

# 免標定生物感測器

## Label-Free Biosensor

章嘉明、李佳瑜、江昌獄、周禮君

Chia-Ming Chang, Chia-Yu Li, Chang-Yue Chiang, Lai-Kwan Chau

免標定生物感測技術相較於傳統感測技術，如螢光或是放射性分析法檢測，除了快速、簡易、可即時偵測之外，還可以降低標定物會破壞鍵結交互作用的風險，對於生物動力學、親和力以及濃度鑑定皆是很好的分析工具。本文中，介紹數種目前市場佔有率較高的免標定生物感測器的技術原理及其相關商業儀器，分別為石英晶體微天平、表面電漿共振、導模共振、光學干涉以及本實驗室開發的光纖定域電漿共振。

As compared to conventional bio-detection techniques such as those with fluorescence and radioactive labelling, label-free biosensors not only avoid the errors due to the labelling procedure but also offer additional advantages such as short analysis time, simple procedure, and capability of real-time monitoring. Furthermore, it is a powerful analytical tool for studies of bio-interaction kinetics, bio-affinity, and concentration of biological species in real samples. This report will introduce the principles of several label-free biosensing techniques that have relatively high market shares today and their commercialized instruments. The techniques to be described will include surface plasmon resonance (SPR), guided mode resonance (GMR), optical interference, and fiber optic-localized plasmon resonance (FO-LPR) which is developed by our laboratory.

### 一、前言

對於很多的生物感測技術來說，基質 (substrate) 或受體 (receptor) 必須具有電化學或光譜等特徵，使其在感測生化反應過程中能獲得特徵的改變而判斷分子是否有交互作用。但是多數的生化反應並沒有這樣的特徵變化，因此，常見的生物感測技術便是在基質或受體上標定螢光基團、放射性物質、氧化還原活性標定 (redox-active label) 或是酵素以達到具有感測能力。但是標定生物分析法通常有步驟冗長、耗時、無法即時偵測、標定困難、生化分子結構改變、放射性物質環境污染等缺點。

相對的，免標定檢測法相較於傳統檢測法，如螢光或是放射性分析法檢測，除了快速、簡易、可即時偵測之外，還可以降低標定物會破壞鍵結交互作用的風險，對於生物動力學、親和力以及濃度鑑定皆是很好的分析工具<sup>(1)</sup>。

簡單來說，生物感測器就是可以使用生物或是仿生化學受體去偵測樣品中的分析物的儀器。它們可以提供詳細的親和力、化學計量學、熱力學以及交互作用之動力學等資訊。免標定生物感測器就定義而言就是不需要使用通報元件 (reporter element)，如螢光、冷光、放射或是比色法等去協

