

私立台北醫學大學口腔醫學院

口腔科學研究所

碩 士 論 文

細胞膜蛋白感測晶片之研製

- 使用氧化銦錫雙電極之連續阻抗量測

Development of bio-chips for cellular-membrane-protein detection

- continuous impedance measurement by ITO di-electrode

指導教授：黃豪銘 副教授 (Dr. Haw-Ming, Huang)

共同指導教授：李勝揚 教授 (Dr. Sheng-Yang, Lee)

研究生：林君彥 (Chun-Yen, Lin) 撰

中華民國 九十六 年 七 月

## 致 謝

研究生的實驗室生活是如此短暫，卻又充實。很幸運地能順利完成我的畢業論文，這其中感激許多人一路上的指導以及協助。

第一個感謝我的指導老師黃豪銘老師，指導我往興趣的方向繼續發展外，也給了學生我許多寶貴的機會及幫助，老師對學生很好但有些是我不知如何報達的。也感謝李勝揚主任在每次報告中給我的教導，也感謝主任給我的支持。也特別感恩儀器科技研究中心林永昇博士在晶片及製程上的大力協助。另外謝謝我的考試委員招集人黃何雄教授，感謝您細心地指導我的論文內容以及對我的認同。也感激以上老師及李宏謨主任、鄧文炳所長給我的鼓勵，讓我繼續往博士班學習。

最後也謝謝實驗室的夥伴及同學們，我們一起努力、一起做實驗、一起討論的這些日子，是在我這段生活中最重要的記憶。

## 論 文 摘 要

論文名稱： 細胞膜蛋白感測晶片之研製

- 使用氧化銦錫雙電極之連續阻抗量測

私立台北醫學大學

口腔醫學院口腔科學研究所

研究生姓名： 林君彥

畢業時間： 95 學年度 第 2 學期

指導教授： 黃豪銘 (台北醫學大學口腔科學研究所副教授)

細胞膜蛋白佔全部蛋白的 30%，為蛋白質體學計畫中的研究重點。然而目前蛋白質相關的研究方法難以對細胞膜蛋白做非破壞的檢測，也無法長時間對單一樣本做連續變化的觀察。基於此，我們製作以 ITO 為電極材料的生物晶片，非破壞性的連續測量細胞的交流阻抗。在本研究中 MG-63 細胞株培養於自製的 ITO 玻璃晶片上，當細胞成長數目越多時，電阻抗的變化量也越大，此與測量細胞活性之 MTT 法比較，有極高的線性相關( $R^2=0.9883$ ,  $p<0.005$ )。本研究亦進

一步結合免疫染色的原理，將帶有奈米級金粒子的抗體連結到細胞膜上 Integrin  $\beta 1$  蛋白，當有越多的 Integrin 膜蛋白存在時，細胞膜上被連結的金粒子也越多，此時會產生越大的電阻抗變化；與螢光染色法之讀值比較，亦有良好的線性相關( $R^2=0.9178$ ,  $p<0.005$ )。本研究以較經濟的 ITO 晶片做為細胞膜蛋白非破壞性之研究方法，並為將來藥物篩選、癌細胞檢驗之應用性提供了初步的數據，但仍需要更多實驗佐證細胞膜蛋白量測相關之結果。

關鍵詞：生物感測器、氧化銦錫、細胞膜蛋白、細胞電阻抗量測

## Abstract

Title of Thesis :

Development of bio-chips for cellular-membrane-protein detection  
- continuous impedance measurement by ITO di-electrode

Author : Chun-Yen, Lin

Thesis directed by : Dr. Haw-Ming, Huang (Associate Professor,  
Graduate Institute of Oral Science, College of Oral Medicine, Taipei Medical  
University)

Membrane proteins, about 30% of the total proteins, become the major research topics of proteomic projects. There were many techniques were proposed for membrane proteins investigations. However, a method for continuous and long-term protein detection is still unavailable. Accordingly, in this study, we developed an ITO-based biochip for non-destructive membrane protein detection.

In our study, when MG-63 cells were seeded on the ITO-based glass chips, a liner relationship was found when comparing with MTT assay ( $R^2=0.9883$ ,  $p<0.005$ ). Additionally, when Integrin  $\beta 1$  membrane protein were taken into account, there exist a liner relationship between cell impedance and immuno-fluorescence intensity ( $R^2=0.9178$ ,  $p<0.005$ ).

In conclusion, we developed a novel ITO biochip for non-destructive membrane protein detection, and provided some preliminary results for

future applications. It will be a useful tool for drugs discovery and cancer cells testing. The results obtained from this study can be a useful reference for future advance investigations on membrane-proteins detection.

Keywords : Biosensor 、 indium-tin oxide (ITO) 、 Cellular membrane protein 、 Electric cell-substrate impedance sensing



# 目 錄

---

	頁 數
致 謝 .....	I
中文摘要 .....	II
英文摘要 .....	IV
目 錄 .....	VI
第一章、緒論 .....	1
第一節、研究動機與重要性.....	1
第二節、研究目的.....	3
第三節、研究假設.....	3
第四節、名詞界定.....	4
第二章、文獻回顧 .....	11
第一節、細胞行為的連續偵測.....	11
第二節、電學生物感測晶片之概況.....	15
第三節、ITO 在生物醫學的研究.....	16

第三章、材料與方法 .....	19
第一節、細胞培養.....	19
第二節、晶片的製作及實驗設備.....	22
第三節、玻璃與 ITO 表面之細胞培養實驗.....	28
第四節、ITO 電極選擇實驗.....	29
第五節、細胞阻抗之量測實驗.....	30
第六節、細胞膜蛋白之偵測.....	34
第四章、結果 .....	40
第五章、討論 .....	46
第六章、結論未來研究目標 .....	52
第七章、參考文獻 .....	54
附錄圖表 .....	65

# 第一章、緒論

## 第一節、研究動機與重要性

在這後基因體(Genome)時代，蛋白質體(Proteome)的研究將會比基因體研究更為龐大、複雜且具挑戰性，並已成為 21 世紀生物科技最主要的研究趨勢。蛋白質除了在數量上遠遠超過已知的基因數之外，在研究方法上，其容易碎裂、易改變的特性增加了蛋白質在發現與分析上的困難。在分析方法上，蛋白質的定量分析必須先以二維膠體電泳(2-dimensional gel electrophoresis)進行蛋白質的初步分離，再配合高效能液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)進行純化，最後再利用分子質譜儀(MS)或多重質譜儀(MS/MS)做蛋白質的胺基酸序列分析。而這些分析方法所需要的儀器與耗材均非常昂貴且耗費時間。此外，二維電泳不易辨識出特定的蛋白質也是一大問題，這些特定的蛋白質包括膜蛋白、高度鹼性或高度酸性的蛋白以及產量稀少的蛋白，其中尤以膜蛋白之研究與分析的難度最高，這是因為當它們從膜上純化出來以後就無法維持其三度空間結構並行使其正常功能，因此雖然細胞膜蛋白為蛋白質體計畫中研究的重點，但其分析方法仍然受到限制。

對於蛋白質研究中已知的蛋白質種類，可以利用單株抗體(Monoclonal antibodies)以免疫的方法對該蛋白質做標示或進一步的

定量。雖然這種方法已經發展得相當成熟，並已大量運用在各種蛋白質相關的檢測與研究上，但在蛋白質的抗體分析中，對細胞都有侵入性及破壞性，不是需要將細胞穿孔就是要將細胞打破，所以在時間相關(Time dependent)的細胞實驗中，細胞必須培養成多盤的形式，不同時間點的實驗數據取自不同盤的細胞。例如：每天一個樣本做七天觀察，就需要培養七盤細胞，每天取不同盤的細胞進行測試。而為了消除不同盤細胞間的差異，每一組細胞還要以多重複樣品數來加以分析，這不僅使分析時間拉長，也增加了誤差的機會。在現有的方法上，利用共軛焦點顯微鏡進行細胞的螢光分析，雖然在相當程度上可以做到連續、即時(Real time)的量測，但其價格昂貴、處理步驟繁雜，而且此所謂的連續量測也僅限數小時而已。因此追求長時間(達數天或數週)非破壞性的蛋白質測量方法，以能在同一個樣本中真正做到連續的量測，也就是可以對同一盤細胞做無限制時間點的觀察，一直是生物技術上的一大挑戰。若能達到這個目的將可以對細胞上蛋白質的變化做較佳的監測，無論是研究蛋白質短時間的或長時間的變化都可以連續記錄，且做到減少人為誤差、節省時間、降低實驗的成本。

有鑒於目前通用的許多實驗方法都將對細胞造成傷害，無法對單一樣品做長時間的監測，因此近年來發展出一種利用不具傷害性的微小交流訊號來偵測細胞，其可以連續記錄細胞生長於電極上的行為。

這種方法也已經實際應用在許多不同種類的細胞上，在細胞株(Cell line)或是初級培養(Primary culture)的細胞實驗中，已證實可以非破壞性的對細胞行為做連續性的量測，但是到目前為止並無法對細胞蛋白質做量測。

綜合以上幾點，細胞膜蛋白的研究在蛋白質體學中佔了重要的角色，以傳統的實驗方法不只昂貴、費時且難以對膜蛋白做研究，因此尋找一個新的實驗方法，可以對細胞做到非傷害性、非破壞性，而且可以降低人為誤差、節省時間、減少實驗成本，這種新的方法將會是蛋白質體學中的一大突破。

## 第二節、研究目的

本研究之目的為研發一種量測細胞膜蛋白的生物晶片。針對貼附生長的哺乳類細胞，利用非破壞的方式對細胞膜蛋白做連續的量測，並可連續觀察細胞膜蛋白的變化。

## 第三節、研究假設

在目前生物晶片的研究上，氧化銦錫(Indium-Tin Oxide, ITO)因為它的透明、細胞相容性、售價便宜等優良特性，漸漸取代傳統以金、鉑等貴金屬材料所做的電極。也因為取得容易與製程簡單，而在生物感測器的研發上被廣為利用。

在本研究中，細胞膜蛋白生物晶片，係在氧化銦錫(ITO)導電玻璃上製作出特殊規格的感測雙電極，再將貼附生長的哺乳類細胞株培養於其上，使細胞成為此感測電路的一部份。由於細胞具有高阻抗的特性，因此當細胞數目越多則電路中的阻抗也越高，並可據此做為細胞增殖、死亡的依據。此外，細胞在細胞膜上會表現許多蛋白質，諸如離子通道、蛋白質受器、細胞標記、酵素等，以這些膜蛋白為研究對象，皆可由特定的單株抗體辨識結合，進而利用帶有奈米級金粒子的二級抗體標示已結合特定膜蛋白的一級抗體<圖 1>。利用導電能力的差別(電阻係數： $Au = 2.4 \times 10^{-6} \Omega\text{cm}$ ； $ITO \doteq 2 \times 10^{-4} \Omega\text{cm}$ ； $Cell \doteq 140 \Omega\text{cm}$ )，金粒子優於 ITO 電極及細胞，所以當細胞膜上有連結上金粒子時，此待測電路的阻抗特性也會隨之改變，藉由偵測此電阻抗的變化，可進一步對此特定蛋白做定性或定量分析。並可從連續的觀測中了解此膜蛋白的變化。

## 第四節、名詞界定

### 1. 蛋白質體學(Proteomics)

自從 1990 年人類基因體研究計畫(Human Genome Project, HGP)開始以來，經過十幾年的基因體浪潮，在 2003 年人類基因體序列完全解碼完成後可以說是達到了一個高峰。然而其序列中蘊藏的基因數

量不如當初所預期的十萬個基因以上，卻僅有 3 萬到 4 萬個有限的基因而已，可見還有更多的資訊潛藏。

基因是由四種鹼基分子排列組合而成的密碼，經由轉錄(DNA→mRNA)及轉譯(mRNA→Protein)製造出一個個具有不同功能的蛋白質，這也是分子生物學的中心定律(DNA→mRNA→Protein)，在這些過程中富含了複雜的變異機制，使得 3 萬到 4 萬個有限的基因可以生產數量龐大的蛋白質，而這些蛋白質才是真正具備實際功能的單位。在這個後基因體時代，接下來要研究的是針對如此眾多的蛋白質，進行胺基酸序列的分析、蛋白質的分類、蛋白質與蛋白質之間交互關係的研究等等...，而這門學問就是—”蛋白質體學(Proteomics)”，或稱為功能性基因體學(Functional genomics)。

在每一個個體中基因體是固定的，我們全身上下所有的細胞都擁有相同的基因體，而位於不同位置不同組織的細胞，卻依其功能及生長條件不同而表現著不同的蛋白質，具有不同的蛋白質體。因此，蛋白質體的研究將會比基因體研究更為龐大、複雜及挑戰性，並已成為 21 世紀生物科技最主要的研究趨勢。

## 2. 細胞膜蛋白(Membrane proteins)

細胞膜是細胞的自然屏障，也將不同功能的部位做好了區分和隔

離，也因為如此，細胞膜扮演了細胞內與環境溝通的重要角色。鑲嵌於細胞膜上的膜蛋白(Membrane proteins)佔了全部蛋白的 30%，負責訊息傳遞、細胞標示辨識、細胞連結、離子通道及物質的輸送等重要的功能。

### 3. 免疫染色(Immunostain)

對於蛋白質研究中已知的蛋白質種類，可以利用單株抗體(Monoclonal antibodies)以免疫的方法對該蛋白質做標示或進一步做定量。然而這種方法已經發展得相當成熟，並已大量運用在各種蛋白質相關的檢測與研究上。細胞免疫螢光染色(Immunocytochemistry)是利用第二級抗體上所帶的螢光物質標示出蛋白質的位置，在螢光顯微鏡下觀察蛋白質的分佈情況，或以共軛焦顯微鏡(Confocal Microscopy)做精密的影像掃描，而這種染色也可以利用不同顏色的螢光物來標示不同的蛋白質，做位置分佈的比較。西方墨漬法(Western blot)則是利用第二級抗體上帶的過氧化氫酶來使受質呈色，經蛋白質膠體電泳(SDS-PAGE)後將蛋白質轉印在轉漬膜上進行免疫染色，可分辨該類蛋白質所在的分子量，若再經由影像分析可以做初步的定量。酵素免疫分析法(ELISA)在多孔盤中使用帶酵素的抗體，對不同樣本做蛋白質的分析，當蛋白質越多則呈色越濃，最後以光度計(如 ELISA reader)

做顏色的定量。放射免疫分析(Radio Immuno Assay, RIA)則利用抗體上帶同位素放射源，並使用  $\alpha$  或  $\gamma$  計數器進行定量分析。

#### 4. 交流阻抗分析

細胞由細胞膜(Cellular membrane)所包覆。細胞膜的主要組成是磷脂質(Phospholipid)構成的雙層結構。磷脂質有一親水的頭部及一個疏水的尾部，在構成細胞膜時，兩個脂質的親水端頭部分別面向細胞外液及細胞內液，而兩個疏水端尾部則介在中間，形成雙層磷脂質(Phospholipid bilayer)。由於離子無法自由通過脂質雙層，所以導電度很低，一般而言其導電係數約在  $10^{-6}$  S/m 的範圍。由於細胞膜中脂質雙層的厚度很小，因此可以提供大約  $20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  的電容量，所以對細胞膜而言，其介電性質的重要性大於其導電性質。由於細胞膜具有電容特性，因此直流或低頻交流電流不易通過，但可以容許高頻交流電通過(交流耦合)。細胞內包括細胞核、粒腺體等胞器均外覆有一層膜，這層膜的構造與細胞外膜類似，因此細胞內胞器亦具有「隔離直流耦合交流」的特性。

在實際應用上，通常以組織為單位來作為呈現生物材料的電學特性。這時我們可以把一個組織的交流阻抗表示成：

$$Z = Z' - jZ''$$

其中， $Z'$ 為生物組織的電阻抗值，而  $Z''$ 為電容抗值，其公式的意義是：一個組織的交流阻抗是生物組織的電阻性阻抗與電容性阻抗的聯合表現，因此一個組織在特定的電流頻率下，可以在以  $Z'$ 為橫軸， $-Z''$ 為縱軸的複數座標平面上對應到一個點。

基於分析上的方便與需要，有許多組織與細胞的等效電路模型被發展出來。因為不論是細胞膜或細胞內外液均有非理想性的電學特性，因此細胞膜或細胞內外液在此等效電路上所扮演的角色均須考慮其電阻性與電容性。細胞內外液保有電解質導體的特性可以視為一導體，這時電阻為重要參數；細胞膜近乎理想的介電特性，並在等效電路上扮演電容器的功能。(黃豪銘, 醫用電子學)

## 5. ECIS (Electrical Cell Impedance Spectroscopy)

由諾貝爾物理獎得主 Giaever 和 Keese 所建立的一種細胞分析方法。利用電學的方式來測量細胞行為，是一種非破壞性的細胞行為連續偵測方法。在操作上是以前微小的正弦交流信號偵測貼附於微小金電極上的細胞，且藉由鎖相放大器(Lock-in amplifier)做雙電極的阻抗量測，並連續記錄細胞電阻與電容抗的變化。因為細胞具有電阻性，因此細胞越多則電阻值越大；而相反的，當細胞數越多總電容量就越小。

## 6. ITO 玻璃

氧化銦錫(Indium-Tin Oxide, ITO)擁有導電性、化學穩定性、高可見光穿透率、高紅外線反射率等特性，是現代最廣為使用的透明導電材質，其可為粉末、漿料或靶材及薄膜材料。ITO 玻璃即是在原本不導電的母玻璃基板上，鍍上一層均勻透明且可導電的氧化銦錫。在工業上常被做為平面顯示器(如液晶顯示器、電漿電視、OLED 等...)面板的重要零組件，其他方面也可以應用在高層建築節能玻璃、飛機、汽車等交通工具防霧防霜風擋、太陽能電池及收集器、烘箱等的隔熱材料或加熱板的集熱材料、氣體敏感材料等...

## 7.鎖相放大器(Lock-in amplifier)

鎖相放大器是用於測量微弱週期性信號的儀器。這些微弱信號可以小至數奈伏特(nV)，即使隱藏在大它數千倍的雜訊當中，亦能精確的測得。鎖相放大器是利用所謂”相位靈敏偵測”(phase-sensitive detection, PSD)的技術以取得具有特定頻率與相位的信號，而不同於此頻率的其他雜訊則被抑制下來，使輸出訊號不受雜訊影響。而許多鎖相放大器亦提供波形產生器作為調制電壓源以及作為內部參考信號之用。

許多高階的鎖相放大器中具有兩個 PSD，且使參考信號進入此二

者時相差  $90^\circ$  相位，則兩者的輸出將分別為  $V \cos(\theta)$  信號與  $V \sin(\theta)$  信號。我們稱前者為 X 輸出(或'in-phase' component)，後者稱為 Y 輸出(或'out-of-phase' component)。



## 第二章、文獻回顧

### 第一節、細胞行為的連續偵測

有鑒於許多實驗的方法都將對細胞造成傷害，因此無法對單一樣品做長時間的監測，所以非破壞性、可以連續偵測細胞狀態的感測方式或裝置非常有其必要，但卻不多見且仍有限制。基於此，諾貝爾物理獎得主 Giaever 在 1984 年和 Keese 共同提出了一套稱為細胞阻抗分析(Electrical Cell Impedance Spectroscopy, ECIS)的方法，利用電學的方式來測量細胞行為。他們利用 4000Hz 正弦交流信號偵測貼附於微小金電極上的細胞，且藉由鎖相放大器(Lock-in amplifier)做雙電極的阻抗量測，並連續記錄細胞與電極介面所產生的電阻與電容抗。他們發現在使用金電極材質或施加電場之下都對細胞沒有影響，細胞無論在貼附、伸展、生長上都一直表現正常(Giaever and Keese,1984)。此外，在連續的細胞量測紀錄中，細胞總電阻值確實會隨細胞生長的密度而增加。近年來隨著儀器技術的進步，許多學者曾嘗試著使用不同的阻抗量測法對細胞進行分析，也有著相同的發現(Xing *et al.*,2005；Yeon and Park, 2005；Guo *et al.*,2006)。而在細胞阻抗分析的連續記錄中，甚至可以記錄到細胞在微小金電極上遊走所產生的微小信號變動(Giaever and Keese,1984)，利用這些微小電阻抗的變動，可以作為即時(Real time)觀察細胞微小移動的依據，當細胞運動性越強，信號的

變動也越大，其偵測的靈敏度可達 1nm (Giaever and Keese, 1991,1993)。

在電極設計上，傳統的細胞阻抗分析將金電極設置在塑膠(PS)培養盤上，其中又分為一個微小的偵測電極和一個較大的計數電極。研究發現如果將此二電極改為兩個等大的電極將會無法測量到細胞的變化(Giaever and Keese,1991)。另也有學者使用鉑製作兩個等面積的指狀電極(IDES)，成功地連續偵測細胞的貼附行為(Yeon and Park,2005；Xing *et al.*,2005；Nguyen *et al.*,2004)。這表示在細胞阻抗量測分析時，電極的形式與大小對量測結果有很大的影響。而近年來有越來越多的研究嘗試利用不同的電極形式設計來達到持續量測的目的，這類研究已漸成為此一領域的另一重點(Yeon and Park,2005；Xing *et al.*,2005；Nguyen *et al.*,2004)。

在電極表面的處理上，傳統的細胞阻抗分析晶片是在金電極上塗佈一層光阻物質來進一步限制金電極的有效面積，也因為細胞對電極的貼附性亦是影響細胞阻抗量測的因素之一，為了達到這個目的，最後在電極上塗附一層蛋白質來幫助細胞的貼附(Wegener *et al.*,2000)是最普遍的做法。而近年來細胞阻抗分析已不再侷限於細胞數目的行為分析，進一步在晶片上加入多功能的感測器來記錄環境的變數，如酸鹼感測器(pH sensor)、氧氣感測器(pO<sub>2</sub> sensor)和溫度計等，提供更

多細胞生長代謝的訊息之方法亦被提出(Ehret *et al.*,2001 ; Henning *et al.*,2001 ; Otto *et al.*,2004)。然而這些電極的製作成本都很高，而且在製程上也頗為繁雜。

在測量的方法上，上述分析大都以交流訊號來做阻抗的量測，這是因為細胞膜如同電容器一般有隔離直流耦合交流的特性，因此必須使用交流訊號來對細胞進行量測。其中傳統的細胞阻抗分析是以 1V 的正弦交流信號通過一個 1M $\Omega$  限流電阻串聯到細胞待測電極，這使得流經細胞的電流將會被控制在 1 $\mu$ A 以下，再藉由鎖相放大器量測細胞樣本兩端的微小電壓進一步做分析(Giaever and Keese,1991)。也因為其測量電路中的電流小於 1 $\mu$ A，且所需的測量時間極為短暫，因此對細胞正常的生理並無影響，所以可以視為一種非破壞性的細胞行為感測器，也可以連續觀察哺乳類細胞形態的改變(Giaever and Keese,1993)。此外，也有學者使用電感-電阻-電容計(LRC-meter)取代鎖相放大器來量測電阻值及電容值(Ehret *et al.*,1998)。

