

# 國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

利用自組裝單層膜技術製造奈米鑽石陣列晶片與其應用：

奈米金粒子耦合於陣列晶片的光學量測

The fabrication of nanodiamond microarray chip by  
self-assembled monolayer technology : The optical  
measurement of coupled gold nanoparticles  
on microarray chip

研究生：林柏帆

指導教授：孫建文 博士

中華民國九十八年十月

利用自組裝單層膜技術製造奈米鑽石陣列晶片與其應用：奈米金粒子

耦合於陣列晶片的光學量測

The fabrication of nanodiamond microarray chip by self-assembled  
monolayer technology : The optical measurement of coupled gold  
nanoparticles on microarray chip

研究生：林柏帆

Student : Po-fan Lin

指導教授：孫建文 博士

Adviser : Dr. Kien-wen Sun



A Thesis

Submitted to Department of Applied Chemistry  
College of Science  
National Chiao Tung University  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
For the degree of  
Master of Science  
In  
Applied Chemistry  
October 2009  
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年十月

利用自組裝單層膜技術製造奈米鑽石陣列晶片與其應用：奈米金粒子耦合  
於陣列晶片的光學量測

學生：林柏帆

指導教授：孫建文 博士

國立交通大學

應用化學所碩士班

摘要

由於奈米鑽石的特性：化學穩定度高、光學穩定度佳、表面容易改質修飾以及對生物分子有很好的吸附力，可以當成生物連結基材。在第一部分我先使用電子束微影系統(Electron Beam Lithography System)，定義出陣列圖形，再配合上自組裝單層膜的技術，將奈米鑽石整齊的排列在二氧化矽基板上，製作成奈米鑽石的陣列晶片。

在第二部分我利用兩股互補的DNA，分別接在奈米鑽石基板以及奈米金粒子上，經由雜合反應將奈米金粒子修飾在奈米鑽石陣列上，再使用共軛焦顯微鏡量測，觀察到在反應之後奈米鑽石光致發光光譜的強度增強，證明金粒子會讓奈米鑽石陣列的光學訊號改變，未來可以用來當作發展成生物偵測器後光學量測的指標。

關鍵字：陣列晶片、奈米鑽石、奈米金粒子

The fabrication of nanodiamond microarray chip by self-assembled monolayer technology : The optical measurement of coupled gold nanoparticles on microarray chip

Student : Po-fan Lin

Adviser : Dr. Kien-wen Sun

Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University

**Abstract**

Recently, nanodiamond has become one of the best candidates to serve as a biobinding platform due to its special properties such as, high chemical stability, good photo-stability, easily surface modification, and binding affinity with biomolecules. In the first part of this thesis, we used E-Beam lithography system to design patterned nanostructure arrays. By using self-assembled monolayer (SAM) technology, we were able to position nanodiamonds into regular arrays on the silicon substrate and to fabricate a nanodiamond microarray chip.

In the second part of this work, we bound the nanodiamond surface with two complementary DNA sequences and gold nanoparticles. After the gold nanoparticle hybridize on the nanodiamond microarrays, we measured the micro-PL spectrum of nanodiamonds through a confocal microscope. In the spectrum, we observed enhancement of the PL signal of the nanodiamonds after hybridization, which demonstrated that the gold nanoparticles have modified the optical signal from the nanodiamonds. In the future, the signal will be used as an index for biosensing purposes.

Keyword : Microarray chip, Nanodiamond, Gold nanoparticles



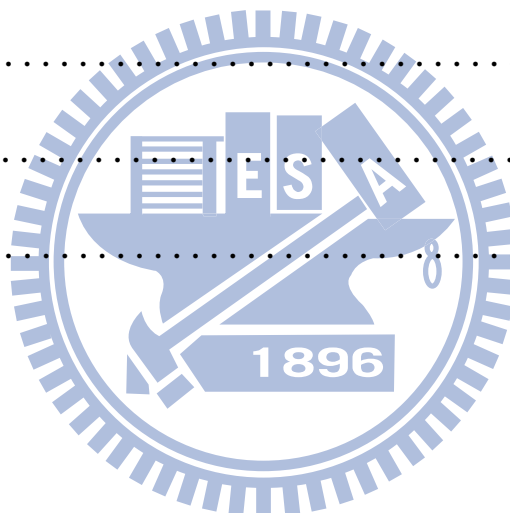
# 目錄

頁次

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
目錄.....	iii
表目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
第一章 緒論.....	1
1-1 前言-奈米科技.....	1
1-2 生物晶片.....	3
1-2-1 生物晶片的定義.....	3
1-2-2 生物晶片分類.....	3
1-2-3 微陣列晶片.....	6
1-3 奈米鑽石.....	8
1-4 文獻回顧.....	11
1-5 研究目的.....	14
1-6 參考資料.....	15
第二章 實驗技術與原理.....	17

2-1 微影技術.....	17
2-1-1 微影技術簡介.....	17
2-1-2 電子束微影系統.....	20
2-2 共軛焦顯微技術.....	24
2-3 光激發螢光光譜.....	28
2-4 參考資料.....	30
第三章 研究方法與基板的製作.....	31
3-1 實驗藥品與儀器.....	31
3-1-1 實驗材料與藥品.....	31
3-1-2 實驗儀器.....	33
3-2 奈米鑽石的定位化晶片.....	35
3-2-1 奈米鑽石酸化步驟.....	35
3-2-2 電子束微影製程定義圖形.....	36
3-2-3 自組裝單層膜與奈米鑽石定位化.....	40
3-2-4 結構與光譜量測.....	43
3-3 奈米鑽石耦合奈米金的偵測平台.....	44
3-3-1 奈米鑽石耦合奈米金樣品的製作.....	44
3-3-2 結構與光譜量測.....	47
3-4 參考資料.....	49

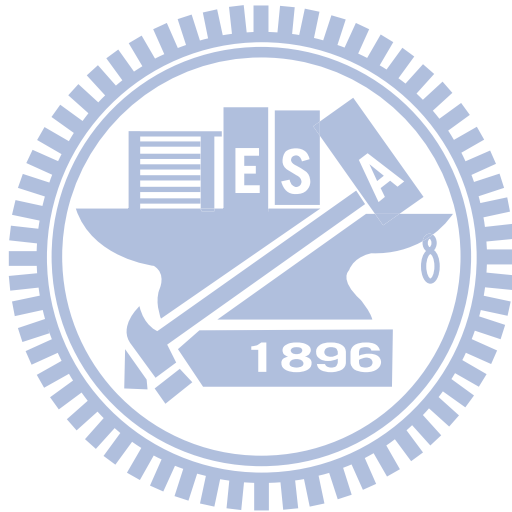
第四章 量測結果與討論.....	50
4-1 定位化晶片的分析量測.....	50
4-1-1 實驗樣品的結構量測.....	50
4-1-2 實驗樣品的光譜量測.....	55
4-2 耦合偵測平台的分析量測.....	61
4-2-1 實驗樣品的結構量測.....	61
4-2-2 實驗樣品的光譜量測.....	70
4-3 參考資料.....	78
第五章 結論.....	79
5-1 改善方法.....	80



## 表目錄

表 2-1..... 18

表 4-1..... 71



## 圖目錄

圖 1-1.....	2
圖 1-2.....	4
圖 1-3.....	5
圖 1-4.....	6
圖 1-5.....	7
圖 1-6.....	9
圖 1-7.....	10
圖 1-8.....	10
圖 1-9.....	12
圖 1-10.....	12
圖 1-11.....	13
圖 1-12.....	13
圖 2-1.....	19
圖 2-2.....	22
圖 2-3.....	23
圖 2-4.....	25
圖 2-5.....	27
圖 2-6.....	29

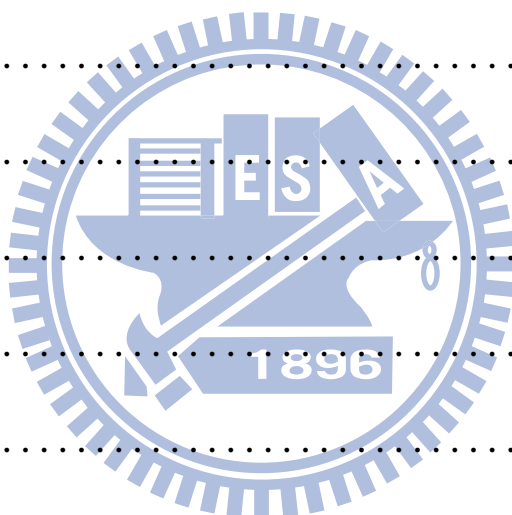


圖 3-1.....	35
圖 3-2.....	38
圖 3-3.....	39
圖 3-4.....	39
圖 3-5.....	40
圖 3-6.....	42
圖 3-7.....	42
圖 3-8.....	44
圖 3-9.....	47
圖 4-1.....	51
圖 4-2.....	52
圖 4-3(a).....	53
圖 4-3(b).....	54
圖 4-4(a).....	56
圖 4-4(b).....	56
圖 4-5(a).....	57
圖 4-5(b).....	57
圖 4-5(c).....	58
圖 4-6(a).....	60

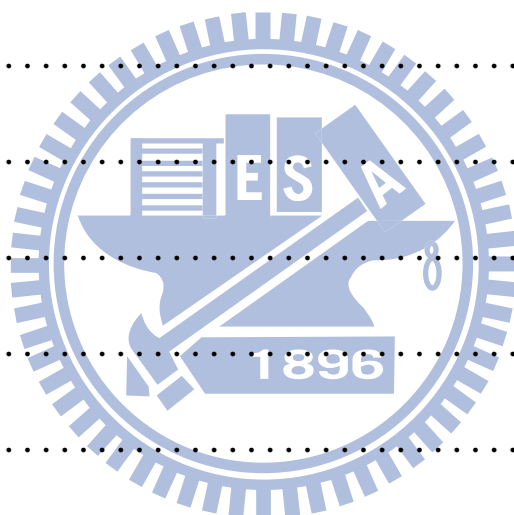
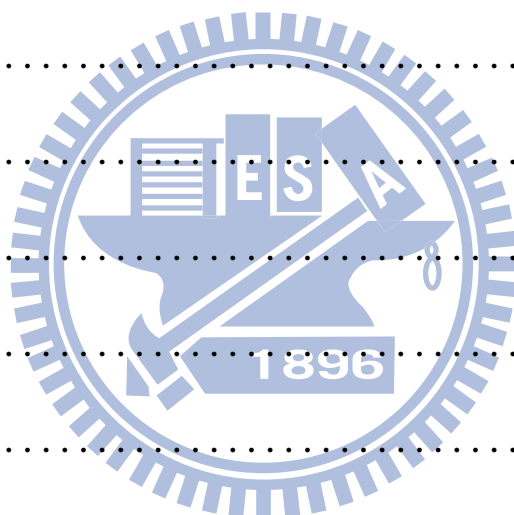


圖 4-6(b).....	60
圖 4-7(a).....	63
圖 4-7(b).....	64
圖 4-8(a).....	65
圖 4-8(b).....	66
圖 4-9(a).....	67
圖 4-9(b).....	68
圖 4-9(c).....	69
圖 4-10.....	70
圖 4-11.....	72
圖 4-12.....	73
圖 4-13.....	74
圖 4-14.....	75
圖 4-15.....	76
圖 4-16(a).....	77
圖 4-16(a).....	77



# 第一章 緒論

## 1-1 前言-奈米科技

諾貝爾物理學獎得主理查·費曼(Richard P. Feynman)，於 1959 年美國物理學年會的專題演講「底下還有廣大空間」(There's plenty of room at the bottom)，預言人類的科技，將邁向極微小尺寸的發展，甚至可以達到操控原子或分子的可能性，因此開啟了人們對奈米科技的興趣。

奈米(Nanometer，簡寫為nm)，即是十億分之一米( $10^{-9}$  meter)，是一種長度的度量單位，約為頭髮直徑的五萬分之一，相當於十個氫原子排列的直徑長。若我們將材料縮小至奈米尺度，其物理、化學和生物上的性質，會與巨觀尺度下的性質，有相當大的差異。利用這些獨特的性質為基礎，設計、製作、組裝成應用上的元件，或是針對這些性質做特性上的量測，就是奈米科技的研究重點，[圖1-1所示](#)。



## Major Topics of Nanoscience and Technology

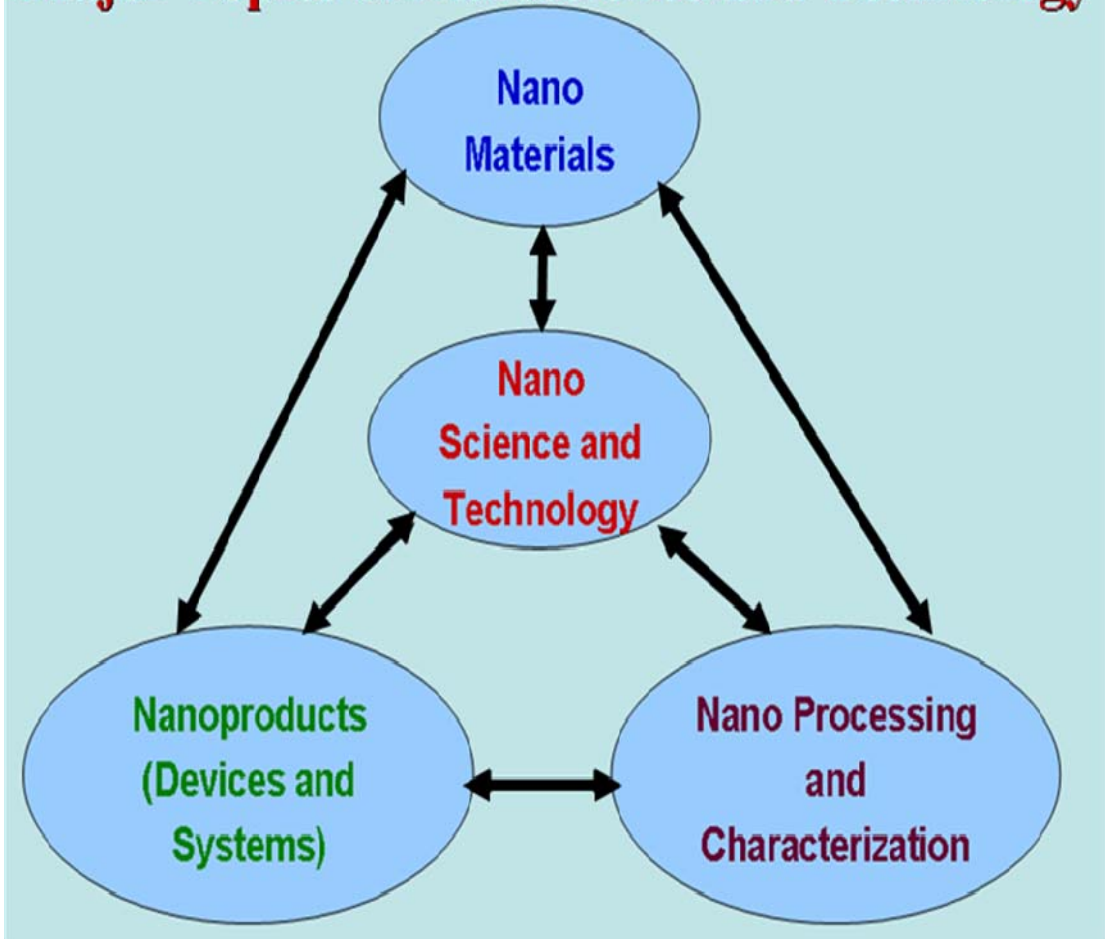


圖 1-1 奈米科技的主要研究重點

## 1-2 生物晶片

### 1-2-1 生物晶片的定義

「生物晶片」一詞起源於 1980 年代，由於電腦晶片的製造，帶動了人類資訊產業的發展，為了提高晶片的產能，晶片的製程將趨向於微小化，此時科學家們興起應用生物分子，與這些微小化晶片結合的想法，以微小化晶片製程技術，整合微機電、材料、化學、生化及生醫工程等領域，並且以其準確性、可平行處理、樣品與化學藥品需求量少、分析速度快及低成本等優點，來進行醫學研究、生物研究、環境監測、食品檢驗的應用。

### 1-2-2 生物晶片分類

生物晶片的種類，[圖1-2所示](#)，依照其特性的不同，可分為：微陣列晶片 (Microarray chip) 以及微處理晶片 (Processing chip)。

微陣列晶片，是將與生物有關的分子，如DNA、蛋白質或細胞組織等，利用小面積、高密度的技術，整齊並且精確地點製在玻璃、矽基板、高分子塑膠等材質上[\[1\]](#)，用來進行大量的樣品檢測。微陣列晶片又依晶片上植入不同的探針物質，可以分成兩大類：基因晶片與蛋白質晶片。

微處理晶片，又稱作實驗室晶片 (Lab-on-a-chip)，是結合電路與微流道 (Micro channel) 結構，[圖1-3所示](#)[\[2\]](#)，於一塊晶片上，以完成混合各種樣品進行反應或分析檢測，就像是一個微型的實驗室。

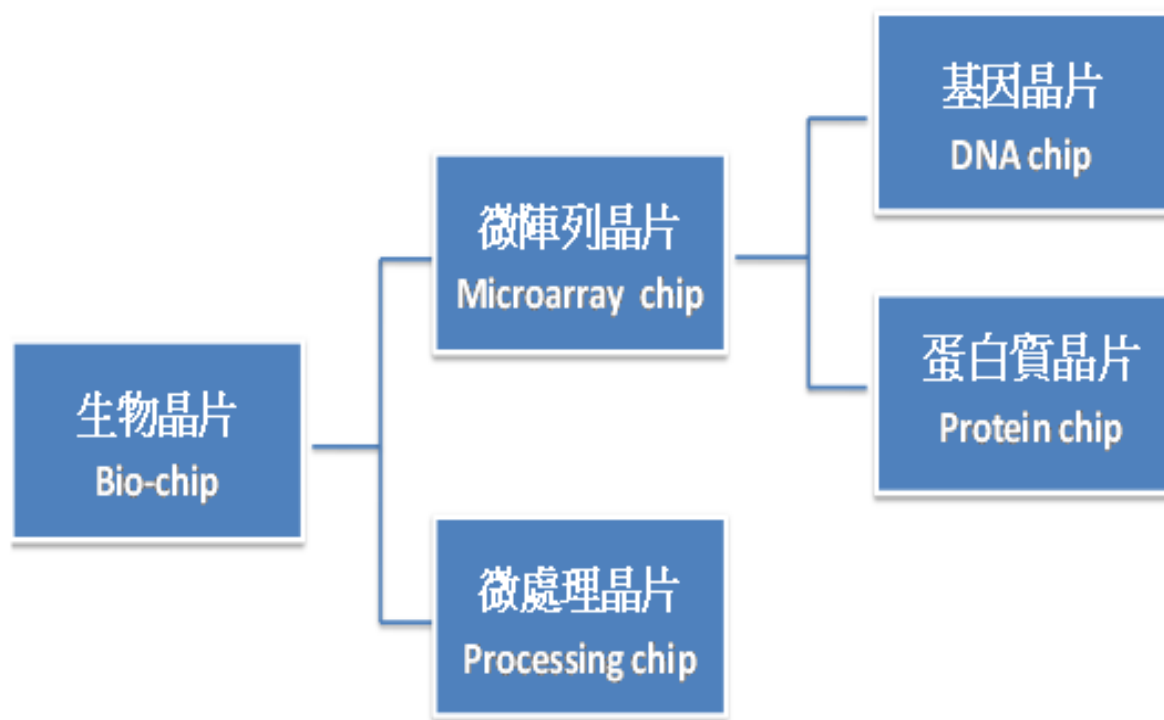


圖 1-2 生物晶片的種類

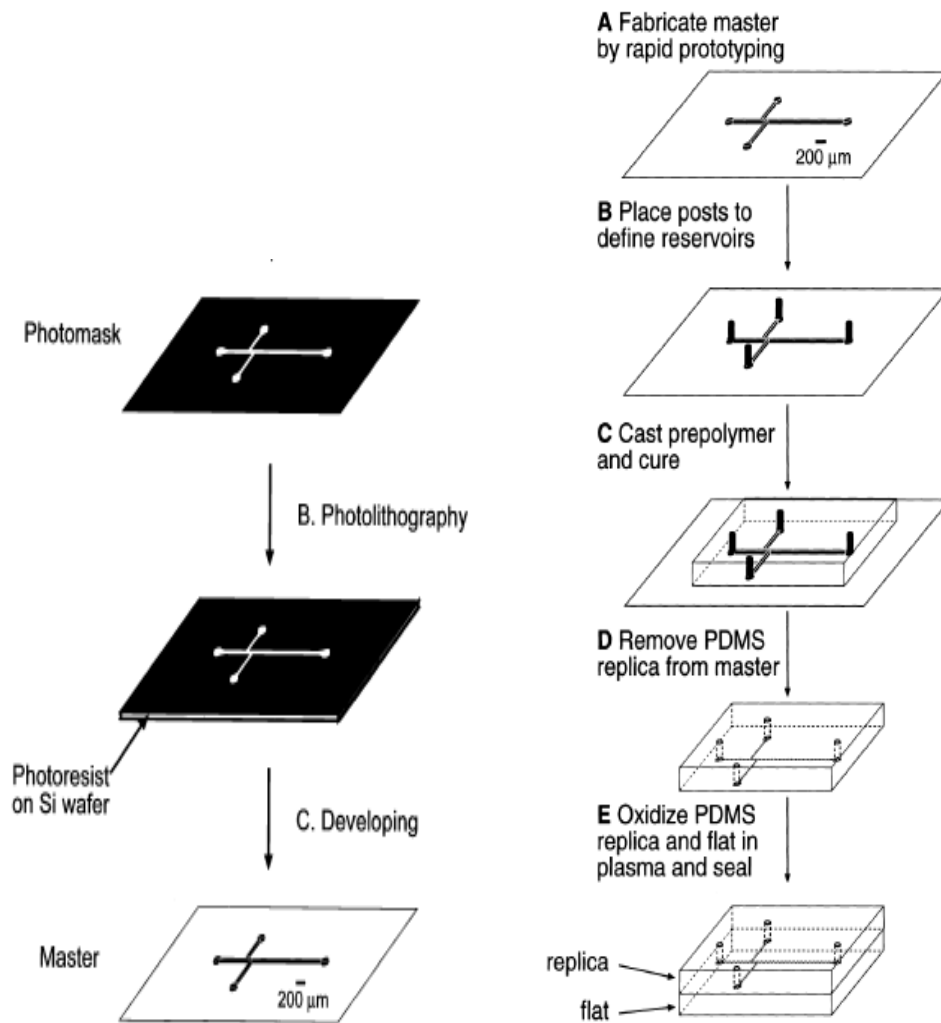


圖 1-3 微流道的製作流程 [2]

### 1-2-3 微陣列晶片

基因晶片(Gene chip；DNA chip)，是以不同序列且已標記的DNA為探針，整齊的排列在晶片上，利用DNA具有的雜合反應性質，將晶片置入受測溶液中，使晶片上的DNA探針和溶液中，具有互補序列的DNA片段產生雜交反應結合，圖1-4所示[3]，來進行樣品檢測。藉由顯微鏡技術觀察，即可從探針上已知排序的DNA片段，推測出受測DNA的排序[4]。

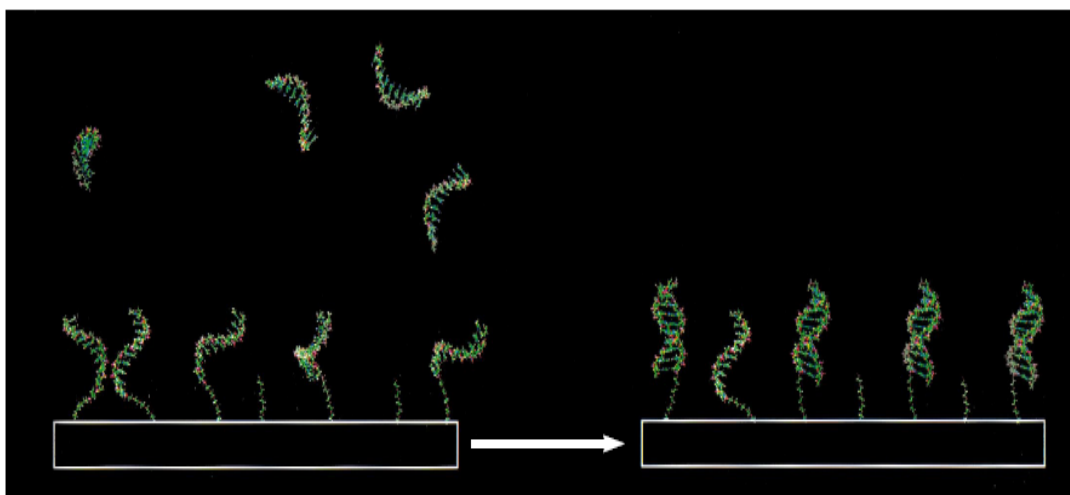


圖 1-4 檢測溶液中與探針 DNA 互補的 DNA 序列[3]

蛋白質晶片(Protein chip)，類似於基因晶片，是以蛋白質當作探針，固定在晶片上，藉著抗原與抗體之間的專一性來檢測，但蛋白質容易失去活性，且三維結構複雜，所以在實際的製作上較困難。製作原理是先把一級抗體固定化於晶片上，接著加入含有抗原的受測物，與這個抗體結合，接著再加入二級抗體，與抗體-抗原的結合物結合，圖1-5所示。因為二級抗體的一側，已先固定上特定酵素，當特定受質加入時，受質就會被這個結合物上的酵素所催化，而釋放出或轉換成有色產物，再利用顯色的方式，就可以測量出受測物中，所含抗原的濃度[1]。

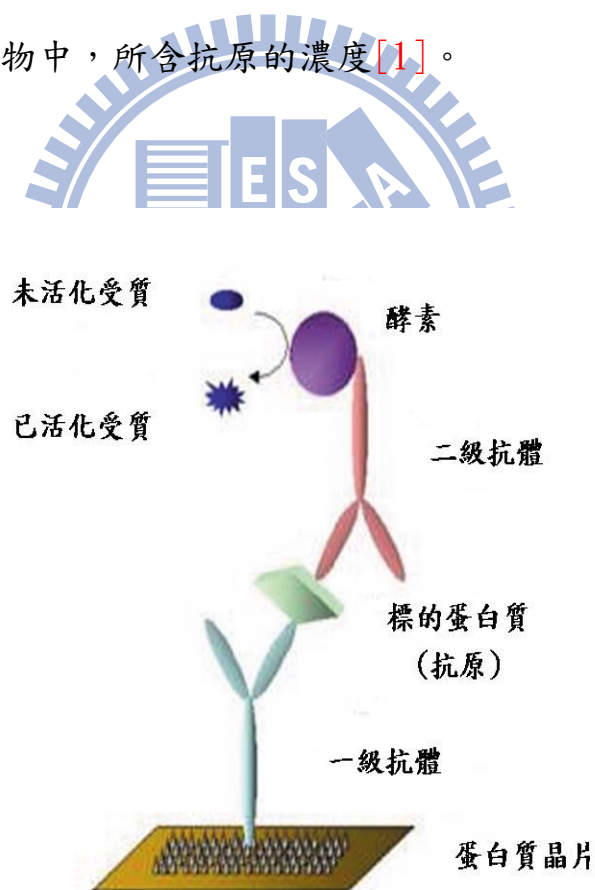


圖1-5 晶片上的蛋白質，被兩個不同的抗體夾在中間 [1]

