

新興傳染疾病檢測趨勢—即驗即報電性生物感測器

Trends for Timely Detecting Emerging Infectious Diseases by Electronic Biosensors

黃若雯、高佳鴻、盧彥蓓、林致廷、楊仁宗、李一能、林明瑜

Jo-Wen Huang, Chia-Hong Gao, Yen-Pei Lu, Chih-Ting Lin, Jen-Tsung Yang, I-Neng Lee, Ming-Yu Lin

近年來具高傳染性的疾病造成全球各地生命威脅與經濟打擊，其中人類免疫缺陷病毒、結核病、B 群鏈球菌和俗稱超級細菌的金黃色葡萄球菌是全球疾病控制中最重要的威脅之一，快速檢測與使用方便的電性生物感測器能適時適地的提供這些新興傳染病快速診斷以及疾病控制。本文將以這幾項新興傳染病為例，介紹最近發展之電性生物感測器目前發展趨勢，未來並可作為其他新興傳染病快速診斷的控制方針。

Emerging diseases with high contagious pathogens have posed threats to life and economic shocks around the world, including human immunodeficiency virus (HIV), mycobacterium tuberculosis (TB), group B streptococcus (GBS) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. Early detection with portable compatibility remains an important priority for on-site measurement of pathogens. The growing field of advanced electronic biosensors attempts to improve timely detection and awareness of emerging infectious diseases. This article will discuss the rapid detection of HIV, TB, GBS, MRSA pathogens by current developing electronic biosensors and may pay a way for diagnosing new emerging diseases.

一、介紹

1. 傳染疾病的診斷技術

快速而準確的診斷致病原是預防傳染性疾病和正確治療重要的防治要素，早期發現病原不僅可及早治療，亦能儘早隔離高傳染風險病患，控制疫情的發展。在臨床上已建立的病原體診斷標準方法中，針對不同種類的病原體 (如細菌或病毒) 以及致病因子 (如毒素)，各有其合適的診斷分析方法包含細菌培養、病毒培養，利用聚合酶鏈反應

(polymerase chain reaction, PCR) 進行核酸檢測，以及以生化分析為主的免疫學等基礎檢測方法^(1,2) (圖 1)。然而採用這些方法通常需要配置專用高端儀器，裝備精良的診斷實驗室與醫院，除了需要訓練有素的專業人員，更加耗費時間。為了成功地控制傳染病的傳播，臨床上對於用藥的精準性要求越來越高的，然而若在疾病初期未確認何種病原就先以初級的抗生素治療，不僅無法有效達到抑菌或殺菌作用，廣泛地不當投藥，在醫院內將造成潛在的疾病傳播危害以及產生抗藥性菌株，因此若能早期分離

病原菌，確定菌種，以及適當的投藥才能有效控制疫情。

2. 全球之新興傳染疾病

新興傳染疾病由於無法預測與預防，對於全球的經濟以及公共衛生造成很大的衝擊，美國布朗大學 Storeygard 教授收集 1940–2004 年期間已歸列為新興傳染疾病的 335 例分析報告，其中來自於病毒的感染佔 25.4%，如後天免疫缺乏症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS)，以及急性呼吸道症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。高於 54% 以上來自於細菌以及立克次體的感染，尤其是發展成多重抗藥性或是抗生素難以對付的菌株，如結核病的病原以及俗稱「超級細菌」的抗甲氧苯青黴素金黃色葡萄球菌 (圖 2)。以全球新興傳染疾病地域分布圖來看 (圖 3)，主要以人口密集以及使用抗生素頻繁的區域為主⁽³⁾，台灣也在發生的範圍中，因此對於新興傳染疾病的了解與預防刻不容緩。

HIV 為一種 RNA 病毒，這種病毒會引起 AIDS，根據聯合國愛滋聯合規畫署 (Joint United Nations programmer in HIV/AIDS, UNAIDS) 於 2013 年的調查指出，自從 1981 年第一例 AIDS 被檢測出來，累積至 2012 年為止，估計全世界有三千五百萬人體內有 HIV 病毒⁽⁴⁾。以 HIV 亞型為例，在感染 HIV 病毒且沒有治療的情況下，平均可存活 9–11 年。但如果在感染後的不同時期及早接受適當的治療，則會大大提高存活率，進而改善生命品質。另一方面，及早診斷出 HIV 的感染也是避免傳染病的擴散，以及避免母子垂直傳染很重要的關鍵。在血清中可偵測出來抗 HIV 病毒的抗體 (血清抗體陽轉)，實驗室會利用 PCR 技術進行 HIV 病毒檢測。而現今血液生化標準檢測則是利用酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，並且再用西方點墨法 (Western blot) 或免疫螢光法 (immunofluorescence, IFA) 做更進一步地確認。然而上述方法仍必須在中央實驗室進行檢驗，對於低度開發與開發中國家無法達到有效地控制。

