

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 PEDOT 修飾之 DNA 生物感測器製備方法及其性質測試

**Investigation the preparation of PEDOT modified biosensor
and its characterization**

研究生：李彥哲 撰

中華民國一百零三年一月

摘要

近年來，生物感測器以專一性高、靈敏度高等優點被廣泛的研究，其中許多研究致力於電化學生物感測器的應用，而本研究主要是探討以電化學聚合將高分子聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)聚合於白金絲，文章中探討以此做為電極製備條件進行不同方式的修飾使其能達最後感測 DNA 的目的。

首先探討對氨基苯甲酸(4-ABA)製程之電極，即將 PEDOT/Pt 電極聚合對氨基苯甲酸使 PEDOT 表面提供羧酸根，經由交聯劑 NHS、EDC 的作用使探針 DNA 能接合，再與互補之目標 DNA 相互雜交，最後加入電化學指示劑道諾霉素(DNM)，以電化學分析儀感測，聚合 4-ABA 影響了導電性，另外也確立了掃描電壓 0.4 V 時的感測目標 DNA 訊號。測試不同的 PEDOT 聚合圈數後對 PEDOT 膜的影響，實驗結果為掃描 10 圈後再聚合 4-ABA，表面無裂縫，進行接合探針及目標 DNA 後感測具波峰。另外研究中也致力於以不同製備方法之電極達到感測目標 DNA 的目的，研究中測試以牛血清蛋白(BSA)取代 4-ABA，藉由 BSA 嵌入於 PEDOT 表面上，再以交聯劑與探針 DNA 接合，達成最後接合目標 DNA 的目的，實驗結果以 BSA 加入濃度 1 mg/mL，交聯劑選擇戊二醛為實驗條件選擇，經由優化後將 BSA 前處理進行加熱及對於交聯時間拉長至 12 小時增加

感測訊號，另外也實驗將交聯劑改為甲烯藍，BSA 製程之電極改為此指示劑後有較明顯之訊號，同時也將 4-ABA 製程之電極浸泡 MB 後進行訊號的確認及比較，文章中測試了許多不同的實驗條件來建構 BSA 製備電極的製程並探討是否亦能達到感測目的。

關鍵字:電化學生物感測器、聚二氧乙烯噻吩、道諾霉素、甲烯藍、牛血清蛋白、雜交。



Abstract

Recently, biosensor has been widely studied with its high specificity and sensitivity. Many of these studies employ the electrochemical approach to construct biosensors. The major purpose of this study is to synthesize poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) biosensor, where the constructive polymer PEDOT is electrochemically polymerized on a platinum wire. Therefore, we have investigated preparation condition by carrying out different modification methods in order to reach the goal of DNA sensing.

First of all, we have discussed the modification of PEDOT/Pt electrode by 4-aminobenzoic acid (4-ABA) which could provide carboxylic acid on PEDOT's surface. Then, we used NHS and EDC surfactants to attach the probe DNA, to achieve the hybridization with a target DNA. Finally, we immersed the electrode in a daunomycin (DNM) solution to let the electrochemical active DNM interact into the double strand DNA, and detect DNA by differential pulse voltammetry (DPV) with an electrochemical analyzer. Meanwhile, we have explored different PEDOT polymerization focusing on the impacts of the polymerization of 4-ABA on

the PEDOT film

On the other hand, this study has also devoted in preparing electrodes by different preparation methods in order to improve the sensing of a target DNA. Therefore, we applied Bovine serum albumin (BSA), replacing to achieve modification process. We expected that could be embedded on the surface of PEDOT, and assist the attachment of the probe DNA, and finally improve binding of the target DNA. In conclusion, an electrode fabrication process has been investigated by many different experimental conditions, and we have discussed whether the processes can improve the sensing of DNA.

key words: electrochemical biosensor · PEDOT · daunomycin · methylene Blue · BSA · hybridization ·

致謝

從大學時就在東海就讀，加上研究所總共六年半的歲月，一開始對於研究所非常的陌生，進來研究室時沒有碩二的學長姊，好多實驗的東西都得自己不斷地摸索，很多問題都得自己想辦法解決，謝謝指導教授顧野松老師的細心指導及實驗方向的協助，也謝謝孟村學長、森迪學長、建中學長，雖然你們都畢業了但還是對於學弟我的問題都有問必答給予協助，對於我的實驗有很大的助益，謝謝東海化材 104 實驗室所有的夥伴時常的聚會與嬉鬧使研究生活更為多采多姿，謝謝小郭、王靜，也謝謝許多大學同學的閒聊與鼓勵，撰寫論文的這期間遇到了很多的人事物，也對於自己心境的成長上了一課，不能時常讓感性充斥著自己的心靈，該做的還是要做，謝謝在這麼重要的時刻，發生如此重要的事情，讓我在出社會前能先稍加的體會壓力，提醒自己還有很多層面需要加強，謝謝家人的陪伴與鼓勵，沒有你們的支持，無法撰寫出論文，寫論文的過程中學到了很多，平常的整理及準備，才不會有書到用時方恨少的情況發生，希望自己能記住寫論文時所遭遇到的點點滴滴，也希望自己把這些經歷好好的存留在心中，不管是教訓或是收穫都能提昇自己，期許自己在往後的道路能體會更多的事物，謝謝一路上曾經幫助我或是傷害我的人，你們讓我成長很多。

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
致謝.....	V
圖目錄.....	X
表目錄.....	XIII
第一章 緒論	1
1-1 生物感測器簡介.....	1
1-2 電化學 DNA 生物感測器簡介.....	3
1-3 聚二氧乙烯噻吩簡介.....	5
1-4 對氨基苯甲酸(4-ABA)簡介.....	7
1-5 電化學雜合指示劑簡介.....	9
1-6 BSA 簡介.....	11
1-7 循環伏安法及微分脈衝伏安法.....	12
1-8 研究動機.....	14
第二章 實驗儀器與藥品	15
2-1 實驗儀器.....	15
2-2 實驗藥品.....	17

2-3 DNA 引子.....	19
第三章 實驗步驟.....	20
3-1 參考電極之製備.....	20
3-2 白金絲之前處理.....	21
3-3 PEDOT/Pt 電極之製備.....	21
3-4 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之製備.....	22
3-4-1 4-ABA 製程電極固定探針 DNA 與感測完全互補 DNA.....	23
3-4-2 4-ABA 製程電極導電性差異.....	24
3-4-3 確認 DNM 感測訊號.....	24
3-4-4 改變 PEDOT/Pt 電極聚合圈數對膜之影響.....	25
3-5 BSA/PEDOT/Pt 電極之製備.....	25
3-5-1 BSA 製程電極固定探針 DNA 與感測完全互補 DNA.....	26
3-5-2 不同交聯劑對 BSA 製程之電極影響.....	27
3-5-3 BSA 製程之交聯步驟改變.....	28
3-5-4 更改指示劑為甲烯藍(MB).....	29
第四章實驗結果與討論.....	31
4-1 4-ABA 製程之電極.....	31
4-1-1 探討 4-ABA 修飾電極導電性差異.....	32

4-1-2	4-ABA 製程之電極感測目標 DNA	34
4-1-3	確認 DNM 訊號	37
4-2	PEDOT 膜之探討	42
4-2-1	4-ABA 製程之電極裂縫問題	42
4-2-2	掃描圈數對電極表面的影響	48
4-2-3	PEDOT 聚合圈數對聚合 4-ABA 之影響	55
4-2-4	改變 PEDOT/Pt 電極聚合掃描圈後之感測結果比較.....	62
4-3	以 BSA 取代 4-ABA 提供縮酸基.....	64
4-3-1	探討 BSA 加入濃度	64
4-3-2	交聯劑之選擇	72
4-4	優化製程	79
4-4-1	BSA 前處理溫度	79
4-4-2	改變交聯步驟	84
4-4-3	優化製程整理	88
4-5	電化學指示劑選擇	89
4-5-1	指示劑改為 MB 後 BSA 製程之電極感測.....	90
4-5-2	BSA 對感測之影響	92
4-5-3	4-ABA 製程之電極改變指示劑感測	96
4-6	4-ABA 製程之電極與 BSA 製程之電極比較	99

第五章 實驗結論與建議	100
5-1 實驗結論	100
5-2 建議	103
第六章 參考文獻	104



圖目錄

第一章

圖 1- 1 生物感測器基本流程.....	2
圖 1- 2 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)結構圖	5
圖 1- 3 對氨基苯甲酸之結構圖	7
圖 1-4 聚對氨基苯甲酸結構圖.....	8
圖 1- 5 道諾霉素(DAUNOMYCIN, DNM)結構圖	10
圖 1- 6 甲烯藍(METHYLENE BLUE, MB)結構圖.....	10
圖 1- 7 循環伏安掃描圖	13
圖 1- 8 微分脈衝伏安掃描圖	13

第三章

圖 3- 1 參考電極組裝結構圖	20
圖 3- 2 電化學分析儀器裝置圖	22

第四章

圖 4- 1 聚合 4-ABA 之赤血鹽感測比較圖	33
圖 4- 2 4-ABA 製備之電極過程圖	34
圖 4- 3 4-ABA 製程之電極感測圖	35
圖 4- 4 聚合 PEDOT 電極感測圖.....	38
圖 4- 5 接合目標 DNA 感測圖.....	39

