

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松 博士

探討 DNA 電化學感測器之製程及其應用分析

研究生：吳森迪 撰

中華民國 一〇一年七月

## 摘要

DNA 於生物細胞中扮演著傳遞遺傳訊息的重要角色，有關 DNA 的識別及檢測一直為人們所關注。由於近年電化學的發展，其用於生物醫學、環境監測與藥物篩選等方面受到廣泛的重視，且電化學方法具有高靈敏度及操作簡便等優點，使得電化學 DNA 生物感測器具有研究發展的前瞻性。

研究中主要是以白金電極為基材，在白金電極上聚合導電高分子 (PEDOT) 後，於 PEDOT 上聚合 4-ABA 以提供固定探針 DNA 之羧酸基。接著以 EDC 與 NHS 做為表面活化劑與媒合劑活化羧酸基，再將 3' 端修飾氨根之探針 DNA 與活化之羧酸基共價鍵結，將探針 DNA 固定於電極表面。最後雜合目標 DNA，將電極浸泡完道諾霉素後以電化學分析儀進行感測。

本研究主要針對導電高分子選材的考量及導電高分子膜的穩定性進行探討，最後以建構之電極進行感測。在完全互補 DNA 的感測中，探討兩種固定探針的方法對探針固定量的影響，並於不同濃度之互補 DNA 感測結果中得到感測訊號隨濃度增加而增加的趨勢。並於錯配之目標 DNA 的感測結果得知，以 DNM 做為雜合指示劑進行感測，於錯配位點後之 DNM 無法進行電子傳遞，因此無法分辨相同錯配位點之目標 DNA 的感測訊號。最後為了將感測器進一步應用於檢體的感測，而

設計了長鏈的探針 DNA，並針對雙鏈的目標 DNA 進行加熱解鏈及加入干擾引子的測試，從結果得知，當加熱至解鏈溫度並加入干擾引子時，可大幅提高感測訊號。

關鍵字：生物感測器、道諾霉素、錯配、微分脈衝伏安法。

## **Abstract**

In this study, the platinum electrode was used as the substrate to build the electrochemical biosensor. At first, the conductive polymer PEDOT was electrochemically polymerized on the platinum electrode. After that, the 4-ABA was synthesized upon the PEDOT film to provide carboxylic acid groups. Then the EDC and NHS were used as surfactant and matched reagent to activate the carboxylic acid groups in order to covalently bind to the amino group at the 3' terminal of modified probe DNA, in which finished to construct the DNA electrode.

To characterize the constructed electrode, a target DNA hybridized with the probe DNA, and immersed in a DNM solution to allow the DNM molecule into GC base pairs. After that, CH Instruments was employed to detect the electron transmit in the DNA by differential pulse voltammetry.

In this study, we have investigated the morphologies of different conductive polymers on the Pt electrode, and the stability of conductive PEDOT film with different approaches. We also used the electrode to measure the target DNA with complementary sequence or mismatched against the probe DNA.

The result showed that the DPV signal was increased with the

concentration of complementary target DNA. On the other hand, in the target DNA mismatches caused the reduction of DPV signal. In addition, position of the site mismatched, seemed to be important since electron transmission would stalk there, no matter other mismatches behind that point. Finally, we explored the possibility to apply the electrode for polymerase chain reaction (PCR) measurement, we therefore design a long probe DNA and a 56-bp double strand DNA. Before measurement, we heated the double strand DNA to separate and added interference primer to anneal to one single strand DNA, in which might enhance the hybridization between another single target DNA with probe DNA. Our result further confirmed the procedure proposed by our laboratory was applicable.

Key words: biosensor, daunomycin, mismatch, Differential Pulse

Voltammetry.

## 誌謝

兩年的研究生生活即將結束，在實驗中碰到很多挫折，雖然有想要放棄的念頭，但在家人的支持鼓勵之下，我還是堅持下來並完成這份論文，感激之情無法言喻，謹以此論文獻給我的家人，希望與你們共享這努力耕耘後的果實。

在求學的期間，非常感謝指導教授 顧野松博士在實驗上的指導，並教會我如何對一個陌生的議題進行研究，在此向老師獻上最誠摯的感謝。此外，感謝口試委員楊怡寬教授、杜景順教授、林其昌教授及林松池教授，在百忙之中費心的審查論文，並於口試時對學生論文的指導，使得論文更加完整及嚴謹。

在實驗室裡，首先要感謝的是情義相挺的大郭，很多不能說的秘密，最後簡化成一句謝謝你。再來是帶領我進入感測器這個領域及指導我實驗的村哥跟峰哥，感謝你們讓我過的相當精實。感謝在精神疲憊時陪我一起打球的楊董、先知-冷凍食品小開以及其他實驗室的球友，可以讓我重振精神繼續努力。感謝難相處的王小潔無聊時跟我吵吵架打發時間，並酸言酸語的刺激我，讓我有向前走的動力。感謝滷蛋實驗上的提醒，下次我會乖乖聽話。感謝亮均學長帶我熟悉實驗室的運作。最後感謝 358K 的各位，在這幾年陪我遊山玩水、陪我打球、陪我玩遊戲。下次再聚首，不知是何年，一起加油吧。

## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
誌謝.....	V
目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1-1 生物感測器簡介.....	1
1-2 電化學生物感測器簡介.....	3
1-3 導電高分子.....	6
1-3-1 聚二氧乙烯噻吩.....	8
1-4 對氮基本甲酸簡介.....	10
1-5 導電 DNA 簡介.....	12
1-5-1 影響 DNA 傳遞電子的因素.....	14
1-6 電化學 DNA 雜合指示劑.....	15
1-7 微分脈衝伏安法原理.....	18
1-8 研究動機.....	20
第二章 實驗藥品與儀器.....	21
2-1 實驗儀器.....	21

2-2	實驗藥品.....	23
2-3	DNA 引子.....	25
	第三章 實驗步驟.....	27
3-1	參考電極之製備.....	27
3-2	白金絲之前處理.....	28
3-3	PEDOT/Pt 電極之製備.....	28
3-4	4-ABA/PEDOT/Pt 電極之製備.....	29
3-5	DNA 感測器探針之固定與感測完全互補 DNA.....	30
3-6	DNA 感測器探針修飾(64mer)與感測 PCR 產物之序列.....	31
3-7	DNA 感測器探針修飾與感測含錯配鹼基之目標序列.....	32
3-8	DNA 感測器探針修飾與感測含錯配鹼基之目標序列.....	33
	第四章 實驗結果與討論.....	35
4-1	導電高分子的選擇.....	35
	4-1-1 探討 4-ABA/Pt 與 4-ABA/PEDOT/Pt 電極對 DNA 感測之影響.....	35
	4-1-2 探討不同導電高分子(PEDOT、PPy、PAni)修飾 4-ABA 對 DNA 感測之影響.....	44
4-2	PEDOT 膜穩定性探討.....	51
	4-2-1 PEDOT 氧化降解電位的探討.....	51

4-2-2 解決因氧化降解而造成膜剝落的方法.....	58
4-3 感測器對目標 DNA 濃度之感測結果.....	77
4-3-1 以不同方式固定探針 DNA 之結果.....	77
4-3-2 以浸泡方式固定探針 DNA 對目標 DNA 濃度之感測結果....	80
4-3-3 以正電場固定探針 DNA 對目標 DNA 濃度之感測結果.....	83
4-4 感測含錯配鹼基之目標 DNA.....	86
4-5 感測插入或移除鹼基之目標序列.....	89
4-6 感測器用於感測長鏈 DNA 之結果.....	91
4-7 感測錯配位點不同之目標 DNA.....	95
第五章 實驗結論與建議.....	99
5-1 實驗結論.....	99
5-2 未來實驗建議.....	101
第六章 參考文獻.....	103

## 圖目錄

(圖 1- 1). EDC 與 NHS 活化羧酸基之流程圖.....	5
(圖 1- 2). 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩結構圖(PEDOT) ....	8
(圖 1- 3). 對氨基苯甲酸結構圖.....	10
(圖 1- 4). 聚對氨基苯甲酸結構圖.....	11
(圖 1- 5). (a)DNA 之鹼基間鍵結示意圖及(b)其立體雙股螺旋結構圖..	12
(圖 1- 6). DNA 分子內以 G 鹼基做為載體的跳躍式電子傳遞示意圖..	13
(圖 1- 7). 道諾霉素結構圖.....	16
(圖 1- 8). 道諾霉素嵌入 DNA 鹼基對間之示意圖.....	17
(圖 1- 9). 鹼基錯配時電子傳遞示意圖.....	17
(圖 1- 10) 微分脈衝伏安法施加電位波型圖.....	19
(圖 3- 1). 參考電極組裝結構圖 .....	27
(圖 3- 2). 電化學分析儀器裝置圖.....	29
(圖 4- 1).白金電極上有無 PEDOT 感測結果.....	38
(圖 4- 2). PEDOT/Pt 電極之表面型態 .....	39
(圖 4- 3). 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之表面型態 .....	40
(圖 4- 4). 4-ABA/Pt 電極之表面型態 .....	41
(圖 4- 5). 表面粗糙度對羧酸基裸露示意圖.....	42
(圖 4- 6).有無浸泡 DNMT 之感測結果 .....	43

(圖 4- 7). PPy/Pt 電極之表面型態 .....	46
(圖 4- 8). 4-ABA/PPy/Pt 電極之表面型態 .....	47
(圖 4- 9). PAni/Pt 電極之表面型態 .....	48
(圖 4- 10). 4-ABA/PAni/Pt 電極之表面型態 .....	49
(圖 4- 11). PEDOT、PAni 及 PPy 感測互補 DNA 之結果 .....	50
(圖 4- 12). 定電壓聚合 4-ABA 之 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖 .....	53
(圖 4- 13). 電壓 0~0.9 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態	54
(圖 4- 14). 電壓 0~1.0 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態	55
(圖 4- 15). 電壓 0~1.1 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態	56
(圖 4- 16). 電壓 0~1.2 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態	57
(圖 4- 17). 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖 .....	60
(圖 4- 18). 不同電壓聚合 4-ABA 之電極感測互補 DNA 之微分脈衝伏安 圖 .....	61
(圖 4- 19). DPV 感測互補 DNA 後 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖 .....	62
(圖 4- 20). CV 聚合 4-ABA 之 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖 .....	65
(圖 4- 21). CV 法聚合 4-ABA 感測不同濃度完全互補 DNA 之微分脈衝 伏安圖 .....	66
(圖 4- 22). 4-ABA/PEDOT/Pt 表面形態圖 .....	69
(圖 4- 23). 不同聚合方式聚合 4-ABA 於 DPV 感測後電極型態 .....	70

(圖 4- 24). 感測不同方法聚合 4-ABA 之微分脈衝伏安圖 .....	71
(圖 4- 25). PAA/PEDOT/Pt 表面形態圖 .....	74
(圖 4- 26). 感測丙烯酸製備電極之微分脈衝伏安圖 .....	75
(圖 4- 27). PAA-PEDOT/Pt 表面形態圖 .....	76
(圖 4- 28). $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 應用於感測電極表面 DNA 濃度之示意圖 .....	78
(圖 4- 29). 不同電極感測赤血鹽之循環伏安圖 .....	79
(圖 4- 30). 感測完全互補 DNA 不同濃度之微分脈衝伏安圖 .....	81
(圖 4- 31). 高濃度目標 DNA 濃度曲線(無電場固定探針 DNA) .....	82
(圖 4- 32). 低濃度目標 DNA 濃度曲線(無電場固定探針 DNA) .....	82
(圖 4- 33). 感測完全互補 DNA 不同濃度之微分脈衝伏安圖 .....	84
(圖 4- 34). 高濃度互補 DNA 濃度曲線(加電場固定探針 DNA) .....	85
(圖 4- 35). 低濃度互補 DNA 濃度曲線(加電場固定探針 DNA) .....	85
(圖 4- 36). 感測不同錯配檢基數目之微分脈衝伏安圖 .....	87
(圖 4- 37). 鹼基錯配數量不同時電子傳遞示意圖 .....	88
(圖 4- 38). 感測插入移除鹼基之微分脈衝伏安圖 .....	90
(圖 4- 39). 感測長鏈 DNA 之微分脈衝伏安圖 .....	94
(圖 4- 40). 鹼基錯配位點不同時電子傳遞示意圖 .....	97
(圖 4- 41). 感測不同錯配位點之微分脈衝伏安圖 .....	98

## 表目錄

表 1-1 常見的導電高分子種類及其結構 .....	7
表 1-2 PEDOT 以不同陰離子摻雜及不同製備方法之導電度 .....	9
表 2-1 本論文使用儀器一覽表 .....	21
表 2-2 本論文所使用藥品一覽表 .....	23
表 2-3 本論文使用引子一覽表 .....	25
表 4-1 不同錯配數量之目標 DNA 序列 .....	88
表 4-2 插入(移除)鹼基之目標 DNA 序列 .....	89
表 4-3 長鏈 DNA 序列 .....	93
表 4-4 不同錯配位點之目標 DNA 序列 .....	96

## 第一章 緒論

### 1-1 生物感測器簡介

生物感測器的發展源自 1962 年 Clark 與 Lyons 所提出的酵素電極的概念為第一代生物感測器，此感測器是藉由葡萄糖氧化酵素本身之特異選擇性，將其與溶氧電極結合，用以檢測該酵素的受質。之後 Yellow Springs Instrument 公司便積極投入開發與商品化，於 1979 年開發出第一個血糖測試用酵素電極[1]。

第二代生物感測器主要是以抗體或受體蛋白做為生物辨識原件，並朝向多元化訊號換能器發展，例如壓電石英晶體微天秤(Piezoelectric quartz crystal microbalance)[2-4]、離子選擇性場效半導體(Ion sensitive field effect transistor)[5, 6]與光纖(Fiber optic sensor)[7, 8]。然而其發展尚未達到醫療檢測應用階段，目前可稱的上是第二代生物感測器的商品為瑞典商 Pharmacia 所推出的 BIAcore 與 BIAlite 兩項產品。

第三代生物感測器被定位在更具攜帶性與即時感測性，主要是於電極表面覆蓋氧化還原膜或是導電高分子聚合膜，再將酵素與電子媒合物固定於膜上，藉此提升電子的傳遞能力[9]。

生物感測器主要結構可分為兩個部份，一為生物感測元件，另一為換能器。生物感測元件即固定化生物分子 (immobilized biomolecules)，主要用以辨識待測生物樣品，因此必須要有高度的專一

性及親和性，如酵素、抗體、DNA、細菌等。依生物感測元件之特性可分為生物親和型及生物催化型感測器。生物親和型感測器是透過生物辨識元件與待測分子之親和性結合，引起電荷、質量或熱的變化。生物催化型感測器是利用其生物辨識元件之催化能力與選擇性，與待測分子反應後，產生生化代謝物質，經電極偵測後以電子訊號表現出來。換能器依訊號傳輸元件的不同可分為電化學生物感測器、光纖生物感測器、場效半導體生物感測器與壓電晶體生物感測器等[10]。

## 1-2 電化學 DNA 生物感測器簡介

電化學 DNA 生物感測器是於 90 年代發展出的一種新的生物感測器，此類型之感測器是將特定 DNA 片段固定於電極上，再加入能檢測具電化學活性之識別元素所構成，此特定 DNA 片段又稱為探針 DNA，為單鏈 DNA 片段，通常由數十個鹼基所組成；目標 DNA 為與探針 DNA 互補之序列，由於雜合時互補 DNA 間的高選擇性，將探針 DNA 固定於電極表面製成 DNA 修飾電極，使得此電極對於互補 DNA 具有較強的分子辨識功能，於適合之溫度、pH 值與離子強度下形成雙鏈 DNA，藉由加入具電化學活性之指示劑來增強訊號，達到定量及定性檢測目標 DNA 序列之功能。

DNA 修飾電極是電化學 DNA 感測器最重要的一部份，文獻中於電極表面修飾 DNA 的方法有吸附法、自組裝法(self-assembly)、共價鍵結法 (covalent-immobilization) 以及蛋白質結合法 (avidin-biotin attachment) 等四種方法。

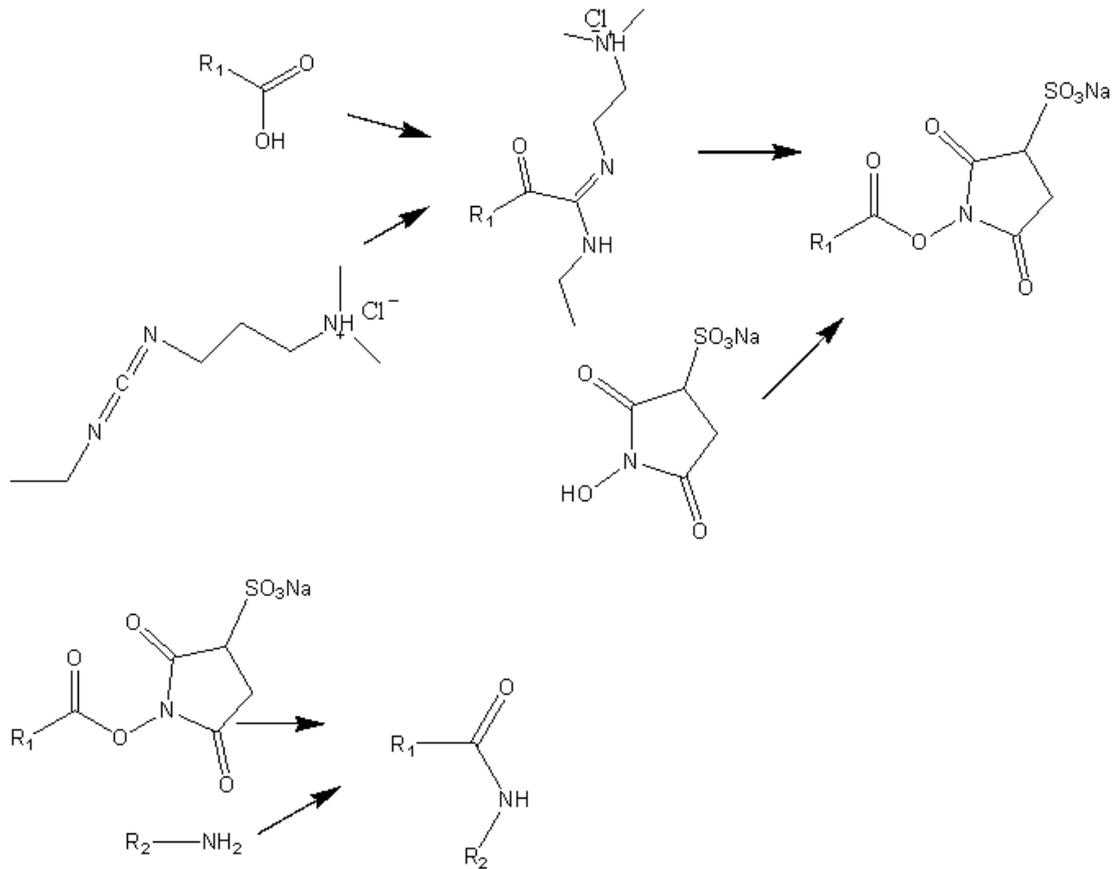
1. 吸附法：有物理吸附，如 Pang 等人直接將探針 DNA 溶液滴在玻璃碳電極上自然陰乾，之後以滅菌之去離子水沖洗浸泡，即得 DNA 修飾電極[11]；或定電壓吸附，如 Wang 等人利用碳糊電極，以提供 1.7 V 的電壓預處理 1 分鐘後，以 0.2 V 的電壓將帶負電之 DNA 磷酸骨架吸附於電極表面上[12]。以吸附法作為探針 DNA 之固定化的

優點有程序簡單、應用範圍廣泛，然而與電極表面結合力不強，且探針 DNA 之方向性較差，不易與目標 DNA 做雜合。

2. 自組裝法：是基於分子的自組裝作用，在固體表面上形成一有序的單分子層，此技術通常是以一端修飾硫醇基(-SH)的探針 DNA 片段，在金電極的表面上形成 Au-S 鍵的自組裝單分子膜。Hashimoto 等人將預處理過之金電極浸泡於 5'端修飾  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2$  單鏈 DNA 之溶液中，於  $4^\circ\text{C}$  恆溫水槽中攪拌 12 小時，將探針 DNA 固定於金電極表面上[13]。
3. 共價鍵結法：共價鍵結法是將電極預處理後，使電極表面具有所需之特殊官能基(如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$  等)，再藉由交聯劑活化官能基與探針 DNA 進行鍵結，將探針 DNA 固定於電極表面。Teh 等人則於玻璃碳電極表面聚合 4-ABA，再將修飾氨基之探針 DNA 以交聯劑反應共價鍵結於電極表面上[14]。本研究便是將修飾羧酸基(-COOH)修飾於 Pt/PEDOT 電極上，以官能基媒合活化劑 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)與輔助媒合劑 N-Hydroxysuccinimide(NHS)活化羧酸基，並將一端修飾氨基(- $\text{NH}_2$ )之探針 DNA 以醯胺鍵結於電極表面。
4. 蛋白質結合法：一般是將親合素(Avidin)共價鍵結於電極上，再透過親合素與生物素(Biotin)間的親合作用將生物素固定，生物素之一端

有羧酸基，可與探針 DNA 反應，進而將探針 DNA 固定於電極表面上。Cosnier 等人在白金電極上，電化學聚合成 poly(pyrrole-biotin) 膜，以親合性固定探針 DNA[15]。

(圖 1-1)為 EDC 與 NHS 交互作用後與羧酸基及氨基形成醯胺鍵結之流程圖，由圖可看到含羧酸基之分子先與 EDC 形成不穩定之反應中間體，再與 NHS 反應形成半穩定之中間體，最後與含氨基之分子共價鍵結，形成一個穩定的型態。



(圖 1-1). EDC 與 NHS 活化羧酸基之流程圖

### 1-3 導電性高分子

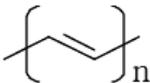
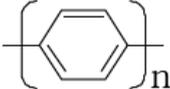
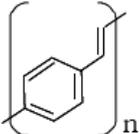
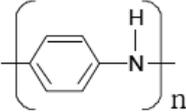
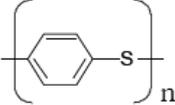
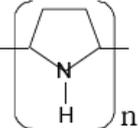
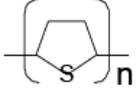
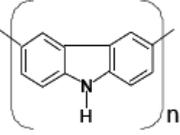
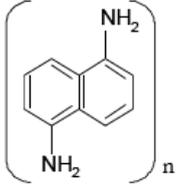
高分子通常是由結構單位或是單體經由共價鍵連接所構成之大分子量的化合物，其在機械強度、易塑性及重量上均有優異的表現，因此廣範應用於日常生活用品上，但其絕緣性限制了高分子的用途，因此科學家希望能製作一種高分子，而此高分子能突破傳統高分子無法導電的情況。

導電高分子導電原理是主鏈上具有共軛的單、雙鍵交替形成的  $\pi$  軌域系統，藉此系統傳遞電子，此外可藉由氧化或還原進行摻雜，藉由摻雜產生電子或電洞來提高導電度。

導電性高分子的研究於 20 世紀 70 年代開始逐漸發展，1958 年 Ziegler-Natta 以觸媒合成之有機導電性高分子聚乙炔後，於 1970 年在日本東京工業技術學院的化學家 Shirakawa 等人，藉由改變溫度與催化劑濃度聚合出帶金屬光澤的薄膜，1977 年 MacDiarmid、Heeger 及 Shirakawa，將碘摻雜至聚乙炔中形成具金屬光澤的金黃色薄片，且導電性提高  $10^9$  倍，而開啟了導電高分子的研究熱潮[16]。

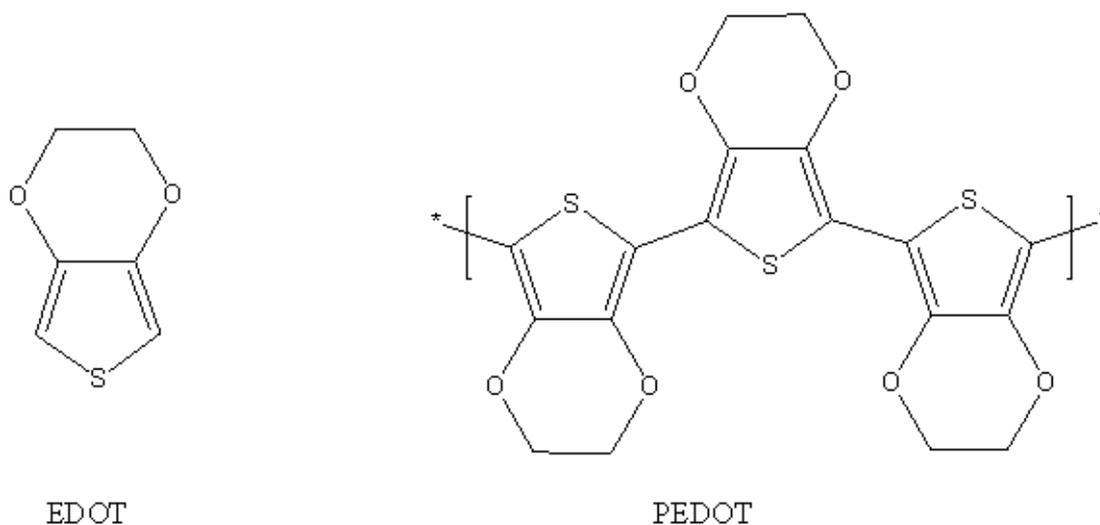
共軛導電高分子具有容易製備、高透明性以及成本低廉等優點，但因共軛導電高分子具有較剛硬之主鏈，無法溶於一般有機溶劑或利用熔融加工法，因此其應用備受限制。表 1- 1 為常見之導電高分子種類及結構[17]。

表 1-1 常見的導電高分子種類及其結構[17]

Conducting Polymer	Structure	Conductivity (S/cm)
Polyacetylene		~ 1000
Polyparaphenylene		100 ~ 500
Polyparaphenylene vinylene		~ 3
Polyazulene		~ 0.1
Polyaniline		1 ~ 100
Polyparaphenylene sulfide		1 ~ 100
Polypyrrole		40 ~ 100
Polythiophene		10 ~ 100
Polycarbazole		10 ~ 100
Polydiaminonaphthalene		10 <sup>-3</sup>

### 1-3-1 聚二氧乙烯噻吩

聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)在 1990 年代由德國 Bayer 首先合成出來，其具有高導電度、高穩定性及高可見光穿透度及對比度的優點，在過去幾年吸引不少團隊進行研究。



(圖 1-2). 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩結構圖(PEDOT)

導電高分子發展至今，較常見的聚合方法有化學聚合及電化學聚合。電化學聚合 PEDOT 及其共聚物通常是在有機溶劑或是水溶液中進行，影響 PEDOT 性質與導電性的條件包含電極種類、溶劑、聚合電位、摻雜離子、聚合溫度等。文獻指出電化學聚合 PEDOT 的導電度隨溫度 (300K 到 10K) 降低而遞減，但是低於 10K 後隨溫度降低而增加，而摻雜之離子對導電度之影響如表 1-2 所示[18]。

表 1- 2 PEDOT 以不同陰離子摻雜及不同製備方法之導電度

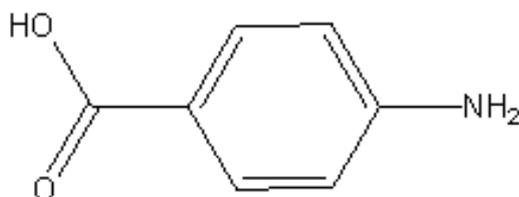
Counter ion	Conductivity [S cm <sup>-1</sup> ]			
	Method 1 [32]	Method 2 [31]	Method 3 [33]	Method 4 [33]
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>			400	650
BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>		30	280	
CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	95	50	200	
PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	105	200	120–150	
(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N	8.5			
PSS <sup>-</sup>			50–80	

Method 1:  $I_{\text{appl}}=0.04 \text{ mA cm}^{-2}$  in PC at  $-30^\circ\text{C}$ ; conductivity of peeled, free standing films; Method 2:  $I_{\text{appl}}=0.01\text{--}0.06 \text{ mA cm}^{-2}$  in PC at  $-30^\circ\text{C}$ ; conductivity of peeled, free standing films; Method 3:  $E_{\text{appl}}=0.85 \text{ V}$  in CH<sub>3</sub>CN at RT; in-situ conductivity measurement; Method 4:  $E_{\text{appl}}=1.1 \text{ V}$  in CH<sub>3</sub>CN at RT; in-situ conductivity measurement.