因為細胞膜的電容特性使得細胞阻抗對通過的電流頻率極其敏感，因此選擇適當的測量頻率亦是細胞阻抗分析中成功與否的一大因素。傳統的細胞阻抗分析對於電阻值的量測在使用 4kHz 的交流電流偵測時有最大的靈敏度，而電容值的測量則以 40kHz 的交流電流有較大的變化量。在上述的電流頻率下，隨著細胞貼附的數量增加，電阻

值的測量確實會隨之上升，而電容值則會下降。且細胞數的變化反應在電容值的變化較之在電阻值的變化上有較好的線性關係(Wegener *et al.*,2000)。

在應用上，目前細胞阻抗分析已被利用在細胞貼附、細胞運動、化學刺激或藥物作用等細胞實驗中(Keese and Giaever,1994)。在一些電穿孔的實驗中，甚至使用較高的電壓來達到細胞膜穿孔的目的，再以小電壓對細胞行為做連續性的觀察(Ghosh *et al.*,1993)。在這類實驗中多使用 5V 的電壓將微小電極上方的細胞做電穿孔使細胞死亡，在單層培養的細胞中形成人工的創傷，藉由這個方法可用來觀察細胞創傷復原的能力(Wegener *et al.*,2002；Keese *et al.*,2004)。近年來因為細胞阻抗分析技術的成熟，已被廣泛的應用在：細胞間的邊界功能(Tirupathi *et al.*,1992；Moy *et al.*,2000)、PGE<sub>2</sub>/cAMP 對細胞形態的影響(Smith *et al.*,1994；Reddy *et al.*,1998)、一氧化氮與血管增生素誘導創傷的癒合(Noiri *et al.*,1997,1998)、物理性水流刺激表皮細胞(DePaola *et al.*,2001)等細胞研究中，作為非破壞性檢測的工具。

在研究的細胞種類中，細胞阻抗分析已經實際應用在許多不同的細胞上，例如：纖維母細胞(fibroblast)(Giaever and Keese,1984,1991；Ghosh PM *et al.*,1993；Smith *et al.*,1994；Reddy *et al.*,1998；Nguyen *et al.*,2004；Xing *et al.*,2005)、上皮細胞(endothelial cell)(Tirupathi *et*

*al.*,1992;Lo *et al.*,1995;Noiri *et al.*,1997,1998;Moy *et al.*,2000;Wegener *et al.*,2000 ; DePaola *et al.*,2001 ; Keese *et al.*,2002) 、星狀細胞 (astrocyte)(O'Connor *et al.*, 1993) 、腎細胞(kidney cell)(Wegener *et al.*,2002 ; Keese *et al.*,2004) 、肝癌細胞(Yeon and Park,2005 ; Guo *et al.*,2006) 、表皮性癌細胞(Yu *et al.*,2006)等，這些細胞包括細胞株(Cell line)或是初級培養(Primary culture)的細胞，其均已被證實可以非破壞性地連續量測。雖然細胞阻抗分析已被應用在許多細胞研究中，但在細胞蛋白質的量測上仍無相關的報導。

## 第二節、電學生物感測晶片之概況

目前以電學方法進行量測的生物感測晶片大致可分為兩類，一類為 DNA 片段的感測器；另一類為測量蛋白質的免疫晶片。

在 DNA 片段感測器中，學者們在電極上設計不同的連結物來抓取 DNA，並以電化學阻抗分析的方法研究與電極表面連結的 DNA。利用貼附在銀電極上的 Avidin 偵測帶有 DNA 片段的 Biotin(Yan and Sadik,2001)；將 DNA 片段連結在金電極上作偵測(Long *et al.*,2003)等，這些研究皆發現，當與電極介面連接的 DNA 分子量越大時，所量測的電阻也越大。另也有利用 DNA 可以連結到金表面的特性，使加入的金粒子連接在金電極之間形成通路(Shiigi *et al.*,2005)；或使用

帶有金粒子的 Avidin，在銀電極之間接上帶有 Biotin 的雙股 DNA，造成阻抗降低(Möller *et al.*,2005)。然而連接金粒子的這兩種方法中，當與 DNA 連結的量越多時，所量測到的電阻反而會越低。

關於免疫晶片，主要是利用抗原抗體特異性結合的原理來對蛋白質做量測，其方法是將抗原蛋白塗佈在半導體表面，以測量其電容特性的改變。研究結果發現當抗原抗體結合時，電容的測量值將會下降(Berney *et al.*,1998)此外；也有在導電性高分子表面接上抗體，以測量抗原抗體結合後導電性的變化，研究發現也發現隨著待測抗原濃度的增加，導電度的變化也越大(Kanungo *et al.*,2002)。

而這些檢測晶片的樣本皆需取自於 DNA 的萃取液或蛋白質的萃取液，樣本的準備如傳統的檢測方法，都需先將實驗細胞破壞，所以還是難以對單一樣本做連續性的測量。目前電學量測的分析方法，在活細胞蛋白質表現的研究中仍未有報導。

### 第三節、ITO 在生物醫學的研究

ITO 在工業上原為平面顯示器與觸控面板等的重要零組件，但生物學家也發現 ITO 與細胞之間有很好的相容性，所以開始有以 ITO 取代金、鉑這類貴金屬來做細胞電刺激的相關實驗(Wong *et al.*,1994；Aoli *et al.*,1996；Qiu,1998)，更有學者比較金、鉑、ITO 所

製作的神經晶片，結果發現在 ITO 電極表面，神經細胞可以生長且發展出類似突觸的結構，神經細胞的生長椎也可與 ITO 電極表面緊密結合(Bieberich and Guiseppi-Elie,2004)。另一方面，在 ITO 施以強電場導致細胞破壞的實驗當中，發現在 20V 以上的脈衝對細胞有明顯的生理影響，在 70V 以上的脈衝則有明顯細胞死亡的情況，此研究指出與金、鉑相較，ITO 本身的導電性雖然比較差，但因為價格便宜且具有可拋棄的特性，可以降低細胞電極晶片的製作成本(Tomai,2003)。

因此近年來 ITO 在生物醫學領域已被使用做為各式感測器的電極材料，諸如：神經細胞晶片(Neurochip)(Bieberich and Guiseppi-Elie, 2004；Buitenweg *et al.*,1998；Kimura *et al.*,1998；Schmidt *et al.*,1997)、細胞電刺激實驗(Cell electrical stimulation)(Wong *et al.*,1994；Qiu *et al.*,1998；Kojima *et al.*,1991)、電泳晶片(Capillary electrophoresis)(Hsieh and Whang,2006)、蛋白質晶片(Protein microarrays)(Yamamoto *et al.*,2002；Liron *et al.*,2002；Konry *et al.*,2005；Cummins *et al.*,2006)、基因晶片(DNA biosensor)等晶片的電極材料(Armistead and Thorp,2001；Lee *et al.*,2003,2005；Pan and Rothberg,2005；Arora *et al.*,2006)與許多電化學生物感測器(Electrical chemistry biosensors)的

電極材料(Mitsubayashi *et al.*,2003; Chaubey *et al.*,2003 ; Sharma *et al.*,2004) , 由此可見 ITO 玻璃的應用已不侷限於工業，其已成為生物晶片感測器材料的明日之星。

其中 ITO 透明的特性尤其很適合用於細胞實驗中，此特性可方便在光學顯微鏡下觀察細胞的形態。早期學者的應用還未在 ITO 上加入電場，將 ITO 蝕刻成網狀的座標格，藉由製造的網格刻度在顯微鏡下觀察中樞神經細胞的形態，如長度、大小等。此研究指出 ITO 網格經過六個月重複的使用後，並無偵測到有任何細胞毒性(Lucas *et al.*, 1985)。在加入電場的實驗觀察中，將細胞培養在 ITO 表面與一般塑膠培養盤上比較，無論是否有在 ITO 上施加電場，DNA 的合成量在各組都無顯著的差異。也說明了在電流密度  $20\mu\text{A}/\text{cm}^2$  下並不會影響纖維母細胞的貼附、伸展及生長(Wong *et al.*,1994)。在顯微鏡下觀察細胞生長於 ITO 表面的情形中，也發現細胞對 ITO 有相當好的貼附性(Aoki *et al.*,1996)。除了藉由 ITO 做為細胞電刺激的電極或作為觀察細胞貼附行為的材料以外，其也被利用在觀察細胞外觀形態與蛋白質的表現上(Qiu,1998)。

## 第三章、材料與方法

### 第一節、細胞培養

#### 1. 藥品配製

##### 1.1. 細胞培養基

本研究使用 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) /High Glucose 培養基(SH30022.02, HyClone Co., Utah, USA)，其中含有 10% 已經加熱去活化的小牛血清(Bovin calf serum)(SH30073.03, HyClone Co.)和 1% 10000 unit/mL 的 Penicillin and Streptomycin solution(SV30010, HyClone Co.)，在經過 STERITOP™ 0.22 $\mu$ m membrane (SCGPT05RE, MILLIPORE Co., MA, USA)的抽氣過濾後冷藏於 4°C 備用。

##### 1.2. PBS (phosphate-buffered saline)

磷酸鹽緩衝液(PBS)是作為細胞清洗或藥品稀釋的溶液，其為每公升去離子水(DI water)中含有 0.2 克的 KCl、0.24 克的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.14 克的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及 8 克的 NaCl，經過飽和水蒸氣、121°C、1.2 kg/cm<sup>2</sup> 之高溫高壓滅菌 20 分鐘後，冷卻且冷藏於 4°C 備用。

## 2. 細胞選取

本研究採用 MG-63 細胞株(BCRC No.60279, 國家衛生研究院細胞庫), 來源是人類骨肉瘤(osteosarcoma), 其為具有許多骨母細胞(osteoblast)特徵的類骨母細胞, 包括擁有表現鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)等特性。

MG-63 所使用的培養基為含有 10%胎牛血清與 1%抗生素的 high glucose DMEM 培養基。並置於 37°C, 5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。繼代培養可使用胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)(Sigma T4174, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)來進行。

## 3. 繼代培養方法

細胞在生長時, 會有生長曲線的表現, 當細胞生長至高密度時, 會造成生長空間過小、培養液的養分不足、細胞的廢棄物過多等, 細胞將會趨向死亡的路徑。所以, 當細胞在培養皿裡達到近八成飽和狀態時, 必須將細胞行以繼代培養 (sub-culture), 以確保細胞可以繼續維持生長。

我們以胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)來進行繼代培養, 胰蛋白酶可將細胞周圍的蛋白質分解成片段, 使細胞可以從培養皿上脫落, 經過減少細胞濃度後再繼續做新的培養, 以達到細胞繼代培養的目的。

10 cm培養皿之繼代步驟如下：將舊的培養液吸去後，使用10 mL PBS 緩衝溶液清洗細胞並將清洗液吸去，此清洗步驟可重複2~3次。加入1 mL的胰蛋白酶使其均勻擴散，並輕拍培養皿底部幫助細胞的脫附，放入37°C培養箱中讓胰蛋白酶作用2分鐘，之後以顯微鏡確認細胞是否完全呈現懸浮狀態。將細胞懸浮液均勻混合，並移除0.75 mL的細胞懸浮液，最後加入10 mL的新鮮培養液至培養皿中，均勻混合且移除氣泡，並置於37°C、5%的CO<sub>2</sub>細胞培養箱中作繼續的培養。

於接種24小時後，即細胞已完成貼附，此時將培養液做更換。並於之後每兩天更換一次細胞培養液。

## 第二節、晶片的製作及實驗設備

### 1. ITO 玻璃晶片之設計與製作

#### 1.1. 晶片本身

本研究使用 350.0×300.0×0.5 mm(L×W×H)的 ITO 玻璃 (GemTech Optoelectronics Co., Taoyuan, Taiwan)為基材，此玻璃母基板上，已濺鍍完成一層厚約 2600 Å 的 ITO 薄膜，表面電阻值約為 5 ( $\Omega/\text{sq}$ )，經表面拋光後可見光穿透率 $\geq 80\%$ 。

ITO 玻璃晶片的大小設計為(76×28 mm)與一般玻片規格相同，電極的形式將被設計成許多不同的規格及樣式。等面積平板間隙電極 (Gap electrodes)，其間隙又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.8mm、1mm、2mm、4mm、5mm、6mm、8mm、10mm 等，如<圖 2>；成對趾狀電極(Interdigital electrode structures, IDES)，其線寬及間距又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm，如<圖 3>；趾狀十倍間隔電極，其線寬又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm，如<圖 4>；趾狀十倍大小差距電極，其小電極之線寬及間距又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm，如<圖 5>。另外也在晶片側邊設計線路接觸片(Fingers)可與邊接頭(Edge Connector)拔插做連結<圖 6>，電極圖案藉由 CAD 軟體繪製並製做成光罩(Photo mask)<圖 7>

在財團法人國家實驗研究院-儀器科技研究中心(ITRC)，我們利用光微影技術(photo-lithography)將 ITO 玻璃晶片製作出來。首先將 ITO 玻璃裁切為 90×80 mm 長方，清洗並置於加熱板(hot plate)上 100°C 乾燥 10 分鐘<圖 8A>。ITO 玻璃經離心塗佈機(spin coater)將光阻(photo resist)(AZ 6112, AZ Electronic Materials Taiwan Co., Ltd.)塗佈在 ITO 層的表面<圖 8B>，經加熱板 90°C 軟烤 5 分鐘，去除光阻大部分溶劑，增加和晶片的附著力<圖 8C>。將預先製作完成的光罩利用光罩對準曝光系統(Mask Aligner System)(MA6, Karl Suss, Germany)將設計好的線路圖形投影在晶片上<圖 8D>。我們使用的是正光阻，在顯影(development)過程中，顯影液(KTD-1, Kemitek Industril Co., Hsinchu, Taiwan)將經過光照分解的光阻層除去，保留未曝光部分的光阻層可以保護底下的 ITO<圖 8E>。經 120°C 將光阻中樹脂成分烤硬<圖 8C>，以利於後續蝕刻處理。蝕刻以 ITO 蝕刻液(EG-462 ITO Etch, eSolv Technology Co., Taipei, Taiwan)蝕刻無光阻保護的 ITO 部分<圖 8F>，最後以丙酮移除剩餘的正光阻部分，如此已完成 ITO 的電極在玻璃母基板上的製作<圖 9>。之後再以烏鋼刀裁切玻璃晶片成確切的大小，經細部磨邊導角之後成為我們實驗使用的晶片<圖 10>，詳細的流程見<表 1>。

## 1.2. 晶片上細胞培養格之建立

本研究選用可重複使用 8-well 的矽膠格(flexiPERM® 90032039, Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)<圖 11A>貼附在 ITO 電極晶片<圖 11B>上以製造八個細胞培養格<圖 11C>。此矽膠格包含八格分隔，適合貼附在玻片等平滑表面，具有化學穩定性且可重複清洗、重複高溫高壓滅菌及可重複組合使用的優點。

## 1.3. 清洗及滅菌

進行細胞培養實驗前晶片以超音波清洗機進行晶片清洗，以清潔劑、丙酮、去離子水各 15 分鐘，每道清洗後皆以去離子水沖洗。晶片以氮氣(N<sub>2</sub> stream)吹乾後放進烘箱中乾燥。

8-well flexiPERM®以清潔劑、70%酒精、去離子水，超音波清洗各 15 分鐘，每道清洗後皆以去離子水沖洗。吹乾後將 flexiPERM®與晶片組合，以(飽和水蒸氣,120°C,1.2 kg/cm<sup>2</sup>)高溫高壓滅菌(Autoclave) 20 分鐘後乾燥備用。

## 2. 實驗測量設備

### 2.1. 測量原理

參考傳統細胞阻抗分析的測量方法(Xiao and Luong,2005)，我們以鎖相放大器(SIGNAL RECOVERY Model 7225 DSP Lock-in Amplifier, AMETEK Inc., TN, USA)作為測量的主要工具。利用鎖相放大器測量的相內(in-phase)電壓值即 X 輸出( $V_X$ )及相外(out-of-phase)電壓值即 Y 輸出( $V_Y$ )，計算出電阻及電容抗。

在交流 R-C 電路中，總阻抗 Z(impedance)包括了電阻抗 R(resistance)的部分及電容抗  $X_C$ (capacitive reactance)的部分。其中通過電容器的電壓將落後電流  $90^\circ$ 。若以複數平面來表示，阻抗包括了實部(real)電阻抗的部分以及虛部(image)電容抗的部分，如(式 1)。

$$Z = R - j X_C \quad (\text{式 1})$$

依據分壓定理推算與限流電阻串聯的帶測物阻抗，電阻抗與電容抗可個別表示為(式 2)。  $R_0$ :  $1M\Omega$  限流電阻，  $V_0$ : 1V 參考訊號，  $V_X$ : 相內電壓測量值，  $V_Y$ : 相外電壓測量值。

$$R = R_0(V_X/V_0)$$

$$X_C = R_0(V_Y/V_0) \quad (\text{式 2})$$

## 2.2. 設備架構

與晶片直接連結的是信號切換盒(Switch Box)，它用於切換欲偵測的細胞格(well)，由電腦軟體控制切換器去指定哪一塊晶片上的哪一格要被偵測，來達到多個樣本的自動量測。信號切換盒的內部電路以數位訊號控制類比多工器(Analog multiplexer)選擇且驅動磁簧開關(Relay)，藉此打開欲量測的細胞格，其電路設計如<圖 12>；信號切換器的外部則密封處理，使其可置於細胞培養箱中與待測晶片連結<圖 13>。

實驗設備的架設如<圖 14>所示。阻抗量測以鎖相放大器作為工具。由鎖相放大器提供 1V 不同頻率(100~100K Hz)的參考交流訊號，經過  $1\text{M}\Omega$  金屬皮膜電阻串聯至待測樣本後到地，再由鎖相放大器測量待測樣本兩端的相內(in phase)電壓及相外(out-of-phase)電壓，依前述公式(式 2)分壓定理可以推算串聯電路中樣本的電阻抗(resistance)值與電容抗(capacitive reactance)值。

儀器控制的部分，藉由 LabVIEW™(National Instrument Co., TX, USA)我們自行撰寫開發控制程式，透過電腦 RS-232 介面連結鎖相放大器，做參數控制、程式化測量、數據擷取以及資料的記錄，並透過這台鎖相放大器的數位輸出埠(Digital output port)來間接控制我們的訊號切換盒(Switch Box)。

### 2.3. 自動控制、數據的擷取、儲存與分析

儀器控制、數據的擷取與儲存由電腦程式所負責。我們使用 LabVIEW™ 撰寫程式，程式透過電腦 RS-232 介面與鎖相放大器連結溝通，自動控制鎖相放大器的各種參數及功能，如：參考信號的振幅及頻率、參考信號的相位、測量時的靈敏度及時間常數等等...。同時也由鎖相放大器的數位輸出埠(Digital output port)來間接控制我們的訊號切換盒(Switch Box)，選擇量測的細胞格(well)。並且依指定的時間間隔做不同時間點的量測，達到連續量測的目的，最後再將這些不同時間點、不同細胞格的測量結果儲存成檔案，以此檔案再由另一程式做進一步的資料換算及作圖。簡易的程式流程如<圖 15>。程式之人機介面圖示於<圖 16>。

### 第三節、玻璃與 ITO 表面之細胞培養實驗

雖然如 Adrenal chromaffin cells (Aoki *et al.*,1996)，等許多細胞生長在 ITO 表面能有很好的貼附、伸展現象。可是卻沒有文章確切地研究我們使用的細胞株 MG-63 培養在 ITO 表面的形態是否正常。此外在我們的晶片上擁有 ITO 電極的部分以及非電極的玻璃部分，所以必須先驗證 MG-63 在玻璃及 ITO 表面的生長情形是否一致。

我們將玻璃和 ITO 的試片裁切成 1×1 cm 正方，每組有 6 片共 12 片，經過前述的晶片清洗步驟後放在玻璃皿中高溫高壓滅菌 20 分鐘，烘乾後將試片置於 12-well plate，每格一片，並且使用三用電表檢查 ITO 組的正反面。ITO 層必須朝上，細胞才可以貼附在 ITO 的那一面。

詳細實驗流程如下：進行胰蛋白酶去貼附後的細胞以培養基稀釋使其懸浮，利用血球計數盤(Hemocytometer)計算細胞懸浮液的細胞密度，並將細胞培養成  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>，每格 1 mL，最後置於 37°C，5% 的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。在接種後 24 小時，即等待細胞貼附完成後視為第 0 天，並於每 12 小時以相機拍照記錄一次，連續觀察三天。觀察細胞形態外，也計算細胞生長的密度製作成生長曲線。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

## 第四節、ITO 電極選擇實驗

‘單一樣本的連續量測’是本晶片的重要特色，在細胞阻抗分析的研究中，Giaever 和 Keese 已經有相當多的成果(Giaever and Keese,1993; Keese and Giaever,1994)。然而不同的是，我們的晶片以 ITO 做為電極，電極的設計也有所不同，所以我們必須以不同的 ITO 電極形式來培養 MG-63 細胞，並利用細胞生長所產生的數量變化，從許多不同樣式的 ITO 電極中找出擁有最佳靈敏度的電極形式。

詳細實驗流程如下：進行胰蛋白酶去貼附後的細胞以培養基稀釋使其懸浮，利用血球計數盤(Hemocytometer)計算細胞懸浮液的細胞密度，並將細胞密度稀釋成  $2 \times 10^4$  cells/mL 培養在晶片上，實驗組中每格加入 300 $\mu$ l 的細胞懸浮液；控制組每格則加入 300 $\mu$ l 的新鮮培養基。最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。在接種後 24 小時，即等待細胞貼附完成後視為第 1 天，並於每 24 小時將晶片拿出細胞培養箱，與訊號切換盒連結，並量測晶片在不同頻率下測量的阻抗 (100~100k Hz, 共 28 個頻率)，連續 4 天記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，並將每天之測量值減去第 1 天的測量值作為”電阻抗變化值”(ΔR)，進一步作圖比較。

## 第五節、細胞阻抗之量測實驗

### 1. 不同細胞濃度之 MTT、WST-1 與阻抗量測

MTT 與 WST-1 是傳統用於測量細胞活性或估算細胞數量的方法。MTT 與 WST-1 經由粒線體代謝後，形成不同顏色的化合物，藉由量測特定波長的吸光值，可以了解細胞的活性或細胞數量。

我們將處理以胰蛋白酶去貼附後的細胞以培養基稀釋使其懸浮，利用血球計數盤計算細胞懸浮液的細胞密度，並將細胞密度稀釋成七種不同的濃度， $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ (cells/mL)培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的培養基。相同的培養方式培養三組晶片(每組有兩片)，一組用於測量阻抗、其他兩組等待 MTT 與 WST-1 的測量。最後將晶片置於 37°C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。

## 1.1. 阻抗量測

待細胞接種後 24 小時，阻抗測量組與訊號切換盒連接，設定以 4000Hz 每 2 分鐘自動測量一次，連續 1 小時記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ ，並將這一小時之數據作平均及統計。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

## 1.2. MTT

待細胞接種後 24 小時，每格細胞加入 30 $\mu$ L 的 MTT(M5655, Sigma, MO, USA)。於 37 $^{\circ}$ C 培育 4 小時後，吸去上清液，並補上 330 $\mu$ L 的 DMSO 均勻混和。最後取 100 $\mu$ L 至 96 孔盤，並將測定波長設於 570nm、參考波長設於 690nm 讀取吸光值。

