

第一章 緒論

1.1 前言

瞭解DNA密碼不僅可以得知人類遺傳的精確過程，還可以追蹤遺傳疾病、瞭解腫瘤成因、研製高效藥物、發展新型療法，並可衍生出許許多多對於生物醫學研究非常有用的知識與工具。傳統分析DNA的辦法是利用PCR製作出特定序列區域的DNA進行凝膠電泳，將不同長度的DNA片段分離，製成「DNA指紋」(DNA fingerprint)，再利用比對的方式找出樣本間的差異，推測某些DNA片段所攜帶的遺傳訊息。雖然使用PCR的電泳所觀察的結果簡單和有效，但電泳並不能確定被放大的目標DNA序列是與預期觀測的DNA序列完全相同。而且，ethidium bromide是一種致癌物質。



而DNA探針是除凝膠電泳之外的另一種選擇，它被廣泛用于特定DNA順序的分析。基於在A、G、C、T四種核酸當中，A只會與T結合，G只會與C結合這個特性，可以合成或遴選已知的單股序列當成「DNA探針」(DNA probe，即固定一段oligo nucleotide順序使其能與檢測的DNA序列股雜交於溶解狀態中)，將未知並且混有多種單股DNA片段的溶液與DNA探針混合。利用DNA探針的精確選擇性，篩檢出與探針互補的DNA片段。藉由篩檢結果，就可以判斷未知溶液中是否含有DNA探針所界定的互補DNA片段。這個過程被稱為DNA的「雜交」(hybridization)。

在其他情況裡，探針通常用一種放射性同位素，通常是 P^{32} 或者一個螢光的物質做標籤 (label)。這種方法需要很長的時間，且只能藉由比對獲取零碎的資訊，雖然是很有用的方式，但對於未來需要快速、高效

率操作的生物資訊學與生物工程學，太過曠日廢時。此外，利用不需另外做標籤的方法作生物分子之檢測，也可以避免生物分子在進行標記時產生無法避免的生物分子結構破壞。

因此，生物科技技術把興趣放在不要需要使用標籤雜交的分析方式例如：表面電漿共振,光纖,電化學以及壓電的設備¹²³⁴⁵⁶⁷⁸⁹¹⁰。本文即是選擇壓電材料中的石英做為壓電感測器的材料。

1.2 研究動機與目的

製作壓電震盪器的材料有很多種類，選擇石英 (quartz) 主要是因為它具有高品質因數 Q 值和非常穩定之諧振頻率，故常常被製成各種形式的感測器與致動器。石英震盪器之諧振頻率與震盪器之結構有直接之關係，但石英質地硬脆不易加工的問題，限制了傳統加工在石英震盪器結構上微小化的發展。此外，一般應用石英晶體微天平法做檢測通常只是單一晶片作單一分子之檢測，若能將多種不同的DNA探針植在以陣列方式分佈的晶片上，再將晶片置入特別設計的偵測系統讀取頻率改變的情形，即可快速判斷待測溶液中含有何種DNA序列。依探針種類數目多寡，可以同時篩檢數千到數萬種不同的DNA序列，並且整個檢測過程所需時間只要幾分鐘，獲得的資訊量卻是傳統方法的千倍萬倍，對於醫療與研究都是非常強大的工具。

1.3 生物感測器

1.3.1 生物感測器的簡介

一般臨床檢驗中待測試樣均含有多種物質，若欲偵測特定物種，就必須藉專一性反應才会有比較明顯的效果，而生物感測器便符合這個需求。所謂生物感測器是利用生物元件所具備的專一性作為分析工具，再配合電子技術組成各種檢測系統。一般生物感測器是由生物元件、換能器、訊號處理器三大部分所組成構成：

(A) 生物元件 (Biological Component)：

生物感測器利用此部份和待測物直接接觸而產生反應，因此生物元件可以利用對待測物的特異性(specificity)來增加感測器的選擇性(selectivity)和靈敏度(sensitivity)。一般的生物元件大多利用生體組織、微生物、胞器、細胞受體、生物的模仿物(bio-mimic intimately)、酵素、抗原、抗體、組織、等生化物質來偵測待測物種的存在，而其中免疫感測器的生物元件則為抗原或抗體，其固定方式可以採填充管柱，或是直接塗覆在感測器上的方式。

