

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97111817

G01N^{33/55} (2006.01)

※ 申請日期：97.4.1 ※IPC 分類：

G01N^{33/53} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

生物晶片及其製造方法

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立交通大學/National Chiao Tung University

代表人：(中文/英文)

吳重雨/Wu, Chung-Yu

住居所或營業所地址：(中文/英文)

300 新竹市大學路 1001 號/1001 Ta Hsueh Road, Hsinchu, Taiwan 300,
R. O. C.

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R. O. C.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 柯富祥/ Fu-Hsiang Ko
2. 林志杰/ Chie-Chieh Lin
3. 朱銘清/ Min-Ching Chu

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國/R. O. C.
2. 中華民國/R. O. C.
3. 中華民國/R. O. C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明揭露一種生物晶片及其製造方法。該生物晶片包括了光檢測器與反應槽，且利用具有催化效果的酵素經由生物分子間親合力鍵結到光檢測器的表面，繼續利用酵素催化冷光反應，以使得光檢測器能獲取光電流訊號。由於生物探針是直接鍵結在光檢測器之主動區的表面，可以將所產生的冷光和元件的主動區的距離降低，以提高元件的靈敏度。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 1A 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1：生物晶片

11：光檢測器

111：主動區

112：保護層

1111：金屬電極

1112：金屬電極

121：開口

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關於一種生物晶片，且特別是有關於一種利用生物分子間親合力將酵素鍵結於光檢測器上，藉由酵素催化冷光反應以獲取光電流訊號之生物晶片。

【先前技術】

近年來關於生物檢測器被廣泛研究，其應用於藥物研發、疾病與生理機能檢測、去氧核糖核酸（DNA）定序、蛋白質分析、生物組織處理等應用。建立一個微型晶片元件並具備直接而且快速偵測鍵結於蛋白質上的小分子，將對於疾病測定方面提供非常重大的貢獻。

關於DNA晶片的研究通常是利用螢光標定所要偵測的生物分子，共焦式螢光掃描器具有非常高的靈敏度以及準確度。但是螢光檢測分析的步驟相當繁雜瑣碎，而且檢測成本相當高。這些因素造成了DNA晶片無法成為一個普及的分析工具。生物感測晶片可利用電、磁、聲、光、熱等方式作為生物檢測的信號轉換機制，其中由光轉換成電子訊號來偵測生物分子，可以降低偵測器本身製造成本、不受電磁場干擾、材料選擇性高、環境容忍度高、低傳導損失、及可以做成更微型化的檢測器等優點，並可以避免訊號之漏失並降低外在環境之污染，且具有不錯的靈敏性。

然而，目前的光學式生物感測晶片通常需要提供額外的光源，例如：平面光波導干涉儀晶片，但此類的光學式生物感測晶片的成本比較高，且在進行生物檢測時比較不方便。

【發明內容】

本發明之一目的，在於提供一種生物晶片，其具有成本低廉、製程簡單、可自動化而且拋棄式的檢測晶片。

本發明之又一目的，在於提供一種生化檢測方法，其可以避免訊號之漏失並降低外在環境之污染。

依據本發明之一特色，提供一種生物晶片，其包括光檢測器（例如：金屬-半導體-金屬光檢測器）與反應槽。上述光檢測器具有一主動區，其上鍵結有多個生物探針。上述反應槽設置於光檢測器上，且反應槽具有一對準主動區的開口。當一待測溶液提供反應槽時，主動區上的生物探針可分別鍵結待測溶液中的多個待測生物分子。繼而，再提供一冷光基質試劑(Luminol+H₂O₂)至反應槽，使得該些鍵結在該些生物探針上的待測生物分子的酵素催化冷光基質試劑(Luminol+H₂O₂)而產生一冷光反應，藉此，光可直接由生物晶片底下之光偵測器偵測，可以減少因為距離造成光強度之衰減，由底下光電針測器之光強度訊號可以決定酵素分子與其鍵結之生物數量。

依據本發明之一特色，提供一種生物晶片的製作方法。這個製作方法包括下述步驟：首先，備製光檢測器（例如：金屬-半導體-金屬光檢測器），其上的保護層為一氧化層，此外光檢測器具有一主動區；接著，利用蝕刻液清洗氧化層；接著，鍵結 3-氨丙基-3-乙氧基矽烷 (APTES) 於氧化層上；繼而，清洗未鍵結於氧化層上的 3-氨丙基-3-乙氧基矽烷 (APTES)；繼而，貼附一 PDMS 反應槽至光檢測器上；最後，透過提供一含多個生物探針的溶液至反應槽，使得該些生物探針鍵結在光檢測器的主動區。

