

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030013

參展科別 化學

作品名稱 ELISA-SERS 分析法應用於檢測卵巢癌前
驅因子—結合球蛋白

得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立中山女子高級中學

指導教師 江建文、陸仲文

作者姓名 許維芳、許維真

關鍵字 酵素連結免疫吸附分析法、表面增強拉曼光譜、
結合球蛋白

作者簡介



我們是就讀台北市立中山女高高二數理資優班的許維芳和許維真，很高興能在高中生涯進入台大化學實驗室做實驗，從中我們學習到許多平常不太會接觸的知識，使用以往不曾用過的儀器，不但開闊了視野，更在實驗中體會到許多的樂趣。我們十分感謝江教授、陸老師、學長及一路上支持鼓勵我們向前的人，儘管一路上遭遇到大大小小的困難與挫折，靠著大家的支持與協助，我們突破了種種瓶頸，一步一步地完成專題研究，並在這段日子留下難忘美好的回憶。

摘要

結合球蛋白(Hp)屬於一種急性反應期血清糖蛋白，目前廣泛作為預測卵巢癌的生物指標，檢測疑似卵巢癌腫瘤組織液中所含的Hp濃度，可判斷檢體是否為卵巢癌及是良性或惡性。

我們提出一種新穎的ELISA-SERS分析法，能靈敏地、可靠地定量分析結合球蛋白，首先競爭型ELISA反應得到黃色TMB²⁺，傳統的ELISA Reader 是測它在450 nm的吸光度而定量，而我們使用晶片及奈米金的表面增強拉曼光譜(SERS)，測TMB²⁺在1605 cm⁻¹的拉曼訊號強度，將訊號強度對數值與Hp濃度對數值作圖，得到非常好的線性關係，其相關係數平方值R²大於0.99，可做為結合球蛋白(Hp) 的標準檢量線，非常精準地測出濃度介於20.0µg/mL至0.078 µg/mL的HP。臨床檢驗上，先將抽出的腹水的濃度稀釋為原來的千分之一，此時臨界值介於2.0 µg/mL–2.5 µg/mL，正好落在我們創新的ELISA-SERS分析法標準檢量線的適用濃度範圍。

Abstract

A Sensitive SERS-based ELISA for Ovarian Cancer Prognostic Factor Haptoglobin

Haptoglobin (Hp) is an acute phase plasma glycoprotein that has been used as a biomarker for prognostic ovarian cancer. On top of using Hp for the detection of prognostic ovarian cancer, the concentration of Hp can also be used to distinct between benign and malignant tumors. Thus, a highly sensitive assay is desired to monitor Hp in a variety of samples. A novel SERS-based ELISA sensing technique which uses the unique TMB²⁺ signal is described. It comprises TMB that reacts with H₂O₂ to form TMB²⁺ generating a SERS signal at 1605 cm⁻¹, and either a SERS-active substrate or gold nanoparticles for signal enhancement. There is a strong linear correlation (R²=0.9946) between the TMB²⁺ SERS signal and the concentration of Hp. The detection range is from 20.0 µg/mL to 0.078 µg/mL, which covers the physiological level of Hp. The result is a specific and sensitive Hp assay which can be used with an extremely low sample volume (20 µL).

一、前言

(一)、研究動機

結合球蛋白(Hp)屬於一種急性反應期血清醣蛋白，它主要是由肝臟中的肝細胞產生，也有少量是由皮膚、腎臟、肺臟所產生，在正常情況下，人體中不存在Hp或僅有微量存在，然而當組織器官受到急性感染、發炎、創傷的刺激反應時，Hp的含量便會明顯地增加。近期研究指出，卵巢癌患者在腫瘤擴清手術前血清及腹水中Hp的含量升高，而化學治療後Hp的含量下降，現在臨床實驗室中偵測或定量Hp的常用方法是酵素催化法，例如ELISA。在ELISA中，藉由與發色基質作用產生的訊號，結合活性酵素的抗體便能夠被測得，訊號強度與樣品中Hp的存量相關，然而傳統ELISA的偵測方法靈敏度不高。

SERS 是一種強大新興的分子振動光譜技術，因為它具有多項優點，近幾年來，SERS 已被認同是一超靈敏的生物檢測平台，當具拉曼活性的分子接近粗糙的金屬表面，便可增強拉曼訊號 10 到 14 的數量級，這些強大的分子特徵訊號使 SERS 具有超高靈敏度和明確性。因此，我們的目標是將 SERS 運用在 ELISA 方法來偵測 Hp。

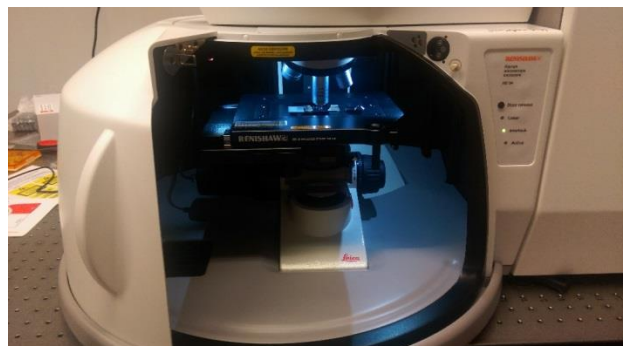
(二)、研究目的

1. 設計可以定量分析 Hp 的 ELISA。
2. 將 SERS 應用於 ELISA 分析法以提高靈敏度。
3. 建立 SERS 拉曼訊號強度與 Hp 濃度的標準線，以便臨床樣品檢驗。

