

螢光奈米鑽石之單分子研究

Single Molecule Studies of Fluorescent Nanodiamonds

許遠揚、張宜仁、張煥正

Yuen Yung Hui, Yi-Ren Chang, Huan-Cheng Chang

螢光奈米鑽石在生物醫學方面有很大的應用潛力，因為它的生物相容性高、沒有毒性，又沒有光致漂白效應。螢光奈米鑽石的螢光來自於內含的「氮-空缺」缺陷，被黃綠光激發後所產生。此缺陷的主要吸收波長為 560 nm，在 700 nm 左右處放出遠紅色的螢光，很適合生物顯影之用。在本文中筆者將介紹如何以單分子技術來研究螢光奈米鑽石，並討論其未來的應用與發展。

Fluorescent nanodiamond (FND) offers great potential for use as a novel diagnostic agent in biomedicine, because it is biocompatible, non-toxic, and shows no sign of photobleaching. The negatively charged nitrogen-vacancy defect center is an active component of FND. It absorbs light strongly at 560 nm and emits fluorescence efficiently from red to the near infrared region, well suited for bioimaging applications. In this article, we summarize the studies of FND by single molecule techniques and discuss its prospective applications in life sciences.

一、生物螢光探針 (Biological Fluorescent Probe)

在微奈米尺度的觀察中，雷射激發螢光 (laser-excited fluorescence) 是一項強而有力的技術，它具備高解析與非侵入的特性，已經廣泛地應用於各研究領域。尤其是在觀察生物系統時，該特性較其他顯微技術 (如電子顯微鏡和原子力顯微鏡) 更具備不可取代的優勢，因此它也成為觀測細胞和追蹤細胞內單分子與單粒子運動最常使用的工具。但是在使用這項技術時，除了光學與雷射系統的選擇與調整外，標定物的螢光探針之特性更是影響影像對比與解析度的一大關鍵，特別是在生物方面的應用。一個良好的螢光探針，必須容易進行化學標記，同時沒有毒性；在光學方面，它也要能夠發出明亮而

穩定的螢光，以供觀察。目前常見的螢光探針中，有機染料 (organic dye) 和螢光蛋白 (fluorescent protein) 是發展最久、也是最常被使用的材料。其體積小與化學上容易標記的特性，增加了使用上的便利。可是它們都有光致漂白 (photobleaching) 及光閃視 (photoblinking) 的特性，因而限制了長時間觀測的應用。

近年來半導體量子點 (quantum dot) 的開發，克服了光致漂白效應的缺點，因此吸引大家的注意，也開始被使用。但量子點的生物毒性高，同時在標定與降低毒性的過程中，必須經過繁複的表面修飾 (surface modification) 過程，這些修飾不僅造成使用上的不便，也會改變其光學性質，而限制其在生物醫學方面的應用。然而螢光奈米鑽石 (fluorescent nanodiamond) 恰好沒有以上的問題，憑

著優異的化學與光學特性，成為生物螢光探針中極有競爭力的選擇⁽¹⁻⁹⁾。

作為一個螢光探針，螢光奈米鑽石具備無毒性、表面容易處理、螢光足夠明亮又穩定等優異特性。螢光奈米鑽石本身就是微小的鑽石晶粒，因此在化學上非常穩定，而且沒有毒性。只要經過強酸的處理後，其表面就會帶有羧基 (carboxyl group)，方便後續化學反應的進行。另外，由於螢光奈米鑽石的螢光來自於鑽石晶格內的點缺陷 (point defect)，它的光學性質不會受鑽石表面修飾的影響，再加上鑽石的結構穩定，這些缺陷不會在雷射光激發照射下有如一般的螢光分子產生光化學反應而變質，所以可以持續產生非常穩定的螢光，沒有光致漂白效應。也就是說，我們可以利用螢光奈米鑽石來進行長時間觀察。除此之外，螢光奈米鑽石能發出紅色螢光，非常適合活體生物的觀察。此螢光來自於鑽石晶格內氮原子與相鄰空缺所形成的點缺陷，簡寫為「氮-空缺」或 (N-V)。當此缺陷受到黃綠光 (560 nm) 激發時，會發出波長為 700 nm 的遠紅色螢光，這恰好避開生物系統中常見的自發螢光 (400–550 nm)，由此可避免接收從自發螢光所產生的背景訊號，進而增加影像的對比，得到較清晰的影像⁽²⁾。在下文中我們將介紹如何以單分子方法來研究螢光奈米鑽石的光物理特性及其在生物醫學

