

國立臺灣大學理學院物理學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Physics

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

(論文題目) 胰島素金奈米粒子螢光耗乏特性之探討

(英文題目) The Fluorescence Depletion Properties of
Insulin-Gold Nanoclusters

陳柏輔

Po-Fu Chen

指導教授：朱士維 博士

Advisor: Shi-Wei Chu, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

誌謝



能完成這篇論文，我要特別感謝我的指導教授朱士維老師在整個研究計畫中多次給予許多實驗上寶貴的建議以及論文寫作上的指導。同時也要感謝台大化學系周必泰教授協助胰島素金材料電子躍遷模型的推導以及感謝劉建良學長多次在日理萬機之餘撥空合成此研究所需之胰島素金奈米粒子。另外還要感謝學弟陳冠杰定期維護時間相關單光子計數系統(Time-Correlated Single Photon Counting system, TCSPC), 讓儀器經常得以順利運作以及提供有關螢光放光機制與理論方面的有用資訊。也很感謝學弟黃彥達協助實驗上胰島素金吸收截面(cross section)的估算。最後也要感謝實驗室裡曾經幫助過我的每一位成員：冠宇、楷文、宗憲、治原、維麟、明穎、恒毅、東榆、庭英、國仁、美瑜、運儒、哲維、李炫、億城、瑋冠、冠郁在我碩班期間所給予的許多寶貴建議與支持，太多感謝實在無法一語道盡，真的非常感謝大家這些日子來持續的關心與鼓勵。

中文摘要



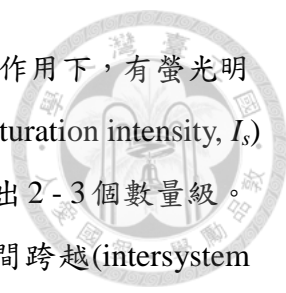
過去十年，能克服光波繞射極限($\sim \lambda/2$)之超解析遠場螢光顯微術，因其於生物醫學研究上，可達到觀察細胞內部細微結構或蛋白質分佈至數十奈米的解析度，而成為熱門議題。在多種超解析螢光顯微術中，我們選擇研究受激放射耗乏顯微術(stimulated emission depletion microscopy, STED microscopy)，因為其容易與共軛焦雷射掃描顯微鏡(confocal laser scanning microscope)結合，並提供快速掃描與光學切片能力，在活體觀察及 3D 奈米成像方面皆有許多方面的應用。透過兩道雷射並利用受激放射原理對螢光分子做光操縱，以達到超解析成像的受激放射耗乏顯微術，目前已可達僅僅只有數十奈米的解析度，是活體神經突觸觀察與研究的良好工具。

執行受激放射耗乏顯微術時，我們需要一道實心的激發光去激發樣本，以及另一道強度分佈為甜甜圈形狀的耗乏光將中心之外的自發螢光耗乏掉。根據理論計算的結果，若所施加的耗乏光強度越高，光學解析度就能提高越多，然而，在此條件下，我們所用的螢光標定物便需具備絕佳的光穩定性以承受強烈雷射照射。此外，若所搭配的螢光標定物容易被激發及耗乏，也能使光學解析度有效提高。因此，檢驗材料之光穩定性及其螢光是否易被耗乏，便成為我們的目標。

目前已知有些金屬奈米粒子(metallic nanoclusters)可發螢光且比起一般有機染劑較少光漂白(photobleach)。然而，目前並無文獻探討螢光金屬奈米粒子於受激放射耗乏顯微術中之應用潛力，且考慮到此螢光標定物需能配合生醫相關研究，因此我們選擇了胰島素金奈米粒子(insulin-gold nanoclusters, IGNCs)作為我們的研究材料。

此論文中，我們檢測 IGNCs，其受激放射耗乏特性、光穩定性，以及評估將 IGNCs 應用於受激放射耗乏顯微術中之應用潛力。

我們發現 IGNCs 在連續激發、耗乏過程中，其所呈現之光穩定性，以 20% 的光漂白(photobleach)為標準，IGNCs 於 10^5 W/cm^2 之激發光、 10^9 W/cm^2 之耗乏光下花費約 120 秒，而常用於受激放射耗乏顯微術之染劑 Atto565 於 10^1 W/cm^2 之激發光下大約花費 210 秒，考慮激發強度不同之下，一般掃描情況下，IGNCs 呈現良



好之光穩定性。同時，我們也檢測，被激發的 IGNCs，在耗乏光作用下，有螢光明顯被耗乏的效應發生，但耗乏效率僅可達 57%，而其飽和強度(saturation intensity, I_s) 約為 2.75 GW/cm²，比一般螢光標定物的 I_s ($\sim 10^6 - 10^7$ W/cm²) 高出 2-3 個數量級。深入探討其原因，是由於此種材料被激發後，電子會做系統間跨越(intersystem crossing, ISC)以及逆系統間跨越(reverse intersystem crossing, RISC)之躍遷機制，而導致螢光不易被耗乏，有較高之 I_s 值。為了能更進一步降低耗乏時的雷射功率以及降低螢光分子的光漂白，我們使用時間閘偵測(time-gated detection)技術以及降低雷射脈衝重複率，進一步提升 14% 之螢光耗乏效率，並降低對螢光分子的破壞。

由於 IGNCs 的 I_s 值與一般螢光標定物相比很大，螢光不易被耗乏，因此我們認為它不適合用於受激放射耗乏顯微術中，除非搭配良好的時間閘偵測技術以及將脈衝寬度、間距、波長最佳化。但我們相信，IGNCs 在其它螢光操縱應用中或生物醫學研究領域，尤其是與胰島素相關的疾病研究中，應該仍能有所表現。

關鍵字：超解析遠場螢光顯微術、受激放射耗乏顯微術、金屬奈米粒子、胰島素金奈米粒子、可逆螢光開關、光漂白、系統間跨越、逆系統間跨越、時間閘偵測、雷射脈衝重複率

ABSTRACT



Super-resolution far-field fluorescence microscopy, which overcomes the diffraction limit ($\sim \lambda/2$), has gotten much interest in the last decade due to its nanoscale resolving ability of observing fine structures or protein distribution in cells. Among super-resolution fluorescence techniques, we study stimulated emission depletion (STED) microscopy because it can easily be combined with confocal laser scanning microscope, then provides not only fast imaging and optical sectioning ability, but also 3D nanoscale *in vivo* observation. By using two laser beams and the mechanism of STED to optically control the fluorescence of fluorophores, STED microscopy can currently achieve resolution with only tens of nanometer, and become one of the best tools in revealing the morphology of dendritic spines and synapse.

During the process of implementing STED microscopy, we need one laser beam (called excitation beam) to excite the sample, and the other beam (called depletion beam) with doughnut shaped intensity distribution to deplete the excited region except the center. According to the theory of STED microscopy, with great depletion intensity, comes great image resolution. However, in this condition, fluorescence markers should be good in optical stability and be capable of sustaining high power laser illumination. In addition, it would also lead to high resolution when fluorescence markers is easy to be excited and depleted.

It is known that some metallic nanoclusters (NCs) have strong fluorescence and less photobleach than organic dyes. However, there is no report discussing the application potential of metallic NCs in STED microscopy. To facilitate applications to biomedical studies, we chose insulin-gold nanoclusters (IGNCs) as our sample and

investigated the optical properties of IGNCs, such as its property of STED, optical stability, and evaluating its application potential in STED microscopy.

We examine the optical stability of IGNCs in the process of continuous excitation and depletion. It took about 120 seconds for IGNCs to reach 20 % photobleach with 10^5 W/cm² excitation and 10^9 W/cm² depletion. Its stability is good and comparable to that of Atto565 (about 210 seconds for 20 % photobleach with 10^1 W/cm² excitation) when considering the excitation intensity.

We also found that under the illumination of depletion beam, an apparent fluorescence depletion phenomenon occurred in the excited IGNCs film. However, the fluorescence depletion efficiency can reach only 57 %, and the saturation intensity (I_s) of IGNCs is 2.75 GW/cm², which is much larger than that of common fluorescence dyes ($\sim 10^6 - 10^7$ W/cm²).

After studying the reason in detail, we found that the low depletion efficiency and high I_s can be explained by the mechanism of intersystem crossing (ISC) and reverse intersystem crossing (RISC) in the process of electron transition. In order to increase depletion efficiency and decrease photobleach of IGNCs, we adopted time-gated detection technique and used low laser pulse repetition rate. The results showed 14 % improvement in depletion efficiency and less damage than previous one.

With large I_s of IGNC, its fluorescence is not easy to be depleted, so we think that IGNC is not suitable for STED microscopy except combining outstanding time-gated detection technique and optimizing the used width, delayed time, wavelength of pulses.

Key words: Super-resolution far-field fluorescence microscopy, Stimulated emission depletion microscopy, Metallic nanoclusters, Insulin-gold nanoclusters, Reversible

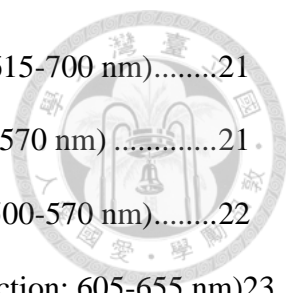
fluorescence photoswitching, Photobleach, Intersystem crossing, Reverse intersystem crossing, Time-gated detection, Laser pulse repetition rate



CONTENTS



口試委員會審定書	#
誌謝	i
中文摘要	ii
ABSTRACT	iv
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF TABLES	xii
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Background.....	1
1.2 Motivation.....	3
1.3 Aim	5
Chapter 2 Theory	7
2.1 Theory of Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy.....	7
2.2 Transition Model of Protein-Protected Metallic Nanoclusters	10
Chapter 3 Sample.....	13
3.1 Introduction to Insulin-Gold Nanoclusters (IGNCs)	13
3.2 Specimen Preparation	16
Chapter 4 Introduction to the Experiments	18
4.1 Experiment 01 (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm or 615-700 nm).....	19
4.1.1 Setup (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm).....	19
4.1.2 Results (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm)	20



4.1.3	Discussion (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm).....	21
4.1.4	Results (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm)	21
4.1.5	Discussion (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm).....	22
4.2	Experiment 02 (exc: 480-500 nm, dep: 690-720 nm, detection: 605-655 nm)	23
4.2.1	Setup.....	23
4.2.2	Discussion about Saturation Intensity and Lifetime	28
Chapter 5	Experiment Improvement	33
Chapter 6	Conclusions.....	35
Chapter 7	Prospects and Future Works.....	37
REFERENCE	38

LIST OF FIGURES



Fig. 1.1	受激放射耗乏顯微術(STED microscopy)除了解析度可達數十奈米，其時間解析度(temporal resolution)可達 $10^0 - 10^1$ 秒的數量級，甚至可達 28 frames/s (即 10^{-2} 秒的數量級[8])。GSD: 基態耗乏(ground-state depletion); SSIM: 飽和結構光學顯微術 (saturated structured-illumination microscopy); PALM: 光敏定位顯微術 (photoactivated localization microscopy); STORM: 隨機光學重建顯微術 (stochastic optical reconstruction microscopy); NSOM: 近場掃描式光學顯微術 (near-field scanning optical microscopy); EM: 電子顯微術 (electron microscopy); ND: not determined; NA: not applicable.....	2
Fig. 1.2	STED microscopy 原理示意圖.....	4
Fig. 2.1	螢光耗乏曲線.....	8
Fig. 2.2	點擴散函數之寬度與耗乏光強度之關係圖。對同一螢光材料來說 I_{dep} 愈大，則受激放射耗乏顯微術之解析度愈高、於焦平面上之點擴散函數的半高寬愈窄.....	9
Fig. 2.3	螢光材料中之電子能階圖，包含基態(ground state) S_0 , 單重態(singlet state) S_1 與三重態(triplet state) T_1	11
Fig. 3.1	左圖中會發紅色螢光之粒子為 IGNCs. 若被胰島素降解酵素 (insulin-degrading enzyme)吃掉胰島素，則 IGNCs 將失去發螢光能力。右圖為高解析穿透式電子顯微鏡(high-resolution transmission electron microscopy, HRTEM)所取得之影像.....	13

Fig. 3.2	IGNCs 的吸收光譜及放光光譜.....	14
Fig. 3.3	樣本準備方法.....	16
Fig. 3.4	咖啡漬圈環效應(coffee ring effect) [23].....	17
Fig. 4.1	實驗摘要圖。實驗分兩部分，分別搭配不同波長之激發光以及耗乏光。 為了避免收到激發光以及耗乏光，收光範圍也隨之而有所調整.....	18
Fig. 4.2	Experiment 01 實驗架設圖(exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm).....	19
Fig. 4.3	Experiment 01, 偵測範圍為 615-700 nm 之實驗結果.....	20
Fig. 4.4	IGNCs 之耗乏曲線圖(depletion curve). 偵測範圍為 500-570 nm. 每調整 一次耗乏光強度，就取一張圖，並對圖中某一小塊區域做平均螢光強度 分析，可得一數據點，圖中共顯示兩組數據。可看出不同耗乏光強度下， IGNCs 螢光隨之耗乏的情形.....	22
Fig. 4.5	Experiment 02 實驗架設圖(exc pulse: 480-500 nm, dep pulse: 690-720 nm, detection: 605-655 nm).....	24
Fig. 4.6	(a)激發脈衝與耗乏脈衝之時間間隔。(b)激發光與耗乏光經物鏡聚焦後， 兩光源之焦平面間距約為 0.2 μm	25
Fig. 4.7	IGNCs 之螢光耗乏。(a)只用激發光激發，尚未加入耗乏光，平均螢光強 度=2225 (a.u.). (b)加入耗乏光後，平均螢光強度=993 (a.u.). 區域大小為 8 \times 8 μm^2	26
Fig. 4.8	IGNCs 之螢光耗乏曲線。每個黑點皆代表在不同耗乏光強度下，自 Fig. 4.7 中的區域分析出之平均螢光強度。藉由指數擬合，我們可得 IGNCs 之飽和強度，2.75 GW/cm^2	27

