

# การประยุกต์ใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ ในไบโอเซนเซอร์

โชคชัย พุทธิรักษา\*

## บทคัดย่อ

เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) เป็นไบโอเซนเซอร์เชิงแสงที่ใช้ประโยชน์จาก evanescent field ในการตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างสาร analyte และคู่สารชีวภาพ (biomolecular recognition molecules) ที่ตรึงอยู่บนพื้นผิว SPR เซนเซอร์ซึ่งมีความจำเพาะต่อสาร analyte การประยุกต์ใช้เทคนิค SPR ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการวัดสาร analyte ที่สนใจ และการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างสารชีวภาพ เทคนิค SPR เป็นเทคโนโลยีที่ไม่ต้องการโมเลกุลติดฉลาก และสามารถติดตามการตรวจวัดได้ตลอดเวลา (real-time monitoring) บทความนี้จะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยี SPR และการประยุกต์ใช้เทคนิค SPR สำหรับตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ ไป

**คำสำคัญ:** คลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) SPR ไบโอเซนเซอร์ การตรวจวัดสารชีวภาพ

# Applications of Surface Plasmon Resonance Technique in Biosensor

**Chokchai Puttharugsa\***

---

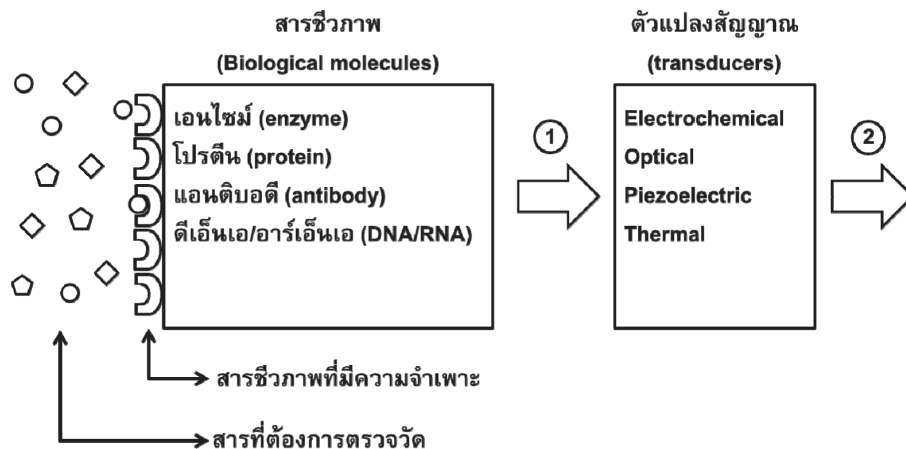
## ABSTRACT

Surface plasmon resonance (SPR) is an optical biosensor which exploits an evanescent field to measure an interaction between analytes and biomolecular recognition molecules on a sensor surface. Major application of SPR includes detection of biological analytes and analysis of biomolecular interaction. An advantage of SPR is label-free and real-time monitoring technology. This paper reviews the fundamental of SPR technology and its applications.

**Keywords:** Surface plasmon resonance, SPR biosensor, Biomolecular detection

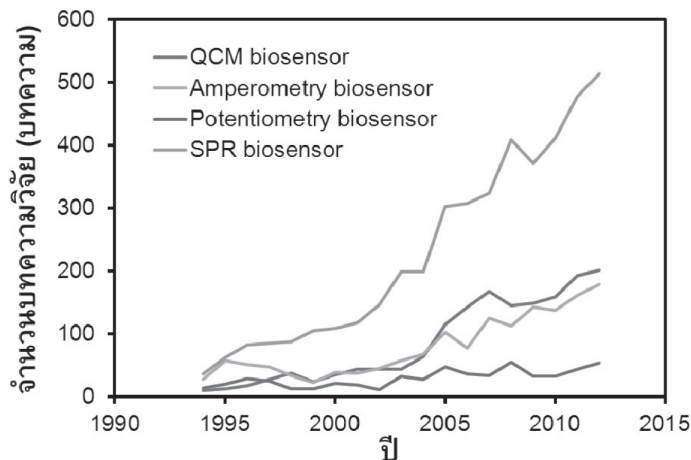
## บทนำ

ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือหรืออุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างจำเพาะเจาะจง และใช้ตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด เช่น ฮอร์โมน โปรตีน ไวรัส แบคทีเรีย เป็นต้น ไบโอเซนเซอร์จะประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญคือ สารชีวภาพ (biological substance) และทรานสดิวเซอร์ (transducer) หรือตัวแปลงสัญญาณ [1, 2] โดยที่ส่วนของสารชีวภาพต้องมีความจำเพาะ (specificity) ต่อสารที่ต้องการตรวจวัด (analytes) รูปที่ 1 แสดงหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์แบบต่างๆ เมื่อสารชีวภาพทำปฏิกิริยาต่อสารที่ต้องการตรวจวัด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี และตัวแปลงสัญญาณทำหน้าที่แปลงสัญญาณทางชีวภาพไปเป็นสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ เช่น สัญญาณไฟฟ้า แสง และความร้อน เป็นต้น ดังนั้นการเลือกตัวแปลงสัญญาณจะต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับสัญญาณทางชีวภาพที่เกิดขึ้น ซึ่งทำให้การตรวจวัดสารชีวภาพมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น สำหรับเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) หรือเทคนิค SPR เป็นไบโอเซนเซอร์เชิงแสง (optical biosensor) ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเห (refractive index) บนพื้นผิวโลหะ ซึ่งมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ โดยมีข้อได้เปรียบคือเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ต้องการโมเลกุลติดฉลาก (label-free) และสามารถติดตามการตรวจวัดได้ตลอดเวลา (real-time monitoring)



**รูปที่ 1** แผนภาพแสดงหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ประกอบด้วยส่วนของสารชีวภาพ และตัวแปลงสัญญาณ เมื่อสารชีวภาพที่มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจวัดเกิดการจับกัน หรือทำปฏิกิริยาต่อกัน ทำให้เกิดสัญญาณทางกายภาพ หรือทางเคมี (ขั้นตอนที่ 1) โดยที่ตัวแปลงสัญญาณจะทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นให้สามารถตรวจวัดได้ (ขั้นตอนที่ 2) (ดัดแปลงจาก [1])

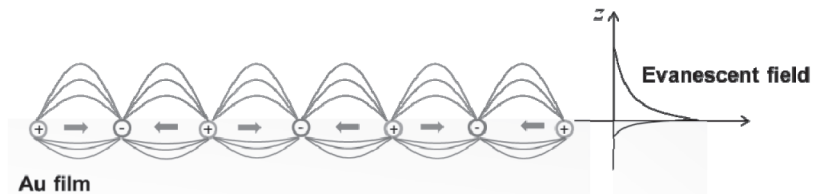
SPR เป็นไบโอเซนเซอร์เชิงแสงที่มีความไวต่อการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเห บนพื้นผิวระหว่างชั้นโลหะ (metal layer) และชั้นไดอิเล็กทริก (dielectric layer) หรือชั้นสารตัวอย่าง (sample layer) SPR ไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการเข้าคู่กันของสารชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น โปรตีน-โปรตีน โปรตีน-ดีเอ็นเอ เอนไซม์-ซับสเตรท และแอนติเจน-แอนติบอดี [3-6] เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิค SPR ในด้านชีวการแพทย์ส่วนใหญ่จะเป็นการวัดค่า affinity ของคู่สารชีวภาพ ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างยากับโปรตีน (drug-protein interaction) [7] การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ (enzymatic turnover analysis) [8] การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง-ฟังก์ชันของโปรตีนและลิแกนด์ (analysis of structure-function relationship of protein and ligand) [9] และการทำ epitope mapping ของโปรตีนด้วยแอนติบอดี [10] ปัจจุบันเทคนิค SPR ได้รับความนิยมสูง โดยมีงานวิจัยที่ตีพิมพ์อย่างต่อเนื่องในฐานข้อมูลงานวิจัยของเว็บไซต์ ScienceDirect เมื่อเทียบกับไบโอเซนเซอร์แบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นว่างานวิจัยที่เกี่ยวกับ SPR ไบโอเซนเซอร์มีผลงานตีพิมพ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2000 จนกระทั่งปัจจุบัน และมีแนวโน้มสูงชันอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 2 แสดงจำนวนบทความวิจัยในฐานข้อมูลของเว็บไซต์ Science Direct ที่เกี่ยวข้องกับไบโอเซนเซอร์แบบต่างๆ โดยใช้คำค้นหา (key word) ดังแสดงในกราฟ

