

# 微陣列晶片於核酸適體研究之應用

## Applications of Microarray in Aptamer Study

勞業興、陳林祈、張翼中、紀鈞璋、白果能

Yeh-Hsing Lao, Lin-Chi Chen, Yi-Chung Chang, Chun-Wei Chi, Konan Peck

「適體」泛指具有抗體功能之單股寡核苷酸，其可形成特殊之立體結構以辨識特定標的蛋白質，深具疾病診斷與治療之應用潛力。適體的產生藉由一種稱為 SELEX 法的人工篩選程序，此程序涉及大量核酸序列分析與配位子確認，因此應用微陣列晶片技術可有效地縮短核酸適體篩選時程。另一方面，以寡核苷酸所構成之適體點印成微陣列晶片可作為一種新穎蛋白質晶片應用。綜合上述原由，本文將簡介適體研發背景，並藉由幾個適體研究上的應用實例，探討微陣列晶片技術在加速適體篩選與蛋白質分析檢測方面之優勢。

“Aptamers” are a unique class of single-stranded oligonucleotides that resemble naturally occurring antibodies. They can fold into unique tertiary conformations for specific recognition of target proteins. Thus, aptamers have great potential for disease diagnosis and therapy. Generation of an aptamer relies on an *in vitro* selection process called SELEX, which involves analysis and identification of ligands from a multitude of nucleic acid sequences. Hence, exploitation of microarray techniques can effectively shorten the time required for aptamer screening. In addition, arraying oligonucleotide-based aptamers into a microarray format can lead to a novel protein chip application. Considering the aforementioned reasons, we brief the backgrounds for aptamer R&Ds and discuss the strengths of microarray techniques in acceleration of aptamer screening and protein analysis by several practical examples in this article.

### 一、前言

適體 (aptamer) 為一種經由人工篩選所得之單股寡核苷酸 (single-stranded oligonucleotides)，其能藉由疏水性作用力 (hydrophobic interaction) 及氫鍵 (hydrogen bonding) 形成獨特之立體結構，且對於特定標的物具有極高的親和力與選別性，作用如同蛋白質抗體，因此也有學者稱適體為人工抗體或是核酸抗體。適體的篩選方法於 90 年代初期由美國科羅拉多大學的 Larry Gold 教授與哈佛大學的 Jack W. Szostak 教授團隊分別提出。他們利用「系統性

配位子指數增益演繹程序 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)」，針對特定標的蛋白，進行以選擇性分子識別為基礎之核酸配位子 (ligands) 篩選<sup>(1,2)</sup>，以獲得高度專一性的核酸適體。經過十餘年的發展，SELEX 方法已被驗證可針對蛋白質、病毒、細菌乃至於小分子篩選出高專一性、高親和力之核酸適體<sup>(3)</sup>。

相較於一般抗體，核酸適體有兩大優點。第一，核酸適體的分子量約落在 10 至 20 kD 範圍內，遠較一般蛋白質抗體低，在標靶治療及細胞影像應用上，比傳統抗體有較佳之組織穿透性，易到

達表現標的蛋白的癌細胞或病變細胞上。第二，由於適體組成為核酸，其序列可直接利用化學方法合成，在生產上較蛋白質抗體為易；同時核酸分子的化學穩定性較佳，在保存上也較為容易。因此最近幾年核酸適體常被用於發展新穎的分子診斷 (molecular diagnostics) 技術，包含螢光感測、電化學感測及表面電漿共振等核酸適體感測領域的技術開發<sup>(4-6)</sup>。在螢光感測部分，受惠於適體的組成為寡核苷酸，傳統 DNA 微陣列晶片 (DNA microarray) 技術可直接用於發展核酸適體生物晶片。筆者研究團隊最近利用既有之微陣列晶片技術<sup>(7, 8)</sup> 與高通量 (high throughput) 分析經驗，開發可適用於平行偵測多種標的蛋白之適體蛋白質晶片 (aptamer-based protein chips)。這類微陣列晶片亦可應用在加速適體篩選及確認高專一性與高親和力之核酸適體。

