

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 工程學(二)科

探究精神獎

052412

簡易製備石墨烯量子點與應用於細胞成像之探討

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 侯佳蕙 高二 張容爾	指導老師： 呂雲瑞 曾韋龍
-------------------------	---------------------

關鍵詞：石墨烯量子點、細胞成像

摘要

我們選擇使用氧化石墨烯作為本次實驗的材料，利用強氧化劑和硫脲切割氧化石墨烯 (GO)，得到石墨烯量子點 (GQDs)，根據量子的尺寸效應，合成出的量子點越小，放光越藍移；量子點越大，放光越紅移。由於我們想將石墨烯量子點發光的特性應用在細胞成像，因此我們透過改變各種變因，得到放光 700 nm 的石墨烯量子點。由於紅外光可穿透較深層的皮膚，產生膠原蛋白，對於醫療上的應用有極大潛力，我們將合成出的石墨烯量子點加入海拉細胞中，使細胞產生胞吞作用，並且比較四個不同樣品，GQDs 20 min、GQDs 1 hr 30 min、GQDs 20 min + biotin、GQDs 1 hr 30 min + biotin，透過儀器鑑定得知細胞對 GQDs 1 hr 30 min + biotin 的接受度較高，再將獲得的結合石墨烯量子點的細胞應用在細胞顯影上。

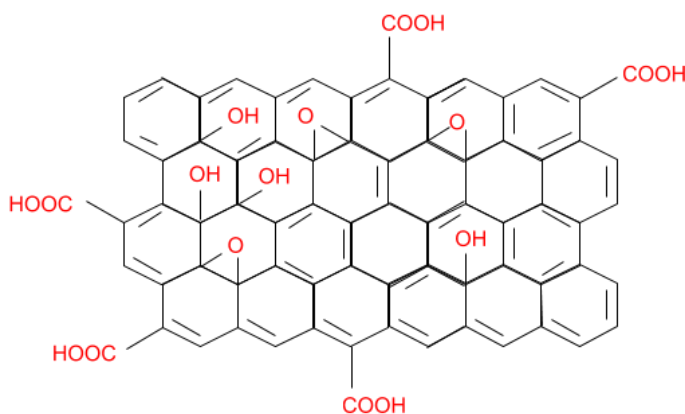
壹、研究動機

一、研究背景介紹

(一) 氧化石墨烯 (Graphene Oxide, GO)

石墨烯是碳原子以 sp^2 軌道組成的六角蜂巢型二維晶體，因共軛結構的存在，石墨烯表面具有均勻的導電性，強韌的機械性質，顏色是黃棕色。氧化石墨烯是指帶有官能基的石墨烯，含有羥基、羧基、含氧基團，含氧基團會破壞共軛結構，促成含氧的缺陷結構，而此結構破壞了石墨烯的完美構造，使氧化石墨烯呈現絕緣或半導體的型態，然而這些缺陷產生的孔洞產生使氧化石墨烯非常適合用在薄膜技術。

氧化石墨烯製造過程成本低且易於大量生產，並且在能量儲存、生物醫學或光電領域中運用廣泛。



圖一、氧化石墨烯結構圖

(二) 石墨烯量子點 (Graphene Quantum Dots, GQDs)

1. 石墨烯量子點的基本特性

當我們將石墨烯縮小尺寸，會因量子侷限效應和邊際效應使其性質改變，施加一定的電場或光壓，就有可能會發出特定頻率的光，而光的頻率會隨著尺寸改變，調節尺寸就能控制發出光的顏色，此材料視為石墨烯量子點。

量子點為奈米級別的半導體，只有 2 到 10 nm。石墨烯量子點含有羧基和羰基，所以也可以和許多生物分子結合。例如，石墨烯量子點已經成功地與抗體結合。此外，石墨烯量子點具有石墨烯優良的電學性質、低毒性、高穩定性、優異的機械強度等特性，克服了傳統量子點的電子傳輸性能較差和石墨烯零帶隙的問題，在光電領域有很好的應用前景。

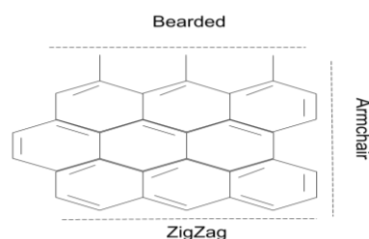
2. 石墨烯量子點的發光因素

(1) 量子侷限效應 (Quantum Confinement Effect)

量子侷限效應是指當樣品大小非常小時，它的電子與光學性質會產生變化，當奈米結構變小時，能帶間隙就會變大。石墨烯並沒有能隙，但是當尺寸縮小時，它的能帶會逐漸分裂，此時電子會從基態躍升至激發態，當電子再次回到基態時會產生螢光。從尺寸效應 (Size Effect) 可得知，當尺寸越小，能隙越大，放出能量越強，螢光會藍移。

(2) 邊際效應 (Edge Effect)

石墨烯量子點的邊際效應由石墨烯量子點邊緣的三種結構所影響：ZigZag、Armchair 以及 Bearded，ZigZag 為石墨烯量子點六角環鋸齒狀邊緣頂點的連線處；Armchair 為石墨烯量子點六角環扶手椅型邊的連線處；而 Bearded 為石墨烯量子點的未鍵結碳的連線處，由於此結構有不穩定的未鍵結碳，以理論討論為主，相較於 Bearded，ZigZag 及 Armchair 為主要影響因素，而由文獻得知有較多 ZigZag 的石墨烯量子點其能隙會比較小，原因為 ZigZag 有較高的電子密度，而使能隙下降，能量降低，造成螢光紅位移。



圖二、石墨烯的邊際結構示意圖

(3) 表面官能基效應 (Functional Group Effect)

由於不同的元素會由不同的能階大小，因此石墨烯量子點若修飾上不同官能基，就能使電子激發的時候有不同的路徑，因此使石墨烯量子點在發出螢光時有不同波長的可能性。而由文獻得知，指出氮參雜的石墨烯量子點，因其上的未鍵結電子對有類似推電子基的作用，使電子密度增加，因而能隙變小，使螢光紅位移。在本實驗中，我們使用硫脲作為製備石墨烯量子點時修飾上的官能基，作為參雜氮元素的來源，以達到石墨烯量子點發光紅移的目的。

(三) 細胞成像 (cell imaging)

細胞成像是利用延時成像研究活細胞的動態生理過程，可將多個快照轉換成影像，在顯微鏡下觀察時，pH 值、緩衝能力、溫度、O₂ 濃度及滲透壓等被限制在一定的最佳條件下，確保細胞的最佳狀態，而螢光技術在細胞成像中被使用在標定特定細胞化合物，使其在顯微鏡下更容易被觀察到。相較於細胞顯影範圍小，生物顯影是指對生物體不同部分進行顯影，可用來觀察生物體或疾病診斷，螢光技術在生物顯影上扮演很重要的角色，由於在生物體內顯影所需的光源能量較低，且較不易破壞生物組織，800 nm 至 1000 nm 的紅外光較為合適。

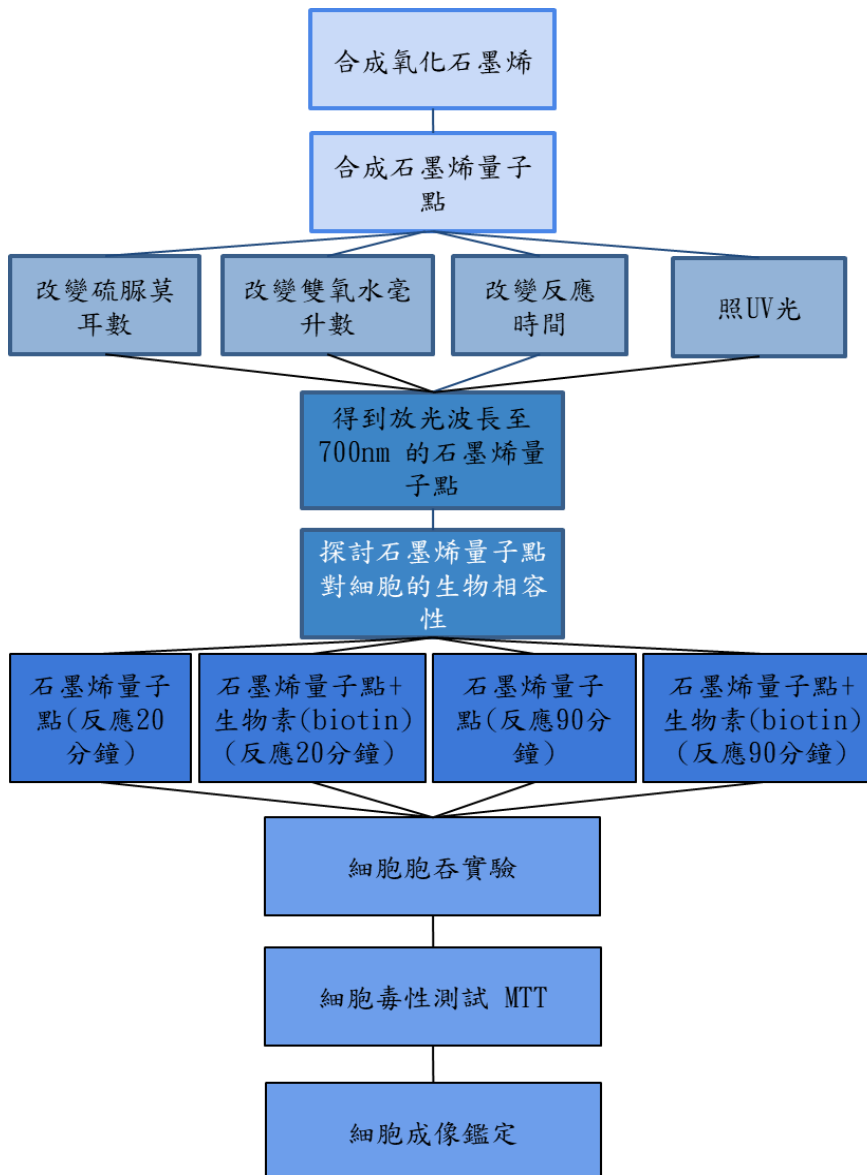
二、 研究動機

曾經在網路報導上看到，近年國人每年平均每 3 名往生者中，就有 1 人的死因為惡性腫瘤，如此高的罹癌比例，使台人聞癌色變，隨著罹癌人數增加且年輕化，初期的腫瘤小難被發現，電腦斷層在微小腫瘤的鑑別力較低，無法使罹癌病患儘早發現，並且儘早治療的目的。在做切除腫瘤手術時，常常會失誤切除健康細胞，顯影劑在此處扮演重要角色，因此我們想做出對身體傷害較少、顯影力較強及毒性小的顯影劑，因此發想出至被放光紅移的石墨烯量子點作為顯影劑的使用，透過和細胞結合探討期的生物相容性，希望日後較小的癌細胞也可以被檢測到，另外也可以在切除手術中降低切除健康細胞的機率，讓罹癌後康復的人數增加。

貳、研究目的

- 一、合成氧化石墨烯
- 二、合成石墨烯量子點
- 三、改變石墨烯量子點的反應變因
- 四、合成放光波長至紅外光的石墨烯量子點
- 五、探討細胞吞噬石墨烯量子點的最佳條件
- 六、探討細胞吞噬石墨烯量子點在生物成像方面的應用

表一：本研究流程圖



參、研究設備及器材

一、研究設備

(一) 拉曼光譜儀 (Raman Spectrometer)

拉曼效應為將激發光照在物質上時會產生散射的現象而產生散射光，當散射光中有比原本激發光波長長或短的光，就是拉曼效應，由於拉曼效應起源於分子的震動和轉動，所以透過拉曼光譜的頻率，強度和有散射物質的性質，可以得知物質的結構。

(二) 螢光分光光譜儀 (Fluorescence Spectrometer)

1. 放光波長與螢光強度：

螢光是分子吸收特定波長的光能，之後再放出螢光之現象。低濃度物質所放出螢光的強度會與其濃度成線性比例，其分析應用包含溶液中分子的定量測量與液相層析時的螢光測量。

2. 量子產率：

即光化學反應中光量子的利用率，為每吸收一個量子所產生的反應物的分子數，這通常是對於特定的波長而言，即（放光光子數）/（吸收光子數）。量子產率分為**相對量子產率**和**絕對量子產率**。**相對量子產率**為需要一種已知量子產率的材料作為參照，透過比對換算其吸收值以及放光強度，得到樣品的量子產率，適用於液相樣品；而**絕對量子產率**係經由單光器激發光進入積分球內，其表面通常會塗有高反射性物質，光源透過積分球照射到樣品，再由單光器及偵測器收光透過計算公式得到量子產率，其中計算公式分為直接量子產率（ Internal quantum yield ）和間接量子產率（ External quantum yield ），其差別為前者產生的螢光為來自於樣品直接被激發光照射，後者的螢光則是樣品受到反射後的激發光所照射，此法因不需要使用標準樣品，逐漸被廣反使用。

(三) 吸收光譜儀 (Atomic Absorption Spectrometer)

最常用的分析方法為標準曲線法，即配製一系列不同濃度的標準溶液，在相同測定條件下用空白溶液調整零吸收，根據標準溶液濃度和吸光度繪製吸光度－濃度標準曲線，測定試樣溶液的吸光度，並用內插法在標準曲線上求得試樣中被測定元素的含量。

(四) 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM)

穿透式電子顯微鏡原理是把經加速和聚集的電子束投射到非常薄的樣品上，電子與樣品中的原子碰撞而改變方向，從而產生立體角散射。散射角的大小與樣品的密度、厚度相關，因此可以形成明暗不同的影像，影像將在放大、聚焦後在成像器件上顯示出來。

由於電子的德布羅意波長非常短，透射電子顯微鏡的解析度比光學顯微鏡高的很多。因此，使用穿透式電子顯微鏡可以用於觀察樣品的精細結構，甚至可以用於觀察僅僅一列原子的結構，比光學顯微鏡所能夠觀察到的最小的結構小數萬倍。

(五) 螢光生命週期分析儀 (Fluorescence Lifetime System)

螢光生命期為一個用來描述樣品組成之螢光強度隨著時間衰減之參數。若一個樣品之螢光衰減符合一級動力學，則此值即為其螢光強度及相應之激發態分子數減少至初始值 $1/e$ 所需要之時間。樣品分子經由吸收光子後會促使其電子躍遷至激發態，而激發態之電子則可經由釋放出光子回到基態，此光子之發射稱為螢光，這種狀態具有相當短的生命期（約 1 ns 到 10 ns 之間）。

(六) 原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM)

是一種奈米級高分辨的掃描探針顯微鏡，優於光學繞射極限 1000 倍。相對於掃描電子顯微鏡，原子力顯微鏡具有許多優點。AFM 提供真正的三維表面圖。同時，AFM 不需要對樣品的任何特殊處理，如鍍銅或碳，這種處理對樣品會造成不可逆轉的傷害。電子顯微鏡需要運行在高真空條件下，原子力顯微鏡在常壓下甚至在液體環境下都可以良好工作。這樣可以用來研究生物宏觀分子，甚至活的生物組織。AFM 的缺點在於成像範圍太小，速度慢，受探頭的影響太大。

(七) 振盪培養器 (Shaking Incubator)

適用於動物、植物細胞、微生物，遺傳工程，生化實驗及一般實驗之恆溫震盪培養。

(八) 奈米雷射粒徑分析儀 (Dynamic Light Scattering, DLS)

利用生化分子在溶液中對光折散射來測定生化分子的物理性質，懸浮在液體中

的粒子由於同溶劑分子的隨機碰撞而產生布朗運動。這種運動會造成粒子在整個媒介中擴散。在動態光散射中，測量布朗運動中粒子所散射光線隨時間的波動來測定粒度及其粒度分佈。由於所測定分子在溶液中不是固定不變的，所以測量的結果是所有分子在溶液中的集體平均，分子在溶液中以光照的方式，不同形狀及大小得分子對入射光都有不同的折射效果來評估此生化分子的物理性質。

