

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用矽凝膠吸附濃縮正價染劑離子之特性建立以奈米矽凝膠微粒為標記之電化學冷光免疫分析系統

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2113-M-041-003-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系(所)

計畫主持人：王貞雅

計畫參與人員：簡誌慶、蕭閔譯、劉修銘、蔡宏良

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 11 月 1 日

(二)中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

近年來奈米材料應用於生醫檢測的領域中有蓬勃的發展，其中以各種複合材料製得具有高螢光強度及穩定性質的奈米粒子，亦不斷被證實有極佳的效能與臨床應用價值。這些摻入螢光物質的奈米微粒，螢光強度遠高於傳統有機螢光分子，又有多種可選擇材料與方法使粒子表面具適當官能基與生化分子產生共價鍵結，使其有優異條件作為蛋白質或核酸標記物 (1, 2)。

我們的研究參考 Tan et. al. (3) 所發表文獻，以溶膠凝膠法配合微乳化方式製備以 TEOS (tetraethoxysilane) 為起始物之奈米矽凝膠微粒，所製得為粒徑約 65nm、大小均一之奈米粒子。我們同時亦製備以 TMOS (tetramethoxysilane) 為起始物之奈米粒子，以比較兩種材質粒子在水溶液中的分散性、tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 吸附進入粒子速率的差異。此外亦探討溶液性質，如酸鹼值、溶液組成對奈米矽凝膠微粒吸附濃縮 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 特性之影響。

免疫分析實驗以未摻入染劑的奈米矽凝膠微粒作為抗體標記，免疫反應於聚苯乙烯微粒上進行，反應完成後方加入固定量 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，待 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 吸附濃縮於奈米標記內，再分離微粒與溶液，將兩部分分別注入光學分析系統，進行 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 螢光訊號偵測；當分析物濃度越高時，則所測得之螢光訊號越小。以奈米矽凝膠微粒作為“先驅標記物”的優點為其性質穩定、可長期保存、對各種抗體或抗原之標記方法簡易、且反應具普遍適用性；預期建立另一種經濟、簡易且靈敏的免疫分析模式。

關鍵詞：免疫分析、奈米矽凝膠微粒、螢光、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

In this work, we have made an effort to establish a new immunoassay method that utilizes silica nanoparticles as an universal pre-probe. The nanometer-sized silica particles were synthesized by a two-step procedure using the reverse-micelle and sol-gel technique. With the characteristics of silica nanoparticles for adsorbing and concentrating cations, none-doped silica nanoparticles were conjugated with antibodies first, after immunoreaction, signal molecules, such as fluorescence luminephores, could be added and concentrated into silica nanoparticles. Then the residual concentration of luminephores was determined based on fluorescence intensity. Using this pre-probe conjugation strategy, other cationic luminiphores, fluorophores, electrochemical active compounds, etc., can also be used in analogous methods. Because silica gel is a polar, biocompatible material, the nonspecific binding, denaturization, inactivation of biomolecules can be diminished. The properties of long-term stability and easy surface bioconjugation of silica nanoparticles make this universal pre-probe can play an important, versatile role in immunoassays.

Keywords: immunoassays、silica nanoparticles、fluorescence、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

前言、

免疫分析法常藉於抗體（或抗原）上標記適當的分子，由標記分子產生訊號的大小作為分析物定量的基準。可作為標記分子的種類很多，偵測方法也有所不同；利用螢光分子為標記，因其可重複受激發放光，具有良好的靈敏度。

欲將具良好螢光特性的分子標記到抗體（或抗原）上，必須兼顧不破壞標記分子之螢光性質、同時不影響抗體與抗原辨識結合特性兩項條件。有些螢光性質適合的分子並不具有可與抗體（或抗原）形成共價鍵結的官能基，此時則需將螢光分子進行適當的衍生，或藉由 coupling agents（如carbodiimides）連結二者；此合成反應常非常複雜，方法亦因螢光分子、抗體、抗原結構不同而各有差異。除此之外，過去常用之螢光分子以有機染料（organic dyes）為主，性質較不穩定，易受光破壞。