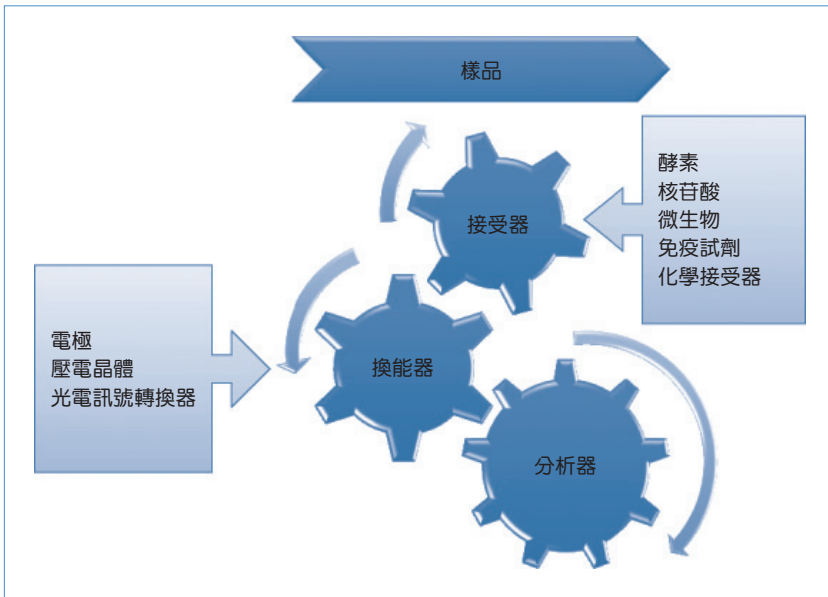


圖 1. 免標定生物感測器的核心架構。

助量測，取而代之是利用一些方法將通報分子與換能器 (transducer) 連接可即時的產生電子訊號。儘管所有的免標定技術的操作原理或是架構可能不同，但都會擁有三個主要的核心元件，包括：接受器 (receptor)、換能器以及分析器，如圖 1 所示。其中接受器可能包含有酵素、抗體、核苷酸或仿生化學接受器等分子辨識元素，主要功能是從生物流體或樣品中以高選擇性的方式捕捉感興趣的分子、蛋白質、核苷酸、細胞或是病原體等。換能器則可由電極、壓電材料或光電訊號轉換器所構成，主要是將接受器與分析物之間的生化反應所產生的變化量依正比關係轉換成光、電、力、磁熱或聲波等物理量。最後經由分析器將這些物理量放大並量化，且將訊號轉換成可供判讀的介面<sup>(2,3)</sup>。

## 二、免標定生物感測器

目前依據上述架構所發展的免標定生物感測器眾多，包括壓電式石英晶體微天平 (quartz crystal microbalance, QCM)、表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR)、導模共振 (guided mode resonance, GMR)、光學干涉 (optical interference)、電子阻抗 (electrical impedance) 等感測器，表 1 為各種市售的免標定生物感測器。下列將介紹一些目

前有較高市場佔有率的免標定生物感測器以及本實驗室開發的光纖定域電漿共振 (fiber optic-localized plasmon resonance, FO-LPR) 感測技術之原理。其中，一些目前市場佔有率較低的技術在此將不詳細描述，但皆列在表 1 中。

### 1. 石英晶體微天平

石英晶體微天平就是所謂的聲波共振器 (acoustic wave resonators)，一般在如手錶、電腦或是電視等電子器材中可以發現它的應用<sup>(4)</sup>。1959 年，Sauerbrey 發現在空氣中或是真空下的晶體共振頻率與表面吸附質量呈線性關係<sup>(5)</sup>，自此 QCM 就開始受到物理和化學學家的高度興趣。1982 年，Nomura 發展出一套可在液體下操作的電子振盪電路之後，QCM 就可結合此電子振盪電路開始應用於檢測液態生物樣品<sup>(6)</sup>。

而石英晶體微天平的偵測原理須回溯至 1880 年 Pierre Curie 與 Jacques Curie 所發現的壓電性 (piezoelectricity)。所謂的壓電性是結合物質的機械和電子行為，當壓電材料受到壓力產生形變時，就會在材料表面聚集電子電荷產生電壓；相對的，若壓電材料遭受到電場施加電壓時，就會產生機械形變。藉由提供交流電壓，即可引起壓電材料產生機械性共振，且振盪頻率會依材料的剪切和幾何形

表 1.  
市售免標記生物感測器。

Technology	Manufacturer	Website
SPR	Biacore	www.biocore.com
	Bio-Rad	www.biorad.com
	Fujifilm	www.fujimed.com
	Reichert	www.reichertspr.com
	ICx Technologies	www.discoversensiq.com
	BioNavis	www.bionavis.com
	Autolab	www.ecochemie.nl
	Graffinity	www.graffinity.com
	GWC Technologies	www.gwctechnologies.com
	GenOptics	www.genoptics-spr.com
	IBIS Technologies	www.ibis-spr.nl
GMR	SRU Biosystems	www.srubiosystems.com
	Corning	www.corning.com
Optical Interference	Farfield Group	www.farfield-group.com
	Silicon Kinetics	www.siliconkinetics.com
	Axela biosensors	www.axelabiosensors.com
	ForteBio	www.fortebio.com
Ellipsometry	Maven Biotechnologies	www.mavenbiotech.com
QCM	Q-Sense	www.q-sense.com
	TTP Labtech	www.ttplabtech.com
	Attana	www.attana.com
	ANT	www.anttech.com.tw
Electrical Impedance	Acea Biosciences	www.aceabio.com
	MDS Analytical Technologies	www.moleculardevices.com
	Applied Biophysics	www.biophysics.com

狀而有所不同<sup>(2, 4)</sup>。一般具均方性 (isotropic) 結構的材料不會具有壓電性，需具有異方性 (anisotropic) 結構之晶體，如若歇爾鹽 (Rochelle salt)、電氣石 (tourmaline) 或石英等材料才會具有壓電性。

