

# 表面電漿子共振式生物感測器之研發與應用

本文內容將著重於目前光學生物感測技術中的表面電漿子共振式 (surface plasmon resonance, SPR) 生物感測器，對於 SPR 的原理、應用以及未來發展作簡要的介紹。

張端芳、林啟萬

## 一、前言

生物感測技術 (biosensing technology) 是泛指對於生物樣本 (biological sample) 中的微量化學、生物分子 (如蛋白質、荷爾蒙) 濃度或分子間的反應進行檢測分析<sup>(1)</sup>。而感測技術發展的重點，便是生物感測器 (biosensor) 的開發以及研究。生物感測器的結構主要含有分析介面，介面上通常固定著特殊的生物分子受體 (receptor)，用來感測所要偵測的目標物分子，以及將感測結果轉換成其他訊號的換能系統 (transducing microsystem)。依換能系統的形式，生物感測器可以分成電化學、光學、磁學以及壓電式 (piezoelectric) 生物感測器。<sup>(2,3)</sup> 生物感測器可以廣泛應用於生物科技、醫學、環境生態等領域。光學生物感測器因為具有高敏感度、快速檢測的優點，近年來被積極採用於生物感測的研究中。

張端芳小姐目前就讀於國立臺灣大學醫學工程研究所碩士班。

林啟萬先生為美國凱斯西儲大學醫學工程博士，現任國立臺灣大學醫學工程研究所副教授。

表面電漿子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 生物感測器屬於光學感測的一種，自 1970 年開始便廣泛應用於檢測微量氣體或是生物分子的微感測器中<sup>(4)</sup>。SPR 具有無需對待測物作螢光標定，以及能夠達到即時偵測生物反應的優點，對於研究生物分子間的反應機構<sup>(5)</sup> 有相當大的幫助。

## 二、SPR 光學感測原理

表面電漿子共振 (SPR) 是屬於一種出現在金屬薄膜表面的偏極化 (TM-mode) 電磁波，最早於 20 世紀初由 R. W. Wood 在研究金屬表面之繞射現象時所發現<sup>(6)</sup>。當光子能量為金屬薄膜表面之自由電子所吸收，則在金屬表面會形成一局部非發散性的電漿子 (nonradiated plasmon)。依據 Maxwell 電磁波方程式的理論，在金屬薄膜 (或金屬層) 與相鄰介電層之間若存在一平面電磁波，則電場強度可表示為：

$$E = E_0 \pm \exp[-i(K_x x \pm K_z z - \omega t)] \quad (1)$$

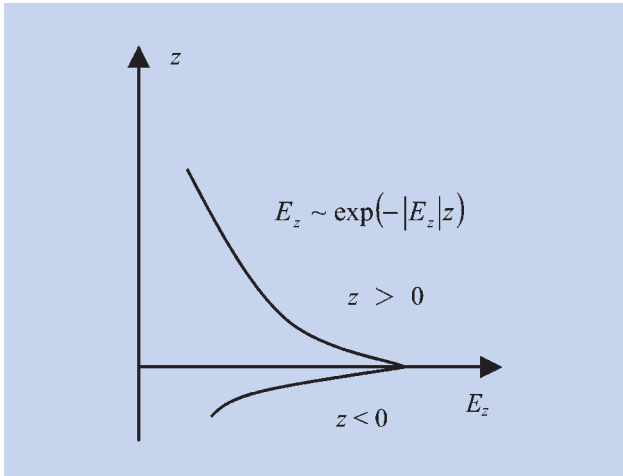


圖 1. 電場強度與距離關係圖。

其中  $z$  方向的波向量 (wave vector,  $K_z$ ) 為虛數，使得電場強度會隨著距離增加而呈現指數衰減 (exponential decay)，電場強度在  $z = 0$  時有最大值<sup>(7)</sup>。(圖 1)

在與金屬平面平行的  $x$  方向，其波向量 (wave vector,  $K_x$ ) 可以由色散關係 (dispersion relation) 求得：

$$K_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon' \epsilon}{\epsilon' + \epsilon}} \quad (2)$$