Fig. 4.9 利用耗乏光對 IGNCs 的螢光做開關操作，其螢光穩定性與時間之關係圖。在不同時間點，我們皆取得一張如 Fig. 4.7 之影像並做平均螢光強度分析，而其結果即為此圖中之黑色數據點。每張影像取得速率為 1.09 s/image, 雷射光停留於影像上每個像素(pixel)的時間約為 4.3 μ s. 每取得一張影像後，有 1 秒的休息時間，然後才會取下一張影像。如此一來，我們將有時間在此 1 秒內加入或移除耗乏光。28

Fig. 4.10 IGNCs 螢光強度與時間之關係圖。(a)由指數擬合結果(綠色線)可計算得 IGNCs 之生命期有兩個，分別為 0.42 ns 與 43 ns. (b)關於系統間跨越(ISC)和逆系統間跨越(RISC)之概念圖。來自即時螢光(prompt fluorescenc, PF)之訊號以及經由 ISC 和 RISC 躍遷後之延遲螢光訊號(delayed fluorescence, DF)分別對應到短生命期和長生命期的部分.....30

Fig. 5.1 利用時間閘偵測技術，提升 IGNCs 之螢光耗乏效率。黑色曲線代表的是被激發光激發出的螢光訊號與時間之關係圖。紅色曲線則是代表受耗乏光影響下螢光訊號與時間之關係圖34

LIST OF TABLES



Table 3.1	IGNCs 與其它螢光標定物之比較	15
Table 4.1	IGNCs 之螢光穩定性與 Atto565 的比較 [25]	32
Table 6.1	本論文所用樣本，IGNCs 之性質整理	36

Chapter 1 Introduction



一般來說，顯微技術可分為電子顯微鏡以及光學顯微鏡。電子顯微鏡解析度較光學顯微鏡來得好很多，可達 10^{-10} - 10^{-11} m 的解析度，但缺點是只能觀察樣本表面，且樣本必須經過特別處理並只能在真空下觀察，無法觀察活體生物樣本[1]。而光學顯微鏡的好處是光可被聚焦於生物樣本較深處而不會有太大散射，可直接用來觀察活體樣本，但缺點則是解析度較差，大約是 10^{-6} - 10^{-7} m [1]. 在雷射掃描顯微技術中，雷射光會被物鏡聚焦成一個光點，以此光點掃描樣本，可取得樣本影像。但由於光波繞射的關係，此光點無法被聚成無限小，而是有個極限，被稱為繞射極限。若以此有限大小的光點來掃描樣本，所獲得的影像解析度將會受到限制。此極限可由 Abbe 於 1873 年發表的顯微鏡解析度公式決定：

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (1.1)$$

其中， d 是顯微鏡系統的解析度， λ 是使用的激發波長， NA 是數值孔徑(numerical aperture).

1.1 Background

最近十年來，能克服光波繞射極限之超解析遠場螢光顯微技術，已成為熱門研究對象，因為它們在生醫研究上，尤其是細胞活動的解析上，可有許多應用方面的應用潛力。例如：使用光敏定位顯微術(photoactivated localization microscopy, PALM)可以奈米級解析度觀察到細胞器 lysosome 和 mitochondrion 中之特定蛋白質標定物(例如：vinculin, actin)之分佈[2]。而使用隨機光學重建顯微術(stochastic

optical reconstruction microscopy, STORM)則可解析出 BS-C-1 細胞中之微管 (microtubules)和腦中之神經突觸(synapse)的分佈型態[3, 4]。在多種超解析螢光顯微技術中，我們主要選擇受激放射耗乏顯微術 (stimulated emission depletion microscopy, STED microscopy) [5]來做研究，因為它容易與共軛焦雷射掃描系統 (confocal laser scanning system)做結合[6, 7]，而能提供快速掃描[8]以及光學切片能力[9]，目前在活體觀察和 3D 奈米成像[9]方面皆有許多方面的應用。透過兩道雷射分別入射至樣本並利用受激放射原理對螢光分子做光學操縱，來達到超解析成像的受激放射耗乏顯微術，目前已可達僅僅只有數十奈米的解析度[1]，是生物醫學研究上，例如活體神經突觸觀察的好工具[10-12]。由於受激放射耗乏顯微術與其它超解析螢光顯微技術(例如：飽和結構光學顯微術[13]，光敏定位顯微術[2]，隨機光學重建顯微術[14]等)相比之下所具有的許多優勢，如 Fig. 1.1 [1]所示，由於受激放射耗乏顯微術於活細胞中可達之空間以及時間解析度高，因此吸引我們以它作為我們的研究題材。

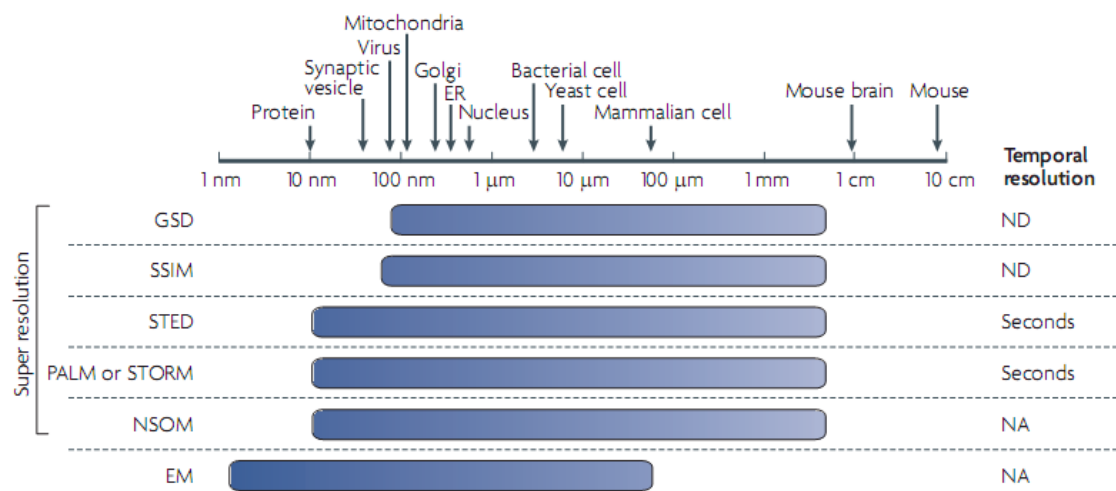



Fig. 1.1 受激放射耗乏顯微術(STED microscopy)除了解析度可達數十奈米，其時間解析度(temporal resolution)可達 $10^0 - 10^1$ 秒的數量級，甚至可達 28 frames/s (即 10^{-2} 秒的數量級[8])。GSD: 基態耗乏(ground-state depletion); SSIM: 飽和結構光學



顯微術 (saturated structured-illumination microscopy); PALM: 光敏定位顯微術 (photoactivated localization microscopy); STORM: 隨機光學重建顯微術 (stochastic optical reconstruction microscopy); NSOM: 近場掃描式光學顯微術 (near-field scanning optical microscopy); EM: 電子顯微術 (electron microscopy); ND: not determined; NA: not applicable

1.2 Motivation

在操作受激放射耗乏顯微術時，根據不同樣本，需選擇螢光放光波長適當且光穩定性佳(例如：可連續接受高強度雷射照射而不易光漂白、飽和強度低而使得螢光易被耗乏光耗乏)之螢光分子來標定樣本。例如：鑽石結構會發螢光之 nitrogen vacancies 材料，就以其能承受高強度激發光以及耗乏光照射聞名，而可用此標定物達到 6 nm 的解析度[15]。目前已知有些金屬奈米粒子(metallic nanoclusters, NCs)可發螢光[16]且比起一般有機染劑有較少的光漂白(photobleach) [17]。然而，目前並無文獻探討這些螢光金屬奈米粒子於受激放射耗乏顯微術中應用之可能性。加上考慮到此螢光標定物需能配合生醫相關研究，因此我們選擇了胰島素金奈米粒子 (insulin-gold nanoclusters, IGNCs)作為我們的研究材料[16]，並評估以 IGNCs 搭配受激放射耗乏顯微術之應用潛力。

利用受激放射耗乏顯微術掃描樣本的過程中，我們需要一道實心的激發光 (excitation beam)去激發樣本，以及另一道甜甜圈形狀的耗乏光(depletion beam)趁螢光分子尚未自發螢光前引導外圍的螢光分子做受激放射(stimulated emission)，如 Fig. 1.1。沒有受到耗乏光影響的中心區域，發光機制仍是自發放射(spontaneous emission)。而受到耗乏光影響的外圍區域，發光機制則是受激放射。最後將會以偵



測器收光(若為雷射掃描，通常是搭配光電倍增管收光)，而偵測器前會放置濾光器 (filter)將受激放射的訊號過濾掉，只收自發螢光訊號。因此從偵測器的角度看，可視為是原本的自發螢光被耗乏光給關掉了

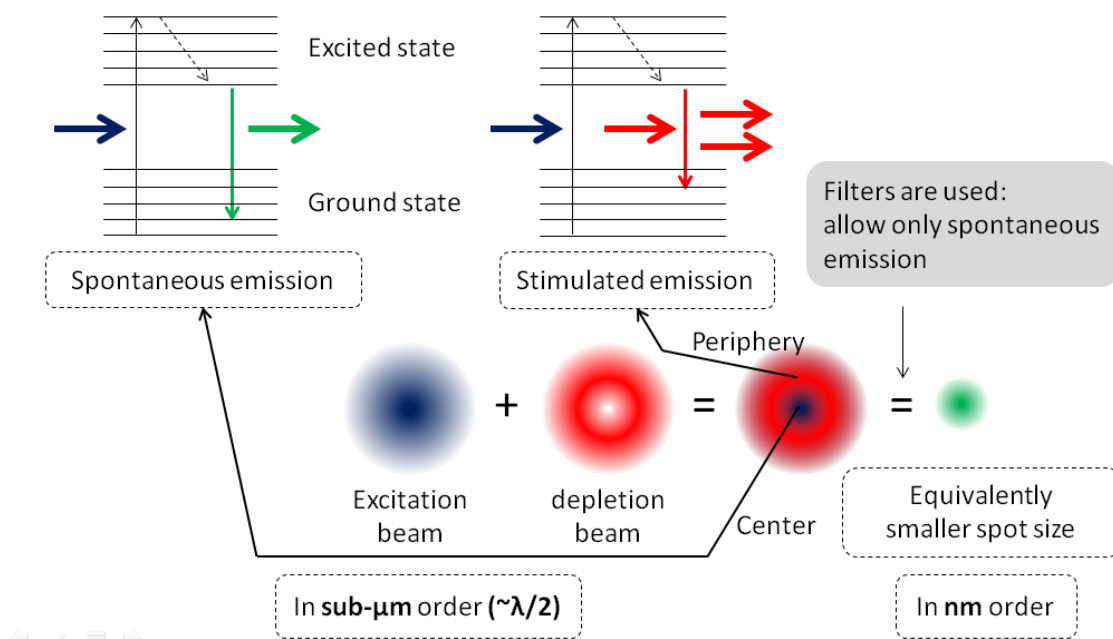


Fig. 1.2 STED microscopy 原理示意圖

為了預測受激放射耗乏顯微術的解析度，Harke 利用拋物面形狀的強度分布，來近似耗乏光在焦平面上的強度分布，而推導了受激放射耗乏顯微術之解析度公式[18] (詳細內容將於第 2 章做說明)，一般寫為[7]：

$$d_{STED} = \frac{d_{confocal}}{\sqrt{1 + \frac{I_{dep}}{I_s}}} \quad (1.2)$$

d_{STED} 和 $d_{confocal}$ 分別代表受激放射耗乏顯微術與共軛焦顯微術的解析度。 I_{dep} 代表耗乏光的強度。 I_s 則是飽和強度(saturation intensity)，被定義為當螢光被關掉一半時，

此時所對應到的耗乏光強度，並且不同的螢光分子通常會有不同的飽和強度。根據 Eq. (1.2) 我們可推論，若耗乏光強度越高，或所搭配的螢光標定物容易被激發及耗乏(若 I_s 低則易被耗乏)，影像解析度將會越好。然而，在此條件下，我們所使用的螢光標定物將必須具備絕佳的光穩定性以承受強耗乏光照射。又或者，我們可搭配 I_s 值較低之螢光標定物，如此一來，將可用較低強度之耗乏光執行受激放射耗乏顯微術，而不會對樣本造成太大傷害。而檢驗材料之螢光是否呈現絕佳光穩定性或者易被耗乏，便成為我們在研究中的主要目標。