## SPR ไบโอสเซนเซอร์

เทคนิค SPR จะอาศัยคลื่นผิวพลาสมอน (surface plasmon) ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหของสารตัวกลางบนพื้นผิวเซนเซอร์ ซึ่งนำมาสู่การประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดการเข้าคู่กันของสารชีวภาพ คลื่นผิวพลาสมอนเป็นคลื่นที่สั้นอย่างพร้อมเพรียงของประจุที่บริเวณพื้นผิวโลหะ ลักษณะเฉพาะของคลื่นผิวพลาสมอนคือ แอมพลิจูดของสนามไฟฟ้ามีค่าสูงสุดที่ชั้นรอยต่อระหว่างผิวโลหะและชั้นไดอิเล็กทริก และมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วแบบเอกซ์โพเนนเชียลเมื่ออยู่ห่างจากผิวโลหะ โดยมีระยะยั้งผล (penetration depth) ประมาณ 200-300 นาโนเมตร ซึ่งจะเรียกสนามไฟฟ้านี้ว่า evanescent field นอกจากนี้คลื่นผิวพลาสมอนสามารถเคลื่อนที่ไปตามพื้นผิวรอยต่อระหว่างชั้นไดอิเล็กทริกและชั้นโลหะ (propagation length) ได้ในระยะประมาณ 10-20 ไมโครเมตร ก็จะสูญเสียพลังงานจนหมด [11] ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของคลื่นผิวพลาสมอนและ evanescent field  
เนื่องมาจากคลื่นผิวพลาสมอน (ดัดแปลงจาก [12])

วิธีการกระตุ้นคลื่นผิวพลาสมอนที่นิยมใช้ทั่วไปจะใช้การจัดแสงแบบ “Kretschmann configuration” [13] แสดงดังรูปที่ 4 โดยให้แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ยิงผ่านปริซึม และตกกระทบกับฟิล์มบางของโลหะซึ่งเคลือบอยู่บนปริซึม และแสงจะสะท้อนเข้าสู่ตัวตรวจจับแสง (detector) โดยฟิล์มบางของโลหะที่สามารถเกิดปรากฏการณ์ SPR ได้คือ ทอง เงิน และโครเมียม แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือทอง เนื่องจากมีความเสถียรสูง และเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ได้ยาก โดยที่ความหนาของชั้นฟิล์มบางของทองโดยทั่วไปจะมีค่าประมาณ 50 นาโนเมตร เงื่อนไขการเกิดปรากฏการณ์ SPR คือ ค่าเวกเตอร์ของแสงตกกระทบในแนวขนานกับพื้นผิวโลหะ ( $k_x$ ) ต้องมีขนาดเท่ากับเวกเตอร์ของคลื่นผิวพลาสมอน ( $k_x$ ) โดยที่

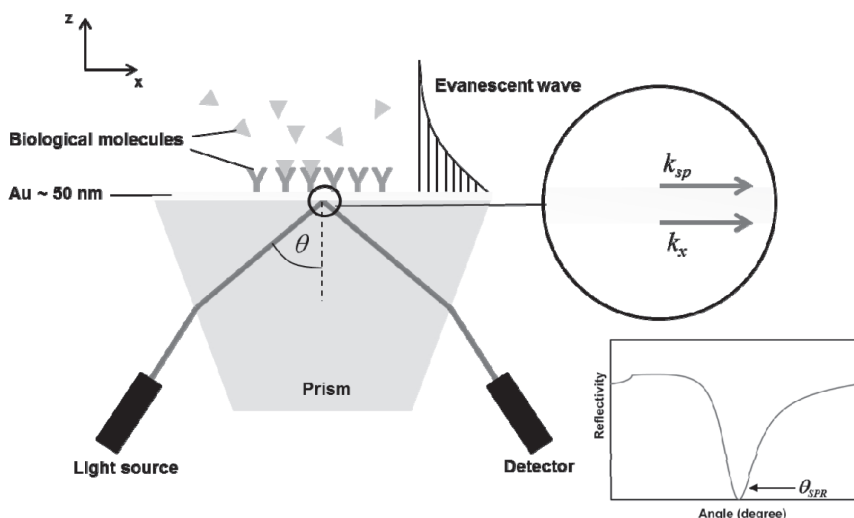
$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$k_{sp} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อเกิดปรากฏการณ์ SPR นั่นคือ จะได้

$$\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) n_p \sin \theta = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

เมื่อ  $\epsilon_M$  และ  $\epsilon_D$  คือค่า dielectric permittivity ของชั้นโลหะและชั้นสารไดอิเล็กทริก ตามลำดับ  $\lambda$  คือความยาวคลื่นของแสงตกกระทบ  $n_p$  คือค่าดัชนีหักเหของปริซึม  $\theta$  เป็นมุมตกกระทบ ของแสง  $k_0$  คือ free space wave vector เนื่องจากคลื่นผิวพลาสมอนมีทิศทางขนานกับระนาบ การเคลื่อนที่ของคลื่น และมีทิศทางสนามไฟฟ้าในแนวตั้งฉากกับระนาบตกกระทบ ซึ่งมีทิศทางโพลาไรเซชัน (polarization) เป็นแบบ “P” (เวฟเวกเตอร์  $k_{sp}$  ดังแสดงในรูปที่ 4 ด้านขวาบน) ดังนั้นแสงตกกระทบที่มี ทิศทางโพลาไรเซชันแบบ “P” หรือ transverse magnetic wave ซึ่งมีทิศทางของสนามไฟฟ้าที่ตั้งฉากกับ พื้นผิวเท่านั้น ที่สามารถกระตุ้นคลื่นผิวพลาสมอนตามเงื่อนไขของสมการที่ 3 ได้ สำหรับแสงที่มีสนามไฟฟ้า ขนานกับระนาบตกกระทบหรือทิศทางโพลาไรเซชันแบบ “S” หรือ transverse electric wave จะไม่มีผล ต่อการเกิดปรากฏการณ์ SPR [14]



รูปที่ 4 แสดงองค์ประกอบของ SPR ไบโอสเซนเซอร์โดยใช้การจัดแสงแบบ “Kretschmann configuration” และกราฟ SPR ที่แสดงมุม SPR ที่ตำแหน่งมุมที่ให้ความเข้มของแสงสะท้อนต่ำสุด (ดัดแปลง จาก [15])

จากสมการที่ 3 เมื่อเกิดปรากฏการณ์ SPR ค่าเวฟเวกเตอร์ทั้งสองมีค่าเท่ากัน ส่งผลให้มีการ สูญเสียพลังงานหรือโมเมนตัมของแสงตกกระทบและทำให้ความเข้มของแสงสะท้อนจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ที่ตำแหน่งมุมนี้ความเข้มของแสงสะท้อนต่ำสุดและจะเรียกว่า “มุม SPR ( $\theta_{SPR}$ )” (รูปที่ 4 มุมขวาล่าง) และ จากสมการที่ 3 จะได้

