

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080005

參展科別 生物化學

作品名稱 新穎「螢光素酶—螢光奈米鑽石」細胞化驗
機制標記於人類間葉幹細胞之藥物篩選應
用與研究

得獎獎項 大會獎：二等獎
出國正選代表

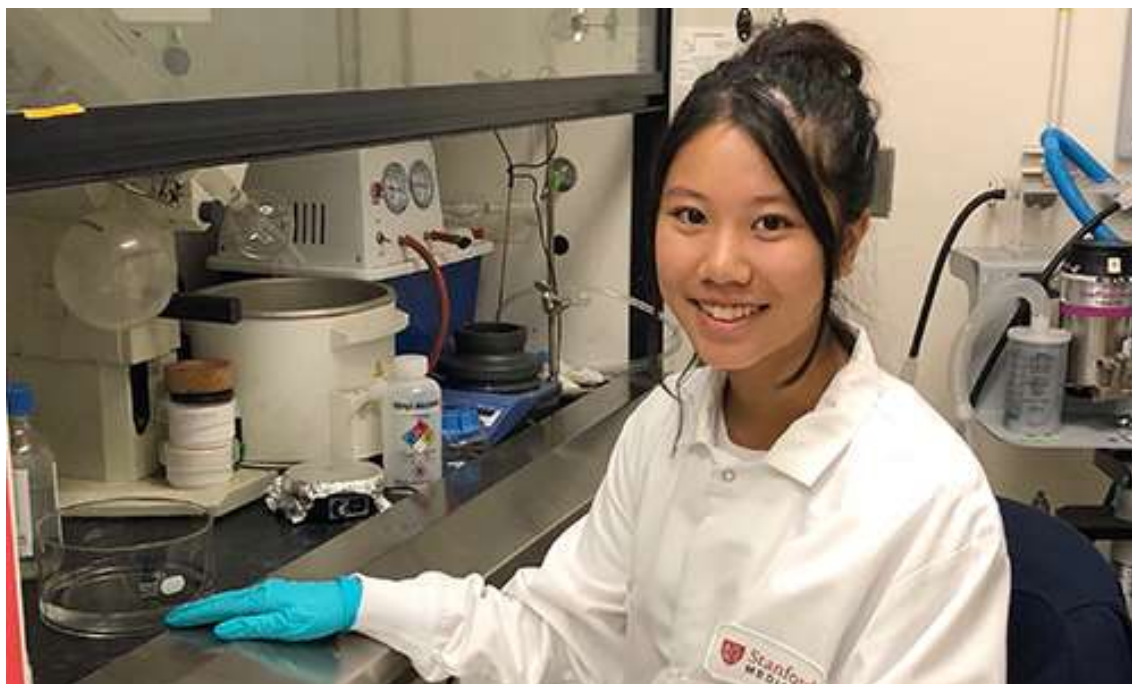
就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣、蘇隆峻

作者姓名 鄭舒允

關鍵詞 螢光奈米鑽石(FluorescentNanodiamond)、
螢光素酶(Luciferase)、
人體間葉幹細胞(MesenchymalStemCells)

作者簡介



我是台北市私立復興實驗高級中學雙語部高二學生，我從小學開始參加科展，中學參加奧林匹亞競賽，在這過程中發掘了我對科學的興趣，近幾年暑假都在台灣和美國的實驗室度過。我的夢想是希望有一天能憑藉著我對科學的熱忱，站上國際舞台，並能夠幫助到有需要的人們。

我想感謝在這條路上幫助過我的每一個人，更要感謝中研院原分所張煥正教授實驗室裡每位學長姐和校內指導教師馬瑪宣老師，以及一直支持我的師長與父母！

摘要

本實驗提出了一個新的細胞化驗平台：結合螢光素酶和螢光奈米鑽石（Luciferase-Fluorescent Nanodiamond；Luc-FND）用來高靈敏檢測極少數量的細胞，克服人體間葉幹細胞（Mesenchymal Stem Cell; MSC）的數量稀少以及來源取得困難的問題。本實驗開發的 Luc-FND assay，不同於以往的 Luciferase assay，Luc-FND assay 利用了 FND 當奈米載體（約為 100nm），將裹上的螢光素酶送入細胞後監測細胞內冷光強度，用以得知細胞吞作用的多寡，進一步推算出細胞的存活率。本實驗將此機制應用於被不同濃度的化療用藥阿黴素（Doxorubicin；Dox）處理過的間葉幹細胞。結果顯示 Luc-FND assay 能夠高靈敏的檢測 Dox 對於間葉幹細胞的毒性，僅用 1×10^3 個細胞就能測出低至 $0.3125\mu\text{M}$ 的 Dox 劑量。本研究結果顯示，Luc-FND 複合物是一種高效能的生醫工具，可將生物發光蛋白均質傳遞到間葉幹細胞中，提供了一種檢測和驗證治療成果的新方法。

Abstract

This report proposes a novel cytotoxicity assay that combines luciferase (Luc) and fluorescent nanodiamonds (FND) to detect a very small number of cells with high sensitivity in order to perform sensitive drug screening on human mesenchymal stem cells. This novel cell assay can reach drug screening with only requiring 1×10^3 MSCs per well and as low as $10^{-1} \mu\text{M}$ of Doxorubicin (Dox), or more commonly known as Adriamycin, a widely-used chemotherapy drug, per well treatment. This report seeks to solve the problem of the low tolerance of MSCs towards Dox and the scarcity of MSCs with the proposed novel Luc-FND assay.

In this report, luciferase is first coated outside of FND to conjugate the Luc-FND hybrid in which FND can act as a protein-modified nanodevice which can directly send in the luciferase proteins without requiring DNA transfection like the conventional luciferase assay. Next, the property analysis of the newly developed cell assay is required in order to validate that the luciferase-coated FND will prevent agglomeration which can allow a rapid and homogenous cell labeling and, therefore, an accurate cell viability testing. This report also verified that Luc-FND assay can measure cell viability by testing the endocytotic activity of cells since cells uptake the Luc-FND hybrid through endocytosis. Furthermore, the application of novel Luc-FND assay on Dox-treated MSCs demonstrates that this cell assay is able to measure the difference in cell viability under a range of low Dox concentrations with only requiring 1×10^3 MSCs per well. The validation of Luc-FND assay results with conventional cell assay results shows that the absorption-based CCK-8 assay is not sensitive enough under $10^{-1} \mu\text{M}$ to $40 \mu\text{M}$ of Dox and that Annexin V+PI staining methods requires a huge demand of MSCs and has high background staining of PI.

This report suggests that this Luc-FND assay is a breakthrough and promising biomedical tool for the delivery of bioluminescent proteins into mesenchymal stem cells, which is also able to provide a novel method for detecting and validating treatments in the future.

壹、前言

一、研究動機

癌症在近年來一直都是造成人類死亡人數最高的疾病，而癌症治療也一直在醫學界持續被探討。現今最常被使用的治療方式為化療（chemotherapy）。化療雖然使用率極為廣泛，但仍有許多不足之處。例如常被使用的化療藥物阿黴素（Doxorubicin；Dox）雖能殺死癌細胞，但其伴隨的副作用卻是連健康的細胞也會被一併殺死，尤其對人體免疫系統極為重要的間葉幹細胞（mesenchymal stem cells；MSC）對此藥物的承受度極低（Baxter-Holland *et al.*, 2018）。因此，在使用藥物治療前，對於間葉幹細胞的藥物檢測，可以降低藥物對於間葉幹細胞所產生的副作用。近年來人體間葉幹細胞於實驗的使用率極高，但由於其生長緩慢以及取得不易的特性，細胞活性化驗方法如擁有高靈敏度的CCK-8 assay對於人體間葉幹細胞，若使用的人體間葉幹細胞數量不夠，則有檢測不到的問題。但因間葉幹細胞取得不易，數量少之外還生長緩慢，因此大部分市售的細胞化驗方法如在市場上已經有高靈敏度的 CCK-8 細胞化驗機制都無法敏感的測量出化療藥物對於人體間葉幹細胞的影響，所以我們需要一個新的化驗機制得以快速、靈敏、以及高效率評估藥物對於人體幹細胞的作用。而我們發現利用生物冷光（bioluminescence）結合細胞的胞吞作用（endocytosis），可以達成監控藥物對於細胞活性的影響。

生物冷光具有以下優點：1）是一項極為靈敏的技術；2）不會有背景螢光（background-free）的問題；3）不需要光的激發，只需要有機化合物以及其對應的酵素以轉換化學能到光能；4）具有廣泛的應用範圍。目前最常被使用的生物螢光是從螢火蟲身上取得的有機化合物螢光素酶（luciferase）。細胞常需要透過電穿孔（electroporation）或是脂質體媒介轉染（liposome-mediated transfection）才能獲得（uptake）螢光素酶。但電穿孔需要大量的細胞，而脂質體媒介轉染耗時且效率低，甚至還會導致基因體被外來物嵌入。

因此，若要將螢光素酶送入細胞則需要利用創新的技術。目前的文獻尚未有使用奈米化合物來將螢光素酶運輸進細胞來達成螢光標記的技術。螢光奈米鑽石（Fluorescent nanodiamond, FND）具有高生物相容性（biocompatibility）及高化學穩定性（chemical stability），所以我們決定使用FND當成運輸螢光素酶的載體（carrier）。FND之所以為一個良好的蛋白質運輸物是因為FND可以形成靜電吸引力（electrostatic attraction），分子間氫鍵（hydrogen bonding），及疏水性

吸引力 (hydrophobic attraction)，因此對於在水溶液中的蛋白質有著高親和性 (high affinity)。利用FND結合螢光素酶的運輸，不但可以達到細胞的生物螢光標記，還可以達到在使用藥物前偵測與監控細胞的功能。

二、研究背景

(一) 螢光奈米鑽石

螢光奈米鑽石 (fluorescent nanodiamond, FND) 為中央研究院所研發出的一種以sp³混成鍵結的碳原子及氮原子 (約100 ppm) 所構成的奈米等級鑽石，而FND能在波長532nm雷射激發下，發散出紅色螢光 (Chang *et al.*, 2005)。由於螢光奈米鑽石的組成物—碳與氮—皆為生物體內常見的元素，因此螢光奈米鑽石有著相當高的生物相容性 (長期在細胞與活體內追蹤及定量)。由於其氮—空缺中心 (N-V center) 之發光特性，因此可以避免使用化學螢光劑，在過強的雷射光激發下不會被光漂白 (photo-bleaching)，並具有永久不滅的螢光顯像與追蹤能力 (Hsiao *et al.*, 2016)。且因為其物理結構，FND可以避開背景螢光 (background fluorescence) 的干擾，具有高度的特異性 (Igarashi *et al.*, 2012)。另外，FND表面可做化學修飾，包含了深度嵌入化學惰性基質內的光發射器，因此它們的光學特性幾乎不受粘度 (viscosity)，pH值，和離子濃度等環境變化影響。這些特性使FND成為細胞內理想的溫度感應器。螢光奈米鑽石甚至可以廣泛用於生醫以及生物科技的領域。現今FND已被研究出可以當奈米溫度測量器等的生物應用，且正在研究如何將FND應用於更廣的範圍如CRISPR 以及癌細胞的PD-1受體。

(二) 螢光素酶 (Luciferase)

螢光素酶是一種發光的酶，存在於螢火蟲和發光的海洋或陸地微生物中。利用螢光素酶和其他發光蛋白 (例如綠色螢光蛋白) 做為可見的標記物/報告基因 (reporter gene) 已經擴展了其多功能性 (Thorne *et al.*, 2010)。螢光素酶基因融合產物的表現賦予宿主在黑暗中發光的能力。報告基因可讓附著的外源基因被表現，並使人們能夠將其定位於大多數生物的特定結構域 (domain)，細胞或胞器。上述方法有下列三個優點：1) 可以非侵入性以及非同位素 (non-isotopic) (不會有輻射) 地進行，2) 擁有易於獲得的基質，並且 3) 在沒有顯著背景螢光的情況下具有極高的靈敏度。