表二：實驗設備

						
加熱爐	離心機	超音波震盪機	真空凍乾機	烘箱	無菌循環 CO ₂ 培養箱	恆溫水槽
						
拉曼光譜儀	螢光分光光譜儀	吸收光譜儀	穿透式電子顯微鏡	螢光生命週期分析儀		
						
原子力顯微鏡	ELISA reader	奈米雷射粒徑分析儀	震盪培養器	共軛聚焦顯微鏡	震盪機	

表三：實驗藥品

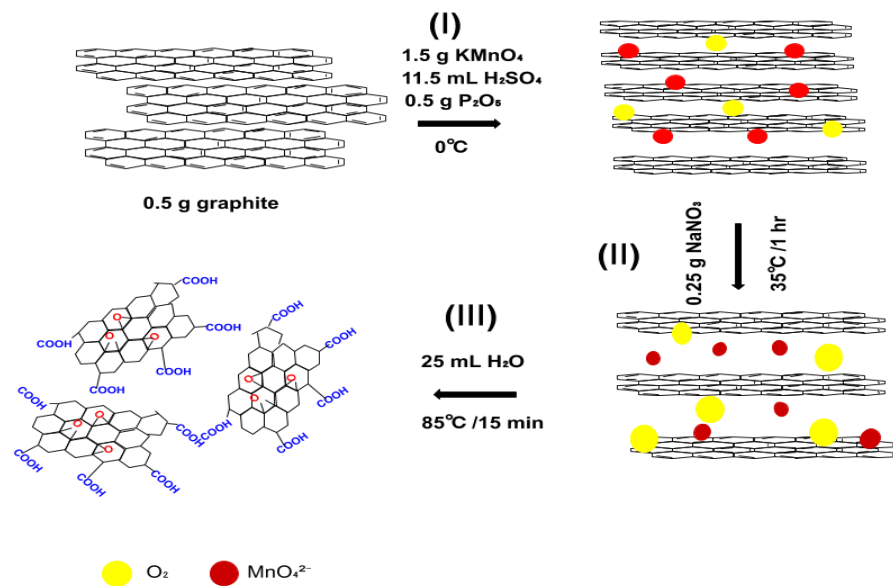
氧化石墨烯	石墨粉末、硫酸五氧化二磷、過錳酸鉀、硝酸鈉、過氧化氫
石墨烯量子點	氧化石墨烯、硫脲、過氧化氫
石墨烯量子點官能基修飾	反應 1 小時 30 分鐘石墨烯量子點、反應 20 分鐘石墨烯量子點、生物素 (NHS-PEG-Biotin)
細胞胞吞實驗	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)、伊格爾最低限度必需培養基 (DMEM)、甲醛、HeLa cell (子宮頸癌細胞)
細胞毒性測試	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)、伊格爾最低限度必需培養基 (DMEM)、甲醛、二甲基亞砷 (DMSO)、HeLa cell (子宮頸癌細胞)

肆、研究過程或方法

一、合成氧化石墨烯 (GO)

我們使用 modified Hummer 法合成氧化石墨烯：

- (一)在冰浴下用圓底燒瓶使 0.5 g 五氧化二磷溶於 11.5 mL 硫酸 (98%)。
- (二)加入 1.5 g 過錳酸鉀混合攪拌 3 分鐘呈綠色。
- (三)加入 0.5 g 石墨粉末和 0.25 g 硝酸鈉攪拌 10 分鐘呈黑色。
- (四)降溫至 35°C 後攪拌油浴 1 小時呈灰色。
- (五)冰浴下加入去離子水 5 mL 五次。
- (六)放入預熱好的油浴 85°C 中加熱 15 分鐘，再降溫至 25°C (室溫)。
- (七)在冰浴下一次加入過氧化氫 5 mL，得到呈亮黃色的氧化石墨烯。

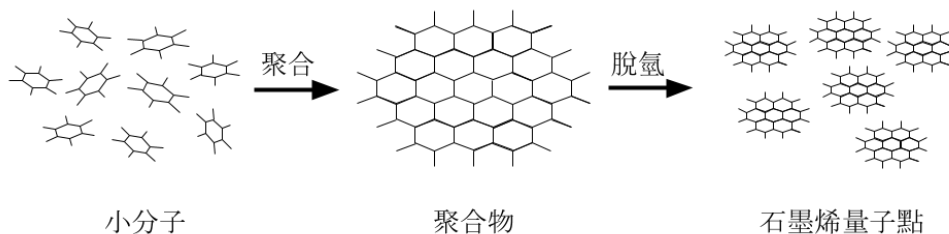


圖三、氧化石墨烯合成流程圖

二、合成石墨烯量子點 (GQDs)

(一) 石墨烯量子點的合成方法主要分為 Bottom-up 或 Top-down：

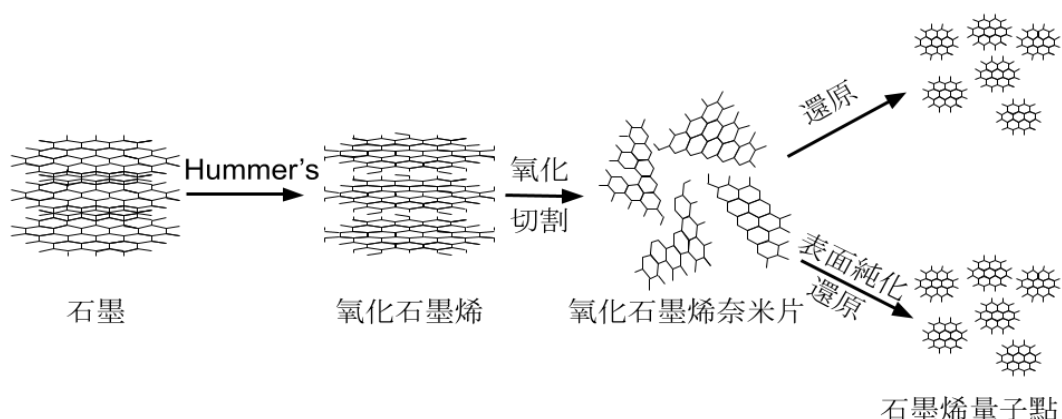
Bottom-up 方法是以小分子為前體，通過一系列化學反應逐步合成尺寸較大的石墨烯量子點。通常為將給予材料能量使其小分子縮合成大分子，而使縮合成的分子尺寸均勻是此方法所求的目標。包含溶液化學法、微波輔助法、超聲法、熱解法、富勒烯法、共燃法、熱解碳化法等。



圖四、Bottom-up 方法示意圖

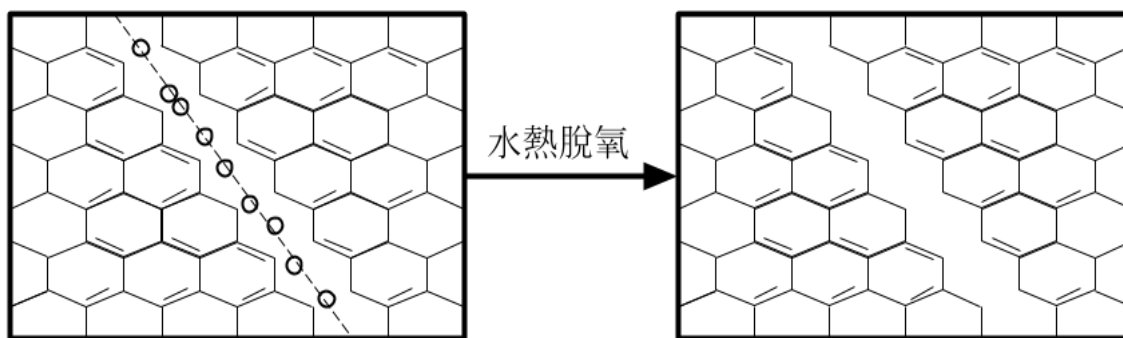
Top-down 方法為將體積較大材料碎裂為奈米尺度，通常是透過高能量或者強酸氧化的方式降碳材裂解，或者以電化學方式在液體下進行伏安法將石墨及多壁奈米碳管碎裂，或者利用電子束切割或氧氣電漿的方式將石墨烯做加工，使其變成石墨烯量子點。包含水熱法、酸氧化、電化學剝離法、微波輔助破碎法等熱法、剝離法、強酸氧化法、溶劑熱法、電化學法、電子束輻照、臭氧法、氫氣法、氣熱法、

磁控濺射技術、輻照等。其中以其中以強酸氧化的方式可達到大量合成，但其使用的容幾對環境有害，且將強酸去除也是一大考驗。



圖五、Top-down 方法示意圖

在本實驗中，我們用強酸做水熱法，使其先氧化出許多含氧官能基進一步將石墨烯碎裂，這個方法易於大量合成石墨烯量子點，並且成本低。但此方法無法避免帶負電的含氧基團存在於量子點上，使石墨烯量子點具有親水性合表面缺陷，並且無法完全移除過量的氧化劑。

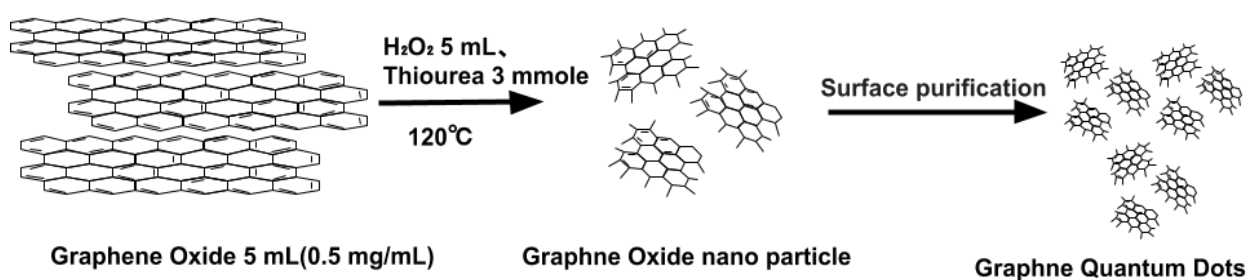


圖六、利用強酸水熱法將石墨烯裂解示意圖

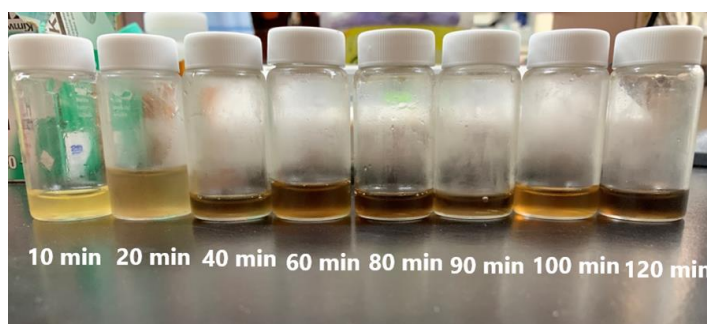
(二)我們使用 Top-down 的水熱強酸方法合成石墨烯量子點：

- 1.加入 1.66 mL 的氧化石墨烯 (1.5 mg/ml) 後加水至 5 mL (0.5 mg/mL)。
- 2.加入過氧化氫 (30%) 5 mL。
- 3.再加入硫脲 3 mmole (0.2283 g)。
- 4.在 120 °C 中油浴 10 分鐘。
- 5.離心 40 分鐘 (轉速 6000 rpm)。

6.將上層廢液吸出後加水回溶，放入超音波震盪機 30 分鐘。



圖七、石墨烯量子點合成流程圖



圖八、反應不同時間的石墨烯量子點

三、石墨烯量子點官能基修飾

為了使石墨烯量子點有更好的生物相容性，且石墨烯量子點表面有官能基，因此可以透過羧基與 biotin 的 NHS 結合，獲得 GQDs-biotin，並將它注射至細胞中，使細胞產生和量子點相同的放光波長。

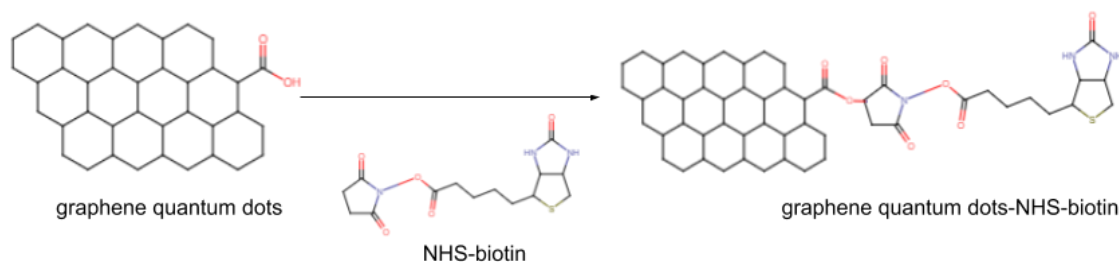
(一)取同重量的石墨烯量子點和生物素，分別加入 1 mL 的水混合。

(二)放到震盪培養器一天（溫度 $37.0^\circ C$ 、轉速 100 rpm）。

(三)取出後，離心 15 分鐘（轉速 12000 rpm）。

(四)吸出上清液，底部沉澱的加水回溶後至超音波震盪 20 分鐘。

(五)分別將上層清液做螢光光譜鑑定，而底部沈澱的自超音波震盪取出後，做 DLS 及螢光光譜鑑定。



圖九、GQDs-biotin 結構圖

四、細胞吞實驗

分別將 GQDs 20 min、GQDs 20 min + biotin、GQDs 1 hr 30 min、GQDs 1 hr 30 min + biotin 加入 HeLa 細胞中，透過細胞成像圖觀察細胞對哪種樣品的存活率較高。

(一) 將 dish 中的培養液吸掉。

(二) 加入 2 mL 1X PBS 清洗細胞，稍微前後左右搖晃再將溶液吸掉，重複 2 次。

(三) 加入 2 mL 培養液 + 200 μ L 材料 (GQDs 20 min、GQDs 20 min + biotin、GQDs 1 hr 30 min、GQDs 1 hr 30 min + biotin)，稍微前後左右搖晃使材料及培養液混合均勻，以 75% 酒精擦拭乾淨後，放入無菌循環 CO₂ 培養箱 2 hr。

(四) 取出培養液，以 2 mL 1X PBS 清洗 2 次 (稍微前後左右搖晃再將溶液吸掉)。

(五) 加入 2 mL 甲醛 (4%)，稍微前後左右搖晃，靜待 20 分鐘 (此步驟是要將細胞標本化)。

(六) 將甲醛取出，以 2 mL 1X PBS 清洗 2 次 (稍微前後左右搖晃再將溶液吸掉)。

(七) 利用美工刀從背面將細胞蓋玻片取下來，並用細胞封片膠將其黏在載玻片上。

五、細胞毒性測試(細胞存活率分析 (MTT))

MTT 會和細胞內的粒腺體反應，產生紫色結晶甲臍，用二甲基亞砷將甲臍溶解，再以平板讀數器 (ELISA reader) 測細胞的吸光度，可得知甲臍的生成量，並且得知細胞還原 MTT 的能力。

(一) 細胞繼代之後，將 5~15 μ L 的 HeLa 細胞置於 24 孔盤中 (視情況調整細胞的體積及所需要的孔數)。

(二) 加入 300 μ L 細胞培養液 (DMEM) 至各孔中，放入無菌循環 CO₂ 培養箱 24 hr。

(三) 隔天，將不同濃度之材料 15~25 μ L 加入至 24 孔盤中反應 6、12、24 小時。

(四) 反應時間到後，以 1X PBS 300 μ L 清洗 3 次 (視細胞情況可減少清洗次數，但至少一定要 2 次)。

(五) 加入 400 μ L DMEM + 20 μ L MTT (0.5%)，放入無菌循環 CO₂ 培養箱 3~4 hr。

(六) 以 1X PBS 清洗 2~3 次。

(七) 加入 125 μ L PBS + 300 μ L DMSO，放入無菌循環 CO₂ 培養箱 10 min (DMSO

為溶解紫色結晶甲臈之試劑)(若是發現還有紫色結晶未溶掉，可再放入培養箱 30 min)。

(八)移至 3D shaker 搖晃 5 min 使結晶溶掉。

(九)利用 ELISA reader 測其吸光度。

伍、研究結果

一、合成石墨烯量子點 (GQDs)

(一)改變反應變因：硫脲濃度、過氧化氫毫升數、反應時間、照 UV 光與否
從數據分析我們發現硫脲濃度為 300 mM、過氧化氫為 15 %、沒有照 UV 光的量子點最紅移，因此我們用以上的條件改變反應時間，而實驗結果發現反應 20 分鐘的量子點螢光強度最大，反應 1 小時 30 分鐘的量子點最紅移，因此我們將以上兩種量子點作為細胞成像的樣品。

