

計畫編號：DOH89-TD-1079

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

表面電漿波相位生物感知器應用在 E. coli
快速檢驗之研究
Phase-sensitive Surface Plasmon Wave Sensor for E. coli
Identification

研究報告

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：周 晟

研究人員：彭莉真 郭文娟

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
本文	3
(1) 前言	3
(2) 材料與方法	8
(3) 實驗結果及討論	11
(4) 結論	12
參考文獻	14
圖表說明	15
圖一	16
圖二	16
圖三	17
圖四	18
圖五	18
圖六	19
圖七	19
圖八	20
圖九	20
圖十	21
圖十一	21
圖十二	22
圖十三	22
圖十四	23

圖十五	-----	23
圖十六	-----	24
圖十七	-----	25
圖十八	-----	26
圖十九	-----	28

中文摘要

發展一種創新的，以相位偵測(phase detection)之 SPR (surface plasmon resonance) 生物感知器(biosensor)用以快速偵測 *E.coli* 是本研究計劃的主要目標。利用相位偵測技術取代傳統上以振幅(amplitude)偵測技術進行抗原-抗體的確認(identification)以及濃度量測(affinity/concentration measurement)靈敏度可大幅提高;然而系統的穩定度以及對外界環境的敏感度的要求亦相對提高。本研究計劃在提出一種光學共同路徑(optical common path)外差干涉技術(optical heterodyne interferometry) 利用鎖相放大器(lock in amplifier)即時量測 SPR 金(Au)薄膜(50nm)表面上單分子膜(self-assembled monolayer SAM)因吸附 *E.coli* (抗原-抗體)而造成光折射率的改變使得入射的線偏極化 P 波(P polarized wave)在 SPR 共振角附近因全反射產生相位的改變。藉由在產生表面電漿波之共振(surface plasmon resonance) 入射角 θ_0 附近的相位 Φ 對應入射角 θ 的改變率

$\left. \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right|_{\theta=\theta_0}$ 之高敏感度，可有效的快速測量 *E.coli*。

中文關鍵詞(至少三個)：大腸桿菌，表面電漿波，極化光

Abstract

A novel phase sensitive surface plasmon resonance (PSSPR) base biosensor as an analytical tool to study the kinetics of interaction of E. coli antibody antigen association is proposed. A polarized optical heterodyne SPR interferometer, which is based on an optical common path configuration and shows the ability of immunity from the environmental disturbance, has been set up. This optical system was used to identify the E. coli by measuring its affinity/concentration from the Beta-D-glucuronidas (GUD), the specific enzyme of E. coli, and its antibody. The self-assemble monolayer SAM is coated on the Au film, where the S-Au covalent binding was arranged. A GUD antibody, which was bound on SAM, absorbs the GUD antigen of the tested sample. The phase change of the reflected P polarized wave at the resonance angle of SPR module is detected when GUD antibody is being bound with GUD antigen during the test. A high sensitive SPR biosensor based on the phase detection, which is 100 times better than conventional amplitude sensitive SPR biosensors, is implemented and demonstrated.

Keyword: E. coli, surface plasmon wave, polarization

本文

(1) 前言

一般傳統常用的免疫檢測技術可分為螢光抗體法，酵素免疫法以及放射免疫法。

1. 螢光抗體法(Fluorescent Antibody Method, 簡稱 FA):

主要將螢光染料，如 FITC (fluorescein Isothiocyanate) 加在抗體上，當與抗原如細菌的表面抗原作用後，由於抗原抗體的特異性結合，可使菌體表面呈現黃綠色的光，利用螢光顯微鏡強光照射下，以特定濾鏡除去可見光，使光集中在一定的波長範圍內而可觀察。通常可利用直接法，尤其是利用抗體測未知抗原的存在，或利用間接法測定抗體，為細菌或真菌實驗室診斷中常用的方法。

2. 酵素免疫法(Enzyme-Linked Immunoabsorbent assay, ELISA):

將酵素如附著於抗體上，可用於測定抗原和抗體的存在，是診斷人類遺傳性疾病時常使用的一種極為敏感的方法。一般可分為直接法與間接法兩種，直接法多用於測定抗原的存在，可將預測之抗原直接附著於上，加上已知抗體作用；間接法則用於測定某特定抗體，將已知抗原附著於上，加上預測之抗體作用後，再加上經酵素標誌之二次抗體，由顏色之變化，而知抗體與抗原之反應。

3. 放射免疫法(Radioimmunoassay, RIA):

傳統的方法是利用競爭性原理，加入超量的標誌同位素的抗原與未標誌抗原(也就是待測物)，與較少量的抗體作競爭性結合。若實驗結果所量到的結合物 抗原加抗體之放射活性較高，表示待測物的濃度較低，反之則相反。

現今常用的是 IRMA，又稱三明治法，先將第一抗體依固相方式吸附在試管壁或塑膠材質上，在將檢體(抗原)加入此試管內培養一段時間，以水洗去未結合之抗原，再加上標誌放射性同位素的第二抗體，再培養一段時間，洗去未結合抗體，此時留在試管內的即為三明治式的〈抗體—抗原—標誌抗體〉的複合物，此時所量到的放射性與待測物濃度成正比。

另外一種新的生物感測器--表面電漿波生物感知器 SPR (Surface Plasma Resonance biosensor)，它是由光學衰減全反射(Attenuated total reflection ATR)的方法發展出來，與傳統免疫檢測法的主要差別有：

- (1)它是利用反射光強度的改變來偵測，不需標誌螢光染料。
- (2)可省去傳統方式的前處理、後處理，及多次沖洗分離的過程。
- (3)其速度與靈敏度都較以往的檢測法快速而有效，尤其可做即時的動力學分析，更是傳統檢測法無法做到的。

瑞典 Biacore 公司於 1991 年正式推出 SPR 生物感知器，這是一種應用光學特性去進行生物分子間交互作用的即時偵測生物感知器，目前應用涉及到生物學中分析、動力學(kinetics)、親和力(affinity)測定、免疫識別、結構與功能分析、基因調控、神經生物學和藥物開發等多個領域，具有較傳統生物檢測法更迅速及更靈敏的功能，現有 SPR 表面電漿波生物感知器所使用的方法是直接測量線偏極化光 P wave (TM wave) 的反射光強度的變化量來決定其抗原-抗體結合的情形，以及藉此能確認抗原的種類及其濃度，由於利用反射光強度的改變來精確量測因抗原-抗體結合所引起折射率(index of refraction)的變化，所造成表面電漿波在金屬薄膜上的特性變化，引起反射光強度改變，均假設入射雷射光的強度穩定性很高，以至於反射光的強度的變化均由於抗原和抗體的結合所產生，然而在實際的量測上，因雷射共振腔的溫度變化而造成輸出的雷射光強度的不穩定性可達 1%以上，足以造成量測上的誤差，然而如將光強度信號轉換成為相位(phase)信號，則在系統的雜訊及穩定性上可大幅提高，主要是相位的變化對外界環境的改變較不敏感，相對於振幅變化，相位的穩定性較佳，自然在偵測及確認 E.coli 的能力上可有效的提昇。

SPR 工作原理

表面電漿波是存在於金屬表面的一種模態(mode)，我們知道金屬是一種導體，所謂導體即內部充滿自由電子，大約是 $10^{28}/\text{m}^3$ ，當這些電子受到外加變化電場的作用而產生集體振動，並沿著''表面''以波形式傳播，故稱之為電漿波 (surface plasma wave, SPW)；而此處''表面''，是強調 SPW 存在於金屬與某種介電質之間(例如金屬與水酒精或空氣---等電中性的介質之接觸介面上)。介電質(dielectric medium) 屬於一種絕緣體，即內部無自由電子，當受到外加變化電場影響才會表現出極化現象(Polarization)的物質。

表面電漿波的一個重要特性是:它除了在很高頻的時候外，都是非輻射式的，即不能用一束光直接照在金屬表面上來激發表面電漿波，而是需要藉由某種耦合(coupling)的結構使入射光在平行介面的方向上之傳播常數(wave vector)與表面電漿波的一致即它們的動量要相等，也就達到共振的狀態，此時表面電漿波會將入射光能量帶走，造成反射光的強度下降。