前文已提到過我們選擇了 IGNCs 作為研究材料。至於為什麼會挑選 IGNC 作為研究材料的主要原因，除了螢光金奈米粒子比起一般有機染劑有較少的光漂白之外，也是因為有文獻報告指出，IGNC 的自發螢光生命期(lifetime)約為 2 μ s [16]，比一般螢光染劑還要來得長($\sim 10^{-9}$ s)。而根據 Eq. (1.3) [19]:

$$I_s = \frac{hc/\lambda}{\sigma \cdot \tau_{lifetime}} \quad (1.3)$$

長的生命期將會導致較小的飽和強度。Eq. (1.3) 中， I_s 是飽和強度， h 是 Planck 常數， c 是光速， λ 是激發光的波長， σ 是螢光分子的吸收截面(cross section)， $\tau_{lifetime}$ 是螢光分子的生命期(lifetime)。因此，在本論文的研究中，我們才會選擇 IGNCs。至於有關 IGNCs 的詳細介紹以及合成方式，將會於第 3 章提到。

1.3 Aim

此論文中，我們將檢測 IGNCs 其受激放射耗乏特性(自發螢光是否會因為耗乏光的加入，而有螢光被耗乏的效應發生)、飽和強度(saturation intensity)、光穩定性(利用耗乏光對 IGNCs 之自發螢光做連續開關操作之後，螢光訊號是否仍能維持穩

定)，並與常用於受激放射耗乏顯微術之其它螢光標定物(如 Atto565)做比較，評估
利用 IGNCs 搭配受激放射耗乏顯微術之應用潛力。



Chapter 2 Theory



本章將介紹：

1. 受激放射耗乏顯微術可達到之光學解析度理論，以及
2. 蛋白質螢光金奈米粒子受激發後之電子躍遷模型。

2.1 Theory of Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy

為了估計受激放射耗乏顯微術的解析度與耗乏光(depletion light)強度之間的關係，參考文獻[18, 20]，我們可先將耗乏因子(depletion factor, η)近似為一指數函數

$$\eta(x) \equiv \frac{I_{fluor}}{I_0} \cong e^{-\ln 2 \frac{I_{dep}(x)}{I_s}} \quad (2.1)$$

其中 I_{fluor} 代表受耗乏光作用後之螢光強度， I_0 則是耗乏光作用前之螢光強度。 I_{dep} 代表耗乏光的強度， I_s 則是飽和強度(saturation intensity)，被定義為當螢光被耗乏一半時，此時所對應之耗乏光強度，並且不同的螢光分子通常會有不同的 I_s 值，且與耗乏光之波長、時間結構或偏振有關。由 Eq. (2.1) 知， η 函數與位置相關，亦即在不同位置，若 I_{dep} 不同，則會導致不同程度之耗乏效率。此外，若 I_{dep} 愈大，理論上會得到愈高之耗乏效率，如 Fig. 2.1 之螢光耗乏曲線所示。

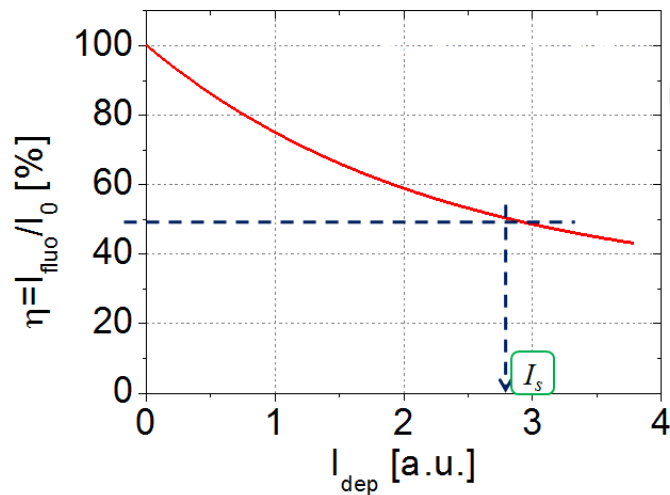


Fig. 2.1 螢光耗乏曲線

接下來，我們可將用於受激放射耗乏顯微術中在物鏡焦平面(x-y 平面)之耗乏光於 x 方向之強度分佈近似為一拋物線函數(實驗上若於 x-y 平面其強度分佈則類似甜甜圈，正中央強度接近零):

$$I_{dep} \approx 4 I_{dep,max} s^2 x^2 \quad (2.2)$$

其中 $I_{dep,max}$ 代表甜甜圈耗乏光之峰值強度， s 則是近似拋物線之斜率。一般來說，光學顯微術解析度之估計，可使用焦平面上點擴散函數(point spread function, PSF)之半高全寬(full width at half maximum, FWHM). 首先，讓我們將激發光(excitation)於焦平面上之強度分佈 $I_{exc}(x)$ 近似為高斯函數(Gaussian):

$$I_{exc} \approx I_{exc,0} e^{-\frac{x^2}{a}} \quad (2.3)$$

其中 a 是常數，與激發光於焦平面上之半高全寬相關，因此可將一般共軛焦顯微術(confocal microscopy)之解析度(近似為半高寬)表示為

$$FWHM_{confocal} = 2\sqrt{a \cdot \ln 2} \quad (2.4)$$



接著考慮在耗乏光之螢光耗乏作用下之情況，而將 Eq. (2.1) (2.2) (2.3) 結合，可得受激放射耗乏顯微術解析度之理論公式

$$S_{TE\bar{D}}(b) = x_{c.o.} h_{f.o.}(a) \cdot \left(\frac{x^2}{a} \right) \cdot e^{-\ln 2 \frac{I_{dep}(x)}{I_s}} = e^{-\frac{x^2}{a}} \cdot e^{-\ln 2 \frac{I_{dep,a} x^2}{I_s}} \quad (2.5)$$

由 Eq. (2.5), 可得受激放射耗乏顯微術之半高寬為

$$FWHM_{S_{TE\bar{D}}} = \frac{FWHM_{c.o.n.f.o.c.a.l}}{\sqrt{1 + FWHM_{c.o.n.f.o.c.a.l}^2 \frac{I_{dep,a} x^2}{I_s}}} \cong \frac{FWHM_{c.o.n.f.o}}{\sqrt{1 + \frac{I_{dep,a} x^2}{I_s}}} \quad (2.6)$$

因此我們可利用 Eq. (2.6) 作為估計受激放射耗乏顯微術之解析度的理論公式。我們可發現，對同一螢光材料來說 I_{dep} 愈大或對同一耗乏光強度來說 I_s 愈小，則受激放射耗乏顯微術之解析度愈高、於焦平面上之點擴散函數的半高寬愈窄，如 Fig. 2.2 所示。

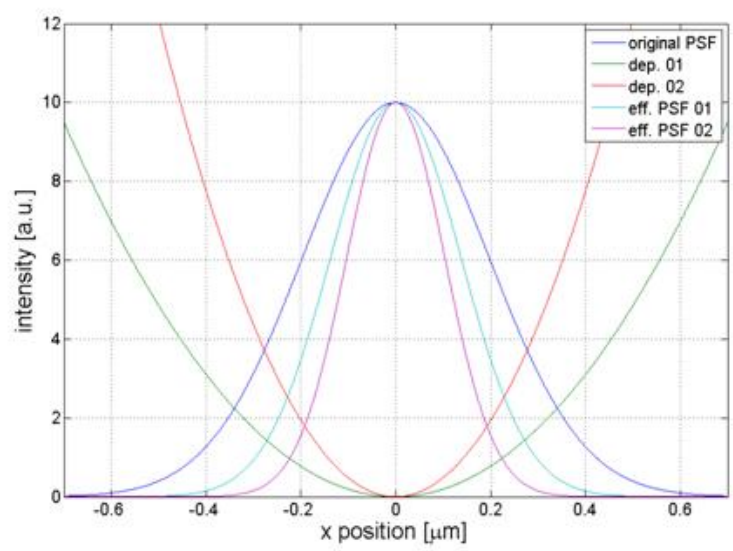
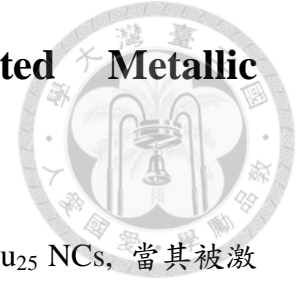


Fig. 2.2 點擴散函數之寬度與耗乏光強度之關係圖。對同一螢光材料來說 I_{dep} 愈大，則受激放射耗乏顯微術之解析度愈高、於焦平面上之點擴散函數的半高寬愈窄

2.2 Transition Model of Protein-Protected Metallic Nanoclusters



與 IGNCs 同屬蛋白質螢光金粒子的材料，BSA-Protected Au₂₅ NCs，當其被激發後，電子除了會從激發態(單重態, singlet state)躍遷回基態(ground state)，而放出即時螢光(prompt fluorescence, PF)，亦會由激發態(單重態)躍遷至三重態(triplet state)，此躍遷稱為系統間跨越(intersystem crossing, ISC)。此外，由於熱效應，處於三重態之電子仍有機會做逆系統間跨越(reverse intersystem crossing, RISC)而回到單重態(singlet state)並發出延遲螢光(delayed fluorescence, DF) [21]，因而造成 BSA-Protected Au₂₅ NCs 有兩個螢光放光生命期(lifetime)。由於文獻[16]記載 IGNCs 有兩個螢光生命期，並且根據後來的實驗結果，我們推測 IGNCs 亦會做 ISC 與 RISC 躍遷。本研究中，IGNCs 的提供者，台大化學系周必泰教授，根據分子動力論，協助我們推導當蛋白質螢光金奈米粒子材料受激發脈衝激發後，電子於單重態與三重態之居量分佈與時間之關係。

首先，若考慮螢光材料中之電子已被激發之情形，如 Fig. 2.3 所示，則我們可寫下電子於單重態與三重態之躍遷速率方程式，並假設 t=0 時，只有單重態存在被激發之電子，此時被激發之電子尚未分佈至基態或三重態

$$\begin{aligned}\frac{d[S_1]}{dt} &= -k_f[S_1] - k_{isc}[S_1] + k_{risc}[T_1] \\ \frac{d[T_1]}{dt} &= k_{isc}[S_1] - k_{risc}[T_1] - k_p[T_1] \\ \text{at } t = 0 \quad [S_1] &= [S_1]_0, [T_1] = 0\end{aligned}$$

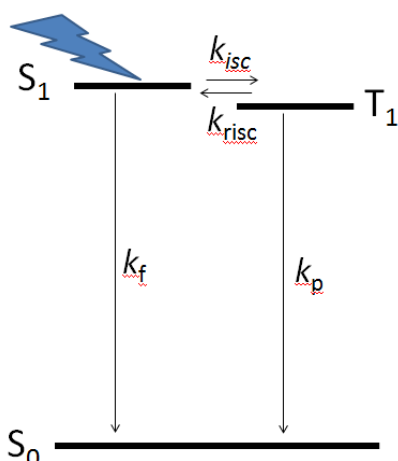


Fig. 2.3 螢光材料中之電子能階圖，包含基態(ground state) S_0 ，單重態(singlet state)

S_1 與三重態(triplet state) T_1 。

其中 $[S_1]_t$ 為時刻 t 時處於單重態之電子數， $[T_1]_t$ 為時刻 t 時處於三重態之電子數。

k_f 為單重態躍遷至基態之速率常數， k_p 為三重態躍遷至基態之速率常數， k_{isc} 為單重態躍遷至三重態之速率常數， k_{risc} 為三重態躍遷至單重態之速率常數。此具有起

始條件之微分方程，可藉由拉普拉斯轉換(Laplace Transformation)而得速解

$$[S_1]_t = \frac{[S_1]_0}{\lambda_2 - \lambda_1} \left\{ (\lambda_2 - X)e^{-\lambda_1 t} + (X - \lambda_1)e^{-\lambda_2 t} \right\}$$

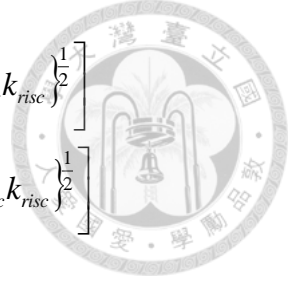
$$[T_1]_t = \frac{k_{isc}[S_1]_0}{\lambda_2 - \lambda_1} \left\{ e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t} \right\}$$

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left[(X + Y) \mp \left\{ (X - Y)^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}} \right]$$

$$X = k_f + k_{isc}$$

$$Y = k_p + k_{risc}$$

其中 $X, Y, \lambda_1, \lambda_2$ 為求解過程中所定義之常數。若將 X, Y 代入，可得



$$\lambda_1 = \frac{1}{2} \left[(k_f + k_{isc} + k_p + k_{risc}) - \left\{ (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc})^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}} \right]$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{2} \left[(k_f + k_{isc} + k_p + k_{risc}) + \left\{ (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc})^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}} \right]$$

並且

$$\lambda_2 - \lambda_1 = \left\{ (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc})^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\lambda_2 - X = -\frac{1}{2} (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc}) + \frac{1}{2} \left\{ (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc})^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$X - \lambda_1 = \frac{1}{2} (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc}) + \frac{1}{2} \left\{ (k_f + k_{isc} - k_p - k_{risc})^2 + 4k_{isc}k_{risc} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

