

計畫名稱：微型生物晶片渠道中 DNA 配對偵測  
之光學量測理論及實驗

計畫編號：NSC90-2212-E-009-031

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：林振德 國立交通大學機械系

### 中文摘要

本計畫中我們建立一光學折射率之量測理論模式，並設計一實際量測之實驗，用以偵測 DNA 於溶液中之配對情況。在考量一般現有的生物晶片之設計後，我們使用一多層膜之結構，其中膜的厚度及排列方式各有不同組合，受測之試樣為其中之一層，將光源入射到此結構，依照各層光學性質的不同，經過多重反射之傳輸過程後，會產生部分反射、部分穿透和部分吸收的效果，當膜的厚度小到某一程度後，干涉效應應被考慮。我們首先推導出多層膜結構之光學反射率及穿透率的公式，用來描述光在不同的光學折射率及厚度的情形下，能量傳輸的結果，再利用最小平方誤差法，來進行光學折射率之逆運算分析。我們探討不同參數變化對於光反射及光穿透之影響，以期在逆運算分析時，能取得最佳的實驗量測組合。在實驗的部分，我們利用建立的量測理論，偵測含有 DNA 樣品之試液在不同的濃度及配對程度下之光學折射率，並探討此方法在生物分子定量量測之應用性。關於 DNA 配對過程中雙鏈 DNA 之解離，我們採取熱學方式來加以控制。

### 英文摘要

In this study, we develop an optical transduction for detection of DNA hybridization. After considering existing biosensors, the physical model adopted is a multi-layer structure for the present study. The arrangement of layer sequences and thicknesses might be random, and the testing sample layer is included. Due to various optical properties of layers, there exist different degrees of reflection, transmission and absorption of electromagnetic energy with multiple reflections inside the multi-layer structure. Interference effect is considered as the layer thickness is small. We first derive the expressions for reflectance and transmittance of the multi-layer structure, which describe the

energy transport under different combination of optical properties and thicknesses of layers. For inverse estimation of optical properties of a specific layer in the structure, the least squared error method is then utilized. Results of the inverse analysis should lead to an optimal design for the experimental measurements. The optical properties of DNA fragment solution in different degrees of hybridization are then measured in association with above-mentioned analysis. As to the controlling of DNA hybridization degrees, the thermal denaturation is utilized.

### 前言

生物晶片是利用生物反應過程中的質量變化、熱散失、光吸收或反射等物理性質改變，藉由電化學、熱學、光學等方法量測，並將訊號加以分析的裝置[1]。現今 DNA 生物晶片，以光學量測法最為普遍[2-8]，且具極佳的分辨率 (Specificity) 及靈敏度 (Sensitivity)。常應用於 DNA 生物晶片的光學量測方法如下：

一、螢光標籤法 (Fluorescence) [2, 3]

將 DNA 分子以螢光元素 (Fluorescent Compound) 加以染色，以配對時產生的螢光訊號量值，判定配對之結果。最常用的螢光元素為 Ethidium Bromide (EB) [9]，其對波長 510 nm 的光有很強的吸收力，且易與 DNA 分子形成鍵結。在理想的狀況下，進行量測，可以達到 5~50 ng 的靈敏度，但對於 DNA 配對分析應用上，仍嫌不足。

二、表面電漿共振 (SPR) [4-6]

表面電漿波 (Surface Plasma) 存在於薄金屬層與介電材質層間的電荷密度波，當以 TM (Transverse Magnetic) 波形式的光源入射至此一結構時，在某特定入射角或特定波長情況下，光波和電荷密度波產生共振，即為表面電漿共振現象 (Surface Plasma Resonance)，換言之，光的反射率會驟減。利用 SPR 所設計的生物晶片，

