

計畫編號：DOH94-DC-1106

行政院衛生署疾病管制局 94 年度科技研究發展計畫

多重抗體流行性感冒快速檢測感測器之開發研究

計畫名稱

研究報告

執行機構：臺灣大學生化科技學系

計畫主持人：陳建源

研究人員：韓謝忱

執行期間：94 年 3 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

94 年度計畫重要研究成果

計畫名稱：多重抗體流行性感冒快速檢測感測器之開發研究

主持人：陳建源 計畫編號：DOH94-DC-1106

1. 計畫之新發現或新發明

依本計畫構思之原理構成之多重抗體流行性感冒快速檢測生物感測器，可迅速提供臨床檢驗結果作為診斷之依據，並可作為配合流感特效藥物儘早進行治療或防疫處理之參考。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

依本計畫構成之多重抗體流行性感冒快速檢測生物感測器，操作簡單並可即時檢知流感病毒之型別，可配置於各地醫療院所使用。一經檢知為流感病毒感染及可配合克流感等特效藥物進行治療，可以有效縮短病程，減低併發症之發生率。由該感測系統之廣泛應用，促使發生感冒症狀之患者都願意到醫療院所就診而不再濫服成藥，不但可民眾養成正確就醫之觀念，對於衛政單位對流感傳播情況之掌握亦能有所貢獻。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

若能一經確定為流感病毒感染就即時使用流感特效藥物進行治療，除可促進迅速康復外，亦可有效減低流感擴散傳播之程度，對全民健康有所助益。

「行政院衛生署疾病管制局 94 年度科技研究發展計畫」
成果資料交付項目一覽表

計畫編號： DOH94-DC-1106

計畫名稱： 多重抗體流行性感胃快速檢測感測器之開發研究

計畫主持人： 陳建源 服務單位： 臺灣大學生化科技學系

聯絡地址： 臺北市羅斯福路四段一號

電話： 02-33664450

傳真： 02-23661696

E-mail： chenyuan@ntu.edu.tw

	項 目	細 項	說 明	應收繳項目說明		
				書面	電腦檔	備 註
基 本 資 料 項 目	GRB 網站成果摘要 成功登錄頁面	書面一份	提供該計畫成果摘要已成功登錄於 GRB 網站之資料			
	資料讀我檔案	書面一份 電子檔一份	提供該計畫之簡介、各電腦檔用途及 檔名對照表、資料之使用說明等。			
	成果報告書	書面八份 電子檔一份	書面成果報告一式八份，報告內容電 子檔一份。			
	著作一覽表	書面一份	九十三年度計畫著作一覽表			
	重要研究成果	書面一份 電子檔一份	九十三年度重要研究成果			
	成果產出統計表	書面一份	九十三年度科技計畫重要研究成果 產出統計表			
	職級與學歷分析表	書面一份	參與九十三年度計畫研究人力之職 級與學歷分析表			
	空白問卷	書面一份 電子檔一份	該計畫所用之訪視問卷。			
	譯碼簿 (CODEBOOK)	書面一份 電子檔一份	該計畫資料之譯碼說明，包括：各題 目描述、各變項名稱及其所對應之 欄位、各變數值代碼。			
	電腦資料數據檔	電子檔一份	已經過計畫主持人檢誤過的完整電 腦資料數據檔，為確保受訪者隱私權 請主持人將可辨認受訪者之姓名、身 份證字號、地址、電話等資料抽離。			
	督導或訪員手冊	書面一份 電子檔一份				

行政院衛生署疾病管制局科技研究發展計畫原始數據資料庫
資料讀我檔案

計畫名稱：**多重抗體流行性感冒快速檢測感測器之開發研究**

計畫編號：DOH94-DC-1106
執行機構：臺灣大學
計畫主持人：陳建源
計畫主持人服務單位：生化科技學系
計畫主持人職稱：教授

流行性感冒為急性病毒性呼吸道疾病，常引起發燒、頭痛、肌肉痛、疲癆、流鼻涕、喉嚨痛以及咳嗽等症狀。流行性感冒之重要性在於其爆發流行快速、散播範圍廣泛、以及常伴隨嚴重併發症，例如細菌性及病毒性肺炎等。引發流行性感冒的流感病毒屬正粘液病毒科，含有核蛋白是為可溶性抗原（S 抗原），抗原性穩定，根據核蛋白抗原性，可將流感病毒分為 A、B、C 三型，其中以 A、B 兩型較常發生，尤其以 A 型易造成大流行而深受注目。

本計畫擬開發之多重抗體流行性感冒快速檢測感測器，是在同一試片上建構分別固定兩種抗體而能夠同時檢測兩種流感病毒之免疫反應型生物感測器。本計畫執行期間已適當修正本實驗室以前所使用之檢測系統，使之符合偵測流感病毒所需。並由國內外取得 A、B 兩型流感病毒之單株抗體，用以進行兩通道檢測系統之開發。經分別檢討兩種抗體之適當固定化條件後，將其分別固定在石英震盪晶片之金屬電極表面以構成檢測試片，再將兩型試片整合成同時檢測兩型病毒之多重抗體流行性感冒快速檢測試片，並配合檢測系統構成本計畫預期完成開發之感測器。

本計畫僅以兩種抗體作為多重抗體同時檢測之模式，但是依照本計畫之模式，可順利擴展抗體種類以構築更多種類抗體同時檢測之多通道、多功能感測器。依此原理構成之多重抗體流行性感冒快速檢測感測器，將可迅速提供臨床檢驗結果作為診斷之依據，並可作為配合流感特效藥物儘早進行治療或防疫處理之參考。

中文關鍵詞：壓電石英晶體 免疫感測器 流行性感冒 單株抗體 多通道檢測

Research Data Archive, Center for Disease Control, The Executive Yuan, R.O.C.
Readme file

Project Title: Development of a multi-channel biosensor for immediate detection of influenza

Project Number: DOH94-DC-1106

Executing Institute: National Taiwan University

Principal Investigator(P.I.): Dr. Chien-Yuan Chen

P.I. Position Title: Professor

P.I. Institute: Department of Biochemical Science and Technology

Abstract:

Keywords : piezo-electric quartz crystal, immunosensor, influenza, monoclonal antibody, multi-channel detection

Influenza is an acute respiratory virus infection with the symptoms including fever, head-ache, paining muscle, tiredness, snivel, sour-throat, cough, and so forth. The severity of influenza is the rapid epidemic, wide-spreading, and the severe complications such as bacillary and viral pneumonia. The influenza virus contains the S antigen, an soluble antigen with stable immunity. They are classified into A, B, and C types according to their immune property. A and B are the types relatively often take place. A type is highly concerned because it is apt to break out.

The multi-channel influenza immunosensor proposed in this project is a sensor with two types of antibody immobilized individually to make the simultaneous determination of two types of influenza virus possible. The home-made circuit and operation system has been modified to fit the purpose of virus detection. The monoclonal antibodies of A and B influenza virus has obtained and immobilized on the gold surface of the quartz crystal electrode after optimization of the immobilization process. The electrodes for A and B influenza virus were then integrated into the modified circuit and multi-channel operation system to complete the proposed sensor system.

A sensor able to detect more items simultaneously is possible to be constructed according the model system completed in this project. The multi-channel sensor system constructed in this study is considered as applicable to the clinical analysis and the management of epidemic disease.

