

第一章 緒論

1.1 基因檢測學起源

”基因”——這個名詞是在 1909 年首先由丹麥遺傳學家 G. Johansen 提出的，其原意是用以描述生物體某個特別性狀的抽象術語。然而，隨著近代生命科學新知的快速演展，”基因”，這個抽象符碼也就不斷地被賦予更實切的科學意涵。五 0 年代後，基因的相關研究開始有了突破性的進展。A. Hershey 和 M. Chase 證實了 DNA 負責攜帶遺傳訊息，而 J. D. Watson 與 F. H. Crick 也藉由 X-ray 繞射技術確定了 DNA 的雙螺旋結構，以及鹼基成對互補的法則^[1]，其相關資料請參考附錄一。

直到 1957 年，Francis Crick 發表了基因學說並闡述了基因是如何製造蛋白質原則後，才讓人們更清楚地瞭解到生物的遺傳、發育、生長等功能均是由基因所掌控，而先天性的遺傳疾病也是由於基因的序列發生變異所導致。由於基因是利用鹼基成對互補的法則來精確地傳遞遺傳訊息，因此基於這項不變的法則，只要透過已知序列的單股 DNA 探針 (probe)，我們就能夠藉由基因雜交 (hybridization) 來搜尋與它互補的另一股 DNA 序列，而這項基本原理如今廣泛地運用在基因檢測與基因定序上。

1.2 基因晶片的發展歷程

八 0 年代伊始，研究學者提出了微小化生物晶片的概念。有鑑於當時基因分析與定序對生命科學研究之重要性，美國史丹佛大學在國家衛生研究院的資助下，著手進行基因晶片的研發。他們將含有各種不同的單股 DNA 序列探針點在一小片濾紙上，當一股 DNA 序列探針與另外一股互補的 DNA 序列標靶雜交 (hybridization) 時會有很強的結合力。因此，利用濾紙上已知序列或已知功能的 DNA 探針，即可偵測檢體中未知的 DNA 標靶，此種方法開創了最早的微陣列基因晶片應用技術。

傳統的基因雜交研究，是將一群未知的 DNA 標靶 (target) 置放在薄膜上，而在雜交反應袋中與之反應的標記 DNA 序列是已知的，我們稱為探針 (probe)。如此，一個雜交實驗只能做一種探針，而探針一次只能研究一種基因。如果要研究多種探針，只能逐項進行，不但極為花費時間，而且也無法深入地探討牽涉到多種基因交互作用的機制。然而反式墨點法 (reverse dot plot) 卻逆其道而行。它是將 DNA 探針全部點在薄膜上，每一點都是不同種的 DNA 探針，並且都是已知序列或功能的基因，並接著與經過標記的 DNA 標靶進行雜交，標靶可以是一種或多種，可以是已知

或未知。如此，一次實驗可以同時研究多種 DNA 標靶。而這種反式的雜交法也就是基因晶片的前身。

然而，如果需要得到更多關於基因所透露的資訊，那就必須置放更多不同種類的探針。這就表示需要使用更大的晶片面積與浪費更多的 DNA 原料。綜而觀之，解決之道惟有將探針陣列儘可能地縮小。然而，以八〇年代當時的工業水準仍然還無法達成這項要求。直到 1994 年，Affymax 公司的 Fodor 等人在玻璃基版上以半導體技術原位 (*in situ*) 合成寡核苷酸 (較短的基因序列，約 15~25 個鹼基) 的微陣列，並成功地應用在雜交定序 (sequencing by hybridization, 簡稱 SBH) 及單鹼基複型序列 (single nucleotide polymorphism, 簡稱 SNP) 的檢測上，微陣列基因晶片的夢想才終於得以實現^[2]。隨後在 1995 年，史丹佛大學教授 P. Brown 則另外發明了利用機械手臂佈放 cDNA 序列的點陣法。因為點陣法所需要投入的研發成本非常低，技術門檻也不高，所以立即掀起了一股發展基因晶片的熱潮。基因晶片產品以及隨此概念而衍生的各式生物晶片，其種類也益趨多樣化^[1]。

1.3 基因晶片的應用領域

現在，基因晶片技術已經成功地運用在遺傳基因疾病的研究上。基因晶片廠商 Affymatrix 更推出了 P53 基因的研究晶片組。根據研究，高達三成的癌症病患都是由於 P53 基因先天的缺陷或是變異，導致細胞無法製造正常的蛋白質來代謝而罹癌。如果 P53 基因異常，那麼罹患癌症的機率就比一般人更高。因此 P53 基因晶片的問世，無疑地為社會大眾提供了最佳的癌症篩驗工具，達到早期預防的目的。

另外，基因晶片也用在藥物研發上。利用其高密度的優點，大規模地找尋能夠阻止基因表現的藥物分子標靶。例如某些遺傳疾病是由於基因表現異常，而製造出錯誤的蛋白質，那麼這種基因藥物便能阻止基因繼續製造表現這種蛋白質以達到治療、減緩症狀的效果。有些基因學家也盼望在不久的未來，將能藉由基因治療修復異常的 DNA 達到完全治癒的目的。而不單只是醫藥研究，基因晶片甚至已經被廣泛地運用在商業資訊保密、歷史考證、犯罪檢驗、環境毒物監測等各個領域。相信還有更多創新的、未知的應用，在等待著我們去發掘。

1.4 基因晶片的概念

1.4.1 體外試驗 (*in vitro*)

迥然不同於過去古典遺傳學或是細胞遺傳學所建立的實驗方法，基因晶片應用的是分子遺傳學稱之為 *in vitro* 的研究概念。所謂的 *in vitro*（體外，或是試管內）是指將生物體內的各種生物有機分子（醣、脂質、DNA、蛋白質）或是代謝過程完全從細胞中分離出來，單獨地放在試管中進行分析、反應、研究、生長的一種研究方法。最為特別的是，在這樣的研究法中生物個體不再是研究對象，而是生物體內的生物分子或代謝反應，所有存在生命間的藩籬都消失了，這些從生物體中完全單獨分離出來的生物分子，被活生生地培養在試管內進行化學分析、結構解析、並探討其反應機制。也正因為如此，不同種的基因可以被遺傳學家從生物體內分離出來，並單獨進行其結構以及功能的探討。

1.4.2 固定化學

經過長時間的實驗經驗累積，現在的基因片段分析實驗都已經有非常制式的實驗步驟。然而，基因晶片最富革命性的概念主要是來自於它高通量（high throughput）以及平行化分析（parallel analysis）的能力，這樣的創見挑戰了過去在基因研究中制式的實驗方法。嚴格來說，基因晶片的實驗程序大部分仍舊是沿襲著傳統的步驟，但兩者最明顯的差異在於：基因晶片引進了固相載體（solid phase support）以及固定化學。首先，固相載體的發明，使得基因能夠牢牢地被固定（immobilization）在晶片表面上，而我們也因此能夠更容易地對基因進行觀察、分析、追蹤與研究。固定化學的技術可以確保這樣的固定狀態是非常堅固且穩定的，而且基因仍然保有生物分子原本的功能及活性。現代的精密科技加上定位技術（patterning）的發明，已經可以使得基因能夠像農作物一樣，有秩序且更大規模地被佈放在晶片表面的不同區域上，這樣的方式可以使得不同種的基因可以同時進行相同的生化操作，並同時觀察所有的反應結果。

其次，基因固定化學的存在性與必要性在於：基因分子在本質上並不會和晶片基板（substrate）產生化學反應而連結（attaching），也因此難以達成固定在晶片表面上的要求。而如果沒有將基因分子與晶片基板分別做修飾（modification）與表面處理來進行連結，實際上，基因只能靠著微弱的凡得瓦力吸附（adsorb）在晶片表面上。這樣弱的吸附力完全無法承受製造過程中不斷地重複進行的化學浸洗程序，以及產品在實際應用時必需進行的的雜交（hybridization）後清洗步驟，極容易造成探針基因序列脫附

(desorbs) 而流失，這樣便無法達到基因晶片原本該有的功能。由此可知，基因晶片的製備必須深入牽涉到基因固定化學的研究。因此，如何在晶片基板表面生長一層可黏附基因的連結分子 (linker)，使其可以非常堅固地將基因分子固定在晶片基板上又能維持其生物活性，乃是基因晶片最關鍵的製程。

Todd Strother 等人指出：雖然不斷有各種新式的基因固定連結分子不斷地被開發出來，然而它們的表現卻遠遠低於最佳化的理論值，且這些化學分子的特性通常也很差。而良好的固定基因表面應該具備如下特點：(1) 表面平坦度以及化學均質度；(2) 控制表面化學性質的能力，例如：極性、疏水性；(3) 可以進行基因雜交驗證 (形成雙股螺旋)；(4) 可控制基因表面密度；(5) 熱及化學穩定性；以及(6) 可重複生產以及良好的可重驗性。然而現在使用的表面化學處理技術多半只能符合其中少數幾項^[3]。

1.5 基因晶片面臨的瓶頸

隨著現代科技的腳步加快，各種晶片材料與基因的表面連結化學不斷地被發表出來。現在的技術已經可以達到在金屬、高分子薄膜材質上固定基因並製作高密度的微陣列 (microarray)。但由於玻璃的平坦性高、表面光滑、抗酸鹼能力強、具有光學透明性、背景雜訊低、價位低廉且容易取得，因此以玻璃為基材的基因晶片仍然是現在市場上的主流。

目前，常用於玻璃基材的連結分子幾乎都是矽烷分子。一般玻璃基材的表面經由將二氧化矽活化 (activate) 為矽醇基 (silanol groups) 後，便可以與具有三矽甲氧基或是三矽氯基的矽烷分子直接偶合 (coupling)，並形成高密度的網絡 (network) 可讓基因連結，以達到固定的效果^[4]。然而玻璃基板通常含有不定比例的鈉、鉀、鐵等雜質，二氧化矽的含量分佈也不均勻。另一方面，矽烷分子彼此之間的聚合效應 (polymerization effect) 也難以控制，聚合反應常會導致表面粗糙度 (surface roughness) 提高、網絡結構塌陷劣化^[5]。再者，操作環境下的水分子也會攻擊矽烷使其水解 (hydrolysis) 而斷裂脫離。因此以玻璃為基材的基因晶片來從事基因的研究時，即使重複相同的實驗過程與控制條件，每次得到的結果都不盡相同。基因晶片一直難以被市場接受的原因除了其價格昂貴外，重驗性 (repeatability)、均質性 (homogeneity)、以及可重製能力 (reproducibility) 不佳亦佔了絕大部分的因素，即使是技術熟稔的研究人員也常被前後不一致的實驗結果所困惑。許多的研究報告一致提出：表面固定技術的創新，穩定且可重驗的量化能力，是目前基因晶片乃至於所有的生物晶片能否帶來突破的契機^[6,7]。

近十年來不斷地研發更高階的半導體基因晶片製程，且執基因晶片技術之牛耳的領導廠商 Affymetrix 所擁有的先驅專利技術，即是在 5 吋方形石英基板 (quartz wafer) 上利用光導引的原位合成技術 (light-directed *in situ* synthesis)，製造長度達 25 個鹼基的寡核苷酸微陣列 (oligonucleotides microarray) [8]。石英基板的優點是無論在二氧化矽含量與均質性、表面平坦度上，都比玻璃更高，又具有自然形成的氫氧基 (native hydroxyl groups)，因此完全能與舊有的矽烷固定化學相容。此法雖然有效改善了重驗性差的缺點，然而石英價格非常昂貴，矽烷的聚合效應仍無法完全消除。

1.5 研究動機與目標

基因晶片的製造技術發展到目前為止，兩大對立陣營已經儼然成形。一是以史丹佛大學為首的機械點陣法，另一是 Affymetrix (Affymax 的母公司) 獨創的半導體合成法。點陣法的優點是成本低，主要用於製造 cDNA 晶片。然而密度不高 (5000 ~ 15,000 spots / cm²)、生產時間太長、用來盛裝不同 cDNA 原料的多孔盤又容易因為交互傳播污染而影響序列準確度；而半導體合成法的優點是超高的序列準確度 (~99%)、高效率且快速量產的能力、高密度的製造能力 (300,000 spots / cm²)、製造時程與微陣列密度無關。然而技術仍受限於無法製造太長的鹼基序列 (<25mer)，光罩的成本也同時隨著序列長度倍速上昇，加上半導體技術門檻高、製程繁複、專利陷阱遍佈，因此關於這方面的研究論文甚少見於各學術期刊上。

然而我們可以預見的是：在未來基因快速定序，基因資訊越趨於明朗化的時代，將整段 cDNA 固定在晶片上的技術將會逐漸沒落，而經過電腦演算驗證且鹼基序列長度約 15~50mer 的寡核苷酸微陣列晶片勢必取而代之，並大量地運用在基因檢測及學術研究上。若能結合微實驗感測晶片、無線通訊網路、行動運算科技，基因晶片將更能夠深入醫院與家庭大眾，形成醫療預防網體系極重要的一環。

因此，我們提出了一項嶄新的構想，即是以製造積體電路元件的矽晶圓 (silicon wafer) 為基因晶片基板，本實驗主要的工作是在矽晶基板表面研發一層連結分子，接著再進行鹼基合成寡核苷酸序列，並逐項地分析晶片表面的物理與化學特性以探討其可行性。假如分析的結果驗證這個構想確實是可行的，則在未來則可以更進一步地運用在寡核苷酸的微陣列製程上，以達到完全在矽晶片上製作寡核苷酸微陣列晶片的能力。而這項技術的特點是完全不需要生長二氧化矽作為中介層 (intermediate layer)，因此也不需要使用到昂貴且性質容易劣化的矽烷作為連結分子。這意味著我們

能夠排除所有二氧化矽介面與矽烷化學所衍生帶來的負面效應。這種新式的連結分子介面是首度被運用在寡核苷酸晶片的半導體製程上，在這篇論文內將會逐步地介紹其基本原理與實驗製作流程。

接著在第二章，我們將會簡要地介紹基因的結構，與基因晶片的檢測原理，俾使讀者對於基因晶片先有初步的認識。接著再詳細介紹基因晶片的表面處理方法、基因的固定方法，以及連結分子的化學反應機制。第三章是介紹本實驗的設計原理及流程，其中對於自行製作的實驗器材也都有簡短的說明。第四章為實驗的結果以及討論。最後，第五章為本實驗的結論以及對未來的展望。



第二章 原理

在本章首節裡，我們首先對基因的特性與結構做一詳細的介紹，並同時說明基因晶片的檢測原理。接著第二節的是生物分子固定概論，從這裡我們先對生物分子固定的現象與方法得到最基本的認識後，就容易進一步理解第三節接著要提到的基因共價固定法。第四節後我們正式踏入本文的重心，開始介紹在矽晶片上製作寡核苷酸微陣列的原理，我們從單晶矽材的基本特性開始介紹，然後依序介紹矽氫化反應、微影顯像術，以及 DNA 原位合成的概念。其中，矽氫化反應是本實驗用來生長連結分子所採用的方法。

2.1 基因的結構與基因晶片的檢測原理

基因是一長串 DNA 序列上的一段，由許多個去氧核苷酸 (deoxygen nucleotide) 串接形成。如圖 2-1 所示，一個去氧核苷酸分子的化學成份是由一個去氧核糖 (deoxyribose)、一個含氮原子的鹼基 (base)，以及一個磷酸 (phosphate) 三項所構成。我們將去氧核糖上的五個碳原子由順時鐘方向分別標上一至五的編號。其中第一個碳原子 (C1) 接的是鹼基，第五個碳原子 (C5) 接的是磷酸。鹼基是一種含有氮與氧原子的平面環形構造，依環形數目可以分成雙環的嘌呤 (purine) 和單環的嘧啶 (pyrimidine) 兩類。如圖 2-2 所示，雙環的嘌呤包含了腺嘌呤 (adenine) 和鳥糞嘌呤 (guanine)，而單環的嘧啶則包括有胸腺嘧啶 (thymine)、胞嘧啶 (cytosine)，以及只有在核糖核酸 (RNA) 才存在的尿嘧啶 (Uracil)。習慣上我們以其英文學名的第一個字母 A、G 和 T、C、U 來分別代稱這些 DNA 上的鹼基。