一般常用的石英晶體微天平是採用切割角度為 35°15' 方式切割成薄片的 AT-cut 石英晶體。AT-cut 的石英晶片是屬於厚度剪切模式 (thickness shear mode, TSM) 振動，換言之，AT-cut 厚度和振盪頻率有關<sup>(7)</sup>，晶片越薄則共振頻率也越高。此外，採用 AT-cut 石英晶體的另一因素為 AT-cut 石英晶體較其他切割方式的晶體受到環境中溫度影響是最小的<sup>(8, 9)</sup>。

石英晶體微天平的主要核心就是壓電性石英晶體，壓電石英晶體是由石英晶片在其兩面各披覆一層金屬電極所構成，一般為金電極。將金電極連接振盪器並施加一交流電壓，使得石英晶體受到壓電

效應 (piezoelectric effect) 的共振頻率開始振盪，而振盪的頻率會隨著吸附在石英晶體表面的質量多寡而改變；頻率的改變量與吸附的質量成正比，吸附的質量越多，頻率的下降量也越多。由於石英晶體微天平振盪頻率的變化量對吸附質量的變化相當靈敏，因此，可在石英晶體的電極表面上修飾一層具有高特異性的辨識分子薄膜，再將此感測晶片置於含有分析物的環境中，使分析物親和性地與辨識分子吸附，即可利用振盪率衰減值測得分析物的量<sup>(2)</sup>。圖 2 為石英晶體微天平感測原理之示意圖。

由於石英晶體微天平不需要標定的流程，即可得知分子間作用力的動態變化，因此石英晶體微天平可被應用於很多領域，如偵測和鑑定生物薄膜沉積、抗原偵測、生物分子的結合動力學、細胞黏附以及 DNA 檢測等<sup>(10-16)</sup>。

## 2. 表面電漿共振

由於金屬擁有束縛力較弱的導電電子雲團，當這些自由電子受到特定頻率的電磁波激發後，即會在金屬與介電物質界面之間產生誘導性的電子集體偶極振盪<sup>(17)</sup>，此現象稱為表面電漿共振。而這些具高能量的表面電漿 (surface plasmon) 會以表面波 (surface wave) 的方式沿著金屬與介電物質界面振盪傳遞，此電荷振盪波稱為表面電漿波 (surface plasma wave, SPW) 或表面電漿振盪 (surface plasma oscillations)<sup>(17)</sup>。

由於光無法於平滑的金屬表面上直接激發出表面電漿波，Otto 在 1968 年提出了一種以稜鏡耦合入射光至表面電漿波的三層架構 (稜鏡－空氣層－金屬膜)<sup>(18)</sup>。入射光在稜鏡與空氣界面經由內全反射所產生的漸逝波能穿透空氣層而激發金屬薄膜上的表面電漿。Otto 在實驗中觀察到只有 *p* 偏極光 (*p*-polarized light) 以特定入射角照射金屬薄膜時，反射光強度會有急劇減弱的現象。且同一年，德國的 Kretschmann 和 Raether 也提出另一種不同的三層架構 (稜鏡－金屬膜－空氣)，同樣也觀察到表面電漿共振的現象<sup>(19)</sup>。因為在 Otto 的架構中空氣層的厚度不易精確控制，而基於架構的方便性，其後進行此研究的人大部分以使用 Kretschmann 和 Raether 的架構為主。

表面電漿共振的偵測系統基本架構包含一偏極光源、一個玻璃稜鏡、稜鏡的一端塗附一層金屬薄膜 (~50 nm) 以及一個光偵測器，如圖 3 所示。當入射光由稜鏡的一端進入耦合至玻璃介質內傳導時，會在與金屬薄膜界面交接處產生內全反射 (total internal reflection)，其反射光可由光偵測器接收。此外，在玻璃與金屬薄膜界面也會產生漸逝波 (evanescent wave)，並會被金屬的自由電子雲吸收產生電子電荷密度波 (electron charge density waves)，或稱為電漿 (plasmons)。而當電漿與漸逝波的頻率相等時，二者將發生表面電漿共振，界面處的全反射條件將被破壞，在特定的反射角範圍內會觀察到反射光強度的急劇降低，此一反射角 (angle of reflection) 稱為共振角 (resonance angle)。共振角的位置會隨著金屬薄膜層表面的折射率不同產生變化<sup>(20)</sup>，以至於當有蛋白質吸附在金屬薄膜表

