

貴金屬粒子電漿共振免標定生物感測器

許偉庭

南華大學 自然生物科技學系

摘要：貴金屬奈米粒子在吸收光譜中會產生特性吸收帶，此特性稱為粒子電漿共振波帶 (particle plasmon resonance, PPR)。其波長的位置與吸收度對外在環境的改變相當敏感。若要增加貴金屬奈米粒子的感測靈敏性可以從粒子形狀作選擇也可利用光波導多次內反射來增加光學路徑，同時也可透過貴金屬奈米粒子的表面官能化修飾增加感測器的選擇性。由於偵測是靠待分析物結合在奈米粒子的表面導致介電性質的改變，因此不必因為待測分析物沒有特殊的光譜特性 (例如：螢光基團、發光團...等) 而需要額外進行標記的動作。

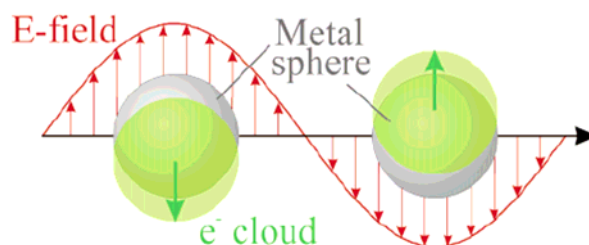
近年來以貴金屬 PPR 現象為基礎開發的檢測平台在感測應用上有長足的進展，此法最大的特點是具有免標定、即時偵測以及高靈敏度等優點，而這些優勢使其成為極具潛力的生物分析工具。本文將介紹不同形狀貴金屬的 PPR 特性與各式奈米生物感測平台。

關鍵詞：貴金屬奈米粒子、粒子電漿共振、免標定生物感測器。

前言

奈米科技之所以能夠成為近年來研究重心的原因之一，是由於許多座落在奈米尺寸的材料，常常會展現出有別其巨觀塊材、並且嶄新的特異性質。其中金屬奈米粒子在光學性質的特異性，更是受到科學家們的矚目，目前也被廣泛的應用在電子、光學、生物等領域上，尤其在生物晶片與生物感測器上的應用更是頻繁。由於貴金屬奈米粒子大小介於原子與巨觀材料之間，包含的原子數目有限，其電子能階密度會隨粒子尺寸大小不同而改變¹；故貴金屬在奈米化後呈現許多獨特的物理特性，這些性質將導致奈米粒子於聲、光、電、磁、熱、力學等特性上呈現小體積效應。對貴金屬而言，比 de Broglie 波長小的奈米結構會增強可見/近紫外光區吸收，即貴金屬奈米粒子大小遠小於光波波長時，金屬表面的自由電子會隨著電磁場振盪而運動以反抗外在電磁場的穿透，在入射光特定的頻率下會引發整體式金屬奈米粒子外層自由電子進行週期

性的集體式偶極或多極振盪 (圖一)；以 5-20 nm 的金圓球奈米粒子為例，此消光現象 (約在 520 nm 左右) 來自於入射光子頻率與導帶電子共振，即所謂的粒子電漿共振 (Particle Plasmon Resonance, PPR) 或定域化表面電漿共振 (localized surface plasmon resonance, LSPR) 物理現象¹⁻⁶。此一 PPR 現象包含有光的強吸收 (強消光係數)、共振光散射 (效率高於螢光且強度不減弱) 與表面電磁場增強 (表面增強光譜) 等效應。



圖一 貴金屬奈米導帶自由電子受入射光激發產生偶極表面電漿振盪示意圖⁶。(經 ACS 許可轉載)

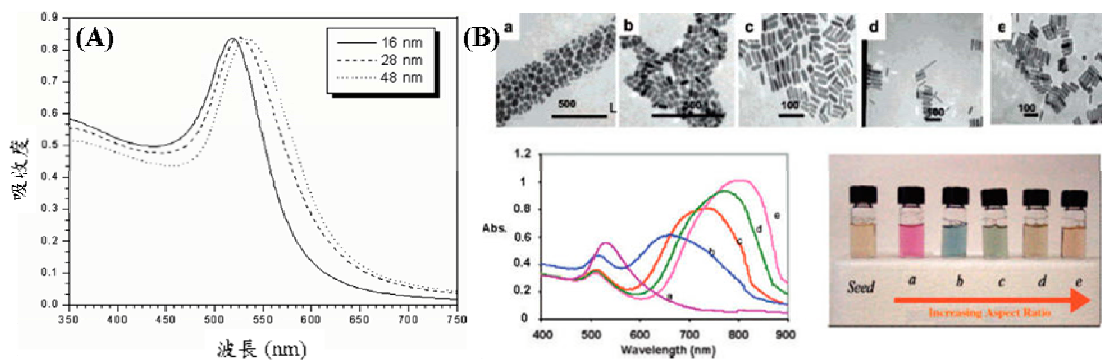
金屬奈米粒子的形狀與大小，對於光的散射與吸收有決定性的影響。以尺寸效應 (the effect of size) 來說，對較大的粒子而言 (> 20 nm)，共振譜帶包含光的吸收與散射現象，表面的電子散射效應會改變金屬極化度的邊界條件，此時以較低的能量就能夠極化激發金屬奈米粒子，因此所呈現的共振波帶會隨著粒子增大而紅位移 (red shift) 至較長的波長位置，此稱為外尺寸效應 (extrinsic size effect)¹，而此時的電漿共振譜帶波寬也將隨著粒子增大而變寬 (圖二 A)；然而，對遠小於入射光波長的粒子而言 (< 20 nm)，偶極振盪主要影響消光截面積，這時候電漿共振頻率和波寬與粒子大小無關，但實際上的實驗結果顯示，直到粒子小於 2 nm 時，電漿共振譜帶才會與粒子大小無關，甚至完全消失，因為隨著粒子變小，導帶電子可以很快的到達粒子表面且進行散射而失去了共振性質，且隨著粒子變小反而造成譜帶波寬增加的現象。由於奈米粒子表面的性質扮演很重要的角色，若是表面電荷改變時，粒子電漿共振頻率便會發生偏移，因此粒子的表面修飾往往導致吸收光譜的改變⁷。部分研究學者藉由金屬奈米材料表面修飾不同的官能基及透過材料型態的控制製作免標定的感測器。粒子電漿共振主要的優點有容易組裝、免標定、反應時間快、有小的偵測點以及表面增強拉曼散射等。