圖 4- 6	4-ABA 製程各步驟之電極感測比較圖.....	40
圖 4- 7	PEDOT/Pt 電極表面型態	44
圖 4- 8	PEDOT/Pt 電極表面型態	45
圖 4- 9	4ABA/PEDOT/Pt 整體結構	46
圖 4- 10	4ABA/PEDOT/Pt 裂縫	47
圖 4- 11	PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 20 圈).....	49
圖 4- 12	PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 20 圈).....	50
圖 4- 13	PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 10 圈).....	51
圖 4- 14	PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 10 圈).....	52
圖 4- 15	PEDOT/Pt 電極聚合 20 圈後聚合 4-ABA 結構圖.....	56
圖 4- 16	PEDOT/Pt 電極聚合 20 圈後聚合 4-ABA 結構圖.....	57
圖 4- 17	PEDOT/Pt 電極聚合 10 圈後聚合 4-ABA 結構圖.....	58
圖 4- 18	PEDOT/Pt 電極聚合 10 圈後聚合 4-ABA 之 SEM 圖.....	59
圖 4- 19	PEDOT/Pt 聚合圈數 10 圈之感測圖.....	62
圖 4- 20	不同濃度之 BSA/PEDOT/Pt CV 感測赤血鹽比較.....	65
圖 4- 21	BSA 加入量 5MG/ML 感測圖.....	67
圖 4- 22	BSA 加入量 2.5MG/ ML 感測圖	68
圖 4- 23	BSA 加入量 1MG/ML 感測圖	69
圖 4- 24	BSA 加入量 0.1MG/ML 感測圖.....	70

圖 4- 25 交聯劑為 EDC 及 NHS 感測效果	73
圖 4- 26 交聯劑為甲醛感測結果	75
圖 4- 27 交聯劑為戊二醛感測結果	77
圖 4- 28 BSA 前處理溫度 100°C	81
圖 4- 29 改變不同 BSA 加熱溫度感測比較圖	82
圖 4- 30 改變交聯步驟及時間感測比較圖	86
圖 4- 31 電極無盡泡 MB 之感測圖	90
圖 4- 32 交聯劑為 MB 之感測圖	91
圖 4- 33 無加入 BSA 之電極感測結果	93
圖 4- 34 不同 MB 濃度之無加入 BSA 之電極感測結果	94
圖 4- 35 4-ABA 電極浸泡 MB 感測結果	97

表目錄

第二章

表 2- 1 本論文使用儀器一覽表 15

表 2- 2 本論文所使用藥品一覽表 17

表 2- 3 本論文使用引子一覽表 19

第四章

表 4- 1 不同 PEDOT 聚合圈數製備之電極感測 DNA..... 63

表 4- 2 BSA 加入濃度之感測數據比較 71

表 4- 3 交聯劑為甲醛之感測結果 76

表 4- 4 電極浸泡不同交聯劑感測比較 78

表 4- 5 不同 BSA 前處理加熱溫度感測影響 83

表 4- 6 改變交聯步驟及時間感測數值比較 87

表 4- 7 交聯劑為 MB 不同製程電極感測比較 99

第一章 緒論

1-1 生物感測器簡介

生物感測器即是利用生物元件裝置於感測系統中，最後達到輸出訊號和分析目的，其設計的理念是希望能達到快速、穩定、操作便利、低成本且具高專一、高靈敏度、高選擇性等特性廣泛應用於基因感測、環境檢驗、食品工業、藥品開發等。(Myszka, 1999)

自從人類開始了基因解讀計畫後，解開基因密碼至今數年的時間，許多研究不斷地致力於尋找不同的技術來檢測生物分子，而研究也演進擴張至醫療保健體系，至今導向個人醫學的發展，演發出的生物晶片配合基因醫學成了一個相當方便的工具。(Barton, 2003)其依功能可分為生物感測器及微處理晶片兩種，感測晶片因其有固定DNA、蛋白質等不同的物質，稱之為探針，不同的探針具有不同的功能，也可發展成微陣列晶片，同時處理多點檢測。微處理晶片則是增強處理待測物的程序及最後分析程序，其應用的技術如毛細管電泳技術和實驗室多功能處理晶片(lab-on-a-chip)等。(林明瑜, 2008)

生物感測器大致可分為幾個重要部份：轉換器及訊號輸出，轉換器是將固定化生物分子和待測物產生反應後將其轉變成如光、電等訊號，然而固定化跟待測物間需具有鍵結的高專一性。

生物感測器的種類可依固定化分子和待測物間的結合方式及訊號

轉換的方式來區分，由固定化元件和待測物間的原理機制主要可分為：
生物親和性感測器 (Bioaffinity biosensor)、生物催化感測器 (Biocatalytic biosensor)、生物膜感測器 (Biomembrane biosensor)、細胞感測器 (Cell biosensor)，而若是以轉換的訊號機制來區分可分為三種類型：電化學生物感測器 (Electrochemical biosensor)、壓電晶體生物感測器 (Piezoelectric quartz crystal biosensor)、光化學生物感測器 (Optic biosensor)，現階段商業化普遍應用的生物感測器主要應用於農業、食品、醫學等，相關產品眾多但突破性的技術卻相當缺乏，故也很多相關研究致力於加速檢測病毒、增加檢測範圍及利用半導體使感測器具更高的靈敏度、微型化、免標定等相關的技術應運而生，日新月異的技術不斷地希望能將生物感測器的效能發揮至最高，未來跟電子技術的結合、個人醫學的相關開發等都將使生物感測器的應用更為廣泛及穩定。(賴麗珍, 2009)



圖 1-1 生物感測器基本流程

1-2 電化學 DNA 生物感測器簡介

此類型的感測器最早的發展由 Clark 及 Lyons 開發出的酵素生物電極感測器為起源(謝振傑, 2006)，其法為將特殊的材料固定化於電極上，利用電極與待測物之間的特殊反應物產生之電化學反應，藉由葡萄糖氧化酵素本身的特異選擇性，與電極結合，檢測該酵素的受質。電化學感測器結合了生物或化學感測特異性及在電化學感測器的優點，如靈敏性等。電化學感測器能將生物或化學檢測的程序轉變成為電子訊號，因此可得到產生的電子訊號強度與分析物濃度間的關係

電化學 DNA 生物感測器為一種基因感測技術，提供了高靈敏度、體積小、低價等優點，其原理是利用一電極上固定特定 DNA 片段(單股 DNA)稱之為探針 DNA(probe)和其互補之 DNA 進行雜交，由於會有高度的選擇性與互補之 DNA 相接成 DNA 修飾電極，並再利用具電化學性質之雜合指示劑如道諾霉素、亞甲基藍等來識別，使最後能達到定性定量的檢測。而藉由這樣的機制發展成 DNA 生物感測器及 DNA 芯片，檢測在許多領域的應用如基因診斷、基因分析、快速診斷及醫療應用。

目前常用的基因檢測方法有光譜法、聚合酶連鎖反應(PCR)法、同位素標記法及電化學法等，電化學提供了快速、靈敏、低成本，活體檢測應用等方面的優勢，因此電化學領域不斷地被廣泛的研究。DNA 雜交的檢測常使用螢光分析、表面等離子共振(SPR)、Raman 分析等。

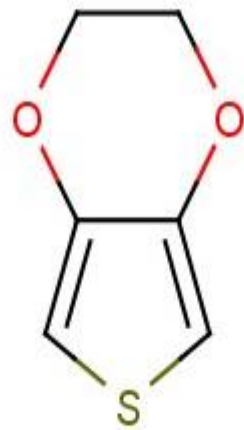
(Sassolas, 2008)

DNA 固定化為感測器中一重要之步驟常見的方法有三種：吸附法 (Byfield, 1994)、共價鍵接合法 (Covalent Immobilization)、生物素相互作用 (Avidin (or Streptavidin) Biotin Interactions)，而本研究使用的方式為共價鍵接合，透過交聯劑使基團以共價鍵的形式連接 DNA (Wong, 2005)，接合後達到電子傳遞目的。不同的固定化各有其優缺點，共價鍵接合經常被使用，因為共價間接合穩定性高但其有費時及需一些表面處理的問題，故許多的研究常對於共價鍵的連接有很多的討論與探討，也是許多研究中需要克服的問題。

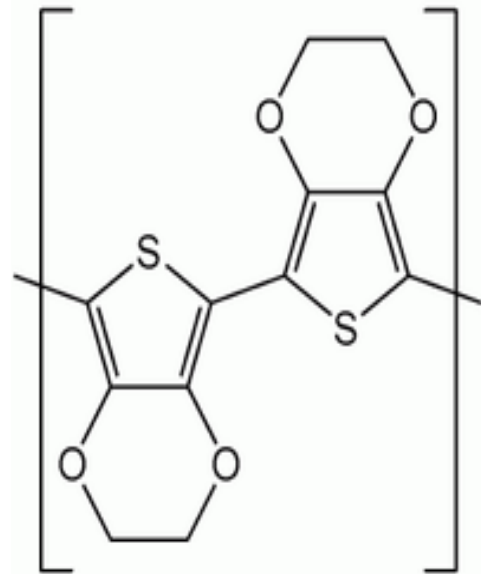
(Mascini, 2000), (Rui, 2010)

1-3 聚二氧乙烯噻吩簡介

聚二氧乙烯噻吩為一種導電性高分子，由二氧乙烯噻吩(EDOT)聚合而成，於 1991 年由德國 Bayer 公司所合成，具導電性高、高可見光透射率等優點，其膜可加熱至 100°C 一千個小時，對其導電度不會有影響，可知其具有高的膜穩定性，也由於 PEDOT 於較低電壓狀態下為導體，但當電壓提升到一定高的狀況下就能有類似半導體的電子性質使其於電子產業的應用更廣泛 (Groenendaal, 2000)。目前 PEDOT 應用於太陽能電池、防靜電塗層、電化學容器等。(Groenendaal, 2003)



EDOT



PEDOT

圖 1-2 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)結構圖

聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)由二氧乙烯噻吩(EDOT)聚合而成，常見的方法有電化學聚合、利用過度金屬偶聯、化學聚合，產生暗色的、不可溶的聚合物，本實驗使用電化學聚合。

導電聚合物可分為兩種：外部聚合及本體聚合，外部聚合物包含共混物導電和非導電性聚合物及懸浮於聚合物質中的金屬顆粒，其基礎是藉由添加高導電性的添加物於聚合物中，而本體聚合則是導電材料上藉由交替的碳鍵網路形成共軛 π 鍵，本實驗之 PEDOT 由 Bayer 發現以本體聚合而成。