（三）阿黴素（Doxorubicin; Dox）

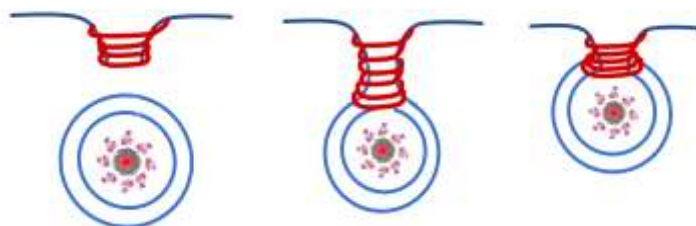
阿黴素為作用於DNA上的化療藥物，是一種Anthracycline 類抗生素，而大部分適用於抗乳癌方面的治療。Dox的抗癌機制有1）直接嵌入DNA，抑制核酸與蛋白質的合成，2）抑制topoisomerase II，防止複製與轉錄，3）和產生氫氧自由基等作用來毒殺細胞。然而間葉幹細胞對於此藥物的承受度極低，所以此藥物雖然能有效地殺死癌細胞，但跟隨的副作用卻是連帶把對人體極為重要的間葉幹細胞也一併殺死。因此想透過這個實驗，來監控不同濃度的Dox對於間葉幹細胞活性的作用。

（四）人體間葉幹細胞（Mesenchymal Stem Cell; MSC）

間葉幹細胞是目前被廣泛研究的一類幹細胞。間葉幹細胞除了可以在培養皿培養，還可以體外增殖。原先間葉幹細胞是從骨髓分離而來的，但後來發現間葉幹細胞可以從幾乎所有的結締組織分離出。此類幹細胞已被確認在免疫系統扮演重要的角色。間葉幹細胞可以被免疫細胞所釋放出的細胞激素（cytokines）所活化，而這些激素多為促發炎的細胞激素如IL1，IL2，以及TNF- α 等，進一步使間葉幹細胞啟動抗發炎反應。間葉幹細胞也是在再生醫學被廣泛討論以及應用的幹細胞，而有研究已指出可以由自體移植間葉幹細胞來治療如骨頭方面的疾病（Shyam *et al.*, 2017）。

（五）Dynasore

Dynasore是一個胞吞阻斷器，其作用機制是阻斷Dynamamin的作用。Dynamamin是一種GTPase，而這種GTPase在胞吞作用扮演不可或缺的角色。Dynasore利用抑制Dynamamin的作用域，進而抑制細胞的胞吞作用。而Dynasore除了可以抑制胞吞作用，還可以用來檢測關於細胞內訊息傳遞，細胞週期，癌症，神經疾病，以及肉毒中毒和HIV等疾病的藥物。



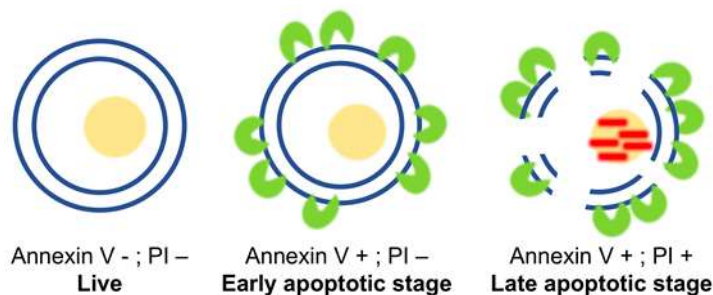
圖（1）. 圖為 Dynamin 作用機制，是以胞吞作用進行的蛋白質。

（六）CCK-8 Assay

CCK-8 細胞化驗方法是一種極高靈敏的細胞化驗比色法。CCK-8 甚至比其他常見的四氮唑（tetrazolium salts）MTT，XTT，MTS，WST-1 還要靈敏。CCK-8 的作用機制是藉由高度水溶性四氮唑（WST）的還原來改變其顏色，進一步得知細胞的存活率。高度水溶性四氮唑會被位於粒線體中的脫氫酶所還原，一但被還原，高度水溶性四氮唑會生成橘黃色的 formazan dye。因此，CCK-8 是利用細胞包內的脫氫酶活性來測得細胞的活性。CCK-8 有許多優點是其他如 MTT，XTT，MTS，WST-1 得細胞化驗機制缺乏的，例如對細胞無毒，靈敏度更高，溶解性更強，和更易於保存等。

（七）Annexin V + Propidium Iodide 染色

Annexin V + PI 的染色方法多用於測量細胞凋亡率。Annexin V 是會染磷脂絲胺酸的一種綠色染劑，而此磷脂是當細胞膜外翻時才會外露。而PI是會染細胞核的一種紅色染劑，是當細胞膜破裂時才能進入細胞內染細胞核。此機制是把雙染色的特質合併，當只有染上Annexin V 時，代表細胞正在經歷凋亡（apoptosis）初期，因為凋亡初期的細胞膜會外翻，而外露的磷脂絲胺酸會被綠色的Annexin V染上。當Annexin V以及PI 皆染上細胞時，代表細胞已經歷凋亡末期，因為此時的細胞膜不但外翻，也開始破碎，PI 才得以進入細胞染上細胞核。而當Annexin V 以及 PI 皆沒有染上細胞時，呈現出來的細胞數量代表活細胞，因為細胞膜既沒有外翻也沒有破裂。最後，當細胞只有染上PI 時，通常會解釋此類細胞為壞死（necrosis）細胞，但細胞壞死只是解釋其現象的原因之一，因為只有染上PI 代表細胞膜破裂但沒有外翻，而此現象也可能只是雜訊，所以只有染上 PI 的細胞不列入活細胞或死細胞的考量。在分析 Annexin V + PI 的圖時，只有染上PI 的細胞數會被忽略不計。



圖（2）. 圖為 Annexin V 和 PI 染色所呈現的顏色以及細胞位置，和其對應的細胞活性或凋亡狀況之意義。

三、研究目的

1. 結合 Luc-FND 來創造一個全新且敏感的 luciferase assay 以監測細胞
2. 利用創新的 Luc-FND assay 平台監測化療藥物 Dox 對於 MSC 的活性影響

貳、研究過程與方法

一、實驗流程圖

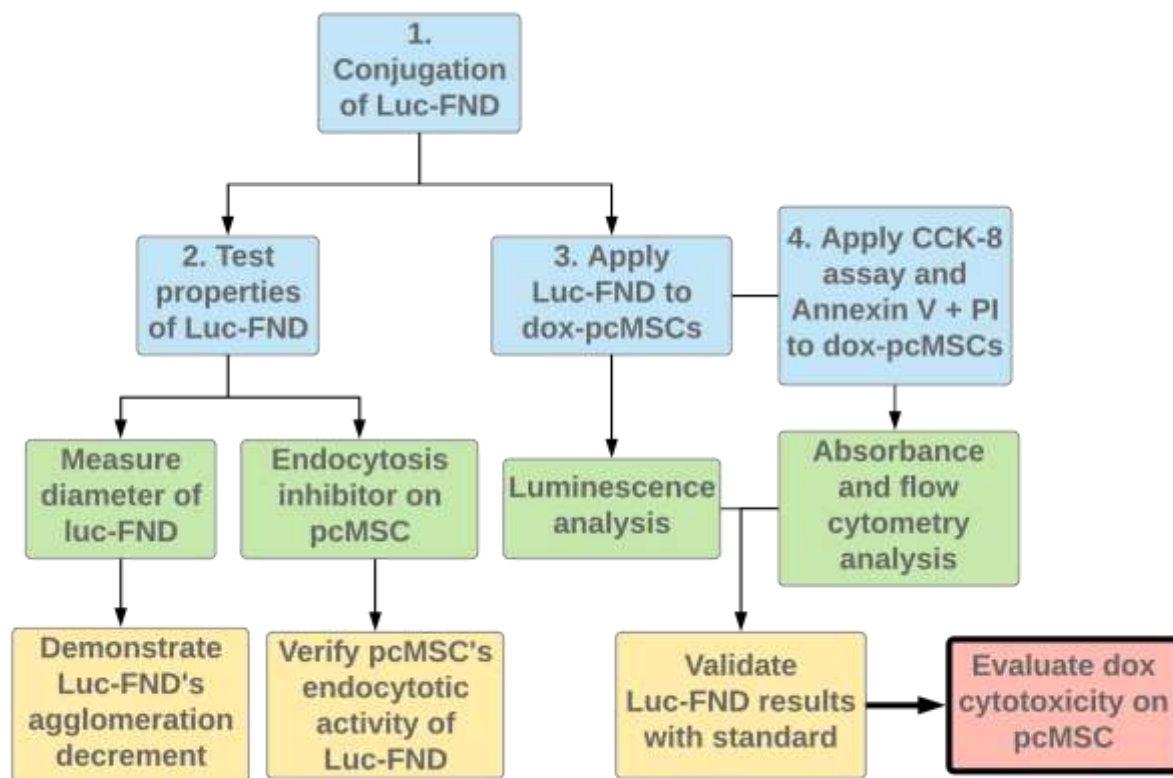
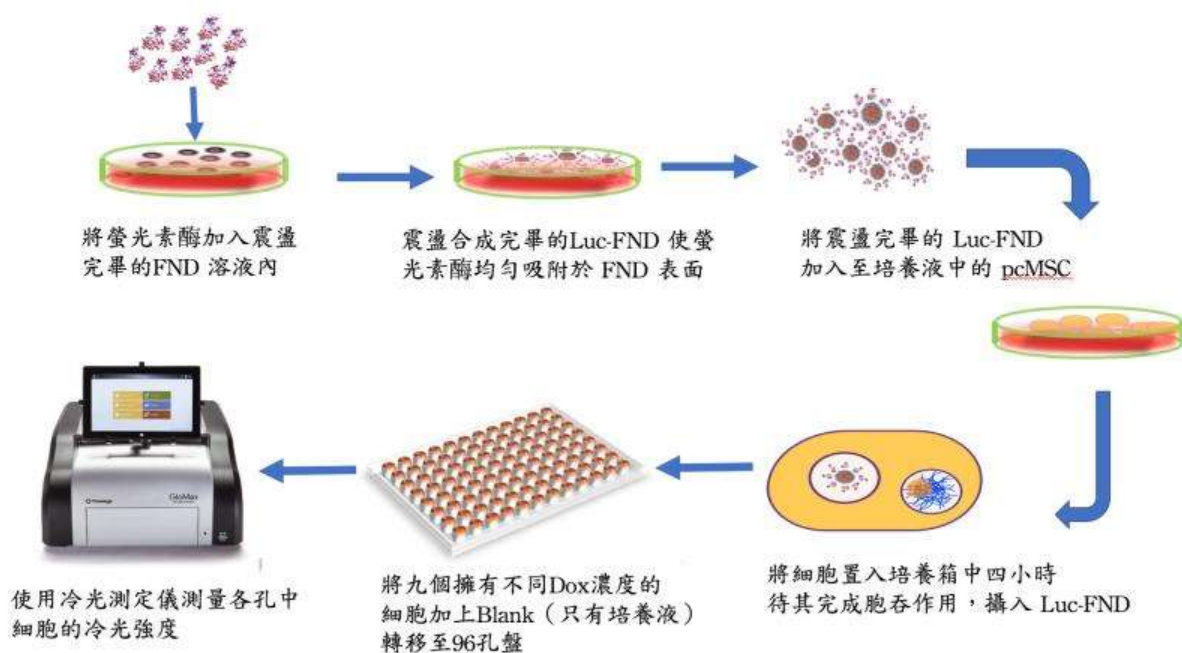


