

國立臺灣師範大學化學系

碩士論文

Department of Chemistry

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

化學鍍法製備銅奈米島狀薄膜及其螢光增強特性分析

Preparation of Copper Nano-Island Films by Electroless

Plating and Their Fluorescence Enhancement

Characteristics

The logo of National Taiwan Normal University is a circular emblem. It features a central yellow circle with the Chinese characters '師大' (Shi Da) inside. Surrounding this is a purple ring with white stylized patterns. The name '黃珮瑜' (Huang Pei-Yu) is written in Chinese characters at the bottom of the emblem.

黃珮瑜

Huang, Pei-Yu

指導教授：陳家俊 博士

Advisor : Chia-Chun Chen, Ph.D.

中華民國 109 年 7 月

July 2020

謝辭

感謝我的指導教授，陳家俊老師，提供了非常豐富的資源及舒適的實驗環境，讓我在實驗之餘無後顧之憂。接著我要感謝口試委員，陳俊維老師、郭聰榮老師、王迪彥老師及李紹先老師能撥冗出席，蒞臨指導學生的碩士論文。再來要感謝顏宏吉學長在我碩班期間給予我在實驗上的建言。

這三年的實驗研究期間，特別感謝千華學姊在我實驗初期給予我的幫助，也很感謝其他學長姐鈺傑、士堯、柏均、威志、信仲、子琳、珈穎、弘毅、俊堯、理軒在實驗方面的幫助及鼓勵；感謝洵正、福利、祐丞、御宸、敏慧、逸修、啟盤同學兩年的陪伴與鼓勵。同時也感謝學弟妹們詠寧、慧穎、思穎、立中、智盈、祐霆、雅雪、亭儀、鑫蓉、冠庭、田叡使實驗室的生活多采多姿。

最後，謝謝我的家人，在金錢及精神上給予我相當大的支持，讓我能順利的取得碩士學位，碩士生涯即將告一段落，再次對上述等人獻上真誠的謝意，謝謝大家。

摘要

金屬奈米粒子具有金屬螢光增強(Metal Enhanced Fluorescence, MEF)之特性，鄰近於金屬奈米粒子的螢光分子(距離小於 20nm)，會受到金屬奈米粒子表面增強電場的影響，進而增強或減弱螢光分子的螢光強度。目前關於金屬螢光增強的研究文獻大多著重於金與銀的奈米粒子，而銅奈米粒子由於其表面相對的容易氧化，故銅的表面電漿共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)相關的研究和應用並未受到太大的重視。本實驗室先前利用金的晶種修飾於玻璃基板後，順利的製備出銅奈米薄膜，但金的晶種增加了實驗成本，因此本研究改善了銅奈米島狀薄膜的製備方法，在不使用金的條件下先於玻璃基板上長出銅晶種，再以少量的銀離子進行賈凡尼置換反應(Galvanic replacement)，形成銅銀核殼晶種(Cu@Ag Seed)，最後以甲醛作為還原劑，順利成長出銅奈米島狀薄膜。為了解決銅奈米島狀薄膜氧化的問題，我們在薄膜上修飾硫醇，並利用碳酸氫鈉緩衝溶液抑制銅的氧化。為了進一步探討銅奈米島狀薄膜與螢光增強倍率的關係，本研究改變銅的生長時間並測試不同的硫醇表面修飾。結果發現銅薄膜的生長時間為 4 分鐘且以硫十一醇(11-mercapto-1-undecanol, 11-MUD)修飾薄膜表面時，能夠得到最高的螢光增強倍率達 148 倍。未來期許本實驗所備的銅奈米島狀薄膜能更進一步的應用到螢光增強的生物化學檢測技術中。

關鍵字：金屬螢光增強、局部表面電漿共振、銅奈米粒子、賈凡尼置換反應

Abstract

Metal nanoparticles have the characteristics of Metal Enhanced Fluorescence (MEF). The fluorescent molecules adjacent to the metal nanoparticles (with a distance of less than 20 nm) are affected by the enhanced electric field on the surface of the metal nanoparticles, thereby enhancing or reducing the fluorescence intensity of fluorescent molecules. Currently, most of the research on MEF focuses on gold and silver nanoparticles, while copper nanoparticles are relatively easily oxidized on the surface. Therefore, researches on Local Surface Plasmon Resonance (LSPR) of copper haven't been attracted. Previously, the laboratory used gold seeds to modify the glass substrate and successfully prepared copper nano-films, but gold seeds increased the experimental cost, so this study improved the preparation method of copper nano-island films. In the absence of gold, copper seeds were grown on a glass substrate, and then a small amount of silver ions were used to perform the Galvanic replacement to form copper silver core-shell seed. Finally, formaldehyde was used as a reducing agent to grow a copper nano island film. To prevent oxidation of copper, we modified the thiol on the films and used sodium bicarbonate buffer solution to inhibit copper oxidation. In order to explore the relationship between the copper nano-island films and the fluorescence enhancement magnification, we changed the copper growth time and different thiol surface modifications. From the results, the growth time of the copper film was 4 minutes as the surface of the film was modified with 11-mercapto-1-undecanol, then the highest fluorescence enhancement factor was 148 times. This experiment expects that the prepared copper nano-island film can be further applied to fluorescence enhanced biochemical detection technology.

Keywords : Metal Enhanced Fluorescence (MEF), Local Surface Plasmon Resonance (LSPR) , Copper nanoparticles, Galvanic replacement.

目錄

謝辭.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VII
第一章 緒論.....	1
1-1 生物傳感器(Biosensor)的簡介.....	1
1-2 生物傳感器的換能器種類.....	3
1-2-1 電化學生物傳感器.....	4
1-2-2 光學生物傳感器.....	5
1-3 奈米材料.....	7
1-3-1 奈米材料的特性.....	7
1-3-2 金屬奈米材料.....	8
第二章 文獻回顧.....	9
2-1 SPR 與 LSPR 特性.....	9
2-1-1 表面電漿共振(Surface Plasmon Resonance, SPR).....	9
2-1-2 局部表面電漿共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR).....	9
2-2 金屬螢光增強 (Metal-Enhanced fluorescence, MEF).....	10
2-3 銅奈米薄膜的螢光增強研究.....	13
2-4 研究目的.....	15
第三章 實驗藥品與步驟.....	16
3-1 實驗藥品.....	16
3-2 實驗儀器介紹.....	18
3-2-1 往返式振盪恆溫水槽.....	18

3-2-2 低溫循環水槽	18
3-2-3 酸鹼度測定儀與電極	19
3-2-4 玻片迷你微量離心機	19
3-2-5 迴轉式振盪器	20
3-2-6 紫外光-可見光吸收光譜儀.....	20
3-2-7 紫外光-可見光-近紅外光分光光譜儀.....	21
3-2-8 掃描式電子顯微鏡.....	21
3-2-9 X 光能量分散光譜儀.....	22
3-2-10 X 射線光電子能譜儀.....	23
3-2-11 微陣列螢光掃描儀	23
3-3 實驗步驟	24
3-3-1 前置作業：玻片清洗與 Succinic anhydride 修飾	24
3-3-2 晶種奈米薄膜的製備	24
3-3-3 Cu 奈米島狀薄膜的製備.....	25
3-3-4 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾	25
3-3-5 修飾螢光物質	26
第四章 研究過程與結果與討論.....	28
4-1 晶種薄膜(seed films)的製備與分析鑑定.....	28
4-2 Cu 奈米島狀薄膜的製備與分析鑑定	33
4-2-1 Cu 奈米島狀薄膜的製備	33
4-2-2 反應時間對 Cu 奈米島狀薄膜的影響.....	33
4-2-3 Cu 奈米島狀薄膜的表面分析.....	37
4-3 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾	38
4-3-1 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾流程	38
4-3-2 硫醇修飾對 Cu 奈米島狀薄膜的影響.....	39
4-4 Cu 奈米島狀薄膜的螢光增強測試.....	41
4-4-1 不同緩衝溶液對 Cu 奈米島狀薄膜的影響.....	41
4-4-2 修飾上不同的硫醇對螢光增強的影響.....	42

4-4-3 Cu 奈米島狀薄膜之不同成長時間對螢光增強的影響.....	43
第五章 結論與未來展望.....	45
參考文獻.....	46



表目錄

表 4-1 合成銅晶種薄膜，實驗數據	29
表 4-2 各緩衝溶液對銅奈米島狀薄膜的影響	41

圖目錄

圖 1-1 生物感測器的應用	1
圖 1-2 生物傳感器之三部分 ²	2
圖 1-3 生物傳感器的種類 ⁸	3
圖 1-4 (a)常規電化學三電極電池與(b)絲網印刷電極 ¹⁰	4
圖 1-5 光學生物傳感器 ²	5
圖 1-6 金屬奈米粒子增強螢光的作用 ²	8
圖 2-1 局部表面電漿共振的示意圖	9
圖 2-2 局部場增強效應 ²	10
圖 2-3 能量轉移與等離子耦合效應	11
圖 2-4 輻射衰減速率的增加效應	12
圖 2-5 貴金屬的螢光增強研究 ³³	13
圖 2-6 化學鍍法製備銅膜 ³⁴	14
圖 3-1 往返式震盪恆溫水槽	18
圖 3-2 低溫恆溫循環水槽	18
圖 3-3 酸鹼度測定儀與電極	19
圖 3-4 玻片迷你微量離心機	19
圖 3-5 迴轉式震盪儀	20
圖 3-6 紫外光-可見光吸收光譜儀	20

圖 3-7 紫外光-可見光-近紅外光分光光譜儀	21
圖 3-8 SEM (Hitachi S4800)	21
圖 3-9 X 光能量分散光譜儀	22
圖 3-10 X 射線光電子能譜儀	23
圖 3-11 MidaScan	23
圖 4-1 銅晶種與 Cu@Ag 晶種的吸收圖譜	30
圖 4-2 文獻中銀奈米粒子的吸收圖譜	30
圖 4-3 (a)銅晶種與(b) Cu@Ag 晶種之 SEM.....	31
圖 4-4 (a)銅晶種與(b)Cu@Ag 晶種之 EDS	32
圖 4-5 所製備出的銅奈米島狀薄膜	33
圖 4-6 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之成長狀況	33
圖 4-7 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之 UV-Vis 光譜	34
圖 4-8 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之 Top view& cross sectional view SEM..	35
圖 4-9 (a) 實驗所得 Cu 奈米島狀薄膜的 XPS 圖譜(b)文獻資料 ⁴⁵	37
圖 4-10 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾流程	38
圖 4-11(a)實驗所得 Cu 奈米島狀薄膜的 XPS 圖譜與(b)文獻資料	39
圖 4-12 Cu 奈米島狀薄膜在修飾過程中的 UV-Vis 光譜	40
圖 4-13 分別修飾上 6-MCH,11- MUD 與 11-MUA 的 Cu 奈米島狀薄膜之螢光增強	42
圖 4-14 不同成長時間的 Cu 奈米島狀薄膜之螢光增強結果	44
圖 4-15 Cu 奈米島狀薄膜(成長為 4 分鐘)的之螢光增強結果.....	44

第一章 緒論

1-1 生物傳感器(Biosensor)的簡介

生物傳感器被定義為一種小型設備，能夠檢測化學或生物化學物質的生物傳感元件，並在醫學研究和生物技術等領域具有廣泛的應用¹，例如藥物發現、疾病診斷、環境監測(水質、土壤等等)、生物醫學、食品安全和加工、防禦和安全等。

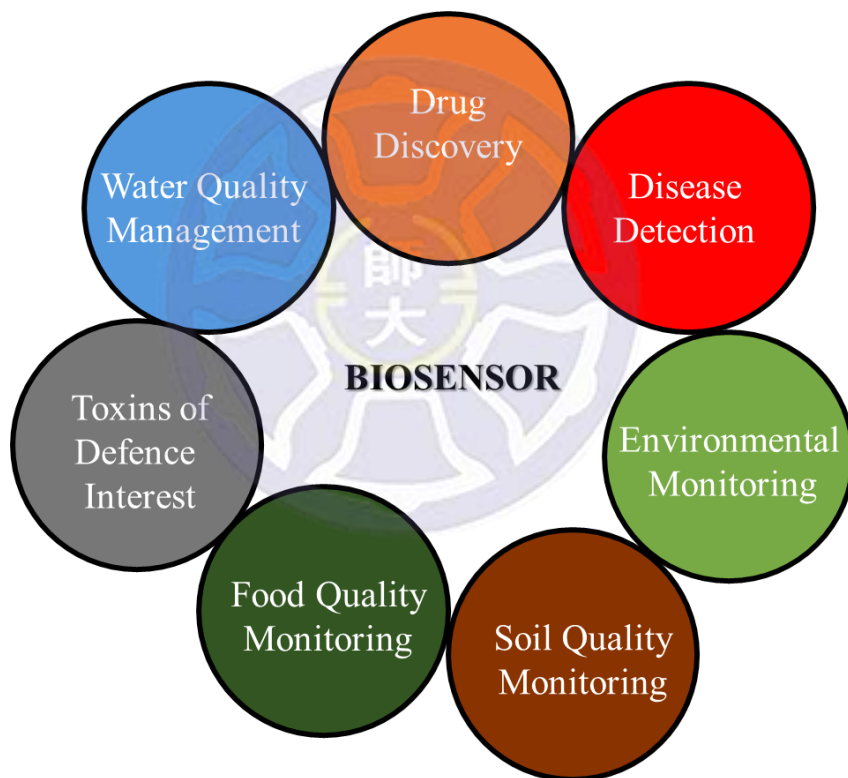


圖 1-1 生物感測器的應用

典型的生物傳感器由三部分組成：i) 生物受體(bioreceptor)，它是一種專門與分析物結合的生物識別元件； ii) 換能器(transducer)，這是一種在發生特定生物學事件時轉換信號的接口體系結構；以及 iii) 處理系統 (processing systems)，其中使用適當的系統檢測信號並將其轉換為其他信號，例如電信號。

Elements of a Biosensor

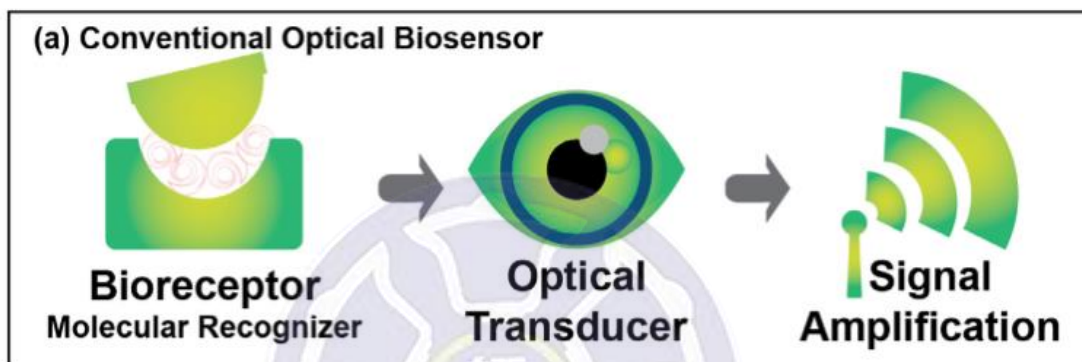


圖 1-2 生物傳感器之三部分²

1962 年，Clark 和 Lyons 為第一個發明測量生物樣品中葡萄糖的生物傳感器，利用固定化葡萄糖氧化酶電極的電化學檢測氧氣或過氧化氫^{3,4}。透過電化學、奈米技術到生物電子學等的創新方法，使生物傳感器的技術和應用方面都獲得進一步的發展。