※磁片檔案說明

檔案性質	磁片別	檔案名稱	檔案說明	檔案大小 (bytes)	修改日期
資料讀我檔案		readme.doc			
空白問卷檔案		ques.doc			
訪員手冊檔案		manual.doc			
譯碼簿檔案		codebook.doc			
原始資料數據檔案		data.dbf			
		data.txt			
成果報告檔案		report.doc			

注意事項：

1. 為方便作業，檔案名稱須依上表規定命名，而若遇兩種以上的調查工具，請再附加標示 1、2、3...(如範例所示 ques1.doc、ques2.doc)，以利區分。
2. 為方便使用者的不同需求，原始資料數據檔案請各交付 dbf 及 txt 檔。
3. 若單一檔案已超過 1.44Mb (相當於一片 3.5" 磁片) 時，請改用 CD-R 光碟片儲存，將所有檔案燒錄至 CD-R 光碟片後交出(但請不要利用 MO 交付)；若遇燒錄有困難時，亦可將檔案壓縮後交付出，並請於磁片標籤上標示「壓縮檔」。

※連絡方式

計畫執行單位：臺灣大學生化科技學系

計畫連絡人：陳建源

地址：臺北市羅斯福路四段一號

連絡電話：02-33664450

傳真：02-23661696

E-mail：chenyuan @ntu.edu.tw

衛生署疾病管制局 委託研究計劃報告

]

中文計畫名稱：多重抗體流行性感冒快速檢測感測器之
開發研究

英文計畫名稱：**Development of a multi-channel biosensor
for immediate detection of influenza**

申請計畫機構與單位：臺灣大學生化科技學系

壹、摘要：

關鍵詞：壓電石英晶體 免疫感測器 流行性感冒 單株抗體 多通道檢測

流行性感冒為急性病毒性呼吸道疾病，常引起發燒、頭痛、肌肉痛、疲癆、流鼻涕、喉嚨痛以及咳嗽等症狀。流行性感冒之重要性在於其爆發流行快速、散播範圍廣泛、以及常伴隨嚴重併發症，例如細菌性及病毒性肺炎等。引發流行性感冒的流感病毒屬正粘液病毒科，含有核蛋白是為可溶性抗原（S 抗原），抗原性穩定，根據核蛋白抗原性，可將流感病毒分為 A、B、C 三型，其中以 A、B 兩型較常發生，尤其以 A 型易造成大流行而深受注目。

本計畫開發多重抗體流行性感冒快速檢測感測器，將建構在同一試片上之兩種抗體同時檢測兩種流感病毒之免疫反應型生物感測器。經取得抗流感病毒之單株抗體、建立單型病毒檢測系統、以及多通道量測系統之開發等工作，已建構可以快速即時量測的壓電石英晶體感測器，用以同時檢知樣品中是否存在 A、B 兩型流感病毒及其存在濃度。

本計畫執行期間已適當修正本實驗室以前所使用之檢測系統，使之符合偵測流感病毒所需。並由國內外取得 A、B 兩型流感病毒之單株抗體，用以進行兩通道檢測系統之開發。經分別檢討兩種抗體之適當固定化條件後，將其分別固定在石英震盪晶片之金屬電極表面以構成檢測試片，再將兩型試片整合成同時檢測兩型病毒之多重抗體流行性感冒快速檢測試片，並配合檢測系統構成本計畫預期完成開發之感測器。

本計畫僅以兩種抗體作為多重抗體同時檢測之模式，但是依照本計畫之模式，可順利擴展抗體種類以構築更多種類抗體同時檢測之多通道、多功能感測器。依此原理構成之多重抗體流行性感冒快速檢測感測器，將可迅速提供臨床檢驗結果作為診斷之依據，並可作為配合流感特效藥物儘早進行治療或防疫處理之參考。

貳、計劃說明

流行性感冒

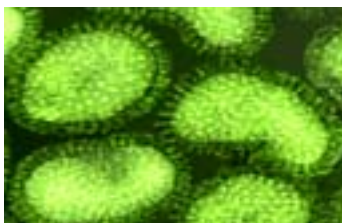
流行性感冒為急性病毒性呼吸道疾病，常引起發燒、頭痛、肌肉痛、疲勞、流鼻涕、喉嚨痛以及咳嗽等，但通常均在 2 至 7 天內會康復、潛伏期 (Incubation period) 短，通常 1~3 天。臨床上所謂的感冒、喉炎、支氣管炎、病毒性肺炎以及無法區分之急性呼吸道疾患均有可能為感染流感病毒所引起。而在爆發流行時，約有 25% 受感染的人有噁心、嘔吐以及腹瀉等腸胃道症狀伴隨呼吸道症狀而來。流行性感冒之重要性在於其爆發流行快速、散播範圍廣泛以及併發症嚴重，尤其是細菌性及病毒性肺炎。爆發流行時，重症及死亡者多見於老年人，以及患有心、肺、腎臟及代謝性疾病，貧血或免疫功能不全者。流感病毒屬正粘液病毒科(圖一)，病毒由三層構成，內層為病毒核衣殼，含核蛋白 (NP)、P 蛋白和 RNA。NP 是可溶性抗原 (S 抗原)，具有型特異性，抗原性穩定。P 蛋白 (P1、P2、P3) 可能是 RNA 轉錄和複製所需的多聚酶。中層為病毒囊膜，由一層類脂體和一層膜蛋白 (MP) 構成，MP 抗原性穩定，也具有型特異性。外層為兩種不同糖蛋白構成的輻射狀突起，即血凝素 (hemagglutinin, H) 和神經氨酸酶 (neuraminidase, N)。H 能引起紅細胞凝集，是病毒吸附於敏感細胞表面的工具，N 則能水解粘液蛋白，水解細胞表面受體特異性糖蛋白末端的 N-乙酰神經氨酸，是病毒複製完成後脫離細胞表面的工具。H 和 N 均有變異特性，故只有株特異的抗原性，其抗體具有保護作用。根據 NP 抗原性，將流感病毒分為 A、B、C 三型，三型病毒具有相似的生化和生物學特徵。按 H 和 N 抗原不同，A 型病毒又分若干亞型。流感病毒的抗原性變異就是指 H 和 N 抗原結構的改變，主要是 H。目前 A 型流感共發現十五種 H 和九種 N。而主要的人類流行性感冒 A 型病毒亞型是 A(H1N1) 和 A(H3N2)^{(1、3、4)(8、9、10、11)}。

流行性感冒之流行可依程度分為世界大流行 (pandemics)、地區流行 (epidemics)、局部地方流行 (localized outbreaks) 以及零星病例 (sporadic cases)。過去一百多年來，曾經分別在 1889、1918、1957 及 1968 年發生世界性大流行。其中 1918 年的大流行，共造成 2000 多萬人死亡，超過第一次世界大戰的總死亡人數，是造成死亡最多的一次傳染病大爆發。而目前在美國，每年因流感導致的死亡人數超過車禍和艾滋病造成的死亡人數^(5、12、13)。

發生地區流行時，一般群體的臨床侵襲率大約在 10~20%，在人員稠密如學校及安養中心等處，則達到 50% 以上。流感的地區流行幾乎年年發生，主要是 A 型病毒所引起，B 型病毒亦很常見。在溫帶地區，流行通常在冬季發生，熱帶地區則常發生在雨季，而局部流行及零星病例則每個月都可能發生。A 型流感病毒可在不同物種間傳播以及重組，曾見於豬、人、鴨及火雞，引起 1957 及 1968 年世界大流行的人類流感病毒均含有類似禽類流感病毒的基因片斷。

對於新血清型的感冒病毒，大人和小孩均具有相同的感受力；感染後可針對感染的病毒抗原產生免疫力，但是免疫力維持的期間及效力則視病毒抗原變異 (

drift) 的狀況及感染的次數而定。疫苗可提供針對疫苗株的血清免疫反應，或是個體先前已感染之相關病毒型的追加免疫作用。至於以前曾經流行的病毒型，免疫力常因暴露史而與年齡成正比，故以學童的感染率最高。