另外 PEDOT 於工業上的應用亦有與 PSS 之間的作用而運用於光電產業，PEDOT 和 PSS 間存在氧化還原反應處於還原態的 PEDOT 具備半導體的特性，也由於具備色彩變化的特性，使 PEDOT 除作為透明導電層外，亦可應用於製作電致色變顯示器。PEDOT:PSS 也常常被運用在有機太陽能元件及有機發光二極體的緩衝層，被製作在 ITO 電極和半導體材料之間。另外，以膠體懸浮液的形態將 PEDOT:PSS 配製成水溶液後，可應用塗布或印刷等溶液式製程製作元件，為發展非真空製程的重要材料。除此之外，PEDOT:PSS 的穩定性和電催化活性(Electronically Catalytic Activity)使其有機會取代昂貴的鉑(Pt)，並被使用在太陽能電池中作為正極材料。(Jönssona, , 2003), (Henry, 2005)

1-4 對氨基苯甲酸(4-ABA)簡介

對氨基苯甲酸縮寫為 4-ABA 或稱 PABA，通常為棕黃色晶體，純品為無色針狀晶體，於空氣中易氧化變為黃色，亦溶於沸水、醇、冰醋酸等溶劑。此外對氨基苯甲酸是許多細菌製造葉酸的必須成份，因對紫外光具有好的吸收能力，廣泛運用於防曬乳等。其結構為苯環上接一氨基(-NH₂)及一羧酸基(-COOH)，圖 1-3 為其結構圖。

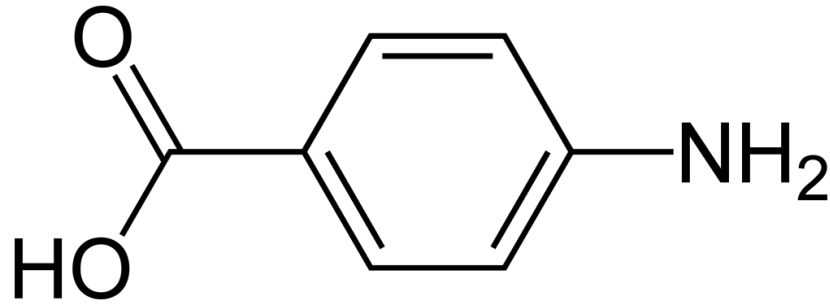


圖 1-3 對氨基苯甲酸之結構圖

目前對氨基苯甲酸合成方法主要有兩種：(1)工業上大多使用的是以對硝基苯甲酸為原料，先酯化再還原所得(2)以對甲基苯胺為原料，經乙酰化、氧化和水解所製。

對氨基苯甲酸它也是細胞生長和分裂所必需的物質的葉酸的組成部分之一，在酵母、肝臟、麩皮、麥芽中含量甚高。對氨基苯甲酸也可以幫助維他命 B5 的利用而消除憂鬱緊張等，並幫助紅血球的製造和蛋白質的代謝等。

細胞質中，對氨基苯甲酸在葡糖醛酸基轉移酶的催化下可逆轉化

為葡糖醛酸酯，因此植物中全部或大部分對氨基苯甲酸都發生了酯化，這可能是植物對對氨基苯甲酸的一種貯存和運輸形式。

本實驗是使用電化學聚合 4-ABA 於 PEDOT 表面，希望藉由聚合 4-ABA 能提供許多羧酸根基團來提供共價鍵的鍵結(Benyoucef, 2005)，以羧酸基共價鍵結合有兩個優點：(1)羧酸基在弱鹼或中性溶液中，將會解離成(-COOH)而使電極帶負電，而 DNA 的磷酸骨架也是帶負電，故在後來進行 DNA 的固定化的步驟時，可以避免電極表面跟 DNA 之間的特異性吸附。(2)可藉由使用交聯劑使羧酸基和末端修飾氨基的 DNA 以醯胺鍵來鍵結。

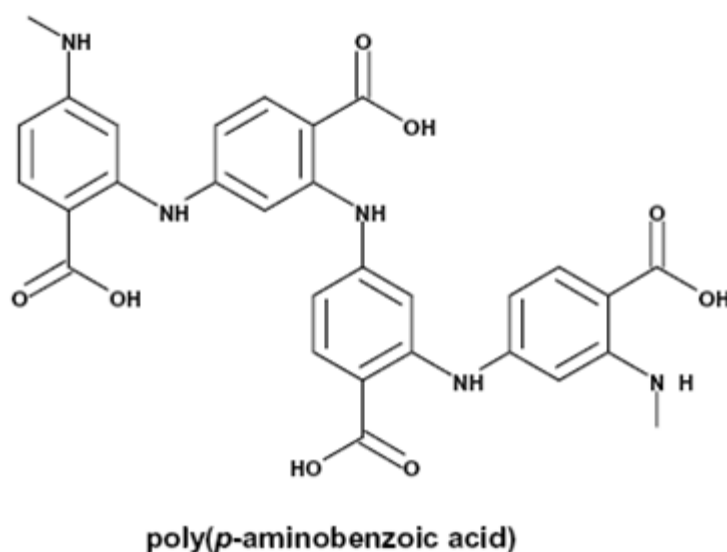


圖 1-4 聚對氨基苯甲酸結構圖

1-5 電化學雜合指示劑簡介

電化學雜合指示劑是 DNA 感測器中很重要的一個元件，其能以嵌入等方式，將雜交後之 DNA 提供更顯劇的電化學訊號的功用，而尋找適當的指示劑不僅能簡化檢測步驟，也可提高感測器的選擇性及零敏度。(汪庆祥, 2007)

一般電化學指示劑能分為兩種：內源型及外源型，內源型指示劑是 DNA 分子可被還原鹼基，外源型則可區分為標記型和非標記型，標記型主要是透過吸附、化學修飾等方法固定在基因片段，非標記型則是能和單股或雙股 DNA 作用成電化學活性化合物能與 DNA 結合進行氧化還原性質化合物。(Thomas, 2003)

本實驗中所使用之指示劑為道諾霉素(daunomycin, DNM)、甲烯藍(Methylene Blue, MB)，道諾霉素為一種蔥環類藥物，其為生物發酵所製，目前應用於抗癌症、抑制腫瘤細胞的 DNA 的轉錄和複製達到抗癌的效果，但也因為一些器官有毒性限制了其發展與臨床應用，故也有研究其在體內的代謝過程和抗癌機制以解決問題。(屈海云, 2001)

而甲烯藍(Methylene Blue, MB)常用於氧化還原反應滴定的指示劑，屬於有機染劑，常用作為細菌染色之用，因細菌常為無色，故檢驗時不易與水分辨，當甲基藍染色後易與周圍環境分別而利於檢視，也有許多研究指出 MB 會跟 DNA 相互作用，應用於電化學及光譜研究。

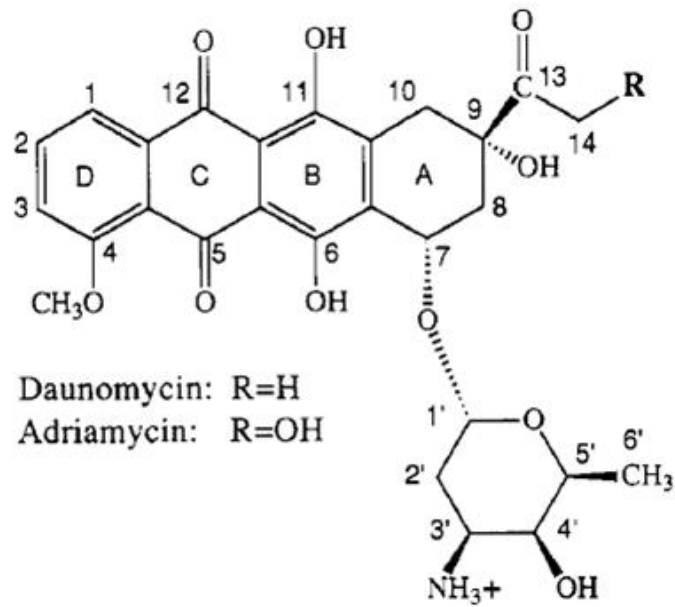


圖 1-5 道諾霉素 (daunomycin, DNM) 結構圖

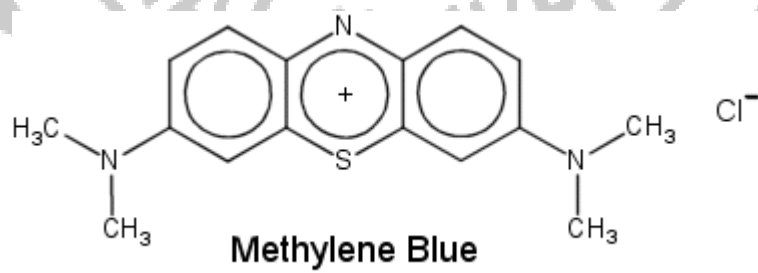


圖 1-6 甲烯藍 (Methylene Blue, MB) 結構圖

1-6 BSA 簡介

牛血清蛋白，為牛血清中的蛋白，是血液的主要成分，血液中的白蛋白主要是維持血液的滲透壓、pH 緩衝作用及營養作用。

BSA 常作為穩定劑，因有些酶在低濃度下很容易不穩定或是活性低，故牛血清蛋白常應用於限制酶或是修飾酶的保存溶液或是反應液中，由於加入 BSA 後會使其活性大幅的提高。能減輕酶變性例如加熱等變性作用。另外其對於剪切酶可以接得更完全，並可重複切割，BSA 亦可結合緩衝溶液抑制內切酶活性的金屬離子和其他化學物質。

而於本實驗中利用 BSA 作為蛋白質的提供源，利用加熱的方式使其解鏈並將其置於聚合 PEDOT 的溶液中使其聚合時能嵌入 PEDOT 表面，提供接合探針 DNA 所需的基團。(Kumar, 2011)。另外 BSA 也有在生物感測器的相關應用。(Soldatkina, 2002), (Ahujaa, 2008)。