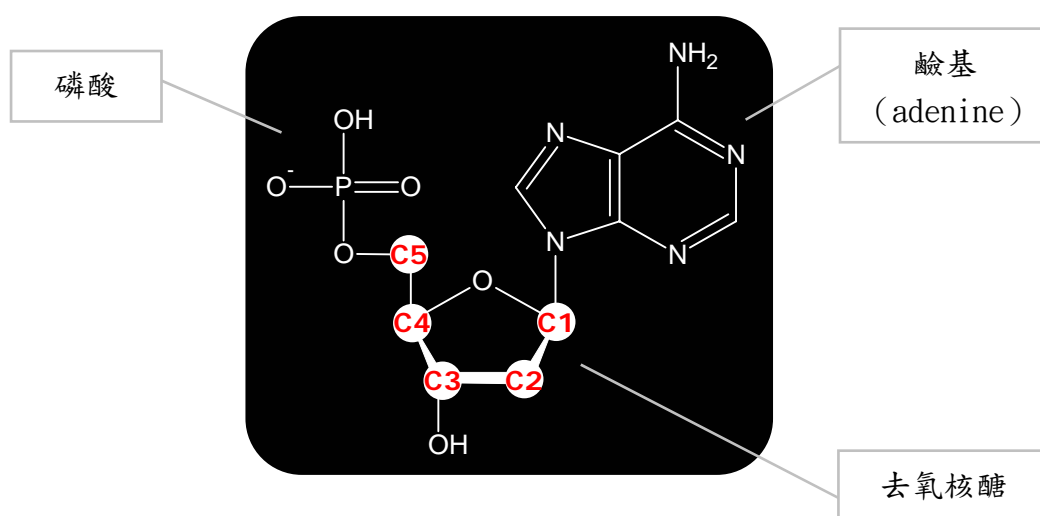
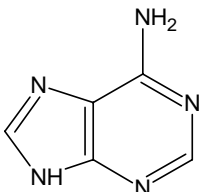
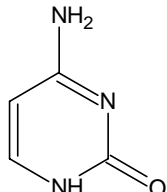
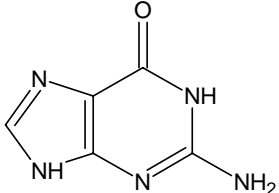
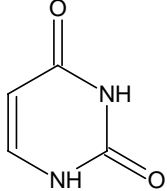
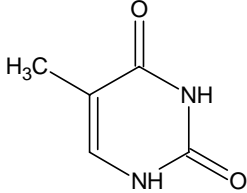


圖 2-1 單一個去氧核苷酸的分子結構 (圖例為腺苷酸)

嘌呤(Purines)	嘧啶(Pyrimidines)
 <p>腺嘌呤：A</p>	 <p>胞嘧啶：C</p>
 <p>鳥糞嘌呤：G</p>	 <p>尿嘧啶：U</p>
	 <p>胸腺嘧啶：T</p>

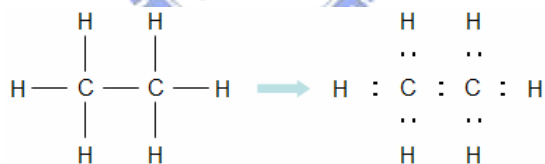


圖 2-3 有機化物之 Lewis 電子點表示式。

DNA 的另一項重要的特性就是“鹼基對互補” (complementary base pairing)。由於鹼基分子的環形構造不只是由碳原子組成，亦包含了許多的氮原子以及氧原子。根據 Lewis 的八隅體原則，化學分子鍵的結合會趨向如惰氣 N_2 、 Ar_2 的組態。如圖 2-3 以 Lewis 電子點式表示，碳原子有四個最外層電子 (亦稱為價電子)，並全部參與化學鍵的形成；然而原子的五個最外層電子中只有三個形成化學鍵，剩下的兩個外環電子是自由的狀態；氧原子的六顆外環電子中只有兩個參與化學鍵 (雙鍵) 形成，並剩下多達四個自由外環電子。這些自由的外環電子在快速的運動中形成電子雲，並使得分子團在靠近氮或是氧的那一端會呈現微弱的負電性。因此，負電性高的氮與氧原子便有吸引正電分子的傾向。反之，氫原子只有一顆外環電子卻也參與了化學鍵的形成。相形之下，卻造成了氫原子裸露出帶正電質子的機會。因此鹼基環上負電性高的 $C=O$ 與 $C=N$ 會去吸引帶正電的氫質子，形成微弱的氫鍵平衡現象，將兩個不同的鹼基分子彼此拉近距離。

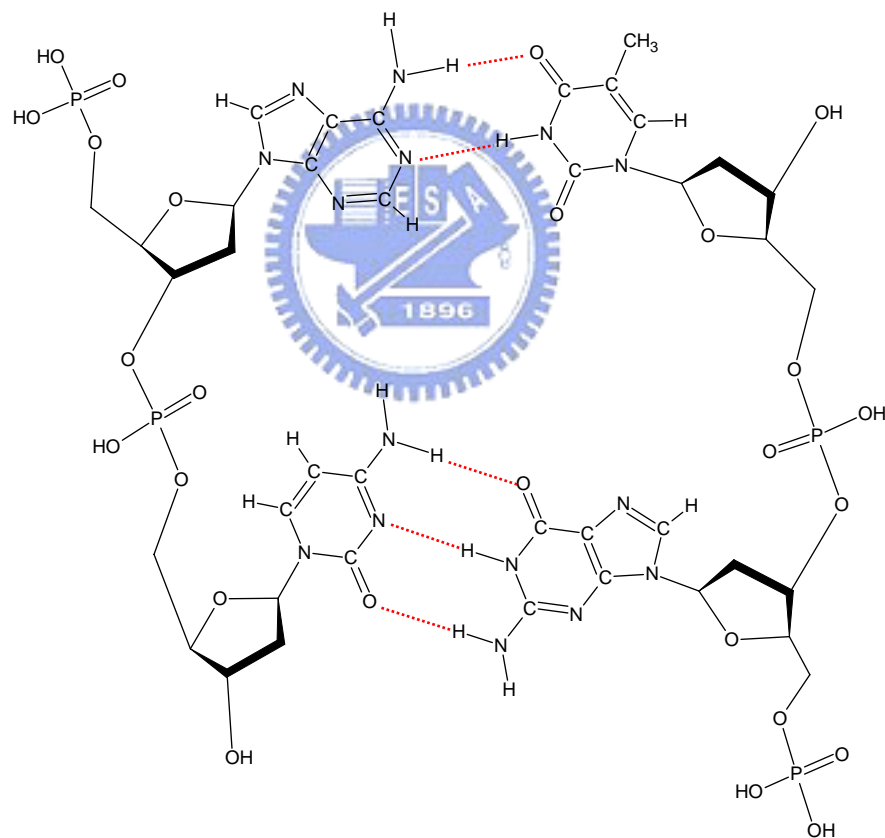


圖 2-4 A 與 T 以及 C 與 G 之間的互補氫鍵力

形成的氫鍵力越多、排斥的電荷越少 (例如： $C=O$ 與 $C=O$ 之間的負電抗斥)，則鹼基之間的吸引越強。如圖 2-4 所示，腺嘌呤 (adenine) 與胸腺嘧啶 (thymine) 間可以形成兩個氫鍵力，而胞嘧啶 (cytosine) 和鳥糞嘌呤 (guanine) 之間可形成三個氫鍵力。對於這樣對應的吸引關係，

我們稱 A 與 T 互補，C 與 G 互補。如圖 2-5 所示，DNA 就是因為這種鹼基對互補的特性，一對接著一對相互吸引而形成雙螺旋結構（double helix）。而這種鹼基對互補的特性，如今被應用在基因晶片技術上。

基因晶片從製造到檢測應用可以分成三個主要步驟。(1) 單股探針序列（probe sequence）之固定化。(2) 單股目標序列（target sequence）之取得與標定。(3) 兩股序列雜交（hybridization）驗證。目前，基因晶片的探針分成兩類：一類為 cDNA，另一類為寡核苷酸（oligonucleotide）。cDNA 乃是經由抽取生物體內的 mRNA 反轉錄而來，所以長度通常比較長，有些甚至多達數千個鹼基，因此無法經由化學合成得到；而寡核苷酸是經由人工化學合成而獲得的，所以通常比較短，甚至可以短到僅只有 5~15 鹼基。通常，探針序列是與目標序列完全互補（perfect match）的基因序列。

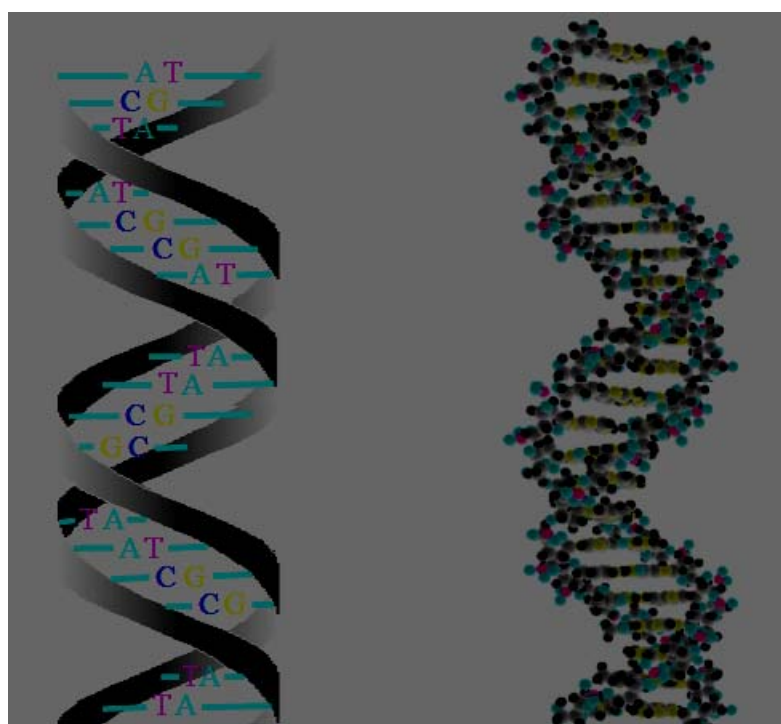


圖 2-5 基因的雙螺旋結構

如下圖 2-6 所示，我們將單股探針序列固定在晶片上，並將待檢測的單股目標序列以螢光標定後，流過晶片表面，並在適當的控制條件下進行雜交，接著將晶片清洗。因為互補的基因可以藉由氫鍵形成穩固的雙螺旋結構，並可以抵抗溶液的洗滌，所以互補鹼基對的數目越多，則兩單股基因序列雜交後形成的雙股螺旋穩定性就越高。如果兩股基因互補，則晶片經過清洗後，目標序列仍會雜合在固定的探針序列上，而在晶片上發出螢光；如果兩股基因並不完全互補，便可以經由清洗的步驟將沒有形成完全

互補的目標序列滌除。因此，藉由螢光顯微鏡觀察晶片上螢光的存在與否，可以確認檢體中是否存在我們想要找尋的目標序列。

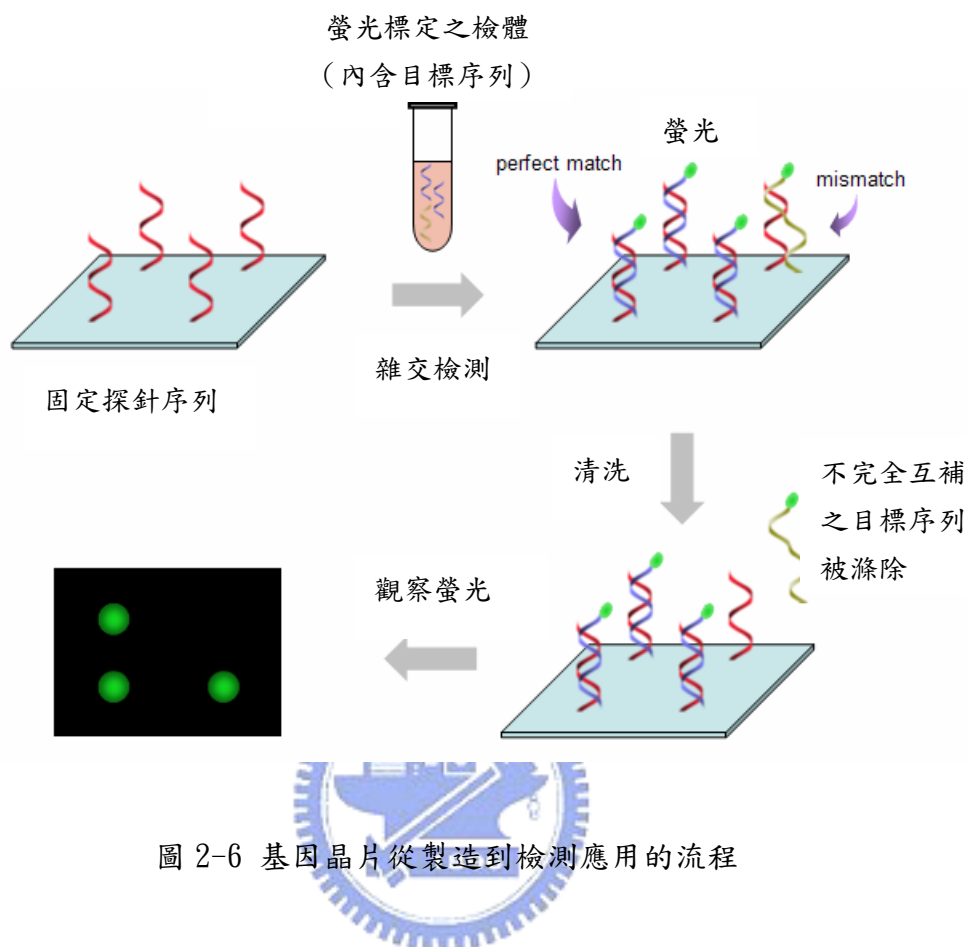


圖 2-6 基因晶片從製造到檢測應用的流程

2.2 生物分子固定概論

利用生物分子的專一性以達到搜尋、觀察、辨認、檢測目的之晶片，我們統稱為生物晶片。基因晶片也是一種生物晶片，其功能是針對基因分子進行序列辨識與檢測。生物晶片的生物辨識單元 (bio-recognition unit)，譬如基因晶片上的固定探針，通常都必須被固定在一固相載體 (solid support) 上。載體有可能是薄膜 (thin film)、共聚合高分子 (copolymer)，或是經由溶膠法 (sol-gel process) 處理過的玻璃基材。辨識單元可以經由物理吸附 (physical adsorption)，或是化學連結 (chemical attachment) 的方法固定住。此外，有些方式是藉由將生物分子陷捕 (entrap) 在多孔材質 (porous materials) 上，而達到固定的目的。生物分子的固定機制可以分成物理性與化學性兩類，分別在下兩小節中討論。

2.2.1 物理性固定方式

1. 吸附 (Adsorption)：

如圖 2-7 所示，生物分子本身可能經由離子吸引、疏水性，或是凡得瓦力與基材形成程度大小不等的物理吸附。例如將表面做疏水處理後，某些種類的蛋白會形成吸附^[9]。此法雖然最為簡單，然而其缺點是它容易形成非特定性吸附（non-specific adsorption），使得吸附的分子種類與密度難以控制，並容易因為不穩定再度造成去吸附（desorption）而流失。



圖 2-7 生物分子藉由非特定吸附固定之示意圖

2. 離子鍵結 (Ionic binding) :

如圖 2-8 所示，如果基材薄膜具有負電荷離子，例如 SO_3^- 、 PO_4^- ，則可以經由靜電吸引的方式吸附帶有正電荷 NH_3^+ 的生物分子，形成離子鍵。不過，由於離子鍵具有方向性，當分子吸收了周遭環境的能量而使振動、轉動模式加遽，即有可能造成鍵結方向偏折，使得離子鍵變弱，最後脫離。離子鍵固定方式對於熱以及鹽類緩衝液清洗的穩定性不佳。