若假設被激發之電子從單重態躍遷回基態或從三重態躍遷回基態前，早已先透過 ISC 與 RISC 機制做好單重態與三重態之居量分佈，則

$$k_{isc}, k_{risc} \gg k_f, k_p$$

若令

$$\frac{k_{isc}}{k_{risc}} = K_{eq}$$

則方程式之解經過簡化後可得

$$\begin{aligned} [S_1]_t &= \frac{[S_1]_0}{\lambda_2 - \lambda_1} \left\{ (\lambda_2 - X) e^{-\lambda_1 t} + (X - \lambda_1) e^{-\lambda_2 t} \right\} \\ &= [S_1]_0 \left\{ \frac{(\lambda_2 - X)}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{-\lambda_1 t} + \frac{(X - \lambda_1)}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{-\lambda_2 t} \right\} \\ &= [S_1]_0 \left\{ \frac{k_{risc}}{k_{isc} + k_{risc}} e^{-\left(\frac{k_f + k_p K_{eq}}{1 + K_{eq}} \right) t} + \frac{k_{isc}}{k_{isc} + k_{risc}} e^{-(k_{isc} + k_{risc}) t} \right\} \end{aligned} \quad (2.7)$$

Eq. (2.7)表示時刻 t 時處於單重態之電子數，且 $[S_1]_t$ 正比於時刻 t 時所收集到之螢光光子數，長生命期的部份為第一項，短生命期的部分則為第二項。在稍後的章節，我們將會使用此式對實驗結果做詳細說明及討論。

Chapter 3 Sample



上一章已介紹過，我們選擇胰島素金奈米粒子(IGNCs)作為研究樣本，原因是因為有文獻指出，蛋白質螢光金奈米粒子比起一般螢光染劑，有較少的光漂白，且由於螢光生命期長，因此根據 Eq. (1.3)可預測 IGNCs 應該會有較小的飽和強度 I_s 。本章則會更進一步介紹 IGNCs 的性質、生物功能及其合成方式。

3.1 Introduction to Insulin-Gold Nanoclusters (IGNCs)

IGNCs 基本上是一種新開發出的、會發光的胰島素。它的核心是一個大約 1 nm 大小的金奈米粒子而周圍接上胰島素分子，因此 IGNC 的整體大小大約為 2-3 nm, 如 Fig. 3.1 所示：

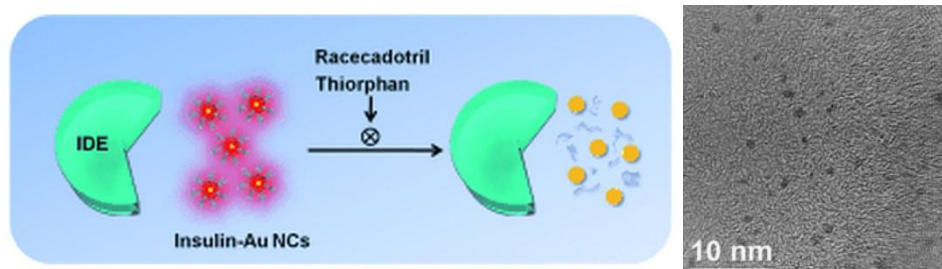


Fig. 3.1 左圖中會發紅色螢光之粒子為 IGNCs. 若被胰島素降解酵素 (insulin-degrading enzyme)吃掉胰島素，則 IGNCs 將失去發螢光能力。右圖為高解析穿透式電子顯微鏡(high-resolution transmission electron microscopy, HRTEM)所取得之影像

而由 IGNCs 的吸收光譜及放射光譜(Fig. 3.2)可知，其 Stokes shift 很大(吸收光譜峰值與放光光譜峰值距離遠)，因此若用它來作為螢光顯微技術的標定物，要將激發

光與螢光訊號分開，將會更加容易。

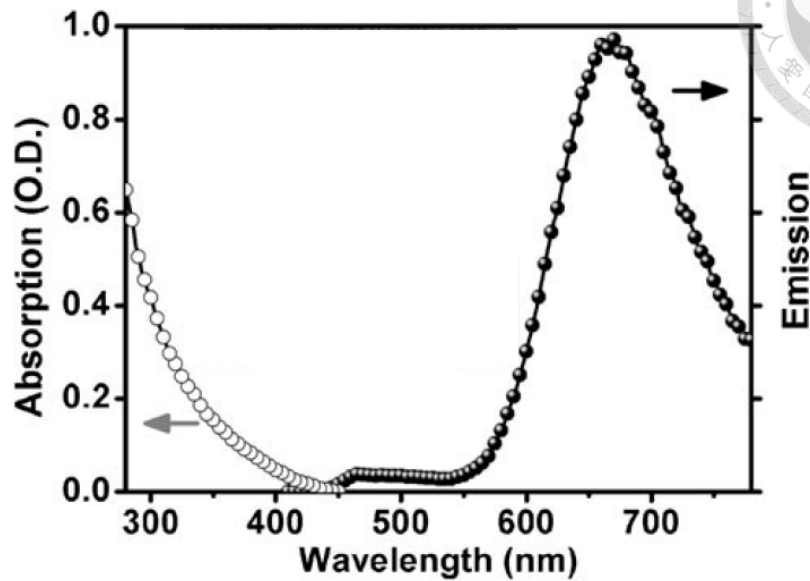


Fig. 3.2 IGNCs 的吸收光譜及放光光譜

此外，目前已有研究指出，被合成出的 IGNCs，於 Wistar 小鼠(rats)體內所具有的生物功能，與商用胰島素 Humulin R 相同，依然具有降血糖的能力[16]。而由於胰島素與許多疾病息息相關，例如：糖尿病、阿茲海默症、肥胖、老化、...等，因此 IGNCs 這種會發光的胰島素，預計將用來做與這些疾病相關的生物醫學研究。此外，與光穩定性超高的螢光標定物，例如：nitrogen vacancies in diamond [15]，或是與其它半導體量子點(quantum dots)相比，IGNCs 因其體積小且金核與胰島素對生物無毒性，因此擁有更優異的生物相容性，較不會影響被標定物原本所具有的生物活動[16]。考慮了 IGNCs 的穩定螢光及其生物相容性，我們認為將 IGNCs 搭配超解析遠場螢光顯微技術，受激放射耗乏顯微術，將會是個非常棒的組合，預期將能於生醫研究上提供更多應用與可能性。


	<p>胰島素金奈米粒子(IGNCs)</p>	<p>半導體量子點 (Semiconductor quantum dots, QDs)</p>	<p>可逆可光切換之強綠色螢光蛋白 (Reversibly switchable enhanced green fluorescent protein, rsEGFP)</p>
<p>低毒性</p>	<p>[16] ✓</p>	<p>常包含有毒重金屬[22]</p>	<p>✓</p>
<p>高生物相容性</p>	<p>[16] ✓</p>	<p>通常較大顆(3-100 nm) [22]</p>	<p>✓</p>
<p>大 Stoke's shift</p>	<p>易將激發光與螢光訊號分離[16] ✓</p>		
<p>較少光漂白 (photobleach)</p>	<p>螢光比有機染劑穩定[17]</p>	<p>可承受多次螢光激發與耗乏操作 [15] ✓</p>	<p>可承受多次螢光激發與耗乏操作 [7] ✓</p>

Table 3.1 IGNCs 與其它螢光標定物之比較



3.2 Specimen Preparation

將胰島素(insulin)與 HAuCl_4 加入至 Na_3PO_4 緩衝溶液並持續攪拌，會發螢光之 IGNCs 可被合成出來。但此時溶液中包含其它產物，因此必須經過純化。此樣本已透過離心分離的方式達到純化，以提供後續使用。本實驗中，我們的顯微鏡樣本是藉由將 IGNCs 溶液以滴管吸取，滴至載玻片上，並覆上蓋玻片，等 IGNCs 乾燥而製成，如 Fig. 3.3 所示。



Fig. 3.3 樣本準備方法

因 IGNCs 粒子形狀接近球形，因此在乾涸過程中，還會出現咖啡漬圈環效應(coffee ring effect), 如 Fig 3.4 所示，亦即會有許多 IGNCs 聚集在邊緣。因此在實驗中尋找樣本時，我們尋找了 IGNCs 較多、螢光較明顯的邊緣來進行實驗。

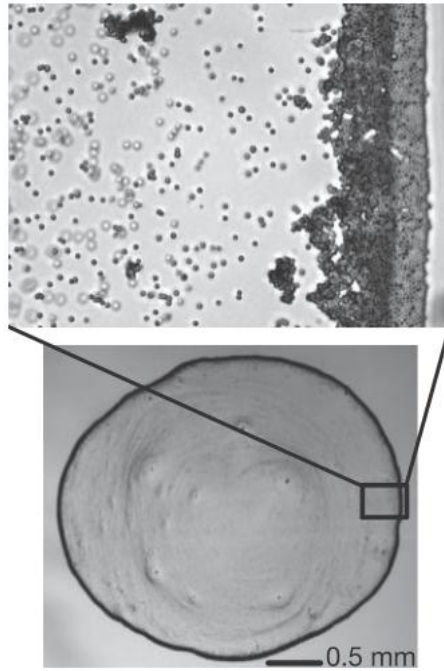


Fig. 3.4 咖啡漬圈環效應(coffee ring effect) [23]

Chapter 4 Introduction to the Experiments



基本上，本論文中實驗分兩部分，分為實驗 1 和實驗 2，如 Fig. 4.1 所示。實驗 1 中，激發光為 476 nm 連續波雷射，耗乏光為 592 nm 連續波雷射，收光部分根據 IGNCs 螢光放光光譜，分別選了 500-570 nm 以及 615-700 nm 這兩個範圍來做測試，觀察此範圍內螢光是否會因耗乏光的作用而有所影響。實驗 2 中，為了降低熱量累積而將樣本損毀，激發光改為 480-500 nm 脈衝雷射，耗乏光改為 690-720 nm 脈衝雷射，收光範圍根據 IGNCs 螢光放光光譜，選在 605-655 nm，觀察此範圍內螢光是否會因耗乏光的作用而有所影響。其餘細節將留待 4.1 節以及 4.2 節做進一步說明。

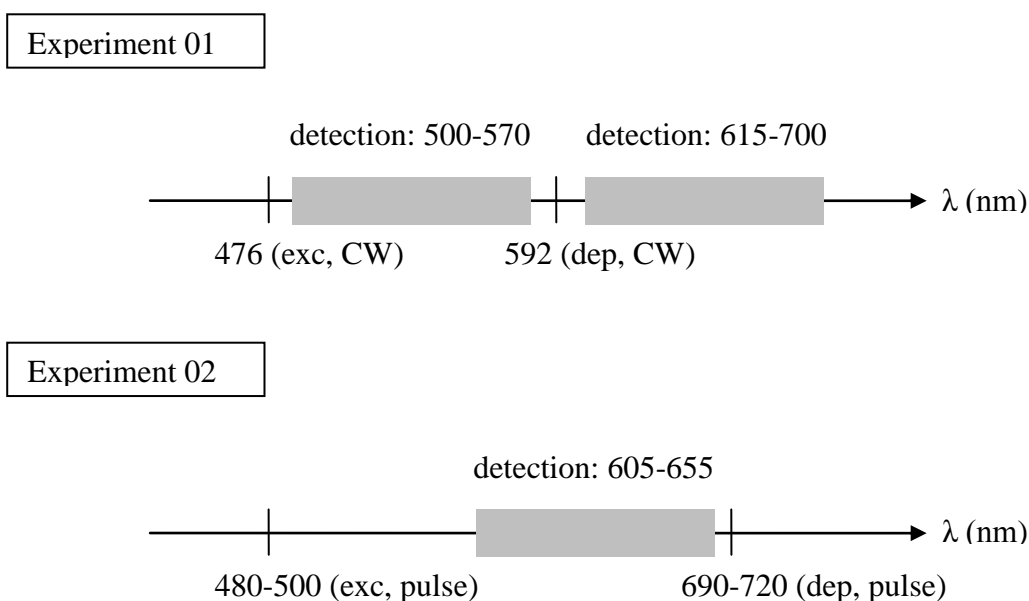


Fig. 4.1 實驗摘要圖。實驗分兩部分，分別搭配不同波長之激發光以及耗乏光。

為了避免收到激發光以及耗乏光，收光範圍也隨之而有所調整



4.1 Experiment 01 (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm or 615-700 nm)

4.1.1 Setup (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm)

本實驗架設如 Fig. 4.2 所示。為了獲得有效之激發以及耗乏效率，根據 IGNCs 之吸收以及放光光譜，激發光(excitation)之波長我們選 476 nm (continuous wave, CW)，而耗乏光(depletion)之波長則受系統之限制，只能為 592 nm (continuous wave, CW)。

