

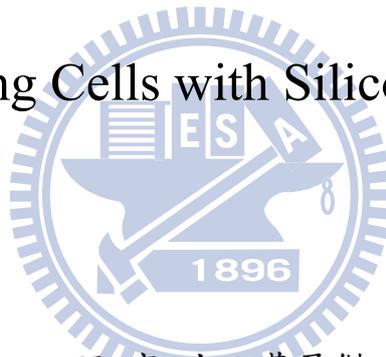
國立交通大學

奈米科技研究所

碩士論文

矽奈米線場效電晶體偵測活體細胞研究

Probing of Living Cells with Silicon Nanowire FETs



研究生：黃盈傑

指導教授：許鈺宗 博士

中華民國九十八年七月

矽奈米線場效電晶體偵測活體細胞研究

Probing of Living Cells with Silicon Nanowire FETs

研究生：黃盈傑

Student : Ying-Jie Huang

指導教授：許鈺宗

Advisor : Jeng-Tzong Sheu



Submitted to Institute of Nanotechnology

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in

Nanotechnology

July, 2009

Hsinchu, Taiwan

中華民國九十八年七月

矽奈米線場效電晶體偵測活體細胞研究

學生：黃盈傑

指導教授：許鈺宗 教授

國立交通大學 奈米科技 學系（研究所）碩士班

摘 要

本論文探討神經分化導引晶片，藉由可重複大量製作的矽晶片微流道導引神經細胞，影響神經細胞的分化行為，並藉由觀察神經細胞培養於不同尺寸的微流道其生長分化的情形，來推論在多大的尺寸下神經細胞如何有效地被導引生長，以提供未來植入生醫晶片與現有神經組織間形成有效神經網路介面連結的解決方法。另外，本論文也運用矽奈米線場效電晶體做為高靈敏度的生物感測器，以 label-free 方式來偵測生物小分子；矽奈米線對表面電位改變有極高的靈敏度，可以作為生物感測器偵測帶電生物分子，矽奈米線會依據外圍的分子帶電荷的不同而造成其電性的改變，可以藉由觀察矽奈米線場效電晶體的電導(Conductance) 變化來作為分子的偵測。Abl tyrosine kinase 是一種磷酸轉移酶，在本實驗中將 Abl tyrosine kinase 以共價鍵方式修飾在矽奈米線的表面上，因為 Abl tyrosine kinase 對三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 有很好的親和力，所以可以用來偵測細胞的能量通貨 ATP 分子。最後、本實驗將 HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體晶片上，直接即時偵測由自由基(ROS) 刺激後 HeLa cell 所釋放的 ATP，證明矽奈米線場效電晶體可以即時偵測到生物體所釋放的 ATP 分子。

Probing of Living Cells with Silicon Nanowire FETs

Student : Ying-Jie Huang

Advisors : Dr. Jeng-Tzong Sheu

Department (Institute) of Nanotechnology

National Chiao Tung University

ABSTRACT

First part of this thesis introduces the PC-12 neural cells culture and guidance using microstructures and microfluidic channels on the silicon chip. The effectiveness of axon guidance with respect to the dimensions of microfluidic channel was explored. PC-12 neural cells were successfully cultured on microstructures and axons grew along the microfluidic channels. The results provide a pathway that bridges the organic living system and the inorganic semiconductor devices. The second part of this study utilized extremely sensitive silicon nanowire field-effect transistors(SiNW-FETs) as label-free sensors in in-situ detection of the biological small molecules, Adenosine triphosphate (ATP) . The ATP molecules were released from HeLa Cells by reactive oxygen species(ROS) stimulation. The enzyme(Tyrosine kinases, Abl) was immobilized onto the aldehyde-terminal nanowire surface; when the ATP molecules were released from the HeLa cells and binded to Abl's binding site resulted in a conductance change of SiNW-FETs. A real-time detection of ATP molecules from ROS stimulation of HeLa cells using SiNW-FETs was also demonstrated.

誌謝

首先感謝我的指導老師 許鈺宗 博士，在碩士班這段日子裡教導我學習知識與做研究應有的積極態度，同時老師也提供我良好的實驗環境以及充足的儀器設備，讓我可以從事生醫半導體跨領域方面的研究，也才有機會可以完成碩士論文。很感謝老師您在碩士生涯中給我的教誨與指教，使我在這兩年生活裡學習到很多，未來更要回饋社會、貢獻所學，幫助一些需要幫忙的人。最後，學生向老師致上最深的感謝，謝謝老師。

感謝實驗室所有的學長們，在我心情不好時給我鼓勵，在我困惑的時候即時地給我方向。在從生醫領域跨到半導體領域常常會有困惑與不懂的時候，學長們總是不厭其煩的教導我，讓我學習到很多新的知識與做實驗應有的積極態度。首先我要感謝我的指導學長 振嘉學長，在實驗上提供我很多方向，並且教導我很多電子元件領域的知識與觀念，讓我對半導體領域有更進一步的了解；感謝柏鈞學長提供的矽奈米線，對我的生醫感測實驗非常重要；最後要感謝皓恆學長教我很多半導體相關儀器的操作，同時在生活上也帶給我們許多歡笑。

感謝實驗室已畢業的學長姐，奕貞、昶龍、子訓、欣霖，每當實驗有困難或是對碩士生活覺得煩悶時，你們總是會出現在我身邊幫助我。再來我要感謝實驗室所有同學，柏勳、履安、治廷和昭睿，在這些日子裡，大家一起努力，這些日子和你們相處，總是帶給我歡樂，讓我有源源不的動力可以進行實驗，使我碩士班兩年過的很有意義與充實。感謝實驗室的學弟妹，珊聿、明莉、以倫、朝俊、廷彥，有了你們的陪伴與幫忙，使我的實驗能順利進行，閒暇之虞也能一起打球鍛鍊身體。

再來我要感謝一些很要好的朋友，能夠分享我生活上的點點滴滴，使我時時刻刻有力量前進。

最後要感謝我的父母親，你們在我身後默默地給我支持，雖然不起眼，但卻是最重要，沒有你們的加油我也無法達到今天的成就，你們無止盡的付出是我今天能拿到學位的力量泉源，謝謝你們。

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
圖目錄	vii
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 神經系統簡介	3
1-3 矽奈米線生物感測器簡介	6
1-4 生物分子修飾與量測	7
1-5 研究動機與目標	11
1-6 文獻回顧	12
第二章 選擇性導引 PC12 cell 細胞圖案	21
2-1 實驗動機	21
2-2 PC12 cell 細胞培養	21
2-2-1 PC12 cell 簡介	22
2-2-2 細胞培養實驗流程	23
2-3 微流道製作流程	25
2-4 蛋白質表面修飾	26
2-5 選擇性導引 PC12 cell 細胞圖案	30
2-6 整合導引 PC12 細胞與元件	39

第三章	選擇性導引 HeLa cell 細胞圖案	42
3-1	實驗動機.....	42
3-2	HeLa cell 細胞培養	42
3-2-1	HeLa cell 簡介.....	42
3-2-2	細胞培養實驗流程	43
3-3	不同材料的細胞培養.....	45
3-3-1	HeLa cell 在不同材料上培養.....	45
3-3-2	單位面積細胞數統計	47
3-4	微結構製作流程.....	48
3-5	選擇性導引 HeLa cell 細胞圖案	50
第四章	結合細胞與矽奈米線場效電晶體來感測細胞釋放的 ATP 分子	51
4-1	實驗動機.....	51
4-2	自由基刺激 HeLa cell 釋放 ATP 分子.....	51
4-2-1	Bioluminescence 測 ATP 分子濃度.....	51
4-2-2	Bioluminescence 測 HeLa cell 細胞外 ATP 分子濃度	54
4-3	矽奈米線場效電晶體元件製作.....	58
4-3-1	元件製作流程	58
4-3-2	加入參考電極及微流道之生物感測元件	62
4-4	矽奈米線表面修飾.....	64
4-5	矽奈米線場效電晶體電性量測.....	66
4-5-1	電性量測方法	67
4-5-2	電性量測結果	67
4-6	結合細胞與矽奈米線場效電晶體用來感測細胞釋放的 ATP.....	69
4-6-1	量測架構	69
4-6-2	電性量測	70

4-6-3 HeLa cell 與元件的整合.....	73
第五章 結論與未來展望.....	76
5-1 結論.....	76
5-2 未來展望.....	77
參考文獻.....	79



圖目錄

圖 1-1、元件實驗結構示意圖.....	2
圖 1-2、矽奈米線場效電晶體感測活體細胞釋放 ATP 分子示意圖.....	3
圖 1-3、神經元之間的訊息溝通.....	4
圖 1-4、神經元結構.....	5
圖 1-5、突觸間的分子傳遞.....	5
圖 1-6、神經系統分類.....	6
圖 1-7、ATP 分子結構示意圖.....	7
圖 1-8、ATP 分子生理功能示意圖.....	8
圖 1-9、Aldehyde silane 修飾流程圖.....	9
圖 1-10、表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖.....	9
圖 1-11、Abl tyrosine kinase 之 Active 和 Inactive 型態.....	10
圖 1-12、矽奈米線場效電晶體結構.....	11
圖 1-13、實驗架構.....	12
圖 1-14、論文主軸.....	13
圖 1-15、矽奈米線場效電晶體生物感測器之感測機制示意圖.....	14
圖 1-16、蛋白質感測之實驗結果.....	15
圖 1-17、神經細胞生長跨越矽奈米線.....	16
圖 1-18、感測神經細胞動作電位.....	16
圖 1-19、偵測小分子與蛋白質間作用示意圖.....	17
圖 1-20、矽奈米線偵測 ATP 分子.....	18
圖 1-21、SWCNT-FET 元件設計與製程.....	19
圖 1-22、SWCNT-FET 感測神經細胞釋放出的分子 CgA.....	19
圖 1-23、SWCNT 元件感測血液中乳癌細胞.....	20
圖 2-1、倒立式顯微鏡觀察 PC12 cell 分化前後型態.....	22

圖 2-2、Confocal 螢光顯微鏡下的 PC12 cell	23
圖 2-3、未分化的 PC12 cell 細胞型態	24
圖 2-4、已分化的 PC12 cell 細胞型態	24
圖 2-5、開放式微流道 SEM 圖	25
圖 2-6、玻璃開放式微流道製作流程	26
圖 2-7、玻璃微流道照相圖	27
圖 2-8、微流道光學顯微鏡俯視圖	27
圖 2-9、Laminin 蛋白修飾前後的螢光圖	28
圖 2-10、Trypan blue 染劑測試流道流通圖	28
圖 2-11、PC12 細胞分化程度比較	30
圖 2-12、PC12 細胞培養在修飾 Collagen、Poly-lysine 矽晶片上實驗流程	31
圖 2-13、PC12 細胞培養在修飾 Collagen 矽晶片上生長型態	32
圖 2-14、PC12 細胞培養在修飾 Poly-lysine 矽晶片上生長型態	32
圖 2-15、選擇性導引 PC12 在 20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 微結構上	33
圖 2-16、不同大小的微結構對 PC12 cell 之 Selectivity 統計圖	33
圖 2-17、不同大小微結構細胞數出現頻率統計表	34
圖 2-18、不同大小微結構出現頻率最高之細胞數	34
圖 2-19、選擇性導引 PC12 在深度 20 μm 、50 μm 微結構	35
圖 2-20、在矽晶片上導引神經細胞生長	35
圖 2-21、選擇性導引 PC12 細胞流程	36
圖 2-22、矽晶片上微流道導引 PC12 細胞圖	37
圖 2-23、PC12 導引在以玻璃為基底之微流道	37
圖 2-24、免疫組織化學螢光染色	38
圖 2-25、染色後在螢光顯微鏡下之 PC12 型態	38
圖 2-26、元件上流道設計圖與照相圖	39
圖 2-27、元件微流道顯微鏡圖	39

圖 2-28、PC12 細胞乾燥處理後 SEM 圖.....	40
圖 2-29、PC12 細胞導引在矽奈米線場效電晶體.....	40
圖 2-30、PC12 細胞之 Axon 生長跨過矽奈米線.....	41
圖 3-1、HeLa cell 細胞型態.....	43
圖 3-2、HeLa cell 染色前後型態.....	44
圖 3-3、HeLa cell 細胞膜破裂染色型態.....	44
圖 3-4、倒立式顯微鏡觀察 HeLa cell 染色前後型態.....	44
圖 3-5、HeLa cell 培養在 Au、Oxide、Nitride、SU-8 上第 0 天.....	46
圖 3-6、HeLa cell 培養在 Au、Oxide、Nitride、SU-8 上第 5 天.....	46
圖 3-7、Trypan blue 染劑測試 HeLa cell 存活率.....	47
圖 3-8、不同材料上的單位面積細胞數量統計.....	48
圖 3-9、微結構示意圖.....	49
圖 3-10、深度 20 μm 微結構 SEM 圖.....	49
圖 3-11、深度 50 μm 微結構 SEM 圖.....	49
圖 3-12、HeLa cell 選擇性生長在深度 20 μm 微結構.....	50
圖 3-13、HeLa cell 選擇性生長在深度 50 μm 微結構.....	50
圖 4-1、冷光反應生物分子示意圖.....	52
圖 4-2、Bioluminescence 冷光反應化學示意圖.....	53
圖 4-3、Bioluminescence 冷光化學反應式.....	53
圖 4-4、ATP 濃度 Bioluminescence 標準曲線.....	54
圖 4-5、HeLa cell 自由基刺激 10 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化.....	55
圖 4-6、HeLa cell 自由基刺激 20 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化.....	55
圖 4-7、HeLa cell 自由基刺激 30 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化.....	56
圖 4-8、刺激前後細胞外 ATP 分子濃度變化統計圖.....	56
圖 4-9、HeLa cell 於刺激前後的表面型態。A: ROS 刺激前、B: ROS 刺激後、C: 培養在 1x PBS 中之死亡率.....	57

圖 4-10、矽奈米線場效電晶體元件製作流程圖	61
圖 4-11、加入參考電極與微流道之生物感測元件示意圖	62
圖 4-12、矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖	63
圖 4-13、Schiff base 醛或酮與胺基反應後之產物	65
圖 4-14、表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖	66
圖 4-15、元件架構與量測示意圖	66
圖 4-16、ATP 分子量測示意圖	67
圖 4-17、50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖	68
圖 4-18、50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖	68
圖 4-19、量測細胞所釋放的 ATP 分子的量測架構	69
圖 4-20、矽奈米線場效電晶體感測活體細胞釋放 ATP 分子示意圖	69
圖 4-21、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子	70
圖 4-22、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子(控制組)	71
圖 4-23、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子(ΔG)	72
圖 4-24、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子(控制組)	73
圖 4-25、HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體顯微鏡圖	74
圖 4-26、HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體 SEM 圖	75
圖 5-1、PDMS 封閉式微流道架構	78

第一章

緒論

1-1、前言

在現代高科技的世界裡，隨著人類知識水準提高、工商業發達，所帶來的環境衝擊已逐漸對人們造成身體上的傷害，如癌症與眾多慢性病的產生，所以對於疾病的檢測必須要做的更精良、更靈敏[1]。生物分子感測是生物醫學研究與應用的基礎，如果可以準確的量測與分析標示人體內重要的生物分子，我們就可以明確地判斷一個人的健康狀況，相同的技術還有其他廣泛的應用，如監控與日常生活息息相關的環境、食品等。

人類自出生後，即自然會使用鼻子的感覺神經細胞去偵測氣味，也懂得使用舌頭的酵素反應去嘗試食物的滋味。經過科學家們不斷的研究，今日人類已經瞭解人體的多數器官是如何去偵測微量的生化分子，特別是組織器官對於外來分子之特定辨識能力(Recognition Ability)。

隨著生物、化學、材料、電子等各種學科之間的整合及進步，結合生物科技和半導體技術來製造未來的元件正在如火如荼的開始。無論是分子元件，或是生物感測器等晶片，整合各種學科領域已經是必然的趨勢。在以往看來不相干的生物分子和半導體元件之間，已經可以因為圖案尺度的奈米化而有了交集，因此在半導體晶片上透過巧妙的固定化技術為介面，已經可以逐步將生物分子與半導體晶片來連結，再經科學家們細心的研發未來將有可能應用到人體內分子之偵測。

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 2 到 3 天的時間才能得到檢測結果，已趕不上現代人類的腳步，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，將生物科技和半導體製程、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。

在本實驗中修飾在矽奈米線的酵素 Tyrosine kinase 是細胞訊息傳遞的重要元素，可以將胺基酸 Tyrosine 磷酸化，對 ATP (Adenosine triphosphate) 分子有很高的親和力。當 ATP 分子與 Abl tyrosine kinase 結合時，矽奈米線場效電晶體的電導率 (Conductance) 因而增加，效果相當於加上負閘極電壓，圖 1-1 為元件實驗結構示意圖。

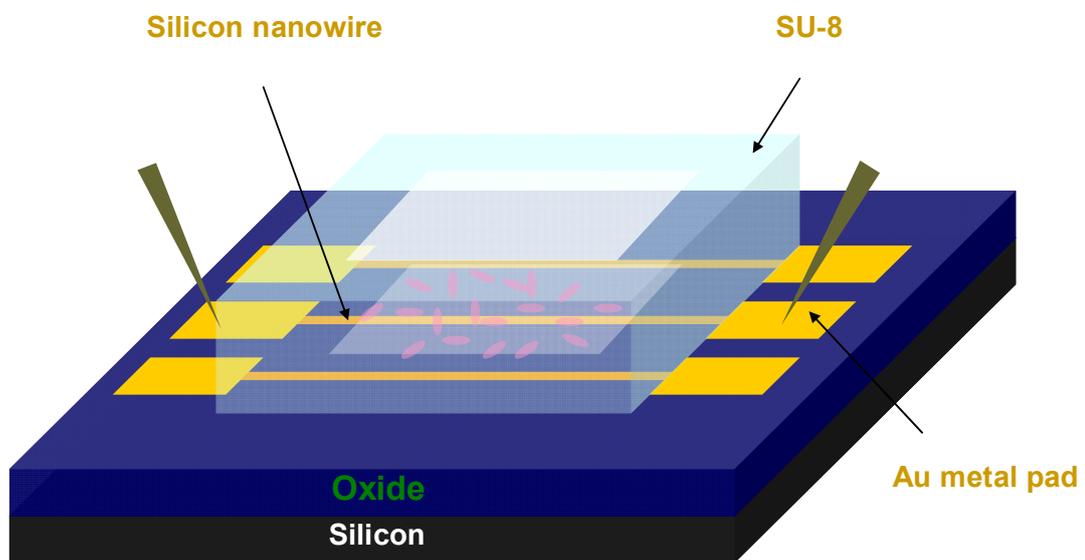
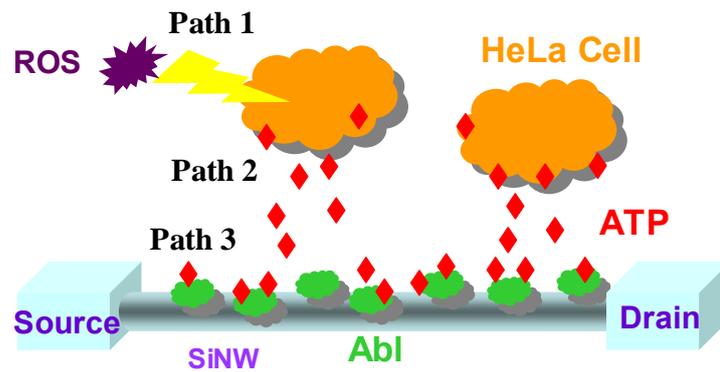


圖 1-1、元件實驗結構示意圖。

在本實驗中要完成以矽奈米線場效電晶體 (SiNW-FET) 來感測活體細胞 HeLa cell 所釋放的 ATP 分子，把矽奈米線場效電晶體與活體細胞結合，架構一個生物感測的系統，讓生物感測系統能即時給予刺激與偵測細胞的行為，如即時偵測細胞所釋放的 label-free 小分子，如圖 1-2 為矽奈米線場效電晶體感測活體細胞釋放 ATP 分子示意圖。



Path 1 : Apply ROS to real-time stimulation

Path 2 : HeLa cells release ATP

Path 3 : SiNW FETs adopt for the real-time detection of ATP

圖 1-2、矽奈米線場效電晶體感測活體細胞釋放 ATP 分子示意圖。

1-2 神經系統簡介

生物體為了生存和繁衍後代，能夠感受環境的種種變化，並產生適當的反應來保護自己。神經系統是人體重要的調節機構，可因應外在環境的變化而產生適當反應，使人們擁有思考、記憶以及情緒的能力。神經系統可分為中樞神經系統 (Central Nervous System, CNS) 與周邊神經系統 (Peripheral nervous system, PNS)。神經細胞則是神經系統作用的基本單元，具快速傳遞訊息的功能[2]，如圖 1-3。以構造來說，可分為細胞本體(Soma) 與突起(Neurite)，而突起又分為將訊息接收至神經細胞的樹突(Dendrite) 和負責將訊息傳遞出去的軸突(Axon)，圖 1-4 為神經元結構。

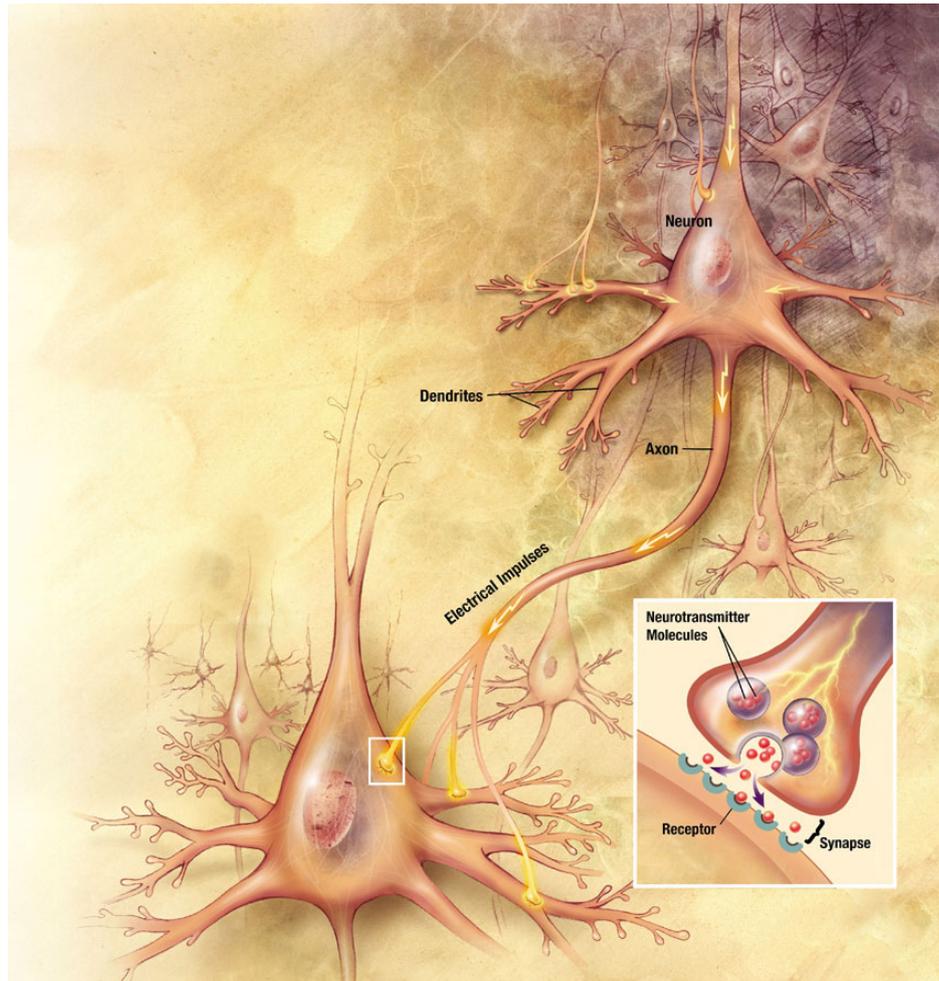


圖 1-3、神經元之間的訊息溝通[3]。

神經細胞彼此連結，藉由化學分子與電訊號傳遞於突觸(Synapse，神經細胞間界面) 形成神經網路，圖 1-5。在神經受傷時，神經網路的傳遞中斷，在此同時人體內自然具備有神經網路修復的功能[3]。不同的神經系統，神經網路修復與重建的方式不同，譬如中樞神經系統可以藉由增加神經之間溝通介面突觸來重新建立神經網路。另一方面在周邊神經系統細胞除了增加突觸機會外，更可以藉由周邊神經再生，並將神經之軸突導引至中斷的神經網路，以產生有效之傳遞系統[4]，圖 1-6。

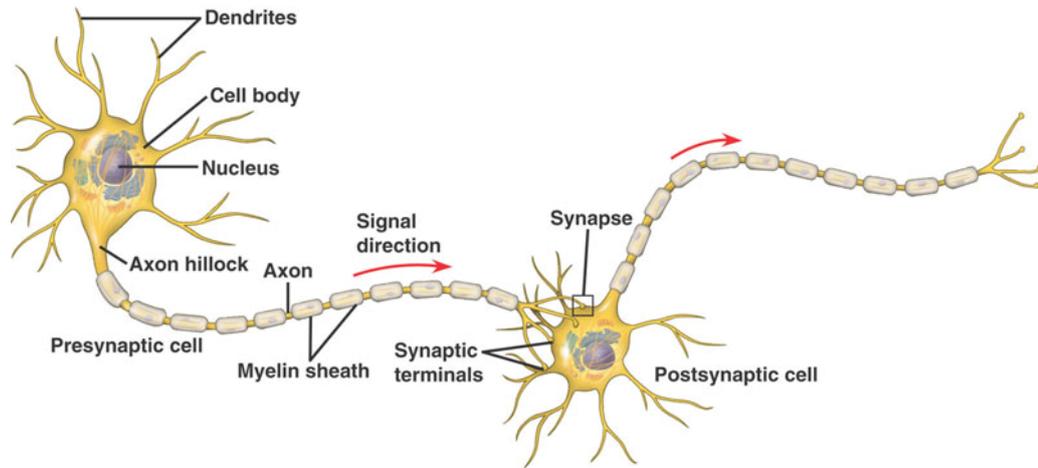


圖 1-4、神經元結構[3]。

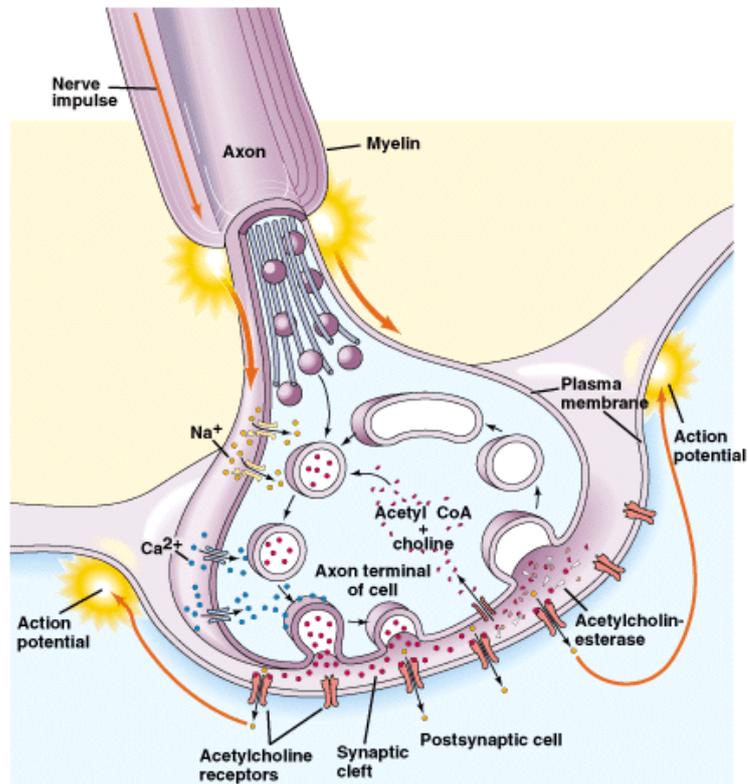


圖 1-5、突觸間的分子傳遞[3]。

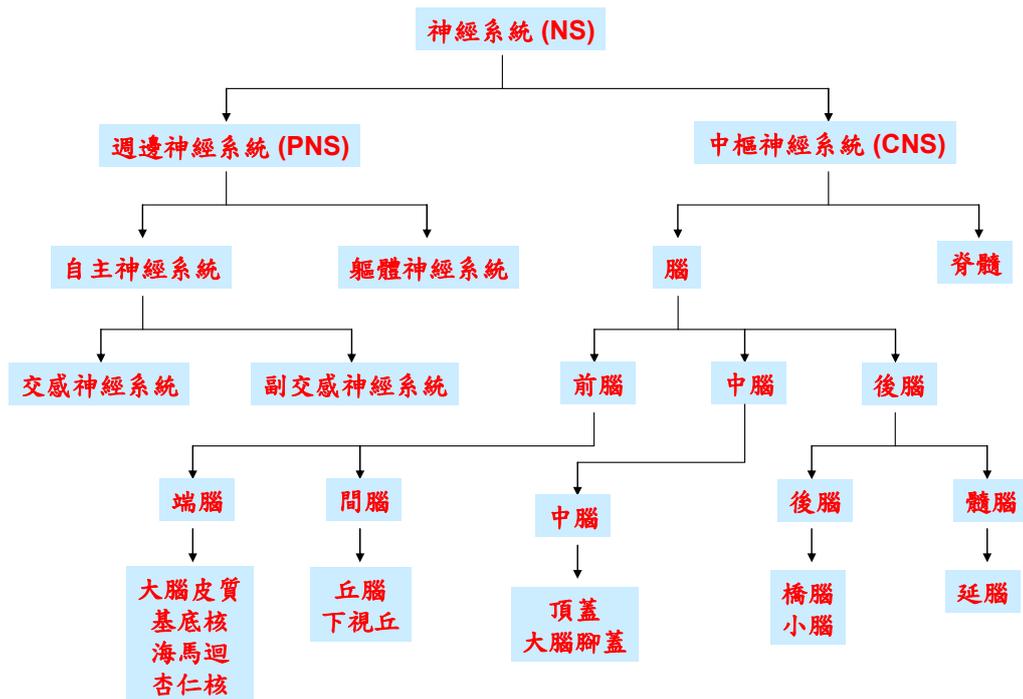


圖 1-6、神經系統分類。

1-3 矽奈米線生物感測器簡介 896

生物感測器被定義為一個元件是由生物辨識系統(Biological Recognition System)所組成，基本上是由生物受體(Bioreceptor) 及轉換器(Transducer) 所組成。待測物會與生物受體有特定的分子間作用，因為具有特定之專一性，故可以進行分子辨識。常用的分子辨識方法有 5 類型，包括抗體/抗原反應、核酸反應、酶反應、細胞反應及仿生材料反應，由於此分子間之特定作用力，會使轉換器感應到特殊的訊號變化。

