

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

發展分析磁泳之線上偵測 --QCM 方法之可行性探討及其應用 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2113-M-040-003-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：蔡惠燕
共同主持人：施正雄、傅傳博
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：林義
大學生-兼任助理：蘇丁香

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 96年11月02日

報告內容：請包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）…等。若該計畫已有論文發表者，可以 A4 紙影印，作為成果報告內容或附錄，並請註明發表刊物名稱、卷期及出版日期。若有與執行本計畫相關之著作、專利、技術報告、或學生畢業論文等，請在參考文獻內註明之，俾可供進一步查考。

研究計畫之背景及目的

目前分離技術中利用物理性質為分離基礎的技術大都是以物質的大小、密度、電荷、擴散係數等為主，對於日益複雜的樣品單由以上一種物理性質來做分離往往未能達到有效的分離的效果，另外發展及使用其他具選擇性的物理性質來達到有效的分離在生化樣品之應用上是非常的重要且必需的。磁場具有高的選擇性且使用簡單，應用於水溶液中的樣品時，較使用離心場在儀器上是更較簡單且快速，若與電場比較，因其不受電解產物的干擾，所以較簡單方便。若使用永久磁鐵來組合磁場在，在儀器設備上更是非常的簡便與經濟。由於它的速度和選擇性的特點，磁性分離技術已陸續被使用在生物技術相關的應用。分析磁泳(analytical magnetapheresis)應用於有磁性感受性物質的分析則是相對較新的技術。

傳統上磁場是應用於採礦業上將磁化率高的物質分離出來^[1-3]，近來在國際上有將磁場應用於顆粒^[3-6]及血球^[7-11]等的分離，技術上主要是利用磁場的高選擇性及簡單性，但這些應用大都使用電磁鐵以產生高的磁場強度來完成，但有些未能有效的控制流速或未能使用流洗 (elution) 的方式完成，所以成本高且不方便。發展以永久磁鐵組合磁場來做分離技術的基礎是非常的值得且有經濟價值，它的應用很多，包括顆粒方面、環境方面、生物 (或微生物)方面等。

過去幾年本研究團隊已建立以永久磁鐵為基礎磁場的磁性分離系統為基礎，結合免疫分析及分析磁泳建立簡單、快速、高選擇性的磁性分離技術，但大都利用顯微鏡off-line的偵測方式，本研究探討分析磁永結合QCM偵測之可行性，並陸續地進一步來探討它在生化相關分析上的應用，如 immunomagnetic assays。

文獻探討與研究方法

磁性分離技術使用功能性之磁性顆粒，是靈敏可靠的方法，可快速且容易的捕獲特定的蛋白質、基因和其它生物物質。此技術相對於其他分析方法而言，對分析物質 (analytes) 產生較少機械壓力 (mechanical stress) 且較簡便、便宜的，而且可自動化和小型化。

磁性流體或 ferrofluids 主要包括微米或奈米大小的氧化鐵顆粒 (Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) 分散在載體液體。近年來，根據使用磁性固態支持 (magnetisable solid phase supports, MSPS) 發現了許多在生物領域應用即診斷、藥物標的、分子生物學、細胞分離和純化、免疫分析等^[12-14]。當前被使用的許多磁性顆粒是超順磁性的 (superparamagnetic)，即這些顆粒在一個外加磁場下可容易地被磁化，當磁場被去除時立刻再分散。商業化的磁性顆粒一般分類為赤裸顆粒 (unmodified magnetic particles)、化學衍生化的顆粒 (chemically derivatized)、以及一般特異性配位基 (general specificity ligands)，如 streptavidin, 蛋白質 A 或 monoclonal 和 polyclonal 抗體。

