

電化學式細胞活性檢測晶片的發展

Development of Electrochemical Cell-Activity Estimation Chip

袁佳吟、傅世宇、吳靖宙

Chia-Yin Yuan, Shih-Yu Fu, Ching-Chou Wu

藥物或生醫材料的開發有賴於大量的動物實驗，但近年來大眾對此種強加動物痛苦的行為產生反感，因此若能結合微流體控制、細胞培養與非侵入式感測器製作的技術，發展出以細胞為感測器的生物晶片，將可直接並快速地瞭解生命體對外界刺激的反應。此晶片的開發將有效地減少動物實驗，成為生技領域中的熱門產業。本文中將針對細胞活性評估原理、細胞活性檢測晶片的發展，及現有之實際應用，作一概述。

The development of drugs or biomaterials needs the assistance of massive animal experiments. Recently, people disapprove the behavior of forcing animals to suffer pains. If we can develop a cell-based biochip by integrating microfluidic control, cell culture and fabrication techniques of noninvasive sensors, the response of a living organism to extrinsic stimulations can be directly and fast realized. It will be helpful to minimize the animal experiments and become a hot issue in biotechnology fields. In the article, the principles, present development and practical applications of a cell-activity estimation chip are described.

一、前言

醫療技術的發展，有許多是藉由大量的動物試驗，才能促使藥品與生醫材料的開發邁向成功，並安全無虞的應用至人體臨床治療上。但動物實驗費時，且近年來大眾對此種強加動物痛苦的行為產生反感，促使許多生技公司與研究學者投入尋求其他高科技方法，以取代或減少動物試驗，而細胞晶片即是其中之一。細胞晶片的概念源起於 1980 年代末期開始的生物晶片，歐美許多研究團隊在玻璃、矽晶圓或塑膠高分子材料上，利用半導體或微機電等微小化技術將感測器、致動器與控制系統整合在同一基材上，並結合分子生物學、分析化學、流體

力學與電動力學等領域之技術，在單一晶片上進行生物樣本的混合、衍生化、輸送、分離、檢測與收集等程序，配合上述之技術所研發的微型儀器，可實現將一生化實驗室微小化至單一晶片的夢想。

而生物晶片因具有待測樣本體積小、檢測迅速、高靈敏度且可批次性、大量化製作等優點，被廣泛的應用於臨床分析、環境監控與生物程序檢測等領域，被視為未來生技領域中的熱門產業。當生物晶片可直接對細胞新陳代謝反應中的物質進行檢測，或直接以整體細胞當作感測器監測外界環境的變化時，便可用來取代動物試驗，以瞭解藥物對不同種類細胞的影響或材料生物相容性之特性。此種整合微流體控制、細胞培養與感測器製作的生物晶

片，可構成一細胞活性檢測平台，用以直接並快速地瞭解生命體對外界刺激的響應。目前有多種感測法(螢光染劑、放射性標定、熱量計探針及電化學感測器等)可被使用於細胞活性之檢測，其中電化學感測器具有專一性、非侵入式與易於微小化的潛力，利於商業化細胞感測器晶片化的發展。因此本文將闡述電化學式溶氧電極、pH 感測電極與活性氧物質(reactive oxygen species, ROS) 酵素電極分別在細胞呼吸活性、胞外酸化率與氧化壓力的檢測原理，並對已結合細胞培養與微流體控制之微小化感測晶片，在探知細胞活性變化的研究現況加以介紹。

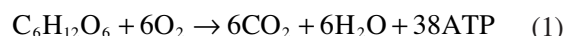
二、細胞活性評估指標

細胞為生物體之最小生命單位，以細胞作為檢測單元可代表生物體直接的生理反應。當細胞受到外來物理量(如電場、磁場或應力作用)或化學物質(藥物或毒物)刺激時，細胞會自行調整並改變其營養物質之消耗量(如氧氣、葡萄糖等)及其代謝物的釋出量(如二氧化碳、有機酸、過氧化氫等)；藉由量測細胞攝取或釋出物質的變化，可評估細胞呼吸活性、胞外酸化率及細胞氧化壓力等生理參數，並且量化外源性刺激源對細胞生理之影響。細胞活性狀態之評估方法可分為兩大類，一是量測細胞能量代謝相關物質的變化；其二是檢測細胞特異性變化或接受器(receptor)/配體(ligand)系統的反應(如膜電位的變化等)⁽¹⁾。在細胞能量代謝檢測的部份，又以下面幾種指標性代謝產物較為常見。

1. 氧氣的消耗

由於細胞需不斷的合成許多大分子(如蛋白質)來維持生理的正常運作，在這些生化合成過程中，須消耗大量的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)，才能克服生化反應所需的活化能，促使生化合成反應的發生。而 ATP 的合成則藉由生命體吞食、消化與吸收外界進來的食物進行氧化，以供生理所需。如一莫耳的葡萄糖分子在經過醱原酵解(glycolysis)與檸檬酸循環(citric acid cycle)後可生成 38 莫耳的 ATP (如式 (1))⁽²⁾，同時在此氧化過程