圖一、流行性感冒病毒

<引自 <http://sites.netscape.net/derekwongkk/homepage>>

B 型流感只感染人，因此只會造成區域的流行，但 A 型流感可跨越物種感染，因此難以根除。A 型病毒所引起的症狀也較為嚴重，並易造成大規模的流行。在北半球，大部份的流行出現在每年的 11 月到隔年的 2 月。流行性感冒經由空氣傳染，病人可傳染給別人的時間平均長達 8 天，因此患有流行性感冒的人，應避免出入公共場所，以免擴散傳染。世界衛生組織每年會分析散佈世界各地，一共 110 個流感監測站所送回的標本，判斷何者可能造成即將來臨的感染，並在二月時提出三種流行性感冒病毒做為製造疫苗的基礎，通常包括兩種 A 型和一種 B 型流感病毒。而應施打流行性感冒疫苗的對象包括：(1) 年齡超過 65 歲；(2) 長期居住於安養機構或慢性病院；(3) 有慢性心肺疾病（包括氣喘）；(4) 過去曾因慢性病（如糖尿病）、血色素疾病、腎臟病或免疫功能障礙（如藥物或 HIV 感染）接受治療者；(5) 6 個月至 18 歲需長期服用阿斯匹靈者等，此外健康照顧提供者如醫療專業人員及看護等，也建議施打。流行性感冒疫苗的副作用，最常見的反應是接種部位局部疼痛、紅腫，另有少數出現發燒、肌肉痛及倦怠感等。根據台大醫院的研究發現，國人接種流行性感冒疫苗副作用最多的是疲倦，其次為發燒與局部不適等。接種流感疫苗後，須注意多喝開水、充分休息及攝取均衡的營養，必要時醫師會給與退燒藥（阿斯匹靈除外）。目前注射用的疫苗是由雞的胚胎培養出來，經過去活性的過程所製造的非活性疫苗，因此下列情況則不能接種流感疫苗，包括：(1) 已知對蛋之蛋白質或疫苗其他成份過敏者；(2) 年齡六個月以下者；(3) 其他經醫師評估不適合接種者；(4) 過去注射曾經發生不良反應者，而發高燒或急性疾病時，宜予延後接種^(6,7)。

國內有研究報告指出針對台北縣 65 歲以上老人施打疫苗能夠降低 29% 的全因死亡率。在高危險群降低的全因死亡率為 33%，一般族群則為 36%。若依

照不同的疾病型態，疫苗能降低死亡率 21 至 46%。在控制相關因子後，流行性感
冒所能降低老人住院率為 2%，而若無合併嚴重疾病住院率能降低 19%，一般
族群能降低 20% 住院率。以成本效益分析而言，每增加一生命年需花費新台幣
48,417 元，即每投資新台幣一元可獲得利益為 16 元⁽²⁾。

流感病毒之實驗室檢測方法

檢驗方法：依衛生署疾病管制局昆陽辦公室開發 Influenza A, influenza B 檢
驗方法

採樣

痰液/鼻咽拭子/鼻腔沖洗液檢體內含棉棒拭子，將棉棒拭子充分攪拌後於塑膠管
壁旋轉擠乾取出。將保存液加入 1 ml 不含血清的 DMEM medium 混合均勻後移
至離心管，於 4°C，3000 rpm 離心 15 分鐘。

接種

1. 取已接種於 culture tube 並長滿平面之 MDCK 細胞，吸除舊有生長培養基，以
不含 Mg 離子的 PBS 溶液清洗兩次後，加入同量含有 2.0 µg/ml tpck-trypsin
維持培養基。
2. 每一檢體接種 2 支 culture tube，每支 tube 接種 100 µL 檢體。培養於 35°C，
CO₂ 培養箱 7~10 日。感病毒快速檢驗。

檢驗

間接螢光免疫法鑑定（以 Chemicon Respiratory Viral Screen kit 為例）

1. 將 culture tube 以 4°C，3000 rpm 離心 15 分鐘，上清液分別存於容積 4 ml 的
塑膠小瓶。經離心沉澱之細胞加入與原培養基等量之 PBS，以吸量管上下混
合數次後，將細胞懸浮液移至另一塑膠小管。
2. 分別將各管細胞取 20~30 µL 點入 21 孔玻片，待細胞於室溫下風乾後置入含
有 4°C 丙酮之玻片槽，固定 10 分鐘。
3. 取出風乾後以 respiratory reagent 一級抗體滴於每個 well(每滴約 20 µL 左右)，
將玻片置於 moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 分鐘。
4. 以含有 1% tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後 10 分鐘風乾。每個 well 加二
級螢光抗體 (FITC)。每滴約 20 µL 左右，將玻片置於 moisture chamber，置
於 37°C 恆溫培養箱 30 分鐘。
5. 以含有 1% tween 20 之 PBS 溶液清洗玻片三次後風乾。以 mounting fluid 封片
後，以螢光顯微鏡鏡檢。
6. 流行性感病毒經螢光抗體鑑定為陽性之檢體，則重複步驟 (3)，並做於
moisture chamber，置於 37°C 恆溫培養箱 30 分鐘。
7. 重複 (5 至 8) 步驟，以螢光顯微鏡鏡檢，鑑定分離株為 A 或 B 型流感病毒

流感治療之特效藥

在投藥治療與預防方面。Amantadine是第一個由美國食品藥物管理局(FDA)核准用於預防(1966年)及治療(1976年)的A型流行性感冒的藥物，可用於大於一歲的患者身上。Rimantadine也在1993年由美國FDA通過，在一歲以上患者可用於預防，在成人可用於預防及治療A型流行性感冒。此兩種藥物可干擾A型流行性感冒病毒的複製，其機制是透過抑制M2離子通道。但M2蛋白只存在於A型流感病毒上，故此藥並不影響B型流感病毒。雖然使用上，Amantadine和Rimantadine價格便宜並且有效，但由於其對B型流感病毒無效，且易產生抗藥性，故使用上較受限制。Amantadine和Rimantadine皆由腎臟排泄，在成人的治療及預防劑量皆為每天200mg，使用在老年及腎功能異常的人身上要減少劑量。

Zanamivir (Relenza®) 及Oseltamivir (Tamiflu®) 為N神經氨酸苷酶抑制劑(Neuraminidase inhibitor)，可阻止新形成的病毒從感染細胞釋出，降低流感病毒的散播率，並可使上呼吸道黏膜易於將病毒去活化。這些藥物並不會影響疫苗產生抗體的作用，也較不易產生抗藥性。Zanamivir口服吸收差，故採吸入劑型，需要衛生教育以達確實的使用；在氣喘及慢性阻塞性肺疾者，可能會造成氣管痙攣及肺功能降低的副作用，可用於治療七歲以上的流感病患。代謝上，主要由腎臟排泄。研究顯示，Zanamivir用於症狀出現三十六小時內的患者身上，其症狀可減短一天半；在高危險群病人身上，Zanamivir可縮短症狀持續的天數，同時也可減少併發症及抗生素的使用。Zanamivir也可用於預防成人感染流行性感冒(每天10mg服用四星期)，可減少31%的感染率。

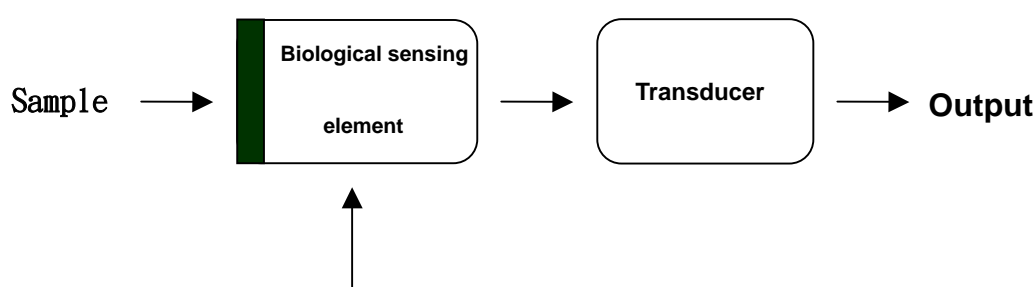
Oseltamivir(商品名剋流感)在今年正式引進台灣。口服吸收效果好，因此服用上較Zanamivir方便。屬前驅藥物，可由肝臟快速轉化成活性代謝物，此活性物不再經過代謝而直接由腎臟排出。成人的治療劑量為每次75mg，一天兩次，連續服用五天，在症狀出現四十八小時內服用效果最明顯。在腎功能異常時，必須調整劑量。研究顯示，Oseltamivir 75mg每天一到兩次，使用六週，可有效預防流行性感冒。在治療上，Oseltamivir可縮短流感病程，提早2~3天回復正常活動力，減輕流感症狀的嚴重度，並降低鼻腔內病毒數目，及縮短病毒散播時間，在服藥二十四小時內即可觀察到治療效果。同時，亦可減少氣管炎、肺炎、中耳炎和鼻竇炎等併發症。至於副作用最常見的為噁心和嘔吐，這些現象通常是短暫的，且多發生在服用第一個劑量時，若與食物一起服用，則可減少這些副作用。

