

應用分子拓印生醫智慧材料於電化學生物感測器之尿液分析

黃俊岳^a, 蔡田峻^b, 詹姆士湯姆森^c, 李玫樺^d, 劉濱達^{e,*}, 林宏殷^{b,f}

^a 台南大學 電機工程學系

^b 高雄大學 生物科技研究所

^c 美國新墨西哥大學 物理與天文學系

^d 義守大學 材料科學與工程學系

^e 成功大學 電機工程學系

^f 高雄大學 化學工程及材料工程學系

bdliu@mail.ncku.edu.tw

[Biosensors and Bioelectronics, Vol. 24, No. 8, pp. 2611-2617, April 2009](#)

在尿液中有許多重要的生物標誌物如白蛋白、尿酸、葡萄糖、尿素、肌酸與肌酸酐，這些對於腎功能不健全或是腎小管感染等問題相關性較高的生物標誌分子，在老年人口不斷增長的社會中，針對以下病症如腎小球、腎遠近曲小管功能不全、糖尿病、高血壓和蛋白尿的病患具有重要的檢測意義。本研究採用溶劑揮發方式，以不同種類的聚乙烯醇高分子（ethylene-co-vinyl alcohol, EVAL）來製作高分子拓印模板，針對拓印的肌酸酐、尿素和溶菌酶等分子進行辨識。其中以乙基莫耳比例為27 mol%的聚乙烯醇高分子對於肌酸酐與尿素分子具有較佳的選擇性，而適用溶菌酶的乙基比例則為較疏水性的44 mol%。此外，整合自製電化學恆電位儀與分子拓印高分子修飾電極，檢測實際尿液檢體中上述分子的回饋訊號，並且比對高雄義大醫院生化檢測的ARCHITECT ci 8200系統的檢驗數據，依此作為判斷拓印電極是否能夠提供一快速準確的檢驗方法。



在許多文獻中已利用分子拓印高分子技術作為生物感測器上的辨識層，並在許多的實驗設計上分別利用電化學、光學、質量敏感、溫度和磁力感測器，在不同環境下整合分子拓印技術進行生物化學檢測，其中最有效的分析感測器是電化學生物感測器，因為電路設計上的可微小化、易於製造及成本低，而且電化學檢測方式也具有高靈敏性與低檢測極限等優點，因此現今許多研究人員試圖開發一種低成本、獨立、可攜式，且可用於不同的感測器的恆電位儀。聚乙烯醇高分子已被用作蛋白質拓印材料之應用，其中乙基莫耳比例含量分別為27, 32, 38或44 mol%的產品已被商業化，聚乙烯醇高分子薄膜的形成方法包括溶劑揮發以及濕式相轉化，隨著聚乙烯醇高分子的高生物相容性和易於製造，這類性質的薄膜非常適合用在生物感測器上作為辨識元件材料。