導電高分子依聚合電位、摻雜離子種類、聚合溫度、溶液 pH 值等不同，所得之導電性也各有優劣，使用(ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>)做為聚合 PEDOT 之參雜離子，所得之 PEDOT(ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>)薄膜具有高度的環境穩定性與導電性(1000 S/cm)，且擁有較長的使用壽命，膜穩定性可達八個月之久[19, 20]。本研究以兩種常見之導電高分子 polypyrrole 及 polyaniline 與 PEDOT 做比較。

#### 1-4 對氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid,4-ABA)簡介

對氨基苯甲酸通常縮寫為 4-ABA 或 p-ABA，其結構為苯環上有一個羧酸基(-COOH)與一個氨基(-NH<sub>2</sub>)，如(圖 1-3)所示。



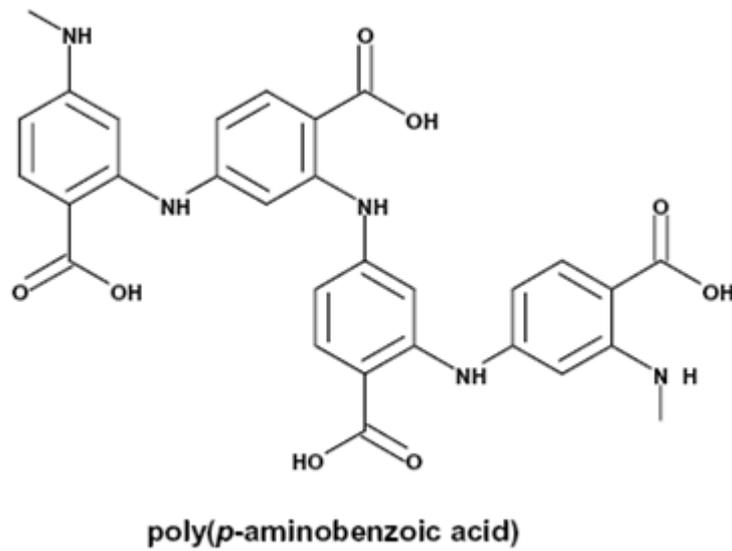
(圖 1-3). 對氨基苯甲酸結構圖

通常為一種淡棕黃色晶體，純品為無色針狀晶體，易溶於沸水、醇、醚、乙酸乙酯和冰醋酸，並可穩定溶於酸鹼溶液中，略溶於冷水，長時間露置於空氣或曝光過久容易使其氧化而變黃。

以羧酸基作為共價鍵結有以下兩個優點：(1)羧酸基於中性或弱鹼性之溶液中，會解離成(-COO<sup>-</sup>)使電極表面帶負電，而 DNA 之磷酸骨架同樣帶負電，在進行探針 DNA 的固定化時，可避免探針 DNA 與電極表面的非特異性吸附。(2)可透過使用交聯劑使羧酸基與末端修飾氨基之 DNA 形成醯胺鍵結。

在 Benyoucef 等人的研究中說到，聚對氨基苯甲酸之可能結構可由以下幾點說明：(1)對氨基苯甲酸的羧酸基為拉電子基，會降低苯環上間位之活性，使其形成鄰位的氨基取代基聚合物。(2)由 IR 圖譜可看出，對氨基苯甲酸在聚合之後仍然有大量羧酸基訊號存在，因此其對

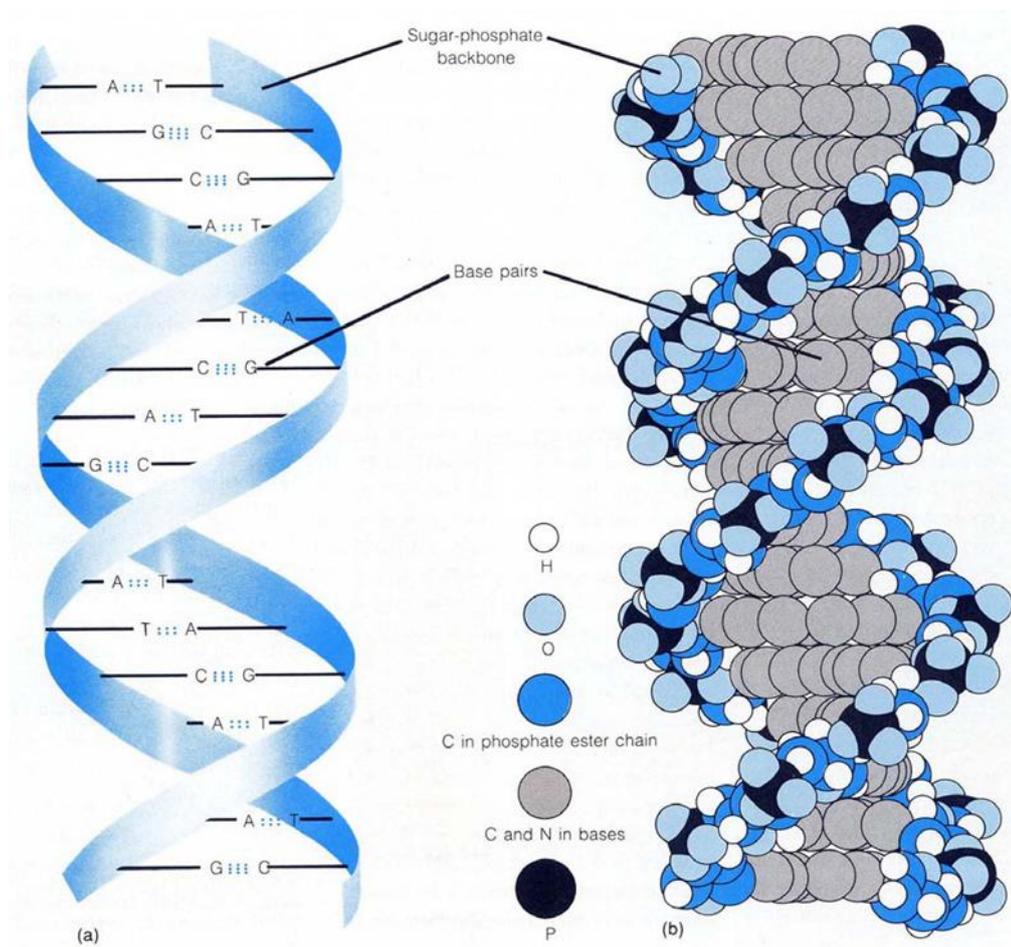
位的聚合反應是困難的。由以上兩點可知道對氨基苯甲酸聚合結構如(圖 1-4)所示[21]。



(圖 1-4). 聚對氨基苯甲酸結構圖

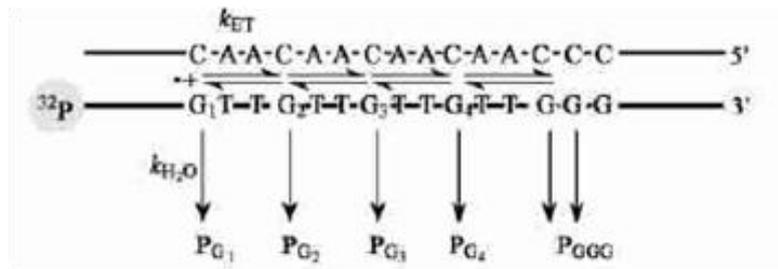
## 1-5 導電 DNA 簡介

DNA 分子可以當作導體的想法可追溯至 1960 年代，因為 DNA 雙股內部的鹼基對中有  $\pi$  軌域堆疊，類似固態材料的  $\pi$  軌域堆疊，因此推斷 DNA 可以導電[22]。可從(圖 1- 5) 立體雙股螺旋結構圖看出其  $\pi$  堆疊。



(圖 1- 5). (a)DNA 之鹼基間鍵結示意圖及(b)其立體雙股螺旋結構圖 [23]

對於電子在 DNA 中的傳輸機制可分為兩大理論，一為電荷跳躍 (charge hopping) 介於不連續的分子軌域；一為電子以超交換或穿隧 (tunneling) 效應作用於 DNA bridge 中。



(圖 1-6). DNA 分子內以 G 鹼基做為載體的跳躍式電子傳遞示意圖

電荷跳躍主要是由 G 鹼基傳遞如(圖 1-6)所示，當給予 DNA 一正電荷時，G1 之正電荷會很快的轉移到 G2 形成  $G2^+$ ，而  $G2^+$  之正電荷再進一步傳到 G3，這種跳躍式電子傳遞的速率取決於 G 鹼基之間的距離，它直接影響電子傳遞的效率，當 GG 鹼基之間距離過長時，電荷跳躍便會發生傳遞時被溶液中的介質捕獲的現象[24]。

超交換或穿隧效應是針對快速且短距離的電子傳遞，此時可將 DNA 看成是分子導線，電子以單一步驟從一端傳至另一端，電荷的傳遞速率隨距離增加而減少。

電子能透過 DNA 鹼基對導電之重要原則為「能趨低原理」(principle of minimum-energy)。GC 鹼基對利用位能較低之電洞特性傳遞電子，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，便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，當電子遇到AT 時則是因為穿遂效應，部分電子還是可以穿過阻力較大的AT 配對[25]。

#### 1-5-1 影響DNA傳遞電子的因素[26]

1. 鹼基錯配：鹼基的正常配對為A=T、C≡G，若出現不符合Watson-Crick法則的配對稱之為錯配，如A=C、T≡G，此情形造成鹼基 $\pi$ 堆疊混亂，降低電子的傳遞。
2. DNA鏈的異常突起(bulge)：當DNA複製出現突變，使序列插入(insertion)或移除(deletion)鹼基時，會造成DNA鏈的異常突起，此情形也會造成鹼基 $\pi$ 堆疊混亂，降低電子的傳遞。
3. DNA自身的動力學：DNA自身的動力學主要受到DNA鏈的長度及序列影響，是因為鹼基的共軛平面在以 $10^{-12}$ 秒的時間不停的震動，使DNA有不同的結構，而部份結構適合做電子的傳遞，因此鹼基數越多越容易造成 $\pi$ 堆疊的缺陷，使電子的傳遞效率降低。

## 1-6 電化學 DNA 雜合指示劑

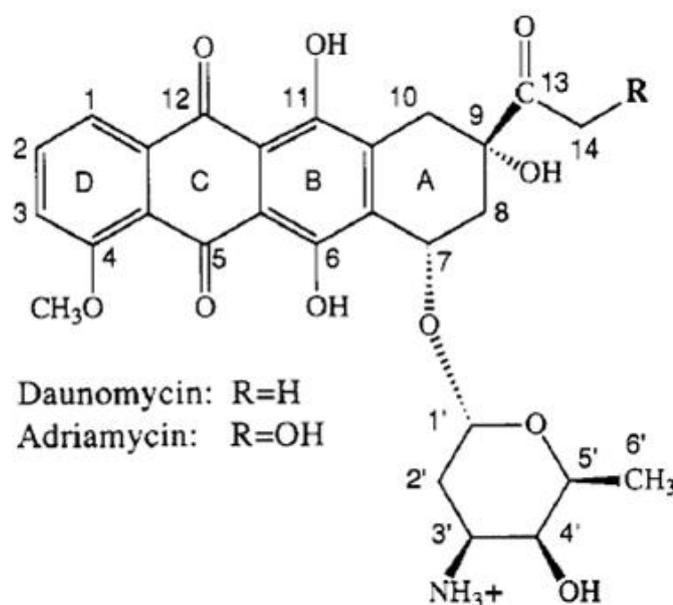
一般根據電化學訊號來源的不同，可將指示劑分為內源型和外源型。內源型指的是 DNA 分子中可被氧化的鹼基；外源型又可分為標記型及非標記型。

標記型指示劑主要是透過化學修飾、吸附、生物親和的方式固定在探針 DNA 上，當探針與目標 DNA 雜合後，可感測其電流強度，如二茂鐵(ferrocene)、辣根過氧化酶(horseradish peroxidase)、蔥醌(hydrochloride)等，此種方法可得到較高的電化學訊號，但檢測過程繁複容易造成樣品的損失。

非標記型指示劑可以不同的方式與單鍊 DNA 及雙鍊 DNA 作用，依結合方式又可分為共價及非共價，其中非共價指示劑與 DNA 作用的方式一為指示劑分子透過氫鍵嵌入雙鍊 DNA 中，另一為指示劑分子與 DNA 骨架的磷酸基團透過靜電結合。此類型的指示劑的共通點為有一個較大的蔥式剛性平面，如道諾霉素(daunomycin)、多柔比星(adriamycin)、諾加霉素(nogalamycin)等[27]。

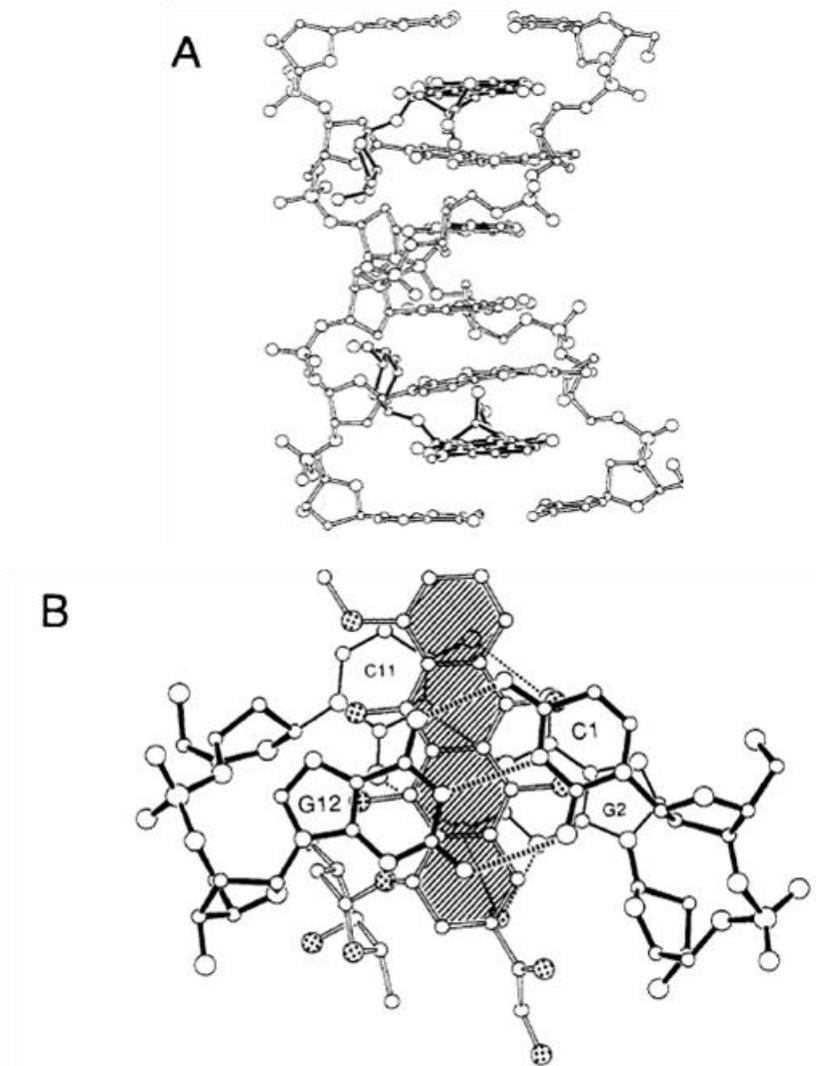
道諾霉素是一種被用於抗癌細胞活性的蔥環類藥物，此化合物是由一個平坦的疏水四環素環與一個六碳氨基糖所構成如(圖 1-6)，兩者間透過糖苷鍵相連，因其環上有一部分為醌式結構，使得道諾霉素可參與電子的轉移而具有電化學活性[28]。最早以道諾霉素為指示劑可能

是在 1994 年，Hashimoto 等人利用石墨電極上具有低氧化電位及高電流密度的道諾霉素對單鏈 DNA 及雙鏈 DNA 之電化學識別進行研究，並將道諾霉素作為雜合指示劑應用於目標 DNA 之檢測，獲得  $10^{-8}$ g/ml 的檢測極限[29]。

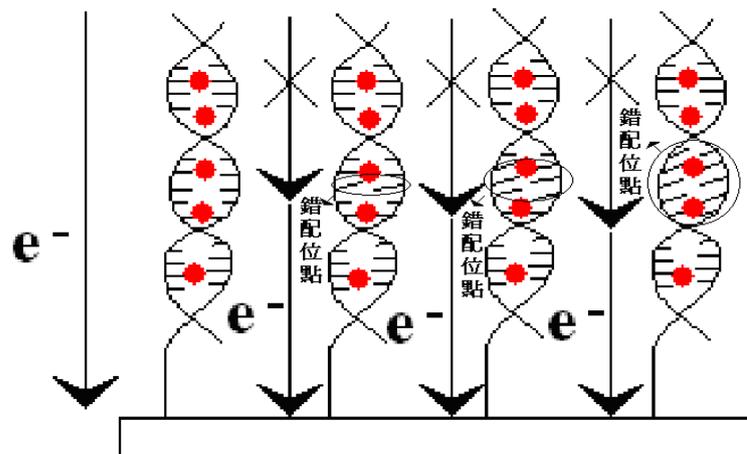


(圖 1-7). 道諾霉素結構圖

本研究是以道諾霉素作為雜合指示劑，其嵌入 DNA 鹼基對的示意圖如(圖 1-8)。有研究指出以道諾霉素作為指示劑，其電子的傳遞條件是較為嚴苛的，以 CA 鹼基錯配為例，當此錯配情形產生時，便無法傳遞電子訊號，如(圖 1-9)，但若以亞甲基藍作為指示劑，即便是 XY 錯配(X、Y=A、T、C、G)也可傳遞電子。其他影響電子在 DNA 傳遞的條件尚有自然生物反應（如氧化損傷）及去嘌呤都會影響到電子的傳遞效果[26]。



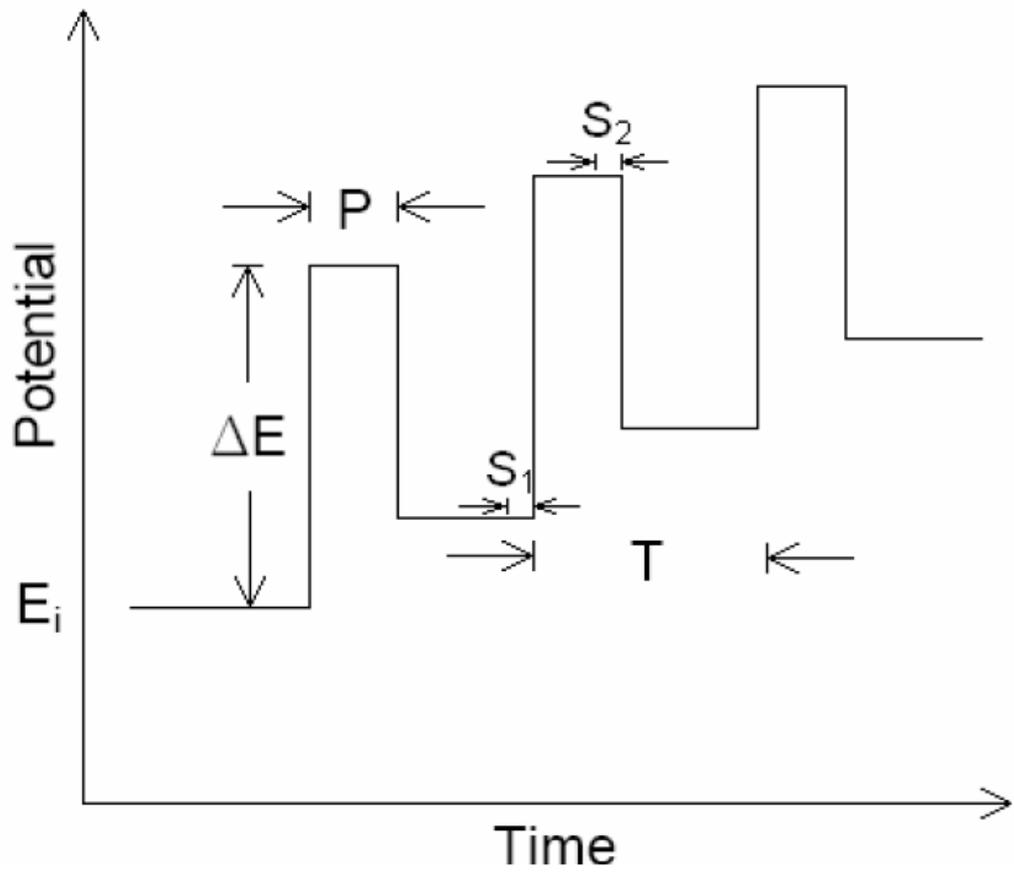
(圖 1-8). 道諾霉素嵌入 DNA 鹼基對間之示意圖(Dan Gelvan 1995)



(圖 1-9). 鹼基錯配時電子傳遞示意圖(•為道諾霉素)

## 1-7 微分脈衝伏安法原理(Differential Pulse Voltammetry, DPV)

(圖1-10)為微分脈衝伏安法所施加之電位波形圖，其電位施加方式是從一固定的初始電位( $E_i$ )開始，週期性地將一固定振幅的脈波電位(pulse amplitude,  $\Delta E$ )施加在一隨時間做線性增加的電位掃描線上，直到設定之末電位( $E_f$ )為止，掃描電位稱為base potential，施加脈波電位之週期稱為脈波週期(pulse period,  $T$ )，而脈波電位持續的時間稱為脈波寬度(pulse width,  $P$ )，然後分別在每一次施加脈波電位前16.7 msec (sampling width,  $S_1$ )與施加脈波電位結束前16.7 msec (sampling width,  $S_2$ )分別測量電流，而將這兩點所測得的電流值相減的電流差( $\Delta i = i_2 - i_1$ )即為偵測訊號。此種電位掃描方式最大的優點是能夠成功地消滅背景電流，以提高訊號對背景電流的比值( $S/N$ )。其方法是利用瞬間施加脈波電位後，法拉第電流(faraday current,  $I_f$ )及充電電流(charging current,  $I_c$ )都會急速上升，接著兩者都會隨著時間的增加而降低，其中充電電流( $I_c \propto e^{-t}$ )降低的速度遠較法拉第電流( $I_f \propto t^{-1/2}$ )為快，因此，當在脈波結束前量取電流時( $S_2$ )，充電電流已經降的很低，且與在 $S_1$ 所測得的充電電流幾乎相等，故 $i_2 - i_1$ 後所得的 $\Delta i$ 幾乎完全是由分析物氧化或還原所得的電流訊號。



(圖1-10) 微分脈衝伏安法施加電位波型圖

## 1-8 研究動機

在人類基因解碼後，許多引發疾病及誘發癌症之相關基因序列陸續被發現，目前仍有相當多的學者致力於研究新的致病基因，因此一套完善、便利、快速的檢驗機制應運而生。

本實驗室在學長的努力下建構了 DNA 電化學生物感測器之雛型，此感測器是在白金電極上聚合導電高分子，再於導電高分子上修飾羧酸基，在藉由 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞酸鹽(EDC)與 N-羥基琥珀硫亞氨(NHS)做為表面活化劑與媒合劑來活化羧酸基，接著將 3'端修飾氨基的探針序列以共價鍵結的方式固定於電極表面，最後以電化學分析儀感測與探針序列雜合之目標序列，藉由電化學訊號判斷目標序列之濃度或有無錯配情形，電子在 DNA 的傳遞較差，相當於半導體，因此在感測前添加具有電化學活性的雜合指示劑來提高電化學訊號以提高靈敏度[9, 30]。

但在電極製備及感測上仍有問題存在，例如：

1. 導電高分子的選擇。
2. 感測時電極表面的高分子剝落現象。
3. 固定在電極表面之探針序列的量。
4. 感測突變 DNA。

因此本實驗便以解決上述問題為研究之方向。

## 第二章 實驗藥品與儀器

### 2-1 實驗儀器

本論文所使用的儀器如表 2- 1 所示:

表 2- 1 本論文使用儀器一覽表

儀器名稱	製造廠商名稱	型號
電化學分析儀 (Electrochemical Analyzer)	CH Instruments (Austin, USA)	CHI621B
場發式掃描電子顯微鏡 (FESEM)	JEOL (Tokyo, Japan)	JSM-7000F
磁石攪拌器 (Hotplate Stirrer)	LabTECH (Beijing, China)	LMS-1003
微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance)	OHAUS (New Jersey, USA)	AR1530
微量移液吸取器 (Micro-Pipette)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/1 00/10
烘箱 (Oven)	DENG YNG (Taipei, Taiwan)	DOV30
酸鹼度計 (pH meter)	Suntex (Taipei, Taiwan)	SP--701
一般冰箱(4°C) (refrigerator)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222

低溫冰箱(-20°C) (Low temperature refrigerator)	Fisher&Paykel (Queensland, Australia)	Standard H160
超純水機 (Ultrapure Water system)	Barnstead (Dubuque, Iowa, USA)	NANO Pure Diamond™
試管震盪器 (Vortex-Mixer)	Scientific Industries (New York, USA)	VORTEX-2 GENIE
恆溫水浴槽 (Thermostat Bath)	FIRSTEK (Taipei, Taiwan)	B206
數位式冷熱乾浴器	GenePure (Taiwan)	GDC120

## 2-2 實驗藥品

本論文所使用的藥品相關資訊如表 2-2 所示:

