

私立東海大學化學系研究所

碩士論文

Department of Chemistry, Tunghai University

Master Thesis

指導教授：龍鳳娣 博士

Advisor: Feng-Di T. Lung, Ph. D.

耦合抗體之磁性奈米粒子及耦合抗體與葡萄糖氧化酶之膠珠的製備

暨電化學反應分析

Preparation and Electrochemical Analysis of Magnetic Nanoparticles

Conjugated with Antibody and Silica Nanoparticles Conjugated with

Antibody and Glucose Oxidase

研究生：陳昱佑

中華民國 108 年 7 月

東海大學碩士班研究生  
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 陳昱佑 君所提之論文

耦合抗體之磁性奈米粒子及耦合抗體與葡萄糖氧化酶之膠珠的製備暨電化學反應分析

Preparation and Electrochemical Analysis of  
Magnetic Nanoparticles Conjugated with Antibody  
and Silica Nanoparticles Conjugated with Antibody  
and Glucose Oxidase

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 張可峰 (簽章)

108 年 06 月 10 日

東海大學碩士班研究生  
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 陳昱佑 君所提之論文

耦合抗體之磁性奈米粒子及耦合抗體與葡萄糖氧化酶之膠珠的製備暨電化學反應分析

Preparation and Electrochemical Analysis of  
Magnetic Nanoparticles Conjugated with Antibody  
and Silica Nanoparticles Conjugated with Antibody  
and Glucose Oxidase

論文口試委員會 召集人 孫雅清 (簽章)

委員 林宗欣  
簡孔豪

中華民國 108 年 7 月 4 日

## 謝誌

又到了薰風的季節，小徑旁鳳凰花開，我聆聽著蟬鳴，回憶起當初進龍鳳娣教授實驗室的日子，還記得開啟那厚重的門，映入眼簾的是慈祥的龍教授；還記得那忐忑的心，卻保持著對科學的熱忱；還記得同學們低下頭，專心地背胺基酸的神情，這些記憶將被存放於酒甕中，當踏入社會後，失去科學熱忱時，取出來細心的品嚐，或許又會回到當初的悸動。讓我值得回憶的原因是在我研究過程中，給予鼓勵與教導的學長學姊們，想起德倫學長要求實驗的獨立性；想起秉謙學長對實驗安全的叮嚀；想起冠婷學姊於實驗的教導；想起俊毅學長對我的心靈支持；想起過去每一分與每一秒的回憶，是燃起我對科學的熱忱。

從回憶拉回至二零一九年的七月，坐在討論室的我，看著詩容與品秀，要說開啟我對社會的認知與教導我處事，我想非他們莫屬，他們的叮嚀與教導如咖啡似的，嚐起來有些苦、有些酸或有些回甘，但每一句話到最後，都讓我振奮去面對複雜的人與事。如果二零一九年的夏天是我離開東海大學的季節，不如讓我說二零一八年夏天，那年我還在為計畫與實驗奮鬥，卻進來四位活潑的專題生，思禹、昱瑄、夢莎與頌方，如果要說印象深刻的事情，那就是他們的微笑吧！頌方的笑聲充斥於東海校園；思禹的笑聲環繞於同儕；昱瑄的笑聲如清風；夢莎的笑聲輕輕款款，因為他們的微笑在我的生活添加不同色彩，而我最終感謝他們於日常的幫忙，如在我口試當天，幫忙佈置場地與叮嚀儀態，以及感謝他們對實驗室的付出。

離開討論室漫步於文理大道，最後一個回憶也是我最後的感謝，感謝龍鳳娣老師收我為專題生與研究生，沒有您就像沒有日出，沒有了希望也沒有了成長；感謝林宗欣老師對實驗結果，給予建議與肯定，沒有您就像沒有雨水，沒有了延續也沒有了發展；感謝暉凱與搭檔實驗，您就像我的兄弟，給予了我前進的動力；感謝雨珊老師給予生活上的幫忙，與教導我很多生化與有機知識；最後，感謝我的伊人郁馨，在我人生低潮時，陪伴著我與給予鼓勵，在我研究生涯中，給予肯定與支持。

二零一九年八月，我將離開東海大學，邁向人生另一個階段，但我的精神與東海化學同在，也感謝東海化學所有老師與教職員工。

## 摘要

材料之表面經過修飾後可與蛋白質、胜肽或小分子藥物以共價鍵結合，形成之耦合物可廣泛應用於生醫檢測方法和治療藥物之開發。本研究推算奈米粒子表面之羧基量，以及蛋白質耦合量，其目的為優化合成方法，降低活化試劑與蛋白質使用量，並應用於耦合抗體之磁性奈米粒子及耦合抗體與葡萄糖氧化酶之膠珠的製備暨電化學反應分析以期建立偵測免疫反應之電化學分析法。實驗流程首先分析奈米粒子與蛋白質耦合之優化條件，接著應用耦合反應之最佳條件製備抗體-奈米粒子或抗體-奈米粒子-蛋白質之耦合物。實驗方法包括：(1) 應用 Ninhydrin 方法推算奈米粒子之羧基含量，以降低活化劑與蛋白質之用量；(2) 應用 Bradford 定量未反應之蛋白質，推算耦合反應所需蛋白質之用量，建立耦合反應優化的條件；(3) 應用耦合反應之優化條件，製備葡萄糖氧化酶-奈米粒子之耦合物，並應用電化學分析法之電流訊號，判別耦合物的製備是否成功；(4) 應用優化之條件，將捕捉抗體耦合至奈米粒子，專一性地辨識其抗原；(5) 應用優化之條件，將偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合至奈米粒子；(6) 應用電化學分析其完整免疫反應。本研究電化學方法之建立，應用於偵測特定抗體與抗原之間的專一性反應，研究成果有助於疾病檢測方法之開發。

關鍵字：奈米粒子、抗體、葡萄糖氧化酶、免疫反應、電化學

## Abstract

The surface of the material can be modified to form covalent bonds with proteins, peptides or small molecular drugs, and the coupling products can be widely used in the development of biomedical testing methods and therapeutic drugs. This study estimated the amount of carboxyl groups and protein coupling on the surface of nanoparticles. The purposes are to optimize the synthesis method and reduce the amount of activation reagents and protein. The preparation and electrochemical analysis of magnetic nanoparticles conjugated with antibody and silica nanoparticles conjugated with antibody and glucose oxidase, are expected to establish an electrochemical analysis method for detecting immunoreaction. The first of experimental procedure analyzed the optimal conditions for the protein-conjugated nanoparticles, and prepared antibody-nanoparticles or antibody-nanoparticle-protein coupling products with the optimal conditions of the coupling reaction. The experimental methods include: (1) Apply Ninhydrin method to estimate the carboxyl group of the nanoparticles to reduce the amount of activation reagent and protein; (2) Apply Bradford assay to quantify the unreacted protein, estimating the amount of protein required for the coupling reaction, and establishing the optimal condition; (3) Glucose oxidase was conjugated with nanoparticles by the optimal conditions and detected whether the conjugation was successful by the electrochemical analysis; (4) The capture antibody was conjugated with nanoparticles by the optimal conditions, and the antibody-conjugated nanoparticles specifically identified the antigen; (5) Antibody and glucose oxidase were conjugated with nanoparticles by the optimal conditions; (6) Apply electrochemical method to analyze immunoreaction. In this study, the established electrochemical analysis method can be applied to detect the specific reaction between antibody and antigen, and the results contribute to the development of disease detection.

Keywords: Nanoparticles, Antibody, Glucose Oxidase, Immunoreaction, Electrochemistry

# 目錄

謝誌.....	i
摘要.....	ii
Abstract .....	iii
圖目錄.....	vii
表目錄.....	ix
專有名詞縮寫列表 .....	xi
第一章、前言 .....	1
第二章、文獻探討與研究動機.....	2
2-1 奈米粒子.....	2
2-1-1 奈米粒子之特性與應用 .....	2
2-2 磁性奈米粒子.....	3
2-2-1 磁性奈米粒子之特性 .....	3
2-2-2 磁性奈米粒子之應用 .....	3
2-3 二氧化矽奈米粒子 .....	4
2-3-1 二氧化矽奈米粒子之特性 .....	4
2-3-2 二氧化矽奈米粒子之應用 .....	4
2-4 葡萄糖氧化酶.....	5
2-4-1 葡萄糖氧化酶之特性 .....	5
2-4-2 葡萄糖氧化酶之應用 .....	5
2-5 奈米粒子應用於生醫檢測.....	6
2-5-1 抗體耦合奈米粒子之製備與應用.....	6
2-5-2 奈米粒子應用於生醫檢測之研究動機與目的 .....	6

第三章、材料與方法.....	7
3-1 實驗設計與流程： .....	7
3-2 Ninhydrin 反應之方法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之羧基量 .....	8
3-3 Bradford 法定量之方法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量 .....	10
3-4 葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子與電化學分析 GOx-MNP .....	11
3-5 捕捉抗體耦合磁性奈米粒子之步驟.....	12
3-6 應用優化條件於捕捉抗體耦合磁性奈米粒子 .....	14
3-7 葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子與電化學分析 GOx-NSP.....	16
3-8 不同條件葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物 .....	17
3-9 不同比例葡萄糖氧化酶與偵測抗體耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析其免疫反應.....	18
3-10 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析其完整免疫反應	20
3-11 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並電化學分析其完整免疫反應 .....	22
第四章、結果與討論.....	25
4-1 應用與探討不同優化條件於奈米粒子之目的 .....	25
4-2 應用 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之羧基量結果 .....	27
4-3 Bradford 法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量結果.....	28
4-4 應用優化條件於葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子並電化學分析結果.....	29
4-5 應用優化條件於抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果.....	30
4-6 電化學分析葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之結果 .....	31
4-7 不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果.....	32



4-8 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析免疫反應結果.....	33
4-9 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並電化學分析免疫反應結果..	34
第五章、結論.....	36
未來展望.....	37
圖附錄.....	38
表附錄.....	54
參考文獻.....	78

## 圖目錄

圖一、磁性粒子尺寸與矯頑力關係圖.....	38
圖二、側向流動免疫測定示意圖.....	38
圖三、奈米粒子應用於生醫檢測示意圖.....	39
圖四、多孔性二氧化矽奈米粒子之載體示意圖.....	39
圖五、無孔性二氧化矽奈米粒子之載體示意圖.....	40
圖六、葡萄糖經葡萄糖氧化酶催化反應圖.....	40
圖七、葡萄糖與黃素腺嘌呤二核苷酸反應機制圖.....	41
圖八、葡萄糖氧化酶與鐵氰酸鹽應用於電極反應圖.....	41
圖九、酵素免疫分析應用於奈米粒子示意圖.....	42
圖十、酵素免疫分析應用於多種奈米粒子示意圖.....	42
圖十一、優化於磁性奈米粒子及應用流程圖.....	43
圖十二、優化於二氧化矽奈米粒子及應用流程圖.....	44
圖十三、 FTIR 分析磁性奈米粒子與 BSA 之關係圖.....	45
圖十四、 Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子之乙醇胺之標準曲線圖.....	46
圖十五、Bradford 反應分析磁性微米粒子之 BSA 耦合量之標準曲線圖.....	46
圖十六、應用 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子之羧基量示意圖.....	47
圖十七、 Ninhydrin 反應機制圖.....	47
圖十八、 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子之乙醇胺之標準曲線圖.....	48
圖十九、 Ninhydrin 反應定量二氧化矽奈米粒子之乙醇胺之標準曲線圖.....	48
圖二十、應用優化條件於 BSA 耦合磁性奈米粒子示意圖.....	49
圖二十一、 Bradford 分析蛋白質反應圖.....	49
圖二十二、 Bradford 反應分析磁性奈米粒子之 BSA 耦合量標準曲線圖.....	50
圖二十三、 Bradford 反應分析二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量標準曲線圖.....	50
圖二十四、不同圖例之示意圖.....	51
圖二十五、樣品編號 A 與 B 之示意圖.....	51

圖二十六、樣品編號 1 與 2 之示意圖.....	52
圖二十七、樣品編號 3 與 4 之示意圖.....	52
圖二十八、樣品編號 5 與 6 之示意圖.....	53
圖二十九、樣品編號 7 與 8 之示意圖.....	53

## 表目錄

表一、實驗材料與儀器設備之購買廠商資訊.....	54
表二、Bradford 法分析活化試劑之結果表 .....	55
表三、Bradford 法分析 BSA 與活化試劑混合之結果表 .....	55
表四、Bradford 法定量未耦合上磁性奈米粒子之 BSA 分析表.....	56
表五、活化試劑影響 Ninhydrin 反應分析表 .....	56
表六、Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子羧基量結果表 .....	57
表七、定量磁性微米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表 .....	57
表八、Bradford 法定量之方法推算磁性微米粒子之 BSA 耦合量結果表 .....	58
表九、定量磁性微米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表 .....	58
表十、MMP 與 GOx-MMP 之電流分析表 .....	59
表十一、MMP 與 GOx-MMP 之電流分析表 .....	59
表十二、MMP 與 GOx-MMP 之電流分析表 .....	60
表十三、抗體耦合磁性微米粒子並電化學分析免疫反應結果表.....	60
表十四、定量磁性奈米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表 .....	61
表十五、Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子羧基量結果表 .....	61
表十六、定量二氧化矽奈米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表 .....	62
表十七、Ninhydrin 反應定量二氧化矽奈米粒子之羧基量之結果表.....	62
表十八、定量磁性奈米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表.....	63
表十九、Bradford 法定量之方法推算磁性奈米粒子之 BSA 耦合量結果表 .....	63
表二十、定量二氧化矽奈米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表.....	64
表二十一、Bradford 法推算二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量結果表 .....	64
表二十二、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表 .....	65
表二十三、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表 .....	65
表二十四、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表 .....	66
表二十五、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	66

表二十六、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	67
表二十七、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	67
表二十八、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	68
表二十九、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	68
表三十、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表 .....	69
表三十一、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表 .....	69
表三十二、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表 .....	70
表三十三、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表 .....	70
表三十四、不同條件葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子表 .....	71
表三十五、不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果表 .....	72
表三十六、不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果表 .....	72
表三十七、不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表 .....	73
表三十八、不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表 .....	73
表三十九、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表 .....	74
表四十、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表 .....	74
表四十一、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表 .....	75
表四十二、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表 .....	75
表四十三、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表 .....	76
表四十四、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表 .....	76
表四十五、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果總表 .....	77

## 專有名詞縮寫列表

EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
DDW	Distilled-deionized water
PBS	Phosphate-buffered saline
BSA	Bovine serum albumin
GOx	glucose oxidase
Ab1	Primary antibody
Ab2	Secondary antibody
MMP	Magnetic microparticle
MNP	Magnetic nanoparticle
NSP	Silica nanoparticle
GOx-MMP	Glucose-conjugated magnetic microparticle
GOx-MNP	Glucose-conjugated magnetic nanoparticle
GOx+MNP	Glucose-absorbed magnetic nanoparticle
GOx-NSP	Glucose-conjugated silica nanoparticle
GOx+NSP	Glucose- absorbed silica nanoparticle
Ab1-MMP	Magnetic microparticles conjugated with a primary antibody.
Ab1-MNP	Magnetic nanoparticles conjugated with a primary antibody.
Ab2-NSP-GOx	Silica nanoparticles conjugated with secondary antibody and glucose oxidase.
GOx-Ab2	Glucose-conjugated secondary antibody
Protein A-MNP	Protein A-conjugated magnetic nanoparticle
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy

## 第一章、前言

奈米材料近年來廣泛應用於生物醫學，其中以奈米粒子作為生醫檢測以及藥物傳送最廣為人知。奈米粒子之尺寸為 1~100 nm [1]，除了尺寸的挑選，也著重於表面官能基，奈米粒子表面可以經由修飾，使表面具有官能基，以胺基 (-NH<sub>2</sub>) 與羧基 (-COOH) 最為常見。表面官能基可以被活化，如：1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide (EDC) 與 N-hydroxysuccinimide (NHS) 活化羧基，形成半穩定 NHS 酯，將具有特定官能基之化合物或蛋白質耦合奈米粒子，並形成較穩定的共價鍵 [2-5]。目前許多文獻研究與探討蛋白質耦合粒子，並應用於生醫檢測 [6, 7]，例如：將 streptavidin 耦合螢光銀奈米粒子，並應用於檢測 HIV [8]。因此，本研究製備不同蛋白質與抗體耦合奈米粒子之耦合物，並開發於疾病之檢測。

本研究目的以酵素免疫分析法為起源，並應用 sandwich ELISA 作為設計概念，將抗體耦合至載體或覆蓋於平台，捕捉目標物進行分析。抗體結構以 light chain 與 heavy chain 為結構 [9]，並以兩個 Fab 區域與一個 Fc 區域組成 [10]，以 Fab 區域辨識抗原特定區域 [11]。sandwich ELISA 之抗體又分為：捕捉抗體與偵測抗體；捕捉抗體為捕捉特定抗原；而偵測抗體上具有酵素，偵測抗體將辨識並免疫反應於捕捉後抗原，加入受質後，使偵測抗體之酵素產生可偵測產物 [12]。然而，很多偵測抗體鍵結一個酵素 [13, 14]，本研究將偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，以達到訊號放大之目的。本實驗中，完整免疫反應為：將捕捉抗體耦合磁性奈米粒子後，捕捉抗體捕捉到特定抗原；抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，與捕捉抗體上的抗原進行免疫反應，並應用呈色分析與電化學分析其完整免疫反應。

近代開發生醫檢測之目標，以達到 point-of-care testing 為目的。point-of-care testing 為醫護人員照顧病人同時，能立即對病人採樣分析，而傳統採樣分析的缺點，檢體需送去實驗室分析，花費較多時間與金錢。point-of-care testing 優點為操作簡單、快速檢測以及分析時間短，亦稱「床邊檢驗」 [15, 16]。本研究以優化條件製備抗體或蛋白質耦合奈米粒子，只需將樣品加入耦合物中，混合反應並分離洗淨，以電化學或呈色偵測特定抗體與抗原之間的專一性反應，期達成快速檢測並準確分析疾病之目的。

## 第二章、文獻探討與研究動機

### 2-1 奈米粒子

#### 2-1-1 奈米粒子之特性與應用

「奈米科技」的概念於 1959 年，由 Richard P. Feynman 的一場演講 “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” 所提出。而奈米粒子之尺寸為 1~100 nm，其特性為：高表面積、具光學特性、不同物理性質等，在同一空間單位，因為奈米粒子尺寸較小，所產生表面積較大 [1]；而光學特性中，以金奈米粒子作為代表，當入射光照射於不同尺寸或不同形狀之金奈米粒子，會產生不同顏色，此現象為局部表面等離子共振 (localized surface plasmon resonance, LSPR) [17]；在不同物理性質，以磁性奈米粒子為例，當磁性粒子尺寸小於臨界直徑時，矯頑力 (coercivity) 變為零 (圖一)，並容易受到熱效應，當給予外部磁場時，磁性奈米粒子磁矩會沿著外部磁場方向，外部磁場移除時，磁性奈米粒子又會恢復非磁性狀態，並再次受到熱效應，磁性奈米粒子呈現零磁偶極，此物理現象為超順磁性 (superparamagnetism) [18]。

奈米科技應用於生物醫學，其中生醫檢測最廣泛應用，以側向流動免疫測定 (lateral flow immunoassays, LFIAs) 最廣為人知。其原理為加入分析物並與抗體耦合金奈米粒子，經毛細作用流動至測試線，測試線之抗體捕捉分析物並抗體抗原反應，透過金奈米粒子之聚集形成顏色 (圖二) [19]。生醫檢測除了應用於紙片上，目前開發於微量離心管或孔盤上，以微量離心管為例，將捕捉抗體耦合奈米粒子，捕捉抗體捕捉特定抗原後，偵測抗體與抗原產生抗體抗原反應 (圖三)，而偵測抗體上之酵素，可以應用呈色分析或電化學等分析其訊號 [20, 21]。



## 2-2 磁性奈米粒子

### 2-2-1 磁性奈米粒子之特性

磁性元素包含鐵、鈷以及鎳，而磁性奈米粒子以  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  與  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  最為常見，磁性奈米粒子依據不同尺寸及結構，而有不同磁性之特性 [22, 23]，如圖一中，尺寸小於臨界直徑時，會有超順磁現象 [18]。另外，為了使磁性奈米粒子之表面具有官能基，在奈米粒子之外層會包覆聚合物，使外層具特定官能基，當磁性奈米粒子具親水性官能基(如：羧基、胺基等)，磁性奈米粒子可以均勻分散於水溶液中，而施加外部磁場時，磁性奈米粒子可以與溶液分離，外部磁場移除後，磁性奈米粒子又可以均勻分散於溶液中 [24]。

### 2-2-2 磁性奈米粒子之應用

藉由磁性奈米粒子之超順磁現象，以及可以製備不同官能基於奈米粒子表面，此兩種特性，可以開發於生醫之應用，以表面官能基為羧基說明其應用。首先，使用 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide (EDC) 與 N-hydroxysuccinimide (NHS) 活化羧基，活化完畢後，加入具有專一性辨識目標物之蛋白質或抗體耦合磁性奈米粒子，當製備成功後，取樣品並加入蛋白質或抗體鍵結磁性奈米粒子，其蛋白質或抗體專一性辨識與捕捉目標物後，應用磁鐵分離磁性奈米粒子與溶液，並使用偵測抗體或聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 等方法，分析捕捉後之目標物 [25-27]。然而，其應用如：HIV 檢測、細菌之檢測或 DNA 或 RNA 耦合磁性奈米粒子檢測病毒等 [28-32]。

## 2-3 二氧化矽奈米粒子

### 2-3-1 二氧化矽奈米粒子之特性

二氧化矽奈米粒子分為無孔及多孔，且兩種無固定形狀，多孔性二氧化矽之孔徑為2~50 nm，其多孔具有物理吸附與化學鍵結功能，可以應用於藥物載體使用；無孔性二氧化矽奈米粒子具有包覆藥物化學蛋白質等功能，而無孔及有孔性二氧化矽奈米粒子表面，可以被修飾為具特定官能基。目前很多的二氧化矽奈米粒子，被當作藥物載體並應用於生物體，主要原因為二氧化矽奈米粒子具有生物相容性 [33, 34]。

合成二氧化矽奈米粒子之條件分為：1. 尺寸的控制：以 sol-gel 方法合成二氧化矽粒子，在水與醇類混合之溶劑中，含有四乙氧基矽烷 (tetraethyl orthosilicate, TEOS) 以及  $\text{NH}_4\text{OH}$  的催化下，使四乙氧基矽烷產生水解與縮合反應，而不同比例之溶劑、四乙氧基矽烷與  $\text{NH}_4\text{OH}$ ，會有不同尺寸之二氧化矽粒子；2. 形狀的控制：以不同模板或通過聚合物吸附，形成不同形狀之二氧化矽粒子；3. 表面性質的控制：可以使用物理吸附或共價鍵結，進行二氧化矽奈米粒子表面修飾，例如：使用 3-aminopropyltriethoxysilane、carboxyethylsilanetriol 或 zwitterion silanes，使二氧化矽奈米粒子表面具正電、負電或兩性離子 [33, 35, 36]。

### 2-3-2 二氧化矽奈米粒子之應用

多孔或無孔性二氧化矽奈米粒子表面修飾具特定官能基，與磁性奈米粒子用途相似，藉由活化官能基後，將化合物或蛋白質等耦合二氧化矽奈米粒子，耦合物將應用於生醫檢測。然而，多孔性之孔洞內可以被修飾 [34, 37-39]，修飾後可以裝載不同藥物或蛋白質 (圖四與圖五)，藉由二氧化矽奈米粒子具有生物相容性，進行體內或體外實驗，其多孔性二氧化矽奈米粒子被分解後，藥物可以釋放並針對癌細胞或腫瘤細胞，進行抗癌或抑制腫瘤之目的 [36, 40]。

## 2-4 葡萄糖氧化酶

### 2-4-1 葡萄糖氧化酶之特性

葡萄糖氧化酶具有兩個亞基 (subunit)，每一個亞基分子量約為 80 kDa，並且各含有一個黃素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 及鐵分子。當葡萄糖進入葡萄糖氧化酶時，其反應過程為  $\beta$ -D-glucose 轉化為 D-glucono-1,5-lactone (圖六)， $\beta$ -D-glucose 將 FAD 還原為 FADH<sub>2</sub>，氧氣與 FADH<sub>2</sub> 反應，形成過氧化氫與 FAD。圖附錄之圖七中為  $\beta$ -D-glucose、FAD 與氧氣之反應機制，而  $\beta$ -D-glucose 進入葡萄糖氧化酶形成氫鍵與疏水性交互作用活性位點為 Tyr 68、Arg 512、Asn 514、His 516、His 559、Thr 110 以及 FAD。然而，在葡萄糖氧化酶催化中，有三個重要的胺基酸，分別為：Glu 412、His 516 以及 His 559，Glu 412 的 O $\epsilon$  與 His 559 的 N $\epsilon$  上的氫形成較強的氫鍵，此氫鍵使 His 559 更固定於活性位點，而 His 516 側鏈較靈活，其側鏈暴露於溶液中，使葡萄糖氧化酶更有效的催化 [41-46]。

### 2-4-2 葡萄糖氧化酶之應用

葡萄糖氧化酶廣泛應用於呈色分析與電化學分析，其主要原因為葡萄糖具有氧化還原特性。當葡萄糖經葡萄糖氧化酶催化，催化過程產生過氧化氫，而過氧化氫可以當作呈色之反應物，過氧化氫經過過氧化物酶 (如：辣根過氧化物酶，horseradish peroxidase，簡稱：HRP)，其催化後之產物為氧氣。催化過程中，過氧化物酶可以將非螢光染料轉換為螢光染料，在轉換後之螢光染料受到激發後產生可見光，或過氧化物酶將無色化合物轉變為產生可見光之化合物，在有可見光之訊號時，可以應用光譜儀器分析特定波長與吸收值 [47, 48]。

