

第一章 緒論

1-1 研究動機與目的

病毒檢測過程不但程序複雜而且成本亦較高，尤其之前爆發 SARS 病毒，從採取病人 DNA 到分析報告出來幾乎要一至兩個禮拜，因此難以普遍被運用於臨床實際檢測而只停留於實驗室使用階段。基於這些理由，如果能將感測器檢測程序方便、檢測時間短之優點運用在檢測不同病毒系統，再加上電化學基礎之應用，期望能發展出操作程序簡便、檢測時間短、敏感性高並且成本低廉之電化學檢測法，以改進傳統方法之缺點而能被廣泛採用，並對於感測器在檢測病毒之領域能有進一步之發展。



在近幾年來，DNA 雜合技術被廣泛的應用於分子生物的基本研究，且越來越被重視；且雜交型 DNA 電化學感測器也成為令人感興趣一環，其應用原理基於固定在固相載體上具有特定序列的單股核苷酸會與另一股互補的游離核酸形成雜合 (Hybridization)，並用來達成疾病的診斷與治療因為只要利用不同的探針 (probe)，即可偵測到不同的目標 DNA。要偵測到有害的基因、突變的基因和確認所感染的病原體，只需要合成單股一小段的互補 DNA 或 RNA 來當作探針，即可精確的偵測出來。

本實驗主要的研究目的是利用電化學高靈敏性與鑑別率發展一套快速病毒檢測製程，在設計這套製程而言，許多因素是需要多方考慮的並相互影響的，如下所示：

1. 選擇電極材料不受到有機溶劑及酸鹼溶液破壞等限制並可增加其重複可利用性。
2. 電極表面化學處理避免DNA非專一性吸附(non-specific binding)。
3. 如何固定探針DNA在電極表面，並探討DNA之表面覆蓋率(surface coverage)影響對雜交作用。
4. 選擇適當嵌合劑 (intercalator)在DNA鹼基中來當電子傳遞媒介。
5. 設計不同DNA的錯位(mismatch)使感測器提升鑑別率。

1-2 研究內容

本實驗主要內容發展一套正確且快速檢測流程針對各種病毒，除此之外，希望透過DNA錯配的設計，能鑑別出同一家族中病毒。

對於雜交型DNA感測器首先需求是如何達到高雜交率，而高雜交率取決單股對金電極覆蓋率。首先針對單股覆蓋率會遇到兩個問題，一是如何使DNA固定化(immobilization)在感測金表面；二是DNA非專一性吸附(non-specific binding)。其次在選擇DNA有高親合性的嵌合劑 (intercalator)來傳遞出電子訊號轉換。



基於上述原因，在DNA固定在感測金面上會使用DNA末端具有硫醇分子，因為硫醇分子彼此之間會藉者凡得瓦爾力(Van der Waal's force)的相互擁擠促使分子之間排列更加緊密且有順序，形成穩定自組分子單層薄膜(SAM)；但在此步驟中，部份單股DNA會像水草般倒下與金表面產生氮-金之鍵結，此種使DNA倒下鍵結之作用力稱非專一性吸附，所以在種完單股DNA後，添加巯基乙醇(mercaptohexanol)，置換倒下單股DNA並因立體結構使單股DNA垂直站立，此巯基乙醇稱為間距物(spacer)。這種具有硫醇基DNA與間距物之混合層可兼顧表面覆蓋率均勻及達成專一性高的感測金面，因為使用專一性高的感測金面有利於精確判讀生物分子間雜合作用。最後

選用陽離子嵌合劑 - 次甲基藍(Methylene Blue ; MB^+)配合赤血鹽 (Potassium Ferricyanide ; $K_3Fe[CN]_6$)組合是用來檢驗其表面覆蓋率 (定量)、完整性 (定性) 和單股DNA層固定在感測金面的電化學性質。

經由前面實驗遭遇上述問題而設定最佳參數與步驟，如單股及互補股DNA濃度和DNA固定時間等等...得知一套快速檢驗方法，再經由兩、三種形式(Type)病毒簡體取樣後分析電化學結果，證明此流程之定性準確性與重複性。

最後，經由同一種病毒搭配不同DNA錯位設計，可區分成V16之0、3、7 錯位與V18之0、2、4 錯位，並對於所量測的還原電位對此錯位作圖，希望鑑別出DNA錯位後定量分析。

第二章 文獻回顧

2-1 生物檢測器簡介

2-1-1 生物感測器之緣起與發展

生物感測器的發展，自1962年Clark和Lyon兩人提出酵素電極的觀念以後[1]，YSI公司於七零年代即積極投入商品化開發與生產，啟開了第一世代生物感測器於1979年投入醫檢市場，最早的商品為血糖測試用酵素電極。YSI公司的上市成功與八零年代電子資訊業的蓬勃發展有很密切的關係，並且一舉帶動了生物感測器的研發熱潮。



Medisense公司繼續以研發第一代酵素電極為主，於1988年由於成功的開發出調節 (mediator) 分子來加速回應時間與增強測試靈敏度而聲名大噪[2]，並以筆型(Pen 2)及信用卡型 (companion 2) 之攜帶型小型生物感測器產品，於1988年上市後立即襲捲70%以上的第一代產品市場，成為生物感測器業的盟主[3]。第二世代的生物感測器定義為使用抗體或受體蛋白當分子識別元件，換能器的選用則朝向更為多樣化，，例如：壓電石英晶體微天平 (Piezoelectric quartz crystal microbalance ; PQCM) [4-7]、離子選擇性場效半導體 (Ion sensitive field effect transistor ; ISFET) [8,9]、光纖 (Fiber optic sensor ; FOS) [10,11]。雖然第二世代的生物感測器，自八零年代中期即開始引起廣

泛的研發興趣，但醫般認為尚未達醫檢應用階段，預定相關技術須待世紀末前方能成熟。目前可稱的上帝二世代的生物感測器產品為1991年上市的瑞典商Pharmacia所推出的BIAcore與BIAlite兩項產品。

Pharmacia公司於1985年成功地開發出表面薄膜共振技術 (SPR, Surface Plasma Resonance)，利用此一光學特性開發出可以於 10^{-6} g/ml到 10^{-11} g/ml之低濃度下[12]，進行生物分子間交互作用的即時偵測式生物感測儀器。第三世代的生物感測器定位在更具攜帶式，自動化，與即時測定功能，預測在二十一世紀初期可以達到上市目標。至於第四世代具偵測/信號輸出/控制/自我組合/自我修補與複製等功能的生物感測器將於何時出現，則尚無法預估。



2-1-2 生物檢測器之定義與種類

生物檢測器簡單定義為使用固定化的生物分子 (immobilized biomolecules) 結合換能器，用來偵測生體內或生體外的環境化學物質或與之起特異性交互作用後產生回應的一種裝置。生物感測器是一種整合性的裝置，主由兩個關鍵部分所構成，分別為生物感測元件 (biological recognition element) 和換能器 (transduction element)，主要功能是將生物訊號轉換成可量化之電子訊號，以便進行資料分析及輸出處理。一般生物性的感測元件大致有生物親和性感測器 (抗體、

抗原等)與生物催化型感測器(酵素、細胞等)兩類,換能器依其原理,主要有電化學(電流、電壓、電導、電容、電阻)、光學(漸逝波技術 EW、表面薄膜共振技術 SPR 等)、質量(壓電晶體 PZ 等)、聲學(表面聲波 SAW、)及熱學(熱傳導)等五大類,其相關介紹如下所示。

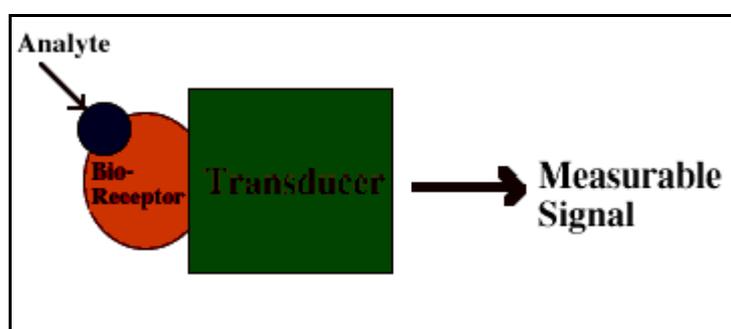


圖2-1 生物檢測器結構示意圖；紅色部分為生物感測元件 (Receptor)，黑色部分為待分析物(Analyte)，綠色部分代表換能器(Transducer)。如圖所示，藉修飾過的感測元件得到化學訊號，並由換能器將化學訊號轉換成可辨識的訊號。

如圖 2-1 所示為生物檢測器之基本架構；為了能夠獲得最佳的信號傳遞，固定化的生物元件通常與信號轉換元件緊密地接合在一起。基本上，由信號產生方式(mode of signal generation)的不同，可以將生物感測器區分成兩種主要類型：

(一)生物親和性感測器(Bioaffinity sensors)

當固定生物元件與待測定之分析物發生親和性結合(bioaffinity binding)時，造成生物分子形狀改變與/或引起諸如荷電、厚度、質量、

熱量或光學等物理量的變化。此種經由分子辨認—結合類型的生物感測器有免疫感測器、化學受體感測器等，其分析可為荷爾蒙、蛋白質、醣類、抗原或抗體，而相對應的受體可為荷爾蒙受體、染劑、外源凝集素(lectins)、抗體或抗原等。

(二)生物催化型感應器(Biocatalytic biosensors)

此類感測器之信號偵測並不在於分子辨認—結合的階段，當固定化分子與待測物反應後，產生生化代謝物質，經特定電極偵測特定代謝物後以電子訊號表現出來。最為人所熟悉的為屬第一世代生物感測器的酵素電極。目前有關此類生物感測器的兩個主要研究發展方向為(1)使用酵素共軛物(enzyme conjugates)、環系酵素群(cycling enzymes)和系列酵素來組合生物檢測器，(2)使用微生物細胞或動、植物組織切片或可滲透性細胞(permealized cells)等來當作分子辨認元件。

組成生物檢測器的第二部分為物理換能器，其換能器最主要的功能便是將難以判定的化學性訊號轉換成為可被處理、儲存、顯示並加以量化的訊號，例如電訊號、光強度、聲波以及熱能大小...等。依據後續系統可加以收集、分析之訊號的不同而可以使用不同種類的換能

器以供訊號之轉換，主要之換能器種類有下列幾種：

(1) 電化學換能器 (Electrochemical transducers)

信號輸出的方式又可分為電流、電壓與導電度測定等方法。電化學換能器可以偵測出兩電極間導電率 (Conductivity) 之改變並依其計算之不同又可以將其分成電流性換能器 (Amperometric devices) 以及電位性換能器 (Potentiometric devices)。電流性換能器可於相同電位下可以偵測出電流之變化，而通常電流值為零時，利用電位性換能器可以偵測出電位之改變。



(2) 光學性換能器 (Optical transducers)

依據其結構不同又可細分為外在模式 (Extrinsic mode) 與內在模式 (Intrinsic mode)；外在模式之光入射波並不會直接穿透樣品而是在樣品表面產生增值波 (Propagates wave)，接著樣品表面與其他材質之介面會被興奮而產生共振波，例如表面電漿共振 (Surface plasmon resonances；SPR) 便屬此類。而內在模式之光入射波則直接穿透樣品並與之作用。光學性換能器可以高靈敏地檢測生物樣品及化學性發光，如螢光，還可以進行精細的免疫化學分析。

(3) 質量偵測換能器 (Mass-detect transducers)

主要是利用共振頻率改變來偵測壓電石英晶體表面微量的質量

變化，其組成為兩片金屬電極(例如金、銀、鋁和鎳等)如同三明治般地夾在中間。電極的作用為沿晶片表面垂直方向導入一振盪電場(oscillating electric field)。此一振盪電場迫使晶體內部結晶格子產生類似立波(standing wave)的機械振盪行為。壓電生醫感測器具有較高的靈敏度、較好的選擇性以及響應快速等特點，且應用於液相環境又能用於氣相環境。

(4) 聲波性生醫感測器 (Sound wave-detect transducers)

聲波性生醫感測器乃是以聲波作為信息載體，是從壓電生物傳感器中分離出來並發展起來的一種新型生物傳感器，一般仍採用壓電晶體為換能器，經常使用的壓電晶體有石英晶體、鈮酸鋰、鉍酸鋰幾種晶體。由於聲學研究的不斷深入，聲表面波技術的成熟，現在不僅出現了體波感測器，還發展出了以聲表面波技術為依托的聲表面激發波生醫感測器。

(5) 熱能偵測換能器 (Heat energy-detect transducers)

則可以偵測微量之熱改變。熱敏生醫感測器顧名思義是以熱敏電阻為測量元件，當生物辨識元件與待測物質產生反應時，伴隨其物理或化學反應中產生之熱量便會被測量並轉換成電信號。熱敏生醫感測器的工作原理簡單、靈敏度高、響應快；應用範圍比較廣泛，主要用

於臨床化學分析、生化工業控制等領域。而其致命的缺點如抗干擾能力很差以及特異性不高。

2-2 生物元件之修飾法

影響生醫感測器辨識能力最重要的因素便是修飾於換能器表面之生物元件，因此如何將生物元件有秩序的緊密排列在容易與待測物反應之區域便顯得十分重要。在生醫感測器發展至今的數十年中，各種針對不同生物元件之修飾法便孕育而生。這些不同的修飾法依其原理主要可以概略分成吸附、包埋、架橋、共價鍵結等方法（見表2-1）；吸附及包埋法其修飾程序簡單但修飾元件結合力不強而且電極-酵素複合體穩定性較差，如：靜電力(Static Force)、氫鍵或凡得瓦爾力(Hydrogen band and Van der Waals)、正負電荷吸引力(Electrical Force)以及螯合劑鍵結 (Chelating)等，而架橋及共價鍵結其修飾程序較複雜但結合力或穩定性皆較佳，如：有機矽烷類烷(Silanes)、表面酯類(Surface Ester)、單體聚合(Polymerization)、生物物質鍵(Avidin-Biotin)、自吸附法修飾膜 (Self-Assembled Membrane)以及L-B修飾膜 (Langmuir-Blodgett Film)。

表2-1 多種修飾法之原理、優缺點比較

方法	優點	缺點
<p>吸附 (利用凡得瓦爾力、原子力、親疏水力鍵結)</p>	<p>程序簡單，應用範圍廣泛，固定之生物元件不易喪失活性。</p>	<p>高度受限於固定時之環境因素 (pH值、溫度、溶劑)，感測靈敏度較差</p>
<p>包埋 (利用瓊脂或高分子包埋酵素，並在表面覆蓋半透膜)</p>	<p>程序簡單、時間短，比較不浪費生物元件，此法廣泛使用於酵素之固定。</p>	<p>具有較大之擴散阻礙層，酵素活性較易喪失，較易隨著瓊脂脫落。</p>
<p>架橋 (利用具有多官能基的反應物作為鍵結橋樑)</p>	<p>步驟簡單，具有穩定的、強力的化學鍵結，普遍使用於固定蛋白質上。</p>	<p>固定反應較難準確控制，酵素的使用量、濃度較大、酵素活性較低</p>
<p>共價鍵結 (利用共價力鍵結在電極或修飾膜表面)</p>	<p>具有穩定電極-酵素複合體，生物元件良好固定於表面之比例高，適合應用於大量製造。</p>	<p>固定時間久、程序複雜，酵素活性較低。</p>

2-3 電化學簡介

在電化學分析方法中以伏安法的使用率較高，所謂的伏安法其原理就是改變施加電位的大小，紀錄所產生的電流，以電位與所產生的電流作圖，用以探討物質隨著施加電位不同所產生的變化。本實驗當中，所使用的方法主要為伏特安培法。茲對於伏特安培法方法作詳細的介紹。

2-3-1 電化學反應系統

電化學反應是一種利用電位調整電極表面電子能量，使得電活性的物種 (electroactive species) 與電極發生電子轉移的化學反應 [13-15]；當電子由該物種轉移至電極時，稱該反應為氧化反應，該電極則稱為陽極。反之，則為還原反應，該電極則稱為陰極 [16]。一般電化學反應系統主要由陰極、陽極與電解質溶液所構成。由於電化學反應乃是利用電位來驅動反應，非一般化學方法之驅動力所能及，所以可以完成一些化學方法所不能完成的反應。

通常三極電解槽 [13] 是最常被用來研究電化學反應的系統，而三極電解槽的三極分別為工作電極 (indicating or working electrode, WE)、參考電極 (reference electrode, RE) 及對應電極 (auxiliary or counter electrode, CE)。茲分述如下：

(1)工作電極 (WE) 為欲研究、測試的電極。此電極不固定為陽極或陰極，端視反應的不同而異。若在電極上發生氧化反應，此工作電極為陽極；若發生還原反應，則此工作電極為陰極。

(2)對應電極 (CE) 根據參考電極的電位，在輔助電極上施加電流使工作電極達到使用者設定的偵測電位，並相對應於工作電極，所以可能是陰極或是陽極。此電極上發生電化學反應以不影響工作電極為原則。一般常使用白金絲作為對應電極。

(3)參考電極 (RE) 主要是在準確地設定工作電極上的電位。在電化學中所有的電位值都是相對的，因此需要一個參考的基準，參考電極即是扮演這個功能；所以此電極在測定的電流範圍內，本身的電位必須幾乎維持一固定值。因此，一個理想參考電極其電化學性能必須是可逆且穩定的，並擁有近似理想非極化電極(ideal nonpolarized electrode)的特性，例如高交換電流和快速的電位應答。

2-3-2 影響電化學反應系統的因素

在決定或設計一電化學反應系統時，通常必須考慮到下列幾個重要因素：

(1) 電極材料的選擇：電極材料的催化特性 [17-20] 對電化學的反應速率之控制、產物之選擇性、陰陽極的反應過電位及電流效

率之提高等皆有影響，而過電位的大小受電極材料影響最大，故良好的電極材料必須具有催化目標反應及降低反應過電位的特性。

(2) 電解質的選擇：一般電解質中所使用的溶劑，可簡單地區分為水溶液與非水溶液。此外，亦可分類為固態、膠態與液態電解質系統。例如：在鋰電池的設計上就應用到膠態與固態電解質。對於溶劑的選擇必須以電化學系統的需要加以考慮；例如：電位的穩定範圍、對反應物及生物之溶解度、揮發性、適用溫度範圍、黏度與毒性等。

(3) 電解槽之設計：通常包括電極之組對與排列；電解質溶液之流動狀況以及陰陽極的隔離等問題。電解槽之設計目的，一般在於降低歐姆電位降（IR potential drop），改善質傳、熱傳效果與提高產濃度等。

2-3-3 電極動力學：Bulter-Volmer方程式

可逆電極的電位，相當於金屬電極及與金屬離子中所達到的現象，如下所示：



如上式所示，若正向的反應等於逆向的反應時，將不會產生任何的淨電流。但為了產生反應，需施加有利於氧化或還原的電位對電極本身，即會有微小的電流產生，因為在系統中施加了一過電位

(overpotential) 超出了原先可以使電極平衡的電位值，促使了電流的產生。在動力學的觀點，上式的 V_a 為金屬離子化(或陽極程序速率，anodic process)，而 V_c 為離子放電速率(或者是陰極程序速率，cathodic process)。而此兩個程序的活化能障礙，如圖所示般，皆必須克服才能進程序的反應。如圖2-2示，而此反應的速率皆可以用Arrhenius方程式來表示：

$$V_a = K_a \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_a^\ddagger}{RT}\right)$$

$$V_c = K_c \cdot [M^{n+}] \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_c^\ddagger}{RT}\right)$$

而 K_a ， K_c 代表者對於於 $[M^{n+}]$ 的金屬濃度的速率常數，而當其達到平衡的時候， $V_a = V_c$ ，所以可以得到：

$$K_a \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_a^\ddagger}{RT}\right) = K_c \cdot [M^{n+}] \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_c^\ddagger}{RT}\right)$$

移項後，可得到：

$$\frac{K_a \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_a^\ddagger}{RT}\right)}{K_c \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_c^\ddagger}{RT}\right)} = \frac{K_c}{K_a} \cdot [M^{n+}]$$

又因為

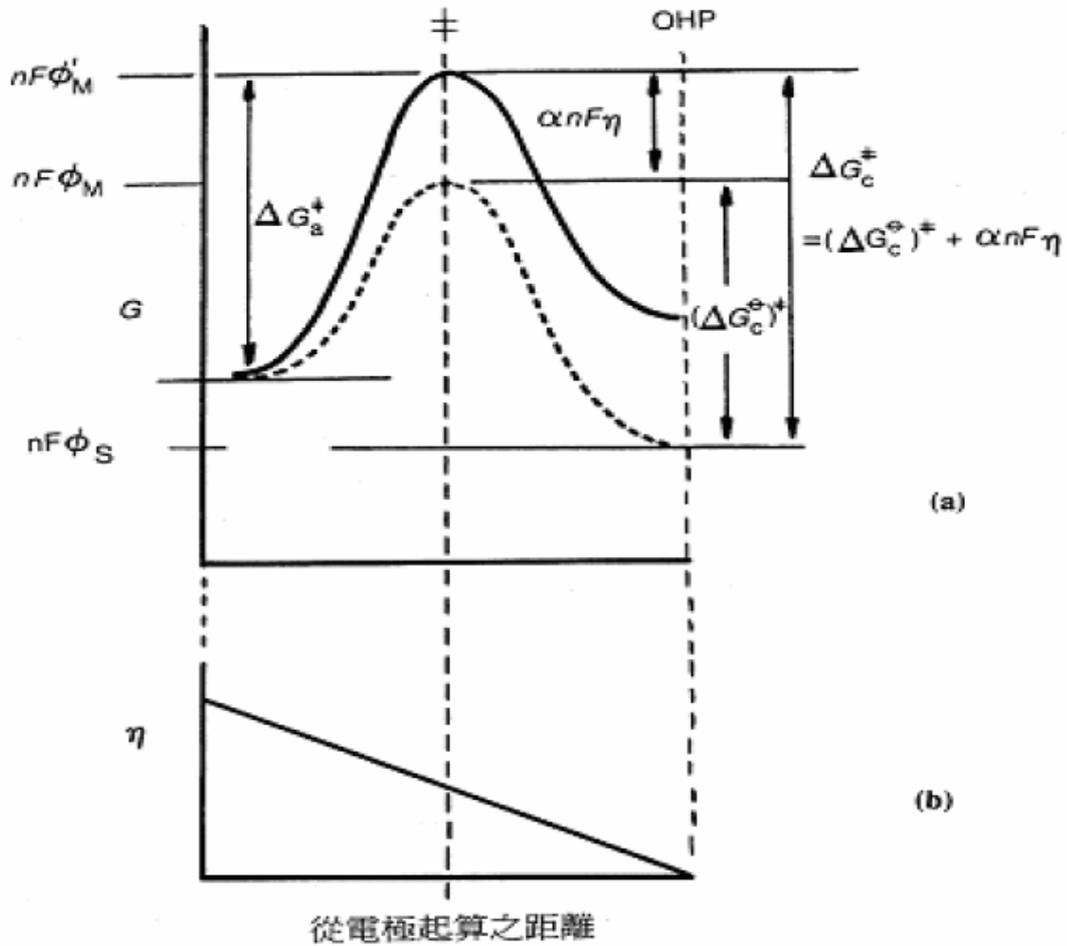
$$\Delta G = \Delta G_c^\ddagger - \Delta G_a^\ddagger$$

