

應用核殼奈米粒子 於漸逝波螢光生物感測器

Evanescent Wave Fluorescence Biosensor with Core-Shell Nanoparticles

蘇育政、江惠華、洪敏偉

Yu-Zheng Su, Huihua Kenny Chiang, Min-Wei Hung

漸逝波螢光生物感測器已發展了 30 多年，但在光學、生物化學與化學工程等領域，還是迫切地需要新的進展。近來有了突破性的發展，奈米金屬增強螢光技術有利於修改光譜特性與減緩光物理限制。筆者發展核殼奈米粒子 (核：Ag、殼：SiO₂) 於光纖生物感測器之可能應用，其中螢光感測強度增進約 50 倍，此外，四種不同的溶劑也影響螢光強度從 1.3 倍至 100 倍以上。

Evanescent wave fluorescent biosensors have developed for 30 years. Nonetheless, the technology continues to evolve with new breakthroughs in optics, biochemistry, and chemical engineering. Recently, there have been explosive developments in the metal-enhanced fluorescence (MEF) technology to favorably modify the spectral properties and to alleviate photo-physical constraints. We report the development of core-shell nanoparticles with the silver core and SiO₂ shell for potential applications in fiber optic biosensor. The fluorescence intensity was approximately 50-fold higher than that without core-shell nanoparticles doping. In addition, four different kinds of organic solvents are used in this study and found to have influence on the fluorescence intensity from 1.3 to over 100 times.

一、前言

綜觀醫學、製藥、環境、防護、生物製程與食品工藝等，皆需提供高靈敏、即時、準確、大量篩選，甚至是個人化的檢測平台，因此發展符合各式需求的生物感測裝置，將具有重要的意義。生物感測器由生物識別元件 (bio-recognition element) 與信號換能器 (signal transducer) 組成，應用於各種生命物質和化學物質的分析和檢測，並融合生物學、物理

學、化學、資訊科學及相關技術於一體，已經發展成為一個十分活躍的研究領域⁽¹⁾。

二、生物感測器

1. 生物感測器

1962 年 Clark 和 Lyons 提出生物感測器，而生物感測器可定義為光／電的檢測裝置，可依特定標的物進行定量化檢測⁽²⁾。

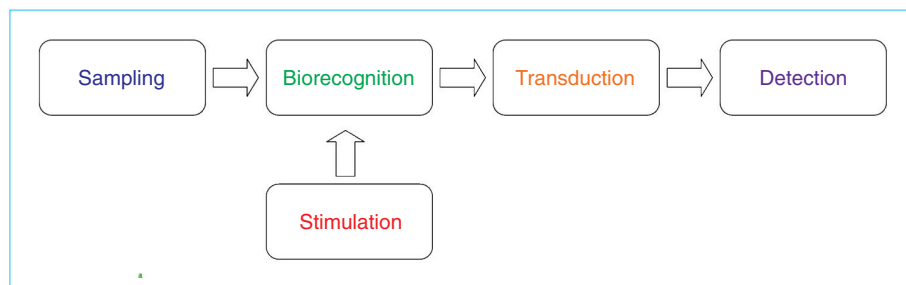


圖 1. 生物感測系統。

生物感測器依物理現象可分為機械式、電子式與光學式三大類。(1) 機械式：利用懸臂因生物鍵結力感測彎曲力量，或是利用質量與振動頻率的改變進行檢測；(2) 電子式：利用樣本的吸附，以探測電子訊號的改變；(3) 光學式：藉由識別元件與待測物的作用，導致光學特性改變，以進行檢測。

生物感測器主要由生物識別元件與信號換能器組成。生物識別元件依其專一性 (specificity) 與親和力 (affinity)，以確認不同的生物樣本；而信號換能器則是將識別元件與待測物結合後的變化，以光學、電化學與熱學等方式呈現，末端再以檢測器紀錄、分析。生物感測系統如圖 1 所示⁽³⁾。

2. 漸逝波螢光生物感測器

光學生物感測器是藉由識別元件與待測物間的作用，導致光學特性改變，以進行檢測。而光學特性可以藉由螢光 (fluorescent)、冷光 (luminescent)、折射率 (refractive index) 與吸收光譜 (absorption spectrum) 等產生改變。