### 1-3 奈米鑽石

由於大部分的生物分子本身無法發出螢光，或是螢光強度微弱，所以找尋適當的材料，可以與生物分子結合，還可以使用光學方法量測分析的生物標記，在生物檢測上就變得相當重要。

在近代所發明的量子點(Quantum dot)，就常被當為生物標記的材料，因為它經過光源激發後，放射光的強度非常強，而且光穩定度較傳統染料佳[5]，比較不會有光漂白(Photo bleach)現象，經過多年的發展，量子點在生物領域有許多篇幅的應用[6-8]，但是量子點的一大缺點，就是具有細胞毒性(Cytotoxicity)，將之應用在醫藥治療上，這些有毒金屬或離子的釋出，使用在人體上有很大的危險性。

但奈米鑽石是由碳原子組成的，被認為具有低細胞毒性[9-10]、良好的生物相容性、表面容易修飾、光穩定度佳[10]及化學穩定度高等優點，所以適合當做生物標記。奈米鑽石表面包覆了一層疏水性的 C-H 鍵結，不過這些 C-H 鍵結，可以經由強氧化酸( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3=3:1$ )酸洗的步驟，將其氧化成羧基-COOH 或其他含氧官能基，故而變成親水性，而這些修飾後的鑽石顆粒對胺基酸、蛋白質[11]以及 DNA[12]有很強的吸附力。

奈米鑽石薄膜與粉末的光學特性，已有許多實驗團隊量測觀察，拉曼光譜部分，由鑽石的  $\text{sp}^3$  結構產生的訊號會出現在  $1332\text{cm}^{-1}$ ，而鑽石粉末表面通常含有少許石墨的  $\text{sp}^2$  結構會產生  $1350\text{cm}^{-1}$  的 D-band，以及  $1580\text{cm}^{-1}$

的 G-band。但除了  $1332\text{cm}^{-1}$  的峰值之外，量測不同大小的奈米鑽石，如 5nm 及 50nm 會發現在  $1600\text{cm}^{-1}$  觀察到訊號，圖 1-6 所示[13]，另外，也有實驗使用不同的雷射激發波長，量測鑽石薄膜觀察到在  $500\text{cm}^{-1}$  會有一拉曼訊號，圖 1-7 所示[14]；螢光光譜部分，已有實驗量測針對不同波長的光源，對不同大小的奈米鑽石的量測，圖 1-8 所示[13]。

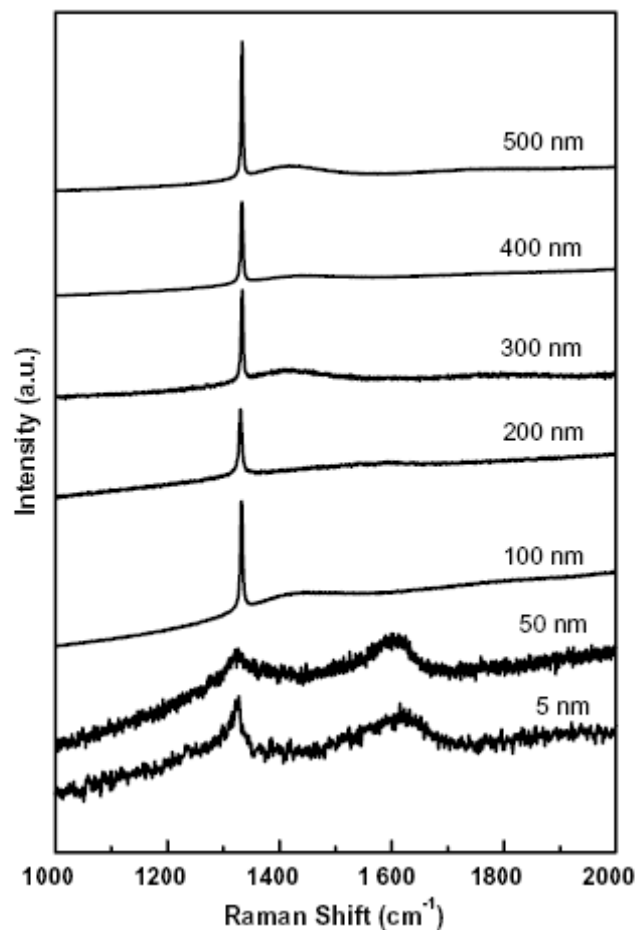


圖 1-6 不同大小的奈米鑽石，在 532nm 雷射光源下，測得的拉曼光譜 [13]



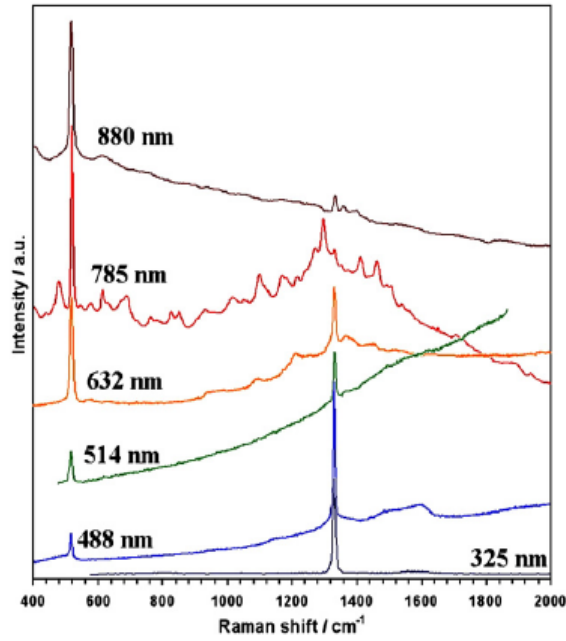


圖 1-7 以不同激發光源，量測厚度約 2 $\mu$ m 鑽石薄膜 [14]

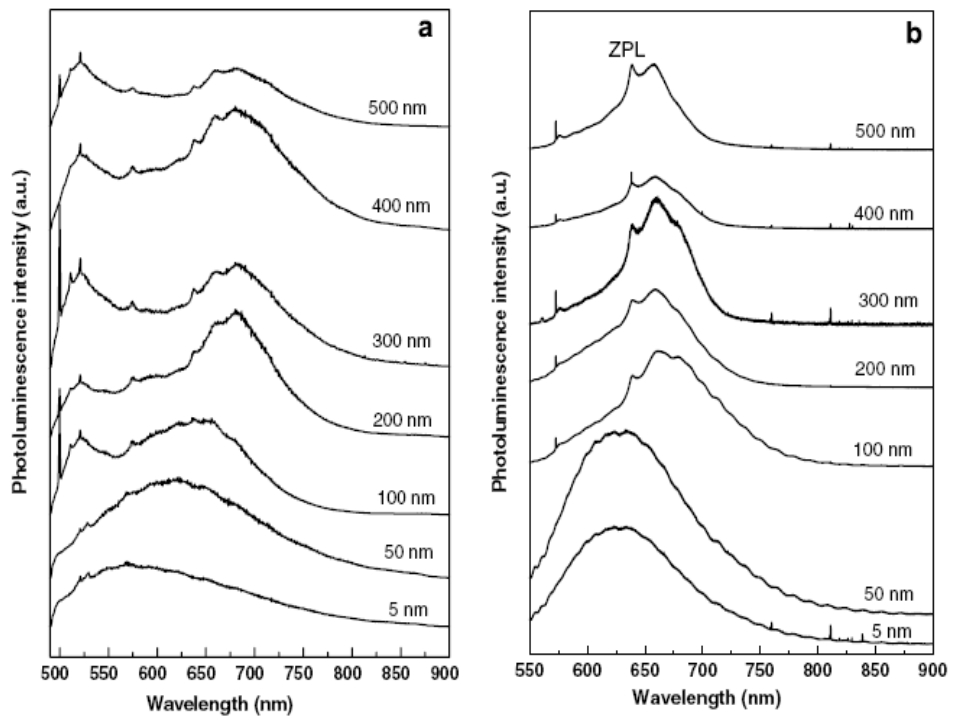


圖 1-8 a. 不同大小奈米鑽石，以 488nm 雷射光源量測螢光光譜

b. 不同大小奈米鑽石，以 532nm 雷射光源量測螢光光譜 [13]

## 1-4 文獻回顧

生物晶片的技術，是許多實驗部分的分工集成一個完整的系統，包含生物分子的選擇、晶片表面的活化步驟以及固定化，訊號的偵測與分析。

生物分子如何固定上晶片表面，就是一個十分重要的課題，其中有兩種簡單的方法：(1)物理吸附法，是利用生物分子與基材之間的凡得瓦爾力 (Van der waals force)、疏水作用 (Hydrophobic interaction)[15]、靜電吸引力 (Electrostatic attraction force)[16]，不過純粹用物理方式的生物分子吸附力，相較於使用化學法的生物分子弱，而且也可能會因為外在的溫度或酸鹼度的改變，而造成分子去吸附；(2)化學鍵結法，是利用生物分子上的胺基酸或某些官能基，例如：離胺酸(Lysine)含有氨基-NH<sub>2</sub>、半胱胺酸(Cysteine)含有硫醇基-SH，與基材進行化學反應而形成共價鍵結。實驗上有時候會先在基材上形成自組裝單層膜(Self-assembled monolayer)，使基板成長上含有特定官能機的一層薄膜，例如：16-mercaptohexadecanoic(16-MHA)含有羧基-COOH，再加入 EDC/NHS 可以與含氨基-NH<sub>2</sub>的山葵過氧酵素(HRP)反應形成醯胺鍵(Amide bond) [17]。

訊號的偵測，是利用生物分子反應作用後，改變電荷變化[18-19]，或光學等變化為量測基準[20-21]。在電荷改變實驗上，G. J. Zhang & J. T. Sheu 等實驗團隊是利用微流道系統，在矽奈米線先長上一層介電層後，再修飾上化合物以及生物分子，造成表面電位差異，圖 1-9 所示[18]，而改

變奈米線的電導值，圖 1-10 所示[19]，形成空乏層模式的金氧半場效電晶體，圖 1-11 所示。

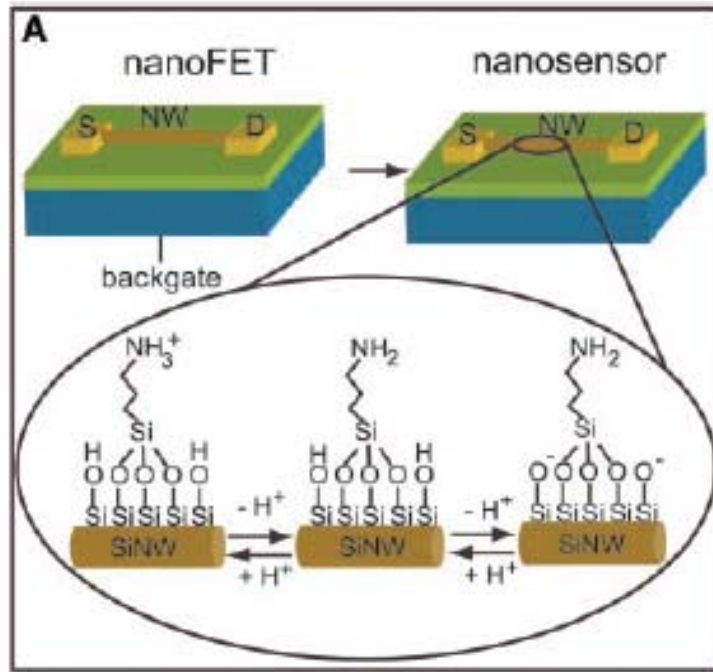


圖 1-9 矽奈米線表面電荷改變[18]

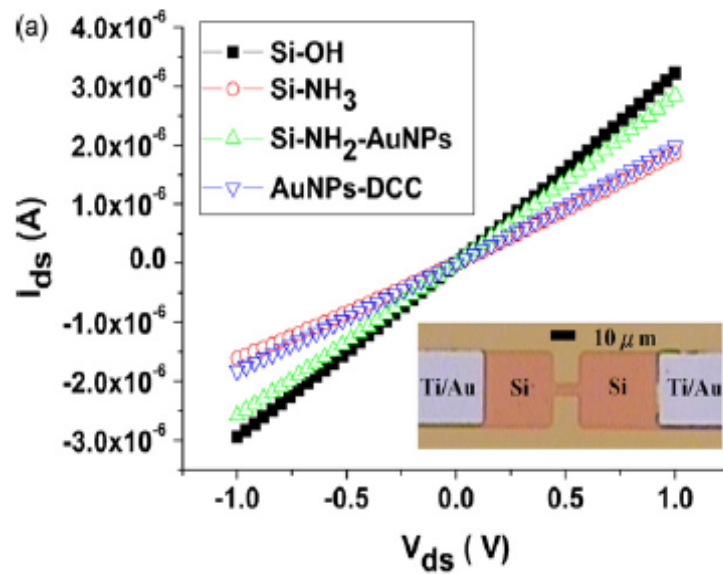


圖 1-10 矽奈米線上修飾不同的化合物，造成電導值的改變[19]

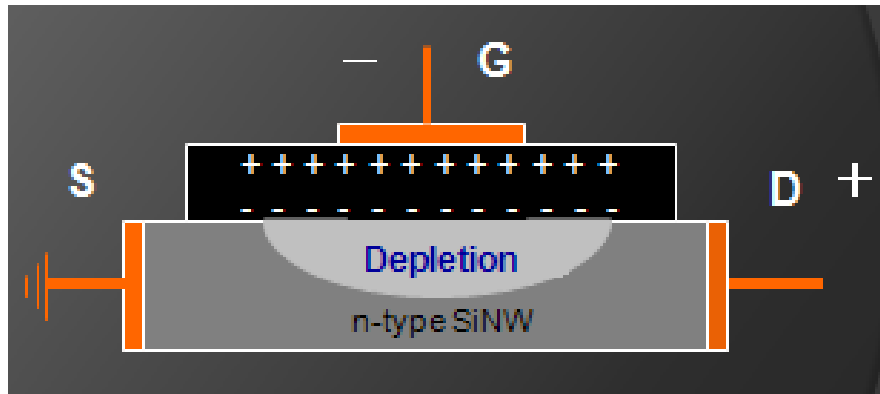


圖 1-11 當表面電荷(閘極 G)改變，空乏區的大小也會跟著改變

而在光學的實驗上，Yujun Song & Vaishali Bagalkot等實驗團隊，是利用 DNA 當作連結平台，當偵測物加入後，連接螢光粒子的 DNA 會分離至溶液中，造成溶液會有螢光訊號，以螢光訊號當作偵測物存在的證明[20]；另外，還有利用量子點以 DNA 連結一個淬滅劑(Quencher)的實驗，當偵測物加入後，淬滅劑會釋出，所以原本放光被淬滅的量子點，後來可以再量到其放光訊號圖1-12所示[21]。

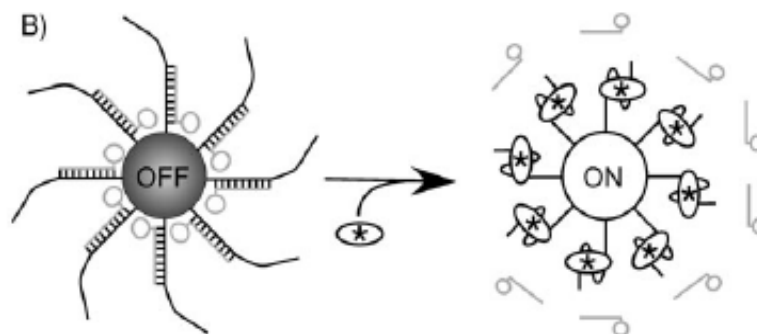


圖 1-12 加入偵測物，抗凝血酵素的 aptamer 會包住偵測物，釋出淬滅劑[21]

## 1-5 研究目的

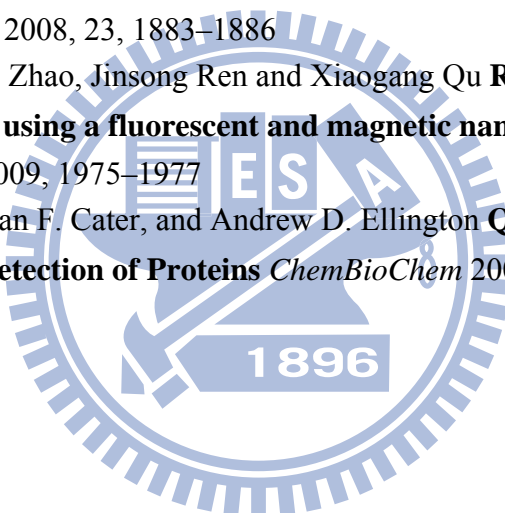
利用奈米鑽石的特性，化學穩定度高、光學穩定度佳、表面容易改質修飾以及對生物分子有很好的吸附力等優點，當成生物連結基材。

本實驗室具有微影製程方面的能力與經驗，配合上高解析度的光學儀器，希望發展製作生物晶片的技術。在本研究先利用電子束微影系統 (Electron Beam Lithography System) 在已塗佈光阻的矽基板上，定義出陣列圖形，再配合上自組裝單層膜的技術，將奈米鑽石整齊的排列在矽基板上，製作成奈米鑽石的陣列晶片。接著，活化鑽石陣列的表面，將一股DNA反應連接上鑽石表面，再將另一股完全互補的DNA反應連接上奈米金粒子，然後把反應後的奈米金溶液，滴在晶片表面進行雜合反應，雜合反應完全後，使用共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy) 去量測晶片反應前後的光學訊號變化。本研究期望利用奈米鑽石-奈米金之間電漿共振的交互作用，當成生物偵測器的量測訊號，未來希望可以建構一個光學量測平台，發展成可實際應用的量測晶片。

## 1-6 參考資料

- [1] 張雅芳、黃正仲，微陣列生物科技，*科學發展月刊*2004年9月381期
- [2] McDonald J.C., Duffy D.C., Anderson J.R., Chiu D.T., Wu H., Schueller O.J., Whitesides G.M. **Fabrication of microfluidic system in poly(dimethylsiloxane)** *Electrophoresis* 2000, 21, 27-40
- [3] Edwin Southern, Kalim Mir & Mikhail Shchepinov **Molecular interactions on microarrays** *Nature Genetics* 1999, 21 No 1s, 5-9
- [4] 王少君，微流體晶片與蛋白質晶片，*科學發展月刊*2003年9月369期
- [5] Marcel Bruchez Jr., Mario Moronne, Peter Gin, Shimon Weiss, A. Paul Alivisatos **Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels** *science* 1999, 281, 2013-2016
- [6] Xiaohu Gao, Yuanyuan Cui, Richard M Levenson, Leland W K Chung & Shuming Nie **In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots** *nature biotechnology* 2004, 22, 969-976
- [7] Chin-Ping Huang, Yaw-Kuen Li, Teng-Ming Chen **A highly sensitive system for urea detection by using CdSe/ZnS core-shell quantum dots** *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 22, 1835-1838
- [8] Chin-Ping Huang, Shu-Wei Liu, Teng-Ming Chen, Yaw-Kuen Li **A new approach for quantitative determination of glucose by using CdSe/ZnS quantum dots** *Sensors and Actuators B* 2008, 130, 338-342
- [9] Amanda M. Schrand, Houjin Huang, Cataleya Carlson, John J. Schlager, Eiji Oh sawa, Saber M. Hussain, and Liming Dai **Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?** *J. Phys. Chem. B Letters* 2007, 111, 2-7
- [10] Shu-Jung Yu, Ming-Wei Kang, Huan-Cheng Chang, Kuan-Ming Chen, Yueh-Chung Yu **Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity** *J. Am. Chem. Soc. Communications* 2005, 127, 17604-17605
- [11] X. L. Kong, L. C. L. Huang, C.-M. Hsu, W.-H. Chen, C.-C. Han, and H.-C. Chang **High-Affinity Capture of Proteins by Diamond Nanoparticles for Mass Spectrometric Analysis** *Anal. Chem.* 2005, 77, 259-265
- [12] Xianglei Kong, L. C. Lora Huang, S.-C. Vivian Liao, Chau-Chung Han, and Huan-Cheng Chang **Polylysine-Coated Diamond Nanocrystals for MALDI-TOF Mass Analysis of DNA Oligonucleotides** *Anal. Chem.* 2005, 77, 4273-4277
- [13] P.-H. Chung, E. Perevedentseva, C.-L. Cheng **The particle size-dependent photoluminescence of nanodiamonds** *Surface Science* 2007, 601, 3866-3870
- [14] P.W. May, J.A. Smith, K.N. Rosser **785 nm Raman spectroscopy of CVD diamond films** *Diamond & Related Materials* 2008, 17, 199-203
- [15] T.S.Huang, Y.Tzeng, Y.K.Liu, Y.C.Chen, K.R.W alker, R.Guntupalli, C.Liu **Immobilization of antibodies and bacterial binding on nanodiamond and carbon**

- nanotubes for biosensor applications** *Diamond and Related Materials* 2004, 13, 1098–1102
- [16] Elena Perevedentseva, Chih-Yuan Cheng, Pei-Hua Chung, Jih-Sian Tu, Yu-Hsin Hsieh and Chia-Liang Cheng **The interaction of the protein lysozyme with bacteria *E. coli* observed using nanodiamond labelling** *Nanotechnology* 2007, 18, 315102 (7pp)
- [17] 陳京瑤 論文: **Self-assembled monolayers technology in protein biochip: Immobilization of horseradish peroxidase on gold-coated chip modified by alkanethiols**, 國立交通大學生物科技研究所
- [18] Yi Cui, Qingqiao Wei, Hongkun Park, Charles M. Lieber **Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species** *Science* 2001, 293, 1289-1292
- [19] J.-T. Sheu, C.C. Chen, K.S. Chang, Y.-K. Li **A possibility of detection of the non-charge based analytes using ultra-thin body field-effect transistors** *Biosensors and Bioelectronics* 2008, 23, 1883–1886
- [20] Yujun Song, Chao Zhao, Jinsong Ren and Xiaogang Qu **Rapid and ultra-sensitive detection of AMP using a fluorescent and magnetic nano-silica sandwich complex** *Chem. Commun.* 2009, 1975–1977
- [21] Matthew Levy, Sean F. Cater, and Andrew D. Ellington **Quantum-Dot Aptamer Beacons for the Detection of Proteins** *ChemBioChem* 2005, 6, 2163 – 2166





## 第二章 實驗技術與原理

### 2-1 微影技術

#### 2-1-1 微影技術簡介

一般在半導體元件的製程上，包含了幾種主要的單元製程，分別是氧化(Oxidation)、微影(Lithography)、蝕刻(Etching)、擴散(Diffusion)、沉積(Deposition)，其中微影製程在半導體製程上，佔有了重要的地位。如何在有限的晶元大小，縮小線寬寫下更多的圖案(Pattern)，以提高元件的密度，進而提高產能產值，一直都是各家半導體公司努力的目標，所以微影技術的提升將影響整個半導體產業發展。

傳統微影技術是使用光學微影，由於光學微影的最小線寬，與光源的波長 $\lambda$ 和數值孔徑NA有關，最小線寬即光學上的解析度(Resolution) $=K_1 \lambda / NA$ ( $K_1$ 為製程參數)，所以可以選擇較短波長的光源以及較大數值孔徑的透鏡來提高線寬解析度。光源的波長已從G-line(436nm)、I-line(365nm)、KrF(248nm)、ArF(193nm)、F<sub>2</sub>(157nm)發展至Ar<sub>2</sub>(126nm)，不過ArF的光源搭配上台積電於2004年底啟用的「浸潤式微影」機台，在製程設備不需要大幅更動下，此技術的突破使得線寬解析度到達65nm世代，甚至進入45nm的世代。但是由於使用光源的波長限制，使得傳統光學微影技術即將到達極限，所以必須開發新的微影技術來接替傳統光學微影技術，例如：極紫外



光(Extreme ultraviolet, EUV)微影、X光微影、電子束(Electron beam)微影、聚焦離子束(Focus Ion beam, FIB)微影、奈米壓印(Nanoimprint)微影等技術，表2-1所示。

以傳統光學微影來說明製作圖案的過程，圖 2-1 所示，首先在基材的表面先塗佈一層光阻(Photo-resist)，光阻又區分為正光阻和負光阻，光源的光在穿透過玻璃材質的光罩後，會照射在光阻上，因為光罩上已經有設計好的圖案，所以基材上的光阻會選擇性的曝光(Exposure)，接著再經過顯影(Dvelop)的步驟，把基材上曝光好的圖案顯現出來。而正光阻和負光阻的差異，正光阻被光照射後，分子結構會分解斷裂並且會溶於顯影劑；而負光阻被照射後，分子結構會加強鏈結並且不溶於顯影劑。不過，負光阻在顯影時，顯影劑會進入以鏈結的負光阻結構，使得負光阻的體積會略微增加，而造成圖案的些許誤差。

表 2-1 微影技術的比較

	技術	圖案產生	曝光模式	曝光範圍	光阻材料	特徵尺寸	產量 (晶圓/時)
寫入	微影	光罩	紫外線 深紫外線 極紫外線	晶圓/10 mm	光敏性	250 nm 180 nm 100 nm	10~50
	全相術	週期性	深紫外線	晶圓掃描	光敏性	150 nm	45~
	聚焦離子束	直寫	離子	0.1~10 mm	薄膜	10 nm	0.1
	X光	光罩	X光	晶圓	光敏性	50 nm	10~40
	電子束	直寫	電子束	0.1~10 mm	光敏性	2 nm	0.1
轉印	奈米壓印微影	模板	熱與壓力	晶圓	熱塑性	10 nm	12~60
	紫外線奈米壓印微影	模板	紫外線	3.5x3.5 mm	光敏性	10 nm	60
	軟微影	PDMS	墨水	晶圓	自組裝	60 nm	10~20