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，感測分子為細胞釋放的三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP)。

未來的元件尺寸必須不斷縮小，需要高靈敏性、偵測快速、高選擇性、免標識及即時反應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大的幫助[5]，如癌症或是疾病生物的標示[6]，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。其中最為大眾熟知的商用生物感測器是使血糖生物感測器，它用酶(酵素)分解血糖。在這個過程中電子轉移到電極上，從而可以測量血糖的濃度，市場對於類似感測器的大量需求大大促進了相關感測器技術的開發。

1-4 生物分子修飾與量測

本實驗將 Abl tyrosine kinase 修飾在矽奈米線上，用來即時感測細胞所釋放的 ATP 分子。ATP 是三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP)，為一種核苷酸 (Nucleotide)，做為細胞內能量傳遞的分子通貨，儲存和傳遞化學能。ATP 是人體主要的能量來源，人類攝取食物中的葡萄糖，經一連串的化學反應後，會產生 ATP，每分子的葡萄糖經生化反應後產生 36 到 38 個 ATP 分子。ATP 分子由腺苷和三個磷酸基所組成，化學簡式為 $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ，分子式 $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ，分子量為 507.18，三個磷酸基團從腺苷開始被編為 α 、 β 和 γ 磷酸基。ATP 的化學名稱為 5'-三磷酸-9- β -D-呋喃核糖基腺嘌呤，或者為 5'-三磷酸-9- β -D-呋喃核糖基-6-氨基嘌呤，如圖 1-7。

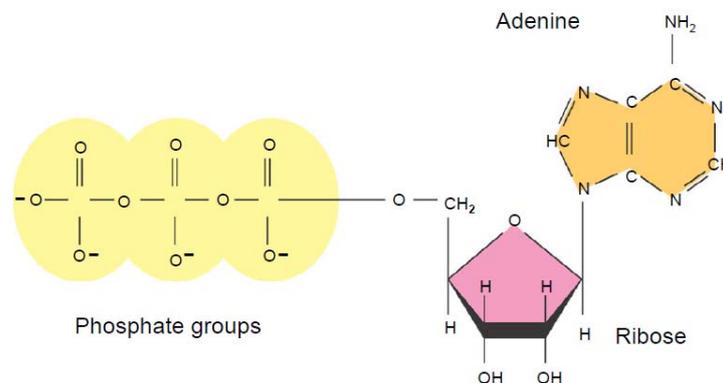


圖 1-7、ATP 結構示意圖[7]。

如圖 1-8，ATP 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(Membrane protein)，膜蛋白上有許多通道(Channel) 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。第二種功能是機械運動功能，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 分子。

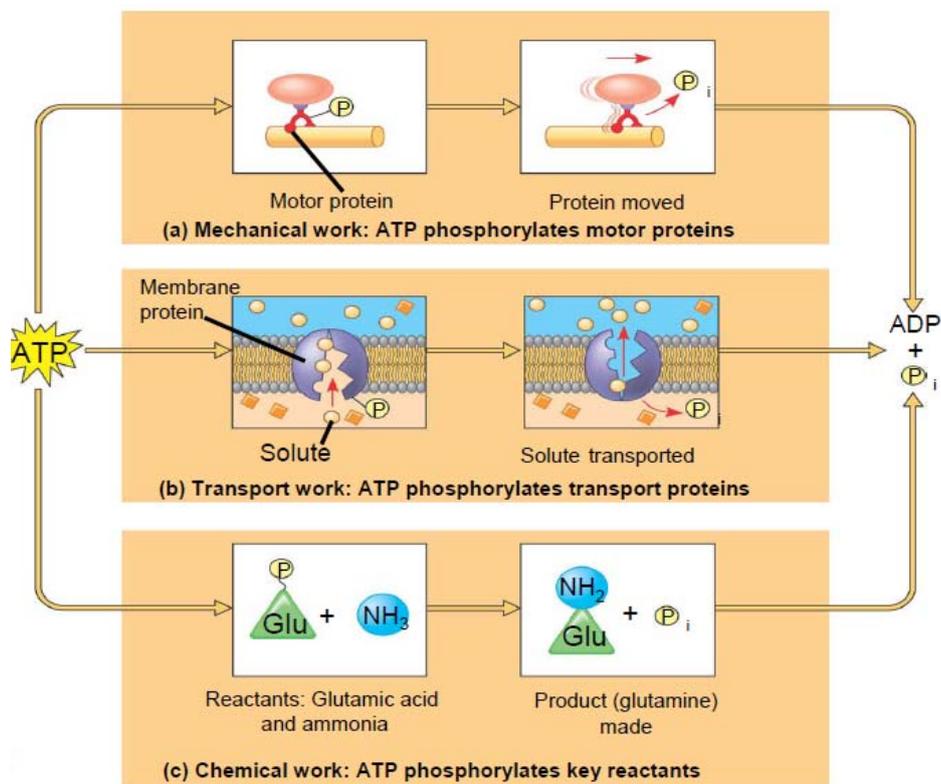


圖 1-8、ATP 生理功能示意圖[7]。

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，修飾流程如圖 1-9 所示，圖 1-10 為表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖。Aldehyde silane 先和 Silicon 上的 Silanol group 反應連接，加入 Abl tyrosine kinase 讓其一級胺(-NH₂)與 Aldehyde group 反應，此為固定蛋白質在 Silicon 表面的方式之一。

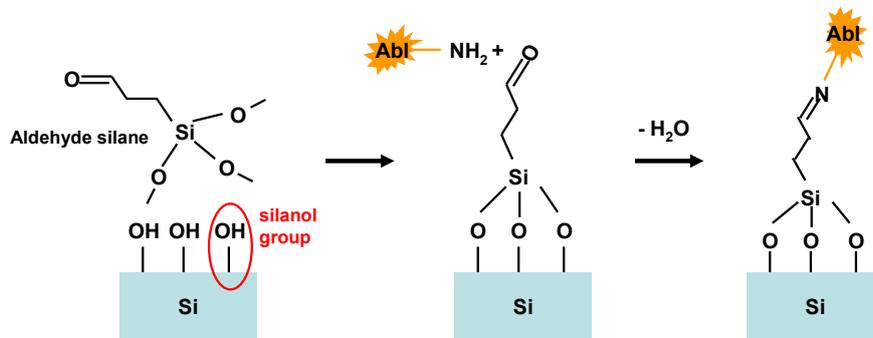


圖 1-9、Aldehyde silane 修飾流程圖。

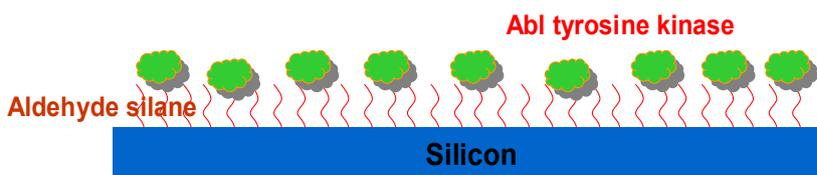


圖 1-10、表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖。

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。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，也很可能會導致癌症[8]。Abl tyrosine kinase 有 Active 和 Inactive 型態，

如圖 1-11，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% 的病患有 Abl tyrosine kinase 與基因 BCR 連結的突變，造成 Abl tyrosine kinase 過度活化。由於 Abl tyrosine kinase 會與 ATP 分子結合，將 ATP 分子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 分子。

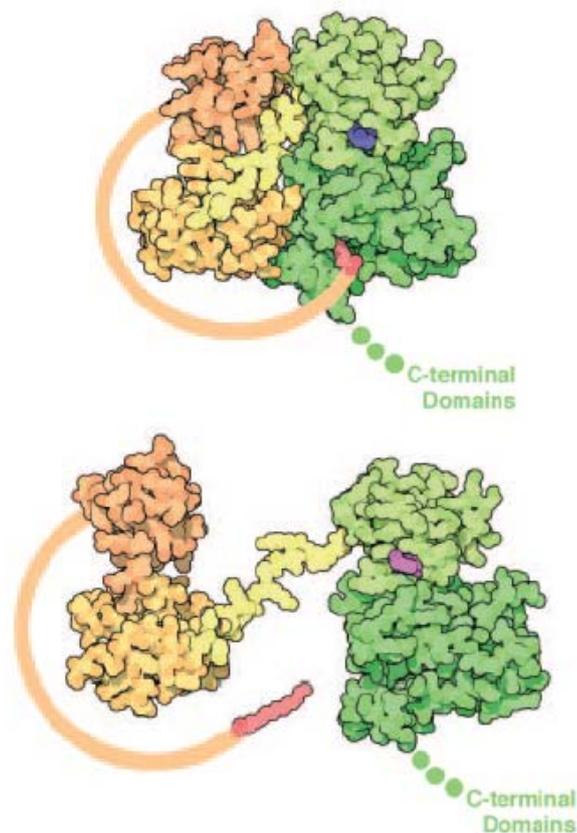


圖 1-11、Abl tyrosine kinase 之 Active 和 Inactive 型態[8]。

1-5 研究動機及目標

本研究要整合生物體與元件，進一步能運用在生物醫學治療方面。人體的溝通、協調都是靠神經系統來完成，一個正常人的神經網路訊息傳遞是快速、順暢的，如果神經網路受破壞，於受傷區域有效且具方向性地神經導引變得極為重要，因此相關研究嘗試發展可以植入人體受損神經網路區的生物晶片，藉由晶片導引正常神經細胞向受損處生長並修補，使訊息能重新傳遞下去。

許多文獻報導，自由基是造成細胞病變的重大因素，癌細胞與正常細胞所釋放出的 ATP 分子濃度也不盡相同，所以量測細胞受刺激後的 ATP 分子濃度即可分辨是否可能有癌細胞的存在。本研究針對自由基對於細胞的刺激，用來量測細胞在受自由基刺激過程中所釋放出的生物分子，經過以上對矽奈米線場效電晶體生物感測器介紹，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，如圖 1-12。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做為目標。

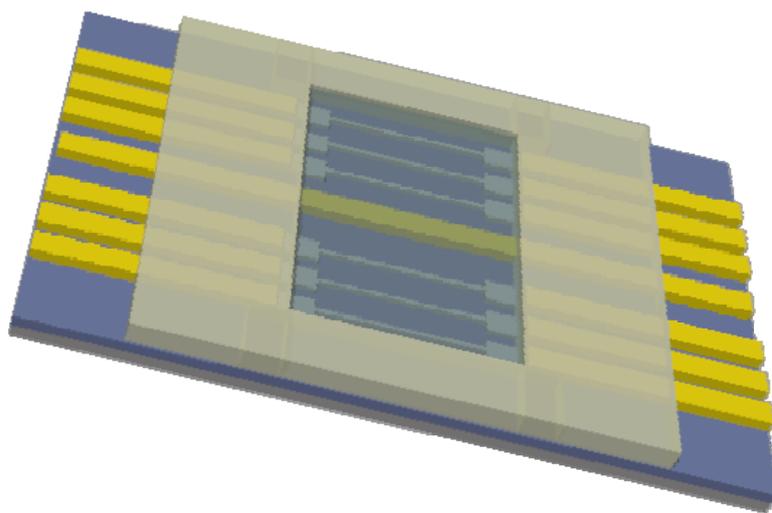


圖 1-12、矽奈米線場效電晶體結構。

首先給予細胞自由基刺激，並測試細胞經由自由基刺激可以即時釋放我們要偵測的 ATP 分子；另一架構為製作出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。最後，將活體 HeLa cell 經繼代培養(Subculture) 直接培養在矽奈米線場效電晶體上，使細胞和矽奈米線場效電晶體結合，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 分子，如圖 1-13。

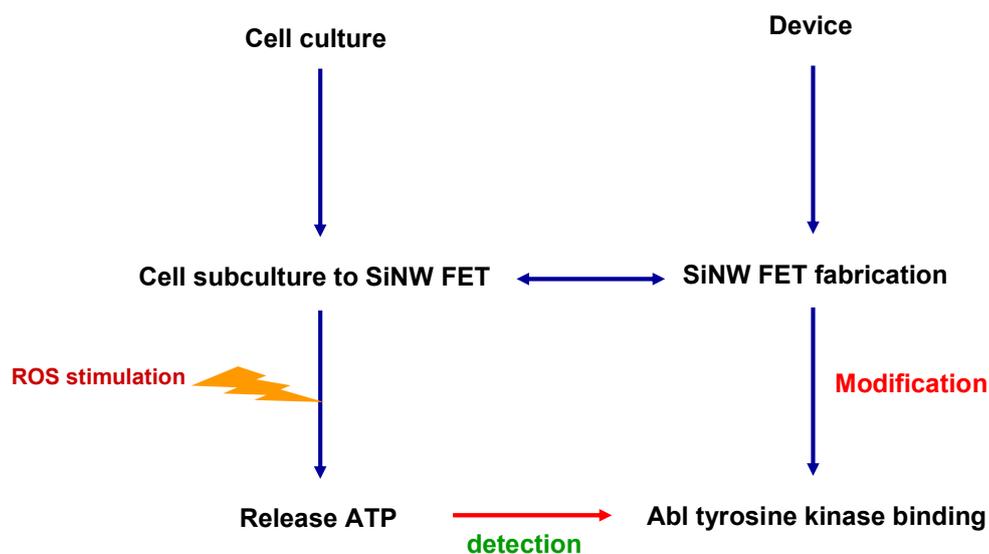


圖 1-13、實驗架構。

1-6 文獻回顧

首先介紹一下文章內容的編排，本論文分兩大部分，第一部分為選擇性導引 PC12 cell 細胞圖案；第二部份為選擇性導引 HeLa cell 細胞圖案，最後在結合細胞與矽奈米線場效電晶體來感測細胞釋放的 ATP 分子。本研究的實驗編排也是依照類似的順序來說明，從基本的細胞培養，元件結構製作，最後將細胞與元件整合，完成整個生醫感測，如圖 1-14。

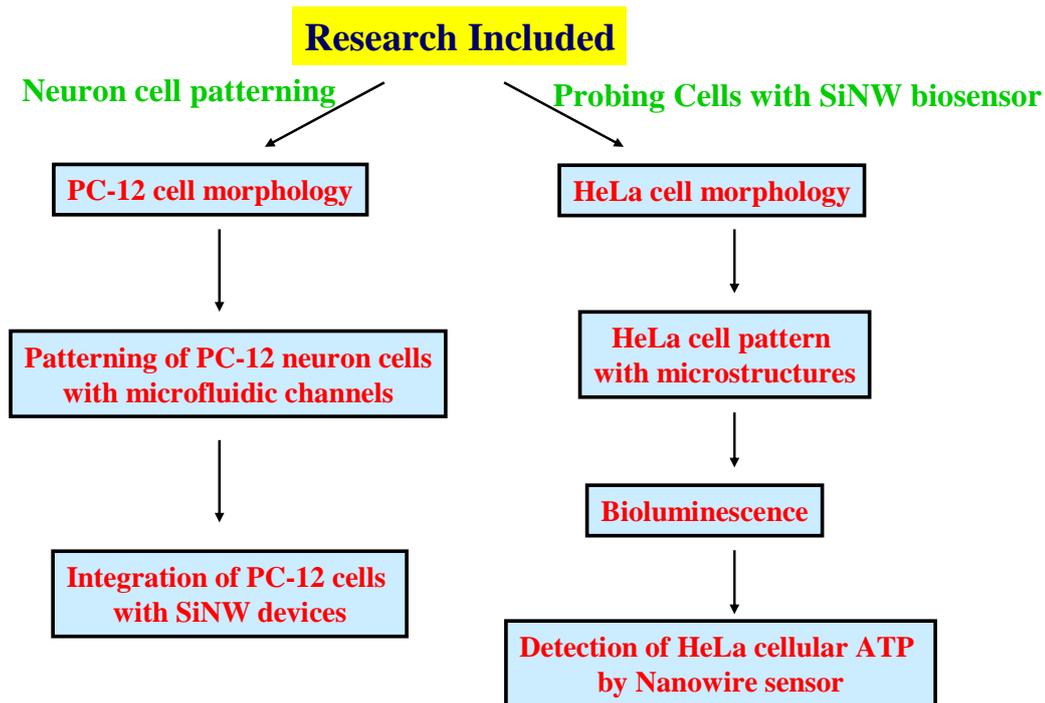


圖 1-14、論文主軸。

近年來由於半導體產業的快速發展，製作功能性晶片的方法也大幅進步，雖然有許多種用半導體方法製成的生物感測晶片，但其中以矽奈米線作為感測元件展現出最佳的表現。哈佛大學化學暨生化系的 Lieber 教授首先提出以奈米線組裝到晶片表面的電極上而形成場效電晶體[9]。其係利用流體攜帶的方式將矽奈米線流到表面並跨接在兩個電極上，稱為源極(Source) 與汲極(Drain)，然後將小分子的生物素(Biotin) 組裝到奈米線的表面。接著若是分子量為 60,000 的 Streptavidin 蛋白質流過奈米線表面，由於此蛋白質與 Biotin 分子間具有專一性，因此很快的反應到奈米線的表面，進而影響到奈米線的電導率(Conductance)。由於奈米線場效電晶體極為靈敏，所以不同濃度的 Streptavidin 蛋白質其對奈米線之電導效應可以被量測出。

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[9]，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[10]，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[11, 12]。

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，如圖 1-15 之示意圖。

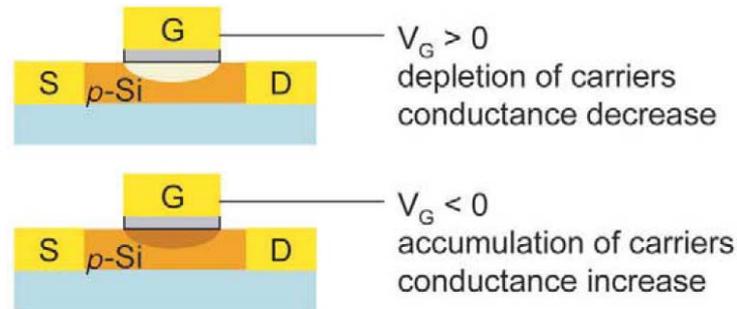


圖 1-15、矽奈米線場效電晶體生物感測器之感測機制示意圖[13]。

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個上電極之正電壓，造成 P 型矽載子空乏，而使電晶體之電流及電導率因此下降；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電導率因此上升，達到其感測分子之目的[13]。

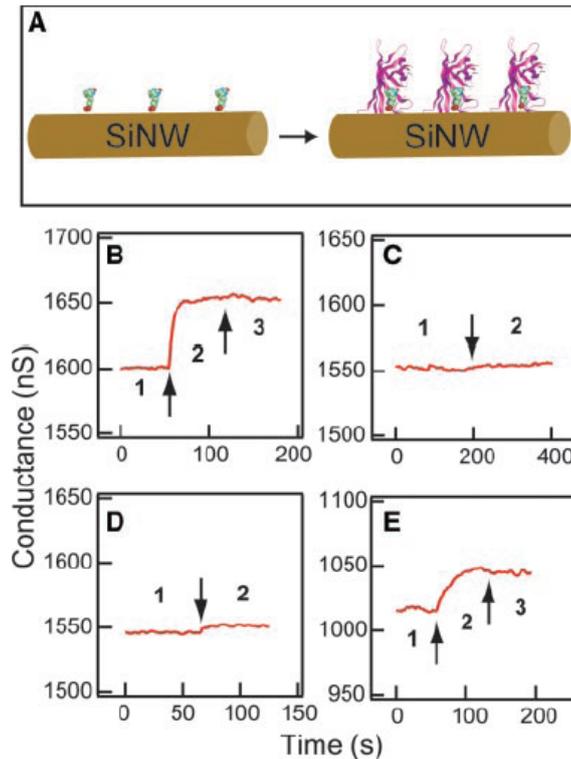


圖 1-16、蛋白質感測之實驗結果[9]。

圖 1-16 為 2001 年 Charles M. Lieber 團隊發表在 Science 期刊[9]，做蛋白質感測之實驗結果，所要感測的目標蛋白質為 Streptavidin。Lieber 團隊先在矽奈米線表面修飾 BSA-biotin 分子，利用 Biotin 與 Streptavidin 之間的生物專一性來結合，由於 Streptavidin 帶負電，所以會使矽奈米線電晶體之電導上升，如圖 1-16B。圖 1-16C 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 1-16D 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，因為剩餘的 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。圖 1-16E 則表示此感測器對 Streptavidin 濃度之感測極限，為 25 pM。

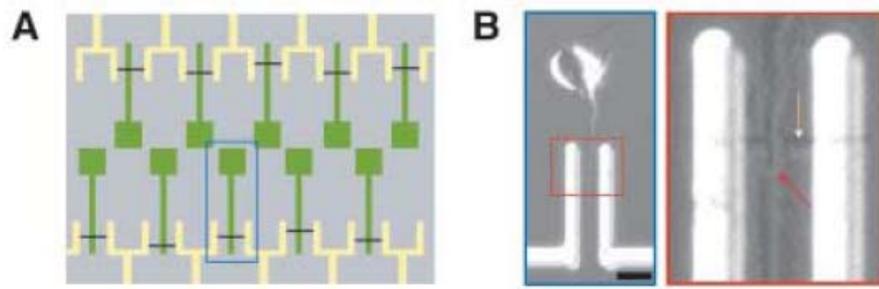


圖 1-17、神經細胞生長跨越矽奈米線[14]。

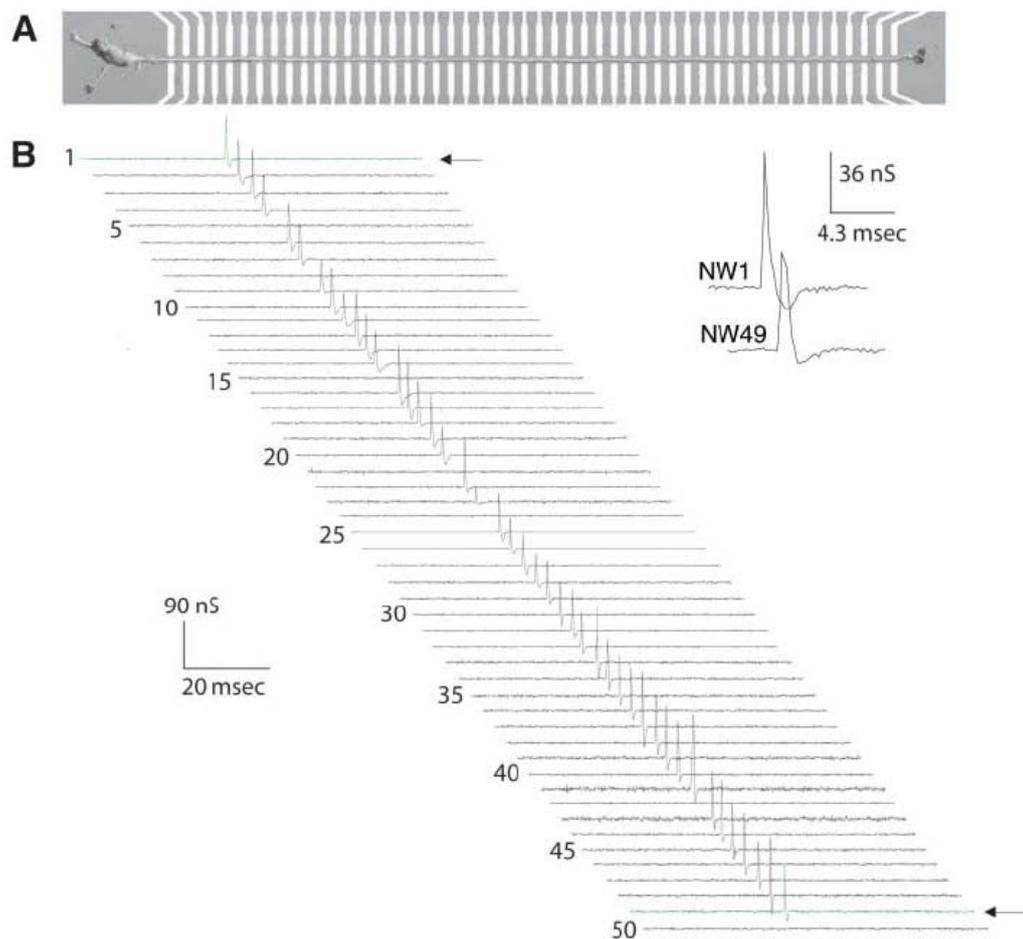


圖 1-18、感測神經細胞動作電位[14]。

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，圖 1-17，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[14]。如圖 1-18，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[14]。

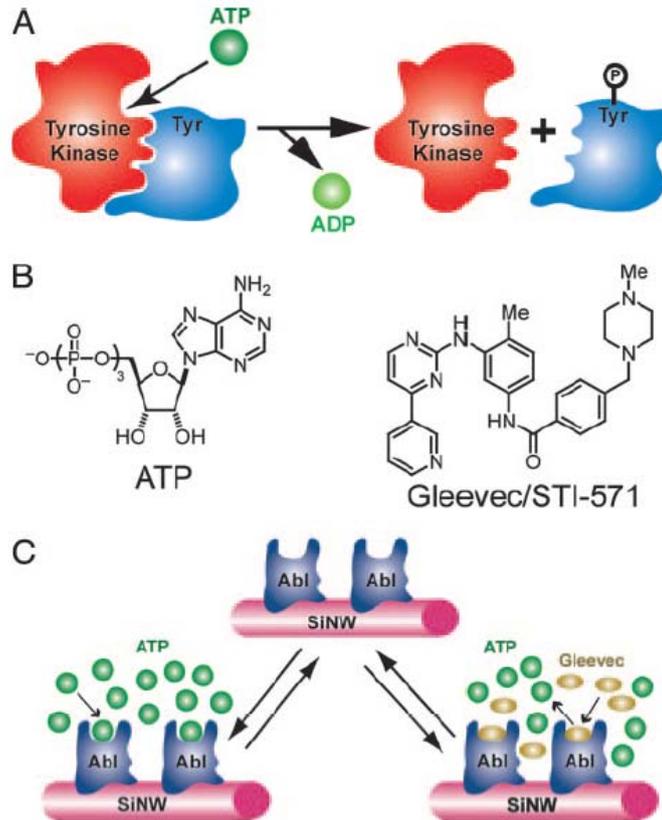


圖 1-19、偵測小分子與蛋白質間作用示意圖[15]。

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，他們在矽奈米線上修飾 Abl tyrosine kinase 來做為藥物篩檢的感測器，如圖 1-19，修飾在矽奈米線上的 Abl 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 Abl tyrosine kinase 的 binding site，在此實驗中，使用的 Abl tyrosine kinase 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1-18C，Gleevec/SIT-571 將 ATP 的 binding site 佔據，使 ATP 不能與 Abl tyrosine kinase 結合[15]。

Prof. C. M. 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。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。

