

[研究成果報導]

螢光奈米鑽石

中央研究院原子與分子科學研究所 張煥正

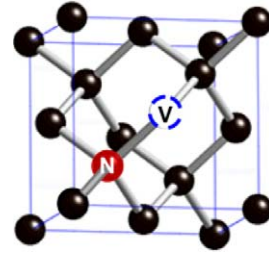
一、前言

科學上許多重要的突破，常常仰賴新工具的開發與應用，生命科學亦是如此，著名的例子包括 X 射線繞射(x-ray diffraction)、磁共振成像(magnetic resonance imaging)與質譜術(mass spectrometry)等。這些物理學家所深入探討的自然現象及其衍生的發明，在上一個世紀裡，為生命科學領域帶來了許多驚人的發現和革命性的影響。

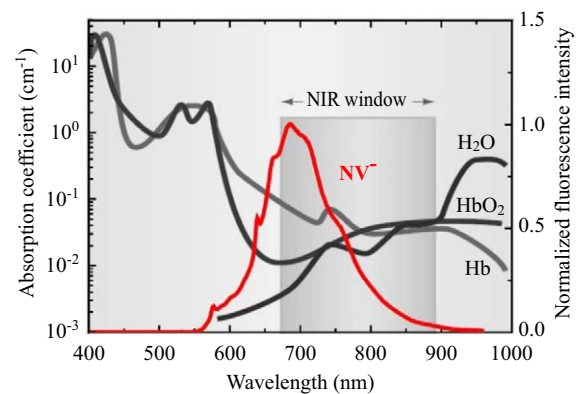
奈米科技被譽為二十一世紀最重要的前瞻技術之一，它是否能如 X 射線繞射、磁共振成像與質譜等技術於生命科學領域中作出重大的貢獻，一直是學界所關心的議題及努力的目標。在眾多的奈米材料中，奈米鑽石鮮少受到注意，原因包括製備困難、非導體、光學特徵不明顯等。但奈米鑽石有著優異的生物相容性，又能發出多彩的螢光，與其他奈米碳材(nanocarbon)截然不同。有鑑於此材料的發展潛力，本人過去多年來致力於螢光奈米鑽石的開發及其在生物醫學方面的應用。這是一項跨領域的研究，結合化學家、物理學家、生物學家及材料學家的專長，通力合作才能獲得顯著的成果。

二、螢光奈米鑽石的特性

螢光奈米鑽石(fluorescent nanodiamond, FND)是一種能發出紅色螢光的奈米級鑽石顆粒，大小在 100 nm 以下，主要的成分是以 sp^3 形式鍵結的碳原子及約 100 ppm 的氮原子[1]。碳與氮皆是生物體內最常見的元素，因此，螢光奈米鑽石有很好的生物相容性，再加上 sp^3 -C 的化學活性低，不會影響細胞的生長與功能。我們曾將螢光奈米鑽石餵食秀丽隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*) [2]及注入至大、小鼠體內[3]，發現該材料的生物毒性非常低，十分適合於長期活體觀測與細胞發育追蹤方面的應用。