中也消耗 6 莫耳的氧分子，因此氧氣分子在 ATP 的合成過程中扮演著重要的角色，故氧氣的消耗量，可代表生命體的呼吸活性。當細胞生理活性愈高，需合成大量蛋白質時，將消耗掉較多的氧氣來合成較多的 ATP，以協助蛋白質的合成：



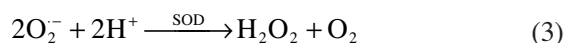
2. 胞外酸化率

細胞在進行醱原酵解和呼吸氧化代謝反應過程中(如式 (1))，會產生二氧化碳，當二氧化碳擴散出胞外並溶解時，會解離產生氫離子，胞外二氧化碳濃度與 pH 值之間的關係可由 Hendersin-Hasselbalch 公式(如公式 (2))描述，因此可藉由胞外 pH 值的量測，來得知細胞的新陳代謝速率：

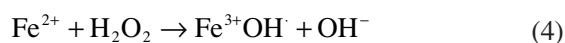
$$pH = 6.1 + \log \left[\frac{HCO_3^-}{CO_2} \right] \quad (2)$$

3. 活性氧物質的釋出

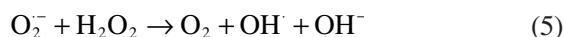
ROS 為含有氧原子之自由基物質的統稱，包括超氧陰離子(superoxide anion, O_2^-)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)與氫氧基自由基(hydroxyl radical, OH^\cdot)， O_2^- 的產生源自於細胞內粒腺體進行呼吸氧化作用時的副產物、細胞膜上 NAPDH oxidase (如噬菌細胞(phagocyte))或細胞質內的 xanthine oxidase 的催化反應產物⁽³⁾。 O_2^- 具有極高的活性，但半生期很短，在粒腺體或細胞質中易被超氧化物歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)快速催化成 H_2O_2 ，如公式 (3) 所示：



高濃度的 H_2O_2 會經由 Fenton reaction (公式 (4)) 與二價鐵產生 OH^\cdot ，



或與 O_2^- 在金屬催化 Haber-Weiss 反應(公式 (5))中產生 OH^\cdot ，



ROS 除了是細胞呼吸氧化反應中自然發生的產物外，亦會在外源性物質與 Fas receptor 結合後誘發產生，ROS 是具有強烈氧化能力的氧化劑，在細胞內有相對的抗氧化系統，如粒腺體內的 SOD (Mn) 或細胞質內的 SOD (Cu, Zn) 都可快速進行 O_2^- 的歧異化 (dimutation)，但當細胞內 O_2^- 濃度超過抗氧化系統的移除能力時，易形成氧化壓力 (oxidative stress)，胞內累積過高的氧化壓力，將會啟動細胞凋亡 (apoptosis) 的機制⁽⁴⁾。此外，噬中性白血球或巨噬細胞的免疫反應，以呼吸爆發 (respiratory burst) 伴隨著吞噬作用 (phagocytosis) 的發生，會釋放大量的 O_2^- 以消滅入侵體內的微生物⁽⁵⁾。因此 ROS 的濃度監測有利於瞭解外界物質對噬菌細胞的免疫反應，以及細胞的氧化壓力程度。以下將對目前細胞活性感測晶片的原理與發展作一回顧。

三、細胞活性檢測晶片的原理與發展

1. 細胞呼吸活性檢測晶片

細胞呼吸活性的評估主要是藉由胞外溶氧量的量測，在不影響細胞正常生理狀態下，非侵入式的電化學溶氧感測微電極非常適合胞外溶氧濃度的檢測。其工作原理為在電極上給予陰極電位，此時電極界面發生氧氣還原反應 (如公式 (6) 與公式 (7))，中性或鹼性環境下溶氧還原反應方程式：



酸性環境下溶氧還原反應方程式：

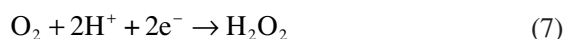


表 1. 不同形狀之超微電極與質傳係數的關係⁽⁶⁾。

電極形狀	Band	Cylinder	Disk	Hemisphere	Sphere
質傳係數 (m_0)	$\frac{2\pi D_0}{w \ln(64D_0t/w^2)}$	$\frac{2D_0}{r_0 \ln \tau}$	$\frac{4D_0}{\pi r_0}$	$\frac{D_0}{r_0}$	$\frac{D_0}{r_0}$

D_0 為擴散係數， w 為帶狀 (band) 電極寬度； r_0 為球型 (spherical) 或盤狀 (disk) 電極半徑

藉由擴散限制方程式 (公式 (8))，可量化還原電流與溶氧濃度之間的關係：

$$I_{ss} = nFAm_0C_0^* \quad (8)$$

N 為電子轉移數目， F 為法拉第常數， A 為電極面積， m_0 為質傳係數， C_0^* 為溶液內初始溶氧濃度。當電化學電極微小化至超微電極時 (半徑或寬度小於 $25 \mu\text{m}$)，易使擴散通量 (flux) 呈現穩態 (steady-state) 或擬穩態 (quasi-steady state) 的傳輸，可具有較高之反應電流密度，其空間解析度提高，則利於接近細胞表面進行量測，且超微電極面積非常小，檢測同時所消耗的氧氣量也極其微小，不至於影響細胞的正常呼吸活性。超微電極幾何形狀與擴散質傳係數 (m_0) 的關係如表 1 所示⁽⁶⁾。