二、石墨烯量子點的修飾

我們將石墨烯量子點修飾上生物素 (biotin)，探討生物素對石墨烯量子點的特性是否產生影響，實驗結果發現，石墨烯量子點的波長位置不變，可以得知修飾上生物素的石墨烯量子點仍然具有原本紅移的特性。

三、細胞毒性測試 (MTT)

表四：細胞在不同時間下的存活率

0.5 X	6 hr	12 hr	24 hr
20 min	75	38	36
1 hr 30 min	66	32	33
20 min + biotin	91	83	70
1 hr 30 min + biotin	91	93	81

由表中數據可得知，石墨烯量子點加入 biotin 後，細胞的存活率提高。

四、細胞成像鑑定

透過顯微鏡觀測，可以看出加入石墨烯量子點的細胞，放出較強的紅光，因此可以得知石墨烯量子點與細胞成功結合，並且細胞具有放紅光的能力。

陸、討論

一、合成放光 700 nm 石墨烯量子點的目的

(一)一般主要的自體螢光蛋白主要有四種：膠原蛋白、菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸、黃素腺嘌呤二核苷酸、彈性蛋白，以光照射，會產生 400-600 nm 的放光，所以如果材料高於 600 nm 甚至到 700 nm 就可以區分出細胞的自體螢光和材料的放光。

(二)放光 700 nm 的光屬於近紅外光，由於強度不像 x-ray 強，因此可以穿透皮膚至深層組織，進行紅外光的療程。

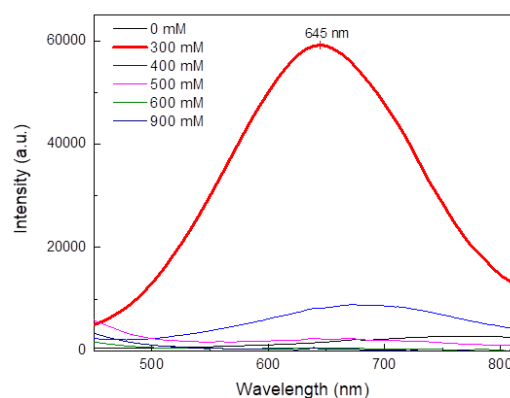
(三)在這個實驗中，我們使用 top-down 方法合成的石墨烯量子點放光至 700 nm，市面上的量子點電視的放光波長可到 1000 nm，但是製造過程會用到有毒性的重金屬離子，例如鎘、鉛、銻等重金屬，不但具有毒性也容易對環境造成污染。因此我們使用的合成方法較環保且具有較良好的生物相容性。

二、石墨烯量子點 (GQDs) 合成

(一)改變反應變因：硫脲濃度、過氧化氫毫升數、反應時間、照 UV 光與否

1. 探討變因：硫脲濃度分別為 0、300、400、500、600、900 mM。

- 共同反應條件：5 mL (0.5 mg/mL) 的氧化石墨烯、15% 的過氧化氫、油浴時間 10 分鐘、反應溫度 120 °C、離心 40 分鐘。

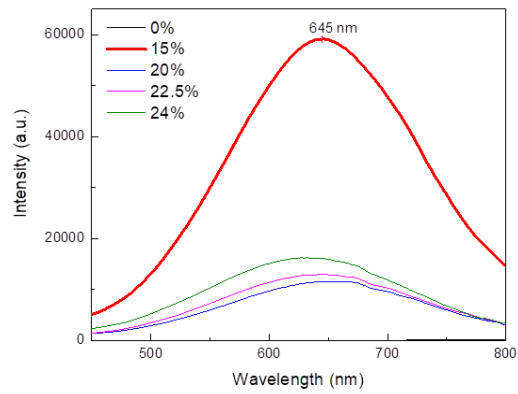


圖十、改變硫脲莫耳數的螢光光譜圖

由圖十可知硫脲莫耳數為 300 mM 時量子點的螢光強度最強。

2. 探討變因：過氧化氫濃度分別為 0%、15%、20%、22.5%、24%。

- 共同反應條件：5 mL (0.5 mg/mL) 的氧化石墨烯、300 mM 的硫脲、油浴時間 10 分鐘、反應溫度 120 °C、離心 40 分鐘。

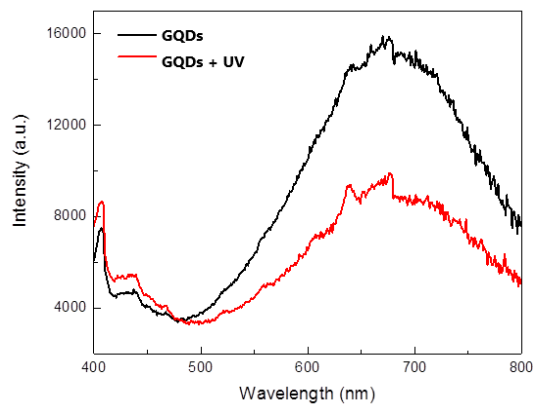


圖十一、改變過氧化氫毫升數的螢光光譜圖

由圖十一可知過氧化氫濃度為 15% 時量子點的螢光強度最強。

3. 探討變因：照 UV 光與否

- 共同反應條件：5 mL (0.5 mg/mL) 的氧化石墨烯、300 mM 的硫脲、15% 的過氧化氫、油浴時間 10 分鐘、反應溫度 120 °C、離心 40 分鐘。

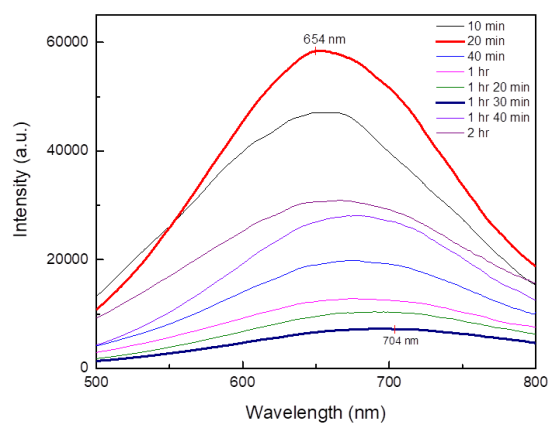


圖十二、照 UV 光與否的螢光光譜圖

由圖十二可知，沒照 UV 光時量子點的螢光強度最強，推測在照光時發生光裂解而破壞石墨烯量子點。

4. 探討變因：反應時間分別為 10 分鐘、20 分鐘、40 分鐘、1 小時、1 小時 20 分鐘、1 小時 30 分鐘、1 小時 40 分鐘、2 小時。

- 共同反應條件：5 mL (0.5 mg/mL) 的氧化石墨烯、300 mM 的硫脲、15% 的過氧化氫、反應溫度 120 °C、離心 40 分鐘。



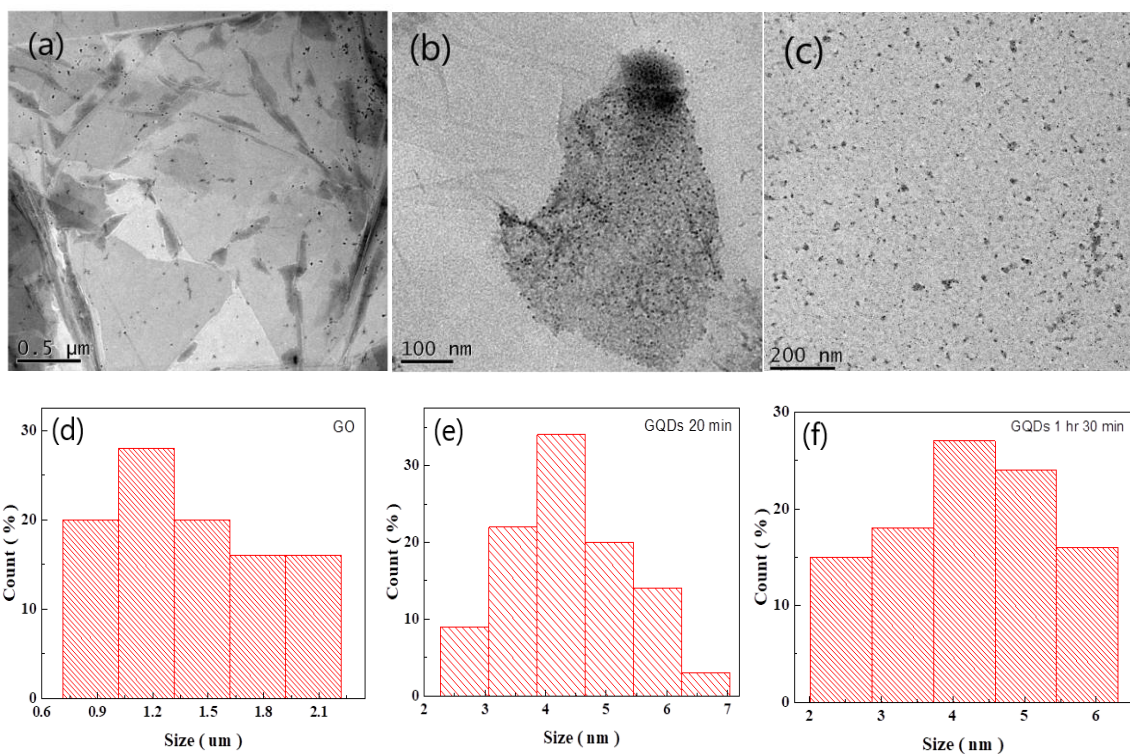
圖十三、改變反應時間的石墨烯量子點的螢光光譜圖

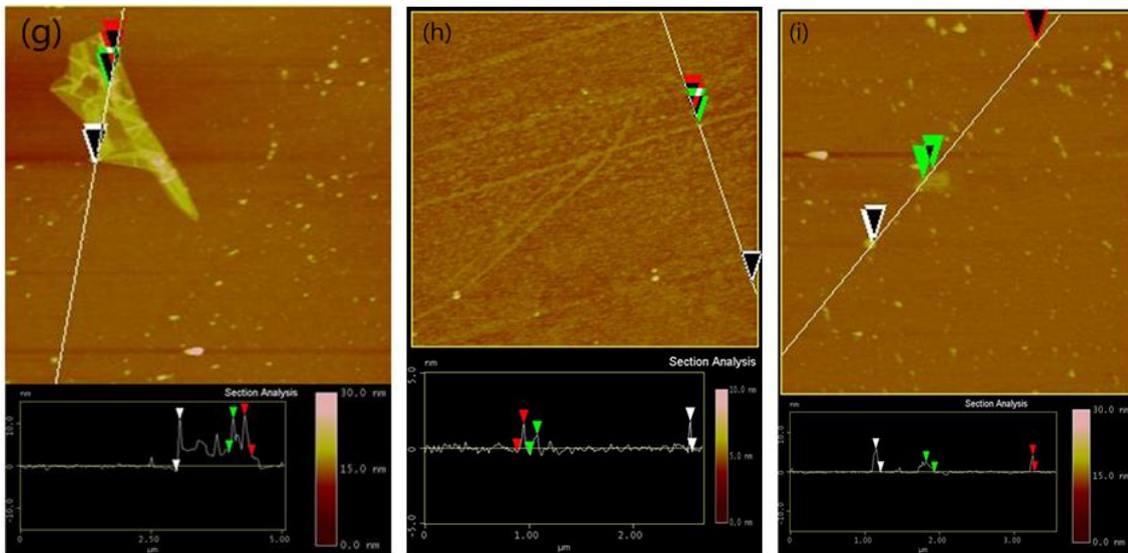
由圖十三可知反應 1 小時 30 分鐘的放光波長最紅移，但螢光強度較弱；反應 20 分鐘的放光波長最短，但螢光強度較強。

因此選擇使用反應 1 小時 30 分鐘和反應 20 分鐘的石墨烯量子點。

三、材料鑑定

(一)物理性質鑑定





圖十四、(a)、(b)、(c) 分別為氧化石墨烯、石墨烯量子點 (20 min)、石墨烯量子點 (1 hr 30 min) 的 TEM 圖；(d)、(e)、(f) 分別為氧化石墨烯、石墨烯量子點 (20 min)、石墨烯量子點 (1 hr 30 min) 的尺寸分布統計圖；(g)、(h)、(i) 分別為氧化石墨烯、石墨烯量子點 (20 min)、石墨烯量子點 (1 hr 30 min) 的 AFM 圖。

由圖十四可得知，反應時間較短時，合成的材料是片狀的，但可以看出裡面有一點一點的，代表材料尚未完全反應完；反應到 1 小時 30 分鐘時材料沒有片狀的，代表它已經反應完全了。

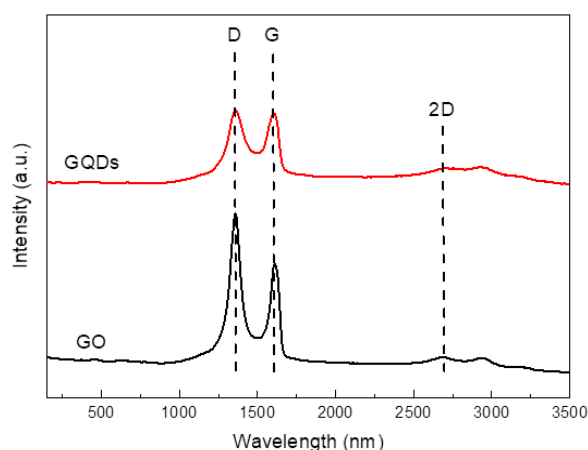
表五: 氧化石墨烯、石墨烯量子點 20 min、石墨烯量子點 90 min 的材料大小與厚度之比較

種類	TEM	DLS	AFM	層數
氧化石墨烯(GO)	片狀	10637.9 ± 4699.23 nm	2.2 nm	雙層
石墨烯量子(GQDs) 20 min	片狀	665.1 ± 222.21 nm	1.8 nm	N.A.
石墨烯量子點	片狀	367.3 ± 258.68	2.6 nm	N.A.

(GQDs) 1 hr 30 min		nm		
石墨烯量子點 (GQDs) 20 min + biotin	N.A.	746.6 ± 240.95 nm	N.A.	N.A.
石墨烯量子點 (GQDs) 1 hr 30 min + biotin	N.A.	433.3 ± 293.67 nm	N.A.	N.A.

