

# 奈米電漿子感測技術於生物分子之功能分析

## Nanoplasmonic Sensing for Biomolecular Function Analysis

簡汎清、邱國智、林俊佑、易政男、陳顯禎

Fan-Ching Chien, Kuo-Chih Chiu, Chun-Yu Lin, Jenq-Nan Yih, Shean-Jen Chen

表面電漿子共振生物感測技術對偵測表面環境變化具有高靈敏度且不需外加任何標記等優勢，已廣泛應用於生物分子交互作用分析上。然而傳統表面電漿子共振生物感測技術仍難以直接偵測極微小分子量或極低濃度下分子間交互作用，且表面電漿子共振可提供生物分子交互作用分析之動力學資訊，但完整的生物分子辨識系統更應具有偵測構形與結構改變之能力。本研究藉由嶄新的奈米電漿子技術來解決上述三個關鍵問題。首先，利用圖樣化金奈米粒子來操控粒子電漿子或稱局域表面電漿子以提升感測器之靈敏度約十倍；再者，研發出耦合波導表面電漿子共振生物感測器，可直接即時地監測蛋白分子構形變化；最後，結合衰減全反射之表面強化拉曼散射以提供生物分子結構資訊。利用這些奈米電漿子技術，可協助快速診斷、藥物研發與蛋白質體學等研究建立一個嶄新的生物分子功能分析平台。

Surface plasmon resonance (SPR) biosensing has become a standard practice in the investigation of biomolecular interaction analysis (BIA), because it is highly sensitive to the resonance condition on the sensing surface caused by environmental changes and do not require any extrinsic labeling. However, the detection limit of the conventional SPR biosensors is insufficient for the monitoring of low concentrations of small biomolecular analytes. In addition, the conventional SPR biosensor only can provide kinetic analysis information in the BIA. A more powerful biorecognition system is required not only to provide the kinetic analysis, but also to have the capability of monitoring biomolecular conformational and structural changes or trends. Therefore, in this study, nanoplasmonic technology was used to overcome three above challenges. First, patternized gold nanoparticle-enhanced plasmonic effects are utilized to manipulate particle plasmons or localized surface plasmons and enhance the biosensor sensitivity. The sensitivity of plasmonic biosensors was enhanced about 10-fold by controlling the size and volume fraction of the embedded Au nanoclusters in dielectric films. Furthermore, a coupled waveguide-surface plasmon resonance biosensor not only retains the same sensing sensitivity as that of a conventional SPR device, but also has the capability of monitoring biomolecular conformational change. Finally, with helps of attenuated total reflection surface-enhanced Raman scattering to detect the structural change of biomolecules, an advanced biomolecular recognition system with the three plasmonic techniques can provide more information in a variety of BIA. Therefore, the nanoplasmonic sensing will be a novel biosensing platform for biomolecular function analysis in fast diagnostics, drug discovery, and proteomics.

## 一、前言

利用標記螢光或放射性分子分析的光學偵測方式雖可快速、精確、低成本且可於混雜樣本中偵測出目標物<sup>(1,2)</sup>，然而螢光系統中牽涉到繁瑣的螢光標記、部分分子標記的困難度、不可避免的螢光衰退及難以即時提供生物分子交互作用分析 (biomolecular interaction analysis, BIA) 之動力學 (kinetics) 資訊，亦可能影響樣本原本特性而導致錯誤等，故無標記 (label-free) 的檢測方法有其存在的意義與價值。各式無標記的光學偵測法中，以激發金屬與介電質界面之表面電漿子 (surface plasmons, SPs) 的表面電漿子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 感測技術具有快速、即時、靈敏度高、動力學分析、不需事先標定生物分子、定性和定量生物分子交互作用以及大量平行篩檢等優點，為極具潛力及競爭性的關鍵技術<sup>(3,4)</sup>。SPR 感測器利用發生在介電質與金屬界面間的表面自由電子同調性震盪之 SPs 來探測在金屬表面上之感測物的折射率及厚度微小變異量，被測量的 SPR 信號變異量便可提供發生在此界面之生物分子交互作用的情形，以 Kretschmann 組態之衰減全反射 (attenuated total reflection, ATR) 方法的 SPR 生物感測器在鄰近界面範圍內有非常高的靈敏度，其偵測極限可到達  $1 \text{ pg/mm}^2$  的生物分子表面覆蓋率。

隨著奈米科技進展，多樣性特殊形狀之金屬奈米粒子 (nanoparticle) 和奈米結構 (nanostructure) 等材料可精確地被製作並操控於次波長 (subwavelength) 到奈米尺度內。在奈米尺度效應下，材料的物理和化學特性皆不同於塊體介質，在適當的電磁波激發條件下，可於其局域的粒子或尖端表面激發 SPs 現象，即粒子電漿子 (particle plasmons, PPs) 或稱局域表面電漿電磁偶極子 (localized surface plasmon-polaritons)，其強烈放大表面局域的近場電磁場<sup>(5-7)</sup>。藉由操控此奈米電漿子效應 (nanoplasmons) 已在許多光電研究方面得到重要成果，如光學資料儲存、光電元件及生醫光電等等<sup>(8-11)</sup>，亦在發展奈米光子學 (nano-photonics) 或近場光學 (near-field optics) 中扮演重要的角色。近年來的超穎材料 (metamaterials) 於異常光學穿透

(extraordinary optical transmission)<sup>(12)</sup>、次波長成像 (subwavelength imaging)<sup>(13)</sup> 和電漿子晶體 (plasmonic crystal)<sup>(14)</sup> 等研究成果更為光學研究帶來嶄新的視野。因此，本文主要探討利用 SPs 與 PPs 效應不僅可提升 SPR 生物感測器之靈敏度 (奈米粒子強化之電漿子生物感測器)，並可即時提供感測器表面之單一生物分子層的構形改變 (耦合波導表面電漿子共振生物感測器) 與結構變化 (表面強化拉曼散射) 分析。

目前，不論利用何種組態耦合或量測方式下之 SPR 生物感測器，其偵測極限都難以偵測到人體內生理濃度之生物分子交互作用或小生物分子於低濃度下作用情形。因此，藉由奈米電漿子效應來突破目前  $1 \text{ pg/mm}^2$  的生物分子表面覆蓋度之偵測極限，進而達到  $100 \text{ fg/mm}^2$  或是更低至生理濃度等級的境界。研究中藉由操控 SPs、PPs、奈米粒子間耦合及金屬層與奈米粒子間耦合之四種電漿子效應，並利用簡化的等效膜層理論來描述奈米粒子層之特性，再經由 Fresnel 方程式模擬在此結構下的電漿子共振情形，來了解這四種電漿子的特性，有助於設計出具更高靈敏度之生物感測器。

另外，傳統 SPR 生物感測器由於在入射衰逝波的相速度與 SPs 的相速度需相等的限制前提下<sup>(15)</sup>，SPs 僅可被橫磁 (transverse magnetic, TM) 模態的入射光波所激發。單一 TM 模態的傳統 SPR 生物感測器會隨著感測器表面的生物分子層折射率及膜厚變化量改變其訊號，但若想單次從傳統 SPR 生物感測器實驗數據中藉由 Lorentzian 近似的方法分別求取隱含於生物分子層構形 (conformation) 改變 (如折射係數與厚度變化) 之訊息是不可行的。因此，以兩側披覆金屬薄膜之厚介電質平板結構的耦合波導表面電漿子共振 (coupled waveguide-surface plasmon resonance, CWSPR) 生物感測器，可在單一 TM 模態入射光波下，同時耦合介電質層的波導模態 (waveguide mode) 及激發於下金屬層下方與緩衝液界面 SPs 模態，可設計控制反射光強譜線中產生二個銳利的共振吸收譜線，利用此二譜線可即時準確地測定出感測器表面之奈米生物分子膜層的折射率與厚度<sup>(16,17)</sup>，提供初步之生物分子層構形改變情形。CWSPR 不僅具有可與傳統 SPR 生物