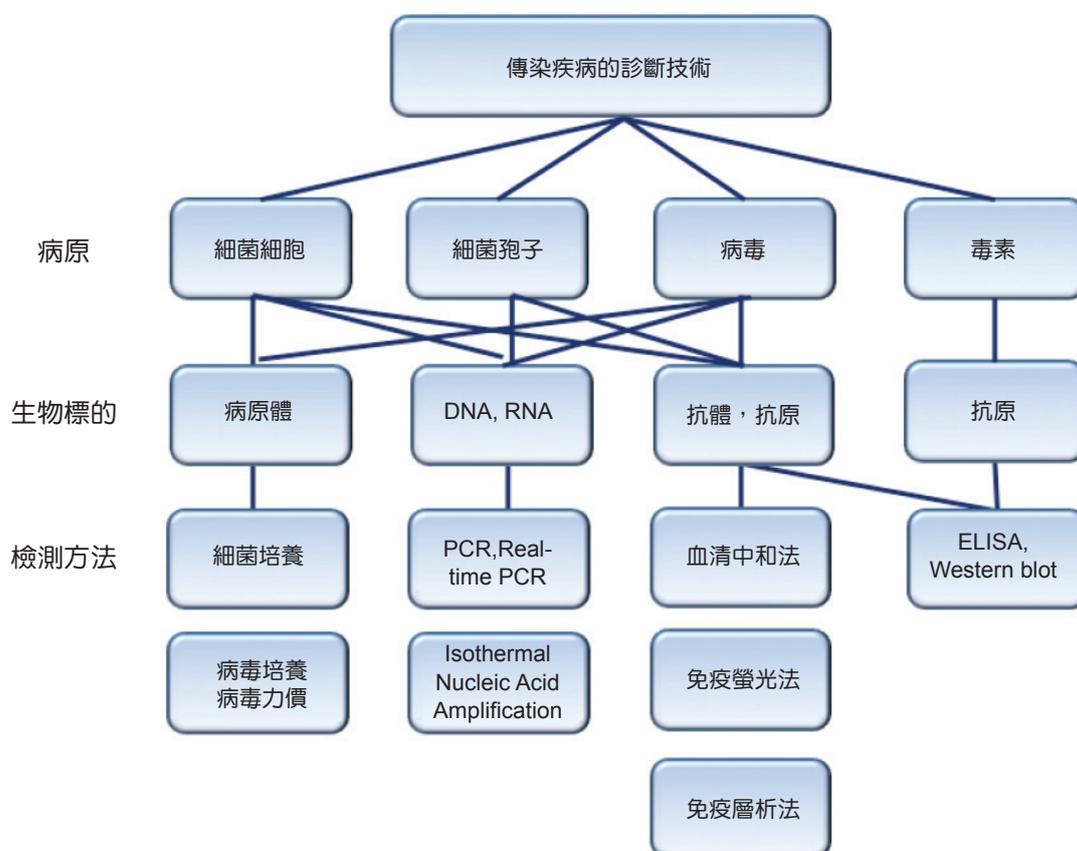


圖 1. 傳染疾病診斷技術。

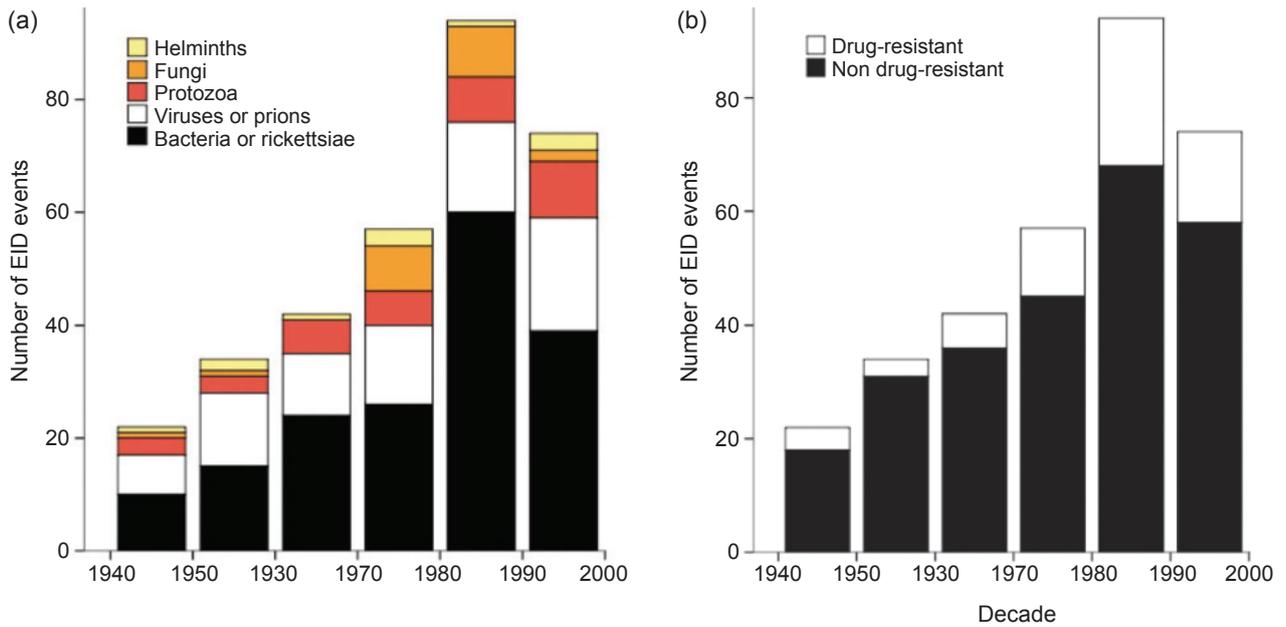


圖 2. 全球之新興傳染疾病病原 (a) 每 10 年各病原類型的比例，來自細菌與立克次體感染佔 54.3%。(b) 抗藥性菌株比例逐年增加⁽³⁾。

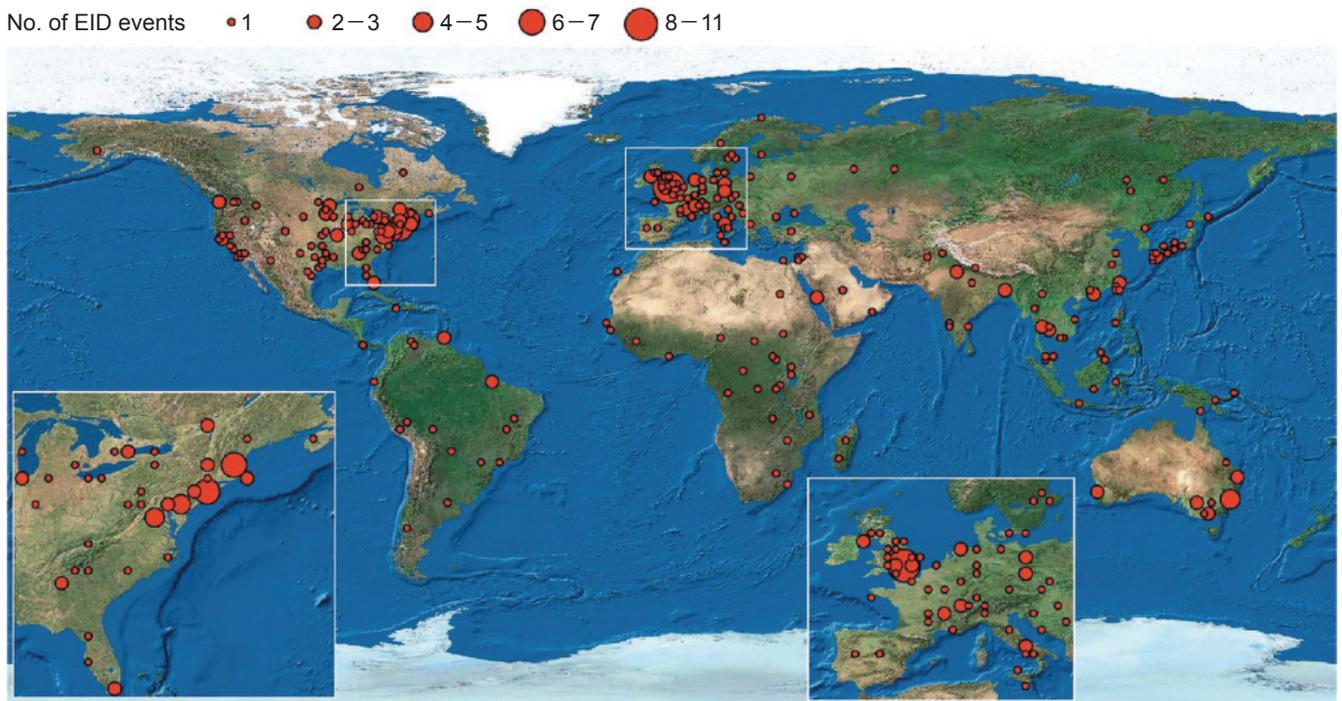


圖 3. 全球新興傳染疾病地域分佈，主要以人口密集以及使用抗生素頻繁的區域，圖中圓圈越大表示發生新興傳染疾病案例數量越多⁽³⁾。

第二種列舉之新型傳染疾病為結核病 (tuberculosis, TB)。TB 是由分枝桿菌包含 *mycobacterium tuberculosis* (結核分枝桿菌)、*mycobacterium bovis*、*mycobacterium africanum*、*mycobacterium canetti* 以及 *mycobacterium microti*，這幾類菌種所引起的感染疾病，通常感染器官為肺部 (被稱為肺結核)。結核病屬於一種肉芽腫性炎症 (granulomatous inflammatory disease)，病灶區可見巨噬細胞、T 淋巴球、B 淋巴球以及纖維母細胞聚集在結核菌感染處周圍。結核病最關鍵的致病原因在於造成先天或後天免疫系統功能缺失⁽⁵⁾。雖然結核病使用抗生素是可以被治癒的，但因為長期療程中，不適當的治療產生了具有抗藥性的結核菌，因此它仍然再度成為全球關注的健康議題。TB 的診斷方法包含乳膠凝集測試 (latex agglutination)、細菌學檢測、ELISA、放射偵測以及 PCR 技術。然而使用顯微鏡檢痰塗片檢測抗酸桿菌欠缺靈敏度，並且需要專業人員去評估檢測結果⁽⁶⁾。而從痰裡面培養結核分枝桿菌 (*M.tuberculosis*) 為診斷 TB 的標準方法，此種方法具有高靈敏度，但是因為細菌生長速度慢，需要 4 至 8 週的培養時間才能得到診斷結果⁽⁷⁾。血清測試為另一種較不昂貴的檢測方式，它是利用抗體與抗原兩者之間的高度專一性來檢測 TB。此外，PCR 檢測方法具有幾項缺點：(1) 對於發展中的國家較為高價；(2) 需要取得痰檢體來做測試。

第三種舉例之新興傳染疾病為 B 群鏈球菌感染 (group B streptococcal infection)，B 群鏈球菌也稱為 *streptococcus agalactiae*，為造成新生兒死亡的主因之一。當新生兒通過母體產道時受到感染，致死率極高，大部分懷孕的女性初期受到 GBS 感染時並沒有症狀，因此建議懷孕 35–37 週再做檢測，此時需要靈敏度高且快速的診斷，才能減少新生兒死亡的機率⁽⁸⁾。傳統方法採樣時是以棉棒在懷孕女性的陰道下段部分及直腸內塗拭取得再以 ECM 培養基 (enriched culture medium, ECM) 來培養及確認菌種，以減少錯誤的陰性結果，但此為十分耗時的實驗室檢測，需要 24–48 小時的培養時間。

最後一種列舉之新興傳染疾病病原的是俗稱「超級細菌，superbugs」的抗甲氧苯青黴素金

黃色葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)，屬於一種革蘭氏陽性球菌，由於很難被治癒，因此已成為全球極嚴重的議題。時至今日，MRSA 已擴散至全世界，並且不論是醫療照護型 (healthcare-associated MRSA) 或者是社區型 MRSA (community-associated MRSA) 皆持續增加。MRSA 具有多重抗藥性，它能夠抵抗 β -內醯胺類抗生素， β -內醯胺類抗生素包含盤尼西林 (penicillins) 和頭孢類藥物 (cephalosporin) 等⁽⁹⁾。如果沒有在早期正確使用抗生素治療 MRSA 感染，將具有高致死率的風險，可導致心內膜炎 (endocarditis)、骨髓炎 (osteomyelitis) 與敗血症 (sepsis) 等病狀⁽¹⁰⁾。MRSA 的抗藥性是被 *mecA* 基因所調控，當 MRSA 獲得一移動基因片段，稱為 staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) 時，SCC*mec* 中的 *mecA* 基因便能夠轉譯出盤尼西林結合蛋白 2A (penicillin-binding protein, PBP-2A)，進而產生抗藥性⁽¹¹⁾，因此現有的生物感測器多以檢測 *mecA* 基因作為 MRSA 的專一性辨識標的。

