

# 第一章

## 緒論

### 1-1 前言

由於傳統之生物檢測技術很費時，且大量樣品需要做純化之後才能被感測，例如 ELISA 需費時二到三天的時間才能得到檢測結果，因此推動了即時偵測生物感測器元件之研發。生物感測器的演進與近代電子資訊業的蓬勃發展有很密切的關係，屬於跨領域的技術整合，將傳統生物技術和半導體製程、微機電、光電、數位訊號擷取與處理等技術結合，使檢測技術的時間縮短、樣品減少，靈敏度增加並且可以即時偵測。

奈米線 (nanowires) 是直徑為奈米尺度的一維結構系統[19, 20]，可由想像一塊材 (三維) 在其中二維方向尺寸縮小為奈米尺寸且遠比第三維的尺寸，即奈米線的長度，小很多而構成，在奈米尺度下，量子效應變得格外重要，且與系統尺寸有密切關聯，而系統由三維演變為一維，物理與化學性質也會因而產生獨特的變化。電子學上的應用，可作為奈米電晶體或記憶體，另外因為奈米材料本身的表面積大，可以作為理想的生物及化學分子感測器。

生物感測器定義為”使用固定化的生物分子(immobilized biomolecules)結合換能器(transducer)，用來偵測體內或體外的環境化學物質或與其有特異性交互作用後產生反應的一種裝置”。生物感測器由兩個主要關鍵部份所構成，一為生物分子和其反應之受體，二為硬體元件，用來偵測生物分子反應後的訊號，主要為物理信號轉換元件。在本次實驗中，我們所使用之硬體元件即為矽奈米線場效電晶體，感測分子為三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP)。

將元件尺寸不斷縮小，可以更靈敏、更快速、更直接的偵測到目標生物分子與修飾分子之間的作用，因為矽奈米線的表面積與體積比很大，所以只要些微的電荷就能影響奈米線的電導(conductance)，這對生物領域的研究或醫學上藥物的篩檢都有很長

足的幫助[1, 2]，如癌症或是疾病生物的標示[18]，不需使用任何標記就能即時偵測小型分子與蛋白質間的交互作用。

在實驗中所修飾的酵素(tyrosine kinase)是細胞訊息傳遞的重要元素，可以將 tyrosine 磷酸化，對 ATP 有很高的親和力當 ATP 與 Abl tyrosine kinase 結合時，奈米線場效電晶體的導電率因而增加，效果相當於加上負閘極電壓。在本實驗中除了要完成用矽奈米線場效電晶體來感測 ATP 之外，又將細胞結合在生物感測的系統中，讓生物感測系統能即時給予電刺激和偵測細胞的行為，如偵測細胞所釋放的 label-free 小分子。

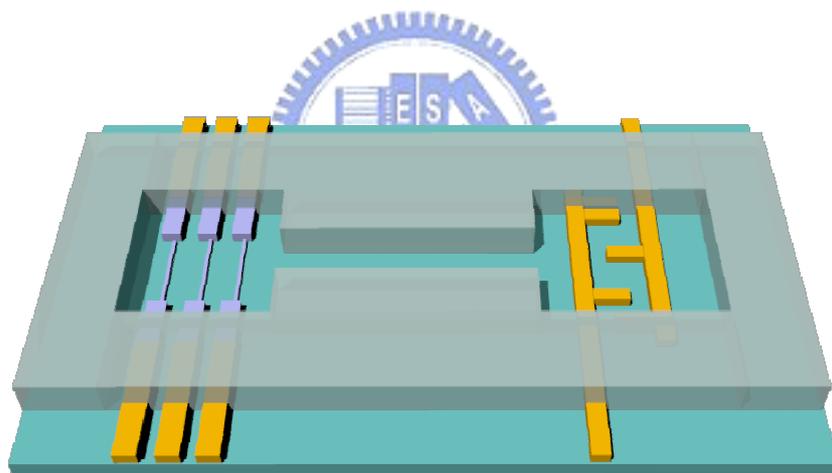


圖 1-1-1 實驗目標。

## 1-2 矽奈米線生物感測器

在2001年，Charles M. Lieber 之團隊首先發表了利用矽奈米線製作之場效電晶體，應用於生物感測器之技術[3]，也因此，後續許多研究團隊都致力於開發所謂的一維奈米結構，用來當作高靈敏度之生物分子感測器，偵測多種微小物質，例如：離子、蛋白質、DNA等等。

矽奈米線場效電晶體之生物感測器，主要即是利用對矽奈米線之表面做特定之修飾後，接上特定之帶電微小物質，而形成類似一個上電極的結構，圖1-2-1之示意圖。

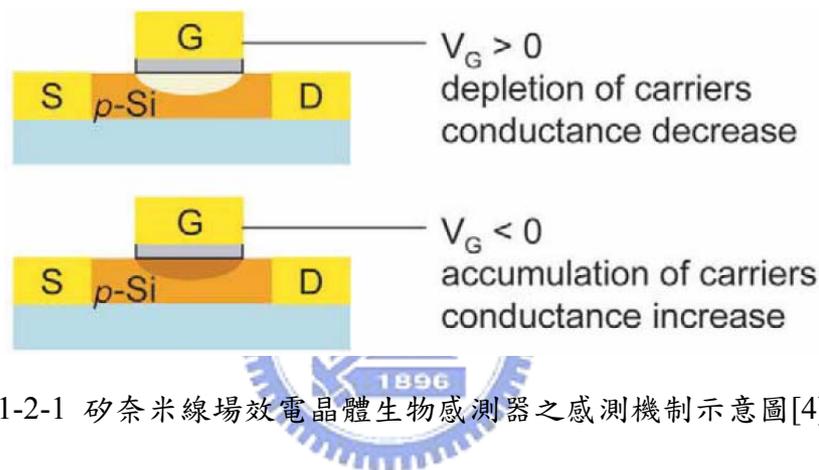


圖1-2-1 矽奈米線場效電晶體生物感測器之感測機制示意圖[4]。

Charles M. Lieber 之團隊所使用之矽奈米線為P型矽，因此若接上矽奈米線之物質帶正電，則等效於對元件加上一上電極之正電壓，造成P型矽載子空乏，而使電晶體之電流及conductance因此下降；同理，若接上之物質帶負電，則等效於對元件加上一上電極之負電壓，造成P型矽載子聚集，而使電晶體之電流及conductance因此上升，達到其感測分子之目的。

矽奈米線場效電晶體之感測原理首先被應用在當pH感測器，由於不同pH值會讓矽奈米線表面帶不同電荷，pH值愈小代表溶液中 $[H^+]$ 愈多，則矽奈米線表面帶愈多正電，則conductance愈小；反之，pH值愈小代表溶液中 $[H^+]$ 愈少、 $[OH^-]$ 愈多，則矽奈米線表面帶愈多負電，則conductance愈大。Charles M. Lieber 團隊在矽奈米線上修飾

APTMS，使矽奈米線的conductance與pH有線性關係，如圖1-2-2，pH值改變會造成矽奈米線的conductance也跟著改變，即成為靈敏的pH感測器。

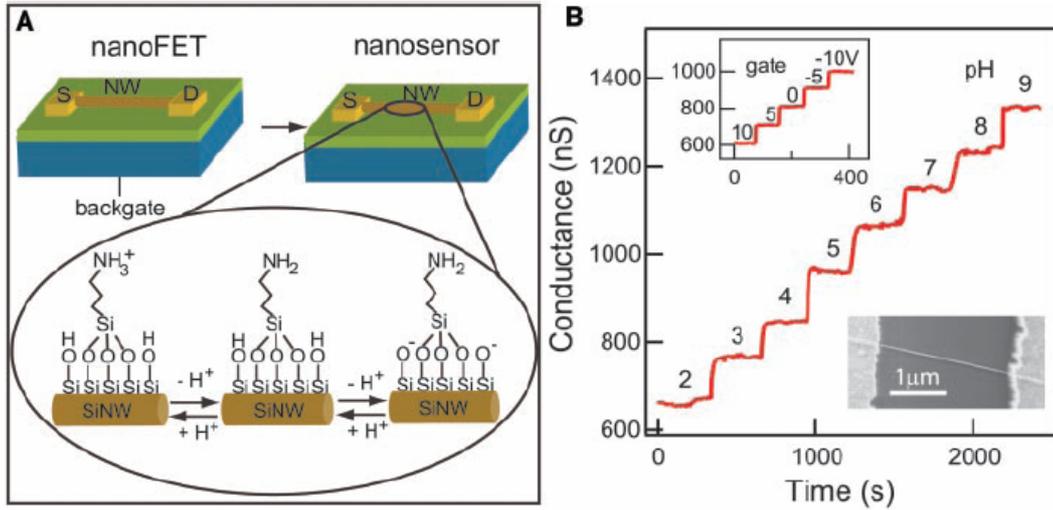


圖1-2-2 Charles M. Lieber團隊pH感測之實驗結果[3]。

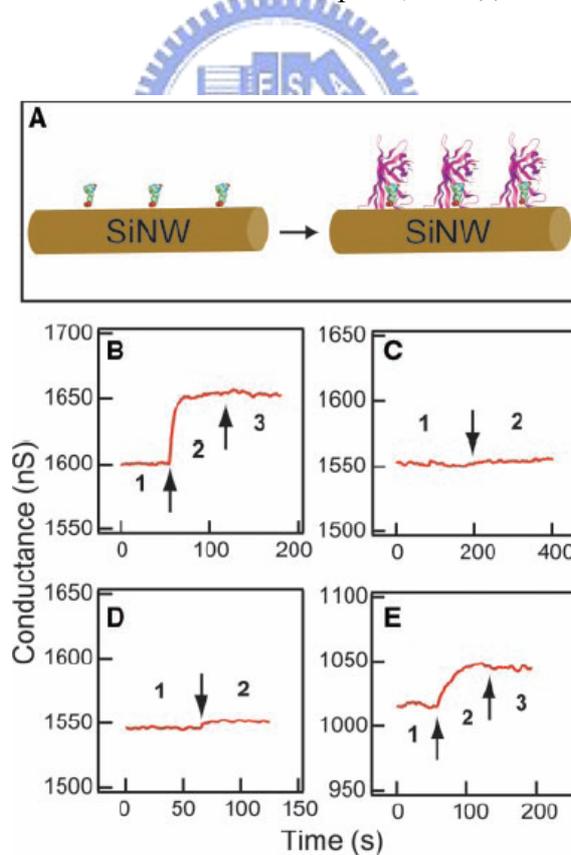


圖1-2-3 Charles M. Lieber團隊蛋白質感測之實驗結果[3]。

圖1-2-3即為2001年Charles M. Lieber團隊做蛋白質感測之實驗結果，發表在science，感測目標蛋白質為streptavidin。他們先在矽奈米線表面修飾BSA-biotin，利用biotin與streptavidin生物專一性結合，streptavidin之帶電性(負電)，使其矽奈米線電晶體之電導上升，如圖1-2-3B。圖1-2-3C為表面未修飾BSA-biotin矽奈米線電晶體元件，若加上streptavidin，因不會形成鍵結，所以對電性不會有任何影響。圖1-2-3D為表面修飾另一種BSA-biotin之矽奈米線電晶體元件，但加入的streptavidin會先與四倍濃度的d-biotin形成反應，使streptavidin上的biotin binding site被佔滿，因未剩餘的binding site很少，所以加入streptavidin的對電性只有些微影響，利用此結果強調矽奈米線電晶體感測器對生物專一性有良好辨別度。而圖1-2-3E則表示當時此感測器對streptavidin濃度之感測極限，為25pM。

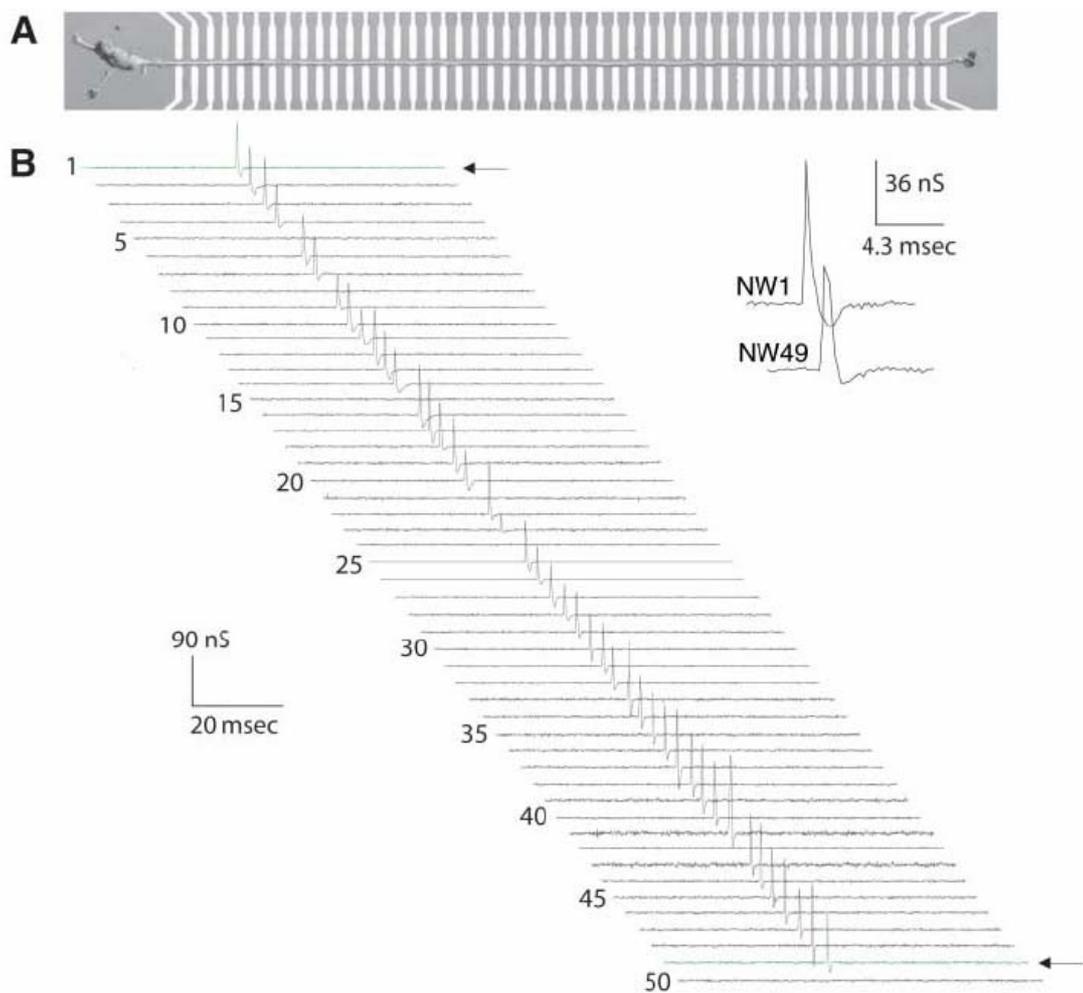


圖1-2-4 Charles M. Lieber團隊感測神經細胞動作電位[5]。

Charles M. Lieber團隊除了將矽奈米線場效電晶體做為生物分子的感測器之外，還將神經細胞長在矽奈米線上，讓矽奈米線能給予神經細胞刺激的電訊號，且觀測神經細胞的動作電位[5]，如圖1-2-4，將神經細胞的生長侷限在特定區域，橫跨矽奈米線，然後在第一條矽奈米線給予神經細胞電訊號，讓訊號藉由神經的軸突來傳送，經過50條矽奈米線讀取軸突的動作電位，實驗結果顯示，矽奈米線場效電晶體可以運用做為神經細胞的動作電位感測陣列，給予電刺激且讀取神經細胞的膜電位，如此可以對神經細胞的研究更快速，更可以進一步對神經細胞的訊息傳遞如何阻斷或強化等功能做研究。

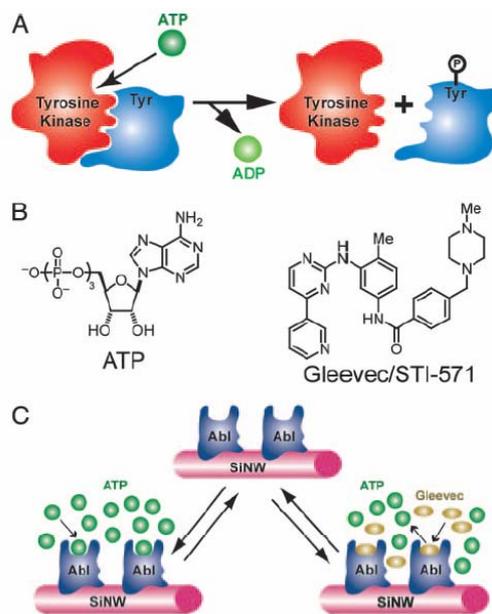


圖1-2-5 偵測小分子與蛋白質間的作用示意圖[6]。

以上介紹了幾種矽奈米線場效電晶體的原理及應用，除此之外，更重要的是將酵素固定在矽奈米線上，並使其發揮功能，無論是做為生物感測器或是進一步運用在藥物篩檢上，都有其重要性，Charles M. Lieber團隊也對此有研究[6]，他們在矽奈米線上修飾tyrosine kinase來做為藥物篩檢的感測器，如圖1-2-5，修飾在矽奈米線上的

tyrosine kinase對ATP有很大的親和力，Gleevec/SIT-571是ATP的競爭型抑制劑，兩者會搶tyrosine kinase的binding site，在此實驗中，使用的tyrosine kinase是Abl，在慢性骨髓性白血病(Chronic myelogenous leukemia)的患者中，有90%有Abl tyrosine kinase與基因BCR連結的突變，造成Abl tyrosine kinase過度活化，所以此藥物篩檢系統可以偵測加入的抑制劑是否有效，能否成功的抑制Abl tyrosine kinase與ATP的結合，如圖1-2-5，Gleevec/SIT-571將ATP的binding site佔據，使ATP不能與Abl tyrosine kinase結合。

Lieber指出，相較於其他如表面電漿共振及熱量計等免標記的方法，這項技術在靈敏度上高出幾個數量級，在執行上也比需要將放射性磷由ATP轉換到基質酶的測試法容易多了。此外，這項技術僅需少量蛋白質，這對於尚未邁入量產階段的新酵素研究至為關鍵。

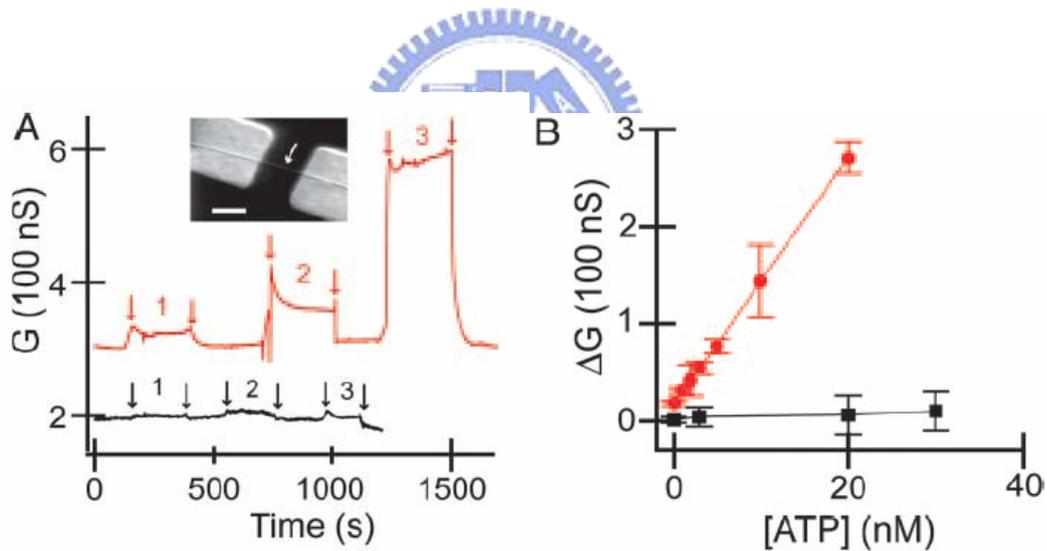


圖1-2-6 用矽奈米線偵測ATP的binding[6]。

圖1-2-6為Charles M. Lieber團隊對ATP即時偵測的實驗結果，在圖1-2-6A中分別加入0.1 nM、3 nM、和20 nM的ATP，觀察矽奈米線場效電晶體的conductance的變化，紅色線是有修飾Abl tyrosine kinase的量測結果，黑色線是沒有修飾的量測結果，由圖中可以知道修飾Abl tyrosine kinase在矽奈米線上，能夠靈敏的偵測ATP，其偵測極限