1-2 生物傳感器的換能器種類

生物換能器是生物傳感器系統的識別-轉導組件。它由兩個緊密耦合的部分組成，生物識別層和物理化學換能器，它們共同作用將生物化學信號轉換為電子或光學信號。生物識別層通常包含酶或另一種結合蛋白，例如抗體。它提供了生物傳感器的選擇性和特異性。物理化學換能器通常與識別層緊密且受控地接觸。由於分析物（目標靶標）的存在和生化作用，在生物識別層內產生了物理化學變化，由物理換能器測量該變化，從而產生與分析物濃度成比例的信號⁵。物理化學換能器有多種類型，可以是電化學、光學、電子、重量、熱電或壓電^{6,7}。以下將分節介紹兩種較常使用的生物傳感器類別，分別是電化學生物傳感器與光學生物傳感器：

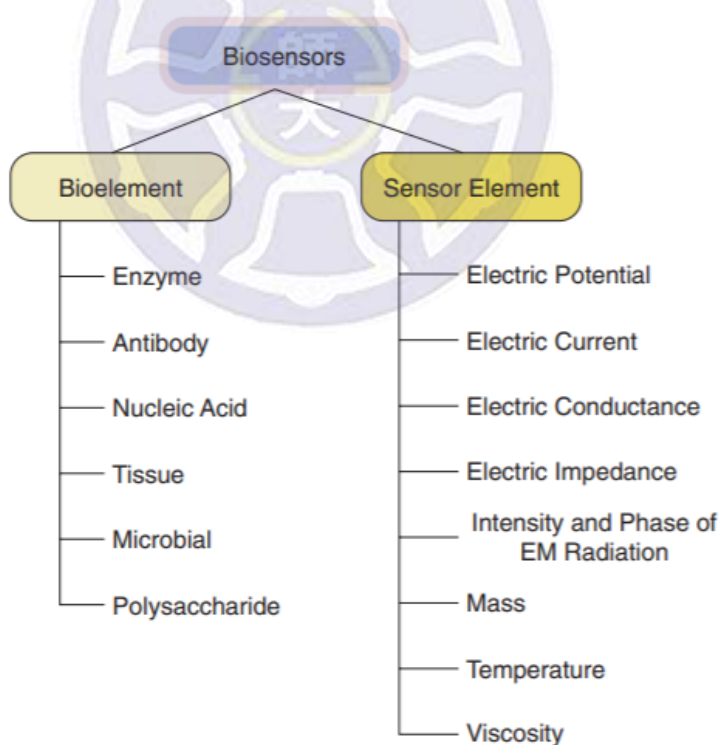


圖 1-3 生物傳感器的種類⁸

1-2-1 電化學生物傳感器

Clark 和 Lyons 所發明測量生物樣品中葡萄糖的生物傳感器，為電化學生物傳感器領域中的第一項發現與開端。常規的三電極電池配置（工作電極，對電極和參比電極，如圖 1-4(a)所示），電化學生物傳感器還可以應用於柔性和便攜式基材（圖 1-4(b)），例如絲網印刷電極(Screen Printed Electrodes, SPE)¹，SPE 的生物傳感器於 1990 年代首次作為紙質便攜式生物傳感設備推出，大大降低了成本、尺寸和重量，並可在低濃度電解質的情況下運行⁹。

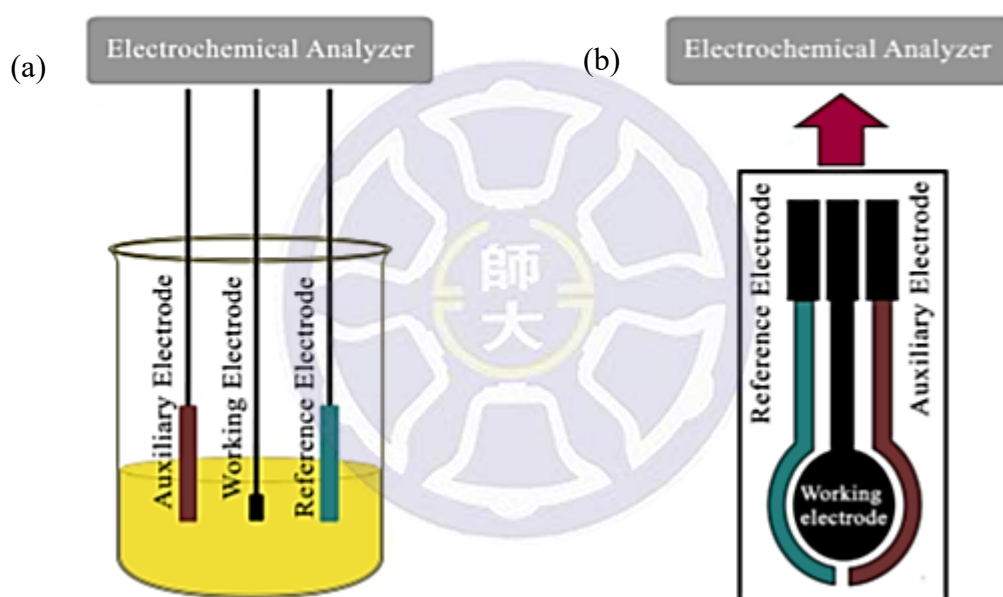


圖 1-4 (a)常規電化學三電極電池與(b)絲網印刷電極¹⁰

電化學傳感器可以通過各種分析方法提供電化學讀數，主要分為以下兩類別：

(1) 安培(伏安)生物傳感器(Amperometric (Voltammetric) Biosensors)：其中又可分為透過循環伏安 (Cyclic voltammetry, CV)、計時安培 (Chronoamperometry, CA)、微分脈衝伏安 (Differential Pulse Voltammetry, DPV)、線性掃描伏安 (Linear Sweep Voltammetry, LSV)。

(2) 阻抗生物傳感器 (Impedimetric Biosensors)：採用電化學阻抗譜技術 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)。

安培(伏安)生物傳感器具簡單性、高靈敏度和可適用於檢測不同分析物的優點，被廣泛採用¹¹⁻¹⁴，而阻抗生物傳感器可以設計為無標記的檢測方法，無需使用任何電活性物質。

1-2-2 光學生物傳感器

光學生物傳感器是根據信號強度與被測物質（分析物）的濃度比例判斷，進行分析檢測。光學生物傳感器可以使用各種生物材料，包括酶，抗體，抗原，受體，核酸，整個細胞和組織作為生物識別元件。

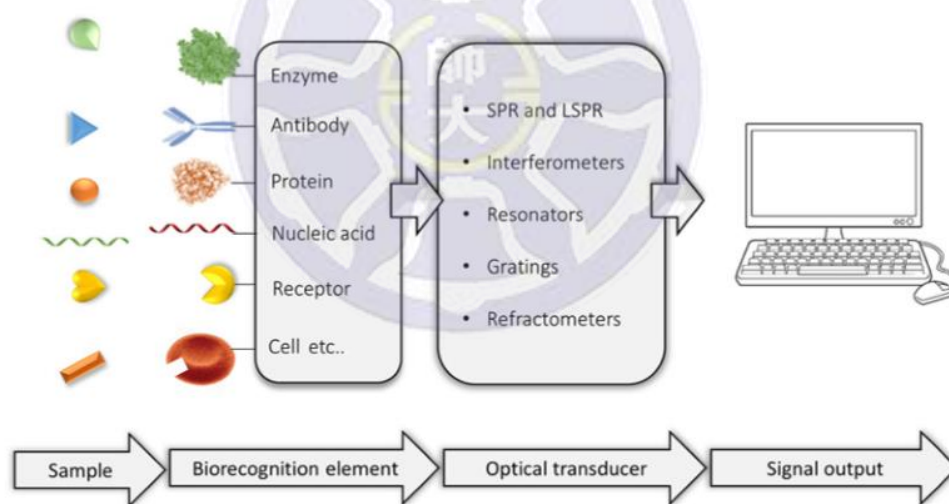


圖 1-5 光學生物傳感器²

光學生物傳感器提供了優於常規分析技術，因為它們能夠直接、即時且無標記地檢測許多生物和化學物質。它們的優點包括高特異性，敏感性，小尺寸和成本效益。新型光學生物傳感器的實現應用了多種先進概念和高度多學科的方法，包括微電子、微機電系統 (MEMS)、微/奈米技術、分子生物學、生物技術和化學。

光學生物傳感器的研究和技術發展在過去十年中經歷了指數級增長。光學生物傳感器的研究主要集中在醫療保健、環境應用和生物技術行業。光學傳感器利用光場與生物識別元件的相互作用來進行光學檢測。光學生物傳感又大致可分為兩種模式：無標記和有標記的模式：

- (1) 無標記：透過分析材料與換能器的相互作用，直接產生的檢測信號。
- (2) 有標記：使用色標、螢光或發光方法，產生光學信號。

螢光技術迅速發展，因為其獨特的功能：螢光材料可以作為出色的傳感探針來改變內在特性（螢光強度變化，螢光位移等）和目標靶標的特異性親和力。此類螢光探針為有效的傳感器，可將生物識別事件轉換為使用各種檢測器所偵測的螢光信號。通過相對簡單的檢測過程，以下總結螢光在生物傳感器中的優勢：

- (1) 多功能性（敏感性，特異性，簡便性和速度）。
- (2) 以非破壞性方式追蹤或分析生物分子。
- (3) 允許使用不同的發射光檢測多種分析物波長。

當前螢光的生物傳感器有兩種發展方向，一種為針對感應元件(Sensing components)的改良，發展新的螢光探針和標記設計等；另一種為傳感組件(Transducing components)的改良。而奈米技術的加入，有助於開發更多用途的材料和簡便的設備。奈米材料因尺寸非常小，因此具有都具有獨特的光學性能。用作為感測元件（例如，類似於分子螢光探針）的新的奈米材料大多表現出更好且功能更強的螢光行為，提供了許多前所未有的可能性。例如，大量的螢光奈米材料（例如量子點¹⁵、碳點¹⁶、上轉換納米顆粒¹⁷、共軛聚合物¹⁸。這先螢光材料在亮度、光穩定性和可調發射光譜方面具有顯著的光學性能與巨大的潛力。奈米材料提供的這些優點使傳感器設備更加靈敏和可靠。

1-3 奈米材料

1-3-1 奈米材料的特性

當材料結構進入奈米尺度以下時，會呈現出同質材料在巨觀尺寸下所沒有的熱學、光學、磁學、電學等性能。其特性的改變，並非單純因尺寸縮小之故，而是因奈米尺度下材料所特有的效應與現象，像是「小尺寸效應」、「表面效應」、「量子尺寸效應」與「巨觀量子穿隧效應」等。

➤ 小尺寸效應 (Small Scale Effect)

因為物質粒子尺寸縮小，而使物質的各種性質產生變化和差異的效應。當微粒尺寸與光波波長或德布洛依波長(de Broglie wave)相當或更小時，粒子的晶體週期性邊界條件將被破壞，奈米粒子表面的原子密度下降，導致光、聲、電、磁、熱等物件發生變化。

➤ 表面效應 (Surface Effect)

微粒縮小成奈米尺寸，使表面效能提高，位於表面的原子占的比例會提高很多。由於表面原子數增多，原子配位數不足及高的表面能，使這些表面原子具有高的活性，極不穩定，很容易與其它原子結合。

➤ 量子尺寸效應 (Quantum Effect)

當粒子尺寸下降到某一值時，金屬費米能階(Fermi Level)附近的電子能級由準連續變為離散(Discrete)能級的現象，以及奈米半導體微粒存在不連續的最高被佔據分子軌道和最低為佔據的分子軌道能級，使能細變寬的現象，均稱作量子尺寸效應。

➤ 巨觀量子穿隧效應(Macroscopic quantum tunneling effect)

微觀粒子具有貫穿位能障壁(potential barrier)的能力，稱為穿隧效應(Tunneling effect)。近年來，人們發現一些巨觀量，例如，微顆粒的磁化強度、量子相干元件中的磁通量(magnetic flux)等亦具有穿隧效應，稱為巨觀的量子穿隧效應。

1-3-2 金屬奈米材料

一般奈米材料皆具有許多特殊的性質，而金屬奈米材料的局部表面電漿共振 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 特性，造就金屬奈米粒子具有獨特的電子、磁性、催化和光學性質，使金屬奈米顆粒在科學及技術上有重要的影響¹⁹。

螢光的檢測是生物技術和生命科學領域中，最受重視的傳感技術之一。增強螢光分子的螢光強度、提高其靈敏度與實現較低檢測限制是螢光感測器所注重的議題。

將金屬奈米材料應用於螢光感測器上，當金屬奈米粒子附近有螢光分子的存在時，由於螢光分子與金屬中自由電子間的交互作用，增強了螢光分子的「共振能量轉移 (Resonance Energy Transfer, RET)」的範圍，以及改變「輻射衰變比率 (Radiative Decay Rate)」，能有效地改變螢光分子的光譜性質，並增強螢光分子的螢光強度¹⁹⁻²¹，見圖 1-6。

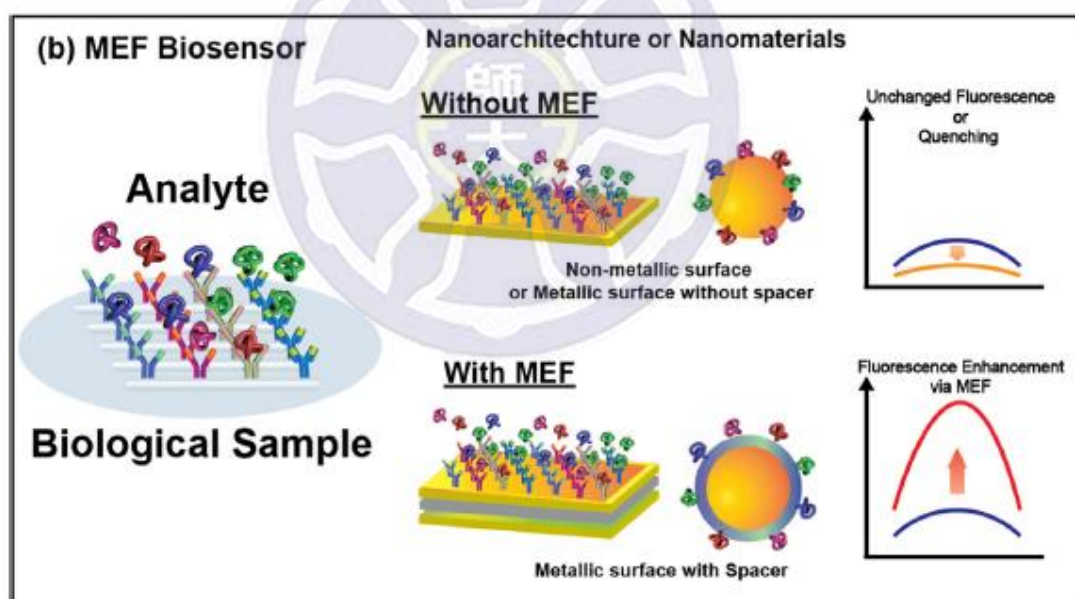


圖 1-6 金屬奈米粒子增強螢光的作用²

第二章 文獻回顧

2-1 SPR 與 LSPR 特性

2-1-1 表面電漿共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)

