

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

生物高感度偵測技術快速鑑別人類

血紅素結合蛋白之表現型

Rapid Phenotypes Determination of Human Haptoglobin
by a Homemade Bio-Electrochemical Analyzer

研究生：李子正

指導教授：張家靖 教授

中華民國九十八年七月

生物高感度偵測技術快速鑑別人類
血紅素結合蛋白之表現型

Rapid Phenotypes Determination of Human Haptoglobin by a
Homemade Bio-Electrochemical Analyzer

研究生：李子正

Student：Tzu-Cheng Lee

指導教授：張家靖

Advisor：Chia-Ching Chang

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

A Thesis

1896

Submitted to Institute of Biomedical Science

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master in Science

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

生物高感度偵測技術快速鑑別人類血紅素結合蛋白之表現型

學生：李子正

指導教授：張家靖 博士

國立交通大學生物醫學研究所 碩士班

摘要

人體血紅素結合蛋白(Human Haptoglobin, Hp)可以被劃分為三種型態，分別是 Hp 1-1, 2-1, 及 2-2。Hp 1-1 具有雙單元 $(\alpha_1\beta)_2$ 構型，Hp 2-2 為不同單元數之環形聚合的混合物 $(\alpha_2\beta)_n$ ，以及 Hp 2-1 由不同長度的線性聚合 $(\alpha_{1.2}\beta)_n$ 所組成。就如同血型一樣，每個人只會有其中一種型態，目前報導指出，許多疾病與 Hp 的表現型以及在血液中的 Hp 濃度有關聯，例如腎衰竭、狹心症、以及冠心病等。然而，目前要從血清中以傳統生化分析方式分辨出 Hp 表現型與血清中濃度，必需精準的操作與耗費漫長的實驗時間，例如 ELISA 以及 RIA 等方法。所以，本實驗致力於發展生物電化學感測器來作抗原(Hp)抗體的親和附著分析，作一快速，操作簡便之生物感測器。分析步驟如下。先將抗體固定在電極的金表面上，再將含有待測的血紅素結合蛋白樣品放入反應槽，測量電極表面的氧化還原電流與阻抗。藉由循環伏安法與電化學阻抗頻譜(electrochemical impedance spectroscopy,EIS)分析，我們可以得知是否有血清結合珠蛋白的存在。而利用 Randles' 等效電路，更可以將流到電極電子的等效串電阻(electron transfer resistance, R_{ct}) 予以量化，並藉此有效的對血紅素結蛋白進行表現性之分型與濃度量化的。

Rapid Phenotypes Determination of Human Haptoglobin by a Homemade Bio-Electrochemical Analyzer

Student: Tzu-Cheng Lee

Advisor: Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Biomedical Science

National Chiao Tung University

Abstract

Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein, similar to blood type, Hp have been classified into three phenotypes: Hp 1-1, 2-1, and 2-2. Briefly, Hp 1-1 represents the dimeric $(\alpha_1\beta)_2$ conformation, Hp 2-2 are mixed cyclic complexes of $(\alpha_2\beta)_n$, and Hp 2-1 are heterogeneous linear complexes $(\alpha_1\beta)_2(\alpha_2\beta)_n$. Hp phenotypes have been reported to be associated with diseases, such as myocardial infarction, kidney failure, and coronary artery diseases in diabetics. Meanwhile, it is a challenge to determine the phenotypes and concentrations of human haptoglobin in serum.

In this study, a homemade portable, high sensitivity bio-electrochemical analyzer (BEA) is design and developed. The developed BEA can rapidly identify the phenotype and quantitate the concentration of Hp. After immobilizing antibodies onto the gold electrode, the interfacial electron transfer rate on the electrode surface with and without antigens is measured by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Furthermore, Randles' equivalent circuit is applied to evaluate the electron transfer resistance (R_{ct}) of bio-molecular interactions. The heterogeneous of Hp and concentrations can be determined easily by this analysis.

誌謝

碩士班，這真是一段特別的旅程，我想有一天，我一定會懷念這段生活那麼簡單，每天目標那麼單純的日子。從 07 年的七月開始到現在結束，這些日子以來過的還算順利，在學業、在心理層面上、在人際關係以及在生涯規劃上，都有了進步，有了更多的想法與改變，比較可以接受失敗一些，比較能夠反省與道歉。這一切都要謝謝所有與這個生科實驗二館相關的導師們與夥伴們。

首先要謝謝我的碩士班指導老師，張家靖教授，謝謝老師給了我這麼一個機會，來到一個這麼好的研究環境，讓我很自由的對於實驗有自己的想法與方法，也很有耐心的跟我討論研究上的大大小小事，另外也要謝謝老師給我去 San Diego 的機會，永遠感謝。碩士班的研究上還有另外兩位我的導師們，分別是曾信華與鄭財木博士，謝謝曾博與鄭博的厚愛，很放心的把這個對本實驗室來說一個全新的題目交付給我，無條件的給我關於電化學量測與處理生物樣品的知識上，我所需要的幫助；有兩位前輩的指導，我真的很幸運，也讓我對於未來的人生規劃以及對於怎麼樣當個科學工作者，更有主見更有信心。也謝謝許銘華博士，跟 Steve 聊聊天，發現原來求學研究過程也可以用另外一種生活態度去作詮釋。國衛院的劉靜萍博士、儀科的陳至信博士，多次麻煩你們了，謝謝你們，我獲益良多。

辰哥、瑤貞與大頭，你們三個人的組合實在是太有趣啦，ok，有趣是一回事，謝謝你們這兩年來的照顧，不論是在實驗上或是在這兩年來的生活上，只能說人活到快 25 還能交到好朋友真是我太幸運，ok，再回到有趣這件事，三傻你們太棒了。朱大哥、阿鬼姊以及芳馨學姊，對於一個化學系剛畢業什麼都不懂的大學畢業生來說，三位給我莫大的心理建設與實質上的歸屬感，太多地方麻煩你們了，真的非常感謝，也祝福朱小妹健康快樂的長大，姜同學快結婚，阿鬼就...anyway。另外還有準博士簡哥與學弟 Dion，兩位在我的電化學實驗上給我最最實質的幫助，謝謝你們寶貴的時間。弘翔與心家，很抱歉光學上我沒有幫上什麼忙，祝福你們未來一切順利。還有我親愛的學弟妹們：明勳、昌翰、偉賢與虹瑋，你們加油，多用點心用點力就會有收穫，祝福你們。也謝謝兩年來所有在 NDL、在廠商等其他單位的所有麻煩過的人，感恩。

也要謝謝我的大學指導老師，廖奕翰老師以及廖老師實驗室的所有夥伴們，兩年來你們的關懷一直沒有斷過，有你們真好。當然，要謝謝我的家人，爸媽，姊姊，姑姑阿姨，郭大美女還有我最愛的外婆，你們是我的基石，謝謝你們都在。最後，僅希望本論文有一天可以對於社會，對於科學，能引伸出一點點點的支持與貢獻，謝謝。

目錄

摘要.....	I
Abstract	II
誌謝.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	XI
縮寫表.....	XII
第一章 緒論	1
1-1 研究動機與實驗目的	1
1-2 生物巨分子的自組織與自組裝	2
1-3 生物感測器之發展與分類	2
1-3-1 各式生化反應之生物感測器設計	3
1-3-2 不同物理量偵測之生物感測器設計	5
1-4 電化學生物感測器	8
1-5 奈米金粒子修飾之生物電化學感測器.....	10
1-6 血紅素結合蛋白 (Haptoglobin, Hp).....	11
1-6-1 Hp 結構與基因遺傳表現.....	11
1-6-2 Hp 相關之生理功能.....	13
1-6-3 傳統檢測 Hp 濃度與表現型之方法	14
1-6-4 Hp 濃度異常所代表之臨床意義	16
1-6-5 Hp 表現型相異性導致之不同病理結果	16

第二章	實驗策略.....	19
2-1	Hp-BEA 之實驗設計.....	19
2-2	Hp-BEA 之實驗總流程.....	19
第三章	實驗原理.....	21
3-1	循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV).....	21
3-2	Randles' 等效模擬電路 (Randles' Equivalent Circuit).....	23
3-3	電化學阻抗頻譜 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS).....	24
3-4	微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC).....	27
3-5	動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering, DLS).....	28
3-6	自組裝單層膜 (Self-Assembly Monolayer, SAM).....	28
第四章	實驗步驟.....	32
4-1	自製三電極電化學反應槽.....	32
4-2	工作電極之研磨與清洗.....	33
4-2-1	金電極組裝與機械研磨.....	33
4-2-2	金電極之化學研磨.....	34
4-3	工作電極表面之感測分子固定.....	34
4-3-1	含奈米金粒子之官能基修飾.....	35
4-3-2	不含奈米金粒子之官能基修飾.....	35
4-3-3	含奈米金粒子之官能基修飾(以聚合物包覆).....	36
4-4	生物樣品之製備.....	36
4-5	奈米金粒子之製備.....	36
4-5-1	水溶液奈米金粒子之製備(Colloidal AuNPs).....	36
4-5-2	單分子層包覆奈米金粒子之製備(AuMPCs).....	37

4-6	CV 與 EIS 量測之儀器設定	38
4-7	電阻分析模擬軟體	38
第五章	實驗結果	40
5-1	實驗室自製電極	40
5-2	電極之化學研磨與清洗	40
5-3	金奈米粒子之製備	42
5-4	以循環伏安法檢測電極表面之修飾	43
5-5	以 Hp-BEA 分辨三種不同表現型之 Hp.....	45
5-6	檢視 Hp-BEA 基本性質	46
5-6-1	重複使用性質	46
5-6-2	專一性程度.....	47
5-6-3	辨識樣品速度.....	49
5-7	以 DSC 分辨三種不同表現型之 Hp.....	51
5-8	以 DLS 分辨三種不同表現型之 Hp	52
5-9	不同表現型之 Hp 於 Hp-BEA 之訊號歸納.....	54
5-10	Hp 濃度變化之於 Hp-BEA 訊號變化.....	56
5-11	其他不同的 Hp-BEA 之實驗設計.....	57
5-11-1	Non-AuNPs based Hp-BEA.....	57
5-11-2	Poly <i>o</i> -aminophenol based Hp-BEA.....	58
5-11-3	Hemoglobin based Hp-BEA.....	63
第六章	討論	65
6-1	本自製感測器可取代商品化之電化學分析儀.....	65
6-2	使用 Hp-BEA 可以準確的分辨三種不同表現型.....	65

6-3	Hp-BEA 亦可作為濃度檢測計	65
6-4	Hp-BEA 為一可重覆使用, 高專一性之穩定生物偵測器.....	66
6-5	Hp-BEA 提供了一個操作、攜帶容易, 成本低廉的檢測方法.....	67
6-6	使用 POAP based Hp-BEA 以簡化製備程序.....	67
6-7	使用 Hb-based Hp-BEA 以簡化製備程序.....	69
6-8	Hp-BEA 與 DSC、DLS 對於分辨 Hp 表現型作比較.....	70
第七章	未來展望	71
參考文獻	74
附錄	86
附錄一	實驗相關藥品	86
附錄二	Hp-BEA 對 Lysozyme 濃度作檢測之原始 EIS 數據與模擬值	87
附錄三	不同表現型之電阻抗值歸納表之原始 EIS 數據與模擬值	89
附錄四	Hp-BEA 對 Hp 2-2 濃度作檢測之原始 EIS 數據與模擬值	91
附錄五	本論文研究相關獲獎紀錄.....	92



圖目錄

圖 一.1 近年來阻抗頻譜與生物感測器相關文獻之數目[1]	1
圖 一.2 一般生物感測器之設計原理簡圖[18]	3
圖 一.3 不同生化反應之生物感測器設計示意圖[18]	5
圖 一.4 SPR 類型感測器之偵測原理[17]	7
圖 一.5 MACH-ZEHNDER 式干涉儀設計示意圖	8
圖 一.6 不同物理量偵測之生物感測器設計[18]	8
圖 一.7 電流生物感測計之設計原理示意圖	10
圖 一.8 人類各種不同表現型之 HP 組成示意圖[57]	12
圖 一.9 利用膠體電泳分辨不同表現型之 HP[57]	15
圖 一.10 利用免疫擴散法分辨不同表現型之 HP[57]	16
圖 二.1 實驗核心架構示意圖	19
圖 三.1 循環伏安法中電位與時間變化之示意圖[102]	21
圖 三.2 典型 $O + n e^{-} \leftrightarrow R$ (可逆氧化還原反應) 循環伏安圖(美式)範例[102]	22
圖 三.3 循環伏安法中峰電流與峰電位之表示圖(美式)	23
圖 三.4 美式(左)與 IUPAC 式(右) 循環伏安圖表示法[103]	23
圖 三.5 一簡單電化學系統之 Randles' 等效模擬電路圖	24
圖 三.6 以 EIS 原理設計之生物感測器示意圖	25
圖 三.7 EIS 電壓電流變化之相位差示意圖[1]	25
圖 三.8 EIS 阻抗與相位差之向量圖表示[1]	26
圖 三.9 標準 NYQUIST PLOT 表示法與其代表之物理量	27
圖 三.10 硫醇烷鏈分子於金電極表面之反應機制示意圖[110]	29
圖 三.11 自組裝單層膜組成示意圖[114]	30
圖 三.12 乙硫醇(ETHANETHIOLATE) 鍵結於 Au(111) 之掃描穿隧式(STM)顯微圖[115]	30
圖 三.13 硫醇分子單層膜與金表面排列之示意圖[115]	31
圖 四.1 實驗室自製之三電極反應槽之配置圖	32
圖 四.2 實驗室自製之三電極反應槽之實體相片	32
圖 四.3 工作電極之製備步驟	33
圖 四.4 以循環伏安法進行化學研磨 (IN H_2SO_4)	34
圖 四.5 含奈米金粒子之電極修飾步驟	35

圖 四.6 不含奈米金粒子之電極修飾步驟.....	35
圖 四.7 含奈米金粒子之電極修飾步驟(以聚合物包覆).....	36
圖 四.8 Au@TIOPRONIN 合成示意圖[124].....	37
圖 四.9 ZSIMPWIN 軟體之模擬曲線.....	38
圖 五.1 實驗室自製電極實物.....	40
圖 五.2 化學研磨前後以循環伏安圖之比較 (IN H ₂ SO ₄).....	41
圖 五.3 化學研磨前後以掃描式電子顯微圖之比較 (IN 10,000X).....	42
圖 五.4 金奈米粒子(S. CITRATE)的吸收光譜圖.....	42
圖 五.5 以 DLS 量測金奈米粒子(S. CITRATE)尺寸約為 30 NM.....	43
圖 五.6 以 DLS 量測單分子層包覆奈米金粒子(AU@TIOPRONIN)尺寸約為 7 NM.....	43
圖 五.7 以 CV 檢測各階段電極修飾之情形.....	44
圖 五.8 以 EIS 量測三種不同表現型之 HP.....	45
圖 五.9 以 HP-BEA 重覆檢測不同表現型之 HP.....	47
圖 五.10 HP-BEA 對於 LYSOZYME 濃度作檢測 (EIS).....	48
圖 五.11 HP-BEA 對於 LYSOZYME 濃度作檢測 (N=3)*.....	49
圖 五.12 HP-BEA 對於 HP 2-2 作不同反應時間之檢測 (EIS).....	50
圖 五.13 HP-BEA 對於 HP 2-2 作不同反應時間之阻抗變化 (FIT IN SIGMOIDAL LOGISTIC FUNCTION).....	51
圖 五.14 以 DSC 來量測不同表現型之 HP.....	52
圖 五.15 HP 1-1 的粒徑大小量測 (DLS).....	53
圖 五.16 HP 2-1 的粒徑大小量測 (DLS).....	53
圖 五.17 HP 2-2 的粒徑大小量測 (DLS).....	54
圖 五.18 不同表現型之 HP 之水合直徑統計圖 (DLS).....	54
圖 五.19 不同表現型之 HP 之電阻抗值歸納表 (N≥4)*.....	55
圖 五.20 HP-BEA 對於 HP 2-2 濃度作檢測 (EIS).....	56
圖 五.21 HP-BEA 對於 HP 濃度作檢測 (N=3 FOR HP 2-2*).....	57
圖 五.22 以無金粒子修飾之 HP-BEA 偵測不同表現型之 HP.....	58
圖 五.23 以伏安法製備並觀測電極表面之 ELECTRO-COPOLYMERIZATION.....	59
圖 五.24 以伏安法檢測電極表面之 ELECTRO-POLYMERIZATION (IN FECN ₆ ^{3-/4-}).....	60
圖 五.25 以 POAP BASED BEA 檢測 HP 1-1 之 EIS 訊號.....	61
圖 五.26 以 POAP BASED BEA 檢測 HP 2-1 之 EIS 訊號.....	61
圖 五.27 以 POAP BASED BEA 檢測 HP 2-2 之 EIS 訊號.....	62
圖 五.28 以 POAP BASED BEA 檢測 LYSOZYME 之 EIS 訊號(對照組).....	62

圖 五.29 以 HB BASED HPBEA 偵測不同表現型之 HP	64
圖 六.1 HP-BEA 於 HP 濃度偵測之線性反應區間與飽和濃度	66
圖 六.2 HP-BEA 重覆性測試	67
圖 六.3 POAP BASED HP-BEA(斜紋柱狀圖)與之前數據(HP=BEA, 實心柱狀圖)作比較	68
圖 六.4 POAP BASED HP-BEA 對三種表現型之 HP 作比較以及其對照組實驗	69
圖 六.5 HB BASED HP-BEA(斜紋柱狀圖)與之前數據(實心柱狀圖)作比較	70
圖 七.1 VIRUS-BEA 針對不同濃度之 EV71 作 EIS 分析	71
圖 七.2 空白 ITO 玻璃 (左) 與 POAP 附著之 ITO 玻璃(右, 紅色方框標示處)作比較	1



表目錄

表格 一.1 常見的電化學生物感測器[43].....	9
表格 一.2 HP 三種不同表現型之物理性質與濃度介紹[2].....	12
表格 一.3 HP 表現型與各人種, 地域分佈之節錄關係[2].....	13
表格 一.4 HP 生理功能與不同表現型之相關性[2].....	14
表格 一.5 HP 表現型與相關連疾病之節錄簡表[101].....	18
表格 三.1 阻抗元素之定義與其物理意義[1].....	26
表格 三.2 SAM 常見之配位分子與其基材[113].....	29
表格 四.1 CV 與 EIS 之量測條件設定.....	38
表格 四.2 ZSIMPWIN 軟體分析之數據格式.....	39
表格 五.1 比較 CV 圖中各階段修飾之峰電位變化值與峰電流值.....	44
表格 五.2 以阻抗分析軟體模擬 HP-BEA 對三種不同表現型 HP 之偵測結果.....	46
表格 五.3 以阻抗分析軟體模擬 HP-BEA 對不同表現型 HP 之重複使用性偵測.....	47
表格 五.4 以阻抗分析軟體模擬 HP-BEA 對 HP 樣品有效反應時間之偵測.....	50
表格 五.5 以阻抗分析軟體模擬 NON-AuNPs HP-BEA 對不同表現型 HP 之偵測.....	58
表格 五.6 以阻抗分析軟體模擬 POAP BASED HP-BEA 對不同表現型 HP 之偵測.....	63
表格 五.7 以阻抗分析軟體模擬 HB BASED HP-BEA 對不同表現型 HP 之偵測.....	64

縮寫表

AuNPs	Gold Nanoparticles	金奈米粒子
AuMPCs	Monolayer Protected Gold Clusters	單分子層包覆奈米金粒子
BEA	Bio-electrochemical Analyzer	生物電化學分析儀
C_{dl}	Double-Layer Capacitance	電雙層電容值
CE	Counter Electrode	輔助電極
CV	Cyclic Voltammetry	循環伏安圖(法)
DAQ	Data Acquisition	資料擷取器(卡)
DLS	Dynamic Light Scattering	動態光散射儀
DSC	Differential Scanning Calorimetry	微溫差掃描熱卡路里計
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	電化學阻抗頻譜
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酵素免疫分析法
E_p	Peak Potential	峰電位值
Hb	Hemoglobin	血紅蛋白
Hp	Haptoglobin	血紅素結合蛋白
i_p	Peak Current	峰電流值
POAP	Poly <i>o</i> -Aminophenol	聚-2-胺基苯酚
QCM	Quartz Crystal Microbalance	石英晶體微天平儀
R_{ct}	Charge Transfer Resistance	電荷傳遞電阻
RE	Reference Electrode	參考電極
R_s	Solution Resistance	溶液電阻
RIA	Radio-Immunoassay	放射線免疫分析法
SAM	Self-Assembly Monolayer	自組裝單層膜
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面電漿共振
WE	Working Electrode	工作電極
Z_w	Warburg Impedance	沃堡阻抗(擴散阻抗)

:以英文字母順序排列

第一章 緒論

1-1 研究動機與實驗目的

人體中，有許多與疾病直接或間接相關的特定蛋白質，該蛋白質的濃度異常改變或是結構上的變化，時常被作為檢驗疾病的重要指標，目前在臨床檢驗上，以免疫分析法為主要的疾病檢測方式，免疫分析法之高靈敏度與高專一性使該方法被廣泛的應用在特定蛋白質的濃度分析上(詳見章節 1-3)。然而，此方法亦存在著許多缺點，例如，免疫分析法所需之儀器與試劑售價昂貴，操作繁瑣費時，實驗人員之技術需求較高……等因素。另一方面，1960 年代起，生物感測器(Biosensor)之觀念逐漸萌芽，其主要以檢測準確快速、操作簡便為訴求(詳見章節 1-4)，經過電路設計的改進與生物分子固定技術的成熟，近十年來，生物感測器的相關研究報告數量呈現指數型的上昇，舉例來說，以 " impedance spectroscopy" 以及 " Biosensor" 為關鍵字文獻數目由 1996 年個位數目的篇數上升至 2006 年時，每年可有上百篇的文獻發表，見下圖一.1，至今仍在增加當中。但儘管生物電感測器已是如此蓬勃的研究領域，也已經被廣泛地應用在商業檢測儀器上，例如血糖計等，相關的電化學研究依然要依賴傳統商品化的電化學分析儀，其外型巨大且售價昂貴；此外，相關配件耗材也受限於原機器之設計，如此即減慢了學生的實驗進度以及阻礙了生醫議題發展的時間迫切性。本實驗室了解客製化，個別實驗差異的重要，所以致力於：發展快速、操作容易、成本低廉的可攜式生物檢測器，作為本實驗室與本論文重要之出發點與欲達成之目的。

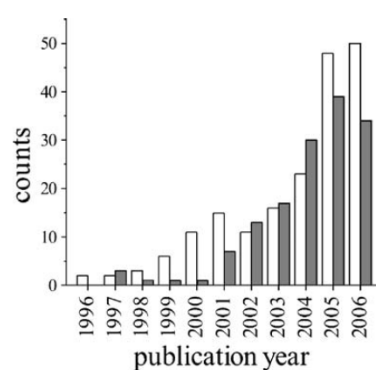


圖 一.1 近年來阻抗頻譜與生物感測器相關文獻之數目[1]

空心柱狀圖為 " ISI web of Science" 搜尋而得，實心部分來自 " PubMed" 之結果。

除此之外，本實驗室研究人類血紅素結合蛋白(Haptoglobin, Hp)之相關文獻，發現其為一相當特別的蛋白質；舉例來說，一般蛋白質相關的疾病表現多與該蛋白之異常濃度或結構有關，但 Hp 不只如此，人類 Haptoglobin 有三種不同的表現型(Phenotype)，

而該表現型的差異只有發生在人類上，其不同表現型之間的胺基酸組成近似，但分子量與立體構型卻呈現明顯的差異[2]。再者，不同表現型的血紅素結合蛋白對於疾病會有不一樣的臨床反應，其中，2-2 型 Hp 更被用來作為預測冠狀動脈血管疾病(coronary vascular disease)及其併發症的指標[3](見章節 1-6)，所以，如果可以發展可辨識不同 Hp 表現型與正確檢測 Hp 濃度的新方法，並符合上述所說對於生物檢測器的要求，則可以大大增進醫療品質與縮短臨床研究的時間，也正是本論文欲研究之主要目標。

1-2 生物巨分子的自組織與自組裝

生物巨分子之自組織(self-organization)、自組裝 (self-assembly)特性，已成為操作此類生物分子形成特殊結構之重要步驟[4, 5]。這些分子所形成之構形與其自組裝成長環境有著密切的關聯。生物巨分子為碳、氫、氧、氮、硫等組成之複雜有機化合物。雖然其結構複雜，但是此類生物巨分子在非均相系統中生物巨分子會受系統作用力, entropically force，驅動下形成特定的構形及所謂之自組織，此外 entropically force 亦會驅動生物巨分子排列出特殊分子級圖形與結構此即為自組裝 (self-assembly)之特性[6-8]。正因為生物分子具有自組織之特性，因此同一類分子在同一環境下達平衡後所形成之特徵結構幾乎相同，其差異性極低，而且這些分子之特徵結構大小在數個奈米左右[9]。因此，此類型分子，具有相同化學官能基，但不同的物理量(例:分子量、相變點、立體結構……等)，成為了一般生化方法較困難與較費時處理的生物樣品類型。

1-3 生物感測器之發展與分類

近數十年來，酵素免疫分析法 (ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay") [10-12]，漸漸取代了放射線免疫分析法(radio-immunoassay, RIA)[13]作為分析生物樣品之免疫反應的主要方法與實驗設計。其原因始於以 RIA 作樣品分析時，對於放射線標定物的操作、保存以及廢棄處理等都必須有較繁瑣的實驗規範與安全防護；使其漸漸被 ELISA 之安全、易操作等特性所取代。而 ELISA 被大量應用來作為分析血液中各類抗原或抗體濃度的工具，例如，HIV test, West Nile Virus test 等[14]。另外各式食品中的過敏原含量檢測，例如：牛奶，花生，杏仁，雞蛋等檢驗，也常使用 ELISA 的方式作檢測[15]。目前已知所使用的 ELISA 方式進行樣品分析，其靈敏度約高達 15 pg/ml[16]。

隨者 ELISA 分析方法的普及，利用"生物感測器"概念作為分析方法的實驗設計也漸漸顯現其多樣性與可行性[17]，不同類型的實驗以嘗試取代 ELISA 生物膜微量培養盤試

驗(Biofilm microtiter plate test)的操作與節省 ELISA 實驗時間而設計。其策略大致為，一端將可與待測物反應之物質(偵測物質)，以各種不同的實驗設計固定於(immobilized)某固態基質上，且通常該基質與待測物極為接近，以增進偵測靈敏度與速度；另外，設計可更換的偵測物質，以達到同一感測器可用於多樣待測物的分析，其分析之訊號可為電子、離子、氣體分子、熱能、光子及質量改變等轉換之訊號；最後，縮小固定基質的體積並且與電路設計作整合，以達到可攜體積與可量產之成本。一般生物感測器之設計概念簡述如下：

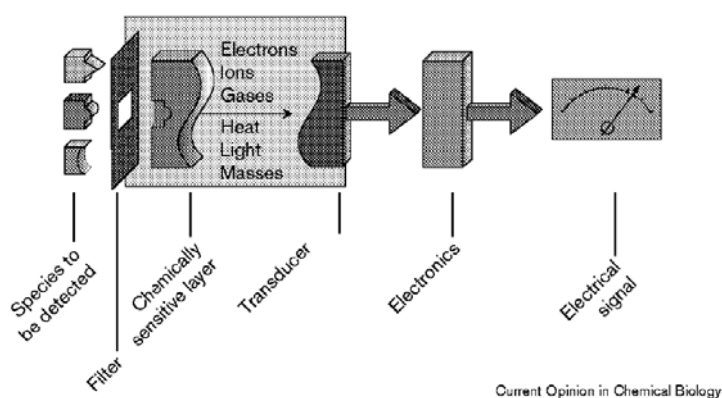


圖 一.2 一般生物感測器之設計原理簡圖 [18]

待測物，例如蛋白質、病毒、細菌等，經過過濾、離心等方式作初步的純化後，與生物感測器上的固定分子(例如：抗體)發生反應，藉由電、熱或光等訊號傳遞至感測器的電路接收器(例如：工作電極)上，再經由一定的轉換、放大與計算後，表達為感測器之電訊號。

1-3-1 各式生化反應之生物感測器設計

Christiane Ziegler *et al.* 在 1998 年 *Curr Opin Chem Biol* 中的 review 文章中 [18]，將不同偵測介面設計的生物感測器歸納為下列幾項：

A. 生物親和吸附感測器 (Bioaffinity sensors)

以生物親和吸附為設計基礎的感測器為目前設計變化性最大的一個類別，其中，以 DNA 感測器最引人注目，其設計原理為利用帶有固定單股 DNA 的感測器，被待測物中的另一股鹼基片段或酵素所辨認進行結合，利用電訊號或光訊號的改變進行偵測，此類型的感測器發展對於鑑識科學與相關酵素研究有極大的潛在貢獻。目前該類型研究正致力於提高靈敏度至欲克服辨認單一鹼基的不同，已知可利用電中性(neutral aminoethyl-glycine based)的仿 DNA 骨架(peptide nucleic acid, PNAs)作取代，以降低電性耦合所形成錯位接合(mismatch)的機率 [19]。另外，利用抗原抗體或是酵素辨認結合的生物感測器則是另一大宗，其複合體在生物感測器上結合

後，藉由質量、光學訊號或電阻訊號的改變(詳見章節 1-3-2)，來作生物偵測的應用，其特點是該類型生物感測器多半朝向取代螢光標定或放射線標定實驗方法，強調”無需標定(label-free)”的實驗設計，大大提升了實務應用的可能性。在其他應用方面，例如：以化學片段篩選適合製藥的分子結構、以可捕捉金屬的酵素或化合物來對於環境中的重金屬含量進行分析[20]以及快速的對恐怖攻擊與不明生化樣品進行判斷[21]……等眾多議題上，生物親和力感測器都占有重要實際應用，其高度應用性與大量的文獻發展等優勢，所以本實驗亦利用生物親和吸附感測器作為 Hp-BEA 之設計依據(詳見章節 2-1)。

B. 酵素催化感測器 (Enzyme biosensors)

酵素催化感測器在目前已商品化的生物感測器占有極大的比例，其中最普及的便是糖尿病血糖感測器，利用葡萄糖氧化酵素(glucose oxidase)的固定，即可針對其不同葡萄糖催化量產生之電流大小不同以用來判斷人體的血糖濃度，目前各研究正致力於發展植入式長效型的血糖偵測器，來改善目前血糖計之侵入式血液樣品取得的缺點[10-12]。一般來說，酵素催化感測器多受限於其固定分子必須本身即具備氧化還原特性，所以其發展性並不如生物親和吸附感測器來的廣泛。

C. 膜通透感測器 (Transmembrane sensors)

膜通透感測器最大的挑戰即是如何固定生物膜在感測器上並且維持它的活性，再者，如何分離並放大的膜上的離子訊號也是另外一個待克服的問題，目前研究團隊利用黑雙層脂膜(black lipid membranes, BLMs)與磷脂(phospholipids)作為基質模擬膜通道的開關等[22]，並利用離子電訊號或表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)的方法進行訊號量測，用以觀察各類型生物分子，如 antibodies、nucleotides，對於膜通道開關的影響。

D. 細胞作用感測器 (Cell biosensors)

此類型感測器設計又可細分為兩種，其一為以光學訊號偵測細胞作用，其作法為將光纖束利用蝕刻的方法把尖端加工為數飛升(femtoliter, ~85 fL)的凹槽，理想上，洽可容納一個細胞生長，利用特殊胞器的螢光標定，可對酸鹼值、鈉鉀離子濃度、一氧化氮、氧與葡萄糖等，與細胞作用作即時的(time-resolved)觀測，並同時分辨反應部位[23]。另一類型為利用捕捉細胞內外離子變化作電訊號的分析或是神經細胞與細胞間的訊息傳遞之電生理分析等，都屬於細胞作用感測器的應用[24]。不同於本實驗之設計，細胞作用感測器著重於胞器等級的即時訊號觀測，其儀器設計複雜，操作門檻高，人為影響因素大。相對的來說，本實驗則著重於巨分子快速判別簡易實驗設計。(見下頁)

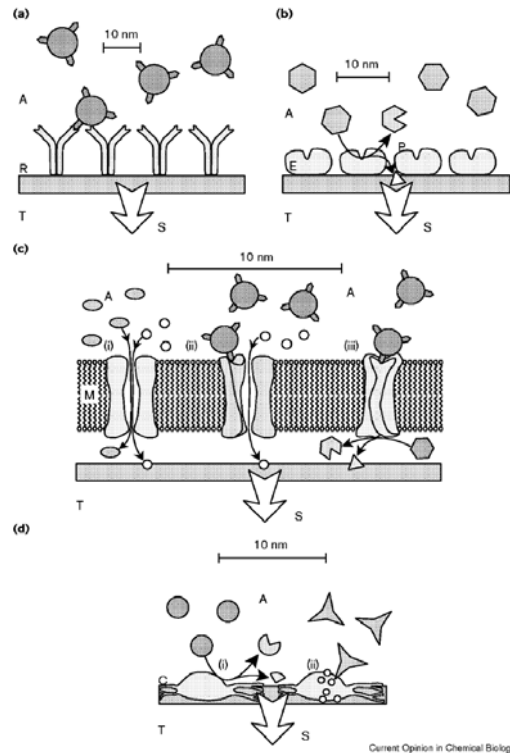






圖 1.3 不同生化反應之生物感測器設計示意圖 [18]