以形狀效應 (the effect of shape) 來說，以金奈米粒子為例，當這些金奈米粒子彼此聚集成形狀不對稱⁸、大小不規則的粒子⁹ (圖二 B) 時，其電漿共振波

長位置也會隨著大小形狀的不同而改變。其主要的原因为對於金屬奈米粒子而言，PPR 共振譜帶的數目至少有一個，最多 3 個。因為奈米粒子的集體偶極震盪可分成 X、Y、Z 三個位向，球形奈米粒子因形狀對稱，所以三個軸向吸收的頻率相同，故造成圓球形奈米粒子在可見光區只有一個特性吸收波帶。當 $X = Y \neq Z$ 時，則在可見光區中會看見兩個特性吸收波帶，短波長的特性吸收波長是由兩個短軸而且位向相同的粒子電漿共振所引起，而長波長的特性吸收波長是由另一個長軸的表面電漿共振所造成的結果； $X \neq Y \neq Z$ ，也就是三個位向的 PPR 共振頻率都不同，根據古典理論計算的推測會有三個特性吸收譜帶。經由理論計算以及實驗結果，均證實長軸的粒子電漿共振頻率會隨著長短軸比例的變化而有大幅度的改變¹⁰。

此外，根據古典理論¹¹ 或者實驗的證實¹²，這個特性吸收波帶的位置變化和環境的介電常數有著關聯，我們可以觀察金奈米粒子的吸收光譜，則可以發現到當外在環境的折射率上升時，其粒子電漿共振的吸收波帶會往長波長方向位移，並且會有吸收度上升的現象¹³；另外若是從散射光的特性來觀察，則會發現到當外在環境折射率上升時，其散射光的光譜同樣也是會往長波長方向來偏移¹⁴，因此由於上述現象，金奈米粒子常被應用在生化感測元件的開發上，當作生化感測元件的材料。

以 PPR 所發展的感測系統除了保有 SPR 感測系統的特性外，因為球狀擴散，所以比起金屬薄層更容



圖二 (A) 為不同大小金圓球奈米粒子溶液之吸收光譜圖；(B) 則為金棒狀奈米粒子的 TEM 與吸收光譜圖⁹。(經 ACS 許可轉載)

易讓樣品擴散至表面，因此會有更快的反應時間。除此之外，奈米粒子本身都是一個光的共振點，而 SPR 系統運作時卻有一定的範圍及角度限制，因此以 PPR 原理所發展的感測平台便有能力開發成較小的 pixel size 的感測系統。此外由於金奈米的 PPR 譜帶座落在可見光的範圍內，加上 PPR 共振不需要光耦合的稜鏡及光學對位裝置，因此 PPR 系統只需要簡單的 UV-Vis 吸收光譜儀就能進行偵測。

一般的生物感測器架構主要包含有生物元件和具物理換能器的微電子電路系統來量測分子尺度的訊號；當分析物與生物接受器發生作用時，結構上的變化將會轉換成有測量效果的訊號，再經由電腦的輸出來讀取。目前發展中的感測器根據其原理可大致分為機械式、電化學式與光學式。機械式感測器有微天平 (Micro-Balance)¹⁵ 與微懸臂 (Micro-Cantilever Beam)¹⁶ 兩種；電化學式感測器有電壓計式 (Potentiometric)¹⁷、電流計式 (Amperometric)¹⁸、電阻抗式 (Impedance)¹⁹ 與電容式 (Capacitive)²⁰；而光學式則包含了螢光式 (Fluorescent)²¹、冷光式 (Chemiluminescence)²²、吸收式 (Absorption)¹³、反射式 (Reflection)、干涉儀式 (Interferometry)²³、表面電漿共振 (Surface plasmon resonance)²⁴ 與粒子電漿共振 (Particle plasmon resonance)²⁵ 等方式。以上的感測器都有其各自的優點，從中可歸納出生化感測器須具備的特性。第一點，生化感測器對待分析物 (Analyte) 必須有特異性 (Specificity) 和選擇性 (Selectivity)。第二點，感測器必須有好的靈敏性 (Sensitivity) 和低的偵測極限 (Limit of detection)。第三點，感測器希望具有快的感應時間 (Response time)。

近年來奈米科技所發展的生物檢測技術大致上可以分為兩類，一是主要以奈米膠體為主，將生物分子修飾化於粒子表面以形成的奈米探針，一般測定以光學為主，製作的技術較為簡單，此稱為免標定 PPR 生物感測探針；另一類則為將奈米粒子固定化於特定基材上做為感測傳導元件並將生物辨識分子修飾於奈米粒子表面，再利用光學儀器進行生物感測的分析，此方法稱為免標定 PPR 生物感測器。

在本篇文章中，將主要介紹以不同的尺寸、材質與形狀的貴金屬奈米粒子 PPR 效應在生物感測上的研

究發展。同時亦介紹以自組裝方式 (self-assembled) 將貴金屬奈米粒子固定於基材上並透過官能基衍伸修飾使其成為免標定、即時偵測極高靈敏度的生物感測元件。