金屬內部含有許多自由電子，當自由電子受到外部電磁場的影響，此時振盪的自由電子在金屬表面來回振盪可稱作為表面電漿子(Surface Plasmon)，當表面電漿子只會在金屬表面以疏密波形式存在，且產生高增強的近場，此現象稱作表面電漿共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)。此技術已廣泛的應用於表面增強光譜學²²、²³、生化感測²⁴等。

2-1-2 局部表面電漿共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)

當金屬材料縮小至奈米結構，其表面的表面電漿子無法傳遞出去而局限於金屬奈米結構中，形成正負電荷累積於相反方向的表面上，使電場局部性的增強，此現象及稱作局部表面電漿共振，見圖 2-1^{25, 26}。

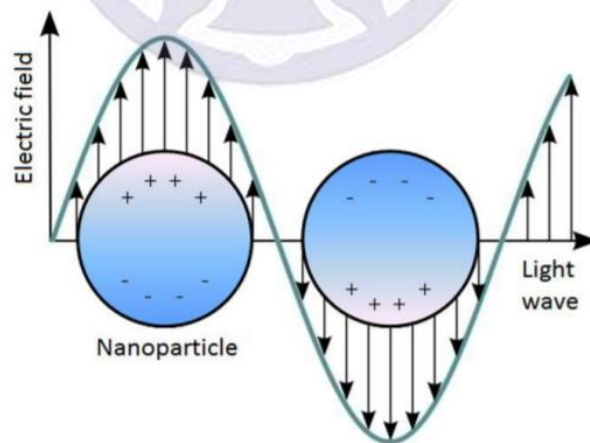


圖 2-1 局部表面電漿共振的示意圖

2-2 金屬螢光增強 (Metal-Enhanced fluorescence, MEF)

多數文獻證實，金屬螢光增強受到螢光分子與金屬表面之間的距離影響，在 5-90 nm 時有明顯的螢光增強，但當螢光分子與金屬表面太接近(<5 nm)時，會發生螢光淬滅(quenched)，導致金屬增強螢光被削弱^{20, 21, 27}。

為了探討 MEF 的機制，可藉以下三種因素解釋螢光增強的原因：

(1) 局部場增強效應，見圖 2-2：

當有一入射光與金屬表面的自由電子頻率相當時，產生集體震盪形成局部共振，也稱作局部表面電漿共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)，此時在金屬表面附近的螢光分子會受到電磁場與自由電子間的耦合而顯示出更高的發射強度^{28, 29}。金屬的形狀與顆粒大小也對局部增強效應有重大的影響³⁰。



圖 2-2 局部場增強效應²

(2) 能量轉移與等離子耦合效應(Plasmon-Coupling Effect)，見圖 2-3：

當金屬表面與螢光分子處於最合適的距離，當螢光分子與金屬表面距離約 10 nm 內時所發生的能量轉移，可藉由 Förster 共振能量轉移(Förster Resonance Energy Transfer , FRET)解釋，根據 Förster - Dexter 機制，當螢光分子的激發態能級高於金屬的費米能級時，能量會由激發態螢光分子轉移到金屬表面，這能量轉移不僅受電場強度影響，也受金屬表面與螢光分子光譜重疊的程度影響²⁸，當金屬奈米結構或奈米顆粒的吸收光譜與螢光分子的吸收重疊時，螢光分子的激發和發射速率都會提高，有顯著的螢光增強³¹。而當距離為 10-50 nm 時所發生的能量轉移，可藉由珀塞爾效應(Purcell effect)來解釋²⁹。

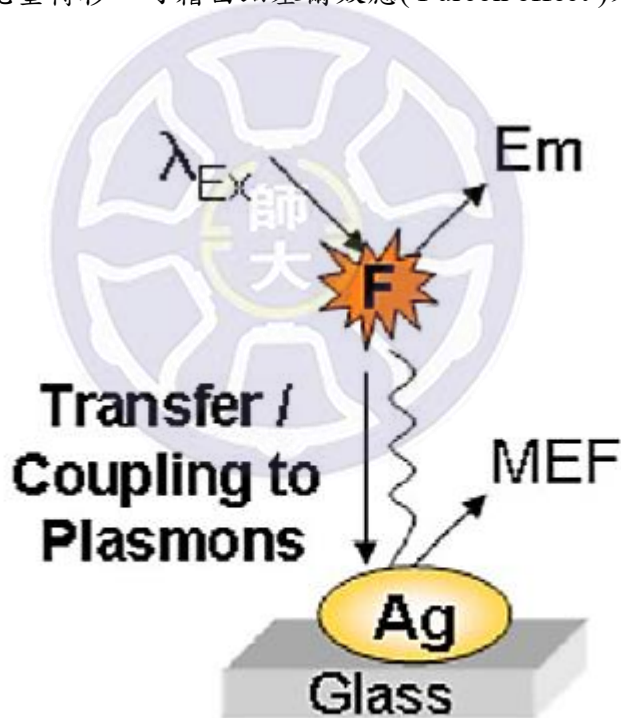


圖 2-3 能量轉移與等離子耦合效應

(3) 輻射衰減速率的增加(Radiative Decay Engineering, RDE), 見圖 2-4:

當金屬表面與螢光分子處於合適的距離，螢光分子的輻射衰減速率增加，可由 Jablonski 能量圖解釋(見圖 2-3)³²。在無金屬時，螢光分子的量子產率為 $Q_0 = \Gamma / (\Gamma + k_{nr})$ ，其中 Γ 為無金屬表面時的輻射衰減速率， k_{nr} 為無金屬表面時的無輻射衰減速率，螢光壽命為 $(\Gamma + k_{nr})^{-1}$ ；而有金屬表面時，在不可逆螢光淬滅情形，螢光分子的量子產率為 $Q_m = (\Gamma + \Gamma_m) / (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr})$ ，其中 Γ_m 為有金屬表面時的輻射衰減速率，螢光壽命為 $(\Gamma + \Gamma_m + k_{nr})^{-1}$ ， Γ_m 的出現是因為在合適的間距下金屬表面與螢光分子之間的交互作用， Γ 、 Γ_m 、 k_{nr} 皆是正值，所以可知有金屬時螢光壽命較短，而螢光分子的量子產率較高。

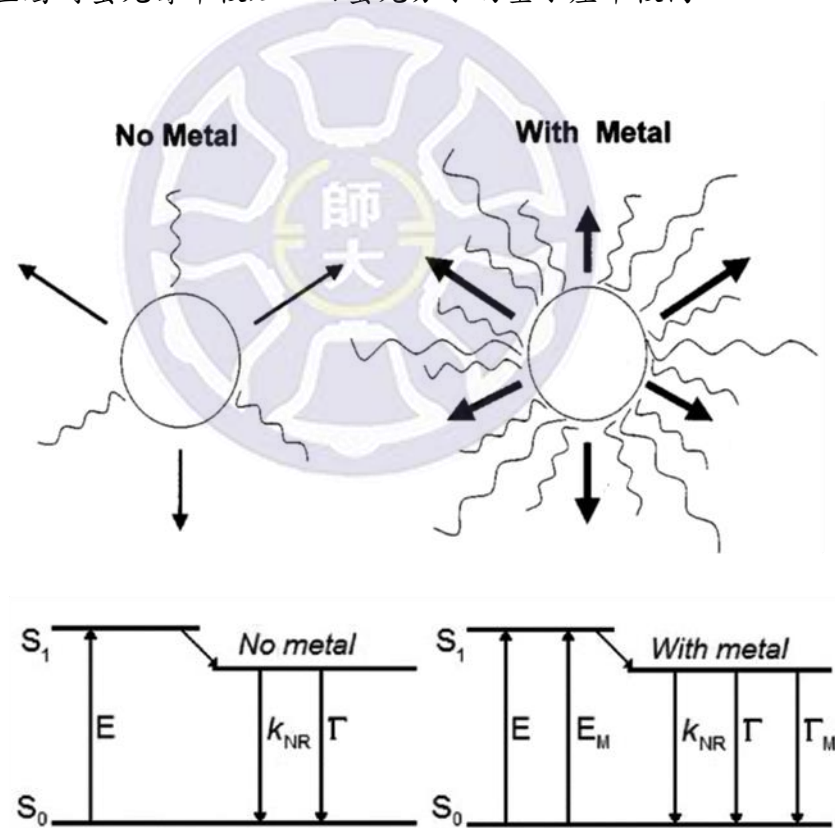


圖 2-4 輻射衰減速率的增加效應

2-3 銅奈米薄膜的螢光增強研究

關於金屬螢光增強的研究文獻大多著重於金與銀的奈米粒子，例如圖 2-5 為 Tabakman 團隊在 2011 年所發表的文獻，指出蛋白芯片廣泛用於高通量蛋白質組學分析，但是迄今為止，低靈敏度和狹窄的動態範圍限制了它們在診斷和蛋白質組學方面的能力。他們製備出等離子金膜上的蛋白質微陣列，而獲得近 100 倍的近紅外螢光增強作用³³。

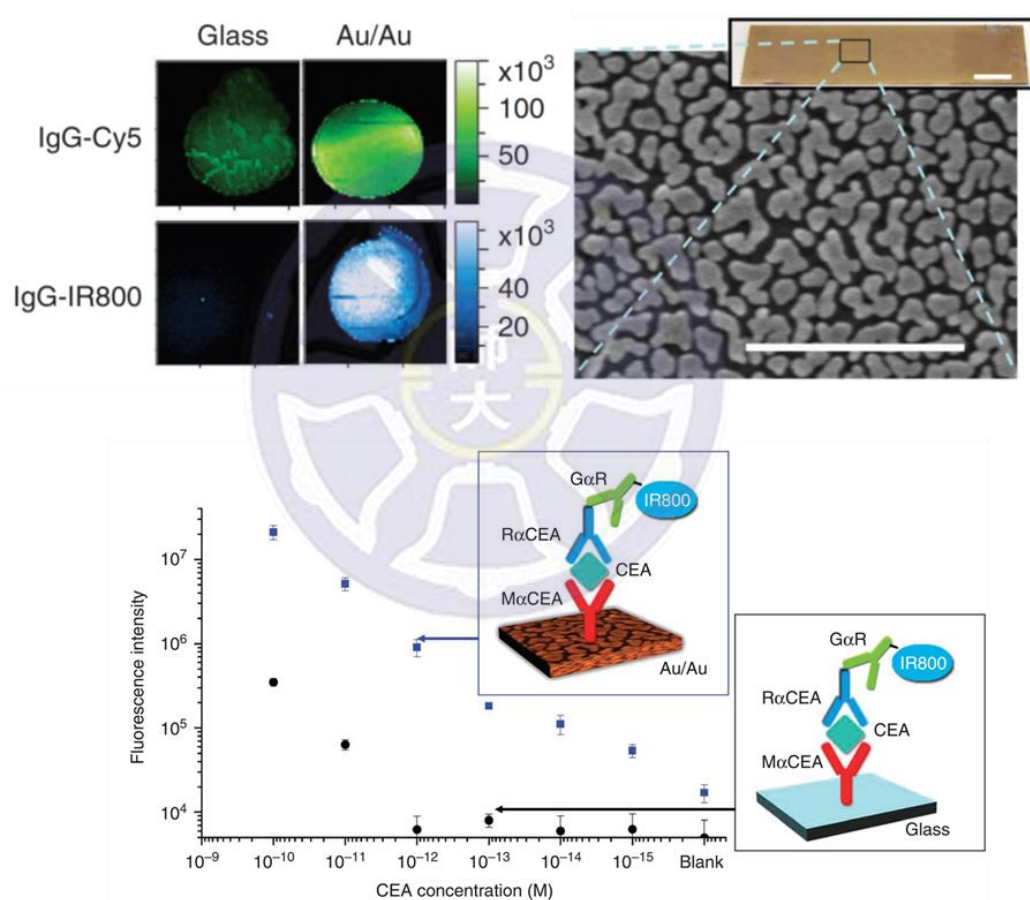


圖 2-5 貴金屬的螢光增強研究³³

但貴金屬的加入由於這些材料相對較高的成本，構成了等離子體傳感裝置的主要障礙。相反，銅除了較容易回收外，還比這兩種金屬便宜許多，因此銅奈米結構的 LSPR 效應對螢增強的應用，具有很大的潛力。

以化學鍍法製作的銅奈米粒子，化學鍍液中必須包含銅的離子來源、以及還原劑(reducing agent)和絡合劑(complexing agent)。常以甲醛，乙醛酸，次磷酸鈉和二甲基胺硼等作為還原劑³⁴⁻⁴⁰。利用化學鍍法製作銅奈米薄膜於玻璃基板，銅奈米粒子要吸附在玻璃基板並不容易，故首要的步驟是要先活化基板，若基板沒有順利被活化，銅奈米粒子即無法還原在玻璃基板表面，文獻中最常以 Pd / Sn 晶種幫助基板活化^{34, 40-42}。

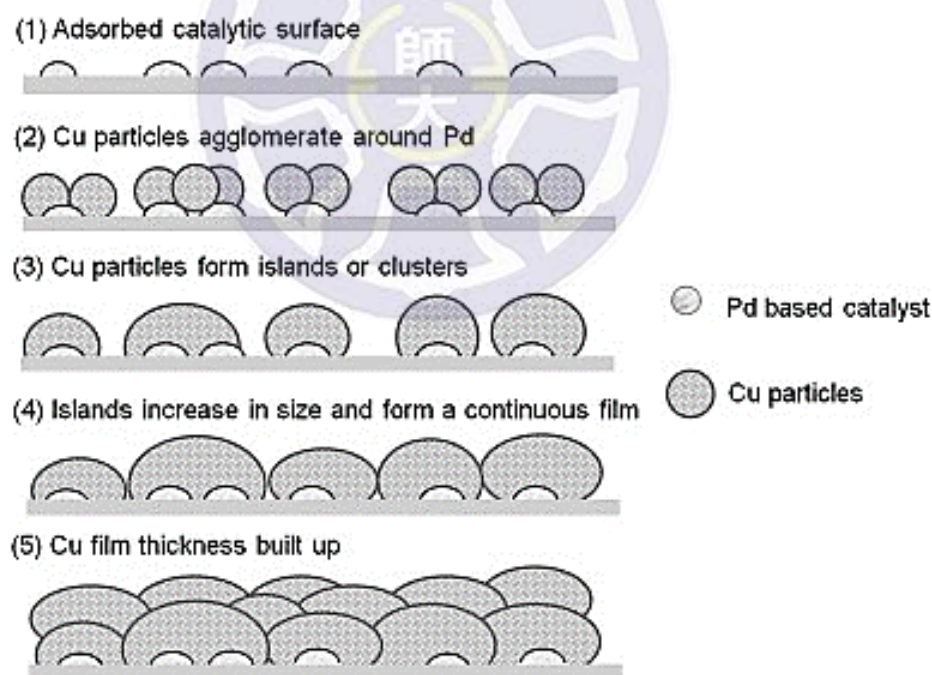


圖 2-6 化學鍍法製備銅膜³⁴

2-4 研究目的

螢光的檢測是生物技術和生命科學領域中，最受重視的傳感技術之一。增強螢光分子的螢光強度、提高其靈敏度與實現較低檢測限制是螢光感測器所注重的議題。在文獻中，已證實金屬奈米結構可改變鄰近螢光分子的光學性質，螢光-金屬交互相互作用被稱為金屬增強螢光(Metal-Enhanced Fluorescence , MEF)。