多以玻璃／金／待測生物分子溶液順序排列而成的層狀結構為主，生物分子會吸附於金的表面上，造成界面的介電常數改變，表面電漿共振的條件（入射角、波長）也因此而改變，藉著此一變化，我們便可檢測不同的生物分子及其性質。運用 SPR 設計的生物晶片，在偵測酵素、抗原—抗體作用或 DNA 方面，已有相當不錯的效果，但在低濃度的情況下，由於待測物在金屬表面的覆蓋度不足，造成了靈敏度的限制（約為  $1 \text{ pg/mm}^2$ ），故 SPR 方法尚待突破。

若能採取直接量測 DNA 在均勻溶液中的情況，並避免標籤的方式，可以更精確的評估 DNA 的配對過程，因此我們利用薄膜光學（Thin Film Optics）原理來進行量測。當薄膜的光學性質及厚度改變時，對入射光而言會有不同的反射率及穿透率。因此量測反射率及穿透率值，可逆推出薄膜的光學性質，此原理的應用已有許多文獻可參考 [10-12]。將待測的 DNA 溶液視為一層膜，當 DNA 進行配對時，會改變膜層的光學性質，因而對光有不同的反射率及穿透率，利用此原理，便可對不同配對程度的 DNA 作光學性質的估算。

### 量測理論之建立

我們使用標準石英液槽來容納 DNA 溶液，並作物理模式之推導，如圖 1。此結構共有三層，依序為石英液槽壁、DNA 溶液、石英液槽壁。以  $d_i$  表示各層的厚度， $n_i$  表示各層的光學折射率，除溶液層厚度及光學折射率待測外，其餘均可由文獻查得光學折射率的資料。以波長  $\lambda$  的非偏極化（Unpolarized）光源，從空氣以入射角  $\theta$  進入三層膜結構，進行 DNA 配對程度之偵測。

假設波長為  $\lambda$  的光源，從空氣（ $n_0$ ）以入射角  $\theta$  進入，依序經過石英液槽壁（ $n_1 d_1$ ）、DNA 溶液（ $n_2 d_2$ ）、石英液槽壁（ $n_3 d_3$ ），再次進入空氣（ $n_4$ ）。當考慮薄膜時，干涉效應應被列入，在本報告中，限於篇幅我們列出厚膜之理論推導結果，即膜層厚度遠大於入射光源之波長，忽略干涉效應。關於此系統之總反射率  $R_{04,total}$  及穿透率  $T_{04,total}$  之推導，參考 Elizaldle and Rueda 及 Heavens 的著作，首先求得從  $n_0$  到  $n_2$  層之反射率  $R_{02}$  及穿透率  $T_{02}$ ，然後有部分的光會因反射而產生由  $n_2$  到  $n_0$  層的行進方向，必須另求得一反射率  $R_{20}$  及穿透率  $T_{20}$ ，如下所示

$$R_{02} = R_{01} + \frac{R_{12} T_{01}^2 A_1^2}{1 - R_{10} R_{12} A_1^2} @C \quad T_{02} = \frac{T_{01} T_{12} A_1}{1 - R_{10} R_{12} A_1^2} @A$$

$$R_{20} = R_{12} + \frac{R_{10} T_{12}^2 A_1^2}{1 - R_{10} R_{12} A_1^2} @C \quad T_{20} = \frac{T_{10} T_{21} A_1}{1 - R_{10} R_{12} A_1^2} @A$$

$$A_1 = \exp [-4\pi \text{Im}(n_1 \cos \phi_1) d_1 / \lambda] @B$$

同理我們可求得從  $n_0$  到  $n_3$  層之  $R_{03}$  及  $T_{03}$ ，

$$R_{03} = R_{02} + \frac{R_{23} T_{02}^2 A_2^2}{1 - R_{20} R_{23} A_2^2} @C \quad T_{03} = \frac{T_{02} T_{23} A_2}{1 - R_{20} R_{23} A_2^2} @A$$

$$R_{30} = R_{23} + \frac{R_{20} T_{23}^2 A_2^2}{1 - R_{20} R_{23} A_2^2} @C \quad T_{30} = \frac{T_{20} T_{32} A_2}{1 - R_{20} R_{23} A_2^2} @A$$