感測器相比的偵測靈敏度<sup>(18,19)</sup>，而且在反射光強譜線也具有較為銳利的譜線，可有效提升量測精度。

藉由金屬奈米粒子 PPs 效應強化之表面強化拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 技術具有探測單一分子結構變化的能力。拉曼散射光譜與分子振動頻率間之關係相當密切，在不同頻率下的光強變化可代表分子的某些結構轉變，然而由於生物分子之拉曼訊號相當微弱，可設計藉由 ATR 方式來激發生物感測器表面金屬膜之 SPs 與金屬奈米粒子之 PPs，放大其鄰近局域電磁場，使其所輻射的散射電磁場受電漿子的強化而增強，用以檢測感測器表面上單一生物分子層結構改變的訊號<sup>(20)</sup>。

因此，結合嶄新 SPR 及 SERS 生物感測技術將可即時靈敏地提供單一生物分子層交互作用時，其動力學、構形與結構改變等之重要功能分析資訊，在快速診斷、藥物研發與蛋白質體學 (proteomics) 等研究上將有所助益，提供一嶄新之光學生物分子辨識平台。

## 二、電漿子效應

電漿子所形成的局域性近場強化效應依其激發型態可分為 SPs 及 PPs，透過單一界面之電磁場理論分析其近場特性，進而推展至多層界面的 Fresnel 方程式及色散關係式 (dispersion relation)。再者，藉由分析 PPs 激發以及特定奈米金屬粒子界面、奈米粒子間的電磁強化效應以瞭解 PPs 特性。根據此兩電漿子效應分析將可作為奈米電漿子生物感測技術設計分析的理論基礎。

### 1. 表面電漿子

當電磁波於介質內傳播時，其物理特性會受到電磁波及介質的交互作用影響而改變其特性，表面電漿子便為電磁波與介質系統耦合作用造成於金屬 (介質 1,  $\epsilon_1$ ) 與介電質 (介質 2,  $\epsilon_2$ ) 界面的金屬之自由電子產生電荷密度的同調擾動，其縱向模態振盪頻率主要是由色散關係  $\omega(k_x)$  的水平波向量  $k_x$  所影響，而且此金屬界面上自由電荷局域於垂直界面  $z$  方向上 Thomas-Fermi 屏蔽長度內的振盪幅度約為

1 Å，並且同時存在縱向模態與橫向模態的電磁場。然而此典型表面波之振盪在  $z = 0$  時有最大值，而消逝於  $|z| \rightarrow \infty$  處，即可解釋其對介質表面特性有非常高的靈敏度。

當共振條件達成時，可得 TM 模態共振條件為

$$\frac{k_{z1}}{\epsilon_1} + \frac{k_{z2}}{\epsilon_2} = 0 \quad (1)$$

由於  $k_{z1}$ 、 $k_{z2}$  均大於零，故當其中一種介質的介電常數小於零時，共振條件便有機會被滿足，將會於此界面處產生共振的現象。由式 (1) 及  $k_i^2 = k_x^2 + k_z^2$ 、 $k_i = (\omega/c)^2 \epsilon_i$ ， $i = 1, 2$  且  $k_x = k_{x1} = k_{x2}$ ，可得 SPs 於兩半無窮空間色散關係：

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2} \quad (2)$$

因金屬介電常數為複數， $\epsilon_1 = \epsilon_1' + i\epsilon_1''$ ，且  $\epsilon_2$  為實數，若  $\epsilon_1'' \ll |\epsilon_1'|$ ，則其  $k_x = k_x' + ik_x''$ ，其中

$$k_x' = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\epsilon_1' \epsilon_2}{\epsilon_1' + \epsilon_2} \right)^{1/2} \quad (3)$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\epsilon_1' \epsilon_2}{\epsilon_1' + \epsilon_2} \right)^{3/2} \frac{\epsilon_1''}{2(\epsilon_1')^2} \quad (4)$$

其實部部分表示電磁場在空間中的傳遞，然而若要形成 SPs，則此項需為實數。因此  $\epsilon_1' < 0$ 、 $\epsilon_2 < -\epsilon_1'$  為存在 SPs 現象之必要條件。虛部部分則表示電磁場在介質間的阻尼效應。

入射光可以稜鏡或光柵耦合增加入射光之波向量，以稜鏡耦合而言，當光先進入一介電質稜鏡 (介質 0,  $\epsilon_0$ )，其介電常數  $\epsilon_0 > \epsilon_2$ ，其入射光在其表面的水平波向量為

$$k_x' = \sqrt{\epsilon_0} \frac{\omega}{c} \sin \theta \quad (5)$$

其中  $\theta$  為入射角，此時若  $\theta$  大於臨界角，則能激發 SPs，並且同時將局域性界面上的近場電場強化。



SPs 在  $z$  方向之波向量  $k_z$  為虛數，在垂直界面上，使得 SPs 電磁場的振幅呈現  $\exp(|k_z||z|)$  衰減，且其膚深 (skin depth) 可表示為  $\hat{z} = 1/|k_z|$ ，假設波長為 630 nm，金和空氣介質之界面的深度距離分別為 29 nm、313.9 nm，而銀和空氣介質之界面的深度距離則分別為 23.2 nm、408.5 nm。同樣地，在  $x$  方向上 SPs 強度沿著水平表面呈現  $\exp(-2k_x''x)$  衰減且傳遞距離為  $L_i = (2k_x'')^{-1}$ 。

另外，光波與粗糙金屬表面交互作用時使得其波向量增加，將可激發於金屬界面之 SPs，其中又以利用金屬層表面的繞射光柵來激發 SPs 為常見的架構<sup>(15)</sup>。當 TM 模態光波入射到一週期起伏表面的繞射光柵時，光波將被繞射於不同的繞射角度，而第  $m$  階繞射光的波向量於水平界面分量  $k_{xm}'$  為

$$k_{xm}' = k_x' + mG = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_2} \sin \theta + m \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (6)$$

其中  $k_x'$  為入射光波向量沿光柵表面的分量， $m$  為繞射光階數， $G$  為光柵之波數， $\Lambda$  為光柵週期。若繞射光的波向量於水平界面分量與 SPs 之波向量  $k_x'$  匹配時，即為

$$k_{xm}' = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_2} \sin \theta + m \frac{2\pi}{\Lambda} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1' \epsilon_2}{\epsilon_1' + \epsilon_2}} = k_x' \quad (7)$$

此即為光柵耦合之共振條件，藉由不同階數的繞射光來改變入射光的波向量以達成共振條件。而繞射光柵之金屬層界面激發 SPs 造成界面的近場強化，且根據能量守恆其電場強化因子 (enhancement factor) 為<sup>(15)</sup>

$$T = \left| \frac{E}{E_0} \right|^2 = \frac{2|\epsilon_1'|^2 \cos \theta \cdot (1 - R_g)}{\epsilon_1''(|\epsilon_1'| - 1)^{1/2}} \quad (8)$$

其中  $R_g$  為反射率， $E_0$  為入射光電場， $\theta$  可由式 (7) 計算出，而且電場強化因子最大值發生於最佳耦合情況，即  $R_g = 0$  時。