近年來奈米材料應用於生醫檢測的領域中有蓬勃的發展，其中以各種複合材料製得具有高螢光強度及穩定性質的奈米粒子，亦不斷被證實有極佳的效能與臨床應用價值。這些摻入螢光物質的奈米微粒，螢光強度遠高於傳統有機螢光分子，又有多種可選擇材料與方法使粒子表面具適當官能基與生化分子產生共價鍵結，使其有優異條件作為蛋白質或核酸標記物（1, 2）。

溶膠-凝膠法可在室溫下製作多孔性陶瓷材料，以 TMOS（tetramethoxysilane, $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ ）、TEOS（tetraethoxysilane, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ）為前驅物所製備的矽凝膠具有親水性的-OH 官能基，水溶液能夠在凝膠的孔洞內進出，並具有良好的透光率。矽凝膠於 pH 2 以上的溶液中帶負電荷，因此可對陽離子產生靜電吸引。Collinson et al（4）與 Pang et al.（5）的文獻報告均證明溶液中的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 可吸附濃縮於矽凝膠內。

奈米矽凝膠微粒易於製作與保存，材料經濟、具生物相容性且性質非常穩定；矽凝膠表面衍生特定官能基或鍵結生化分子亦已有廣大的研究基礎可為應用。因此本計劃先行製備奈米矽凝膠微粒，探討 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 吸附濃縮於奈米矽凝膠微粒的特性，並將此機制應用於免疫分析偵測系統。

研究目的、

本計畫希望發展以可長期保存、對不同抗體或抗原之標記反應簡易的奈米矽凝膠微粒作為免疫分析之“空白標記”，待免疫反應結束後，再利用奈米矽凝膠標記對陽離子特殊的吸附濃縮效應，將訊號分子如 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 吸附濃縮於奈米矽凝膠微粒內，而後分別測定溶液中與奈米微粒內之分析訊號，建立另一種免疫分析之偵測模式。

研究方法、

一、奈米矽凝膠微粒製備

參考 Tan et. al.（3）所發表文獻，以溶膠凝膠法配合微乳化方式製備以 TEOS（tetraethoxysilane）為起始物之奈米矽凝膠微粒：將 0.885mL Triton X-100，3.75mL cyclohexane，0.9mL n-hexanol，和純水混合均勻，形成水分散於油中之乳化液（the

water-in-oil microemulsion)。將 50 μ L TEOS (或 TMOS) 及 30 μ L 氨水加入乳化液後即開始進行聚合反應，此聚合反應持續進行 24 小時；待反應完成後，加入丙酮、以離心機離心分離出奈米矽凝膠微粒，再分別以乙醇及水清洗數次，去除殘餘的 Triton X-100。每 11.8mL 乳化液可得完全乾燥之奈米矽凝膠微粒約 19.9 mg

我們同時以相同方法製備以 TMOS (tetramethoxysilane) 為起始物之奈米粒子，以比較兩種材質粒子在水溶液中反應偵測時的分散性、Ru(bpy)₃²⁺ 吸附進入粒子特性的差異。