圖 (3) . 圖為本實驗總流程圖



圖（4）. 圖為 Luc-FND assay 實驗流程簡圖

二、研究藥品與設備

（一）細胞與藥品

人體MSC 細胞， DMEM培養基（Dulbecco's Modified Eagle Medium），SMEM培養基，MCDB201培養基，FBS 胎牛血清（Fetal bovine serum），Penicillin/ Streptomycin，DMSO 細胞抗凍劑（Dimethyl Sulfoxide），DPBS（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline），Trypsin，BSA (Bovine Serum Albumin)，Promega的QuantiLum recombinant luciferase以及luciferase assay kit。

（二）設備

液態氮桶，CryoGen凍管，恆溫水槽，微量吸管（pipette），玻璃吸管（glass pipette），電動吸管（pipette aid），培養箱，10cm 培養皿，3cm 培養皿，微量離心管，離心機，量杯，量筒，15mL塑膠管，30mL塑膠管，超音波洗淨機（Ultrasonic sonicator），GloMax多功能微量分析測定儀，自製磁性調製機（Magnetic modulated fluorescent spectrometer）。

三、細胞培養

(一) 細胞培養

本實驗細胞間葉幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSC) 是源自人類胎盤蛻膜，以分離培養取得的。

MSC保存方法為置入液態氮中，所以我們從液態氮桶中取出裝MSC以及 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 的CryoGen凍管，此時細胞呈現結凍狀，而管內DMSO的目的是為了避免細胞在液態氮的低溫狀態下結冰而造成損壞。將裝在CryoGen凍管的結凍細胞先置入37°C的恆溫水槽至解凍為液體狀為止。首先我們要去掉在管中的DMSO因為過量的DMSO會破壞細胞的氫鍵而導致蛋白質變性。為了要去掉DMSO，我們將含有DMSO的MSC轉移到15mL的塑膠管中，再加入MSC medium以幫助我們離心。將含有MSC medium，DMSO，以及我們想保留的MSC的15mL的塑膠管置入離心機，將轉速設為300g / 1400mpf，運轉時間設為兩分鐘。離心完後倒掉含有DMEM以及DMSO的上清液，此時管中的沈澱物為我們要的MSC細胞。在塑膠管中加入MSC medium，以玻璃吸管(glass pipette)加上電動吸管(pipette aid)將管內的細胞沈澱和DMEM 用玻璃吸管混合(pipetting)，再將混合液加入10cm塑膠盤上，之後再加入DMEM。

將含有泡在DMEM的MSC的10cm塑膠盤置入37°C，5%的CO₂的培養箱中。培養液每兩至三天更換一次（每個禮拜換約三次）。

(二) 細胞繼代

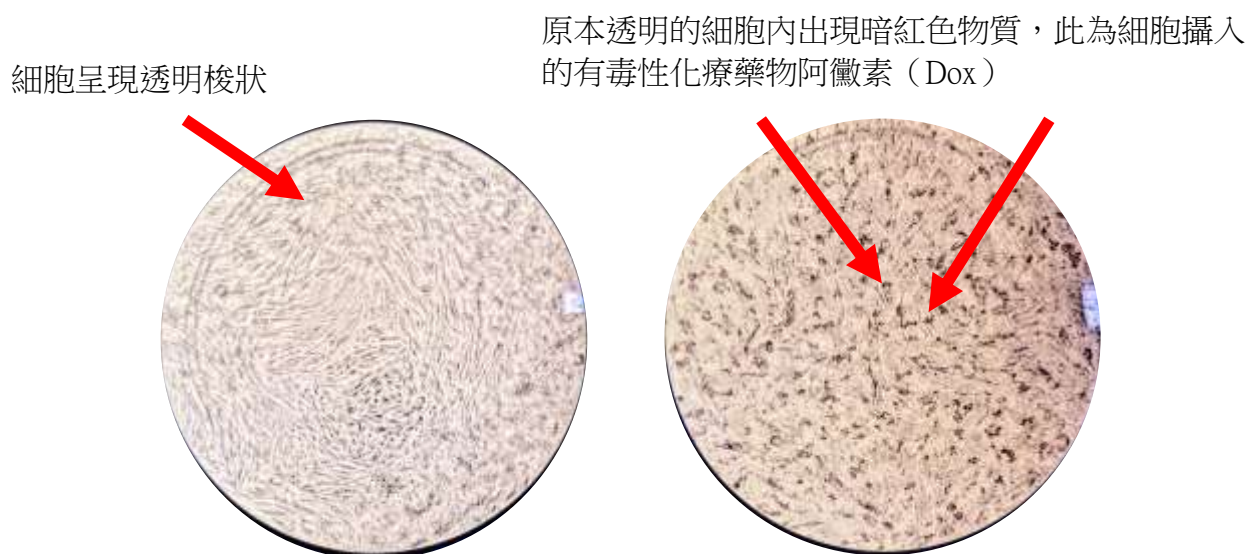
當細胞生長約八分滿時，就可以進行細胞繼代。首先我們移除原先在細胞盤內的medium，再以 DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 反覆清洗兩次。在這裡DPBS是當作一種緩衝溶液，是為了要把盤內殘餘的medium洗掉，而如果還有殘留的medium，那接下來要加的trypsin會被血清所抑制。反覆清洗完後，加入2 mL 的0.05% (1X) Trypsin，確定覆蓋過培養盤整面，再搖晃培養盤使得trypsin均勻覆蓋過整面，接著將培養盤置入37°C，5%的CO₂的培養箱中放約五分鐘，使細胞與 trypsin 充分反應，讓 trypsin可以充分分解細胞與盤壁間的附著蛋白。把培養盤自培養箱移除之後，把含有細胞的trypsin液體離心，倒掉上清液(成份為trypsin)，留下的沈澱物便是細胞。接著加入 10mL 的medium，用微量吸管混合medium跟細胞，再轉移到培養盤上。

（三）種細胞

取兩個96孔盤，並將MSC種入四十個孔內。將細胞分別標上細胞種以及日期，以八字均勻搖晃，放入37°C，5%的CO₂的培養箱中。

四、添加阿黴素（Doxorubicin application in cells）

先在裝有MSC的三十六孔中（四列九行）依序加入不同濃度的Dox（0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μ M）



圖（5）.左圖為無添加任何阿黴素的間葉幹細胞，右圖為添加40 μ g的阿黴素（為本實驗最高濃度之藥物處理）左右兩圖皆為在顯微鏡下觀測出的細胞型態。左圖未添加藥物的間葉幹細胞呈現透明梭狀，而右圖中許多被藥物處理過的間葉幹細胞內含有明顯的暗紅色物質，此物質為本身具鮮豔紅色的阿黴素在細胞內堆積而成的。右圖中的細胞再經過高濃度的要務處理後也失去了原本明顯的梭狀型態。

五、FND 製備

利用高能加速器產生一個40 keV的氦離子束轟擊直徑100 nm的奈米鑽石粉末（Micro+ MDA M0.10, Element Six），上述步驟的目的是為了把奈米鑽石結構裡的部分碳原子移除，使在奈米鑽石晶格中製造出空缺（vacancy）。再來將這些奈米鑽石置於800°C高溫真空加熱，使空缺移動至氮原子附近，形成氮—空缺中心（N-V Centers），此步驟稱之為黏合（annealing）。之後將溫度降至450°C，於空氣中進行氧化，此時的鑽石便是螢光奈米鑽石。最後我們以H₂SO₄:HNO₃(3:1, v/v)酸洗（acid wash）螢光奈米鑽石，除去表面殘餘的石墨碳及增加羧基（Carboxyl group; -COOH），以利於FND表面官能化（functionalize）（圖6）。



圖（6）. 圖為FND的製作流程圖，圖源自 Fabrication of Fluorescent Nanodiamonds: A Practical Protocol（Lin *et al.*, 2018）FND的製作過程簡單分為四步驟：1) 雷射激發（irradiation），2) 黏合（annealing），3) 氧化，以及4) 酸洗。

六、FND—Luciferase 合成

先從4°C冰櫃取出5mg/ml的FND，再將此FND放入裝滿冰塊的超音波洗淨機，用超音波震盪

FND。加冰塊的目的是為了要讓 FND在被震盪的時候保持低溫，因為FND將與螢光素酶結合，而螢光素酶是蛋白質，所以在高溫下有變性的可能性。用超音波洗淨機震盪FND 45分鐘，而在震盪的同時，可以準備調配BSA溶液。

接下來從4°C冰櫃取出牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin；BSA），秤量10mg的BSA並加入15mL塑膠管中，再加入等重量的蒸餾去離子水（distilled deionized water; DDW）10mL，用震盪混合器 (Vortex shaker) 均勻混合。

此時再去-80°C的冰櫃取螢光素酶和它的受質，並放在冰上保持低溫狀態。

將FND，BSA，螢光素酶都準備完善後，就可以開始製備FND-Luciferase（FND-Luc）溶液。在此溶液中我們要調配一個FND：BSA：螢光素酶為10：3：3的溶液，並加水補到FND：水為1：1。

製備完FND-Luc溶液後，我們將溶液放置在震盪混合器上，以低強度震盪溶液一小時。震盪完後，將溶液放入4°C的離心機中，用150rpm轉速離心十五分鐘。離心結束後，去除上清液，加500uL的PBS，再用超音波洗淨機震盪，使沈澱物與PBS充分混合（圖 7）。



圖（7）. 圖為超音波震盪器，用來將FND均勻震盪於溶液中以及使 FND 與螢光素酶可以充分混合，讓螢光素酶均勻的覆蓋於液體中 FND表面。

七、Luciferase - FND 複合物性質測量

（一）粒徑大小測量

使用奈米粒徑分析儀來測量FND in PBS，以及FND-Luc in PBS 的半徑（圖 8）。將調配好的 Luc-FND取1mL至玻璃光析管（cuvette）中並放入奈米粒徑分析儀中，使用連接的電腦程式，選取「粒徑大小」(number distribution)，等到intensity數值達標後，即可按下開始鍵，等分析儀跑完後，就可以收集數據。將數據儲存，再以Origin X8程式來畫圖表分析。



圖（8）. 圖為奈米粒徑分析儀，將含有FND 以及 Luc-FND 的溶液裝入玻璃光析管中，利用光線的繞射，測量 FND 和 Luc-FND 的粒徑大小。

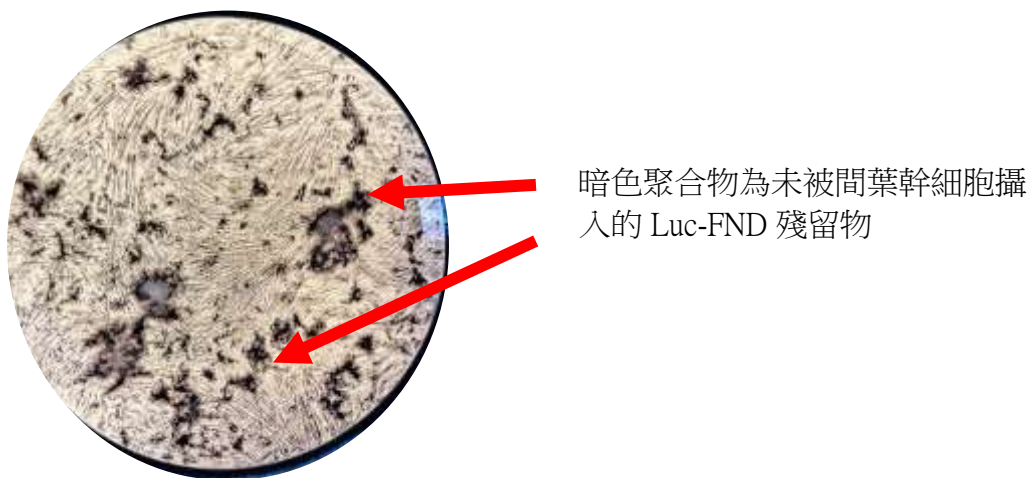
（二）細胞胞吞作用測量

為了要確認可以利用細胞胞吞（endocytosis）FND的能力來測包裹在FND外的螢光素酶蛋白質的冷光而得知細胞存活率，我利用胞吞阻斷器（endocytosis inhibitor）來測試MSC胞吞Luc-FND的能力。先將MSC分裝於六孔中並吸乾medium。