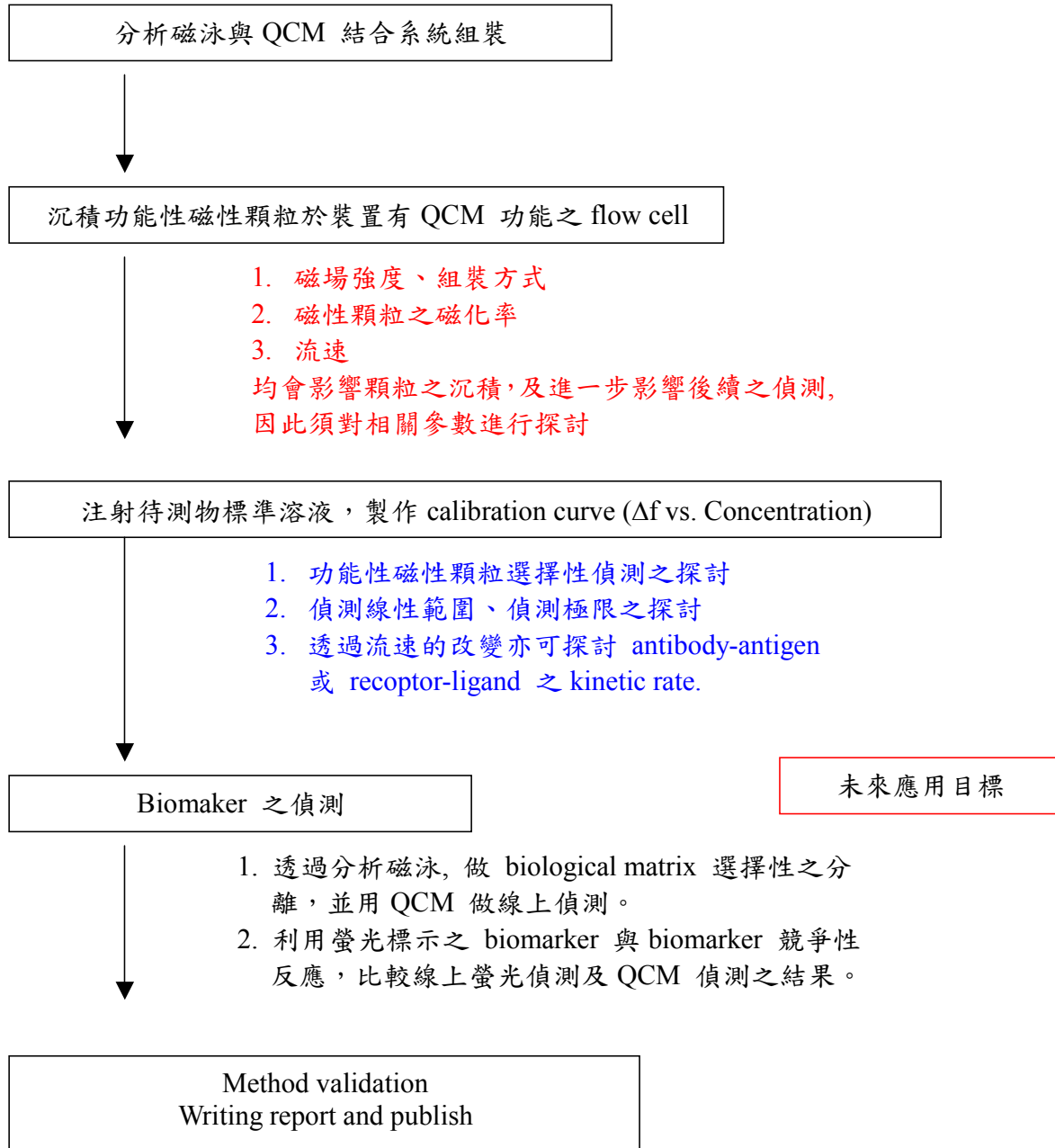
Immunoassays 由於它的敏感性、特異性和一般適用性，在臨床診斷和在基礎研究上成為一個重要工具。包括 fluoroimmunoassays、酵素 immunoassays 或放射免疫測定的各式各樣的 immunoassays，主要是將酵素或抗體固定化在為微盤上，再經過與分析物反應 (incubation)、清洗 (wash)..... 等步驟，所需步驟多，時間長。磁性顆粒已應用於與一級或二級抗體，用來分離和定量抗原。此方法可減少離心試樣的步驟，如此可減少分析試樣的時間和簡化操作，因此增加效率和準確性。Matsunaga 等人^[15]開發了一個新穎的 fluoroimmunoassay 方法，螢光素 isothiocyanate (FITC) 被共軛的單株抗體 (conjugated monoclonal)，anti-Escherichia coli 抗體，固定在細菌磁性顆粒 (bacterial magnetic particles, BMPs) 用來作為 E. coli 之偵查和移除。在分析磁泳系統中若要利用 fluoroimmunoassay 方法作定量，一般需利用 competitive binding assay，即將被分析物 (substrate/analyte) 之標準品進行螢光標示，再加入被分析的 biological sample 中，與 biological sample 中之 substrate 對磁珠上之 antibody 產生競爭反應，如果 biological sample 中之 substrate 濃度