二、快速即時檢測傳染疾病病原之需求

傳統實驗室標準診斷方法仍為對抗疾病最重要也最可靠的檢測診斷工具，然而其主要挑戰在於耗費時間久無法立即性確認病原體，檢驗延遲主要原因來自於樣品的製備、細菌培養和藥敏試驗等。故如何有效提升診斷效率及準確性，加速後續治療與防疫工作，實有迫切性需求。自 1960 年開始，克拉克團隊提出一電化學生物感測器，通過使用二茂鐵減少來自尿酸和抗壞血酸的干擾⁽¹²⁾，拓展全球普及的血糖檢驗市場。目前生物感測器的開發在臨床醫學、食品安全、環境與生物安全等領域已有許多重要的發展與成果。

生物感測器是一種分析設備，集合了兩個緊密元素，分別是生物受體識別元件和物理性訊號感測器，並由換能器 (transistors) 連接兩元件。檢測疾病病原時，生物受體辨識因子 (例如酶、抗體、適體、或寡核苷酸等) 一般是與生物樣本發生相互作用 (包括微生物的表面抗原、代謝物、毒素、與抗

菌感受性試驗有關之 16S rRNA 等⁽¹³⁾，因此生物受體提供了對目標的特定識別，並確定該生物感測器的特異性。構成生物感測器第二元件物理性訊號感測器，可將生物識別元件和目標物間的相互作用轉換為可測量的信號(圖 4)。常見的檢測原理如電化學式^(12, 13)、光學式^(14, 15)、壓電聲波式^(16, 17)、磁學式⁽¹⁸⁾ 以及電性式^(13, 19) 等方式量測。本文將進一步探討如何在新興的生物感測器上固定化特有的生物受體辨識因子，以及電性式生物感測器等現今的研究現況與商業化進展。

三、利用核酸適體強化生物感測器上晶片穩定度，應用於傳染疾病病原檢測與微生物的抗生素耐受性評估

生物感測器的性能好壞與生物受體 (bioreceptor) 以及換能器 (transistors) 息息相關，將生物辨識元素固定在表面上已成為換能器發展成生物感測器的關鍵因素。適體 (aptamer) 在偵測病原

體的生物感測器中，是一種良好的生物辨識元素，它具有便於操作、保存穩定、高靈敏度、高選擇性、反應時間短以及高重複性的特點⁽¹⁵⁾。適體為一種可辨識微生物的單股 DNA 或 RNA。相較於抗體，適體具有較小分子量、較單純的構造、合成過程較簡單的優點，因此對於感測器的開發，適體是較具有潛力。針對目標病原體篩選出具有寡核苷酸序列的適體是利用指數增殖系統化配體篩選法 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)，使用純化的標的物 (通常是蛋白質) 可以減少 SELEX 篩選次數獲得高親和力的適體。近年來由於 RNA 分子具有更多重三維結構的可能性，以 RNA 分子作為適體蔚為風潮，然而製作後的純化分離以及製作長鏈的 RNA 成為開發 RNA 適體資料庫的挑戰。Yu Lin 在 2015 年開發了一個在 agarose beads 上利用 streptavidin/biotin 結合的方法將 DNA 模板固定在上面，而後可以直接在 agarose beads 上利用 DNA 轉錄成 RNA 的方式製作長鏈的 RNA，透過 solid phase extraction 方法可以反覆收集合成好的 RNA 分子⁽²⁰⁾ (圖 5)。