$\epsilon'$ 、 $\epsilon$  分別代表金屬層以及與金屬層相鄰之介電層的介電常數 (dielectric constant)，且必須滿足  $\epsilon' < 0$  以及  $|\epsilon'| > \epsilon$ ，才能夠滿足形成表面電磁波特徵頻率 (eigen frequency) 的條件。由光子與表面電漿子的色散關係圖可以發現，在同樣的頻率中，電漿子比光子具有較大的波向量 (wave vector)，因此電漿子無法由光線直接入射到金屬薄膜表面而形成。通常使用高折射係數的石英或玻璃等材料作為耦合介質，使入射光先通過耦合介質層之後才入射到金屬薄膜。藉由此方法改變光子動量以符合形成表面電漿子的條件 (圖 2)。

1968 年，德國的 Kretschmann<sup>(8)</sup> 提出以光子激發表面電漿子的結構設計 (圖 3)，在稜鏡平面上方直接鍍上一層金屬薄膜，使得入射光在稜鏡內部產生全反射，入射光的動量在進入稜鏡介質後，由

$\hbar\omega/C$  增加為  $(\hbar\omega/C)\sqrt{\epsilon_1}$ ，其中  $\epsilon_1$  為稜鏡的折射係數且  $\epsilon_1 > 1$ 。在與稜鏡表面方向平行的水平動量 ( $K_x$ ) 可以表示為：

$$K_x = (\hbar\omega/C)\sqrt{\epsilon_1} \sin \theta \quad (3)$$

Kretschmann 的結構設計使得入射光子的動量能夠符合形成 SPR 的條件，光子的能量被金屬表面自由電子所吸收而形成表面電漿子共振。在 SPR 產生時，反射光的能量會呈現明顯的衰減，因此這種設計又稱為 ATR 方式 (attenuated total reflection method)。Kretschmann 的設計成為目前 SPR 感測器最常見的結構之一。除了 ATR 方式能夠形成 SPR 之外，還可以由表面繞射光柵 (grating) 結構設

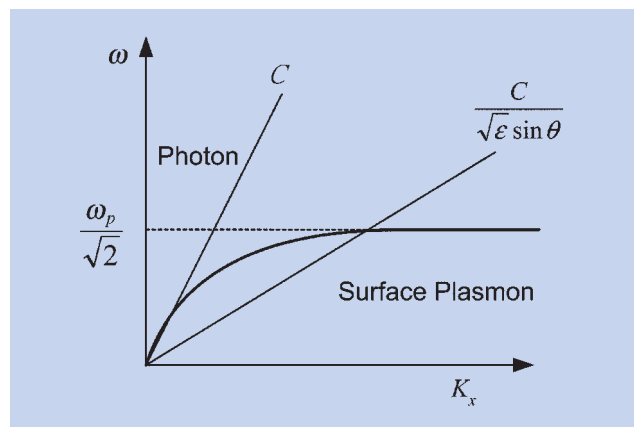


圖 2. 光子與表面電漿子的 dispersion relation 關係圖，其中表面電漿子的特徵頻率範圍在  $\omega = 0$  到  $\omega = \omega_p/\sqrt{2}$ ， $\sqrt{\epsilon}$  為耦合介質之折射係數， $\theta$  為入射角度。