高，則樣品流過分析磁泳分離槽後進入螢光偵測器之訊號會較 substrate 濃度低時之訊號弱。此種方法較不符合經濟效益。

石英震盪微量天秤(quartz crystal microbalance, QCM)應用在immunoassay 上已有很多文獻報導^[16-43]，但其偵測之線性範圍受塗佈(coating)在其金屬電極表面之抗體(antibody)的量而有所影響，應用在 flow-cell 的偵測上一般選用金電極之壓電晶片價格較為昂貴，且塗佈之抗體與抗原作用後利用 glycine HCl 清洗，以斷掉antibody-antigen之鍵結，此過程會使原先之antibody 喪失部分活性，需重新coating，無法達到快速重複偵測^[43]。本計劃將結合分析磁泳快速分離之特性與QCM 對表面重量改變靈敏的感應發展分析磁泳”nonlabeling”之線上偵測技術(on-line detection)，建立一套不需標示螢光或化學發光、亦不需對壓電晶片電極塗佈抗體，簡單、快速、高選擇性的磁性分離與分析之技術，並進一步應用在biomarker定量之生化相關分析上的應用。

本實驗偵測定量乃以 Sauerbrey's equation 為基礎。將使用Thickness shear mode AT-Cut的石英震盪器，The Sauerbrey's equation 顯示，其震動頻率之改變 $\Delta f = -S_f \Delta m$ ，即其 frequency 之改變(減少的量)正比於石英表面上電極上沉積物質的質量。The Sauerbrey's equation 顯示QCM 是 mass sensitivity, 石英震盪器本身並無選擇性，因此 QCM biosensor 通常要在電極表面塗布(coating)一層選擇性物質 (如 antibody or receptor)，在flow system中，當分析物(如特定之antigen or substrate)通過已塗布antibody的表面，特定的antigen 將與antibody結合，而增加 sensor 表面之質量，因此QCM的 frequency 下降，且藉由電極表面塗布選擇性物質使QCM達到具選擇性的偵測。在本研究將使用已有特殊標示的磁性顆粒，將此顆粒注射入系統 (磁泳系統)，其系統設計如圖 1a, 紅色線表示石英震盪片，磁性顆粒通過該系統將會受磁場作用而沉積在QCM電極表面, QCM之震盪頻率即會隨之改變，即本研究利用磁場作用達到將有選擇性作用物質 ”immobilized” 在電極表面。然後可注射入待測物質(有或沒有磁性均可)。待測物質與先沉積在電極表面之磁性顆粒作用，增加電極表面之質量, QCM頻率下降。