面時，其光學密度 (optical density) 會增加，而導致共振角會偏移到較大的數值。

藉此，表面電漿共振可即時監控分子間作用力的改變，同時具有免標定與即時檢測 (real-time) 的能力，最為廣泛應用的是偵測抗體與抗原之間的交互作用<sup>(21-25)</sup>。將特定的抗原修飾固定於感測器表面的金屬薄膜層上，利用抗原與分析物中的抗體做專一性的鍵結吸附，當抗原與抗體鍵結時介電常數不同會改變感測器表面折射率，進而影響共振角的位置或是強度。最後可根據共振角位置或是強度改變量或是折射率改變量推算待測物的抗體含量。因此，可利用表面電漿共振來偵測生物分子的交互作用，並可應用於判斷檢體來源、種類、濃度、病毒篩檢、新藥物開發與藥物作用機制和酵素動力學等生物醫學研究。

以表面電漿共振為核心技術所建構的商業化儀器中，以 General Electric Company 公司所販售的流動式生物分子感測器 (Biomolecule Interaction Analysis System, BIACORE) 最具代表性。在 1991 年，瑞士的 Pharmacia 公司開發出生物分子相互作用分析系統，主要是利用表面電漿共振的光學原理，即時偵測生物分子之相互作用的反應結果 (鍵結、解離時的質量改變)，此感測器不需對欲分析的生物分子進行螢光或放射性物質標定，以及不需對欲分析樣品進行分離、純化的前處理步驟即可即時偵測，因此可以使實驗過程簡單，避免實驗時人為所造成的誤差與縮短檢測時間。相較於傳統的酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELSA)，表面電漿共振生物感測器不但省時便利，更省去了分子標定時所造成的困擾。

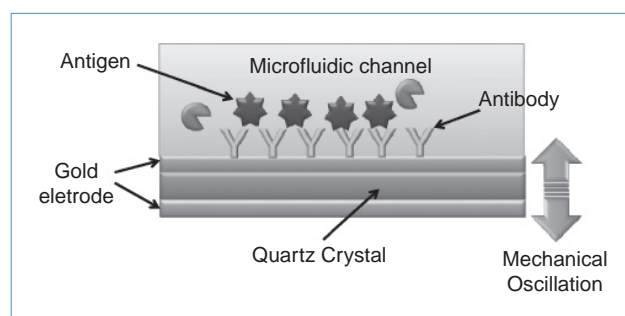


圖 2. QCM 系統的檢測機制。

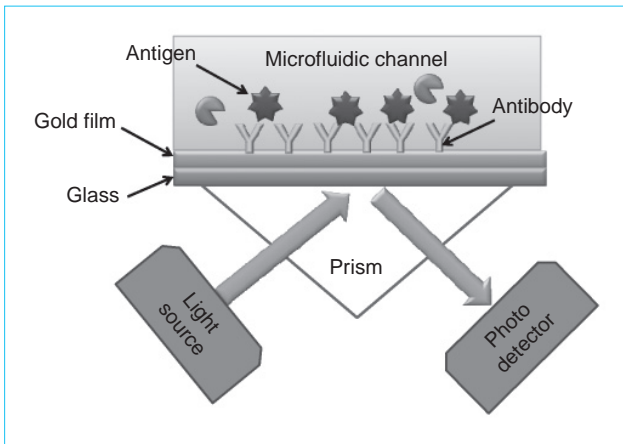


圖 3. SPR 系統的檢測機制。

### 3. 導模共振

導模共振光學生物感測器屬於免標定 (label free)、高通量 (high throughput)、可即時偵測生物分子鍵結時動力學曲線的生物感測器之一。近期，也有許多相關的文獻<sup>(26-36)</sup> 報導利用此感測器進行許多相關的研究。此感測器主要由具週期性排列的介電材料組成，通常在此折射率較低、具週期性表面結構的塑膠材料上覆蓋一層高折射率的  $\text{TiO}_2$  薄膜。當外部入射光經由光柵耦合入波導中，被耦合到波導內的光波與波導內存在的波導模態達相位匹配 (phase-matching) 時，便會產生共振。共振波長會產生反射 (reflection)，其餘非共振波長則會全部穿透。圖 4 為導模共振感測原理之示意圖。

當生物分子或細胞附著在 GMR 的表面時，會改變表面上一些物理參數，如等效折射率、等效光柵厚度等，而使得量測出來的反射頻譜產生變化。此感測器是以白光照射在其表面並以另一非接觸式的光纖收集反射光訊號，此量測方法可一次分別分析感測器上各個不同位置。另外，以奈米壓印的方法可以重複製作大面積的微小結構 (100–200 nm)，較共振波長小，結合  $\text{TiO}_2$  沉積法，不僅降低成本、製作方法簡單，且可以將感測區域排列成陣列模式，修飾不同標的物，大量進行生物分子的偵測，縮短分析時間。