1-7 循環伏安法及微分脈衝伏安法

循環伏安法 (cyclic voltammetry, CV) 是改變電位以得到氧化還原電流方向之方法。主要是以施加一個循環電位的方式來進行，設定起始電位以固定速率施加到一所設定的終點電位，再以相同速率改變回到起始電位，此為一個循環，若待測物有氧化還原產生則可繪製出一張氧化還原反應圖，此圖為一電流對電位的關係圖，可經由所得之 CV 圖得到分析物的氧化還原峰，當從低電位往高電位掃瞄時，會使分析物產生氧化電流的氧化峰，反者稱之為還原峰，此 CV 圖可幫助我們判斷在何種電位時會發生氧化還原應、電池的循環效益 (可逆性)、活性物質結構的改變、亦可測量電化學反應發生時的擴散係數與電子轉移數等。圖 1-7 為常見的 CV 圖及由 CV 圖中可得的數值。

而微分脈衝伏安法 (Differential-Pulse Voltammetry, DPV) 所使用的原理，即其電位波形是在一個隨時間做線性改變的直流電位上，加上一個週期然後固定振幅的脈波，當此脈波一開始加於電極時，充電電流與待測物產生的法拉第電流會同時產生，而法拉第電流的消退速度相對於充電電流較為緩慢，故於此時所紀錄的電流值可去除大部分的充電電流，亦即達到了降低背景電流的目的，故常用於感測，故於很多高靈敏度的感測中常使用微分脈衝伏安法感測。圖 1-8 為常見的 DPV 感測圖。

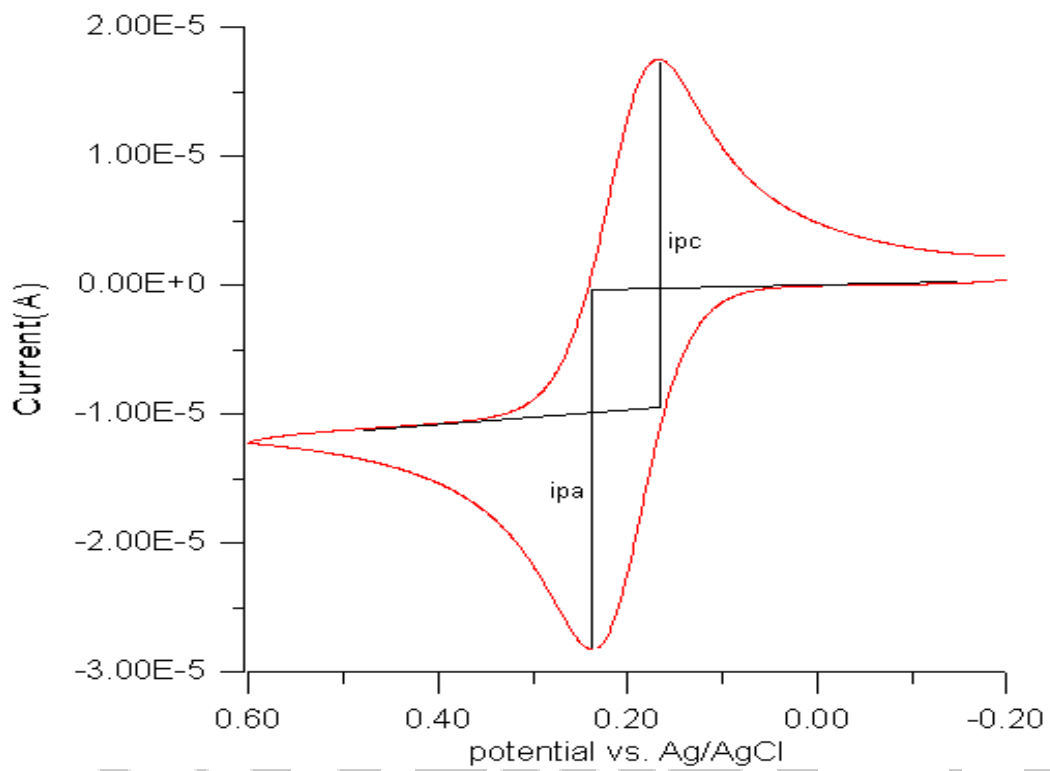


圖 1- 7 循環伏安掃描圖

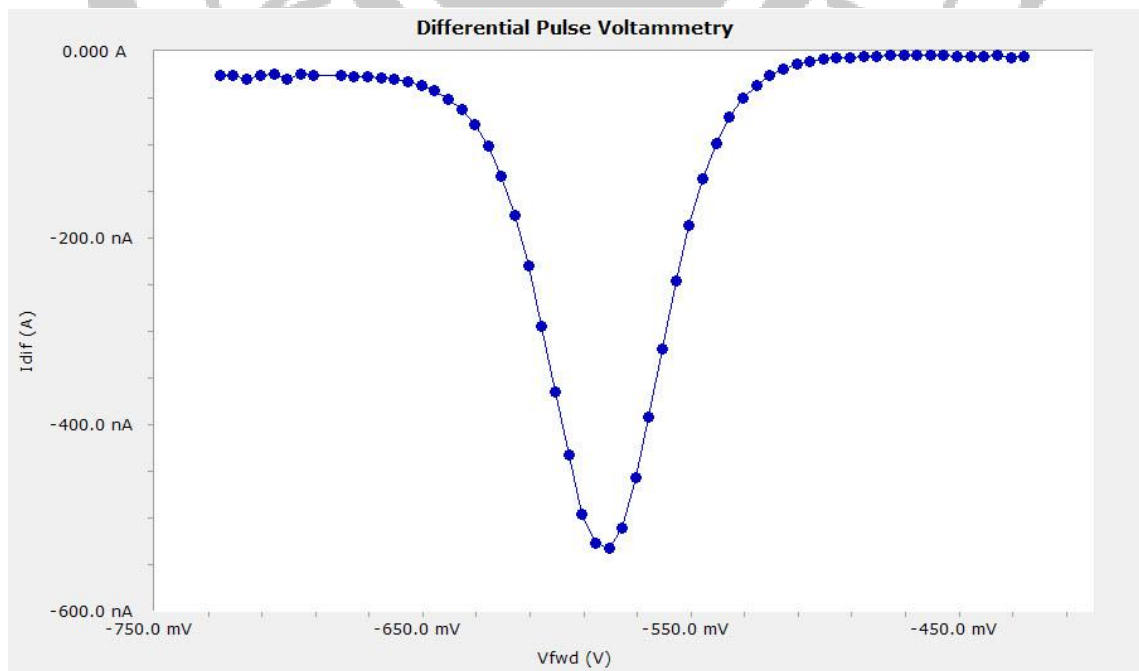


圖 1- 8 微分脈衝伏安掃描圖

1-8 研究動機

生物感測器發展到現在廣泛的運用在醫療檢測、藥物開發、水質監控、結合奈米科技、生物晶片的應用等，最廣為人知的即為血糖計的應用，生物感測器的特異性、專一性、穩定性與靈敏度是最為大家所探討與研究的，而由於 DNA 生物感測器能藉由 DNA 本身所具備的特異性的親和力，藉此快速的識別特定序列的 DNA，希望往後的應用能致力於快速檢定致病基因，因而運用於醫療檢測的目的，而本實驗所利用的電化學法為生物感測器研究中常使用的方法之一，利用電化學如循環伏安法(Cyclic voltammetry)、微分脈衝伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)等方法，利用氧化還原、電子轉移的方式將生物分子修飾於電極上，而最後再利用感測的訊號來達到定性定量的研究。

而本實驗室在學長的研究中提出了 DNA 電化學生物感測器的製備，是利用電化學法將高分子聚合在 Pt，再聚合 4-ABA，經由交聯劑達固定探針的效果，再經雜合使互補的進行 DNA 雜交，最後加入電化學指示劑增加感測的訊號，最後達成感測目標 DNA 的效果。而本實驗主要是藉由學長所建構的 DNA 生物感測器的雛型進行實驗，討論製程中所遇之一些問題並加以處理，另外致力於利用不同的製程來測試感測 DNA 之電極，實驗是否能達成感測效果並加以比較與討論。

