

# 國立交通大學

奈米科技研究所

碩士論文

以表面奈米化處理提升 QCM 靈敏度其應用性

**Enhancing the sensitivity and application of quartz crystal  
microbalance by nano-structured surface modification**

研究生：陳高超

學 號：9552516

指導教授：黃國華 教授

中華民國九十七年七月

以表面奈米化處理提升 QCM 靈敏度其應用性

**Enhancing the sensitivity and application of quartz crystal  
microbalance by nano-structured surface modification**

研究生：陳高超

Student : Kaochao Chen

指導教授：黃國華 教授

Advisor : Guewha Steven Huang

國 立 交 通 大 學

奈 米 科 技 研 究 所

碩 士 論 文

A Thesis

Submitted to Institute of Nanotechnology

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of

Master

in

Institute of Nanotechnology

July 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中 華 民 國 九 十 七 年 七 月

# 中文摘要

石英晶體微量天平 QCM(quartz crystal microbalance)，在上下表面之間加上交變電壓就會引起振動。待測物質與 QCM 相接觸時，會引起 QCM 諧振頻率得變化，通過諧振頻率的變化，即可檢測待測物質的物理特性。在前人的研究中發現在液相介質當中只要保持液體的密度和黏度不變，通過 QCM 的諧振頻率變化同樣可以測出電極表面的質量變化。在本論文中，QCM 電極表面覆蓋有高專一性的抗原與抗體通過流體分析儀(Liquid flow cells)，來測定特定的待測物質的原理，成功偵測到金奈米粒子的存在。

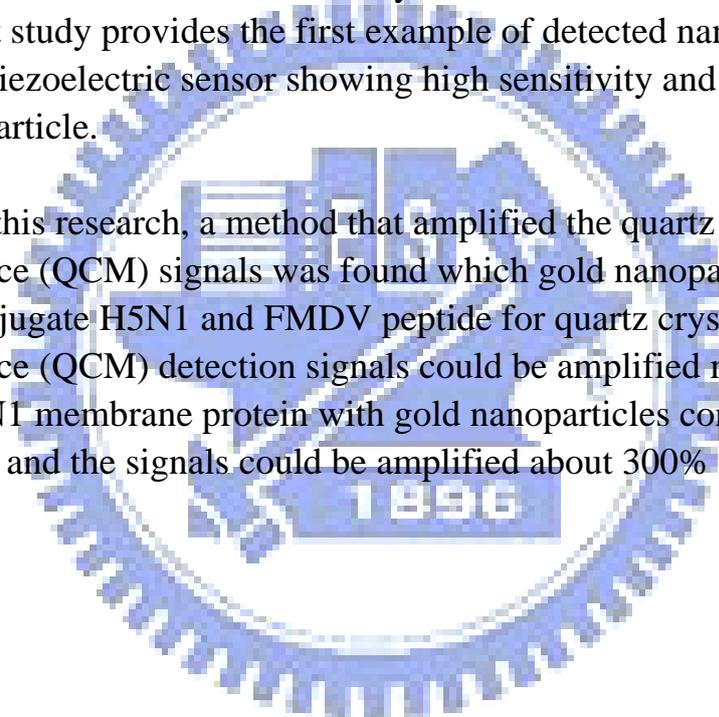
第二部分，我們使用 17nm GNPs 與 H5N1/FMDV peptide 混合要引起生物的免疫反應，將免疫反應產生之抗體進行 QCM 的量測。與 GNPs 結合與 H5N1/FMDV peptide conjugate 的反應優於單 H5N1/FMDV peptide 所引起的 QCM 頻率響應。利用此結論實際應用到禽流感(H5N1)膜蛋白進行 QCM 的檢測，成功放大信號 300%。

# Abstract

A quartz crystal microbalance (QCM) is a micro-mass-detection device that operates based on the piezoelectric properties of quartz crystals.

Part I : A nanoparticle detection system was constructed by cross-linking antibodies onto the gold electrode of quartz crystal microbalance (QCM). The sensitivity of gold nanoparticle detection was 118 Hz . Surface structured modification of quartz crystal microbalance (QCM) binding to gold nanoparticle was characterized by atomic force microscopy (AFM). The current study provides the first example of detected nanoparticle sensor by piezoelectric sensor showing high sensitivity and specific to gold nanoparticle.

Part II : In this research, a method that amplified the quartz crystal microbalance (QCM) signals was found which gold nanoparticles were used to conjugate H5N1 and FMDV peptide for quartz crystal microbalance (QCM) detection signals could be amplified more than 200%. H5N1 membrane protein with gold nanoparticles conjugate could be detected and the signals could be amplified about 300% in our system.



## 致 謝

首先要感謝在交通大學奈米科技研究所碩士班這兩年當中，所有願意幫助我，指導我並支持我的每個人。一路走來遇到了很多貴人的拔刀相助，雖然對妳們來說只是不足掛齒的小事，但對我來說卻是大大的支持，有妳們在我背後的援助，讓我沒有顧慮走完碩士班這兩年的時光。



兩年的時間一轉眼就過了，在這當中最重要得到的東西就是除了本身大學機械背景中又添加的生物方面的專長。能夠獲的這樣的成就首先就是要感受我的指導老師 黃國華 教授，在老師的指導之下由完全陌生的到漸漸熟悉了解生物方面的各種知識，我真的非常幸運有這種機會獲得”跨領域”的學習。在實驗室當中不只獲得老師學業上的指導，更在生活上有了更多的照顧與關懷，特別是師母 洪孟燕女士，在精神方面：師母豐富的人生閱歷讓我更了解做人處事的態度以及所應具備的道德勇氣；在物質方面：每個月都可以嚐到師母大廚般的手藝，填飽我們這些小毛頭的肚子，每每都讓我感動萬分。

在碩士的求學生涯中，實驗室的夥伴無疑是我前進的最大動力。要感謝 小天使、凱明、孟德、大勳、敘安、佳典、嘉偉、志杰、永昌及禮閣學長，把我從完全不懂得門外漢訓練成具有生物實驗基礎的人員。

再來是我的同袍新堯及祥溢還有其他實驗室的中書、依蓁、上哲、玟蓉及靖文，我們一起經歷的時光我想我應該一輩子也不會忘記，也感謝妳們在我實驗上的建議與幫助。最後是實驗室未來棟樑的學弟們：世明、煌孟、韋旭及宏書，從你們進來實驗室後成長的點點滴滴我都歷歷在目，加油！！！！

最後要感謝的是我的家人，謝謝你們給予我精神上及經濟上的資助，讓我無後顧之憂的可以完成碩士班這兩年的學業。

能夠完成這份論文要感謝的人太多，非常可惜得沒辦法跟妳們一致謝，因此在最後感謝所有幫助過我的人，謝謝你們。



## 目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
致謝	III
目錄	V
圖目錄	VIII
表目錄	IX
第壹章 緒論	1
1.1 前言	1
1.2 研究動機	3
第貳章 文獻回顧	4
2.1 生物感測器(Bio-sensors)	4
2.1.1 奈米生物技術	4
2.1.2 生物感測器的發展之歷史與其之定義	5
2.1.3 生物感測器的類型	8
2.1.4 生物感測器常用的表面修飾方法	11
2.2 免疫反應	13
2.2.1 免疫反應基本理論	13
2.2.2 免疫系統	13
2.2.3 抗原與抗體	14
2.2.4 抗原抗體反應與應用	17
2.3 石英晶體微量天平	18
2.3.1 石英晶體微量天平簡介	18
2.3.2 石英晶體微量天平工作原理	19
2.4 奈米粒子	21
2.4.1 奈米粒子簡介	21
2.4.2 金奈米粒子	22
2.4.3 二氧化鈦奈米粒子	24

2.4.4 氧化鋅奈米粒子 .....	25
2.4.5 四氧化三鐵奈米粒子 .....	26
2.4.6 奈米粒子的檢測 .....	27
2.5 台灣地區重要經濟作物疾病 .....	30
2.5.1 H5N1 流感病毒 .....	30
第參章 實驗設備、藥品及方法 .....	32
3.1 實驗藥品與設備 .....	32
3.1.1 實驗藥品 .....	32
3.1.2 實驗儀器 .....	33
3.2 實驗溶液泡製 .....	34
3.2.1 1X 生物緩衝劑 (Phosphate buffered solution, PBS) .....	34
3.2.2 2.5% (v/v) 戊二醛 (Glutaraldehyde) 溶液 .....	35
3.2.3 0.5% (v/v) 烷基雙硫醇溶液 .....	36
3.2.4 奈米金粒子溶液 .....	37
3.3 QCM 表面修飾 .....	37
3.3.1 QCM 前處理 .....	37
3.3.2 QCM 表面修飾 Anti-5nm GNPs Antiserum .....	38
3.3.3 QCM 表面修飾奈米金粒子 .....	39
3.3.4 QCM 表面修飾 Anti-H5N1(Piptide)-17nm Antiserum .....	41
3.3.5 QCM 表面修飾 Anti-FMDV(Piptide)-17nm Antiserum .....	42
3.3.6 QCM 表面修飾 H5N1 Antiserum .....	43
3.4 實驗方法 .....	45
3.4.1 抗體濃度稀釋 .....	45
3.4.2 Anti-5nm GNPs Antiserum 對不同粒徑奈米金粒子的 QCM 頻率響應 .....	46
3.4.3 Anti-5nm GNPs Antiserum 對相同粒徑不同材質之奈米粒子的 QCM 頻率響應 .....	49

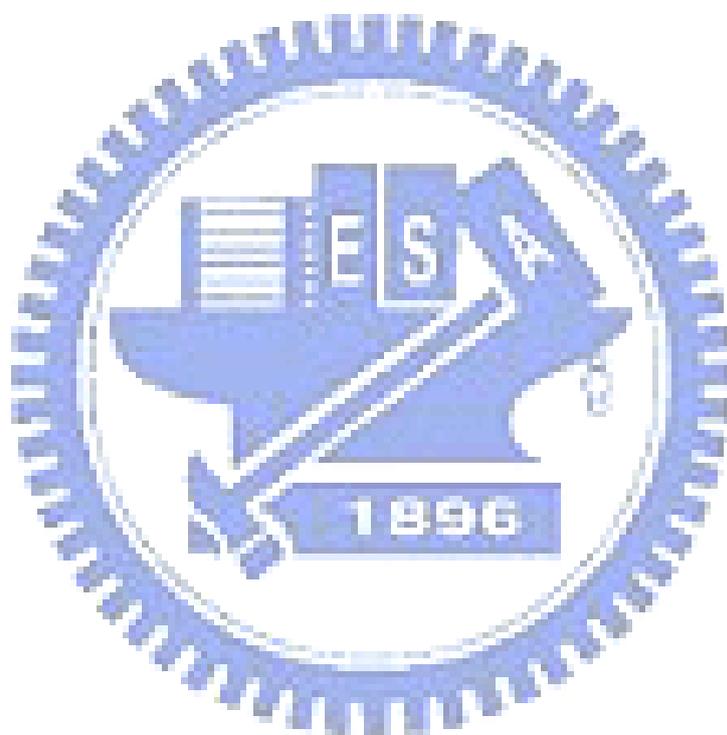
3.4.4 奈米金粒子與禽流感 H5N1(peptide) conjugate 的 QCM 頻率響應	51
3.4.5 奈米金粒子與口蹄疫病毒 FMDV(peptide) conjugate 的 QCM 頻率響應	54
3.4.6 奈米金粒子與禽流感 H5N1 病毒膜蛋白 conjugate 的 QCM 頻率響應	56
第肆章 結果與討論	60
4.1 粒徑分析	60
4.1.1 金奈米粒子粒徑分析	60
4.1.2 二氧化鈦粒徑分析	63
4.1.3 氧化鋅粒徑分析	64
4.1.4 四氧化三鐵粒徑分析	65
4.2 Anti-5nm GNPs Antiserum QCM 頻率響應分析	66
4.2.1 不同尺寸之金奈米粒子的 QCM 頻率響應分析	68
4.2.2 相同尺寸，不同材質之金、二氧化鈦、氧化鋅與四氧化三鐵奈米粒子的 QCM 頻率響應分析	70
4.3 金奈米粒子與 H5N1/FMDV(peptide) conjugate 的 QCM 頻率響應分析	72
4.4 金奈米粒子與禽流感(H5N1)病毒膜蛋白 conjugate 的 QCM 頻率響應分析	74
4.5 結論	75
第伍章 未來展望	77
第陸章 參考文獻	79

## 圖目錄

Fig.2- 1	生物感測器示意圖.....	7
Fig.2- 2	(a)戊二醛(Glutaraldehyde)分子式；(b)烷基雙硫醇 (1, 6-hexanedithiol)分子式。.....	12
Fig.2- 3	抗體(Antibody)示意圖.....	16
Fig.2- 4	QCM 實體圖.....	18
Fig.2- 5	H5N1 禽流感病毒示意圖.....	31
Fig.4- 1	2、4、5 nm GNPs 穿隧式電子顯微鏡影像(TEM).....	60
Fig.4- 2	5 nm GNPs 原子力顯微鏡(AFM)影像.....	61
Fig.4- 3	17 nm GNPs 掃瞄式電子顯微鏡影像.....	62
Fig.4- 4	Image-J 粒徑分析.....	62
Fig.4- 5	TiO <sub>2</sub> 原子力顯微鏡(AFM)影像.....	63
Fig.4- 6	ZnO 原子力顯微鏡(AFM)影像.....	64
Fig.4- 7	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 原子力顯微鏡(AFM)影像.....	65
Fig.4- 8	QCM 頻率響應圖.....	66
Fig.4- 9	注入不同粒徑金奈米粒子的 QCM 頻率響應圖.....	68
Fig.4- 10	表面修飾不同粒徑金奈米粒子的 QCM 頻率響應圖.....	68
Fig.4- 11	不同材質、相同粒徑奈米粒子的 QCM 頻率響應圖.....	70
Fig.4- 12	混合奈米粒子對單純金奈米粒子 % bound 圖.....	71
Fig.4- 13	H5N1(peptide)的 QCM 頻率響應圖.....	72
Fig.4- 14	FMDV(peptide)的 QCM 頻率響應圖.....	73
Fig.4- 15	H5N1 的 QCM 頻率響應圖.....	74

## 表目錄

Table. 1	常見生物檢測器的比較表 .....	11
Table. 2	TEM 與 SEM 的特點 .....	29



# 第壹章 緒論

## 1.1 前言

奈米科技是新世紀的明星，影響之層級深入到各個領域當中，許多的學者視它為第四次的工業革命。因為在介觀的尺寸(1~100 nm)裡，材料具有新穎的特性，預期將會把產業帶入新的發展方向，大幅提升產品的附加價值與競爭力。世界各國的政府也相繼投入龐大的經費，台灣也在 2006 年宣布了“奈米國家型科技計畫”，預計在 2008 年底所有奈米科技相關技術產業的產值可以達到 3000 億新台幣。

近年來奈米科技的崛起竄紅，主要是因為國內半導體先進製程進入微米階段後，在 0.13 微米下的製程遇到技術上的瓶頸，而奈米科技就是針對更細微元件製程的研發，提供一突破的可能性，因而產生了許多新的結構與新的用途。在奈米科技中，不僅僅是把東西變小了而已，更改變了其物理性質，這一方面使工程領域裡的研究人員相當興奮，也為奈米科技產業注入了相當多的原動力。

生物科技是一個跨學門的新興研究領域，它包括了生物、化學和工程三大科學領域，它的應用範圍涵蓋了農業、製藥工業、特化工業和環保工業等。由於生物科技產業對於人類未來的生活、健康、和環境品質有深遠的影響，因此它與奈米科技已被公認為二十一世紀最具

有發展潛力的高科技產業之基礎。

奈米科技在生物醫學上的應用如雨後春筍般冒出頭來；從中國傳統的中草藥到西方世界的先進醫療技術，也和奈米科技緊緊結合著。比方說：在科學中藥的製程中，將原先的生藥製成奈米粉末，由於與組織的接觸表面積增加，使致藥效的大幅提升、吸收率亦獲得改善，且相對給予的劑量減少了，副作用進而下降了…等等的優勢；再者，奈米粉末具有強滲透性，將其製成貼劑(transdermal system)或噴劑(inhaled route)，可以避免藥物經過胃腸吸收時，造成可能會被胃酸分解掉，或是導致吸收不穩定，無法達到藥物的有效劑量。奈米粒子(nanoparticles, NPs)的細微結構，目前已有用於生態環境中的化學檢測，及標定人體內的病原體，作為早期診斷的工具，以磁共振造影(MRI)顯影劑為例，將螢光染劑鍵結在奈米顆粒上時，較不易受到背景值的干擾，也不容易衰退變淡，因此可以增加檢驗的靈敏度；而檢測腫瘤細胞時，可以利用磁性奈米粒子作為抗癌藥物的載體(carrier)，注入體內後，藥物經過我們的控制下能聚集於病灶的部位，因而降低對於人體的副作用小，又可以對病理位置進行高濃度的藥物治療。這對於腫瘤、結核等有固定病灶的疾病有相當的療效。生物感測器(biosensor)則是另外一個奈米科技技術與生物學結合的跨領域應用範圍。生物感測器主要是運用生物分子如：抗體