- 1.從得到的 AFM 數據得知，氧化石墨烯的平均厚度為 2.224 nm，由網路上的文獻得知，氧化石墨烯的單層厚度為 0.9 到 1.3 nm，因此我們合成的氧化石墨烯為雙層。
- 2.從得到的 AFM 數據得知，石墨烯量子點的平均厚度為 1.807 nm，與查到的文獻資料符合。
3. 從得到的 AFM 數據得知石墨烯量子點的平均厚度分別為 2.692 nm，與查到的文獻資料符合。

(二)結構缺陷鑑定



圖十五、氧化石墨烯 (GO) 和石墨烯量子點 (GQDs) 的拉曼光譜圖

1. 峰值意義:

氧化石墨烯的特徵峰主要有三個：D、G、2D，其中的 D 峰出現在 1270-1450 cm^{-1} ，代表意義為氧化石墨烯的無序震動，用來表示氧化石墨烯的缺陷和邊緣，相較於石墨烯的完美結構是不會有 D 峰的；G 峰出現在 1580 cm^{-1} ，由碳原子的 sp^2 芳香環碳結構的鍵結震動所造成，可以反應出氧化石墨烯的層數，當氧化石墨烯的層數增加，G 峰位置較低；2D 峰出現在 2700 cm^{-1} ，可以判斷氧化石墨烯的層數，當層數為一層時，2D 只會有一個峰，如果是雙層則會有兩個峰。

2. 數據分析:

在 sp^2 雜化的系統中，D 峰和 G 峰的比值 (I_d/I_g) 越低，表示其缺陷程度越低，而本樣品為非單純的 sp^2 結構，而是含有 sp^3 ，因此缺陷增加導致 I_d/I_g 變大。

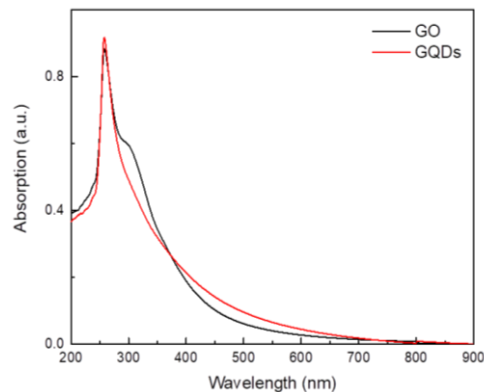
表六：氧化石墨烯與石墨烯量子點的峰值比較

	氧化石墨烯	石墨烯量子點
I_d/I_g	$7482 / 5360 = 1.4$	$4538 / 4315 = 1.1$
代表意義	相較於文獻中氧化石墨烯的 I_d/I_g 均約為 1 ± 0.1 ，本樣品的缺陷結構較多。	相較於文獻中石墨烯量子點的 I_d/I_g 均約為 0.5，本樣品的缺陷結構較少。

從石墨烯量子點的 D 峰和 G 峰可以得知量子點缺陷和層數較氧化石墨烯少。

(三) 光譜圖鑑定

1. 吸收光譜圖

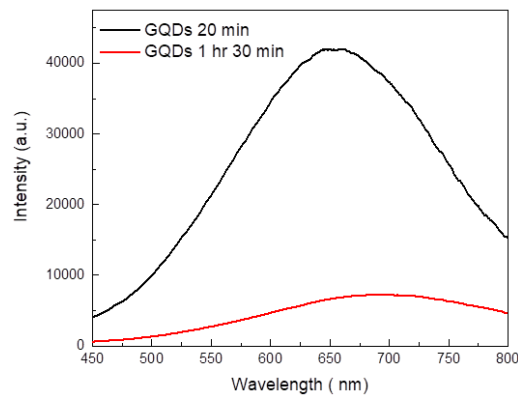


圖十六、氧化石墨烯 (GO) 和石墨烯量子點 (GQDs) 的吸收光譜圖

由圖十六可知，氧化石墨烯和石墨烯量子點位於 250 nm 至 300 nm 之間有強烈吸收，

且氧化石墨烯在 300 nm 到 350 nm 之間有微突出的波峰，此為氧化石墨烯的特徵。

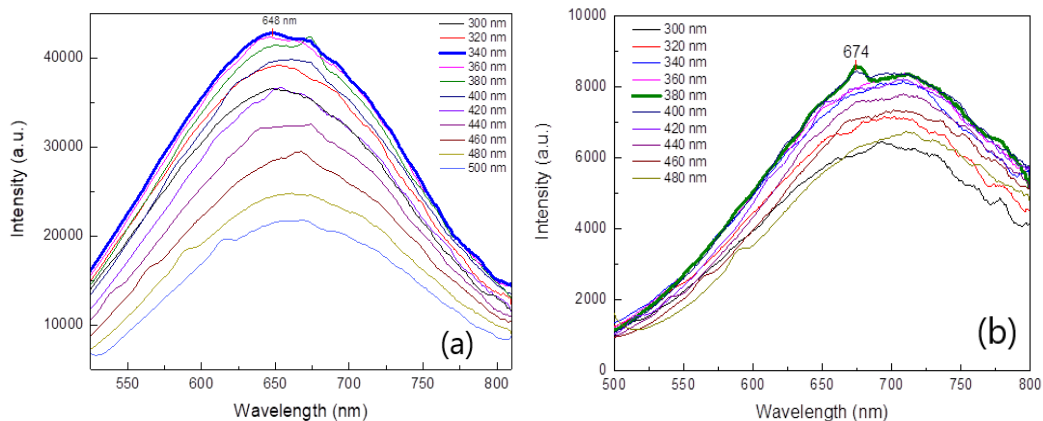
2. 螢光光譜圖



圖十七、石墨烯量子點 (GQDs) 螢光光譜圖

由圖十七可知，合成出的 20 分鐘石墨烯量子點和 1 小時 30 分鐘石墨烯量子點 放光波長分別位於 650 nm 和 700 nm，螢光強度分別位於 40000 及 10000。

3. 改變激發光光譜圖



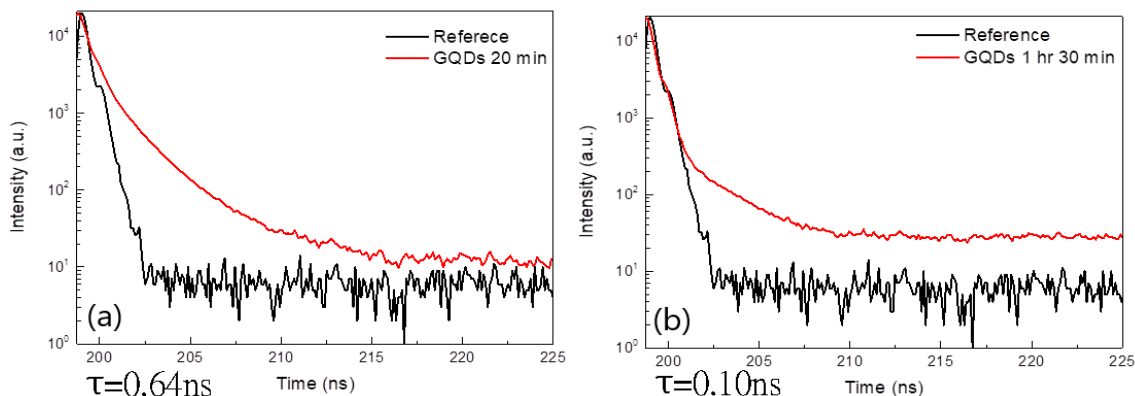
圖十八、改變不同激發光的石墨烯量子點 (GQDs) 螢光光譜圖

(a) 20 分鐘 (b) 1 小時 30 分鐘

由圖十八之 (a) 可知，激發光為 340 nm 時，20 分鐘的石墨烯量子點的螢光強度最強；圖 (b) 可知，激發光為 380 nm 時，1 小時 30 分鐘的石墨烯量子點的螢光強度最強。

4. 螢光生命週期圖

以波長 360 nm 的雷射做激發，680 nm 收集放光訊號所測得。



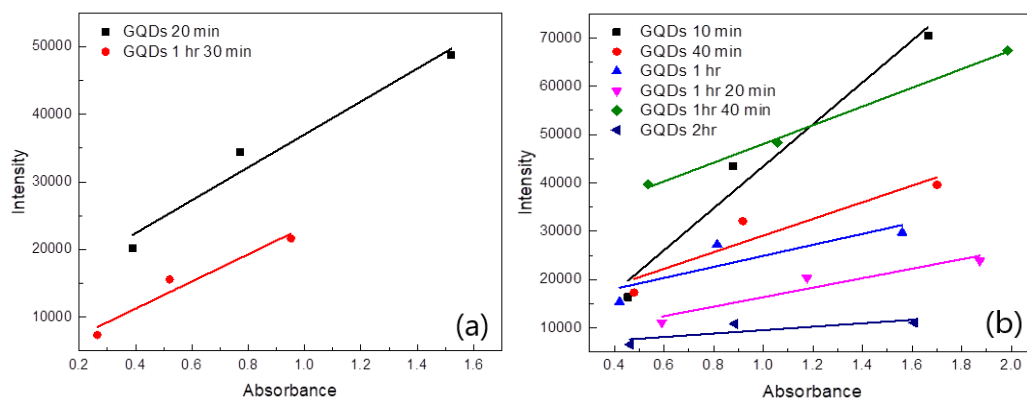
圖十九、(a) 石墨烯量子點 20 分鐘、(b) 1 小時 30 分鐘的螢光生命週期圖

(四) 量子產率

本量子產率鑑定選擇相對量子產率作為鑑定的方法，使用 5(6)-羧基-X-羅丹明作為參考材料，因其螢光放光波長大約為 600 nm，與本實驗合成之樣品大略相符，故選擇此材料作為標準，並利用樣品的螢光放光強度值與吸收值進行運算。

相對量子產率方程式：

$$QY_{sample} = QY_{ref} \times \frac{slope_{sample}}{slope_{ref}} \times \left(\frac{n_{sample}}{n_{ref}} \right)^2$$



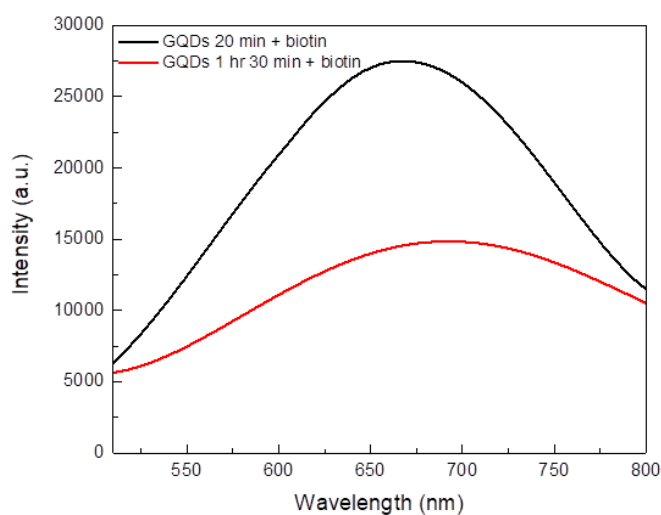
圖二十、石墨烯量子點 (GQDs) 吸收值對螢光強度的校正曲線圖 (a) 20 分鐘與 1 小時 30 分鐘的石墨烯量子點 (b) 10 分鐘、40 分鐘、1 小時、1 小時 20 分鐘、1 小時 40 分鐘、2 小時的石墨烯量子點

表七：石墨烯量子點的相對量子產率

	slope of sample	slope of reference	QY of reference	QY of sample
10 min	43454.10	1141522.38	0.43	1.64%
20 min	24344.06			0.92%
40 min	17246.76			0.65%
1 hr	11417.58			0.43%
1 hr 20 min	9832.28			0.37%
1 hr 30 min	20133.28			0.76%
1 hr 40 min	2890.20			0.11%
2 hr	3307.32			0.13%

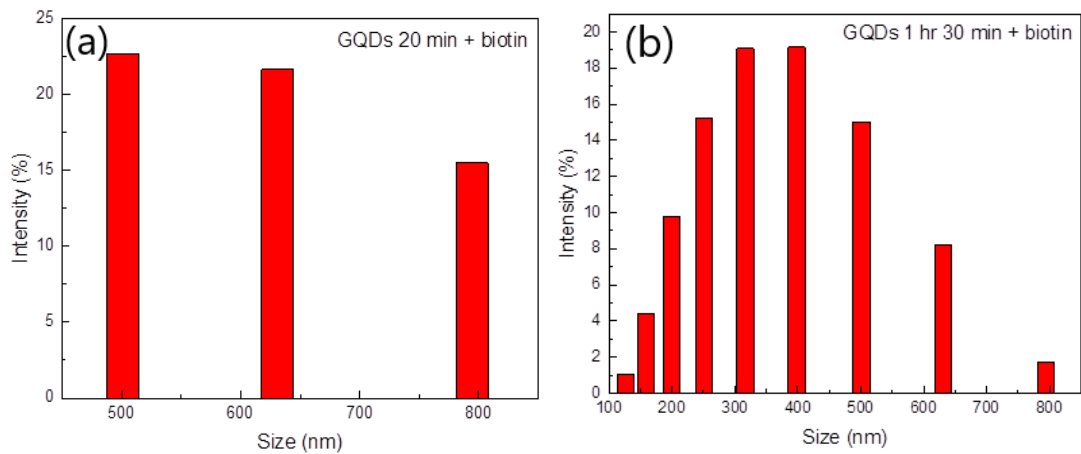
四、細胞成像

(一)將石墨烯量子點與 biotin 結合



圖二十一、石墨烯量子點 (20 min)、石墨烯量子點 (1 hr 30 min) 加入 biotin 的螢光光譜圖

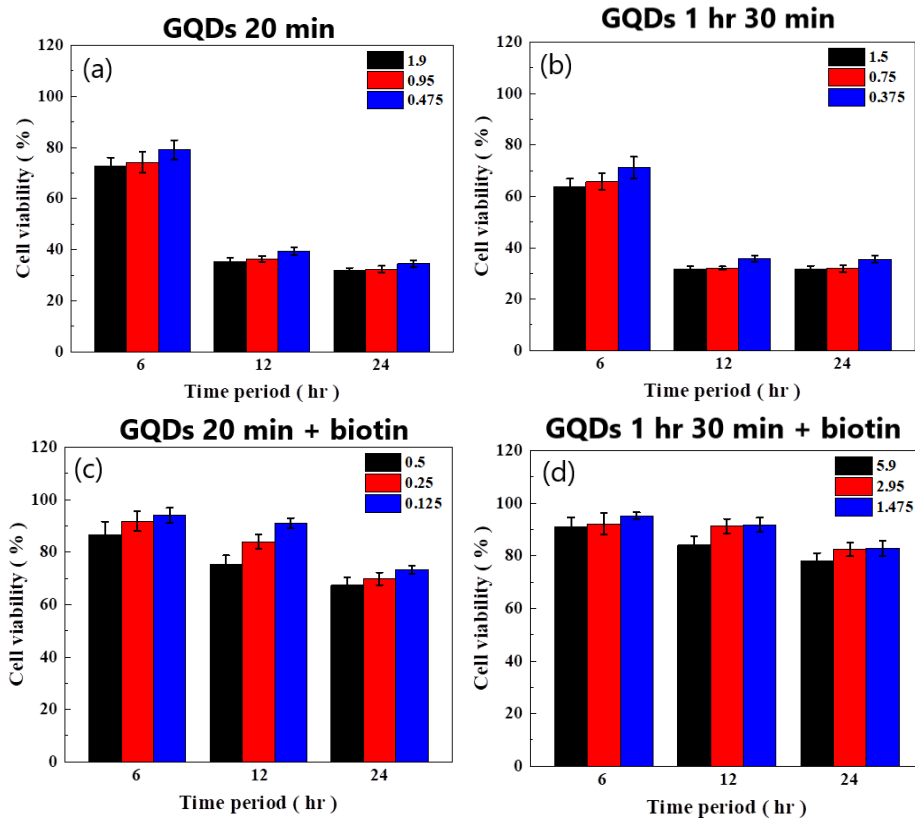
由圖二十一可得知石墨烯量子點加入 biotin 後的放光波長與原本一樣，而反應 1 hr 30 min 的石墨烯量子點的螢光強度從 10000 提升至 15000。



圖二十二、石墨烯量子點的粒徑分析圖 (a) 石墨烯量子點 (20 min)、(b) 石墨烯量子點 (1 hr 30 min) 加入 biotin

由圖二十二可得知加了 biotin 後大小變大了。

(二) 細胞毒性測試 (MTT)



圖二十三、石墨烯量子點 (GQDs) 的細胞存活率分析圖 (樣品濃度單位: mg/mL)

(a) 石墨烯量子點 20 min、(b) 石墨烯量子點 1 hr 30 min、(c) 石墨烯量子點 20 min + biotin、(d) 石墨烯量子點 1 hr 30 min + biotin

由圖二十三可得知細胞在 0.25 倍的石墨烯量子點中存活率較高, 1 倍時較低。在六小時以前, 細胞的存活率可達到 8 成以上, 隨著時間增加, 細胞的存活率越低。

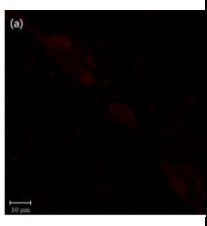
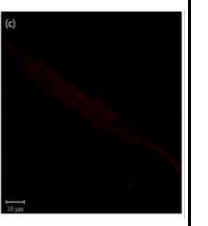
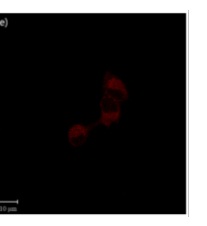
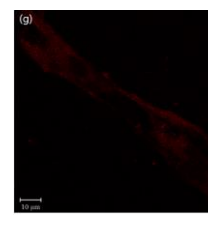
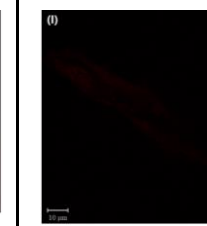
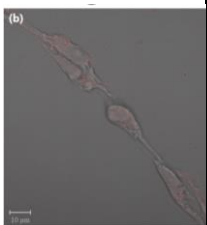
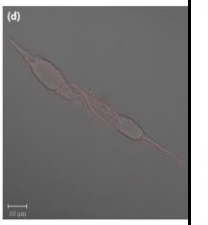
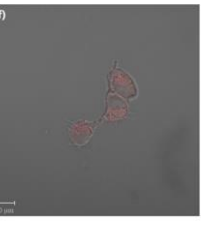
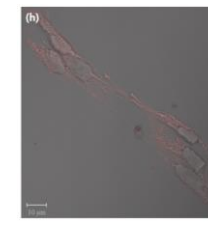
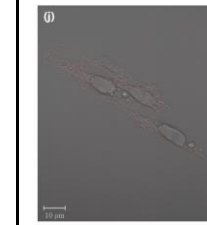
表八、為原濃度的一半的石墨烯量子點 (20 min、1 hr 30 min、20 min + biotin、1 hr 30 min + biotin)與細胞胞吞後隨時間變化的存活率(%)