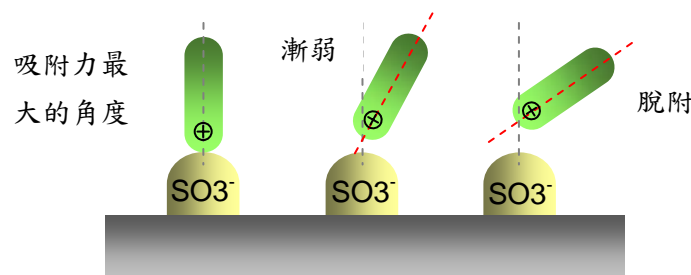


圖 2-8 生物分子藉由離子鍵結固定之示意圖

3. 物理陷補 (Physical entrapment) :

如圖 2-9 所示，生物分子可以藉由被陷捕在聚亞醯胺、聚乙烯醇、聚乙烯氣、環氧樹脂、玻璃溶膠等高分子基質本體內而達到固定的目的。這種方式的優點是：(1)生物分子的流失可以達到最小；(2)有效隔離造成生物

分子腐化的污染物。然而現在的技術瓶頸在於無法製造密度不等的陣列，尤其除了定性外，可控制的密度對於定量的偵測非常地重要。

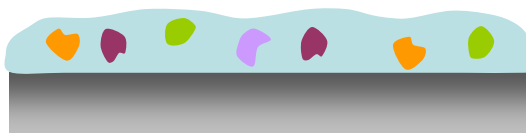


圖 2-9 生物分子藉由物理陷補固定之示意圖

此外，在這方面仍有待克服的課題是：

- ◆ 生物分子活性的維持。
- ◆ 生物分子結構長時間的穩定性。
- ◆ 生物分子能夠接觸分析物的能力。
- ◆ 陷捕基質的光學透明性。

2.2.2 化學性固定方式

共價鍵結 (Covalent bonding)：

共價鍵結是原子與原子相連最穩定鍵結的狀態，其鍵結方式是兩個原子各貢獻出對等數目的價電子並一起分享。所謂的價電子就是原子最外圍軌道的電子，通常外圍軌道都是尚未填滿的，因此狀態並不穩定。價電子由於位在原子最外圍，因此最能直接參與和其他原子鍵結有關的化學反應；換句話說，價電子數決定了其化學性質。反之，如果最外圍軌道的電子恰好填滿，則此原子不需藉助其他原子的電子即已達到穩定狀態，而呈現化學惰性。回想我們在 2.1 節曾提到：一個氧原子外圍有六個價電子，並不穩定。如果兩個氧原子在一起，各貢獻出二個價電子並共同分享四個價電子而形成雙鍵；那麼再加上各自未分享的四個價電子，就可以形成各自最外圍軌域都被八個電子填滿，而與惰性氣體相同的電子軌域狀態。因此共價鍵是穩定化學分子結構的最佳方式。

生物晶片中化學方式的固定，牽涉到生物分子與基材之間共價鍵的形成，通常二者均需要進行修飾 (modification)，也就是引入具有化學反應活性的官能基 (functional group)，例如： $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SH}$ ，如圖 2-10 所示。共價鍵結的方式具有特定性、無方向性的優點，且每莫爾分子鍵結的分離能 (dissociation energy) 在數百千焦耳以上，穩定性強，

因此不易受到熱或是外界的影響而產生斷裂。

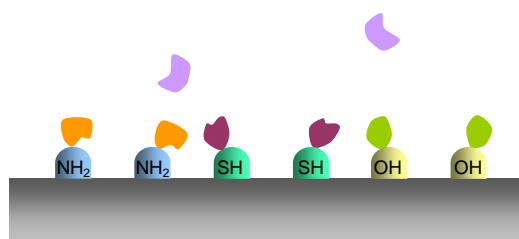


圖 2-10 生物分子藉由共價鍵結固定之示意圖

2.3 基因的共價固定化學

從物理與化學固定的方式來比較，物理性固定的方式都不具特定性，假使用來製作基因晶片，極容易因為吸附到非目標序列而造成偽陽性反應（false positive）。因此，具有特定性且穩定的化學性鍵結顯然才是最適合用來製作基因晶片的方法。基因先經過官能基修飾（labeled）後，就能夠與改質（modified）後的基材表面進行特定鍵結反應（specific-bonding reaction）。現在已知有數種官能基之間的特定鍵結反應被運用於固定基因，例如：SH 與 SH 可以形成 S-S 雙硫鍵^[10]；而 CHO 醛基可與 NH₂ 胺基可以形成 CONH 醯胺鍵結。

藉由基因修飾的技術，我們可以針對基因之特定部份進行連接。如圖 2-11 所示，將基因 3'端硫化後，再與同樣也經過硫化處理的基板進行雙硫鍵結。而這種連結方式可以形成三度空間的固定，既不會破壞生物分子的活性，同時還能提供更大的自由度，增加基因雜交反應的效率。

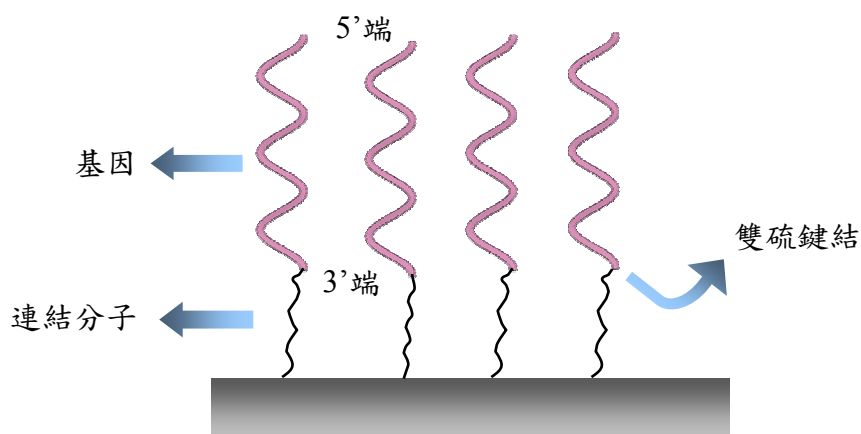


圖 2-11 基因分子藉由雙硫鍵結形成立體固定之示意圖

2.4 矽晶圓基材表面合成寡核苷酸序列的原理

本論文提出在半導體矽晶圓上製作寡核苷酸微陣列是一項全新的嘗試，我們將研發一種有機烯酸酯作為連結分子，以改進現行昂貴且性質容易劣化的矽烷作為連結分子的缺點。我們提出的方法是藉由矽氫化反應 (hydrosilylation) 而達到在矽晶表面生長連結分子 (linker) 的目的。這種連結分子的介面讓我們得以接著進行 DNA 寡核苷酸序列的合成並完成微陣列的製作。在本節裡，我們將逐步介紹矽晶材料的特性、矽氫化反應原理、以及 DNA 的合成化學。

2.4.1 矽基材料的固體形式與矽晶平面表示法

矽基材料依其固體形式可以分為非結晶矽 (amorphous silicon)，多晶矽 (polycrystal silicon)，與單晶矽 (silicon) 三種型式^[11]。如圖 2-12 所示，每一個型式都是依據材料中一塊具有秩序區域的尺寸來加以區分的。這個秩序區域裡的矽原子排列，具有一定的週期性或規則性。如圖 2-12 (a) 所示，非結晶矽只在幾個矽原子範圍內有秩序，玻璃就是一種含有多量雜質的非結晶矽材料。如圖 2-12 (b) 所示，多晶矽則在非常多的矽原子範圍內具有高度排列秩序，這些具有秩序的區域也稱為單晶矽，但其尺寸及排列方向卻都大不相同。而單晶矽在整個體積內都具有高度排列秩序以及幾何週期性，如 2-12 (c) 所示。例如：半導體工業所用來製造電子元件的矽晶圓片 (silicon wafer) 即為單晶矽材料。

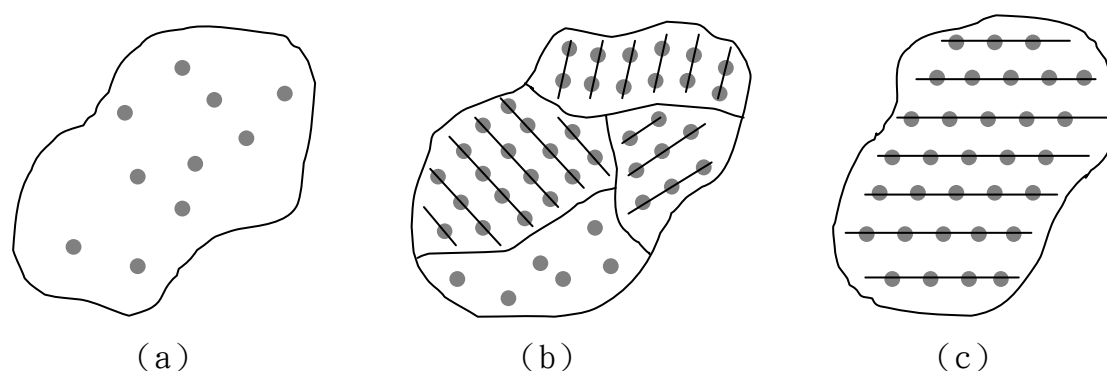


圖 2-12 矽基材料的固體形式：(a) 非結晶矽，(b) 多晶矽，與 (c) 單晶矽

單晶矽材的晶格排列並不是無窮延伸，其晶體排列最終會在表面處終止。平面的方向不同，所觀察到的矽原子排列也不盡相同，與化學物質交

互反應的結果也會不同，而我們所合成的連結分子就是在單晶矽材的表面所進行的。

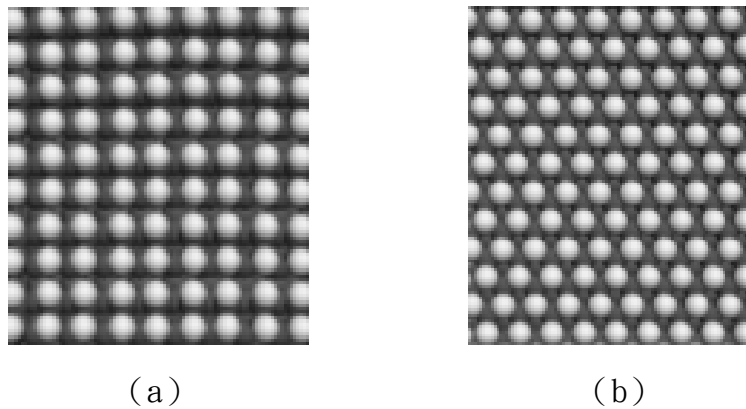


圖 2-13 單晶矽平面的原子模擬圖：(a) Si (1,0,0)平面與 (b) Si (1,1,1)平面

圖 2-13 為單晶矽表面原子模擬圖。對矽材料而言，Si (1,0,0) 面是最常被使用的平面，幾乎所有的電子元件都是在這個平面製造的。而對化學溶液蝕刻的性質、以及對濺鍍金屬的電性、製程的參數，也研究得最為完備。另外 Si (1,1,1) 平面的分子排列最平整，表面平坦度也最好，表面平均粗糙度小於 0.5Å。平面的命名以及表示法，有興趣的讀者可以參考 Neamen 所著的“Semiconductor Physics & Devices”一書。

2.4.2 矽氫化反應 (Hydrosilylation)

對於製造有機矽化物的方式諸多來說，矽氫化反應是最有效率也最簡便的一種。如下圖 2.14 所示，通常利用不飽和碳氫化物 (carbon hydride) 與矽的氫化物 (silicon hydride)，藉由催化 (catalysis) 或是活化 (activation) 的方式即可發生高效率的矽氫化反應。圖 2-13 中，R，R₁，R₂，R'，R'' 可以是單氫元素；也可以是分子基團。

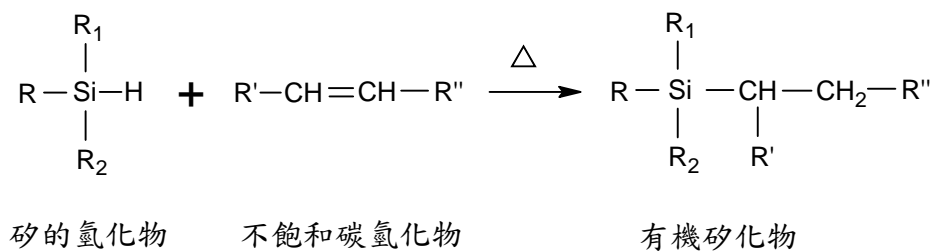


圖 2-14 矽氫化反應的化學方程式

本質上，矽氫鍵結很容易受到外在的影響而導致均裂分離反應 (homolytic reaction)。如下圖 2-15 所示，矽基板表面的矽氫鍵受到光照或加熱之後發生斷裂，並釋出一個氫質子來進行液相還原反應 (aqueous phase reduction)。因此，只要在固相的矽結晶表面先形成矽氫鍵，再利用高溫加熱便可以很快地讓矽氫鍵斷裂。而矽氫鍵斷裂後所釋出的氫質子將促使 1-烯分子 (1-alkene) 進行加成反應。此外，也可以藉由添加起始基 (radical initiator)、催化^[12,13]，或是光合成 (light synthesis) 的方式來促使矽氫弱鍵斷裂，使得矽原子裸露出自由電子並與不飽和烯烴進行加成反應以形成穩定的共價鍵^[14,15,16,17,18,19]。

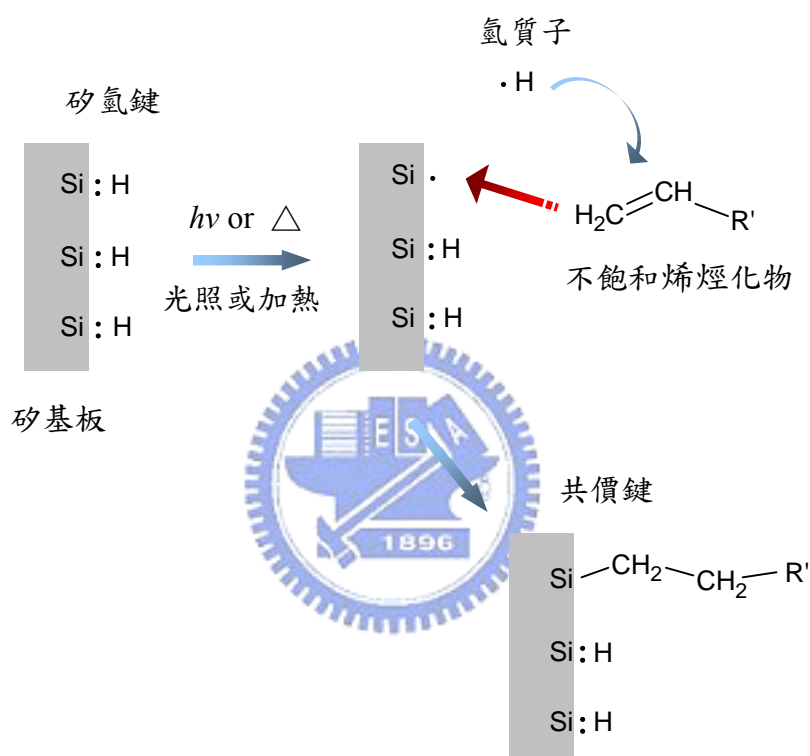


圖 2-15 矽基板固相平面矽氫化加成反應示意圖

2.4.3 矽晶片表面氫化

在矽晶片表面形成矽氫鍵的方法隨其結晶平面的不同，而有不同的處理步驟。已知在 Si (100) 面上可用 2.5% 的氫氟酸水溶液浸泡五分鐘；而在 Si (111) 平面可用 40% 的 NH₄F 溶液浸泡四分鐘。許多研究都證實，經過上述處理之後，在矽晶片表面上的矽將會被氫化，並形成一層非常高密度、規則排列、分佈均勻的矽氫鍵結。在 Si (111) 平面上會形成原子級平坦度 (atomically flat) 的 Si-H 單氫鍵結平面；而在 Si (100) 平面上則形成 Si-H₂ 雙氫鍵結平面。

當矽的外圍環繞著氫原子時，矽對氫的束縛力是非常微弱的。如果氫原子能得到足夠的能量跳脫束縛，則矽將會裸露出一個電子，形成既活潑又不穩定的狀態，稱為自由基 (free radical)。含有自由基的矽會更容易參與化學反應。