## 二、核酸適體篩選原理與微陣列晶片應用

歷經十餘年的發展，「系統性配位子指數增益演繹程序」(SELEX) 技術已有許多變革與改進，但方法架構並未有太大變化。基本 SELEX 程序如圖 1 所示，首先將欲篩選出適體之標的物固定於磁珠 (magnetic beads) 或管柱等固相基材上，然後與具有  $10^{14}$  至  $10^{15}$  種不同序列之單股核酸分子庫 (library) 進行雜合作用 (hybridization)。由於標的物固定於固相基材上，因此在雜合作用之後可利用離心或是磁力方式進行洗滌 (wash) 步驟，如此便能將非專一性吸附於基材或標的物上之非適體核酸序列去除，同時亦能以同樣方式獲得標的物-核酸配位子 (ligand) 複合物。再進一步純化出具標的親和力之核酸配位子後，便能利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 將核酸序列擴增放大。聚合酶連鎖反應的雙股核酸產物經過單股序列分離 (single-strand isolation) 後即完成一回合 (round) 的 SELEX 程序，並產生一群具有更強標的物辨識能力的單股核酸集合。這個新的單股核酸集合將投入下一回合的 SELEX 篩選程序。

SELEX 技術的核心精神來自達爾文演化論的物競天擇概念，因此經周而復始的 SELEX 篩選程

序，整體單股核酸集合對標的物的解離常數 (dissociation constants) 便能由原先  $\mu\text{M}$  等級降至  $\text{nM}$  或  $\text{pM}$  等級，隨後藉由定序分析便能得到核酸適體的候選序列 (candidate sequences)。

候選序列需要進一步的分析，方能確定與標的物識別性最佳的序列 (即適體) 為何。一般會先行利用兩種方法進行判斷。第一種方法直接對序列進行重複性分析，理論上識別性越高的核酸適體在篩選過程中應越容易被挑出，因此定序結果中重複性高的序列有較高的機率就是適體序列。第二種則是以序列比對 (sequence alignment) 的方式來判斷候選序列中是否出現共同序列區域 (conserved region)，若多條序列中存在一致的共同序列區域，可以推估與標的物主要結合的結構應由此一共同序列區域所組成，識別性最佳的適體亦可能出現於含有共同序列區域的序列之中。在序列分析之後，通常會利用濾膜結合試驗 (filter binding assay) 等方法來決定候選序列的解離常數，進而從候選序列中挑得親和性和專一性最佳之核酸適體，但候選序列可能有十幾至數十條，若要分別進行濾膜結合試驗，將會花費大量的時間以及實驗成本。相形之下，微陣列晶片提供一個非常有效率的序列分析方法，可用來簡化繁複的候選序列確認步驟。這是因為微陣列晶片高通量分析的特性極為適用於篩選單股寡核苷酸所

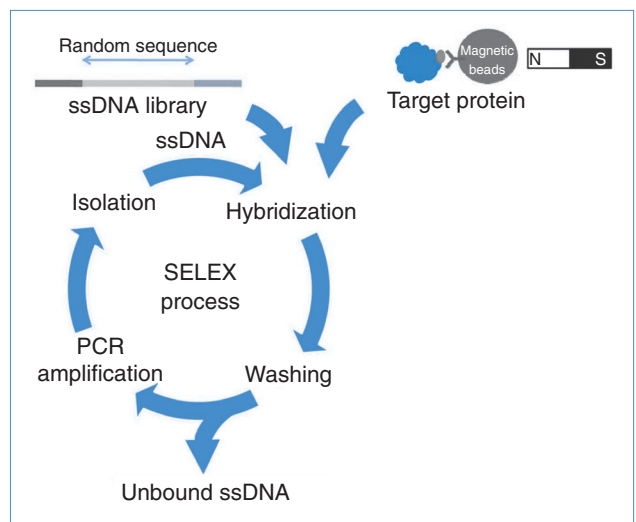


圖 1.「系統性配位子指數增益演繹程序」技術 (SELEX) 基本架構示意圖。

構成之適體，所有的候選序列可同時點印在晶片表面，藉由與螢光標記之標的物的雜合反應，便能以所測得的螢光強度來判別最佳序列。除了可協助確認最佳的適體序列，微陣列晶片亦容許利用序列位移 (sequence shift) 或是鹼基置換 (base replacement) 的方式來決定適體與標的物結合序列以及進行適體序列長度之最佳化。在分子診斷應用上，可將能辨識不同標的蛋白之核酸適體同時點印在晶片上，以發展高通量分析之適體晶片來檢測蛋白質。

### 三、應用微陣列晶片加速核酸適體篩選

微陣列晶片高通量分析的特性可用來幫助研究人員從多組 SELEX 所得之候選序列中快速挑選識別性最佳的核酸適體，以利於核酸適體之最佳化設計。以下以兩實例說明應用微陣列晶片進行核酸適體候選序列分析與最佳化設計。