1965 年漸逝波 (evanescent wave) 首先由 Hirschfeld 描述。當全反射現象發生時，光波以駐波形式存在於波導中，但事實上，電場能量並非完全侷限於核心層內，在低折射率的介面層中依然存

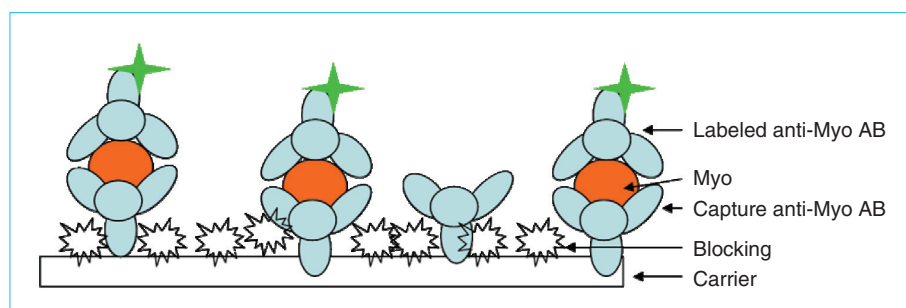
在著電場能量，此能量以指數形式衰減，約一個波長的距離。因此可以僅激發介面層上數十奈米的待測物，達奈米級的解析。以漸逝波為基礎的生物感測器可分為：共振鏡 (resonant mirrors)、干涉儀 (interferometers)、表面電漿共振感測器 (surface plasmon resonance sensors)、光纖生物感測器 (fiber optic) 及平面陣列螢光感測器 (planar array fluorescence sensors) 等。

在漸逝波螢光生物感測器的範疇，即利用漸逝波的刺激，激發螢光、螢光淬滅 (fluorescence quenching) 及螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer) 等。1975 年由 Kronick 與 Little 將漸逝波應用於螢光免疫分析 (fluorescence immunoassay)。螢光免疫分析係利用特定波長去激發與待測物相接之螢光標誌物，並藉由偵測螢光強度獲得待測物位置或濃度，在靈敏度 (sensitivity) 與選擇性 (selectivity) 等極具優勢⁽²⁾。

3. 生物識別元件

生物感測器的核心是憑藉生物體的識別元件，依其專一性與親和力，識別元件可以是酵素 (enzyme)、受體 (receptor)、抗體 (antibody)、螯化物 (chelator)、核酸 (nucleic acid) 與抗生素

圖 2. 肌紅蛋白螢光免疫分析。



(antibiotic) 等。

以抗體應用為例，肌紅蛋白 (myoglobin) 為人類心肌主要的蛋白之一，當心肌受損時，將大量釋放至血液循環中，因此肌紅蛋白的濃度可做為檢測急性心肌梗塞 (AMI) 的指標。檢測肌紅蛋白時，首先會在固定載體 (如：波導) 上修飾一級抗體 (first antibody)，而後加入待測物—肌紅蛋白，最後再與接有螢光標定物的二級抗體 (secondary antibody) 結合，就如同三明治夾層的複合體。此時二級抗體會隨著待測物的濃度改變，因此螢光強度與待測物濃度成正比⁽⁴⁾。肌紅蛋白螢光免疫分析如圖 2 所示。

三、螢光分子與奈米金屬的交互作用

1. 螢光分子與奈米金屬的交互作用

探討螢光分子與奈米金屬 (fluorophore-metal) 的交互作用，可稱為輻射衰減工程 (radiative decay engineering)、奈米金屬增強螢光 (metal enhanced fluorescence, MEF) 或表面增強螢光 (surface enhanced fluorescence) 等^(5,6)。在近十五年之間，螢光已成為極佔優勢的感測技術，廣泛地應用於醫學診斷與生物技術等。雖然螢光技術已擁有極高的靈敏度，可輕易地偵測單分子，但依然受限於螢光分子的量子產率 (quantum yield)、樣本的自體螢光 (autofluorescence) 及螢光分子的光穩定性 (photostability) 等。近年來有了重大的突破，金屬奈米結構有利於提升螢光分子的光譜特性與減緩光物理限制。

