



奈米科技在食品檢測的應用

▣ 溫曉薇

- 7-1 免疫吸附法
- 7-2 磁珠分離法
- 7-3 側層流分析法
- 7-4 石英晶體微量天平生物感測法
- 7-5 電化學生物感測器
- 7-6 結 論



前言 | Foreword

奈米科技的發展，可藉由兩種製備方式使物質達到奈米尺寸，第一為利用外力將大分子物質變成奈米尺度大小的分子，第二則是將原子或分子合成可運用之奈米元件。目前已有多種奈米粒子被應用於檢測上，奈米粒子的粒徑小，表面積大，使其偵測靈敏度增加，因此能縮短檢測時間，減低樣品中其他物質干擾。另外，奈米粒子於不同粒徑下，其物理化學特性會有所改變，例如金奈米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)在不同粒徑大小，具有不同的外觀顏色。而在檢測病原菌時，在 AuNPs 表面修飾甘露醣(mannose)分子，使其能和大腸桿菌(*Escherichia coli*)鞭毛上的蛋白質受體結合，大腸桿菌會和 AuNPs 結合，以便在顯微鏡下能清楚觀察到菌體⁽¹⁾。隨著奈米技術的純熟與進步，使檢測技術的發展能有更新更簡便的檢測方法。



7-1 免疫吸附法

免疫吸附法(immunosorbent assay)發展至今已為一項純熟的技術，依分析方式的不同，可分為非競爭型或競爭型，此外根據抗體(antibody)標定物的位置可分為直接型或間接型，其中常用於測定抗原(antigen)和半抗原(hapten)的方法有直接競爭型、間接競爭型和三明治型三種方式⁽²⁾。免疫吸附法常用的固相載體為聚苯乙烯 96 孔平盤及聚苯乙烯球，而以兩者固定抗體或蛋白的方式稱為被動吸附。與 96 孔平盤相較，聚苯乙烯球可提供較大的表面積，吸附較多抗體或蛋白。

免疫吸附法的實驗原理是將抗體固定在固相載體上，加入待測抗原，此時目標物和固定相作專一性結合，接著清洗去除未接合上的物質，再加入帶有酵素的抗體與目標物作專一性結合，清洗掉非專一性結合後再加入受質，即可觀察抗原是否存在並加以定量。為了提升檢測的偵測極限，繼而發展了間接偵測法，將酵素或螢光標定物固定在二級抗體上，以擴大偵測訊號。並發展出多重的檢測方法，即在不同抗體上標定不同激發波長的螢光物質，可同時分析數個不同種類的待測抗原。

傳統上螢光標定物被固定在二級抗體上，但若以包覆螢光物質的微脂體取代螢光標定物，則可放大偵測訊號，提高檢測的靈敏度。微脂體是由磷脂質所形成的脂雙層(lipid bilayer)結構，其為球型的膜狀胞器，可說是人造細胞膜(artificial membrane)。微脂體脂雙層結構主要由磷脂質與膽固醇所構成，磷脂質以甘油為骨架，在第一及第二號碳接上飽和或不飽和的長鏈或短鏈脂肪酸，第三號碳接上磷酸根分子，微脂體外觀如圖 7-1 所示。此外，微脂體具有生物相容性(biocompatibility)與生物可分解性

(biodegradation)。脂溶性藥物(hydrophobic drugs)可嵌入脂雙層結構的疏水性碳鏈區域，而水溶性藥物(hydrophilic drugs)則包裹在微脂體內的親水空層中，而微脂體粒徑分布可從奈米至微米等級。

免疫微脂體主要是在微脂體的表面接上生物辨識分子，如抗體、抗原、配體等。微脂體球體表面可修飾胺基、羧基、馬來醯亞胺基(maleimide group)、雙硫基或氫氧基，具以上官能基的磷脂質可做為典型的接合分子，接合生物辨識分子分別有 phosphatidylethanolamine (PE)、maleimidomethyl cyclohexane-carboxamide PE (MCC-PE)、maleimidophenylbutyramide PE (MPB-PE)或 pyridyldithiopropionate PE (PDP-PE)⁽³⁾；另外還有使用膽固醇及聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的氫氧基做為辨識分子的結合處(圖 7-2)。

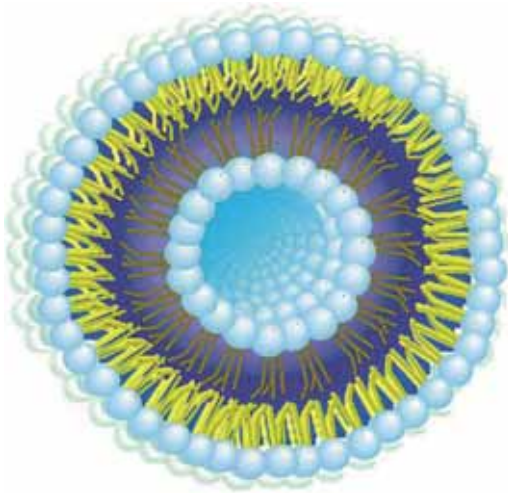


圖 7-1 微脂體外觀

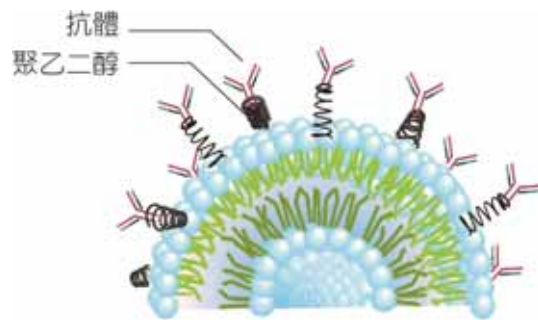


圖 7-2 具有抗體及 PEG 表面修飾的免疫微脂體

提供專一性辨認功能的生物分子也必須經由化學分子的修飾，而在生物分子上產生特殊官能基，使其有效接合在微脂體的球體表面。目前常用來提供接合的架橋分子(cross-linker)主要特性是必須具有異質雙功能的特性，使得生物辨識分子能有效的與微脂體結合形成免疫微脂體。以 succinimidyl-4-N-maleimidomethyl-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)為例，其分子的一端具有與生物辨認分子的胺基接合功能，另一端具有與微脂體球體形成雙硫鍵結的功能基團。目前常見的架橋化學分子含有 N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate(SPDP)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC)與 N-4-(p-maleimidophenyl) butyrate(MPB)。除了上述的化學架橋之外，可以提供高結合力的生物分子亦可作為架橋，例如 Plant 等⁽⁴⁾、Baemner 等⁽⁵⁾和