此感測器主要偵測生物分子鍵結在 GMR 表面時，反射光的波長偏移量 (peak wavelength value, PWV) 的變化。例如，蛋白質被固定在感測器表面

時，當另一互補的蛋白質與之鍵結時，反射波長便會增加。

目前 Coring 以及 SRU Biosystems 已發展並販賣高通量分析和免標定的系統：Epic System<sup>(34-36)</sup> 和 BIND System<sup>(37, 38)</sup>，適合用來分析生物分子和細胞鍵結的陣列晶片。Epic System 包含兩個部分：(1) 標準 384 個陣列的拋棄式生物分子篩檢晶片，且每一陣列內為一獨立 GMR 感測器；(2) 光學閱讀機 (optical reader)，可在 8 小時內量測 40,000 陣列。當以寬帶的入射光以固定角度進入 GMR 感測器時，GMR 只會反射出相當窄的波長。此款儀器還有自我校正技術 (self-referencing technology) 的功能，陣列中 GMR 表面只有一半具有蛋白質鍵結功能，因此標的物固定在陣列表面時僅能固定一半，另一半則用來當參考值。偵測器則設定分別掃描兩個區域的共振波長，當分析物與固定在表面的標的物鍵結時，導致波導的有效折射率改變，進而將影響反射光波長的位移。可以利用此方法扣除溫度波動或使用溶液折射率不合適所造成的波長飄移。因分子間鍵結造成的波長偏移量與分析物鍵結在標的物上的量成正比，所以可以藉由波長偏移量來估算分析物鍵結量的多寡。

### 4. 光學干涉

數種高靈敏度的光學生物感測器已被證實可利用生物分子調控光學干涉效應，且可以準確地被量

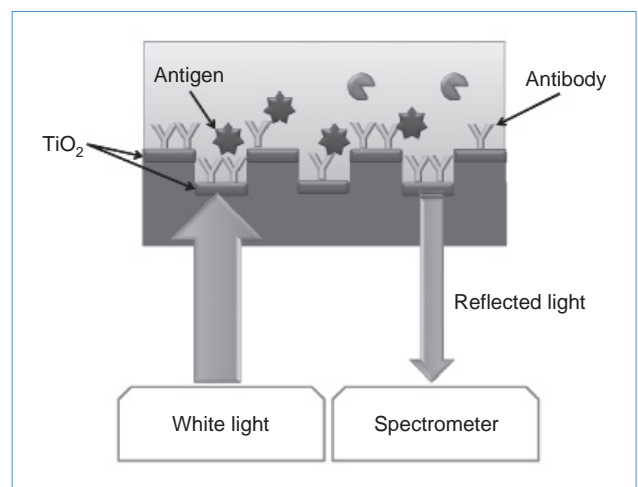


圖 4. GMR 系統的感測機制。

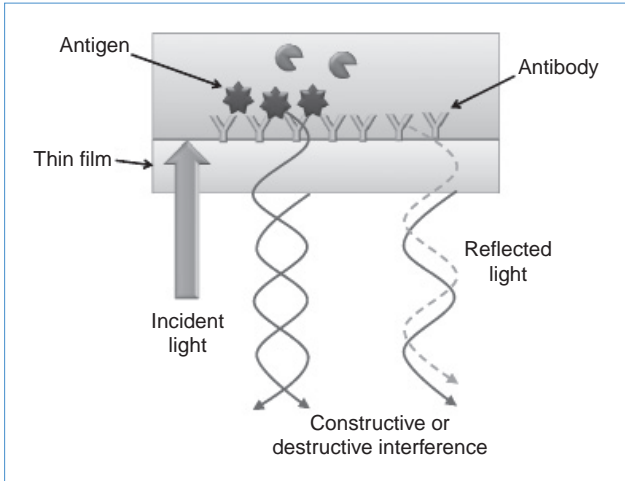


圖 5. 光學干涉式生物感測器之檢測原理。

測。由於光學干涉可以建構在可穿透性的薄膜，因此當光波照射在薄膜上會在各個界面產生反射，而當兩束反射光波行經不同的光學路徑就會產生相位差，進而產生干涉效應<sup>(39)</sup>。