電化學分析葡萄糖氧化酶訊號，以鐵氰酸鹽 (ferricyanide) 氧化還原作為產生訊號來源，GOx-FAD 還原為 GOx-FADH<sub>2</sub> 時，鐵氰酸鹽與 GOx-FADH<sub>2</sub> 反應，而鐵氰酸鹽之正三價鐵被還原為正二價鐵，GOx-FADH<sub>2</sub> 被氧化為 GOx-FAD，鐵氰酸鹽之二價鐵與電極反應後，放出電子並氧化為正三價鐵 (圖八) [49, 50]。

## 2-5 奈米粒子應用於生醫檢測

### 2-5-1 抗體耦合奈米粒子之製備與應用

抗體結構分為 heavy chain 與 light chain，並以兩個 Fab 區域以及一個 Fc 區域組成，Fab 區域辨識抗原位置為 Paratope；而抗原被辨識區域為 Epitope [11]。當抗體耦合奈米粒子時，奈米粒子被當作生醫檢測之載體，而抗體負責捕捉抗原，捕捉並分離完後，需要發出訊號之來源。因此，許多文獻設計可以偵測奈米粒子上之抗原為目的，偵測捕捉到的抗原，可以使用另一種對抗原不同位置辨識之抗體，而此抗體可以被修飾上不同酵素或螢光標記物，當受質加入含有酵素之抗體或激發螢光標記物時，酵素進行反應與標記物產生螢光，可以判讀與分析其訊號 (圖九) [26, 28, 51]。

除了在抗體上修飾不同酵素，目前有文獻將抗體與酵素同時修飾上奈米粒子，或是抗體與 DNA 同時修飾上奈米粒子，並應用 real-time PCR 或呈色方法，以達到訊號放大之效果 [25, 52]。將不同比例之抗體與酵素同時耦合奈米粒子，與抗體耦合另一種奈米粒子，讓不同奈米粒子上之抗體辨識抗原不同位置，當完整免疫反應完成後，加入受質，與奈米粒子上的酵素產生催化反應，進行訊號放大 (圖十)，其優點為少量抗原存在下，可以被偵測以及更準確判斷疾病，並應用於生醫檢測疾病 [51, 53-56]。

### 2-5-2 奈米粒子應用於生醫檢測之研究動機與目的

本研究將酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 之概念，應用於抗體耦合奈米粒子並完整免疫反應。酵素免疫分析法將抗體覆蓋於盤子上 [57]，依序加入抗原與偵測抗體進行免疫反應，加入受質反應並分析其訊號後，判斷是否有相對疾病，而奈米粒子與酵素免疫分析法結合稱為 Nano-ELISA [56]。將 Nano-ELISA 應用於製備抗體耦合奈米粒子，以及抗體與酵素耦合奈米粒子，酵素選用葡萄糖氧化酶，開發於生醫檢測之訊號來源，其應用於呈色與電化學分析，以達成快速並準確判斷訊號為目的。

### 第三章、材料與方法

#### 3-1 實驗設計與流程：

本研究目的為製備抗體或蛋白質耦合奈米粒子，並應用於生醫檢測，奈米粒子選用磁性奈米粒子 (magnetic nanoparticle, MNP) 與二氧化矽奈米粒子 (silica nanoparticle, NSP)，應用活化試劑 EDC 與 NHS，使羧基化奈米粒子形成 NHS 酯，將抗體或蛋白質耦合已活化奈米粒子並形成共價鍵。其規劃與設計之實驗流程如下： 1. 應用 Ninhydrin 反應定量奈米粒子羧基量； 2. 應用 Bradford 法定量 BSA 耦合奈米粒子量； 3. 製備捕捉抗體耦合磁性奈米粒子； 4. 製備偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子； 5. 電化學與呈色分析免疫反應，其流程圖彙整如圖十一與圖十二。建立優化條件與製備抗體或蛋白質耦合奈米粒子，所需實驗材料與儀器設備，以及購買廠商如表一。另外，本實驗所用之抗體： 1. 捕捉抗體耦合磁性奈米粒子為單株抗體； 2. 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子為單株抗體； 3. 檢驗捕捉抗體耦合磁性奈米粒子之免疫反應，所使用之抗體為 GOx-Ab2，而 GOx-Ab2 為多株抗體。

### 3-2 Ninhydrin 反應之方法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之羧基量

#### 乙醇胺耦合磁性奈米粒子之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg/mL，取 20  $\mu$ L 磁性奈米粒子，加入 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 10  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 10  $\mu$ L 0.10 M NHS，在室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離已活化磁性奈米粒子與未反應完活化試劑，加入 50  $\mu$ L 1 M 乙醇胺，在室溫反應 4 小時。

#### 乙醇胺耦合二氧化矽奈米粒子之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，加入 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，加入 10  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 10  $\mu$ L 0.10 M NHS，在室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離已活化二氧化矽奈米粒子與未反應完活化試劑，加入 50  $\mu$ L 1 M 乙醇胺，在室溫反應 4 小時。

#### 配製乙醇胺標準品溶液之步驟：

準備 100 mL 定量瓶，加入一些 DDW 至定量瓶。加入 5  $\mu$ L 1 M 乙醇胺至定量瓶。取 50  $\mu$ L 冰醋酸至定量瓶，並加入 DDW 至 100 mL 刻度。配製完後，將溶液混合均勻，濃度為 50  $\mu$ M。

#### 配製標準曲線中各樣品之步驟：

Tube 1： 加入 2 mL DDW； Tube 2： 0.5 mL 50  $\mu$ M 乙醇胺以及 1.5 mL DDW；  
Tube 3： 1.0 mL 50  $\mu$ M 乙醇胺以及 1.0 mL DDW； Tube 4： 1.5 mL 50  $\mu$ M 乙醇胺以及 0.5 mL DDW； Tube 5： 2.0 mL 50  $\mu$ M 乙醇胺。

#### 配製反應完後之乙醇胺上清液步驟：

準備 100 mL 定量瓶，加入一些 DDW 至定量瓶。取 5  $\mu$ L 未反應完之上清液至定量瓶。取 50  $\mu$ L 冰醋酸至定量瓶，加入 DDW 至 100 mL 刻度。配製完後，將溶液混合均勻，並取 2 mL 至試管。

### **Ninhydrin 反應之步驟：**

將樣品各加入 1 mL 之 Ninhydrin 試劑並混合均勻後，在沸水中反應 10 分鐘。反應完後，冷卻至室溫並加入 5 mL 之 95% 乙醇至每一管稀釋並混合均勻。每一個試管取 200  $\mu$ L 至 96 孔盤並四重覆，使用 ELISA reader 在 OD<sub>570</sub> 下偵測並分析樣品。

### 3-3 Bradford 法定量之方法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量

#### BSA 耦合磁性奈米粒子之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg/mL，取 20  $\mu$ L 磁性奈米粒子，加入 200  $\mu$ L DDW 清洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 80  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 80  $\mu$ L 0.10 M NHS，在室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離已活化磁性奈米粒子與未反應完活化試劑，加入 1000  $\mu$ L pH= 3.70 之醋酸鈉緩衝溶液沖洗一次。秤 1.2 mg BSA 與 2000  $\mu$ L pH= 3.70 之 sodium acetate buffer 混合，取 1000  $\mu$ L 配製好的 0.6 mg/mL BSA 溶液，加入已活化磁性奈米粒子，並於室溫反應 4 小時。反應完後，分離 BSA 鍵結磁性奈米粒子與上清液。

#### BSA 耦合二氧化矽奈米粒子之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，加入 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，加入 10  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 10  $\mu$ L 0.10 M NHS，在室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離已活化二氧化矽奈米粒子與未反應完活化試劑，加入 1000  $\mu$ L pH= 3.70 之醋酸鈉緩衝溶液，並沖洗已活化二氧化矽奈米粒子一次。取 2.3 mg BSA 與 2000  $\mu$ L pH= 3.70 之醋酸鈉緩衝溶混合，取 1000  $\mu$ L 配製好的 BSA 溶液，並加入已活化二氧化矽奈米粒子，在室溫反應 4 小時。反應完後，分離二氧化矽奈米粒子與上清液。

#### 配製標準曲線各濃度之 BSA 與 Bradford 反應定量 BSA 之步驟：

取一安瓶且 BSA 濃度為 2 mg/mL，配製 BSA 濃度為 1500  $\mu$ g/mL、1000  $\mu$ g/mL、750  $\mu$ g/mL、500  $\mu$ g/mL、250  $\mu$ g/mL 以及 125  $\mu$ g/mL。各樣品以及上清液取 30  $\mu$ L 並加入 1500  $\mu$ L Coomassie 試劑至微量離心管，於室溫下反應 10 分鐘。反應完後，每一個微量離心管取 200  $\mu$ L 至 96 孔盤並四重覆，使用 ELISA reader 在 OD<sub>595</sub> 下偵測並分析樣品。



### 3-4 葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子與電化學分析 GO<sub>x</sub>-MNP

#### 製備 GO<sub>x</sub>-MNP、GO<sub>x</sub>+MNP 與 MNP 之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg/mL，取三組 10  $\mu$ L 磁性奈米粒子，每一組為 0.5 mg。三組名稱：A、B 與 C，A 為 GO<sub>x</sub>-MNP；B 為 GO<sub>x</sub>+MNP；C 為 MNP。每一管各加入 200  $\mu$ L DDW，分別清洗三次，分離磁性奈米粒子與溶液後，A 管加入 40  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 40  $\mu$ L 0.10 M NHS 並在室溫反應 15 分鐘；B 與 C 管加入 80  $\mu$ L DDW 並在室溫混合 15 分鐘。混合與反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，加入 200  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次。使用 pH=6.80 之 1 X PBS 配製葡萄糖氧化酶，濃度為 0.8 mg/mL，取 125  $\mu$ L 至已活化磁性奈米粒子 (樣品名稱：A)，並在室溫反應 1 小時；取 125  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至 B 管，並在室溫混合 1 小時；取 125  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 至 C 管，並在室溫混合 1 小時。混合以及反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，A、B 與 C 管使用 200  $\mu$ L pH=5.80 之 1 X PBS buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，各加入 500  $\mu$ L pH=5.80 之 1 X PBS buffer，並保存於 4 °C 環境。

#### 電化學分析之步驟：

取 A、B 與 C 管，使用 200  $\mu$ L pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，各加入 8  $\mu$ L 之 pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer，且 A、B 與 C 管各分成 4 管，每一管加入 2  $\mu$ L 400 mM Ferricyanide / Glucose，在室溫反應 5 分鐘，使用電化學分析混合後電流訊號。

### 3-5 捕捉抗體耦合磁性奈米粒子之步驟

#### 製備 Ab1-MNP 與 MNP 之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg / mL，取兩組 2  $\mu$ L 磁性奈米粒子，每一組為 0.1 mg 磁性奈米粒子。兩組名稱：A 與 B，A 為 Ab1-MNP；B 為 MNP。兩管各使用 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次，分離磁性奈米粒子與溶液後，A 管加入 8  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 8  $\mu$ L 0.10 M NHS，並在室溫反應 15 分鐘；B 管加入 16  $\mu$ L DDW，並在室溫混合 15 分鐘。反應與混合完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 200  $\mu$ L pH= 8.00 之 1 X PBS 清洗 A 與 B 管一次。取 4  $\mu$ L 捕捉抗體 (濃度：0.549 mg / mL，簡稱：Ab1)，加入至 96  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 8.00) 混合均勻，並加入至 A 管，在室溫下反應 4 小時；取 100  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 8.00)，並加入至 B 管，在室溫混合 4 小時。反應與混合完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 1 M 乙醇胺 (pH= 8.50) 加入 Ab1-MNP (目的為 blocking)，反應 1 小時；B 管加入 DDW 混合均勻，並混合 1 小時。反應與混合完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗 A 與 B 管三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 100  $\mu$ L 保存液至 Ab1-MNP，並分裝成 4 管且存放 4°C 環境。

#### 配製抗原與偵測抗體 (偵測抗體具葡萄糖氧化酶)：

取 200  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，將 200  $\mu$ L 1 X PBS 取 2  $\mu$ L 出來丟棄，取 2  $\mu$ L 抗原 (濃度：100 mg / mL) 並混合均勻，混勻後抗原濃度為：1 mg / mL；取 1000  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，將 1000  $\mu$ L 1 X PBS 取 100  $\mu$ L 出來丟棄，加入 100  $\mu$ L 抗原 (濃度：1 mg / mL) 並混合均勻，混勻後抗原濃度為：100  $\mu$ g / mL；取 100  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，將 100  $\mu$ L 1 X PBS 取 40  $\mu$ L 出來丟棄，加入 40  $\mu$ L 抗原 (濃度：100  $\mu$ g / mL)，混勻後抗原濃度為：40  $\mu$ g / mL。取 50  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，加入 5  $\mu$ L 偵測抗體並混合均勻 (避光配製)。

#### 免疫反應與電化學分析之步驟：

取分裝後之 A 與 B 兩管，以 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗三次。清洗完畢後，加

入 50  $\mu\text{L}$  已配製之抗原 (抗原濃度: 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) 至 A 管, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  反應 1 小時; 加入 50  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1X PBS 至 B 管, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  混合 1 小時。反應與混合完後, 使用 pH=7.40 之 1X PBS 清洗三次。清洗完後, 加入 50  $\mu\text{L}$  已配製之偵測抗體至 A 管 (避光加入), 在 37  $^{\circ}\text{C}$  反應 0.5 小時 (避光反應); 加入 50  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1X PBS 至 B 管, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  混合 0.5 小時。反應混合完後, 使用 pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer 清洗三次。A 與 B 組各加入 8  $\mu\text{L}$  pH= 6.50 之 10 mM phosphate buffer, 分裝成 4 管, 每一管加入 2  $\mu\text{L}$  400 mM Ferricyanide / Glucose, 在室溫反應 5 分鐘, 使用電化學分析混合後電流訊號。

#### 保存液條件:

1. 1 mL 1 X PBS buffer (pH= 7.40) 中, 含有 0.05 % Tween 20、0.1 % BSA 和 0.05 %  $\text{NaN}_3$ ,
2. 含保存液之 Ab1-MNP 或 MNP 存放於 4  $^{\circ}\text{C}$  環境 (不能冷凍), 放置一個禮拜,
3. 保存液之磁性奈米粒子濃度為 1mg / mL。

### 3-6 應用優化條件於捕捉抗體耦合磁性奈米粒子

#### 抗體耦合磁性奈米粒子之優化步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg / mL，取一組 2  $\mu$ L 磁性奈米粒子，使用 DDW 沖洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 8  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 8  $\mu$ L 0.10 M NHS 並在室溫反應 15 分鐘。反應完後，使用 40  $\mu$ L DDW 迅速清洗一次。取 4  $\mu$ L 捕捉抗體 (0.549 mg / mL，捕捉抗體簡稱 Ab1)，加入至 96  $\mu$ L pH= 8.00 之 1 X PBS，在室溫反應 4 小時。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 1 M 乙醇胺 (pH=8.50) 加入 Ab1-MNP(目的為 blocking)，在室溫反應 1 小時。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗已 blocking 之 Ab1-MNP 三次。加入 100  $\mu$ L 保存液至 Ab1-MNP (已 blocking)，並存放於 4  $^{\circ}$ C 環境。

#### 配製抗原與偵測抗體 (偵測抗體具葡萄糖氧化酶)：

取 200  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，將 200  $\mu$ L 1 X PBS 中，取 2  $\mu$ L 出來丟棄，取 2  $\mu$ L 抗原 (濃度： 100 mg / mL)，加入至 1 X PBS (pH= 7.40) 裡混合均勻，濃度為：抗原 1 mg / mL；取 1000  $\mu$ L 1 X PBS (pH=7.40)，將 1000  $\mu$ L 1 X PBS 中，取 100  $\mu$ L 出來丟棄，取 100  $\mu$ L 抗原 (濃度： 1 mg / mL)，加入至 1 X PBS (pH= 7.40) 裡混合均勻，濃度為：抗原 100  $\mu$ g / mL；取 100  $\mu$ L 1 X PBS (pH=7.40)，將 100  $\mu$ L 1 X PBS 中，取 40  $\mu$ L 出來丟棄，取 40  $\mu$ L 抗原 (濃度： 100  $\mu$ g / mL)，加入至 1 X PBS (pH=7.40) 裡混合均勻，濃度為：抗原 40  $\mu$ g / mL。取 50  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，加入 5  $\mu$ L 偵測抗體 (避光配製)。

#### 抗體耦合磁性奈米粒子免疫反應之步驟：

取 25  $\mu$ L Ab1-MNP (已 blocking)，以 pH= 7.40 之 1 X PBS 清洗三次。加入 50  $\mu$ L 已配製之抗原 (抗原： 40  $\mu$ g / mL) 至 Ab1-MNP，在 37  $^{\circ}$ C 反應 1 小時。反應完後，使用 pH= 7.40 之 1 X PBS 清洗三次。加入 50  $\mu$ L 已配製之二抗 (避光加入)，在 37  $^{\circ}$ C 反應 1 小時 (避光反應)。反應完後，使用 pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer 清洗三次。

### 清洗磁性奈米粒子之步驟 (背景值)：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg / mL，取一組 2  $\mu$ L 磁性奈米粒子，使用 DDW 沖洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 16  $\mu$ L DDW 並室溫混合 15 分鐘。混合完後，使用 40  $\mu$ L DDW 迅速清洗一次，並取 100  $\mu$ L pH=8.00 之 1 X PBS，加入至含有 MNP 之微量離心管中，在室溫混合 4 小時。混合完後，分離磁性奈米粒子與溶液，加入 DDW，在室溫混合 1 小時。混合完後，使用 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗 MNP 三次，並加入 100  $\mu$ L 保存液至 MNP，並存放 4 $^{\circ}$ C 環境。取 25  $\mu$ L 含保存液之 MNP，以 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 50  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS 至 MNP，在 37 $^{\circ}$ C 混合 1 小時。混合完後，使用 pH=7.40 之 1 X PBS 清洗三次，並加入 50  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS 至 MNP，在 37 $^{\circ}$ C 混合 1 小時 (避光混合)。混合完後，使用 pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer 清洗三次。

### 電化學分析之步驟：

取完整免疫之磁性奈米粒子與已清完之 MNP，各加入 8  $\mu$ L pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer，並分裝成 4 管，每一管加入 2  $\mu$ L 400 mM Ferricyanide / Glucose，在室溫反應 5 分鐘，使用電化學分析混合後電流訊號。

### 3-7 葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子與電化學分析 GOx-NSP

#### 製備 GOx-NSP、GOx+NSP 與 NSP 之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取一組 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：A，A 為 GOx-NSP；取二組 5  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：B 與 C，B 為 GOx+NSP；C 為 NSP。A 使用 200  $\mu$ L DDW 清洗三次；B 與 C 組各加入 100  $\mu$ L DDW 清洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，A 管加入 60  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 60  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘；B 與 C 管各加入 40  $\mu$ L DDW 並室溫混合 15 分鐘。反應與混合完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，A 管加入 200  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次；B 與 C 管各加入 100  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次。使用 pH=6.80 之 1 X PBS 配製葡萄糖氧化酶，濃度為 0.8 mg/mL，取 120  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至已活化二氧化矽奈米粒子（樣品名稱：A），並室溫反應 1 小時；取 80  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至 B 管，並室溫混合 1 小時；取 80  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 至 C 管，並室溫混合 1 小時。反應與混合完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，A、B 與 C 管使用 200  $\mu$ L pH=5.80 之 1 X PBS buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，A 組分為三管，每一管含 0.5 mg 二氧化矽奈米粒子，將 A 三管以及 B 與 C 管各加入 500  $\mu$ L pH=5.80 之 1 X PBS buffer，並保存於 4  $^{\circ}$ C 環境。

#### 電化學分析之步驟：

取 A、B 與 C 管，使用 200  $\mu$ L pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，各加入 8  $\mu$ L pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer，將 A、B 與 C 管各分成 4 管，每一管加入 2  $\mu$ L 400 mM Ferricyanide / Glucose，室溫反應 5 分鐘，使用電化學分析混合後電流訊號。

### 3-8 不同條件葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物

製備不同條件葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，並呈色分析耦合物之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取四組 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：1、2、3、4；取八組 5  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：5、6、7、8、9、10、11 與 12。1~4 為 GOx-NSP；5~8 為 GOx+NSP；9~12 為 NSP。1~4 使用 200  $\mu$ L DDW 清洗三次；5~12 各加入 100  $\mu$ L DDW 清洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，1 與 2 各加入 60  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 60  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘；3 與 4 各加入 10  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 10  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘；5、6、9 與 10 各加入 40  $\mu$ L DDW 並室溫混合 15 分鐘；7、8、11 與 12 各加入 10  $\mu$ L DDW 並室溫混合 15 分鐘。反應與混合完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，1 與 2 各加入 200  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次；3~12 各加入 100  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次。使用 pH=6.80 之 1 X PBS 配製葡萄糖氧化酶，濃度為 0.8 mg/mL，取 120  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至已活化二氧化矽奈米粒子（樣品編號：1 與 3），並室溫反應 1 小時；取 240  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至已活化二氧化矽奈米粒子（樣品編號：2 與 4），並室溫反應 1 小時；取 40  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至 5 與 7，並室溫混合 1 小時；取 80  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶至 6 與 8，並室溫混合 1 小時；取 40  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 至 9 與 11，並室溫混合 1 小時；取 80  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 至 10 與 12，並室溫混合 1 小時。反應與混合完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，1~12 使用 200  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer 沖洗三次，沖洗完畢後，1~4 分為三管，每一管含 0.5 mg 二氧化矽奈米粒子與 500  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer；5~12 各加入 500  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer。每一個樣品取 50  $\mu$ L 並三重覆至 96 孔盤，加入 50  $\mu$ L 葡萄糖氧化酶呈色試劑，在 OD<sub>570</sub> 下進行偵測。

### 3-9 不同比例葡萄糖氧化酶與偵測抗體耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析其免疫反應 製備不同比例葡萄糖氧化酶與偵測抗體耦合二氧化矽奈米粒子之步驟：

配製不同比例葡萄糖氧化酶 (簡稱: GOx) 與偵測抗體 (簡稱: Ab2), GOx:Ab2 (重量比)= 50:1、100:1、200:1、400:1、800:1 以及 1600:1, GOx 在溶液中, 濃度固定為 0.8 mg/mL。製備不同比例之葡萄糖氧化酶與偵測抗體耦合二氧化矽奈米粒子 (名稱: Ab2-NSP-GOx), 以及葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子 (名稱: GOx-NSP)。

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL, 取八組 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子, 各使用 200  $\mu$ L DDW 各別清洗二氧化矽奈米粒子三次。清洗完後, 每一組各加入 60  $\mu$ L 0.39 MEDC 與 60  $\mu$ L 0.10 M NHS, 並室溫反應 15 分鐘。反應完後, 分離已活化二氧化矽奈米粒子與溶液, 使用 200  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 6.80) 清洗一次。分離已活化二氧化矽奈米粒子與溶液後, 取 7 管已活化二氧化矽奈米粒子, 每一管各加入 240  $\mu$ L 不同比例 GOx:Ab2 與 GOx, 並室溫反應 1 小時; 取一管已活化二氧化矽奈米粒子, 加入 pH= 8.50 之 1 M 乙醇胺, 並室溫反應 1 小時。反應完後, 分離二氧化矽奈米粒子與溶液, 加入 pH= 8.50 之 1 M 乙醇胺, blocking 含有不同比例 GOx:Ab2 與 GOx 之二氧化矽奈米粒子, 並室溫反應 1 小時。反應完後, 分離二氧化矽奈米粒子與溶液, 使用 200  $\mu$ L pH= 7.40 之 1 X PBS 清洗三次。配製保存液 (每毫升 1 X PBS 含 1.0 wt% BSA), 加入保存液至已製備之 GOx-NSP、Ab2-NSP-GOx 與 NSP, 且每 1 mg 二氧化矽奈米粒子含有 1000  $\mu$ L 保存液, 並保存於 4 $^{\circ}$ C 環境。

#### 呈色分析免疫反應之步驟：

取 1  $\mu$ L 抗原 (濃度: 100 mg/mL), 加入 20 mL pH= 7.40 之 1 X PBS 並混合均勻 (抗原濃度: 5  $\mu$ g/mL)。將已配製之抗原加入 96 孔盤 (100  $\mu$ L/well), 放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱至隔天。將已製備之 GOx-NSP、Ab2-NSP-GOx 與 NSP, 使用 200  $\mu$ L pH= 7.40 之 1 X PBS 清洗三次, 加入 500  $\mu$ L pH= 7.40 之 1 X PBS 混合均勻。配製偵測抗體 (偵測抗體上具有葡萄糖氧化酶) 與 pH= 7.40 之 1 X PBS 兩者比例為 1:1000 溶液。將未覆蓋至孔盤之抗原移除, 並使用 200  $\mu$ L pH= 7.40 之 1 X PBS 清洗兩次, 加入 blocking buffer 至 96 孔盤 (200  $\mu$ L/well), 在 37 $^{\circ}$ C 下, blocking 1 小時。Blocking