金屬螢光增強現象與局部場增強效應(Localized Surface Plasmon Resonance , LSPR)有關，當光與金屬奈米結構的電子相互作用時，LSPR 現象被激發，導致集體激發振盪，奈米粒子的局部電磁場增強，又因 LSPR 現象需在特定的波長條件下激發，才可產生共振，因此 LSPR 被廣泛應用在生物化學的感測上。

關於金屬螢光增強的研究文獻大多著重於金與銀的奈米粒子，但金、銀相對於銅的成本較高，再加上銅具有容易回收、低成本且典型球形銅奈米粒子在可見光區域內有 LSPR 特徵鋒等優點對未來的電子和傳感器件有很大的潛力。不過因為銅有氧化的問題，所以銅的 LSPR 未受太大的關注，因此將銅做為本論文研究的材料。

第三章 實驗藥品與步驟

3-1 實驗藥品

藥 品	CAS number	廠 牌
免疫載玻片 Polysine		Thermo
丙 酮 Acetone	67-64-1	Honeywell
甲 醇 Methanol	67-56-1	Honeywell
丁二酸酐 Succinic anhydride	108-30-5	AK Scientific
二甲基甲酰胺 Dimethylformamide (DMF)	68-12-2	Fisher
二環己基碳二亞胺 N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide, (DCC)	538-75-0	Alfa Aesar
N-羥基琥珀醯亞胺 N-hydroxysuccinimide (NHS)	6066-82-6	Aldrich
硫酸銅 Copper(II) sulfate pentahydrate	7758-99-8	ACROS
甲 醛 Formaldehyde	50-00-0	ACROS
氨 水 Ammonium hydroxide	1336-21-6	Fisher Chemical

硼氫化鈉 Sodium borohydride	16940-66-2	ACROS
硝酸銀 Silver nitrate	7661-88-8	ACROS
乙二胺四乙酸 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	60-00-4	ACROS
2-巰基乙醇 2-Mercaptoethanol (2-ME)	60-24-2	Sigma-Aldrich
6-巰基-1-己醇 6-Mercapto-1-hexanol (6-MCH)	1633-78-9	Fluka
11-巰基-1-十一醇 11-Mercapto-1-undecanol (11-MUD)	73768-94-2	Aldrich
11-巰基十一烷酸 11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA)	71310-21-9	Aldrich
乙醇 Ethanol	64-17-5	Fisher Chemical
N,N-二異丙基乙基胺 N,N'-Diisopropylethylamine (DIPEA)	7087-68-5	ACROS
八臂聚乙二醇氨 8arm-PEG10K-NH ₂ , -10K	25322-68-3	JenKem Technology
生物素 Biotin	58-85-5	SIGMA-Aldrich
Streptavidin IRDye® 800		LI-COR
碳酸氫鈉 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	144-55-8	ACROS

3-2 實驗儀器介紹

3-2-1 往返式振盪恆溫水槽

- ✓ 英文 : Reciprocal Shaking Baths
- ✓ 型號 : B601D
- ✓ 可同時提供轉速(20 ~ 200 rpm)與溫度(RT + 5 °C ~ 100 °C)控制，使液態反應物在恆溫下且均勻地進行。



圖 3-1 往返式震盪恆溫水槽

3-2-2 低溫循環水槽

- ✓ 英文 : Refrigerated Circulator
- ✓ 品牌/型號 : FIRSTEK / B401H
- ✓ 溫度調控範圍為 -20 ~ 100 °C



圖 3-2 低溫恆溫循環水槽

3-2-3 酸鹼度測定儀與電極

- ✓ 英文：pH-meter
- ✓ 電極型號：LENON E-1312 工業用電極
- ✓ 酸鹼度測定儀型號：PH 200
- ✓ 酸鹼測定儀的使用可使實驗數據更加準確，提升再現性。



圖 3-3 酸鹼度測定儀與電極

3-2-4 玻片迷你微量離心機

- ✓ 英文：Microcentrifuge Force SpinPrep
- ✓ 品牌/型號：LP-1414
- ✓ 此儀器最高轉速/離心力：4800 rpm/1750 xg，可快速的轉乾玻片。



圖 3-4 玻片迷你微量離心機

3-2-5 迴轉式振盪器

- ✓ 英文：Orbital Shaker
- ✓ 品牌/型號：TKS / OS-701
- ✓ 轉速調控範圍為 10 ~ 250 rpm，可幫助使反應更均勻地在玻璃片上進行。



圖 3-5 迴轉式震盪儀

3-2-6 紫外光-可見光吸收光譜儀

- ✓ 英文：UV-Visible Spectrophotometer
- ✓ 品牌/型號：Hawlett-packard / 8453
- ✓ 儀器燈源為氘燈及汞燈，可測量到的波長範圍為 190-1100 nm。

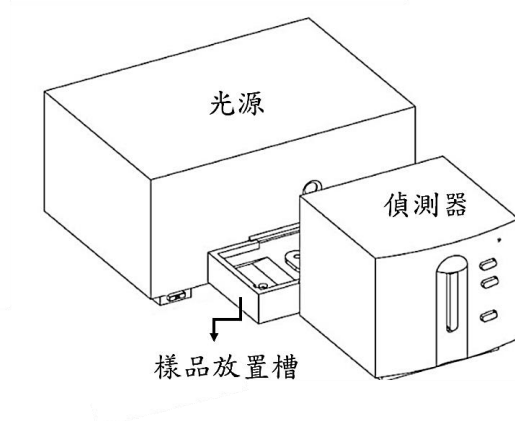


圖 3-6 紫外光-可見光吸收光譜儀

3-2-7 紫外光-可見光-近紅外光分光光譜儀

- ✓ 英文：UV-Visible-NIR Spectrophotometer
- ✓ 品牌/型號：Aglient / Cary5000
- ✓ 可測量液態樣品、固態樣品(粉末、片狀或是薄膜)，可測量到的波長範圍為 200 ~ 3300 nm，可測量穿透與反射光譜。



圖 3-7 紫外光-可見光-近紅外光分光光譜儀

3-2-8 掃描式電子顯微鏡

- ✓ 英文：Scanning Electron Microscope, SEM
- ✓ 品牌/型號：Hitachi / S4800 (台大思亮館)
- ✓ 原理：掃描式電子顯微鏡利用電磁透鏡聚焦高能的電子束(約以 0.2~40 kv 的電壓)在試片掃描樣品依其所激發出的二次電子與背向散射電子的接收對試片表面進行分析，可獲得試片表面的化學成分，晶體缺陷等信息，是對固體物質表面進行綜合分析的儀器。



圖 3-8 SEM (Hitachi S4800)

3-2-9 X 光能量分散光譜儀

- ✓ 英文：Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS
- ✓ 品牌/型號：QUANTAX ANNULAR XFLASH® QUAD FQ5060
- ✓ 原理：

EDS 用高能電子轟擊樣品，樣品內基態電子吸收能量後激發到激發態，由於處於激態的電子不穩定，因此會回到基態釋出能量，這種能量是以 X 射線出現，因為原子核外電子的基態和激發態所對應的能量都是分立的能級，所以它們的能量差也就是釋放的 X 射線的能量，是個特定的能量值，這些 X 射線是特徵 X 射線。

EDS 是一種可以與 SEM、TEM 配合使用的分析技術，當 EDS 和這些影像工具結合時，可以提供直徑小至 nm 的區域進行元素分析，電子束對樣品的撞擊會產生樣品元素的特性 X 射線，EDS 分析可用於確定單點的元素成分。



圖 3-9 X 光能量分散光譜儀

3-2-10 X 射線光電子能譜儀

- ✓ 英文：X-ray photoelectron spectroscopy, XPS
- ✓ 品牌/型號：英國 Thermo Scientific, Theta Probe
- ✓ 原理：用 $Al K\alpha$ (1486.6 eV) 作為 X 光來源，轟擊樣品，儀器測量撞出電子的動能，反推其束縛能 (binding energy)，來鑑定樣品的元素種類與化學環境。



圖 3-10 X 射線光電子能譜儀

3-2-11 微陣列螢光掃描儀

- ✓ 英文：MidaScan
- ✓ 品牌/型號：NIRMIDAS
- ✓ 原理：此儀器同時有 647 nm 與 780 nm 兩種波長的激發光源，主要用以掃描帶有螢光物質的玻片樣品，可以做定量及定性的分析。利用十六孔盤將不同濃度的染劑與樣品玻片反應後，放入機器中偵測，即可得一系列增強的螢光強度。

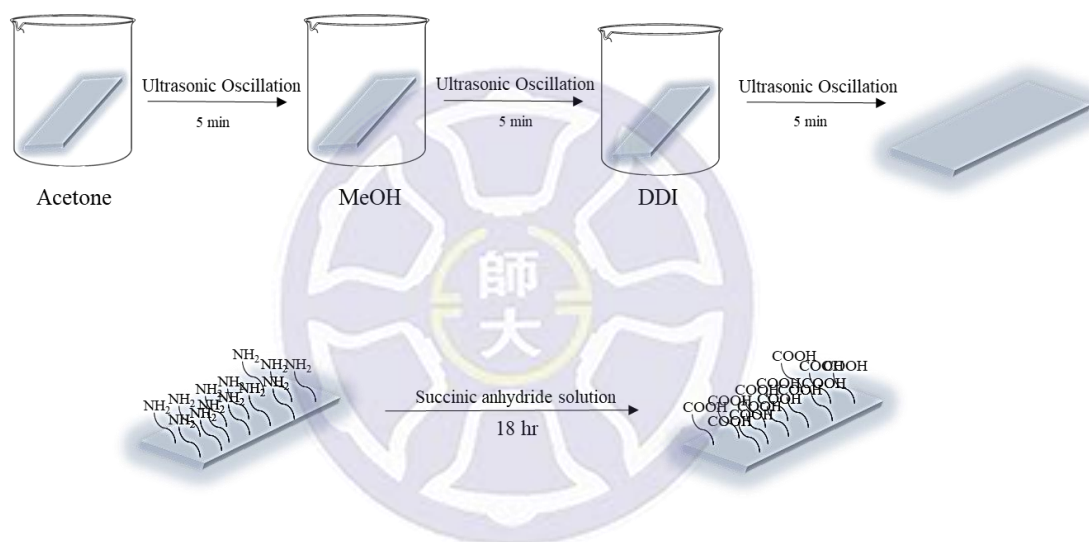


圖 3-11 MidaScan

3-3 實驗步驟

3-3-1 前置作業：玻片清洗與 Succinic anhydride 修飾

1. 玻片清洗：玻片依序用酮、甲醇、去離子水在超音波震盪池中清洗各 5 分鐘。
2. Succinic anhydride 修飾：玻片經過 Succinic anhydride 溶液在室溫下反應 18 小時後，將玻璃基板表面-NH₂之官能基置換成-COOH，有利於後續實驗的銅晶種吸附在基板上。



3-3-2 晶種奈米薄膜的製備

長晶可以分為兩步驟：

1. 製備 Cu Seed：

- (1) 將已修飾上 Succinic anhydride 之玻璃片放入反應槽中，並使用恆溫水槽，控溫在 42.5°C 下進行反應。
- (2) 配置 CuSO₄ 溶液，且將溶液倒入反應槽中，反應的轉速調為 40 rpm，反應 15 分鐘，氨水會與 Cu²⁺ 形成 Cu(NH₃)₂²⁺ 吸附在玻片表面上。CuSO₄ 溶液由去離子水 27 mL、0.5 M CuSO_{4(aq)} 20 mL，最後加入 1.5 mL 的氨

水(37%)配製而成。其中氨水作為穩定劑的功用。

- (3) 將反應後的玻片以去離子水洗乾淨，保存於去離子水當中，過程中要避免玻片表面乾掉而影響接下來實驗。
- (4) 配置 1 mM NaBH₄ 溶液，且將溶液倒入反應槽中，反應的轉速調為 40 rpm，反應 5 分鐘，將 Cu²⁺ 還原成 Cu，反應後保存於去離子水當中。過程中要避免玻片表面乾掉而影響接下來實驗。

2. 製備 Cu@Ag Seed :

- (1) 將長上 Cu Seed 的玻片放入控溫在 42.5°C 下的反應槽中。
- (2) 配置 1mM AgNO₃ 溶液，且將溶液倒入反應槽中，反應的轉速調為 40 rpm，反應 10 分鐘，由於 Ag 與 Cu 的還原電位不同，Ag 與 Cu 會發生置換，將表層的 Cu 置換成 Ag，反應後保存於去離子水當中。過程中要避免玻片表面乾掉而影響接下來實驗。

3-3-3 Cu 奈米島狀薄膜的製備

配製鍍液，且將溶液與長上 Cu@Ag Seed 的玻片倒入恆溫在 42.5°C 反應槽中，反應的轉速調為 40 rpm，依所需的 Cu 奈米粒子大小，調控反應時間。鍍液為依序加入 27 mL 的去離子水、20 mL 的 0.1 M CuSO₄ 溶液、50 mL 的 0.1 M EDTA 溶液、0.7 mL 的甲醛組合而成。其中 EDTA 作為穩定劑，甲醛作為還原劑。

3-3-4 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾

1 修飾上硫醇：

- (1) 配置硫醇溶液：分別配置以 DMF 作為溶劑且濃度為 0.2 mM 之 2-ME, 6-MCH, 11-MUD, 11-MUA 溶液。
- (2) 將配置好的硫醇溶液倒入培養皿中，並將 Cu 奈米島狀薄膜放入其中，在室溫下反應 16 小時。

(3) 反應後，將以修飾上硫醇的 Cu 奈米島狀薄膜取出用乙醇與去離子水潤洗，並用玻片離心機將玻片轉乾。

2. 修飾上 8arm-PEG-NH₂：

- (1) 配置 DCC 與 NHS 混合溶液與 8arm-PEG-NH₂ 溶液：DCC 與 NHS 混合溶液為 0.25 mmole DCC 與 0.25 mmole NHS 溶於 25 mL DMF 中。8arm-PEG-NH₂ 溶液為 0.0052 mmole 8arm-PEG-NH₂ 溶於 10 mL DMF 中，混合均勻後再加入 1 mmole DIPEA。
- (2) 將配置好的 DCC 與 NHS 混合溶液倒入培養皿中，並將以修飾上硫醇的 Cu 奈米島狀薄膜放入其中，DCC 與 NHS 會使玻片上的羧基(-COOH) 活化，在室溫下反應 15 分鐘後，倒入 8arm-PEG-NH₂ 溶液，在室溫下反應 1 小時，8arm-PEG-NH₂ 會與羧基(-COOH)反應。
- (3) 反應後，將以修飾上 8arm-PEG-NH₂ 的 Cu 奈米粒子薄膜玻片取出用乙醇與去離子水潤洗乾淨，並用玻片離心機將玻片轉乾。