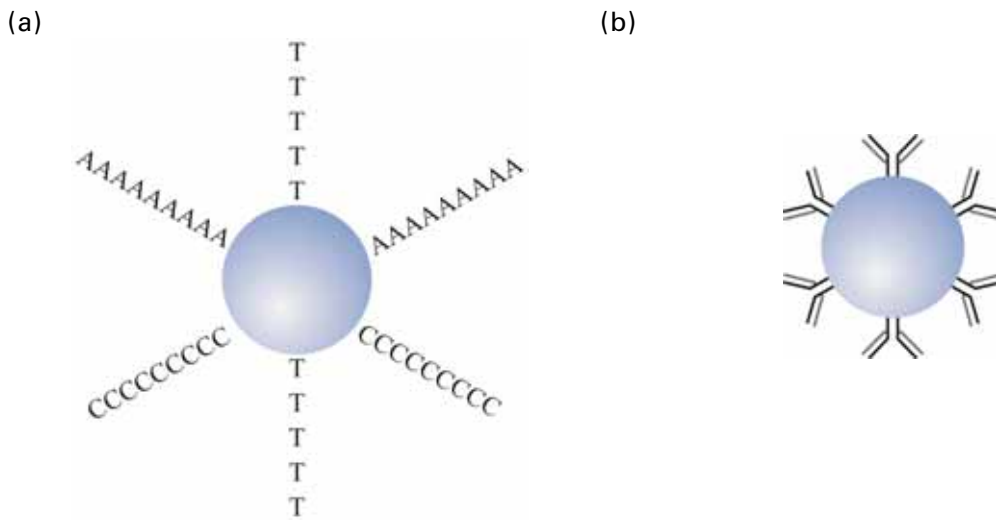
Wen 等⁽⁶⁾使用的生物素(biotin)與抗生物素蛋白(avidin)交互作用，或 Leserman 等⁽⁷⁾和 Chen 等⁽⁸⁾所使用的 protein A/G，其具有與抗體的專一性結合能力。

因螢光物質的螢光強度會隨時間消逝，若將螢光物質經適當包裹，隔絕與環境的作用，即可使偵測訊號更為穩定，故可將顯色物質以奈米微脂體包裹，並在其表面修飾抗體以具有專一性。依照三明治免疫吸附的原理，在 96 孔平盤上吸附抗體，加入抗原後洗去非專一性結合，再加入包裹螢光染劑的奈米免疫微脂體與固定在 96 孔平盤中的抗原作用，洗去未接合上的奈米免疫微脂體，接著以界面活性劑將奈米免疫微脂體打破以釋放出螢光染劑，並藉由適當的波長進行激發和偵測訊號。因奈米免疫微脂體具有多功能性、簡單、高感性與可定量等特點，另可搭配以顏色、螢光、冷光及膠體凝集等方式來判定訊號以進行定性或定量分析，故此項技術已廣泛使用在大腸桿菌 (*Escherichia coli* O157:H7)、B 細胞及 B 型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)核酸的檢測。過去的研究也發展出針對 *E. coli* O157:H7 的免疫微脂體三明治螢光 (immunoliposomes sandwich fluorometric assay, ILSF) 檢測系統。其原理是將經由硫醇基衍生化的抗體與帶有馬來醯亞胺基且內腔含有 carboxyfluorescein (CF) 螢光分子 (fluorescent molecule) 的奈米微脂體共價形成的奈米免疫微脂體作為檢測試劑。當奈米免疫微脂體辨認樣品內的 *E. coli* O157:H7，分離未作用的奈米免疫微脂體後，經過界面活性劑破壞與菌體結合的奈米免疫微脂體結構而釋放出 CF 螢光分子，經由螢光測定儀測定其螢光訊號而評估樣品中菌體含量。根據此研究結果指出，檢測緩衝溶液環境下的純菌株，其靈敏度可達 10^4 CFU/mL，而食物樣本輔以增殖培養放大後，其檢測極限可達到 0.8 CFU/mL⁽⁹⁾。



7-2 磁珠分離法

近年來，在生物科技與醫藥應用的研究已證實免疫磁珠 (immunomagnetic bead, IMB) 在運用上具有高效率、高便利性及高準確性。以免疫檢測來說，在磁性奈米粒表面上修飾可與生物相容之功能性物質，如圖 7-3 所示連接 DNA 探針可做 DNA 純化分離試劑或疾病檢驗試劑、連接抗體可做為專一性純化分離試劑及疾病檢驗試劑之應用，且僅需少量檢體體積即可偵測。若於生醫方面的運用，在接合藥物後利用外加磁場導引可做為藥物傳遞之載體，製成具目標導向藥劑；此外在磁振造影技術方面之應用，具有專一性的免疫磁珠可作為新一代顯影劑。



▲ 圖 7-3 磁珠標定核酸探針(a)或是修飾上抗體(b)

免疫磁珠的體積極小，能均勻且分散存在於水相溶液當中。免疫磁珠是由磁性奈米微粒和免疫配基結合而成。免疫配基一般為與待測生物分子具高專一性及強力結合性的物質，包括抗原、抗體或生物素等。磁性奈米微粒具有兩項重要特性：一為具有超順磁性(superparamagnetism)，即當磁奈米顆粒尺寸小到讓熱能足以使每個磁粒內之磁矩改變方向時，在無外加磁場下，該流體無自發性磁偶極。但當有磁場施加在該流體時，液體中的磁性粒子之磁矩會傾向沿著外加磁場方向，因而產生了磁偶極。而當外加磁場移除時，由於磁性奈米粒子受水分子熱擾動的作用，再度呈現出零磁偶極，這現象即所謂之超順磁性⁽¹⁰⁾。另一重要特性為其大小與生物分子相近，且因製備材料和方法的不同，使其表面具有疏水 - 親水、非極性 - 極性、帶正電荷 - 帶負電荷等不同的物理性質，故藉由適當地改變粒子表面的生化特性，可使粒子與特定生物分子相結合，致使生物分子帶有磁性標記。