最早的安培式溶氧感測電極於 1953 年為 Clark 博士開發⁽⁷⁾，此電極具有透氧膜以隔開電解液與待測樣本，可避免電極的污染。Clark 電極更可藉由氧化還原酵素 (如葡萄糖氧化酵素 (glucose oxidase)) 的固定 (如圖 1 所示)，透過溶氧的量測得知組織或血液內葡萄糖的濃度。而最早的晶片式 Clark 氧氣電極是由 Koudelka 在 1986 年所研發出來⁽⁸⁾，以矽為基材，透過微影蝕刻製程技術配製電極位置，以銀做為工作電極，量測氧的還原電流，參考電極使用 Ag/AgCl ，以水膠做為電解液，晶片上方以 epoxy resin 固定，具有氧氣通透性的矽膠 (silicone) 膜，以避免電極遭受外界環境的污染。然而透氧膜為疏水性，不利於貼附型細胞生長，且不易以微製程進行局部性塗佈，因此尚未有文獻報導可將哺乳類細胞直接培養於 Clark 式氧氣晶片上，進行細胞呼吸活性的檢測。為改善此缺點，筆者實驗室以矽烷化修飾聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 透氧膜的表面，使之帶有胺基可利於細胞的貼附，並整合可供細胞生長之微培養槽，以構成

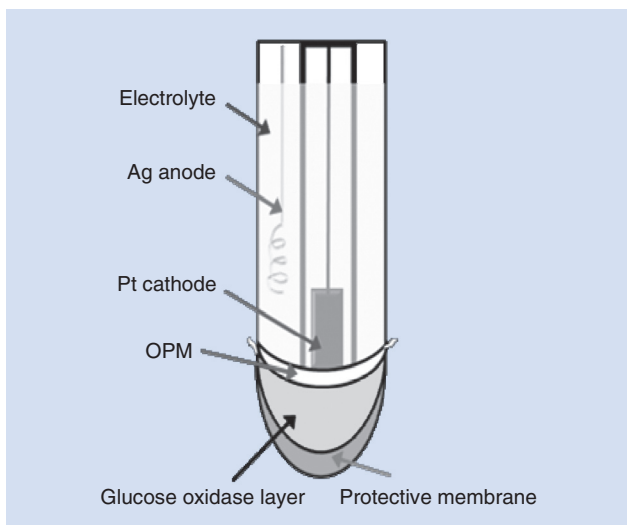


圖 1. Clark-type 氧氣感測電極示意圖。

一新型 Clark 式細胞呼吸活性檢測晶片⁽⁹⁾，可用於量測 glucose 或 propofol 麻醉劑對人類子宮頸癌細胞 (HeLa cell) 耗氧量的影響。實驗結果顯示加入 glucose，可使細胞氧氣需求量增加；而添加 propofol 則會抑制細胞訊息傳遞，導致代謝緩慢，使氧氣需求下降 (如圖 2 所示)。

除了 Clark 式溶氧電極的設計外，目前也有商業化安培法溶氧感測晶片，但沒有透氧膜的隔離常

有電極污染的缺點，如 1999 年 Amano 等人開發出一種新型拋棄式溶氧感測器⁽¹⁰⁾，具有 96 個檢測槽的 disposable oxygen electrode sensors (DOX-96)，此感測晶片已由日本 Daikin 公司將之商品化販售，每一檢測槽皆含有三極式金電極 (工作、輔助、參考電極皆為金電極)，藉由多工恆電位儀 (multipotentiostat) 可同時進行溶氧檢測，數據分析方法與使用傳統 96-well microplate 的檢測法類似。目前被應用至肺癌細胞對異黃酮的反應⁽¹¹⁾、細菌分類⁽¹²⁾，以及抗菌敏感性測試⁽¹³⁾ 等。

上述之溶氧感測晶片的共同缺點是細胞為隨機性貼附，無法控制細胞與量測電極之間的距離，當細胞離電極較遠時，可能會因檢測靈敏度不足，致使無法測出細胞活性的變化量，或當細胞分布不均時，在相同的細胞密度下，也無法重複地量化出細胞活性的變化率。針對此缺點，筆者實驗室於 2009 年利用微機電製程技術⁽¹⁴⁾，製作以玻璃為基材的溶氧電極陣列，並搭配原位 (*in situ*) 細胞圖案化製作，固定細胞與感測電極間的距離 (如圖 3 所示)，此晶片設計可在圖案化細胞區的耗氧擴散層範圍內，在不同位置檢測出細胞的耗氧擴散曲線，並利用半球型擴散公式可量化細胞耗氧速率 (oxygen consumption rate)，在半徑 200 μm 的細胞圖