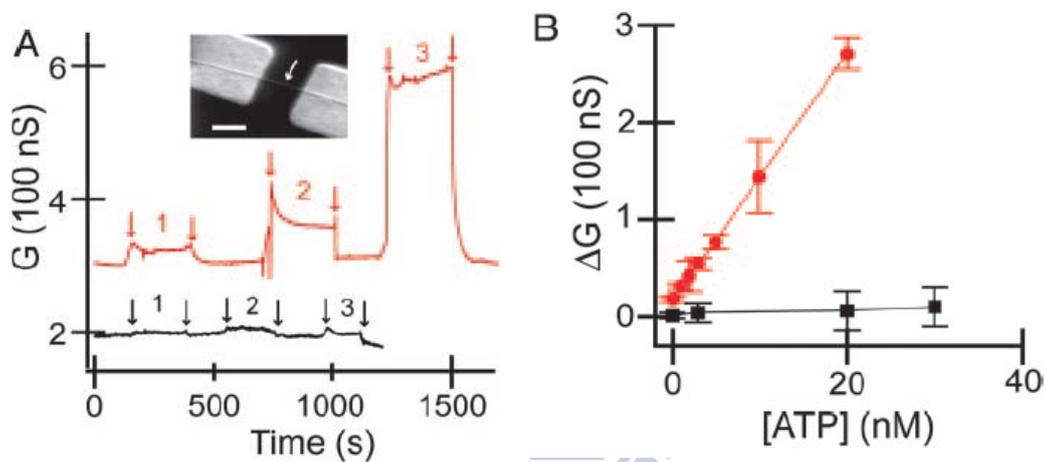


圖 1-20、矽奈米線偵測 ATP 分子[15]。

圖 1-20 為 Prof. C. M. Lieber 團隊對 ATP 即時偵測的實驗結果，在圖 1-20A 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電導率的變化，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 分子，其偵測極限可到 0.1 nM；圖 1-20B 是 ATP 濃度對電導率變化量(ΔG) 做圖，呈線性關係的改變[15]。

圖 1-21 為 2007 年在 Small 期刊發表的文獻[16]，實驗以單壁奈米碳管場效電晶體(Single-Walled Carbon-Nanotube Field-Effect Transistor, SWCNT-FET) 應用於生物感測，來偵測神經細胞釋放的分子 Chromogranin A，簡稱 CgA。實驗首先設計出

SWCNT-FET 元件，將 Cortical neurons 細胞培養在元件上以 Glutamate 刺激，用 SWCNT-FET 去量測細胞釋放出的 CgA，如圖 1-22。圖 1-23 是 2008 年在 Nanotechnology 期刊發表的文獻[17]，實驗以 SWCNT 元件來感測血液中乳癌細胞，先將 SWCNT 修飾上選擇性抗體，讓此抗體能與細胞上抗原做生物專一性結合，之後再加入細胞之後可以明顯看到電流的變化。

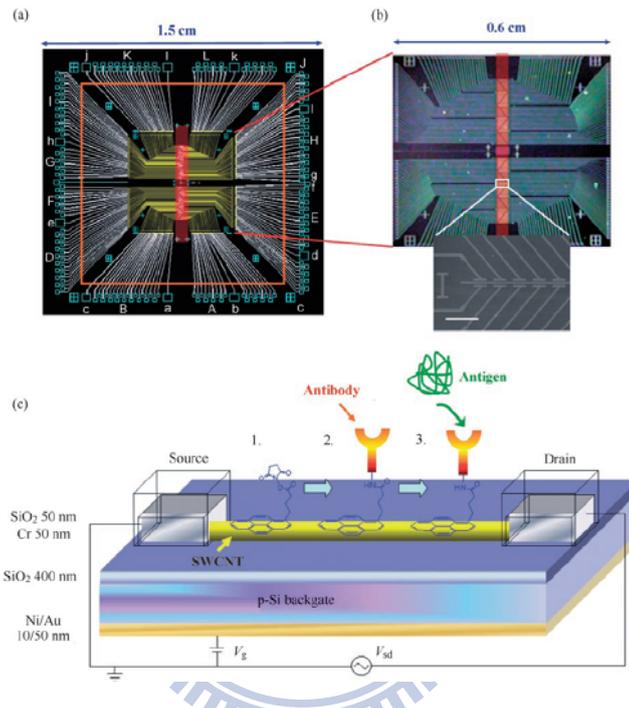


圖 1-21、SWCNT-FET 元件設計與製程[16]。

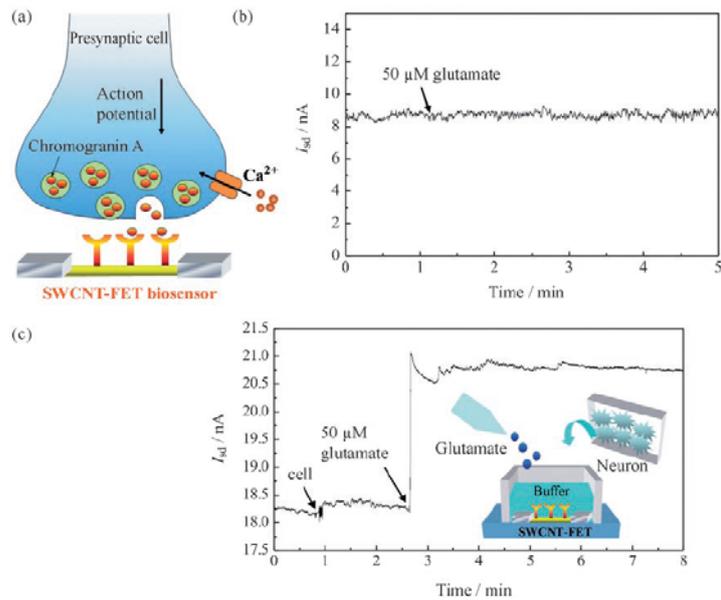


圖 1-22、SWCNT-FET 感測神經細胞釋放出的分子 CgA[16]。

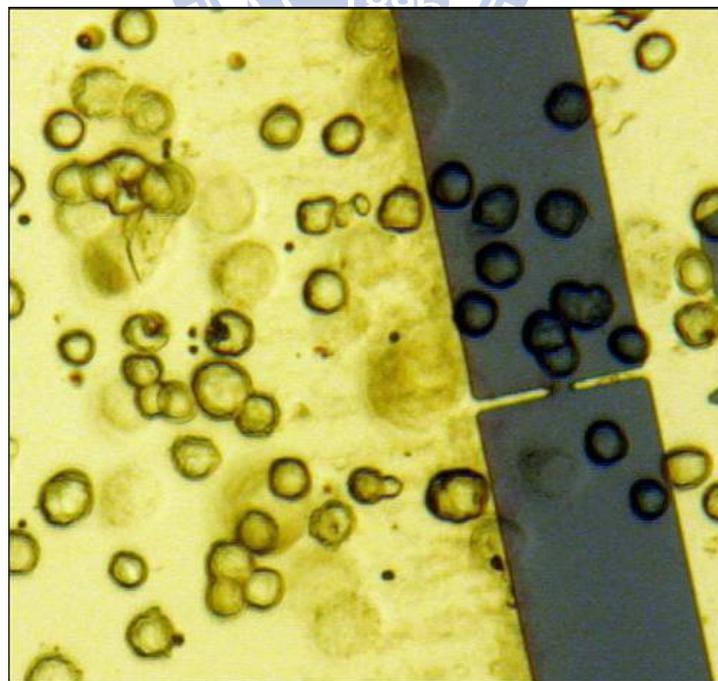
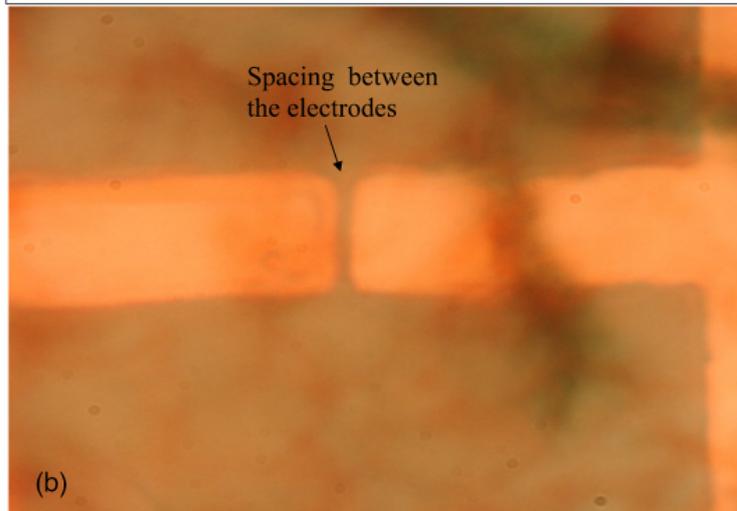
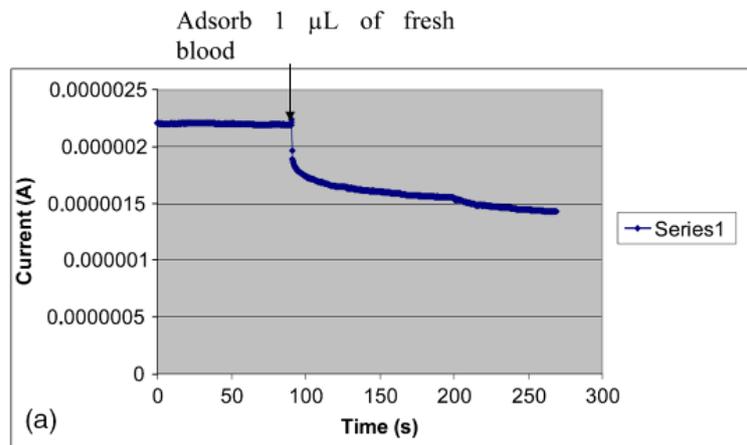


圖 1-23、SWCNT 元件感測血液中乳癌細胞[17]。

第二章

選擇性導引 PC12 cell 細胞圖案

2-1 實驗動機

導引細胞運動被認為是組織工程學中的關鍵過程[18]。因此，控制細胞移動方法的研究對於瞭解細胞基本形態發生過程是一重要的課題，利用微流道的相關研究已有相當多的文獻發表。為瞭解細胞移植行為的機制，使用微製造技術製備精確地貌基板相當有用，利用光學微影技術(Photolithography) 可將設計的圖案轉移到矽晶片的表面，明確定義的表面地貌特徵包括孔洞、溝槽等。細胞對這些基板的響應深受其幾何特徵尺寸的影響，細胞本身會適應周遭的環境來作排列；細胞的運動方向會由表面的形狀所導引的現象已廣為人知。流道溝槽的圖案也被用來做此研究；微流道的寬度、深度與重複的間隔都會影響細胞的位向和形狀。

本文將介紹神經分化導引晶片，藉由可重複大量製作的矽晶片上之微流道導引神經細胞，影響神經細胞的分化行為，並藉由觀察神經細胞生長於不同尺寸的微流道生長分化的情形，來推論在多大的尺寸下神經細胞可以有效地被導引生長，以提供未來植入晶片與現有神經組織間形成有效神經網路介面連結的解決方法。

2-2 PC12 細胞培養

整合細胞與元件，需要有良好的細胞株；由於 PC12 細胞生長快速且具有類似未分化神經細胞的特性，適合在實驗室持續生長，一旦受到神經生長因子 NGF 刺激就會進一步分化成神經細胞，具有樹突、軸突以及與鄰近細胞形成突觸與神經網路的能力[2]。

2-2-1 PC12 細胞簡介

PC12 細胞是由一個大白鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 (Rat adrenal pheochromocytoma) 選殖出的細胞株，命名為 PC12 細胞株。此細胞株是由外胚層 (Ectoderm) 之細胞發育而成，當以神經成長因子 NGF (Nerve growth factor) 處理造成分化後，PC12 細胞更明顯地表現出成熟神經細胞的特性，稱之為已分化 (Differentiated) PC12 細胞。已分化的 PC12 細胞會生長出許多軸突 (Axon) 和樹突 (Dendrite)，總稱為突起 (Neurite)，於細胞分枝的末端上累積許多小液泡 (Vesicles)，能合成與儲存神經傳導物質 (Neurotransmitter)，因此 PC12 細胞無論是對於生物感測器與神經科學領域而言都是一個很好的實驗材料[19]，圖 2-1。

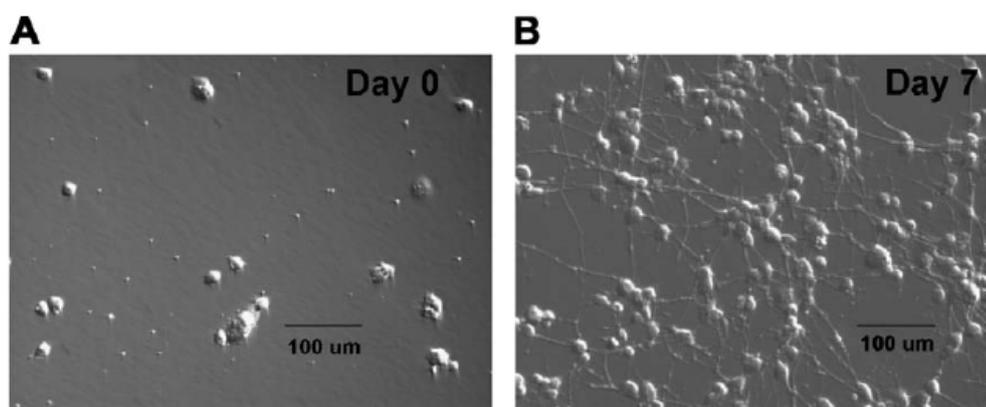


圖 2-1、倒立式顯微鏡觀察 PC12 cell 分化前後型態[19]。

PC12 是一種常用來研究神經細胞分化行為的細胞株。傳統上 PC12 細胞生長於聚苯乙烯 (Polystyrene) 的塑膠盤上，其神經生長分化不具方向性。圖 2-2 是生物研究團隊拍攝 PC12 cell 在 Confocal 螢光顯微鏡下的細胞型態[20]，從此研究可以很清楚的看出從一個細胞本體分化出許多的突處以及突處末端的小液泡。

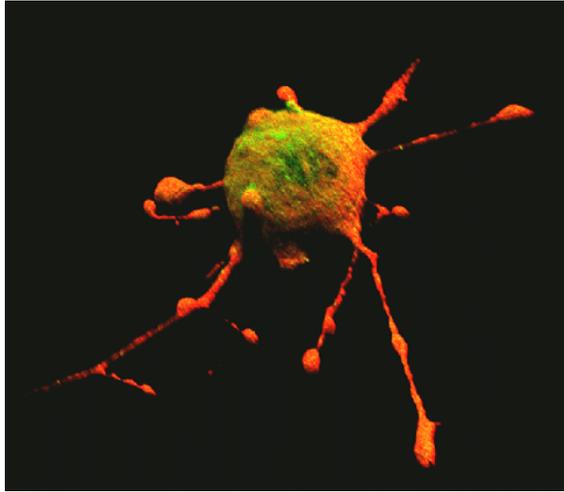


圖 2-2、Confocal 螢光顯微鏡下的 PC12 cell[20]。

2-2-2 細胞培養實驗流程

PC12 細胞培養在 37°C、5% CO₂ 培養液為 RPMI 1640 medium 混合馬血清 (Horse serum) 和胎牛血清(Fetal bovine serum)，開始細胞培養以前先將培養液至於 37°C 水溫槽中回溫。

細胞培養步驟如下：

- (1) 配置細胞培養液。
- (2) 準備離心管。
- (3) 細胞離心。
- (4) 去除上清液。
- (5) 加入新的培養液。
- (6) 打散細胞。
- (7) 細胞加到新培養盤。
- (8) 置入 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養。

圖 2-3 是將 PC12 培養在有修飾蛋白的培養盤上，等細胞貼附在培養盤。以神經成長因子 NGF (Nerve growth factor) 50 ng/ml 誘導 PC12 分化後，圖 2-4，每隔 48 小時更換新的細胞培養液，並重新添加 NGF 生長因子。



圖 2-3、未分化的 PC12 cell 細胞型態。

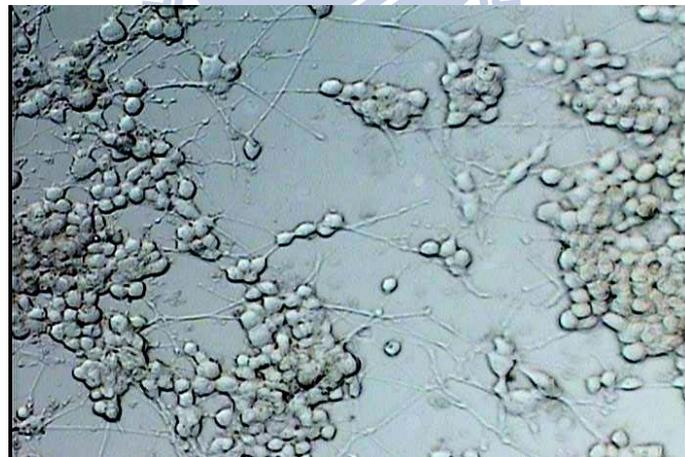


圖 2-4、已分化的 PC12 cell 細胞型態。

2-3 微流道製作流程

在本實驗中以負光阻(SU-8) 作為開放式微流道的材料。使用光學微影技術製做開放式微流道，這是一個可靠、迅速且容易的方法，來生產大量相同的微流道結構以從事細胞的體外研究，如圖 2-5。本實驗利用具有各種寬度與深度的微流道來探索細胞的行為。本研究感興趣的是確定更寬且更深的平行微溝槽有導引細胞遷移的作用。更深的微溝槽會比平坦的表面更能夠促進細胞的遷移，促進的程度將取決於微溝槽的尺寸。開放式微流道製程步驟如下：

- (1) Initial clean、HMDS vapor 處理。
- (2) 旋塗光阻 SU-8 2015。
- (3) 軟烤 65°C 1 分鐘、
95°C 5 分鐘、
65°C 1 分鐘。
- (4) 光罩對準曝光定義 Active area。
- (5) 曝後烤 65°C 1 分鐘、
95°C 2 分鐘、
65°C 1 分鐘。
- (6) 光阻顯影。
- (7) 硬烤 150°C 20 分鐘。

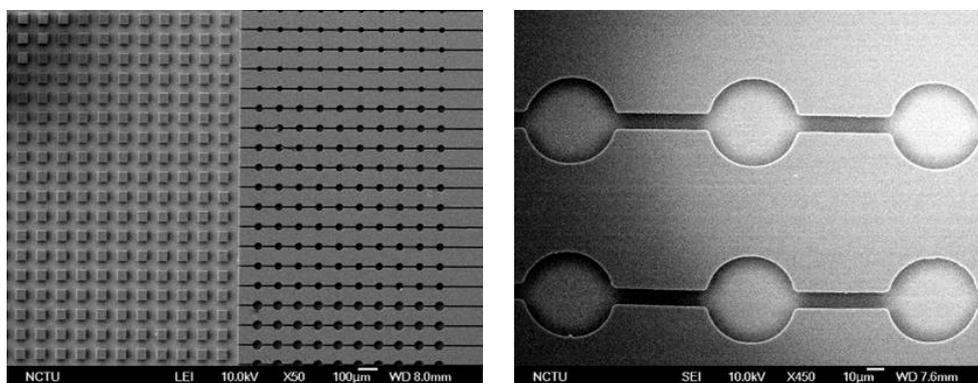


圖 2-5、開放式微流道 SEM 圖。

2-4 蛋白質表面修飾

微流道晶片的製作流程主要是利用光學微影技術(Photolithography) 來完成,如圖 2-6 為玻璃開放式微流道製作流程圖以及俯視圖。本研究利用高分子負光阻 SU-8 所製作出的微流道,其結構深度為 20 μm ,如圖 2-7。晶片在經過臭氧(O_3) 的處理後,結構表面轉為附有 SiOH 基團而變成親水性表面(Hydrophilic surface),可進一步修飾上 Collagen 蛋白,讓 PC12 進行細胞的附著,如圖 2-8。

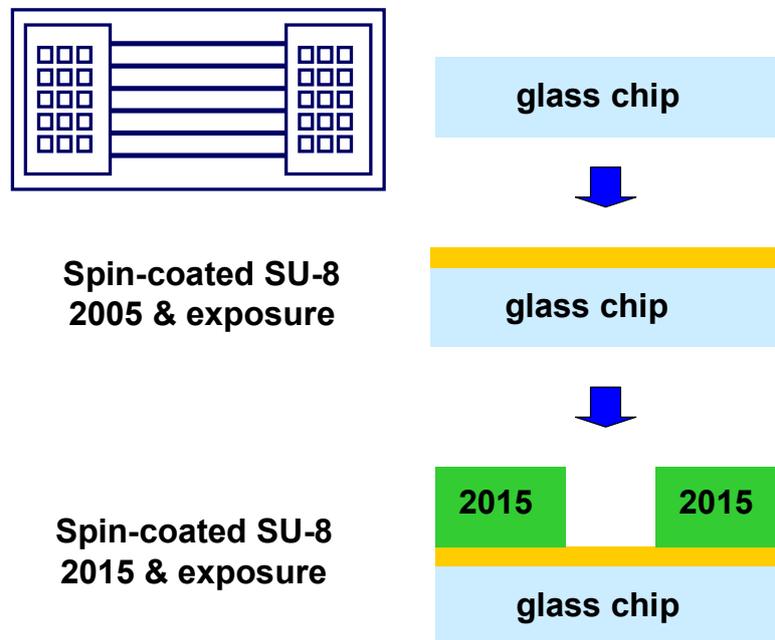


圖 2-6、玻璃開放式微流道製作流程。

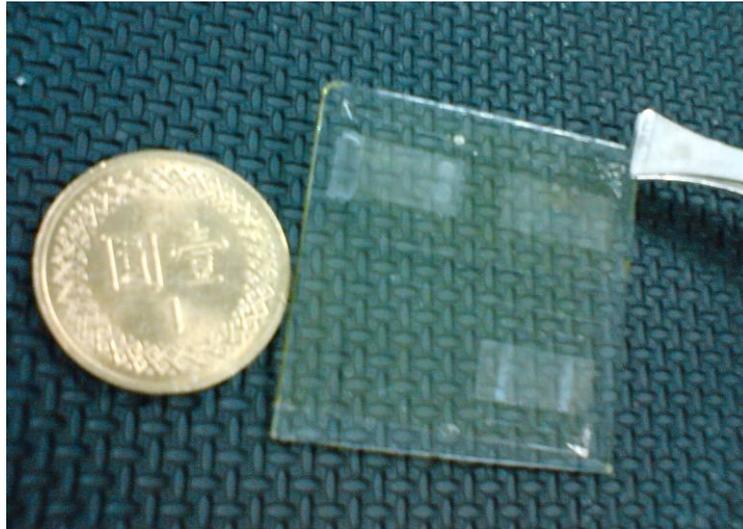


圖 2-7、玻璃微流道照相圖。

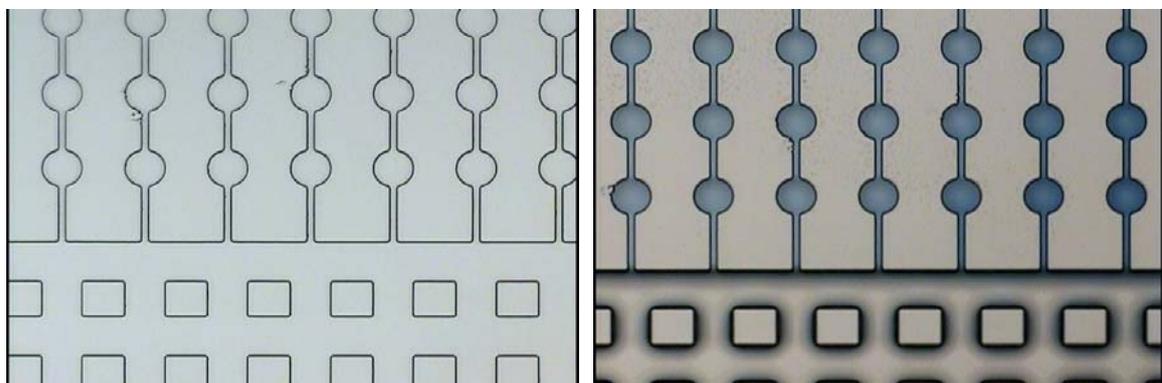
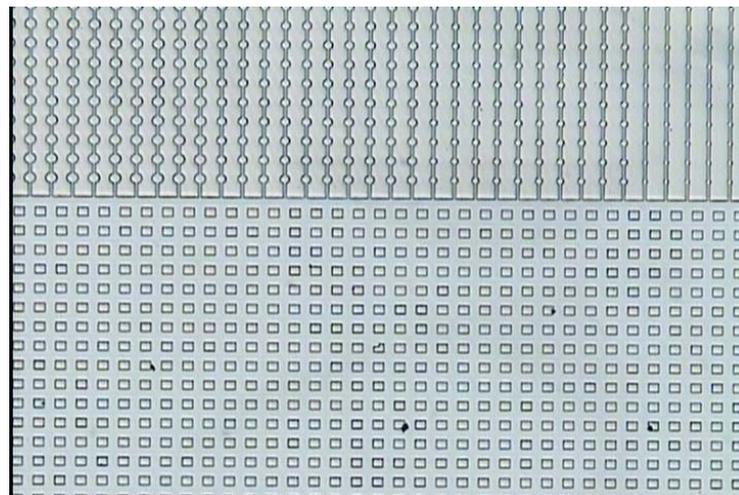


圖 2-8、微流道光學顯微鏡俯視圖。

為了證明蛋白確實會佈滿在整個微流道上，我們先把帶螢光的 Laminin 做流道螢光測試，步驟如下：

- (1) 玻璃晶片。
- (2) SU-8 微流道製程。
- (3) O₃ 處理，使流道親水。
- (4) 微流道 Protein tank 注入帶有螢光的 Laminin 蛋白。
- (5) 等螢光 Laminin 佈滿流道。
- (6) 螢光顯微鏡觀測。

實驗結果可以清楚的看到 Laminin 蛋白修飾前後的螢光圖，如圖 2-9。

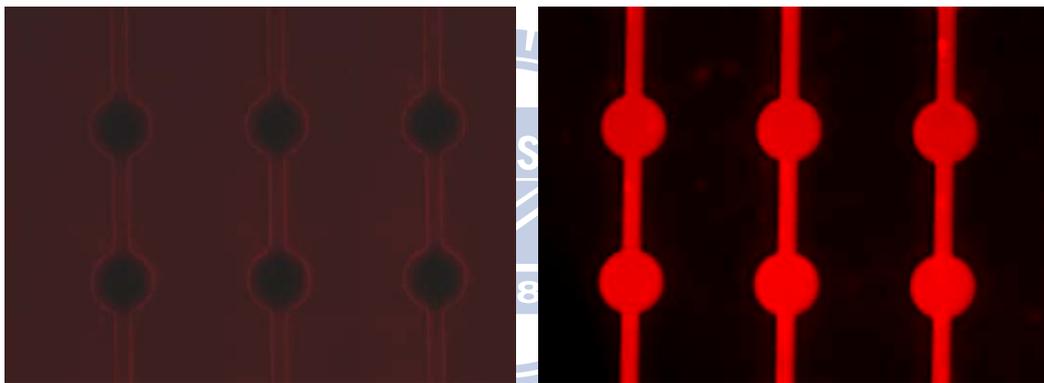


圖 2-9、Laminin 蛋白修飾前後的螢光圖。

另外我們也用 Trypan blue 染劑測試流道流通情形，圖一可以很清楚得知染劑作用前後流道顏色的變化，證明流道是可流通的，圖 2-10。

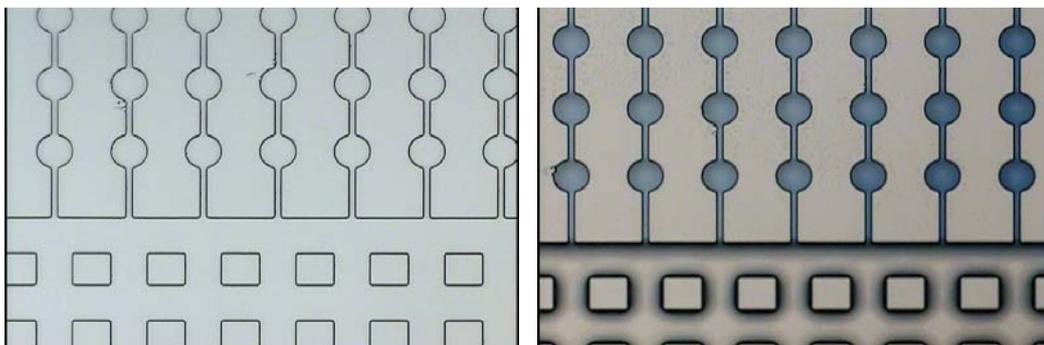
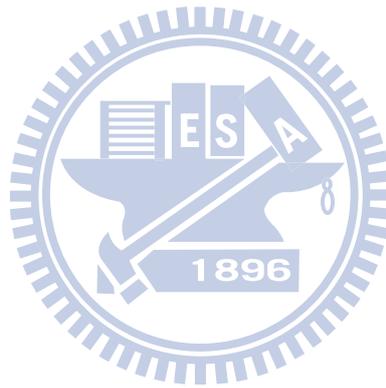


圖 2-10、Trypan blue 染劑測試流道流通圖。

螢光測試結果證明出螢光 Laminin 蛋白確實有修飾到晶片上。之後我們直接在微流道晶片上修飾 Collagen，步驟如下：

- (1) Silicon 晶片 Initial clean。
- (2) HMDS vapor 處理。
- (3) SU-8 微流道製程。
- (4) O₃ 處理，使流道親水。
- (5) 微流道注入 Collagen 蛋白。
- (6) 等 Collagen 佈滿流道。
- (7) 乾燥。
- (8) 加入細胞培養液。