免疫磁珠運用於微生物的分離與檢測方面可分為直接偵測與間接偵測，原理是將已修飾一級抗體的磁珠直接與細胞表面相應分子做特異性結合，或者已修飾二級抗體的磁珠與預先已與細胞表面分子特異結合的一級抗體結合。將目標物捕獲後，緊接著配合不同的生物感應器或免疫檢測方式，可使偵測訊號放大以提高其方法之靈敏度。

聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)方法是檢測環境樣品中強而有力的工具，但主要面對的問題是如何獲得純度較高的 DNA。Mahbubani 等⁽¹¹⁾ 及 Hulten 等⁽¹²⁾ 分別利用以 IMB 結合 PCR 的方法，使用免疫磁珠先從環境水樣本中將病原菌分離後，再配合 PCR 擴增目標物的 DNA，可提高方法的靈敏度。在食品安全的檢測上，利用 IMB-PCR 方法檢測食物樣品中單核細胞增多性李斯特菌和鼠傷寒沙門氏



菌，均證明此方法可行性高，靈敏度高⁽¹³⁾。Tan 等⁽¹⁴⁾以沙門氏菌抗體包覆的磁珠對數種食物樣品（蛋、奶及雞肉）中的沙門氏菌收集後進行選擇性培養，結果與標準方法相一致。

E. coli 常被作為食品衛生或公共衛生之重要指標細菌，而 *E. coli* O157:H7 為主要食源性的致病菌，因此如何快速的在飲水及食物中檢出 *E. coli* 存在也是一重要的研究課題。利用固相螢光毛細管免疫分析牛肉和蘋果醬中 *E. coli* O157:H7，用免疫磁珠捕獲蘋果醬中 *E. coli*，培養 7 小時，然後用固相螢光毛細管免疫分析，最低偵測極限為 0.5~1 CFU/mL⁽¹⁵⁾。而 DeCory 等⁽¹⁶⁾則先以膜過濾的方式將蘋果汁和水樣本中的 *E. coli* O157:H7 收集，經擴大培養後，採用免疫磁珠將菌體分離出來，再結合免疫微脂球檢測也證明該方法可快速、直接獲得準確的結果。而直接將免疫磁珠與牛奶樣本混合一小時，將分離出的仙人掌桿菌與包裹螢光染劑的奈米免疫微脂球作用 1 小時，洗去未接合的奈米免疫微脂球並偵測其螢光值，經 4 小時的檢測時間，其最低偵測極限可達 5 CFU/mL⁽¹⁷⁾。

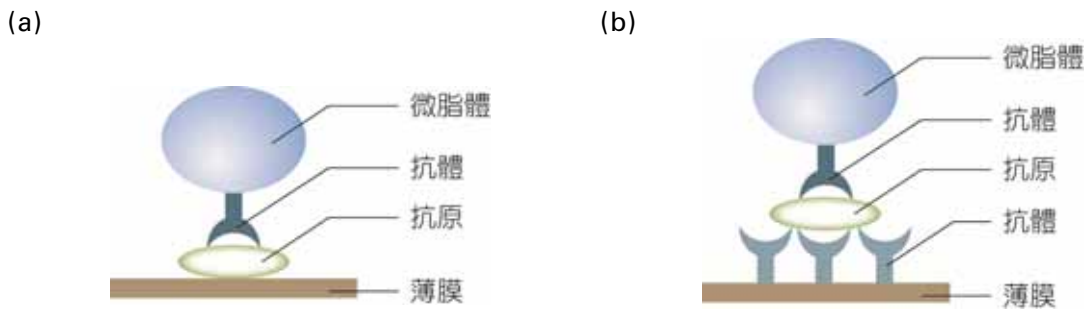
綜合以上所述，免疫奈米磁珠擁有以下優點：(1)增加標記物與待測物的結合面積，以提升檢測的靈敏度；(2)待測生物分子是藉由生物探針直接與奈米磁性粒子（標記物）結合上，與傳統之生醫檢測法相較起來具有較簡便的檢驗程序；(3)待測生物體本身不具磁性，不會對檢測訊號產生干擾；及(4)可依臨床檢測便利性與精確性的需要，研發具不同特性之磁性免疫檢測系統以供應用。



7-3 側層流分析法(lateral flow assay (LFA))

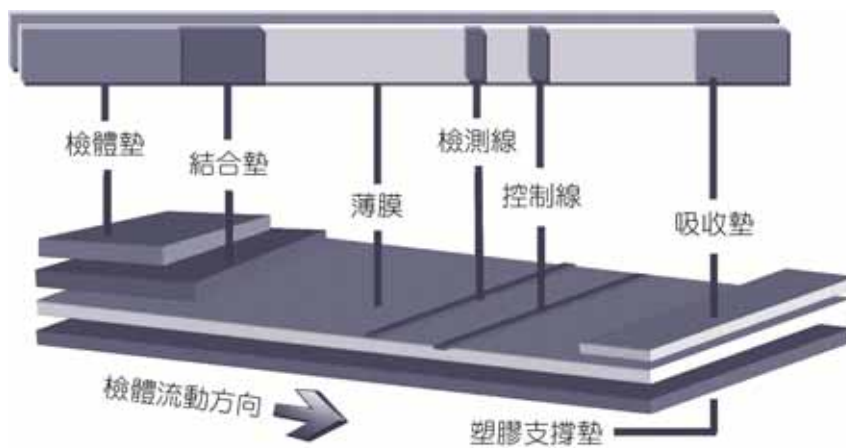
西元 1988 年以側層流為原理的商業套組問世，即為知名的女性懷孕檢測試劑，用以檢測人類絨毛膜性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)。側層流分析可用於定性、半定量以及定量待測物的濃度，而且應用範圍包含檢測病原菌、藥物、荷爾蒙、生物性代謝物，以及環境當中的污染物，例如農藥。此項檢測技術具有快速、靈敏、具選擇性、容易使用以及小型化等特點，不需在實驗室即可做測定，且操作人員不需專業訓練。