#### 1. 應用微陣列晶片確認核酸適體

完成 SELEX 程序後所得之適體候選序列雖可利用重複性比對與鹼基排列比對進行初步分析，然而重複性最高的候選序列亦可能並非親和性最好的適體<sup>(9)</sup>；再者，鹼基排列比對僅能預測適體核酸序列在 SELEX 過程中被保留下來的共同序列區域為何，但非共同序列區域位置的鹼基仍可能會扮演適體辨識標的物的關鍵角色，因此無法直接由序列比對或是重複性比較中得出最佳的核酸適體序列。相對地，微陣列晶片平台提供研究人員一個直接比較候選序列對標的物識別能力高低的工具。實作上可將全部適體候選序列建置於晶片上，藉由類似抗體晶片的試驗步驟，判讀個別候選序列所結合之螢光標記標的物多寡，便能具體評估最佳的適體候選序列為何。

在晶片製程上，可以利用機械點印 (spotting) 或是原位合成 (*in situ synthesis*) 的方式，將候選序列固定於帶有官能基修飾之晶片表面上<sup>(7)</sup>。基本的操作原理與晶片生產與傳統 DNA 微陣列晶片完全相同，例如德州大學 Ellington 教授的研究團隊便利用卵白素 (avidin) 類似物修飾玻璃晶片表面，以

進行核酸適體點印。他們將尾端修飾生物素 (biotin) 的候選序列直接點印於帶有卵白素修飾之晶片表面，由於卵白素與生物素兩者間的解離常數在 fM 等級，因此可讓適體序列輕易地固定於晶片表面上，該團隊同時對適體點印之最佳化條件進行討論<sup>(10,11)</sup>。

然而卵白素修飾的晶片有保存上的問題，因此本研究團隊所採用的適體固定化策略是利用胺基 (amino group) 與環氧基 (epoxy group) 共價鍵結反應的特性，將尾端帶有胺基的候選序列點印在環氧化物修飾的晶片表面製成適體微陣列晶片。在篩選抗人類凝血蛋白原 (prothrombin) 適體的過程中，便利用此一適體微陣列晶片技術來比較 SELEX 法所得之候選序列對凝血蛋白原之親和性與專一性。經過十個回合 SELEX 篩選，我們進行了最後一回合所得之單股核酸集合序列分析，定序結果獲得五組具重複性之候選序列，合成這些序列，並將其尾端修飾胺基然後點印於環氧化物修飾之晶片表面後，再與標定綠色 Cy3 螢光分子之凝血蛋白原進行雜合試驗，最後藉由判斷綠色螢光強度，推論出不同適體候選序列對標的蛋白質的親和力強弱 (如圖 2(a) 所示)。在專一性測試的部分，則利用凝血蛋白原的下游產物凝血蛋白 (thrombin) 進行干擾試驗，讓晶片在與凝血蛋白原樣本作用的過程中，加入同樣濃度但標定紅色 Cy5 螢光分子之凝血蛋白進行辨識干擾，然後藉由微陣列晶片訊號中綠色／紅色的螢光比值，便能挑選出專一性最佳的核酸適體 (如圖 2(b) 所示)。

在實驗過程中，我們的晶片表面同時點印另一團隊<sup>(12)</sup> 所發表之抗凝血蛋白原核酸適體 F16 作為親和性分析對照組；專一性分析的部分，則以兩種專一辨識凝血蛋白之核酸適體 HTQ 與 HTDQ 作為控制組<sup>(13,14)</sup>。利用此一方法可以得知親和性較佳的候選序列應為編號 C5 及 RB2 兩條核酸適體，而 E2 及 B8 兩條序列則具有較佳的專一性。與對照組相比，本研究團隊所篩選之抗凝血蛋白原適體具有較佳的親和性，同時專一性亦較文獻中所報導之適體序列為佳。適體微陣列分析結果顯示經過十回合 SELEX 篩選後，可成功地產生凝血蛋白原的核酸適體。