最常用的方法產生 SPW 為衰減的全反射法(attenuated total reflection,ATR)，是由 Otto 於 1968 年所提出，光學架構較複雜（如圖一）因此採用在 1971 年由 Kretschmann 所提出的方法，他用光學稜鏡為耦合元件，直接將金屬真空鍍膜於稜鏡的底面，然後緊接著介電質。而在金屬與介電質介面激發 SPW（如圖二）。兩者都是藉由 ATR 方法所激發 SPW，金屬薄膜的厚度約 50 nm，對 SPW 的產生相當敏感。

當一道 P-偏極化光(或 TM wave)以大於臨界角的角度入射至稜鏡內及金屬表面，會發生全反射現象，在垂直平面仍有縱向的衰減 (attenuated) 電場存在，這些電場的傳播常數在垂直介面的方向上是虛數，故其強度成指數衰減，稱為消散波(evanescent wave)。

消散波為一種非均勻平面波，它可用來產生表面電漿波，因為它能引發一些表面電雙極(electric dipole)，在光波的入射角等於表面電漿波的共振角時，這些表面電雙即將隨著入射光電場的變化而共振，以面電荷密度變化的方式在介面上的傳遞，然後將能

量轉變為材料中的聲子而被吸收，因此反射率會明顯的降低。

若以 k 表示波的傳播常數 (或稱傳播向量)

在真空中的傳播常數 (wave number) $K_0 = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{\omega}{c}$, λ 為波長 (wavelength)

在介質中的傳播常數 $K = nK_0 = \left(\frac{\omega}{c}\right)(\epsilon_r)^{1/2}$

ω : angular frequency 光頻率 ϵ_r : dielectric constant 介電常數

n 為折射率 (index of refraction) $n = \left(\frac{\epsilon}{\epsilon_0}\right)^{1/2} = \epsilon_r^{1/2}$

由圖二中，P 波反射率可表示成

$$r_p = \frac{(r_{12} + r_{23} \exp(2ik_{z_2} d_2))}{(1 + r_{12}r_{23} \exp(2ik_{z_2} d_2))} \text{-----}(1)$$

d_2 為金屬薄膜的厚度

$$r_{12} = \frac{(Z_1 - Z_2)}{(Z_1 + Z_2)} \text{-----}(2)$$

$$r_{23} = \frac{(Z_2 - Z_3)}{(Z_2 + Z_3)} \text{-----}(3)$$

$$Z_i = \frac{\epsilon_i}{k_{zi}}, \quad k_{zi} = \left(\epsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - k_1^2 \right)^{1/2} \text{-----}(4)$$

$i=1,2,3.$

$$k_1 = \left(\frac{\omega}{c} \right) \sin \theta \epsilon_1^{1/2} \text{-----}(5)$$

SPR 的產生有一重要條件，即入射光動量與表面電漿波的動量需相等

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \epsilon_0^{1/2} \cdot \sin \theta_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2} \text{-----}(6)$$

上式中 ϵ_0 為稜鏡的介電常數， ϵ_1 為金屬的介電常數， ϵ_2 為介電質的介電常數，介電常數則是用以代表材料性質，而其值等於折射率的平方關係 ($\epsilon^{1/2} = n^2$)，又因 Eq(1) 中稜鏡與金屬的介電常數為已知且屬於固定的值，故可的到共振角 θ_{sp} 與某介電值的介電常數 ϵ_2 之關係

$$\theta_{sp} = \sin^{-1} \left[\frac{\left(\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2}}{\epsilon_0} \right] \text{-----(7)}$$

若金屬膜下改接一折射係數較大的介質(n_2)，對應較大的 ϵ_2 會造成 θ_{sp} 的改變。

將共振角的改變與反射光強度大小作圖，就可得到如圖三的結果。

所以 SPR 作為生物感測器的重要因素就在於金屬膜表面所接觸被測試檢體所造成折射率變化，而引起 θ_{sp} 的改變相當敏感，利用 SPW 最低能測到折射率變化可達 $\Delta n=10^{-6}$ 。

由 SPR 的產生原理可知，當金屬膜所接觸的介質係數 ϵ_2 越大(即折射率越大)，則共振角就越大。若先將抗體固定於金屬膜上，得到第一個共振角 θ_1 ，再將待測物接觸金屬膜表面，當測試溶液中有與抗體相符合的抗原，抗原就會與抗體結合，並附著在金屬膜表面，使得金屬膜相鄰的介面上，產生折射率的改變，因此會得到另一個共振角 θ_2 。

表面濃度越高，則共振角越大。

圖四和圖五可清楚表示出反射光強度變化和共振角改變的關係，它們所滿足的條件如 Eq(3)。

由上述的原理清楚了解到反射光強度因受到表面電漿波的產生而降低，同時共振角也隨著金屬表面附著抗原抗體的濃度而改變折射率大小造成共振角度偏移，但由 S.Shen etal 所發表的論文發現，在共振角附近的 p 波反射光在相位的變化上更是敏感，圖六中實線部分和虛線部分分別表示相位和反射強度的變化曲線，由曲線 A 中所表示薄膜厚度為 45 nm 的銀 (Ag) 金屬薄膜在共振角附近，相位在 -100° 到 150° 之間變化，由本實驗所使用的鎖相放大器 (Lock-in Amplifier) 的量測靈敏度以 0.1° 計算，可得到 10^4 的信號雜訊比值(SNR)相對於強度變化範圍 0.1~ 0.8 的範圍，以量測精度為 0.1 % 的條件，振幅信號的 SNR 為 10^3 。因此，SPR 相位敏感(phase sensitive)的生物感知器應可提高 10-50 倍的偵測靈敏度。

(2) 材料與方法

本研究計劃中所使用產生表面電漿的金屬薄膜為金(Au)，其厚度為 45nm，屬於 Biacore 公司 CM5 感應片，將抗體與抗原是以直接捕獲 (direct capture) 的方式結合。。

然而 CM5 感應片如何將有機物的抗體接在無機物的金屬 (Au) 表面上，主要是藉由一種自發吸附性的單分子膜，稱為 SAM(self-Assembled Monolayer)，也就是利用它能自發性的與金屬膜產生強力共價鍵結，而同時又能用另一端與有機物以直接耦合方式 (Direct coupling) 結合抗原與抗體。而產生金屬表面折射率的改變。

SAM 的結構如圖七，分為三部份 (A,B,C):

- A: 頭端：自發吸附的主因是單分子的頭端基團與基質得強力鍵結，目前大致有三種方式---Si-O，CO₂Ag⁺，S-Au(Ag,Cu)，以最後一種最常用於生物感測器，它利用硫醇或雙硫醇分子在金銀銅表面成膜因為硫原子與金原子的空軌域作共價鍵結，具有較佳的規則性與穩定性，且金為相當不活潑的金屬，耐酸鹼。
- B: 碳鏈：碳鏈間的凡得瓦力決定 SAM 的規則排列。
- C: 尾端：改變尾端官能基就能創造新表面的特性。而反應的特異性就完全決定於偶在感應片上生物分子(配體)的特性。

聚焦式衰減全反射法

表面電漿波的應用範圍包括金屬薄膜光學特性的量測,光學式的化學及生物感應器,以及表面非線性光學等。在可見光的頻譜裡,表面電漿波的實驗方法屬於的衰減的全反射法,簡稱為 ATR (Attenuated total reflection),由於聚焦式的 ATR 實驗方法有其特殊的優點,因此特別討論以這種方法來量材料的反射率曲線,並應用在生物感知器上。