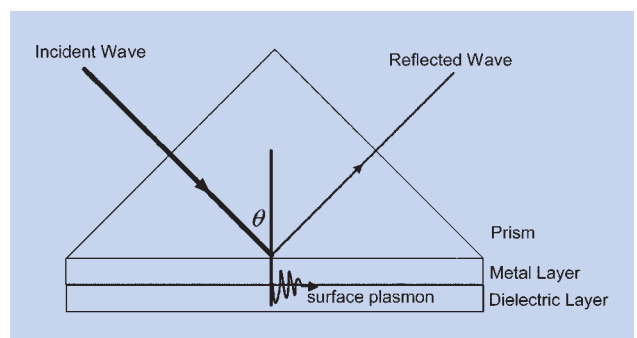


圖 3. Kretschmann 式 SPR 結構。

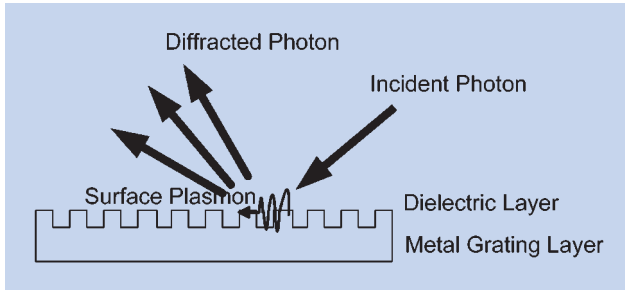


圖 4. SPR 由金屬繞射結構激發。

計(圖 4) 以及由光學波導(例如光纖元件) 材料來達成由光子激發出 SPR 的效果。

基本的 SPR 光學感測系統依測量方式主要可以分為入射角度分析、頻譜分析與相位分析三種。

### 1. 入射角度分析

改變入射角，並偵測反射光強度的變化，反射光強度最弱之入射角，又稱為共振角 (resonance angle)，即代表有 SPR 現象在金屬表面產生。一般

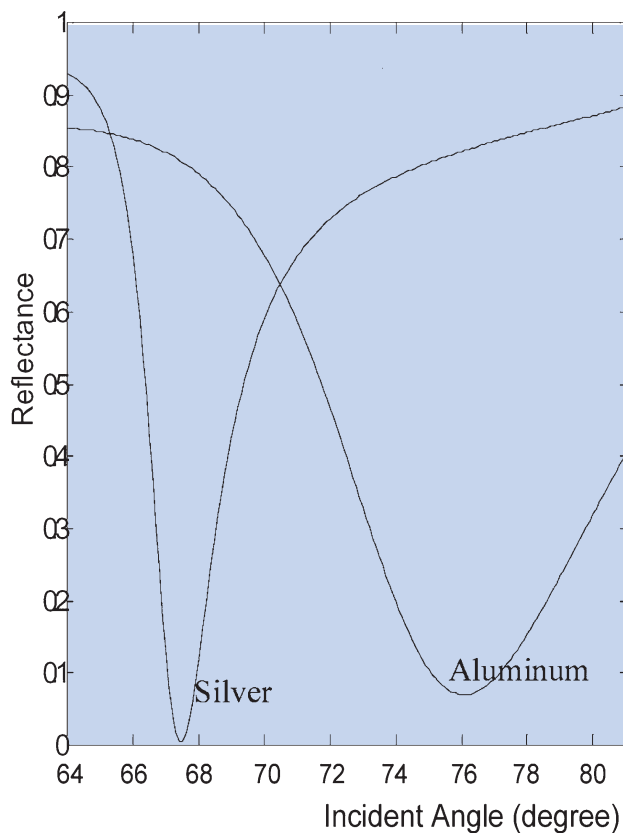


圖 5. 角度分析圖。

反射光強度變化多由 Fresnel equation 計算而求得的反射率 (reflectance) 來表示。當圖形中反射率改變的角度範圍越小即代表 SPR 效應越明顯，光子能量僅在形成表面電漿子時才會被吸收；反之當金屬層內部的金屬原子同時會吸收部分光子能量時，則 SPR 效應較為不明顯。金屬薄膜材料若選擇為銀 (silver) 的成分，並且採用可見光範圍的光源作為入射光時，在入射角度的分析圖形中可以得到非常明顯的 SPR 效應；若改採鋁 (aluminum) 作為薄膜材料，因為鋁原子內部吸收光子的遲滯現象 (internal damping effect) 較銀原子明顯，反射率的圖形變化曲線較平緩(圖 5)。

因此 SPR 也受金屬薄膜材料成分的影響，僅限於鋁、貴重金屬，如金、銀以及鹼金屬等元素所形成的金屬薄膜能夠產生 SPR 效應<sup>(9)</sup>。

### 2. 頻譜分析

固定入射角度在共振角的範圍，改變入射光波長，同時測量反射率變化，同理，當 SPR 形成時反射率的強度最低(圖 6)。當金屬層材質為金 (gold)