表 2-2 本論文所使用藥品一覽表

藥品名稱	廠商	產品序號	藥品等級
2, 3-dihydrothieno [3,4- <i>b</i> ]-1,4-dioxin	Aldrich (St.Louis,MO,USA)	483028-1 0G	
4-Aminobenzoic acid	Sigma (St.Louis,MO,USA)	A9878-25 G	99%
Dipotassium hydrogenphosphate	Showa (Tokyo,Japon)	1645-815 0	
Disodium hydrogenphosphate	Kento (Tokyo,Jopen)	37243-00	
1-Ethyl-3-(3-dimethyl-ami nopropyl) carbodiimide HCl	Pierce (Boston,USA)	22980	
N-Hydroxysuccinimide	Pierce (Boston,USA)	24500	
Potassium dihydrogenphosphate	Kento (Tokyo,Jopen)	32379-00	
Lithium perchlorate	Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,USA)	20528-1	95%
Nitric acid	Merck (Darmstadt,Germany)	1.00456.1 000	
Hydrochloric acid	Merck (Darmstadt,Germany)		95%
Potassium chloride	Showa(Tokyo,Jopan)	32379_00	
Platinum	麗山 (Tainan,Taiwan)	AG35004	99.95%
Sodium chloride	Merck (Darmstadt,Germany)	1.06404.1 000	Analysis
Sodium hydroxide	Meerck (Darmstadt,Germany)	1.06498.1 000	Analysis

Daunorubicin hydrochloride	Sigma (St.Louis,MO,USA)	D8809-1 MG	
$K_3[Fe(CN)_6]$	Meerck (Darmstadt,Germany)	27106	
Acrylic acid	Alfa Aesar	L04280	99%
Pyrrole	Alfa Aesar	A12616	98%
Aniline	Merck (Darmstadt,Germany)	1.01261.1 00	

## 2-3 DNA 引子

本論文所使用的 DNA 引子相關資訊如表 2-3 所示：

表 2-3 本論文使用引子一覽表

引子編號	序列(5'→3')	備註	TM(°C)
THU-DJ1	CGCCGGCCACGAGAATAG CaminoC6	3'端修飾氨 根	52.4
THU-DJ2	GCTATTCTCGTGGCCGGCG	與 THU-DJ1 完全互補	52.4
THU-DJ3	GCTATTCTCATGGCCGGCG	與 THU-DJ1 一個鹼基錯 配	50.3
THU-DJ4	GCTATTCTTAGGGCCGGCG	與 THU-DJ1 三個鹼基錯 配	50.3
THU-DJ5	GCTATTCCTAGAGCCGGCG	與 THU-DJ1 五個鹼基錯 配	50.3
THU-RT-PP 1	TGGCCCACAGACGACTCA GGCGGGAGACGAGCGGTG TCATGGATCCCCGTATGCT AaminoC6	3'端修飾氨 根	

THU-RT-PT 1	CGGGGATCCATGACACCGC TCGTCTCCCGCCTGAGTCG TCTGTGGGCCATCATGAGG AAGCCAC	與 THU-RT-PP 1 完全互補
THU-RT-PT C1	GTGGCTTCCTCATGATGGC CCACAGACGACTCAGGCG GGAGACGAGCGGTGTCAT GGATCCCCG	與 THU-RT-PT 1 完全互補
PE1	CGGGGATCCATGACACCG	PCR primer
PE1-1	CCATCATGAGGAAGCCAC	PCR primer
THU-SD1	GCTATTCTCGTTGGCCGGC G	Insertion 一 個鹼基
THU-SD2	GCTATTCTCG__GGCCGGC G	Deletion 一 個鹼基
THU-SD3	GCTATTCTCGCGGTGGCCG GCG	Insertion 三 個鹼基
THU-SD6	GCAATTCTCGTGGCCGGCG	第三個鹼基 錯配
THU-SD7	GCTATTCTCGTGGCCGTCG	第十七個鹼 基錯配

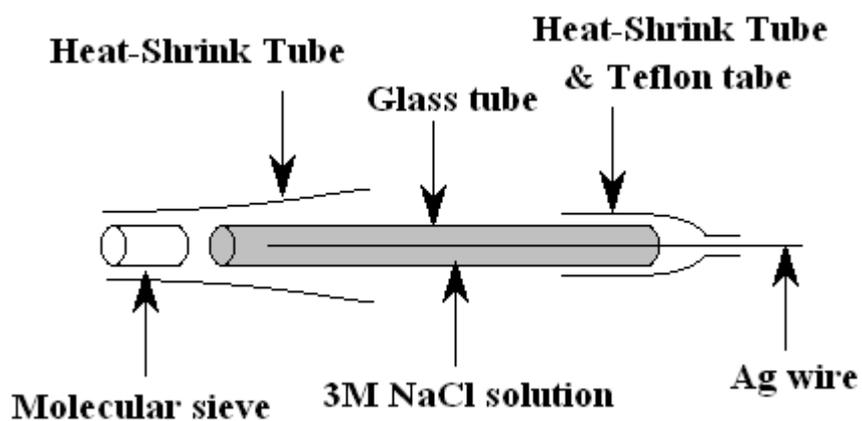
### 第三章 實驗步驟

#### 3-1 參考電極之製備

1. 取一段 7 cm 之銀線，將銀線浸泡在 3 M HNO<sub>3</sub> 溶液中 10 分鐘，溶解表面被氧化的銀，產生新的表面。
2. 以去離子水清洗銀線。
3. 將銀線浸泡在 0.1 M HCl 溶液中，陽極極化 30 分鐘（電流密度 0.4 mA/cm<sup>2</sup>）。

「使用的電流密度計算方法： $0.06 \times \pi \times 5 \times 0.4 \times 5 = 1.885$  (mA)」

4. 將銀線置入含飽和 3 M NaCl 溶液的玻璃管中（如(圖 3- 1)所示），並以熱縮套管與熱溶膠封住即可。



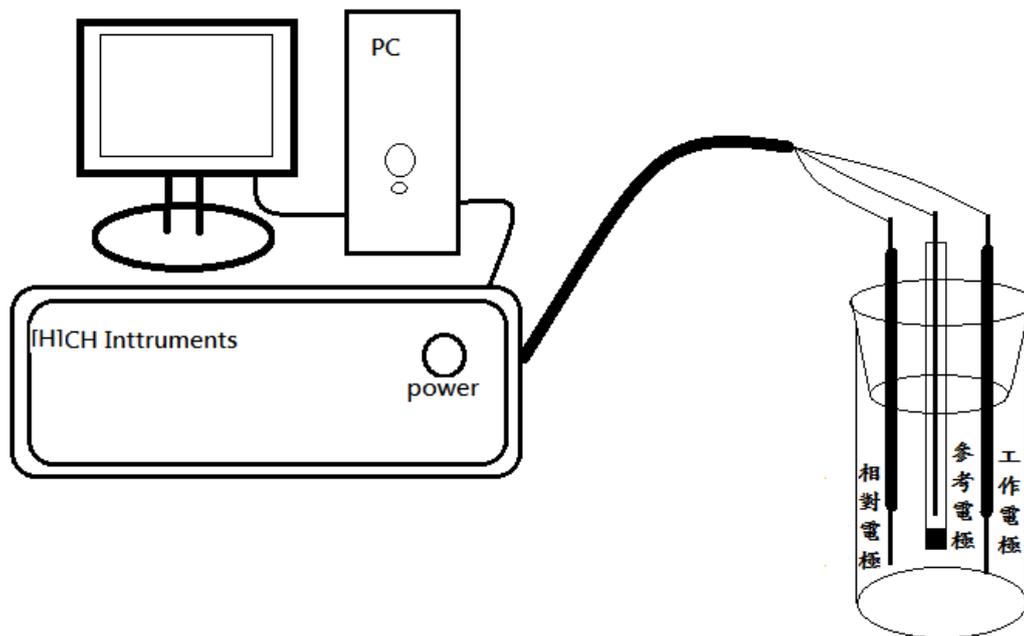
(圖 3- 1). 參考電極組裝結構圖[9]

### 3-2 白金絲之前處理

1. 將直徑 6 mm 之白金絲浸泡於 12 M HNO<sub>3</sub> 中 6 小時。
2. 以超音波震盪 30 分鐘後，以去離子水沖洗數次。
3. 將上步驟之白金絲浸泡於 3 M NaOH 中，以超音波震盪 30 分鐘後，以去離子水沖洗數次。
4. 再將白金絲浸泡於 3 M HCl 中，以超音波震盪 30 分鐘後，以去離子水沖洗數次。
5. 最後將白金絲置於烘箱中烘乾備用。

### 3-3 PEDOT/Pt 電極之製備

1. 秤取 1.4215 g 之二氧乙炔噻吩單體溶液與 10.6390 g LiClO<sub>4</sub> 加入去離子水至 1000 ml，攪拌至完全溶解，配置成含 0.01 M 二氧乙炔噻吩單體之 0.1 M LiClO<sub>4</sub> 溶液。
2. 取步驟 1. 之溶液 6 ml，以白金絲為工作電極及相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，裝置成如(圖 3- 2)所示之電化學分析裝置。
3. 啟動電化學分析儀，以循環伏安法將 EDOT 單體聚合於工作電極之白金絲上，掃瞄電位為 0.0~1.0 V，掃描速率為 10 mV/s，掃描圈數為 5 圈，溫度為 25°C。
4. 將聚合後之 PEDOT/Pt 電極以鱈魚夾固定並浸泡於去離子水中 4 小時待用。



(圖 3-2). 電化學分析儀器裝置圖

### 3-4 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之製備

1. 秤取 0.0103 g 之對氨基苯甲酸，溶於 25 ml 的 0.1 M  $\text{LiClO}_4$  溶液中配置成 3 mM 之對氨基苯甲酸溶液。
2. 取步驟 1.之溶液 6 ml，將前面製備之 PEDOT/Pt 電極置入溶液中，直到電極表面沒入溶液中。
3. 以 PEDOT/Pt 電極為工作電極，白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，裝置如(圖 3-2)所示完成線路。
4. 啟動電化學分析儀作定電壓實驗掃描，電壓為 1.0 V，修飾時間為 1800 秒，溫度為 25°C。
5. 掃描結束後再啟動電化學分析儀作循環伏安法掃描，電壓範圍為

0~0.9 V，掃描速率為 50 mV/s，掃描圈數為 30 圈，溫度為 25°C。

6. 將製備好之 4-ABA/PEDOT/Pt 電極以鱈魚夾固定於試管內待用。

### 3-5 DNA 感測器探針之固定與感測完全互補 DNA

1. 秤取 9.6 mg EDC 與 9.2 mg NHS，加入 1.0 ml 去離子水，溶於 1.5 ml 的微量離心管中，配置成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液，置於冰浴槽中待用。
2. 以去離子水配置 1.0  $\mu$ M 之核酸探針溶液(DJ1)，置於冰浴槽中待用。
3. 取步驟 1.之溶液 100  $\mu$ l，步驟 2.之溶液 50  $\mu$ l，加入含 850  $\mu$ l 磷酸緩衝液(pH = 7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，將 4-ABA/PEDOT/Pt 電極以鱈魚夾固定，電極表面浸入溶液中，放入 25°C 恆溫水槽中 2 小時。
4. 取出步驟 3.之電極，以 PBS buffer(pH = 7.4)做清洗後，浸入不同濃度之完全互補的目標 DNA(DJ2)進行雜合，於 55°C 乾浴器中反應 1 小時。
5. 取出步驟 4.之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，取 3  $\mu$ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997  $\mu$ l 之 PBS 緩衝溶液(pH = 7.4)，配置成 1  $\mu$ M 道諾霉素溶液，再將電極浸入，並以磁石攪拌 15 分鐘。
6. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH = 7.4)作為感測溶液，將步驟 5.之電極以

PBS buffer(pH = 7.4)做清洗後作為工作電極，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。

7. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃瞄電為範圍為 0.2~0.7 V，脈衝電位(amplitude)0.05 V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝周期(pulse period)為 0.2 秒，感測溫度為 25°C。

### 3-6 DNA 感測器探針修飾(64mer)與感測 PCR 產物之序列

1. 秤取 9.6 mg EDC 與 9.2 mg NHS，加入 1.0 ml 去離子水，溶於 1.5 ml 的微量離心管中，配置成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液，置於冰浴槽中待用。
2. 以去離子水配置 1.0  $\mu$ M 之核酸探針溶液(RT-PP1)，置於冰浴槽中待用。
3. 取步驟 1.之溶液 100  $\mu$ l，步驟 2.之溶液 50  $\mu$ l，加入含 850  $\mu$ l 磷酸緩衝液(pH = 7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，將 4-ABA/PEDOT/Pt 電極以鱈魚夾固定，電極表面浸入溶液中，放入 25°C 恆溫水槽中 2 小時。
4. 取出步驟 3.之電極，以 PBS buffer(pH = 7.4)做清洗後，取 PCR 產物(RT-PT1)加入 PBS 緩衝液(pH = 7.4)中加熱至 94°C，冷卻至室溫後將電極浸入，於 55°C 乾浴器中反應 1 小時。
5. 取出步驟 4.之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，取 3  $\mu$ l 之 1

- mM 道諾霉素溶液，加入 2997  $\mu\text{l}$  之 PBS 緩衝溶液(pH = 7.4)，配置成 1  $\mu\text{M}$  道諾霉素溶液，再將電極浸入，並以磁石攪拌 15 分鐘。
6. 取出步驟 5.之電極，以 PBS buffer(pH = 7.4)做清洗後取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH = 7.4)作為感測溶液，將電極作為工作電極，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。
  7. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電為範圍為 0.2~0.7 V，脈衝電位(amplitude)0.05 V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝周期(pulse period)為 0.2 秒，感測溫度為 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 3-7 DNA 感測器探針修飾與感測含錯配鹼基之目標序列

1. 秤取 9.6 mg EDC 與 9.2 mg NHS，加入 1.0 ml 去離子水，溶於 1.5 ml 的微量離心管中，配置成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液，置於冰浴槽中待用。
2. 以去離子水配置 1.0  $\mu\text{M}$  之核酸探針溶液(DJ1) ，置於冰浴槽中待用。
3. 取步驟 1.之溶液 300  $\mu\text{l}$ ，步驟 2.之溶液 50  $\mu\text{l}$ ，加入含 2650  $\mu\text{l}$  磷酸緩衝液(pH = 7.0)之玻璃試管中，以 4-ABA/PEDOT/Pt 電極微工作電極，白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。
4. 啟動電化學分析儀做循環伏安法實驗掃描，掃描範圍為 0~0.3 V，

掃描速率為 0.02 mV/s，掃描圈數 160 圈，溫度 25°C。

5. 取出步驟 4.之電極，再浸入不同濃度的目標 DNA 序列(DJ2)中進行雜合，於 55°C 乾浴器中反應 1 小時。
6. 取 3 $\mu$ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997  $\mu$ l 之 PBS 緩衝溶液(pH = 7.4)，配置成 1  $\mu$ M 道諾霉素溶液，再將步驟 4.之電極浸入，並以磁石攪拌 15 分鐘。
7. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH = 7.4)作為感測溶液，將步驟 5.之電極作為工作電極，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。
8. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電為範圍為 0.2~0.7 V，脈衝電位(amplitude)0.05 V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝周期(pulse period)為 0.2 秒，感測溫度為 25°C。

### 3-8 DNA 感測器探針修飾與感測含錯配鹼基之目標序列

1. 秤取 9.6 mg EDC 與 9.2 mg NHS，加入 1.0 ml 去離子水，溶於 1.5 ml 的微量離心管中，配置成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液，置於冰浴槽中待用。
2. 以去離子水配置 1.0  $\mu$ M 之核酸探針溶液(DJ1)，置於冰浴槽中待用。
3. 取步驟 1.之溶液 300  $\mu$ l，步驟 2.之溶液 50  $\mu$ l，加入含 2650  $\mu$ l 磷酸

緩衝液(pH = 7.0)之玻璃試管中，以 4-ABA/PEDOT/Pt 電極微工作電極，白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。

4. 啟動電化學分析儀做循環伏安法實驗掃描，掃描範圍為 0~0.3 V，掃描速率為 0.02 mV/s，掃描圈數 160 圈，溫度 25°C。
5. 取出步驟 4.之電極，再浸入不同錯配數目的目標 DNA 序列 (DJ3,DJ4,DJ5)進行雜合，於 55 °C 乾浴器中反應 1 小時。
6. 取 3  $\mu$ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997  $\mu$ l 之 PBS 緩衝溶液(pH = 7.4)，配置成 1  $\mu$ M 道諾霉素溶液，再將步驟 4.之電極浸入，並以磁石攪拌 15 分鐘。
7. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH = 7.4)作為感測溶液，將步驟 5.之電極作為工作電極，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3- 2)所示。
8. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電為範圍為 0.2~0.7 V，脈衝電位(amplitude)0.05 V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝周期(pulse period)為 0.2 秒，感測溫度為 25°C。

## 第四章 實驗結果與討論

### 4-1 導電高分子的選擇

由於修飾胺基的探針 DNA 需接在具有羧酸基的基材上，因此研究中使用聚-對胺基苯甲酸 (poly-4-ABA) 做為羧酸基團的提供者。由實驗室先前的研究中發現，聚-對胺基苯甲酸若直接聚合於白金電極上，並無法有效的感測 DNA。因此，後來改以先於白金電極上聚合導電高分子 PEDOT 後，再聚合上 4-ABA 即可作為固定探針 DNA 之電極表面，並有效的進行 DNA 感測。由於前人對於造成此現象之原因並無探討，因此，此部分除了探討造成上述結果之原因外，亦引進其他兩種導電高分子 polyaniline(PAni)及 polypyrrole(PPy)，探討 4-ABA 聚合在不同的導電性高分子上，是否也能有效的進行 DNA 感測。並藉此觀察導電性高分子的種類對於 DNA 感測器之影響，以累積更多導電性高分子應用於 DNA 感測之經驗。

#### 4-1-1 探討 4-ABA/Pt 與 4-ABA/PEDOT/Pt 電極對 DNA 感測之影響

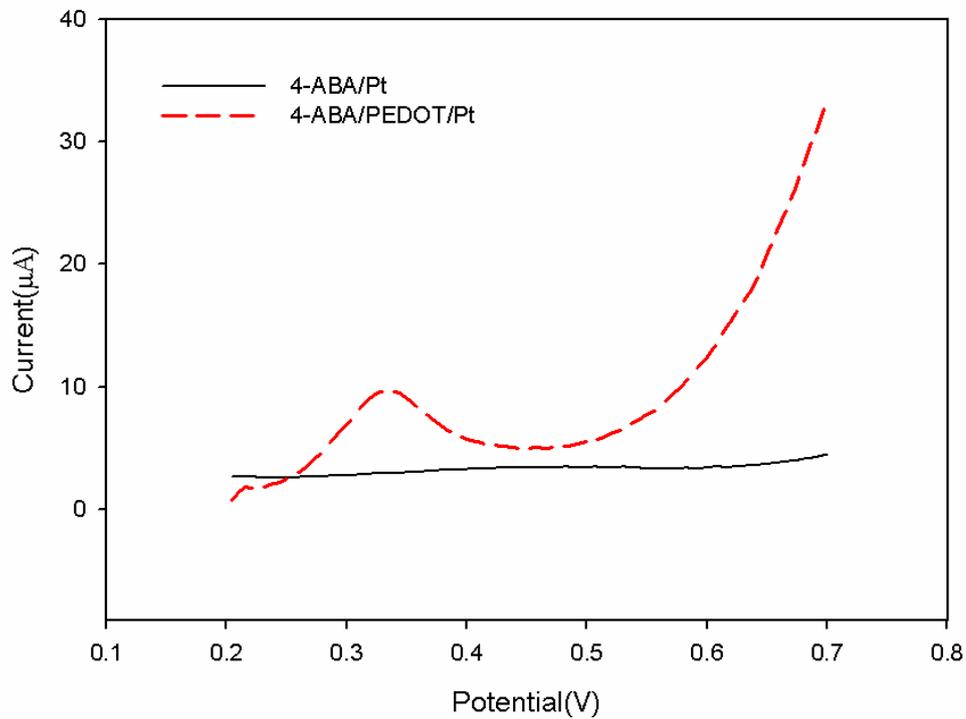
首先探討 4-ABA 直接聚合於白金電極與 PEDOT/Pt 電極之差異。取白金電極以定電壓法(電壓 1.0 V)聚合 4-ABA 後，將電極浸泡在含探針 DNA 之磷酸 buffer(pH = 7.0)溶液中 2 小時固定探針，將電極取出後以 PBS buffer 沖洗後浸泡含完全互補之目標 DNA 進行雜合，雜合後以 PBS buffer 沖洗，最後浸泡道諾霉素(DNM)15 分鐘，

取出電極以 PBS buffer 沖洗後進行微分脈衝伏安法(DPV)感測，峰值僅 0.37  $\mu\text{A}$ 。而在白金電極以循環伏安法(電壓範圍 0~1.0 V)聚合 PEDOT 後再以定電壓法(電壓 1.0 V)修飾 4-ABA 後重複上述步驟固定探針、與互補之目標 DNA 進行雜合、浸泡 DNM 後以 DPV 進行感測，感測訊號提高至 6.33  $\mu\text{A}$ ，如(圖 4-1)所示。

而造成 4-ABA/Pt 電極(感測訊號 0.37  $\mu\text{A}$ )與 4-ABA/PEDOT/Pt 電極(感測訊號 6.33  $\mu\text{A}$ )訊號差異之原因，推測為 PEDOT 膜表面有許多突起的小顆粒，如(圖 4-2)，當 4-ABA 膜聚合於其上時，如(圖 4-3)，會因幾何空間的變化使得聚 4-ABA 膜彎曲，而造成羧酸基團相對易裸露，因而提高電極表面與探針 DNA 的接合效率。而相較於 4-ABA 聚合於白金電極表面，如(圖 4-4)，聚 4-ABA 膜上的羧酸基團則因電極表面平整而不容易突出於表面，使探針 DNA 無法固定於電極表面。其中電極表面型態對羧酸基團裸露示意圖可參考(圖 4-5)。

從感測結果可看到約 0.5 V 時電流值再次上升，而文獻中對於道諾霉素感測波峰的探討，所得的波峰位置約在 0.35 V，且因電極的不同而造成波峰的偏移，因此排除 0.5 V 後電流值的上升為道諾霉素所造成。且從(圖 4-6)可看出無浸泡 DNM 之電極感測於 0.4 V 有一波峰，而在 0.55 V 後之電流值開始往上升，而浸泡 DNM 後之電極感測時感測波峰從 0.4 V 偏移至 0.35 V，而於 0.55 V 時同樣有電流值上升的現

象，而有文獻提到磷酸根會與 Pt 形成氧化反應，因此 0.5 V 後造成電流值上升可能為磷酸根的氧化所造成，或是磷酸根參與摻雜而造成的結果。且從(圖 4-6)之結果可知，DNA 本身便會產生電化學訊號，而 DNM 的添加則有訊號放大的效果。



(圖 4- 1).白金電極上有無 PEDOT 感測結果

工作電極：4-ABA/Pt、4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

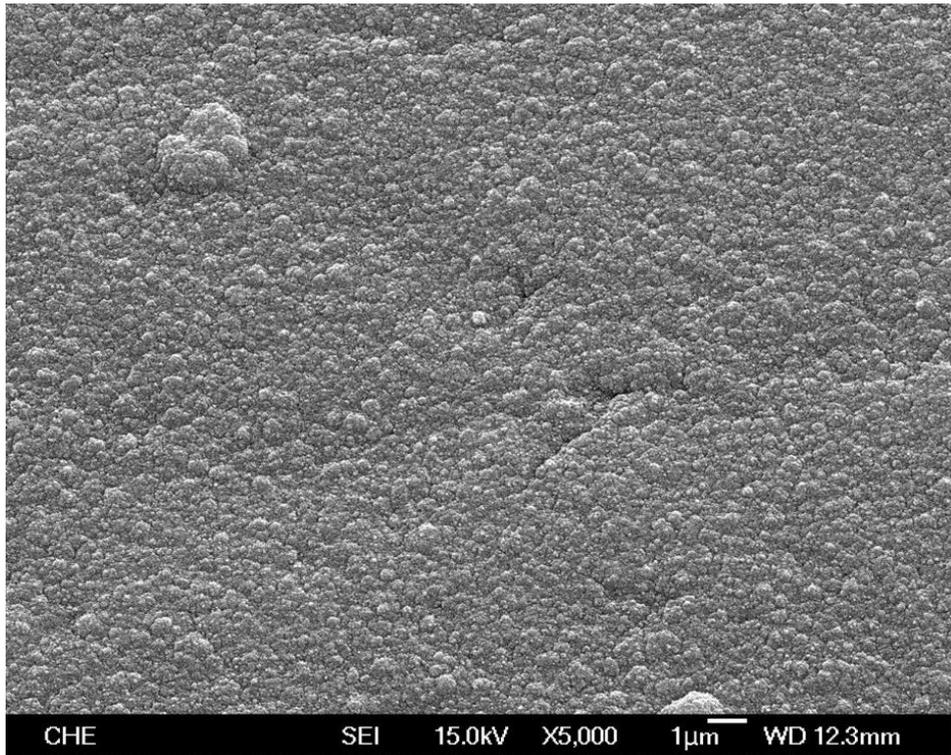
掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒



(圖 4- 2). PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法

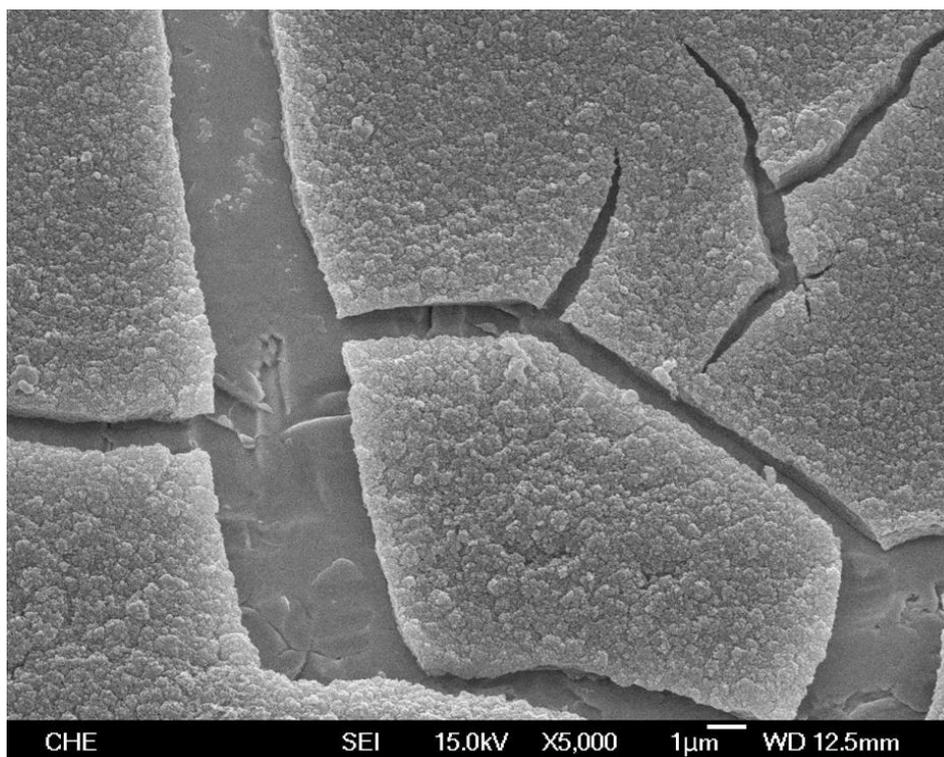
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：0~1.0 V