流行性感冒和一般病毒感冒臨床上的區分，其病患個人病史及社區流行的資料有助於正確的診斷，但確定診斷仍須靠實驗室檢查。檢驗方法可分為四大類：病毒分離、檢測病毒蛋白、檢測病毒核酸及血清學檢驗等。病毒分離培養雖然為實驗診斷的主要依據，但是結果需二到五天，無法應用於單一病患投藥治療或感染的控制上。而偵測病毒蛋白的檢驗方法則是目前的新發展方向，雖然敏感度比不上病毒培養，但其具有耗時短且容易操作的特性，可在短時間內得到結果，因此適合於病患投予抗病毒藥物的依據，目前國外的產品包括 Directigen™、Flu OIA®、ZstatFlu™及 QuickVue®等 4 種，但只有 Directigen™可區分 A 或 B 型病毒感染。國內生技公司則以反轉錄(reverse transcription)其特定基因後再利用

DNA 檢測技術鑑定其互補股 DNA(cDNA)檢測時間約數小時⁽¹⁴⁻²¹⁾。

多通道壓電石英晶體免疫感測器

生物感測器是近幾十年內發展起來的一種新的感測器應用。生物感測器係應用生物分子之專一性辨識特性配合電子元件所構成之分析系統。主要由生物辨識材料與各種訊號轉換器(transducer)組合而成(圖二)，是一門整合了生物分子、電子與材料科學之整合技術^(22·23)。



圖二：Principle of a biosensor

本計劃將利用本實驗室發展之石英壓電感測器測量換能器表面之質量變化，作為流行性感冒之生物感測器。一般的壓電晶體系統是於石英晶體經切割研磨後於各切向上建構不同種類之電極構型以利用各種不同之表面聲波特性偵測表面質量變化情形。

壓電晶體微量天平(Quartz crystal microbalance, QCM)

1880 年 Curies 發現若對某些晶體如石英(quartz)、電石(tourmaline)、Rochelle salt 等施以機械應力，則在晶體兩側產生電位差，其大小與應力成正比，此現象稱為壓電效應(Piezoelectric effect)。1920 年 Cady 發現在晶體切面兩側表面施以電壓時，晶體會產生剪力變形，此壓電效應可用來建構非常穩定之振盪迴路。晶體天然之振盪頻率稱為基本振頻或諧振頻率，主要由其化學特性、大小、形狀、以及質量等因子決定。當晶體具有壓電性，會使振盪迴路產生振盪電場，且晶體之振頻與電場相同。

壓電石英晶體通常以兩片金屬電極如三明治般將石英晶體夾在中間。其中金屬電極一般材料為金、銀、鋁或鎳，因金最為安定，所以用途最廣。所用的壓電晶體大多為 AT-cut 之石英晶體，電極之作用為沿晶體垂直方向導入一振盪電場，此電場迫使晶體內部結晶格子產生類似立波(standing wave)之機械振盪行為。假使石英片之厚度一定，此機械性振盪會以一定頻率表現，而此諧振頻率很容易藉著導入一適當振盪路線而量測。此種由機械與電子兩種振盪所產生之諧振頻率決定於溫度、密度、剪力係數等多項因素。某些因素在正常情況下均為固定值，包括：石英晶體之厚度、密度及剪力係數等，且在某些情況下，氣體或液體接觸時晶體表面之密度、黏度及橫跨晶片兩面間之壓力差與溫度亦保持固定值等。因此

改變晶體頻率最大因素為電極之質量與附加在電極上之質量變化，此即為壓電石英晶體微量天平的主要原理。

1959年 Sauerbrey 導出在石英晶體金屬表面之質量與頻率變化之關係式，用來描述氣相狀態下壓電晶體之質量變化與頻率應答關係^(19、20)：

$$\Delta F = -2.3 \times 10^6 F^2 \Delta M / A^{6.7}$$

ΔF (Hz)：表示因質量負載所導致之頻率變化。

F：為石英晶體之諧振頻率。

M：為電極上所覆加之質量(g)。

A：表示金屬電極之面積。

隨著質量負載(ΔM)增加，頻率衰減值(ΔF)越大。若將抗體固定在金電極表面，再使固定化抗體與樣品接觸，則樣品中存在之抗原將與固定在金電極表面之抗體結合，造成質量負載增加，導致石英晶體之諧振頻率降低，而震頻降低之程度將與樣品中之抗原濃度成比例。

本年度擬建構多通道、即時量測之壓電石英免疫感測器，檢測系統係利用本實驗室現在所使用之系統加以修改，現有系統中所使用的 DAQ(NI) 介面卡為一多通道的資料擷取卡，在進行計數器的定址分配後 DAQ 介面卡可以同時進行對多組計數器進行儀器控制與資料擷取動作。同時將電腦上之 LabView 圖形介面程式撰寫之資料擷取分析與控制介面加以修改，使其能同時進行多組計數器資料之分析工作，藉以實現多通道的免疫感測器構想。建構完成之系統則與單一通道分析系統進行比較，以實際評估多通道系統之應用效益。目前本實驗試所建構之系統與設備如圖三所示。