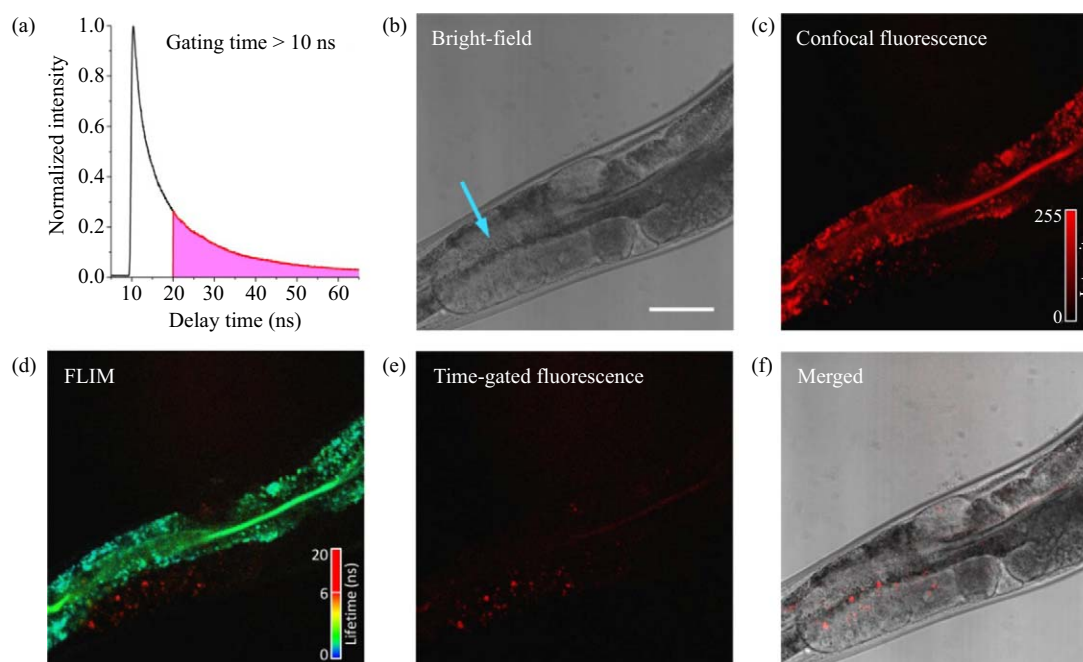
圖一 鑽石晶格中氮-空缺中心之結構示意圖，N 為氮原子，V 為空缺，黑色的球為碳原子



圖二 氮-空缺中心的螢光光譜(紅色曲線)與生物組織近紅外窗口(NIR window)的比較

奈米鑽石之所以能發光，在於其擁有氮-空缺顏色中心(nitrogen-vacancy color center, NV)，如圖一所顯示。此顏色中心的製造方式特殊，首先需以高能量的電子束或離子束轟擊人工合成的鑽石粉末，使結構中產生空缺，再以高溫加熱促進此空缺移動，與鑽石晶體中之氮原子結合後形成氮-空缺中心。當含有 NV 的奈米鑽石受到黃綠色光(500-600 nm)照射時，會發出波長為 700 nm 左右的紅光。這些螢光非常穩定，不會有光漂白和光閃爍的現象，很容易以光學顯微鏡偵測到單一螢光奈米鑽石[4]。

氮-空缺中心的紅色螢光，百分之七十是座落在生物組織近紅外窗口(near infrared window)



圖三 以螢光顯微鏡術觀察秀丽隱桿線蟲體內中之螢光奈米鑽石。(a) FND 螢光衰減之時間軌跡，紅色區域代表時間長於 10 ns 之螢光訊號；(b)明視野影像，藍色箭頭表示 FND 之注入部位；(c)共軛焦螢光影像；(d)生命週期螢光影像；(e)時間長於 10 ns 之螢光影像；(f) b 與 e 之合併影像

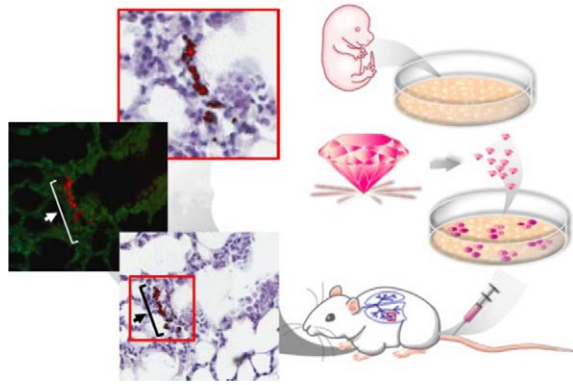
中，如圖二所顯示[3]。波長介於 670-890 nm 的光在生物組織內的穿透深度高，背景訊號弱，最適合活體成像。此外，由於 NV 的電子結構特殊，其螢光生命週期(lifetime)與眾不同，時間可長達 20 ns。生物體內各式各樣的化合物，有些在可見光的照射下也會發出螢光，其發光時間大約為 1–4 ns。因此，可以利用此時間差，將背景訊號移除，在活體內（如線蟲體內）偵測到單一螢光奈米鑽石（見圖三）[5]。