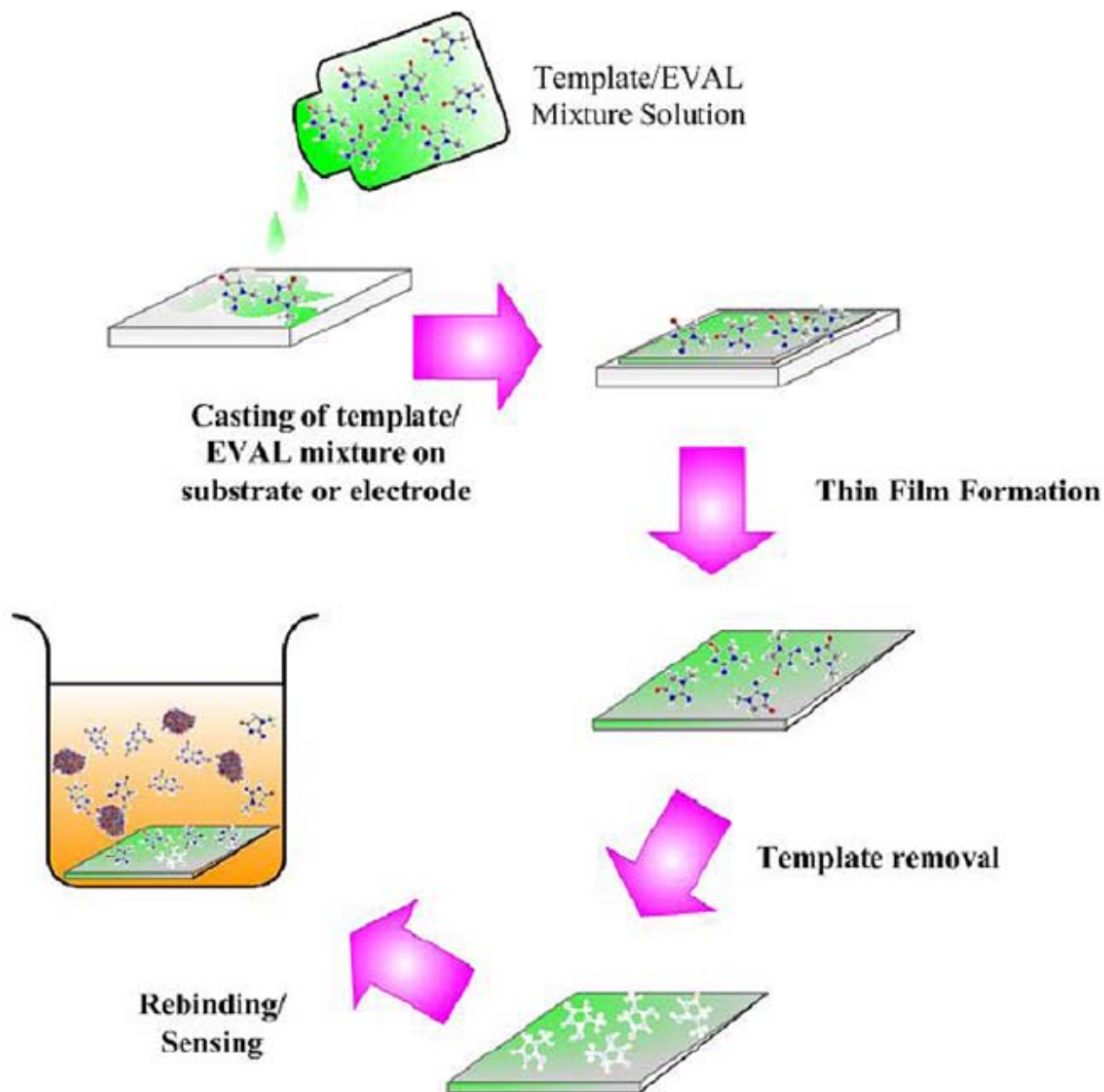
本跨校跨領域整合研究的目標，是發展一個循環伏安式恆電位儀，製作出一個低成本、可攜式和獨立的循環恆電位儀用來分析分子拓印模板上吸附的分子濃度。該恆電位儀利用現成的電路元件及系統晶片來達到一個具有廣泛量測電流範圍、穩定性佳及高品質的測量。為了驗證系統，我們利用尿液感測器來測試自製恆電位儀的效能。