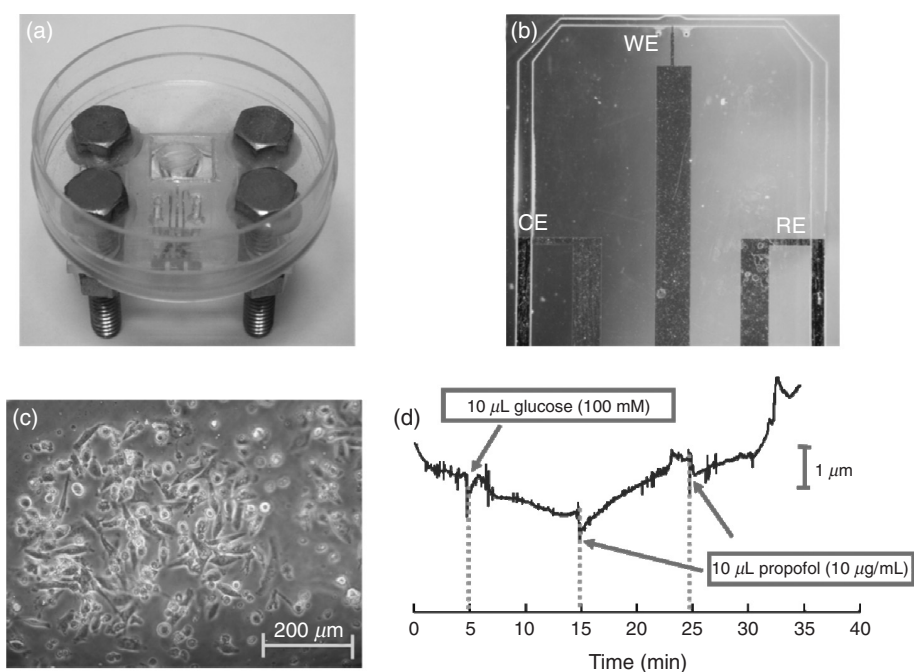


圖 2. (a) 晶片實體架設圖，(b) 電極實體圖，(c) HeLa cell 於透氧膜上培養 18 小時之結果與 (d) HeLa cell 受 glucose 與 propofol 刺激時胞外溶氧變化圖⁽⁸⁾。

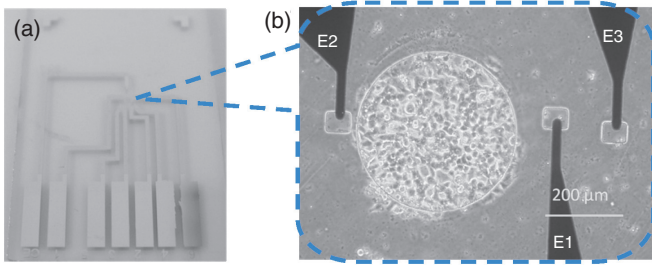


圖 3. (a) 溶氧電極陣列晶片與 (b) 培養於溶氧電極陣列晶片之圖案化 HepG2 cells⁽¹³⁾。

案區，其耗氧率在細胞培養液與 glucose 或 insulin 刺激下分別為 $11.74 \pm 3.00 \times 10^{-14}$ mol/s、 $13.99 \pm 4.14 \times 10^{-14}$ mol/s 與 $15.93 \pm 5.40 \times 10^{-14}$ mol/s。此晶片已結合一微流體控制裝置，可構成快速評估藥、毒物對細胞呼吸活性影響的檢測平台。

2. 胞外酸化率檢測

細胞在進行醱解作用和呼吸代謝過程中，會釋出有機酸與二氧化碳，藉由胞外 pH 值的量測，可得知細胞的代謝速率，此類晶片式的 pH 感測器有離子感測場效電晶體 (ion sensitive field effect transistor, ISFET)、光趨電位感測器 (light-addressable potentiometric sensor, LAPS) 與金屬氧化物薄膜電極等。

(1) 離子感測場效電晶體

離子感測場效電晶體於 1970 年由 Bergveld 提出⁽¹⁵⁾，ISFET 與金氧半場效電晶體 (metal-oxide-semiconductor FET, MOSFET) 相似，如圖 4 所示。但 ISFET 的閘極金屬接觸部分用 Ag/AgCl 參考電

極替代，以提供穩定電位，在閘極上方的絕緣層使用離子感測膜，當溶液中氫離子濃度發生變化時，感測膜會產生不同程度的解離或離子吸附，此時會改變液體與絕緣層間的表面電位，藉由此閘極電壓 (V_{gs}) 的改變，可得知溶液中 pH 的變化。一般用來檢測氫離子濃度變化的離子感測膜有 SiO_2 、 Si_3N_4 、 Al_2O_3 等。

2001 年 Martinoia 團隊將 ISFET 與溫度感測器、電阻抗感測器整合至同一晶片上，以非侵入式方法監測細胞在長期培養過程中的生理狀態⁽¹⁶⁾；同時結合微注入系統，減少樣本量，增快分析速度，達到即時檢測之目的。ISFET 的優點是易與微電子電路整合及利於微電子製程，能承受滅菌時的高溫高壓；但 ISFET 感測器的靈敏度約僅 40–50 mV/pH，且外接式 Ag/AgCl 參考電極體積龐大，使整體晶片微小化發展受到限制。