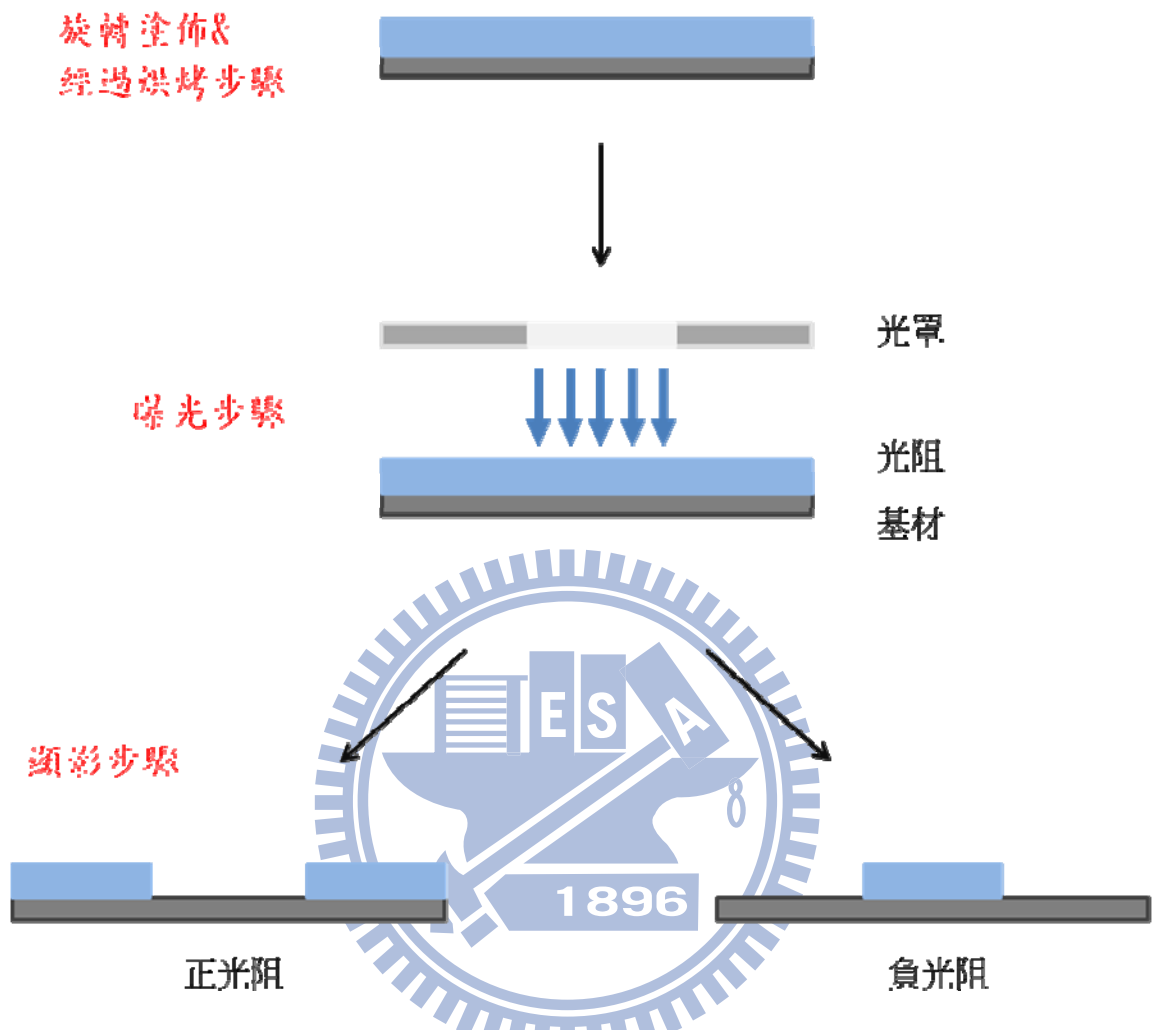


圖 2-1 光學微影製作過程

## 2-1-2 電子束微影系統

電子束微影系統，即是以電子束當作光源的微影技術，根據德布洛伊(de Broglie)物質波公式， $\lambda = h / P = h / (2mE_K)^{1/2} = h / (2mqV)^{1/2}$   
 $= 6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s} / (2 \times 9.11 \times 10^{-31} \text{ kg} \times 1.6022 \times 10^{-19} \text{ C} \times \underline{X} \text{ eV})^{1/2} = 1.23 \text{ nm} / (\underline{X})^{1/2}$ ，其中 $\lambda$ 為電子束的波長， $h$ 為浦朗克常數， $P$ 為動量， $q$ 為電子電荷， $m$ 為電子質量， $V$ 為加速電壓。若電子的加速電壓為10kV，帶入公式計算會得到物質波波長0.0123nm，其解析度遠優於傳統光學系統。電子束微影系統，[圖2-2所示\[22\]](#)，主要包含電子槍、電子束消除器、兩個以上的聚焦透鏡、偏折透鏡、像差校正器、物鏡、移動平台、電子偵測器、真空控制器等等。以下略為介紹電子束的發射源：一為熱游離發射源，原理是電流加熱電子槍，使電子克服功函數能障而游離，常見的材料為鎢絲、鈦化處理鎢絲、六硼化鏷；二為場發射源，原理是利用極強的電場，降低針狀金屬的功函數，電子因穿隧效應脫離，常見材料為鎢絲和鋯/氧/鎢合金；另外，最後一種是場發射，同時也對電子槍加熱的方式，被稱為是熱(Thermal)場發射以及蕭特基(Schottky)場發射，材料為鎢絲和氧化鋯/鎢[\[23\]](#)。

在本篇研究中，我使用了國立交通大學奈米科技中心的電子束微影系統(Electron Beam Lithography System)，型號為 ELS-7500EX，是由日本 ELIONIX Inc.製造，搭載的電子槍為氧化鋯/鎢(ZrO/W)蕭特基場發射源，加速電壓可達 50kV，最小線寬可達 10nm。

以下簡述我的微影製程，我先把製程分為五個步驟：

一.基材晶片清潔。

二.光阻旋轉塗佈並且烘烤。

三.使用的Wecas繪圖程式設計圖形，[圖2-3所示](#)。

四.把塗佈好光阻的晶片，置於微影系統的移動平台後，送入真空腔進行微影過程。

五.把曝光完成的晶片放入顯影液中，選用的顯影液是N-pentyl acetate，顯影結束後用異丙醇沖洗，最後再用氮氣槍吹乾，即完成微影製程。



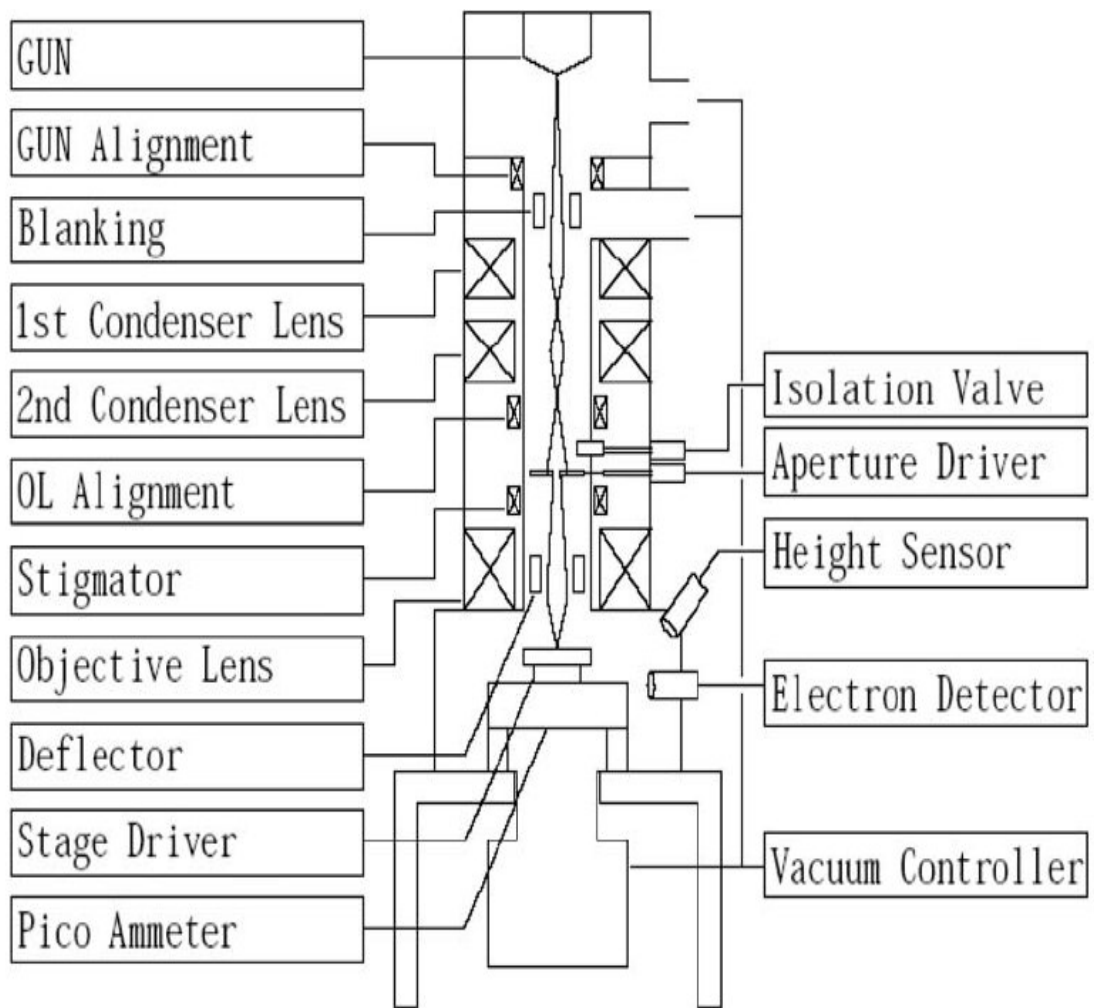


圖 2-2 電子束微影系統構造 [22]

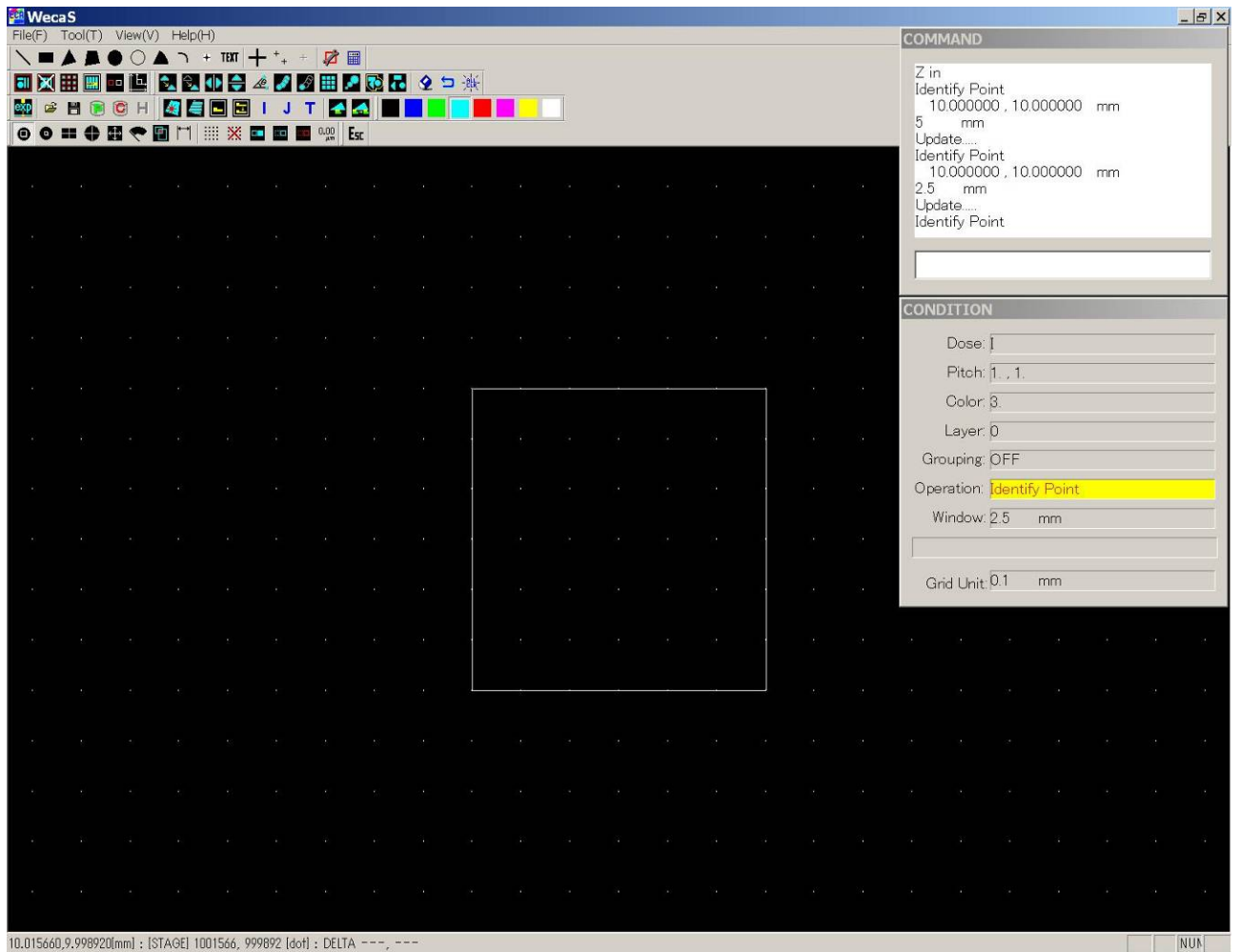


圖 2-3 Wecas 繪圖程式

## 2-2 共軛焦顯微技術

共軛焦，指的是顯微鏡物鏡(Objective lens)的焦點與收光鏡(collector lens)的焦點，兩者焦點位置相互對稱，使得兩個焦點有共軛的關係，因此被稱作共軛焦顯微鏡(Confocal Microscopy)。

共軛焦的基本原理，最早是 Marvin 於 1957 年提出的，但因為當時缺乏適當的激發光源以及精密的電腦控制系統，所以無法將共軛焦的概念付諸實際。不過，到了 1969 年 Paul Davidovits 和 M. David Egger 使用 5 mW 的 He-Ne 雷射當光源，建構了第一台共軛焦顯微鏡[24]。利用 Marvin 共軛焦的設計，激發光會經由物鏡聚焦在樣品的表面上，樣品會受到激發而放出螢光，樣品的螢光訊號會沿著原路徑經過物鏡、分光片(Beam splitter)，最後由收光鏡接收到偵測器(Detector)中，進行光譜分析。因為雷射光源在激發聚焦平面(Focus plane)樣品的同時，也會照射到物鏡聚焦平面以外的區域(Reference plane)並且產生訊號，不過，因為在光路中設置了共焦針孔(Confocal pinhole)的裝置，排除了這些聚焦平面以外區域的訊號，因此偵測系統只會量測到聚焦平面附近的訊號，圖 2-4 所示。

共軛焦顯微鏡可以在聚焦平面上得到清晰之影像，若慢慢地移動聚焦平面，則可取得觀測樣品中一批深淺有序的截面。若將這些截面的數據經過電腦影像處理，即可重組出相對應的三度空間影像。因此，利用光學斷

層掃描而不需要將樣品切片，正是共軛焦顯微鏡最大的優點之一。

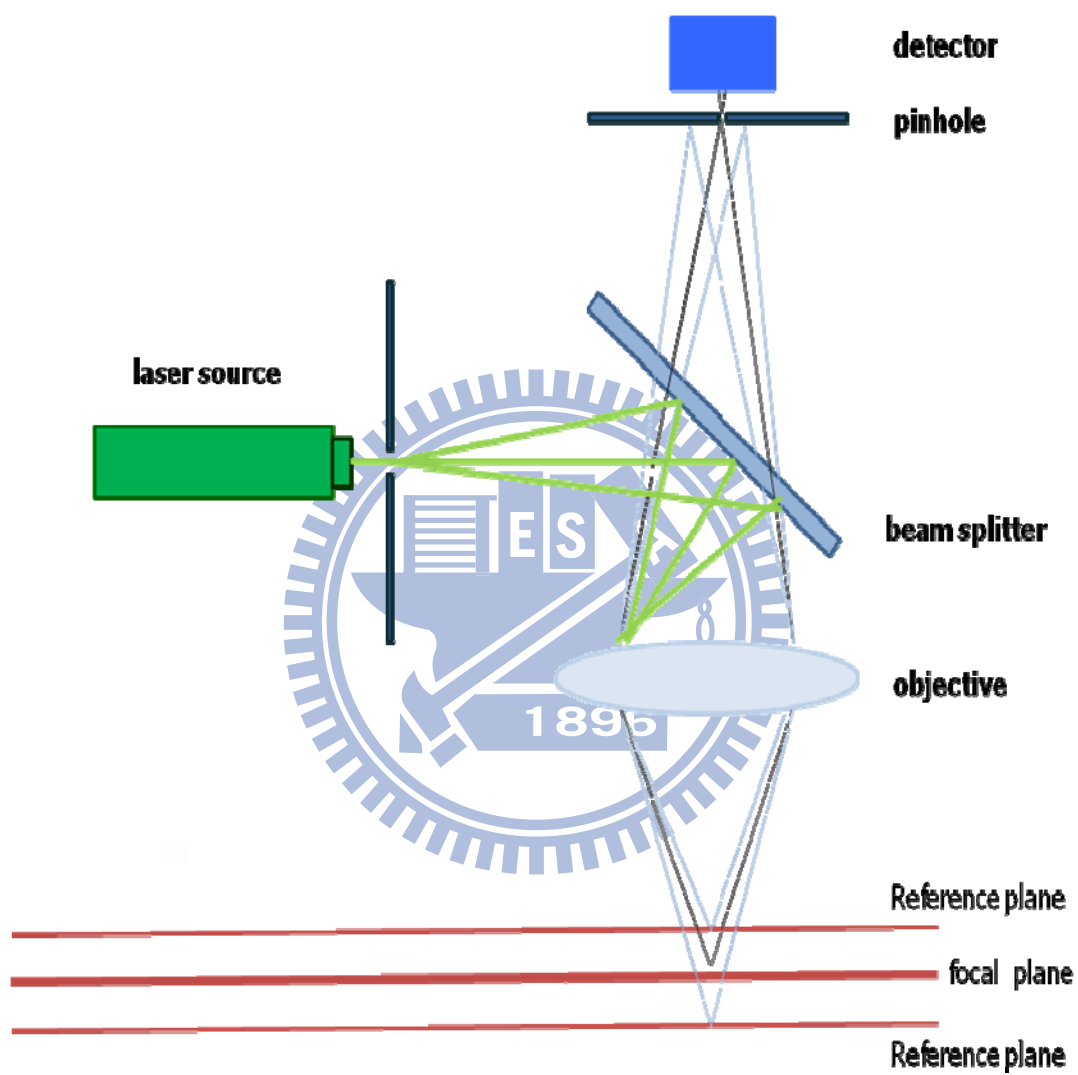


圖 2-4 共軛焦顯微鏡原理架構



傳統光學顯微鏡的解析度，會受到光學繞射極限的限制。根據Rayleigh Criterion，光學顯微鏡可分辨的最小解析度可由Airy光斑，圖2-5所示[25]，來決定：

$d \geq 1.22 \lambda / 2 n \sin \theta = 0.61 \lambda / NA$ ，其中 $\lambda$ 是光波長、 $n$ 為折射係數、 $\theta$ 是光孔徑半角、而 $NA$ 是透鏡數值孔徑。

共軛焦顯微鏡，由於共焦針孔的裝置，可以排除聚焦平面以外的訊號，提高影像的鑑別度，使得橫向解析度較傳統光學顯微鏡更佳，而Airy光斑的大小也相對的較小：

$$d = 0.51 \lambda / NA$$

以傳統光學顯微鏡對樣品作量測，當其偏離聚焦平面時，會產生散焦的現象，對聚焦平面所產生的影像造成干擾，而此時影像中心的強度亦會隨著降低，但經共焦顯微鏡所取得影像的強度隨散焦距離的變化使其比傳統顯微鏡激烈得多，而共焦顯微鏡的縱向解析度，主要來自光源在縱軸方向的深度，而軸向的解析度可表示為：

$$Z_{\min} = 2 \lambda \eta / (NA)^2$$
，其中 $\eta$ 為聚焦平面介質的折射係數。

在本篇研究中，我使用了國立交通大學奈米科技中心的共軛焦顯微鏡，型號是LabRAM HR800，是由法國HORIBA JOBIN YVON公司生產的，內建一台633nm He-Ne雷射，另外還搭載了一個步進式的移動平台，來做XY方向的掃描，再配合上壓電材料控制Z方向的物鏡，可以做XYZ三維的掃

描，透過電腦處理得到樣品訊號的三度空間的形貌或是分析樣品深度的訊號。

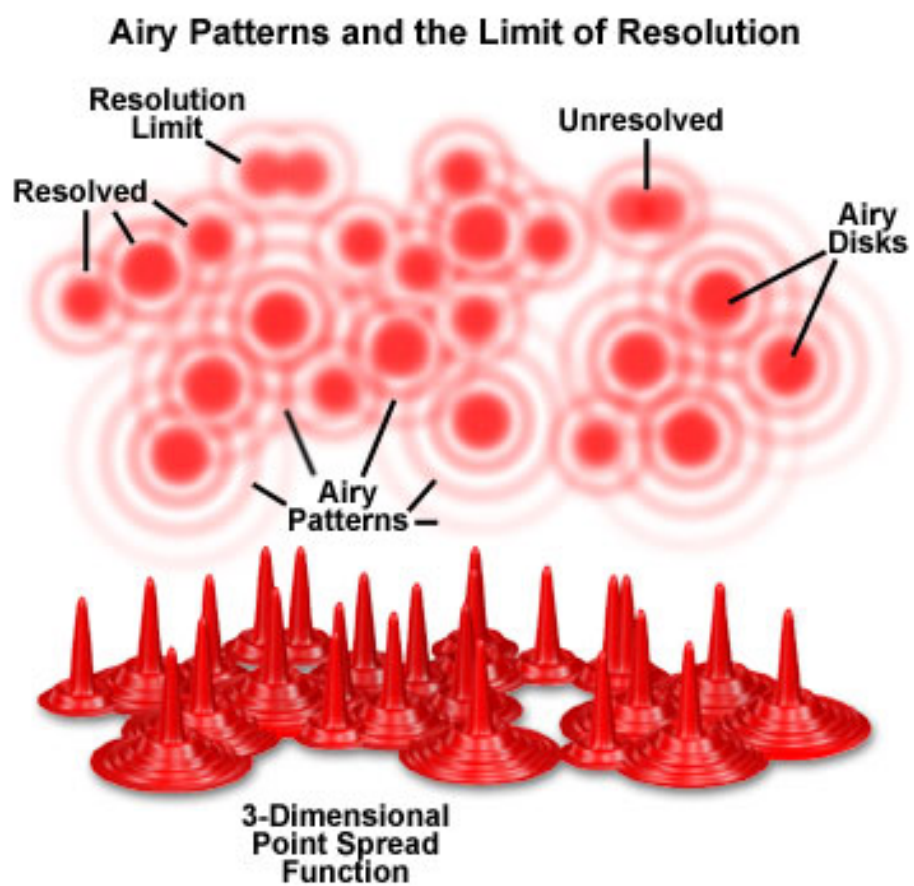


圖 2-5 Airy 光斑與解析度的關係[25]

## 2-3 光激發螢光光譜

光激發螢光(photoluminescence, PL)光譜，是一個簡單快速的方法，用來觀察基材的能階結構和載子躍遷行為。藉著分析螢光訊號，可以從光譜中的特徵峰值，得知基材能階差異、基材所摻雜的雜質種類，或是量子點的尺寸大小等資訊。

以發光量子點為例，當一入射光的光子能量大於QDs的能隙時，此時原本在價帶(即基態)的電子，因為獲得光子能量會躍遷至導帶(即激發態)，並且遺留一個電洞在價帶，形成電子電洞對。但是激發狀態的電子相當的不穩定，它們會經由非輻射放射(non-radiation)的方式，釋放熱能來到導帶的邊緣，最後電子會掉回價帶並且放出螢光，發光過程包含激發、熱平衡、再復合三個過程。整個光激發螢光的機制，如圖2-6所示。

光激發螢光光譜量測的技術，目前已普遍應用於樣品材料的光學特性的研究分析上，用波長固定的光去激發樣品，其放出某一波長的光，利用  $E=h\nu$  公式，即可推算出樣品的能隙  $E_g$ 。

處在高能量態  
不穩定電子  
以聲子或是熱的形式放出能量

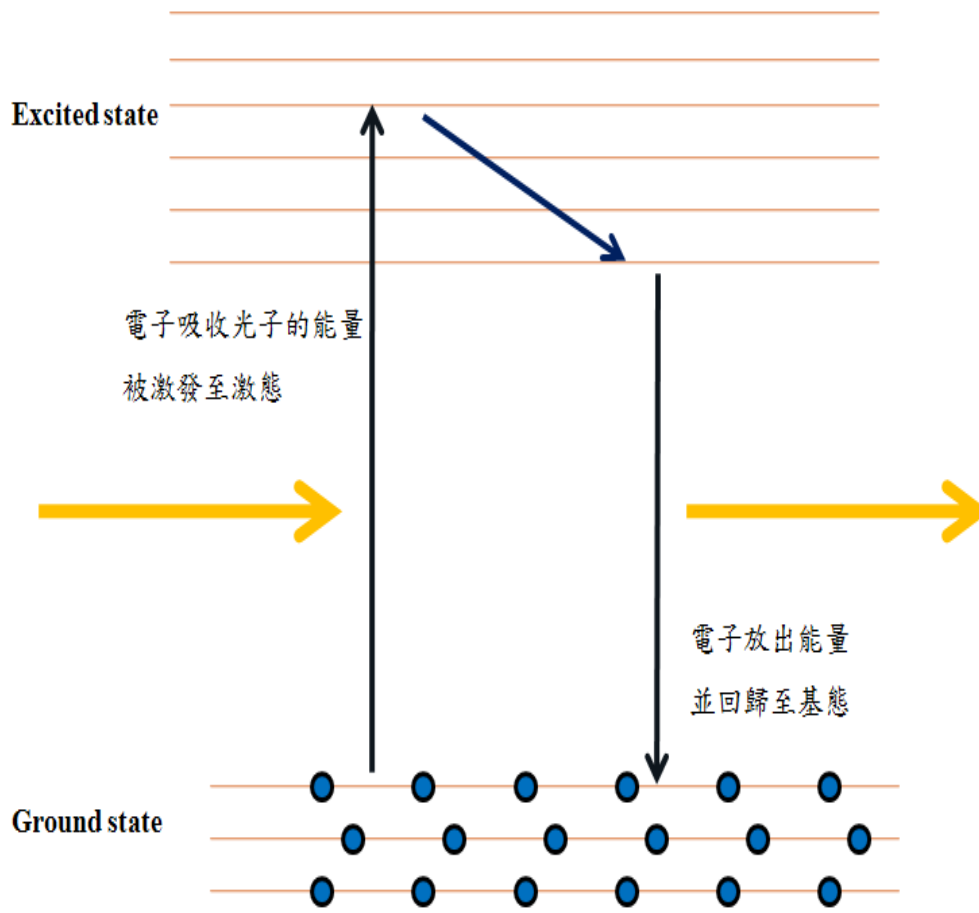


圖 2-6 光激發螢光的機制

## 2-4 參考資料

- [22] ELS-7500EX Electron Beam Lithography System Instrument Manual, ELIONIX Inc.
- [23] 龍文安，半導體微影技術，五南圖書出版股份有限公司
- [24] Paul Davidovits M. David Egger **Scanning Laser Microscope** *Nature* 1969, 223, 831
- [25] <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasresolution.html> **Concepts and Formulas in Microscopy : Resolution**

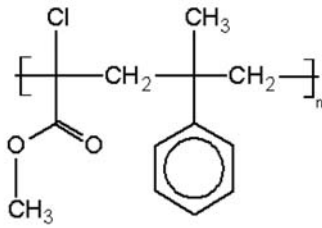


## 第三章 研究方法與基板的製作

### 3-1 實驗藥品與儀器

#### 3-1-1 實驗材料與藥品

(1) Photo resist ZEP520A



，購自 ZEONREX electronic chemicals

(2) Developer N-pentyl acetate(ZED-N50)

$\text{CH}_3\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ，MW:130.19，99%，購自 Alfa Aesar

(3) Remover Dimethylacetamide(ZDMAC)

$\text{CH}_3\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ ，MW:87.12，購自 ZEONREX electronic chemicals

(4) Acetone

$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ，MW:58.08，購自 TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(5) Isopropanol(IPA)

$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ，MW:60.10，購自 TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(6) Nanodiamond

Size:0-0.25  $\mu\text{m}$ ，購自 BAOO WEI International Co., Ltd.