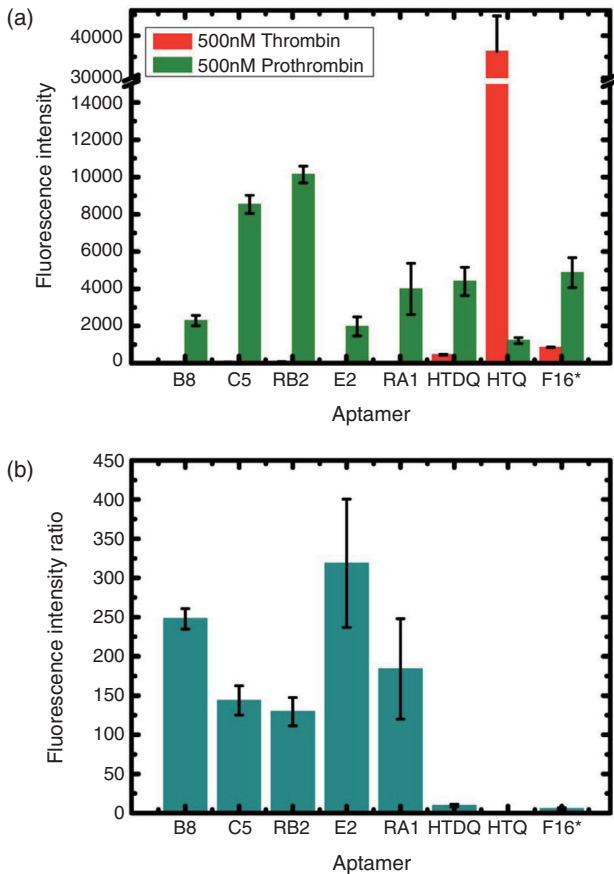


圖 2. 利用微陣列晶片針對抗凝血蛋白原之核酸適體候選序列親和性分析。(a) 候選序列對凝血蛋白原 (綠色螢光) 及凝血蛋白 (紅色螢光) 之訊號響應。(b) 微陣列晶片上候選序列之綠色螢光/紅色螢光之訊號比值。

## 2. 核酸適體序列設計最適化

使用微製程搭配原位合成方式所生產的客製化微陣列晶片 (customized microarrays), 可容許同時建置大數量的核酸序列於晶片表面上, 此種晶片能用於進一步分析適體與標的物結合時的關鍵序列區域與鹼基排列位置。相對地, 在適體晶片探針 (probe) 的設計上有兩種方式: 一為序列位移法, 另一則為鹼基置換法。

### (1) 序列位移法

序列位移方式的適體探針設計概念如圖 3 所示, 在固定長度下以一個鹼基為移動單位, 由適體候選序列前段位移至後段, 依序設計出各組探針。

但由於序列長度可能會影響到核酸適體的親和性與專一性<sup>(14)</sup>, 故通常會設計長度不一的探針, 藉由長度的調整, 以降低此一因素對實驗結果的影響。本研究團隊在篩選 toll 樣受體 (toll-like receptor, TLR) 之適體時, 便採取此一策略進行適體結合位的序列分析。經 SELEX 篩選所得具抑制 TLR-2 活性之核酸適體 TLR2AP7, 以序列位移法將原長 62 鹼基長度之適體序列拆解成 15 至 35 鹼基長度, 共獲得 798 條適體探針, 並與其他控制組序列交付客製化微陣列晶片製造商生產研究所需之晶片。利用不同排列組合及序列位移之適體微陣列晶片與帶有紅色 Cy5 螢光並表現 TLR-2 之 HEK293T 細胞萃取物 (cell lysates) 進行試驗 (如圖 4(a) 所示)。在控制組的部分, 利用等量之不含 TLR-2 蛋白分子的 HEK293T 細胞萃取物及人類血清同樣以螢光染劑標定, 並與相同之微陣列晶片進行結合, 以去除會與其他蛋白結合的適體序列, 並辨識會專一性結合 TLR-2 蛋白之適體序列。結果由強至弱展示其中 20 條與含 TLR-2 蛋白分子的細胞萃取物具較高之結合訊號的適體序列。相反地, 這些序列對不含 TLR-2 蛋白分子細胞萃取物及人類血清不具明顯之結合力 (圖中 TLR2-lysate 部分代表探針對於表現 TLR-2 之 HEK293T 細胞萃取物感測結果; Control 1 部分為探針對於不表現 TLR-2 之 HEK293T 細胞萃取物感測結果; Control 2 部分為探針與人類血清雜交所得之感測結果)<sup>(15)</sup>。取該 20 條試驗組與控制組相較有高比值之探針進行序列比對, 能決定出 TLR2AP7 與 TLR-2 的主要結合區域位置。之後, 可利用鹼基變異的方式改變 TLR2AP2 主要結合區域之二級結構, 若發現 TLR2AP7 適體不再具有辨識 TLR-2 的能力, 即可確定此一序列區域為適體辨識標的物的主要結合區域<sup>(15)</sup>。

### (2) 鹼基置換法

鹼基置換法為另一種能有效判定核酸適體結合位移序列的方法, 其探針設計原理是將已確認之適體序列中每個鹼基依序置換, 以獲得與原始序列差異一個或多個鹼基之適體探針。與序列位移法不同點在於鹼基置換法設計所得之探針通常不會改變序列長度, 以免除改變長度造成訊號差異的影響因