完後，使用 200  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS 清洗兩次，加入已製備 GOx-NSP、Ab2-NSP-GOx、NSP 與偵測抗體（偵測抗體上具有葡萄糖氧化酶）並三重覆（100  $\mu\text{L}$ /well），在 37  $^{\circ}\text{C}$  下，反應 0.5 小時。反應完後，使用 200  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS 清洗四次，加入 pH=7.40 之 1 X PBS（50  $\mu\text{L}$ /well），加入 50  $\mu\text{L}$  葡萄糖氧化酶呈色試劑，在 OD<sub>570</sub> 下進行偵測。

### 3-10 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析其完整免疫反應

#### 製備 Ab2-NSP-GOx、GOx-NSP 與 NSP 之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取二組 15  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：A 與 B；取一組 5  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：C。A 為 Ab2-NSP-GOx；B 為 GOx-NSP；C 為 NSP。A 與 B 管各加入 200  $\mu$ L DDW，分別清洗三次；C 管加入 100  $\mu$ L DDW，分別清洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，A 與 B 管加入 60  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 60  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘；C 加入 20  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 20  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘。混合與反應完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，A 與 B 管加入 200  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次；C 加入 1 M 乙醇胺在室溫 blocking 1 小時。使用 pH=6.80 之 1 X PBS 配製葡萄糖氧化酶與偵測抗體 (GOx:Ab2 = 100:1)，而含有葡萄糖氧化酶與偵測抗體溶液中，葡萄糖氧化酶濃度固定 0.8 mg/mL；配製葡萄糖氧化酶濃度為 0.8 mg/mL (無偵測抗體)。取 240  $\mu$ L 之含有葡萄糖氧化酶與偵測抗體溶液，加入至已活化二氧化矽奈米粒子 (樣品名稱：A)，並室溫反應 1 小時；取 240  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶溶液，加入至已活化二氧化矽奈米粒子 (樣品名稱：B)，並室溫反應 1 小時。反應完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，A 與 B 管加入 1 M 乙醇胺在室溫 blocking 1 小時。反應完後，將 A、B 與 C 管使用 200  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，A 與 B 各分為三管，每一管含有 0.5 mg 二氧化矽奈米粒子，將 A 與 B 組各三管，以及 C 各加入 50  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer。

#### 製備 Ab1-MNP 之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg/mL，取 20  $\mu$ L 磁性奈米粒子，使用 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 80  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 80  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 200  $\mu$ L DDW 清洗一次。取 40  $\mu$ L 捕捉抗體 (濃度：0.549 mg/mL，簡稱：Ab1)，加入至 960  $\mu$ L pH=8.00 之 1 X PBS，在室溫反應 4 小時。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 pH=8.50 之 1 M 乙醇胺加入 Ab1-MNP (目的為 blocking)，並室溫反應 1 小時。反應完

後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 1000  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS 清洗三次。將 Ab1-MNP 分裝為 10 管，每一管含 0.1 mg 磁性奈米粒子，且每一管含有 50  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS。

#### 配製抗原與偵測抗體之步驟：

加入 200  $\mu\text{L}$  1 X PBS (pH=7.40) 至新的微量離心管，取 2  $\mu\text{L}$  出來丟棄，取 2  $\mu\text{L}$  抗原 (濃度：100mg/mL)，混勻後抗原濃度為：1 mg/mL；取 1000  $\mu\text{L}$  1 X PBS (pH=7.40) 至新的微量離心管，取 100  $\mu\text{L}$  出來丟棄，加入 100  $\mu\text{L}$  抗原 (濃度：1 mg/mL)，混勻後抗原濃度為：100  $\mu\text{g}$ /mL；取 100  $\mu\text{L}$  1 X PBS (pH=7.40) 至新的微量離心管，取 40  $\mu\text{L}$  出來丟棄，加入 40  $\mu\text{L}$  抗原 (濃度：100  $\mu\text{g}$ /mL)，混勻後抗原濃度為：40  $\mu\text{g}$ /mL；配製偵測抗體 (偵測抗體上有葡萄糖氧化酶)：取 1000  $\mu\text{L}$  1 X PBS (pH=7.40) 至新的微量離心管，加入 1  $\mu\text{L}$  偵測抗體 (避光配製)。

#### 完整免疫反應與非專一性吸附，以及呈色分析之步驟：

取一管 Ab2-NSP-GOx，對半稀釋 0.5 mg 至 0.03125 mg，總共五組並含有 50  $\mu\text{L}$  之 pH=7.40 之 1 X PBS buffer。將五組不同重量之 Ab2-NSP-GOx，以及 0.5 mg GOx-NSP 與 0.5 mg NSP，各加入 0.1 mg Ab1-MNP；取 50  $\mu\text{L}$  配製好之偵測抗體，加入至含有 1 X PBS buffer 之 0.1 mg Ab1-MNP。上述八管各加入 50  $\mu\text{L}$  已配製之抗原 (濃度：40  $\mu\text{g}$  /mL)，八管各自總體積為 150  $\mu\text{L}$ ，且在 37 $^{\circ}\text{C}$  下，反應 1 小時。反應完後，使用 500  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS buffer 清洗每一管五次，清洗完後呈色分析。

取 0.5 mg GOx-NSP 與 0.5 mg Ab2-NSP-GOx 各加入 0.1 mg Ab1-MNP，上述兩管各加入 50  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS buffer (不含抗原)，兩管各自總體積為 150  $\mu\text{L}$ ，且在 37 $^{\circ}\text{C}$  下，反應 1 小時。反應完後，使用 500  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS buffer 清洗每一管五次。清洗完後，每一管各加入 200  $\mu\text{L}$  pH=7.40 之 1 X PBS buffer，取一個 96 孔盤，每一孔加入 50  $\mu\text{L}$  樣品，並加入 50  $\mu\text{L}$  葡萄糖氧化酶呈色試劑，在 OD<sub>570</sub> 下進行偵測。

### 3-11 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並電化學分析其完整免疫反應

#### 製備 Ab2-NSP-GOx、GOx-NSP 與 Ab2-NSP 之步驟：

二氧化矽奈米粒子濃度為 100 mg/mL，取兩組 30  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：A 與 B；取一組 5  $\mu$ L 二氧化矽奈米粒子，名稱：C。A 為 Ab2-NSP-GOx；B 為 GOx-NSP；C 為 Ab2-NSP。A 與 B 管加入 200  $\mu$ L DDW，分別清洗三次；C 管加入 100  $\mu$ L DDW，分別清洗三次。分離二氧化矽奈米粒子與溶液後，A 與 B 管各加入 120  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 120  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘；C 管加入 20  $\mu$ L 0.39 M EDC 和 20  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘。反應完後，A 與 B 管加入 200  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次；C 管加入 100  $\mu$ L pH=6.80 之 1 X PBS buffer 沖洗一次。使用 pH=6.80 之 1 X PBS 配製葡萄糖氧化酶與偵測抗體 (GOx : Ab2 = 100 : 1)，葡萄糖氧化酶濃度固定 0.8 mg/mL；配製葡萄糖氧化酶濃度為 0.8 mg/mL (無偵測抗體)。取 480  $\mu$ L 之含有葡萄糖氧化酶與偵測抗體溶液，加入至已活化二氧化矽奈米粒子 (樣品名稱：A)，並室溫反應 1 小時；取 480  $\mu$ L 之葡萄糖氧化酶溶液，加入至已活化二氧化矽奈米粒子 (樣品名稱：B)，並室溫反應 1 小時；取 80  $\mu$ L 之偵測抗體溶液 (8  $\mu$ g/mL)，加入至已活化二氧化矽奈米粒子 (樣品名稱：C)，並室溫反應 1 小時。反應完後，分離二氧化矽奈米粒子與溶液，A、B 與 C 管加入 1 M 乙醇胺在室溫 blocking 1 小時。反應完後，將 A、B 與 C 管使用 200  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer 沖洗三次。沖洗完畢後，A 與 B 各分為六管，每一管含有 0.5 mg 二氧化矽奈米粒子，將 A 與 B 各六管，以及 C 管各加入 50  $\mu$ L pH=7.40 之 1 X PBS buffer。

#### 製備 Ab1-MNP 之步驟：

磁性奈米粒子濃度為 50 mg/mL，取 14  $\mu$ L 磁性奈米粒子，使用 200  $\mu$ L DDW 沖洗三次。分離磁性奈米粒子與溶液後，加入 56  $\mu$ L 0.39 M EDC 與 56  $\mu$ L 0.10 M NHS 並室溫反應 15 分鐘。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 200  $\mu$ L DDW 清洗一次。取 28  $\mu$ L 捕捉抗體 (濃度：0.549 mg/mL，簡稱：Ab1)，加入至 672  $\mu$ L pH=8.00 之 1 X PBS，在室溫反應 4 小時。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 pH=

8.50 之 1 M 乙醇胺加入 Ab1-MNP (目的為 blocking)，在室溫反應 1 小時。反應完後，分離磁性奈米粒子與溶液，使用 1000  $\mu$ L pH= 7.40 之 1 X PBS buffer 清洗三次。分離已 blocking 之 Ab1-MNP 後，將 Ab1-MNP 分裝為 7 管，每一管含 0.1 mg 磁性奈米粒子，且每一管含有 50  $\mu$ L 之 pH= 7.40 之 1 X PBS buffer。

#### 配製抗原與偵測抗體之步驟：

加入 200  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40) 至新的微量離心管，取 2  $\mu$ L 出來丟棄，取 2  $\mu$ L 抗原 (濃度： 100 mg/mL)，混勻後抗原濃度為： 1 mg/mL；取 1000  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40) 至新的微量離心管，取 100  $\mu$ L 出來丟棄，加入 100  $\mu$ L 抗原 (濃度： 1 mg/mL)，混勻後抗原濃度為： 100  $\mu$ g/mL；取 100  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40) 至新的微量離心管，取 40  $\mu$ L 出來丟棄，加入 40  $\mu$ L 抗原 (濃度： 100  $\mu$ g/mL)，混勻後抗原濃度為： 40  $\mu$ g/mL；配製偵測抗體 (偵測抗體上有葡萄糖氧化酶)：取 1000  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40) 至新的微量離心管，加入 1  $\mu$ L 偵測抗體 (避光配製)。

#### 不同免疫反應或非專一性吸附情況：

1. 取一管 Ab2-NSP-GOx，與 Protein A-MNP 混合反應，
2. 取一管 GOx-NSP，與 Protein A-MNP 混合反應，
3. 取一管 Ab1-MNP 與 50  $\mu$ L 抗原 (濃度： 40  $\mu$ g / mL) 混合，加入 50  $\mu$ L 之 1：1000 偵測抗體，且在 37  $^{\circ}$ C 下，反應 1 小時，
4. 取一管 Ab1-MNP 與 50  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40) 混合，加入 50  $\mu$ L 之 1：1000 偵測抗體，且在 37  $^{\circ}$ C 下，混合 1 小時，
5. 取一管 Ab1-MNP 與一管 GOx-NSP 混合，加入 50  $\mu$ L 抗原 (濃度： 40  $\mu$ g/mL)，且在 37  $^{\circ}$ C 下，混合與反應 1 小時，
6. 取一管 Ab1-MNP 與一管 GOx-NSP 混合，加入 50  $\mu$ L 1 X PBS (pH= 7.40)，且在 37  $^{\circ}$ C 下，混合 1 小時，
7. 取一管 Ab1-MNP 與一管 Ab2-NSP 混合，加入 50  $\mu$ L 抗原 (濃度： 40  $\mu$ g/mL)，且在 37  $^{\circ}$ C 下，反應 1 小時，

8. 取一管 Ab1-MNP 與一管 Ab2-NSP-GOx 混合，加入 50  $\mu$ L 抗原 (濃度：40  $\mu$ g / mL) ，且在 37  $^{\circ}$ C 下，反應 1 小時。反應與混合完後，使用 500  $\mu$ L pH= 6.50 之 10 mM phosphate buffer，清洗每一管五次。取一管 GOx-NSP 與 Ab2-NSP-GOx，使用 200  $\mu$ L pH= 6.50 之 10 mM phosphate buffer，清洗 GOx-NSP 與 Ab2-NSP-GOx 兩次。

#### 電化學分析之步驟：

上述不同免疫反應與非專一性吸附共八組，以及 GOx-NSP 與 Ab2-NSP-GOx，各加入 8  $\mu$ L pH=6.50 之 10 mM phosphate buffer，且每一管分為 4 管，每一管各加入 2  $\mu$ L 400 mM Ferricyanide / Glucose，並室溫反應 5 分鐘，使用電化學分析混合後電流訊號。

## 第四章、結果與討論

### 4-1 應用與探討不同優化條件於奈米粒子之目的

本研究目的為應用優化條件製備抗體與蛋白質耦合物，而實驗流程之一為：使用活化試劑活化奈米粒子之羧基，蛋白質耦合已活化之奈米粒子，並應用 Bradford 法分析其上清液。在沒有優化條件下，探討活化試劑與蛋白質之關係，是否影響 Bradford 法定量蛋白質。因此，先以活化試劑與 Bradford 試劑直接混合，分析活化試劑影響性，結果說明無明顯影響 Bradford 反應 (表二)。但是活化試劑與 BSA 混合反應後，可能造成蛋白質之間互相影響，使 Bradford 法無法定量蛋白質，由表三說明，醋酸鈉緩衝溶液 pH 值範圍為 pH= 3.70 至 pH= 5.60，將 BSA 於不同環境耦合磁性奈米粒子，結果可以說明不同環境皆產生誤差，且在 pH=3.70 之環境中，% Bias 更達到 48.5%。另外，在沒有推算奈米粒子上之羧基量，BSA 耦合磁性奈米粒子並 Bradford 法分析其耦合量，表四說明，反應前減去反應後皆為負值，無法定量有多少 BSA 耦合上磁性奈米粒子。

由上述結果說明，過多活化試劑造成 Bradford 法無法定量蛋白質，本研究應用 Ninhydrin 反應推算奈米粒子表面羧基量，計算適當活化試劑使用量後，將 BSA 耦合奈米粒子，並應用 Bradford 法分析有多少蛋白質耦合至奈米粒子。另外，蛋白質由多種區域 (domain) 組成，以抗體為例分為 Fab 與 Fc 區域，在沒有特定區域耦合奈米粒子，多數蛋白質耦合較佳的環境為 pI (isoelectric point) 減去一個 pH 值 [58]，本實驗之 BSA 耦合奈米粒子，耦合環境為 pH=3.70 (BSA 之 isoelectric point 為 pH=4.70) [59]。然而，在捕捉抗體耦合磁性奈米粒子實驗中，為了使捕捉抗體之 Fab 區域辨識特定抗原，依據實驗所選擇抗體之種類，以及期刊與結構判斷 [60, 61]，設計 pH=8.00 的環境下，使捕捉抗體選擇性將不同區域耦合奈米粒子，但是只能推測捕捉抗體之 Fc 區域耦合磁性奈米粒子。

製備耦合物後，分析耦合物之鍵結與吸附重要性，主要目的為確認是否為共價鍵形成之耦合物，而共價鍵形成之耦合物應用於生醫檢測訊號可以更穩定並準確判斷。本研究應用 FTIR 判別蛋白質為吸附或鍵結磁性奈米粒子，由圖十三結果可以看出 A、B、

C、D 與 E 在  $2800\text{ cm}^{-1}$  與  $2930\text{ cm}^{-1}$  之間，其波長具有磁性奈米粒子訊號；而在  $1400\text{ cm}^{-1}\sim 1720\text{ cm}^{-1}$  之間，可以看出 A、D、E 與 BSA only 訊號峰的分布都在相似位置，而 B 與 C 卻不相同；B 與 C 不相同，可以推測由於 BSA 溶解於不同 pH 值之溶液，會使 BSA 不同區域耦合或吸附磁性奈米粒子，造成  $1400\text{ cm}^{-1}\sim 1720\text{ cm}^{-1}$  有差異；由於 A、D 與 E 圖相似，此結果無法判斷鍵結與吸附。因此，選用電化學儀器判斷蛋白質鍵結與吸附奈米粒子之差異。為了使優化條件於製備耦合物具可行性，本研究將實驗先測試於磁性微米粒子，分析後擬定優化條件步驟，並應用於蛋白質或抗體耦合奈米粒子之製備。

應用 Ninhydrin 反應與 Bradford 法於磁性微米粒子，先測試活化試劑對 Ninhydrin 反應之影響性，將活化試劑與乙醇胺混合，應用 Ninhydrin 反應定量分析其混合物。表五說明，在只有乙醇胺與活化試劑之情況下，探討活化試劑是否影響 Ninhydrin 定量，結果可以看出活化試劑有影響 Ninhydrin 定量之可能性，其 % Bias 為  $-16.3\%$ 。因此，推算出  $1\text{ mg}$  磁性微米粒子有  $25.8\text{ }\mu\text{mole}$  之羧基量 (表六)；而  $25.8\text{ }\mu\text{mole}$  乙醇胺包含活化試劑造成之誤差，以及乙醇胺耦合至磁性微米粒子之羧基量。表八說明，應用 Bradford 法實驗推算微米粒子之蛋白質耦合量，有  $4.49 \times 10^{-3}\text{ }\mu\text{mole}$  之 BSA 耦合上  $1\text{ mg}$  磁性微米粒子。優化條件於葡萄糖氧化酶耦合磁性微米粒子，由表十、十一與十二說明，電化學分析磁性微米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性微米粒子，不管於  $10\text{ 秒}$ 、 $20\text{ 秒}$  與  $30\text{ 秒}$  之電流值，皆比只有磁性微米粒子之電流值高且具顯著差異，初步說明磁性微米粒子上有葡萄糖氧化酶。表十三說明，將捕捉抗體耦合磁性微米粒子並免疫反應，與只有磁性微米粒子，兩者皆含有 glucose 與 ferricyanide 溶液混合反應後，電化學分析其電流值。磁性微米粒子之平均電流值為： $0.14\text{ }\mu\text{A}$ ；捕捉抗體耦合磁性微米粒子並免疫反應之平均電流值為： $0.19\text{ }\mu\text{A}$ ；而捕捉抗體耦合磁性微米粒子放置保存液，保存一個禮拜後，經免疫反應之平均電流值為： $0.18\text{ }\mu\text{A}$ 。捕捉抗體耦合磁性微米粒子經免疫反應，其電流值比磁性微米粒子高，其電流值具顯著差異 ( $*p<0.05$ )，初步證明捕捉抗體耦合磁性微米粒子並免疫反應且訊號有顯著差異。



## 4-2 應用 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之羧基量結果

應用圖十六解釋 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子之羧基量，將磁性奈米粒子活化，加入乙醇胺耦合已活化磁性奈米粒子，Ninhydrin 反應定量圖十六之紅色框。圖十七為 Ninhydrin 反應機制，其 Ninhydrin 與一級胺形成之化合物為紫色，於 OD<sub>570</sub> 下定量上清液（紅色框）與標準品。計算奈米粒子之羧基量為：反應前乙醇胺莫耳數減去反應後上清液莫耳數，即為有多少乙醇胺耦合上磁性奈米粒子。

圖十八與表十四為乙醇胺之標準曲線。表十五說明，應用 Ninhydrin 定量上清液之結果為反應前減去反應後上清液，相差 6.43  $\mu\text{mole}$ 。6.43  $\mu\text{mole}$  為乙醇胺鍵結上 1 mg 之磁性奈米粒子。但是在應用 Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子之羧基實驗中，表五說明，在含有活化試劑的情況下，會影響 Ninhydrin 定量，所以 6.43  $\mu\text{mole}$  除了為乙醇胺鍵結上 1 mg 之磁性奈米粒子，也包含活化試劑造成之誤差。

應用乙醇胺耦合已活化二氧化矽奈米粒子，並定量上清液推算二氧化矽奈米粒子上含有多少羧基。圖十九與表十六為乙醇胺之標準曲線。表十七說明，應用 Ninhydrin 定量上清液推算二氧化矽奈米粒子之羧基量，反應前減去反應後上清液之相差值為 2.86  $\mu\text{mole}$ ，2.86  $\mu\text{mole}$  為乙醇胺鍵結上 1.5 mg 之二氧化矽奈米粒子。但是在應用 Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子之羧基實驗中，表五說明，在含有活化試劑的情況下，會影響 Ninhydrin 定量，所以 2.86  $\mu\text{mole}$  除了為乙醇胺鍵結上 1.5 mg 之二氧化矽奈米粒子，也包含活化試劑造成之誤差。

### 4-3 Bradford 法推算磁性奈米粒子與二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量結果

應用圖二十解釋 Bradford 法推算耦合磁性奈米粒子，將磁性奈米粒子活化，加入 BSA 耦合已活化磁性奈米粒子，Bradford 定量上清液 (紅色框)。圖二十一為 Bradford 反應機制，其形成之藍色錯合物，於 OD<sub>595</sub> 下可以被偵測。推算蛋白質耦合量為：耦合前 BSA 莫耳數減去耦合後上清液 BSA 莫耳數，可以推算有多少 BSA 耦合磁性奈米粒子。

因此，圖二十二與表十八為標準曲線結果。表十九說明反應前 BSA 莫耳數減去反應後之上清液 BSA 莫耳數，有  $6.0 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mole}$  之 BSA 耦合上 1 mg 磁性奈米粒子。BSA 分子量為 66463 Da，推算出有 39  $\mu\text{g}$  耦合上 1 mg 磁性奈米粒子。

BSA 耦合二氧化矽奈米粒子，並應用 Bradford 法定量上清液。圖二十三與表二十為標準曲線結果。表二十一說明，反應前 BSA 莫耳數減去反應後之上清液 BSA 莫耳數，有  $4.0 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mole}$  之 BSA 耦合上 1.5 mg 二氧化矽奈米粒子。BSA 分子量為 66463 Da，推算出有 27  $\mu\text{g}$  耦合上 1.5 mg 二氧化矽奈米粒子。

#### 4-4 應用優化條件於葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子並電化學分析結果

樣品名稱：GO<sub>x</sub>-MNP、GO<sub>x</sub>+MNP 與 MNP；GO<sub>x</sub> 為葡萄糖氧化酶；GO<sub>x</sub>-MNP 為葡萄糖氧化酶鍵結磁性奈米粒子；GO<sub>x</sub>+MNP 為葡萄糖氧化酶吸附磁性奈米粒子；MNP 為磁性奈米粒子。

由表二十二、二十三與二十四說明，GO<sub>x</sub>-MNP 與 GO<sub>x</sub>+MNP 皆比 MNP 的平均電流訊號高且具顯著差異，證明有葡萄糖氧化酶存在。而 MNP 有電流值產生，由於 MNP 加入 ferricyanide 與 glucose 混合反應後，產生氧化還原反應，導致有電流值產生。電化學測得電流值分析 SD 值與 CV %，可以判別電流訊號穩定或不穩定，發現不同偵測時間下，GO<sub>x</sub>+MNP 之 CV % 皆比 GO<sub>x</sub>-MNP 大。電化學偵測秒數增加至 30 秒時，GO<sub>x</sub>-MNP 之 CV % 降低很多且小於 5%，第 30 秒 GO<sub>x</sub>+MNP 之 CV % 卻高達 14.1%。除了比較 CV % 之外，電化學偵測不同秒數之 GO<sub>x</sub>-MNP，其 SD 值也隨著偵測秒數降低，第 30 秒 GO<sub>x</sub>+MNP 之 SD 值是 0.1424 比 GO<sub>x</sub>-MNP 之 SD 值 0.0510 高。另外，GO<sub>x</sub>-MNP 電流值比 GO<sub>x</sub>+MNP 高，但沒有顯著差異，所以由 CV % 與 SD 值判別鍵結與非鍵結。另外，第 30 秒之 MNP 電流值 CV % 較大，由於 MNP 與 GO<sub>x</sub>-MNP 之 SD 值相近，因此，MNP 平均電流值較小，導致 MNP 之 CV % 較大。

#### 4-5 應用優化條件於抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果

樣品名稱：MNP 為磁性奈米粒子；Ab1-MNP 為捕捉抗體耦合磁性奈米粒子並經免疫反應。抗體耦合磁性奈米粒子與優化條件於抗體耦合奈米粒子之差異：磁性奈米粒子經活化試劑活化後，前者使用 pH=8.00 緩衝溶液清洗剩餘活化試劑；而後者使用 DDW 清洗剩餘活化試劑。表二十五至三十中，MNP 有電流值產生，由於 MNP 加入 ferricyanide 與 glucose 混合反應後，產生氧化還原反應，導致有電流值產生。

表二十五、二十六與二十七說明：抗體耦合磁性奈米粒子並經免疫反應。由電流值比較 Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP。電化學偵測第 10 秒之電流值，MNP：0.25  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.35  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )；電化學偵測第 20 秒之電流值，MNP：0.20  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.30  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )；電化學偵測第 30 秒之電流值，MNP：0.19  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.26  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )，初步證明捕捉抗體耦合磁性奈米粒子並免疫反應。

表二十八、二十九與三十說明：優化條件於抗體耦合磁性奈米粒子並經免疫反應。由電流值比較 Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，電化學偵測第 10 秒之電流值，MNP：0.29  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.44  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )；電化學偵測第 20 秒之電流值，MNP：0.23  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.35  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )；電化學偵測第 30 秒之電流值，MNP：0.20  $\mu\text{A}$  與 Ab1-MNP：0.30  $\mu\text{A}$ ，其兩者之電流值具顯著差異 (\*\* $p < 0.001$ )，初步證明捕捉抗體耦合磁性奈米粒子並免疫反應。

由電流穩定度可以得出：抗體耦合磁性奈米粒子在不同時間之 CV% 皆低於 5%，比優化條件於抗體耦合磁性奈米粒子之 CV% 更穩定，但是優化條件於抗體耦合磁性奈米粒子與 MNP 之電流差異性較大。此結果推測說明羧基經過活化後，使用 pH 值較高的溶液沖洗，造成 NHS ester 形成羧基，導致較少抗體耦合磁性奈米粒子，但是 CV% 卻較低且穩定，而圖二十七之 3 為此實驗免疫反應示意圖。