三、螢光奈米鑽石的重要應用

2011 年，我們在中研院原分所自行建構了台灣第一台受激放射耗乏(stimulated emission depletion, STED)顯微鏡來觀測細胞內的螢光奈米鑽石，空間解析度達到 40 nm，突破光學繞射極限達六倍之多[6]。有如此高空間解析度的原因之一是螢光奈米鑽石有絕佳的光穩定性(photostability)，它能承受高功率 STED 光的照射而不損壞，將解析度提升至最大值。在這項工作裡，我們首先克服了架設 STED 顯微鏡技術上的困難，同時證明了表面塗有血清白蛋白(serum albumin)的螢光奈米鑽石粒子能夠很好地分散在

生理溶液裡，可以作為特異生物標記之用。我們的結果顯示，使用螢光奈米鑽石為生物顯影材料不僅僅可以提供單一粒子的靈敏度和長時間的追蹤能力，也可以提升生物成像技術至奈米級的解析度，達到一嶄新的境界。

2013 年，本人與中研院細胞與個體生物學研究所游正博教授合作，應用螢光奈米鑽石來標記肺部幹細胞，追蹤該幹細胞在小鼠體內的路徑與修復方式[7]。在此項工作中，所使用的關鍵技術是時間閘門(time gating)及生命週期螢光顯微鏡術(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)。我們首先分離出新生小鼠的肺部幹細胞，進行螢光奈米鑽石標記，並證明該幹細胞的生長與功能不受到影響。我們隨後將這些幹細胞注入肺部已損傷的成鼠體內，利用時間閘門這項技術區分出螢光生命週期較長的螢光奈米鑽石訊號與螢光生命週期較短的細胞背景訊號，追蹤該幹細胞在組織與器官中的分布情形（見圖四）。實驗結果發現，以螢光奈米鑽石標定的肺部幹細胞不僅僅會回到受傷的肺部區域來進行修補，並且能夠再生出新的肺部組織。我們藉由共軛焦螢光顯微鏡(confocal fluorescence



圖四 利用螢光奈米鑽石追蹤肺幹細胞移植與再生能力之流程與示意圖

microscope)建構之影像系統來追蹤體內微量的肺部幹細胞，可以達到單一細胞的偵測靈敏度與解析度。此項成果為奈米科學和生物醫學的應用開啓了一個新的研究方向，在未來疾病或癌症幹細胞的治療領域，有極大的臨床應用價值。

2015 年，我們將螢光奈米鑽石的應用由生物成像擴展至奈米感測方面[8]。鑽石晶格中的帶負電氮-空穴中心(NV)是一個非常獨特的量子系統，它的電子自旋狀態，可經由「光檢測磁共振 (optically detected magnetic resonance, ODMR)」技術偵測得出來。由於此電子自旋的光譜非常穩定，透過測量其共振頻率的改變，可以作為高靈敏度的奈米溫度感測器。在此項工作中，我們自行搭建了一套 ODMR 系統來收集從 NV-激發態所發出的螢光，經由微波輻射發射誘導磁共振後，得到基態電子自旋的 ODMR 光譜，從而推導出奈米環境（如細胞）中的溫度。除此以外，我們也提出了一個三點取樣法，結合激發-探測(pump-probe)技術，進行具有時間分辨率的溫度測量。我們將此方法應用於水溶液中奈米傳熱方面的研究，達到 10 μ s 的分辨率。此項技術同時提供了奈米級的空間解析度與微秒級的時間分辨率，是奈米測溫術(nanothermometry)的里程碑，未來在生物醫學方面的應用不可限量。

四、螢光奈米鑽石的國際影響力

過去多年來，本人所領導的研究團隊證明了奈米鑽石的表面可以很容易地衍生官能基（如 -COOH 和 -NH₂），它們可以作為生物分子（包括

DNA 與蛋白質）的載體，應用於活體內、外的標靶輸送、基因轉殖和基因療法等方面。特別是表面官能基化的螢光奈米鑽石，它同時具備有治療功能與成像能力，是一個理想的生物醫學工作平台[9]。此外，我們也已進行了許多活體測試，包括線蟲、果蠅、斑馬魚、小鼠及大鼠等，所有的測試生物均健康存活，顯示螢光奈米鑽石安全無毒。近年來，愈來愈多的實驗證據顯示奈米碳管(carbon nanotube)和石墨烯(graphene)皆具有細胞毒性，並會引起體內的發炎反應，相較於這些低維碳材，奈米鑽石有極佳的生物相容性與安全性，是少數可進入人體之奈米材料。