在奈米金屬表面或顆粒附近，可以改變螢光在自由空間的狀態，導致令人驚豔的光譜效應，其中包含修改螢光分子的輻射衰減比 (radiative decay

rate) 與增強共振能量轉移 (resonance energy transfer) 的範圍。這些效應源自於激態的螢光分子 (excited-state fluorophores) 與自由電子 (free electrons) 之間的交互作用，因此稱為表面電漿電子 (surface plasmon electrons)。

在自由空間的狀態，量子產率 (Q_0) 與螢光生命期 (τ_0) 可表示如下：

$$Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1)$$
$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

其中 k_{nr} 為非輻射比 (non-radiative rate)。於金屬表面時，考慮一新的光譜效應，增加一項輻射比 (radiative rate), Γ_m 。量子產率 (Q_m) 與螢光生命期 (τ_m) 可表示於 (2) 式，如圖 3 所示。

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (2)$$
$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}}$$

螢光分子與金屬之間的交互作用增進了螢光分子的光譜特性，如增強量子產率、增強刺激率、能量轉移及增強光穩定性 (減少螢光生命期)，提供獨特的前景於臨床化學與生物化學，更可改善訊雜比與提升偵測極限。

2. 奈米金屬增強螢光

金、銀等金屬奈米粒子可有效改變螢光分子的光學特性，導致螢光訊號的增強或淬滅，其中螢光

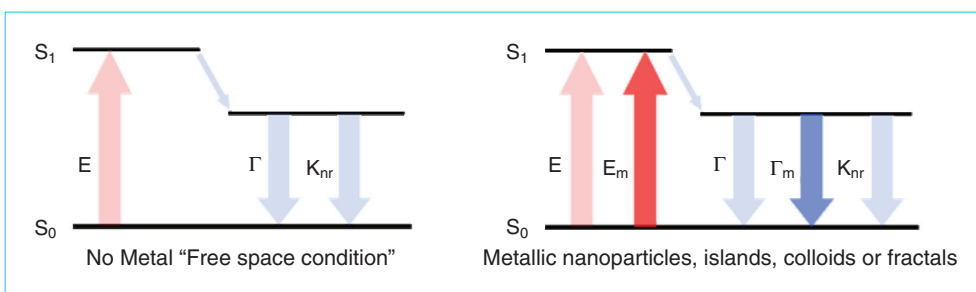
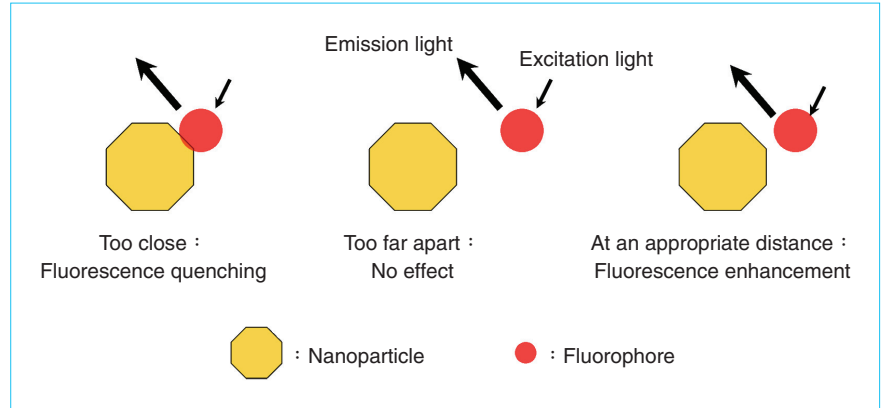


圖 3. 螢光分子與奈米金屬的交互作用。

圖 4. 螢光分子與奈米金屬之間的距離效應。



訊號增強與否，與金屬奈米粒子的大小、螢光分子與金屬奈米粒子間的距離、螢光分子的量子產率、有機溶劑 (organic solvent) 等相關⁽⁷⁾，而螢光分子與金屬奈米粒子的距離效應更佔一重要的關鍵。

當金屬奈米粒子與螢光分子的距離很接近時，金屬奈米粒子將促使螢光分子中的自由電子處於過分激態；假使金屬奈米粒子與螢光分子的距離太遠，強表面電漿子場 (surface plasmon polariton fields, SPPF) 可能無法到達螢光分子，而無法增強螢光；當螢光分子與金屬奈米粒子保持一適當距離時，將可有效地轉換螢光分子中的自由電子，以致螢光訊號增強，如圖 4 所示。