(antobody)、抗原(antigen)、酵素(enzyme)、蛋白質(protein)、及核酸(nuclear acid)等來做為量測某種特定化合物或離子的工具。一般而言，其量測的化合物是具有選擇性(selectivity)且為一可逆反應。隨著感測技術的演進，生物感測器已有長足的進步。常見的生物感測器有壓電晶體感測器(piezoelectric crystal sensor)、光纖感測器(optic fiber sensor)、場效電晶體感測器(field effect transistor sensor)等等，可以預見的是，隨著奈米生物技術的成熟，用生物感測器來檢測重大疾病將越來越廣泛，越來越準確。

## 1.2 研究動機

目前的生物感測器受限於許多的限制，如生物樣本本身的選擇性不夠專一而常被不反應的物質(inactive)所阻隔；或是所要偵測的樣本濃度要高濃度才能被偵測，故其實測的應用性及準確度都有待加強。

因此我們希望利用強大的奈米技術當成我們的資料庫，並利用生物分子的特性，來進行生物感測器的改良，目標將朝向建立多樣化及高靈敏度的檢測平台邁進。

## 第貳章 文獻回顧

### 2.1 生物感測器(Bio-sensors)

#### 2.1.1 奈米生物技術

在近年來科學的研究領域中，研究微小的生物元件或生物分子的奈米級技術或檢測技術統稱為奈米生物技術(nano-bio-technology)，奈米生物技術的發展可以進一步促成研究了解生物體內分子間的運作模式，借由對此模式知識取得生命體內所有微小而分工細膩的規則將逐一被解開，我們對大自然生命奧妙的認識也將完整呈現在所有世人的眼前。

在奈米生物技術中，生物感測器的地位站有一個重要地位。所有研究學者的結論大多都有一種共識：“生物感測器是往後奈米生物科技技術發展的重點”，雖然仍在發展中，但已有部份的成果已成功的商品化，列如：血糖計等等…。然絕大部分的研究成果，卻還停留在實驗室階段，離商品化、實用化仍需要有研究學者以及專家的努力。生物感測器可以針對預期要之到的結果做量測上的設計，特別在藥品的篩檢與代謝或是其他生物分子間交互作用的量測上。與其他傳統分析儀器相比，生物感測器最獨特的地方就是來自生物體的元件與其所

具備的高特异性、高靈敏度或高選擇性，與即時監控等特性，而且真實地結合生物感測元件當作感測器或探針來進行我們所需要的量測。生物與奈米技術成果的運用廣泛，涵蓋了醫藥、生化、環保、農業、材料工程等等得研究領域，期未來的影響層面不僅有助精密機具的開發，亦將遍及日常生活用品，它的貢獻也將是無可取代。

### 2.1.2 生物感測器的發展之歷史與其之定義

生物感測器主要是以生物分子如抗體、抗原、酵素、蛋白質以及核酸等來做為量測某種特定物質的工具 1962 年，Clark 和 Lyons 開發酵素電極(enzyme electrode)[1]最先提出生物感測器的概念距今已快半世紀的歷史，生物感測器已有長足的進步。生物感測器在發酵工藝、環境監測、食品工程、臨床醫學、軍事及軍事醫學等方面得到了深度重視和廣泛應用。在最初 15 年裡，生物感測器主要是以研製酵素電極製作的生物感測器為主，但是由於酵素的價格昂貴並不夠穩定，因此以酵素作為敏感材料的感測器，其應用受到一定的限制。最近的研究指出，特定生物分子固定化技術的不斷發展，產生了跨領域的結合。特定的生物電極以生物受體作為分子識別元件，與酵素電極相比有其獨到之處。它可以克服價格昂貴、提取困難及不穩定等弱點。

生命體本身就具有各式各樣的化學量感受器，包括味覺、嗅覺、

內分泌系統的荷爾蒙受體，神經傳導系統的神經化學傳遞物質與受體蛋白質，酵素與基質及免疫系統中的抗體與抗原等等。因此，生物體本身實際上式一個化學受體(chemoreceptors)的集合體。這些化學受體均具有高度的特異性/選擇性與靈敏度，而且絕大部分係屬於受體蛋白質分子。生物感測器最重要的原理就是利用在感測器上加裝生物原件來增加偵測的選擇性與敏感度，因此我們可以將生物感測器定義為：“使用固定化的生物分子(immobilized bio-molecules)結合某種轉換器(transistor)，其轉換器可以光學、電性或是質量上的改變，主要的目定用來偵測生物體內或生物體外的環境化學物質或與之起特異性交互作用後產生回應的一種裝置”。

生物感測器由兩個主要關鍵部份所構成，一是來自於生物體分子、組織部份或個體細胞的分子特定的辨認元件，此一元件為生物感測器信號接收或產生部份。另一為屬於硬體儀器元件部份，主要為光學、電性或物理信號轉換元件。因此，如何已生化方法分離、純化甚或設計合成特定的生物活性分子(biological active materials)，結合精確而且回應快速的換能器(transducers)組合成生物感測器反應系統，是做為一個研究生物感測器學者最主要目的。

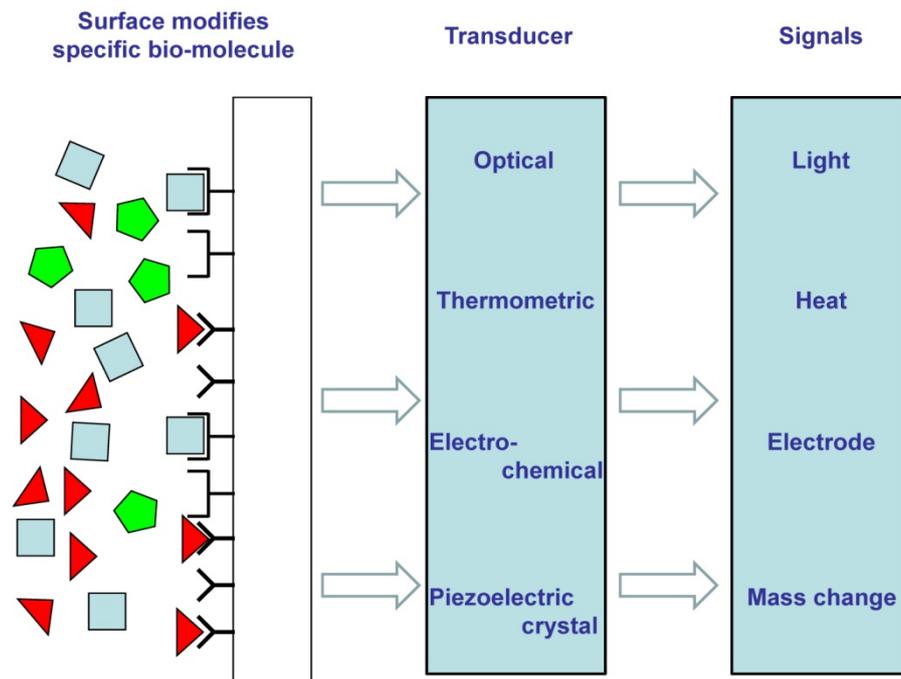


Fig.2-1 生物感測器示意圖

近來年許多的工程學者致力發展生物感測器，產生的許多跨領域結合的生物感測器也將這個領域推向另一個顛峰。從1962的Clark開發出酵素電極，隨著感測技術的快速演進，共計發明了壓電晶體感測器(piezoelectric crystal sensor, 1964)[2]、離子選擇性場效電晶體感測器(ion selective field effect transistor sensor, 1970)[3]，光纖感測器(optic fiber sensor, 1975)[4]，酵素修飾電極生物感測器(enzyme modified electrode biosensor, 1977)[5]、生物晶片(bio-chip, 1987)[6]以及陣列式微電極感測器(matrix micro-electrode sensor, 1997)[7]等等。由這些生物感測器的發展可以預期的是，隨著奈米生物技術的成熟，最大的受益者將是全世界

的生物體。

### 2.1.3 生物感測器的類型

依照使用生物分子的不同可以區分為酵素感測器(enzyme sensor)、免疫感測器(immune-sensor)、受體感測器(receptor sensor)、微生物感測器(microbial sensor)、細胞及組織感測器(cell and tissue sensor)及核酸感測器(nucleic acid sensor)等等…，其中最大差異就是在我們所修飾在感測器表面的生物分子的種類。

生物檢測器依據偵測原理的不同，大致可分為光學(optic)、放熱(thermal)、電化學(electrochemical)以及質量感測(mass-sensitive)等四種方法，而偵測器之選定則需考慮檢測系統的特性、反應機制、訊號模式、待測物型態、檢體濃度範圍、操作環境等因素。不同的偵測方式有不同的檢測器，其主要的代表如下：

#### (1)光學式生物感測器(optical biosensor)

光學式感測器主要在光纖的縱切端面，固定化一層適當的指示劑材料(例如生物螢光物質，化學發光物質或染料)，當測定溶液內發生生化反應時，由指示劑材料的變化產生光學訊號。依據不同之檢測原理分為分光光度法(spectrophotometry)、螢光法(fluoresence)以及反射光法(reflectometry)等，雖然不受電子訊號干擾，但易

受到其他光源干擾且檢測範圍較窄。

## (2)熱交換式生物感測器(thermometric biosensor)

熱交換式生物感測器其檢測原理主要是利用生物分子與待測物質結合反應時，藉由熱量轉換便可以利用精密微卡計量測，即利用生物分子結合生成反應所產生的熱量做為量測的依據。其優點為不受電子與光學的干擾，但其成本昂貴、靈敏度低且需要大量之檢測物質為其缺點。

## (3)電化學式生物感測器(electrochemical biosensor)

電化學式生物感測器分析原理主要利用其於生物系統交互作用所產生之電子轉移。此類型的感測器發展的最早，Clark 和Lyons 首先開發出酵素電極生物感測器，在一定的條件下，當電極表面物質濃度改變或電極產生反應時，可以使電極產生電位、電阻與電流等電性訊號，借由電性訊號的產生用以定量帶測物質的濃度。此類型生物感測器具有簡單、高選擇性之優點，但應用於檢測時易受物理、化學或生物間反應產生之電子雜訊干擾為其缺點。

## (4)壓電式生物感測器(piezoelectric crystal biosensor)

當壓電材料為石英晶體時，外加一個固定電壓時，晶體及產生一個固定交叉震盪頻率之機械性的形變，當質量改變時其震盪頻率亦隨之變化，本論文主要選用的感測器為石英震盪晶體，其特性之後會有

詳細的介紹。

另一與表面聲波(surface acoustic wave : SAW)換能器有關，表面聲波換能器亦利用壓電特性而設計，表面聲波由聲原產生經由吸附器傳到接收器，主要利用壓電晶體之基礎頻率與晶體表面質量負載之線性關係藉以檢測，其具有直接檢測、高靈敏度、應答快速、成本低廉與檢測簡便等優點，但於液相檢測時，靈敏度會降低，且易遭非特异性鍵結干擾。

而近年來因為奈米製程技術的發展，產生了另一種新的技術光學檢測技術 SPR(surface plasmon resonance, SPR)。SPR 生物感測器的原理是利用感測器上探針吸附樣品溶液中的待測物，當反應發生時共振條件發生改變，使反射波長產生位移，藉此偵測訊號，此方法年來常使用在奈米粒子的檢測上。



檢測方式	優點	缺點	檢測極限
激發螢光 (LIF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>靈敏度高</li> <li>偵測時間短</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>價格較昂貴</li> <li>波長受到限制</li> <li>使用壽命較短</li> </ul>	$10^{-11}$ g
表面電漿共振技術 (SPR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>無需標定特定生物分子或外加指示劑</li> <li>靈敏度極高</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>需控制幾何因素</li> <li>儀器昂貴</li> </ul>	$10^{-13}$ g
紫外光吸收 (UV-VIS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>分析物範圍廣</li> <li>操作較簡單</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>偵測光徑短</li> <li>偵測靈敏度較差</li> </ul>	nM
表面聲波器 (SAW)	<ul style="list-style-type: none"> <li>靈敏度高</li> <li>可利用半導體技術做微加工</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>製程複雜易受水份及晶體雜質影響</li> <li>高頻之干擾問題</li> <li>不易製作陣列結構</li> </ul>	$10^{-12}$ ~ $10^{-15}$ g
電化學式	<ul style="list-style-type: none"> <li>回應範圍廣</li> <li>儀器化容易</li> <li>線性回應佳</li> <li>靈敏度高</li> <li>價廉耐用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>回應速度慢</li> <li>選擇性受限制</li> <li>易受干擾</li> <li>選擇性差</li> <li>信號雜訊比差</li> </ul>	100ppm ~1ppm
熱量式生物感測器	<ul style="list-style-type: none"> <li>不受電子與光學的干擾</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>成本昂貴、靈敏度低</li> <li>需要大量之檢測物質</li> </ul>	nM
石英晶體微量天平 (QCM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>價廉、適合自動化系統</li> <li>可利用半導體技術做成同時檢定多成分的陣列感測器</li> <li>應答快速</li> <li>應用面廣</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>製程複雜易受水份及晶體雜質影響</li> <li>高頻之干擾問題</li> </ul>	$10^{-10}$ ~ $10^{-12}$ g

Table. 1 常見生物檢測器的比較表

#### 2.1.4 生物感測器常用的表面修飾方法

常見的表面修飾方法有下列幾種：

##### (1) 物理性吸附(physical absorption)

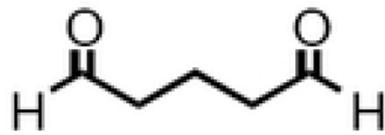
這個方法主要是利用分子間的凡得瓦力(van der waals)、靜電力(electrostatic)、親和性(affinity)的物理性質吸附特定的分子，優點是方法便宜、簡單；缺點是容易因外在的環境溫度、酸鹼值、容易中離子的強度之改變，而導致分子脫落。

## (2)離子鍵結(ion bonding)

此方法利用蛋白質具有被離子化性質，將蛋白質以離子鍵結形式結合於離子交換體，比物理性吸附有較強的結合力，但相同的蛋白質反應中緩衝溶液的種類、酸鹼值、離子強度、溫度等，都會對固定化的效率蛋白質的脫離有很大的影響。

## (3)共價鍵結(covalent bonding)

蛋白質含有與活性無直接關係的反應性游離基，由其是羥基、羧基與氨基之含量很高，可用來與基材表面具有的官能機發生共價鍵結，此種鍵結形式具有結合力強的特性，故被固定之蛋白質不易受外在環境影響而脫離基材。由此可知，將蛋白質在體外被固定後分析，對其結構而言，易受固定及結晶技術的影響；且蛋白質離開人體後，可能產生活性及結構上的變異，都是我們應該考慮的地方。在本文章當中主要也是使用此鍵結方式，增加我們固定的生物分子量，所使用的化學物質為戊二醛 (Glutaraldehyde,  $C_5H_8O_2$ )與烷基雙硫醇 (1,6-hexanedithiol,  $C_6H_{14}S_2$ )。



Glutaraldehyde

(a)



1,6-hexanedithiol

(b)

Fig.2- 2 (a)戊二醛(Glutaraldehyde)分子式；(b)烷基雙硫醇

(1,6-hexanedithiol)分子式。

## 2.2 免疫反應

### 2.2.1 免疫反應基本理論

免疫反應是病原體侵入人體，刺激免疫系統引起的另一種反應，這是特異性防衛機制。免疫系統是個極為複雜的系統，某些免疫作用是與生俱來的，某些則在出生之後才產生出來，出來之後才獲得的免疫能力稱為後天性免疫(acquired immunity)，後天性免疫皆為專一性免疫(specific immunity)；而與生俱來的免疫能力稱為先天性免疫(innate immunity)，先天性免疫皆為非專一性免疫(non-specific immunity)。在此篇文章當中我們所要探討的皆屬於後天性免疫。

### 2.2.2 免疫系統

免疫系統由淋巴結、淋巴組織，淋巴細胞以及巨噬細胞等組成。

在針對病原體進行的免疫反應過程中，淋巴器官能大量生產淋巴細胞。

這些淋巴細胞可經過淋巴管或者直接進入血循環。

免疫系統的器官與組織分為兩大類：

(1)初級淋巴器官，包括骨髓及胸腺，是白血球心聲及發育的場所；

以人體而言，骨髓是所有白血球的發源地，也是大多數白血球發育的場所，不過對T淋巴球會轉移胸腺發育、成熟。

(2)次級初級淋巴器官，包括淋巴結、脾臟、黏膜層淋巴組織等；淋巴結負責對淋巴管系統中的異物起免疫反應，脾臟負責血液循環系統中的異物清除工作，黏膜層淋巴組織則是黏膜層下的防禦系統；這些次級的淋巴器官與組織中的專一性免疫反應，主要在淋巴濾泡中發生，淋巴濾泡能進一步發育成萌發中心。