2-5 選擇性導引 PC12 cell 細胞圖案

將 PC12 細胞生長在具微流道且經分子表面處理的矽晶片上持續生長，於培養皿加入 NGF 50 ng/mL 誘導神經細胞分化而生長出突起(Neurite)，並利用顯微鏡觀察 PC12 細胞在 SU-8 微流道上的生長情形。本實驗分別以不同大小的微流道來培養 PC12 細胞生長[19]。

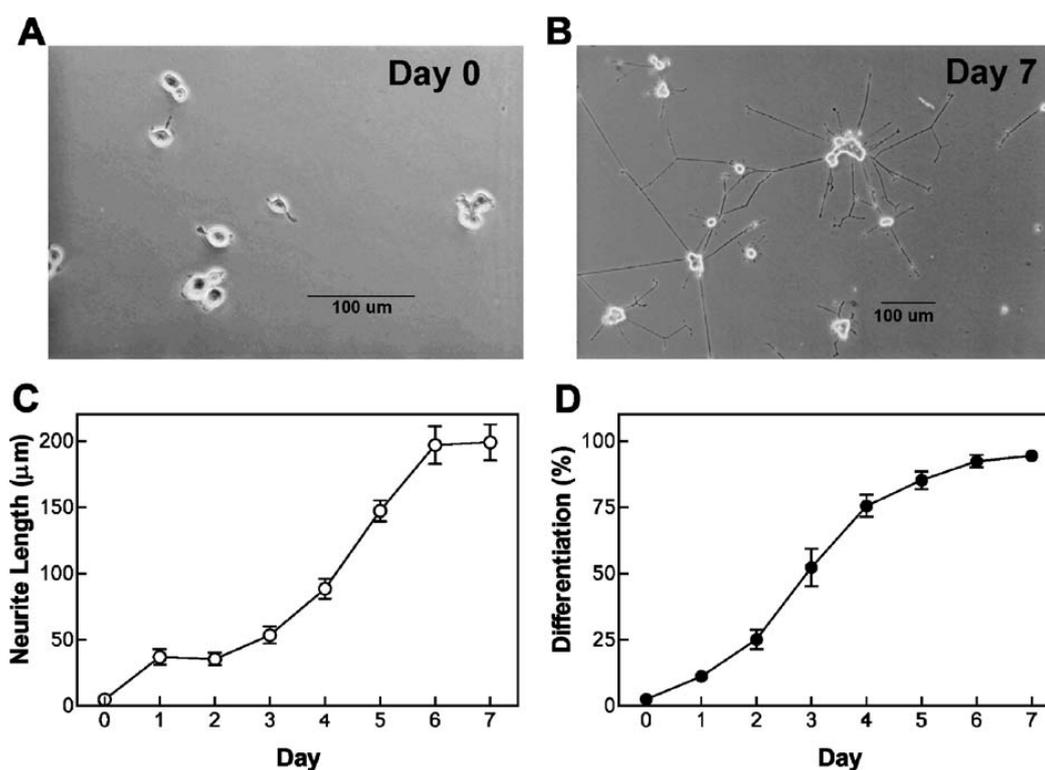


圖 2-11、PC12 細胞分化程度比較[19]。

要使 PC12 在矽晶片上長出軸突和樹突前，必須選定蛋白來讓細胞貼附。本實驗以矽晶片做為基底來做 2 種蛋白測試，分別是修飾上膠原蛋白(Collagen) 與長鏈氨基酸 Poly-lysine，之後將 PC12 經細胞繼代培養(Subculture) 方法，培養到矽晶片上。等 24 小時細胞貼附在矽晶片上時，施以濃度 50 ng/mL 的 NGF 處理，持續觀察 PC12 軸突和樹突的生長狀態，圖 2-12。

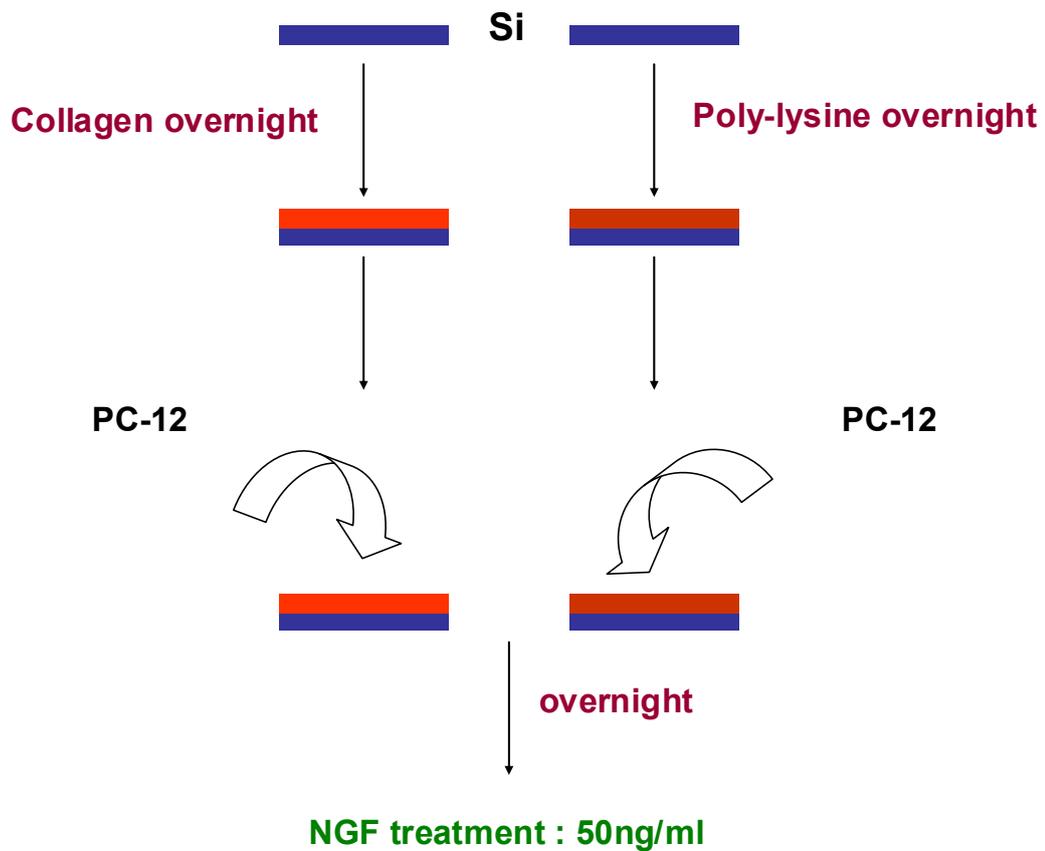


圖 2-12、PC12 細胞培養在修飾 Collagen、Poly-lysine 矽晶片上實驗流程。

圖 2-13 是 PC12 細胞生長在修飾 Collagen 矽晶片上的型態，顯示出 PC12 在 Collagen 上是會貼附，並且生長的很好；圖 2-14 則是 PC12 細胞生長在修飾 Poly-lysine 矽晶片上的生長型態，顯示出 PC12 在 Poly-lysine 上也是可以貼附，並且生長的很好，由以上實驗結果得知 Collagen 與 Poly-lysine 皆可用來做 PC12 細胞貼附，生長軸突、樹突實驗。

Collagen



圖 2-13、PC12 細胞培養在修飾 Collagen 矽晶片上生長型態。

Polylysine



圖 2-14、PC12 細胞培養在修飾 Poly-lysine 矽晶片上生長型態。

為了知道 PC12 在微結構凹槽的選擇性情形，本實驗設計大小 20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm ，深度 20 μm 的微結構，將細胞繼代培養到微結構上。實驗結果得知 PC12 在微結構裡大致上的選擇性比例，圖 2-15 說明四種大小為結構 20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 細胞的選擇性情形。實驗結果發現，長寬越大的微結構對於細胞圖案的選擇性越不好，主要是因為底層細胞在大的微結構裡，很容易因為溶液的流動而流出微結構中；然而在長寬較小的微結構中，底層細胞受溶液流動影響很小，也因此細胞不容易因液體流動流出，造成細胞圖案選擇性較大。

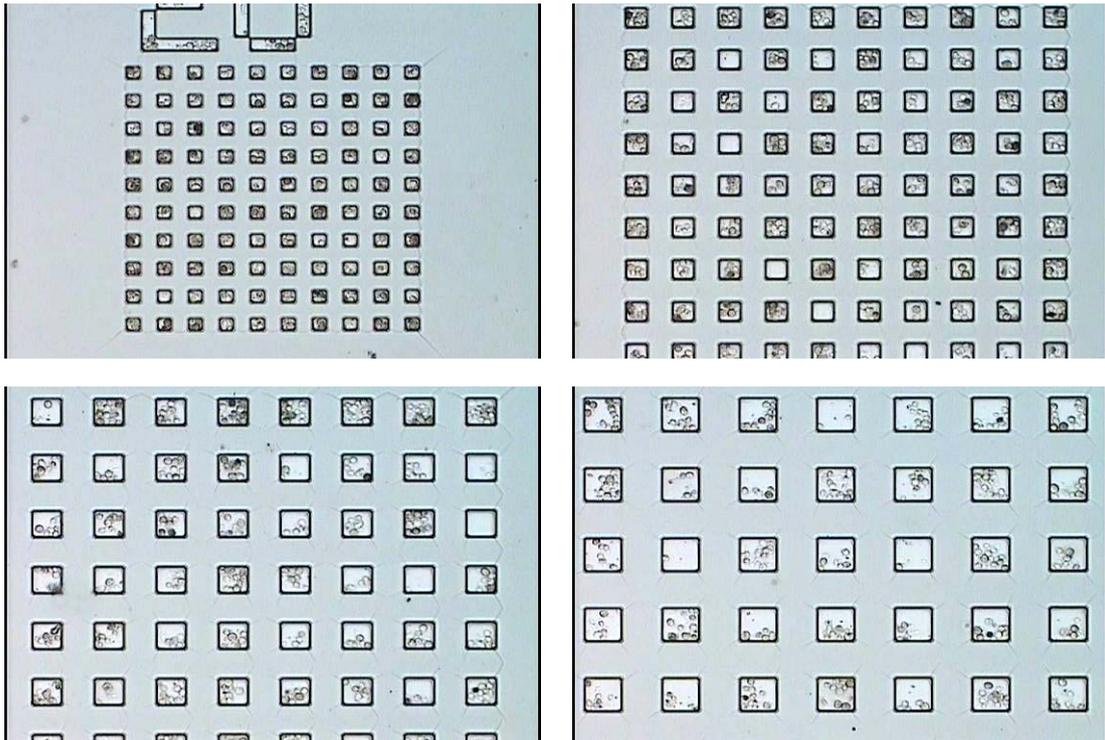


圖 2-15、選擇性導引 PC12 在 20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 微結構上。

本實驗將上述不同大小的微結構對 PC12 cell 之選擇性(Selectivity) 做統計圖表，如圖 2-16；將不同大小微結構細胞數出現頻率做出統計表，如圖 2-17；不同大小微結構出現頻率最高的細胞數，如圖 2-18。

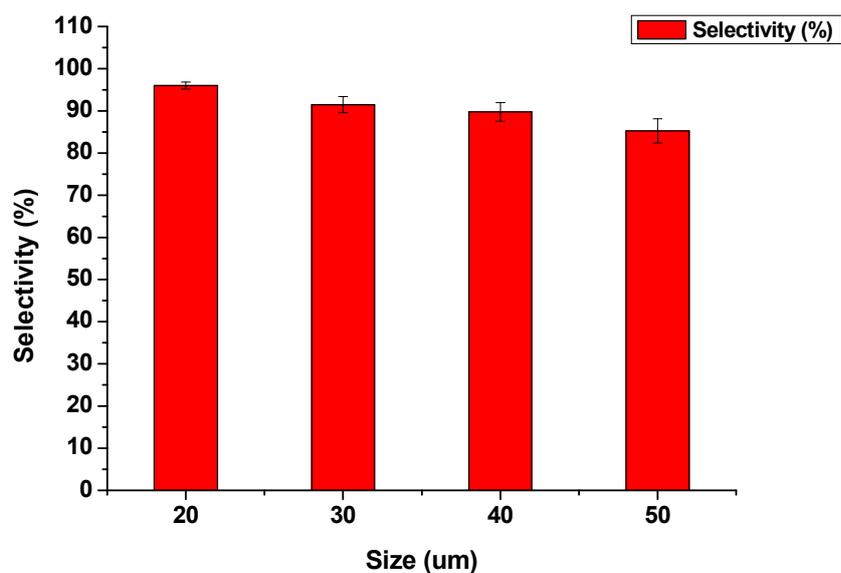


圖 2-16、不同大小的微結構對 PC12 cell 之 Selectivity 統計圖。

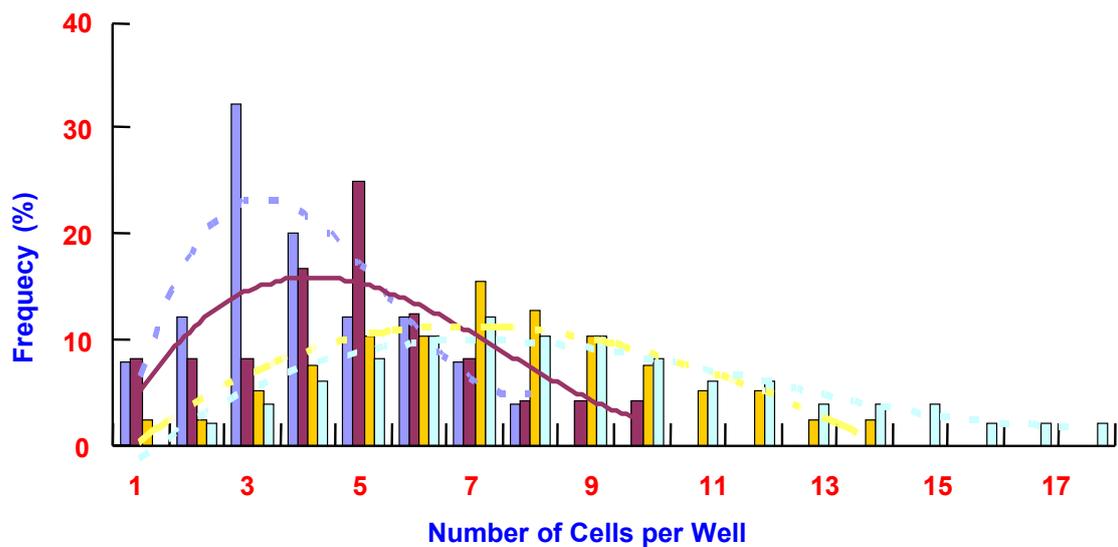


圖 2-17、不同大小微結構細胞數出現頻率統計表。



size	20 μm	30 μm	40 μm	50 μm
Cell No. (most freq.)	3	5	7	7

圖 2-18、不同大小微結構出現頻率最高之細胞數。

圖 2-19 則是長形微結構深度 20 μm 和 50 μm 測試所導引出的 PC12 細胞圖案，可以看出深度 50 μm 的微結構比深度 20 μm 的微結構導引效果更好，主要是因為較深的微結構細胞不易被環境的擾動而流走，細胞也因此容易在微結構裡生長分化。

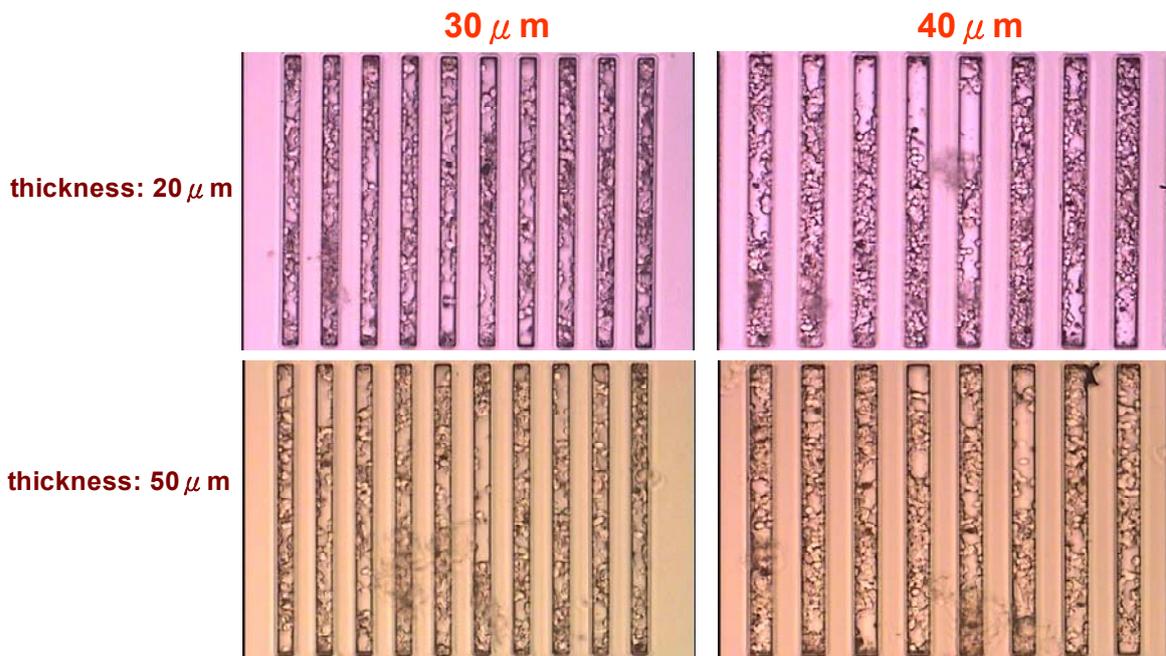


圖 2-19、選擇性導引 PC12 在深度 20 μm、50 μm 微結構。

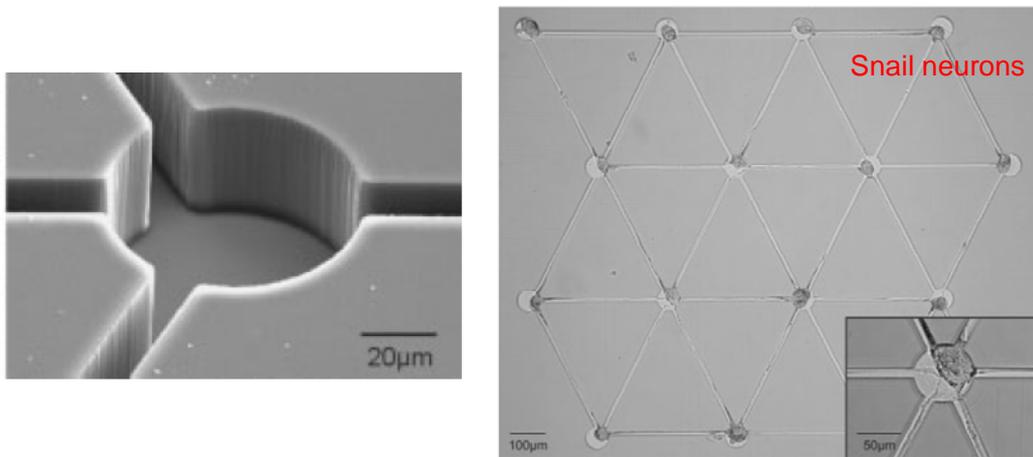


圖 2-20、在矽晶片上導引神經細胞生長[4]。

之後要進入導引 PC12 突處階段，首先設計的流道寬度為 20 μm、30 μm，微流道深度為 20 μm 時觀察 PC12 細胞受到結構的導引而生長，並選擇位於同一平面的

結構生長，圖 2-20。

另一方面，培養細胞生長於更大流道 40 μm 和 50 μm ，結構深度 20 μm 的流道，觀察神經細胞是否會依溝槽形狀限制造成導引細胞的效果，發現到分化之神經細胞長出的突起能夠成功的被導引[4]。由此觀察得知分化中的 PC12 神經細胞藉由高分子微流道晶片，能夠將產生的突起有方向性地導引生長，以利於形成有效的神經網路，同時當細胞生長於較大流道時，由於有較多細胞聚集在一起以及較大空間伸展，其軸突(Axon) 導引效果最好。

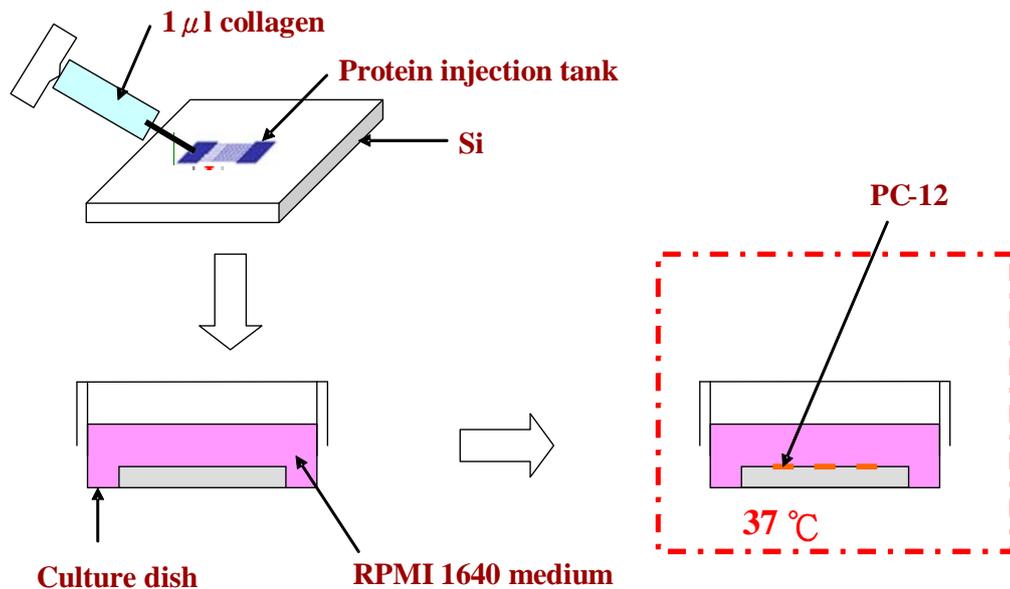


圖 2-21、選擇性導引 PC12 細胞流程。

圖 2-21 為導引 PC12 細胞的實驗流程圖，經上述實驗方法處理後，將 sample 放入細胞培養箱裡培養，48 小時換一次培養液，再添加 NGF 神經生長因子。圖 2-22 則是將 PC12 細胞導引在矽晶片微流道上的結果，證明出以開放式微流道來導引神經細胞的生長分化是可行的。

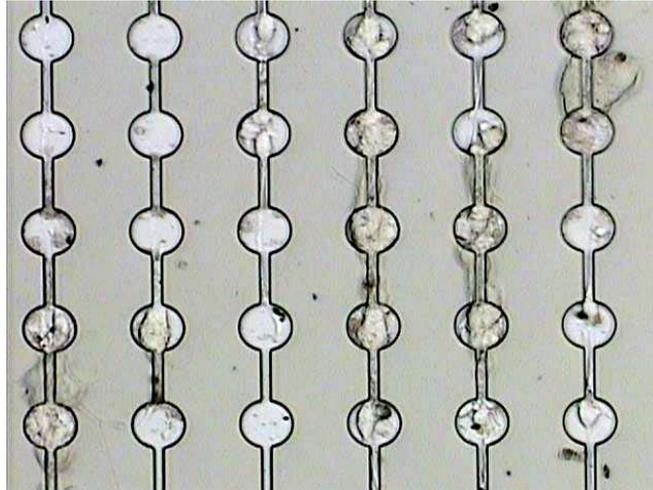


圖 2-22、矽晶片上微流道導引 PC12 細胞圖。

為了使細胞導引的型態更清楚，本實驗以玻璃為基底製作 SU-8 流道，由於 SU-8 2015 不易附著在玻璃上，所以本實驗先旋上一層 SU-8 2005，之後再蓋上一層厚度 20 μm 的 SU-8 2015，來做為導引神經細胞的微結構，如 2-4 節。圖 2-23 為導引好的 PC12 細胞做細胞固定化處理之後所拍下的圖。

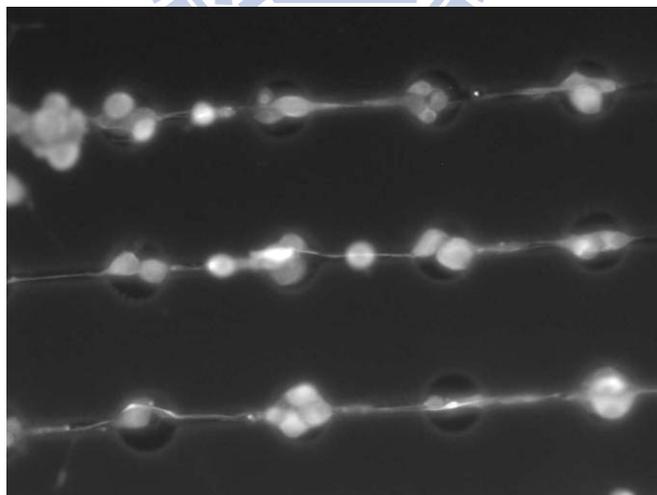


圖 2-23、PC12 導引在以玻璃為基底之微流道。

首先將細胞固定，之後以免疫組織化學螢光染色方法處理，以一號抗體和細胞膜上的抗原產生反應，反應完整之後再以帶有螢光的二號抗體去和一抗反應，整個反應的示意圖，如圖 2-24。圖 2-25 則是經免疫組織化學螢光染色後在螢光顯微鏡下的 PC12 型態，可以更清楚的看到細胞被導引的位置。

Immunohistochemical Staining

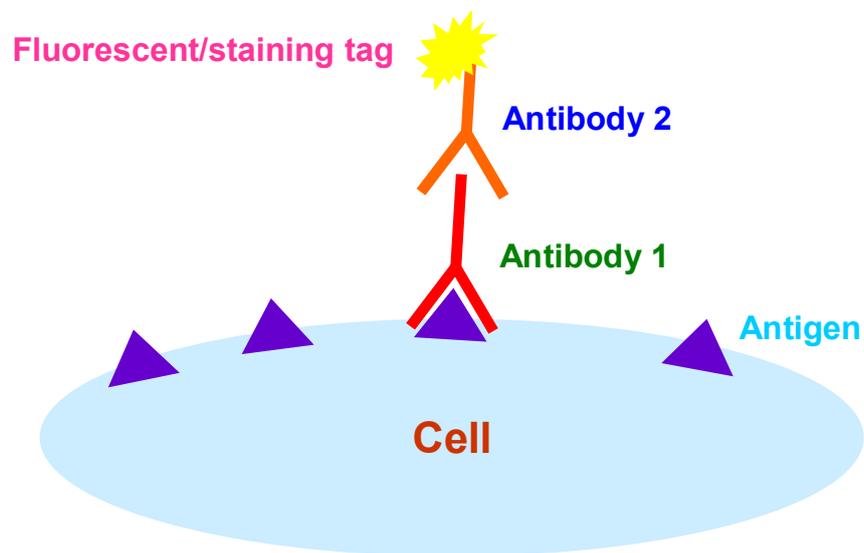


圖 2-24、免疫組織化學螢光染色。

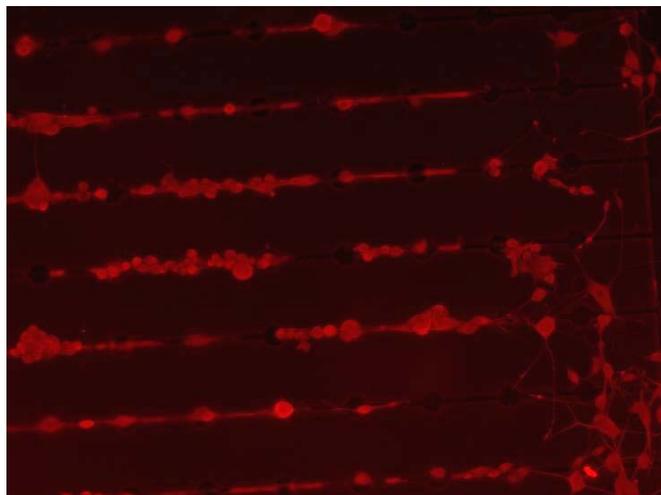


圖 2-25、染色後在螢光顯微鏡下之 PC12 型態。

2-6 整合導引 PC12 細胞與元件

在以上 PC12 細胞導引結果成功後，本實驗進一步要把 PC12 導引在矽奈米線場效電晶體上。

首先本實驗先製做出矽奈米線場效電晶體，之後如第 2-3 節方法蓋上微流道，經 2-5 節方式處理使 PC12 細胞在元件上被導引生長突處。圖 2-26 是元件上微流道之 Auto CAD 設計圖與元件實體照相圖，圖 2-27 則是元件上微流道之顯微鏡圖。