所以可代換成

$$\exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) = \frac{K_c}{K_a} \cdot [M^{n+}] = \exp\left[\frac{nF\Delta\phi}{RT}\right]$$

移項之後，可以得到：

$$\Delta\phi = \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{K_c}{K_a} \right] + \frac{RT}{nF} \ln [M^{n+}] = \Delta\phi + \frac{RT}{nF} \ln [M^{n+}]$$



如圖2-2：不可逆電極反應之自由能外形 (a) 過渡狀態之形成經由施予陰極過電位活化能圖；(b) 施加過電位於電極表面的影響圖[22]

將 $\Delta\phi$ 以電極電位符號E代替，此為涅斯特定律 (Nernst Eqn.)。而在不可逆反應的過程中，在過渡狀態的時候可以藉由施加一定量的過電位 η 來促使反應的進行。此時，陽極與陰極的自由能的值會變成：

$$\Delta G_a^\ddagger = (\Delta G_c^\theta)^\ddagger + \alpha n F \eta$$

$$\Delta G_c^\ddagger = (\Delta G_c^\theta)^\ddagger - (1 - \alpha) n F \eta$$

過電位施加於不可逆的系統，一方面用於幫助陰極的程序，而另一方面用於阻礙陽極的程序。 α 代表用過電位用促使陰極反應的轉移係數 (transfer coefficient)。而 $(1 - \alpha)$ 代表用過電位阻擋陽極反應的過電位係數。經由過電位的施加，整個電極的反應速率式可以標示為：

$$V_c' = K_c \cdot \exp\left[-\frac{\{(\Delta G_c^\theta)^\ddagger + \alpha n F \eta\}}{RT}\right]$$

$$V_a' = K_a \cdot \exp\left[-\frac{\{(\Delta G_a^\theta)^\ddagger - (1 - \alpha) n F \eta\}}{RT}\right]$$

當我們以電流密度來表示整個電極反應的速率， $V = i_0 / nF$ 代入

$$i_c = nF K_c \exp\left[-\frac{(\Delta G_c^\theta)^\ddagger}{RT}\right] \exp\left[-\frac{\alpha n F \eta}{RT}\right]$$

$$i_a = nF K_a \exp\left[-\frac{(\Delta G_a^\theta)^\ddagger}{RT}\right] \exp\left[\frac{(1 - \alpha) n F \eta}{RT}\right]$$

將其簡化，我們可得到：

$$i_c = i_0 \exp\left[-\frac{\alpha n F \eta}{RT}\right]$$

$$i_a = i_0 \exp\left[\frac{(1 - \alpha) n F \eta}{RT}\right]$$

上式的 i_0 為交換電流密度 (exchange current density)，陰極的電流密度可以表示為：

$$i = i_c - i_a = I_0 \left\{ \exp\left[-\frac{\alpha n F \eta}{RT}\right] - \exp\left[\frac{(1 - \alpha) n F \eta}{RT}\right] \right\}$$

此式稱為巴特勒-伏爾美方程式 (Butler-Volmer equation)，可以用來得知電流與過電位之間的關係 [21-22]。

2-4 伏特安培法(Voltammetry)：

伏特安培分析法使用固電極，如鉑、金、石墨等為工作電極，並施予線性電位掃描，並以一定的速率改變外加的電位，記錄瞬間電流，並以電位與電流關係作圖。圖上不同的峰值電位代表著被分析物的特性，而電流值則反映出分析物的量。本實驗所使用循環伏安法介紹如下：



循環伏安法(Cyclic Voltammetry, CV) [21,23]

循環伏安法的方式是隨著時間的改變，對於再靜止溶液的工作電極，藉由還原掃引及氧化掃引所表現出來的峰值電位、電流值及形狀等可以判斷出物種的電化學特性。通常在幾分鐘內實驗可完成迅速得到數據，故常用於對一個新系統的初步定性探討研究。因此在持續的進行循環伏安的掃描下，原先依附在電極表面的雜質不純物在經由多次的循環伏安的掃描，會呈現出其接近電極表面的反應機制 [21]。於此工作電極施予電位以線性方式掃引，即電位隨時間成線性增加或減少，如圖2-3所示。記錄隨電位掃引而產生的電流，並由這些資料

進行做圖，較常用的循環伏安圖譜是以電流對電位作成的曲線圖，電流是受電子轉移速率(electron transfer rate)與電活性物種傳送到工作電極表面的速率所控制。從循環伏安法上可獲得一些分析物的重要訊息，如峰的電流(i_p)、峰的電位(E_p)等等，對循環伏安的圖形而言，產生的波峰大小主要與工作電極表面所形成的質量擴散層形成有著密切的關係，尤其是電位的掃描速率的快慢。因此，電極上面的電化學反應，所對應形成的電流量也隨之不同。這些數值對不同的分析物具有獨特性，所以應用於定性上的分析更勝於應用在定量上的分析。

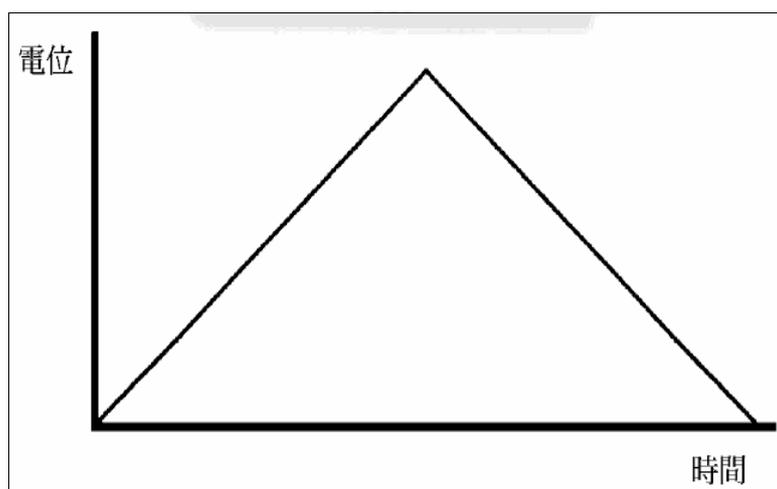


圖 2-3 循環伏安法之電位施予形式示意圖

2-4-1 可逆與不可逆反應[22,24,25,26]

從循環伏安圖中可以得到氧化與還原間的關係。也可以簡單的由圖形趨勢來得到反應是否可逆。

(1) 可逆系統 (Reversible system) :

對於具備有可逆性的氧化還原程序而言，再施加一循環往返的電位掃描的時候，還原峰與氧化峰的兩波峰之間必須是極為接近的。而用來判別是否具備有可逆性，則是以下式來作為判斷：

$$\Delta E_p = \Delta E_{p,a} - \Delta E_{p,c} = \frac{0.059}{n} V$$

對於單電子轉移反應，當氧化峰與還原峰的相隔的大小為59mV時，代表此反應為具備有可逆性的反應。當我們得知整個反應為可逆反應時（25°C），而根據Randles-Sevcilk 方程式可以得到峰電流與其他變數的關係式：

$$i_p = (2.69 * 10^5) * n^{3/2} * A * CD^{1/2} * \nu^{1/2}$$

其中， ν 為掃描速率（ vs^{-1} ）， A 為工作電極面積（ cm^2 ）， D 為電極與電解質之間的擴散係數（ cm^2s^{-1} ）， C 為整體電解質的濃度（ $mol\ cm^{-3}$ ）。在我們忽略其他可能變數的時候，可以視可逆反應的電流產生量與循環伏安的掃描速率 $\nu^{1/2}$ 成正比。另外，前向掃描的電流大小與反向掃描的電流大小的比值會很接近於1。

（2）不可逆系統（Irreversible system）：

相對於可逆現象，不可逆現象產生的時候，會有比可逆現象來的有比較大的峰與峰分離情況產生，且電流的產生量會比可逆現象為小。產生的峰與峰分離情形會隨著掃描速率的改變有所改變：

$$\Delta E_p = \Delta E_o - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln\left(\frac{K_0}{D^{1/2}}\right) + \ln\left(\frac{\alpha F v n_a}{RT}\right)^{1/2} \right]$$

而峰電流與掃描速率的關係則變成：

$$i_p = (2.99 * 10^5) * n(\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2}$$

(3) 近可逆系統 (Quasi- Reversible system) :

在近可逆的系統，這時候的峰電流量是由電荷轉移和質傳所共同所控制的。因此在循環伏安的圖形會隨著參數 $\frac{K^0}{\sqrt{\pi a D}}$ 所控制住。當此參數上升時，會越接近可逆現象，相對的，則會接近不可逆的現象。



2-5 交流阻抗法分析法

2-5-1 交流阻抗分析法之原理

利用交流阻抗分析法 [27] 分析電化學系統，是對系統施以一小振幅頻率之交流訊號，對於此訊號，系統會有一對應之電流響應，並且也是以正弦波的形式出現。同時可用歐姆定律來定義阻抗函數 $Z(\omega)$ 為：

$$Z(\omega) = V(t) / I(t)$$

其中， V ：電壓 I ：電流 t ：時間

各種電子元件的阻抗值形式不同，因此交流阻抗之圖譜也不盡相同。

2-5-2 交流阻抗分析法之應用

流阻抗分析法的主要特色，是在對一個電化學系統中，可以提出一對應的等效電路(Equivalent circuit)模型，因此其應用很廣。其優點是非常靈敏，能忠實的反應出系統中的真實情況。

在電化學系統中，電阻、電容及電感三種元件經常被用於模擬電極與電解質介面的電化學性質。電化學反應中電荷轉移所需之阻抗，常以電荷轉移電阻(Charge transfer resistance, R_{ct})來表示。在電極表面電雙層(Helmholtz mode)性質部分，以電雙層電容(Double layer capacitance, C_{dl})表示，而高分子電解質對離子傳導的阻抗可以用整體阻抗(Bulk resistance, R_b)來表示，Figure 2-4 為理想狀態之電化學介面的阻抗圖譜與其等效電路。

當電化學反應嚴重受到反應物的靠近或生成物遠離電極表面之離子擴散速率影響時，對某些電化學系統而言，單純的RC等效電路已不足以完整描述其電化學行為。此現象常發生在溶液中，物質在電極表面擴散效應。當擴散效應完全支配電化學反應機構時，稱為Warburg擴散阻抗 [27]。此時，在等效電路中加入Warburg擴散阻抗元件與電荷轉移阻抗串聯，如Figure 2-5(a)所示。

Figure 2-5(b)的Nyquist圖譜中，高頻的部分近似一半圓形，在低頻部分則呈現一斜率近似 45° 之直線。這是由於當電化學系統處於高頻時，系統並不會產生電化學反應，故其Warburg擴散阻抗並不會顯現。當施加的頻率降低時，Warburg擴散阻抗會隨之產生。在高頻部分之半圓與實軸座標產生兩交點，左邊交點為電解質之阻抗(R_b)，右邊之交點為電荷傳遞之阻抗(R_{ct})與電解質阻抗之和。電解質之阻抗(R_b)代入下式中，可求得電解質的電導係數。

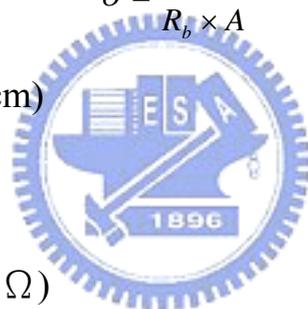
$$\sigma = \frac{l}{R_b \times A}$$

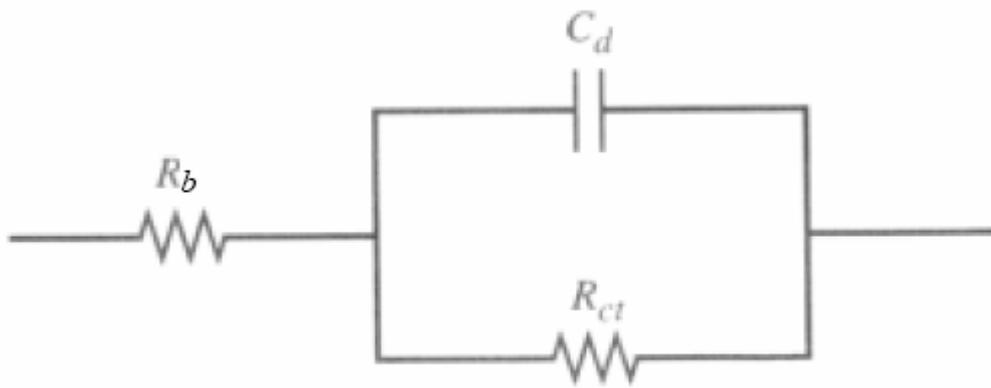
其中， σ ：電導係數(S/cm)

l ：膜厚(cm)

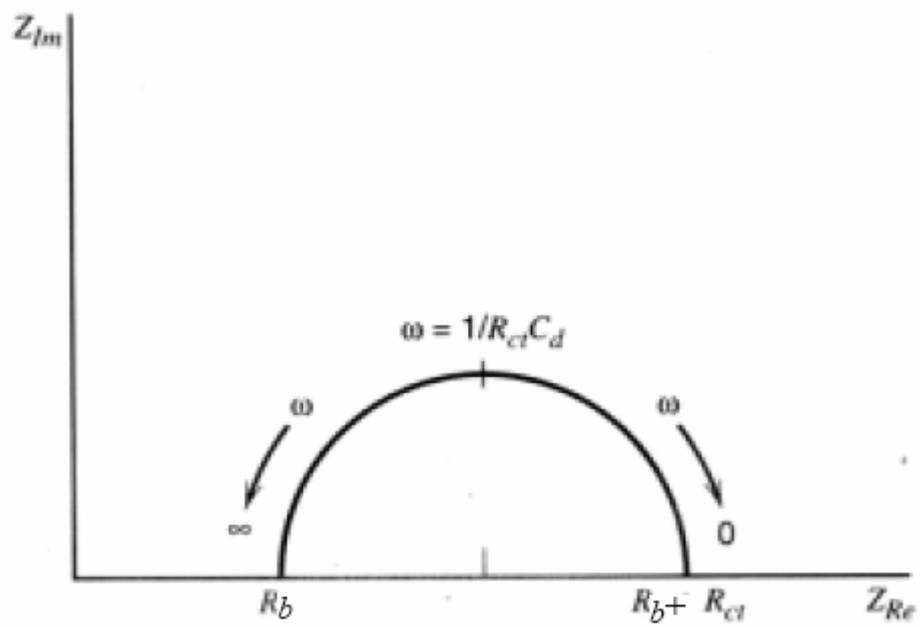
R_b ：薄膜阻抗值(Ω)

A ：電極面積(cm^2)



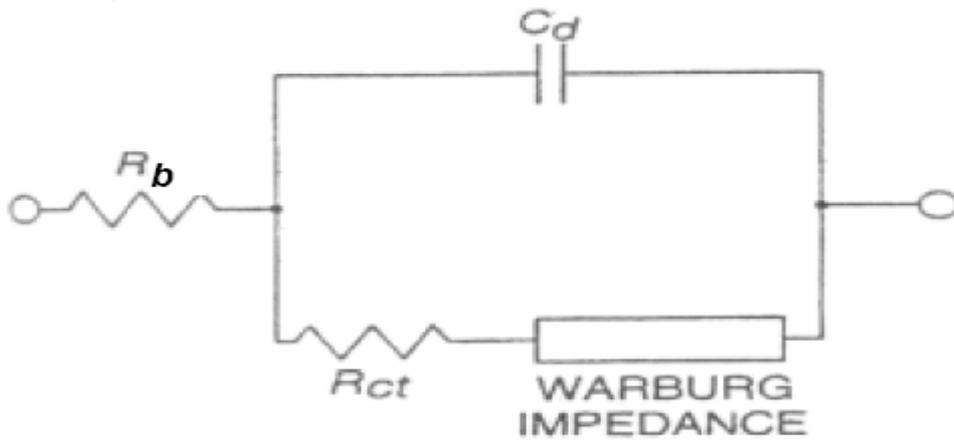


(a)

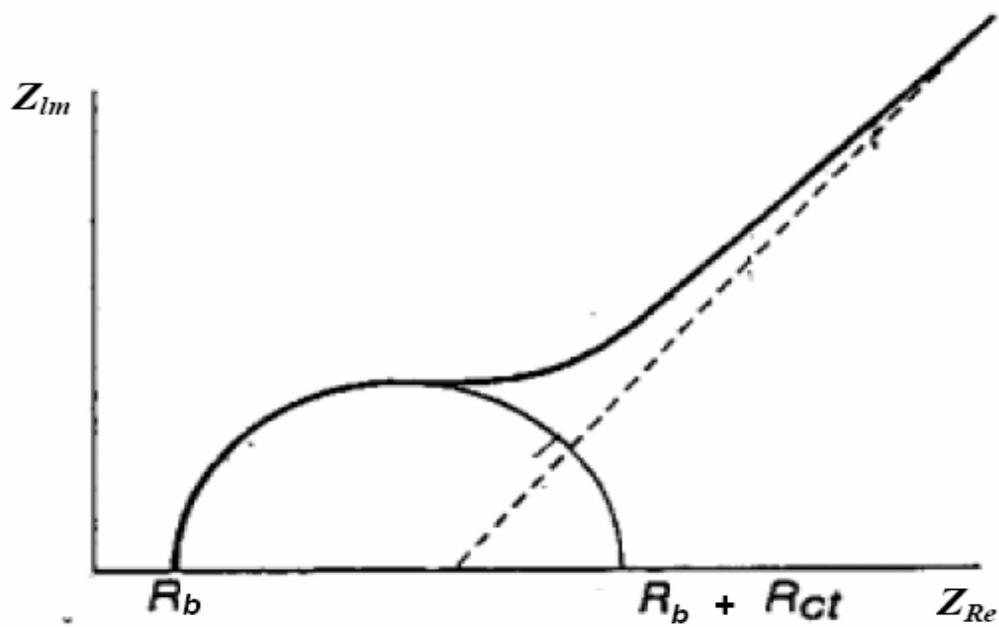


(b)

圖2-4 為理想狀態之電化學介面的(b)阻抗圖譜與其(a)等效電路[27]



(a)



(b)

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[27].