### 2.2.3 抗原與抗體

不論是專一性或非專一性免疫反應，皆有賴外原性或內生性的刺激才能被活化；這些刺激因子包括各種外來的微生物、寄生蟲、真菌、異類蛋白等，以及體內組織損傷產生的細胞內含物與細胞碎片。雖然這些刺激物往往先刺激第一線的防禦系統的非專一性免疫反應，但不是所有能活化非專一性免疫反應的刺激因子皆能活化專一性免疫反應，其中能刺激專一性免疫反應的物質稱為抗原，而這種能激發免疫反應的特性被稱為抗原性(antigenicity)。

由免疫器官與組織來解釋就是T-淋巴細胞負責辨別「自己」和「異己」。病原體侵入人體後，會被T-淋巴細胞認出是「異己」。受到刺激的T-淋巴細胞會發出攻擊的命令，促使B-淋巴細胞產生抗體。那些能刺激淋巴細胞產生抗體的異己蛋白質就是抗原。

在免疫系中，抗體是最早被研究的免疫活性物質。在學者的研究當中抗體具有下列幾種主要的效應才能防止或治療動物及人類的疾病，其效應分別是：沉澱效應、凝聚反應、中和毒素、干擾病毒活性，活化補體系統、調理作用、抗體依賴型細胞性胞殺作用(ADCC)及過敏免應。

由免疫器官與組織來解釋就是抗體是由B-淋巴細胞產生的，它是蛋白質的Y形結構。抗體可到達病原體，並與病原體上的抗原結合。抗原抗體結合的結果引至病原體被直接破壞，或者被巨噬細胞吞噬。抗體與抗原的結合有高度的專一性，即每一種抗體只能與引起它產生的抗原結合，而每種抗原只能誘發一種抗體產生。抗體在抗原的刺激下產生，並與抗原結合的過程，就是免疫反應。淋巴細胞受到抗原刺激而增生、分化的時候，還產生少量的記憶細胞。但記憶細胞並不立即與抗原作出反應。

抗體是一種蛋白質，故與所有蛋白質的生化特性及合成途徑相同，基本上由4條多肽鍵所組成。四條多肽鍵中可分為兩對，每一對所含2

條多肽鏈完全相同，其中一條得分子量較輕，稱為“輕鏈”，另一對的分子量較重，稱為“重鏈”，重鏈的分子量約為輕鏈的兩倍，四條多肽鏈互相以雙硫鍵連接在一起。

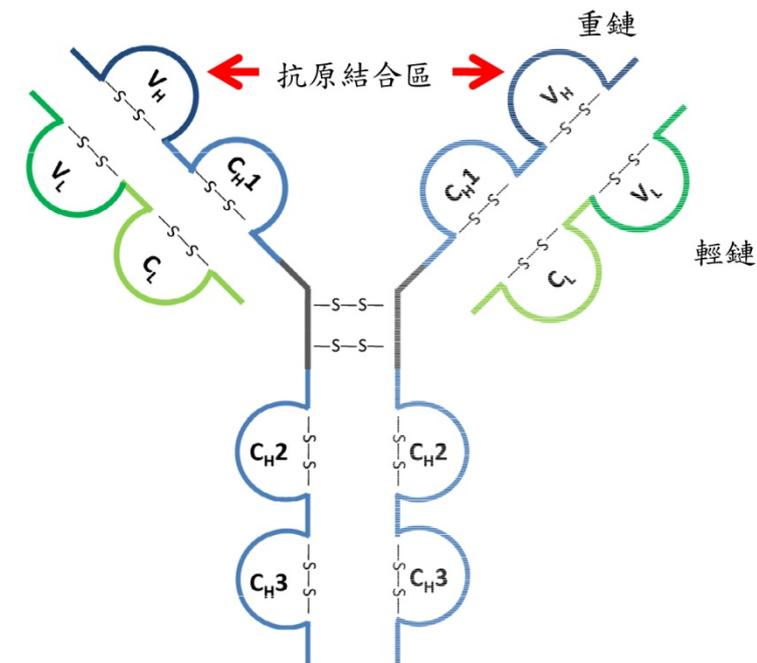


Fig.2-3 抗體(Antibody)示意圖

生物體初次受到某種抗原刺激，抗體的產生比較慢，血液中抗體的濃度要若干天後才明顯增加。所以病原體從入侵到被消滅需要一段時間。假若同一種抗原再次入侵，短時間內便會有大量抗體產生。這是因為在第一次抗原刺激時，分裂增生的細胞中一部分轉為記憶細胞。同種抗原再次入侵時，記憶細胞會很快分裂生並產生抗體。記憶細胞能存在較長時期，並在血液中循環。由於記憶細胞的存在，人體對入

侵過的病原體就有了抵抗力，也就是說有了對該疾病的免疫能力。

#### 2.2.4 抗原抗體反應與應用

抗原與抗體反應的專一性，只能用情人眼裡容不下一個小沙粒來形容，因為抗體能辨識抗原分子中非常細微的差異，可見抗體分子結合抗原部位，必定有其特殊的組成分子與化學特性。任何兩種分子之間的作用，皆利用一定的化學鍵結。事實上，抗體抗原分子間的結合方式，除了共價鍵之外，尚包括離子鍵(ion strength)、凡得爾力(van der waals force)、氫鍵(hydrogen bond)、厭水性作用力(hydrophobic interaction)等皆可以作用。抗原與抗體間的作用力約  $5\text{kcal/mole}$ ，相較於共價鍵的 $80\sim 150\text{ kcal/mole}$ 而言，是很弱的作用力，也因為如此，抗原抗體間的結合反應是可逆的。利用抗原與抗體反應的專一性與親和性，研究學者發展出許多靈敏度與準確度都很高的檢驗技術，如沉澱環檢驗法(ring test)、放射狀免疫擴散法(radial immuno-diffusion)、免疫電泳法(immune-electrophoresis)以及酵素免疫吸附檢驗法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等等。在本實驗當中也將利用抗原與抗體反應的專一性來進行石英晶體微量天平的量測。

## 2.3 石英晶體微量天平

### 2.3.1 石英晶體微量天平簡介

石英晶體微量天平QCM(quartz crystal microbalance)是在圓形AT切石英片的上下表面鍍上金電極構成的。在上下表面之間加上交變電壓就會引起QCM的振動。當石英片的厚度為半波長的整數倍時就會產生諧振。待測物質與QCM相接觸時，會引起QCM諧振頻率得變化，通過諧振頻率的變化，即可檢測待測物質的物理特性。QCM作為微質量感測器最早用於檢測沉澱積膜的厚度。現在QCM已被廣泛應用於化學和生物等領域，如電化學感測器，免疫感測器等等。

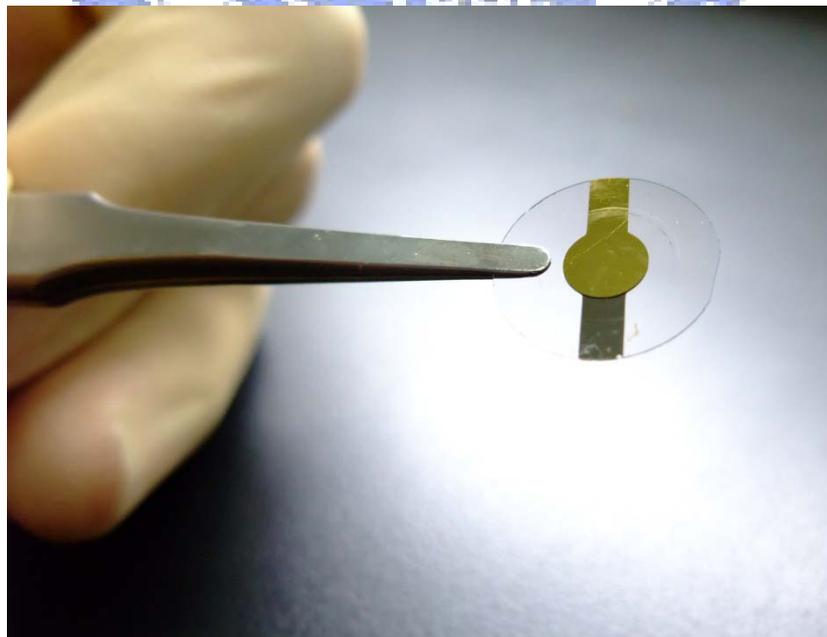


Fig.2- 4 QCM 實體圖

QCM有下列幾項優點可以供研究學者製作成高靈敏度的感測器：

(1)檢測靈敏度高，可到達ng等級；(2)振動Q值大，解析度高；(3)製造容易，成本低；(4)結構簡單，應用範圍廣；(5)可作即時線上檢測；(6)輸出為數位模式等等的優點。Rechenbach[8]等的研究，將QCM用於氫的檢測，並且不受濕度的影響；Hierlemann[9]和Chang[10]的研究則是利用QCM來偵測有機氣體分子；G. Steven Huang[11]也利用QCM裝置測得重金屬離子而且其靈敏度更可達Picogram ( $10^{-12}$  g)，本論文也選用石英晶體微量來作為感測器。

### 2.3.2 石英晶體微量天平工作原理

當石英晶體微量天平的振動為厚度剪切模態時，在液相中的阻尼小，容易起振，諧振頻率受溫度影響也小。在1959年Sauerbrey的文獻中指中[12]，電極表面的質量變化會引起QCM諧振頻率的變化，而兩者的關係呈線性變化：

$$\Delta f_m = -f_0^2 \frac{2}{A \sqrt{\rho_q G_q}} \Delta m \text{ -----(1)}$$

式中：A為電極面積， $\rho_q$ 和 $G_q$ 分別為石英的密度和剪切模量， $\Delta m$ 為質量變化， $f_0$ 為基頻。此公式適用的條件式，外加質量均於分佈在電極表面，形成一極薄膜，並與石英晶片同步振動。

在生物與化學等領域通常要求QCM在液相介質中工作，在這種情況下，QCM通常只有一個電極與液相介質相接觸，而另外一個電極則與空氣相接觸。與電極相接觸的液相介質也會引起QCM諧振頻率的變化。1982年Nomura和Okuhara[13]成功的使QCM在液相中保持震盪；1985年Kanazawa[14]的文獻中詳細的解釋了在這種工作環境中影響諧振頻率的變化與介質黏度  $\eta_l$  和密度  $\rho_l$  有關，詳細的關係式如下：

$$\Delta f_l = -f_0^2 \frac{2}{A \sqrt{\rho_q G_q}} \left[ \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{4\pi f_0}} \right] \quad \text{---(2)}$$

Martin[15]也指出了，電極表面質量的變化和液相介質引起的諧振頻率是可以疊加的，也就是

$$\Delta f_{ml} = -f_0^2 \frac{2}{A \sqrt{\rho_q G_q}} \left[ \rho_s + \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{4\pi f_0}} \right] \quad \text{---(3)}$$

式中  $\rho_s = \Delta m/A$

由公式(1)中可以看出，真空或空氣中通過QCM諧振頻率的變化即可以測出電極表面的質量變化。由公式(2)、公式(3)不難發現在液相介質當中只要保持液體的密度和黏度不變，通過QCM的諧振頻率變化同樣可以測出電極表面的質量變化。在本論文中，QCM電極表面覆蓋有高專一性的抗原與抗體，來測定特定的待測物質。

## 2.4 奈米粒子

### 2.4.1 奈米粒子簡介



微小的粒子其實充滿在我們的生活空間中，不論是在化學，光學、紡織、藥妝與食品等領域，帶來了極大的商機跟利益，但是它的負面影響也不容我們忽視。超微粒子(ultrafine particles)就是我們所稱的奈米粒子(nano-particles)，奈米粒子為奈米級之高精製粒子，其粒子徑達十億分之一公尺。具有表面之力學性質，高統動性及高分散性。以這些性質來生產具化學，機械，電子及光學效能之材料而超越原始材料之性能。另一方面，奈米材料之所以吸引大家重視的原因之一，是它的尺度介於原子與塊材之間，性質會隨著尺度不同而改變。

奈米粒子的性質決定於它的大小、結構及組成，除了可以直接利用外，並可做為砌塊用來建構較高級的結構材料及多功能元件。不過，

由單一成分所構成的奈米粒子，儘管它的性質可藉由尺度與結構的變化加以調整，但應用仍受限於固有的性質。奈米粒子有哪些不同一般物質之效應呢？(1)小尺寸效應：觸於表面粒子之比率越來越大，活性就越大；(2)表面效應：催化效果，表面吸附特性，荷葉效應；(3)量子效應：量子尺寸效應(非連續性電子能階)，量子穿隧效應等等的特性。

近年有研究報告指出某些粒子進入奈米尺度時可能具有毒性，如這些奈米粒子進入人體，將會對生命體的健康造成危害。隨著奈米科技的演進，我們擁有所多先進的觀測儀器可以對奈米粒子作研究，我們可以清楚的了解到奈米粒子對生命體健康的影響，並且對真正危害人體的奈米粒子應多加以管制，以保護地球生命的永續延伸。

#### 2.4.2 金奈米粒子

約在西元十七世紀時，歐美的煉金術士利用植物酒精萃取物(alcoholic extract of plants)還原金氯酸根離子用以製備含有褐紅色膠體金粒子之黃金飲料，其中所含之奈米金粒子因受到植物酒精萃取物的保護，可長期保存而不聚集(aggregate)，但當時的人們並不知道這褐紅色飲料便是包含著均勻的金膠體粒子。科學家Faraday [16]於1857年時，將  $[\text{AuCl}_4]^-$  水溶液(chloroaurate)以磷(phosphorus)來還原，而得到呈深紅色之金膠體粒子溶液，開始了

金膠體粒子製備方法及性質的研究。

金在最近幾年的熱門話題，就是把金加入我們的飲食中，一般認為金是生物相容性高的金屬對人體應無為害，在中國明朝李時珍的本草綱目記載寫著，金有安神、去風、鎮靜等功效；但由於奈米科技技術的蓬勃發展，當金進入了奈米的尺度，是否還具有相同穩定的性質，對生命體本身是否有跟以往不同的危害產生都是我們要注意的。

許多學者也都在對金奈米粒子與生命體之間的許多可能進行探討，Warren C. W. Chan [17]的研究中發現其實金奈米粒子對細胞有一定的效應影響；G. Steven Huang[18]利用不同粒徑的金奈米粒子打入老鼠體內，發現不同粒徑的金奈米粒子所產生的免疫反應均不相同，甚至會導致老鼠死亡。

在本實驗中需要使用到相當多的金奈米粒子，主要的合成的方式是根據在1973年，Frens提出一個簡單合成金奈米粒子的方法[19]，主要使用檸檬酸鈉還原法來製備粒徑均一的金奈米粒子溶液，這樣的一個方法提出後，馬上被應用於生物上的研究，同樣使用類似的方法亦有 Stathis 和 Fabrikas 等人使用 sodium ascorbate 來還原四氯金酸溶液來生產金奈米粒子[20]。這些方法所合成出來的金奈米粒子皆是內層由奈米金球所構成，外層則是包覆了一層帶負電荷的離子層，以化學還原方式 (Chemical reduction method) 還原的金奈米粒子，

在粒子外層會包覆一層界面活性劑，避免金奈米粒子再度聚集成塊狀金，所以說即使是相同尺寸的金奈米粒子，但可因其還原或合成方式的不同而有不同的殼層。所以這些金奈米粒子會因為靜電排斥而分散於溶液相中。使用還原法的優點在於在製備奈米粒子時，不需有機溶劑來參與反應。詳細的製作方法在之後的文章中會有詳述。

### 2.4.3 二氧化鈦奈米粒子

奈米粒子的種類相當眾多，近來最熱門的便是「奈米二氧化鈦光觸媒」了。一般我們所說的觸媒，是一種可以促進化學反應進行的材料，但觸媒本身在反應前後並不會改變或減少。而光觸媒顧名思義就是可以利用光當能量，在光觸媒材料表面上進行觸媒反應。

光觸媒材料在光的照射下，會把光能轉變成化學能，促進有機物的合成或分解，這樣的過程稱為光觸媒反應。利用這樣的光觸媒反應，我們可以分解一些污染物質、去除空氣中的臭味或分解水中的雜質，進而達到去污、除臭、淨水等功效，可說是具有相當發展潛力的綠色環保材料。

光觸媒是由日本東京大學的藤嶋昭(Fujishima Akira)[21]教授在一九七二年發現，其發現被稱為「藤嶋效應」。當時他發現二氧化鈦在紫外光的照射下，可以把水分子分解產生氫氣，因而發現二氧化

鈦的光化學特性。後來由於全球環保意識高漲，使得二氧化鈦的光觸媒特性引起世界各國的重視，尤其在日本更是掀起研究熱潮。

近年來發現許多半導體材料都具有光觸媒特性，但是後來的研究發現，部分半導體材料在酸性或鹼性的環境中容易變質，另外有些化合物容易發生化學或光化學腐蝕性，所以不太適合做淨水用的光觸媒。反觀二氧化鈦，不但具有相當優良的光觸媒活性，而且有物理與化學性質穩定，耐酸鹼、價格便宜、容易製備、無毒等優點，所以成為最具發展潛力的光觸媒材料。