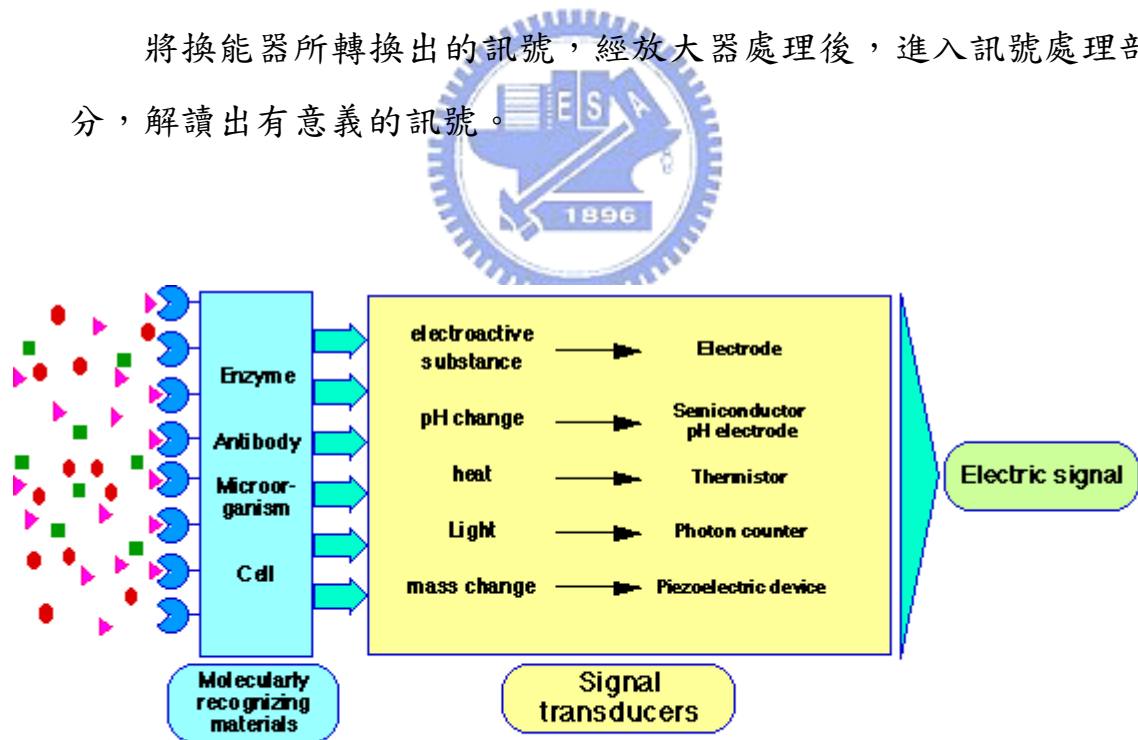
(B) 換能器 (Transducer)：

此部份將生物元件和待測物質反應後物理量或化學量的改變，轉換成電子訊號。因其所依據物理或化學原理的不同，分為光學(optic)、質量感應(mass-sensitive)、熱化學(thermal)、電化學(electrochemical)、磁感應(magnetic)等。例如在酵素標記型免疫感測

器中，酵素與受質的反應除了具高度的選擇性外，於反應過程中會產生如熱、酸鹼值、吸收光或其他化學物質等等的變化，若以適當的換能器（如熱偶計、電極、光子計數器等）將這些變化轉換成電流訊號，便可藉由紀錄器供我們判斷而了解待測分析物的特性及濃度。例如：本實驗中所使用的石英晶體微天平(QCM)，利用塗附在石英表面上的生物元件（單股DNA），對待測分子（目標DNA）的吸附，引起石英晶體的表面重量改變，引起石英晶體的頻率改變，可以間接量測待測物質的濃度。

(C) 訊號處理器 (Signal Processor) :

將換能器所轉換出的訊號，經放大器處理後，進入訊號處理部分，解讀出有意義的訊號。



Principle of Biosensors

圖 1-1 生物感測器之結構及其反應過程示意圖¹¹

1.3.2 壓電晶體生物感測器 (Piezoelectric crystal biosensor)

為質量式生物感測器，利用壓電晶體的基礎頻率會因為晶體表面上的質量變化，而有所改變的特性，以此作為偵測的依據，除了原理簡單外，其操作方便、成本低廉又具有即時應答等優點，但是在液相檢測時，靈敏度會降低，且易受非特異性鍵結的干擾。信號換能器必須具有高靈敏性、雜訊小、偵測範圍大及反應時間短等特性，圖1-2 分別針對不同換能器的生物感測器之檢測範圍做比較，由圖1-2 可看出壓電晶體生物感測器的檢測範圍最大且最靈敏，故在本研究中選擇壓電晶體生物感測器作為我們研究的重點。



