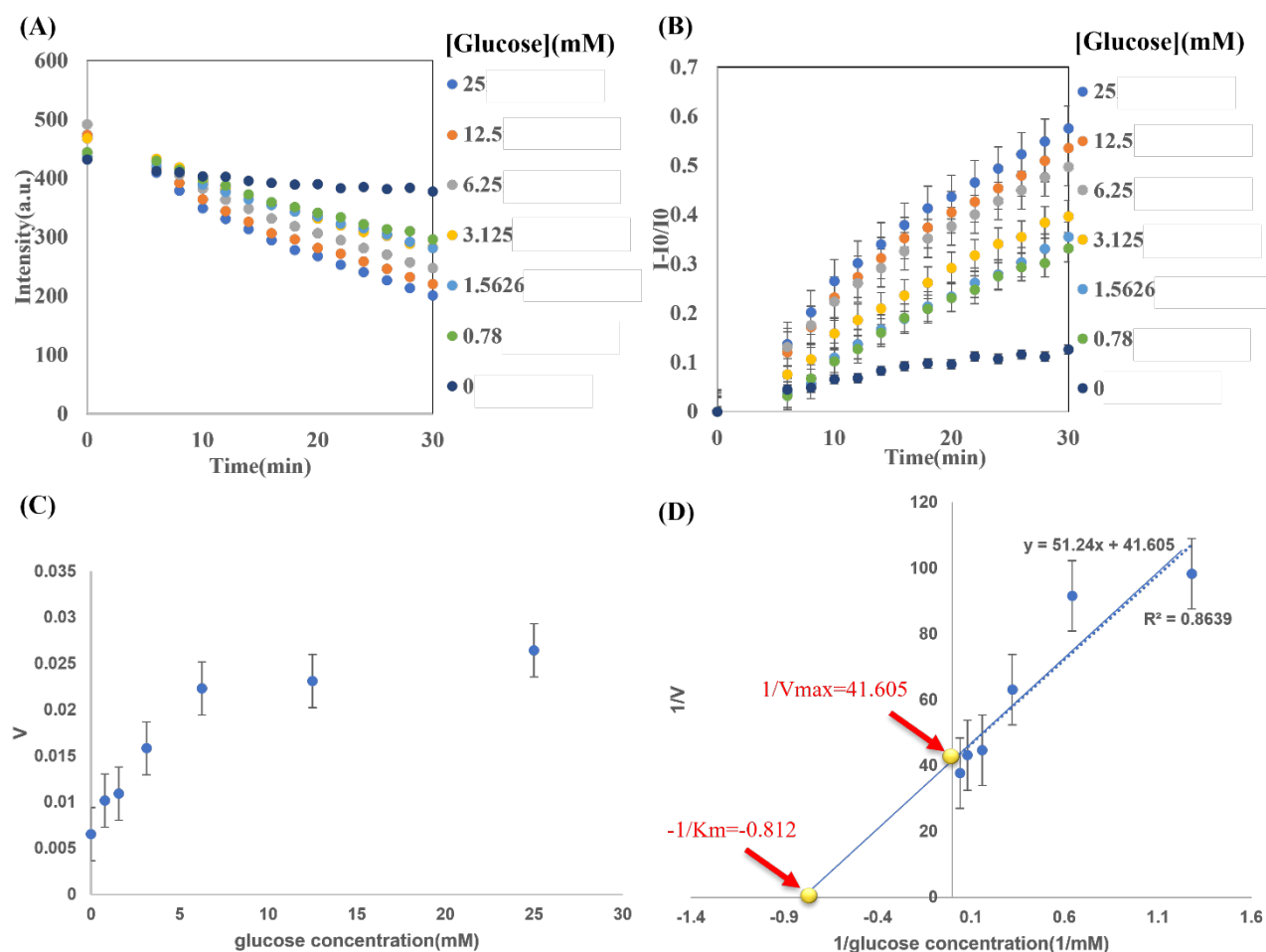
由與圖十三(A)可看出在波長 650 奈米時，不同濃度的 Glucose 與修飾上 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 反應後，螢光有明顯的下降，而圖十三(B) BSA-Au NCs 螢光下降則不明顯。由圖十三(C)(D)可看出在測試不同濃度(0~1mM)的 Glucose 的線性圖中，BSA/GSH-Au NCs 靈敏度更好(回歸直線斜率較大)，因此其可作為偵測醣類的一個好的螢光劑，並由實驗結果得知目前最低可測得 0.01mM 的 Glucose，人體的正常血糖範圍約為 3.3mM~6.3 mM，包含在 BSA/GSH-Au NCs 的偵測範圍內。