中研院是世界上唯一有技術與能力來大量生產螢光奈米鑽石的單位[10]，所製造之螢光奈米鑽石含有高密度的氮-空穴顏色中心，適用於各種式樣的細胞、組織與活體成像，包括光致發光 (photoluminescence) 和 電子束發光 (cathodoluminescence) 成像等多方面。目前中研院是以材料轉讓協定(material transfer agreement)的方式，提供全球人士使用螢光奈米鑽石及其他相關產品(<http://www.biodiamond.url.tw/>)。美國國家衛生研究院(US National Institutes of Health, NIH)曾於 2012 年提出一項「小企業創新研究計畫(Small Business Innovation Research, SBIR)」，標題為“080 Fluorescent Nanodiamonds for *In Vitro* and *In Vivo* Biological Imaging”：http://www.nhlbi.nih.gov/funding/sbir/funding/contract_topics/contracttopic_FY2013_080.htm，預算（總成本）為第一期（6 個月）美金 150,000 元及第二期（2 年）美金 1,500,000 元，可見此材料受到重視的程度。目前全球使用螢光奈米鑽石的研究團隊超過 100 個，來自於 20 個以上的國家，多篇以中研院所生產的螢光奈米鑽石為題材的論文，已出現於國際頂級期刊如 *Nature* 及 *Science*。更重要的是，這些國外研究團隊所發表的論文裡皆註明此材料的產地是「Academia Sinica」，並引用原分所的研究成果，有效地提升台灣在國際上之知名度與學術地位。

今年，螢光奈米鑽石的應用更上一層樓，國際大廠「Sigma-Aldrich」正式販售這項源自於台灣的創新與發明：<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?T ablePage=119325316>。這表示此材料有量產的價

值，而且我國的技術已獲得國際肯定。擴展螢光奈米鑽石在生物醫學方面的應用，提升其學術研究的能量與影響力，將是未來努力的目標與方向。

參考文獻

- [1] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen and Y.-C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17604 (2005).
- [2] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu and H.-C. Chang, *Nano Lett.*, **10**, 3692 (2010).
- [3] V. Vaijayanthimala, P.-Y. Cheng, S.-H. Yeh, K.-K. Liu, C.-H. Hsiao, J.-I. Chao and H.-C. Chang, *Biomaterials*, **33**, 7794 (2012).
- [4] C.-C. Fu, H.-Y. Lee, K. Chen, T.-S. Lim, H.-Y. Wu, P.-K. Lin, P.-K. Wei, P.-H. Tsao, H.-C. Chang and W. Fann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 727 (2007).
- [5] Y. Kuo, T.-Y. Hsu, Y.-C. Wu and H.-C. Chang, *Biomaterials*, **34**, 8352 (2013).
- [6] Y.-K. Tzeng, O. Faklaris, B.-M. Chang, Y. Kuo, J.-H. Hsu and H.-C. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 2262 (2011).
- [7] T.-J. Wu, Y.-K. Tzeng, W.-W. Chang, C.-A. Cheng, Y. Kuo, C.-H. Chien, H.-C. Chang and J. Yu, *Nature Nanotech.*, **8**, 682 (2013).
- [8] Y.-K. Tzeng, P.-C. Tsai, H.-Y. Liu, O. Y. Chen, H. Hsu, F.-G. Yee, M.-S. Chang and H.-C. Chang, *Nano Lett.*, **15**, 3945 (2015).
- [9] B.-M. Chang, H.-H. Lin, L.-J. Su, W.-D. Lin, R.-J. Lin, Y.-K. Tzeng, R. T. Lee, Y. C. Lee, A. L. Yu and H.-C. Chang, *Adv. Funct. Mater.*, **23**, 5737 (2013).
- [10] Y.-R. Chang, H.-Y. Lee, K. Chen, C.-C. Chang, D.-S. Tsai, C.-C. Fu, T.-S. Lim, Y.-K. Tzeng, C.-Y. Fang, C.-C. Han, H.-C. Chang and W. Fann, *Nature Nanotech.*, **3**, 284 (2008).