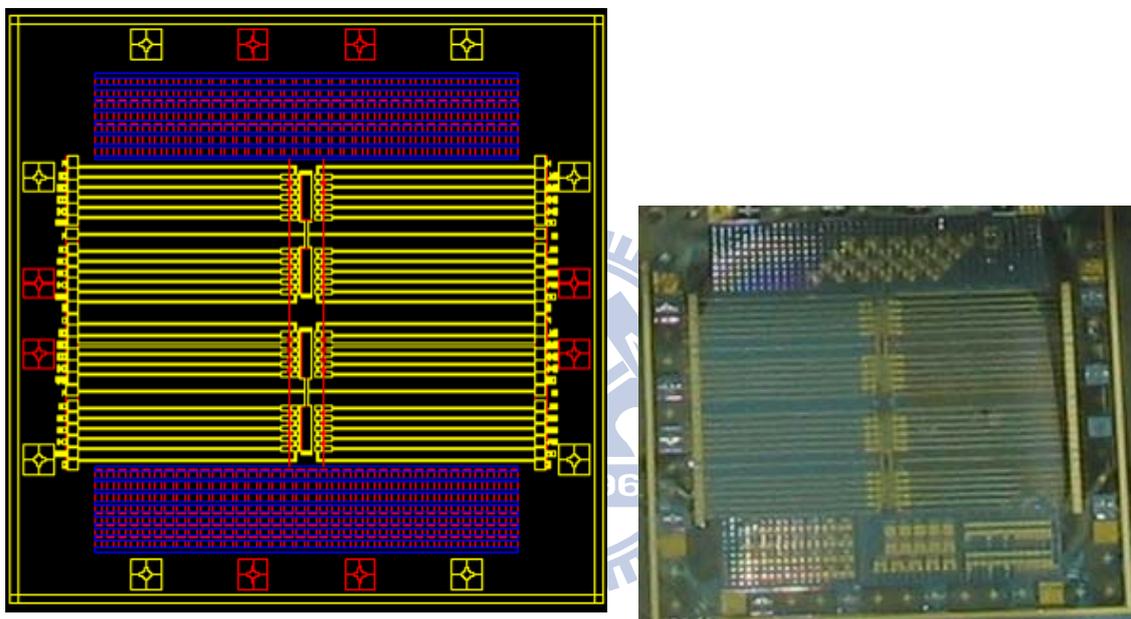


圖 2-26、元件上流道設計圖與照相圖。

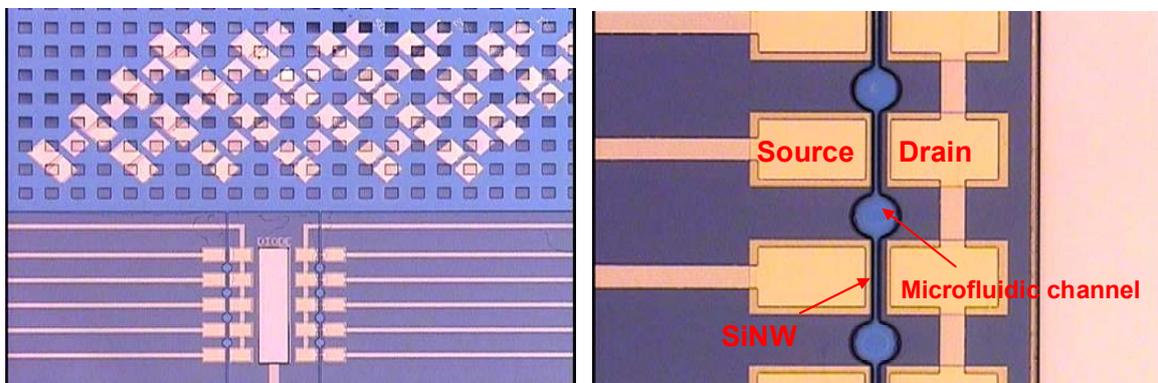


圖 2-27、元件微流道顯微鏡圖。

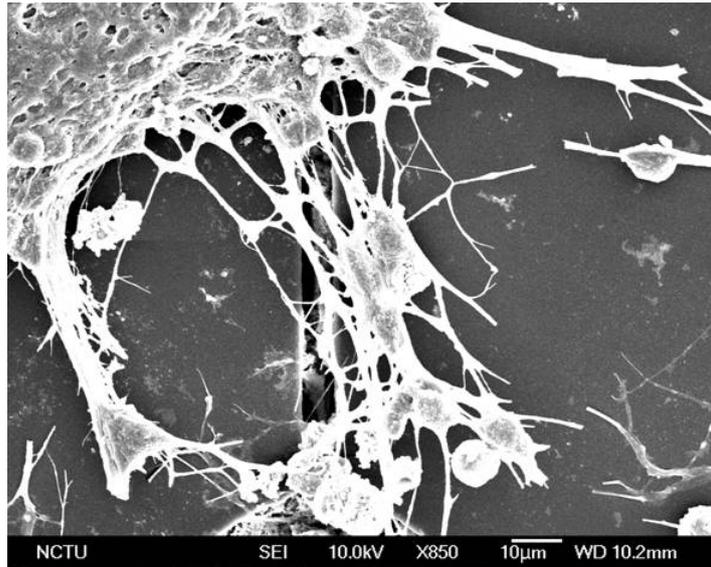


圖 2-28、PC12 細胞乾燥處理後 SEM 圖。

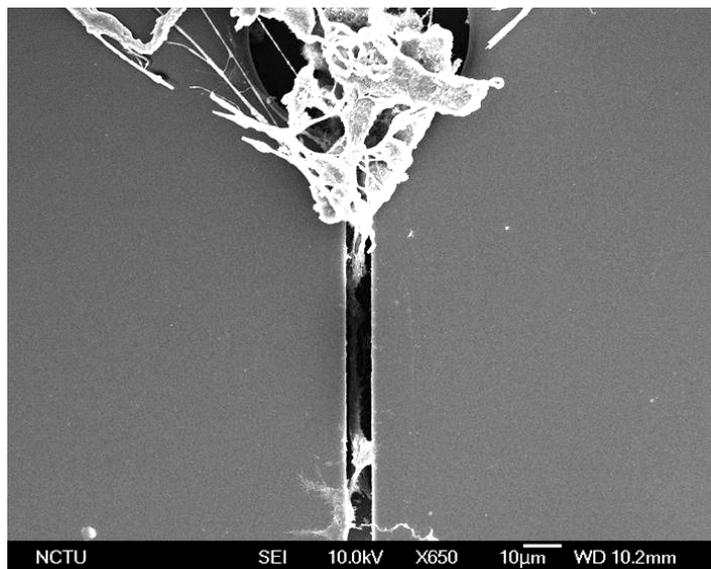


圖 2-29、PC12 細胞導引在矽奈米線場效電晶體。

從圖 2-29 可以明顯地看出 PC12 生長出的 Axon 導引在矽奈米線場效電晶體上。並且生長跨過矽奈米線(Silicon nanowire)，符合本實驗要把 PC12 導引在矽奈米線場效電晶體上的目標，圖 2-30。

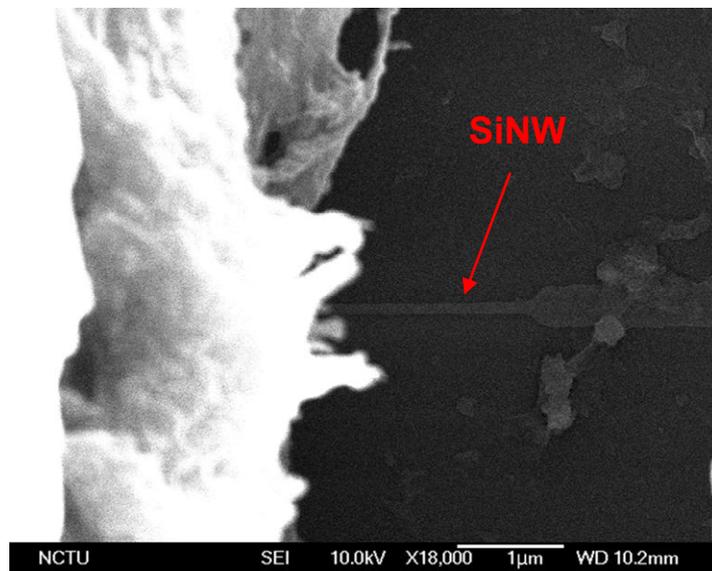
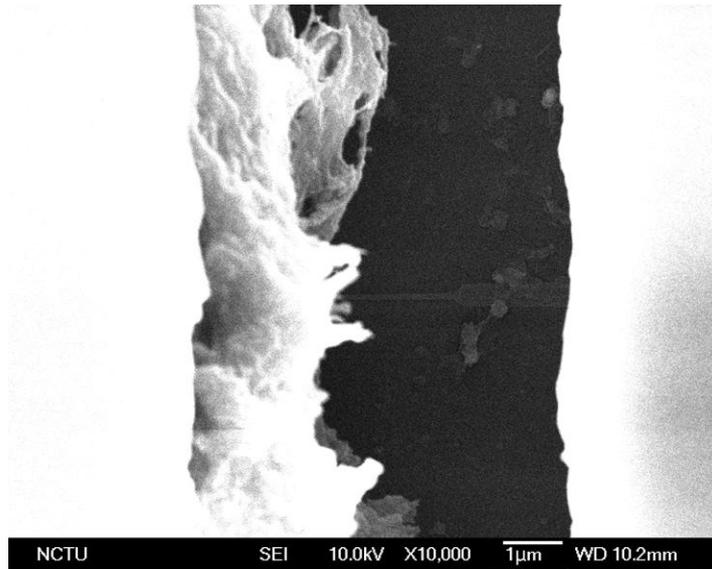


圖 2-30、PC12 細胞之 Axon 生長跨過矽奈米線。

神經細胞的導引使細胞樹突、軸突間形成突觸。整合神經細胞與半導體元件，此結果將可進一步提供未來植入人體生醫晶片與現有神經組織形成有效性神經網路介面連結的解決方法，對神經科學醫療上有卓越影響。

第三章

選擇性導引 HeLa cell 細胞圖案

3-1 實驗動機

導引細胞運動對於生物感測是非常重要的步驟[21, 22]。利用光學微影技術可將設計的圖案轉移到矽晶片的表面，細胞對這些基板的響應深受其幾何特徵尺寸的影響，細胞本身會適應周遭的環境來作排列；細胞的運動方向會由微流道表面的形狀所導引。微流道溝槽的圖案也被用來做此研究，微流道的寬度、深度與重複的間隔都會影響細胞生長的位向[23, 24]。

3-2 HeLa cell 細胞培養

整合細胞與元件，需要有良好的細胞株，以便在實驗室培養。本實驗所選擇的細胞為 HeLa cell，此細胞株具有繁殖力強、生長快速、不易死亡的特性，且易於在實驗室培養。

3-2-1 HeLa cell 簡介

HeLa cell 是生物醫學與生醫電子學研究中使用的一種細胞，源自於子宮頸癌細胞的細胞系。從子宮頸癌的腫瘤組織中分離出癌細胞，並在離體培養(In vitro) 下發展成為 HeLa cell 的細胞株。這是第一株可離體連續培養的人類細胞，由於 HeLa cell 很容易在離體培養下生長，故被研究人員廣泛的用來從事有關細胞生物醫學的研究，如圖 3-1 為 HeLa cell 細胞型態。

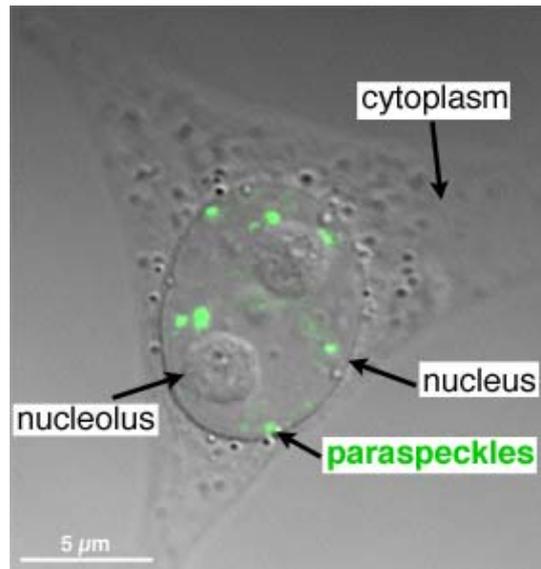


圖 3-1、HeLa cell 細胞型態[25]。

3-2-2 細胞培養實驗流程

在 HeLa cell 生長狀況良好下，細胞密度達 7 分滿時，進行繼代培養 (Subculture)。首先以細胞生理緩衝溶液 1xPBS 清洗，加入 Trypsin(Enzyme) 溶液使其與細胞反應。Trypsin 為一種末端水解酵素(Endopeptidase)，在細胞培養常被用來把黏附在瓶壁的細胞切離以便離心，然而 Trypsin 酵素最原始的作用是針對蛋白質胜肽鏈(Peptide chain) 上的 Lysine 和 Arginine 兩種胺基酸作用，從兩種胺基酸 C-terminal 切斷，進行蛋白質的水解，這種特定性稱為專一性，但如果碰到 Proline 則不會作用，因為其 N-terminal 被環起來受保護無法被水解。

加入新 PBS 生理溶液清洗，進行離心，之後添加新的細胞培養液，取出後混合均勻，轉移到新的培養盤中，放入相同條件的培養箱內培養。圖 3-2、圖 3-3、圖 3-4 分別為 HeLa cell 培養 5 天，以 Trypan blue 染劑做細胞染色後的各種型態，實驗加入的細胞其細胞密度為 2.3×10^5 cells/ml。

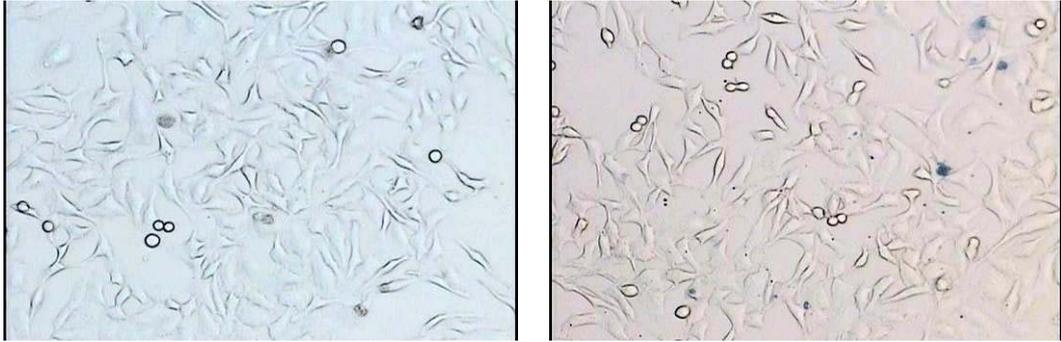


圖 3-2、HeLa cell 染色前後型態。

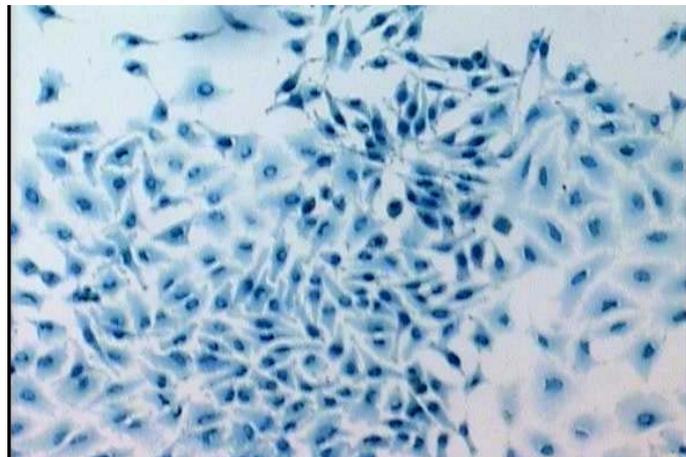


圖 3-3、HeLa cell 細胞膜破裂染色型態。

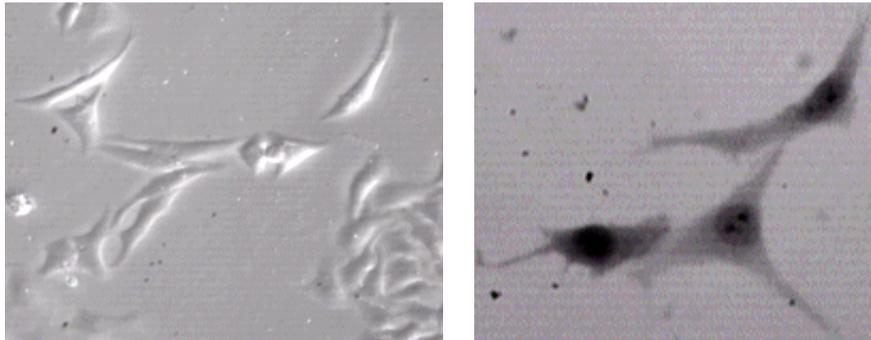


圖 3-4、倒立式顯微鏡觀察 HeLa cell 染色前後型態。

3-3 不同材料的細胞培養

為了得知 HeLa cell 在材料表面上的生長情形，本實驗先把細胞培養在幾種材料上，進一步比較細胞在各種材料的生長狀況，找出適合做為選擇性導引 HeLa cell 的材料。

3-3-1 HeLa cell 在不同材料上培養

首先我們在矽晶片上分別覆蓋上金(Au)、二氧化矽(Oxide)、氮化矽(Nitride)、負光阻 SU-8 等材料。金是用熱阻絲蒸鍍(Thermal coater) 系統沉積、二氧化矽以濕式氧化(Wet oxidation) 爐管沉積、氮化矽則是以 PECVD 方式沉積。

之後本實驗將 HeLa cell 在相同條件下，依序培養在以上四種材料表面上。由圖 3-6 HeLa cell 培養在 Au、Oxide、Nitride、SU-8 上第 5 天之結果，可以清楚地證明出，HeLa cell 在金、二氧化矽、氮化矽表面上生長的數目與在 SU-8 的數目差距蠻大的，細胞在 SU-8 上的數量比起其他材料相對的少很多。

另外實驗又以 Trypan blue 染劑來測試 HeLa cell 的存活率，圖 3-7 是加 Trypan blue 染劑測試完的結果，由此可以得知細胞的存活率和正常狀況將細胞培養在培養盤裡的存活率都很高，證明 HeLa cell 生長在以上材料環境是沒問題的，並不會使細胞大量死亡。

實驗結果可以發現細胞在各種材料上的存活情形，本實驗更進一步對貼附在材料上的 HeLa cell 其存活率做出統計。算出的細胞在材料上的存活率分別是 Au : 96%、Oxide : 97%、Nitride : 98%、SU-8 : 91%。由此結果可以得知，生長貼附在材料上的 HeLa cell 基本上細胞絕大多數是存活的，只是因為 HeLa cell 在這些材料上其生長分化速度不同，而造成細胞的數量不同。

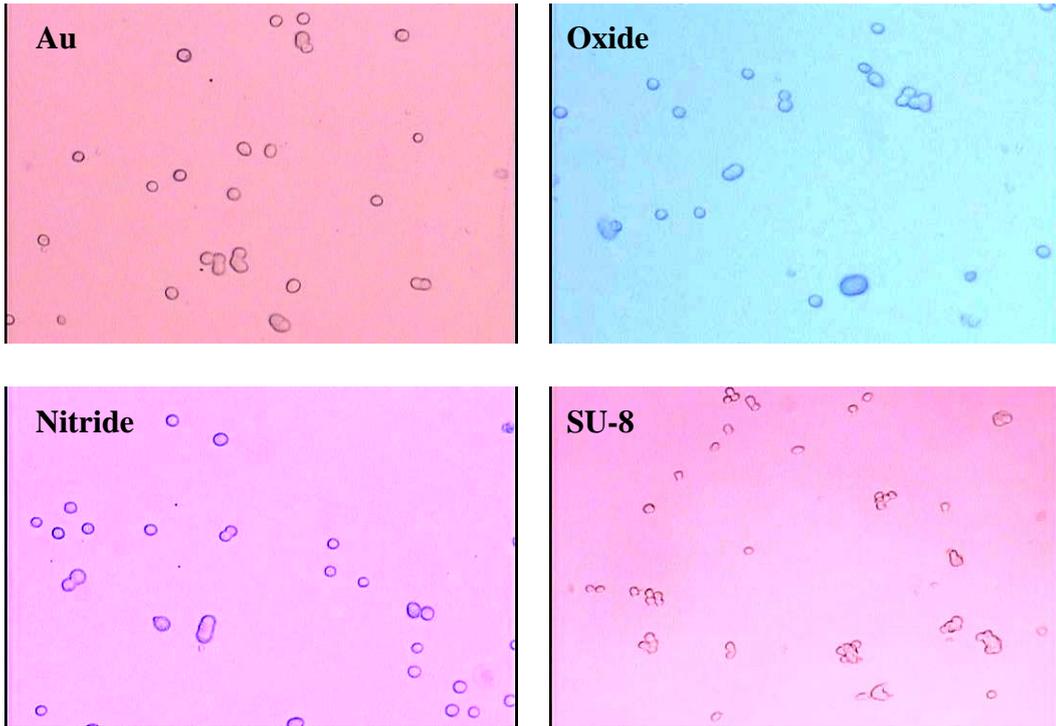


圖 3-5、HeLa cell 培養在 Au、Oxide、Nitride、SU-8 上第 0 天。

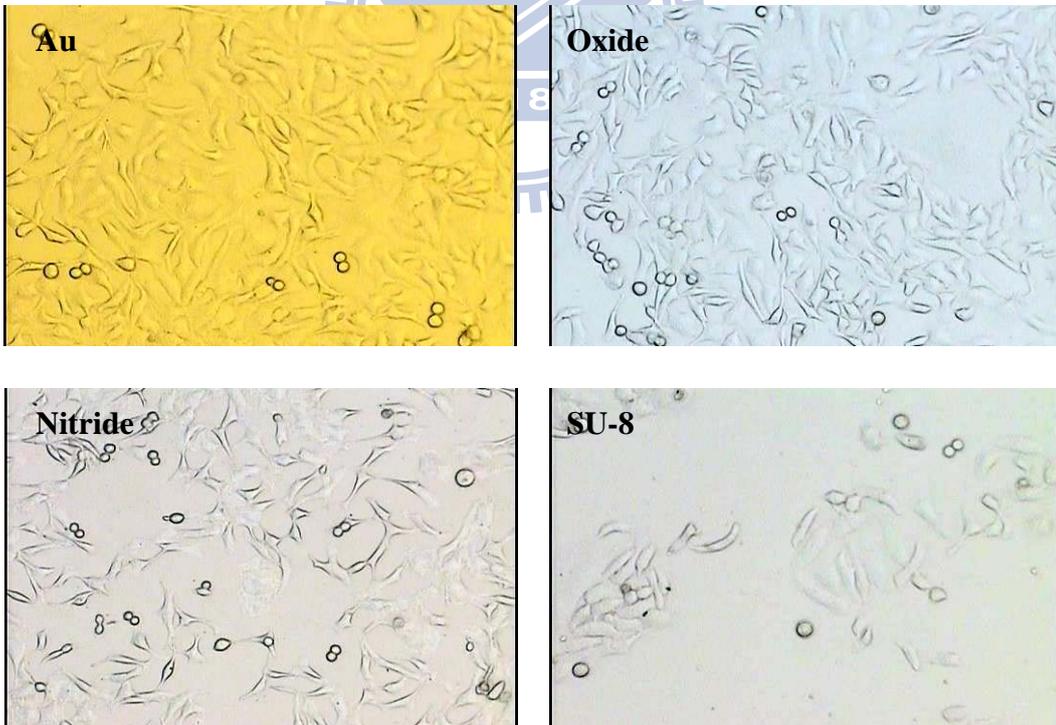


圖 3-6、HeLa cell 培養在 Au、Oxide、Nitride、SU-8 上第 5 天。

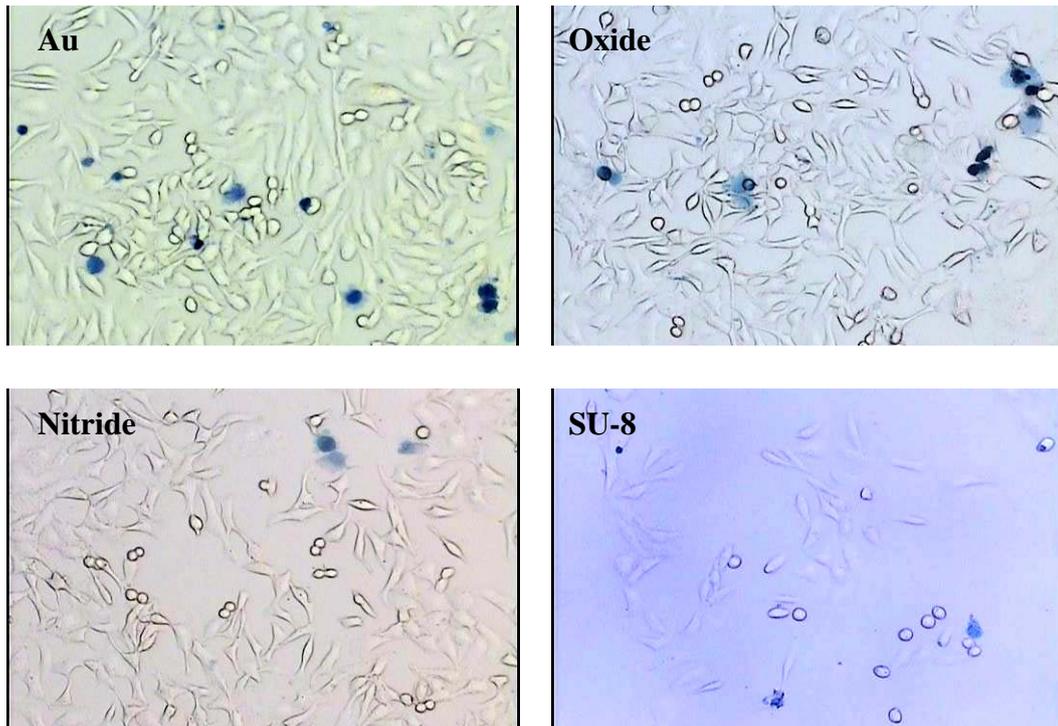


圖 3-7、Trypan blue 染劑測試 HeLa cell 存活率。

3-3-2 單位面積細胞數統計

HeLa cell 在材料表面上培養完之後，進一步計算細胞的數量，以單位面積細胞的數量表示，如圖 3-8。實驗結果顯示 HeLa cell 在不同材料的生長速度是不同的，在金表面上細胞的數量是最多的，其次是在二氧化矽與氮化矽上，細胞數量最少的則是在 SU-8 上。

由此實驗結果得知，HeLa cell 在 SU-8 上的生長相對於其他材料是比較慢的，加上 SU-8 開放式微結構的製程不會很複雜，利用光學微影技術就能完成，所以本研究以 SU-8 用來做為微結構的材料。

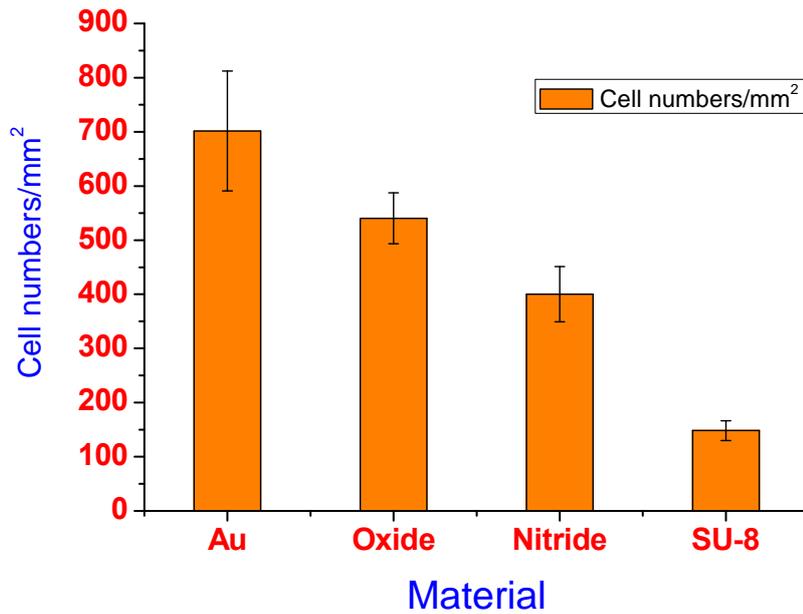


圖 3-8、不同材料上的單位面積細胞數量統計。

3-4 微結構製作流程

在本實驗中以負光阻(SU-8) 作為開放式微結構的材料。使用光學微影技術製做微結構，這是一個可靠、迅速且容易的方法，來生產大量相同的微結構以從事細胞的體外研究。開放式微流道製程步驟如下：

- (5) Initial clean。
- (6) HMDS vapor。
- (7) 旋塗負光阻 SU-8 2015；SU-8 2050。
- (8) 軟烤 65°C 1分鐘、 ；65°C 3 分鐘、
95°C 3分鐘、 ；95°C 6 分鐘、
65°C 1分鐘。 ；65°C 1 分鐘。
- (9) 光罩對準曝光定義 Active area。
- (5) 曝後烤 65°C 1分鐘、 ；65°C 1 分鐘、
95°C 2分鐘、 ；95°C 6 分鐘、