利用光學干涉特性建構的生物感測器，主要是利用白光照射感測器的薄膜層，並在薄膜的上表面和下表面產生反射，而此兩束反射光可產生建設性或破壞性干涉，並可由光譜儀準確地的量測，其感測示意圖如圖 5 所示。光譜儀可以快速的量測反射光譜以及具有多重獨立檢測之功能，且薄膜的厚度若有任何的改變可隨時由反射光譜獲得訊息，因此，在薄膜上的一表面修飾辨識分子做為感測界面，而另一表面則未修飾任何分子可做為參考界面。當溶液中的分析物被感測層的辨識分子捕捉後會改變反射光的光學路徑，進而會改變干涉光譜。干涉式生物感測器即是利用此原理監測生物分子的交互作用，且此方法也被證實可應用在檢測小分子、蛋白質或是 DNA 等分析物。

Fortebio 發展的 Bio-Layer Interferometry (BLI) 技術是利用在光纖末端建立修飾有辨識分子的生物感測層，由光纖的另一端照射白光，光波經由光纖照射參考界面與生物感測層，並有小量的光波會沿著光纖反射並產生干涉光譜。當生物感測層的辨識分子捕捉待測物後，參考界面和生物感測層所產生的干涉光譜會改變，並藉由光譜儀可即時量測干涉光譜的偏移量。以光纖的末端做為生物感測區可以

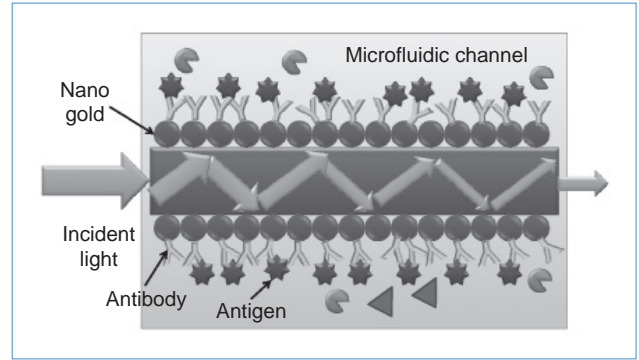


圖 6. FO-LPR 生物感測器之檢測原理。

直接與樣品接觸，而不需要額外的微流體槽道，且可以減少流體流過感測區表面，進而降低測量動力學時擴散的影響<sup>(40, 41)</sup>。

除了以二維平面作為反射層之外，另有 Silicon Kinetics 以奈米多孔矽 (nano-porous silicon) 作為三維多孔感測層的生物感測技術。此感測技術是利用奈米多孔矽搭配白光干涉儀量測多孔表面折射率的改變。當白光投射到多孔矽表面，光會從多孔矽與流體的界面以及塊狀矽 (bulk silicon) 與多孔矽的界面反射回來，並同時聚焦於繞射光柵，干涉光則由光偵測器接受。當蛋白質以共價鍵鍵結到多孔表面或是蛋白質與受體鍵結時，折射率會隨著鍵結的數量改變並導致波長偏移<sup>(42)</sup>。

## 5. 光纖定域電漿共振

貴金屬奈米粒子 (如奈米金粒子、奈米銀粒子) 的電子能階密度會隨粒子大小的不同而改變，造成該貴金屬奈米粒子具有特殊之吸收波帶，如：銀奈米圓球粒子在 410 nm<sup>(43)</sup> 附近會有一個特性吸收，金奈米圓球的特性吸收波帶則是出現在 520 nm 附近等。當貴金屬奈米粒子中的自由電子吸收某一特定波長的光，會以某一特定的頻率進行集體式的偶極振盪，此振盪的現象稱為定域電漿共振<sup>(44)</sup>。有別於表面電漿共振的非本質共振，貴金屬奈米粒子的定域電漿共振是屬於本質共振，不需藉著稜鏡或光柵耦合的方式即可激發電子產生共振。定域電漿共振的共振頻率與貴金屬奈米粒子表面的環境有高的相關性，也就是金屬奈米粒子的光學性質，如吸收度或吸收峰的位置對外在環境的折射率變化相當靈

敏<sup>(45)</sup>。

由於貴金屬奈米粒子的定域電漿共振波會因表面環境折射率所引起的改變而隨之變化。因此，藉由辨識分子將貴金屬奈米粒子表面官能化後，即可測量辨識分子與生物分子結合後所引起的電漿共振光學訊號變化，進而可得知生物分子交互作用與否。