(a). 生物親和吸附感測器 Bioaffinity sensors。(b). 酵素催化感測器 Enzyme biosensors。(c). 膜通透感測器 Transmembrane sensors。(i)表示一般鹽類或小分子藉由蛋白質通道進入細胞內，(ii)表示抗原分子與通道蛋白質作用以填充膜通道的開合，(iii)表示抗原分子與通道蛋白質作用後以啟動細胞內的酵素催化反應。(d). 細胞作用感測器 Cell biosensors。(i)表示細胞對反應物(分析物)產生轉換(convert)式的反應，(ii)細胞與反應物產生鍵結(bind)式的反應。

”A”表示欲分析物-Analyte。”R”表示固定的辨識分子-Recognition。”T”表示電訊號轉換器-Transducer。”S”表示訊號-Signal。”E”表示酵素-Enzyme。”P”表示反應產物-Product。”M”表示生物雙層膜-Membrane。”C”表示細胞-Cell。詳細圖示代表意義:見內文 1-3-1。

  : 分別表示抗原與抗體分子;   : 分別表示與酵素反應前後之反應物。

1-3-2 不同物理量偵測之生物感測器設計

相同的生化反應，在不同設計的生物感測器中，可能被轉換成不同的物理量被改測器接收與記錄。以下以最常見的生物親合吸附感測器(Bioaffinity sensors)為例，就不同的物理量偵測原理作分類，對各類型生物感測器作介紹[17, 18]，以利於讀者對於本實驗選擇之實驗設計有更多的認識：

A. 石英晶體微天平儀 (Quartz crystal microbalance, QCM)

QCM 設計原理是藉由將抗原與抗體固定於某壓電材料表面上(piezo-electric

material)。藉由基質本身(quartz)的振動頻率在生物反應後發生調變，以頻率差值來計算感測器表面上質量的變化，推測是否有抗原抗體的辨識作用產生[25]。目前此類型的感測器在發展上最大的障礙是使用複合材料作固定時，其會干擾基質本身的振動現象，使其產生雜訊誤差。另外，緩衝溶液的溫度以及其介電常數也是影響訊號量測的重要變因[26]。目前文獻上指出，QCM 可達到之濃度偵測極限約為 40 ppb，偵測時間約需 1~2 分鐘[17]。另外，將待測樣品加以”前處理”，例如，以乳膠顆粒(latex beads)[27]、奈米金球(gold nanoparticles)[28]等方法來加大待測物的質量，用以改善感測器之靈敏度，則是目前 QCM 常用的樣品製備模式。

B. 電化學感測器 (Electrochemical sensors)

利用電化學的氧化還原現象來作為生物感測器的偵測方式，為目前最為廣泛使用的作法，其原理大致為將待反應的抗原或是抗體固定在導電基質上，例如：石墨電極[29]、金電極[29]、導電玻璃電極[30]、特殊薄膜電極[31]與高分子聚合物電極[32, 33]等。固定在基質上的抗原或抗體互相反應後，產生氧化還原反應，直接的或間接的放出電子並被電路設計所捕捉並放大，產生電流訊號則作為免疫發生之訊息，反應其分子作用變化程度。另一類型則是利用溶液中所添加的電解質，利用其自身氧化還原反應的難易程度差異，反應出電極表面的電阻或是反應槽之電容。詳細設計後續文章中(見章節 3)作介紹。

C. 光柵耦合式感測器 (Grating coupling sensors)

光柵耦合式感測器可分為反射式、進光式與出光式等數種，反射式原理為將光束線聚焦至帶有欲反應抗體之光柵，反射光的波長與強度分佈，對照於未與抗原反應之波長與強度分佈會發生改變，將此改變以光電偵測器紀錄之，用以計算介質折射系數(refractive index)的變化，來推測抗原之濃度[34]。另外一類型設計為利用對全反射表面的倏逝波(evanescent wave)吸收，在距離焦平面(反射面)約 200 nm 的高度內，其能量足以將抗原表面修飾之螢光分子作激發，用此原理來觀測免疫反應的發生，其設計類似於內全反式螢光顯微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence spectroscopy, TIRF)[35]。

D. 表面電漿共振感測器 (Surface Plasmon Resonance sensors)

在奈米尺寸的金屬表面產生電磁波的傳遞時，特定波長且滿足特定入射角度的電磁波，該能量正好可以被奈米金屬粒子吸收進而產生電子共振(resonance)效應，稱作表面電漿共振效應(SPR)；影響 SPR 中”可反應激發光”的入射角度的因素有波長、光偏振(polarization)等，也與金屬粒子的表面環境有關，藉由不同的金屬表面的抗原抗體修飾步驟，與光束線角度的變化，可以用來觀測免疫反應的程度

[36-38]。詳細原理如下圖所示：

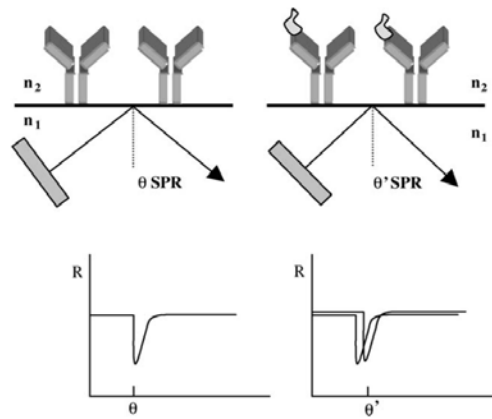


圖 一.4 SPR 類型感測器之偵測原理[17]

當有待測物(抗原)與抗體(Y 型表示)反應時, SPR 感測器上的奈米金屬粒子表面環境產生改變, 使得可激發表面電漿共振的入射光吸收產生角度(或波長)偏移, 如右半圖所示。 (θ) 表示尚未與抗原結合時之 SPR 吸收反射角度, (θ') 表示接上抗原後, 改變後的 SPR 吸收反射角度。 n 表示不同物值之折射系數 (Refraction Index)。 R 表示在接收器(receptor)觀察到的訊號強弱大小。

E. 反射式干涉儀 (Reflectometric Interference Spectroscopy, RIfS)

利用光在不同介面與介面之間的反射, 互相產生干涉效應形成亮暗紋, 當有免疫反應發生時, 及最上層薄膜發生厚度(optical thickness, " n " \times " d ")的改變, 因此, 干涉條紋的亮暗紋位置也會偏離(shift), 藉此原理, 即可以觀測基質上是否有免疫作用的發生及其程度[39, 40]。

F. Mach-Zehnder 分光式干涉儀

分光式干涉儀, 其偵測免疫反應之設計原理相同於上述反射式干涉儀, 都是利用光學干涉條紋的變化, 來推之因免疫反應產生的厚度或折射系數(refractive index)的改變, 不同的設計在於後者是利用分光鏡, 將光路導至不同光路, 所以其中樣品放置與固定方式與前者不同, 最後再互相產生的干涉條紋作應用[41]。

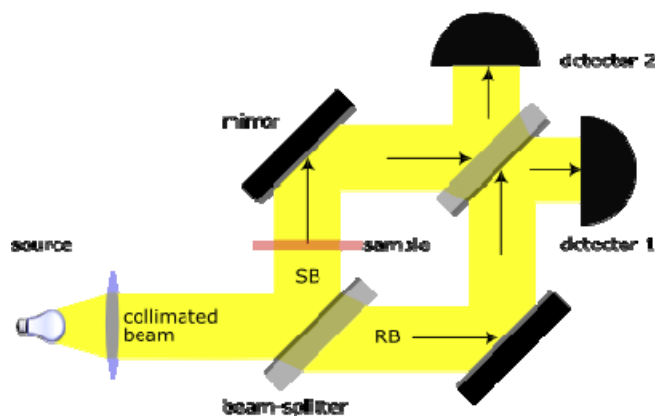


圖 一.5 Mach-Zehnder 式干涉儀設計示意圖

此類型設計利用兩片分光鏡(beam-splitter)分別在通過樣品前後，將光束保持分離，之後分別在兩個不同的光感測器上作光程差的量測。SB 表示經過樣品的光束，Sample Beam；RB 表示對照光束，Reference Beam。(created with Inkscape, October 06 2005, Freiburg i.Brsg., Germany)

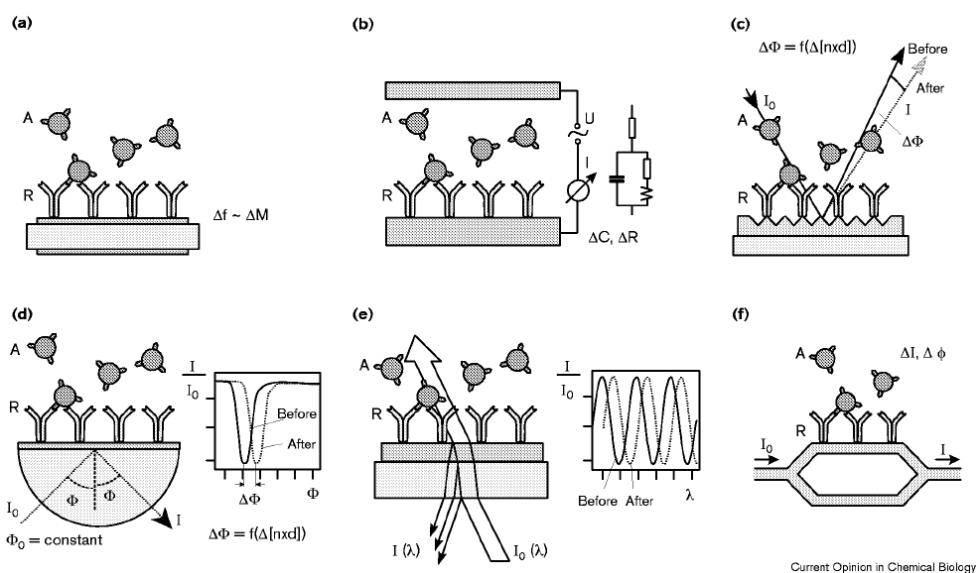


圖 一.6 不同物理量偵測之生物感測器設計[18]

以上所敘述之六種感測計之設計分別為：(a). 石英晶體微天平儀 Quartz crystal microbalance, QCM。(b). 電化學感測器 Electrochemical sensors。(c). 光柵耦合式感測器 (Grating coupling sensors)。(d). 表面電漿共振感測器 (Surface Plasmon Resonance sensors)。(e). 反射式干涉儀 (Reflectometric Interference Spectroscopy, RIFS)。(f). Mach-Zehnder 分光式干涉儀。”A” 表示欲分析物-Analyte。”R” 表示固定的辨識分子-Recognition。” I_0 or I ” 表示光強度-Intensity。●, Y：分別表示抗原與抗體分子

1-4 電化學生物感測器

傳統分析用之生物化學實驗設計多半為昂貴以及耗時的，例如：RIA、ELISA 等，另外

越來越多實驗需求指向非實驗室操作設計，例如：戶外採樣分析、居家遠距醫療、現場 (on site) 診斷等。所以，電化學感測器之低成本、反應時間快速、輕便可攜帶等優勢，加上其高靈敏度、專一性與準確性等特點，使得此類型之感測器漸漸受到實驗室甚至是臨床研究上的青睞。現今電化學感測器應用在生物樣品上的分析上，起始於 1962 年，Clark and Lyons 設計了第一套電化學生物感測器，稱之為” enzyme electrode”，將葡萄糖氧化酵素 (glucose oxidase, GOx) 固定於電極上，量測氧溶解之含量，此一實驗設計後續也被應用在商品化的血糖計上，造福無數需長期追蹤血糖濃度的糖尿病病患 [42]。目前電化學生物感測器已日趨成熟，雖然在發展歷程中還是有數個應用上的問題需要克服，例如：電化學偵測用的氧化還原物質與待測物的干擾、長時間的固定物保存等，但儘管如此，電化學生物感測器已是最具有發展規模的產業與最多臨床分析用的指標性感測器設計。

下圖為目前常見的樣品分析應用，於此我們以電訊號來源的不同，將電化學生物感測器分為電位感測器 (Potentiometric sensors)、電流感測器 (Amperometric sensors) 與電阻感測器 (Impedimetric sensors)。

<i>Measurands</i>		<i>Sensing Substrates</i>		<i>Electrochemical Measurements</i>	Analytic Parameters
Blood Gases	→	Semipermeable Membrane	→	Potentiometric/ Amperometric	
Electrolytes	→	Ionophore	→	Potentiometric	
Metabolites	>	Enzyme	>	Amperometric	
DNA	→	Single Strand DNA	→	Amperometric/ Impedimetric	
Antigen/Antibody	→	Antigen/Antibody	→	Potentiometric/ Amperometric/ Impedimetric	

表格 一.1 常見的電化學生物感測器 [43]

A. 電位感測器 (Potentiometric sensors)

不同的帶電分子，其等電位 (isoelectric point) 不盡相同，對溶液的靜電荷改變也不同；電位感測器即是利用溶液中分子 (例：抗體) 與待測物 (例：抗原) 產生反應後，與發生反應前的電位，作靜電荷的電位偏差 (potential shift) 的紀錄，以此作為生物反應發生的指標訊號，其電位與溫度、酸鹼值及待測物濃度等皆有關係 [44, 45]。

B. 電流感測器 (Amperometric sensors)

電流感測器的原理即是利用待測物在接收到電極表面酵素或其他分子的催化進而產生氧化還原反應，釋放出微電流訊號。而基本上待測物反應濃度在電流操作極限(limiting current operating mode)之前，電流感測器偵測的電流大小與待測物濃度呈一線性關係，以此效應來檢測生化反應的發生[46-48]。下圖為電流感測器之電流傳遞設計之示意圖：

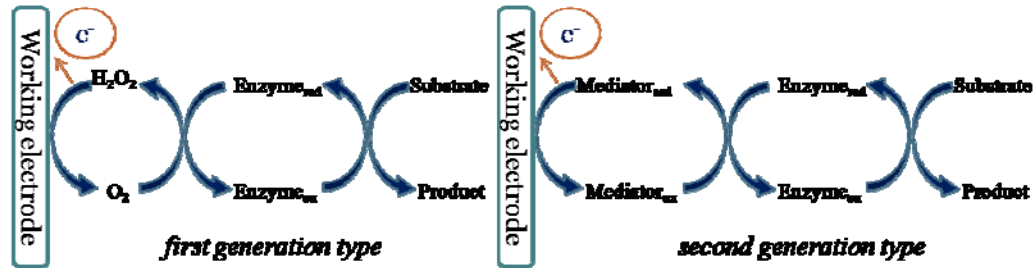


圖 一.7 電流生物感測計之設計原理示意圖

圖左為”一階段產生型”的電流感測器，其設計為當反應物氧化為產物時，表面的酵素吸收電子產生酵素還原態，再將電子釋放至溶液中，使其產生中間態，過氧化氫，其不穩定之中間態再將電子傳遞至電極產生電訊號與氧氣。圖右為”二階段產生型”電流感測器，其與左圖不同處為再固定一可氧化還原之中間物以取代水溶液作酵素電訊號之傳遞。”red”表示酵素分子之還原態，”ox”表示酵素分子之氧化態。圖表重製自參考文獻[43]。

C. 電阻感測器(Impedimetric sensors)

電阻感測計的設計略相同於上述所介紹之電流感測器，不同之處在於電阻感測器操作時，待測物不直接參與氧化還原反應，而是間接的利用緩衝溶液中所添加的電解質金屬離子(detection buffer)作為訊號發生的啟動器，換句話說，緩衝溶液中離子發生氧化還原反應的難易程度，即取決於工作電極上的覆蓋是否緊密[49]。例如，當工作電極表面上之抗體與待測物中的抗原作結合時，其電極上的遮蔽效應較沒有抗原存在時為大，致使緩衝溶液中的金屬離子較難發生氧化還原反應，電阻值較反應前為高，電阻感測器於此原理偵測生化反應的發生。本論文也是使用此種模式探討 Hp 的表現型與濃度。

1-5 奈米金粒子修飾之生物電化學感測器

奈米粒子多定義為尺寸介於 1~100 nm 大小的顆粒性材料，奈米粒子修飾的生物電化學感測器在近年來逐漸應用在商品化儀器上，其中又以奈米金粒子(gold nanoparticles, AuNPs)應用案例最多[50];其原因主要為奈米金粒子提供了一個穩定的固定平台可以讓生物分子(例：抗體)有更多的空間方向自由度(enhanced orientational freedom)，以

利抗體較不受立體障礙(steric hindrance)的影響固定在生物感測器上。再者，奈米金粒子的修飾，提供了更高的面積體積比，使感測器可以在有限的體積內固定更多數目的偵測分子(例:抗體)，提高偵測器的靈敏度[50, 51]，目前所知的此類型(奈米金粒子修飾)感測器的偵測極限可至 0.34 ng/ml(抗原濃度)[52]。另外，金奈米粒子本身也是電子傳遞的良導體，所以不需要再透過中間物(mediator)，即可成為氧化還原反應的電子傳輸通道。最後，奈米金粒子與奈米碳管(carbon nanotubes)[53]，兩者皆是高生物相容系(bio-compatible)的材料，也同樣常見用來修飾生物電化學感測器，但是奈米金粒子的製備與處理則遠遠較奈米碳管來的簡單(利用 HAuCl_4 作還原，見第三章)，一般生化實驗室即可操作，這也是奈米金粒子被廣泛應用的重要原因。

目前常見的奈米粒子修飾電極的方法有三：第一，利用物理吸附的方式，將奈米金粒子噴附在電極表面上，此類型多半為在工業大量製造時的製備方式。第二，利用電極表面的官能基修飾，使其產生帶有官能基之自組裝單層膜(self-assembly monolayer)，將金粒子以金硫鍵的方式固定。第三，利用類似溶膠凝膠(sol-gel)的方式捕捉奈米金粒子，形成帶有金粒子的孔洞性高分子基質，優點為製備快速，化學穩定性高[54]。

1-6 血紅素結合蛋白 (Haptoglobin, Hp)

1-6-1 Hp 結構與基因遺傳表現

A. 蛋白質構型 (Structure)

Hp 巨分子存在於所有哺乳類動物中，但特別的是，人類 Hp 演化出三種不同的表現型(Phenotype)[55]。Hp 中含有兩種不同組成的多肽鏈： β 鏈 (Heavy, 40 kD)與 α 鏈 (Light, α_1 , 8.9 kD; α_2 , 16 kD)[2, 56]。在所有表現型的 Hp 中， β 鏈都是相同的，不同的是 α_1 鏈與 α_2 鏈的組成比例不同與其所造成的幾何構型差異。每一個 α 鏈都會與一個 β 鏈或是另一個 α 鏈利用雙硫鍵結合，但 β 鏈彼此不產生鏈結[3]。依照構型以及組成單位的不同，我們將 Hp 表現型分為下列三種 Hp 1-1、Hp 2-1 與 Hp 2-2。

Hp 1-1 為以 $\alpha_1\beta$ 為組成的雙體(dimer)，亦為體積最小之 Hp，分子量約為 86 kD[2] (此處文獻是以單純胺基酸聚合之分子量數目作計算)。Hp 2-2 是以 $\alpha_2\beta$ 為組成的環狀(Cyclic)結構非均相(heterogeneous)複合體。分子量為 170~900 kD，是三種表現型中分子量最大的一類。Hp 2-1 分子量則介於上述二者，約 86~300 kD，為前後兩個 $\alpha_1\beta$ 單體與中間數個 $\alpha_2\beta$ 組成的線性(linear)巨分子。

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
Structural formula	$(\alpha_1\beta)_2$	$[(\alpha_1\beta)_2 + (\alpha_2\beta)_n]$ (n = 0, 1, 2, ...)	$(\alpha_2\beta)_n$ (n = 3, 4, ...)
Apparent Molecular mass, kDa	86	86-300	170-900
Reference range in serum, g/L	0.57-2.27	0.44-1.83	0.38-1.50

表格 一.2 Hp 三種不同表現型之物理性質與濃度介紹[2]

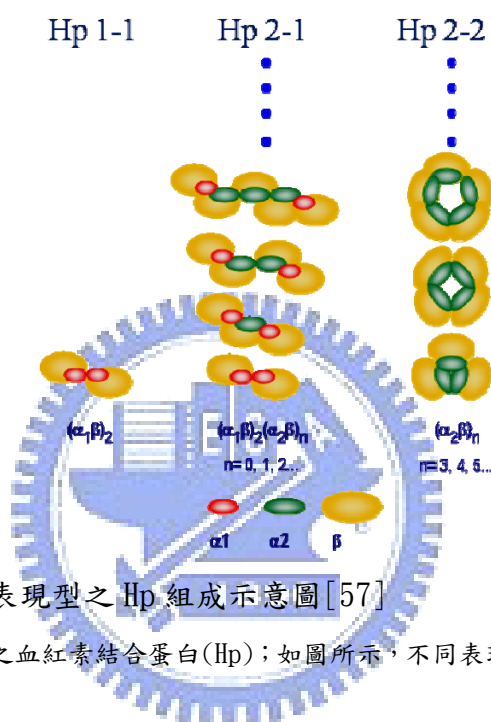


圖 一.8 人類各種不同表現型之 Hp 組成示意圖[57]

上圖所顯示三種不同表現型之血紅素結合蛋白(Hp)；如圖所示，不同表現型之 Hp，其分子構型，分子量，以及組成單位皆不盡相同。

B. 基因遺傳表現 (Genetics)

Hp 中的 α 鏈與 β 鏈為兩處基因位點(Genetic Locus)所控制， α 鏈基因位點位於第 16 號(16q22)染色體上[58]， α 鏈中的 α_1 又可分為 α_{1f} 與 α_{1s} 的差異。而三種不同的 α 鏈控制於三個不同的對偶基因($Hp\alpha_{1f}$, $Hp\alpha_{1s}$ 與 $Hp\alpha_2$)[59]，前兩項對偶基因共稱為 Hp^1 ，第三項稱為 Hp^2 。 α_1 包含有 84 個胺基酸，而 α_{1f} 與 α_{1s} 差別在於第 54 號胺基酸位置組成不同(α_{1s} 為 glutamic acid 而 α_{1f} 為 lysine)[59]。 α_2 組成近似於 α_1 ，但是 α_2 多帶有 α_1 四分之三的胺基酸片斷重複，共帶有 142 個胺基酸。 β 鏈則包含有 245 個胺基酸。

下圖為不同地域與不同人種之 Hp 表現型分佈百分比關係表，可見三類型之 Hp 表現型在人口所占百分比之歧異度非常大[2]。

Population		Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
Caucasians	US (Seattle)	14.4	48.2	37.4
	France (Paris)	15.3	49.7	35.0
Blacks	US (Seattle)	26.4	31.2	38.2
	Liberia	48.7	42.3	9.1
Mongoloids	Japan (Tokyo)	7.4	37.2	35.4
	Taiwan (Taipei)	9.3	37.7	52.9
	Eskimos (Greenland)	6.6	45.9	47.2
				(%)

表格 一.3 Hp 表現型與各人種, 地域分佈之節錄關係[2]

(其人口分布百分比不足 100 者, 肇因為引用文獻中部分樣品訊號難以判斷表現型, 故以 Hp⁰ 作替代。)

1-6-2 Hp 相關之生理功能

A. 抗氧化活性 (Antioxidant Activity)

血紅蛋白(Hemoglobin, Hb)帶有人體中最豐富之鐵離子, 而這些鐵離子與含鐵化合物易形成高反應活性之氧化物對人體造成傷害[60, 61], 例如不正常的血基質(Heme protein)釋放鐵離子會催化對神經細胞膜上的氧化作用, 嚴重會造成中樞神經系統(Central Nervous System, CNS)損傷[62]。另外, 對低密度脂蛋白的氧化作用易會造成血管內皮細胞(vascular endothelial cell)損傷與動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)[62]。因此, 藉由 Hp 與 Hb 之間極強鍵結能力($K_a \approx 1 \times 10^{15}$ mol/L)[63], 可以將人體循環系統中 Free Hb 移除, 避免其產生氧化自由基, 達成抗氧化活性之效果。

B. 避免腎臟傷害 (Prevention of Renal Damage)

Hb 的氧化活性亦會造成腎臟血管間產生紅血球溶解(Hemolysis), 致使腎臟組織損傷。當 Hp 與 Hb 結合後, 複合體積變大以致於無法通過腎小球(Glomeruli), 其後由網狀內皮組織(Reticuloendothelial)系統排出, 避免 Hb 誘發之腎臟傷害[64]。

C. 抗生素特性 (Antibacterial Activity)

組織大量出血與病原菌感染同時發生時, 可能對人體造成致命性的後果。而因為鐵元素為細菌生長的必要元素, 所以當 Hp 存在時, 其與 Hb 的強鍵結能力, 可視為防止細菌生長的抑制劑[65]。在人體肺泡與肺部黏膜中也有相類似的抑菌機制[66]。

D. 抑制一氧化氮反應 (Inhibition of Nitric Oxide)

當活化的巨噬細胞(Macrophage)進行免疫反應時, 會大量分泌一氧化氮(Nitric

Oxide, NO), NO 不但是強烈的血管擴張劑, 過多的 NO 亦會造成血小板聚集與心肌收縮的失衡[67]。當有 Hp 鍵結時, Hb 可調控 NO 的反應活性, 避免血管內皮細胞過度舒張[68]。

E. 前列腺素的抑制 (Inhibition of Prostaglandins)

前列腺素(Prostaglandin, PG)在於生物體內扮演著調節血小板功能的重要角色, 除此之外, 有些 PG, 例如白血球間素(Leukotrienes)會造成體內的發炎反應[69], 同樣的, Hp 與 Hb 的結合可抑制白血球間素的生成, 在人體內抗發炎反應功能上扮演著重要的角色[70]。

F. 血管新生 (Angiogenesis)

血漿中的 Hp 會促進內皮細胞的生長與分化, 是人體內血管新生的重要因子 (Angiogenic factor)與組織修復的重要蛋白質[71]。

G. 免疫系統之調控 (Regulation of the Immune system)

Hp 被發現在體外實驗可調控第一型與第二型輔助 T 細胞(Th1, Th2)的平衡[72], 除此之外, Hp 被發現可抑制 Cathepsin B 與 L 的功能、降低噬中性白血球(neutrophil)的代謝以及降低發炎現象引起的抗體合成反應[73]。也有研究指出 Hp 會抑制單核白血球與巨噬細胞的功能[74]。

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
Hemoglobin binding	Strong	Intermediate	Weak
Antioxidative capacity	Strong	Intermediate	Weak
Inhibition of prostaglandin synthesis	Strong	Intermediate	Weak
Angiogenic effect	Weak	Intermediate	Strong
Agglutination of Streptococcus pyogenes T4	--	Intermediate	Strong

表格 一.4 Hp 生理功能與不同表現型之相關性[2]

1-6-3 傳統檢測 Hp 濃度與表現型之方法

A. 傳統量測 Hp 濃度方法

最初 Hp 濃度檢測的方法是利用與 Hb 結合後, 對於過氧化酵素的活性(peroxidase activity)有不同的反應來作為濃度的判定, 或是與 Hb 結合後造成吸光值的改變, 另外, 檢測未結合的 Hb 濃度也是間接偵測 Hp 的方法[75]。但以上偵測極限都限制在每公升數公克以上。近期, 利用抗體與 Hp 結合的方法, 對其吸光值進行量測, 例如免疫速率散射濁度法 (immunonephelometric) 與免疫濁度檢測法,

(immunoturbidimetric)[70]；是現在實驗室最常用來量化 Hp 之方法。目前市面上已經自動化儀器可搭配使用，可大大縮短分析時間。在較低濃度的情況下，酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunoassay, ELISA)，目前也已被發展用來偵測 Hp 的濃度。

B. 傳統分辨 Hp 表現型方法

目前最準確的表現型判斷法還是建立的膠體電泳(Gel electrophoresis)的分離上，其作法約是利用 Hp 與 Hb 結合用，以 SDS-膠體電泳(Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)分離 [76] 並利用過氧化酵素使其呈色 (peroxidase staining)[77]。另外，基於不同表現型之 Hp，體積大小互異，致使其在膠體內擴散速率不同的原理所發展出之輻射性免疫擴散法 (Radial Immunodiffusion, RID)[78]，此方法依舊受限於 Hp 濃度的差異，尚待解決。

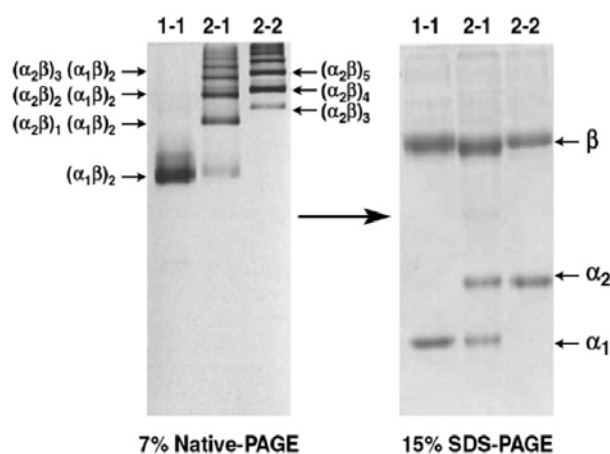


圖 一.9 利用膠體電泳分辨不同表現型之 Hp[57]

該文獻中作者先以 mAb-based affinity column 以及 superose-12 管柱作 HPLC 純化後作 7%的 Native-PAGE，圖中可藉由三種表現型之次單位分佈以辨識 Hp 之不同表現型；上圖右利用 2-mercaptoethanol 將雙硫鍵還原作 15% SDS-PAGE 分離，可以 α_1 與 α_2 的位置來分辨不同表現型之 Hp，例如 1-1 只帶有 α_1 位置 band，2-2 只帶有 α_2 位置 band，而 2-1 則是兩條訊號皆有。

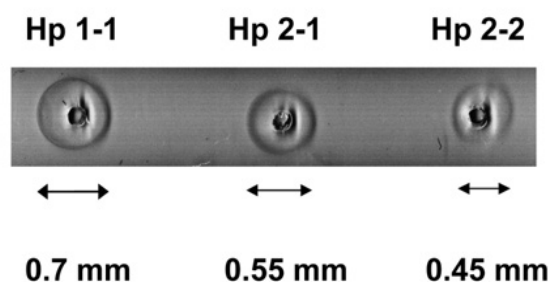


圖 一.10 利用免疫擴散法分辨不同表現型之 Hp[57]

該文獻中作者利用 1.5% agarose gel 加上體積比 1% 的 Hp 抗體，加入 Hp 樣品後帶其擴散 48 小時，以擴散圖譜直徑大小分辨不同表現型之 Hp。1-1 分子量，立體構型皆最小，擴散最容易，直徑最大；2-2 分子量，環狀結構大，擴散不易，直徑最小。

1-6-4 Hp 濃度異常所代表之臨床意義

不正常的 Hp 濃度上升可能肇因於發炎反應、皮膚外傷(trauma)、燒傷以及腫瘤(tumors)等。舉例來說，人體內發生發炎反應的四至五天內，Hp 濃度大量上升，約持續至致病原因(causative agent)消除後的兩個禮拜為止。另外，在急性心肌炎的初期(initial phase of acute myocardial infarction)，也常可見到 Hp 濃度的異常增大[3]。

低濃度 Hp 案例可能發生於血球溶解(hemolysis)、營養失調(malnutrition)、造血失敗(ineffective erythropoiesis)、肝細胞異常(hepatocellular disorder)、妊娠晚期(late pregnancy)與新生嬰兒等案例上[3, 79]。另一方面，在對花粉(pollens)、塵蟎(house dust mite)過敏與過敏性鼻炎(rhinitis)、過敏性氣喘(allergic asthma)等體內高濃度 IgE 抗體反應之案例中，可發現其 Hp 濃度低於一般成人標準[80]。此外，在 Hp 引起之中樞神經系統傷害(CNS damage)的案例中，發現其與極低的 Hp 濃度以及家族性癲癇病史(seizure in familial idiopathic epilepsy)有極高的相關性[81]，其中詳細作用機制仍是未知，但若能及時檢測追蹤 Hp 之濃度則可以藥物控制避免發病。

1-6-5 Hp 表現型相異性導致之不同病理結果

S. M. Sadrzadeh *et al.* 在 2004 年 Am J Clin Pathol 的 review 文章中，將與 Hp 表現型關係的疾病分為下列幾項[3]：

A. 心血管疾病 (Cardiovascular disorders)

探討 Hp 表現型與冠狀動脈疾病關聯性的研究以行之有年，目前，2-2 表現型為一處理心肌梗塞(myocardial infarction)的獨立指標[82]，在案例中，2-2 表現型被發現明顯的較其他表現型 Hp，對於該疾病有較嚴重的與較廣泛的心肌傷害程度

[83]。另外，在冠狀動脈繞動手術(coronary artery bypass graft surgery)的研究中，2-2 表現型者的術後存活時間也較其他類型短，預料其影響與抗氧化活性有關聯[84]。在高血壓的研究方面，2-2 表現型者，被發現其膽固醇濃度統計上較其他表現型為高，也有研究指出其需要較多組合的抗高血壓藥物來控制血壓，也有較大的風險演變為頑固性高血壓(refractory hypertension)。相對的，1-1 表現型在高血壓所引發併發症的機率是最低的[85, 86]。