二、研究方法或過程

(一)、設備及器材

1. 研究設備：拉曼光譜儀



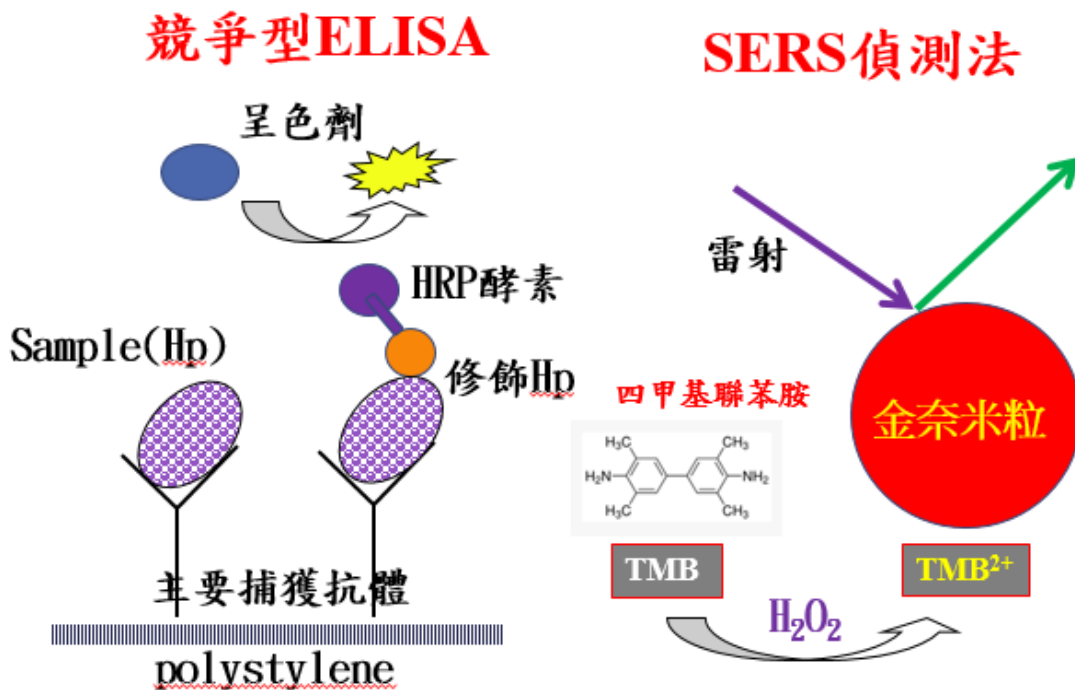
2. 器材：ELISA 用的檢測盤、微量分注器(pipet)、SERS 晶片

(二)、藥品

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10X Diluent N Concentrate (30 mL) | Haptoglobin Standard (20 µg/mL) | Biotinylated Human Haptoglobin | 20X Wash Buffer Concentrate (30 mL) |
| 稀釋劑 | 結合球蛋白標準液 | 生物素化人體結合球蛋白 | 沖洗緩衝液 |
|  |  |  |  |
| 100X Streptavidin-Peroxidase Conjugate (80 µL) | Chromogen Substrate (8 mL) | Stop Solution (12 mL) | Gold Colloid (60 nm) |
| 抗生蛋白鍊菌素-過氧化酶結合物 | 顯色劑 | 終止液 | 奈米金膠體溶液 (粒徑 60 nm) (保存於-4°C) |
|  |  |  |  |

(三)、研究方法

1. 酵素連結免疫吸附分析法(簡稱 ELISA)
競爭型 ELISA (competitive ELISA)
2. 表面增強拉曼光譜分析法(Surface-enhanced Raman spectroscopy 簡稱 SERS)
晶片 SERS、奈米金 SERS



(四)、步驟

1. 配製大用量溶液 (block solution)

(1) 配製稀釋液 1X 的 Diluent N (a 溶液)：

取 1 mL 的 10X Diluent N 加入 9 mL 的蒸餾水。

(2) 配製 1X 的 Biotinylated Haptoglobin (c 溶液)：

取 50 μL 的 4X Biotinylated Haptoglobin 加入 150 μL 的 a 溶液。

(3) 配製沖洗用緩衝液 1X 的 Wash Buffer (d 溶液)：

取 1 mL 的 20X Wash Buffer 加入 19 mL 的蒸餾水。

(4) 配製 1X 的 SP Conjugate (e 溶液)：

取 3 μL 的 100X SP Conjugate 加入 297 μL 的 a 溶液。

2. 奈米金溶液的配製

(1) 1X 奈米金：取 50 μL 粒徑 60 nm 的奈米金溶液置於離心管 A，置於 -4°C 的冰箱冷藏備用。

(2) 2X 奈米金：取 900 μL 的 1X 奈米金溶液離心，轉速 14020 rpm，離心 3 分鐘，停止後，抽出上層 450 μL 的澄清液，將下層溶液混合均勻，取出 50 μL 置於離心管 B，置於 -4°C 的冰箱冷藏備用。

(3) 4X 奈米金：取 400 μL 的 2X 奈米金溶液離心 3 分鐘後，抽出上層 200 μL 澄清液，將下層溶液混合均勻，取出 50 μL 置於離心管 C，置於 -4°C 的冰箱冷藏備用。

(4) 6X 奈米金：取 150 μL 的 4X 奈米金溶液離心 3 分鐘後，抽出上層 50 μL 澄清液，將下層溶液混合均勻，取出 50 μL 置於離心管 D，置於 -4°C 的冰箱冷藏備用。

3. 配製 HP 等比濃度標準液：

(1) 取五支離心管，分別記為離心管 1 ~ 6。

(2) 分別取 50 μL 的結合球蛋白標準液(Haptoglobin Standard)和 150 μL 的 A 溶液到離心管 1，記為 S1。

(3) 分別取 360 μL 的 A 溶液至離心管 2 ~ 6。

(4) 取 120 μL 的 S1 至離心管 2 並將之混合均勻，記為 S2。

(5) 取 120 μL 的 S2 至離心管 3 並將之混合均勻，記為 S3。

(6) 取 120 μL 的 S3 至離心管 4 並將之混合均勻，記為 S4。

(7) 取 120 μL 的 S4 至離心管 5 並將之混合均勻，記為 S5。

(8) 將離心管 6 記為 S6。

| 編號 | Hp 來源溶液的體積(μL) | 稀釋劑的體積(μL) | 總體積(μL) | Hp 最終濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Hp 濃度(μM) |
|----|-----------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|--|
| S1 | 25 | 0 | 25 | 20.00 | 0.2222 μM |
| S2 | 120 | 360 | 480 | 5.000 | 0.0555 M |
| S3 | 120 | 360 | 480 | 1.250 | 13.88 nM |
| S4 | 120 | 360 | 480 | 0.313 | 3.472 nM |
| S5 | 120 | 360 | 480 | 0.078 | 0.868 nM |
| S6 | 0 | 360 | 360 | 0 | 0 |

4. 競爭型 ELISA 反應

(1) 準備 6 個檢測盤，分別加入 25 μL 的 S1~S6 溶液，再加入 25 μL 的 c 溶液，貼上膠膜封。1 小時後，以 200 μL 的 d 溶液分批清洗檢測盤 3 次。

(2) 在檢測盤裡加入 50 μL 的 e 溶液，貼上膠膜後靜置，30 分鐘後，以 200 μL 的 d 溶液分批清洗檢測盤 3 次。

(3) 在檢測盤中加入 50 μL 顯色劑(Chromogen Substrate)，溶液呈藍色，貼上膠膜後靜置反應 15 分鐘，迅速在檢測盤中加入 50 μL 停止液(Stop Solution)，溶液呈淡黃色。