可到0.1 nM；圖1-2-6B是ATP濃度對conductance變化量做圖，呈線性關係的改變。

### 1-3 矽奈米線生物感測器的感測限制

矽奈米線場效電晶體在高離子濃度的緩衝溶液中 debye length 會變小，這限制會使矽奈米線場效電晶體的靈敏度下降。在高離子濃度的緩衝溶液中，會造成矽奈米線的 debye length 變小，Debye length 公式(1.1)：

$$\lambda_D = \frac{1}{\sqrt{4\pi l_B \sum_i \rho_i z_i^2}} \quad (1.1)$$

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T} \quad (1.2)$$

$l_B$  表示Bjerrum length，定義為在兩個基本電荷間有靜電作用，而兩電荷間會被Bjerrum length的距離分開，Bjerrum length在水中是0.71 nm，可以藉由增加水中 ionic strength 使其變大； $\sum_i$  表示所有離子的總和、 $\rho_i$ 表示*i*離子的density、 $z_i$ 是*i*離子的價電數[7]。公式(1.1)中表示當溶液中離子濃度愈高，debye length就愈小，則矽奈米線可感測的範圍就愈小，所以靈敏度下降。

圖1-3-1為Mark.A Reed團隊在2007發表在Nano Letter的文章，研究緩衝溶液中離子濃度與debye length的關係[8]，如圖1-3-1A，表示在不同濃度的緩衝溶液PBS中，debye length的長度和能感測分子的範圍，當在正常生理環境中的離子濃度時，debye length為0.7 nm，所以文章中提到在矽奈米線場效電晶體修飾的linker也會大大影響其感測的靈敏性；圖1-3-1B，是Mark.A Reed團隊做緩衝溶液中離子濃度與debye length的關係之實驗結果，在矽奈米線場效電晶體先修飾biotin，然後在不同離子濃度的緩衝溶液中加入相同濃度的streptavidin，觀察電流的大小，發現在低離子濃度的緩衝溶液中，電流的改變較大，當增加離子濃度時，雖然是加入相同濃度的streptavidin，但是電流的變化卻變小了，代表在高離子濃度下，靈敏度會下降，當濃度提高到正常生

理環境時，電流變化量又更小了，所以代表矽奈米線能感測的範圍變很小，所以能改變矽奈米線的電荷變少了，所以電流變化量也變小。

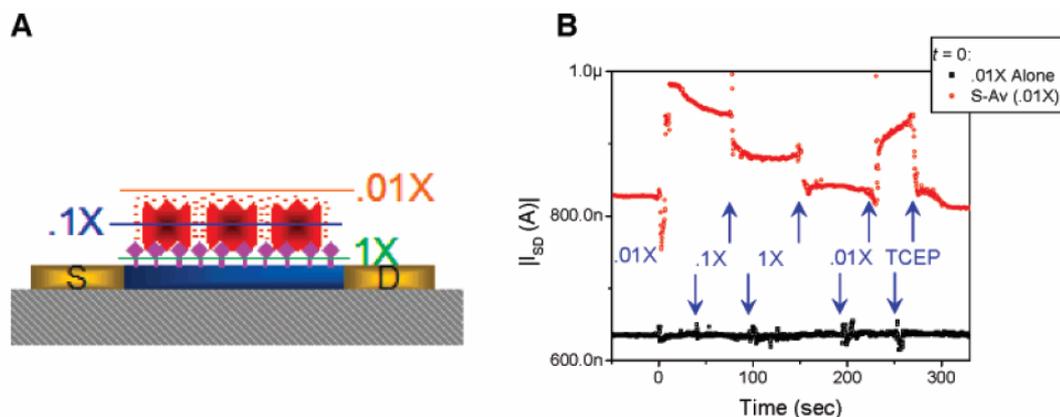


圖1-3-1 緩衝溶液濃度與debye length的關係圖[8]。

## 1-4 生物分子修飾與量測

在本實驗中，將修飾Abl tyrosine kinase在矽奈米線上來感測生物體所釋放的ATP。

ATP是三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 是一種核苷酸，作為細胞內能量傳遞的「分子通貨」，儲存和傳遞化學能，如圖1-4-1，主要分成三種功能，第一種為傳輸功能，在細胞膜上有很多膜蛋白，膜蛋白負責選擇性的傳送物質進出細胞，而膜蛋白傳輸的能量來源即為ATP，可以藉由磷酸化或是去磷酸化將通道開放或關閉。第二種功能是機械功能，肌蛋白上的motor protein也可以藉由磷酸化或是去磷酸化來移動。第三種為化學功能，在生理環境中有很多的功能都要藉由化學反應而進行，這些化學反應的能量來源也都是ATP。ATP由腺苷和三個磷酸基所組成，化學簡式  $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ，分子式  $C_{10}H_8N_4O_2NH_2(OH)_2(PO_3H)_3H$ ，分子量507.184。三個磷酸基團從腺苷開始被編為 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 磷酸基。ATP的化學名稱為5'-三磷酸-9- $\beta$ -D-呋喃核糖基腺嘌呤，或者5'-三磷酸-9- $\beta$ -D-呋喃核糖基-6-氨基嘌呤，如圖1-4-2。

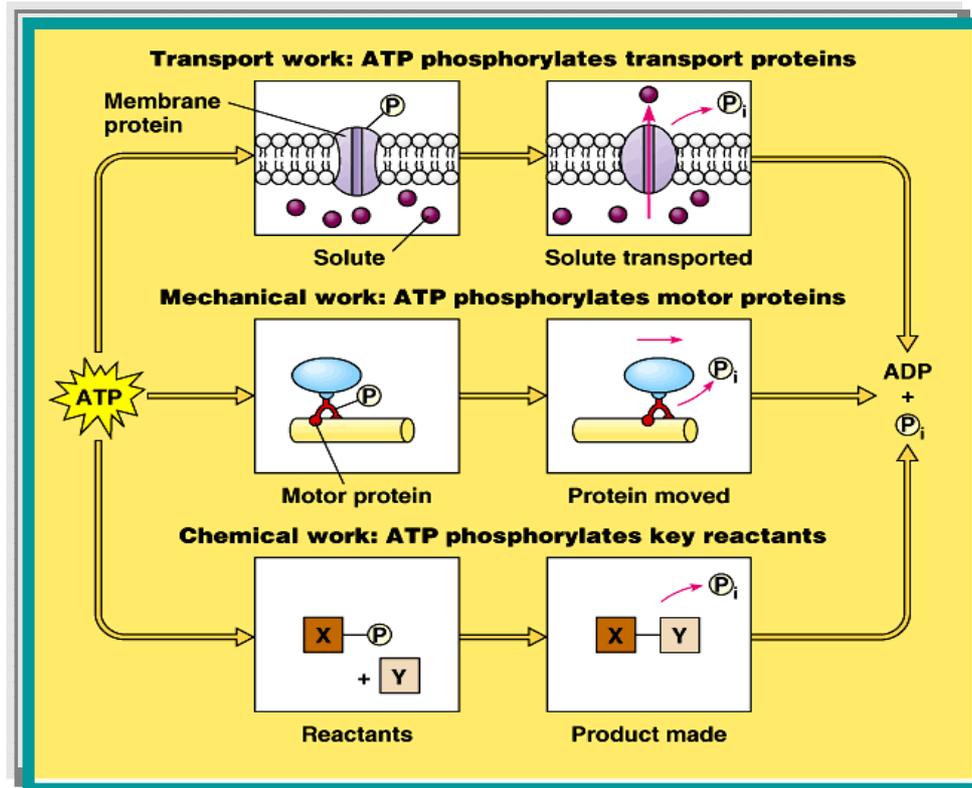


圖1-4-1 ATP生理功能示意圖。

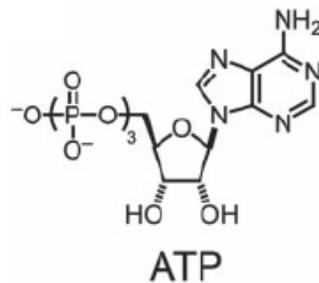


圖1-4-2 ATP結構示意圖。

在本實驗中，由 aldehyde silane (3-(trimethoxysilyl)propyl aldehyde, United Chemical Technologies, Bristol, PA)與 Abl tyrosine kinase作用形成 -C-N- 鍵結，使 Abl tyrosine kinase可以固定在製作完成的矽奈米線場效電晶體上，這修飾的流程如圖 1-4-3所示，aldehyde silane先和 Silicon上的 silanol group反應連接，加入 Abl tyrosine

kinase讓其一級胺(-NH<sub>2</sub>)與aldehyde group反應，此為固定蛋白質在Silicon表面的方式之一。

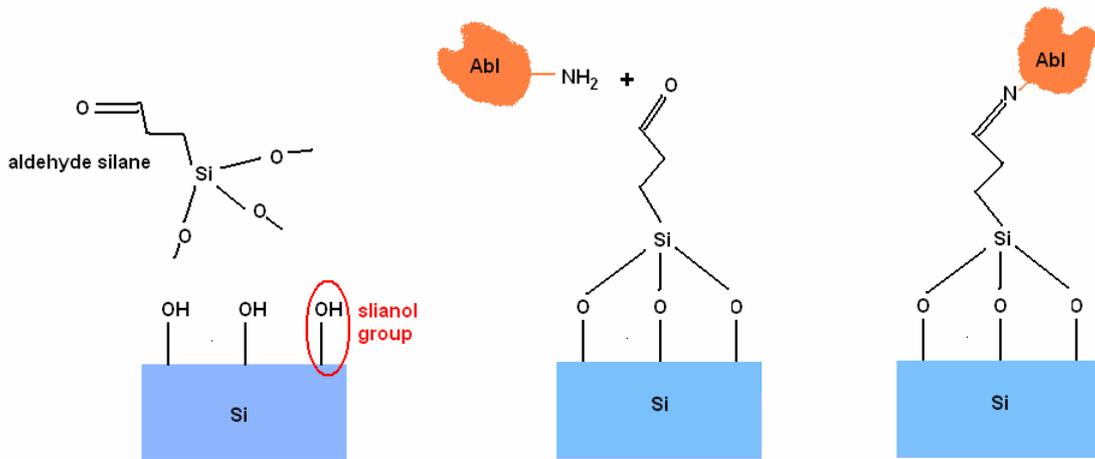


圖 1-4-3 aldehyde silane修飾流程

Abl在細胞訊息傳遞中扮演重要的角色，生理環境中，Abl tyrosine kinase會在細胞要貼附於另一細胞時、細胞準備要生長或移動到另一位置時發出訊息[9]。當在生理情況下，磷酸化的調節失去控制時，可能是突變或是過度表現，都會造成很多種疾病產生，也很有可能導致癌症[1, 11, 12]。Abl tyrosine kinase有active和inactive型態，如圖1-4-4，上面是inactive的型態，下方是active的型態，各包含兩個regulatory domain、一個kinase domain、和多個可以與actin和DNA做binding的additional domain，來調節Abl的活性，在慢性骨髓性白血病(Chronic myelogenous leukemia)的患者中，90%的病患患有Abl tyrosine kinase與基因BCR連結的突變，造成Abl tyrosine kinase過度活化[1, 2]。由於Abl tyrosine kinase會與ATP結合，將ATP上的磷酸轉移到另一個蛋白質上，為一磷酸轉移酶，所以Abl tyrosine kinase對ATP有很大的親和力，因此將Abl tyrosine kinase修飾在矽奈米線上，可以用來感測ATP。

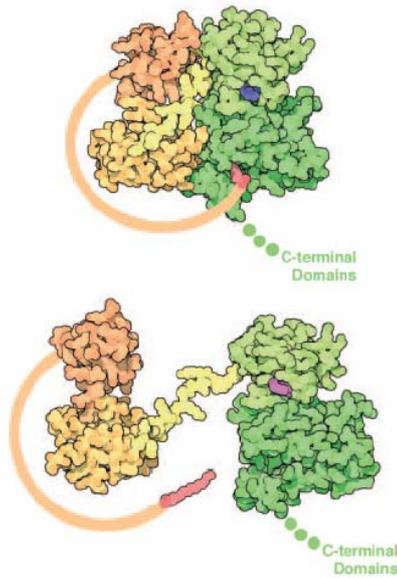


圖1-4-4 Abl tyrosine kinase的active和inactive型態[9]。



## 1-5 電刺激HeLa Cell釋放ATP

在本實驗的架構及目標下，除了製作出矽奈米線場效電晶體、完成ATP生物感測之外，還要找出電刺激細胞的方式，圖1-5-1為在電刺激之後用冷光的方式測HeLa cell細胞內外的ATP濃度[13]，作者給予HeLa cell直流電流600  $\mu\text{A}$ ，刺激8分鐘，在用Roche's Bioluminescence assay kit和冷光儀測細胞內外ATP濃度；發現細胞外原先ATP濃度很低，但在經過電刺激之後，細胞外的ATP濃度增加了50倍，而且細胞內的ATP濃度也減少了，但因為細胞內ATP濃度在電刺激前後差異並不像細胞外有很大的差異，所以推斷電刺激後，不僅能刺激細胞釋放ATP，也可能會促進細胞活化來製造更多的ATP。由此實驗結果可知，當細胞經過電刺激之後，細胞外的ATP濃度會提高，所以我們可以藉由電刺激讓細胞釋放ATP

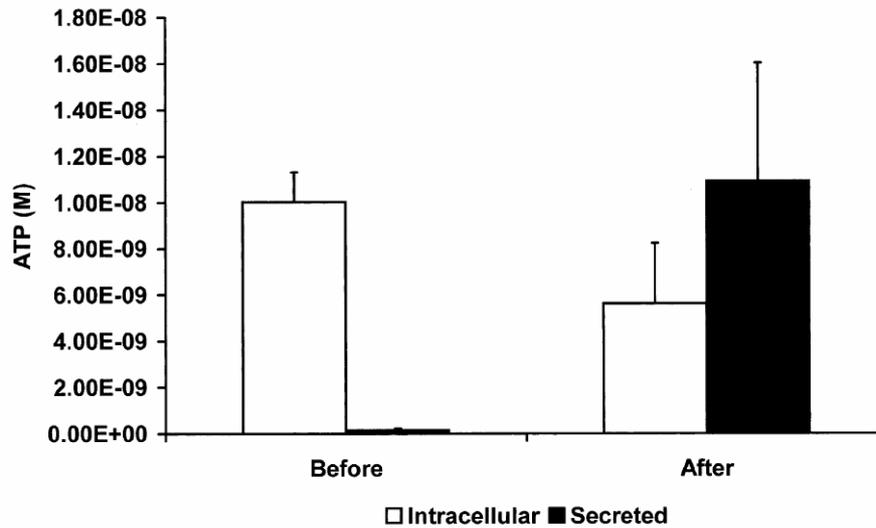


圖1-5-1 電刺激後細胞內外的ATP濃度[13]。



## 1-6 研究動機及目標

經過以上對矽奈米線場效電晶體生物感測器、電刺激細胞等介紹，本實驗研究動機為進一步運用矽奈米線場效電晶體來結合生醫感測。既然上述參考文獻中提到矽奈米線場效電晶體為一高靈敏度的生物感測器，在本研究中將架構出一系統，作為刺激生物體和感測其所釋放的分子的感測器，以即時刺激和偵測生物體行為作為目標。

本實驗架構分成兩個部份，如圖1-6-1，一為製作可以給予細胞電刺激的結構，並測試細胞經由此結構的電刺激可以釋放我們要偵測的分子ATP，另一架構為製作高靈敏度的矽奈米線場效電晶體，且在矽奈米線修飾上Abl tyrosine kinase，並測試在此架構上能高靈敏度的偵測ATP的存在；最後，將兩架構合併，讓矽奈米線場效電晶體生物感測系統能即時偵測細胞所釋放的ATP。

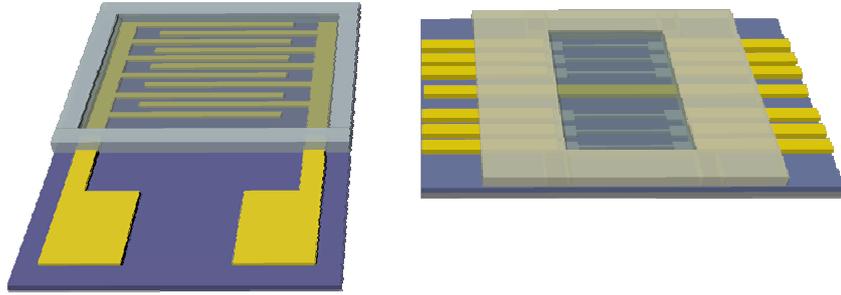


圖1-6-1 實驗架構。



# 第二章

## 元件製作及量測

### 2-1 元件製作

本次實驗所選用的是Silicon on insulator (SOI) (100) 之晶片。而我們的SOI晶片為50 nm的矽在150 nm二氧化矽絕緣層之上。奈米線部份則是使用電子束微影(E-beam Lithography)之技術所製作，奈米線之寬度為100 nm，長度10 $\mu$ m。

#### 2-1-1 矽奈米線場效電晶體元件製作

##### (1).成長氧化層

1. 利用乾式氧化成長30 nm之矽氧化層來保護矽層不在離子佈植時表面被破壞。

950°C 30 分鐘



##### (2).離子佈植

1. 硼(Boron) 離子佈植，劑量為 $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ ，能量15 keV，離子佈植後矽層之參雜濃度為 $10^{18} \text{ cm}^{-2}$ 。

##### (3).定義源極(source)和洩極(drain)

1. 旋塗光阻(FH6400)。
2. 光罩對準曝光定義源極(source)和洩極(drain)
3. 光阻顯影。
4. 硬烤120°C 10分鐘。

##### (4).離子佈植

1. 硼(Boron) 離子佈植，劑量為 $3 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ ，能量15 keV，離子佈植後矽層之參

雜濃度為  $10^{20} \text{ cm}^{-2}$ 。

2. 退火  $950^\circ\text{C}$  30 分鐘以活化佈植之離子。

(5). 定義 contact via

1. 旋塗光阻(FH6400)。
2. 光罩對準曝光定義 contact via
3. 光阻顯影。
4. BOE 40秒，蝕刻去除30 nm矽氧化層。

(6). 定義接觸金屬

1. 做initial clean。
2. 熱阻絲蒸鍍系統沉積Al(200 nm)。
3. 旋塗光阻(FH6400)。
4. 光罩對準曝光定義active area。
5. 光阻顯影。
6. Al etch。(蝕刻Al 溶液  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ，加熱至 $40\sim 60^\circ\text{C}$ )
7. 浸泡acetone 及超音波震盪以去除光阻。
8. 金屬熱退火 $400^\circ\text{C}$  30分鐘。

(7). 開放式微流道

1. 旋塗光阻(SU-8 2005)
2. 軟烤  $65^\circ\text{C}$  1分鐘、  
 $95^\circ\text{C}$  2分鐘、  
 $65^\circ\text{C}$  1分鐘。
3. 光罩對準曝光定義active area。
4. 曝後烤 $65^\circ\text{C}$  1分鐘、  
 $95^\circ\text{C}$  1分鐘、  
 $65^\circ\text{C}$  1分鐘。



5. 光阻顯影。
6. 硬烤150°C 10分鐘。
7. 電性量測。

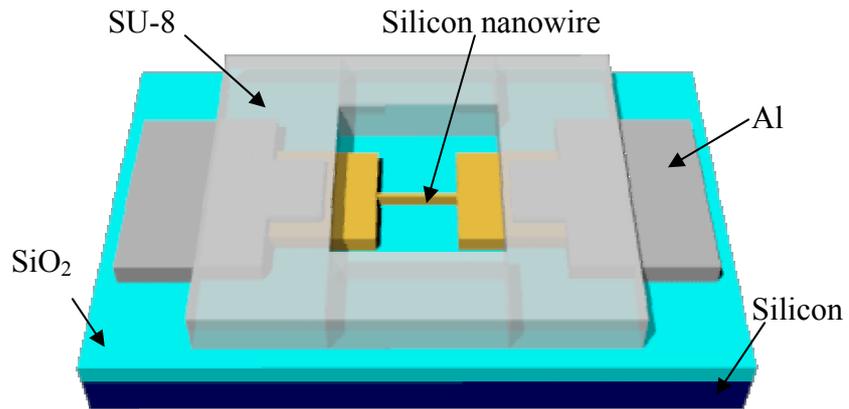


圖 2-1-1 矽奈米線場效電晶體結構示意圖。



## 2-1-2 加入參考電極及微流道之生物感測元件

由於我們所要量測的目標為生物分子，所以必須在水溶液下進行量測，因此加入金屬參考電極(Au)，目的為維持平衡溶液中之電壓，並可在溶液中加入電壓比較兩種元件對於帶電溶液之感測靈敏度，即可推測元件對於水溶液中生物分子之感測靈敏度較高。