(2) 光趨電位感測器

在 1988 年 Hafeman 等人開發了 LAPS⁽¹⁷⁾，其檢測原理為在參考電極與工作電極 (以矽晶片為工作電極) 間施加一固定電位，驅動經光效應產生之電子電洞對移動，以產生電流，而電子電洞流大小與絕緣層的表面電位有關，其架構示意圖如圖 5 所示。當細胞培養在矽基材上時，可以激發光對細胞培養區底部進行掃描，若細胞因新陳代謝產生酸性物質，將會改變細胞外圍環境 (培養液) pH 值，從而影響絕緣層表面電位，藉由電子電洞流得知局部 pH 值的變化，而推估細胞活性。目前有加拿大的 Molecular Devices 公司所開發的 Cytosensor[®] Microphysiometer 商業化產品，然而此系統僅能進

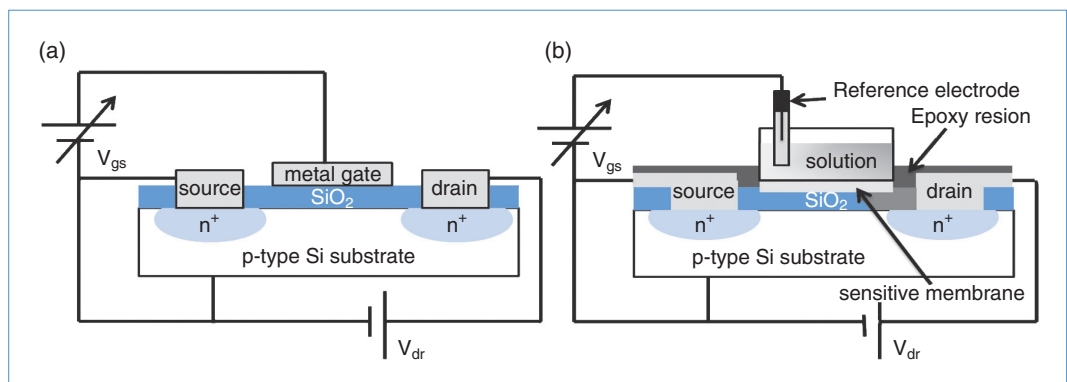


圖 4.
(a) MOSFET 與 (b) ISFET 的基本架構圖。

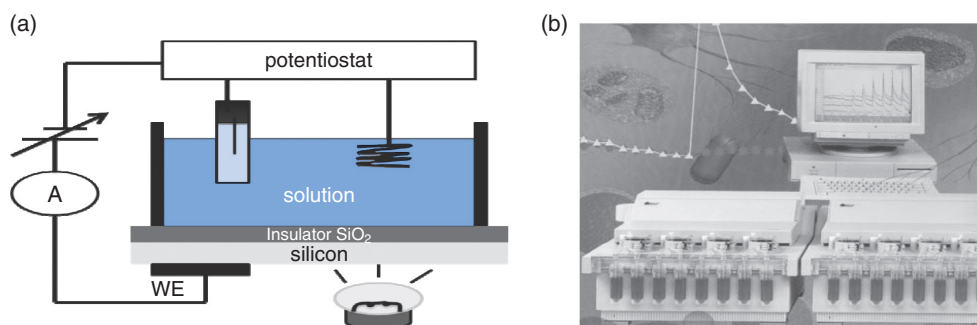


圖 5.
(a) LAPS 感測器基本架構與 (b) Molecular Devices 公司所開發 Cytosensor[®] Microphysiometer⁽¹⁸⁾。

行單一生理指標胞外酸化率之檢測，於實際細胞生理活性評估上資料不夠廣泛。

(3) 氧化銱 pH 電極感測器

1980 年 Niedrach 團隊利用金屬氧化物固態電極，量測高溫高壓下的油水混合物 pH 值⁽¹⁹⁾，不同 pH 值的溶液對金屬氧化物會有不同電位反應，藉由參考電極與金屬氧化物電極間的電位差，可推算出待測液 pH 值。目前有多種金屬氧化物被用來測試 pH 值，如 TiO₂、RuO₂、RhO₂、SnO₂、PtO₂ 及 IrO₂ 等，其中氧化銱 (iridium oxide, IrO₂) 因具有較廣的 pH 量測範圍、反應迅速、高靈敏度、低電位漂移、不易受外界環境溫度及氧化還原影響，因此被廣泛應用在微小化 pH 電極的製作上。製作 IrO₂ 的方法有濺鍍法 (sputtering，靈敏度約 59 mV/pH)、熱氧化法 (thermal oxidation，靈敏度約 59 mV/pH) 以及電化學法等。目前較多研究團隊採用電化學法電沉積 IrO₂ 薄膜，此方法利於局部化沉積技術的整合。IrO₂ 經浸泡含水處理後，可呈現超能斯特 (super Nernstian) 現象，其 pH 靈敏度可在 -60 mV/pH 至 -90 mV/pH 之間。

