

[研究新領域報導]

金奈米生物感測器開發與應用

臺灣大學化學系與台東大學自然科學教育學系 張煥宗
 臺灣大學化學系 黃志清

一、前言

奈米結構的大小為 1~100 奈米(nanometer, nm)，介於分子和次微米之間。當材料的尺寸縮小，表面原子數與總原子比急速增加，使得表面能增加，致使奈米粒子具有很高的活性，而比表面積增加會引發物質化學活性、表面性質、力學性質、光學性質、電性、磁性與熱性質的改變，這就是奈米粒子的表面效應[1]。藉由調控奈米粒子大小、形狀、及表面組成，科學家們可開發出許多具特定光學、電、磁、催化等活性之新材料，因此奈米科技已儼然成為本世紀最重要的科技之一。限於篇幅，本文僅介紹金奈米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)的一些分析應用。

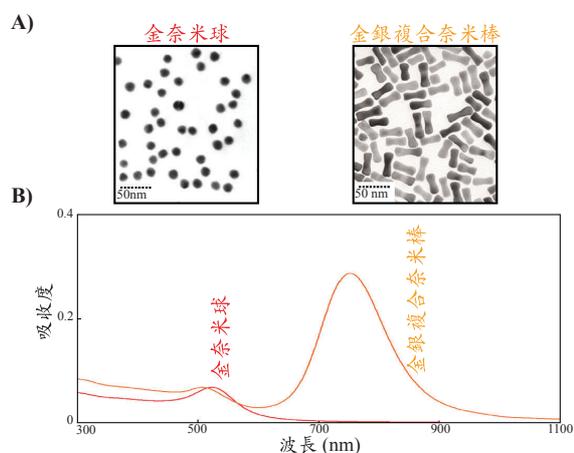
由於表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)吸收[2]，AuNPs 的吸收光波長和其形狀及大小有關。例如：原本是金黃色的金，在奈米的尺度下具有不同顏色；如 13 與 56 nm 的球型 AuNPs 顏色分別為玫瑰紅與紫紅色。另外，AuNPs 之 SPR 吸收與溶液之折射係數及介電常數亦有關。AuNPs 由於具有生物安全性、穩定性高、表面積大、特殊光學活性及和硫醇分子（許多蛋白質及生物分子含有硫醇官能基）間強大 Au-S 作用力，近十年來 AuNPs 已被廣泛用於生物分子分析。另外 AuNP 之 SPR 吸收係數 (10^8 - 10^{10} $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)為一般傳統染料之吸收係數一百倍以上，因此利用金奈米粒子所開發出來之奈米感測器應具有靈敏度高、選擇性高及生物相容性大等優點。

二、AuNPs 合成及光學感測器

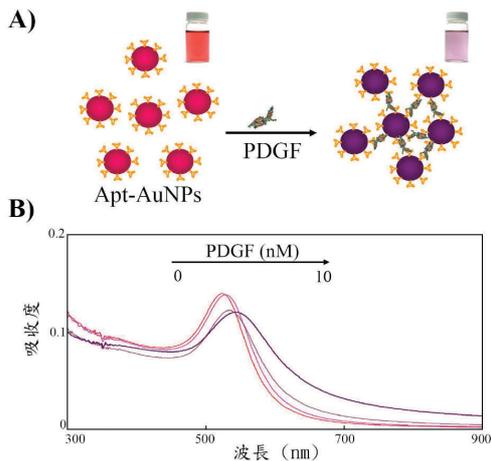
不同形狀及大小之 AuNPs 可利用簡單化學還原法於水相及有機相中合成，常見的還原劑為檸檬酸(citric acid)及硼氫化鈉(NaBH_4)。基於綠色科學及生物相容性考量，我們以發展水相

合成法為主。為了於水相中合成穩定的 AuNPs，合成溶液中常加入如檸檬酸鹽及界面活性劑當保護劑。近年來，我們亦開發出利用控制溶液之組成(改變胺基酸種類及濃度)及 pH 值等方法，來合成金銀及金銀汞等複合奈米粒子[3-5]。和球型之 AuNPs 相較，我們所合成之複合奈米粒子具有較大之吸收係數及較長且寬廣之吸收波長(圖一)。因此我們預期複合奈米粒子在生物分析之應用應更具吸引力，但為增加其選擇性及生物相容性，在進行修飾前，其表面活性劑需先除去。

利用 AuNPs 所開發之感測器，其偵測方法主要以分析物和感測器上辨識分子作用時，造成 AuNPs 聚集而產生 SPR 變化為主。AuNPs 聚集時會造成 SPR 吸收峰紅位移，進而造成溶液顏色改變。螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)為 AuNPs 感測器之另一重要偵測方法[6]。由於 AuNPs 相當高的 SPR 吸收係數，因此可於偵測系統中扮演高效率的消光劑(quencher)。下文將簡介一些 AuNPs 生物感應器的開發與應用。