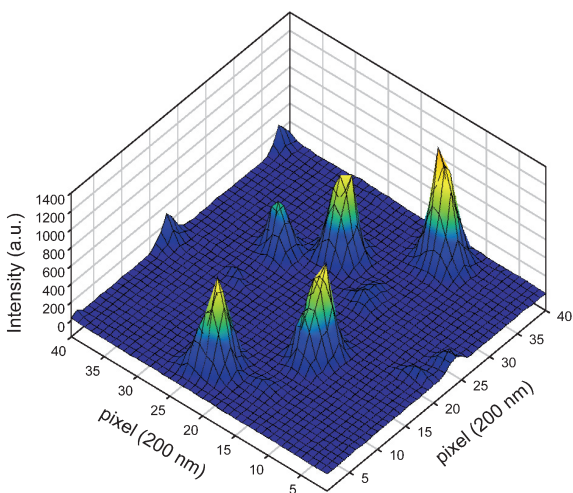


圖 1. 35 nm 螢光奈米鑽石之共軛掃描顯微鏡影像。奈米鑽石影像的半高全寬是 2 至 3 影像點，相當於 400 至 600 nm。⁽²⁾

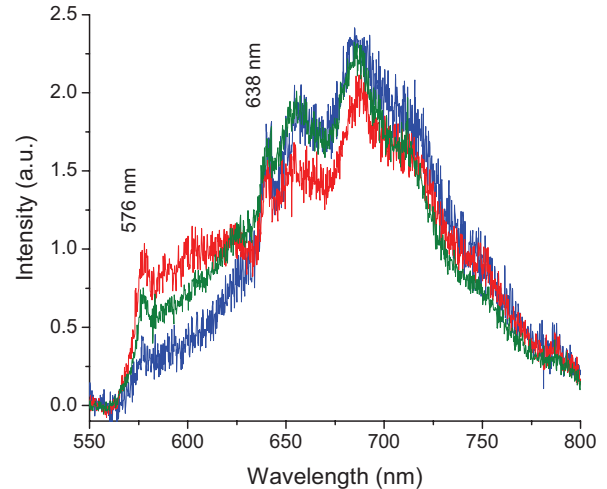


圖 2. 35 nm 螢光奈米鑽石之螢光光譜。兩條在波長 576 nm 與 638 nm 的零聲子線分別是由 (N-V)⁰ 和 (N-V)⁻ 缺陷之電子躍遷而來。⁽²⁾

方面的應用。其中主要的工作皆在中央研究院原子與分子科學研究所范文祥博士指導下完成。

二、螢光奈米鑽石之光物理

我們使用了一套改裝過的雷射共軛焦掃描顯微鏡 (confocal scanning microscope)，對單一個直徑約為 35 nm 的螢光奈米鑽石粒子進行觀察。首先將螢光奈米鑽石很稀疏的鋪灑於玻璃片上，以一台 532 nm 固態雷射作為激發光源，經過物鏡聚焦激發螢光奈米鑽石後，以雪崩式光電二極體 (avalanche photodiode) 接收所產生的螢光，再利用壓電式驅動平台移動樣品，取得共軛螢光影像圖 (如圖 1 所示)。在此圖中，奈米鑽石影像的半高全寬約為 400–600 nm，約是此光學顯微鏡的繞射極限 (diffraction limit)，證明了我們所看到的是單一螢光奈米鑽石粒子的影像⁽²⁾。

