


矽奈米線元件於細胞釋放腺嘌呤核苷三磷酸之感測研究

學生：陳奕貞

指導教授：許鈺宗 教授

國立交通大學 奈米科技 學系（研究所）碩士班

摘 要



本論文運用矽奈米線場效電晶體做為高靈敏度的生物感測器，用來偵測 label-free 的生物小分子；經過參雜 Boron(硼)的矽奈米線有很高的靈敏度，所以運用來做生物感測器，矽奈米線會依據外圍的分子帶電荷的不同而造成其電性的改變，可以藉由觀察矽奈米線場效電晶體的電導(conductance)的變化來作為分子的偵測。Abl tyrosine kinase 是一種磷酸轉移酶，在慢性骨髓性白血病中的病人會有突變，在本實驗中將 Abl tyrosine kinase 用共價鍵的修飾在矽奈米線的表面上，因為 Abl tyrosine kinase 對 ATP 有很好的親和力，所以可以用來偵測細胞的「能量通貨」ATP。實驗中利用矽奈米線場效電晶體做 ATP 的即時偵測，在低離子濃度的緩衝液中，可以量測到濃度 1 pM 的 ATP，在高離子濃度的緩衝溶液中，也可以量測到濃度 1 nM 的 ATP。除此之外，在本論文中還進一步直接測到由 HeLa cell 經電極結構刺激後所釋放的 ATP，證明矽奈米線場效電晶體可以即時偵測到生物體所釋放的 label-free 小分子。

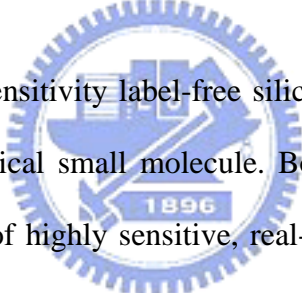
Silicon nanowire sensor for cellular ATP detection

student : Yi-Zhen Chen

Advisors : Dr. Jeng-Tzong Sheu

Department (Institute) of Nanotechnology
National Chiao Tung University

ABSTRACT

The logo of National Chiao Tung University is a circular emblem with a gear-like border. Inside the circle, there is a stylized representation of a building or a bridge, and the year '1896' is inscribed at the bottom.

This study utilized ultrahigh sensitivity label-free silicon nanowire field-effect transistors (SiNW FETs) to detect biological small molecule. Boron-doped silicon nanowires were adopted due to the properties of highly sensitive, real-time electrical response to charged biological and chemical species. Abl, which is a protein tyrosine kinase whose constitutive activity is responsible for chronic myelogenous leukemia, was covalently linked to the surfaces of silicon nanowires for the detection of Adenosine triphosphate (ATP), the energy currency of cells. A real-time time-dependent measurement of conductance of SiNW FETs showing that detection of ATP down to a picomolar concentration is achievable. In high ion strength buffer, due to shorter Debye screening effect, the detection limit of SiNW FETs for ATP was at nanomolar range. Furthermore, this investigation applied the interdigitated electrodes to stimulate the HeLa cell to release ATP and SiNW FETs were adopted for real-time detection of ATP.

誌謝

謝謝我的老師許鈺宗教授，在我碩士班兩年來細心栽培，提供我良好的環境、儀器設備以及充足的實驗經費，讓我在無後顧之憂的情況下順利完成碩士論文。老師在我迷失方向時給我指點，告訴我很多做實驗的態度及研究的精神，讓我在碩士班期間能對研究充滿熱忱，因此順利的完成我的研究。

再來我要感謝實驗室的學長們，在我失落時候給我鼓勵，在我迷惑的時候給我方向。因為從生物領域跨足電子領域常常會有不懂得時候，學長們總是能耐心指導，感謝柏鈞學長提供的奈米線，對我的實驗非常重要；感謝皓恆學長常常能幫我解決一些化學上的問題；感謝泰瑞學長常常讓我覺得充滿動力；感謝我的指導學長 振嘉學長，在電子領域給我很多重要的觀念，使我能順利的完成碩士論文。