## 1.3. WST-1

待細胞接種後 24 小時，每格細胞加入 30 $\mu$ L 的 Cell Proliferation Reagent WST-1(1644807, Roche, NP, Germany)。於 37 $^{\circ}$ C 培育半小時。均勻混和後取 100 $\mu$ L 至 96 孔盤，並將測定波長設於 450nm、參考波長設於 690nm 進行吸光讀值。

## 2. 細胞生長曲線之量測

利用上個實驗中找到靈敏度較佳的幾種電極形式，接下來使用這些電極來對細胞進行更長時間的連續觀察，目的是希望可以觀察到整個細胞生長或凋亡的變化。

我們的晶片組經過滅菌乾燥後，每組晶片上有 8 個細胞培養格。進行胰蛋白酶去貼附後的細胞以培養基稀釋使其懸浮，利用血球計數盤計算細胞懸浮液的細胞密度，並將細胞密度稀釋成  $2 \times 10^4$  cells/mL 培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的新鮮培養基。最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5% 的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。於接種後 24 小時，即等待細胞貼附完成後視為第 1 天，並於每 24 小時將晶片拿出細胞培養箱，與訊號切換盒連結，並量測晶片在 4000Hz 下的電阻抗與電容抗，連續 11 天拍照記錄細胞的形態，並記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ 。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換，即細胞生長到飽和後會因為培養基養分耗盡而死亡。

### 3. 細胞貼附之連續阻抗量測

以上實驗中，阻抗測量與量測之間的時間間隔為 24 小時。在這個實驗中，我們將使用較短的時間間隔做自動的量測，來觀察細胞由懸浮狀態到貼附、伸展的這些行為。另一方面，也將訊號切換盒密封以隔絕水氣，並將它置於細胞培養箱中與晶片連結，好讓電腦程式做完全自動的量測與記錄。

我們將進行胰蛋白酶去貼附後的細胞以培養基稀釋使其懸浮，利用血球計數盤計算細胞懸浮液的細胞密度，並將細胞密度稀釋成  $5 \times 10^4$  cells/mL 培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的培養基。最後將晶片置於 37°C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中，並與訊號切換盒連接。設定在 4000Hz 下每 5 分鐘自動測一次，連續 24 小時記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ 。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

## 第六節、細胞膜蛋白之偵測

本研究針對細胞膜蛋白 Integrin  $\beta 1$ ，使用免疫染色的相關概念，在培養液中加入抗體來抓住細胞膜上的 Integrin  $\beta 1$  蛋白。在這些實驗中使用的抗體分為兩類：主要用來辨識膜蛋白的第一級抗體，以及用於標示一級抗體的第二級抗體。

在第一級抗體中，一為 mouse anti- human Integrin  $\beta 1$  IgG (sc-9970, Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA)可連結細胞表面的 Integrin 蛋白；另一個作為對照的 rabbit anti-Rat Ig (P0450, DakoCytomation, Denmark)，將不與任何細胞膜蛋白結合。

在第二級抗體中，一為帶有直徑 10nm 金粒子的 goat anti-Mouse IgG-Au (25129, Electron Microscopy Sciences, PA, USA)，原為電子顯微鏡所使用的免疫標示抗體；另一為帶有綠色螢光的 goat anti-Mouse IgG-FITC (sc-2010, Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA)，可用於螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡的觀察。

## 1. 不同濃度的 anti-Integrin 一級抗體之阻抗量測

第一級抗體使用 mouse anti-human Integrin  $\beta 1$  IgG；無使用第二級抗體。

將  $5 \times 10^4$  cells/mL 的細胞培養在晶片上，實驗組(共 4 格)加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組(共 4 格)則加入 300 $\mu$ L 的新鮮培養基，最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。於接種後 24 小時，即細胞貼附完成，在晶片上分別加入不同稀釋倍數的一級抗體，100 倍稀釋(1:100)、300 倍稀釋(1:300)、500 倍稀釋(1:500)、以及不加抗體。並設定以 4000Hz 每 5 分鐘自動量測一次，且記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ 。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

## 2. 金粒子抗體連結細胞膜蛋白 Integrin $\beta$ 1 之阻抗量測

第一級抗體使用 mouse anti-human Integrin  $\beta$ 1 IgG；第二級抗體則為帶有奈米級金粒子的 goat anti-Mouse IgG-Au。

將  $1 \times 10^5$  cells/mL 的細胞培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的新鮮培養基，以前述之相同方式培養在 A、B 兩片晶片中。最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。於接種後 24 小時，即細胞貼附完成，在 A 晶片上分別加入一級抗體、二級抗體、一級加二級抗體、不加抗體，其抗體加入細胞培養液後濃度為原始的 1/50 倍(1:50)；在 B 晶片上其抗體加入細胞培養液後濃度為原始的 1/100 倍(1:100)。並設定以 4000Hz 每 5 分鐘自動量測一次，且記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ 。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

### 3. 不同一級抗體之阻抗量測

第一級抗體使用 mouse anti-human Integrin  $\beta 1$  IgG，以及 rabbit anti-Rat Ig；第二級抗體則為帶金粒子的 goat anti-Mouse IgG-Au。

將  $5 \times 10^4$  cells/mL 的細胞培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的新鮮培養基，最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。於接種後 24 小時，即細胞貼附完成，在晶片上分別加入 anti-Integrin 一級抗體加二級抗體、anti-Rat 一級抗體加二級抗體、只加二級抗體、不加抗體，其抗體加入細胞培養液後濃度為原始的 1/100 倍(1:100)。並設定以 4000Hz 每 5 分鐘自動量測一次，且記錄鎖相放大器的 X 輸出及 Y 輸出，以進一步換算電阻抗值及電容抗值，且將實驗組減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$ 。在實驗過程中，皆不做任何細胞培養液的更換。

#### 4. 細胞免疫螢光染色

第一級抗體使用 mouse anti-Integrin  $\beta 1$  IgG；第二級抗體則改使用帶螢光的 goat anti-Mouse IgG-FITC。

將  $1 \times 10^4$  cells/mL 的細胞培養在晶片上，實驗組的 4 格各加入 300 $\mu$ L 的細胞懸浮液；對側之控制組的 4 格則各加入 300 $\mu$ L 的新鮮培養基，最後將晶片置於 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中。於接種後 24 小時，即等待細胞貼附完成後，以 PBS 對細胞作清洗兩次，並以 4% paraformaldehyde 室溫固定 15 分鐘，再以 PBS 清洗兩次。隨後細胞以 EtOH 95% / CH<sub>3</sub>COOH 5% 在 -20 $^{\circ}$ C 穿孔 15 分鐘，並以 PBS 清洗三次每次 5 分鐘。加入一級抗體，於 4 $^{\circ}$ C 過夜培育，之後以 PBST 清洗兩次；加入二級抗體，於室溫培育 1 小時，之後以 PBST 清洗兩次。免疫螢光染色完成後，加上蓋玻片封片，最後螢光顯微鏡以激發光 488nm 及發射光 530nm 觀察。

## 5. Integrin 膜蛋白之定量試驗

將細胞以四種不同的濃度， $5 \times 10^5$  cells/mL、 $2.5 \times 10^5$  cells/mL、 $1.2 \times 10^5$  cells/mL、 $5 \times 10^4$  cells/mL，培養於晶片及 96 孔盤中。

待接種細胞 24 小時後加入抗體。於晶片實驗組中加入 mouse anti-Integrin  $\beta 1$  IgG 及帶金粒子的 goat anti-Mouse IgG-Au；對照組則加入 PBS 及帶金粒子的 goat anti-Mouse IgG-Au。並且置於細胞培養箱中與儀器連結，連續量測 24 小時。

96 孔盤待細胞接種後 24 小時後做免疫螢光染色。第一級抗體使用 mouse anti-Integrin  $\beta 1$  IgG；第二級抗體則使用帶螢光的 goat anti-Mouse IgG-FITC。在細胞培養箱中與細胞共同培養，於第 48 小時結束實驗，並以 PBS 清洗 96 孔盤三次，移去液體後利用多功能微盤分析儀(Chameleon, Hidex, Turka, Finland)於激發光 485nm 及發射光 535nm 讀取螢光密度之數值。

最後將晶片第 48 小時之電阻抗變化量與螢光讀值做相關比較及分析。

## 第四章、結果

為了瞭解細胞在晶片表面的生長行為，我們分別將 MG-63 細胞培養在玻璃表面及 ITO 表面上，觀察細胞的形態以及生長曲線。在細胞形態上利用光學顯微鏡做觀察，在接種後 24 小時可以發現，無論是在玻璃組或是在 ITO 組中，細胞的貼附情況都相當良好，在細胞形態上不論是生長於玻璃上的細胞，還是生長於 ITO 表面上的細胞，均保持良好的扁平梭狀之形態，且並沒有觀察到細胞程式性凋亡 (Apoptosis) 或壞死 (Necrosis) 的現象<圖 17>。此外，在每 12 小時所觀察的細胞數目中，隨著培養天數的增加，玻璃上細胞的數目由  $10.0 \pm 0.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 慢慢增加到  $40.8 \pm 3.3 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>；ITO 上細胞的數目由  $10.3 \pm 1.1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 慢慢增加到  $46.6 \pm 1.1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>。將每次計算的細胞數製作成細胞生長曲線，並將玻璃組與 ITO 組的生長曲線加以比較，我們發現兩條曲線幾乎是重疊在一起，在前二天的實驗中並沒有顯著的差異<圖 18>。

在尋找靈敏度較佳的電極中，經幾次實驗測試，我們把每 well 不同天的阻抗測量值減去第 1 天的測量值作為變化量。由於電容抗在不同頻率時於不同天之測量值皆無明顯的變化，而電阻抗測量值有較明顯的改變，且多在 4000Hz 有最大的測量差異，所以在接下來的實驗

中，我們都以 4000Hz 之電阻抗測量值作為我們實驗之數據<圖 19>。其於以上的結果，我們以電阻抗之變化量從 28 種不同的電極樣式中選出了 4 種較佳的樣式，如<圖 20>所示；其分別為 A 電極、B 電極、C 電極及 D 電極。由此圖可以看出，隨著細胞數目的增加，這 4 種電極均有上升趨勢及明顯的上升變化量。

當以 A 電極進行細胞培養時，可以發現隨著時間的增加，電阻變化值在四天中均有上升，其第 4 天的變化量為  $31.00 \pm 5.35 \Omega$  較第 2 天  $10.25 \pm 3.28 \Omega$  明顯增加了 202% ( $p < 0.05$ )。同理在 B、C、D 電極中進行相同的分析，亦發現隨著時間的增加電阻變化值均有上升的情形，分別為：B 電極第 4 天的平均值為  $19.00 \pm 4.86 \Omega$  較第 2 天  $3.67 \pm 4.08 \Omega$  明顯增加了 418% ( $p < 0.05$ )；C 電極第 4 天的平均值為  $50.25 \pm 8.51 \Omega$  較第 2 天  $9.25 \pm 1.49 \Omega$  明顯增加了 443% ( $p < 0.05$ )；D 電極第 4 天的平均值為  $81.00 \pm 9.20 \Omega$  較第 2 天  $8.75 \pm 2.38 \Omega$  明顯增加了 826% ( $p < 0.05$ )。其中以 D 電極之變化量最大，第 4 天較第 2 天成長之百分比分別為 A、B、C 電極的 4.09 倍、1.98 倍、1.86 倍<圖 21>。因為 D 電極有最大的變化量，即擁有較佳的靈敏度，所以我們選用這個電極來做為接下來實驗所使用的電極。

細胞阻抗量測的實驗中，我們將細胞組的電阻抗測量值減去對側控制組的測量值作為  $\Delta R$  值，作為我們的實驗數據。

在不同細胞濃度下所測得的  $\Delta R$  值，於最高濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL 可測得平均值  $89.04 \pm 1.32 \Omega$ 、於最低濃度  $5 \times 10^2$  cells/mL 測得平均值  $0.11 \pm 2.45 \Omega$ ，高低值相差  $88.93 \Omega$ ，其可偵測最低細胞濃度約為  $1 \times 10^4$  cells/mL<圖 22>。在不同細胞濃度下所測得的 MTT 吸光值，可於最高濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL 測得平均值  $0.3743 \pm 0.0391$ 、於最低濃度  $5 \times 10^2$  cells/mL 測得平均值  $0.0313 \pm 0.0017$ ，高低值相差  $0.3430$ ，其可偵測最低細胞濃度約為  $1 \times 10^4$  cells/mL<圖 23>。在不同細胞濃度下所測得的 WST-1 吸光值，可於最高濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL 測得平均值  $0.3160 \pm 0.0264$ 、於最低濃度  $5 \times 10^2$  cells/mL 測得平均值  $0.1525 \pm 0.0064$ ，高低值相差  $0.1635$ ，其可偵測最低細胞濃度約為  $1 \times 10^3$  cells/mL<圖 24>。

若將  $\Delta R$  值與 MTT 吸光值作相關性分析， $R^2=0.9883$ ，p 值小於  $0.005$ ，顯示有極高的線性相關<圖 25>。若將  $\Delta R$  值與 WST-1 吸光值作相關性分析， $R^2=0.9599$ ，p 值小於  $0.001$ ，也顯示有極高的線性相關<圖 26>。

以我們的晶片觀測 MG-63 的生長曲線，記錄長達 11 天的阻抗變化。當細胞隨生長天數增加時，我們發現  $\Delta R$  值也隨之明顯的增加，並在第 7 天達到最大值  $246.00 \pm 29.35 \Omega$ ，即細胞在第 7 天時生長達到飽和。此時  $\Delta R$  值也從第 1 天的  $57.50 \pm 17.69 \Omega$  上升至  $246.00 \pm 29.35$

$\Omega$ ，此時為最大值，其上升的變化量為 328%；第 7 天後，細胞趨向死亡， $\Delta R$  也隨著細胞死亡明顯的降低<圖 27>，且在顯微鏡的觀察中，在第 7 天細胞生長達到最大的密度之後，細胞形態開始不完整，且有破裂、死亡的現象，即其已有趨向死亡的情況<圖 28>。其中  $\Delta R$  之標準差也隨細胞死亡程度而增大，這可能是因為細胞以不同的死亡方式所造成的，也是典型細胞生長曲線會發生的現象，這結果如同文獻中的發現(Yeon and Park,2005)。

觀察細胞的貼附行為中，細胞從懸浮狀態慢慢沉降至晶片表面，並貼附延展開來。 $\Delta R$  值由細胞接種後從  $0\Omega$  開始慢慢增加，到第 4 個小時達到最大值  $126\Omega$ ，並趨向緩和，即所有細胞於 4 小時內貼附且延展完成<圖 29>。

在細胞膜蛋白的偵測實驗中，利用抗體來針對細胞膜上的 Integrin  $\beta 1$  蛋白作研究。在加入不同稀釋倍數的 mouse anti-human Integrin  $\beta 1$  後 24 小時，稀釋 100 倍的  $\Delta R$  值最高平均為  $88.64 \pm 2.25\Omega$ 、稀釋 300 倍的  $\Delta R$  值平均為  $84.64 \pm 1.80\Omega$ 、稀釋 500 倍的  $\Delta R$  值平均為  $80.18 \pm 1.99\Omega$ 、不加抗體的  $\Delta R$  值為最低，平均為  $78.73 \pm 2.05\Omega$ 。加入越高濃度的 mouse anti-Integrin  $\beta 1$  有越高的  $\Delta R$  值<圖 30>。

在加入一抗(mouse anti-Integrin  $\beta 1$ )與帶金粒子的二抗(goat

anti-Mouse IgG-Au)的實驗中，只加二抗的  $\Delta R$  值為最高；一抗加二抗的  $\Delta R$  值會比只加二抗低；而只加入一抗的  $\Delta R$  值也比只加二抗低；不加任何抗體的控制組為最低。相同的結果出現在抗體稀釋 100 倍的 A 晶片<圖 31>以及抗體稀釋 50 倍的 B 晶片<圖 32>。

若將無法與細胞膜結合的抗體(rabbit anti-Rat Ig)來作比較，anti-Rat Ig 加上帶金粒子的二抗， $\Delta R$  值反而會比只加二抗來得高<圖 33>。一抗為 anti-Integrin 時，加入二抗的  $\Delta R$  值會比只加二抗為低，與<圖 31,32>相同。

進一步將細胞作免疫螢光染色，可以在螢光顯微鏡下清楚看到 FITC 的綠色螢光<圖 34,A>，與光學顯微鏡下的影像<圖 34,B>作比對，可以發現螢光均勻的分佈在細胞上。

在嘗試對細胞膜 Integrin 蛋白定量的結果中，當培養的細胞濃度越高時，可測得越高的電阻抗變化量：當初始濃度為  $5 \times 10^5$  cells/mL 時，於第 48 小時測得  $37\Omega$ 、 $2.5 \times 10^5$  cells/mL 為  $20\Omega$ 、 $1.2 \times 10^5$  cells/mL 為  $14\Omega$ 、 $5 \times 10^4$  cells/mL 為  $11\Omega$ 。且細胞隨時間增生，電阻抗變化量也隨之上升<圖 35>。到了第 48 小時， $5 \times 10^5$  cells/mL 組的螢光讀值測得為  $229.65 \pm 4.52$ 、 $2.5 \times 10^5$  cells/mL 為  $224.39 \pm 3.93$ 、 $1.2 \times 10^5$  cells/mL 為  $221.64 \pm 4.33$ 、 $5 \times 10^4$  cells/mL 為  $217.51 \pm 4.20$ ，即細胞越多有越多的 Integrin 蛋白<圖 36>。將所測得的電阻抗變化量( $\Delta R$ )與螢光讀值作線

性迴歸分析，發現兩者間有良好的線性相關( $R^2=0.9178$ ， $p<0.005$ )<圖

37>。



## 第五章、討論

由玻璃與 ITO 不同表面 MG-63 的培養結果，我們可以推論，我們選用的 MG-63 細胞培養在此晶片上時，不會偏好生長於玻璃上或偏好生長於 ITO 電極上，而且 MG-63 細胞無論在玻璃或 ITO 表面都可以貼附的很好，且正常的生長。但使用 ITO 晶片做長時間的實驗是否對 MG-63 有不良的影響，目前尚缺乏實驗證明，不過在文獻中重複使用 ITO 晶片培養 PC-12 細胞六個月，仍不見不良的影響(Lucas *et al.*, 1985)。此外，我們也發現細胞貼附的情況雖然很好，但以胰蛋白酶(Trypsin)嘗試將在玻璃或 ITO 表面的細胞去貼附時，卻因為 MG-63 細胞與晶片表面結合的太緊密，而無法順利將細胞全部打下來。

在尋找最佳電極樣式的實驗裡，由於採用每 24 小時將晶片拿出培養箱測量的方法，造成一些培養液蒸發的情形，這會影響到測量的結果。在只有培養液的控制組中，我們發現當蒸發量越大時，所量測的電阻值將會越低。由此推論，培養液的蒸發會使剩下培養液的導電性增加，然而這可能是培養液內離子濃度增加所導致。另一方面，我們也曾嘗試將晶片做重複的使用，經過前述超音波清洗機的幾道清洗程序後，發現晶片的靈敏度降低許多，約為新晶片的十分之一。原因可能是 ITO 表面在實驗過程中鍵結了許多有機分子，使得 ITO 有效的電極表面縮小，或細胞貼附環境改變導致貼附行為的變化。在我們

前述的清洗過程中並無法洗去這些附著物，而導致重複使用時靈敏度的降低。如果要讓晶片可以重複使用，未來需要另設計實驗，嘗試其他的清洗程序，例如使用鹼性的洗劑來清洗等。

在測試許多不同的電極樣式時，本研究發現並不是越小或越接近細胞尺寸的電極設計就有越好的靈敏度，反而是間距大的電極會有較佳的表現。因此我們推測，我們所測量到的訊號可能是電極間細胞串連所構成的電阻抗，電極間距越大，所經過的細胞串連越多，所以有越好的靈敏度。另外我們發現隨細胞生長，電阻抗在 4000Hz 有較大的變化量，此結果與其他文獻之研究結果相類似 (Giaever and Keese, 1991 ; Wegener *et al.*, 2000)。

在 ITO 電極的設計中，我們發現在晶片上不同位置的電極將會有一基礎的電阻背景值存在，這是因為 ITO 本身為半導體的緣故，其無法像金、鉑一樣有優良的導電性。所以當 ITO 電極離線路接觸片 (Fingers) 越遠時，所需要經過的連接導線 (ITO) 的長度就越長，因此離線路接觸片越遠的電極，就有越高的電阻背景值。然而，晶片中左右對稱的電極由於經過之導線長度相同，所以擁有相同的電阻背景值。因此，我們將另一邊對稱位置的 well 設計為實驗的控制組，當實驗組的數值減去對側控制組的數值時，即可排除此 ITO 導線長度所造成的電阻效應。此外，經由這樣的背景校正也可以扣除由培養液所造成的

的干擾，如培養液的蒸發或二氧化碳濃度改變所引起的 pH 值改變。

在不同細胞濃度的實驗中，我們以電阻抗量測的方法比對傳統的化學呈色方法(MTT、WST-1)，結果有相當好的線性相關。由此更可以確定細胞數目與  $\Delta R$  值的正相關性，也給予了  $\Delta R$  值可信度的佐證。此外，本研究所開發的晶片在細胞密度  $5 \times 10^4$  cells/mL 以下並無法顯示出差異，因此其偵測極限為  $5 \times 10^4$  cells/mL，與 MTT 法相同。

在連續 11 天細胞生長曲線的觀察中，電阻抗測量值隨著細胞生長的數目而上升，結果完全符合我們的理論假設，這個結果也與傳統 ECIS (Giaever and Keese,1984)或其他學者(Xing *et al.*,2005；Yeon and Park, 2005；Guo *et al.*,2006)的研究結果相符合；實驗中因為培養液養分用盡及細胞廢棄物過多，導致細胞自然死亡使得電阻抗測量值下降的結果，也於文獻中有相同的發現(Yeon and Park,2005)。培養液蒸發的現象，在這次實驗中也使得電阻抗測量值有些微的降低，但經過扣除控制組的測量值已校正這個誤差，這電阻值降低的現象也與文獻中所敘述之情形相符(Yeon and Park,2005)。

細胞貼附的觀察結果，也顯示了  $\Delta R$  值的靈敏度足以精確的觀測細胞貼附的過程，這部份的數據也與文獻中類似(Giaever and Keese,1993；Smith *et al.*,1994)。在 ECIS 的一些文獻中(Giaever and Keese,1993；Wegener *et al.*,2000；Keese *et al.*,2002)均提到電極表面需

要塗佈一層幫助細胞貼附的蛋白質，不過在我們的晶片上並不需要預先塗佈蛋白，MG-63 細胞就能夠獲得相當好的細胞貼附性。

Integrin 是貼附生長的哺乳類細胞普遍擁有的一種細胞膜蛋白，在細胞免疫螢光染色的結果中，可以確定我們所使用的 MG-63 細胞膜上帶有 Integrin  $\beta 1$ ，也證明我們所使用的 mouse anti-human Integrin  $\beta 1$  一級抗體可連結到 MG-63 的細胞膜上<圖 34>。