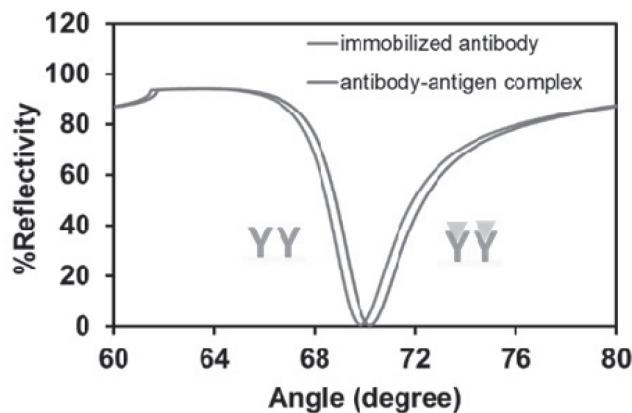
$$\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)n_p \sin \theta_{SPR} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad \text{สมการที่ 4}$$

จากสมการที่ 4 เมื่อค่าความยาวคลื่น ดัชนีหักเหของปริซึม และค่า dielectric permittivity ของโลหะ เป็นค่าคงตัว และ  $\epsilon^2 = n$  เมื่อ  $n$  คือค่าดัชนีหักเหเชิงซ้อน จะได้

$$\theta_{SPR} \propto n \quad \text{สมการที่ 5}$$

$$\Delta\theta_{SPR} \propto \Delta n \quad \text{สมการที่ 6}$$

เมื่อพิจารณาผลต่างของมุม SPR จะได้ สมการที่ 5 แสดงให้เห็นว่ามุม SPR ( $\Delta\theta_{SPR}$ ) แปรผันตรงกับค่าดัชนีหักเหของสารตัวอย่างที่อยู่บนพื้นผิวทอง ในกรณีที่น่าเทคนิค SPR มาใช้ตรวจวัดคู่สารชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่นระบบแอนติเจน-แอนติบอดี (รูปที่ 5) โดยทำการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิวทอง (immobilized antibody) และเมื่อมีการเข้าคู่กันระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี (antibody-antigen complex) ส่งผลให้มุม SPR เพิ่มขึ้น (กราฟ SPR เลื่อนไปทางขวา) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ (ตามสมการที่ 5) โดยทั่วไปมุม SPR จะแปรผันตามปริมาณของสารชีวภาพที่อยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์หรือตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด ส่วนผลต่างของมุม SPR ( $\Delta\theta_{SPR}$ ) ตามสมการที่ 6 บ่งบอกถึงปริมาณของแอนติเจนหรือสารที่ต้องการตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อขีดจำกัดการวัด (limit of detection) ของเทคนิค SPR คือความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นการทำให้ SPR ไปโอเซนเซอร์มีความไวในการตรวจวัดสารที่ต้องการตรวจวัดได้ในปริมาณน้อยๆ นั้น สิ่งที่เราควรคำนึงถึงคือ 1. ปริมาณของสารชีวภาพที่จำเพาะซึ่งถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ 2. รูปแบบการตรวจวัดที่เหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการตรวจวัด (จะกล่าวในหัวข้อต่อไป) และ 3. การควบคุมทิศทางของแอนติบอดี หรือสารชีวภาพที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจวัด ให้มี active site ที่เหมาะสมในการเข้าคู่กันของสารชีวภาพ สิ่งเหล่านี้จะทำให้ความไวของเทคนิค SPR เพิ่มมากขึ้น หรือทำให้ได้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ดีขึ้น

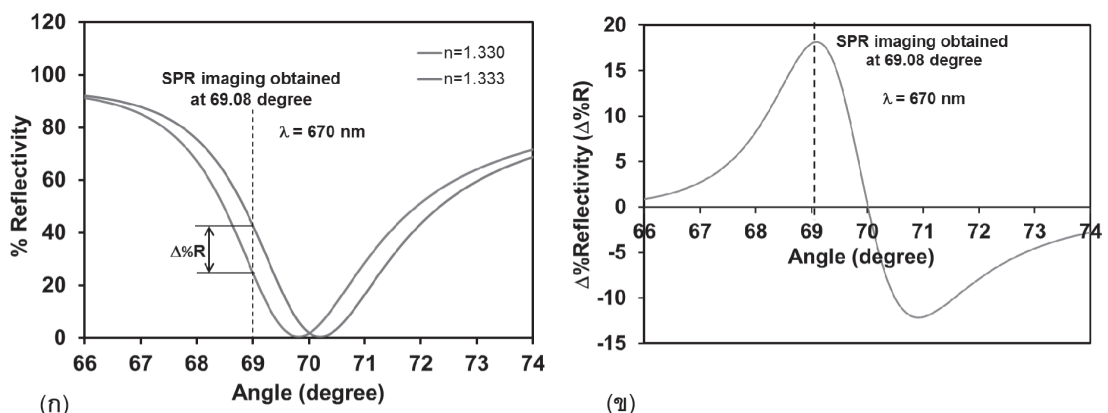


รูปที่ 5 แสดงกราฟ SPR ที่วัดความเข้มแสงสะท้อนเทียบกับมุมตกกระทบเมื่อมีอันตรกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ตำแหน่งที่มุมตกกระทบที่มีความเข้มแสงต่ำสุดจะเรียกว่ามุม SPR

## SPR แบบภาพ (SPR imaging)

SPR แบบภาพเริ่มแรกถูกสร้างมาเพื่อศึกษาโครงสร้างของพื้นผิวในระดับไมโครเมตร (microstructure) [16] เทคนิค SPR แบบภาพจะใช้พื้นฐานของเทคนิค SPR โดยที่เทคนิคนี้จะวัดค่าความเข้มแสงสะท้อนโดยใช้กล้อง CCD [17] เมื่อตั้งค่ามุมตกกระทบและความยาวคลื่นที่ค่าๆ หนึ่ง ข้อดีของเทคนิค SPR แบบภาพคือ มีความไวสูง สามารถเห็นพื้นผิวเซนเซอร์ได้ตลอดเวลา และสามารถวัดปรากฏการณ์ SPR ได้พร้อมกันหลายตำแหน่งบนพื้นผิวเซนเซอร์ในเวลาเดียวกัน แต่มีข้อจำกัดเรื่องช่วงของการวัด (dynamic range)