然而矽氫鍵結就如同前面提到的，是一個容易受到影響的弱束縛力。因此，矽氫鍵結可以溶解在水中。如果置放在空氣中，它會與氧原子反應而迅速地氧化，形成較為穩定的二氧化矽。

在本論文中，我們先利用高溫加熱來斷裂矽氫鍵，然後再利用矽氫化反應在矽晶片表面合成一層連結分子。表面的連結分子層製成後，未來我們將利用寡核苷酸合成技術，直接在表面原位合成鹼基序列。雖然微陣列製程不是本論文的實作目標，然而附錄二中仍收錄了相關的製造技術，讀者可以從中概略了解寡核苷酸微陣列晶片的製造與應用原理。而下一節所要介紹的是寡核苷酸序列的化學合成技術。

2.4.4 連結分子的進一步改質 (functionalization)

我們所合成上去的連結分子是一種烯酸酯類，前端烯烴部份與矽表面進行加成反應而連結，末端酯基部份則提供了寡核苷酸的鍵結位置 (binding site)。不直接使用烯酸醇是因為氫氧基可能會與晶片起反應^[20]。然而酯基並無法和寡核苷酸逕行合成，必須要改質成氫氧基 (hydroxyl group，簡稱 OH group) 才能和接下來要進行的寡核苷酸合成化學相容。如圖 2-16 所示，我們利用還原劑四氫化鋰鋁 (lithium aluminum hydride，簡稱 LAH) 將酯還原為氫氧基^[21,22,23]，以銜接下一步要進行的寡核苷酸合成。

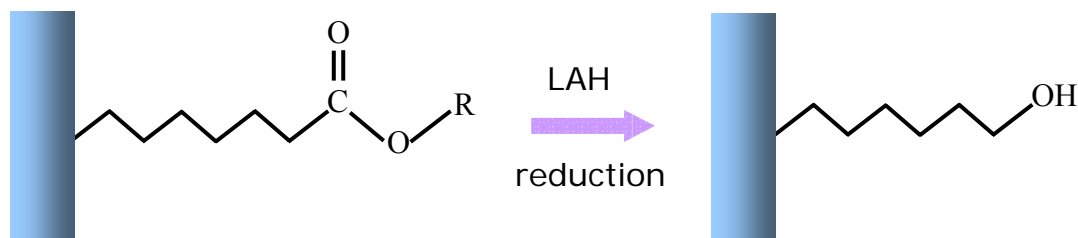


圖 2-16 連結分子之酯基還原成氫氧基之示意圖，R 為原子團。

2.4.5 寡核苷酸的合成化學

β cyanoethyl-phosphoramidite solid-phase synthesis

六〇年代末，隨著基因快速定序法（rapid sequencing）的蓬勃發展，當時產業界迫切需要一種快速、方便的方法來製造適當長度且鹼基序列非常明確的寡核苷酸。因此寡核苷酸的合成化學也就應運而生，這是一種利用亞磷酸氨進行的人工合成技術^[24,25]。

核苷酸合成的基本原則是建立在對核苷酸的3'端和5'端具有特定性保護與移除（也就是，防止其與外界發生化學反應）的能力上。如圖 2-17 所示，這必須藉由在3'端或5'端的自由氫氧基（free hydroxyl group）上頭再加上一個巨大的保護分子（blocking group）來達成。現在的合成步驟大多都是從單股 DNA 序列的3'端開始合成，並結束在5'端。

利用亞磷酸氨進行的人工 DNA 化學合成法和自然界生物利用 DNA 聚合酶（polymerase）的方法極為不同。自然界裡，生物細胞內的 DNA 聚合酶藉由將去氧核苷三磷酸前驅物（deoxynucleotide triphosphate precursor）移除二個磷酸根後，再將所得到的單磷酸去氧核苷酸接合在 DNA 鏈的最後一個核苷酸的3'端氫氧基上，來達到鏈的延伸（chain extension）^[26]，其過程如圖 2-18 所示。有許多容易遭到化學變性的分子基團（例如：DNA 末端的氫氧基、鹼基外圍的氨基）並不會在此時發生反應或是被破壞，主要是由於生物體內的酵素反應（enzymatic process）都具有極高度的專一性（specificity）所致。

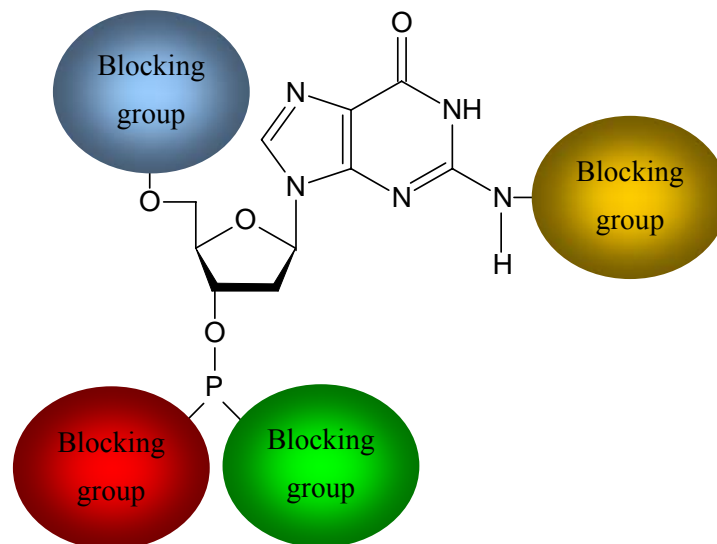


圖 2-17 加上保護分子的核苷酸（圖例為腺苷酸）

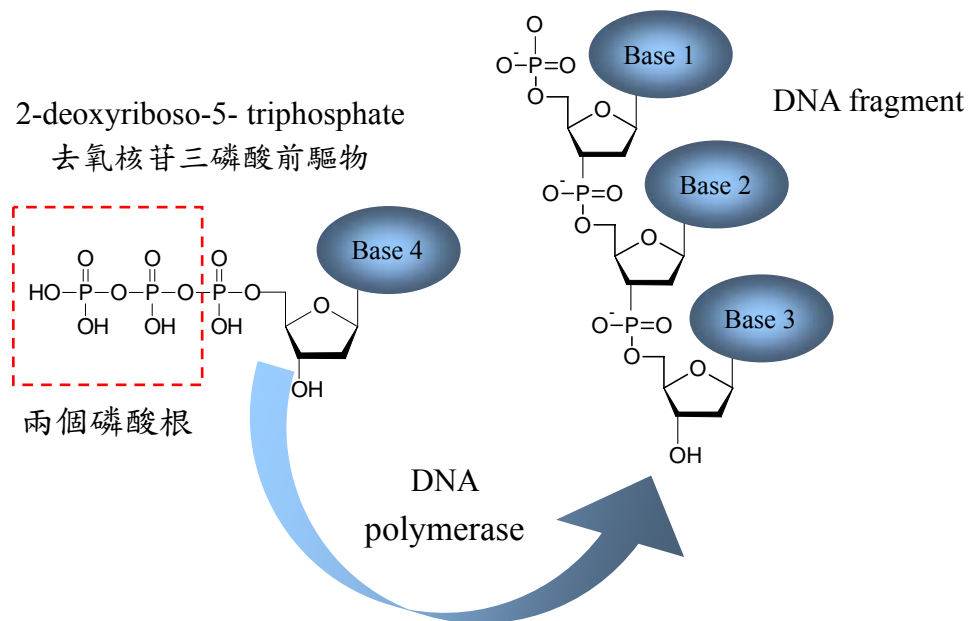


圖 2-18 自然界的生物利用 DNA 聚合酶合成 DNA 的機制

然而，亞磷酸氨人工合成法並沒有像這樣的高度專一性。如下圖 2-19 所示，欲使得 DNA 能在強烈的酸性化學合成環境下倖存，必須將廣泛存在於腺嘌呤、胞嘧啶，以及鳥糞嘌呤上且又容易遭到化學變性的氨基予以保護（A 鹼基 adenine 和 C 鹼基 cytosine 用 benzoyl 基；而 G 鹼基 guanine 則用 isobutyryl 基）。而這些保護基只有對於鹼才特別具有敏感性，因此當鹼基序列合成完畢後，可以藉由浸洗鹼性溶液將所有鹼基上的保護基移除以恢復 DNA 的活性。此外，核糖的 5' 端 OH 基則可以二甲氧基三苯基群（dimethoxytrityl group，簡稱 DMT group）保護。相反的，DMT 卻是一種酸不穩定分子團（acid-labile group），可利用酸性溶液浸洗將其移除；而核糖的 3' 端接的是氰乙基-亞磷酸氨（cyanoethyl-phosphoramidite）。若想要合成出一段特定的鹼基序列，可從 5' 端開始，將第一個去氧核苷 5' 端的 DMT 用酸移除，使暴露出具有活性的自由氫氧基後，再與第二個去氧核苷 3' 端的亞磷酸氨化合物進行接合（coupling），如此重複不斷進行，即可以製備出序列明確的寡核苷酸序列。此法是由 Gait 等人於七 0 年代所發明^[27]，是目前為止固相合成中用來製備寡核苷酸序列最有效率的方法。

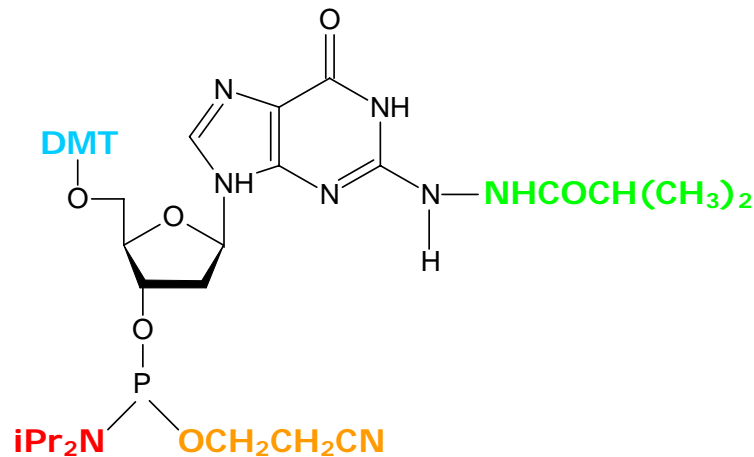


圖 2-19 單一核苷酸分子(圖例為鳥苷酸)的保護基。其中 dimethoxytrityl(DMT) 保護 5'端氫氧基。A 與 C 鹼基外環的一級氮用 benzoyl 保護；G 鹼基外環的一級氮用 isobutyryl 保護，T 鹼基因為沒有一級氮，所以不需保護。除非加入 tetrazole，否則三價磷上的 diisopropylamino-phosphoramidite (二異丙胺-亞磷酸氮) 是穩定的。3'端上的磷另外接上 cyanoethyl (氰乙基) 保護基的目的是防止 side reaction 及增加在 acetonitrille (丙腈) 的溶解度。

2.5 DNA 合成儀的原理

DNA 自動合成儀可說是將基因序列固相合成法予以商業化最成功的例子。原本基因的合成步驟極為耗費時間，而且也被限制在最多 20 個鹼基以內的長度。然而隨著九〇年代電腦以及全自動可程式化機器的出現，利用電腦程式控制的 DNA 序列合成已經可以達到 100 個鹼基以上，並在幾個小時內就完成。合成儀是藉由四個階段不斷地重複循環，以進行 DNA 序列的合成。合成通常是從序列的 3'端開始，最後在 5'端結束。序列的第一個鹼基通常已經固定在多孔性玻璃 (controlled pore glass, 簡稱 CPG) 管柱上，因此可以選擇對應的鹼基管柱以開始序列的合成^[28]。以下便是針對每個階段的步驟詳細予以說明：

(1) 去保護基 (Deblocking)：

如圖 2-20 所示，藉由三氯乙酸(TCA)將第一個去氧核苷 5'端的 DMT 保護基移除，使暴露出活性自由氫氧基，此步驟又稱為 "trityl off"。

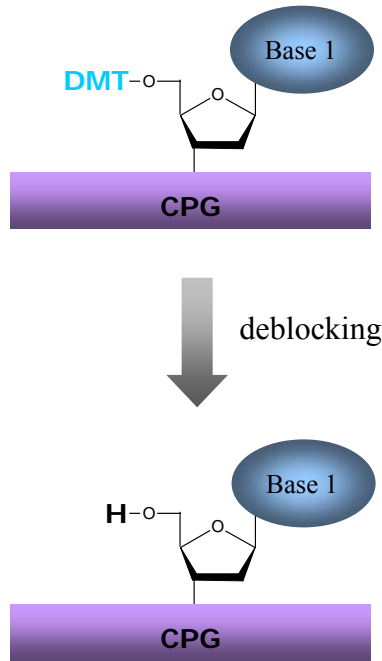


圖 2-20 移除去氧核苷 5' 端的 DMT 保護基之示意圖

(2) 接合 (Coupling):

如圖 2-21 所示，第二個去氧核苷的 3' 端必須先以 1H-tetrazole 將二異丙胺部分活化 (activate) 後才能與第一個去氧核苷的 5' 自由氫氧基進行接合。

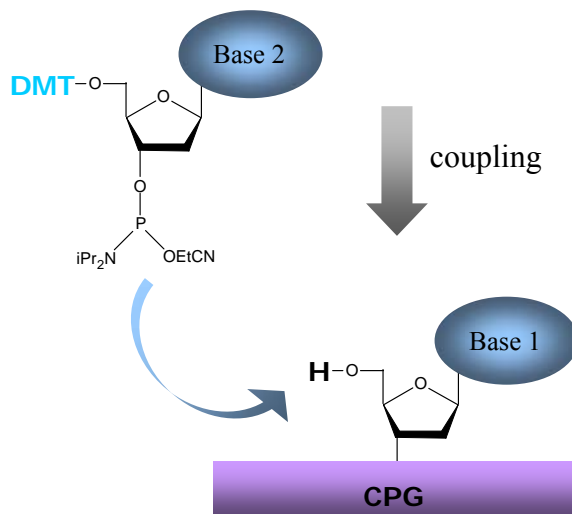


圖 2-21 接合兩個去氧核苷之示意圖

(3) 封蓋 (Capping):

如圖 2-22 所示，對於沒有成功接合新鹼基的原序列，如果繼續參與後續鹼基的接合，則將導致序列漏失一個鹼基而跳接的錯誤，因此必須將沒有成功接合到鹼基的序列淘汰出局。淘汰的方法是在去了保護基的 5' 端用乙酸酐 (acetic anhydride) 予以封蓋，使其鈍化而不再參與後續的鹼基序列接合。

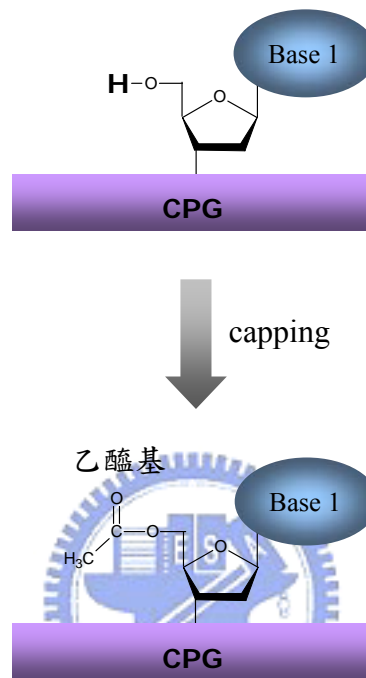
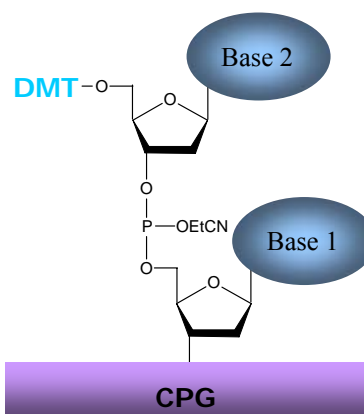


圖 2-22 封蓋以停止未成功接合鹼基的序列之示意圖

(4) 氧化 (Oxidation):