接著將5mg的胞吞阻斷器 Dynasore 加入1mL的 DMSO，可以得到160 μ M 的Dynasore溶液，接著序列稀釋出 80 μ M，40 μ M，和20 μ M的 Dynasore，將四種濃度的 Dynasore 溶液分別加入四孔細胞，另外一孔加入1%的DMSO，而最後一孔細胞不加任何藥物或DMSO，接著在每孔中加入FND。將細胞置入37°C，5%的CO₂的培養箱中一小時後，使用PBS wash兩次，加入trypsin打下細胞，並將細胞轉移到eppendorf，離心五分鐘，去掉上清液，就可以上機使用flow cytometry分析胞吞結果。

八、MSC標定

我們使用的間葉幹細胞是源自人類胎盤蛻膜，以分離培養取得的。先從4°C冰櫃取出DMEM only，PBS，和FND-Luc混合液。先將DMEM和PBS置入恆溫水槽10至20分鐘，到升溫為常溫為止。之後取出加溫完的DMEM以及PBS和從4°C冰櫃取出的FND-Luc混合液放入無菌操作台中。接著再從培養箱中取出裝有MSC的60孔盤。分別將含有細胞的40孔中的DMEM吸掉，再加1mL的PBS充分覆蓋細胞後再吸掉。由於我們要調配100 μ L/mL的FND-Luc在DMEM中，所以我們先用一個15mL塑膠管裝入900 μ L的DMEM以及100 μ L的FND-Luc混合液，用微量吸管均勻混合，再放入37°C，5%的CO₂的培養箱中等四個小時。



暗色聚合物為未被間葉幹細胞攝入的 Luc-FND 殘留物

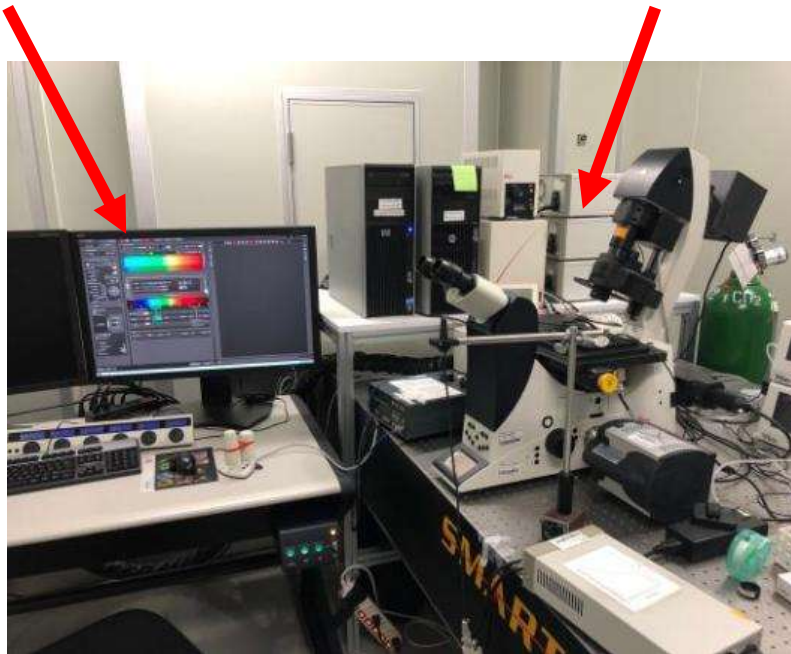
圖（9）. 圖為在顯微鏡下以Luc-FND標記完的MSC，細胞周圍的暗色聚合物為游離在細胞培養基中聚集的Luc-FND，透過吸取培養液以去除這些胞外的Luc-FND殘留物，進而去除在細胞外未被胞吞的Luc-FND所產生的背景螢光。

九、以共軛焦顯微分析（Confocal microscopy）進行 FND-Luciferase 細胞攝取效率（uptake efficacy）分析

我們使用倒立式的共軛焦顯微鏡（SP8, Leica）來觀測細胞的螢光（圖 8）。接上561nm的白光連續波雷射來激發FND後，再用63倍的油鏡觀測細胞螢光，再將混合測定器設定至700-800nm的放射波長，把定時選通（time gating）設定為 5 ns 以去除例如細胞自體螢光的背景螢光。由於FND其螢光生命週期與眾不同，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，可偵測到單一螢光奈米鑽石（Kuo *et al.*, 2013）。由於FND的發光時間長而穩定，所以利用定時選通可以成功去除較短暫而不穩定的背景螢光。由此共軛焦分析可以得知FND在細胞被攝取的量，進而確定螢光素酶也有被攝取。

此為調整共軛焦顯微鏡的功能
與分析共軛焦圖的電腦軟體

此為 Leica 的倒立式共軛焦顯微鏡



圖（10）. 圖為Confocal Room（Leica的共軛焦顯微鏡以及電腦）

十、以冷光測定儀（luminometry）進行 FND-Luciferase 細胞活性分析

上述的細胞在經過四個小時的37°C，5%的CO₂的培養後，將餵好的三盤（兩盤含鑽石，一盤為控制）細胞從培養箱中取出細胞盤。先將盤內的medium吸出，接著用PBS洗細胞。洗完細胞後，加入trypsin使細胞漂浮在溶液中。放入培養箱中五分鐘，將細胞轉移到塑膠管並加入PBS至塑膠管中，用最高轉速離心五分鐘，倒掉上清液，再加一次PBS離心五分鐘，倒掉上清液。此時離心完的塑膠管中只會含有沈澱的細胞，各加入40μL的PBS，再將各塑膠管中含有細胞的溶液轉移至60孔盤中。接著加入等量的裂解緩衝液（lysis buffer）至含有細胞的四十孔中。接著將60孔盤帶到GloMax的房間，接著快速加入等量受質以避免過度反應，接著馬上將60孔盤放入GloMax多功能微量分析測定儀，選取「luminescence」（冷光），再選取裝有細胞的孔，另外加一個空的孔當作控制數據，設定每孔掃十秒，來回掃七次，設定完畢後按下開始鍵，讓機器運作來測定螢光。

待機器跑完後，便可以收集以及觀測數據。

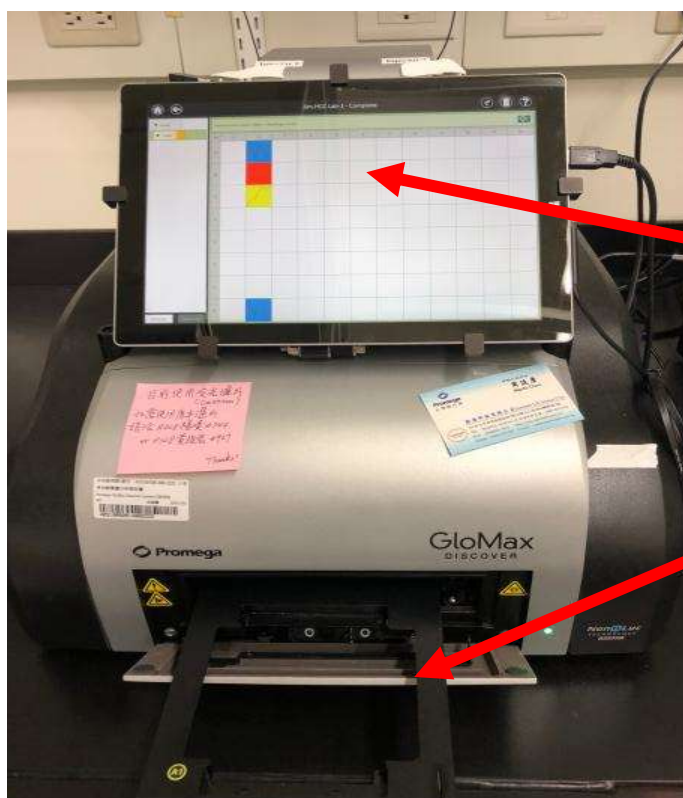
十一、CCK-8 assay 細胞活性測定

將以Dox處理過的MSC 細胞盤中的細胞培養基利用微量吸管吸走，在加入 PBS 作為緩衝液，達到沖洗殘餘的培養基的功用。以 PBS 沖洗兩次後，再加入 trypsin 以切除在細胞外游離的 Luc-FND，才不會導致細胞外螢光素酶的冷光造成背景螢光。加入 trypsin 後，將60孔盤放入培養箱五分鐘。之後加入1:10的CCK-8濃度至含有細胞的孔中

十二、以吸收值測定儀進行CCK-8細胞活性（cell viability）分析

將在培養箱靜置一天的CCK-8間葉幹細胞盤取出，再將其置入GloMax的吸收值測定儀中（圖 11），選取「Absorbance」（吸收值），並將吸收光波長調至450nm。

待機器跑完後，便可以收集以及觀測數據。



此處顯示吸收 O.D. 值／冷光數值

此處為放置 96 孔盤的凹槽

圖 (11) . Promega 多功能微量分析測定儀，用來測量 CCK-8 的顏色吸收值以及 Luc-FND 的冷光數值。

十三、Annexin V + Propidium Iodide 染色細胞活性測定

先準備不同 Dox 濃度 ($0\mu\text{M}$ ， $0.3125\mu\text{M}$ ， $0.625\mu\text{M}$ ， $1.25\mu\text{M}$ ， $2.5\mu\text{M}$ ， $5\mu\text{M}$ ， $10\mu\text{M}$ ， $20\mu\text{M}$ ， $40\mu\text{M}$) 的細胞，並將盤中的 medium 吸乾，再 PBS wash 兩次。接著用 $500\mu\text{L}$ Trypsin 打細胞，再放入烘箱一至兩分鐘。之後將細胞盤在顯微鏡下觀察細胞的掉落情況，再加入 1mL 的 PBS 混合，將細胞全數吸入 15mL 的離心管，並用 500g 轉速離心五分鐘。去掉上清液後，再加入 1mL 的 PBS wash，再離心一次，並將 PBS 吸乾淨。

接著取出 Annexin V kit，加入 binding buffer $100\mu\text{L}$ ，再沿著管壁加入 $2.5\mu\text{L}$ 的 Annexin V 以及 $5\mu\text{L}$ Propidium Iodide (PI)，並將管內物用離心機 spin down，但這次的 spin down 適當轉速一達到 500g 就停止離心，目的不是為了要分離內容物，而是要將所有管內物 spin down。之後用超音波洗淨機將 pellet 震碎，再加入 $250\mu\text{L}$ binding buffer，就可以上流式細胞儀分析。

除了不同濃度的dox-treated MSCs，還要配置標準液。取五管細胞，各加入500 μ L的binding buffer。一管加2.5 μ L的 Annexin V only，一管加入5 μ L PI，兩管加 2.5 μ L的 Annexin V和5 μ L的PI，剩下的一管不加任何染劑。這五管標準液是為了用來之後上機時作為螢光補償（compensation）。