檢測方式為在薄層層析的試紙上結合對待測物具專一性的抗體，或 DNA/RNA 序列，以毛細現象將液態的樣品吸附後，試紙表面修飾的分子將和待測物作結合，再利用表面有修飾對待測物具專一性的抗體、DNA/RNA 序列或生物性分子（如：ganglioside）的奈米微脂體與待測物結合，可利用(a)競爭型或(b)三明治型檢測模式進行檢測（圖 7-4），藉由奈米微脂體內所包裹的大量染劑分子以放大訊號。



▲ 圖 7-4 檢測模式：(a)競爭型、(b)三明治型

側層流分析和一般免疫分析方法不同，其不需經多重步驟及長時間檢測，只要將待測物和薄層層析試紙作用即可。一般側層流試紙是由不同效能部分所組成，其組織結構如圖 7-5 所示，而通常側層流試紙所包含的五種組成結構之功能則如表 7-1 所整理。



▲ 圖 7-5 側層流試紙結構圖

► 表 7-1 側層流試紙不同部分所具備的功能分析表

部分	功能
檢體墊 (sample pad)	促進樣品均勻分布，甚至過濾檢體，使待測物順利進入結合墊與標記的抗體做結合。
結合墊 (conjugated pad)	均勻傳送已標記的抗體和待測物至薄膜。當待測物進入結合墊後，會和已標記的抗體結合，並一起流向薄膜。
薄膜 (membrane)	此為最重要的地方，其主要是鍵結待測物，將抗原、抗體或 DNA/RNA 等固定在試紙上，形成肉眼可辨識的檢測線(test line)。另外，控制線(control line)則是塗布和偵測試劑相鍵結的抗體或 DNA/RNA 等，以確定此試驗的有效性。



► 表 7-1 側層流試紙不同部分所具備的功能分析表 (續)

部分	功能
吸收墊 (absorbent pad)	增加試紙吸附檢體的總體積，因此能降低背景值，提升檢測的靈敏度。
塑膠支撐 (plastic backing)	因薄層層析試紙的材質薄且脆弱，因此需貼附於塑膠層以增加強度。

奈米微脂體應用在側層流分析已行之多年，主要用於顯示及放大偵測訊號，立即得知檢測結果。應用的例子包含有微生物檢測，以 DNA/RNA 雜合的方式偵測水中的 *E. coli*，自 *E. coli* 菌體萃取出 RNA 並藉由 PCR 放大，而相對應的 DNA 探針則修飾在薄膜上以及奈米微脂體上，檢測極限為 40 CFU/mL⁽¹⁸⁾。另外檢測 *Streptococcus pyogenes* 則是在薄膜上修飾卵白素(streptavidin)，在捕捉探針(capture probe)上修飾生物素，卵白素和生物素具專一性結合，而奈米微脂體上則修飾 DNA 作為報導探針(report probe)，偵測極限為 7.5×10^6 cells⁽¹⁹⁾。Ahn 等^(20, 21) 使用表面修飾神經節苷脂(ganglioside)的奈米微脂體，檢測毒素 cholera toxin，其最佳的檢測極限可達 15 fg/mL。其他相關奈米微脂體在側層流分析的文獻整理於表 7-2。

► 表 7-2 奈米微脂體在側層流分析的應用

待測物	方法	應用	靈敏度	參考文獻
total glycoalkaloids from Potato	Solanine-/biotin tagged, dye-loaded liposome Competitive assay	Determination of potato glycoalkaloids	0.1-0.7 ppm	(22)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Antibody (anti- <i>E. coli</i> O157:H7)-directed liposomes encapsulating dye Sandwich assay	Detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7	104 CFU/mL	(9)
cholera toxin (CT)	Ganglioside-liposome Sandwich assay	Detection of cholera toxin	10 fg/mL; water samples spiked with CT	(20)
<i>Escherichia coli</i>	RNA-tagged liposome Sandwich assay	Detection of <i>Escherichia coli</i> in drink water	40 CFU/mL	(18)
botulinum toxin	Ganglioside-liposome Sandwich assay	Detection of botulinum toxin	15 pg/mL	(23)
Arah1	Arah1-liposome Competitive assay	Detection of Arah1	0.45 µg/mL	(24)

表 7-2 奈米微脂體在側層流分析的應用 (續)

待測物	方法	應用	靈敏度	參考文獻
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DNA capture liposome Sandwich assay	Detection of <i>Streptococcus pyogenes</i>	7.5×10^6 cells	(19)
cholera toxin	Ganglioside-liposome Sandwich assay	Detection of cholera toxin in seafood	8×10^3 - 3×10^3 fg/mL	(21)

另一個常用的偵測試劑 (detection reagents) 為金奈米粒子 (gold nanoparticle, AuNP), 其具有特殊的光學特性、表面修飾和生物結合性質, 因此被廣泛應用於奈米技術。AuNPs 所呈現的顏色和其粒徑大小、形狀以及聚集情形有關連, 當 AuNPs 吸收特定波長會產生表面電漿共振 (surface plasmon resonance), 而產生顏色, 在 520 nm 有最強的吸收係數, 顏色呈現紅色⁽²⁵⁾。檸檬酸鹽還原法 (citrate reduction) 為合成 AuNPs 常用的方式, 西元 1951 年由 Turkevitch 提出, 其作法是將四氯氫金 (HAuCl_4) 置於水中以檸檬酸鈉 (sodium citrate) 還原, 反應時需加熱並不停攪拌, 當顏色由藍黑色轉為酒紅色即表示反應完成, 此法所合成之 AuNPs 多為單一粒徑, 粒徑大概為 20 nm⁽²⁶⁾, 另外, 四氯氫金和檸檬酸鈉的比例會影響 AuNPs 的粒徑大小。合成過程中, AuNPs 形成時會經過成核 (nucleation)、成長 (growth) 以及凝結 (coagulation) 三個階段, 而在四氯氫金溶液中加入越多的檸檬酸鈉 (還原劑) 進行還原時, 成核階段的晶種會越多, 故所形成的 AuNPs 粒徑就會越小。因 AuNPs 表面特殊的性質, 不同的基團 (-SH、-CN、-NH₂、-COOH 和 -OH) 可用吸附或化學鍵結方式連結到 AuNPs 表面⁽²⁷⁾, 適當的表面修飾可提供具功能性的基團, 也可使 AuNPs 穩定。生物性分子可透過以上基團修飾於 AuNPs, 或直接與 AuNPs 結合。