表 1-1 依轉換器之不同對生物感測器的分類¹²

Transduction system	Measurement
Electrochemical	Amperometry (current at fixed voltage) Potentiometry (voltage at zero current)
Electrical	Conductivity
Optical	Luminescence Fluorescence Refractive index
Thermal	Calorimetry
Piezoelectric	Mass – quartz crystal microbalances – surface acoustic waves

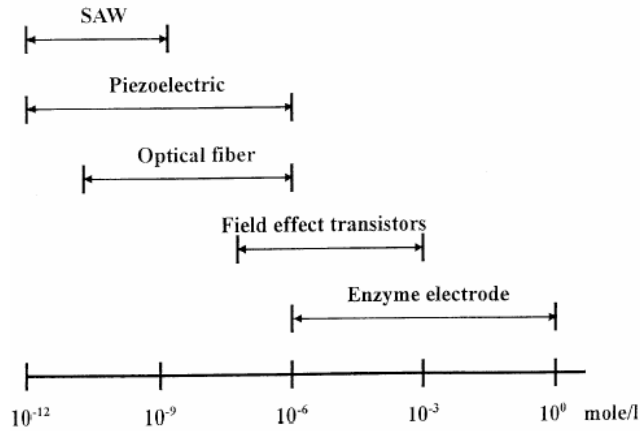
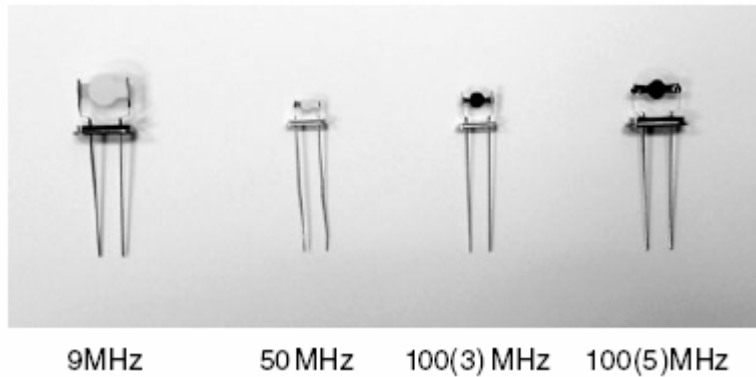


圖 1-2 各種生物感測器偵測範圍之比較¹³

1.4 石英晶體微天平法(Quartz Crystal Microbalance, QCM)簡介及應用

壓電晶體是近年來才被引用到生物感測器的轉換器使用，其原理因為與晶體表面吸附物質質量有關，其晶體材料又以石英為主，故又可稱為石英晶體微量天平 (quartz crystal microbalance; QCM)。早期的壓電晶體感測器，用在測定空氣污染物質，其使用在電極表面具有功能的包覆材料大多為非生物性物質 (abiotics)，直到 Guilbault 在 1982 年首先發表將 formaldehyde dehydrogenase 與輔因子 (cofactor) 固定在電極表面來測定空氣中甲醛的成分，才開始引起生化界的重視。壓電晶體生物感測器主要是由電子震盪電路、計頻器及生物感測元件的壓電晶體所組成，典型的壓電石英晶體構造如圖 1-3 所示。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)，使晶體內部因壓電效應而產生一機械性振盪，如果石英板的厚度一定，此機械性振盪為一固定頻率，此時利用適當的電子振盪電路，即可將其共振頻率 (resonant frequency) 測定出來。

(a)



(b)