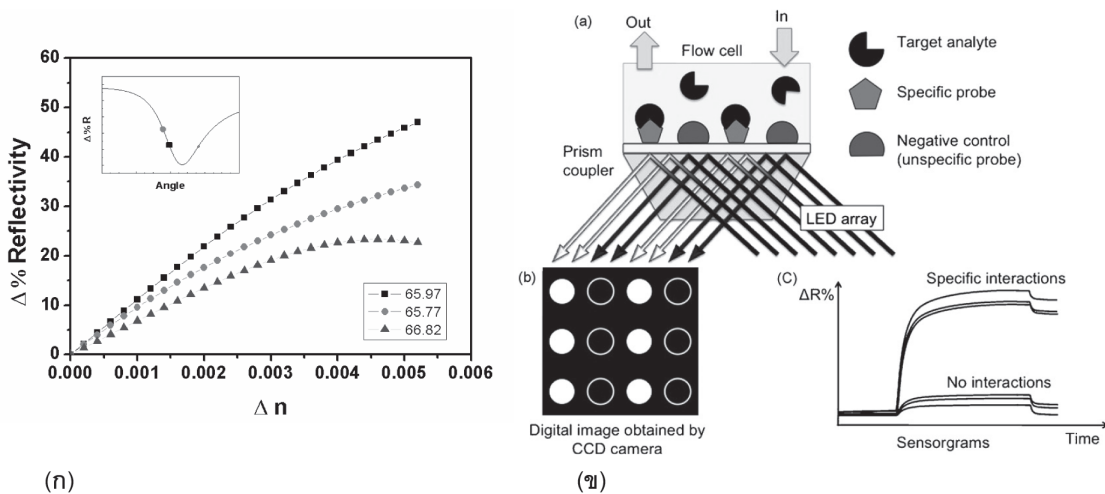
รูปที่ 6 (ก) แสดงกราฟ SPR ที่มีค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ที่ต่างกันคือ  $n = 1.330$  และ  $n = 1.333$  เมื่อตั้งค่ามุมตกกระทบของแสงความยาวคลื่น 670 nm ที่มุม 69.08 องศาดีกรี เมื่อค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์เป็น  $n = 1.330$  (รูปที่ 6 (ก) เส้นสีน้ำเงิน) ค่าความเข้มแสง (%R) ที่วัดได้เป็น 20.95 %R เมื่อดัชนีหักเหเปลี่ยนแปลงไปเป็น  $n = 1.333$  (รูปที่ 6 (ก) เส้นสีแดง) กราฟ SPR เลื่อนมาทางขวามือ และค่าความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 39.11 %R เมื่อคำนวณผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน ( $\Delta\%R$ ) มีค่าประมาณ 18 %R จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหเพียงเล็กน้อยบนพื้นผิวเซนเซอร์สามารถตรวจวัดได้จากผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน การหาค่ามุมที่ให้ผลต่างของความเข้มแสงมากที่สุดหาได้จากการนำกราฟ SPR จากรูปที่ 6 (ก) ที่มีค่าดัชนีหักเหที่ต่างกันนำมาลบกัน แสดงดังรูปที่ 6 (ข) ซึ่งมุมที่ให้ค่าผลต่างมากที่สุดจะอยู่ทางซ้ายมือของกราฟ SPR เนื่องจากลักษณะอสมมาตรของกราฟ SPR นั้นเอง จะเห็นว่าที่ตำแหน่งมุมอื่นๆ จะให้ผลต่างของความเข้มแสงสะท้อนที่ลดต่ำลงส่งผลให้ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหลดลง ดังนั้นการตั้งค่ามุมตกกระทบของแสงจึงมีความสำคัญสำหรับเทคนิค SPR แบบภาพ



รูปที่ 6 (ก) แสดงการตั้งค่ามุมตกกระทบให้คงที่ และวัดค่าความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลง เมื่อ  $n = 1.330$  และ  $n = 1.333$  ดัดแปลงจาก [18] (ข) แสดงผลต่างของกราฟ SPR ที่มีค่าดัชนีหักเห  $n = 1.330$  และ  $n = 1.333$  โดยที่มุม 69.08 degree จะให้ค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน ( $\Delta\%R$ ) มากที่สุด

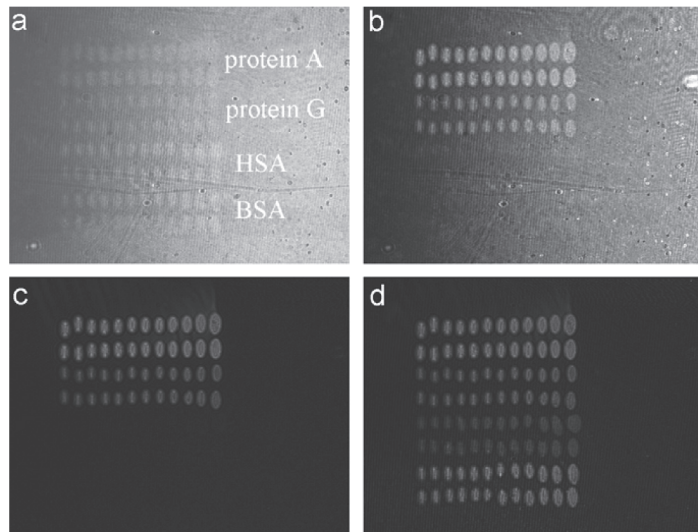


ข้อจำกัดของ SPR แบบภาพคือช่วงการวัดที่มีจำกัด แสดงดังรูปที่ 7 (ก) จะเห็นว่าที่มุมที่ให้ค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อนมากที่สุดหรือมุมที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหมากที่สุด จะมีช่วงการวัด  $\Delta\%R$  ประมาณ 30% ถ้าค่าดัชนีหักเหมีการเปลี่ยนแปลงมากๆ การเปลี่ยนแปลงของ  $\Delta\%R$  จะเปลี่ยนแปลงไม่เป็นเชิงเส้น และถ้าตั้งมุมที่ตำแหน่งอื่นๆ จะทำให้ความไวของการตรวจวัดต่ำลง และช่วงการวัดต่ำลงตามไปด้วย รูปที่ 7 (ข) แสดงองค์ประกอบของ SPR แบบภาพ และข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้หลายตัวพร้อมๆ กัน โดยมีรายงานสำหรับการใช้ SPR แบบภาพในการตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ มากกว่า 1,000 จุด พร้อมกันบนพื้นผิวเซนเซอร์ [19]



รูปที่ 7 (ก) แสดงการตั้งค่ามุมที่ตำแหน่งต่างๆ และวัดค่าผลต่างของความเข้มแสงสะท้อนที่ค่าดัชนีหักเหต่างๆ กัน (ข) แสดงองค์ประกอบของ SPR แบบภาพที่มี CCD เป็นตัวตรวจวัดความเข้มแสงของตำแหน่งที่สนใจ (region of interest, ROI) [20]

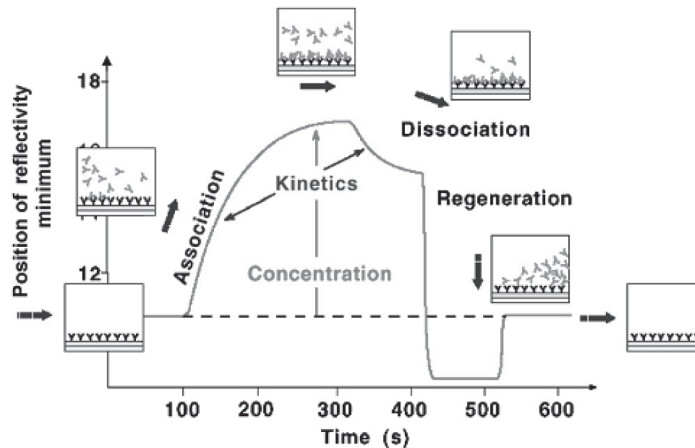
รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างการประยุกต์ใช้ SPR แบบภาพในการตรวจวัดการเข้าคู่กันของสารชีวภาพ [21] รูปที่ 8a คือ SPR แบบภาพของโปรตีน microarray เมื่อทำการ spot โปรตีนต่างๆ ได้แก่ โปรตีนจี (protein G) โปรตีนเอ (Protein A) human serum albumin (HSA) และ bovine serum albumin (BSA) บนพื้นผิวเซนเซอร์ รูปที่ 8b เมื่อทำการผ่าน 0.1 mg/ml ของ human IgG ภาพที่ได้บนตำแหน่งแถวของโปรตีนจี และโปรตีนเอ มีความสว่างเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีการจับกันของคู่สารชีวภาพ รูปที่ 8c แสดงผลต่างของ SPR แบบภาพ หรือภาพผลต่างของ b และ a โดยนำภาพ b ลบด้วยภาพ a จะเห็นว่าตำแหน่งแถวของโปรตีนจีและโปรตีนเอมีความสว่างเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการจับกันแบบจำเพาะของ human IgG กับโปรตีนทั้งสองตัว สำหรับรูปที่ 8d แสดงภาพผลต่างของ SPR แบบภาพ เมื่อทำการผ่าน 0.1 mg/ml ของ anti-BSA IgG จะเห็นว่าตำแหน่งจุด BSA สว่างเพิ่มขึ้นเนื่องจากการจับกันแบบจำเพาะ