圖十三、複合 GOx 的 (A)BSA/GSH-Au NCs (B) BSA-Au NCs 與不同濃度 Glucose 反應的螢光光譜(C)BSA/GSH-Au NCs (D)BSA-Au NCs 檢測 Glucose 的線性圖(研究者自行繪製)

九、酵素動力學

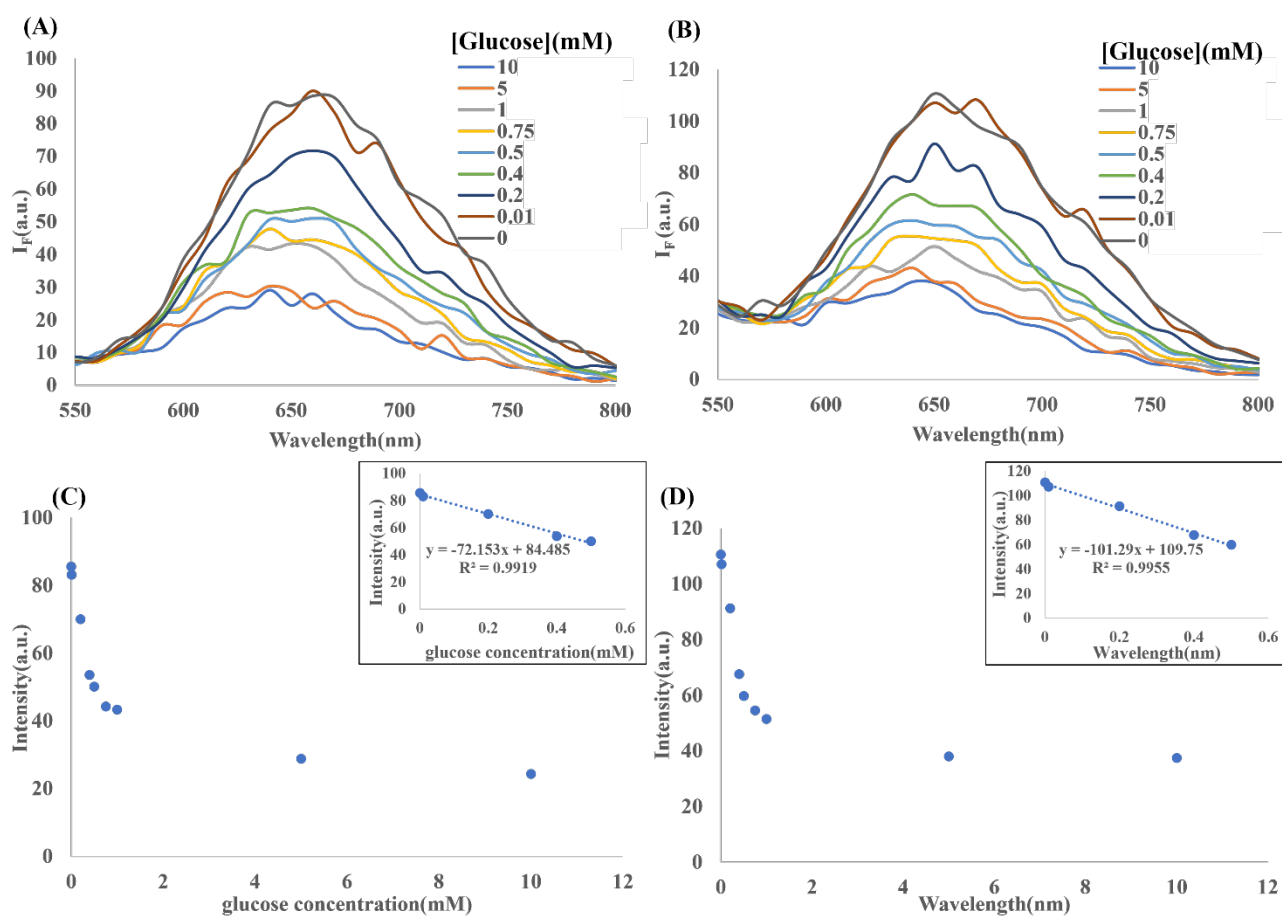
為了探討酵素的催化能力，分別將複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 在最佳溫度及酸鹼值條件下加入進行酵素動力學分析，反應條件為每 2 分鐘測一次螢光值, pH 7.0, 37°C。由圖十四(A)可以看出加入 Glucose 後的螢光訊號隨著時間增加逐漸降低，由圖十三(C)可以看出反應速率隨 Glucose 濃度升高而變快，直到經過數據處理後，得到最大的催化效率 $V_{\text{Max}}=0.024(\text{a.u./min})$ ，與基質(Glucose)的親和力 $K_m=1.23(\text{mM})$ ，由於 K_m 常數是達到一半最高速率 V_{max} 時的基質濃度，因此 K_m 越大，表示要達到最高速率時，所添加基質的濃度也要越高，這顯示出基質與酵素的親和力並不是很好，所以 K_m 值越小則親和力越大。