實施流程簡圖：



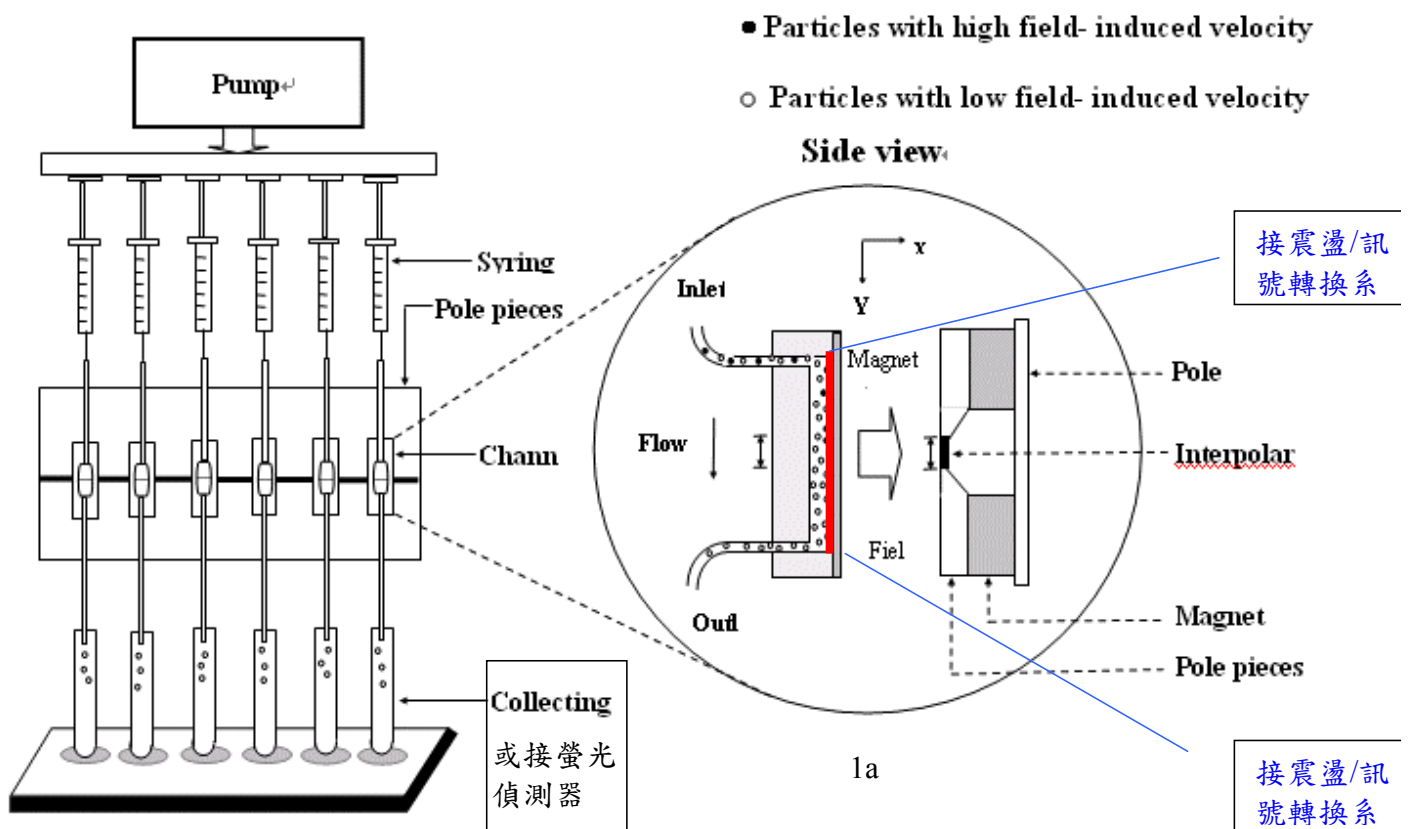
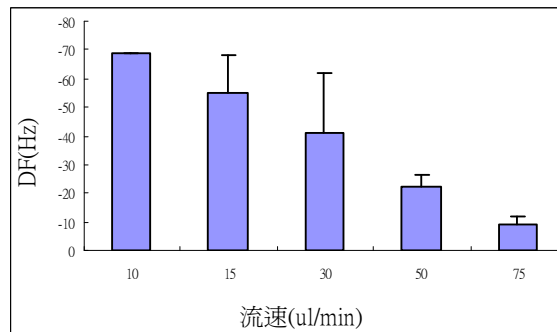


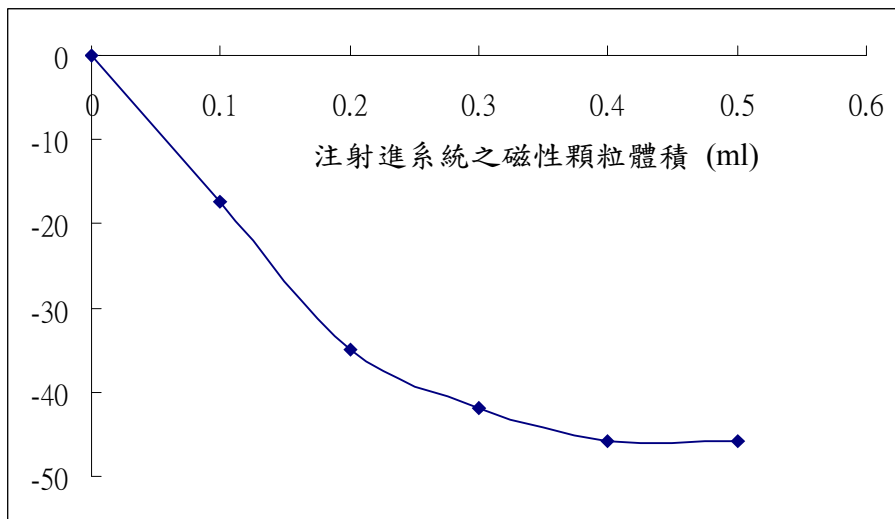
圖 1 Front and side views of analytical magnetapheresis with multi-channels coupling with QCM