繞射光柵之電磁場分布可以利用向量繞射理論

求解，向量繞射理論是以嚴格耦合波分析 (rigorous coupled wave analysis)，將一均質平面波入射到一週期性光柵結構，其內部的電磁場可以用各個空間頻率的平面波疊加表示之，再經由 Maxwell 方程式及界面上邊界條件限制下來求解出其電磁場分布情形，在求解過程中並無做任何省略以得到電磁場的完整解，進而計算出各階反射及穿透光的繞射效率。

## 2. 粒子電漿子

SPs 不只能夠在平滑表面上被激發，在一曲面仍然能夠被激發，諸如球體表面或圓柱表面，這種在局部區域上所產生的 SPs 即為 PPs。由上述可知於平面激發 SPs，兩介質之介電常數需滿足  $\epsilon_1'(\omega) = -\epsilon_2$ ，其中  $\epsilon_1'(\omega)$  為金屬介電常數之實部， $\epsilon_2$  為周圍環境之介電常數， $\omega$  為入射光之頻率，所以 SPs 僅存在單一特徵模態。不同於 SPs，PPs 可存在無限多的表面模態，如一粒徑遠小於入射光波長之金屬球體粒子，可以近似為準靜止 (quasi-static) 之電偶極振盪子而得其共振條件為<sup>(15)</sup>

$$\epsilon_1(\omega_l) = -\epsilon_2 \left( \frac{l+1}{l} \right) \quad l=1,2,3... \quad (9)$$

其中  $\epsilon_1(\omega)$  為金屬球體粒子之介電常數， $\epsilon_2$  為嵌入此金屬球體粒子之介電質的介電常數。對於第  $l$  階的表面模態之極化會隨與球體表面距離的增加呈現  $r^{l-1}$  的關係而降低，其中  $l=1$  為均勻模態或稱 Frohlich 模態，對於整個球體其振幅為定值，且使得  $\epsilon_1(\omega_f) = -2\epsilon_2$ ，並決定此金屬奈米球體粒子之吸收光譜特性，且  $\omega_f$  為共振吸收頻率並低於其餘模態 ( $l=2,3,...$ ) 頻率。而當  $l \rightarrow \infty$ ，即愈高階模態，則其模態愈侷限於球體表面並使得  $\epsilon_1(\omega_{sp}) = -\epsilon_2$ ，且其頻率將收斂於  $\omega_{sp}$ ， $\omega_{sp}$  為 SPs 的頻率。

當光源與奈米粒子交互作用時，其光學特性會受到粒子尺寸、粒子形狀、粒子和粒子間耦合 (interparticle coupling) 作用以及粒子和基材間 (gap mode) 作用影響，達到不同之近場電磁場之強化效應<sup>(21,22)</sup>。

### (1) 粒子尺寸效應

當一半徑  $a$  之金屬球體粒子被一均勻分布之電磁波照射時，假設電磁波的電場為  $E_0$  且粒子半徑遠小於入射電磁波之波長，此時，金屬球體粒子表面之電極化率 (polarization) 可表示為<sup>(15)</sup>

$$P(\omega) = \frac{3}{4\pi} \frac{\epsilon_1(\omega) - \epsilon_2}{\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_2} E_0 \quad (10)$$

在真空中 ( $\epsilon_2 = 1$ )，金屬球體粒子表面之電場為

$$E(a) = 2 \frac{\epsilon_1(\omega) - 1}{\epsilon_1(\omega) + 2} E_0 + E_0 = \frac{3\epsilon_1(\omega)}{\epsilon_1(\omega) + 2} E_0 \quad (11)$$

當其達成單偶極 ( $l = 1$ ) 共振條件時，即  $\epsilon_1' = -2$ ，可使其電場達到最大並表示電場強化因子為

$$T = \left| \frac{E(a)}{E_0} \right|^2 = \left| \frac{3\epsilon_1}{\epsilon_1 + 2} \right|^2 = \left| \frac{3\epsilon_1'}{\epsilon_1''} \right|^2 \quad (12)$$

### (2) 粒子形狀效應

不同粒子形狀效應，若是常見的形狀，如橢球、球殼、圓柱、立方體等金屬粒子，可經由修正的以米氏理論 (Mie theory) 描述其光譜特性，不過對於更複雜形狀之粒子甚至於特殊的奈米結構，則多利用數值計算方式求解馬克斯威爾方程式以瞭解其特性<sup>(23-26)</sup>。考慮金屬粒子的形狀為橢球體時，其長軸為  $a$ 、短軸為  $b$ ，同樣當以一電場為  $E_0$  之電磁波入射且電場方向平行長軸時，若粒子之長短軸尺寸遠小於入射電磁場之波長，則可得到金屬橢球體粒子電場之長軸尖端的強化因子為<sup>(15)</sup>

$$T = \left| \frac{E_{tip}}{E_0} \right|^2 = \left| \frac{\epsilon_1'}{\epsilon_1'' A} \right|^2 \quad (13)$$

其中  $A$  為去極化因子。當粒子形狀為球體時，則  $A = 1/3$ ；當為橢球體且長軸短軸比  $b/a = 1/3$ ，則  $A = 0.1087$ 。而當考慮粒子尺寸效應時，原本實數的去極化因子  $A$  將以複數  $A + i(4\pi^2/3)(V/\lambda^3) = A + iR$  表示， $V$  為橢球粒子的體積。當共振條件達成時，金

屬橢球體粒子電場之長軸尖端強化因子修正為

$$T = \left| \frac{E_{tip}}{E_0} \right|^2 = \left| \frac{\epsilon_1'/\epsilon_2}{i(\epsilon_1''/\epsilon_2)A + R\epsilon_1''\sqrt{\epsilon_2} + iR(1 - \epsilon_1')\sqrt{\epsilon_2}} \right|^2 \quad (14)$$

粒子形狀效應很明顯的影響強化效應的大小，相較於球體粒子，其粒徑皆遠小於波長，橢球體粒子尖端具有更大幅度的強化量，所以具有特殊尖端部分的粒子或奈米結構將可經由激發 PPs 而得到大幅的近場強化。另外粒子尺寸效應也是影響強化的重要因素，當粒子遠小於入射波長時，可達到最大強化量。

### (3) 粒子和粒子間耦合作用

粒子和粒子間耦合作用也影響其光譜特性，例如二橢球金粒子間距減小時，其電漿子耦合效應會使得其共振波長增加，即紅移 (red shift) 現象，並且呈現指數關係，而當其間距大於短軸的 2.5 倍時，則回到原來單一粒子特性<sup>(27)</sup>。經由時域有限差分法 (finite-difference time-domain method) 模擬二半徑為 40 nm 的銀奈米圓柱以波長為 480 nm 電磁波入射且電場平行作用於粒子軸方向，於不同間距下所造成的電場分布，其於粒子之間有最大的電場強化，而隨著間距增加使得強化量大幅降低<sup>(28)</sup>。因此，藉由這些 PPs 強化效應所增強的電場強度較 SPs 所產生的效果可大上數百倍以上。

### (4) 粒子和基材間作用

當粒子與基材間距小於粒子之半徑時，粒子和基材間的電磁場會隨之強化，且金屬基材也較介電質基材強化幅度為大<sup>(29)</sup>。

## 三、奈米粒子強化之電漿子生物感測器

藉由同時激發金屬奈米粒子之 PPs 及金屬膜層之 SPs 並耦合二種電漿子效應，可大幅強化生物感測器的界面電磁場。透過瞭解電漿子耦合機制，並

以等效膜層理論搭配 Fresnel 方程式以設計分析此電漿子生物感測器，進而降低傳統 SPR 生物感測器約  $1 \text{ pg/mm}^2$  生物分子表面覆蓋度的偵測極限。研究中分別以混合濺鍍方式完成此感測器的金奈米粒子層製作，並由純氮氣、純氫氣 (99.99%) 檢測實驗<sup>(30)</sup>，證實可將檢測極限降低至  $100 \text{ fg/mm}^2$ 。利用蛋白酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 受器偵測極低分子量的抑制分子 Tyrphostin 23 實驗，驗證此電漿子生物感測器可直接偵測極微小分子的能力<sup>(31)</sup>。