#### 2.4.4 氧化鋅奈米粒子

氧化鋅奈米粒子是一種多功能性的新型無機材料，其顆粒大小約在 1~100 nm。由於晶粒的細微化，其表面電子結構和晶體結構發生變化，產生了宏觀物體所不具有的表面效應、體積效應、量子尺寸效應和宏觀隧道效應以及高透明度、高分散性等特點。近年來發現它在催化、光學、磁學、力學等方面展現出許多特殊功能，使其在陶瓷、化工、電子、光學、生物、醫藥等許多領域有重要的應用價值，具有普通氧化鋅所無法比較的特殊性和用途。氧化鋅奈米粒子在紡織領域可用於紫外光遮蔽材料、抗菌劑、螢光材料、光催化材料等。

氧化鋅也是化妝品常用的白色顏料，具有中等的收斂作用、抗菌作用和緩解作用，所以能舒緩輕微的皮膚刺激作用。太陽光中的紫外

線按其波長可分為 UVA (320 nm~400nm)、UVB (290 nm~320nm)和 UVC (200nm ~290nm)。UVB 是導致灼傷、間接色素沉積和皮膚癌的主要根源，灼傷主要表現皮膚出現紅斑，嚴重者還可能伴有水腫、水皰、脫皮、發燒和噁心的症狀。目前，防曬化妝品中的防曬指數(SPF)就是針對 UVB 的防護。UVC 雖絕大部分被大氣平流層中的臭氧層所吸收，但由於其波長短、能量高和臭氧層破壞的日益加劇，對人類造成的傷害也不能忽視。隨著全球紫外線輻射強度的不斷增加和皮膚科學的發展，UVA 對人體的傷害逐漸引起人們的關注。UVA 的穿透能力強且具有累積性，長期作用於皮膚可造成皮膚彈性降低、皮膚粗糙和皺紋增多等光老化現象，UVA 還能加劇 UVB 造成的傷害。氧化鋅奈米粒子能夠有效屏蔽 UVA，近年來在防曬化妝品中得到廣泛應用。

#### 2.4.5 四氧化三鐵奈米粒子

科學家用磁性奈米粒子把癌細胞變成微小的“磁鐵”，使其在有磁性的檢測設備面前無所遁形，這項新技術可望大幅提高癌症診斷的準確度和效率。目前的癌症活組織檢查有時不準確，例如檢查所取的組織樣本中恰好癌細胞太少，於是檢查得出陰性的結果，但實際上患者體內有癌細胞存在。經過這樣處理的奈米粒子注射到人體中後，數以千計的粒子因抗體作用而附著在癌細胞上，使癌細胞變成微小

“磁鐵”。此時用帶有磁性的探針進行檢查，癌細胞就會在磁性吸引力作用下游向探針。

數學模型顯示，利用這種方法，在兩到三分鐘之內就會有相當數量的癌細胞被吸引到探針上。研究人員在試驗中成功地用磁性探針吸引了血液和其他液體中經奈米粒子處理的血癌細胞。癌症患者需要經常檢查以確定病情，其中一些檢查非常痛苦，例如血癌患者的骨髓穿刺，這項技術可以減少檢查次數。它還可用於檢查癌細胞是否有擴散跡象，癌細胞擴散數量有時極為微小，普通方法難以檢查出來。

磁性四氧化三鐵奈米粒子被廣泛用作各種抗癌藥物的載體，形成一種磁靶向給藥系統；用磁性四氧化三鐵奈米粒子製成的磁性微球還可廣泛用於磁性免疫細胞的分離，核磁共振造影成像等方面。利用磁性四氧化三鐵奈米粒子在外加交變電磁場作用下能產生熱量的特性，殺死腫瘤細胞，達到治療腫瘤的目的。

#### 2.4.6 奈米粒子的檢測

電子於1897年由英國人J. J. Thomson發現，到量子力學的出現，提出電子波質二元論的理論，即電子既然有粒子的特性，亦有波動的特性，所以電子亦應該有繞射現象；1927年美國Davisson和Germer兩氏以電子繞射實驗證實了電子的波性。1927年德國Busch實驗發現可藉電磁場聚焦電子，產生放大作用。

## (1) 穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy ; TEM)

對於近十年來迅速發展的半導體製程，以及奈米尺度的先進材料，材料的研究已進入原子尺度大小，為了觀察如此微小的尺度，新的研究工具也陸續出現。在這些新的研究工具當中，穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy; TEM)可提供材料內部的形態、晶體原子結構。

自1936年第一台商用電子顯微鏡於英國建立以來，穿透式電子顯微鏡不斷地進步與突破，其最重要指標就在於影像解析度。隨著高壓設備之成熟技術發展與建立，一百萬伏特(volts)以上之超高電壓穿透式電子顯微鏡也已問世。因此原子級的影像解析度早已不再是遙不可及之夢想。

## (2) 掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope , SEM)

原理的提出與發展，約與 TEM 同時。但到 1964 年，第一台商售 SEM 才問世。由於 SEM 為研究物體表面結構及成份的利器，成像及使用較容易，此外還有許多其他優點，目前已被廣泛的使用；同時，SEM 亦廣泛的應用於生物學及醫學上。電子顯微鏡和光學顯微鏡最大的不同，在於光學顯微鏡以「可見光」為光源，由透鏡組將影像放大。而電子顯微鏡則以「電子束」，由「磁場」來作「透鏡」來「折射」電

子束。電磁場對電子之作用與光學透鏡對光波之作用非常相似，因而發展出電磁透鏡。

類型	特點
TEM	是用入射電子對被觀察物的繞射來瞭解其結構,包括晶格形狀與晶格大小,甚至晶格缺陷與原子的堆疊狀態都可以解讀出來。
SEM	是用入射電子對被觀察物的反射來瞭解其表面,可以做高倍率的模擬放大,像是光學顯微鏡的放大版。

Table. 2 TEM 與 SEM 的特點



以上兩種方發是常用來檢測奈米粒子的方法,但要使用這兩種方法檢測時都會遇到價格昂貴及試片不易製作的問題,因此我們想做一種可以簡單檢測奈米粒子的方法,在本論文後段文章中,利用 QCM 成功製作中檢測 5nm 金奈米粒子的裝置,雖然現在只完成 5nm 金奈米粒子偵測,但以為之後的研究跨出了一大步。

## 2.5 台灣地區重要經濟作物疾病

### 2.5.1 H5N1 流感病毒

H5N1 流感病毒主要感染鳥類，在鳥類間的傳染性高並易致死。禽鳥的 H5N1 流感疫情自 2003 年底至 2004 年初之間，在亞洲 8 個國家發生流行，並造成至少 1 億隻禽鳥因染病或撲殺而死亡。疫情至 2004 年 3 月始獲控制。2004 年 6 月起，亞洲再度發生家禽及野鳥之 H5N1 流感流行，病毒並開始擴展其地理分布，2005 至 2006 年間，歐洲、非洲及中東陸續報告野鳥或家禽之 H5N1 流感案例。H5N1 流感病毒通常並不會感染人類，但自 2003 年底開始，世界衛生組織(WHO)陸續接獲人類 H5N1 流感之病例報告。病例以孩童及少年為多，且多數曾直接或密切接觸感染 H5N1 的病禽，或曾處於受病毒污染的環境。一般而言，感染者通常也很難將病毒傳播給其他人，僅有泰國及印尼通報有限性人傳人之家庭聚集案例。在現有的人類 H5N1 流感案例中，患者在染病初期多有類流感症狀，如發燒(耳溫 38°C 以上)、喉嚨痛、咳嗽、肌肉酸痛、頭痛、全身倦怠等，部分患者有嘔吐、腹瀉和腹痛等症狀。患者可能在發病數天後，發生呼吸困難等下呼吸道症狀。依現有經驗，許多病人出現嚴重的臨床症狀，導致快速惡化或死亡，致死率高達五成以上。但亦有可能嚴重病例較有機會送醫診斷與通報。

儘管如此，因所有的流感病毒均有可能發生抗原變異，H5N1 流感病毒不無可能演變至可在人與人之間迅速傳播，而由於人類幾無免疫抗體，將會造成” 流感大流行 (influenza pandemic)” 。

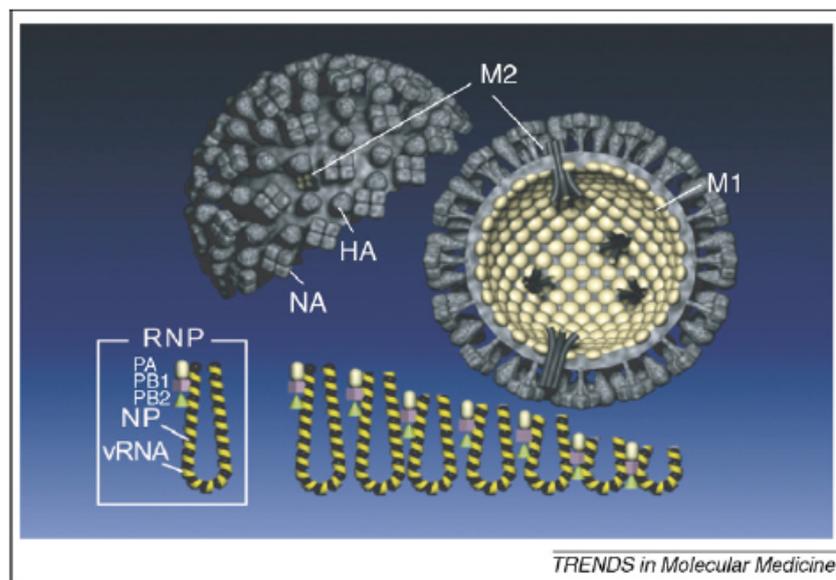


Fig.2-5 H5N1 禽流感病毒示意圖 [22]

家禽產業所發生的高病原性家禽流行性感冒，其 H 抗原皆屬於 H5 或 H7 兩種亞型。人類流行的 A 型感冒，都屬於 H1、H2 或 H3 亞型，而首度驗出 H5 型的則是在香港。H5N1 禽流感病毒只會影響禽鳥，對雞隻具有高致病力，但是因病毒會不定時基因突變，產生新的品種，導致原來僅感染禽類的流感病毒，變得可以影響人類，面對如此的變化我們不可不慎。因此發展出一個可以檢測 H5N1 的生物感測器，是一個迫切並且需要解決的問題。

## 第參章 實驗設備、藥品及方法

### 3.1 實驗藥品與設備

#### 3.1.1 實驗藥品

氯化鈉(Sodium chloride, NaCl)

氯化鉀(Potassium Chloride, KCl)

磷酸氫二(Sodium Phosphate Dibasic,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

磷酸二氫鉀(Potassium dihydrogen phosphate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

氯化氫(Hydrochloric acid, HCl)

戊二醛 (Glutaraldehyde,  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ )

烷基雙硫醇 (1,6-hexanedithiol,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{S}_2$ )

乙醇(Absolute Ethanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )

硫酸(Sulfuric acid,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

過氧化氫(Hydrogen Peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )

去離子水(DD Water)

氮氣(Nitrogen,  $\text{N}_2$ )

碳酸鈉(Sodium Carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

碳酸氫鈉(Sodium Bicarbonate,  $\text{NaHCO}_3$ )

小牛血清(Bovine serum albumin , BSA)

氯金酸(Hydrogen tetrachloroaurate(III) , H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub>)

硼氫化鈉(Sodium borohydride , NaBH<sub>4</sub>)

檸檬酸鈉(Sodium citrate , C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O)

硝酸(Nitric acid , HNO<sub>3</sub>)

二氧化鈦(Titanium dioxide , TiO<sub>2</sub>)

氧化鋅(Zinc oxide , ZnO)

四氧化三鐵(Ferric oxide black , Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

Anti-5nm GNPs Antiserum

Anti-H5N1(Peptide)-17nm Antiserum

Anti-FMDV(Peptide)-17nm Antiserum

蘭花葉病毒 CymMV Antiserum

H5N1 Antiserum

### 3.1.2 實驗儀器

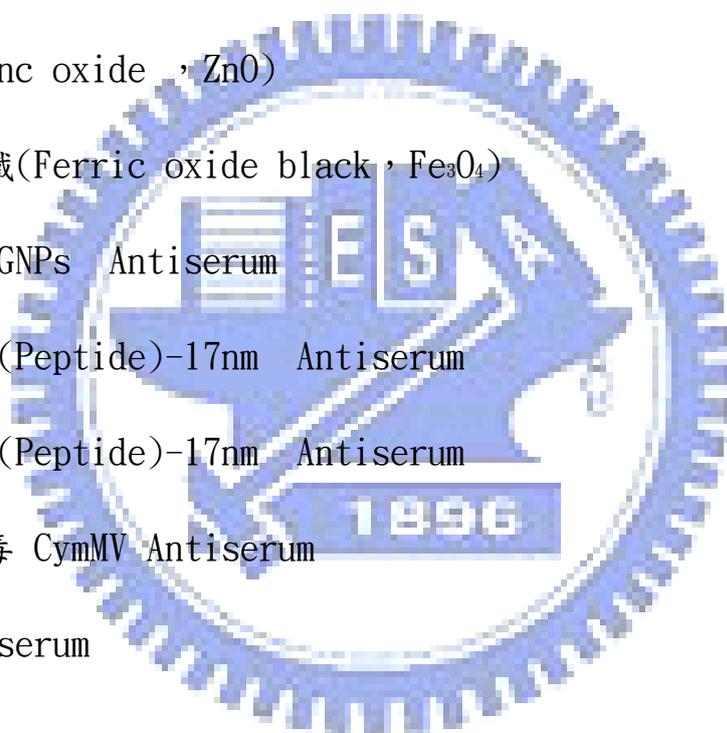
量筒

電子秤

攪拌器

pH Meter

真空馬達



過濾器

15ml 離心管

微量吸管

Dish

華碩個人電腦(ASUS D670)

ICM 石英震盪器(ICM, QCM Crystal)

ICM 10Mhz 振盪器(ICM LAB OSCILLATOR (LEVER) (10.00MHZ), 35366)

流體檢測儀(Liquid flow cells)

注射器

KDS 注射針幫浦

安捷倫計頻器(Agilent, 53132A)

樣本注入口

電腦 PCI -GPIB 介面卡(Agilent, PCI-GPIB, IEEE 466.2)



## 3.2 實驗溶液泡製

### 3.2.1 1X 生物緩衝劑 (Phosphate buffered solution, PBS)

使用藥品：氯化鈉(Sodium chloride)、氯化鉀(Potassium Chloride)  
磷酸氫二(Sodium Phosphate Dibasic)、磷酸二氫鉀(Potassium  
dihydrogen phosphate)、氯化氫(Hydrochloric acid)、去離子水

(DD Water)。

使用儀器：量筒、燒杯、電子秤、攪拌器、pH Meter、真空馬達、過濾器。

泡製方法：

1. 取去離子水 1 L。
2. 以電子秤量取

NaCl 8.0g

KCl 0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g

3. 將藥品放入去離子水中，並且以攪拌器均勻攪拌至無沉澱物。
4. 利用 pH Meter 檢測 PBS 的 pH 值。
5. 使用 HCl 滴定 PBS 至 pH 值到 7.4。
6. 將 PBS 放置過濾器過濾。
7. 完成 PBS 備用。

### 3.2.2 2.5 % (v/v) 戊二醛 (Glutaraldehyde) 溶液

使用藥品：戊二醛 (Glutaraldehyde)、1X 生物緩衝劑 (Phosphate buffered solution, PBS)。

使用儀器：15ml 離心管、微量吸管。

泡製方法：

1. 計算總體積 10ml 所需之 50% 戊二醛原液之體積

$$0.025 = \frac{0.5 \times X}{10}, X = 0.5,$$

取戊二醛原液 0.5 ml。

2. 取 1X 生物緩衝劑  $10 - 0.5 = 9.5$  ml。

3. 將 0.5 ml 戊二醛原液加入 9.5 ml 1X PBS 中，均勻搖晃。

4. 完成 2.5 % (v/v) 戊二醛溶液備用。

### 3.2.3 0.5 % (v/v) 烷基雙硫醇溶液

使用藥品：烷基雙硫醇 (1,6-hexanedithiol)、乙醇(Absolute Ethanol)。

使用儀器：15ml 離心管、微量吸管。

泡製方法：

1. 計算總體積 10ml 所需之烷基雙硫醇之體積

$$0.005 = \frac{X}{10}, X = 0.05,$$

取烷基雙硫醇原液 0.05 ml。

2. 取乙醇  $10 - 0.05 = 9.95$  ml。

3. 將 0.05 ml 雙硫醇原液加入 9.95 ml 1 乙醇中，均勻搖晃。

4. 完成 0.5 % (v/v) 烷基雙硫醇溶液備用。

### 3.2.4 奈米金粒子溶液

使用藥品：氯金酸(Hydrogen tetrachloroaurate(III))、硼氫化鈉(Sodium borohydride)、檸檬酸鈉(Sodium citrate)、氯化氫(Hydrochloric acid)、硝酸(Nitric acid)。

使用儀器：燒杯、攪拌器、微量吸管。

泡製方法：

1. 先以王水( $\text{HNO}_3:\text{HCl} = 1:3, \text{v/v}$ )清洗玻璃燒杯
2. 配製 0.2 mM, 500 mL 的  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶液
3. 配製 38.8 mM, 50 mL 的檸檬酸鈉溶液
4. 把兩者溶液(1.)及(2.)混合攪拌並且加熱至沸騰 30 分鐘，反應時其溶液顏色變化由淡黃色變成深紅紫色。
5. 利用氯金酸與檸檬酸鈉溶液的比例，配製不同粒徑的金奈米粒子。