IrO_x 感測器在胞外酸化率的研究，有 Baudenbacher 團隊結合 IrO_x-pH 感測電極、IrO_x 參考電極與細胞培養槽，在微通道內量測老鼠纖維母細胞 (mouse fibroblast cell) 的胞外酸化率^(20, 21)。實驗中在僅 9 nL 的微管道中對高密度的細胞群進行量測，雖可快速地增加液體酸化幅度，但也可能造成細胞生理狀況不良的影響，使經時性培養與藥物作用的量測失真，是此研究仍需改善的地方。

筆者研究團隊所研發之 IrO₂-pH 感測晶片，則整合了開放式培養槽與微流體控制，進行胞外酸化

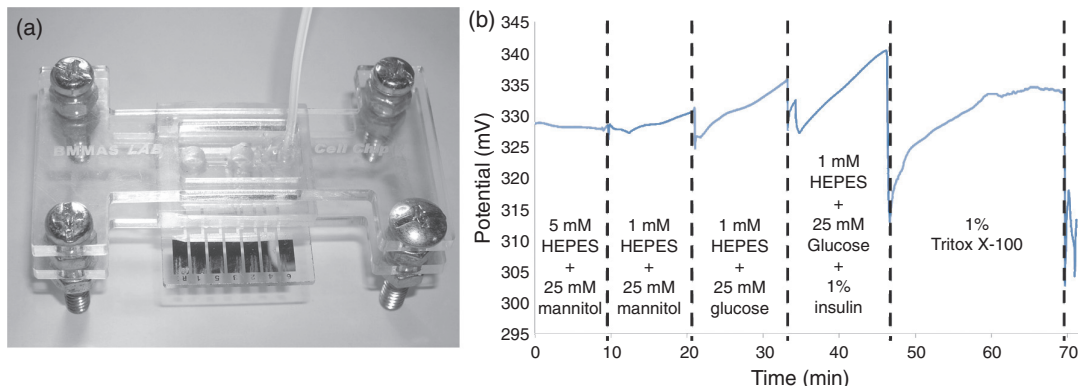
率的檢測，改善了上述 Baudenbacher 團隊的缺點⁽²²⁾，如圖 6(a) 所示。培養液體積不再受微管道高度限制可達數十微升 (microliter)，利於靜止狀態下長時間細胞活性的量測。此外，開放式的培養槽可讓樣本直接的滴入，液體的更換則藉由連接培養槽的微流道進行，由於微流道銜接口被舉離一定高度，故流體抽換時對細胞的剪切力可大幅下降。圖 6(b) 為將細胞密度為 10¹⁶ cells/mm² 之 HeLa cell 培養於晶片底部，並加入 10 μL 的細胞培養液 (1 mM HEPES)，比較當培養液中含有 glucose 或 insulin 時，對胞外酸化率的影響，最後以 1% Triton X-100 將細胞移除。結果顯示含有 25 mM glucose 與 25 mM glucose+1% insulin 的細胞培養液中，酸化率較含有 25 mM mannitol 時分別增加 2.0 及 3.0 倍。此整合微流體控制與 pH 感測的 IrO_x 細胞活性評估晶片，可成功地量測細胞在不同分子作用下活性的變化，未來可應用至藥物篩選 (drug screening) 等領域。

3. 細胞氧化壓力量測

當細胞內源性產生 O₂⁻ 時，會在 SOD 催化下轉變成 H₂O₂，H₂O₂ 可擴散出細胞膜，再經安培法直接對 H₂O₂ 進行氧化或還原，若待測樣本液中有其他干擾物 (vitamin C、uric acid、oxygen 等) 存在時，將無法進行高選擇性的檢測。此外，細胞膜上有 NADPH oxidase 存在時，所產生的 O₂⁻ 可散逸出胞外，或噬菌細胞進行呼吸爆發反應時，亦有大量的 O₂⁻ 會被釋放至胞外，此時便可以酵素電極方式進行非侵入式的 O₂⁻ 檢測。目前研究中大都使用 cytochrome c 及 SOD 當作 O₂⁻ 的辨識分子元件，當這類金屬蛋白質 (metalprotein) 的金屬活性中心被

圖 6.

(a) 結合開放式培養槽之氧化鋇 pH 感測晶片實體圖與 (b) HeLa cells 受 glucose 與 insulin 刺激，對胞外酸化率之影響⁽²¹⁾。



O_2^- 還原後，可藉由電極所施加的氧化電位，直接對金屬活性中心進行氧化反應，以量化胞外 O_2^- 濃度，下列就 cytochrome *c*- 與 SOD-based 感測器的原理與應用進行說明。

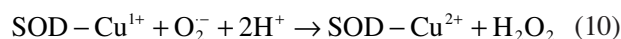
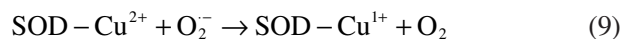
(1) Cytochrome *c*-based 感測器