依據本發明之一特色，提供一種生化檢測方法。這個生化檢測方法包括下述步驟：首先，提供生物晶片，其包括光檢測器（例如：金屬-半導體-金屬光檢測器）與設置在光檢測器上的一反應槽，光檢測器並具有一鍵結有多個生物探針的主動區；繼而，提供待測溶液至反應槽，使得待測溶液中的多個待測物分子與光檢測器之主動區中的該些生物探針鍵結；繼而，提供冷光基質試劑(Luminol+H₂O₂)，使得已鍵結在該些生物探針上的該些待測物分子的酵素催化該冷光基質試劑(Luminol+H₂O₂)而產生一冷光反應；最後，利用光檢測器之主動區偵測冷光反應的光強度訊號。

本發明藉由利用金屬-半導體-金屬光檢測器，偵測藉由鍵結於卵白素(streptavidin-HRP)上面的辣根酵素催化冷光基質試劑(Luminol+H₂O₂)而放出之冷光。此方式可以用來建立一個可自動化而且可拋棄式的檢測晶片，並且因為相當便宜所以未來可以普及化應用。

關於本發明之優點與精神可以藉由以下的發明詳述及所附圖式得到進一步的瞭解。

【實施方式】

第 1A 圖，第 1B 圖分別顯示第 1A 圖繪示本發明較佳實施例之光檢測器的示意圖，以及生物晶片的俯視圖。有關本發明較佳實施例，敬請一併參照第 1A 圖與第 1B 圖。本實施例所提供之生物晶片 1 包括光檢測器 11 以及反應槽 12，其中光檢測器 11 具有一主動區 111 與一保護層（氧化層）112。在本實施例中，光檢測器 11 為金屬-半導體-金屬光檢測器（MSM-PD），

且主動區 111 上具有多個指叉狀的金屬電極 1111, 1112, 這些金屬電極 1111, 1112 之佈局呈現一指叉狀之圖案, 且每一金屬電極 1111, 1112 的線寬在本實施例中為 50 nm~5000 nm。

在本實施例中, 反應槽 12 具有一對準光檢測器 11 之主動區 111 的開口 121, 且反應槽 12 之材質為聚二甲基矽氧烷 (PDMS)。上述 PDMS 的材質堅韌、透明, 且符合光學檢測技術的需求。

下述將介紹本實施例所提供之光檢測器的製程步驟。由於製作 MSM 光檢測器必須利用隔離蝕刻來定義主動區, 所以須先定義 Align key, 使之後每一道步驟都能以此為對準基準點, 精確的定義出每一步驟的位置。首先, 於 N+型矽晶圓上形成一熱氧化層, 再利用曝光、顯影、及蝕刻, 使該熱氧化層形成具有對準效果之零層圖案, 其中熱氧化層是以爐管成長之濕式氧化物, 之後再利用自動化光阻塗佈及顯影系統在晶圓上塗上光阻, 而曝光係利用電子束直寫系統將零層圖案定義於熱氧化層, 而顯影步驟可利用顯影液將定義的圖案顯出。繼而, 再以熱氧化層作為後續矽晶圓蝕刻之遮罩, 以乾式蝕刻機台來將一矽晶圓蝕刻成零層圖案, 其特徵在於此圖案具有後續製程之曝光對準用途。

繼而, 再利用爐管進行乾式氧化技術於矽晶圓成長之乾式氧化層。之後, 再利用電子束曝光、顯影、及蝕刻, 定義 MSM 光檢測器的照光主動區。在定義主動區的步驟中, 可利用化學性溼蝕刻技術將光檢測器的主動區蝕刻出來。