平行光式的衰減全反射法

傳統的 ATR 實驗架構如圖八所示。入射光是一束平行光, Pol. 是偏光片, B.S. 是分光器, D1, D2 是兩個光偵檢器。使用 D1 的目地是要監看雷射光源輸出功率的穩定性。金屬真空蒸鍍到稜鏡的斜面上, 然後將稜鏡放在一個旋轉台上。調整偏光片, 使入射光為 p-偏極光。旋轉旋轉台以改變入射光對稜鏡的入射角, 便得到稜鏡在各個入射角的反射光強度 I_p 。將 I_p 除以入射光強度, 或是乘以分光器的分光率, 就得到稜鏡的反射率 R 。另外, 因為表面電漿波無法用 s-偏極光產生, 所以當入射光為 s-偏極化時, 稜鏡的反射率在在大於臨界角的部份為 100 %。因此將偏光片旋轉九十度, 使入射光為 s-偏極光, 將所量到的稜鏡的反射光強度 I_s 來除 I_p 也可得到 R 。這個方法比用分光器的分光率計算 R 來得更可靠、方便, 因此被廣泛的採用。

前述以 I_s 為量取稜鏡反射率的歸一化因子的方法有一項限制: 表面活性介質必需為非吸收性的, 亦即其介電常數必需滿足 $|\epsilon_r| \gg |\epsilon_i|$ 的關係。否則很可能當入射角在臨界角附近時會發生 $I_s < I_p$ 的現象, 而造成反射率大於一的不合理結果。可是由 Fresnel 的反射理論可知, 介面對 s-偏極光的反射率 R_s 永遠大於對 p-偏極光的反射率 R_p , 亦即 $R_s \geq R_p$, 如此怎麼會使量測值發生 $I_s < I_p$ 的情形呢? 道理在於 Fresnel 的理論只考慮在單一介面上的反射, 而 ATR 實驗是個雙介面系統, 量測的結果實際上是由兩個介面的反射光所產生的干涉現象, 自然不同於 Fresnel 的理論。 $R_s < R_p$ 的事實可以從模擬的反射率曲線得到證明。P-偏極光的反射率曲線用 Eq(1) 可以算出圖九是分別以銀與鋁為表面活性介質算出的反射率曲線。在圖八中 R_s 為一直線, 表示 S-偏極光無法產生表面電漿波。

此外不論入射角的大小, S-偏極光的反射率都大於 P-偏極光的, 亦即 $R_s > R_p$ 。由此也證明了前述將 I_p 除以 I_s 以得到 R 的作法是合理的。

為使入射光束能夠同時涵蓋適當的入射角是一個重要的實際上的考量。某些材料(譬如銀)的反射率曲線的半高寬很窄, 為了要精確的找出共振角的位置, 入射光束所涵蓋的入射角要儘量的小, 以增加角度的解析度。相反的, 對於像鋁這種吸收性材料而言, 反射率

曲線反射率曲線的半高寬度很寬,因此入射光束所涵蓋的入射角要儘量的大,才能得到完整的反射率曲線。入射角的計算參考圖九。

假設入射光為平行光,光束直徑為 l 聚焦透鏡的焦距為 f 那麼聚焦光束所涵蓋的角度 α 為

$$\alpha = \tan^{-1}\left(\frac{l}{2f}\right) \text{-----}(8)$$

如果這束光的光軸垂直於直角偶合稜鏡的入射面,它在稜鏡底面所涵蓋的入射角為

$$\theta = \frac{\pi}{4} \pm \sin^{-1}\left(\frac{\sin \alpha}{n}\right) \text{-----}(9)$$

由這些關係式,可以算出最合適的 f 與 l

為驗證理論與實驗相符,首先進行以 Kretschmann 的光學模組配合聚焦式衰減的全反射實驗架構如圖十一進行金屬膜鋁和空氣介面的 SPW 反射光衰減實驗。稜鏡的細部結構表示於嵌圖中。鋁膜的厚度小於 10nm。光源為 p-偏極化的氦氖雷射, $\lambda=632.8\text{nm}$ 。平行入射光的直徑 $l=19\text{mm}$;透鏡 L 的焦距 $f=64\text{mm}$; 稜鏡為直角 BK7 玻璃 $n=1.515$ 。入射光束所涵蓋入射角 θ 可由前述的公式算出為 $(45^\circ \pm 5.56^\circ)$ 。這個範圍的角度除了包括臨界角之外,所得到的反射率曲線也很完整。S 是一張半透明片,用以使稜鏡的反射光在其上成像。一台有 512x512 個像素(pixel)的 CCD 相機與一片插在個人電腦中的影像處理卡(frame grabber)將 S 上的影像轉變成灰階(grey level)式的數位信號,並且予以儲存

附圖十二與附圖十三分別是鋁膜與鏡面的反射光在 S 上所形成的影像。在照片的橫向上,已可看出類似位於影像中心的橫向像素作為所量到的光強度分佈,然後用一電腦程式將影像檔中這條橫向像素的灰階取出,另外存檔。圖十四為鋁膜反射光的灰階分佈,其中第二個峰值是雷射光本身的高斯式(Gaussian)強度分佈。圖十五是鏡面反射光的灰階分佈,為一單純的高斯式(Gaussian)強度分佈。在圖十四與圖十五的資料中,被光束涵蓋的像素才是有效的。將圖十四中有效像素的灰階除以圖十五中的,便得到歸一化的反射率曲線。圖十六中的小方塊實驗數據方塊便是這樣得來的。原來的高斯式強度

分佈已經被消除,而且在臨介角附近也沒有 $R>1$ 的情形。圖十六中的數據所對應的入射角是有效像素轉換過來的。轉換公式為;第 x 個有效像素所對應的入射角

$$\theta(x) = \theta_{\min} + (\theta_{\max} - \theta_{\min}) \frac{x}{m} \text{-----}(10)$$

其中 m 是有效像素的總數, θ_{\min} 與 θ_{\max} 分別為入射光所涵蓋入射角的最小值與最大值。將圖十六中小方塊的值用最小平方平均值(least square mean)和 Eq (1) 式作曲線擬合(curve fitting)以找出鋁膜的介電常數及厚度,結果為; $(\epsilon, d)=(-47+12i, 8\text{nm})$ 。算出來的鋁膜的介電常數與參考值極為接近。而這些值所代表的反射曲線為圖十六中的實線部分。圖八~圖十六出自本計畫主持人所指導張克蘇博士論文---表面電漿波在吸收性材料表面的傳播特性之研究---的實驗結果。僅供參考說明。

(3) 實驗結果

圖十七(a),(b)為本研究計畫光學外差干涉系統的穩定性測試,其振幅的穩定度為 0.5%,相位的穩定度為 $0.25^\circ / 0.5\text{hr}$ 。可清楚看出來本實驗架構的相位穩定度,由理論推論在產生表面電漿波共振角附近所產生的相位改變為 $-100^\circ < \Phi < 150^\circ$, 由 $0.25^\circ / 0.5\text{hr}$ 的相位穩定性可預估本實驗方法有 $250^\circ / 0.25 = 10^4$ 的 SNR。

圖十八(a) (b)為 SPR 組件的結構圖,稜鏡的材質為 BK-7 玻璃,介質係數為 $\epsilon = 2.298$, 折射率 $n = 1.5159$, 由 Biacore 所提供的 CM-5 感應片在金薄膜表面鍍上一層玻璃。(但無法有效知道 n 值), 由於稜鏡和玻璃中間有空氣間隙必須要有 index matching oil 填充方可達到同一介質的條件而滿足表面電漿波的共振條件。

圖十九為利用 Biacore CM-5 感應片在共振角附近所量測得到的 P 波反射強度變化圖,其中共振角發生在 $\theta = 45.66^\circ$, 而全波半高 (FWHM) 的寬度為 1.5° 。這和理論上計算 FWHM 為 1° 有 0.5° 的差距,主要原因在於可能得折射率的未能完全配合以及雷射的入射角度因雷射光的平行度未達到實驗的要求,以致於入射角有一定的分散 (divergent) 而造成每次產生表面電漿波時強度變化和入射角度的分散角形成 convolution 而造成 P 波的強度衰減變化比理論值更寬,同時,強度的衰減也無法達到