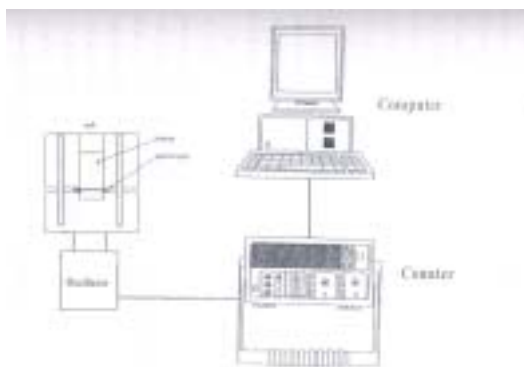
晶片直徑：8 mm

厚度：0.16 mm

電極材質：金

圓形電極直徑：3.6 mm

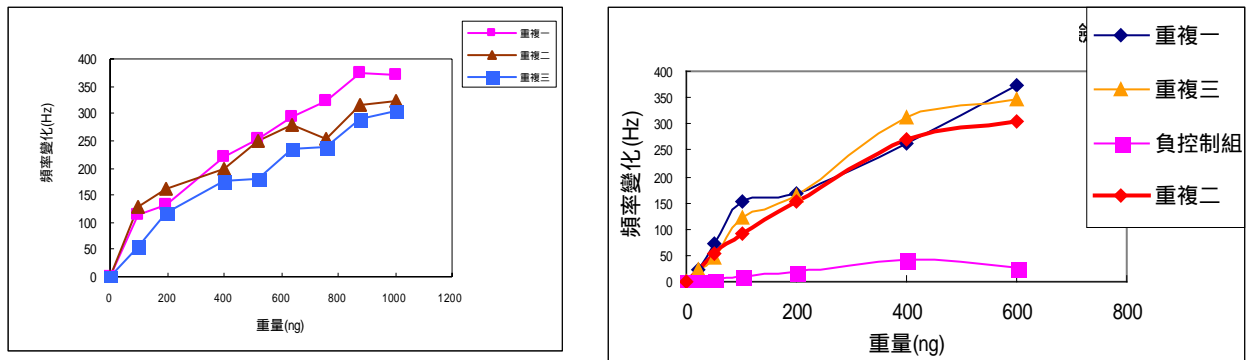
振頻：10 MHz



圖三、本研究室使用之振盪系統與石英晶片

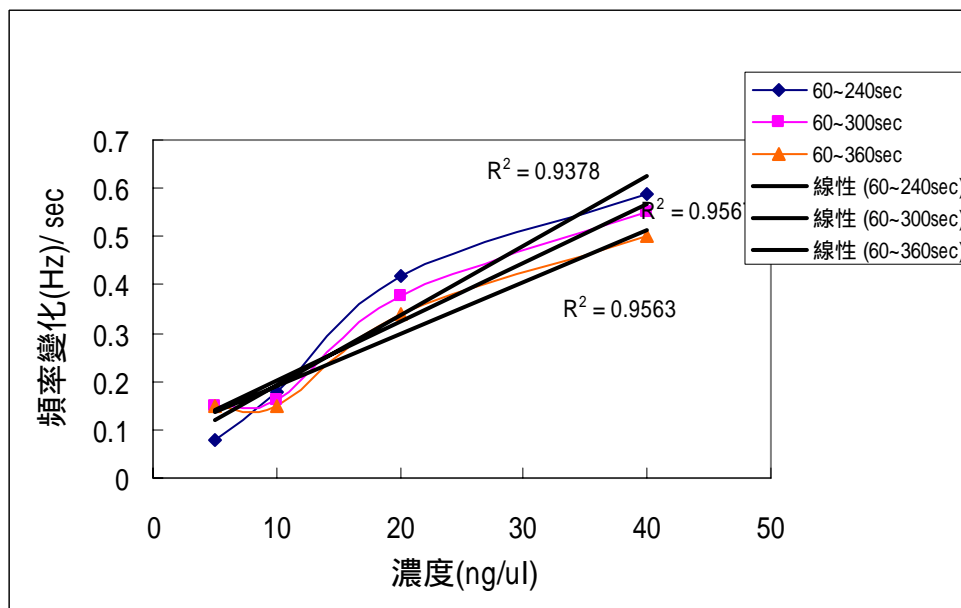
電腦控制儀器與資料擷取分析：

採用 LabVIEW(Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)之圖形化程式語言，是目前已被廣泛應用做為資料擷取分析的一套軟體。使用該軟體進行振頻量測時電腦螢幕顯示狀況如圖四所示。



圖四：LabVIEW 軟體進行本計畫之振頻量測

由結果可知檢測範圍在 500ng 後抗體抗原反應即達飽和。在 500ng 檢測範圍內其頻率的反應有很好的線性關係，其 R^2 可達 0.9。從重複一到重複三的試驗可看出檢測的結果具有良好的再線性。而從負控制組（加 BSA 取代抗原）和檢測結果的比較可知本系統的檢測具有很好的專一性。



圖五：本計畫中取不同濃度抗原在反應時間 60~240、60~300、60~360 秒內的斜率值做比較，發現它們彼此都有很高的線性度和相關性。這代表本系統可以在五分鐘內做快速的檢測。

本研究之主旨：

本計劃擬開發多重抗體流行性感冒快速檢測感測器，預計使用壓電晶體作為檢測系統，配合各型流行性感冒之單株抗體作為生物識別功能性材料，共同構築多重抗體流行性感冒快速檢測感測器。壓電晶體檢測系統因具有高靈敏度、測試時間短、成本低、測試步驟簡易等優點，目前已在免疫化學分析方面廣受注目。本計劃預定在壓電晶體電極表面固定上抗體（A、B兩型流感病毒之抗體）來辨識抗原(A、B兩型流感病毒)。預期應用固定有抗A、B兩型流感病毒的單株抗體的石英晶片，可提供A、B型流感病毒同時快速、準確之診斷。

本年度預定執行工作內容：

1. 10MHz 震盪電路修改與壓電石英晶體之取得
2. 取得國內外產製之商業化流性感冒單株抗體與抗源樣品
3. 進行石英壓電晶體之電極表面 A 型流感單株抗體固定，實際於實驗室偵測 A 型流感病毒核蛋白標準樣品
4. 進行石英壓電晶體之電極表面 B 型流感單株抗體固定，實際於實驗室偵測 B 型流感病毒核蛋白標準樣品
5. 多重抗體流行性感冒快速檢測感測器於實驗室偵測抗源(病毒核蛋白檢體)

重要參考文獻：

1. 王阡樺，A 型流行性感冒病毒 M2 核酸疫苗增強免疫效果之研究，國立臺灣大學醫事技術學研究所碩士論文台北市 (2002)
2. 王森德，老人流行性感冒疫苗接種之效能及健康經濟評估某縣流行性感冒疫苗接種計畫之經驗，國立臺灣大學預防醫學研究所碩士論文台北市 (2002)
3. 李君男，A 型流行性感冒病毒 M2 蛋白質基因疫苗之研究，行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告，臺北市 (2003)
4. 林會娣，A 型流行性感冒病毒 M2 蛋白質表現載體之構築與應用，國立臺灣大學醫學院醫事技術學研究所碩士論文台北市 (2001)
5. 科拉塔 流行性感冒，1918 流感全球大流行及致命病毒的發現，科學新視野 28 (2002)
6. 廖若吟，A 型流行性感冒病毒 M2 蛋白質免疫反應之研究，國立臺灣大學醫事技術學研究所碩士論文台北市 (2002)
7. 劉寶云，1989-2001 年台北地區分離之 A 型 H3 亞型流行性感冒病毒之 HA1

基因變異及趨細胞性之分析，國立臺灣大學醫學學醫事技術學研究所碩士論文台北市 (2001)

8. Alexander A. Kortt, Edouard Nice, and L. Clem Gruen Analysis of the Binding of the Fab Fragment of Monoclonal Antibody NC10 to Influenza Virus N9 Neuraminidase from Tern and Whale Using the BIAcore Biosensor: Effect of Immobilization Level and Flow Rate on Kinetic Analysis Analytical Biochemistry **273**, 133–141 (1999)
9. Amy B. Smith *, Valerie Mock, Rachael Melear, Pamela Colarusso, Dean E. Willis Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR Journal of Clinical Virology 28: 51_ 58(2003)
10. E.G.Brown Influenza virus genetics Biomed and Phamarcother 54:196-209(2000)
11. Eun A. J., Huang L., Chew F. T., Li S. F., Wong S. M., Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. J. Virol. Methods, 99(1-2): 71-79(2002)
12. Nicole Kessler, Olivier Ferraris, Kevin Palmer, Wayne Marsh, and Adam Steel Use of the DNA Flow-Thru Chip, a Three-Dimensional Biochip, for Typing and Subtyping of Influenza Viruses JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May, p. 2173–2185(2004)
13. Songhua Shan, Lung-Sang Ko, Richard A. Collins, Zhongliang Wu, Jiahua Chen, Ka-Yun Chan, Jun Xing, Lok-Ting Lau, and Albert Cheung-Hoi Yub, Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation Biochemical and Biophysical Research Communications 302:377 – 383(2003).
14. Lindley K.M., Su J.L., Hodges P. K., Wisely G. B., Bledsoe R. K., Condreay J. P., Winegar D. A., Hutchins J. T., Kost T. A., Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. J. Immunol. Methods, 234(1-2):123-35(2000).
15. Moa X. T., Zhou Y. P., Leia H., Denga L., Microbalance-DNA probe method for the detection of specific bacteria in water. Enzyme and Microbial Technology , 30:583–589(2002).
16. Kim Dore´, Se´bastien Dubus, Hoang-Anh Ho, Isabelle Le´vesque, Fluorescent Polymeric Transducer for the Rapid, Simple, and Specific Detection of Nucleic Acids at the Zeptomole Level. j.A.C.S. (2004)
17. Kanazawa K. K., Gordon J. G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. Anal. Chem., 57:1770-1771(1985).
18. Peter Critchleya, and Nigel J. Dimmockb Binding of an influenza A virus to a neomembrane measured by surface plasmon resonance Bioorganic & Medicinal Chemistry 12:2773 – 2780(2004).
19. Sauerbrey G.Z., The piezoelectric crystal. Physik. 91:294(1959).