0.5 X	6 hr	12 hr	24 hr
20 min	75	38	36
1 hr 30 min	66	32	33
20 min + biotin	91	83	70
1 hr 30 min + biotin	91	93	81

由表中數據可得知，石墨烯量子點加入 biotin 後，細胞的存活率提高，推測原因為，合成石墨烯量子點時，離心後的下清溶液含有氧化石墨烯，而氧化石墨烯表面上的官能基可能會使細胞較難存活。加入 biotin 後，NH₂ 分子會與官能基連接，因此細胞存活率較高。由此可知，石墨烯量子點加入 biotin 後，細胞的存活率提高。

(三) 細胞成像鑑定

表九、石墨烯量子點經 HeLa 細胞胞吞 2.5 hr confocal 成像圖

	GQDs 20 min	GQDs 20 min + biotin	GQDs 1 hr 30 min	GQDs 1 hr 30 min + biotin	HeLa Cell
Dark Field					
Bright Field					

由表八可知還沒加石墨烯量子點時細胞放的紅光較弱，加了石墨烯量子點後紅光變得較強，由此可知，細胞與石墨烯量子點成功結合。

柒、結論

一、結論

- (一)氧化石墨烯透過硫脲和過氧化氫的切割合成出零維度的石墨烯量子點。
- (二)藉由反應時間的不同改變能隙寬度得到放光 700 nm 的石墨烯量子點。
- (三) Top-down 方法可大量生產石墨烯量子點，且成本低。
- (四)由於合成過程中不含重金屬，因此合成的量子點是環保的螢光材料。
- (五)細胞能與放紅光的石墨烯量子點結合並發光。
- (六)由實驗結果可得知石墨烯量子點加上 biotin 能使細胞存活率提高。
- (七)由上述數據能確定細胞進行胞吞作用，使得細胞質的地方能觀察到石墨烯量子點的螢光，在後續實驗中想利用 GQDs + biotin 上的 biotin 與 streptavidin 有很強的專一性鍵結，進行專一位置的標記。

二、應用

(一)癌症治療:

合成具有專一性的顯影劑可以在注射後標記出癌細胞的位置，較以往的電腦斷層快速許多。例如：注射肝細胞特異性磁振造影顯影劑後可以經由肝細胞特殊管道 (OATP) 進入肝細胞，正常的肝細胞會呈現白色，而癌細胞呈現黑色，對比之下快速找出難以發現小肝癌細胞；透過染色定位技術，顯影劑注射並集中在腫瘤組織，手術時在近紅外光照射下，會呈現螢光反應，在切除癌細胞的同時，避免健康組織被誤切。

(二) 近紅外光熱療法:

近紅外光產生的熱效應有助於減緩深層組織的炎症，鎮靜止痛，並可改善人體微循環。紅外光可穿透較深層的皮膚，可被細胞色素 C 氧化酶 (COX) 吸收而激活線粒體呼吸作用，提高粒線體產能效，因而減少因老化所誘導之視神經退化。

捌、參考資料及其他

1. Chia-Chun Ke , Ya-Chun Yang , and Wei-Lung Tseng(2015)Synthesis of Blue-, Green-, Yellow-, and Red-EmittingGraphene-Quantum-Dot-Based Nanomaterials withExcitation-Independent Emission
2. Disi Lu, Zhaozhu Zheng, Shaozhe Guo, Cheng Wang,David L. Kaplan, and Xiaoqin Wang(2015).Binding Quantum Dots to Silk Biomaterials for Optical Sensing
3. Xin Ting Zheng , Arundithi Ananthanarayanan , Kathy Qian Luo , and Peng Chen (2014).Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots:Properties, Syntheses, and Biological Applications
4. Nongnut Sasithorn and Lenka Martinová(2012).Effect of calcium chloride on electrospinning of silk fibroin nanofibers
5. Qi Wang, Shengjie Ling, Xiaoping Liang, Huimin Wang, Haojie Lu, and Yingying Zhang(2019).Self-Healable Multifunctional Electronic Tattoos Based on Silk and Graphene
6. Thanh Jin Suk Truong Chung a, Dang a, Viet Hung Pham a, Seung Hyun Hur a, Eui Jung Kim a, Byung-Seon Kong (2012). Superior dispersion of highly reduced graphene oxide in N,N-dimethylformamide
7. Muqiang Jian, Kailun Xia, Qi Wang, Zhe Yin, Huimin Wang, Chunya Wang,Huanhuan Xie, Mingchao Zhang, and Yingying Zhang(2016).Flexible and Highly Sensitive Pressure Sensors Basedon Bionic Hierarchical Structures
8. Se Youn Cho,Moataz Abdulhafez, Min Eui Lee, Hyoung-Joon Jin, and Mostafa Bedewy(2018)Promoting Helix-Rich Structure in Silk Fibroin Films throughMolecular Interactions with Carbon Nanotubes and SelectiveHeating for Transparent Biodegradable Devices
9. Xiaopeng Huang, Virendra K. Parashar, and Martin A. M. Gijs(2019).Spontaneous Formation of CdSe Photoluminescent Nanotubes withVisible-Light Photocatalytic Performance
10. Joe Hodkiewicz, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA.Characterizing Graphene with Raman Spectroscopy

【評語】 052412

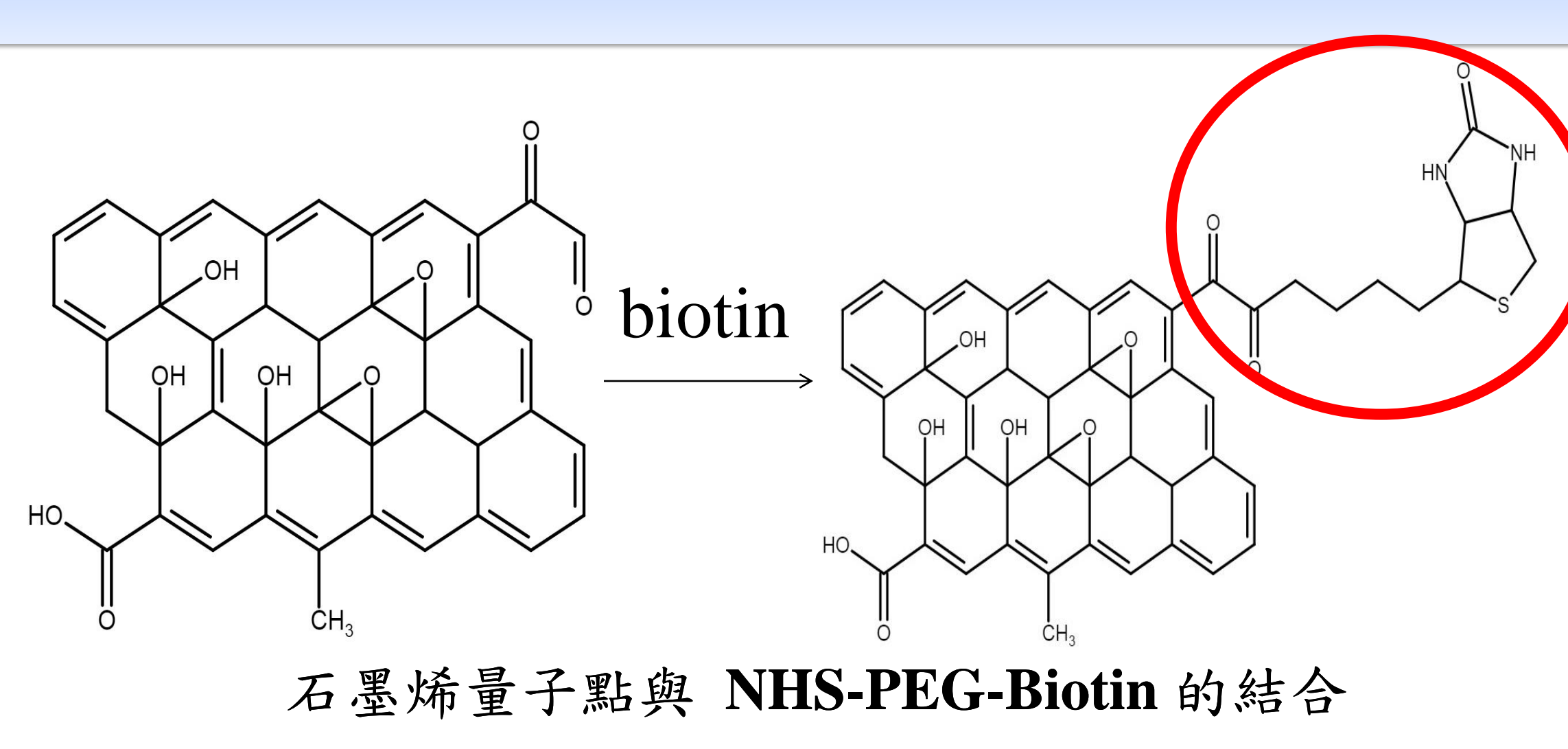
本作品利用強氧化劑和硫脲將氧化石墨烯(GO)水熱裂解成石墨烯量子點(GQDs)，進而結合生物素(biotin)，獲得 GQDs/biotin，並將其注射至細胞中，藉由 GODs 放出紅外線螢光特點，探索其於細胞顯影劑之應用。實驗流程規劃清晰，實驗結果呈現圖表亦屬清晰，惟討論可再深入。作者在石墨烯量子點的製作上，大致依據文獻，而為了使石墨烯量子點有更好的生物相容性，作者以石墨烯量子點表面之官能基，透過羧基與 biotin 的 NHS 結合，獲得 GQDs/biotin，則是本作品較為關鍵的步驟。作者達成細胞成像，也得到還不錯的細胞存活率之初步成果，持續探索與精進，未來應有潛力發展出對身體傷害較少、顯影力較強及毒性小的顯影劑，本作品是對醫療診斷具有參考價值的研究。

壹、研究動機

我們想做出對身體傷害較少、顯影力較強及毒性小的顯影劑，因此以低毒性的方式合成石墨烯量子點，並將其發紅光的特性運用在細胞成像，希望能及早檢測出癌細胞，並降低切除健康細胞的機率。

貳、研究目的

- 一、合成氧化石墨烯(GO)、石墨烯量子點(GQDs)
- 二、改變石墨烯量子點的反應變因
- 三、合成放光波長至近紅外光的石墨烯量子點
- 四、探討細胞吞石墨烯量子點在生物成像方面的應用

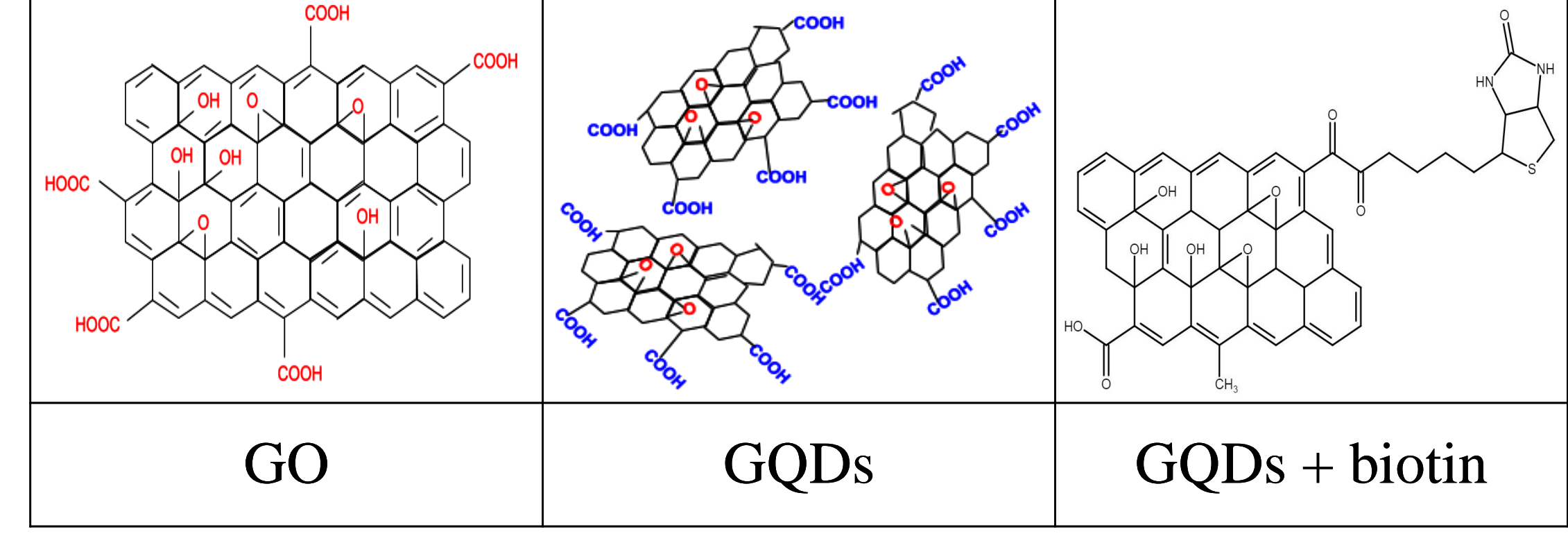
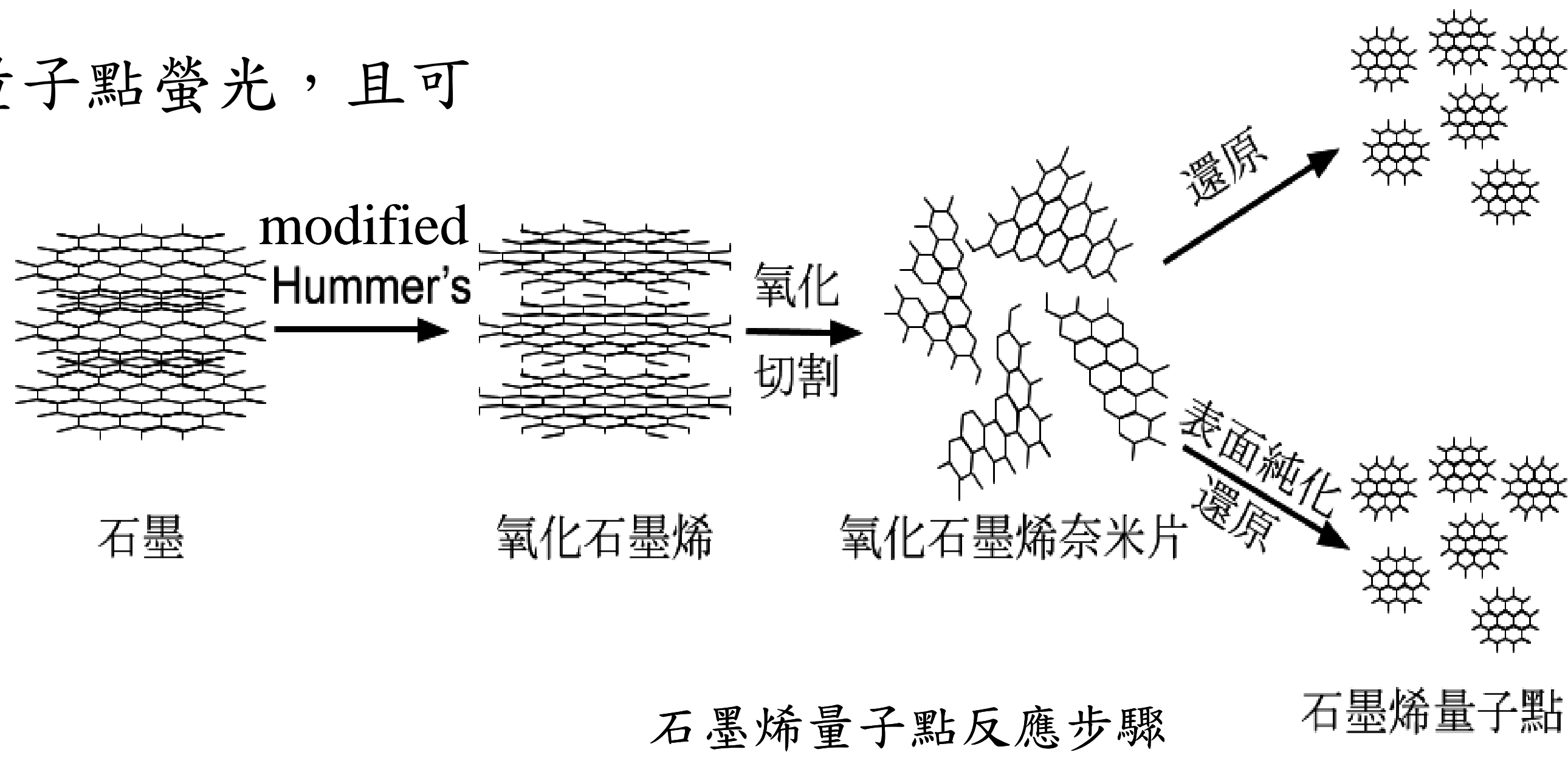