元件完成後，將在中間元件部份蓋上 SU-8 2005 微流道，目的在使溶液只流經奈米線的部份，而不會影響左右電極的電性量測。

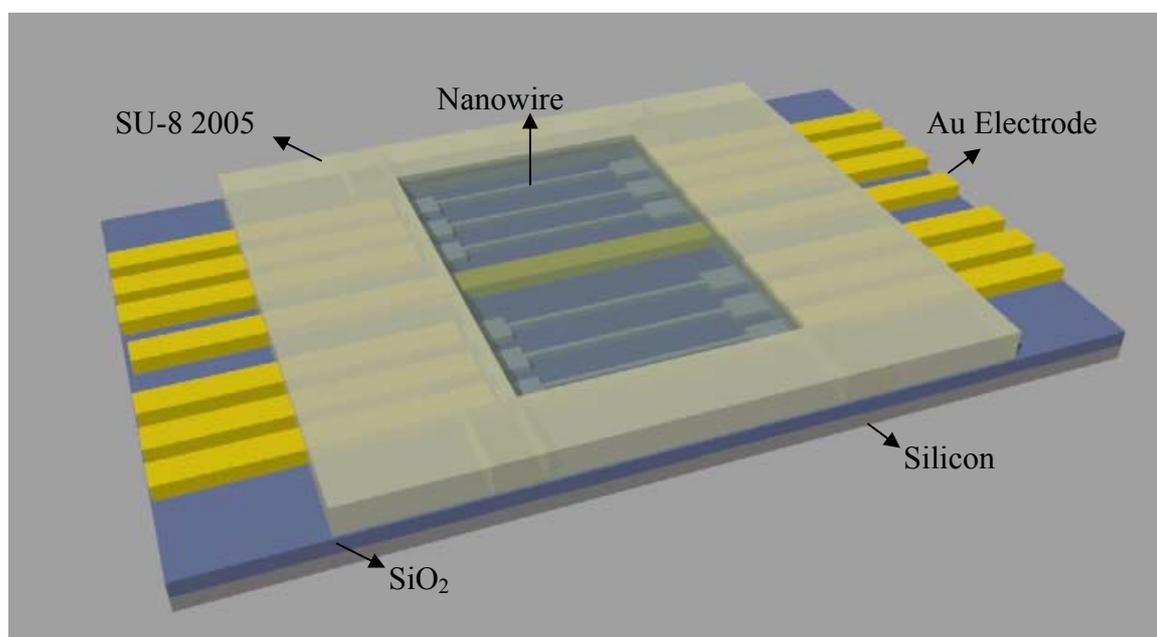


圖 2-1-2 加入參考電極與微流道之生物感測元件示意圖。

## 2-2 表面修飾

### 2-2-1 表面修飾 Aldehyde silane

做生物感測元件之前，要先建立有效的表面修飾系統，由 aldehyde silane (3-(trimethoxysilyl)propyl aldehyde, United Chemical Technologies, Bristol, PA) 與 streptavidin 作用形成 -C-N- 鍵結，在加入 biotin-bead 與 streptavidin 形成專性的 binding，如圖 2-2-1。

(1) Silicon wafer 先做 initial clean。

(2) UV Ozone treatment 10 分鐘。

(3) 沉積 Aldehyde silane

acetic acid: water: aldehyde silane: ethanol = 0.1: 4: 2: 93.9。

浸泡 1 小時。

(4) 酒精沖洗，120°C 10 分鐘。

(5) 沉積 Streptavidin

25  $\mu$ M streptavidin: 50 mM  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  = 1:1

浸泡 3 小時。

(6) 加入 Biotin-bead(50 nm) 浸泡 3 小時。

(7) SEM 拍攝。

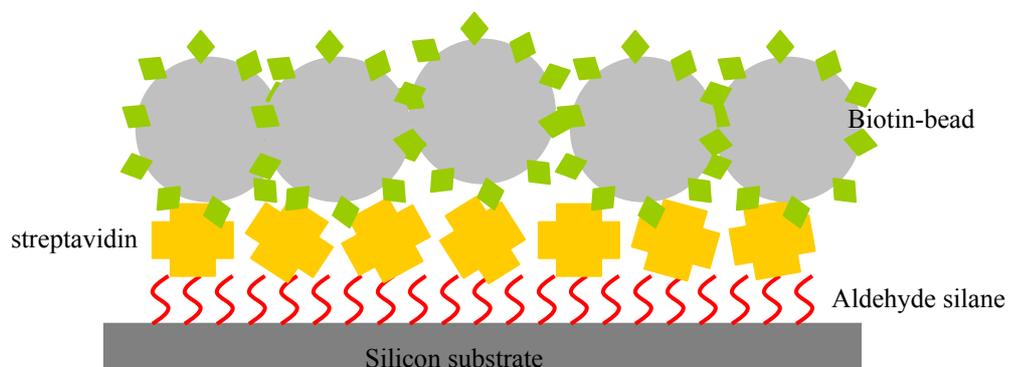


圖 2-2-1 表面修飾 Aldehyde silane-streptavidin-biotin bead 示意圖。

## 2-2-2 表面修飾 Abl tyrosine kinase

Abl tyrosine kinase 為磷酸化酵素，也是一種蛋白質，會將 ATP 的磷酸切下，在 ATP 量測系統為專一性的 ATP receptor，其表面修飾的系統和前一小節的 streptavidin 相同，也是藉由蛋白質的-NH<sub>3</sub> 和 aldehyde silane 作反應，形成-C-N-鍵結，不同的是，Abl tyrosine kinase 是酵素，為了維持其活性，所以沉積 Abl tyrosine kinase 的反應需要在 4°C。[6]

- (1) Silicon wafer 先做 initial clean。
- (2) UV Ozone treatment 10 分鐘。
- (3) 沉積 Aldehyde silane

acetic acid: water: aldehyde silane: ethanol = 0.1: 4: 2: 93.9。

浸泡 1 小時。

- (4) 酒精沖洗，120°C 10 分鐘。
- (5) 沉積 Abl tyrosine kinase

Abl 5 µg/ml with 5 mM NaBH<sub>3</sub>CN

4°C, 2 小時。

- (6) 用 buffer 沖洗表面。
- (7) AFM image 使用 tapping mode。

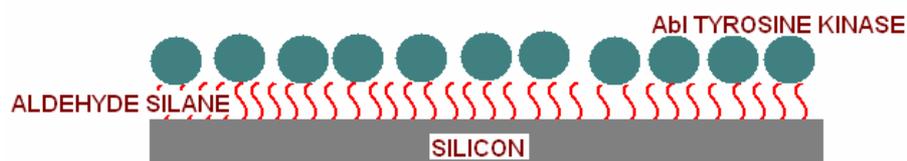


圖 2-2-2 表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖。

## 2-3 電刺激 HeLa cell

### 2-3-1 電刺激 HeLa cell 的結構

利用電極給予 HeLa cell 電刺激，使其釋放 ATP，藉由電極間距大小、電壓大小和交流或直流電壓不同，找出能刺激 HeLa cell 的最好條件。

電極製程：

1. Silicon wafer 先做 initial clean。
2. 熱阻絲蒸鍍系統沉積 Cr(10 nm)/Au(200 nm)。
3. 旋塗光阻(FH6400)。
4. 光罩對準曝光定義 contact via
5. 光阻顯影。
6. 浸泡KI溶液1分鐘，蝕刻Au。
7. Cr etch。
8. 量測電極間不導通。

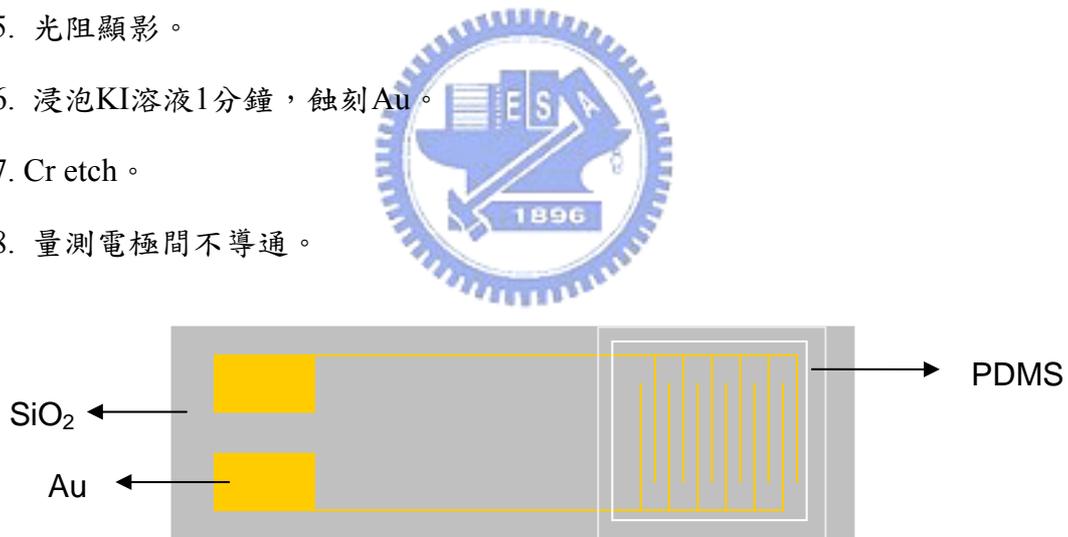


圖 2-3-1 電極結構示意圖。

## 2-3-2 電刺激 HeLa cell 釋放 ATP

HeLa cell 培養：

1. 將製作好的電極貼上 PDMS frame。
2. 把此結構滅菌。
3. 打散的 HeLa cell 加入至 PDMS frame

DMEM + 10% FBS, 37°C, 48 hr。

電刺激：

1. 將培養兩天的 HeLa cell 用 PBS buffer 沖洗。
2. 加入 50  $\mu$ l PBS 在 PDMS frame，停留 5 分鐘。
3. 將 50  $\mu$ l PBS sample、50  $\mu$ l dilution buffer 和 50  $\mu$ l Luciferase reagent 混合，測冷光強度 10 秒，作為控制組。

Luciferase reagent (Roche's Bioluminescence assay kit)

ELISA reader 測冷光強度 10 秒

4. 在兩電極給予 AC 或是 DC 電壓，10 分鐘。
5. 再將 50  $\mu$ l PBS sample、50  $\mu$ l dilution buffer 和 50  $\mu$ l Luciferase reagent 混合，測冷光強度 10 秒，作為實驗組。
6. 比較兩組 ATP 濃度差異。



圖 2-3-2 電刺激方式示意圖。

## 2-4 量測

### 2-4-1 電性量測

本次實驗我們使用 ICS 程式和 Agilent 4156 及 probe station 來做電性上的量測。  
 $V_g$  為 liquid gate 外加的金屬探針，另外兩點探針則分別為  $V_D$  及接地。

在元件製作完成時，先量測其電流對電壓(I-V curve)關係，確認元件和金屬電極的介面為 Ohmic contact，並觀測不同長度的矽奈米線場效電晶體的 I-V curve 差異[11, 15]。

利用外加的金屬探針 liquid gate 為  $V_g$ ，量測元件在 liquid environment 之下外加不同電壓時電性上的改變[16]，得到可再現且可預料的電性變化。

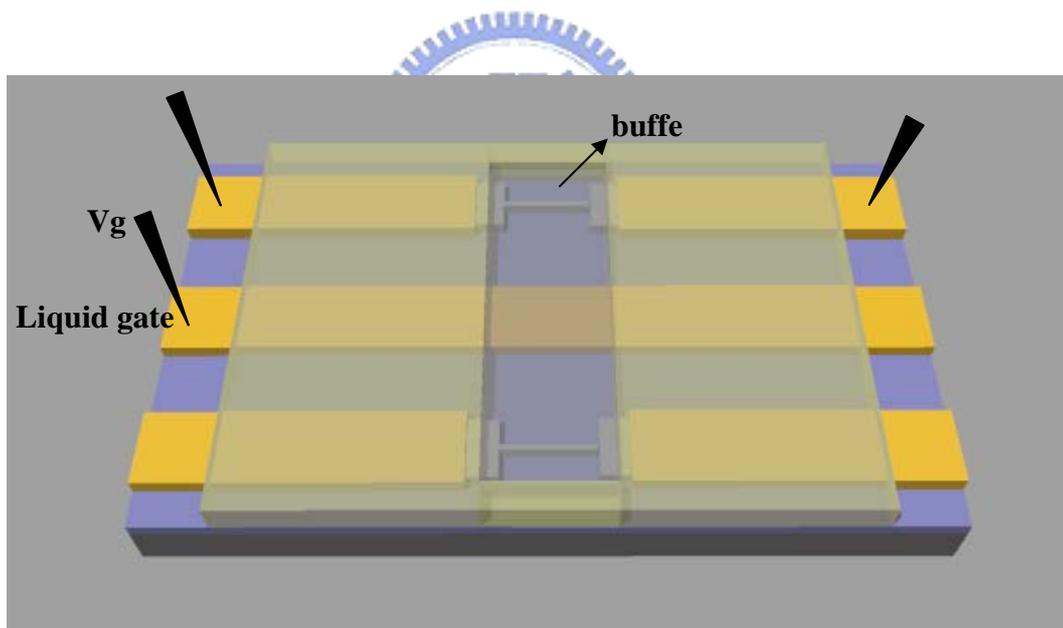


圖 2-4-1 元件量測示意圖。

## 2-4-2 低離子濃度下的 ATP 量測

ATP sensing 是用 real-time 量測方式，先將矽奈米線場效電晶體修飾上 Abl tyrosine kinase，開始量測之前先在元件上滴上 buffer (1.5  $\mu\text{M}$  HEPES buffer at pH 7.5 containing 1  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  and 1  $\mu\text{M}$  EGTA)作為電流基準線(baseline)，以建立元件的 conductivity background，在 ATP binding 量測的實驗中，每一種 ATP 濃度都使用與上述相同的 buffer[6]。

ATP binding 實驗是用 ICS 程式和 Agilent 4156 及 probe station 來做 conductance 的 real-time 電性量測，我們可以藉由加入含有 ATP 的 buffer 來觀察 conductance 的變化，矽奈米線場效電晶體的 time-dependent conductance 量測條件是在 100 mV 的 DC source-drain bias、0 V 的 liquid gate bias 下完成。

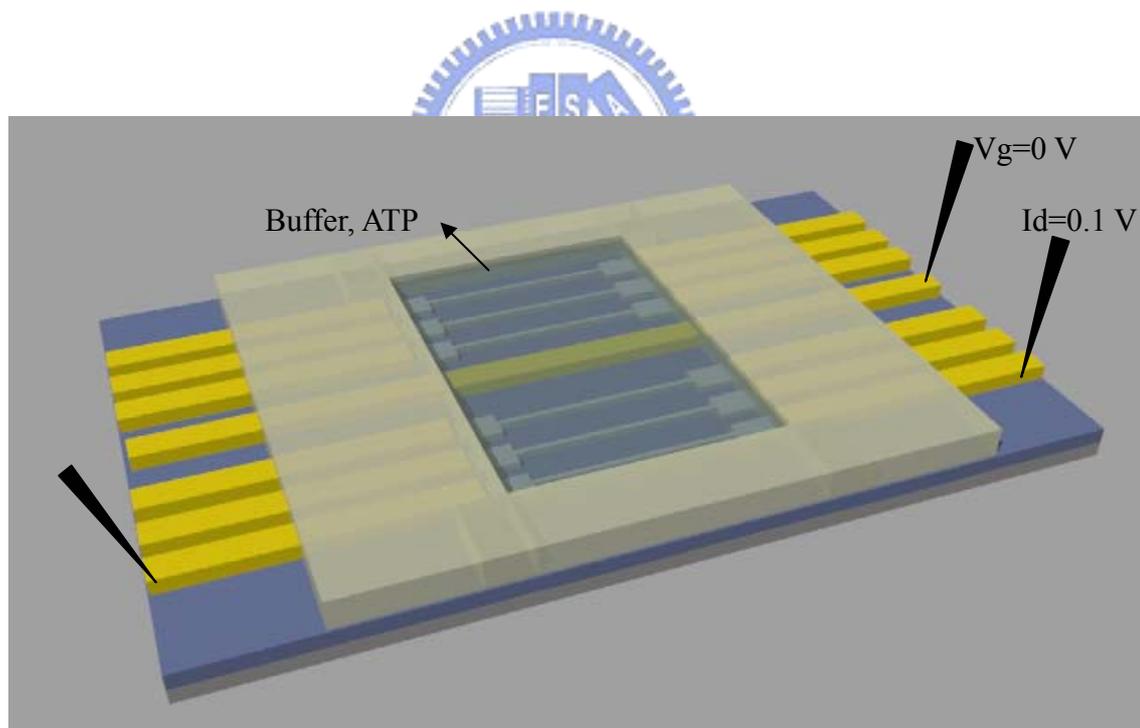
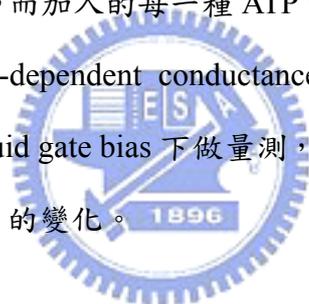


圖 2-4-2 ATP 量測示意圖。

### 2-4-3 高離子濃度下(生理環境)的 ATP 量測

用矽奈米線場效電晶體做為生物感測器有其限制，在高離子濃度的緩衝液下矽奈米線對環境的帶電分子感受能力會比較不靈敏，因為 Debye length 的關係[8]，公式(1.1)中表示當溶液中離子濃度愈高，Debye length 就愈小，則矽奈米線可感測的範圍就愈小，所以靈敏度下降。因此在高離子濃度的緩衝液下，為了提高矽奈米線場效電晶體的 sensitivity，我們使用更細的矽奈米線(50 nm 寬)。

在高離子濃度的緩衝液下做 ATP sensing 的量測，量測方式也是用 ICS 程式和 Agilent 4156 及 probe station 來做 conductance 的 real-time 電性量測，但緩衝溶液換成接近生理環境離子濃度的 PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM)，在量測前先在元件上滴上 PBS 作為電流基準線(baseline)，建立元件的 conductivity background，而加入的每一種 ATP 的濃度也都是用 PBS 作為 buffer；矽奈米線場效電晶體的 time-dependent conductance 量測條件是在 100 mV 的 DC source-drain bias、0 V 的 liquid gate bias 下做量測，加入不同濃度的 ATP 來觀察矽奈米線場效電晶體 conductance 的變化。



#### 2-4-4 高離子濃度下測試 Abl tyrosine kinase 的活性

因為要量測細胞所釋放的 ATP，所以先測試在高離子濃度的緩衝液下 Abl tyrosine kinase 的活性可以維持多久的時間，讓我們在量測細胞外的 ATP 的實驗中可以在活性時間內做完，才可以表示量測到的 conductance 變化是因為 Abl 抓到 ATP 的關係。

量測方式也是用 ICS 程式和 HP/Agilent 4156 及 probe station 來做 conductance 的 real-time 電性量測，同 2-4-3 小節的流程，在量測前先在元件上滴上 PBS 作為 baseline，建立元件的 conductivity background，30 分鐘量測一次，每次都加入同一種 ATP 濃度 (10 nM)，量測完用 PBS 清洗數次，觀察每次量測的結果，來判斷 Abl tyrosine kinase 的活性可以維持的時間。