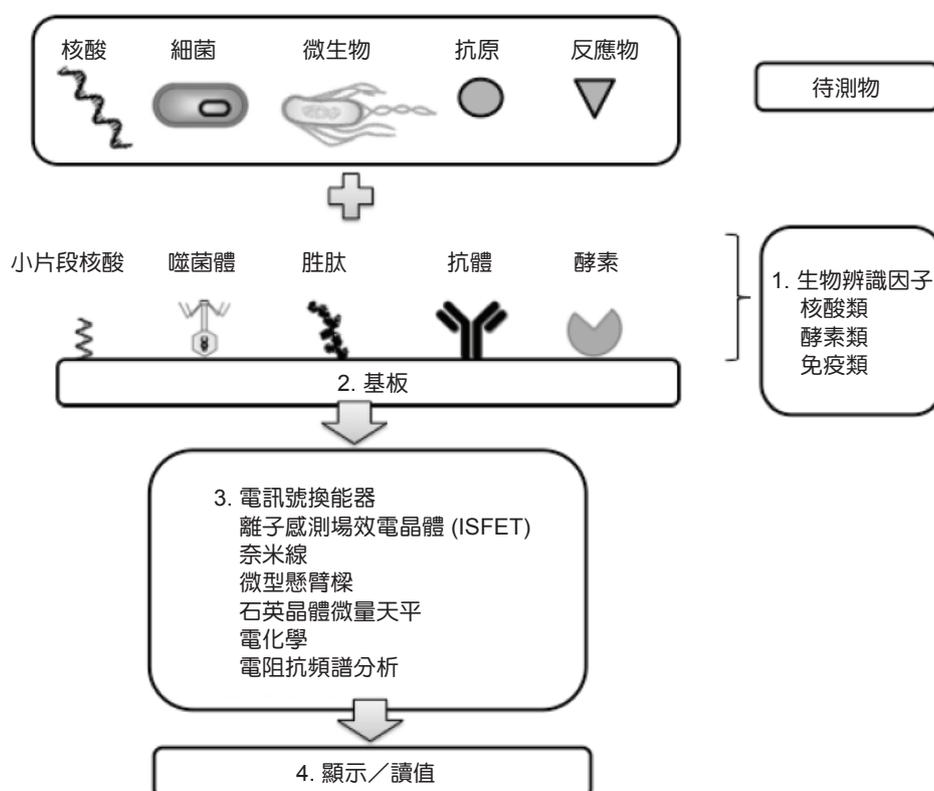


圖 4. 以生物感測器檢測各種病原的方法。

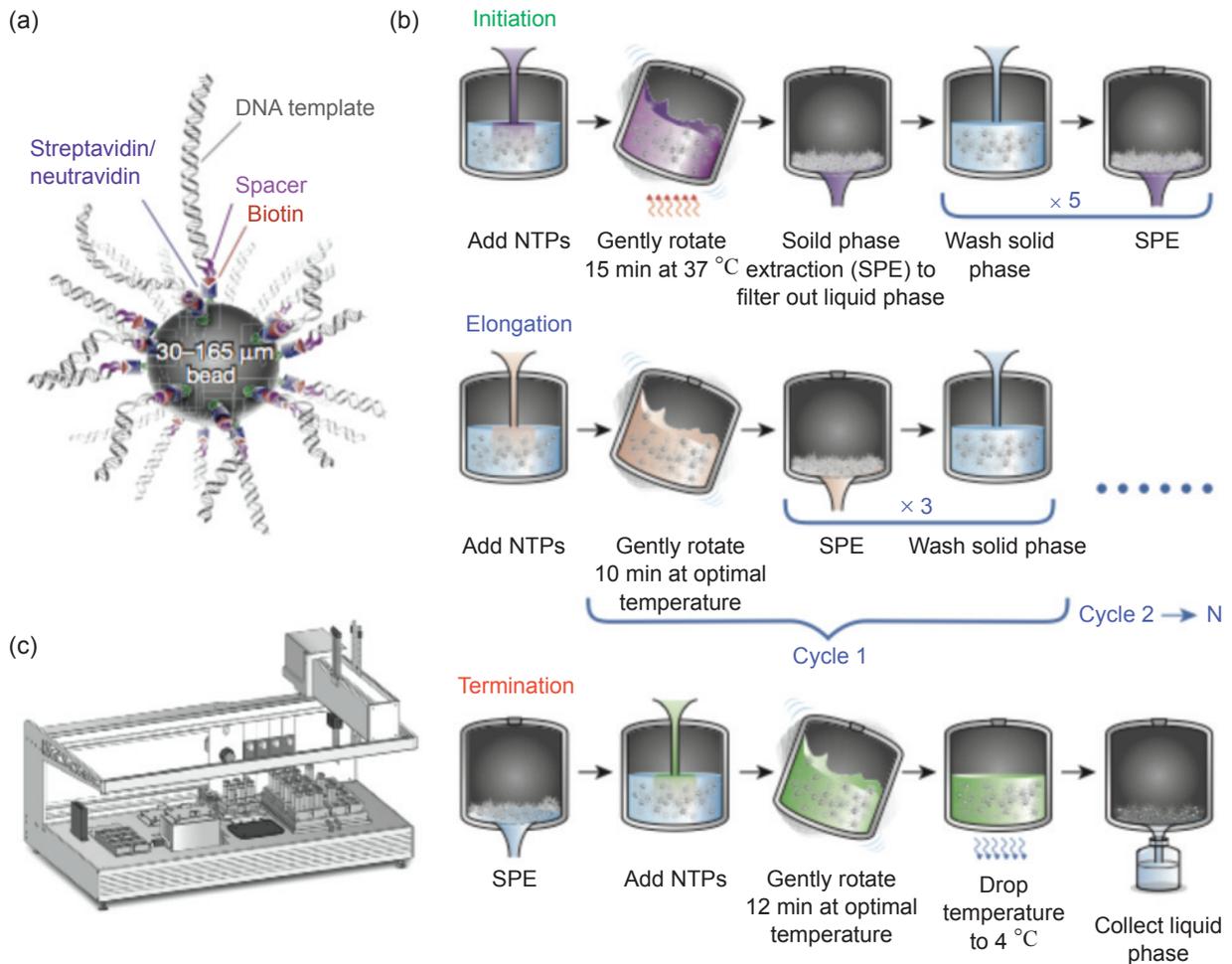


圖 5. 長鏈的 RNA aptamer 適體快速製作系統⁽²⁰⁾。

四、生物分子固定化方法

為了要提高生物的專一性，必須將特定的生物辨識因子固定在晶片表面，可利用 (1) 金-硫自我聚集單分子層 (gold-sulfur self-assembled monolayer)，(2) 共價鍵，(3) 生物素/卵白素 (biotin/streptavidin) 親和力，做為適體固定在換能器表面的方法。以 (1) 金-硫自我聚集單分子層為例，在金電極上，3' 或 5' 具有硫醇官能基 (thiol) 修飾的適體會透過自主性形成單層薄膜，而直接黏附在感測器表面。(2) 共價鍵，矽材質的表面常常被用來當作生物辨識元素和換能器之間的接合面，像是半導體生物感測器 (如矽奈米線場效電晶體) 以及光學生物感測器 (如光纖生物感測器)⁽²¹⁾。

化學性共價接合不僅會提高生物感測器對標的物的專一性，也會降低其他非專一性的接合。舉例來說：羧基在經過 3-氨基丙基三乙氧基矽烷 (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES)、丁二酸酐 (succinic anhydride) 以及碳酸鈉處理後，會在矽材質表面上形成自我聚集單分子層，接著，在 3' 或 5' 修飾 amine 的適體與 EDC/sulfo-NHS (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide/N-sulfosuccinimide) 相互作用後可以固定於處理過的矽材質表面上⁽²²⁾。然而，這些複雜的化學反應可能會因為界面活性劑、交聯劑 (cross-linking agent) 以及有機溶劑而對實驗產生干擾⁽²²⁾。(3) 靠著生物素/卵白素的相互作用，使用標定 biotin 的 DNA 分子經過 Nsuccinimidyl ester(3, 3'-dimercapto

dipropionate II) 處理後可以固定在很多種感測器表面，像是在氧化多孔矽 (oxidized porous silicon, OPS) 感測器表面等⁽²³⁾。隨著以金和矽這兩種基板為基礎的生物感測器發展蓬勃，用來偵測病原體的適體固定化將變成很關鍵的步驟，而且預期能夠被更廣泛地應用。

五、新穎電性生物感測器於傳染疾病病原檢測之開發

為了發展一個如上述所說可以即時偵測 (in-field) 的生物感測器，相關研究領域對於偵測裝置體積的微小化已投入許多資源進行開發。藉由微製程技術所帶來的好處，微小化的生物感測器可以運用多種新穎的偵測技術來進行量測。由於電性偵測的方式較易於能無接縫地整合進訊號處理與分析系統，因此在這些應用於微小化生物感測器的偵測技術當中，電性偵測是最受矚目的。原則上，在這個方法中，電訊號換能器的上面必須附著上一層生物受體，這些生物受體與待偵測物的交互作用，如專一性結合，將被電訊號換能器轉換成可被量測的電訊號。在相關電性偵測技術於生物分子的量測上，如病原體的偵測 (表 1) 以及抗菌敏感度測試 (表 2)，常見的電訊號轉化器有以下幾種：離子感測場效電晶體 (ISFET)⁽²⁴⁾、奈米線 (nanowire)⁽²⁵⁾、微型懸臂樑 (microcantilever)⁽²⁶⁾、石英晶體微量天平 (quartz crystal microbalance, QCM)^(16, 17, 27-31)、電化學 (electrochemistry)⁽³²⁻³⁴⁾ 以及電阻抗頻譜分析 (electrical impedance spectroscopy)^(12, 13, 35-39)。

1. 離子感測場效電晶體生物感測器

過去數十年，離子感測場效電晶體 (ISFET) 感測器不斷地被研發與改良，相關元件結構以及工作原理與金氧半場效電晶體 (MOSFET) 類似。簡單來說，在源極與汲極之間通道的電流可以被閘極電位所控制。換句話說，這個半導體通道的導電度是被表面電位所影響。相同的道理，在水溶液中，靠近元件表面的帶電離子可以影響場效電晶體的導電度。因此，傳統上可以把離子感測場效電晶體 (ISFET) 感測器運用在 pH 值的偵測上，進而用來

監控環境以及水質⁽⁴³⁾。

因為生物分子在水溶液的環境中常常是帶電的，附著在 ISFET 元件上的生物分子可以改變元件的導電度。利用此一特性，再透過具有鍵結親和力的生物探子，ISFET 元件即可以用來偵測特定的生物分子。為了可以應用在不同狀況，研究人員致力於從不同的方式，像是交互鍵結的物質，來提升 ISFET 的敏感度。此外，考量到降低成本與大量生產，ISFET 能被整合於互補金屬氧化物半導體 (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) 上的潛力也是非常重要的。舉例來說，K.-M. Chang 的研究團隊研發了一個轉導匹配的 ISFET。這個轉導匹配的 ISFET 配合上一個固態差動的讀取電路，可以在 25 秒之內偵測到 1 mg / dL 的尿素⁽⁴⁴⁾。此外，D.C. Li 的研究團隊利用 0.35 mm 的 CMOS 製程製作一個開閘式的 ISFET，此開閘式的 ISFET 可以用來即時偵測多巴胺 (dopamine, DA)，其精準度可以至 femtomolar (fM)⁽⁴⁵⁾。而 F. Aberl 也曾利用 ISFET 晶片表面上固定可以辨識 HIV 病毒蛋白質的抗體，進行如傳統 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 技術，並在後續辨識 HIV 的抗體中標定尿素酶 (urease)，一旦接上抗原，尿素酶發揮作用使得水溶液產生些微 pH 值的變化，進而影響 ISFET 的讀值⁽⁴⁶⁾。

2. 奈米線生物感測器

由於奈米結構具有很高的面積對體積的比例，

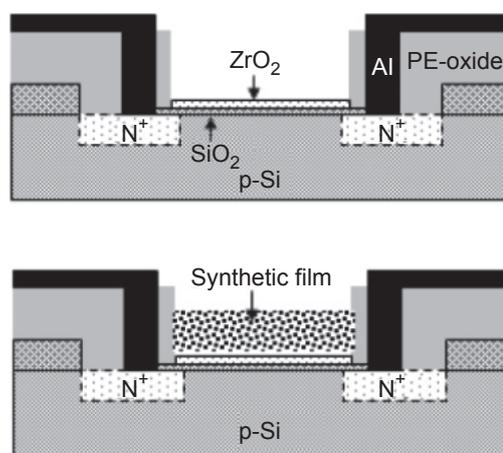


圖 6. 一種 ISFET 元件剖面圖⁽⁴⁴⁾。

表 1. 辨識病原體之生物感測器近期發展。

裝置名稱	目標物	方法	目標序列	偵測	耗時 (不包含樣品處理)	微小化的可行性	偵測極限 (LoD)	文獻
HIV	HIV-1 Tat 蛋白質*	壓電石英晶體	蛋白質	壓電晶體頻率	15 分鐘	是	0.5 ppm	(27)
	HIV-1 Vif 蛋白質	壓電石英晶體	蛋白質	壓電晶體頻率			動態研究	(28)
	HIV-1 & HIV-2 低聚核甘酸	SWV (以亞甲基藍做為還原指示劑)	DNA 低聚核甘酸	最大氧化電流	60 分鐘	否	20 nM	(40)
	HIV-1 短 DNA 序列	SWV & EIS (含甲殼素 / Fe ₃ O ₄ -之奈米微粒)	DNA	最大氧化電流	(樣品進行鍵結)	是	50 pM	(36)
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	壓力式免疫感測器 (SBS 石英晶體)	細菌細胞	壓電晶體頻率	30 分鐘		10 ⁵ cells / mL	(29)
		多通道壓電石英晶體		壓電晶體頻率			100 cfu / mL	(30)
	<i>M. Tuberculosis</i> DNA 序列	EIS (ZnO 奈米薄膜結構)	DNA	最大還原電流	60 秒		1 pM	(37)
		壓電石英晶體		壓電晶體頻率	20 分鐘		0.25 M	(31)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	電化學 (電極為有修飾 aptamer 之奈米碳棒)	細菌	電動勢 (electromotive force)	8 分鐘	可	800 CFU / mL	(32)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	表面增強拉曼散射 (SER)	細菌	拉曼訊號	3.3 分鐘		100 cells / droplet	(41)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	電阻抗頻譜分析 (使用石墨烯電極)	DNA	阻抗值			100 fM	(38)