圖十四、 酵素動力學 (A)酵素反應時間 (B)螢光訊號變化率(C) Michaelis-Menten 動力學 (D)Lineweaver-Burk 雙倒數作圖 (I：不同時間對應的螢光值； I_0 ：在反應初始的螢光值) (研究者自行繪製)

十、在仿生理高蛋白環境下複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測葡萄糖的效果

由圖十五(A)、(B)的螢光光譜圖可知，波長為 650nm 時，在高蛋白的環境下螢光訊號下降的幅度和在 PBS 溶液中沒有差很多。再由圖十五(C)、(D)的線性圖中可以發現在高蛋白的環境下，兩者的靈敏度沒有差很多，因此複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 在高蛋白的仿生理環境下，檢測葡萄糖的效果依舊不受到高蛋白的影響。

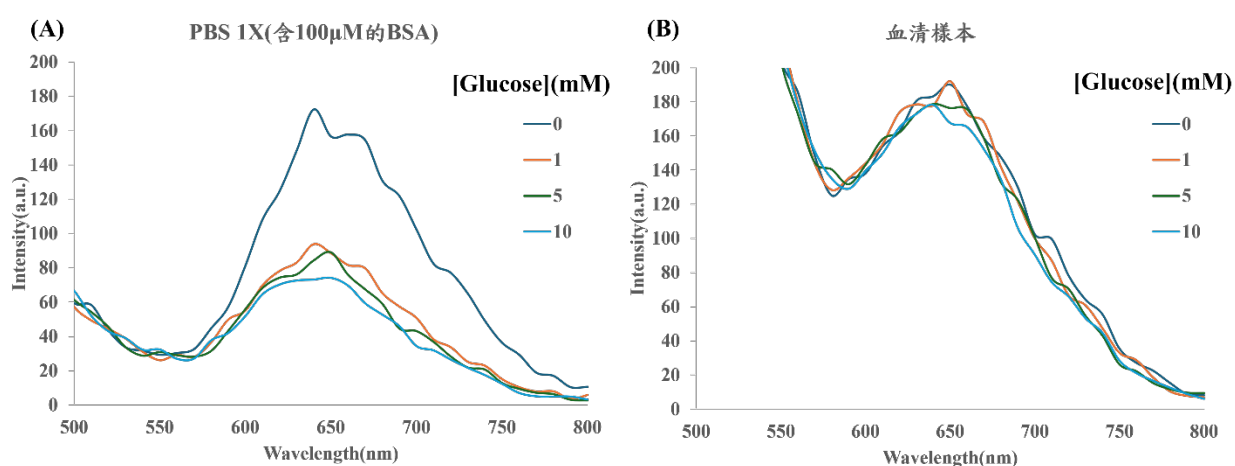


圖十五、在(A)PBS(B)仿生理高蛋白環境複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測 Glucose 的效果
在(C)PBS(D)仿生理高蛋白環境檢測 Glucose 的線性圖(研究者自行繪製)

十一、 利用複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 偵測人體血清樣本

由圖十六(B)可知 BSA/GSH-Au NCs、GOx 在人體血清樣本中和葡萄糖反應後，在波長約為 650 奈米時，螢光值並沒有明顯的下降。這表示在血清樣本中，應該還有其他干擾因素影響螢光值得變化，據推測血清樣本中應該含有鐵離子，由於鐵離子會透過芬頓反應(Fenton reaction)催化過氧化分解成氧氣與水，使得過氧化氫無法與 BSA/GSH-Au NCs 反應進而無法改變金奈米團簇表面的特性，因此螢光就不會下降。