## 2-4-5 HeLa cell 的 ATP 量測

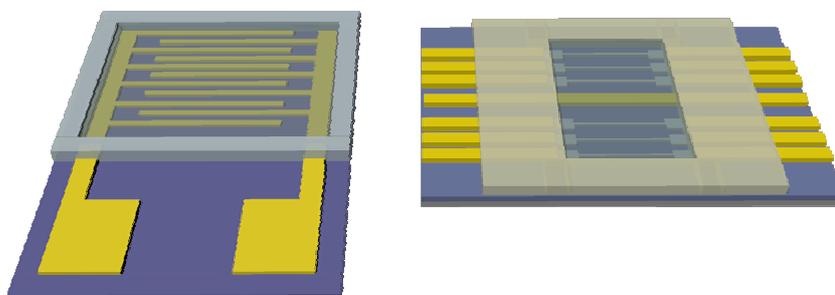


圖 2-4-3 量測細胞所釋放的 ATP 的量測架構示意圖。

實驗中，為了量測細胞所釋放的 ATP，我們先將實驗分成兩部份，如圖 2-4-3 所示；第一個部份，先製作電極結構，如 2-3-1 小節的製作流程，將 HeLa 細胞培養在電極中 24 小時；第二部份是製作矽奈米線場效電晶體，如 2-1-1 小節的製作流程，再修飾 aldehyde silane 及 Abl tyrosine kinase，量測方式也是用 ICS 程式和 HP/Agilent 4156 及 probe station 來做 conductance 的 real-time 電性量測，在量測前先在元件上滴上 PBS 作為 baseline，建立元件的 conductivity background，將培養後的 HeLa 細胞用 PBS 沖洗 5 次，再以圖 2-3-2 電刺激方式刺激 10 分鐘，然後將經電刺激過後的 HeLa 細胞的 PBS 緩衝液，加入矽奈米線場效電晶體的 SU-8 流道中，矽奈米線場效電晶體的 time-dependent conductance 量測條件是在 100 mV 的 DC source-drain bias、0 V 的 liquid gate bias 下做量測，觀察 conductance 的改變。

# 第三章

## 實驗結果與討論

### 3-1 電刺激 HeLa cell 釋放 ATP

#### 3-1-1 用 bioluminescence 測 ATP 濃度

在本實驗中使用 Roche's Bioluminescence assay kit 來測定 ATP 濃度，反應原理如圖 3-1-1，在 kit 所附的 luciferase reagent 中包含了 D-luciferin-H<sub>2</sub> 和 luciferase，當溶液含有 ATP 的時候，反應便開始向右邊進行，luciferase 會將 D-luciferin-H<sub>2</sub> 氧化，並消耗 ATP 的兩個磷酸根，且放出冷光，此反應放出的冷光強度和 ATP 的濃度有關，所以用偵測冷光的方式即可得知溶液中 ATP 的濃度。

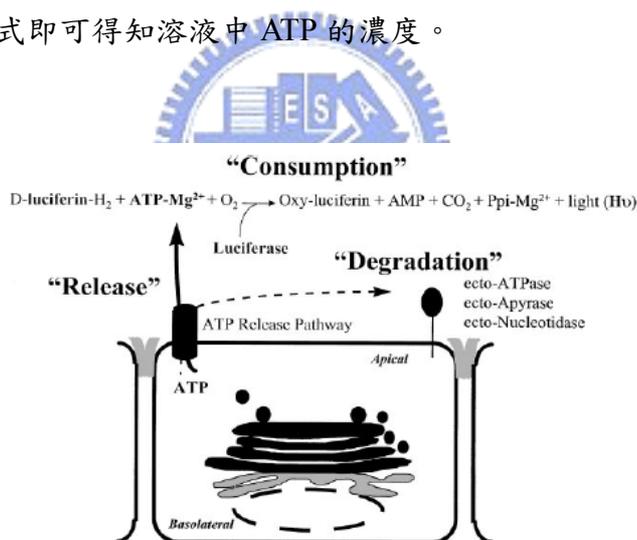


圖 3-1-1 bioluminescence 的冷光反應示意圖。

用 PBS 作為 buffer 來配製不同濃度的 ATP，加入 50  $\mu\text{l}$  ATP sample、50  $\mu\text{l}$  dilution buffer、50  $\mu\text{l}$  luciferase reagent 混合，測冷光強度 10 秒，作出 ATP 濃度的標準曲線圖 3-1-2。在這實驗中發現用 bioluminescence 的方式偵測 ATP 的極限大約在 1 nM，而且不能做到 real-time 的量測，因此我們的研究目的除了挑戰 ATP 偵測的濃度之外，

亦有即時監測的好處。

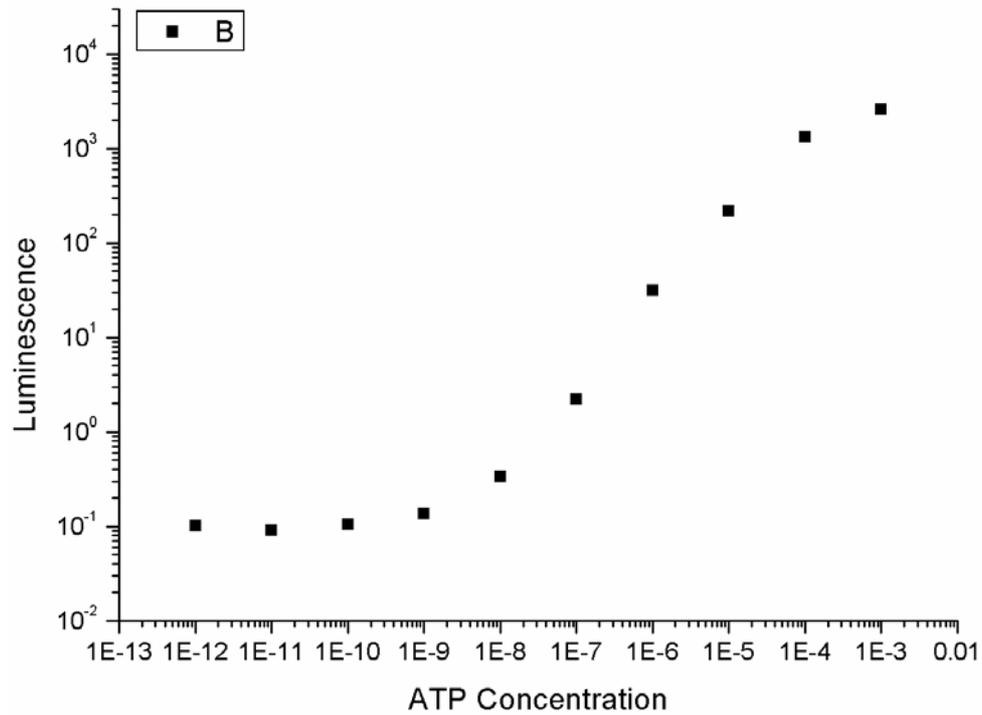


圖 3-1-2 ATP 濃度 bioluminescence 標準曲線。



### 3-1-2 用 bioluminescence 測 HeLa cell 細胞外 ATP 濃度

我們製作了兩種不同寬度的電極，100  $\mu\text{m}$  與 10  $\mu\text{m}$  間距，將 HeLa cell 養在電極上，給予電極間不同 DC voltage 刺激細胞 10 分鐘，觀察電刺激前後 HeLa cell 細胞外的 ATP 濃度改變量，以找出最好的條件來刺激細胞釋放 ATP。

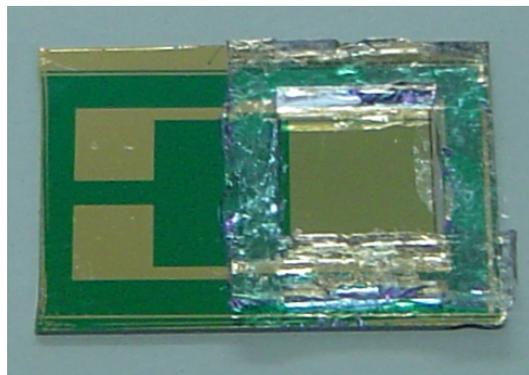


圖 3-1-3 刺激細胞的電極結構圖。

圖 3-1-3 為製作完成的電極結構，在電極上有黏上 PDMS 的 well，兩端的電極可以對細胞進行電刺激，中間的 PDMS well 可以用來培養細胞，本實驗將細胞養在此電極結構中 48 小時，在進行電刺激。

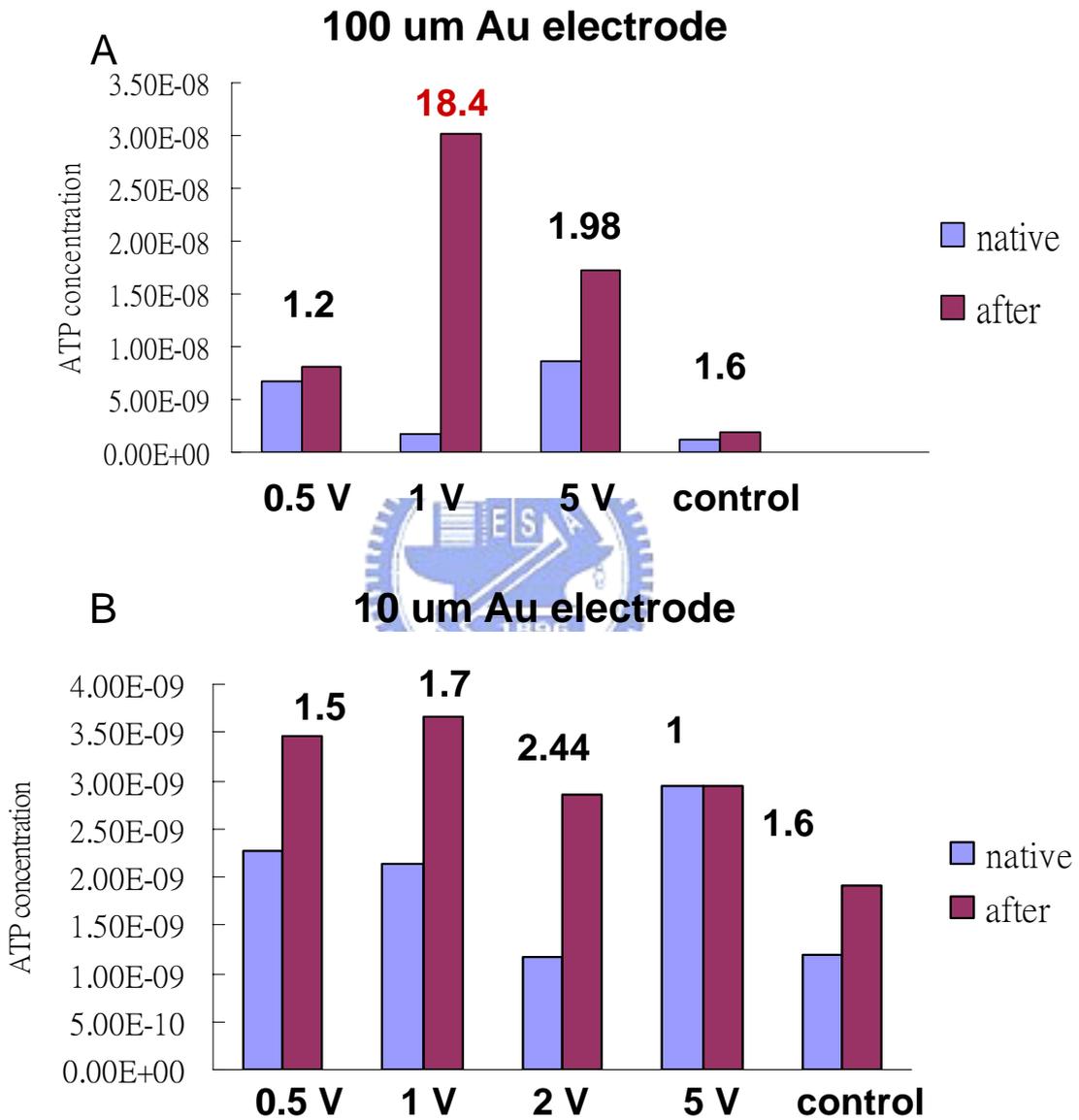
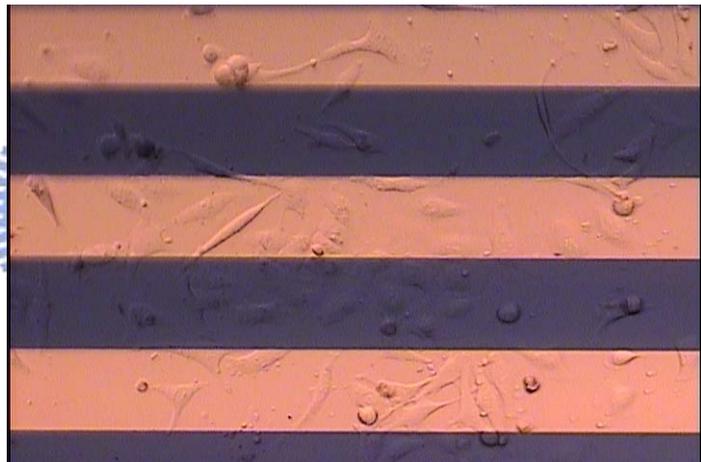


圖 3-1-4 HeLa cell 電刺激前後細胞外 ATP 濃度變化。

圖 3-1-4A 表示間距 100 μm 的電極，在兩端加不同電壓刺激 HeLa cell 後，細胞外 ATP 濃度的改變，在兩端加 0.5 V 刺激細胞 10 分鐘，細胞外 ATP 濃度提高 1.2

倍，加 1 V 細胞外 ATP 濃度提高 18.4 倍、加 5 V 細胞外 ATP 濃度提高 1.98 倍；圖 3-1-4B 表示電極兩端間距 10  $\mu\text{m}$  的條件下刺激 HeLa cell，細胞外 ATP 濃度的變化，當電極兩端加 0.5 V 刺激細胞 10 分鐘，細胞外 ATP 濃度提高 1.5 倍，加 1 V、2 V 刺激細胞 10 分鐘後，細胞外 ATP 濃度分別提高 1.7 倍和 2.44 倍，電極兩端加 5 V 刺激細胞，細胞外 ATP 濃度幾乎沒變；由上述的實驗結果我們可以得到電刺激 HeLa cell 釋放 ATP 最好的條件，就是用間距 100  $\mu\text{m}$  的電極在兩端給予 1 V 直流電壓，刺激 HeLa cell 10 分鐘，以上實驗給予的電壓頻率是 50 Hz，偵測冷光 10 秒都是用 ELISA reader。

Before electrical stimulation



After electrical stimulation

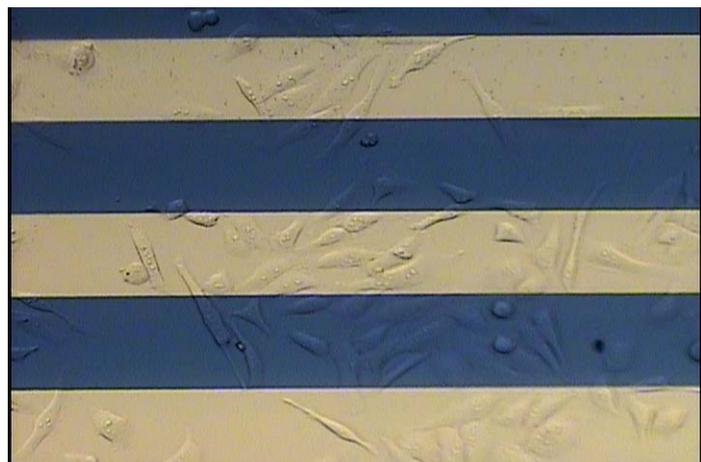


圖 3-1-5 HeLa cell 電刺激前後表面形貌。

圖 3-1-5 是 HeLa cell 電刺激前後的表面型態，電刺激後 HeLa cell 的差異並不大，表示我們給予的電刺激並不會對細胞造成明顯的傷害，而後細胞也可以繼續生長分裂，因此本實驗中所測定的 ATP 是細胞經由電刺激後所釋放出來的，並不是細胞電刺激後破裂所造成的。



## 3-2 表面修飾

### 3-2-1 Aldehyde Silane 的表面修飾

我們表面修飾的系統是利用 SAM (Self-assembled monolayer)的技術讓 Silicon 與 Aldehyde silane 反應，使 Aldehyde group 裸露在表面，加入 protein 使 aldehyde group 與 protein 的氨基(-NH<sub>2</sub>)發生 Schiff base 反應(圖 3-2-1)，進而將 protein 接在表面上。

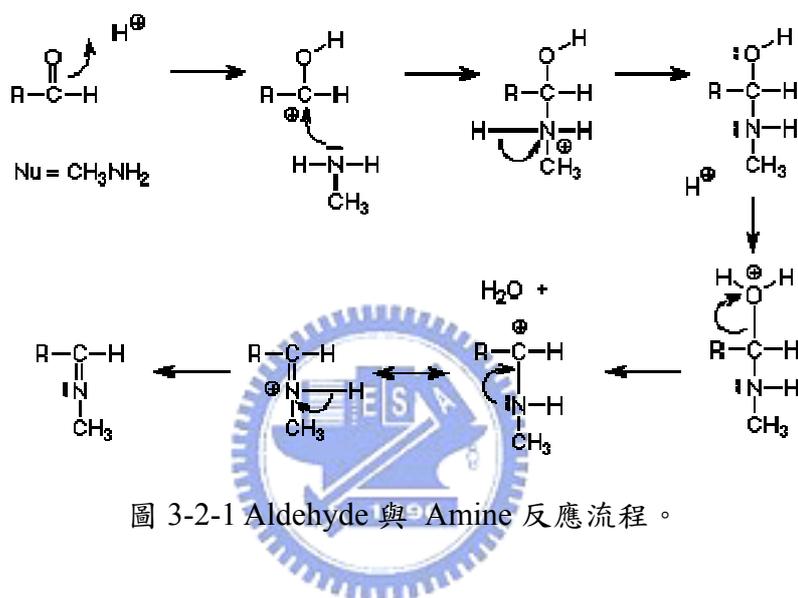
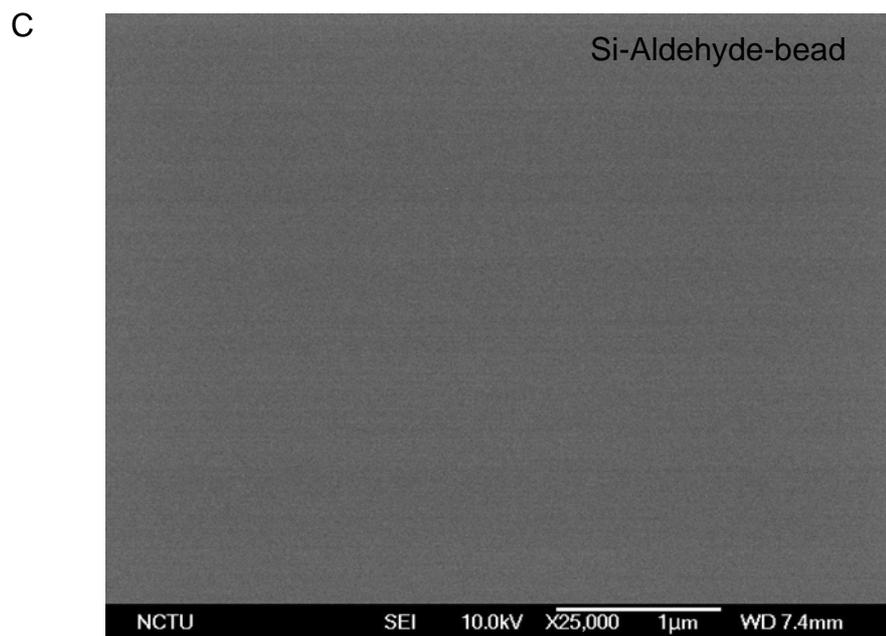
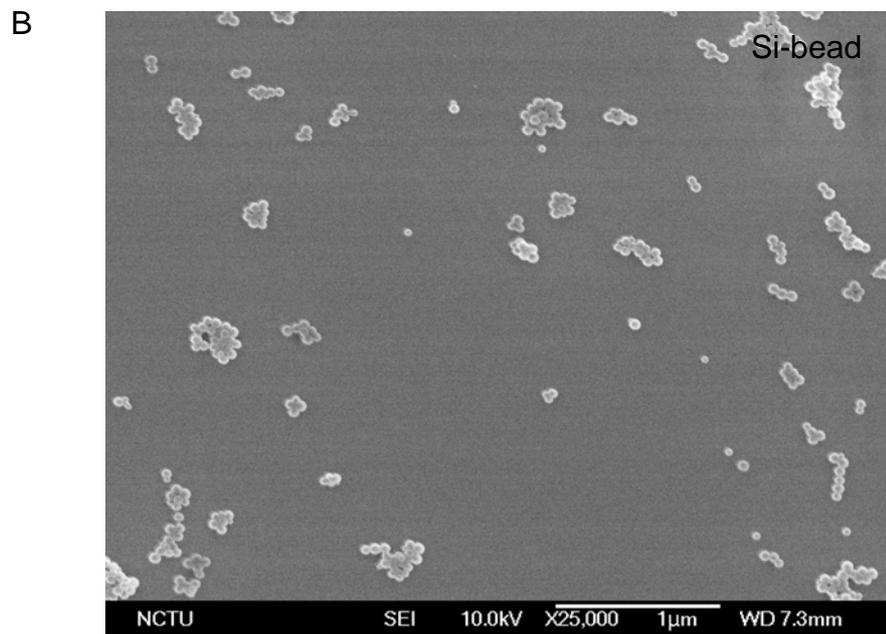
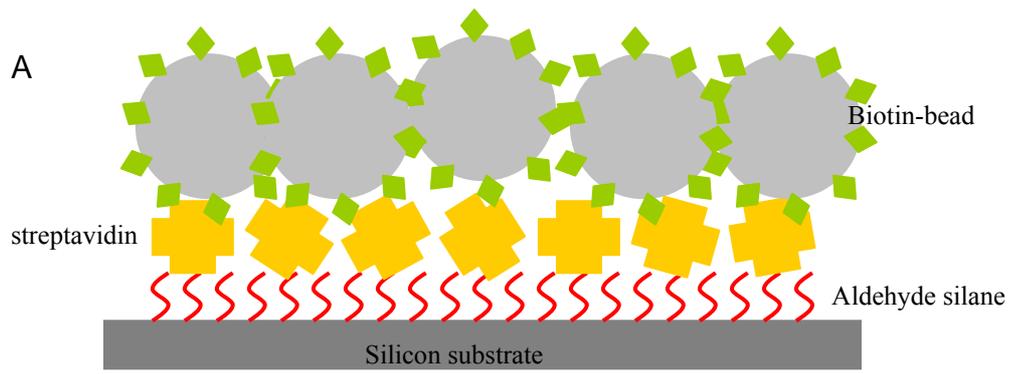