*Tat 蛋白質：轉錄的轉活蛋白

SWV：square wave voltammetry，伏安法

Vif：Virion Infectivity Factor

SBS：styrene-butadiene- styrene

EIS：electrochemical impedance studies

表 2. 評估抗菌物靈敏度的方法。

方法平台	種類	目標	方法	偵測	耗時 (不含樣品處理)	微小化的可行性	儀器的特殊需求	偵測極限 (LoD)	文獻
電化學量測	尿液	細菌 16S rRNA	快速 b-AST	最大氧化電流	1 小時 (在收集樣品之後：3.5 小時)	是	電化學生物感測器	94% 的準確度 (368個病原體-抗生素測試)	(33)
阻抗量測	水溶液	細菌	Antimicro peptide magainin I functionlized 微電容式電極	阻抗	即時	否	阻抗頻譜	靈敏度 = 1 個細菌 / L	(39)
螢光共振能量轉移	帶有細菌之水溶液	E.coli	運用 PFP 及 FL 之間的螢光轉移		4-5 小時		光譜儀	4×10^4 CFU	(42)
電化學測量	血液	細菌 16S rRNA	使用交流電動力產生焦耳熱進而強化生物感測器	電流	3 小時	是	電化學生物感測器	10^4 CFU	(34)

PFP : cationic polyfluorene

FL : fluorescein

奈米結構已經成為一個熱門的研究領域。在許多的奈米級偵測器元件當中，半導體奈米線(nanowire)是最受矚目的一種，因為它可以利用已發展成熟的 top-down & bottom up 技術簡易地製作出來⁽⁴⁷⁾。為了與發展成熟的半導體業做結合，以矽材料為基底的奈米線感測器已經被研究多年^(47, 48)，奈米線感測器的工作原理與 ISFET 相似。利用生物分子的鍵結進而造成表面電位的改變，最終影響到元件的電導與工作起始電壓⁽⁴⁸⁾ (圖 7)。利用奈米線偵測生物分子會受一些因素的影響，例如奈米線參雜的型態以及濃度。

大部分以矽材料製成的奈米線感測器都是單晶矽 (single crystal silicon, SCS)⁽⁴⁸⁾。雖然 SCS 製程的奈米線具有很好的靈敏度以及穩定性，但是製程較為複雜，成本也比較高。基於可行性的考量，多晶奈米線是較為廣泛的選擇。利用側壁間隔層的生成技術，C.-H. Lin 的研究團隊研發出一個相當靈敏的多晶矽奈米線，可以用於偵測禽流感 DNA，其精細度可以小至 pM 甚至 fM⁽⁴⁹⁾ (圖 8)，此晶片主要是透過 APTES 所形成的單分子層固定單股 DNA

序列。C.-W. Huang 利用 0.35 mm 的 CMOS 製程，研發一個多晶矽整合於晶片上的感測器系統，可以用來偵測 HBA DNA 以及心肌肌鈣蛋白 (cardiac troponin I)，其精確度接近 pM⁽⁵⁰⁾。在這項研究當中，此整合於晶片的感測器系統包含類比前端電路、類比與數位換能器、微處理器與無線訊號接收器。這個晶片系統是第一個展示出臨床檢測 (point-of-care testing) 於單晶片技術上可行性的元件。

3. 微懸臂樑生物感測器

以微機電 (MEMS) 技術來製作微感測器已經發展超過 20 年，由於微機電製程的高靈敏度以及整合進 CMOS 電路與系統的方便性，有許多感測器因此被發展出來，像是加速度計以及壓力計。利用 MEMS 技術所製成的生物感測器，像是微懸臂樑 (microcantilever) 也被提出、製造，並且被許多研究員採納與研究⁽⁵¹⁾。簡而言之，微懸臂樑的原理是因為鍵結或附著於懸臂樑上的生物分子會造成懸臂樑機械特性的改變，像是共振頻率以及彎曲程度⁽⁵²⁾ (圖 9)。而這些機械特性的改變需要再轉換成

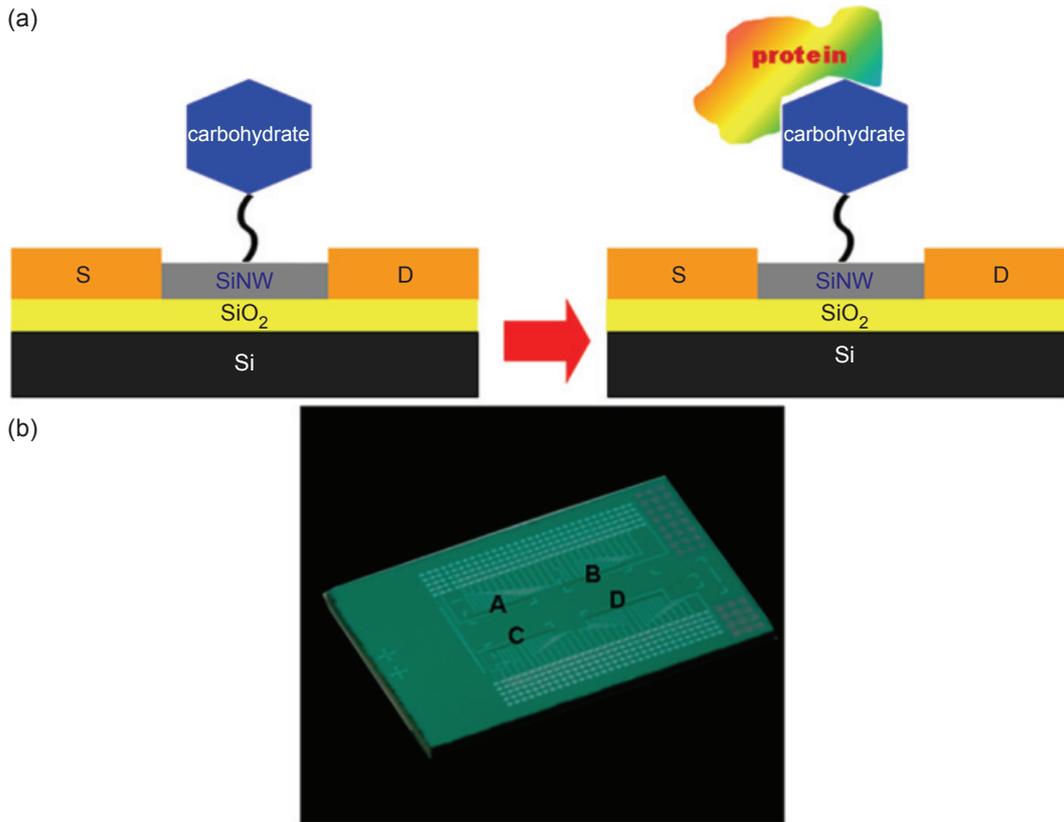


圖 7. 奈米線 (nanowire) 場效電晶體辨識與特定醣類分子鍵結的蛋白質 (a) 在奈米線閘極上固定醣類分子示意圖 (b) 晶片上的四組奈米線場效電晶體⁽⁴⁸⁾。

電訊號以便分析。有許多轉換的方法，像是光學、壓電、以及阻抗分析，都廣泛地被採用。同時微懸臂樑生物感測器的設計參數，像是形狀以及附著其上的生物材料，都被進一步的研究與討論。