#### 4-6 電化學分析葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之結果

樣品名稱：GO<sub>x</sub>-NSP、GO<sub>x</sub>+NSP 與 NSP；GO<sub>x</sub> 為葡萄糖氧化酶；GO<sub>x</sub>-NSP 為葡萄糖氧化酶鍵結二氧化矽奈米粒子；GO<sub>x</sub>+NSP 為葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子；NSP 為二氧化矽奈米粒子。表三十一至三十三中，NSP 有電流值產生，由於 NSP 加入 ferricyanide 與 glucose 混合反應後，產生氧化還原反應，導致有電流值產生。

表三十一、三十二與三十三說明，GO<sub>x</sub>-NSP、GO<sub>x</sub>+NSP 與 NSP 各加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後，電化學偵測三十秒。在第 10 秒與第 20 秒之 GO<sub>x</sub>-NSP 與 GO<sub>x</sub>+NSP 皆比 NSP 的平均電流訊號高，且具顯著差異，代表有葡萄糖氧化酶存在，但是第 30 秒之 GO<sub>x</sub>+NSP 比 NSP 的平均電流訊號高，卻沒有顯著差異。當偵測秒數增加時，GO<sub>x</sub>+NSP 之 CV% 越來越大，而 GO<sub>x</sub>-NSP 越來越小，結果可以說明，葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子，其電流穩定性不好。另外，GO<sub>x</sub>-NSP 之 SD 值隨著偵測時間增加，有降低的趨勢，而 GO<sub>x</sub>+NSP 第 30 秒之 SD 值為 16.66，約為 GO<sub>x</sub>-NSP 之 SD 值 1.7 倍。不同時間 GO<sub>x</sub>-NSP 平均電流值比 GO<sub>x</sub>+NSP 高，但沒有顯著差異，所以由 CV% 與 SD 值判別鍵結與非鍵結。

#### 4-7 不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果

表三十五與表三十六之條件如表三十四，樣品編號 1、2、3 與 4 為葡萄糖氧化酶鍵結二氧化矽奈米粒子；樣品編號 5、6、7 與 8 為葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子；樣品編號 9、10、11 與 12 為二氧化矽奈米粒子。

本實驗樣品編號 1 與 2 之活化試劑使用量，依 Ninhydrin 反應推算二氧化矽奈米粒子之羧基量並過量活化羧基；而樣品編號 3 與 4 之活化試劑使用量，依廠商提供之羧基量並過量活化羧基。因此，為了比較 Ninhydrin 反應推算出羧基量與廠商提供羧基量之差別，計算活化試劑使用量後，將二氧化矽奈米粒子活化，並使用不同使用量葡萄糖氧化酶耦合已活化二氧化矽奈米粒子，挑選出優化條件後，將應用抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子。

樣品編號 9、10、11 與 12，由吸收值差可以看出葡萄糖氧化酶呈色試劑對 NSP 沒有呈色之效果；樣品編號 3 與 7，由時間差 3 分鐘與 6 分鐘，可以看出鍵結之吸收值差高於吸附，當時間差至 9 分鐘時，吸附之吸收值差高於鍵結，但上述三個不同時間差之吸收值差都無明顯差異，因此，無法判別鍵結與吸附差異性。不同時間下，樣品編號 8 比樣品編號 4 吸收值差還要大，在時間差為 9 分鐘時，樣品編號 8 之吸收值差減去編號 4 之吸收值差為 0.0721。另外，不同時間下，樣品編號 5 比樣品編號 1 吸收差值大，當時間差至 9 分鐘時，樣品編號 5 之吸收值差減去編號 1 之吸收值差為 0.0339。但是樣品編號 2 比樣品編號 6 之吸收值差還要明顯，且隨著時間差增加至 9 分鐘，差異性越大，樣品編號 2 與 6 相差 0.1487。

由上述結果得出，樣品編號 1 與 2 之活化試劑使用量為 Ninhydrin 定量並推算其使用量，而增加葡萄糖氧化酶使用量，可以發現吸收值差明顯增加。而樣品編號 1 與 4 由二氧化矽奈米粒子之廠商提供相關資訊，並推算其活化試劑使用量，雖然活化試劑使用量較少，但是增加葡萄糖氧化酶使用量，吸收值差並沒有明顯有差異性，無法分辨吸附與鍵結。結果說明，後續實驗耦合物之製備，需要應用 Ninhydrin 定量羧基量並推算活化試劑使用量，有利於分辨吸附與鍵結，以及增加葡萄糖氧化酶量，使其更有效且較多的葡萄糖氧化酶耦合上二氧化矽奈米粒子。

#### 4-8 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析免疫反應結果

表三十七與三十八說明，本實驗理論推測葡萄糖氧化酶比例越高，其吸收值差越大，並探討非專一性吸附 GOx-NSP 與抗原之影響性。首先，使用 GOx-Ab2 (偵測抗體上有葡萄糖氧化酶) 證明 96 孔盤有覆蓋抗原，其吸收值差為 0.0706，比 NSP 之吸收值差為 0.0018 高，因此證明 96 孔盤上有抗原。當 GOx:Ab2 為 50:1 時，其吸收值差為 0.0038，比 GOx:Ab2 為 100:1 時，其吸收值差為 0.0123 低，提高葡萄糖氧化酶比例時，GOx:Ab2 為 200:1、400:1、800:1 與 1600:1，其吸收值差皆相近，比 GOx:Ab2 為 100:1 之吸收值差低。上述結果說明，當葡萄糖氧化酶比例越高，其吸收值差不會比較好，需要依設計不同比例之抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，探討不同比例之抗體與葡萄糖氧化酶何者為有利於與抗原進行免疫反應。另外，在 GOx-NSP 與抗原非專一性吸附之吸收值差為 0.0034，與 GOx:Ab2 為 50:1、200:1、400:1、800:1 以及 1600:1 之吸收值差相近，無法判別非專一性吸附與免疫反應結果。但是 GOx:Ab2 為 100:1 之吸收值差高於非專一性吸附約 3.6 倍，所以選用 GOx:Ab2 為 100:1 當作耦合比例。

表三十九說明，製備抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，以及探討非專一性吸附，而非專一性吸附為：在沒有特定偵測抗體或抗原存在下，是否有其他非相關之蛋白質或抗體等，與耦合物進行非專一性吸附，並產生訊號。將 0.5 mg 之 Ab2-NSP-GOx 進行對半稀釋，對半稀釋範圍為 0.5 mg 至 0.03125 mg 之 Ab2-NSP-GOx，與 Ab1-MNP 以及抗原進行免疫反應，並呈色分析其結果。在樣品編號 A，吸收值差比其他濃度之 Ab2-NSP-GOx 大，0.5 mg 之 Ab2-NSP-GOx 在短時間內，可以與非專一性吸附性作判別，以樣品編號 A 之吸收值差為 0.2115，與以下非專一性吸附具差異性，如樣品編號 F 吸收值差為 -0.0073；樣品編號 I 吸收值差為 0.0106；樣品編號 J 吸收值差為 0.0373。但是對半稀釋之 Ab2-NSP-GOx 濃度越小，與非專一性吸附差異越小，雖然可以看出不同濃度之 Ab2-NSP-GOx 皆可以與 F 區分，但是與樣品編號 C、D 與 E 比較樣品編號 I 與 J，其吸收值差無法與非專一性吸附區分。因此，選用 0.5 mg 之 Ab2-NSP-GOx，並且與 0.1 mg Ab1-MNP，以及抗原進行免疫反應，並用電化學分析其電流值。

#### 4-9 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並電化學分析免疫反應結果

表四十到四十四中，A 為 GOx-NSP 與 protein A-MNP 混合，B 為 Ab2-NSP-GOx 與 protein A-MNP 混合； 1 為 Ab2-NSP、Ab1-MNP 與抗原混合； 2 為 Ab2-NSP-GOx、Ab1-MNP 與抗原混合； 3 為 GOx-Ab2、Ab1-MNP 與抗原混合； 4 為 GOx-Ab2 與 Ab1-MNP 混合； 5 為 GOx-NSP、Ab1-MNP 與抗原混合； 6 為 GOx-NSP 與 Ab1-MNP 混合； 7 為 Ab2-NSP-GOx； 8 為 GOx-NSP (各樣品編號之示意圖，如圖二十四至圖二十九)。

表四十說明，樣品編號 A 與 B 於有無偵測抗體下，與 Protein A-MNP 混合，樣品編號 B 之平均電流值比樣品編號 A 高  $0.04 \mu\text{A}$ ，可以看出經過完整免疫後，其平均電流值較高，而 GOx-NSP 無偵測抗體，Protein A-MNP 無法與 GOx-NSP 免疫反應，所以電流值比樣品編號 B 低。但是樣品編號 A 與 B 之平均電流值無顯著差異，因此說明樣品編號 A 有較高之電流值，但是 GOx-NSP 與 Protein A-MNP 之非專一性吸附，無法與樣品編號 A 之平均電流值明顯區分。

表四十一說明，樣品編號 1 與 2 於有無葡萄糖氧化酶下，與 Ab1-MNP 混合，兩個具有偵測抗體之耦合物經免疫反應後，耦合物上有葡萄糖氧化酶電流值訊號較高，比樣品編號 1 高  $0.04 \mu\text{A}$ ，與樣品編號 A 與 B 電流值之相差值相近，但是兩者具顯著差異 ( $*p < 0.05$ )，說明偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合至二氧化矽奈米粒子，並成功免疫反應。

表四十二說明，樣品編號 3 與 4 於有無抗原下，與 Ab1-MNP 混合，樣品編號 3 與 4 之偵測抗體並含有葡萄糖氧化酶，此偵測抗體為 Polyclonal antibodies，樣品編號 4 比樣品編號 3 之電流值高  $0.01 \mu\text{A}$ ，兩者相近且無法分辨訊號差異，電流穩定度較差，說明抗體需要使用 Monoclonal antibodies，且間接證明偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之重要性為放大訊號，更容易顯示其差異性。

表四十三說明，樣品編號 5 與 6 於有無抗原下，與 Ab1-MNP 混合，樣品編號 5 與 6 都沒有偵測抗體存在，而樣品編號 5 之電流值卻比樣品編號 6 高  $0.05 \mu\text{A}$ ，推測 Ab1-MNP 有可能捕捉抗原後，結構以及表面性質改變，更容易吸附葡萄糖氧化酶，所以電流訊號高於樣品編號 6。但是樣品編號 5 之電流值訊號高於樣品編號 2，理論



上含有偵測抗體與葡萄糖氧化酶之二氧化矽奈米粒子其電流值較高，但是實驗結果與此理論相反，推測 GOx-NSP 具有非專一性吸附。

表四十四說明，電化學偵測 GOx-NSP 與 Ab2-NSP-GOx，而 Ab2-NSP-GOx 之電流值比 GOx-NSP 高 0.06  $\mu\text{A}$ ，實驗理論上，GOx-NSP 表面之葡萄糖氧化酶量比 Ab2-NSP-GOx 多，所以電化學訊號較高。但是實驗結果 Ab2-NSP-GOx 之電流值比 GOx-NSP 高，推測偵測抗體耦合二氧化矽奈米粒子時，其結構穿插於葡萄糖氧化酶之間，使葡萄糖氧化酶較容易耦合二氧化矽奈米粒子，而 GOx-NSP 只有葡萄糖氧化酶，因為結構龐大，導致較少葡萄糖氧化酶耦合至二氧化矽奈米粒子。

## 第五章、結論

本研究目的為推算奈米粒子之羧基量，並降低蛋白質使用量。應用 Ninhydrin 反應推算 1 mg 磁性奈米粒子表面上，羧基含量約為 6.43  $\mu\text{mole}$ ；1.5 mg 二氧化矽奈米粒子之羧基含量約為 2.86  $\mu\text{mole}$ 。得知奈米粒子之羧基量後，降低活化試劑使用量，將 BSA 耦合奈米粒子，應用 Bradford 方法推算，有  $6.0 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mole}$  之 BSA 耦合至 1 mg 磁性奈米粒子；有  $4.0 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mole}$  之 BSA 耦合至 1.5 mg 二氧化矽奈米粒子。以 Ninhydrin 與 Bradford 反應優化合成條件，將優化後條件應用於製備耦合物，且 Ninhydrin 反應可以檢測市售奈米粒子是否修飾上特定官能基。

為了探討蛋白質鍵結或吸附奈米粒子，在應用優化條件於葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子或二氧化矽奈米粒子實驗中，其電流訊號為 GOx-MNP、GOx-NSP、GOx+MNP 和 GOx-NSP 比單純奈米粒子電流值高，證明有葡萄糖氧化酶存在。電流穩定度之比較為 GOx-MNP 與 GOx-NSP 比 GOx+MNP 與 GOx+NSP 好，以電流穩定度初步判斷蛋白質是否為鍵結或吸附。確認耦合物為鍵結時，說明優化條件之可行性，且證明耦合物被成功製備。

將兩種耦合物分開合成與鑑定：1. 應用優化條件於捕捉抗體耦合磁性奈米粒子實驗中，經免疫反應後，其電流值比磁性奈米粒子之電流值高，且具有顯著差異，初步證明有捕捉抗體並免疫反應；2. 偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子實驗中，需要依據不同比例耦合，並探討其免疫反應，何者為有效於抗體抗原反應。應用呈色分析可以發現短時間內，經完整免疫反應後之吸收值差異顯著差異，並且可以判別非專一性吸附，初步證明製備兩種不同耦合物並免疫反應；3. 電化學分析其免疫反應，解釋抗體選用單株抗體之重要性。抗體與葡萄糖氧化酶同時耦合二氧化矽奈米粒子，並免疫反應於 Protein A-MNP，無法與非專一性吸附區分。製備抗體耦合磁性奈米粒子，以及抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子，兩者耦合物完整免疫反應後，兩者具有顯著差異。但是只有葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子時，與 Ab1-MNP 以及抗原混合後，卻有非專一性吸附問題。

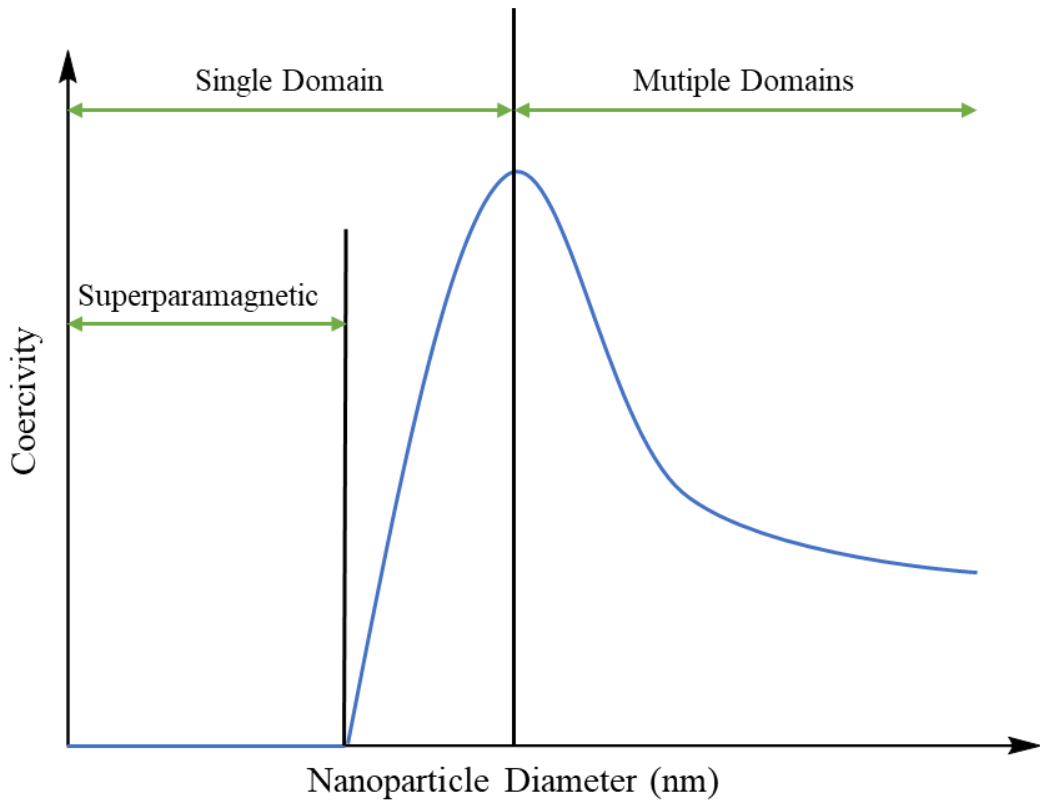
## 未來展望

本研究以優化條件於製備兩種耦合物，並呈色與電化學分析兩種耦合物之免疫反應，每製備完一種耦合物後進行分析鑑定。首先，以 Ninhydrin 反應推算奈米粒子表面之羧基量 (-COOH)，Bradford 反應推算 BSA 耦合量，以較低成本實驗並擬定優化條件後，推算抗體使用量並耦合奈米粒子。Bradford 反應推算蛋白質耦合量實驗中，以上清液作為定量溶液，而非蛋白質-奈米粒子，推測如果取蛋白質-奈米粒子作為定量目標物，可能會因為蛋白質鍵結於奈米粒子上，而整體結構會與分散於溶液之蛋白質有差異，導致無法精準定量，後續將比較蛋白質-奈米粒子與上清液推算蛋白質耦合量之差異性。

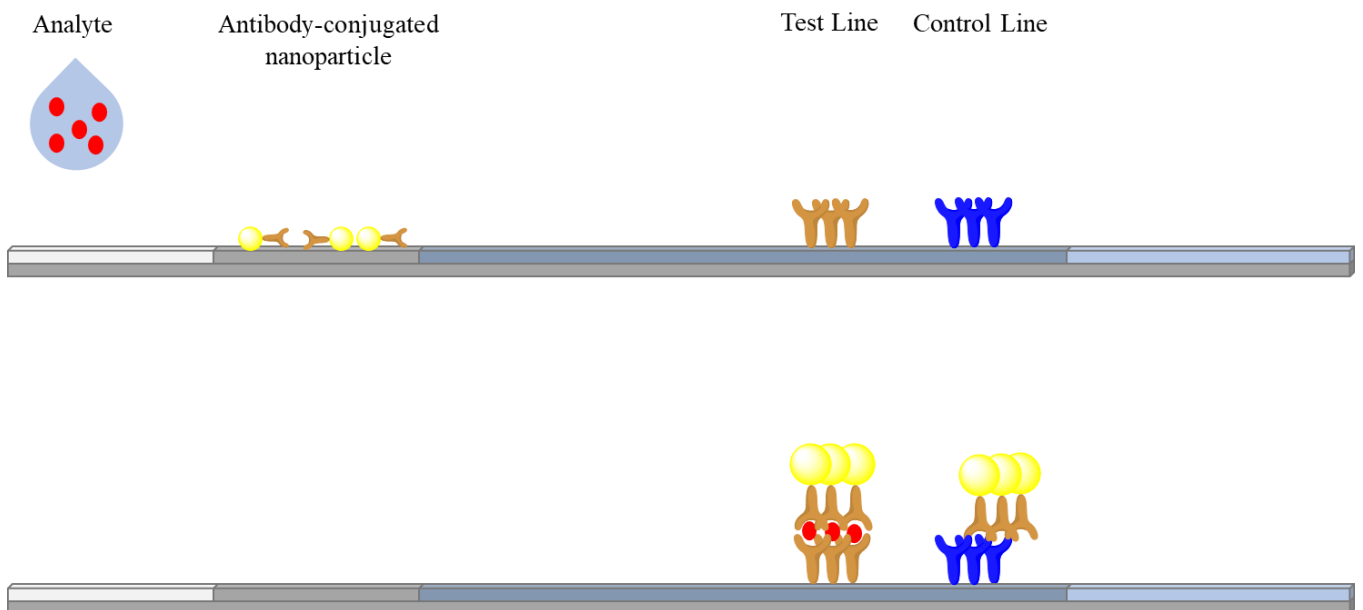
當製備完耦合物，以及進行免疫反應後，加入受質並電化學分析其電流值。但是在應用優化條件於捕捉抗體耦合磁性奈米子實驗中，以奈米粒子當作對照組，仍有一些疑慮，如對照組為單純奈米粒子，可能有一些雜訊存在，導致對照組之平均電流值偏高，將考慮捕捉抗體耦合奈米粒子與偵測抗體混合，在無抗原下當作對照組，推測電流值差異性會更大。捕捉抗體耦合磁性奈米粒子，使用之偵測抗體為多株抗體，未來將改為單株抗體進行免疫反應，電化學分析其電流值。另外，將探討抗原不同濃度之電流值，當增加抗原濃度時，是否提高電流值，並與對照組比較其差異性。

不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之實驗中，以抗原覆蓋於孔盤上，分析何者比例為較好與抗原免疫反應，未來將應用於兩種耦合物進行免疫反應，分析抗體與葡萄糖氧化酶較好之比例。因為抗原覆蓋於孔盤之平面，與在捕捉抗體耦合磁性奈米粒子捕捉之抗原，其兩者立體結構不同，因此，將探討孔盤與磁性奈米粒子分析不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶，其結果兩者是否一致。