$$A_2 = \exp [-4\pi \text{Im}(n_2 \cos \phi_2) d_2 / \lambda] @B$$

最後我們可求得整個  $n_0$  到  $n_4$  層之  $R_{04}$  及  $T_{04}$ ，如下式所示

$$R_{04} = R_{03} + \frac{R_{34} T_{03}^2 A_3^2}{1 - R_{30} R_{34} A_3^2} @C \quad T_{04} = \frac{T_{03} T_{34} A_3}{1 - R_{30} R_{34} A_3^2} @A$$

$$A_3 = \exp [-4\pi \text{Im}(n_3 \cos \phi_3) d_3 / \lambda] @B$$

其中  $A_1$ 、 $A_2$  和  $A_3$  分別代表光通過  $n_1$  層、 $n_2$  層及  $n_3$  層時的能量衰減，上述表示式適用於垂直偏極化及水平偏極化的光源。在考慮非偏極化光源的情況下，總體的反射率  $R_{04,total}$  及穿透率  $T_{04,total}$  為垂直偏極化及水平偏極化的平均值，即

$$R_{04,total} = \frac{R_{04,s} + R_{04,p}}{2} @T \quad T_{04,total} = \frac{T_{04,s} + T_{04,p}}{2} @B$$

下標 s 及 p 分別為垂直、水平偏極入射光。

利用特定入射角光源之反射率和穿透率推算特定膜層之光學折射率的方法，本文將採用最小平方誤差法（Least Squared Error Method）來進行。我們欲逆運算的參數為厚膜之 DNA 溶液之光學折射率，亦即（ $n_2 k_2$ ），其他膜層的光學折射率及厚度為已知，入射光源的入射角和波長亦可由實驗控制。定義一誤差函數  $\varepsilon$

$$\varepsilon = \sum_{i=1}^n [(R_{i,e} - R_{i,c})^2 + (T_{i,e} - T_{i,c})^2] @B$$

$i$  代表不同的入射角及波長的情況， $R_{i,e}$  及  $T_{i,e}$  是由實驗所量測到的反射率及穿透率， $R_{i,c}$  及  $T_{i,c}$  則是由理論計算出的反射率及穿透率。將不同情況下的實驗值和理論值分別定義出  $Y$  和  $\eta(\beta)$  二個矩陣，如下所示：

$$Y = \begin{bmatrix} R_{1,e} \\ T_{1,e} \\ M \\ M \end{bmatrix}, \quad \eta(\beta) = \begin{bmatrix} R_{1,c}(\beta) \\ T_{1,c}(\beta) \\ M \\ M \end{bmatrix} @B$$

式中  $\beta = n_2$  或  $k_2$ ，因此可將誤差函數  $\varepsilon$  寫成

$$\varepsilon = [Y - \eta(\beta)]^T [Y - \eta(\beta)] @ B$$

欲求得最小的  $\varepsilon$  值時的光學常數，我們首先將  $\varepsilon$  分別對  $n_2, k_2$  微分可得到下式

$$\nabla_{\beta} \varepsilon = 2[-\nabla_{\beta} \eta(\beta)]^T [Y - \eta(\beta)] @ B$$

令  $X(\beta) = \nabla_{\beta} \eta(\beta)$ ，此為敏感矩陣 (Sensitivity Matrix)，其中的元素稱為敏感係數，可改寫  $\nabla_{\beta} \varepsilon$  為

$$\nabla_{\beta} \varepsilon = -2X^T(\beta)[Y - \eta(\beta)] @ B$$

當  $\nabla_{\beta} \varepsilon = 0$  時， $\varepsilon$  存在著最小值，亦即我們試著尋找一組  $\hat{\beta}$ ，使得

$$X^T(\hat{\beta})[Y - \eta(\hat{\beta})] = 0 @ B$$

取  $\eta(\hat{\beta})$  在某一點  $b$  的泰勒展開 (Taylor Expansion)

$$\eta(\hat{\beta}) = \eta(b) - \nabla_{\beta} \eta(b)(\hat{\beta} - b) @ B$$

代入上式，並加以整理，我們可得

$$X^T(b)[Y - \eta(b) - X(b)(\hat{\beta} - b)] \approx 0 @ B$$

此式將作為逆運算之迭代關係式，即

$$\hat{\beta} = b + P \{ X^T(b)[Y - \eta(b)] \} @ B, \text{ 其中 } P = [X^T(b)X(b)]^{-1} @ B$$