(7) Sulfuric Acid

$\text{H}_2\text{SO}_4$ ，MW:98.08，購自 TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(8) Nitric Acid

$\text{HNO}_3$ ，MW:63.012，購自 TAIWAN MAXWAVE Co., Ltd.

(9) (3-Aminopropyl)triethoxysilane(APTES)

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$ ，MW:221.37，98%，購自 Alfa Aesar

(10) Ethanol

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  , MW:46.07 , 95% , 購自 UNI-WARD Corp.

(11) 2-(4-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate(MES)

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$  , MW:213.26 , 98% , 購自 Alfa Aesar

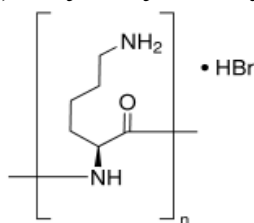
(12) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$  , MW:191.71 , 98+% , 購自 Alfa Aesar

(13) N-hydroxy succinimide(NHS)

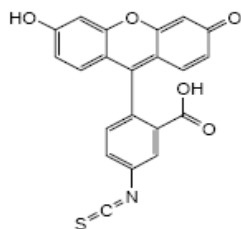
$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$  , MW:115.09 , 98+% , 購自 Alfa Aesar

(14) Poly-L-lysine hydrobromide(PLL)



, MW:15,000-30,000 , 購自 Sigma-Aldrich

(15) Fluorescein isothiocyanate(FITC)



, MW:389.38 , 購自 Thermo SCIENTIFIC

(16) Borate buffer , pH:8.5

購自 Thermo SCIENTIFIC

(17) Dimethyl sulfoxide(DMSO)

$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  , MW:78.13 , 購自 Thermo SCIENTIFIC

(18) 1mM Gold nanoparticles

Size:15-20nm , 交通大學應用化學所李耀坤老師實驗室提供

(19) Sodium chloride

$\text{NaCl}$  , MW:58.443 , 交通大學應用化學所余艇老師實驗室提供

(20)DNA sequence : 5'- H<sub>2</sub>N-GGAATTCCATATGGAATTCC

購自 Bio basic Inc.

(21)DNA sequence : 5'-HS-GGAATTCCATATGGAATTCC

購自 Bio basic Inc.

(22)Phosphate buffered saline(PBS) , pH:7.4

購自 Bio basic Inc.

(23)Restriction enzyme NdeI

交通大學應用化學所李耀坤老師實驗室提供

(24)NEB buffer 2

交通大學應用化學所李耀坤老師實驗室提供

### 3-1-2 實驗儀器

(1)旋轉塗佈機( Spin coater ) , 進行光阻塗佈。

(2) 離心機( Centrifuge )

(3)加熱板( Hot plate )

(4)電子束微影系統( Electron Beam Lithography System , ELS-7500EX ,

ELIONIX Inc. ) , 交通大學奈米科技中心 , 進行微影製程以及掃描式電子顯微鏡觀測。

(5)共軛焦顯微鏡( Confocal microscopy , LabRAM HR800 , HORIBA JOBIN

YVON ) , 交通大學奈米科技中心 , 進行實驗樣品的拉曼以及光激發螢光光譜量測。





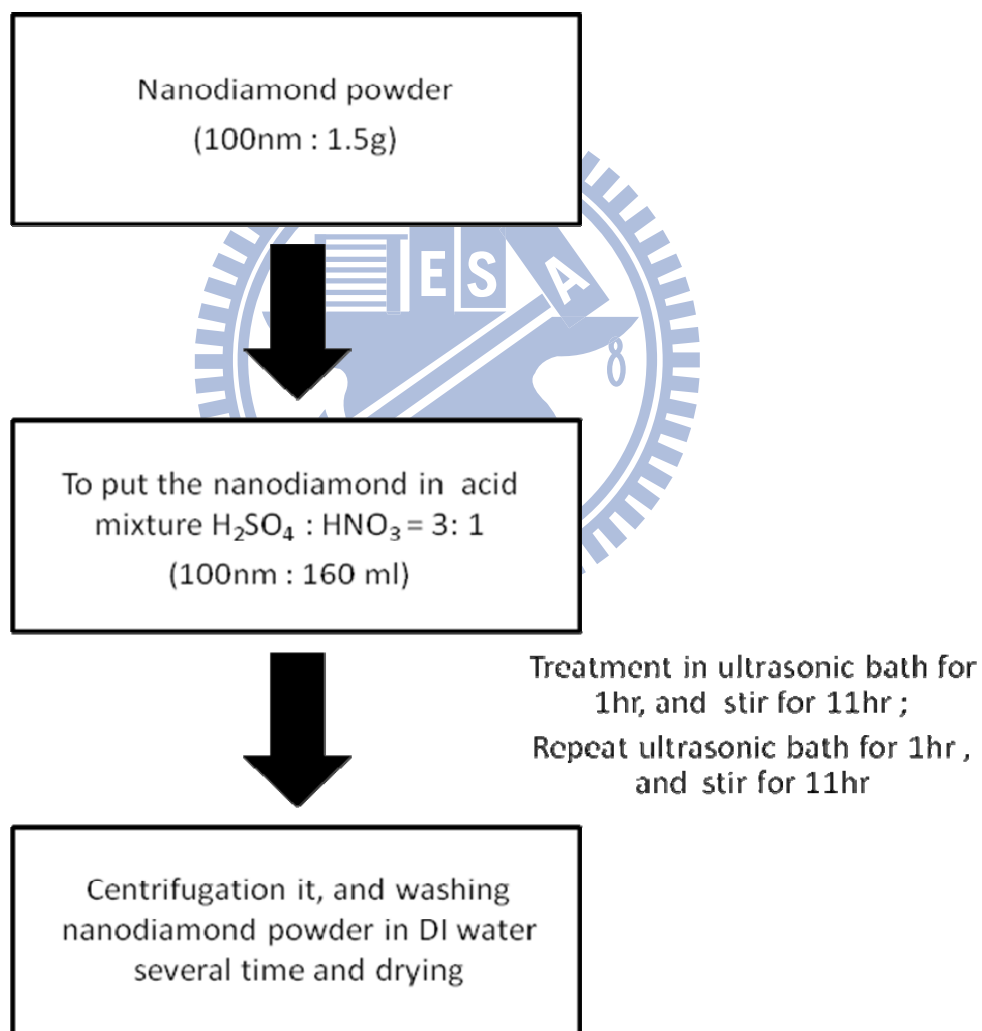
(6)酸鹼度計( pH meter , Microprocessor pH meter SP-2200 , 其電極是使用 Mettler Toledo InLab422 , SUNTEX INSTRUMENTS Co., Ltd. ) , 交通大學應用化學所余艇實驗室 , 進行反應酸鹼值量測。

本篇論文實驗主要分成兩部分：(1)先使用電子束微影系統在已塗佈光阻的基板上，定義出設計好的400nm洞陣列，接著利用經過酸洗步驟的奈米鑽石，以自組裝單層膜以及化學鍵結法的方式，定位於洞陣列之中，然後再將定位完成的晶片與聚離胺酸以及FITC染料反應，最後使用共軛焦顯微鏡量測FITC染料的螢光訊號，未來可以應用於製作微陣列生物晶片。(2) 使用第一部分的製程來製作奈米鑽石的陣列晶片，並利用兩股DNA序列的雜合反應，將奈米金連接上奈米鑽石的表面，接著使用共軛焦顯微鏡去量測定位化的奈米鑽石，在奈米金溶液反應前後的光學訊號變化，未來想利用奈米鑽石-奈米金之間光學訊號的改變，建立生物偵測系統，做成可實際應用的量測晶片。

## 3-2 奈米鑽石的定位化晶片

### 3-2-1 奈米鑽石酸化步驟

奈米鑽石經過強氧化酸酸洗的步驟，可以把表面 $sp^2$ 結構去除，並讓鑽石表面產生羧基-COOH，可以應用到與含有胺基-NH<sub>2</sub>的生物分子鍵結。酸化的步驟則是參考實驗室王鏡堯學長的方式[26]，如圖3-1所示。



The procedure for the functionalization of nanodiamond

圖 3-1 奈米鑽石酸化步驟

### 3-2-2 電子束微影製程定義圖形

#### ◎電子束微影製程定義圖形

在微影製程前，矽晶圓先以化學氣相沉積法，成長約 400nm 厚的二氧化矽層，二氧化矽層的厚度可以藉由觀察晶圓的顏色來得知，如圖 3-2 所示[27]，接著才會進行微影步驟。

基板製作的流程圖如圖 3-3 所示，實驗一開始，我會先將四吋矽晶圓切割成 1.5cm × 1.5cm 大小的正方形破片，實驗的步驟如下：

一.在電子束微影的製程中，為了使光阻塗佈平整，矽基板要先經過清潔的步驟，去除基板表面的微粒髒汙。首先，準備三個乾淨的燒杯分別盛裝適量的丙酮(Acetone)、異丙醇(Isopropanol, IPA)以及去離子水(DI water)，先把晶片置於丙酮中配合超音波震盪機震盪五分鐘，初步去除表面的微粒，接著再把晶片置於異丙醇中配合超音波震盪機震盪五分鐘，異丙醇會把晶片上殘留的丙酮有機溶劑帶走，最後再把晶片置於去離子水中超音波震盪五分鐘，去離子水會把殘留的異丙醇溶劑帶走，最後用氮氣槍吹乾完成清潔的步驟。

二.實驗上所選用的電子阻劑是ZEONREX electronic chemicals所製造的ZEP520A，將清洗好的晶片利用旋轉塗佈的方式，配合適當的轉速得到厚度約300nm的阻劑層，接著晶片要經過180°C烘烤三分鐘，把光阻中溶劑烤乾，等待晶片冷卻後即可進行下一步驟。

三.使用的Wecas繪圖程式設計圖形，設計的圖形如圖3-4所示，整個矽基板破片，包含四個Cross mark和二十個定義圖形：兩個Cross mark之間間隔6mm，每一個Cross mark長為600  $\mu\text{m}$ ，寬為25  $\mu\text{m}$ ，設計Cross mark的目的，是為了在顯影後能夠用肉眼觀察到定義圖形的所在位置，而我設計的定義圖形則是介於兩個Cross mark之間；兩個定義圖形之間間隔距離為1mm，每一個定義圖形包含了四個12  $\times$  12的400nm圓點陣列，每一區圓點陣列外圍有四個長寬皆為5  $\mu\text{m}$ 的方形，設計方形的目的，是為了能輕易的在光學顯微鏡觀察下，找到400nm圓點陣列的位置，而在圓點陣列中，點與點距離為5  $\mu\text{m}$ 。

四.在設計好定義圖形後，把晶片置於微影系統的移動平台，送入電子束真空腔進行微影過程。利用電腦選擇加速電壓50kV、電子束的電流大小600pA、設定欲曝光的圖形座標、控制曝光時間等不同參數，來得到最佳的微影圖案。

五.把曝光完成的晶片置於顯影液N-pentyl acetate中，顯影三分鐘將已曝光的電子阻劑去除，顯影結束後用異丙醇沖洗，最後再用氮氣槍吹乾，即完成微影製程。

六.等待後續將試樣鍵結上基板的反應完成，使用ZEP520A專用的去光阻液ZDMAC來進行去光阻的步驟。將基板浸入裝有ZDMAC的燒杯中，過程中輕微的搖晃燒杯，大約五至十分鐘便可完全去除光阻，最後取出基板

用異丙醇以及去離子水沖洗，用氮氣吹乾即完成陣列晶片的製作。




















Oxide Thickness [Å]	COLOR	COLOR CODE	Color and Comments
500		D2B48C	Tan
750		A52A2A	Brown
1000		B32F79	Dark Violet to red violet
1250		2E73F3	Royal blue
1500		ADD8E6	Light blue to metallic blue
1750		D9ECB3	Metallic to very light yellow-green
2000		F9F9C8	Light gold or yellow slightly metallic
2250		DAA520	Gold with slight yellow-orange
2500		F6853D	Orange to Melon
2750		B32F79	Red-Violet
3000		5D3694	Blue to violet-blue
3100		0000FF	Blue
3250		0083AE	Blue to blue-green
3450		00FF00	Light green
3500		84D82E	Green to yellow-green
3650		84C82E	Yellow-green
3750		E2DE2B	Green-yellow
3900		FFFF00	Yellow.
4120		FFB500	Light orange
4260		FA7FC1	Carnation pink
4430		E82362	Violet-red
4650		B32F79	Red-violet
4760		EE82EE	Violet
4800		5D3694	Blue Violet
4930		0000FF	Blue
5020		008080	Blue-green
5200		008846	Green (Broad)
5400		9ACD32	Yellow-green
5600		ADFF2F	Green-yellow
5740		FFFFD2	Yellow to Yellowish (not yellow but is in the position where yellow is to be expected. At times is appears to be light creamy gray or metallic)
5850		FFDE93	Light orange or yellow to pink borderline
6000		FA7FC1	Carnation pink

圖 3-2 二氧化矽層厚度與晶圓顏色對應圖[27]

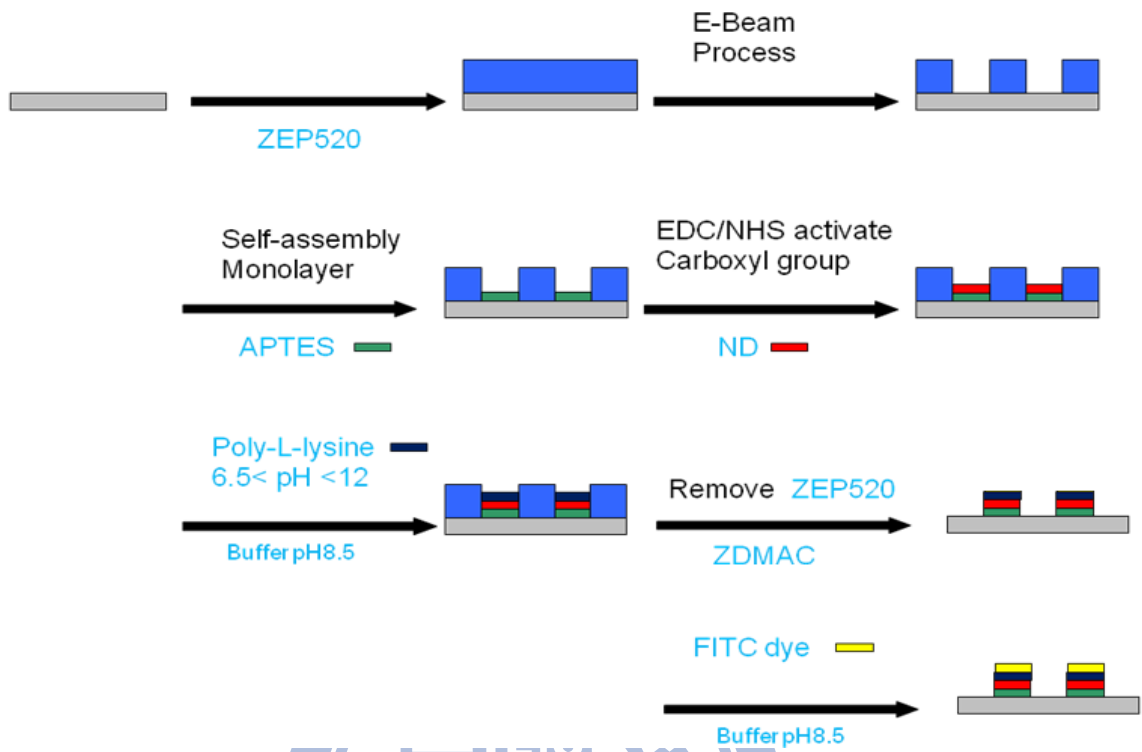


圖 3-3 基板製作流程圖

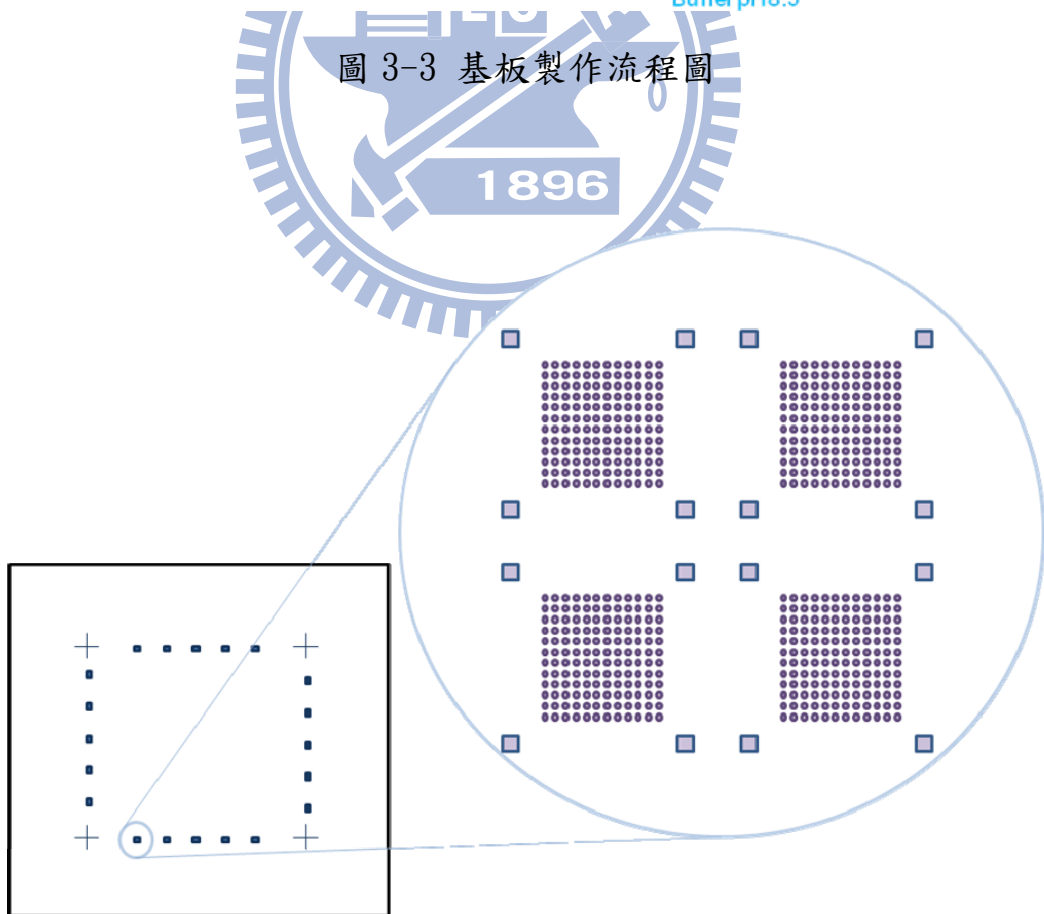


圖 3-4 定義圖形設計簡圖

### 3-2-3 自組裝單層膜與奈米鑽石之定位化

#### ◎自組裝單層膜與奈米鑽石之定位化

在成長薄膜的實驗中，我嘗試了兩種不同的方式在基板表面形成薄膜：旋轉塗佈法、自組裝單層膜；以及使用不同的反應試劑，例如：不同的電子阻劑 PMMA、ZEP520A，不同的溶劑甲醇、乙醇，不同的配置比例 1%、2%、3%、10% 的 APTES 試劑等參數，其中由於不同的溶劑對光阻破壞性皆不一樣，經過測試我最後選擇的是 ZEP520A 搭配乙醇來配置 2% 的 APTES 溶液進行自組裝反應。在實驗步驟中，先將 APTES 溶於 95% 的乙醇溶劑，配合超音波震盪調配成 2 vol% 溶液，把經過電子束微影的基板置入溶液中反應一小時，反應後使用乙醇和去離子水沖洗並用氮氣槍吹乾，沖洗的目的是為了把物理吸附的 APTES 去除，接著基板要經過 120°C 烘烤十分鐘，完成後 APTES 會在定義圖案區內，形成自組裝膜，如圖 3-5 所示。

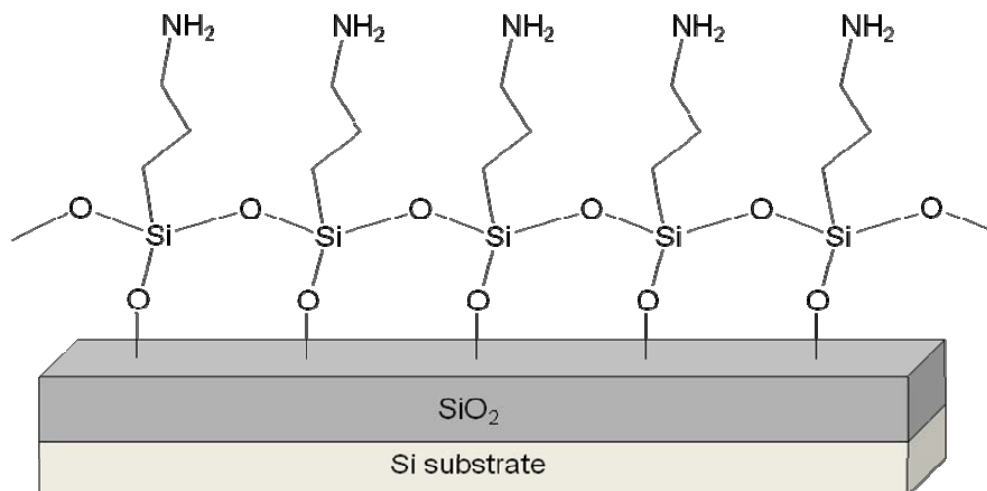


圖 3-5 APTES 自組裝膜



接著，使用 EDC/NHS 試劑[28]活化奈米鑽石表面的羧基，讓羧基容易與 APTES 膜形成醯胺鍵(Amide bond)，反應機構如圖 3-6 所示，進而將奈米鑽石固定在基板之上。

在奈米鑽石定位化的實驗中，在各種試劑的使用也嘗試了許多不同的比例，最後使用較過量的鑽石溶液成功地將其定位於晶片上，實驗步驟所配置的試劑濃度分別是 0.1mM MES buffer、0.025M EDC、0.025M NHS、0.1g 的奈米鑽石分散於 100ml 去離子水，取用適量的比例( MES buffer : ND : DI water : EDC : NHS = 3ml : 6ml : 3ml : 6ml : 6ml )反應一小時後，用去離子水沖洗。

◎在陣列的奈米鑽石上標定 FITC 染料

下一步反應試劑的配置：取 8mg PLL 溶於 20ml Borate buffer，並取 10mg FITC 溶於 1ml DMSO，實驗的步驟是把基板浸入 3ml Borate buffer 後，加入 1ml PLL 溶液反應三十分鐘，完成後使用 Borate buffer 與去離子水沖洗並且進行去光阻步驟。接著，再把基板浸入 2ml Borate buffer 後，加入 0.02ml FITC 溶液在暗室下反應一小時，完成後使用 DMSO 沖洗去除多餘染料，即完成陣列晶片的製作，實驗流程圖如圖 3-7 所示[29]，在光學量測之前實驗樣品會先密封保存在 4°C 的環境下。



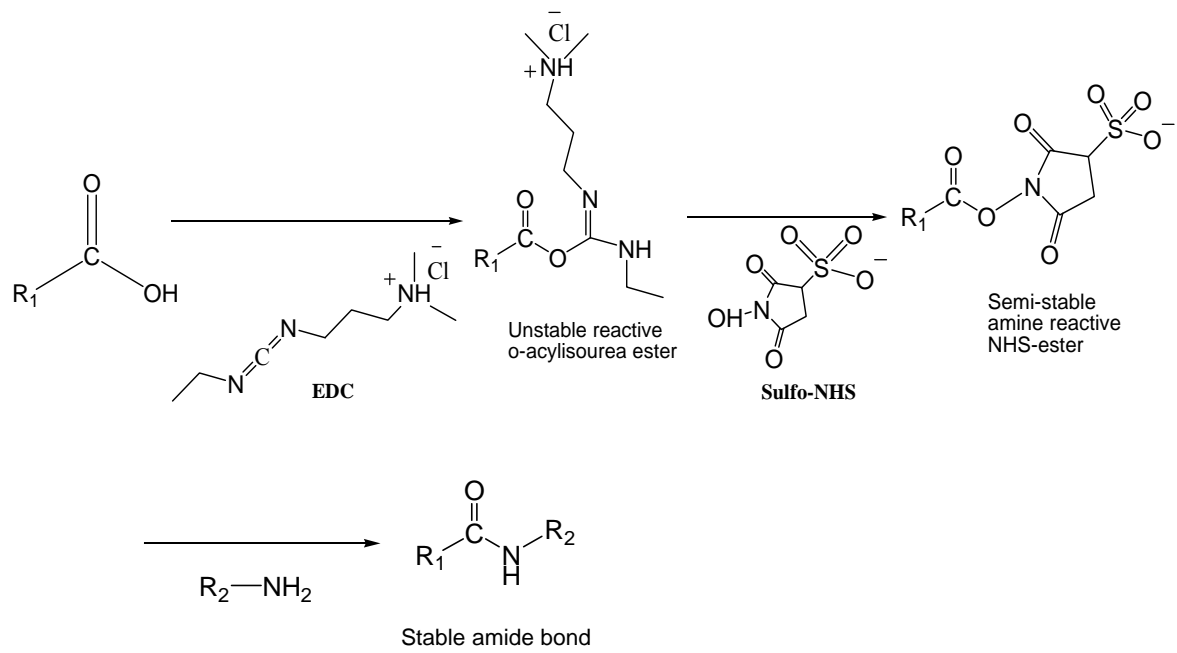


圖 3-6 形成醯胺鍵的反應機構

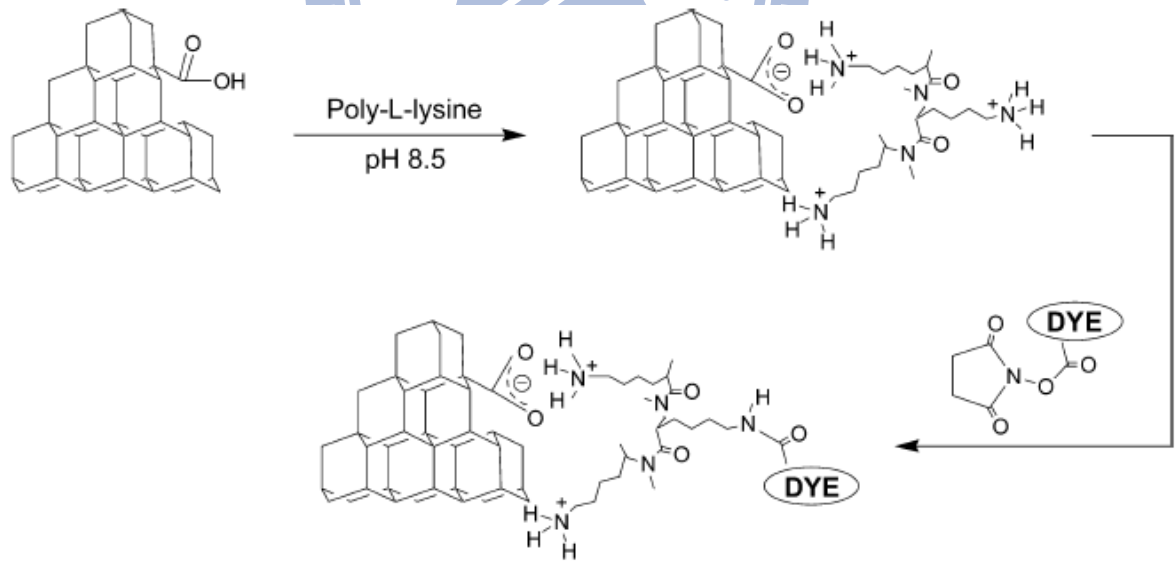


圖 3-7 奈米鑽石上胺基化和染料標定的流程圖[29]