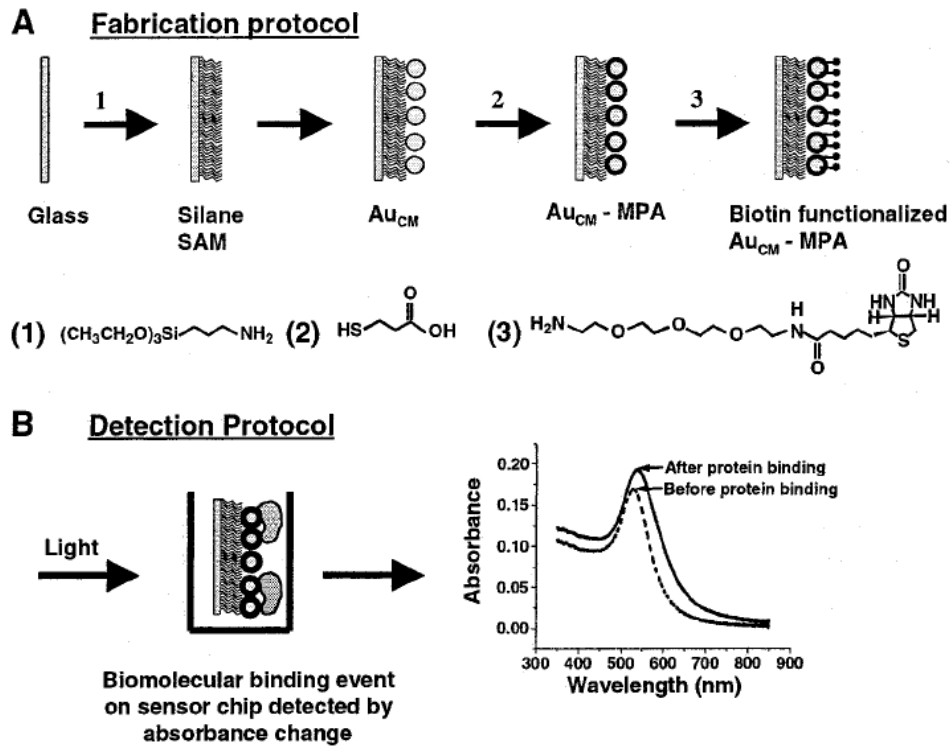
免標定 PPR 生物感測器

圓球形金奈米粒子與銀奈米粒子

圓球形金奈米粒子主要的吸收波峰在大約 520 nm，溶液顏色為桃紅色，而銀奈米粒子主要的吸收波峰在大約 410 nm，溶液顏色為金黃色，因為金奈米粒子的吸收落在可見光的範圍，較易於觀測，且可以很穩定的存在，粒子大小在合成時也容易控制，由於 PPR 吸收波帶對於粒子外在環境的改變十分靈敏²⁶，因此適合用於光學感測元件。奈米粒子對外在環境的改變所造成的光譜位移，根據理論模擬結果²⁷ 可知金奈米粒子為 70 nm/RIU，銀奈米粒子為 120 nm/RIU，若相較於實驗結果²⁸ 金奈米粒子為 72 nm/RIU，銀奈米粒子為 108 nm/RIU，理論與實驗結果呈現相似的趨勢。

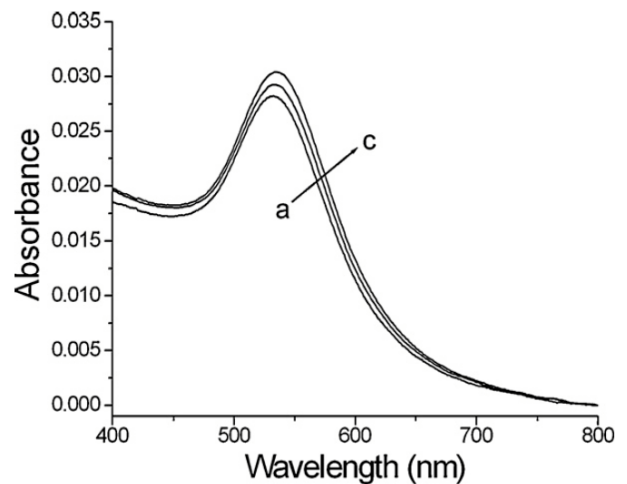
2002 年 Chilkoti 等人¹³ 在玻璃片上修飾圓球形金奈米粒子，成功的偵測不同折射率的溶劑，並在金奈米粒子表面透過官能修飾處理，使表面修飾上 MPA (mercaptropionic acid) 並偵測不同濃度的纖維素原 (fibrinogen)，經由紫外可見光光譜也可看見吸收度有明顯改變 (圖三)，他們也在金奈米粒子表面修飾上維生素 H (biotin)，並對鏈狀卵蛋白 (streptavidin) 做偵測，偵測極限為 16 nM。此外，由於不同濃度的待測物會造成光譜有位移的現象，因此他們也利用比色法成功開發出簡易的陣列式偵測系統。2004 年 Chilkoti²⁹ 等人修飾不同大小的奈米粒子，找出實驗條件的最佳化，發現大約 39 nm 的圓球形金奈米粒子其偵測極限比 2002 年文獻¹³ 的實驗條件提升大約 20 倍，對不同濃度的 streptavidin 溶液作偵測，其偵測極限可以下降至 0.83nM。2004 年 Kajikawa 研究團隊³⁰ 亦將金奈米粒子固定於光纖的尾端製作成生化感測器。

Chau 研究團隊³¹ 曾將顆粒大小落在 10 nm 左右的圓球形金奈米粒子，透過溶膠凝膠組裝薄層的方式，



圖三 金圓球奈米粒子固定化於玻璃片上之生化感測平台¹³。(經 ACS 許可轉載)

相互連接玻璃與圓球形金奈米，成為中間的架橋基，成功將圓球形金奈米粒子修飾在透明的玻璃基材上，表面大約有 30% 的表面覆蓋率，透過紫外可見光光譜儀的測試，確實在 520 nm 附近有一個明顯的吸收波帶。接著配製不同濃度的蔗糖水溶液，使修飾在玻璃基材上的圓球形金奈米粒子的外在環境折射率改變，結果不論是吸收度或是最大吸收波長都會有明顯的偏移²⁵，此偏移關係可以做成一條線性的曲線，由此曲線可建構簡易的折射率光學感測器。接著對玻璃基材上的金奈米粒子做官能化修飾，在金奈米粒子表面修飾上抗原 (biotin)，探討與抗體 (anti-biotin) 鍵結後的光譜變化，透過圖四³²可以明顯看到吸收度的改變，因此可對不同濃度的抗體做偵測，成為簡易的生化感測器。Chau 等人在 2005 年³³亦曾利用聚甲基丙烯酸甲酯 [poly(methyl methacrylate) 簡稱 PMMA] 具有透明度高、易加工、便宜等特性，將 PMMA 代替玻璃基材，將圓球形金奈米粒子修飾在基材表面，同樣的可以利用紫外可見光光譜儀偵測金奈米粒子外在環境的改變，藉助表面場發式光學顯微鏡 (FE-SEM) 可清楚