第二章 實驗儀器與藥品

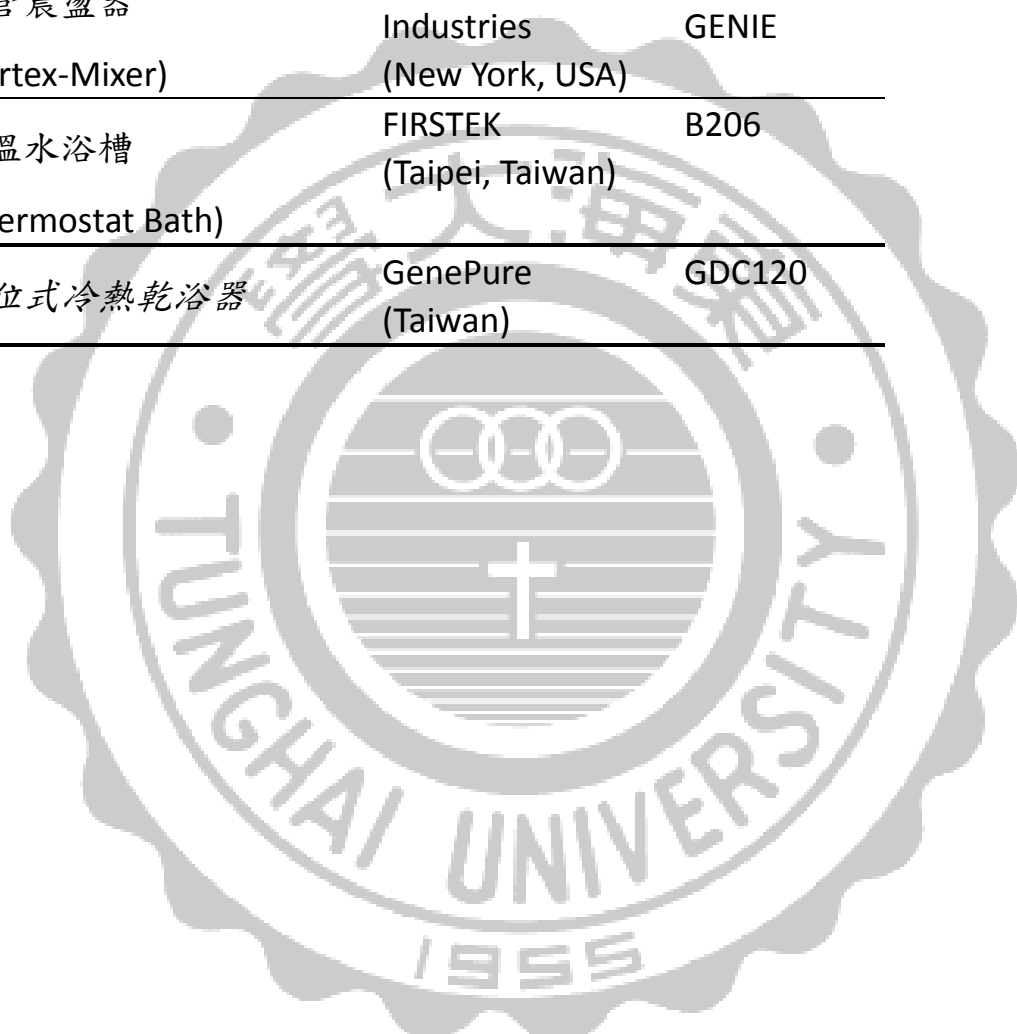
2-1 實驗儀器

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)	483028-10G	
4-Aminobenzoic acid	Sigma (St.Louis,MO,USA)	A9878-25G	99%
Dipotassium hydrogenphosphate	Showa (Tokyo,Japon)	1645-8150	
Disodium hydrogenphosphate	Kento (Tokyo,Jopen)	37243-00	
1-Ethyl-3-(3-dimethyl- aminopropyl) 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)	1.00456.100 0	
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)	1.06404.100 0	Analysis

Sodium hydroxide	Meerck (Darmstadt,Germany)	1.06498.100 0	Analysis
Daunorubicin hydroocholride	Sigma (St.Louis,MO,USA)	D8809-1MG	
$K_3[Fe(CN)_6]$	Meerck (Darmstadt,Germany)	27106	
Acrylic acid	Alfa Aesar	L04280	99%
Methylene Blue	Sigma	M9410	



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	CGCCGGCCACGAGAATAGCamin oC6	3'端 修飾氮根	52.4
THU-DJ2	GCTATTCTCGTGGCCGGCG	與 THU-DJ1 完全互補	52.4

第三章 實驗步驟

3-1 參考電極之製備

1. 取一段 7cm 銀線，將銀線浸泡於 3M HNO_3 溶液中 10 分鐘，溶解表面被氧化的銀，產生新的表面。
2. 以去離子水沖洗銀線。
3. 將銀線浸泡在 0.1M HCl 溶液中，陽極極化 30 分鐘（電流密度 $0.4\text{mA}/\text{cm}^2$ ）。

「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 3M NaCl 溶液的玻璃管中並依圖示（如圖 3-1 所示）將熱縮套管與熱溶膠封住即可完成參考電極製作。

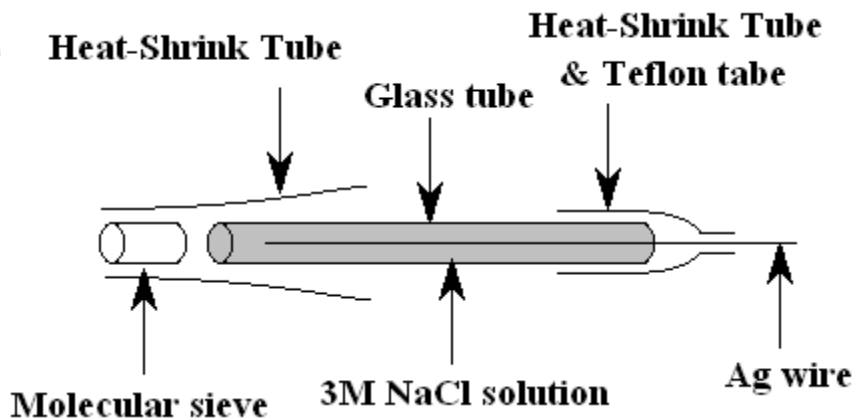


圖 3- 1 參考電極組裝結構圖

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_3 中 6 小時。
2. 以超音波震盪 30 分鐘後，加去離子水於瓶中，搖晃沖洗數次。
3. 將步驟<2>之白金絲浸泡於 3 M NaOH 中，以超音波震盪 30 分鐘後，再的去離子水加於瓶中搖晃沖洗數次。
4. 再將白金絲浸泡於 3 M HCl 中，以超音波震盪 30 分鐘後，以去離子水於瓶中搖晃沖洗數次。
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 之二氧乙烯噻吩單體溶液與 10.6390 g LiClO_4 加入去離子水至 1000 ml，攪拌一日至完全溶解，配置成含 0.01 M 二氧乙烯噻吩單體之 0.1 M LiClO_4 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. 開啟電化學分析儀，掃描循環伏安法將 EDOT 單體聚合於工作電極之白金絲上，掃描電位為 0.0V ~1.0 V，掃描速率為 10 mV/s，掃描圈數為 5 圈，操作溫度為 25°C 的水浴槽中進行。
4. 將 PEDOT/Pt 電極以鱈魚夾固定浸泡於去離子水中 4 小時待用。

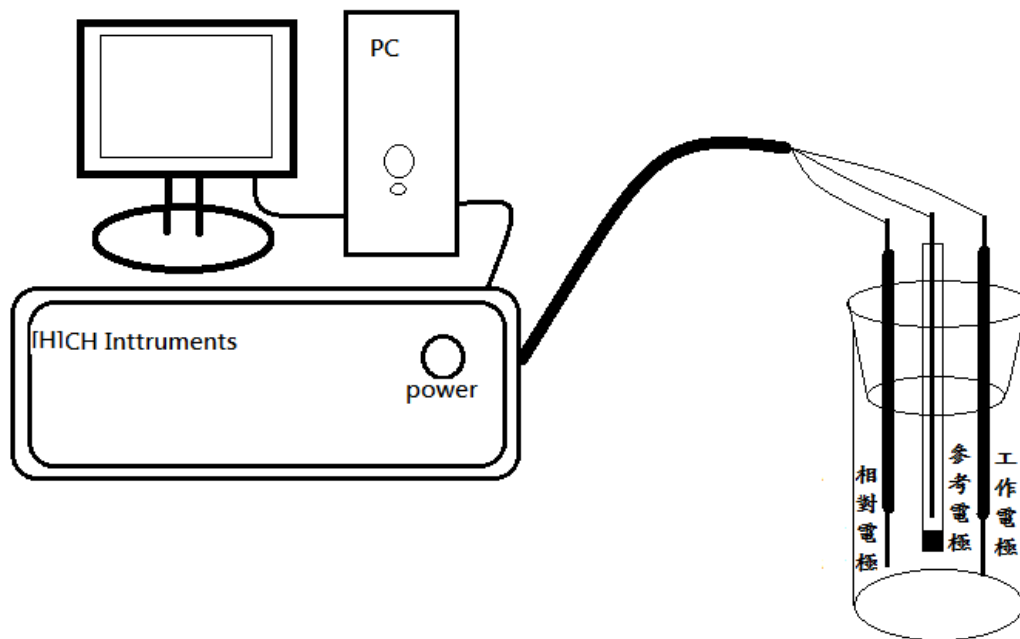


圖 3- 2 電化學分析儀器裝置圖

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 LiClO₄ 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，並將電極表面浸入溶液中。
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. 啟動電化學分析儀進行定電壓實驗掃描，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進行循環伏安法掃描，掃描電壓

為 0 V~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 電極以鱷魚夾固定於試管內待用。

3-4-1 4-ABA 製程電極固定探針 DNA 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 μ M 之核酸探針溶液(DJ1)，於冰浴槽中待用。
3. 取步驟<1>之溶液 100 μ l，步驟<2>之溶液 50 μ l，加入含 850 μ l 磷酸緩衝液(pH=7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，將 4-ABA/PEDOT/Pt 電極以鱷魚夾固定，電極表面浸入溶液中置於 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 μ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997 μ l 之 PBS 緩衝溶液(pH=7.4)，配置成 1 μ M 道諾霉素溶液，以磁石攪拌後，將電極浸入 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，裝置成如(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，掃描電位範圍為 0.2 V~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。

3-4-2 4-ABA 製程電極導電性差異

1. PEDOT/Pt 電極、4-ABA/PEDOT/PT 電極，分別製備好。
2. 配置好 0.01M 的赤血鹽溶液。
3. 將兩電極分別作為工作電極，Pt 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. 將裝置架設好後，於步驟<2>之赤血鹽溶液中進行循環伏安掃描及微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電位為-0.2V~0.5V。

3-4-3 確認 DNM 感測訊號

1. 將 PEDOT/Pt 電極、4-ABA/PEDOT/PT 電極、DJ1/4-ABA/PEDOT/PT 電極、DJ2/DJ1/4-ABA/PEDOT/PT 電極，分別製備好。
2. 將步驟<1>製備好的電極分別浸泡 1 μ M 道諾霉素溶液 15 分鐘。
3. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)作為感測溶液，將步驟<2>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，裝置如(圖 3-2)所示。
4. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電位範圍為

0.2 V~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。

3-4-4 改變 PEDOT/Pt 電極聚合圈數對膜之影響

1. 沿用步驟<3-3>製備之 PEDOT/Pt，分別實驗將聚合 PEDOT 的 CV 掃描圈數調整 5 圈、10 圈、20 圈。
2. 將不同圈數製備的 PEDOT/Pt 電極經由 SEM 觀察表面結構。
3. 另外再將不同圈數製備好之 PEDOT/Pt 電極聚合 4-ABA，沿用步驟<3-4>製備成 4-ABA/PEDOT/Pt 電極，再由 SEM 觀察結構。

