

壹、前言

由於採用薄膜式表面電漿波共振 (surface plasmon resonance, SPR) 檢測方式之生化感測器無須螢光或輻射標記待測物，且具有可定性、定量、動態、平行等分析生化分子間交互作用之優點，因此已廣泛地應用於各種科學領域之生化反應動力學的分析研究，不過即便如此，對於分子量少於 1000 Dalton 之微小生化分子的結合反應，由於其對應之 SPR 訊號很微弱甚至無法偵測，因此，有許多文獻在探討可行的強化訊號技術 (Mitchell, 2010; Shankaran, Gobi, & Miura, 2007)，例如，以奈米粒子標記待測小分子便是其中之一，該技術使小分子先與奈米粒子結合再流過表面電漿波共振生化感測器表面，而與固定化之探針分子結合，由於奈米粒子可以強化感測器表面結合之質量變化，甚至使用金屬奈米粒子可進一步產生侷域化表面電漿與薄膜表面電漿耦合效應，使得 SPR 訊號被放大而提升對於小分子反應之訊號偵測能力。

使用奈米粒子時通常須進行粒子表面的化學修飾，而硫醇分子常被使用於修飾金奈米粒子的表面，因其前端的硫氫基分子可與金產生硫金共價鍵結，而其尾端可帶有羧基或是可由 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亞胺 (EPC) 及 N-羥基丁二醯亞胺 (NHS) 活化轉變為 NHS 酯，在中性 pH 值環境下，羧基因為氫離子解離而帶有負電荷，所以可與表面帶有正電荷基團 (如 NH_3^+) 之生化分子產生靜電吸附作用，而硫醇分子帶有羧基的尾端可再經由 EDC 及 NHS 活化轉變成為 NHS 酯，該酯可與表面帶有胺基之生化分子產生勝肽共價鍵結，因此，本研究中將硫醇視為待測之小分子樣品，並於不同的 SPR 反應流程設計下探討比較金奈米粒子標記之硫醇分子與牛血清蛋白分子間之羧基與胺基的靜電吸附以及 NHS 酯與胺基的勝肽鍵結反應之現象，同時也一併探討這些樣品互為流動相或固定相時所產生之結合作用。

貳、實驗方法

在本研究，將以 11 個碳之羧基硫醇分子 ($\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$) 作為本研究中之小分子樣品，並使其以硫金共價鍵結合於金奈米粒子標記。首先，利用檸檬酸鈉 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 將四氯金酸 (HAuCl_4) 還原而製造出含有直徑為 13 nm 之金奈米粒子 (AuNP) 膠體溶液，再分別配置成表面被硫醇修飾後對外伸出羧基的金奈米粒子 (AuNP- COO^-) 與被硫醇修飾並經 EDC 及 NHS 活化後對外伸出 NHS 酯

的金奈米粒子 (AuNP-NHS)，而與硫醇分子進行結合反應的生化分子樣品則採用較常見的牛血清蛋白 (BSA; $0.005\text{g}/100\text{mL}$ or $7.5 \times 10^{-7}\text{ M}$)，AuNP-COO⁻ 的配置方法為 AuNP 水溶液 (15 mM)、羧基硫醇酒精溶液 (1 mM) 及二次水以 1 : 2 : 10 的體積比均勻混合並靜置 2 小時；AuNP-NHS 的配置方法為 AuNP 水溶液 (15 mM)、羧基硫醇酒精溶液 (1 mM)、活化劑 (EDC 與 NHS) 及二次水以 1 : 1 : 2 : 3 的體積比均勻混合並靜置 2 小時，配置後之 AuNP-COO⁻ 與 AuNP-NHS 水溶液無沉澱現象產生，此處使用之 EDC 與 NHS 溶液為 2 mM 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亞胺 (C₈H₁₇N₃HCl) 與 5 mM N-羥基丁二醯亞胺 (C₄H₇NO₃) 的酒精混和溶液，而 SPR 感測器使用之金膜的修飾方法則將金膜浸泡於羧基硫醇酒精溶液 (1 mM) 24 小時後，依序以二次水與酒精沖洗並吹乾，之後在浸泡於 EDC 與 NHS 溶液 12 小時，同樣依序以二次水與酒精沖洗並吹乾後再進行實驗，此處研究者以 AuFilm-NHS 代表有硫醇修飾與活化之金膜，AuFilm-NH₃⁺ 代表未做任何修飾卻覆蓋有帶胺基之雜質吸附層之金膜。

本研究使用具有直立雙旋臂角度掃描之菱鏡耦合 SPR 檢測器，為自行組裝之儀器，使用雷射波長為 632.8 nm，而流道腔之長、寬、高分別為 12.0 mm × 2.2 mm × 0.5 mm，微流道腔溫度控制在 $30 \pm 0.05^\circ\text{C}$ ，體積流率為 4.0 $\mu\text{L}/\text{sec}$ 。另外，使用 0.6 mm 厚的聚碳酸酯 (Polycarbonate) 基板鍍上 50 nm 厚的金膜作為 SPR 檢測用之換能器，此塑膠基板之優點為容易剪裁且與金膜附著力良好，不需要預先鍍上黏著層，本儀器所獲得之共振角度誤差為 $\pm 0.02^\circ$ ，對應之折射率解析度為 2×10^{-4} RIU，整體儀器結構如圖 1 所示。

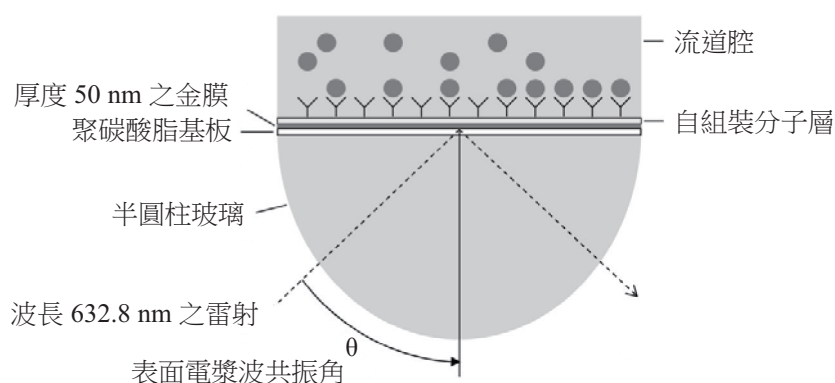


圖 1 菱鏡耦合 SPR 檢測器之結構