圖四 圓球形金奈米粒子吸收光譜圖³²：(A) 玻璃片修飾上圓球形金奈米粒子；(B) 將 (A) 步驟的奈米粒子官能化修飾上 biotin；(C) 將 (B) 步驟的樣本置於 anti-biotin 溶液中 (1×10^{-5} M)。(經 ELSEVIER 許可轉載)

看見 PMMA 表面確實有修飾上圓球形金奈米粒子，在光譜圖上也可以看見金奈米粒子的特定吸收波帶隨著

外在環境的變化有著線性的偏移，該系統的感測靈敏度為 77 nm/RIU。雖然 PMMA 對於有機溶劑的忍受力較差，但對部分有機溶液的樣品與一般水溶液的樣品，提供一種可拋棄的材料。

一般而言，銀奈米粒子的穩定性相對於金奈米粒子比較不穩定，但是銀奈米粒子的表面薄膜吸收係數比金奈米粒子大³⁴，對於外在介質環境的變化，有較好的靈敏性，因此，在光學偵測系統的應用上，理論上銀奈米粒子比金奈米粒子更加適合。由於圓球形的銀奈米粒子的特定吸收波帶位置落在 410 nm 左右，同樣的可以利用紫外可見光光譜儀進行測試，Hsu 等人²⁸曾透過化學還原法的方式合成水相與有機相的圓球形銀奈米粒子，其中水相圓球形銀奈米粒子的穩定度極佳，可放置大約 50 天左右還不會有聚集的現象，銀奈米粒子的大小大約在 30 nm 左右。若將銀奈米粒子修飾於玻璃基材上，最大吸收波長對於外在環境的改變同樣有線性關係的變化，其波長位置偏移量為 108 nm/RIU (Refractive Index Unit)，比金奈米粒子的 72 nm/RIU 高。為了比較兩種奈米粒子受外在環境折射率影響的敏感性，作者控制兩種奈米粒子膜有一致的起始吸收度，銀奈米粒子膜對吸收度變化的靈敏度為 0.0419 AU/RIU，確實較金奈米粒子膜的 0.0248 AU/RIU 靈敏，與理論預測相符合。若將銀奈米粒子表面修飾上抗原 (biotin) 對抗體 (anti-biotin) 做偵測，吸收光譜同樣也會有明顯的變化且光譜最大吸收波峰位移量也十分明顯。由此可知，銀奈米粒子的確比金奈米粒子有較高的靈敏性，對於光學感測上的應用應該會有相當高的發展潛力。

棒狀金奈米粒子

由於圓球形奈米粒子的最大吸收波峰位置對於外在環境的感測靈敏度較小，所以最大波長位置偏移量的變化不容易辨別，導致偵測極限有所限制。根據古典靜電學理論中得知，棒狀的奈米粒子相對於圓球形的奈米粒子對於外在環境的改變會有較靈敏的光譜位移，所以可以利用光譜位移做定量分析；另外由於共振波帶會隨外在環境變化，所以也可以利用棒狀金奈

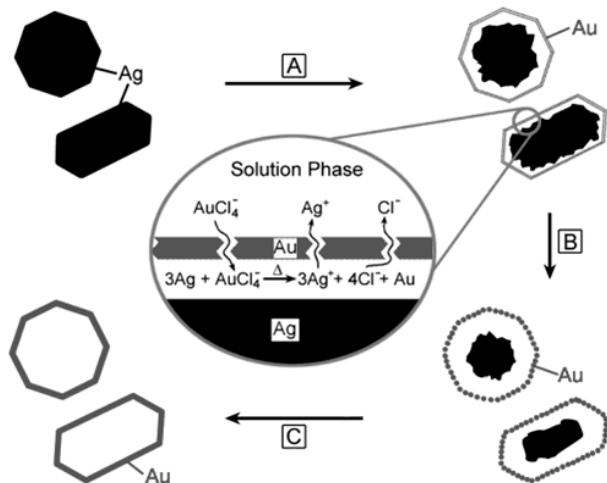
米粒子的顏色變化作半定量偵測。根據理論模擬的結果，當棒狀金奈米粒子的 R 值 (長短軸比例) 越大時 (棒子越長)，其最大吸收波長的位置會有紅移現象，靈敏度也會提高。由於棒狀金奈米粒子的感測靈敏度會隨著 R 值的增加而增加，因此 Chau 等人³⁵曾選用不同 R 值的棒狀金奈米粒子對於外在環境的變化作感測。該研究團隊主要選用 R = 4.6 與 R = 5.17 二種不同 R 值的棒狀金奈米粒子，將其分別修飾於玻璃基材並利用紫外可見光光譜儀，對不同濃度的蔗糖水溶液環境作偵測，二者皆會隨著蔗糖水溶液濃度的增加，而光譜的最大吸收波帶有很明顯的紅位移，所得到的感測靈敏度為 263.3 nm/RIU (R = 4.6) 及 366.0 nm/RIU (R = 5.17)，二者皆比圓球形金奈米 (72 nm/RIU) 好大約 3 至 5 倍，且都有線性的變化。由結果可以歸納出：(1) 棒狀金奈米粒子的最大吸收波長會隨 R 值增加而往長波長偏移。(2) 棒狀金奈米粒子會隨外在環境折射率的不同，其最大吸收波長會有明顯的偏移。(3) 棒狀金奈米粒子之最大吸收波長的偏移對於外在環境折射率的改變比圓球形金奈米粒子還靈敏。(4) 在相同條件下，棒狀金奈米粒子的長度越長，其最大吸收波長的改變也更加明顯。若將棒狀金奈米粒子進行生化感測，則當棒狀金奈米粒子表面修飾上維生素 H (biotin) 偵測鏈狀卵蛋白 (streptavidin)，該系統的偵測極限為 25 ng/mL (4.2×10^{-10} M)，進一步將實驗結果做模擬計算得到的結合常數 (K_d) 為 1.2×10^7 (M^{-1})，這與文獻^{25,36}結果十分相近。