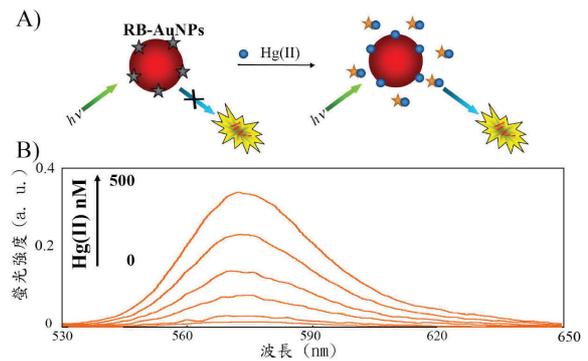
圖一 金奈米球與金銀複合奈米棒之 A)穿透式電子顯微鏡與 B)吸收光譜圖



圖二 分子適合體修飾的金奈米粒子(Apt-AuNPs)應用於血小板生長因子(PDGF)偵測。A)示意圖；B)吸收光譜變化和PDGFs 濃度關係

美國西北大學 Mirkin 教授首先提出利用經單股 DNA 修飾之 AuNPs 應用於 DNA 的檢測。當修飾單股 DNA 之 AuNPs 與互補 DNA 結合時，會造成 AuNPs 的交鏈聚集，並使粒子吸收產生紅位移，這種偵測方式可分辨出單點突變的 DNA 序列[7]。類似的觀念亦被應用於蛋白質、醣類及金屬之偵測。本研究室提出利用特殊序列 DNA 分子適合體 (aptamer) 修飾之 AuNP (Apt-AuNPs) 感測器來偵測蛋白質，如圖二所示。利用奈米粒子上適合體與乳癌標誌物血小板生長因子(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF)的 1:2 結合可應用於 PDGF 偵測，此適合體修飾奈米感測器具有相當高的選擇性，其偵測靈敏度可達 0.42 nM [8]。為增加對汞離子之選擇性，本研究室於 2,6-吡啶二甲酸(2,6-pyridinedicarboxylic acid)存在下，開發出對汞離子具高靈敏度及選擇性之硫醇修飾 AuNP 感測器[9]。

當螢光物質(fluorophore)與 AuNPs 距離 5 nm 之內，AuNPs 的 SPR 吸收與螢光物質的電子轉移，會使螢光物質本身螢光幾乎完全被 AuNPs 消光。利用 AuNPs 特殊消光效應，許多可偵測生物分子如 DNA 和蛋白質的金奈米偵測器已被開發成功[10-11]。我們利用硫醇和 AuNP 間具有作用力強之觀念，利用尼羅紅(nile red)修飾之 AuNP 感測器，開發出顏色及螢光轉移雙偵測法來測定硫醇分子，在不同的 pH 值下，藉由顏色改變來分辨出不同電荷之硫醇分子，利用螢光增

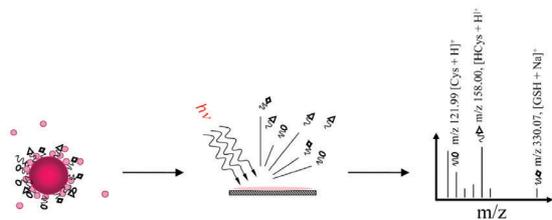


圖三 染料修飾的金奈米粒子(RB-AuNPs)應用於汞離子之偵測。A)示意圖；B)吸收光譜變化和汞離子濃度關係

加之量和硫醇分子濃度之線性關係，可測得低至 nM 之硫醇分子[12]。結合研究室所開發之光學顯微鏡技術，我們可觀測到紅血球中麩胱苷 (glutathione; GSH)之分佈與量[13]。染料鹽基桃紅精(Rhodamine B, RB)吸附的 AuNPs (RB-AuNPs)，會使 RB 螢光完全被 AuNPs 消光，而溶液中汞離子會取代 AuNPs 表面的 RB 並使其螢光回復，利用 RB 吸附的金奈米感測器可選擇性地測得 10 nM 的汞離子，如圖三所示[14]。

三、AuNPs 於質譜偵測生物分子之應用

除了上述光學感測器，AuNPs 亦可成為質譜偵測法中之選擇性吸附劑及有效表面輔助雷射脫附基質。Russel 等人於 2005 年時提出 AuNPs 擁有高紫外光範圍吸收係數，可直接作為表面輔助雷射脫附游離化質譜儀(Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, SALDI-MS)之無機基質，應用於重要生物分子之研究[15]。此技術可有效解決質譜分析中 sweet spots 及有機基質干擾的問題，作者利用不同粒徑之 AuNPs (2-10 nm)來進行胜肽及蛋白質樣品的分析，其並指出無論在正離子或負離子模式中，都可以看到胜肽樣品之訊號，且隨著奈米尺寸越小有訊號越強之趨勢(2 > 5 > 10 nm)，偵測極限可達到 100 fmol。最近我們利用 AuNPs 與半胱氨酸(cysteine)、高半胱氨酸(homocysteine)和 GSH 等生物硫醇化合物結合強之觀念純化如紅血球的生物硫醇，並搭配 SALDI-MS 技術可偵測到 25 nM GSH [16]，如圖四所示。另外，我們亦用 Apt-AuNPs 來偵測血球中三磷酸腺苷