## 1. 設計與製作

奈米粒子強化之電漿子生物感測器是利用稜鏡耦合之 ATR 方式，且膜層結構主要為金屬薄膜、金或銀奈米粒子層，以及生物分子層，如圖 1，並且依序使膜層直接沉積於玻璃基材上，以達最佳化的設計。利用上述之感測器膜層結構，並依據角度探測的反射光強譜線，將可使生物感測器獲得高靈敏度。其主要因為沉積於傳統 SPR 生物感測器之金屬層表面的奈米金粒子與介電材料所構成之奈米複合 (nanocomposite) 膜層，除了原有藉由衰逝波來激發於金屬膜界面的 SPs 之外，亦激發 PPs、奈米粒子間耦合效應及奈米粒子與膜層間效應等電漿子效應。奈米粒子強化之電漿子生物感測器經由耦合此四種不同的電漿子效應以大幅度的強化局域界面電場分布，將可較傳統 SPR 生物感測器提升靈敏度，所以如何調整金奈米粒子層產生最大的界面電場強化，將是此生物感測器設計的重要課題。考慮單一奈米粒子大小所造成的影響，粒子越大所造成

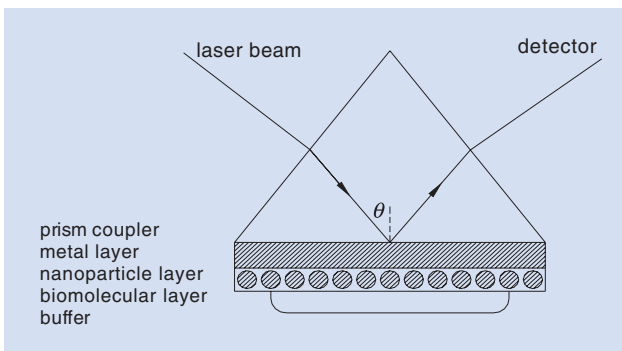


圖 1. 奈米粒子強化電漿子生物感測器。

的電場也越大，不過強化幅度不大。在多奈米粒子的影響下，奈米粒子越靠近，造成的電場也是增加的。而介電層厚度在一適當厚度下，電場是會增加的。總結上面三種效應，在設計奈米粒子強化之電漿子生物感測器時，首先要考慮的因素是粒子間的距離，再來是選擇適當的介電層厚度，最後才考慮粒子大小的影響<sup>(32)</sup>。

由於入射激發光之波長遠大於金屬奈米粒子之半徑，金屬奈米粒子複合材料可依照等效折射率理論視為均質材料。其中 Maxwell-Garnett 組態理論對於因金屬奈米粒子嵌入基材中造成介電常數變化使具有不同吸收光譜有相當之研究，因此根據此組態理論，對於在介電層薄膜或緩衝液層中嵌入金屬奈米粒子將可提供相當精準的介電常數值，故透過金或銀奈米粒子的介電常數和 Fresnel 方程式以便分析其反射光光譜。首先假設金屬奈米粒子和介電質材料皆均勻分布於其層中，則其等效介電常數 ( $\epsilon_e$ ) 表示為<sup>(33)</sup>

$$\epsilon_e = \epsilon_d \frac{\epsilon_p(1+2\phi_p) + 2\epsilon_d(1-\phi_p)}{\epsilon_p(1-\phi_p) + \epsilon_d(2+\phi_p)} \quad (15)$$

其中  $\phi_p$  為金屬奈米粒子層中所添加之金屬粒子體積濃度分率， $\epsilon_e$  為金屬奈米粒子層之等效介電常數、 $\epsilon_d$  為介電質材料的介電常數、 $\epsilon_p$  為添加在金屬奈米粒子層中金屬粒子之介電常數。隨著感測器上不同金屬奈米粒子膜層的介電常數及厚度變化，並根據經由 Fresnel 方程式所計算的反射光曲線之寬度及最小反射光強度，將可得到對於生物感測器的設計條件。

至於奈米粒子強化之電漿子生物感測器的製作程序，首先利用平面磁控濺鍍系統，將已經清洗過的 SF11 玻璃基材依序鍍上金膜 (40 nm) 與金奈米粒子層 (10 nm) 後，即完成生物感測器製作。在濺鍍完成後，同時以穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 觀測其金奈米粒子層的體積濃度分率和粒徑大小，以得知奈米粒子層性質及規格要求，如圖 2。最後，利用 ATR 生醫感測儀<sup>(34)</sup> 分別量測上述製作之生物感測器之入射角度對於反射光強之分布情形是否符合需求，而由實際



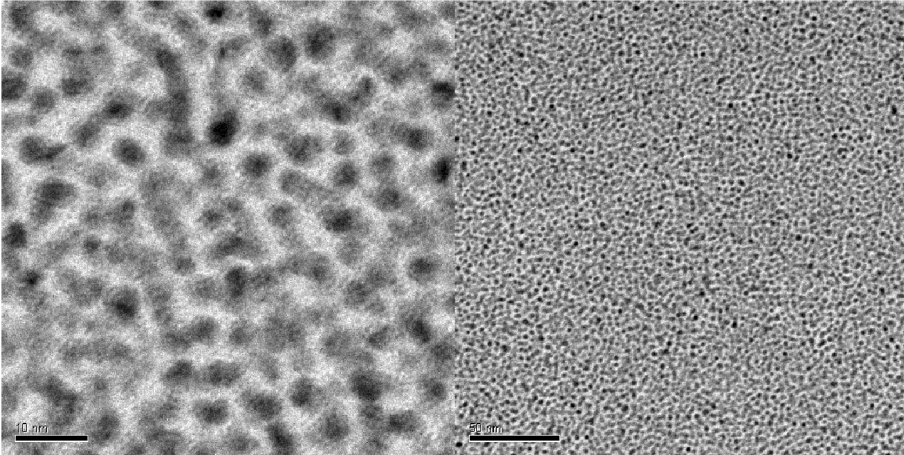


圖 2.  
以物理沉積方式調控金奈米粒子層之 TEM 影像。粒徑約為 4.2 nm，濺鍍功率為 Au：25 W，SiO<sub>2</sub>：200 W。

量測數據亦驗證了以等效膜層理論模擬此電漿子強化效應使得反射光強譜線半高寬增寬的特性。

## 2. 直接監測微小生物分子交互作用

在共振角度探測方式下，傳統 SPR 生物感測器之偵測極限於偵測待測分子的分子量約為 200 Da，然而對於藥物的研發，其作用分子大多是分子量小於 200 Da 的分子。因此，透過奈米粒子強化之電漿子生物感測器降低感測器的偵測極限，將可能直接監測如此微小生物分子的交互作用。藉由以固定於奈米粒子強化之電漿子生物感測器表面的 PTK 受器 (分子量為 170 kDa) 為分子探針來偵測其抑制分子 Tyrphostin 23 (分子量為 186.1 Da)，證實此電漿子生物感測器具直接偵測極低分子量分子交互作用的能力。