Cytochrome *c* 為一普遍存在於粒腺體內的蛋白質，於氧化磷酸化時做為電子轉移的媒介，可利用帶有硫醇 (thiol) 基之分子在金電極表面形成自組性薄膜 (self-assembled monolayers, SAM)，再活化此 SAM，將 cytochrome *c* 共價鍵結至電極上。當 O_2^- 還原 cytochrome *c* 之 Fe (III) 活性中心，使之變成 Fe (II) 時，電極施予一氧化電位，使之再轉變成 Fe (III)，此時便可由氧化電流量化 O_2^- 。此方式可在較低電位間接進行 O_2^- 的檢測，並避開需在較高電位氧化的電活性物質 (如 H_2O_2 與維他命 C) 的干擾。但是 cytochrome *c* 自身對於 O_2^- 專一性不高，在 H_2O_2 存在的環境中，也易被 H_2O_2 氧化，使電極上可檢測到之還原態 cytochrome *c* 數量減少，無法有效精準量化 O_2^- 的濃度，限制此電極在真實生物樣本上的使用。

目前 McNeil 研究團隊於 24 孔培養盤上濺鍍金電極，並在金電極表面修飾上 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP) 後再與 cytochrome *c* 共價鍵結，以二極式的方式將電位設在 +0.1 V (vs. Ag/AgCl) 來檢測人腦膠質瘤細胞 (Human glioblastoma cell, A172) 胞外的 O_2^- 濃度，此套檢測系統具有同時多工檢測的優勢，對細胞氧化壓力量測上具有商品化的價值⁽²²⁻²⁴⁾。

(2) SOD-based 感測器

SOD 具有催化 O_2^- 的專一性，且於氧化態及還原態時皆能對 O_2^- 進行催化 (如式 (9) 及 (10))，產生 O_2 及 H_2O_2 ，因此被認為在真實生物樣本量測中，具有較佳的發展潛力。



早期 SOD-based 感測器的設計以檢測 H_2O_2 的氧化為主，但由於 H_2O_2 氧化需較高的陽極電位，反而造成其他電活性物質在此電位下也被氧化，而形成干擾。因此目前 SOD-based 感測器以直接量測 SOD 上的電子轉移為主，以避開量測 H_2O_2 所需高電位之干擾。在 Ohsaka 團隊的研究中提出，透過半胱氨酸 (cysteine) 在電極表面形成 SAM，再將 SOD 修飾於 SAM 上，於電極上施加氧化電位 +0.3 V (vs. Ag/AgCl) 時，對接受 O_2^- 電子而還原的 SOD 進行氧化，藉此電位的施加，能避開 H_2O_2 、homovanillic acid (HVA) 與 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) 於檢測上的干擾；反之，若是施加還原電位 -0.2 V (vs. Ag/AgCl) 將氧化態 SOD 還原，則可避開尿酸 (uric acid)、維他命 C (ascorbic acid) 及神經傳導物質代謝產物 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 於檢測電流上的影響⁽²⁵⁾。目前於文獻回顧中尚未有 SOD-based 感測晶片於活體細胞 O_2^- 的研究，因此在此領域仍有極大的研究潛力。

四、細胞感測系統整合

由於微製程技術有利於製作電極陣列，因此開發可同時量測多種生理參數的細胞活性晶片已受到重視，此類商業化產品有德國 Bionas 公司出產的多參數細胞生理分析晶片 (Bionas[®] metabolism chip SC1000)⁽²⁷⁾，可對細胞氧氣消耗率 (安培法感測器)、胞外酸化率 (ISFET) 及細胞貼附性 (交指狀電極導電度感測器) 進行整合性量測，如圖 7 所示。其優點是可同時進行細胞多生理參數的量測，缺點是無法圖案化培養細胞於晶片上，因無法固定感測器與細胞生長區之間的距離，在量測上僅能用活性變化百分比來量化細胞活性。且此商品以矽作為基材，雖有利於標準半導體製程技術的製作，但其不透光性，將無法利用光學顯微鏡同時觀測培養在矽基材上的細胞形態，所需基材與製作成本也相對昂貴。因此在此整合型細胞活性感測晶片的開發上，仍有許多發揮的空間。

本研究團隊提出以玻璃為基材的微製程技術，已成功製作出可同時檢測細胞氧氣消耗率與胞外酸化率的電化學電極陣列，未來更會整合局部化電聚合包埋 SOD 或 cytochrome c 技術，以期能同時量化細胞呼吸活性、酸化率與氧化壓力的檢測晶片。藉由之前所開發之連結微管道的開放式微培養槽，可進行大體積細胞培養，以去除細胞上方之微管道高度限制，使細胞處於正常生理狀態下受檢測。此免標定非侵入式細胞活性檢測平台，將可實現以細胞為感測元件，快速評估生物體受外界藥、毒物刺激時之生理響應。

五、結論

細胞活性感測晶片是一項結合生物醫學、系統控制與工程製作等多領域整合的新興科技，藉由量測細胞生理參數的變化，可以得知生命體的生理運作；相對的，也能利用不同種類的細胞對外在環境進行監控。如監測肥大細胞 (mast cell) 與過敏源結合的免疫反應，可進行過敏原測試；噬菌細胞對內毒素刺激的呼吸爆發反應；或以此晶片建立抗癌藥