傳統的 MSM 光偵測器的頻寬因指金屬的電容效應而無法有效提昇。因此, 在本實施利中, 光檢測器之主動區中的指金屬

電極是利用電子束直寫系統來製作，使得每一金屬電極的線寬可在 50 nm~5000 nm，以有效提高 MSM 光偵測器的頻寬表現。之後，利用真空電子濺鍍機濺鍍金屬沈積金屬，並利用 Lift-off 技術去除非定義區之多餘的金屬。接著，利用電漿輔助化學氣相沉積 (CVD) 系統在元件上沈積二氧化矽作為保護層，以避免元件長時間曝露於大氣下而使其特性衰退，也可阻絕因化學性蝕刻遭受破壞的表面產生之漏電流。最後，定義出金屬探針量測之區域。值得一提的是，本實施例所提供之光偵測器所使用的的保護層 (二氧化矽)，具有作為抗反射層、提供固定化生物分子表面的功能。

本實施例藉由上述製成所完成的 MSM 光偵測器具有良好的靈敏度，如第 2 圖所示，在未固定化生物分子與冷光反應之前，元件操作在 1.3V 的情況下，暗電流約為 1.4nA，意味著元件有優良的靈敏度，而光電流、暗電流比 (IP/ID) 在 1.3V 的偏壓下，其值約 1300，代表具有極高的靈敏度。

在完成 MSM 光偵測器之後，接著下文將說明如何將反應槽以及生物探針設置在光偵測器上。

第 3 圖顯示本發明較佳實施例之生物晶片的製作方法的流程圖。有關本實施例流程圖的說明，敬請一併參照第 1A 圖與第 3 圖。首先，在步驟 S305 中，如上述說明利用標準半導體製程製備一光檢測器 11，其上具有一保護層 (氧化層) 112 與一主動區 111。

在步驟 S310 中，利用成份例如為 $H_2SO_4:H_2O_2=7:3$ 的蝕刻液 (Piranha) 對保護層 112 進行高溫清洗。接著，在步驟 S315 中，將 3-氨基丙基-3-乙氧基矽烷 (APTES) 直接鍵結於經過清洗

的保護層 112 上面，以作為耦合劑並對保護層 112 的表面進行修飾。在步驟 S320 中，利用丙酮與甲苯溶液清洗保護層 112 上剩餘的 APTES，亦即未鍵結於保護層 112 的 APTES 將被清洗掉，以利後續步驟的處理。

繼而，在步驟 S325 中，將材質為聚二甲基矽氧烷(PDMS)的透明反應槽 12 貼在光檢測器 11。接著，在步驟 S330 中，提供一含多個生物探針的溶液（例如：生物素（NHS-Biotin）溶液）至反應槽 12 內，使得溶液能透過反應槽 12 的開口 121 而進入光檢測器 11 的主動區 111，進而使得 NHS-Biotin 可以鍵結在光檢測器 11 的主動區 111。

在步驟 S335 中，加入去離子水（DI Water）與 1% 的非離子表面活性劑（tween-20）（其溶劑是 PBS buffer）至反應槽 12，以去除未鍵結在光檢測器 11 之主動區 111 中的該些生物探針（NHS-Biotin）。

最後，在步驟 S340 中，加入血清蛋白（Bovine serum albumin, BSA）溶液至反應槽 12 並靜置一段時間，以覆蓋主動區 111 中未鍵結該些生物探針（NHS-Biotin）的 APTES。

接著，請參照第 4 圖，其顯示本發明較佳實施例所提供之生物晶片之生化檢測的流程圖。首先，於步驟 S505 中，提供一生物晶片，其中，該生物晶片包括 MSM-PD 光檢測器與設置在光檢測器上的塑膠反應槽（PDMS），且 MSM-PD 光檢測器之主動區上鍵結有多個生物探針（例如：NHS-Biotin）。繼而，於步驟 S510 中，加入一待測溶液至生物晶片上的反應槽，使得該待測溶液中的多個待測物分子（例如：卵白素（Sterptavidin-HRP））與 MSM-PD 光檢測器之主動區中的該些

生物探針鍵結。

接著，於步驟 S515 中，加入一冷光基質試劑至生物晶片上的反應槽，使得已鍵結在該些生物探針上的該些待測物分子的酵素（例如：Sterptavidin-HRP 的辣根酵素（HRP））催化該冷光基質試劑而產生一冷光反應，其中上述冷光基質試劑包括有機化合物顯光劑（Luminol）-過氧化氫（ H_2O_2 ）。