20. Sauerbrey G. Z., Use of quartz crystal vibrator for weighting thin films on a microbalance. Z. Phys., 155-206(1959).
21. Saibal K. Poddar Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis Journal of Virological Methods 99 63–70(2002)
22. Richard A. Collins, Lung-Sang Ko, King-Yip Fung, Ka-Yun Chan, Jun Xing, Lok-Ting Lau, and Albert Cheung Hoi Yua, Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA Biochemical and Biophysical Research Communications 300 : 507 – 515(2003)
23. Robert Jenison, Marynnette Rihanek, Barry Polisky, Use of a thin film biosensor for rapid visual detection of PCR products in a multiplex format Biosensors & Bioelectronics 16: 757–763(2001)

參、結果與討論

1. 10MHz 壓電石英晶體之取得與震盪電路修改

經收集國內外產製之壓電石英晶體樣品，測試其反應特性並考慮價格及取得之方便性後，決定向國內生產商泰藝電子公司訂購 10MHz 壓電石英晶體兩千餘片。原使用之電路為 Pierce 震盪電路是考畢茲電路的一種改良，其上所使用之電阻決定了 CMOS 於工作點的放大倍率，並利用 RC low pass filter 使 total harmonic distortion 減到最少。本計畫除改採用新的高速 7404 系列以減少電晶體啟閉間的延遲現象，提升電路穩定度外，另外使用 7449 系列取代 inverter 作為主動元件，主要是因為新的 7404 IC 內部使用 amplifier 作為主動元件，是由多個 transistor 構成，易造成 propagation delay，故改用 7449 系列直接由更高速之 amplifier 減少 delay 現象。此外電路外加更精確之 low pass filter，以更精確控制其頻率飄移範圍，提升電路的 Q 值。

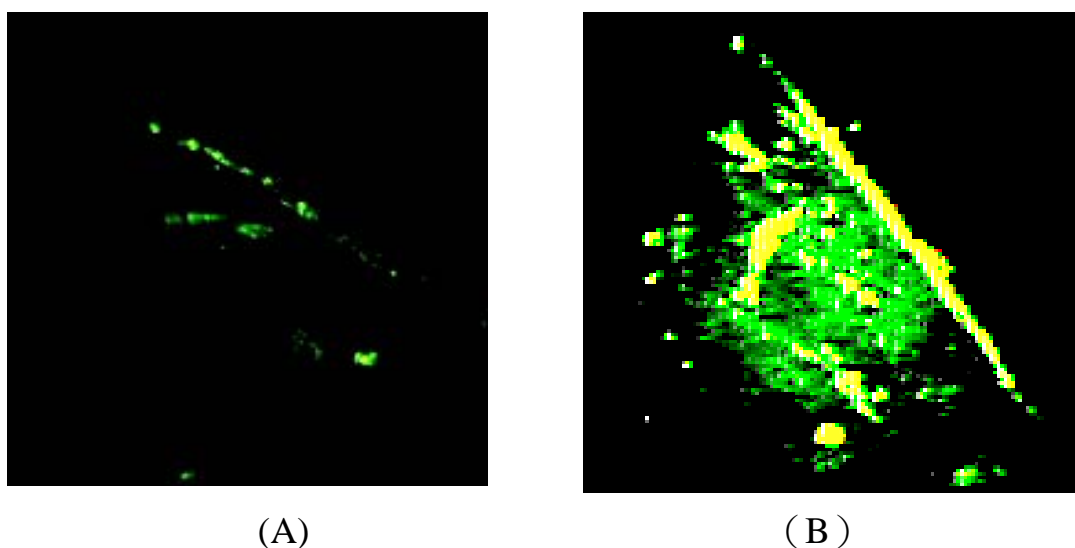
2. 取得國內外產製之商業化流行性感冒 A、B 型單株抗體與其抗原樣品。

經進行抗體之各項分析比較後，選擇優良品質廠商購買。購入之抗體與抗原等經 ELISA 定量後，再經測定其基礎特性如效價、動力學等參數後妥善保存備用。

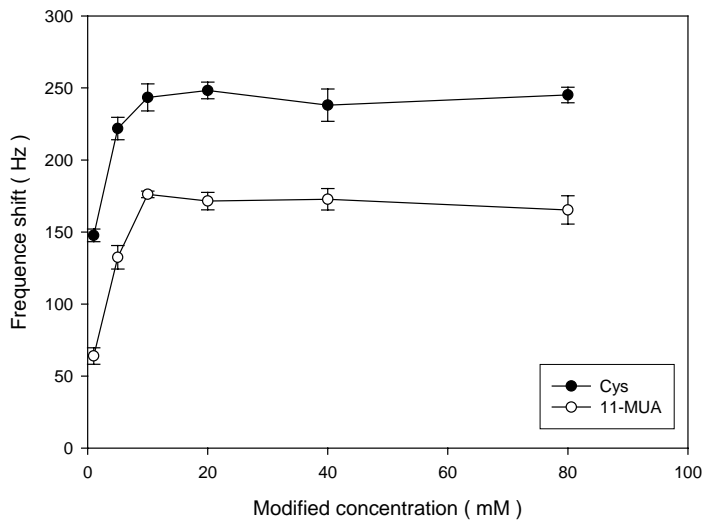
3. 將流感 A 型單株抗體固定在石英壓電晶體之金屬電極表面

本實驗室(許, 2004) 也曾經嘗試以 3 碳鏈長之 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) 配合 EDC 和 NHS 做為建構自組裝單層之材料，但是由抗體固定情形和

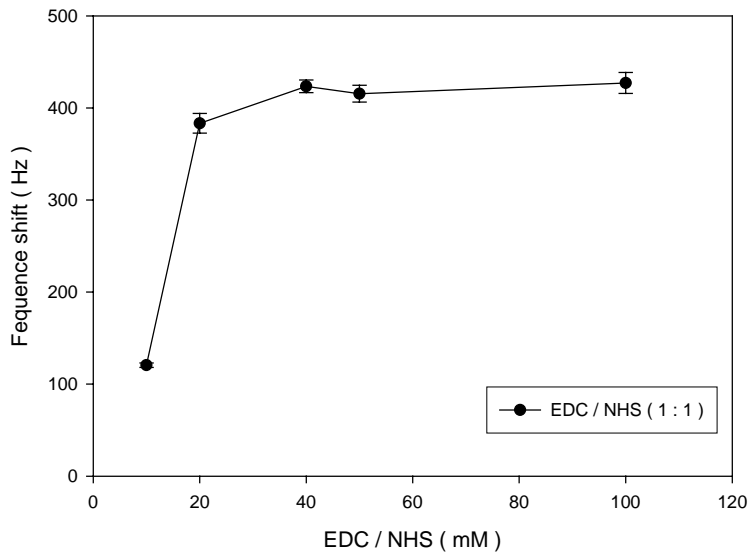
檢測結果來看不甚理想，所以參酌文獻的研究，以市面上商品化之十一碳鏈長烷基硫醇化物 11-MUA 做為自組裝單層膜之材料。而 Cystamine-glutaraldehyde 法是參酌本實驗室歷年來研究結果所歸納出之抗體最佳固定方法，所以本研究以此兩種方法在石英晶體電極表面建構自組裝單層膜。從兩種固定法之結構圖來看可知，因為 Cystamine 和 glutaraldehyde 的反應是藉由胺基和醛基之縮合反應，在單層膜中間疏水性區域上含有 -NH- 基團，推測此基團會破壞單層膜的規則排列和形成之穩定度，加上部分 glutaraldehyde 兩端的醛基 (-CHO-) 也會和金電極上經 Cystamine 修飾後所裸露的胺基(-NH₂) 彼此相互反應，這樣便會降低抗體固定於電極表面的機會；相較 Cys 和 GA 法，11-MUA 藉由 EDC 與 NHS 活化一端之羧酸基團使之與抗體反應。11-MUA 中間為長碳鏈疏水性結構，比起前述方法更能形成穩定規則的單層膜，抗體固定效率相對來說比較好。此結果可對應台大化工系研究烷基硫醇自組裝單分子層於金電極上之電化學特性，其研究結果指出十二碳鏈長之烷基硫醇自組裝單分子層有最緊密和規則的排列。然而抗體固定量高並不代表反應活性就會比較好，因為這還牽涉到抗體固定在晶片表面的位向，是否有立體障礙的產生，抗體活性是否受到表面修飾的影響等等，所以必須再觀察兩種固定法在樣品檢測上的反應再做比較。