**รูปที่ 8** แสดง SPR แบบภาพ (a) โปรตีน microarray (protein A, Protein G, HSA และ BSA) บนพื้นผิวเซนเซอร์ (b) หลังจากทำการผ่าน 0.1 mg/ml ของ human IgG (c) ภาพผลต่างของ SPR แบบภาพ (นำภาพ b-a) หลังจากทำการผ่าน 0.1 mg/ml ของ human IgG (d) ภาพผลต่างหลังจากทำการผ่าน 0.1 mg/ml ของ anti-BSA IgG ภาพ a, b และ c ทำการถ่ายภาพภายใต้สารละลาย PBS [21]

### การแปรผลสัญญาณ SPR

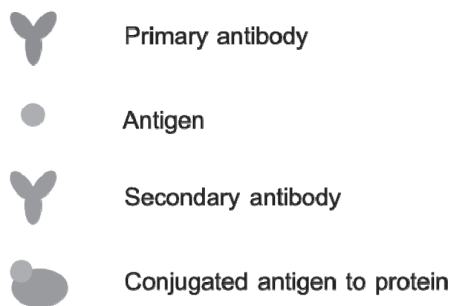
โดยทั่วไปแล้วสัญญาณ SPR สามารถติดตามการตรวจวัดได้ตลอดเวลา ซึ่งเป็นการวัดตำแหน่งมุม SPR เทียบกับเวลา (ในกรณีของ SPR แบบภาพ จะวัด  $\Delta\%R$  เทียบกับเวลา) ซึ่งกราฟลักษณะนี้จะเรียกว่า “SPR sensorgram” แสดงดังรูปที่ 9 โดยใช้คู่สารชีวภาพที่มีความจำเพาะเป็นระบบทดสอบ แอนติบอดี (รูปตัว Y สีดำ) ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ เมื่อระบบมีแอนติเจน (รูปตัว Y สีแดง) ผ่านมายังพื้นผิวเซนเซอร์ ทำให้ค่าดัชนีหักเหของระบบเพิ่มขึ้น และทำให้ตำแหน่งของมุม SPR เพิ่มขึ้น ช่วงนี้เรียกว่า association ซึ่งเป็นช่วงที่คู่แอนติเจนและแอนติบอดีเข้ามาใกล้กันและจับกันแบบจำเพาะ ลักษณะความชันของกราฟช่วงนี้จะแสดงถึงความเร็วของการจับกันของคู่สารชีวภาพ จนกระทั่งถึงจุดสมดุล หลังจากนั้น แอนติเจนที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีหรือจับกันไม่แรงพอจะไหลออกจากระบบ ทำให้ค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวลดลงและทำให้มุม SPR ลดลง ช่วงนี้เรียกว่า dissociation ข้อมูลในช่วง association และ dissociation สามารถนำมาคำนวณหาค่า affinity ที่แสดงถึงความแรงของการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ปริมาณแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีวัดจากตำแหน่งของช่วง dissociation ถึง baseline ก่อนที่จะผ่านแอนติเจน นอกจากนี้ยังสามารถล้างแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ โดยใช้สารละลายที่เหมาะสม ช่วงนี้จะเรียกว่า regeneration และทำให้มุม SPR กลับมาเท่าที่ตำแหน่ง baseline ตอนเริ่มต้นก่อนที่จะผ่านแอนติเจน ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิค SPR ที่สามารถนำพื้นผิวเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่ได้



รูปที่ 9 แสดง SPR sensorgram สำหรับการตรวจวัดคู่สารชีวภาพ [22]

### รูปแบบการตรวจวัด (detection platform) [23]

การเลือกรูปแบบการตรวจวัดต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพโดยใช้เทคนิค SPR จะต้องคำนึงถึงขนาดหรือมวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง ความไวของเครื่องมือ และการนำไปประยุกต์ใช้กับสารชีวภาพแบบต่างๆ เพื่อให้ง่ายต่อความเข้าใจผู้เขียนจะเลือกคู่สารชีวภาพในระบบของแอนติบอดีและแอนติเจน เป็นสารชีวภาพตัวอย่างสำหรับรูปแบบในการตรวจวัดสารชีวภาพโดยใช้เทคนิค SPR ดังรูปที่ 10

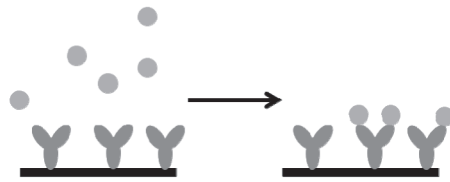


รูปที่ 10 รูปภาพแสดงสัญลักษณ์แทนสารชีวภาพต่างๆ

โดยทั่วไปแล้วรูปแบบการตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิค SPR สามารถจำแนกได้เป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ คือ

#### 1) การตรวจวัดโดยตรง (direct detection)

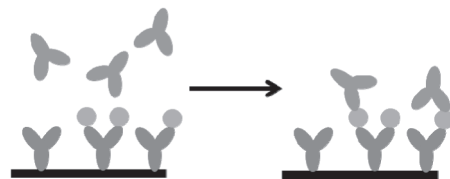
การสร้างพื้นผิวเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดโดยตรง ทำโดยการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์และตรวจวัดแอนติเจน แสดงดังรูปที่ 11 ในกรณีนี้สัญญาณ SPR จะแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติเจนในสารตัวอย่างรูปแบบการตรวจวัดแบบนี้เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่หรือขนาดกลาง เพราะว่าสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้น้อย หรือไม่มีเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 11 แสดงการตรวจวัดโดยตรง

## 2) Sandwich assay

รูปแบบการตรวจวัด sandwich assay จะประกอบด้วยสองขั้นตอนแสดงดังรูปที่ 12 โดยขั้นตอนแรกแอนติบอดี (primary antibody) จะถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดแอนติเจน ซึ่งเป็นรูปแบบการตรวจวัดโดยตรงนั่นเอง ขั้นตอนที่ 2 ทำการผ่านแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody, ส่วนใหญ่จะเลือกใช้เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี) และแอนติบอดีตัวที่สองจะจับกับแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ ซึ่งรูปแบบการตรวจวัดนี้จะเป็นการเพิ่มความไว (sensitivity) ของสัญญาณ SPR โดยสัญญาณ SPR จะแปรผันตามปริมาณของแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ และความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่สอง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความจำเพาะ (selectivity) ของระบบการตรวจวัด เนื่องจากแอนติบอดีตัวที่สองจะต้องมีความจำเพาะกับแอนติเจนเท่านั้น