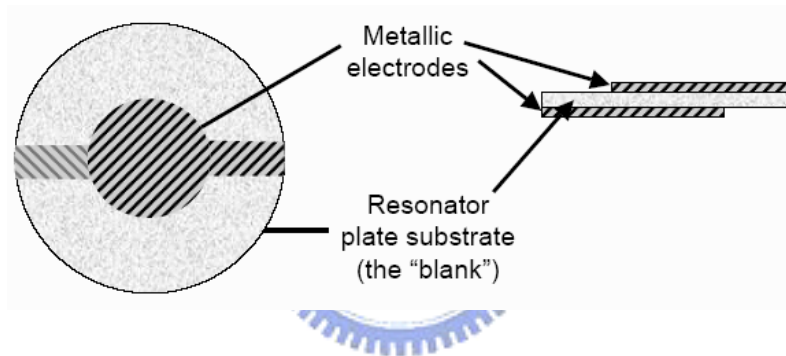


圖 1-3 壓電石英晶體示意圖：

(a) 市售壓電石英晶體；(b) 石英晶體通常為兩片金屬電極將石英板如三明治般的夾住所構成。

一般不管是氣體壓電感測系統或是液體壓電感測系統，若依樣品的流動性來區分，一般區分為靜態式(satatic system)和動相(flow system)壓電感測系統，其結構示意圖，如下圖1-4、圖1-5所示。

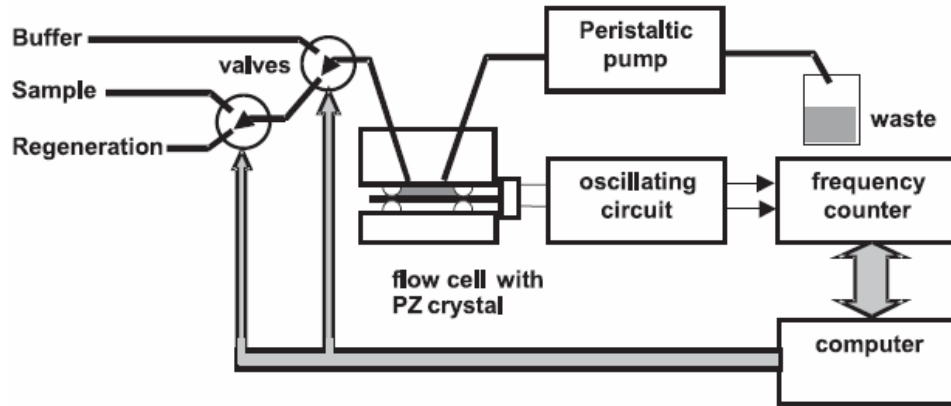


圖 1-4 動相液體壓電感測器¹⁴

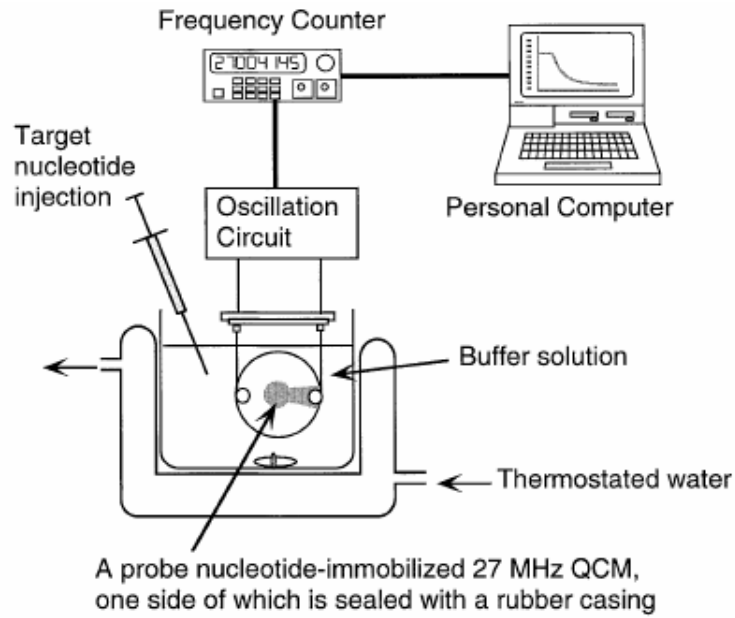


圖 1-5 靜相液體壓電感測器¹⁵

生物壓電感測器主要是用來專門偵測生物醫學樣品的壓電裝置，常用的技術有三種：

1. 晶體表面修飾直接吸附法

即利用壓電晶體表面修飾(如雙硫衍生物)直接吸附待測生物物質。

2. 免疫吸附法

利用抗體作為晶體吸附物，並用來偵測這個抗體的相對應的抗原。

3. 酵素反應吸附法

可將生化樣品經由酵素催化後產生產物，利用壓電晶體吸附及偵測此產物，可間接檢測樣品中的待測生物醫學生化樣品。

由於QCM不需藉由標定物，如酵素、放射線的標定，即可得知分子間作用力變化之資訊，具有高靈敏度、反應快速、即時檢測等多項優點。包括抗體-抗原、酵素-受體、激素-受體、核酸-核酸等生物親和反應所進行的檢測，均可依分析物的不同，在石英晶體的電極表面上固定不同的感測分子。