當迭代  $k$  次後， $\hat{\beta}$  成為  $b^{(k+1)}$ ，可表示為下式

$$b^{(k+1)} = b^{(k)} + P^{(k)} \{ X^T(b^{(k)})[Y - \eta^{(k)}] \} @ B$$

繼續此迭代過程，直到相對誤差滿足收斂條件，即

$$\frac{|b^{(k+1)} - b^{(k)}|}{|b^{(k)}| + \alpha_1} \leq \alpha @ B$$

式中  $\alpha$  為收斂條件， $\alpha_1$  為避免分母為零之微小量。

符合上述之收斂條件下，即可求出 DNA 溶液之光學折射率，亦即 ( $n_2, k_2$ )。

## 實驗方法

在此對實驗系統、樣品溶液配製以及實驗步驟做說明。

### 一、實驗系統

實驗系統包含光學量測系統及溫度控制系統，如圖 2。光學量測的部分，藉由紫外線/可見光分光光譜儀，配合石英樣品液槽，直接作垂直穿透率之量測。垂直反射率之量測，我們將光學鏡片組合在可移動之板上，此板移動時可量穿透率，移入時可量反射率，所有的鏡片皆是適

用於紫外光波段並以 45 度的入射角擺設，其中之分光透鏡 (Beam Splitter)，在入射光波長為 260 nm 時，可以產生 50% 之反射率及 50% 穿透率。溫度控制的部分，是利用 Peltier 效應來加熱或冷卻石英液槽的外部壁面，並藉由感測壁面溫度和設定溫度之差值，來調節加熱或冷卻的功率。

### 二、樣品溶液的配製

針對實驗需求，我們以五十五組鹼基對的雙股 DNA 為樣品，使用二次水作為溶劑，配製出不同莫耳濃度的雙股 DNA 溶液。我們所取得樣品質量相當微小，且存放於離心管內，故注入 1000  $\mu$ l 的水配製成濃度較高的母液，再由母液取得所須的樣品量，分裝於離心管內便於實驗取用。

### 三、實驗步驟說明

首先使用紫外線/可見光分光光譜儀來對 DNA 溶液進行光譜掃描，因 DNA 對紫外光具有較強的吸收性，且光學折射率和入射光的波長具有相關性，故在紫外光波段內尋找最易被 DNA 吸收的波長，作為進行其他實驗和理論分析之用。在此固定波長下，對於不同濃度之 DNA 樣品液進行反射率和穿透率量測，並利用溫控裝置加溫樣品改變其配對程度，依照 25、35、45、55、65、70~90 (間隔 2.5  $^{\circ}$ C)、95、100  $^{\circ}$ C 的順序加熱樣品，並量測樣品之反射率和穿透率。最後以逆運算來估算對應的光學折射率，觀察 DNA 在配對過程中，折射率和溫度變化的關係。

## 結果與討論

三層膜物理模式數值分析部分，假設入射光的波長為 260 nm 的情況下進行。此波長下，空氣折射率實部 ( $n_0$ ) 為 1.0、虛部 ( $k_0$ ) 為 0，石英液槽壁折射率實部 ( $n_1$  及  $n_3$ ) 為 1.59478、虛部 ( $k_1$  及  $k_3$ ) 為 0。

### 反射率及穿透率之討論

由於在不同之入射角下皆有相似趨勢，所以我們以 0 度入射的情況來討論。

圖 3 是針對樣品的  $k_2$  等於 0、 $10^{-6}$  及  $10^{-5}$  下， $R$  與  $n_2$  的關係。在此情況中，可觀察到  $R$  對  $n_2$  的變化皆會有一極小值區域，當  $n_2$  值逐漸遠離此區域時， $R$  會有增加的趨勢。當入射角較小時， $R$  值會以極小值區域為中心，對  $n_2$  作對稱的變化，即在固定  $k_2$  值下，除了極小值發生