B. 糖尿病 (Diabetes)

研究推論，因為 1-1 表現型者其 Hp 有較高的抗氧化能力，所以有較大機率可避免產生糖尿病型血管併發症(diabetic vascular complication)[87]。Hp 表現型也常常被用來作為預測冠狀動脈血管疾病(coronary vascular disease)的指標，相較於 1-1 表現型，2-2 表現型據統計有五倍的機率，容易罹患冠狀動脈疾病[88]。另外 1-1 表現型者也較不容易產生冠狀動脈支架置放術(coronary artery stent implantation)後再狹窄(restenosis)[89]。2-2 表現型之 Hp 也被發現與糖尿病型腎病(diabetic nephropathy)的成因有很大的關係[90]。

C. 血液疾病 (Hematologic disorders)

研究指出，2-2 表現型者有較多視網膜出血與剝離(retinal hemorrhage and detachment)的案例[91]，相反的，1-1 表現型則有較多鐮刀型貧血症(sickle cell disease)、骨髓性白血病(myeloid leukemia)、淋巴性白血病(lymphoid leukemia)的案例[2]。

D. 感染性疾病 (Infectious diseases)

2-2 表現型者，相較於其他表現型之 Hp 有較高的肺結核病菌(tuberculosis)致死率與感染率[92]；HIV 患者血漿中，也較其他表現型者有較高之 HIV-1 RNA 濃度，以致其對於愛滋病生存機率最低[93]。另一方面 Hp 表現型對於接種疫苗的免疫效果也有不同的影響，舉例來說，2-2 表現型對於 B 型肝炎(hepatitis B)疫苗的抗體反應濃度較其他表現型低[94]，但對於傷寒(typhus)與破傷風(tetanus)疫苗則有相對較強的抗體反應[2]。

E. 惡性腫瘤 (Malignant neoplasm)

1-1 表現型者被發現有較高機率罹患乳癌與子宮頸癌(cervical carcinoma)，2-1 表現型者則被發現與家族性遺傳卵巢癌(ovarian carcinoma)病史有高相關性[95]。另一方面，2-2 表現型者則有較低罹患膀胱癌(bladder carcinoma)與肺腺癌(adenocarcinoma of the lung)的機率[2]。

F. 婦產科學 (Obsterics and Gynecology)

2-2 表現型者，有較多妊娠引起之高血壓案例[3]。此外 1-1 表現型婦女則被發現有較高機率發生停經後骨質疏鬆症(postmenopausal osteoporosis)[96]。也有研究指出 1-1 表現型婦女在年輕時相較於其他表現型婦女有較高生育率[97]。

G. 神經學疾病 (Neurologic disorders)

近期研究指出，2-2 表現型與自發家族性癲癇病(idiopathic familial epilepsy)患者的發作(seizure)有極大的相關性(67% vs. 35%：2-2 表現型在該研究所占的比例)[98]，另外 2-2 表現型者在精神分裂症 (schizophrenia)，神經疾病 (psychoses)，酗酒及濫用藥物上，都有較高的比例[99]。也有研究指出，帶有 Hp¹ 基因者，較少患有阿茲罕默型失智症 (dementia of Alzheimer type) 的案例[100]。

Disease type	Specific condition	Hp type or Hp ¹ frequency			
		1-1	2-1	2-2	Hp ¹
Cardiovascular disorders	Coronary heart disease	--	--	--	↑
	Peripheral arterial occlusive disease	--	--	↑	↓
Diabetes	Type II diabetes	--	--	↑	--
Cancer	Cancer of the ovaries	—	↑	↓	↑
	Lung cancer	—	—	↑	↓
Infection	Chronic hepatitis C	↑	--	↓	
	Falciparum malaria	↑	↓	↓	
Liver disease	Cirrhosis	↑		↓	↑
Hematologic diseases	Acute myeloid, lymphoid and myeloid leukemia	↑	--	--	--
Mental and neurological disorders	Unipolar major depression	↑	↑	↓	
	Schizophrenia	↓	↓	↑	↓

表格 一.5 Hp 表現型與相關連疾病之節錄簡表[101]

表格 一.5 中，↑：表示有正相關性，↓：表示有負相關性，--：表示沒有明顯影響，空白處則為未知。

綜合章節 1-6 所述，肇因於人類 Hp 的基因型差異，致使人類特有三種不同 Hp 表現型；而 Hp 又與人體內各類生理功能有相關，尤其是心血管與糖尿病相關的疾病。不同的 Hp 表現型與異常的 Hp 濃度，將有不同的臨床結果與生理反應。傳統的分類與定濃度的方法費時費力，人為操作變因大，如此則顯現出發展 Hp-BEA 之重要性。

第二章 實驗策略

2-1 Hp-BEA 之實驗設計

此實驗乃利用不同表現型 Hp 之分子量與構型的歧異，對於工作電極(金電極)所造成不同程度的遮蔽效應，以 Detection Buffer (Redox probe, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) 之氧化還原難易程度對不同表現型之 Hp 作快速的判定。其實驗設計示意圖如下：

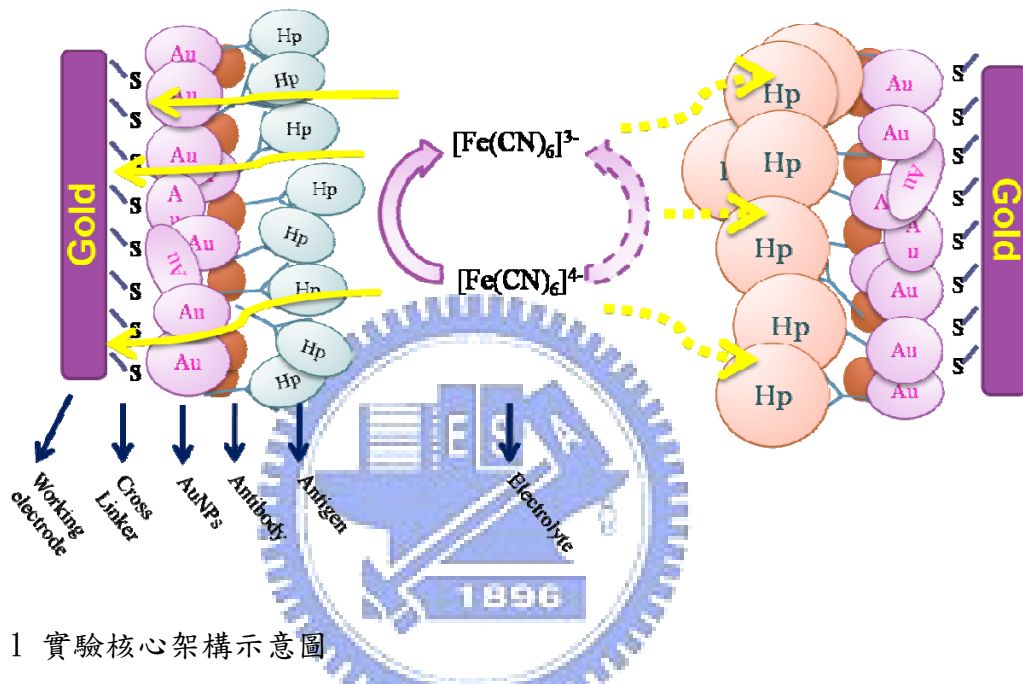


圖 二.1 實驗核心架構示意圖

將工作電極作官能基修飾，使其可以接上金奈米粒子以增大感測器之反應面積，再將抗體以硫金鍵的方式接上金粒子，加上 Blocking reagent(橘色)，以確保抗原(Hp)只會與抗體產生反應，而不會與金奈米粒子產生非專一性鍵結。另一方面，相同各數不同表現型之 Hp，因其分子量與構型大小不同，對於電極產生的遮蔽效應也會不同，本實驗利用 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ，作為氧化還原指示劑(Redox probe)，以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 所產生的電流與相位的不同，求得不同的電荷傳遞電阻值(Charge transfer resistance, R_{ct})，以判斷不同表現型之 Hp。

2-2 Hp-BEA 之實驗總流程

此實驗始製備至得到訊號之流程簡述如下：

步驟一： 製備工作電極，以漸進式機械研磨方式使表面光滑無刮痕，並在超

音波震盪器中以二次去離子水→無水酒精→二次去離子水之順序清洗金電極表面(詳見章節 4-2-1)。



步驟二: 將工作電極放入稀硫酸中,以循環伏安法進行化學研磨,清洗並檢驗金電極表面是否乾淨無雜質,表面金相是否規則排列。至於二次去離子水中清洗稀硫酸之殘留(詳見章節 4-2-2)。



步驟三: 將工作電極表面進行官能基之化學修飾,產生自組裝單層膜,浸置於奈米金溶液中行奈米金粒子修飾後,依序接上待測物之抗體與遮蔽劑,完成待測電極的官能基修飾(詳見章節 4-3-1 與 4-5-1)。



步驟四: 將表面修飾過之電極浸置至待測物(抗原)中使其產生抗原抗體專一性結合,使用緩衝溶液清洗電極表面,以去除非專一性之附著,接下來至於電化學反應槽中,測量其電流與電阻(詳見章節 4-6 與 4-7)。



步驟五: 將所得之實部電阻,虛部電阻與頻率之關係數據,輸入至電阻分析軟體中,選定相對等效電路進行模擬,求得各電阻電容值。



步驟六: 將相對電阻值訊號對不同表現型,不同濃度或不同反應時間等操縱變因之抗原樣品作圖,得最終實驗數據。

第三章 實驗原理

3-1 循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV)

對於不同之分析物，其分子軌域與能階變化均不盡相同，亦即其氧化還原電位也不盡相同。循環伏安法主要藉由其對可氧化還原物(redox probe)施加一偏壓(bias)後，藉由工作電極提供一三角波形的電位掃描，當電位掃描到一特定的伏特數時，溶液中開始發生氧化或還原反應的現象產生，偵測其電流的變化並作圖，藉由改變電位與電流變化的關係圖，可以得到相關電化學資訊。電流的產生，主要是由於電子轉移所造成的，因此對於不同的分析物而言，發生反應的電位也有所不同。另外，使用相同氧化還原物而工作電極表面狀況不同時(例：電極表面修飾官能基)，其發生反應的電位與電流也會有所不同，並且對應電極表面的穩定度而有可逆與不可逆的反應差異。而循環伏安法之原理，則是藉由工作電極提供一三角波型式的電位掃描，當電位掃描到一特定的伏特數時，溶液中開始發生氧化或還原反應的現象。

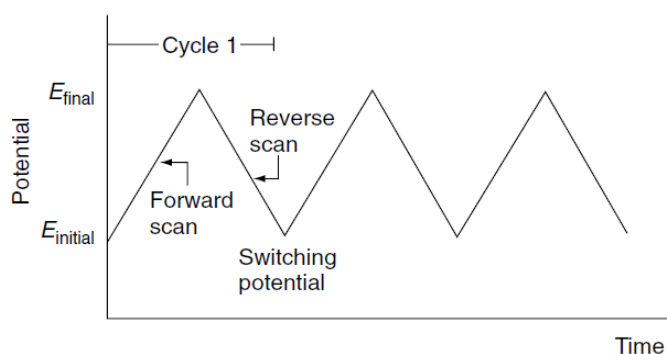


圖 三.1 循環伏安法中電位與時間變化之示意圖[102]

得到的電流電壓對應曲線，包含兩個分支，如果上半部分電位改變向陰極方向遞增，氧化還原物質在電極上還原，產生還原波，下半部分電位元向陽極方向遞增時，還原產物又會重新在電極上氧化，產生氧化波。因此一次三角波型的電位掃描，完成一個還原和氧化過程的循環，故該法稱為循環伏安法，其電流電壓曲線稱為循環伏安圖。

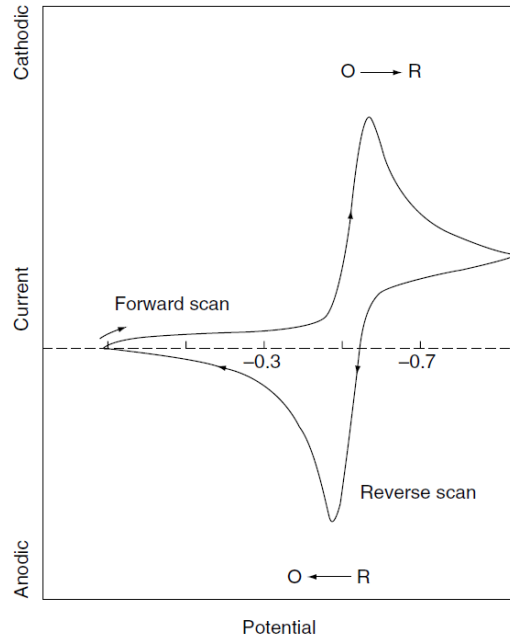


圖 3.2 典型 $O + ne^- \rightleftharpoons R$ (可逆氧化還原反應) 循環伏安圖(美式)範例[102]

圖中下半部分為陽極(Anode)發生之氧化反應，將氧化還原物質(Redox probe)由還原態釋出電子流變為氧化態，故電流增大且為負；當大部分氧化還原物質皆轉變為氧化態後，電子流強度漸漸變小至接近零，此時反轉電位方向，將氧化態還原，即完成一循環伏安圖週期。

根據循環伏安圖中峰電流(i_p)、峰電勢(E_p)及電位差(ΔE_p)和掃描速率(v)之間的關係，可以判斷電極反應的可逆性。當電極反應完全可逆時，在 25°C 下，這些數據可用 Randles-Sevcik equation 解釋[102, 103]:

$$i_p = 0.4463 \frac{n^{3/2} F^{3/2}}{R^{1/2} T^{1/2}} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \approx (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2}$$

n 為參與反應之電子數， F 為法拉第常數(Faraday' s constant, 96485 C / mol)， R 氣體常數(8.314 J / mol K)， A 為電極表面積(cm^2)， T 為絕對溫度(k)， C_0 為氧化反應物質之濃度(mol/cm^3)， D_0 為擴散常數(cm^2/s)，and v 為掃描電壓改變速率(V/s)。

另外，
$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} \text{mV} \rightarrow \text{at } 298^\circ \text{K}$$

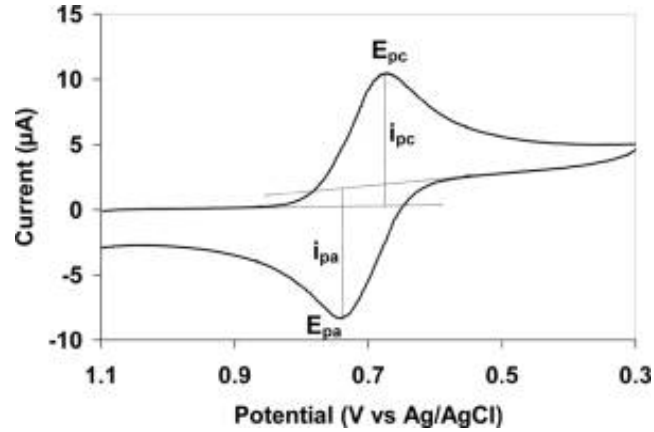


圖 3.3 循環伏安法中峰電流與峰電位之表示圖(美式)

循環伏安圖中，通常以峰電流(i_p)、峰電位(E_p)之變化來表是每個階段電極的化學修飾情形，其中 i_{pc} 、 E_{pc} 用以表示陰極(cathode)的峰電流、電位值；同樣的， i_{pa} 、 E_{pa} 用以表示陽極(anode)的峰電流、電位值。其電流變化值計算與氧化反應方向有關。

另外，依據對循環伏安圖座標軸定義的不同，常見有以下兩種不同的作圖格式，其一為”American style”其將工作電極(陽極, anodic)產生的電子流以其電性定義為負電流，且電壓向”左”加大使得循環伏安圖下半部的氧化反應發生，此類型表現優點為符合電子流的通用定義為：負(-)。相反的，依據”國際純粹與應用化學聯合學會(IUPAC)”的定義，其將陽極反應所產生的電流定義為正(+)，上半部循環伏安圖像”右”增大電壓使得氧化反應發生，以符合一般對於作標 X 軸右邊為大，左邊為小的觀念。

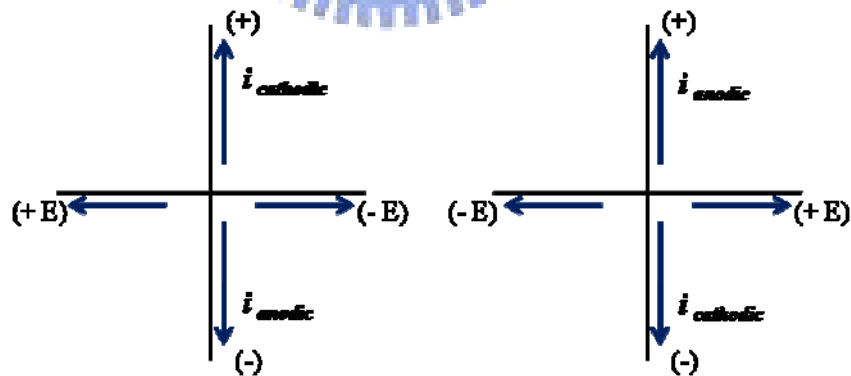


圖 3.4 美式(左) 與 IUPAC 式(右) 循環伏安圖表示法[103]

3-2 Randles' 等效模擬電路 (Randles' Equivalent Circuit)

電化學反應之物理量(訊號)通常可用數個電阻與電容表示之，Randles' 等效模擬電路為最常用來解釋簡單電化學反應系統的模擬方式[104]，其中， R_{ct} 為電極表面氧化還原反應產生之電荷傳遞阻抗(charge transfer resistance)，其數值與電荷傳遞速率成

正比； C_{dl} 為電雙層的電容值(double-layer capacitance)，表示電極表面上儲存之電荷量； R_s 為溶液項的阻抗值； Z_w 則為 Warburg impedance，其代表電極表面與溶液之間產生的擴散效應所產生的阻抗值[53]。其電路配置如下圖。

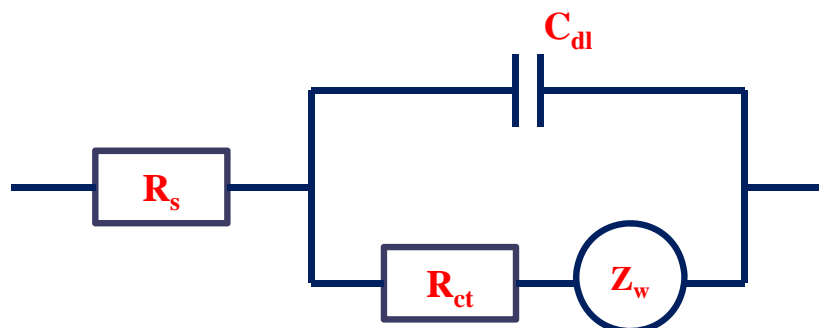


圖 3.5 一簡單電化學系統之 Randles' 等效模擬電路圖

以標準 Randles' 等效電路圖來模擬電化學反應槽之各種物理量，其中 R_{ct} 為工作電極之電荷傳遞阻抗； C_{dl} 為電雙層的電容值，上述兩者經常被用來作為感測器之觀察物理量； R_s 為溶液相的阻抗值，電解質環境中通常極小； Z_w 則為 Warburg impedance，表示電極表面上的擴散效應，通常在 EIS 頻譜的低頻區可以觀察到。

3-3 電化學阻抗頻譜 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)

電化學阻抗頻譜 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)，長期被用來研究各類型的電化學系統，例如：腐蝕效應 (corrosion)、電解沉積效應 (electro-deposition)、電池 (batteries) 與燃料電池 (fuel cell) 等。在 1980 年代後期，EIS 方法漸漸被應用於生物偵測之上，其主要原因為利用電阻抗的差異不但可取代傳統的螢光標定 (fluorescence dyes) 與放射物標定 (radioactive labels) 的方式亦可取代氧化還原物質的固定 (為電流式偵測器之必要步驟)，成為一不需標定 (label-free) 物的偵測方式。其中原理為利用一微小的 (2~10 mV) 正弦波交流電訊號 (sinusoidal AC voltage) 擾動作為偵測電壓，量測系統反應之電流訊號。

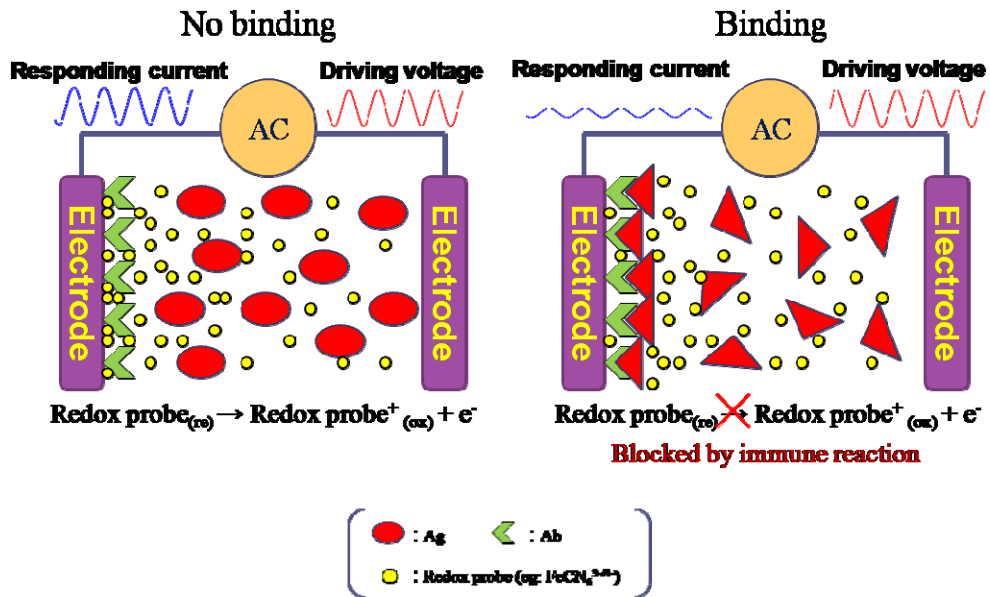


圖 三.6 以 EIS 原理設計之生物感測器示意圖

從以上標準示意圖中得知，當電極表面產生抗體抗原結合反應時，電極的電阻、電容產生變化；此時，輸入的擾動電壓會得到與沒有產生抗原抗體結合反應時之不同(電流大小、相位差)反應電流。

已知電阻遵守歐姆定律(ohm's law, $E=IR$)，但在交流電系統中($\text{frequency} \neq 0$)，則下列關係式成立($E=IZ$)，其中 Z 表示為阻抗，阻抗與電阻都代表著抗拒電流的能力，在直流電下稱為電阻，全部稱為阻抗。所以輸入一電壓隨時間變化的函數可得一電流隨時間變化之含數，其比值即為 Z 值如下[1, 53]：

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft + \varphi)}$$

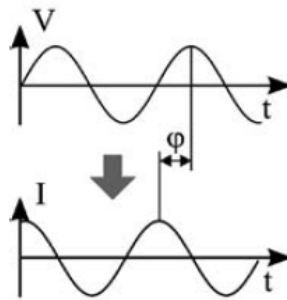


圖 三.7 EIS 電壓電流變化之相位差示意圖[1]

電極表面有電容效應時時，輸入的擾動電壓會得到不同相位(φ)的電流反應。

其中 V_0 與 I_0 分別代表電壓與電流的最大值， f 為偵測頻率， φ 為相位差(phase)

shift), 其 Z 值於向量坐標平面上表示時, 可將 in-phase(x 軸) 電阻反應(R , resistive) 視為實部(real component) 電阻(Z_{re} , Z_R), 而 out-of-phase(y 軸) 的電容反應(C or C_d , capacitance) 可視為虛部(imaginary component) 電阻(Z_{im} , Z_I)。

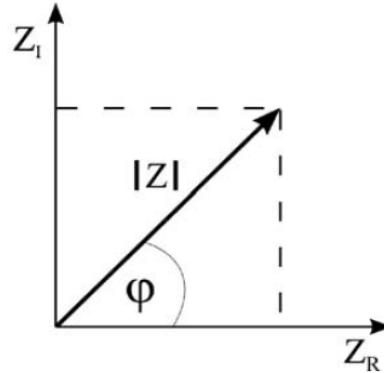


圖 三.8 EIS 阻抗與相位差之向量圖表示[1]

Z_R 表示實部電阻, Z_I 則表示虛部電阻

Impedance element	Definition	Phase angle	Frequency dependence
R, ohmic resistance	$z=R$	0°	No
C, capacitance	$Z_c = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Yes
CPE, constant phase element	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^a}$	$0-90^\circ$	Yes
W, Warburg impedance	$Z_w = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$	45°	Yes

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_1 C_1}} + \frac{1}{\sqrt{D_2 C_2}} \right)$$

表格 三.1 阻抗元素之定義與其物理意義[1]

ω 為角速度(rad/s); j 為虛數相的向量值; CPE 可視為不理想之電容值(imperfect capacitor); A 為阻抗(Z)之倒數; a 表示複數平面之角度, 定義為 $-(90^\circ * a) = \varphi$; σ 為 Warburg coefficient: 其中, D 為擴散常數(diffusion coefficient); C 表示為濃度(bulk concentration); 下標 R 與 O 分別表示還原態與氧化態; R 為氣體常數; T 為絕對溫度; F 為法拉第常數; n 為其當量。

綜合以上物理量之定義與推導, 可得實部電阻與虛部電阻如下列方程式所示[103]:

$$Z_{\text{cell}} = Z_{\text{Re}} + jZ_{\text{Im}}$$

$$Z_{\text{Re}} = R_{\Omega} + \frac{R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-1/2}}{(C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

$$Z_{\text{Im}} = -\frac{\omega C_d (R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma\omega^{-1/2} (C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)}{(C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{\text{ct}} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

另外，將實部電阻與虛部電阻以複數平面表示時，可得 EIS 常使用之表示法：極座標圖示法(Nyquist plot, polar plot)[1, 102, 103]，可得各 Randles' plot 所標示之物理量：

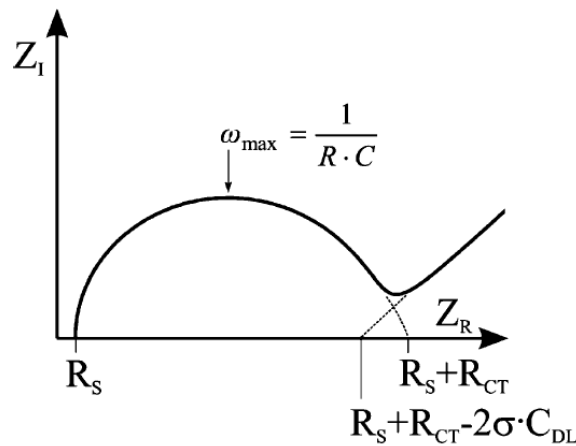


圖 三.9 標準 Nyquist plot 表示法與其代表之物理量

由 Nyquist plot 之 x 軸截距即可得知溶液之阻抗(R_s , R_{Ω})，在半圓形之頂點對照頻率值可求得電容值(C , C_d , C_{dl})，再者，由半圓圖形之直徑可求得 R 值($R_s + R_{ct}$)，最後於低頻區可求得 Warburg Coefficient。

3-4 微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

蛋白質摺疊通常是由高構型能階態往低構型能階態進行，大部分自然態的蛋白質，皆處於構型能量最低態。所以接近自然結構的蛋白質，對熱的穩定性就越高。加熱使蛋白質變性，可觀察其三級結構的穩定性。加熱會使蛋白質產生變性，也就是形成相變，蛋白質變性後，其比熱會發生變化。我們利用微溫差掃描熱卡路里計 (Differential Scanning Calorimeter) 觀察蛋白質的比熱變化，即可得到蛋白質對熱的穩定性。微溫差掃描熱卡路里計可分為熱流式 (Heat flux DSC) 與熱補償式 (Compensation Calorimeters) 兩種，熱流式是對樣品端 (sample) 及參考端 (reference) 提供相同

的功率的能量將兩端同時加熱，當樣品達到相變點時，會吸收或釋放出額外的熱量，使得兩端溫度產生了溫度差，再使用熱電偶（thermocouple）將此溫度差轉換成熱量差，由此計算出樣品的相變點以及比熱變化。而補償式的則是提供不同功率的熱量，去維持樣品端以及參考端的溫度相同，根據所提供的熱量不同，也可以計算出樣品的相變點及比熱變化[105]。本實驗所使用儀器為 CSC 公司所出產的 N-DSC-II (Lindon, UT, USA)，可測量的溫度範圍從 -10°C 到 130°C ，升溫度速率可從 $0.125^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；cell 容量為 0.33ml ；靈敏感為 $0.2\mu\text{cal}$ 。

3-5 動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering, DLS)

雷射光射入含有懸浮粒子的溶液中時，雷射光因粒子而產生散射光，散射的雷射光會隨時間改變，再由散射光的變化計算出平均粒徑大小。因為粒子所處的環境並非絕對零度，本身含有動能而進行布朗運動 (Brownian Motion)，粒子大小不同會造成不同的擴散運動，因為粒子隨時在移動而相對位置不斷變化，各個粒子的散射光互相干涉也隨時在變化，因此散射光強度也隨時間在變化，粒子越小，擴散運動速度越快，粒子越大，擴散運動越慢，利用雷射光穿透溶液時，粒子會產生散射光，粒子因為大小及位置的不同，產生的散射光到達檢測器時會有光程差。不同時間粒子位置會改變，散射光也跟著改變，可利用 Stokes-Einstein equation 可計算出粒徑大小[106]。

3-6 自組裝單層膜 (Self-Assembly Monolayer, SAM)

如何將生物分子固定至感測器表面之上，已達到偵測目標物之目的，為一生物感測器之關鍵製備步驟。奈米技術的多樣性發展對於生物感測器有相當大的助益[9]，其中，利用自組裝單層膜 (self-assembly monolayer, SAM) 技術用以固定欲修飾之生物分子，為最為重要的製備方法[107, 108]，此技術之特點為[109]：(1) 單分子層厚度約數十個 Å，(2) 單分子曾以化學共價鍵為其鍵結力，(3) 單分子層排列緻密且具有方向性，(4) 可依不同基質或不同待測物更換單層膜之官能基作應用。其作用原理與方是多是藉由將電極置於硫醇或矽烷類之中，藉硫醇與白金、金、銀、鎳等的化學吸附作用，或矽烷於表面氫氧根(-OH)間的化學鍵結，而形成一單分子層。又此類型反應在熱力學上屬於自發性反應，故形成之單分子層稱為”自組裝”單層膜。

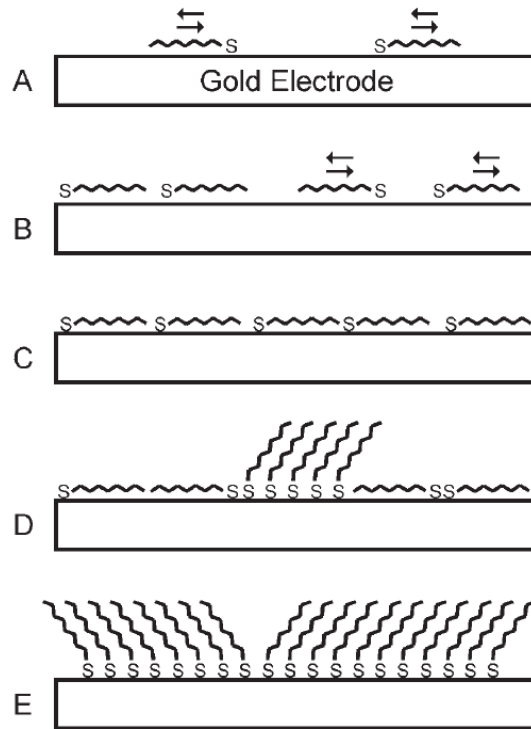


圖 三.10 硫醇烷鏈分子於金電極表面之反應機制示意圖[110]

如圖所示，分子因為受熱力學的驅動，在低濃度時，烷鏈分子平鋪於電極上，並且隨意移動，但當濃度漸漸提高時，其分佈位置逐漸固定，待其濃度更高時，烷鏈分子欲尋求更高的穩定性便直立排列於電極上；由此示意圖可知，當硫醇烷鏈分子濃度過量時，即可視為其可直立排列於電極上修飾。

SAM 技術始於 1946 年 Zisman 發現長鏈胺類可以吸附在白金上，1980 年代後始有大量文獻指出長碳鏈硫醇分子與雙硫醇分子穩定的鍵結於金分子表面[111, 112]。

Molecule	Electrode material
RSR'	Au, Ag, Pt, Cu, Hg
RSSR'	Au
RSR'	Au
R ₃ P	Zr
RNC	Au, Pt, Cu
RCOOH	Ag, Al ₂ O ₃
R(OArClI(NIL₂)₂)₂	Au
Silanes	Hydroxlyated surfaces
RSiCl₃, RSi(OR)₃	SiO₂ glass

表格 三.2 SAM 常見之配位分子與其基材[113]

此處 R 表示長烷鏈(Alkane)；Ar 表示芳香類(Aromatic)；Silane 則是指矽烷類(SiH₄)