最後，於步驟 S520 中，利用上述光檢測器之主動區偵測該冷光反應的光強度訊號，使得光可直接由生物晶片底下之 MSM-PD 光檢測器偵測。其中，感測原理為 Sterptavidin-HRP 的辣根酵素（HRP）可以催化 Luminol+ H_2O_2 的冷光反應，產生的光電流與無辣根酵素時元件的暗電流比值（ I_p/I_d ratio），因此根據冷光的 I_p/I_d 比值可回推 HRP 的量。由於本實施例所使用 Sterptavidin-HRP 藥劑的 Sterptavidin 和 HRP 比例為 1:1，因此 HRP 的數量等於 Sterptavidin 的數量，藉此，便可由底下光電檢測器之光強度訊號來決定辣根酵素分子與其鍵結之生物數量。

值得注意的是，本實施例所提供之生物晶片的結構與探測方式亦可適用於未來軟性電子之應用。此外，在本發明較佳實施例中，反應所需要的溶液（例如：待測溶液、顯光劑、包含有生物素的溶液、丙酮、或甲苯溶液）亦可透過下述其中一種製程來提供：軟性電子製程之浸沾式塗佈（Dip Coating）、旋轉式塗佈（Spin Coating）、滾筒式塗佈（Roll Coating）、噴灑式塗佈（Spray Coating）、粉體塗裝（Powder Coating）、狹縫模具式塗佈（Slot die Coating）、斜板式塗佈（Slide Coating）、淋幕式塗佈（Curtain Coating）、及噴墨

(Printing)。

由以上之說明可知，本發明較佳實施例將具有催化效果的酵素經由生物分子間親合力固定化到金屬-半導體-金屬光檢測器表面，並利用酵素催化冷光反應，以獲取光電流訊號。由於透過保護層的設計，可以把 Luminol 的冷光和元件的主動區的距離降低，以提高元件的靈敏度。此外，此方式可以用來建立一個可自動化而且拋棄式的檢測晶片，並且因為相當便宜所以可以普及化應用。

藉由以上較佳具體實施例之詳述，係希望能更加清楚描述本發明之特徵與精神，而並非以上述所揭露的較佳具體實施例來對本發明之範疇加以限制。相反地，其目的是希望能涵蓋各種改變及具相等性的安排於本發明所欲申請之專利範圍的範疇內。因此，本發明所申請之專利範圍的範疇應該根據上述的說明作最寬廣的解釋，以致使其涵蓋所有可能的改變以及具相等性的安排。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖繪示本發明較佳實施例之光檢測器的示意圖。

第 1B 圖繪示本發明較佳實施例之生物晶片的俯視圖。

第 2 圖繪示本發明較佳實施例之光偵測器之電壓-電流特性圖。

第 3 圖繪示本發明較佳實施例之生物晶片的製作方法的流程圖。

第 4 圖繪示本發明較佳實施例之生物晶片之生化檢測的流程圖。

【主要元件符號說明】

1：生物晶片

11：光檢測器

111：主動區

112：保護層

1111：金屬電極

1112：金屬電極

12：反應槽

121：開口

十、申請專利範圍：

1. 一種生物晶片，至少包含：

一金屬-半導體-金屬光檢測器，具有一鍵結有多個生物探針的一主動區，其中該主動區至少包含多個指金屬電極；以及

一反應槽，設置於該光檢測器上。

2. 如申請專利範圍第1項所述之生物晶片，其中該些指金屬電極呈現一指叉狀之圖案，且每一指金屬電極的線寬為50奈米至5000奈米。

3. 如申請專利範圍第1項所述之生物晶片，其中該光檢測器包括有一氧化層，該氧化層上鍵結有3-氨基-3-乙氧基矽烷。

4. 如申請專利範圍第1項所述之生物晶片，其中該反應槽之材質為聚二甲基矽氧烷，且該反應槽具有一對準該光檢測器之主動區的開口。

5. 如申請專利範圍第1項所述之生物晶片，其中當一待測溶液提供至該反應槽時，該些生物探針分別鍵結該待測溶液中的待測生物分子，且一顯光劑被提供至該反應槽時，該些鍵結在該些生物探針上之待測生物分子的酵素催化該顯光劑以產生一冷光反應，以使用該光檢測器之主動區偵測該冷光反應的一光強度訊號。

6. 如申請專利範圍第5項所述之生物晶片，其中該些生物探針透過提供一包含有生物素的溶液於該反應槽，鍵結在該主動區中。

7. 如申請專利範圍第6項所述之生物晶片，其中該包含有生物素的溶液可選自下述製程其中之一來提供：軟性電子製程之浸沾式塗佈、旋轉式塗佈、滾筒式塗佈、噴灑式塗佈、粉體塗裝、狹縫模具式塗佈、斜板式塗佈、淋幕式塗佈、及噴墨。