的點上有一個  $R$  值對應到單一  $n_2$  值，其它的區域內，一個  $R$  值會對應到二個  $n_2$  值。故在  $n_2$  值靠近 1 附近時，一個  $R$  值對應到單一  $n_2$  值的機會就會增加。總體來說，當入射角度逐漸增加時， $R$  有增加的趨勢。

圖 4 表示和圖 3 相同  $k_2$  和入射角下， $T$  與  $n_2$  的關係。我們可以觀察到  $T$  對於  $n_2$  的變化，恰好相反於  $R$  對於  $n_2$ ，會有一極大值區域，當  $n_2$  值逐漸遠離此區域時， $T$  會有減少的趨勢。在  $k_2$  不同的情況下， $T$  值對於  $n_2$  變化的趨勢類似，但當  $k_2$  增大到某種程度後， $T$  值會變成 0，使得  $T$  與  $n_2$  的變化無關。

圖 5 針對樣品的  $n_2$  等於 1.0、2.0 及 3.0 時，表示  $R$  與  $k_2$  的關係。當樣品  $k_2$  逐漸增加時， $R$  有降低的趨勢，且會趨近一定值。其原因在於：當樣品  $k_2$  繼續增加到某種程度後，光線穿過樣品層到達第三層石英液槽壁時所產生的反射光線，返回到第一層石英液槽壁前即會被樣品層吸收完畢，在這樣的情況下， $R$  值相當於光源入射至單一石英液槽壁層所造成之反射率，實際以程式進行計算比對後，結果確實符合上述現象。在不同  $n_2$  的情況下， $R$  對於  $k_2$  的變化大致相同。

圖 6 呈現和圖 5 在相同的  $n_2$  值和光源入射角度下， $T$  對於  $k_2$  的關係。我們觀察到當  $k_2$  逐漸增加時， $T$  皆會有降低的趨勢，最後減少到 0。不同的  $n_2$  值對於  $T$  與  $k_2$  的變化趨勢影響不大。

關於  $R$  和  $T$  對於  $n_2$  和  $k_2$  變化的反應程度，我們觀察其對應之敏感係數並加以比較。從圖 8 到圖 11 中，可以知道  $R$  和  $T$  對  $n_2$  的敏感係數絕對值較對  $R$  和  $T$  對  $k_2$  的值小很多，因此  $R$  和  $T$  的變化主要是肇因於  $k_2$  的改變上， $n_2$  的影響性相對較小。

### 逆運算結果分析

進行逆運算之目的，在於利用量測特定入射角光源之反射率和穿透率，以最小平方誤差法來推算樣品層之光學折射率。

圖 7 為波長 260 nm 的光線，以 0 度和 75 度角入射至三層物理模式時，反射率和穿透率對於光學折射率實數部分 ( $n_2$ )、虛數部分 ( $k_2$ ) 之輪廓線圖，從圖中可以發現，某些反射率及穿透率組合下，對應之  $n_2$ 、 $k_2$  會有二組，亦即呈現前述多值函數之特性，意謂著進行逆運算工作時，得出的結果可能不是唯一解，因此在迭代過程中起始

值選定，必須要針對樣品層之光學折射率作估算，方能收斂至正確的答案。

在圖中，反射率輪廓線的部分分布較鬆散，表示反射率對  $n_2$  和  $k_2$  的變化較不敏銳，以實驗量測的角度來看，反射率的誤差對於逆運算之精確度影響較大。在穿透率輪廓線的分布方面，呈現較密集的情況，且穿透率主要是隨著  $k_2$  變化，對於  $n_2$  的反應較弱，因此穿透率的量測，在  $k_2$  方面達到較精準的答案，且相對於反射率之量測，穿透率之量測誤差對於逆運算的結果影響將會較小。