四、實驗與方法

1. 核殼奈米粒子

探討螢光增強效應，一般可採用次奈米銀粒子架構於全內反射 (total internal reflection, TIR) 量測平台^(8, 9)，也可使用自組單分子層 (self-assembled monolayer, SAM) 或蛋白分子結合於金屬奈米粒子，架構於光纖感測系統，用以調控螢光分子與金屬奈米粒子間的距離^(7, 10)。但上述的架構，卻可能因螢光分子與金屬奈米粒子未處於最佳的距離，導致螢光訊號增強受限，甚至衰減。

本文採用核殼奈米粒子 (core-shell nanoparticle) 架構於光纖感測系統，探討螢光增強效應，其中核為奈米銀粒子，殼為二氧化矽 (SiO_2)，只需修改二氧化矽層厚度，即可輕易地調控螢光分子與金屬奈米粒子之間的最佳距離。如圖 5 所示。

2. 核殼奈米粒子的製備

藉由相關文獻，將核殼奈米粒子的製備步驟修改如下^(11, 12)。

步驟 1：奈米銀。(1) 首先將硝酸銀 (AgNO_3 , SIGMA) 溶液 (98 mL 之三次水 (reagent-grade water) 混合 18 mg 之硝酸銀粉末) 加熱至沸騰，並於攪拌 (900 rpm) 中緩慢加入 38.8 mM 之檸檬酸鈉 (sodium citrate, SIGMA) 2 mL，密封持續加熱沸騰 10 分鐘後，再自然冷卻至室溫。(2) 離心 500 rpm 一小時，移除較大的奈米銀粒子。

步驟 2：合成核殼奈米粒子。(1) 首先混合 0.4 mL 之奈米銀、100 mL 之異丙醇 (isopropanol, SIGMA)、10 mL 之三次水，並於攪拌下 (900 rpm) 加入 40 μL 之四乙基矽酸鹽 (tetraethyl orthosilicate, TEOS, SIGMA)，攪拌均勻後加入 2 mL 之 30% 氨水 (ammonium hydroxide, Fluka)，最後持續攪拌 30 分鐘。(2) 為調控二氧化矽之厚度，以 40 μL 之 TEOS 定義為 100%，因此依濃度可調配 50% 至 100% 之 TEOS。

步驟 3：淨化。以三次水與酒精 (ethanol,

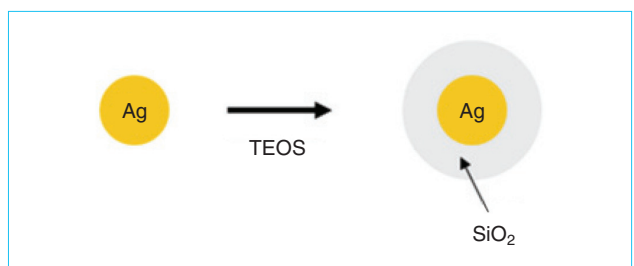


圖 5. 核殼奈米粒子。

Shimakyu) 依 5:4 混合，清洗與離心三次，以去除殘餘藥品。

步驟 4：還原。最後再將核殼奈米粒子還原於 12 mL 之三次水中。

3. 光纖前處理

步驟 1，裁取光纖 10 cm。步驟 2，以光纖研磨機進行端面研磨。步驟 3，以高溫火焰燒除纖衣層 (cladding) 與緩衝層 (buffer)，去除長度為 2.5 cm，並定為感測反應區。步驟 4，清潔感測反應區，使用硫酸 (H₂SO₄, Fluka) (98%) 與雙氧水 (H₂O₂, Fluka) (30%) 以 9:1 混合，清潔 12–24 小時 (overnight) 後，以二次水 (lab-grade water) 清洗備用。

4. 量測系統架構

漸逝波螢光生物感測器的組成主要可分成：(1) 光學系統，包含波導、光源與檢測器；(2) 流體系統，用於導引樣本與設置感測光纖；(3) 電子與電腦處理，用於訊號分析。量測系統示意圖如圖 6 所示。