濃度越高的 mouse anti-Integrin  $\beta 1$  一級抗體，會使  $\Delta R$  值越高，推論是因為加入越濃的一抗會有越多過量的抗體懸浮在培養液中<圖 30>。因此培養液中擁有越多懸浮抗體， $\Delta R$  值也就會越大。再加上帶金粒子的二抗(goat anti-Mouse IgG-Au)後，一抗加二抗[1+2]中，因為連結在細胞膜上的一抗會把部份懸浮的二抗帶到細胞表面，因而使懸浮的抗體總量下降，而使得  $\Delta R$  值比只加二抗[0+2]的實驗組來的低。而只加一抗[0+1]的實驗組因為部份抗體可連結在細胞膜上，所以懸浮的抗體目較少；然而只加二抗[0+2]的實驗組因為沒有一抗的存在，而無法直接連結在細胞膜上，因此抗體的懸浮量為最多， $\Delta R$  值也就最高，如圖<31,32>。在加入另一種無法連結上細胞膜的一抗(rabbit anti-Rat Ig)實驗中，證明了一抗有連結上細胞的能力才能使得二抗連結，導致  $\Delta R$  值的下降。否則，無法連結的一抗(rabbit anti-Rat Ig)加上二抗，也只會使整體懸浮的抗體數目增加，導致  $\Delta R$  值加成上

升的結果<圖 33>。但這一方面的結果仍屬推論而缺乏相關的佐證，其確切機制有待未來做進一步深入的實驗來加以探討。

Integrin 的定量實驗中，如<圖 35>，因為細胞數量越多就會有越多的 Integrin 蛋白，也可以使得越多抗體連結上細胞表面，這可以由螢光染色的讀值中看出。另外，也可以發現當越多的抗體與底層細胞膜蛋白 Integrin 結合，電阻抗變化量有越高的趨勢存在。由此可看出抗體對於不同數量 Integrin 的影響，但其中也有可能是抗體非特異性結合細胞所造成的結果。此外，帶金粒子的二抗在實驗中是增加阻抗或是降低阻抗，目前仍然缺乏相關的證據。

本研究之系統未來也期待可以應用在臨床檢驗上。細胞膜上有一群含醣鏈的蛋白質，作為細胞表面的標記(Surface marker)，不同種類的細胞，表面標記也不盡相同，依照這些表面標記我們可以判別這細胞的類別。在癌細胞方面，每種癌細胞都可能有特殊的表面標記存在，藉由抗體可辨識且連結這些特殊的表面標記。在癌症專一給藥的研究上，將藥物連在抗體上，藥物會因為抗體的專一性，而連結到特定的癌細胞上達到毒殺的目的(Polakis, 2005)。目前關於癌細胞的特定表面標記已有許多報導，在血液細胞方面：CD33 會表現在急性髓性白血病(Acute myeloid leukemia)的細胞表面、CD20 在淋巴癌(Lymphomas)、CD22 在非何傑金氏淋巴瘤(Non-Hodgkins' lymphomas)

等(Polakakis, 2005); 在其他腫瘤方面: HER-2 表現在乳癌(Breast cancer) 細胞表面(Nahta *et al.*, 2006)、CD52 出現在 B 細胞慢性淋巴性白血病 (B-cell chronic lymphocytic leukemia) 中(Waldmann, 2006)、VEGF 與 EGFR(HER-1) 出現在大腸癌(Colorectal cancer) 中(Waldmann, 2006)、PSMA 與 PSCA 在前列腺癌(Prostate cancer) 細胞上(Tricoli *et al.*, 2004)、Akt 與 mTOR 在乳癌(Breast cancer) 細胞(Nahta *et al.*, 2006)、CD44v6 出現在一些淋巴癌(Lymphoma) 和血癌(Leukemia) 細胞上 (Shau *et al.*, 2003)、CA 15-3 在乳癌方面及 CEA 在大腸癌(Shau *et al.*, 2003) 等, 為一些比較確定的表面標記<表 2>。隨著蛋白質體學的進步, 許多細胞表面標記陸續的發現, 且印証這些標記的專一性及相關性, 而利用結合細胞表面標記的癌症抗體藥品也已陸續通過美國 FDA 並上市(Waldmann, 2006)。

但目前在使用抗體連結細胞膜蛋白的相關實驗中, 未來仍有改善的空間, 原因可能是因為不同 well 細胞生長速率不同所造成的干擾, 或是手工製作的晶片品質良莠不齊所造成。在量測靈敏度上, 因為細胞培養液有良好的導電性, 因此大部分訊號都流經上層液體, 而流經細胞的訊號較少, 導致測量結果不明顯的情形。這部份將來可以嘗試以低導電度的細胞培養液來操作而獲得解決; 即藉由增加流經細胞的訊號, 來達到增加其靈敏度的目的。

## 第六章、結論與未來研究目標

1.本研究之 ITO 細胞感測晶片成功的應用在細胞阻抗量測上，可達到非破壞性連續量測單一樣本，可使用在細胞生長、細胞貼附、細胞毒殺等細胞實驗。

2.細胞膜蛋白方面的研究成果需要更多實驗來加以驗證，若能如同我們的研究假設，此套系統將可應用在許多細胞實驗中，如藥物反應、訊息傳遞、物理性刺激等。這些關於活細胞培養、表面抗原抗體結合的實驗，都將可以用這套系統做非破壞性的偵測。

3.本研究發展的晶片可以銜接這些癌細胞表面標記的研究，在臨床上可以將病灶的細胞培養在我們的晶片上，藉由各種癌細胞的專一抗體來做到癌細胞的定性或量測癌細胞位於正常組織中之比例，甚至可以做初步藥物的篩選等等，這些皆有可能在同一片晶片上完成體外的測試。

4.目前本研究範圍侷限於細胞膜表面蛋白的觀察，至於細胞內蛋白質相關的量測，也是未來研究的方向之一。另外，雖然血液細胞不屬於貼附生長的哺乳類細胞，無法自然貼附生長在晶片的表面，但未來也

許可以藉由電極表面的處理或培養基的改良，進一步對懸浮生長的細胞來作量測。至於其他腫瘤的細胞也許就可以比照一般初次培養 (Primary culture) 的方法來進行。

5. 在偵測系統中，本研究使用一般培養細胞的培養液，因為其具有良好的導電能力，可能是造成測量靈敏度降低的原因。因此未來將嘗試選擇低導電性的培養液，減少流經液體的測量電流；增加經過細胞的電流，藉此設法提升測量之靈敏度。



## 第七章、参考文献

Aoki T, Tanino M, Sanui K, Ogata N and Kumakura K, Secretory function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films, *Biomaterials*, 17: 1971-1974, (1996).

Armistead PM and Thorp HH, Oxidation kinetics of guanine in DNA molecules adsorbed onto indium tin oxide electrodes, *Anal Chem*, 73: 558-564, (2001).

Arora K, Chaubey A, Singhal R, Singh RP, Pandey MK, Samanta SB, Malhotra BD and Chand S, Application of electrochemically prepared polypyrrole-polyvinyl sulphonate films to DNA biosensor, *Biosens Bioelectron*, 21: 1777-1783, (2006).

Berney HC, Alderman J, Land WA and Collins JK, Development of a capacitive immunosensor: a comparison of monoclonal and polyclonal capture antibodies as the primary layer, *J Mol Recogn*, 11: 175-177, (1998).

Bieberich E and Guiseppi-Elie A, Neuronal differentiation and synapse formation of PC12 and embryonic stem cells on interdigitated microelectrode arrays: Contact structures for neuron-to-electrode signal transmission (NEST), *Biosens Bioelectron*, 19: 923-931, (2004).

Buitenweg JR, Rutten WLC, Willems WPA and van Nieuwkastele JW, Measurement of sealing resistance of cell-electrode interfaces in neuronal cultures using impedance spectroscopy, *Med Biol Eng Comput*, 36: 630-637, (1998).

Chaubey A, Pande KK and Malhotra BD, Application of polyaniline/sol-gel derived tetraethylorthosilicate films to an amperometric lactate biosensor, *Anal Sci*, 19: 1477-1480, (2003).

Cummins CM, Koivunen ME, Stephanian A, Gee SJ, Hammock BD and Kennedy IM, Application of europium(III) chelate-dyed nanoparticle labels in a competitive atrazine fluoroimmunoassay on an ITO waveguide, *Biosens Bioelectron*, 21: 1077-1085, (2006).

DePaola N, Phelps JE, Florez L, Keese CR, Minnear FL, Giaever I and Vincent P, Electrical impedance of cultured endothelium under fluid flow, *Ann Biomed Eng*, 29: 648-656, (2001).

Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Lehmann M, Henning T, Freund I, Drechsler S, Friedrich U, Hubert ML, Motrescu E, Kob A, Palzer H, Grothe H and Wolf B, Multiparametric microsensor chips for screening applications, *J Anal Chem*, 369: 30-35, (2001).

Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A and Wolf B, On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures, *Med Biol Eng Comput*, 36: 365-370,

(1998).

Ghosh PM, Keese CR and Giaever I, Monitoring electroporation in the plasma membrane of adherent mammalian cells, *Biophys J*, 64: 1602-1609, (1993).

Giaever I and Keese CR, A morphological biosensor for mammalian cells, *Nature*, 366: 591-592, (1993).

Giaever I and Keese CR, Micromotion of mammalian cells measured electrically, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7896-7900, (1991).

Giaever I and Keese CR, Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 3761-3764, (1984).

Guo M, Chen J, Yun X, Chen K, Nie L and Yao S, Monitoring of cell growth and assessment of cytotoxicity using electrochemical impedance spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, 1760: 432-439, (2006).

Henning T, Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Freund I, Kammerer R, Lehmann M, Schwinde A and Wolf B, Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay, *Anticancer Drugs*, 12: 21-32, (2001).

Hsieh YC and Whang CW, Analysis of ethambutol and methoxyphenamine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection, *J Chromatogr A*, 1122: 279-282, (2006).

Kanungo M, Srivastava DN, Kumar A and Contractor AQ, Conductimetric immunosensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Chem Commun*, 680-681, (2002).

Keese CR and Giaever I, A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields, *IEEE Eng Med Biol Mag*, June/July: 402-408, (1994).

Keese CR, Wegener J, Walker SR and Giaever I, Electrical wound-healing assay for cells in vitro, *PNAS*, 101(6): 1554-1559, (2004).

Kimura K, Yanagida Y, Haruyama T, Kobatake E and Aizawa M, Electrically induced neurite outgrowth of PC12 cells on the electrode surface, *Med Biol Eng Comput*, 36: 493-498, (1998).

Kojima J, Shinohara H, Ikariyama Y, Aizawa M, Nagaike K and Morioka S, Electrically controlled proliferation of human carcinoma cells cultured on the surface of an electrode, *J Biotechnol*, 18: 129-140, (1991).

Konry T, Novoa A, Shemer-Avni Y, Hanuka N, Cosnier S, Lepellec A and Marks RS, Optical fiber immunosensor based on a

poly(pyrrole-benzophenone) film for the detection of antibodies to viral antigen, *Anal Chem*, 77: 1771-1779, (2005).

Lee TMH, Cai H and Hsing IM, Effects of gold nanoparticle and electrode surface properties on electrocatalytic silver deposition for electrochemical DNA hybridization detection, *Analyst*, 130: 364-369, (2005).

Lee TMH, Carles MC and Hsing IM, Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection, *Lab Chip*, 3: 100-105, (2003).

Liron Z, Tender LM, Golden JP and Ligler FS, Voltage-induced inhibition of antigen-antibody binding at conducting optical waveguides, *Biosens Bioelectron*, 17: 489-494, (2002).

Lo CM, Keese CR and Giaever I, Impedance analysis of MDCK cells measured by Electric Cell-substrate Impedance Sensing, *Biophys J*, 69: 2800-2807, (1995).

Long YT, Li CZ, Kraatz HB and Lee JS, AC impedance spectroscopy of native DNA and M-DNA, *Biophys J*, 84: 3218-3225, (2003).

Lucas JH, Kirkpatrick JB and Gross GW, A photoetched cell relocation matrix for long-term, quantitative observations of selected individual neurons in culture, *J Neurosci Meth*, 14: 211-219, (1985).

Mitsubayashi K, Wakabayashi Y, Tanimoto S, Murotomi D and Endo T, Optical-transparent and flexible glucose sensor with ITO electrode, *Biosens Bioelectron*, 19: 67-71, (2003).

Möllar R, Powell RD, Hainfeld JF and Fritzsche W, Enzymatic control of metal deposition as key step for a low-background electrical detection for DNA chips, *Nano Lett*, 5(7): 1475-1482, (2005).

Moy AB, Winter M, Kamath A, Blackwell K, Reyes G, Giaever I, Keese CR and Shasby DM, Histamine alters endothelial barrier function at cell-cell and cell-matrix sites, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278: L888-L898, (2000).

Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN and Esteva FJ, Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer, *Nat Clin Pract Oncol*, 3: 269-280, (2006).

Nguyen DD, Huang X, Greve DW and Domach MM, Fibroblast growth and H-7 protein kinase inhibitor response monitored in microimpedance sensor arrays, *Biotechnol Bioeng*, 87(2): 138-144, (2004).

Noiri E, Hu Y, Bahou WF, Keese CR, Giaever I and Goligorsky MS, Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells, *J Biol Chem*, 272(3): 1747-1752, (1997).

Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I and Gologorsky S, Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide, *Am J Physiol*, 274: C236-C244, (1998).

O'Connor ER, Kimelberg HK, Keese CR and Giaever I, Electrical resistance method for measuring volume changes in monolayer cultures applied to primary astrocyte cultures, *Am J Physiol*, 264: C471-C478, (1993).

Otto AM, Brischwein M, Motrescu E and Wolf B, Analysis of drug action on tumor cell metabolism using electronic sensor chips, *Arch Pharm Pharm Med Chem*, 337: 682-686, (2004).

Pan S and Rothberg, Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy, *Langmuir*, 21: 1022-1027, (2005).

Polakis P, Arming antibodies for cancer therapy, *Curr Opin Pharmacol*, 5: 382-387, (2005).

Qiu Q, Sayer M, Kawaja M, Shen X and Davies JE, Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces, *J Biomed Mater Res*, 42: 117-127, (1998).

Reddy L, Wang HS, Keese CR, Giaever I and Smith TJ, Assessment of rapid morphological changes associated with elevated cAMP levels in

human orbital fibroblasts, *Exp Cell Res*, 245: 360-367, (1998).

Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP and Langer R, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8948-8953, (1997).

Sharma SK, Singhal R, Malhotra BD, Sehgal N and Kumar A, Biosensor based on langmuir-blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) for detection of galactose in human blood, *Biotechnol Lett*, 26: 645-647, (2004).

Shau H, Chandler GS, Whitelegge JP, Gornbein JA, Faull KF and Chang HR, Proteomic profiling of cancer biomarkers, *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2: 147-158, (2003).

Shiigi H, Tokonami S, Yakaba H and Nagaoka T, Label-free electronic detection of DNA-hybridization on nanogapped gold particle film, *J Am Chem Soc*, 127: 3280-3281, (2005).

Smith TJ, Wang HS, Hogg MG, Henrikson RC, Keese CR and Giaever I, Prostaglandin E2 elicits a morphological change in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves ophthalmopathy, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5094-5098, (1994).

Tiruppathi C, Malik AB, Del-Vecchio PJ, Keese CR and Giaever I, Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier function, *Proc Natl Acad Sci USA*,

89: 7919-7923, (1992).

Tlili C, Reybier K, Gélöën A, Ponsonnet L, Martelet C, Ouada HB, Lagarde M and Jaffrezic-Renault N, Fibroblast cells: A sensing bioelement for glucose detection by impedance spectroscopy, *Anal Chem*, 75: 3340-3344, (2003).

Tomai E, Vultur A, Balboa V, Hsu T, Brownell HL, Firth KL and Raptis L, In Situ electroporation of radioactive compounds into adherent cells, *DNA Cell Biol*, 22: 339-346, (2003).

Tricoli JV, Schoenfeldt M and Conley BA, Detection of prostate cancer and predicting progression: Current and future diagnostic markers, *Clin Cancer Res*, 10: 3943-3953, (2004).

Waldmann TA, Effective cancer therapy through immunomodulation, *Annu Rev Med*, 57: 65-81, (2006).

Wegener J, Keese CR and Giaever I, Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces, *Exp Cell Res*, 259: 158-166, (2000).

Wegener J, Keese CR and Giaever I, Recovery of adherent cells after in situ electroporation monitored electrically, *Biotechniques*, 33: 348-357, (2002).

Wong JY, Langer R and Ingber DE, Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3201-3204, (1994).

Xiao C and Luong JHT, Assessment of cytotoxicity by emerging impedance spectroscopy, *Toxicol Appl Pharmacol*, 206: 102-112, (2005).

Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun XJ, Wang XB and Xu X, Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors, *Chem Res Toxicol*, 18: 154-161, (2005).

Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun XJ, Wang XB and Xu X, Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors, *Chem Res Toxicol*, 18: 154-161, (2005).

Yamamoto T, Nojima T and Fujii T, PDMS-glass hybrid microreactor array with embedded temperature control device. Application to cell-free protein synthesis, *Lab Chip*, 2: 197-202, (2002).

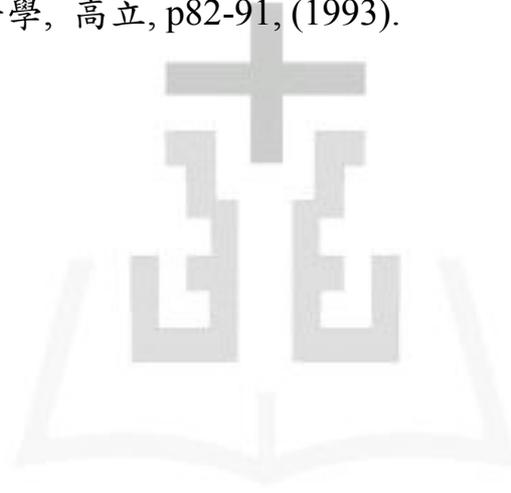
Yan F and Sadik OA, Enzyme-modulated cleavage of dsDNA for supramolecular design of biosensors, *Anal Chem*, 73: 5272-5280, (2001).

Yeon JH and Park JK, Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip, *Anal Biochem*, 341: 308-315, (2005).

Yeon JH and Park JK, Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip, *Anal Biochem*, 341: 308-315, (2005).

Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, Xu X and Abassi YA, Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electric cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors, *Anal Chem*, 78: 35-43, (2006).

黃豪銘, 醫用電子學, 高立, p82-91, (1993).



附  
錄  
圖  
表



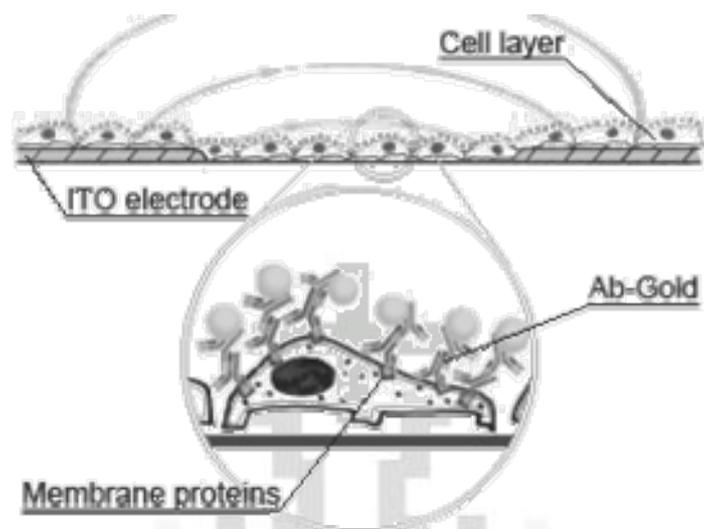
<表 1> ITO 玻璃晶片詳細製程

製程	內 容
薄膜	由正太科技完成 ITO 的濺鍍
黃光	玻璃清洗與乾燥 (CLEAN) 清潔劑(detergent) →去離子水(DI) →氮氣吹乾(N <sub>2</sub> stream) 丙酮(Acetone)/丙二醇(2-Propanol) →去離子水(DI) →氮氣吹乾(N <sub>2</sub> stream) 加熱器(Hot plate)100°C 10 min 烤乾
光阻塗佈 (PR COAT)	正光阻 AZ6112 離心塗佈機(Spin coater) 5"1000rpm →30"3000rpm
軟烤 (SOFT BAKE)	90°C 5min, 烤去光阻大部分溶劑, 增加和晶片附著力。 冷卻至室溫(RT)
曝光 (EXP.)	上光罩(Mask) 接觸式(Hard contact) 曝光 1.5 秒
顯影 (DEVELOP)	顯影液(KTD-1) 將經過光照分解的光阻層除去, 保留未曝光部分的光阻層。 →去離子水定影(DI) →氮氣吹乾(N <sub>2</sub> stream)
硬烤 (HARD BAKE)	120°C 5min 將光阻中樹脂成分烤硬, 以利於後續蝕刻處理。 冷卻至室溫(RT)
蝕刻	蝕刻 (ETCHING) ITO 蝕刻液(EG-462) 50°C 3~5min →去離子水(DI) →氮氣吹乾(N <sub>2</sub> stream)
	去光阻 (STRIP CLEAN) 丙酮(Acetone)/丙二醇(2-Propanol) 去除正光阻。 清洗乾燥 (CLEAN) →去離子水(DI) →氮氣吹乾(N <sub>2</sub> stream)
後製	鎢鋼刀裁切 →磨邊、導角 → 清洗乾燥

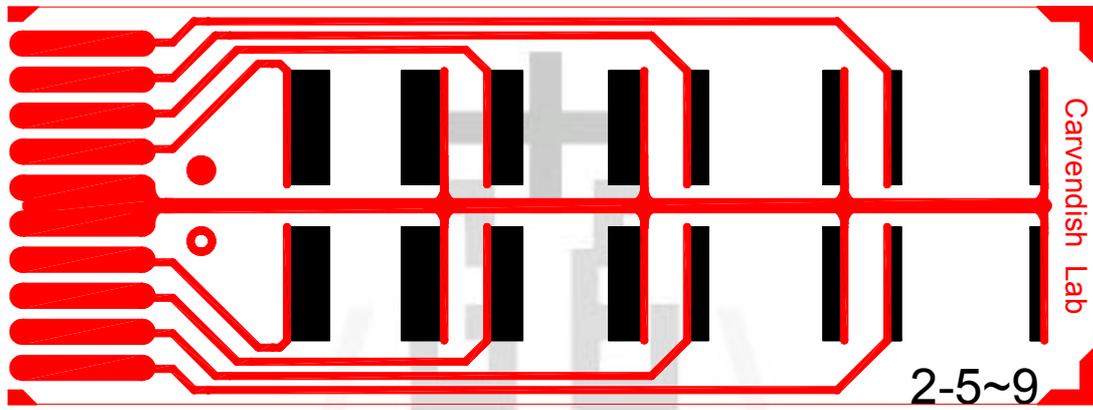
<表二> Cancer surface markers

Type	Surface Markers	Indications
Blood	* CD 33	Acute myeloid leukemia
	* CD 20	Normal B lymphocytes and lymphomas
	CD 22	Non-Hodgkins lymphoma
Solid tumor	* HER-2/neu	Positive metastatic breast cancer
	* CD 52	B-cell chronic lymphocytic leukemia
	* VEGF	Colorectal cancer
	* EGFR (HER-1)	Colorectal cancer
	PSMA	Prostate cancer
	PSCA	Prostate cancer
	Akt	Breast cancer
	mTOR	Breast cancer
	CD 44v6	Certain lymphoma and leukaemia
	CA 15-3	Breast cancer
	CEA	Colon cancer
	Emmprin (basigin/CD 147)	Carcinoma cells