因此，欲選擇性地檢測某一特定分析物時，僅需在石英晶體的電極表面上修飾一層具有特異性的感測分子薄膜，爾後將此感測晶片置於含有分析物的測試環境中，使分析物親和性地吸附於感測電極上，再由吸附後晶體之震盪頻率衰減值即可推知感測分子對分析物親和力大小，典型的感測曲線如圖 1-6、1-7^{16,17}所示。

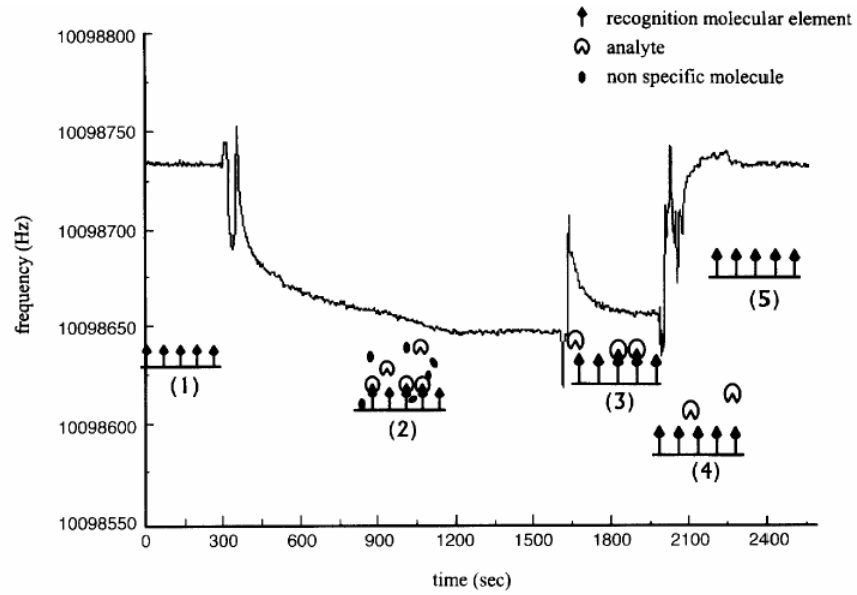


圖 1-6 典型感測曲線示意圖：

- (1) Immobilization of antibody on chip surface
- (2) Injection of analyte
- (3) Binding of analyte with antibody
- (4) Regeneration of the antibody on chip surface
- (5) Reuse of the antibody on chip surface

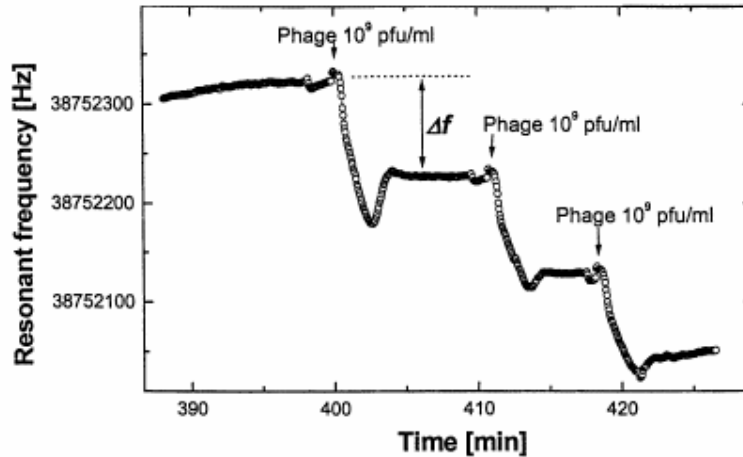


圖 1-7 實際感測感測曲線圖：

石英震盪器的頻率隨著吸附在電極表面的感測物增加而減小

1.5 研究方法與架構

本文共討論以下問題，第一、針對製程中，石英在濕式以及乾式蝕刻上之條件及結果分析，期能找到最佳化之石英蝕刻條件；第二、考慮結構變化效應，以震盪器電極些許變化對自然基頻頻率變化的分析；第三、考慮電極形成陣列之條件下，對微陣列震盪器進行分析並與單一結構震盪器條件結果互相比較；最後、則提出一套初步設計石英振盪器之程序與探討製程中每個步驟影響。