光纖是應用全反射原理來傳導光波的圓柱型波導材質，具有低光損失、低色散、高撓性及無電磁干擾等特性。將貴金屬奈米粒子與光纖的核心結合形成一感測區，光於光纖核心中依全反射傳遞經感測區時，因辨識分子與生物分子結合後改變貴金屬奈米粒子的光學特性，進而會減弱光纖核心中傳遞的光強度。此外，藉由光纖的多次全反射可加強定域電漿共振波的訊號，進而提升偵測靈敏度。將定域電漿共振與光纖結合的感測技術稱為光纖定域電漿共振<sup>(2)</sup>。圖 6 為光纖定域電漿共振感測原理示意圖，將表面修飾有抗體之金奈米粒子鍵結在光纖核心層，由光纖的一端導入特定波長之入射光並在光纖末端以光偵測器擷取光學訊號，當抗原與金奈米粒子表面之抗體結合後會因金奈米粒子的吸收峰值增加，而導致光纖末端的光強度減少，因此量測光學訊號之減少量即可獲知抗原的含量。除此之外，導入微流體晶片的概念，將具感測能力的光纖內建在微流體晶片之中可減低樣品和試劑的使用量，並可在短時間內即時偵測貴金屬奈米粒子表面生物分子結合的反應情形<sup>(46, 47)</sup>。

### 三、結論

免標定生物感測技術改善傳統需要標定生物的分析方法，如螢光或是放射性分析檢測方法，步驟冗長、耗時、無法即時偵測、標定困難、生化分子結構改變、放射性物質環境污染等缺點。發展一套檢測快速、簡易、可即時偵測的分析方法之外，還可以降低標定物會破壞鍵結交互作用的風險。文中簡單介紹數種目前具有高市場佔有率的免標定生物感測儀器的原理及技術，並列舉介紹已商品化的儀器。從商業化免標定生物感測器往高通量分析上的迅速增長數量，顯示免標定生物感測技術在市場上的蓬勃發展。

### 參考文獻

1. R. L. Rich and D. G. Myszka, *Anal. Biochem.*, **361**, 1 (2007).
2. M. A. Cooper and V. T. Singleton, *J. Mol. Recognit.*, **20**, 154 (2007).
3. J. M. Perkel, *Science*, **19**, 1561 (2009).
4. G. N. M. Ferreira, A-C, da-Silva and B. Tomé, *Trend in Biotechnology*, **27**, 689 (2009).
5. G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, **155**, 206 (1959).
6. T. Nomura and M. Okuhara, *Anal. Chim. Acta*, **142**, 281 (1982).
7. J. E. Butler, L. Ni, R. Nessler, K. S. Joshi, M. Suter, B. Rosenberg, J. Chang, W. R. Brown, and L. A. Cantarero, *Immunol. Methods*, **150**, 77 (1992).
8. X. Su, R. Robelek, Y. Wu, G. Wang, and W. Knoll, *Anal. Chem.*, **76**, 489 (2004).
9. P. Skladal, C. S. Riccardi, H. Yamanaka, and P. I. Costa, *J. Virol Methods*, **117**, 145 (2004).
10. R. Etchenique and V. L. Brudny, *Langmuir*, **16**, 5064 (2000).
11. F. H. Fabreguette, Z. A. Sechrist, J. W. Elam, and S.M. George, *Thin Solid Films*, **488**, 103 (2005).
12. G. N. M. Ferreira, J. M. Encarnacao, L. Rosa, R. Rodrigues, R. Breyner, S. Barrento, L. Pedro, F. A. da Silva, and J. Goncalves, *Biosens. Bioel.*, **23**, 384 (2007).
13. Y. Liu, W. Zhang, X. Yu, H. Zhang, R. Zhao, D. Shanguan, Y. Li, B. Shen, and G. Liu, *Sens. Actuators B*, **99**, 416 (2004).
14. C. Modin, A. L. Stranne, M. Foss, M. Duch, J. Justesen, J. Chevallier, L. K. Andersen, A. G. Hemmersam, F. S. Pedersen, and F. Besenbacher, *Biomaterials*, **27**, 1346 (2006).
15. W. Pan, C. J. Durning, and N. J. Turro, *Langmuir*, **12**, 4469 (1996).
16. X-L. Su, and Y. Li, *Biosens. Bioelectron*, **21**, 840 (2005).
17. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **54**, 3 (1999).
18. A. Otto, *Z. Physik*, **216**, 398 (1968).
19. E. Kretschmann and H. Raether, *Z. Naturforsch*, **23A**, 2135 (1968).
20. 謝振傑, 物理雙月刊, **28** (4), 704 (2006).
21. B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom, *Sens. Actuators*, **4**, 299 (1983).
22. E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 513 (1991).
23. R. L. Rich and D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.*, **13**, 388 (2000).
24. D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.*, **12**, 390 (1999).
25. R. L. Rich and D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.*, **14**, 1 (2001).
26. B. T. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, *Sens. Actuators B Chem.*, **81**, 316 (2002).
27. A. J. Haes and R. P. V. Duyne, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10596 (2002).
28. L. L. Chan, P. Y. Li, D. Puff, and B. T. Cunningham, *Sens. Actuators B Chem.*, **120**, 392 (2007).
29. B. T. Cunningham and L. Laing, *Expert. Opinions in Proteomics*, **3**, 271 (2006).