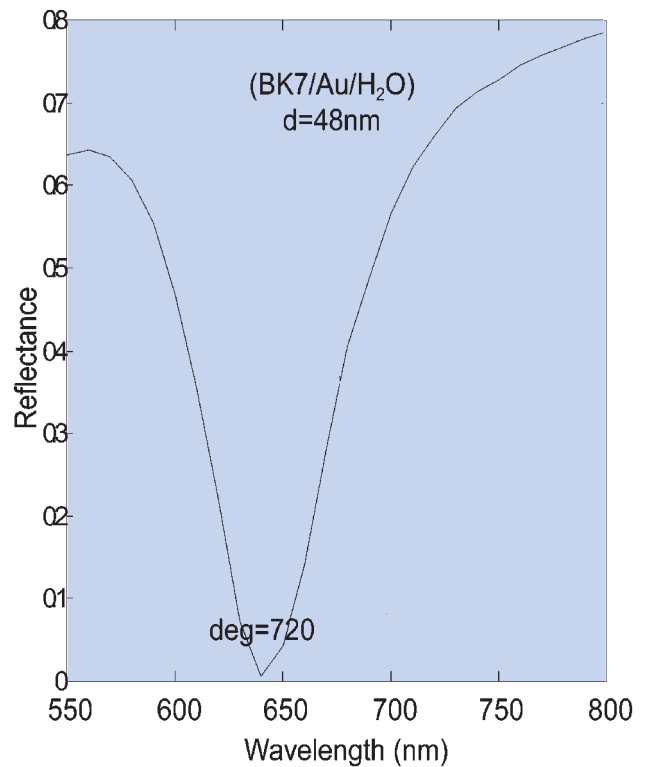


圖 6. 頻譜分析圖。

時，從頻譜分析圖可得知在近紅外光區 (near-infrared area) 範圍的 SPR 效應最顯著。

### 3. 相位分析

由 Mach-Zehnder 干涉技術原理來量測產生 SPR 效應後之雷射光的相位改變 (phase shift)，靈敏度較前兩種分析方式高出許多。相位分析最低可以偵測到  $4 \times 10^{-8}$  RIU (refractive index unit) 的變化<sup>(10)</sup>。

## 三、SPR 生物微感測系統之研發

整體來看，SPR 產生的條件受入射光波長、入射角度，以及金屬層材料和介電質層的折射係數所影響。SPR 生物微感測系統，主要便是藉由測量介電層的折射係數變化，來偵測生物分子間的反應。所謂的介電質層，便是指固定於金屬表面的生物反應層。以抗原抗體 (antigen-antibody) 反應作用為例，當固定於金屬表面的抗體與待測物中存在的抗原結合時，介電層的厚度與表面特性均會改變。折射係數微小的變化，會使得形成 SPR 的條件與未反應之前的情況有所差異，從測量的結果可以求得反應前後 SPR 形成的共振角度有偏移，或是波長範圍的變化 (圖 7)。而共振角度的變化，與完全反應後固定於金屬表面的生物分子濃度成正相關，SPR 生物感測器最小可以偵測到  $1 \text{ pg/mm}^2$  的濃度變化。

目前 BIAcore 公司以及德州儀器公司 (Texas

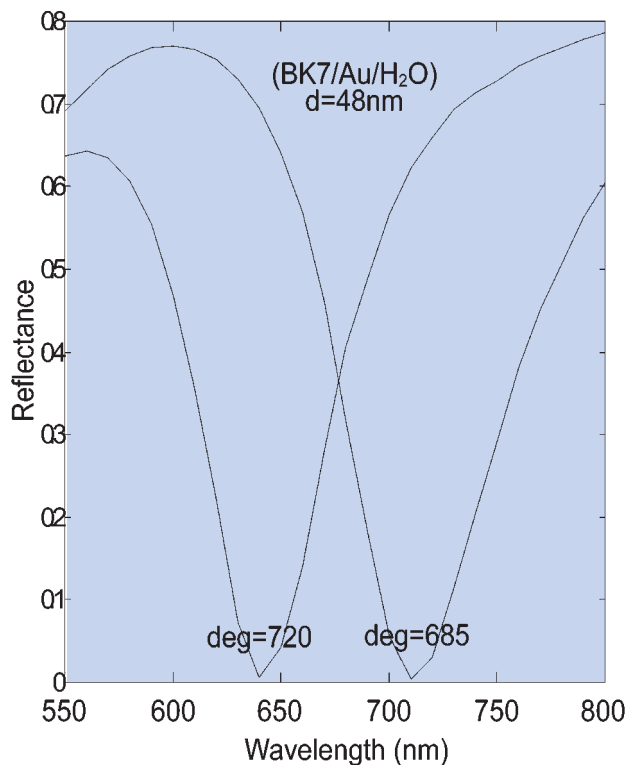
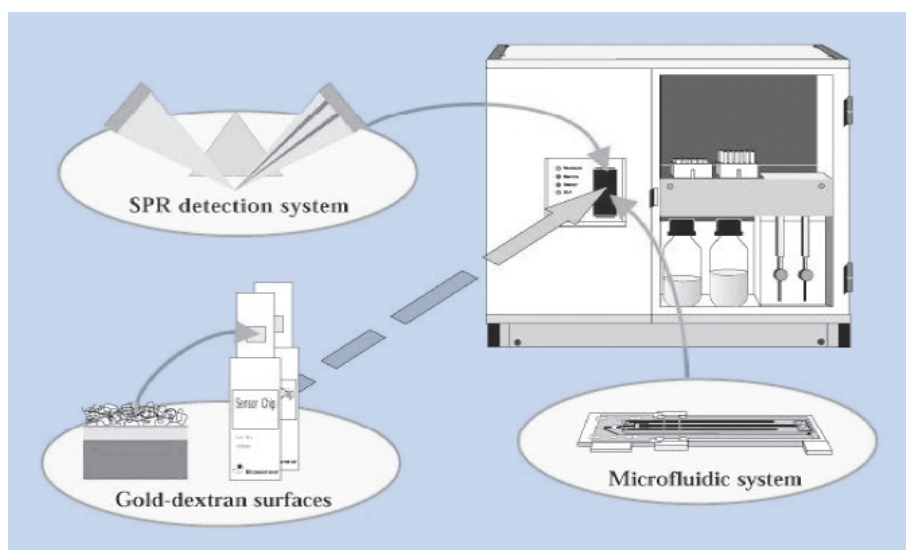