3. 修飾上生物素(Biotin)：

- (1) 配置 Biotin 溶液：取 0.25 mmole DCC、0.25 mmole NHS 與 0.25 mmole Biotin 溶於 25 mL DMF 中，混合均勻後再加入 1 mmole DIPEA。
- (2) 將配置好的配置 Biotin 溶液倒入培養皿中，並將以修飾上 8arm-PEG-NH₂ 的 Cu 奈米粒子薄膜玻片放入其中，在室溫下反應 6 小時。
- (3) 反應後，將以修飾上 Biotin 的 Cu 奈米粒子薄膜玻片取出用乙醇與去離子水潤洗乾淨，並用玻片離心機將玻片轉乾。

3-3-5 修飾螢光物質

- (1) 配製 10 mM 的為 NaHCO₃ 作緩衝溶液，將溶液倒入培養皿中，並將已修飾上 Biotin 的 Cu 奈米粒子薄膜玻片放入其中，控溫在 37°C 下，反應 1 小時，藉此洗淨玻片上多餘的修飾物質。
- (2) 配製螢光染劑：以 NaHCO₃ 作為溶劑，配製不同濃度的 Streptavidin-IR 800

(0.2 $\mu\text{L/mL}$, 0.1 $\mu\text{L/mL}$, 0.05 $\mu\text{L/mL}$, 0.025 $\mu\text{L/mL}$, 0.0125 $\mu\text{L/mL}$)

- (3) 將已洗淨的玻璃片裝入 16 孔盤模型中，並將不同濃度的 Streptavidin-IR 800 以每格 100 μL 滴入孔盤中，控溫在 37°C 下，避光反應 2 小時。
- (4) 反應完後，每格以 150 μL NaHCO_3 清洗三次，將多餘的 Streptavidin-IR 800 洗淨。
- (5) 洗淨後，將玻璃片從 16 孔盤模型取下，用去離子水潤洗，並用玻片離心機轉乾，即可用微陣列螢光掃描儀(Mida Scan)偵測螢光。



第四章 研究過程與結果與討論

4-1 晶種薄膜(seed films)的製備與分析鑑定

第一步先在羧酸化的玻璃片(Carboxylated polysine slides)上成長銅晶種奈米粒子，以利於後續的 Cu 奈米島狀薄膜(Cu nanoisland films)的製作。為了將銅晶種合成於玻璃片上，首先將 $\text{NH}_3(\text{aq})$ 加入於先配置的 $\text{CuSO}_4(\text{aq})$ 溶液中，使溶液呈鹼性($\text{pH} = 11.3$)，此時 NH_3 與 Cu^{2+} 離子形成 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 陽離子團簇，溶液顏色由淺藍變成寶藍。接著將玻璃片浸泡於 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 團簇的溶液中，使陽離子團簇藉由靜電引力(Electrostatic attraction)吸附到帶負電的玻璃基板上。接著將吸附 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 團簇的玻璃片浸泡到 NaBH_4 溶液中，將吸附的 Cu^{2+} 還原成 Cu^0 。此時在玻璃基板的邊緣可以看到呈現微黃色，意味著銅晶種有成功的還原在玻璃基板上。

要將銅晶種吸附在玻璃片上，反應時間與反應溫度為關鍵，實驗發現當反應時間少於 20 min 或反應溫度沒有調到適當溫度，後續的實驗將無法順利進行，詳細實驗條件結果見表 4-1。最佳的反應溫度為 42.5°C 與反應時間為 20 分鐘。

表 4-1 合成銅晶種薄膜，實驗數據

反應條件		後續實驗(Cu plating)的結果 (無/部分/完整長出 Cu 奈米薄膜)
溫度(°C)	時間(min)	
37.5	5	無
37.5	10	無
37.5	15	部分，可再現性差
37.5	20	部分，可再現性差
40	15	部分，可再現性差
40	20	部分，可再現性差
42.5	15	完整，可再現性差
42.5	20	完整，可再現性佳
45	15	完整，但反應容易形成氧化銅

銅的晶種無法順利長出銅晶種，認為是銅晶種極容易氧化，所以不利於接下來銅奈米島狀薄膜的生長。故會進行第二步的晶種步驟，將銅晶種薄膜浸泡在的 1mM $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ 中，此時可以發現有銅晶種的玻璃片逐漸變為淡紫色，此意味著銀有順利置換成功，形成銅銀核殼(Cu@Ag)晶種。由於銅與銀的還原電位不同，銅的還原電位為 +0.34 V，銀的還於電位為 +0.80，發生賈凡尼置換反應(Galvanic replacement)，銀具有較高的還原電位，可以促使銅發生氧化反應， $2\text{Ag}^+ + \text{Cu} \rightarrow 2\text{Ag} + \text{Cu}^{2+}$ ，將表面的銅置換成銀⁴³。我們利用兩步驟的晶種修飾形成 Cu@Ag 晶種在玻璃基板上，取代文獻常使用 Pd/Sn 貴金屬活化基板的步驟。

圖 4-1 為銅晶種與 Cu@Ag 晶種的吸收光譜，可觀察到銅晶種薄膜並無明顯的訊號，可能是此層的銅奈米粒子太薄或是銅奈米粒子太容易氧化，所以才無法看到明顯的訊號。而在 Cu@Ag 晶種可觀察在 300-600 nm 有其特徵訊號，與文獻中銀奈米粒子的約 400 nm 的吸收峰比較(見圖 4-2)⁴⁴，可以發現 Cu@Ag 晶種的特徵鋒不僅紅移且為較廣的訊號。

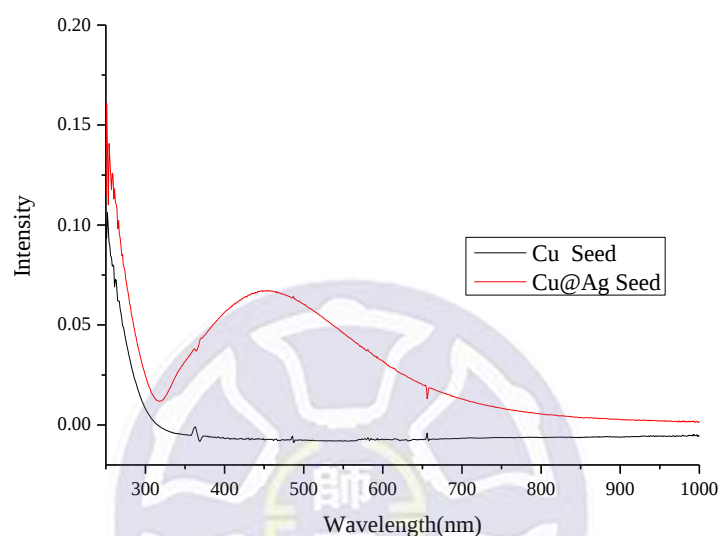


圖 4-1 銅晶種與 Cu@Ag 晶種的吸收圖譜

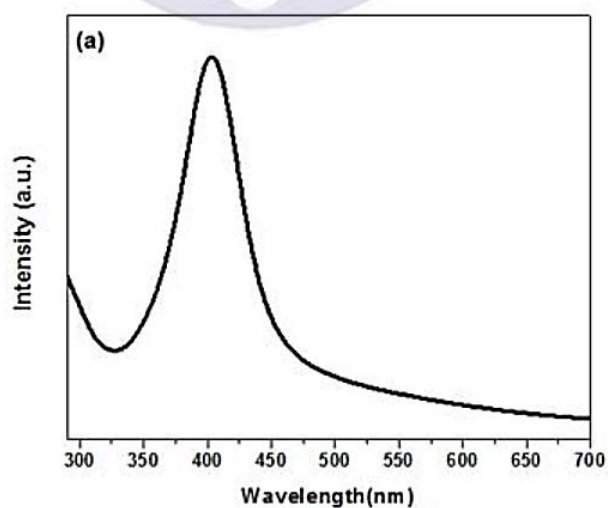


圖 4-2 文獻中銀奈米粒子的吸收圖譜

銅晶種肉眼上觀察玻璃基板邊緣呈現微黃色，圖 4-3(a)為銅晶種的 SEM 圖譜，Cu@Ag 晶種肉眼上觀察玻璃基板呈現微紫色，圖 4-3(b)為 Cu@Ag 晶種的 SEM 圖譜。發生賈凡尼置換反應時， $2\text{Ag}^+ + \text{Cu} \rightarrow 2\text{Ag} + \text{Cu}^{2+}$ ，因為氧化一個銅離子會還原兩個銀離子到基板上，且有些晶種黏在一起，可以解釋形成 Cu@Ag 晶種，在 SEM 圖譜上觀察到粒徑變大的現象。

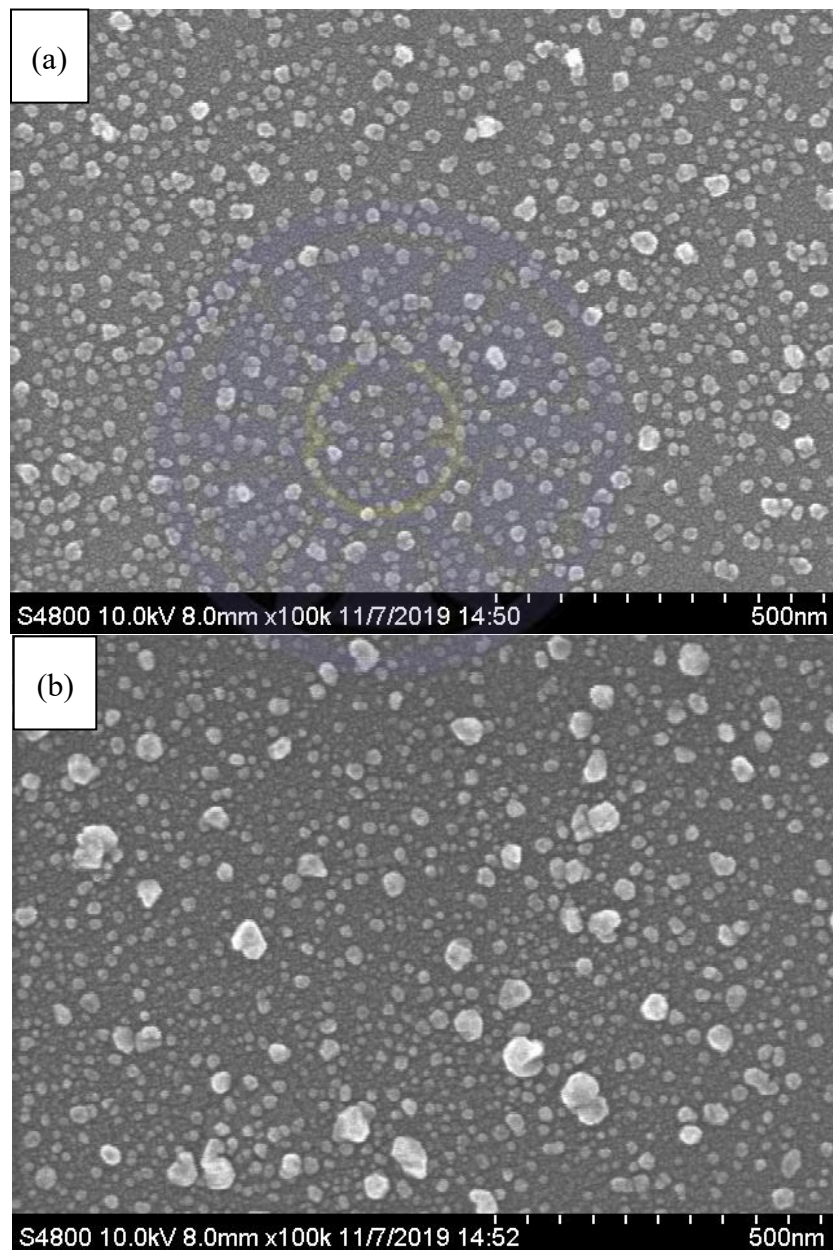


圖 4-3 (a)銅晶種與(b) Cu@Ag 晶種之 SEM

圖 4-4(a)為銅晶種的 EDS 結果，發現訊號中並無銅的訊號，再與吸收光譜所得到的結果一同解釋，認為是銅晶種太薄且顆粒太小以至於偵測不到訊號。圖 4-4(b)為 Cu@Ag 晶種的 EDS 結果，可見銀的訊號，可證實銀與銅有成功置換，合成出 Cu@Ag 晶種。

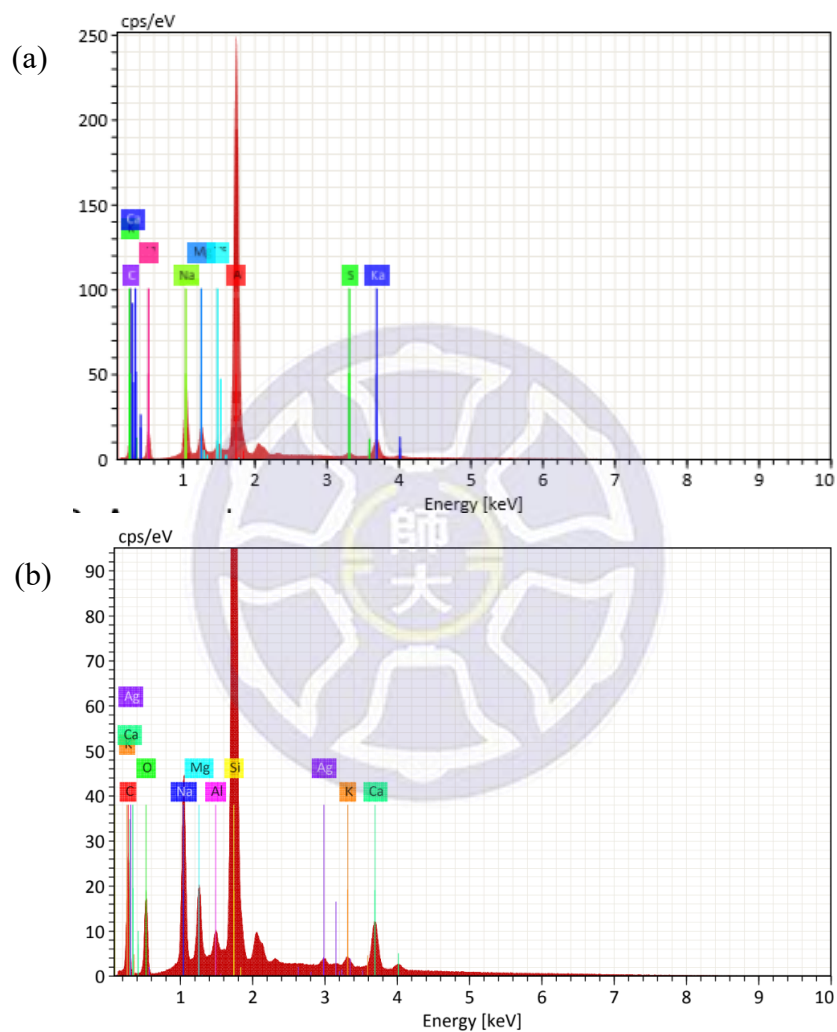


圖 4-4 (a)銅晶種與(b)Cu@Ag 晶種之 EDS

4-2 Cu 奈米島狀薄膜的製備與分析鑑定

4-2-1 Cu 奈米島狀薄膜的製備

利用化學合成法，配置 40 mM 的 CuSO_4 溶液，其中以甲醛作為還原劑，將銅奈米粒子還原在銀晶種薄膜上，藉由調控反應時間，可長出不同厚度的銅薄膜。所製備出的銅奈米島狀薄膜見圖 4-5。