### 3.3 QCM 表面修飾

#### 3.3.1 QCM 前處理

使用藥品：硫酸(Sulfuric acid)、過氧化氫(Hydrogen Peroxide)、去離子水(DD Water)。

使用儀器：燒杯 500ml、夾子、氮氣。

實驗步驟：

1. 以硫酸：過氧化氫 = 3：1，v/v，配置 SPM 溶液於燒杯中。
2. 將 QCM 放入 SPM 溶液中，10 分鐘；此步驟可將殘留在 QCM 表面之微小粒子帶走。
3. 將 SPM 溶液中的 QCM 取出，以去離子水清洗 3 次。
4. 利用氮氣將 QCM 表面水漬吹乾。
5. 完成 QCM 前處理。

### 3.3.2 QCM 表面修飾 Anti-5nm GNPs Antiserum

使用藥品：氯化氫(Hydrochloric acid)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、乙醇(Ethanol)、去離子水(DD Water)、戊二醛(Glutaraldehyde)、Anti-5nm GNPs Antiserum、小牛血清(Bovine serum albumin)。

使用儀器：6 Wells Dish、夾子、微量吸管。

實驗步驟：

1. 配置 1.2M NaOH 溶液備用。
2. 配置 1.2M HCl 溶液備用。
3. 配置 2.5 % 戊二醛溶液備用。
4. 配置 1mg/ml 小牛血清溶液備用。
5. 將前處理完畢之 QCM 放入 1.2M NaOH 溶液中，靜待 15 分鐘。
6. 取出 QCM 以去離子水清洗 3 次。

7. 再將 QCM 放入 1.2M HCl 溶液中，靜待 5 分鐘。
8. 利用去離子水將 QCM 清洗 3 次。
9. 將 QCM 放入 95%乙醇中，靜待 3 分鐘。
10. 取出 QCM 放到室溫中自然乾燥。
11. 使用微量吸管抽取 2.5 % 戊二醛溶液 20  $\mu$ l，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，此步驟需要避光，靜待 30 分鐘。
12. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的戊二醛溶液沖洗乾淨。
13. 使用微量吸管抽取 Anti-5nm GNPs Antiserum 20  $\mu$ l，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，避光，靜待 40 分鐘。
14. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的 Anti-5nm GNPs Antiserum 沖洗乾淨。
15. 把表面修飾完成的 QCM 放入 1mg/ml 小牛血清溶液中 Over night。

### 3.3.3 QCM 表面修飾奈米金粒子

使用藥品：氯化氫(Hydrochloric acid )、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、乙醇(Ethanol)、去離子水(DD Water)、烷基雙硫醇(1,6-hexanedithiol)、不同尺寸之奈米金粒子、小牛血清(Bovine serum albumin)。

使用儀器：6 Wells Dish、夾子、微量吸管。

實驗步驟：

1. 配置 1.2M NaOH 溶液備用。
2. 配置 1.2M HCl 溶液備用。
3. 配置 0.5 % ( v/v) 烷基雙硫醇溶液備用。
4. 配置不同尺寸之奈米金粒子溶液備用。
5. 配置 1mg/ml 小牛血清溶液備用。
6. 將前處理完畢之 QCM 放入 1.2M NaOH 溶液中，靜待 15 分鐘。
7. 取出 QCM 以去離子水清洗 3 次。
8. 再將 QCM 放入 1.2M HCl 溶液中，靜待 5 分鐘。
9. 利用去離子水將 QCM 清洗 3 次。
10. 將 QCM 放入 95%乙醇中，靜待 5 分鐘。
11. 把 QCM 移至 0.5 % (v/v) 烷基雙硫醇溶液中，靜待 30 分鐘。
12. 取出 QCM 以乙醇輕輕沖洗表面。
13. 利用氮氣將 QCM 表面水漬吹乾。
14. 使用微量吸管抽取不同尺寸之奈米金粒子溶液  $20\ \mu\text{l}$ ，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，靜待 1 小時。
15. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的溶液沖洗乾淨。
16. 把表面修飾完成的 QCM 放入 1mg/ml 小牛血清溶液中 Over night。

### 3.3.4 QCM 表面修飾 Anti-H5N1(Piptide)-17nm Antiserum

使用藥品：氯化氫(Hydrochloric acid )、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、乙醇(Ethanol)、去離子水(DD Water)、戊二醛(Glutaraldehyde)、Anti-H5N1(Piptide)-17nm Antiserum、小牛血清(Bovine serum albumin)。

使用儀器：6 Wells Dish、夾子、微量吸管。

實驗步驟：

1. 配置 1.2M NaOH 溶液備用。
2. 配置 1.2M HCl 溶液備用。
3. 配置 2.5 % 戊二醛溶液備用。
4. 配置 1mg/ml 小牛血清溶液備用。
5. 將前處理完畢之 QCM 放入 1.2M NaOH 溶液中，靜待 15 分鐘。
6. 取出 QCM 以去離子水清洗 3 次。
7. 再將 QCM 放入 1.2M HCl 溶液中，靜待 5 分鐘。
8. 利用去離子水將 QCM 清洗 3 次。
9. 將 QCM 放入 95%乙醇中，靜待 3 分鐘。
10. 取出 QCM 放到室溫中自然乾燥。
11. 使用微量吸管抽取 2.5 % 戊二醛溶液  $20\mu\text{l}$ ，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，此步驟需要避光，靜待 30 分鐘。

12. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的戊二醛溶液沖洗乾淨。
13. 使用微量吸管抽取 Anti-H5N1(Piptide)-17nm Antiserum  $20 \mu\text{l}$ ，心滴至 QCM 表面金電極正上方，避光，靜待 40 分鐘。
14. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的 Anti H5N1(Piptide)-17nm Antiserum 沖洗乾淨。
15. 把表面修飾完成的 QCM 放入  $1\text{mg/ml}$  小牛血清溶液中 Over night。

### 3.3.5 QCM 表面修飾 Anti-FMDV(Piptide)-17nm Antiserum

使用藥品：氯化氫(Hydrochloric acid)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、乙醇(Ethanol)、去離子水(DD Water)、戊二醛(Glutaraldehyde)、Anti-FMDV(Piptide)-17nm Antiserum、小牛血清(Bovine serum albumin)。

使用儀器：6 Wells Dish、夾子、微量吸管。

實驗步驟：

1. 配置  $1.2\text{M}$  NaOH 溶液備用。
2. 配置  $1.2\text{M}$  HCl 溶液備用。
3. 配置  $2.5\%$  戊二醛溶液備用。
4. 配置  $1\text{mg/ml}$  小牛血清溶液備用。
5. 將前處理完畢之 QCM 放入  $1.2\text{M}$  NaOH 溶液中，靜待 15 分鐘。

6. 取出 QCM 以去離子水清洗 3 次。
7. 再將 QCM 放入 1.2M HCl 溶液中，靜待 5 分鐘。
8. 利用去離子水將 QCM 清洗 3 次。
9. 將 QCM 放入 95%乙醇中，靜待 3 分鐘。
10. 取出 QCM 放到室溫中自然乾燥。
11. 使用微量吸管抽取 2.5 % 戊二醛溶液 20  $\mu$ l，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，此步驟需要避光，靜待 30 分鐘。
12. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的戊二醛溶液沖洗乾淨。
13. 使用微量吸管抽取 Anti-FMDV(Piptide)-17nm Antiserum 20  $\mu$ l，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，避光，靜待 40 分鐘。
14. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多 Anti-FMDV(Piptide)-17nm Antiserum 沖洗乾淨。
15. 把表面修飾完成的 QCM 放入 1mg/ml 小牛血清溶液中 Over night。

### 3.3.6 QCM 表面修飾 H5N1 Antiserum

使用藥品：氯化氫(Hydrochloric acid)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、乙醇(Ethanol)、去離子水(DD Water)、戊二醛(Glutaraldehyde)、H5N1 Antiserum、小牛血清(Bovine serum albumin)。

使用儀器：6 Wells Dish、夾子、微量吸管。

實驗步驟：

1. 配置 1.2M NaOH 溶液備用。
2. 配置 1.2M HCl 溶液備用。
3. 配置 2.5 % 戊二醛溶液備用。
4. 配置 1mg/ml 小牛血清溶液備用。
5. 將前處理完畢之 QCM 放入 1.2M NaOH 溶液中，靜待 15 分鐘。
6. 取出 QCM 以去離子水清洗 3 次。
7. 再將 QCM 放入 1.2M HCl 溶液中，靜待 5 分鐘。
8. 利用去離子水將 QCM 清洗 3 次。
9. 將 QCM 放入 95%乙醇中，靜待 3 分鐘。
10. 取出 QCM 放到室溫中自然乾燥。
11. 使用微量吸管抽取 2.5 % 戊二醛溶液  $20\ \mu\text{l}$ ，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，此步驟需要避光，靜待 30 分鐘。
12. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的戊二醛溶液沖洗乾淨。
13. 使用微量吸管抽取 H5N1 Antiserum  $20\ \mu\text{l}$ ，小心滴至 QCM 表面金電極正上方，避光，靜待 40 分鐘。
14. 利用去離子水小心清洗 QCM 表面，將多餘的 H5N1 Antiserum 沖洗

乾淨。

15. 把表面修飾完成的 QCM 放入 1mg/ml 小牛血清溶液中 Over night。

## 3.4 實驗方法

### 3.4.1 抗體濃度稀釋

在本實驗中抗體稀釋皆利用 1X 生物緩衝劑，由於 QCM 晶片的靈敏度達 11ng/Hz，可以偵測到的濃度非常的準確，所以我們必須將原始抗體稀釋後在進行量測，在濃度定量方面我們使用 UV-OD 波段 280nm 定量。

使用藥品：去離子水(DD Water)、待測樣本、1X 生物緩衝劑

使用儀器：Hitachi Spectrophotometer U-2800、玻璃分光液槽 (Cuvette)、微量吸管

實驗步驟：

1. 將待測樣品稀釋為 0.01X、0.008X、0.006X、0.004X、0.002X、0.001X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，完成備用。
2. 用去離子水將玻璃兩個分光液槽內部清洗乾淨。
3. 注入 1X 生物緩衝劑至兩個分光液槽達八分滿。
4. 開啟軟體 UV Solutions 2.1 做 Base Line 校正，使吸收值 (Abs.) > 0.002。

5. 將待測液體分光液槽用去離子水清洗乾淨。
6. 將待測樣本 0.01X 注入分光液槽，並量測記錄  $\lambda_{280}$  吸收值。
7. 重複步驟 5. 步驟 6.，樣本依序更換為 0.008X、0.006X、0.004X、0.002X 與 0.001X。
8. 利用  $\lambda_{280}$  吸收值繪出樣本檢量線。
9. 校正檢量線使 R 值大於 0.98。

### 3.4.2 Anti-5nm GNPs Antiserum 對不同粒徑奈米金粒子的 QCM 頻率

#### 響應

在文獻[18]中得知，Antiserum 的 Fab 兩端具有彈性，所以可以接受的金奈米粒子粒徑範圍有一定的區間。我們將施打不同粒徑奈米金粒子並且已產生免疫反應的老鼠作取血的動作，再將血液分離，取出我們所需的抗體。

根據生物免疫學的抗原與抗體會專一性的結合，我們將抗體經由表面修飾在 QCM 金電極表面上，再把 QCM 晶片放至在流體分析儀中，打入不同粒徑的金奈米粒子，由電腦記錄 QCM 晶片的頻率響應，如此將可以對抗體所可以認取到金奈米粒子抗原粒徑區間所產生的頻率差。

## <實驗一>

使用藥品：去離子水(DD Water)、不同尺寸之奈米金粒子(0~13nm)。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 取出完成表面修飾 Anti-5nm GNPs Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
2. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
3. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
4. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
5. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
6. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
7. 用注射器抽取  $20\ \mu\text{l}$  奈米金粒子的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
8. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
9. 重複步驟 1. 到步驟 8.，並更換不同尺寸之奈米金粒子的樣品。

## <實驗二>

使用藥品：去離子水(DD Water)、Anti-5nm GNPs Antiserum

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 取出完成表面修飾不同粒徑奈米金粒子的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
2. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
3. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
4. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
5. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
6. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
7. 用注射器抽取  $20\ \mu\text{l}$  Anti-5nm GNPs Antiserum 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
8. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
9. 重複步驟 1. 到步驟 8.，並更換不同的 Antiserum。

### 3.4.3 Anti-5nm GNPs Antiserum 對相同粒徑不同材質之奈米粒子的

#### QCM 頻率響應

##### <實驗三>

使用藥品：去離子水(DD Water)、二氧化鈦(Titanium dioxide, TiO<sub>2</sub>, 5nm)、氧化鋅(Zinc oxide, ZnO, 5nm)、四氧化三鐵(Ferric oxide black)、奈米金粒子(Au, 5nm)、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度之二氧化鈦、氧化鋅及金奈米粒子溶液備用，其濃度分別為  $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  mg/ml，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，完成備用。
2. 取出完成表面修飾前處理的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器

上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。

6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 用注射器抽取  $20\ \mu\text{l}$  的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
9. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
10. 重複步驟 2. 到步驟 9.，並更換不同濃度、不同材質之奈米粒子的樣品。

#### <實驗四>

使用藥品：去離子水(DD Water)、二氧化鈦(Titanium dioxide,  $\text{TiO}_2$ , 5nm)、氧化鋅(Zinc oxide,  $\text{ZnO}$ , 5nm)、奈米金粒子(Au, 5nm)。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度之二氧化鈦、氧化鋅、四氧化三鐵與奈米金粒子溶液備用，其濃度分別為  $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  mg/ml，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，完成備用。
2. 取出完成表面修飾 Anti-5nm GNPs Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。

3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 用注射器抽取 20  $\mu\text{l}$  不同濃度之二氧化鈦、氧化鋅、四氧化三鐵及奈米金粒子的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
9. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
10. 重複步驟 2. 到步驟 9.，並更換不同濃度、不同材質之奈米粒子的樣品。

#### 3.4.4 奈米金粒子與禽流感 H5N1(peptide) conjugate 的 QCM 頻率響應

##### <實驗五>

使用藥品：去離子水(DD Water)、H5N1(Peptide)、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的 H5N1(Peptide)，其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 Anti-H5N1(Peptide)-17nm Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 用注射器抽取 20  $\mu\text{l}$  H5N1(Peptide) 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
9. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
10. 重複步驟 2. 到步驟 10.，並更換不同濃度的 H5N1(Peptide)。

### <實驗六>

使用藥品：去離子水(DD Water)、H5N1(Peptide)、奈米金粒子(Au, 17nm)、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的 H5N1(Peptide)，其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 Anti-H5N1(Peptide)-17nm Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 將 H5N1(Peptide)與奈米金粒子以體積比 1:1 的方式均勻混合。
9. 用注射器抽取 20  $\mu\text{l}$  H5N1(Peptide)與奈米金粒子 conjugate 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
10. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。

11. 重複步驟 2. 到步驟 10. , 並更換不同濃度的 H5N1(Peptide) 與奈米金粒子混合之樣本。

### 3.4.5 奈米金粒子與口蹄疫病毒 FMDV(peptide) conjugate 的 QCM

#### 頻率響應

#### <實驗七>

使用藥品：去離子水(DD Water)、FMDV(Peptide)、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的 FMDV(Peptide), 其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X, 稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑, 保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 Anti-FMDV(Peptide)-17nm Antiserum 的 QCM 晶片, 並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器, 若連接成功計頻器

上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。

6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 用注射器抽取  $20\ \mu\text{l}$  FMDV(Peptide) 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
9. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
10. 重複步驟 2. 到步驟 10.，並更換不同濃度的 FMDV(Peptide)。

#### <實驗八>

使用藥品：去離子水(DD Water)、FMDV(Peptide)、奈米金粒子(Au, 17nm)、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的 FMDV(Peptide)，其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 Anti-FMDV(Peptide)-17nm Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。

3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 將 FMDV(Peptide)與奈米金粒子以體積比 1:1 的方式均勻混合。
9. 用注射器抽取 20  $\mu\text{l}$  FMDV(Peptide)與奈米金粒子 conjugate 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
10. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
11. 重複步驟 2. 到步驟 10.，並更換不同濃度的 FMDV(Peptide) 與奈米金粒子混合之樣本。

### 3.4.6 奈米金粒子與禽流感 H5N1 病毒膜蛋白 conjugate 的 QCM 頻率

響應

#### <實驗九>

使用藥品：去離子水(DD Water)、禽流感 H5N1 病毒膜蛋白、1X 生物緩衝劑。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz

振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的禽流感 H5N1 病毒膜蛋白，其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 H5-10 Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。
8. 將禽流感 H5N1 病毒膜蛋白加熱至 95°C，5 分鐘。
9. 用注射器抽取 20  $\mu\text{l}$  禽流感 H5N1 病毒膜蛋白的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
10. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
11. 重複步驟 2. 到步驟 10.，並更換不同濃度的禽流感 H5N1 病毒膜蛋