3-5 BSA/PEDOT/Pt 電極之製備

1. 分別稱取 35mg、17.5mg、7mg、0.7mg、0.07mg 之 BSA，加入 1ml 磷酸 Buffer(pH 7.0)攪拌 25min 後加熱至 70°C 攪拌 5 分鐘。
2. 將實驗步驟<3-3>中配置好的 EDOT 溶液取 6ml 加入配置好的 BSA，配成濃度為 5mg/mL、2.5mg/mL、1mg/mL、0.1mg/mL、0.01mg/mL 的溶液。
3. 以白金絲為工作電極及相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，浸入不同 BSA 濃度的溶液後，裝置如(圖 3-1)所示完成線路裝置。
4. 開啟電化學分析儀，掃描循環伏安法將 EDOT 單體聚合及將 BSA 附著於工作電極，掃描電位為 0.0V ~1.0V，掃描速率為 10 mV/s，

掃描圈數為 5 圈，操作溫度為 25°C 的恆溫水槽中進行。

5. 將聚合後之 BSA/PEDOT/Pt 電極以鱷魚夾固定並浸泡於去離子水中 4 小時待用。

3-5-1 BSA 製程電極固定探針 DNA 與感測完全互補 DNA

1. 取 100 μ L 戊二醛，加入 5200 μ L ddH₂O，配置成 50mM 戊二醛溶液。
2. 以去離子水配置 1.0 μ M 之核酸探針溶液(DJ1)，於冰浴槽中待用。
3. 取步驟<1>之溶液 100 μ l，步驟<2>之溶液 50 μ l，加入含 850 μ l 磷酸緩衝液(pH=7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，並將步驟<3-5>製備之電極以鱷魚夾固定後置入於微量離心管中使電極浸入溶液，於 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 μ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997 μ l 之 PBS 緩衝溶液(pH=7.4)，配置成 1 μ M 道諾霉素溶液，並以磁石攪拌，再將電極浸入 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，掃描電位範圍為 0.2 V~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。

3-5-2 不同交聯劑對 BSA 製程之電極影響

1. 配置 50mM 甲醛溶液。
2. 以去離子水配置 1.0 μM 之核酸探針溶液(DJ1)，於冰浴槽待用。
3. 取步驟<1>之溶液 100 μl ，步驟<2>之溶液 50 μl ，加入含 850 μl 磷酸緩衝液(pH=7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，並將步驟<3-5>製備之電極以鱈魚夾固定後置入於微量離心管中使電極浸入溶液，置於 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，浸入完全互補的目標 DNA(DJ2)中進行雜合，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 μl 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997 μl 之 PBS 緩衝溶液(pH=7.4)，配置成 1 μM 道諾霉素溶液，並以磁石攪拌，再將電極浸入 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，裝置如(圖 3-1)所示。
7. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電位範圍為

0.2 V~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。

3-5-3 BSA 製程之交聯步驟改變

1. 由步驟<3-5>中製備 BSA 濃度為 1mg/mL 之 BSA/PEDOT/Pt 電極。
2. 取 100 μ L 戊二醛，加入 5200 μ L ddH₂O，配置成 50 mM 戊二醛溶液。
3. 以去離子水配置 1.0 μ M 之核酸探針溶液(DJ1)，於冰浴槽中待用。
4. 取步驟<2>之溶液 100 μ L，取加入含 900 μ L 磷酸緩衝液(pH = 7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，並將步驟<1>之電極以鱈魚夾固定後浸入，並將微量離心管置於 25 °C 恆溫水槽浸入不同實驗所需之交聯時間。
5. 取步驟<3>之溶液 50 μ L 加入含 950 μ L 磷酸緩衝液(pH = 7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，並將步驟<4>之電極以鱈魚夾固定後浸入將微量離心管置於 25 °C 恆溫水槽浸入不同實驗所需之交聯時間。
6. 取出步驟<5>之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，浸入完全互補的目標 DNA(DJ2)進行雜合，於 55°C 乾浴器中反應 1 小時。
7. 取出步驟<6>之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，取 3 μ l 之 1 mM 道諾霉素溶液，加入 2997 μ l 之 PBS 緩衝溶液(pH=7.4)，配置成 1 μ M 道諾霉素溶液，並以磁石攪拌後將電極浸入 15 分鐘。

8. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)作為感測溶液，將步驟<7>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，裝置成(圖 3-2)所示。
9. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電位範圍為 0.2 V~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。

3-5-4 更改指示劑為甲烯藍(MB)

1. 由步驟<3-5>中製備 BSA 濃度為 1mg/mL 之 BSA/PEDOT/Pt 電極。
2. 取 100 μ L 戊二醛，加入 5200 μ L ddH₂O，配置成 50 mM 戊二醛溶液。
3. 以去離子水配置 1.0 μ M 之核酸探針溶液(DJ1)，於冰浴槽中待用。
4. 取步驟<2>之溶液 100 μ l，步驟<3>之溶液 50 μ l，加入含 850 μ l 磷酸緩衝液(pH=7.0)之 1.5 ml 微量離心管中，並將步驟<1>製備之電極以鱈魚夾固定後置入於微量離心管中，使電極浸入溶液，放入 25°C 恆溫水槽中 12 小時。
5. 取出步驟<4>之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，浸入完全互補的目標 DNA(DJ2)進行雜合，於 55°C 乾浴器中反應 1 小時。
6. 取出步驟<5>之電極，以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後，配置 1 μ M 甲烯藍溶液，再將電極浸入 15 分鐘。

7. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)作為感測溶液，將步驟<6>之電極以 PBS buffer(pH=7.4)做清洗後為工作電極，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，配置成(圖 3-1)所示。
8. 啟動電化學分析儀做微分脈衝伏安法實驗掃描，掃描電位範圍為 0.2 V~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 4-ABA 製程之電極

本實驗中所使用的探針 DNA 為末端修飾胺根，能與羧酸基有共價鍵接合，於實驗中先使用白金絲為電極基底，利用電化學聚合 EDOT，將白金絲表面聚合 PEDOT 膜，再利用聚合對胺基苯甲酸(poly-4-ABA) 於 PEDOT 膜表面，其目的是為了提供羧酸基於 PEDOT 膜表面，以便經由交聯劑與末端修飾胺根之探針 DNA 以共價鍵接合，探針 DNA 再與互相互補之目標 DNA 於雜合器中進行雜交，最後再經由浸泡 DNM 溶液使其嵌入經雜交後的雙股 DNA 中，使訊號能更加明顯，最後再於 PBS 溶液中以 DPV 法掃描，能於掃描電壓約 0.4 V 得到一個感測波峰，藉以用來感測是否含雙股目標 DNA。經實驗室所製備的此 4-ABA 電極之製程，因存在有些許的問題，故於本文章中提供了許多優化製程實驗及對於 4-ABA 電極製程問題的探討的實驗，目的是為了更深入的探討與了解感測目標 DNA 之機制。

4-1-1 探討 4-ABA 修飾電極導電性差異

首先瞭解各實驗步驟之製備的電極導電性的差異，目的是想了解 4-ABA 製程之電極的修飾 4-ABA 對導電性的差異，經由感測赤血鹽來比較波峰差異及大小。

將 PEDOT/Pt 電極、4-ABA/PEDOT/PT 電極製備完成。PEDOT/Pt 電極為將白金絲以電化學循環伏安聚合 EDOT 而成，4-ABA/PEDOT/PT 電極為將 PEDOT/Pt 電極以定電壓及循環伏安將 4-ABA 聚合於電極，。最後以各電極為工作電極架設好裝置後以 DPV 感測 0.01M 赤血鹽，並將最後感測圖比較並討論。

由圖 4-1 中可觀察出以相同濃度赤血鹽感測，工作電極為 PEDOT/Pt 的整體感測的氧化還原峰皆高於工作電極為 4-ABA/PEDOT/Pt 所感測，由此可知原製備之 PEDOT/Pt 電極具有較佳之導電性，而當電極經由對氨基苯甲酸的修飾之後，雖為了接合探針 DNA 提供了共價鍵所需的基團，但卻也因此降低了電極的導電度。