65°C 1 分鐘。 ; 65°C 1 分鐘。

(6) 光阻顯影。

(7) 硬烤 150°C 20 分鐘。

圖 3-9 SU-8 微結構示意圖，圖 3-10 與圖 3-11 為製程後微結構之 SEM 圖。

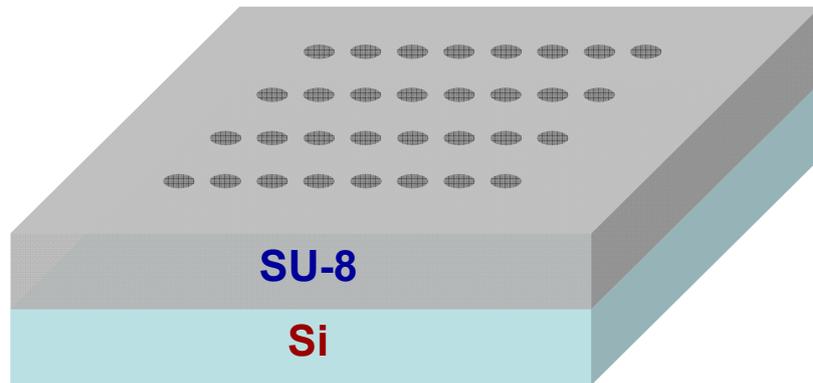


圖 3-9、微結構示意圖。

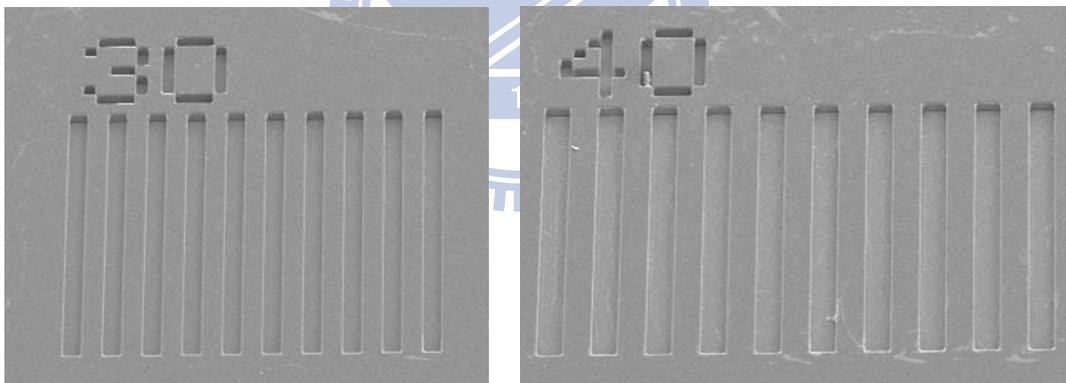


圖 3-10、深度 20 μm 微結構 SEM 圖。

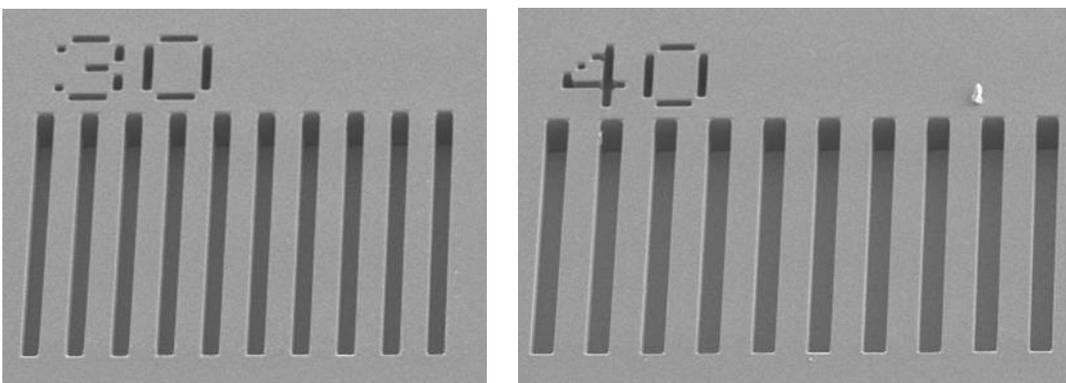


圖 3-11、深度 50 μm 微結構 SEM 圖。

3-5 選擇性導引 HeLa cell 細胞圖案

在細胞生長狀況良好下，細胞密度達約 7 分滿時，進行繼代培養(Subculture)。如同上述小節以 1xPBS 清洗，加入 Trypsin 溶液反應，使 HeLa cell 從培養盤中脫離，加入 1xPBS 清洗，之後以離心機離心，加入新的細胞培養液(Medium)，將細胞吸取出，轉移到 20 μm 和 50 μm 矽晶片微結構上，使細胞分散均勻，放入相同條件的培養箱內培養，圖 3-12、圖 3-13。

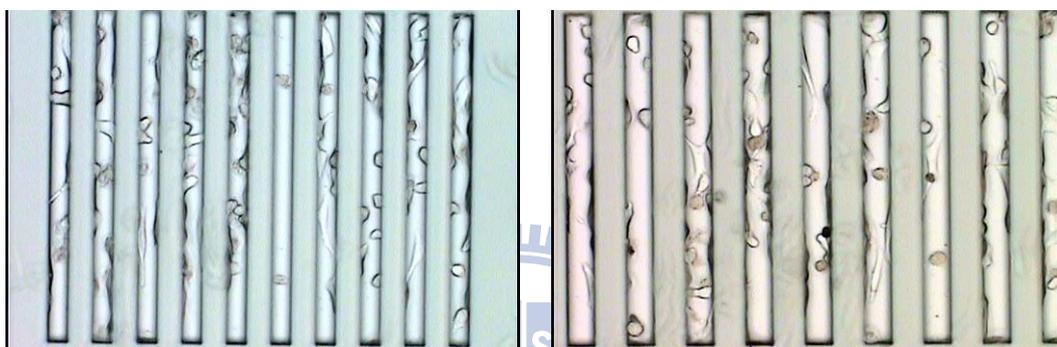


圖 3-12、HeLa cell 選擇性生長在深度 20 μm 微結構。

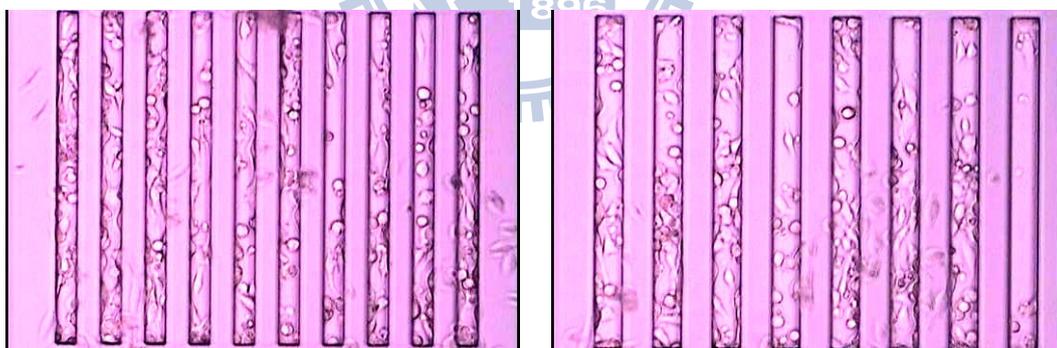


圖 3-13、HeLa cell 選擇性生長在深度 50 μm 微結構。

第四章

結合細胞與矽奈米線場效電晶體來感測細胞釋放的 ATP

4-1 實驗動機

在本實驗中所要量測的目標是細胞所釋放的 ATP 分子，所以量測過程必須要讓 HeLa cell 維持在其正常的生長環境，因此在實驗中，所使用量測的緩衝溶液為符合生理環境的離子濃度的 1X PBS(137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄) 緩衝溶液。

製作矽奈米線場效電晶體，再修飾 Aldehyde silane 及 Abl tyrosine kinase，完成感測 ATP 的矽奈米線場效電晶體。

文獻中有許多利用矽奈米線與奈米碳管作為生物感測器[8, 27]。本實驗進行的主要目的是要將 HeLa cell 培養在元件上，整合細胞與元件，將製作出的 ATP 分子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 分子。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。所以將細胞以 ROS 刺激後造成 Conductance 的變化，是因為細胞釋放的 ATP 分子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 偵測到細胞經自由基刺激所釋放出的 ATP 分子。

4-2 自由基刺激 HeLa cell 釋放 ATP

在許多文獻上說明自由基對於細胞有重大影響，基於此論點，本研究想針對自由基刺激細胞的 ATP 濃度變化，來探討自由基對 HeLa cell 的影響。

4-2-1 Bioluminescence 測 ATP 濃度

在本實驗中以 Roche's Bioluminescence assay kit 來測定 ATP 分子的濃度，實驗

反應原理如圖 4-1，在 Kit 所附的 Luciferase reagent 中包含了 D-luciferin-H₂ 和 Luciferase，當溶液含有 ATP 分子的時候，反應便開始向右邊進行，Luciferase 會將 D-luciferin-H₂ 氧化，並消耗 ATP 分子的兩個磷酸根，且放出冷光[26]，此反應放出的冷光強度和 ATP 分子的濃度有相關，所以用偵測冷光的方式即可得知溶液中 ATP 分子的濃度，如圖 4-2。

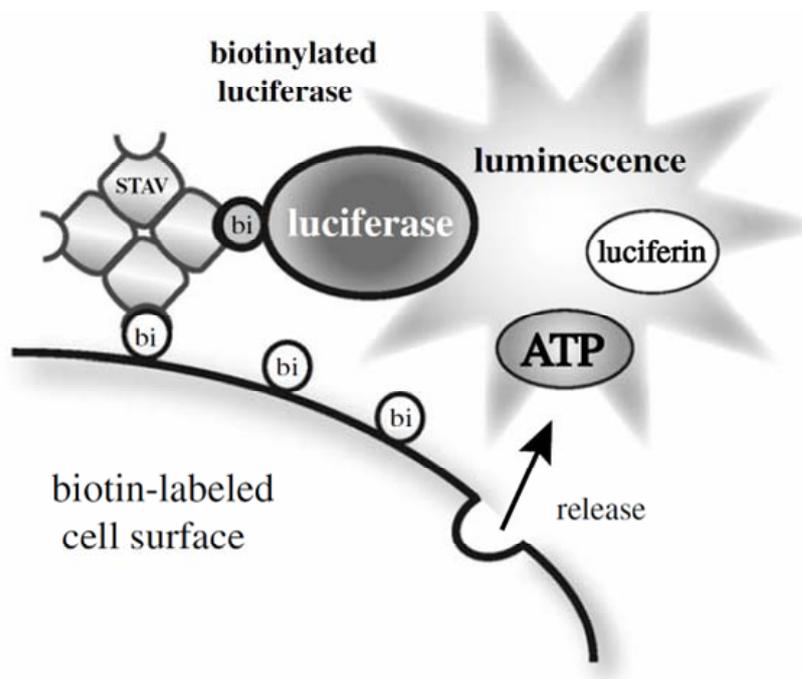


圖 4-1、冷光反應生物分子示意圖[26]。

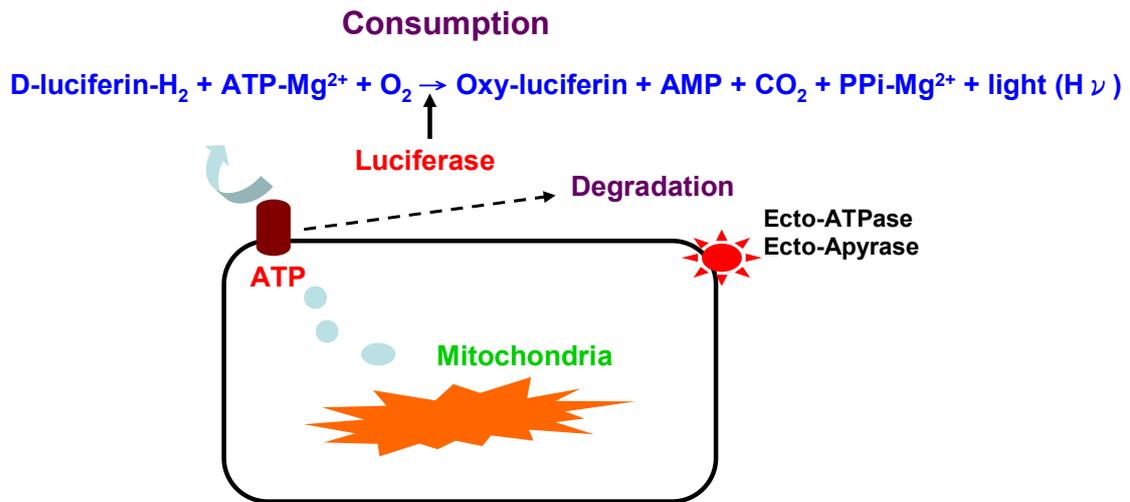


圖 4-2、Bioluminescence 冷光反應化學示意圖。

圖 4-3 則是 Bioluminescence 冷光的化學反應方程式，首先消耗反應物的 ATP、D-luciferin、 O_2 ，化學反應後生成產物 Oxy-luciferin、磷酸根、AMP、 CO_2 以及發出螢光。



圖 4-3、Bioluminescence 冷光化學反應式。

以 PBS 作為 Buffer 來配製不同濃度的 ATP 分子，加入體積 50 μ l ATP sample、50 μ l Dilution buffer、50 μ l Luciferase reagent 混合，測冷光強度 10 秒，畫出 ATP 分子濃度的標準曲線圖，如圖 4-4。

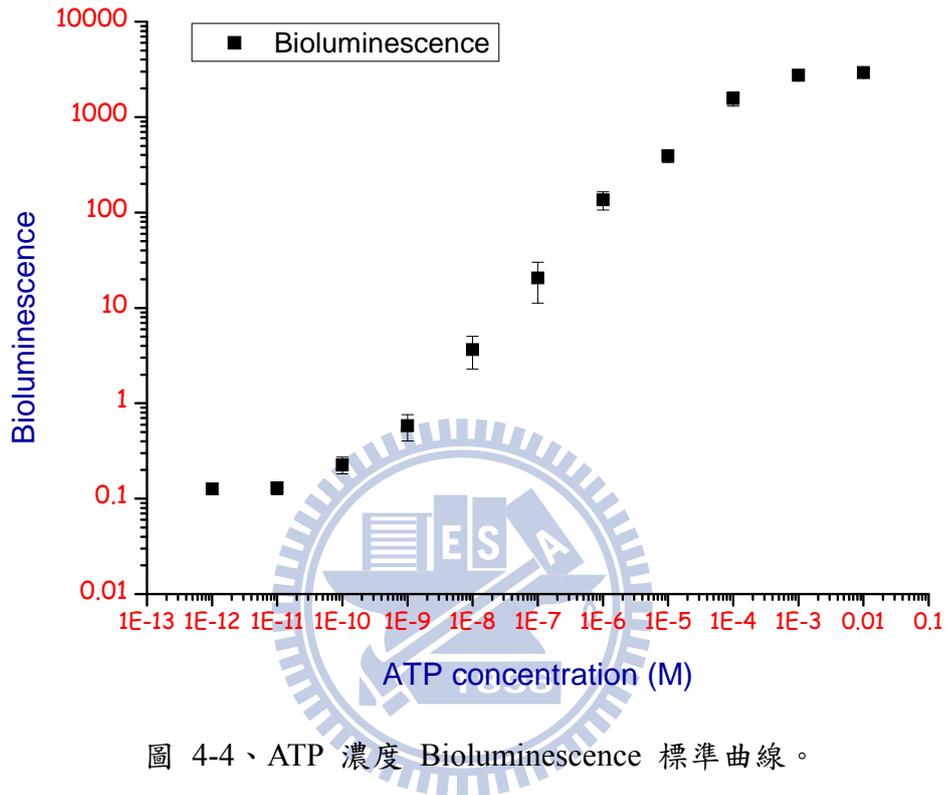


圖 4-4、ATP 濃度 Bioluminescence 標準曲線。

4-2-2 Bioluminescence 測 HeLa cell 細胞外 ATP 分子濃度

由於 H_2O_2 在水溶液中會有自由基產生，加上其價格不會很高，所以我們以 H_2O_2 來測試。首先我們將 HeLa cell 分盤到 ELISA plate 中培養，給予不同濃度 H_2O_2 刺激，觀察自由基刺激前後 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 分子。

圖 4-5、圖 4-6、圖 4-7 實驗組分別是以各種濃度 H_2O_2 刺激 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘後，以 ELISA reader 冷光方式，偵測冷光 10 秒測出 HeLa cell 細胞外 ATP 分子濃度，控制組則是原始細胞外 ATP 分子濃度，圖 4-8 則是以上的統整圖。實驗結果發現以 5 mM H_2O_2 刺激 10 分鐘後，細胞所釋出的 ATP 分子濃度最大，但當 ROS 濃度太高時，會直接傷害到細胞粒線體裡的呼吸鏈，當呼吸鏈受影響時，其製造 ATP 的能力會下降，所以當 ROS 濃度過高時，細胞釋放出的 ATP 分子濃度反而較小。

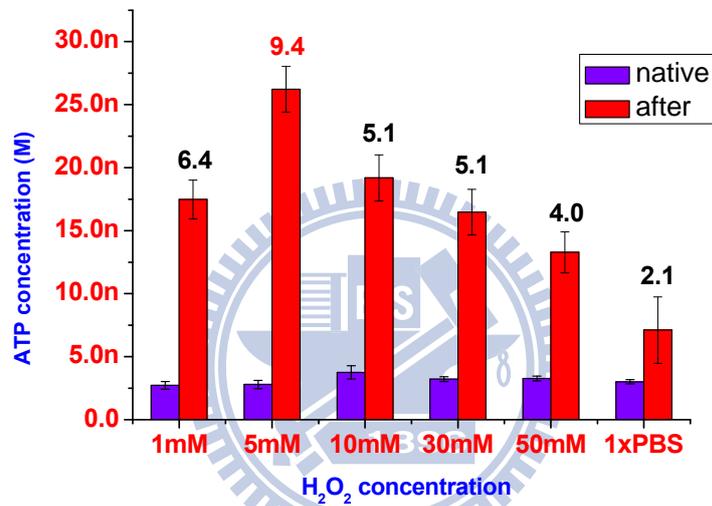


圖 4-5、HeLa cell 自由基刺激 10 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化。

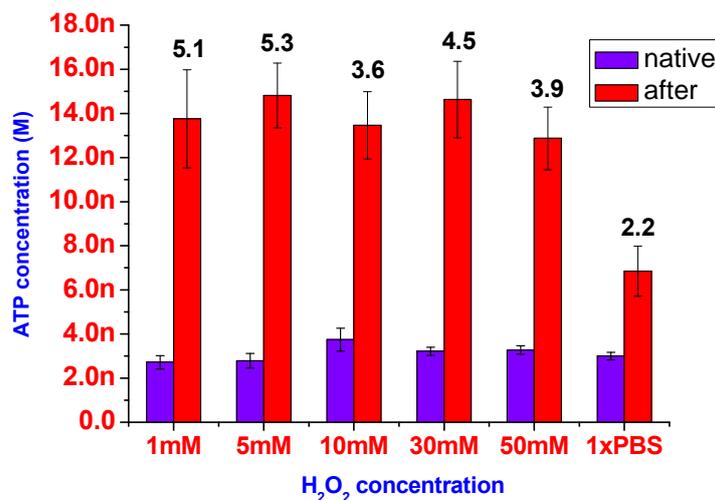


圖 4-6、HeLa cell 自由基刺激 20 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化。

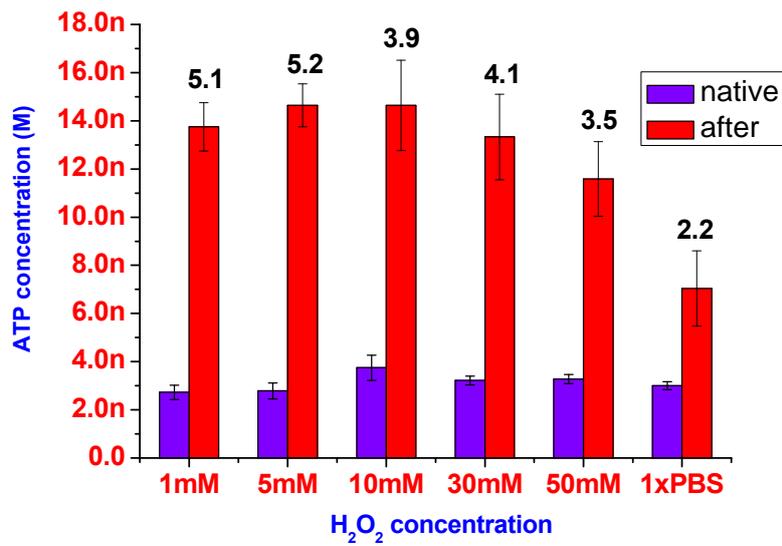


圖 4-7、HeLa cell 自由基刺激 30 分鐘前後細胞外 ATP 分子濃度變化。

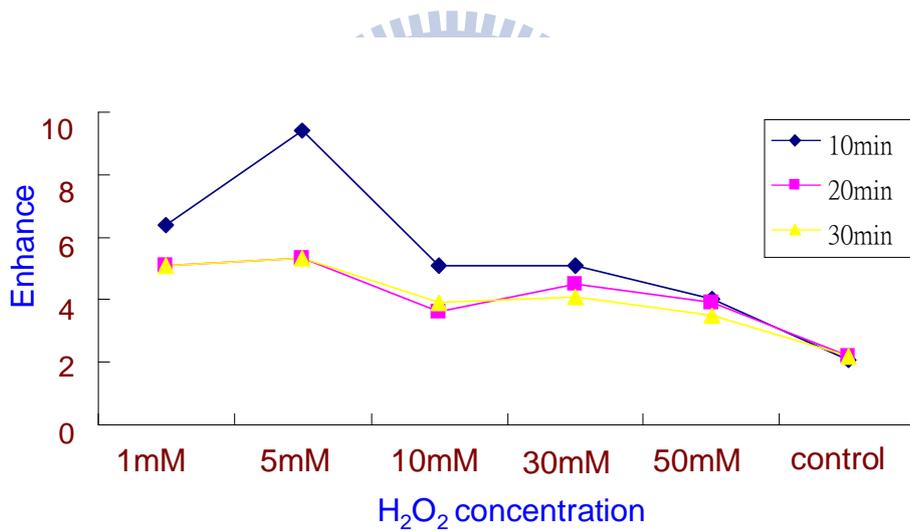


圖 4-8、刺激前後細胞外 ATP 分子濃度變化統計圖。

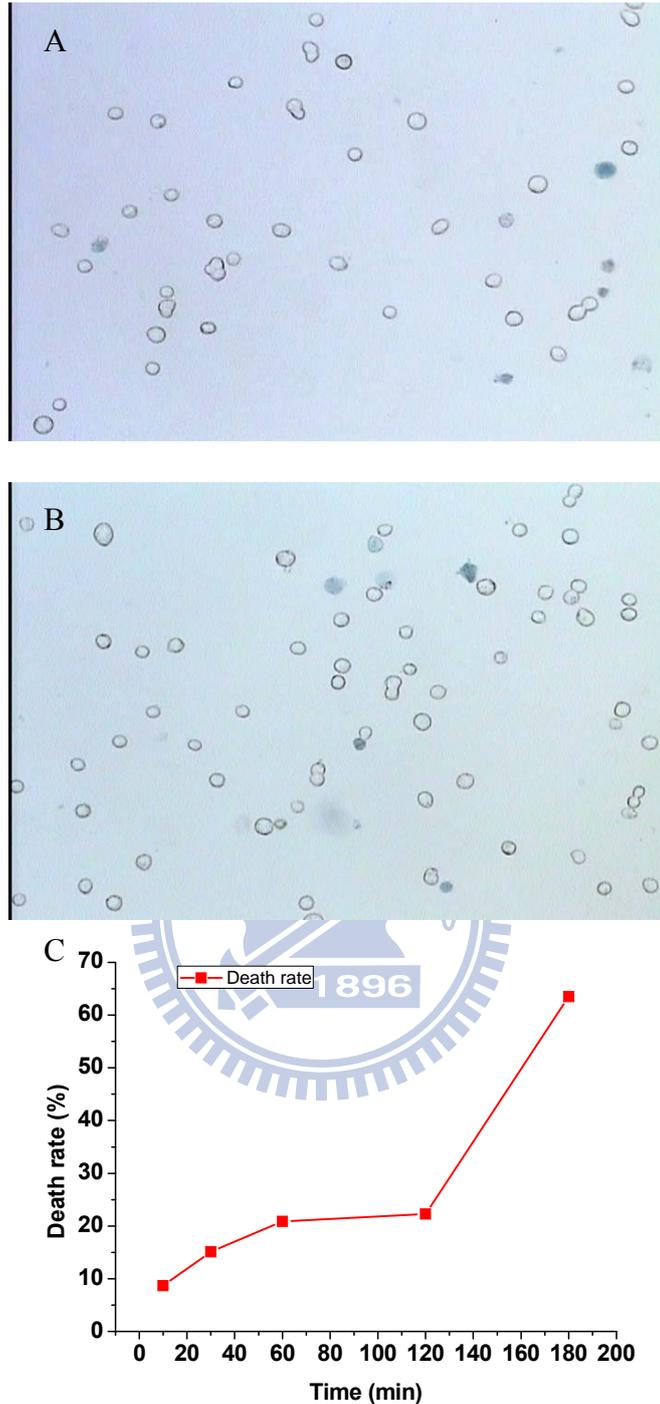


圖 4-9、HeLa cell 於刺激前後的表面型態。 A: ROS 刺激前、B: ROS 刺激後、C: 培養在 1x PBS 中之死亡率。

圖 4-9 為 HeLa cell 經自由基刺激前後的表面型態，自由基刺激前後 HeLa cell 的型態差異並不大，表示我們給予的自由基刺激並不會對細胞造成明顯的傷害，因此本實驗中所測定的 ATP 分子是細胞經由自由基刺激後所釋放出來的，並不是細胞被

破壞所造成的。圖 4-9C 為 HeLa cell 培養在 標準 PBS 溶液裡，細胞死亡率，超過兩小時後 HeLa cell 開使大量死亡。

4-3 矽奈米線場效電晶體元件製作

本次實驗所選用的是 Silicon-on-Insulator(SOI)(100) 之晶片。其 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 50 nm，長度 10 μm ，元件製作流程如下，圖 4-10。

4-3-1 元件製作流程

(1). 成長氧化層:

利用乾式氧化成長 20 nm 之矽氧化層(Dry oxide) 來保護矽層不在離子佈植時表面被破壞。

(2). 離子佈植:

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

(3). 光學微影定義源極(Source) 和洩極(Drain):

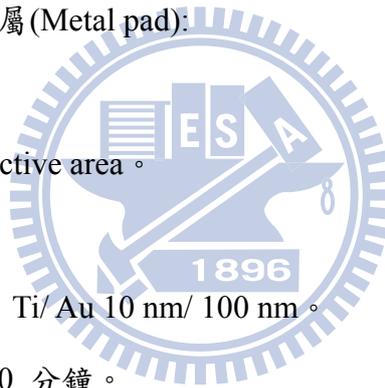
1. 旋塗光阻(FH6400)。
2. 光罩對準曝光定義源極(Source) 和洩極(Drain)。
3. 光阻顯影。
4. 硬烤 120°C, 10 分鐘。

(4). 離子佈植:

硼(Boron) 離子佈植，劑量為 $3 \times 10^{15} \text{cm}^{-2}$ ，能量 10 keV，離子佈植後矽層之參雜濃度為 10^{20}cm^{-2} 。

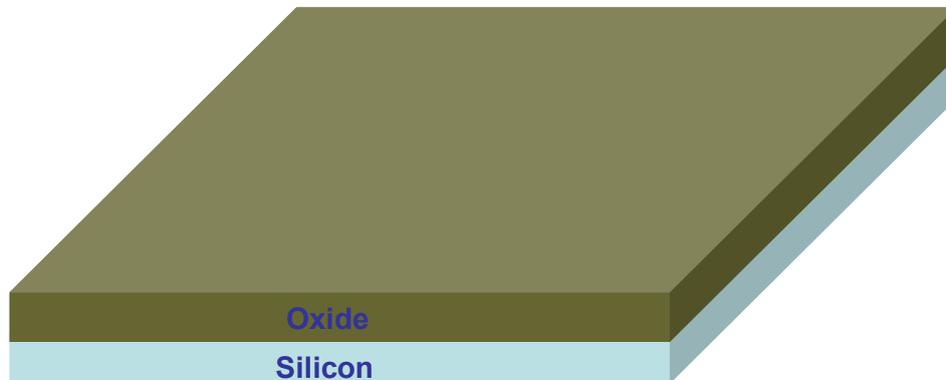
(5). 去光阻:

1. O-zone 加熱。
 2. 煮硫酸去除有機污染。
 3. Acetone 超音波震。
- (6). P⁺ annealing 退火，以活化佈植之離子。
- (7). 光學微影定義 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，蝕刻去除矽氧化層。
- (8). 熱阻絲蒸鍍系統沉積 Ti/ Au。
- (10). 光學微影定義接觸金屬(Metal pad):
- 1.旋塗光阻(FH6400)。
 - 2.光罩對準曝光定義 Active area。
 - 3.光阻顯影。
- (11). 熱阻絲蒸鍍系統沉積 Ti/ Au 10 nm/ 100 nm。
- (12). 金屬熱退火 400°C, 30 分鐘。
- (13). SU-8 開放式微流道:
1. 旋塗光阻(SU-8 2005)。
 2. 軟烤 65°C 1 分鐘、
95°C 3 分鐘、
65°C 1 分鐘。
 3. 光罩對準曝光定義 Active area。
 4. 曝後烤 65°C 1 分鐘、
95°C 1 分鐘、
65°C 1 分鐘。
 5. 光阻顯影。