AuNPs 本身所具有的顏色可直接以肉眼判讀, 另外其表面可修飾生物性分子, 以提供專一性的辨識。在 AuNPs 表面修飾不同的單株抗體, 用以同時偵測黴菌毒素 deoxynivalenol (DON) 和 zearalenone (ZEA)。DON 和 ZEA 為鐮刀黴菌 (*Fusarium fungi*) 的二次代謝物, 常出現在小麥、大麥、黑麥和玉米等穀物, 對食品及動物飼料安全性具有危險性, 利用此法 DON 和 ZEA 的偵測極限分別為 1500 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²⁸⁾。另一項研究則是市面上偵測肉毒桿菌毒素 (*Clostridium botulinum* neurotoxins, BoNTs) 套組, 試劑分別來自兩家公司分別是 Naval Medical Research Center (Silver Spring, MD, USA) 和 Alexeter Technologies (Gaithersburg, MD, USA), 兩種套組對於 BoNTs 類型 A 和 B 的偵測極限為 10 ng/mL, 而對於 BoNTs 類型 E 則為 20 ng/mL, 相較於其他檢測方式其靈敏度較低, 不過確實能偵測出食品中的 BoNTs, 故可做為初步篩選的方法⁽²⁹⁾。此外, 將多株抗體分別修飾在 AuNPs 和薄膜上, AuNPs 上的抗體先和樣品中的金

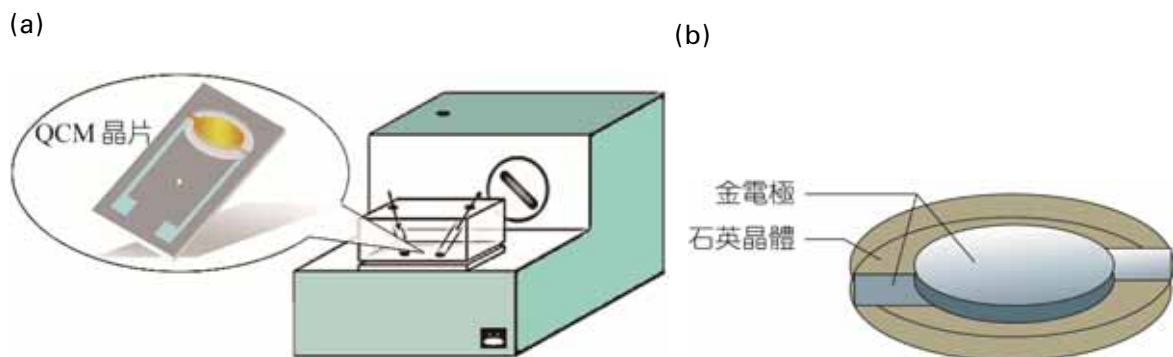


黃色葡萄球菌腸毒素 B (Staphylococcal Enterotoxin B, SEB)作用，在流經檢測區和膜上的抗體作用形成三明治型(sandwich format)的聚合物以便肉眼觀察，其檢測極限為 1 ng/mL，而再以銀放大偵測訊號，其檢測極限可下降至 10 pg/mL⁽³⁰⁾。



7-4 石英晶體微量天平生物感測法

QCM 為石英晶體微量天平(quartz crystal microbalance, QCM)之簡稱，為一種壓電感測器(piezoelectric sensor)。壓電效應為具有極性對稱的晶體因施加機械力而產生表面電荷變化現象；反之，將晶體置於電場中會產生變形，此現象稱之為逆壓電效應，而常見的壓電晶體包含石英、羅雪鹽、磷酸胺等⁽³¹⁾。在西元 1959 年由 Sauerbrey 開始將 QCM 應用在氣體樣品之質量變化測試⁽³²⁾，西元 1980 年再由 Konash 等人成功將 QCM 的應用推展到溶液樣品的檢測⁽³³⁾，而近年來 QCM 發展則廣泛應用於分子檢測，作為一種壓電式的生物感測器。Nakane 等⁽³⁴⁾則在西元 2009 年時建立了一個偵測環境荷爾蒙 - 壬基酚(nonylphenol)的檢測平台，利用靜電力將微脂體修飾上 QCM 的表面，再藉由表面重量的改變而偵測到壬基酚。



▲ 圖 7-6 石英體微量天平：(a)石英晶體微量天平裝置，(b)石英晶體微量感測晶片

圖 7-6 之(a)圖為 QCM 裝置示意圖，而(b)圖為其晶片示意圖，是由兩片金屬電極（如金、銀等）中央夾一石英板所形成，當金屬電極表面所結合之辨識分子專一性地捕捉住樣品中待測物質時，QCM 晶片表面上的質量產生變化，進而使震盪頻率改變，故可由測量出的震盪頻率差推出質量差，其基本公式如下：

$$\Delta f = -\frac{f_R^2}{\rho dA} = \Delta m$$

其中 Δf 是頻率的變化量， f_R 是晶片的原始頻率，而兩者單位為赫茲(Hz)， ρ 是晶體密度(g/cm^3)， d 是晶體厚度， A 是電極面積(cm^2)， Δm 是質量的變化量(g)。在線性範圍內，頻率的變化量(Δf)與質量的變化量(Δm)成正比，故可藉由頻率的變化量推算出晶片表面上質量變化，進一步可推測表面吸附量之變化情形。因以石英晶體為材料檢測出其表面微小質量之差異，故稱之為石英晶體微天秤⁽³⁵⁾。因 QCM 不需藉由標定物(例如：酵素或螢光物質)的標定，即可得知晶片表面上質量之變化，具有即時檢測的特性，再加上其高靈敏度，目前可應用範圍包括抗體/抗原、酵素/受體、配體/受體、核酸/核酸等生物性分子交互作用之檢測⁽³⁶⁾。另外也可在石英晶體表面再修飾上一層奈米結構，例如：AuNPs，樹狀狀聚合物(dendrimer)及奈米微脂體(liposome)等，可增加石英上金屬電極與生物分子接觸之表面積，以提高其檢測的靈敏度。