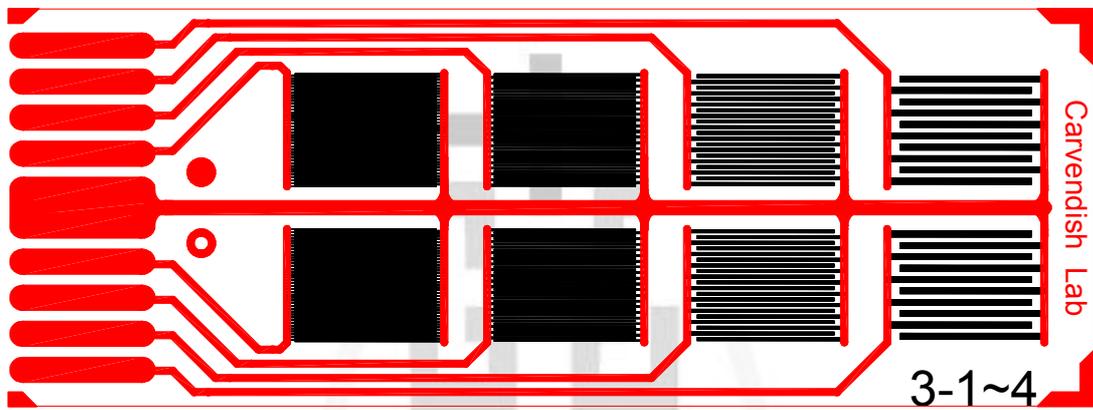
\* 已有抗體藥品通過 FDA 認證，使用於臨床。



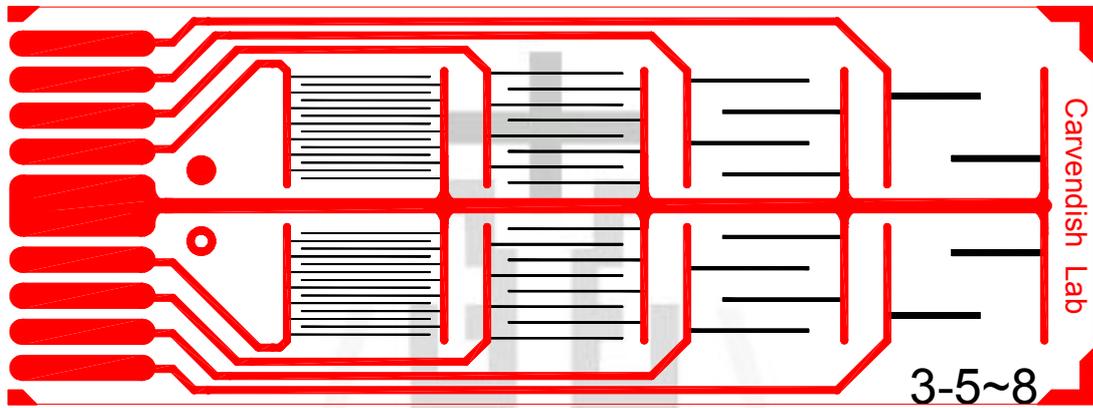
<圖 1> 蛋白質偵測示意圖。一級抗體(1°Ab)辨識欲研究的細胞膜蛋白，帶有金粒子的二級抗體(2°Ab)抓住一級抗體。當該蛋白質表現越多，細胞表面連結的金粒子越多，會影響阻抗的量測。



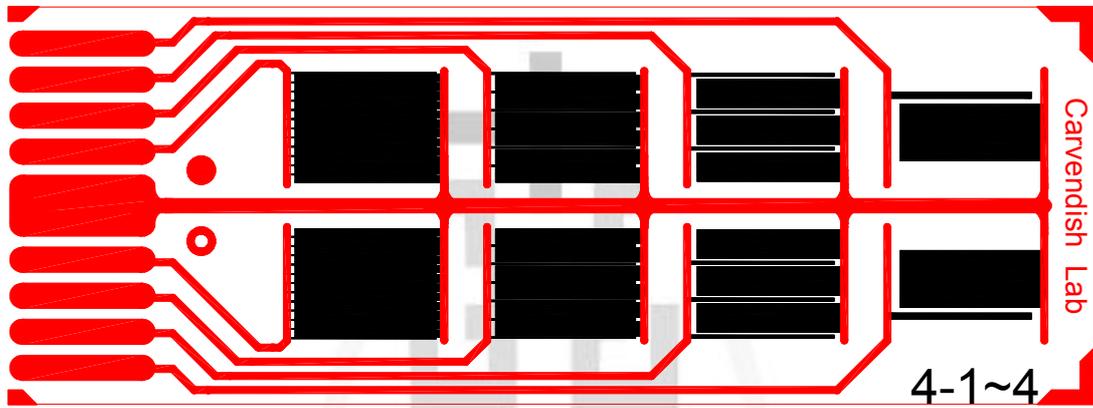
<圖 2> 等面積平板間隙電極(Gap electrodes)例圖。



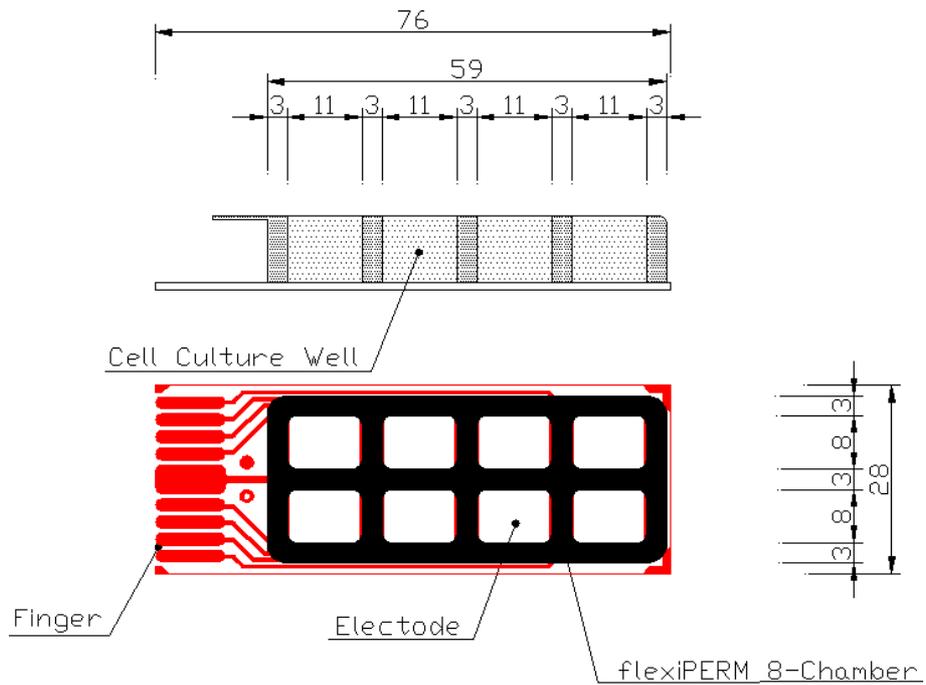
<圖 3> 成對趾狀電極(Interdigital electrode structures, IDES), 其線寬及間距又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm。



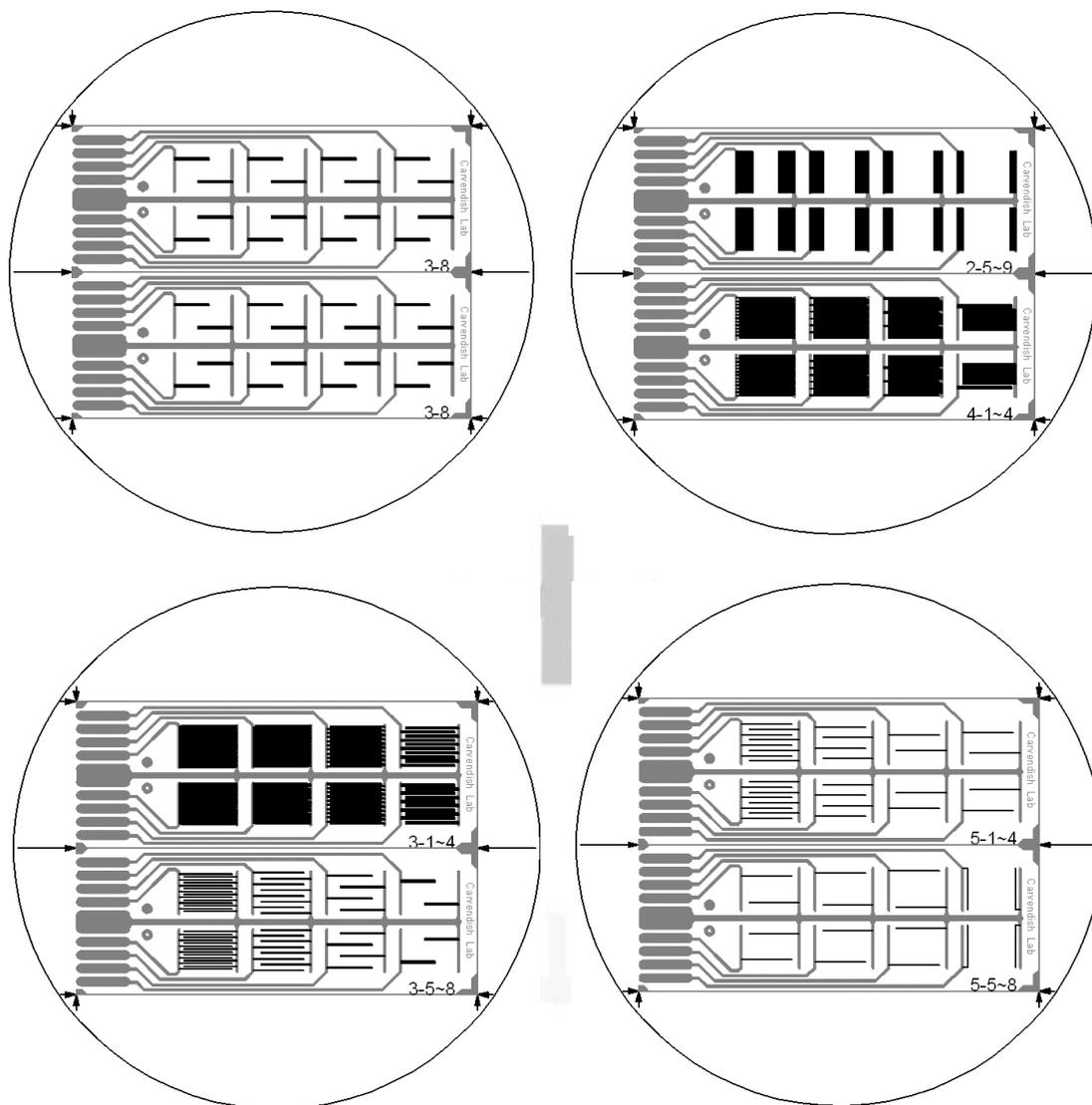
<圖 4> 趾狀十倍間隔電極，其線寬又分為 0.05mm、0.1mm、0.2mm、  
0.4mm。



<圖 5> 趾狀十倍大小差距電極，其小電極之線寬及間距又分為  
0.05mm、0.1mm、0.2mm、0.4mm。



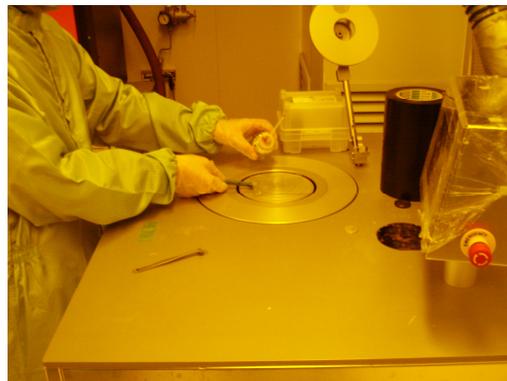
<圖 6> 晶片設計圖。大小與一般玻片相似，依照 8-well flexiPERM® 設計電極的大小及位置，並在側邊放置線路接觸片(fingers)可與邊接頭(Edge Connector) 做拔插連結。



<圖 7> 4”光罩。每片光罩可容納兩個晶片，晶片上的電極被設計成許多不同的樣式，同一片上最多有四個不同的電極樣式，其對側為對稱的相同電極，以方便控制組的實驗設計。



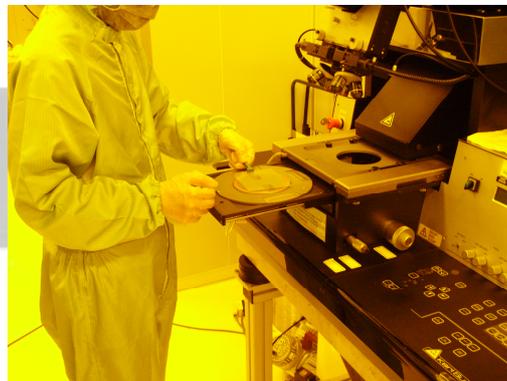
A



B



C



D

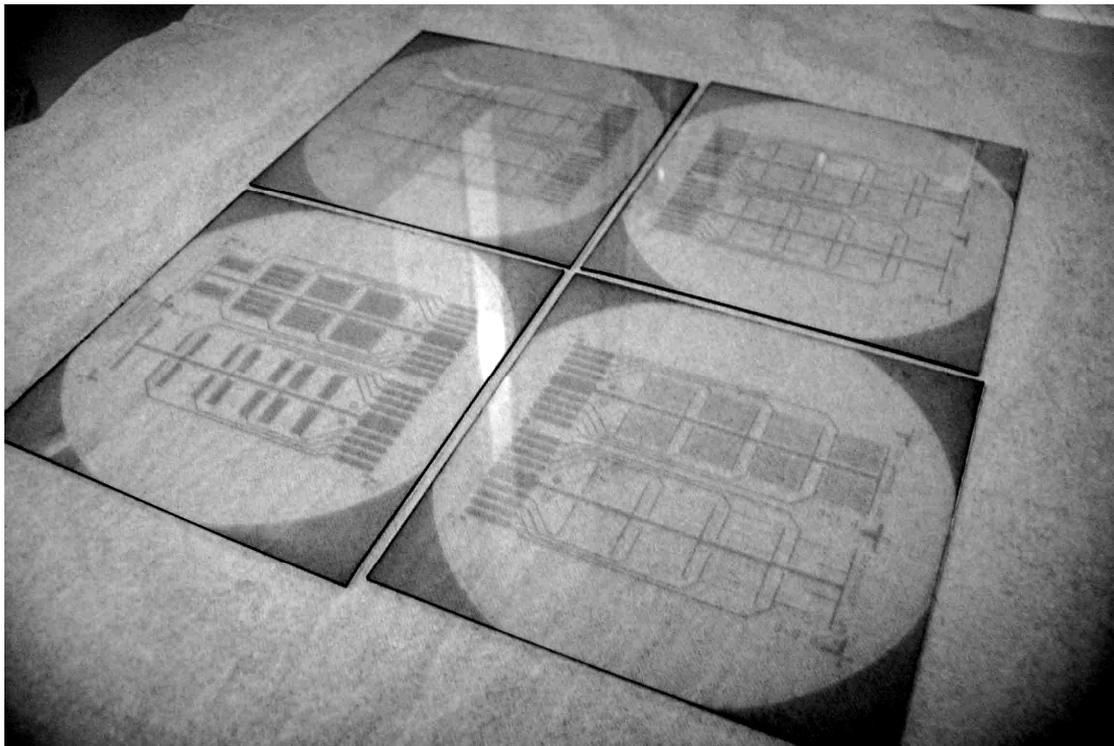


E

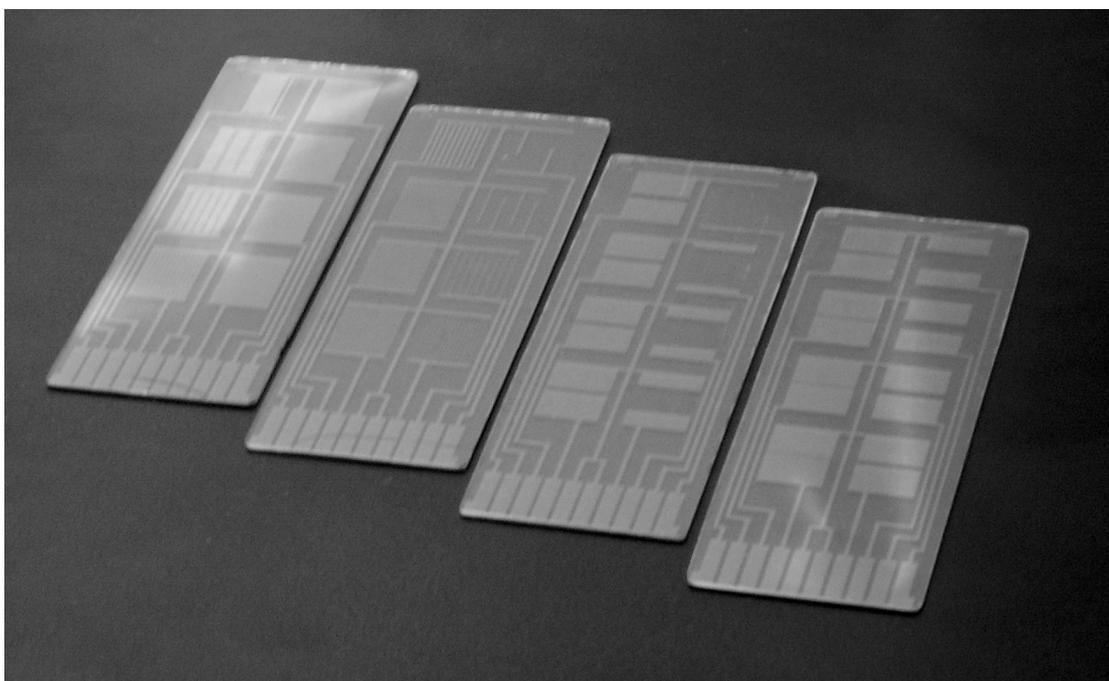


F

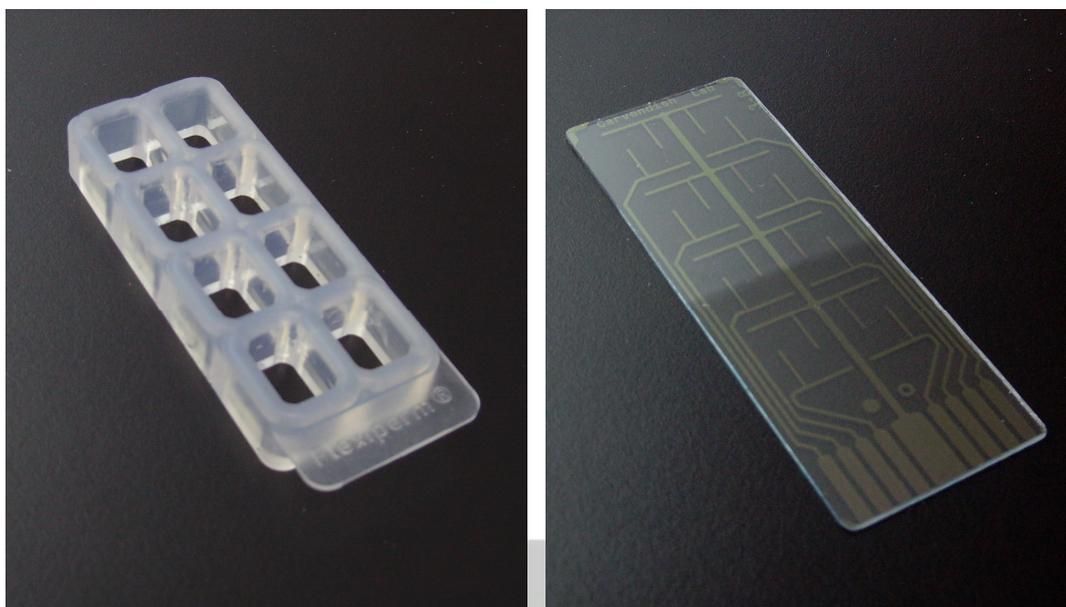
<圖 8> 黃光室中 ITO 晶片的製作過程。清洗(A)；光阻塗佈(B)；烘烤(C)；曝光(D)；顯影(E)；蝕刻(F)。



<圖 9> 在儀科中心使用光微影技術製作完成的 ITO 電極晶片。



<圖 10>經切割、磨邊後的晶片成品。



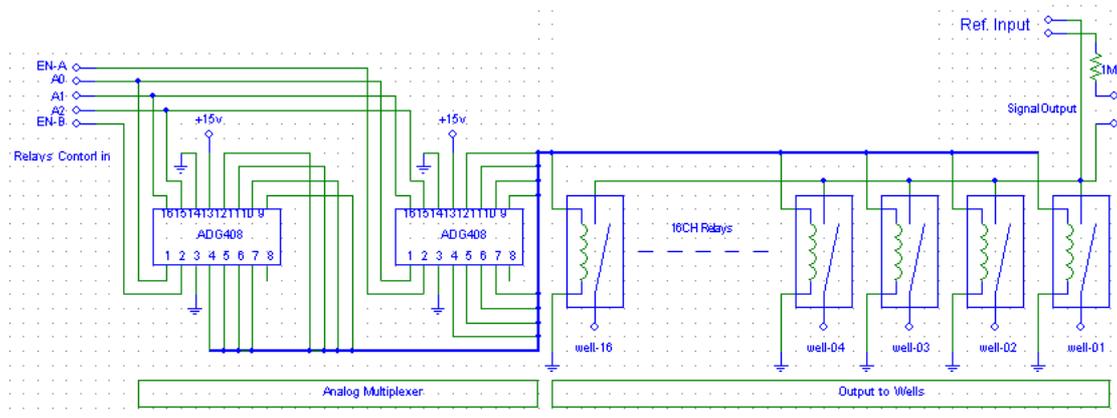
A

B



C

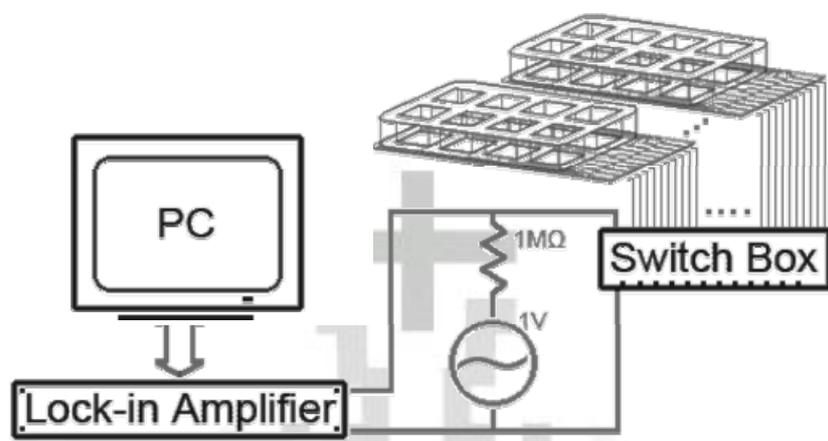
<圖 11>8-well flexiPERM®矽膠格(A)；切割完成的 ITO 晶片(B)；晶片與矽膠格組合形成 8 個細胞培養格(C)。