之後用BD FACS Canto II 流式細胞儀來分析細胞存活與死亡率。先用調配好的標準液做螢光補償，再將其餘的十二管各用機器測定之。

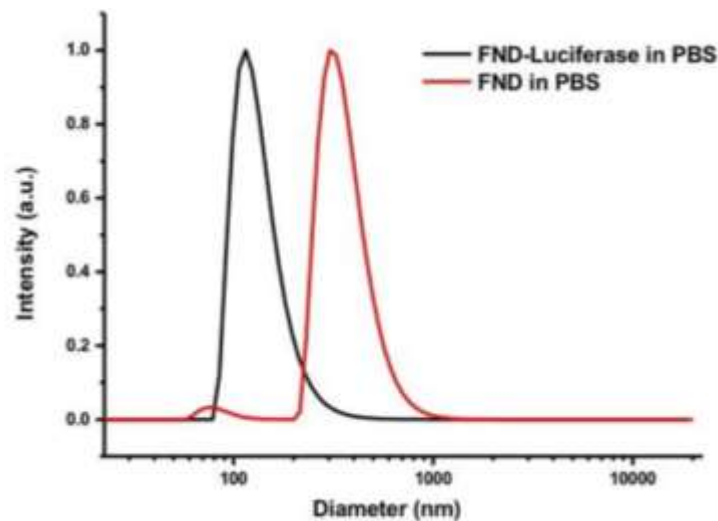
參、研究結果與討論

一、Luc-FND 性質測量

（一）粒徑測量

我們比對了只有裸露的 FND 以及裹上了螢光素酶的 FND 在 PBS 中的粒徑大小。PBS 為一種細胞標記的緩衝物。我們發現了當只有裸露的 FND 時，粒徑明顯地較大，代表了表面沒有另加修飾的 FND 非常容易聚集（agglomeration），而聚集的 FND 不易均勻地被細胞攝入。

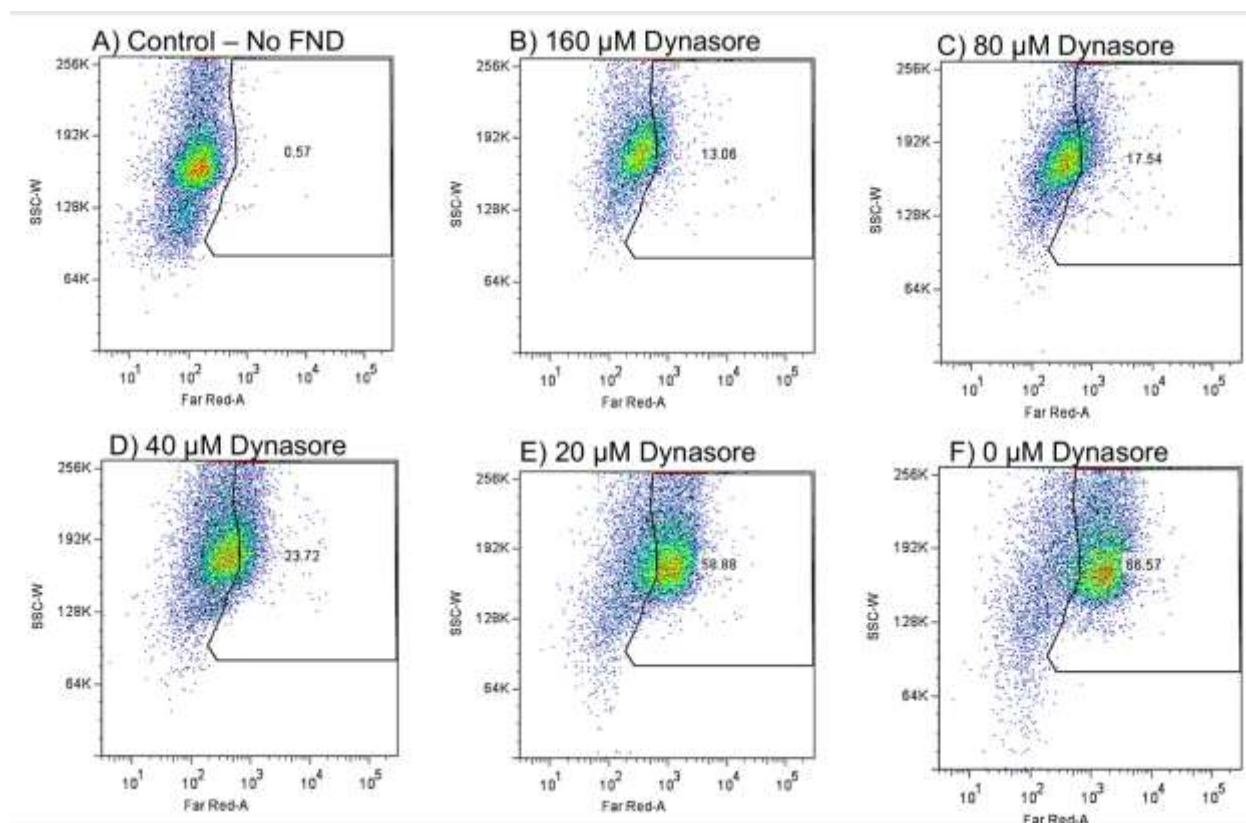
但當我們在 FND 表面裹上了螢光素酶之後，粒徑大小明顯的變小了。由於在 FND 表面有蛋白質包覆及修飾，因此 FND 較不容易聚集。這個特性也提供了我們創造出的 Luc-FND assay 一項優點。因為修飾過後的 Luc-FND 的粒徑大小位於 103 nm 左右，而裸露未修飾的 FND 的粒徑為 370，裹上了螢光素酶的 FND 很明顯的被抑制了顆粒聚集成塊的現象，因此我們能得知 Luc-FND 的顆粒依舊保持著原本 FND 各別顆粒的微小尺寸（圖 12）。非共價結合的奈米顆粒生物複合物在 PBS 中高度穩定，並且在為了去除溶液中未結合的蛋白質分子而進行的五個洗滌循環後的顆粒大小仍然不變。這提供了一個可以將 Luc-FND 均勻傳遞到各細胞的細胞化驗平台。



圖（12）. 利用粒徑儀，分別測量出裸露於PBS中的FND 以及在PBS中裹上螢光素酶的FND的粒徑大小並做出比對圖。從圖中可以看出裹上螢光素酶的 FND 的粒徑（黑線）比裸露的 FND（紅線）低超過三倍。這說明了表面被修飾過的FND，也就是裹上螢光素酶的 FND 比較不容易聚集，可以讓 Luc-FND 均勻傳遞到要測量的細胞內。

（二）胞吞性質測量

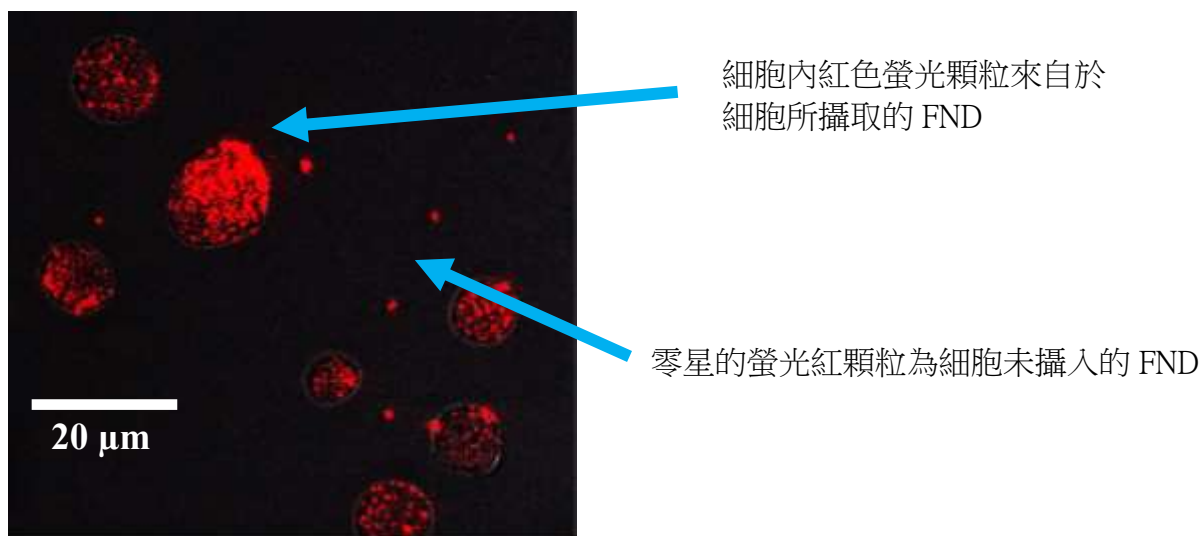
利用（圖13A）的控制組來比照（gate）其餘的圖，可以清楚地發現當藥物濃度降低，代表MSC的胞吞作用沒有受到太多 Dynasore 的阻斷，細胞數會往X軸也就是 Far-Red log值的右側移動，這說明遠紅外光的強度在增加，也能夠進一步的證實MSC會通過胞吞的作用來吃進FND。



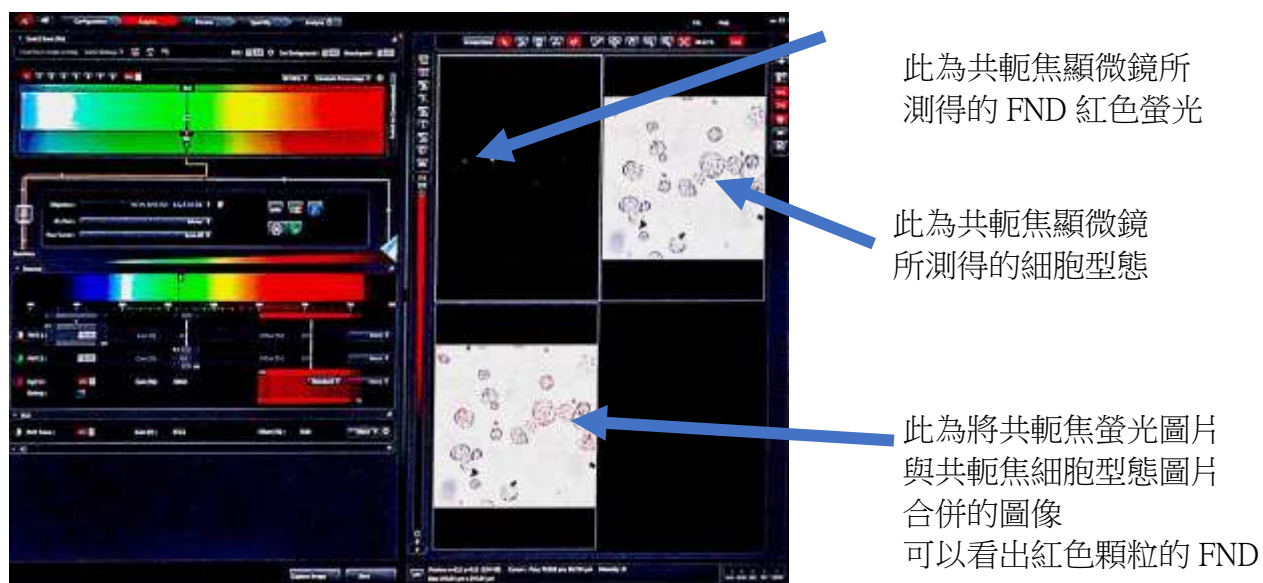
圖（13）. 在MSC內加入不同濃度的胞吞阻斷器後的流式細胞儀分析圖（gated data）。