圖 4-5 所製備出的銅奈米島狀薄膜

4-2-2 反應時間對 Cu 奈米島狀薄膜的影響

銅薄膜隨著反應時間越長，其透光越偏綠色與薄膜越厚實且均勻，見圖 4-6。

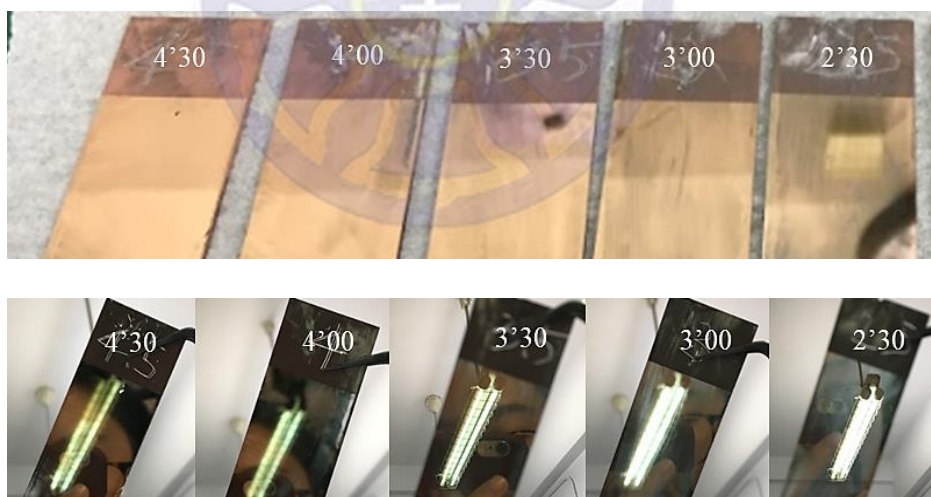


圖 4-6 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之成長狀況

圖 4-7 為 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之 UV-Vis 光譜，由光譜可之隨反應時間增加，薄膜厚度增厚，吸收訊號也會增加，且 LSPR peak 和 IR800 的放光波長有重疊，進而證實銅奈米島狀薄膜會有螢光增強的現象產生。

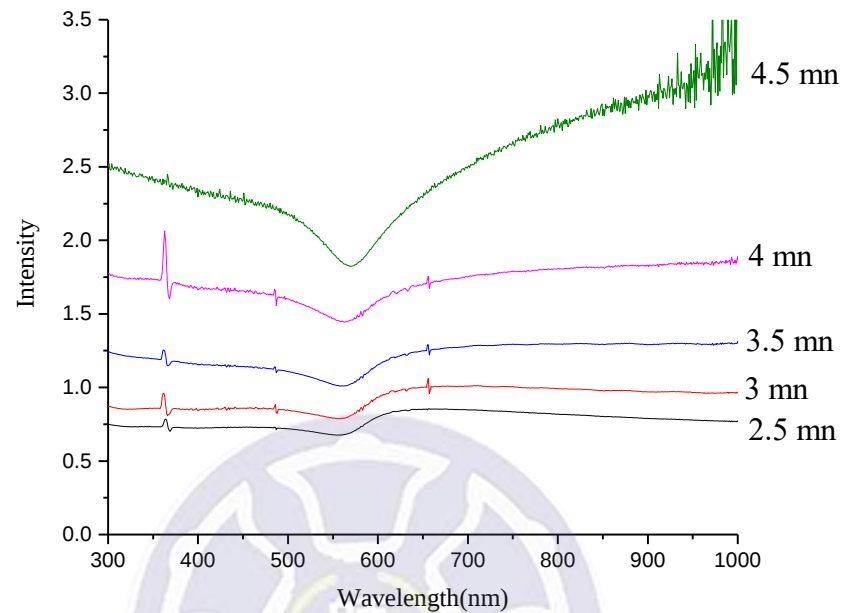


圖 4-7 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之 UV-Vis 光譜

圖 4-8 (a)-(e)分別為以 2.5 分鐘, 3 分鐘, 3.5 分鐘, 4 分鐘, 4.5 分鐘作為成長時間之 Top view Cu 奈米島狀薄膜之 SEM 圖，可見隨反應時間增加，Cu 奈米粒子大小增加與粒子間空隙隨越緊密，圖 4-8 (f)-(j)分別是以 2.5 分鐘, 3 分鐘, 3.5 分鐘, 4 分鐘, 4.5 分鐘作為成長時間之 cross sectional view Cu 奈米薄膜之 SEM 圖，可見厚度隨時間增加而增厚。各反應時間所對應的銅奈米粒子的 Gap 與厚度見表 4-1。

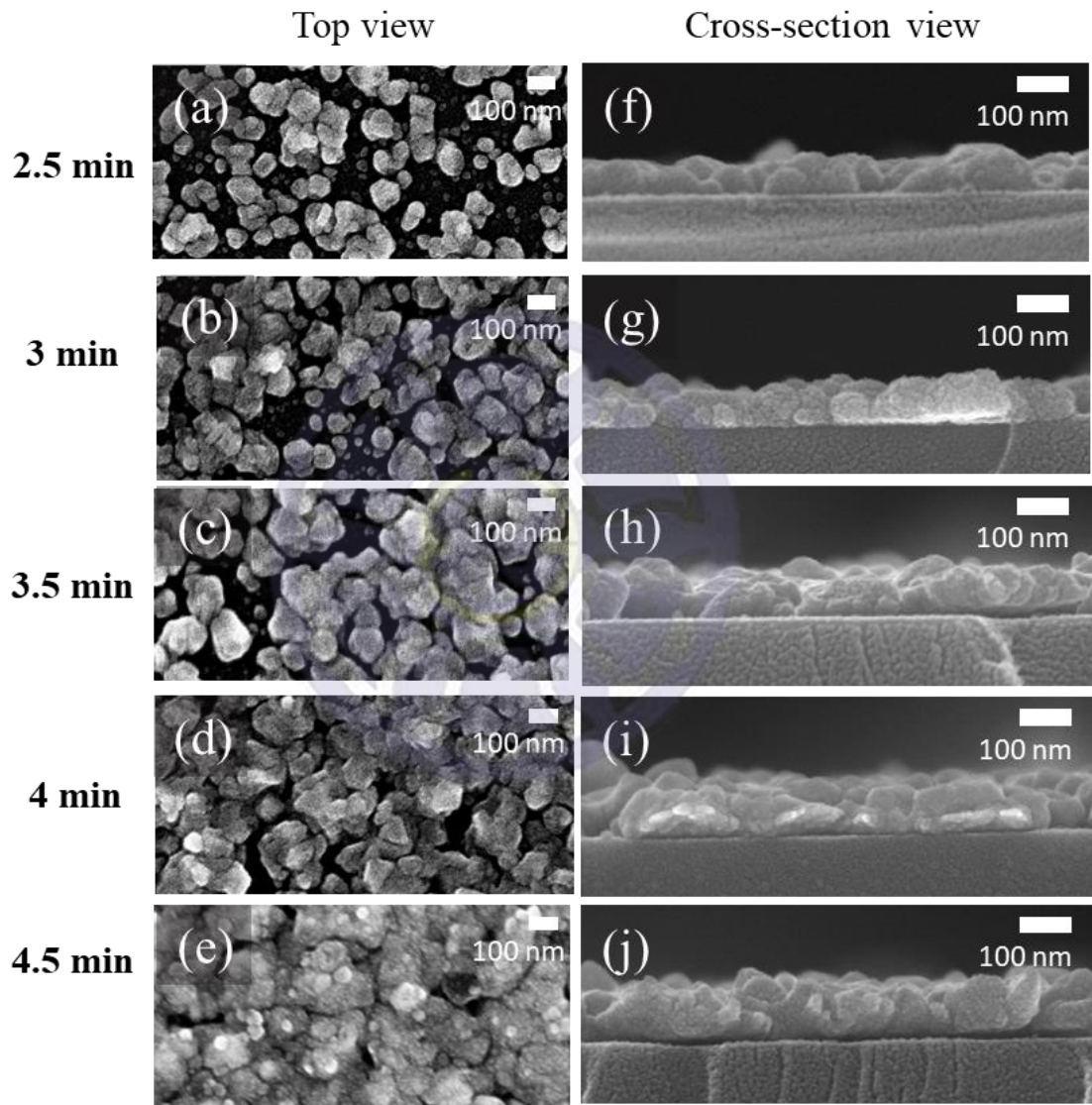


圖 4-8 Cu 奈米島狀薄膜隨不同反應時間之 Top view& cross sectional view SEM

Reaction time	Gap Distance (nm)	Thickness (nm)
2.5 min	42.9 ± 3.5	67.81 ± 1.0
3 min	31.1 ± 1.0	77.87 ± 0.2
3.5 min	26.2 ± 0.2	102.55 ± 0.4
4 min	18.3 ± 1.9	114.88 ± 0.9
4.5 min	8.6 ± 0.8	121.23 ± 0.3

表 4-1 不同反應時間 Cu 奈米島狀薄膜之 Gap 與厚度



4-2-3 Cu 奈米島狀薄膜的表面分析

若 Cu 奈米島狀薄膜表面有受到氧化，將會影響後續的螢光增結果，為了確認我們所製備的 Cu 奈米島狀薄膜是否被氧化，將樣品送至台大化工系之表面分析實驗室圖做電子能譜儀(XPS)。

圖 4-9(a)為實驗所得 Cu 奈米島狀薄膜的 XPS 圖譜，圖中 932.72 eV 及 933.9 eV 峰值與文獻資料，圖 4-9(b)比對後，得知為 $\text{Cu}2p_{3/2}$ 的特徵峰，而圖譜中另有 952.55 eV 與文獻比對為 $\text{Cu}2p_{1/2}$ 的特徵峰，而圖譜中為觀測到 CuO 的訊號，因此可證明所製備出的 Cu 奈米島狀薄膜表面並無被氧化的現象。

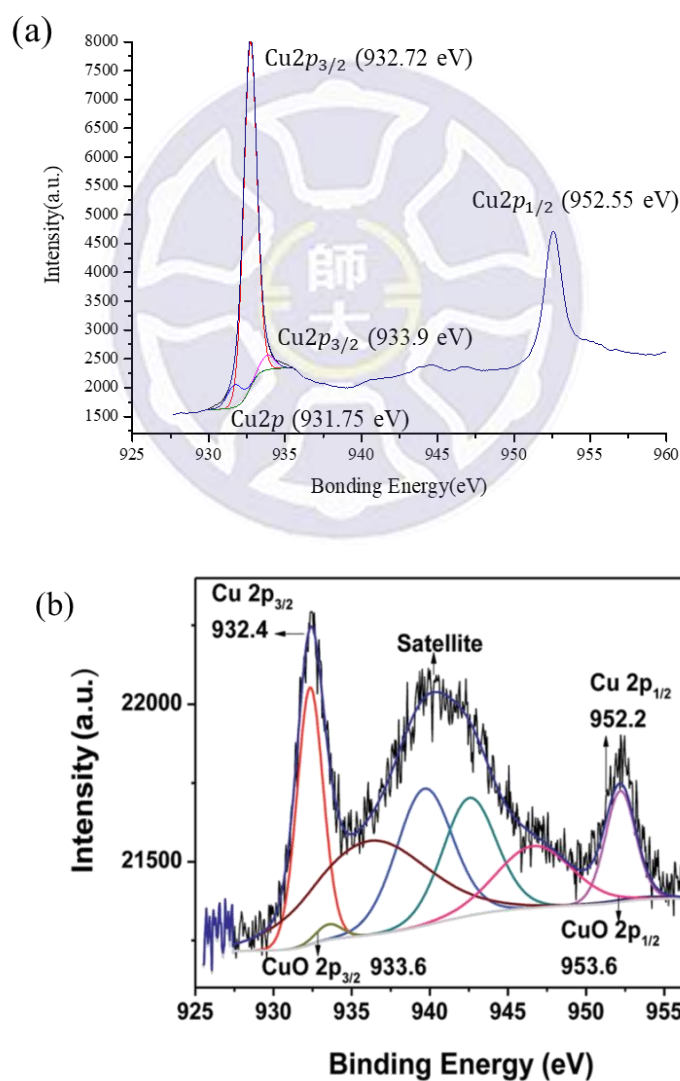


圖 4-9 (a) 實驗所得 Cu 奈米島狀薄膜的 XPS 圖譜(b)文獻資料⁴⁵

4-3 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾

4-3-1 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾流程

製備好的 Cu 奈米島狀薄膜接著要進行以下三步驟修飾，流程圖請見圖 4-10：

- (1) 第一步-修飾上硫醇：此步驟是為了避免 Cu 奈米島狀薄膜在接下來修飾的過程中受到氧化。
- (2) 第二步-修飾上 8arm-PEG-NH₂：先以 DCC-NHS 活化玻璃片上原本的 COOH，接著順利接上 PEG-NH₂。
- (3) 第三步-修飾上生物素(Biotin)：生物素(Biotin)一端為 COOH 會與 PEG 的 NH₂ 端形成鍵結。接上生物素(Biotin)的 Cu 奈米島狀薄膜，會與染劑 Streptavidin IRDye® 800 產生鍵結，進行螢光的測試。