Chu 等⁽³⁷⁾，利用 protein A 修飾上具有抗體的 AuNPs 做為主要的免疫複合擴大層，用以偵測人類免疫蛋白(human IgG)的濃度，其檢測靈敏度可提高 1000 倍。如果將此感測器應用在食品品質管制上，則可用來檢測食品過敏原的存在或是食品中毒毒素之污染。海鮮食品是人們日常生活不可或缺的食物種類之一，但是在容易引發過敏的食物中，海鮮類高居榜首。為了防止過敏患者誤食標示不清的海產加工食品，Sun 等⁽³⁸⁾ 藉由化學方式在石英晶體表面修飾 AuNPs，再將抗蝦過敏原的多株抗體固定在晶體表面，以自吸附的方式與 AuNPs 結合，以檢測食品中蝦過敏原(shrimp allergen)的存在，其偵測極限可至 $0.333 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。食品若是因保存不當，則常會滋生細菌或黴菌，輕者會造成食物中毒、重者則可能有死亡案例發生。赭麴毒素 A (ochratoxin A, OTA) 主要由 *Aspergillus ochraceus* 及 *Penicillium verrucosum* 所產生之二級代謝產物，常出現在穀類或肉類食品當中，會對動物造成腎毒性、肝毒性及致癌性等問題，因此 Vidal 等⁽³⁹⁾ 利用牛血清白蛋白(BSA)將 OTA 聚合成較大的分子後，再以 QCM 做檢測，並利用 AuNPs 放大檢測訊號，其偵測極限可達 $8 \text{ ng}/\text{mL}$ 。*Aspergillus flavus* 也是一種常見的黴菌，其分布相當廣泛，於全球農產品(例如：黃豆、玉米、花生、小麥及五穀雜糧類、土壤及乾草)中皆可發現，而由 *A. flavus* 所產生的天然毒素 - 黃麴毒素(aflatoxin B1)現已被證實是誘發肝癌的主要毒素之一，目前台灣規定花生中黃麴毒素上限含量不得超過 15 ppb。先前 Wang 等⁽⁴⁰⁾ 將奈米磁珠以共價鍵結抗黃麴毒素抗體以做為 QCM 上的探針，其檢測 aflatoxin B1 範圍在 $0.3 \sim 7.0 \text{ ng}/\text{mL}$ 之間。

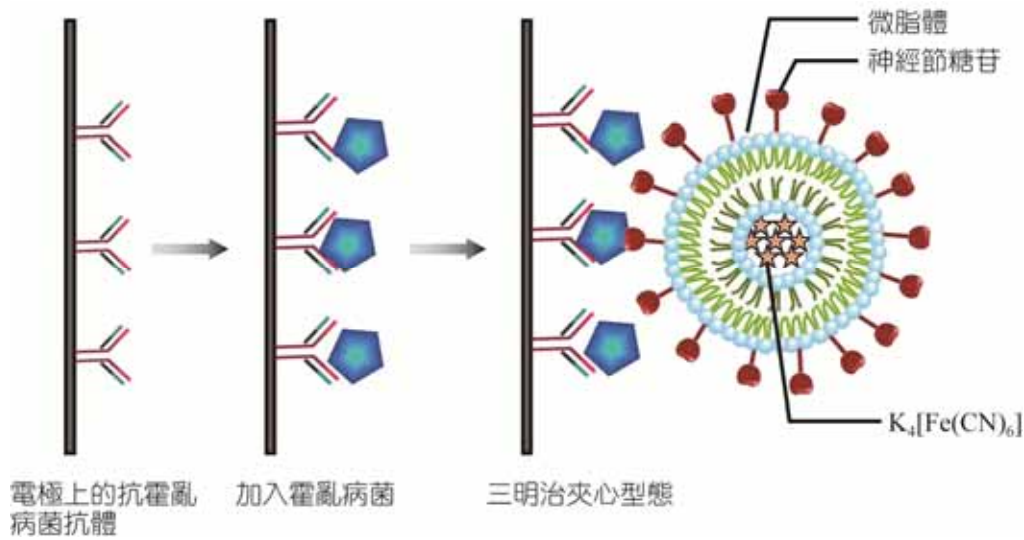


7-5 電化學生物感測器

生物感測器(biosensor)是以生物特有之專一性辨識或生化或酵素反應為基礎所發展出之快速檢測系統，主要由兩個部分所構成，分別為生物性識別系統(biorecognition element)以及信號傳輸系統(transducer)。生物感測器主要利用待測物與生物性識別系統上的識別分子產生光、熱、質量或電化學等反應，再利用信號傳輸系統將這些反應轉換成可輸出之電信號以利數據分析，目前生物感測器之應用相當廣泛，包括醫療檢驗、環境與毒物檢測及食品品質檢測。而近年來奈米技術於生物感測器中的應用主要分為兩大區塊，其一為固定化技術(immobilization)，將奈米材料做為生物辨識分子與傳遞系統間的連結物(linker)；其二為訊息放大技術(signal enhancing)。

針對奈米材料在固定化技術的應用，與傳統生物感測器相較，於生物辨識分子和信號傳輸區域之間加入奈米材料，可使(1)生物辨識分子更具穩定性，(2)讓生物辨識分子連結於訊號傳遞區域的數量(loading)增加，因奈米材料的添加使信號傳輸系統之總表面積增加，進而(3)提高偵測靈敏度。常使用之奈米材料如奈米碳管(carbon nanotubes, CNT)，其為一維奈米結構，具有高表面積並有傳遞電子之功能，在應用上先將奈米碳管固定在信號傳輸系統表面，再將酵素共價鍵結於奈米碳管的另一端上，故可將酵素反應所產生的電子快速且有效地傳遞到信號傳輸系統^(41, 42)，已用於丙烯醯胺(acrylamide)的檢測，丙烯醯胺產生於經高溫加熱的碳水化合物含量高的食物，為一種神經毒素且具有致癌風險，檢測上將單壁奈米碳管和血紅素固定於電極上，偵測薯片中的丙烯醯胺含量，可偵測到最低濃度為 $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ⁽⁴³⁾；另外 AuNPs 因製備簡單且無毒性而常運用於生物感測器中，如檢測牛奶中的病原菌 *E. coli* O157:H7，將修飾二茂鐵甲酸(ferrocenedicarboxylic acid, FeDC)的 AuNPs 和抗 *E. coli* O157:H7 的抗體固定在電極上檢測病原菌，其 response current(RC)和未修飾 AuNPs 作比較，為原來的 13.1 倍，並可在 1 小時內檢測到 50 CFU *E. coli* O157:H7⁽⁴⁴⁾。