近乎零反射率的狀態，以上都可經由將雷射光束經過一空間濾波器 (spatial filter)和一顯微物鏡組合再配合光束放大裝置而達到，原因是空間濾波器能摒除雜波並使得雷射光的平行度大幅增加，使得 P 波所產生的 SPW 能達到預期的效果。然而折射率的不吻合是最可能的誤差由於事屬 Biacore 公司商業機密只有一再試驗方可知曉。由於圖一中由 Kretschmann 的結構已經達到理論預期，原因是 Kretschmann 沒有 index match 的問題，而本研究計劃因使用 CM-5 感應片和稜鏡分離，只靠預估的折射率無法達到理想的 Kretschmann 架構自然較不易有圖的結果。由於本實驗線仍在測試階段，尚未完成最佳的 P 波因 SPW 的衰減反應，當雷射平行光完成平行度的要求，應可即時利用已架設完成的外差干涉儀進行相位變化的即時測量，由圖中已可預估相位在表面電漿波共振角附近的變化，在實際的相位量測上亦應獲得相對的反應，而大幅提高 SPW 相位生物感知器的偵測靈敏度，這是本研究計劃的主要目標之一。

(4) 總結與討論

大腸桿菌 (E.Coli) 檢體的準備工作是利用 GUD(β -D-glucuronidase)和 E.Coli 有 98% 的相關性 (Correlation)，藉由 GUD 抗體吸附在 CM-5 感應片的 Au 表面上，再和由台北榮總臨床生物科提供病人大腸桿菌的血液培養體 (blood culture) 進行結合而造成折射率的改變達到 P 波反射強度的改變進而確認 E.Coli 的存在是目前還在進行中的實驗。

發展一種以相位 SPW 生物感知器應用在 E.coli 的定性和定量的偵測上是本研究計劃的主要目標，目前已完成實驗光學系統的架設，並已完成光學系統的振幅和相位穩定性測試，並已達到相位在 $0.25^\circ / 0.5\text{hr}$ 和振幅 0.5% 的穩定度，由理論計算相位在共振角的變化為 $-100^\circ < \Phi < 150^\circ$ ，如以 0.25° 的相位穩定性計算本系統在相位的信號雜訊比值(signal to noise ratio SNR) 為 10^4 。本計畫目前已完成 SPW 光強度反射率的測試，其中先以直接在 Bk-7 零鏡表面鍍 Ag，形成 Kretschmann 的光學組態，並量測 SPW 在共振角的光強度變化，並得到和理論值相符的結果，然而在更進一步以 Biacore 的 CM-5 感應片進行 SPW 強度反射率的測量，結果可清楚看出反射光強

度在 SPW 共振角的變化，但因入射角及雷射光平行度的條件不夠理想，同時 Bk-7 稜鏡和反應片之間 index matching oil 的耦合尚未充分吻合，以致於實驗結果需再進行試驗，直到完全達到理論計算的結果方可量取相位信號，由於相位的變化隨振幅改變同時發生，本研究計劃應確實可完成相位的數據量測，希望再進一步的研究進行中可完成本研究計劃目標，同時即時偵測 E.coli 病菌，由於本研究計劃只有一年時間，稍嫌倉促，無法在一年內完成本計劃的預期目標，但本著現有的基礎，計劃主持人將會持續進行相關實驗，由於 SPW 相位偵測技術是一種創新的生物感測技術可大力發展並可應用在其它相關的生物醫學及食品工業領域中，並預期將有 2 篇論文產生。更希望能儘快發展完成此技術以供相關單位參效。

参考文献

- (1) Y.S.Chen et al “ Detection of protein A produced by staphylococcus aureus with fiber-optic based biosensor” *Bioscience, Biotechnology, Biochemtry* 60 1571-1574 (1996)
- (2) K.Matsubara et al “ Optical Chemical sensor based on surface plasmon measurement” *Applied Optics* 27 1160-1163 (1988)
- (3) K.Kano et al “ Surface plasmon sensor for absorption-sensitivity enchantment “ *Applied Optics* 33 5166-5169 (1994)
- (4) E.Fontana et al “ Surface plasma immunoassay “ *Applied Optics* 29 4694-4704 (1990)
- (5) M.T.Flanazan “ Immuosensors “ *Electronic Lett* 20 968-970 (1984)
- (6) R.C. Jorgenson et al “ A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance “ *Sensors Actuators B* 12 213-220 (1993)
- (7) S.Shen et al “ Optical phase surface detection of surface plasmon resonance “ *Applied Optics* 37 1747-1751 (1998)
- (8) C.H.Lin et al “Real time interferometric ellipsometry with optical heterodyne and phase lock in technique “ *Applied Optics* 29 5159-5162 (1990)
- (9) J.Guo et al “ Angle measurement using surface-plasma-resonance heterodyne interferometry : a new method “ *Opt. Eng.* 37 2998-3001(1998)
- (10) G.Margheri et al “ High-resolution angular and displacement sensing based on the excitation of surface plasma waves “ *Appl.Opt.* 36 4521-4525(1997)

圖表說明

圖一 Otto 光學架構

圖二 Kretschmann 光學架構

圖三 SPW 共振角度偏移

圖四 SPW 共振角度偏移 (流動式)

圖五 P 波反射光強度改變

圖六 引起 SPW 相位改變

圖七 SAM 的結構，可分為三部分 (A,B,C)