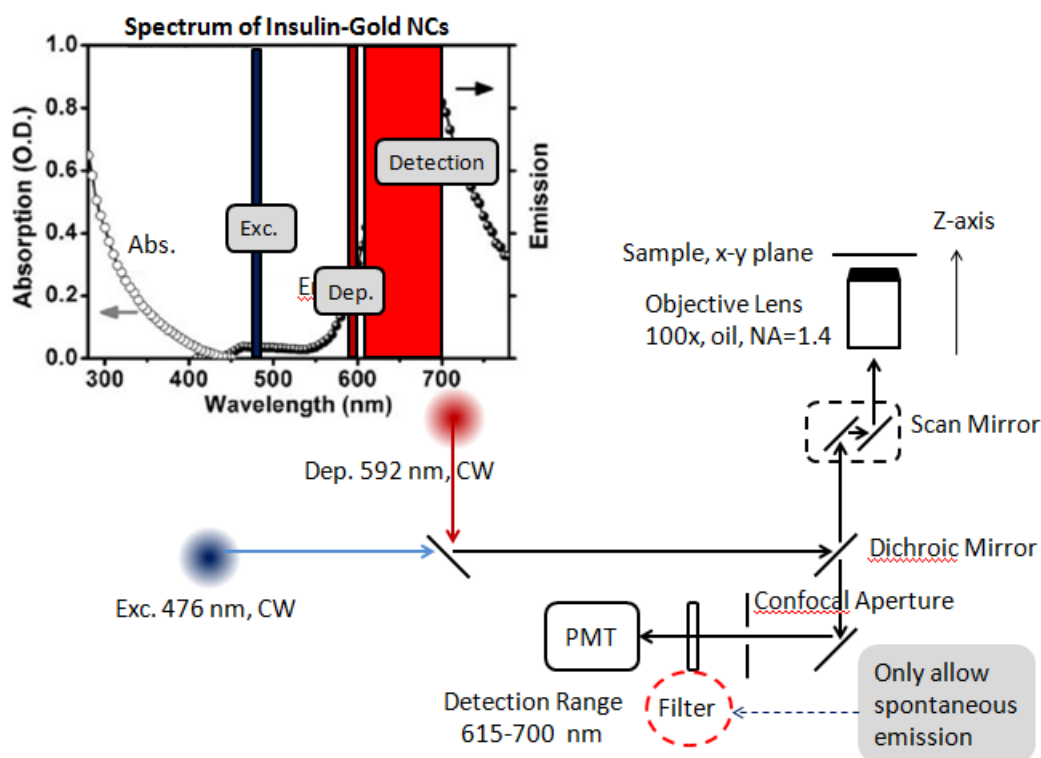


Fig. 4.2 Experiment 01 實驗架設圖(exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm)

實驗中，激發光會連續地激發 IGNCs，並利用耗乏光的加入與否來控制 IGNCs，

觀察其自發螢光是否會受耗乏或恢復。我們使用的物鏡為 100x (HCX PL APO 100.0x1.40 OIL, LEICA). 至於掃描系統及收光部分，我們使用共軛焦顯微鏡系統 (LEICA TCS SP5 STED)。其好處是可利用共軛焦孔徑(confocal aperture)將來自焦平面以外之訊號擋掉，好讓我們只會收到焦平面的螢光訊號，而增強訊雜比。此外，系統中於偵測器(photomultiplier tube, PMT)前使用稜鏡分光，收光範圍為 615-700 nm, 只收自發螢光訊號而過濾激發光、耗乏光以及受激放射訊號，觀察 IGNCs 的螢光是否會因耗乏光的加入而被耗乏。

4.1.2 Results (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm)

Fig. 4.3 顯示，若偵測範圍設為 615-700 nm, 當只施加 476 nm 激發光時，IGNCs 的螢光如同預期，會被激發。當只施加 592 nm 耗乏光時，原本我們根據 IGNCs 的螢光吸收光譜，而預期此波長對應之吸收應該很小，不會激發螢光，但我們發現 IGNCs 之螢光仍會被激發出來。最後當同時施加激發光與耗乏光時，會發現 IGNCs 之螢光訊號變得更強，掩蓋了因受激放射而產生之螢光耗乏效應。

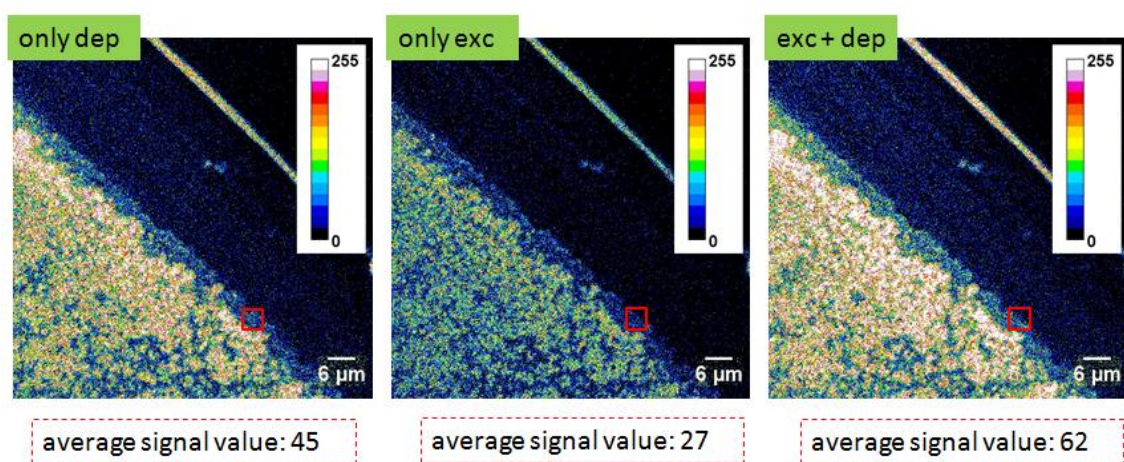


Fig. 4.3 Experiment 01, 偵測範圍為 615-700 nm 之實驗結果

4.1.3 Discussion (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 615-700 nm)

雖然根據 IGNCs 之吸收光譜預測，IGNCs 對 592 nm 耗乏光之吸收應該不高，但因為耗乏光平均强度高($\sim 10 \text{ MW/cm}^2$)，因此當只施加 592 nm 耗乏光時，仍可偵測到 IGNCs 之螢光訊號。若取 Fig. 3.3 中之紅色方框區域進行平均訊號強度分析，可發現當只有 592 nm 耗乏光進行作用時，訊號強度為 45。當只有 476 nm 激發光作用時，訊號強度為 27。當激發光與耗乏光同時作用時，訊號強度為 62，不等於各別激發時之螢光訊號相加，因此我們相信其中仍伴隨 IGNCs 螢光訊號的耗乏，耗乏率約為 $[(45+27)-62]/27=37\%$ 。

4.1.4 Results (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm)

為了不收到由 592 nm 耗乏光所激發出之螢光，我們將收光範圍調整為 500-570 nm，而其它實驗架設仍與 Fig. 3.2 相同，皆維持不變。我們發現 IGNCs 之螢光，確實出現被耗乏光些微耗乏之效應。隨著耗乏光強度繼續增大，耗乏效率略為提高，如 Fig. 4.4 所示，為 IGNCs 之螢光耗乏曲線圖(depletion curve)。但若將耗乏光強度繼續增強下去，則 IGNCs 樣本將被燒毀，原因是連續波雷射所造成的熱量累積。

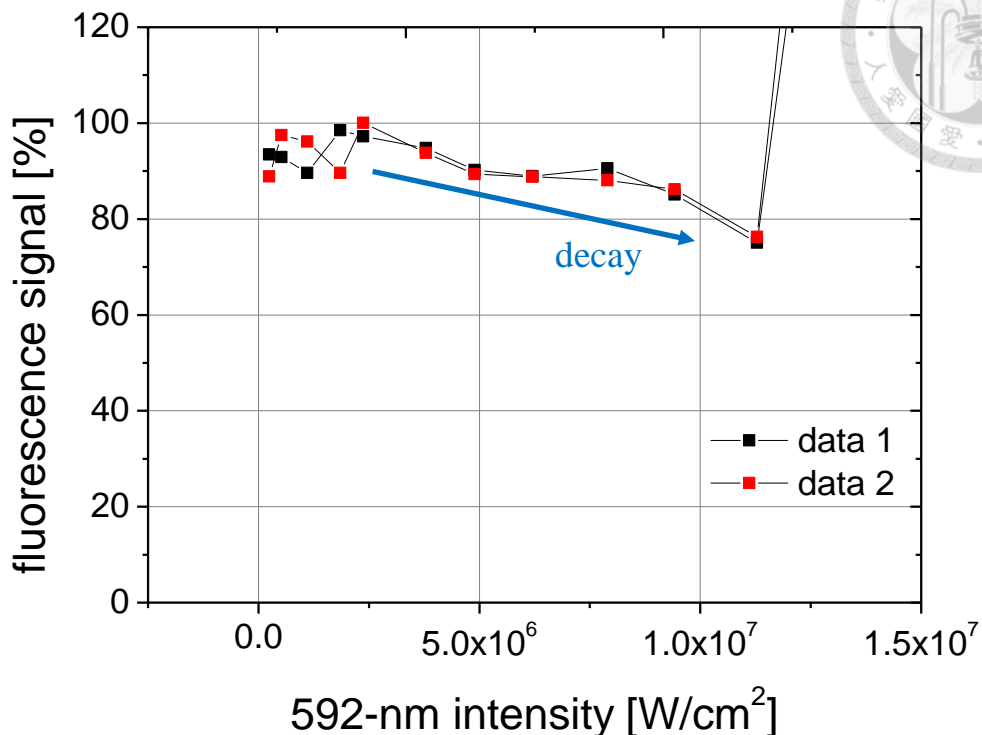


Fig. 4.4 IGNCs 之耗乏曲線圖(depletion curve). 偵測範圍為 500-570 nm. 每調整一次耗乏光強度，就取一張圖，並對圖中某一小塊區域做平均螢光強度分析，可得一數據點，圖中共顯示兩組數據。可看出不同耗乏光強度下，IGNCs 螢光隨之耗乏的情形

4.1.5 Discussion (exc: 476 nm, dep: 592 nm, detection: 500-570 nm)

由 Fig. 4.4 可發現，IGNCs 之螢光，在耗乏光強度(I_{dep}) $\sim 1.15 \times 10^7$ W/cm² 下，最多可降為原來強度之 75%，亦即在此實驗中，螢光耗乏效率最高為(100-75) % = 25%。若將耗乏光強度繼續提高至 1.3×10^7 W/cm²，則 IGNCs 將無法承受而被燒毀。IGNCs 螢光耗乏效率不佳(~ 25 %)，推測其原因，應該是所使用的耗乏光波長，不夠接近 IGNCs 放光光譜之峰值，因此耗乏光與樣本的交互作用程度相較於選擇靠近峰值之波長時為低。此外，IGNCs 被燒毀的原因，推測應該是由於本實驗使用

了連續波(continuous wave, CW)雷射光源，因而容易造成熱量累積於樣本中，沒有足夠時間讓其釋放能量，因此當耗乏光強度高時，樣本容易毀損。

由於以上考量，在接下來的實驗 2 中，我們將使用脈衝雷射光源，且調整耗乏光之波長，使之更接近放光光譜之峰值，以得到更好的螢光耗乏效率。

4.2 Experiment 02 (exc: 480-500 nm, dep: 690-720 nm, detection: 605-655 nm)

4.2.1 Setup

本實驗之架設如 Fig. 4.5 所示。光源部分使用超連續脈衝雷射(supercontinuum pulse laser source, SC400-PP-HE, Fianium, UK), 脈衝重複率為 2 MHz. 利用分光片可將光源分為兩道，一道為激發光(excitation), 另一道為耗乏光(depletion). 為獲得較有效之激發以及耗乏效率，我們根據 IGNCs 之吸收以及放光光譜，激發脈衝之波長我們選為 480-500 nm, 而耗乏脈衝之波長則為 690-720 nm. 而我們之所以不使用低於 480 nm 之光作為激發波長的原因是因為 SC400-PP-HE 所提供之短波長雷射功率相當低，因此選擇 480-500 nm 進行實驗。

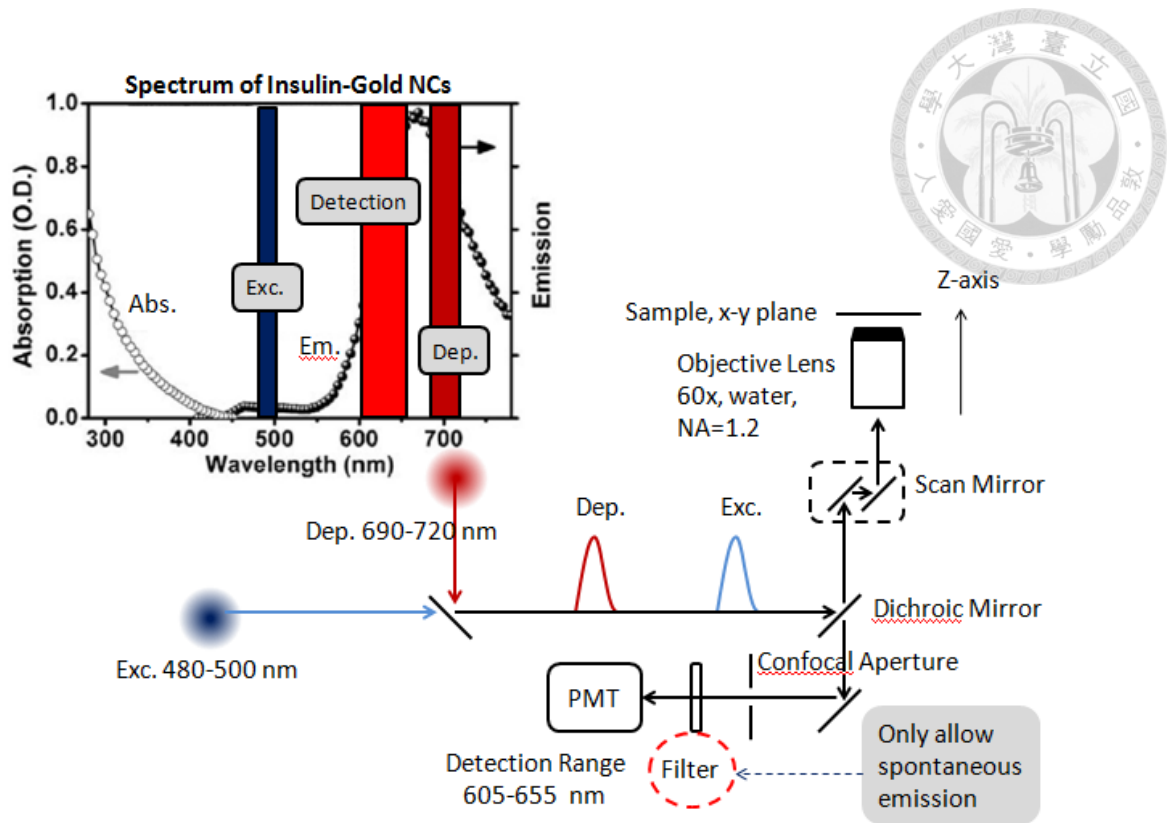


Fig. 4.5 Experiment 02 實驗架設圖(exc pulse: 480-500 nm, dep pulse: 690-720 nm, detection: 605-655 nm)