而針對訊息放大技術，則是將電化學活性物質包裹於奈米材料中，如利用免疫微脂體做為訊息放大工具檢測霍亂毒素(cholera toxin)，在電極板上固定抗霍亂毒素的抗體，當抗體和霍亂毒素專一性結合後，加入表面修飾神經節糖苷(ganglioside GM1)和包有亞鐵氰化鉀(potassium ferrocyanide)的免疫微脂體，微脂體表面的神經節糖苷會和霍亂毒素結合，接著加入 Triton X-100 使微脂體降解，對微脂體釋出之亞鐵氰化鉀進行偵測，藉由免疫微脂體的應用可得最低偵測極限為 10^{-16} g 的霍亂毒素⁽⁴⁵⁾，圖 7-7 為此實驗的示意圖。



▲ 圖 7-7 免疫微脂體之電化學生物感測器

7-6 結 論

近年來，隨著生活水準的提高，消費者對於食品不僅注重營養、口味與品質，食品安全與否亦為重要的關心指標。食品病原菌及毒素的檢測，或分析技術在食品安全及品質管制上扮演重要角色，而以往常規定食品微生物檢測方法操作繁瑣、時間長，難以滿足現代食品生產和流通領域對檢測速度的要求。因此，開發快速的致病菌檢測技術已經成為保障食品安全的重要任務之一。目前已有許多檢測技術與設備供應商都在積極開發檢測的各類技術，以適應現今各大食品企業大規模化的實際需求。而奈米科技的加入，相較於傳統檢測方法，能快速、簡便甚至更為準確的得到檢驗數據，有效彌補傳統鑑定方法的不足。

目前的食品安全快速檢測技術除了商業化的微量生化試劑盒方法，利用生物親和性的抗體及 DNA 檢測也逐漸得到應用，如免疫吸附法。側層流分析法則非常適合用於現場檢測，因其操作簡易且用肉眼即可觀察到結果；或者利用免疫磁珠，可從大量複雜的食品樣品中快速篩選出特定致病菌或毒素，節省反覆增菌、菌落分離的時間；而免標定的石英晶體微量天平生物感測法及電化學生物感測器，更能快速、靈敏的偵測病原菌或毒素的存在。因此若將快速食品檢測技術與傳統鑑定方法相互配合，再加上消費者本身對食品保存及處理方式的重視，便能提供民眾在食品安全上雙重的保護。



參考文獻

References

1. C.C. Lin, Y.C. Yeh, C.Y. Yang, C.L. Chen, G.F. Chen, C.C. Chen, and Y.C. Wu: Selective binding of mannose-encapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in *Escherichia coli*. *J Am Chem*, 124(14): 3508-3509 (2002).
2. J.R. Crowther: The ELISA guidebook Chapter 1: 1-8 (2001).
3. V.P. Torchilin, and W. Weissig: Liposome: A Practical Approach. 2nd edition. Oxford University Press, New York, NY (2003).
4. A.L. Plant, M.V. Brizgys, L. Locasio-Brown, and R.A. Durst: Generic liposome reagent for immunoassays. *Anal Biochem*, 176(2): 420-426 (1989).
5. A.J. Baeumner, J. Pretz, and S. Fang: A universal nucleic acid sequence biosensor with nanomolar detection limits. *Anal Chem*, 76(4): 888-894 (2004).
6. H.W. Wen, T.R. DeCory, W. Borejsza-Wysocki, and R.A. Durst: Investigation of NeutrAvidin-tagged liposomal nanovesicles as universal detection reagents for bioanalytical assays. *Talanta*, 68(4): 1264-1272 (2006).
7. L.D. Leserman, J. Barbet, F. Kourilsky, and J.N. Weinstein: Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature*, 288: 602-604 (1980).
8. C.S. Chen, A.J. Baeumner, and R.A. Durst: Protein G-liposomal nanovesicles as universal reagents for immunoassays. *Talanta*, 67(1): 205-211 (2005).
9. S. Park, S. OH, and R.A. Durst: Immunoliposomes sandwich fluorometric assay (ILSF) for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci*, 69(6): 151-156 (2004).
10. K. Woo, J. Hong, S. Choi, H.W. Lee, J.P. Ahn, C.S. Kim, and S.W. Lee: Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chem Mater*, 16(14): 2814-2818 (2004).
11. M.H. Mahbubani, F.W. Schaefer 3rd, Jones DD, and Bej AK: Detection of Giardia in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. *Curr Microbiol*, 36:107-113 (1998).
12. K. Hulten, S.W. Han, H. Enroth, P.D. Klein, A.R. Opekun, R.H. Gilman, D.G. Evans, L. Engstrand, D.Y. Graham, and F.A. El-Zaatari: Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*, 110(4): 1031-1035 (1996).
13. H.Y. Hsih, and H.Y. Tsen: Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. *J Food Prot*, 64(11): 1744-1750 (2001).
14. W. Tan, and L.A. Shelef: Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. *J Microbiol Methods*, 37(1): 87-91 (1999).
15. J. Czajka, and C.A. Batt: A solid phase fluorescent capillary immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and apple cider. *J Appl Bacteriol*, 81(6): 601-607 (1996).