二、螢光訊號偵測

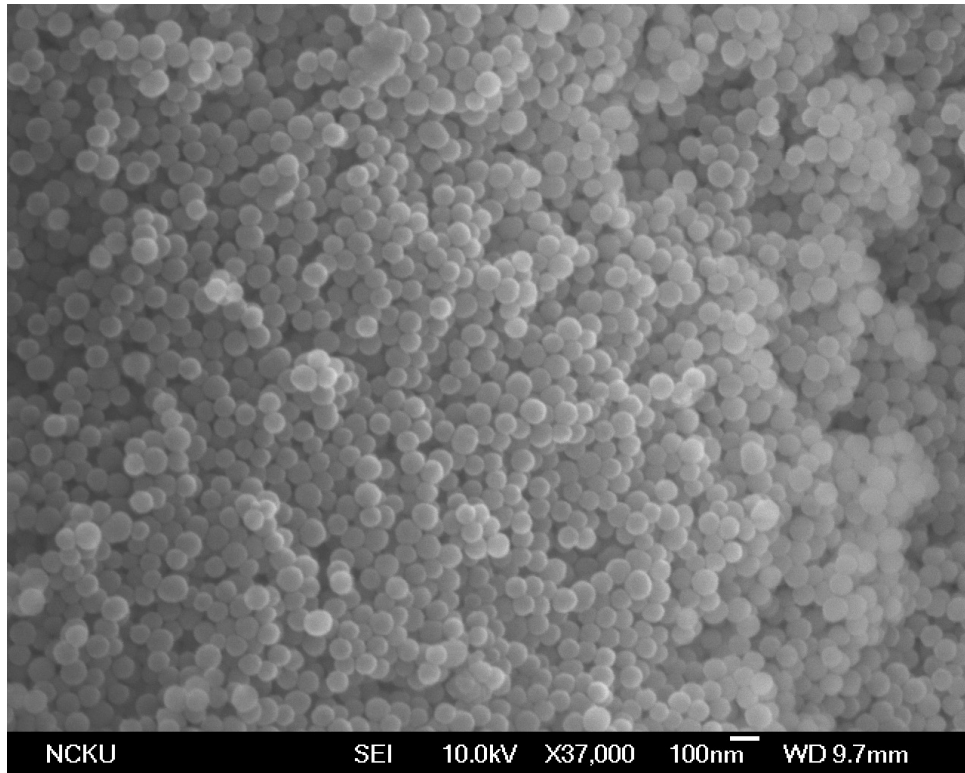
螢光偵測系統購自展陽公司，以藍光 LED 作為激發光源，搭配單光器與濾片，以光電倍增管 Hamamatsu R928 偵測螢光強度。分析溶液由內徑 250 μ m 之毛細管送入儀器量測。

三、免疫分析實驗

免疫分析實驗採三明治型免疫分析法，以 human IgG (作為抗原) 為分析物。將 goat anti-human IgG 固定奈米矽凝膠微粒及聚苯乙烯微粒上。免疫分析實驗以未摻入染劑的奈米矽凝膠微粒作為抗體標記，免疫反應於聚苯乙烯微粒上進行，反應完成後方加入固定量 Ru(bpy)₃²⁺，待 Ru(bpy)₃²⁺ 吸附濃縮於奈米標記內，再分離微粒與溶液，將微粒與溶液分別注入光學分析系統，進行 Ru(bpy)₃²⁺ 螢光訊號偵測；當分析物濃度越高時，則所測得之螢光訊號越小。

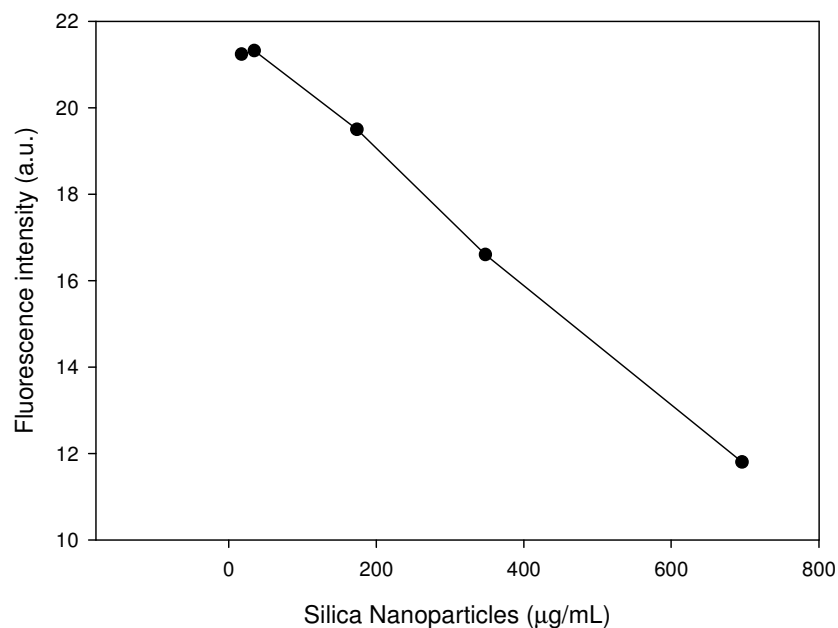
結果與討論 (含結論與建議)