接合後的骨鏈為一帶有三價亞磷酸根 (trivalent phosphite) 不穩定分子基團。如圖 2-23 所示，必須用過氧化碘水溶液 (iodine peroxide water solution) 將其氧化為最穩定的五價磷酸 (phosphate)。



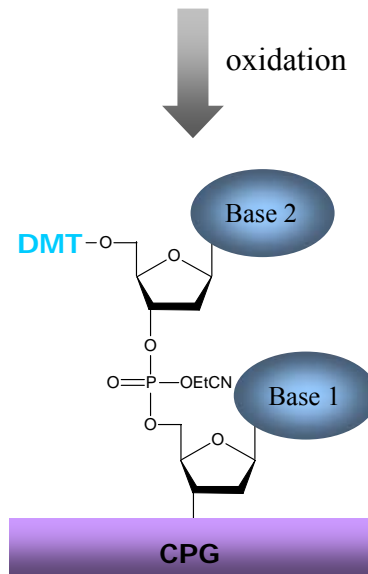


圖 2-23 氧化鹼基示意圖

如此經過四個階段後即完成一個循環 (cycle)，並成功接合一個鹼基。當循環不斷地重複進行，鹼基也逐一地接上。直到完成預定合成的序列後，再利用濃氨水溶液 (~40%) 將序列從 CPG 上切除下來，而磷酸上殘留的氰乙基以及鹼基上的保護基也會同時一併被移除。這樣即成功地完成一條正確鹼基序列之單股 DNA。

第三章 實驗步驟與流程

在此章節中，我們介紹實驗的步驟以及流程。實驗分成三個階段循序進行。首先進行矽氫化合成，接著進行酯基的還原反應，最後是 DNA 合成。

3.1 矽氫化合成

在本實驗中，我們的目的是探討烯酸酯作為連結分子的可行性。因此我們使用兩種烯酸酯類：分別為十一烯酸甲酯（Methyl 10-undecenoate 95%，Sigma）與十一烯酸乙酯（ethyl undecylenate 97%，Aldrich）作為連結分子原料，並以 silicon wafer 為基材（phosphorus doped, orientation (100), TSA），利用熱活化（thermal activation）的方式進行矽氫化反應。Si-H 鍵會在高溫時發生斷裂，變成裸露出一顆價電子的活性自由基 $\text{Si}\cdot$ 並與不飽和鍵產生反應。為了避免與氧分子以及水氣分子產生反應上的競爭，在合成前我們會將連結分子用氮氣進行預處理。同樣的道理，在矽氫化反應的過程中也全程使用氮氣。

《連結分子預處理》

Step 1. 去氧（deoxygen）

首先將十一烯酸酯注入我們自製的容器中，並從底部通入氮氣（99.99%）吹洗至少一小時。如圖 3-1 所顯示，容器的底部設計了一個氣孔陣列並內襯 500A 孔徑的 CPG，氮氣通過 CPG 時會產生大量密集的氣泡，可以增加氮氣的包覆總面積，有效地攜帶並去除更多的水氣雜質以及溶氧。

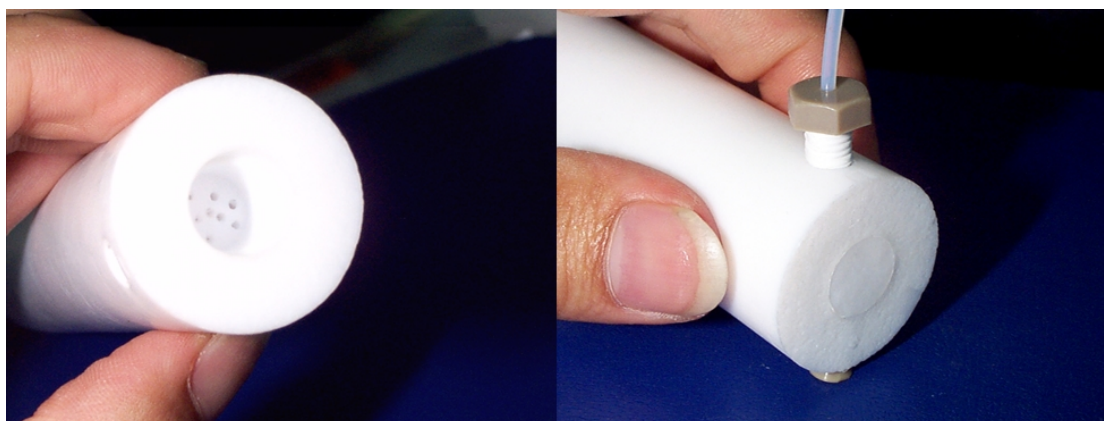




圖 3-1 連結分子之去氧裝置

Silicon wafer 的矽氫化合成步驟依照下列程序逐步進行：

《清洗》

Step 2. 濃硫酸與雙氧水體積比 3：1 浸泡 20 分鐘。

將 Silicon wafer 表面的有機污染氧化後分解除去，同時使得表面產生一極薄（ $\sim 20 \text{ \AA}$ ）的化學氧化層（chemical oxide layer）。

Step 3. 去離子水（D.I. water）沖洗 5 分鐘。

《氫化》

Step 4. 5% 氫氟酸浸泡 3 分鐘（注意：氫氟酸必須以 Teflon 容器裝盛）。

在這個過程裡，氫氟酸將會快速地蝕刻掉化學氧化層，當抵達矽表面後蝕刻速率隨即變慢，與氫氟酸反應後的矽表面會因此產生矽化氫（ SiH_2 ），並形成不沾水的現象。

Step 5. 去離子水沖洗 5 分鐘至中性 pH 7.0。

將前一步驟被蝕刻的氧化層殘留物溶解並除去，以防止其遮蓋矽表面而影響連結分子的生長與合成。

Step 6. 5% 氫氟酸浸泡 1 分鐘。

矽化氫可以溶解在水中，所以步驟 4 將會導致部分的 SiH_2 溶解在水裡而流失，因此必須再一次浸泡氫氟酸以補足剛才溶解的 SiH_2 。

Step 7. 過量去離子水浸泡 30 秒。

Step 8. 5% 氫氟酸浸泡 5 秒。

Step 9. 過量去離子水浸泡 2 秒。

Step10. 5% 氫氟酸浸泡 2 秒。

Step11. 異丙醇 (2-propanol) 浸泡 5 秒。

浸泡異丙醇的目的是保護 SiH_2 遭受到空氣中水氣分子的攻擊。此外，異丙醇並不會溶解 SiH_2 ，並能促進矽氫化的反應。

《矽氫化反應》

Step12. 置入去氧十一烯酸乙酯中浸泡 5~10 分鐘，過程中持續注入氮氣。持續注入氮氣去氧，防止矽的表面遭到氧化而無法進行矽氫化反應。

Step13. 200°C 油浴 2 小時，過程中持續注入氮氣。

圖 3-2 所示為此步驟進行時之高溫油浴裝置。另外，矽與氧分子發生氧化反應的傾向比進行矽氫化反應的傾向大，因此為了防止在高溫油浴過程中彼此競爭，我們利用氮氣持續地將溶氧分子攜出來完全隔絕氧化反應，以生長覆蓋密度高且特性良好的表面單分子薄膜層 (surface monolayer)。



圖 3-2 連結分子熱活化油浴裝置

Step14. 最後，自 200°C 緩慢降至室溫後取出，過程中持續注入氮氣。

《silicon wafer 後清洗步驟》

Step15. 乙醇 (96%) 沖洗二次，接著超音波震盪 10 分鐘。

此步驟可以初步地清洗掉大部分物理吸附在 wafer 表面的烯酸乙酯。

Step15. 正己烷 (hexane) 浸洗 3 分鐘。(此步驟重複進行三次)

Step16. 石油醚 65°C 水浴 10 分鐘，氮氣吹乾。(此步驟重複進行三次)

改質後的 silicon wafer 表面會因為物理吸附而存在著極薄一層的烯酸乙酯分子，無法經由乙醇洗淨，必須藉由沸騰的石油醚將其溶解。(注意！石油醚的沸點在 45~60°C 間，具有腐蝕性。)

Step17. 二氯甲烷中浸泡並超音波震盪 5 分鐘後，氮氣吹乾。

二氯甲烷為非極性溶劑，具有與氯仿 (chloroform) 相當的溶解力；基於安全的考量上，現在的化學清洗程序大多會以二氯甲烷取代具有高毒性且容易致癌的氯仿。

Step18. 乙醇 (96%) 超音波震盪 3 分鐘，氮氣吹乾。

《連結分子酯基還原成 OH 基步驟》

Step19. 在氮氣箱中混合 LAH 與 THF 的溶劑，並將晶片浸入其中 15 分鐘後取出，用過量 THF 沖洗必接著以氮氣吹乾。

3.2 DNA 合成

矽晶片表面的酯基被還原成 OH 基後，接著就進行寡核苷酸序列的合成。我們採用 Applied Biosystem 公司所生產，型號為 Expedite 的 DNA 合成儀來合成序列，合成規模則選擇系統內建的 0.1 μ mole 程序，而最終程序必須選擇移除 DMT。

由於 DNA 合成儀的藥劑均透過內部氣閥的控制管路間運送，每種合成規模與管路的藥劑流量均有原廠已經設定好的最佳運送時間及反應時間，這些最佳參數是經由研究人員累積了無數的實驗所驗證得來。因此，對於較大尺寸的矽晶片，必須額外製作可以容納晶片的反應腔體。這種腔體與 DNA 合成所使用的 CPG 管柱是完全不同的設計。這就必須牽涉到反應時間參數的更改。因此，為了能夠相容於 DNA 合成儀的內建程序，我們將表面已經還原成 OH 基的矽晶片切成尺寸大小為 4mm × 4mm 的小正方形並將其置入 CPG 管柱內 (註：DNA 合成儀用來進行鹼基合成的玻璃管柱)，就可以直接利用內建的程序進行合成，而不需要更改原廠最佳參數以排除影響實驗的不確定因素。

在本實驗中，我們製作 A 與 B 兩種晶片。晶片 A 為 silicon+linker+3'-SSGGCAGCAA-5'。這種晶片可以和綠色螢光標定序列 UM13202 互補，UM13202 鹼基序列為 5'-GGTTCGGACACCGTCGTTTACCAA-3'。晶片 B 則為 silicon+linker+3'-SSSSCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC-5'，這個序列可以和紅色螢光標定序列 UM13242C 互補，UM13242C 鹼基序列為 5'-GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG-3'。其中，S 是指 spacer，其結構式如圖 3.3 所示，與 DNA 合成化學程序完全相容。Spacer 並沒有生物功能活性，而我們加入 Spacer 的目的是為了延長序列的長度，以增加其雜交的空間以及效率。而序列合成完畢的晶片，必須接著浸泡在比例 1：1 混合的無水乙醇（~99.5%）與 EDA（ethyl diamine）溶液內六個小時後，再沖洗大量的 D. I. Water 以脫除鹼基上的保護基，使回復生物活性。



第四章 實驗結果與討論

本章中，我們將完成的 oligonucleotide chip 逐步進行表面定性分析並得到充分的證據證實我們合成的連結分子能夠成功地接合 DNA。我們利用傅立葉轉換紅外光譜儀、橢圓偏振薄膜測厚儀、X-ray 光電子能譜儀、寡核苷酸 5'端探測法，以及螢光標靶序列原位雜交法來檢測 DNA 是否能夠成功連結上去。

4.1 紅外吸收光譜分析

化學分子的鍵結會吸收特定波長的能量而形成伸縮、轉動、彎曲、擺動等振動模式。有些模式具有紅外光活性，能夠吸收紅外光能量。利用紅外光波段進行掃描可以分析樣品中所含有的官能基種類。因此，紅外光頻譜儀被廣泛地運用在化學分子的官能基鑑定上。由於我們生長的薄膜是在原子級的尺度內。因此必須利用全反射的附件來偵測。另外因為 DNA 分子所含有的官能基非常地複雜，會影響到紅外吸收光譜的判讀，因此我們只針對晶片表面尚未連結 DNA 前的連結分子做紅外光譜分析，而連結了 DNA 之後的晶片則藉由橢圓偏振薄膜測厚儀、X-ray 光電子能譜儀、寡核苷酸 5'端探測法來觀測。

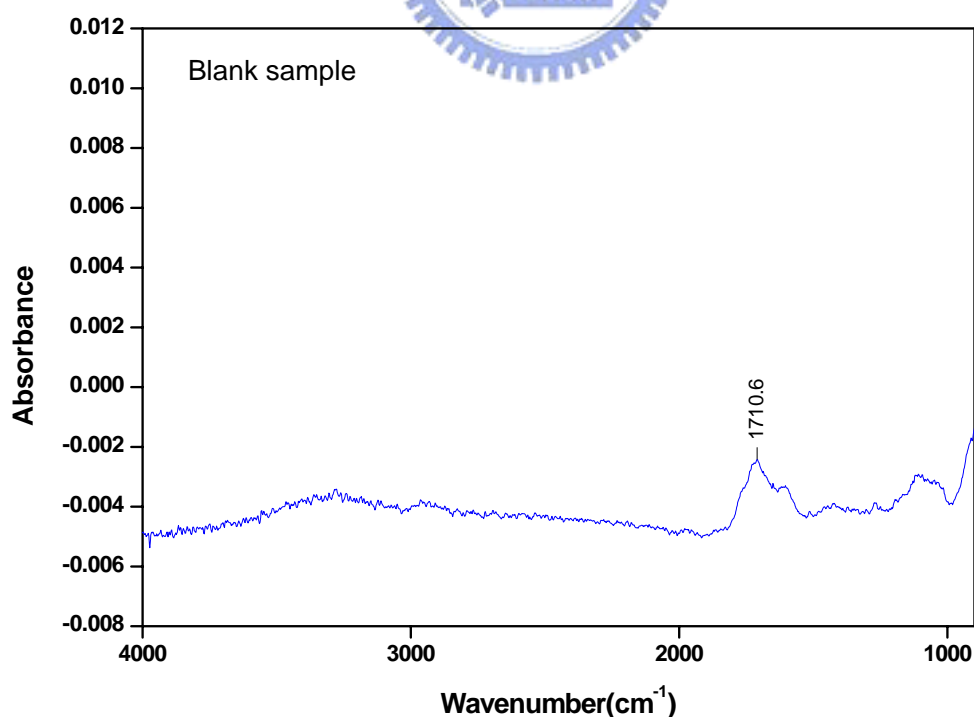


圖 4-1 矽晶片氫化表面之紅外吸收光譜

圖 4-1 為氫氟酸氫化後之矽晶片表面的紅外光譜。利用 60° 角的鍍晶體做全反射表面衰逝波量測，掃瞄 500 次平均，背景為鍍晶。在光譜上除了 silicon 本身的吸收外，並沒有任何的官能基或化學分子存在於晶片的表面。

圖 4-2 為氫化後之矽晶片在 200°C 的溫度下與連結分子 methyl 10-undecenote 進行矽氫化合成反應一小時後所呈現的吸收光譜。我們可以在 2926.1cm^{-1} 以及 2855.3cm^{-1} 看見碳氫鍵 CH_x 的吸收峰，然而強度並不高，而在 1738.7 也可以觀測到 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰。這兩個吸收峰可以證明連結分子 methyl 10-undecenote 確實存在矽晶片表面上，但是從吸收峰的幅度可以推斷密度並不高，這或許跟反應的時間有正相關性。因此，我們接著增加反應時間為 4 小時。