5. 晶片表面增強拉曼光譜法

(1) 取 10 μL 步驟 4 之 S6(不含 HP)反應後所得的淡黃色溶液滴於晶片中央，並放在載玻片上，覆蓋上蓋玻片。

(2) 將載玻片置入拉曼儀，雷射強度調整為 10%，進行 SERS 測量。

6. 奈米金表面增強拉曼光譜法

(1) 各取 10 μL 步驟 4 之 S6(不含 HP)反應後所得的淡黃色溶液加入裝有奈米金溶液的離心管 A~D 混合，取 20 μL 至載玻片，再覆蓋上蓋玻片。

(2) 將載玻片置入拉曼儀，雷射強度調整為 10%，進行 SERS 的測量。

7. HP 濃度標準檢量線－晶片 SERS 法

(1) 同步驟 5，各取 10 μL 步驟 4 之 S1-S5 反應後所得的淡黃色溶液，以晶片 SERS 法偵測。

(2) 將所得光譜數據做出 HP 濃度標準檢量線，並進行迴歸分析 (Regression Analysis)。

8. HP 濃度標準檢量線－奈米金 SERS 法

(1) 取 1000 μL 粒徑 60 nm 的奈米金溶液離心 3 分鐘，停止後，抽出上層 500 μL 澄清液，將下層溶液混合均勻，置於 -4°C 的冰箱冷藏備用，各取 10 μL 的 2X 奈米金溶液於 6 支離心管。

(2) 各取 10 μL 的步驟(二)之 3 反應後所得的淡黃色溶液加入上述 6 支離心管，從中分別取 20 μL 混合液至各載玻片，再覆蓋上蓋玻片。

(3) 將載玻片置入拉曼儀，雷射強度調整為 10%，進行 SERS 測量。

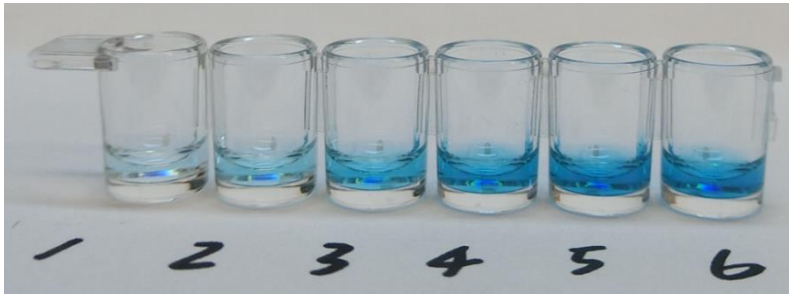
(4) 將所得光譜數據做出 HP 濃度標準檢量線，並進行迴歸分析 (Regression Analysis)。

三、研究結果與討論

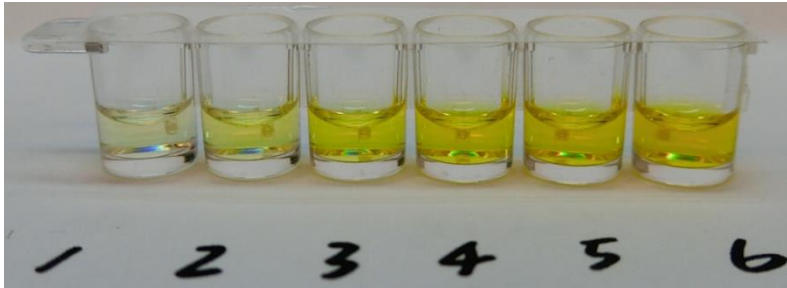
(一)、競爭型 ELISA 反應

※研究結果：

1. 在檢測盤中加入 50 μL 顯色劑，溶液呈藍色。

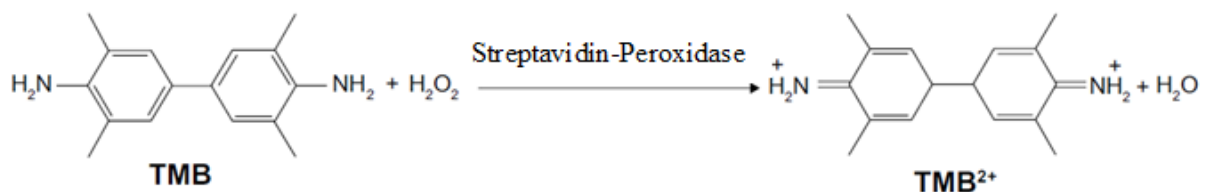


2. 在檢測盤中加入 50 μL 停止液，溶液呈淡黃色。



※討論：

1. 實際應用上 ELISA 又細分為多種方法，本研究使用競爭法測 Hp 的濃度，在 96 孔 ELISA 專用檢測盤中已包被(coating)了 Hp 的專一結合抗體，結合球蛋白標準液(Haptoglobin Standard)與生物素化結合球蛋白(Biotinylated Human Haptoglobin)同時加入檢測盤中，此兩種抗原競爭與檢測盤上的固相抗體結合，將未結合的抗原以沖洗緩衝液(Wash Buffer)洗滌去掉，接著加入過氧化物酶結合物(Streptavidin-Peroxidase Conjugate)，僅有生物素化結合球蛋白可以與過氧化物酶結合形成酶標抗原，再將未結合的過氧化物酶以沖洗緩衝液洗滌去掉。
2. ELISA 的檢測必須加入顯色劑基質(Chromogen Substrate)，再經由酶標抗原的催化而顯色，藉由 ELISA Reader 測吸光度而定量，本研究使用含過氧化氫(H_2O_2)的四甲基聯苯胺(TMB)溶液作為基質，酶標抗原催化過氧化氫(H_2O_2)氧化四甲基聯苯胺(TMB)成藍色溶液，固定反應一段時間後加入終止液(Stop Solution)生成黃色的 TMB^{2+} ，傳統的 ELISA Reader 便是測黃色的 TMB^{2+} 在 450 nm 的吸光度而定量。



3. 本實驗結果，隨著由 S1 至 S6 溶液的 HP 濃度逐漸減少，溶液的顏色逐漸變深，此因競爭法 ELISA 樣品中抗原(Hp)的濃度愈稀薄，則結合在固相上的酶標抗原愈多，催化反應速率愈快，固定反應時間，最後生成的 TMB²⁺愈多，顯色也愈深，所以吸光度與樣品中 Hp 濃度具有負相關性，可做出 Hp 濃度的標準檢量線。