傳統上，微懸臂樑生物感測器藉由光學的方式來進行，G.-H. Wu 的研究團隊研究結果顯示，濃度在 0.2 ng / ml 至 60 mg / ml 的攝護腺特定抗原可以被微懸臂樑搭配光學的方式偵測到⁽⁵³⁾，即使微懸臂樑搭配光學的方式具有高靈敏度，但因為複雜的光學儀器架設，使得這個方法變得昂貴且不具可攜帶性。為了解決這個問題，其他的方法像是可以與 CMOS 製程技術整合的金氧半場效電晶體 (MOSFET)⁽⁵⁴⁾ 以及壓電電阻器 (piezoresistor)⁽²⁶⁾ 也被提出來。舉例來說，C.W. Huang 的研究團隊發展了一個微懸臂樑的系統晶片 (system on chip, SoC)，此系統晶片包含了介面電路、微控制器與無線訊號接收器。此系統晶片有能力在 1 pM 至 10

nM 的範圍內去偵測鹼基對匹配的 DNA⁽²⁶⁾，因此近年來微懸臂樑生物感測器已經被當成是一個可行的偵測技術。

4. 石英晶體微量天平生物感測器

QCM 生物感測器是一個具有低成本效益的感測器，其具有高解析度以及可以偵測較大變異的特性⁽⁵⁵⁾。一個 QCM 生物感測器包含了上方附有電極的石英薄片、基底，以及一個匹配電路。藉由石英具有壓電材料的特性，外加的電壓會給石英薄片一個機械壓力 (圖 10)⁽⁵⁵⁾，因此石英薄片就可以跟著外加電壓的變化去做震動。藉由調整石英薄片的結構、厚度、形狀以及其表面的物理特性，即可以達到讓石英在特性頻率，也就是共振頻率下做震盪⁽⁵⁶⁾。利用這個特性可以偵測石英表面所發生的抗體抗原專一性結合。此外，QCM 生物感測器的靈敏度與共振器的品質因子 (quality factor) Q 值成正

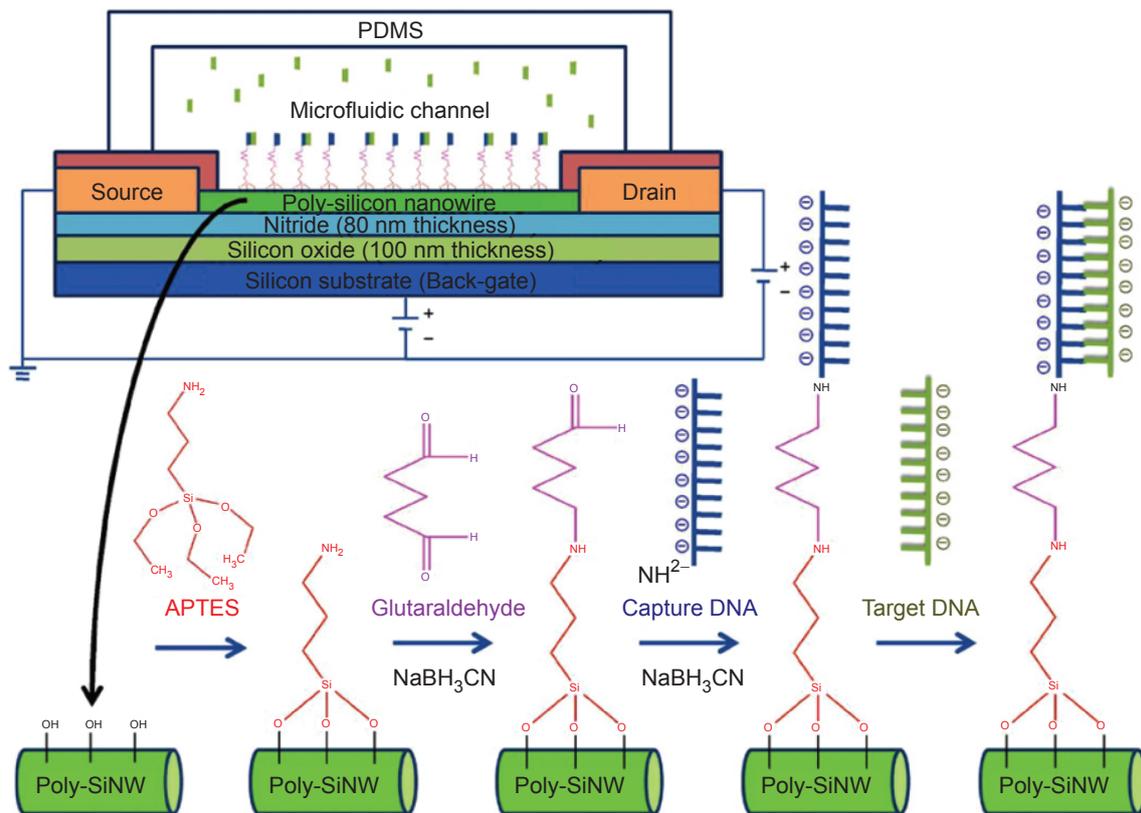


圖 8. 多晶矽奈米線場效電晶體 (poly-silicon nanowire field-effect transistor) 生物感測器，可用於辨識致病原的 DNA，主要是透過 APTES 所形成的單分子層固定單股 DNA 序列⁽⁴⁹⁾。

比， Q 值越高，QCM 生物感測器的靈敏度也就越高⁽⁵⁵⁾。此外，其他種類的壓電材料也可以在同樣原理之下，運用在 QCM 生物感測器上⁽⁵⁷⁾。

QCM 生物感測器最大優點在於它對環境的穩定性、低成本、容易組裝或架設。因此適合用於多種不同病原體的偵測，像是 HIV 或是肺結核病原體 (tuberculosis, TB)，舉例來說，M. Minunni 研發了一個運用生物可辨識適體來偵測 HIV-1 Tat 的 QCM 生物感測器，在具有良好的可重複性下，實驗的偵測極限可達 0.25 ppm⁽²⁷⁾。J. M. Encarnacao 的研究團隊研發了一個針對 HIV-1 Vif 蛋白質的 QCM 生物感測器，該生物感測器可以與阻抗分析系統同步運作⁽²⁸⁾。此即時的阻抗分析可以減少一些非質量效應，像是電聲以及黏彈性的干擾。另一方面，F. He 的研究團隊研發了一個用來偵測肺結核病原體 (TB) 的厚度簡應變模式 QCM 生物感測器⁽²⁹⁾。

藉由運用聚苯乙烯-丁二烯-聚苯乙烯的聚合物來固定化抗體，TB 細胞數目的偵測極限約在 10^5 cells/ml。同時，J. Ren 的研究團隊研發的一個新穎多通道壓電性石英晶體偵測器系統，此偵測系

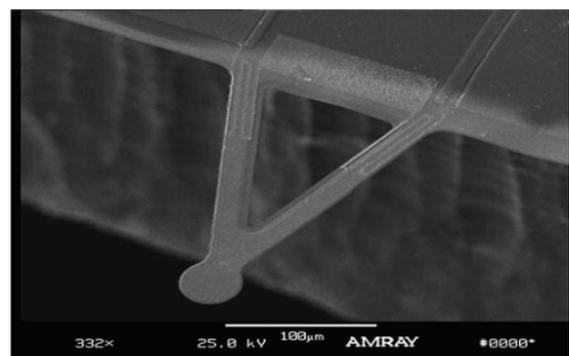


圖 9. 微懸臂樑 (microcantilever) 生物感測器，利用共振頻率以及彎曲程度來評估附著於懸臂樑上的鍵結上待測物的生物分子⁽⁵²⁾。

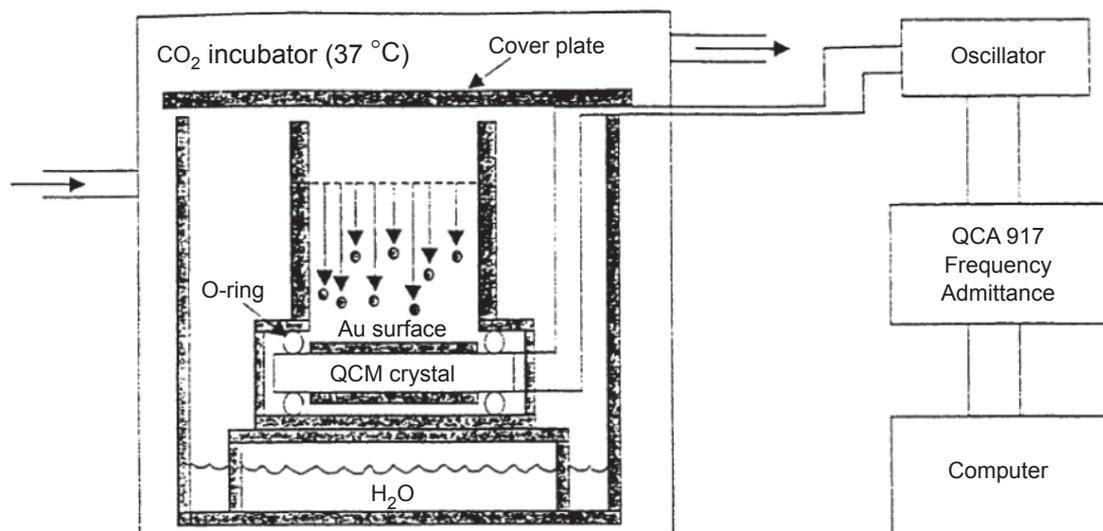


圖 10. QCM 感測器實驗設置圖⁽⁵⁵⁾。

統可用於 TB 的偵測，其精確度可以到達 100 cfu/ml⁽³⁰⁾。T. Kaewphinit 的研究團隊研發出一個針對 TB 基因組 DNA 的 QCM 生物感測器，此技術無聚合酶鏈式反應 (PCR) 流程，其偵測極限約在 0.25 μM ⁽³¹⁾。該結果顯示出 QCM 生物感測器用在即時偵測 (in-field) 的可能性。