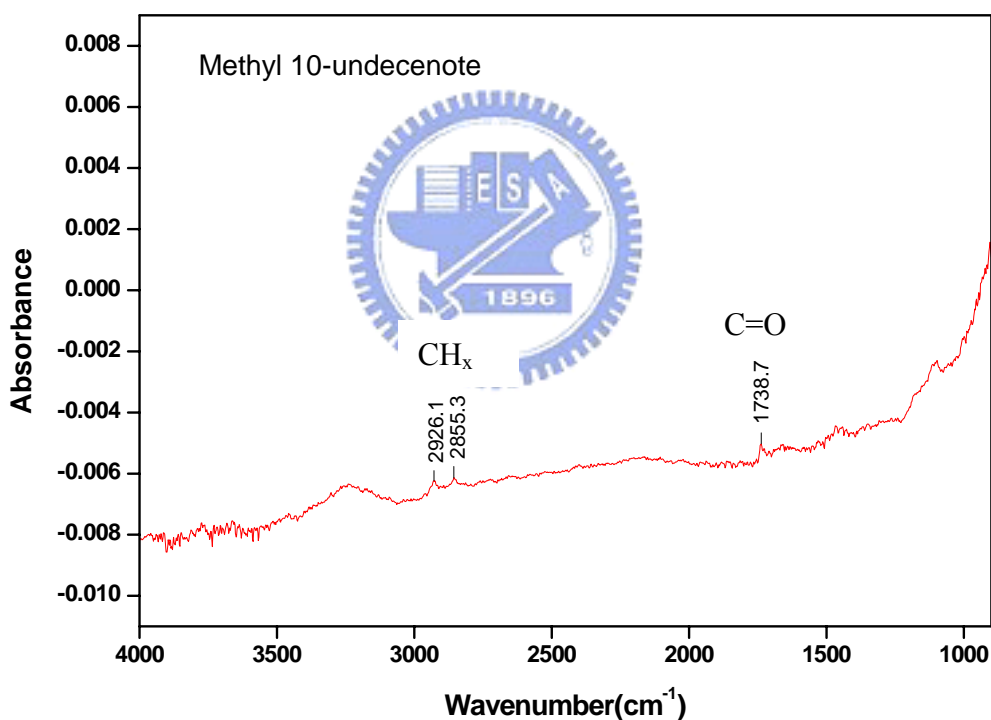


圖 4-2 矽晶片合成連結分子 methyl 10-undecenote 一小時後之表面吸收光譜

如圖 4-3 所示，經過氫化之矽晶片浸泡 IPA 後，在 200°C 下與連結分子 methyl 10-undecenote 反應 4 小時之表面吸收光譜。我們可以發現碳氫鍵 CH_x 的吸收幅度比反應 1 小時情況大了許多。 CH_x 與 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰幅度非常明顯，而在 1458.2cm^{-1} 也可以清楚發現到 CH_2 的吸收峰。由於 1300cm^{-1} 以下為紅外吸收光譜的指紋區，即使是一個簡單的有機化物也有可能出現

數千個複雜的吸收峰，因此我們無法判定 1264.8 cm^{-1} 是什麼官能基的吸收峰。

圖 4-4 為同一晶片經過 LAH 還原後所測得的吸收光譜。可以觀察到 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰已經消失。 $3000\text{ cm}^{-1}\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 之間可以看到廣泛隆起的吸收峰帶，推測應該是被還原的 OH 官能基所造成。而 CH_x 、 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰仍然存在，這代表連結分子的強度可以承受快速激烈的還原反應，並不會因為 LAH 的反應劇烈而造成連結分子斷裂或分解。

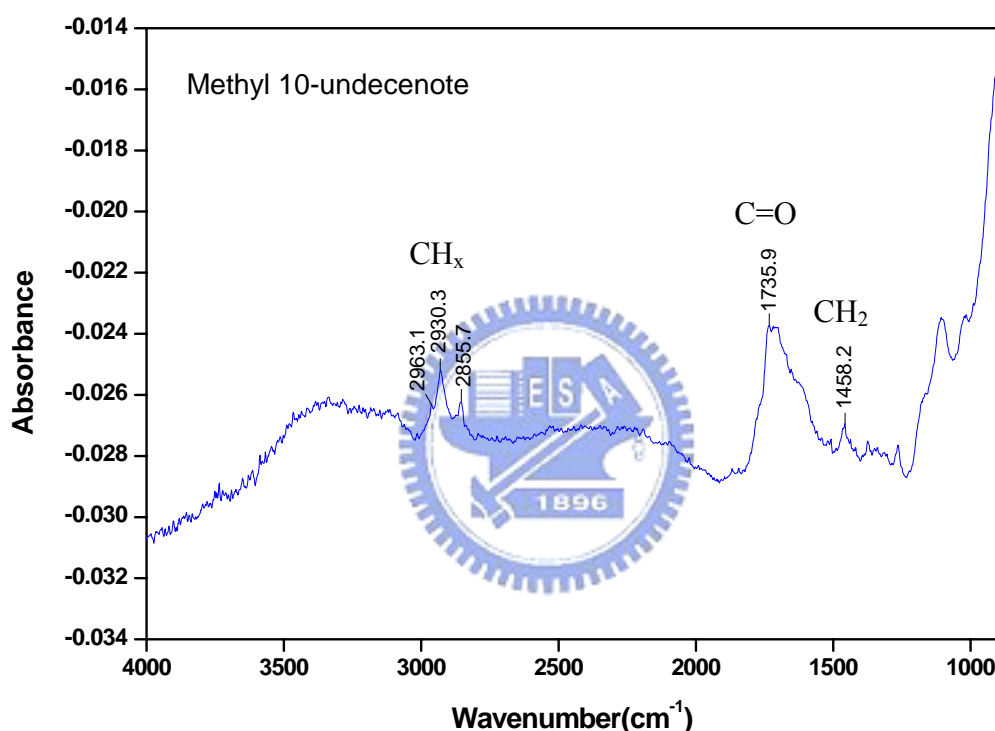


圖 4-3 矽晶片合成連結分子 methyl 10-undecenoate 4 小時後之表面吸收光譜

圖 4-5 為經過氫化之矽晶片浸泡 IPA 後，並緊接著在 200°C 下與連結分子 ethyl undecylenote 反應 4 小時之表面吸收光譜。 $2800\text{ cm}^{-1}\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 之間同樣可以觀測到 CH_x 的吸收。在 1739.8 cm^{-1} 的吸收峰證明 $\text{C}=\text{O}$ 的存在， 1454.2 為 CH_2 的吸收。

圖 4-6 為同一晶片經過 LAH 還原後再測得的吸收光譜。可以發現到原本在 1739.8 cm^{-1} 的吸收消失了，而 CH_x 卻沒有消失。因此可以證明連結分子的確可以成功地連結在矽晶片上，並且接著進行還原為 OH 基的反應，而不會造成斷裂。

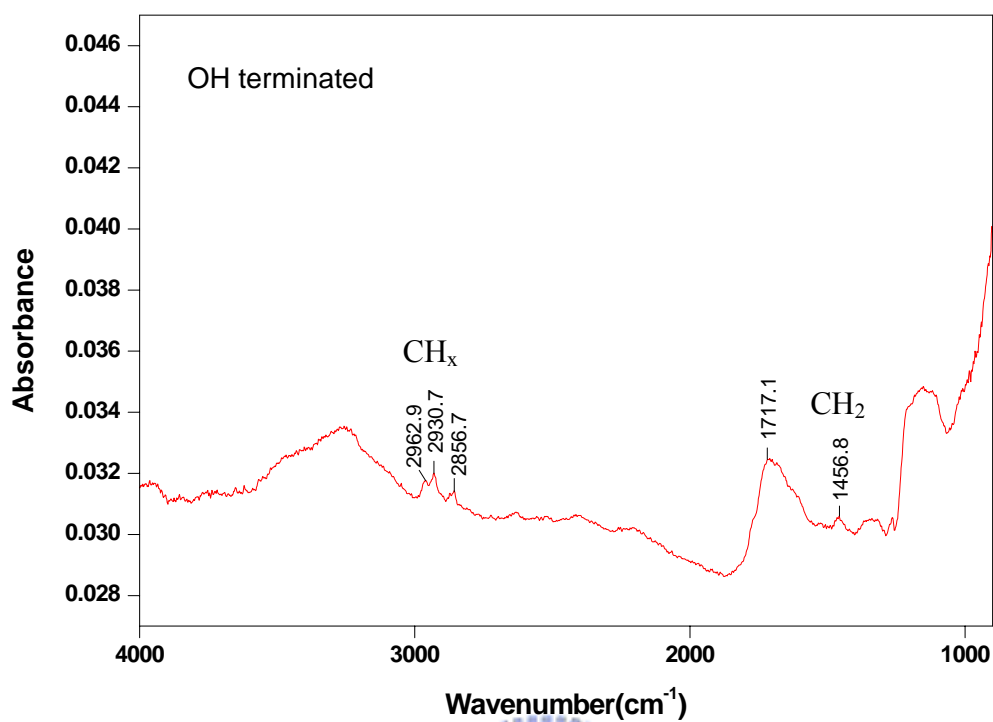


圖 4-4 LAH 還原連結分子 methyl 10-undecenoate 後之表面吸收光譜

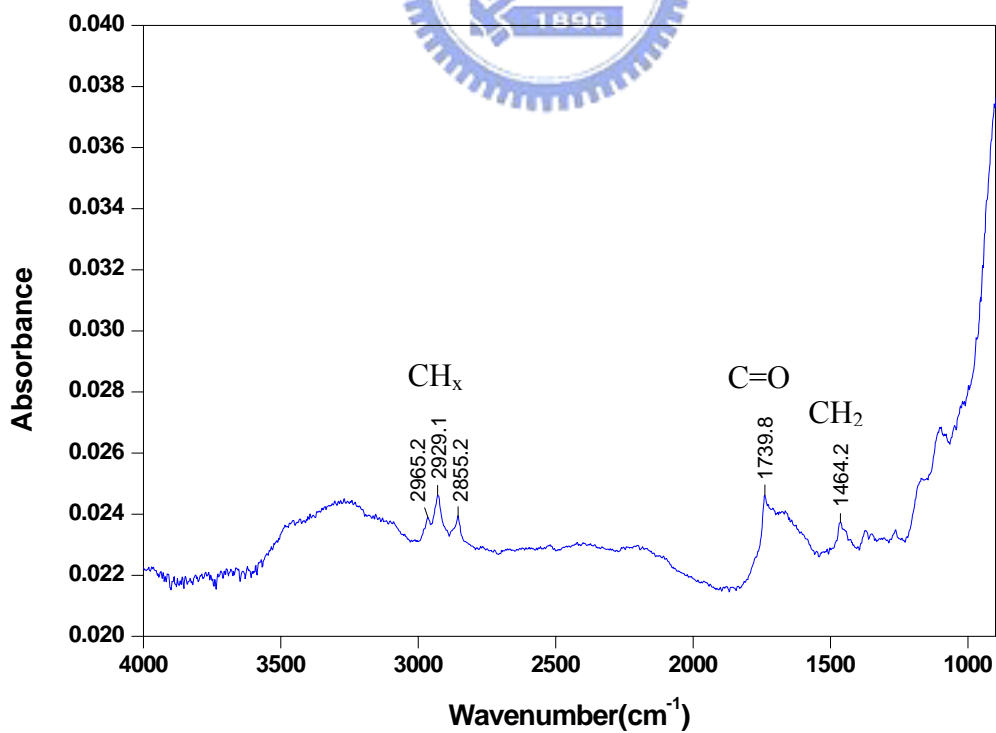


圖 4-5 矽晶片合成連結分子 ethyl undecylenate 4 小時後之表面吸收光譜

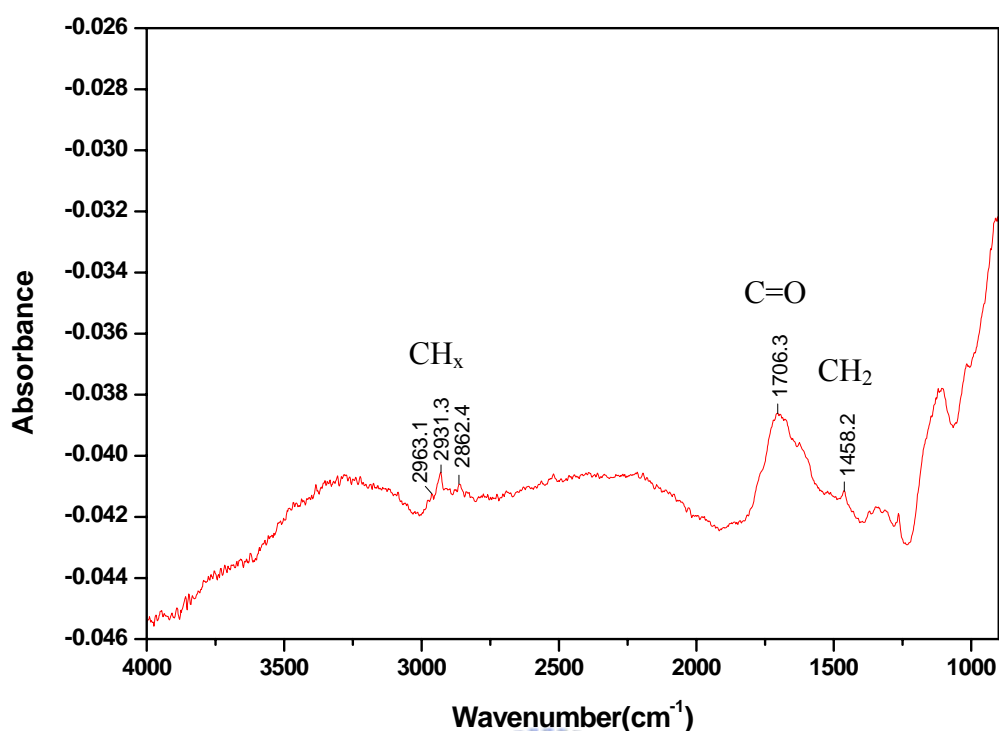


圖 4-6 LAH 還原連結分子 ethyl undecylenate 後之表面吸收光譜

如果連結分子只是吸附在表面而沒有產生加成的反應，則分子的雙鍵並不會被破壞。而從上列光譜上並未出現 C=C 雙鍵（吸收在 1595 cm^{-1} ）的吸收峰的情形推斷：幾乎沒有物理吸附的連結分子存在於晶片表面。然而進一步的分析則必須要藉助 ESCA 與橢圓測厚儀的量測。

4.2 橢圓測厚儀分析

與 X-Ray 測厚儀相比較，橢圓測厚儀是比較方便的薄膜測厚儀器，然而前提是待測薄膜必須是可透光的材料。它是利用偵測光通過材料後，形成電磁波相位延遲不同所導致的橢圓偏振效應，來估計薄膜厚度。靈敏度可以量測到厚度只有幾個 Å 的薄膜。橢圓測厚儀不需要在高真空系統下，就可以直接進行量測，因此本實驗是利用 Sopra 公司生產，型號 GES5 的多波長掃描橢圓測厚儀來分析晶片表面連結分子的厚度，以及合成鹼基序列之後所造成的厚度變化。對於大多數的飽和碳氫化物，薄膜折射率可以適當地設定為 1.46。

	Linker	Linker + sequence A	Linker + sequence B
Methyl 10-undecenoate	20 Å	85 Å	134 Å
Ethyl undecylenate	24 Å	109 Å	145 Å

表 4-1 晶片上的連結分子原始厚度與接上鹼基序列後之厚度量測值

我們可以從表 4-1 發現到，兩種連結分子的原始厚度都在原子級的尺寸範圍內。當我們合成上鹼基序列後，薄膜會因為增加了基因序列大幅增加其厚度。

4.3 X-ray 光電子能譜分析

X-ray 光電子能譜分析的基本原理乃根據光電效應，當足夠能量的電磁波 (X-ray) 照射在材料表面時，原子內電子會經由吸收電磁波能量而被游離出來成為所謂的光電子 (photoelectron)。光電子的動能為入射電磁波的能量減去該電子在原子內特定軌域的束縛能，因此不同元素之光電子具有特定動能而作為判定材料表面元素成分的根據。而本實驗中，我們利用 X-ray 光電子能譜分析儀來分析晶片表面元素組成，分析儀的廠牌型號為德國 Omicron Multiprobe Compact。因為壓力與溫度為正相關因子，因此在 X-ray 照射時，會導致腔體升溫而使腔體內壓力回升。我們的晶片樣本 (能譜分析部份，我們只有分析連結有 ethyl undecylenate 的晶片) 在 X-ray 照射前的真空壓力一直維持在 2.3×10^{-9} torr 左右，而 X-ray 照射後所觀測到的壓力約為 5.8×10^{-9} torr。