2-6 化學修飾電極的備製方法

化學修飾電極的製作方法大致可分為下列三種，茲分述如下：

(A)單分子層吸附(Monomolecular Layer Adsorption)

利用電極表面的性質即將修飾劑直接吸附於電極表面，如：

(a)具有olefins 的 π 電子系統的分對鉑電極的吸附 [28]，

(b)金與硫原子之間特有的作用力所構成的自身堆疊修飾電極

(self-assembling modified electrode, SAMelectrode)等 [29-31]。

(B)共價鍵法：

修飾劑與電極表面以共價鍵結的方式架接於電極表面，如：金屬或金屬氧化物電極上氫氧官能基部份(-OH)與被修飾物之間的反應 [32]。

(C)混合物修飾：

碳填充電極為混合物修飾電極中最典型的代表，將化學修飾劑與碳、礦物油以適當的比例混合填入電極載體，再將電極表面磨平即可。此電極的優點為便宜、背景電流小，且每次偵測完後只需將電極表面抹去即可獲得新的工作電極表面。化學修飾劑可視其分析物或分析方法之所需更換種類、增減添加量 [33]。

本實驗所使用的方法為單分子層吸附，以特有的作用力(S-Au linkage)將DNA具有末端硫基固定於電極表面，再利用SAMs在電極表

面組裝成ssDNA/MCH之混合層，以避免非專一性吸附（Non-specific binding）。本實驗中選用MCH(mercaptohexanol)為thiol-spacer，其主要原因有三，藉由XPS可知非專一性吸附（non-specific adsorption）並不會發生在混合層(ssDNA/MCH)中、可溶於水溶液並含有親水性團基（OH⁻），因為靜電排斥力的特性，可是DNA“站立”，且不會干涉雜交反應(Hybridization reaction)。MCH的另一項特色，為其可溶於乙醇等低醇類等揮發性溶劑中，利用單分子層吸附製作化學修飾電極的良好材料 [34]。



2-7 導電DNA簡介

2-7-1 導電DNA歷史回顧

追溯回1950年代，開始研究有關電荷移轉行為。電子移轉 (electron transfer) 的行為可分為兩種：從一個分子移轉至另一個分子，及一個分子內一端傳遞至另一端。物理化學家利用分子內原子間的相對運動來描述電子傳遞的速度，加上一些量子力學效應，發展出最初的電子移轉理論，下列為電子轉移機構。



打從1953年Watson和Francis提出DNA具有雙螺旋結構之後，沒多久在1962年，Daniel Eley和D I Spivey也發表了DNA分子可以當作導體的研究結果 [35]。又因為DNA雙股內部的鹽基對中有 π 軌域堆疊，很類似固態材料的 π 軌域堆疊，因此推斷 DNA 可以導電 [36]。對於 DNA 和固態材料之最大差別在於鹽基對在DNA中排列為非週期性（西元2002年Carpena et al.指出DNA序列並非完全的亂數排列，而是有長距離範圍的相關性 [37]）；而固態材料則是排列為週期性，所以兩者的 π 軌域堆疊是不完全相同的，推論其電子的傳輸模式不完全相似的。

2-7-2 去氧核糖核酸組成結構

DNA 是長條狀、雙螺旋結構的分子，主要有四個組成單位：鳥嘌呤脫氧核苷酸(Guanine，簡稱為 G)、胞嘧啶脫氧核苷酸(Cytosine，簡稱為 C)、腺嘌呤脫氧核苷酸(Adenine，簡稱為 A)和胸腺嘧啶脫氧核苷酸(Thymine，簡稱為 T) [38-39]，如圖 2-6 所示。

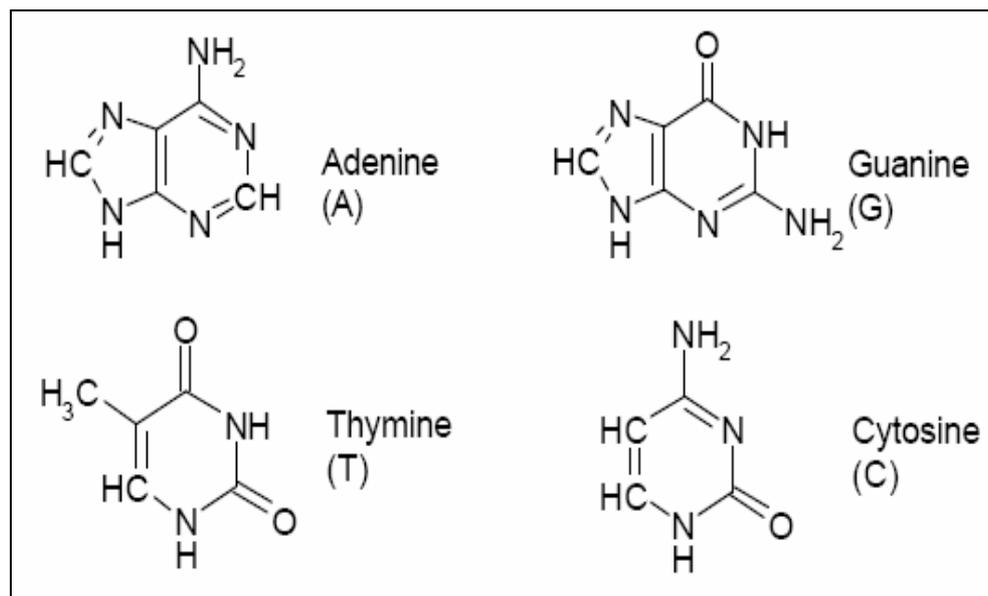
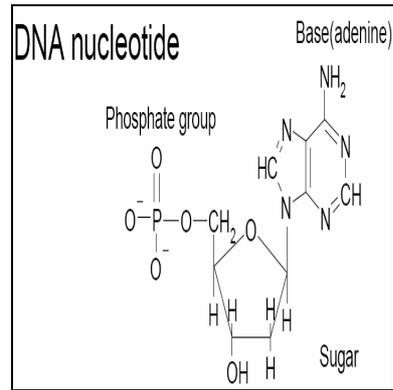
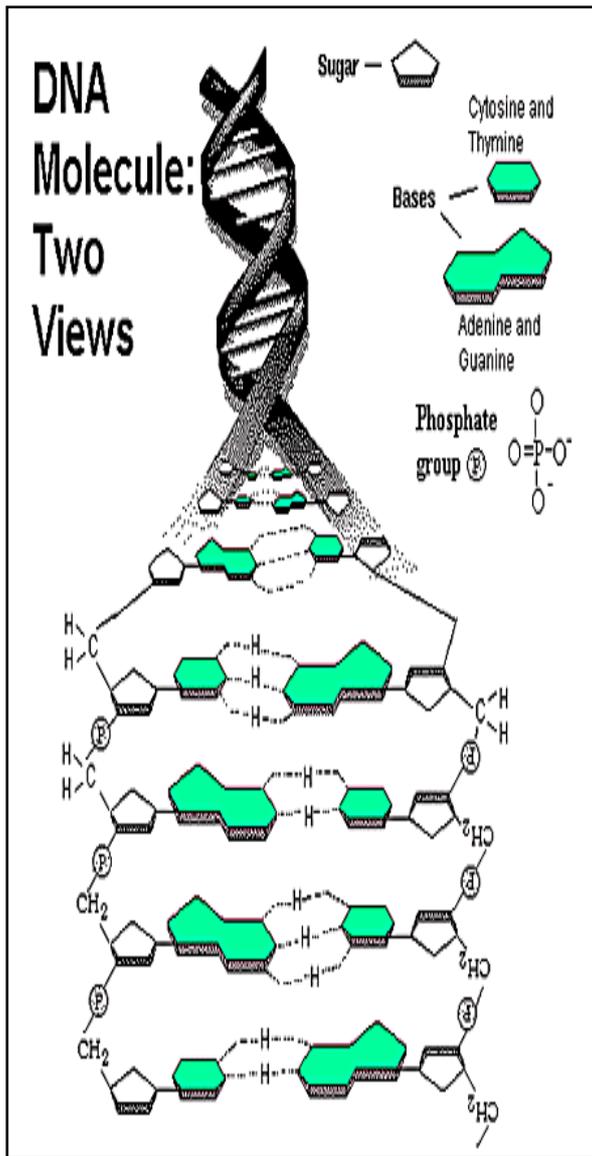


圖2-6 去氧核糖核酸組成結構[38-39]

核苷酸是由一分子的五碳糖、磷酸和鹽基所組成的的單位，磷酸和去氧核糖藉著磷酸二脂橋結合，鹽基則由糖的側面向內側延伸形成橫軸。DNA 分子由核苷酸所組成，形成雙股螺旋狀，鹽基靠氫鍵結合，每一對鹽基不是 G 和 C 就是 A 和 T [40-43]，G 和 C 由三個氫鍵結合 (C≡G)，A 和 T 由兩個氫鍵結合 (A=T) [44-46]。又由於 G 和 A 的分子大於 C 和 T 分子，所以鹽基對形成時，就必須形成螺旋結構，自然界中多屬右手旋者，如圖 2-7 所示。



Nucleotide

(sugar + base + phosphate group)

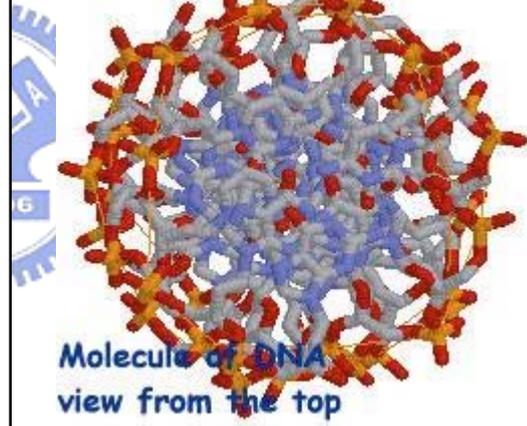


圖2-7 核苷酸基本結構與鹽基鍵結示意圖 [44-46]

2-7-3 DNA 導電機制

對於載子在DNA中的傳輸機制可分為兩大理論分別探討之，一為載子利用超交換 (superexchange) 相互作用或穿遂 (tunneling) 效應作用於DNA bridge中；二為電荷跳躍 (charge hopping) 介於不連續的分子軌域，如圖 2-8 中所示並詳細介紹如下。

對於利用超交換或穿遂機制對應於電荷傳輸在DNA bridge中，電子不會暫時性地停留在bridge 上並適用於短距離和injection barrier高的電荷傳輸。從(a)圖中可看出電子直接靠量子力學的穿遂效應 (tunneling effect)，以單一步驟從一端直接移轉至另一端，電子也沒有定域化 (localized)；在這過程中並沒有能量轉換成其它形式之能量，這樣的方式我們稱為諧振 (coherent) [45]；而對於電荷傳輸速率將會隨者 donor 跟acceptor 距離增加而成指數減慢 [47-48]。

相對於利用電荷跳躍機制對應於在不連續分子軌域當中，電子會有定域化 (delocalized) 並適用於長距離和injection barrier低的電荷傳輸 [45]。從(b)圖中可看出電子在傳輸的過程中會因為分子內原子相對運動而互相靠近而有部分電子能量被轉化成分子的動能，這樣反應我們稱為非諧振 (incoherent)。而電荷傳輸速率並不會隨著 donor 跟 acceptor 距離增加而成指數減慢，代表受距離影響似乎不

大 [47-48]。

電子能透過 DNA 鹼基對導電之重要的原則「能趨低原理」(principle of minimum-energy)。GC 鹼基對利用其位能較低電洞(hole)特性傳遞電流，所以 GC 對電子吸引力較 AT 強；又 AT 能量較高，利用電子傳遞電流，並成為電洞傳輸的能障，因此在雙螺旋的 DNA 中，電荷移轉一般透過 GC 配對，即所謂的 G-hopping [45,49]，當電子遇到 AT 時則是因為穿隧效應，部分電子還是可以穿過阻力較大的 AT 配對，但對於長距離 AT ($n \geq 4$) 配對會迫使電荷不能傳輸，所以 G-hopping 已經不能滿足於長距離的電荷傳輸，因此有所謂的 A-hopping ($n \geq 4$) 適用於長距離的電荷傳輸 [49]，而圖(c)看出所謂 domain-hopping[50-51]。

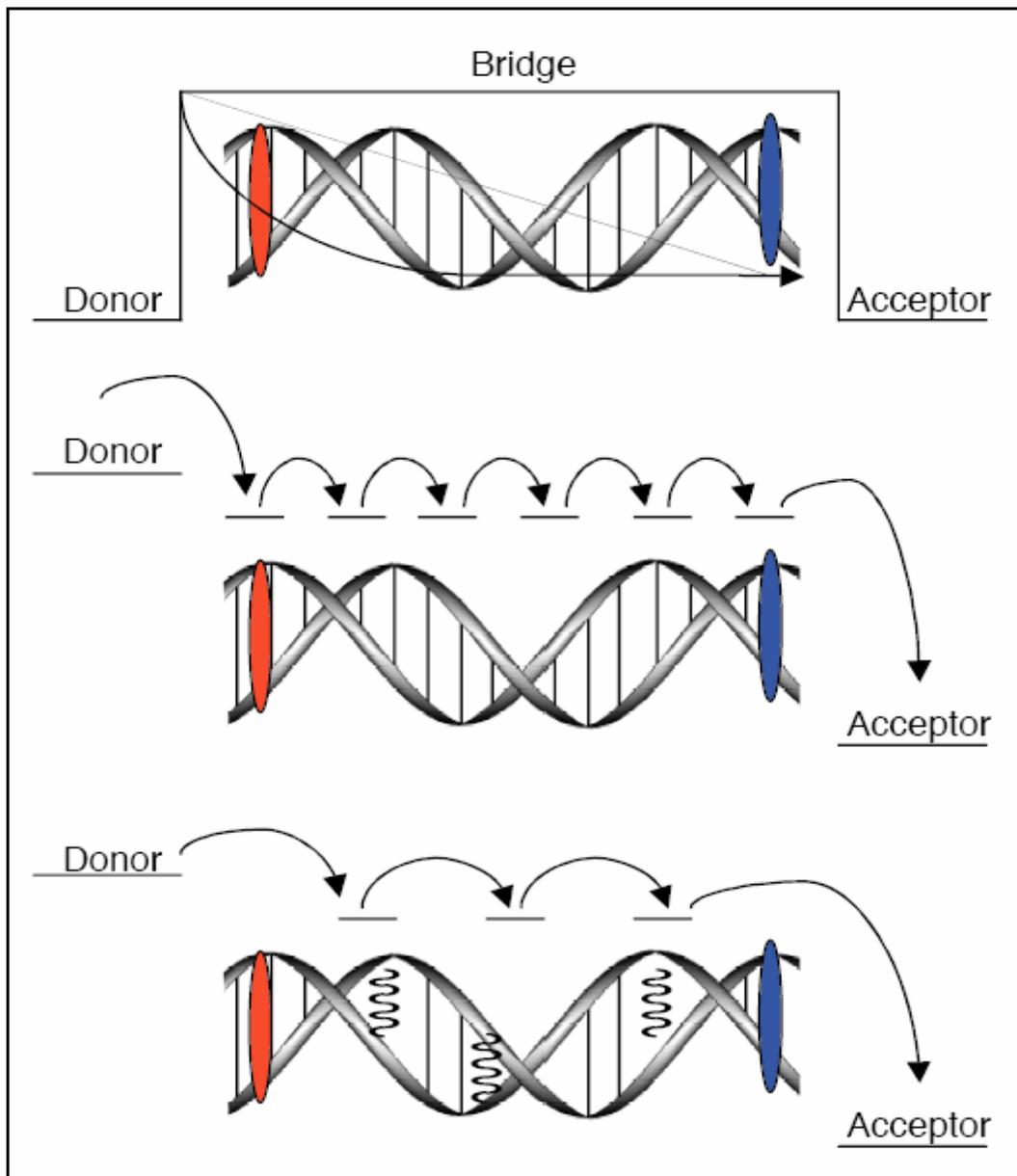


Figure 2-8 Schematic representations of several possible mechanisms for charge transport through DNA.

- (a) Superexchange: charge tunnels from the donor to the acceptor through the bridge in a nonadiabatic process.
- (b) Hopping: charge occupies the bridge in traveling from donor to acceptor by hopping between discrete molecular orbitals on the bridge. If the rate of charge migration is faster than trapping, the charge should be able to migrate over long distances before getting trapped.
- (c) Domain Hopping: charge occupies the bridge by delocalizing over several bases, or a domain. This domain hops along the bridge to travel from donor to acceptor. As in a pure hopping mechanism, the charge should be able to travel long distances before getting trapped.

2-8 催化DNA訊號放大機制

由Figure 2-9 所示，可以看出電子從金電極跑到 MB^+ ，此時 MB^+ 就扮演還原 ferricyanide ($Fe(CN)_6^{3-}$) 的 mediator，並且可看出。
 $(i_{pc}/i_{pa})_{LB} \gg (i_{pc}/i_{pa})_{MB}$ ，相對暗示LB會快速脫附DNA，所以如果不能產生電子訊號，其原因應歸咎於LB氧化。相對的當 $Fe(CN)_6^{3-}$ 被氧化， MB^+ 依然扮演著 mediator的角色，讓電化學的反應能夠不斷的循環下去。

由以下式子(2-1) 可推得整個過程發生於DNA film開始充滿在MB溶液中，當電位處於負電平衡時， MB^+ 會得到 $2e^-$ 還原至 MB ，此時隨後分開從DNA film並使具有相同電子當量2個 $Fe(CN)_6^{3-}$ 轉變再生 MB 。可得知有 MB^+ 來當 DNA的 intercalator，可以有效的促進電子的傳輸，造成電化學訊號的增強。

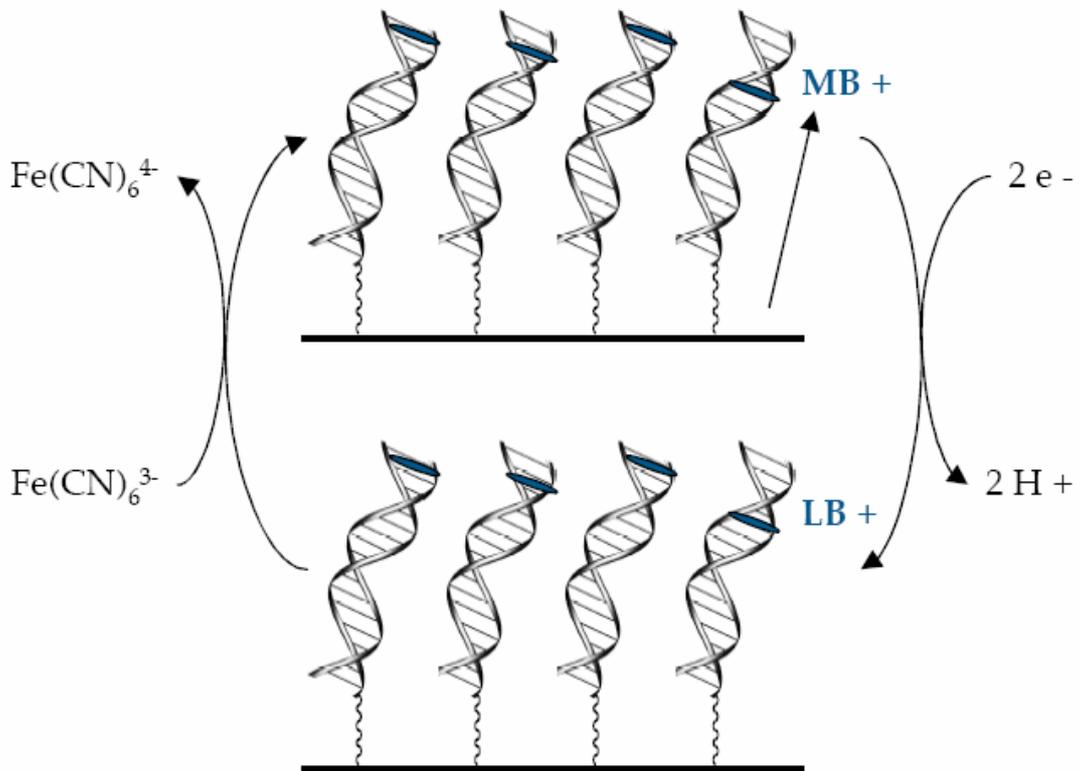
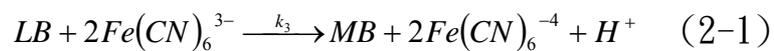
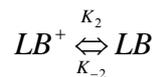
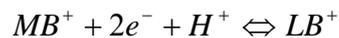


Figure 2-9 Schematic representation of electrocatalytic reduction of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ by MB^+ at a DNA-modified electrode. Electrons flow from the electrode surface to intercalated MB^+ . Once reduced, LB^+ can easily reduce $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ and regenerate MB^+ that can continue on in the catalytic cycle, thus repeated interrogation of the DNA monolayer is achieved.



第三章 實驗材料、設備與方法

3-1 病毒DNA序列介紹

臨床已證實人類乳突病毒（Human papilloma virus, 簡稱HPV）是造成子宮頸細胞癌化的最主要原因。

人類乳突病毒是DNA病毒，專門感染人類表皮及黏膜組織並潛伏人體。目前發現人類乳突病毒超過80種，其中35種專門感染生殖道上皮，造成各種良性及惡性疾病，包括菜花、子宮頸癌等等。其中被認為高危險基因型的至少是16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、68型。



本次實驗所選定的HPV是第16與第18型的高危險基因群，因為HPV第16、18型引起的子宮頸癌佔三分之二，加上第45、31、33、58、52型，則佔85.5%，且大部分的子宮頸癌患者，都可在其體內發現HPV病毒，其V16與V18如Table1所示：

Table 1- DNA Sequences for two Probes and six targets

Probe 16

5 'thiol-AAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGCCATT-3'

為 type16 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，並在末端接上 thiol，當作 probe 股。

Target : type 16 (comp)

3'-TTTATCAACCAATGGGGTTGTTTACGGTAA-5'

為 type16 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 probe16—thiol 形成完全互補的雙股 DNA。

Target : type 6 (3MM)

3'-TTT**G**TCAAC**T**AATGGGGTTGTTT**A**TGGTAA-5'

為 type16 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 V16—thiol 形成互補的雙股 DNA，但是有 3 個 mismatch。

Target : type 51 (7MM)

3'-TTT**T**T**C**GACT**A**A**C**A**A**GGT**C**GTTTACGGTAA-5'

為 type51 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 V16—thiol 形成互補的雙股 DNA，但是有 7 個 mismatch。

Target : *Probe 16 (noncomp)

3'-**TTACCGTAAACAACCCATTGGTTGATAAA**-5'

為 type16 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 probe 股用於對照實驗。

Probe 18

5 '-thiol-AAATAATTGATTATGCCAGCAAACACCAATT-3'

為 type18 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，並在末端接上 thiol，當作 probe 股。

Target : type 18(comp)

3'-TTTATTA ACTAATACGGTCGTTTGTGGTAA-5'

為 type18 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 probe16 —thiol 形成完全互補的雙股 DNA。

Target : type 45(4MM)

3'-TTT**GTTG**ACTAATACGGT**TGTTT**ATGGTAA-5'

為 type45 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 V16 —thiol 形成互補的雙股 DNA，但是有 4 個 mismatch。

Target : type 6 (6MM)

3'-TTT**GTCA**ACTAAT**GGGTT**GT**TTA**TGGTAA-5'

為 type6 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 target 股，與 V16 —thiol 形成互補的雙股 DNA，但是有 6 個 mismatch。

Target : *Probe 16(noncomp)

3'-**TTACCGTAAACAACCCATTGGTTGATAAA**-5'

為 type16 的 HPV 病毒，序列長為 30 個 mer，未在末端接上 thiol，當作 probe 股用於對照實驗。

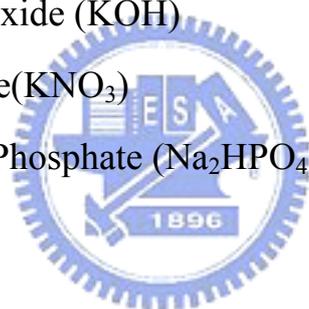
Non-complementary bases indicated by italics.

*3MM, three internal mismatch; 4MM, four internal mismatches ; 6MM, six internal mismatches ; 7MM, seven internal mismatches.

