

國立交通大學
材料科學與工程研究所

碩士論文

以電化學法檢測人類乳突病毒序列之研究

**The Study of Electrochemical Detection for the
Sequence of Human Papillomavirus**

研 究 生：魏伸紘

指 導 教 授：涂肇嘉博士

蔡明蒔博士

中華民國九十四年七月

以電化學法檢測人類乳突病毒序列之研究

研究生：魏伸紘

指導教授：涂肇嘉 博士

蔡明蒔 博士

國立交通大學材料科學與工程研究所

中文摘要

以電化學法去偵測病毒至今已有不少文獻被發表，這種方法具有不錯的敏感度、操作方便、容易得到訊號等優點。若是配合修飾電極表面，可使偵測的結果更加明確，並可提高偵測極限。本論文主要是利用6-Mercapto-1-hexanol(MCH)修飾電極，並將此電極用於分析在僅差幾個mismatch病毒檢測之應用。

實驗設計為針對子宮頸癌之高危險性人類乳突病毒(human Papillomavirus; HPV)16型(HPV type16)與18型(HPV type18)分別設計特定探針序列Probe16與Probe18，利用 $Fe(CN_6)^{-3} / KNO_3$ 溶液為設定之環境狀態，利用電化學法偵測這兩種家族間在 $Fe(CN_6)^{-3} / KNO_3$ 溶液中的氧化還原反應，如分離氧化還原波峰電位、兩波峰電流比值間比較等等。

在這實驗中，利用脫氧核糖核酸本身骨幹或雜交完後所帶的負電

荷與存在水溶液中 $Fe(CN_6)^{-3}$ 離子產生靜電力排斥反應；或加入MB使脫氧核糖核酸呈電中性，配合其它的適當條件與方法，反應在電化學訊號進行偵測。

實驗中探討電極清洗、電解質種類、電解質濃度、電化學行為、緩衝液pH值高低影響、單股種的時間、雜交時間、MB插入時間等參數，並探討如何去除非專一性吸附的干擾並提高雜交率。對於Probe16及Probe18序列在本實驗分開討論。

第一部份探討Probe16配合三種不同雜交股，分別為0、3、7錯位；本實驗所得之結果是利用含硫醇基單/雜交股種在金電極表面為工作電極，配合插入MB放大訊號之不同來比較。以循環伏安法從負電位的方向往正電位方向掃引，電解質為100mM的 KNO_3 ，搭配固定DNA種上去時間來探討脫氧核糖核酸在金電極上電化學行為。

第二部份探討Probe18配合三種不同雜交股，分別為0、4、6錯位，本實驗所得之結果是利用含硫醇基單/MCH/雜交股種在金電極表面為工作電極，配合插入MB放大訊號之不同來比較。以循環伏安法從負電位的方向從正電位方向掃引。電解質為100mM的 KNO_3 ，搭配固定DNA種上去時間來探討脫氧核糖核酸在金電極上電化學行為，並與第一部份實驗數據比較之。

針對 DNA 感測器的結構進行各項檢測，電化學檢測電子傳輸情形(Cyclic Voltammetry)；DNA 的覆蓋率與雜交率 (Quartz Crystal Microbalance)；接觸角量測 DNA 的堆疊密度(Contact angle)，希望能藉此得到高鑑別率且穩定的鑑識技術，而利用亞甲基藍達到定性的功用，與 QCM 相互印證 DNA 覆蓋率。

由本研究之發現，綜合言之可列舉如下：

1. 金電極表面的乾淨度是影響 DNA 接和的最重要因素。
2. DNA 緩衝液配置與種完單/雙股後清洗對於電化學訊號影響。
3. 在此實驗中，DNA 之非特異性吸附會影響雙股間雜交率。
4. 次甲基藍對於雜交股 DNA 會有放大訊號功能。
5. 次甲基藍可放大效果可鑑別出同一家族中具有錯位之 DNA。
6. 利用 MCH 當作單股 DNA 之間係物(spacer)，可有效提升雙股間雜交率至 100%且避免非特異性吸附。
7. 經由 QCM 驗證，與其電化學量測結果是相互配合。

The study of Electrochemical detection for the sequence of Human Papilloma Virus

Student : Chih-Hao Lin

Advisor : Dr. George C. Tu

Dr. Ming-Shih Tsai

Institute of Materials Science and Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

Many theses of electrochemical methods detecting DNA virus have been announced and the electrochemical methods have good sensitivity, convenient operation, easy to get the signals. After the modified electrode, we will get the result more explicit. This thesis mainly used the modified electrode with 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) to detect the DNA viruses that are different from several of mismatches.