(二)、SERS 分析法的最佳條件

※研究結果：

1. 編號 S6(不含 Hp)反應後的黃色溶液(含 TMB²⁺)顏色最深，分別使用晶片及不同濃度的奈米金增強其拉曼訊號，結果如表一。

(1) 使用奈米金比使用晶片增強拉曼訊號的效果好。

(2) 濃度 2 倍(2X)奈米金對增強拉曼訊號的效果最佳。

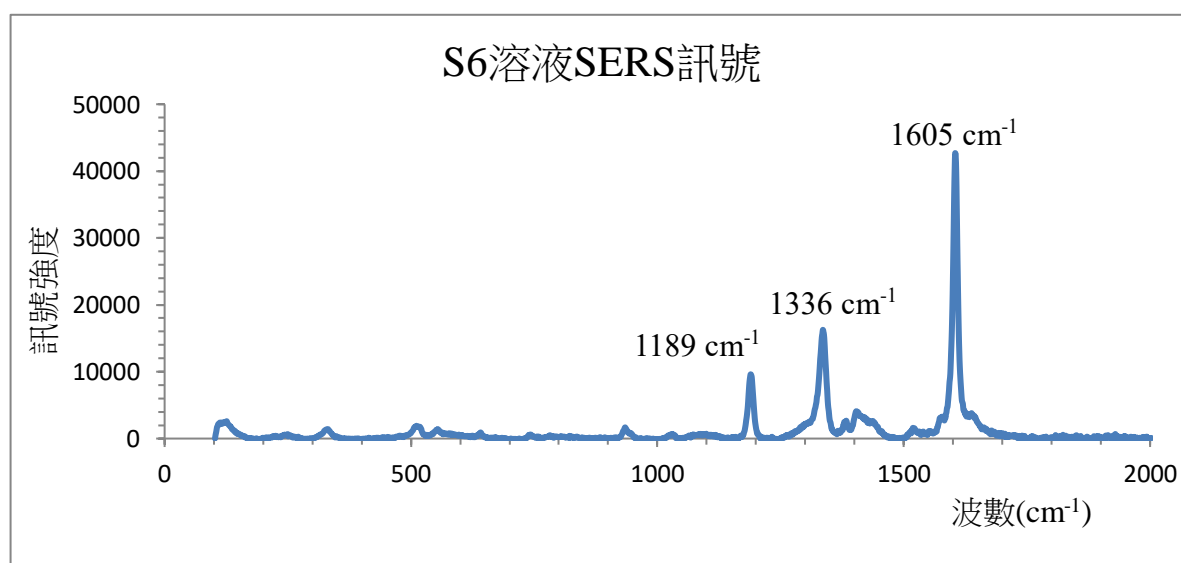
表一：編號 S6 的表面增強拉曼光譜，波數 1605 cm⁻¹ 的訊號強度。

| SERS | 晶片 | 1X 奈米金 | 2X 奈米金 | 4X 奈米金 | 6X 奈米金 |
|-------------------------------|------|--------|--------|--------|--------|
| 1605 cm ⁻¹ 訊號強度 | 3832 | 20758 | 42698 | 27301 | 16038 |

2. 編號 S6(不含 Hp)反應後的黃色溶液(含 TMB²⁺)加入 2 倍(2X)濃度粒徑 60 nm 的奈米金溶液，拉曼光譜儀的雷射強度訂為 10%，得到表面增強拉曼光譜圖如圖一。

(1) 在波數 (Wave number) 1189 cm⁻¹、1336 cm⁻¹、1605 cm⁻¹ 有很顯著的 3 個峰值。

(2) 波數 1605 cm⁻¹ 處的訊號強度最大。



圖一：編號 S6(不含 Hp)反應後，加入 2X 濃度奈米金溶液的表面增強拉曼光譜圖

※討論：

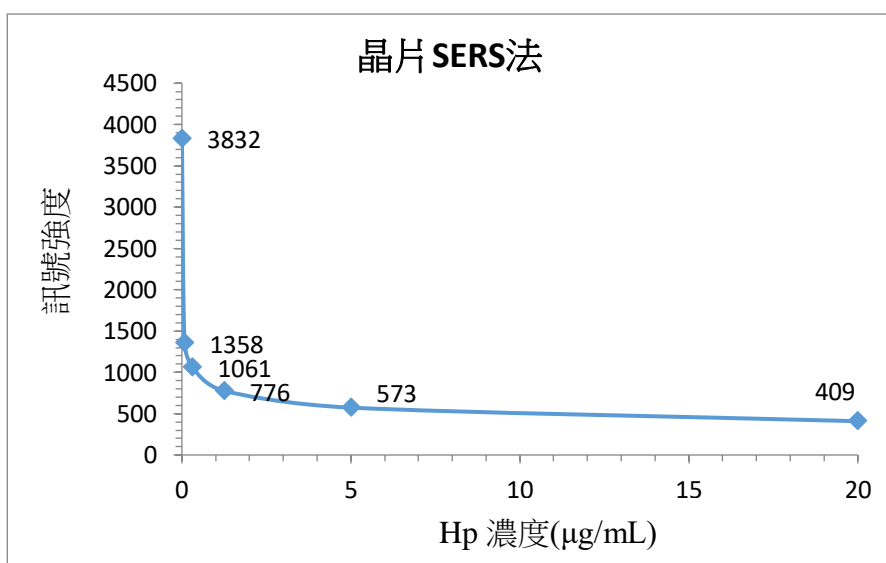
1. 黃色的 TMB²⁺除了在 450 nm 有很好的吸收峰，它也具有拉曼活性，因此我們不採用傳統測吸光度的偵測法，而改用表面增強拉曼光譜(SERS)來偵測 TMB²⁺的濃度。
2. 我們分別使用粒徑 60 nm 的奈米金膠體(Gold Colloid)及晶片(Chips)來增強拉曼訊號強度，由圖一看出 S6 溶液(不含 Hp)反應後，在波數 (Wave number) 1189 cm⁻¹、1336 cm⁻¹、1605 cm⁻¹ 有很顯著的峰值。
3. 由表一得知粒徑 60 nm 奈米金膠體溶液比晶片對增強拉曼訊號效果好，而各種濃度的奈米金溶液中，又以濃縮原始奈米金溶液為 2 倍濃度時對增強拉曼訊號效果最佳，因此我們除了使用晶片 SERS 法做 HP 濃度的標準檢量線，還使用了 2 倍濃度奈米金 SERS 法做 HP 濃度的標準檢量線。