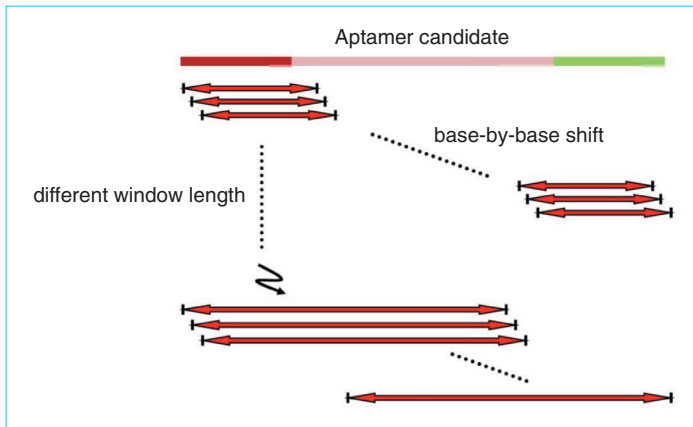


圖 3. 序列位移法之微陣列晶片探針設計概念示意圖。

素，而在晶片的製程上，原位合成法亦為主要的適體晶片生產方式。亞利桑那州立大學 (Arizona State University) 的 Evaldas Katilius 研究團隊便利用此一方法，針對免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 的核酸適體序列以單點、雙點及三點置換的方式進行分析。此法同樣可以確認核酸適體結合 IgE 的序列區域，並可進一步揭露置換鹼基對核酸適體與 IgE 複合物之解離常數的影響<sup>(16)</sup>。

#### 四、適體微陣列晶片應用於蛋白質分析與檢測

利用核酸適體來發展適體晶片檢測蛋白質是另一種極有潛力的應用方向。這類型的適體晶片擁有核酸晶片在製造上與保存上的優點，同時又可以針對特定蛋白質標的物進行專一性偵測或對組成複雜之蛋白質樣本進行分析，因此以適體為核心之適體晶片有機會凌駕於傳統抗體式的蛋白質晶片上。另外，高通量蛋白質晶片技術用於功能性蛋白質體 (functional proteomics) 的解析是後基因時代一大課題，因此利用適體晶片找尋細胞或微生物在不同環境或刺激下所表現的特殊蛋白質，以進行差異性蛋白質表現剖析 (differential protein profiling)，亦是適體晶片一個可能的應用方向。

本研究團隊以大腸桿菌 K12 菌種 (*E. coli* K12 strain) 的全蛋白質進行核酸適體的篩選來發展多通路平行化 SELEX 技術 (multiplexed SELEX)，作為