為了去掉血清中的干擾因素的影響，之後將有兩個方向再進行嘗試：對血清樣本中的鐵離子進行前處理，如，可以加入 EDTA 與鐵離子形成螯合物，使鐵離子不會干擾過氧化氫與 BSA/GSH-Au NCs 的反應或利用試紙等分離技術降低反應時干擾因子的濃度。第二種方式是利用酶固定化技術，將 GOx 固定於 BSA/GSH-Au NCs 表面這可以讓 GOx 產出之 H_2O_2 有效的與 BSA/GSH-Au NCs 反應，並減少一些外在環境的干擾。



圖十六、 在(A)仿生理環境(B)血清 BSA/GSH-Au NCs 反應後的螢光光譜(研究者自行繪製)

肆、 結論與應用

- 一、 利用 GSH 輔助少量的 BSA 合成具光致發光特性穩定的螢光奈米團簇 BSA/GSH-Au NCs，相較於 BSA-Au NCs 或是 GSH-Au，在修飾了 GOx 後，在 37 °C 的溫度下，反應 40 分鐘，對於偵測 Glucose 有更明顯的螢光訊號變化，有更好的靈敏度，最低可測得 0.01mM 的葡萄糖。
- 二、 由 TEM、Zeta potential、凝膠電泳的實驗結果顯示添加 GOx 對蛋白質結構或電性幾乎不造成影響，GOx 無法有效與螢光奈米團簇 BSA/GSH-Au NCs 結合。後續還需藉由更穩固的方式將 GOx 與螢光奈米團簇 BSA/GSH-Au NCs 結合。
- 三、 酵素動力學的實驗結果為：最大的催化效率 $V_{\text{Max}}=0.024$ ，與基質(Glucose)的親和力 $K_m=1.23\text{mM}$ 。
- 四、 在仿生理高蛋白環境下，複合 GOx 的 BSA/GSH-Au NCs 檢測葡萄糖的效果跟靈敏度並沒有降低，因此可知在高蛋白的仿生理環境下螢光值變化不會受到太大影響。
- 五、 在血清樣本中，由於血清中擁有一些干擾因素影響螢光的變化，所以之後實驗會在血清樣本中加入 EDTA 對鐵離子進行螯合，去除干擾螢光的因素，或是對材料進行酶固定化的調整。