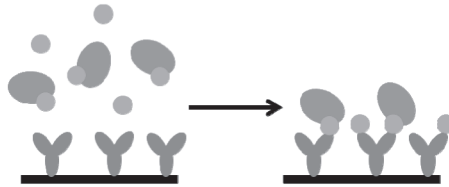


รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดแบบ sandwich assay

## 3) Competitive assay

การตรวจวัดในรูปแบบ competitive assay จะใช้สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรง หรือการตรวจวัดแบบ sandwich assay ในรูปแบบการตรวจวัดนี้จะใช้หลักการแย่งกันจับของแอนติเจนที่ติดฉลาก (conjugated antigen) และแอนติเจนอิสระ (free antigen) กับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ โดยแอนติเจนจะถูกติดฉลากกับสารชีวภาพที่มีขนาดใหญ่กว่า เช่น bovine serum albumin (BSA) หรือโปรตีนเคซีน (casein) ในขั้นตอนการตรวจวัดแอนติเจนอิสระและแอนติเจนที่ติดฉลากจะผสมกันก่อน โดยใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยความเข้มข้นคงที่ เมื่อผ่านแอนติเจนทั้งสองแบบไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ แอนติเจนทั้งสองจะแย่งกันจับกับแอนติบอดี แสดงดังรูปที่ 13 และสัญญาณ SPR ที่ได้จะแปรผันแบบผกผันกับความเข้มข้นของแอนติเจนอิสระ นั่นคือ ถ้ามีปริมาณของแอนติเจนอิสระ(มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก)มากในสารตัวอย่างจะทำให้แอนติเจนอิสระจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้มากกว่าแอนติเจนที่ติดฉลากจึงส่งผลให้ได้สัญญาณ SPR

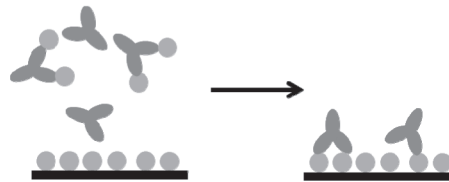
น้อยลง ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณของแอนติเจนอิสระน้อย จะทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้มากกว่า และทำให้ได้สัญญาณ SPR มากกว่า (ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ติดฉลากคงที่)



รูปที่ 13 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบแย่งจับ

#### 4) Inhibition assay

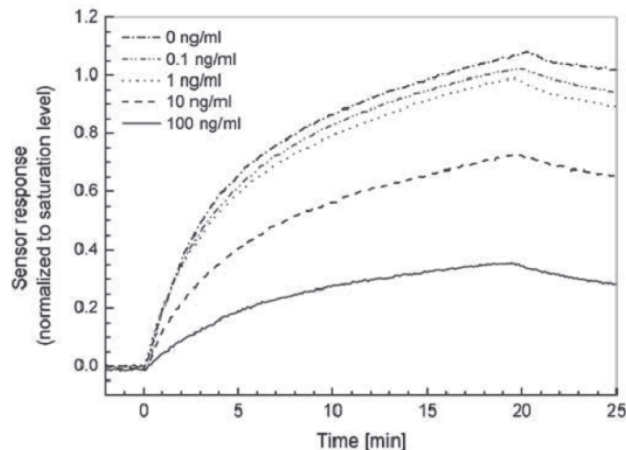
การตรวจวัดแบบ Inhibition assay แสดงดังรูปที่ 14 โดยสารชีวภาพที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (แอนติเจน) จะถูกผสมก่อนกับแอนติบอดีซึ่งจะจับกับแอนติเจนเป้าหมาย ต่อจากนั้นทำการผ่านสารชีวภาพที่ผสมไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ที่มีแอนติเจนถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ และแอนติบอดีที่ไม่ได้ทำอันตรกิริยากับแอนติเจนจะจับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ ส่วนแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนตอนต้นไม่สามารถจับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้ ส่งผลให้สัญญาณ SPR ที่ได้แปรผันแบบผกผันกับปริมาณของสารชีวภาพที่ต้องการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการตรวจวัดแบบ competitive assay



รูปที่ 14 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบ inhibition assay

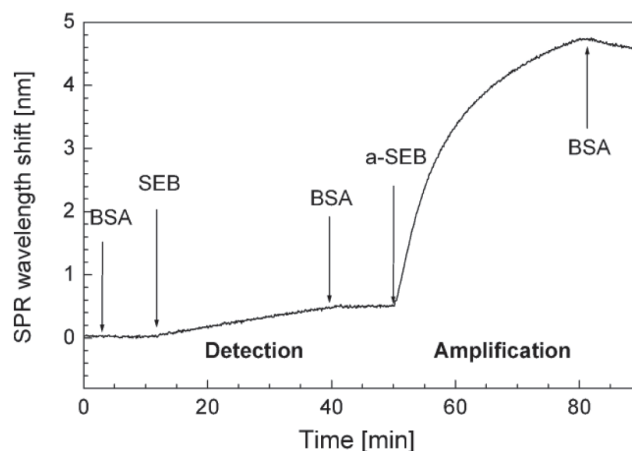
### การประยุกต์ใช้เทคนิค SPR ไบโอดีเซนเซอร์

SPR ไบโอดีเซนเซอร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้ SPR ไบโอดีเซนเซอร์ในงานด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการแพทย์ และด้านความปลอดภัยของอาหาร Minunni และ Mascini [24] ได้พัฒนา SPR ไบโอดีเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัด atrazine ซึ่งเป็นสารเคมีในการกำจัดวัชพืช และอาจจะตกค้างได้ในสิ่งแวดล้อม การตรวจวัดสาร atrazine จะใช้ inhibition assay โดยผสมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ atrazine กับสารตัวอย่างที่มี atrazine หลังจากนั้นแอนติบอดีที่ไม่ได้จับกับ atrazine จะถูกตรวจวัดโดย SPR ไบโอดีเซนเซอร์ โดยมี atrazine เคลือบอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ รูปที่ 15 แสดง SPR sensorgram สำหรับการตรวจวัด atrazine โดยใช้ inhibition assay สัญญาณ SPR จะลดลงเมื่อมีปริมาณ atrazine เพิ่มขึ้น และขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ที่ 0.05 ng/ml



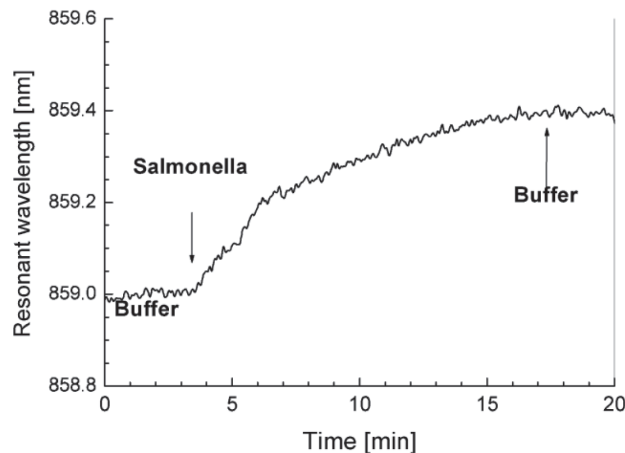
รูปที่ 15 SPR sensorgram ของการตรวจวัด atrazine โดยใช้ inhibition assay [24]

ในการประยุกต์ใช้ SPR ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารชีวภาพที่มีขนาดกลาง เช่น botulinum toxin และ straphylococcal enterotoxin B (SEB) ในงานวิเคราะห์ด้านความปลอดภัยของอาหาร Choi และคณะ [25] พัฒนา SPR ไบโอเซนเซอร์โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรงในการตรวจวัด botulinum toxin โดยใช้แอนติบอดีตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ และทำการตรวจวัด botulinum toxin ได้ LOD ที่ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  นอกจากนี้ Homola และคณะ [26] สามารถตรวจวัด SEB โดยใช้ SPR ไบโอเซนเซอร์ร่วมกับแอนติบอดี ได้ LOD ที่ 5.0 ng/ml สำหรับการตรวจวัดโดยตรง และเมื่อขยายสัญญาณโดยใช้รูปแบบการตรวจวัดแบบ sandwich assay จะสามารถตรวจวัด SEB ที่ความเข้มข้นต่ำลง 10 เท่า คือมี LOD ที่ 0.5 ng/ml รูปที่ 16 แสดง SPR sensorgram สำหรับการตรวจวัด SEB โดยตรง และขยายสัญญาณโดยใช้ sandwich assay