圖四 金奈米粒子表面輔助雷射脫附游離化質譜應用於生物硫醇分析。

(adenosine triphosphate, ATP)之含量,此方法具靈敏性、選擇性及再現性高等優點。

四、AuNPs 於散射光譜及表面增強拉曼散射光譜之應用

AuNPs 表面電場增強效應使其本身擁有相當高的散色光,故在暗示野顯微鏡下,AuNPs 是一個相當好的散射顯影劑,抗體修飾的 AuNPs 在暗示野的顯微鏡下,可用於分辨正常與癌化的細胞[17]。近期我用利用分子適合體修飾的 AuNPs (32 nm)分辨正常與癌化的乳癌細胞,進一步的發現適合體修飾的 AuNPs 可抑制癌細胞的增長。

Fleischmann 等人在 1970 中期首先觀察到吸附在粗糙銀表面的吡啶(pyridine)之拉曼光譜[18],後來 Van Duyne 發現銀表面的吡啶分子拉曼散射訊號增強 10^6 倍[19],此一現象即為表面增強拉曼散射效應(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)。SERS 效應的金屬表面必須有具微觀的粗糙度,與金屬表面直接相連的被吸附官能基團的增強效應最為顯著。近期利用金屬奈米粒子於 SERS 之應用相當受到注目,不同染劑修飾的單股 DNA 與 AuNPs 上互補 DNA 結合時,藉由 SERS 效應可同時偵測多種 DNA[20]。最近我們合成出的奈米銀花(snowflake-shaped Ag NPs)和金-碲(Au-Te)奈米複合材料,已證實其對 SERS 增強效率可高達 10^9 倍。

五、總結

由上述例子,我們可看出 AuNPs 在生物分析應用方面具有許多優點及前瞻性。此外,我們亦利用高分子修飾之金奈米粒子來增加 DNA 之毛細管電泳分析速度、解析度及再現性等。近期,我們亦開發新的合成方法來製備具原生螢光之金奈米粒子點(gold nanodots),亦將其應用到蛋白質及金屬離子之偵測(投稿中)。金銀複合奈米材料結合對金屬選擇性高之高分子之觀

念,亦被我們用來偵測微量金屬離子。因此我們相信,以金為基質所開發出來之奈米感測器將極具應用性。

參考資料

- [1] M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.*, **34**, 257 (2001).
- [2] S. Link and M. A. El-Sayed, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **54**, 331 (2003).
- [3] C.-C. Huang, Z. Yang and H.-T. Chang, *Langmuir*, **20**, 6089 (2004).
- [4] Y.-F. Huang, Y.-W. Lin and H.-T. Chang, *Nanotechnology*, **17**, 4885 (2006).
- [5] Z. Yang, Y.-W. Lin, W.-L. Tseng and H.-T. Chang, *J. Mater. Chem.*, **15**, 2450 (2005).
- [6] B. Dubertret, M. Calame and A. J. Libchaber, *J. Nat. Biotechnol.*, **19**, 365 (2001).
- [7] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998).
- [8] C.-C. Huang, Y.-F. Huang, Z. Cao, W. Tan and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **77**, 5735 (2005).
- [9] C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Chem. Commun.*, 1215 (2007).
- [10] D. J. Maxwell, J. R. Taylor and S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9606 (2002).
- [11] L. Ao, F. Gao, B. Pan, R. He and D. Cui, *Anal. Chem.*, **78**, 1104 (2006).
- [12] S.-J. Chen and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **76**, 3727 (2004).
- [13] W.-L. Tseng, K.-H. Lee and H.-T. Chang, *Langmuir*, **21**, 10676 (2005).
- [14] C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **78**, 8332 (2006).
- [15] J. A. McLean, K. A. Stumpo and D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5304 (2005).
- [16] Y.-F. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **78**, 1485 (2006).
- [17] I. H. El-Sayed, X. Huang and M. A. El-Sayed, *Nano Lett.*, **5**, 829 (2005).
- [18] M. Fleischmann, P. J. Hendra and A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, **26**, 163 (1974).
- [19] R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84**, 1 (1977).
- [20] Y. W. C. Cao, R. Jin and C. A. Mirkin, *Science*, **297**, 1536 (2002).