圖 3-2-1 Aldehyde 與 Amine 反應流程。

我們知道了上述的反應式，就可以將想接的 protein 接在 SiNW 上，但首先要先確定 Aldehyde silane 的 Self-assembled monolayer 的技術使否可行，所以先利用 streptavidin 與 biotin-bead 的修飾來證明 aldehyde silane 可行性。首先先將 silicon wafer 做 ozone 處理，沉積上一層 aldehyde silane，再加入 streptavidin 與 aldehyde group 發生 Schiff base 反應，溶液中有添加 NaBH<sub>3</sub>CN 作為還原劑，將 Schiff base 還原成-C-N-，完成 streptavidin 與 aldehyde silane 的鍵結；而後加入表面修飾 biotin 的 bead，藉由 streptavidin 與 biotin 的強鍵結將 bead 沉積在表面上，因此我們可以經由表面是否有 bead 來判斷 aldehyde silane 有沒有成功修飾在表面上。



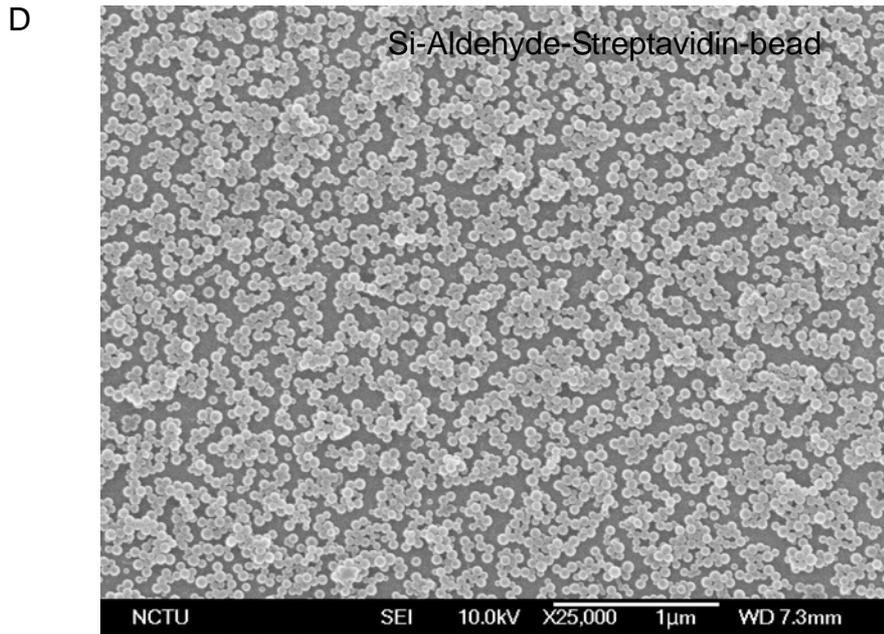


圖 3-2-2 aldehyde silane、streptavidin 與 biotin-bead 的修飾圖示

及各表面 SEM 影像。

圖 3-2-2A 為 aldehyde silane 表面修飾的圖示，在 silicon 表面接上 aldehyde silane，加入 streptavidin 與 aldehyde group 反應鍵結，再加入 biotin-bead 來修飾表面之後拍 SEM。圖 3-2-2B 的 SEM 影像是 silicon 表面先做 ozone treatment 在沉積 biotin-bead 後所拍攝的結果，因為 biotin-bead 在 silicon 表面會有物理性的非專一性吸附，所以即使沒有 streptavidin 在表面做 receptor，亦會有一些非專一性吸附的 biotin-bead 在 silicon 表面上；圖 3-2-2C 是先在 silicon 表面修飾上 aldehyde silane 後，直接沉積 biotin-bead，再拍 SEM 的影像，由圖可以得知當 silicon 表面修飾上 aldehyde silane，沒接 streptavidin 時，biotin-bead 不會在表面上沉積，也沒有非專一性的吸附。圖 3-2-2C 就是圖 3-2-2A 圖示的表面修飾流程，從這 SEM 的影像可發現 biotin-bead 幾乎佈滿表面，也可代表 aldehyde silane 與 streptavidin 是有發生 Schiff base 反應，所以 biotin-bead 才可以有專一性的與 streptavidin 做結合，因此表面才會佈滿 biotin-bead。由上述實驗中可以證明 aldehyde silane 修飾的方式是有效率的，所以採用此方式做蛋白質表面修飾。

### 3-2-2 Abl tyrosine kinase 的表面修飾

由上一小節的實驗結果，我們確定 aldehyde silane 的修飾當作於 silicon 和 protein 之前的 linker，所以我們要將 ATP sensing 實驗中所使用的 Abl tyrosine kinase 與 aldehyde silane 鍵結，表面修飾的圖示如圖 3-2-3，先在 silicon 表面修飾上 aldehyde silane，再將 Abl tyrosine kinase 加入使其與 aldehyde silane 發生 Schiff base 反應，再做 AFM(atomic force microscope)掃描其表面 topography 比較其差異。

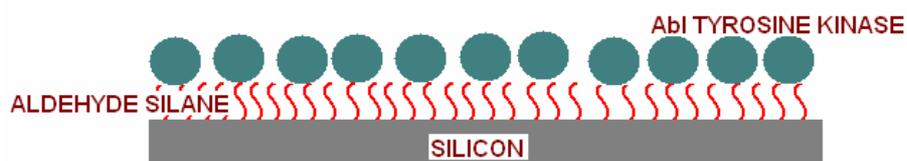


圖 3-2-3 Abl tyrosine kinase 表面修飾圖示。

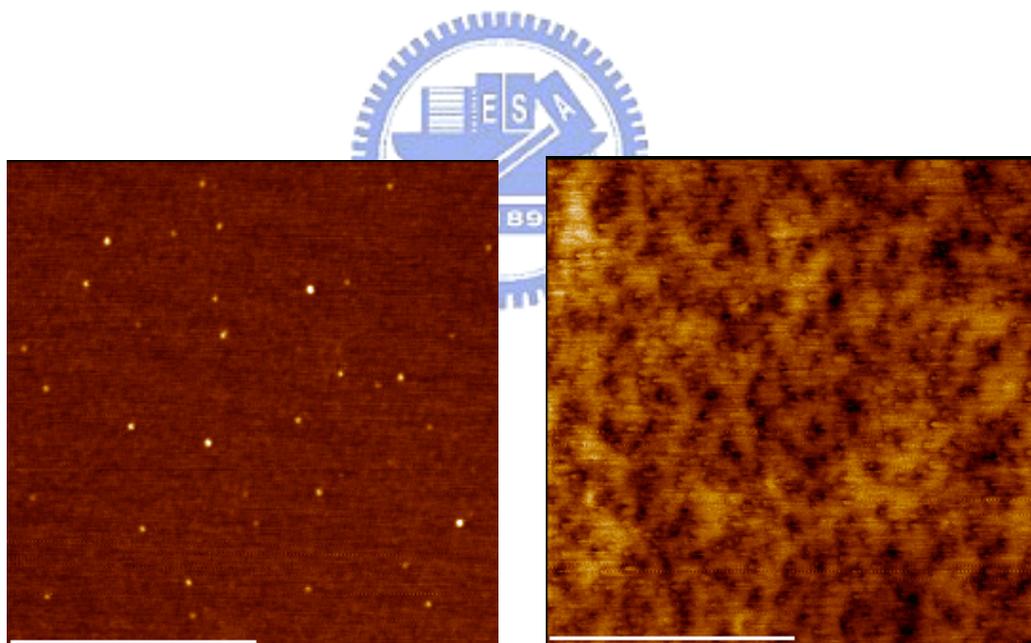


圖 3-2-4 aldehyde silane 和 Abl tyrosine kinase 的 AFM 影像。

由圖 3-2-4 可以區分 aldehyde silane 和 Abl tyrosine kinase 的 topography 不同，圖 3-2-4A 是表示 silicon 表面上修飾 aldehyde silane 之後的 AFM 影像，由圖可以看出表面還算是平整，影像中部分出現的亮點可能是因為表面上有 aldehyde silane 的

aggregation。圖 3-2-4B 表面修飾即是對應圖 3-2-3 的圖示，先在 silicon 表面修飾上 aldehyde silane，再將 Abl tyrosine kinase 加入使其與 aldehyde silane 發生 Schiff base 反應，形成 -C-N- 鍵結，由圖 3-2-4B 的 topography 可知 Abl tyrosine kinase 有和 aldehyde silane 接上，因為兩者的 topography 不同。



### 3-3 矽奈米線場效電晶體元件電性分析

#### 3-3-1 矽奈米線場效電晶體

經過 2-1-1 的元件製作流程，完成矽奈米線場效電晶體，圖 3-3-1 為利用光學顯微鏡所拍攝的元件俯視圖。圖 3-3-1A 是長度 10  $\mu\text{m}$  的矽奈米線場效電晶體，圖 3-3-1B 是長度 20  $\mu\text{m}$  的矽奈米線場效電晶體；完成的矽奈米線場效電晶體包含 source 和 drain、silicon nanowire、電極；source 和 drain 為參雜濃度  $10^{20}\text{cm}^{-3}$  之矽，silicon nanowire 為參雜濃度  $10^{18}\text{cm}^{-3}$  之矽，電極的部份用 Al。

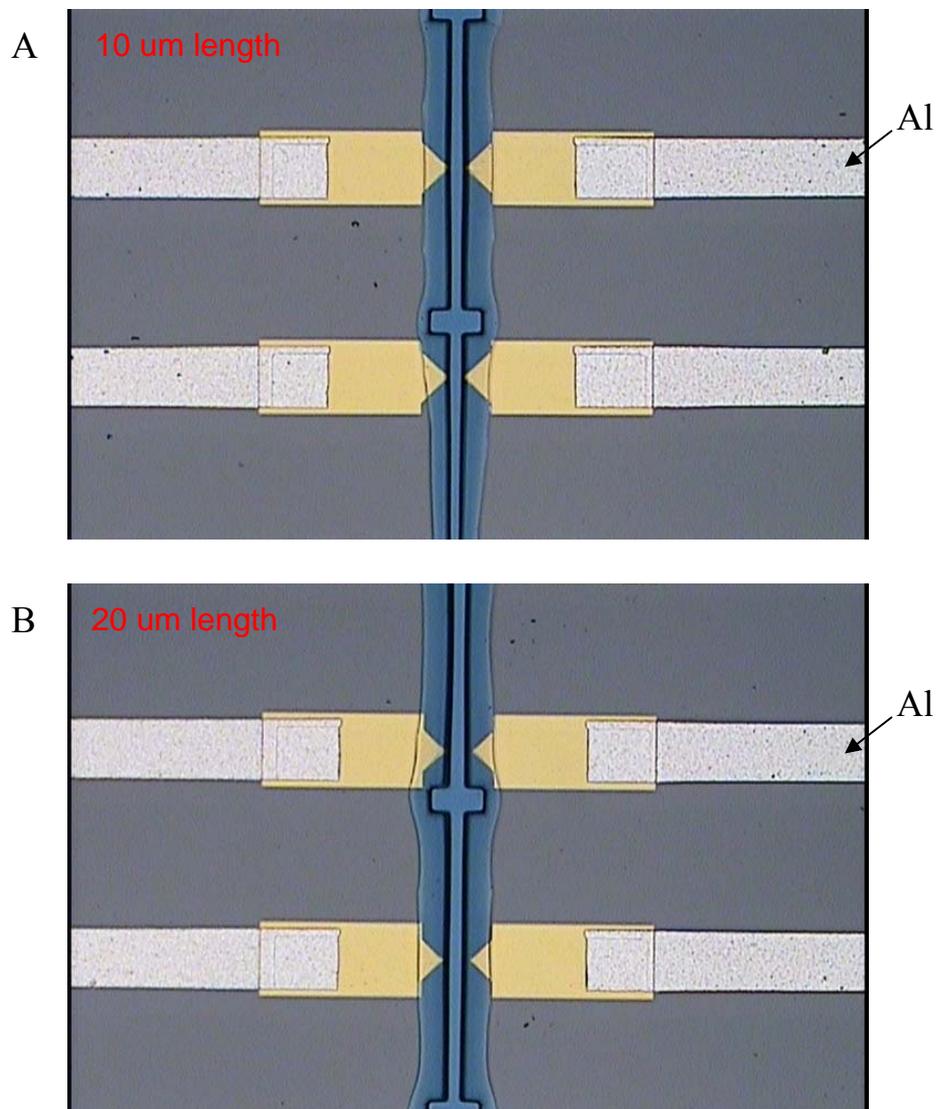


圖 3-3-1 矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖。

圖 3-3-1 中所表示的部份除了 silicon nanowire 之外，其他部分都會被 SU-8 覆蓋住，讓量測時的水溶液只會接觸到 silicon nanowire，由圖 3-3-2 的 silicon nanowire 之電子顯微鏡(SEM)俯視圖可以證明只有 silicon nanowire 是開放於環境中的。

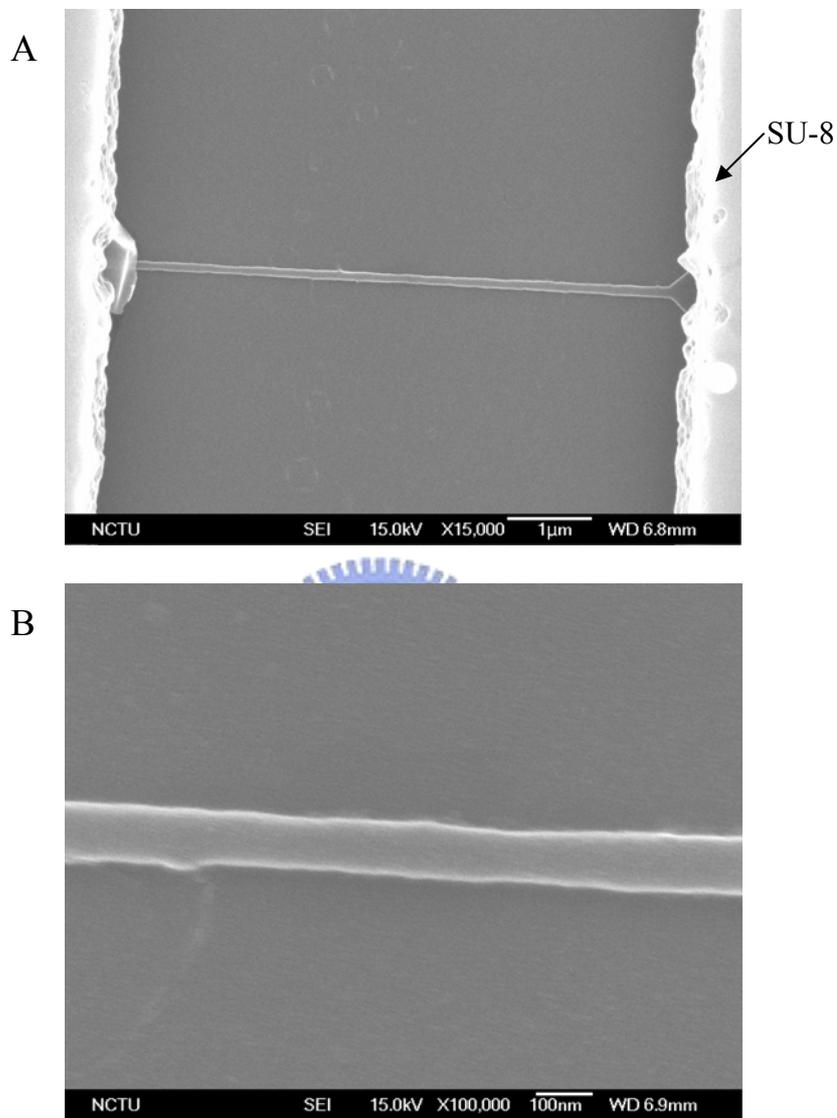


圖 3-3-2 矽奈米線場效電晶體電子顯微鏡俯視圖。

圖 3-3-2A 表示 SU-8 把除了 silicon nanowire 的部分之外都覆蓋住了，SU-8 是一種很好的 MENS 材料，在 polymerised epoxies 材料中，SU-8 是很不容易被去除的，這也代表 SU-8 很適合用於永久性的結構，而且 SU-8 對生物適性很好，不會對生物體或生物分子造成傷害，加上製程的技術很簡單，只需要一到黃光製程，因此選用

SU-8 做為保護元件的材料。圖 3-3-2B 是 silicon nanowire 的放大圖，由圖可知我們所使用的 silicon nanowire 大約是 80~100 nm 寬。