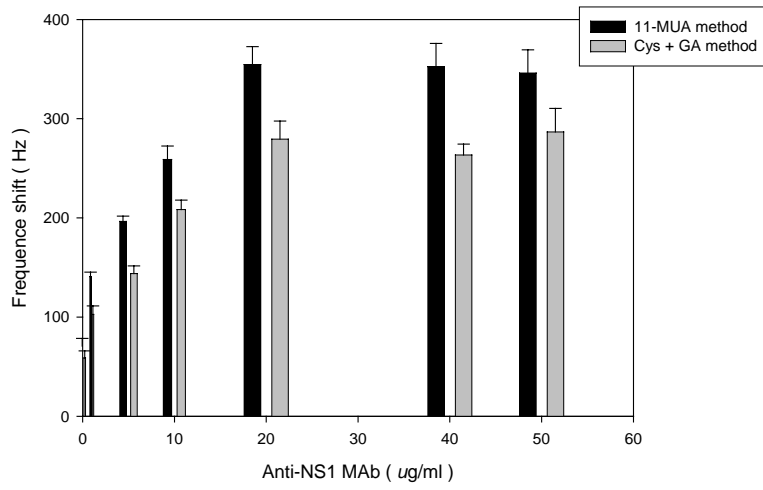
圖六：利用螢光顯微鏡觀察抗體 IgG-FITC 於石英晶體金電極表面固定化情形。(A) 物理吸附法 (B) Cystamine-glutaraldehyde 法
經檢討比較後，選定 11-MUA 自組單層分子膜(self- assemble monolayer; SAM) 技術，順利進行流感 A 型單株抗體之固定化。



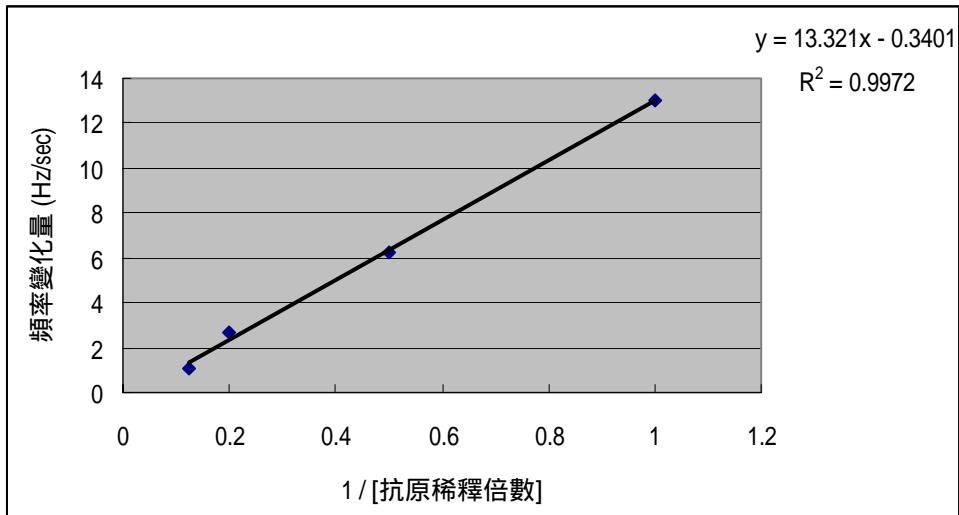
圖七：不同催化濃度之 EDC/NHS (1:1) 對振頻移差之關係



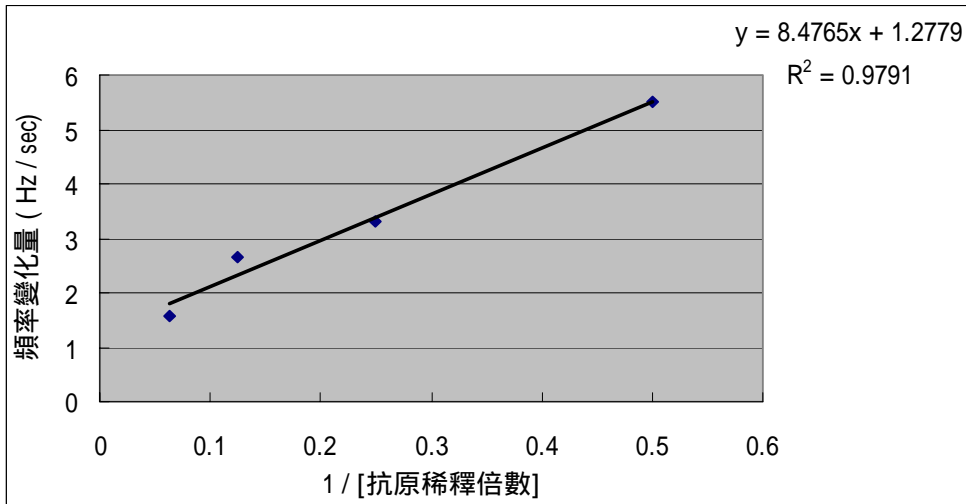
圖八：不同濃度 Cys 和 11-MUA 對振頻移差之關係



圖九：利用兩種不同固定法將單株抗體固定於石英晶體電極表面對振頻移差之關係。



圖十：以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法固定 A 型(H3N2)抗體，對 A 型(H3N2)抗原之檢測結果。 檢測時間：25 秒 抗原最高稀釋倍數：8

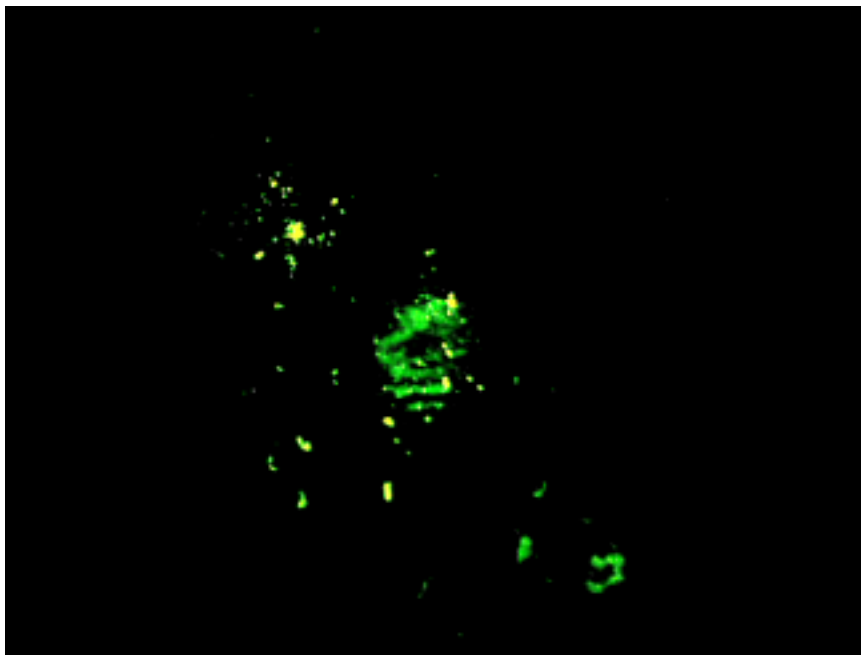


圖十一：以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法固定 A 型(H1N1)抗體，對 A 型(H1N1) 抗原之檢測結果。 檢測時間：60 秒 抗原最高稀釋倍數：16