結果與討論：

本計畫與師大施正雄教授合作自行研製QCM感測器儀器之震盪/訊號轉換界面(interface board)，組裝頻率/數位界面(frequency/digital converter)及微電腦訊號處理。並設計、製作分析磁泳之分離槽，將石英晶片置入其中。建立運作介面，組裝完成的系統(如圖1)，並用標準 magnetic bead 探討顆粒沉積與QCM頻率變化之關係，已確認系統運作無誤。並探討最適化條件，圖二為探討磁性顆粒注射流速與沉積量，流速愈小沉積愈多，但流速小耗時較久，因此選擇性即線性探討均以 50 ul/min 為主。注射量超過1 mg已達沉積飽和度。



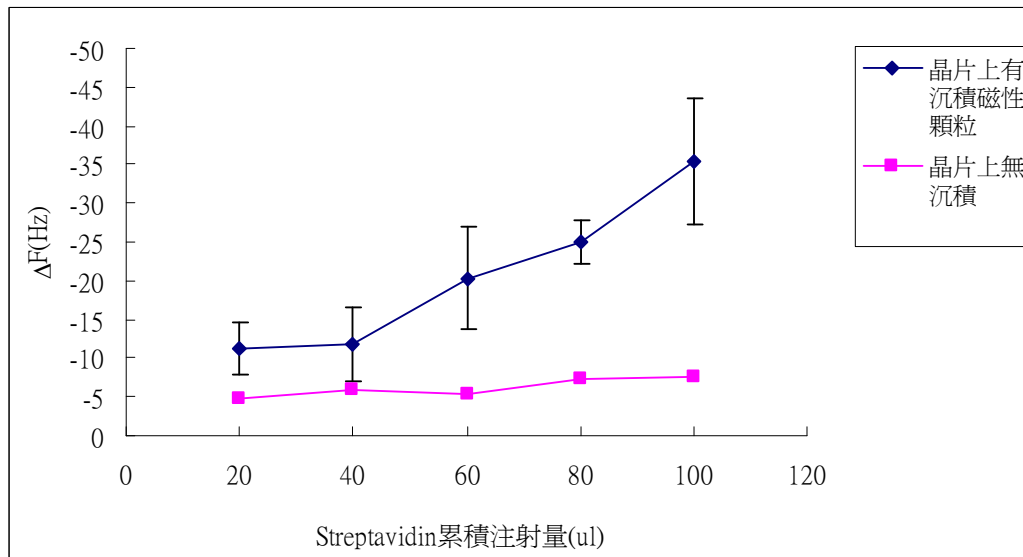
(a) 不同流速下對磁性顆粒沉積效果的影響



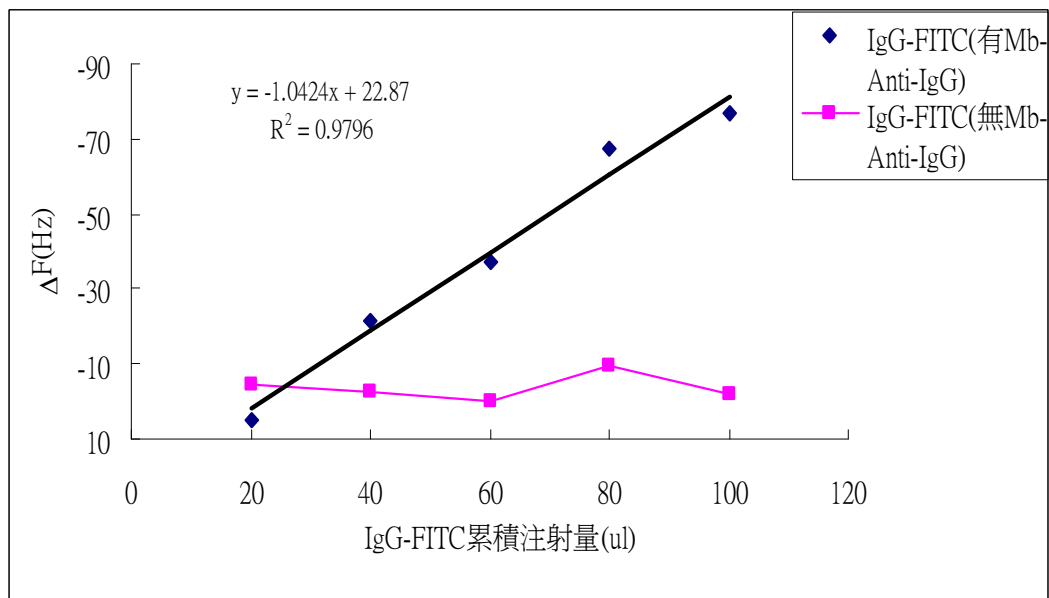
(b) 注射磁性顆粒量與沉積效果, QCM 晶片距離磁場 2.5mm, carrier 為 PBS 緩衝溶液 pH 7.4, 流速 50ul/min, 每次注射量: 0.1ml PGMA@Fe₄O₃ Anti-BSA-80nm, 濃度 2.562 mg/ml