(三)、HP 濃度標準檢量線—晶片 SERS 法

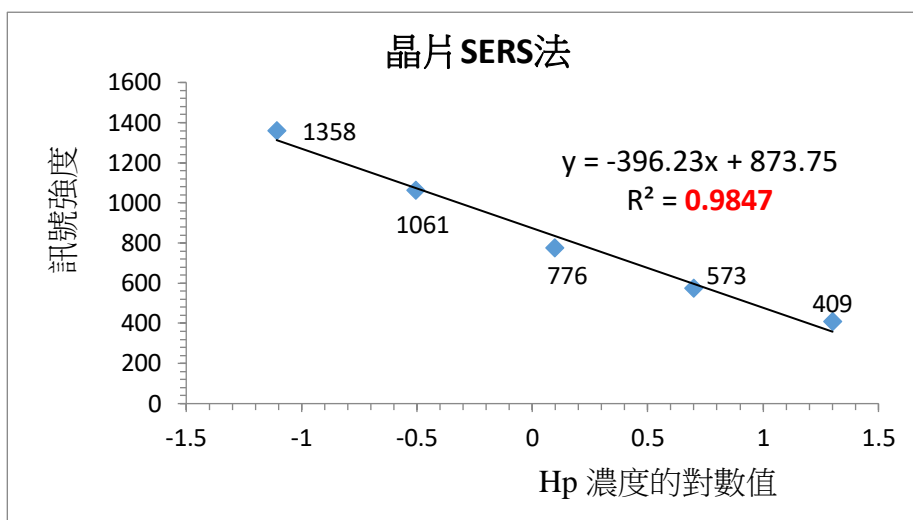
※研究結果：

表二：各種濃度的 Hp 以晶片 SERS 法測拉曼訊號，在峰值 1605 cm⁻¹ 的訊號強度。

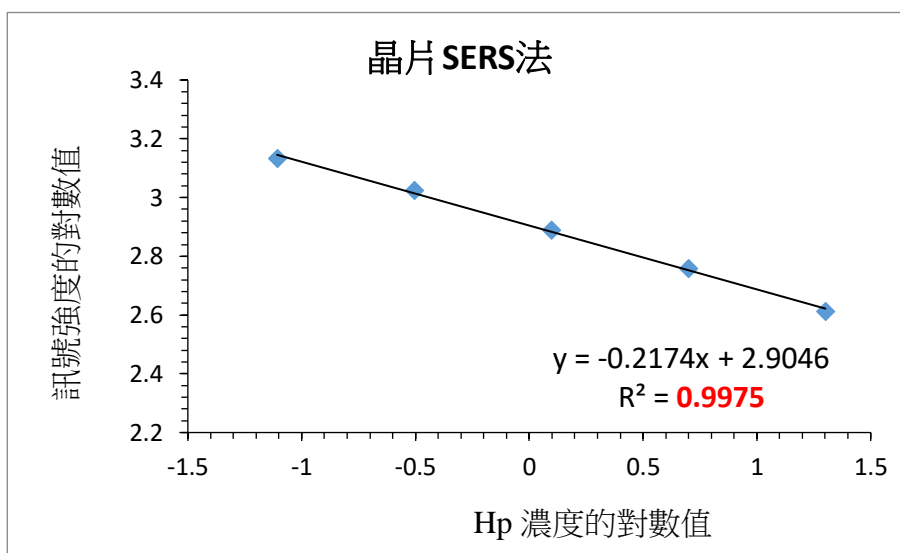
| 編號 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
|-----------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| 濃度(μg/mL) | 20.0 | 5.00 | 1.25 | 0.313 | 0.0783 | 0 |
| 濃度對數值 | 1.301 | 0.699 | 0.097 | -0.505 | -1.108 | — |
| 訊號強度 | 409 | 573 | 776 | 1061 | 1358 | 3832 |
| 訊號強度對數值 | 2.612 | 2.758 | 2.89 | 3.025 | 3.133 | 3.583 |



圖二：在 1605 cm⁻¹ 峰值的晶片 SERS 訊號強度與 Hp 濃度(編號 S1 至 S6)的關係圖。



圖三：在 1605 cm^{-1} 峰值的晶片 SERS 訊號強度對數值與 Hp 濃度(S1 至 S5)的關係圖。



圖四：在 1605 cm^{-1} 峰值的晶片 SERS 訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值(S1 至 S5)的關係圖。

※討論：

1. 我們以 ELISA 結合晶片 SERS 法做 Hp 的標準檢量線，配製 Hp 標準液 S1~S6，濃度以等比級數改變，分別為 20.0、5.00、1.25、0.313、0.0783、0 $\mu\text{g/mL}$ ，實驗結果中，取峰值最大的 1605 cm^{-1} 訊號強度紀錄於表二，圖二為 1605 cm^{-1} 峰值的拉曼訊號強度與 Hp 濃度的關係圖，隨著 Hp 的濃度越小，拉曼訊號強度越大，但兩者並沒有線性關係。
2. 接著我們將數據進行迴歸分析 (Regression Analysis)，希望找到具有高相關係數 (Correlation coefficient) 的線性回歸線 (Linear regression)，首先將拉曼訊號強度對 Hp 濃度(S1 至 S5)的對數值作圖如圖四，得到很好的線性關係，其相關係數平方值(R-squared value) R^2 等於 0.9847。

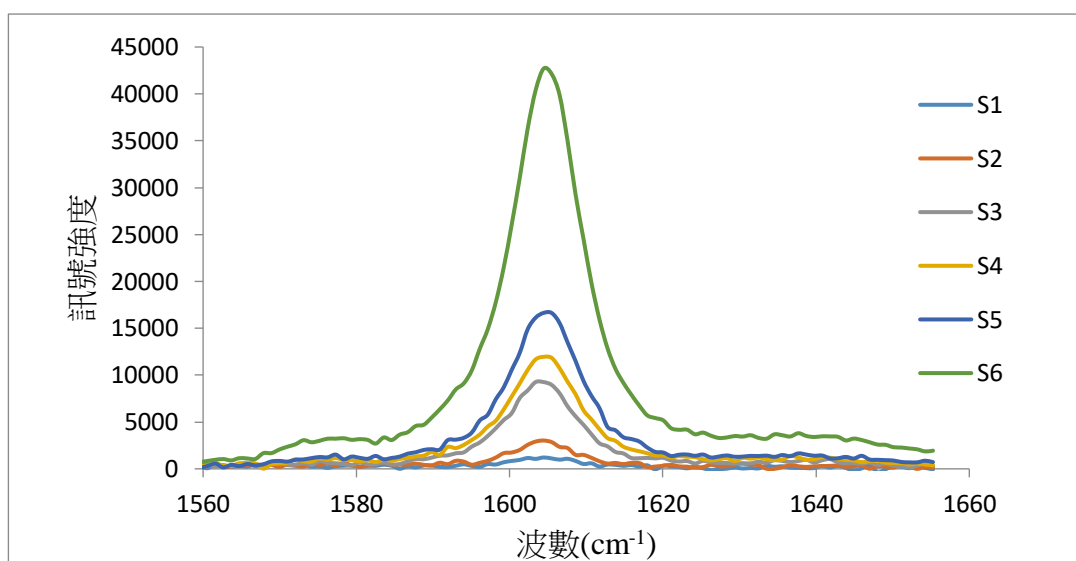
3. 更進一步，我們將拉曼訊號強度也取對數值，做 1605 cm^{-1} 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度(S1 至 S5)對數值的關係圖如圖五，得到非常好的線性關係，其相關係數平方值 (R-squared value) R^2 等於 0.9975，利用此關係圖做為結合球蛋白(Hp) 的標準檢量線，可以非常精準地測出濃度介於 $20.0\mu\text{g/mL}$ 至 $0.0783\mu\text{g/mL}$ 的 HP 濃度。