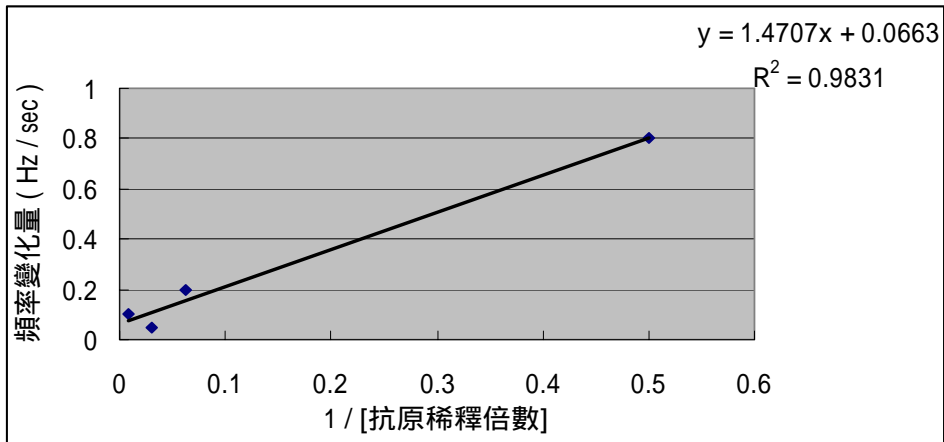
當濃度達 20 mM Cys、10 mM 11-MUA 時，頻率反應已達飽和，以此條件繼續第二層修飾之探討。由實驗得知以 40 mM EDC/NHS 條件下有最高之抗體固定量，表示此濃度對於 11-MUA 有最佳之催化效果。

4. 將已固定流感 A 型單株抗體之晶片，配合經改良的震盪線路、計頻器、以及由個人電腦構成之訊號處理與儲存系統，構成整體 A 型流感感測器。
5. 將流感 B 型單株抗體固定在石英壓電晶體之金屬電極表面。

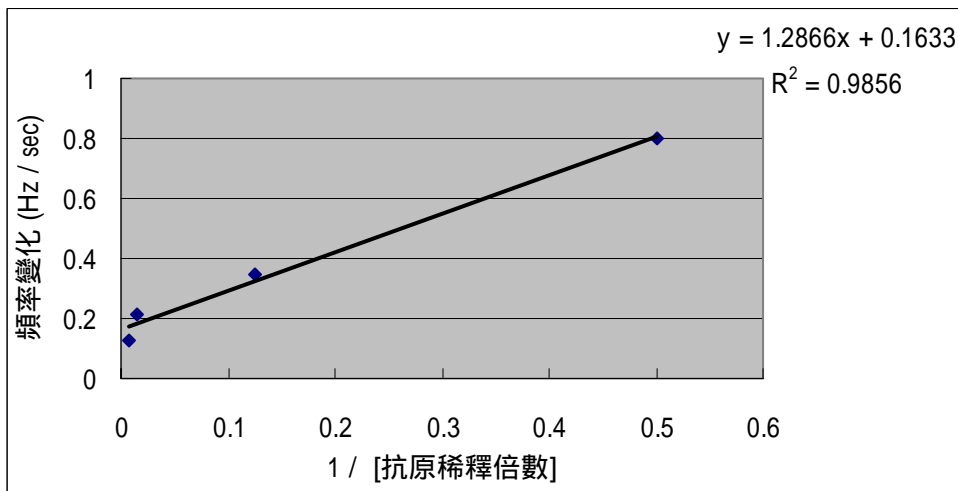
經檢討比較後，選定 11-MUA 自組單層分子膜(self- assemble monolayer; SAM) 技術，順利進行流感 B 型單株抗體之固定化。



圖十二：B 型抗體以 Cystamine-glutaraldehyde 法固定



圖十三：以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法固定 B 型(Sichuan)抗體，對 B 型(Sichuan) 抗原之檢測結果。檢測時間：60 秒、抗原最高稀釋倍數：128



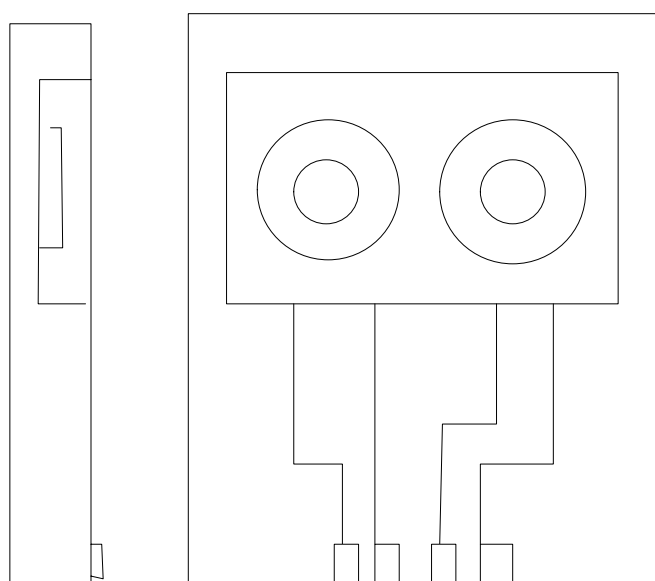
圖十四：以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法固定 B 型(Hong Kong)抗體，對 B 型 (Hong Kong) 抗原之檢測結果。檢測時間：40 秒、抗原最高稀釋倍數：128

6. 將已固定流感 B 型單株抗體之晶片，配合經改良的震盪線路、計頻器、以及由個人電腦構成之訊號處理與儲存系統，構成整體 B 型流感感測器。

7. 多重抗體流行性感冒快速檢測感測器於實驗室偵測抗源(病毒核蛋白檢體)

已將本研究室自行製備多套 10MHz 之 A、B 單項檢測用 QCM 系統的電路系統結合構成一雙通道檢測系統，固定 A 與 B 型的流感病毒之抗體，同時進行

檢測，實現雙通道的免疫感測器構想。建構完成之系統具有實際應用效益。



圖

結論與建議

經由本年度計畫之順利執行，可證明依照本計畫之構想去設計多通道免疫反應型石英震盪晶片微天平生物感測器之可行性。本計畫雖然只使用兩種單株抗體構築雙通道同時量測免疫感測器，但是依照本計畫相同模式之構想，可隨時擴增購築多通道感測系統，用以同時檢測同一樣品中之多種成分，有潛力成為臨床檢驗或流行病防治之有用工具。

可是被用於本計畫之石英震盪晶片電極，因為係以應用於電子電路為其主要用途，因而不易適用於生化反應之用途。所取得之電極常發生金屬成份因無法耐受抗體固定化流程而剝落、或是相對於電極表面之相同質量負荷所發生的震頻移差卻有極大出入等問題。這些問題顯示目前製造電子電路使用之石英震盪晶片之程序，其精密度尚不足以應付生化反應之需求，因此日後若有擴大規模產製免疫感測器之計畫時，必須事先尋求晶體生產廠家之同意配合，以求取得具備更佳品質之晶片。

除了使用石英震盪晶片以外，目前本研究室正積極進行以半導體製程自製交叉指狀電極，再配合表面彈性波使用之高頻震盪電路構築敏感度更高之微質量檢測系統，不久將來應可應用於更靈敏之免疫反應型生物感測器之開發應用。