如圖 4-7 所示，我們合成在晶片表面的連結分子 (ethyl undecylenate) 因為含有碳 (carbon) 與氧 (oxygen) 元素，因此在全能譜掃瞄中可以觀測到其存在。而能譜在 99 eV 所出現的峰值，則來自於矽晶片基板含有的矽元素所產生的光電子造成。

圖 4-8 則顯示了晶片表面連結分子的酯基還原成 OH 基後的全能譜掃瞄與氧元素的微區掃瞄。我們可以發現到碳與氧原子仍然存在晶片表面，

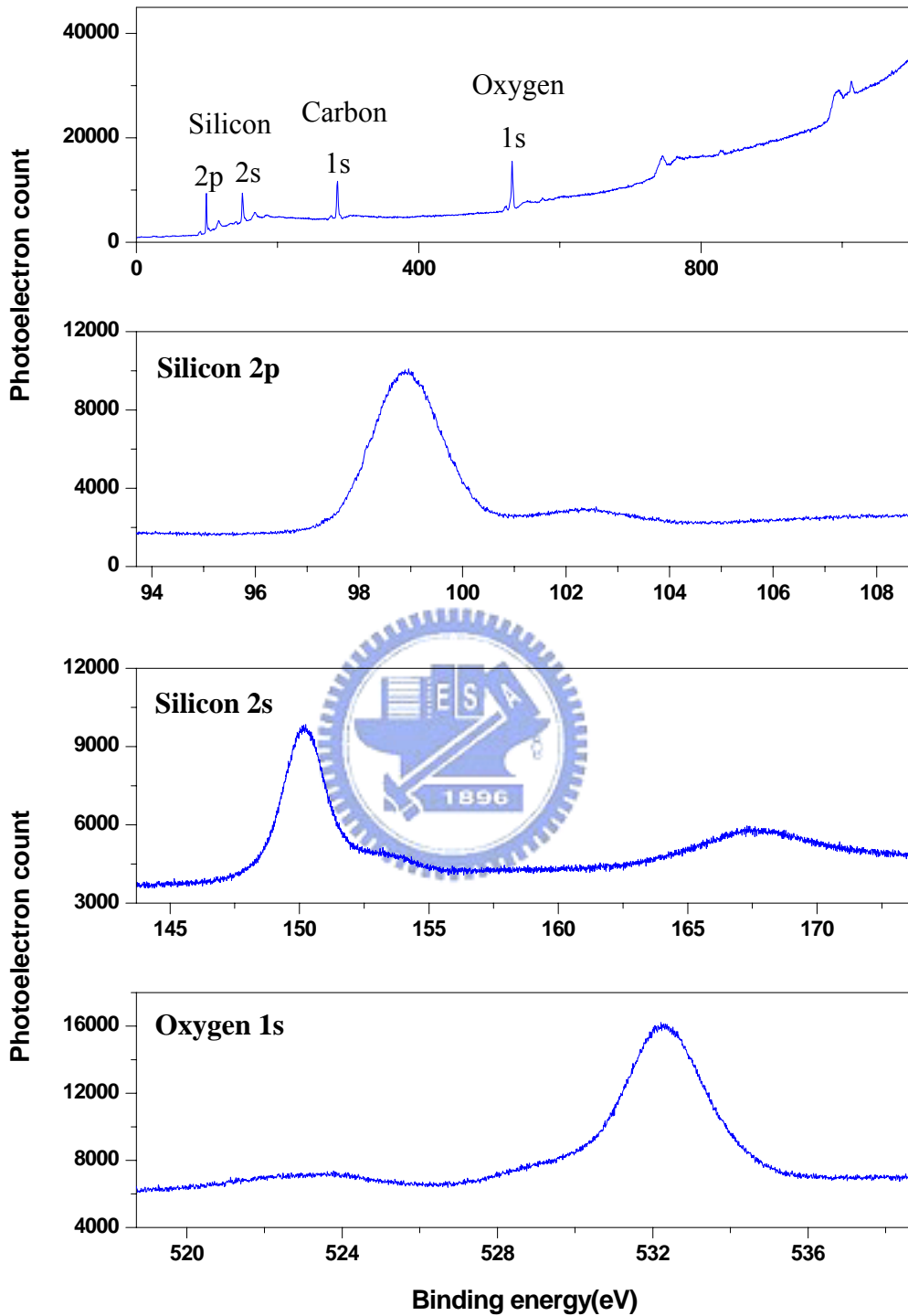


圖 4-7 晶片表面 linker 還原成 OH 基前的 X-ray 光電子
全能譜掃瞄與單元素 silicon 與 oxygen 微區掃瞄

由此可以推測經過還原後，連結分子仍然存在晶片表面。然而，由於氧的氧化態在還原前後都是相同的，因此圖 4-8 與圖 4-9 兩個氧元素 (1s) 能譜對照的結果均極為相似。雖然光電子能譜對元素的分析極為靈敏，但卻無法像紅外吸收光譜可以很容易地判斷官能基的類型。

如圖 4-9 的全能譜圖所示，晶片表面的連結分子連結上 DNA 後，DNA 的磷酸中含有的磷 (Phosphorus) 元素，以及鹼基中含有的氮 (Nitrogen) 元素，均可以在全能譜圖中觀測到。因此，我們從 X-ray 光電子能譜的一系列分析中證實 DNA 確實能夠經由連結分子 ethyl undecylenate 的鍵結，在矽晶片的表面進行原位合成。

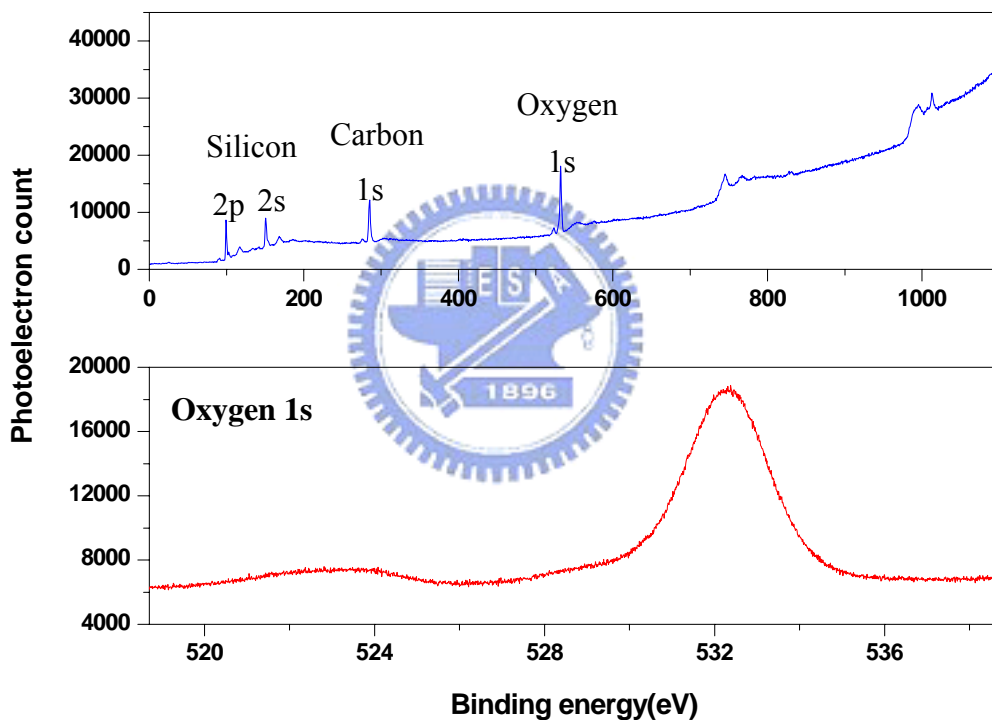


圖 4-8 晶片表面 linker 還原成 OH 基後的 X-ray 光電子全能譜掃描與單元素 Oxygen 微區掃描

X-ray 光電子能譜分析儀必須操作在超高真空 (ultra-high vacuum, 簡稱 UHV) 環境下，因此，待測樣品必須能承受 X-ray 照射下而產生的升溫效應。對於常溫下非固態、非結晶、揮發性，及容易受熱分解的化學分子，均不適合進行光電子能譜分析。我們採用的連結分子其化學特性在常溫下是液態，並且受熱會揮發。如果連結分子僅是物理吸附，則將會被離

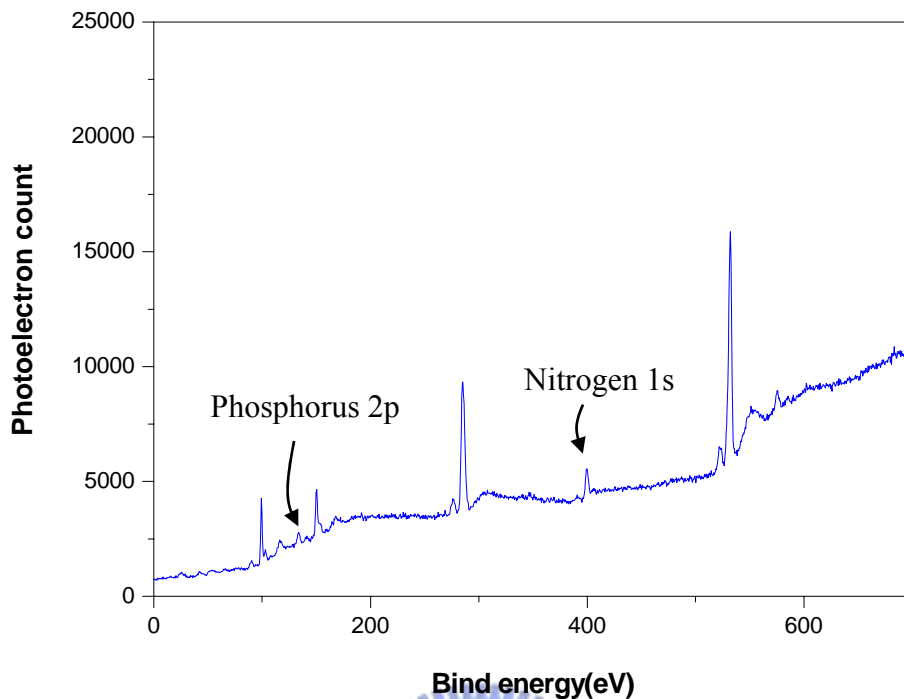


圖 4-9 晶片表面 linker 還原成 OH 基
並連結上 DNA 後之全能譜掃瞄

子幫浦抽出分析儀腔體外，即使表面只有些微的受熱揮發，也會導致腔體壓力遽增而使分析儀自動跳機停擺。然而，當我們將它與矽晶片基板產生化學共價鍵結後，原本性質應該是液態的有機分子就屬於固態矽晶體的一部份，理論上就可以承受超高真空下的操作。而從實驗裡，我們證明了晶片表面鍵結的連結分子在超高真空度的環境下，仍然可以穩定地存在晶片表面，即使連結分子受到 X-ray 照射也不會熱揮發。同理，合成上鹼基序列的矽晶片也同樣地通過了超高真空度下 X-ray 照射的考驗，並且觀測到 DNA 分子中特有的磷 (P) 以及氮 (N) 元素。

然而，在紅外吸收光譜的量測中，碳氫鍵的吸收峰均出現在 2929 cm^{-1} 與 2955 cm^{-1} 。因此，我們可以推斷出連結分子應該偏向於液態。如果分子緻密到一定程度時，會與碳化物的固態結晶吸收類似，並使碳氫鍵的吸收峰偏移至 2920 cm^{-1} 與 2950 cm^{-1} 。而在單元素矽的微區掃瞄中，我們發現在 103 eV 附近偵測到微量的光電子，推斷是屬於二氧化矽的氧化態。同樣地，橢圓儀的量測中也發現到類似二氧化矽的折射率型態。因此我們可以合理地推斷晶片表面仍然無可避免地生成了微量的二氧化矽。

由於我們合成兩種晶片 A 與 B，晶片 A 只合成 8 個鹼基；而晶片 B 有 24 個鹼基。因為較長的 DNA 比較容易進行檢測與雜交，因此在這裡我們只進行晶片 B 的雜交。雜交在 40°C 溫度下，SSPE 的鹽緩衝液內進行 12 小時，晶片 B 上面合成的序列為 silicon+linker+3'-SSSSCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC-5'。

4.4 螢光標靶序列原位雜交

下圖 4-10 為晶片 B 與其互補標靶序列 UM13242C 進行雜交後的螢光影像圖。從圖中我們發現雖然表面有紅色螢光，然而微弱得幾乎看不見。由於基因晶片的雜交效率通常都在 10% 以下，因此雜交訊號通常會非常地微弱。一般的 CCD 對於基因晶片如果需要呈現對比更強的螢光影像，一般通常都使用共軛焦雷射掃描儀較為理想。

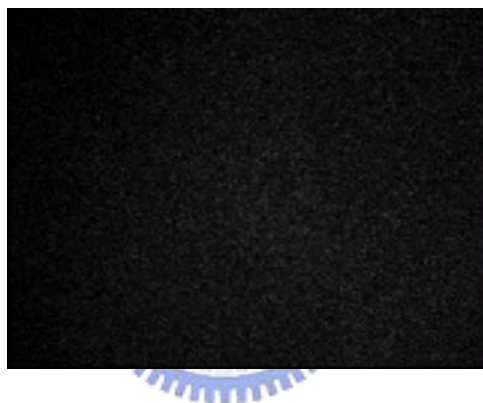


圖 4-10 晶片表面的螢光雜交影像圖。其中使用 40 倍物鏡觀測所見視野。照片中的影像視野約為 150 μ m \times 150 μ m 左右。

第五章 結論與展望

生物分子的固定化在生物晶片科技上一直扮演極重要的角色，本篇論文不但探討了在基因晶片表面的固定技術，並且提出一項在矽晶片表面製作基因晶片的構想。而我們也利用了多種儀器分析並證明了 DNA 確實能夠在矽晶片表面上生長。

然而，我們在技術上仍有許多需要改進的地方。從 X-ray 光電子能譜與橢圓儀量測中，我們發現到了微量的二氧化矽存在。這是由於我們並非在密閉的容器中進行這些實驗，因此，在矽晶片氫化完畢，要置入油浴裝置內反應時，仍然難免會接觸到大氣中以及包含在反應液中尚未去除的氧而形成二氧化矽。從紅外光譜的分析中，也可以發現到連結分子因為受到部份二氧化矽的影響，並非生長得很緻密。

在還原反應上，我們是利用 LAH 作為還原劑以還原連結分子上的酯基為 OH 基。雖然效率很高，然而 LAH 是對水汽分子非常敏感的物質，因此我們即使在氮氣箱操作，仍然會有些微的 LAH 與水分子反應時所產生的副產物殘留在晶片表面上，使得我們難以利用橢圓儀來量測其還原後的厚度，而這也會間接地影響到晶片合成 DNA 的效率。

雖然從理論上來看，這個構想非常容易實行。然而在實驗中才會真正面臨到種種的困難與瓶頸。材料對於有機溶劑的反應、化學污染的排除、反應裝置的設計等等，都有非常關鍵的 know how 必須從中摸索。對於矽基板與厚度僅數十埃的檢測方式，也必須要運用特殊的儀器來分析。從實驗裡，我們已經可以掌握到生長製造這種薄膜的技術以及量測的方法。

雖然所有人都樂觀地認為，在矽晶電子元件上製造基因晶片是未來必定屆臨的趨勢，然而其相關研究仍然為數甚少。現在的基因晶片主要還是將基因點放在玻璃、塑膠、尼龍薄膜等被動載具上，並藉由儀器去掃描反應結果。然而在不久的未來，設計在矽晶片上並具有主動感測能力的生物電子裝置將會成為更新一代的科技工具，而本論文便提供了一種在矽晶片上製作基因晶片的方法，期望能促進研究的風氣及激發更多的想法，並為未來的人類謀求更多的福祉。

附錄一 基因學發展簡史

本節附錄簡要地介紹基因從首度被發現，直到逐漸被地被科學家們分析了解，到現在成為一個新興研究學門的過程。其中充滿了無數曲折但有趣的故事。對於從未接觸過生命科學與基因相關知識的讀者，可從本文簡短淺顯的歷史回顧中，迅速獲得一些基本的概念。