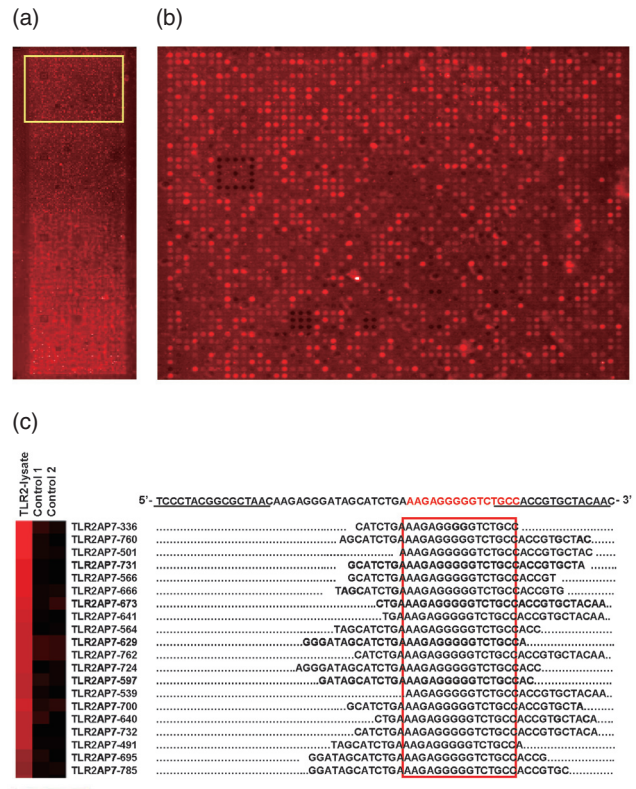


圖 4. 利用序列位移法最佳化 TLR2AP7 適體序列與標定適體結合位的序列。利用 SELEX 程序獲得之候選適體序列製成微陣列晶片，並與含有 TLR-2 蛋白分子之細胞萃取物進行結合反應，以進行核酸適體結合位之分析。(a) 該晶片對於表現 TLR-2 蛋白之 HEK293T 細胞萃取物的感測結果，其中之細胞萃取物須先以 Cy5 螢光染劑標定。(b) 為圖 (a) 中黃色區域之放大圖。(c) 20 條與 TLR-2 蛋白質有較高結合訊號，並且具專一性之適體序列。將這 20 條適體序列對齊排列，可解出適體序列中能結合 TLR-2 蛋白質之共同序列區域。

篩選複雜蛋白質基質 (complex protein matrixes) 核酸適體的方法。在策略上，首先利用不同萃取條件以及高效能液相層析技術 (high performance liquid chromatography)，在不同鹽濃度下獲得共 26 組大腸桿菌全蛋白分群檢體。其次，利用 SELEX 技術針對此 26 組檢體進行核酸適體篩選，經過多次多回合的篩選，配合本研究團隊發展的高效能核酸合成儀<sup>(17)</sup> 製造之候選序列，再利用微陣列晶片進行

序列挑選，獲得對應大腸桿菌全蛋白中各種不同蛋白質的核酸適體。成果如圖 5(a)所示。經本法十二回合篩選所得之核酸適體佈放於晶片表面，標定紅色 Cy5 螢光之赫氏桿菌 (*E. hermannii*) 全蛋白與標定綠色 Cy3 螢光之大腸桿菌全蛋白一同與晶片雜交，可以發現以本法所篩選之核酸適體，確實能針對大腸桿菌與赫氏桿菌全蛋白進行差異性功能蛋白質解析。除此之外，透過微陣列晶片檢測結果，亦發現多通路平行化 SELEX 技術能針對不同品系 (strain) 細菌間的差異蛋白篩選出對應的核酸適體 (如圖 5(b) 所示)，並且本研究團隊也將技術應用於微生物抗藥型細菌的鑑定，此兩技術的結合在菌種鑑定以及相關的醫學檢驗領域具有相當的發展性<sup>(18, 19)</sup>。

前述結果證實核酸適體可以被用來偵測全蛋白檢體中差異性蛋白，因此便能利用這樣的策略來找

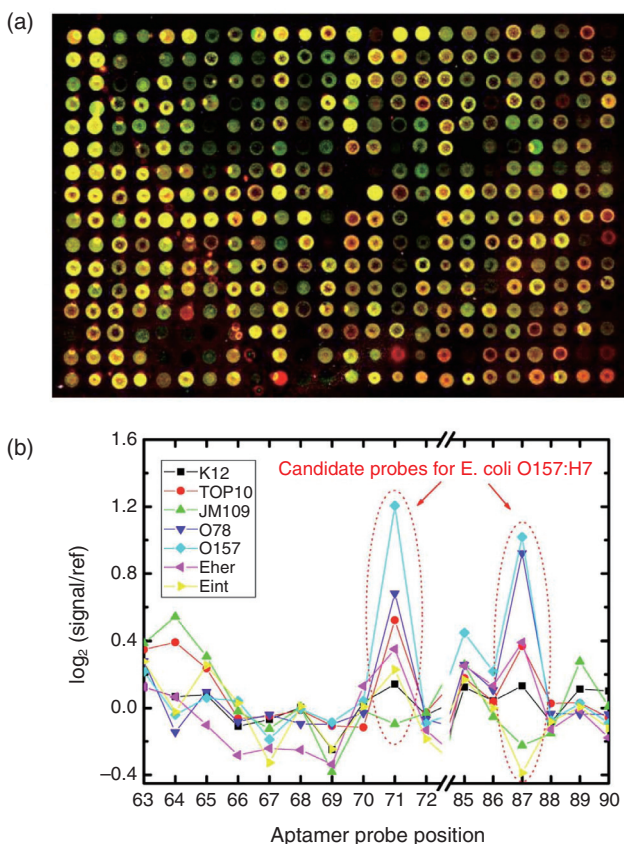


圖 5. 利用核酸適體微陣列晶片進行差異性全蛋白質解析：(a) 以核酸適體微陣列晶片感測大腸桿菌 K12 菌株 (綠色訊號) 與赫氏桿菌 (紅色訊號) 全蛋白結果。(b) 以微陣列晶片挑選辨識不同品系大腸桿菌中差異蛋白之適體探針實例。