There were two kinds of high risk sequences that we choose in this experiment between human papilloma viruses. After detecting women who had cervical cancer, Probe 16 and Probe 18 are two of the sequences that appear most often. In other words, it may imply that Probe 16 and Probe 18 could be applied to detect cervical cancer. We set up electrolytic environment that contains ferricyanide and potassium nitrate, and detect the redox reactions of two family types by electrochemical method. For example the separation redox peak potentials or the ratio of redox peak current.

In this experiment, some reactions that we know just like the repulsive reaction between the negative charge backbone of nucleotide and ferricyanide anions in electrolytic solution ; or nucleotide base pair intercalated Methylene blue is presented charge neutrality. If matching with appropriated methods, the signal of electrochemical reactions can be detected.

We inquired into the items of electrode cleaning, electrolyte type, concentration of electrolyte, electrochemical behavior, pH effect of buffer solution, probe single-strand DNA in different time, hybridized time, intercalating MB in different time. We also inquired into how to rid of non-specific binding and increase the hybridization ratio. Probe 16 and Probe 18 were discussed separately in this experiment.

At part I, we inquired into type Probe 16 with three different hybridized DNA, including 0 、 3 、 7 mismatch DNA sequences ; The results of the experiment are following: The working electrode was modified a monolayer containing ssDNA/dsDNA, and then adding methylene blue to compare with each electrodes that get the increasing signals. The direction of sweep was from negative potential to positive potential by method of cyclic voltammetry. The electrolyte is 100M KNO₃; pH value of buffer solution was 5.7. Parameters above were arranged to collocate different probing time to discuss the electrochemical behavior of gold electrode modified DNA.

At part II, we inquired into type Probe 18 with three different hybridized DNA, including 0 、 4 、 6 mismatch DNA sequences ; The results of the experiment are following: The working electrode was modified a monolayer containing ssDNA/MCH/dsDNA, and then adding methylene blue to compare with each electrodes that get the increasing signals. The direction of sweep was from negative potential to positive potential by method of cyclic voltammetry. The electrolyte is 100M KNO₃; pH value of buffer solution was 7.0. Parameters above were arranged to collocate different probing time to discuss the electrochemical behavior of gold electrode modified DNA, and use these data to compare with the data of part I.



We use many methods and instruments to make sure that the DNA sensor is completely. For example, the electron transfer condition(CV), the coverage and the hybridization ratio of the DNA(QCM), and the packing density of the DNA(CA).We hope to develop more stable and reliable fabrication process to produce more accurate DNA sensor.

In this study, several of results can be found:

1. The most important of the DNA coverage on the gold electrode is the gold surface cleaning.
2. The effect of DNA buffer solution and the cleaning step after immobilizing ssDNA/dsDNA on electrochemical signals.
3. The non-specific binding of DNA will decrease hybridization

ratio.

4. DNA intercalated Methylene Blue will increase signals.
5. We can identify mismatch DNA by adding Methylene Blue.
6. We can improve hybridization ratio and avoid non-specific binding by adding Mercaptohexanol.
7. The results from electrochemical measurements can be matched with that from QCM.



致謝

由衷感謝在我碩士兩年來給予我指導三位老師，首先，感謝指導教授涂肇嘉老師給予我優良學習空間及見解；生科所林志生老師提供我DNA方面的資源與合成技術；最後是國家奈米元件實驗室副主任蔡明蒔博士在這一年多來無私指導與付出，在上下班之餘還要抽空線上或研討室與我們討論實驗進度，給予我實驗正確方針。真的非常感激以上三位老師無私的奉獻與教誨。

再來要向政煜學長、旺申學長、寶明學長、秉緯學長說聲謝謝你們。尤其是寶明、政煜與志豪感謝你們適時的關心，提供實驗研究上的建議與協助，讓我這一路上走的更順利。最後，對於美儀姐在實驗上對我的關心，使我永生難忘。



除此，對別提出我的實驗上伙伴，徐繹翔。感謝你每次都要幫我置備 DNA 樣品，不管是多晚，只要一通電話，你就會放下手邊的是，義不容辭先幫我配好；並可以陪我作實驗到半夜，可以隨時討論實驗上所遇到問題。並感謝林勝結、謝逸凡學長處理實驗室大大小小的事務，讓我在實驗中不用煩惱實驗室瑣碎繁雜的事。