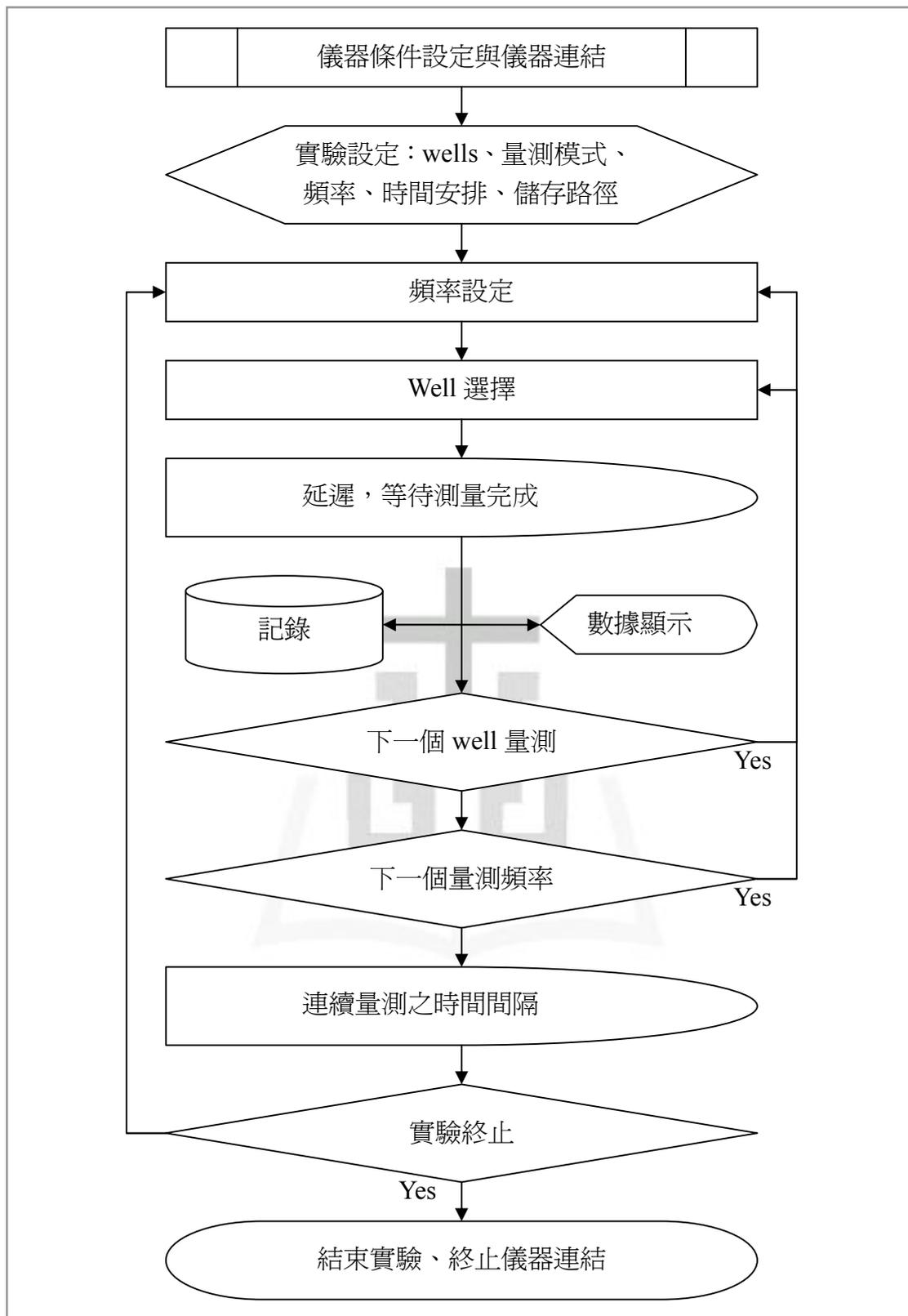
<圖 12>信號切換盒(Switch Box)之電路設計。



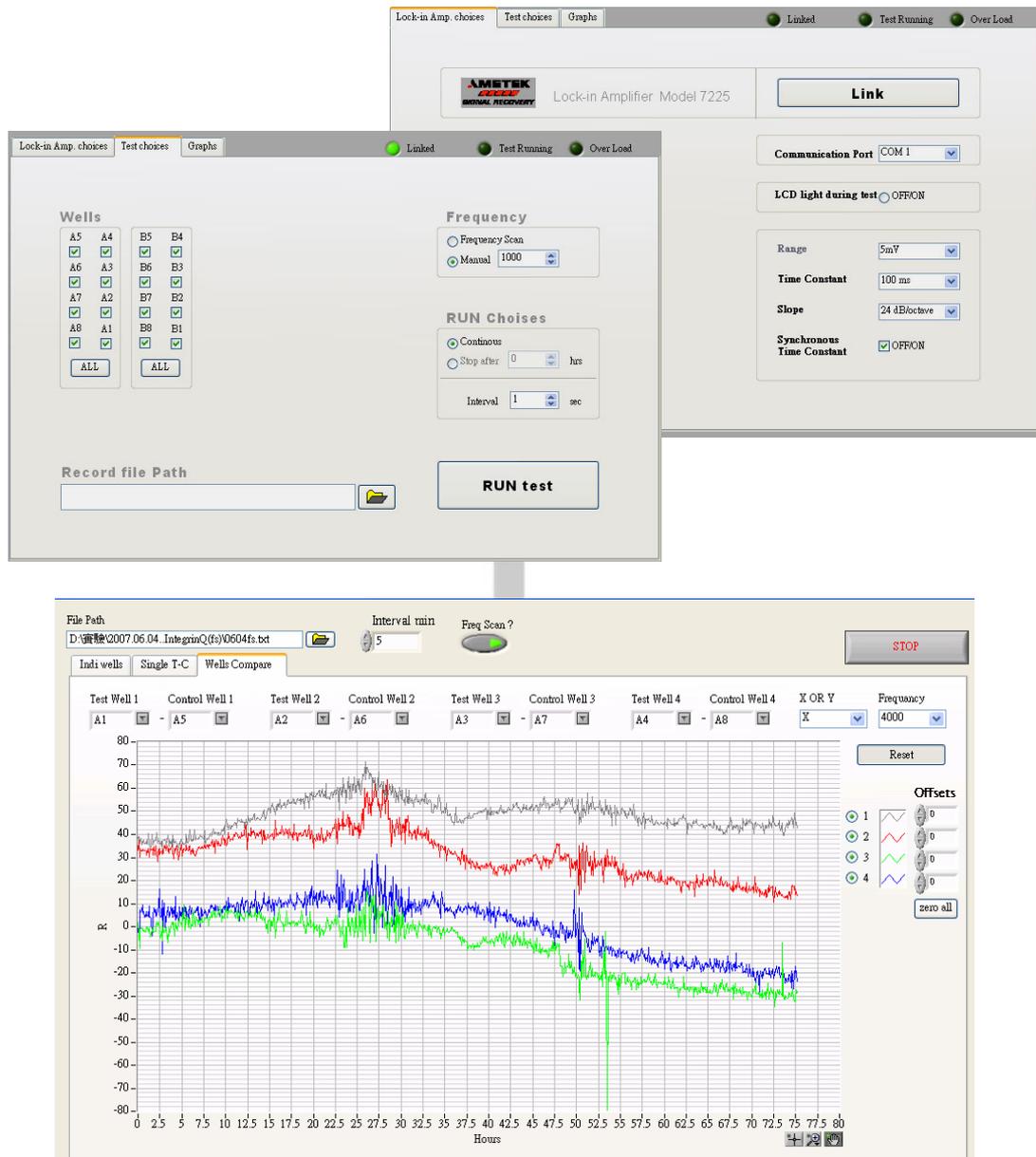
<圖 13> 訊號切換盒(Switch Box)。晶片組與邊接頭連結後，經過一段排線接到訊換切換盒中，訊號切換盒再由另一排線與鎖相放大器連結。



<圖 14>裝置示意圖。鎖相放大器提供 1V 的交流訊號，通過 1MΩ 限流電阻到訊號切換盒(Switch Box)，由電腦控制切換盒指定哪一塊晶片上的哪一格要被偵測。最後由鎖相放大器讀出樣本兩端的相內 (in-phase)電壓及相外(out-of-phase)電壓。



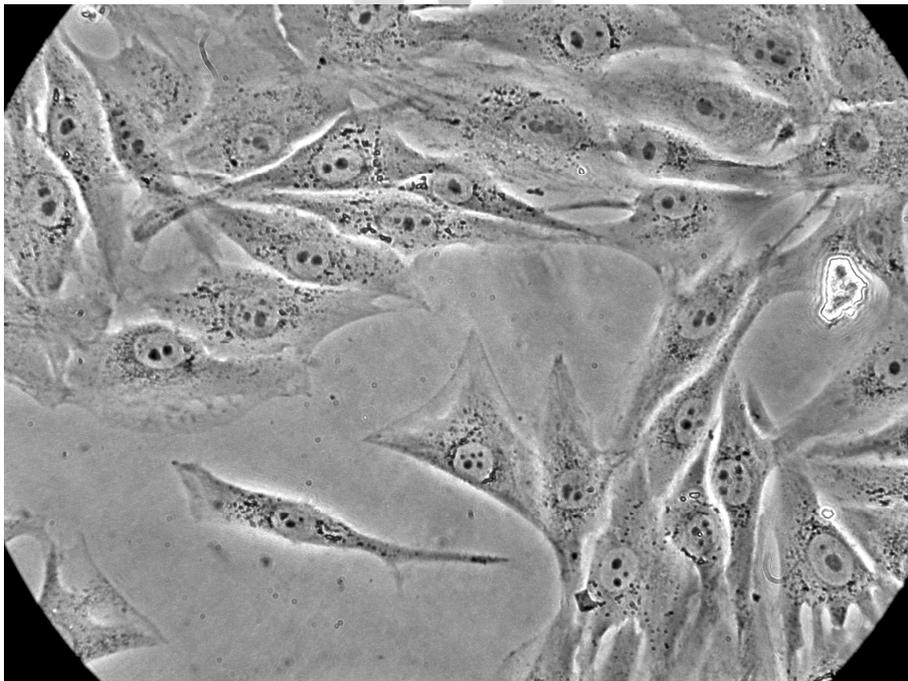
<圖 15>LabVIEW 程式流程圖。負責實驗的儀器控制、自動化量測、數據的擷取及資料的儲存。



<圖 16>自行撰寫的程式，三個主要的人機介面視窗。第一個視窗，做鎖相放大器的基本設定與連結；第二個視窗，做自動化量測的相關設定；第三個視窗，數據的分析做圖。

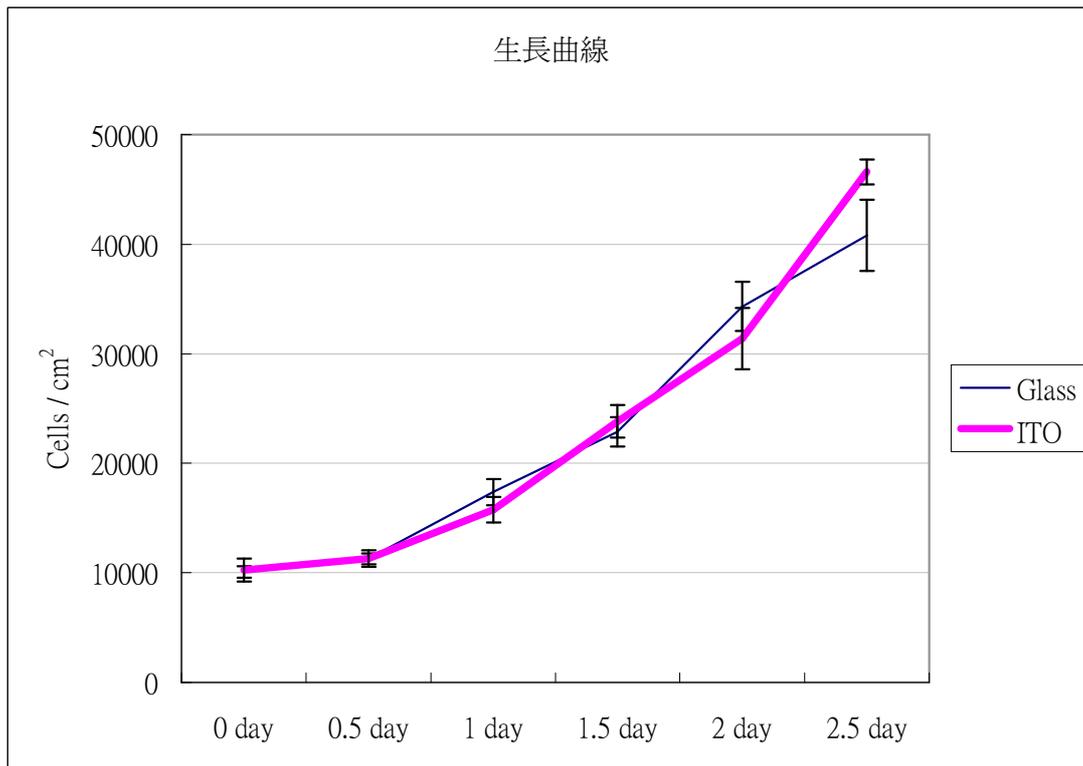


Glass surface

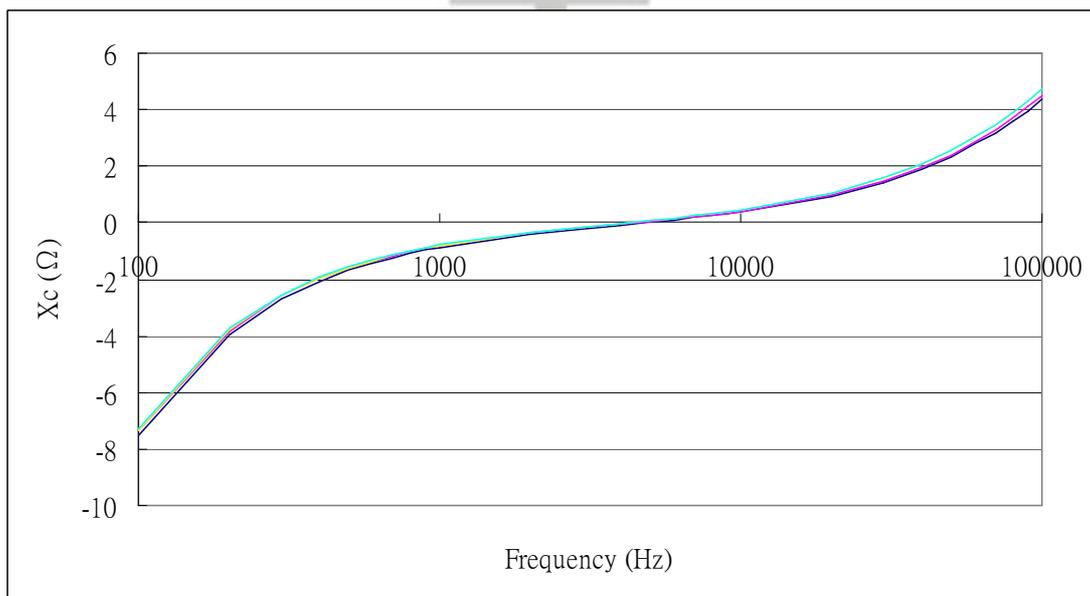
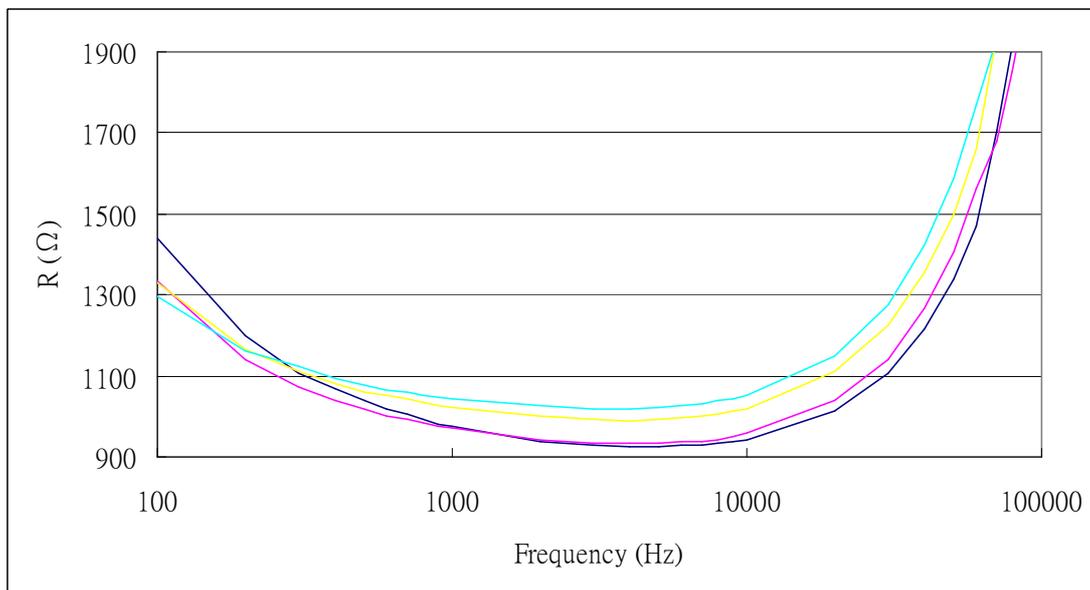


ITO surface

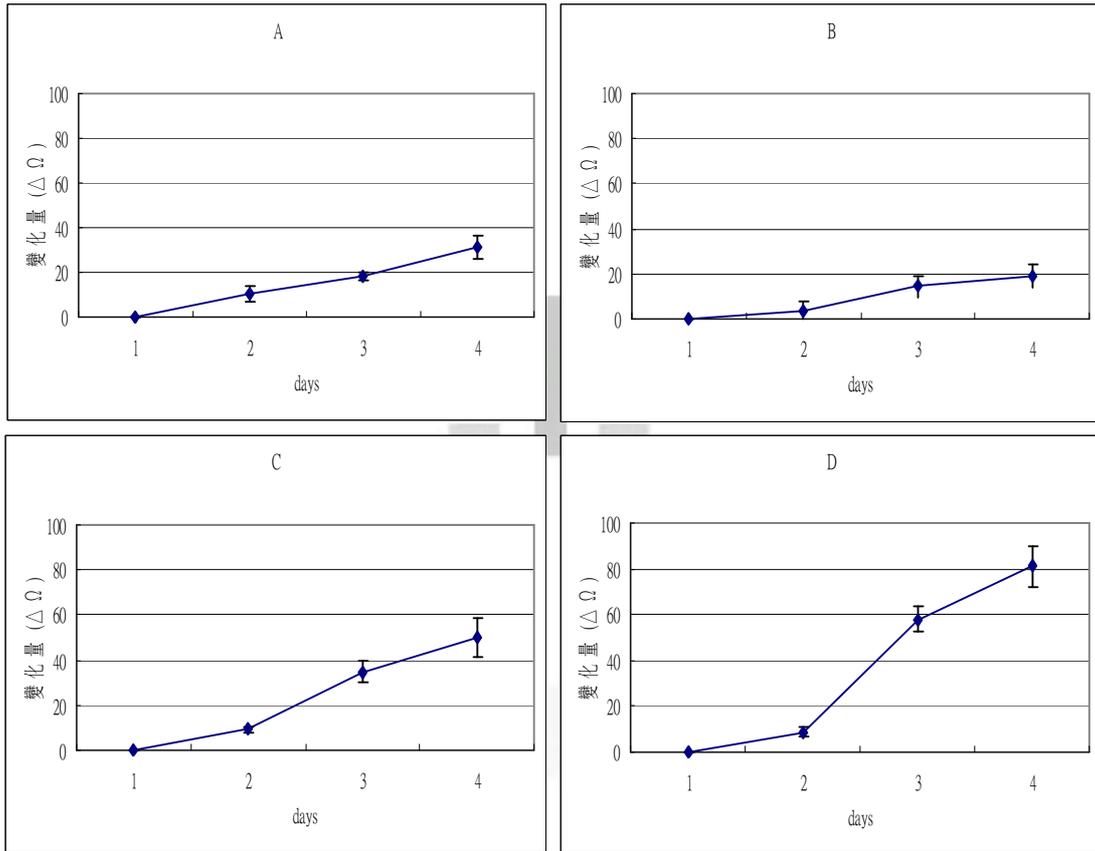
<圖 17>MG-63 分別培養在玻璃及 ITO 表面。在顯微鏡觀察下，細胞的貼附行為及型態上都很正常



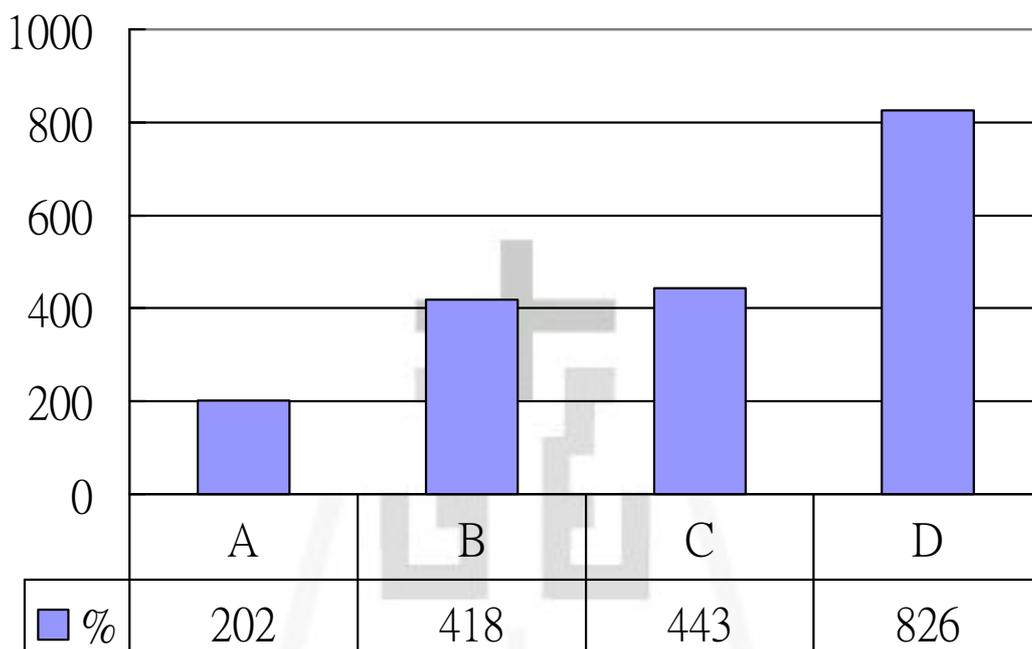
<圖 18>以相片計算細胞密度，在細胞的生長曲線中，MG-63 培養在玻璃上(—)和培養在 ITO 表面(—)，兩組曲線幾乎重疊無顯著的差異。