掃描速率：10 mV/s

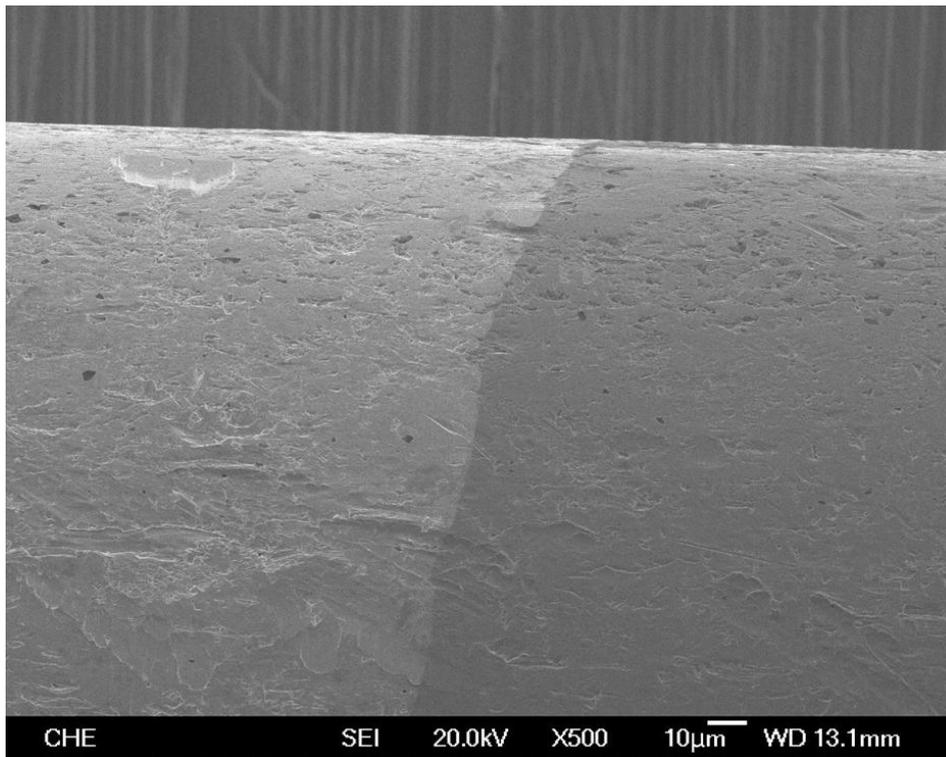
聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C



(圖 4- 3). 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法	4-ABA 聚合方法：定電壓
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>
掃描範圍：0~1.0 V	聚合電壓：1.0V
掃描速率：10 mV/s	聚合時間：1800 秒
聚合圈數：5 圈	聚合溫度：25°C
聚合溫度：25°C	



(圖 4- 4). 4-ABA/Pt 電極之表面型態

4-ABA 聚合方法：定電壓

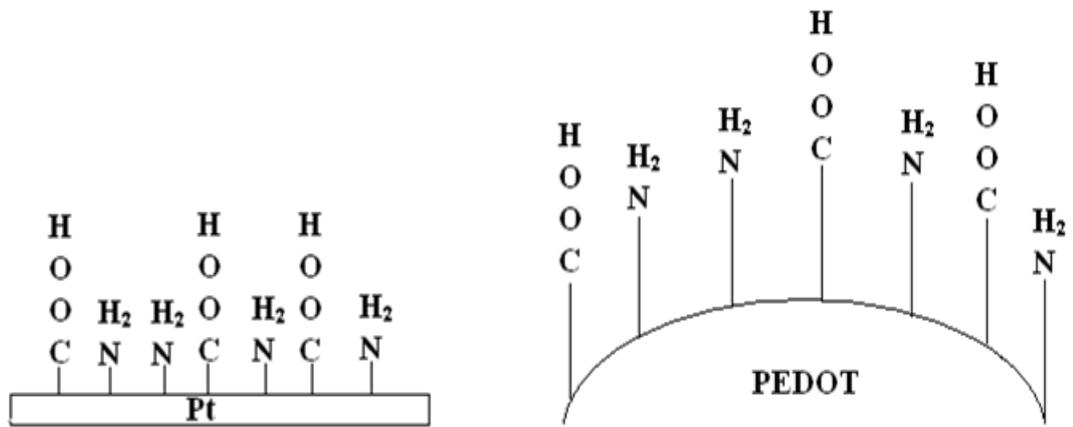
聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

聚合電壓：1.0 V

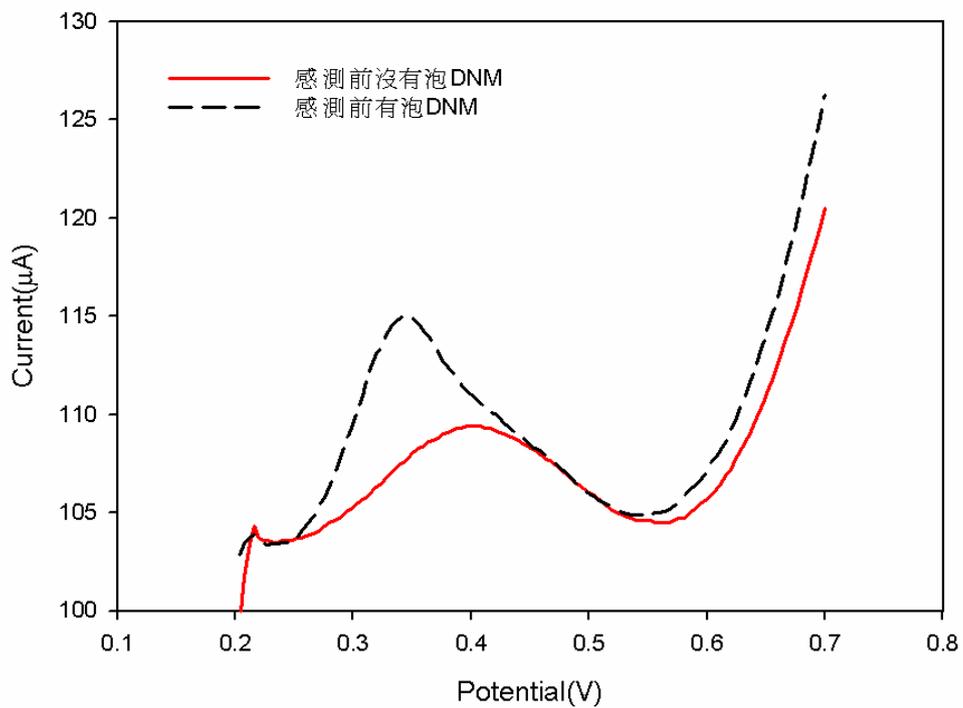
聚合時間：1800 秒

右邊顏色較暗為聚 4-ABA

聚合溫度：25°C



(圖 4-5). 表面粗糙度對羧酸基裸露示意圖



(圖 4-6).有無浸泡 DNM 之感測結果

工作電極： 4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA： 5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA： 5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

掃描 buffer： PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍： 0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅： 50 mV

脈衝寬度： 0.06 秒

脈衝週期： 0.2 秒

#### 4-1-2 探討不同導電高分子(PEDOT、PPy、PAni)修飾 4-ABA 對 DNA 感測之影響

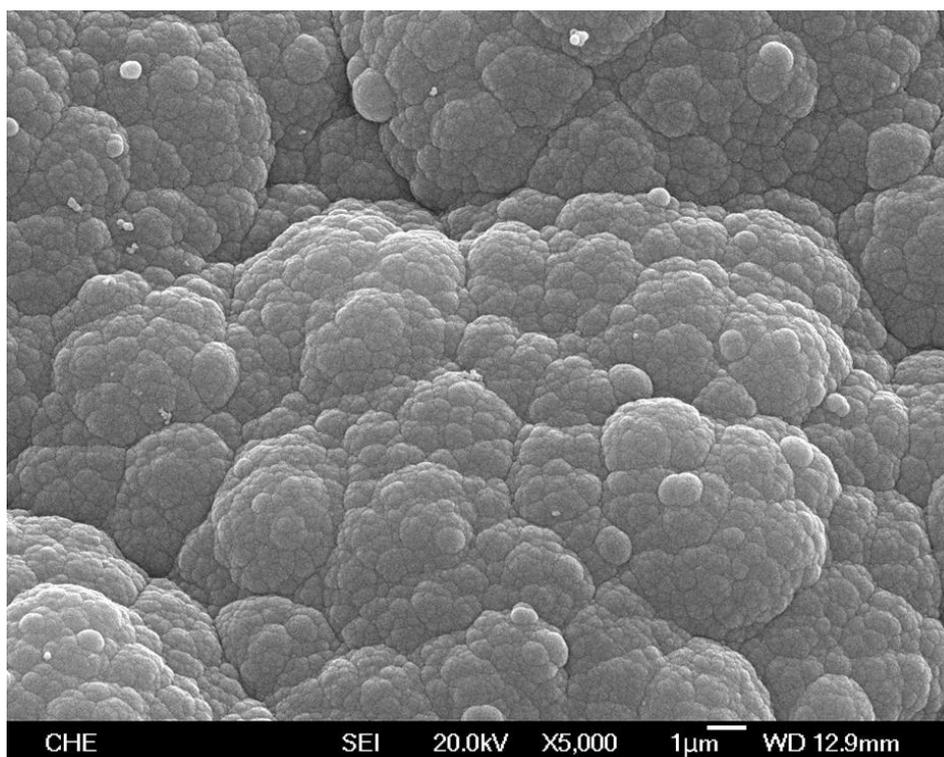
從上述實驗結果得知，若以 4-ABA 作為提供羧酸基之高分子，需將 4-ABA 聚合於表面粗糙之導電高分子上，以利羧酸基的裸露。因此，此部分我們將探討兩個表面粗糙度不一的導電高分子(PEDOT 與 polypyrrol)，觀察表面粗糙度對聚 4-ABA 的影響。同時，我們亦選擇一纖維狀之導電高分子(polyaniline)，想了解聚 4-ABA 高分子能否在立體纖維狀之導電高分子中呈現不一樣的表面型態，以利探針 DNA 的接合。

比較 PEDOT/Pt(圖 4-2)與 4-ABA /PEDOT/Pt(圖 4-3)的 SEM 圖，可觀察出兩者的表面結構差異不大。而由 4-ABA/Pt(圖 4-4)的 SEM 圖可知 4-ABA 是以膜狀方式緊貼於白金電極上，因此可說明聚 4-ABA 亦以膜狀方式緊密貼附於 PEDOT 膜上，才造成 PEDOT/Pt(圖 4-2)與 4-ABA /PEDOT/Pt(圖 4-3)之表面結構相似的結果。

由(圖 4- 7)可看出，PPy 聚合在白金電極表面上，主要呈現波浪狀大顆粒，與 PEDOT (圖 4- 2) 表面之細微小突起顆粒差異甚大。若觀察 4-ABA 聚合在 PPy 之 SEM 圖(圖 4- 8)可明顯看出，聚 4-ABA 之薄膜與 PPy 之間尚有空隙，說明 4-ABA 於 PPy 膜的附著性不佳。預期在後續的電極製備步驟中，可能導致聚 4-ABA 薄膜的剝落，進而

造成無法感測之結果。(圖 4-9)為電化學聚合聚苯胺的表面形態，可看出以電化學法聚合之聚苯胺呈現纖維狀聚合於 Pt 電極表面。(圖 4-10)為 4-ABA 聚合於 PANi 膜上之表面結構，聚 4-ABA 並非以膜的方式包覆於 PANi 上，而是於纖維狀之孔洞中形成片狀的聚合。由實驗結果(圖 4-11)-b 可看出，以 4-ABA/PPy/Pt 電極之感測結果的確無明顯峰值，因此可證明 4-ABA 膜於 PPy 膜的附著性不佳，的確會造成無法感測之結果。由於探針 DNA 在固定或雜合時需考慮其位向，於纖維狀孔洞中會有探針纏繞或是非特異性吸附的情形發生，不利探針在聚 4-ABA 膜上的固定與雜合，由(圖 4-11)-a 電極之感測結果無明顯的電化學訊號。

綜合上述討論之結果，PEDOT 膜提供一均勻之細小顆粒表面，使聚 4-ABA 之羧酸基團易於裸露，同時又可提供一適當平面，使 DNA 雜合時不因位向問題，導致雜合效率降低。PPy 表面雖然也有均勻之顆粒，但 4-ABA 於 PPy 之附著性不佳，於後續電極製備中可能會造成聚 4-ABA 之剝落，而無法固定探針 DNA。在纖維狀的聚苯胺中，4-ABA 以片狀聚合於 PANi 之纖維孔洞中，其空間障礙使得探針 DNA 無法固定於電極表面上。因此我們選用 PEDOT 做為修飾於白金電極上之導電高分子。



(圖 4- 7). PPy/Pt 電極之表面型態

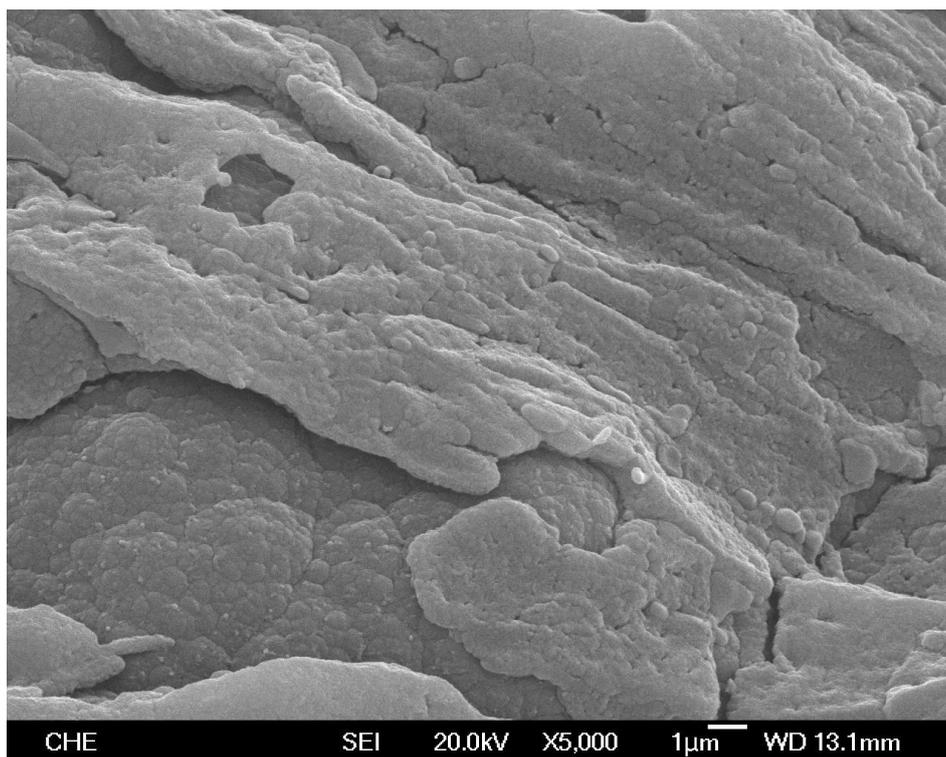
PPy 聚合方法：定電壓

聚合溶液：0.1M Py/0.1M LiClO<sub>4</sub>

聚合電壓：0.8V

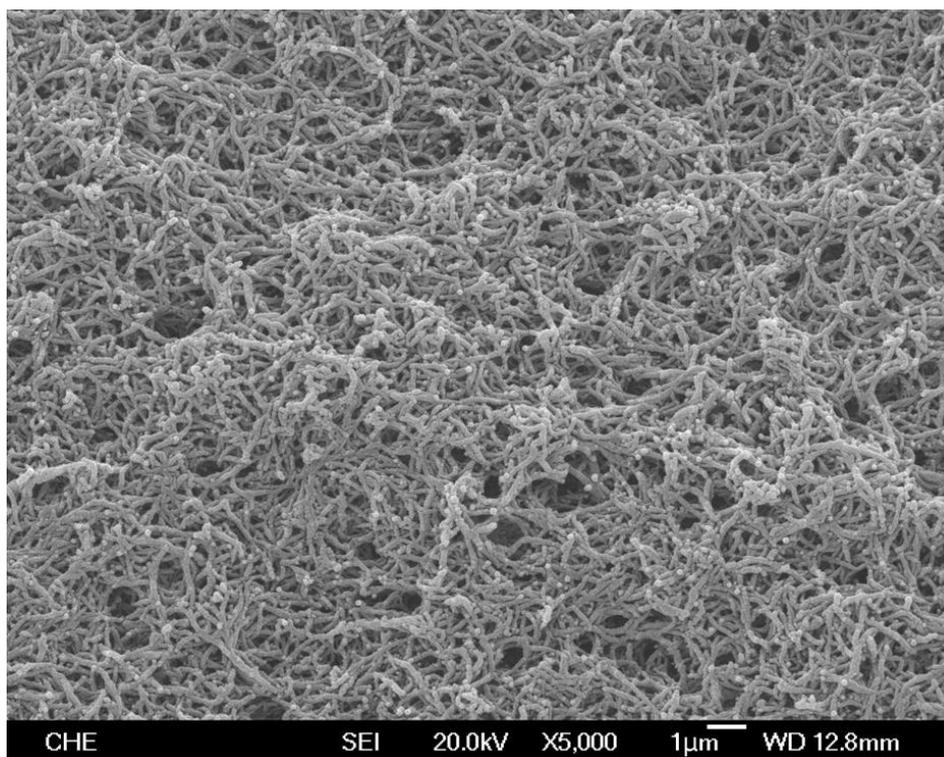
聚合時間：1200 秒

聚合溫度：25°C



(圖 4- 8). 4-ABA/PPy/Pt 電極之表面型態

<p>PPy 聚合方法：定電壓</p> <p>聚合溶液：0.1M Py/0.1M LiClO<sub>4</sub></p> <p>聚合電壓：0.8V</p> <p>聚合時間：1200 秒</p> <p>聚合溫度：25°C</p>	<p>4-ABA 聚合方法：定電壓</p> <p>聚合溶液：3mM 4-ABA/0.1M LiClO<sub>4</sub></p> <p>聚合電壓：1.0V</p> <p>聚合時間：1800 秒</p> <p>聚合溫度：25°C</p>
---	---



(圖 4- 9). PANi/Pt 電極之表面型態

PANi 聚合方法：循環伏安法

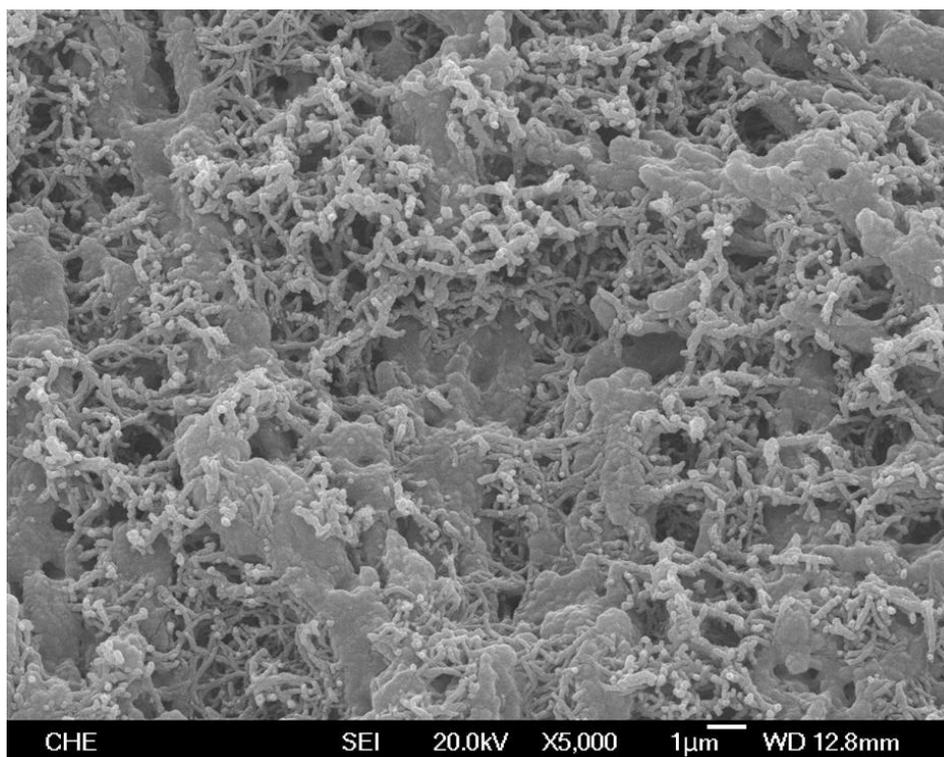
聚合溶液：0.1 M Aniline /1 M HCl

掃描範圍：0~1.0 V

掃描速率：10 mV/s

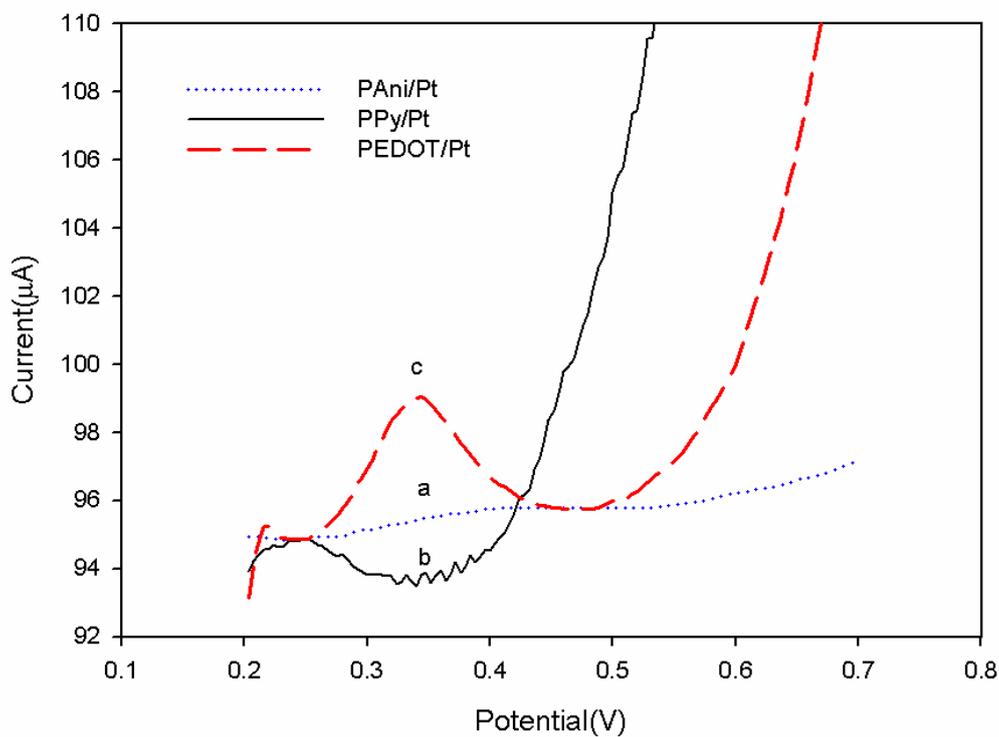
掃描圈數：5 圈

聚合溫度：25°C



(圖 4- 10). 4-ABA/PAni/Pt 電極之表面型態

PAni 聚合方法：循環伏安法	4-ABA 聚合方法：定電壓
聚合溶液：0.1 M Aniline /1 M HCl	聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>
掃描範圍：0~1.0 V	聚合電壓：1.0 V
掃描速率：10 mV/s	聚合時間：1800 秒
掃描圈數：5 圈	聚合溫度：25°C
聚合溫度：25°C	



(圖 4- 11). PEDOT、PAni 及 PPy 感測互補 DNA 之結果

工作電極：dsDNA/4-ABA/PAni/Pt、dsDNA/4-ABA/PPy/Pt、  
dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

## 4-2 PEDOT 膜穩定性探討

### 4-2-1 PEDOT 氧化降解電位的探討

由於實驗室先前研究指出以定電壓法(電壓 1.0 V)聚合 4-ABA 所製備之電極於 SEM 圖中可發現均勻的裂痕(圖 4- 12)，且於雜合目標 DNA 後浸泡道諾霉素或是進行電化學分析時，皆可觀察到電極表面有嚴重剝落之情形，此結果可能會影響感測之準確性，因此便希望能找到電極表面剝落的原因及改善之方法。

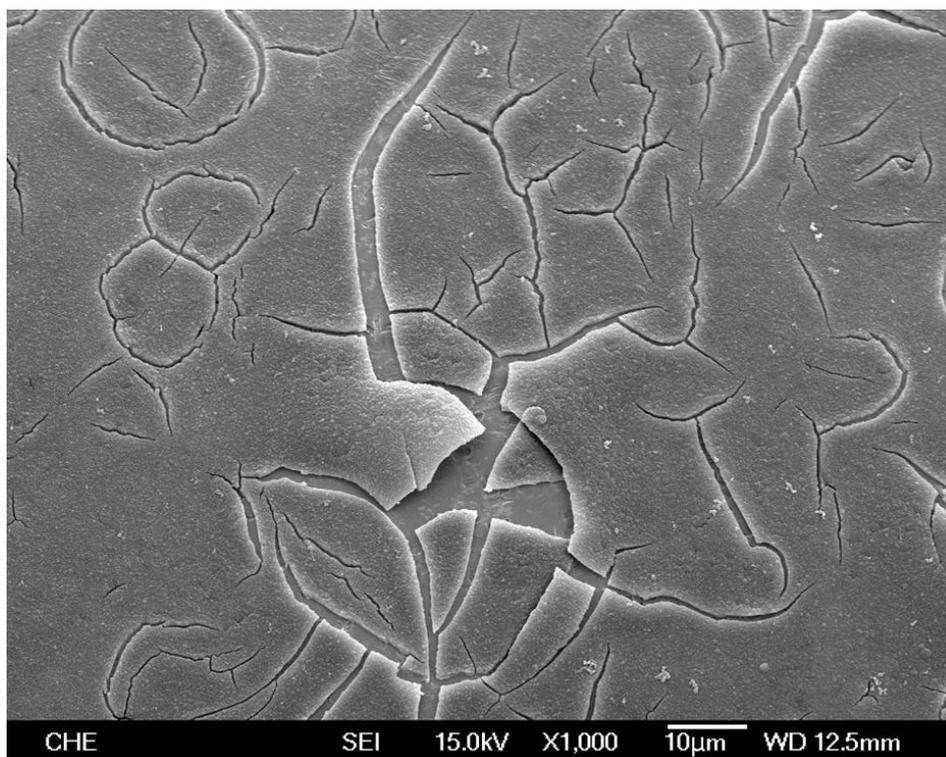
實驗中發現 PEDOT 膜上的裂痕是在聚合 4-ABA 之後所產生的，其可能原因為聚合 4-ABA 時電壓過高導致高活性分子(如自由基)攻擊高分子的活性基團，造成共價鍵的斷裂產生氧化降解[31]。因此，將先針對 PEDOT 膜的氧化降解電壓進行探討。