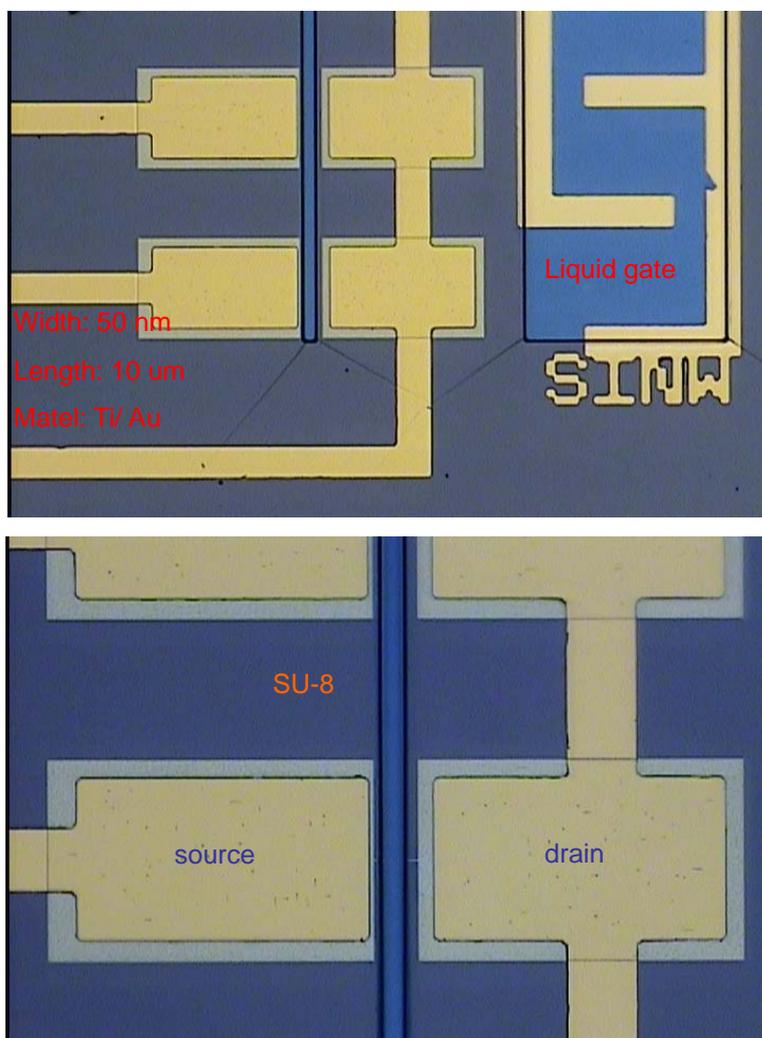
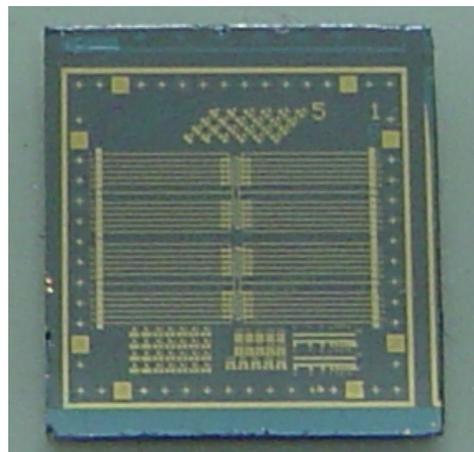


圖 3-3-3 50 nm 寬矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖。

由於我們要感測需更高靈敏度，所以又製作了 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體，

圖 3-3-3 是矽奈米線場效電晶體用光學顯微鏡拍攝的結果，金屬部分改為 Ti/Au 做為電極，這次的矽奈米線場效電晶體也加了 Au 的參考電極，一樣用 SU-8 將電極保護住，使矽奈米線裸露在液體中做為感測元件。

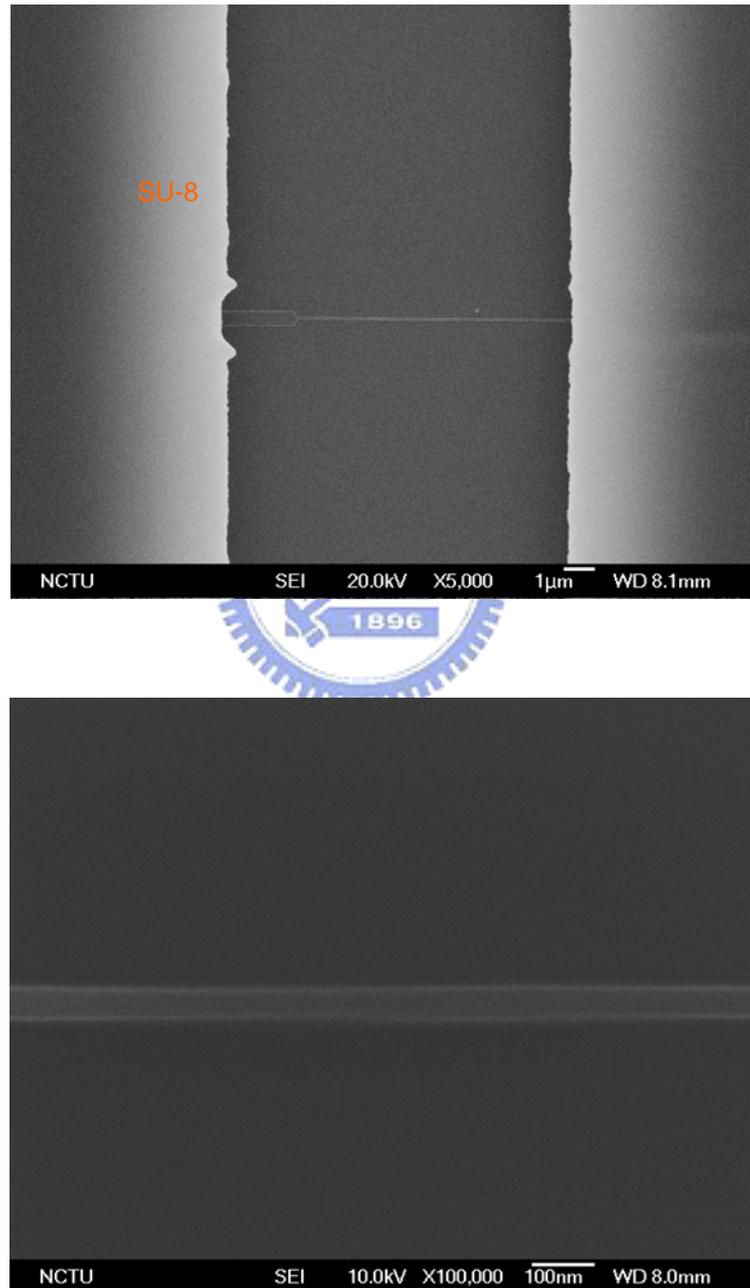


圖 3-3-4 50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電子顯微鏡俯視圖。

圖 3-3-4 表示矽奈米線的電子顯微鏡影像，邊緣較亮的區域為 SU-8，中間有矽奈米線裸露，圖 3-3-4B 可以觀察到矽奈米線的寬度大約為 50 nm。

### 3-3-2 矽奈米線場效電晶體電性量測

在元件製作完成時，先量測其電流對電壓(I-V curve)關係，確認元件和金屬電極的介面為 Omic contact，並觀測不同長度的矽奈米線場效電晶體的 I-V curve 差異。

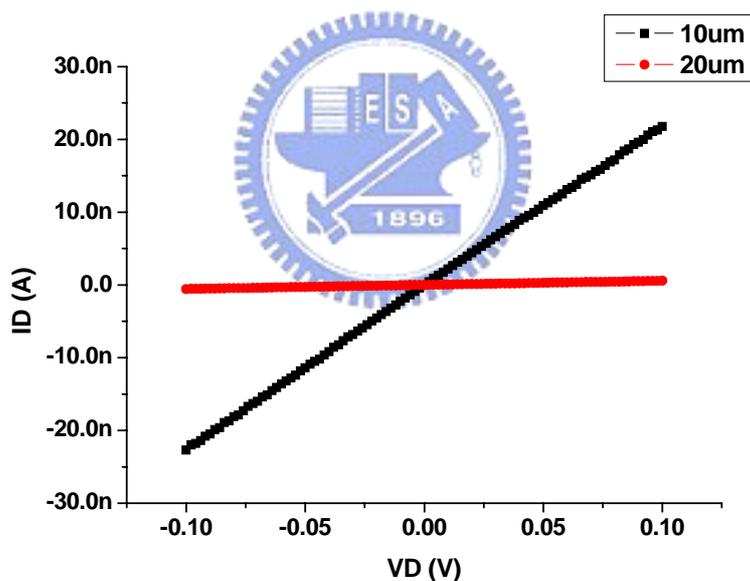


圖 3-3-5 不同長度矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖。

圖 3-3-5 是矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖(I-V curve)，圖中電流對電壓為線性關係，表示元件在金屬與半導體間為 Omic contact，不同長度的矽奈米線場效電晶體的電流大小不同，長度 10  $\mu\text{m}$  的矽奈米線電流較大，20  $\mu\text{m}$  的電流較小，因為 20  $\mu\text{m}$  的阻值較大，也就是說長度愈長阻值愈大。

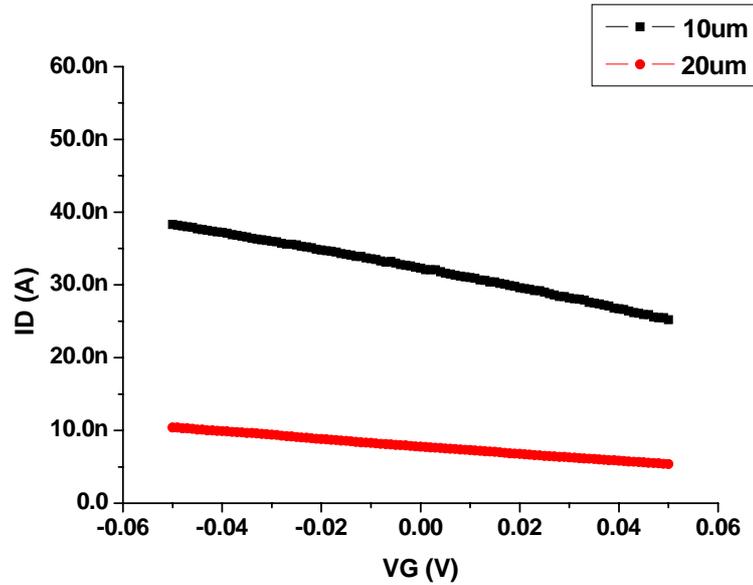


圖 3-3-6 不同長度矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖。

圖 3-3-6 為不同長度的矽奈米線場效電晶體的電流對閘極電壓圖，在  $V_{ds}$  加 0.1 V 時加不同的閘極電壓(Liquid gate)，將閘極電壓從 50 mV sweep 到 -50 mV，觀察電流的變化；由於元件為 p-type 的矽奈米線，所以閘極施加負電壓時會造成矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation，使電流變大；反之，當所以閘極施加正電壓時載子濃度(電洞)會被 depletion，使電流變小。不同長度矽奈米線場效電晶體的電流對閘極電壓的改變量也不同；長度 10  $\mu\text{m}$  的矽奈米線，在  $V_{ds}$  加 0.1 V 時將閘極電壓從 50 mV sweep 到 -50 mV，conductance 變化量為 131 nS；長度 20  $\mu\text{m}$  的矽奈米線，conductance 變化量為 50.4 nS。

矽奈米線場效電晶體在表面經過不同的處理之後，對閘極電壓的改變會有不同的靈敏度，圖 3-3-7 表示當矽奈米線表面還有氧化矽未被蝕刻時、表面氧化矽經過 BOE 蝕刻液蝕刻後、以及經過 ozone treatment 之後，分別在  $V_{ds}$  加 0.1 V 時將閘極電壓從 50 mV sweep 到 -50 mV，觀察電流的變化；圖中所示，當矽奈米線表面還有一層氧化矽時，conductance 的變化量為 55.456 nS， $\Delta G/G_0 = 15.52\%$ ；矽奈米線經過 BOE 處理將表面氧化矽去除之後，其 conductance 的變化量為 78.276 nS， $\Delta G/G_0 = 24.42\%$ ；最

後，將矽奈米線用 Ozone 處理使表面親水之後，其 conductance 的變化量為 82.593 nS， $\Delta G/G_0 = 51.92\%$ ；由上述數據得知，當矽奈米線表面經過 BOE、Ozone 處理之後，雖然電流變小，但是可以使矽奈米線場效電晶體對 Liquid Gate 的靈敏度增加，因此也可以增加對生物分子的感測靈敏度。

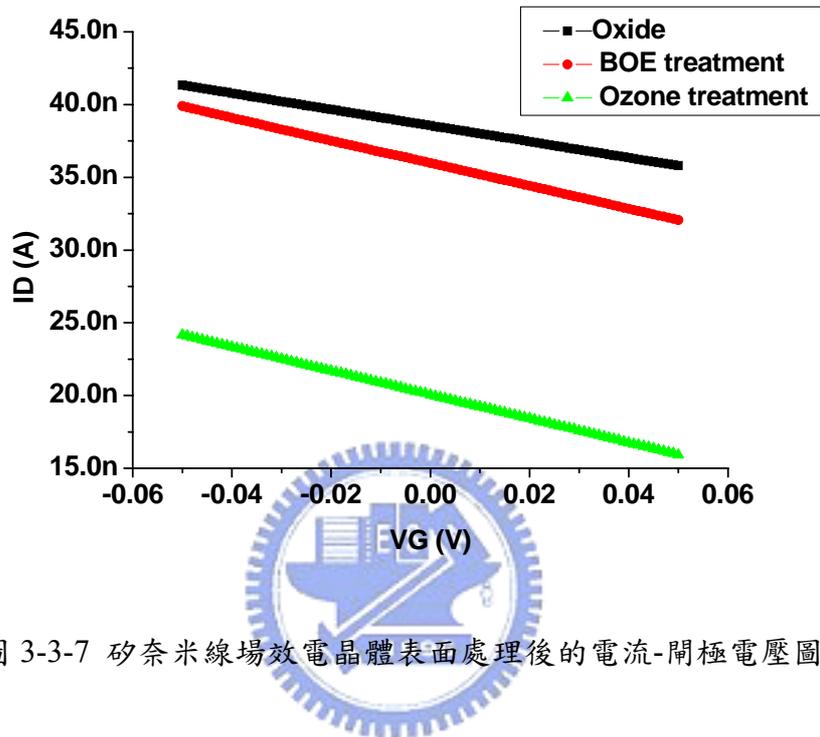


圖 3-3-7 矽奈米線場效電晶體表面處理後的電流-閘極電壓圖。

由於實驗中會需要在接近生理環境下來做 ATP 的感測，所以如 2-4-3 小節中所提及的，我們會使用靈敏度更高的矽奈米線場效電晶體來做生物感測器，因此製作了 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體，圖 3-3-8 為其電流對電壓圖(I-V curve)，圖中電流對電壓為線性關係，表示元件在金屬與半導體間為 Ohmic contact；圖 3-3-9 即為 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體電流對閘極電壓圖，量測條件亦是在  $V_{ds}$  加 0.1 V 時加不同的閘極電壓(Liquid gate)，將閘極電壓從 50 mV sweep 到 -50 mV，觀察電流的變化，由圖中所示，conductance 的變化量為 161 nS， $\Delta G/G_0 = 86.10\%$ ，比 100 nm 寬的矽奈米線場效電晶體( $\Delta G/G_0 = 51.92\%$ )有更高的靈敏度，所以在本實驗中用 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體做為高離子濃度下的生物感測器。

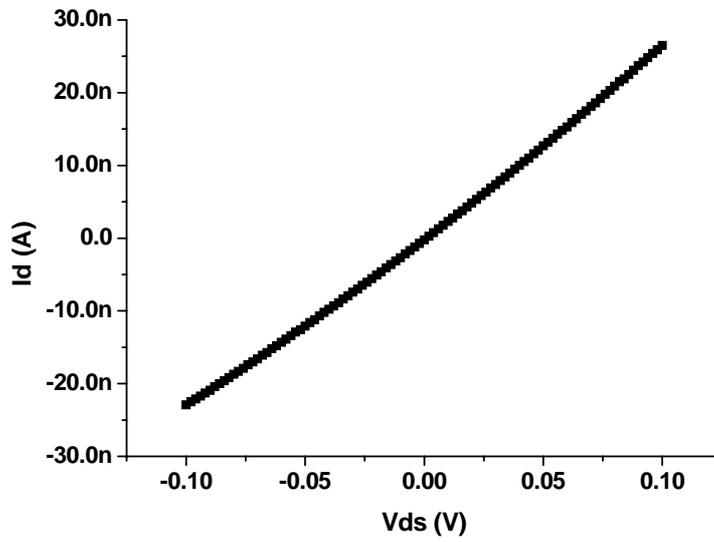


圖 3-3-8 50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖。

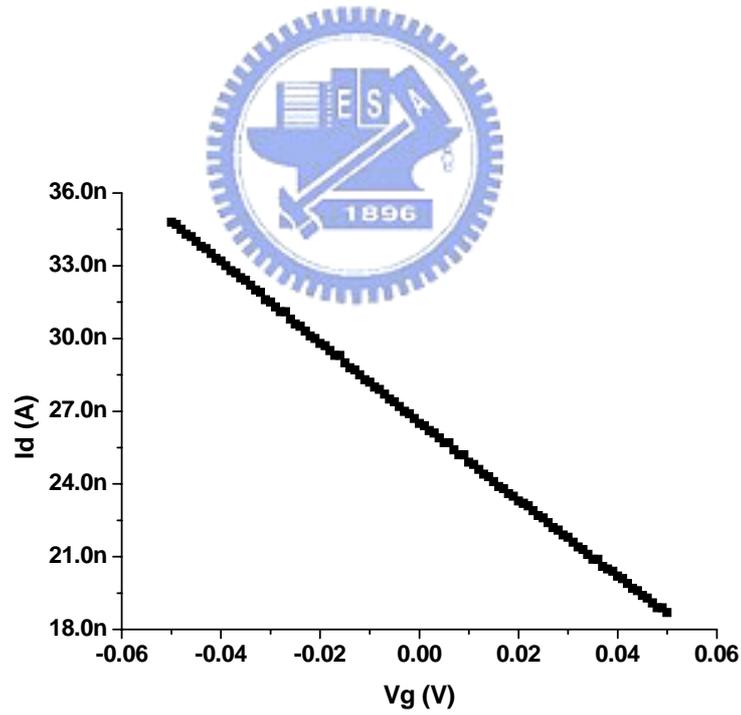


圖 3-3-9 50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖。

經過實驗，將修飾過的矽奈米線場效電晶體會有更好的靈敏度，至少增加 10 倍，這樣的結果在其他的實驗中也可以被證明[17]。

### 3-4 矽奈米線場效電晶體感測 Label-free 小分子 ATP

#### 3-4-1 低離子濃度的緩衝液下感測 ATP

在低離子濃度的緩衝液下，矽奈米線場效電晶體對生物分子具有很高的靈敏度，因為其 Debye length 很大，所以溶液中的電荷很容易影響矽奈米線的電性，因此當溶液中帶負電壓的分子接近或是 binding 上矽奈米線時，會造成矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation(堆積)，使電流變大；反之，當溶液中帶正電壓的分子接近或是 binding 上矽奈米線時，載子濃度(電洞)會被 depletion，使電流變小。

ATP 是三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 是一種核苷酸，作為細胞內能量傳遞的「分子通貨」，儲存和傳遞化學能。ATP 由腺苷和三磷酸基所組成，化學簡式  $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ，分子式  $C_{10}H_{16}N_4O_2NH_2(OH)_2(PO_3H)_3H$ ，分子量 507.184。三個磷酸基團從腺苷開始被編為  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  磷酸基。ATP 的化學名稱為 5'-三磷酸-9- $\beta$ -D-呋喃核糖基腺嘌呤，或者 5'-三磷酸-9- $\beta$ -D-呋喃核糖基-6-氨基嘌呤。

由上述的化學式中得知，ATP 帶有三個磷酸根，因此帶有多個負電荷，當 ATP 可以 binding 在矽奈米線時，造成矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation(堆積)，使電流變大，也就是 conductance 變大[3]，所以在 ATP 感測的實驗中，將矽奈米線先修飾上 Abl tyrosine kinase，再以 real-time 的方式觀察電流的改變，就可以知道 ATP 是否有被修飾上的 Abl tyrosine kinase 抓住，以改變矽奈米線的 conductance。

在低離子濃度的緩衝液(1.5  $\mu$ M Hepes buffer at pH 7.5 containing 1  $\mu$ M  $MgCl_2$  and 1  $\mu$ M EGTA)下感測 ATP，量測前，先將完成的矽奈米線場效電晶體，經過 2-2-2 小節所敘述的方式修飾上 Abl tyrosine kinase，再用 15 mM 的 Tris buffer 將未反應的 Aldehyde silane 的 Aldehyde group 做 quench，經 5~10 分鐘，即可在上述的低離子濃度的緩衝溶液中感測 ATP。