1865年，孟德爾（G. J. Mendel）在豌豆的雜交實驗中首度發現了古典遺傳學的法則，但是這項成果並沒有受到任何的重視。而在1869年，瑞士科學家 Frederick Miescher 在病人的傷口濃液中分離出了一種當時仍未知的生物分子，由於是取自細胞核，且為酸性物質，因此命名為核酸（nucleic acid）。直到1902年，孟德爾的研究又再度被重新探討。此後，遺傳學得到突破性的進展。1905年，N. Steven 和 E. Wilson 在實驗中發現了控制生物後代性別的性染色體（sex chromosomes）X 與 Y。同年，英國醫師 Archibald Garrod 在其觀察黑尿病（Alkaptonuria）的研究中，認為這是一種先天性的代謝錯誤，遂提出了人類先天遺傳疾病的概念。

二十世紀以來，儘管遺傳學的發展是如此地成功，並大規模地運用在家畜、農作物的栽植培育上。人們利用遺傳法則將高生產力、高經濟價值的好基因保留下來；而將容易受蟲害、容易致病的壞基因淘汰掉。然而在功利的考量下，人類的基因是否也可有優劣之分？是否也能經由育種的方式來將所謂低劣的基因汰除掉呢？種族優越論以及優生學主義就在此時興起，並得到極力鼓吹。使得接下來的數十年，導致了來自文化、宗教、種族、性別上的多方面歧視衝突與相互殺戮，寫下了人類史上最為悲慘的一頁歷史，而遺傳學的發展也在二次世界大戰終止後沈寂了相當長的一段時間。

反觀，生物化學雖然發展較晚，卻沒有這樣沈重的包袱。1920年代，洛克斐勒研究院的 P. Levine 開始進行核酸的研究。他仔細地分析了核酸的化學成分，並提出了核酸的化學架構。他指出：核酸，是由基本單元—核苷酸（nucleotide）所組成的巨大分子，而且每個核苷酸都是由核糖（ribose）、磷酸（phosphate），以及一種含有氮原子的鹼基（base）三項構成，其中鹼基有四種不同的形式。他也明白揭露了核酸中的糖其實是一種去氧核糖（deoxyribose）。因此，最初被 Miescher 發現的核酸，也就開始普遍地被稱為去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，簡稱 DNA）。同時期，人們利用一種由德國化學家 Robert Feulgen 發明，只對 DNA 具專一性的紫色染料，觀測到 DNA 位於細胞核內的染色體上。1928年，微生物學家 Fred Griffith 藉由小鼠實驗首度發現了一種可在細菌中交換的遺傳分子。而在

1944 年，Oswald Avery、Colin Macleod、及 Maclyn McCarty 經由分離此種細菌的生物分子並觀察其交換現象，證實了 Griffith 發現的遺傳分子就是 DNA。

然而，僅由四種鹼基排列組合的 DNA 分子，竟可以攜帶世界上所有形形色色生命，數以千萬計不同的遺傳訊息？這一番論點，幾乎令大部分的生物遺傳學家難以置信！況且，生物體內遺傳訊息所在的染色體是由 DNA 與一種稱為 histone 的蛋白質（protein）所共同組成的，而蛋白質的主要成分—氨基酸（amino acid），當時已知就多達二十餘種。光是可能的排列組合數就比 DNA 的還要多更多。因此，他們堅信蛋白質才是最佳的遺傳訊息攜帶分子。再則，人類貴為萬物之靈，奚異於鳥獸花木，如果所有的物種都是由相同的材料—DNA 所變衍而來，那對人類的尊嚴不啻是一大打擊。關於遺傳分子的論述就這樣始終爭論不休。一直到 1952 年，Alfred Hershey 和 Martha Chase 才終於利用病毒，非常嚴謹地證實了攜帶遺傳訊息的物質確實是 DNA，而不是蛋白質。

1950 年，生化學家 E. Chargaff 在分析不同物種的 DNA 時發現：不管是什麼樣生物的 DNA，不管是大的或小的，其中腺嘌呤（adenine）的量永遠與鳥糞嘌呤（guanine）的量一樣；而胸腺嘧啶（thymine）的量也永遠與胞嘧啶（cytosine）的量一樣，然而卻無法明白解釋這其中的道理。

這項奇妙的發現，為當時亟欲解開 DNA 結構之謎的科學家們帶來靈感。稍後在 1953 年，華生（J. D. Watson）與克里克（F. H. Crick）藉由 X 射線繞射技術，推斷出核酸為兩兩鹼基成對，並由兩股磷酸長鏈相互交纏所構成的雙螺旋結構（double helix structure）。這項振奮人心的成果立刻被發表在 Nature 期刊上。而這些在科學上源續不絕的新發現，不但為當時的生物學界注入一股驚人的活力，也就此展開通往現代分子遺傳學與基因學的寬闊大道。

自從 DNA 的結構之謎被揭曉以來，Chargaff 所發現的法則也一併得到了合理的解答。而這解答的背後，更悄悄地透露了生物是如何藉由 DNA 來複製以及傳遞基因給下一代的奧秘。

生化學家從鹼基配對的規律中，很快地就猜出基因利用雙螺旋中的任何一股當成模版來進行複製的原理。1957 年，Francis Crick 在一場《論蛋白質合成》的演講中，闡述了基因製造蛋白質的概念。而在 1960 年，訊息核糖核酸（messenger RNA，簡稱 mRNA）首度被 S. Brenner 等人發現。直到 1966 年，M. Nirenberg，H. G. Khorana 和 R. Holley 終於發表了遺傳密

碼的學說，而關於基因如何複製、如何表達遺傳性徵的機制的研究也終於告一個段落。

現在我們已經清楚地知道：基因是 DNA 序列中的一小片斷序列。人類由三萬多個可表現的功能性基因 (functional genes) 控制著生長、發育、遺傳以及行為。一個人擁有將近六十兆個細胞，而每個細胞在核內總共有二十三對染色體。除了一小部分的蛋白質外，DNA 是構成染色體最主要的物質。如果將這些染色體上的 DNA 完全展開，可以得到多達三十億個鹼基對序列。然而，卻只有不到 1% 的 DNA 序列是真正帶有遺傳訊息的基因序列。沒有意義的 DNA 序列又被稱為垃圾 DNA (junk DNA)，因為它迄今仍未被發現能夠表現 (express) 以及傳遞訊息。而基因又是如何表現的呢？基因的表現是由 DNA 到 mRNA，再由 mRNA 到蛋白質。首先，基因會將自己的 DNA 鹼基序列轉錄 (transcribe) 一份而生成 mRNA，接著 mRNA 又將所攜帶的序列訊息以每三個鹼基為一組的法則轉譯 (translate) 成一份線性的遺傳密碼。每個密碼對應一個氨基酸 (amino acid)，而細胞便是根據這樣的密碼，循序將氨基酸合成蛋白質巨分子，並利用它來負責推動生物體內的酵素代謝反應，表現出生物特有的性質。

基因可說是一本指導生物體從孕育到凋零的設計藍圖。基於這樣的事實—生命現象的奧妙與先天疾病的果因，都被記載於此。物種隨著自然發生的基因變異，讓下一代進化成更適應嚴酷環境考驗的新個體。人類更因它，得以倖存於一波波地球氣候變遷的浩劫下，在貧病與飢餓中建立文明。由於基因相關的應用科技在農漁畜牧、疾病研究、臨床診斷、藥物研發、乃至國防軍事上都極具前瞻發展價值，甚至可能對未來的人類文明帶來巨大躍變。鑑於此，美國國會在 1989 年快速通過了「人類基因組計劃」 (Human Genome Project, 簡稱 HGP)，並於 1997 年開始著手進行由美國國家衛生研究院 (National Institute of Health, 簡稱 NIH) 主導的人類基因定序任務，試圖解開這本生命之書。

由於美國政府在基因研究的強勢指導、壟斷介入，使得研究進度仍遠遠落後的歐洲各先進國家倍感威脅。因此，英國、法國、義大利與德國也在此刻紛紛成立人類基因的專責研究機構。然而，歐盟諸國的經費有限，因此他們將研究重心聚焦在互補去氧核糖核酸 (complementary DNA, 簡稱 cDNA) 的分析定序上。這是因為推動生命運作的終極產物畢竟還是蛋白質，如果試圖將三十億鹼基對完全解碼，則其中高達 99% 將是毫無意義的資訊。因此，攜帶指導蛋白質合成密碼的 mRNA 立刻成了這波基因研究熱潮下的最佳材料。然而 RNA 的特性並不太穩定，不適合用來做研究，於是科學家們將 mRNA 反轉錄 (reverse transcription) 成原先的 DNA 狀態。

由於反轉錄後的 DNA 是與原初的 DNA 互補的，因此稱 mRNA 反轉錄後的產物為 cDNA。歐洲先進國的基因研究便是集中在這些能夠製造蛋白質的 cDNA 上，而現在有許多的基因晶片也正是利用 cDNA 所製造的。



附錄二 寡核苷酸微陣列的微影製程與檢測應用

在製作微陣列晶片時，需要在矽晶片表面同時進行大量的選擇性蝕刻、濺鍍，以及擴散。為此，微影顯像術（photolithography）提供了最精密的微圖案（micro pattern）製作能力，下圖一顯示了它的製程原理。首先，在矽晶片上旋轉塗佈（spin）一層正型光阻（positive photoresist）。接著，覆蓋具有微圖案的光罩（mask）。光罩為一底層鍍鉻（chrome）的石英基材，其上的微圖案有的鍍鉻有的則沒有。接著進行紫外光（ultra-violet，簡稱 UV）曝光，沒有鍍鉻的區域可以被紫外光穿透，使得其下的光阻曝光。光阻曝光後其化學性質會產生改變，我們便可以利用顯影液（developer）將其選擇性去除，只留下未曝光的光阻。同樣的道理，負型光阻（negative photoresist）將會得到反義圖案（antisense pattern）。無論利用正型光阻或負型光阻所得圖案中，被顯影液去除光阻的地方即可進行有效的寡核苷酸原位合成。反之，有光阻的地方，則隔絕了寡核苷酸合成的機會。因此，微影顯像製程技術可以製作出精密的寡核苷酸微陣列晶片。

矽晶片

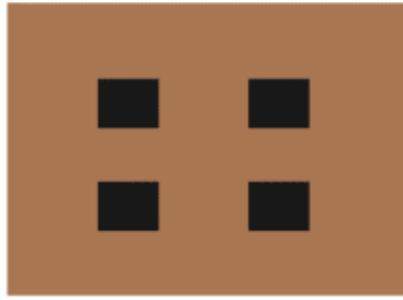


矽晶片
塗佈光阻

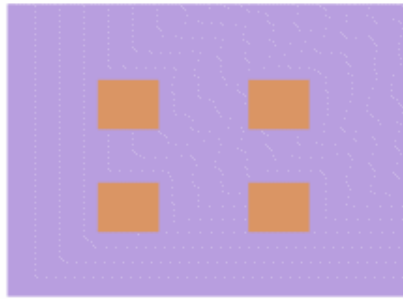




覆蓋光罩
進行曝光



顯影



圖一 微影製程示意圖

参考文献

1. “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Desoxyribonucleic Acid”, J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature.*, 1953, **171**, 737-738.
2. “Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists”, G. McGall , J. Labadie , P. Brock , G. Wallraff , T. Nguyen , and W. Hinsberg , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 13555-13560.
3. “Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces”, T. Strother , R. J. Hamers , and L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, No. 18, 3535-3541.
4. “Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films”, L. A. Chrisey , G. U. Lee , C. E O’Ferrall , *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 3031-3039.
5. “Silane Coupling agent 2nd Edition”, E. P. Plueddemann ,1992.
6. “Improving DNA-Chip Technology: *chemical aspects*”,D. Jörg *et al.*
7. “A perspective on protein microarrays”P. Mitchell, FEATURE on *nature biotechnology*, **20**, 2002.
8. “Manufacturing of GeneChip Microarrays”,
web site: <http://www.affymetrix.com/techology/index.affy>
9. “Microscopic investigations of the interaction of proteins with surfaces”, J.-H. Wang , L. W. Ruddock , and A. E. G. Cass, *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, **9**, 647-655.
10. “Immobilization of Oligonucleotides onto a Glass Support via Disulfide Bonds:A Method for Preparation of DNA Microarrays” , Y.-H. Rogers,P. Jiang-Baucom , Z.-J. Huang , V. Bogdanov , S. Anderson , and Michael T. Boyce-Jacino , *Anal. Biochem.*1999, **266**, 23-30.
11. “Semiconductor Physics & Devices, 2nd edition”, D. A. Neamen, 1992.
12. “Lewis Acid-Catalyzed *trans*-Hydrosilylation of Alkynes”, N. Asao, T. Sudo, and Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 7654-7655.
13. “Lewis Acid-Catalyzed Regio- and Stereoselective Hydrosilylation of Alkenes with Trialkylsilanes”, Y.-S. Song, B. R. Yoo, G.-H. Lee, and I. N. Jung, *Organometallics*, 1999, **18**, 3109-3115. “Microscopic investigations of the interaction of proteins with surfaces”, J.-H. Wang , L. W. Ruddock , and A. E. G. Cass, *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, **9**, 647-655.
14. “Organometallic chemistry on silicon surfaces : formation of functional monolayers bound through Si-C bonds”, Jillian M. Buriak , *Chem. Commun.*, 1999, 1051-1060. “Covalent attachment of

- oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces”, T. Strother , R. J. Hamers , and L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, No. 18, 3535-3541.
15. “Highly Stable Si-C Linked Functionalized Monolayers on the Silicon (100) Surface”, A. B. Sieval, A. L. Demirel, J. W. M. Nissink, M. R. Linford, J. H. van der Maas, W. H. de Jeu, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter, *Langmuir* 1998, **14**, 1759-1768.
 16. “Synthesis and Characterization of DNA-Modified Silicon (111) Surfaces”, T. Strother , W. Cai , X. Zhao , R. J. Hamers , and L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 1205-1209.
 17. “Formation of Ordered, Anisotropic Organic Monolayers on the Si(001) Surface ”, R. J. Hamers , J. S. Hovis , S. Lee , H. B. Liu , and J. Shan, *J. Phys. Chem. B, letters*, 1997, **101**, No. 9, 1489-1492.
 18. “Bioreactive Self-Assembled Monolayers on Hydrogen-Passivated Si(111) as a New Class of Atomically Flat Substrates for Biological Scanning Probe Microscopy”, P. Wagner, S. Nock, and J. A. Spudich, *J. Struct. Biol.*, 1997, **119**, 189-201.
 19. “Thermal Behavior of Alkyl Monolayers on Silicon Surface”, M. M. Sung, G. J. Kluth, O. W. Yauw, and R. Mabounian, *Langmuir*, **13**, 1997, 6164-6168.
 20. “Thermal Derivatization of Porous Silicon with Alcohols”, N. Y. Kim , and P. E. Laibinis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2297-2298.
 21. “Alkyl Monolayers on Silicon Prepared from 1-Alkenes and Hydrogen-Terminated Silicon”, M. R. Linford , P. Fenter , P. M. Eisenberger , and C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 3145-3155.
 22. 線性 α -烯烴的典型反應
web site: <http://www.agrofert.com.cn/CHN/HTM/gongy02cc.htm>
 23. “Preparation of Aldehydes from Carboxylic Esters by Reductive Oxidation with Lithium Aluminium Hydride and Pyridinium Chlorochromate or Pyridinium Dichromate”, J. S. Cha, J. H. Chun, J. M. Kim, D. Y. Lee, and S. D. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1999, **20**, No. 11, 1373-1374.
 24. “5’ phosphate-on user manual ”, Clontech, May 1999.
 25. “Custom Oligonucleotide Synthesis”, Nucleic Acid Facility, Cancer Center Department of Chemistry, web site: <http://www.med.upenn.edu/~dna>
 26. “Recombinant DNA 2nd edition”, J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller, 1992.
 27. “Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides : a new solid-phase

method.”,M. J. Gait, and R. C. Sheppard, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1977, 1135-1158.

28. “Models 392 and 394 DNA/RNA Synthesizers : User’s Manual”, Applied Biosystems Canada, Inc. 1992.