● 一般量子點之缺點:

1. 參雜重金屬:造成環境汙染、不適合應用於生物上
2. 反應時高溫且時間長，成本高

● 硫脲參雜石墨烯量子點:

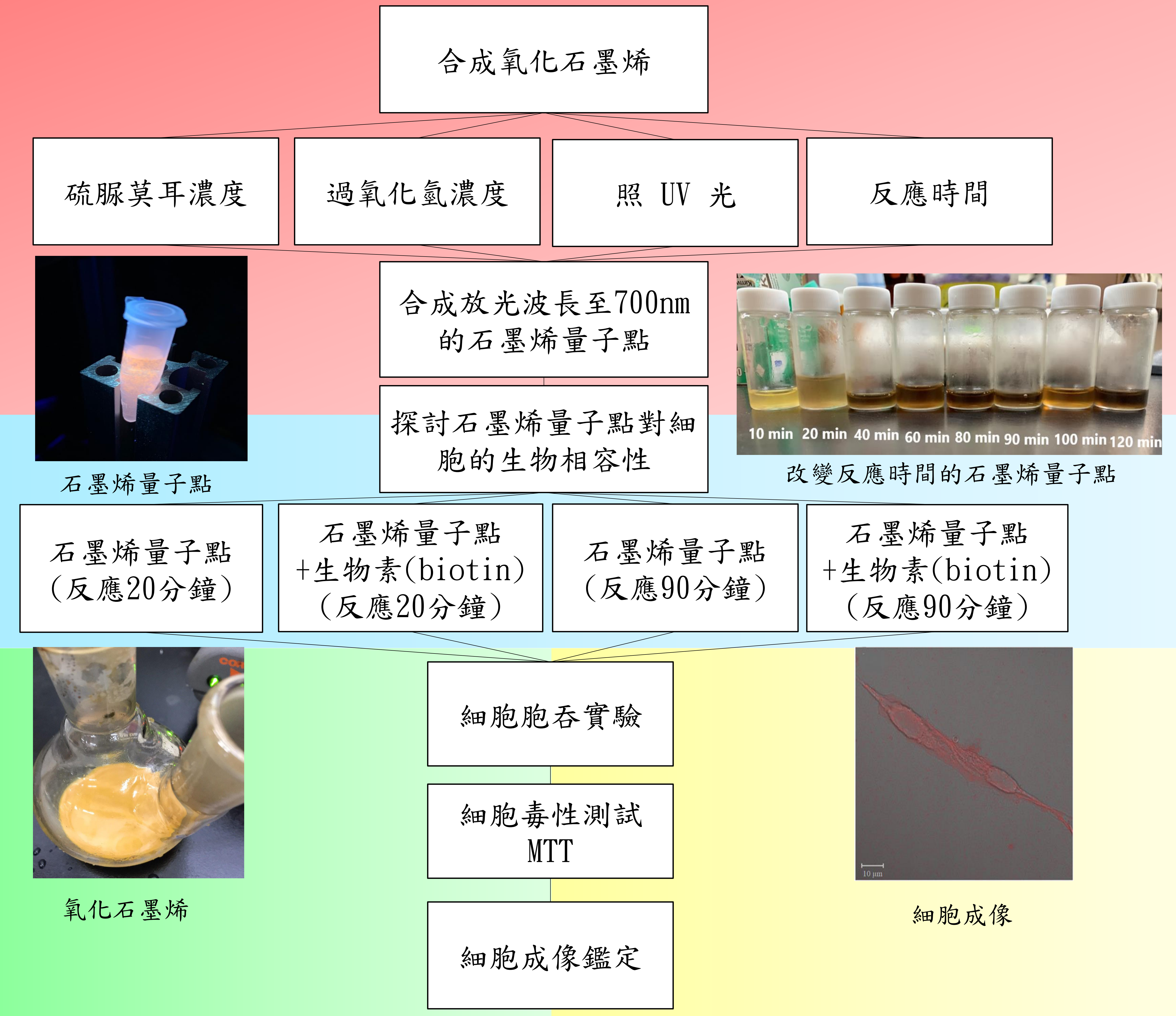
1. 放光波長 700 奈米，可區分細胞自體螢光和量子點螢光，且可穿透至深層皮膚，對皮膚的影響較小
2. 合成方式無毒性，具有良好的生物相容性



參、實驗器材

儀器							藥品					
拉曼光譜儀	螢光分光光譜儀	吸收光譜儀	穿透式電子顯微鏡 (TEM)	螢光生命週期分析儀	原子力顯微鏡 (AFM)	奈米雷射粒徑分析儀 (DLS)	ELISA reader	氧化石墨烯 (GO)	硫脲	過氧化氫	生物素 (NHS-PEG-Biotin)	Hela 細胞

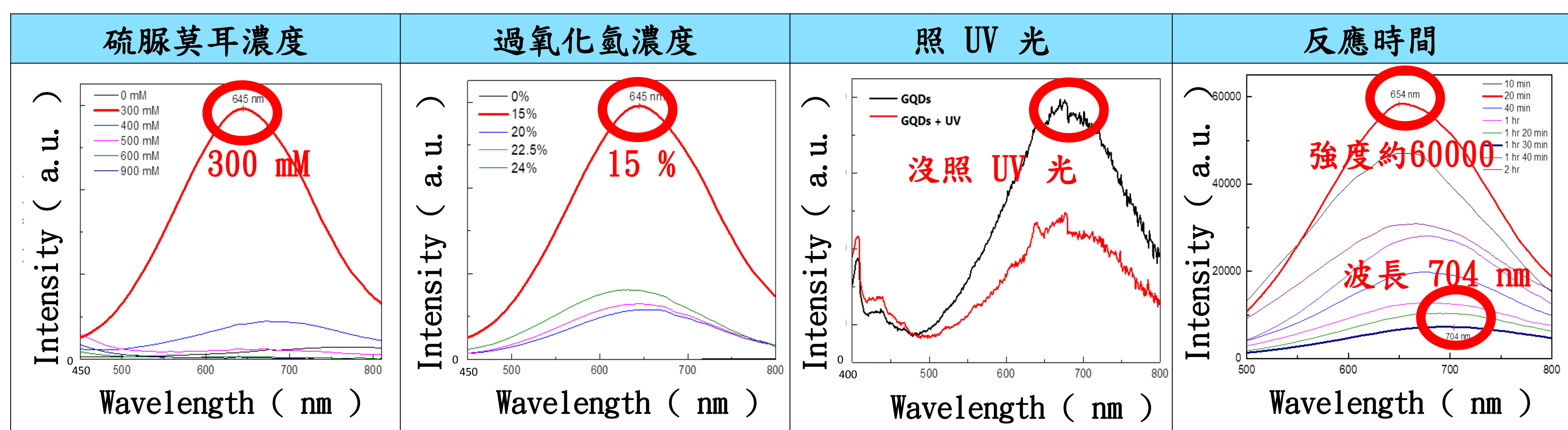
肆、研究流程



伍、研究結果

一、石墨烯量子點(GQDs)合成

改變變因：硫脲莫耳濃度、雙氧水濃度、照 UV 光、反應時間

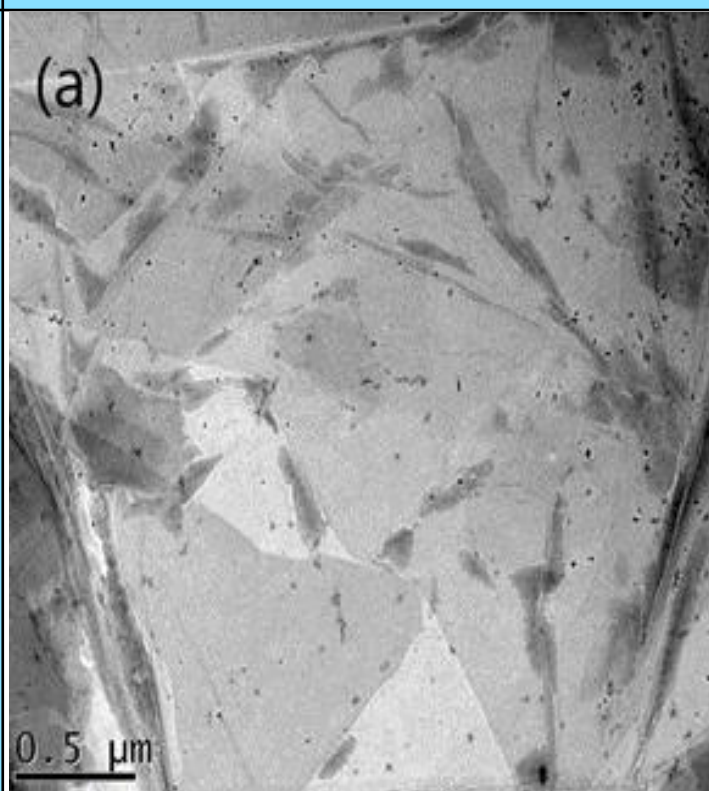
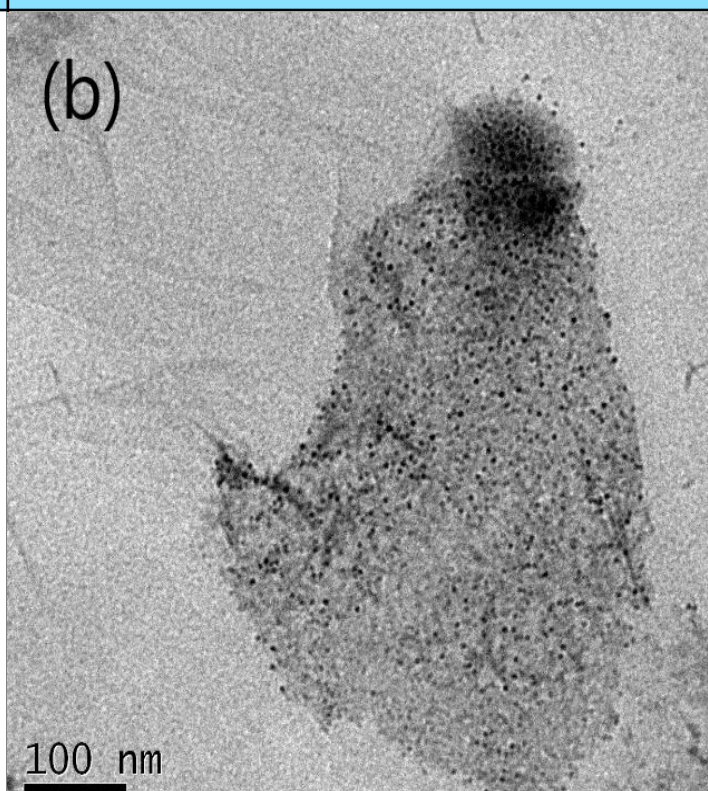
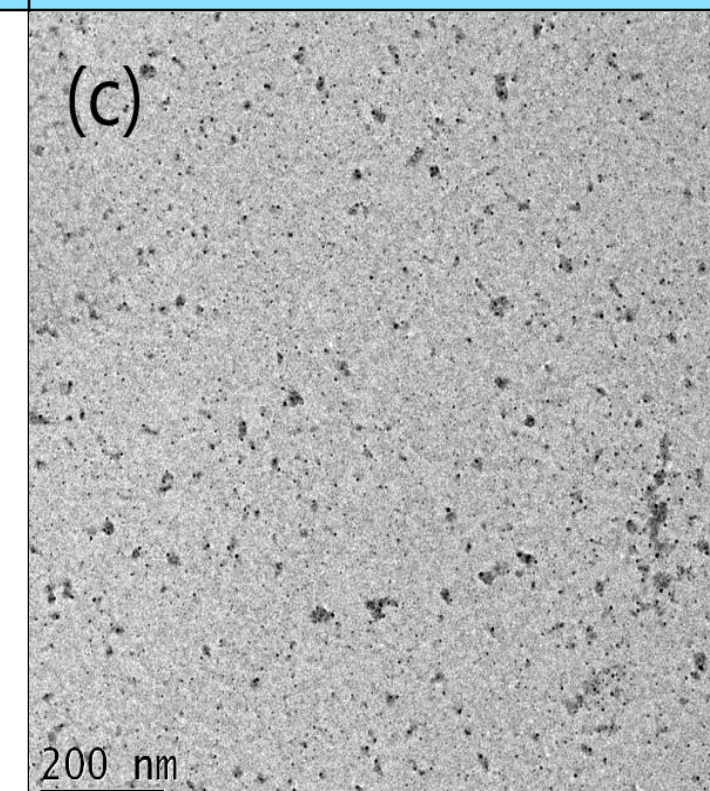
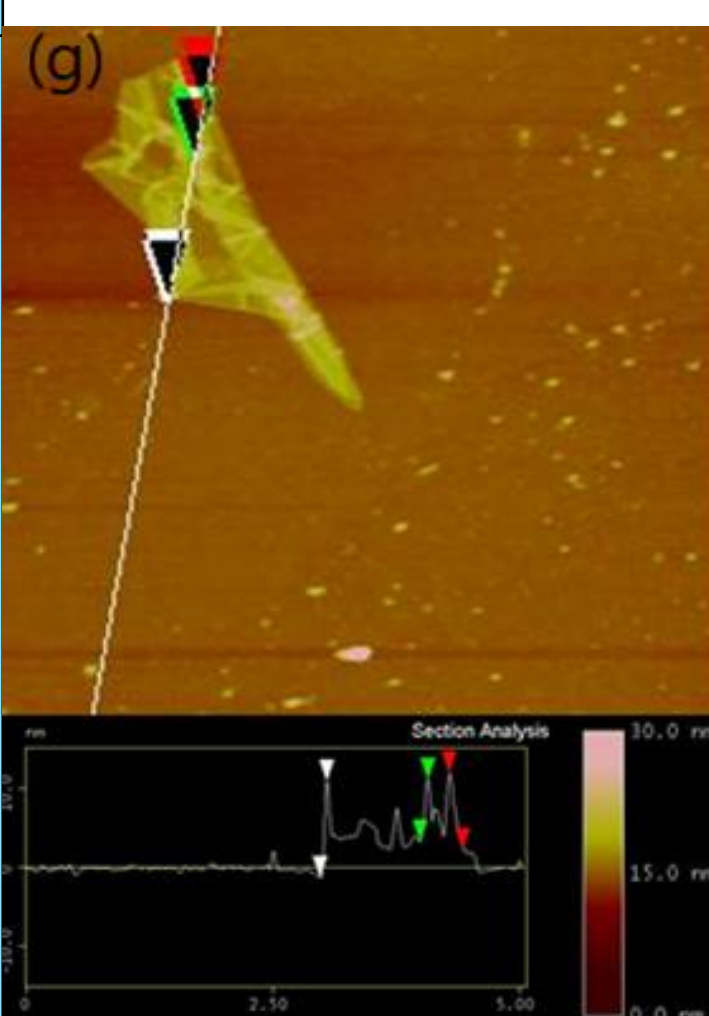
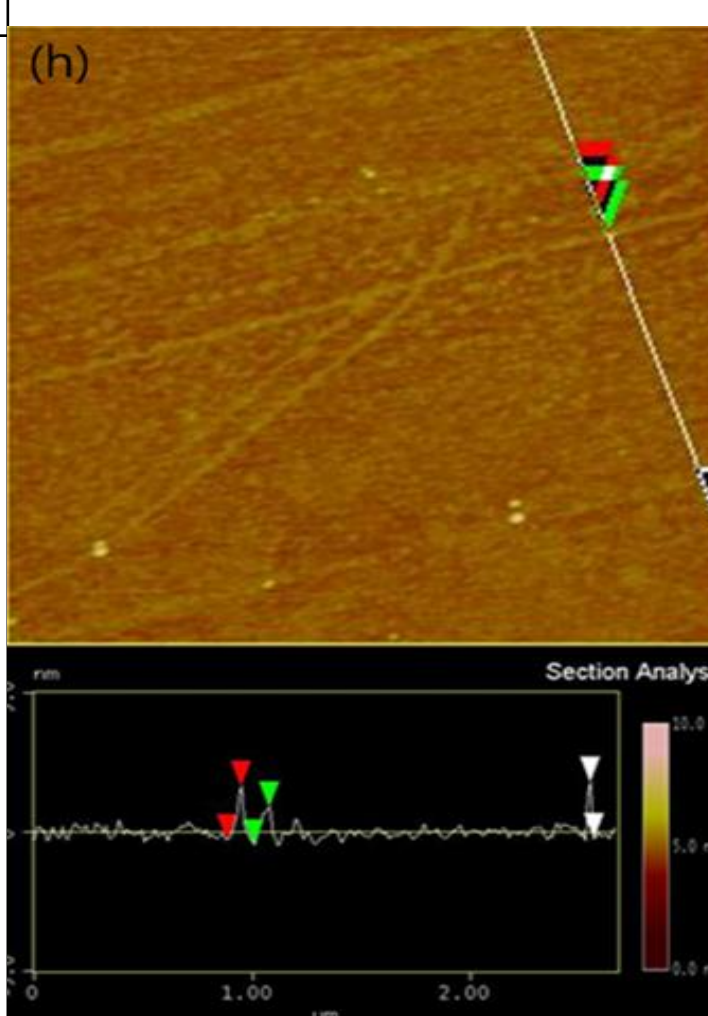
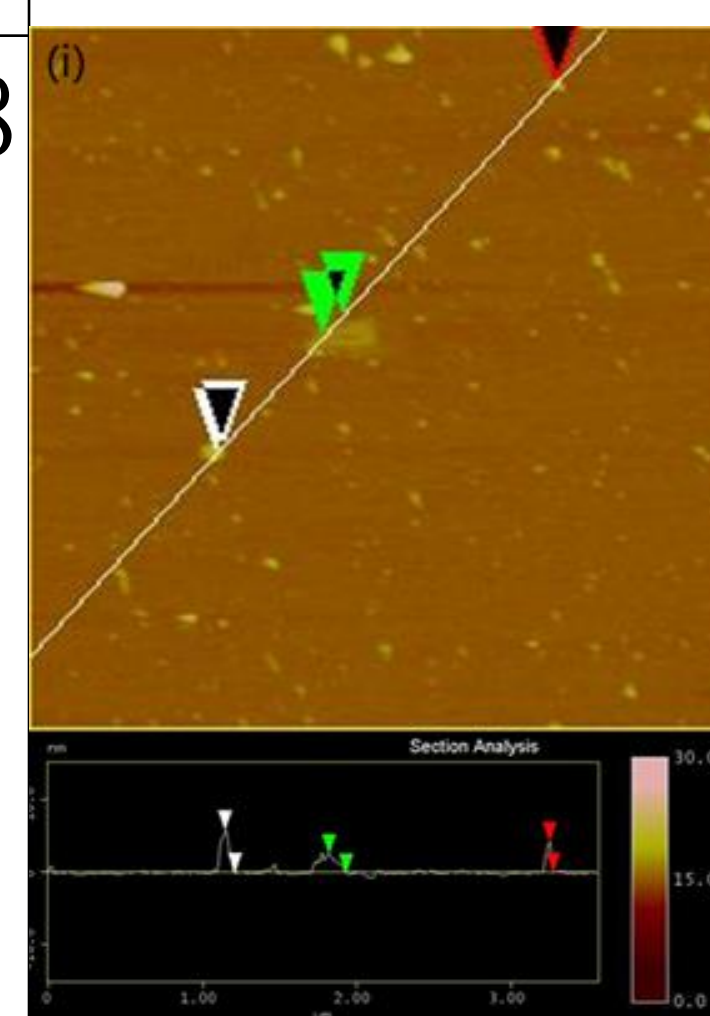