我們進一步使用單光儀 (monochromator) 和液氮冷卻攝影機 (liquid-nitrogen-cooled CCD camera) 來取得此螢光奈米鑽石的光譜。圖 2 所示為三個不同螢光奈米鑽石粒子的光譜，雖然此三個光譜略有不同，但都有兩支獨特的零聲子線 (zero-phonon lines)。其中 576 nm 的零聲子線是從中性的氮-空缺缺陷「(N-V)⁰」的電子躍遷而來，而在 638 nm

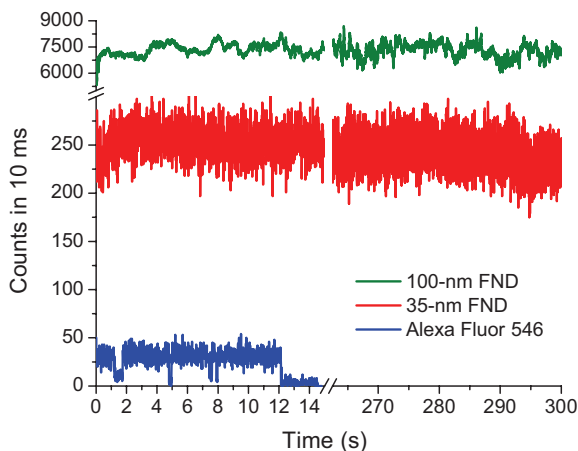


圖 3. 140 nm 螢光奈米鑽石、35 nm 螢光奈米鑽石及染料 Alexa Fluor 546 之螢光強度隨激發時間的變化圖。⁽²⁾

的零聲子線則是從帶負電的氮-空缺陷「(N-V)⁻」的電子躍遷而來。這兩支零聲子線皆附帶很寬的聲子伴線 (phonon sideband)，它們紅位移了約 50 nm。由於每一個奈米鑽石粒子中所含的 (N-V)⁻ 和 (N-V)⁰ 比例不同，光譜也有所差異。

同時，我們也測試螢光奈米鑽石的螢光穩定性，並記錄其螢光強度隨時間變化的情形。如圖 3 所示，螢光奈米鑽石的光穩定性非常高，即使在強度約為 10 kW/cm² 的強光照射下，其螢光亮度在 300 秒內都沒有改變，不僅沒有出現光致漂白的現象，也沒有光閃視情形。相反地，在相同量測條件下，有機染料單分子如 Alexa Fluor 546 則出現光閃視現象，也產生光致漂白的結果，螢光在 10 秒左右迅速地消失了⁽²⁾。

此外，測量單一螢光奈米鑽石的「反集束 (anti-bunching)」效應，亦即測量螢光光子的二階相關函數 (second-order correlation function, $g^{(2)}(\tau)$)，來定量每一螢光奈米鑽石粒子中所含 (N-V) 缺陷之數目⁽⁶⁾。在本實驗中螢光奈米鑽石所發出之螢光光子會經過一個分光器 (beam splitter)，分開行走兩條路線，每個光子只能選擇走其中一條路線，而到達其中一個雪崩式光電二極體偵測器 (avalanche photodiode)。時間相關單光子計數系統 (time-corrected single photon counting system) 會測量光子抵達兩個二極體之間的時間差 (τ)，經由多光

子的時間統計之後，便可以得到 $g^{(2)}(\tau)$ 。理論上， $g^{(2)}(\tau)$ 在 $\tau=0$ 時，光子的發射源數目 (N) 會遵守一特定的關係： $g^{(2)}(0) = 1 - 1/N$ 。例如，當 $g^{(2)}(0) = 0$ 時，表示所偵測的光訊號是來自於單一光子發射源 (single emitter)；當 $g^{(2)}(0) = 1/2$ 時，表示光訊號是來自於兩個獨立的發射源，即兩個 (N-V) 缺陷。因此可以藉由此量測的二階相關函數，計算出單一螢光奈米鑽石內的缺陷數量。