圖八 平行光式的衰減全反射實驗架構

圖九 在所有的入射角上 $R_s > R_p$

圖十 聚焦光束所涵蓋的角度由透鏡的焦距及平行光的直徑決定

圖十一 聚焦式衰減全反射實驗架構

圖十二 鋁膜的反射光在半透明片 S 上的成像

圖十三 平面鏡的反射光在半透明片 S 上的成像

圖十四 鋁膜反射光的光強度分佈， R_p

圖十五 鏡面反射光的光強度分佈， R_m

圖十六 以鏡面反射光為歸一化因子所得

圖十七 相位敏感 SPW 生物感知器系統穩定圖

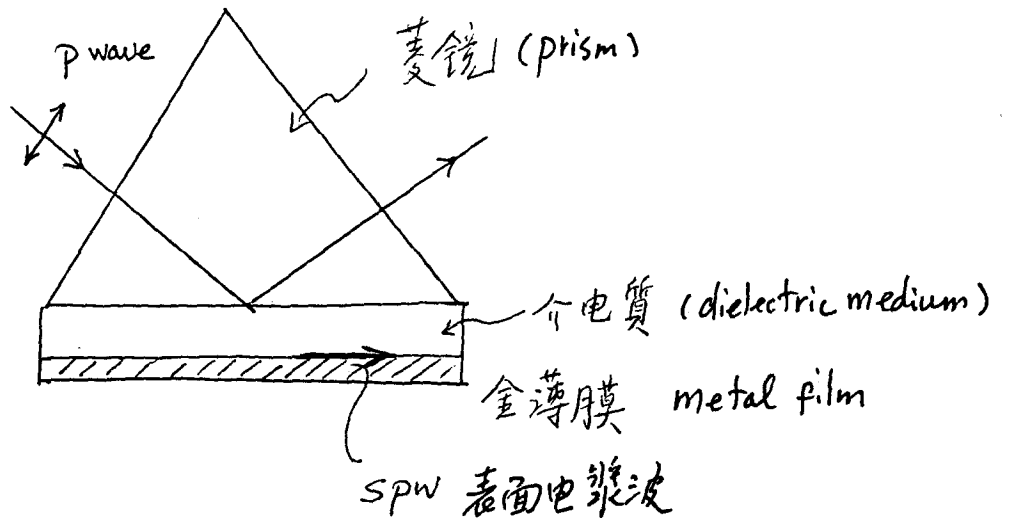
(a) 相位

(b) 振幅

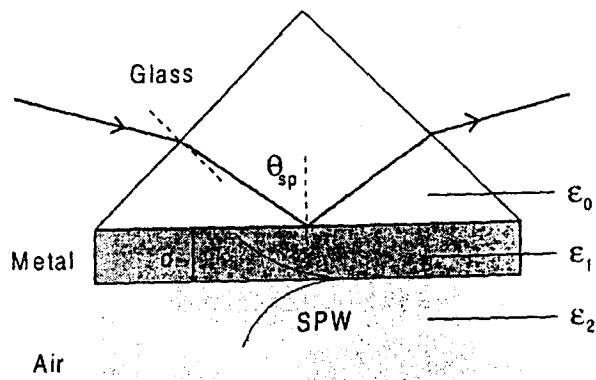
圖十八 (a) 相位敏感 SPW 生物感知器光學架構圖

(b) SPW 光學組件

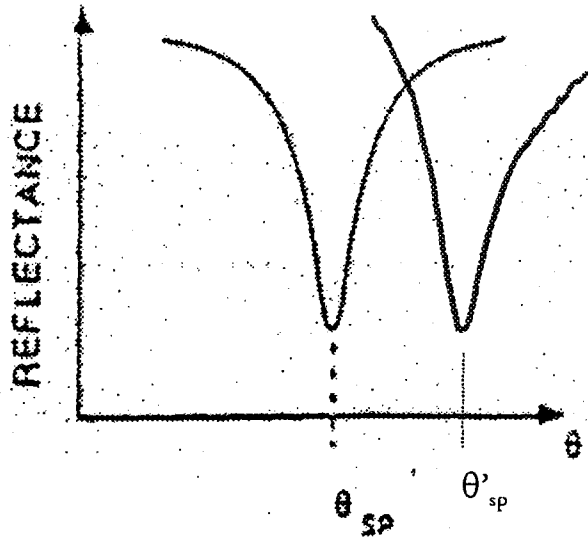
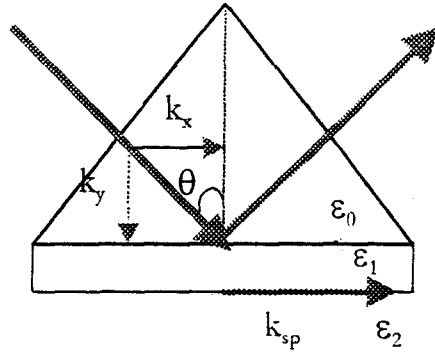
圖十九 P 波 SPW 引起的強度變化



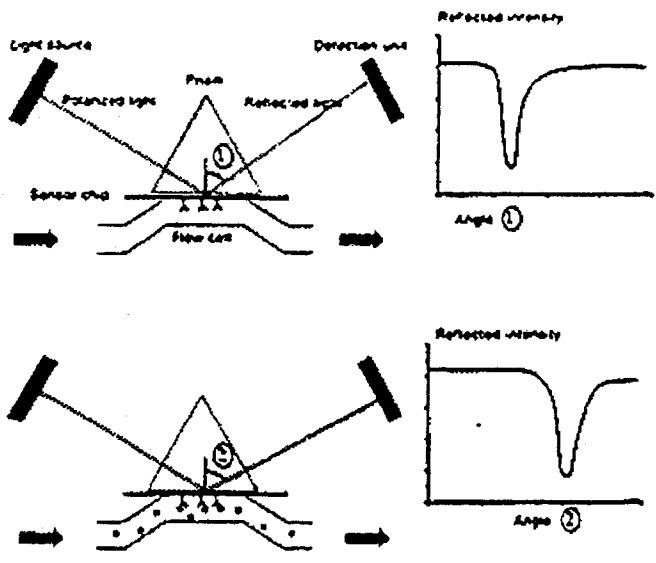
圖一



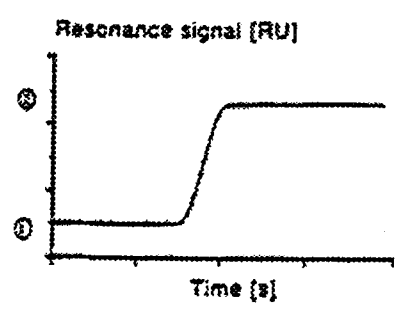
圖二



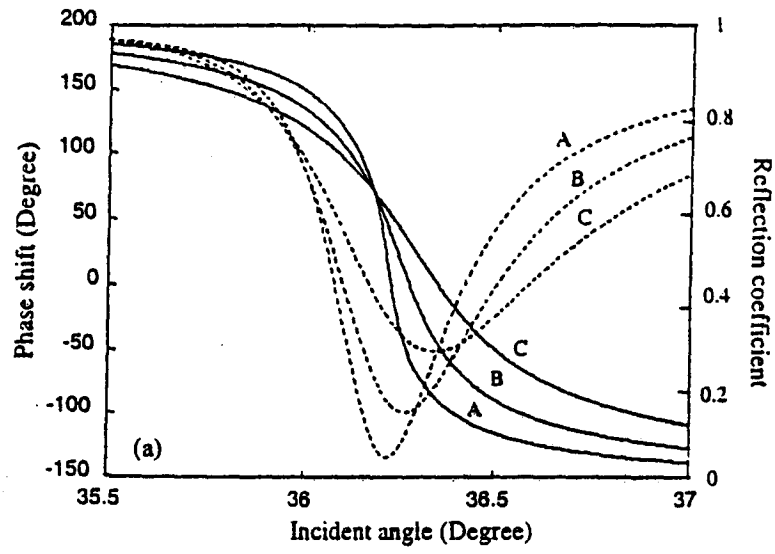
圖三



① ②

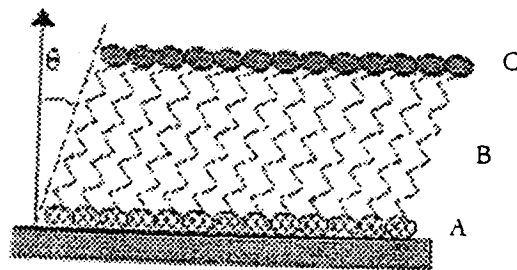


① ②

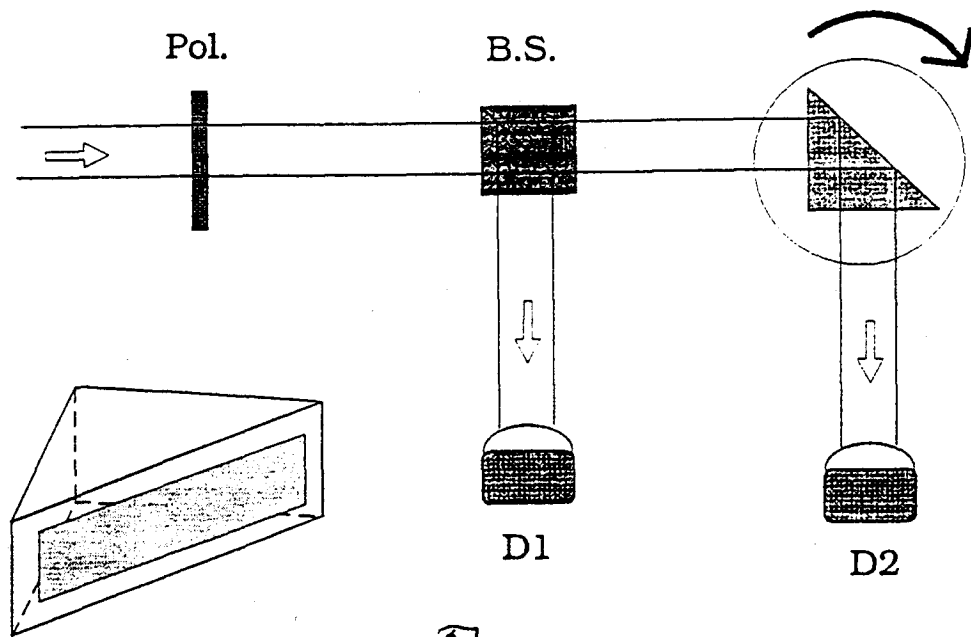


(S.Shen etal Applied Optics 37 1747-1751(1998))