5. 電化學生物感測器

電化學 (electrochemistry) 反應是一種牽涉電子交換的化學反應。電子的轉移會改變介面的電特性，進而顯示電極表面的生物反應⁽⁵⁸⁾。為了量測電化學反應，量測的物理量主要可以歸類為三種：電流、電位、阻抗。量測電流與電位的方式分別稱為電流分析法與伏安法。簡單來說，電流分析法與伏安法都是藉由量測一個在工作電極與參考電極之間的施加電壓，並量測工作電極以及參考電極之間的電流。最大的差別在於：伏安法使用一個變動的電位，而電流分析法使用的是一個固定的電位⁽⁵⁹⁾。阻抗量測的方法，電阻抗頻譜分析 (electrical impedance spectroscopy, EIS)，將會在下文詳細介紹。

由於具有簡單組裝與架設，小體積，反應快速，電化學生物感測器被廣泛地使用在各種不同病原體的量測^(60, 61)。舉例來說，D. Zhang 的研究團隊發展了一個用於 HIV-1 和 HIV-2 偵測且免生物

標記的電化學 DNA 生物感測器陣列⁽⁴⁰⁾。藉由方波伏安法 (square wave voltammetric, SWV)，該研究成果顯示其可以在 20 nM 的濃度下，同時偵測多種 DNA 序列。此外，L. D. Tran 的研究團隊研發了一個 CS/Fe₃O₄ 奈米級生物相容性，針對 HIV-1 偵測的電化學方法與平台⁽³⁶⁾ 藉由量測臨床樣本中細菌 16S rRNA，來評估抗菌的靈敏度。在 3.5 小時內，從 368 位病人所蒐集到的尿液樣本的培養與靈敏度資訊與標準的微生物檢測比對後，可以得到 94% 精確度⁽³³⁾。藉由使用 Fe₃O₄ 的奈米微粒來提升電子轉換效率，SWV 以及 EIS 都可以達到一個很低的偵測極限，約 50 pM。總而言之，電化學生物感測器因為絕佳的靈敏度與選擇能力，因此在許多的應用上扮演重要的角色。奈米科技的進步也增加了電化學生物感測器在即時偵測 (in-field) 的潛力。

6. 電阻抗頻譜分析 (Electrical Impedance Spectroscopy, EIS) 生物感測器

雖然電化學生物感測器擁有上述的一些優點，但傳統的電化學生物感測器並不適合用來量測蛋白質以及 DNA，因為這些生物分子並不具有氧化還原的特性。為了克服該項缺點，EIS 生物分子感測機制因此被發展出來。不同於傳統的電化學生物感測器，EIS 藉由提供一個小震幅的電位訊號來偵測

電極表面的表面特性，並且觀察這些細胞在這個外加電訊號下的反應⁽⁵⁸⁾。而這個外加電訊號的頻率會隨時間改變，以得到一個阻抗頻譜。藉由分析這個阻抗頻譜我們就可以得知電極表面的電阻以及電容特性，並可以了解整體生物分子鍵結在電極表面的情形。由於 EIS 藉由量測阻抗，並未透過標定生物標記來了解特定分子間作用方法，因此會受到非特定鍵結 (non-specific binding) 以及再生 (regeneration) 的限制。此外，其他因素，像是利用奈米材料來改進電極表面的導電度，以及利用化學改質的方式來提升訊號，都是優化 EIS 很重要的課題⁽⁵⁹⁾。

由於先天上具有電化學生物感測器的優點，EIS 生物感測器也具有運用在即時偵測 (in-field) 上的潛力。因此 EIS 被廣泛地討論，從各方面去提升 EIS 的應用領域。舉例來說，M. Das 的研究團隊研發出一個針對 TB DNA 的 EIS 生物感測器，此感測器是利用奈米結構的 zinc oxide (ZnO) 來當作 ITO 導電層，以提升導電度⁽³⁷⁾。藉由奈米材料的幫助，偵測極限可以小至 1 pM，偵測範圍約在 1 pM 至 1 mM。另一方面，M. S. Mannoor 的研究團隊發表了一個病原體細菌的 EIS 偵測平台⁽³⁹⁾，這個平台可以達到臨床檢測的靈敏度也是就 1 個細菌 / mL，這些研究成果指出了 EIS 偵測技術的可行性。

六、新興傳染疾病快速檢測發展趨勢

由於不當地使用抗生素，導致新興傳染疾病持續造成危害。幸好，某些疾病因生物感測科技而被有效地控制住。在此提到幾種生物感測科技，這些電性生物感測器或者仰賴適體的生物受體科技將可以應用在定點照護 (point-of-care, POC) 領域中，並且對於偵測病原體是非常有價值的。如何滿足快速即時檢測新興傳染疾病病原之需求，大量生產、快速試驗、高穩定性、同時檢測、再現性與可攜性的能力，或是與其他擴充模組搭配來提高靈敏度等，皆為開發即驗即報的電性生物感測器的評估重點。基於目前的發展，更多生物感測器的創新應用將非常蓬勃，未來也期望更多科學研究致力於此領域上

面。相信直接偵測生物流體或者微型化整合型生物感測系統對於未來發展將是不可或缺的重要方向。

參考文獻

1. C. Saviuc, A. M. Holban, A. Mihai Grumezescu, C. Bleotu, O. Banu, V. Lazar, D. E. Mihaiescu, and M. C. Chifiriuc, *Lett. Appl. Nanobiosci.*, **1**, 67 (2012).
2. G. Pîrcălăbîoru, S. Plessas, E. Bezirtzoglou, A. Papageorgiou, A. Alexopoulos, I. Mantzourani, C. Bleotu, C. Chifiriuc, and V. Lazăr, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **1**, 9 (2011).
3. K. E. Jones, N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman, and P. Daszak, *Nature*, **451**, 990 (2008).
4. HIV/AIDS, J.U.N.P.o., *Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2013. Geneva: UNAIDS, 2013.* World Health Organization.
5. E. Torrado, R. T. Robinson, and A. M. Cooper, *Trends Immunol.*, **32**, 66 (2011).
6. S. D. Lawn, L. G. Bekker, and R. F. Miller, *Lancet Infect. Dis.*, **5**, 361 (2005).
7. K. M. Samanich, M. A. Keen, V. D. Vissa, J. D. Harder, J. S. Spencer, J. T. Belisle, S. Zolla-Pazner, and S. Laal, *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, **7**, 662 (2000).
8. O. Clerc and G. Greub, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 1054 (2010).
9. A. Mihai Grumezescu, E. Andronescu, A. Ficai, C. H. Yang, K. S. Huang, B. S. Vasile, G. Voicu, D. E. Mihaiescu, and C. Bleotu, *Lett. Appl. Nanobiosci.*, **1**, 77 (2012).
10. O. Banu, I. Gheorghe, I. Czobor, R. S. Brojban, N. N. Serbănescu, M. Cainaru, M.C. Chifiriuc, and C. Bleotu, V. Lazăr, *Lett. Appl. NanoBioSci.*, **1**, 18 (2012).
11. D. C. Oliveira, A. Tomasz, and H. de Lencastre, *Lancet Infect. Dis.*, **2**, 180 (2002).
12. L. C. Clark, Jr. and C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
13. S. Campuzano, M. Pedrero, and J. M. Pingarrón, *Portable Chem. Sens.*, **119** (2012).
14. C. Zhu, Q. Yang, L. Liu, and S. Wang, *Angewandte Chemie International Edition.*, **50**, 9607 (2011).
15. M. Y. Lin, Y. P. Lu, A. Mihai Grumezescu, H. H. Fu, Y. H. Kao, Y. S. Yang, and C. H. Yang, *Current Organic Chemistry.*, **17**, 132 (2013).
16. M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, and E. Prohaska, *Anal. Chem.*, **74**, 4488 (2002).
17. E. de Boer and R. R. Beumer, *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 119 (1999).
18. A. M. Grumezescu, E. Ilinca, C. Chifiriuc, D. Mihaiescu, P. Balaure, V. Traistaru, and G. Mihaiescu, *Biointerface. Res. Appl. Chem.*, **1**, 139 (2011).
19. M. Y. Lin, Y. P. Lu., Y. S. Yang, H. L. Chen, C. H. Yang, A. Mihai Grumezescu, E. C. Wang, and Y. S. Lai, *Curr. Org. Chem.*, **17**, 144 (2013b).