### 3-2-4 結構與光譜量測

在實驗樣品的結構量測部分，我使用電子束微影系統的 SEM 功能，來觀察基板上奈米鑽石的反應鍵結情形。

在實驗樣品的光譜量測部分，我使用共軛焦顯微鏡的光學顯微功能，先用 10 倍以及 100 倍的物鏡找到基板上圓點陣列的位置，並且利用電腦的影像擷取系統記錄下來，接著使用波長為 488nm 和 633nm 的固態雷射聚焦在奈米鑽石陣列點上面，量測拉曼以及 PL 光譜。進一步再利用共軛焦顯微鏡的 Mapping 功能，得到空間對訊號強度的拉曼以及 PL 光譜。



### 3-3 奈米鑽石耦合奈米金的量測平台

#### 3-3-1 奈米鑽石耦合奈米金樣品的製作

##### ◎電子束微影製程定義圖形

實驗樣品的製作與前一部分的實驗步驟相同，我會先在矽晶圓上成長約 400nm 厚的二氧化矽層，並且會將其裁切成  $0.75\text{cm} \times 0.75\text{cm}$  大小的正方形破片，接著才進行微影步驟。

在微影製程步驟，基板要先經過清潔、塗光阻、設計定義圖形、微影以及顯影等，其中設計的圖形，如圖3-8所示，為  $9 \times 9$  的  $100\ \mu\text{m}$  的方形陣列，而在方形陣列中，方塊與方塊距離為  $100\ \mu\text{m}$ 。

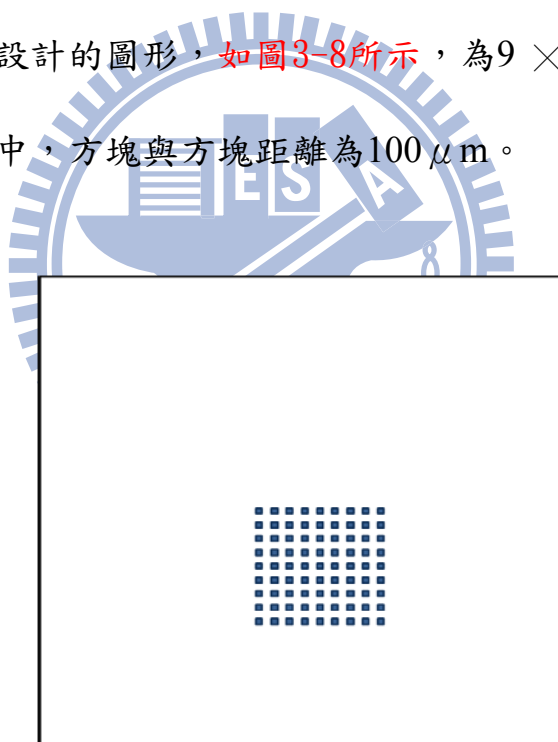


圖 3-8 定義圖形設計簡圖

##### ◎自組裝單層膜與奈米鑽石之定位化

在自組裝單層膜的製程，如前述步驟把基板置入 2 vol% 的 APTES 溶

液中反應。

而在奈米鑽石的定位化製程，使用 EDC/NHS 試劑把奈米鑽石固定在基板之上，反應試劑的濃度如前述步驟，取用適量的比例( MES buffer : ND : DI water : EDC : NHS = 1ml : 4ml : 1ml : 2ml : 2ml )反應。在這個定位化的實驗，以上的反應是在酸性條件下進行，會發現奈米鑽石聚集的情形很嚴重，交通大學應用化學系李耀坤老師建議，可以將反應改成在鹼性條件下進行，並且把鹼性的緩衝溶液濃度調高，以增加緩衝容忍力。反應試劑的濃度分別是 0.05M PBS buffer、0.025M EDC、0.025M NHS、0.1g 的奈米鑽石分散於 100ml 去離子水，取用適量的比例( PBS buffer : ND : EDC : NHS = 3ml : 2ml : 1ml : 1ml )反應一小時後用去離子水沖洗，接著使用去光阻劑 ZDMAC 去除光阻。

#### ◎DNA 雜合反應耦合奈米金粒子

下一步反應為奈米金的耦合，反應試劑的配置：取  $100\ \mu\text{M}$  已修飾上胺基的 DNA 序列 5'-H<sub>2</sub>N-GGAATTCCATATGGAATTCC(以下篇章，簡稱為 DNA1)，配置成  $10\ \mu\text{M}$  DNA1 溶液；取  $10\ \mu\text{l}$  的  $100\ \mu\text{M}$  已修飾上硫醇基的 DNA 序列 5'-HS-GGAATTCCATATGGAATTCC(以下篇章，簡稱為 DNA2) 和  $10\ \mu\text{l}$  的 Gold nanoparticles 反應十二小時，再加入  $40\ \mu\text{l}$  的 0.01M PBS buffer 四小時，再加入  $20\ \mu\text{l}$  的 0.05M NaCl 溶液四小時，再加入一次  $20\ \mu\text{l}$  的 0.05M NaCl 溶液，配置成  $10\ \mu\text{M}$  DNA2 溶液，所配置的 DNA 溶液在使

用前皆保存在 4°C 的環境下。

實驗的步驟是取用適量的比例( MES buffer : EDC : NHS = 0.005ml : 0.01ml : 0.01ml )滴在先前製作的晶片上反應一小時，目的是活化鑽石陣列表面的羧基，再滴 20  $\mu$ l DNA1 溶液至晶片反應一小時，反應完成後用 0.01M PBS buffer 和去離子水仔細沖洗，把未鍵結的 DNA1 沖掉，並且用氮氣槍吹乾。接著，取用 20  $\mu$ l 先前配好的 DNA2 溶液滴在晶片上再加入 0.01M PBS buffer，讓兩股 DNA 進行雜合反應二十四小時，反應完成後用 0.01M PBS buffer 和去離子水仔細沖洗，把未鍵結的 DNA2-Gold NPs 沖掉，並且用氮氣槍吹乾，即完成實驗樣品的製作。

#### ◎純奈米金粒子溶液的對照實驗

經推算可以得知先前耦合金粒子的實驗，滴在晶片上的 DNA2 溶液，當中奈米金粒子的含量為 2  $\mu$ l，所以我取用相等含量的奈米金溶液滴在晶片上，做一個對照組實驗，並且用 SEM 觀察晶片彼此的差異。

#### ◎切斷雜合 DNA 並且去除耦合奈米金粒子

等待製作的實驗樣品進行一系列光譜的測量後，我利用限制酶 NdeI 去切斷已雜合的雙股 DNA，DNA 切斷的部位如圖 3-9 所示。實驗的步驟是取 5  $\mu$ l NdeI 先與 5  $\mu$ l 的反應活化試劑 NEB buffer 2 混合，再加入 40  $\mu$ l 無菌

水，滴在實驗樣品上，在 37°C 的環境下反應 2 小時，最後用去離子水仔細沖洗。



圖 3-9 限制酶 NdeI 的作用部位圖示

### 3-3-2 結構與光譜量測

在實驗樣品的結構量測部分，我使用電子束微影系統的 SEM 功能，來觀察基板上奈米鑽石的反應鍵結情形。

在實驗樣品的光譜量測部分，我使用共軛焦顯微鏡的光學顯微功能，先用 10 倍以及 40 倍的物鏡找到基板上方形陣列的位置，並且利用電腦的影像擷取系統記錄下來，接著使用波長為 488nm 的固態雷射聚焦在奈米鑽石陣列點上面，量測拉曼以及 PL 光譜。

由於我想去量測的是奈米金經由 DNA 雜合反應後，接上奈米鑽石的表

面，所造成的光學訊號改變。所以我在奈米鑽石陣列晶片完成後，就要先量測 PL 光譜；奈米金粒子反應上晶片後，再量測 PL 光譜觀察訊號變化；等到限制酶把雙股 DNA 切斷並把金粒子去除後，再量測 PL 光譜來觀察奈米鑽石-奈米金之間的交互作用。



### 3-4 參考資料

- [26] 王鏡堯 論文: **Optical properties of single nano-diamond particle** , 國立東華大學應用物理研究所
- [27] [http://www.htelabs.com/appnotes/sio2\\_color\\_chart\\_thermal\\_silicon\\_dioxide.htm](http://www.htelabs.com/appnotes/sio2_color_chart_thermal_silicon_dioxide.htm)  
**SiO<sub>2</sub> Color Chart for thermally grown silicon dioxide**
- [28] Alexey Shavel, Nikolai Gaponik, and Alexander Eychmuller **Covalent Linking of CdTe Nanocrystals to Amino-Functionalized Surfaces** *ChemPhysChem* 2005, 6, 449–451
- [29] L.-C. Lora Huang and Huan-Cheng Chang **Adsorption and Immobilization of Cytochrome c on Nanodiamonds** *Langmuir* 2004, 20, 5879-5884





## 第四章 量測結果與討論

### 4-1 定位化晶片的分析量測

#### 4-1-1 實驗樣品的結構量測

第一部分-奈米鑽石(ND)的定位化晶片，在實驗的各個步驟中，以自組裝單層膜與奈米鑽石之定位化為關鍵。

起初我是使用旋轉塗佈的做法，在基板滴上數滴 APTES 溶液並利用旋轉塗佈機，把 APTES 塗佈在整片基板上，不過後來我發現這樣的方式，讓 APTES 層厚度太厚，在經過奈米鑽石固定化以及去光阻的步驟後，會使得過厚的 APTES 層再沾黏回基板上，如圖 4-1 所示。

後來我調配稀薄的 APTES 溶液，並且把基板浸入溶液中，讓基板進行自組裝反應，經由這個方式大大的改善了先前的情況，在 SEM 圖 4-2 即看不到 APTES 膜所造成的沾汙，再經過反應條件的調整，後來製作的奈米鑽石陣列晶片更為完整，如圖 4-3 所示。

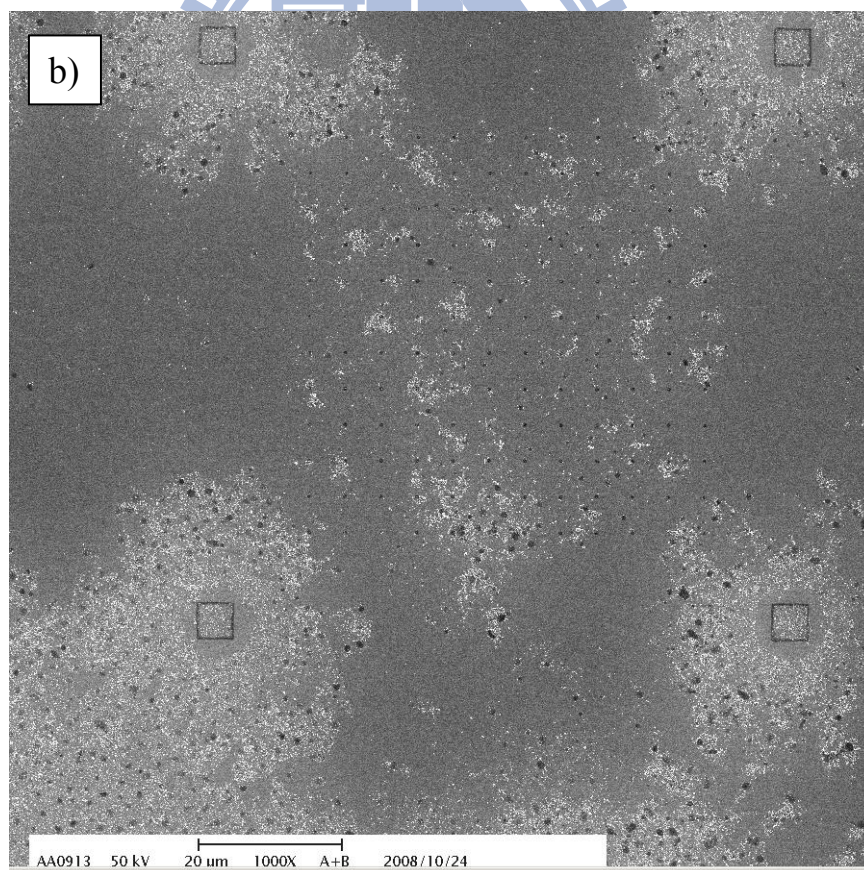
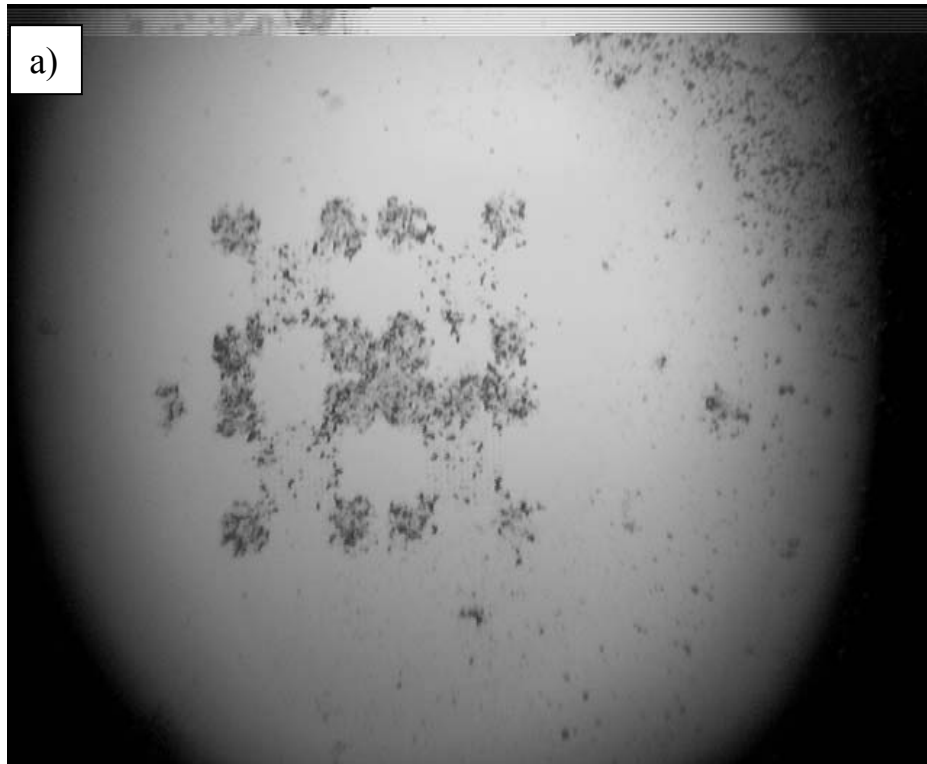


圖 4-1a. 使用旋轉塗佈製作之基板的光學顯微鏡(OM)圖

b. 使用旋轉塗佈製作之基板的掃描式電子顯微鏡(SEM)圖



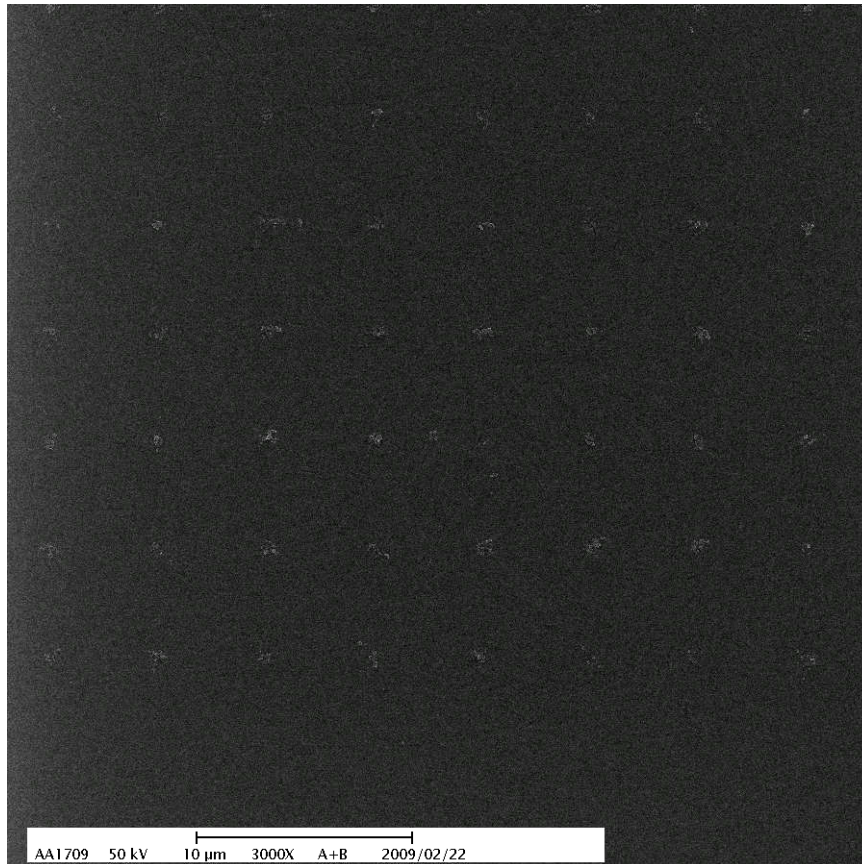


圖 4-2 使用自組裝單層膜製作之基板的 SEM 圖

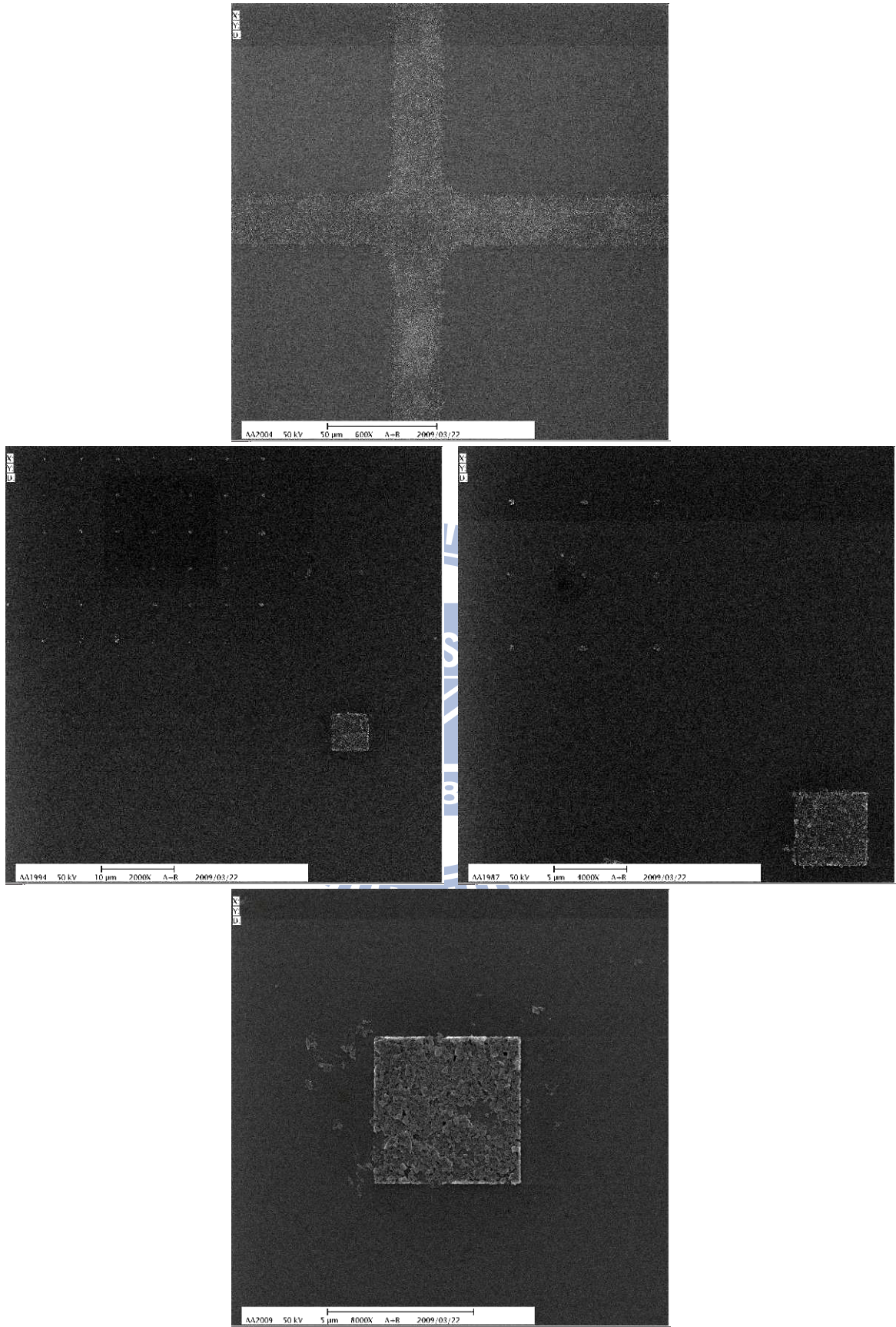


圖 4-3a. ND 晶片記號區域的 SEM 圖



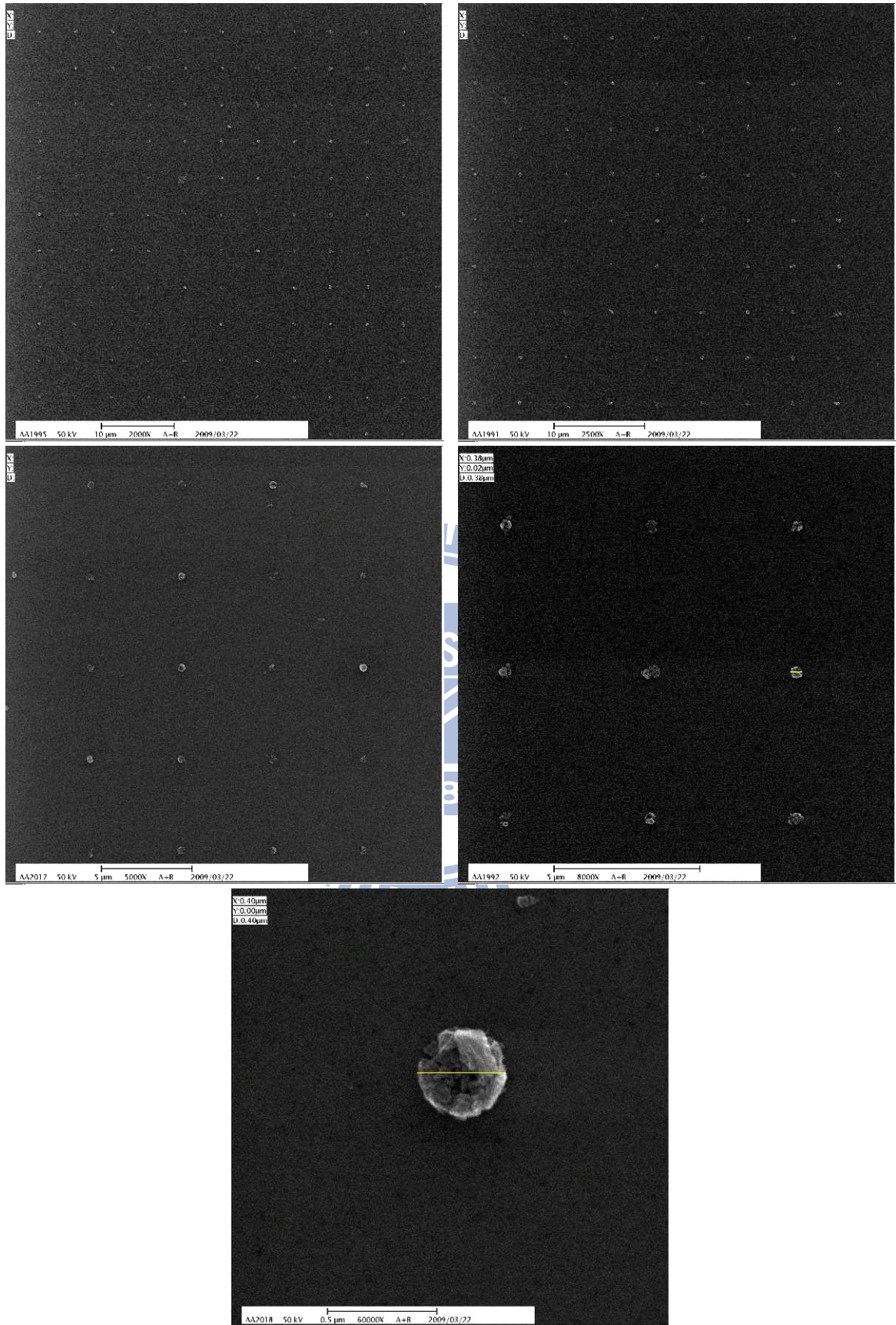


圖 4-3 b. ND 晶片陣列區域的 SEM 圖

## 4-1-2 實驗樣品的光譜量測

除了用 SEM 來觀察陣列晶片的結構外，另外我使用了實驗室的共軛焦顯微鏡 LabRAM HR800 來量測光譜，利用奈米鑽石在拉曼光譜特有的  $1332\text{cm}^{-1}$  訊號，來確認奈米鑽石定位化反應的成功與否。我先使用光學顯微鏡 10 倍的物鏡，找到基板上 Cross mark 的位置，接著再利用 100 倍的物鏡找出圓點陣列，並用影像擷取系統記錄下來，光譜的量測上我使用兩種不同的雷射光源，聚焦在先前找到的陣列點上，並且用程式設定共焦針孔的大小、選擇的光柵、CCD 接受訊號的積分時間、量測波段範圍以及 Mapping 的區域等參數，來得到拉曼圖譜(其中的光柵參數設定為 600)，**圖 4-4 所示**(量測的參數：632nm 雷射光源、共焦針孔  $150\ \mu\text{m}$ 、積分時間 180 秒、量測波段  $1200\text{-}1550\ \text{cm}^{-1}$ 、Mapping 點的數目為一個方塊區域共 144 個點)，**4-4(a)**是陣列晶片設定 Mapping 一個方塊區域的 OM 圖；**4-4(b)** 已用程式鎖定之  $1332\text{cm}^{-1}$  訊號的強度對 XY 空間位置的 Mapping 圖。**圖 4-5 所示**(量測的參數：488nm 雷射光源、共焦針孔  $200\ \mu\text{m}$ 、積分時間 180 秒、量測波段  $1100\text{-}2000\ \text{cm}^{-1}$ 、Mapping 點的數目為一直線共 15 個點，其中有 7 個點為 ND 存在的點)，**4-5(a)**是陣列晶片設定 Mapping 一直線的 OM 圖；**4-5(b)**訊號強度、量測波段對 X 軸 Mapping 圖，在圖中可以明顯看到  $1332\text{cm}^{-1}$  的訊號值；**4-5(c)** 已用程式鎖定之  $1332\text{cm}^{-1}$  訊號的強度對 X 軸位置的 Mapping 圖，我們可以看到訊號的距離為  $5\ \mu\text{m}$ ，即是微影系統所設定的距