圖 7. Bionas[®] metabolism chip SC1000 實體圖⁽²⁷⁾。

物、殺蟲劑、保健食品中有效成分對細胞活性影響的快速篩選系統，這將可取代部分的動物實驗，減少藥物開發時程。此細胞活性晶片檢測平台，若能同時提供更多專一性的生理參數量測，將可對現行的生物感測器產業開創新的商業應用價值。

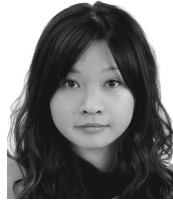
誌謝

筆者感謝國科會 (NSC98-2313-B-005-031-MY3) 提供經費補助。

參考文獻

1. L. Bousse, *Sensor Actuat B-Chem*, **34**, 270 (1996).
2. C. Starr, *Biology, Concepts and Applications*, 2nd. ed., California: Wadsworth (1994).
3. J. F. Curtin, M. Donovan, and T. G. Cotter, *J. Immunol. Methods*, **265**, 49 (2002).
4. D. J. McConkey, *Toxicol. Lett.*, **99**, 157 (1998).
5. I. Fridovich, *Science*, **201**, 875 (1978).
6. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., America: Wiley (2001).
7. L. C. Clark, Jr., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, *Appl Physiol.*, **6**, 189 (1953).
8. M. Koudelka, *Sensor Actuat B-Chem*, **9**, 249 (1986).
9. 林彥廷, 吳靖宙, 國立中興大學碩士論文 (2007).
10. Y. Amano, C. Okumura, M. Yoshida, H. Katayama, S. Unten, J. Arai, T. Tagawa, S. Hoshina, H. Hashimoto, and H. Ishikawa, *Human Cell*, **12**, 3 (1999).
11. S. Andreescu, O. A. Sadik, and D. W. McGee, *Anal. Chem.*, **76**, 2321 (2004).
12. J. Karasinski, S. Andreescu, O. A. Sadik, *Anal. Chem.*, **77**, 7941 (2005).
13. T. Kitahara, N. Koyama, J. Matsuda, Y. Hirakata, S. Kamihira,

- S.Kohno, M. Nakashima, and H. Sasaki, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1229 (2003).
14. 袁佳吟, 吳靖宙, 國立中興大學碩士論文 (2009).
 15. P. Bergveld, *IEEE T. Bio-Med. Eng.*, **17**, 70 (1970).
 16. S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin, and M. Zen, *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 1043 (2001).
 17. D. G. Hafeman, J. W. Parce, and H. M. McConnell, *Science*, **240**, 1182 (1988).
 18. http://www.tekontech.com/product_detail.asp?pid=4
 19. L. W. Niedrach, *J. Electrochem. Soc.*, **127**, 2122 (1980).
 20. I. A. Ges, B. L. Ivanov, D. K. Schaffer, E. A. Lima, A. A. Werdich, and F. J. Baudenbacher, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 248 (2005).
 21. I. A. Ges, B. L. Ivanov, A. A. Werdich, and F. J. Baudenbacher, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1303 (2007).
 22. 林瑋宸, 吳靖宙, 國立中興大學碩士論文 (2008).
 23. P. Manning, C. J. McNeil, J. M. Cooper, and E. W. Hillhouse, *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1304 (1998).
 24. S. C. Chang, N. P. Rodrigues, N. Zurgil, J. R. Henderson, F. Bedioui, C. J. McNeil, and M. Deutsch, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **327**, 979 (2005).
 25. S. C. Chang, N. P. Rodrigues, J. R. Henderson, A. Cole, F. Bedioui, and C. J. McNeil, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 917 (2005).
 26. Y. Tian, M. Shioda, S. Kasahara, T. Okajima, L. Mao, T. Hisabori, and T. Ohsaka, *BBA-Gen. Subjects*, **1569**, 151 (2002).
 27. M. Brischwein, E. R. Motrescu, E. Cabala, A. M. Otto, H. Grothe, and B. Wolf, *Lab Chip*, **3**, 234 (2003).
 28. <http://www.bionas.de/en/Products/Systems.html>



袁佳吟小姐為國立中興大學生物產業機電工程碩士，現任國立中興大學生物產業機電工程學系研究助理。

Chia-Yin Yuan received her M.S. in bio-industrial mechatronics engineering from National Chung Hsing University. She is currently a research assistant in the Institute of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Chung Hsing University.



傅世宇先生為現就讀於國立中興大學生物產業機電工程學研究所碩士班。

Shih-Yu Fu is currently a M.S. student in the Institute of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Chung Hsing University.



吳靖宙先生為國立成功大學醫學工程博士，現任國立中興大學生物產業機電工程學系助理教授。

Ching-Chou Wu received his Ph.D. in biomedical engineering from National Cheng Kung University. He is currently an assistant professor in the Institute of Bio-Industrial Mechatronics Engineering at National Chung Hsing University.