* Probe without thiol group

3-2 實驗藥品

1. 6-Mercapto-1-hexanol (MCH)
2. Methylene blue (MB)
3. Potassium Ferricyanide ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)
4. Sulfur acid (H_2SO_4)
5. Hydrogen Peroxide (H_2O_2)
5. Hydrochloric Acid (HCl)
6. Hydrogen Nitrate (HNO_3)
7. Sodium chloride crystal (NaCl)
8. Potassium Chloride (KCl)
9. Potassium Hydroxide (KOH)
10. Potassium Nitride(KNO_3)
10. Dibasic Sodium Phosphate (Na_2HPO_4)



3-3 緩衝液配置

從文獻中 [53] 可得知緩衝液有無對於DNA吸附影響重大，主要原因為實驗中單股DNA皆帶有負電荷的磷酸鹽分子，當單股DNA在金電極上有一定數量時，會因分子間靜電排斥力而使單股DNA互相排斥使得在金電極上覆蓋率不佳。在本實驗中建立良好表面覆蓋率對於量測不同病毒雜交時傳遞電化學訊號扮演者重要一環，以下為此實驗中所使用的緩衝液：

1. 固定單股DNA之緩衝液：1.0 M Na_2HPO_4
2. 雜交時之緩衝液：1.0 M Na_2HPO_4 +1.0NaCl
3. 嵌合劑之緩衝液：20mM phosphate solution
4. 清洗單、雙股DNA之緩衝液：單股用 DI water 清洗；雙股用 1.0 M Na_2HPO_4 +1.0NaCl之緩衝液清洗
5. MCH 溶液：稀釋至10mM 在 Na_2HPO_4 緩衝液中

3-4 實驗設備

3-4-1 電化學腐蝕量測系統(EG&G Model 273A)

對於CV量測所需配件及控制參數如下所示：

1. 感測單元 (三電極：金電極、白金電極、氯化銀電極)
2. 電腦×1
3. 數據傳導線×1
4. 夾子×1
5. O型環×2
6. 掃瞄速率：20 mv/s
7. 掃瞄電位範圍為0.5V至-0.2V



3-4-2 石英晶體微量天平(QCA-922)

所需配件如下所示：

1. 軟體程式-WinEchem Software
2. RG100 Cell
3. 共振器(Resonator)-AT cut
4. 設定參數：

- Frequency Range: 1MHz -10MHz
- Resolution: 0.1 Hz
- Gate Time: (0.1s, 1.0s, 10.0s)
- Resonant Resistance Range: 10ohm-16Kohm, 0.1ohm resolution



5. 石英晶體微量天平使用運算公式：

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

.....Sauerbrey Equation

F_0 is the original frequency of oscillation.

For a 9 MHz crystals, a change of 1 Hz equals 1.068 ng

3-5 其他實驗裝置設備

1. 電子槍蒸鍍系統 (E/B Gun Coater)
: VTI E/B Gun Coater
2. 電漿輔助式化學氣相沈積 (PECVD)
: 英國Oxford Plasmalab System 100
3. 自動化光阻塗佈及顯影系統 (Track)
: Suss MicroTec ACS 200

4. 後段清洗蝕刻工作機台

: 和益實業

5. 大試片掃描探針顯微鏡 (Large Sample Scanning Probe
Microscope) : Digital Instruments DI 5000

6. 接觸角量測系統分析儀 (Contact Angle System)

: KRuSS GmbH (澳登堡公司代理)

7. 紅外線光譜儀 (FTIR)

: ASTeX PDS-17 System , 美國

8. 恆溫震盪器 :

9. 電子天秤 :



3-6 實驗方法(,sample preparation,scan parameters)

3-6-1 金電極製作流程

1. 四吋矽晶圓經標準RCA清洗，去除表面塵粒及化學不純物，得到潔淨之晶圓。
2. 經清洗後的晶圓分為兩大步驟來製作成為檢測用金電極。
3. 利用電子槍蒸鍍(evaporation)方法製作：第一層為鉻(300Å^0)；第二層為金(1000Å^0)；第三層為鈦(100Å^0)。鉻、鈦層又稱黏著層

(Adhesion Layer)，其作用在於跟金與最上一層氧化矽間良好之接著力特性。

4. 利用PECVD來製備最後一層為氧化矽(5000 \AA)，而氧化矽用來當抑制電子傳輸阻絕層(isolation Layer)，並給予作用面積定量化。
5. 將正光阻(AZ5214E)均勻地塗佈在蒸鍍完後晶圓上，利用曝光顯影製程配合軟、硬烤後將光罩上圖案顯現出來。
6. 顯影後的晶圓須經兩大蝕刻程序去除金屬與氧化矽，裸露出種植DNA所需金表面即達到實驗設計電極表面。
7. 首先，浸泡在稀釋過後BOE約五至七分鐘，會發現表面原呈現紫色的面會逐漸變成金黃色，表示氧化矽逐漸被蝕刻掉直至裸露出第二層鈦薄層，在經DI water清洗300秒。
8. 把清洗完後晶圓浸泡在硫酸與過氧化氫(3:1)溶液中約一至兩分鐘，會發現pattern上外圈會有咖啡色一層剝落，代表光阻脫落；而外圈中鈦也會被蝕刻掉而露出金表面，經DI water清洗300秒，即完成蝕刻的完整步驟。

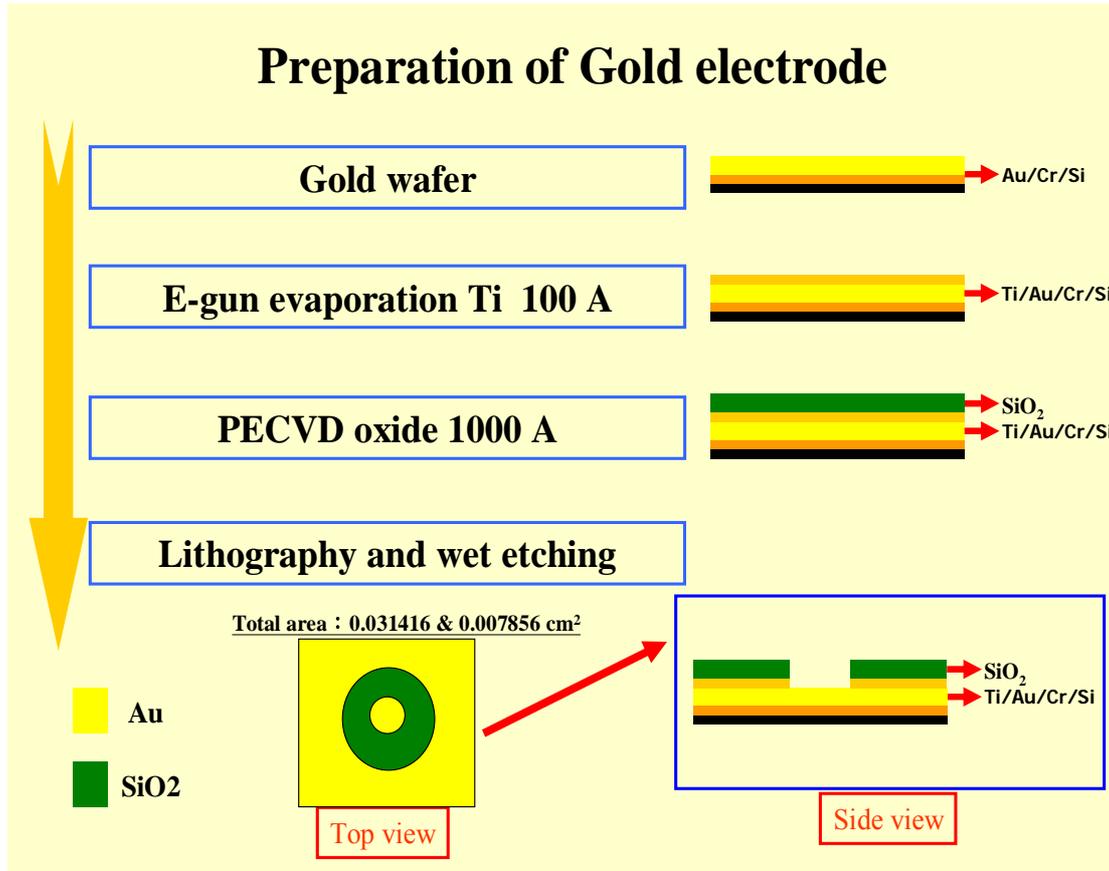


圖3-1 製備感測金電極之流程

3-6-2 金電極清洗流程

1. 電極用 DI water 沖洗 300 秒，使用氮氣槍使電極表面乾燥。
2. 把金電極放入溫度約在 80°C 硫酸與過氧化氫混和(3 : 1)稀釋溶液中約 60 秒，並重複步驟一動作。
3. 再將配好硝酸與鹽酸混和(1:3)的溶液，稀釋成原來 20%，浸泡 30 秒，可得到裸金薄層。

4. 最後，將金試片經 DI water 沖洗後，用氮氣槍使試片表面乾燥。

3-6-3 量測電化學前置作業

1. 將所需玻璃器皿用 10%硝酸清洗乾淨，避免殘餘粉末吸附在玻璃瓶壁上而影響實驗準確性。

2. 調配量測電化學所需溶液

$Fe(CN)_6^{3-}$ 濃度 5mM，取 1.645 克； KNO_3 濃度 100mM，取 10.111 克兩者共重 11.756 克，溶在 1 公升 DI water 中。

3. 要注意 KNO_3 當電解質，若濃度不夠的話，則 $Fe^{+3} \leftrightarrow Fe^{+2}$ 的氧化還原峰會有偏移或不明顯現象。



3-6-4 單股 DNA 吸附金電極

1. 首先將金電極經上述步驟(3-6-2)清洗流程過後用氮氣吹乾。
2. 取 V16-thiol DNA 濃度 $1\mu M$ ，在 $1.0 M Na_2HPO_4$ 緩衝液中取體積 $10\mu L$ 。
3. 滴到金電極表面，室溫下密封不同實驗所需時間。
4. 再將金電極浸入 $1.0 M Na_2HPO_4$ 緩衝液 10 分鐘，再用 DI water 清洗金電極表面，再以氮氣槍使之乾燥。
5. 將修飾完後金電極，量測配好溶液量測電化學。

3-6-4-1 S-Au 鍵結原理

在 probe DNA 末端接上硫基，再利用硫基與金鍵結，將單股的 probe DNA 接到金上去。鍵結原理如下：

西元 1980 年代初期，Allara 及 Nuzzo 針對有機硫化合物在固體表面形成分子薄膜進行過大量的相關研究 [54]。隨著表面分析方法的進步，以及著眼於這些新材料應用在先進技術上的潛力 [55]，促使自組分子單層薄膜（self-assembled monolayers，簡稱為 SAMs）相關的研究蓬勃發展，應用於生化薄膜、表面的濕潤、潤滑、抗腐蝕、分子電子元件等技術上。自組有機分子的結構包含活性官能基及有機長鏈，自組分子藉活性官能基吸附在固體基材的表面上，相鄰分子因長鏈間的凡得瓦爾作用力（Van Der Waal's forces）而平行的排列在一起。當表面的覆蓋率增大後，分子間會緻密的堆積成 SAM。這成膜過程屬於熱力學自發性反應，因此一般通稱為自組分子單層薄膜。SAM 的形成，以硫醇在金表面吸引最多的注意 [56-60]，主要的原因如下：

1. 金為反應性較鈍的金屬，在大氣下不容易被氧化，有助於硫醇分子的吸附 [61]，製備流程簡單且可靠性高 [62]。

2. 硫醇官能基和金之間有強烈的作用力 [63]，促使硫化合物吸附在金表面，形成 SAM。
3. 隨著烷基硫醇分子的碳鍊長度的增長，分子的排列也就愈具規則性 [64-65]。依據 Nuzzo 所提出的是分子附著與載體上後，分子與分子之間藉著凡得瓦爾力的相互作用，會使得分子為佔據吸附的位置而彼此互相推擠，分子之間的排列更加緊密而有順序，所以附著在載體上的單層薄膜也就更加的緊密且具規則性[66-68]。

3-6-5 單股 DNA/MCH 修飾於金電極表面上

1. 把已經清洗好不同時間單股 DNA 在金電極上，將 MCH 取
2. 取 MCH 濃度 1mM 在 10mM 在 Na_2HPO_4 緩衝液中，取體積 10 μL 。
3. 滴到金電極表面，室溫下密封不同實驗所需時間。
4. 再將金電極浸入 1.0 M Na_2HPO_4 緩衝液 10 分鐘，再用 DI water 清洗金電極表面，再以氮氣槍使之乾燥。
5. 將修飾完後金電極，量測配好溶液量測電化學。

3-6-5-1 MCH 當間距物原因 [53]

當單股 DNA 種在金電極表面時，會有部分單股 DNA 如同水草般倒下與金電極產生 N-Au 鍵結，並使另一股雜交 DNA 再次種下時，

其雜交率大大，如 Figure 3-2 所示 [69]。

我們可從文獻中 [53] 找出避免 N-Au 鍵結，使用 MCH 來當 spacer 原因有下列所示：

1. 可溶於在水溶液中。
2. 可置換傾倒單股 DNA。
3. 本身具有 6 個碳，跟 thiol-DNA 具有相同長度，所以不會有立體障礙，若長度不夠會影響其雜交反應。

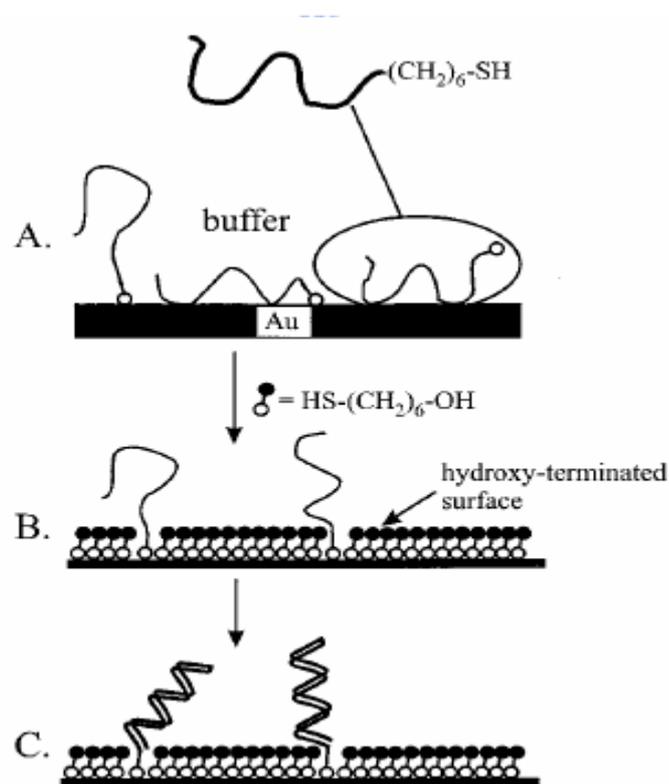


Figure 3-2 (A) Single-stranded DNA (HS-ssDNA) which adsorbs to the gold substrate through the thiol end group as well as through backbone /substrate contacts. A multitude of adsorption states exists.(B) After the formation of a mercaptohexanol (MCH) monolayer that prevents contacts between the DNA backbone and the substrate, the HS-ssDNA is left

attached by the thiol end. (C) The end-tethered HS-ssDNA after hybridization to complementary oligonucleotides [69].

3-6-6 雙股 DNA 雜交

1. 取T16(3MM、7MM)DNA濃度 $1\mu\text{M}$ ，在 $1.0\text{ M Na}_2\text{HPO}_4+1.0\text{MNaCl}$ 緩衝液中取體積 $10\mu\text{L}$ 。
2. 滴到已經在金電極修飾過 probe DNA 或 probe DNA/MCH 表面上，室溫下密封不同實驗所需時間。
3. 再將金電極浸入 $1.0\text{ M Na}_2\text{HPO}_4+1.0\text{MNaCl}$ 緩衝液 10 分鐘，再用 DI water 清洗金電極表面，再以氮氣槍使之乾燥。
4. 將修飾完後金電極，量測配好溶液量測電化學。



3-6-6-1 雜交原理

雜交反應屬自發性反應，G/C 和 A/T 以氫鍵結合。但是室溫下 DNA 為捲曲狀，甚至形成環鍊狀，因此要雜合的機率大大的降低，所以在進行雜合反應前，必須先加熱至 85°C ，增加其熱活化能。

在雙股進行雜交時，DNA 本身帶有磷酸鹽骨幹，彼此會因為帶有負電荷而產生靜電力排斥，造成雜交率下降，故在種 target DNA 時，其緩衝液中需有 NaCl，目的是 NaCl 會解離成 Na^+ 跟 Cl^- 兩種離子態，且中和負電荷。

3-6-7 雙股 DNA/MB 作用

1. 調配不同濃度次甲機藍溶液，取 10uL 的體積滴入在上述步驟-雜交 DNA 所量測溶液當中($Fe(CN)_6^{-3} + KNO_3$)，並攪拌直至溶液變成淺綠色為止。
2. 在室溫下靜置至實驗所需時間。
3. 等待時間完成後，即量測電化學。

3-6-7-1 亞甲基藍(Intercalator)

本次實驗所選定的 intercalator 材料為亞甲基藍 (Methylene Blue，簡稱為 MB⁺) 是一種藍色染料分子，其結構式如 Figure 3-3、3-4，分子式為 C₁₆H₁₈ClN₃S，分子量 319.5g/mol [70]，此次甲基藍分子可視為一個單位體積為 17.0 Å × 7.6 Å × 3.25 Å 的長方體，對許多物質的表面都能產生相當的吸附作用 [71-72]，次甲基藍吸附時的有效面積為 130 Å²，且不容易因照光而分解。圖 3-3 為一典型的次甲基藍吸收光譜，從圖中可看出三個明顯的吸收峰，分別在波長為 665 nm、292 nm 及 246 nm，其中 665 nm 是最大的吸收峰 [73-76]。

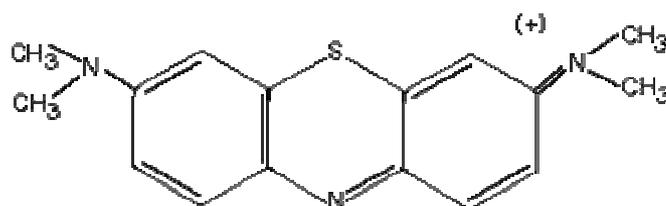


圖 3-3 亞甲基藍化學結構

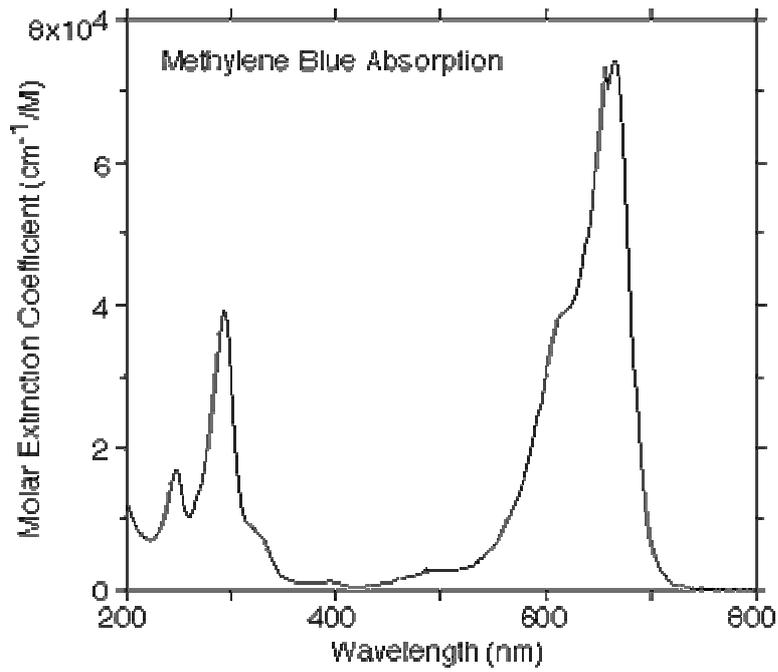
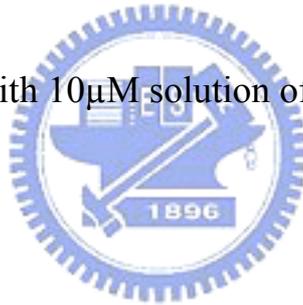


圖 3-4 This spectrum was taken with a HP spectrophotometer using a 1 cm quartz cuvette filled with $10\mu\text{M}$ solution of Methylene Blue in Water by Scott.