離。經由 Mapping 實驗的結果，可以再次證明定位化步驟的成功。

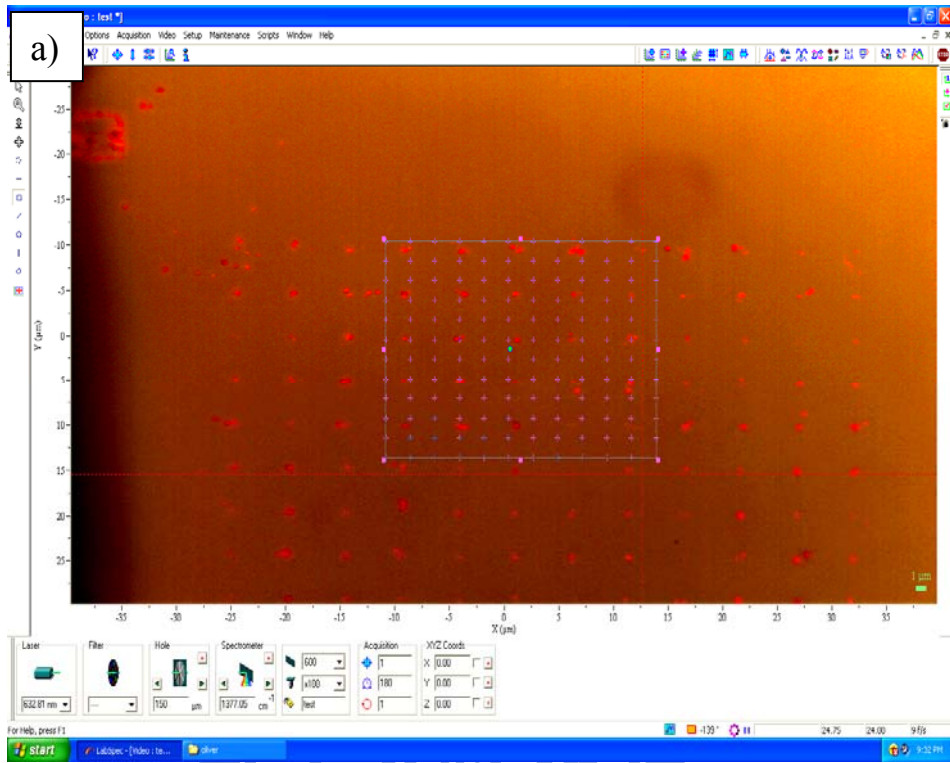


圖 4-4a. 陣列晶片設定 Mapping 區域的 OM 圖

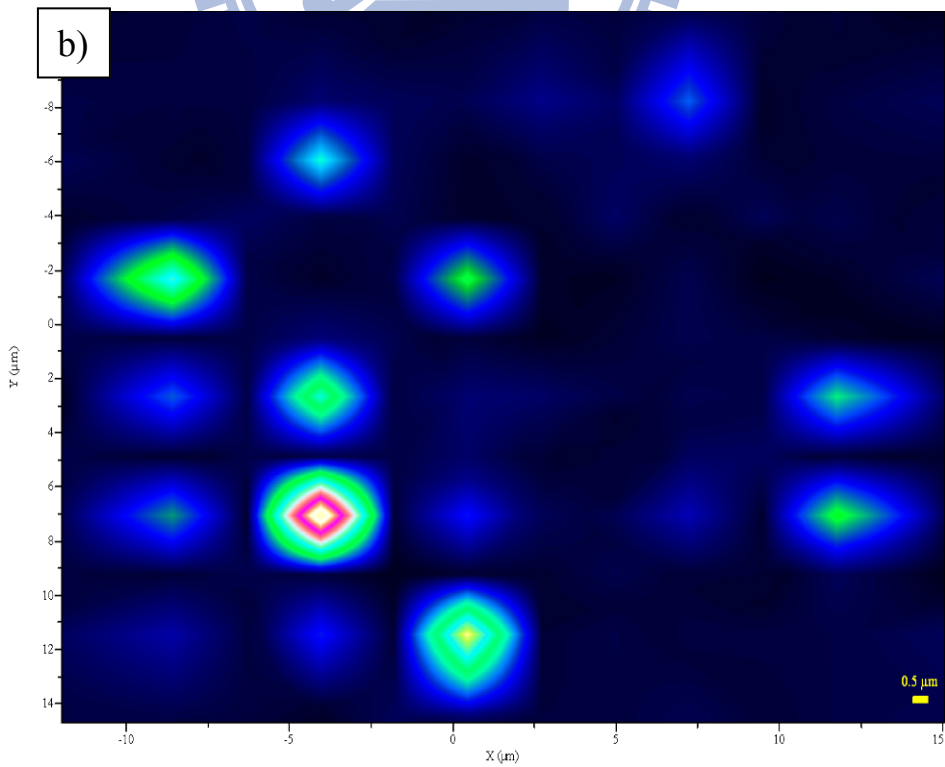


圖 4-4b. 與 OM 圖對應的 Mapping 圖



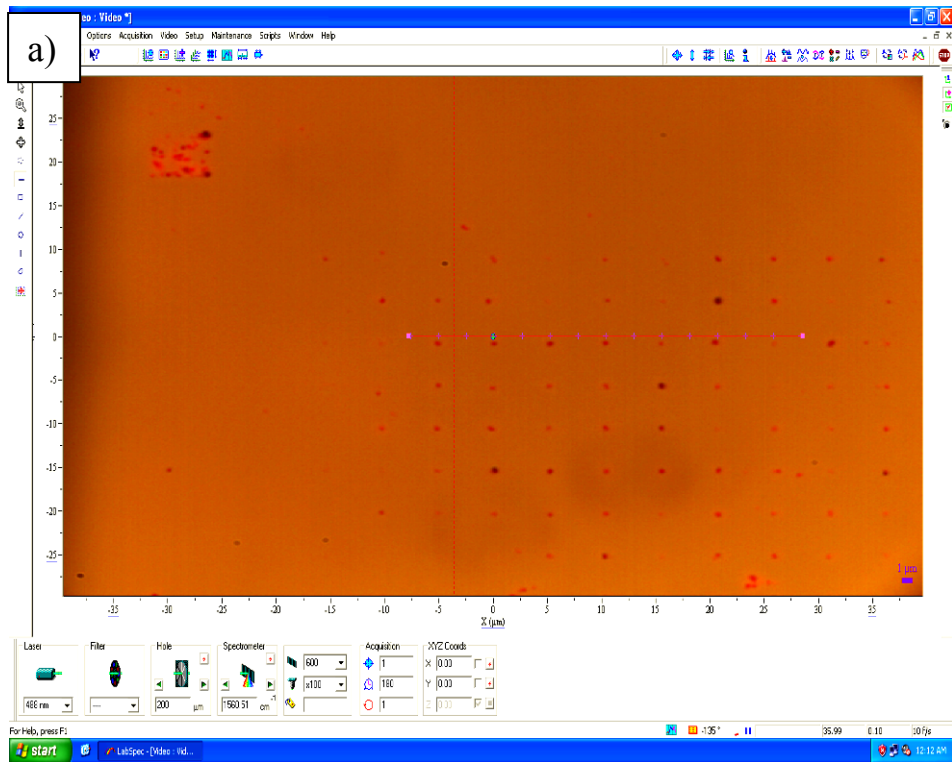


圖 4-5a. 陣列晶片設定 Mapping 區域的 OM 圖

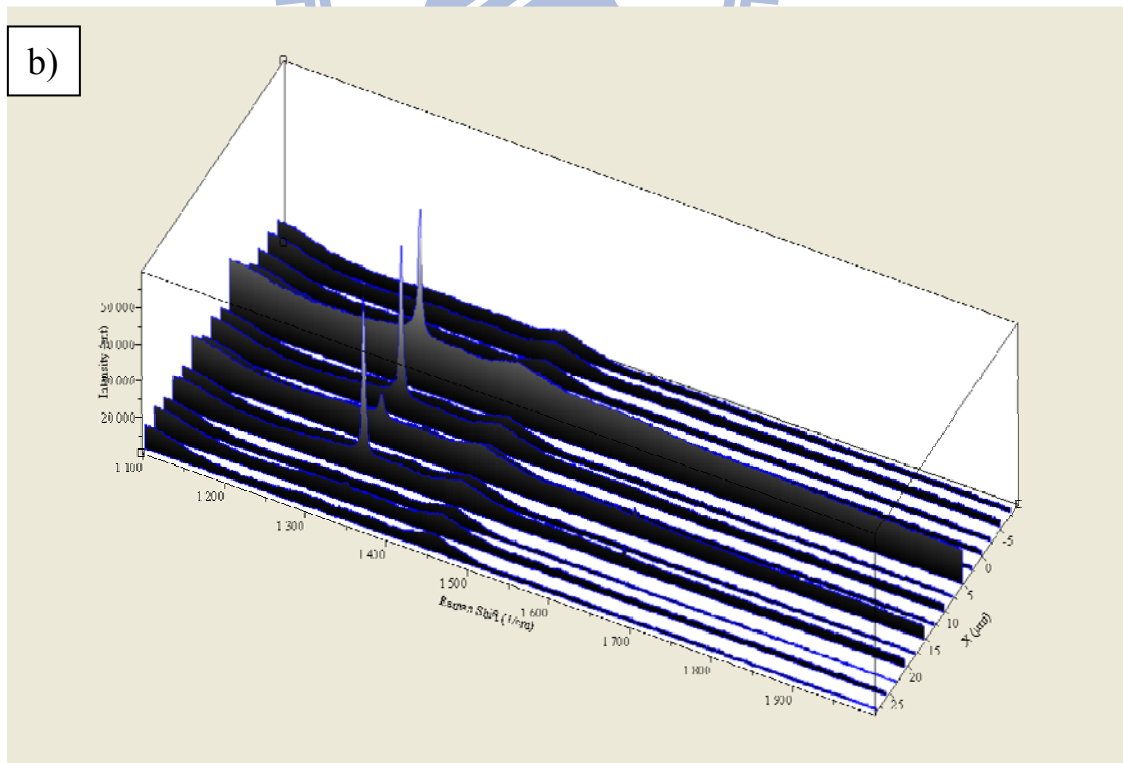


圖 4-5b. 與 OM 圖對應的 Mapping 圖



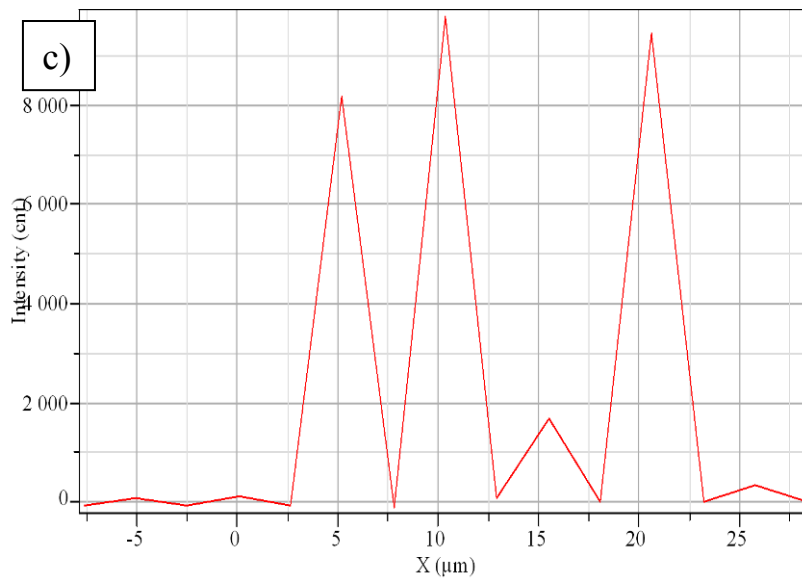


圖 4-5c. 已鎖定訊號的強度對 X 軸位置的 Mapping 圖

接下來所做的實驗，是為了要確認我們製作的 ND 陣列晶片，可以與生物分子鍵結並應用於製作生物陣列晶片，實驗上我使用含有許多胺基的聚離胺酸，與含有許多羧基的奈米鑽石陣列作用，接著再使用 FITC 染料去標定聚離胺酸，利用量測 FITC 的 PL 訊號來確認生物分子鍵結反應的成功與否。

在光譜上，量測的波段是 FITC 染料受光源激發後放光的波段 (Ex/Em wavelength: 494/518 nm)，我一樣是利用 Mapping 的實驗量測晶片上一直線的陣列位置，如圖 4-6 所示 (量測的參數：488nm 雷射光源、共焦針孔  $300\ \mu\text{m}$ 、積分時間 360 秒、量測波段 515-700 nm、Mapping 點的數目為一直線共 7 個點，其中有 4 個點為 ND 存在的點)，4-6(a) 是陣列晶片設定 Mapping 一直線的

OM圖；4-6(b)訊號強度、量測波段對X軸Mapping圖，由圖譜的結果可以看到只有在有陣列圖形的位置上，才量的到FITC染料的訊號，基板上其他位置上則否，證明我們所製作的陣列晶片，的確可以與生物分子作用鍵結，之後我會以第一部分的實驗結果來建構可應用的光學量測平台。



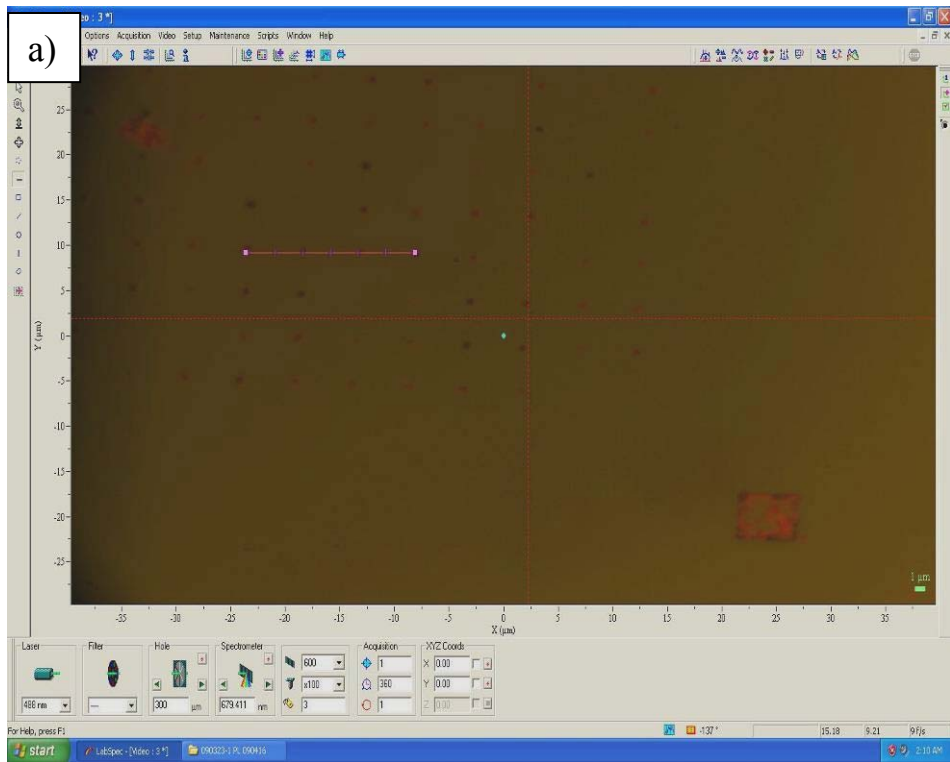


圖 4-6a. 陣列晶片設定 Mapping 區域的 OM 圖

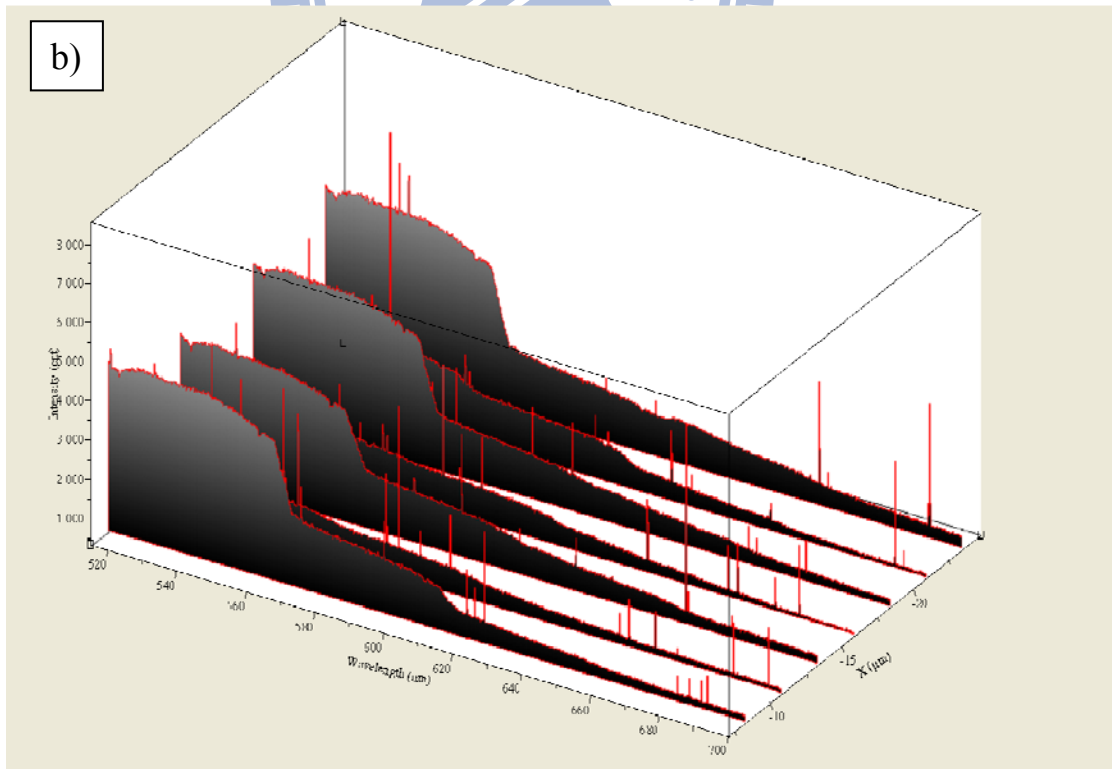


圖 4-6 b. 與 OM 圖對應的 Mapping 圖

## 4-2 耦合偵測平台的分析量測

### 4-2-1 實驗樣品的結構量測

第二部分-奈米鑽石耦合奈米金的量測平台，在奈米鑽石之固定化的實驗中，反應試劑的比例有兩種，分別是：一. 酸性條件 MES buffer : ND : DI water : EDC : NHS = 1ml : 4ml : 1ml : 2ml : 2ml；二. 弱鹼性條件 PBS buffer : ND : EDC : NHS = 3ml : 2ml : 1ml : 1ml。如果固定化反應在酸性條件下進行，會發現奈米鑽石會有很嚴重的聚集情形，如圖 4-7(a)所示，因此把反應改在鹼性條件以及配合較低用量的奈米鑽石，讓奈米鑽石表面帶負電改善聚集的問題，如圖 4-7(b)所示。

而在耦合奈米金粒子的實驗，我是先嘗試使用高濃度的 DNA 溶液和奈米金溶液，滴在酸性條件製作的基板上，分別是 DNA-奈米金粒子的實驗組 A-1 和奈米金粒子的對照組 A-2，反應完成的基板以 SEM 來觀察，如圖 4-8 所示。在 SEM 圖中，我們可以明顯地發現使用 DNA-奈米金粒子溶液的實驗組 A-1，圖 4-8(a)，在奈米鑽石陣列上的奈米金粒子的密度，遠遠高於使用純奈米金粒子溶液的對照組 A-2，圖 4-8(b)，而且發現對照組 A-2 會有團聚的情形。由此我們可以知道，經過兩股 DNA 的雜合反應，會讓奈米金粒子更有效地附著在奈米鑽石的表面。

不過，因為奈米鑽石聚集的問題，所以實驗上改用鹼性條件改善，接著使用高濃度的 DNA 溶液和奈米金溶液，滴在鹼性條件製作的基板上，分

別是 DNA-奈米金粒子的實驗組 B-1、奈米金粒子的對照組 B-2 以及去除 DNA-奈米金粒子的實驗組 B-3，反應完成的基板以 SEM 來觀察，如圖 4-9 所示。實驗組 B-3 是使用限制酶 NdeI，切斷奈米鑽石與奈米金粒子之間的雙股 DNA，用以去除耦合奈米金粒子，我發現基板的鑽石表面在經過限制酶 NdeI 反應後，沾黏上一些殘留物，如圖 4-9(c)，我推測是限制酶 NdeI 與奈米鑽石作用鍵結，所以在反應後使用去離子水沖洗，也無法將其去除乾淨。





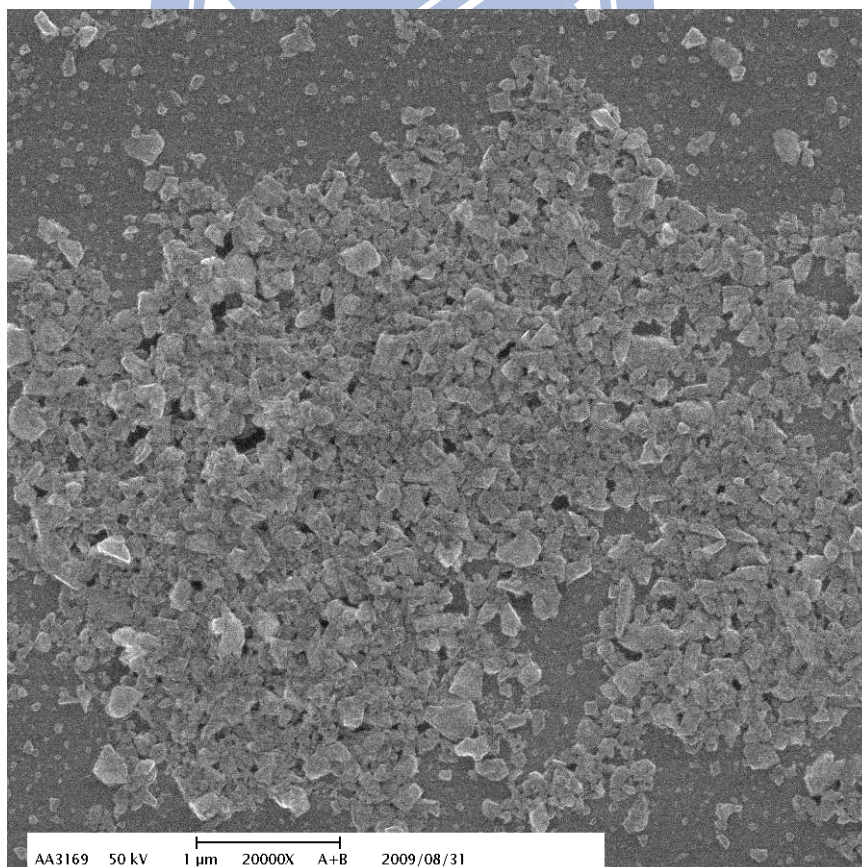
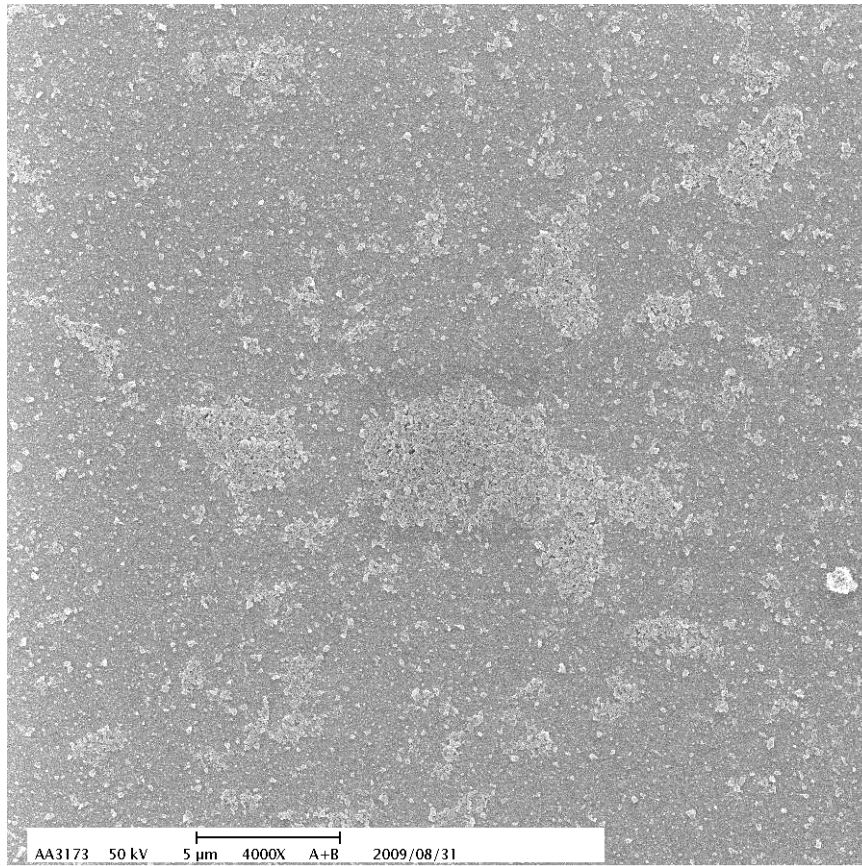