殼體金奈米粒子

Xia 等人³⁷利用氧化還原的方式製備中空殼體金奈米粒子，主要是因為 $AuCl_4^-/Au$ 的標準還原電位 (0.99 V) 比 Ag^+/Ag (0.80 V) 還大，所以會進行氧化還原反應。所以在合成殼體金奈米粒子溶液前必須先製備水相的圓球形銀奈米粒子，並以銀奈米粒子當作模板的角色。將水相的圓球形銀奈米粒子溶液加熱過程中加入 $HAuCl_4(aq)$ ，使銀奈米粒子表面進行氧化還原反應，產生高度結晶性的殼體金奈米粒子。當溶液降低至室溫時，溶解度降低的 $AgCl$ 也慢慢析出。最後將 $AgCl(s)$

移除，則可得到我們所要的殼體金奈米粒子溶液，該殼體金奈米粒子的形狀大小會類似於氧化還原前的水相圓球形銀奈米粒子模板，合成步驟示意圖如圖五所示。

根據殼體金奈米粒子合成的條件控制，可使殼體金奈米粒子的 PPR 吸收波帶範圍介於 560 nm 到 1030 nm 之間^{37,38}，由於殼體金奈米粒子對於外在介電性質的變化也會與棒狀金奈米有類似的情形，隨著溶液的折射率上升，其 PPR 吸收波帶會往長波長偏移。殼體金奈米粒子對折射率變化所造成的光譜位移靈敏性為 409 nm/RIU，該結果較圓球形金奈米粒子進步至少七倍³⁷。Chau 等人³³也嘗試利用殼體金奈米粒子建構感測器，將殼體金奈米修飾於 PMMA 對外在環境作偵測則感測靈敏度為 222.8 nm/RIU，此位移的偏移量相較於圓球型金奈米粒子系統，大約為 3 倍，同時也具有高度的再現性。所以殼體金奈米粒子可以利用外在環境的改變導致位置的偏移來做定量偵測，或者能適用於肉眼觀察的半定量偵測。若將殼體金奈米粒子用於免疫分析，在殼體金奈米粒子的表面修飾上 anti-transferrin 偵測 transferrin，其波長位移量為 38.8 nm，



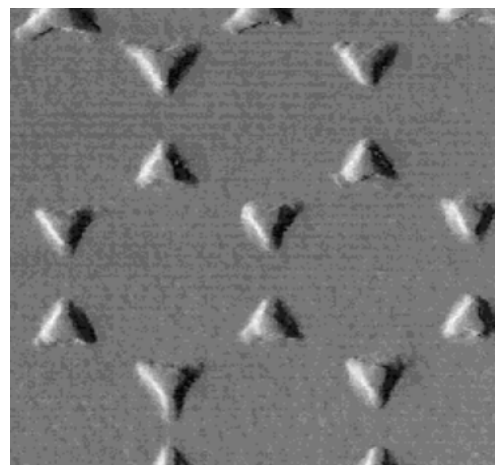
圖五 殼體金奈米粒子合成示意圖³⁷：(A) 在以水相銀奈米粒子當作模板的溶液中加入 HAuCl₄；(B) HAuCl₄ 與銀奈米粒子進行置換反應的過程；(C) 銀奈米粒子被耗盡並進行降溫便完成殼體金奈米粒子的製備。(經 ACS 許可轉載)

相較於圓球形金奈米粒子系統 10.3 nm 的偏移量明顯大很多，其偵測極限為 5.9×10^{-9} M。

三角錐形銀奈米粒子

Van Duyne 研究團隊於 1999 年利用蝕刻技術製作週期性的三角錐形銀奈米粒子³⁹，三角錐形銀奈米粒子如圖六所示，該奈米粒子可透過調控三角錐形的高、寬與形狀使 PPR 的吸收波帶落於可見光區或紅外光區⁴⁰，此三角錐形銀奈米粒子的光譜特性非常敏感，即使是錐形高度的些微改變，同樣會造成吸收光譜波帶明顯的位移⁴¹。由於三角錐形銀奈米粒子對外在環境亦有高靈敏性，因此可做為感測器的材料。Van Duyne 等人主要是利用玻璃片基材修飾上三角錐形銀奈米粒子，接著修飾架橋基，即可連接銀奈米粒子與生化分子，由於三角錐形的銀奈米粒子外在介電性質改變會造成光譜的位移，因此接上架橋基與生化分子理論上都會造成光譜位移，他們曾研究架橋基的長短對光譜的影響，當架橋基隨著碳鏈的增多，光譜位移量的確也會加大⁴²。由於三角錐形的銀奈米粒子對外在環境的改變，也會產生明顯的光譜位移，PPR 吸收波帶對折射率的靈敏性為 191 nm/RIU。

Van Duyne 研究團隊也利用三角錐型銀奈米粒子的感測靈敏性發展生化感測元件⁴²，例如維生素 H 與



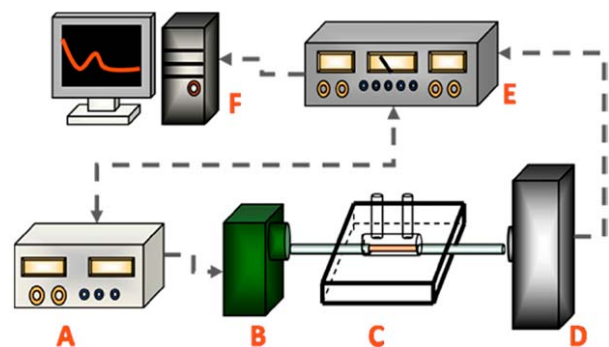
圖六 三角錐形銀奈米粒子的原子顯微鏡影像⁴²。(經 ACS 許可轉載)