8. 如申請專利範圍第5項所述之生物晶片，其中該些待測生物分子為

卵白素，且該些卵白素的辣根酵素可催化該顯光劑產生該冷光反應。

9. 如申請專利範圍第5項所述之生物晶片，其中該待測溶液或該顯光劑可選自下述製程其中之一來提供：軟性電子製程之浸沾式塗佈、旋轉式塗佈、滾筒式塗佈、噴灑式塗佈、粉體塗裝、狹縫模具式塗佈、斜板式塗佈、淋幕式塗佈、及噴墨。

10. 一種生物晶片的製作方法，包括：

備製一光檢測器，該光檢測器包括一氧化層，該氧化層具有一主

● 動區；

清洗該氧化層，係藉一蝕刻液清洗該氧化層；

鍵結3-氨基-3-乙氧基矽烷於該氧化層上；

清洗未鍵結於該氧化層上的3-氨基-3-乙氧基矽烷；

設置一反應槽至該光檢測器上；以及

提供一含多個生物探針的溶液至該反應槽，使得該些生物探針鍵結在該光檢測器的主動區。

11. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其中該光檢測器為一金屬-半導體-金屬光檢測器，且該主動區至少包含多個指金屬電極，該些指金屬電極呈現一指叉狀之圖案，其中該指金屬電極的線寬為50奈米至5000奈米。

12. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其中該蝕刻液的成份為 $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=7:3$ 。

13. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其中利用丙酮與甲苯溶液清洗該氧化層。

14. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其中該反應槽之材質為聚二甲基矽氧烷，且該反應槽具有一對準該光檢測器之主動區的

一開口。

15. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其中上述含有該些生物探針的溶液為生物素溶液。

16. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其更包括一步驟，係利用去離子水與1%的非離子表面活性劑去除未鍵結在該光檢測器上的該些生物探針。