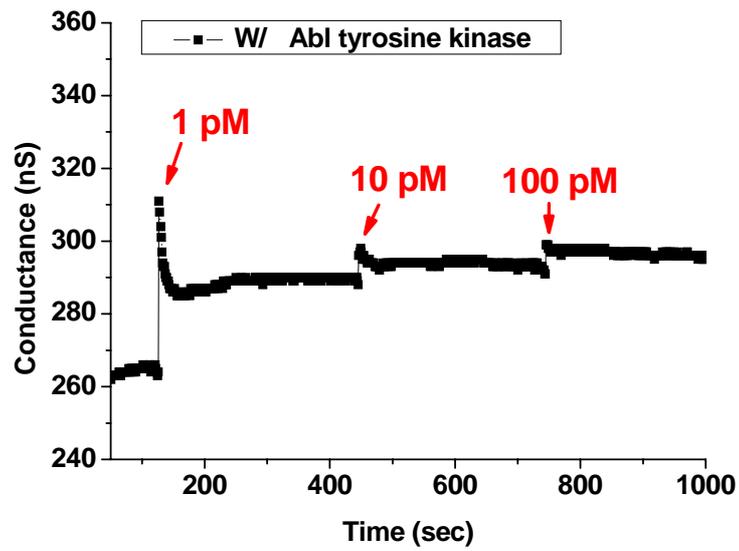


圖 3-4-1 低離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP。

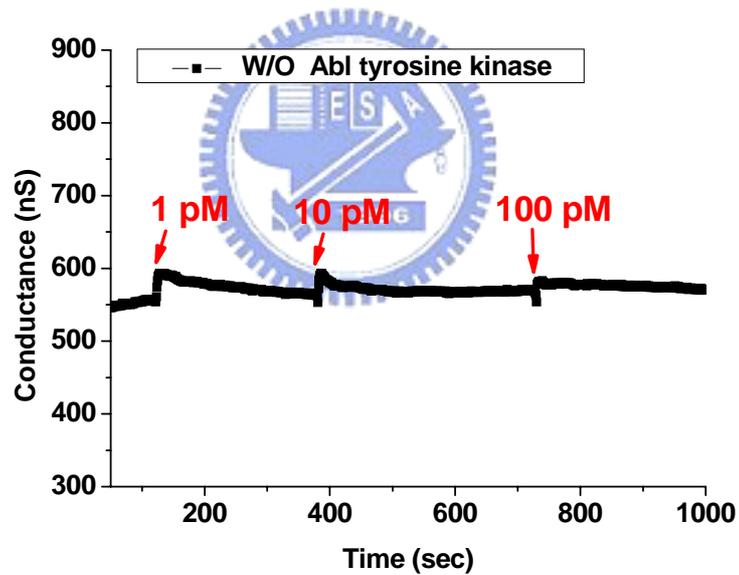


圖 3-4-2 低離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP(控制組)。

在感測 ATP 的實驗中，先將緩衝液加在元件上三分鐘，作為 baseline，再依序加入 1 pM、10 pM、100 pM 的 ATP，以 real-time 的方式觀察 conductance 的變化。圖 3-4-1 所示，加入不同濃度的 ATP，conductance 會改變，因為矽奈米線為 p-type，所

以當帶負電荷的 ATP 被修飾上的 Abl tyrosine kinase 抓住時，會使矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation(堆積)，使 conductance 變大，如圖中所示，每增加 10 倍的 ATP 濃度，conductance 就有一階層的變化。實驗中為了要證明圖 3-4-1 的 conductance 變化是 ATP binding 所造成，所以做了控制組，將沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線場效電晶體以上述相同的方式加入 ATP，然後以 real-time 的方式做 ATP 的感測實驗，由圖 3-4-2 所示，沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線，conductance 的變化無明顯的趨勢，所造成的改變應該為液體擾動的關係，圖中 conductance 成 random 變化，因此可以證明圖 3-4-1 的 conductance 變化是 ATP binding 所造成，而且由實驗得知，矽奈米線沒有修飾 Abl tyrosine kinase 就無法對溶液中的 ATP 有感測的能力。

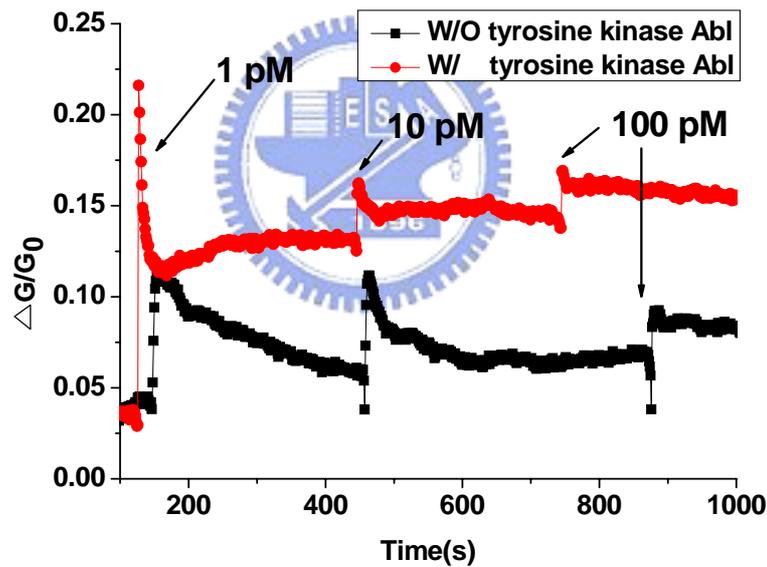


圖 3-4-3 低離子濃度緩衝液下感測 ATP， $\Delta G/G_0$  對時間圖。

由於每一個矽奈米線場效電晶體的電流大小並不一致，所以必須將每個元件做標準化，因此求出  $\Delta G/G_0$  對時間做圖，如圖 3-4-3 所示，經過標準化後  $\Delta G/G_0$  表示在感測中的 conductance 變化比值，由此過程可以將每個元件電流大小不同的變因給消除掉，從圖中的 conductance 變化比值可得知，當矽奈米線場效電晶體有修飾 Abl tyrosine

kinase 時，加入不同 ATP 濃度的溶液， $\Delta G/G_0$  是有一個個階層的改變；至於沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的元件，雖然  $\Delta G/G_0$  也有變化，但是其變化趨勢沒有和 ATP 濃度相關。

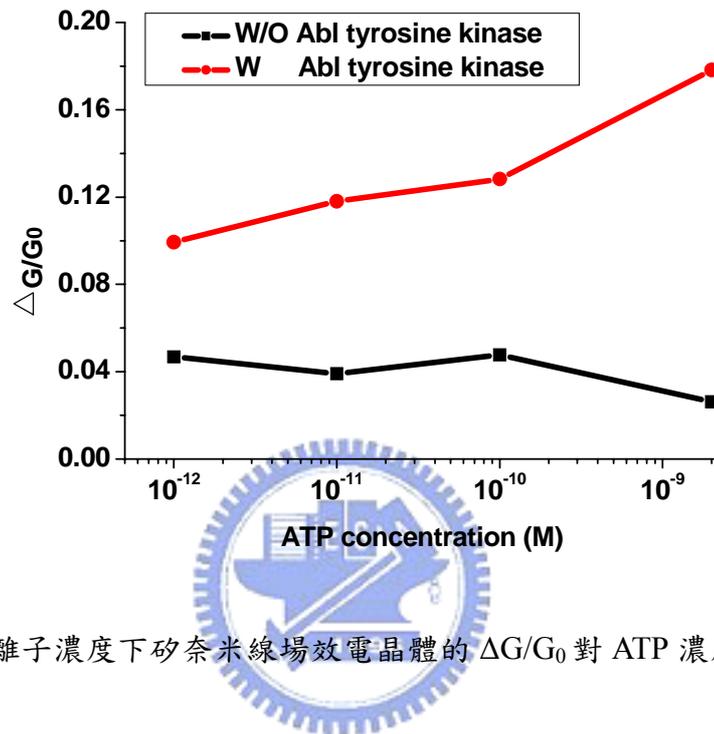


圖 3-4-4 低離子濃度下矽奈米線場效電晶體的  $\Delta G/G_0$  對 ATP 濃度對數作圖。

將 ATP 濃度取對數對  $\Delta G/G_0$  作圖，如圖 3-4-4，可以觀察到當矽奈米線場效電晶體有修飾 Abl tyrosine kinase 時， $\Delta G/G_0$  對 ATP 濃度的對數成正比關係，ATP 濃度愈高， $\Delta G/G_0$  值就愈大；沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的元件，雖然  $\Delta G/G_0$  也有些微變化，但  $\Delta G/G_0$  值對 ATP 濃度的對數並沒有正比關係。

將本實驗量測的結果與 Charles M. Lieber 團隊所做的結果做比較，他們量測 ATP 極限是 0.1 nM，本實驗中量測到的結果可以達到 1 pM，由此可知在相同緩衝溶液的標準下，本實驗的元件可以比 Charles M. Lieber 團隊的元件更靈敏，至少相差 100 倍的濃度。

### 3-4-2 高離子濃度的緩衝液下感測 ATP

在本實驗中所要量測的目標是細胞所釋放的 ATP，所以量測的環境要能保持細胞的存活，因此在實驗中，需要將量測的緩衝溶液置換成符合生理環境的離子濃度 (mM)，如常在細胞培養時 rinse 用的 1X PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 緩衝溶液；在這種高離子濃度的緩衝溶液中，用矽奈米線場效電晶體做生物感測時，首先會遇到 Debye length 的問題，如 2-4-3 小節所敘述，因為 Debye length 的關係，在高離子濃度的緩衝液下矽奈米線對環境的帶電分子感受能力會比較不靈敏，由公式(2.1)可得知：當離子濃度增加， $l_B$  (Bjerrum length) 會變大， $\Sigma_i$  (所有離子的總和)、 $\rho_i$  ( $i$  離子的 density)、 $z_i$  ( $i$  離子的價電數) 都會變大，由公式(2.1)推論出 Debye length 會變小，因此電荷必須非常靠近矽奈米線，小於 Debye length，才能對其造成場效的影響。由文獻中提及，在 1X PBS 緩衝溶液中，矽奈米線的 Debye length 約為 0.7 nm，也就是說，ATP 必須要在矽奈米線周圍 0.7 nm 以內的距離才能改變其 conductance。在實驗中修飾的 Abl tyrosine kinase，由查詢文獻得知其大約為 3~4 nm 大小，所以在 1×PBS 緩衝溶液下量測，並非所有被 Abl tyrosine kinase 抓到的 ATP 都能改變矽奈米線的 conductance，可能必須在 0.7 nm 以內的距離，所以在此實驗中的生物感測器使用靈敏度更高的 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體。

在高離子濃度緩衝液中感測 ATP 的實驗，先將緩衝液加在元件上三分鐘，作為 baseline，再依序加入 1 nM、10 nM、100 nM、以及 1  $\mu$ M 的 ATP，以 real-time 的方式觀察 conductance 的變化。如圖 3-4-5 所示，在緩衝溶液中每增加 10 倍的 ATP 濃度，conductance 就有一階層的變化，此現象如同圖 3-4-1 所示，但與其不同之處是在高離子濃度的緩衝液中，conductance 的變化較緩慢，不像在低離子濃度緩衝液中時的變化，一加入不同濃度的 ATP，conductance 馬上變大；此一現象應該是因為在高離子濃度的緩衝液中，Debye length 很小，ATP 必須要擴散到非常接近矽奈米線時，才會變化，所以圖 3-4-5 的 conductance 變化是呈緩坡慢慢增加，然後逐漸飽和。在此實驗中另一發現，ATP 濃度加到 1  $\mu$ M 時就呈現飽和狀態，conductance 變化不大，即

使加入更高濃度的 ATP 也不會使 conductance 改變。

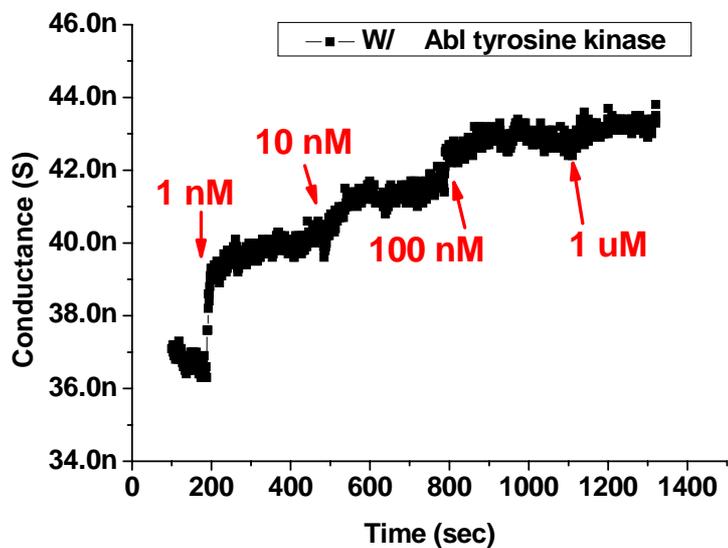


圖 3-4-5 高離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP。

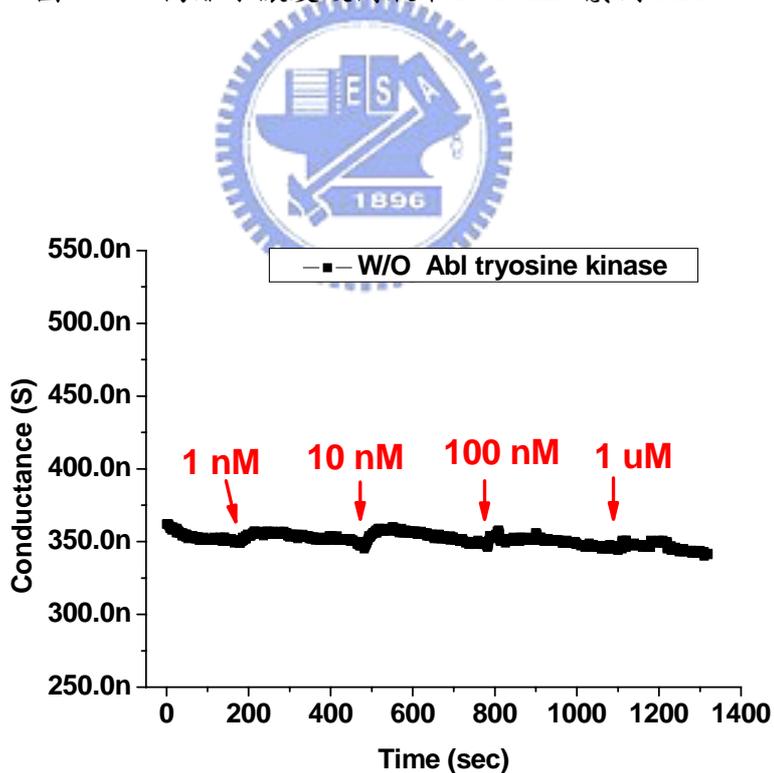


圖 3-4-6 高離子濃度緩衝液下 real-time 感測 ATP(控制組)。

同樣地，在高離子濃度的緩衝溶液中，也要證明圖 3-4-5 所示的 conductance 變

化是由 ATP binding 所造成，所以也作了控制組。將沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線場效電晶體以上述相同的方式加入 ATP，然後以 real-time 的方式做 ATP 的感測實驗，如圖 3-4-6 所示，沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線加入不同濃度的 ATP，雖然 conductance 也會被液體的擾動所干擾，但其變化量與 ATP 濃度並沒有直接的關係，因此可以證明圖 3-4-5 的 conductance 變化是 ATP binding 所造成，而且，在此實驗中也可知道，在高離子濃度的緩衝溶液下，矽奈米線沒有修飾 Abl tyrosine kinase 就無法對溶液中的 ATP 有感測的能力。

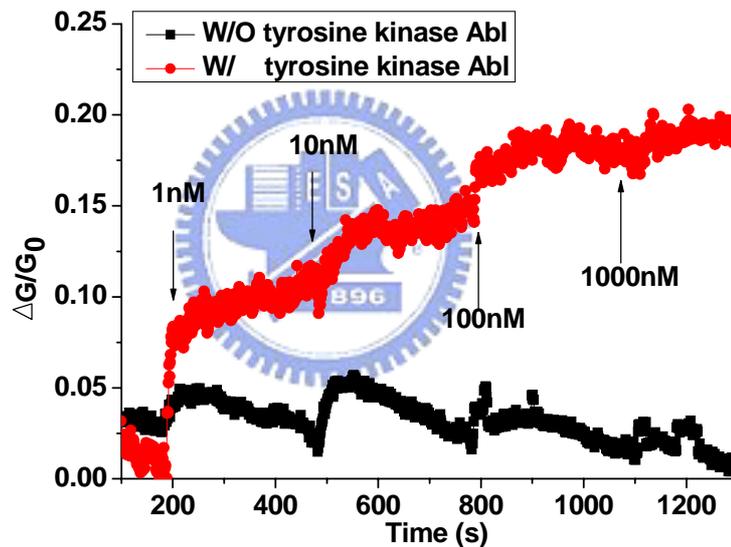


圖 3-4-7 高離子濃度緩衝液下感測 ATP， $\Delta G/G_0$  對時間圖。

同樣地，由於每一個矽奈米線場效電晶體的電流大小並不一致，所以必須將每個元件做標準化，因此求出  $\Delta G/G_0$  對時間做圖，如圖 3-4-7 所示，矽奈米線有修飾 Abl tyrosine kinase 時， $\Delta G/G_0$  的變化會和 ATP 濃度相關，當 ATP 濃度增加十倍， $\Delta G/G_0$  的變化也會成一階階的改變；反之，當矽奈米線沒有修飾 Abl tyrosine kinase 時， $\Delta G/G_0$  的變化不會和 ATP 濃度相關，呈現 random 的改變，所以經過標準化後，同樣可以證

明  $\Delta G/G_0$  的變化是由 ATP binding 所造成。

在高離子濃度緩衝液的量測中，將 ATP 濃度取對數對  $\Delta G/G_0$  作圖，如圖 3-4-8 所示，可以發現當矽奈米線有修飾 Abl tyrosine kinase 時，在特定 ATP 濃度範圍內， $\Delta G/G_0$  對 ATP 濃度的對數成正比，有特定區域的線性關係，當 ATP 濃度愈高， $\Delta G/G_0$  的值就愈大，當 ATP 濃度上升 10 倍時， $\Delta G/G_0$  的值提高約 4%；相較之下，當矽奈米線沒有修飾 Abl tyrosine kinase 時， $\Delta G/G_0$  的變化就和 ATP 濃度無直接的關係。

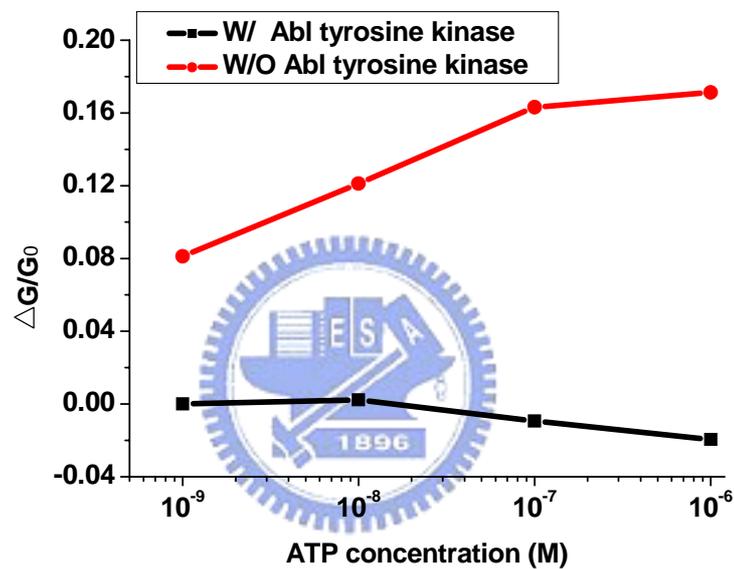


圖 3-4-8 高離子濃度下矽奈米線場效電晶體的  $\Delta G/G_0$  對 ATP 濃度對數作圖。

綜合前一小節與本小節實驗所討論的結果，無論在高或低離子濃度的緩衝液中，只要矽奈米線沒有修飾 Abl tyrosine kinase，就不能感測溶液中的 ATP；而且，我們已經建立出一套可以在高或低離子濃度的緩衝液中感測 ATP 的方式，也都有明顯的變化，進而可以利用於感測細胞所釋放的 ATP。

### 3-4-3 高離子濃度的緩衝液下測試 Abl 的活性

當我們完成上一小節的實驗後，成功的量測到在高離子濃度的緩衝溶液下的 ATP，接下來必須要知道實驗中矽奈米線上所修飾的生物分子 Abl tyrosine kinase 的活性在 PBS 下可以維持多久時間，使量測細胞所釋放的 ATP 之實驗可以在酵素失去活性以前完成。