二、Luc-FND 標記的 MSC 的表徵

為了進行細胞標記，在 MSC 中加入濃度為 100μg/ mL 的 Luc-FND，靜置 4 小時。隨後在培養基中去除未攝取的 Luc-FND 後，通過冷光分析儀做細胞活性的分析。Luc-FND 標記的 MSC 的共聚焦螢光成像清楚地顯示濃度為 100μg / mL 時的顆粒被均勻攝取（圖 14）。這些顆粒主要被捕獲在胞內體（endosome）或溶酶體（lysosome）中，並且不進入細胞核，對幹細胞的活性和增殖特性沒有影響。將傳統的質體轉染法和螢光素酶蛋白質轉染法相比，利用 FND 裹上螢光素酶再進一步送入細胞更可以均勻地遞送至人體間葉幹細胞。



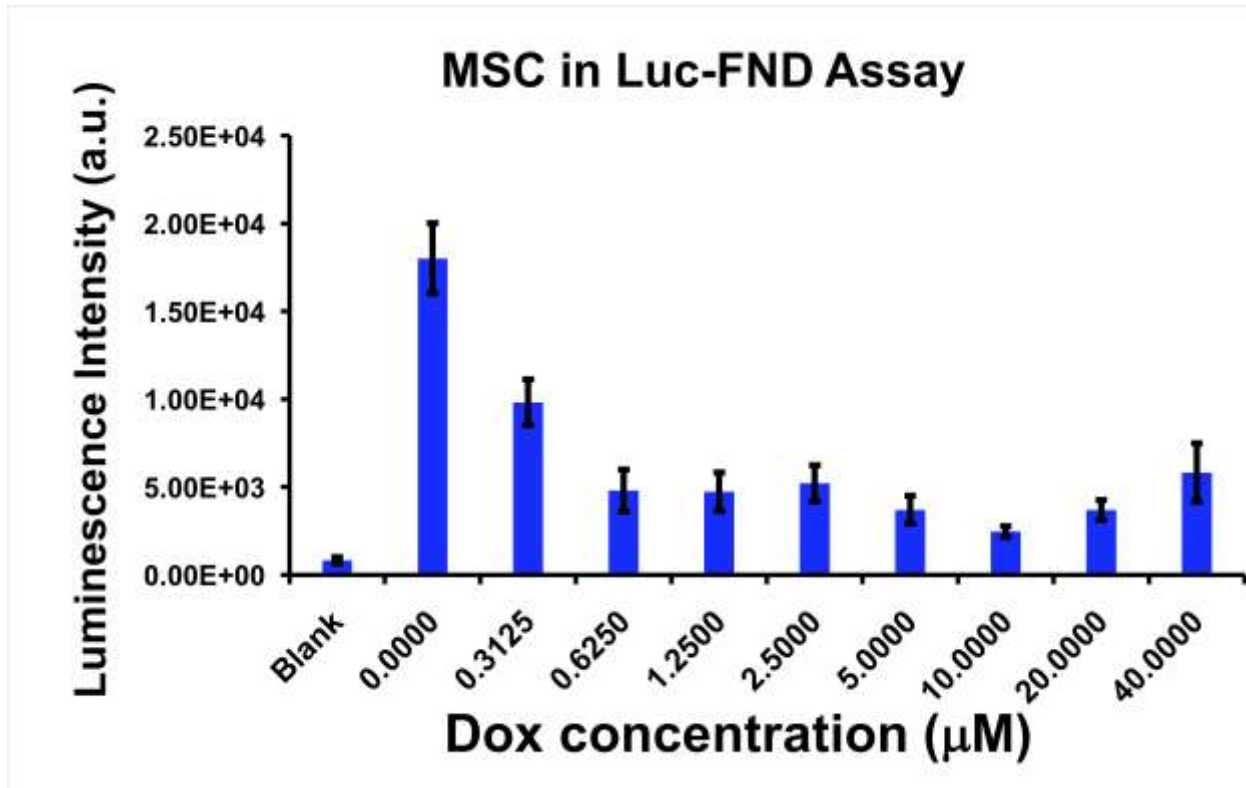
圖（14）. 圖為共軛焦顯微圖，圖中可以看見發出紅光（761nm）的 FND 已被間葉幹細胞成功攝入，進一步確認 FND 是會被胞吞進間葉幹細胞。圖中的細胞內有明顯高密度的螢光紅顆粒，而細胞外只有零星的幾個紅顆粒，這說明了 FND 在間葉幹細胞內擁有極高攝取率。



圖（15）. 圖為Leica倒立式共軛焦顯微鏡照出被MSC胞吞的 FND，我們利用電腦程式選取散發波長為761nm，並將選時通道（time-gating）開啟5 ns，以去除發光時間較短的背景螢光。

三、Luc-FND assay 在 MSC 內的藥物檢測分析

由於採用FND標記技術，所有 MSC 均維持至少24小時的發光信號，這對於藥物評估應用非常重要。接著我們將以Luc-FND處理過的間葉幹細胞置入 GloMax 的冷光測定儀中，測定各孔內的冷光數值，可以得知多少Luc-FND被攝入（圖 16）。再由這攝入值，可以得知細胞的胞吞作用的多寡，而利用觀測細胞的胞吞作用的多寡，進而得知細胞的存活率。

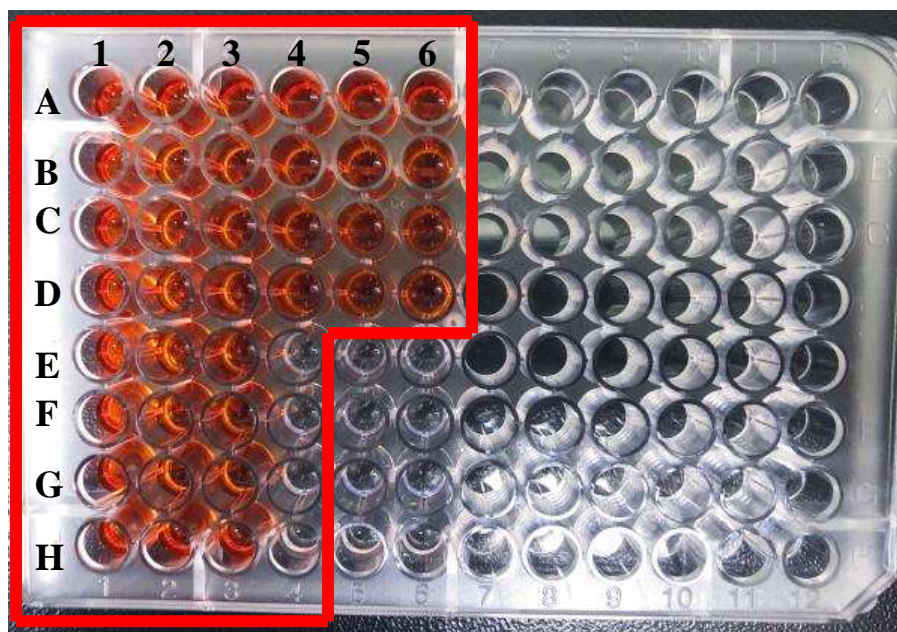


圖（16）。圖中為利用冷光測定儀所測量出不同濃度的Dox為於間葉幹細胞中對於加入的 Luc-FND的攝取量。（blank，0μM，0.3125μM，0.625μM，1.25μM，2.5μM，5μM，10μM，20μM，40μM）從圖中可以看出冷光強度隨著 Dox 濃度的增加呈現對藥物的負趨勢。

四、CCK-8 assay 在 MSC 內的藥物檢測分析

(一) 肉眼觀察顏色

從64孔盤中可以用肉眼觀察出在40個含有被不同濃度的Dox所處理過的MSC的孔中呈現出來的顏色幾乎是一樣的（圖 17）。而CCK-8所加入的四氫唑會被位於粒線體中的脫氫酶所還原，一但被還原，高度水溶性四氫唑會生成橘黃色的 formazan dye。顏色越濃，代表粒線體中的脫氫酶活性越高，表示細胞存活率越高，而（圖14）中除了控制組以外的每個孔都呈現了深橘色，表示細胞存活率幾乎是百分百。CCK-8已經是市場上擁有極高靈敏度的一個細胞化驗機制，但就算用這個靈敏度極高的細胞化驗機制也無法達到在人體間葉幹細胞中藥物檢測的效果。



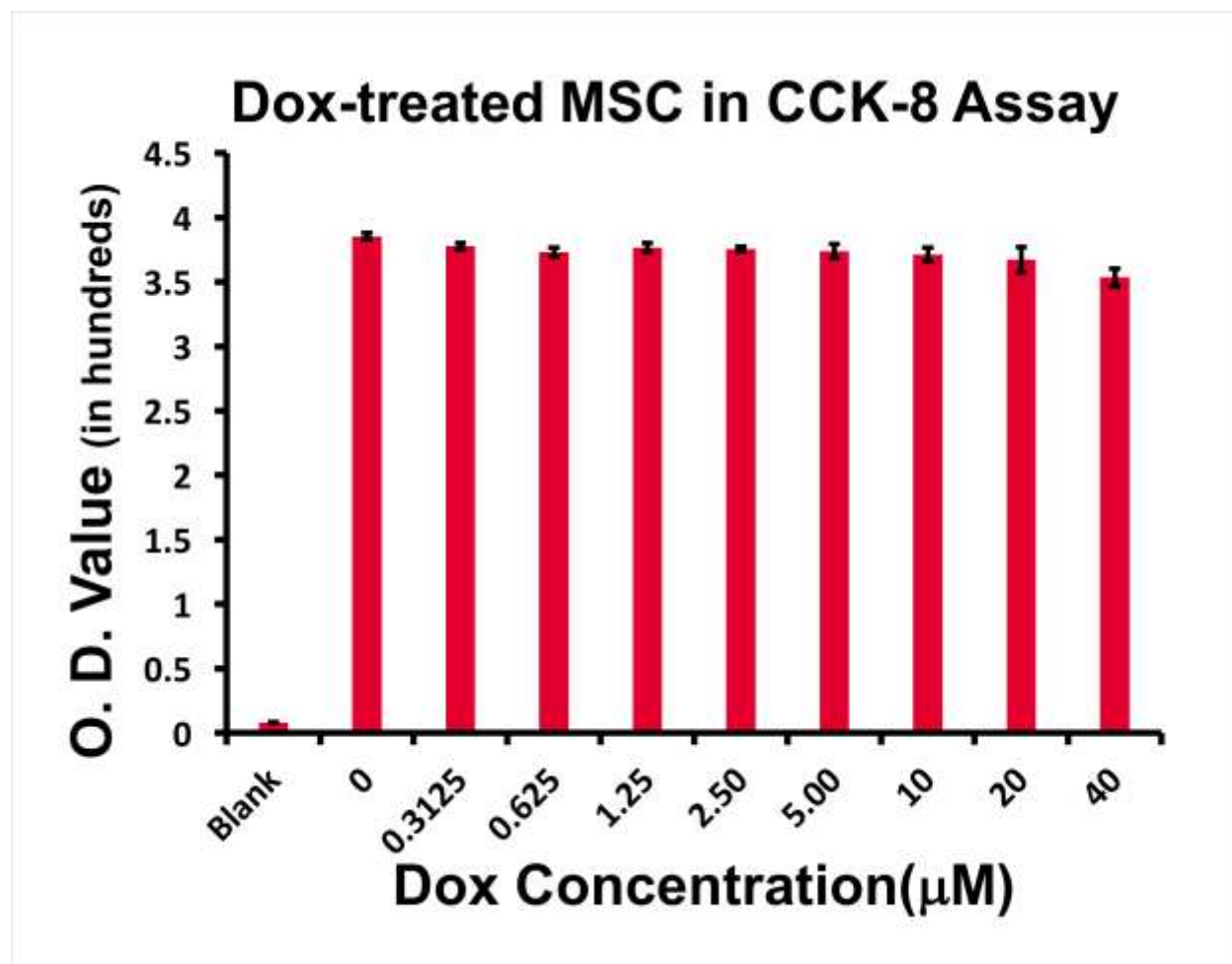
圖（17）. 圖中顯示利用CCK-8在MSC內測得的反應顏色沒有分辨度

（1 A-D: 0 μ M，2 A-D: 0.3125 μ M，3 A-D: 0.625 μ M，4 A-D: 1.25 μ M，5 A-D: 2.5 μ M，6 A-D: 5 μ M，
1 E-F: 10 μ M，2 E-F: 20 μ M，3 E-F: 40 μ M，4 E-F: blank）