當然，除了在我學習歷程當中，最最感謝是我家中爸爸，辛苦工作一整天來提供我的花費與開銷，再來感謝我敬愛的媽媽費心處理家中大小事務使我無須擔

心，還有我前女友-淑芬，感謝你在我人生最失意時候給予我鼓勵與信心，讓我相信我是最棒的；最後，特別感謝怡文及千容在我畢業前幾個月，陪我度過這段悲傷日子，給我關心與信心。



總目錄

中文摘要-----	II
英文摘要-----	V
致謝-----	IX
總目錄-----	XI
圖目錄-----	XV
表目錄-----	XVIII
第一章 緒論-----	1
1.1 研究動機與目的-----	1
1.2 研究內容-----	3
第二章 文獻回顧-----	5
2.1 生物檢測器簡介-----	5
2.1.1 生物感測器之緣起與發展-----	5
2.1.2 生物檢測器之定義與種類-----	6
2.2 生物元件之修飾法-----	11
2.3 電化學簡介-----	13
2.3.1 電化學反應系統-----	13

2.3.2	影響電化學反應系統的因素-----	14
2.3.3	電極動力學：Bulter-Volmer方程式-----	15
2.4	伏特安培法-----	19
2.4.1	可逆與不可逆反應-----	20
2.5	交流阻抗法分析法-----	22
2.5.1	交流阻抗分析法之原理-----	22
2.5.2	交流阻抗分析法之應用-----	23
2.6	化學修飾電極的備製方法-----	27
2.7	導電DNA簡介-----	29
2.7.1	導電DNA歷史回顧-----	29
2.7.2	去氧核糖核酸組成結構-----	29
2.7.3	DNA導電機制-----	32
2.8	催化DNA訊號放大機制-----	35
第三章 實驗材料、設備與方法-----		37
3.1	病毒DNA序列介紹-----	37
3.2	實驗藥品-----	40
3.3	緩衝液配置-----	40
3.4	實驗設備-----	41

3.4.1 電化學腐蝕量測系統-----	41
3.4.2 石英晶體微量天平-----	42
3.5 其他實驗裝置設備-----	42
3.6 實驗方法-----	43
3.6.1 金電極製作流程-----	43
3.6.2 金電極清洗流程-----	45
3.6.3 量測電化學前置作業-----	46
3.6.4 單股 DNA 吸附金電極-----	46
3.6.4.1 S-Au 鍵結原理-----	47
3.6.5 單股 DNA/MCH 修飾於金電極表面上-----	48
3.6.5.1 MCH當間距物原因-----	48
3.6.6 雙股 DNA 雜交-----	50
3.6.6.1 雜交原理-----	50
3.6.7 雙股 DNA/MB 作用-----	51
3-6-7-1 亞甲基藍-----	51
第四章 結果與討論-----	53
4.1 影響循環伏安法因素探討-----	53
4.1.1 電解液對伏安電位與電流之影響-----	53

4.1.2	掃瞄速率對在金電極表面上伏安圖變化-----	57
4.2	探討單股DNA覆蓋率影響之因素-----	59
4.2.1	緩衝液對單股DNA覆蓋於金電極上之影響-----	59
4.2.2	種植單股DNA時間對於覆蓋金電極上之影響-----	62
4.3	電極表面經DNA修飾之循環伏安之定性測試-----	63
4.4	嵌入劑在多聚陰離子雙股螺旋之電荷補償-----	66
4.4.1	嵌入劑濃度對於完全互補股DNA之電化學訊號影響-----	67
4.4.2	嵌入劑時間對於完全互補股DNA之電化學訊號影響-----	68
4.4.3	嵌入劑分別在單/雙股DNA之插入之機制-----	70
4.4.4	MCH在金電極表面之電化學訊號影響-----	72
4.5	電化學檢測V16序列之病毒-----	73
4.5.1	完全互補股DNA之電化學測試-----	73
4.5.2	3 mismatch DNA之電化學測試-----	75
4.5.3	7 mismatch DNA之電化學測試-----	76
4.6	電化學檢測V18序列之病毒-----	78
4.6.1	完全互補股DNA之電化學測試-----	78
4.6.2	4 mismatch DNA之電化學測試-----	80
4.6.3	6 mismatch DNA之電化學測試-----	82
4.6.4	完全不互補DNA之電化學測試-----	83