合成肌酸酐、尿素和溶菌酶分子拓印與非拓印分子薄膜包括以下三個步驟（如圖一所示）

(1) 將混合1 wt%模板尿素、0.5 wt%的肌酸酐和0.1 wt%溶菌酶的聚乙烯醇高分子溶液注入到玻璃基板或金電極上。

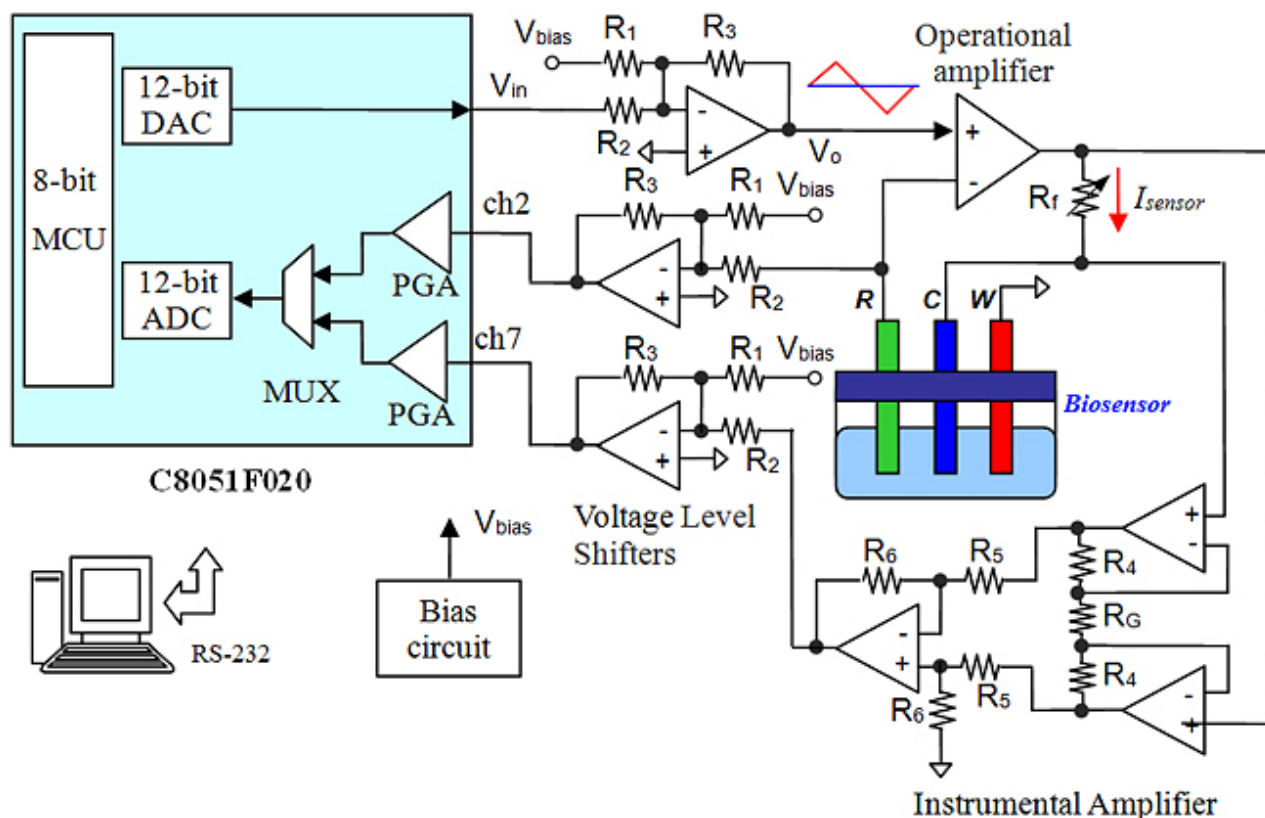
(2) 以『溶劑蒸發』的方式使得二甲基亞砜溶劑揮發完全。

(3) 分別以乙醇清洗去除拓印的尿素和肌酸酐分子模板及1 wt%的SDS溶液去除溶菌酶分子模板上目標分子30分鐘，然後以去離子水清洗10分鐘並重複三次以維持薄膜穩定性。在下次使用前所有的模版皆置於平衡磷酸鹽緩衝液（PBS）。



圖一 分子拓印模板製備示意圖

圖二所示為可攜式循環伏安式恆電位儀電路架構圖，這個電路主要是由一個混合信號微處理器晶片(C8051F005)、一個電流電壓轉換器電路、三個位準轉移電路、兩個電壓放大器、一個電壓隨耦器及一個運算放大器組成，並透過RS232串列傳輸介面與電腦溝通。其中電流電壓轉換器電路是用來將感測器的電流轉換成電壓信號，整個恆電位儀製作的印刷電路板尺寸為7.5 × 6 cm²，整體製作經費低於美金35元。