白。

### <實驗十>

使用藥品：去離子水(DD Water)、禽流感 H5N1 病毒膜蛋白、1X 生物緩衝劑、奈米金粒子(Au, 17nm)。

使用儀器：華碩個人電腦(ASUS D670)、ICM 石英震盪器、ICM 10Mhz 振盪器、流體檢測儀(Liquid flow cells)、注射器、KDS 注射針幫浦、安捷倫計頻器 53132A、樣本注入口。

實驗步驟：

1. 配置不同濃度的禽流感 H5N1 病毒膜蛋白，其濃度比例為 0.01X、0.008X、0.0067X、0.0057X、0.005X、0.0044X、0.004X、0.0036X、0.0033X，稀釋溶劑為 1X 生物緩衝劑，保存至 4 °C 冰箱備用。
2. 取出完成表面修飾 H5-10 Antiserum 的 QCM 晶片，並以去離子水輕輕沖洗 QCM 金電極表面。
3. 將 QCM 晶片裝置電極並放置流體檢測儀中。
4. 開啟安捷倫計頻器 53132A 與 ICM 10Mhz 振盪器電源。
5. 使 QCM 晶片電極兩端接於 ICM 10Mhz 振盪器，若連接成功計頻器上會顯示約 9.997Mhz 的頻率響應，此為 QCM 晶片自然頻率。
6. 設定 KDS 注射針幫浦緩衝劑流量 3ml/Hr，緩衝劑為去離子水。
7. 開始 Excel 記錄頻率響應，等待 QCM 晶片動態穩定( $\pm 1\text{Hz}/60\text{s}$ )。

8. 將禽流感 H5N1 病毒膜蛋白加熱至 95°C，5 分鐘。
9. 將禽流感 H5N1 病毒膜蛋白與奈米金粒子以體積比 1:1 的方式均勻混合。
10. 用注射器抽取 20  $\mu$ l 禽流感 H5N1 病毒膜蛋白與奈米金粒子 conjugate 的樣品注入樣本注入口，並旋開開關。
11. 記錄樣品注入後的頻率響應反應。
12. 重複步驟 2. 到步驟 10.，並更換不同濃度的禽流感 H5N1 病毒膜蛋白。



## 第肆章 結果與討論

### 4.1 粒徑分析

奈米粒子在溶液中彼此會有互相聚集的現象產生，因此實際上的粒徑可能會遠大於我們所估計的尺寸。而金奈米粒子在和成的時候是採用化學合成的方式，表面也許會殘留所多不必要的化學成份而影響到粒徑的尺寸。在本次實驗當中粒徑的大小會影響到實驗數據的準確度，我們利用 SEM 照片與影像處理程式 Image-J 來進行粒徑分析，確定我們所使用的奈米粒子粒徑的準確度。

#### 4.1.1 金奈米粒子粒徑分析

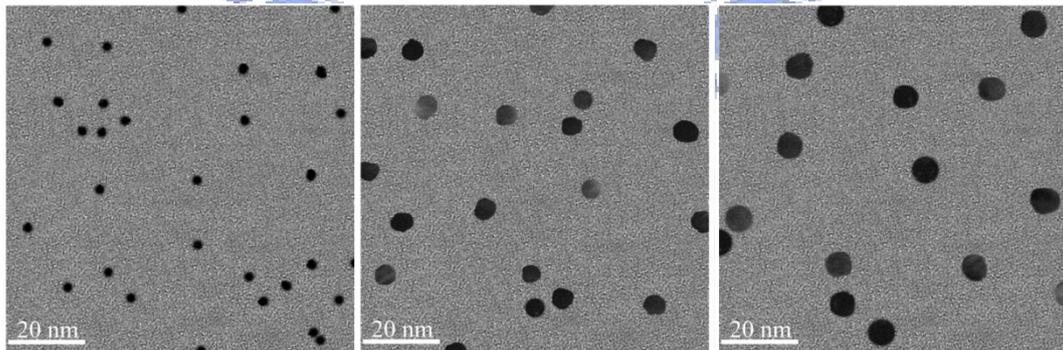


Fig.4- 1 2、4、5 nm GNPs 穿隧式電子顯微鏡影像(TEM)

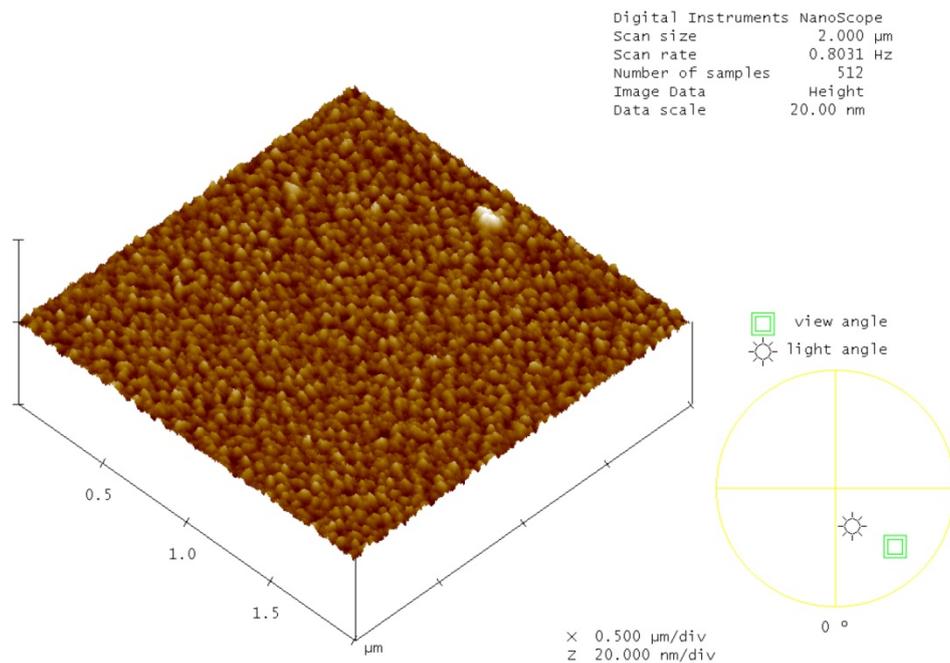


Fig.4-2 5 nm GNPs 原子力顯微鏡(AFM)影像

由於 SEM 可以觀察到的尺寸極限約到 10nm，在往下就會有失真的現象產生，對於 5nm 的金奈米粒子，我們使用原子力顯微鏡(AFM)來進行觀測，Fig. 4-2 中 Z 軸最高值為 20nm，可以發現 5nm 的金奈米粒子分佈在基材上的情形非常理想。

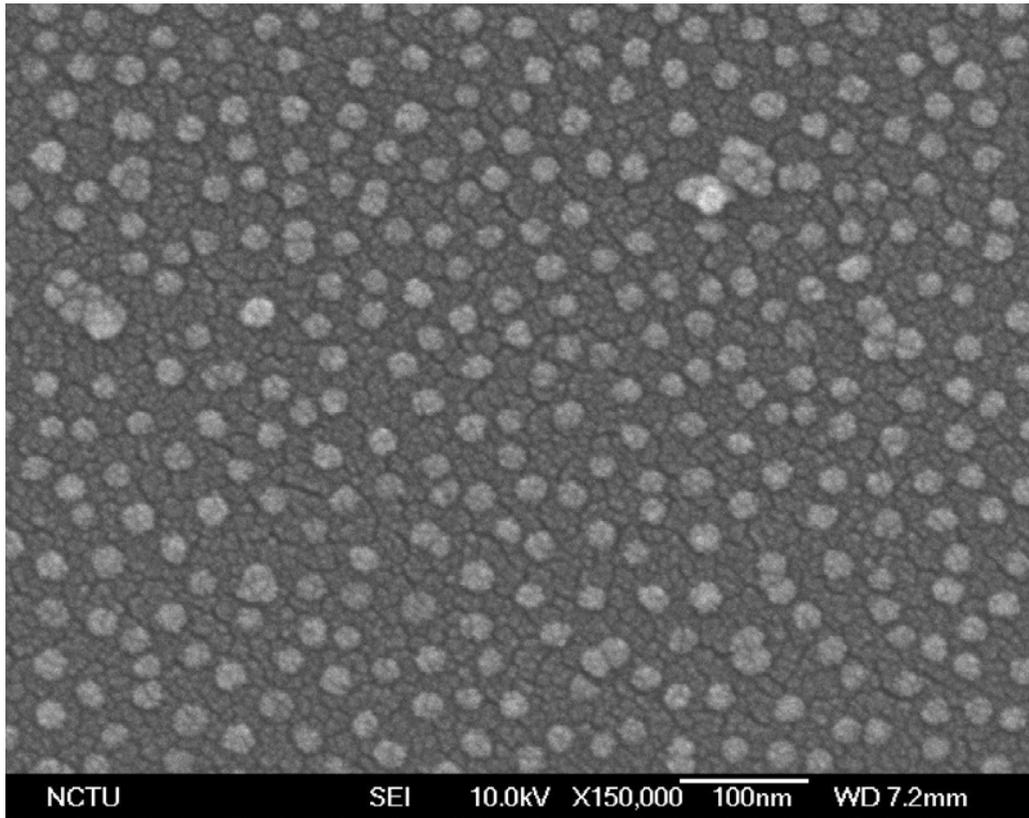


Fig.4- 3 17 nm GNPs 掃瞄式電子顯微鏡影像

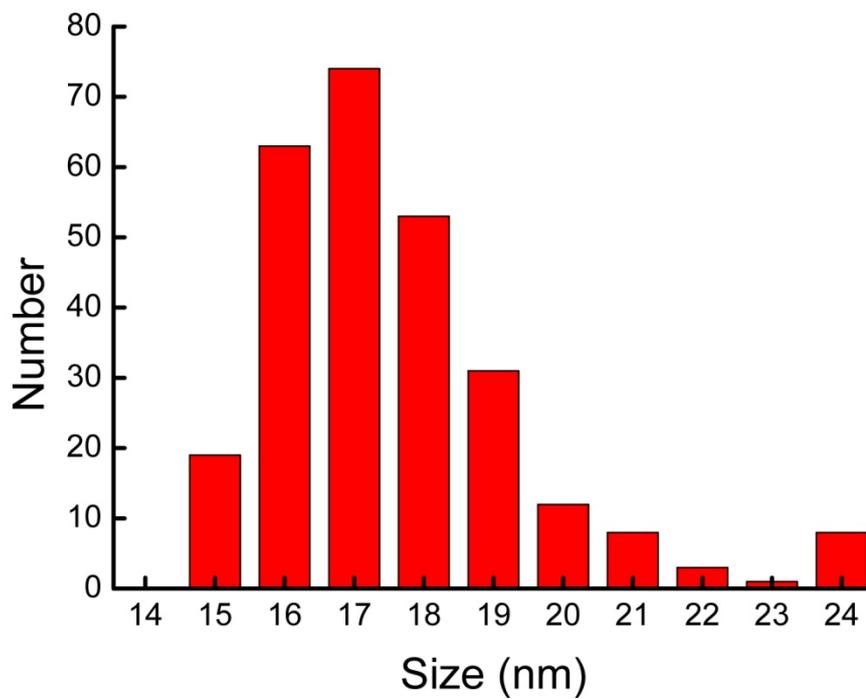


Fig.4- 4 Image-J 粒徑分析

我們根據 Fig. 4-3 經由 Image-J 影像辨識軟體處理後的 17nm 金奈米粒子粒徑分析如 Fig. 4-4 所示。粒徑大小由 15nm 到 24nm 不等，而大約有 0.69 的數據在我們所設定的 17nm 左右一個刻度內，有 0.90 的數據在所設定的 17nm 左右二個刻度內，符合統計學上的常態分佈 (normal distribution)。

#### 4.1.2 二氧化鈦粒徑分析

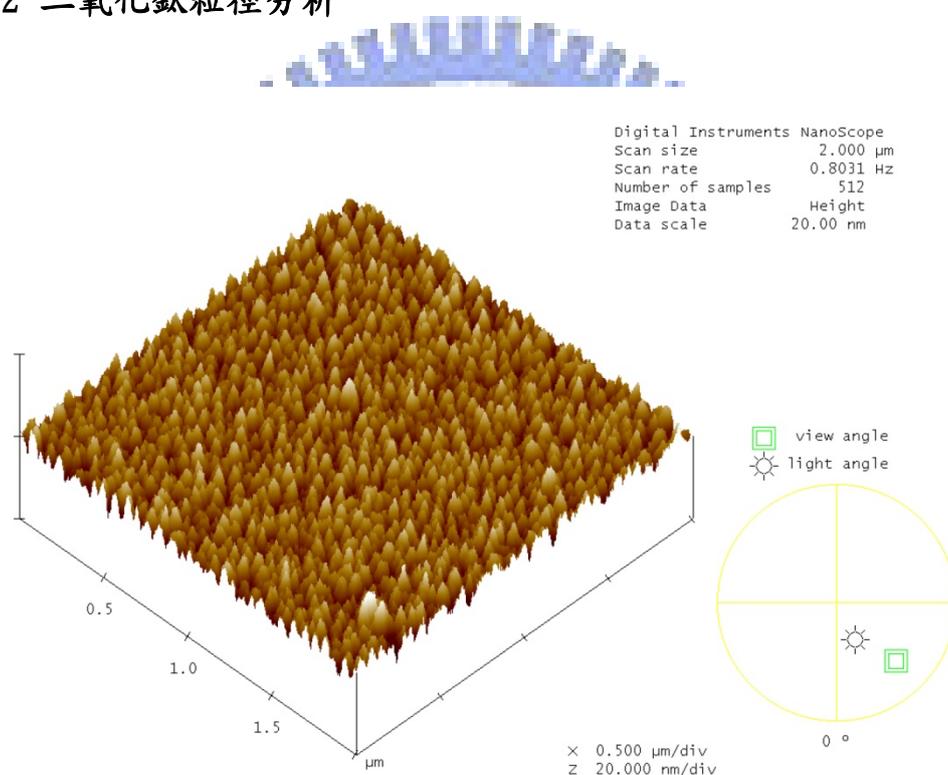


Fig.4- 5 TiO<sub>2</sub> 原子力顯微鏡(AFM)影像

在 Fig. 4-5 中原子力顯微鏡影像 Z 軸高度為 20nm，從影像中判讀 TiO<sub>2</sub> 在基材上的分佈無聚集的現象，但粒徑範圍分佈較金粒子大。

### 4.1.3 氧化鋅粒徑分析

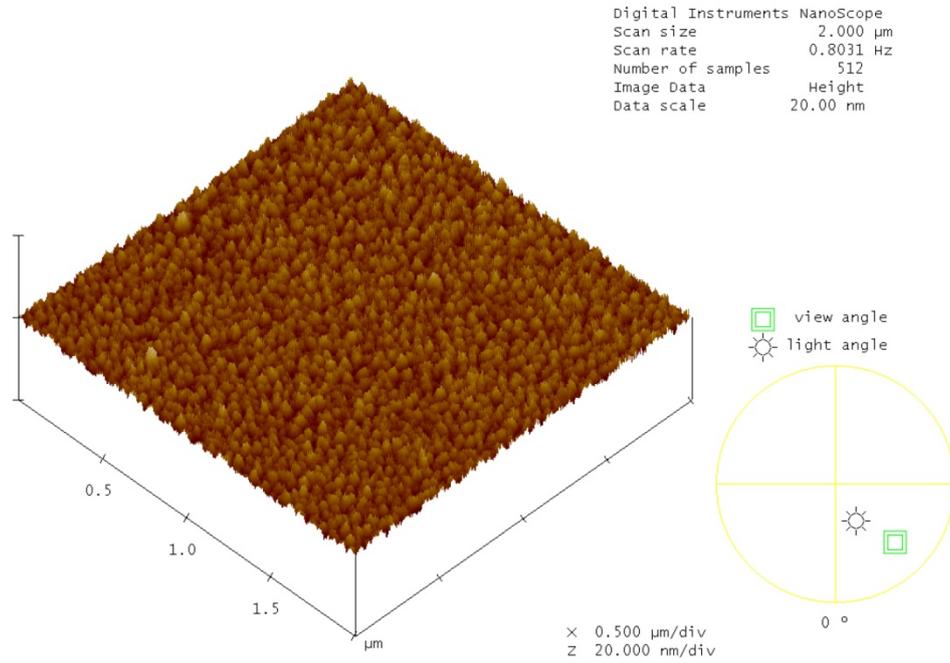


Fig.4-6 ZnO 原子力顯微鏡(AFM)影像

在 Fig.4-6 中原子力顯微鏡影像 Z 軸高度為 20nm，從影像中判讀 ZnO 在基材上的分佈均勻。且粒徑大小情形與金奈米粒子相同。

#### 4.1.4 四氧化三鐵粒徑分析

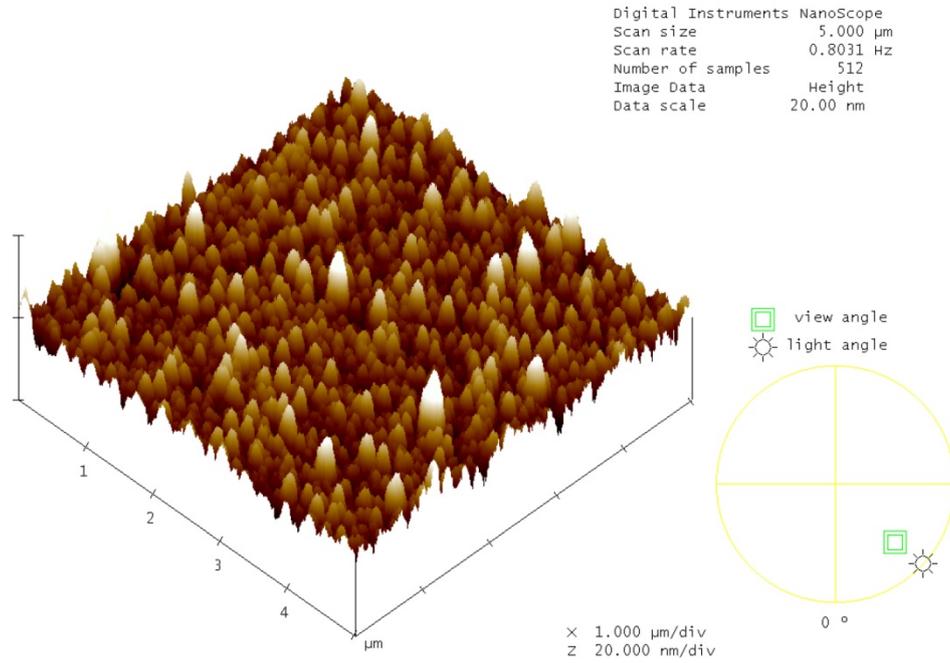


Fig.4-7 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 原子力顯微鏡(AFM)影像

在 Fig.4-6 中原子力顯微鏡影像 Z 軸高度為 20nm，從影像中判讀 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 在基材上的分佈有聚集的現象與其他三組粒子比較明顯粒徑較大，由於 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 本身溶於特定的溶液中，再用去離子水稀釋才會產生此現象，但粒徑分佈 60% 仍控制在 5nm 區間內。