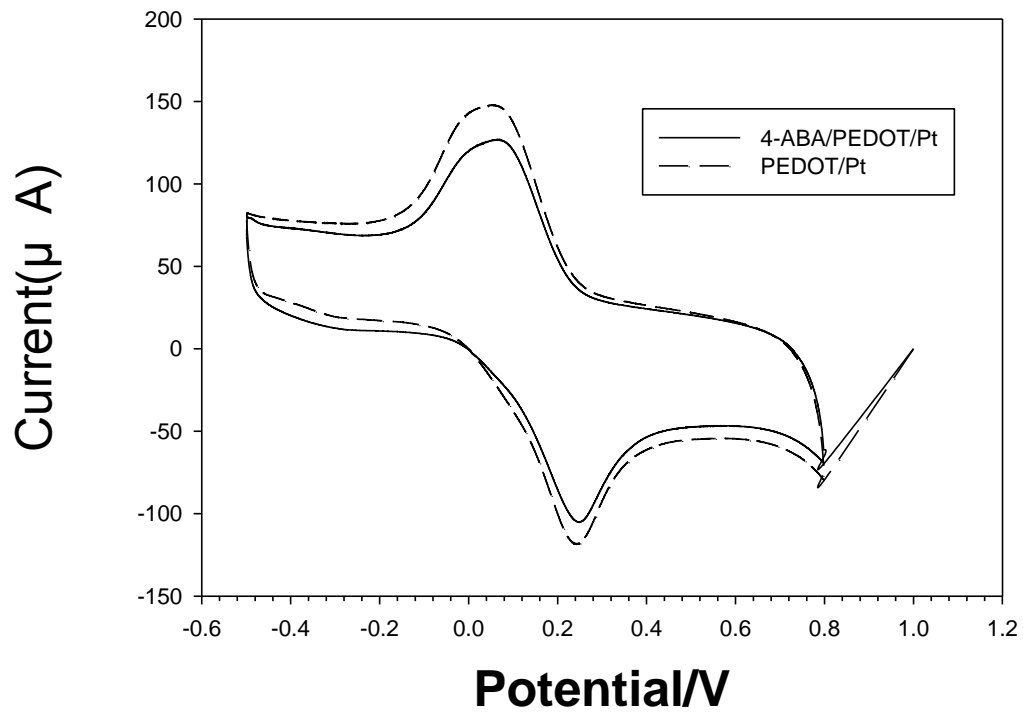


圖 4- 1 聚合 4-ABA 之赤血鹽感測比較圖

工作電極：PEDOT/Pt、4-ABA/PEDOT/Pt

掃描範圍：-0.5 V~0.8 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

4-1-2 4-ABA 製程之電極感測目標 DNA

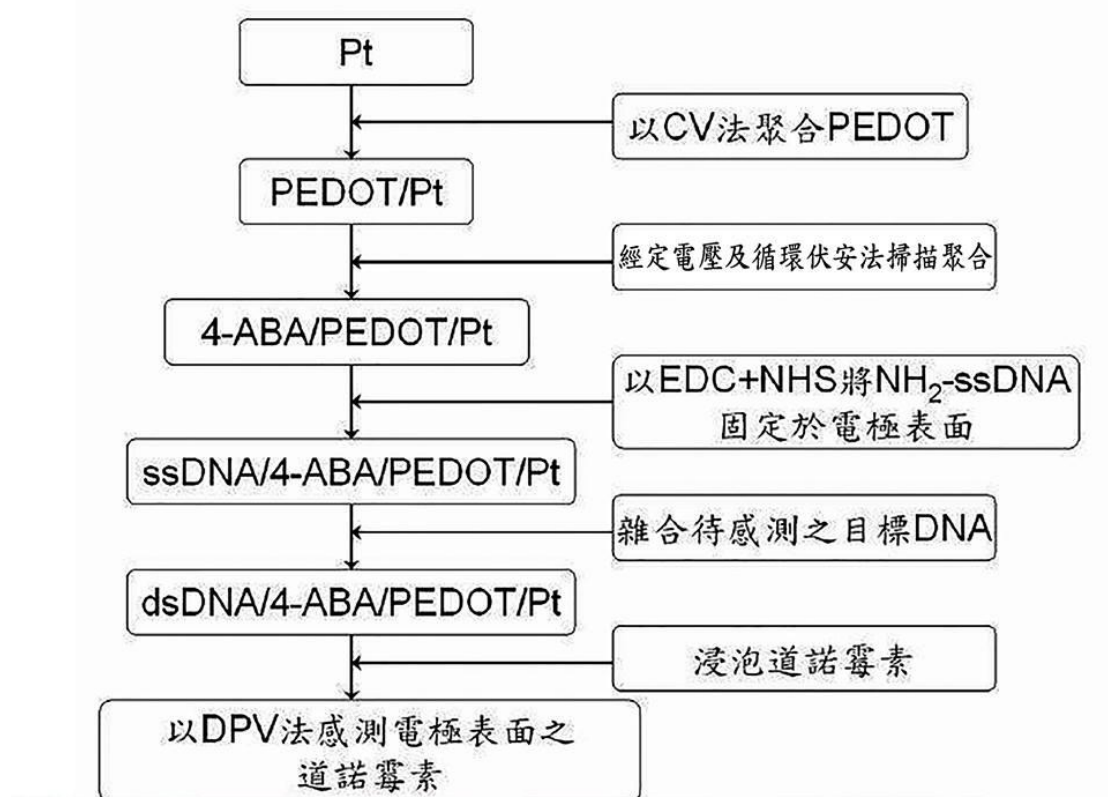


圖 4-2 4-ABA 製備之電極過程圖

由實驗室學長所製備出的 4-ABA 製程之電極(賴孟村, 2007), 可由圖 4-2 為示意圖, 首先經由電化學聚合 PEDOT/Pt 電極後, 再經由定電壓法及循環伏安法掃描使 4-ABA 聚合, 再經由浸泡交聯劑及探針 DNA 後, 使探針 DNA 經由共價鍵的接合, 使其與電極表面相互連接, 再將電極浸泡於含目標 DNA 之 Buffer 的離心管後, 將其置於雜合器中進行 DNA 雜交後將製備好的電極浸泡道諾霉素(DNM), 最後進行掃描 DPV 法感測。因接著實驗皆需與此製程或此感測結果加以比較探討, 故於本節實驗中依然製備 4-ABA 製程之電極, 紀錄感測結果待用。

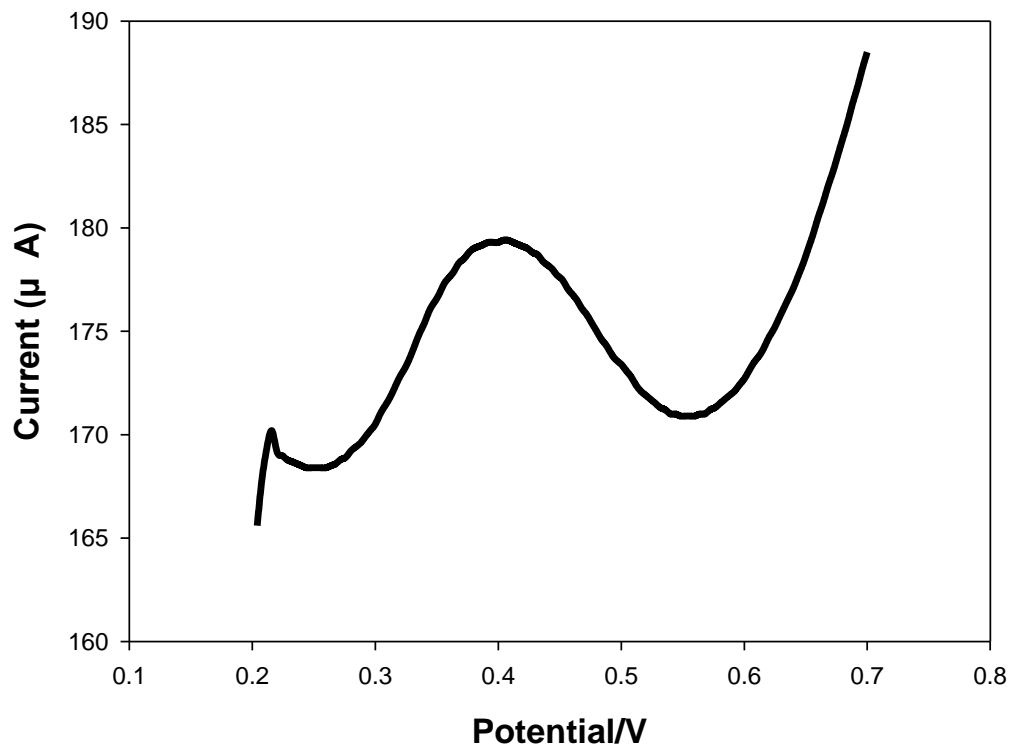


圖 4-3 4-ABA 製程之電極感測圖

工作電極：dsDNA/4-ABA/PEDOT/Pt

探針 DNA：THU-DJ1

目標 DNA：THU-DJ2

掃描 Buffer: PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

由圖 4- 3 4-ABA 製程之電極感測圖可觀察到當掃描電壓達約 0.4 V 時，具有很明顯的波峰，產生了約 $1.8e^{-4}$ A 的電流，亦即所製備之 4-ABA 製程之電極與文獻中是相符合的，由於 4-ABA 提供了羧酸基與探針 DNA 以共價鍵相連接，使得目標 DNA 能與其進行雜合達雜交之目的，最後經由電化學指示劑道諾霉素(DNM)的嵌入而放大了感測訊號，亦即由此感測訊號感測出目標 DNA。

由此結果知道實驗所製備之 4-ABA 製程之電極與文獻結果相符合之後，將其運用於之後的探討，如 PEDOT 表面探討、確認 DMN 的訊號等，以及最重要的是將其與之後文章中所提及的實驗以其他製備方法之電極所得到的感測結果並加以比較。

4-1-3 確認 DNM 訊號

由於本實驗最終是透過加入電化學指示劑道諾霉素嵌入目標 DNA 與探針 DNA 雜交之雙股 DNA 中，最後以掃描 DPV 法感測產生訊號。為了確認實驗所製備之電極感測的訊號是否真為目標 DNA 之感測訊號達到實驗所需之感測目的，故將各步驟之電極 (DJ2/DJ1/4-ABA/PEDOT/Pt、DJ1/4-ABA/PEDOT/Pt、4-ABA/PEDOT/Pt、PEDOT/Pt) 製備完成後，皆浸泡道諾霉素溶液後分別以掃描 DPV 感測，實驗是否僅具目標 DNA 與探針 DNA 雜交之雙股 DNA 的電極才有感測訊號藉以確認實驗所製備之電極能確實的感測出目標 DNA 的訊號。