(四)、HP 濃度標準檢量線－奈米金 SERS 法

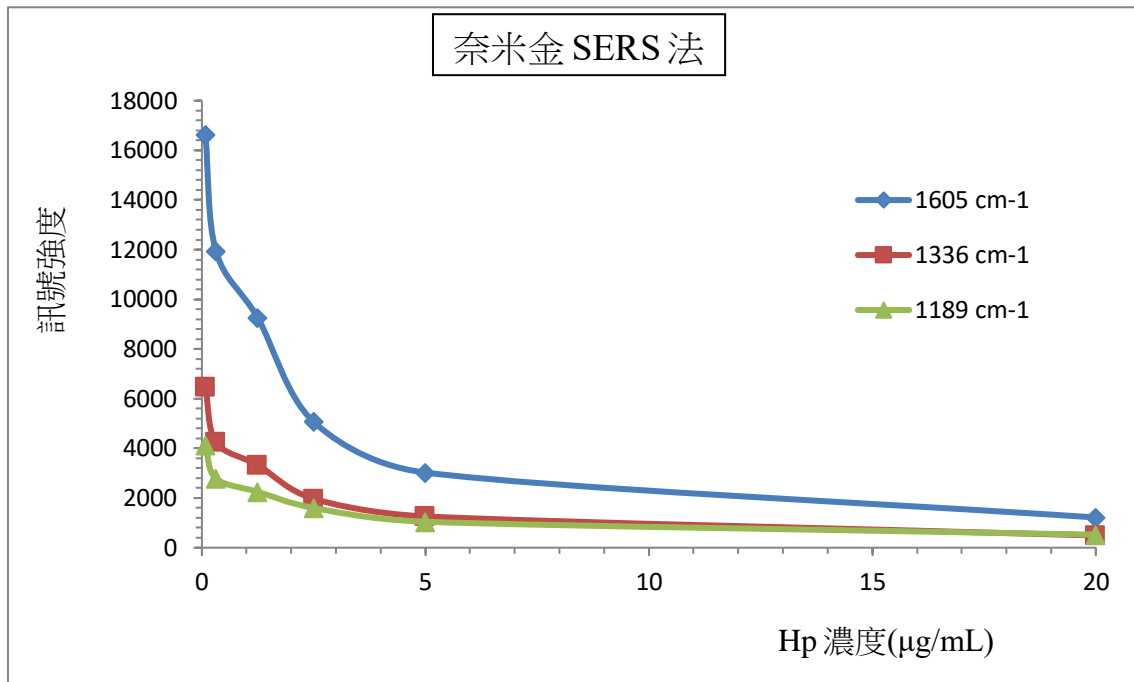
※研究結果：

表三：各種濃度的 Hp 分別加入 2X 濃度的奈米金溶液測拉曼訊號，在三個峰值 1189 cm^{-1} 、 1336 cm^{-1} 、 1605 cm^{-1} 的訊號強度。

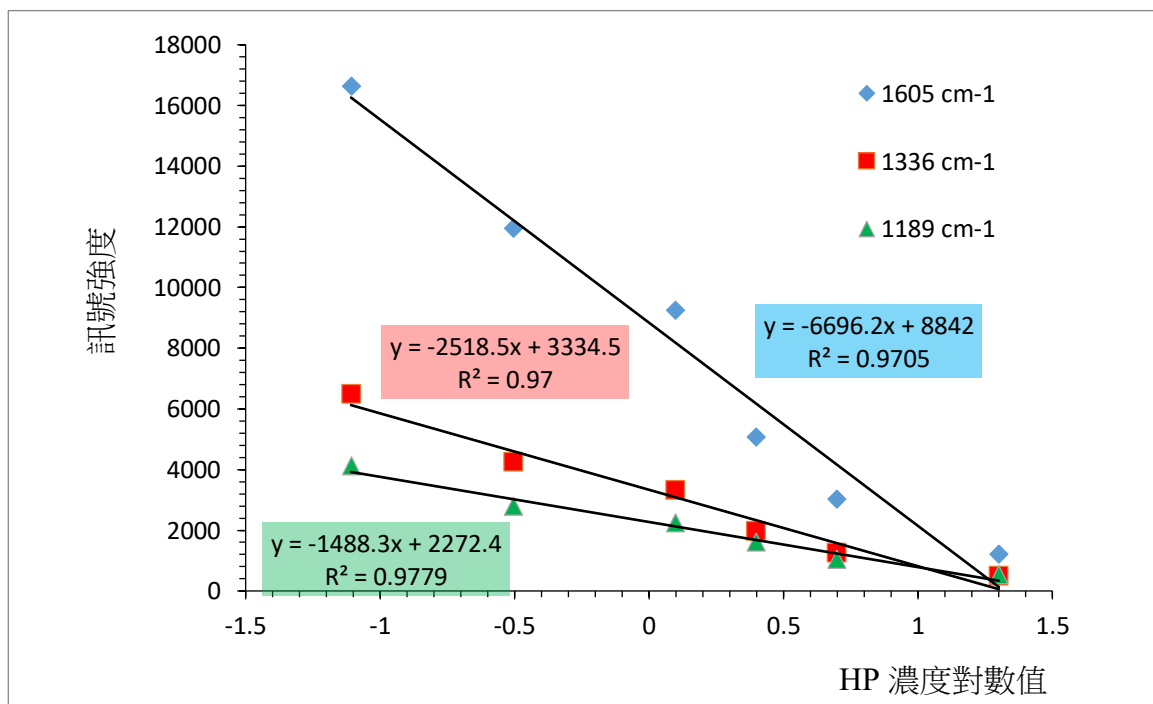
| 編號 | S1 | S2 | S2.5 | S3 | S4 | S5 | S6 |
|-------------------------|------|------|------|------|-------|--------|-------|
| 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 20.0 | 5.00 | 2.5 | 1.25 | 0.313 | 0.0783 | 0 |
| 1189 cm^{-1} | 524 | 1044 | 1602 | 2251 | 2787 | 4114 | 9605 |
| 1336 cm^{-1} | 491 | 1259 | 1969 | 3326 | 4257 | 6484 | 16261 |
| 1605 cm^{-1} | 1214 | 3023 | 5069 | 9255 | 11949 | 16636 | 42698 |