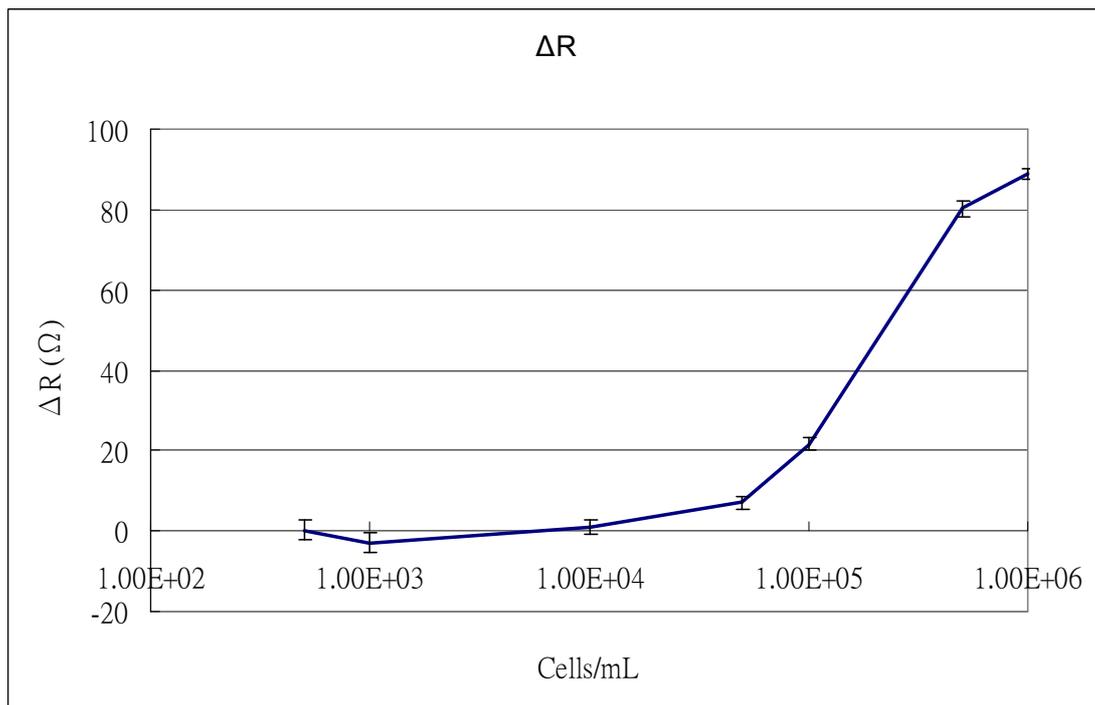
<圖 19>電阻抗( $R$ )與電容抗( $X_c$ )在不同頻率下不同天(不同的曲線)的測量值。電容抗在各頻率不同天之測量值皆無明顯的變化，而電阻抗測量值有較明顯的改變，且在4000Hz有較佳的差異。



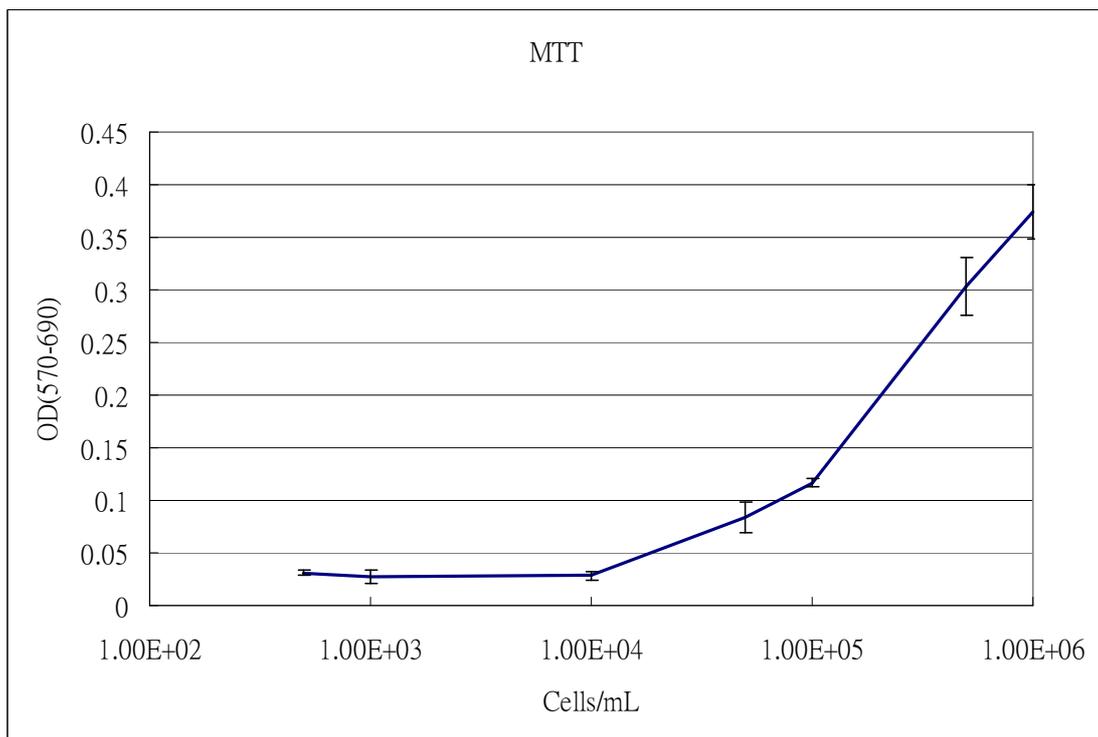
<圖 20>靈敏度較佳的四種電極。變化量( $\Delta\Omega$ )是電阻抗讀值減去第一天的電阻抗值。其中以 D 電極有最大的變化量。



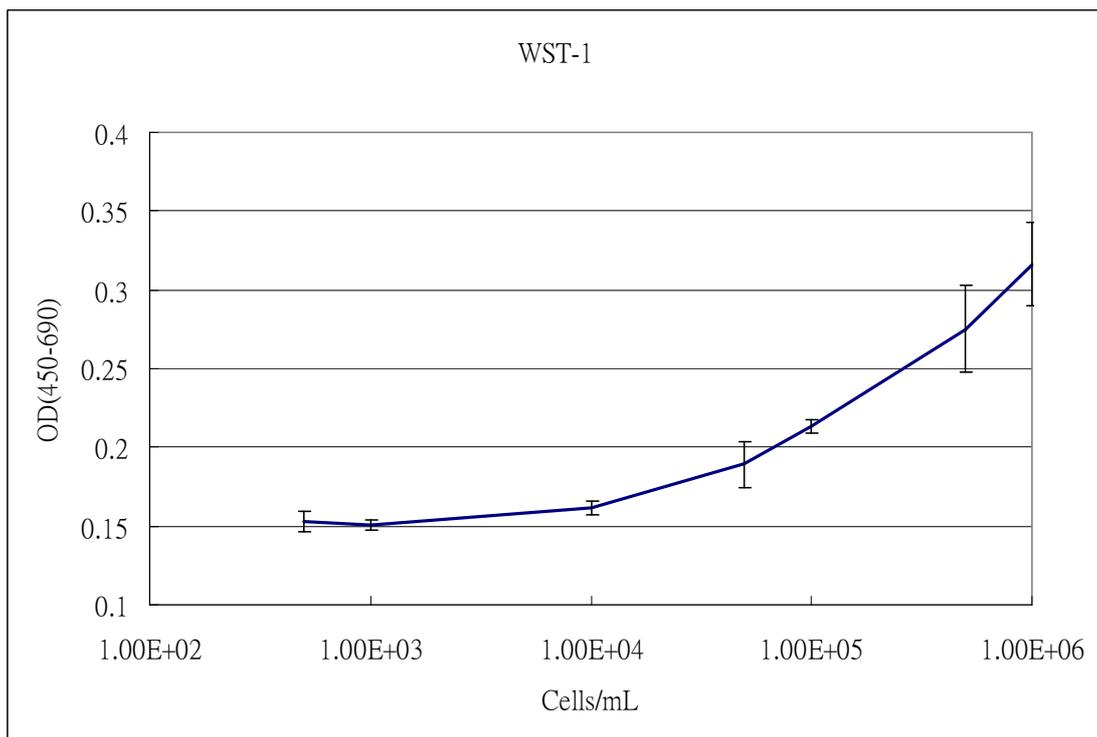
<圖 21>第 4 天較第 2 天成長之百分比(%)。D 電極分別為 A、B、C 電極的 4.09 倍、1.98 倍、1.86 倍。



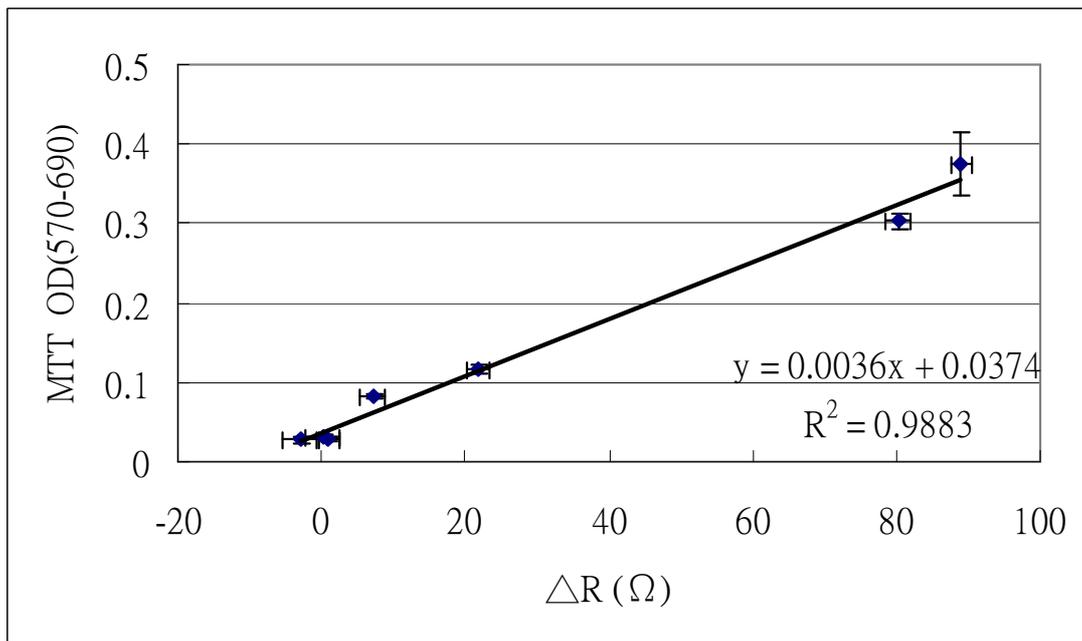
<圖 22>不同細胞濃度的電阻抗( $\Delta R$ )量測。最低可偵測的細胞濃度約為  $1 \times 10^4$  cells/mL。



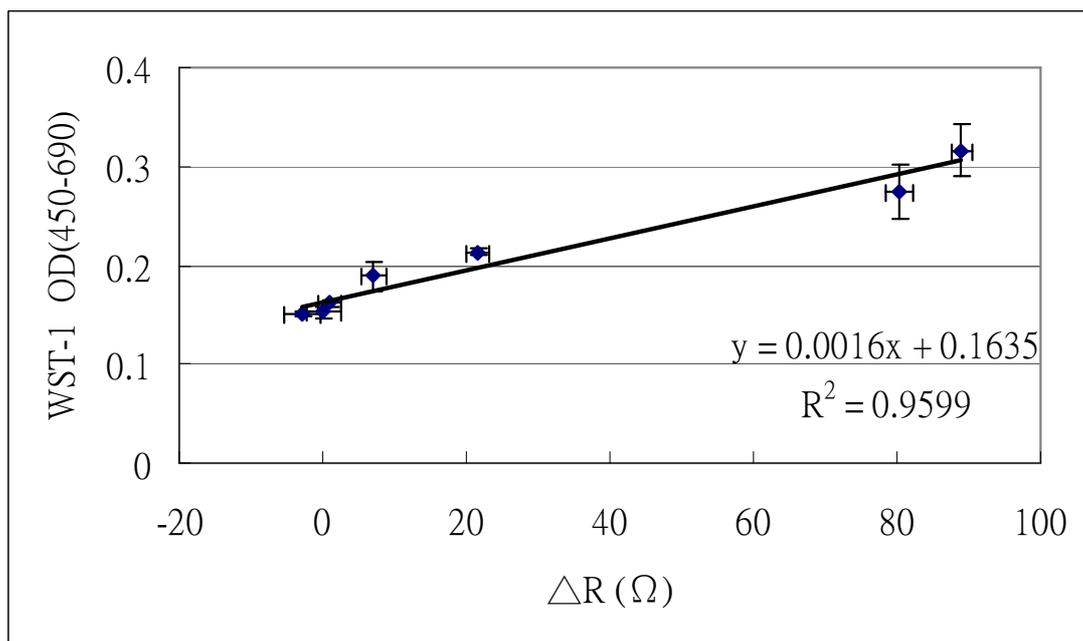
<圖 23>不同細胞濃度所測的 MTT 吸光值(OD 570-690)。最低可偵測的細胞濃度約為  $1 \times 10^4$  cells/mL。



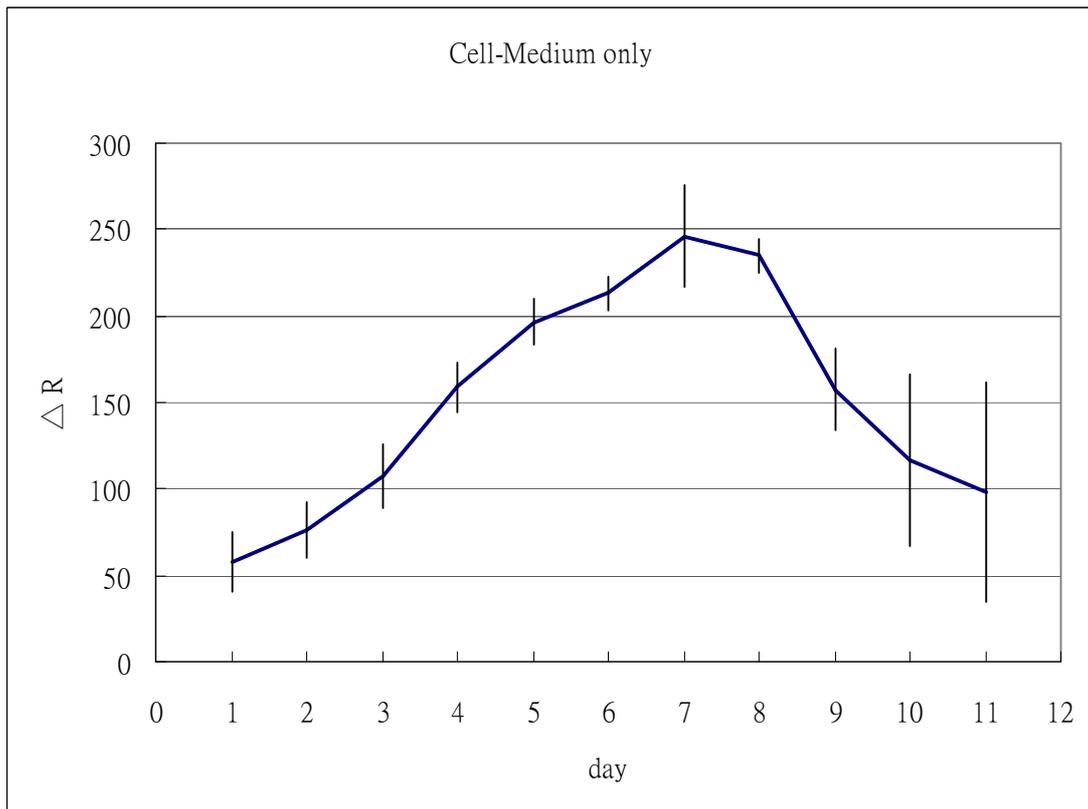
<圖 24>不同細胞濃度所測得的 WST-1 吸光值(OD 450-690)。最低可偵測的細胞濃度約為  $1 \times 10^3$  cells/mL。



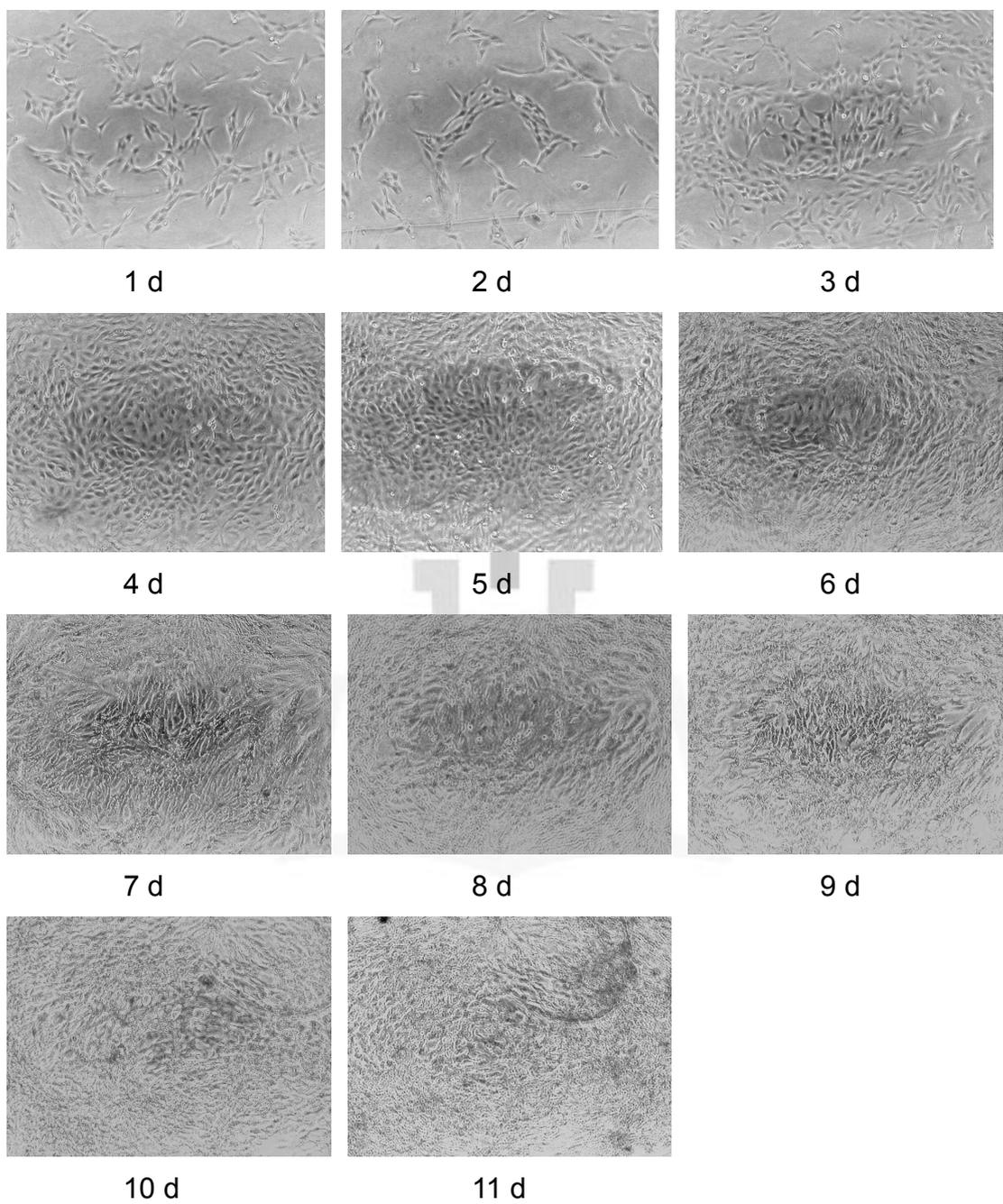
<圖 25>電阻抗變化值( $\Delta R$ )與 MTT 吸光值(OD 570-690)之相關性分析。(p < 0.005)



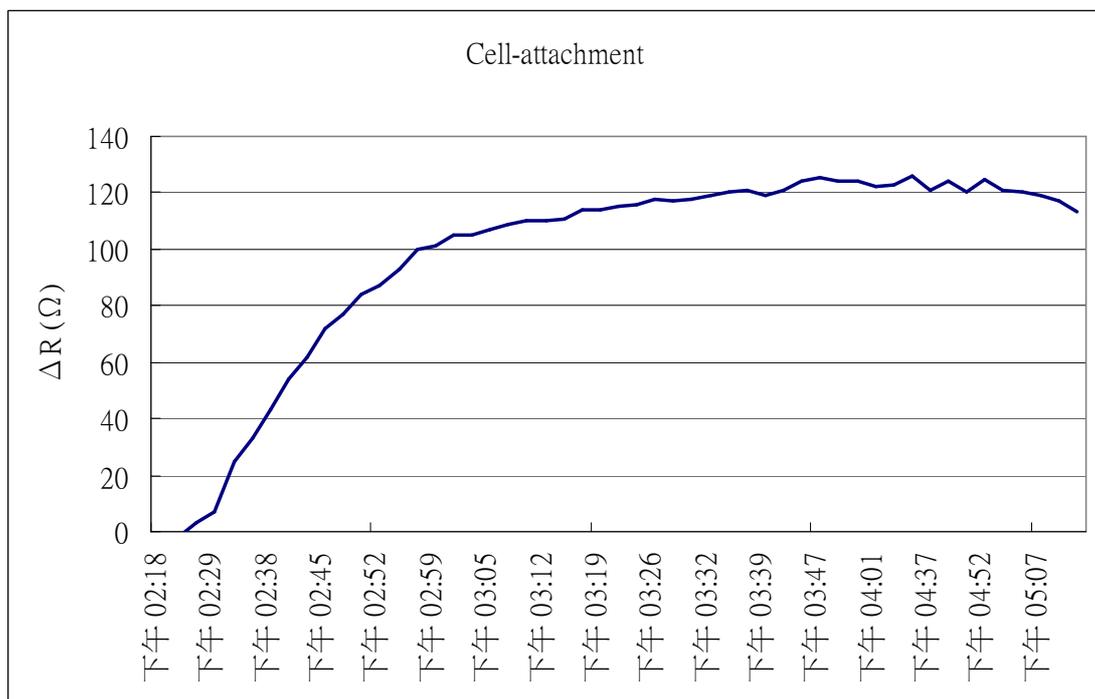
<圖 26>電阻抗變化值( $\Delta R$ )與 WST-1 吸光值(OD 450-690)之相關性分析。(p<0.001)