分別已固定上 PTK 受器的傳統 SPR 生物感測器之金膜表面及奈米粒子強化之電漿子生物感測器的奈米複合表面，可用來動態研究其抑制反應。進行抑制反應時，先將 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液 (300 mM sodium chloride、1 mM EDTA 與 100 mM urea，pH 7.4) 通入分別安置好傳統 SPR 生物感測器及奈米粒子強化之電漿子生物感測器的反應流室，並且設定流速為 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ 且流室溫度為 30  $^{\circ}\text{C}$ ，待其量測系統訊號穩定後，通入具有 100  $\mu\text{M}$  抑制分子 Tyrphostin 23 ( $\text{IC}_{50} = 35 \mu\text{M}$ ) 的磷酸鹽緩衝溶液，當抑制反應到達飽和後，通入原先磷酸鹽緩衝溶液，以沖洗掉感測表面非專一性鍵結的分

子，以完成抑制反應程序。

抑制分子 Tyrphostin 23 的抑制效能及動力學數據可以直接由監測反射光強譜線中共振角度值動態飄移情形得知，如圖 3。圖中虛線及實線分別為傳統 SPR 生物感測器及奈米粒子強化之電漿子生物感測器所測得之抑制反應數據，很明顯可看到非常小分子量的抑制分子造成抑制反應透過傳統 SPR 生物感測器所表現的共振角飄移量小於  $3 \times 10^{-4}$  度，相對的，以電漿子生物感測器則可得到較大的共振角度值動態飄移量約為  $3 \times 10^{-3}$  度，故相對的靈敏度約有十倍的增進<sup>(31)</sup>。

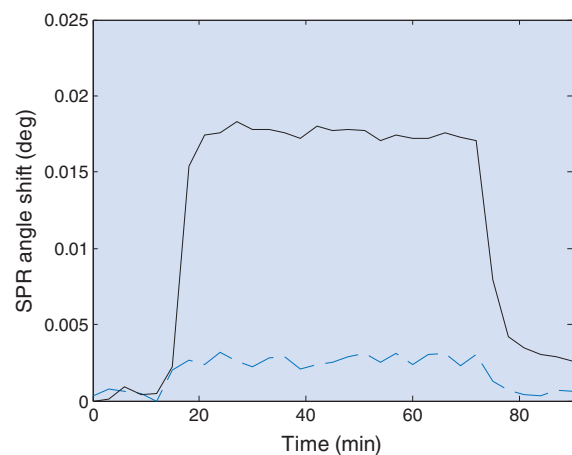


圖 3. 傳統 SPR 生物感測器及奈米粒子強化之電漿子生物感測器偵測 PTK 受器與其抑制分子 Tyrphostin 23 之抑制反應圖。實線：奈米粒子強化之電漿子生物感測器；虛線：SPR。

## 四、耦合波導表面電漿子共振生物感測器

建構於 Kretschmann 組態的 CWSPR 生物感測器同時耦合 SPs 模態及波導模態，並在反射光強譜線中產生二個銳利的共振吸收譜線。這嶄新的生物感測器不僅可維持如同傳統 SPR 生物感測器的靈敏度，而且反射光強譜線產生較銳利的吸收譜線，可因此提高量測的精度。更重要的是，利用此二個共振吸收譜線，可即時準確地測定出感測器表面之奈米分子膜層的折射率與厚度。經由鈣離子誘發組織性轉麩氨酶 (tissue transglutaminase, tTG) 單分子層的構形變化，也被即時地分析出來。

### 1. 設計與製作

如圖 4(a) 所示，目前以 Kretschmann 組態的 CWSPR 生物感測器由六層膜層所組成，分別為稜鏡、上層金屬層、波導層、下層金屬層、生物分子層及緩衝液。對於 TM 模態的入射光波，CWSPR 的反射係數及色散關係可經由 Fresnel 方程式求得。圖 4(b) 表示 CWSPR 生物感測器及傳統 SPR 生物感測器反射率—入射角度關係，入射光波為 TM 模態且波長為 632.8 nm，可在其反射光強譜線形成二個吸收譜線。相較之下，傳統 SPR 生物感測器包含 SF11 稜鏡、單一 47.5 nm 金屬層及緩衝液，僅有單一寬闊的吸收譜線。對於 CWSPR 生物感測器，在較小角度位置的第一個 CWSPR 模態其耦合 SPs 百分比與在較大角度位置的第二個 CWSPR 模態的耦合百分比，可藉由在研製過程中控制波導層的厚度來加以調整。

### 2. 實驗結果與討論

研究生物分子吸附於表面之前，例如蛋白分子於 CWSPR 生物感測器之表面，羧基端的 16-mercaptohexadecanoic acid 必須先行固定於感測器的金屬表面，形成一層相同硫醇化的單分子聚合層 (self-assembled monolayer, SAM)。在形成 SAM 時，先將折射率為 1.361 的乙醇溶液通入 CWSPR 感測裝置的反應槽內，之後再使含有 1 mM 16-mercaptohexadecanoic acid 的乙醇溶液流入

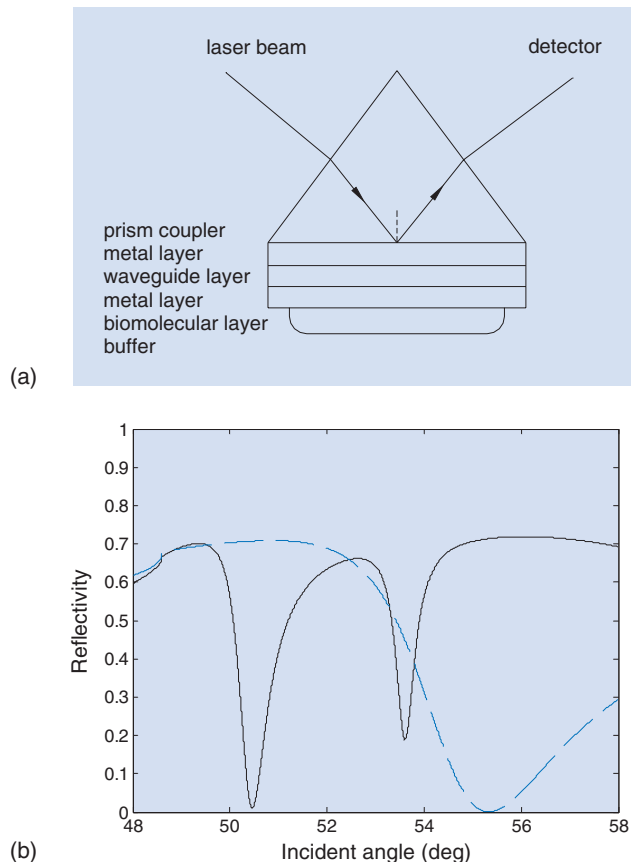


圖 4. (a) CWSPR 生物感測器的架構；(b) 二種 SPR 感測器的入射角度—反射光強譜線關係圖 (虛線：傳統 SPR，實線：CWSPR)。

反應槽內，待 SPR 角度飄移量增加至飽和後 (約為六小時後)，再將原先的乙醇溶液注入，以清除表面上未發生鍵結的分子。利用 Fresnel 方程式為基礎的擬合方法，由二個在反射光強譜線的吸收譜線可分別得到二組單分子層的折射率與厚度的解集合，再經由在折射率—厚度平面此二條曲線的交點可獲得 SAM 的折射率與厚度。與先前文獻相較，此單一分子層的折射率與厚度分別為 1.464 及 2.78 nm 是相當合理的。因此，藉由 CWSPR 的二個在反射光強譜線的吸收譜線可計算出 SAM 的折射率與厚度，並作為隨後以此 CWSPR 的二個吸收譜線直接測定生物分子層折射率與厚度的校準依據。