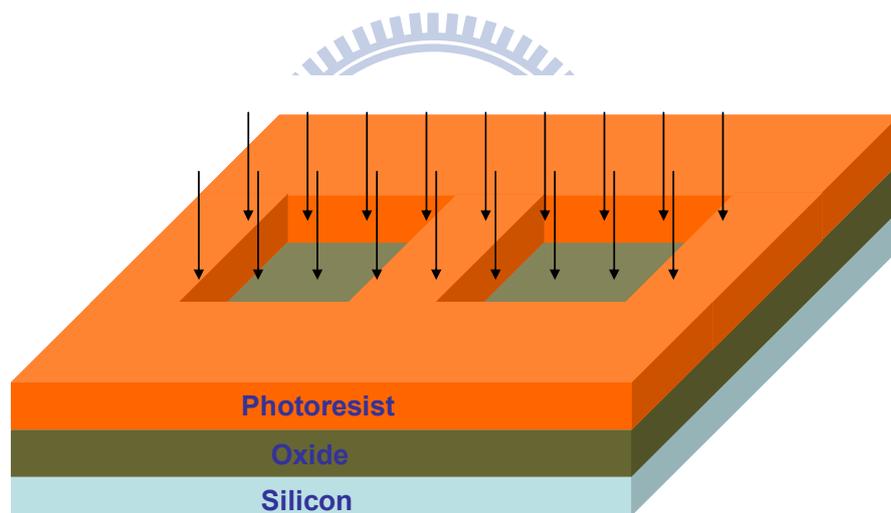


6. 硬烤 150°C, 20 分鐘。

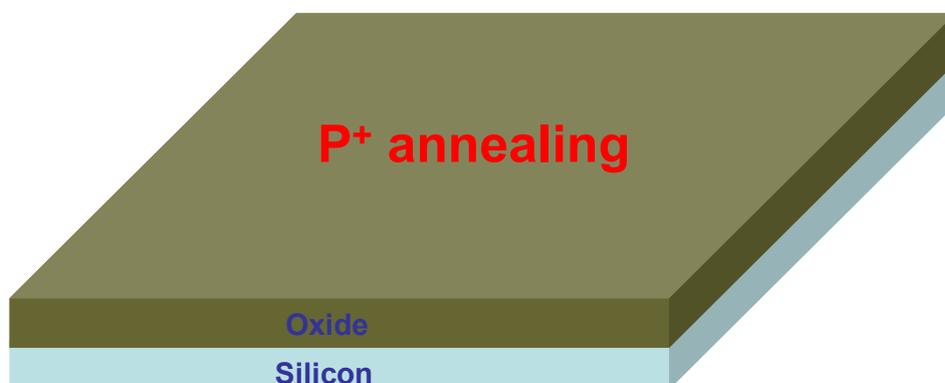
7. 電性量測。



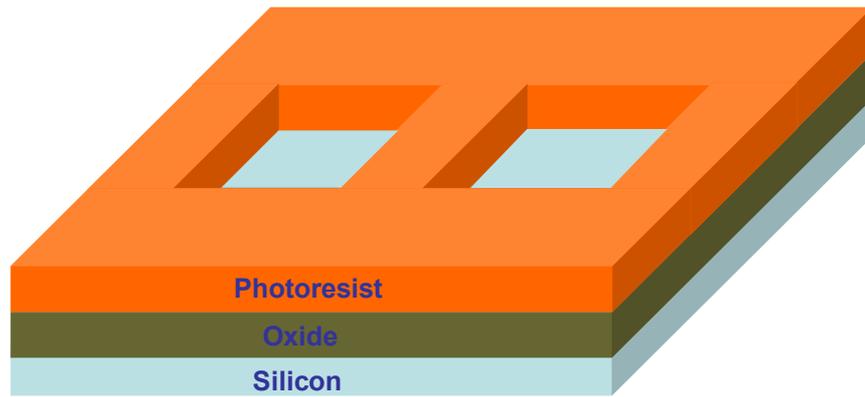
(a) 乾式氧化成長矽氧化層(Dry oxide)。



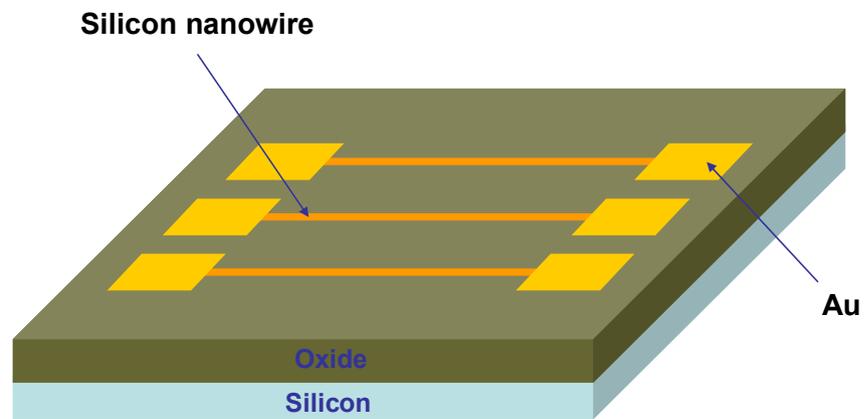
(b) 光學微影定義源極(Source) 和洩極(Drain) 與離子佈值。



(c) 去光阻與 P⁺ annealing 退火。



(d) 光學微影定義 Contact via。



(e) 光學微影定義與熱阻絲蒸鍍系統沉積。

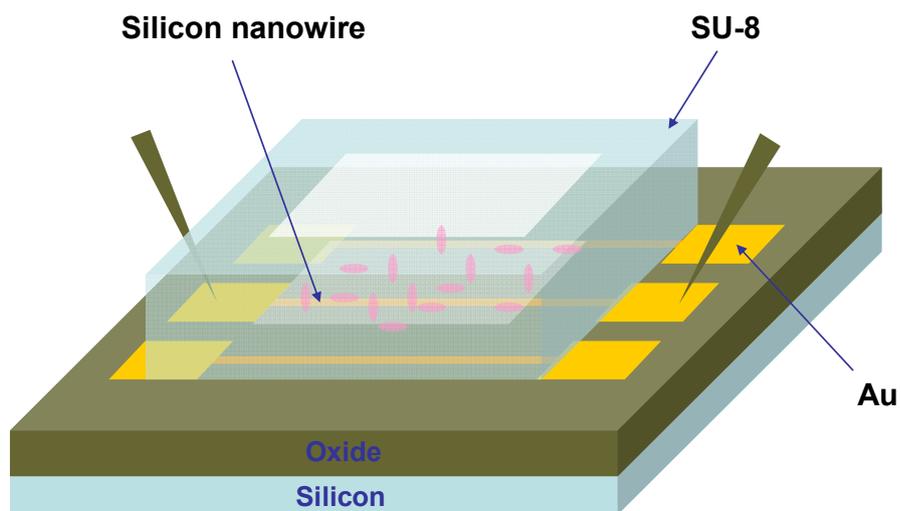


圖 4-10、矽奈米線場效電晶體元件製作流程圖。

4-3-2 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，圖 4-11。

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，如圖 4-12。

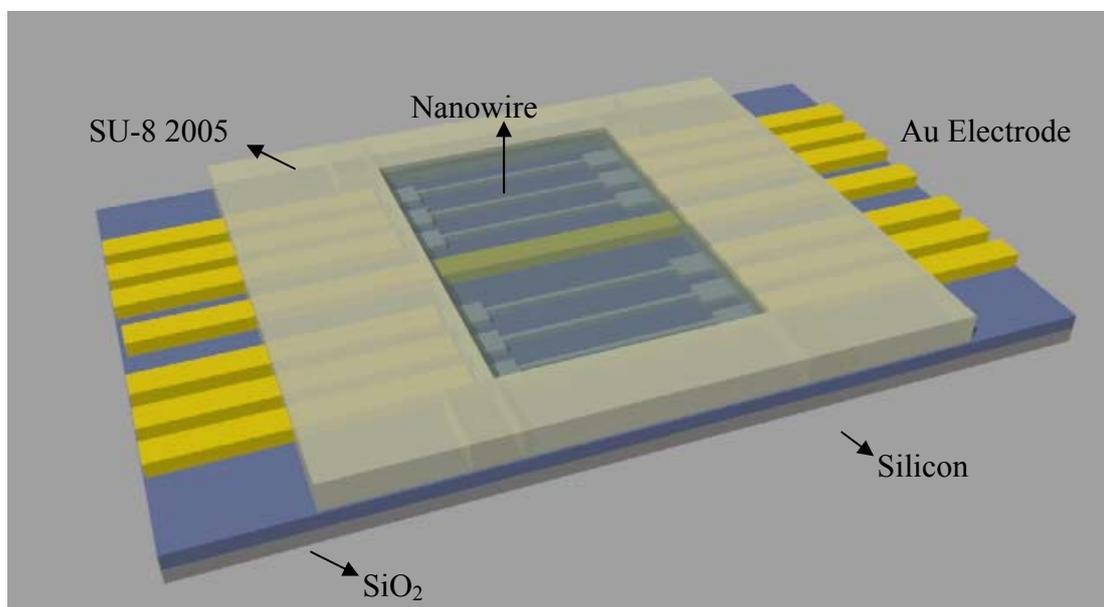


圖 4-11、加入參考電極與微流道之生物感測元件示意圖。

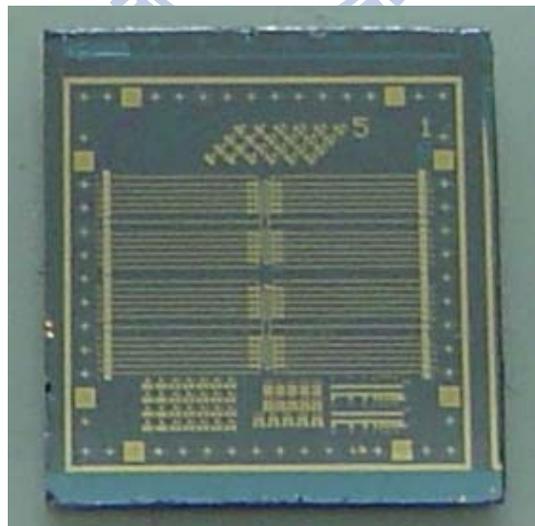
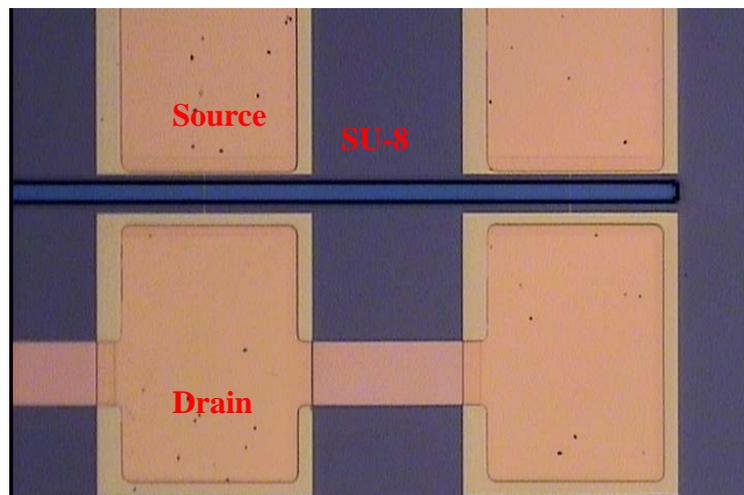
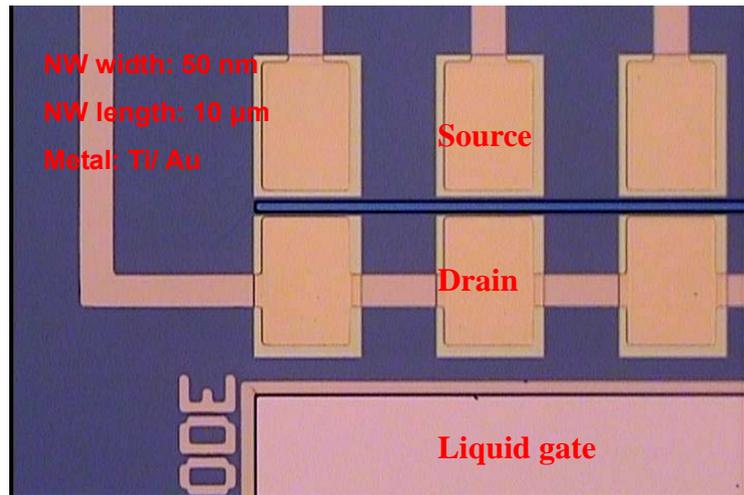


圖 4-12、矽奈米線場效電晶體光學顯微鏡俯視圖。

4-4 矽奈米線表面修飾 Abl tyrosine kinase

Abl tyrosine kinase 為磷酸化酵素，也是一種蛋白質，會將 ATP 分子的磷酸切下，在 ATP 分子偵測系統為專一性的 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 $-NH_2$ 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 $4^\circ C$ [15]。

修飾流程如下：

(1) Silicon wafer 先做 Initial clean。

(2) UV Ozone treatment。

(3) 沉積 Aldehyde silane:

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

浸泡 1 小時。

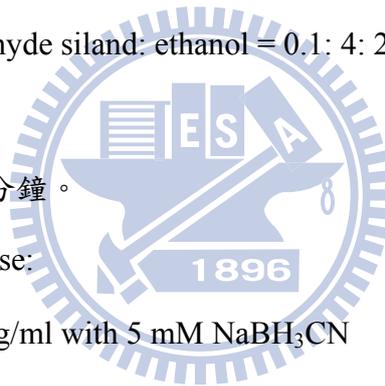
(4) 酒精沖洗 $120^\circ C$, 10 分鐘。

(5) 沉積 Abl tyrosine kinase:

Abl tyrosine kinase $5 \mu g/ml$ with $5 mM NaBH_3CN$

$4^\circ C$, 2 小時。

(6) PBS buffer 沖洗表面。



Overall Rx



Mechanism of Rx

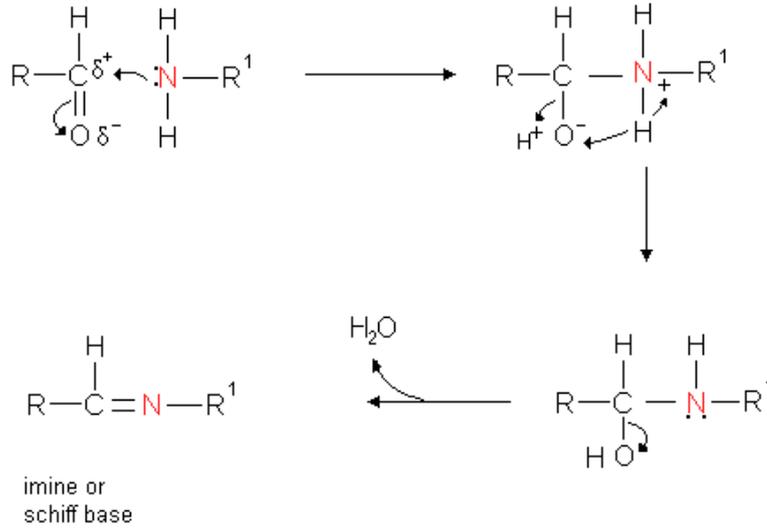
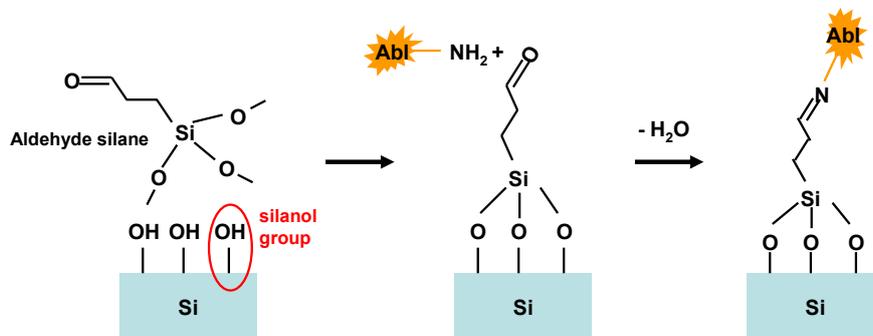


圖 4-13、Schiff base 醛或酮與胺基反應後之產物。

圖 4-13 是 Aldehyde silane 修飾流程圖，首先 Aldehyde silane 會和 Silicon 上的 Silanol group 互相鍵結。之後 Abl tyrosine kinase 的 -NH₂ 和 Aldehyde silane 作反應，形成 -C=N- 鍵結，使 Abl tyrosine kinase 能接上去，如圖 4-14。



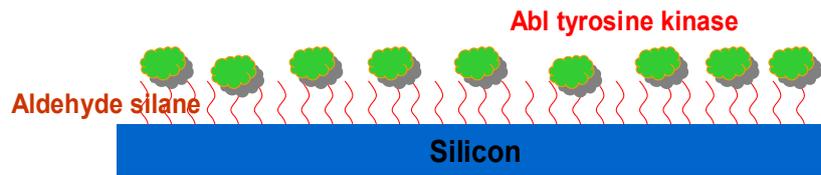


圖 4-14、表面修飾 Aldehyde-Abl tyrosine kinase 示意圖。

4-5 矽奈米線場效電晶體電性量測

本次實驗我們使用 ICS 程式以及 Agilent 4156 和 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。

在矽奈米線場效電晶體元件製作完成時，首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是否為 Omic contact[27]。之後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，如圖 4-15。

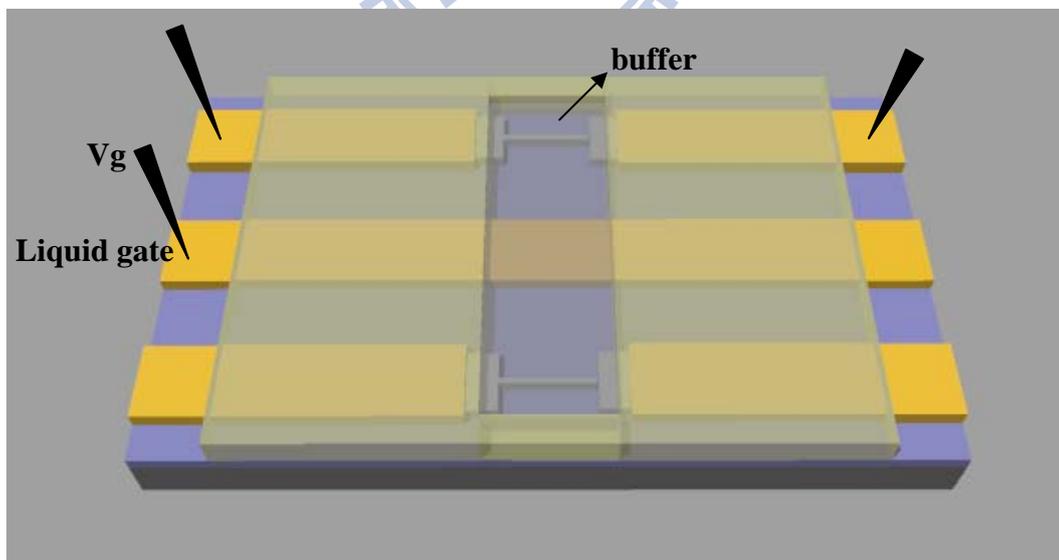


圖 4-15、元件架構與量測示意圖。

4-5-1 電性量測方法

在元件製作完成時，我們以 ICS 程式以及 Agilent 4156 和 Probe station 來量測，首先 V_{ds} Sweep 0.1 V 到 -0.1 V，測試元件電流對電壓(I-V curve) 關係，確認元件和金屬電極的介面為 Omic contact。之後在元件上加 Buffer 做為 Liquid gate， V_{ds} 施加 0.1 V 時加不同的閘極電壓(Liquid gate voltage, V_g)，將閘極電壓 Sweep 50 mV 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[28]，圖 4-16。

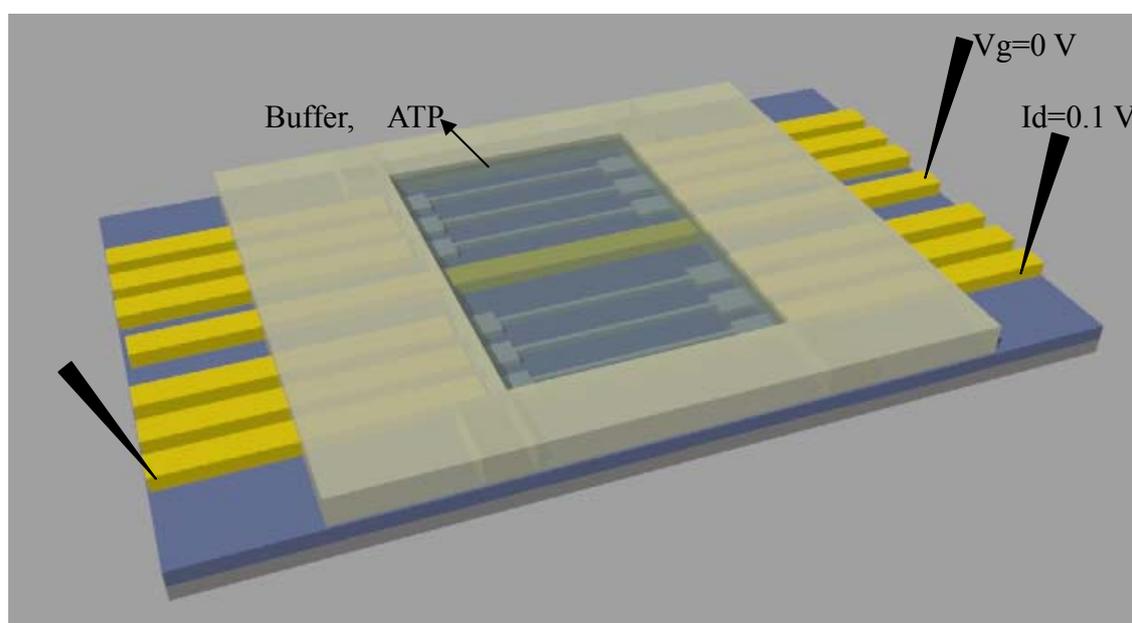


圖 4-16、ATP 分子量測示意圖。

4-5-2 電性量測結果

由於實驗中需要在接近生理環境下來做 ATP 的感測，所以我們會使用靈敏度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 4-17 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 Omic contact；圖 4-18 即為 50 nm 寬的矽奈米線場效電晶體電

流對閘極電壓圖，量測條件也是在 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，由於分子帶電荷約在此範圍，所以證明元件在 50 mV 到 -50 mV 的 Sensitivity 程度才可做分子感測。在確認元件可工作之後，即可進一步來量測分子，如圖所示，得知元件 Conductance 單位變化量為 300 nS，由於靈敏度高，所以本研究以此元件來進行生物分子感測。

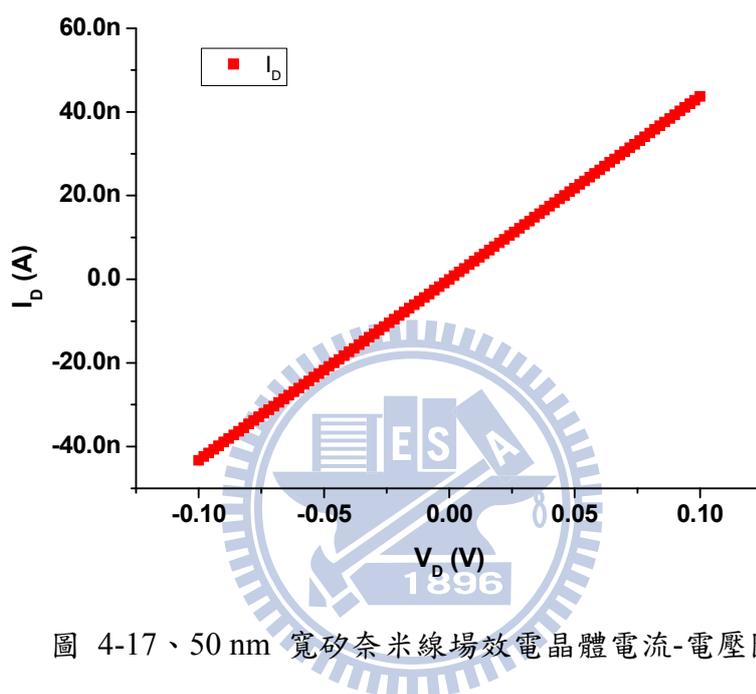


圖 4-17、50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-電壓圖。

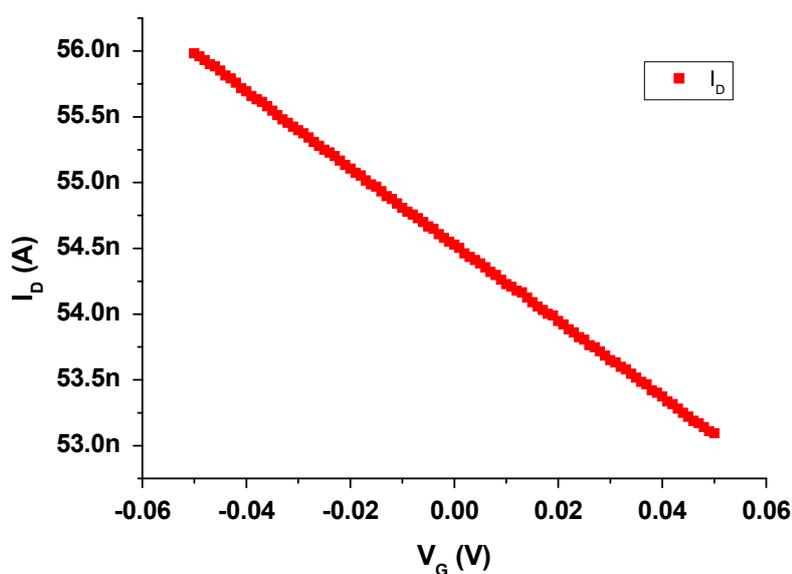


圖 4-18、50 nm 寬矽奈米線場效電晶體電流-閘極電壓圖。

4-6 結合細胞與矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子

在本實驗中要完成用矽奈米線場效電晶體 (SiNW-FET) 來感測活體細胞 HeLa cell 所釋放的 ATP 分子，把矽奈米線場效電晶體與活體細胞結合，架構一個生物感測的系統，讓生物感測系統能即時給予刺激和偵測細胞的行為[29, 30]，如即時偵測細胞所釋放的 ATP 分子，圖 4-19。

4-6-1 量測架構

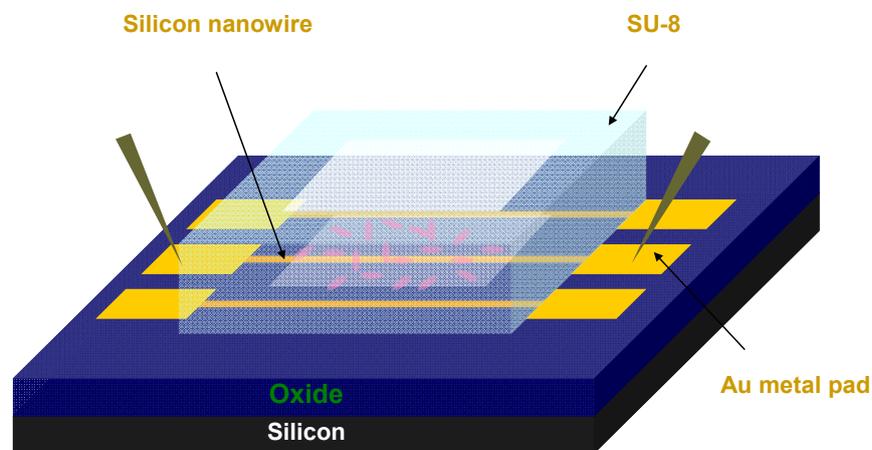
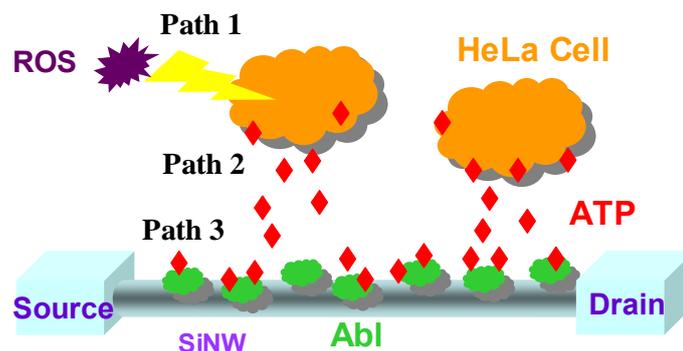


圖 4-19、量測細胞所釋放的 ATP 的晶片與量測架構。



Path 1 : Apply ROS to real-time stimulation

Path 2 : HeLa cells release ATP

Path 3 : SiNW FETs adopt for the real-time detection of ATP

圖 4-20、矽奈米線場效電晶體感測活體細胞釋放 ATP 示意圖。

為了量測 HeLa cell 所釋放出的 ATP 分子，本實驗首先製作出矽奈米線場效電晶體，如 4-3-1 小節的元件製作流程，再修飾 Aldehyde silane 及 Abl tyrosine kinase，完成感測 ATP 分子的矽奈米線場效電晶體。