第四章 結果與討論

4-1 影響循環伏安法因素探討

對於檢測HPV病毒之前，首先經由循環伏安法所觀察還原與氧化峰值電流與電位對於之後比對是相當重要的。影響循環伏安法有眾多因素，例如：電解質溶液中溶劑(solvent)、抗衡離子(counter ion)、DNA結構(structure)與構型(conformation)等等都會影響之。

4-1-1 電解液對伏安電位與電流之影響

在本次實驗當中，為得一個最佳參數對於實際反映出電極表面上所吸附離子的定性或定量並呈現於循環伏安圖中。在電解液中有主要區別在電解質與抗衡離子濃度上不同。如表4-1所示：

Fe^{+3} (g)	5mM	50mM	100mM
KNO_3 (g)			
5mM	1.645/0.50555	16.45/0.50555	32.9/0.50555
50mM	1.645/5.0555	16.45/5.0555	32.9/5.0555
100mM	1.645/10.111	16.45/10.111	32.9/10.111

從圖4-1中可看出在電解液中電解質單純只有DI water，在鐵離子濃度不同(5mM、50mM、100mM)對金電極上做循環伏安法。可看出隨者鐵離子濃度增加，其氧還峰電流比值($\frac{i_{pc}}{i_{pa}}$)大約在1.723，氧還峰

電位大概差在550伏特，遠大於一個電子傳輸電荷（60~120伏特），屬於是不可逆反應。因為DI water是極弱的電解質，很難導電。如果在DI water中加入強的含氧酸(如H₂SO₄)、活潑金屬的可溶性含氧酸鹽(如Na₂SO₄、KNO₃)或可溶性強鹼(如NaOH、KOH)。因溶液中的離子越多，比導電度也越大，增加水的導電性，則鐵離子較易有氧化跟還原峰值。

由圖4-2可知當固定電解質KNO₃濃度為5mM時，變化鐵離子濃度去做鐵離子循環伏安圖。由圖可知從5mM至100mM的鐵離子之氧還峰電位差從550伏特降至430伏特，並且氧還峰電流比值(i_{pc}/i_{pa})都在1.40上下，與圖4-1氧還峰電流比值(i_{pc}/i_{pa})為1.723相較下，證明加入KNO₃可促進鐵離子氧化還原作用，並由電流比值中可知當鐵離子濃度達5mM時，已經足夠反應鐵離子循環伏安圖。而圖4-2中氧還峰電流比值(i_{pc}/i_{pa})在1.40上下未達可逆反應主要因為當電子傳輸至吸附在金電極表面上鐵離子時卻因為溶液中導電離子濃度不夠大，未能完全反應致電化學儀器中所致。

由圖4-3當固定鐵離子濃度為5mM時，可看出電解質KNO₃濃度變化對循環伏安圖形變化。我們由圖中可看出兩點：一為電解質濃度增加，其氧還峰電流比值(i_{pc}/i_{pa})約在1.08上下，理論上鐵離子可逆反應

$(\frac{i_{pc}}{i_{pa}})$ 應當為1，但在本實驗中只添加一種電活化物($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)，故氧化峰電流值會比還原峰電流值低一點；二為氧還峰電位差會從550伏特急遽縮減至180伏特，並且由標準電位表查知鐵三價還原成鐵二價標準電位在+0.356伏特，而我們所使用參考電極為氯化銀(AgCl)，其標準電位在+0.222伏特，兩者標準電位相扣得鐵三價離子在氯化銀參考電極下還原電位+0.114伏特；與圖4-3中綠色線中的還原峰電位相近，故我們選用鐵離子濃度為5mM並搭配電解質 KNO_3 濃度為100mM做為我們最佳參數來反應吸附在金電極表面上鐵三價離子之循環伏安圖。

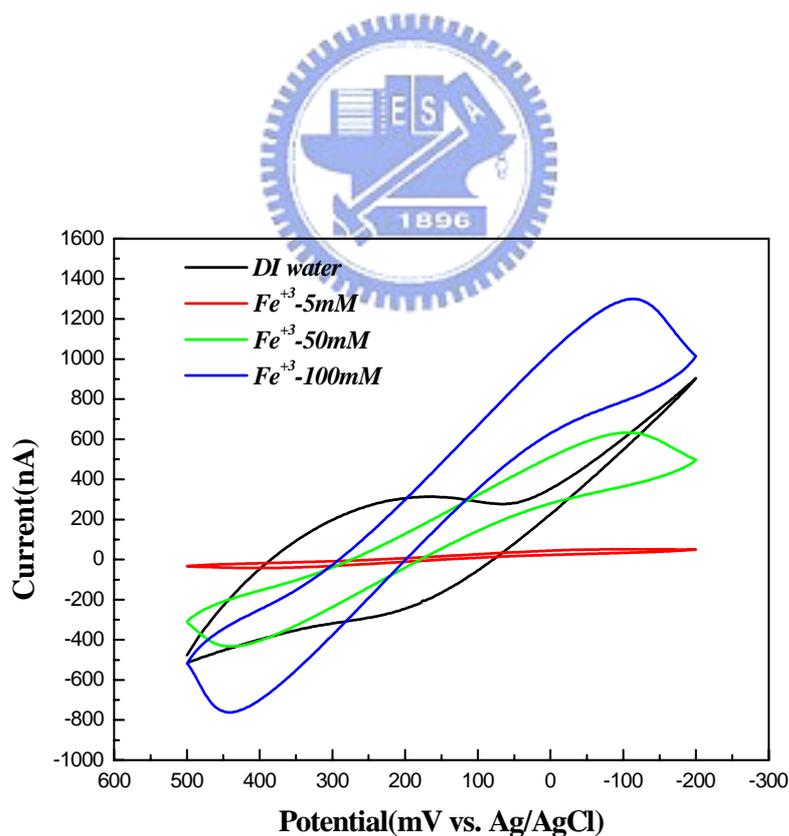


圖4-1為電活化物(Fe^{+3})在不同濃度之下之循環伏安圖

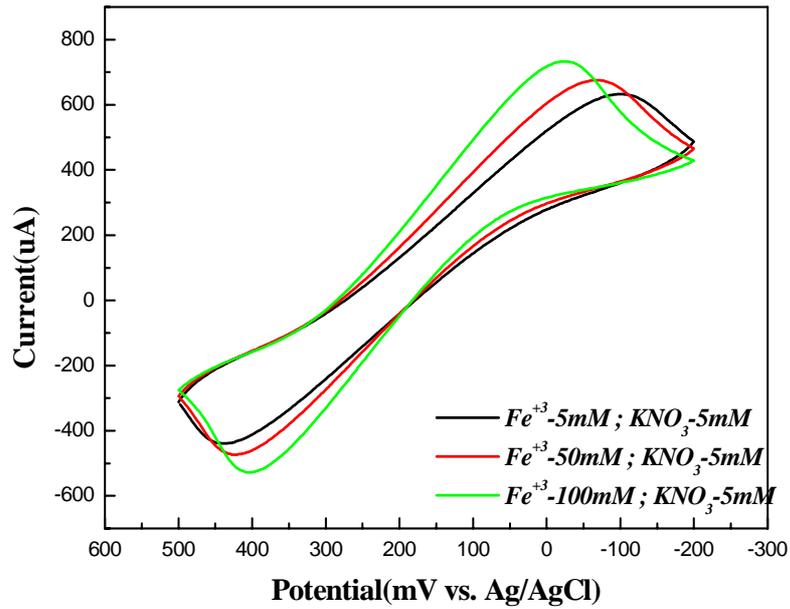


圖4-2為在固定 KNO_3 濃度--5mM下改變電活化物濃度(Fe^{+3})之循環伏

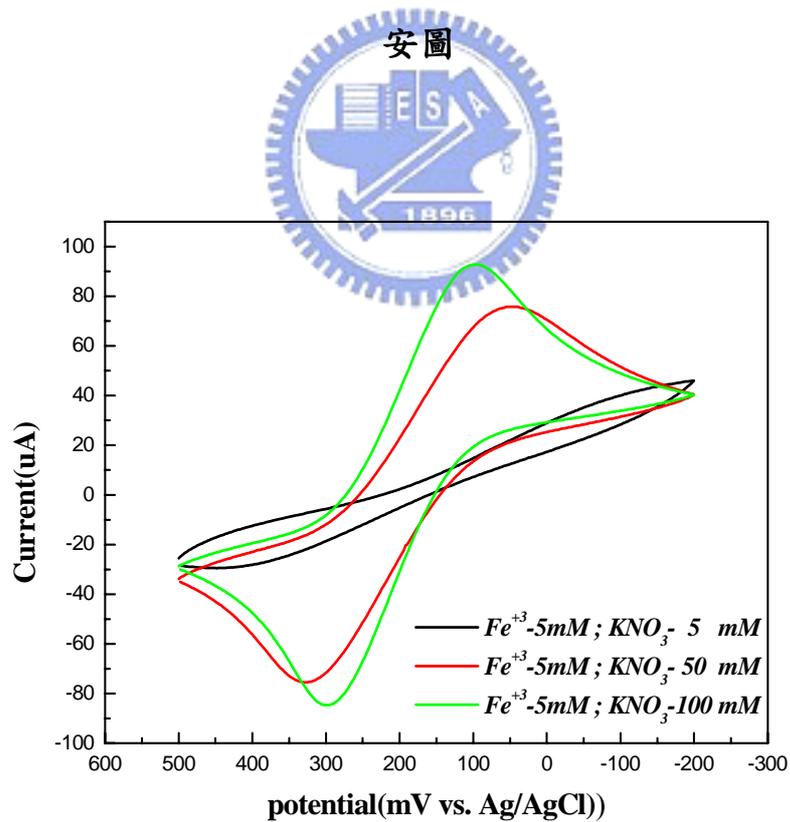


圖4-3為在固定電活化物濃度(Fe^{+3})濃度--5mM下改變 KNO_3 濃度之循

環伏安圖

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| * Working electrode: Gold | * Reference electrode: Ag/AgCl |
| * Counter electrode: Pt | * Scan rate: 20mV/s |
| * Scan potentials: 0.5 ~ -0.2 Volt | * Store cycle: 3 |
| * Gold area: 0.031416cm ² | |

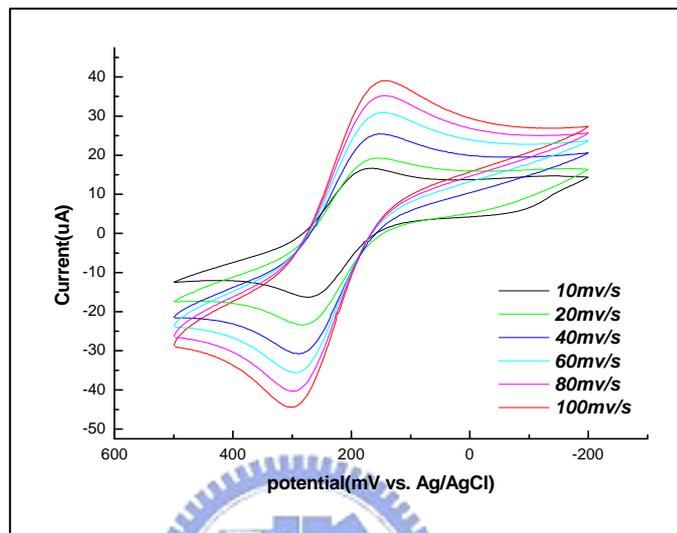


圖4-4為在變化掃瞄速率對固定濃度電活化物(Fe^{+3})之循環伏安圖

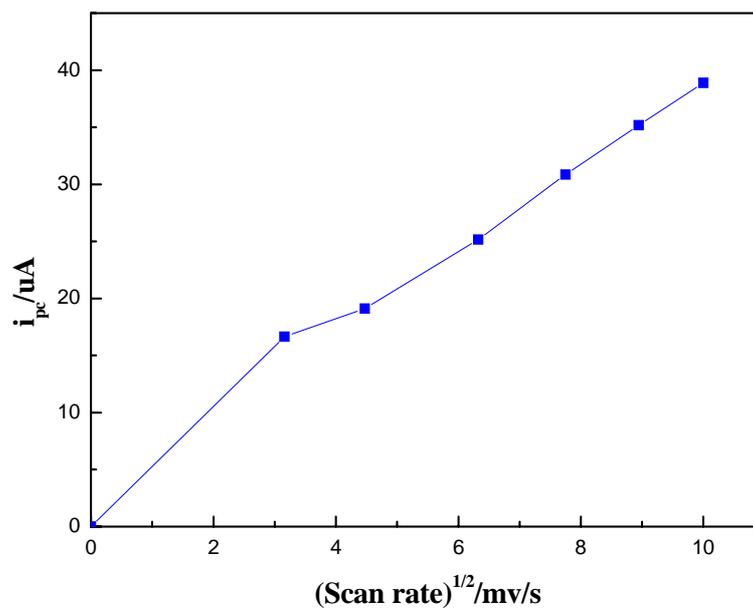


圖 4-5 為在掃瞄速率平方根 vs. 還原峰電流值

4-2 探討單股DNA覆蓋率影響之因素

由於硫醇很容易與金產生化學鍵結而形成自組裝單層 (Self-Assembly Monolayer, SAMs)，因此末端具有硫醇寡聚核苷酸易在金電極表面形成自主裝單股DNA層；完全覆蓋單DNA層對於研究堆疊干擾(stacking perturbations)是非常重要的。當單股DNA層堆疊不緻密時，會提供路徑使嵌入劑(intercalator)與單股DNA層間空隙接觸，此時所量測到電流值不是經由整體的螺旋雙股DNA傳遞。

影響單股DNA覆蓋率主要區分兩種因素：一為緩衝液配置；二為單股種植時間。



4-2-1 緩衝液對單股DNA覆蓋於金電極上之影響

各種生化溶液，均需維持其 pH 的恆定，是為緩衝作用 (buffering)；緩衝液是因為其中含有緩衝分子，當溶液系統的pH改變時 (即其 H^+ 濃度改變)，緩衝分子可吸收或放出 H^+ ，如此可以調節溶液中的游離 H^+ 濃度，因而保持 pH 恆定。

在本次實驗中，在緩衝液配置上主要濃度區分0M及1M兩種濃度，且電解液配置都參考4-1-1節最佳參數。由圖4-6中可看出當緩衝液為0M，也就是說為添加任何 Na_2HPO_4 。在金電極表面種單股DNA這步驟中，氧化及還原峰訊號卻未被覆蓋掉，代表意義為單股DNA

並未與金電極產生鍵結，相對應證緩衝液存在性對單股DNA重要性，而之後再種互補股DNA也是一樣效果，因為沒有單股DNA在金電極上，所以並不會有雜交(hybridization)動作，故其訊號依舊跟純金訊號一樣，之後加入MB也是一樣效果。

在圖4-7當中可發現與圖六不同處是在金電極加入單股DNA時氧化跟還原峰的訊號已經被蓋住，主要原因是單股DNA中磷酸鹽骨幹帶負電荷，為其緩衝液中有 Na_2HPO_4 時，會釋放出 Na^+ 離子存在，促使單股DNA得以正負離子中和，不會有靜電排斥力影響，並且均勻覆蓋於金電極表面上，而 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子不能擴散至金電極表面並且參與 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 氧還反應，故沒有氧還峰訊號呈現。

故之後所有實驗過程當中，其單、互補股DNA或錯位股DNA其緩衝液配置濃度都在控制在1M。

Buffer solution : 0M Na₂HPO₄ pH=7.0

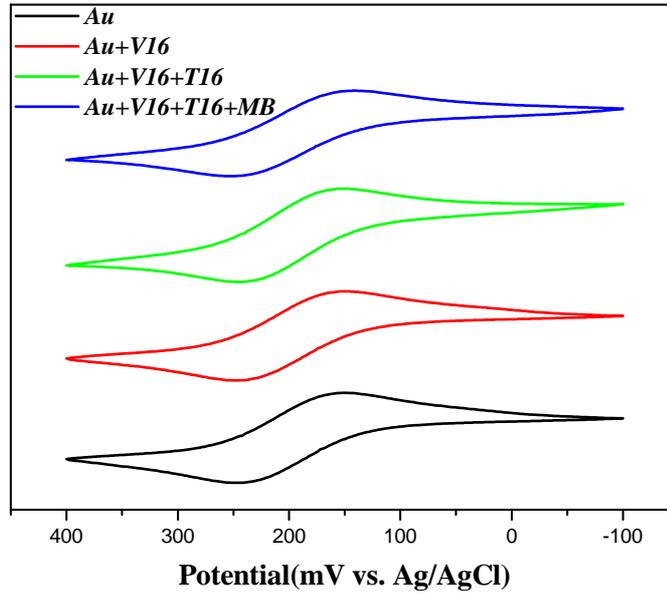


圖4-6為單股DNA在緩衝液濃度為0M之循環伏安圖；

(K₃Fe(CN)₆--5mM ; KNO₃--100mM)

Buffer solution:1M Na₂HPO₄ pH=5.7

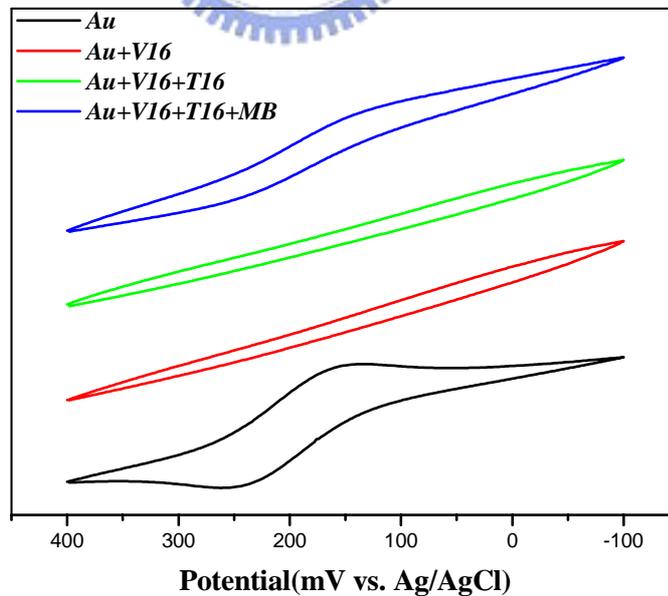


圖4-7為單股DNA在緩衝液濃度為1M之循環伏安圖

(K₃Fe(CN)₆--5mM ; KNO₃--100mM)

4-2-2 種植單股DNA時間對於覆蓋金電極上之影響

當緩衝液濃度固定在1M且電解液濃度也參考4-1-1節所述，由圖八可看出單股DNA在金電極表面上15分鐘時，其 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子氧化跟還原峰訊號幾乎已經被消失，只剩在還原峰值還有不太明顯電流訊號；隨單股DNA在金電極表面時間增加，其還原峰與氧化峰值幾乎呈現沒有電流訊號，故我們將單股DNA種植時間選在120分鐘，因為在圖4-8可看出在種植時間在120分與240分兩個循環伏安圖狀態已經是一樣的。

而另外一個原因是在檢測病毒流程當中，希望能相對縮短檢測時間達到最大功效。

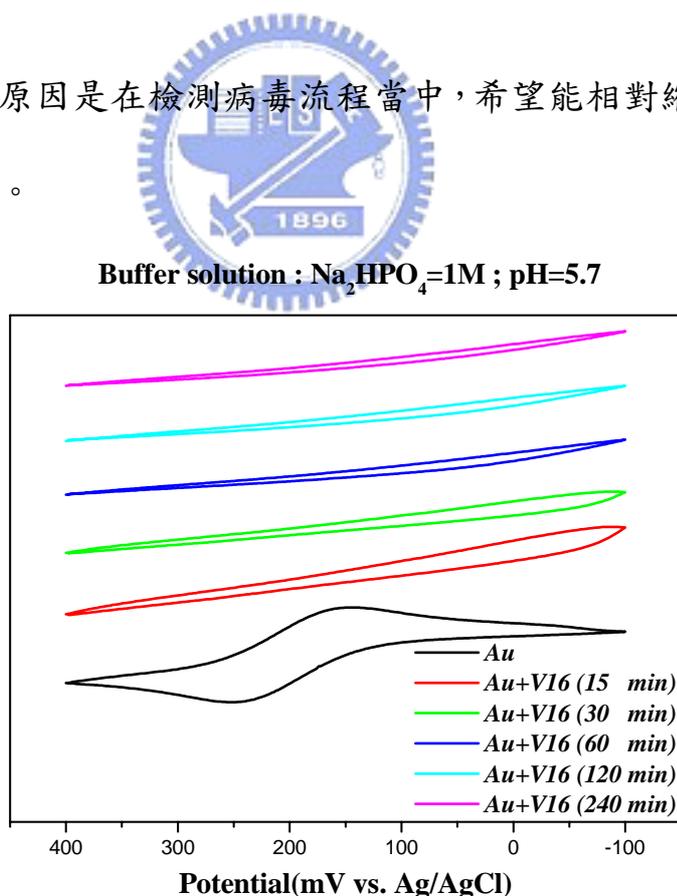


圖4-8為單股DNA在金電極表面上不同時間之循環伏安圖
($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-3 電極表面經DNA修飾之循環伏安之定性測試(Qualitative test)

在量測之前，注意在燒杯中金電極、白金電極與氯化銀參考電極之三電極彼此要分開。電化學分析之前，修飾過DNA後電極需用緩衝液清洗，搭配5mMFe(CN)₆⁻³/100mMKNO₃電解液並掃瞄電位從0.5至-0.2伏特，並固定掃瞄速率為20mv/s。

由下圖4-9中可看出HS-5'單股DNA密集覆蓋在金電極表面藉由硫-金鍵結，電極表面覆蓋一層具有帶負電荷磷酸鹽骨幹的寡聚核苷酸膜(oligonucleotides)，又因為Fe(CN)₆⁻³不能擴散至金電極表面並且做Fe(CN)₆⁻³氧還反應，故伏安圖呈現不明顯電流值。單股寡聚核苷酸膜固定在金電極上很容易地與互補股進行雜交，此時，電極表面相對覆蓋一層帶負電荷之雙股核苷酸。

由圖4-9可證實經DNA修飾過後電極表面是帶有負電荷層。當把修飾過後金電極至入電解液中，其Fe(CN)₆⁻³是電活化物並且為高陰離子性，我們預期靜電排斥力將使Fe(CN)₆⁻³不接近帶負電荷雙股DNA層，所以往返在電極表面之異質電子轉移(heterogenous electron transfer)能夠被阻擋介於還氧週期(redox cycling)。

一裸露金電極在5mMFe(CN)₆⁻³/100mMKNO₃電解液中，可得一可逆循環伏安圖，具有高電流值~15uA(沿黑線在圖4-9中)。金電極經

單股與雜交後，其伏安圖呈現不明顯的電流值(沿紅跟綠線在圖4-9中)，但在電極經雜交DNA中理論應當比單股DNA來得緻密，但綠線電流值卻比紅線電流值來的大，其原因有可能為當單股DNA在金電極上並不會垂直站立，單股DNA本身糾結在一起，故所佔金電極面積較多，相對電流值訊號較低；而DNA雜交時，會因為DNA本身構型上的問題，比較容易垂直排列好，相對裸露出金面積較高，電流值訊號較高。綜合綠與紅線，暗示出可忽略一 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 表面濃度在修飾完的金電極上。值得注意的事是還原峰在氧還電流中經DNA修飾電極表面可歸咎於 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 與負電DNA層中靜電排斥力所致，將圖解於圖4-10當中。

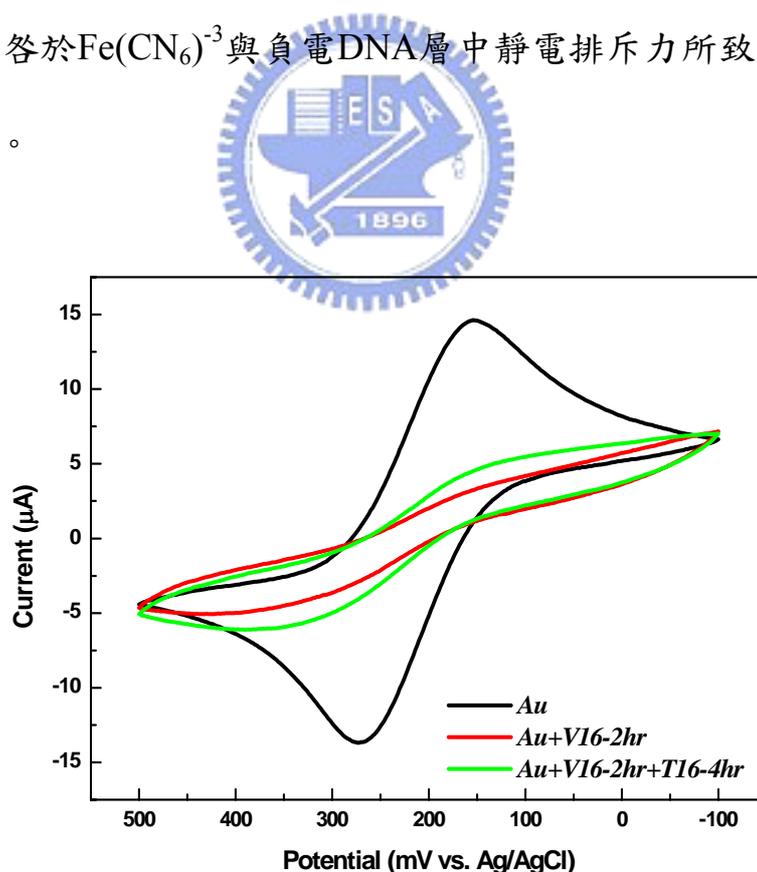


圖4-9為金電極表面修飾過單、雜交股DNA之循環伏安圖
($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

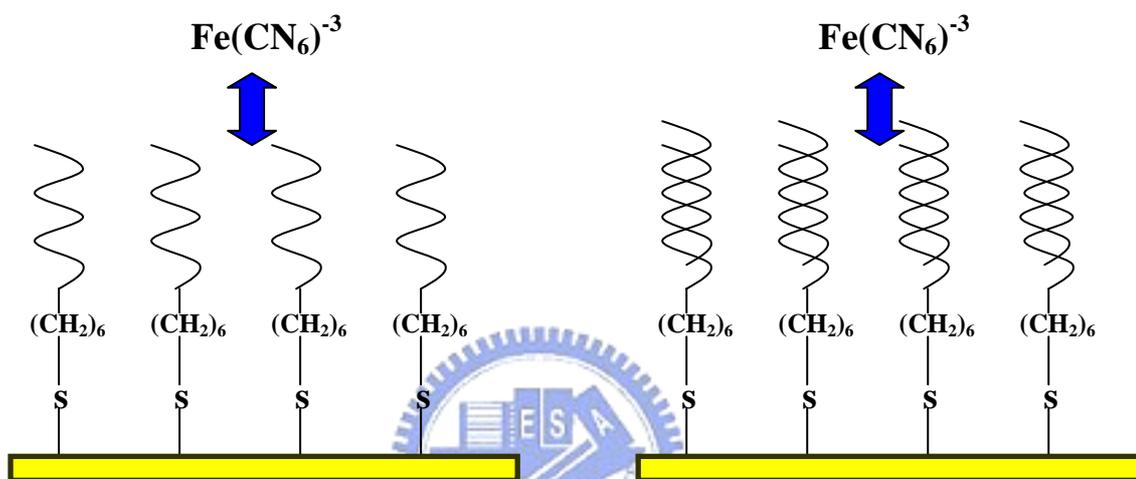
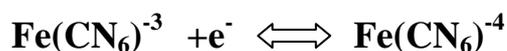
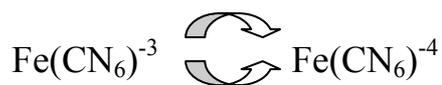


圖4-10為改變金電極表面電荷和經表面修飾過後之電化學反應介於

$\text{Fe}(\text{CN}_6)^{-3}$ 和電極

(a) Bare gold electrode:

no charge on the electrode allows $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ to approach the electrode surface and, therefore, the reduction/oxidation of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ occurs without difficulty.