17. 如申請專利範圍第10項所述之製作方法，其更包括一步驟，加入血清蛋白溶液至該反應槽，以覆蓋該主動區中未鍵結該些生物探針的3-氨基丙基-3-乙氧基矽烷。

18. 一種生化檢測方法，包括：

提供一生物晶片，該生物晶片包括一光檢測器與設置在該光檢測器上的一反應槽，該光檢測器並具有一鍵結有多個生物探針的一主動區；

提供一待測溶液至該反應槽，使得該待測溶液中的該些待測物分子與該光檢測器之該主動區中的該些生物探針鍵結；

提供一冷光基質試劑，使得已鍵結在該些生物探針上的該複數

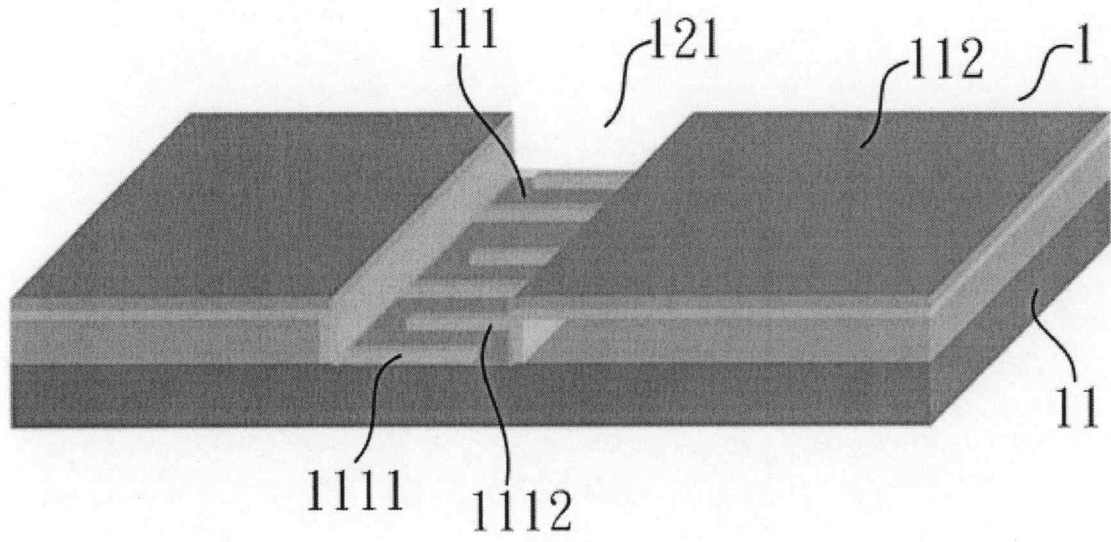
待測物分子的一酵素催化該冷光基質試劑，產生一冷光反應；以及

利用該光檢測器之該主動區偵測該冷光反應的一光強度訊號。

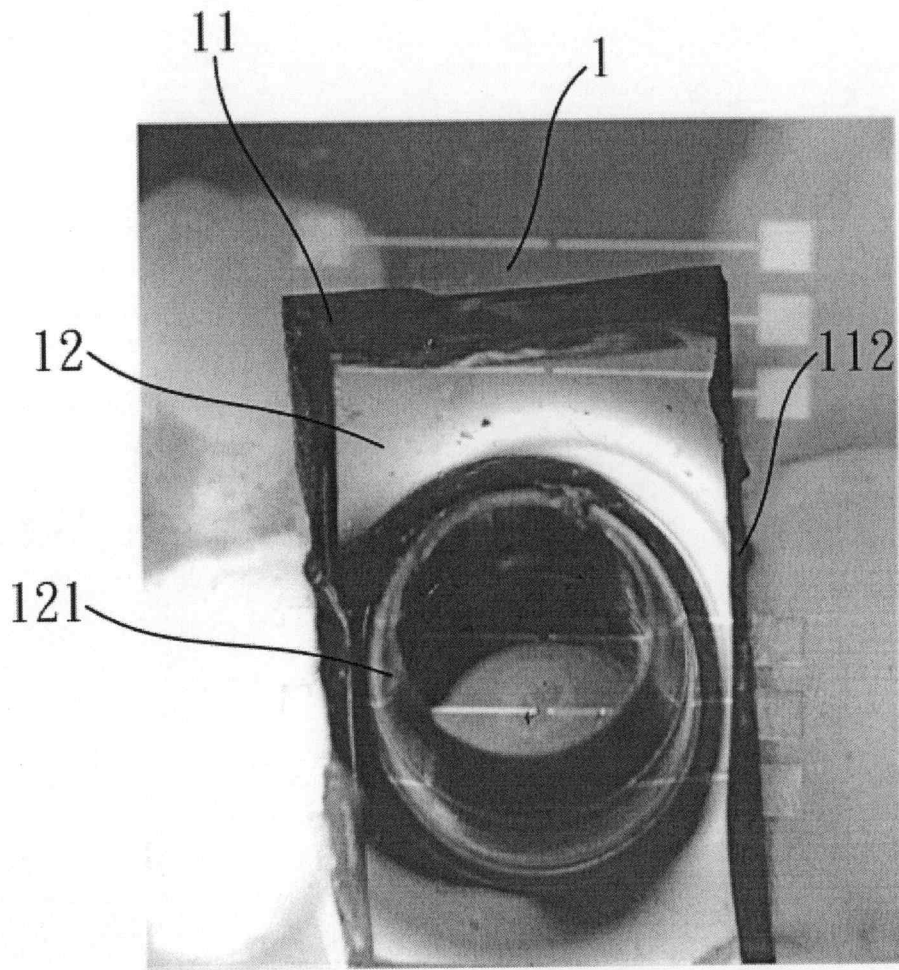
19. 如申請專利範圍第18項所述之生化檢測方法，其中該些待測生物分子為卵白素，且該些卵白素的辣根酵素催化該冷光基質試劑，以產生該冷光反應。

20. 如申請專利範圍第18項所述之生化檢測方法，其中該光檢測器為一金屬-半導體-金屬光檢測器，且該主動區包括多個指金屬電極，呈現一指叉狀之圖案，其中該指金屬電極的線寬為50奈米至5000奈米。