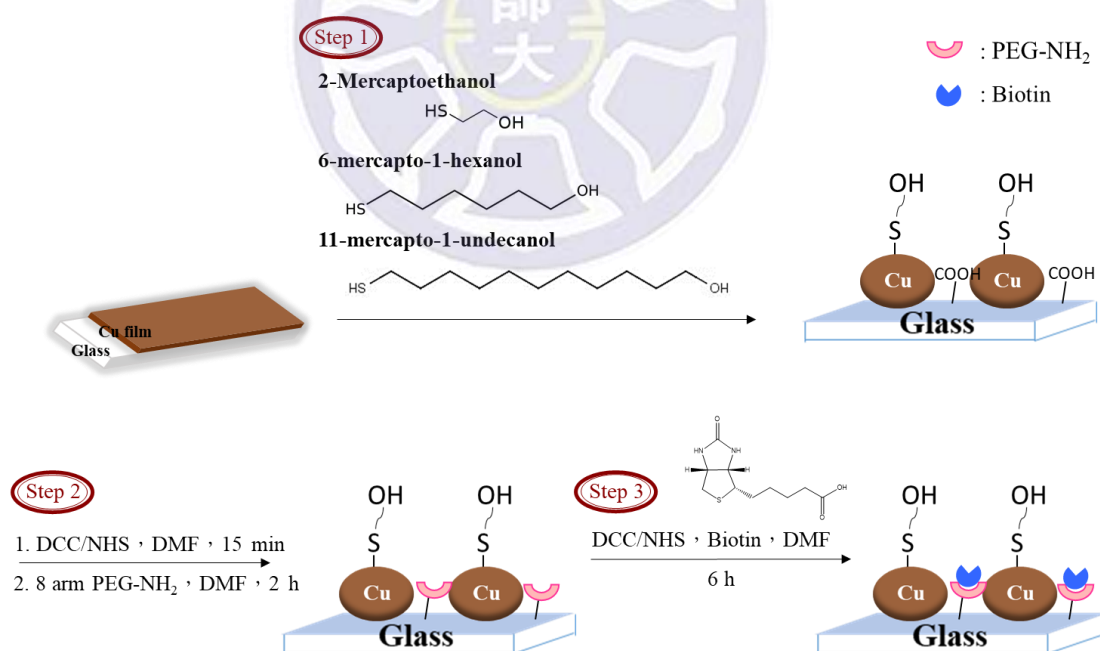


圖 4-10 Cu 奈米島狀薄膜的表面修飾流程

4-3-2 硫醇修飾對 Cu 奈米島狀薄膜的影響

修飾硫醇是為了避免 Cu 奈米島狀薄膜表面受到氧化。實驗中，我們選用的硫醇一端為 OH，我們利用 XPS 確認硫醇是否有成功修飾在表面，圖 4-11(a)為修飾上硫醇的 Cu 奈米島狀薄膜之 XPS 圖譜，圖譜中 162.5 及 163.35 峰比對文獻(見 4-11(b)⁴⁶)，分別為 S-Cu 及 S-H 特徵峰，確定 Cu 奈米島狀薄膜有修飾上硫醇。

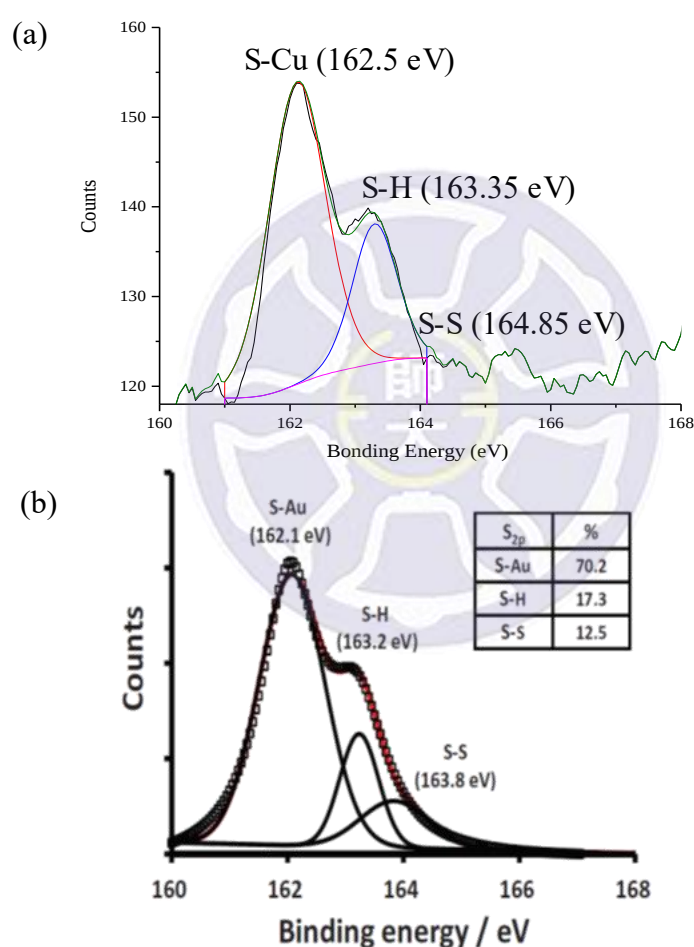


圖 4-11(a)實驗所得 Cu 奈米島狀薄膜的 XPS 圖譜與(b)文獻資料

為了比較不同長度與不同官能基的硫醇是否對 Cu 奈米島狀薄膜造成影響，分別使用 2-Mercaptoethanol (2-ME), 6-Mercapto-1-hexanol (6-MCH), 11-Mercapto-1-undecanol (11-MUD), 11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA)，且利用 UV-Vis 吸收光譜觀察 Cu 奈米島狀薄膜在修飾過程中被氧化的情形，見圖 4-12。圖譜中黑色為未做任何修飾前的 Cu 奈米島狀薄膜訊號，圖譜中粉紅色為修飾 11-MUD 且經三步驟修飾後的訊號，圖譜中綠色為修飾 11-MUA 且經三步驟修飾後的訊號，圖譜中藍色為修飾 6-MCH 且經三步驟修飾後的訊號，圖譜中紅色為修飾 2-ME 且經三步驟修飾後的訊號。由圖譜可觀察到修飾硫醇的 Cu 奈米島狀薄膜經三步驟修飾後，位於約 570 nm 峰值都有減弱的趨勢，尤其是修飾上 2-ME 到三步驟修飾後幾乎沒有吸收峰訊號，而修飾上 11-MUD，其峰值下降的趨勢最小，故後續實驗選用 6-MCH, 11-MUA, 11MCH 硫醇做為 Cu 奈米島狀薄膜的第一步修飾，之後會對此三種不同的硫醇進行螢光測試的分析。

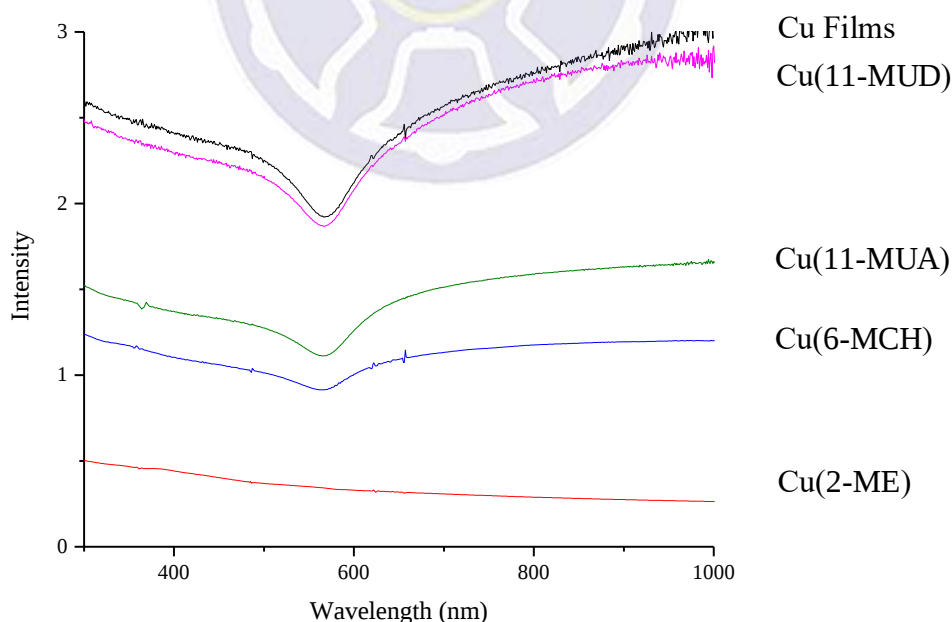


圖 4-12 Cu 奈米島狀薄膜在修飾過程中的 UV-Vis 光譜

4-4 Cu 奈米島狀薄膜的螢光增強測試

螢光增強測試的流程，分成以下三步驟：

- (1) 緩衝溶液清洗，去除多餘的修飾分子。
- (2) 接上 Streptavidin IRDye® 800 。
- (3) 利用 Mida Scan 偵測螢光。

4-4-1 不同緩衝溶液對 Cu 奈米島狀薄膜的影響

在實驗中，通常會在系統中添加適當的緩衝溶液來調控 PH 值。緩衝溶液在有金屬的狀況下，可能形成弱配位體，參考文獻選用以下不會與銅產生錯合物的緩衝溶液：Bis-tris propane(BTP), NaHCO_3 , Phosphate-buffered saline(PBS), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid(MES), Imidazole⁴⁷。

各緩衝溶液配置成 0.01 M 的溶液，將銅奈米島狀薄膜分別放入各溶液中，結果整理於表 4-2 中，只有 NaHCO_3 做緩衝溶液時，銅奈米島狀薄膜不被侵蝕，故我們實驗將選用 NaHCO_3 做緩衝溶液。

Buffer Solution	Result	pH	Concentration
Bis - tris propane (BTP)	disappear	10.36	0.01 M
NaHCO_3	constant	8.62	0.01 M
Phosphate-buffered saline (PBS)	corrosion	7.00	0.01 M
2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)	oxide	7.30	0.01 M
Imidazole	disappear	7.00	0.01 M

表 4-2 各緩衝溶液對銅奈米島狀薄膜的影響

4-4-2 修飾上不同的硫醇對螢光增強的影響

在三步驟修飾的第一步時，分別在 Cu 奈米島狀薄膜修飾上 6-MCH, 11-MUD 與 11-MUA，比較三者所表現的螢光增強效應，其中 11-MUA 為之前實驗室千華學姊做銅奈米粒子薄膜時所選用的硫醇。由圖 4-13 的螢光增強結果證實可得知修飾上 11-MUD 的 Cu 奈米島狀薄膜有較好的螢光增強倍率，故在此之後實驗皆選用 11-MUD 做硫醇修飾。文獻研究顯示在金屬與金屬縫隙間的電磁場增強效應較為顯著，故若將螢光分子修飾在金屬粒子之間，對螢光增強有更效果的提升⁴⁸。而我們使用硫醇末端為 OH 基時，就可使螢光分子選擇性的修飾在 Cu 奈米粒子之間。

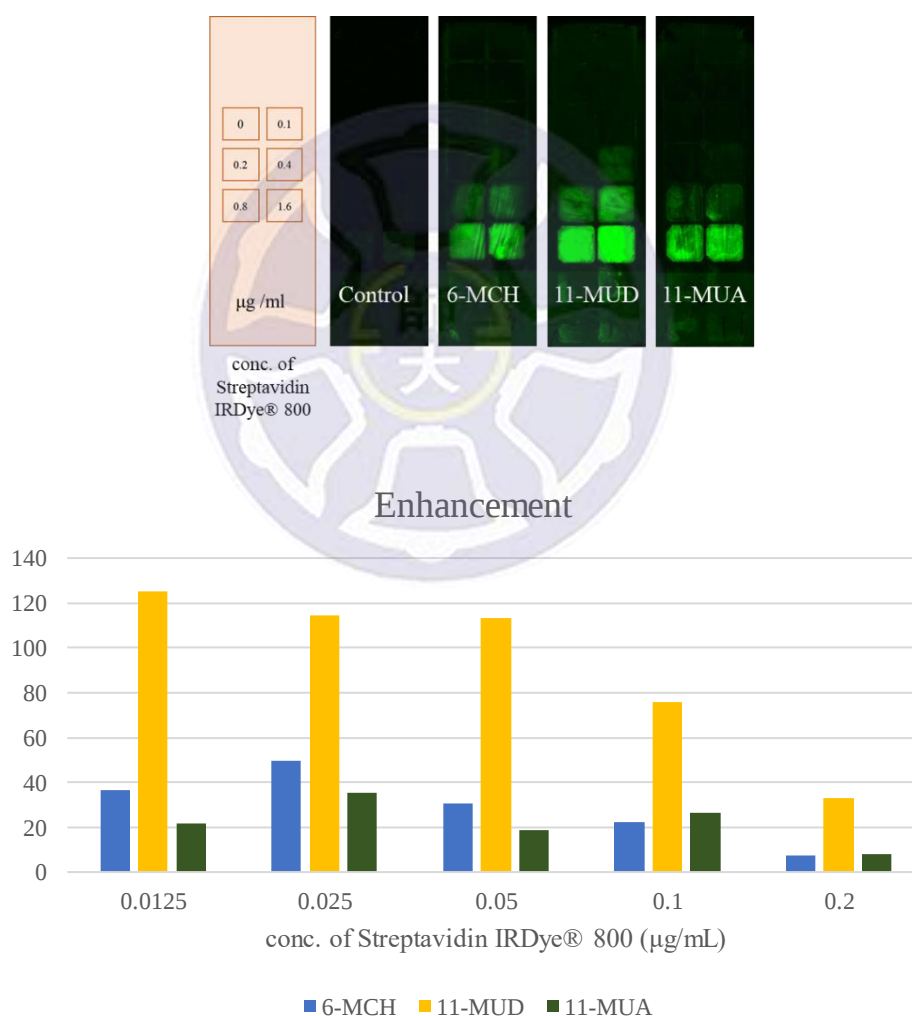
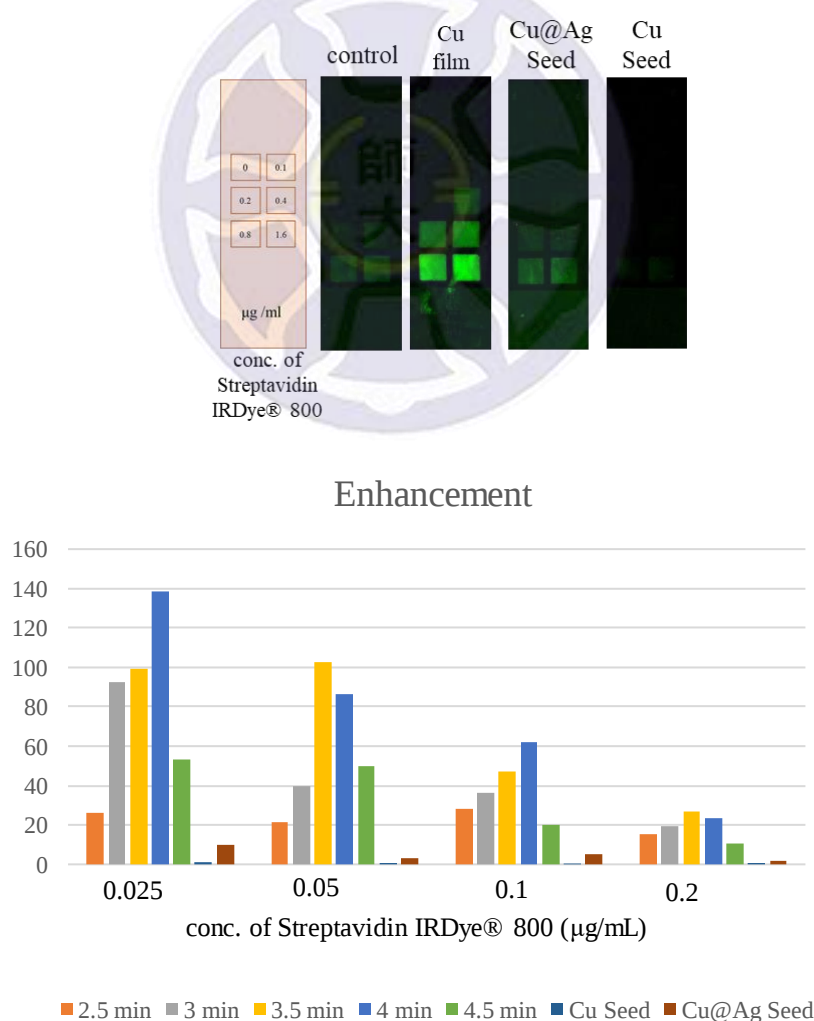