藉由鈣離子誘導 tTG 分子結構改變可以驗證此發展的 CWSPR 生物感測器可直接動態監測生物分子構形變化的能力。首先讓 50 mM 的 Tris-HCl



(150 mM NaCl) 緩衝液以小於 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流速流入已經上述 SAM 改質後的感測器表面，並設定反應溫度固定維持於 27.0  $^{\circ}\text{C}$ ，再使具有 344.65 nm 的 tTG 分子的緩衝液流入，最後以原先 Tris-HCl 緩衝液沖洗掉未發生鍵結的 tTG 分子，使感測器表面固定上一層 tTG 單分子，作為引起分子構形變化的標地分子，然後再將誘發 tTG 分子構形變化的 5 mM 活化因子鈣離子通入，同時藉由感測器即時記錄其變化情形，待訊號至穩定後，以原先的 Tris-HCl 緩衝液沖洗掉誘發構形變化的鈣離子，使 tTG 分子結構再行回復。圖 5 是經由 CWSPR 生物感測器監測並以前述 Fresnel 方程式為基礎的擬合方法，動態的量測 tTG 分子因分子構形改變導致其感測層的折射率及厚度變化情形，很明顯可發現鈣離子的效應促使其感測層的厚度增加且折射率減小，主要是因為鈣離子會促使的 tTG 分子活化使得其分子半徑增加所致。表 1 為其監測此 tTG 單分子層的折射率及厚度改變的詳細數據<sup>(19)</sup>。

## 五、ATR 表面強化拉曼散射

拉曼散射光譜可獲得散射光強與頻率之關係。由於在不同頻率下的光強變化亦代表著分子一些特殊結構的轉變，即生物分子振動光譜學，其可以提供詳細的生物分子結構之資訊。但由於生物分子拉曼信號相當微弱，因此使用電漿子來強化拉曼信號，即為 SERS。又由於聚焦激發之 SERS 光譜無法動態量測單一生物分子層之結構變化情形，所以 ATR 激發之拉曼光譜的發展為一重要研究，以獲得生物分子結構資訊之動態變化情形。

### 1. 強化機制

SERS 機制仍未有簡單易懂之理論可完全概

表 1. tTG 單分子層及鈣離子誘發過程其折射率及厚度變化情形。

tTG	$n$	$d$ (nm)	$\Delta n$	$\Delta d$ (nm)
在感測器表面	1.4212	4.30		
加入 $\text{Ca}^{2+}$	1.4196	4.78	-0.0016	0.48
沖洗後	1.4208	4.33	0.0012	-0.45

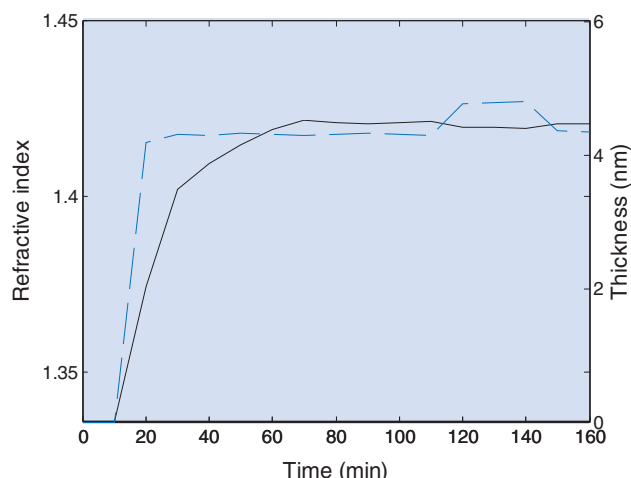


圖 5. 動態監測 tTG 分子吸附及鈣離子誘發分子構形變化的 tTG 單分子層折射率 (虛線) 及厚度 (實線) 變化情形。

括，其所涉及的是奈米金屬粒子中似自由電荷之學問—奈米電漿子學。在物理機制方面，只有在極少數情況下，例如金屬球及金屬薄膜，有精確描述之電磁解析解。在其他結構下，金屬介電常數不僅與波長有關之外，也與其形狀、尺寸、粒子間距、基板間距及入射光偏振有關<sup>(20)</sup>。

以 ATR 方式激發之 SERS 的優點為可以去除部份雷利散射，利用表面強化之衰逝波可以有效激發受限制於相距介面數百奈米內之拉曼活性分子，以獲得局部深度內的拉曼散射訊號。在此以金屬奈米球團簇之表面拉曼散射為理論模型<sup>(35)</sup>，當探測分子在聚簇的金屬球粒子中，先只考慮被吸附條件相同的表面分子，其拉曼散射截面相同；並假設其所受之電磁強化條件相同。則整體表面強化拉曼散射的輻射功率可表示為

$$P^{\text{SERS}}(\omega_s) = N' \cdot \sigma_{\text{ads}}^R \cdot T(\omega_0) \cdot T(\omega_s) \cdot I(\omega_0) \quad (16)$$

其中， $N'$  為吸附在金屬粒子表面上之探測分子數目， $\sigma_{\text{ads}}^R$  為探測分子的 SERS 截面， $T(\omega_0)$ 、 $T(\omega_s)$  分別為入射及散射的場強化因子， $\omega_0$  為入射頻率， $\omega_s$  為散射頻率，其與環境介電常數、金屬球介電常數、金屬球半徑及分子與金屬球的距離有關， $I(\omega_0)$  為入射光強度。

考慮一分子與一金屬球 (其半徑  $R \ll \lambda$ ) 距離  $d$ ，其感受電場  $E$  為入射電場  $E_0$  及金屬球上被誘發電偶極場之相加。其場強化因子可表示為

$$T(\omega) = \left| \frac{E(\omega)}{E_0(\omega)} \right|^2 \propto \left| \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2} \left( \frac{R}{R+d} \right)^3 \right|^2 \quad (17)$$

當  $\epsilon_1(\omega)$  之實部等於  $-2\epsilon_2$ ，且  $\epsilon_1(\omega)$  之虛部夠小時， $T(\omega)$  有最大值，此時達到金屬球之 PPs 激發，定義其共振頻率為  $\omega_R \equiv \omega$  及共振波長為  $\lambda_R = 2\pi c/\omega$ 。當史托克斯散射 (Stokes scattering) 發生時，同樣也受到奈米金屬球團簇之電磁強化而輻射，因此其史托克斯散射強度之總電磁強化可近似為

$$G_{em}(\omega_s) = T(\omega_0) \cdot T(\omega_s) \propto \left| \frac{\epsilon_1(\omega_0) - \epsilon_2}{\epsilon_1(\omega_0) + 2\epsilon_2} \right|^2 \left| \frac{\epsilon_1(\omega_s) - \epsilon_2}{\epsilon_1(\omega_s) + 2\epsilon_2} \right|^2 \left( \frac{R}{R+d} \right)^{12} \quad (18)$$