圖 4-7a. 酸性條件下製作的基板 SEM 圖



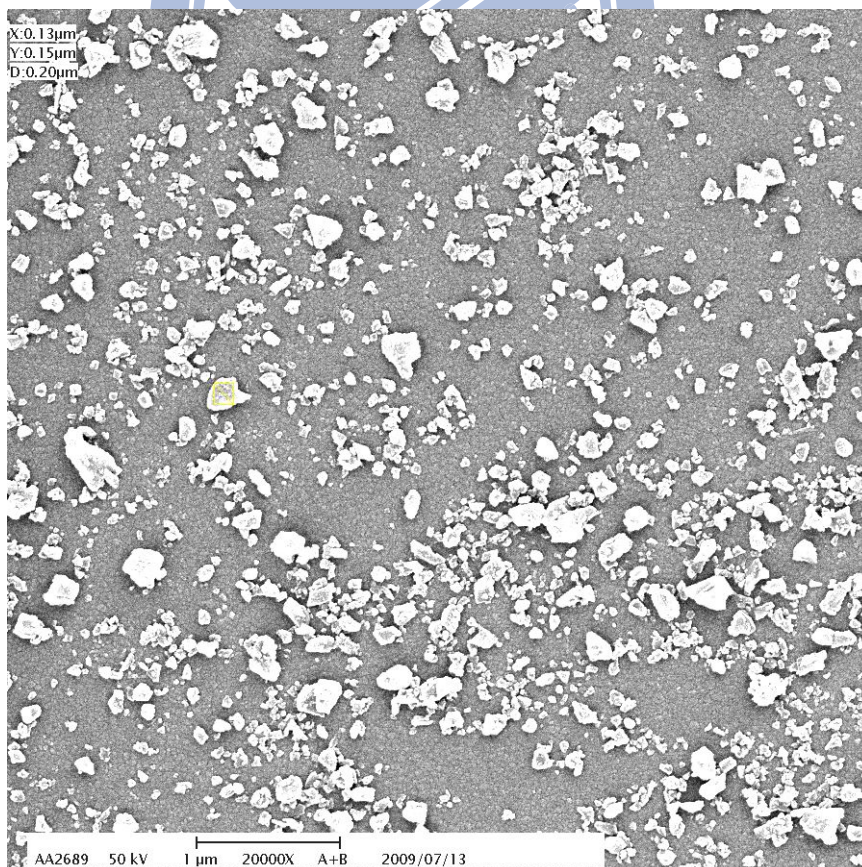
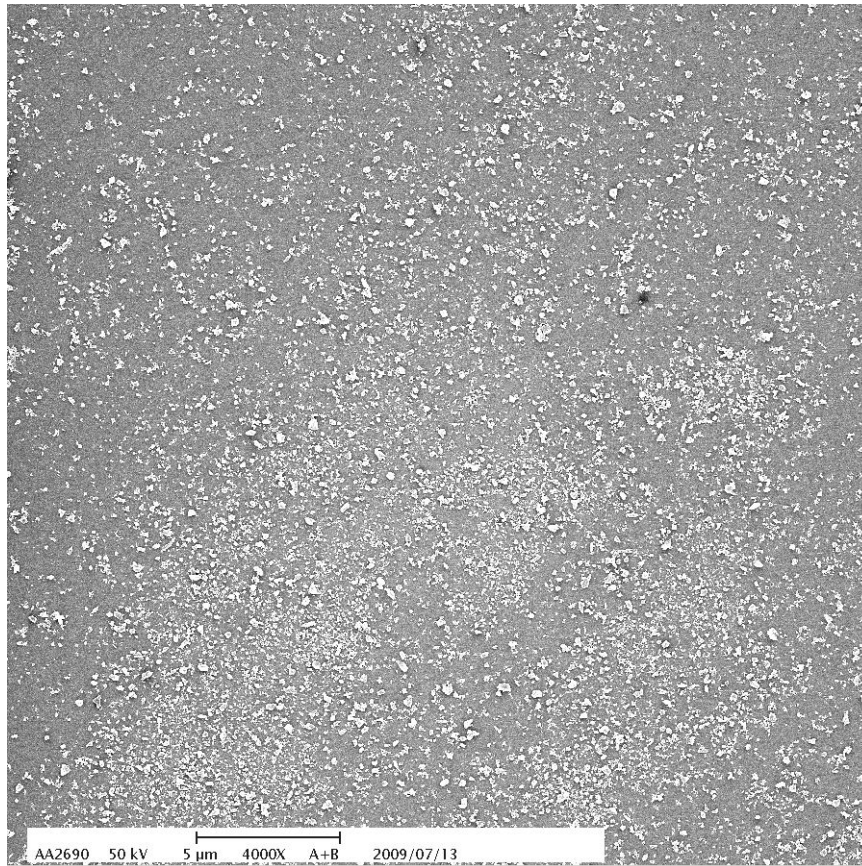


圖 4-7b. 鹼性條件下製作的基板 SEM 圖



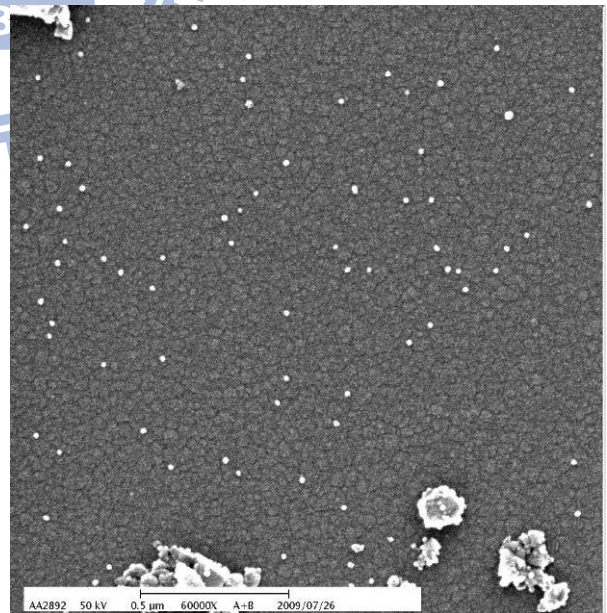
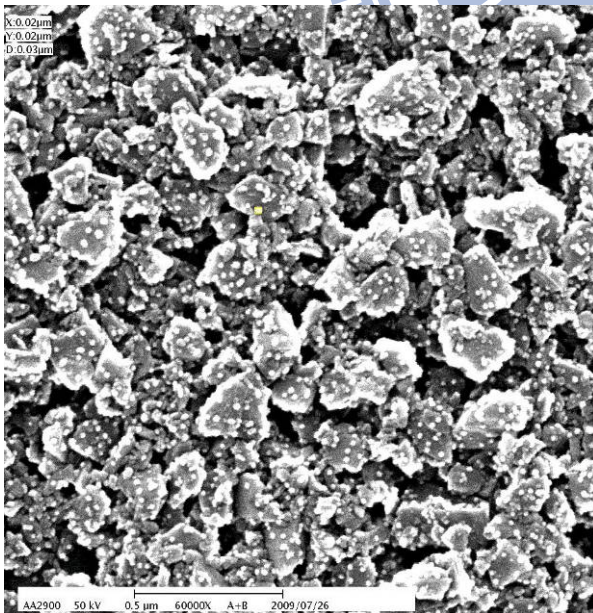
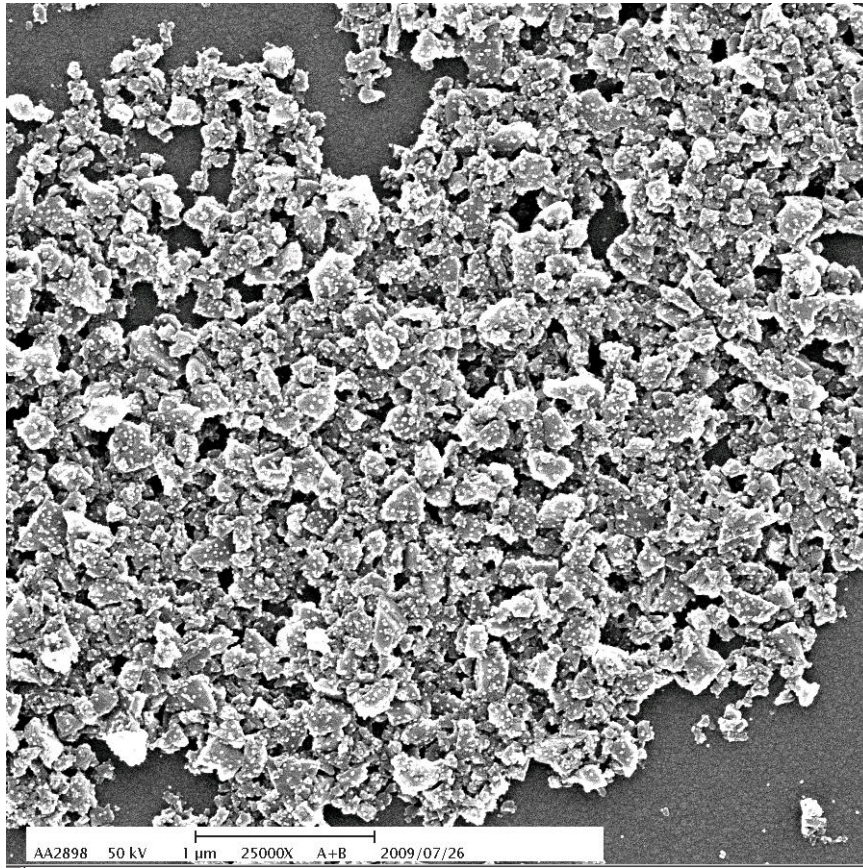


圖 4-8a. 實驗組 A-1 的 SEM 圖



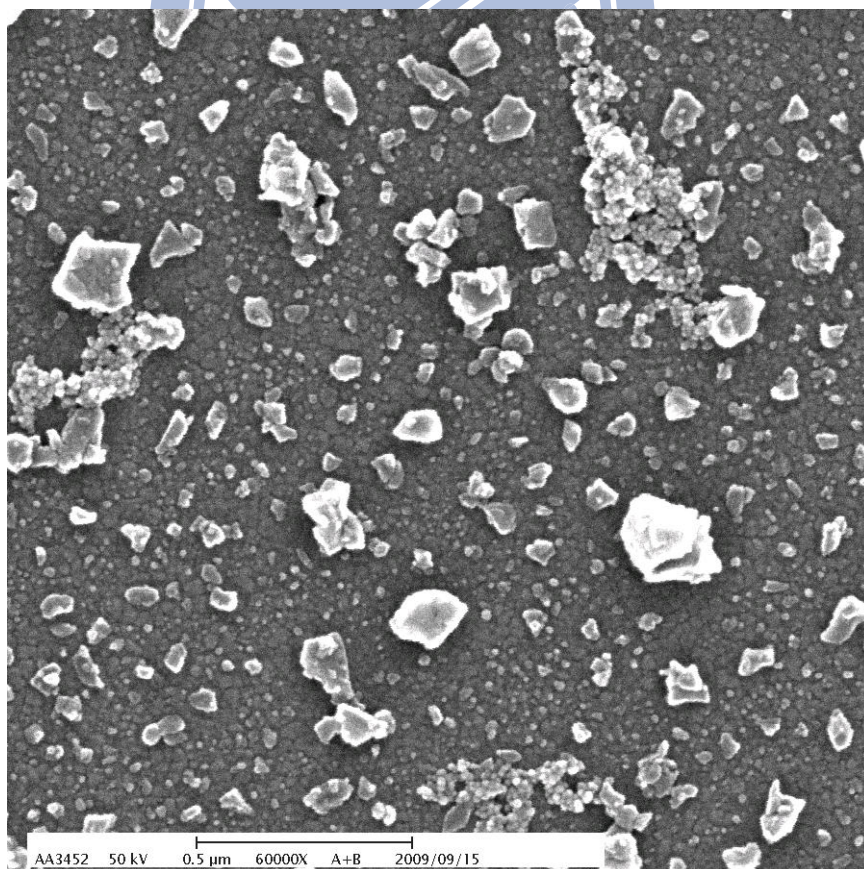
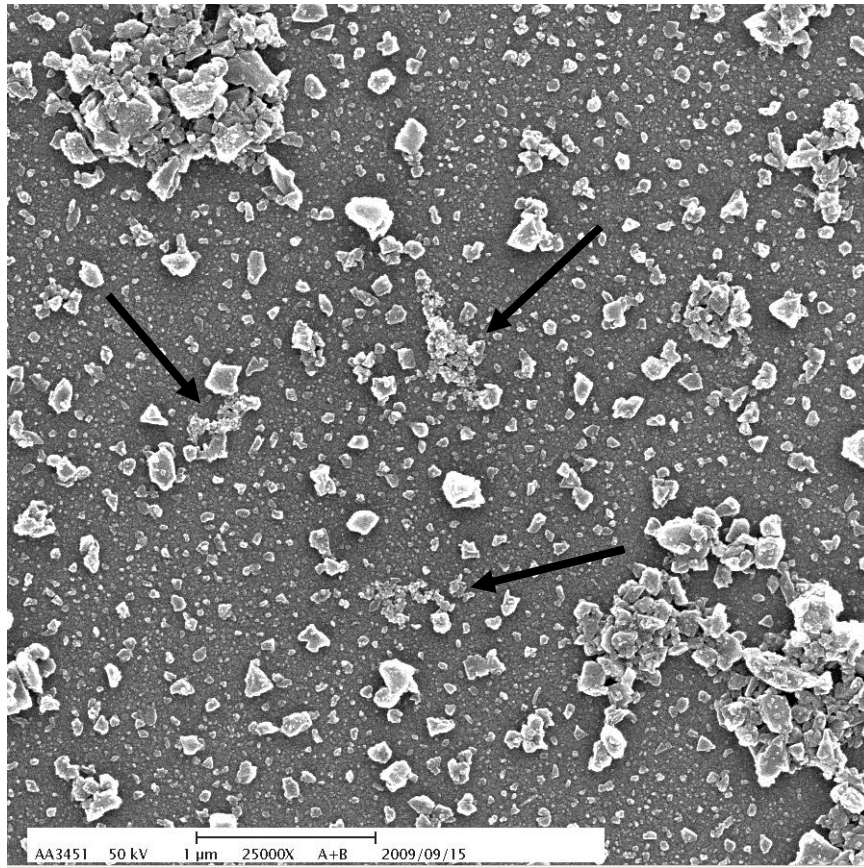


圖 4-8b. 對照組 A-2 的 SEM 圖

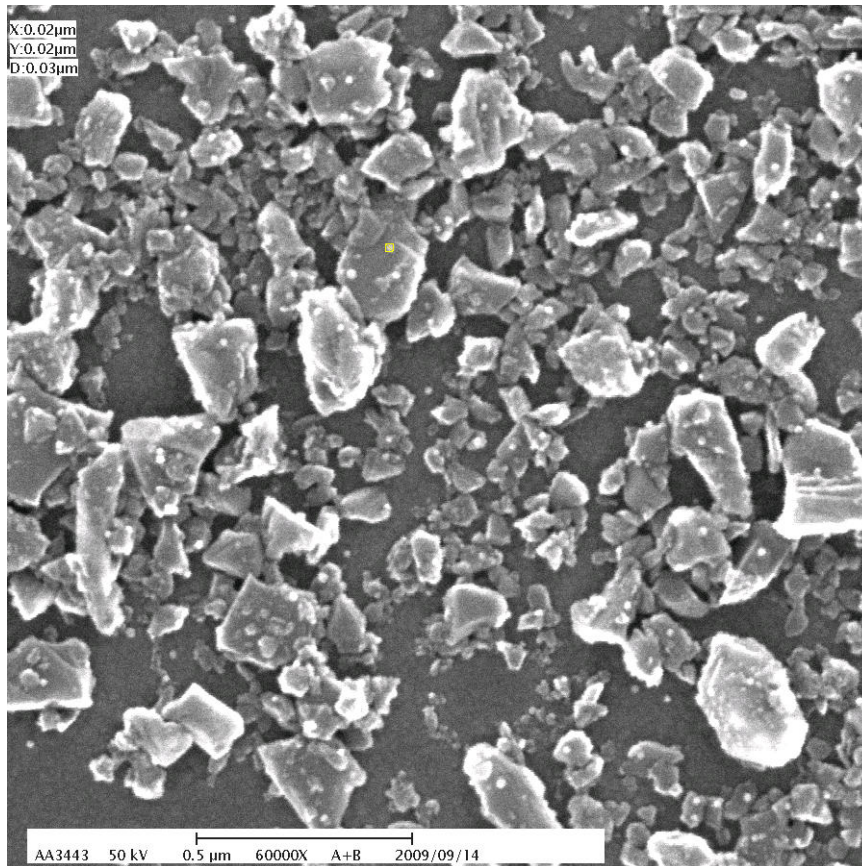


圖 4-9a. 實驗組 B-1 的 SEM 圖



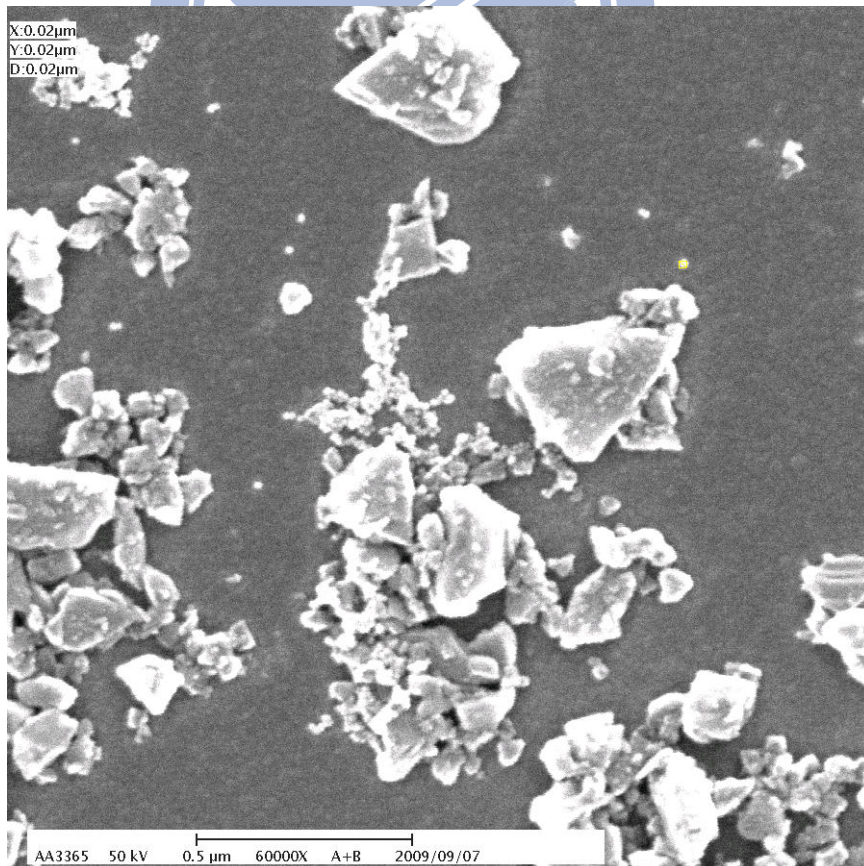
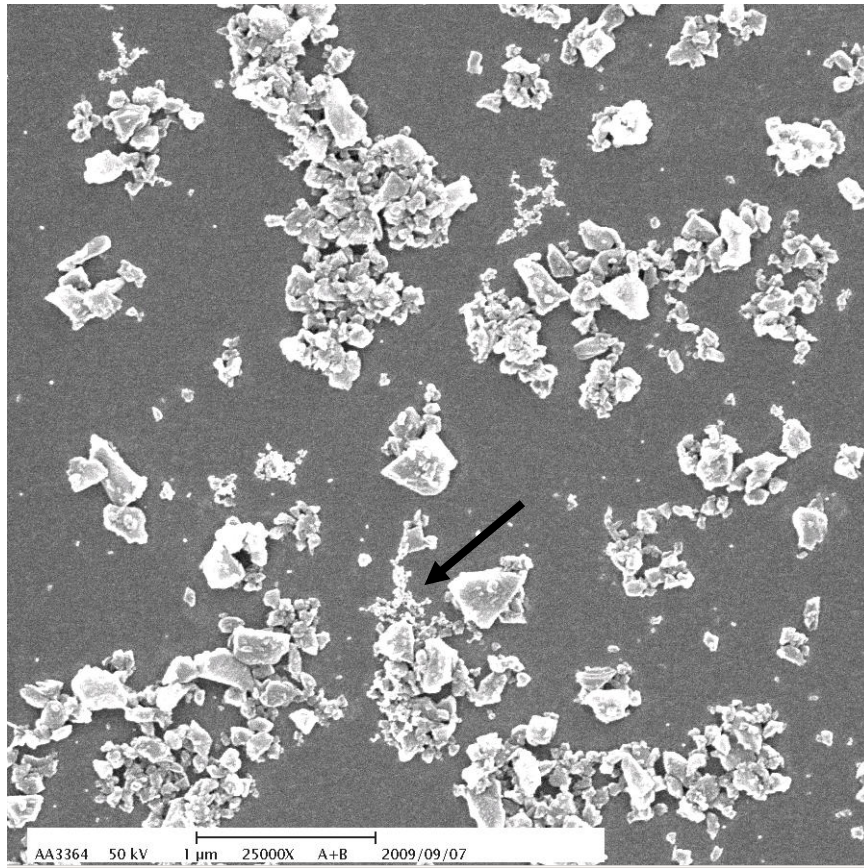


圖 4-9b. 對照組 B-2 的 SEM 圖



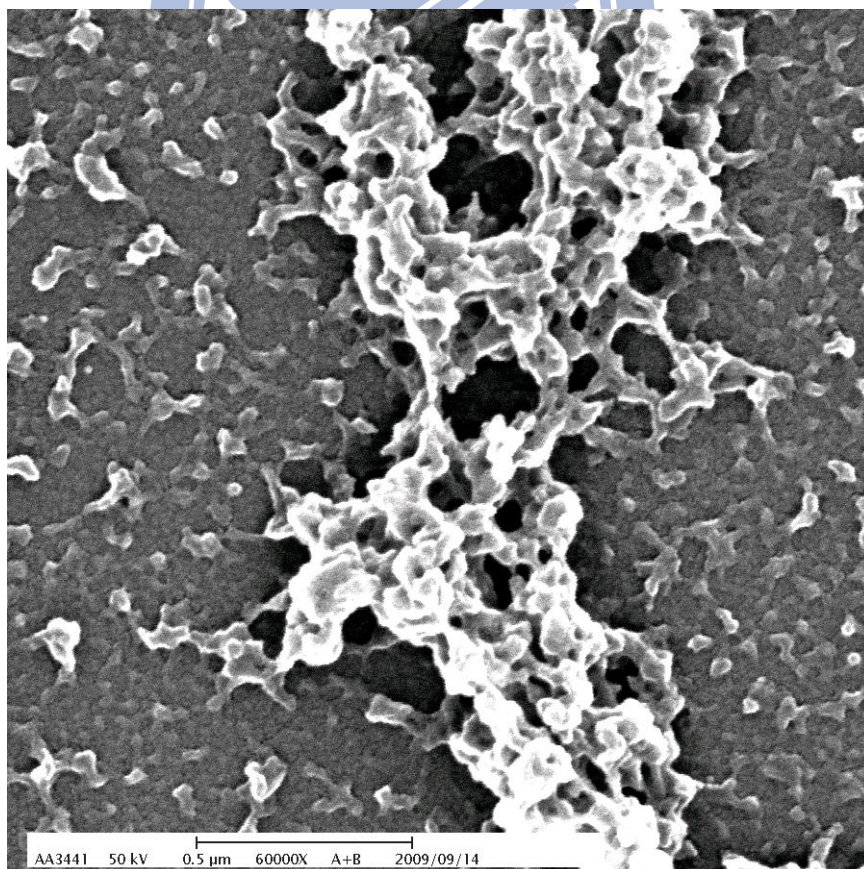
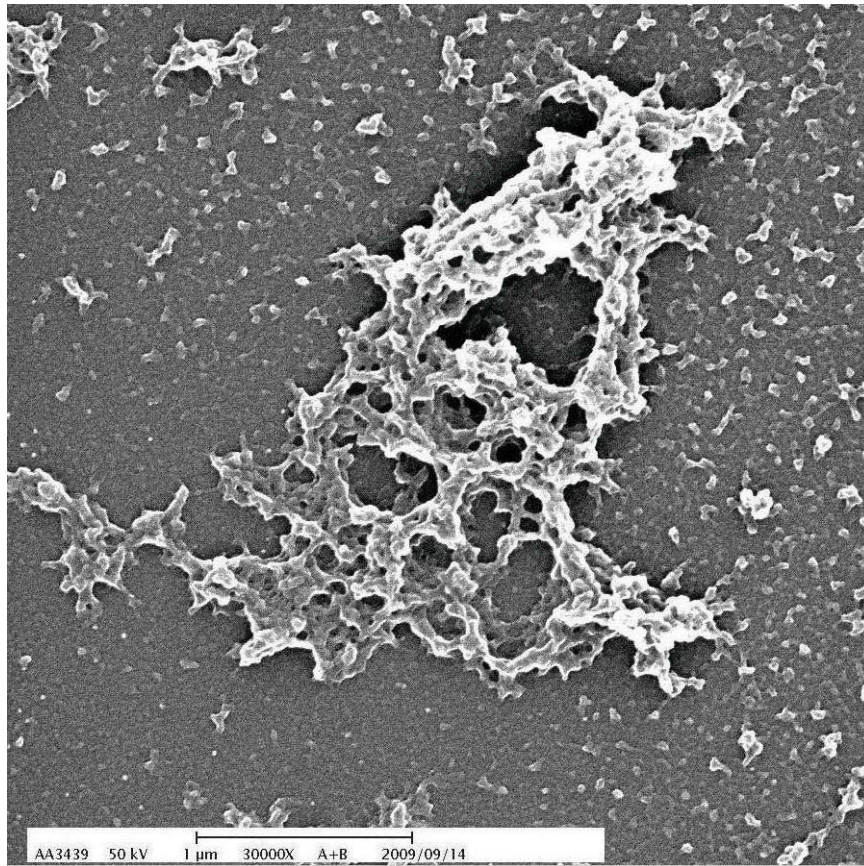


圖 4-9c. 實驗組 B-3 的 SEM 圖

## 4-2-2 實驗樣品的光譜量測

前一節所製作的試片：實驗組 A-1、實驗組 B-1、對照組 B-2 以及實驗組 B-3，我會使用共軛焦顯微鏡 LabRAM HR800 來量測這些試片的 PL 光譜。光譜量測的步驟是當奈米鑽石陣列晶片製作完成後，我會先量測晶片上奈米鑽石的 PL 光譜，圖 4-10 所示，和文獻上的 PL 光譜對照，如表 4-1 所示 [13]，在我量到的光譜上可以看到 530nm、576nm、610nm、620nm、638nm、660nm、680nm 和 730nm 等峰值與文獻上相同，接著再把 DNA-奈米金粒子或純奈米金粒子，滴在晶片上進行反應並耦合上奈米鑽石，我會在先前量測奈米鑽石的相同位置上，量測其 PL 光譜，並觀察 PL 光譜的變化，之後我會針對切斷雜合 DNA 並去除耦合奈米金粒子的試片，再做一次 PL 光譜量測。