尋疾病的標記蛋白 (disease markers)。但在感測上遇到的最大問題則是全蛋白質中的蛋白質濃度差異甚大，標記蛋白的濃度範圍可能在 pM 乃至於 fM 等級，同時其他全蛋白質中的非標記蛋白質可能有濃度過高所產生的非專一性干擾問題，因此如何改善適體微陣列晶片在蛋白質檢測的靈敏度與專一性是一個重要的課題。一般常見之靈敏性感測策略乃是採用橋接分子 (spacer) 的方式，將固定於晶片表面的核酸適體墊高，以降低核酸適體在固定化時所產生的立體障礙，獲得較好的訊號表現<sup>(16)</sup>，但事實上這樣的策略在複雜基質中能改善感測表現有限<sup>(20)</sup>。因此本研究團隊嘗試利用辨識同一蛋白質但不同結合位 (epitope) 之核酸適體來改善微陣列晶片上的感測效果，核酸適體已被驗證如同傳統抗體一般，具有協同作用 (avidity) 的效果，意即同時使用前述辨識不同結合位之核酸適體，能夠進一步降低核酸適體對標的物的解離常數<sup>(21, 22)</sup>。因此便利用此一概念，同時佈放兩種辨識凝血蛋白不同結合位的核酸適體 HTQ 及 HTDQ 在同一點上 (如圖 6(a) 所示)，配合不同長度橋接分子，在人類血清中針對凝血蛋白進行感測，可以發現其偵測極限可從原先的 1.13 nM 及 0.5 nM 降至 7.57 pM (如圖 6(b) 所示)，晶片靈敏度 (指可感測到之凝血蛋白與血清全蛋白訊號比值) 亦可由原先單一核酸適體的 1/100 提升至 1/10000 以上，顯示核酸適體的協同作用可以利用同時點印的方法在微陣列晶片上獲得，並且能大幅提升核酸適體晶片的靈敏度與專一性，有助於未來發展疾病標記蛋白的晶片檢驗<sup>(20)</sup>。

## 五、結論

核酸適體微陣列晶片是一個嶄新的應用領域，微陣列晶片可以協助核酸適體序列的最佳化，配合不同的探針設計策略，便能針對核酸適體中重要的辨識序列進行分析與決定。除此之外，核酸適體更能被用於發展適體晶片，以進行差異性功能蛋白質的解析。而透過探針設計上的改善以及搭配核酸適體協同作用的概念，能大幅提升核酸適體式的蛋白質晶片在複雜基質中的感測靈敏性與專一性，更進一步發展檢測疾病標記蛋白之晶片平台。這些研究切入點以及應用實例顯示微陣列晶片在核酸適體研

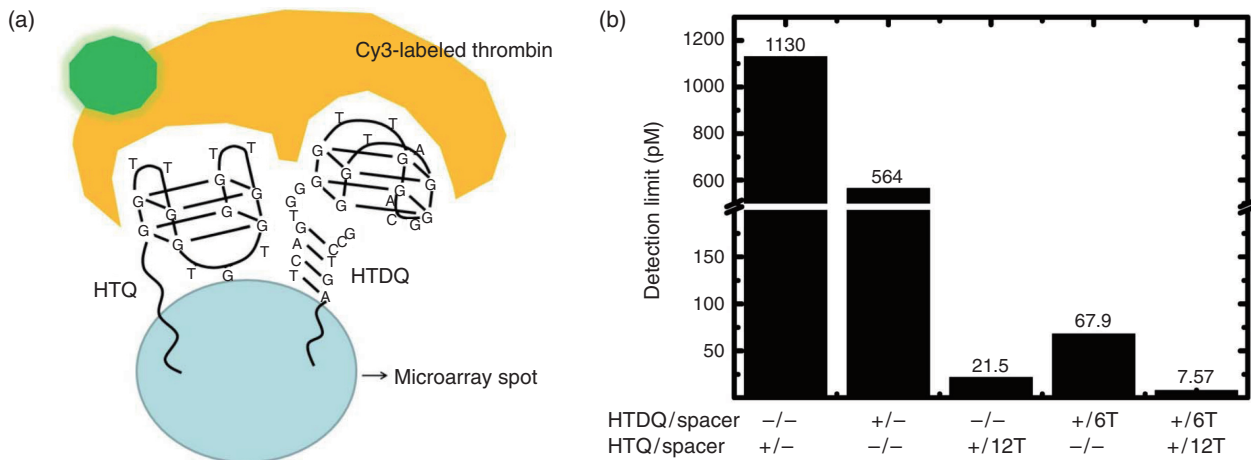


圖 6. 利用核酸適體之協同作用改善微陣列晶片於複雜基質中感測靈敏度策略。(a) 核酸適體同時點印於晶片表面示意圖。(b) 核酸適體晶片於人類血清中感測凝血蛋白偵測極限。