此外，為了能均勻激發以及進行螢光耗乏，我們所使用的激發光以及耗乏光均為圓偏振。實驗中，激發脈衝會先激發 IGNCs，而趁 IGNCs 處於激發態並且尚未自發螢光前，利用耗乏脈衝使 IGNCs 做受激放射，耗乏其自發螢光。欲達此激發以及耗乏效果，激發光以及耗乏光兩脈衝在時間上之間隔，需小於 IGNCs 之螢光生命期。在實驗上，我們將此兩脈衝在時間上之間隔調整為 210 ps，如 Fig. 4.6 (a) 所示。

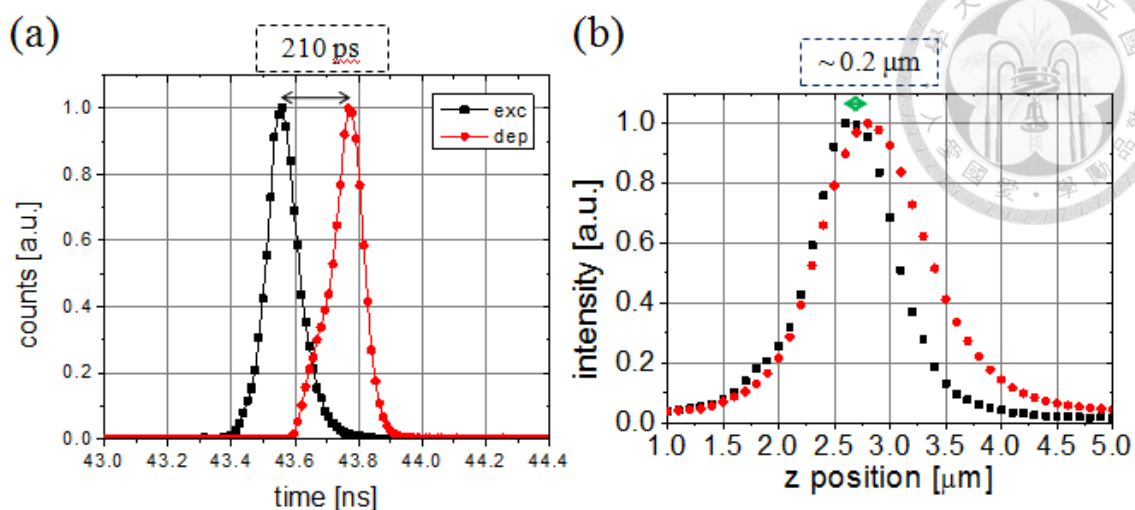


Fig. 4.6 (a) 激發脈衝與耗乏脈衝之時間間隔。(b) 激發光與耗乏光經物鏡聚焦後，兩光源之焦平面間距約為 $0.2 \mu\text{m}$ 。

實驗中，我們使用 60x 物鏡 (NA=1.2, water immersion, UPlanSApo, Olympus, Japan)。至於樣本掃描及收光部分，我們使用共軛焦雷射掃描偵測系統 (FV300, Fluoview, Olympus, Japan)。此外，我們使用分光片 (dichroic beamsplitter): FF505/606-Di01 (Semrock, US)，濾光片 (filter): 629/53 nm BrightLine (Semrock, US) 以及濾光片 (filter): 565 nm longpass (BA565IF, Olympus, Japan) 於偵測器 (photomultiplier tube, PMT, FV300 內建) 前，使收光範圍落於 605-655 nm，亦即只收自發螢光而過濾激發光、耗乏光以及受激放射訊號，目的在觀察 IGNCs 之螢光是否會受耗乏光影響而產生耗乏現象。

實際上，為了使實驗操作過程中，激發光與耗乏光經物鏡聚焦後之焦平面能盡量接近並且重疊，以增加耗乏效率，兩道光之波長必須盡量接近，以減少光學元件色散造成的聚焦差距，此即實驗 1 (激發光與耗乏光之波長較接近)，而其結果已於 4.1 節說明，由於耗乏效率不佳，因此才發展出本實驗。而在本實驗參數下所

對應之激發光與耗乏光焦平面間距則如 Fig. 4.6 (b)所示。

本實驗中，我們順利觀察到在耗乏脈衝的作用下，IGNCs 有螢光被耗乏的現象發生，如 Fig. 4.7 所示。在此之前，並未有文獻提出對於蛋白質螢光金奈米粒子之螢光耗乏特性相關研究，這是第一次在實驗上被觀察到。

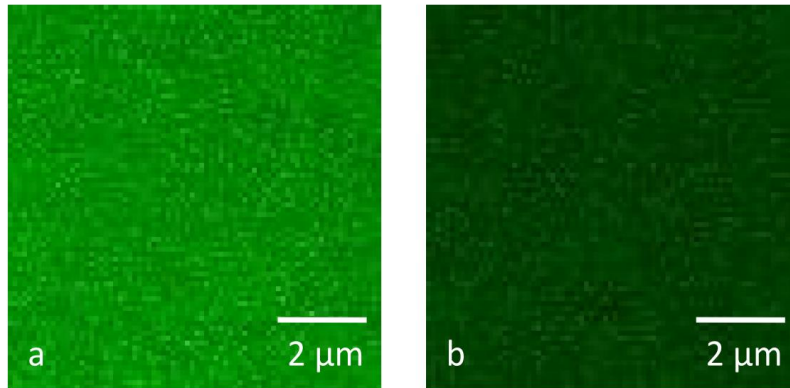


Fig. 4.7 IGNCs 之螢光耗乏。(a)只用激發光激發，尚未加入耗乏光，平均螢光強度=2225 (a.u.). (b)加入耗乏光後，平均螢光強度=993 (a.u.). 區域大小為 $8 \times 8 \mu\text{m}^2$

接著，我們分別使用不同強度之耗乏光進行實驗，而獲得 IGNCs 之螢光耗乏曲線圖，如 Fig. 4.8 所示。當所施加的耗乏光強度愈高，IGNCs 之螢光將被耗乏愈多。當耗乏光之強度達到最大值， $3.8 \text{ GW}/\text{cm}^2$ 時，螢光訊號只剩原來的 43%，即此時螢光耗乏效率達到最大值，為 $(100-43) \% = 57 \%$ 。

此外，我們可利用指數擬合(exponential fitting)對 IGNCs 之螢光耗乏曲線進行分析，而獲得 IGNCs 之飽和強度(saturation intensity) = $2.75 \text{ GW}/\text{cm}^2$ ，並發現有個 30% 的背景值(background)存在。而之所以無法取得更高耗乏效率數據的原因，除了是因為雷射光源在此波長所提供之功率，已無法再進一步提升，也可能是來自於 IGNCs 內部電子躍遷之相關物理機制所導致，此部分將於 4.2.2 節做詳細說明。

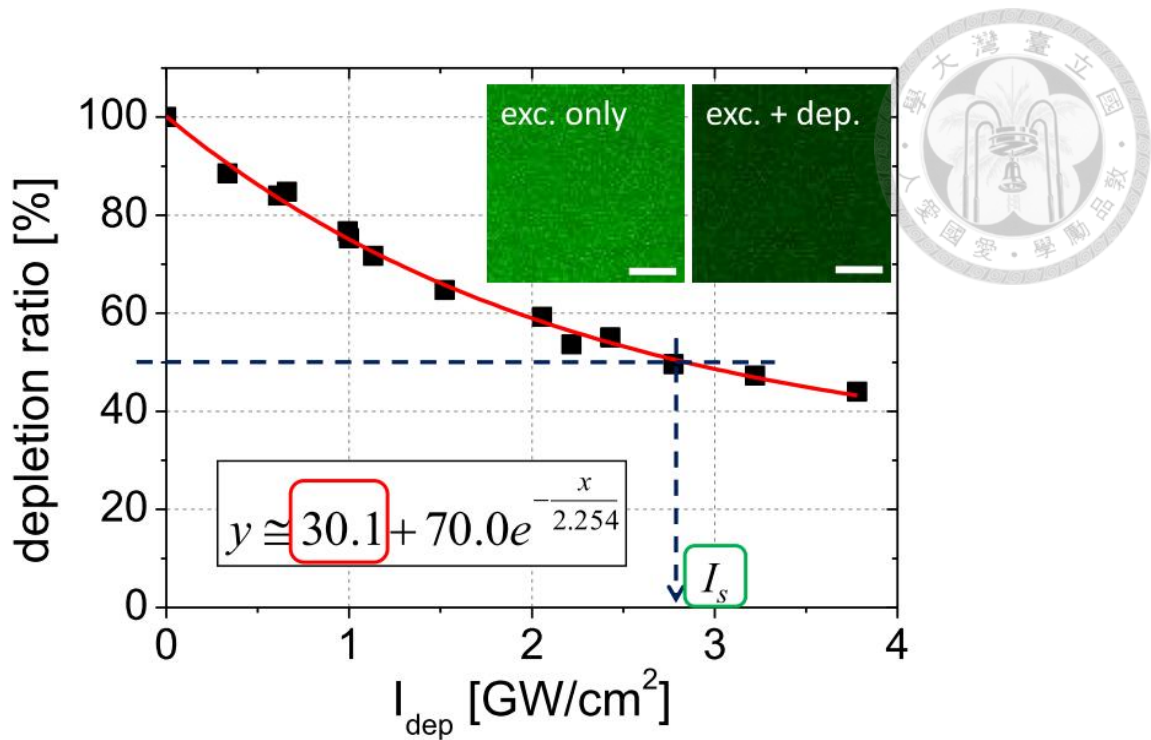


Fig. 4.8 IGNCs 之螢光耗乏曲線。每個黑點皆代表在不同耗乏光強度下，自 Fig. 4.7 中的區域分析出之平均螢光強度。藉由指數擬合，我們可得 IGNCs 之飽和強度， 2.75 GW/cm^2

另外，我們量測了當連續利用耗乏光對 IGNCs 的螢光做開關操作的過程中，其自發螢光的穩定性隨著時間之變化情形，結果如 Fig. 4.9 所示。螢光強度會因有時有加耗乏光、有時沒加而有相對應之變化。此外，由 Fig. 4.9 中之擬合曲線還可觀察到，隨著耗乏光照射時間越久，IGNCs 之螢光會開始出現無法完全回復、有光漂白(photobleach)之現象發生。

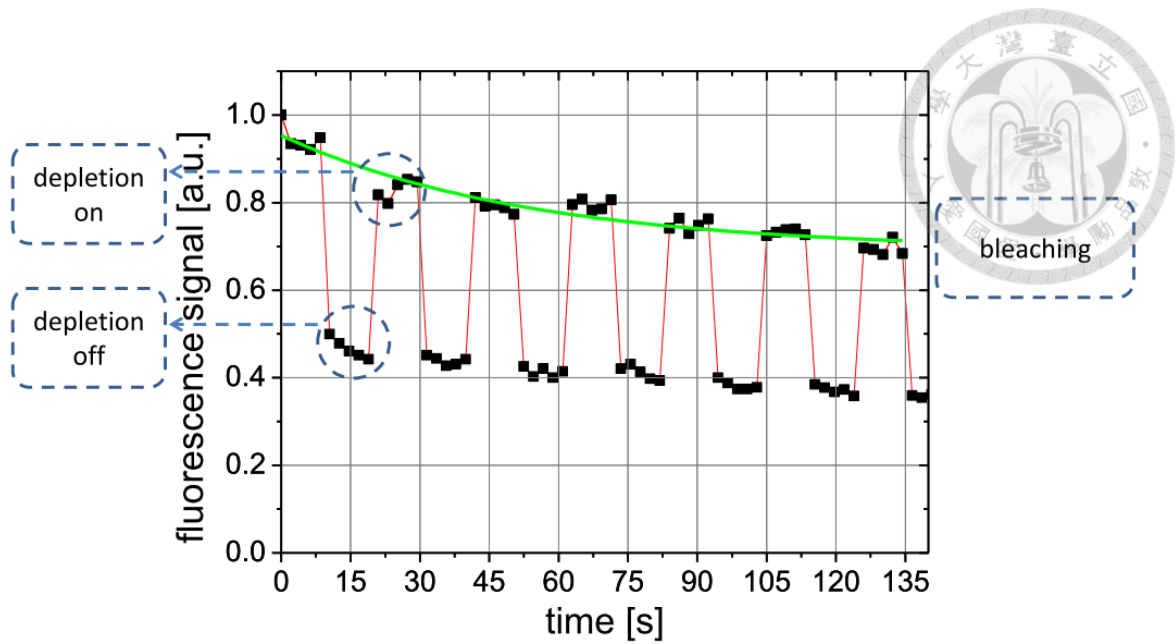


Fig. 4.9 利用耗乏光對 IGNCs 的螢光做開關操作，其螢光穩定性與時間之關係圖。在不同時間點，我們皆取得一張如 Fig. 4.7 之影像並做平均螢光強度分析，而其結果即為此圖中之黑色數據點。每張影像取得速率為 1.09 s/image, 雷射光停留於影像上每個像素(pixel)的時間約為 4.3 μ s. 每取得一張影像後，有 1 秒的休息時間，然後才會取下一張影像。如此一來，我們將有時間在此 1 秒內加入或移除耗乏光。