圖 2 磁性顆粒沉積條件之探討

圖三與圖四為選擇性吸附之探討，結果顯示預先沉積有生化標示之磁性顆粒於QCM晶片上，可有限現關係地偵測其對應之ligand。



圖三 比較 Streptavidin 在 predeposited biotin-labeled 磁性顆粒之作用與非選擇性吸附在 QCM 金電級之差異



圖四 比較 IgG 在 predeposited AntiIgG-labeled 磁性顆粒之作用與非選擇性吸附在 QCM 金電級之差異

結論：

本研究成功地將分析磁泳與 QCM 兩系統的結合，研究人員自行設計整個系統，建立 QCM 與分析磁泳之介面 (Interface of QCM and magnetapheresis)，奈米磁性顆粒之合成與生化標示，初步結果顯示可有線性地偵測樣品中的 ligands.

此果將搭配暨大傅傳博教授研究室自製之功能性磁性奈米顆粒，進行生化分析之應用。可使分析磁泳在應用上更方便，並有全自動化之可行性。對 QCM 的應用也可增加另一可行性，即不需電極表面之塗佈。改由透過磁場之作用，把功能性之磁性顆粒先沉積在晶片之電極上。

參考文獻

1. Mitchell R, Bitton G, Obertenffer JA, *Sep. Purif. Meth.*, 1975, 4, 267-303.
2. Oder RR, *IEEE Trans Magn.*, 1976, 12, 428-435.
3. Hirschbein B.L., Brown D.W., Whitesides G.M., *Chemtech.*, 1982, 172-179.
4. Evens C.H., Russell A.P., Westcott V.C., *J. Chromatog.*, 1986, 351, 409-425.
5. Seifert W.W., Westcott V.C., *Wear*, 1972, 21, 27-42.
6. Takayasu M, Gerber R, Friedlaender F.J., *IEEE Trans Magn.* 1983, 19, 2112-2114.
7. Graham M.D., Selvin P.R., *IEEE Trans Magn.* 1982, 18, 1523-1525.
8. Miltenyi S., Muller W., Weichel W., Radbruch A., *Cytometry*, 1990, 11, 231-238.
9. Zborowski M., Fuh C.B., Green R., Sun L., Chalmers J., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3702-3712.
10. Mellville D., Paul F., *Nature*, 1975, 255, 706-710.
11. Ugelstad J., Berge A., *Anal. Chem.*, 1988, 328, 303-334.
12. Ramchand CN, Priyadarshini P, Kopcansky P, Mehta RV: Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian J Pure Appl Phys* 2001, 39:683-686.
13. Ramchand CN, Priyadarshini P, Kopcansky P, Mehta RV: Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian J Pure Appl Phys* 2001, 39:683-686.
14. Safarik I, Safarikova M: Overview of magnetic separations used for biochemical and biotechnological applications. In *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* (Edited by: Hafeli U, Schutt W, Teller J, Zborowski M). New York: Plenum Press 1997, 323-340.
15. Nakamura N, Burgess JG, Yagiuda K, Kudo S, Sakaguchi T, Matsunaga T: Detection and removal of *Escherichia coli* using fluorescein isothiocyanate conjugated monoclonal antibody immobilized on bacterial magnetic particles. *Anal Chem* 1993, 65(15):2036-2039.
16. Storri, S., et al., *Surface modifications for the development of piezoimmunosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1998. **13**(3-4): p. 347-57.
17. Yun, K., et al., *Use of a quartz crystal microbalance to monitor immunoliposome--antigen interaction*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(2): p. 260-4.
18. Spangler, B.D. and B.J. Tyler, *Capture agents for a quartz crystal microbalance-continuous flow biosensor: functionalized self-assembled monolayers on*