首先將波長 488 nm 的藍光固態雷射 (85 BCD Series 10 mW, Melles Griot) 控制適當功率後，以數值孔徑 (numerical aperture, NA) 為 0.4 的 20× 物鏡，將激發光耦合至流室中的感測光纖 (JTFLH6006301040, Polymicro Technologies)，當螢光激發後，藉由 530 nm 高通濾光片 (long-pass filter) 濾除激發光與背景光，再以透鏡耦合至光

纖，以導入光譜儀 (SP-150, Princeton Instruments)，並藉由增強型光檢測器 (intensity charge coupled device, ICCD) 放大訊號，最後再由電腦分析處理。

5. 量測

實驗 1：為探討二氧化矽厚度對螢光之增強效應，首先以不同尺寸之核殼奈米粒子，調配成相同濃度之 FITC (fluorescein isothiocyanate, SIGMA) 螢光溶液 (1 μg/mL)，進行螢光訊號量測，以評估螢光分子與金屬奈米粒子之最佳距離。

實驗 2：由實驗 1 決定二氧化矽層之厚度，並適當地調控核殼奈米粒子之濃度，最後調配 FITC 螢光溶液，以進行量化量測。

實驗 3：為探討有機溶劑對螢光之效應，因此針對免疫分析常用溶劑進行評估，分別為甲醇 (methanol, Fluka)、乙醇 (ethanol, Shimakyu)、0.01 M 之磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS, SIGMA)、0.05% 之吐恩 20 (Tween 20, SIGMA)，而方法只需將核殼奈米粒子製備方法之步驟 4 更改為上述溶劑即可，量測架構如圖 7 所示。