SAM 技術可歸納為三個部分[114]，分別為與基質鍵結的接觸分子(Head group):此類型分子以共價鍵結鍵結於基質表面上，以硫醇吸附於金電極表面上而言，S-Au 的鍵結強度約為 40~45 kcal/mol。烷基碳鏈(alkyl chain):連接接觸分子與官能基分子的部分，通常為烷基組成之長鏈，烷基碳鏈間產生的凡得瓦力約小於 10 kcal/mol，故接觸分子可不受影響。官能基分子(functional group, terminal functionality):此端為官能基最具變化性的部分，常見的鍵結官能基為-CH₃、-COOH、-NH₂、-OH 等，多用來與生物分子或是奈米金屬粒子作鍵結。

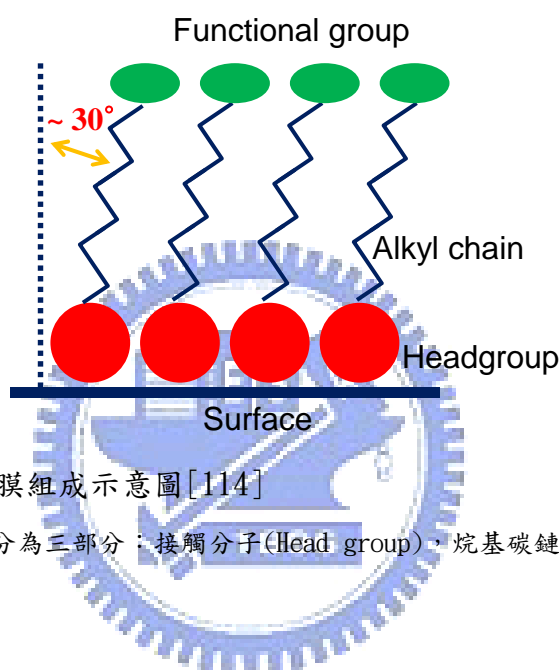


圖 三.11 自組裝單層膜組成示意圖[114]

一般自組裝單層膜組成可分為三部分：接觸分子(Head group)，烷基碳鏈(Alkyl chain)與官能基分子(Functional group)

SAM 技術應用中以 Au (111) 為最常見之工作電極，上述之 Alkylthiol 會形成 $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ 的結構[103, 115]，見圖表四.5，實心圓表示硫原子，空心圓代表金原子。

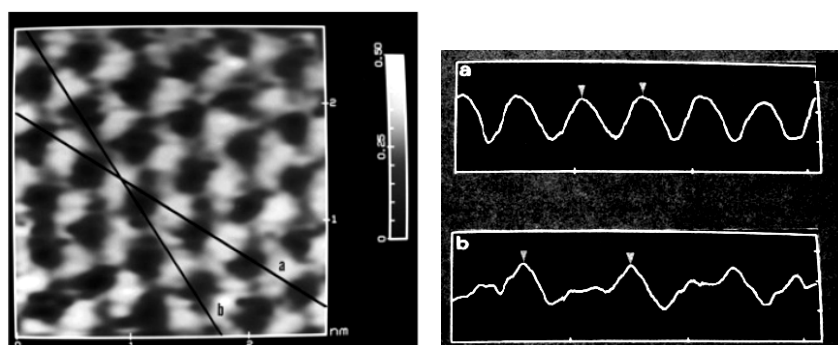


圖 三.12 乙硫醇(ethanethiolate) 鍵結於 Au(111) 之掃描穿隧式(STM)顯微圖[115]

圖中白色影像為硫醇分子；上圖右則為其截面圖。

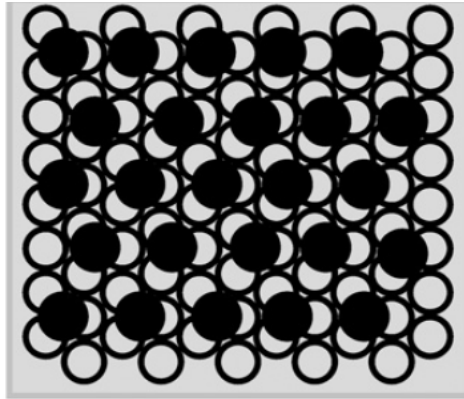


圖 三.13 硫醇分子單層膜與金表面排列之示意圖[115]

黑色圓圈為硫醇分子，空心圓圈為 Au(111)之表面



第四章 實驗步驟

4-1 自製三電極電化學反應槽

傳統二電極的量測系統測定了工作電極(working electrode, WE)與輔助電極(counter electrode, CE)之間的電壓-電流訊號，為了瞭解工作電極是在何種電位下進行反應，這時即會加入另一電極，稱作參考電極(reference electrode, RE)，作為量測氧化還原反應的基準電極，即稱為三電極量測，其個別功能皆有所不同，輔助電極主要是與工作電極形成一迴路，因此其面積通常都要比工作電極大上許多，使得電化學反應之電子都能經由此迴路作為傳遞，本實驗使用穩定性高的白金線作為輔助電極；參考電極主要為提供一基準電位，故其電位不隨電流增大而有所改變，目前常使用的參考電極有 Ag/AgCl, H₂(Pt), SCE 等，本實驗使用前者(Ag/AgCl)作為標準電極[102, 116]，其方式為利用銀線浸泡至漂白水，使其表面反應為 AgCl，並將銀線插入至玻璃毛細管內；將玻璃管內注入 3N KCl，前端並以 5% 的 agarose 封口，作為與電解液接觸的介質。其實驗配置如下圖：

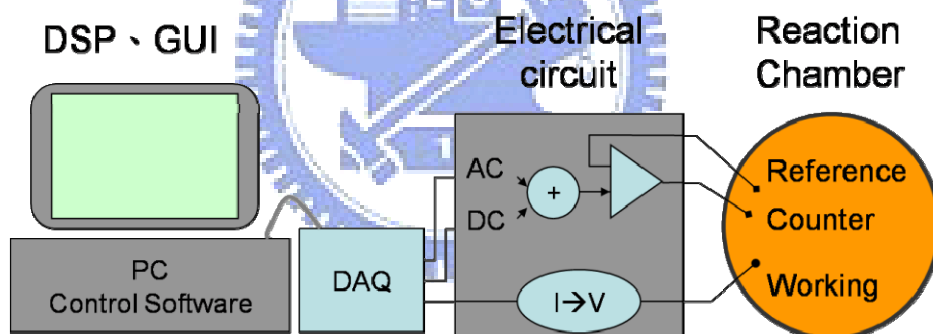


圖 4.1 實驗室自製之三電極反應槽之配置圖

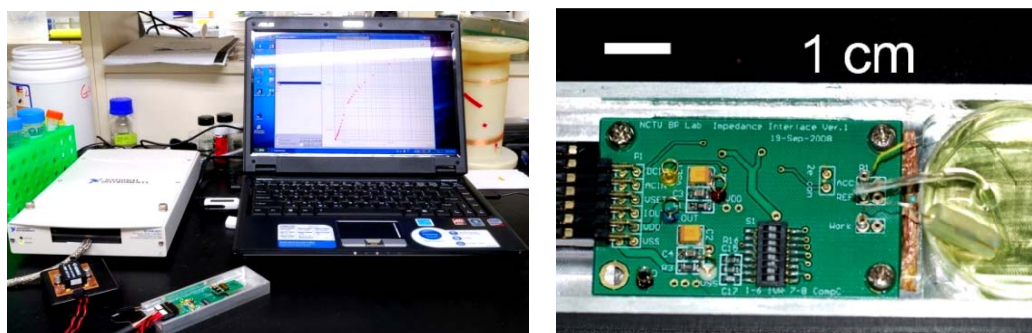


圖 4.2 實驗室自製之三電極反應槽之實體相片

4-2 工作電極之研磨與清洗

工作電極(Working electrode, WE)之製備分為電極灌模組裝(molding)、機械研磨、化學研磨(polish)與章節 4-3 所介紹之官能機修飾(surface modification)等步驟。



圖 4.3 工作電極之製備步驟

4-2-1 金電極組裝與機械研磨

步驟一： 取 0.5 公分長、純度 99.99、直徑 0.5 公釐之金線約與約 3 公分長之銀線(或銅線)以薄銅環相連接，並以三用電錶測試電流是否可導通。將製備之電極置入直徑約 1.3 公分之鐵氟龍模具中，下端固定。

步驟二： 以三比一之比例配製編號為 174 之壓克力樹脂(AB 膠形式)，充分混合，去除產生之氣泡後，灌入上述所說之鐵氟龍模具，放入真空反應槽中。

步驟三： 將反應槽抽高真空至約 1×10^{-5} pa，去除未反應之高揮發性溶劑，中間反覆真空破真空以抑制氣泡凝固成型，約 30 分鐘後回復常壓，加熱至攝氏 85 度約 120 分鐘，使其固化。退出模具取出電極備用。

步驟四： 將金電極表面先依序使用 2000、3000 目水砂紙(Silicon Carbide)作初步拋光，以超音波震盪器清洗殘餘粉末後，使用八吋鑽石砂紙依 10、5、3、1 毫微米(μm)尺寸研磨之，各約 15 分鐘，再次以超音波震盪器清洗，最後使用研磨用絨布配合 0.3、0.05 毫微米(μm)進行細部拋光，各約 30 分鐘。電極以二次水，無水酒精，二次水之順序震盪清洗備用之，或充填氮氣保存。

4-2-2 金電極之化學研磨

步驟一： 將上述經過機械研磨清洗過之金電極，至於三電極反應槽之中。加入約 3 ml 之 0.5 M 稀硫酸(H_2SO_4)。



步驟二： 設定掃瞄電壓範圍為 0~+1.6 V，掃描速率為 100 mV/sec。



步驟三： 以循環伏安法的方式反覆循環約 15 次，藉由硫酸的氧化能力清洗金電極表面，使得表面雜質藉由金電極的氧化還原反應而脫落。



步驟四： 檢測是否有明顯之氧化還原電位峰：Au(111) 與 Au(100)的氧化還原電位，不同的潔淨程度與金電極晶相排列則會有不同的循環伏安圖，見下圖四.4，一般來說，清洗至如下圖紅色曲線，即為完成化學清洗動作(電位峰值明顯)。

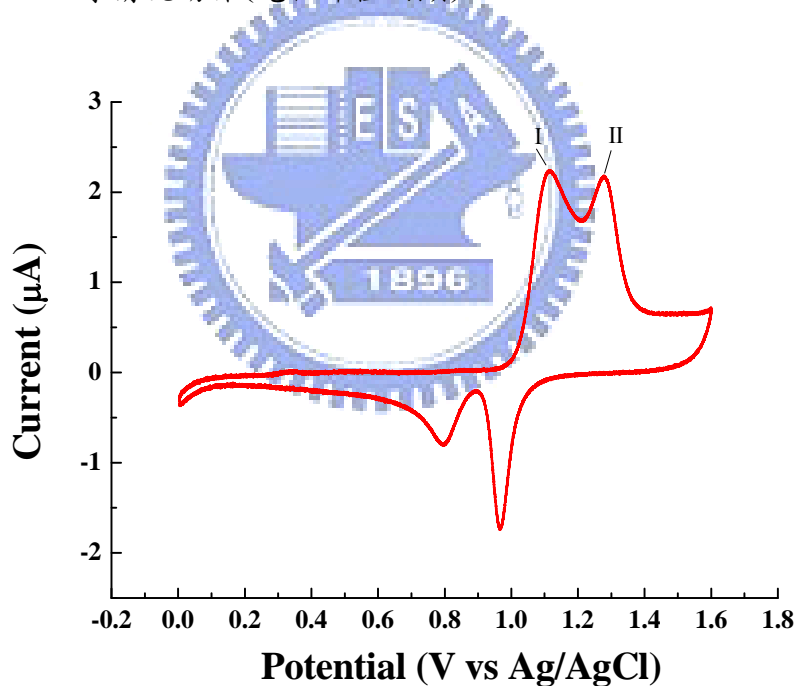


圖 四.4 以循環伏安法進行化學研磨 (in H_2SO_4)

上圖中” I” 代表的是 Au(100)的氧化電位值，” II” 代表的是 Au(111)的氧化電位值，循環伏安圖下半部則為還原電位值。由圖可知工作電極表面以兩種晶相為主要排列，其於雜晶相都可視為被研磨而消失。

4-3 工作電極表面之感測分子固定

本實驗欲在工作電極上固定生物分子以利後續生物感測之功能，其步驟就方法不同分為下列三種：

4-3-1 含奈米金粒子之官能基修飾

本實驗操作之含奈米金粒子之電極修飾步驟詳參見文獻[117, 118]與附錄六：

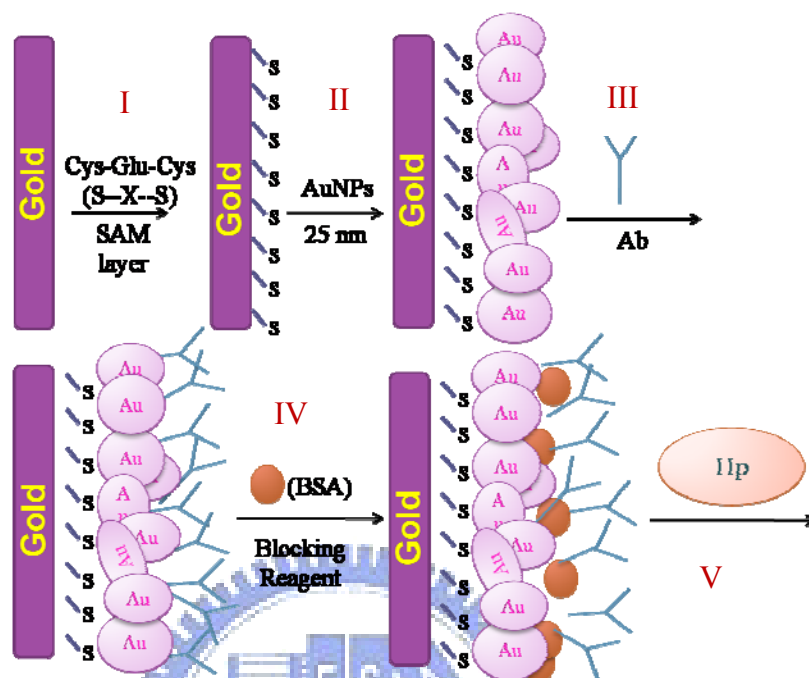


圖 4.5 含奈米金粒子之電極修飾步驟

4-3-2 不含奈米金粒子之官能基修飾

本實驗操作之不含奈米金粒子之電極修飾步驟詳參見文獻[119, 120]與附錄七：

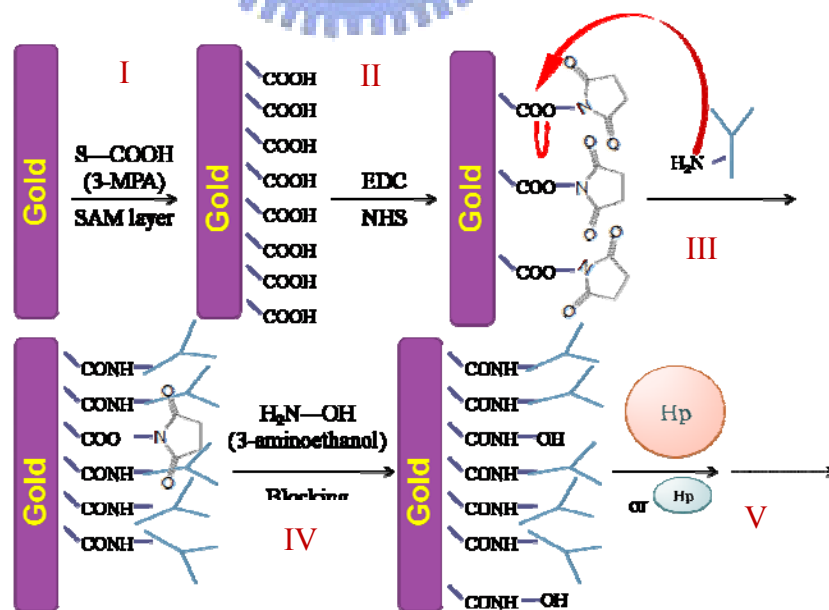


圖 4.6 不含奈米金粒子之電極修飾步驟

4-3-3 含奈米金粒子之官能基修飾(以聚合物包覆)

本實驗操作之以 2-胺基苯酚包覆奈米金粒子之電極修飾步驟詳參見文獻[32, 121]與附錄八:

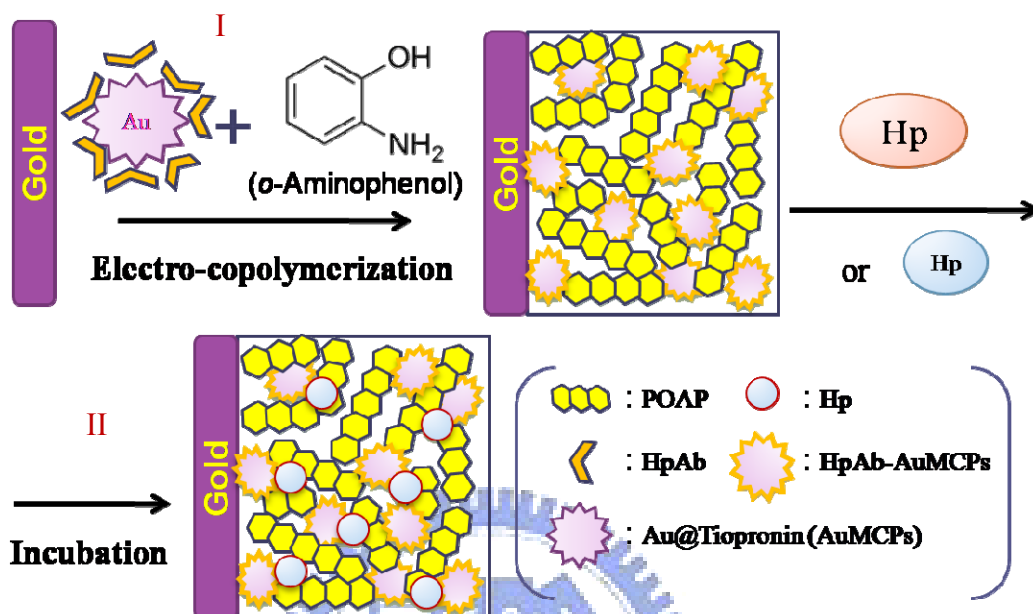


圖 4.7 含奈米金粒子之電極修飾步驟(以聚合物包覆)

4-4 生物樣品之製備

本部分由實驗室博士後研究員鄭財木博士與姜芳馨同學完成製備工作：Hp 抗體分子來自鄭財木博士於實驗室以小鼠腹水所製備之 monoclonal antibodies，其過程詳述於鄭博士於 2007 年發表在 Clinical Biochemistry 的文獻中[57]，取部分測其濃度約為 2 mg/ml。測試表現型之 Hp 分子為健康自願者禁食抽血後，以低轉速離心(~3000 rpm)後，取上清血漿並去除漂浮之脂質。正常人體血液內之 Hp 濃度皆在 0.5 mg/ml 以上。Hb 分子則為離心後之血球破裂後即可取得 95%濃度以上之 Hemoglobin。

4-5 奈米金粒子之製備

4-5-1 水溶液奈米金粒子之製備(Colloidal AuNPs)

30 nm 檸檬酸鈉還原之水溶液金粒子製備步驟[122, 123]:

步驟一：以二次去離子水配製 4%的 HAuCl₄ 溶液 1 ml。



步驟二： 取 0.5 ml 上述配置之溶液加入製 200 ml 二次去離子水中加熱至沸騰並充分攪拌。



步驟三： 劇烈攪拌上，緩慢加入濃度為 1% 的 Sodium citrate 溶液 3 ml 至上述沸騰溶液中，迴流冷凝(Reflux)加熱反應 30 分鐘。



步驟四： 觀察溶液顏色由藍黑色轉變為酒紅色後即告反應完全，關閉加熱表使其回溫至室溫，放至攝氏四度冰箱保存備用。

4-5-2 單分子層包覆奈米金粒子之製備(AuMPCs)

7 nm Tiopronin 包覆之奈米金粒子(Au@Tiopronin)之製備步驟[124]：

步驟一： 取 0.31 克 HAuCl_4 (>45%) 與 0.38 克之 Tiopronin 一同溶解於 35 毫升之甲醇/乙酸 (6:1) 溶液中，生成寶石紅色水溶液。



步驟二： 現配製 0.6 g 克 NaBH_4 15 mL 水溶液緩慢加入至劇烈攪拌之上述溶液中，於 4°C 環境下待其反應 30 分鐘。



步驟三： 以冷凍乾燥方式去除溶液並收集上層懸浮之黑藍色乾燥固體。取該粗製之 Au@Tiopronin 固體 150 毫克溶解至 75 毫升之 dd- H_2O 中，以鹽酸調控其酸鹼度至 pH 值為 1。



步驟四： 將上述溶液以分子量孔洞約為 3000 之透析袋以大量 dd- H_2O (4 L) 緩慢進行透析約 72 小時，並更換水溶液五次以完整去除殘餘鹽類。收集並置於 4°C 保存，如此即可得帶有酸根包覆之奈米金粒子。

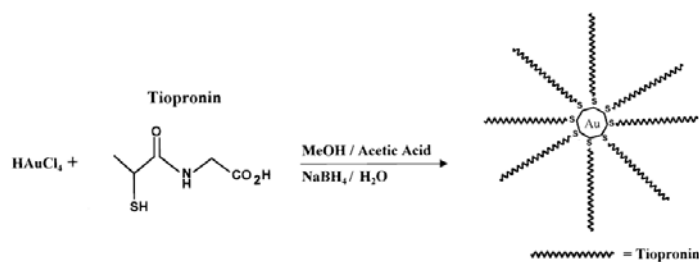


圖 4.8 Au@Tiopronin 合成示意圖[124]

4-6 CV 與 EIS 量測之儀器設定

如無特別加註，本論文之 CV 與 EIS 實驗皆是以 2.5 mM 之 $\text{FeCN}_6^{3-/4-}$ 作為氧化還原溶液 (Redox probe)，並以自製之三電極反應槽作為反應容器，其中數據量測之細部設定如下表所示：

Cyclic Voltammetry (CV) mode	
Scanning Potential	-0.2 ~ +0.6 V
Bias Path	Triangle
Bias Ramp	100 mV/sec
Sample Rate	800 pts/sec
Signal Average	8
Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) mode	
Scanning Frequency	$10^5 \sim 0.1$ Hz
DC Level	0.23 V
AC Amplitude	10 mV
Sample Points	10000

表格 四.1 CV 與 EIS 之量測條件設定

4-7 電阻分析模擬軟體

本次實驗使用 ZSimpWin V.3.20 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, Tennessee, USA.) 作為分析 Nyquist plot 之工具，所有數據皆帶入至簡單 Randles' Equivalent Circuit 作模擬，得各電阻電容值，主要利用 R_{ct} 值作為實驗結果分析用，其介面操作如下圖所示：(紅色為實際測量值，綠色為軟體模擬趨近數值)

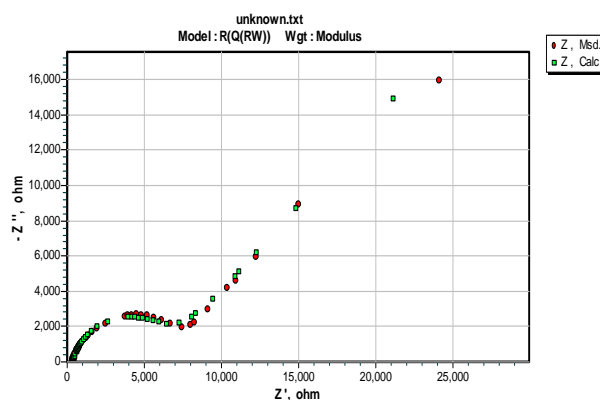


圖 四.9 ZSimpWin 軟體之模擬曲線

	value	% error
R_s	350.2	0.9495
Q_{dl}	6.267 E-7	6.53
n	0.8217	0.8737
R_{ct}	6150	2.329
Z_w	5.972 E-5	3.059
		$\chi^2=1.833 \text{ E-}3$

表格 四.2 ZSimpWin 軟體分析之數據格式



第五章 實驗結果

5-1 實驗室自製電極

本論文主要論述之一遍為以較低價，較方便的方式製備生物電感測器，其中，取代傳統昂貴的金柱狀電極便是本論文欲達成的目標之一，在本系所助理研究員曾信華博士的設計指導下，我們利用金線來取到一般使用的柱狀電極，以節省成本，可大量製造，以利實驗進行，如上一章節實驗步驟中所敘述的，將金線聯接導線後，灌入壓克力膠，真空下緩慢加熱使之固化，退出模具後，將表面拋光，即初步完成自製金電極的製備，如下圖所示。其電極柱高度約為 2.5~3.0 公分高，表面約為直徑 4.5 公釐，中央金線截面約為直徑 0.5 公釐。

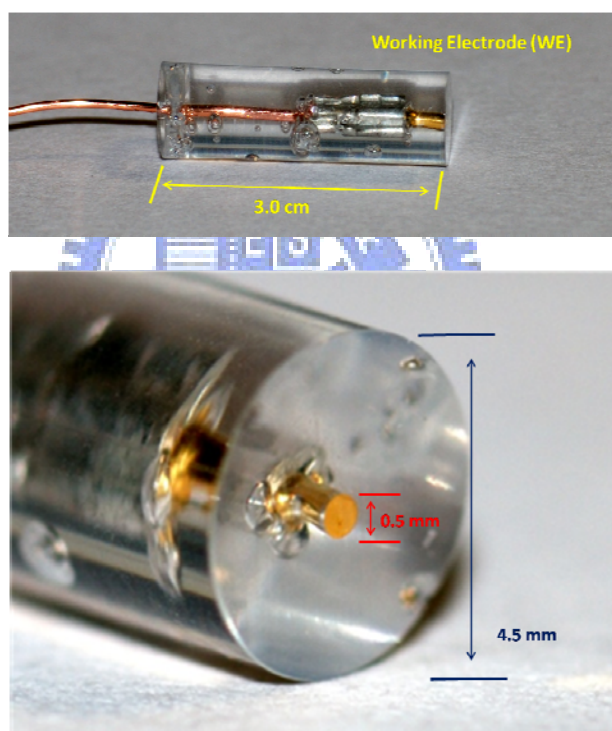


圖 5.1 實驗室自製電極實物

上圖左為側拍工作電極之實物，如圖所示，金線與銅線藉由銅環片相連接，外面再以壓克力膠作包覆，其圓柱高度約 3 公分，直徑約 1 公分，金屬截面積則約 4.5 公釐。右圖為其工作電極截面實物圖。

5-2 電極之化學研磨與清洗

在電極以 Al_2O_3 粒子完成機械研磨後，將工作電極置於硫酸溶液中，以循環伏安法進行化學研磨與清洗，實驗結果可發現反應初期：以循環伏安法清洗一個回合（藍色），

可見上半部伏安圖在進行氧化反應時，並無明顯的氧化電位峰值產生，推測可與硫酸發生氧化反應之金電極晶相排列組態眾多(Poly crystalline gold)。在數次稀硫酸清洗研磨後(紅色)，可發現兩個明顯的氧化峰電位值分別為 1.02 與 1.18(V)，推測分別為 Au(100)與 Au(111)之氧化反應電位，而下半部則有明顯的還原電位分別為 0.86 V : Au(111)與 0.73 V : Au(100)，由此四個電位峰值可推斷：第一，金電極表面並無明顯的雜質覆蓋，所以氧化還原反應值明顯，為一潔淨之工作電極。第二，氧化電位由數個縮減為兩個，可推測為金電極表面晶相趨於單純，可視為化學研磨之完成。由圖五. 三也可進一步證明硫酸對於金電極雜晶相之侵蝕作用。

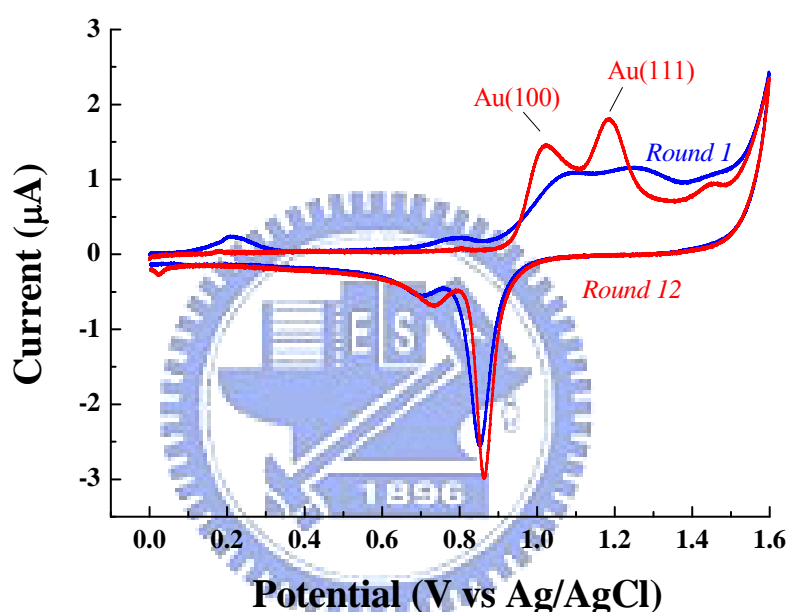


圖 5.2 化學研磨前後以循環伏安圖之比較 (in H_2SO_4)

由上圖可見，”藍色”代表甫進行化學研磨之工作電極表面，其氧化電位模糊不明顯，推知其晶相排列組態眾多(Poly crystalline gold)；而”紅色”則為化學研磨完成之金電極表面，其 Au(100)與 Au(111)之氧化還原電位分別為 Au(111): 1.18, 0.86 V 與 Au(100):1.02, 0.73 V (詳見章節 4.2.2)，可視為化學研磨完成之指標。

為了進一步觀測並驗證化學研磨之效果，我們使用掃描式電子顯微鏡(Hitachi S-4000 FESEM)觀測電極表面在化學研磨前後的改變，如圖 5.3 所示，在同樣放大 1 萬倍的倍率下，可見未進行化學研磨之電極其表面大多平坦，但仍有少數明顯機械研磨留下之刮痕；而在化學研磨後(以 0.5 M 硫酸清洗 15 個回合)，可觀察到長條形之機械研磨刮痕變少，但新生成許多圓形的侵蝕孔洞於電極表面，推測為硫酸對非 Au(111)與 Au(100)晶相進行研磨而成。

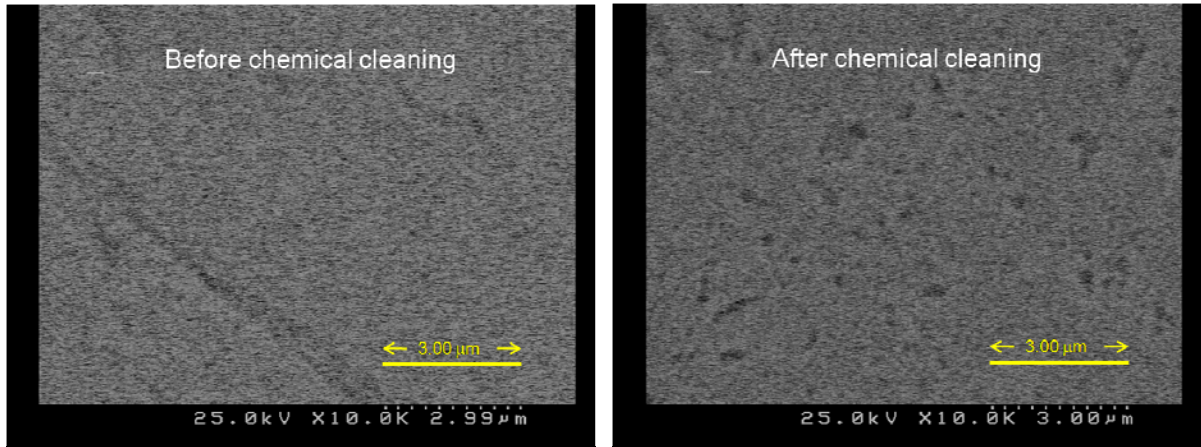


圖 5.3 化學研磨前後以掃描式電子顯微圖之比較 (in 10,000x)

由上圖左可見，尚未進行化學研磨之工作電極表面，其電極表面平坦，但偶有機械研磨之刮痕氧化。上圖右為化學研磨完成之金電極表面，已不見其機械研磨之刮痕，但發現眾多淺層圓形侵蝕孔洞。

5-3 金奈米粒子之製備

金奈米粒子製備完成後，稀釋 10 倍，以 UV-Vis 吸收光譜儀(JASCO V-500)測量其吸收值，確認其在 525 nm 附近有明顯的吸收峰，推測原因為表面電漿(surface Plasmon)所產生的吸收效應[125]，其可視為金奈米粒子的特徵訊號。AuMCPs 則為尺寸太小所以其吸收峰不明顯。