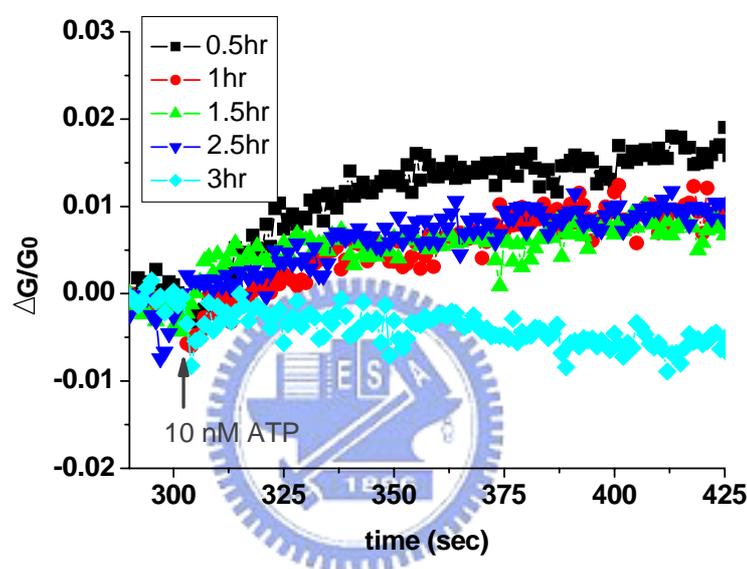


圖 3-4-9 量測 binding 在奈米線上之 Abl tyrosine kinase 活性的 life time。

圖 3-4-9 為量測 Abl tyrosine kinase 活性的結果，在 300 秒時加入濃度 10 nM 的 ATP，每隔 30 分鐘量測一次，觀察每次量測的結果，來判斷 Abl tyrosine kinase 的活性可以維持的時間。觀察圖 3-4-9 中曲線可以發現，Abl tyrosine kinase 在第一次量測 (30 分鐘) 的活性最好，conductance 的變化最大，後來每隔 30 分鐘的幾次量測差異並不大，conductance 變化量差不多，直到三小時過後，加入濃度 10 nM 的 ATP 時 conductance 已經沒有變化，代表實驗中所修飾的 Abl tyrosine kinase 已經失去活性，所以量測細胞所釋放的 ATP 之實驗必須要在三小時內完成。

## 3-5 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP

### 3-5-1 量測架構

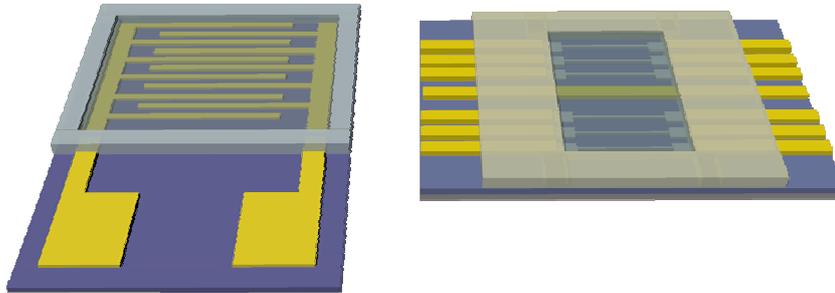


圖 3-5-1 量測細胞所釋放的 ATP 的量測架構。

實驗中，為了量測細胞所釋放的 ATP，我們先將實驗分成兩部份，如圖 3-5-1 所示；第一個部份，先製作電極結構，如 2-3-1 小節的製作流程，將 HeLa 細胞培養在電極中 24 小時；第二部份是製作矽奈米線場效電晶體，如 2-1-1 小節的製作流程，再修飾 aldehyde silane 及 Abl tyrosine kinase，完成感測 ATP 的矽奈米線場效電晶體。

先將培養後的 HeLa cell 用 PBS 洗 5 次，加入 PBS 靜置 10 分鐘，電刺激 10 分鐘，量測流程為如同在高離子濃度緩衝液 PBS 中感測 ATP 的實驗，先將細胞外原先的緩衝液加在元件上五分鐘，作為 baseline，再依序加入細胞靜置(immobile)10 分鐘後的緩衝溶液、以及電刺激 10 分鐘的緩衝溶液，以 real-time 的方式觀察 conductance 的變化。本實驗兩個架構是同時進行，由 2-3-1 小節刺激方式，再由 2-4-4 的量測方式，所以等於觀察細胞經電刺激後釋放分子的即時偵測，因此，實驗為即時觀測細胞行為的結果。

### 3-5-2 細胞外 ATP 量測結果

細胞經電刺激後會釋放 ATP 已在 3-1-2 小節被證明，所以本實驗進行到最後，一定要將製作出的 ATP 生物感測器矽奈米線場效電晶體運用在感測細胞所釋放的 ATP，且在 3-4-2 小節解決了矽奈米線場效電晶體在高離子濃度 debye length 的問題，所以，將運用 3-5-1 小節所敘述的架構來量測細胞經由電刺激後所釋放的 ATP，感測的原理和 3-4 節的方式相同，當 ATP 可以 binding 在矽奈米線時，造成矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation(堆積)，使電流變大，也就是 conductance 變大，由此觀察細胞經過電刺激之後的改變。

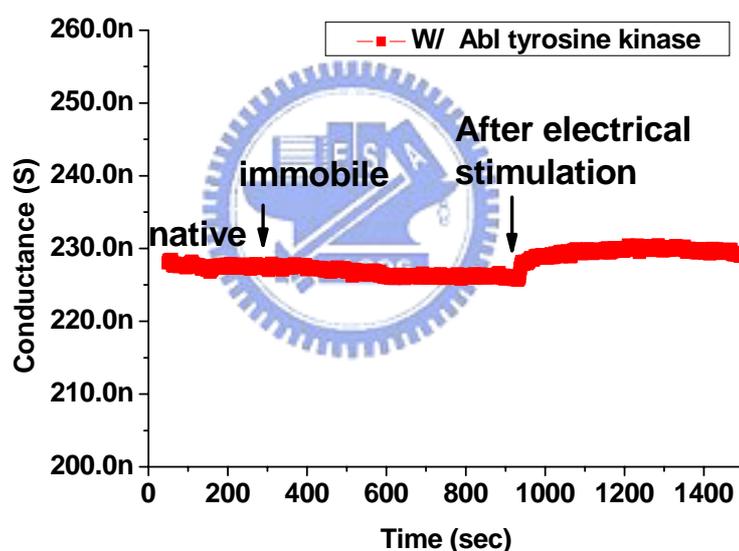


圖 3-5-2 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP。

量測的結果如圖 3-5-2 所示，加入細胞外原先的緩衝液在元件上五分鐘，作為 baseline，然後再加入細胞靜置(immobile)10 分鐘後的緩衝溶液，觀察矽奈米線場效電晶體的 conductance 變化，由圖 3-5-2 所示，發現加入細胞靜置(immobile)10 分鐘後的緩衝溶液後，conductance 並無明顯的變化，這結果和 3-1-2 小節相同，再細胞沒有電

刺激之下，在 1X PBS 緩衝溶液下細胞不會釋放 ATP 到細胞外，所以 conductance 沒有明顯的改變；細胞經過 10 分鐘的電刺激之後，將緩衝溶液加入元件上，發現 conductance 有明顯的變化，代表經過電刺激之後，細胞有釋放 ATP，所以在矽奈米線上的 Abl tyrosine kinase 會抓到 ATP，使矽奈米線的載子濃度(電洞)被 accumulation(堆積)，使電流變大，也就是 conductance 變大，由圖 3-5-2 可證明在本實驗的量測架構上，可以 real-time 偵測到細胞經電刺激所釋放出的 ATP。

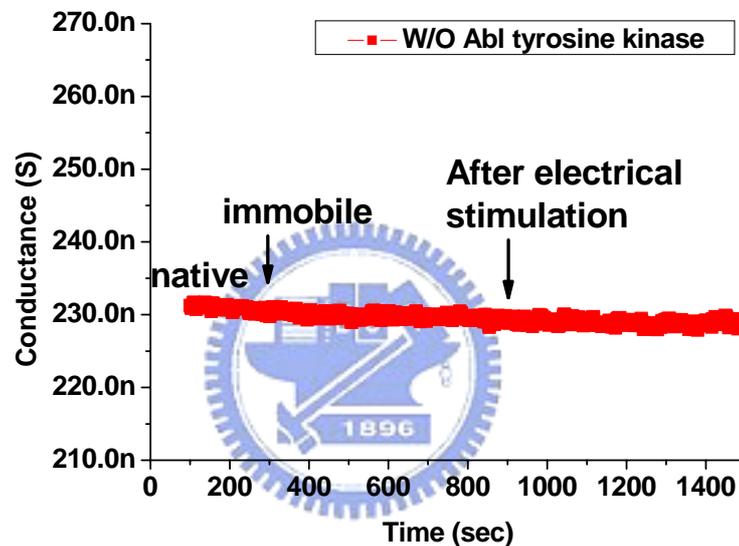


圖 3-5-3 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP (控制組)。

雖然在圖 3-5-2 中可以測出細胞經電刺激所釋放出的 ATP，但必須再做控制組來確認圖 3-5-2 中矽奈米線 conductance 的改變是由 Abl tyrosine kinase 抓到 ATP 所造成，所以又將沒有修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線場效電晶體，以圖 3-5-1 的架構量測細胞經電刺激所釋放出的 ATP，如圖 3-5-3 所示，加入細胞外原先的緩衝液在元件上五分鐘，作為 baseline，然後再加入細胞靜置(immobile)10 分鐘後的緩衝溶液，觀察矽奈米線場效電晶體的 conductance 變化，由圖中所示的結果和圖 3-5-2 的結果相同，以 real-time 觀察不會有 conductance 的變化，表示沒有電刺激的情形下，細胞

不會釋放 ATP；細胞經過電刺激 10 分鐘後，將緩衝溶液加入元件上，發現 conductance 也沒有明顯的變化，所以由圖 3-5-2 和圖 3-5-3 可以證明，將細胞電刺激後造成的 conductance 的變化，是因為細胞所釋放的 ATP 被修飾在矽奈米線上的 Abl tyrosine kinase 捕獲的關係，因此，本實驗的量測架構上，可以 real-time 偵測到細胞經電刺激所釋放出的 ATP。

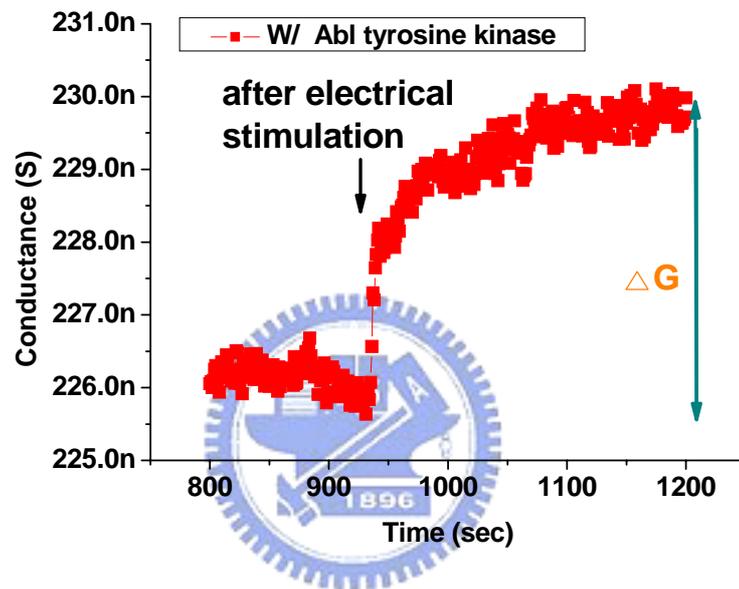


圖 3-5-4 利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP( $\Delta G$ )。

將圖 3-5-2 的變化放大之後，如圖 3-5-4，即可算出在細胞靜置(immobile)10 分鐘後的緩衝溶液和細胞經過電刺激 10 分鐘後的緩衝溶液之間 conductance 的變化，觀察圖 3-5-4 發現在電刺激之後 conductance 增加( $\Delta G/G_0$  的值)了 3.5%，比對在 1X PBS 緩衝溶液下的  $\Delta G/G_0$  的值對 ATP 濃度的圖，如圖 3-4-8，當 ATP 濃度愈高， $\Delta G/G_0$  的值就愈大，當 ATP 濃度上升 10 倍時， $\Delta G/G_0$  的值提高約 4%，所以用矽奈米線場效電晶體的量測結果是在細胞外的 ATP 濃度提高約 10 倍；再對照圖 3-1-2 HeLa cell 電刺激前後細胞外 ATP 濃度變化，發現細胞經過電刺激後，用 bioluminescence 的方式測 ATP 濃度，細胞外 ATP 濃度大約是上升 10 倍左右，由此可以發現用矽奈米線場

效電晶體和用 bioluminescence 測的 ATP 結果十分接近，也就是說用矽奈米線場效電晶體感測細胞所釋放的 ATP，不僅能很靈敏的偵測 ATP 的釋放，而且能夠用 real-time 的方式，即時偵測細胞的行為，此為奈米線生物感測器的一大圖突破。

一般奈米線生物感測器雖然也都很靈敏，但必須要將使用的緩衝溶液的離子濃度調到  $\mu\text{M}$  的等級，使其 Debye length 較大以利感測生物分子的靈敏度，在此實驗中不僅能突破在高離子濃度的緩衝溶液下 Debye length 的問題，更進一步去偵測到細胞所釋放的生物小分子，完成即時偵測生物體行為的量測實驗。



# 第四章

## 結論與未來展望

### 4-1 結論

由以上之實驗結果與討論，可以歸納出以下之結論：

1. 我們成功製作出矽奈米線場效電晶體的生物感測器，且當其表面修飾分子時，可成功的感測表面修飾之分子，且感測之靈敏度相當高。
2. 我們可以藉由掃 liquid gate 的電位，證明當有帶電荷的分子接在矽奈米線上時，會造成的是載子的 depletion 或是 accumulation，進而判斷分子是帶正電或是負電荷。
3. 當矽奈米線場效電晶體在低離子濃度( $\mu\text{M}$ )的緩衝溶液中量測時，可以有非常高的靈敏度，將 Abl tyrosine kinase 修飾在矽奈米線上且在此條件下量測，可以偵測到 1 pM 的 ATP。
4. 在高離子濃度的緩衝溶液(生理環境)下做 ATP 的量測，雖然矽奈米線場效電晶體的 Debye length 很小，但我們使用尺寸更小的矽奈米線，也能成功的感測到濃度 1 nM 的 ATP。
5. 藉由我們所製作的電極結構，可以將 HeLa cell 養在電極上並給予電刺激使其釋放 ATP 至細胞外，在電刺激前後細胞外的 ATP 濃度可以相差 10 倍左右，且電刺激後細胞還依然存活。
6. 我們成功的運用矽奈米線場效電晶體生物感測器以及電刺激細胞的電極結構，即時偵測細胞行為和其釋放的小生物分子 ATP，並成功量測到細胞外 ATP 濃度在電刺激前後的變化也約為 10 倍左右。



## 4-2 未來展望

由以上所得到之結果，矽奈米線場效電晶體，能成為未來應用於生物分子感測之主要元件。在本實驗中已經能成功的刺激細胞行為及感測細胞釋放的分子，所以在未來有多重要的研究可以繼續進行。

在此，我們對於未來之工作有幾項建議：

1. 在實驗中元件上的微流道是使用開放式(SU-8)的結構，雖然此架構在量測上很方便和穩定，但卻不容易將矽奈米線上的溶液洗去，所以可以進一步發展封閉式的微流道架構(PDMS)，使量測上能更完整的更換溶液。
2. 將實驗中目前量測的架構整合在同一片晶片上，或是將電極結構和矽奈米線場效電晶體生物感測器用微流道相連接，使量測時能在同一架構中同時進行電刺激和生物分子的量測。整合的方式可以將矽奈米線電晶體和電極先製作完成後，如圖 1-1-1，先將矽奈米線場效電晶體與電極先隔開，將細胞養在電極區域，在對矽奈米線做修飾，即可將兩者整合在同一片晶片上，但也會遇到困難，就是在修飾的過程很有可能造成細胞的死亡，所以必須解決的問題還很多。
3. 可將此研究的架構運用在細胞訊息傳遞的研究，除了本實驗中所量測的 ATP 之外，更可以研究如神經傳導物質 Dopamine 的釋放或傳遞。

## 參考文獻

- [1] K. Grosios, and P. Traxler, “Tyrosine kinase targets in drug discovery,” *Drugs Future*, vol. 28, pp. 670-697, 2003.
- [2] J. Becker, “Signal transduction inhibitors—a work in progress,” *Nature Biotechnology*, vol. 22, pp. 15-18, 2004.
- [3] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, and C. M. Lieber, “Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species,” *Science*, vol. 293, pp. 1289-1292, 2001.
- [4] F. Patolsky, and C. M. Lieber, “Nanowire Nanosensors,” *Materials Today*, vol. 8, no. 4, pp. 20-28, 2005.
- [5] F. Patolsky, B. P. Timko, G. Yu, Y. Fang, A. B. Greytak, G. Zheng, and C. M. Lieberl, “Detection, Stimulation, and Inhibition of Neuronal Signals with High-Density Nanowire Transistor Arrays,” *Science*, vol. 313, pp. 1100-1104, 2006.
- [6] W. U. Wang, C. Chen, K. H. Lin, Y. Fang, and C. M. Lieber, “Label-free detection of small-molecule–protein interactions by using nanowire nanosensors,” *PNAS*, vol. 102, no. 9, pp. 3208–3212, 2005.
- [7] J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd Ed.; Academic Press: London, 1991.
- [8] E. Stern, R. Wagner, F. J. Sigworth, R. Breaker, T. M. Fahmy, and M. A. Reed, “Importance of the Debye Screening Length on Nanowire Field Effect Transistor Sensors,” *Nano Letter*, vol. 7, no. 11, pp. 3405-3409, 2007.
- [9] D. S. Goodsell, “The Molecular Perspective: c-Abl Tyrosine Kinase,” *Stem Cell*, vol. 24, pp. 209-210, 2006.

- [10] M. H. Anderson, J. R. Ensher, M. R. Matthews, C. E. Wieman, and E. A. Cornell, "Observation of Bose-Einstein Condensation in a Dilute Atomic Vapor," *Science*, vol. 269, pp. 198-201, 1995.
- [11] Y. Cui, and C. M. Lieber, "Functional Nanoscale Electronic Devices Assembled Using Silicon Nanowire Building Blocks," *Science*, vol. 291, pp. 851-853, 2001.
- [12] P. Blume-Jensen, and T. Hunter, "Oncogenic kinase signalling," *Nature*, vol. 411, pp. 355-365, 2001.
- [13] J. C. Seegers, M. L. Lottering, A. M. Joubert, F. Joubert, A. Koorts, C. A. Engelbrecht, and D. H. van Papendorp, "A pulsed DC electric field affects P2-purinergic receptor functions by altering the ATP levels in in vitro and in vivo systems," *Medical Hypotheses*, vol. 58, no. 2, pp. 171-176, 2002.
- [14] C. A. Sackett, D. Kielpinski, B. E. King, C. Langer, V. Meyer, C. J. Myatt, M. Rowe, Q. A. Turchette, W. M. Itano, D. J. Wineland and C. Monroe, "Experimental entanglement of four particles," *Nature*, vol. 404, pp. 256-258, 2000.
- [15] Y. Cui, X. Duan, J. Hu, and C. M. Lieber, "Doping and Electrical Transport in Silicon Nanowires," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, pp. 5213-5216, 2000.
- [16] A. Star, K. Bradley, J. C. P. Gabriel and G. Gruner, "Nano-Electronic Sensors: Chemical Detection Using Carbon Nanotubes," *Polym. Mater. Sci. Eng.*, vol. 89, pp. 204, 2003.
- [17] Y. Cui, Z. Zhong, D. Wang, W. U. Wang, and C. M. Lieber, "High Performance Silicon Nanowire Field Effect Transistors," *Nano Letter*, vol. 3, no. 2, pp. 149-156, 2003.
- [18] G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, and C. M. Lieber, "Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays," *Nature Biotechnology*, vol. 23, pp. 1294-1301, 2005.

- [19] S. M. Prokes and K. L. Wang, "Novel methods of nanoscale wire formation," *MRS Bulletin*, vol. 24, no. 8, pp. 13-19, 1999.
- [20] J. Hu, T. W. Odom, and C. M. Lieber, "Chemistry and Physics in One Dimension: Synthesis and Properties of Nanowires and Nanotubes," *Acc. Chem. Res.*, Vol. 32, pp. 435-445, 1999.