圖 4 顯示為單一 10 nm 螢光奈米鑽石之二階相關函數，發現在直徑為 10 nm 的螢光奈米鑽石中，它可以含有三個 (N-V) 缺陷⁽⁷⁾。不過，在有些螢光奈米鑽石中，僅存在一個 (N-V) 缺陷，它們可以作為奈米尺度的單光子發射源。這種穩定的單光子光源，在量子光學通訊的應用中非常有價值。

三、螢光奈米鑽石之三維追蹤

螢光奈米鑽石的光穩定性非常高，能夠進行長時間的三維追蹤，適用於偵測細胞內的動態行為。為了證明此想法，我們利用一台倒立式螢光顯微鏡 (inverted microscope)，以 532 nm 固態雷射為激發光源，開發一套單粒子三維追蹤系統。我們以一自行設計的 LabVIEW 程式，控制位於壓電式微驅動器 (piezoelectric translational stage) 上的物鏡，自動改變其高度來維持螢光影像之最高亮度，記錄單一螢光奈米鑽石粒子在液體中或細胞中的三維運動行為 (圖 5 為此儀器之架構圖)。藉由此一特殊的反饋

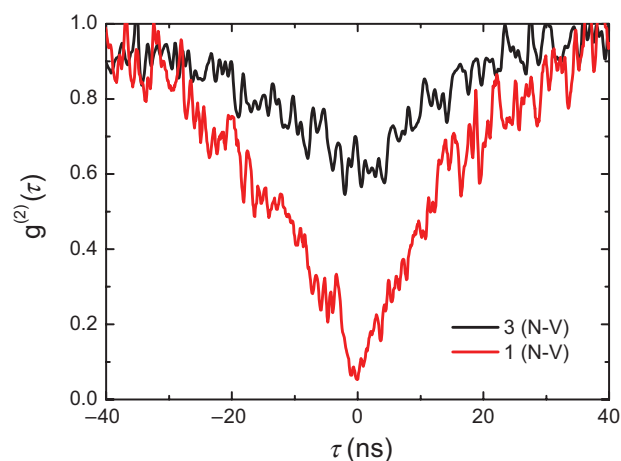


圖 4. 10 nm 螢光奈米鑽石的二階相關函數測量結果。⁽⁷⁾

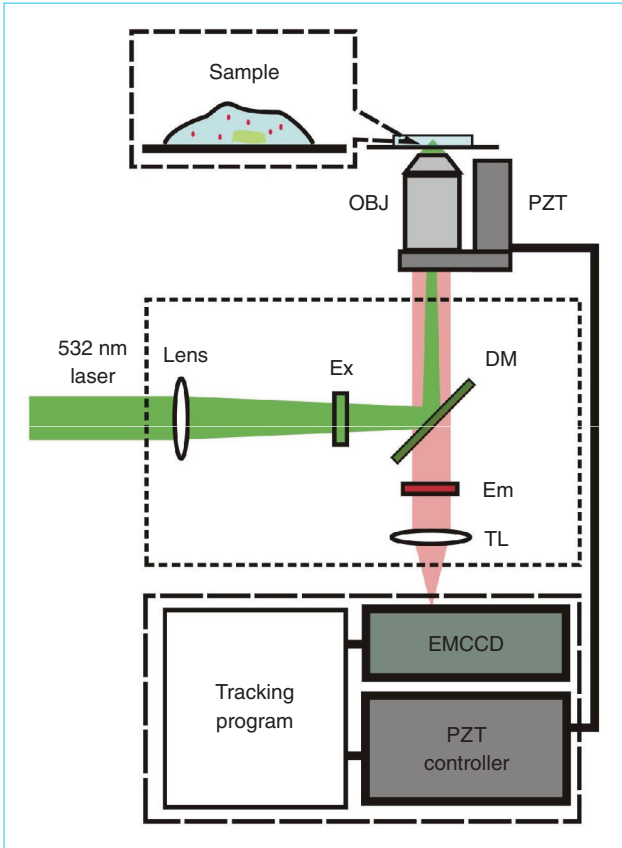


圖 5. 單粒子三維追蹤系統。組成包括 OBJ：物鏡 (objective)、Ex：激發濾光片 (excitation filter)、DM：雙色分光鏡片 (dichroic mirror)、Em：螢光濾光片 (emission filter)、TL：鏡筒透鏡 (tube lens)、PZT：壓電式微驅動器 (piezoelectric translational stage) 等。⁽⁴⁾