因此本實驗選擇使用：
 硫脲莫耳濃度 300 mM、過氧化氫濃度 15%、沒照 UV 光
 之條件，進行改變反應時間的實驗

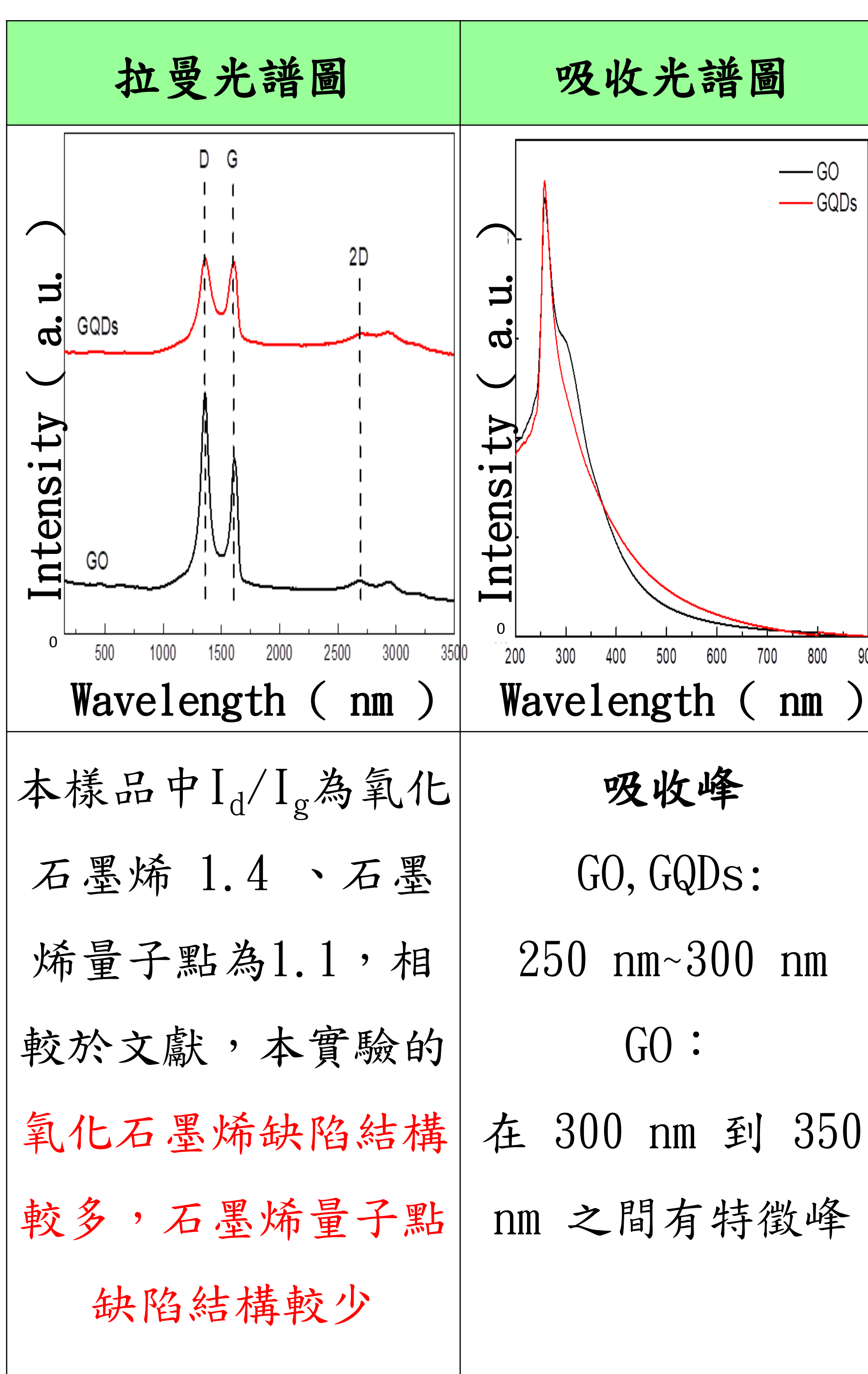
選擇反應
 1 小時 30 分鐘
 20 分鐘
 當作實驗樣品

三、材料鑑定

(一)物理性質鑑定

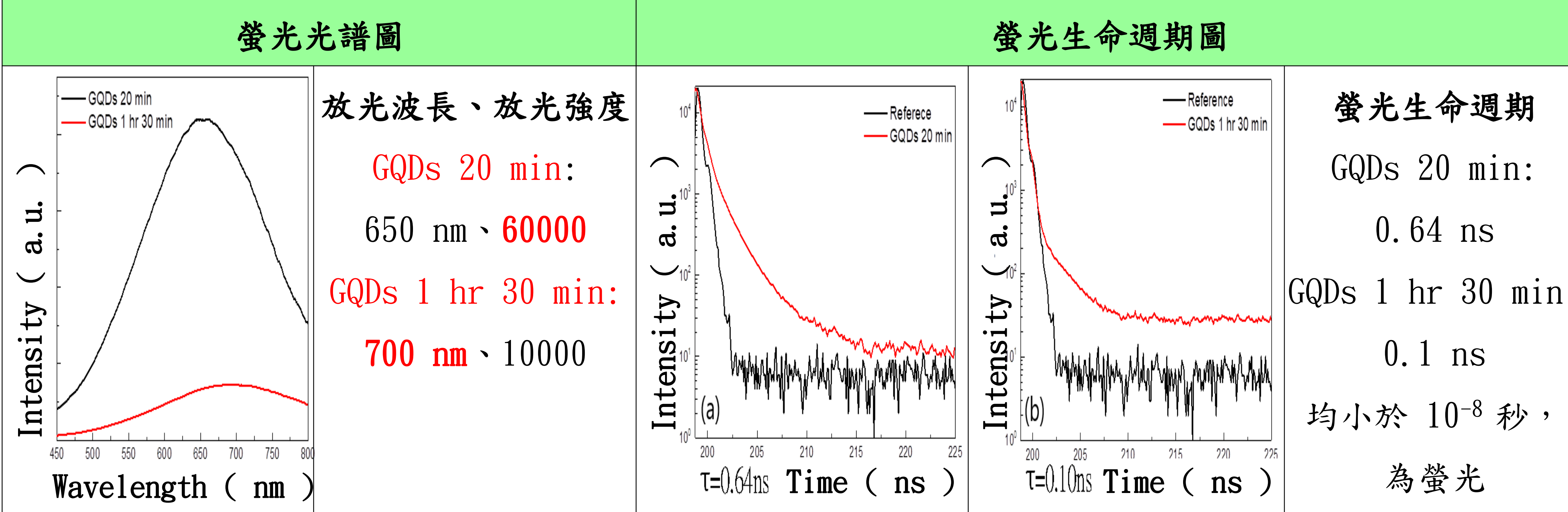
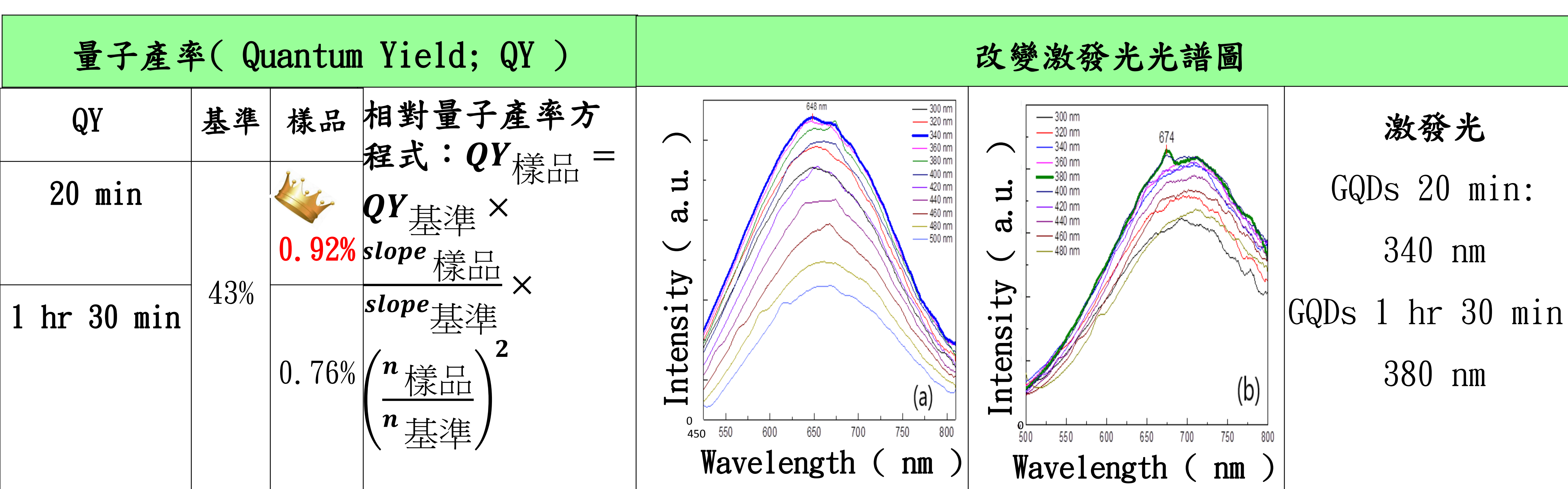
種類	GO	GQDs 20 min	GQDs 1 hr 30 min
TEM	 片狀	 尚有片狀	 無片狀
DLS	約 10637 nm	約 665.1 nm	約 367.3 nm
AFM	 2.2 nm 雙層	 1.8 nm	 2.6 nm