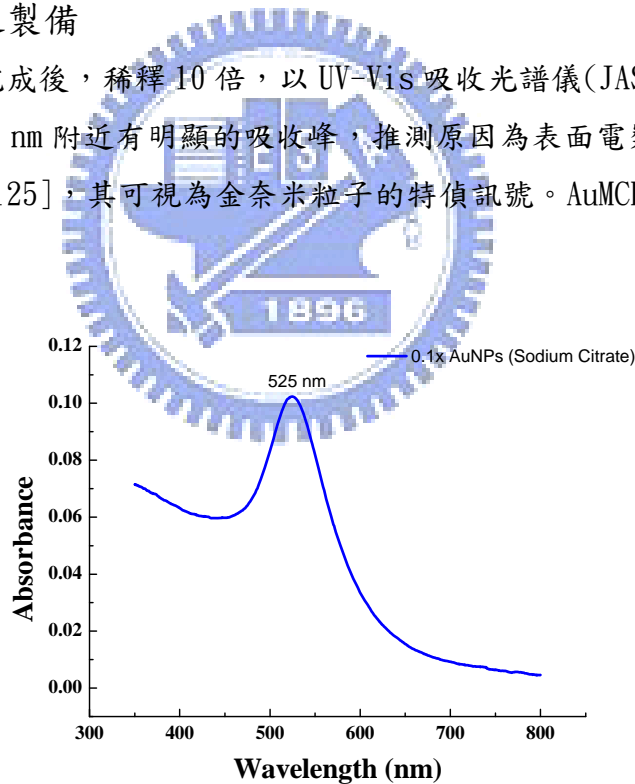


圖 5.4 金奈米粒子(S. Citrate)的吸收光譜圖

另一方面本論文利用動態光散射儀(DLS)，來測量金奈米粒子是否形成子及其顆粒大小是否符合預期。可以發現水溶液金奈米粒子大約分部約落在 25~40 nm 之間，符合檸檬酸鈉還原機制的最適合大小，其最多分佈尺寸約為 27.5~30 nm 之間，與文獻中[123]敘述符合(~28 nm)。此批樣品平均大小約為 30 nm。單分子層包覆之奈米金粒子之大小

則約為 7 nm。

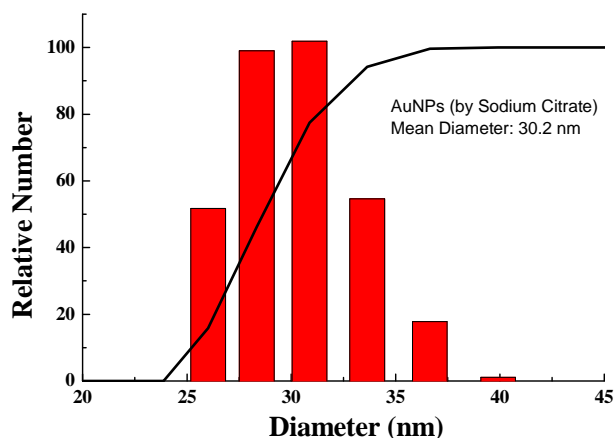


圖 五.5 以 DLS 量測金奈米粒子(S.Citrate)尺寸約為 30 nm

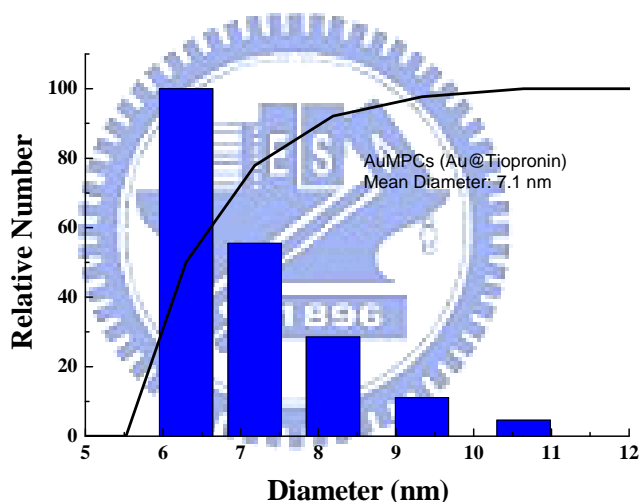


圖 五.6 以 DLS 量測單分子層包覆奈米金粒子(Au@Tiopronin)尺寸約為 7 nm

5-4 以循環伏安法檢測電極表面之修飾

利用循環伏安法量測各個階段的電極表面修飾，從中我們可以藉由陰極與陽極的電流電壓變化而推論官能基或抗體修飾是否成功。方法為將修飾後之工作電極（金電極）放入實驗室自製之三電極化學反應槽中，在反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定掃描電壓範圍為-0.2 ~ +0.6 V，掃描速率為 100 mV/sec。待訊號穩定後記錄之。由 CV 圖可以觀察到，在每一個修飾步驟後，氧化還原電位與反應電流值皆會發生變化，見圖 五.7 與表格 五.1，電位差值自 0.079 V 增大至 0.174 V，電流變化也自單純的金電極約 17 nA 左右減少至接上抗體時的 7 nA。即代表氧化還原的難易程度與反應的分子數量發生改變。由此現象可推估，本實驗化學

官能基修飾步驟與抗體分子固定的程序確實完成。另外在接上金奈米粒子時，可見其電位改變不增反降(0.083 V → 0.067 V)，推測其為金本身即具有導電效應的表現[126]，充分證實了金奈米粒子有效的被固定在電極之上。

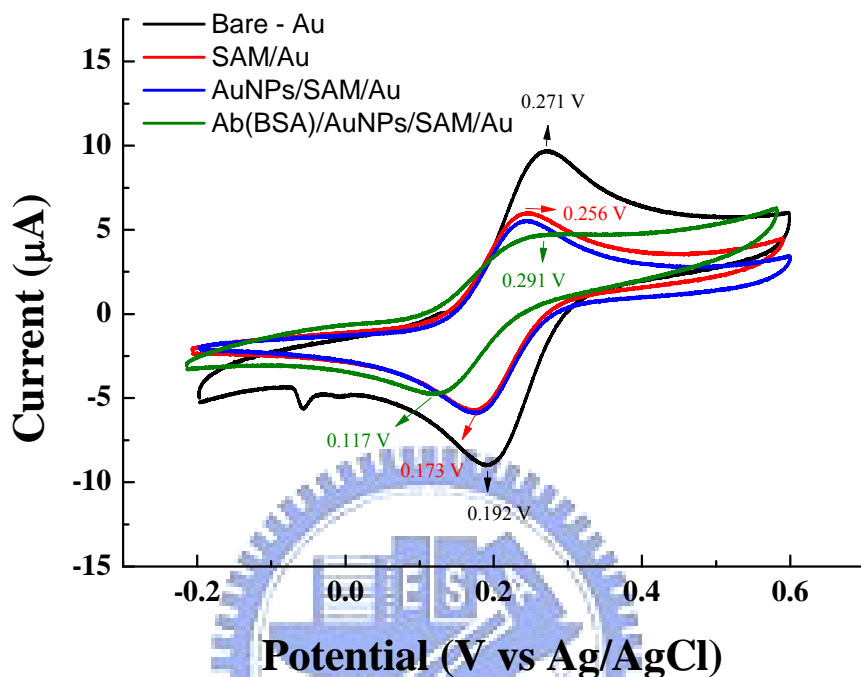


圖 五.7 以 CV 檢測各階段電極修飾之情形

由 CV 圖可以觀察到，在每一個修飾步驟後，氧化還原電位與反應電流值皆會發生變化，即代表氧化還原的難易程度與反應的分子數量發生改變。由此現象可推估，本實驗化學官能基修飾步驟與抗體抗原分子固定的程序確實完成。

可再以峰電位峰電流值作表示，如下表所示：

Probe Condition	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	I_{pc} (nA)	I_{pa} (nA)
Bare-Au	0.271	0.192	0.079	8.41	-8.51
SAM/Au	0.256	0.173	0.083	6.54	-5.70
AuNPs/SAM/Au	0.244	0.177	0.067	5.91	-5.68
Ab(BSA)/AuNPs/SAM/Au	0.291	0.117	0.174	3.92	-3.61

表格 五.1 比較 CV 圖中各階段修飾之峰電位變化值與峰電流值

註： E_p , I_p 分別表示電位峰值與電流峰值；下標號“a”與“c”則分別代表陽極(anode)發生的氧化效應與陰極(cathode)發生的還原反應。

5-5 以 Hp-BEA 分辨三種不同表現型之 Hp

本論文研究目的除了如前述所述發展更輕巧更廉價的電化學分析儀以外，也希望利用此儀器設計來應用在實際臨床檢測上，其中，主要的研究標的就是 Hp 的表現型分類，我們將已知 Hp 表現型的受試者抽血，將血液初步離心，取上清的血漿部分(human plasma)，再將前述之修飾過後的實驗室自製金電極浸泡至血清樣品約 120 μl ，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer 潤洗，以去除物理吸附之 Hp，將其放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 與 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5\sim 0.1\text{Hz}$ ，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。

由結果可以看出三類型的 Hp 在 EIS 的頻譜中，明顯的對於工作電極產生不一樣的遮蔽效應，以致於圖中半圓直徑:電荷傳遞阻抗 (R_{ct})值，如表格五.2 所示，接上抗原分子之 Hp-BEA，其訊號反應值皆為尚未接上抗原分子之訊號 ($R_{ct}=6150\text{ ohm}$) 的一點五倍以上，差異極大，可有效判斷抗原抗體分子是否接合，並且比較電荷傳遞阻抗即可分辨三種不同表現型之 Hp。

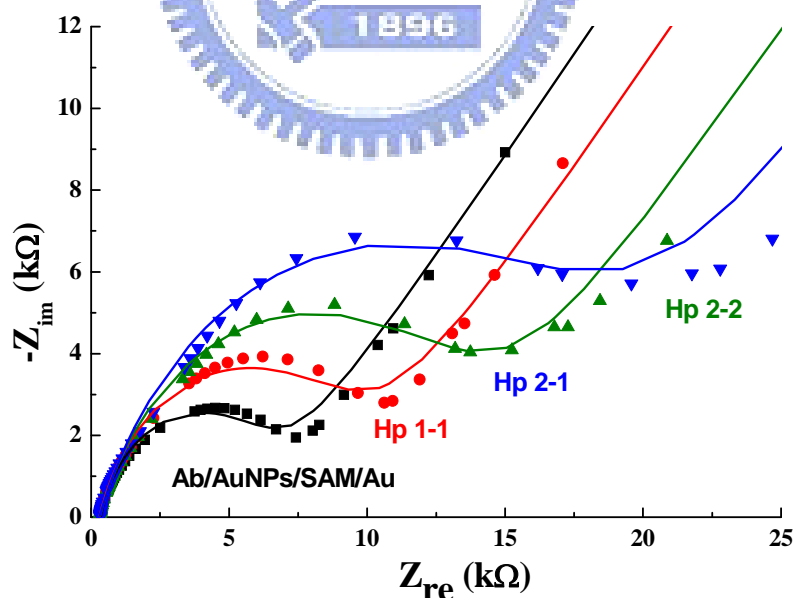


圖 五.8 以 EIS 量測三種不同表現型之 Hp

由 Nyquist plot 圖中可觀察到三種不同表現型之 Hp 以不同順序分別與 Hp-BEA 反應 90 分鐘，在 EIS 量測中有相當不同的反應圖譜。如實驗設計所預測，因不同表現型 Hp 之間其分子量與構型有歧異，所以在電荷傳遞阻抗(R_{ct} , 半圓直徑)有相當明顯的差異，也因此本實驗證明 Hp-BEA 可成功分辨三種不同表現

型之 Hp。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

	$R_s (\Omega)$	$Q_{dl} (F)$	n	$R_{ct} (\Omega)$	$Z_w (\Omega)$
Ab/AuNPs/SAM/Au	350.2	6.27E-07	0.8217	6150	5.97E-05
Hp 1-1	302.7	6.70E-07	0.7928	9285	6.21E-05
Hp 2-1	307	1.24E-06	0.7579	13650	7.47E-05
Hp 2-2	304	1.33E-06	0.7449	16360	5.58E-05

表格 五.2 以阻抗分析軟體模擬 Hp-BEA 對三種不同表現型 Hp 之偵測結果

5-6 檢視 Hp-BEA 基本性質

5-6-1 重複使用性質

將電化學分析儀應用在實際的生物感測上，以未來的商業應用來說，壓低成本與可重複使用性質必定是最重要的發展方向，也左右了此類型商品的普及程度，本部分實驗欲探討此類型的實驗設計是否可以重複使用以及是否依然可辨識三種表現型作實驗。

將修飾過後的金電極浸泡至血清樣品約 120 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer(pH=7.2)潤洗，以去除物理吸附之 Hp，之後放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5 \sim 0.1$ Hz，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。待其掃描完成後，以 pH=12 的緩衝溶液清洗數次，欲使抗體結構變性，將抗原(Hp)釋放，再用中性緩衝溶液潤洗使其活性恢復，放入另外一樣品中，如此重複，作完不同表現型之 Hp。

由結果可驗證 Hp-BEA 之可重覆使用性，並且其不會受樣品測試順序之影響，其模擬出來的電荷傳遞阻抗值，見表格五.3，依照樣品測試的順序(Hp 2-2 \rightarrow Hp 1-1 \rightarrow Hp 2-1)分別為 12140，6625，8417 (ohm)。符合我們對於”不同分子量所造成的工作電極遮蔽效應不同”的預期，分子量越大所造成的阻抗越大，不受測試順序所影響。由此實驗可證明 Hp-BEA 至少可以重複使用三次，並且樣品偵測順序之影響並不存在。(見下頁)

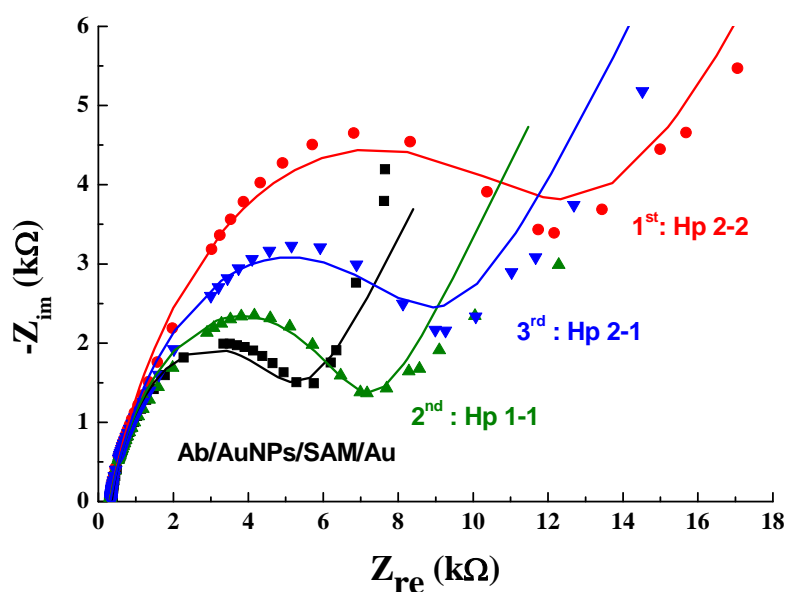


圖 5.9 以 Hp-BEA 重覆檢測不同表現型之 Hp

由 Nyquist plot 圖中可觀察到三種不同表現型之 Hp 以不同順序分別與 Hp-BEA 反應 90 分鐘，在 EIS 量測中有明顯相異的反應圖譜。為了避免抗原殘留效應影響實驗電阻量測，本實驗將分子量最大的 2-2 表現型先行量測，再量測分子量最小的 1-1 表現型，發現其電荷傳遞阻抗值(R_{ct} , 半圓直徑)依然有明顯的差異與正確的趨勢 (半圓直徑: Hp 2-2 > Hp 2-1 > Hp 1-1)，也因此本實驗證明 Hp-BEA 可重覆使用並成功分辨三種不同表現型之 Hp。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

	R_s (Ω)	Q_{dl} (F)	n	R_{ct} (Ω)	Z_w (Ω)
Ab/AuNPs/SAM/Au	353.2	6.49E-07	0.8313	4649	8.28E-05
1 st : Hp 2-2	294.7	1.36E-06	0.7542	12140	7.26E-05
2 nd : Hp 1-1	299.6	1.34E-06	0.7614	6625	1.91E-04
3 rd : Hp 2-1	317.2	1.30E-06	0.7622	8417	9.50E-05

表格 5.3 以阻抗分析軟體模擬 Hp-BEA 對不同表現型 Hp 之重複使用性偵測

5-6-2 專一性程度

此部分實驗在於驗證 Hp-BEA 之專一程度，實驗方法為配置不同濃度的 Lysozyme from(序列稀釋)，將修飾過後的金電極浸泡至最稀樣品約 120 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer(pH=7.2)潤洗，以去除物理吸附效應，之後放入至三

電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5 \sim 0.1$ Hz，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。待其掃描完成，取出後再以大量 PBS buffer 潤洗，之後在置於次稀薄的樣品中，如此重複數次，並且將 EIS 圖譜作 ZSimpWin 軟體分析，取其 ΔR_{ct} 值對濃度變化作圖。如圖五.10 所示：可發現其半圓直徑變化並不依照濃度變化做改變，其改變順序沒有規則性，可初步推斷 Hp-BEA 仍然會少量的受到 Lysozyme 濃度變化的影響，但是其效應不大，並且沒有規律性，也有可能為雜質效應所產生的訊號變化。

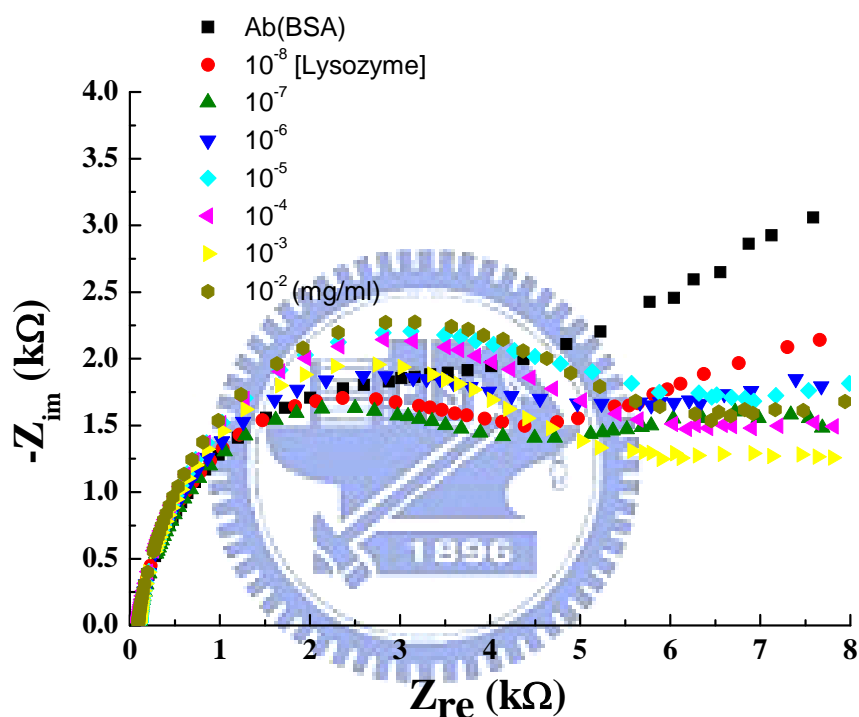


圖 五.10 Hp-BEA 對於 Lysozyme 濃度作檢測 (EIS)

將 Hp-BEA 依序插入至序列稀釋過後的 Lysozyme 樣品中，作對照組實驗，發現在 Nyquist plot 圖譜中，高濃度之對照組樣品(Lysozyme)有小幅度的波動，皆位於 0 附近震盪，但幅度(~ 0.2)與趨勢不若 Hp 明顯正確，將電荷傳遞阻抗值(R_{ct} , 半圓直徑)作整理與標準化，於此可證明 Hp-BEA 之高專一性程度。如下圖所示：

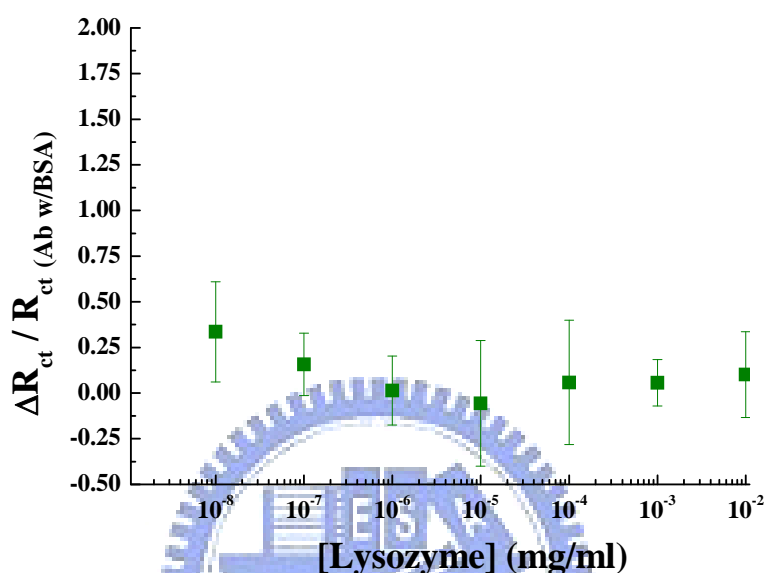


圖 5.11 Hp-BEA 對於 Lysozyme 濃度作檢測 (n=3)*

*原始數據詳見附錄二

5-6-3 辨識樣品速度

此實驗設計目的在於欲了解抗原(Hp)與抗體反應後，需要多少時間才可以偵測到正確而且穩定的訊號，實驗條件為將修飾過後的金電極浸泡至 Hp 2-2 血清樣品約 120 μl ，置於 4° C 中等待欲控制之時間後，以大量 1x PBS buffer(pH=7.2)潤洗，以去除物理吸附之 Hp，之後放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 與 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5 \sim 0.1\text{Hz}$ ，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。待其掃描完成，清洗後再放入 Hp 2-2 血清樣品中，如此重複數次。由圖五.12 可觀測到電極與樣品反應 30 秒，60 秒後，其阻抗變化($\sim 900 \text{ ohm}$)較反應兩分鐘至三分鐘之阻抗變化($\sim 350 \text{ ohm}$)來的大，見表格五.4，推測其接近於飽和反應時間，數據如下所示

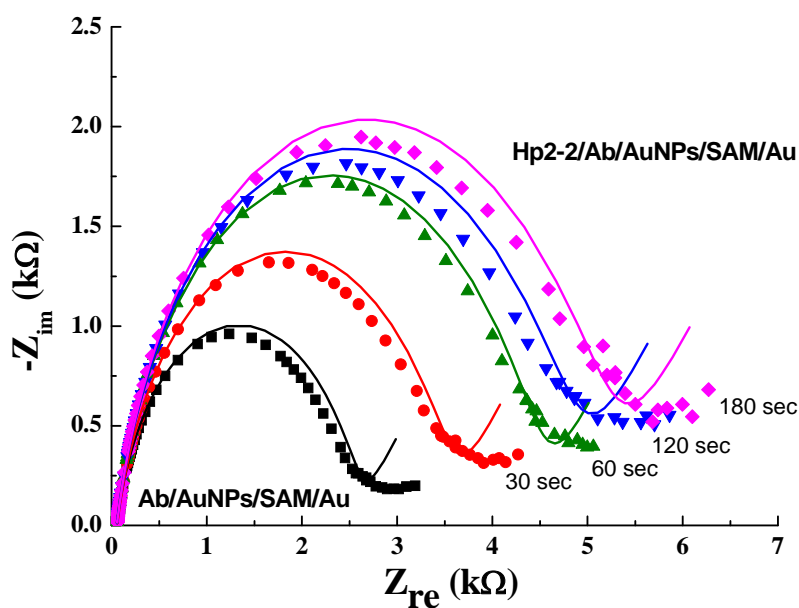


圖 五.12 Hp-BEA 對於 Hp 2-2 作不同反應時間之檢測 (EIS)

由 Nyquist plot 圖譜可觀察到，相同樣品，不同抗體抗原反應時間之 Hp-BEA 訊號，其值有所不同，並且電荷傳遞阻抗值(R_{ct} , 半圓直徑)在反應 60 秒後差值漸漸變小，推測其穩定訊號時間值並不長約落在數百秒之間。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

	$R_s (\Omega)$	$Q_{dl} (F)$	n	$R_{ct} (\Omega)$	$Z_w (\Omega)$
Ab/AuNPs/SAM/Au	55.06	1.02E-08	0.8603	2525	0.00107
30 sec (Hp 2-2)	58.18	9.93E-07	0.8461	3466	7.76E-04
60 sec	53.45	9.07E-07	0.85	4411	7.83E-04
120 sec	54.34	8.98E-07	0.8461	4751	5.20E-04
180 sec	55.01	8.40E-07	0.8466	5117	4.76E-04

表格 五.4 以阻抗分析軟體模擬 Hp-BEA 對 Hp 樣品有效反應時間之偵測

於此推論，將 R_{ct} 作整理並標準化作圖，以 Sigmoidal model 作分析，結果如下圖所示：

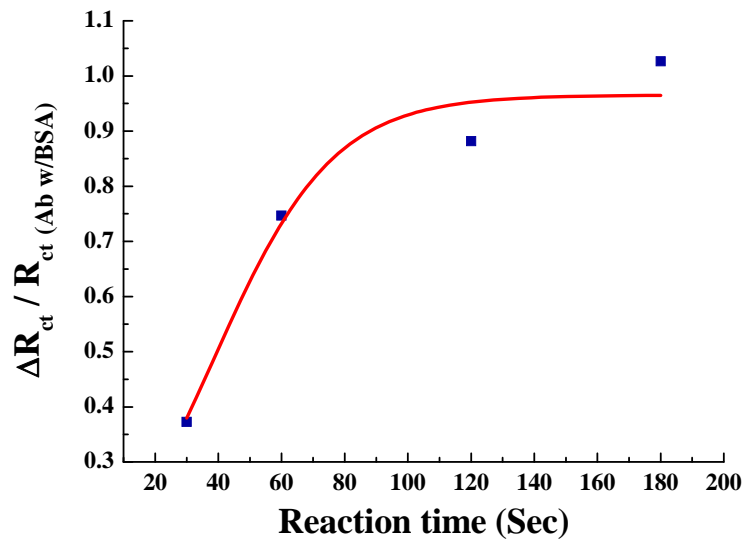


圖 五.13 Hp-BEA 對於 Hp 2-2 作不同反應時間之阻抗變化 (Fit in Sigmoidal Logistic function)

得其函數為：

$$y = a / (1 + \exp(-k(x - xc))) \quad \text{其中:}$$

$$a = 0.9652$$

$$xc = 38.2094$$

$$k = 0.0527$$

將時間帶入一極大值($t=10^4$ sec)，得 y 軸約為 0.97，對照後述圖五.19，其值落在正確範圍*之內(>0.9)；相反的，按照趨近函數回推可得，反應時間約在 180 秒處其 y 軸反應值即至 0.964，所以可說 Hp-BEA 在抗原抗體反應三分鐘後即可作正確的表現型判定。

*:統計歸納之表現型判定範圍見圖五.19

5-7 以 DSC 分辨三種不同表現型之 Hp

本實驗目的之一為希望有別於傳統電泳的方法鑑別三種不同表現型之 Hp，其中，熱訊號也是一般感測器常應用之物理量，本實驗利用微溫差掃描熱卡路里計來量測不同表現型之 Hp，藉由不同 Hp 之組成次單位不同來藉此分辨各種表現型之 Hp，其量測結果如下圖五.14 所示，Hp 2-1 之變性溫度約在 61.5°C ，Hp 2-2 則落在 59.5°C ，尚無 Hp 1-1 之數據導因於 DSC 樣品純化過程中消耗大，加上 Hp 1-1 樣品本取得不易，所以實驗仍在進行當中。焓改變量(enthalpy change)，Hp 2-1 為 212 kcal/kmol ，Hp 2-2= 146 kcal/kmol 。由此推估 Hp 2-1 之次單位組成之鍵結能力較 Hp 2-2 來的強。

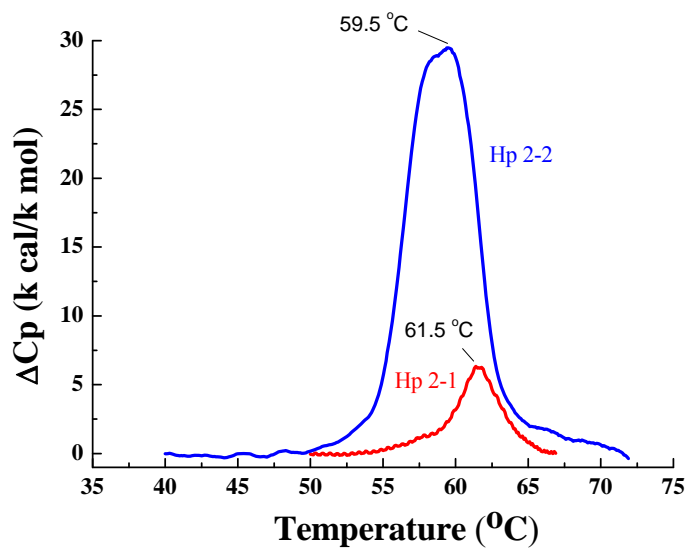


圖 五.14 以 DSC 來量測不同表現型之 Hp

溫度掃描範圍：25-100°C，溫度掃描速率：1°C/min，樣品濃度：[Hp 2-1]=0.39 mg/ml；[Hp 2-2]=0.9 mg/ml。蛋白質變性溫度(Melting temperature)：Hp 2-1=61.5°C；Hp 2-2=59.5°C。焓改變量(Enthalpy change)：Hp 2-1=212 kcal/kmol；Hp 2-2=146 kcal/kmol。

5-8 以 DLS 分辨三種不同表現型之 Hp

本實驗目的之一為希望有別於傳統電泳的方法鑑別三種不同表現型之 Hp，其中，應用動態光散射儀來量測三種不同表現型之 Hp，來實際觀測印證 Hp 之立體結構在大小上的歧異程度，取個別濃度約為 0.5 mg/ml 之純化 Hp，測得分子水合直徑大小為 Hp 1-1：8.19±0.34 nm，Hp 2-1：10.41±1.67 nm，Hp 2-2：16.90±1.52 nm，與分子量之大小順序相同，數據符合預期，在 DLS 中分佈圖如以下所示：

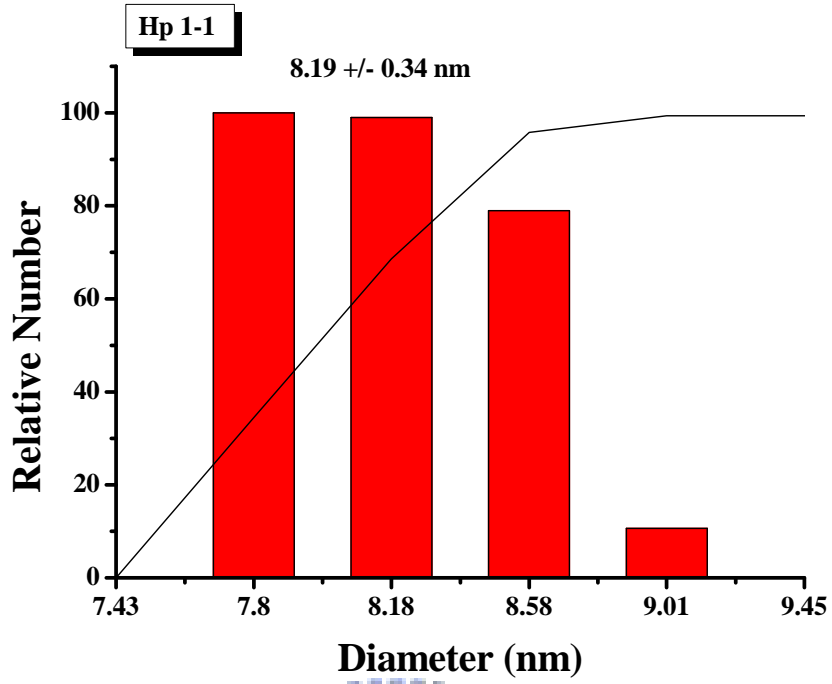


圖 五.15 Hp 1-1 的粒徑大小量測 (DLS)

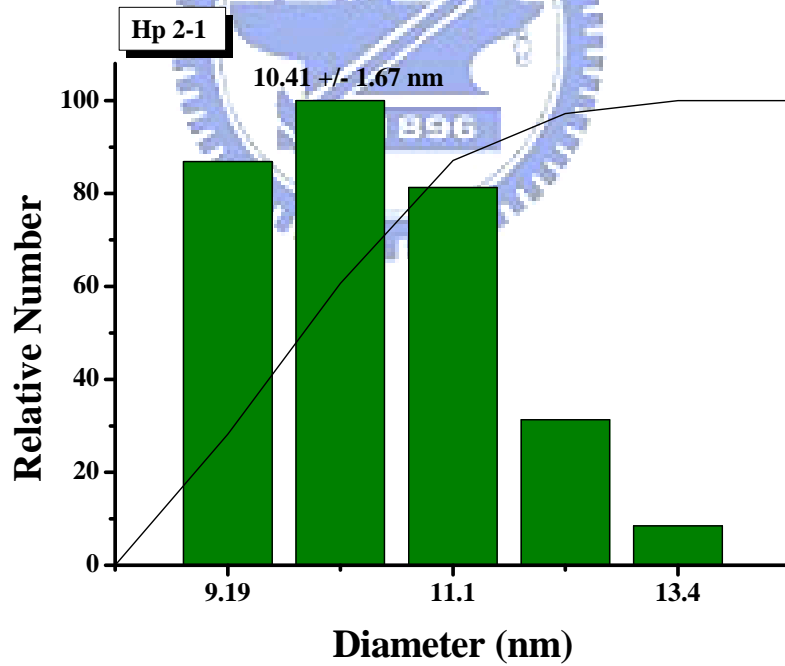


圖 五.16 Hp 2-1 的粒徑大小量測 (DLS)