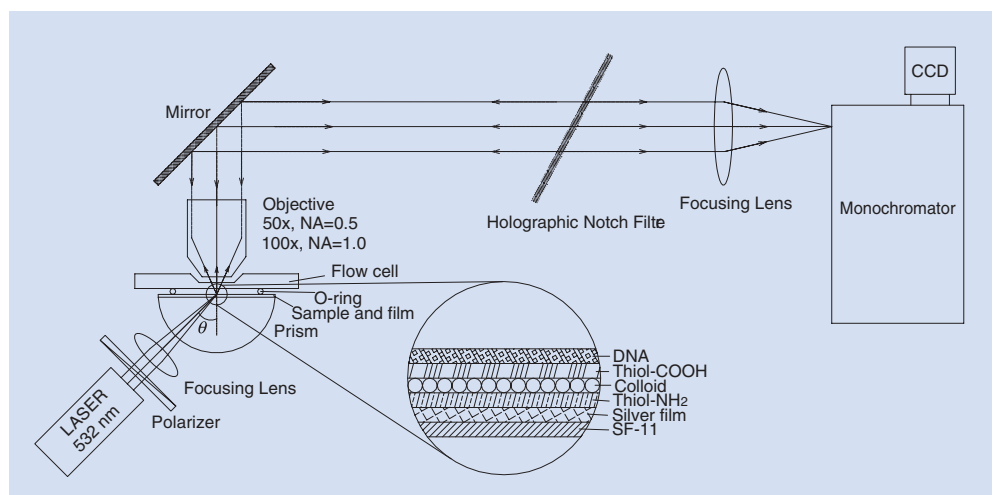
在 SERS 的強化機制中，化學效應通常在分子與金屬表面相距小於 10 nm 的情況下發生，並在 SERS 光譜中產生異常拉曼譜線，這些譜線將干擾本身分子結構的訊號，所以將會影響分子結構檢測的正確性。在不考慮化學效應之影響下，最大的近場電磁強化往往發生在金屬尖端或兩顆金屬粒子之間隙，分子愈靠近尖端或在愈小之間隙中則電磁強化因子愈大，可以有效將分子之拉曼散射放大。因此，製作 active-Raman 基材以達到最大之電磁強化

而減少化學效應為最佳，所以控制金屬粒子之尺寸與粒子間距離就成為一重要工作，並且需要控制待測分子與金屬表面之距離，以期達到最大之電磁場強化效果。另外，表面分子之整齊排列對檢測技術而言是相當重要的，而最佳之分子排列方式為相同方向之單層分子排列在平整的表面上，使待測分子之振動自由度減少，具有相同排列方向，將使表面分子之訊號更加一致。所以將單一層生物分子固定於固態表面觀測其結構變化，並結合 ATR 與銀奈米粒子來激發金屬的 SPs 及金屬奈米粒子的 PPs，以放大其鄰近範圍之電磁場，使吸附在其表面的分子接受到強烈放大的電磁場，故其所輻射的散射電磁場增強。

## 2. ATR 顯微拉曼系統

圖 6 為 ATR 激發系統裝置示意圖，主要組成元件有液態氮冷卻式電荷耦合裝置 (charge coupled device, CCD) 照相機、單光儀 (monochromator)、二極體雷射泵激固態雷射 (diode-pumped solid state laser, DPSS) 及全像式光學陷波片 (holographic notch filter)。ATR 激發系統架構中使用二極體雷射泵激固態雷射產生 532 nm 的光束，並經過一線性偏振片，使入射光之偏振為平行入射面，再經由透鏡聚焦至稜鏡，其入射角度可由角度計調整，產生 ATR 激發散射光，散射光由物鏡收光，再經過全像式光學陷波片將雷利散射光減低，使拉曼信號光經由透鏡聚焦至光譜儀之狹縫，經光譜儀光柵分

圖 6. ATR 激發—微拉曼光譜量測系統示意圖。



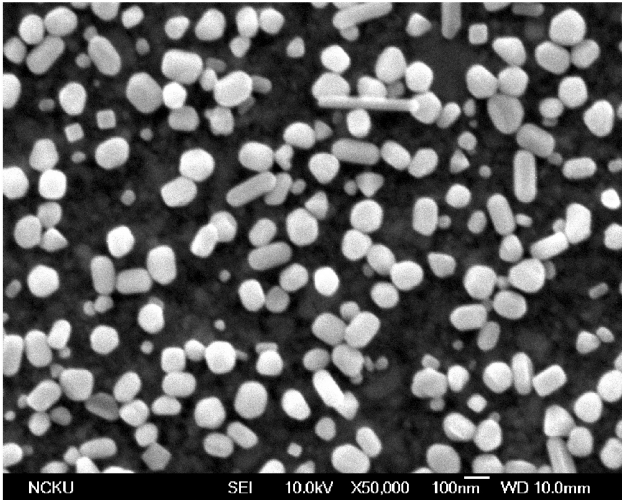
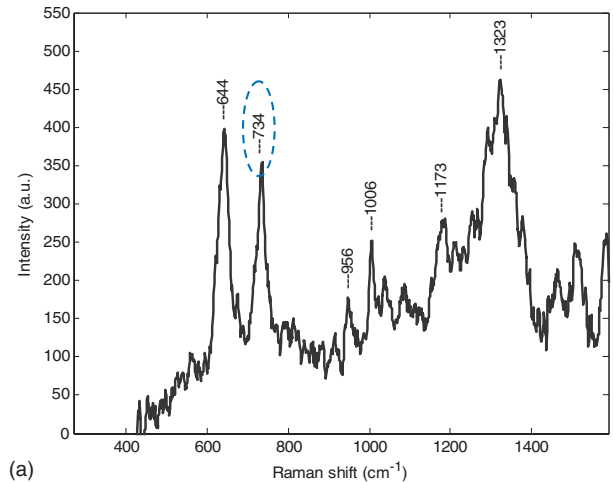


圖 7. 奈米銀粒子固定在金膜上之 SEM 影像，粒徑： $100 \pm 10$  nm。

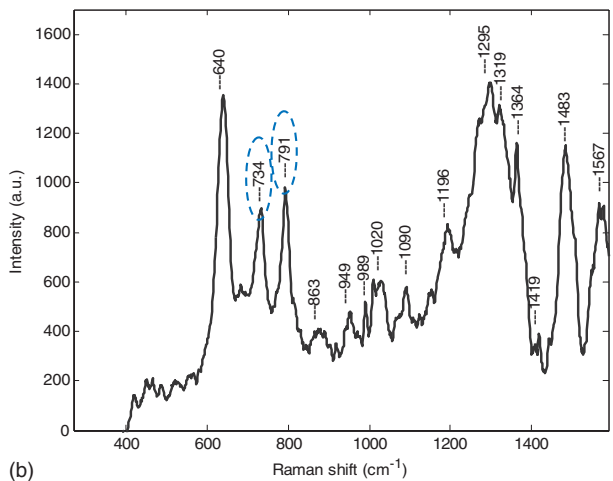
光，最後由液態氮冷卻式 CCD 擷取信號，得到拉曼光譜圖。

### 3. DNA 二次結構分析

將已濺鍍上銀膜的晶片 (SF11/Ag) 浸泡於官能基為氨基硫醇化合物的溶液 (10 mM,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ) 中 12 小時，以 99% 酒精清洗、氮氣吹乾，再將試片浸泡於膠體粒子溶液 1 小時，取出試片，以去離子水清洗、氮氣吹乾。圖 7 為將其固定於金膜上的銀粒子之掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 影像，粒徑大小為  $100 \pm 10$  nm。接著將試片放置於官能基為羧基硫醇化合物的溶液 (10 mM,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ ) 中，浸泡 24 小時後以酒精清洗、氮氣吹乾；再把試片浸泡於 2 mM EDC 與 5 mM NHS 之溶液中，時間為 24 小時，以去離子水清洗、氮氣吹乾；最後將試片浸泡於氨基改質之單股去氧核糖核酸分子水溶液中，濃度 0.1  $\mu\text{M}$ ，時間 24 小時，取出試片完成樣品製作<sup>(36)</sup>。由於生化反應最先發生於界面上，將生物分子固定在表面上去檢測其生化反應，乃為探討微量生物分子交互作用之有效定量方式。因此，使用 ATR 激發為此部分研究重點，其優點為可有效濾除雷利散射光，但所需積分時間較長。並且於生物分子結構動態量測時，可有效地抑制緩衝液的背景雜訊影響，只量測於感測器表面上數百奈米內之生物分子