以溶膠凝膠法配合微乳化方式製備以 TEOS (tetraethoxysilane) 為起始物之奈米矽凝膠微粒，以掃描式電子顯微鏡確認粒子大小與分佈，證明所製得為粒徑約 65nm、大小均一之奈米粒子。(如圖一)



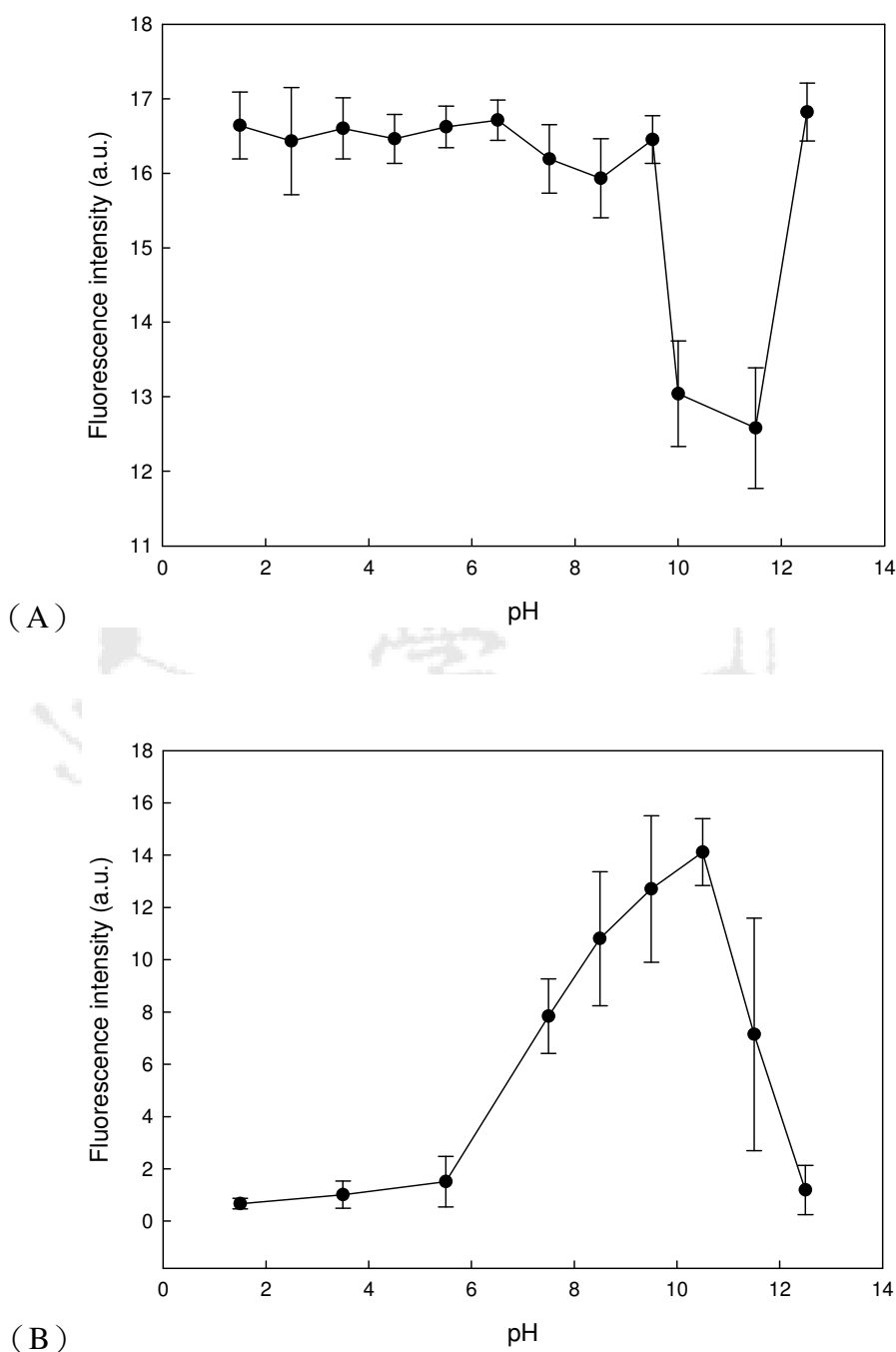
圖一、奈米矽凝膠微粒之掃描式電子顯微鏡照片。

圖二為以固定濃度之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液與特定不同濃度奈米矽凝膠微粒混合作用三十分鐘後，將溶液部分與奈米矽凝膠微粒離心分開，測得溶液中所餘留之螢光訊號。因溶液中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 進入奈米矽凝膠微粒，因此奈米矽凝膠微粒增加時，螢光訊號即隨之下降。



圖二、溶液中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 螢光強度與奈米矽凝膠微粒濃度關係圖。
溶液中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 起始濃度為 $62.5\mu\text{M}$ ，PBS buffer (pH 7.4)。

由圖三可見於鹼性溶液中奈米矽凝膠微粒吸附濃縮 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 之效應更為明顯，可能此時奈米矽凝膠微粒結構中解離出之負電荷增加，使 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 更易因正負電荷吸引力而進入矽凝膠。然而當 pH 11.5 以上時，此鹼性溶液會破壞矽凝膠結構，使吸附之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 重回溶液中，因此 pH 12.5 時溶液之螢光強度又與酸性及中性時相近。



圖三、溶液酸鹼值對奈米矽凝膠微粒吸附濃縮 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 效應之影響。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液與奈米矽凝膠微粒作用後 (A) 上清液 (B) 奈米矽凝膠微粒之螢光強度。溶液中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 起始濃度為 $62.5\mu\text{M}$ ，奈米矽凝膠微粒濃度 $350\mu\text{g/mL}$ ，磷酸鈉緩衝溶液。