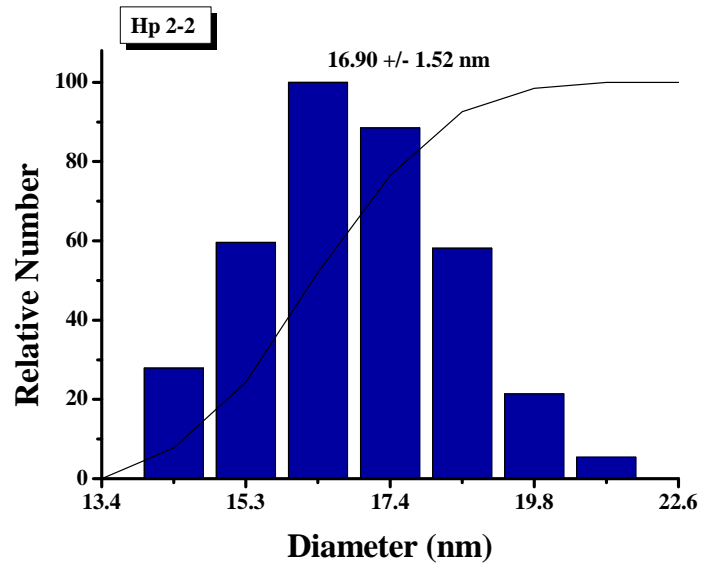


圖 五.17 Hp 2-2 的粒徑大小量測 (DLS)

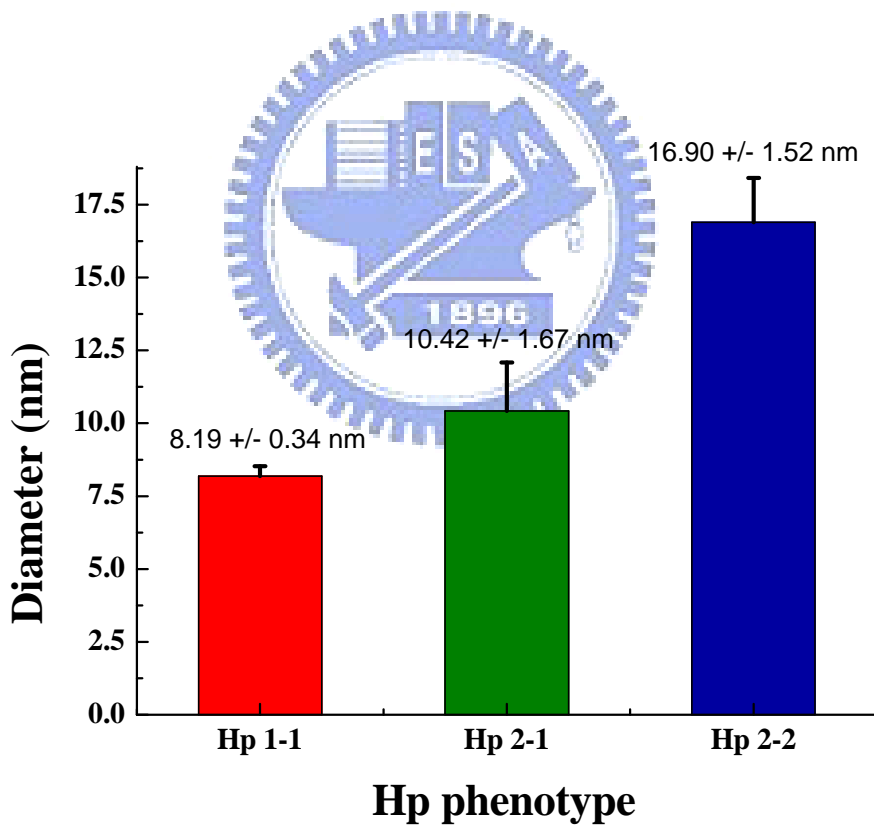


圖 五.18 不同表現型之 Hp 之水合直徑統計圖 (DLS)

5-9 不同表現型之 Hp 於 Hp-BEA 之訊號歸納

由前述結果已知三種不同表現型之 Hp 在於 EIS 量測上會有不一樣的 R_{ct} 值，但前述只限於三者相對的表面電荷傳遞差異，此部分實驗欲了解使否可藉由電阻抗值直接分辨到

一未知血液樣品的 Hp 表現型。

大量製備金電極並予以修飾上抗體，分別浸泡置不同的血清樣品中(來源數: Hp 1-1:1, 2-1:2, Hp 2-2:2)約 120 μ l, 置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後, 以大量 1x PBS buffer (pH=7.2) 潤洗, 以去除物理吸附效應, 之後放入至三電極氧化還原反應槽中, 以作 EIS 分析, 反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V, 以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5 \sim 0.1$ Hz, 交流偏壓為 10 mV, 詳細儀器設定見表格四. 1。將 EIS 圖譜作 ZSimpWin 軟體分析, 原始數據見附錄二, 取其 ΔR_{ct} 值, 以無抗原的電極訊號 normalize 後, 對不同的 Hp 表現型作圖。

由統計結果可發現, Hp 1-1 型的阻抗反應為 0.282 ± 0.13 , 絕大多數落在 0.45 以下, 而分子量最大的 Hp 2-2 則在統計中為 1.371 ± 0.19 , 絕大多數數據皆位於 0.9 以上, 而 Hp 2-1 則介於兩者之間, 反應值為 0.638 ± 0.10 , 當標準化後阻抗數據落在 0.45~0.90 之間時, 可推論其為 Hp 2-1 之樣品。預計此統計歸納可以有效的建立出快速辨別未知血液樣品的的方法。

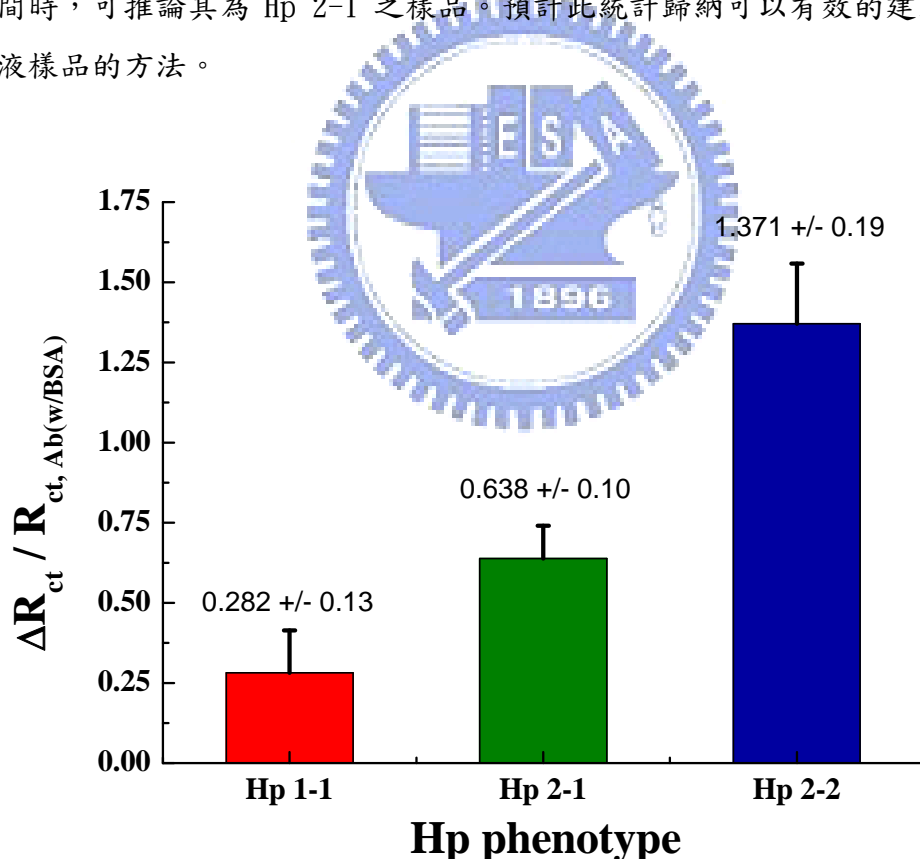


圖 五.19 不同表現型之 Hp 之電阻抗值歸納表 ($n \geq 4$)^{*}

^{*}原始數據詳見附錄三

5-10 Hp 濃度變化之於 Hp-BEA 訊號變化

如第一章節所指出的，不同的 Hp 的濃度帶有不同的臨床意義，本部分實驗欲探討是否 Hp-BEA 也可以當作濃度的檢測器，將以 HPLC 純化過的 Hp 以 UV-Vis 吸收光譜儀確定濃度後，以 1x PBS buffer(pH=7.2)作十倍濃度序列稀釋，配置濃度範圍為 90 pg/ml~ 90 μ g/ml，將金電極至於 Hp 中約 120 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer(pH=7.2)潤洗，以去除物理吸附效應，之後放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 10^5 ~0.1Hz，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。待其掃描完成，取出後再以大量 PBS buffer 潤洗，之後在置於次稀薄的樣品中，如此重複數次，結果如下圖五.20 所示，其半圓直徑（電荷傳遞阻抗）隨著濃度變化而增大，推測其對於濃度變化有靈敏的反應程度，並且將 EIS 圖譜作 ZSimpWin 軟體分析，取其 ΔR_{ct} 值對濃度變化作圖。得前半段約可見線性的濃度對訊號的反應範圍，後半段數據則是漸漸收斂為水平直線（約 =1.5），見圖五.21。

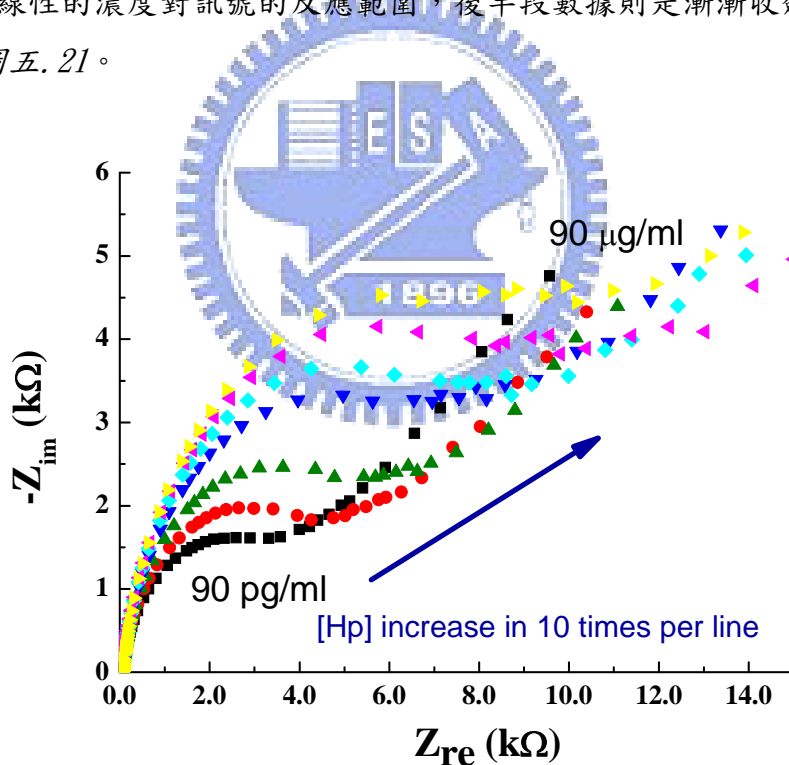


圖 五.20 Hp-BEA 對於 Hp 2-2 濃度作檢測 (EIS)

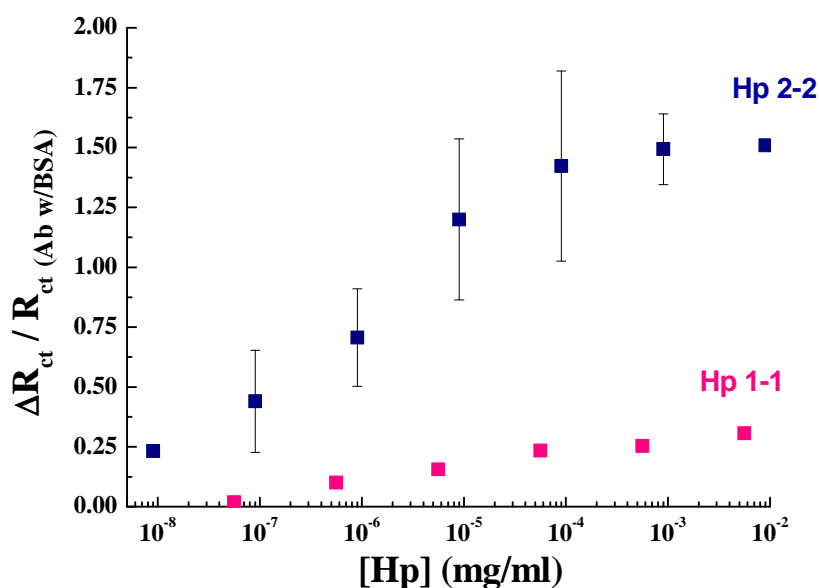


圖 5.21 Hp-BEA 對於 Hp 濃度作檢測 (n=3 for Hp 2-2*)

*原始數據詳見附錄四

5-11 其他不同的 Hp-BEA 之實驗設計

5-11-1 Non-AuNPs based Hp-BEA

本實驗起初以單純的金電極直接使用 cross linker (EDC/sulfo-NHS) 連結抗體作 EIS 的量測，目的為更簡化修飾的步驟，但是其穩定性並不如金奈米粒子修飾來的好，再現性並不高，但依舊可以分辨三種不同表現型之 Hp 之差異。步驟為將前述之修飾過後的實驗室自製金電極浸泡至血清樣品約 120 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer 潤洗，以去除物理吸附之 Hp，將其放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 10⁵~0.1Hz，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。相同於前述之 Hp-BEA 之設計，non-AuNPs based Hp-BEA 也相同的可以見得其 Rct 值在電極於抗原反應後，至少有兩倍以上的阻抗變化反應(5649→16490 ohm)，見表格五.5，也因此本實驗證明 non-AuNPs based Hp-BEA 亦可成功分辨三種不同表現型之 Hp，但就操作者經驗來說，再現性較低，推測其分子固定較不穩定，亦可能反應面積不若有奈米金粒子修飾之 Hp-BEA 來的大。

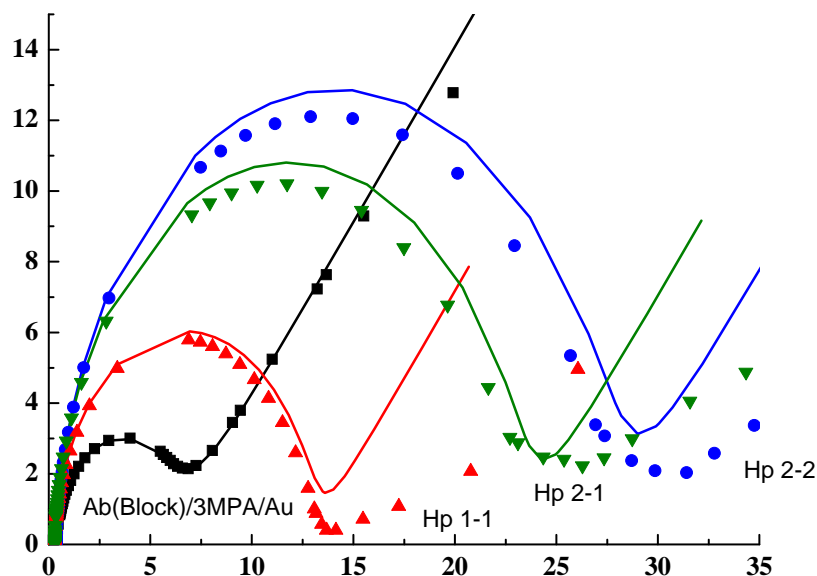


圖 5.22 以無金粒子修飾之 Hp-BEA 偵測不同表現型之 Hp

由 Nyquist plot 圖中亦可觀察到三種不同表現型之 Hp 在 EIS 量測中有相當不同的反應圖譜。如前述實驗設計所預測，在電荷傳遞阻抗(R_{ct} , 半圓直徑)有相當明顯的差異。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

	$R_s (\Omega)$	$Q_{dl}(F)$	n	$R_{ct} (\Omega)$	$Z_w (\Omega)$
Ab(Block)/3MPA/Au	398.6	1.08E-07	0.984	5649	3.89E-05
Hp 1-1	278.9	1.48E-07	0.9635	12590	1.61E-04
Hp 2-1	278.9	1.47E-07	0.959	22780	1.38E-04
Hp 2-2	365.6	1.35E-07	0.9593	27060	1.06E-04

表格 5.5 以阻抗分析軟體模擬 non-AuNPs Hp-BEA 對不同表現型 Hp 之偵測

5-11-2 Poly *o*-aminophenol based Hp-BEA

本實驗以溶膠-凝膠(sol-gel)的形式來固定感測分子，以簡單的鄰-胺基苯酚(*o*-aminophenol)單體與帶有抗體之酸根金奈米粒子(Au@Tiopronin)一同產生電聚合反應(electro-copolymerization)以產生 HpAb-AuMCPs-POAP 聚合物。目的為一步驟製備

完成工作電極的感測分子(Hp 抗體)固定。以下為製備之 CV 圖，製備步驟見章節 4-3-3: 由以上製備之循環伏安圖可見，通以循環電壓越多回時，其反應電流越小且位於 0.31 V 之氧化電位也趨於平緩，此現象為聚合物(Poly-o-Aminophenol)大量附著於工作電極表面之結果，可將此視為 POAP based Hp-BEA 製備完成之指標。

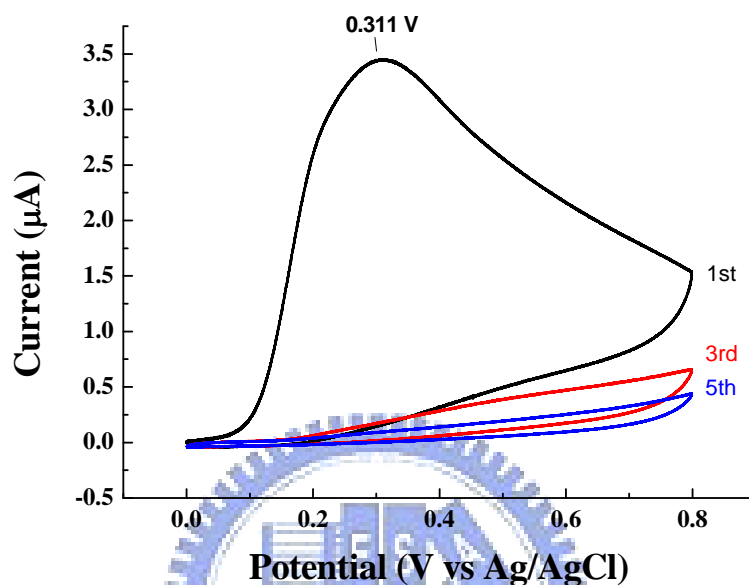


圖 五.23 以伏安法製備並觀測電極表面之 Electro-copolymerization

上圖中，分別記錄通以循環伏安電位第一，第三與第五次訊號之電流記錄；可見圖中在 0.311 V 的 OAP 氧化電位，因為 POAP 生成覆蓋電極的關係，使得電流反應趨於平緩，成為一不可逆反應之循環伏安圖。

反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定掃描電壓範圍為 -0.2~ +0.6 V，掃描速率為 100 mV/sec。待訊號穩定後記錄之，由下圖五.24 可見，原本位於 0.256 V(氧化電位)與 0.193 V(還原電位)之訊號在電聚合效應之 POAP 生成後，完全不復見，可再度證明 POAP 薄膜確實的生成於電極之上。

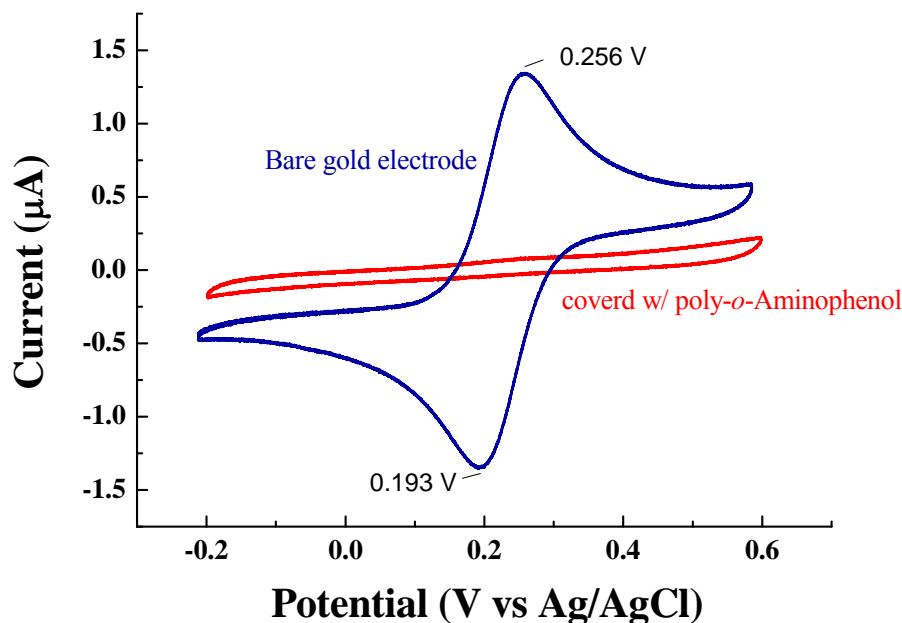


圖 五.24 以伏安法檢測電極表面之 Electro-polymerization (in $\text{FeCN}_6^{3-/4-}$)

由上圖可電流與電位值可見，POAP 生成前後對於氧化還原溶液(Redox probe, $\text{FeCN}_6^{3-/4-}$)之阻擋效應非常明顯。

作 EIS 的量測，詳細製備步驟見章節 4-3-3，將製備完成之金電極以大量 1x PBS buffer 潤洗，以去除物理吸附之 Hp，將其放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 與 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 $10^5 \sim 0.1\text{Hz}$ ，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四.1。由圖五.25~28 可見，POAP based Hp-BEA 對於各種表現型之 Hp 皆有不同程度的反應，並將 EIS 圖譜作 ZSimpWin 軟體分析，得表格五.6，比較 R_{ct} 值皆有改變，最小程度之 Hp 1-1 樣品也有接近 100 (k·ohm) 的變化，進一步討論見章節 6-6。

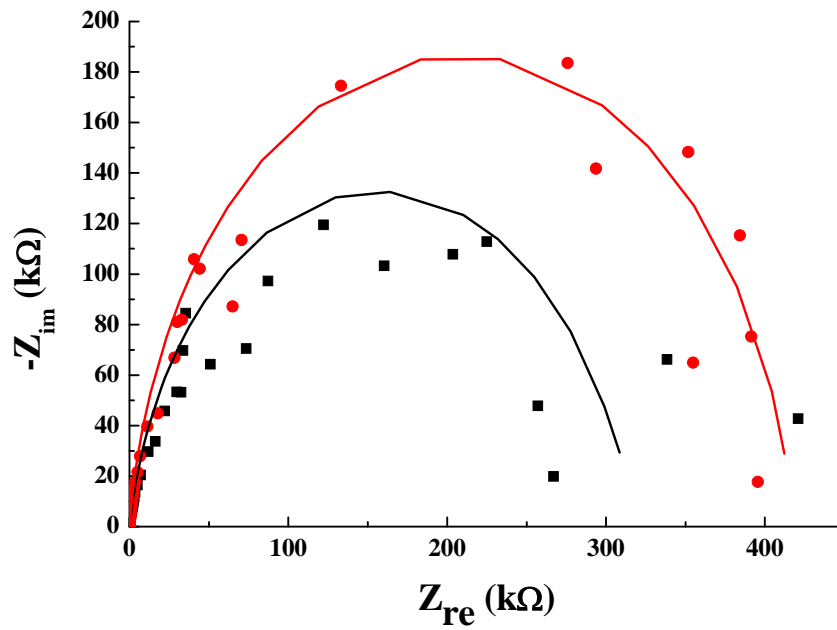


圖 五.25 以 POAP based BEA 檢測 Hp 1-1 之 EIS 訊號

上圖中：■表示 Ab-AuMCPs/POAP 作為空白對照組；●表示 Hp 1-1/Ab-AuMCPs/POAP 作為實驗組(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

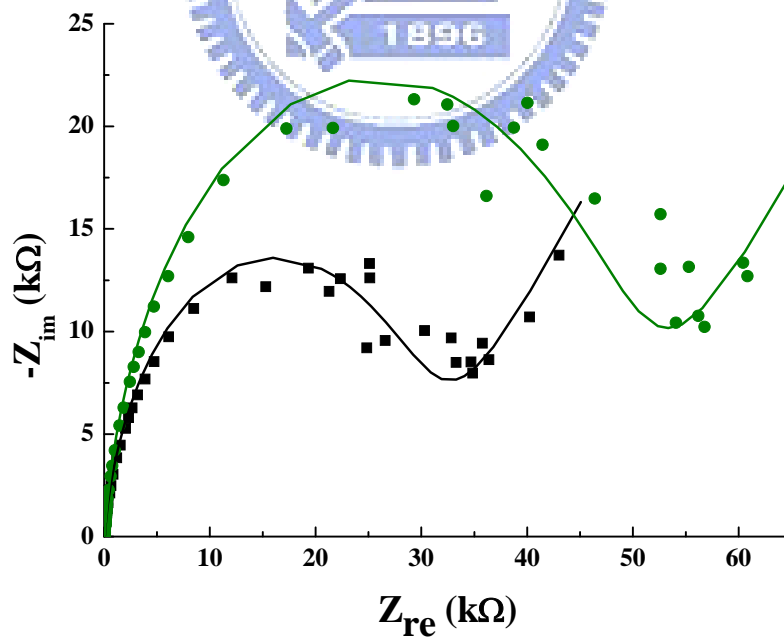


圖 五.26 以 POAP based BEA 檢測 Hp 2-1 之 EIS 訊號

上圖中：■表示 Ab-AuMCPs/POAP 作為空白對照組；●表示 Hp 2-1/Ab-AuMCPs/POAP 作為實驗組(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

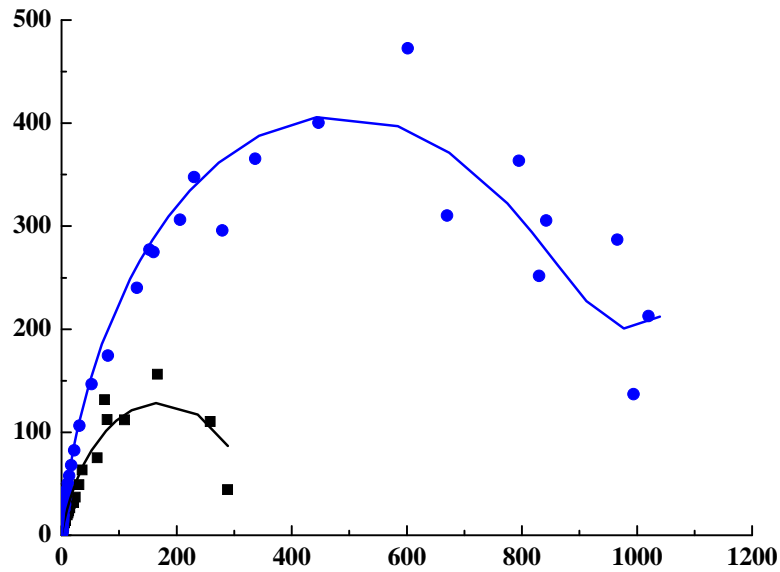


圖 5.27 以 POAP based BEA 檢測 Hp 2-2 之 EIS 訊號

上圖中：■表示 Ab-AuMCPs/POAP 作為空白對照組；●表示 Hp 1-1/Ab-AuMCPs/POAP 作為實驗組(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

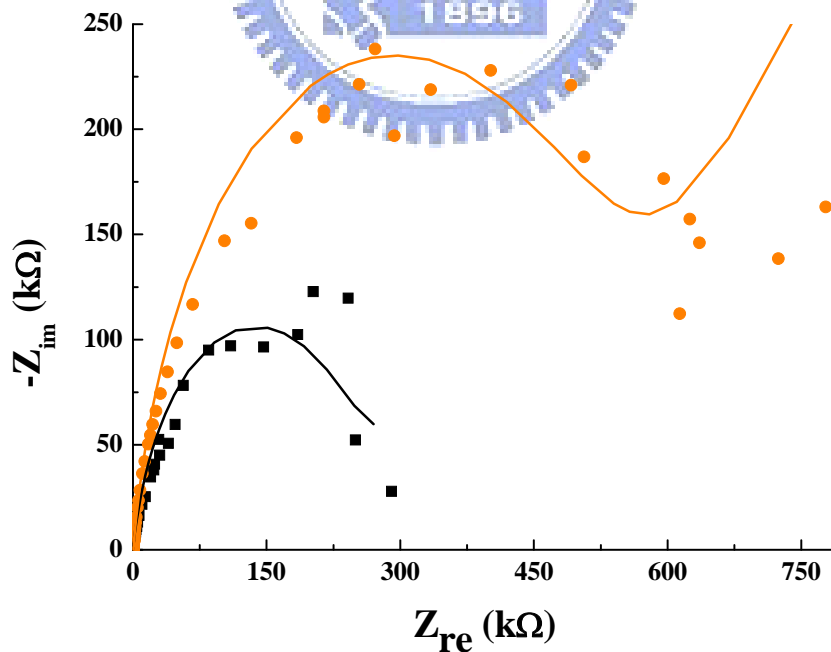


圖 5.28 以 POAP based BEA 檢測 Lysozyme 之 EIS 訊號(對照組)

上圖中：■表示 Ab-AuMCPs/POAP 作為空白對照組；▲表示接上 Lysozyme 之專一性實驗，[Lysozyme]=0.1 mg/ml。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin

軟體所模擬之數據)

probes	R_{ct} (Ω)	Q_{dl} (F)	n	R_{ct} (Ω)	Z_{w} (Ω)
POAP(Ab-AuMCPs)/Au	80.7	4.02E-07	0.897	310900	2.02E-04
Hp 1-1	60.91	2.62E-07	0.9283	417600	354300
POAP(Ab-AuMCPs)/Au	59.93	4.74E-07	0.912	29720	5.64E-05
Hp 2-1	50.16	3.20E-07	0.9227	48760	5.02E-05
POAP(Ab-AuMCPs)/Au	54.29	1.46E-06	0.8144	346100	1.96E+07
Hp 2-2	539.4	7.67E-08	0.9079	905200	5.52E-06
POAP(Ab-AuMCPs)/Au	72.52	6.40E-07	0.8514	257500	2.92E-05
0.1 mg/ml Lysozyme	522	6.27E-08	0.8863	526100	3.79E-06

表格 5.6 以阻抗分析軟體模擬 POAP based Hp-BEA 對不同表現型 Hp 之偵測

本實驗證明 POAP based Hp-BEA 可成功分辨三種不同表現型之 Hp，雖然專一性程度不高，但已找到相對應之解決辦法。其簡單快速之工作電極修飾步驟，現今已為本實驗室欲發展之生物感測器之製備方向。

5-11-3 Hemoglobin based Hp-BEA

在 Hp-BEA 製備中，其中耗時且昂貴的步驟便是抗體製備了，如果可以將抗體置換成更便宜更易取得的樣品想必可以對於 Hp-BEA 未來的應用性有突破性的進展，有鑑於此，我們使用血紅蛋白(Hb)來作為辨識 Hp 的樣品；也正因為 Hb 在人體血球中占有 95% 以上的含量，所以樣品取得非常容易，設計了這項實驗，作為嘗試。

電極製備步驟一如前述，不同處在於以 Hemoglobin(over 95%)取代 Ab 鍵結於金奈米粒子上。之後，將修飾過後金電極浸泡至血清樣品約 120 μ l，置於 4 $^{\circ}$ C 中等待約 90 分鐘後，以大量 1x PBS buffer 潤洗，以去除物理吸附之 Hp，將其放入至三電極氧化還原反應槽中，以作 EIS 分析。反應槽中加入 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 與 $K_4Fe(CN)_6$ 當作為氧化還原溶液(redox probe)。設定固定直流偏壓為 0.23 V，以利 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 離子至氧化電極反應。掃描頻率為 10^5 ~0.1Hz，交流偏壓為 10 mV，詳細儀器設定見表格四. 1。結果如下圖所見，三種表現型之抗原分子(Hp)在 Hb based Hp-BEA 上皆有不同阻抗反應，見表格五. 7，其電荷傳遞阻抗由小至大分別為(Hp 1-1:3129 ohm, Hp 2-1:3633 ohm, Hp