(二) 使用吸收值分析儀測量CCK-8顏色的吸收數值（O.D. Value）

我們將加入CCK-8 assay的細胞盤放置入吸收值測定儀中，以檢測各孔中的顏色吸收值。由機器所取得的數據可以得知，不管在細胞中加入多少濃度的Dox，每一格顯示的數值大約為相等的

數值，所以透過CCK-8 assay，我們無法得知不同濃度的Dox對於間葉幹細胞的影響，所以CCK-8無法成功的數量少且生長緩慢的間葉幹細胞達到藥物篩選與監控的功能（圖 18）。



圖（18）. 圖中為利用吸收值測定儀所測量出不同濃度的Dox為於間葉幹細胞中對於加入的CCK-8顏色的吸收值。（blank， 0μM， 0.3125μM， 0.625μM， 1.25μM， 2.5μM， 5μM， 10μM， 20μM， 40μM）從圖中無法看出CCK-8 O.D.值隨著 Dox 濃度的增加而做任何改變。由於無法透過CCK-8得知Dox濃度與細胞活性之間的關聯性，可以得知CCK-8對於數量少且生長緩慢的間葉幹細胞不夠敏感。

五、CCK-8 Assay 與 Luc-FND Assay 檢測 MSC 的細胞存活率之比較

將（圖18）的 CCK-8 以及（圖16）的 Luc-FND 的數據相比，可以清楚地看到，CCK-8數據明顯的顯示間葉幹細胞不管在任何小於 40 μ M 的藥物濃度下，細胞存活率都還可以有接近百分之百的存活率。CCK-8對於間葉幹細胞在不同的藥物濃度下是沒有鑑別度的，所以證明了一般市售的細胞化驗檢測法對於間葉幹細胞都不夠靈敏。反觀紅色的Luc-FND數據，可以明顯地看出隨著藥物濃度的增加，Luc-FND 所測量出的冷光數值所對應出的細胞存活率有大幅的降低。

CCK-8 的細胞檢測範圍為1,000 至 25,000 個細胞。本實驗我們利用了每孔1,000 個間葉幹細胞分別加上 CCK-8 和 Luc-FND assay 以測其細胞活性。實驗結果顯示若只使用了1,000個細胞，CCK-8 assay無法敏感的達到在間葉幹細胞內的藥物監測。數據顯示在加入 CCK-8 的細胞中，CCK-8的比色在不同Dox濃度下無鑑別度。結果顯示不出Dox藥物所造成的細胞死亡。1,000 個細胞是CCK-8檢測範圍的極限，再加上間葉幹細胞較特殊，間葉幹細胞生長緩慢，因此更不容易測得，而利用CCK-8 脫氫酶還原酵素的活性而產生出的Formazan dye來測量細胞活性是不夠敏感的。然而Luc-FND assay是直接利用細胞的胞吞作用來噬入 Luc-FND，再利用螢光素酶和其受質的一對一結合所發出強且敏感的冷光來達到藥物篩選的效能。而在此Luc-FND assay 中，結果證明此細胞化驗機制可以成功且敏感的測得不同濃度的 Dox 對於間葉幹細胞的活性之影響，而最小偵測敏感度為在 1,000 個細胞中，加入0.3125 μ M 的Dox。比對未加入藥物的細胞以及最小劑量的 0.3125 μ M，可以發現只需要 0.3125 μ M 的藥物劑量於 1,000 個細胞中，Luc-FND 的敏感度已足夠以達到間葉幹細胞對於 Dox 的藥物監控。

這說明了Luc-FND對於像間葉幹細胞這種數量少且生長緩慢的細胞有足夠的靈敏度，所以可以做為測量藥物對於間葉幹細胞的影響，進一步的達成一個創新的高靈敏藥物監控與篩選的平台。

而兩組數據：CCK-8以及Luc-FND的P value = 0.00025662，<0.001，（***），有統計學上的顯著差異，顯示出高度的差異性。

兩圖表中的數值皆是重複實驗三次所得出的數據，而誤差棒表示偏差值在一個標準差之內。Luc-FND 使用的細胞數是 1×10^3 ，CCK-8 使用的細胞數是 1×10^4 。

六、Annexin V + Propidium Iodide 在 MSC內藥物檢測分析

流式細胞儀圖中的四個象限，Q1（左上），Q2（右上），Q3（左下），和Q4（右下）分別代表了凋亡（apoptosis）初期的細胞，凋亡末期的細胞，活細胞，以及壞死或有其他雜訊的細胞。Q1的染色意義是 Annexin V + PI -，表示細胞膜已經外翻，所以膜內側的磷脂絲胺酸會展現出來，而Annexin V 染的就是磷脂絲胺酸，而這種細胞是在經歷凋亡初期，所以Q1內細胞是凋亡初期的細胞。Q2的染色意義是 Annexin V + PI +，由於細胞膜已經破裂PI才可以染到細胞核，加上凋亡初期磷脂絲胺酸的外露，這象限的double positive展現已經進入凋亡末期的細胞，所以Q2象限的細胞數主要是用來判斷細胞死亡率。而Q3的染色意義是 Annexin V - PI -，這象限的double negative的含義是展現還活著的細胞，細胞膜沒有破裂而磷脂絲胺酸也沒有外翻。最後Q4的染色意義是 Annexin V - PI +，這代表只有染到細胞核而細胞膜沒有外翻，通常這區的細胞會被解釋為細胞壞死（necrosis），由於細胞還沒有啟動凋亡機制細胞膜就已經破碎，不過在分析Annexin V + PI staining 的流式細胞儀圖時，不會把Q4內的細胞列入考量，因為壞死只是一種為了解釋Q4細胞的說法，更有可能是因為其他雜訊。

（圖19）是Annexin V + PI staining的流式細胞儀圖。從圖中，因為螢光補償開的高，所以Q3的細胞數量看起來會相對少，但其實在下方的象限細胞百分比可以看見，在（圖19A）未染色（unstain）時，Q3的比例數是99.5%，而在（圖19B）未加藥物的細胞則有84.7%的細胞位於Q3，而（圖19C）加入0.3125 μ M的藥物，也就是此實驗所加入的最低濃度，Q3細胞存活率就來到了44.2%，而接下來的0.625 μ M 至 40 μ M的Q3 細胞存活率都大約在0.5% 至4% 之間。這說明雖然Annexin V + PI staining夠靈敏可測出在低濃度的藥物下的細胞死亡率，但其方法並不適用於測量對於間葉幹細胞的藥物毒性，因為Annexin V + PI又太敏感。而且在（圖19B）中，Q2細胞死亡末期比例已經來到4.7%，背景染色相較多。

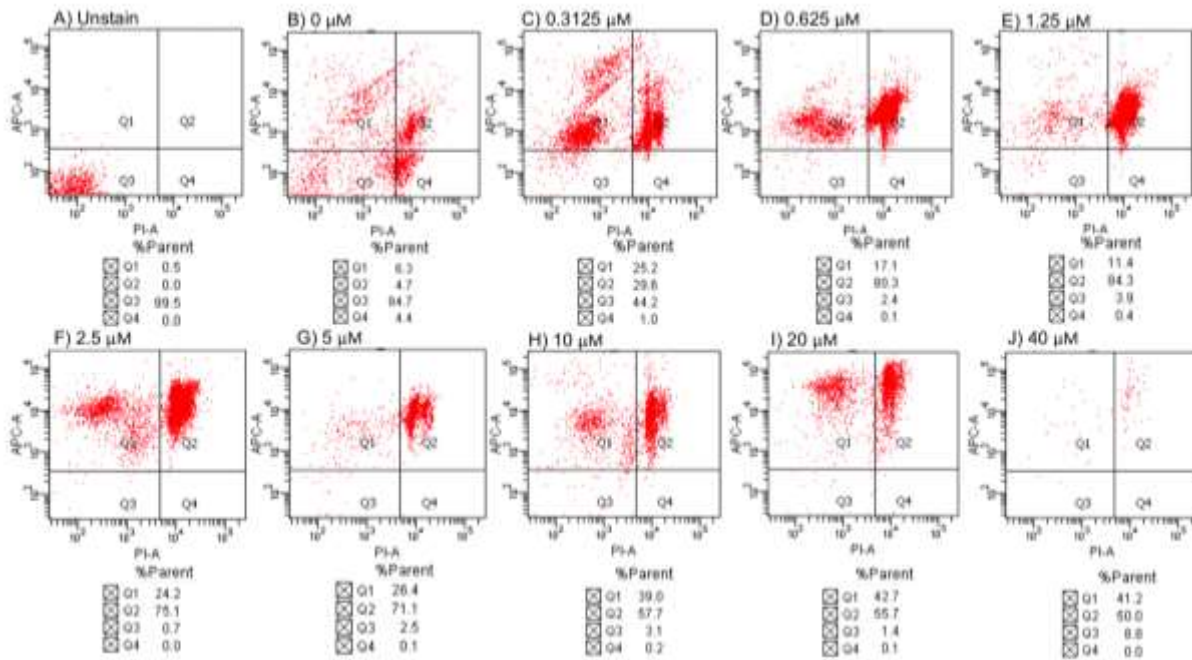


圖 (19) . 圖為在流式細胞儀下 Annexin V + PI 染色於不同藥物濃度的 MSC。

七、Annexin V + Propidium Iodide 與 Luc-FND Assay 檢測 MSC 的細胞存活率之比較

在分析細胞活性時，利用了（圖19）中的Q3的細胞比例數來畫出細胞活性趨勢圖，如（圖20）中所示。雖然 Annexin V + PI staining 和 Luc-FND 一樣能在低濃度的藥物處理下測出細胞存活率與藥物濃度的反比關係，但當我們把兩個結果畫在同一張圖時，可以明顯地看出 Annexin V + PI 的方法又太過敏感，導致有效濃度縮減許多。當 Annexin V + PI 測到大於 $0.6250\mu\text{M}$ 時，細胞存活率就沒有再有顯著的趨勢，而因為 PI 染色方法太過敏感，也造成 Annexin V + PI staining 的背景染色相較 Luc-FND 的背景螢光顯著的多。而且 Annexin V + PI staining 至少需要 2×10^5 ，也就是需要比 Luc-FND assay 多兩百多倍的細胞數量。因此，就算 Annexin V + PI staining 能夠靈敏的測出在低濃度的藥物處理下的細胞死亡，但是相較於創新的 Luc-FND assay，Luc-FND assay 更高效且可信。