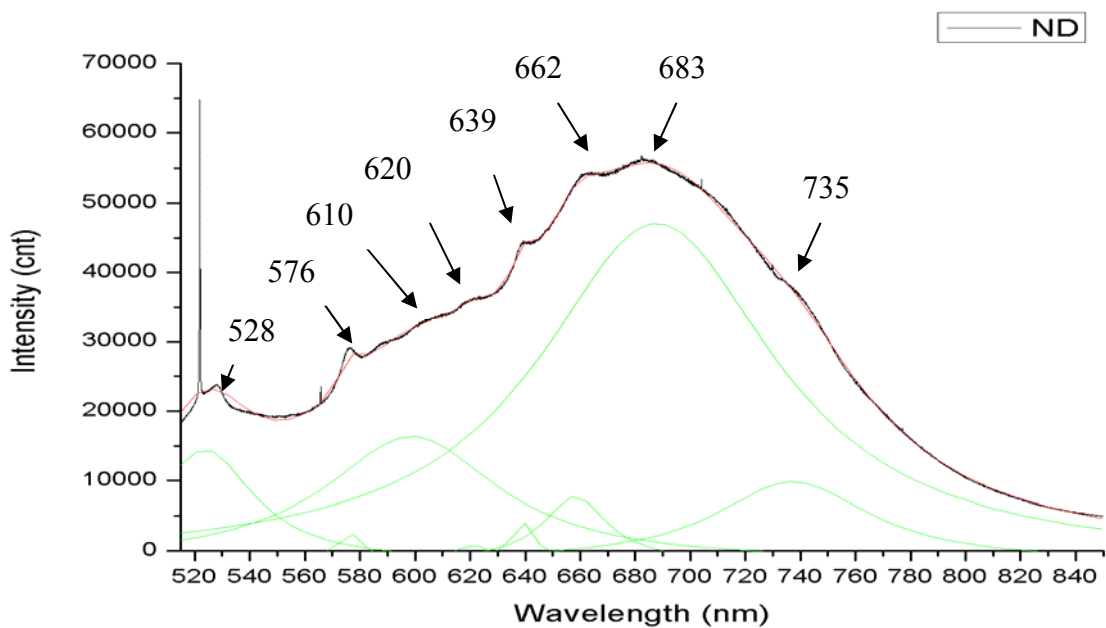


圖 4-10 以 488nm 雷射量測晶片上鑽石陣列的 PL 光譜

表 4-1 不同尺寸大小的奈米鑽石 PL 峰值[13]

The observed PL peaks for different size nanodiamonds and the comparison with literature data

No	Experimental data			Literature data	
	Peak (nm)	Size (nm)	Excitation (nm)	Defect center	Peak position (nm)
I	505	5	488	H <sup>3</sup>	503
II	520 ± 3	5-50	488	(N-V) <sup>0</sup>	530
III	548 ± 8	5, 100, 200	488	-	-
IV	574 ± 4	50, 100-500	488	(N-V) <sup>0</sup>	576
V	597 ± 2	5, 50, 100	488	Divacancy-related centers	600
VI	611 ± 1	5, 50 200	488	-	-
VII	623 ± 2	50, 100, 300, 400	488	-	-
VIII	641 ± 2	5, 50	532	-	-
IX	660 ± 5	200-500	488, 532	(N-V) <sup>-</sup>	638
X	~680	5-500	488, 532,	Sideband of (N-V) <sup>-</sup> ; Divacancy-related centers	660
XI	698 ± 3	5-400	488, 532,	Sideband of (N-V) <sup>-</sup> ; Divacancy-related centers	680
XII	730 ± 10	100-500	630	-	-
		400, 500	488, 532, 630	V <sup>0</sup> (GR1)	>720



光譜的量測我是先使用光學顯微鏡 40 倍的物鏡，找到基板上陣列的位置，並用影像擷取系統記錄下來，接著使用雷射光源聚焦在先前找到的陣列上，量測陣列位置的 PL 光譜。在同一個基板上，我會量測數個不同位置的陣列，其光譜量測結果如圖 4-11 所示(量測的參數：488nm 雷射光源、共焦針孔 200 μm、積分時間 5 秒、量測波段 515-850nm)，我在不同陣列上所量測的光譜，發現在 515nm 至 740nm 的區段，光譜的訊號與先前量測只有奈米鑽石樣品的訊號有明顯地不同，奈米鑽石的 PL 強度會有上升的現象。



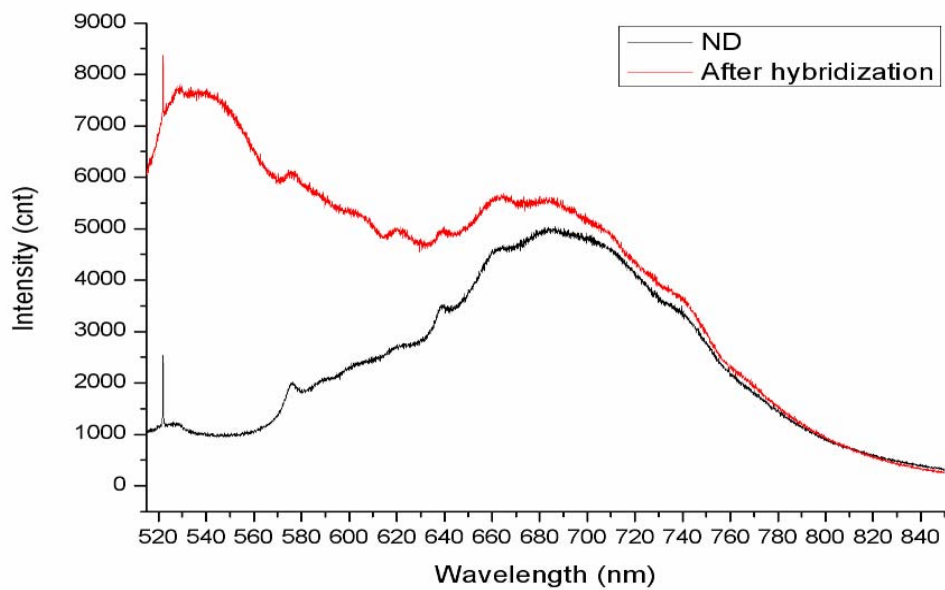
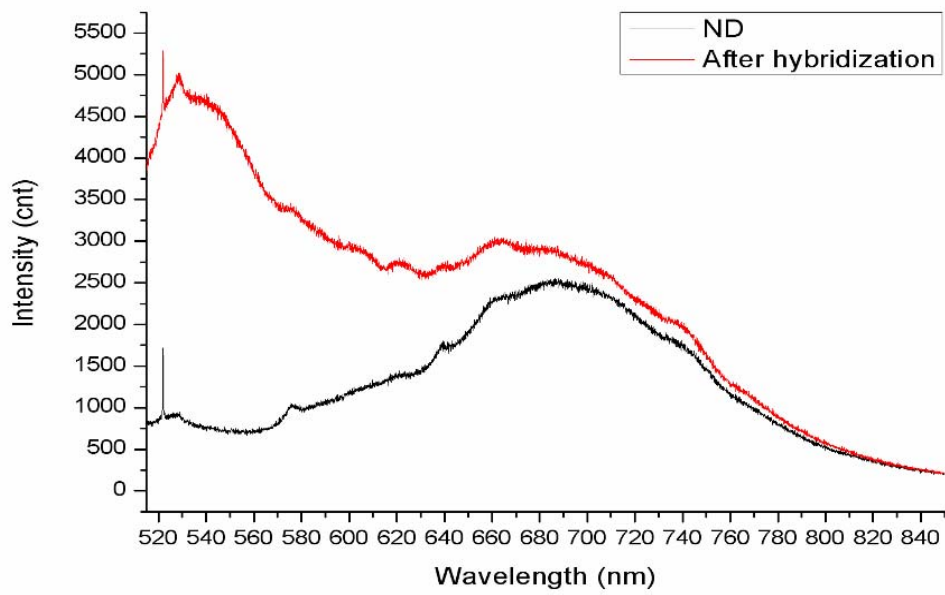


圖 4-11 奈米金粒子反應前後的 PL 光譜(實驗組 A-1)

這個結果在Stefan Schietinger等人的研究[30]中有類似的發現，他們利用AFM探針推動大小為60nm的奈米金粒子，使其接觸到奈米鑽石形成耦合，接著再利用532nm雷射去激發，並量測奈米鑽石的PL光譜。在PL光譜

中，他們發現到奈米鑽石會受到奈米金粒子電漿共振的影響，所以奈米鑽石的PL會有上升的現象，而其PL增加的幅度又以在575nm附近的訊號較638nm附近的訊號來的顯著。他們指出這是因為奈米鑽石575nm的放射波段比較接近奈米金粒子540nm的電漿共振波段，所以其PL訊號會有很大的改變。

我所使用的奈米金粒子，大小約在15-20nm，其UV-Vis吸收光譜如圖4-12所示，我們由圖中可以知道其電漿共振波段在524nm。在實驗中，我利用兩股DNA進行雜合反應，讓奈米金耦合上奈米鑽石陣列的反應，會使得奈米鑽石的PL，因為金粒子電漿共振的效應而上升，尤其是靠近奈米金粒子524nm的電漿共振波段附近的PL訊號，會有大幅度的上升。

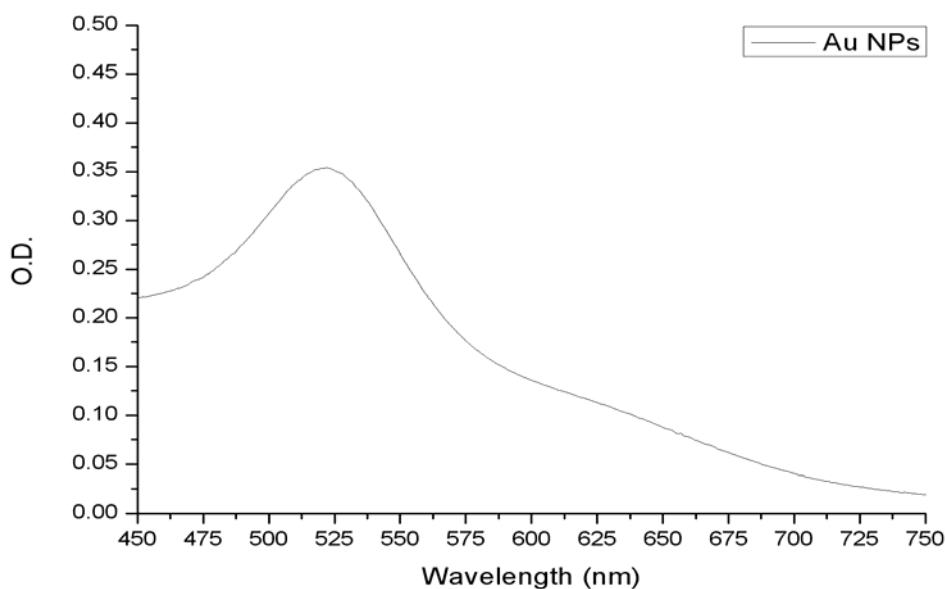


圖4-12 奈米金粒子(15-20nm)的UV-Vis吸收光譜



## 實驗組 B-1

光譜的量測與實驗組 A-1 相同，我是先使用影像擷取系統記錄欲量測陣列點的位置，接著使用雷射光源聚焦於陣列上，並量測陣列位置的 PL 光譜。其光譜量測結果如圖 4-13 所示。

實驗組 B-1 試片是在鹼性條件下製作的，使用 SEM 已經觀察到陣列中奈米鑽石的密度低於酸性條件下製作的實驗組 A-1 試片，所以我將量測積分的時間，從 5 秒調整至 25 秒以利光譜的觀察。在光譜的量測上與實驗組 A-1 相同，可以發現在 515nm 至 740nm 的區段，奈米鑽石的 PL 強度會有上升的現象，原因與前述相同。而奈米鑽石的 PL 強度提升的幅度大小，則與鑽石表面耦合的金粒子多寡有關。

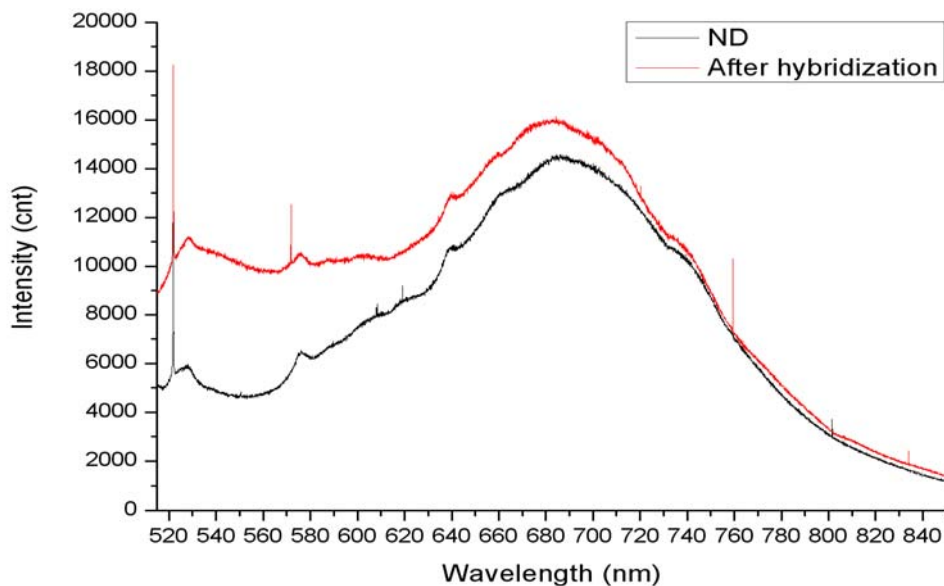


圖 4-13 奈米金粒子反應前後的 PL 光譜(實驗組 B-1)

## 對照組 B-2

光譜的量測與實驗組 B-1 相同，我是先使用影像擷取系統記錄欲量測陣列點的位置，接著使用雷射光源聚焦於陣列上，並量測陣列位置的 PL 光譜。其光譜量測結果如圖 4-14 所示。

對照組 B-2 試片是使用未與 DNA 鍵結的純奈米金粒子溶液製作的，目的是去觀察奈米金粒子與奈米鑽石的吸附情形，因為我使用的反應條件與 DNA 雜合反應一樣，都是在高鹽溶液下反應，所以使用 SEM 會觀察到奈米金粒子聚集的情形，金粒子不會均勻的分佈於鑽石的表面，因此在光譜的量測上，並沒有先前實驗觀察到的在局部波段，奈米鑽石的 PL 會大幅提升的現象。

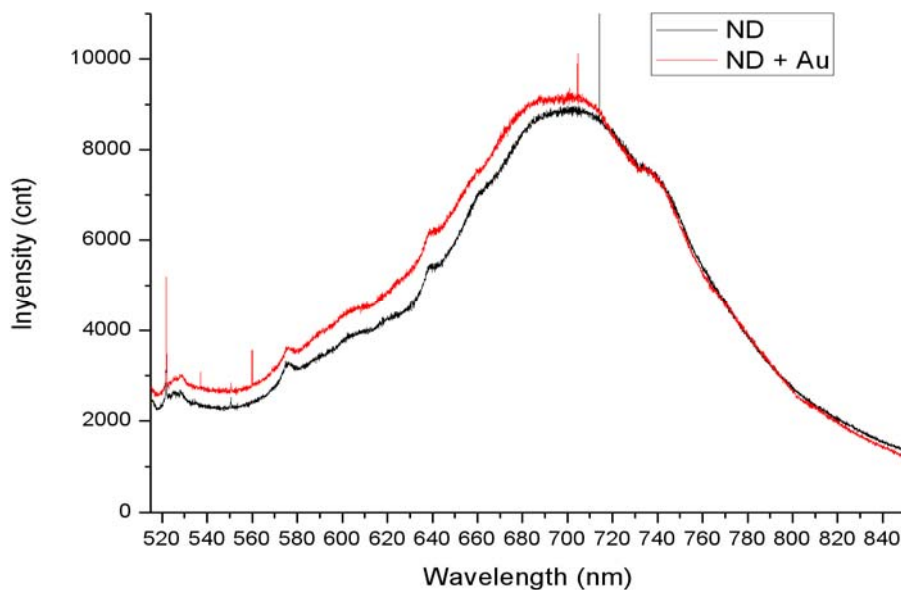


圖 4-14 奈米金粒子反應前後的 PL 光譜(實驗組 B-2)

### 實驗組 B-3

光譜的量測與實驗組 B-2 相同，我是先使用影像擷取系統記錄欲量測陣列點的位置，接著使用雷射光源聚焦於陣列上，並量測陣列位置的 PL 光譜。其光譜量測結果如圖 4-15 所示。

實驗組 B-3 試片是將 DNA 雜合的試片，與限制酶 NdeI 反應去切斷已雜合的雙股 DNA，反應完成後量測先前記錄的陣列點的 PL 光譜，發現其 PL 的訊號多出了 717nm 的峰值，如圖 4-16(a)所示，而且在 SEM 的觀察下也看到的許多反應殘留物質沾黏在基板的表面，針對這些殘留物質做 PL 光譜量測，如圖 4-16(b)所示，其中殘留物的峰值與奈米鑽石表面經過 NdeI 反應後多出來的峰值吻合，後來發現每一個量測的陣列之中，其光譜都會出現這峰值，表示基板上都佈滿了一層反應殘留物。

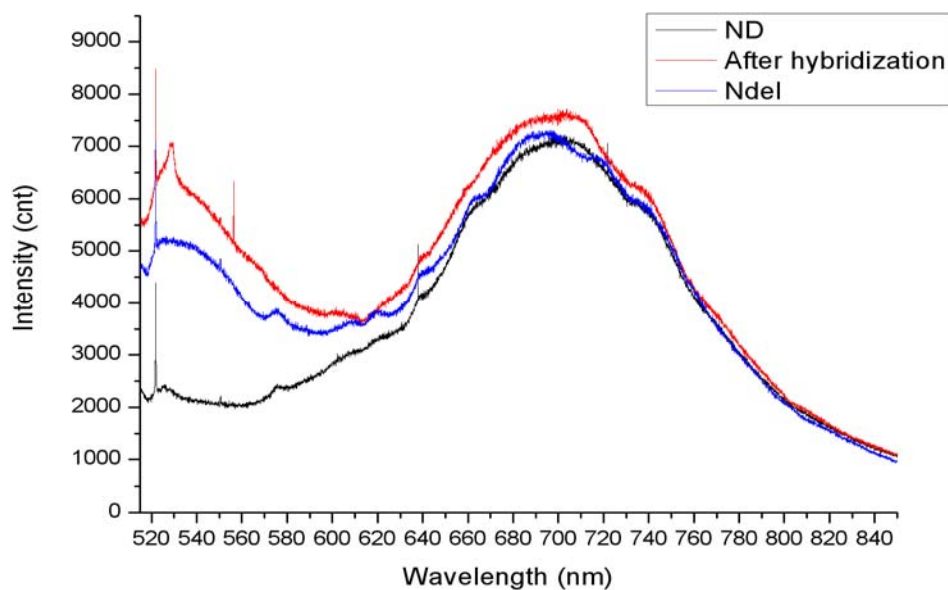


圖 4-15 奈米金粒子與酵素反應前後的 PL 光譜(實驗組 B-3)

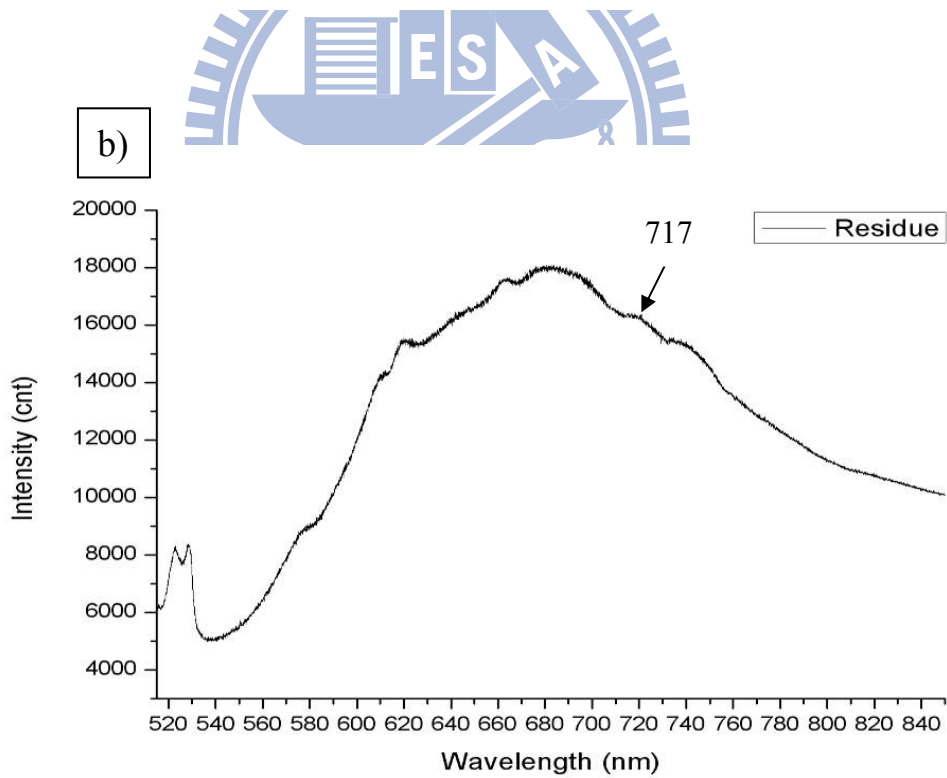
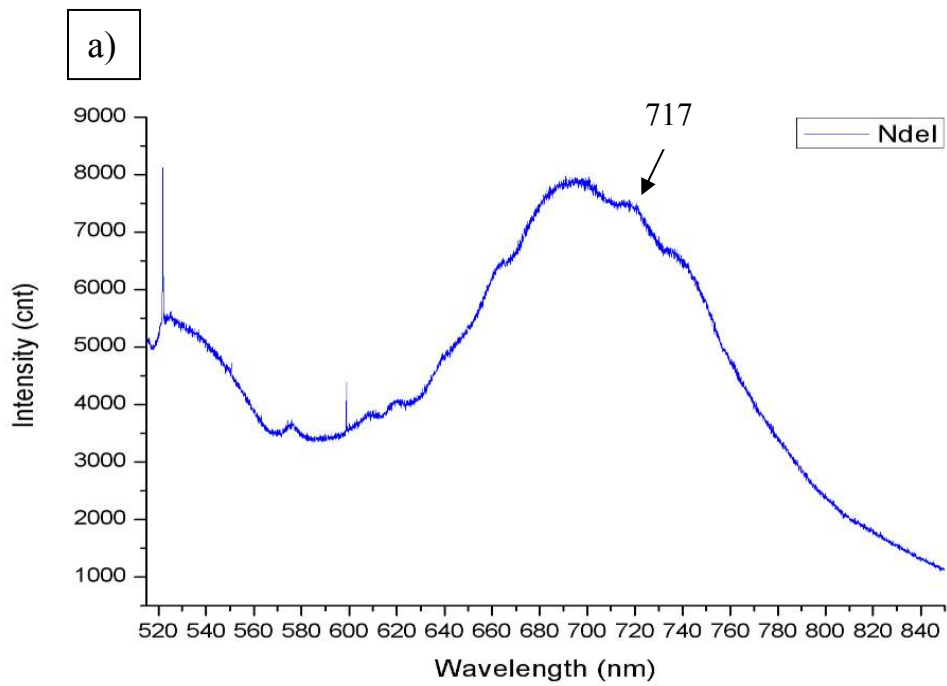


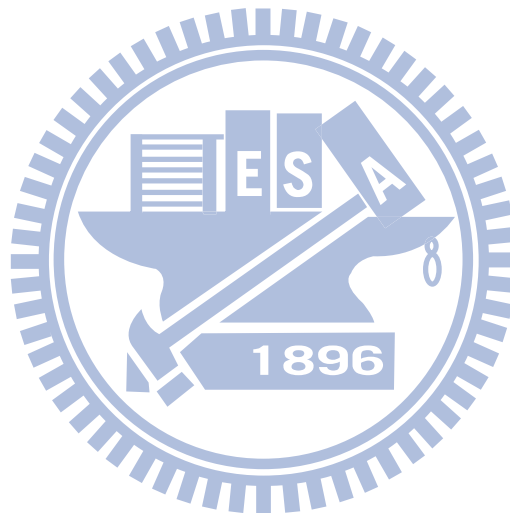
圖 4-16a. NdeI 限制酶作用後的 PL 光譜

b. 基板上殘留物質的 PL 光譜

### 4-3 參考資料

[30] Stefan Schietinger, Michael Barth, Thomas Aichele, and Oliver Benson

**Plasmon-Enhanced Single Photon Emission from a Nanoassembled Metal-Diamond Hybrid Structure at Room Temperature** *Nano Lett.* 2009, 9, 1694-1698



## 第五章 結論

第一部分利用電子束微影技術來繪製定義圖形，接著使用化學鍵結的方式，把奈米鑽石粒子固定在基板上，使其形成陣列，而定位化的奈米鑽石經過光譜測量，證明了可以吸附具有特定官能基的生物分子。未來可以利用這製程簡單的鑽石陣列晶片，搭配掃描式共軛焦顯微鏡量測其光譜，去研究量測欲分析的蛋白質分子的光學訊號。

第二部分利用兩股互補的 DNA，分別接在奈米鑽石基板以及奈米金粒子上，經由反應步驟將奈米金粒子修飾在奈米鑽石陣列上，經過共軛焦顯微鏡量測，觀察到在反應之後奈米鑽石光致發光光譜的強度增強，證明金粒子會讓奈米鑽石陣列的光學訊號改變，未來可以用來當作發展成生物偵測器後光學量測的指標。但是在使用限制酶 NdeI 切除雙股 DNA 的實驗中，在光譜中並未將光致發光增強的部分降回至原本強度，而且還有額外的峰值出現，經過 Control 實驗後推測，是反應殘留物於切除反應之後又沾黏回基板上所致，這個問題未來可以透過改善方法來解決。

## 5-1 改善方法

對於經過限制酶 NdeI 切除雙股 DNA 的實驗後，使用共軛焦顯微鏡對不同陣列位置進行量測，發現其光譜都會出現額外的峰值，推測是反應殘留物沾黏上基板，這個問題可能是因為奈米鑽石上的鍵結區，並未被 DNA 完全佔滿，所以有額外的區域可以與後來加入的酶類試劑反應，我們可以嘗試在雜合反應完成後，使用含有  $\text{-NH}_2$  官能基的 Tris 緩衝溶液把奈米鑽石上的  $\text{-COOH}$  位置保護住，以免在與後面所加入的藥劑進行反應。

在實驗時偶爾會遇到光譜量測後 XY 平面位置偏移和聚焦面的偏移的情形，而這些情況會讓光譜的量測上造成些許誤差。量測光譜前先選取要量測的位置，再使用影像擷取系統記錄下來，接著把雷射聚焦點的大小記下來，最好是將雷射聚焦點調至最小，在量測後要再確認量測位置以及聚焦點的大小與量測前是相同的，經過反覆確認這個問題即可以避免並且可以將影響降至最低。