2-2:4425 ohm)，雖然相對阻抗變化並不像前述設計之 Hp-BEA 來的大，但初步看來，仍是有效的 Hp-BEA 之設計。

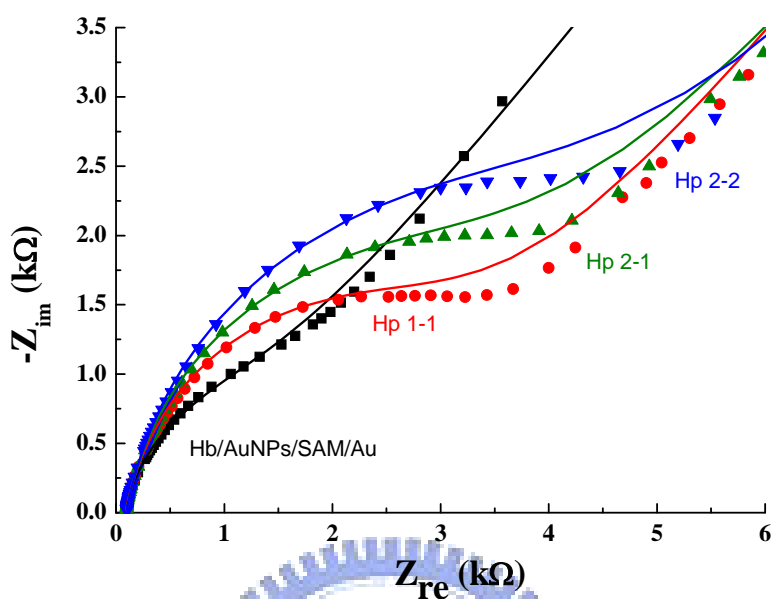


圖 五.29 以 Hb based HpBEA 偵測不同表現型之 Hp
由 Nyquist plot 圖可觀察到三種不同表現型之 Hp 在 EIS 量測中有不同的反應圖譜。電荷傳遞阻抗(R_{ct} , 半圓直徑)有些微程度的差異。(圖中數據點均為實際實驗數據；實線則為使用 Randles' 等校電路經由 Zsimpwin 軟體所模擬之數據)

	R_s (Ω)	Q_{dl} (F)	n	R_{ct} (Ω)	Z_w (Ω)
Hb/AuNPs/SAM/Au	87.61	5.11E-07	0.8783	1373	2.40E-05
Hp 1-1	86.7	6.40E-07	0.8501	3129	4.01E-05
Hp 2-1	90.66	6.21E-07	0.8539	3633	3.07E-05
Hp 2-2	92.38	6.56E-07	0.8516	4425	2.80E-05

表格 五.7 以阻抗分析軟體模擬 Hb based Hp-BEA 對不同表現型 Hp 之偵測

本實驗證明 Haptoglobin based Hp-BEA 亦可成功分辨三種不同表現型之 Hp，雖然反應程度不大，但其樣品製備容易，所以為目前實驗室努力突破之研究方向。

第六章 討論

6-1 本自製感測器可取代商品化之電化學分析儀

本實驗室曾信華博士利用簡單的電路板設計與購置之數據擷取卡設計了此三電極式電化學分析儀，由第五章節之實驗數據可得知，測得之循環伏安法氧化還原電位與電化學阻抗頻譜之趨勢，皆與教科書、文獻記載之結果相符合，由此證明，該實驗工具為一可靠之電化學分析儀。

6-2 使用 Hp-BEA 可以準確的分辨三種不同表現型

本實驗使用設計 Hp-BEA，希望藉由其不用標定(label-free)，非破壞性的偵測原理來取代原有的膠體電泳方式鑑別，以電泳方法從得到樣品到判斷表現型大都需要數小時操作時間，除此之外，經驗指出一般以電泳形式(native page)分辨不同表現型之 Hp 時，Hp 2-1 與 Hp 2-2 經常難以分辨，原因是兩者最明顯差異只有 α 、 β 的不同，其餘則較難直接以有無呈色(band)來判定。使用 Hp-BEA 就不會有這方面的問題，與膠體電泳不同的是，EIS 是以 Hp 整體對於工作電極的遮蔽效應作為對於電解質(Redox probe)的影響作為表現型的判斷，並且從量測頻率自 $10^0 \sim 0.1$ Hz 只需要五分鐘的時間。準確度方面，如同圖五.13 所示，實驗以接上不同表現型 Hp 時的電荷傳遞電阻相對於沒有接上 Hp 時的阻抗取其變化量，並且在不同工作電極間加以標準化(normalize)，由數次實驗的統計圖可知，從標準化過後的電荷傳遞電阻變化值可以清楚的分辨出三種不同的表現型: Hp 1-1 < 0.45 , Hp 2-1 $0.5 \sim 0.9$, Hp 2-2 > 1.0 。就已往文獻的調查，本論文是第一個結合 EIS 與 Hp 表現型判定的研究，相信此次研究可以對於 Hp 表現型判別作出實質的貢獻。

6-3 Hp-BEA 亦可作為濃度檢測計

一般而言，EIS 已經被廣泛的用作在生物樣品的濃度檢測上，無論是蛋白質或病毒皆有相關的研究[119, 127, 128]，並且致力於改善其偵測的極限，目前已知 EIS 對於一般生物樣品的線性偵測極限可達 0.34 ng/ml[52]。本實驗欲探討使否在分辨 Hp 之表現型之外，還可以達到判定濃度的效果，由圖五.21 與下圖可發現，Hp-BEA 其線性偵測範圍約落在 ng/ml 的等級，其極限甚至可至 sub-ng/ml 等級，而該區間由下圖可見，為一線性濃度反應區，也就是說測試者可以將一般血漿樣品稀釋數倍至改區間即可由稀釋倍率回推其樣品濃度；而當樣品濃度在 $\mu\text{g/ml}$ 的等級時，訊號則呈現一個線性的訊號飽和區間，也符合了我們之前預期的在一般血液中，Hp 皆已過量於 Hp-BEA 的型態存在，也

解決了濃度與表現型混淆阻抗的疑慮。如此以來，以一般的血液案例來說，正常 Hp 濃度在血液中皆為過量值(>0.5 mg/ml 以上)，將血液離心取血漿即可判定其表現型，將其稀釋，使其濃度可達線性偵測範圍，即可以同一裝置判斷出 Hp 於血液中的濃度量，於此更加大了 Hp-BEA 的臨床應用潛力。

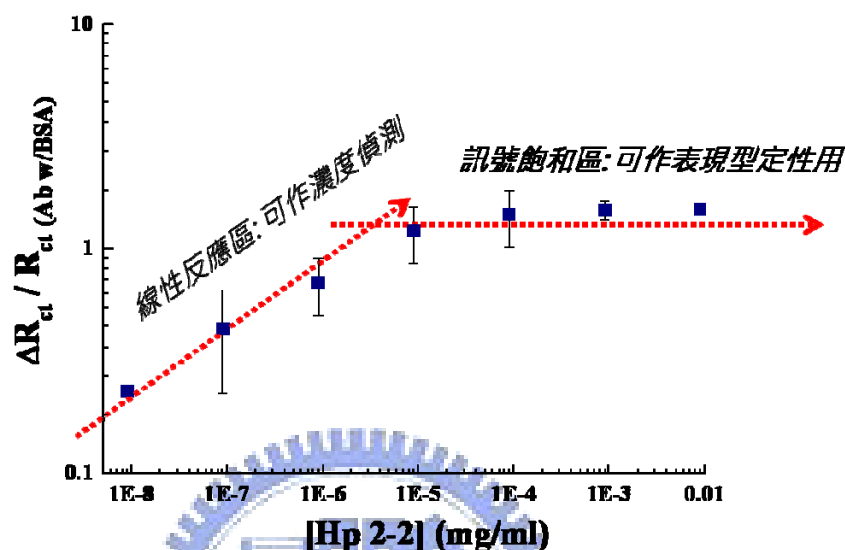


圖 六.1 Hp-BEA 於 Hp 濃度偵測之線性反應區間與飽和濃度

6-4 Hp-BEA 為一可重覆使用，高專一性之穩定生物偵測器

一樣普及化檢測器必定朝著降低生產成本以及提高重複使用性來做改善，Hp-BEA 在對於重複使用性方面，還在嘗試著提高穩定度與重複使用率，如圖章節 5-6-1 與圖六.2 所表示，利用不同酸鹼性的緩衝溶液(wash buffer)，使得抗體分子產生構型上的改變，以致使釋放原有的抗原分子，達到重複使用的效果，由實驗結果可得知，Hp-BEA 之重複使用性質並不受到 Hp 樣品測試順序的影響而可以有效的明顯分辨三種不同表現型之 Hp。目前本實驗正致力於提高重覆使用之極限，如下圖六.2 所示，目前可靠之重覆極限約三次，見綠色方框，其值皆位在虛線(1.6)以下，目前為 Hp 2-2 樣品判斷之標準差上限，推測為處理樣品時易接觸到汙染，也有可能為抗體分子在多次構型改變之後即失去原有之活性，亦可能為高 pH 值之緩衝溶液大量殘留致使偵測溶液(redox probe)被其電性影響。為目前欲解決之課題。在專一性方面，不同於 Hp 濃度的量測，Hp-BEA 於 Lysozyme 中並沒有明顯的濃度依數趨勢，可以作為參考的是，當 Lysozyme 濃度低於 sub ng/ml 時，訊號易受雜質的干擾，也印證了前述之可靠濃度線性區間約落在每毫升數個奈公克之等級。

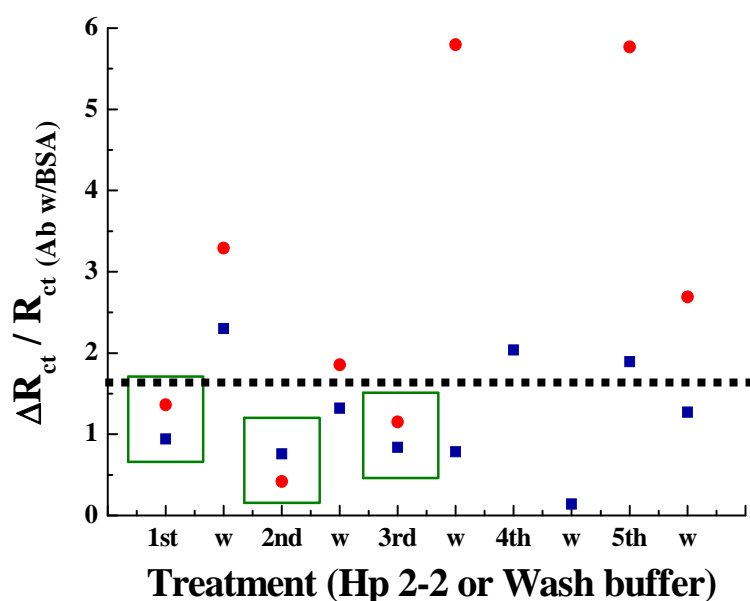


圖 六.2 Hp-BEA 重覆性測試

兩組數據，分別為●與■，綠色方框分別為依序三次與抗原(Hp 2-2)反應之實驗，其值皆落在虛線(1.6)以下，尚可認定為正確的 Hp 2-2 反應，待清洗三次之後，則兩組數據皆成沒有規律之反應，故推測偵測極限約為三次。

6-5 Hp-BEA 提供了一個操作、攜帶容易, 成本低廉的檢測方法

目前據實驗室初步作計算，一跟工作電極的大約是新台幣 100 元的成本，比起一般 7、8000 元等級的工作電極自然是便宜許多，重點在於讓實驗者，或一般醫檢人員有機會可以同時測試大量的生物樣品。另一方面，本實驗室設計之感測器電路板成本也在數百元之內，較商用之電化學分析儀便宜百倍以上，使得 Hp-BEA 有大量推廣的可能性。再者，Hp-BEA 在體積方面，在不含數據截取卡(DAQ)的條件下，只有約 12x5 cm 的大小，使用 USB 介面，普通低階 netbook 即可操作使用。

在操作上，只需將血液樣品初步離心再放入修飾之電極即可成功分辨不同表現型之 Hp，長期目標為待標準化製備程序完成後，操作人員只需拿商品化之電極放入待測血清中即可得知此樣品之 Hp 表現型與濃度。相較於膠體電泳分辨表現型與利用 ELISA 得之濃度，其操作技術門檻與時間都可以大大的減少。當然，本實驗目前最重要的課題便是簡化電極修飾製備的時間。

6-6 使用 POAP based Hp-BEA 以簡化製備程序

如章節 4.3.3 所敘述之，改 POAP-based Hp-BEA 只需兩個實驗步驟即可製備完成，為

本實驗室所有 Hp-BEA 製備方式之中最簡便省時的，約只需要兩個小時的時間就可以製備完成。POAP based Hp-BEA 可清楚的分辨三種不同表現型之 Hp，其趨勢極近似於前述之 Hp-BEA 量測知結果(Hp-BEA 對 Hp 分子標準化後之訊號變化由小至大分別為 0.282, 0.638 與 1.371；而 POAP based Hp-BEA 由小至大為 0.343, 0.641 與 1.615)，見下圖六.3。惟其專一性部分至現在仍難以掌握(POAP based Hp-BEA 對 0.1 mg/ml 之 Lysozyme 分子標準化後之訊號變化達 1.043)，見圖六.4，推測原因為固定之高分子層過厚(目前循環伏安置備之高分子層為五個回合)，以致抗體表現不明顯。本實驗正朝探討高分子層厚度對於 Hp 感測靈敏度與專一性的影響作研究。

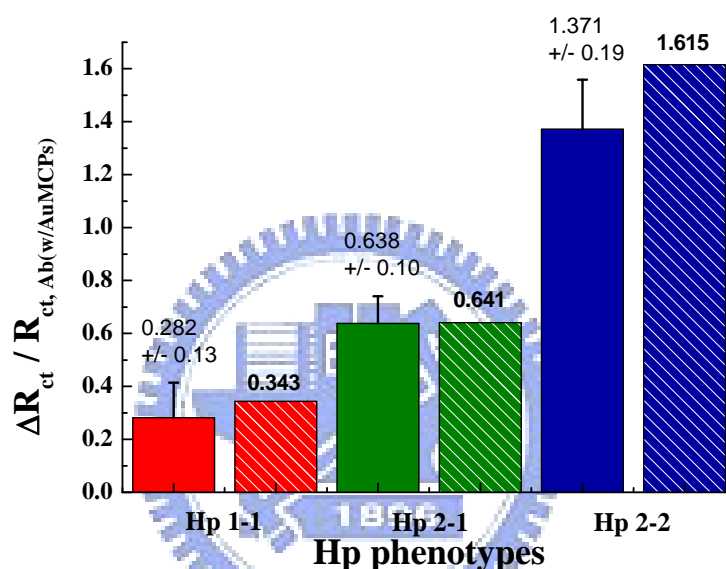


圖 六.3 POAP Based Hp-BEA(斜紋柱狀圖)與之前數據(Hp=BEA, 實心柱狀圖)作比較

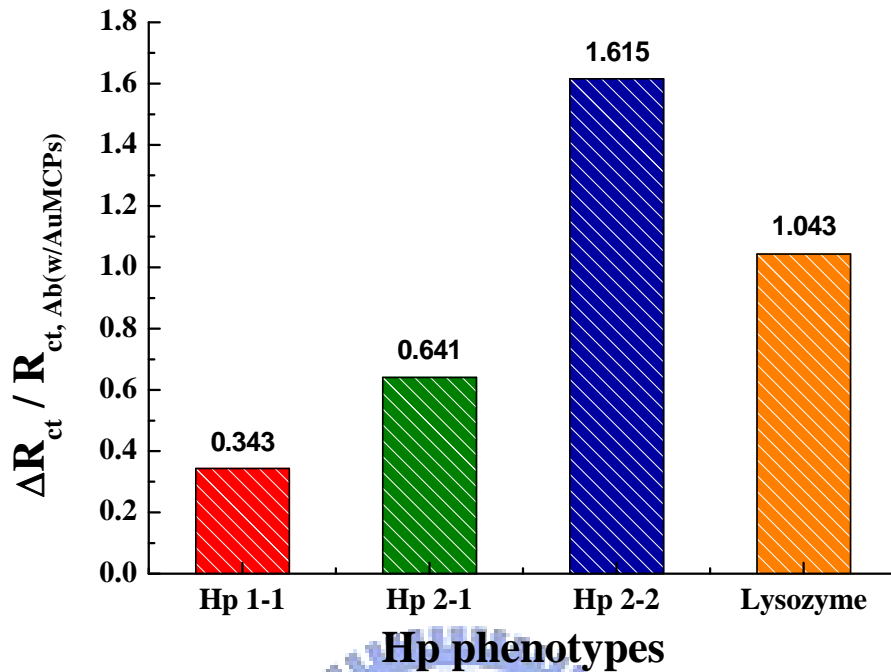


圖 六.4 POAP Based Hp-BEA 對三種表現型之 Hp 作比較以及其對照組實驗

6-7 使用 Hb-based Hp-BEA 以簡化製備程序

從文獻上得知，目前已有研究將 Hemoglobin-Haptoglobin 與電化學感測器 (Amperometric type sensors) 作結合[129]，也因為 monoclonal antibody 製備不易，所以計畫設計 Hb-based Hp-BEA 感測器，讓樣品取得更容易，操作環境更廣泛，由圖五.29 可見，Hb-based Hp-BEA 可以成功的分辨三種表現型的 Hp，但是不同的是， ΔR_{ct} 訊號個別表現型差異性並不如抗體製備的 Hp-BEA 來的明顯(Hp-BEA 對 Hp 分子標準化後之訊號變化由小至大分別為 0.282, 0.638 與 1.371；而 Hb based Hp-BEA 由小至大為 0.035, 0.201 與 0.464)，如下圖六.5 所示，推論因是 Hb 立體構型龐大的關係，使得表面抗原對於電極的遮蔽效果來的較為小。即便如此，使用 Hb 來當作偵測分子已是未來本實驗室努力的方向，希望欲結合其他增大訊號的方法（例如：後製加大 Hp 體積等），來改善目前的量測訊號。

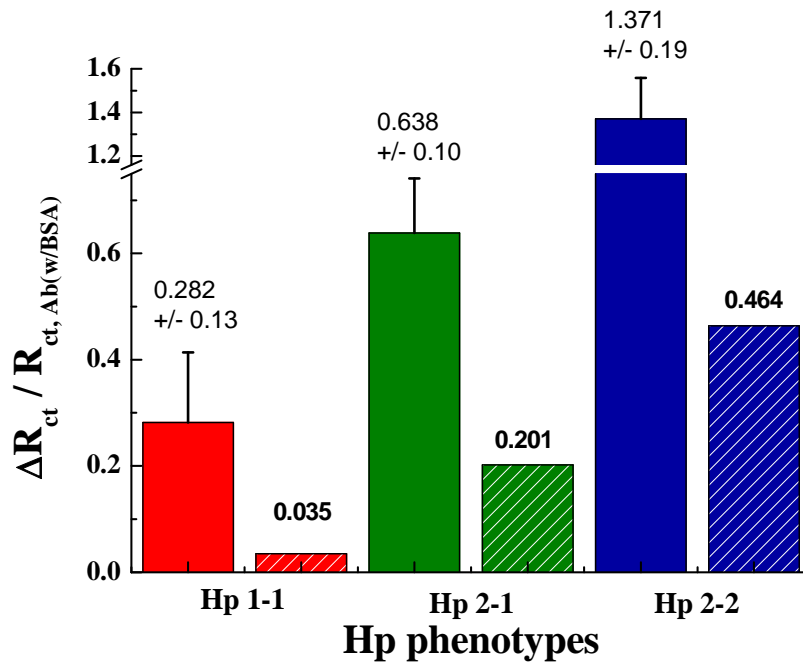


圖 六.5 Hb Based Hp-BEA(斜紋柱狀圖)與之前數據(實心柱狀圖)作比較

6-8 Hp-BEA 與 DSC、DLS 對於分辨 Hp 表現型作比較

目前就本實驗室已知的文獻搜尋，尚未有與 Hp 相關之 DSC 與 DLS 文獻刊登，所以目前以 DSC 與 DLS 作 Hp 表現型的判定，本實驗室葉奕辰、周輔宣學長應為其先驅者。由 DSC 原理可知，主要測其蛋白質之熱變性溫度，也就是 Hp 次單元($\alpha_1\beta$ or $\alpha_2\beta$)之雙硫鍵斷鍵溫度。由數據可知，Hp 2-1 變性分佈溫度較 2-2 為高(61.5 vs 59.5°C)，推測其原因為 2-1 表現型亦含有 $\alpha_1\beta$ 單體，而 $\alpha_1\beta$ 次單元較 $\alpha_2\beta$ 分子間作用力來的強，所以依其變性溫度的不同，理論上我們可以 DSC 的方法判斷不同表現型之 Hp。另一方面，以 DLS 散射光的方式量測蛋白質的水合直徑亦為本論文欲嘗試之 Hp 判定方法之一，由實驗數據可見，其大小由小至大分別為 8、10.5、17 nm (Hp1-1、2-1、2-2)，驗證了 Hp 表現型亦可以 DLS 作判斷。綜合以上兩種分別以熱學與光學判斷 Hp 表現型之方法，與先前敘述之 Hp-BEA 相比較，Hp-BEA 最大之優勢在於其帶有 Hp 之抗體，所以樣品前處理較後二者容易，只需要簡單的血液離心，取其血漿即可；DSC 與 DLS 因為對於樣品內含物沒有鑑別能力，所以必須要以各式層析法(chromatography)的方式先將血漿中的雜蛋白質去除，其過程冗長繁複。另外，Hp-BEA 之儀器體積遠較 DSC 與 DLS 來的小巧，對於推廣至臨床檢驗為絕對的優勢。

第七章 未來展望

如同第一章節所敘述的論文實驗目的本論文欲達到發展快速、操作容易、成本低廉的可攜式生物檢測器與發展可辨識不同 Hp 表現型與正確檢測 Hp 濃度的新方法已達到初步的成果，目前針對實驗製備、研究樣品即電極設計等尚有相當多的想法與規劃，簡述如下：

■ 將相同設計之 BEA 應用於流行性疾病的病毒類型與濃度檢測

目前流感，禽流感，腸病毒等為世界各國頂尖實驗室積極研究的目標，每年發表之文獻更是不計其數，本實驗室認為，如果有一簡易的實驗儀器可以分辨出不同病毒的突變型以及濃度，將大大的增進實驗進度並縮短各地衛生機構對於病毒突變的控制時間，另一方面，對疑似發病者可縮短檢測時間，已近一步改善衛生安全與人身自由的之間的衝突兩難。目前對於流感病毒已有部分的文獻發表[127]，本實驗室則針對腸病毒 71 型(Enterovirus 71)作濃度的檢測作研究，已有初步的結果，如下列所示：

其實驗步驟皆相同於 Hp-BEA 之設計，惟抗體使用不同。

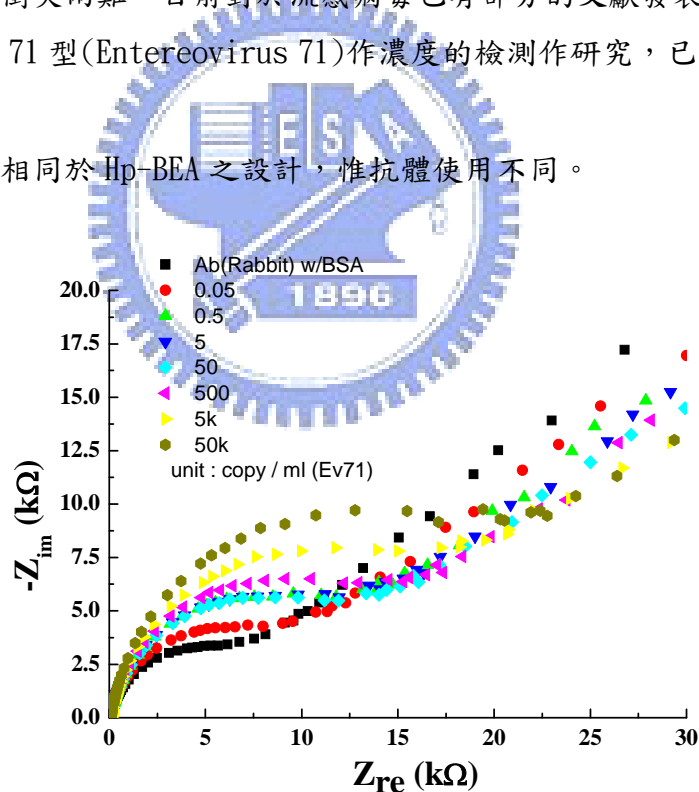


圖 七.1 Virus-BEA 針對不同濃度之 Ev71 作 EIS 分析

由 Nyquist plot 圖中可觀察到 Virus-BEA 在 EIS 量測中有相當程度的反應。如實驗設計所預測，因不同濃度的樣品所影響，在電荷傳遞阻抗(R_{ct} , 半圓直徑)有相當明顯的差異，也因此本實驗證明 Virus-BEA 對於不同濃度之 Ev71 病毒有不同的訊號反應。並將作為病毒濃度檢測器。

■ 利用 sol-gel 設計之 ITO-BEA 應用於各類抗原之檢測

另一方面，本實驗室所設計之 Hp-BEA 在數據量測時間(一分鐘內)以及樣品反應時間(六分鐘內)的研究上都有想當理想的結果，相較於傳統生化分析法也有長足的改善。惟長時間製備過程與重複使用次數依然是本實驗室欲改進努力之目標。目前本研究正在嘗試朝 sol-gel(polymer-film)設計為發展的目標，如同 POAP based Hp-BEA 一樣，其原理為利用生物相容性高的高分子單體，在電極表面產生長鏈網狀聚集，形成孔洞性材質，同時將據有生化活性的抗體分子一定包覆進孔洞中，優點為固定步驟快速，整理化學性質穩定，亦即縮短製備時間與增加 BEA 的重複使用性；不同的是，本實驗目前欲利用導電玻璃(ITO, Indium Tin Oxide)來作為此類設計的基材[130]，可省略掉工作電極研磨的實驗前置時間，又可以藉由其高透光度來即時作光學的量測，如果該實驗設計成功，那將會是本系列實驗之中最省時，最低成本，推廣價值最高的生物感測器設計，下圖為目前利用導電玻璃來生成 POAP 聚合物的初步實驗，步驟同 POAP based Hp-BEA，在數次電聚合效應之後，可見表面有一層咖啡色的聚合物薄膜生成，本實驗設計即是想利用該薄膜來固定偵測物分子。



圖 七.2 空白 ITO 玻璃 (左) 與 POAP 附著之 ITO 玻璃(右, 紅色方框標示處)作比較

■ 利用融溶態金球作 BEA 工作電極製備

本論文研究亦欲取代傳統商品化電極設計，朝客製化，微小化與低價化發展；研究經驗指出，一般品質之較廉價金導線在電子顯微鏡下可見為數頗多的孔洞，推測其原因應為拉線時的速度過快已致孔洞的產生，目前本實驗室正研究利用將金線重新融溶為液體使其自然聚集為微小金球，再將金球置入於高分子塑膠中，接以導線即完成一簡易之高品質工作電極，在電子顯微鏡下也證明孔洞數目明顯變少，推論可

增大電極之穩定程度與增加抗體固定數目已加大訊號反應。

■ **作大量已知表現型之血液樣品測試以驗證 Hp-BEA 之準確度與穩定性**

目前所有關於本論文研究的血液樣品皆來自於自願者提供，尚未有任何大規模的樣品檢測，使得本研究尚停留在實驗階段而無法往臨床實驗上應用，而且 Hp 1-1 始終有樣品取得不易的問題。目前本實驗室透過鄭財木博士的引薦，與台北榮民總醫院潘如濱醫師作合作，短期之內應該可以有較為多數的血液樣品可作研究，如此即有利於 Hp-BEA 的驗證與推廣。



參考文獻

1. Lisdat F, Schäfer D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* 2008, **391**,1555.
2. Langlois M, Delanghe J. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996, **42**,1589.
3. Sadrzadeh SMH, Bozorgmehr J. Haptoglobin Phenotypes in Health and Disorders. *Am J Clin Pathol* 2004, **121**,S97.
4. 張家靖. 蛋白質摺疊與聚集. *物理雙月刊* 2006, **28**,668.
5. Chang C-C, Kan L-S. Protein Folding: An Antagonistic Reaction of Spontaneous Folding and Diffusion Limited Aggregation in Nature. *Chin J Phys* 2007, **45**,693.
6. Nobuhiko Tokuriki MK, Shigeru Negi, Masaru Hoshino, Yuji Goto, Itaru Urabe, Tetsuya Yomo,. Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Protein Science* 2004, **13**,125.
7. Lin K-h, Crocker JC, Prasad V, *et al.* Entropically Driven Colloidal Crystallization on Patterned Surfaces. *Phys Rev Lett* 2000, **85**,1770.
8. Lau AWC, Lin K-H, Yodh AG. Entropic interactions in suspensions of semiflexible rods: Short-range effects of flexibility. *Phys Rev E* 2002, **66**,020401.
9. 張家靖, 蔡娟美, 李美儀, *et al.* 功能性生物巨分子開發與在矽基板之應用. In *專題企劃: 以國家奈米元件實驗室矽晶片技術為基礎邁向 21 世紀生物科技之明星產業*. Edited by. 新竹: 國家實驗研究院 2007.
10. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen--enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971, **15**,232.
11. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971, **8**,871.

12. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem* 2005, **51**,2415.
13. Acebedo G, Hayek A, Klegerman M, *et al.* A rapid ultramicro radioimmunoassay for human thyrotropin. *Biochem Biophys Res Comm* 1975, **65**,449.
14. ELISA/Western blot tests for HIV on URL:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003538.htm>
15. Food Allergen Partnership on URL:
<http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/FoodAllergensLabeling/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm106779.htm#analysis>
16. Lin M, Carlson E, Diaconu E, *et al.* CXCL1/KC and CXCL5/LIX are selectively produced by corneal fibroblasts and mediate neutrophil infiltration to the corneal stroma in LPS keratitis. *J Leukoc Biol* 2007, **81**,786.
17. Marquette CA, Blum LJ. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens Bioelectron* 2006, **21**,1424.
18. Ziegler C, Göpel W. Biosensor development. *Curr Opin Chem Biol* 1998, **2**,585.
19. Wang J. SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips. *Nucl Acids Res* 2000, **28**,3011.
20. Bontidean I, Berggren C, Johansson G, *et al.* Detection of Heavy Metal Ions at Femtomolar Levels Using Protein-Based Biosensors. *Anal Chem* 1998, **70**,4162.
21. Gooding JJ. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Anal Chim Acta* 2006, **559**,137.
22. Cornell BA, Braach-Maksvytis VLB, King LG, *et al.* A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* 1997, **387**,580.
23. Taylor LC, Walt DR. Application of High-Density Optical Microwell Arrays in a Live-Cell Biosensing System. *Anal Biochem* 2000, **278**,132.

24. Clark HA, Kopelman R, Tjalkens R, *et al.* Optical Nanosensors for Chemical Analysis inside Single Living Cells. 2. Sensors for pH and Calcium and the Intracellular Application of PEBBLE Sensors. *Anal Chem* 1999, **71**,4837.
25. Minunni M, Mascini M, Guilbault GG, *et al.* THE QUARTZ-CRYSTAL MICROBALANCE AS BIOSENSOR - A STATUS-REPORT ON ITS FUTURE. *Anal Lett* 1995, **28**,749.
26. Mallat E, Barcel D, Barzen C, *et al.* Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends Anal Chem* 2001, **20**,124.
27. Aizawa H, Kurosawa S, Tozuka M, *et al.* Conventional detection method of fibrinogen and fibrin degradation products using latex piezoelectric immunoassay. *Biosens Bioelectron* 2003, **18**,765.
28. Ma Z, Wu J, Zhou T, *et al.* Detection of human lung carcinoma cell using quartz crystal microbalance amplified by enlarging Au nanoparticles in vitro. *New J Chem* 2002, **26**,1795.
29. Rosen I, Rishpon J. Alkaline phosphatase as a label for a heterogeneous immunoelectrochemical sensor : An electrochemical study. *J Electroanal Chem* 1989, **258**,27.
30. Doron A, Katz E, Willner I. Organization of Au Colloids as Monolayer Films onto ITO Glass Surfaces: Application of the Metal Colloid Films as Base Interfaces To Construct Redox-Active Monolayers. *Langmuir* 1995, **11**,1313.
31. Carter RM, Poli MA, Pesavento M, *et al.* Immunochemical Biosensors for Detection of Saxitoxin and Brevetoxin. *ImmunoMethods* 1993, **3**,128.
32. Tang H, Chen J, Nie L, *et al.* A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film. *Biosens Bioelectron* 2007, **22**,1061.
33. Tsuji I, Eguchi H, Yasukouchi K, *et al.* Enzyme immunosensors based on electropolymerized polytyramine modified electrodes. *Biosens Bioelectron* 1990, **5**,87.