(a)



(b)

圖 8. ATR 激發之 SERS 光譜。(a) 10 mer dAMP with  $\text{NH}_2$ -modified 之 SERS 光譜，入射角度  $40^\circ$ ，積分時間 100 s，特徵譜線： $734 \text{ cm}^{-1}$ 。(b) 60 mer DNA\_III 之 SERS 光譜，入射角度  $40^\circ$ ，積分時間 100 s，其具有明顯  $734 \text{ cm}^{-1}$  (adenine)、 $791 \text{ cm}^{-1}$  (cytosine) 之特性譜線。

結構資訊。使用 ATR 激發，在共振條件下量測拉曼信號，分別得到如圖 8 所示結果，發現穩定之特徵譜線。

## 六、結論

本研究利用 ATR 方式來激發 SPs 與 PPs 的近場強化為基礎，並藉由金屬奈米粒子大小及分佈操控電漿子效應，分別研發新穎的奈米電漿子感測技術應用於生物分子構形變化分析和提升感測器靈敏



度，並結合 ATR-SERS 以提供生物分子結構資訊。對於感測靈敏度的提升，係利用調控上述四種電漿子效應來達成，並實驗證實此電漿子生物感測器具有直接量測極低濃度且微量分子 (< 200 Da) 交互作用動力學之能力。另外，CWSPR 生物感測器利用兩個耦合波導表面電漿子模態可直接偵測發生生物分子交互作用時伴隨之折射係數與厚度 (構形變化) 的能力，並成功地監測鈣離子誘發 tTG 單分子層構形變化及鈣離子脫離使其構形回復情形。最後，利用操控奈米銀粒子排列於銀膜上之大小與分布情形以及 ATR 方式激發，來強化單一分子層之拉曼信號，提供此固定於感測器表面之生物分子結構資訊。因此，此嶄新的奈米電漿子生物感測技術將可彌補現有 SPR 感測技術之不足，提供生物分子反應之功能分析平台。

## 誌謝

筆者感謝國科會科教處對於本研究之支持 (計劃編號：NSC 94-2515-S-006-011)。

## 參考文獻

1. R. M. T. de Wildt, C. R. Mundy, B. D. Gorick, and I. M. Tomlinson, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 989 (2000).
2. G. MacBeath and S. L. Schreiber, *Science*, **289**, 1760 (2000).
3. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, *Sens. Actuat. B*, **54**, 3 (1999).
4. R. L. Rich and D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 54 (2000).
5. A. V. Zayats and I. I. Smolyaninov, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, **5**, S16 (2003).
6. C. Girard, *Rep. Prog. Phys.*, **68**, 1883 (2005).
7. S. A. Maier and H. A. Atwater, *J. Appl. Phys.*, **98**, 011101 (2005).
8. J. Tominaga and D. P. Tsai eds., *Optical Nanotechnologies: The Manipulation of Surface and Local Plasmons*, Berlin: Springer-Verlag (2003).
9. B. P. Rand, P. Peumans, and S. R. Forrest, *J. Appl. Phys.*, **96**, 7519 (2004).
10. J. Vuckovic, M. Loncar, and A. Scherer, *IEEE J. Quantum Electron.*, **36**, 1131 (2000).
11. D. A. Schultz, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 13 (2003).
12. T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff, *Nature*, **391**, 667 (1998).
13. N. Fang, H. Lee, C. Sun, and X. Zhang, *Science*, **308**, 534 (2005).
14. J. J. Baumberg, T. A. Kelf, Y. Sugawara, S. Cintra, M. E. Abdelsalam, P. N. Bartlett, and A. E. Russell, *Nano Lett.*, **5**, 2262 (2005).
15. H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Berlin: Springer-Verlag (1988).
16. J.-J. Chyou, C.-S. Chu, F.-C. Chien, C.-Y. Lin, T.-L. Yeh, R.-C. Hsu and S.-J. Chen, *App. Opt.*, **45**, 6038 (2006).
17. J.-J. Chyou, C.-S. Chu, Z.-H. Shih, C.-Y. Lin, S.-J. Chen, and C.-F. Shu, *Opt. Eng.*, **44**, 034001 (2005).
18. F.-C. Chien and S.-J. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 633 (2004).
19. F.-C. Chien and S.-J. Chen, *Opt. Lett.*, **31**, 187 (2006).
20. 易政男, 藉由奈米電漿子偵測信號強化之表面電漿共振與表面強化拉曼散射生物感測器, 中央大學光電所, 九十四學年博士論文。
21. U. Kreibig and M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Berlin: Springer-Verlag (1995).
22. K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 668 (2003).
23. B. T. Draine and P. J. Flatau, *J. Opt. Soc. Am. A*, **11**, 1491 (1994).
24. P. W. Barber and S. C. Hill, *Light Scattering by Particles: Computational Methods*, Singapore: World Scientific (1990).
25. C. Hafner, *The Generalized Multipole Technique for Computational Electromagnetics*, Boston: Artech House (1990).
26. A. Taflove, *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method*, Boston: Artech House (1995).
27. K.-H. Su, Q.-H. Wei, X. Zhang, J. J. Mock, D. R. Smith, and S. Schultz, *Nano Lett.*, **3**, 1087 (2003).
28. M. Futamata, Y. Maruyama, and M. Ishikawa, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 7607 (2003).
29. S. Kawata ed., *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons*, Berlin: Springer-Verlag (2001).
30. S.-J. Chen, F.-C. Chien, G. Y. Lin, and K. C. Lee, *Opt. Lett.*, **29**, 1390 (2004).
31. F.-C. Chien, K.-T. Huang, C.-Y. Lin, and S.-J. Chen, *Proc. SPIE*, **5703**, 107 (2005).
32. 林俊佑, 表面電漿子與粒子電漿子強化之光電生物感測器, 中央大學機械所, 九十二學年碩士論文。
33. J. C. Maxwell-Garnett, *Phil. Trans. R. Soc. London A*, **205**, 237 (1906).
34. J.-N. Yih, F.-C. Chien, C.-Y. Lin, H.-F. Yau, and S.-J. Chen, *App. Opt.*, **44**, 6155 (2005).
35. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, *J. Phys.: Condens. Matter*, **14**, R597 (2002).
36. K.-C. Chiu, J.-N. Yih, L.-Y. Yu, and S.-J. Chen, *Proc. SPIE*, **6323**, 63231O (2006).

- 簡汎清先生為國立中央大學光電科學博士。
- 邱國智先生為國立成功大學工程科學系博士生。
- 林俊佑先生為國立成功大學工程科學系博士生。
- 易政男先生為國立中央大學光電科學博士，現任國立高雄應用科技大學電機工程學系助理教授。
- 陳顯禎先生為美國加州大學洛杉磯分校機械工程博士，現任國立成功大學工程科學系副教授。
- Fan-Ching Chien received his Ph.D. in optical science from National Central University.
- Kuo-Chih Chiu is a Ph.D. student in the Department of Engineering Science at National Cheng Kung University.
- Chun-Yu Lin is a Ph.D. student in the Department of Engineering Science at National Cheng Kung University.
- Jenq-Nan Yih received his Ph.D. in optical science from National Central University. He is currently an assistant professor in the Department of Electrical Engineering at National Kaohsiung University of Applied Science.
- Shean-Jen Chen received his Ph.D. in mechanical engineering from UCLA. He is currently an associate professor in the Department of Engineering Science at National Cheng Kung University.