(二)氧化石墨烯鑑定

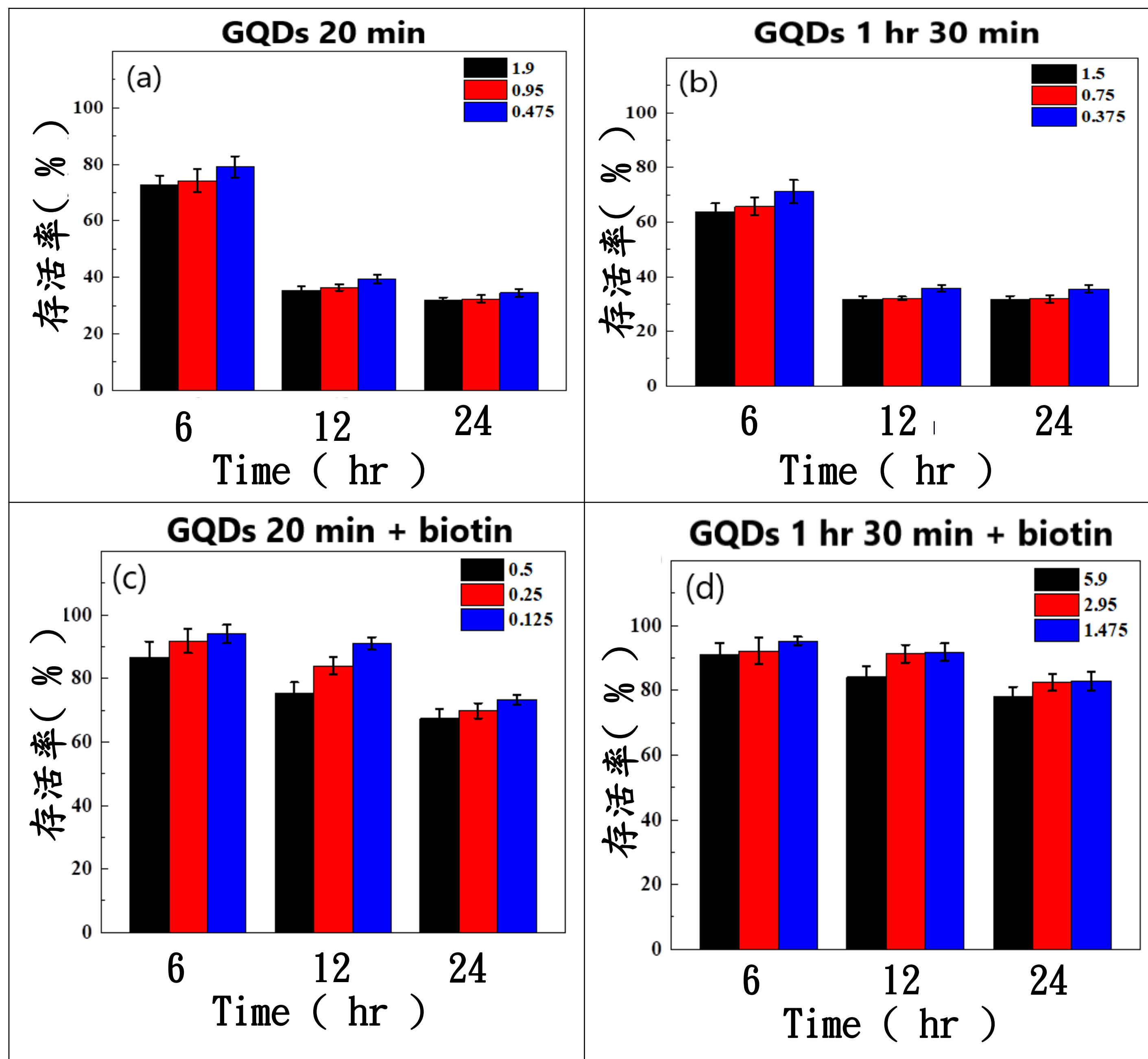


GO 為大塊片狀的材料，隨反應時間增加，材料逐漸變小，反應到 1 小時 30 分鐘時材料已沒有片狀，代表完全反應

(四)光譜圖鑑定



(二) 細胞毒性測試 (MTT)：細胞隨時間存活率的變化之長條圖



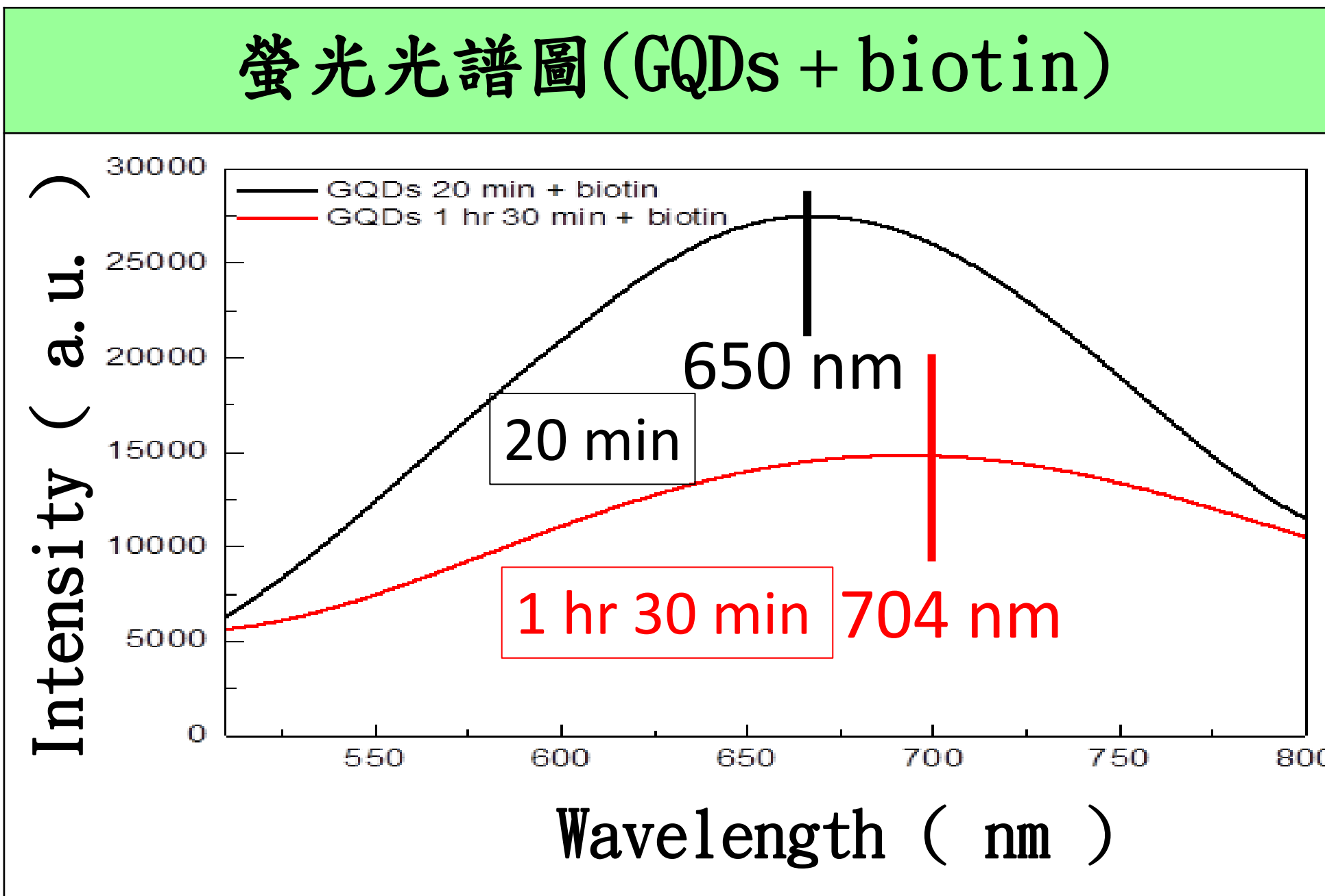
細胞加入 GQDs 後的存活率：
0.25 倍藥品最高、1 倍藥品時最低，6 小時前可達到 8 成以上，隨著時間增加，細胞的存活率越低

四、細胞成像

(一) 石墨烯量子點與 biotin 結合

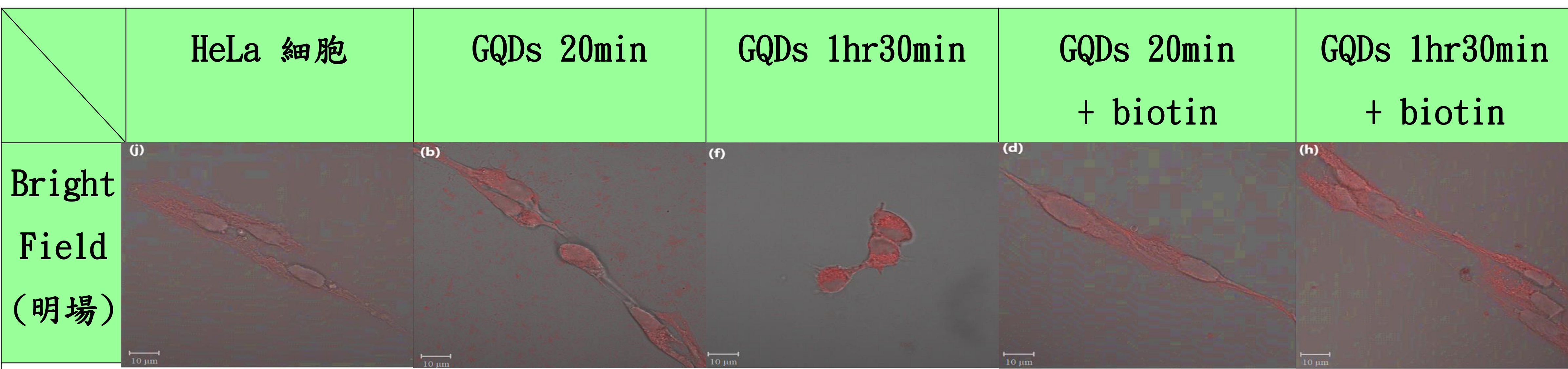
DLS	20 min	1 hr 30 min
未加 biotin	665.1 nm	367.3 nm
加入 biotin	746.6 nm	433.3 nm

大小均變大，可知與 biotin 成功結合



加入 biotin 後量子點放光波長不變

(三) 細胞成像鑑定(加入 GQDs 與否)

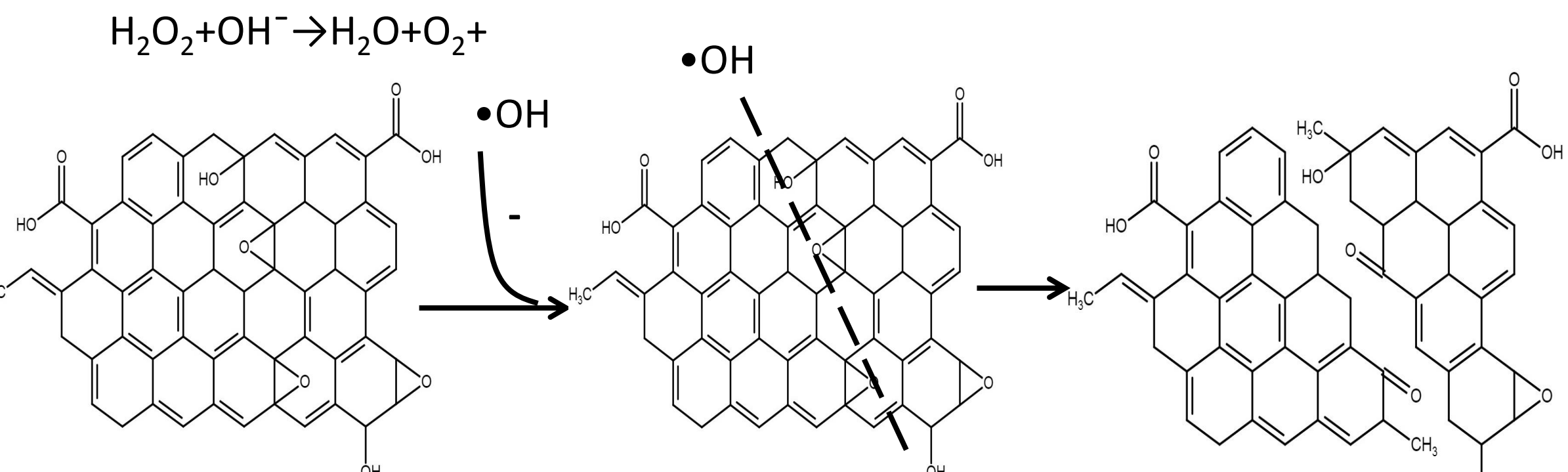


加了 GQDs 後紅光變得較強，可知細胞與石墨烯量子點成功結合

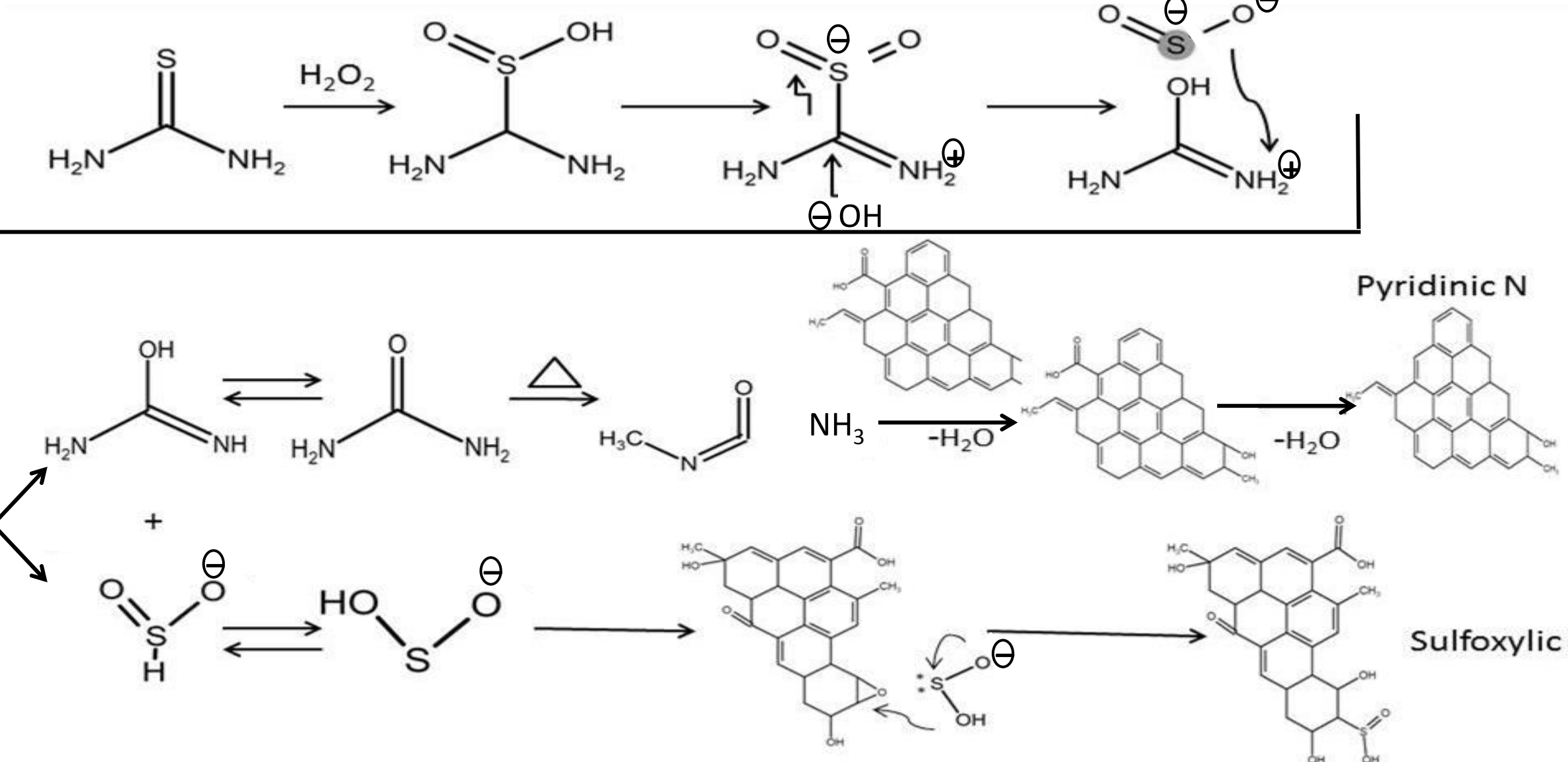
陸、討論

一、合成石墨烯量子點

反應機構 1：雙氧水裂解氧化石墨烯



反應機構 2：硫、氮參雜在石墨烯量子點



二、細胞成像

石墨烯量子點加入 biotin 後，細胞的存活率提高。

柒、結論

一、合成放光至近紅外光的石墨烯量子點

反應時間	20 分鐘	1 小時 30 分鐘
放光波長	654 奈米	704 奈米
螢光強度	近 60000 a.u.	近 15000 a.u.

本研究使用以上石墨烯量子點做為細胞成像材料

二、和市面上量子點之比較

比較對象	石墨烯量子點	重金屬參雜量子點
放光波長	600~700 nm	約 600 nm
材料	石墨、硫脲	碲化鎘、硫化銀
量子產率	0.76~0.92 %	97.2 ± 2.5 %

三、加 biotin 與否之比較

材料	存活率	隨時間增加的存活率
含 biotin	9成以上	維持在8至9成
不含 biotin	6至7成	迅速降低至3成

石墨烯量子點加上 biotin 能使細胞存活率提高

石墨烯量子點較適合生物應用，且低毒性

本研究材料低污染且具有優良的生物相容性

捌、參考資料及其他

- Chia-Chun Ke, Ya-Chun Yang, and Wei-Lung Tseng(2015)Synthesis of Blue-, Green-, Yellow-, and Red-Emitting Graphene-Quantum-Dot-Based Nanomaterials with Excitation-Independent Emission
- Jin, S. H. ; Kim, D. H. ; Jun, G. H. ; Hong, S. H. ; Jeon, S., Tuning the Photoluminescence of Graphene Quantum Dots through the Charge Transfer Effect of Functional Groups. ACS Nano 2013, 7(2), 1239-1245.