## 4.2 Anti-5nm GNPs Antiserum QCM 頻率響應分析

在分析頻率響應前，要先定義有效的數值分析方法；由於 QCM 在空氣中穩定只需數分鐘而已，但在流體的應用上必須要達到動態上的穩定才能進行我們的樣品量測。在 QCM 對時間軸作圖時，我們可以發現大約可以分為四間階段：(I)前置期，(II)前穩定期，(III)樣品注入期與(IV)後穩定期

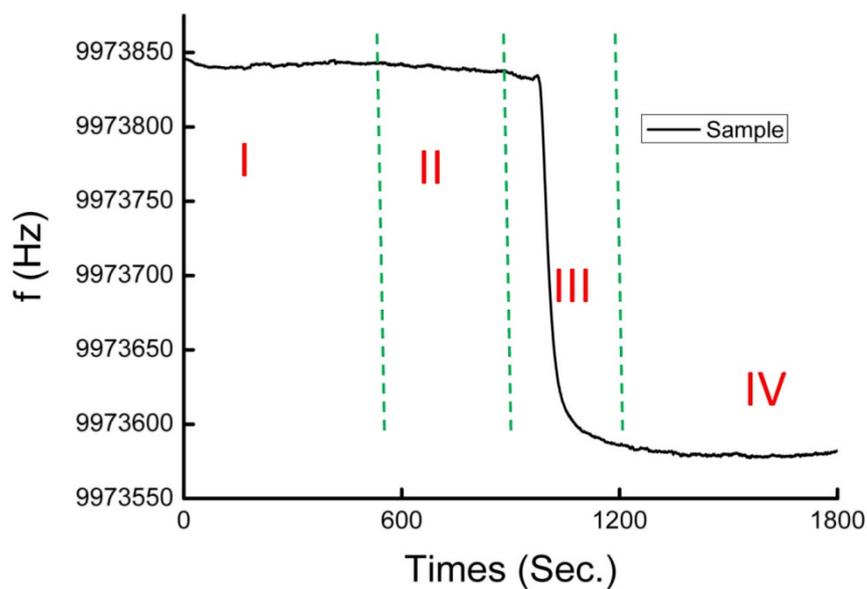


Fig.4- 8 QCM 頻率響應圖

在前置期時中，由於系統中的緩衝液藉由針筒式幫浦的作用，迫使緩衝液進入流體檢測儀中，此階段 QCM 的頻率響應呈現大幅度的震

盪。經過一段時間後，系統便會進入前穩定期，此時 QCM 頻率響應的上下震盪範圍縮小，在本實驗中如 QCM 頻率響應維持在一分鐘內只有  $\pm 1\text{Hz}$  的差異，我們便視為動態穩定。前穩定期的判斷會影響到之後的數據分析，儀器偵測極限(Instrument detection limit , IDL) 可以定義如下：待測物之最低量或最小濃度，足夠在儀器偵測時，產生一可與空白訊號區別之訊號者。亦即該待測物之量或濃度在 99% 之可信度下，可產生大於平均雜訊之標準偏差 3 倍之訊號，也就是說當前穩定期只有  $\pm 1\text{Hz}$  的差異，我們將有效訊號定義在大於  $\pm 3\text{Hz}$ 。

當我們判斷 QCM 狀態處於動態穩定時期後，便會將待測物經由樣本注入口進入流體檢測儀中，也就是樣品注入期。此時期如果待測樣本會與 QCM 表面修飾的特殊分子結合，QCM 頻率響應就會有明顯的變化，有可能是上升或下降。經過分子間的反應後，QCM 的頻率響應又會趨於動態穩定，進入後穩定期，實驗主要數據的判斷是依據此時期的頻率響應與前穩定期的頻率響應，兩者間的差異作為 QCM 有效訊號的辨讀。

#### 4.2.1 不同尺寸之金奈米粒子的 QCM 頻率響應分析

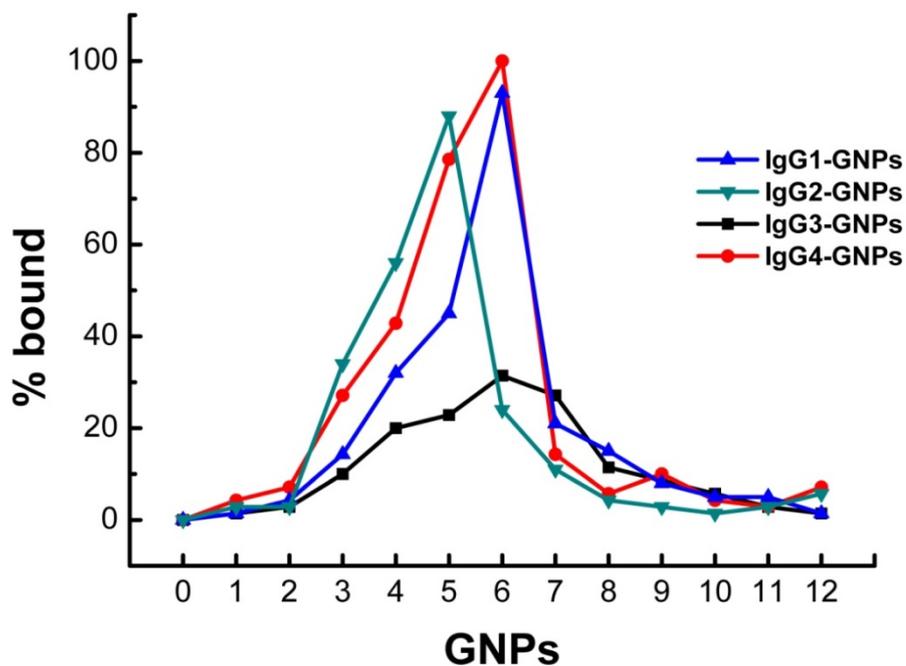


Fig.4-9 注入不同粒徑金奈米粒子的 QCM 頻率響應圖

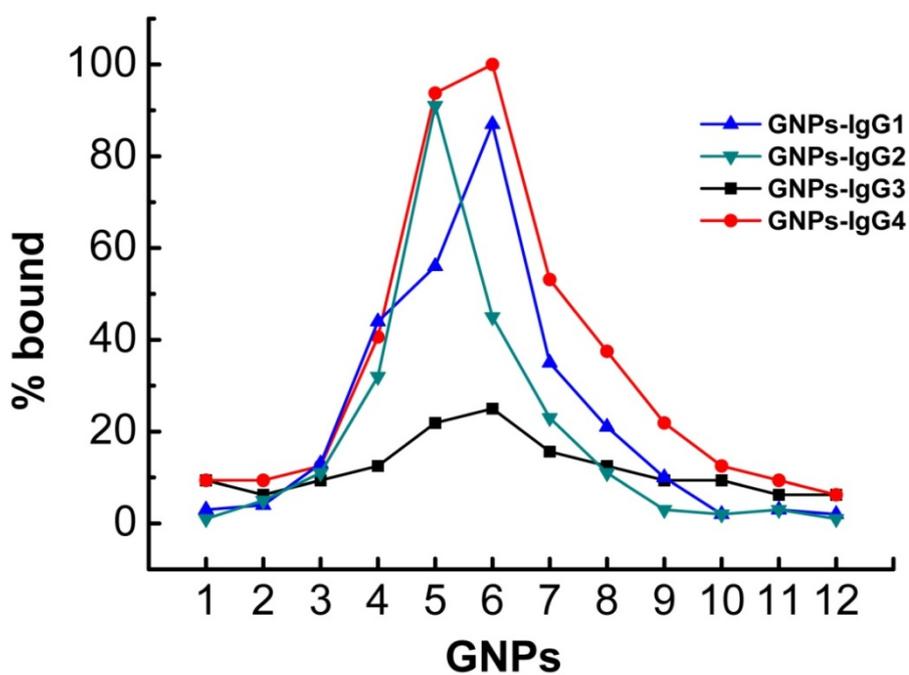


Fig.4-10 表面修飾不同粒徑金奈米粒子的 QCM 頻率響應圖

在之前的文獻中[18]得知抗體的 Fab 兩端具有彈性，因此可認取的抗原應該有一定的範圍拘束，由 Fig. 4-9 可以看到 IgG1 到 IgG4 的四組樣本中，除了 IgG3 的反應不明顯外，其餘三組的曲線，半高寬皆處於 4 到 7nm 之間。經由這組資料我們可以得知 Fab 兩端可以接受的 Antigen 範圍應該在 4 到 7nm 這個區間內。相同的，我們將 QCM 晶片表面的修飾改為金奈米粒子的 Antigen，也獲得同樣的結果，經由 Fig. 4-10 上得曲線所示，四組樣本將 IgG3 剔除後，曲線的半高寬依然介於 4 到 7nm 區間當中。

根據上面所示的結果，我們可以得知 Anti-5nm Antiserum 可以認取 Antigen 也就是金奈米粒子的範圍在 4 到 7nm 間。



#### 4.2.2 相同尺寸，不同材質之金、二氧化鈦、氧化鋅與四氧化三鐵奈

米粒子的 QCM 頻率響應分析

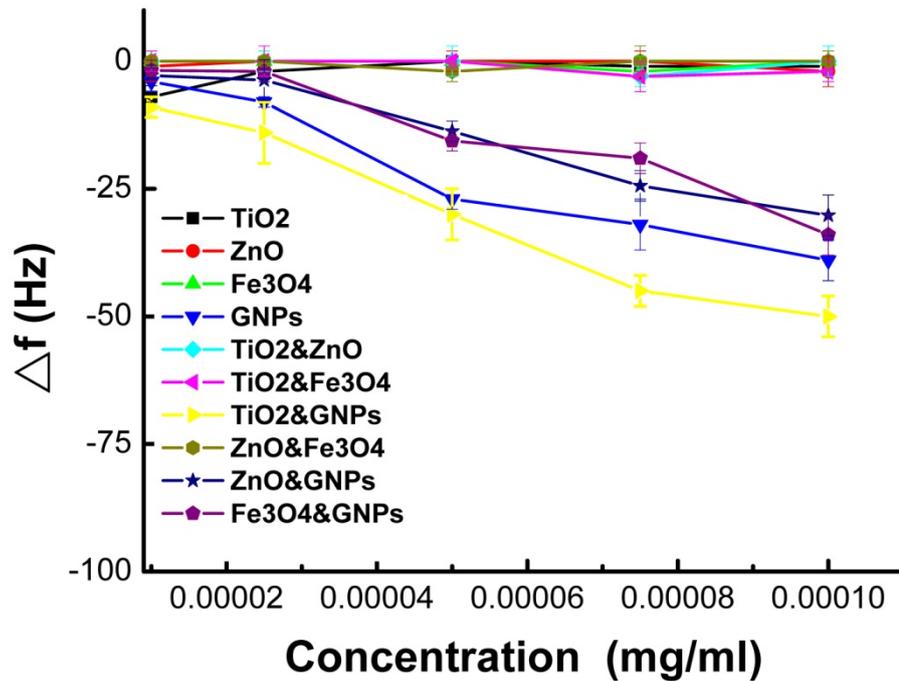


Fig.4- 11 不同材質、相同粒徑奈米粒子的 QCM 頻率響應圖

在上一個實驗中，我們使用相同材質的 Antigen 也就是金奈米粒子，所得到的 QCM 頻率響應相當的明顯，那我們不禁懷疑 Antiserum 是對尺寸有特異性的反應，或是對材質上有特異性的反應。於是我們使用了 Antiserum 對尺寸反應最強烈的尺寸，也就是選擇 5nm，挑選的相同尺寸但式不同材質的奈米粒子；在 Fig.4-11 顯示出，除了含有合金奈米粒子的樣本之外，其他材質的 Antigen 所產生的 QCM 頻

率響應，都只有達到背景值的訊號。

根據這樣的 QCM 頻率響應，我們可以得到一個結論；在打入 5nm GNP 所產生的抗體，只對奈米金材質且尺寸介於 4 到 7nm 間的粒子有免疫上的反應。

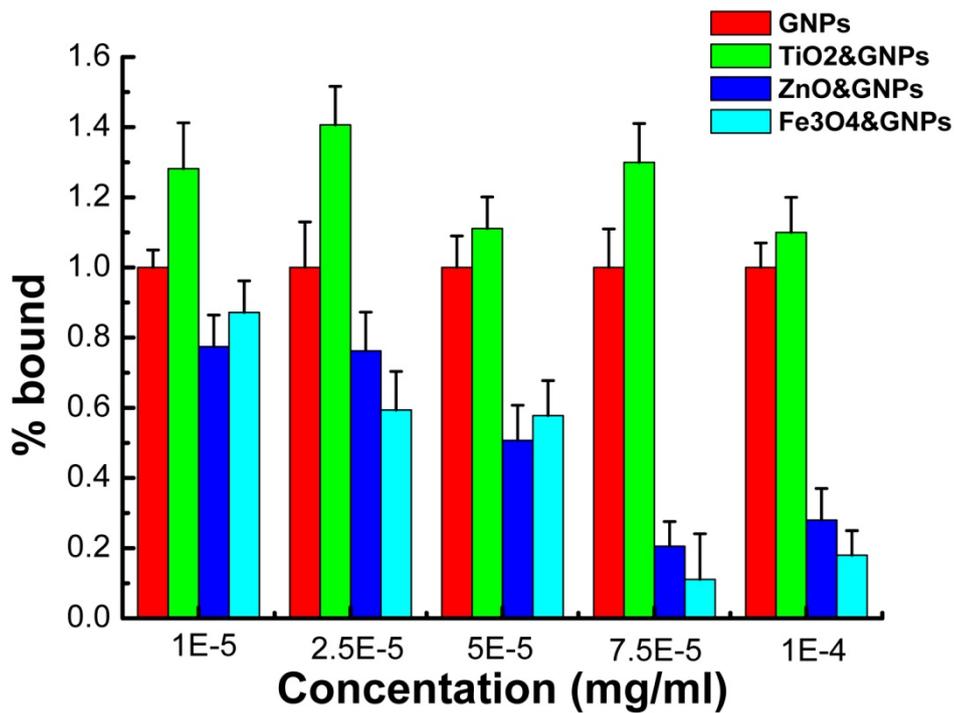


Fig.4- 12 混合奈米粒子對單純金奈米粒子 % bound 圖

在 Fig.4-11 可以看出抗體只對含有金奈米粒子的樣本有 QCM 頻率上的明顯差異，但如果我們將皆與金奈米粒子的樣本，把金奈米粒子所產生的 QCM 頻率差當 100% 下去做圖 Fig4-12，可以發現有一組數據明顯高過單純金奈米粒子樣本，就是二氧化鈦與金奈米粒子混合這組，但根據前面所得到的結論，抗體只對奈米金材質且尺寸介於 4 到

7nm 間的粒子有免疫上的反應；我們推論應該是混合的過程中二氧化鈦與金奈米粒子產生吸附的作用，這組數據是對金奈米粒子與二氧化鈦的 QCM 頻率響應，而不是對二氧化鈦的 QCM 頻率響應反應，由於 QCM 晶片本身對質量上的反應非常的靈敏，因此當二氧化鈦與金奈米粒子產生吸附的作用相對的質量上產生增加，所以得到的 QCM 頻率響應也會較單純金奈米粒子的 QCM 頻率響應高。