圖 4-13 分別修飾上 6-MCH, 11-MUD 與 11-MUA 的 Cu 奈米島狀薄膜之螢光增強

4-4-3 Cu 奈米島狀薄膜之不同成長時間對螢光增強的影響

藉由調控 Cu 奈米島狀薄膜成長的時間，可以得到不同厚度的薄膜。比較不同厚度的 Cu 奈米島狀薄膜所表現的螢光增強效應，螢光結果(見圖 4-14)，當成長時間分別為 2.5 分鐘、3 分鐘、 3.5 分鐘、 4 分鐘、 4.5 分鐘時，所得到的平均螢光增強倍率分別約為 21 倍、51 倍、65 倍、74 倍、32 倍。從結果可發現生長時間為 4 分鐘時螢光增強的效果最顯著。當成長時間超過 4 分鐘，Cu 奈米粒子會開始堆積，此時 Cu 奈米粒子間的空隙被填滿，可以修飾在金屬縫隙間的螢光分子量較少，故所得到的螢光增強倍率較為低。為了確認螢光有增強為 Cu 奈米島狀薄膜的 LSPR 貢獻，我們將只長上 Cu Seed 與 Cu@Ag Seed 的玻璃片做螢光實驗，發現皆沒有螢光增強的現象，故可證實螢光增強為 Cu 奈米島狀薄膜的 LSPR 所貢獻。



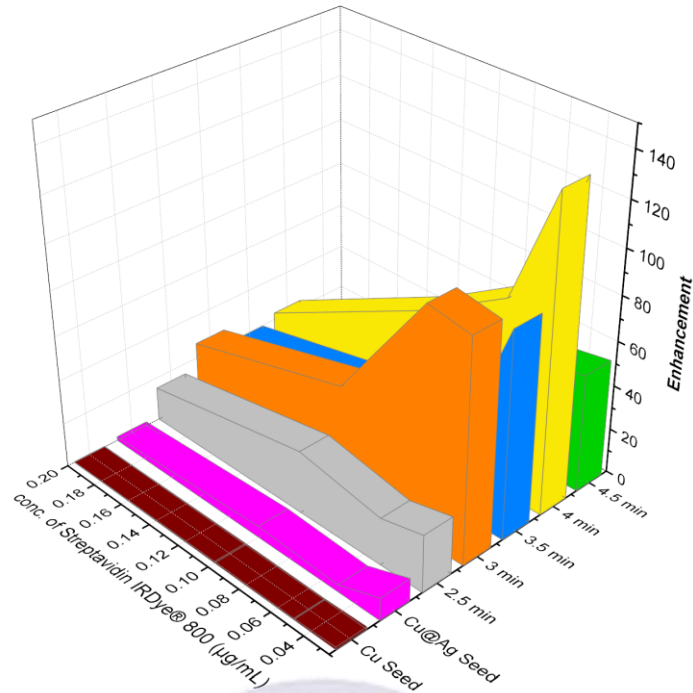


圖 4-14 不同成長時間的 Cu 奈米島狀薄膜之螢光增強結果

由結果可發現在 Cu 奈米島狀薄膜的成長時間為 4 分鐘時，螢光倍率最好。為了找最佳的螢光倍率，我們對 4 分鐘的 Cu 奈米島狀薄膜進行不同螢光染劑濃度的實驗，結果見圖 4-15，發現當染劑濃度為 $0.0125 \mu\text{g/mL}$ 時，有最佳的螢光倍率為 148 倍。

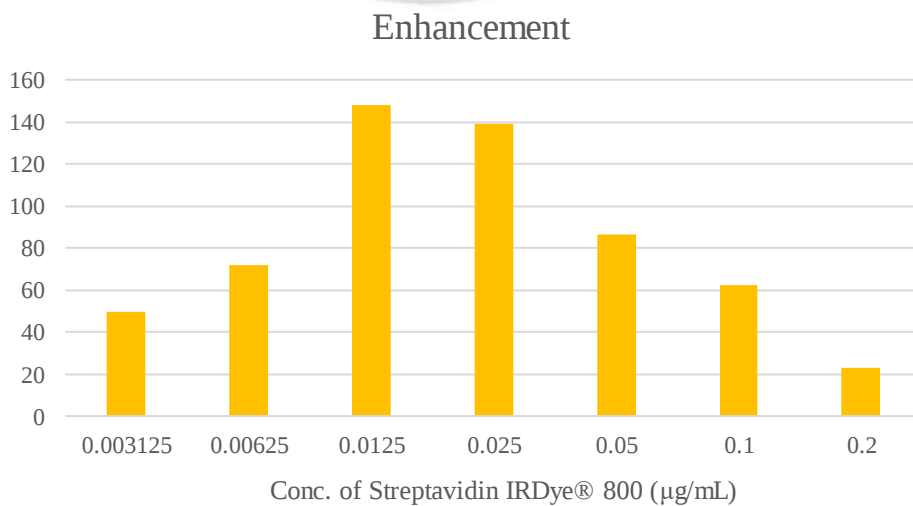


圖 4-15 Cu 奈米島狀薄膜(成長為 4 分鐘)的之螢光增強結果

第五章 結論與未來展望

本實驗以化學鍍法，調控反應溫度、反應時間等參數，利用甲醛作為還原劑製備 Cu 奈米島狀薄膜。Cu 奈米島狀薄膜經硫醇修飾後，使表面避免直接接觸空氣，並利用碳酸氫鈉作為緩衝溶液，解決了銅氧化的問題。修飾 Streptavidin IRDye® 800 在銅薄膜表面上，當銅薄膜的生長時間為 4 分鐘且以硫十一醇(11-mercapto-1-undecanol, 11-MUD)修飾薄膜表面時，能夠得到最高的螢光增強倍率達 148 倍。

未來期許本實驗所備的銅奈米島狀薄膜能更進一步的應用到螢光增強的生物化學檢測技術中。像是利用螢光增強的特性，可以標記腫瘤細胞，給予臨床醫學上有更準確的判讀。



參考文獻

1. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vithanavong, J.; Reimhult, E., Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* **2008**, *8* (3), 1400-1458.
2. Jeong, Y.; Kook, Y.-M.; Lee, K.; Koh, W.-G., Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *111*, 102-116.
3. Clark Jr, L. C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences* **1962**, *102*, 29-45.
4. Fracchiolla, N. S.; Artuso, S.; Cortelezzi, A., Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology. *Sensors* **2013**, *13* (5), 6423-6447.
5. Wang, J., Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews* **2008**, *108* (2), 814-825.
6. Hoa, X. D.; Kirk, A.; Tabrizian, M., Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosensors and bioelectronics* **2007**, *23* (2), 151-160.
7. Ahuja, T.; Kumar, D., Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *136* (1), 275-286.
8. Mohanty, S. P.; Kougianos, E., Biosensors: a tutorial review. *Ieee Potentials* **2006**, *25* (2), 35-40.
9. Arduini, F.; Micheli, L.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Piermarini, S.; Ricci, F.; Volpe, G., Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *79*, 114-126.
10. Sanati, A.; Jalali, M.; Raeissi, K.; Karimzadeh, F.; Kharaziha, M.; Mahshid, S. S.; Mahshid, S., A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. *Microchimica Acta* **2019**, *186* (12), 773.
11. Labib, M.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O., Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. *Chemical reviews* **2016**, *116* (16), 9001-9090.
12. Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R., Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (5), 1747-1763.
13. Hayat, A.; Marty, J. L., Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. *Sensors* **2014**, *14* (6), 10432-10453.
14. Sinha, A.; Jain, R.; Zhao, H.; Karolia, P.; Jadon, N., Voltammetric sensing based on the use of advanced carbonaceous nanomaterials: a review. *Microchimica Acta* **2018**, *185* (2), 89.

15. Wegner, K. D.; Hildebrandt, N., Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (14), 4792-4834.
16. Sun, Y.-P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. S.; Pathak, P.; Mezziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H., Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (24), 7756-7757.
17. Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X., Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chemical reviews* **2014**, *114* (10), 5161-5214.
18. Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swager, T. M., Chemical sensors based on amplifying fluorescent conjugated polymers. *Chemical reviews* **2007**, *107* (4), 1339-1386.
19. Gericke, M.; Pinches, A., Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* **2006**, *83* (1-4), 132-140.
20. Li, Y.-Q.; Guan, L.-Y.; Zhang, H.-L.; Chen, J.; Lin, S.; Ma, Z.-Y.; Zhao, Y.-D., Distance-dependent metal-enhanced quantum dots fluorescence analysis in solution by capillary electrophoresis and its application to DNA detection. *Analytical chemistry* **2011**, *83* (11), 4103-4109.
21. Cheng, D.; Xu, Q.-H., Separation distance dependent fluorescence enhancement of fluorescein isothiocyanate by silver nanoparticles. *Chemical communications* **2007**, (3), 248-250.
22. Jensen, T.; Van Duyne, R. P.; Johnson, S.; Maroni, V., Surface-enhanced infrared spectroscopy: a comparison of metal island films with discrete and nondiscrete surface plasmons. *Applied Spectroscopy* **2000**, *54* (3), 371-377.
23. Shimizu, K.; Woo, W.; Fisher, B.; Eisler, H.; Bawendi, M. G., Surface-enhanced emission from single semiconductor nanocrystals. *Physical review letters* **2002**, *89* (11), 117401.
24. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P., Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (7), 2264-2271.
25. Hammond, J. L.; Bhalla, N.; Rafiee, S. D.; Estrela, P., Localized surface plasmon resonance as a biosensing platform for developing countries. *Biosensors* **2014**, *4* (2), 172-188.
26. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267-297.
27. Guzatov, D. V.; Vaschenko, S. V.; Stankevich, V. V.; Lunevich, A. Y.; Glukhov, Y. F.; Gaponenko, S. V., Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment. *The Journal of Physical*

Chemistry C **2012**, *116* (19), 10723-10733.

28. Lakowicz, J. R.; Ray, K.; Chowdhury, M.; Szmajski, H.; Fu, Y.; Zhang, J.; Nowaczyk, K., Plasmon-controlled fluorescence: a new paradigm in fluorescence spectroscopy. *Analyst* **2008**, *133* (10), 1308-1346.

29. Li, M.; Cushing, S. K.; Wu, N., Plasmon-enhanced optical sensors: a review. *Analyst* **2015**, *140* (2), 386-406.

30. Zenin, V. A.; Andryieuski, A.; Malureanu, R.; Radko, I. P.; Volkov, V. S.; Gramotnev, D. K.; Lavrinenko, A. V.; Bozhevolnyi, S. I., Boosting local field enhancement by on-chip nanofocusing and impedance-matched plasmonic antennas. *Nano letters* **2015**, *15* (12), 8148-8154.

31. Abadeer, N. S.; Brennan, M. R.; Wilson, W. L.; Murphy, C. J., Distance and plasmon wavelength dependent fluorescence of molecules bound to silica-coated gold nanorods. *ACS nano* **2014**, *8* (8), 8392-8406.

32. Lakowicz, J. R., Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications. *Analytical biochemistry* **2001**, *298* (1), 1.

33. Tabakman, S. M.; Lau, L.; Robinson, J. T.; Price, J.; Sherlock, S. P.; Wang, H.; Zhang, B.; Chen, Z.; Tangsombatvisit, S.; Jarrell, J. A., Plasmonic substrates for multiplexed protein microarrays with femtomolar sensitivity and broad dynamic range. *Nature communications* **2011**, *2* (1), 1-9.

34. Cui, X.; Hutt, D. A.; Conway, P. P., Evolution of microstructure and electrical conductivity of electroless copper deposits on a glass substrate. *Thin Solid Films* **2012**, *520* (19), 6095-6099.

35. Hanna, F.; Hamid, Z. A.; Aal, A. A., Controlling factors affecting the stability and rate of electroless copper plating. *Materials letters* **2004**, *58* (1-2), 104-109.

36. Shacham-Diamand, Y.; Osaka, T.; Okinaka, Y.; Sugiyama, A.; Dubin, V., 30 years of electroless plating for semiconductor and polymer micro-systems. *Microelectronic Engineering* **2015**, *132*, 35-45.

37. Tourir, R.; Larhizil, H.; Ebntouhami, M.; Cherkaoui, M.; Chassaing, E., Electroless deposition of copper in acidic solutions using hypophosphite reducing agent. *Journal of Applied Electrochemistry* **2006**, *36* (1), 69-75.

38. Gan, X.; Wu, Y.; Liu, L.; Shen, B.; Hu, W., Electroless copper plating on PET fabrics using hypophosphite as reducing agent. *Surface and Coatings Technology* **2007**, *201* (16-17), 7018-7023.

39. Yang, F.; Yang, B.; Lu, B.; Huang, L.; Xu, S.; Zhou, S., Electrochemical study on electroless copper plating using sodium hypophosphite as reductant. *Acta Physico-Chimica Sinica* **2006**, *22* (11), 1317-1321.

40. Su, W.; Yao, L.; Yang, F.; Li, P.; Chen, J.; Liang, L., Electroless plating of copper on surface-modified glass substrate. *Applied surface science* **2011**, *257* (18), 8067-

8071.

41. Meenan, B.; Brown, N.; Wilson, J., Characterisation of a PdCl₂/SnCl₂ electroless plating catalyst system adsorbed on barium titanate-based electroactive ceramics. *Applied surface science* **1994**, 74 (3), 221-233.
42. Zhao, J.; Tian, R.; Zhi, J., Electroless deposition of copper and fabrication of copper micropatterns on CVD diamond film surfaces. *Applied surface science* **2008**, 254 (11), 3282-3287.
43. Park, J.; Kwon, T.; Kim, J.; Jin, H.; Kim, H. Y.; Kim, B.; Joo, S. H.; Lee, K., Hollow nanoparticles as emerging electrocatalysts for renewable energy conversion reactions. *Chemical Society Reviews* **2018**, 47 (22), 8173-8202.
44. Vekariya, R. L.; Dhar, A.; Lunagariya, J., Synthesis of silver nanoparticles in aqueous solution: ionic liquid used as a shape transformer. *Colloid and Surface Science* **2016**, 1 (1), 5.
45. Lin, F.; Shao, Z.; Li, P.; Chen, Z.; Liu, X.; Li, M.; Zhang, B.; Huang, J.; Zhu, G.; Dong, B., Low-cost dual cocatalysts BiVO₄ for highly efficient visible photocatalytic oxidation. *RSC advances* **2017**, 7 (25), 15053-15059.
46. Tsai YS, C. Y., Cheng PC, et al., TGF- β 1 conjugated to gold nanoparticles results in protein conformational changes and attenuates the biological function. (1613-6829 (Electronic)).
47. Ferreira, C. M.; Pinto, I. S.; Soares, E. V.; Soares, H. M., (Un) suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions: a review. *Rsc Advances* **2015**, 5 (39), 30989-31003.
48. Khlebtsov, B. N.; Khanadeev, V. A.; Panfilova, E. V.; Bratashov, D. N.; Khlebtsov, N. G., Gold nanoisland films as reproducible SERS substrates for highly sensitive detection of fungicides. *ACS applied materials & interfaces* **2015**, 7 (12), 6518-6529.