4.2.2 Discussion about Saturation Intensity and Lifetime

藉由分析 IGNCs 之螢光耗乏曲線(Fig. 4.8)，我們已獲得 IGNCs 的飽和強度(I_s), 2.75 GW/cm^2 . 然而此值比一般搭配受激放射耗乏顯微術所使用的螢光標定物之 I_s 值(約 $10^6 - 10^7 \text{W}/\text{cm}^2$ [7, 24])還要大 2 - 3 個數量級。此外，IGNCs 的 I_s 值也比我們根據 Eq. (1.3)計算之值來得大。

思考其中原因，推測我們於實驗中所使用的 IGNCs 樣本(無水狀態)，其生命期(lifetime)之值不同於文獻中所記載的值(參考文章中，其使用 IGNCs 水溶液樣本，

[16])，這可能是因為兩個實驗樣本所處的觀察環境不同所導致的。因此，我們重新量測 IGNCs 之生命期。我們使用了時間相關單光子計數系統(time-correlated single photon counting system, TCSPC)及偵測器(SPC-150, Polychromator MS 125, and PML-16-1-C, Becker & Hickl GmbH, Germany)進行量測。對數據進行擬合以及分析 (Fig. 4.10 a)之後，發現我們所使用的 IGNCs 樣本，其生命期有兩個，分別為 43 ns (94.6 %)與 0.42 ns (5.4 %)，其中的百分比為佔總放光的比例。

若我們將激發波長 $\lambda = 490 \text{ nm}$ ，生命期 $\tau_{lifetime} = 0.42 \text{ ns}$ (這邊之所以用較短的生命期估算，原因是因為我們後來搜尋文獻[21]發現，此材料的短生命期與受激放射耗乏顯微術理論中所耗乏的自發螢光才有關)，吸收截面(cross section) (根據 IGNCs 內金核的大小, $r = 0.5 \text{ nm}$ ，以 Mie theory 估算之值) $= 3.77 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ，代入 Eq. (1.3)而重新計算出 IGNCs 之飽和強度 I_s 約為 $2.56 \times 10^6 \text{ W/cm}^2$ 。然而，此重新計算的結果，IGNCs 之 I_s 理論值仍遠小於實驗值。因此我們推論，Eq. (1.3)所代表的雙能階躍遷模型(two-level transition model)也許無法完整解釋 IGNCs 之螢光躍遷，可能需尋找其它模型來配合解釋。

經過文獻搜尋，我們發現一種叫做牛血清白蛋白-金奈米粒子(Bovine Serum Albumin, BSA-Protected Au₂₅ NCs)的材料。當其電子被激發後，將會做系統間跨越(intersystem crossing, ISC)躍遷至三重態(triplet state)，並且由於熱效應，處於三重態之電子仍有機會做逆系統間跨越(reverse intersystem crossing, RISC)而回到單重態(singlet state)並發出螢光[21]。

因為 BSA-Protected Au₂₅ NCs 與 IGNCs 類似，也是屬於蛋白質螢光金奈米粒子的材料，因此我們根據 IGNCs 有兩個生命期，一個較短一個較長的實驗結果來推測，當我們激發 IGNCs 後，IGNCs 也會做類似的躍遷機制，如 Fig. 4.10 (b)所示。

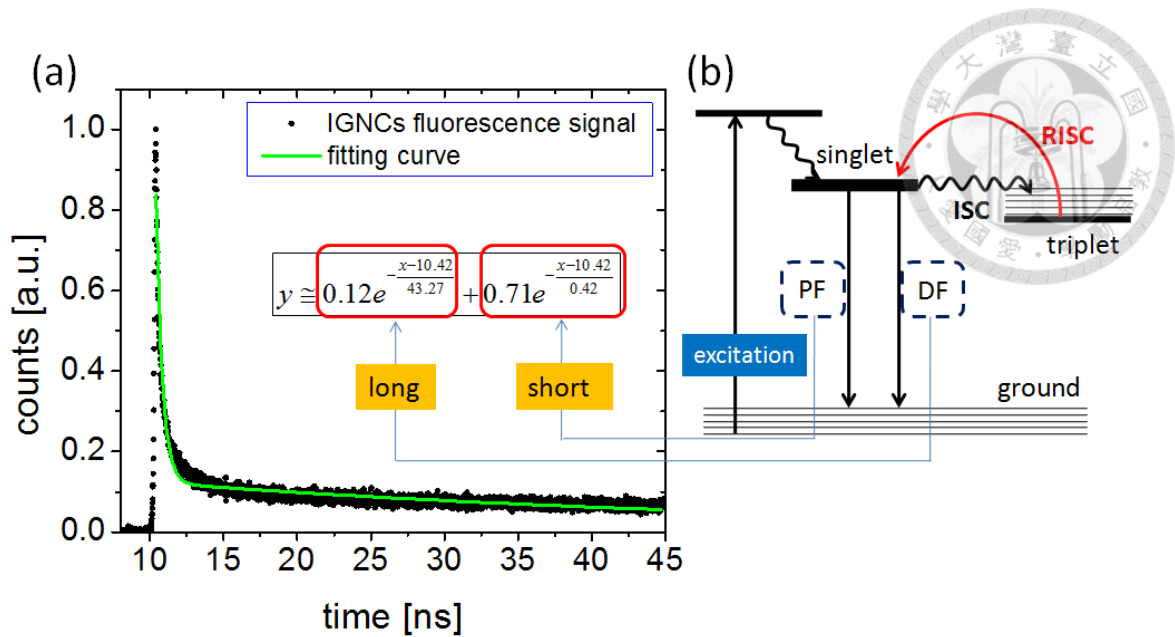


Fig. 4.10 IGNCs 螢光強度與時間之關係圖。(a)由指數擬合結果(綠色線)可計算得 IGNCs 之生命期有兩個，分別為 0.42 ns 與 43 ns。(b)關於系統間跨越(ISC)和逆系統間跨越(RISC)之概念圖。來自即時螢光(prompt fluorescence, PF)之訊號以及經由 ISC 和 RISC 躍遷後之延遲螢光訊號(delayed fluorescence, DF)分別對應到短生命期和長生命期的部分

我們推測，當耗乏脈衝抵達樣本要去耗乏 IGNCs 上處於單重態的電子時，其實有一部份電子已透過 ISC 機制躍遷至三重態。這些電子稍待一會兒因環境熱效應所提供之能量，還會做 RISC 躍遷回單重態並放出螢光，而導致了我們在耗乏曲線(Fig. 4.8)上所觀察到的，即使耗乏光強度繼續增加，最後仍會有 30% 的背景值。我們推測，此背景值包含有耗乏脈衝所無法耗乏掉的、屬於長生命期的螢光部分，也因此 IGNCs 有比一般螢光染劑大的 I_s 值。

此外，若根據 2.2 節所提到的蛋白質螢光金奈米粒子受激發後之電子躍遷模型，由 Eq. (2.7) 與 Fig. 4.10 的螢光放光擬合曲線方程式成正比之關係，即



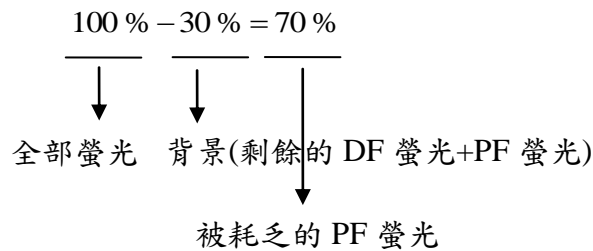
$$\frac{k_{risc}}{k_{isc} + k_{risc}} e^{-\left(\frac{k_f + k_p K_{eq}}{1 + K_{eq}}\right)t} \propto 0.12283 e^{-\frac{t}{43.26585}}$$

$$\frac{k_{isc}}{k_{isc} + k_{risc}} e^{-(k_{isc} + k_{risc})t} \propto 0.71448 e^{-\frac{t}{0.42321}}$$

可解出 $t=0$ 時，

$$\frac{k_{isc}}{k_{risc}} = K_{eq} = \frac{0.71448}{0.12283}$$

亦即 IGNCs 受激發後，在發螢光前，被激發之電子於單重態與三重態所占的比例分別約為 $[0.71448/(0.71448+0.12283)]\% = 85\%$ 與 $[0.12283/(0.71448+0.12283)]\% = 15\%$ 。若我們假設耗乏脈衝到達時可完全耗乏 IGNCs 處於單重態的電子，則 Fig. 4.8 的耗乏曲線應該不會呈現還有 30% 之背景值，應該只會剩 15% 才對。因此我們推測耗乏脈衝到達時只能部分耗乏處於單重態的電子，



由外推法推算以同樣的實驗架設，若能繼續提高耗乏光強度，則理論上對單重態電子之最大耗乏比例為 $(70/85)\% = 82\%$ 。之所以 DF 螢光未被抑制，其原因為有部分電子較早由單重態躍遷至三重態，因此這些電子未被耗乏脈衝之受激放射耗乏效應所影響。此外，若考慮到耗乏脈衝實際上在激發脈衝抵達之後 210 ps 抵達，此段期間已發出一些螢光，由積分計算的結果，其比例約占總比例的 2.5%，暗示耗乏脈衝即使於高強度下仍無法完全耗乏 IGNCs 之螢光訊號。

另一方面，由 Fig. 4.9，我們發現 IGNCs 的螢光，經過耗乏光多次之開關操作

後，當移除耗乏光後，並沒有辦法完全回復，會有一點光漂白之情形產生，原因除了為激發光造成，也與高強度之耗乏光有關。若單純只以激發光做一般樣本掃描，則會發現光漂白現象較不明顯，如 Table. 4.1 所示。若將此結果與常用於受激放射耗乏顯微術之螢光標定物：Atto565 相比，則會發現 IGNCs 之螢光穩定性於 10^5 W/cm^2 之激發光、 10^9 W/cm^2 之耗乏光，於一般掃描速率下 ($235 \times 235 \text{ } \mu\text{m}^2$, $512 \times 512 \text{ pixel}^2$, 0.44 s/image) 其實相當不錯。若以光漂白 20 % 為基準，則 IGNCs 耗時約 120 秒、Atto565 在空氣中於 10^1 W/cm^2 之激發光下耗時約 210 秒。若考慮到激發 IGNCs 之光強度較高，可發現 IGNCs 具有良好之光穩定性。

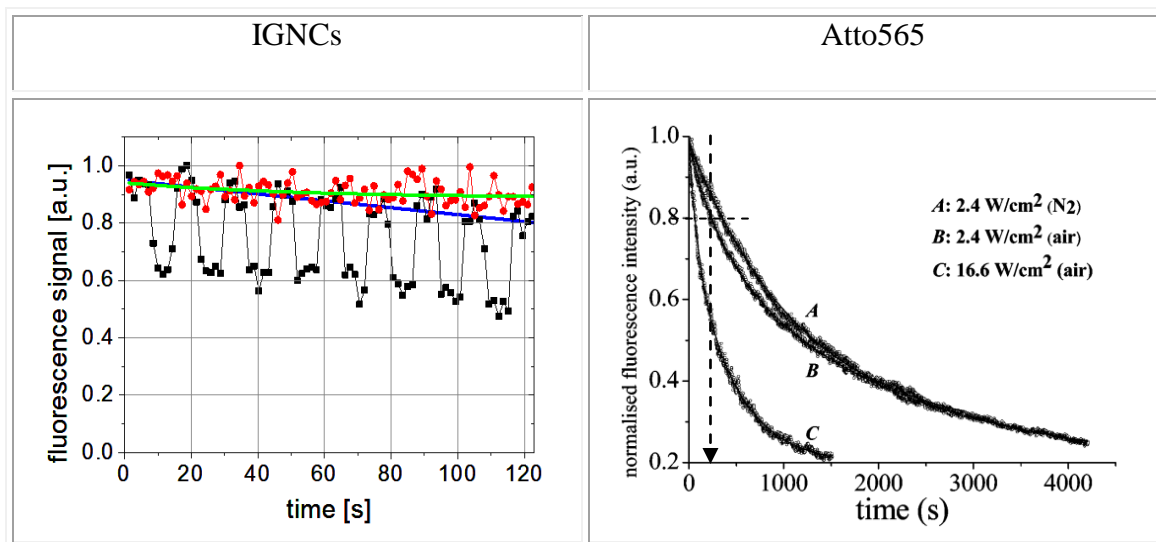


Table 4.1 IGNCs 之螢光穩定性與 Atto565 的比較 [25]

Chapter 5 Experiment Improvement



為了延長光漂白的時間以及降低 IGNCs 的飽和強度，我們思考並搜尋文獻，看看是否有方法可以改善這兩個問題。而第一個問題，可藉由 2007 年 Donnert 於其報告中提出的概念解決：降低雷射脈衝重複率，可使樣本有更多時間將熱量排出，而減少光漂白或樣本燒毀的機會[26]，而此結果我們已於第四章之實驗 1 與實驗 2 裡得到驗證。

另一方面，根據 Vicidomini 於 2011 年的研究報告中提出的概念：時間閘受激放射耗乏顯微術(time-gated STED microscopy) [27]，我們獲得啟發，認為若使用時間閘偵測(time-gated detection)技術應該可使 IGNCs 的飽和強度進一步降低。而其結果示於 Fig. 5.1. 其中，激發脈衝峰值(480-500 nm)抵達的時間點為 38.46 ns. 而耗乏脈衝峰值(670-695 nm)抵達的時間點為 38.65 ns. 兩脈衝之時間間隔為 190 ps.