(b) ssDNA-modified electrode:

negative charges on the sugar-phosphate backbone of ssDNA cover the electrode surface, which prevents $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ from approaching the surface, and the reduction/oxidation demands excessive over voltages.

(c) dsDNA-modified electrode:

the situation is almost the same as that in (b).

4-4 嵌入劑在多聚陰離子(polyanionic)雙股螺旋之電荷補償(charge compensation)

在未探討電化學反應在DNA嵌入劑之前，在金電極表面上覆蓋密集的DNA層事先要被預設成立的，在4-3節前實驗結果與參數下，已經能把單或雜交股DNA均勻覆蓋在金電極表面上，再加入嵌入劑所得到電化學訊號是經由金電極傳至雙股螺旋DNA中鹼基對，並透過嵌入劑在溶液中帶正電而使雙股螺旋DNA中帶負電磷酸鹽骨幹可以或至少部分電荷中和，並且促進 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 與電極表面的DNA接近，將電子傳輸至溶液中 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 進行氧還作用。甚至利用嵌入劑放大功效去檢測含有錯位(mismatch)或perturbations DNA。

在本次實驗中選用嵌入劑-亞甲基藍(Methylene Blue)，濃度則有2、6、10 μM 三種，而催化劑有以下三點被要求：

1. 催化劑與DNA中鹼基對是靠插入(intercalation)
2. 不會在太密集或太稀疏DNA層中進行作用
3. 它的氧還電位介於-0.2~-0.6伏特 vs. 標準甘汞電極

在探討電荷補償問題之前，主要會影響之因素在於選用催化劑的濃度與催化劑與雙股螺旋反應時間，將在下兩小節探討之：

4-4-1 嵌入劑(MB)濃度對於完全互補股DNA之電化學訊號影響

在圖4-11中可發現當DNA進行雜交完後，其電化學訊號依舊不明顯，而其原因在4-3節中已敘述，主要因為靜電排斥力。而當添加不同濃度亞甲基藍固定在10分鐘下，可看出其還原及氧化峰電流值隨者濃度增加而又增大趨勢，主因為在相同時間內，完全互補DNA中插入亞甲基藍量隨濃度增加而增加，其電荷補償作用相對增加，故單位面積上/單位時間上帶負電之完全互補DNA被正負電荷中和並促使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子接近完全互補DNA量變多而伏安圖有所不同所致。氧還峰電流比值為 $(\frac{i_{pc}}{i_{pa}})_{2\mu\text{M}}=1.57 > (\frac{i_{pc}}{i_{pa}})_{6\mu\text{M}}=1.51 > (\frac{i_{pc}}{i_{pa}})_{10\mu\text{M}}=1.21$ ，可看出亞甲基藍的加入可促進 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 可逆反應進行。

在本實驗目的中，因為主要偵測HPV高危險病毒族群V16及V18兩大種類，個別之間差異在於有DNA序列上有幾個錯位(mismatch)，因為嵌入劑-亞甲基藍具有放大訊號效果，並由圖十可看出只要添加亞甲基藍僅2uM，也具有放大機制，但在後續實驗中，我們選用濃度為較高濃度10uM亞甲基藍作用偵測具有錯位(mismatch)DNA。

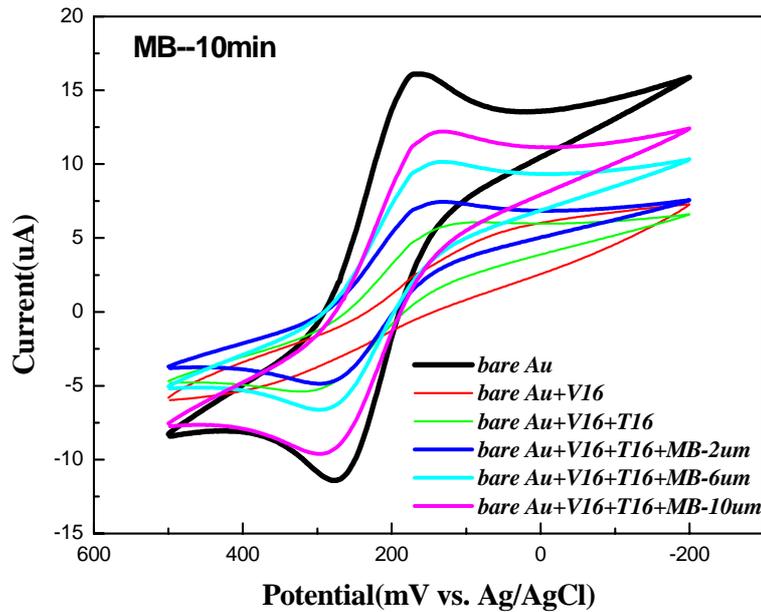


圖4-11為完全互補DNA在不同濃度之亞甲基藍10分鐘反應之循環伏安圖 ($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-4-2 嵌入劑(MB)時間對於完全互補股DNA之電化學訊號影響

在圖4-12中可發現金電極表面修飾完全互補DNA後，其電化學訊號依舊不明顯，而其原因在4-3節中已敘述，主要因為靜電排斥力。

而當添加不同時間亞甲基藍固定在10uM，可看出其還原及氧化峰電流值隨者間增長而又增大趨勢，並且在還原及氧化尖峰電位之差距

($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p}$)因插入時間增長而有 $\Delta\phi_p$ 有縮小現象 ($\Delta\phi_{p,30min} = 162V$;

$\Delta\phi_{p,60min} = 141V$; $\Delta\phi_{p,120min} = 131V$; $\Delta\phi_{p,240min} = 129V$;))

由伏安圖中可看出雜交過DNA經intercalator-亞甲基藍插入後分離的波峰電位(peak potential)與金電極分離的波峰電位比較有所不同

，而其相異點歸咎於由DNA層提供電子轉移的阻礙所致。

另一項有趣現象是注意亞甲基藍不是電活化物在實驗所掃描的電位當中; 0.5~-0.2伏特，可由圖4-12中紫線與黃線看出其還原峰電流值達13.6622uA(扣掉金電極起始點電流值)，可達幾乎金電極所轉移電荷量的85%($\frac{13,6622(uA)}{16.1607(uA)} \cong 85\%$)，可指出亞甲基藍對帶負電DNA產生電荷中和是非常有效率的。

由圖4-12之伏安圖中，我們選用1小時來作為亞甲基藍對雙股DNA反應時間，而不選用2小時原因主要是因為放大功用幾近相同。

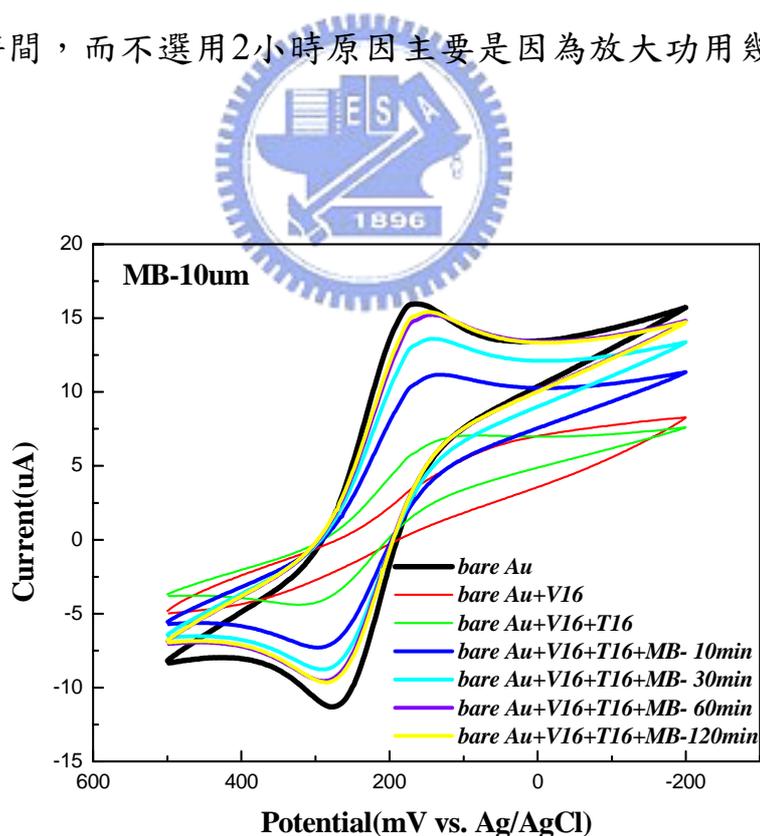


圖4-12為完全互補DNA在固定亞甲基藍濃度配合不同插入時間下之循環伏安圖 ($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-4-3 嵌入劑(MB)分別在單/雙股DNA之插入之機制

由圖4-13與圖4-14可看出無論是單股DNA或者是雙股DNA都會藉硫-金基鍵結在金電極表面形成一層高覆蓋率薄膜(thin film)，來減小 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 氧化還原的峰值。

然而，比較金電極經單或雙股DNA修飾過後加入亞甲基藍後，可發現 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 訊號變大，代表亞甲基藍分子會在金電極表面上吸附單或雙股DNA。從下圖中雙股DNA/亞甲基藍的氧化還原峰的電流值($i_{pc} = 13.444(\mu\text{A})/i_{pa} = 10.303(\mu\text{A})$)都比單股DNA/亞甲基藍的氧化還原峰的電流($i_{pc} = 10.115(\mu\text{A})/i_{pa} = 7.115(\mu\text{A})$)來的大；且雙股DNA/亞甲基藍的氧化還原峰電位差距($\Delta\phi_p = 140\text{mV}$)也比單股DNA/亞甲基藍的氧化還原峰電位差距($\Delta\phi_p = 356\text{mV}$)來的小，代表亞甲基藍插入主要作用於雙股DNA中。由文獻已知亞甲基藍分子主要是插入在雙股螺旋DNA中鹼基對，而單股DNA我們猜測它之所以訊號會放大原因是因為亞甲基藍分子會靜電力(electrostatic force)吸附在DNA hydrophobic處，並促使溶液中 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 離子接近。

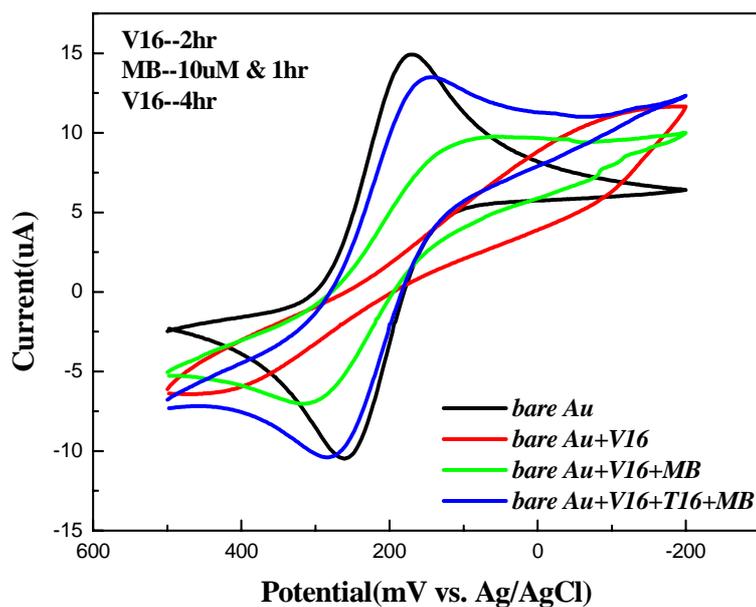


圖4-13為亞甲基藍插入在完全互補DNA之循環伏安圖

($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

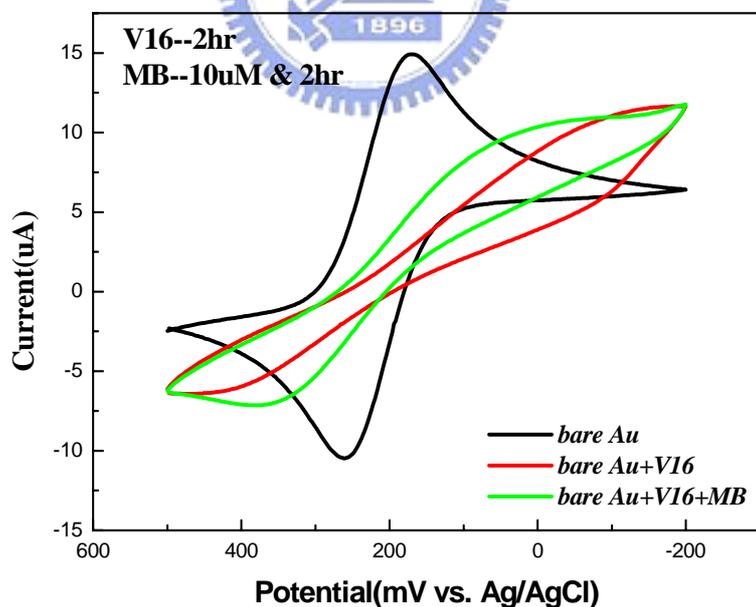


圖4-14為亞甲基藍插入在單股DNA之循環伏安圖

($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-4-4 MCH在金電極表面之電化學訊號影響

由下圖中可看出當 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子金電極還原及氧化峰差距約在110伏特，代表在一個電子轉移所需電位中。當MCH約在金電極表面0.5小時可發現氧化及還原波峰被掩蓋，其電位差距達至超過200伏特以上($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 268 - 10$)代表此反應為不可逆過程；因為MCH會在金電極表面形成一層帶負電OH⁻基薄膜並阻擋 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子與金電極反應之。

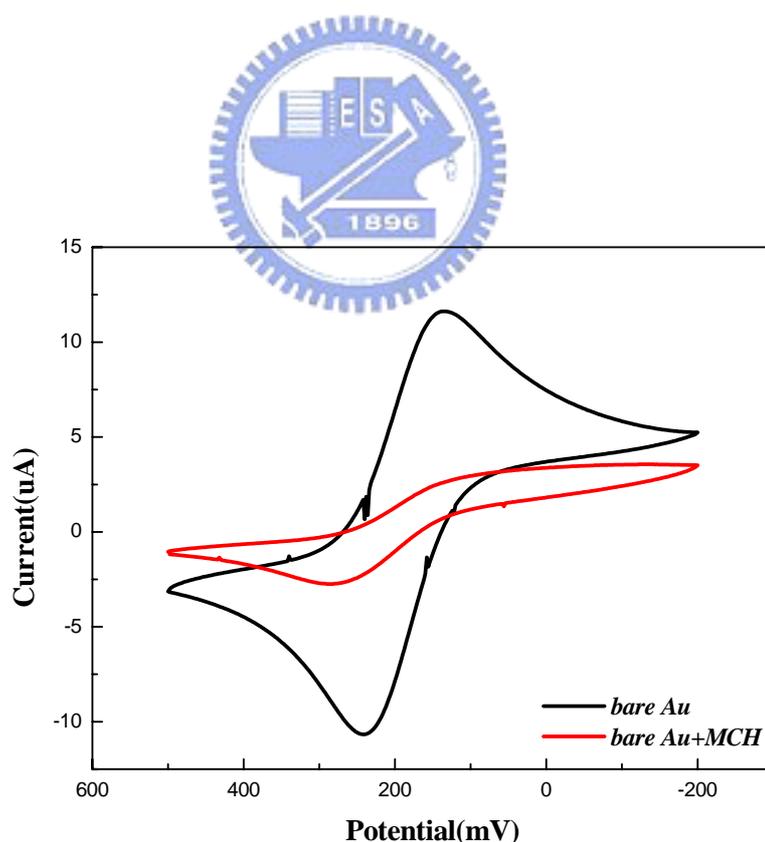


圖4-15為MCH在金電極之循環伏安圖
($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-5 電化學檢測V16序列之病毒

本次實驗採用依序雜合的製程，共準備了三種材料：

第一種：V16+T16 為長度 30 個 base pair，序列為完全互補的 DNA。

第二種：V16+ T6 為長度 30 個 base pair，序列有 3 個 mismatch 的 DNA。

第三種：V16+T51 為長度 30 個 base pair，序列有 7 個 mismatch 的 DNA。

在下列實驗中，其亞甲基藍固定在濃度10uM/1小時；單股2小時；雜交股4小時；。



4-5-1 完全互補股DNA之電化學測試

由圖4-16中可觀察 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子在裸露金電極中，量測到分離波峰電位(peak potentials)為110伏特($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 269 - 159$)，而一個電子轉移需要60~120伏特，代表電極表面上是乾淨且是可逆的。金電極經單股與互補股後，其伏安圖呈現不明顯的電流值(沿紅跟綠線在圖中)，其中V16+T16電流值卻比V16電流值來的明顯些，主要影響因素可解釋兩點：一為DNA骨幹帶負電，會使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子因靜電排斥力接近金電極表面產生作用。二為單/雙股構型上的問題，在4-3節有詳細解釋。

在V16+T16+MB實驗中，我們可發現一個有趣現象，因為在本節實驗中，V16+T16是完全互補型態，故雜交比例應相當高，但如何證明雜交比例多高，我們圖中可由藍線與黑線相比，在分離波峰電位而言，金電極(110mV)與V16+T16+MB(111mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 270 - 159$])兩者都在一個電子可逆反應內，在氧化還原電流值而言，經加入嵌入劑(MB)時，訊號放大至跟金電極產生電流訊號幾乎一樣。由上述電流值與分離波峰電位兩者結果都可說明雜交比例很高，利用還原峰電流值比較達至93% ($i_{pc,v16+T16+MB} / i_{pc,Au} = 15.23\mu A / 16.25\mu A$)，因為亞甲基藍並不參與反應，只是當電子傳輸媒介角色。

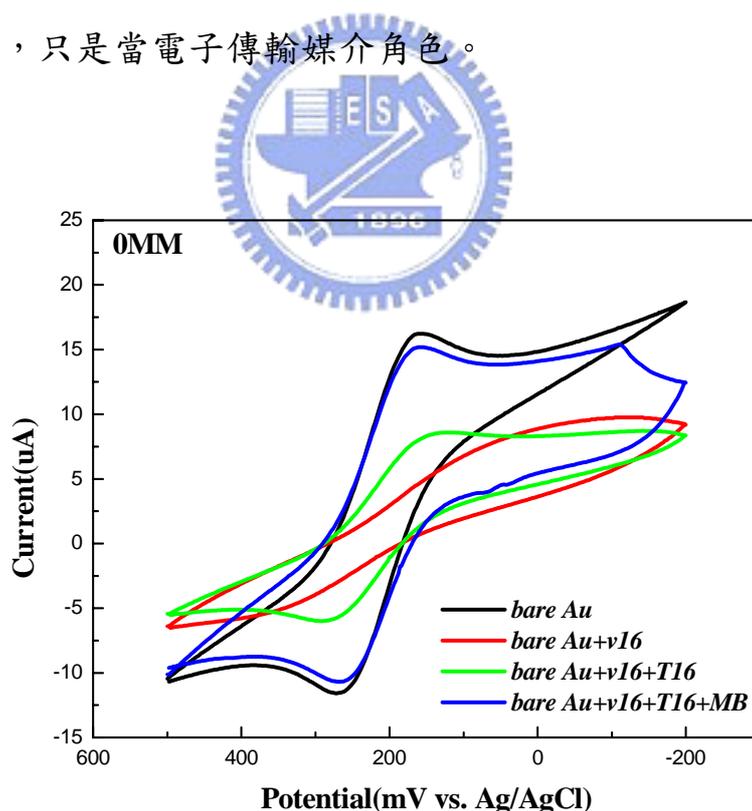


圖4-16為亞甲基藍插入在完全互補股DNA之循環伏安圖
($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-5-2 3 mismatch DNA之電化學測試