References

1. Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B. Adv. Colloid Interface Sci. 2006, Article in Press.
2. Wang, L.; Wang, K.; Santra, S.; Zhao, X.; Hilliard, L.R.; Smith, J.E.; Wu, Y.; Tan, W. Anal. Chem. 2006, 78, 646-654.
3. Santra, S.; Zhang, P.; Wang, K.; Tapecc, R.; Tan, W. Anal. Chem. 2001, 73, 4988.
4. Khramov, A. N.; Collinson, M. M. Anal. Chem. 2000, 72, 2943.
5. Zhang, P.; Guo, J.; Wang, Y.; Pang, W. Mater. Lett. 2002, 53, 400.
6. 唐自強, 蕭閔譯, 簡誌慶, 劉修銘, 王貞雅*, “探討奈米矽凝膠微粒吸附正價染料離子特性並建立以奈米矽凝膠微粒為標記之免疫分析系統”, 中國化學會年會, 臺灣, 台北, 11 月 24-26 日, 2006.

(六)計畫成果自評部份, 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等, 作一綜合評估。

計畫的實際執行與原計畫主要有兩點差異: 一為免疫反應於 polystyrene beads 表面進行, 期可提高反應及沖洗、分離的效率; 另一為偵測訊號由原定之電化學冷光改為螢光偵測, 此乃因目前尚無適當電化學儀器以提供訊號激發, 而所購置之螢光偵測儀器操作簡便, 對沒有實驗經驗的學生而言較易熟習使用; 但面臨的缺點是靈敏度不甚理想。

本計畫之實驗工作現今仍在進行中, 尤其免疫分析部份偵測極限尚不理想, 會嘗試不同固定抗體的方法, 以增加偵測的靈敏度。

由此計畫之執行, 我們已建立利用超音波震盪或微乳化方法製備矽凝膠奈米粒子, 其提供了一個好的平台, 除了本計畫的執行與論文發表(6)外, 也希望將奈米矽凝膠微粒作不同的修飾、或結合其它之分子或粒子, 應用於分離系統。