藉由適當選擇偵測範圍(螢光耗乏前後對比度高之區域,如 Fig. 5.1 中綠色長方形框)，由偵測器的角度來看，IGNCs 螢光被耗乏之機率可更進一步提高。例如當偵測範圍選為 38.9-39.4 ns 時，螢光耗乏比率為 36%。而當偵測範圍選為 39.2-39.6 ns 時，螢光耗乏比率可提高至 50%，在同樣的耗乏光強度下，此結果意味著，我們可利用時間閘偵測技術，將耗乏光對 IGNCs 的螢光耗乏效率進一步提高約(50-36) % = 14 %.

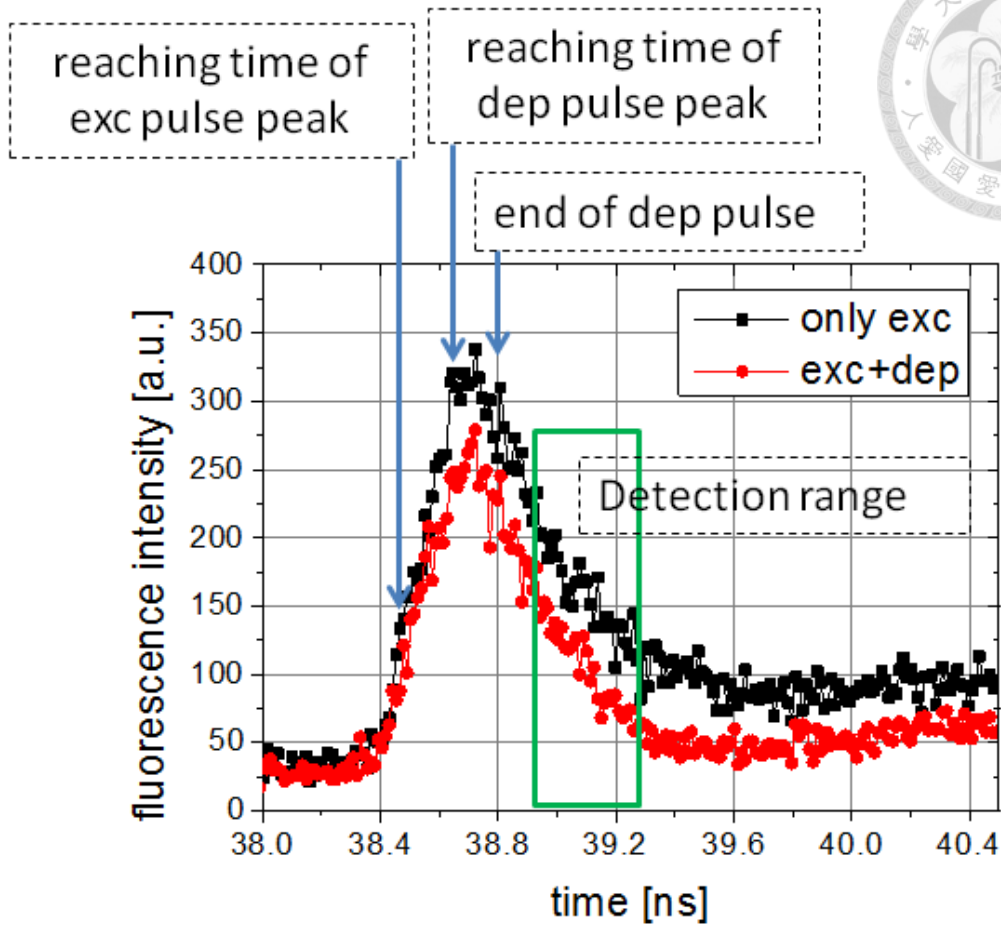


Fig. 5.1 利用時間閘偵測技術，提升 IGNCs 之螢光耗乏效率。黑色曲線代表的是被激發光激發出的螢光訊號與時間之關係圖。紅色曲線則是代表受耗乏光影響下螢光訊號與時間之關係圖

Chapter 6 Conclusions



目前尚無文獻記載蛋白質螢光金奈米粒子之受激放射耗乏特性及評估將其運用於受激放射耗乏顯微術之可能性。本論文中，首先提出蛋白質螢光金奈米粒子之一，insulin-gold NCs (IGNCs)受激放射耗乏特性之發現：當耗乏光存在時，IGNCs的自發螢光有被耗乏的效應發生。我們檢測了在連續利用耗乏光對IGNCs的螢光做開關操作的過程中，其所呈現之光穩定性。若以20%的光漂白為基準，IGNCs於 10^5 W/cm^2 之激發光、 10^9 W/cm^2 之耗乏光、一般掃描速率下花費約120秒，而Atto565於 10^1 W/cm^2 之激發光下大約花費210秒。若考慮到實驗上用來激發IGNCs之光強度較高，則可發現IGNCs之光穩定性其實相當不錯，符合當初預期。

然而當耗乏光強度逐漸增強至實驗上可達之最大值 3.8 GW/cm^2 時，IGNCs之螢光耗乏效率僅可達57%。根據所獲得之螢光耗乏曲線，利用指數擬合，我們可得IGNCs之飽和強度(I_s)為 2.75 GW/cm^2 ，但此值大於一般受激放射耗乏顯微術常用之染劑的 I_s ($\sim 10^7 \text{ W/cm}^2$)。

為了改善螢光耗乏效率，我們利用了時間閘偵測技術。結果可使670-695 nm之耗乏光，其螢光耗乏效率進一步提升14%，亦即我們等效降低了IGNCs的 I_s ，使它的螢光更易被開關。另一方面，我們文獻搜尋後發現，低的雷射脈衝重複率，將可使IGNCs或生物樣本較不易有能量累積，因此可使光漂白或樣本燒毀情況更加減少。

由於較大的 I_s 將無法使解析度提升太多，因此我們認為，IGNCs並不適合用於受激放射耗乏顯微術中，除非搭配更加良好的時間閘偵測技術以及低雷射脈衝重複率，並且還要將所使用之雷射脈衝寬度、激發脈衝與耗乏脈衝之時間間距、

波長等實驗參數最佳化，才有可能進一步降低 I_s 值。



IGNCs 之性質	是否可適用於 STED microscopy 作為螢光標定物?	相關應用
低毒性、高生物相容性、大 Stoke's shift	✓	胰島素相關疾病研究
仍具原有生物功能(降血糖)	✓	
螢光可耗乏特性	✓	光操縱(photoswitching)之 其它應用
$I_s = 2.75 \text{ GW/cm}^2$; 最大耗乏效率 ~ 57%	比一般螢光染劑大 ($\sim 10^6$ - 10^7 W/cm^2)	若欲用於 STED microscopy, 需搭配:
光漂白	與 Atto565 相比, 光 穩定度佳	<ol style="list-style-type: none"> 1. 時間閘偵測技術 2. 低雷射脈衝重複率 3. 雷射脈衝寬度、激發 脈衝與耗乏脈衝之時 間間距、波長等實驗 參數最佳化

Table 6.1 本論文所用樣本，IGNCs 之性質整理

Chapter 7 Prospects and Future Works



雖然結論提到，IGNCs 可能不適合用於受激放射耗乏顯微術，除非搭配更優良的時間閘偵測技術及低雷射脈衝重複率。但我們相信，IGNCs 的螢光可耗乏特性與它在生物功能上的許多特點，仍將使其於光學操作(photoswitching)的其它方面應用上、生醫研究上，特別是與胰島素相關的疾病研究上，仍提供許多發展機會與可能性。

另一方面，本論文中的研究，所使用的樣本為乾燥的 IGNCs 樣本，若能將 IGNCs 置於含水細胞中或其它能維持水溶液狀態的環境中，也許其飽和強度的值會有所不同，並且可能適用於受激放射耗乏顯微術，這是另一個未來可以嘗試的方向。

REFERENCE



1. M. Fernandez-Suarez, and A. Y. Ting, "Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**, 929-943 (2008).
2. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
3. B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science* **319**, 810-813 (2008).
4. A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, and X. Zhuang, "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain," *Neuron* **68**, 843-856 (2010).
5. S. W. Hell, and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Optics Letters* **19**, 780-782 (1994).
6. T. A. Klar, and S. W. Hell, "Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy," *Optics letters* **24**, 954-956 (1999).
7. T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, and S. W. Hell, "Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP," *Nature* **478**, 204-208 (2011).
8. V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S. W. Hell, "Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement," *Science* **320**, 246-249 (2008).
9. D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup, and S. W. Hell, "A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution," *Journal of Microscopy* **236**, 35-43 (2009).
10. U. V. Nagerl, and T. Bonhoeffer, "Imaging living synapses at the nanoscale by STED microscopy," *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* **30**, 9341-9346 (2010).
11. J. Tonnesen, F. Nadrigny, K. I. Willig, R. Wedlich-Soldner, and U. V. Nagerl, "Two-color STED microscopy of living synapses using a single laser-beam pair," *Biophysical Journal* **101**, 2545-2552 (2011).
12. U. V. Nagerl, "Dual-color nanoscale imaging of synapses and glia cells in living brain slices using STED microscopy," *Journal of Neurochemistry* **125**, 33-33 (2013).
13. M. G. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13081-13086 (2005).
14. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nature Methods* **3**, 793-795 (2006).
15. E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, and S. W. Hell, "STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution," *Nature*

- Photonics **3**, 144-147 (2009).
16. C. L. Liu, H. T. Wu, Y. H. Hsiao, C. W. Lai, C. W. Shih, Y. K. Peng, K. C. Tang, H. W. Chang, Y. C. Chien, J. K. Hsiao, J. T. Cheng, and P. T. Chou, "Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters: preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging," *Angewandte Chemie* **50**, 7056-7060 (2011).
 17. C. A. J. Lin, C. H. Lee, J. T. Hsieh, H. H. Wang, J. K. Li, J. L. Shen, W. H. Chan, H. I. Yeh, and W. H. Chang, "Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: recent progress and present challenges," *Journal of Medical and Biological Engineering* **29**, 276-283 (2009).
 18. B. Harke, J. Keller, C. K. Ullal, V. Westphal, A. Schonle, and S. W. Hell, "Resolution scaling in STED microscopy," *Optics Express* **16**, 4154-4162 (2008).
 19. S. W. Hell, "Toward fluorescence nanoscopy," *Nature Biotechnology* **21**, 1347-1355 (2003).
 20. M. Dyba, J. Keller, and S. W. Hell, "Phase filter enhanced STED-4Pi fluorescence microscopy: theory and experiment," *New Journal of Physics* **7** (2005).
 21. X. M. Wen, P. Yu, Y. R. Toh, A. C. Hsu, Y. C. Lee, and J. Tang, "Fluorescence dynamics in BSA-protected Au-25 nanoclusters," *Journal of Physical Chemistry C* **116**, 19032-19038 (2012).
 22. J. Xie, Y. Zheng, and J. Y. Ying, "Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters," *Journal of the American Chemical Society* **131**, 888-889 (2009).
 23. P. J. Yunker, T. Still, M. A. Lohr, and A. G. Yodh, "Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions," *Nature* **476**, 308-311 (2011).
 24. B. Huang, M. Bates, and X. Zhuang, "Super-resolution fluorescence microscopy," in *Annu Rev Biochem*(2009), pp. 993-1016.
 25. E. K. Yeow, S. M. Melnikov, T. D. Bell, F. C. De Schryver, and J. Hofkens, "Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface," *The journal of physical chemistry. A* **110**, 1726-1734 (2006).
 26. G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, "Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation," *Nature Methods* **4**, 81-86 (2007).
 27. G. Vicidomini, G. Moneron, K. Y. Han, V. Westphal, H. Ta, M. Reuss, J. Engelhardt, C. Eggeling, and S. W. Hell, "Sharper low-power STED nanoscopy by time gating," *Nature Methods* **8**, 571-573 (2011).