鏈狀卵蛋白結合的探討。當玻璃基材上三角錐形銀奈米粒子上的維生素 H 與 100 nM 的鏈狀卵蛋白鍵結，可產生 27 nm 的 PPR 光譜位移，此外又透過 Langmuir adsorption isotherm 理論計算得知飽和結合會產生 26.5 nm 的位移，理論與實驗數據相當一致。若將修飾有 biotin 的三角錐形奈米粒子偵測 anti-biotin，其偵測極限可小於 7×10^{-10} M⁴³。此外該系統若應用於阿茲海默症的臨床檢測標記⁴⁴ (amyloid- β derived diffusible ligands, 簡稱 ADDLs)，該方法可測得病人腦中小於 1 pM 的 ADDL。

光纖式粒子電漿共振感測器 (FO-PPR)

由於貴金屬奈米粒子與特定波長的光發生偶極共振並產生特定的吸收波帶，為了使貴金屬奈米粒子的光學效應更加明顯，2003 年 Chau²⁵ 等人將金奈米粒子修飾在移除塗覆層後的光纖表面，由於光纖具有多次全反射的特性，可使入射光的漸逝波在多次全反射的過程中，產生更長的光學路徑而增加感測靈敏度。同時系統也加入訊號截斷器與鎖向放大器，藉以提升訊號對雜訊的比值以提升系統的靈敏性 (偵測系統如圖七)。此方法不僅可以對圓球形金奈米粒子外在環境的折射率改變進行偵測，透過修飾特定官能基於金奈米粒子表面並收集光纖末端的光強度變化，可用來偵測特定金屬離子和生化分子。在金屬離子感測上對 Ni²⁺ 與 Pb²⁺ 的偵測極限分別為 2.2×10^{-4} M 與 1.1×10^{-4} M，若在金奈米粒子表面修飾上 biotin (維生素 H) 對 streptavidin (鏈狀卵蛋白) 做偵測，其偵測極限下降至 9.8×10^{-11} M，相較於文獻¹³中使用玻璃基材的方式，其偵測極限下降約 3 個數量級。在 2006 年 Chau 等人⁴⁵ 再次利用金奈米粒子修飾光纖作感測元件，其中不同的是將原本穿透式的感測方式變成反射式的探針。其優點是利用反射式的偵測系統可以讓光在光纖中的行進路徑因反射而增加一倍，也可以對狹小的偵測環境採取插入式的方式做偵測，增加使用上的靈活性與方便性。此系統對鎳離子可以有 1.7×10^{-5} M 的偵測極限，也可對 SEB 及 anti-SEB 的抗原抗體對進行感測，偵測極限可以到達 1.4×10^{-12} M。

2010 年 Wang 研究團隊⁴⁶ 成功的將 FO-PPR 感測晶片與微混合器結合，並利用高頻率的交流電場產生電滲渦流來偵測不同濃度的鏈狀卵蛋白 (streptavidin) 及蘭花病毒 (Odontoglossum ringspot virus, 簡稱 ORSV)，該研究對不同濃度的 streptavidin 及 ORSV 所得到的偵測極限分別為 10^{-11} M 及 0.11 ng/mL，此外偵測時間也大幅度的減少一個數量級，由原本的 1000 秒縮短為 330 秒。由於分子擴散時間與距離平方成正比⁴⁷，2011 年 Hsu 和 Chau 等人³² 將 FO-PPR 與微流體結合的優勢與該系統應用於免疫分析的結果，發表於 *Analytica Chimica Acta* 期刊中，該晶片將所需的待測物體積從 3 mL (傳統槽道) 縮小至 14 μ L (微流體槽道)，有效將原本數千秒的反應時間縮短至 300 秒以內，大大減少反應所需時間；該光纖式 PPR 微流體感測系統不僅具有良好的專一選擇性與再現性，量測 anti-DNP (anti-dinitrophenyl antibody)、anti-biotin 和 streptavidin 等生化分子時，感測的偵測極限皆較傳統槽道進步至少一個數量級以上，並利用 anti-OVA 當作樣品進行至少三次的再生過程，使晶片能重複再生的使用，以達到微量、環保、快速、準確等優勢。此外，FO-PPR 系統亦可量測真實樣品，Chau 等人與大林慈濟醫院骨科合作進行退化性關節炎病人關節液檢體量測，其中有 6 位病人的關節液進行 MMP-3 (matrix metalloproteinases-3) 的量測³²，另外有 13 位病人的關節液進行

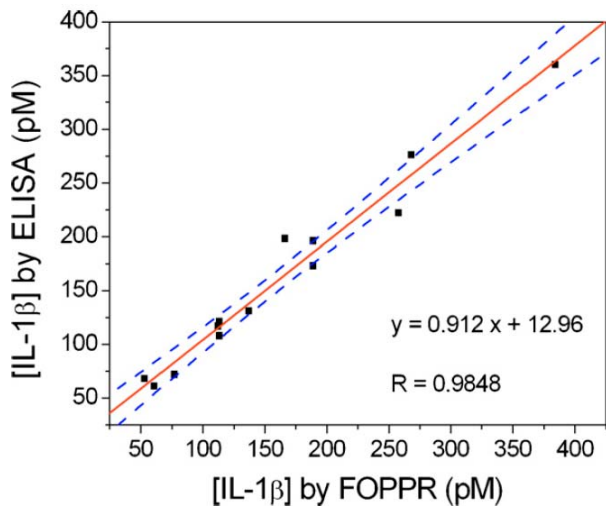


圖七 光纖式 PPR 生化感測平台³²：(A) 波形訊號產生器；(B) 發光二極體；(C) 光纖式生化感測晶片；(D) 光接收器；(E) 鎖向放大器；(F) 電腦。(經 ELSEVIER 許可轉載)