反射率和穿透率之輪廓線間的交角，也是影響逆運算的因素，以入射角為 75 度的圖形為例，在  $k_2$  較小的區域附近時，反射率和穿透率之輪廓線呈現近乎平行的狀態，逆運算在此區域進行時，容易造成多重解甚至發散的情況，其它輪廓線交角較大之區域，較不會有此狀況，故進行逆運算工作時，應儘可能避開輪廓線交角較小的區域。

圖八至十一顯示不同之樣本對於穿透率和反射率敏感係數之影響。綜合以上觀察反射率和穿透率輪廓線圖之結果，發現影響逆運算結果的因素有三項：適當之起始值給定、輪廓線之疏密程度、反射率和穿透率輪廓線間之夾角。經評估後，基於逆算結果和實驗操作方便性，決定採用垂直入射光源的方式進行反射率和穿透率之量測。

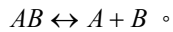
### 實驗量測結果

反射率的量測部分，因受限於實驗儀器之光學鏡片組合，因此本計劃中只能對穿透率部分做完整的實驗量測。又，標準石英液槽之尺寸為 DNA 液層厚度 10 mm，二層石英液槽壁厚度皆為 1.25 mm。

以濃度為 0.4  $\mu\text{M}$  的樣品液之實驗結果來討論，穿透率對於溫度變化之關係，如圖 12 中虛線部分所示。當 DNA 樣品液溫度逐漸升高時，穿透率值有降低之趨勢。其降低的原因，是因單股 DNA 之光吸收性優於雙股 DNA，因此會直接反映在樣品之折射率虛部值的變化上。藉由逆運算之程式，假設樣品液之折射率實部值 ( $n_2$ ) 為 1.3330，可利用穿透率推算出樣品液之折射率虛部值 ( $k_2$ )，因此得到樣品液  $k_2$  對於溫度變化之關係，如圖 12 中實線部分所示， $k_2$  有著隨溫度升高而增加的趨勢。

進行 DNA 的生物實驗時，需知道熔點溫度 (Melting Temperature, 簡稱 Tm)，其定義為假設以熱裂解的方式控制配對程度的過程中，雙股 DNA 有 50% 的量裂解成單股

DNA 時的溫度。我們嘗試以實驗的結果，來估算樣品 DNA 的熔點溫度，DNA 之配對過程可由下面反應式來表示：



式中  $AB$  代表雙股 DNA， $A$  和  $B$  代表單股 DNA。由於  $AB$ 、 $A$  和  $B$  具有不同的折射率虛部值，所以假設 DNA 在不同配對程度下之光學折射率虛部值，是由  $AB$ 、 $A$  和  $B$  分別所造成的效應累積而成，如下所示：

$$k_2 = xk_{ds} + (1-x)(k_{ss,A} + k_{ss,B})@B$$

式中  $x$  代表配對程度， $k_{ds}$  代表  $AB$  之光學折射率虛部值， $k_{ss,A}$  及  $k_{ss,B}$  分別代表單  $A$  和  $B$  之光學折射率虛部值。

假設 DNA 在  $25^\circ C$  時完全配對(即  $x=1$ )， $100^\circ C$  時完全裂解(即  $x=0$ )，利用逆運算求出對應溫度下之  $k_T$ ，可以得到  $k_{ds}$  及  $k_{ss,A} + k_{ss,B}$  的值，將這二個值代入  $k_2$  表示式，配對程度  $x$  可表示為：

$$x = \frac{k_T - (k_{ss,A} + k_{ss,B})}{(k_{ss,A} + k_{ss,B}) - k_{ds}}@B$$

將各溫度對應的  $k_T$  值代入，即可得到當時樣品之配對程度，針對濃度為  $0.4 \mu M$  的樣品液評估，配對程度隨溫度變化的關係如圖 13，將配對程度( $x$ )和溫度( $T$ )的關係，利用最小平方誤差的方式找出不同階(Order)的曲線方程式來近似，在比較曲線方程式的平方誤差和的大小後，以 9 階的曲線方程式，來代表配對程度( $x$ )和溫度( $T$ )的關係，如圖 14。由此方程式的計算，可以求得樣品在不同溫度下的配對程度，當溫度值為  $77.00^\circ C$  時，所估算出之配對程度約為 50%，此溫度即為樣品之熔點溫度。