究上確實扮演著重要的角色，透過微陣列晶片的使用能大幅加速核酸適體研究的速度，同時開創更多可能的應用空間。

## 參考文獻

1. C. Tuerk and L. Gold, *Science*, **249**, 505 (1990).
2. A. D. Ellington and J. W. Szostak, *Nature*, **346**, 818 (1990).
3. D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, 3rd ed., Amsterdam: Elsevier. (2005).
4. E. Heyduk and T. Heyduk, *Anal. Chem.*, **77**, 1147 (2005).
5. Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, and K. W. Plaxco, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **44**, 5456 (2005).
6. Y. Li, H. J. Lee, and R. M. Corn, *Anal. Chem.*, **79**, 1082 (2007).
7. 鄭鄧言, 白果能, *科儀新知*, **22** (5), 8 (2001).
8. 周正中, 白果能, *科儀新知*, **23** (5), 5 (2002).
9. J. R. Collett, E. J. Cho, J. F. Lee, M. Levy, A. J. Hood, C. Wan, and A. D. Ellington, *Anal. Biochem.*, **338**, 113 (2005).
10. J. R. Collett, E. J. Cho, and A. D. Ellington, *Methods*, **37**, 4 (2005).
11. E. J. Cho, J. R. Collett, A. E. Szafranska, and A. D. Ellington, *Anal. Chim. Acta*, **564**, 82 (2006).
12. F. Stephen and R. James, *J. Biol. Chem.*, **280**, 34193 (2005).
13. L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermass, and J. J. Toole, *Nature*, **355**, 564 (1992).
14. D. M. Tasset, M. F. Kubik, and W. J. Steiner, *Mol. Biol.*, **272**, 688 (1997).
15. Y. -C. Chang, W. -C. Kao, W. -Y. Wang, W. -Y. Wang, R. -B. Yang, and K. Peck, *FASEB J.*, **23**, 3078 (2009).
16. E. Katilius, C. Flores, and N. W. Woodbury, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7626 (2007).
17. J. -Y. Cheng, H. -H. Chen, Y. -S. Kao, W. -C. Kao, and K. Peck,

*Nucleic Acids Res.*, **30**, e93 (2002).

18. L. -C. Chen, N. -C. Lee, W. -C. Kao, and K. Peck, *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, S269 (2004).
19. K. Peck, L. -C. Chen, S. -C. Tzeng, Y. -S. Kao, and W. -C. Kao, *J. Genet. Mol. Biol.*, **19**, 263, (2008).
20. Y.-H. Lao, K. Peck, and L.-C. Chen, *Anal. Chem.*, **81**, 1747 (2009).
21. D. A. D. Giusto and G. C. King, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46483 (2004).
22. H. Hasegawa, K. -I. Taira, K. Sode, and K. Ikebukuro, *Sensors*, **8**, 1090 (2008).



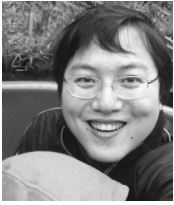
勞業興先生現為國立台灣大學生物產業機電工程學研究所碩士班學生。

Yeh-Hsing Lao is currently a M.S. student in the Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Taiwan University.



陳林祈先生為國立台灣大學化學工程博士，現任國立台灣大學生物產業機電工程學系副教授。

Lin-Chi Chen received his Ph.D. in chemical engineering from National Taiwan University. He is currently an associate professor in the Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Taiwan University.



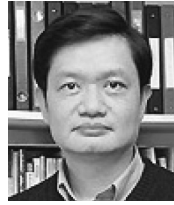
張翼中先生為國立台灣大學微生物學博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所博士後研究員。

Yi-Chung Chang received his Ph.D. in microbiology from National Taiwan University. He is currently a post-doctoral fellow in the Institute of Biomedical Sciences at Academia Sinica.



紀鈞璋小姐現為國立台灣大學生物產業機電工程學研究所碩士班學生。

Chun-Wei Chi is currently a M.S. student in the Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Taiwan University.



白果能先生為美國密西根大學安娜堡分校化學博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所研究員。

Konan Peck received his Ph.D. in chemistry from the University of Michigan at Ann Arbor, USA. He is currently a research fellow in the Institute of Biomedical Sciences at Academia Sinica.