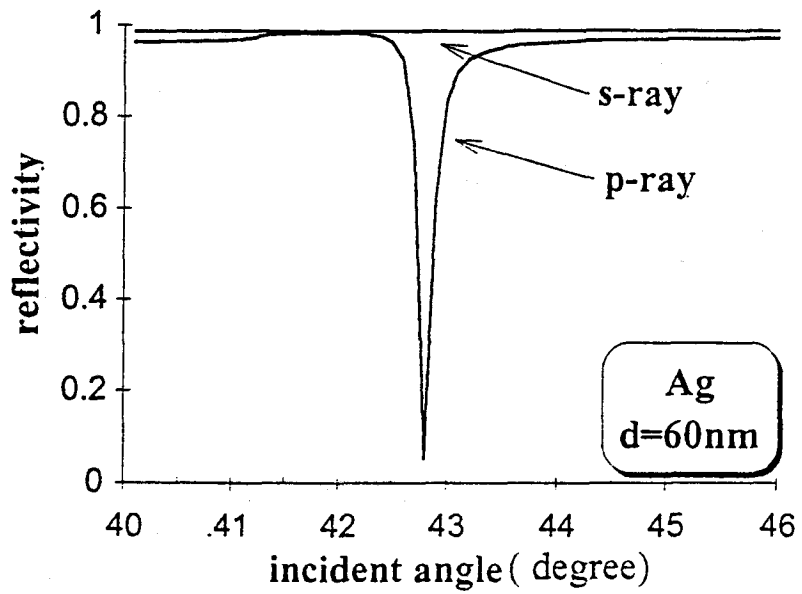
圖六



圖七



圖八



圖九

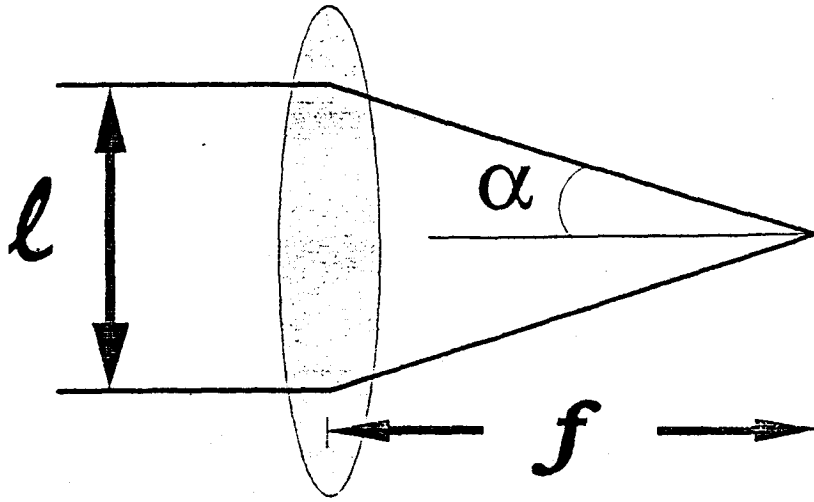


圖 +

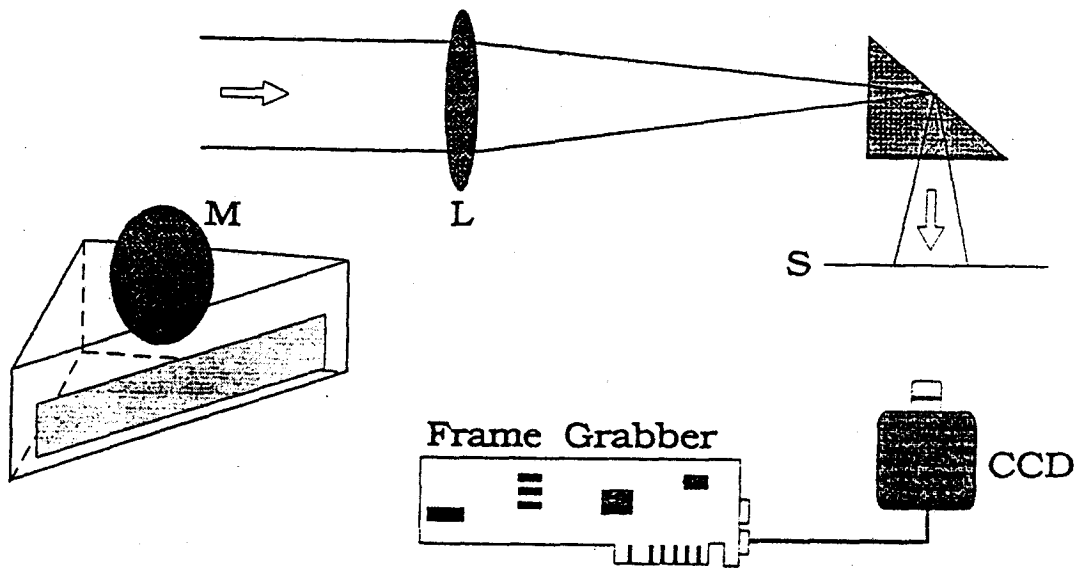
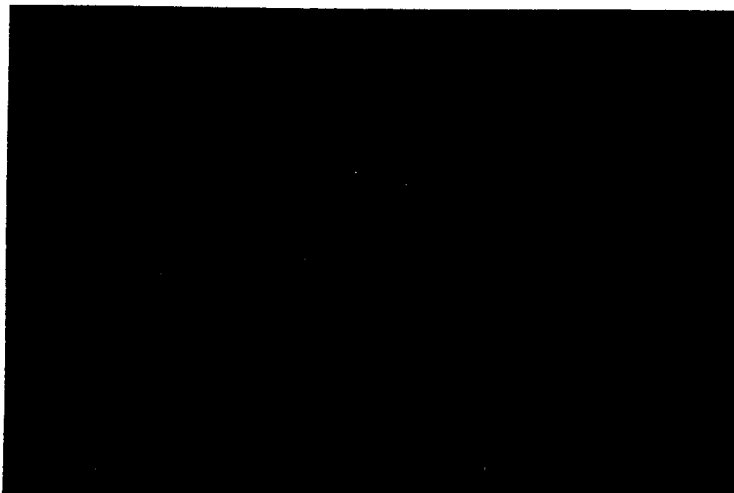
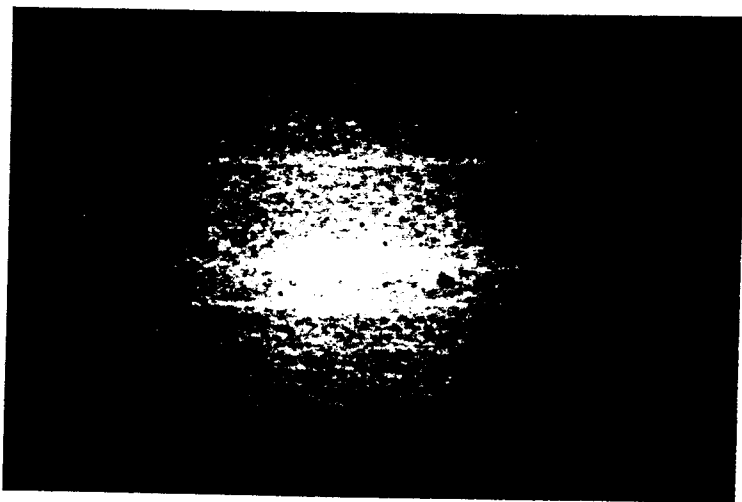