研究中利用 CV 法於白金電極上聚合 PEDOT 膜，並觀察在不同電壓範圍下 PEDOT 膜的表面型態，以找出 PEDOT 膜的氧化降解電位。

由實驗結果可知，掃描電壓範圍介於 0~1.0 V 時，所聚出的 PEDOT 膜表面呈現砂粒般的細小顆粒，隨聚合電位提高，形成的顆粒大小直徑從 100~200 nm(CV 0~0.9 V) 如(圖 4- 13)提高到 300~500 nm(CV 0~1.0 V)如 (圖 4- 14)，於此電位條件下聚合出的 PEDOT 膜並無裂痕產生。當掃描電壓高於 1.0 V 時 (0~1.2 V)，所形成之顆粒粒

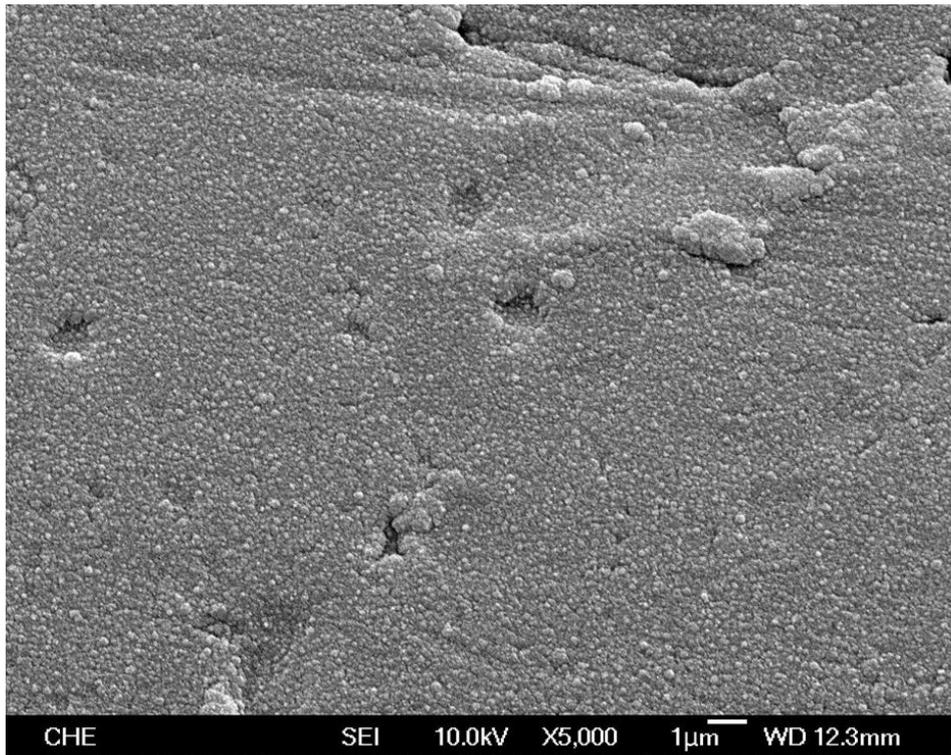
徑從 1400 nm~2200 nm(CV 0~1.1 V) 如(圖 4- 15)提高到 3500 nm~4000 nm(CV 0~1.2 V) 如(圖 4- 16), 並可觀察出 PEDOT 膜的表面有裂痕生成。因此, 以 CV 法聚合 PEDOT 導電高分子時其掃描電位範圍應介於 0~1.0 V。

綜合上述結果可知, 在 CV 電壓為 0~0.9 V 與 0~1.0 V 時聚合之 PEDOT 膜無裂痕產生, 電壓調高到 0~1.1 V 時開始產生裂痕。但是由先前實驗可知, 在 4-ABA 的聚合時, 條件為定電壓 1.0 V, PEDOT 膜卻產生裂痕, 原因可能為降解電壓為 1.0 V, 但以 CV 聚合 PEDOT 時, 聚合過程停留在降解電壓的時間較短, 因此可預期產生之高活性分子的量較少, 降低了高活性分子攻擊 PEDOT 活性基團的機率, 因此減少 PEDOT 膜裂痕的產生。綜合上述結果實驗中將選擇以循環伏安法, 掃描範圍為 0~1.0 V, 掃描速率 10 mV/s, 掃描圈數 5 圈的條件來聚合 PEDOT。且得知 4-ABA 在定電壓 1.0 V 下聚合時, 會造成 PEDOT 膜的氧化降解, 而在進行 DPV 感測時造成電極表面的剝落。



(圖 4- 12).定電壓聚合 4-ABA 之 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖

PEDOT 聚合方法：循環伏安法	4-ABA 聚合方法：定電壓
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>
掃描範圍：0~1.0 V	聚合電壓：1.0 V
掃描速率：10 mV/s	聚合時間：1800 秒
聚合圈數：5 圈	聚合溫度：25°C
聚合溫度：25°C	



(圖 4- 13) . 電壓 0~0.9 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法

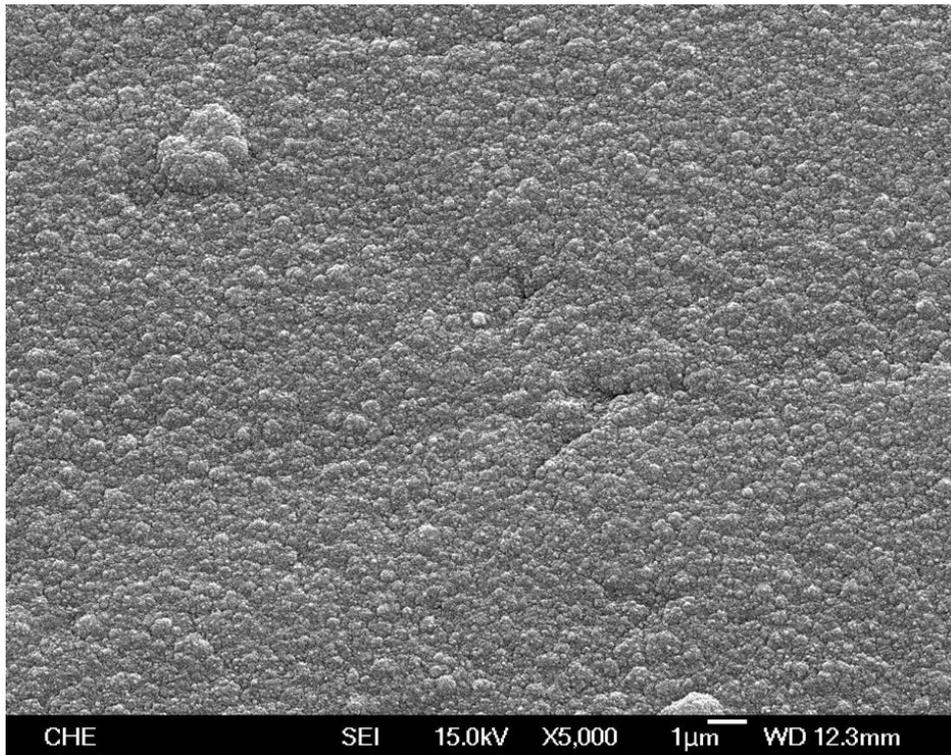
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：0~0.9 V

掃描速率：10m V/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25 °C



(圖 4- 14) . 電壓 0~1.0 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法

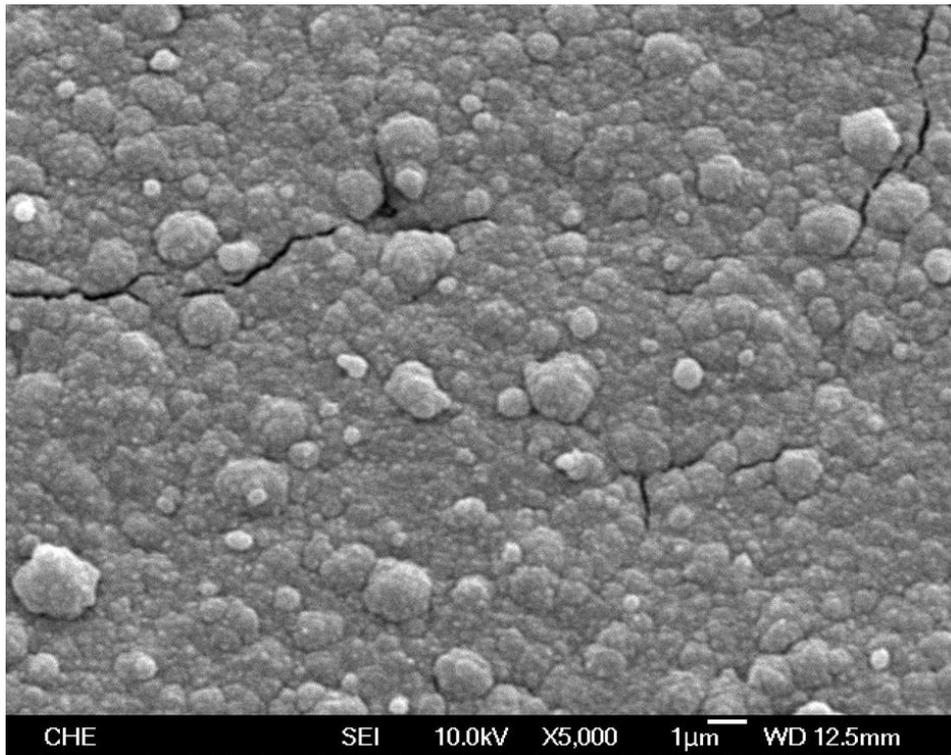
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：0~1.0 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C



(圖 4- 15). 電壓 0~1.1 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法

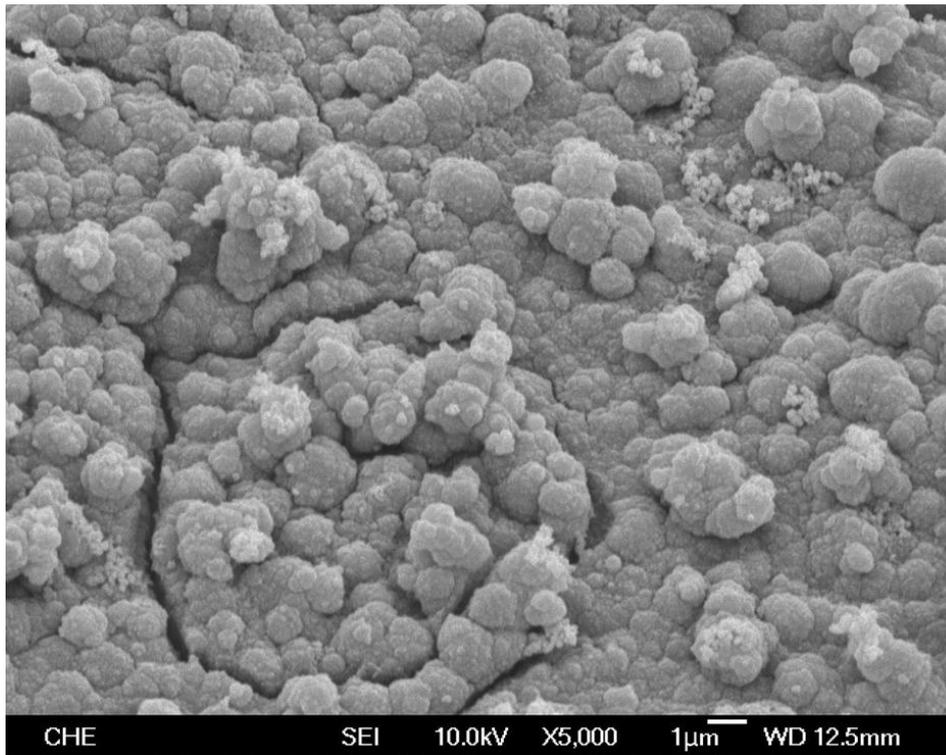
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：0~1.1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C



(圖 4- 16). 電壓 0~1.2 V 聚合 PEDOT 之 PEDOT/Pt 電極之表面型態

PEDOT 聚合方法：循環伏安法

聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：0~1.2 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C

## 4-2-2 解決因氧化降解而造成膜剝落的方法

### 方法 1：

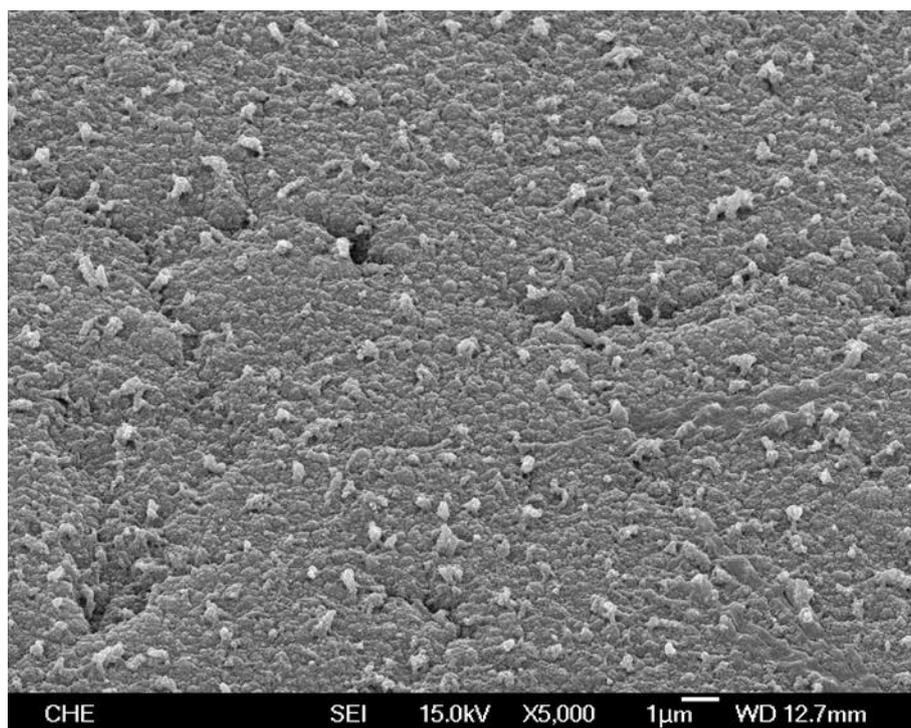
由 4-2-1 小節中可知道，以定電壓聚合 4-ABA 時，過高的電壓(1.0 V)會造成 PEDOT 膜的氧化降解，使電極表面產生均勻的裂痕，導致在進行 DPV 感測時，電極表面會剝落於溶液中，因此希望藉由降低 4-ABA 的聚合電壓(0.8 V)，來避免 PEDOT 膜的氧化降解。

以定電壓 0.8 V 聚合 4-ABA 之 4-ABA/PEDOT/Pt 電極表面無裂痕產生(圖 4- 17)，4-ABA 主要以顆粒狀的型態聚合在電極表面。以此電極固定探針 DNA，並進行目標 DNA 的雜合與指示劑 DNM 的嵌合反應後，最後以電化學分析儀進行微分脈衝伏安法(DPV)的感測。若比較 0.8V 與 1.0 V 聚合 4-ABA 之電極在相同條件下進行感測之結果，由(圖 4- 18)可看出，以 0.8V 聚合 4-ABA 之電極所偵測之電流訊號約為 1  $\mu\text{A}$ ，而以 1.0 V 聚合 4-ABA 之電極進行感測可得到約為 6.5  $\mu\text{A}$  之訊號。

雖然以 0.8 V 聚合 4-ABA 之電極可避免氧化降解產生之裂痕，但其感測訊號極其微弱。因此我們觀察其感測後之電極的 SEM 圖，比較感測前(圖 4- 17)與感測後(圖 4- 19)之 SEM 圖，可知感測後電極表面之聚 4-ABA 顆粒消失，推測原因為顆粒狀之聚 4-ABA，可能於固定探針、雜合目標 DNA 或浸泡道諾霉素等過程於溶液中脫落，因而

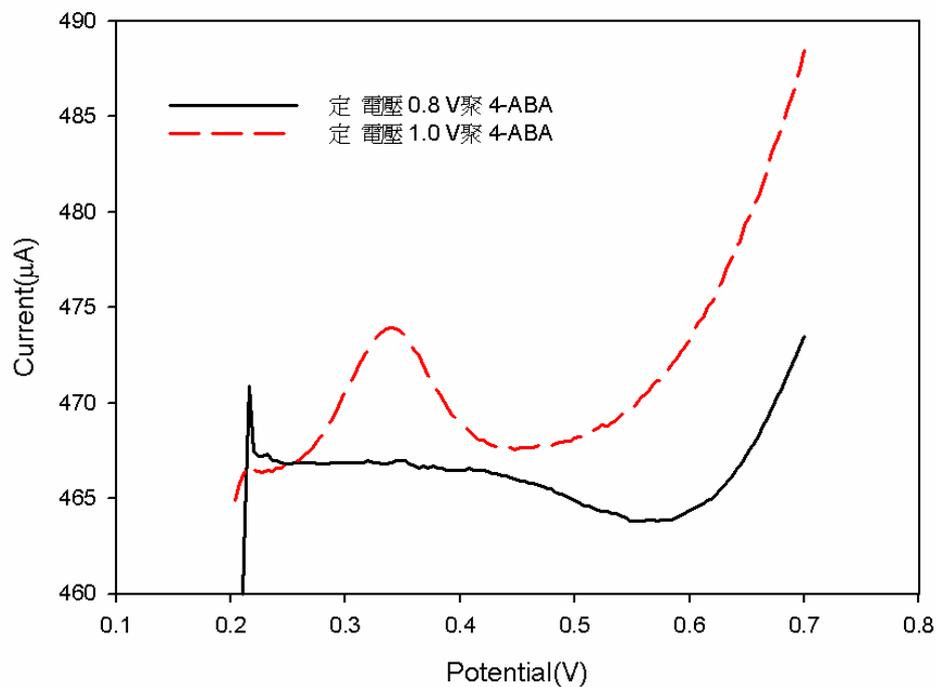
導致探針 DNA 無法固定於電極表面，造成感測訊號的微弱。

綜合以上結果可知，降低電壓聚合 4-ABA 可避免 PEDOT 膜產生氧化降解，但於此條件下聚合之 4-ABA 不易固定於 PEDOT 膜上，無法提供固定探針 DNA 時所需的羧酸基團，因此我們需另尋其他聚合方法，以解決 PEDOT 膜的氧化降解及聚 4-ABA 脫落等問題。



(圖 4- 17). 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖

<p>PEDOT 聚合方法：循環伏安法</p> <p>聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>掃描範圍：0~1.2 V</p> <p>掃描速率：10 mV/s</p> <p>聚合圈數：5 圈</p> <p>聚合溫度：25°C</p>	<p>4-ABA 聚合方法：定電壓</p> <p>聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>聚合電壓：0.8 V</p> <p>聚合時間：1800 秒</p> <p>聚合溫度：25°C</p>
--	--



(圖 4-18).不同電壓聚合 4-ABA 之電極感測互補 DNA 之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

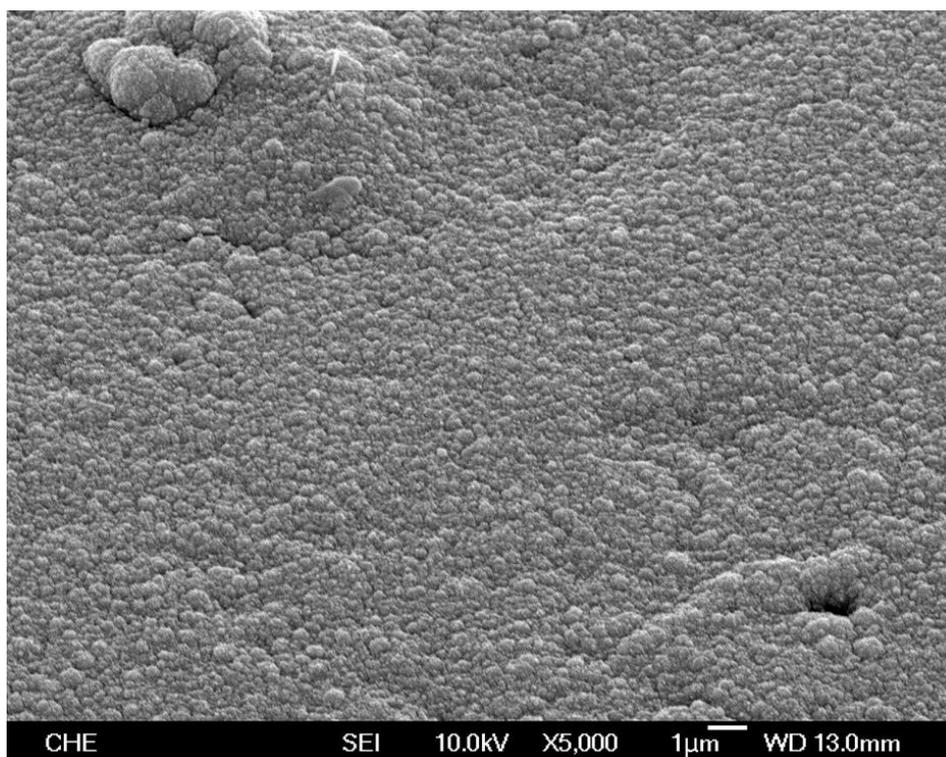
掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒



(圖 4- 19). DPV 感測互補 DNA 後 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖

PEDOT 聚合方法：循環伏安法	4-ABA 聚合方法：定電壓
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>
掃描範圍：0~1.2 V	聚合電壓：0.8 V
掃描速率：10 mV/s	聚合時間：1800 秒
聚合圈數：5 圈	聚合溫度：25°C
聚合溫度：25°C	

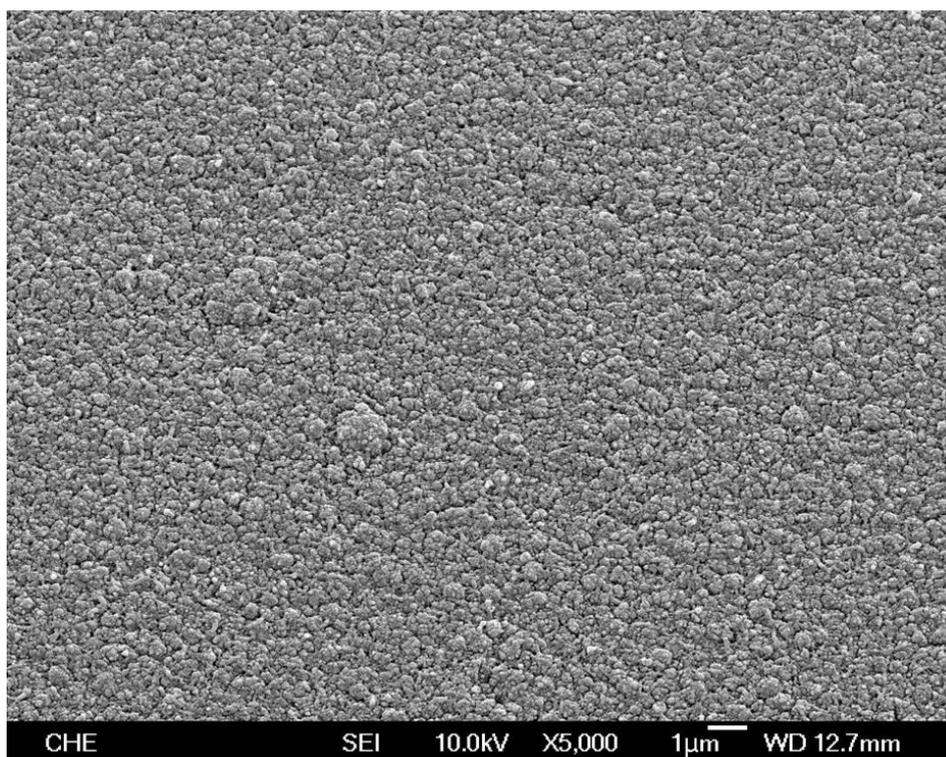
## 方法 2：

由上述實驗結果可知，降低定電壓聚合 4-ABA 之電壓時，會因 4-ABA 不易固定於 PEDOT 膜表面，而造成探針 DNA 無法固定於電極表面之問題，但若以定電壓 1.0 V 聚合之聚 4-ABA，因其以膜的方式緊密貼附於 PEDOT 膜上，不會有聚 4-ABA 剝落之問題，因此推測 4-ABA 之聚合電壓須達到 1.0 V。

在 4-2-1 小節中可知 PEDOT 在聚合時掃瞄電位範圍為(0~1.0 V)，但因為以循環伏安法聚合時，停留在氧化降解電位之時間較短，因此產生之高活性分子的量較少，可以減少高活性分子攻擊 PEDOT 的活性基團所造成的共價鍵斷裂，因此便想以相同方法聚合 4-ABA 來解決氧化降解之問題。

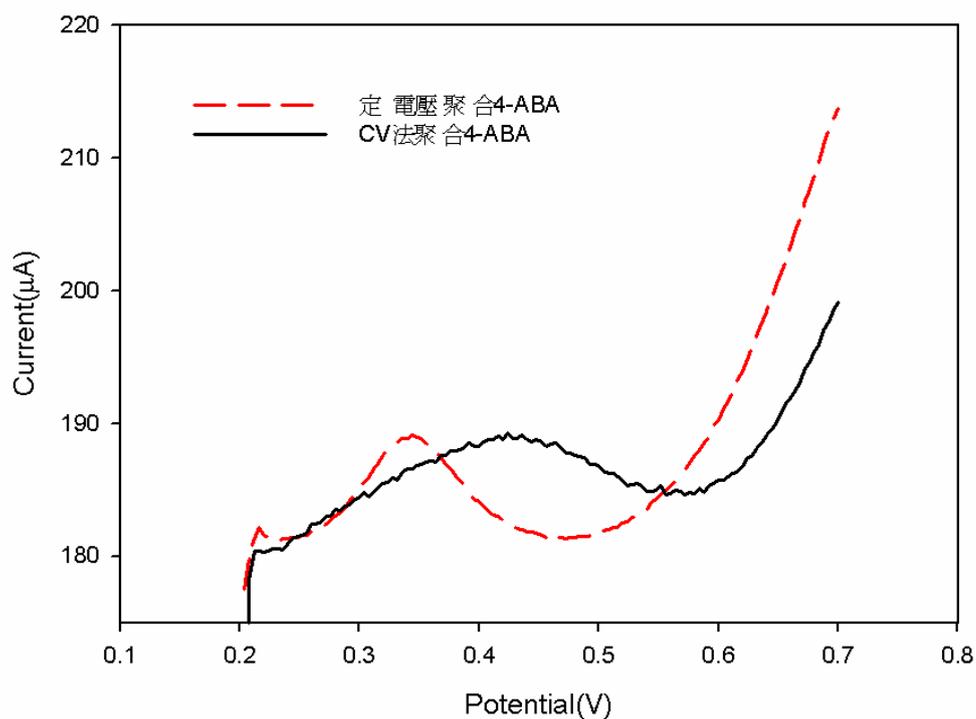
以 CV 法掃瞄電位範圍為(0~1.0 V)聚合 4-ABA 後電極表面型態如(圖 4- 20)，此條件下聚合 4-ABA 確實可避免氧化降解所造成之裂痕。將此條件製備之電極固定探針 DNA，並進行目標 DNA 的雜合與指示劑 DN1 的嵌合反應後，最後以電化學分析儀進行微分脈衝伏安法之感測。與定電壓法聚合 4-ABA 於相同條件下感測之結果比較。由(圖 4-21)可知使用 CV 法聚合 4-ABA 之感測訊號約為 5  $\mu\text{A}$  略小於定電壓法聚合 4-ABA 之感測訊號(約 6.5  $\mu\text{A}$ )。而造成 CV 法聚合 4-ABA 感測訊號較小的可能原因為，雖然 CV 法聚合之時間與定電壓