4.7 利用接觸角測量在金電極上不同單/雙股之特性-----	85
4.8 利用石英晶體微量天平量測單/雙DNA間質量變化-----	87
4.8.1 V16+T16 DNA之微量天平圖-----	87
4.8.2 V16+ T6 DNA之微量天平圖 -----	88
4.8.3 V16+*T16 DNA之微量天平圖-----	89
第五章 結論-----	91
參考文獻-----	93



圖 2-1 生物檢測器結構示意圖-----	7
圖2-2 不可逆電極反應之自由能外形-----	17
圖 2-3 循環伏安法之電位施予形式示意圖-----	20
圖2-4 為理想之電化學介面的(b)阻抗圖譜與其(a)等效電路-----	25
圖 2-5 (a)等效電路中加入 Warburg 擴散阻抗元件與電荷轉移阻 抗串聯;(b) Warburg 擴散阻抗在 Nyquist 圖譜中影響-----	26
圖 2-6 去氧核糖核酸組成結構-----	30
圖 2-7 核苷酸基本結構與鹽基鍵結示意圖-----	31

圖2-8 DNA導電機制(a) 超交換相互作用或穿遂效應作用於 DNA bridge中；(b)為電荷跳躍；(c)A-hopping或G-hopping-----	34
圖 2-9 描述當亞甲基藍加入在修飾過 DNA 金電極表面上對 Fe(CN) 6^{3-} 之影響-----	36
圖3-1 製備金電極流程-----	45
圖3-2 MCH在單股之間功用-----	49
圖3-2 亞甲基藍化學結構-----	51
圖 3-3 亞甲基藍為一典型的次甲基藍吸收光譜-----	52
圖 4-1 為電活化物(Fe $^{+3}$)在不同濃度之下之循環伏安圖-----	55
圖4-2為在5mM KNO $_3$ 濃度下改變(Fe $^{+3}$)之循環伏安圖-----	56
圖4-3為在5mM (Fe $^{+3}$)濃度下改變KNO $_3$ 濃度之循環伏安圖--	56
圖 4-4 為掃瞄速率對固定濃度電活化物(Fe $^{+3}$)之循環伏安圖-----	58
圖 4-5 為在掃瞄速率平方根 vs. 還原峰電流值-----	58
圖 4-6 為單股 DNA 在緩衝液濃度為 0M 之循環伏安圖-----	61
圖4-7為單股DNA在緩衝液濃度為1M之循環伏安圖-----	61
圖4-8為單股DNA在金電極表面上不同時間之循環伏安圖-----	62
圖4-9為金電極表面修飾過單、雜交股DNA之循環伏安圖-----	64

圖4-10為改變金電極表面電荷和經表面修飾過後之電化學反應 介於 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 和電極-----	65
圖 4-11 為完全互補 DNA 在不同濃度之亞甲基藍 10 分鐘反應之 循環伏安圖-----	68
圖 4-12 為完全互補 DNA 在固定亞甲基藍濃度配合不同插入時 間下之循環伏安圖-----	69
圖 4-13 為亞甲基藍插入在完全互補 DNA 之循環伏安圖-----	71
圖 4-14 為亞甲基藍插入在單股 DNA 之循環伏安圖-----	71
圖 4-15 為 MCH 在在 金電極之循環伏安圖-----	72
圖 4-16 為亞甲基藍插入在完全互補股 DNA 之循環伏安圖-----	74
圖 4-17 為亞甲基藍插入在 3 Mismatch DNA 之循環伏安圖-----	76
圖 4-18 為亞甲基藍插入在 7 Mismatch DNA 之循環伏安圖-----	77
圖 4-19 為亞甲基藍插入在完全互補 DNA 之循環伏安圖-----	80
圖 4-20 為亞甲基藍插入在 4 Mismatch DNA 之循環伏安圖-----	81
圖 4-21 為亞甲基藍插入在 6 Mismatch DNA 之循環伏安圖-----	83
圖4-22為完全不互補DNA之循環伏安圖-----	84
圖 4-23 為單股 DNA 隨種在金電極表面時間之角度變化-----	86
圖 4-24 為 DI water 對單/雙股之接觸角度之變化-----	86
圖 4-25 為 bare Au+V16+T16 之頻率變化圖-----	88

圖4-26為bare Au+V16+T6之頻率變化圖----- 89

圖 4-27 為 bare Au+V16+*T16 之頻率變化圖----- 90

表目錄

表2-1 多種修飾法之原理、優缺點比較----- 12

表 3-1 病毒 DNA 序列----- 38

表 4-1 電解液中濃度配置表----- 53

表 4-2 Probe 16 與 Probe 18 加入不同雜交股之可逆反應----- 84