รูปที่ 16 SPR sensorgram แสดงการตรวจวัด SEB โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรง และขยายสัญญาณโดยใช้ sandwich assay [26]

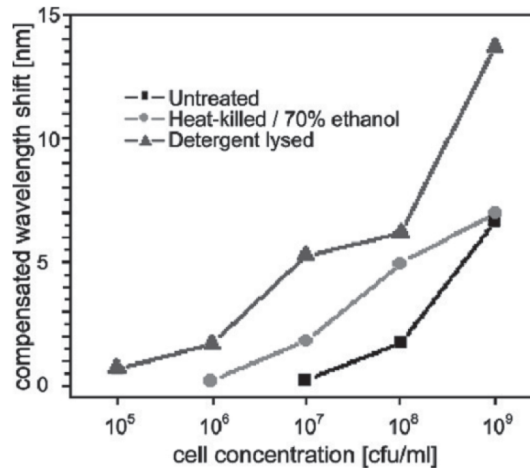
สำหรับสารชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ เช่นแบคทีเรียที่ก่อโรคต่างๆ Fratamico และคณะ [27] ใช้ SPR ไปโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัด *E. coli* O157:H7 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ในการตรวจวัด *E. coli* O157:H7 และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการขยายสัญญาณ มี LOD ที่  $5 \times 10^7$  cfu/ml Koubuva และคณะ [28] สามารถตรวจวัด *Salmonella enteritis* และ *Listeria monocytogenes* ได้ LOD ที่  $10^6$  cfu/ml โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรง รูปที่ 17 แสดงการตรวจวัด *Salmonella enteritis* โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรง



รูปที่ 17 SPR sensorgram แสดงการตรวจวัดโดยตรงของ *Salmonella enteritis* [28]

การตรวจวัดแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นที่ต่ำโดยใช้เทคนิค SPR เป็นเรื่องยากและมีความท้าทายเนื่องจากขนาดและรูปร่างของแบคทีเรียมีขนาดใหญ่ ทำให้ evanescent field ที่พุ่งผ่านพื้นผิว (มีค่าจำกัดประมาณ 200-300 nm) ไม่ครอบคลุมขนาดของแบคทีเรีย ค่าดัชนีหักเหของแบคทีเรียในสารละลายที่มีค่าต่ำและใกล้เคียงกับค่าดัชนีหักเหของสารละลาย การเข้าถึง (accessibility) ของแอนติบอดีในการจับแอนติเจนบนพื้นผิวของแบคทีเรีย รวมถึงการแพร่ (diffusion) ของแบคทีเรียไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ [29] ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่อการตรวจวัดแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค SPR ไปโอเซนเซอร์ ดังนั้น Taylor และคณะ [30] ทำการเตรียมสารตัวอย่างแบคทีเรียแบบต่างๆ (untreated, heat-killed 70% ethanol และ detergent lysed) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกออก และมีขนาดเล็กลง ส่งผลให้ตรวจวัดแบคทีเรียที่เตรียมสารตัวอย่างแบบ detergent lysed ได้ LOD ที่  $10^5$  cfu/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพดีขึ้นประมาณ 100 เท่า เทียบกับสารตัวอย่างแบคทีเรียปกติ (untreated, live cell) ดังรูปที่ 18





**รูปที่ 18** การเปรียบเทียบสารตัวอย่างแบบที่เตรียมด้วยวิธีการต่างๆ และนำไปวัดโดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรงด้วยเทคนิค SPR [30]

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ามีการประยุกต์ใช้ SPR โบไอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารชีวภาพที่มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันได้ รวมถึงการเลือกใช้รูปแบบการตรวจวัดให้เหมาะสมกับขนาดของโมเลกุลสารชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่นำเทคนิค SPR มาประยุกต์ใช้ร่วมกันกับการพัฒนาโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจวัด ยกตัวอย่างเช่น Zhang และคณะ [31] ได้พัฒนาพอลิเมอร์ลอกแบบ (molecularly imprinted polymer, MIP) ในการตรวจวัดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) โดยใช้ SPR โบไอเซนเซอร์ โดย MIP ถูกสังเคราะห์จากโมโนเมอร์ (monomer) สองชนิดร่วมกับแม่แบบโมเลกุลของเทสโทสเตอโรน พบว่าโบไอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้มี LOD ที่  $10^{-15}$  g/ml และความคงทนในการใช้งานนานถึง 8 เดือนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีความคงทนมากกว่าการใช้โปรตีนมาเป็นสารชีวภาพ Loo และคณะ [32] ได้พัฒนาชุดเครื่องมือวัด SPR แบบ common-path interferometry ร่วมกับ aptamer (เป็น DNA หรือ RNA ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถจับกับโมเลกุลของสารต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ ถึงแม้ว่าโมเลกุลนั้นจะไม่ใช้สารที่จับอยู่กับ DNA หรือ RNA ในธรรมชาติ) ที่จำเพาะต่อ cytochrome c ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงผลของยาภายหลังจากการรักษามะเร็งด้วยวิธีการเคมีบำบัด โดยมี LOD น้อยกว่า 80 pM



## สรุปและความคาดหวังของเทคโนโลยี SPR ในอนาคต

เทคโนโลยี SPR พัฒนามามากกว่า 20 กว่าปี มีการพัฒนาส่วนของเครื่องมือ SPR ให้มีความไวสูง การพัฒนาพื้นผิว SPR สำหรับการตรึงสารชีวภาพ รวมทั้งการพัฒนารูปแบบการตรวจวัดต่างๆ เทคโนโลยี SPR ไปโอเซนเซอร์ออกสู่ตลาดในเชิงพาณิชย์ครั้งแรกโดยบริษัท Biacore International AB ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 ซึ่งมีการพัฒนาเครื่อง SPR รุ่นต่างๆ รุ่นที่มีความไวสูงและสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้จำนวนมาก (high throughput) คือ Biacore T200 นอกจากนี้ยังมีบริษัทอื่นๆ ที่มีการพัฒนาเทคโนโลยี SPR ในเชิงพาณิชย์เช่น British Windsor Scientific (IBIS), Nippon Laser and Electronics Laboratory (SPR-670 and SPR-CELLIA), Texas Instruments (Spreeta), และ Analytical  $\mu$ -Systems (BIO-SUPLAR 2)

ความสำเร็จของการพัฒนาเทคโนโลยี SPR ในการตรวจวัดสารชีวภาพ ประกอบด้วยส่วนหลักๆ 3 ส่วนคือ 1. การพัฒนาส่วนของเครื่องมือวัด ให้สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงน้อยๆ ได้ 2. การพัฒนาส่วนของพื้นผิวเซนเซอร์สำหรับรองรับสารชีวภาพต่างๆ เพื่อลดสัญญาณที่เกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding) เนื่องจากโปรตีนหรือสารชีวภาพอื่นๆ ในสารตัวอย่าง 3. การพัฒนาส่วนของสารชีวภาพให้มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจวัด มีความคงทน สามารถอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์โดยไม่เสียสภาพ และสามารถเก็บไว้ได้นาน นอกจากนี้ยังมีส่วนที่อื่นๆ เช่น การลำเลียงสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบวัดโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย การพัฒนาในเรื่อง SPR เซนเซอร์ชิพรวม (integrated SPR chip) โดยใช้ระบบไมโครฟลูอิดิก (microfluidic) การพัฒนาระบบ sensor array ทำให้สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างในหลายชนิด (high throughput) และการพัฒนาเครื่อง SPR แบบกระเป๋าหิ้ว (SPR portable) สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพในภาคสนาม

## เอกสารอ้างอิง

1. Nakamura, H., and Karubi, I. 2003. Current Research Activity in Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (3): 446-468.
2. Paddle, B.M. 1996. Biosensors for Chemical and Biological Agents of Defense Interest. *Biosensors and Bioelectronics* 11 (11): 1079-1113.
3. Leelawatwattana, L., Praphanphoj, and V., Prapunpoj, P. 2011. Effect of the N-terminal Sequence on The Binding Affinity of Transthyretin for Human Retinol-Binding Protein. *FEBS Journal* 278 (18): 3337-3347.
4. Schaferling, M., and Nagl, S. 2006. Optical Technologies for The Read Out and Quality Control of DNA and Protein Microarrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (3): 500-517.
5. Iwasaki, Y., Horiuchi, T., and Niwa, O. 2001. Detection of Electrochemical Enzymatic Reactions by Surface Plasmon Resonance Measurement. *Analytical Chemistry* 73 (7): 1595-1598.

6. Choi, S.H., Lee, J.W., and Sim, S.J. 2005. Enhanced Performance of a Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Detecting Ab-GAD Antibody Based on The Modified Self-Assembled Monolayers. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2): 378-383.
7. Frostell-Karlsson, A., Remaeus, A., Roos, H., Andersson, K., Borg, P., Hamalainen, M., and Karlsson, R. 2000. Biosensor Analysis of The Interaction Between Immobilized Human Serum Albumin and Drug Compounds for Prediction of Human Serum Albumin Binding Levels. *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (10): 1986-1992.
8. Iwasaki, Y., Horiuchi, T., and Niwa, O. 2001. Detection of Electrochemical Enzymatic Reactions by Surface Plasmon Resonance Measurement. *Analytical Chemistry* 73 (7): 1595-1598.
9. Van Regenmortel, M.H. 2001. Analysing Structure-Function Relationships with Biosensor. *Cell and Molecular Life Science* 58 (5-6): 794-800.
10. Johne, B. 1998. Epitope Mapping by Surface Plasmon Resonance in The BIAcore. *Molecular Biotechnology* 9 (1) 65-71.
11. Ho, H.P., Lam, W.W., and Wu, S.Y. 2002. Surface Plasmon Resonance Sensor Based on The Measurement of Differential Phase. *Review of Scientific Instrument* 73 (10): 3534-3540.
12. Reather, H. 1983. Surface Plasmons on Smooth and Rough Surface and on Gratings. Springer Berlin Heidelberg, New York.
13. Kretschmann, E. 1971. Die Bestimmung Optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächen Plasmaschwingungen. *Zeitschrift fur Physik A Hadrons and Nuclei* 241: 313-324.
14. Aslan, K., and Geddes, C.D. 2009. Directional Surface Plasmon Coupled Luminescence for Analytical Sensing Applications: Which Metal, What Wavelength, What Observation Angle? *Analytical Chemistry* 81 (16): 6913-6922.
15. Shankaran, D.R., and Miura, N. 2007. Trends in Interfacial Design for Surface Plasmon Resonance Based Immunoassays. *Journal of Physics D: Applied Physics* 40 (23): 7187-7200.
16. Rotenhausler, B., and Knoll, W. 1988. Surface-Plasmon Microscopy. *Nature* 332: 615-617.
17. Huang, H., and Chen, Y. 2006. Label-Free Reading of Microarray-Based Proteins with High Throughput Surface Plasmon Resonance Imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (5): 644-648.
18. Smith, E.A., and Corn, R.M. 2003. Surface Plasmon Resonance Imaging as a Tool to Monitor Biomolecular Interactions in an Array Based Format. *Applied Spectroscopy* 57 (11): 320A-332A

19. Campbell, C.T., and Kim, G. 2007. SPR Microscopy and Its Applications to High-Throughput Analyses of Biomolecular Binding Events and Their Kinetics. *Biomaterials* 28 (15): 2380-2392.
20. Scarano, S., Mascini, M., Turner, A.P.F., and Minunni, M. 2010. Surface Plasmon Resonance Imaging for Affinity-Based Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (5): 957-966.
21. Kim, G., Jiang, L., Rathod, P.K., Campbell, C.T., Nishimoto, A., and Casasanta, V. 2005. A Demonstration of High-Throughput Immunoassay and Small Molecule Binding on Protein Microarrays with SPR Microscopy. In: Laudon, M., and Romanowicz, B., Editors. *Nanotech 2005. Proceedings of the 2005 NSTI Bio Nano Conference and Trade Show. 8-12 May 2005. California. U.S.A.* p. 381-384.
22. Abery, J. 2001. Detecting The Molecular Ties That Bind. *Modern Drug Discovery* 4: 34-36.
23. Homola, J. 2006. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. In: Wolfbeis, O.S., Editors. *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. New York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.* p. 184-186.
24. Minunni, M., and Mascini, M. 1993. Detection of Pesticide in Drinking Water Using Real-Time Biospecific Interaction Analysis. *Analytical Letter* 26 (7): 1441-1460.
25. Choi, K., Seo, W., Cha, S., and Choi, J. 1998. Evaluation of Two Types of Biosensors for Immunoassay of Botulinum Toxin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 31 (1): 101-105.
26. Homola, J., Dostálek, J., Chen, S., Rasooly, A., Jiang, S., and Yee, S. 2002. Spectral Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in Milk. *International Journal of Food Microbiology* 75 (1-2): 61-69.
27. Fratamico, P.M., Strobaugh, T.P., Medina, M.B., and Gehring, A.G. 1998. Detection of Escherichia Coli O157:H7 Using A Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Biotechnology Technique* 12 (7): 571-576.
28. Koubová, V., Brynda, E., Karasová, L., Škvor, J., Homola, J., Dostálek, J., Tobiška, P., and Rošický, J. 2001. Detection of Foodborne Pathogens Using Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Sensors and Actuators B* 74 (1-3): 100-105.
29. Taylor, A.D., Ladd, J., Homola, J., and Jiang, S., 2008. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors for the Detection of Bacterial Pathogens. In: Zourob, M., Elwary, S., and Turner, A. Editors. *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems.* Springer Science + Business Media, LLC, New York, p. 91-92.

30. Taylor, A.D., Yu Q.M., Chen, S.F., Homola, J., and Jiang, S.Y. 2005. Comparison of E-Coli O157: H7 Preparation Methods Used for Detection with Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sensors and Actuators B* 107 (1): 202-208.
31. Zhang, Q., Jing, L., Zhang, J., Ren, Y., Wang, Y., Wang, Y., Wei, T., and Liedberg, B. 2014. Surface Plasmon Resonance Sensor for Femtomolar Detection of Testosterone with Water-Compatible Macroporous Molecularly Imprinted Film. *Analytical Biochemistry* 463: 7-14.
32. Loo, F.C., Ng, S.P., Wu, C.M.L., and Kong, S.K. 2014. An Aptasensor Using DNA Aptamer and White Light Common-Path SPR Spectral Interferometry to Detect Cytochrome-c for Anti-cancer Drug Screening. *Sensors and Actuators B* 198: 416-423.

ได้รับบทความวันที่ 6 มิถุนายน 2557  
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 20 สิงหาคม 2557