由圖4-17中首先可量測到金電極分離波峰電位(peak potentials)為105伏特($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 267 - 162$)，符合 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 需要一個電子轉移需要60~120伏特，這代表電極表面上是乾淨的。然而，金電極經修飾過V16股與V16+T6後，其伏安圖呈現與圖4-15相同之狀況(沿紅跟綠線在圖中)，其中V16+T6電流值卻比V16電流值來的明顯些，主要影響因素皆在4-5-1節中詳細敘述。

在V16+T6+MB實驗中，我們可發現一個現象，因V16+T6是3 mismatch的型態，故雜交比例應當會下降，但如何說明雜交比例降多低，我們圖中可由藍線與黑線相比，可看出雜交比例為65.4% ($i_{pc,v16+T6+MB} / i_{pc,Au} = 13.137\mu\text{A} / 20.008\mu\text{A}$)。在分離波峰電位相較下，V16+ T6 +MB (166mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 292 - 138$])比金電極(105mV)更不可逆，在氧化還原電流值而言，經加入嵌入劑(MB)時，氧化及還原電流值與金電極相比較都變小。由上述電位差說明不可逆與電流值變小結果可暗示mismatch應會降低雜交比例，並使雙股DNA結構不完全，影響亞甲基藍接上的量，其放大訊號降低。

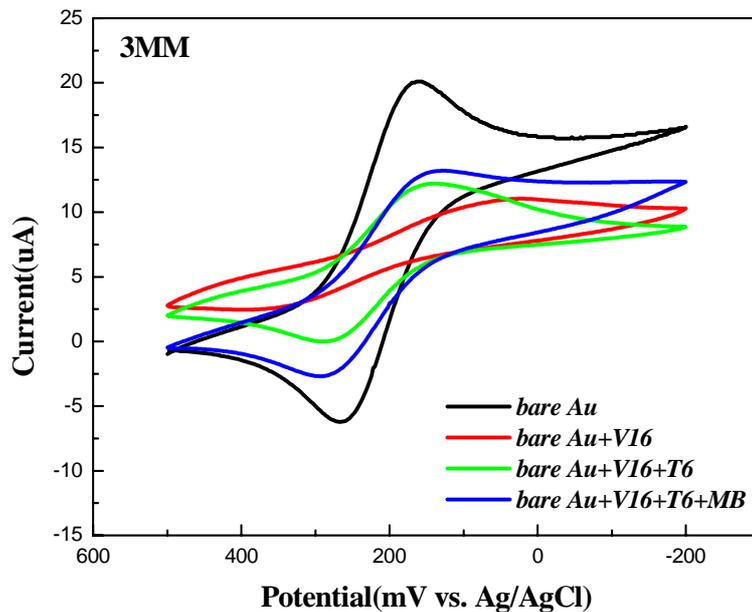


圖4-17為亞甲基藍插入在 3 Mismatch DNA之循環伏安圖
($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-5-3 7 mismatch DNA之電化學測試

由圖4-18中先觀察金電極分離波峰電位(peak potentials)為113伏特($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 269 - 156$)，而 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 需要一個電子轉移需要60~120伏特，這代表電極表面上是乾淨且是可逆的。然而，由下圖中紅線與綠線比較出其中V16+T6電流值卻比V16電流值來的明顯些，主要影響因素皆在4-5-1節中詳細敘述。

在V16+T51+MB實驗中，我們可發現一個非常有趣現象，因V16+T51是7 mismatch的型態，故雜交比例應當會大大下降，並且在構型上排列是否還會垂直站立或傾倒，都是值得我們深切去探討之。

但如何說明雜交比例降多低，因為在V16+T51+MB其還原峰值電流值不明確，不能比較其相對雜交率。尤其在分離波峰電位相較下，V16+T51+MB (超過200mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 292 - 70$]) 比V16+T6+MB (166mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 292 - 138$]) 更加不可逆；並在氧化還原電流值而言，在加入嵌入劑(MB)之後，氧化及還原電流值幾乎跟V16+T51股電流量差不多。由上述電位差說明較V16+T6+MB更加不可逆反應與加入MB電流值與原來雙股電流值差不多大小。結果我們可猜測出 mismatch 越多應會大量降低雜交比例，甚至因 mismatch 會影響整體構型之外加因素，並使雙股DNA結構更加不完全，嚴重影響亞甲基藍插入在DNA鹼基對中的量，幾乎沒有放大訊號。

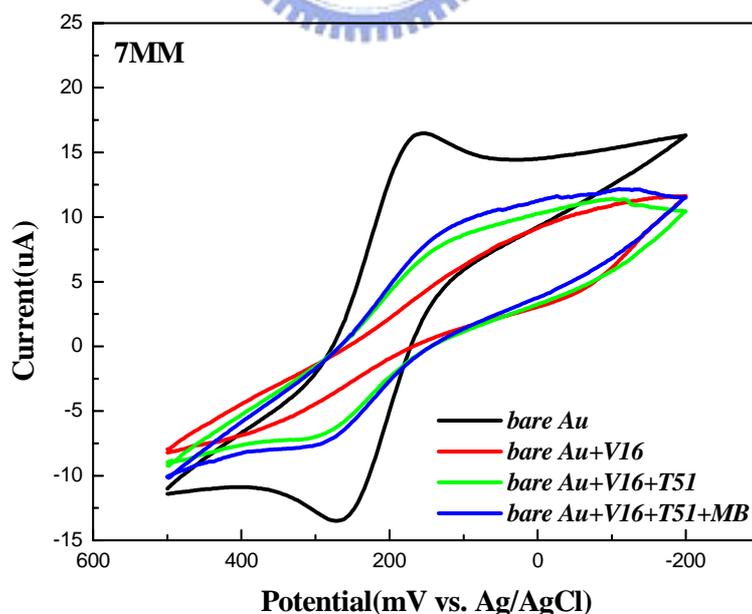


圖4-18為亞甲基藍插入在 7 Mismatch DNA之循環伏安圖
($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-6 電化學檢測V18序列之病毒

本次實驗採用依序雜合的製程，共準備了三種材料：

第一種：V18/MCH+T18 為長度 30 個 base pair，序列為完全互補的 DNA。

第二種：V18/MCH+ T45 為長度 30 個 base pair，序列有 4 個 mismatch 的 DNA。

第三種：V18/MCH+T6 為長度 30 個 base pair，序列有 6 個 mismatch 的 DNA。

在下列實驗中，其中種單股2小時；雜交股4小時；亞甲基藍固定在濃度10uM/1小時；MCH在濃度1mM/0.5小時，本節實驗所添加MCH目的是解決非專一性吸附(non-specific binding)且增大單股DNA直立機率。

4-6-1 完全互補股DNA之電化學測試

由圖4-19中可觀察 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 離子在裸露金電極中，量測到分離波峰電位(peak potentials)為87伏特($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 260 - 173$)，而一個電子轉移需要60~120伏特，代表電極表面上是乾淨且是可逆的。金電極經V18與MCH後，其伏安圖中還原及氧化波峰電位及電流值皆不太明顯(沿紅跟綠線在圖中)，而V18/MCH+T18還原峰電流值與V18還原峰

電流值幾乎相同，主要影響因素可解釋當MCH當spacer時，可有效填補單股與單股之間空隙處且末端帶負電氫氧基會促使帶負電DNA不會有傾倒並與金產生氮-金(N-Au)鍵結。

在V18+T18+MB實驗中，我們可發現相當有趣現象，在本節實驗中，V18+T18是完全互補型態，故雜交比例應相當高，但如何證明雜交比例多高，我們圖中可由藍線與黑線相比，在分離波峰電位而言，金電極(87mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 260 - 173$])與V18/MCH + T18+MB (121mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 271 - 150$])兩者都在一個電子可逆反應內。在氧化還原電流值而言，經加入嵌入劑(MB)時訊號放大至比金電極產生電流訊號要大上一點。上述氧化及還原電流值與分離波峰電位差距兩者結果都可說明雜交比例很高，利用還原峰電流值比較其雜交率為104% ($i_{pc,v16+T16+MB} / i_{pc,Au} = 15.63\mu A / 14.89\mu A$)，因為亞甲基藍並不參與反應，只是當電子傳輸媒介角色。

所以發現與4-5節相較下，將單股加入MCH可有效避免非專一性吸附，並且有效增加雜交效率，對於區分mismatch具有更大鑑別率與幫助。

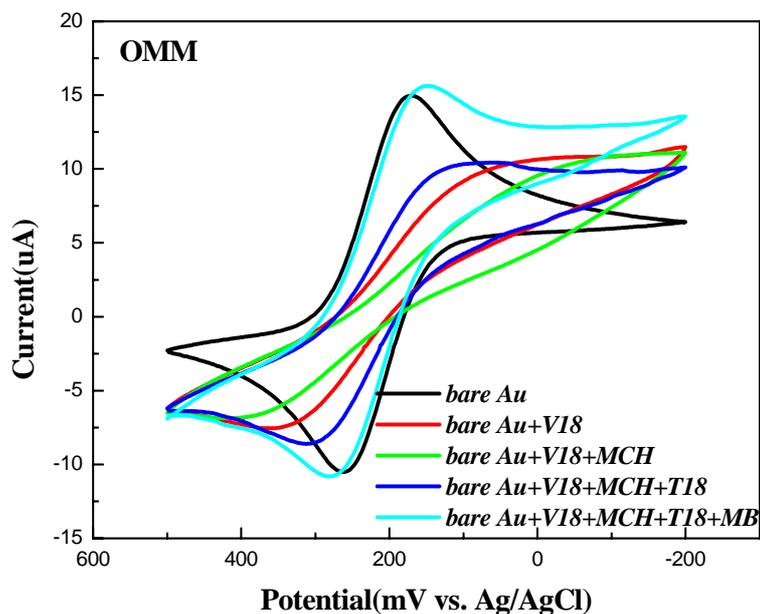


圖4-19為亞甲基藍插入在完全互補DNA之循環伏安圖

($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-6-2 4 mismatch DNA之電化學測試

由圖4-20中可得金電極分離波峰電位(peak potentials)為105伏特 ($\Delta\phi_p = \phi_{a,p} - \phi_{c,p} = 264 - 159$)，符合 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} + e^- \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 需要60至120伏特，這代表電極表面上是乾淨且是可逆的。而後金電極經修飾過V18/MCH與V18/MCH+T45後，伏安圖呈現與圖4-18相同之狀況(沿紅跟綠線在圖中)，其中V18/MCH+T45電流值卻比V18/MCH電流值來的明顯些，原因猜測當單純只有V18股時，DNA會因本身構型而捲曲成一團，或者是V18之間再結合為更大一團，加上MCH去佔據單股間空隙時，當進行雜交時，會因為雙股間結合而站立，並裸露出些許金電

極，而造成V18/MCH+T45電流值比V18/MCH電流值來的大一些。

在V18/MCH+T45+MB實驗中，我們可發現一個現象，因V18/MCH+T45是4 mismatch的型態，故雜交比例應當會下降，但如何說明雜交比例降多低，我們圖中可由藍線與黑線相比，可看出雜交比例為63.6% ($i_{pc,v16+T6+MB} / i_{pc,Au} = 9.478\mu A / 14.881\mu A$)。在分離波峰電位相較下，V18/MCH+ T45 +MB (209mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 301 - 92$])比金電極 (105mV)更不可逆，在氧化還原電流值而言，經加入嵌入劑(MB)時，氧化及還原電流值與金電極相比較都變小。由上述電位差說明不可逆與電流值變小結果可暗示mismatch應會降低雜交比例，並使雙股DNA結構不完全，影響亞甲基藍接上的量，其放大訊號降低。

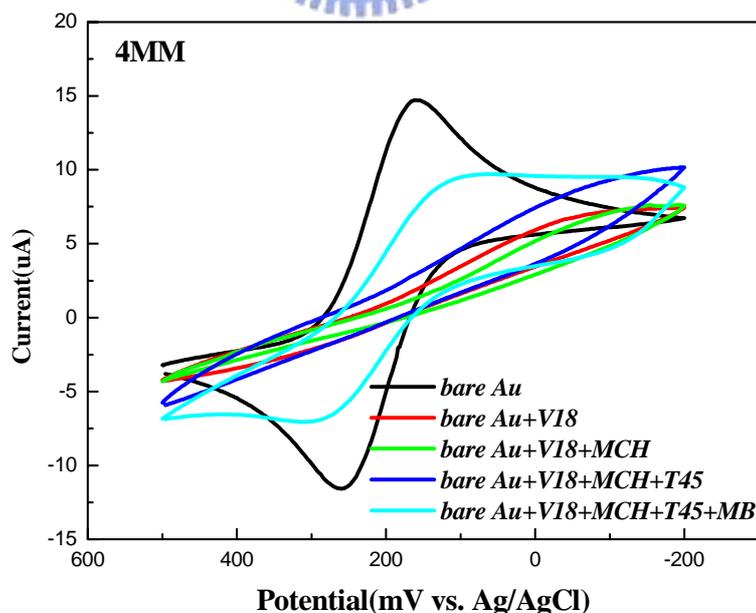


圖4-20為亞甲基藍插入在 4 Mismatch DNA之循環伏安圖
($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-6-3 6 mismatch DNA之電化學測試

由圖4-21中先觀察金電極分離波峰電位(peak potentials)為107伏特($\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 264 - 157$)，符合 $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{-3} + e^- \rightarrow \text{Fe}(\text{CN}_6)^{-4}$ 需要60至120伏特，這代表電極表面上是乾淨且是可逆的。伏安圖呈現與圖4-18相同之狀況(沿紅跟綠線在圖中)，其中V18/MCH+T6電流值卻比V18/MCH電流值來的明顯些，原因猜測當單純只有V18股時，DNA會因本身構型捲曲成一團，或更大一團，加上MCH去佔據單股間空隙時，當進行雙股間雜交結合而使雙股DNA站立，並裸露出些許金電極，而造成V18/MCH+T6電流值比V18/MCH電流值來的大一些。



在V18/MCH+T6+MB實驗中，我們可發現一個非常有趣現象，因V18/MCH+T6是6 mismatch的型態，故雜交比例應當會大大下降，但如何說明雜交比例降多低，因為在V18/MCH+T6+MB其還原峰值電流值不明確，不能比較其相對雜交率。尤其在分離波峰電位相較下，V18/MCH+T6+MB (超過300mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 317 + 26$]) 比V18/MCH+T45 +MB (209mV [$\Delta\phi_p = \phi_{\alpha,p} - \phi_{c,p} = 301 - 92$]) 更加不可逆；並在氧化還原電流值而言，在加入嵌入劑(MB)之後，氧化及還原電流值並沒有增大現象。上述電位差說明較V18/MCH+T45+MB更加不可逆反應且加入MB電流值與原來雙股電流值相較下並沒有放大效果。結果我們可猜測出雖有MCH能使雜交率提高並使MB有效放大其

訊號，但是隨mismatch越多應會大量降低雜交比例，並會影響雙股DNA結構更加不完全，嚴重影響亞甲基藍插入在DNA鹼基對中的量，而幾乎沒有放大訊號。

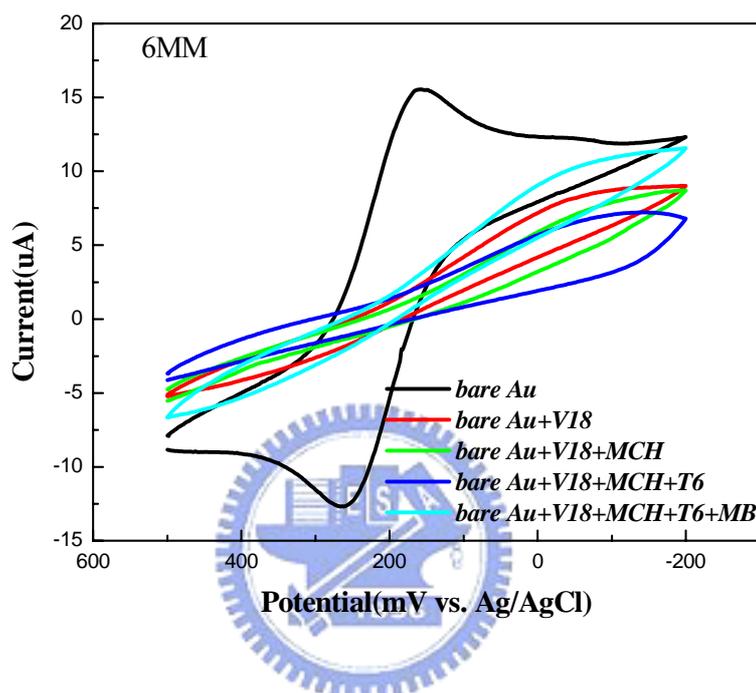


圖4-21為亞甲基藍插入在 6 Mismatch DNA之循環伏安圖
($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

4-6-4 完全不互補DNA之電化學測試

在本實驗中，主要為驗證當雜交股為完全不互補時，其電化學訊號應呈現跟V18時訊號一樣，因為理論上當雜交股在進行雜交完後，會被緩衝液給洗掉，只剩下原來單股DNA，但是在V18+T16訊號反而更不明顯原因為當T16股在進行雜交階段，會因氮-金鍵結而使雜交股鍵結於單股與金電極空隙之間上，而使訊號峰值降低。

而V18+T16+MB會放大原因可能為MB吸附在單股之hydrophobic處，而放大其訊號。

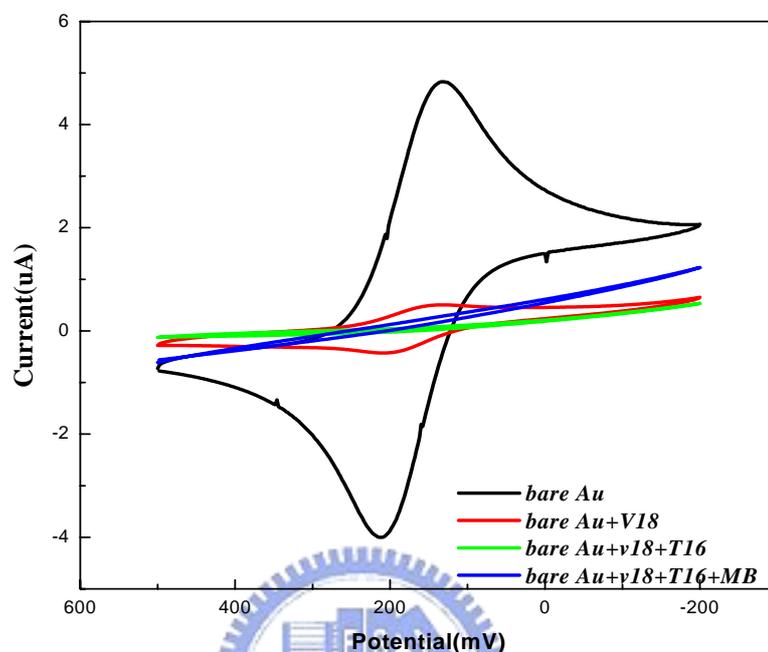


圖4-22為完全不互補DNA之循環伏安圖
($K_3Fe(CN)_6$ --5mM ; KNO_3 --100mM)

表4-2 Probe 16與Probe 18加入不同雜交股之可逆反應

(1)	Au	V16	V16+T16	V16+T16+MB
0MM	reversible	irreversible	quasi-reversible	reversible
3MM	reversible	irreversible	quasi-reversible	quasi-reversible
7MM	reversible	irreversible	irreversible	irreversible
(2)	Au	V18+MCH	V18+MCH+T18	V18+MCH+T18+MB
0MM	reversible	irreversible	quasi-reversible	reversible
4MM	reversible	irreversible	quasi-reversible	quasi-reversible
6MM	reversible	irreversible	irreversible	irreversible

4-7 利用接觸角測量在金電極上不同單/雙股之特性

由圖4-23中可看出當金電極表面上沒有DNA時，水跟金表面形成疏水性，其角度逼近90度。當單股DNA種在電極時間越長(約在24小時)，其角度會從85度降至30度左右，並可看出單股DNA約在種兩小時過後在角度上將沒有太大變化，可間接說明單股DNA在金電極表面上去的量約在兩小時達至短暫最大量，。

由圖4-24中可瞭解DI water對於雙股DNA之影響，在量測過程當中，我們可發現當金電極上覆蓋單股/雜交股DNA時，角度會從將近85度降至25度，代表意義為當DNA在金電極時會形成一層親水性DNA薄膜層；在之前每步驟都會用緩衝液清洗，但是在雙股DNA清洗過程當中，若是清洗緩衝液只有水，會把雜交股部分洗掉，是猜測因緩衝液沒有足夠正離子讓兩股DNA雜交，如果把清洗時間拉長，從角度變化來看，又從25度回復到跟單股一樣40度，可想像金電極表面最後只剩單股DNA存在。