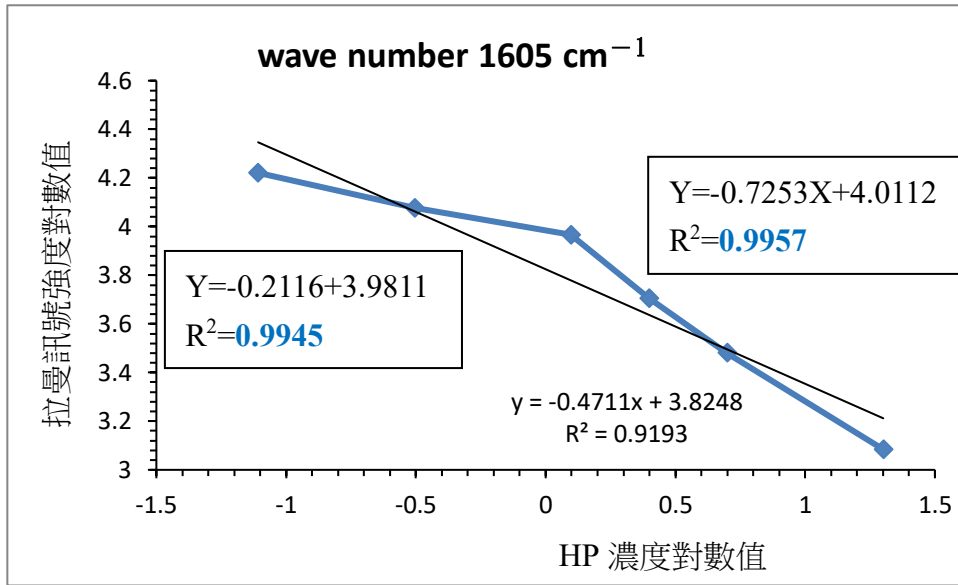
圖五：編號 S1 至 S6(含不同濃度 Hp)在峰值 1605 cm^{-1} 的訊號強度比較。



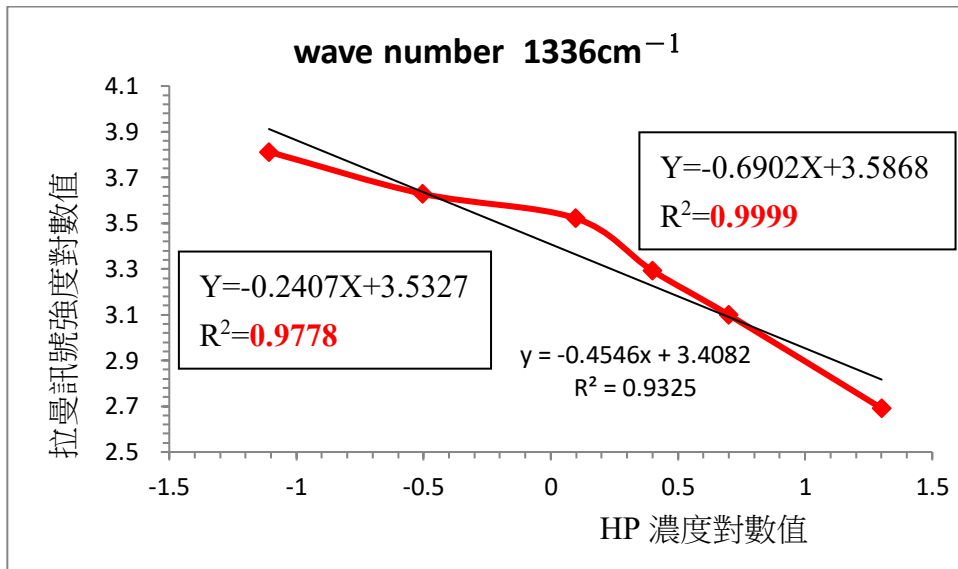
圖六：在 1605 cm⁻¹、1336 cm⁻¹ 和 1189 cm⁻¹ 三個峰值的拉曼訊號強度與 Hp 濃度 (編號 S1 至 S6) 的關係圖。



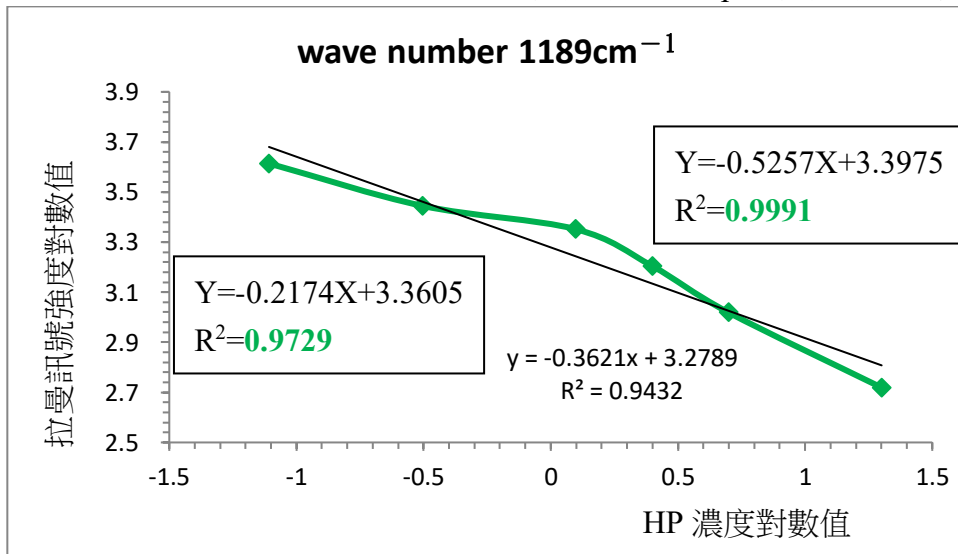
圖七：奈米金 SERS 法在 1605 cm⁻¹、1336 cm⁻¹ 和 1189 cm⁻¹ 三個峰值的拉曼訊號強度與 Hp 濃度對數值的關係圖。