圖 7. 共振頻率偏移。

Instrument) 均有推出商業化的 SPR 生物感測系統 (圖 8)，其系統內部主要是將微流道系統與 SPR 生物感測結合，使得待測物溶液藉由微流道傳輸，再藉由 SPR 所偵測到的折射係數變化對於溶液中的分子反應進行即時偵測。瑞典的 BIAcore 公司<sup>(11)</sup> 並提出先將一種多醣體分子 (carboxymethyl dextran

圖 8. BIACORE<sup>®</sup> 2000 SPR 感測系統。



polymer) 預先固定於金屬表面，使得 ligand molecule 不用完全固定在金屬表面，而是填充在 dextran 的介質之中。如此增加了 ligand 本身在溶液中的空間自由度，以增加目標物分子與 ligand molecule 接觸的機會，並且提高反應效率。未來新一代 SPR 系統將會提高微流道的數量，例如從目前的四個微流道增加到十六個或甚至更多，以藉此增加感測系統的平行化檢測功能<sup>(12)</sup>。

### 1. 表面電漿子式顯微鏡

在使用影像分析進行奈米結構的檢測時，一般的光學顯微鏡常會受限於光學繞射 (the diffraction of light) 現象，而無法辨識比光波長更小的奈米結構。若使用紫外光區波長範圍的光源以提高解析度，紫外光會破壞生物樣本的結構，不適用於生物微結構的檢測。

另一種提高光學影像解析度的方法是使用近場光學影像 (near field imaging) 原理。所謂的近場光學是指由光波所形成的電磁場在與光波行進方向垂直的電場，其電場強度 ( $E$ ) 可以表示為下列方程式：

$$E = \exp[-j(K_x x + K_y y + K_z z - \omega t)] \quad (4)$$

在與  $x$  方向垂直的  $z$  方向中，若光子的波向量 (wave vector,  $K_z$ ) 為虛數時，則電場強度可以改為下列形式：

$$E = \exp[-j(K_x x + K_y y + \omega t)] \exp(-|K_z|z) \quad (5)$$

電場強度隨高度增加而衰減，此電場侷限在表面的固定範圍，因此又可以稱為漸逝場 (evanescent field)；而存在於近場光學中的光波則稱為漸逝波 (evanescent wave)。SPR 因為同樣屬於近場光學的效應，可以使用於近場光學影像中，增加影像的反差對比 (image contrast)，此種影像系統稱為表面電漿子式顯微鏡 (surface plasmon microscopy, SPM)。SPM 系統結構並無機械式的探針結構，而且在檢測過程中光學系統不會直接與樣本接觸，不會破壞表面結構。SPM 的側向解晰度 (lateral resolution) 可以達到五微米。SPM 常用於觀察 Langmuir-Blodgett