法聚合之時間相同，但 CV 法聚合之電位並不固定，達到電化學聚合反應之電位時間較短，因此聚合於 PEDOT 膜上之聚 4-ABA 較定電壓法聚合的量少，能提供之羧酸基團相對也比較少，因此感測時所得訊號較小。從(圖 4-21)可看出以 CV 法聚合 4-ABA 之電極所得之感測波峰，相較於以定電壓法聚合 4-ABA 之電極的感測波峰有偏移的現象(0.34 V $\rightarrow$ 0.42 V)，推測其原因為不同方法聚合之 4-ABA 其型態及表面活性略有差異，因而造成感測時波峰較寬及偏移的現象。



(圖 4- 20). CV 聚合 4-ABA 之 4-ABA/PEDOT/Pt 表面型態圖

PEDOT 聚合方法：循環伏安法	4-ABA 聚合方法：循環伏安法
聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>
掃描範圍：0~1.0 V	掃描範圍：0~1.0 V
掃描速率：10 mV/s	掃描速率：50 mV/s
聚合圈數：5 圈	聚合圈數：25 圈
聚合溫度：25°C	聚合溫度：25°C



(圖 4- 21). CV 法聚合 4-ABA 感測不同濃度完全互補 DNA 之微分脈衝  
伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

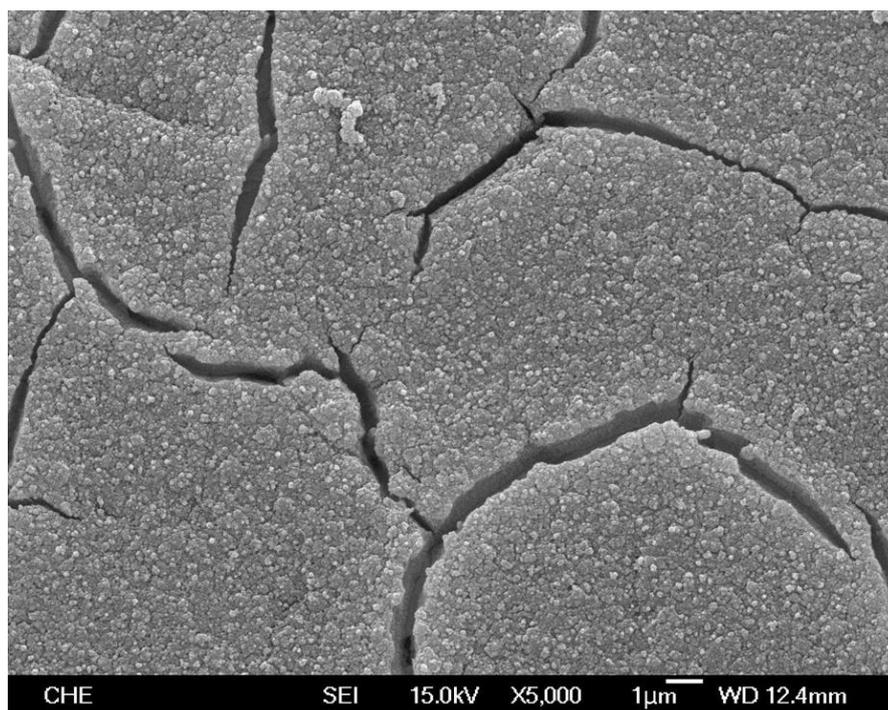
### 方法 3：

綜合 4-2-1 前兩個實驗結果得知，若以定電壓法聚合 4-ABA，電壓應達 1.0 V，才可使聚 4-ABA 以膜的方式緊密貼附於 PEDOT 膜表面，但卻會造成 PEDOT 膜的降解。而以 CV 法(掃描範圍 0~1.0 V)聚合 4-ABA，雖然可避免 PEDOT 氧化降解而造成的裂痕，但其 DPV 感測之訊號相對於定電壓法聚合 4-ABA 之電極小。因此嘗試先以定電壓 1.0 V 聚合 4-ABA，之後再以循環伏安法 0~0.9 V 聚合一次 4-ABA，使聚合之 4-ABA 以膜的形式包覆電極，希望能達到感測訊號大(定電壓法聚合 4-ABA 之優點)且電極不剝落的效果(CV 法聚合 4-ABA 之優點)。

由(圖 4-22)可看出氧化降解造成的裂痕依然存在，但於感測過程中，PEDOT 膜並無產生剝落的現象。證明以 CV 法(掃描電位 0~0.9 V)再次聚合 4-ABA，可形成新的聚 4-ABA 膜將氧化降解之 PEDOT 膜包覆，避免於感測過程中 PEDOT 膜的剝離。

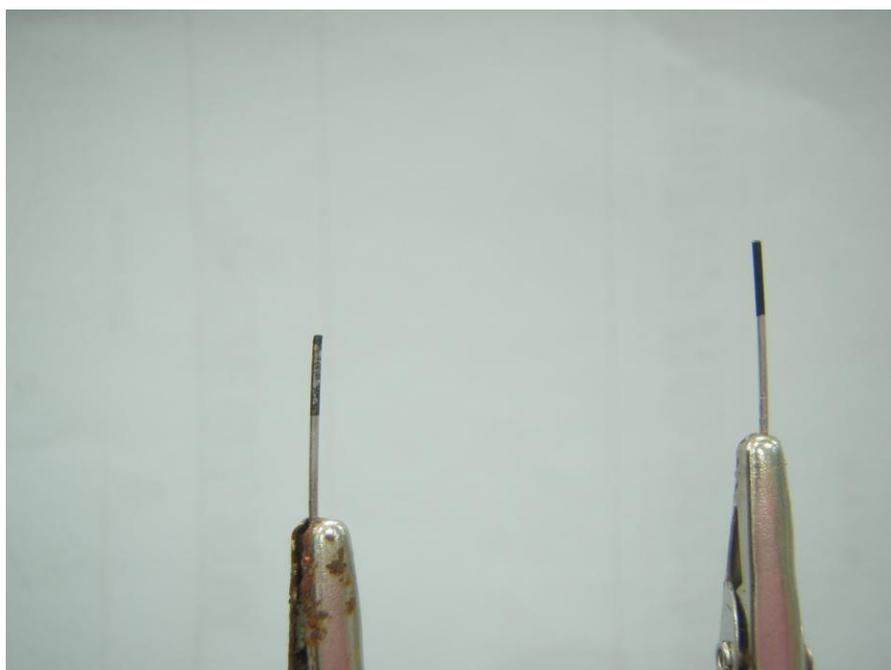
此外亦嘗試改變 CV 法聚合之條件(提高或減少聚合 4-ABA 之圈數)，並觀察其影響。由實驗結果得知，當 CV 法聚合 4-ABA 圈數不足時，會因聚合之 4-ABA 膜強度不夠，於感測時造成 PEDOT 膜的剝落。研究中觀察發現，以 CV 法掃描速率為 50 mV/s 聚合 30 圈即可避免 PEDOT 膜的剝離。將此條件製備之電極固定探針 DNA 後，

進行目標 DNA 的雜合，接著浸泡 15 分鐘的 DNM，最後以電化學分析儀進行微分脈衝伏安法之感測。以此電極與 1.0 V 聚合 4-ABA 之電極，在相同條件下進行 DPV 感測之結果進行比較，感測後電極表面改善前與改善後剝落程度如(圖 4- 23)。從(圖 4- 24)可看出，改善後之電極(b)感測訊號約為 13  $\mu\text{A}$  比改善前之電極(a)的感測訊號的 6.5  $\mu\text{A}$  大，此感測結果顯示當提高膜的穩定性後，在進行電化學感測時所得之電化學活性面積較大，可得到較大之感測訊號。同時不會因為 PEDOT 膜氧化降解的原因造成電極表面剝落程度不一，大大的提升了感測的靈敏度及實驗結果的再現性。



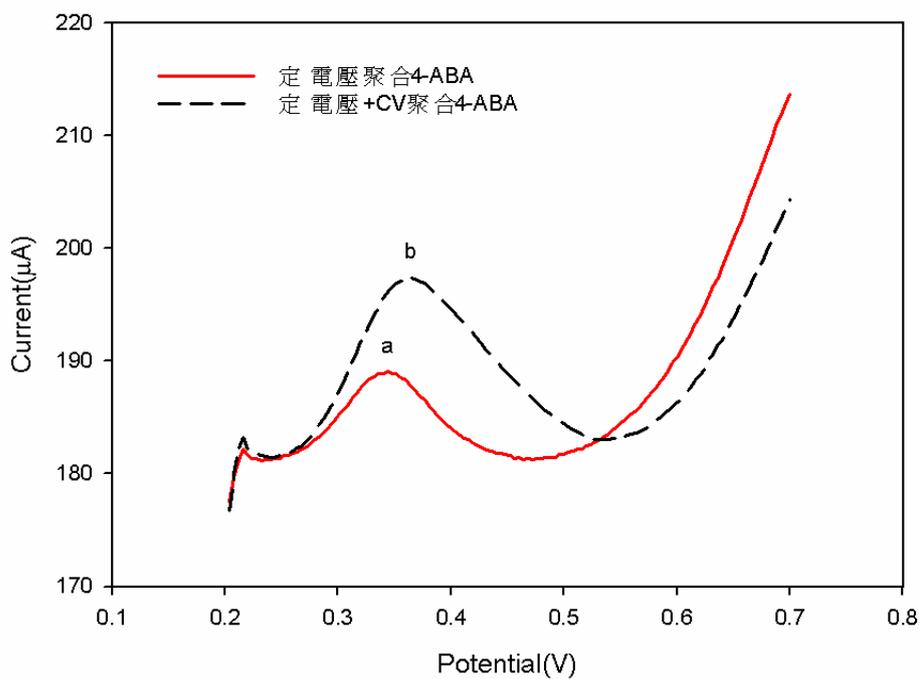
(圖 4- 22). 4-ABA/PEDOT/Pt 表面形態圖

<p>PEDOT 聚合方法：循環伏安法</p> <p>聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>掃描範圍：0~1.2 V</p> <p>掃描速率：10 mV/s</p> <p>聚合圈數：5 圈</p> <p>聚合溫度：25°C</p>	<p>4-ABA 聚合條件：定電壓</p> <p>聚合溶液：3 mM 4-ABA/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>聚合電壓：1.0 V</p> <p>聚合時間：1800 秒</p>	<p>定電壓結束後以循環伏安法再次聚合 4-ABA</p> <p>掃描範圍：0~0.9 V</p> <p>掃描速率：50 mV/s</p> <p>聚合圈數：30 圈</p> <p>聚合溫度：25°C</p>
--	---	---



(圖 4-23). 不同聚合方式聚合 4-ABA 於 DPV 感測後電極型態

左：4-ABA 聚合條件：	右：4-ABA 聚合條件：	定電壓結束後以循環
定電壓	定電壓	伏安法再次聚合
聚合溶液：3 mM	聚合溶液：3 mM	4-ABA
4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	4-ABA/0.1 M LiClO <sub>4</sub>	掃描範圍：0~0.9 V
聚合電壓：1.0 V	聚合電壓：1.0 V	掃描速率：50 mV/s
聚合時間：1800 秒	聚合時間：1800 秒	聚合圈數：30 圈
聚合溫度：25°C		聚合溫度：25°C



(圖 4-24). 感測不同方法聚合 4-ABA 之微分脈衝伏安圖

a. PEDOT/Pt 電極定電壓聚合 4-ABA. b. PEDOT/Pt 電極定電壓聚合 4-ABA 後以 CV 再聚合 4-ABA.

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

方法 4：

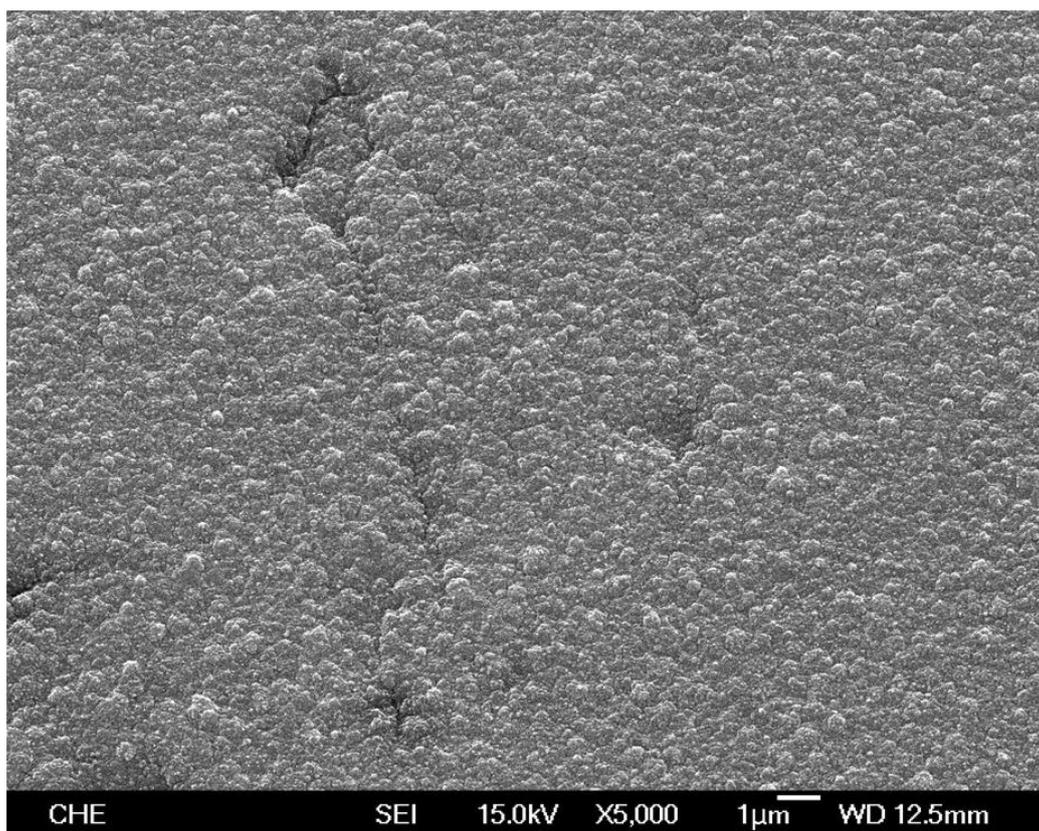
由於丙烯酸與 4-ABA 同樣具有可以提供固定探針時所需的羧酸基團，因此嘗試以丙烯酸聚合於 PEDOT 膜上，並探討聚丙烯酸膜之表面型態及感測後的結果。由文獻中得知丙烯酸之聚合電位為-1.5 V，因此可避免對 PEDOT 膜造成氧化降解。

由 AA 聚合於 PEDOT 表面之 SEM 圖(圖 4-25)可看出，PAA/PEDOT 與 PEDOT 之圖形相似，推測 PAA 與聚 4-ABA 一樣是以膜的方式聚合於 PEDOT 膜上。以 PAA/PEDOT/Pt 電極進行感測，由 DPV 感測結果(圖 4-26)得知，PAA/PEDOT/Pt 電極之 DPV 感測結果無明顯峰值產生。由文獻中得知聚丙烯酸(PAA)有良好的水溶性，因此推測於固定探針 DNA 時聚丙烯酸會溶於水溶液中，使得電極表面無提供固定探針時所須之羧酸基團，因而導致在進行 DPV 感測時並無訊號產生。

由於 PAA 於固定 DNA 探針時會溶於水溶液中，因此研究中嘗試將 AA 溶液加入 EDOT 單體溶液中進行共聚，希望可解決前述之問題。

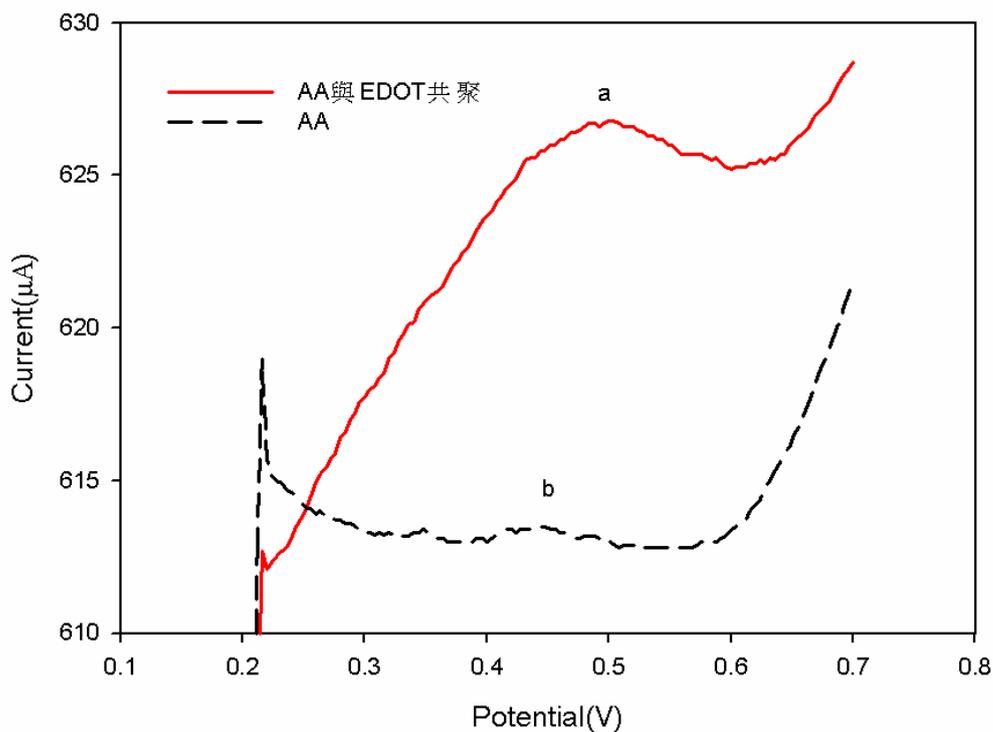
實驗中 AA 與 EDOT 共聚之聚合電位範圍設定為-1.5 V~1.0 V，其共聚結果如(圖 4-27)。由圖可看出 PAA/PEDOT 共聚後的表面產生大量皺摺，且於感測過程 PEDOT 膜會發生剝落現象。於 DPV 感測互補 DNA 之結果(圖 4-26)可知，其感測訊號約為 6  $\mu$ A。此結果說明

將 AA 與 EDOT 共聚，PAA 可提供羧酸基團進行探針 DNA 的固定，因而獲得感測訊號。但因 PAA 仍然具有水溶性，因而導致共聚後的 PAA/PEDOT 膜因 PAA 的溶解，而導致 PEDOT 膜的剝落。由於此部分之實驗尚處於嘗試階段，且目前尚未找到有關使用 AA 與 EDOT 進行共聚之文獻，或許將來可針對聚合的條件進行探討，觀其是否能將 PAA 應用於此，以解決修飾 4-ABA 膜引發 PEDOT 氧化降解之問題。



(圖 4- 25). PAA/PEDOT/Pt 表面形態圖

<p>PEDOT 聚合方法：循環伏安法</p> <p>聚合溶液：0.01 M EDOT/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>掃描範圍：0~1.2 V</p> <p>掃描速率：10 mV/s</p> <p>聚合圈數：5 圈</p> <p>聚合溫度：25°C</p>	<p>AA 聚合條件：定電壓</p> <p>聚合溶液：3 mM AA/0.1 M LiClO<sub>4</sub></p> <p>聚合電壓：-1.5 V</p> <p>聚合時間：1800 秒</p>
--	--



(圖 4- 26). 感測丙烯酸製備電極之微分脈衝伏安圖

a. AA 與 EDOT 共聚/Pt    b. AA/PEDOT/Pt

工作電極：a. dsDNA/PAA-PEDOT/Pt    b. dsDNA/PAA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

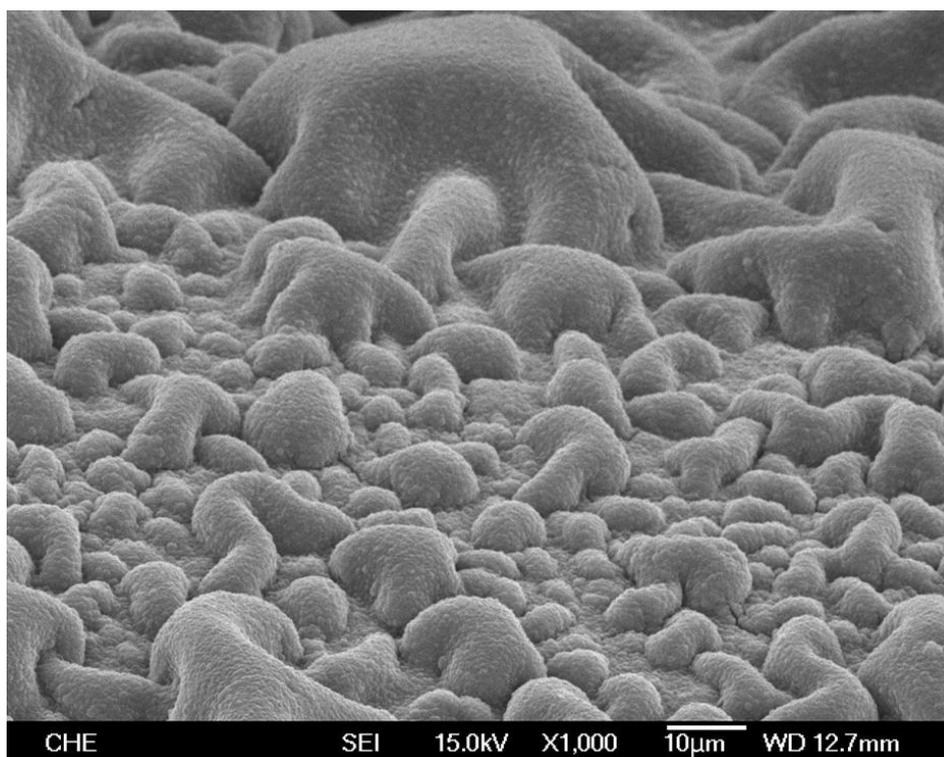
掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒



(圖 4- 27). PAA-PEDOT/Pt 表面形態圖

AA 與 EDOT 共聚聚合方法：循環伏安法

CV -1.5~1.0 V Scan rate:10mV/s

聚合溶液：0.005 M EDOT+1.5 mM AA/0.1 M LiClO<sub>4</sub>

掃描範圍：-1.5 V~1.0 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C

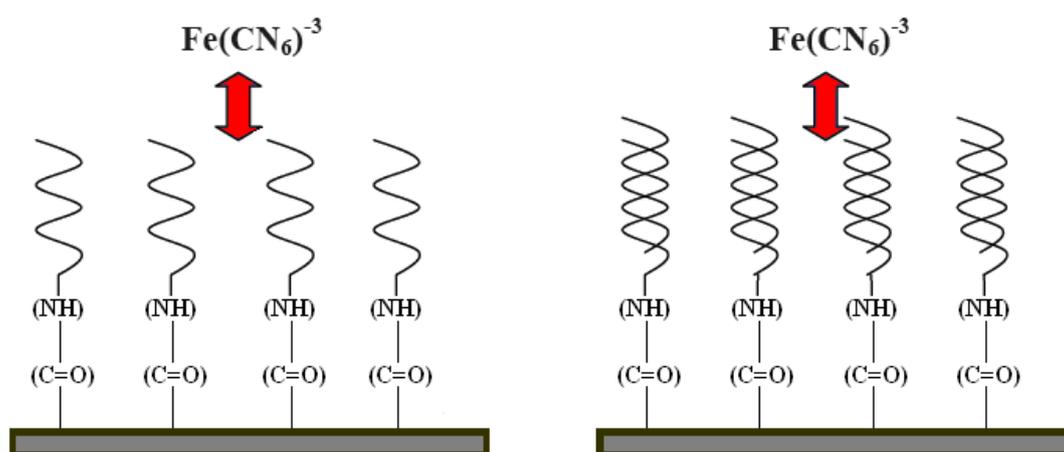
### 4-3 感測器對目標 DNA 濃度之感測結果

#### 4-3-1 以不同方式固定探針 DNA 之結果

研究中於完全互補之目標 DNA 的濃度感測實驗中，目標 DNA 之最大濃度設計為 50 nM，並遞減為 25 nM、10 nM，但於感測之訊號並無明顯差異，推測或許是固定於電極表面之探針 DNA 的量相當微量，因而造成在感測較高的目標 DNA 濃度時，感測之訊號結果相差不大。由文獻中可知，檢測固定於電極表面之探針 DNA 的方法，可由赤血鹽與電極表面接觸所得到的氧化還原訊號進行判斷。電極表面未固定 DNA 探針時，對於赤血鹽而言具有最大感測面積，因此所獲得的氧化還原訊號最大。當單股或雙股 DNA 固定於電極表面時，帶負電的磷酸骨架可避免赤血鹽與電極接觸而發生氧化還原反應，因此於循環伏安法之檢測中，有固定 DNA 的氧化還原訊號會因此而下降。若比較單股與雙股 DNA 的差別，雙股 DNA 於電極表面上具有更高的負電荷，因此獲得的赤血鹽於 CV 感測中的氧化還原訊號，將比單股 DNA 來的低(圖 4-28)。