### 結論

在物理模式之數值分析下，發現穿透率對於樣品層之光學折射率虛部之變化較為敏感，且其量測誤差所造成之影響較小，所以量測穿透率對於評估樣品之光吸收特性較有幫助，相當適合於探討 DNA 之配對過程；反觀，反射率在本物理模式中對於光學折射率變化之敏感度較小，實驗誤差所造成之影響較大，惟有藉由良好之實驗設置，方能夠量測出精確的變化。

進行 DNA 配對程度之量測時，由於反射率量測不易，且在敏感係數分析時，發現樣品液折射率實部值之變化對於反射率及穿透率造成之影響，遠小於虛部值，所以將樣

品液之折射率實部以水來近似，並量測穿透率來推算樣品之折射率虛部值，亦可達到觀測的目的。

### 參考文獻

1. Junhui Zhai, Hong Cui and Ruifu Yang, "DNA Based Biosensors," *Biotech. Adv.*, Vol. 15, No. 1, pp. 43-58, 1997.
2. P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha and H. Cohen, "Fiber Optic Biosensor for Fluorometric Detection of DNA Hybridization," *Analytica Chimica Acta*, Vol. 288, pp. 205-214, 1994.
3. P. A. E. Piunno, U. J. Krull, R. H. E. Hudson, M. J. Damha and H. Cohen, "Fiber-optic DNA Sensor for Fluorometric Nucleic Acid Determination," *Anal. Chem.*, Vol. 67, pp. 2635-2643, 1995.
4. A. Thiel, A. Frutos, C. Jordan, R. Corn and L. Smith, "In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold surfaces," *Anal. Chem.*, Vol. 69, pp. 4948-4956, 1997.
5. H. Watts, D. Yeung and H. Parkes, "Real-time Detection and Quantification of DNA Hybridization by an Optical Biosensor," *Anal. Chem.*, Vol. 67, pp. 4283-4289, 1995.
6. A. Hanning, J. Roeraade, J. J. Delrow, R.C. Jorgenson, "Enhanced Sensitivity of Wavelength Modulated Surface Plasmon Resonance Devices Using Dispersion from a Dye Solution," *Sensors and Actuators B*, Vol. 54, pp. 25-36, 1999.
7. T. Vo-Dinh, K. Houck, and D. L. Stokes, "Surface-Enhanced Raman Gene Probes," *Anal. Chem.* Vol. 66, pp. 3379-3383, 1994.
8. S. S. Yee, J. Homola, G. Gauglitz, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 54, Issue: 1-2, Jan 25, 1999.
9. R. R. Monaco and F. H. Hausheer, "Binding Site for Ethidium Cation in the Major Groove of B-form DNA," *J. Biomolecular. Struct. Dynamics*, Vol. 10, pp. 675-680, 1993.
10. O. S. Heavens, *Optical Properties of Thin Solid Films*, Dover Publications, New York, 1991.

11. E. Elizalde and F. Rueda, "On The Determination of The Optical Constants  $n(\lambda)$  and  $\alpha(\lambda)$  of Thin Supported Films", Thin Solid Films, Vol.122, pp. 45-57, 1984.
12. J. J. Chen, J. D. Lin and L. J. Sheu, "Simultaneous Measurement of Spectral Optical Properties and Thickness of an Absorbing Thin Film on a Substrate", Thin Solid Films, Vol. 354, pp. 176-186, 1999.