式薄膜 (Langmuir-Blodgett film) 的微結構影像中<sup>(13)</sup>。

### 2. SPR 影像系統

SPR 影像系統 (SPR imaging system, SPRI) 亦是屬於 SPR 生物感測系統的一種，其基本原理與表面電漿子式顯微鏡 (SPM) 相似。SPRI 使用 CCD 相機擷取來自 SPR 感測器的反射光強度訊號，當感測器表面的感測層並未完全覆蓋住下方金屬層，而是具有陣列般規則的設計時，則感測層與裸露的金屬層之間形成 SPR 的共振角不一致，因此形成 SPR 影像中的基本對比 (contrast) 強度差。在反應過程中，隨著感測層上的固定分子 (probe) 與生物樣本中的目標物分子 (target) 造成表面折射係數以及厚度改變，使得產生 SPR 共振角的條件改變。當使用 SPRI 作為生物感測方法時，可以直接從影像明暗變化而得知反應的進行，反射光變化率與表面折射係數變化率呈線性正相關，且由反射強度的變化，可以求得感測層的厚度變化<sup>(14,15)</sup>。

SPRI 的最大優點是在感測層的不同區域可以固定相異的 ligand molecule，並且可以在對於生物樣本坐在相同條件下做多種分析物的檢測。SPR 影像系統可以提供較大範圍的檢測面積，因此非常適用於發展成為平行式的篩檢系統。SPRI 可以作為研究 DNA 雜合反應 (hybridization) 的研究工具，將陣列式的 DNA 結構作為 SPR 感測器表面，再由 SPRI 後端影像分析來讀取反應結果<sup>(16)</sup>。

### 3. 光纖式 SPR 感測器系統

在 SPR 系統的研究中，如何將整個感測系統縮小化，也是非常重要的主題。其中使用波導材料—光纖元件作為 SPR 感測器的材料光纖式 SPR 感測器的原理，是在光纖元件表面的 cladding 層作局部的剝除，並附著一層金屬層作為生物感測區域，當偏極化光源導入光纖中且其波向量符合形成 SPR 的條件時，光子能量便會穿透光纖在金屬層表面形成電漿子的共振<sup>(17)</sup>。光纖式 SPR 感測器的結構設計可以大幅縮小感測系統的體積，除此之外，光纖元件本身便具有較高的機械延展性 (mechanical flexibility)，可以應用在不同的環境條件中，並且能夠發展成可攜式的小型生物感測系統。

光纖元件的製程加工，遠較於 Kretschmann 式 SPR 感測器的製程困難。如何在光纖表面鍍上均勻的金屬層，並且能夠在圓柱形的光纖表面金屬層固定 ligand molecule，都是發展光纖式 SPR 感測器所必須解決的問題。

#### 四、未來展望

SPR 生物感測器未來的發展，將朝向提高感測系統的靈敏度，並結合光學波導、積體光學以及微光機電技術 (optical MEMS)，開發出新的 SPR 感測器製程，以達到系統微小化的目標。

#### 參考文獻

1. G. Harsanyi, *Sensors in Biomedical Applications*, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc. (2000).
2. <http://www.elsevier.com/locate/bios>, Journal homepage of Biosensors and Bioelectronics.
3. J. N. Roe, *Pharm. Res.*, **9**, 835 (1992).
4. J. Homola *et al.*, *Sens. Actuators B*, **54**, 3 (1999).
5. G. Panayotou, G. Gish, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 523 (1993).
6. R. W. Wood, *Phil. Magm.*, **4**, 396 (1902).
7. H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Berlin: Springer-Verlag (1988).
8. E. Kretschmann and H. Raether, *Z. Naturforsch.*, **23a**, 2135 (1968).
9. A. D. Boardman, Ed., *Electromagnetic Surface Modes*, New York: John Wiley and Sons (1982).
10. A. V. Kabashin and P. I. Nikitin, *Quantum Elec.*, **27**, 653 (1997).
11. <http://www.biacore.com>
12. C. E. H. Berger, T. A. M. Baumer *et al.*, *Anal. Chem.*, **70**, 703 (1998).
13. W. Hickel, D. Kamp, and W. Knoll, *Nature*, **18**, 339 (1989).
14. W. B. Lin *et al.*, *Sens. Actuators B*, **74**, 207 (2001).
15. Steiner *et al.*, *J. Mol. Struct.*, **509**, 265 (1999).
16. B. P. Nelson *et al.*, *Anal. Chem.*, **71**, 3928 (1999).
17. R. C. Jorgenson and S. S. Yee, *Sens. Actuators B*, **12**, 213 (1993).