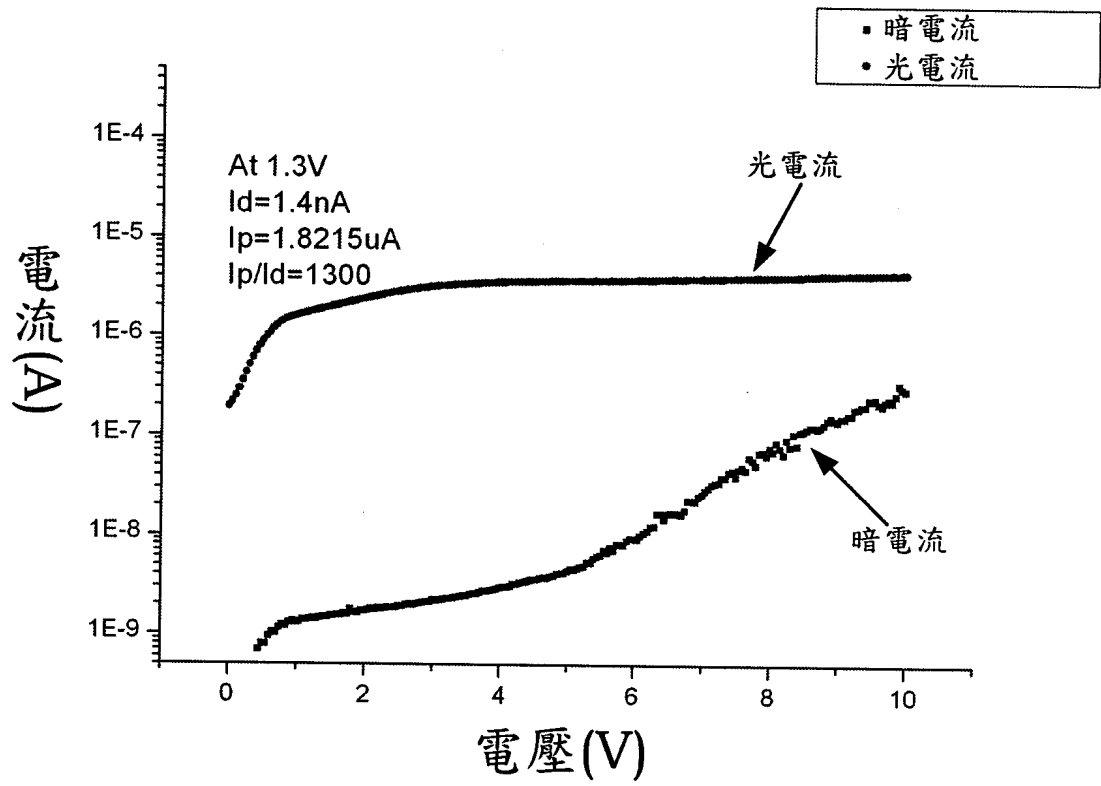
十一、圖式：



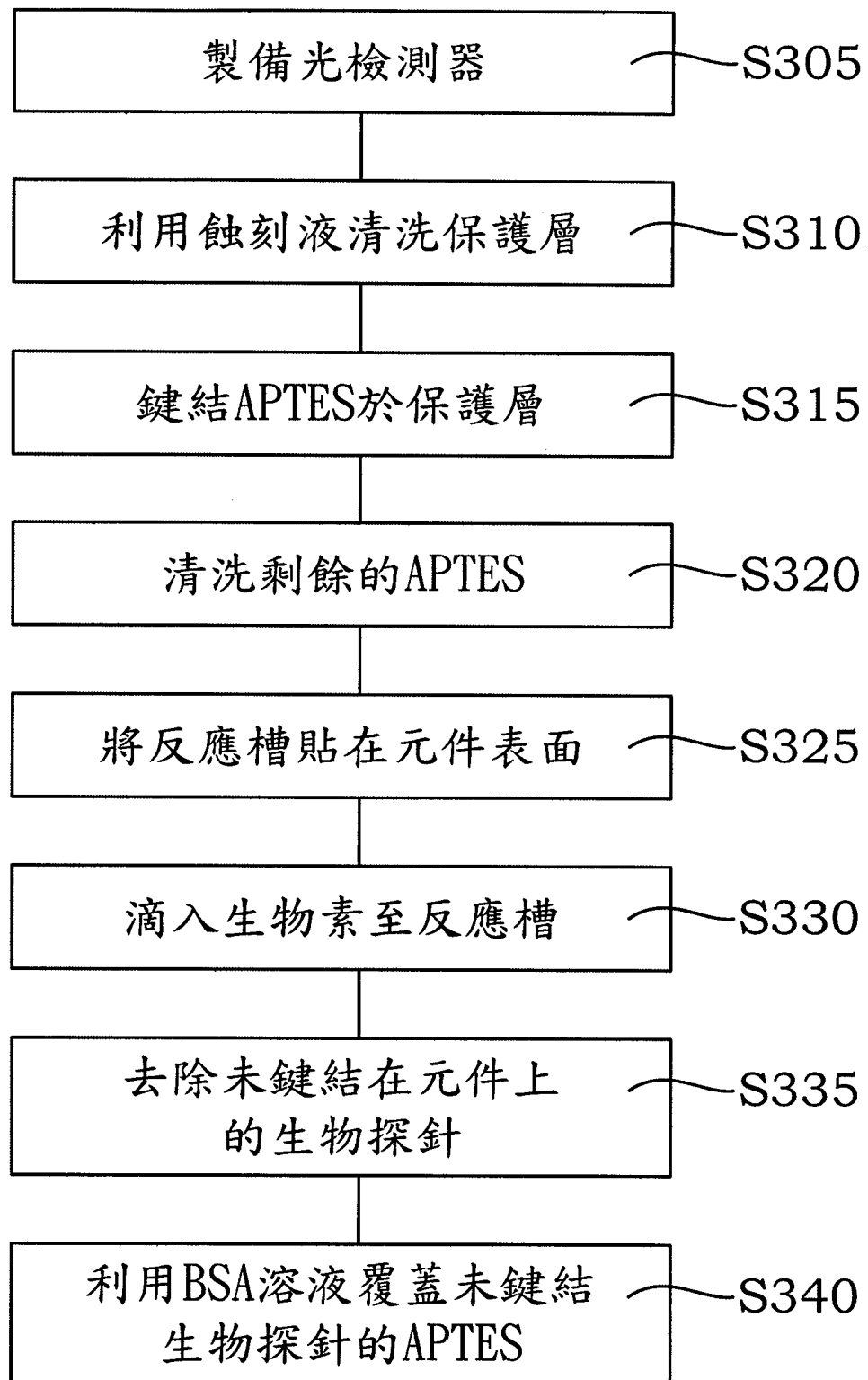
第 1A 圖