34. Sychugov VA, Tishchenko AV, Lyndin NM, *et al.* Waveguide coupling gratings for high-sensitivity biochemical sensors. *Sens Actuator B-Chem* 1997, **39**,360.
35. Bluestein BI, Walczak IM, Chen SY. FIBER OPTIC EVANESCENT WAVE IMMUNOSENSORS FOR MEDICAL DIAGNOSTICS. *Trends Biotech* 1990, **8**,161.
36. Severs AH, Schasfoort RBM, Salden MHL. An immunosensor for syphilis screening based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* 1993, **8**,185.
37. Soh N, Tokuda T, Watanabe T, *et al.* A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide. *Talanta* 2003, **60**,733.
38. Millot MC, Martin F, Bousquet D, *et al.* A reactive macromolecular matrix for protein immobilization on a gold surface. Application in surface plasmon resonance. *Sens Actuator B-Chem* 1995, **29**,268.
39. Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, *et al.* Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers. *Sens Actuator B-Chem* 1993, **11**,21.
40. Nagel T, Ehrentreich-Föster E, Singh M, *et al.* Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sens Actuator B-Chem* 2008, **129**,934.
41. Schipper EF, Brugman AM, Dominguez C, *et al.* The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology. *Sens Actuator B-Chem* 1997, **40**,147.
42. Leland C. Clark Jr. CL. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1962, **102**,29.
43. Wang Y, Xu H, Zhang J, *et al.* Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 2008, **8**,2043.
44. Qiang Z, Yuan R, Chai Y, *et al.* A new potentiometric immunosensor for determination of [alpha]-fetoprotein based on improved gelatin-silver complex film. *Electrochim Acta* 2006,

- 51,3763.
45. Thurer R, Vigassy T, Hirayama M, *et al.* Potentiometric Immunoassay with Quantum Dot Labels. *Anal Chem* 2007, **79**,5107.
46. Wu L, Chen J, Du D, *et al.* Electrochemical immunoassay for CA125 based on cellulose acetate stabilized antigen/colloidal gold nanoparticles membrane. *Electrochim Acta* 2006, **51**,1208.
47. Du D, Xu X, Wang S, *et al.* Reagentless amperometric carbohydrate antigen 19-9 immunosensor based on direct electrochemistry of immobilized horseradish peroxidase. *Talanta* 2007, **71**,1257.
48. Ordóñez SS, Fàbregas E. New antibodies immobilization system into a graphite-polysulfone membrane for amperometric immunosensors. *Biosens Bioelectron* 2007, **22**,965.
49. Sun Y, Yan F, Yang W, *et al.* Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Biomaterials* 2006, **27**,4042.
50. Liu S, Leech D, Ju H. Application of Colloidal Gold in Protein Immobilization, Electron Transfer, and Biosensing. *Anal Lett* 2003, **36**,1
51. Eugenii Katz IW, Joseph Wang,. Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles. *Electroanalysis* 2004, **16**,19.
52. Zhuo Y, Yu R, Yuan R, *et al.* Enhancement of carcinoembryonic antibody immobilization on gold electrode modified by gold nanoparticles and SiO₂/Thionine nanocomposite. *J Electroanal Chem* 2009, **628**,90.
53. Suni II. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends Anal Chem* 2008, **27**,604.
54. Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2005, **382**,884.

55. Bowman BH: *Hepatic plasma proteins: mechanisms of function and regulation*: San Diego : Academic Press; 1993.
56. Smithies O, Connell GE, Dixon GH. Chromosomal Rearrangements and the Evolution of Haptoglobin Genes. *Nature* 1962, **196**,232.
57. Cheng T-M, Pan J-P, Lai S-T, *et al.* Immunochemical property of human haptoglobin phenotypes: Determination of plasma haptoglobin using type-matched standards. *Clin Biochem* 2007, **40**,1045.
58. Teisberg P, Gjone E. Probable linkage of LCAT locus in man to the [alpha] haptoglobin locus on chromosome 16. *Nature* 1974, **249**,550.
59. Connell GE, Dixon GH, Smithies O. Subdivision of the Three Common Haptoglobin Types based on 'Hidden' Differences. *Nature* 1962, **193**,505.
60. Repine JE. Generation of Hydroxyl Radical by Enzymes, Chemicals, and Human Phagocytes In Vitro DETECTION WITH THE ANTI-INFLAMMATORY AGENT, DIMETHYL SULFOXIDE. *J Clin Investig* 1979, **64**,1642.
61. Rosen H, Klebanoff SJ. Role of iron and ethylenediaminetetraacetic acid in the bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. *Arch Biochem Biophys* 1981, **208**,512.
62. Vercellotti GM, Balla G, Balla J, *et al.* Heme and the Vasculature: an Oxidative Hazard that Induces Antioxidant Defenses in the Endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994, **22**,207
63. McCormick DJ, Atassi MZ. Hemoglobin binding with haptoglobin: Delineation of the haptoglobin binding site on the α -chain of human hemoglobin. *J Protein Chem* 1990, **9**,735.
64. Javid J. Human haptoglobins. *Curr Top Hematol* 1978, **1**,151.
65. Eaton J, Brandt P, Mahoney, JR, *et al.* Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science* 1982, **215**,691.

66. Yang FM, Friedrichs WE, Navarijoashbaugh AL, *et al.* CELL-TYPE-SPECIFIC AND INFLAMMATORY-INDUCED EXPRESSION OF HAPTOGLOBIN GENE IN LUNG. *Lab Investig* 1995, **73**,433.
67. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993, **329**,2002.
68. Edwards DH, Griffith TM, Ryley HC, *et al.* Haptoglobin-haemoglobin complex in human plasma inhibits endothelium dependent relaxation: evidence that endothelium derived relaxing factor acts as a local autocoid. *Cardiovasc Res* 1986, **20**,549.
69. Funk CD. The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1304**,65.
70. Jue D-M, Shim B-S, Kang Y-S. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol Cell Biochem* 1983, **51**,141.
71. Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, *et al.* IDENTIFICATION OF HAPTOGLOBIN AS AN ANGIOGENIC FACTOR IN SERA FROM PATIENTS WITH SYSTEMIC VASCULITIS. *J Clin Invest* 1993, **91**,977.
72. M. Arredouani PM, E. Van Hoeyveld, A. Kasran, H. Baumann, J. L. Ceuppens, E. Stevens,. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 2003, **108**,144.
73. Oh S, Pavlotsky N, Tauber A. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* 1990, **47**,142.
74. Oh SK, Ross S, Walker J, *et al.* ROLE OF A SER IMMUNE SUPPRESSOR IN IMMUNE SURVEILLANCE. *Immunology* 1988, **64**,73.
75. Standing S, Price CP. A kinetic method for the determination of haptoglobin as haemoglobin binding capacity. *Clin Chim Acta* 1976, **66**,393.
76. Andrea John JH, Frank J. Morich,. Identification of a so-far not characterized human

- serum protein associated with essential hypertension. *Electrophoresis* 1985, **6**,292.
77. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* 1955, **61**,629.
78. Marcovina S, France D, Phillips R, *et al.* Monoclonal antibodies can precipitate low-density lipoprotein. I. Characterization and use in determining apolipoprotein B [published erratum appears in *Clin Chem* 1986 Feb;32(2):390]. *Clin Chem* 1985, **31**,1654.
79. Berkova N, Lemay A, Dresser DW, *et al.* Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2001, **7**,747.
80. Piessens MF, Marien G, Stevens E. Decreased haptoglobin levels in respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 1984, **14**,287.
81. Panter S, Sadrzadeh S, Hallaway P, *et al.* Hypohaptoglobinemia associated with familial epilepsy. *J Exp Med* 1985, **161**,748.
82. Gogishvili AV KV, Mamaladze GT, Arutiunova MS, Takadze GSh. Haptoglobin phenotype distribution in patients at high risk of developing myocardial infarct. *Kardiologiia* 1985, **25**,55.
83. Chapelle J, Albert A, Smeets J, *et al.* Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. *N Engl J Med* 1982, **307**,457.
84. Delanghe J, Cambier B, Langlois M, *et al.* Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. *Atherosclerosis* 1997, **132**,215.
85. Braeckman L, De Bacquer D, Delanghe J, *et al.* Associations between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. *Atherosclerosis* 1999, **143**,383.
86. Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, *et al.* Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. *J Hypertens* 1993, **11**,861.
87. Levy AP, Roguin A, Hochberg I, *et al.* Haptoglobin Phenotype and Vascular Complications in Patients with Diabetes. *N Engl J Med* 2000, **343**,969.

88. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, *et al.* Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the strong heart study. *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**,1984.
89. Roguin A, Ribichini F, Ferrero V, *et al.* Haptoglobin phenotype and the risk of restenosis after coronary artery stent implantation. *Am J Cardiol* 2002, **89**,806.
90. Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, *et al.* Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001, **44**,602.
91. Padma T MJ. Association of genetic markers with some eye diseases. *Acta Anthropogenet* 1983, **7**,1.
92. Kasvosve I, Gomo ZAR, Mvundura E, *et al.* Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, **4**,771.
93. Delanghe JR, Langlois MR, Boelaert JR, *et al.* Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. *AIDS* 1998, **12**,1027.
94. Louagie H, Delanghe J, Desombere I, *et al.* Haptoglobin polymorphism and the immune response after hepatitis B vaccination. *Vaccine* 1993, **11**,1188.
95. Bartel U, Elling D, G G. Distribution of haptoglobin phenotypes in gynecologic tumors. *Zentralblatt für Gynäkologie* 1985, **107**,1492.
96. Pescarmona GP, D'Amelio P, Morra E, *et al.* Haptoglobin genotype as a risk factor for postmenopausal osteoporosis. *J Med Genet* 2001, **38**,636.
97. Bottini N, Gimelfarb A, Gloria-Bottini F, *et al.* Haptoglobin genotype and natural fertility in humans. *Fertil Steril* 1999, **72**,293.
98. Bozorgmehr J, Saffari Y, Sadrzadeh S. Role of haptoglobin in epilepsy. In *55th Annual Meeting of the American-Association-for-Clinical-Chemiatry Jul 20-24; Philadelphia, Pennsylvania: Amer Assoc Clinical Chemistry: 2003:A116.*
99. Maes M, Delanghe J, Bocchio Chiavetto L, *et al.* Haptoglobin polymorphism and schizophrenia: Genetic variation on chromosome 16. *Psychiatr Res* 2001, **104**,1.

100. Matsuyama SS, Cripe AT, Joseph J. Haptoglobin Phenotypes in Dementia of the Alzheimer Type. *Hum Hered* 1986, **36**,93.
101. Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 2007, **29**,92.
102. Wang J: *Analytical Electrochemistry* edn 3rd. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006.
103. Zoski CG: *HANDBOOK OF ELECTROCHEMISTRY* edn 1st. Oxford, UK: ELSEVIER; 2006.
104. Randles JEB. Kinetics of rapid electrode reactions. *Discuss Faraday Soc* 1947, **1**,11.
105. Sturtevant JM. BIOCHEMICAL APPLICATIONS OF DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY. *Annu Rev Phys Chem* 1987, **38**,463.
106. Burchard W. STATIC AND DYNAMIC LIGHT-SCATTERING FROM BRANCHED POLYMERS AND BIO-POLYMERS. *Adv Polymer Sci* 1983, **48**,1.
107. Lowe CR. Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. *Curr Opin Struct Biol* 2000, **10**,428.
108. Gooding JJ, Hibbert DB. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *Trends Anal Chem* 1999, **18**,525.
109. 賴民峰: Characteristic Evaluation and Biodetecting Application of Self-Assembled Monolayer by Electrochemical Impedance Spectroscopy. 台南: 國立成功大學: 2004.
110. Poirier GE, Pylant ED. The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111). *Science* 1996, **272**,1145.
111. Finklea HO, Avery S, Lynch M, *et al.* Blocking oriented monolayers of alkyl mercaptans on gold electrodes. *Langmuir* 1987, **3**,409.
112. Nuzzo RG, Fusco FA, Allara DL. Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. *J Am Chem Soc* 1987, **109**,2358.

113. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, *et al.* Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev* 2005, **105**,1103.
114. Sellers H, Ulman A, Shnidman Y, *et al.* Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces: implications for self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc* 1993, **115**,9389.
115. Widrig CA, Alves CA, Porter MD. Scanning tunneling microscopy of ethanethiolate and n-octadecanethiolate monolayers spontaneously absorbed at gold surfaces. *J Am Chem Soc* 1991, **113**,2805.
116. 黃建豪: Combining Gold Nanoparticles with Antibody on SAM Modified Electrode for Trace Protein A Detection Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy. 台南: 國立成功大學 2007.
117. Xiao Y, Ju H-X, Chen H-Y. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Anal Chim Acta* 1999, **391**,73.
118. He YB, Luo HQ, Li NB. Thermodynamic and kinetic analysis of the interaction between hepatitis B surface antibody and antigen on a gold electrode modified with cysteamine and colloidal gold via electrochemistry. *Biosens Bioelectron* 2007, **22**,2952.
119. Balkenhohl T, Lisdat F. An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins. *Analyst* 2007, **132**,314.
120. Ribaut C, Reybier K, Torbiero B, *et al.* Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. *IRBM* 2008, **29**,141.
121. Zhang Z, Liu H, Deng J. A Glucose Biosensor Based on Immobilization of Glucose Oxidase in Electropolymerized o-Aminophenol Film on Platinized Glassy Carbon Electrode. *Anal Chem* 1996, **68**,1632.
122. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, *et al.* One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *J Am*

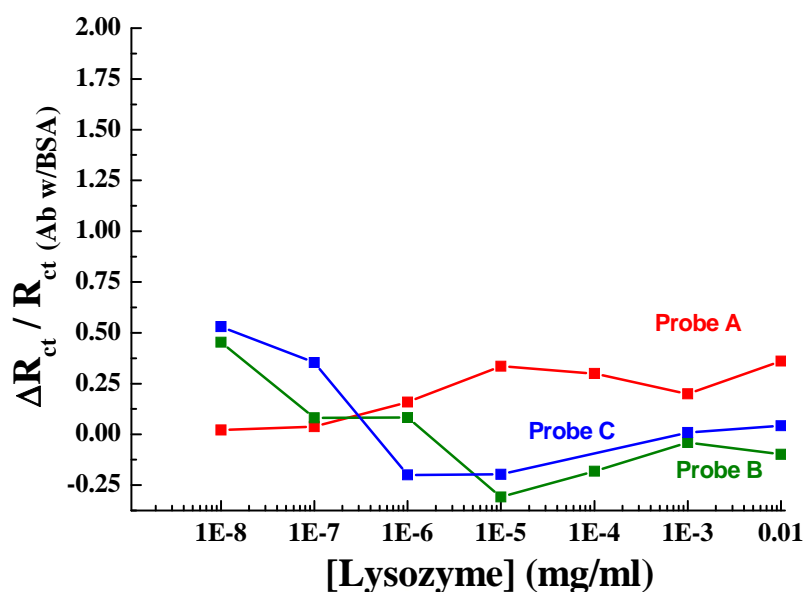
- Chem Soc* 1998, **120**,1959.
123. He H, Xie C, Ren J. Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging. *Anal Chem* 2008, **80**,5951.
124. Templeton AC, Chen S, Gross SM, *et al.* Water-Soluble, Isolable Gold Clusters Protected by Tiopronin and Coenzyme A Monolayers. *Langmuir* 1999, **15**,66.
125. Sen T, Sadhu S, Patra A. Surface energy transfer from rhodamine 6G to gold nanoparticles: A spectroscopic ruler. *Appl Phys Lett* 2007, **91**,043104.
126. Liu Y, Li Y, Liu S, *et al.* Monitoring the self-assembly of chitosan/glutaraldehyde/cysteamine/Au-colloid and the binding of human serum albumin with hesperidin. *Biomaterials* 2004, **25**,5725.
127. Diouani MF, Helali S, Hafaïd I, *et al.* Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection. *Mater Sci Eng C* 2008, **28**,580.
128. Lin C-C, Chen L-C, Huang C-H, *et al.* Development of the multi-functionalized gold nanoparticles with electrochemical-based immunoassay for protein A detection. *J Electroanal Chem* 2008, **619-620**,39.
129. Stöllner D, Stöcklein W, Scheller F, *et al.* Membrane-immobilized haptoglobin as affinity matrix for a hemoglobin-A1c immunosensor. *Anal Chim Acta* 2002, **470**,111.
130. Zhang J, Wang J, Zhu J, *et al.* An electrochemical impedimetric arrayed immunosensor based on indium tin oxide electrodes and silver-enhanced gold nanoparticles. *Microchim Acta* 2008, **163**,63.

附錄

附錄一 實驗相關藥品

論文使用名稱	藥品說明	供應商	編號
3-MPA	3-Mercaptopropionic acid, $\geq 99\%$	Aldrich	M5801
BSA	Albumine, Bovine, Biotechnology grade	Amresco	0332
Cysteamine	2-Aminoethanethiol, BioChemika, $\geq 98.0\%$ (RT)	Fluka	30070
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride	Pierce	PI-22980
Glutaraldehyde	Grade I, 25% in H ₂ O	Sigma-Aldrich	G5882
HAuCl₄	Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate, ACS, 99.99%, Au 49.5% min	Alfa Aesar	36400
K₃Fe(CN)₆	Potassium hexacyanoferrate (III), ACS reagent, $\geq 99\%$	Riedel-de Haën	31253
K₄Fe(CN)₆	Potassium hexacyanoferrate(II), trihydrate, ACS Reagent	J.T.Baker	3114-01
NaBH₄	Sodium borohydride, purum p.a., $\geq 96\%$ (gas-volumetric)	Aldrich	71320
<i>o</i>-Aminophenol	2-Aminophenol, 99%	Alfa Aesar	A13735
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide	Thermo-Scientific	PI-24510
Tiopronin	N-(2-Mercaptopropionyl)glycine, purum, $\geq 98.0\%$ (RT)	Fluka	63794

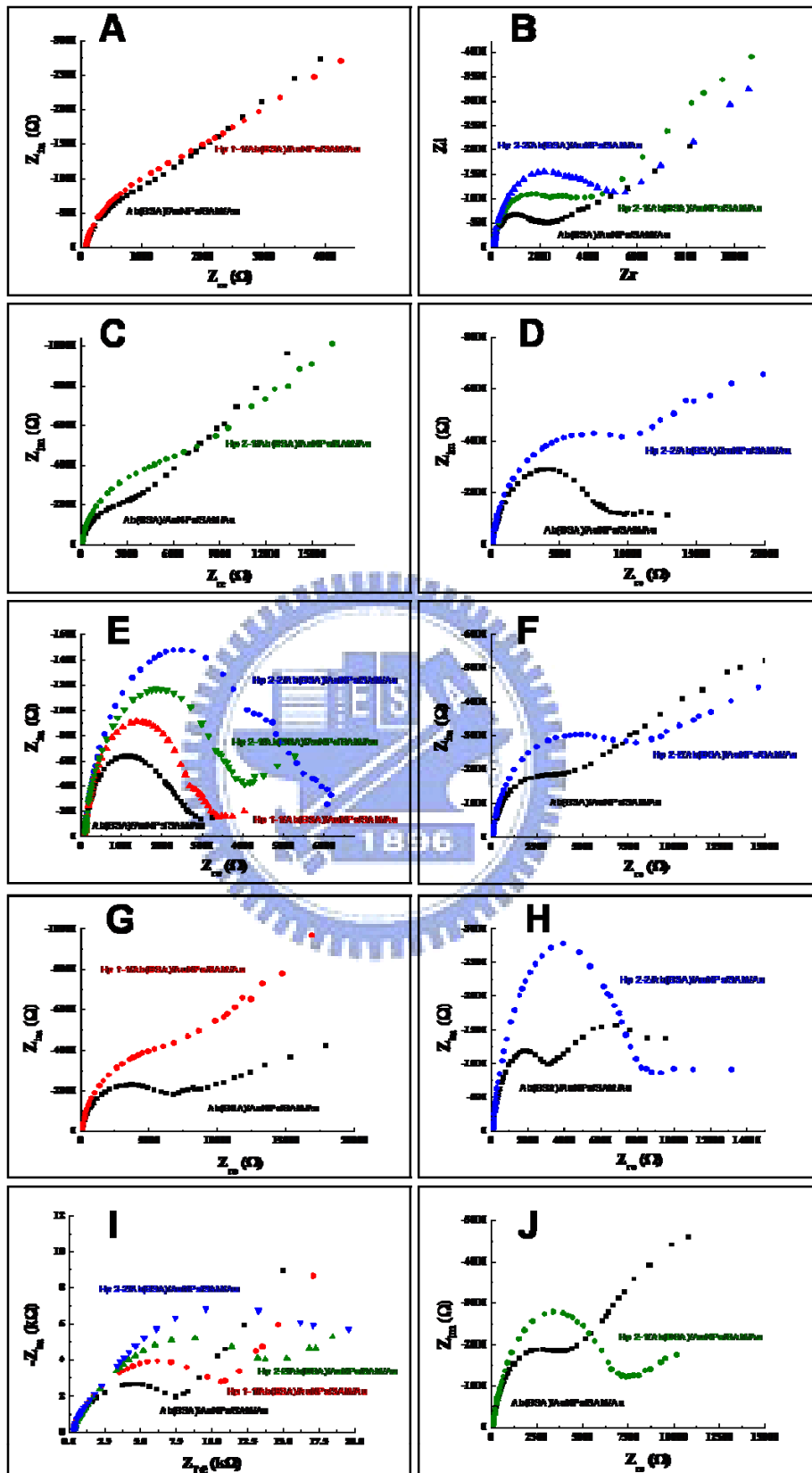
附錄二 Hp-BEA 對 Lysozyme 濃度作檢測之原始 EIS 數據與模擬值



probes	$R_s (\Omega)$	$Q_{dl} (F)$	n	$R_{ct} (\Omega)$	$Z_w (\Omega)$
A, Ab/AuNPs/SAM/Au	85.85	5.81E-07	0.8525	4271	4.50E-05
Lysozyme: 10 ⁻⁸ (mg/ml)	102.8	4.05E-07	0.8708	4360	8.32E-05
10 ⁻⁷	99.32	5.50E-07	0.8528	4433	1.13E-04
10 ⁻⁶	101.5	5.27E-07	0.8575	4950	1.02E-04
10 ⁻⁵	104.3	4.78E-07	0.8643	5703	1.09E-04
10 ⁻⁴	94.41	4.63E-07	0.8679	5548	1.27E-04
10 ⁻³	89.89	4.80E-07	0.8646	5124	1.47E-04
10 ⁻²	89.41	4.65E-07	0.8684	5809	1.17E-04

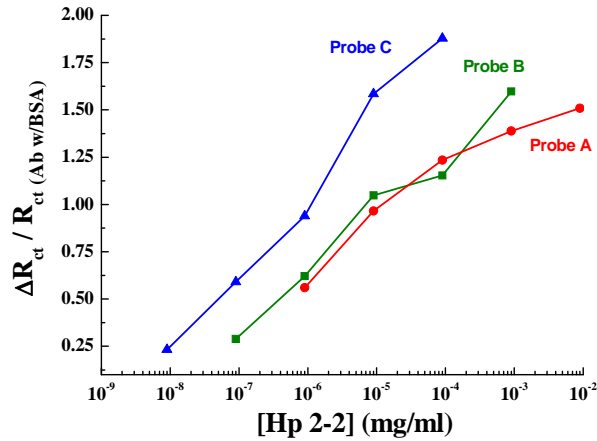
B , Ab/AuNPs/SAM/Au	96.8	4.56E-07	0.8617	5522	2.71E-05
Lysozyme: 10⁻⁸(mg/ml)	98.67	4.48E-07	0.8653	8031	2.25E-05
10⁻⁷	98.37	4.21E-07	0.8764	5970	2.40E-05
10⁻⁶	105.3	4.20E-07	0.8765	5977	2.50E-05
10⁻⁵	98.59	3.80E-07	0.8863	3819	2.55E-05
10⁻⁴	104.6	3.91E-07	0.8833	4515	2.38E-05
10⁻³	83.99	6.10E-07	0.8564	5299	1.94E-05
10⁻²	88.45	4.18E-07	0.8803	4977	1.87E-05
C , Ab/AuNPs/SAM/Au	83.24	4.15E-07	0.8872	1697	3.52E-05
Lysozyme: 10⁻⁸(mg/ml)	92.91	4.98E-07	0.8642	2670	1.57E-04
10⁻⁷	91.6	5.46E-07	0.8581	3714	8.18E-05
10⁻⁶	78.87	7.99E-07	0.8358	1363	1.86E-04
10⁻⁵	86.59	6.11E-07	0.8506	4122	1.45E-04
10⁻⁴	89.58	5.79E-07	0.8534	4556	1.14E-04
10⁻³	85.64	6.23E-07	0.847	4438	1.11E-04
10⁻²	75.19	7.22E-07	0.8383	3315	1.72E-04

附錄三 不同表現型之電阻抗值歸納表之原始 EIS 數據與模擬值



probes	R_s (Ω)	Q_{dl} (F)	n	R_{ct} (Ω)	Z_w (Ω)
A, Ab/AuNPs/SAM/Au	96.1	1.10E-06	0.7989	2577	3.40E-05
Hp 1-1	84.3	1.24E-06	0.7885	3544	3.84E-05
B, Ab/AuNPs/SAM/Au	91.59	2.90E-07	0.9195	1286	4.56E-05
Hp 2-1	95.97	3.16E-07	0.9069	2200	2.55E-05
Hp 2-2	94.91	3.21E-07	0.9022	3421	2.30E-05
C, Ab/AuNPs/SAM/Au	96.76	3.15E-07	0.9	3312	2.01E-05
Hp 2-1	95.49	3.02E-07	0.9007	7190	1.50E-05
D, Ab/AuNPs/SAM/Au	102.3	6.60E-07	0.8477	8020	2.40E-04
Hp 2-2	93.08	5.24E-07	0.8637	11400	2.93E-05
E, Ab/AuNPs/SAM/Au	95.36	3.23E-06	0.756	2176	0.00123
Hp 1-1	98.79	1.85E-06	0.8067	2845	0.00121
Hp 2-1	94.67	1.87E-06	0.7975	3519	6.74E-04
Hp 2-2	102.7	2.09E-06	0.7911	4881	8.08E-04
F, Ab/AuNPs/SAM/Au	86.9	4.67E-07	0.8673	4655	4.43E-05
Hp 2-2	89.57	3.91E-07	0.8809	7827	3.71E-05
G, Ab/AuNPs/SAM/Au	89.53	2.73E-06	0.7853	3568	1.72E-04
Hp 1-1	97.4	1.76E-06	0.8167	7817	3.17E-04
H, Ab/AuNPs/SAM/Au	96.1	1.10E-06	0.7989	2577	3.40E-05
Hp 2-2	84.3	1.24E-06	0.7885	3544	3.84E-05
I, Ab/AuNPs/SAM/Au	350.2	6.27E-07	0.8217	6160	5.97E-05
Hp 1-1	302.7	8.70E-07	0.7928	9285	6.21E-05
Hp 2-1	307	1.24E-06	0.7579	13650	7.47E-05
Hp 2-2	304	1.33E-06	0.7449	18360	5.58E-05
J, Ab/AuNPs/SAM/Au	98.13	4.88E-07	0.8427	4731	4.68E-05
Hp 2-1	89.01	5.92E-07	0.8378	7094	1.68E-04

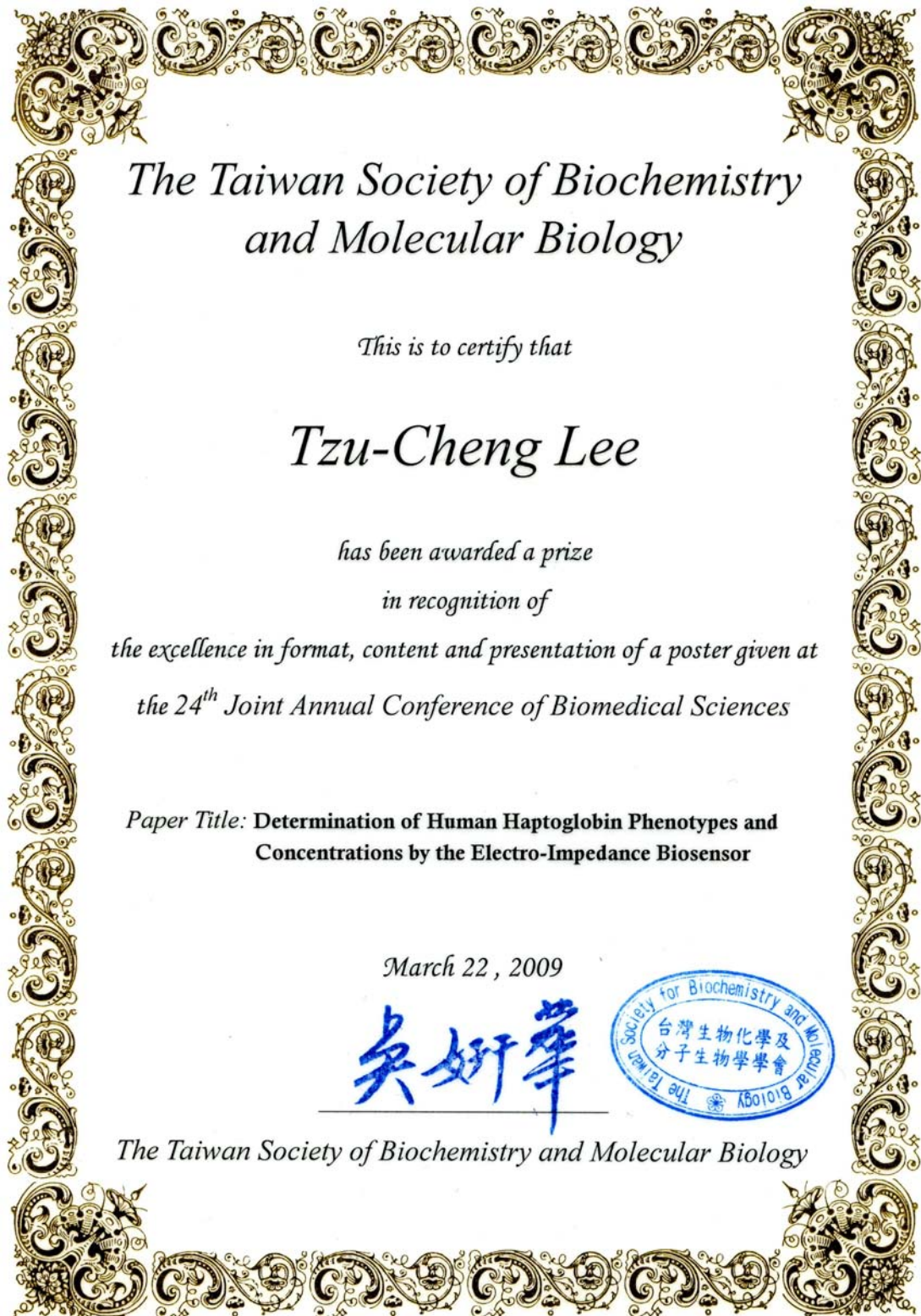
附錄四 Hp-BEA 對 Hp 2-2 濃度作檢測之原始 EIS 數據與模擬值



probes	R_s (Ω)	Q_{dl} (F)	n	R_{ct} (Ω)	Z_{w} (Ω)
A, Ab/AuNPs/SAM/Au	60.98	7.76E-07	0.8639	3344	6.91E-05
Hp 2-2: 10⁻⁶ (mg/ml)	61.51	7.46E-07	0.8653	8217	4.94E-05
10⁻⁵	62.67	7.87E-07	0.8629	6674	4.96E-05
10⁻⁴	55.51	7.91E-07	0.8638	7473	5.04E-05
10⁻³	56.62	7.78E-07	0.8629	7988	4.60E-05
10⁻²	56.62	8.12E-07	0.86	8388	4.04E-05
B, Ab/AuNPs/SAM/Au	37.67	3.92E-08	0.7347	960.1	2.43E-04
Hp 2-2: 10⁻⁷ (mg/ml)	61.37	9.96E-07	0.8237	1190	4.29E-04
10⁻⁶	69.92	9.58E-07	0.8157	1548	3.05E-04
10⁻⁵	78.35	7.31E-07	0.8387	1946	2.77E-04
10⁻⁴	77.57	7.27E-07	0.8367	2047	2.13E-04
10⁻³	79.6	6.60E-07	0.8454	2430	2.12E-04
C, Ab/AuNPs/SAM/Au	60.98	1.10E-08	0.8784	2818	7.19E-05
Hp 2-2: 10⁻⁸ (mg/ml)	57.04	1.27E-08	0.8687	3686	6.96E-05
10⁻⁷	62.03	1.15E-08	0.8727	4643	7.56E-05
10⁻⁶	56.38	1.19E-08	0.8735	5668	7.53E-05
10⁻⁵	54.47	1.21E-08	0.8739	7543	6.49E-05
10⁻⁴	52.91	1.13E-08	0.8781	8388	6.68E-05

附錄五 本論文研究相關獲獎紀錄

第二十四屆生物醫學聯合年會優秀看板論文獎狀



國立交通大學生物科技學院

College of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University

獎 狀

李子正 君參加國立交通大學生物科技學院 2009 年生物科技學術壁報競賽，表現優異，獲選為優勝，特頒此狀以資表揚

Certificate of Award

This certificate is awarded to Tzu-Cheng Lee for his/her outstanding performance in the 2009 Poster Contest of the College of Biological and

Technology, NCTU.

院長 *Jann*

Dean *Jann*

2009/05/14