IL-1 β (interleukin-1 β) 的量測⁴⁸，量測的檢體同時利用光纖式 PPR 微流體系統與 ELISA 進行比較，實驗結果顯示兩系統的感測結果具有一致性 (如圖八所示)。

除了在圓形的光纖表面修飾奈米粒子外，有部分學者嘗試改變光纖表面結構以期能增加系統的感測能力。2006 年 Tang 等人⁴⁹ 利用二氧化碳雷射在光纖的纖核部分 (core) 製作長週期的光纖光柵 (long period fiber grating, 簡稱 LPFG)，並在光纖光柵區域修飾上金奈米粒子，該系統對於 anti-DNP 的偵測極限為 1.4×10^{-7} g/mL (9.5×10^{-10} M)。2009 年 Jen 等人⁵⁰ 將光纖表面製作出 U 型與 D 型兩種光纖樣式 (如圖九所示)，該模擬研究結果顯示 D 型光纖與生化分子的結合效率較 U 型光纖為佳，且 D 型光纖相較於 U 型光纖有較佳的機械強度，2010 年 Wu 等人利用飛秒雷射製作 D 型光纖⁵¹，其折射率變化的偵測解析度為 4.1×10^{-4} RIU，相較於 U 型⁵² 的偵測解析度 1.8×10^{-3} RIU 有明顯的差異及進步。

FO-PPR 感測器由上述的結果，共可整理出五項優點：(1) 單一粒子便可成為獨立之檢測單元，可縮小感測器的體積、(2) 簡單的光學元件即可組裝架設、(3) FO-PPR 感測器的組裝成本十分便宜、(4) 具有免標定

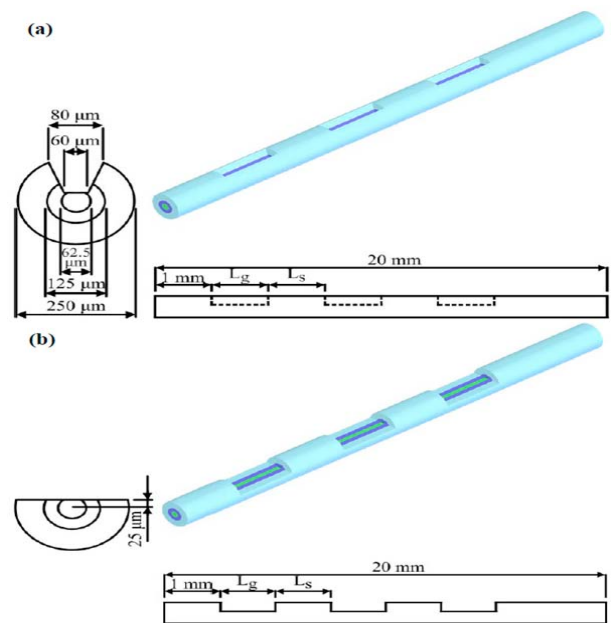


圖八 FO-PPR 與 ELISA 感測系統對關節液 IL-1 β 的感測相關性⁴⁸：虛線為 95% 信心區間的回歸曲線，線性相關係數 $r = 0.9848$ 、 $p < 0.0001$ 。(經 ELSEVIER 許可轉載)

的優點，待測物不需做發光染料的標定、(5) 可即時偵測受體與待測物的結合過程。從 2003 年所發表的期刊至此，FO-PPR 感測系統在 Chau 等多方研究學者的共同努力之下，FO-PPR 生化感測器將是未來極具應用潛力的新型感測平台。

結 論

本文主要介紹了以貴金屬粒子電漿共振為原理所發展的各式免標定生物感測器，此類平台不僅可以對奈米粒子外在環境變化進行偵測，在貴金屬奈米粒子表面上修飾特定且具專一性的生物感測分子，一旦待測分析物與之結合，則可以透過光學訊號的改變進行即時的反應量測。若要增加系統的靈敏度或是配合系統的激發光源波長可選擇不同的奈米粒子形狀。由於此感測器不需要對待測分析物進行額外的標定，可以免除待測物標定的繁瑣過程。且樣品擴散至奈米粒子表面會比樣品擴散至薄層更快，可加快分子之間的反應速率。並且每個奈米粒子都是獨立的感測元件，若將奈米粒子做成微陣列的感測元件，則可有效提升感



圖九 不同形狀光纖感測器之設計⁵⁰：(A) U 型光纖；(B) D 型光纖。(經 MDPI 許可轉載)

測效率。此外奈米粒子也可以結合光纖發展 FO-PPR 系統來增強感測靈敏性。此系統容易組裝且易微小化，並具有簡單、方便、低成本、感測能力佳等優點。雖然在文章中我們提及了許多相當成功的例子，未來對於如何持續提升感測靈敏度、發展多重感測系統、使感測晶片多次再生利用與如何將實驗室平台轉換成實用性更高的技術都是將來所要面臨挑戰的種種課題，亦代表著感測器的開發與生化感測上的應用尚仍有極大的發展空間。