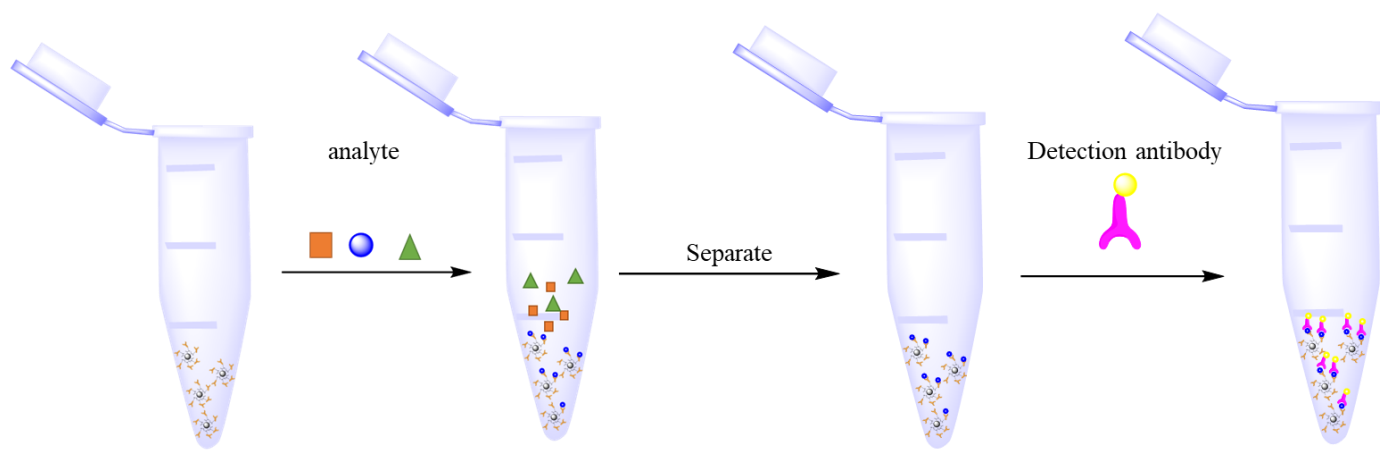
# 圖附錄



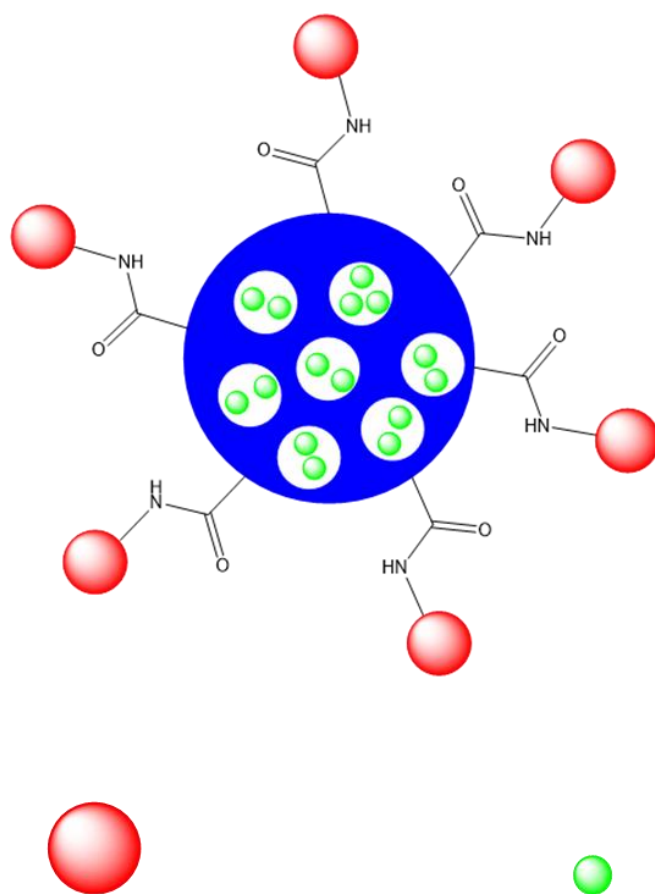
圖一、磁性粒子尺寸與矯頑力關係圖。



圖二、側向流動免疫測定示意圖。

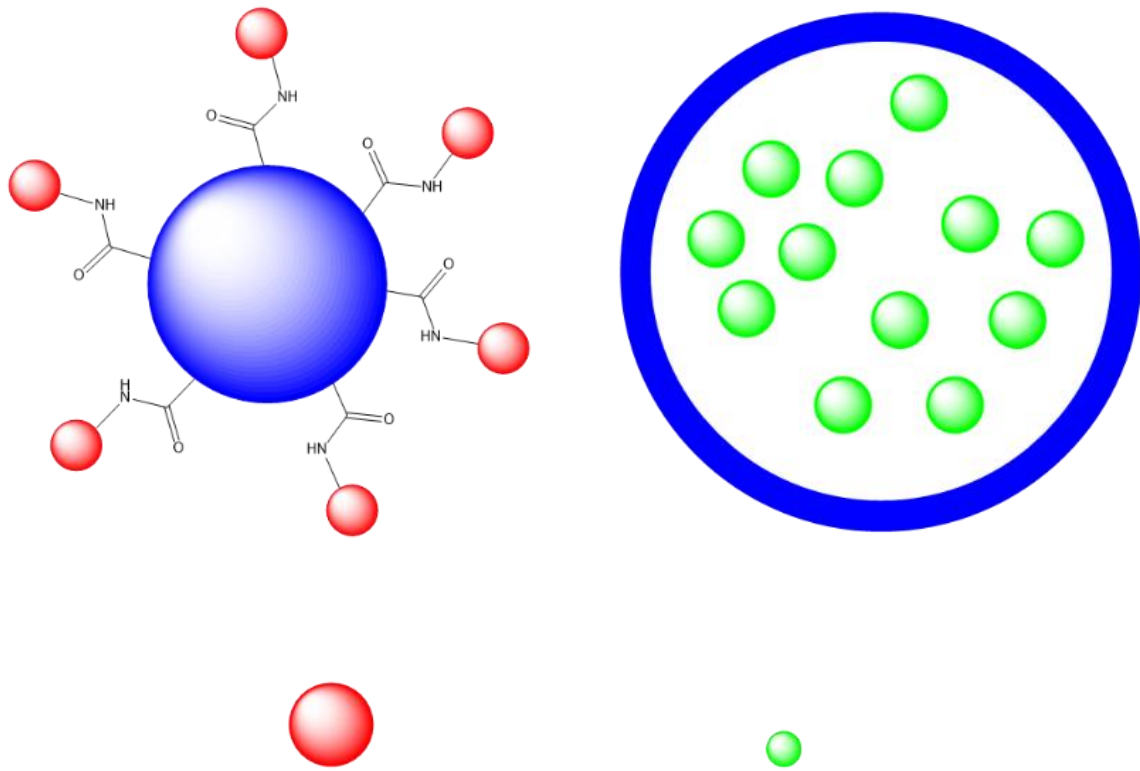


圖三、奈米粒子應用於生醫檢測示意圖。



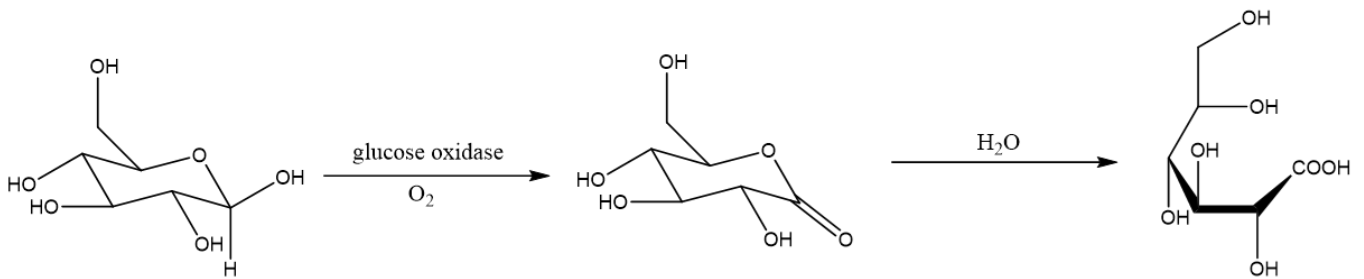
DNA, other nucleic acids,  
proteins or fluorescent molecules      Drug or fluorescent molecules

圖四、多孔性二氧化矽奈米粒子之載體示意圖。

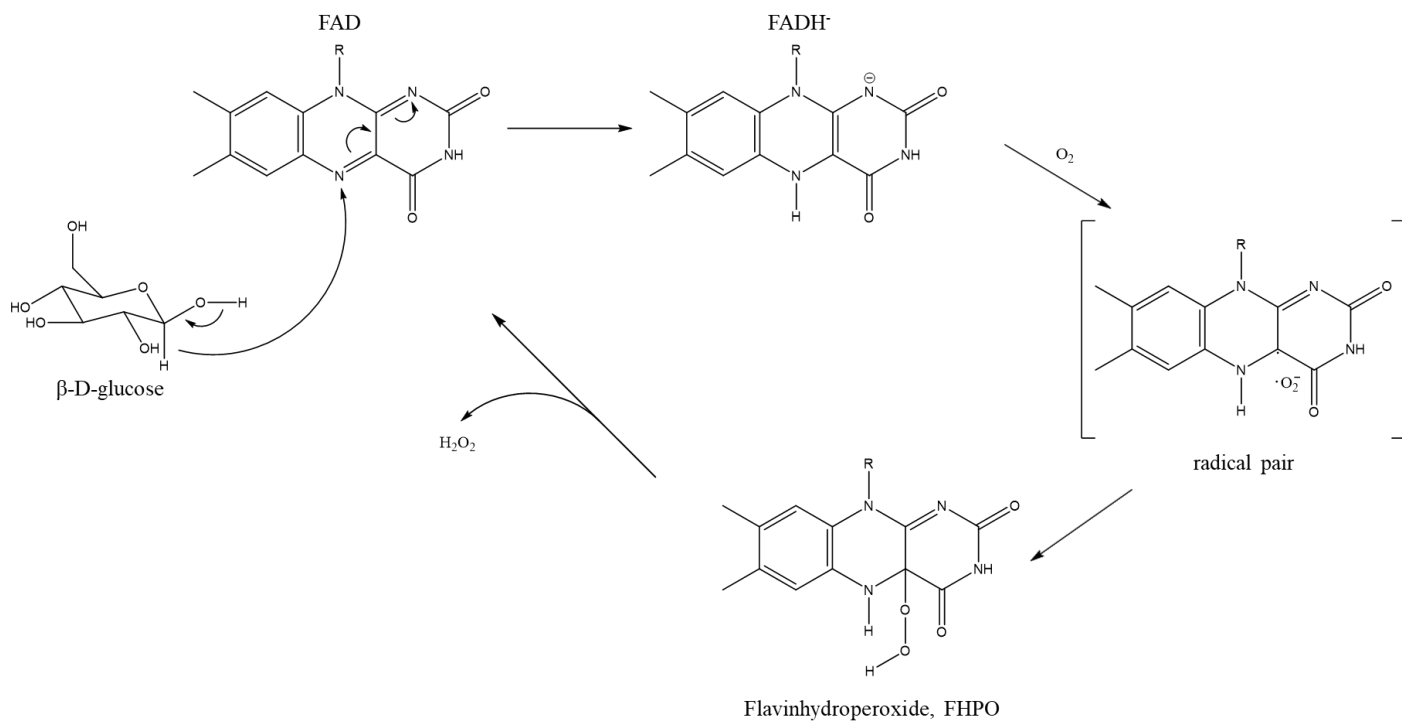


DNA, other nucleic acids,  
proteins or fluorescent molecules      Drug or fluorescent molecules