五、結果與討論

1. 核殼奈米粒子

為探討螢光分子與奈米金屬之間的最佳距離，採用核殼奈米粒子，其中核為奈米銀粒子，殼為二氧化矽。藉由 TEOS 的濃度控制，殼的厚度將隨之

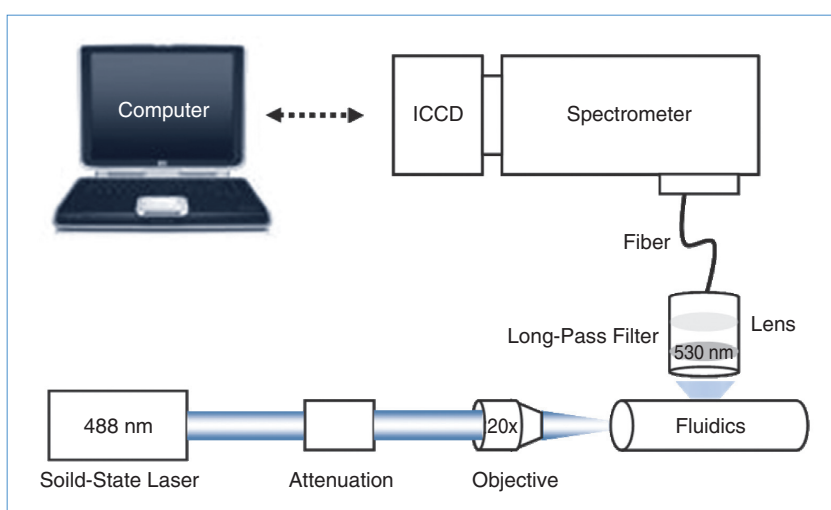


圖 6.
量測系統示意圖。

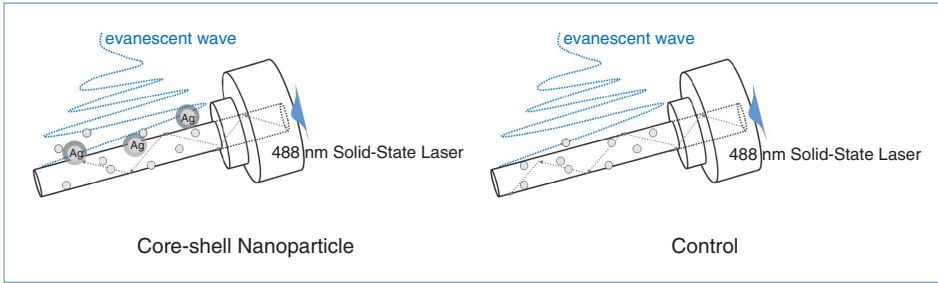


圖 7. 量測架構。

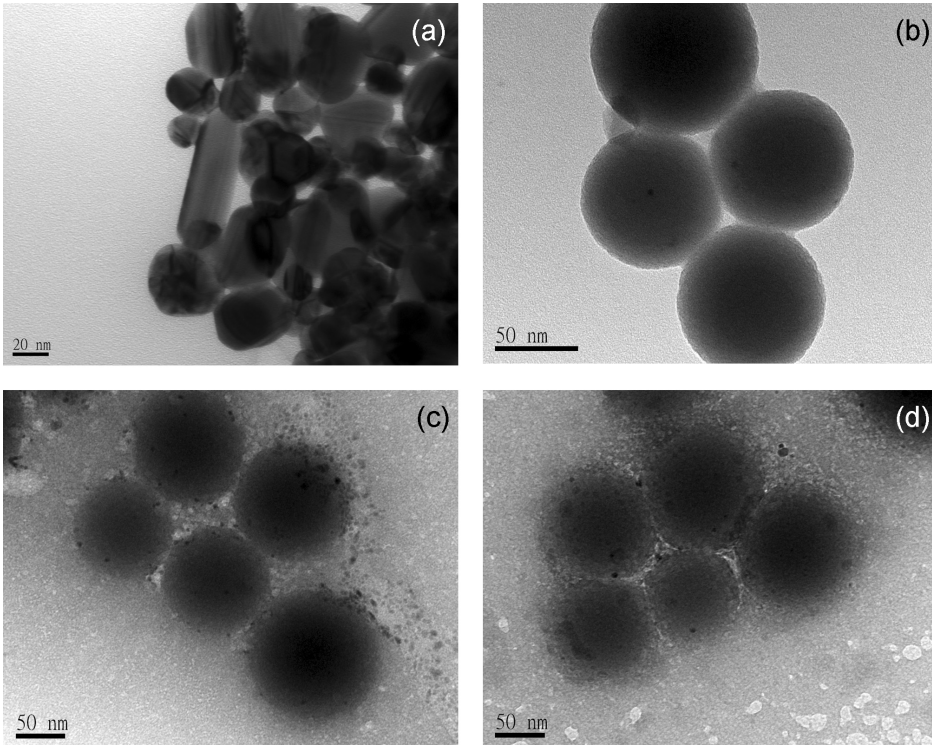


圖 8. 核殼奈米粒子之穿透式電子顯微鏡影像。

改變，因此可輕易地改變螢光分子與金屬奈米粒子之間的距離。圖 8(a) 為奈米銀粒子，粒徑約 50 ± 10 nm；圖 8(b)、(c) 與 (d) 皆具相同粒徑之奈米銀粒子，而包覆 SiO_2 厚度分別為 15 nm、25 nm 及 27 nm，對應至 TEOS 分別為 40 μL 之 50%、70% 與 100%。

2. 螢光分子與金屬奈米粒子之間的距離

首先置入不同尺寸之核殼奈米粒子，並調配成相同濃度之 FITC 螢光溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以進行螢光量測，實驗結果如圖 9 所示。由圖 9 可得知，當二氧化矽厚度為 25 nm 時，有較佳的螢光增強效應，螢光增強效果約 50 倍，意味著在此條件下，螢光分子與金屬奈米粒子較佳的距離約 25 nm。相對於