20. Y. Liu, E. Holmstrom, J. Zhang, P. Yu, J. Wang, M. A. Dyba, D. Chen, J. Ying, S. Lockett, D. J. Nesbitt, A. R. Ferré-D'Amaré, R. Sousa, J. R. Stagno, and Y. X. Wang, *Nature*, **522**, 368 (2015).
21. W. A. Lai, C. H. Lin, Y. S. Yang, Michael and S. C. Lu, *Biosensors and Bioelectronics*, **35**, 456 (2012).
22. C. Fan, *Curr. Org. Chem.*, **15**, 445 (2011).
23. N. Massad-Ivanir, G. Shtenberg, and E. Segal, *Springer*, **37** (2012).
24. C. S. Lee, S. K. Kim, and M. Kim, *Sensors*, **9**, 7111 (2009).
25. C. W. Huang, Y. J. Huang, P. W. Yen, H. H. Tsai, H. H. Liao, Y. Z. Juang, S. S. Lu, and C. T. Lin, *Lab on a Chip*, **13**, 4451 (2013).
26. C. W. Huang, H. T. Hsueh, Y. J. Huang, H. H. Liao, H. H. Tsai, Y. Z. Juang, T. H. Lin, S. S. Lu, and C. T. Lin, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **181**, 867 (2013).
27. S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, and M. Mascini, *Bioelectrochemistry*, **67**, 135 (2005).
28. J. M. Encarnacao, L. Rosa, R. Rodrigues, L. Pedro, F. A. da Silva, J. Goncalves, and G. N. Ferreira, *Journal of Biotechnology*, **132**, 142 (2007).
29. F. He and L. Zhang, *Anal. Sci.*, **18**, 397 (2002).
30. S. Q. Wang, F. Inci, G. De Libero, A. Singhal, and U. Demirci, *Biotechnol. Adv.*, **31**, 438 (2013).
31. T. Kaewphinit, S. Santiwatanakul, C. Promptmas, and K. Chansiri, *Sensors (Basel)*, **10**, 1846 (2010).
32. G. A. Zelada-Guillén, J. L. Sebastian-Avila, P. Blondeau, J. Riu, and F. X. Rius, *Biosens. Bioelectron.*, **31**, 226 (2012).
33. K. E. Macha, R. Mohana, E. Jo Baron, M. C. Shih, V. Gau, P. K. Wong, and J. C. Liao, *J. Urol.*, **185**, 148 (2011).
34. T. Liu, Y. Lu, V. Gau, J. C. Liao, and P. K. Wong, *Ann. Biomed. Eng.*, **42**, 2314 (2014).
35. M. S. Mannoos, S. Zhang, A. J. Link, and M. C. McAlpine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 19207 (2010).
36. L. D. Tran, B. H. Nguyen, N. V. Hieu, H. V. Tran, H. L. Nguyen, and P. X. Nguyen, *Materials Science and Engineering: C*, **31**, 477 (2011).
37. G. S. Maumita Das, R. Nagarajan, and B. D. Malhotra, *Thin Solid Films*, **519**, 1196 (2010).
38. Z. Wang, J. Zhang, P. Chen, X. Zhou, Y. Yang, S. Wu, L. Niu, Y. Han, L. Wang, P. Chen, F. Boey, Q. Zhang, B. Liedberg, and H. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 3881 (2011).
39. M. S. Mannoos, S. Zhang, A. J. Link, and M. C. McAlpine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 19207 (2010).
40. D. Zhang, Y. Peng, H. Qi, Q. Gao, and C. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 1088 (2010).
41. X. Lu, D. R. Samuelson, Y. Xu, H. Zhang, S. Wang, B. A. Rasco, J. Xu, and M. E. Konkel, *Anal. Chem.*, **85**, 2320 (2013).
42. C. Zhu, Q. Yang, L. Liu, and S. Wang, *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 9607 (2011).
43. C. Jimenez-Jorquera, J. Orozco, and A. Baldi, *Sensors*, **10**, 61 (2009).
44. K. M. Chang, C. T. Chang, and K. M. Chan, *Sensors*, **10**, 6115 (2010).
45. D. C. Li, P. H. Yang, and M. S. C. Lu, *IEEE J. Electron Devices.*, **57**, 2761 (2010).
46. F. Aberl, S. Modrow, and H. Wolf, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **6**, 183 (1992).
47. G. J. Zhang and Y. Ning, *Analytica Chimica Acta.*, **749**, 1 (2012).
48. G. J. Zhang, M. J. Huang, J. J. Ang, Q. F. Yao, and Y. Ning, *Analytical Chemistry*, **85**, 4392 (2013).
49. C. H. Lin, C. H. Hung, C. Y. Hsiao, H. C. Lin, F. H. Ko, and Y. S. Yang, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 3019 (2009).
50. C. W. Huang, Y. J. Huang, P. W. Yen, H. T. Hsueh, C. Y. Lin, M. C. Chen, C. H. Ho, F. L. Yang, H. H. Tsai, H. H. Liao, Y. Z. Juang, C. K. Wang, C. T. Lin, and S. S. Lu, *2012 Symposium on IEEE*. (2012).
51. N. V. Lavrik, M. J. Sepaniak, and P. G. Datskos, *Review of Scientific Instruments*, **75**, 2229 (2004).
52. K. R. Buchapudi, X. Huang, X. Yang, H. F. Ji, and T. Thundat, *Analyst*, **136**, 1539 (2011).
53. G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, and A. Majumdar, *Nature Biotechnology*, **19**, 856 (2001).
54. G. Shekhawat, S. H. Tark, and V.P. Dravid, *Science*, **311**, 1592 (2006).
55. Marx, K.A., *Biomacromolecules*, **4**, 1099 (2003).
56. N. A. Karaseva and T. N. Ermolaeva, *Talanta*, **93**, 44 (2012).
57. C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 663 (1999).
58. A. J. Bard and L. R. Faulkner, John Wiley & Sons Inc, **2**, (2001).
59. N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1747 (2010).



黃若雯小姐為高雄醫學大學生物醫學碩士，現任嘉義長庚腦神經外科研究助理。

Jo-Wen Huang received her M.S. in biomedical science and environmental biology from Kaohsiung Medical University. She is currently a research assistant in the Department of Neurosurgery at Chiayi Chang-Gung Memorial Hospital.



高佳鴻先生現為國立台灣大學電子工程學研究所碩士學生。

Chia-Hong Gao is currently a master student in the Department of Electrical Engineering, National Taiwan University.



盧彥蓓小姐為國立中興大學獸醫病理所碩士，現任國家實驗研究院儀器科技研究中心副研究員。

Yen-Pei Lu received her M.S. in veterinary pathobiology from National Chung Hsing University. She is currently an associate researcher at Instrument Technology Research Center, National Applied Research Laboratories.



林致廷先生為美國密西根大學電機及資訊工程博士，現任國立台灣大學電子工程學研究所副教授。

Chih-Ting Lin received his Ph.D. in electrical engineering and computer science from University of Michigan, USA. He is currently an associate professor in the Department of Electrical Engineering at National Taiwan University.



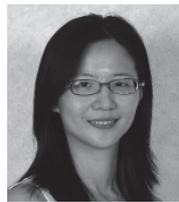
楊仁宗先生為長庚大學臨床醫學研究所博士，現任長庚醫療財團法人嘉義長庚紀念醫院外科部主任。

Jen-Tsung Yang received his Ph.D. in clinical medicine from Chang Gung University. He is currently the chief of Department of Surgery in Chiayi Chang Gung Memorial Hospital.



李一能先生為國立台灣大學生化暨分子生物學研究所博士，現任財團法人嘉義長庚醫院醫學研究部助理研究員。

I-Neng Lee received his Ph.D. in biochemistry & molecular biology from National Taiwan University. He is currently a research assistant fellow of Medical Research in Chiayi Chang Gung Memorial Hospital.



林明瑜小姐為國立交通大學分子醫學與生物工程博士，現任國家實驗研究院儀器科技研究中心副研究員。

Ming-Yu Lin received her Ph.D. in molecular medicine and bioengineering from National Chiao Tung University. She is currently an associate researcher at Instrument Technology Research Center, National Applied Research Laboratories.