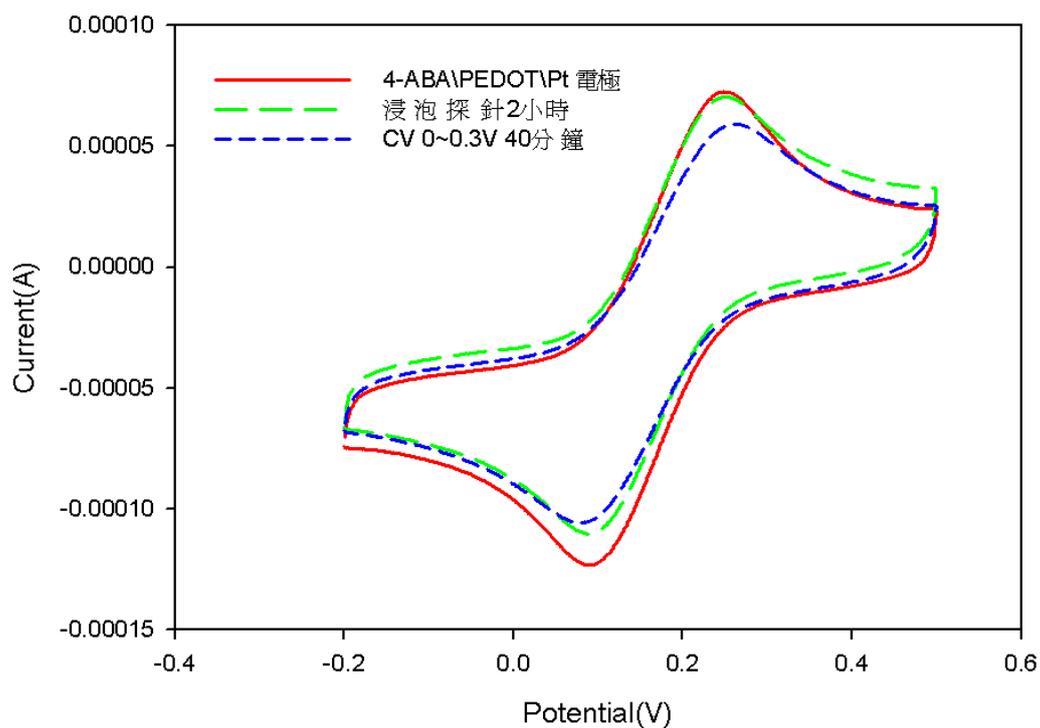
比較 4-ABA/PEDOT/Pt 與浸泡探針 2 小時的電極之循環伏安法感測赤血鹽之 CV 圖，後者所獲得面積僅略小於前者，代表接在電極表面的 DNA 探針非常微量，推測可能是因為羧酸基團於中性溶液中解離氫離子而帶負電，與 DNA 之磷酸骨架產生相斥之作用力，使 DNA

較難固定於電極表面。為了提高電極表面探針的數量，改以提供一正電場(CV 0~0.3 V)的方式進行探針固定化。從循環伏安圖面積(圖 4- 29)可看出探針固定的量是有增加的 (感測赤血鹽 CV 圖面積變小)。從 DPV 感測結果來看，可感測最大濃度從 0.1 nM 提高至 2 nM ，說明了固定在電極表面之探針 DNA 的量有提升。



(圖 4- 28).  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$  應用於感測電極表面 DNA 濃度之示意圖

- (a). 單股 DNA 的磷酸骨架上帶負電，當單股 DNA 修飾於電極表面時可避免  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$  接觸電極表面而產生氧化還原反應。
- (b). 雙股 DNA 的磷酸骨架上帶負電，當單股 DNA 修飾於電極表面時可避免  $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$  接觸電極表面而產生氧化還原反應。



(圖 4-29). 不同電極感測赤血鹽之循環伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

掃描範圍：-0.2 V~0.5 V(vs. Ag/AgCl)

掃描速率：20 mV/s

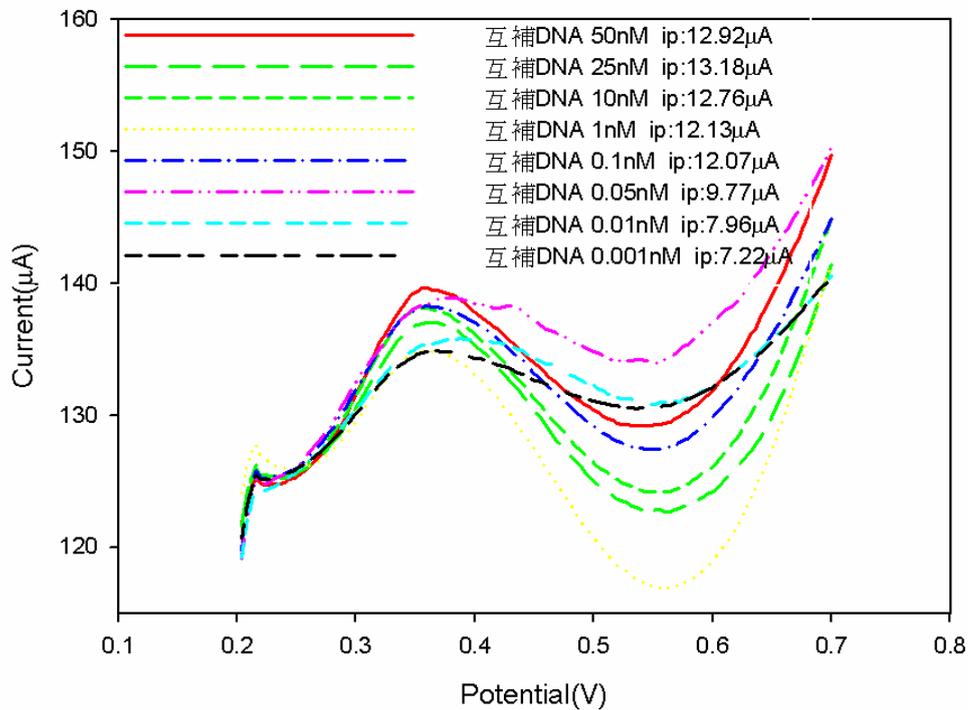
掃描圈數：10 圈

赤血鹽濃度：0.01 M

#### 4-3-2 以浸泡方式固定探針 DNA 對目標 DNA 濃度之感測結果

由於固定於電極表面之探針 DNA 數目是無法確定的，因此必須先找出固定探針 DNA 後的電極，可有效感測目標 DNA 濃度的範圍。當找出有效感測目標 DNA 濃度範圍時，便可進一步的探討感測濃度與訊號之間的關係，以此作為其他實驗之比較基準。

(圖 4-30)為 DPV 感測完全互補 DNA 之結果，其固定探針的方法是將 4-ABA/PEDOT/Pt 電極浸泡於含探針 DNA 之磷酸 buffer(pH = 7.0)溶液中兩小時，取出電極後以 PBS buffer(pH = 7.4)沖洗，再將電極浸泡在含有目標 DNA 之 PBS buffer(pH = 7.4)溶液中，以乾浴器加熱至雜合溫度 55°C 雜合一小時，取出電極後再以 PBS buffer 沖洗後，浸泡 15 分鐘 DNM，取出電極後再以 PBS buffer 沖洗，最後在 PBS buffer 溶液中以 DPV 法感測。此實驗變因為改變目標 DNA 之濃度，從(圖 4-30)中可觀察出，當改變目標 DNA 濃度由 0.1 nM、1 nM 至 10 nM，訊號僅僅只增加 0.7  $\mu$ A，說明了目標 DNA 已達飽和，推測固定於電極表面之 DNA 探針數目僅能感測低於 0.1 nM 之濃度如(圖 4-31)與(圖 4-32)。



(圖 4- 30). 感測完全互補 DNA 不同濃度之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

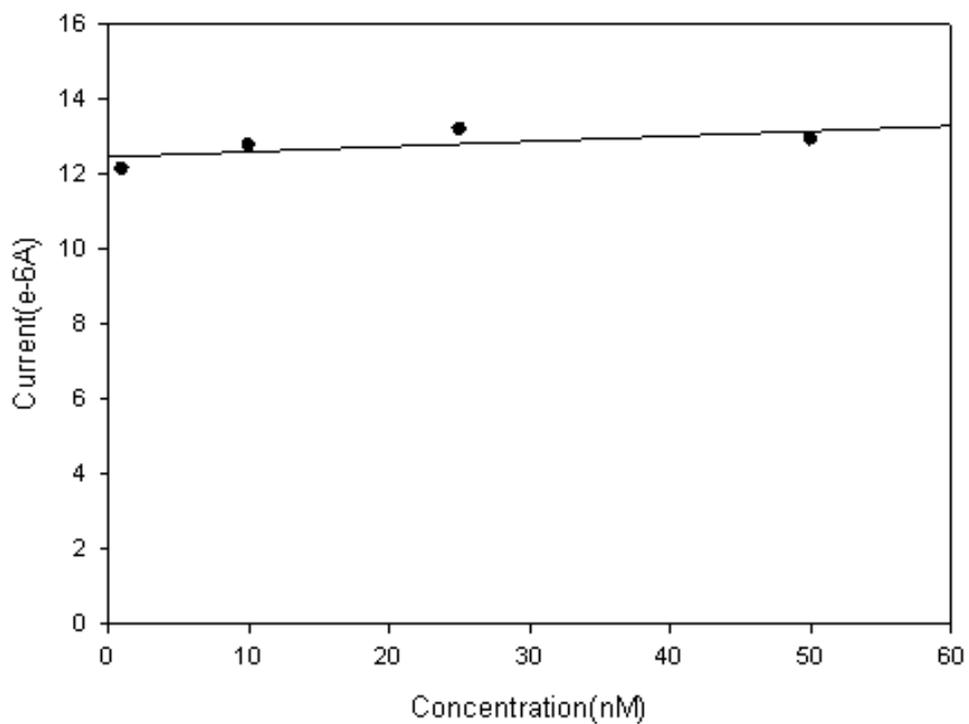
掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

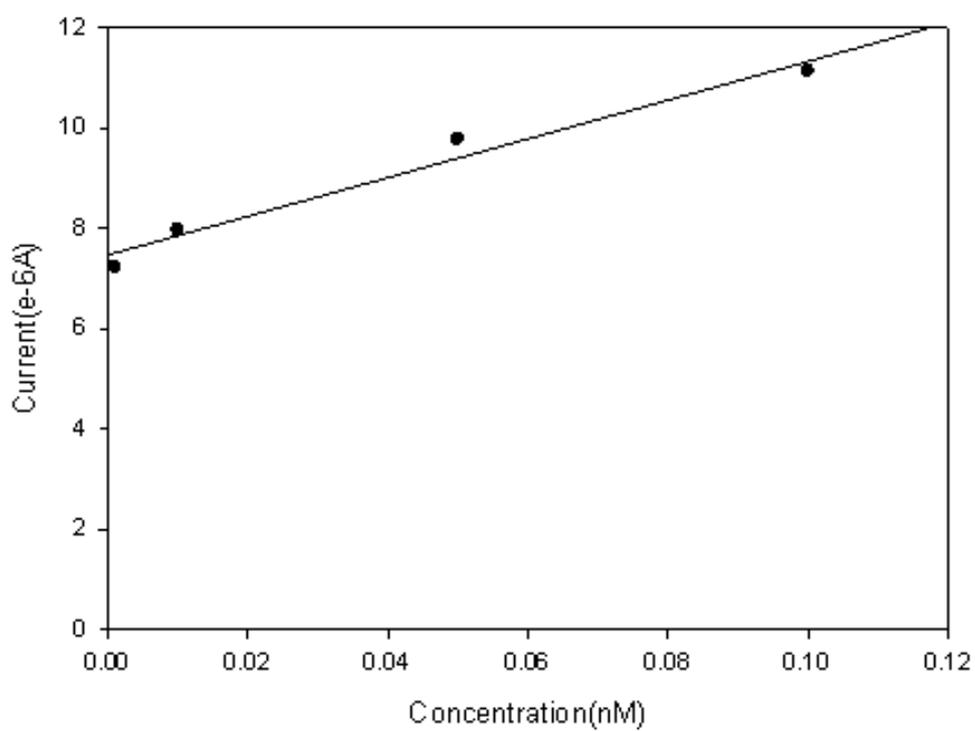
脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒



(圖 4- 31). 高濃度目標 DNA 濃度曲線(無電場固定探針 DNA)

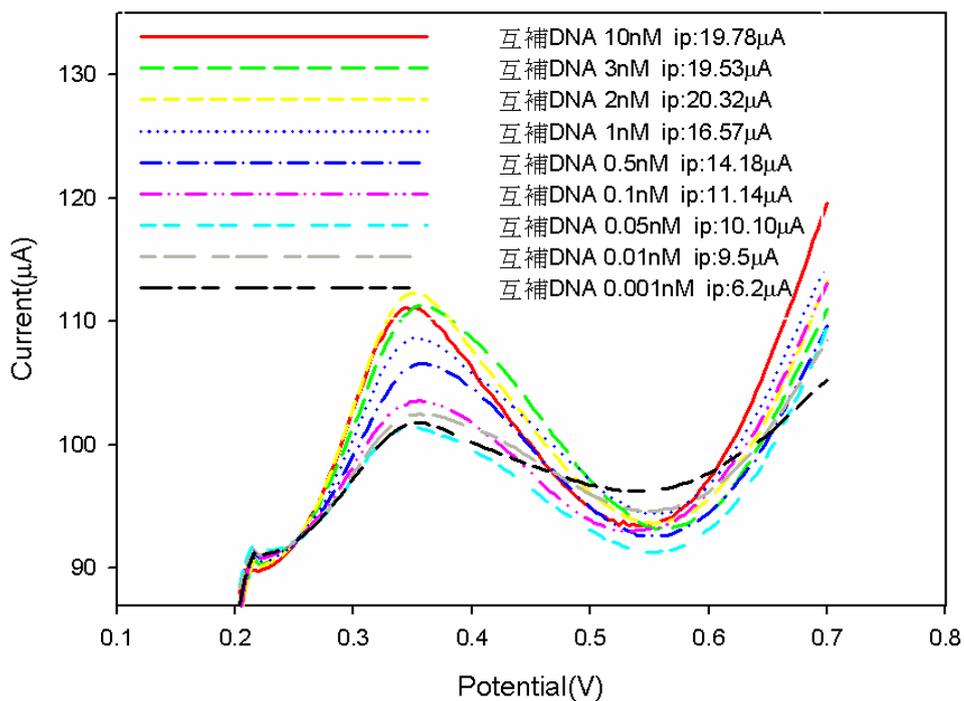


(圖 4- 32). 低濃度目標 DNA 濃度曲線(無電場固定探針 DNA)

#### 4-3-3 以正電場固定探針 DNA 對目標 DNA 濃度之感測結果

由於以浸泡的方式固定探針 DNA 的數量較少，為了提高固定探針的量以增加感測目標 DNA 的濃度，改以提供一正電場的方式來吸引探針 DNA。實驗中以 CV 法給予一正電位作為吸引探針 DNA 之驅動力，希望藉此來增加探針固定於電極表面的量。由 DPV 感測之結果，從(圖 4- 33)與(圖 4-34)可觀察出，可感測之目標 DNA 濃度從 0.1 nM 增加至 2 nM，感測訊號從 13.5  $\mu$ A 提高至約為 20  $\mu$ A。當濃度增加至 10 nM 時感測之訊號與 2 nM 之結果近似，因此可知提供正電場之方法能將目標 DNA 之感測濃度提高 20 倍 (0.1 nM => 2 nM)。

由(圖 4- 35)可觀察出目標 DNA 感測濃度的高低與訊號間並無線性關係，而影響濃度感測無法呈線性之原因為，目標 DNA 在溶液中因 DNA 分子鏈鹼基中氫鍵的影響形成繞曲型態，而此型態會影響 DNA 在進行雜合互補時無法完全與探針 DNA 進行黏合。因此會以控制雜合溫度來破壞目標 DNA 分子間的氫鍵，以達到完全與探針 DNA 黏合之目的。當目標 DNA 鄰近電極表面時，電極表面的粗糙程度、目標 DNA 濃度與探針 DNA 接合的密度，皆會影響目標 DNA 與探針 DNA 完全黏合的程度，因此在訊號的獲得方面無法得到完全與濃度呈現線性的關係。文獻中也提到，其感測所得之濃度曲線為類似吸附曲線，而影響的因素為目標 DNA 的濃度[32]。



(圖 4- 33). 感測完全互補 DNA 不同濃度之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5' CGCCGGCCACGAGAATAGCaminoC6 3'

目標 DNA：5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG 3'

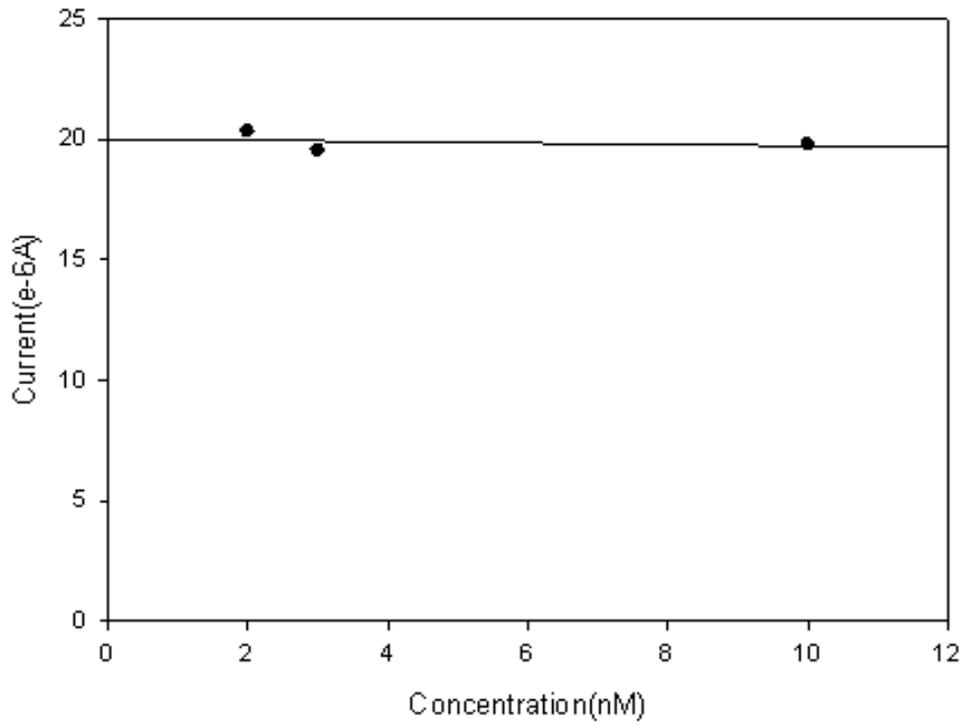
掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

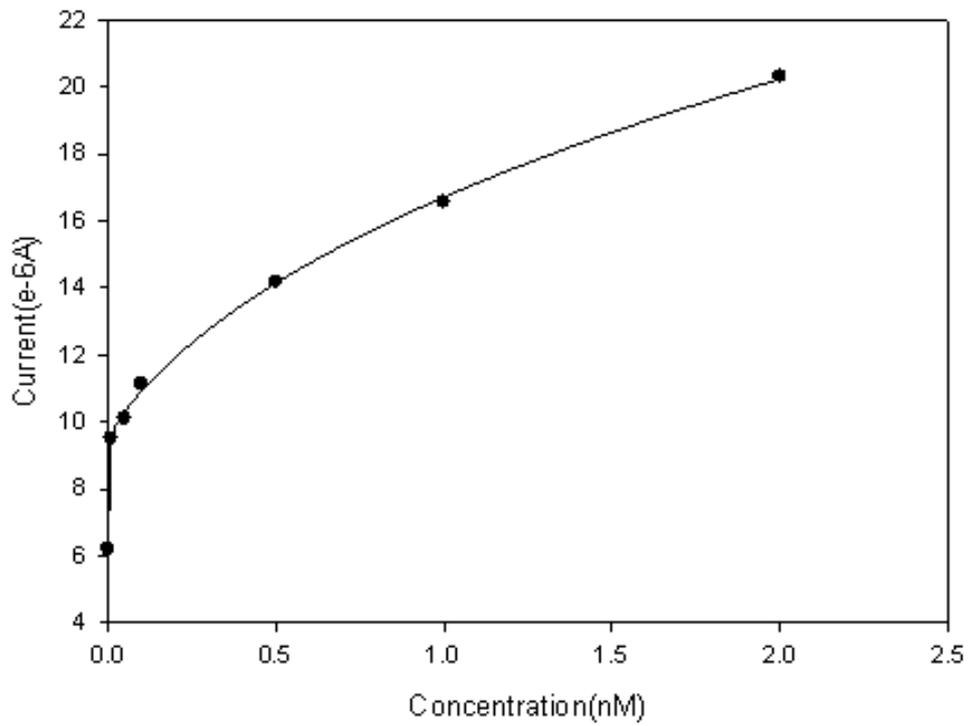
脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒



(圖 4- 34). 高濃度互補 DNA 濃度曲線(加電場固定探針 DNA)

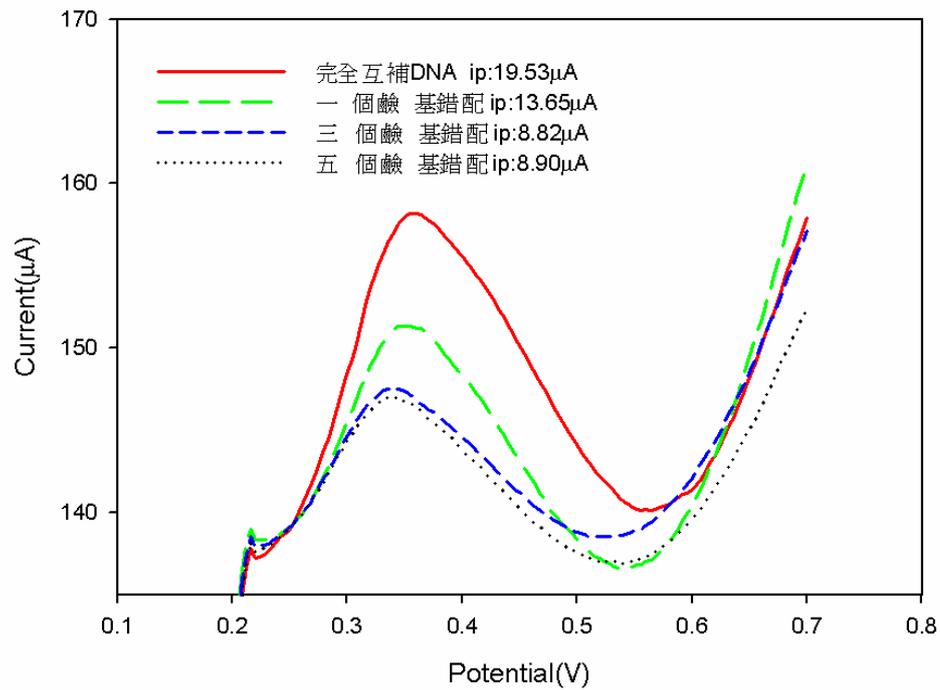


(圖 4- 35). 低濃度互補 DNA 濃度曲線(加電場固定探針 DNA)

#### 4-4 感測含錯配鹼基之目標序列

此組實驗之設計是為了觀察鹼基錯配數目對於雜合效率之影響，希望能得到鹼基錯配數越多感測訊號越小之結果。實驗結果如(圖 4- 36)所示，當鹼基錯配數從完全互補增加一個、三個錯配鹼基時，感測訊號分別為  $19.53 \mu\text{A}$ 、 $13.65 \mu\text{A}$  及  $8.82 \mu\text{A}$ 。此結果符合實驗前所預期之結果，但當鹼基錯配數目從三個增加至五個時，感測訊號為  $8.90 \mu\text{A}$ ，與三個鹼基錯配之感測結果相似。比較實驗室先前所做的結果，三個鹼基錯配( $3.77 \mu\text{A}$ )與五個鹼基錯配( $3.40 \mu\text{A}$ )之感測訊號亦無明顯變化[9]。因此，造成訊號下降之原因可能不完全是鹼基錯配數目對雜合效率之影響。

文獻上指出道諾霉素作為指示劑傳遞訊號的條件較為嚴苛，於錯配後段鹼基之道諾霉素無法傳遞電子，導致含鹼基錯配之感測結果訊號下降。由道諾霉素嵌入鹼基之示意圖如(圖 4- 37)，於一個鹼基錯配之序列中可傳遞電子之道諾霉素，比三個與五個鹼基錯配序列中可傳遞電子之道諾霉素多，因此感測之訊號較大，而三個與五個鹼基錯配之序列，其 DNМ 嵌入之量相同，因此 DPV 感測之訊號相近。



(圖 4- 36). 感測不同錯配檢基數目之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(一個錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(三個錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(五個錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

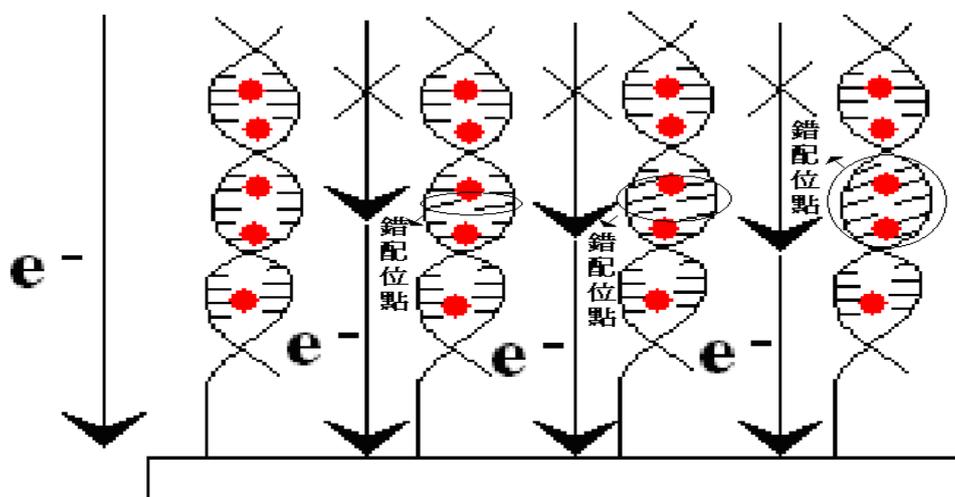
脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

表 4-1 不同錯配數量之目標 DNA 序列

DNA sequence	名稱
5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG3'	完全互補序列
5' GCTATTCTC <u>A</u> TGGCCGGCG3'	一個鹼基錯配序列
5' GCTATTCTT <u>A</u> GGCCGGCG3'	三個鹼基錯配序列
5' GCTATTC <u>C</u> TAGAGCCGGCG3'	五個鹼基錯配序列



(圖 4-37). 鹼基錯配數量不同時電子傳遞示意圖(●為道諾霉素)

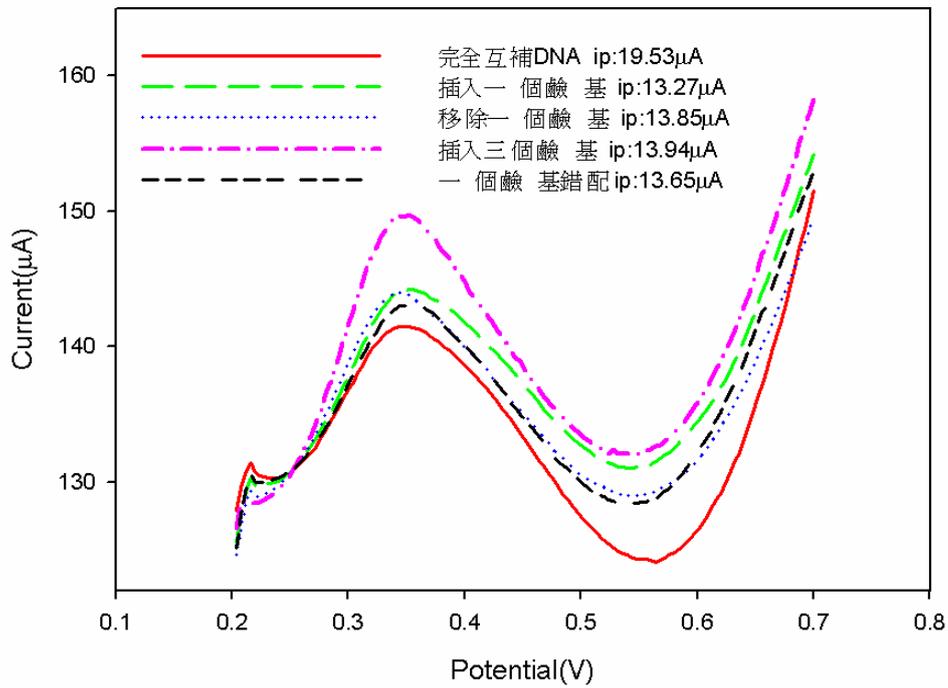
#### 4-5 感測插入或移除鹼基之目標序列

導致人體致病之 DNA 突變，包含了 DNA 序列中鹼基的插入(insertion)或移除(deletion)，因此希望能藉由 DNA 感測器來檢測出 DNA 序列中的突變情形為鹼基插入或鹼基移除。