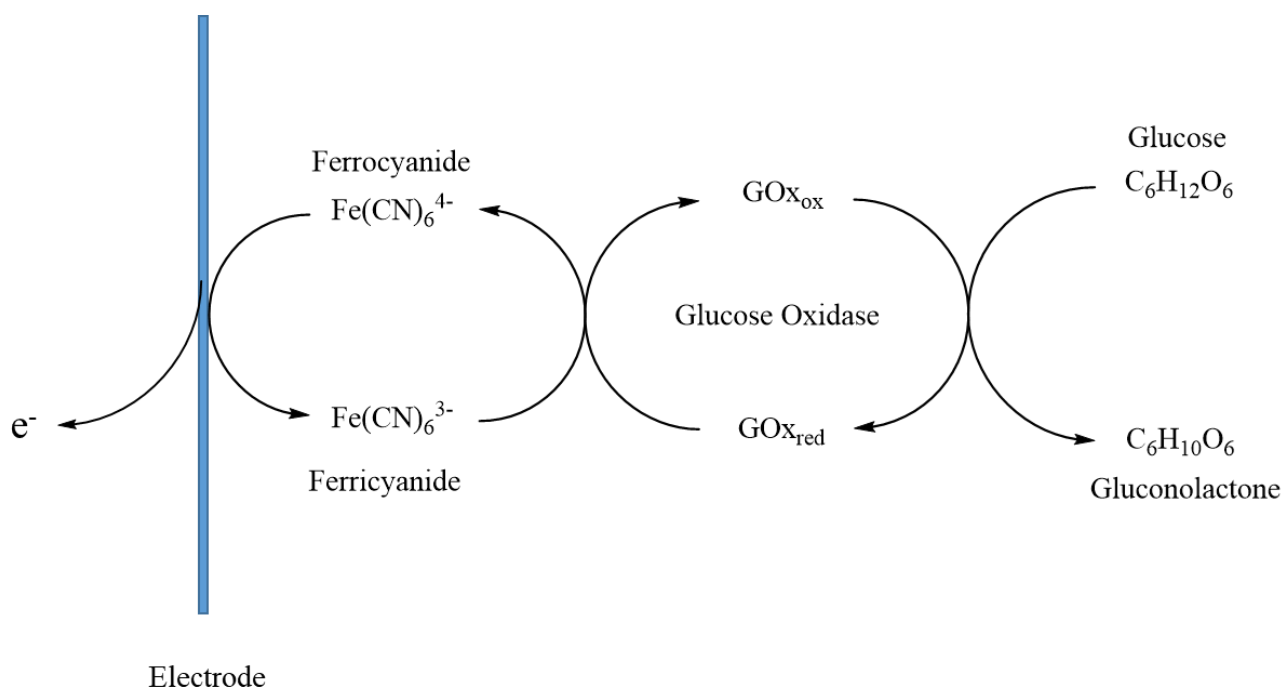
圖五、無孔性二氧化矽奈米粒子之載體示意圖。



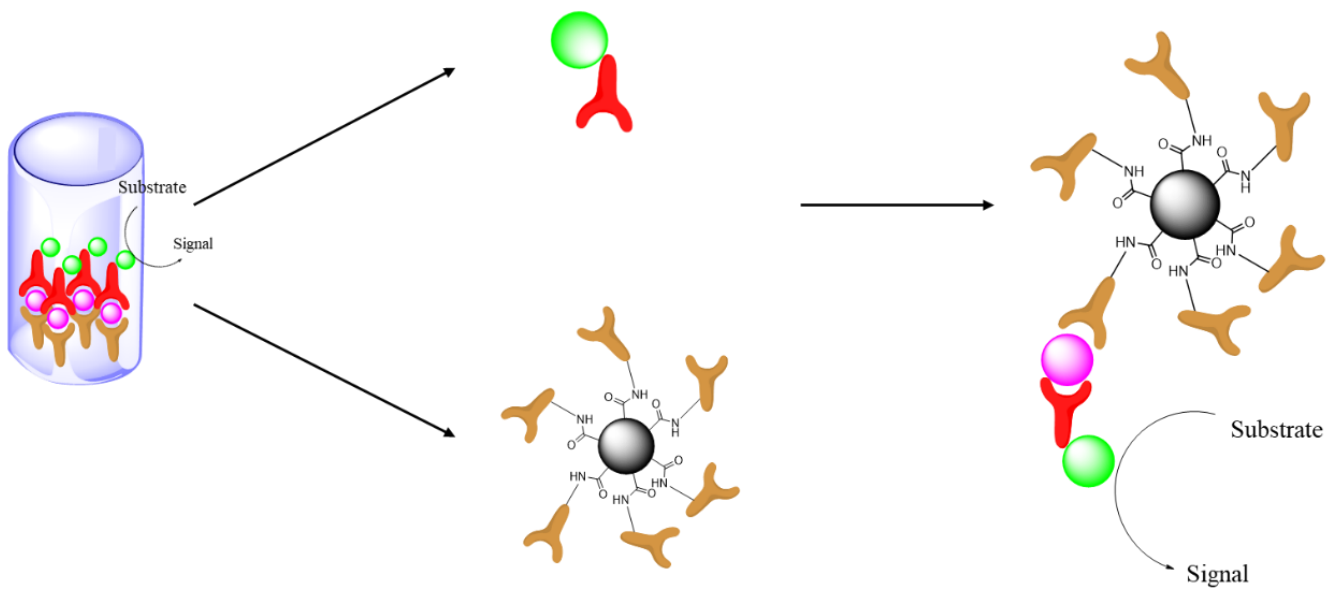
圖六、葡萄糖經葡萄糖氧化酶催化反應圖。



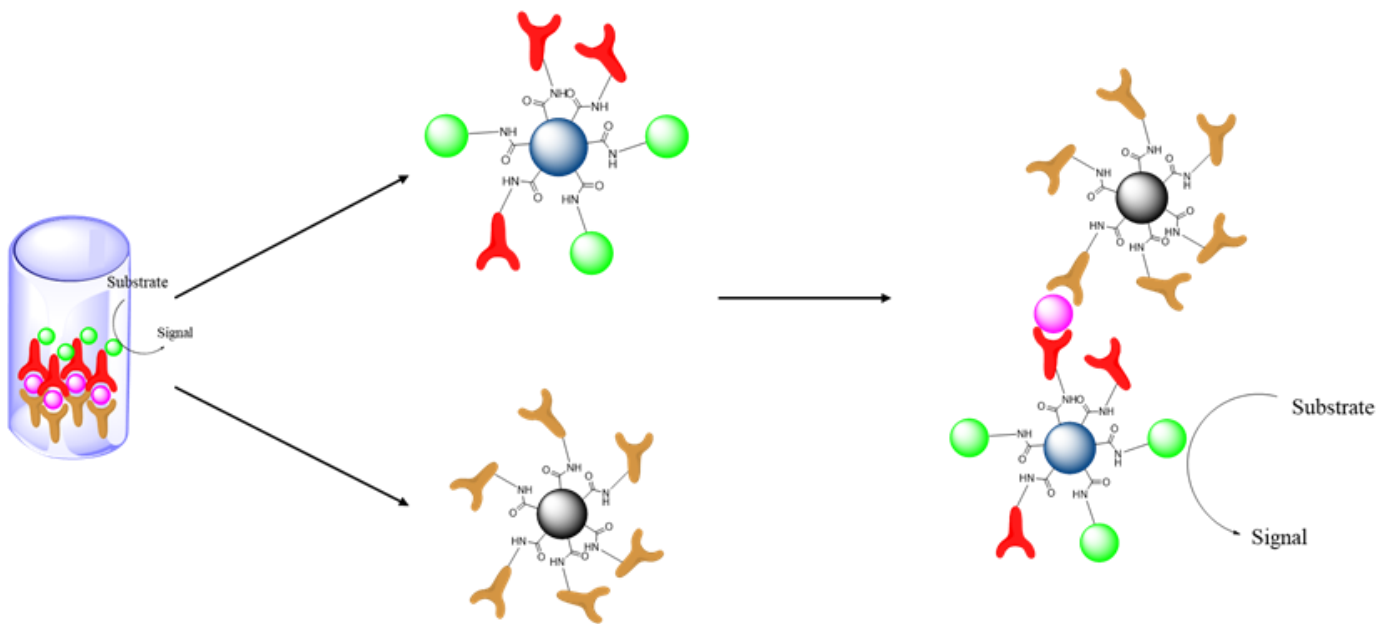
圖七、葡萄糖與黃素腺嘌呤二核苷酸反應機制圖。



圖八、葡萄糖氧化酶與鐵氰酸鹽應用於電極反應圖。

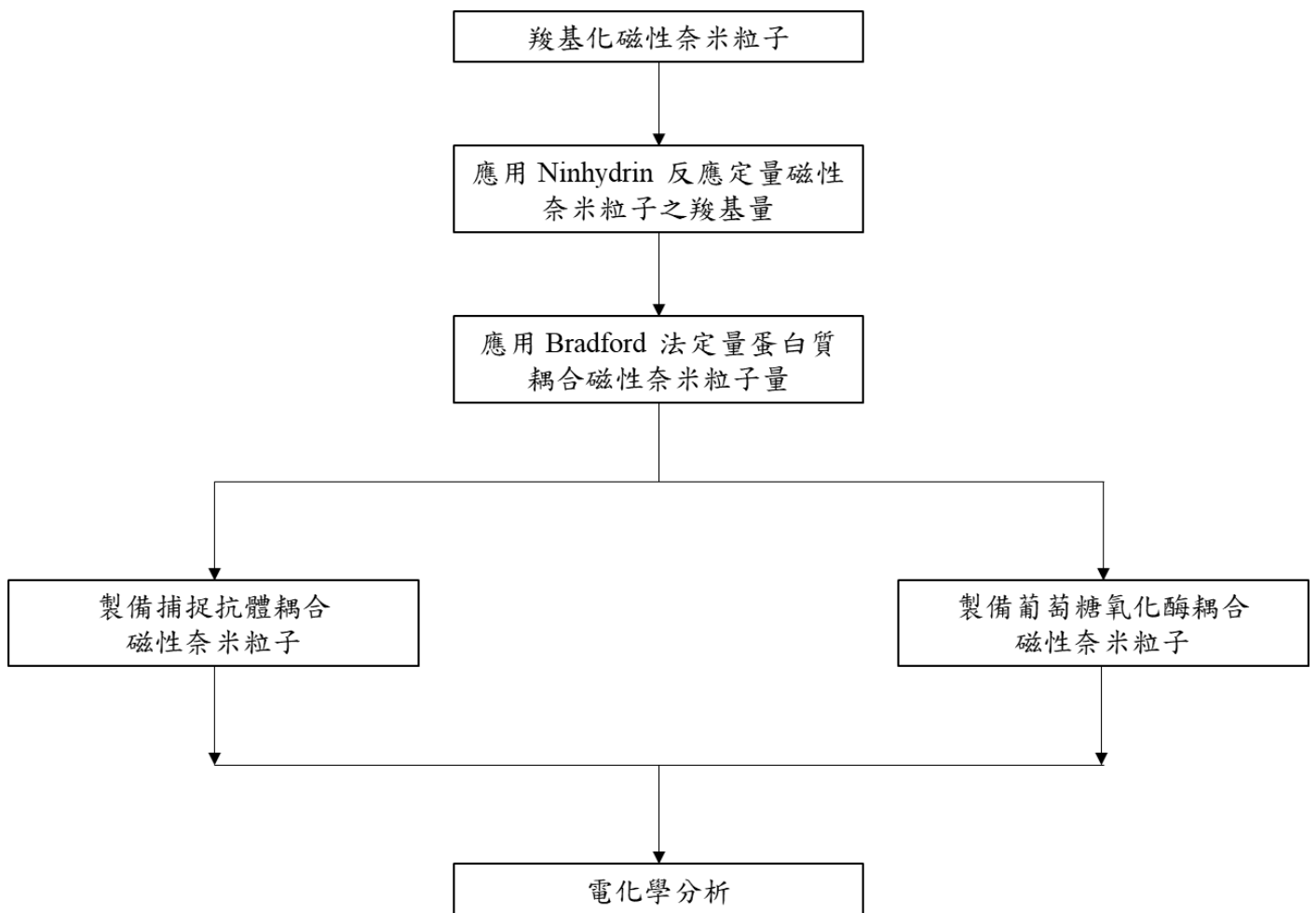


圖九、酵素免疫分析應用於奈米粒子示意圖。

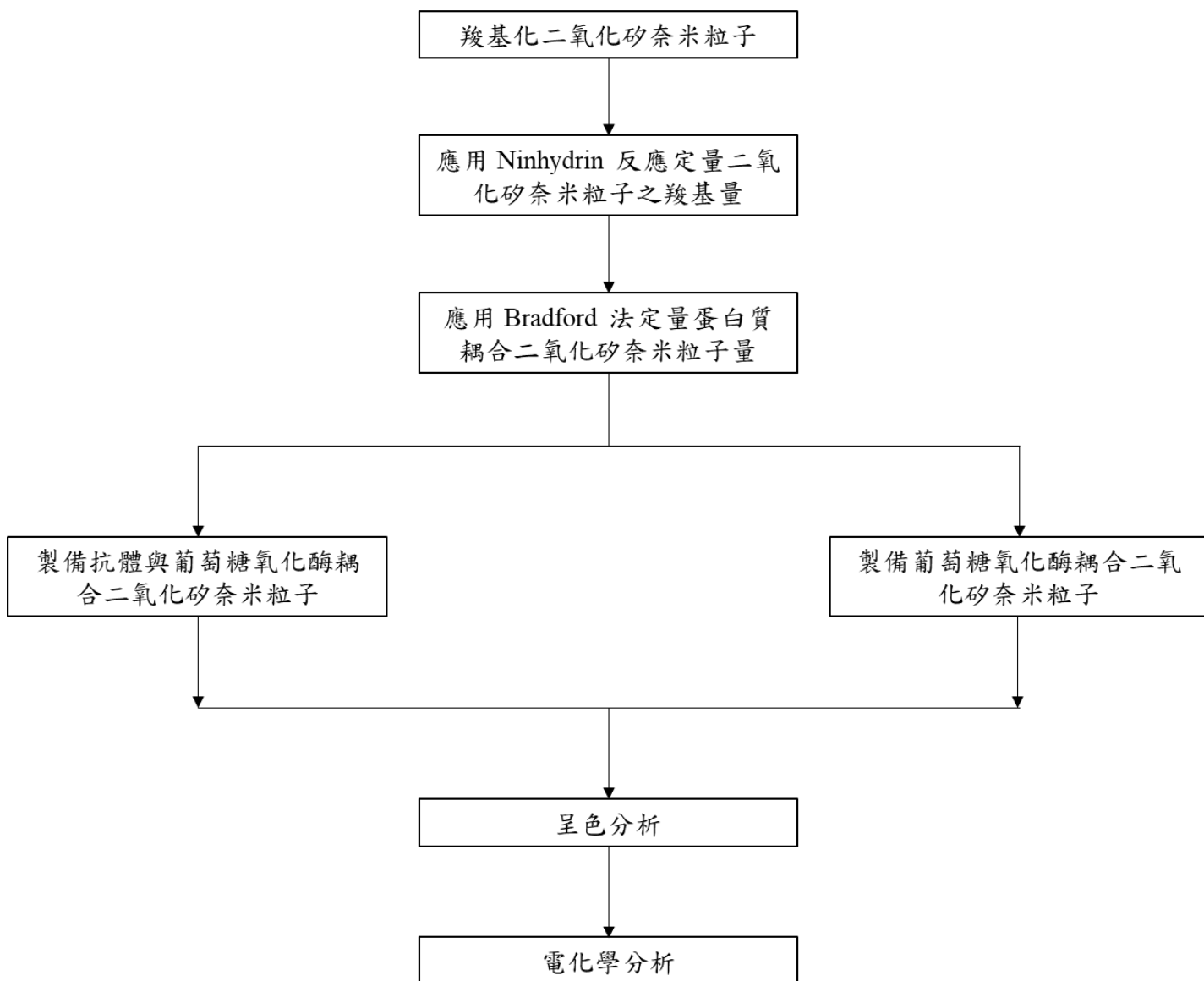


圖十、酵素免疫分析應用於多種奈米粒子示意圖。

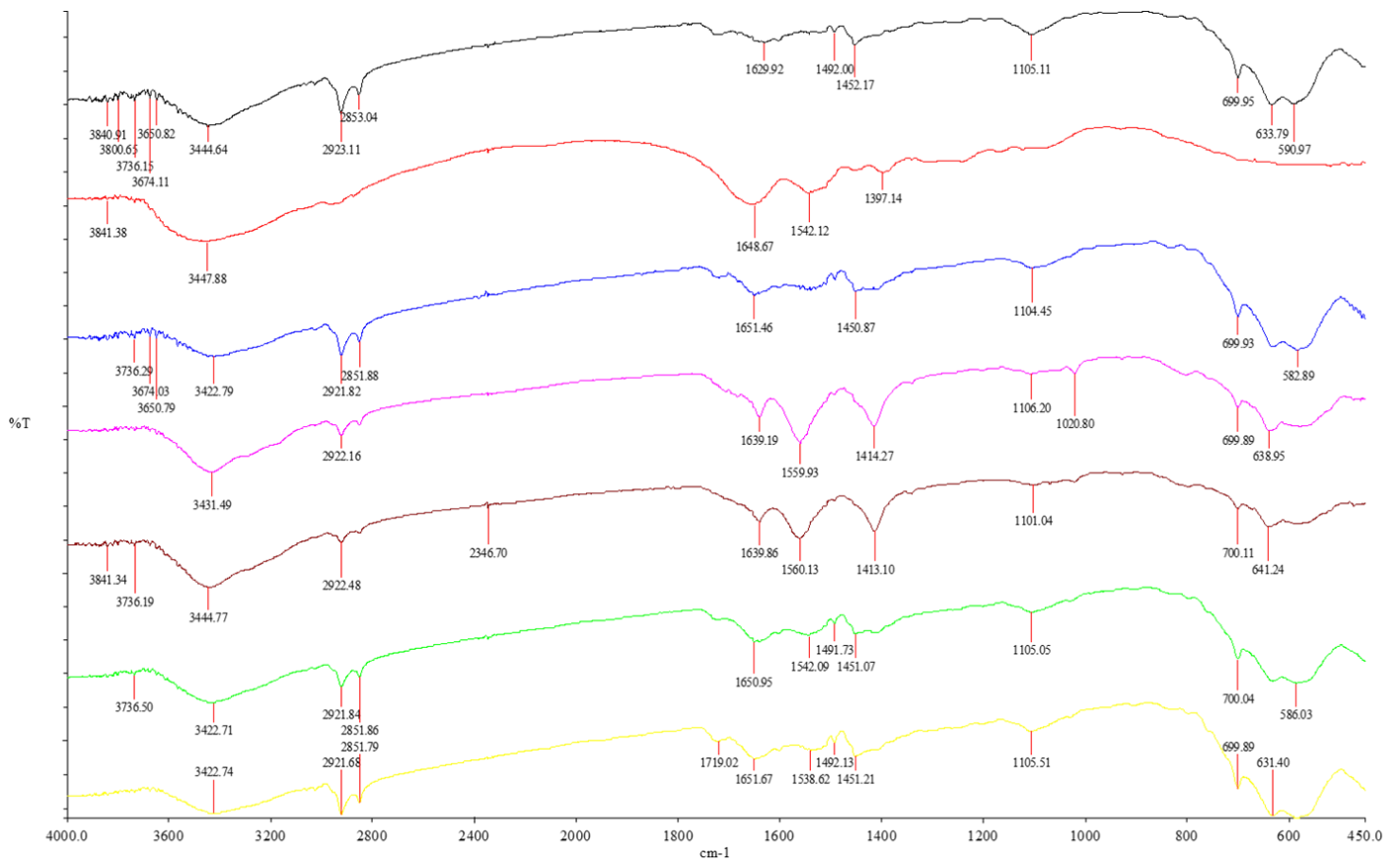




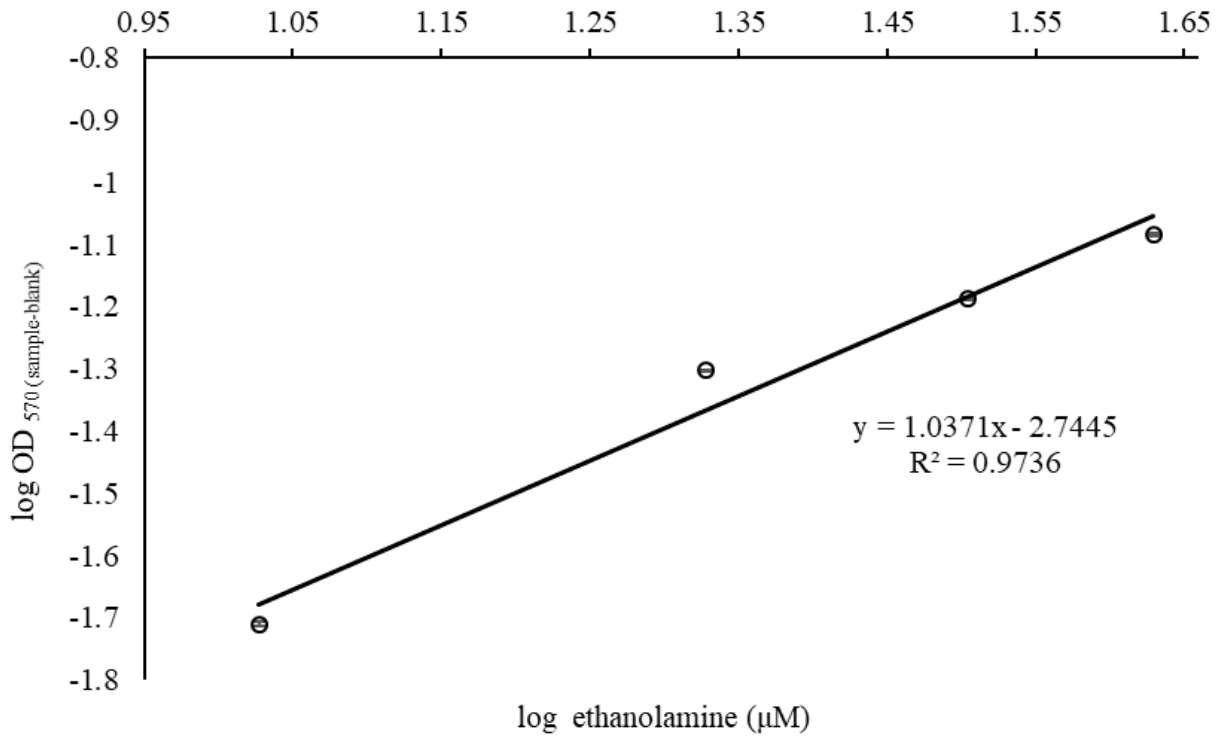
圖十一、優化於磁性奈米粒子及應用流程圖。



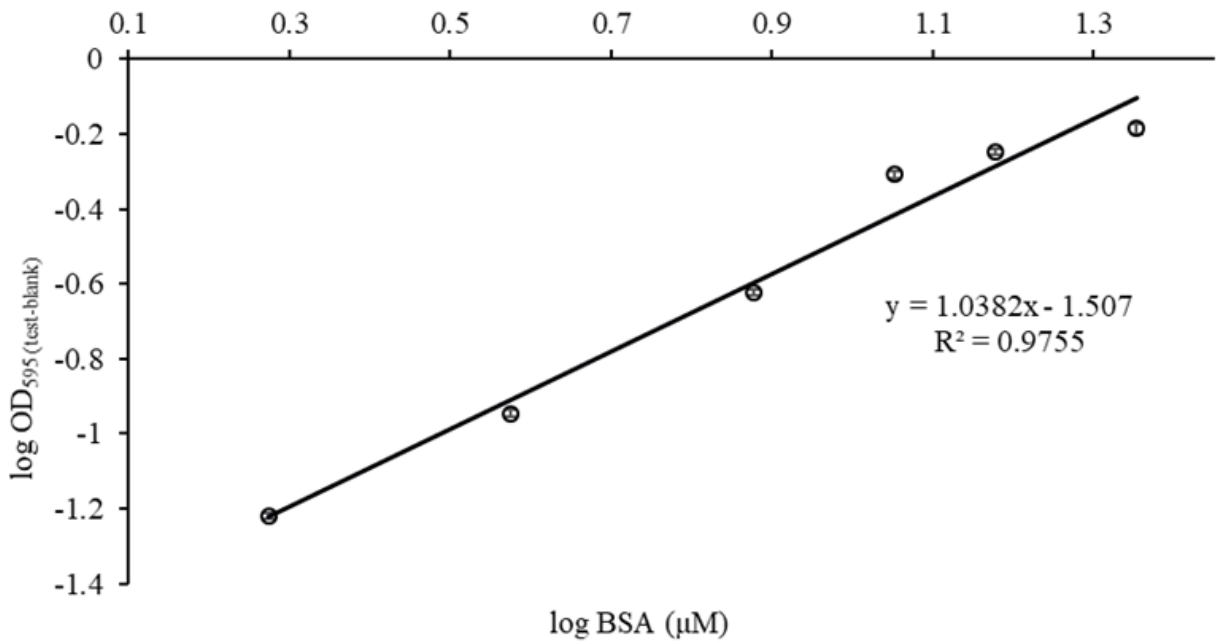
圖十二、優化於二氧化矽奈米粒子及應用流程圖。



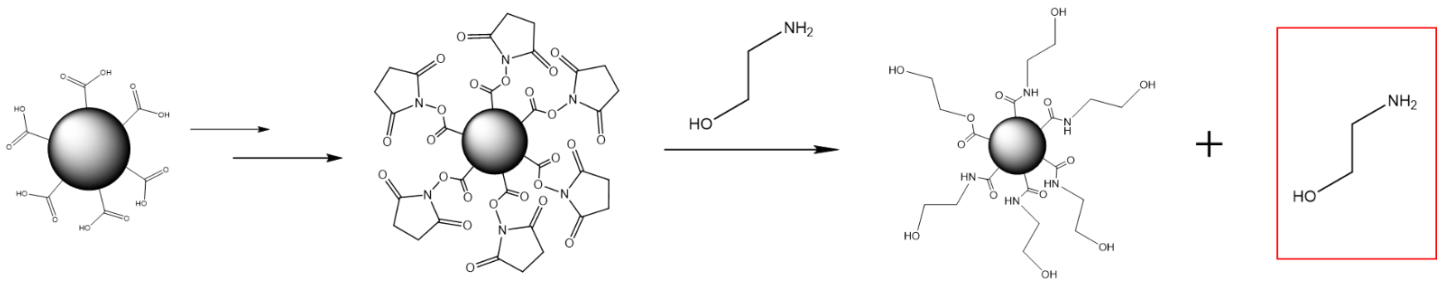
圖十三、FTIR 分析磁性奈米粒子與 BSA 之關係圖。由上往下為 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> only、BSA only、A、B、C、D 與 E；A 為 BSA 溶解於 pH=3.7 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子混合 (不加活化試劑)；B 為 BSA 溶解於 pH=4.7 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應；C 為 BSA 溶解於 pH=5.6 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應；D 為 BSA 溶解於 pH=3.7 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應；E 為加入 EDC 與 NHS 至磁性奈米粒子，活化後不抽離活化試劑，直接加入 BSA(溶解於 pH=3.7 醋酸鈉緩衝溶液) 與磁性奈米粒子反應。



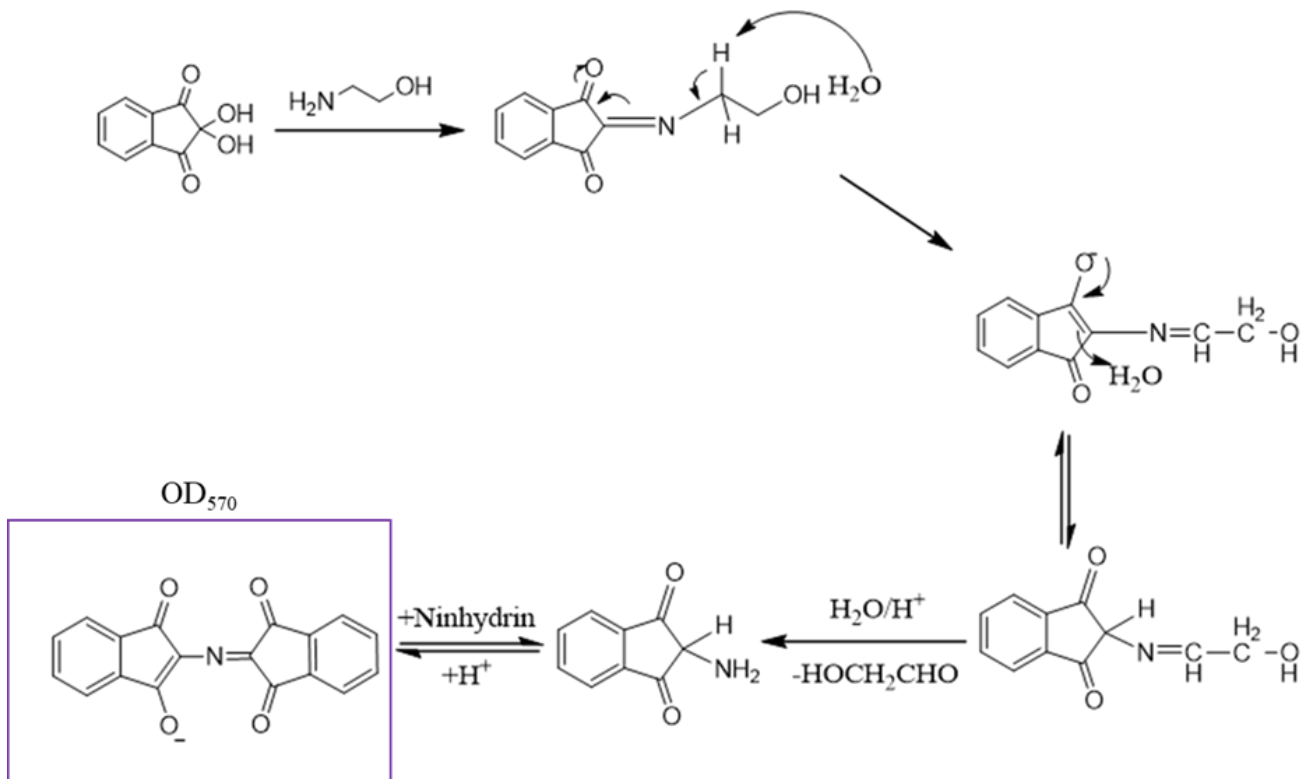
圖十四、Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子之乙醇胺之標準曲線圖。



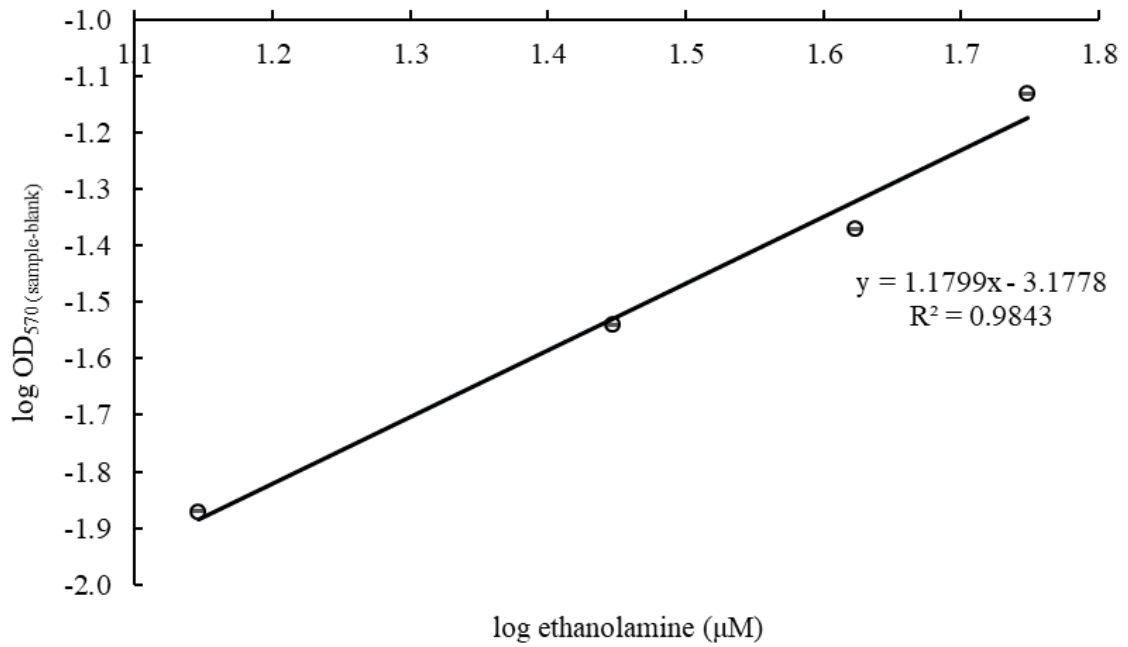
圖十五、Bradford 反應分析磁性微米粒子之 BSA 耦合量之標準曲線圖。



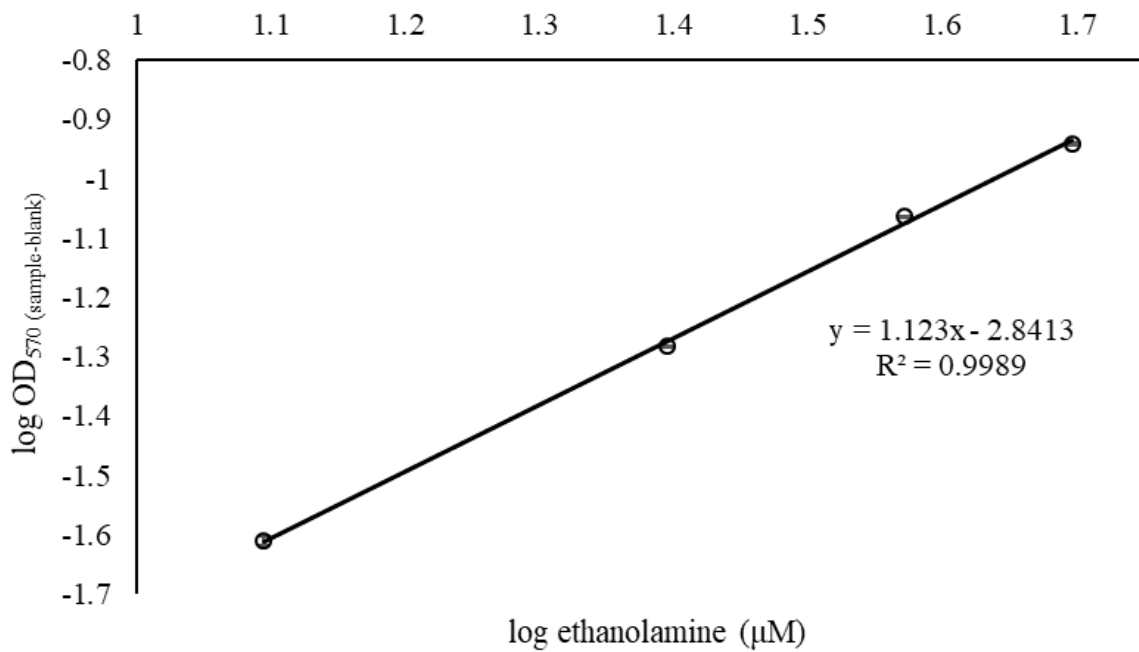
圖十六、應用 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子之羧基量示意圖。將羧基活化形成 NHS ester 後，使用 ethanolamine 之小分子耦合已活化奈米粒子，並 Ninhydrin 反應定量上清液，推算奈米粒子羧基量。



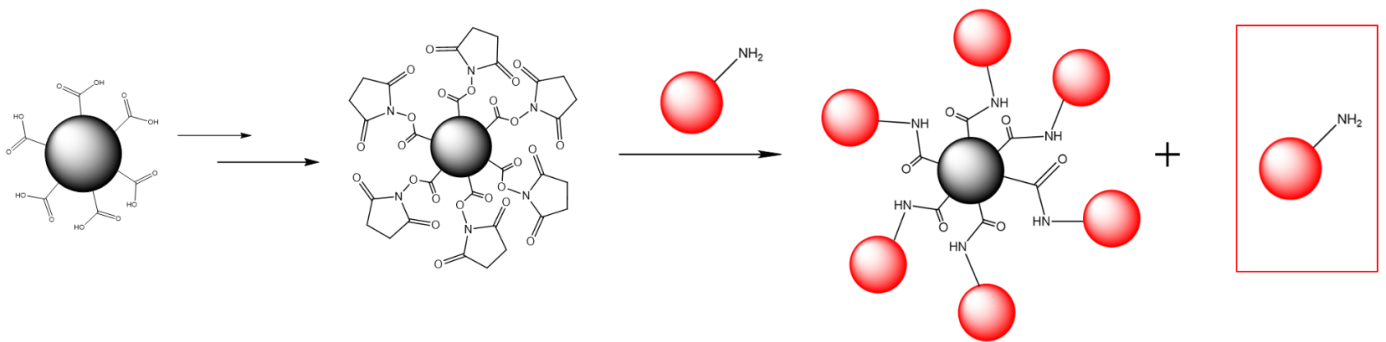
圖十七、Ninhydrin 反應機制圖。Ninhydrin 反應與一級胺反應，並產生藍紫色，在  $OD_{570}$  下，偵測反應後之化合物。



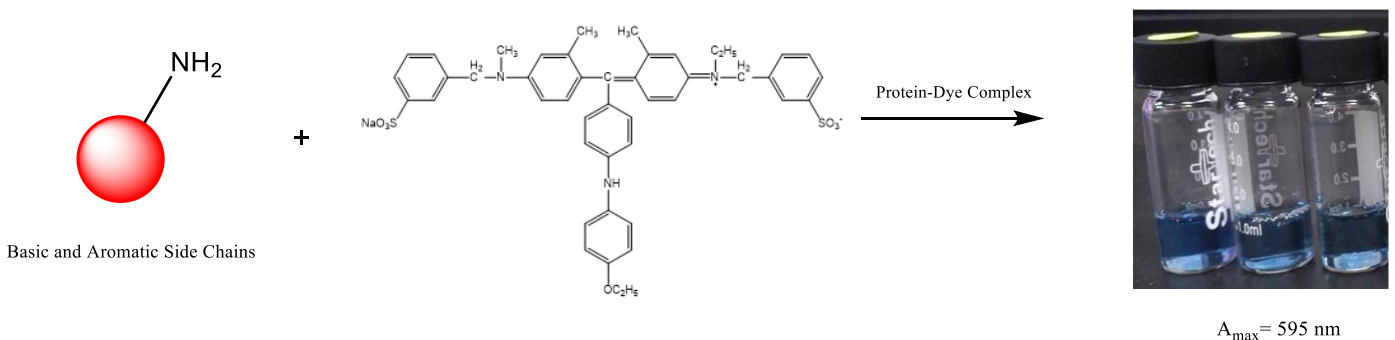
圖十八、Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子之乙醇胺之標準曲線圖。



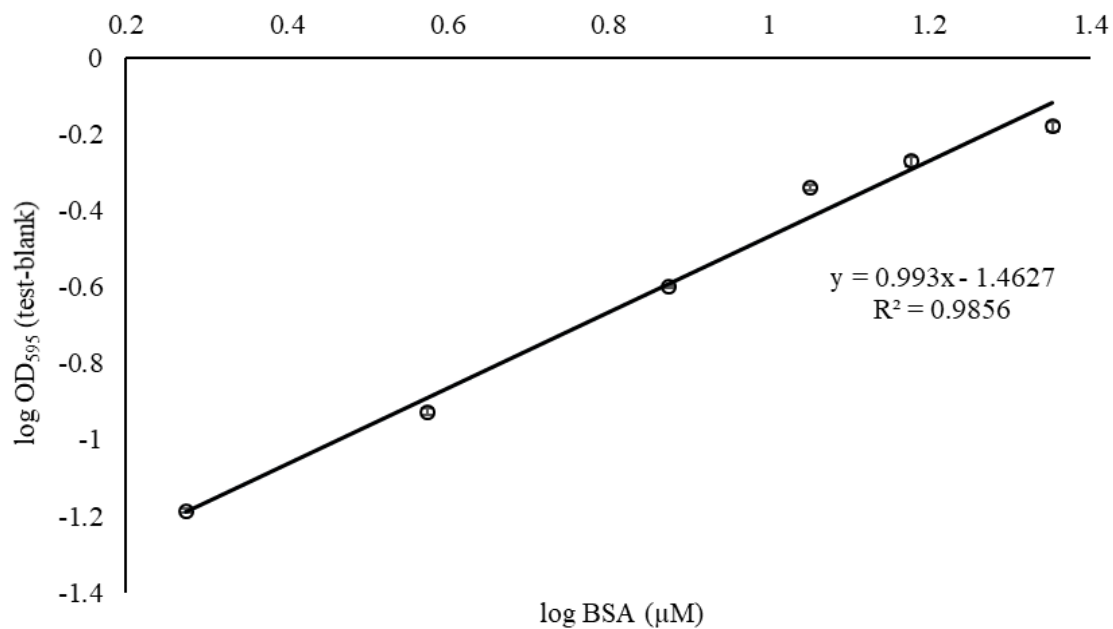
圖十九、Ninhydrin 反應定量二氧化矽奈米粒子之乙醇胺之標準曲線圖。



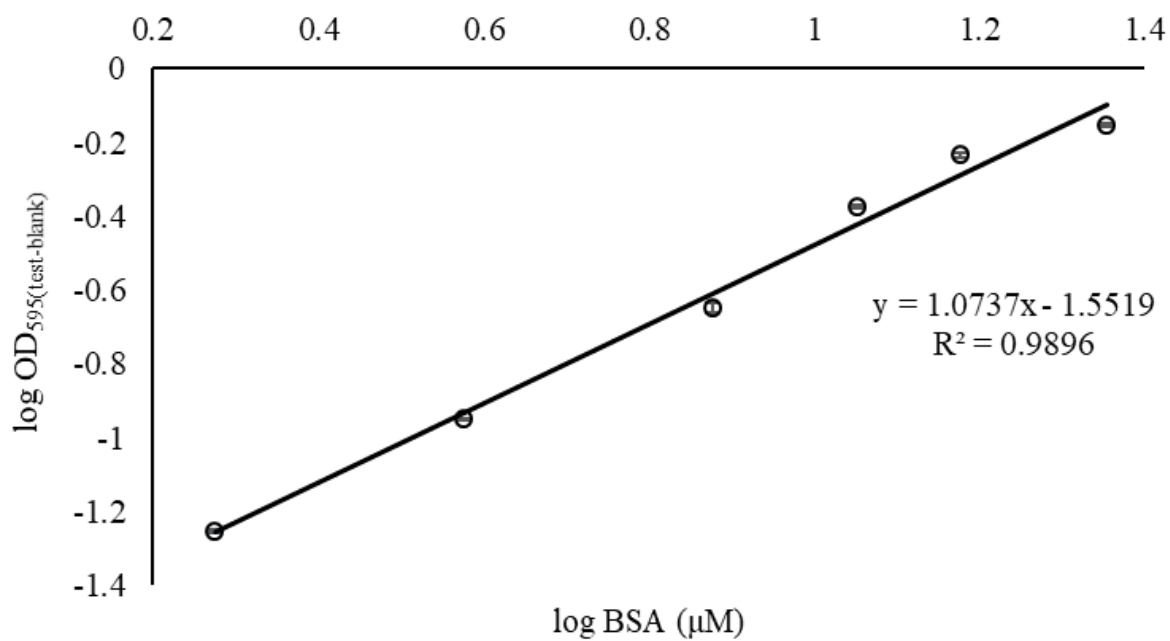
圖二十、應用優化條件於 BSA 耦合磁性奈米粒子示意圖。將羧基活化形成 NHS ester 後，使用 BSA 耦合已活化奈米粒子，並 Bradford 法定量上清液，推算奈米粒子可以被 BSA 耦合量。