還要感謝我的同學們，欣霖、昶龍、和子訓，因為我個性比較迷糊，你們常常提醒我很多事情，無論是課業或是實驗上的細節，都多虧有你們才能讓我如此順利通過，感謝你們在碩士班的兩年裡，陪我一起辛苦，一起歡笑，有了你們的陪伴，讓我的碩士生涯過得更充實，也希望我們畢業以後都能常常連絡，一起分享出社會後的生活。感謝實驗室的學弟，盈傑、柏勳、履安、昭睿、和治廷，有了你們的幫忙，我的論文實驗才能順利的完成。

我要特別感謝一位去年畢業的玠澤學長，在碩士期間所有的實驗技術和觀念都是他教我的，即使已經畢業也給我很多幫助，雖然是我男朋友，但在工作下班之虞還要聽我在實驗上的問題或是抱怨，也真的是很辛苦，所以真的非常謝謝他。還有我的狗女兒咪小妮，是我生命的泉源，再怎麼心情低落都可以因為她的可愛而痊癒。

最後要謝謝我的父母，給我最大的自信，一直在我背後鼓勵我往前衝，在我受傷時給我最大的安慰，謝謝你們，希望我能成為你們的驕傲。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vii
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 矽奈米線生物感測.....	3
1-3 矽奈米線生物感測器的感測限制.....	8
1-4 生物分子修飾與量測.....	9
1-5 電刺激 HeLa Cell 釋放 ATP.....	12
1-6 研究動機及目標.....	13
第二章 元件製作及量測.....	15
2-1 元件製作.....	15
2-1-1 矽奈米線場效電晶體元件製作.....	15
2-1-2 加入參考電極及微流道之生物感測元件.....	18
2-2 表面修飾.....	19
2-2-1 表面修飾 Aldehyde silane.....	19
2-2-2 表面修飾 Abl tyrosine kinase.....	20
2-3 電刺激 HeLa Cell.....	21
2-3-1 電刺激 HeLa cell 的結構.....	21

2-3-2	電刺激 HeLa cell 釋放 ATP.....	22
2-4	量測.....	23
2-4-1	電性量測.....	23
2-4-2	低離子濃度下的 ATP 量測.....	24
2-4-3	高離子濃度下(生理環境)的 ATP 量測.....	25
2-4-4	高離子濃度下測試 Abl tyrosine kinase 的活性.....	26
2-4-5	HeLa cell 的 ATP 量測.....	27
第三章	實驗結果與討論.....	28
3-1	電刺激 HeLa cell 釋放 ATP.....	28
3-1-1	用 bioluminescence 測 ATP 濃度.....	28
3-1-2	用 bioluminescence 測 HeLa cell 細胞外 ATP 濃度.....	29
3-2	表面修飾.....	33
3-2-1	Aldehyde Silane 的表面修飾.....	33
3-2-2	Abl tyrosine kinase 的表面修飾.....	36
3-3	矽奈米線場效電晶體元件電性分析.....	38
3-3-1	矽奈米線場效電晶體.....	38
3-3-2	矽奈米線場效電晶體電性量測.....	42
3-4	矽奈米線場效電晶體感測 Label-free 小分子 ATP.....	46
3-4-1	低離子濃度的緩衝液下感測 ATP	46
3-4-2	高離子濃度的緩衝液下感測 ATP	49
3-4-3	高離子濃度的緩衝液下測試 Abl 的活性.....	54
3-5	矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP.....	55
3-5-1	量測架構.....	55
3-5-2	細胞外 ATP 量測結果.....	56