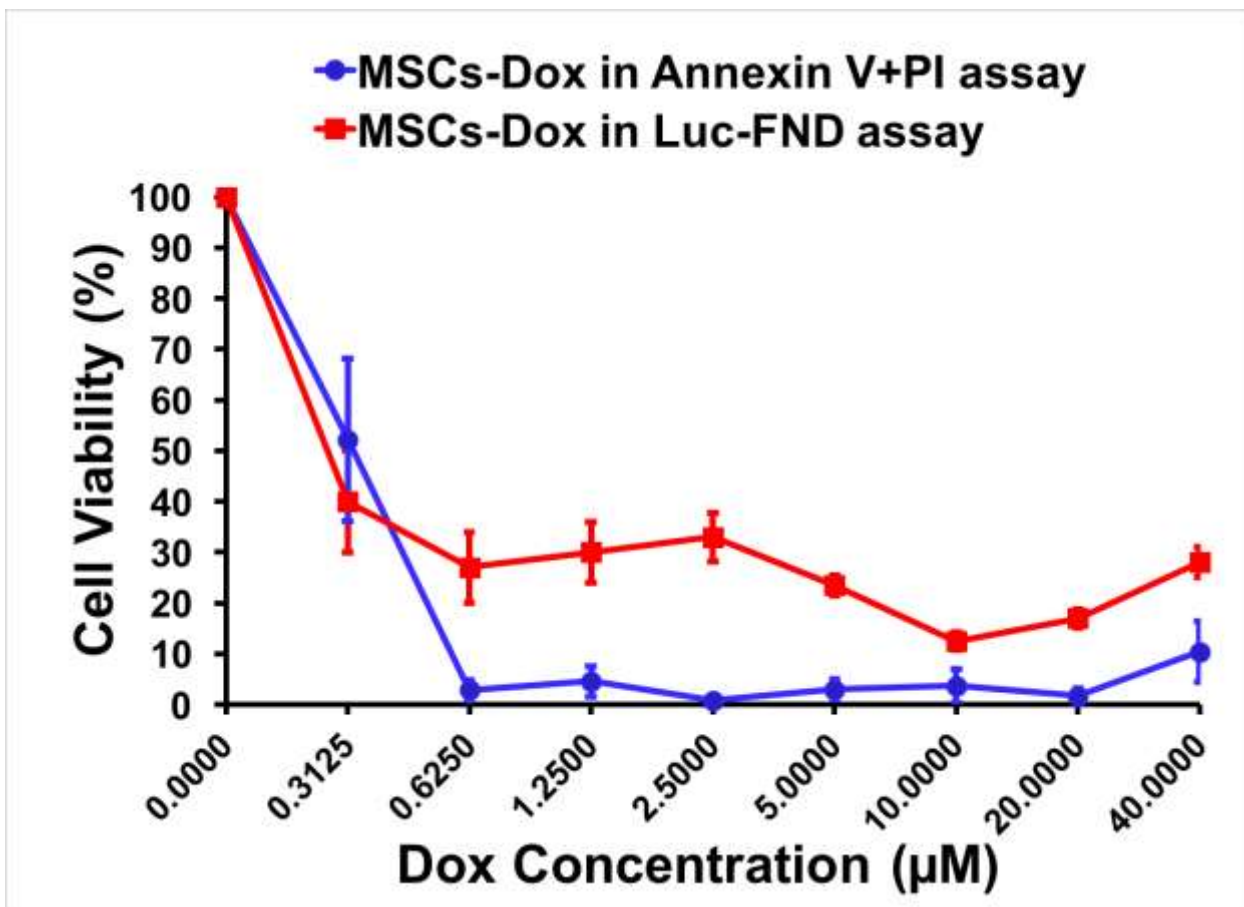


圖 (20) . 圖中可以得知，Annexin V + PI staining和Luc-FND assay所測量出的Dox濃度對於間葉幹細胞的活性都是呈現負趨勢，但兩者之間還是有統計學上 P value 0.01** 的差異，而Annexin V + PI的檢測方法則太過敏感。

圖表中的數值皆是重複實驗三次所得出的數據，而誤差棒表示偏差值在一個標準差之內。Luc-FND 使用的細胞數是 1×10^3 ，Annexin V + PI 所使用的細胞數是 2×10^5 。

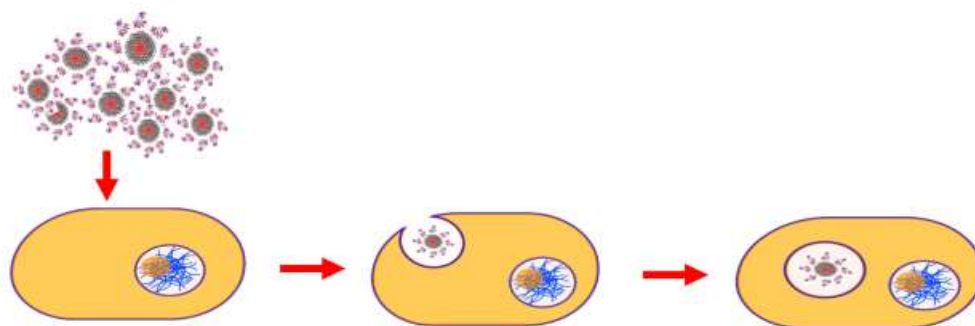
肆、結論與應用

一、結論

本研究證實Luciferase能夠均勻且快速地傳遞到人類間葉幹細胞中，而可以非常高靈敏的監控藥物對於間葉幹細胞的影響。我們同時利用了FND和螢光素酶的對於細胞化驗的優點，進而研發出Luc-FND assay，一個創新的細胞化驗平台。我們選用Luciferase assay來當作我們細胞化驗平台的模板，因為螢光素酶的發光機制有別於其他螢光，螢光素酶的發光機制是以酵素－受質的鎖鑰反應，透過螢光素酶以及其受質一對一的結合來發出強且敏感度高的光。一般常見的Luciferase assay 不會將螢光素酶直接地送入細胞內以測細胞活性，但在此平台，我們利用了FND作為奈米載體，將螢光素酶直接地送入細胞。

結果顯示，FND結合的Luciferase是完整的並且同時保持了其催化活性甚至被捕獲在細胞的內體中。這個方法也是高度模式化的，因而使其成為各種傳輸應用的良好候選者。FND不會對於幹細胞的功能產生影響，因為FND進到細胞後會留在脂質體（liposome）中，因此不會像螢光蛋白標記一樣需要進到細胞核對DNA做基因修改。而且FND擁有的3D立體結構是穩定的，所以即使是酸，也不會造成結構上的改變。

在測量化療藥物對於人類間葉幹細胞時，相比常用市售的還原酶CCK-8 assay和Annexin V + PI 染色機制，新穎Luc-FND assay可以更加高效且準確的做藥物篩選，因此自製的Luc-FND assay可以扮演一個比前述的機制更為良好且妥善的藥物檢驗機制。



圖（21）．間葉幹細胞會以胞吞的方法攝入 Luc-FND，而被攝入後的 Luc-FND會長久的留在脂質體（endosome）內，因此利用 Luc-FND 不需要嵌入或干擾DNA。

二、未來應用

1. 此Luc-FND細胞化驗平台也可以當作雙重成像的功能。由於螢光素酶本身就會與受質結合產生冷光，再加上被裹腹的FND因為特殊的氮－空缺中心而導致FND會發散出螢光。所以我們可以將這兩種光結合而達到雙重成像的效果。
2. Luc-FND 可以做為活體內 (*in vivo*) 的雙重成像由於螢光素酶的載體FND有著極高的生物相容性，所以即使是以活體內讓細胞攝入Luc-FND，動物活體不會受此奈米化合物所影響。Luc-FND可以追蹤活體內細胞的動向，例如間葉幹細胞的「歸巢」效應 (homing effects)。
3. 利用FND加上螢光素酶這種高度敏感的平台，除了能對於生醫方面的藥物篩選機制做出貢獻，還能夠扮演活體內成像而進行活體細胞追蹤，甚至能夠進一步的在未來改變通過幹細胞研究，得以發現其他驗證治療幹細胞的方法。

伍、參考文獻

1. Baxter-Holland M, Dass CR. (2018), Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. *J Pharm Pharmacol.* 7:320-327.
2. Kozhukharova I, Zemelko V, Kovaleva Z, Alekseenko L, Lyublinskaya O, Nikolsky N. (2018), Therapeutic doses of doxorubicin induce premature senescence of human mesenchymal stem cell derived from menstrual blood, bone marrow and adipose tissue. *Int J Hematol.* 107: 286-296
3. Thorne N, Inglese J, Auld DS. (2010), Illuminating insight into firefly luciferase and other bioluminescence reporters used in chemical biology. *Chem Biol.* 17:646-657.
4. Mezzanotte L, van' t Root M, Karatas H, Goun EA, Lowik CWGM. (2017), In vivo molecular bioluminescence imaging: New tools and applications. *Trends Biotechnol.* 35:640-652
5. Hamm A, Krott N, Breibach I, Blindt R, Bosserhoff AK. (2002), Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 8:235-245.
6. V. Vijayanthimala, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, C.-L. Li, (2009), *Nanotechnology* 20, 425103.

7. Huang YA, Kao CW, Liu KK, Huang HS, Chiang MH, Soo CR, Chang HC, Chiu TW, Chao JI, Hwang E (2014), The effect of fluorescent nanodiamonds on neuronal survival and morphogenesis. *Sci Rep* 4:6919
8. L.-J. Su, M.-S. Wu, Y. Y. Hui, B.-M. Chang, L. Pan, P.-C. Hsu, Y.-T. Chen, H.-N. Ho, Y.-H. Huang, T.-Y. Ling, H.-H. Hsu, H.-C. Chang, (2017), *Sci. Rep.* 7, 45607
9. Chang BM, Lin HH, Su LJ, Lin WD, Lin RJ, Tzeng YK, Lee RT, Lee YC, Yu AL, Chang HC (2013), Highly fluorescent nanodiamonds protein-functionalized for cell labeling and targeting. *Adv Funct Mater* 23:5737-5745.
10. Kong XL, Huang LCL, Hsu CM, Chen WH, Han CC, Chang HC (2005), High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis. *Anal Chem* 77:259-265
11. Fu CC, Lee HY, Chen K, Lim TS, Wu HY, Lin PK, Wei PK, Tsao PH, Chang HC, Fann W (2007), Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:727-732
12. Igarashi R, Yoshinari Y, Yokota H, Sugi T, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M (2012), Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds in vivo. *Nano Lett* 12:5726-5732.
13. Sarkar SK, Bumb A, Wu X, Sochacki KA, Kellman P, Brechbiel MW, Neuman KC. (2014), Wide-field in vivo background free imaging by selective magnetic modulation of nanodiamond fluorescence. *Biomed Opt Express*. 5:1190-1202.
14. Hsiao WWW, Hui YY, Tsai PC, Chang HC (2016), Fluorescent nanodiamond: A versatile tool for long-term cell tracking, super-resolution imaging, and nanoscale temperature sensing. *Acc Chem Res* 49:400-407.
15. Shyam H., Singh S., Kant R., Saxena S., (2017), Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: a new paradigm for degenerative bone diseases. *Regenerative Medicine*, Vol. 12, No. 12.
16. Y. Kuo, T.-Y. Hsu, Y.-C. Wu and H.-C. Chang, (2013), Fluorescent nanodiamond as a probe for the intercellular transport of proteins in vivo. *Biomaterials*, 34, 8352.

* 註：本文部分數據與中研院原分所共享，未來可能參與中研院國際期刊發表

【評語】 080005

1. 本研究擬結合螢光素酶與螢光奈米鑽石兩者的特性，開發一個新的細胞化驗平台，提供一種攜帶抗癌藥物檢測和驗證治療成果的新方法。
2. 本研究具原創性，值得鼓勵。有系統地說明科學研究的背景知識，實驗數據做適切的統計分析。
3. 書面報告陳述部分數據與中研院原分所共享，諸多實驗方法與設備均已超出高中生程度。
4. 英語十分流利，對研究內容清楚瞭解，並能說出重大意義。
5. 有原創性，方法具可行性？
6. 對科學及醫療有產生影響之潛力。
7. 回答問題清楚簡潔，且思考慎密。