圖二十一、Bradford 分析蛋白質反應圖。Coomassie brilliant blue G-250 與鹼性殘基 (Arg, Lys, and His) 以及芳香殘基 (Try, Tyr, and Phe) 胺基酸有正負電相互作用，形成 Protein-Dye Complex，因此，可以在波長 595 nm 下，偵測到最大吸收值。

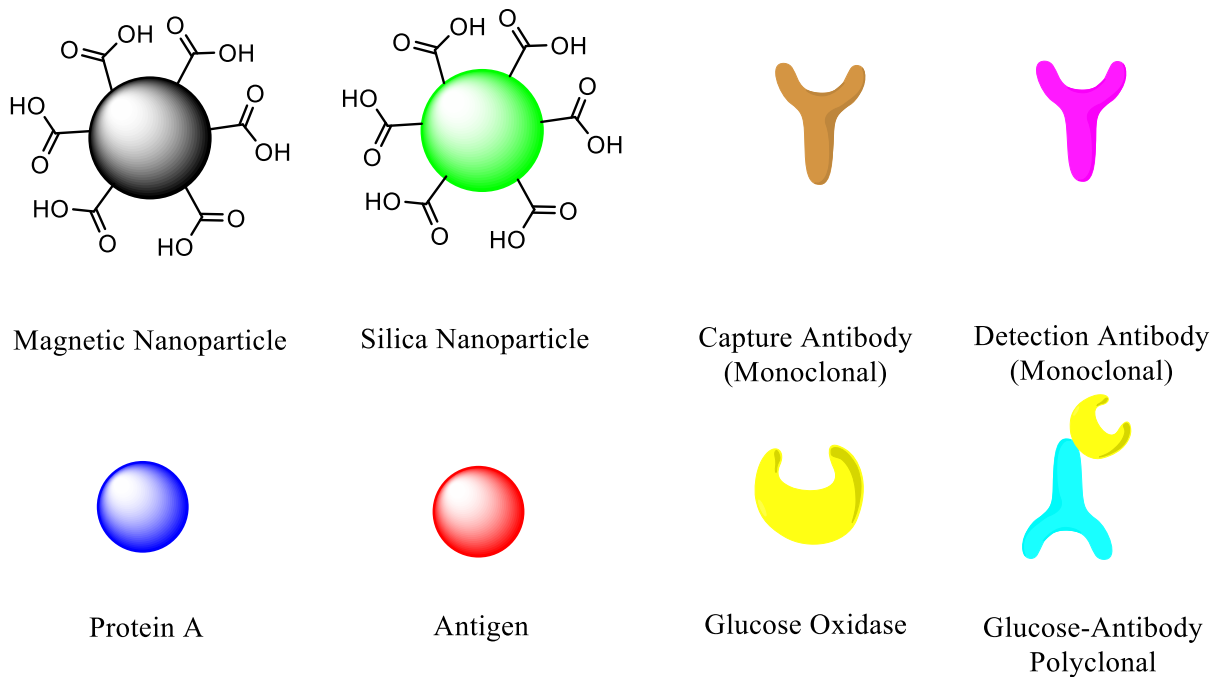


圖二十二、 Bradford 反應分析磁性奈米粒子之 BSA 耦合量標準曲線圖。

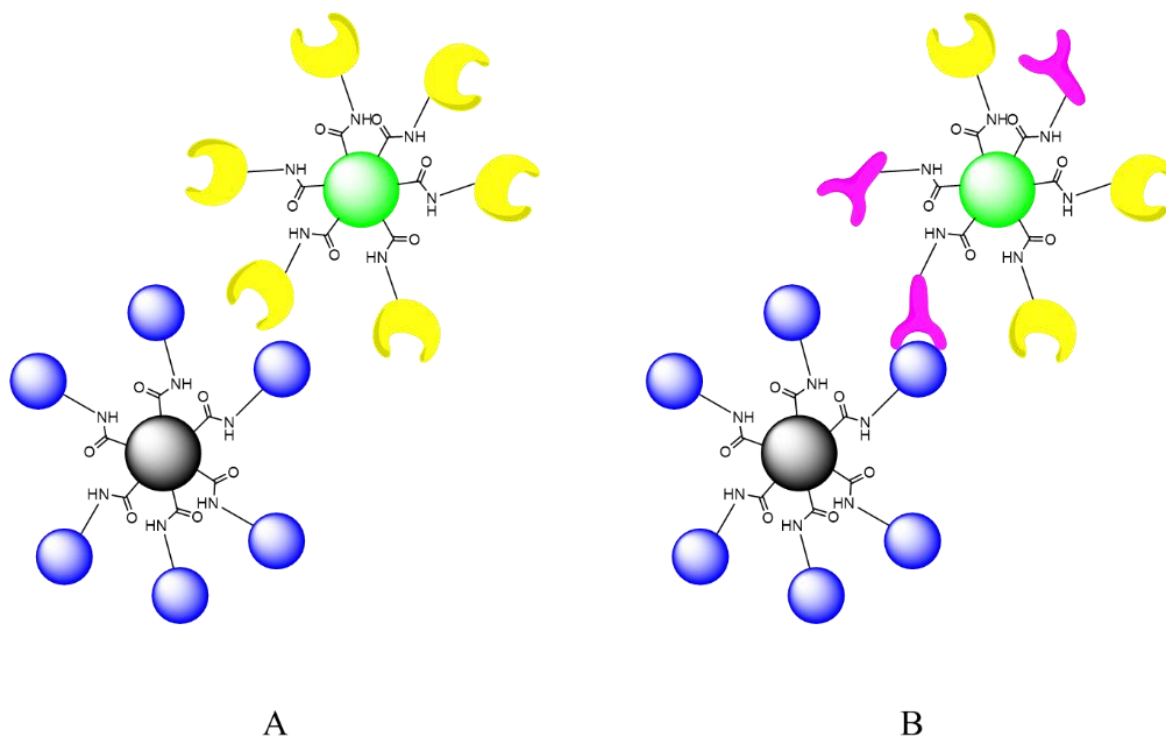


圖二十三、 Bradford 反應分析二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量標準曲線圖。

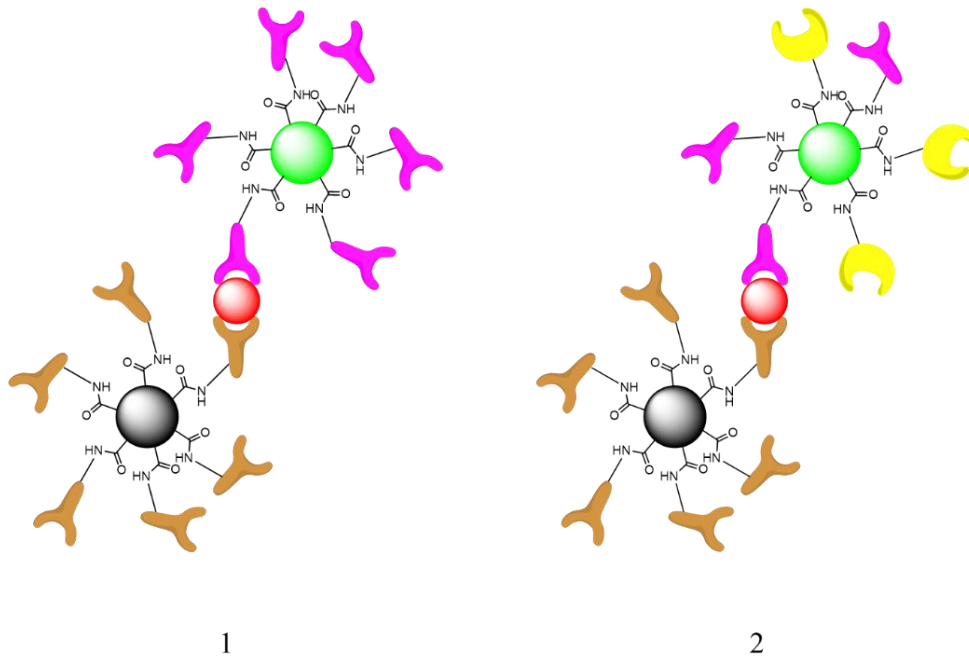




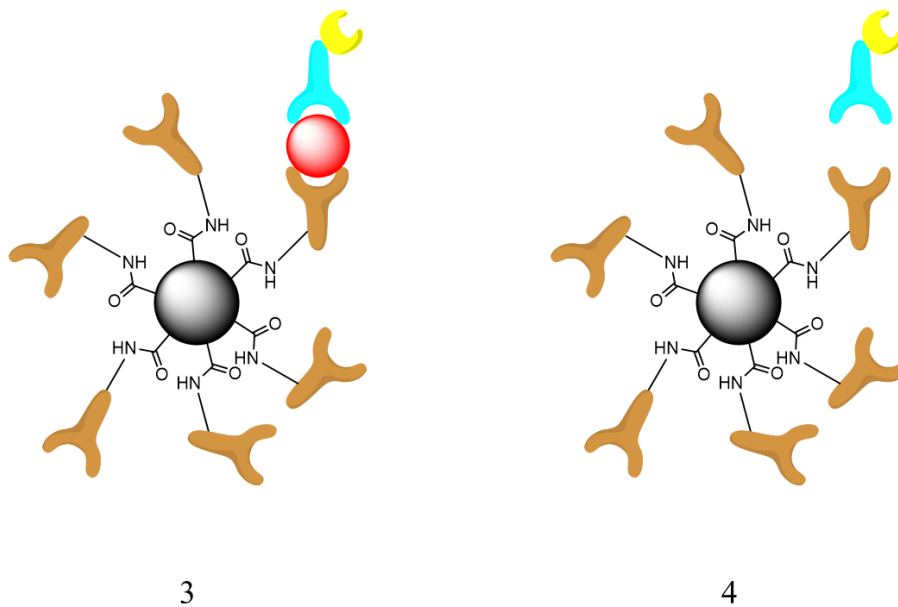
圖二十四、不同圖例之示意圖，圖顯示奈米粒子、抗體與蛋白質之示意圖。



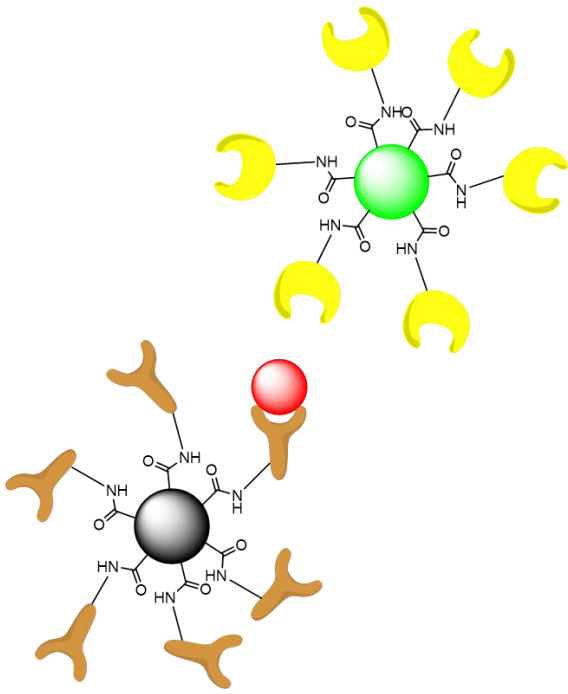
圖二十五、樣品編號 A 與 B 之示意圖。二氧化矽奈米粒子上有無偵測抗體，GOx-NSP 以及 Ab2-NSP-GOx，與 Protein A-MNP 混合反應。



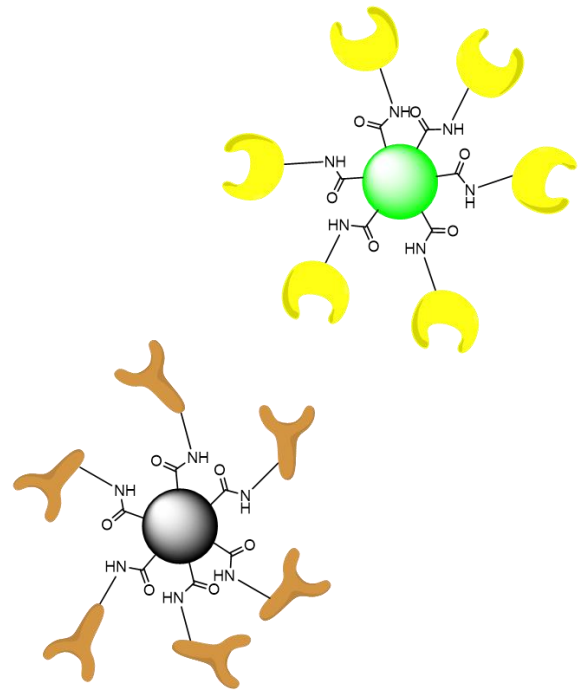
圖二十六、樣品編號 1 與 2 之示意圖。樣品編號 1 與 2 在二氧化矽奈米粒子有無葡萄糖氧化酶，且含有抗原情況下，Ab2-NSP 以及 Ab2-NSP-GOx，與 Ab1-MNP 混合反應。



圖二十七、樣品編號 3 與 4 之示意圖。樣品編號 3 與 4 在有無抗原下，GOx-Ab2 與 Ab1-MNP 混合反應。

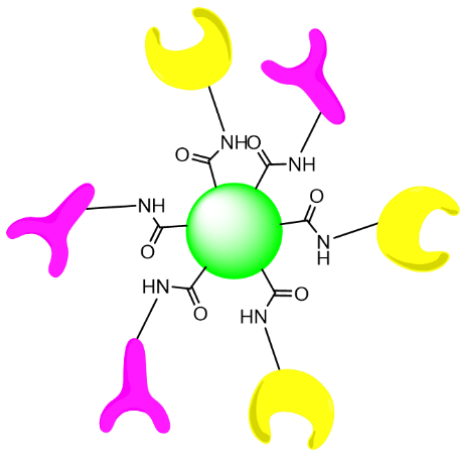


5

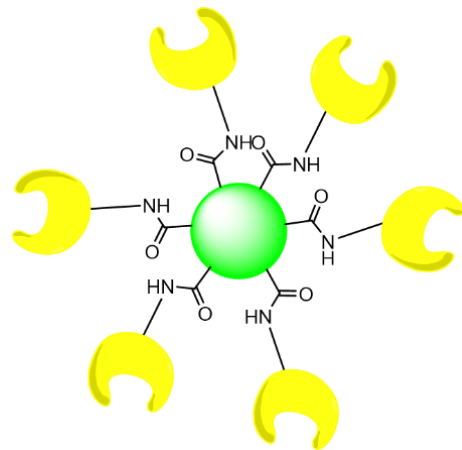


6

圖二十八、樣品編號 5 與 6 之示意圖。樣品編號 5 與 6 在有無抗原下，GOx-NSP 與 Ab1-MNP 混合。



7



8

圖二十九、樣品編號 7 與 8 之示意圖。樣品編號 7 為 Ab2-NSP-GOx；樣品編號 8 為 GOx-NSP。

表附錄

表一、實驗材料與儀器設備之購買廠商資訊。

實驗材料與儀器設備	購買廠商
Magnetic Nanoparticle	Ademtech France
Silica Nanoparticle	Golden Innovation Business New Taipei City, Taiwan
Ethanolamine	Acros Organics New Jersey, USA
1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride	Alfa Aesar Ward Hill, MA, USA
N-hydroxysuccinimide	Alfa Aesar Ward Hill, MA, USA
Ninhydrin Reagent solution (N7285)	Sigma St. Louis, MO, USA
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (23200)	Thermo Fisher Scientific USA
Bovine Serum Albumins	Thermo Fisher Scientific USA
Glucose Oxidase from Aspergillus niger Type VII, lyophilized powder	Sigma St. Louis, MO, USA
Glucose Oxidase Activity Assay Kit (Colorimetric) (ab219924)	Abcam USA
ELISA 96 well plate	PerkinElmer MA, USA
SpectraMax® Plus 384 連續波長微量盤 分光光譜儀	Molecular Devices, USA
Centrifuge 5415 D 桌上型微量管高速離心機	Eppendorf, Germany

表二、Bradford 法分析活化試劑之結果表。Bradford 試劑與活化試劑混合，分析活化試劑對 Bradford 反應影響性。

數據項目 \ 分析項目	EDC	NHS	EDC / NHS
BSA 實驗值 (µg / ml)	14.0	N/A*	17.7
BSA 理論值 (µg / ml)	0	0	0
Bias (µg / ml)	13.99	N/A	17.72
% Bias	N/A*	N/A*	N/A*

\* : Not Applicable

表三、Bradford 法分析 BSA 與活化試劑混合之結果表。BSA 與活化試劑混合反應，並應用 Bradford 法分析其反應物。

數據項目 \ 樣品標題	不同環境 BSA 與活化試劑混合條件			
	600 (pH= 3.70)	600 (pH= 4.70)	800 (pH= 5.60)	700 (DDW)
BSA 理論值 (µg)				
BSA 實驗值 (µg)	890.9	764.6	757.6	730.0
Bias	290.9	164.6	-42.4	30.0
%Bias	48.5%	27.4%	-5.3%	4.3%

**表四**、Bradford 法定量未耦合上磁性奈米粒子之 BSA 分析表。A 為 BSA 溶解於 pH=4.70 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應後，應用 Bradford 定量上清液；B 為 BSA 溶解於 pH=5.60 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應後，應用 Bradford 定量上清液；C 為 BSA 溶解於 pH=3.7 醋酸鈉緩衝溶液與磁性奈米粒子反應後，應用 Bradford 定量上清液；D 為 加入 EDC 與 NHS 至磁性奈米粒子，活化後不抽離活化試劑，直接加入 BSA (溶解於 pH=3.7 醋酸鈉緩衝溶液) 溶液與磁性奈米粒子反應後，應用 Bradford 定量上清液。

樣品編號 數據項目	A	B	C	D
反應後 (µg / ml)	3556	3477	4680	6165
反應前 (µg / ml)	3500	3400	3700	3900
反應前-反應後 (µg / ml)	-56	-77	-980	-2265

**表五**、活化試劑影響 Ninhydrin 反應分析表。Ninhydrin 反應分析乙醇胺與活化劑混合後，造成誤差之關係表。

乙醇胺理論值 (µmole)	76.66
乙醇胺實驗值 (µmole)	64.16
Bias (µmole)	-12.5
% Bias	-16.3%

表六、Ninhydrin 反應定量磁性微米粒子羧基量結果表。磁性微米粒子與乙醇胺反應完後，Ninhydrin 反應分析其上清液，推算乙醇胺耦合量。

反應前 ( $\mu\text{mole}$ )	127.77
反應後上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	101.99
羧基量 ( $\mu\text{mole}$ )	25.8

表七、定量磁性微米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表。Ninhydrin 反應後，標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	$\mu\text{M}$	Mean OD <sub>595(sample)</sub>	Mean OD <sub>595(sample-blank)</sub>	log [Mean OD <sub>595(sample-blank)</sub> ]
標準曲線	42.59	0.2451	0.0823	-1.0845
	31.94	0.2278	0.0650	-1.1871
	21.29	0.2125	0.0498	-1.3030
	10.65	0.1822	0.0195	-1.7105
混合液		0.2285	0.0657	-1.1823
上清液		0.2326	0.0698	-1.1561

表八、Bradford 法定量之方法推算磁性微米粒子之 BSA 耦合量結果表。磁性微米粒子與 BSA 反應完後，Bradford 法分析其上清液，推算 BSA 耦合量。

反應前莫耳數 ( $\mu\text{mole}$ )	$1.96 \times 10^{-2}$
上清液莫耳數 ( $\mu\text{mole}$ )	$1.51 \times 10^{-2}$
反應前-上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	$4.49 \times 10^{-3}$
反應前-上清液 ( $\mu\text{g}$ )	298

表九、定量磁性微米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表。Bradford 反應分析磁性微米粒子之蛋白質耦合量，表格為標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	$\mu\text{M}$	Mean OD <sub>595</sub> (sample)	Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)	Log [Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)]
標準曲線	22.57	0.9547	0.6531	-0.1850
	15.05	0.8668	0.5652	-0.2478
	11.28	0.7940	0.4925	-0.3076
	7.52	0.5402	0.2386	-0.6223
	3.76	0.4146	0.1131	-0.9466
	1.88	0.3618	0.0603	-1.2200
樣品		0.8201	0.5203	-0.2838



表十、MMP 與 GOx-MMP 之電流分析表。MMP 與 GOx-MMP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MMP 與 GOx-MMP 第 10 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性微米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性微米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。

分析項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MMP	1.08	0.0379	3.5%	1.11	1.04
GOx-MMP	1.22	0.0351	2.9%	1.26	1.19

表十一、MMP 與 GOx-MMP 之電流分析表。MMP 與 GOx-MMP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MMP 與 GOx-MMP 第 20 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性微米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性微米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。

分析項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MMP	0.84	0.0208	2.5%	0.86	0.82
GOx-MMP	0.97	0.0351	3.6%	1.01	0.94

表十二、MMP 與 GO<sub>x</sub>-MMP 之電流分析表。MMP 與 GO<sub>x</sub>-MMP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MMP 與 GO<sub>x</sub>-MMP 第 30 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性微米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性微米粒子之電流值具顯著差異，其 \**p*<0.05。

分析項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MMP	0.72	0.0379	5.2%	0.76	0.69
GO <sub>x</sub> -MMP	0.85	0.0611	7.2%	0.91	0.79

表十三、抗體耦合磁性微米粒子並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測抗體耦合磁性微米粒子經免疫反應，並分析第 30 秒之電化學數據。抗體耦合磁性微米粒子並免疫反應與磁性微米粒子之電流值具顯著差異，其 \**p*<0.05。(電流單位：μA)。抗體耦合磁性微米粒子，放入保存液一個禮拜後，其經免疫反應與磁性微米粒子之電流值具顯著差異，其 \**p*<0.05。(電流單位：μA)。

分析項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MMP <sup>†</sup>	0.14	0.02	17.2%	0.16	0.11
Ab1-MMP <sup>†*</sup>	0.18	0.02	9.1%	0.20	0.16
Ab1-MMP <sup>†</sup>	0.19	0.02	11.4%	0.21	0.17

\*：抗體耦合磁性微米粒子放置保存液一個禮拜後，經免疫反應後，電化學分析其電流值，其免疫反應示意圖 (圖二十七之項目 3)。

†：磁性微米粒子加入 glucose 與 ferricyanide 混合，電化學偵測其電流值。抗體耦合磁性微米粒子經免疫反應後，加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應，電化學偵測其電流值，其免疫反應示意圖 (圖二十七之項目 3)。

表十四、 定量磁性奈米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表。Ninhydrin 反應後，標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	$\mu\text{M}$	Mean OD <sub>595(sample)</sub>	Mean OD <sub>595(sample-blank)</sub>	log [Mean OD <sub>595(sample-blank)</sub> ]
標準曲線	49.88	0.2335	0.0740	-1.1311
	37.41	0.2022	0.0427	-1.3701
	24.94	0.1884	0.0289	-1.5399
	12.47	0.1730	0.0135	-1.8697
樣品		0.2164	0.0569	-1.2451

表十五、 Ninhydrin 反應定量磁性奈米粒子羧基量結果表。應用 Ninhydrin 反應定量反應後上清液，計算反應前 ethanolamine 之莫耳數，減去反應後 ethanolamine 之莫耳數，可以推算磁性奈米粒子之表面羧基量，此表為 1 mg 磁性奈米粒子之羧基量。

反應前 ( $\mu\text{mole}$ )	49.88
反應後上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	43.45
反應前-反應後上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	6.43

表十六、 定量二氧化矽奈米粒子的羧基量實驗之乙醇胺標準曲線與樣品表。Ninhydrin 反應後，標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	$\mu\text{M}$	Mean OD <sub>595</sub> (sample)	Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)	log [Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)]
標準曲線	49.75	0.3306	0.1143	-0.9420
	37.31	0.3029	0.0866	-1.0627
	24.88	0.2685	0.0522	-1.2823
	12.44	0.2409	0.0245	-1.6104
樣品		0.2955	0.0792	-1.1013

表十七、 Ninhydrin 反應定量二氧化矽奈米粒子之羧基量之結果表。應用 Ninhydrin 反應定量反應後上清液，計算反應前 ethanolamine 之莫耳數，減去反應後 ethanolamine 之莫耳數，可以推算二氧化矽奈米粒子之表面羧基量，此表為 1.5 mg 二氧化矽奈米粒子之羧基量。

反應前 ( $\mu\text{mole}$ )	9.95
反應後上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	7.09
反應前-反應後上清液 ( $\mu\text{mole}$ )	2.86

表十八、 定量磁性奈米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表。Bradford 反應分析磁性奈米粒子之蛋白質耦合量，表格為標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	μM	Mean OD <sub>595</sub> (sample)	Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)	Log [Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)]
標準曲線	22.57	0.9104	0.6619	-0.1792
	15.05	0.7839	0.5354	-0.2713
	11.28	0.7059	0.4574	-0.3397
	7.52	0.4998	0.2514	-0.5996
	3.76	0.3667	0.1183	-0.9270
	1.88	0.3135	0.0651	-1.1866
樣品		0.4561	0.2076	-0.6828