第四章 結論與未來展望.....	60
4-1 結論.....	60
4-2 未來展望.....	61
參考文獻.....	62



圖目錄

圖 1-1-1 實驗目標.....	2
圖 1-2-1 矽奈米線場效電晶體生物感測器之感測機制示意圖	3
圖 1-2-2 Charles M. Lieber 團隊 pH 感測之實驗結果.....	4
圖 1-2-3 Charles M. Lieber 團隊蛋白質感測之實驗結果	4
圖 1-2-4 Charles M. Lieber 團隊感測神經細胞動作電位	5
圖 1-2-5 偵測小分子與蛋白質間的作用示意圖	6
圖 1-2-6 用矽奈米線偵測 ATP 的 binding	7
圖 1-3-1 緩衝溶液濃度與 debye length 的關係圖	9
圖 1-4-1 ATP 生理功能示意圖.....	10
圖 1-4-2 ATP 結構示意圖.....	10
圖 1-4-3 aldehyde silane 修飾流程.....	11
圖 1-4-3 Abl tyrosine kinase 的 active 和 inactive 型態	12
圖 1-5-1 電刺激後細胞內外的 ATP 濃度	13
圖 1-6-1 實驗架構.....	14
圖 2-1-1 矽奈米線場效電晶體結構示意圖.....	17
圖 2-1-2 加入參考電極與微流道之生物感測元件示意圖.....	18
圖 2-2-1 表面修飾 Aldehyde silane-streptavidin-biotin bead 示意圖.....	19
圖 2-2-2 表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖.....	20
圖 2-3-1 電極結構示意圖.....	21
圖 2-3-2 電刺激方式示意圖.....	22
圖 2-4-1 元件量測示意圖.....	23
圖 2-4-2 ATP 量測示意圖.....	24

圖 2-4-3 量測細胞所釋放的 ATP 的量測架構示意圖.....	27
圖 3-1-1 bioluminescence 的冷光反應示意圖.....	28
圖 3-1-2 ATP 濃度 bioluminescence 標準曲線.....	29
圖 3-1-3 刺激細胞的電極結構圖.....	29
圖 3-1-4 HeLa cell 電刺激前後細胞外 ATP 濃度變化.....	30
圖 3-1-5 HeLa cell 電刺激前後表面形貌.....	31
圖 3-2-1 Aldehyde 與 Amine 反應流程.....	33
圖 3-2-2 aldehyde silane、streptavidin 與 biotin-bead 的修飾圖示及各表面 SEM 影像.....	34, 35
圖 3-2-3 Abl tyrosine kinase 表面修飾圖示.....	36
圖 3-2-4 aldehyde silane 和 Abl tyrosine kinase 的 AFM 影像.....	36
圖 3-3-1 矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖.....	38
圖 3-3-2 矽奈米線場效電晶體電子顯微鏡俯視圖.....	39
圖 3-3-3 50 nm 矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖.....	40
圖 3-3-4 50 nm 矽奈米線場效電晶體電子顯微鏡俯視圖.....	41
圖 3-3-5 不同長度矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖.....	42
圖 3-3-6 不同長度矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖.....	43
圖 3-3-7 矽奈米線場效電晶體表面處理後的電流-閘極電壓圖.....	44
圖 3-3-8 50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖.....	45
圖 3-3-9 矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖.....	45
圖 3-4-1 低離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP.....	47
圖 3-4-2 低離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP(控制組).....	47
圖 3-4-3 低離子濃度緩衝液下感測 ATP, $\Delta G/G_0$ 對時間圖.....	48
圖 3-4-4 低離子濃度下矽奈米線場效電晶體的 $\Delta G/G_0$ 對 ATP 濃度對數作圖.....	49
圖 3-4-5 高離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP.....	51

圖 3-4-6 高離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP(控制組)	51
圖 3-4-7 高離子濃度緩衝液下感測 ATP, $\Delta G/G_0$ 對時間圖	52
圖 3-4-8 高離子濃度下矽奈米線場效電晶體的 $\Delta G/G_0$ 對 ATP 濃度對數作圖	53
圖 3-4-9 量測 Abl tyrosine kinase 活性的 life time	54
圖 3-5-1 量測細胞所釋放的 ATP 的量測架構	55
圖 3-5-2 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP	56
圖 3-5-3 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP (控制組)	57
圖 3-5-4 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP (ΔG)	58