16. T.R. DeCory, R.A. Durst, S.J. Zimmerman, L.A. Garringer, G. Paluca, H.H. DeCory, and R.A. Montagna: Development of an immunomagnetic bead-immunoliposome fluorescence assay for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in aqueous samples and comparison of the assay with a standard microbiological method. *Appl Environ Microbiol*, 71(4): 1856-1864 (2005).
17. P.T. Chu, M.F. Hsieh, S.Y. Yin, and H.W. Wen: Development of a rapid and sensitive immunomagnetic-bead based assay for detecting *Bacillus cereus* in milk. *Eur Food Res Technol*, 229(1): 73-81(2009).
18. A.J. Baeumner, R.N. Cohen, V. Miksic, and J. Min: RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Biosens Bioelectron*, 18(4): 405-413 (2003).
19. S.R. Nugen, B. Leonard, and A.J. Baeumner: Application of a unique server-based oligonucleotide probe selection tool toward a novel biosensor for the detection of *Streptococcus pyogenes*. *Biosens Bioelectron*, 22(11): 2442-2448 (2007).
20. S. Ahn-Yoon, T.R. DeCory, A.J. Baeumner, and R.A. Durst: Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *J Anal Chem*, 75(10): 2256-2261 (2003).
21. S. Ahn, and R.A. Durst: Detection of cholera toxin in seafood using a ganglioside-liposome immunoassay. *Anal Bioanal Chem*, 391(2): 473-478 (2008).
22. G.P. Patricia, and A.D. Richard: Determination of potato glycoalkaloid using a liposome immunomigration, liquid-phase competition immunoassay. *J Agric Food Chem*, 48(5): 1678-1683 (2000).
23. S. Ahn Yoon, T.R. DeCory, and R.A. Durst: Ganglioside-liposome immunoassay for the detection of botulinum toxin. *Anal Bioanal Chem*, 378(1): 68-75 (2004).
24. H.W. Wen, W. Borejsza-Wysocki, T.R. DeCory, and R.A. Durst: Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Anal Bioanal Chem*, 382(5): 1217-1226 (2005).
25. C.A. Mirkin: Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks. *Inorg Chem*, 39(11): 2258-2272 (2000).
26. J. Turkevitch, P.C. Stevenson, and J. Hillier: Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc*, 11: 55-75 (1951).
27. R.A. Sperling, G.P. Rivera, F. Zhang, M. Zanella, and W.J. Parak: Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*, 37(9): 1896-1908 (2008).
28. A.Y. Kolosova, and S.D. Saeger: Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol. *Anal Bioanal Chem*, 389: 2103-2107 (2007).
29. S.K. Sharma, B.S. Eblen, R.L. Bull, D.H. Burr, and R.C. Whiting: Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl Environ Microbiol*, 71(7): 3935-3941 (2005).
30. R.H. Shyu, S.S. Tang, D.J. Chiao, and Y.W. Hung: Gold nanoparticle-based



- lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Food Chem*, 118: 462-466 (2010).
31. R.L. Bunde, E.J. Jarvi, and J.J. Rosentreter: Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 46(6): 1223-1236 (1998).
32. G.Z. Sauerbrey: Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung Dunner Schichten und zur Mikrowagung. *Z Phys*, 155(2): 206-222 (1959).
33. P.L. Konash, and G.J. Bastianns: Piezoelectric crystals as detectors in liquid chromatography. *Anal Chem*, 52(12): 19-29 (1980).
34. Y. Nakanea, and I. Kubo: Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor. *Thin Solid Films*, 518(2): 678-681 (2009).
35. C.K. O'Sullivan, and G.G. Guilbault: Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications. *Biosens Bioelectron*, 14(8-9): 663-670 (1999).
36. F. Scheller, and F. Schubert: *Biosensors*. Elsevier, New York (1992).
37. X. Chu, Z.L. Zhao, G.L. Shen, and R.Q. Yu: Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. *Sens Actuators B Chem*, 114(2): 737-739 (2006).
38. X. Sun, Y. Zhang, J. Shao, L. Shen, H. Qian, and W. Zhu: A quartz crystal microbalance-based immunosensor for shrimp allergen determination in Food. *Eur Food Res Technol*, 231(4): 563-570 (2010).
39. J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, and J.R. Castillo: Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors. *Anal Bioanal Chem*, 394(2): 575-582 (2009).
40. L. Wang, and X.X. Gan: Biomolecule-functionalized magnetic nanoparticles for flow-through quartz crystal microbalance immunoassay of aflatoxin B1. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32(1): 109-116 (2009).
41. J.J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, and D.B. Hibbert: Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. *J A Chem Soc*, 125(30): 9006-9007 (2003).
42. X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, F. Papadimitrakopoulos, and J.F. Rusling: Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. *Electrochem Commun*, 5: 408-411 (2003).
43. A. Krajewska, J. Radecki, and H. Radecka: A voltammetric biosensor based on glassy carbon electrodes modified with single-walled carbon nanotubes/hemoglobin for detection of acrylamide in water extracts from potato crisps. *Sensors*, 8: 5832-5844 (2008).
44. Y.H. Lina, S.H. Chena, Y.C. Chuanga, Y.C. Lua, T.Y. Shenb, C.A. Changa, and C.S. Lina: Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron*, 23: 1832-1837 (2008).

45. S. Viswanathan, L.C. Wu, M.R. Huang, and J.A. Ho: Electrochemical immunosensor for cholera toxin using liposomes and poly

(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes. *Anal Chem*, 78: 1115-1121 (2006).



習題

Exercise

- () 1. 金奈米粒子較常使用的合成方式為 (A)濺鍍法 (B)超聲波化學法 (C)檸檬酸鹽還原法 (D)研磨法。
- () 2. 下列哪項檢測技術不需在實驗室即可完成測定？ (A)石英晶體微量天平生物感測法 (B)磁珠分離法 (C)免疫吸附法 (D)側層流分析法。
- () 3. 側層流分析法的檢測區域在其哪個部分 (A)吸收墊 (B)薄膜 (C)檢體墊 (D)結合墊。
- () 4. 石英晶體微量天平的測定原理是藉由 (A)光學 (B)質量 (C)電流 (D)體積 改變。
- () 5. 下列哪項檢測技術不須標定物即可進行 (A)側層流分析法 (B)磁珠分離法 (C)免疫吸附法 (D)石英晶體微量天平生物感測法。
- () 6. 將奈米材料應用在電化學生物感測器，除了有固定鑑別分子和訊號傳遞區域作用外還具有什麼功用？ (A)增加體積 (B)放大偵測訊號 (C)增加電子數量 (D)以上皆是。
- () 7. 當免疫微脂體和目標物結合後，會加入界面活性劑降解微脂體而釋出螢光物再由儀器偵測，為何要如此設計實驗？ (A)增加專一性結合 (B)防止其他訊號干擾 (C)保護螢光物質 (D)放大偵測訊號。
- () 8. 石英晶體微天秤中給予壓電材料之電流為 (A)直流電 (B)交流電 (C)靜電 (D)以上皆可。
- () 9. 奈米磁珠在無外加磁場下，其在液體中的分布情形為 (A)沉澱於底部 (B)均勻懸浮於溶液中 (C)兩兩相吸聚集成團 (D)漂浮在溶液表面。
- () 10. 生物感測器不包含以下哪些部分？ (A)換能器 (B)訊號輸出器 (C)生物辨識層 (D)變壓器。