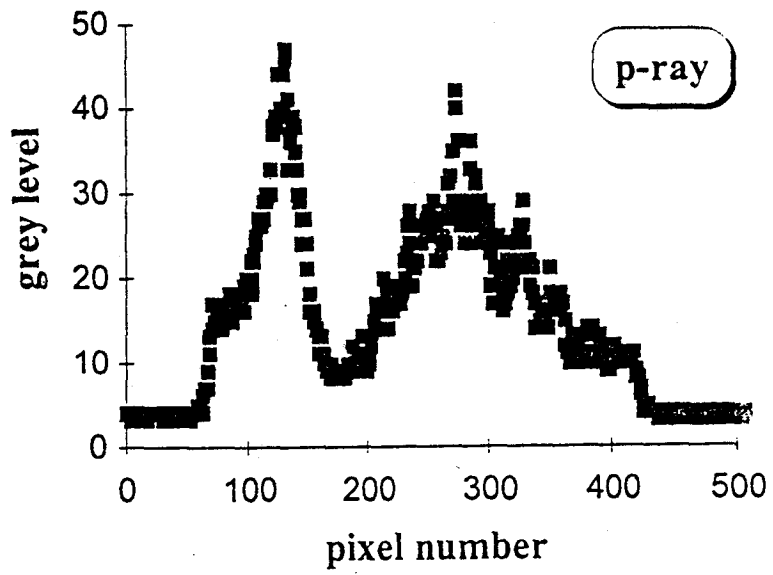
圖 + 一



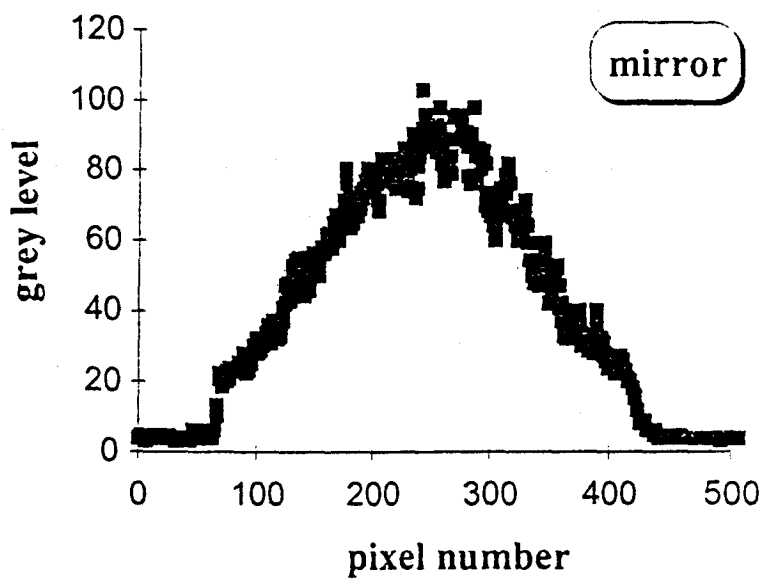
圖十二



圖十三



10 + 12



10 + 5

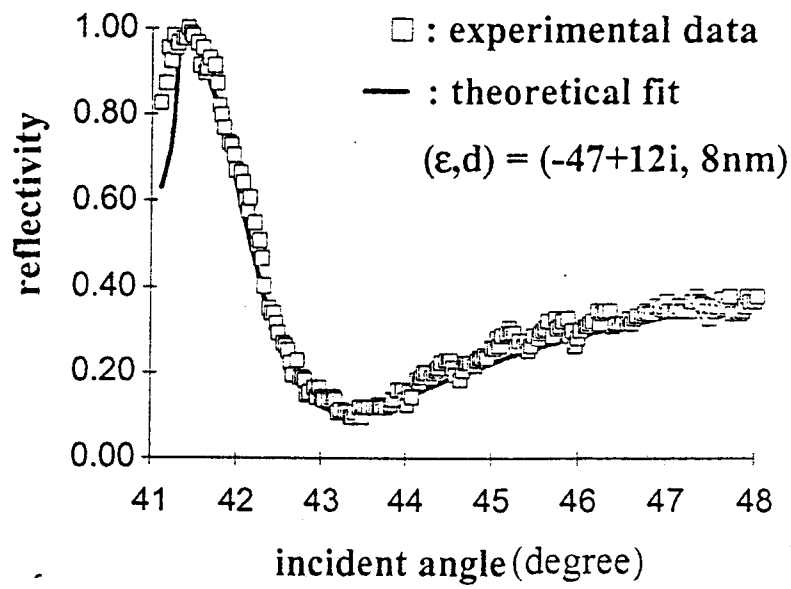
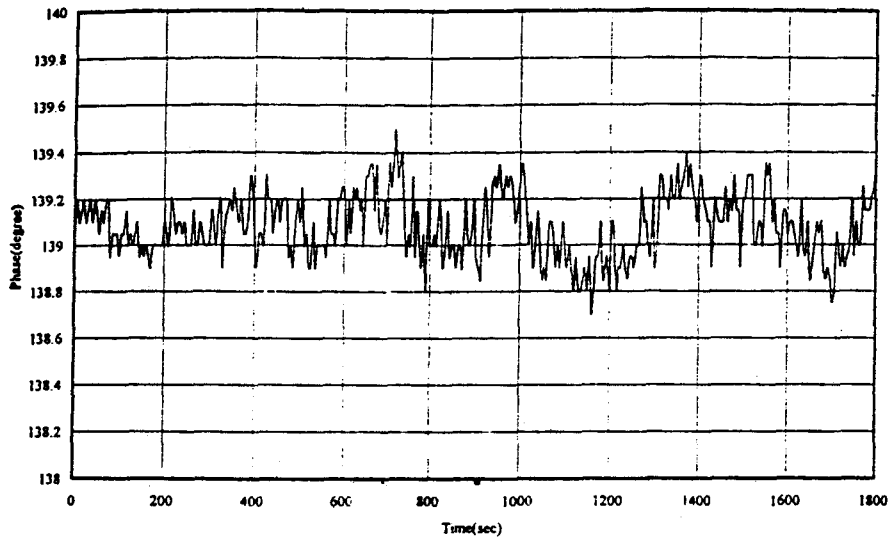
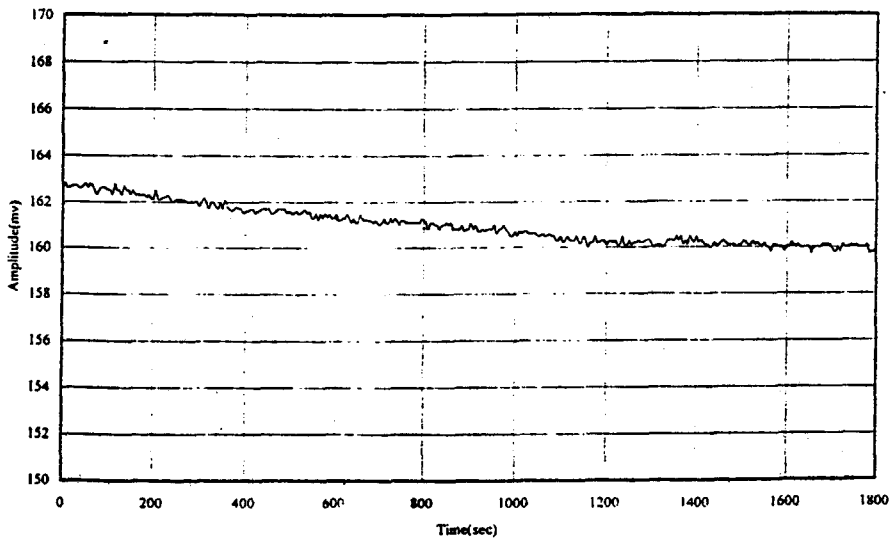