伺服控制系統，可以在影像速度是 10 Hz、軸向分辨率是 100 nm 的情況下，連續監控螢光奈米鑽石在三度空間中的位移長達數個小時之久⁽⁴⁾。圖 6 是利用此單粒子三維追蹤系統所觀察到的一個範例，我們成功地追蹤一顆位於活 HeLa 細胞內的 35 nm 螢光奈米鑽石，記錄其三維移動軌跡，並計算出其在細胞質內的擴散係數為 $3.1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。

這項三維追蹤技術結合螢光奈米鑽石作為光學探針，可以同時提供短時間與長時間觀察的動態訊息，特別適合於偵測活體內的生化活動。例如藥品輸送和病毒入侵等過程，其總反應都可能需要一個小時以上的時間，但在這些過程中藥物或是病毒與細胞表面的相互反應，又有可能短短數毫秒即完成。要進行這樣的觀察，對放出有限光子的有機染料和螢光蛋白、或是會螢光閃視的半導體量子點來說，在技術上都是不容易做到的。但如果利用螢光奈米鑽石作為探針，其光學特性與材料優勢則可以在這項研究中完全發揮出來。

最後，為了進一步降低細胞內自發螢光的背景訊號，使用雙光子顯微技術 (two-photon fluorescence microscopy) 來增加影像的對比，以獲得更清晰的影像。使用波長 875 nm 的飛秒紅外光為激發光源，產生螢光奈米鑽石在 HeLa 細胞內雙光子激發的共軛影像 (如圖 7 所示)。與單光子影像相比較，雙光子影像讓我們更容易在細胞中尋找到螢光奈米鑽石⁽⁴⁾。

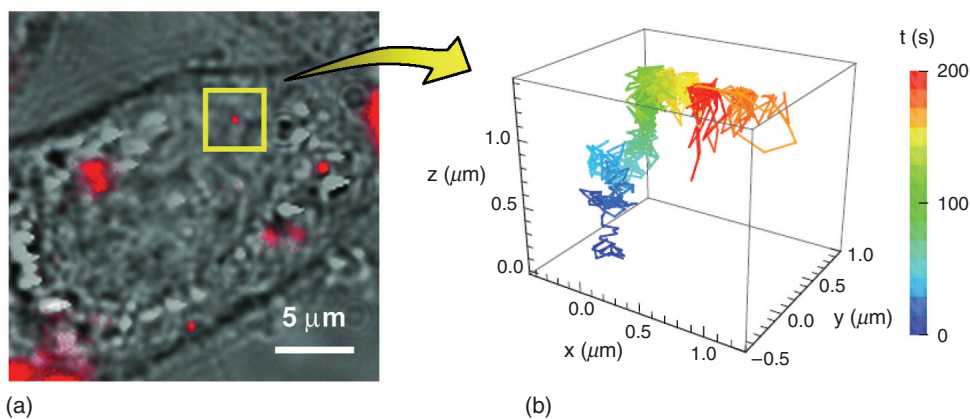


圖 6. 單一 35 nm 螢光奈米鑽石粒子在活 HeLa 細胞內之三維追蹤。(a) 白光照明與螢光影像重疊的 HeLa 細胞影像圖，紅色螢光點表示螢光奈米鑽石的位置。(b) 螢光奈米鑽石之三維移動軌跡，總記錄時間為 200 s。⁽⁴⁾