實驗目的是為了能 Real-time 的方式刺激細胞並量測，所以必須將 HeLa cell 經繼代培養培養到元件上，以自由基邊刺激邊做量測，釋放出的 ATP 分子能被修飾在矽奈米線上的 Abl tyrosine kinase 補獲，此方法可以 Real-time 的方式觀察到 Conductance 的變化，圖 4-20。

4-6-2 電性量測

當 ATP 分子 binding 到矽奈米線時，由於個 ATP 分子帶 4 價負電，所以當 ATP binding 到矽奈米線時，會造成矽奈米線的通道載子濃度(電洞)被 Accumulation (堆積)，使電流變大，也就是 Conductance 變大，由此觀察細胞經過自由基刺激之後 HeLa cell PBS 溶液環境 ATP 分子濃度的改變。

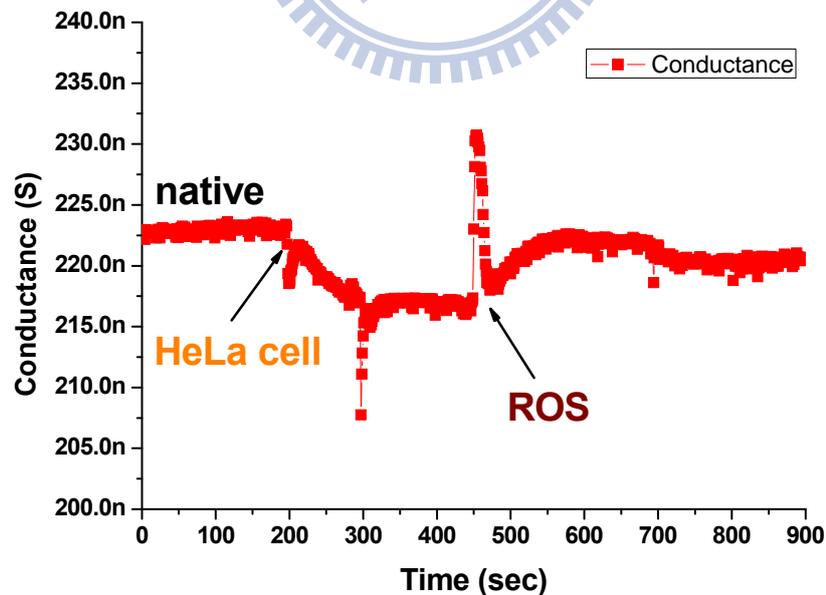


圖 4-21、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子。

量測的結果如圖 4-21 所示，首先是加入細胞生理緩衝液(1xPBS) 在元件上做為量測的基準(baseline)，然後經細胞繼代培養(Subculture)，將 HeLa cell 的 sample 培養到元件上，之後利用 H_2O_2 作為自由基以 Real-time 方式刺激 HeLa cell，並觀察矽奈米線場效電晶體 Conductance 的變化，實驗結果顯示加入細胞生理緩衝液(1xPBS) 時，其 Conductance 並無明顯的變化；在加入自由基刺激後，發現 Conductance 有明顯的變化，顯示經過自由基刺激之後，細胞釋放 ATP 分子到細胞外，所以在矽奈米線上的 Abl tyrosine kinase 會捕捉 ATP 分子，使矽奈米線的載子濃度(電洞)增加，電流變大，也就是 Conductance 變大，在 ROS 刺激一段時間後 Conductance 有些許變小，主要是因為 ATP 是生化分子，其本身會降解(Degradation)，而且細胞上的 ATP 分子水解酵素本身也會水解 ATP 分子，如圖 4-2，造成環境溶液中 ATP 分子的濃度變小，進而使 Conductance 變小。由上述結果可證明在本實驗的量測架構上，是能夠 Real-time 偵測到細胞經自由基刺激所釋放出的 ATP 分子。由圖 4-9C HeLa cell 細胞死亡率，得知 HeLa cell 培養在 PBS 生理緩衝溶液，到第 3 小時細胞死亡率會明顯增加，所以實驗量測的時間以 2 小時內完成為最佳。

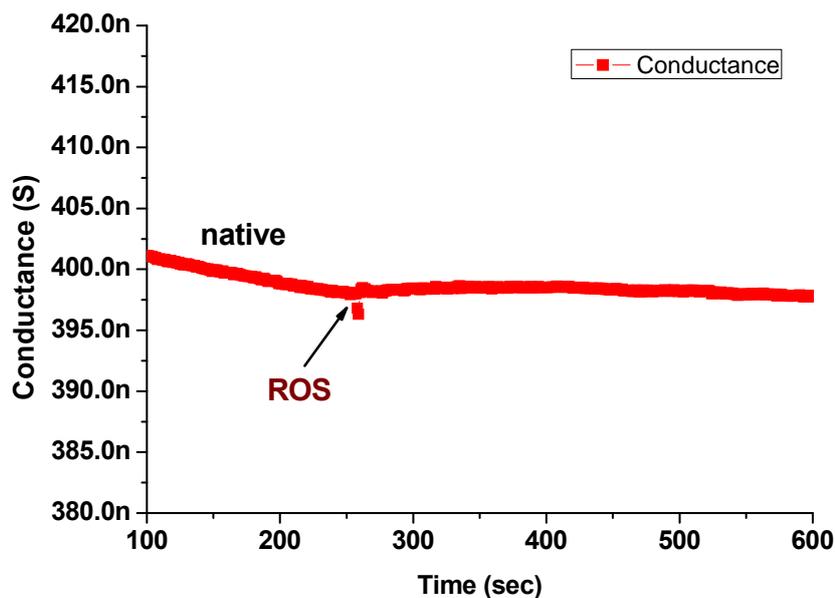


圖 4-22、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子(控制組)。

完成圖 4-21 的實驗組，必須要再做控制組來確認自由基不會影響矽奈米線 Conductance 的改變，所以將修飾 Abl tyrosine kinase 的矽奈米線場效電晶體，如圖 4-22 所示，加入細胞生理緩衝液(1xPBS) 在元件上做為 baseline，然後再加入 H₂O₂，觀察矽奈米線場效電晶體的 Conductance 變化。由圖中所示的結果，表示在 1xPBS 緩衝溶液下，Conductance 沒有明顯的變化，加入雙氧水，其 Conductance 也沒有明顯的變化，所以由圖 4-21 和圖 4-22 可以證明，將細胞經自由基刺激後造成的 Conductance 的變化，是因為細胞所釋放的 ATP 分子被修飾在矽奈米線上的 Abl tyrosine kinase 抓住的關係，與刺激物無關。因此，本實驗的量測架構上，可以 Real-time 偵測到細胞經自由基刺激所釋放出的 ATP 分子。

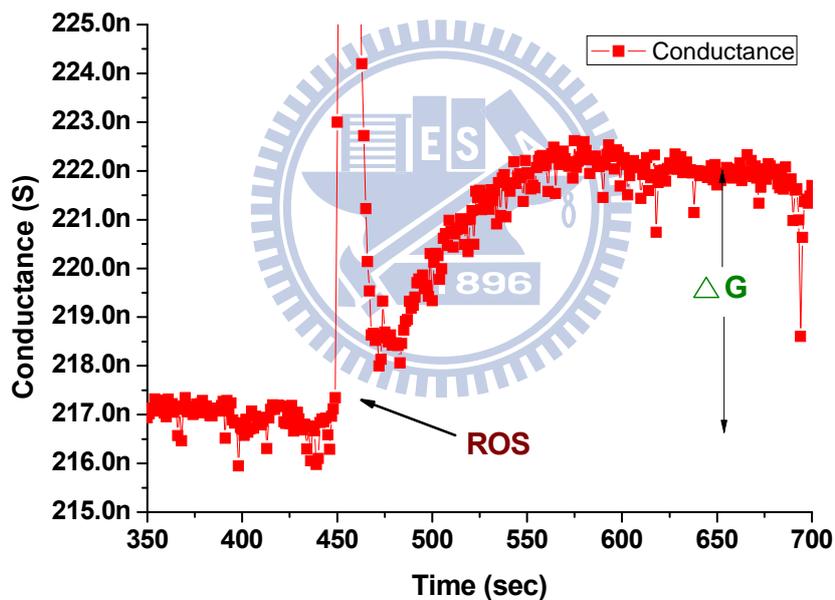


圖 4-23、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放 ATP 分子的電導變化(ΔG) 圖。

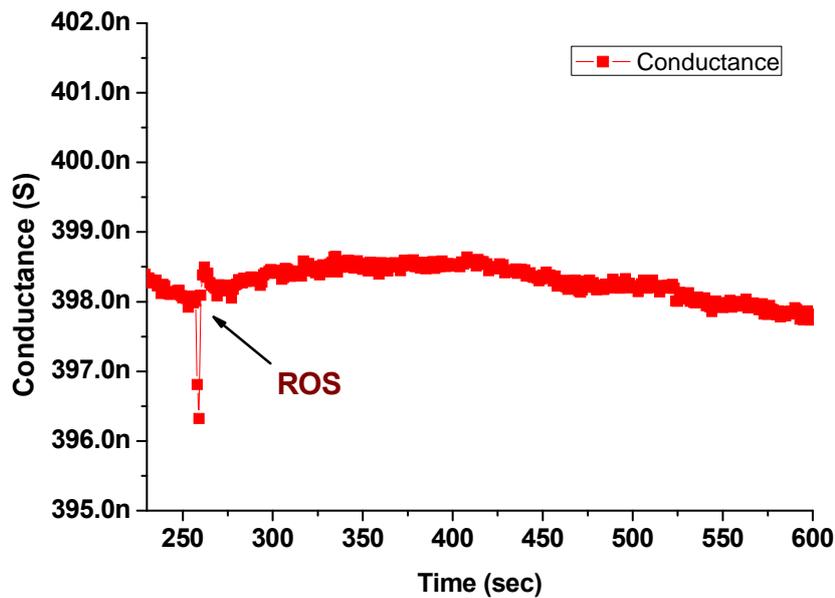


圖 4-24、利用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子(控制組)。

將圖 4-21 的變化放大之後，觀察圖 4-23 發現在自由基刺激之後 Conductance 增加 ($\Delta G/G_0$ 的值) 約為 2.8%，根據實驗室前人研究結果所得到的數據，當 ATP 分子濃度增加 10 倍時，其 $\Delta G/G_0$ 的值約增加 4%。以此 $\Delta G/G_0$ 的值約為 2.8% 之實驗結果做對照，可得知細胞外 ATP 分子濃度增加約為 7.5 倍，數值接近 4-2-1 小節用 ELISA reader 所測出細胞外 ATP 濃度值。圖 4-24 控制組的部分 $\Delta G/G_0$ 的值約為 0.1%，幾乎沒變化，也就是說用矽奈米線場效電晶體感測細胞釋放的 ATP 分子，不僅能很靈敏的偵測 ATP 分子的釋放，而且能夠以 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突破。

4-6-3 HeLa cell 與元件的整合

本實驗目的是整合生醫與半導體奈米元件，在量測之後的重點就是細胞在元件上的生長形態，圖 4-25、圖 4-26 分別是 HeLa cell 在元件周遭生長形態的光學顯微鏡圖和 SEM 圖。證明本實驗能以 Real-time 的方式刺激細胞並量測。

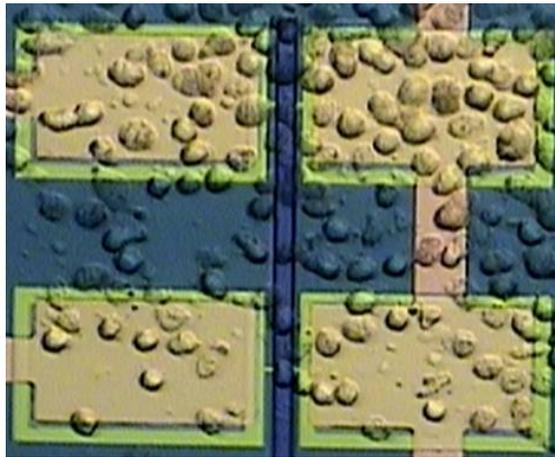
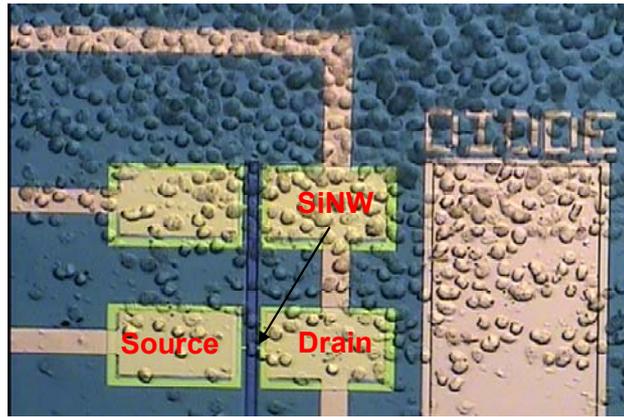
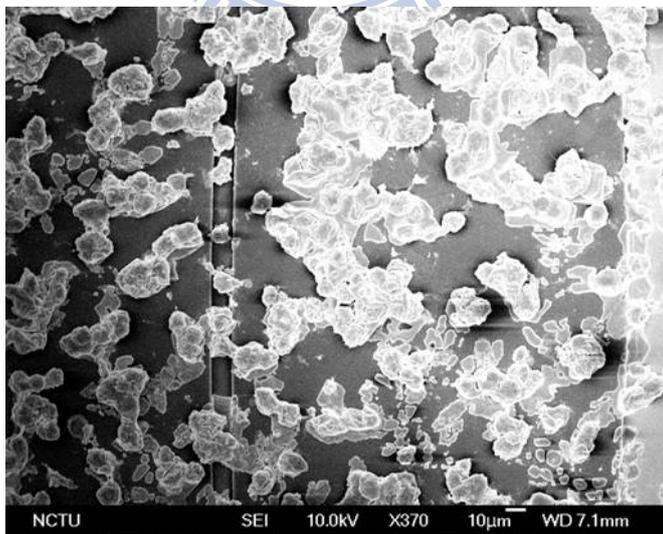


圖 4-25、HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體晶片上之顯微鏡圖。



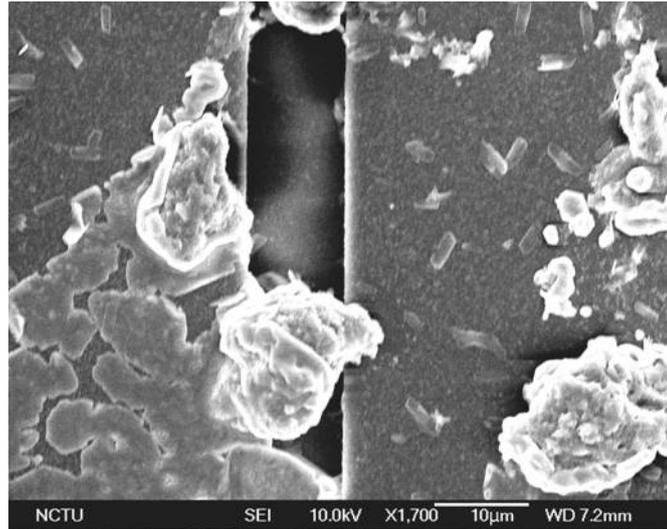
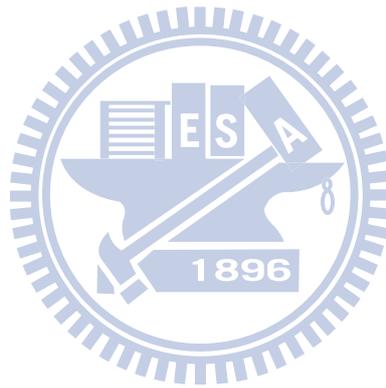


圖 4-26、HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體晶片上之 SEM 圖。



第五章

結論與未來展望

5-1 結論

發展奈米生物感測器一直是人類相當重視的課題，特別是在後基因體時代。快速檢驗及有效的藥物治療已經成為目前首要研究目標，要達到上述的目標仍然有很多事情必須去克服，特別是整合的問題，例如生物分子和半導體晶片原來是沒有交集的兩項重要技術。將半導體工程之製造技術與生物科技技術做整合，藉由固定化技術之聯繫，可以製出未來之生物晶片。

超高靈敏性生物分子感測器研發成功將有助於人類對於疾病之早期測定，且有助於新功能性藥物之開發。以半導體製程為基礎之生物分子感測器是相當具有潛力之技術，因為其具有大量製造之優勢，並且有助於產品化後市場價格之競爭力。發展此新式感測器必須同時整合奈米製造技術與表面固定化技術，仍然有許多的問題必須設法解決，台灣由於半導體相關之高科技產業蓬勃發展，也相當具有利基去發展超高靈敏生物分子感測器。

由本論文之實驗結果與討論，可以歸納出以下之結論：

1. 本實驗成功的以開放式 SU-8 微流道，針對想要培養細胞的位置，來導引 HeLa cell 和 PC12 神經細胞的生長在矽晶片上。此結果將可進一步提供未來植入晶片與現有神經組織形成有效性神經網路介面連結的解決方法，對神經科學醫療上有卓越影響。
2. 本實驗製作出矽奈米線場效電晶體的生物感測器，在其表面修飾蛋白分子時，可成功的感測表面之生物分子，其感測方式為可逆的，且感測之靈敏度相當高。
3. 本實驗成功的將 HeLa cell 培養在矽奈米線場效電晶體生物感測器上，以自由基刺激並即時偵測 HeLa cell 釋放的生物分子 ATP，成功量測到細胞外的 ATP 分子，此結果可運用到疾病或癌症的檢測，使未來疾病篩檢更靈敏、更快速。

4. 本實驗成功的整合 HeLa cell、PC12 cell 與矽奈米線場效電晶體，讓生醫與半導體兩種領域可以相互連結。

5-2 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將細胞與元件做整合，並且能感測細胞所釋放的分子，所以在未來有許多重要的研究可以繼續進行。

未來研究可行的方向：

1. 本研究可以進一步在矽奈米線場效電晶體或電極上製作封閉式的微流道架構 (PDMS)，直接在封閉式微流道上培養神經細胞，量測上能更方便、快速的更換細胞溶液，用來感測神經細胞之間動作電位的訊息傳遞，圖 5-1。
2. 將實驗中目前量測的架構整合，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以封閉式微流道進行刺激和生物分子的量測。此方法好處是量測過程中不須將元件拿出來清洗，緩衝溶液用微流道流即可，使實驗更方便、更快速[30]。
3. 此研究的架構可以運用在細胞神經細胞訊息傳遞的研究，除了本實驗中所量測的 ATP 分子之外，更可以研究如神經傳導物質 Dopamine、Norepinephrin 的釋放或傳遞。

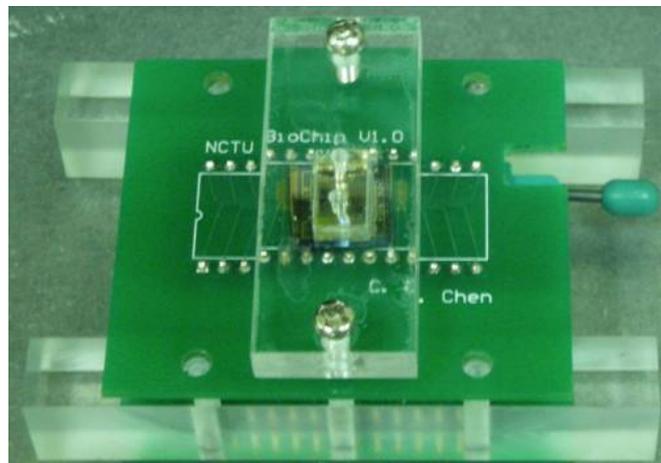
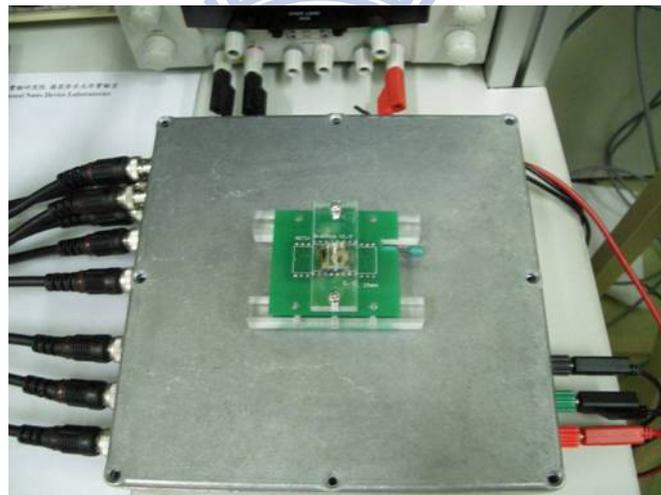
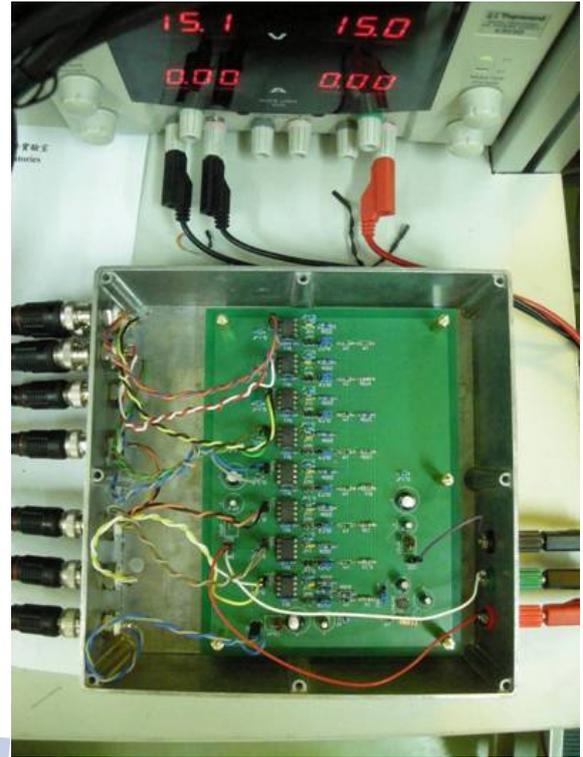
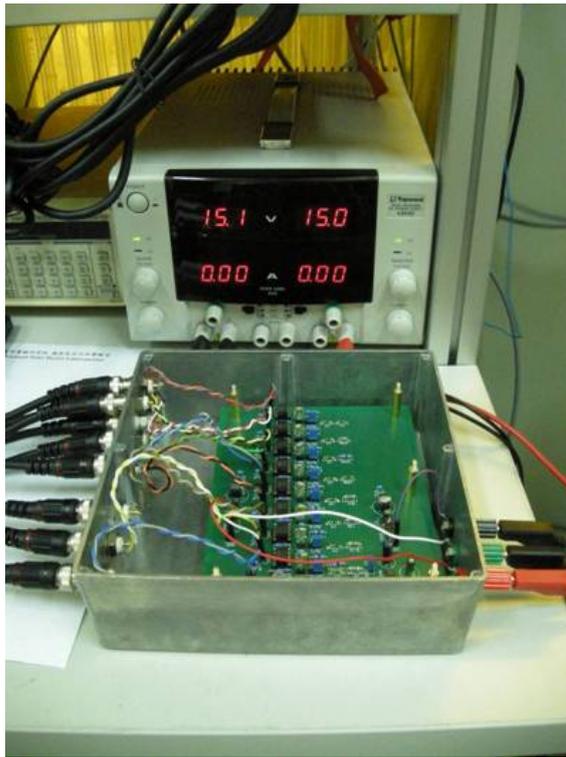


圖 5-1、PDMS 封閉式微流道架構。

參考文獻(References)

- [1] K. Grosios, and P. Traxler, “Tyrosine kinase targets in drug discovery,” *Drugs Future*, vol. 28, pp. 670-697, 2003.
- [2] K. K. Spratt, “Transfection of PC-12 cells: a model system for primary neuronal cells,” *Qlagen news*, vol. 4, pp. 3-4, 1998.
- [3] Miserlou, “Mechanisms for propagating action potentials,” *Wikipedia, the free encyclopedia*, 2008.
- [4] M. Merz, and P. Fromherz, “Silicon Chip Interfaced with a Geometrically Defined Net of Snail Neurons,” *Adv. Funct. Mater*, vol. 15, no. 5, pp. 739-744, 2005.
- [5] J. Becker, “Signal transduction inhibitors—a work in progress,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, pp. 15-18, 2004.
- [6] G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, and C. M. Lieber, “Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, pp. 1294-1301, 2005.
- [7] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick, “Molecular Biology of the Gene,” *Pearson Education*, 2005.
- [8] D. S. Goodsell, “The Molecular Perspective: c-Abl Tyrosine Kinase,” *Stem Cells*, vol. 24, pp. 209-210, 2006.
- [9] 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.
- [10] I. Park, Z. Li, X. Li, A. P. Pisano, and R. S. Williams, “Towards the silicon nanowire-based sensor for intracellular biochemical detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, pp. 2065–2070, 2007.
- [11] Z. Li, Y. Chen, X. Li, T. I. Kamins, K. Nauka, and R. S. Williams,

- “Sequence-Specific Label-Free DNA Sensors Based on Silicon Nanowires,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. 2, pp. 245-247, 2004.
- [12] C. Heitzinger, G. Klimeck, “Computational aspects of the three-dimensional feature-scale simulation of silicon-nanowire field-effect sensors for DNA detection,” *J Comput Electron*, vol. 6, pp. 387-390, 2007.
- [13] F. Patolsky, and C. M. Lieber, “Nanowire Nanosensors,” *Materials Today*, vol. 8, no. 4, pp. 20-28, 2005.
- [14] F. Patolsky, B. P. Timko, G. Yu, Y. Fang, A. B. Greytak, G. Zheng, and C. M. Lieber, “Detection, Stimulation, and Inhibition of Neuronal Signals with High-Density Nanowire Transistor Arrays,” *Science*, vol. 313, pp. 1100-1104, 2006.
- [15] 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,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 9, pp. 3208-3212, 2005.
- [16] C. W. Wang, C. Y. Pan, H. C. Wu, P. Y. Shih, C. C. Tsai, K. T. Liao, L. L. Lu, W. H. Hieh, C. D. Chen, and Y. T. Chen, “In Situ Detection of Chromogranin A Released from Living Neurons with a Single-Walled Carbon-Nanotube Field-Effect Transistor,” *Small*, vol. 3, no. 8, pp. 1350-1355, 2007.
- [17] N. Shao, E. Wickstrom and B. Panchapakesan, “Nanotube–antibody biosensor arrays for the detection of circulating breast cancer cells,” *Nanotechnology*, vol. 19, pp. 1-11, 2008.
- [18] C. Wyart, C. Ybert, L. Bourdieu, C. Herr, C. Prinz, and D. Chatenay, “Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces,” *J. Neurosci*, vol. 117, pp. 123-131, 2002.
- [19] K. P. Das, T. M. Freudenrich, W. R. Mundy, “Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures,” *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 26, pp. 397-406, 2004.

- [20] R. Duncan, "A three-dimensional reconstruction of a single phaeochromocytoma (PC12) cell," *University of Edinburgh of Biomedical and Clinical Laboratory Sciences*.
- [21] M. N. De Silva, R. Desai, and D. J. Odde, "Micro-Patterning of Animal Cells on PDMS Substrates in the Presence of Serum without Use of Adhesion Inhibitors," *Biomed. Microdevices*, vol. 6, pp. 219-222, 2004.
- [22] M. C. Park, J. Y. Hur, K. W. Kwon, S. H. Park, and K. Y. Suh, "Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus," *Lab Chip*, vol. 6, pp. 988-994, 2006.
- [23] S. Hou, K. Yang, M. Qin, X. Z. Feng, L. Guan, Y. Yang, and C. Wang, "Patterning of Cells on Functionalized Poly(dimethylsiloxane) Surface Prepared by Hydrophobin and Collagen Modification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, pp. 912-916, 2008.
- [24] S. W. Rhee, A. M. Taylor, C. H. Tu, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon, "Patterned cell culture inside microfluidic devices," *Lab Chip*, vol. 5, pp. 102-107, 2005.
- [25] A. Fox, "HeLa Paraspeckle," Wikipedia, the free encyclopedia, 2007.
- [26] M. Nakamura, M. Mie, H. Funabashi, K. Yamamoto, J. Ando, and E. Kobatake, "Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase," *Anal. Biochem.*, vol. 352, pp. 61-67, 2006.
- [27] 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.
- [28] Y. Cui, Z. Zhong, D. Wang, W. U. Wang, and C. M. Lieber, "High Performance Silicon Nanowire Field Effect Transistors," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 2, pp. 149-156, 2003.
- [29] X. Tang, S. Bansaruntip, N. Nakayama, E. Yenilmez, Y. I. Chang, and Q. Wang, "Carbon Nanotube DNA Sensor and Sensing Mechanism," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 8, pp. 1632-1636, 2006.

[30] D. R. Kim, C. H. Lee, and X. Zheng, "Probing Flow Velocity with Silicon Nanowire Sensors," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 1984-1988, 2009.