圖 + 六

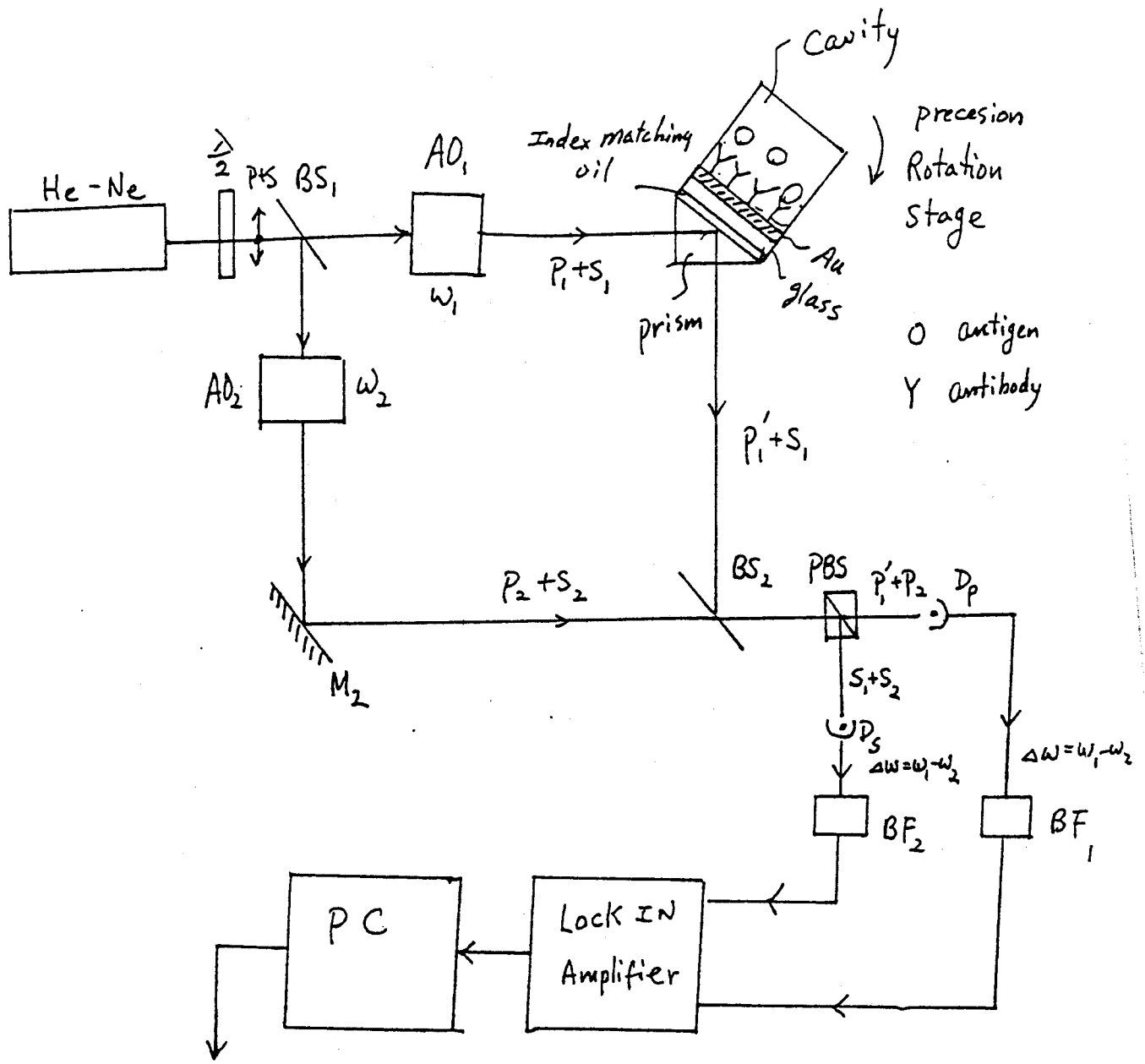


(a)



(b)

圖 + 七

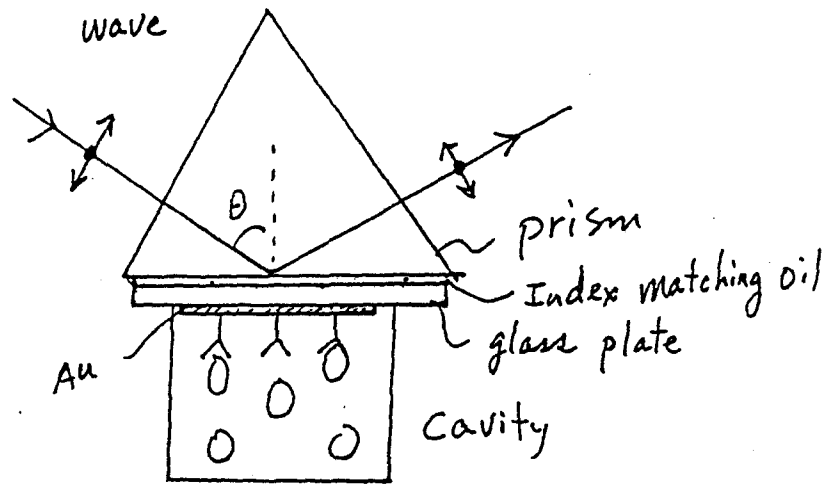


$$\left[\delta, \sqrt{\frac{I_{P_1}' I_{P_2}}{I_{S_1} I_{S_2}}} \right]$$

$$\begin{aligned} \delta &= (\delta_{P_1}' - \delta_{P_2}) - (\delta_{S_1} - \delta_{S_2}) \\ &= \delta_{P_1}' - (\delta_{P_2} + \delta_{S_1} - \delta_{S_2}) \end{aligned}$$

$$\left[\frac{P}{I} \right] + 1, (a)$$

S polarized + P polarized wave

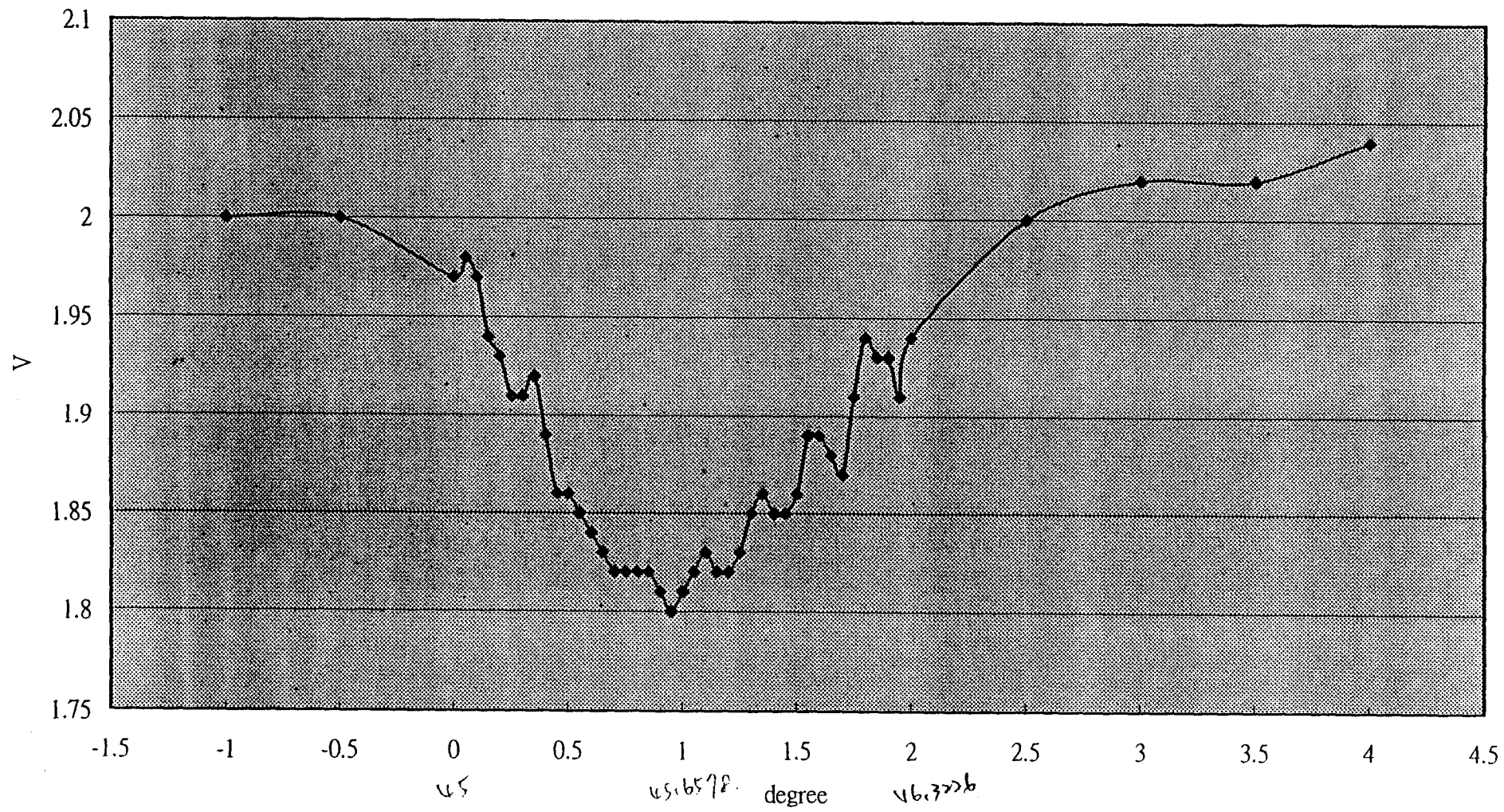


O antigen

Y antibody

$\left[\frac{1}{\mu} \right] + 1 - (b)$

AC(only P-wave)



圖十九