圖八：奈米金 SERS 法在 1605 cm⁻¹ 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖。



圖九：奈米金 SERS 法在 1336 cm⁻¹ 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖。



圖十：奈米金 SERS 法在 1189 cm⁻¹ 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖。

※討論：

1. 我們以 ELISA 結合奈米金 SERS 法做 Hp 的標準檢量線，除了原本 S1~S6 溶液之外，增加 S2.5=2.50 $\mu\text{g/mL}$ ，將實驗結果，取 1605 cm^{-1} 、1336 cm^{-1} 和 1189 cm^{-1} 三個峰值的拉曼訊號強度紀錄於表三。
2. 圖五為 S1 至 S6 溶液在峰值 1605 cm^{-1} 的訊號強度比較，得知隨著 Hp 的濃度越小，拉曼訊號強度越大。
3. 圖六為 S1 至 S6 溶液三個峰值的拉曼訊號強度與 Hp 濃度的關係圖，拉曼訊號強度與 Hp 濃度均呈負相關，但沒有線性關係。
4. 接著我們將數據進行迴歸分析，首先將拉曼訊號強度對 Hp 濃度的對數值作圖如圖七，在 1605 cm^{-1} 、1336 cm^{-1} 和 1189 cm^{-1} 三個峰值均得到很好的線性關係，其相關係數平方值(R-squared value) R^2 都大於 0.97。
5. 更進一步，我們將拉曼訊號強度也取對數值，做 1605 cm^{-1} 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度(S1 至 S5)對數值的關係圖如圖八，得到相關係數較差($R^2=0.9253$)的線性回歸線，但若將數據分成高、低濃度兩組，高濃度組(S1、S2、S2.5、S3)得到斜率(0.73)較大的線性回歸線，低濃度組(S3、S4、S5)得到斜率(0.21)較小的線性回歸線，兩回歸線都有非常好的線性關係，其相關係數平方值 R^2 都大於 0.99。
6. 同樣地，做 1336 cm^{-1} 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖如圖九，做 1189 cm^{-1} 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖如圖十，在高濃度組(S1、S2、S2.5、S3)均可得到相關係數平方值 R^2 都大於 0.99 的線性回歸線。
7. 利用 ELISA—奈米金 SERS 法，拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖，做為結合球蛋白(Hp) 的標準檢量線，可以非常精準地測出濃度介於 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 至 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 的 HP 濃度。

四、結論與應用

(一)、結論

1. 利用競爭型 ELISA 法檢測結合球蛋白(Hp)，以四甲基聯苯胺作為顯色劑基質，除了傳

統上測 TMB²⁺ 在 450 nm 的吸光度而定量 Hp 之外，可以改用表面增強拉曼光譜法(SERS) 來偵測 TMB²⁺ 在 1605 cm⁻¹、1336 cm⁻¹ 和 1189 cm⁻¹ 三個峰值的拉曼訊號強度以便定量 Hp 濃度。

2. 使用奈米金膠體及晶片均可增強拉曼訊號強度，我們發現濃縮原始奈米金溶液為 2 倍時對增強拉曼訊號效果最佳。
3. 我們以 ELISA-SERS 分析法做 Hp 濃度的標準檢量線，競爭型 ELISA 隨著 Hp 的濃度愈小，拉曼訊號強度愈大，因此可以測出極低濃度的 Hp。若將拉曼訊號強度與 Hp 濃度均取對數值而後做關係圖，則有很好的線性關係。
4. 利用晶片 SERS 法做出 1605 cm⁻¹ 拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖，得到相關係數平方值 R² 等於 0.9975 的線性回歸線，可以做為結合球蛋白(Hp) 的標準檢量線，非常精準地測出濃度介於 20.0µg/mL 至 0.0783 µg/mL 的 HP。
5. 利用奈米金 SERS 法做出 1605 cm⁻¹、1336 cm⁻¹ 和 1189 cm⁻¹ 三個拉曼訊號強度對數值與 Hp 濃度對數值的關係圖，在較高濃度時，均可得到相關係數平方值 R² 大於 0.99 的線性回歸線，可以做為結合球蛋白(Hp) 的標準檢量線，非常精準地測出濃度介於 20.0µg/mL 至 1.25 µg/mL 的 HP。
6. 我們融合了 ELISA 與 SERS，使兩種分析法相得益彰，將其應用於檢測卵巢癌的前驅因子—Hp，將來以此分析模式設計流程檢驗其它抗原和抗體，可做為各類臨床醫學快速、靈敏的檢驗法。

(二)、應用

1. 從卵巢癌腫瘤抽取出的腹水所含 HP 濃度，若高於臨界值則為惡性(malignant)腫瘤的機率很高，若低於臨界值則為良性(benign)腫瘤的機率很高，而此臨界值介於 23–28 µM(約 2.0 mg/mL–2.5 mg/mL)，臨床檢驗上，先將抽出的腹水的濃度稀釋為原來的千分之一，此時臨界值介於 2.0 µg/mL–2.5 µg/mL，正好落在我們創新的 ELISA-SERS 分析法標準檢量線的適用濃度範圍。
2. 從醫院取得已知惡性或良性腫瘤的各種腫瘤檢體，經由我們 ELISA-SERS 分析法檢測，累積大數據後，便可建立各種腫瘤的良性惡性臨界值範圍。

五、參考文獻

1. K.V. Kong, Z.Y. Lam, Weber Kam On Lau, Weng Kee Leong, and Malini Olivo. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 18028–18031
2. Zhao C1, Annamalai L, Guo C, et al. Circulating haptoglobin is an independent prognostic factor in the sera of patients with epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*. 2007;9(1):1–7.
3. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods*. 1992;150(1–2):5–21.
4. “PHASE”™ Haptoglobin Assay Cat. No. TP-801. Tridelta Development Limited. Available from: [http://www.nordiclabsupply.se / modules /pdf2/ Haptoglobin%20Assay.pdf](http://www.nordiclabsupply.se/modules/pdf2/Haptoglobin%20Assay.pdf). Accessed January 28, 2014.

【評語】 030013

作者使用 ELISA-SERS 分析法偵測結合球蛋白，uv-vis 的方法，獲得很好的偵測極限，作品完整，但須強化偵測極限之定義，與如何獲得 SERS 的靈敏度比 uv-vis 儀器強，應該可以獲得更低的偵測極限。