參考文獻

1. Link, S.; El-Sayed, M. A. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *19*, 409.
2. Link, S.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8410.
3. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 920.
4. Alvarez, M. M.; Khoury, J. T.; Schaaff, T. G.; Shafiqullin, M. N.; Vezmar, I.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3706.
5. Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3073.
6. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668.
7. Templeton, A. C.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Mulvaney, P. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 564.
8. Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M. *Nano Today* **2009**, *4*, 244.
9. Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J. X.; Gou, L. F.; Hunyadi, S. E.; Li, T. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857.
10. Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. *Chem. Commun.* **2008**, 544.
11. Creighton, J. A.; Eadon, D. G. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3881.
12. Okamoto, T.; Yamaguchi, I.; Kobayashi, T. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 372.
13. Nath, N.; Chilkoti, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 504.
14. Henglein, A. *The J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 5457.
15. Arregui, F. J.; Liu, Y.; Matias, I. R.; Claus, R. O. *Sens. Actuat. B* **1999**, *59*, 54.
16. Del Villar, I.; Matias, I. R.; Arregui, F. J.; Claus, R. O. *IEEE Trans. Nanotechnol* **2005**, *4*, 187.
17. Lin, V. S. Y.; Motesharei, K. *Science* **1997**, *278*, 840.
18. Nikitin, P. I.; Valeiko, M. V.; Gorshkov, B. G. *Sens. Actuat. B* **2003**, *90*, 46.
19. Northen, M. T.; Turner, K. L. *Curr. Appl. Phys.* **2006**, *6*, 379.
20. Kim, D. S.; Lee, H. U.; Kim, N. H.; Lee, K.-H.; Cho, D.-W.; Kwon, T. H. *Microelectron. Eng.* **2007**, *84*, 1532.
21. Rowe-Taitt, C. A.; Hazzard, J. W.; Hoffman, K. E.; Cras, J. J.; Golden, J. P.; Ligler, F. S. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 579.
22. Wood, K. V. *Luminesc.* **2008**, *23*, 102.
23. Piehler, J.; Brecht, A.; Gauglitz, G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 139.
24. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sens. Actuat. B* **1999**, *54*, 3.
25. Cheng, S. F.; Chau, L. K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 16.
26. Okamoto, T.; Yamaguchi, I.; Kobayashi, T. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 372.
27. Xu, H.; Kall, M. *Sens. Actuat. B* **2002**, *87*, 244.
28. Hsu, W.-T.; Chau, L.-K. *Instrum. Today* **2006**, *28*, 38.
29. Nath, N.; Chilkoti, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5370.
30. Mitsui, K.; Handa, K.; Kajikawa, K. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 4231.
31. Tseng, J.-Y.; Lin, M.-H.; Chau, L.-K. *Colloids Surf. A* **2001**, *182*, 239.
32. Hsu, W.-T.; Hsieh, W.-H.; Cheng, S.-F.; Jen, C.-P.; Wu, C.-C.; Li, C.-H.; Lee, C.-Y.; Li, W.-Y.; Chau, L.-K.; Chiang, C.-Y.; Lyu, S.-R. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *697*, 75.
33. Cheng, S. F.; Chau, L. K.; Pao, K. C. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2005**, *1*, 143.
34. 楊正義、陳吉峰、葉怡均、陳正龍、陳家俊。 *物理雙月刊* **2001**, *23*, 667.

35. Chen, C. D.; Cheng, S. F.; Chau, L. K.; Wang, C. R. C. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 926.
36. Zhao, S.; Reichert, W. M. *Langmuir* **1993**, *9*, 3116.
37. Sun, Y.; Xia, Y. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5297.
38. Sun, Y.; Xia, Y. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1569.
39. Jensen, T. R.; Schatz, G. C.; Duyne, R. P. V. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2394.
40. Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Duyne, R. P. V. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10549.
41. Haes, A. J.; Duyne, R. P. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10596.
42. Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Duyne, R. P. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1471.
43. Riboh, J. C.; Haes, A. J.; McFarland, A. D.; Yonzon, C. R.; Duyne, R. P. V. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1772.
44. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Duyne, R. P. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2264.
45. Chau, L. K.; Lin, Y. F.; Cheng, S. F.; Lin, T. J. *Sens. Actuat. B* **2006**, *113*, 100.
46. Chuang, Y.; Lee, C. Y.; Lu, S. H.; Wang, S. C.; Chau, L. K.; Hsieh, W. H. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1123.
47. Sato, K.; Hibara, A.; Tokeshi, M.; Hisamoto, H.; Kitamori, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 379.
48. Chiang, C. Y.; Hsieh, M. L.; Huang, K. W.; Chau, L. K.; Chang, C. M.; Lyu, S. R. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1036.
49. Tang, J. L.; Cheng, S. F.; Hsu, W. T.; Chiang, T. Y.; Chau, L. K. *Sens. Actuat. B* **2006**, *119*, 105.
50. Huang, C. T.; Jen, C. P.; Chao, T. C.; Wu, W. T.; Li, W. Y.; Chau, L. K. *Sensors* **2009**, *9*, 6456.
51. Chen, C. H.; Chao, T. C.; Li, W. Y.; Shen, W. C.; Cheng, C. W.; Tang, J. L.; Chau, L. K.; Wu, W. T. *J. Laser Micro Nanoeng.* **2010**, *5*, 1.
52. Chen, C. H.; Tsao, T. C.; Li, W. Y.; Shen, W. C.; Cheng, C. W.; Tang, J. L.; Jen, C. P.; Chau, L. K.; Wu, W. T. *Microsyst. Technol.* **2010**, *16*, 1207.

Special Report

Label-Free Particle Plasmon Resonance Biosensors Using Noble Metal Nanoparticles

Wei-Ting Hsu

Department of Natural Biotechnology, Nanhua University,
Chia-Yi, Taiwan

ABSTRACT

Noble metal nanoparticles exhibit a characteristic absorption band in the absorption spectrum, known as “Particle Plasmon Resonance, PPR”. The absorbance and peak wavelength of the PPR band are linearly dependent on the refractive index of the surrounding medium. The sensing sensitivity can be increased by using nanoparticles of different shapes and by using waveguides to increase the optical path. The nanoparticles can also be functionalized to allow the selectivity of the sensor. Since the detection process is based on the change of refractive index of the surrounding medium when the analyte interacts with the molecular recognition group on the nanoparticle surface, the analyte does not require to have a spectroscopic signature (e.g. fluorophore, chromophore, etc.). Thus, noble metal nanoparticles can be used to construct label-free sensors.

Recent developments of biosensors have paved the route toward label-free and real-time optical transducers using the particle plasmon resonance (PPR) of metal nanostructures. These platforms can provide extremely sensitive assays. In this article, the characteristics of noble metal nanoparticles of different shapes and development of biosensors based on these materials will be introduced.

Key words: Noble metal nanoparticles; Particle plasmon resonance; Label-free biosensing.