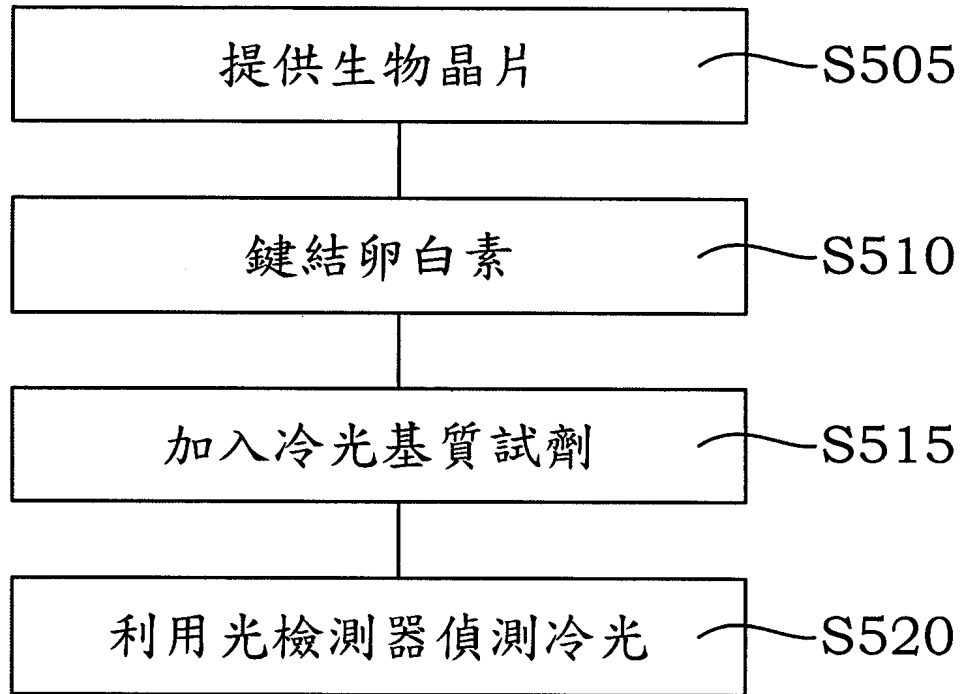
第 1B 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