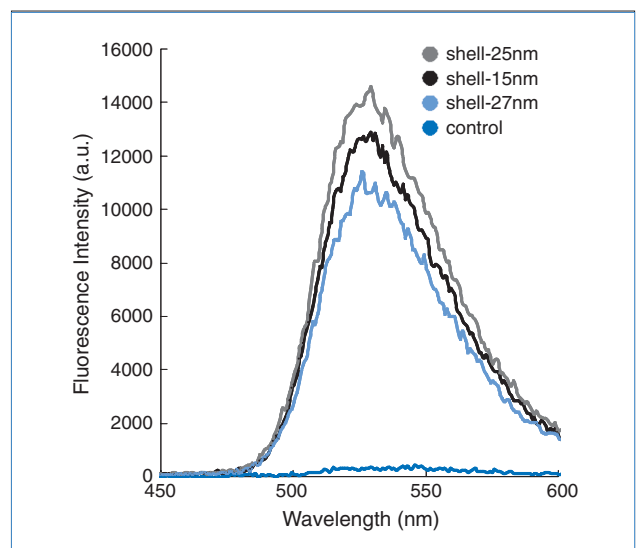


圖 9. FITC 螢光光譜—距離效應。

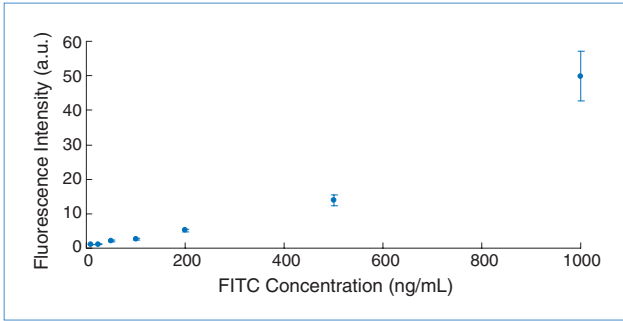


圖 10. FITC 螢光光譜—量化量測。

15 nm 與 27 nm 厚度有較差的增強效果，這可歸咎於螢光分子與金屬奈米粒子未處於較佳的距離。藉由上述實驗，選定二氧化矽厚度為 25 nm 之核殼奈米粒子，並適當地控制核殼奈米粒子之濃度後，進行量化量測，實驗結果如圖 10 所示。

3. 核殼奈米粒子之溶劑效應

為探討有機溶劑對螢光之效應，因此針對甲醇、乙醇、0.01 M 之磷酸鹽緩衝液、0.05% 之吐恩 20 進行評估，實驗結果如圖 11 所示。實驗結果分別為：0.01 M PBS 增強約 1.3 倍、乙醇增強約 1.5 倍、甲醇增強約 13 倍、0.05% Tween 20 增強超過 100 倍以上。溶劑與螢光強度之效應，可能是藉由改變螢光分子的刺激／激發光譜 (excitation/emission spectrum)、異構化作用 (isomerization) 與收縮性等⁽⁷⁾。

近年來有不少文獻探討金屬增強螢光與入射角的關係⁽⁸⁾，將金屬奈米粒子應用於光纖生物感測器中，不同溶劑代表不同介質，以致於光波在光纖中有不同的模態，因此筆者認為在此範疇裡，這也是影響螢光強度的重要因素之一。