### 4.3 金奈米粒子與 H5N1/FMDV(peptide) conjugate

的 QCM 頻率響應分析

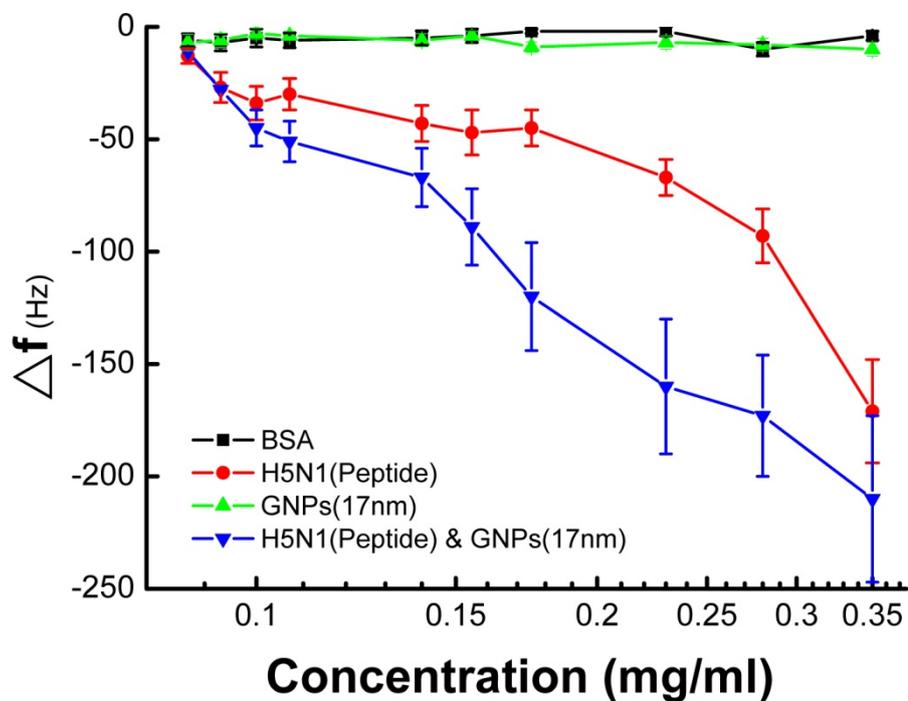


Fig.4- 13 H5N1(peptide)的 QCM 頻率響應圖

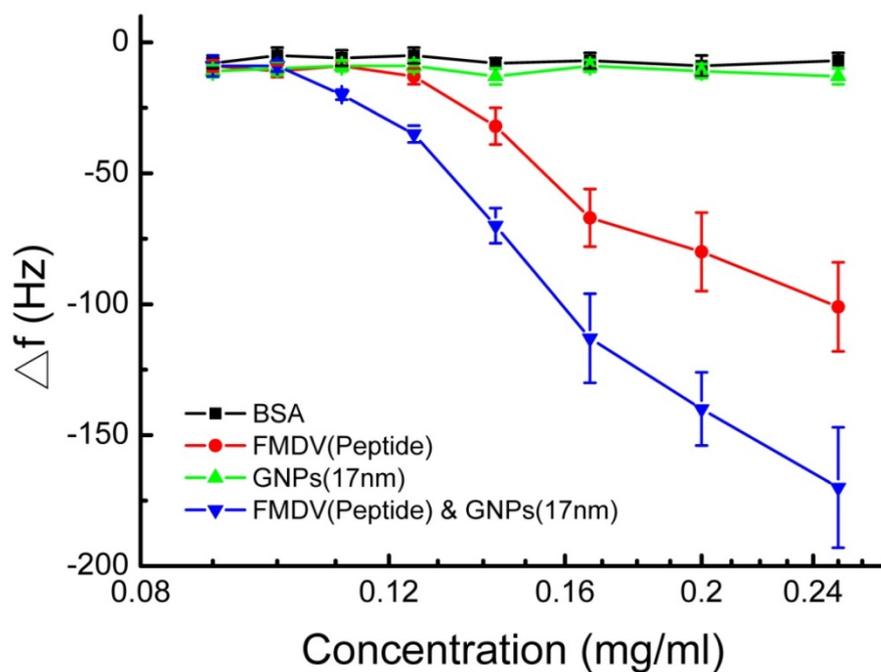


Fig.4- 14 FMDV(peptide)的 QCM 頻率響應圖

我們使用 17nm GNPs 與 H5N1 peptide 混合要引起生物的免疫反應，從 Fig. 4-13 可以看到兩種物質的混合確實引起免疫反應，但就 QCM 的頻率響應而言，與 GNPs 結合與 H5N1 peptide conjugate 的反應優於單純 H5N1 peptide 所引起的 QCM 頻率響應，如果我們可以將此機制運用到實際上的生物抗體與抗原上，可以使 QCM 晶片偵測靈敏度提升。

#### 4.4 金奈米粒子與禽流感(H5N1)病毒膜蛋白

conjugate 的 QCM 頻率響應分析

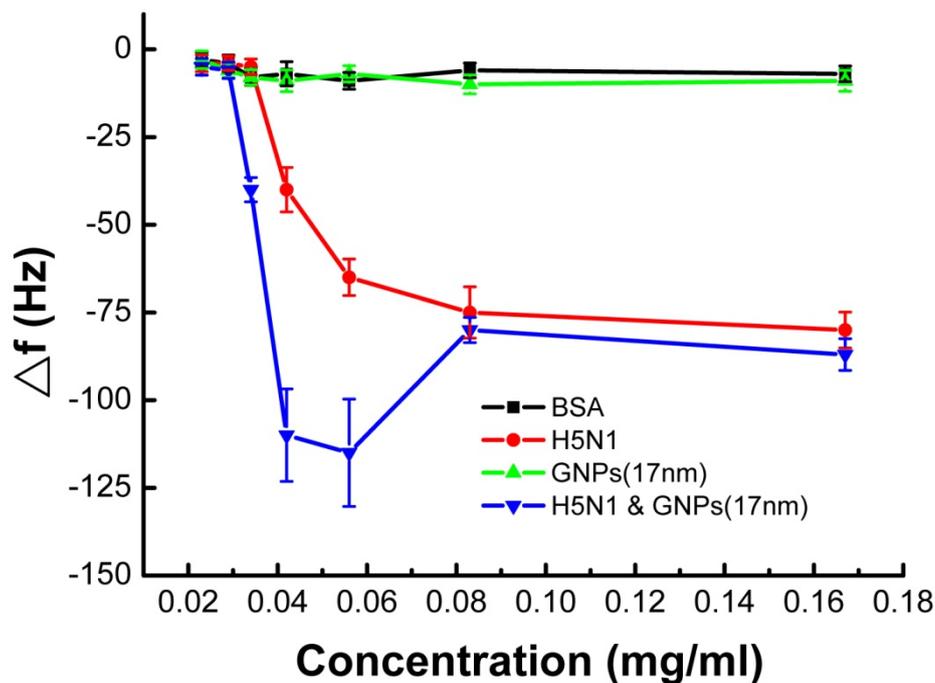


Fig.4-15 H5N1 的 QCM 頻率響應圖

我們預計使用金奈米粒子來增加 QCM 的靈敏度；根據 4.3 節的結論金奈米粒子可以與 H5N1 跟 FMDV 的 peptide 成功 conjugate，並且在同一濃度之 QCM 偵測訊號有放大 200% 的效果。因此我們想利用這個結果實際應用到台灣地區常見的疫病上，在本實驗中選擇了最近幾年引起恐慌的禽流感(H5N1)膜蛋白進行 QCM 的檢測。在 Fig. 4-15 中可以發現與 Fig. 4-13 禽流感(H5N1, peptide)較大的差異，在自製的

H5N1(peptide)在與金奈米粒子 conjugate 後的 QCM 頻率響應的表現，幾乎與不添加金奈米粒子呈現一個線性表現；但真實的禽流感(H5N1)膜蛋白卻只在特定濃度有放大的效果，antigen 濃度在 0.04 mg/ml 時最大可將 QCM 的量測訊號放大 300%；但是訊號放大的範圍只限制 antigen 濃度在 0.08 mg/ml 到 0.03mg/ml 間，推測會產生這種結果的原因是當 antigen 與 17nm 金奈米粒子進行體積比(v/v) 1:1 混合時，在 antigen 濃度在 0.04 mg/ml 時為與金奈米粒子的飽和點，因此所產生訊號放大的效果也是最大放大值。

那為什麼會與 H5N1(peptide)有不一樣的結果呢？因為 peptide 只合成出所需的抗原決定基(Synthesis Peptide)，也就是 H5N1 的特徵序列，與實際上真實 H5N1 的病毒膜蛋白應該有一定程度上的差異，所以導致這樣的結果。

## 4.5 結論

本論文主要的研究主軸在於 QCM 檢測平台檢測方法的開發應用與靈敏度的提升。在分析了 4.2 節的實驗數據之後，我們成功的利用表面修飾 Anti-5nm GNPs Antiserum 檢測出奈米粒子的存在。並且根據抗原與抗體高專一性的性質，將所偵測的奈米粒子特性也侷限在特定區域，也就是我們完整的製作出檢測 5nm 金奈米粒子的裝置。在目前學界的研究中，檢測奈米粒子的方法都限制在化學與材料領域，我

們是第一個提供根據生物機制，而且可以成功檢測金奈米粒子的存在的檢測方法，這對之後的檢測方法貢獻了不一樣的想法，對於跨領域的整合邁出了一大步。

雖然 QCM 檢測平台可以達到 picogram( $10^{-12}$ g)的等級，但對於分析領域想要的偵測極限當然是越低越好。每種抗原與抗體所能結合的飽和度都有一個固定值存在，不可能無限制的提升。所以我們必須想出一個增加訊號強度的方法，由於 QCM 訊號強弱的來源是根據表面質量改變的多寡來決定，於是我們想出了一個增加質量方法，利用了生物相容性最佳的金奈米粒子會與蛋白質 conjugate 的特性，以特定的比例加入到我們待測的生物樣本達到飽和點，此方法成功的放大 QCM 頻率響應達 300%。雖然效果有限，不過也提供了一個方式可以使 QCM 的訊號放大。



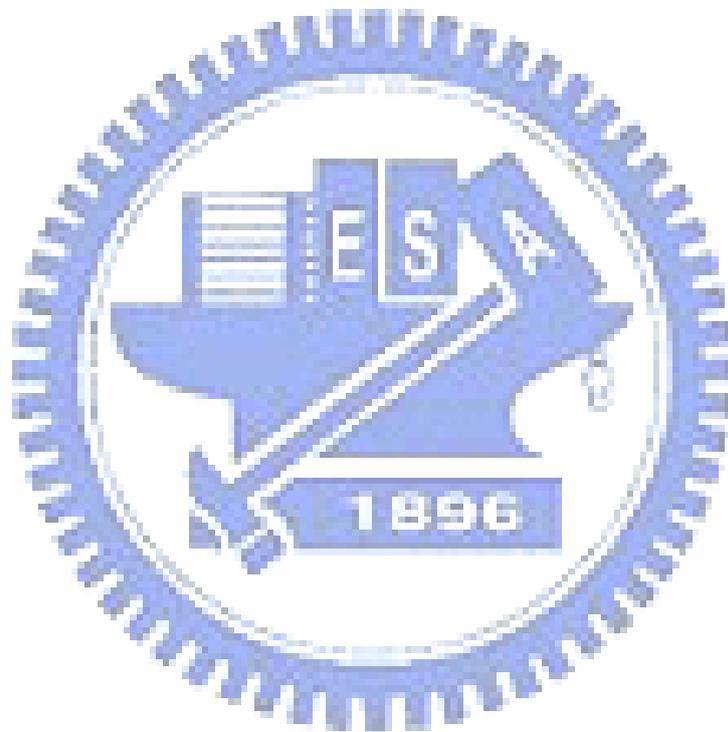
## 第五章 未來展望

目前這些對奈米粒子的檢測方法都只是初步的開端，奈米粒子具有不同的形狀、大小與材質，甚至有我們沒想到的特性。這些必須留給接下的人繼續探討。現在我們只針對球形且直徑在 5 nm 的金奈米粒子，但是金粒子的形狀並不只侷限在球型，許多的研究都可以將金奈米粒子和成為奈米桿狀(nanorods)。因此要作出符合各式各樣形狀的金奈米粒子檢測器還要投入更多的努力。但光只能檢測金奈米粒子還不夠，我們生活的周遭充滿許多無法以肉眼看見的奈米粒子，如汽機車排放的廢氣當中就含有奈米級的碳分子，這種分子在組成奈米級聚合體便形成有毒性的富勒烯分子[23]，研究人員推測富勒烯分子能產生氧化劑氧化細胞膜進而殺死細胞。面對這些有毒的分子我們必須做到有效的監控，而 QCM 則提供了一個方便而且快速的選擇，如果能成功的將生物科技技術與 QCM 作跨領域的整合，相信我們之後對奈米粒子的監控便能迅速的掌握，如此一來就可以讓人們生活在無奈米粒子汙染的空間，也達到生命的永續延伸。

在檢測生物樣本的技術中，所要追求的是以最少的樣品獲得最好的偵測訊號，在本論文中提供了一種可以成功放大 QCM 檢測平台訊號的方法，此方法在研究領域中只應用在標準的生物模型當中，我們成

功的使用在禽流感(H5N1)病毒膜蛋白中，並放大 QCM 訊號達 300%。

未來可以朝著 QCM 表面改質的方式來增進與特殊生物分子的鍵結放大訊號，也可以利用奈米科技成熟的技術，將表面奈米化後大量增加 QCM 電極表面積，如此一來也可成功提升 QCM 量測訊號的強度。



## 第陸章 參考文獻

1. Clark, L. C., Jr. and C. Lyons (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." Ann N Y Acad Sci **102**: 29-45.
2. King, W. H. (1964). "Jnr. A piezoelectric sorption detector." Anal. Chem **36**: 1735-1739.
3. Bergveld, P. (1970). "Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements." IEEE Trans Biomed Eng **17**(1): 70-1.
4. Yoder, P. R. (1975). "Active annular-beam laser autocollimator system." Applied optics **14**: 1890-1895.
5. Kobos, R. K. and G. A. Rechnitz (1977). "Regenerable Bacterial Membrane Electrode for L-Aspartate." Analytical Letters **10**(10): 751-758.
6. Robinson, B. H. and N. C. Seeman (1987). "The design of a biochip: a self-assembling molecular-scale memory device." Protein Engineering Design and Selection **1**(4): 295-300.
7. Frebel, H., G. C. Chemnitz, et al. (1997). "Multianalyte sensor for the simultaneous determination of glucose, l-lactate and uric acid based on a microelectrode array." Sensors & Actuators: B. Chemical **43**(1-3): 87-93.
8. Rechenbach, T., U. Schramm, et al. (2000). "A QMB-based temperature-modulated ammonia sensor for humid air." Sensors & Actuators: B. Chemical **67**(3): 219-226.
9. Hierlemann, A., U. Weimar, et al. (1995). "Polymer-based sensor arrays and multicomponent analysis for the detection of hazardous organic vapours in the environment." Sensors & Actuators: B. Chemical **26**(1-3): 126-134.
10. Chang, P. and J. S. Shih (2000). "Multi-channel piezoelectric quartz crystal sensor for organic vapours." Analytica Chimica Acta **403**(1-2): 39-48.
11. Huang, G. S., M. T. Wang, et al. (2006). "A versatile QCM matrix system for online and high-throughput bio-sensing." The Analyst **131**(3): 382-387.

12. Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung." Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei **155**(2): 206-222.
13. Nomura, T. and M. Okuhara (1982). "Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids." Analytica Chimica Acta **142**: 281-284.
14. Kanazawa, K. K. and J. Gordon (1985). "The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid." Analytica chimica acta. **175**: 99-105.
15. Martin, S. J., V. E. Granstaff, et al. (1991). "Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading." Analytical chemistry **63**(20): 2272-2281.
16. Faraday, M. (1857). "The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light." Philosophical Transactions of the Royal Society of London **147**: 145-181.
17. Warren C.W. Chan, B. Devika Chithrani, et al. (2006). "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells." Nano letters(Print) **6**(4): 662-668.
18. Huang, G. S., Y. S. Chen, et al. (2006). "Measuring the Flexibility of Immunoglobulin by Gold Nanoparticles." Nano Lett. **6**(11): 2467-2471.
19. Frens, G. (1973). "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions." Nature Phys Sci **241**(2): 22.
20. Stathis, E. C. and A. Fabrikanos (1958). "Preparation of colloidal gold." Chem Ind (London) **27**: 860-861.
21. Fujishima, A. and K. Honda (1972). "Electrochemical photocatalysis of water at a semiconductor electrode." Nature **238**(5358): 37-38.
22. Horimoto, T. and Y. Kawaoka (2006). "Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses." Trends in Molecular Medicine **12**(11): 506-514.

23. Webster, T. J., M. C. Waid, et al. (2004). "Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants." Nanotechnology **15**(1): 48-54.