伍、 參考文獻

- 一、 Zhang, N.; Si, Y.; Sun, Z.; Chen, L.; Li, R.; Qiao, Y.; Wang, H. Rapid, Selective, and Ultrasensitive Fluorimetric Analysis of Mercury and Copper Levels in Blood Using Bimetallic Gold–Silver Nanoclusters with “Silver Effect”-Enhanced Red Fluorescence. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11714–11721
- 二、 Marsaputra, B.-P.; Taqwatomo, G.; Novriadi, D. Synthesis of Bimetallic Gold-Silver Nanoclusters and Its Application as Pb (II) Sensing Based on Fluorescence Technique. *E3S Web of Conferences* ,**2024**,*483*, 01016
- 三、 Zheng , Y. ; Wu, J.; Jiang, H. ; Wang X. Gold nanoclusters for theranostic applications. *Coordin Chem Rev*,**2021**,*431*,213689
- 四、 Che, L.; Gharib, M.; Zeng, Y.; Roy, S.; Chayan, K.-N.; Chakraborty, I.; Advances in bovine serum albumin-protected gold nanoclusters: from understanding the formation mechanisms to biological applications. *Mater Today Chem*,**2023**,*29*,101460
- 五、 Chen, P.-C.; Chiang, C.-K.; Chang, H.-T. Synthesis of fluorescent BSA-Au NCs for the detection of Hg²⁺ ions. *J. Nanopart. Res.*, **2013**,*15*, 1336
- 六、 Xia, X.; Long, Y.; Wang, J. Glucose Oxidase-Functionalized Fluorescent Gold Nanoclusters as Probes for Glucose. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, *772*, 81–86.
- 七、 Wu B.-Y.; Wang C.-W.; Chen P.-C.; Chang H.-T. Glutathione assisted preparation of gold nanoclusters using minimum amount of protein. *Sens Actuators B Chem*,**2017**, *238*,1258–1265.
- 八、 Hsu, N.-Y. CuO/Cu₂O/Ppy composites modified paper electrodes for highly sensitive detection of glucose and β-galactosidase. 國立台灣大學理學院化學系碩士論文,**2016**.
- 九、 Yang, T.-Q.; Peng, B.; Shan, B.-Q.; Zong, Y.-X.; Jiang, J.-G.; Wu, P.; Zhang, K. Origin of the Photoluminescence of Metal Nanoclusters: From Metal-Centered Emission to Ligand-Centered Emission. *Nanomaterials* ,**2020**, *10*, 261
- 十、 Li, D.; Chen, Z.; Mei, X. Fluorescence enhancement for noble metal nanoclusters. *Adv. Colloid Interface Sci.* , **2017**,*250*, 25–39
- 十一、 Marry K. C.; Shawn O. F. *BIOCHEMISTRY*,*6e*.**2011**,165-181
- 十二、 林清江;楊文琪;羅靜婷;胡綾真;張怡娟;林冠華;陳炯瑜;翁淑娟;徐志宏;黃嫦芳;鄭高珍;楊俊杰;陳珊吟;邱定宇;曾維昌;黃美涵;蔡麗紅;瞿馥苓;程紋貞;林正浩;陳美滿;黃月芳. 醫護檢驗手冊第四版,**2023**,448-452

【評語】 030010

使用牛血清白蛋白 (BSA)、穀胱甘肽 (GSH)、金離子合成金奈米螢光團簇，與葡萄糖氧化酶 (GOx) 同時存在時。葡萄糖氧化酶與葡萄糖反應，製造出過氧化氫，改變金奈米螢光團簇穩定性使螢光強度減弱，藉以偵測葡萄糖濃度。實驗論述清楚，然金奈米團簇 AuNC 的螢光強度減弱是間接關係易受其他因素影響，所得數據變化稍大，後續還需藉由更穩固的方式將 GOx 與螢光奈米團簇 BSA/GSH-AuNCs 結合。避免在血清樣本中一些干擾因素影響螢光的變化。亦需考慮目前市面上已有的簡易血糖測試劑，發掘所開發方法的優勢。