- gold*. Analytica Chimica Acta, 1999. **399**(1-2): p. 51-62.
19. Lin, S.L., Chih-Cheng; Chien, Hsiung-Fei; Hsu, Su-Ming , *An on-line quantitative immunoassay system based on a quartz crystal microbalance*. Journal of Immunological Methods, 2000. **239**(1-2): p. 121-124.
 20. Liu, Y.C., C.M. Wang, and K.P. Hsiung, *Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay*. Analytical Biochemistry, 2001. **299**(2): p. 130-5.
 21. Liu, Y.-C., C.-M. Wang, and K.-P. Hsiung, *Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay*. Analytical Biochemistry, 2001. **299**(2): p. 130-135.
 22. Lippa, P.B., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2001. **314**(1-2): p. 1-26.
 23. Uttenthaler, E., et al., *Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids*. Biosensors and Bioelectronics, 2001. **16**(9-12): p. 735-743.
 24. Eun, A.J.-C., et al., *Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors*. Journal of Virological Methods, 2002. **99**(1-2): p. 71-9.
 25. Sota, H., et al. A versatile planar QCM-based sensor design for nonlabeling biomolecule detection. Anal. Chem. 2002, 74, 3591-3598.
 26. Aizawa, H., et al., *Conventional detection method of fibrinogen and fibrin degradation products using latex piezoelectric immunoassay*. Biosensors and Bioelectronics, 2003. **18**(5-6): p. 765-771.
 27. Brogan, K.L., et al., *Direct oriented immobilization of F(ab′) antibody fragments on gold*. Analytica Chimica Acta, 2003. **496**(1-2): p. 73-80.
 28. Kathryn L. Brogan, K.N.W., Patricia A. Jones, Mark H. Schoenfish, *Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold*. Analytica Chimica Acta, 2003. **496**(1-2).
 29. Liu, Y., et al., *Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. **18**(11): p. 1419-27.
 30. Liu, Y.-C., et al., *Evaluation and application of conducting polymer entrapment on quartz crystal microbalance in flow injection immunoassay*. Biosensors and Bioelectronics, 2003.

- 18(7): p. 937-942.
31. Shigeru Kurosawa^{1, 6}, Hidenobu Aizawa^{1,3}, Mitsuhiro Tozuka^{1,4}, Miki Nakamura^{1,2} and Jong-Won Park^{1,5}, *Immunosensors using a quartz crystal microbalance*. Meas. Sci. Technol, 2003. **14**: p. 1882-1887.
 32. Wang, H., et al., *A novel biosensing interfacial design produced by assembling nano-Au particles on amine-terminated plasma-polymerized films*. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(4): p. 632-8.
 33. Calvo, E.J., et al., *Characterization of self-assembled redox polymer and antibody molecules on thiolated gold electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **19**(10): p. 1219-28.
 34. Darain, F., C. Ban, and Y.-B. Shim, *Development of a new and simple method for the detection of histidine-tagged proteins*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **20**(4): p. 857-63.
 35. Kurosawa, S., et al., *Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **20**(6): p. 1134-9.
 36. Laricchia-Robbio, L. and R.P. Revoltella, *Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **19**(12): p. 1753-8.
 37. Su, X.-L. and Y. Li, *A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **19**(6): p. 563-74.
 38. Wang, H., et al., *A protein A-based orientation-controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer-sized gold particles and plasma-polymerized film*. Analytical Biochemistry, 2004. **324**(2): p. 219-26.
 39. Monika Michalzik, Ralph Wilke, Stephanus Büttgenbach *Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application in liquid*. 2005. **111-112**: p. 410-415.
 40. Oshima, K., et al., *Quartz crystal microbalance assay for determination of plasma vitellogenin*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **105**(2): p. 473-478.
 41. Shen, Z., et al., *Single-chain fragment variable antibody piezoimmunosensors*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(3): p. 797-805.

42. Wang, H., et al., *Nanogold particle-enhanced oriented adsorption of antibody fragments for immunosensing platforms*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **20**(11): p. 2210-2217.
43. Lee, Y., Chang K., Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid. Talanta, 2005, 65, 1335-1342.