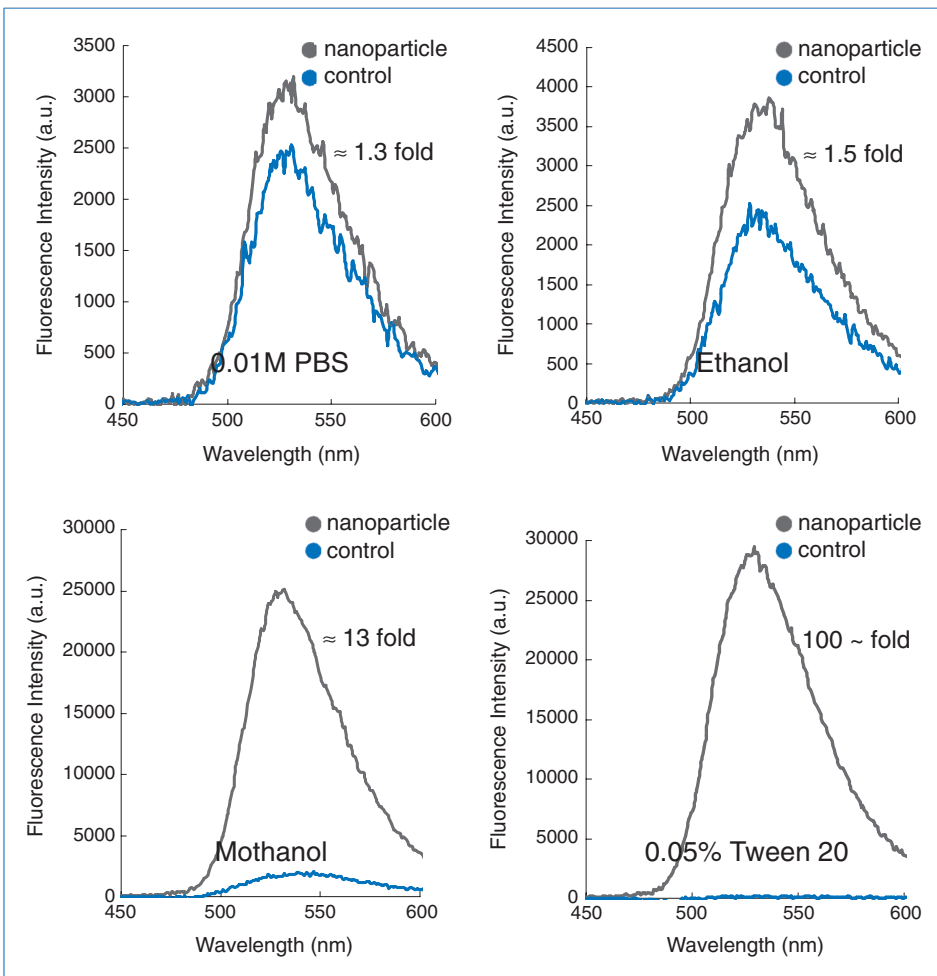


圖 11. FITC 螢光光譜—溶劑效應。

六、結論

本研究將核殼奈米粒子 (核：Ag、殼：SiO₂) 應用於漸逝波螢光生物感測器，以金屬奈米粒子的特殊光學性質，大幅增強系統之靈敏度。核殼奈米粒子提升螢光感測訊號約 50 倍，若進一步考慮溶劑效應，更可高達 100 倍以上。

核殼奈米粒子可增進螢光分子的光譜特性與減緩光物理限制，而 SiO₂ 層不但可輕易地調控用以匹配各式應用，更可保護奈米銀粒子與修飾生物分子，期望未來核殼奈米粒子可廣泛地應用於感測技術上。

參考文獻

1. M. E. Bosch, A. J. Sanchez, F. S. Rojas, and C. B. Ojeda, *Sensors*, **7**, 797 (2007).
2. C. R. Taitt, G. P. Anderson, and F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2470 (2005).
3. P. N. Prasad, *Introduction to Biophotonics*, New Jersey: Wiley, 311 (2003).
4. E. G. Matveeva, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, *J. Immunol. Methods*, **302**, 26 (2005).
5. K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 55 (2005).
6. K. Aslan, J. R. Lakowicz, H. Szmackinski, and C. D. Geddes, *J. Fluoresc.*, **14**, 677 (2004).
7. B. Hong and K. A. Kang, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1333 (2006).
8. E. Matveeva, Z. Gryczynski, J. Malicka, I. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, **334**, 303 (2004).
9. K. Aslana, P. Holleya, and C. D. Geddes, *J. Immunol. Methods*, **312**, 137 (2006).
10. B. Y. Hsieh, Y. F. Chang, M. Y. Ng, W. C. Liu, C. H. Lin, H. T. Wu, and C. Chou, *Anal. Chem.*, **79**, 3487 (2007).
11. K. Aslan, M. Wu, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes, *J. Fluoresc.*, **17**, 127 (2007).
12. D. Cheng and Q. H. Xu, *Chem. Commun.*, 248 (2007).



蘇育政先生為國立陽明大學生醫光電碩士，現任國家實驗研究院儀器科技研究中心助理研究員。

Yu-Zheng Su received his M.S. in biophotonics from National Yang Ming University. He is currently an assistant researcher at Instrument Technology Research Center, National Applied Research Laboratories.



江惠華先生為美國喬治亞理工學院電機工程博士，現任國立陽明大學生醫光電所教授。

Huihua Kenny Chiang received his Ph.D. in electrical engineering from Georgia Institute of Technology, USA. He is currently a professor in the Institute of Biophotonics at National Yang Ming University.



洪敏偉先生為國立中山大學機械與機電工程碩士，現任國家實驗研究院儀器科技研究中心助理研究員。

Min-Wei Hung received his M.S. in mechanical and electro-mechanical engineering from National Sun Yat-sen University. He is currently an assistant researcher at Instrument Technology Research Center, National Applied Research Laboratories.