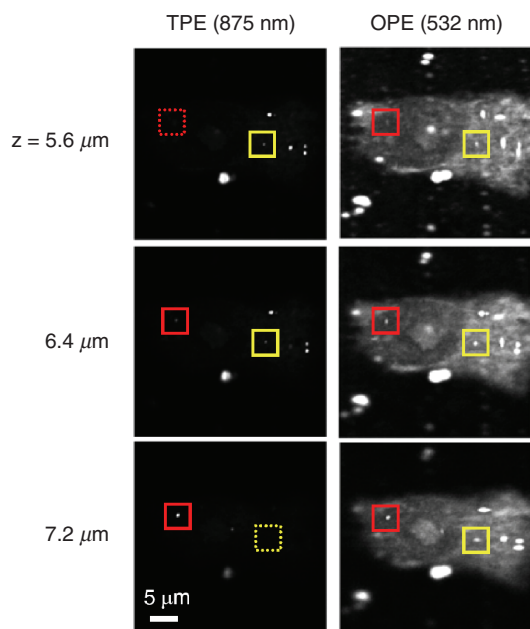


圖 7.140 nm 螢光奈米鑽石在 HeLa 細胞內之單光子及雙光子雷射激發共軛螢光影像圖。單光子及雙光子影像來自同一個固定細胞。⁽⁴⁾

四、結論和展望

螢光奈米鑽石是理想的螢光探針，非常適用於生物醫學方面之研究。倘若能在它的表面進行適當的功能化 (surface functionalization)，螢光奈米鑽石將能進入生物體內的特定器官標定，並顯示該處複雜的生化活動。此外，螢光奈米鑽石具有高穩定且低飽和激發強度 (saturated excitation intensity) 的特性，它可與激發性放射損耗顯微術 (stimulated emission depletion microscopy, STED microscopy) 相結合，大大地提升顯微影像之解析度，提供突破光學繞射極限的影像⁽¹⁰⁾。

誌謝

筆者感謝中央研究院與國科會對本研究計畫 (NSC 96-2628-E-001-006-MY2 及 NSC 96-2120-M-001-008) 的支持。同時筆者也悼念范文祥博士，其致力於開發單分子測量研究，並引領實驗團隊研究螢光奈米鑽石的光物理特性及其應用，成果斐然，令人敬佩。

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. 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).
3. F. Neugart, A. Zappe, F. Jelezko, C. Tietz, J.-P. Boudou, A. Kruger, and J. Wrachtrup, *Nano Lett.*, **7**, 3588 (2007).
4. 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**, 28 (2008).
5. O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, F. Druon, J.-P. Boudou, T. Sauvage, P. Georges, P. A. Curmi, and F. Treussart, *Small*, **4**, 2236 (2008).
6. Y. Y. Hui, Y.-R. Chang, T.-S. Lim, H.-Y. Lee, W. Fann, and H.-C. Chang, *Appl. Phys. Lett.*, **94**, 013104 (2009).
7. N. Mohan, Y.-K. Tzeng, L. Yang, Y.-Y. Chen, Y. Y. Hui, C.-Y. Fang, and H.-C. Chang, *Adv. Mater.* DOI: 10.1002/adma.200901596.
8. V. Vijayanthimala and H.-C. Chang, *Nanomed.*, **4**, 47 (2009).
9. Y. Xing and L. Dai, *Nanomed.*, **4**, 207 (2009).
10. E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, and S. W. Hell, *Nature Photonics*, **3**, 144 (2009).

- 許遠揚先生為香港中文大學物理博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所博士後研究員。
- 張宜仁先生為國立交通大學光電工程博士，現任中央研究院應用科學研究中心博士後研究員。
- 張煥正先生為美國印第安那大學物理化學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所研究員。
- Yuen Yung Hui received his Ph.D. in physics from the Chinese University of Hong Kong. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
- Yi-Ren Chang received his Ph.D. in electro-optical engineering from National Chiao Tung University. He is currently a postdoctoral fellow in the Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica.
- Huan-Cheng Chang received his Ph.D. in physical chemistry from Indiana University, Bloomington, USA. He is currently a research fellow in the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.