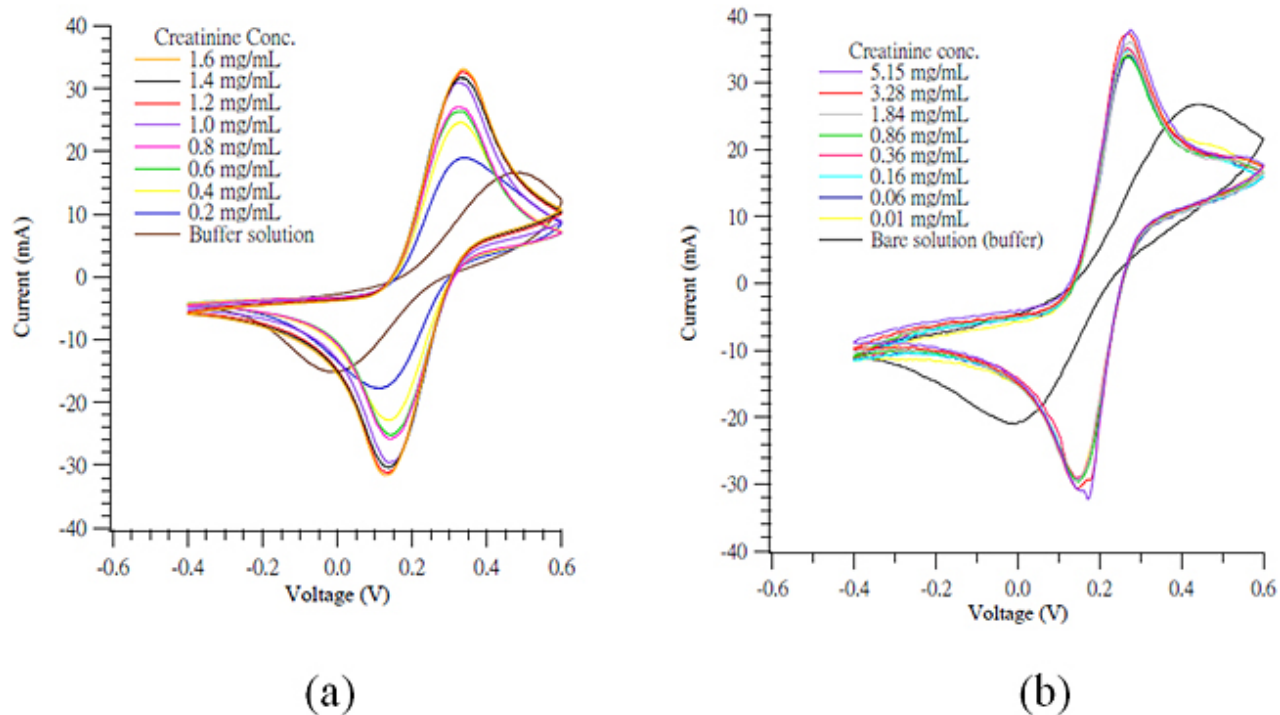
圖二 可攜式循環伏安式恆電位儀電路架構圖

尿液分析在不久的將來為家庭照護(Home-care)的重要檢測方式，尿液分析通常包括檢測尿液中的pH值、比重、蛋白質含量、葡萄糖、酮體、亞硝酸鹽和白細胞酯酶等，對於腎臟病患者而言，尿素、肌酸酐、尿溶菌酶是特別重要的指標分析物質，在此研究中分子拓印模版的選擇性，主要是在對於這些特定分子具有特異性的辨識能力，其選擇性的定義為分子拓印薄膜吸附量/非分子拓印薄膜吸附量，由表一得知尿素和肌酸酐分子在乙烯莫耳比例為27 mol%的聚乙烯烯醇高分子中具有較佳的選擇性，然而溶菌酶則為乙烯莫耳比例44 mol%。

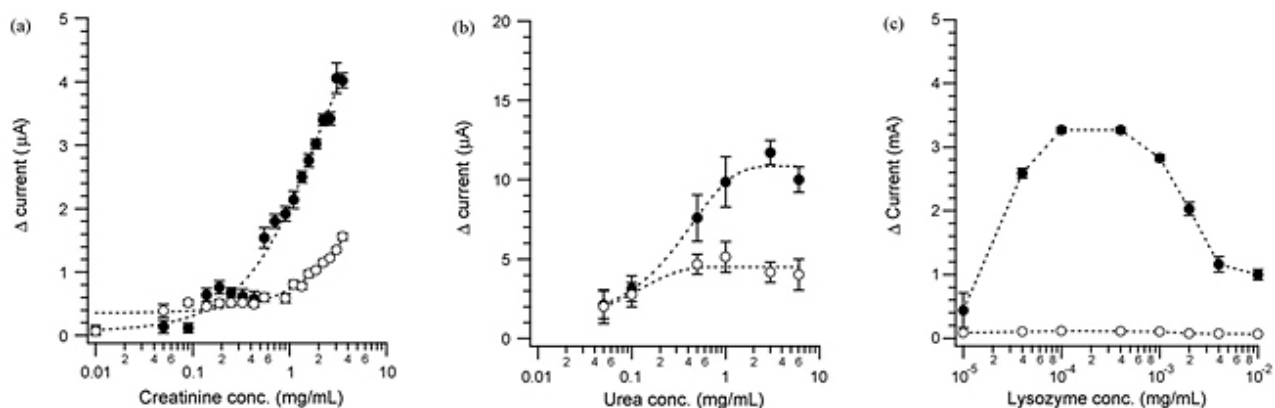
表一 分子拓印薄膜吸附量及非分子拓印薄膜吸附量（粗體字部分表示具有較佳的選擇性）