由(圖 4- 38)可觀察到，插入鹼基與移除鹼基所測得的電流值結果近似，與含一個鹼基錯配的結果雷同，訊號值分別為 13.27  $\mu\text{A}$  (插入一個鹼基)、13.85  $\mu\text{A}$  (移除一個鹼基)、13.94  $\mu\text{A}$  (插入三個鹼基)及 13.65  $\mu\text{A}$  (一個鹼基錯配)。推測在插入鹼基及移除鹼基後所獲得的電子訊號來源與錯配相同，其主要訊號來源為錯配點前端至電極表面之 DNA 片段，而於錯配或鹼基插入(移除)位置後端的 DNA 無法有效的將道諾霉素的電子進行傳遞，因此導致訊號來源下降。所以本研究所設計之 DNA 感測器對於鹼基錯配數目，以及插入或移除鹼基之目標 DNA 無法進行有效的檢測。

表 4- 2 插入(移除)鹼基之目標 DNA 序列

5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG3'	完全互補序列
5' GCTATTCTCG <u>T</u> TGGCCGGCG3'	插入一個鹼基序列
5' GCTATTCTCG_ GGCCGGCG3'	移除一個鹼基序列
5' GCTATTCTCG <u>CGG</u> TGGCCGGCG3'	插入三個鹼基序列



(圖 4-38). 感測插入移除鹼基之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(插入一個鹼基)/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(移除一個鹼基)/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(插入三個鹼基)/4-ABA/PEDOT/Pt、dsDNA(一個錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

#### 4-6 感測器用於感測長鏈 DNA 之結果

由於實際之 DNA 鏈長遠大於目前所設計之目標 DNA 的鏈長，為了未來能進行檢體 DNA 的感測，因此設計了較探針 DNA 長的目標 DNA(RT-PT1)，並且探討當 RT-PT1 與其完全互補之 DNA(RT-PTC1) 同時存在時，對探針 DNA 與目標 DNA 之雜合的影響，因此設計了以下四組實驗。

此四組實驗條件分別為(a.)探針於 55°C 與雙股 DNA(PT-PT1 + RT-PTC1)進行雜合、(b.)雙股 DNA 加熱至 94°C 後，降至雜合溫度 55°C 與探針 DNA 進行雜合、(c.)雙股 DNA 加入 3'及 5'端的干擾引子後加熱至 94°C，降至雜合溫度 55°C 後與探針 DNA 進行雜合及(d.)探針與互補 DNA 進行雜合。

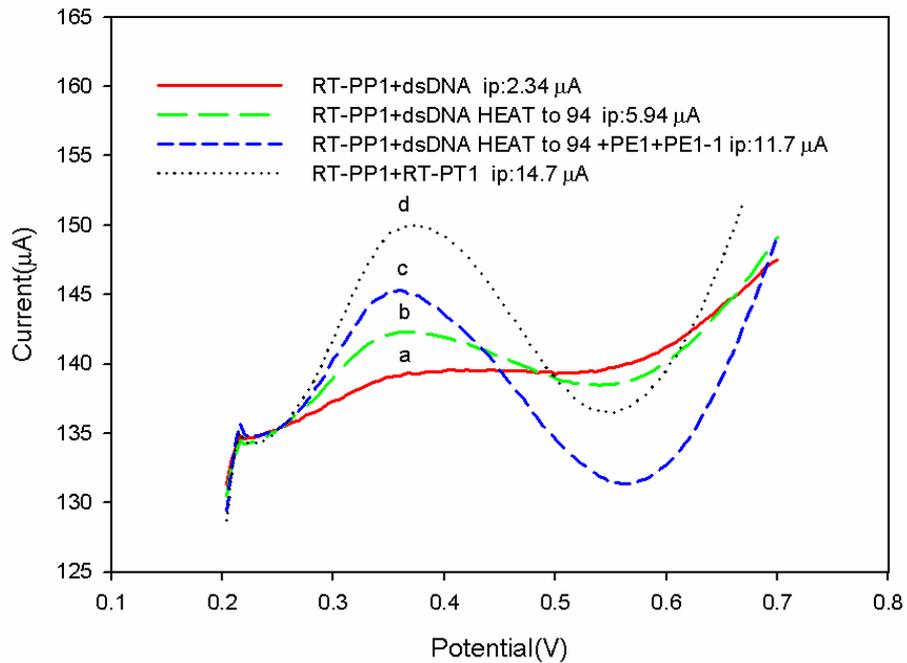
由(圖 4- 39)可看出(a.)條件所感測之波峰約為 2  $\mu\text{A}$ ，應為探針 DNA 所產生之背景訊號；(b.)條件之感測波峰約為 6  $\mu\text{A}$ ，原因為當雙股 DNA 加熱至 94°C 時氫鍵被破壞後解鏈成單股 DNA，當溫度降至雜合溫度時，部分目標 DNA 與探針雜合，部分則與 RT-PTC1 雜合，因此感測訊號較(a.)大；而(c.)之條件，因為加入與 RT-PTC1 之 3'端 (PE1)與 5'端(PE1-1)互補之干擾引子，當 RT-PTC1 被干擾引子佔據後便無法與目標 DNA 進行雜合，目標 DNA 便可以更多的量與探針 DNA 雜合，而達到提高感測訊號(11.7  $\mu\text{A}$ )的效果；(d.)之電極所得的感測

結果為 14.7  $\mu$ A。比較(c.)與(d.)之感測結果可發現，雖然加入干擾引子可有效的使解鏈後之目標 DNA 與探針 DNA 進行雜合，但相較於單純只有單股互補 DNA 存在的環境下，於雙股 DNA 中添加干擾引子之感測結果，仍無法達到與(d)實驗相似的訊號大小，造成此結果差異之因素，推測為長鏈互補 DNA 解鏈後與干擾引子雜合效率未完全，即是未完全與兩種干擾引子結合的 PE1/RT-PTC1、PE1-1/RT-PTC1 於溶液中仍與 RT-PT1 有部分區域雜合，導致可感測的目標 DNA 數量減少所致，但仍發現加入兩端干擾引子的確對於感測雙股 DNA 中的一股有相當的幫助。

綜合以上結果發現，當雙鏈 DNA(RT-PT1 + RT-PTC1)加熱至解鏈溫度(94 $^{\circ}$ C)後，RT-PT1 僅能少量的與探針 DNA 進行雜合，但當加入與 RT-PTC1 互補之干擾引子後，可大大提升 RT-PT1 與探針 DNA 雜合的量，而提高感測訊號。未來若進行檢體感測時，便可設計干擾引子，使其與目標 DNA 之完全互補 DNA 序列(此實驗為 RT-PTC1)進行雜合，提高感測之靈敏度。

表 4-3 長鏈 DNA 序列

DNA sequence	名稱
5' TGGCCACAGACTCAG GCGGGAGACGAGCGGTGTCAT GGATCCCCGTATGCTAminoC6 3'	探針 DNA(RT-PP1)
5' CGGGGATCCATGACACCGCT CGTCTCCCGCCTGAGTCGTCTG TGGGCCATCATGAGGAAGCCAC 3'	互補 DNA(RT-PT1)
5' GTGGCTTCCTCATGATGGCCC ACAGACTCAGGCGGGAGA CGAGCGGTGTCATGGATCCCCG 3'	與 RT-PT1 完全互補 DNA(RT-PTC1)
5' CGGGGATCCATGACACCG 3'	干擾引子(PE1)
5' CCATCATGAGGAAGCCAC 3'	干擾引子(PE1-1)



(圖 4- 39). 感測長鏈 DNA 之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：5'TGGCCCACAGACGACTCAGGCGGGAGACG  
AGCGGTGTCATGGATCCCCGTATGCTAminoC6 3'

目標 DNA：5' GGGGATCCATGACACCGCTCGTCTCCCGCC  
TGAGTCGTCTGTGGGCCATCATGAGGAAGCCAC 3'

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

#### 4-7 感測錯配位點不同之目標 DNA

4-4 小節中探討鹼基的錯配數量與 DPV 感測訊號之間的關係，發現以 DNM 作為雜合指示劑應用於 DNA 感測器，並無法明顯感測出多點錯配的目標 DNA 之差別。由前述之文獻中亦提及到 DNM 於 DNA 序列中傳遞電子的諸多限制，因此便於不同 DNA 位點設計單點錯配之目標 DNA 序列，來做為探討不同的錯配位點對 DPV 感測時訊號的關係，其示意圖如(圖 4-40)所示，主要想得知電極表面所獲得的訊號來源大小是否與錯配位點與電極間之 DNA 片段長度有關。其感測結果如(圖 4-41)所示，對應於錯配位點變化的訊號大小分別為，錯配位點位於第三鹼基其訊號為  $7.8 \mu\text{A}$ 、第十鹼基訊號為  $13.6 \mu\text{A}$  及第十七鹼基訊號為  $15.1 \mu\text{A}$ 。

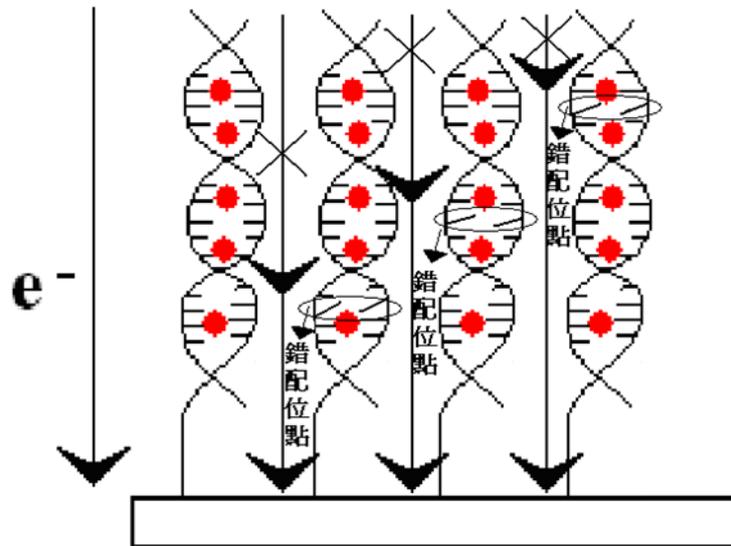
由上述結果可知，當鹼基錯配位點越接近電極表面時，所獲得的訊號越小（第三鹼基訊號為  $7.8 \mu\text{A}$ ）；反之，當鹼基錯配位點遠離電極表面時，所獲得的訊號越大（第十七鹼基訊號為  $15.1 \mu\text{A}$ ）。因此可證明以 DNM 做為雜合指示劑用來感測 DNA 錯配位點之 DNA 感測器，其訊號來源主要為錯配位點與電極表面之間的 DNA 片段所提供。於錯配位點另一端的 DNA 片段之訊號，則因 DNM 訊號的傳遞條件嚴苛而無法將訊號穿過錯配位點。

而文獻中所提到 DNA 電子訊號的大小，雖然取決於 GC 鹼基對

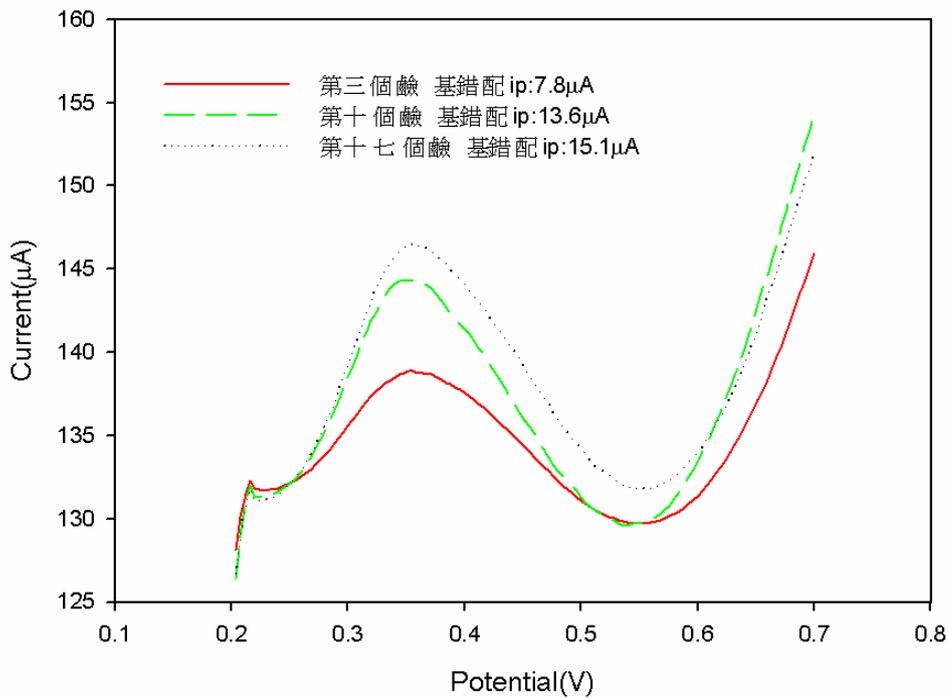
的多寡(道諾霉素嵌入位點的數量)，但電子訊號的傳遞卻同時又與 DNA 長度、G 鹼基間隔及 AT 鹼基相連的長度有很大的關係。當 GG 鹼基間隔越長、AT 序列越多，或是電子傳遞距離越遠時，都可能造成電子在傳遞過程中被溶液中之介質所捕獲，而無法獲得訊號，造成訊號的損失。綜合文獻與實驗結果可得知，電子於 DNA 序列中進行訊號的傳遞，其影響因素廣泛。因此，電子訊號的獲得有可能因上述的各項原因，使得訊號的大小與完全互補的 DNA 片段有一正相關的趨勢，但卻不一定為完全的正比關係。

表 4-4 不同錯配位點之目標 DNA 序列

DNA sequence	名稱
5' GCAATTCTCGGTGGCCGGCG3'	第三個鹼基錯配
5' GCTATTCTCGTGGCCGGCG3'	第十個鹼基錯配
5' GCTATTCTCGGTGGCCGTCG3'	第十七個鹼基錯配



(圖 4- 40). 鹼基錯配位點不同時電子傳遞示意圖(●為道諾霉素)



(圖 4- 41). 感測不同錯配位點之微分脈衝伏安圖

工作電極：dsDNA(第三個鹼基錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt，dsDNA(第十個鹼基錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt，dsDNA(第十七個鹼基錯配)/4-ABA/PEDOT/Pt

掃描 buffer：PBS buffer (pH = 7.4)

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

## 五. 實驗結論與建議

### 5-1 實驗結論

1. 由實驗結果可看出，白金電極若直接修飾 4-ABA，不適合用來固定 DNA，是因為白金電極過於平坦，不利 4-ABA 羧酸基的裸露，而在 PEDOT 上聚合 4-ABA 後，PEDOT 提供粗糙之表面，可讓羧酸基裸露出來。而另外兩種導電高分子 PPy 及 PANi，前者是與 4-ABA 之相容性不好，聚 4-ABA 膜與 PPy 膜形成的空隙，可能會導致聚 4-ABA 膜剝落。而 PANi 膜呈纖維狀，4-ABA 聚合於纖維狀孔洞中，因為 DNA 固定及雜合時需考慮到位向問題，於纖維狀孔洞中可能會發生 DNA 纏繞等問題，因此選用 PEDOT 為本研究採用之導電高分子。
2. 由於 PEDOT 存在氧化降解問題，再改變掃描電未聚合 PEDOT 時發現，PEDOT 的降解電位為 1.0V，而 4-ABA 聚合之電位同樣的也是 1.0V，為了改善膜因氧化降解產生之裂痕及剝落，使用了不同的條件聚合，或以 AA 取代 4-ABA。實驗之結果，較為可行的方法為定電壓聚合 4-ABA 後再以低電壓再次聚合，此方法修飾之電極可於感測時得到較大的感測訊號，且可避免膜的剝落。
3. 在互補目標 DNA 的感測結果可看出，以浸泡的方式固定探針 DNA，當濃度大於 0.1nM 後，訊號差異不大，判斷探針固定的量

為 0.1nM，電極表面探針的數量很微量。當給予一電場作為驅動力時，可提高感測濃度至 2nM，說明電極表面探針的數量有增加。

4. 文獻指出道諾霉素在 DNA 中傳遞電子的條件比較嚴苛，當雙股 DNA 有任何鹼基錯配產生時，便無法傳遞電子訊號。其他影響電子在 DNA 傳遞的條件尚有自然生物反應（如氧化損傷）及去嘌呤都會影響到電子的傳遞效果。在改變鹼基錯配數量的實驗中，可發現電子訊號來源主要由鄰近電極表面的第一個鹼基錯配位置點與電極表面之間的 DNA 片段（G 鹼基）所提供，亦即錯配位置點以上之 DNA 片段訊號無法傳遞至電極表面。因此當進行多點錯配偵測時，所獲得的訊號並不會因錯配點的增多而有明顯下降，主要還是與鄰近電極表面的第一個錯配點與電極表面之間的 DNA 片段有關。因此利用 DNMT 作為訊號放大試劑無法用來檢測 DNA 多點錯配，也可由此結果來解釋插入及移除鹼基之實驗結果。

5. 在做 PCR 產物的感測時，因為 PCR 產物為雙鏈 DNA，要與探針 DNA 做雜合須先加熱至解鏈的溫度(94°C)，當解鏈後，目標 DNA 除了與探針做雜合外也會與解鏈後互補 DNA 雜合，因此在解鏈時加入兩段干擾引子，使解鏈後之 DNA 與干擾引子做雜合，增加目標 DNA 與探針 DNA 雜合的量，藉此提高電子訊號。

## 5-2 未來實驗建議

1. 因為 4-ABA 之聚合電位會產生 PEDOT 的氧化降解，雖嘗試多種方法，但仍有瑕疵，而且從聚 4-ABA 之結構圖來看，可看出聚 4-ABA 分子鏈上的羧酸基團位向並不固定，可推測裸露於電極表面的羧酸基團也因此減少，文獻也指出，若以含羧酸基之長碳鏈分子修飾於電極表面，有利於探針 DNA 之固定。實驗中所用之 AA，聚合電位低於氧化降解電位，或許可朝共聚之條件做改進，或以交聯劑交聯，使其不溶於溶液中，以此取代 4-ABA。
2. 除了本研究所使用的電極系統外，文獻中亦有使用黃金電極為工作電極。由於黃金電極具有表面平整性佳，能與修飾硫醇基之 DNA 進行金硫鍵鍵結以及工作電極面積固定等優點。因此，相較於本研究之製程所遇到的問題，即工作電極面積無法固定、修飾基團（羧酸基）位向不明，以及導電高分子膜 PEDOT 因後修飾過程的聚合電位過高，導致膜的氧化降解而產生的剝落現象等，可發現若將本研究之工作電極系統汰換成黃金電極，除了使工作電極面積固定能提高結果的再現性外，還可簡化整體製程。
3. 從文獻及實驗結果得知，以道諾霉素作為指示劑僅可感測單點錯配，對於多點錯配的目標 DNA 並無法有效進行感測，因此可尋找適當的雜合指示劑，對於多點錯配的目標 DNA 亦能有效感測。

4. 目前對於電極表面固定之探針 DNA 的量並無進行探討，且無找到相關文獻提供測量探針 DNA 之方法，較難確定電極表面的探針數量，或許可嘗試以放射線標定的方法來進行測量。
5. 4-ABA 為提供固定探針之羧酸基團的分子，但聚合於 Pt 電極上時感測互補 DNA 卻無法得到感測訊號，但於粗糙之 PEDOT 表面聚合 4-ABA 卻可得到  $6.33 \mu\text{A}$  感測訊號，因此推測是因為粗糙度不同造成羧酸基團裸露程度不同，而影響探針的固定，但是否為粗糙度所造成之影響，或許可從 AFM 來觀察表面粗糙度，再與探針大小(長約 8.6 nm 直徑約 1.1 nm)做比較，來證實感測結果差異是否為表面粗糙度所引起的。

## 6. 第六章 參考文獻

1. 謝振傑, 光纖生物感測器. 物理雙月刊 28 卷 4 期, 2006.
2. Barisci, J.N., G.G. Wallace, and R.H. Baughman, *Electrochemical quartz crystal microbalance studies of single-wall carbon nanotubes in aqueous and non-aqueous solutions*. *Electrochimica Acta*, 2000. **46**(4): p. 509-517.
3. Suematsu, S., Oura, Yasushi, Tsujimoto, Hisashi, Kanno, Hiroshi, Naoi, Katsuhiko, *Conducting polymer films of cross-linked structure and their QCM analysis*. *Electrochimica Acta*, 2000. **45**(22-23): p. 3813-3821.
4. Zhang, J., Bao, Lili, Yao, Shouzhuo, Wei, Wanzhi, *A Series Piezoelectric Quartz Crystal Microbial Sensing Technique Used for Biochemical Oxygen Demand Assay in Environmental Monitoring*. *Microchemical Journal*, 1999. **62**(3): p. 405-412.
5. Cosnier, S., *Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999. **14**(5): p. 443-456.
6. Merkoçi, A., E. Fàbregas, and S. Alegret, *Consolidated biocomposite membrane technology for production of potentiometric biosensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999. **60**(2-3): p. 97-105.
7. Markgren, P.-O., M. Hämäläinen, and U.H. Danielson, *Kinetic Analysis of the Interaction between HIV-1 Protease and Inhibitors Using Optical Biosensor Technology*. *Analytical Biochemistry*, 2000. **279**(1): p. 71-78.
8. Tempelman, L.A., King, Keeley D., Anderson, George P., Ligler, Frances S., *Quantitating Staphylococcal Enterotoxin B in Diverse Media Using a Portable Fiber-Optic Biosensor*. *Analytical Biochemistry*, 1996. **233**(1): p. 50-57.
9. 蘇政峰、顧野松, *DNA 電化學生物感測器製程探討及其於 PCR 分析之應用*. 2010, 東海大學.
10. 陳建中, 顧野松, *以導電性聚苯胺建構過氧化氫生物感測器之技術及其性質探討*. 2009, 東海大學.
11. Pang, D.-W., Zhang, Min, Wang, Zong-Li, Qi, Yi-Peng, Cheng, Jie-Ke, Liu, Zi-Ye, *Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. **403**(1-2): p. 183-188.

12. Wang, J., Palecek, Emil, Nielsen, Peter E., Rivas, Gustavo, Cai, Xiaohua, Shiraishi, Haruki, Dontha, Narasaiah, Luo, Denbai, Farias, Percio A. M., *Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(33): p. 7667-7670.
13. Hashimoto, K., K. Ito, and Y. Ishimori, *Novel DNA sensor for electrochemical gene detection*. Analytica Chimica Acta, 1994. **286**(2): p. 219-224.
14. Teh, H.F., Gong, Haiqing, Dong, Xian-Dui, Zeng, Xianting, Lai Kuan Tan, Annie, Yang, Xinhao, Tan, Swee Ngim, *Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface*. Analytica Chimica Acta, 2005. **551**(1-2): p. 23-29.
15. Cosnier, S., Galland, Bruno, Gondran, Chantal, Le Pellec, Arielle, *Electrogeneration of Biotinylated Functionalized Polypyrroles for the Simple Immobilization of Enzymes*. Electroanalysis, 1998. **10**(12): p. 808-813.
16. Chiang, C.K., Fincher, C. R., Park, Y. W., Heeger, A. J., Shirakawa, H., Louis, E. J., Gau, S. C., MacDiarmid, Alan G., *Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene*. Physical Review Letters, 1977. **39**(17): p. 1098.
17. Rahman, M., et al., *Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers*. Sensors, 2008. **8**(1): p. 118-141.
18. Groenendaal, L., Zotti, G., Aubert, P. H., Waybright, S. M., Reynolds, J. R., *Electrochemistry of Poly(3,4-alkylenedioxythiophene) Derivatives*. Advanced Materials, 2003. **15**(11): p. 855-879.
19. Bendikov, T.A. and T.C. Harmon, *Long-lived solid state perchlorate ion selective sensor based on doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) films*. Analytica Chimica Acta, 2005. **551**(1-2): p. 30-36.
20. Rahman, M., Kumar, Pankaj, Park, Deog-Su, Shim, Yoon-Bo, *Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers*. Sensors, 2008. **8**(1): p. 118-141.
21. Benyoucef, A., Huerta, F., Vázquez, J. L., Morallon, E., *Synthesis and in situ FTIRS characterization of conducting polymers obtained from aminobenzoic acid isomers at platinum electrodes*. European Polymer Journal, 2005. **41**(4): p. 843-852.

22. Eley, D.D. and D.I. Spivey, *Semiconductivity of organic substances. Part 9.-Nucleic acid in the dry state*. Transactions of the Faraday Society, 1962. **58**: p. 411-415.
23. Becker M.W., K.J.a.H.J., *he World of The Cell 4th edition*. 2000.
24. 蔣曉華、劉偉強、陳建軍、林祥欽, *DNA 內電子傳遞特性的研究現況*. 化學進展, 2007.
25. 魏伸紘, *以電化學法檢測人類乳突病毒序列之研究*. 2005, 交通大學.
26. Treadway, C.R., M.G. Hill, and J.K. Barton, *Charge transport through a molecular [pi]-stack: double helical DNA*. Chemical Physics, 2002. **281**(2-3): p. 409-428.
27. 汪慶祥、袁顯龍、焦奎、謝江坤、張波, *非標記電化學 DNA 雜交指示劑*. 化學進展, 2007.
28. Sun, X., He, Pingang, Liu, Shenghui, Ye, Jiannong, Fang, Yuzhi, *Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications*. Talanta, 1998. **47**(2): p. 487-495.
29. Hashimoto, K., K. Ito, and Y. Ishimori, *Sequence-Specific Gene Detection with a Gold Electrode Modified with DNA Probes and an Electrochemically Active Dye*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(21): p. 3830-3833.
30. 賴孟村、顧野松, *DNA 生物感測器製備及其於 DNA 分析之應用*. 2007, 東海大學.
31. Temenoff J.S., M.A.G., *The Intersection of Biology and Materials Science*. 2009.
32. Wong, E.L.S. and J.J. Gooding, *Charge Transfer through DNA: A Selective Electrochemical DNA Biosensor*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(7): p. 2138-2144.