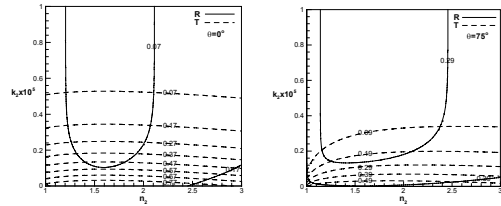


圖 7 光源以不同角度入射時，反射率和穿透率對於折射率實部和虛部之輪廓線圖

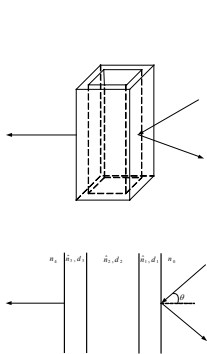


圖 1 物理模式

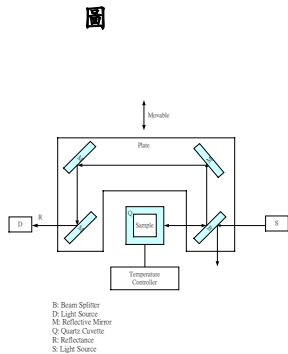


圖 2 實驗系統示意圖

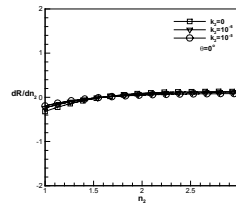


圖 8 樣品之折射率虛部在不同值下，反射率敏感係數與折射率實部值關係

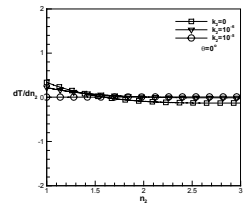


圖 9 樣品之折射率虛部在不同值下，穿透率敏感係數與折射率實部值關係

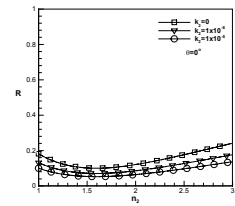


圖 3 樣品之折射率虛部在不同之值，反射率與樣品折射率實部值的關係

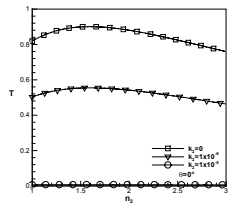


圖 4 樣品之折射率虛部在不同之值，穿透率與樣品折射率實部值的關係

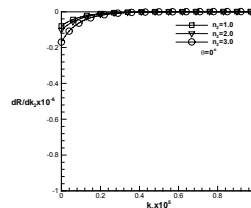


圖 10 樣品折射率實部在不同之值，反射率敏感係數與折射率虛部值關係

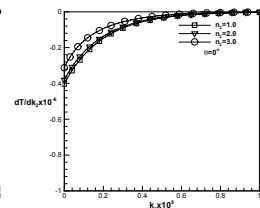


圖 11 樣品折射率實部在不同之值，穿透率敏感係數與折射率虛部值關係

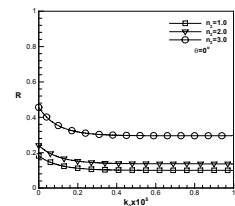


圖 5 樣品的折射率實部在不同之值，穿透率與樣品折射率虛部值的關係

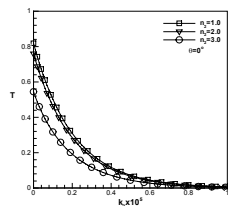


圖 6 樣品之折射率實部在不同之值，反射率與樣品折射率虛部值的關係

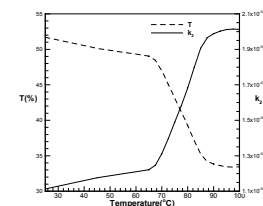


圖 12 穿透率及樣品折射率虛部對溫度的關係

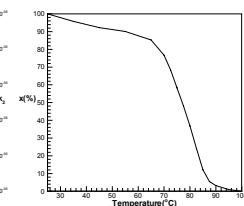


圖 13 配對程度與溫度之關係

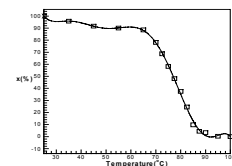


圖 14 九階曲線方程式