30. P. C. Mathias, N. Ganesh, L. L. Chan, and B. T. Cunningham, *J. Biomol. Screen*, **9**, 481 (2004).
31. B. T. Cunningham, J. Qiu, P. Li, J. Pepper, and B. Hugh, *Sens. Actuators B Chem.*, **85**, 219 (2002).
32. B. Lin, P. Y. Li, and B. T. Cunningham, *Sens. Actuators B*, **114**, 559 (2006).
33. L. L. Chan, S. Gosangari, K. Watkin, and B. T. Cunningham, *Sens. Actuators B*, **132**, 418 (2008).
34. Y. Fang, A. M. Ferrie, N. H. Fontaine, and P. K. Yuen, *Anal. Chem.*, **77**, 5720 (2005).
35. Y. Fang, A. M. Ferrie, and G. Li, *FEBS Lett.*, **579**, 4175 (2005).
36. Y. Fang, G. Li, and J. Peng, *FEBS Lett.*, **579**, 6365 (2005).
37. B. T. Cunningham, P. Li, S. Schulz, B. Lin, C. Baird, J. Gerstenmaier, C. Genick, R. Wang, E. Fine, and L. Laing, *J. Biomol. Screen*, **9**, 481 (2004).
38. B. T. Cunningham and L. Laing, *Expert Rev. Proteomics*, **3**, 271 (2006).
39. J. Piehler, A. Brecht, and G. Gauglitz, *Anal. Chem.*, **68**, 139 (1996).
40. T. Do, F. Ho, B. Heidecker, K. Witte, L. Chang, and L. Lerner, *Protein Expression and purification*, **60**, 147 (2008).
41. Y. N. Abdiche, D. S. Malashock, A. Pinkerton, and J. Pons, *Anal. Biochem.*, **386**, 172 (2009).
42. M. Latterich and J. Corbeil, *Proteome Sci.*, **6**, 31 (2008).
43. 張仕欣, 王崇仁, *化學*, **56**, 209 (1998).
44. D. S. Wang and M. Ketxer, *Phys Rev. B*, **24**, 1777 (1981).
45. S. F. Cheng and L. K. Chau, *Anal. Chem.*, **75**, 16 (2003).
46. L. K. Chau, Y. F. Lin, S. F. Cheng, and T. J. Lin, *Sens. Actuators B*, **113**, 100 (2006).
47. N. S. Lai, C. C. Wang, H.-L. Chiang, and L. K. Chau, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 901 (2007).



章嘉明先生為國立中正大學化學博士，現任國立中正大學奈米生物檢測科技研究中心博士後研究員。

Chia-Ming Chang received his Ph.D. in chemistry from National Chung Cheng University. He is currently a postdoctoral fellow in the Center for Nano Bio-Detection at National Chung Cheng University.



李佳瑜小姐為國立中正大學化學暨生物化學博士，現任國立中正大學奈米生物檢測科技研究中心博士後研究員。

Chia-Yu Li received her Ph.D. in chemistry and biochemistry from National Chung Cheng University. She is currently a postdoctoral fellow in the Center for Nano Bio-Detection at National Chung Cheng University.



江昌獄先生現為國立中正大學化學暨生物化學研究所博士候選人。

Chang-Yue Chiang is currently a Ph.D. candidate in chemistry and biochemistry at National Chung Cheng University.



周禮君先生為美國愛俄華州立大學分析化學博士，現任國立中正大學化學暨生物化學系教授。

Lai-Kwan Chau received his Ph.D. in analytical chemistry from Iowa State University, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry and Biochemistry at National Chung Cheng University.