表十九、 Bradford 法定量之方法推算磁性奈米粒子之 BSA 耦合量結果表。應用 Bradford 法定量耦合後之上清液，在 OD<sub>595</sub> 分析其吸收值，將耦合前之 BSA 莫耳數，減去耦合後上清液莫耳數，推算 BSA 耦合 1 mg 磁性奈米粒子之莫耳數。

反應前莫耳數 (μmole)	$6.7 \times 10^{-3}$
上清液莫耳數 (μmole)	$6.1 \times 10^{-3}$
反應前-上清液 (μmole)	$6.0 \times 10^{-4}$
反應前-上清液 (μg)	39

表二十、定量二氧化矽奈米粒子的蛋白質耦合量之 BSA 之標準曲線與樣品表。Bradford 反應分析二氧化矽奈米粒子之蛋白質耦合量，表格為標準曲線與各樣品吸收值之平均值，以及扣除空白溶液之平均值。

項目	μM	Mean OD <sub>595</sub> (sample)	Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)	log [Mean OD <sub>595</sub> (sample-blank)]
標準曲線	22.57	0.9627	0.7033	-0.1528
	15.05	0.8435	0.5842	-0.2335
	11.28	0.6810	0.4216	-0.3751
	7.52	0.4842	0.2249	-0.6481
	3.76	0.3720	0.1126	-0.9485
	1.88	0.3153	0.0559	-1.2524
樣品		0.8563	0.5959	-0.2248

表二十一、Bradford 法推算二氧化矽奈米粒子之 BSA 耦合量結果表。應用 Bradford 法定量耦合後之上清液，在 OD<sub>595</sub> 分析其吸收值，將耦合前之 BSA 莫耳數，減去耦合後上清液莫耳數，推算 BSA 耦合 1.5 mg 二氧化矽奈米粒子之莫耳數。

反應前莫耳數 (μmole)	$1.76 \times 10^{-2}$
上清液莫耳數 (μmole)	$1.72 \times 10^{-2}$
反應前-上清液 (μmole)	$4.0 \times 10^{-4}$
反應前-上清液 (μg)	27

表二十二、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表。MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 第 10 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-MNP	1.85	0.3281	17.8%	2.1731	1.5169
GOx+MNP	1.72	0.3965	23.1%	2.1115	1.3185
MNP	0.93	0.0300	3.2%	0.9550	0.8950

表二十三、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表。MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 第 20 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-MNP	1.32	0.0968	7.4%	1.4118	1.2182
GOx+MNP	1.23	0.2062	16.8%	1.4312	1.0188
MNP	0.64	0.0265	4.2%	0.6615	0.6085

表二十四、MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 之電流分析表。MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP、GOx+MNP 與 GOx-MNP 第 30 秒之電流值 (電流單位：μA)。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。磁性奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-MNP	1.10	0.0510	4.6%	1.1510	1.0490
GOx+MNP	1.01	0.1424	14.1%	1.1549	0.8701
MNP	0.49	0.0602	12.2%	0.5527	0.4323

表二十五、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 10 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.25	0.0250	10.1%	0.2725	0.2225
Ab1-MNP	0.35	0.0150	4.3%	0.3675	0.3375



表二十六、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 20 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其 \*\*\* $p < 0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.20	0.0129	6.6%	0.2079	0.1821
Ab1-MNP	0.30	0.0141	4.7%	0.3141	0.2859

表二十七、抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 30 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其 \*\*\* $p < 0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.19	0.0100	5.4%	0.1950	0.1750
Ab1-MNP	0.26	0.0096	3.6%	0.2721	0.2529

表二十八、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 10 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其 \*\*\* $p < 0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.29	0.0150	5.2%	0.3025	0.2725
Ab1-MNP	0.44	0.0327	7.4%	0.4727	0.4073

表二十九、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 20 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其 \*\*\* $p < 0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.23	0.0222	9.5%	0.2547	0.2103
Ab1-MNP	0.35	0.0141	4.0%	0.3641	0.3359

表三十、優化抗體耦合磁性奈米粒子並電化學分析免疫反應結果表。Ab1-MNP 經免疫反應與 MNP，兩者皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 MNP 與 Ab1-MNP 第 30 秒之電流值 (電流單位：μA)。抗體耦合磁性奈米粒子與磁性奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
MNP	0.20	0.0206	10.4%	0.2181	0.1769
Ab1-MNP	0.30	0.0206	6.8%	0.3231	0.2819

表三十一、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表。NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 第 10 秒之電流值 (電流單位：nA)。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $*p<0.05$ 。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $*p<0.05$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-NSP	262.71	18.16	6.9%	280.87	244.55
GOx+NSP	256.20	22.51	8.8%	278.71	233.69
NSP	229.05	12.77	5.6%	241.82	216.28

表三十二、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表。NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 第 20 秒之電流值 (電流單位：nA)。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $*p<0.05$ 。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $***p<0.001$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-NSP	206.79	11.58	5.6%	218.37	195.21
GOx+NSP	200.85	18.98	9.5%	219.83	181.87
NSP	174.83	12.11	6.9%	186.93	162.72

表三十三、NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 之電流分析表。NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 皆加入 glucose 與 ferricyanide 混合反應後偵測電化學，偵測 NSP、GOx+NSP 與 GOx-NSP 第 30 秒之電流值 (電流單位：nA)。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子之電流值無顯著差異。二氧化矽奈米粒子與葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子之電流值具顯著差異，其  $**p<0.01$ 。

電化學項目 樣品名稱	平均電流值	SD	CV %	Mean+SD	Mean-SD
GOx-NSP	179.25	9.59	5.4%	188.84	169.66
GOx+NSP	170.85	16.66	9.7%	187.51	154.19
NSP	157.65	9.36	5.9%	167.01	148.29

表三十四、不同條件葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子表。樣品編號 1 與 2 活化試劑量為樣品編號 3 與 4 六倍；編號 2 與 3 之耦合物量為編號 1 與 4 兩倍；編號 5~8 為葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子。編號 1~4 之耦合物製備完成後，將二氧化矽奈米粒子各分為三管，與 5~12 同時呈色分析。呈色分析主要分為四組，以 GOx-NSP、GOx+NSP 與 NSP 作為分組分析，樣品 1、5 與 9 為一組；樣品 2、6 與 10 為一組；樣品 3、7 與 11 為一組；樣品 4、8 與 12 為一組。

製備項目 樣品編號	二氧化矽奈米粒子	活化試劑	耦合物
1	1.5 mg	60 $\mu$ L 0.39 M EDC 60 $\mu$ L 0.10 M NHS	120 $\mu$ L GOx
2	1.5 mg	60 $\mu$ L 0.39 M EDC 60 $\mu$ L 0.10 M NHS	240 $\mu$ L GOx
3	1.5 mg	10 $\mu$ L 0.39 M EDC 10 $\mu$ L 0.10 M NHS	120 $\mu$ L GOx
4	1.5 mg	10 $\mu$ L 0.39 M EDC 10 $\mu$ L 0.10 M NHS	240 $\mu$ L GOx
5	0.5 mg	40 $\mu$ L DDW	40 $\mu$ L GOx
6	0.5 mg	40 $\mu$ L DDW	80 $\mu$ L GOx
7	0.5 mg	10 $\mu$ L DDW	40 $\mu$ L GOx
8	0.5 mg	10 $\mu$ L DDW	80 $\mu$ L GOx
9	0.5 mg	40 $\mu$ L DDW	40 $\mu$ L 1 X PBS
10	0.5 mg	40 $\mu$ L DDW	80 $\mu$ L 1 X PBS
11	0.5 mg	10 $\mu$ L DDW	40 $\mu$ L 1 X PBS
12	0.5 mg	10 $\mu$ L DDW	80 $\mu$ L 1 X PBS

表三十五、不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果表。樣品編號 3 與 4 為葡萄糖氧化酶鍵結二氧化矽奈米粒子，樣品編號 7 與 8 為葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子，樣品編號 11 與 12 為二氧化矽奈米粒子。

樣品編號 吸收值差	3	7	11	4	8	12
OD <sub>570</sub> (3 min)	0.0228	0.0208	0.0000	0.0189	0.0350	0.0001
OD <sub>570</sub> (6 min)	0.0604	0.0531	-0.0002	0.0485	0.0871	0.0001
OD <sub>570</sub> (9 min)	0.0813	0.0996	0.0001	0.0835	0.1556	-0.0003

ELISA reader 於第 N 分鐘偵測吸收值 (N 為 3 的倍數)，而 OD<sub>570</sub> (3 min)、OD<sub>570</sub> (6 min) 與 OD<sub>570</sub> (9 min) 為偵測第 3、6 與 9 分鐘減去第 0 分鐘，由時間差判別吸收值差，比較葡萄糖氧化酶耦合或吸附量。

表三十六、不同條件之葡萄糖氧化酶耦合二氧化矽奈米粒子並呈色分析耦合物結果表。樣品編號 1 與 2 為葡萄糖氧化酶鍵結二氧化矽奈米粒子，樣品編號 5 與 6 為葡萄糖氧化酶吸附二氧化矽奈米粒子，樣品編號 9 與 10 為二氧化矽奈米粒子。

樣品編號 吸收值差	1	5	9	2	6	10
OD <sub>570</sub> (3 min)	0.0162	0.0244	-0.0005	0.0532	0.0245	-0.0002
OD <sub>570</sub> (6 min)	0.0416	0.0613	-0.0005	0.1435	0.0585	-0.0007
OD <sub>570</sub> (9 min)	0.0770	0.1108	-0.0007	0.2517	0.1030	-0.0006

ELISA reader 於第 N 分鐘偵測吸收值 (N 為 3 的倍數)，而 OD<sub>570</sub> (3 min)、OD<sub>570</sub> (6 min) 與 OD<sub>570</sub> (9 min) 為偵測第 3、6 與 9 分鐘減去第 0 分鐘，由時間差判別吸收值差，比較葡萄糖氧化酶耦合或吸附量。

表三十七、不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表。不同比例之 GO:Ab2 耦合二氧化矽奈米粒子，並與抗原免疫反應後，呈色分析其結果。(表三十七與三十八為同一個實驗，需要合併分析。)

GOx : Ab2 OD <sub>570</sub> (min)	50:1	100:1	200:1	400:1	800:1	1600:1
T <sub>0</sub> (0 min)	0.0393	0.0402	0.0398	0.0408	0.0413	0.0397
T <sub>5</sub> (15 min)	0.0431	0.0526	0.0449	0.0467	0.0465	0.0446
OD <sub>570</sub> (15 min)	0.0038	0.0123	0.0051	0.0059	0.0052	0.0049

ELISA reader 於第 N 分鐘偵測吸收值 (N 為 3 的倍數)，T<sub>0</sub> (0 min) 與 T<sub>5</sub> (15 min) 為偵測第 0 分鐘與第 15 分鐘之吸收值，而 OD<sub>570</sub> (15 min) 為偵測第 15 分鐘減去第 0 分鐘，由時間差判別吸收值差。

表三十八、不同比例之偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表。非專一性吸附 GOx-NSP、NSP 以及 GOx-Ab2 與抗原混合反應，呈色分析其結果，而 GOx-Ab2 為確認盤子上有抗原。(表三十七與三十八為同一個實驗，需要合併分析。)

GOx : Ab2 OD <sub>570</sub> (min)	GOx-NSP	NSP	GOx-Ab2
T <sub>0</sub> (0 min)	0.0385	0.0381	0.0461
T <sub>5</sub> (15 min)	0.0420	0.0399	0.1167
OD <sub>570</sub> (15 min)	0.0034	0.0018	0.0706

ELISA reader 於第 N 分鐘偵測吸收值 (N 為 3 的倍數)，T<sub>0</sub> (0 min) 與 T<sub>5</sub> (15 min) 為偵測第 0 分鐘與第 15 分鐘之吸收值，而 OD<sub>570</sub> (15 min) 為偵測第 15 分鐘減去第 0 分鐘，由時間差判別吸收值差。

表三十九、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並呈色分析免疫反應結果表。A~E 為 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 與 0.03125 mg 之 Ab2-NSP-GOx，並且與 0.1 mg Ab1-MNP，以及抗原進行免疫反應；F 為 0.5 mg GOx-NSP 與 0.1 mg Ab1-MNP，以及抗原混合；G 為 0.5 mg NSP 與 0.1 mg Ab1-MNP，以及抗原混合；H 為 GOx-Ab2 (偵測抗體上有葡萄糖氧化酶) 與 0.1 mg Ab1-MNP，以及抗原混合；I 為 0.5 mg 之 Ab2-NSP-GOx，並且與 0.1 mg Ab1-MNP，以及 1 X PBS (無抗原) 混合；J 為 0.5 mg 之 GOx-NSP，並且與 0.1 mg Ab1-MNP，以及 1 X PBS (無抗原) 混合。

樣品編號 OD <sub>570</sub> (min)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
T <sub>0</sub> (0 min)	0.2832	0.2316	0.1514	0.0872	0.0638	0.2523	0.1108	0.1531	0.2676	0.1677
T <sub>2</sub> (6 min)	0.4946	0.3519	0.1621	0.0983	0.0684	0.2450	0.1061	0.2190	0.2782	0.2051
OD <sub>570</sub> (6 min)	0.2115	0.1203	0.0108	0.0111	0.0046	-0.0073	-0.0047	0.0660	0.0106	0.0373

ELISA reader 於第 N 分鐘偵測吸收值 (N 為 3 的倍數)，T<sub>0</sub> (0 min) 與 T<sub>2</sub> (6 min) 為偵測第 0 分鐘與第 6 分鐘之吸收值，而 OD<sub>570</sub> (6 min) 為偵測第 6 分鐘減去第 0 分鐘，由時間差判別吸收值差。

表四十、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測 GOx-NSP 以及 Ab2-NSP-GOx，與 Protein A-MNP 非專一性吸附或免疫反應，偵測時間第 30 秒 (電流單位：μA)，其兩者無顯著差異。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
A	0.38	0.0222	5.9%	0.3997	0.3553
B	0.41	0.0299	7.2%	0.4424	0.3826



表四十一、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測 Ab2-NSP 以及 Ab2-NSP-GOx，與 Ab1-MNP 完整免疫反應，偵測時間第 30 秒 (電流單位：μA)，其兩者具顯著差異，\* $p < 0.05$ 。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
1	0.23	0.0236	10.2%	0.2561	0.2089
2	0.27	0.0082	3.0%	0.2782	0.2618

表四十二、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測 GOx-Ab2 在有無抗原下，與 Ab1-MNP 免疫反應，偵測時間第 30 秒 (電流單位：μA)，其兩者無顯著差異。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
3	0.21	0.0222	10.4%	0.2347	0.1903
4	0.22	0.0350	15.7%	0.2575	0.1875

表四十三、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測 GO<sub>x</sub>-NSP 在有無抗原下，與 Ab1-MNP 非專一性吸附，偵測時間第 30 秒 (電流單位：μA)，其兩者具顯著差異，\*\* $p < 0.01$ 。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
5	0.30	0.0208	7.1%	0.3158	0.2742
6	0.25	0.0096	3.9%	0.2571	0.2379

表四十四、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果表。電化學偵測 GO<sub>x</sub>-NSP 與 Ab2-NSP-GO<sub>x</sub>，偵測時間第 30 秒 (電流單位：μA)，其兩者具顯著差異，\* $p < 0.05$ 。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
7	0.30	0.0306	10.3%	0.3272	0.2661
8	0.23	0.0222	9.5%	0.2547	0.2103

表四十五、偵測抗體與葡萄糖氧化酶耦合物並電化學分析免疫反應結果總表。電化學偵測 總表，偵測時間第 30 秒 (電流單位：  $\mu\text{A}$ )。

數據項目 樣品編號	平均電流值	SD	CV%	Mean+SD	Mean-SD
A	0.38	0.0222	5.9%	0.3997	0.3553
B	0.41	0.0299	7.2%	0.4424	0.3826
1	0.23	0.0236	10.2%	0.2561	0.2089
2	0.27	0.0082	3.0%	0.2782	0.2618
3	0.21	0.0222	10.4%	0.2347	0.1903
4	0.22	0.0350	15.7%	0.2575	0.1875
5	0.30	0.0208	7.1%	0.3158	0.2742
6	0.25	0.0096	3.9%	0.2571	0.2379
7	0.30	0.0306	10.3%	0.3272	0.2661
8	0.23	0.0222	9.5%	0.2547	0.2103

## 參考文獻

1. Ibrahim Khan, K.S., Idrees Khan, *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry, 2017.
2. Rehana, D., A.K. Haleel, and A.K. Rahiman, *Hydroxy, carboxylic and amino acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer studies*. Journal of Chemical Sciences, 2015. **127**(7): p. 1155-1166.
3. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
4. Yu, M.K., J. Park, and S. Jon, *Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy*. Theranostics, 2012. **2**(1): p. 3-44.
5. Bartczak, D. and A.G. Kanaras, *Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling*. Langmuir, 2011. **27**(16): p. 10119-10123.
6. Avvakumova, S., et al., *Biotechnological approaches toward nanoparticle biofunctionalization*. Trends in Biotechnology, 2014. **32**(1): p. 11-20.
7. Conde, J., et al., *Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine*. Frontiers in Chemistry, 2014. **2**.
8. Kurdekar, A.D., et al., *Fluorescent silver nanoparticle based highly sensitive immunoassay for early detection of HIV infection*. Rsc Advances, 2017. **7**(32): p. 19863-19877.
9. Chailyan, A., P. Marcatili, and A. Tramontano, *The association of heavy and light chain variable domains in antibodies: implications for antigen specificity*. Febs Journal, 2011. **278**(16): p. 2858-2866.
10. Mahan, A.E., et al., *A method for high-throughput, sensitive analysis of IgG Fc and Fab glycosylation by capillary electrophoresis*. Journal of Immunological Methods, 2015. **417**: p. 34-44.

11. Sela-Culang, I., V. Kunik, and Y. Ofran, *The structural basis of antibody-antigen recognition*. *Frontiers in Immunology*, 2013. **4**.
12. Sakamoto, S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *J Nat Med*, 2018. **72**(1): p. 32-42.
13. Abuknesha, R.A., et al., *Labeling of biotin antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(4): p. 452-60.
14. Abuknesha, R.A., et al., *Efficient labelling of antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride*. *Journal of Immunological Methods*, 2005. **306**(1-2): p. 211-217.
15. Nayak, S., et al., *Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age*. *Analytical Chemistry*, 2017. **89**(1): p. 102-123.
16. Xu, J., et al., *Family-Based Big Medical-Level Data Acquisition System*. *Ieee Transactions on Industrial Informatics*, 2019. **15**(4): p. 2321-2329.
17. Xiaohua Huang, M.A.E.-S., *Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy*. *Journal of Advanced Research*, 2010. **1**(1): p. 13-28.
18. Akbarzadeh, A., M. Samiei, and S. Davaran, *Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine*. *Nanoscale Research Letters*, 2012. **7**: p. 1-13.
19. Banerjee, R. and A. Jaiswal, *Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases*. *Analyst*, 2018. **143**(9): p. 1970-1996.
20. Zhao, L.J., et al., *Sensitive detection of protein biomarkers using silver nanoparticles enhanced immunofluorescence assay*. *Theranostics*, 2017. **7**(4): p. 876-883.
21. Draz, M.S. and H. Shafiee, *Applications of gold nanoparticles in virus detection*. *Theranostics*, 2018. **8**(7): p. 1985-2017.
22. Wahajuddin and S. Arora, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. *International Journal of Nanomedicine*, 2012. **7**: p. 3445-3471.

23. Singamaneni, S., et al., *Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(42): p. 16819-16845.
24. Schladt, T.D., et al., *Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment*. Dalton Transactions, 2011. **40**(24): p. 6315-6343.
25. Du, P.F., et al., *A Competitive Bio-Barcode Amplification Immunoassay for Small Molecules Based on Nanoparticles*. Scientific Reports, 2016. **6**.
26. Golberg, A., et al., *Cloud-Enabled Microscopy and Droplet Microfluidic Platform for Specific Detection of Escherichia coli in Water*. Plos One, 2014. **9**(1).
27. Wang, S.F., et al., *Electrochemical immunoassay of carcinoembryonic antigen based on a lead sulfide nanoparticle label*. Nanotechnology, 2008. **19**(43).
28. Shukla, S., et al., *Detection of Cronobacter sakazakii in powdered infant formula using an immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay*. Scientific Reports, 2016. **6**.
29. Kim, E.Y., et al., *Detection of HIV-1 p24 Gag in plasma by a nanoparticle-based bio-barcode-amplification method*. Nanomedicine, 2008. **3**(3): p. 293-303.
30. Almstatter, I., et al., *Characterization of Magnetic Viral Complexes for Targeted Delivery in Oncology*. Theranostics, 2015. **5**(7): p. 667-685.
31. Koudelka, K.J., et al., *Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines*. Annual Review of Virology, Vol 2, 2015. **2**: p. 379-401.
32. Lee, A.H.F., et al., *Preparation of iron oxide silica particles for Zika viral RNA extraction*. Heliyon, 2018. **4**(3): p. e00572.
33. Tang, L. and J.J. Cheng, *Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application*. Nano Today, 2013. **8**(3): p. 290-312.
34. Bitar, A., et al., *Silica-based nanoparticles for biomedical applications*. Drug Discovery Today, 2012. **17**(19-20): p. 1147-1154.
35. Ab Rahman, I. and V. Padavettan, *Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites-A Review*. Journal of Nanomaterials, 2012.
36. Kim, J.W., L.U. Kim, and C.K. Kim, *Size control of silica nanoparticles and their*

- surface treatment for fabrication of dental nanocomposites*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(1): p. 215-222.
37. Bouchoucha, M., et al., *Antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticles for brain microvessel endothelial cell targeting*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017. **5**(37): p. 7721-7735.
38. Narayan, R., et al., *Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(3).
39. Wu, Y.Y., et al., *A novel ratiometric fluorescent immunoassay for human alpha-fetoprotein based on carbon nanodot-doped silica nanoparticles and FITC*. *Analytical Methods*, 2016. **8**(27): p. 5398-5406.
40. Qu, W., et al., *Folic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles for enhanced therapeutic efficacy of topotecan in retina cancers*. *International Journal of Nanomedicine*, 2018. **13**: p. 4379-4389.
41. Wohlfahrt, G., et al., *The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004. **260**(1-2): p. 69-83.
42. Leskovac, V., et al., *Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005. **37**(4): p. 731-750.
43. Meyer, M., et al., *Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1998. **12**(5): p. 425-440.
44. Bankar, S.B., et al., *Glucose oxidase - An overview*. *Biotechnology Advances*, 2009. **27**(4): p. 489-501.
45. Hecht, H.J., et al., *Crystal-Structure of Glucose-Oxidase from *Aspergillus-Niger* Refined at 2.3 Angstrom Resolution*. *Journal of Molecular Biology*, 1993. **229**(1): p. 153-172.
46. Wohlfahrt, G., et al., *1.8 and 1.9 angstrom resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1999. **55**: p. 969-977.
47. Zhai, H., et al., *Colorimetric and Ratiometric Fluorescence Dual-Mode Sensing of*

- Glucose Based on Carbon Quantum Dots and Potential UV/Fluorescence of o-Diaminobenzene*. *Sensors*, 2019. **19**(3).
48. Bohm, A., et al., *Covalent Attachment of Enzymes to Paper Fibers for Paper-Based Analytical Devices*. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **6**.
49. Lee, S.R., et al., *Development of a disposable glucose biosensor using electroless-plated Au/Ni/copper low electrical resistance electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008. **24**(3): p. 410-414.
50. La Belle, J.T., et al., *Self-monitoring of tear glucose: the development of a tear based glucose sensor as an alternative to self-monitoring of blood glucose*. *Chemical Communications*, 2016. **52**(59): p. 9197-9204.
51. Su, D., et al., *Magnetic bead-based mimic enzyme-chromogenic substrate and silica nanoparticles signal amplification system for avian influenza A (H7N9) optical immunoassay*. *Rsc Advances*, 2017. **7**(67): p. 41989-41999.
52. Nam, J.M., K.J. Jang, and J.T. Groves, *Detection of proteins using a colorimetric bio-barcode assay*. *Nature Protocols*, 2007. **2**(6): p. 1438-1444.
53. Luo, Y.H., W.C. Dou, and G.Y. Zhao, *Rapid electrochemical quantification of Salmonella Pullorum and Salmonella Gallinarum based on glucose oxidase and antibody-modified silica nanoparticles*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. **409**(17): p. 4139-4147.
54. Liu, L., et al., *Nanomaterials-Based Colorimetric Immunoassays*. *Nanomaterials*, 2019. **9**(3).
55. Gao, Z.Q., et al., *Magnetic Bead-Based Reverse Colorimetric Immunoassay Strategy for Sensing Biomolecules*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(14): p. 6945-6952.
56. Jia, C.P., et al., *Nano-ELISA for highly sensitive protein detection*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(9): p. 2836-2841.
57. Frampton, J.P., et al., *Aqueous two-phase system patterning of detection antibody solutions for cross-reaction-free multiplex ELISA*. *Scientific Reports*, 2014. **4**.
58. Lahiri, J., et al., *A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: A surface plasmon resonance study*. *Analytical Chemistry*, 1999. **71**(4): p. 777-790.



59. Medda, L., M. Monduzzi, and A. Salis, *The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific*. Chemical Communications, 2015. **51**(30): p. 6663-6666.
60. Tonigold, M., et al., *Pre-adsorption of antibodies enables targeting of nanocarriers despite a biomolecular corona*. Nature Nanotechnology, 2018. **13**(9): p. 862-+.
61. Puertas, S., et al., *Designing novel nano-immunoassays: antibody orientation versus sensitivity*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2010. **43**(47).