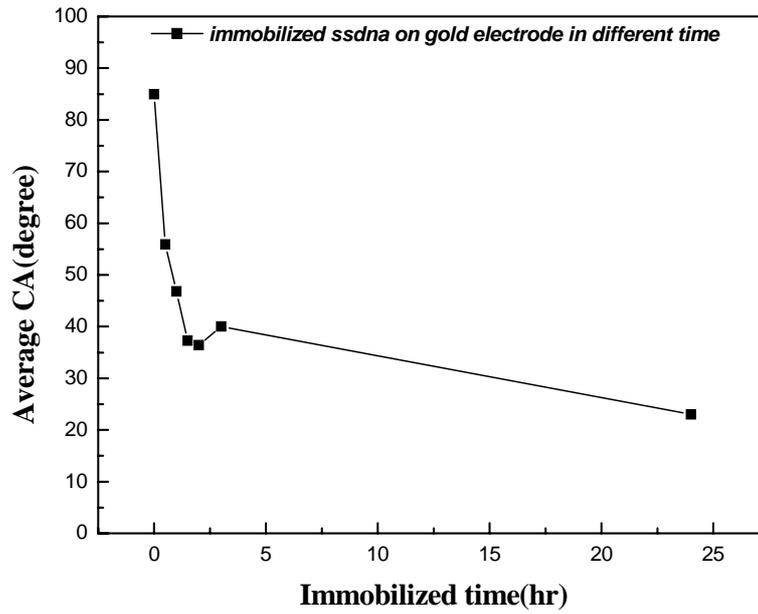


圖4-23為單股DNA隨種在金電極表面時間之角度變化

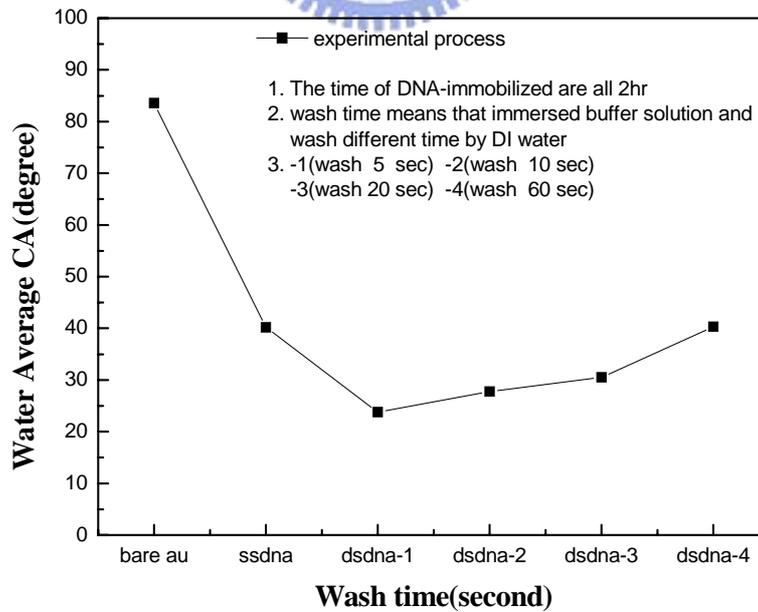


圖4-24為DI water對單/雙股之接觸角度之變化

4-8 利用石英晶體微量天平量測單/雙DNA間質量變化

在實驗中敘述出當DNA覆蓋在金電極中，最大影響是電化學氧化還原峰訊號被掩蓋掉，利用MB插入放大訊號來比較不同序列間訊號差，在下列實驗中，利用QCM量測微量單股與雜交股後重量上差別，加以佐證之前電化學實驗上數據。

4-8-1 V16+T16 DNA之微量天平圖

由下圖中可觀察出硫酸清洗過後金電極，其基頻 $F_{Au}=8975661$ ；當金電極上覆蓋V16時，可發現頻率下降約190赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8975848-8975661$)，代表意義是V16股鍵結於金電極表面上，而使電極震盪頻率減緩，振盪頻率衰減值計算出V16在金電極的量約202.92 (ng)；當完全互補股進行雜交時，鹼基對靠氫鍵間(hydrogen-bonding)鍵結，可發現頻率再次下降170赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8975661-8975491$)，代表雜交股種上去的量約在181.56 (ng)，而雜交率粗估約90% [$F_{T16}-F_{V16}/F_{V16}-F_{Au}=170/190(\text{Hz}/\text{Hz})$]。

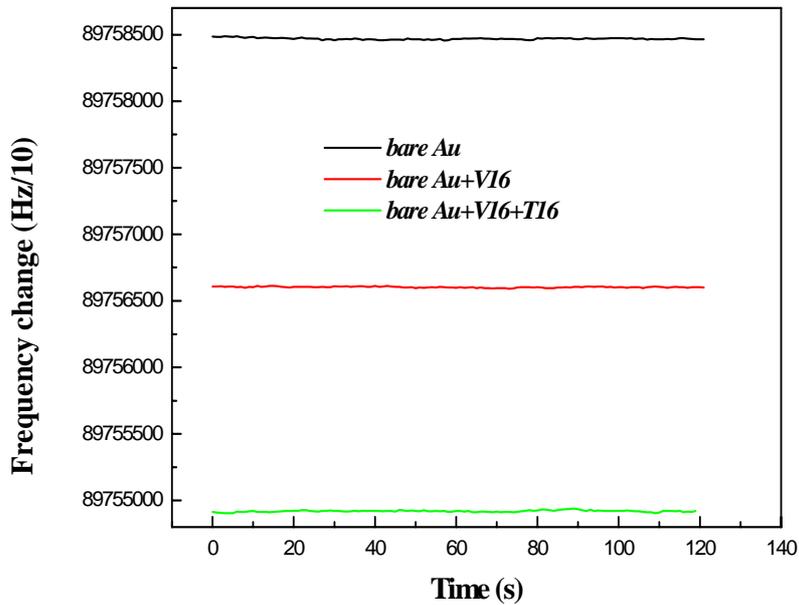


圖4-25為bare Au+V16+T16之頻率變化圖



4-8-2 V16+ T6 DNA之微量天平圖

由下圖中看出硫酸清洗過後金電極，其基頻 $F_{Au}=8965894$ ；當金電極上有覆蓋V16時，可發現頻率下降約127赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8966021-8965894$)，代表意義是V16股鍵結於金電極表面上，而使電極震盪頻率減緩，振盪頻率衰減值計算出V16在金電極的量約135.64(ng)；當有3mismatch之T6進行雜交時，可發現頻率只下降66赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8965894-8965828$)，代表種上去的量約在70.488 (ng)，而雜交率降低至約52% [$F_{T6}-F_{V16}/F_{V16}-F_{Au}=66/127(\text{Hz}/\text{Hz})$]。

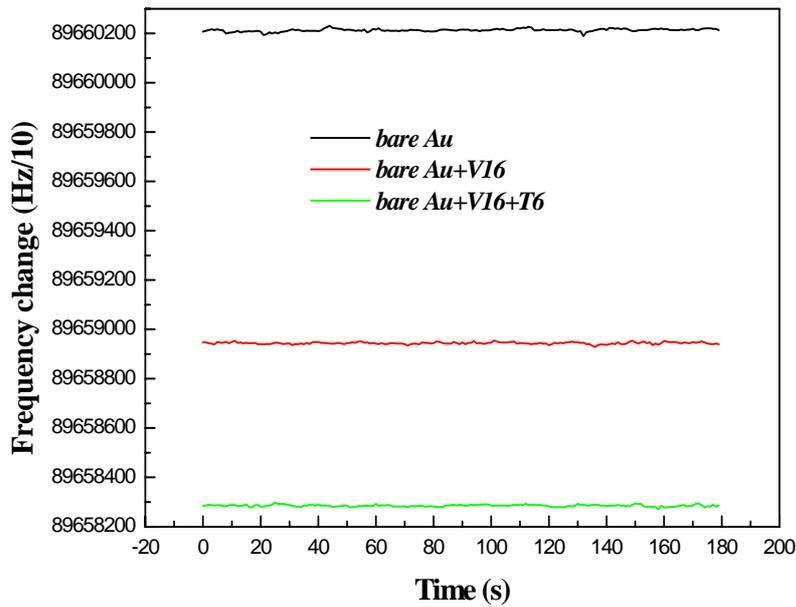


圖4-26為bare Au+V16+T6之頻率變化圖



4-8-3 V16+^{*}T16 DNA之微量天平圖

由下圖中可看出硫酸清洗過後金電極，其基頻 $F_{Au}=8978756$ ；當金電極上有覆蓋V16時，可發現頻率下降約97赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8978853-8978756$)，代表意義是V16股鍵結於金電極表面上，而使電極震盪頻率減緩，振盪頻率衰減值計算出V16在金電極的量約103.6(ng)；當完全不互補之^{*}T16進行雜交時，可發現頻率才下降4赫茲($F_{V16}-F_{Au}=8978752-8978756$)，代表^{*}T16種上去的量約在4.272(ng)，而雜交率粗略不到5% [$F_{*T16}-F_{V16}/F_{V16}-F_{Au}=4/97(\text{Hz}/\text{Hz})$]。

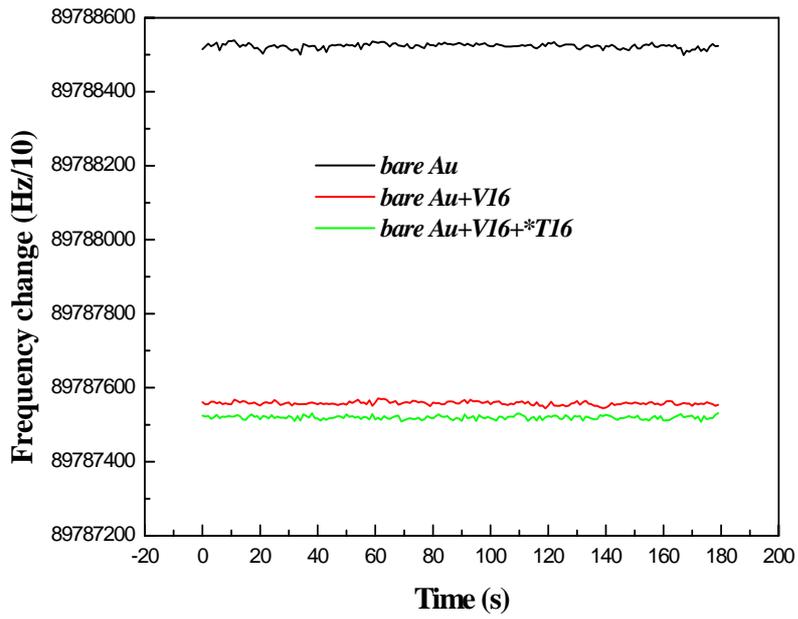
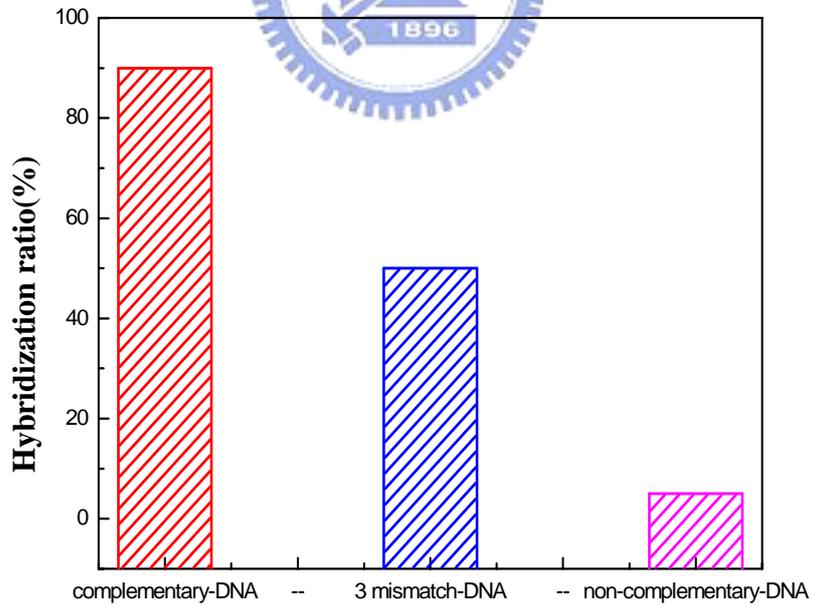


圖 4-27 為 bare Au+V16+*T16 之頻率變化圖



第五章 結論

1. S 與 Au 共價鍵結，最主要決定 S 鍵結在金電極表面上的因素是金電極表面的潔淨度，潔淨度愈高則鍵結密度愈高；相反的，潔淨度愈低則鍵結密度愈低。
2. 緩衝液濃度配置與電解質濃度皆會影響 DNA 在金電極表面之 $Fe(CN)_6^{-3}$ 的氧化還原的峰電流與峰電位。
3. 單股 DNA 無法傳輸電子，但可靠靜電力吸附 MB 放大其電子訊號；完全互補的雙股 DNA 不可傳輸電子，但未達可逆反應，需加入 MB 後，才可經 DNA 鹼基對傳輸電子給 $Fe(CN)_6^{-3}$ 做可逆反應；若序列有 mismatch 的雙股 DNA，則電荷傳輸效果會大大降低。
4. 在完全互補系統中，加入 MCH 後，可使兩股雜交率由 93% 至 100%，可證明 MCH 有助於提高雜交率；在三跟四個 mismatch 系統中，其雜交率達 60% 左右；在六跟七 mismatch 系統中，因其還原峰不能判斷，故雜交率不易判之，在完全不互補系統中，雜交率更不易判斷。。

5. MB^+ 很容易接在 DNA film 上，用 MB^+ 來做 intercalator，可以促進雙股 DNA 的電子傳輸。
6. 電化學整體量測流程總共需花七之八小時便完成，比一般病毒檢測縮短一半時間以上。
7. 由 Probe 16 與 Probe 18 兩種序列得知，可推測當錯位超過 6 個以上，其反應為完全不可逆；但介於 0 至 4 錯位，其反應式為半-可逆反應；而 0 錯位則是屬於完全可逆反應。



參考文獻

- [1] Clark Jr L. C., Lyons C., “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45, 1962.
- [2] Danielsson B., Mosbach K., Oxford University Press: New York. 1989.
- [3] Sternesjo A., “Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay”, *Analytical Chemistry*, 226, 175-181, 1995.
- [4] Shunzo S., Yasushi O., Hisashi T., Hiroshi K., Katsuhiko N., “Conducting polymer films of cross-linked structure and their QCM analysis”, *Electrochimica Acta*, 45, 3813–3821, 2000.
- [5] Zhang J., Bao L., Yao S., Wei W., “A series piezoelectric quartz crystal microbial sensing technique used for biochemical oxygen demand assay in environmental monitoring”, *Microchemical Journal*, 62, 405-412, 1999.
- [6] Barisci J. N., Wallace G. G., Baughman R. H., “Electrochemical quartz crystal microbalance studies of single-wall carbon nanotubes in aqueous and non-aqueous solutions”, *Electrochimica Acta*, 46, 509-517, 2000.
- [7] Keita B., Nadjo L., Belanger D., Wilde C. P., Hilaire M., “Electrochemical quartz crystal microbalance: evidence for the adsorption of heteropoly and isopoly anions on gold electrodes”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 384, 155-169, 1995.
- [8] Serge C., “Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically poly-merized films”, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 443-456, 1999.
- [9] Arben M. I., Esteve F., Salvador A., “Consolidated biocomposite membrane technology for production of potentiometric Biosensors”, *Sensors and Actuators B*, 60, 97-105, 1999.
- [10] Linda A. T., Keeley D. K., George P. A., Frances S. L., “Quantitating

Staphylococcal Enterotoxin B in Diverse Media Using a Portable Fiber-Optic Biosensor”, Analytical Biochemistry, 233, 50-57, 1996.

[11] Ma R. P. O., Hämäläinen M., Danielson U. H., “Kinetic Analysis of the Interaction between HIV-1 Protease and Inhibitors Using Optical Biosensor Technology”, Analytical Biochemistry, 279, 71-78, 2000.

[12] Weetall H. H., “Biosensor technology” Biosensors and Bioelectronics, 11, 1-4, 1996.

[13] A. J. Bard and L. R. Faulkner, “Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications ”, John Wiley & Sons, Singapore ,1980.

[14] D. Pletcher, “A First Course in Electrode Processes”, The Electrochemical Consultancy, England, 1991.

[15] D. R. Crow, “Principles and Applications of Electrochemistry”, 2nd Ed. Chapman and Hall Ltd. London , 1979.

[16] D. Pletcher and F. C. Walsh, “Industrial Electrochemistry”, Chapman and Hall Ltd. N. Y , 1990.

[17] H. Wendt, “Electrocatalysis in Organic Electrochemistry”, Electrochim. Acta, 29, 1513 , 1984.

[18] Reza Karimi Shervedani and Andrzej Lasia “Studies of the Hydrogen Evolution Reaction on Ni-P Electrodes,” J. Electrochem. Soc., 144, 511, 1997.

[19] A. M. Couper, D. Pletcher, and F. C. Walsh, Chem. Rev., 90, 837, 1990.

[20] S. Trasatti, “Physical Electrochemistry of Ceramic Oxides”, Electrochim. Acta, 36, 225 , 1991.

[21] C. H. Hamann , A. Hamnett , W. Viestich , Electrochemistry , Wiley-VCH, New York , 1998.

[22] 萬其超，電化學，台灣商務印書館，台北，1996.

- [23] D.K.Gosser, "Cyclic Voltammetry-Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms" ,VCH New York ,1993
- [24] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications* 2nd ed , John Wiley and Sons , New York ,2001.
- [25] F. Scholz, *Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications* , Springer, Berlin, 2002.
- [26] J. Wang, *Analytical Electrochemistry* 2nd ed, Wiley-VCH, New York, 2000.
- [27] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd, John Wiley & Sons, Inc., New York, Chap. 10, 2001.
- [28] R.R.Dalangin;H.Gunasingham,*Anal.Chim.Acta*,291,81, 1994
- [29] T.Ederth; P.Claesson; B.Liedberg,*Langmuir*,14,4782, 1998
- [30] G.B.Signal, M.Mrksich; G.M.Whitesides, *Langmuir*,13,2749, 1997
- [31] P.E.Laibinis; M.A.Fox; J.P.Folkers; G.M.Whitesides, *Langmuir*, 7, 3167 , 1991
- [32] T.Miwa; L.T.Jin; A.Mizuike, *Anal.Chim.Acta*,160,135, 1984
- [33] R.Ahamad; J.Barek; A.R.Yusoff; S.M.Sinaga; J.Zima, *Electroanalysis* 12,1220 , 2000
- [34] Tonya M. Herne;Michael T. Tarlov,*J. Am.. Chem. Soc.* 119, 8916-8920,1997
- [35] Eley, D. D., Spivey, D. I. *Trans. Faraday Soc.*1962, 58, 411-415.
- [36] Christopher R. Treadway, Michael G. Hill, Jacqueline K. Barton *Chemical Physics* 2002, 281, 409-428.
- [37] Carpena, P., P. Bernaola-Galvan, P. Ch. Ivanov, H. E. Stanley, *Nature (London)* 2002, 418, 955

- [38] L. Kittler, J. Lober, F.A. Gollmick, H. Berg, J. Electroanal. Chem. 1980, 116, 503.
- [39] <http://www-scf.usc.edu/~chem203/resources/DNA/>
- [40] Brauns, E. B., Madaras, M. L., Coleman, R. S., Murphy, C. J., Berg, M. A. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 11 644-11 649.
- [41] Schuerman, G. S., Van Meervelt, L. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 232-240.
- [42] Kelley, S. O.; Holmlin, E., Stemp, E. D. A., Barton, J. K. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 9861-9870.
- [43] Kelley, S. O., Barton, J. K. Chem. Biol. 1998, 5, 413-425.
- [44] Christopher R. Treadway, Michael G. Hill, Jacqueline K. Barton Chemical Physics 2002, 281, 409-428.
- [45] The quest for high-conductance DNA, Reviews of modern physics,76,January 2004
- [46] Koradi, R., M. Billeter, K. Wuthrich, J. Mol. Graphics 1996, 14, 51.
- [47] Marcus, R.A., Sutin, N. (1985) Biochem. Biophys. Acta 811, 265-322.
- [48] Bixon, M., Giese, B., Wessely, S., Langenbacher, T., Michel-Beyerle, M.E., Jortner, J. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11713-11716.
- [49] Giese, B., Amaudrut ,J., Kohler, A.K., Spormann, M., Wessely, S. (2001) Nature 412, 318-320.
- [50] Williams, T.T., Odom, D.T., Barton, J.K. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122, 9048-9049.
- [51] Nunez, M.E., Hall, D.B., Barton, J.K. (1999) Chem. Biol. 6, 85-97.
- [52] Vipin Bhagat, Migran Nersissian, Weidong Wang, and Michael G. Hill, Langmuir(2003) 19, 9255-9259

- [53] Tonya M. Herne* and Michael J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* (1997) 119, 8916-8920
- [54] Nuzzo, R. G., Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 4881.
- [55] Bell, C. M., Yang, H. C., Mallouk, T. M. *Adv. Chem. Ser.* 1995, 245, 221.
- [56] Hayashi, T., Morikawa, Y., Nozoye, H. *J. Chem. Phys.* 2001, 114, 7615.
- [57] Gottschalck, J., Hammer, B. *J. Chem. Phys.* 2002, 116, 784.
- [58] Gronbeck, H., Curioni, A., Andreoni, W. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 3839.
- [59] Poirier, G. E. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1117.
- [60] Rodriguez, J. A., Dvorak, J., Jirsak, T., Liu, G., Hrbek, J., Aray, Y., González, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 276.
- [61] Somorjai, G. A. "Chemistry in Two Dimensions-Surface"; Cornell University Press: Ithaca, N. Y. 1982.
- [62] Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3559-3568.
- [63] Nuzzo, R. G., Fosco, F. A., Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2358-2368.
- [64] Strong, L., Whitesides, G. M. *Langmuir* 1988, 4, 546-558.
- [65] Allara, D. L., Nuzzo, R. G. *Langmuir* 1985, 1, 45-52
- [66] Troughton, E. B., Bain, C. D., Whitesides, G. M., Allara, D. L., Porter, M. D. *Langmuir* 1988, 4, 365-385.
- [67] Laibinis, P. E., Whitesides, G. M., Tao, Yu-Tai., Parikh, N., Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 7152-7167.
- [68] Ulman, A. "Self-Assembled Monolayers of Thiol Thin Films", Academic Press: San Diego, 1998.

- [69] Rastislav Levicky , Tonya M. Herne, Michael J. Tarlov , and Sushil K. Satija *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, No. 38, 1998
- [70] Ardizzone, S., G. Gabrielli, and P. Lazzari. *Colloids Surfaces*, 1993, 76, 149-157.
- [71] Froix, M.F., R. Nelson. *Macromolecules*, 1975, 8, 726-730.
- [72] Barton, S.S. *Carbon*, 1987, 25, 343-350.
- [73] Ronald A. Shelden, Walter R. Caseri, Ulrich W. Suter, *Journal of colloid and interface*, 1993, 157, 318-327,
- [74] Pham Thi Hang, G. W. Brindley, *Clays and caly mineral* , 1970, 18, 203-212
- [75] G. W. Brindley , T. D. Thompson, *Israel Journal of Chemistry.*, 1970, 8, 409-415
- [76] Miguel G. Neumann, Fergus Gessner, Carla C. Schmitt, Rogerio Sartori, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 255, 254-259