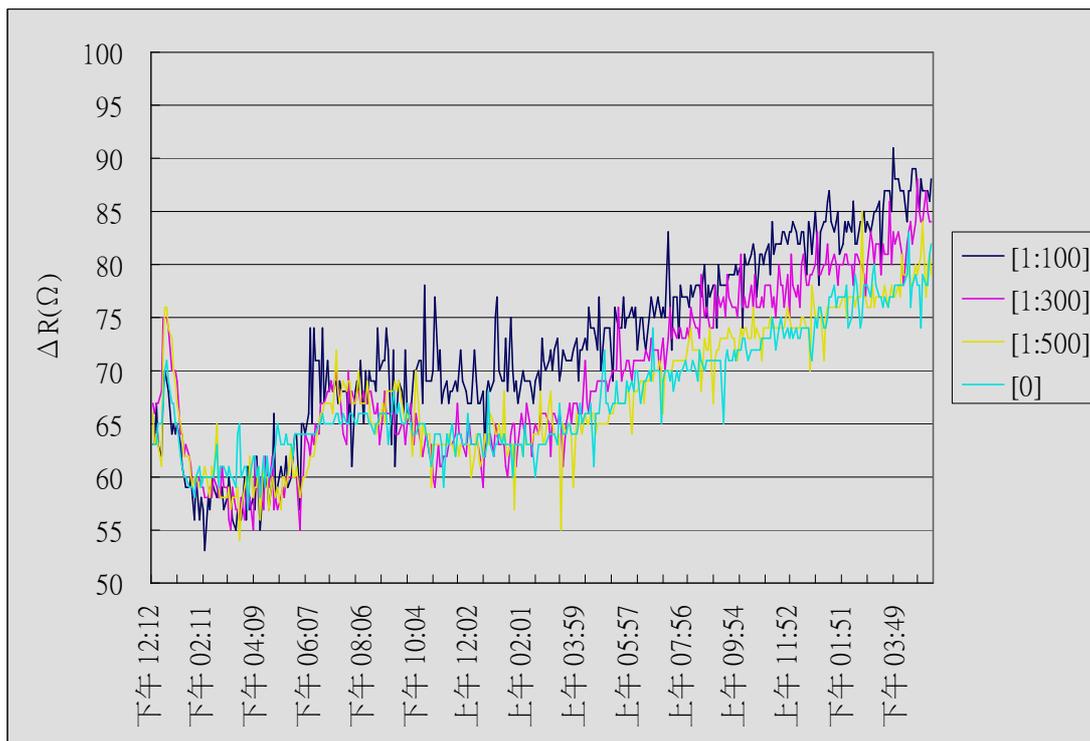
<圖 27>連續量測 MG-63 生長的曲線，細胞組的電阻測量值減去只有培養基的量測值為 $\Delta R$ 。 $\Delta R$ 隨著細胞生長的情形所變化。第 1 天為 $(57.5\Omega \pm 17.69)$ 上升至第 7 天為 $(246\Omega \pm 29.35)$ 。



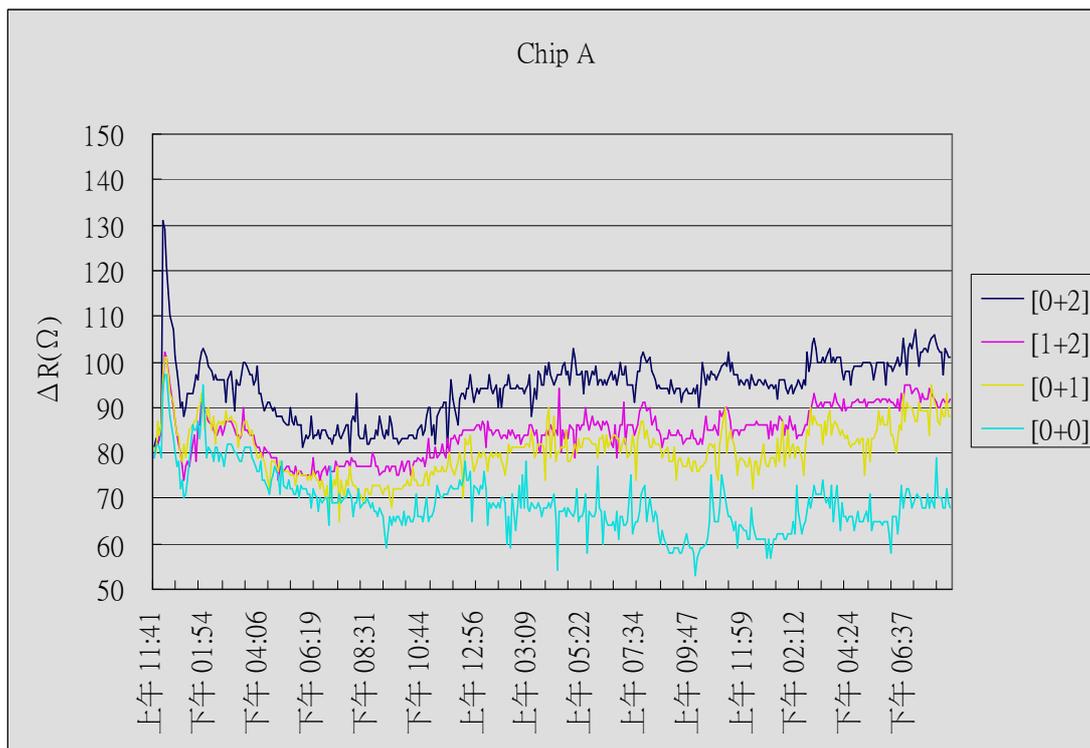
<圖 28>MG-63 生長在晶片上的型態。至第七天長到最滿，之後死亡。



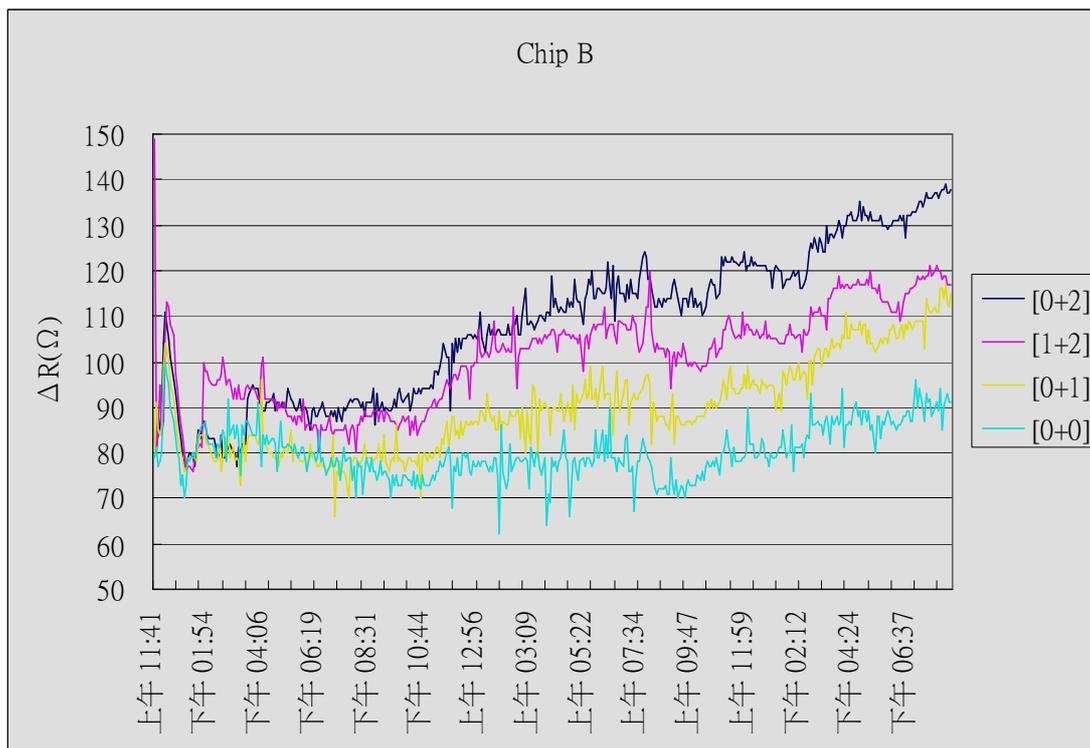
<圖 29>細胞貼付之連續阻抗量測。細胞於第 4 個小時完成貼付， $\Delta R$  也到達最大值，並趨於平緩。



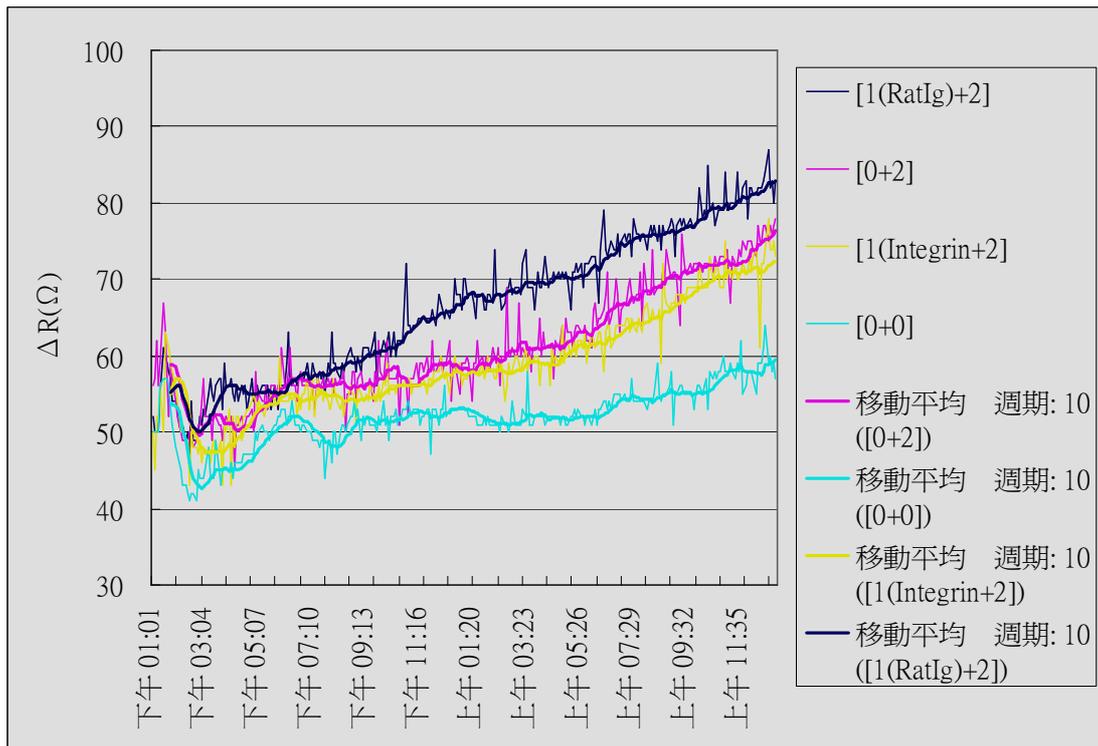
<圖 30>不同稀釋倍數的一級抗體(mouse anti-Integrin  $\beta 1$ )，加入後 24 小時的阻抗測量紀錄。原倍抗體被稀釋 100 倍[1:100]、被稀釋 300 倍[1:300]、倍稀釋 500 倍[1:500]、無添加抗體之控制組[0]。濃度越高的一抗伴隨越多過量的懸浮抗體， $\Delta R$  值也就越高。



<圖 31>加入稀釋 100 倍的一抗(mouse anti-Integrin  $\beta 1$ )及帶金粒子之二抗(goat anti-Mouse IgG-Au)。一抗加二抗[1+2]的  $\Delta R$  值比只加二抗[0+2]來的低;只加一抗[0+1]的  $\Delta R$  值也比只加二抗[0+2]來的低。

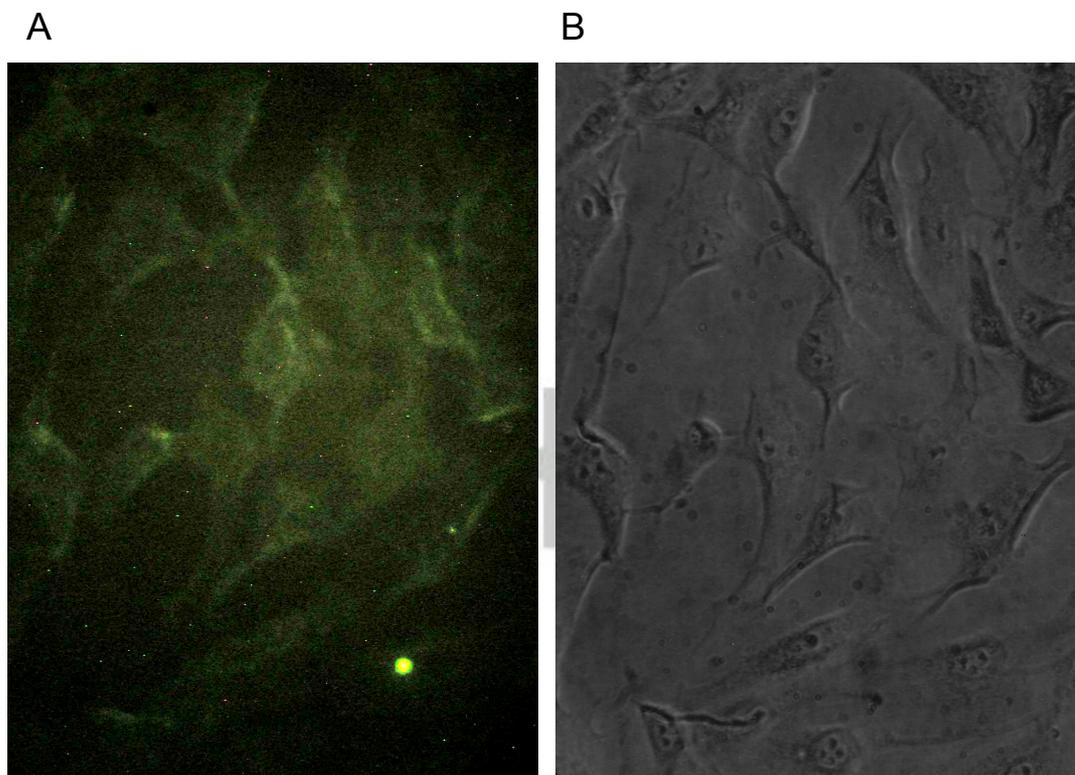


<圖 32>加入稀釋 50 倍的一抗(mouse anti-Integrin  $\beta 1$ )及帶金粒子之二抗(goat anti-Mouse IgG-Au)。一抗加二抗[1+2]的  $\Delta R$  值比只加二抗[0+2]來的低；只加一抗[0+1]的  $\Delta R$  值也比只加二抗[0+2]來的低。

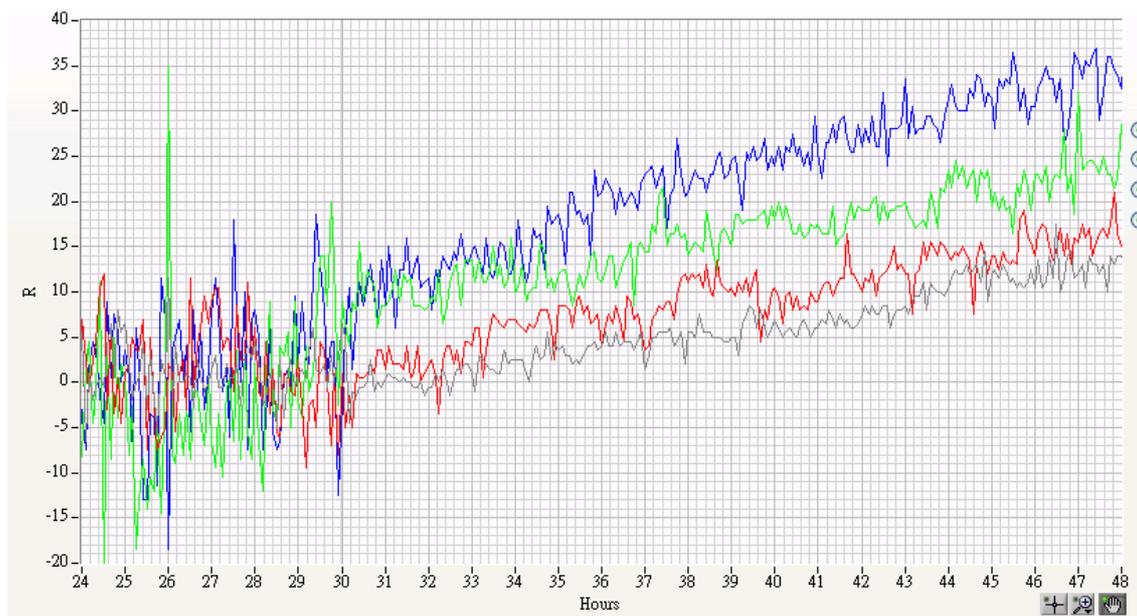


<圖 33>不與細胞膜連結的一抗(rabbit anti-Rat Ig)加上金粒子二抗

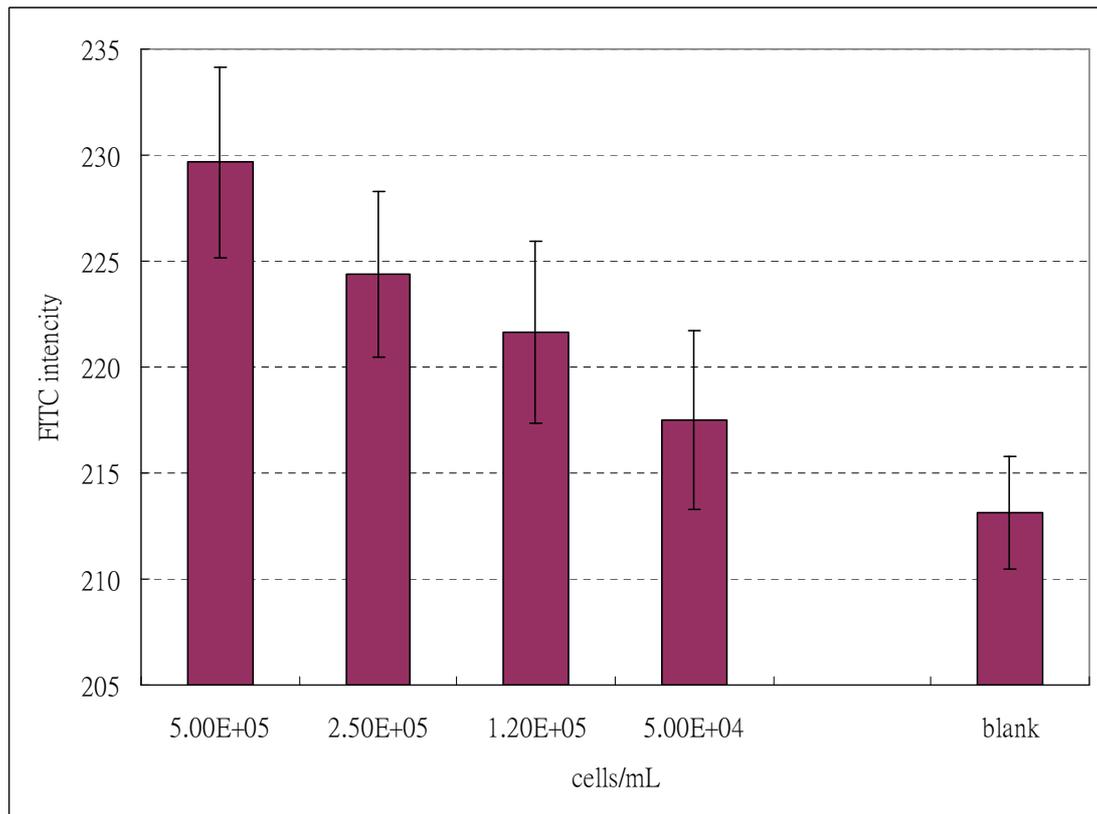
(goat anti Mouse IgG-Au) , [1(RatIg)+2]的  $\Delta R$  值則會比只加二抗[0+2]的高。



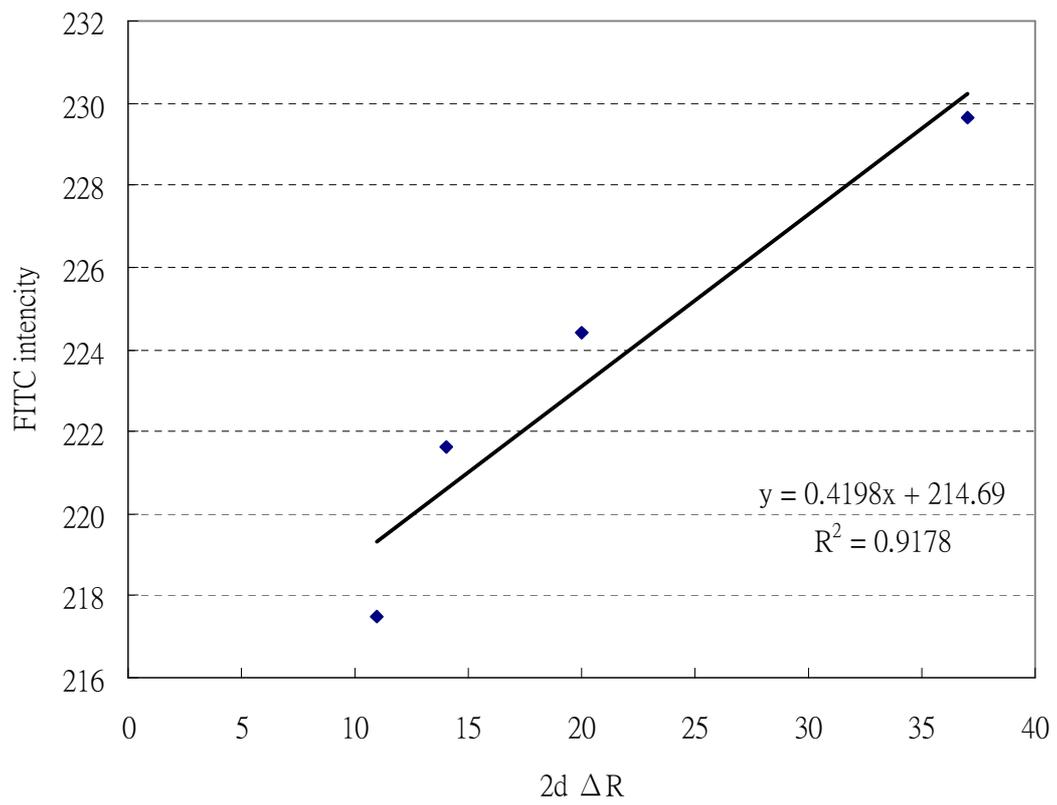
<圖 34>細胞免疫螢光染色。使用的一抗為 mouse anti-Integrin  $\beta 1$ ，二抗為帶螢光的 goat anti-Mouse IgG-FITC。在螢光顯微鏡下觀察(A)；及光學顯微鏡下觀察(B)。



<圖 35>不同細胞濃度加入 anti-Integrin 及帶金粒子二抗，24~48 小時  
 阻抗變化量( $\Delta R$ )之連續量測。接種細胞越多有越多的 Integrin  
 蛋白存在， $\Delta R$  值也越高。細胞隨時間增生，Integrin 的含量  
 也越多， $\Delta R$  值也有上升的趨勢。



<圖 36>不同的細胞濃度 Integrin 的螢光染色，細胞數量越多細胞膜上有越多的 Integrin 蛋白，也有越高的螢光密度讀值。



<圖 37>第 48 小時  $\Delta R$  值與螢光讀值之相關性分析。其線性迴歸

$R^2=0.9178$ ， $p<0.005$ 。