| EVALs (ethylene mole %) | Urea ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | Creatinine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | Lysozyme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|--|-----------------|
| | MIPs | NIPs | MIPs | NIPs | MIPs | NIPs |
| 27 | 233.7± 50.7 | 100.6± 4.5 | 12.83± 0.56 | 5.20± 1.30 | 7.9± 1.6 | 5.1± 1.5 |
| 32 | 124.3± 72.5 | 82.5± 14.5 | 7.74± 0.96 | 5.45± 0.95 | 8.9± 0.7 | 8.3± 0.2 |
| 38 | 189.4± 29.0 | 109.5± 7.2 | 8.65± 1.36 | 5.58± 0.11 | 13.6± 2.5 | 9.1± 1.1 |
| 44 | 47.3± 0.1 | 207.1± 0.1 | 1.96± 0.15 | 1.52± 0.05 | 17.7± 0.7 | 7.3± 0.2 |

圖三顯示的結果分別利用商用恆電位儀及自製恆電位儀量測肌酸酐拓印薄膜(Creatinine-MIP)之循環伏安法，其氧化峰偏壓值發生在0.29 V，因而在其氧化峰所產生的偏壓位置下，進行定電位的伏安法量測；圖四所顯示的結果分別為三種不同分子拓印模版的反應電流與非拓印分子模版的電流變化值，肌酸酐和尿素的反應電流分別從 $0.12 \pm 0.07 \mu\text{A}$ 到達 $4.06 \pm 0.24 \mu\text{A}$ ， $2.12 \pm 0.87 \mu\text{A}$ 至 $10.9 \pm 1.5 \mu\text{A}$ ，隨著分子濃度的增加其電流變化量有上升的趨勢，但溶菌酶分子拓印和非拓印分子薄膜電極，濃度範圍在10~100 ng/mL時，電流差距擴大到3.2 mA，在較高濃度區間0.1~4.0 g/mL時反應電流卻呈現往下變化。



圖三 (a)商用恆電位儀量測肌酸酐拓印薄膜(Creatinine-MIP)之循環伏安法結果，(b)自製恆電位儀量測肌酸酐拓印薄膜(Creatinine-MIP)之循環伏安法結果



圖四 利用伏安法量測 (a) 肌酸酐 (b) 尿素 (c) 溶菌酶 濃度與反應電流變化之關係。

在表二中，使用自製的恆電位儀和商用的ARCHITECT ci 8200系統，量測了三個由作者和同事間取得的獨立隨機尿液樣本。我們發現其尿素和肌酸酐的準確度平均值分別為82.46%和80.04%。其中一個量測結果的準確度小於60%，可能是因為電極於清洗過後會將部分吸附檢測分子的凹洞一併洗掉而使準確度降低。這個實驗中聚乙烯醇高分子拓印模板被使用了6次，即使電極薄膜髒汙，可以將舊的薄膜用DMSO溶解以產生新的薄膜。

表二 自製分子拓印薄膜電極之恆電位儀感測器與商用ARCHITECT ci 8200系統測試之比較

| Molecules | Sample | Home-built potentiostat sensor | | ARCHITECT ci | Accuracy |
|------------|--------|--------------------------------|-------------------------------|--------------|----------|
| | | Δ current(μ A) | Convert concentration (mg/mL) | 8200 (mg/mL) | (%) |
| Urea | I | 27.70 \pm 10.49 | 10.10 \pm 3.25 | 11.86 | 85.16 |
| | II | 31.30 \pm 8.75 | 11.00 \pm 2.98 | 13.24 | 83.08 |
| | III | 17.20 \pm 5.66 | 5.24 \pm 1.98 | 6.62 | 79.15 |
| Creatinine | I | 0.88 \pm 0.44 | 0.74 \pm 0.28 | 0.61 | 82.43 |
| | II | 2.40 \pm 0.24 | 1.56 \pm 0.91 | 1.56 | 100.00 |
| | III | 1.12 \pm 0.21 | 0.90 \pm 0.11 | 1.56 | 57.69 |

綜合而言，我們利用分子拓印技術所完成的電極來量測尿液中的特定分子，證明聚乙烯醇高分子的聚合性薄膜可以利用可溶於DMSO的數種目標分子來達到拓印功效。此外，我們所開發的分子拓印薄膜，其塗層的聚乙烯醇高分子從電極上移除後，能再度形成另一個拓印薄膜，重覆使用。最後，我們利用自行開發的恆電位儀和分子拓印聚合物的整合感測系統，完成實際尿液樣本中肌酸酐、尿素、溶菌酶之分析。展望未來，將朝電路部份全部整合成單一晶片為研究目標，並拓展可偵測目標分子種類。

Copyright 2013 National Cheng Kung University