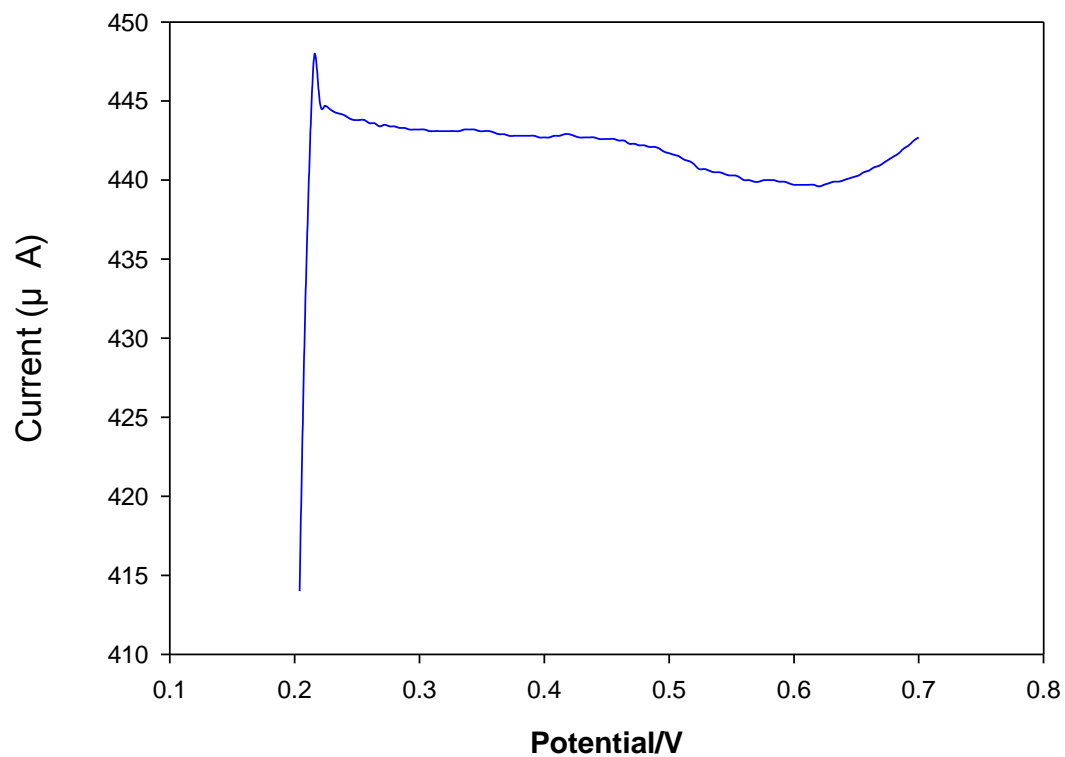


圖 4-4 聚合 PEDOT 電極感測圖

工作電極：PEDOT/Pt

掃描 Buffer: PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

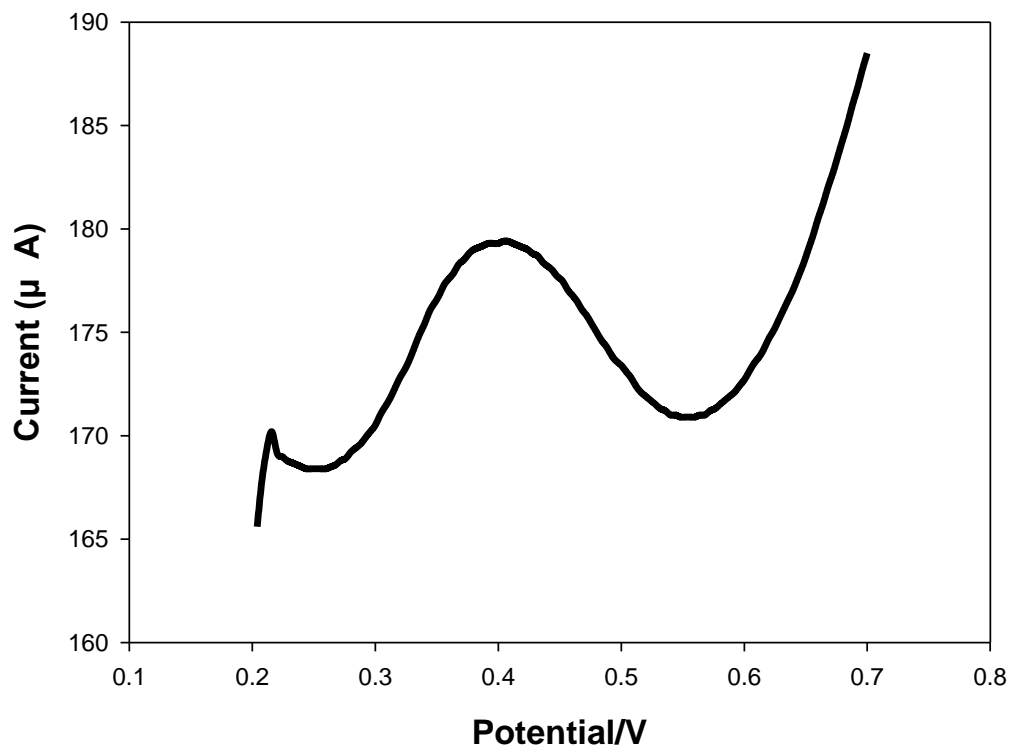


圖 4- 5 接合目標 DNA 感測圖

工作電極：ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

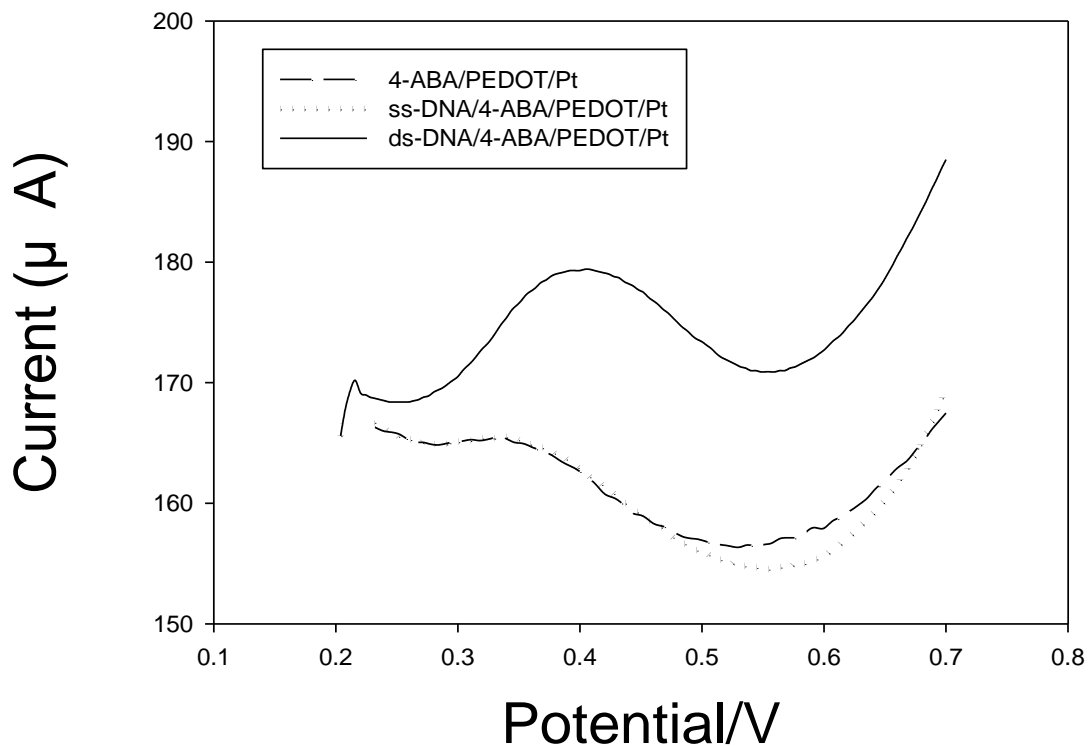


圖 4-6 4-ABA 製程各步驟之電極感測拉圖比較圖

由各個步驟製備電極的感測比較圖可觀察出，圖 4-4 中 PEDOT/Pt 浸泡 DNM 後感測之結果，猜測推測背景值過高加上 DNM 的確無法嵌入，故無訊號產生，亦不加入比較。而實驗了其他三組電極，由圖 4-6 經由拉圖後相互比較可發現，含有目標 DNA DJ2 與探針雜交後之電極 ds/4-ABA/PEDOT/Pt 具有與其他步驟電極不同的感測波峰，整體的感測波峰很明顯，掃描電壓約 0.4 V 時具有很明顯的波峰，電流約為 $1.8e^{-4}$ A，推測具有雜交後的目標雙股 DNA 之電極，能使道諾霉素嵌入其中，進而放大電化學的感測訊號，故由此比較後可知，圖 4-5 所感測之波峰，掃描電壓約 0.4 V 時所產生的波峰，確實感測出因有目標

DNA 與探針 DNA 雜交後之雙股 DNA 被 DNM 嵌入所產生之訊號。

故由本節實驗中可驗證 4-ABA 製備之電極後所感測的訊號，故作為文章後之不同製程比較參考之依據，並且利用 4-ABA 製程之電極作為文章後續加以比較製程的時間、波峰大小為標的。



4-2 PEDOT 膜之探討

由文獻中指出 4-ABA 製程之電極會有電極裂縫的問題產生，而確實由前實驗中最後接合目標 DNA 後及浸泡道諾霉素之後，於實驗的過程中常會發現許多次實驗的電極有產生嚴重的剝落的行為產生，亦即會明顯的發現白金絲裸露的情形，故於此實驗中藉由將電極照 SEM 電子顯微鏡顯示所製備電極之結構圖，來觀察是否於製備的過程當中的環節使 PEDOT 表面產生了龜裂或是裂縫。

4-2-1 4-ABA 製程之電極裂縫問題

由圖 4-7 可以觀察到經由聚合 PEDOT 於 Pt 上的電極表面，是呈現平滑平整的表面型態，另外由圖 4-8 放大倍率後觀察，表面上有許多顆粒狀的小顆粒，無裂縫產生。故白金絲經由 PEDOT 聚合後的結構大略呈現平滑的表面型態。然而由圖 4-9 中可知道，經由對氨基苯甲酸的修飾之後，綜觀看來，呈現片狀的碎片堆疊，也可以發現片與片的堆疊中有類似裂縫的產生，經倍率放大後觀察，如圖 4-10 所示，的確有很明顯的裂縫產生，也說明了將對氨基苯甲酸聚合於 PEDOT/Pt 表面的確會對於整體的結構產生裂縫，推測原因為對氨基苯甲酸聚合於電極表面時的聚合電壓導致高活性分子如自由基等攻擊高分子的活性基團，導致造成共價鍵的斷裂產生氧化降解，由於此

裂縫可能導致電極製備的表面容易剝落，進而影響了最終的感測。

由文獻中(吳森迪, 2011)有提到對於氧化降解的探討，是調整對胺基苯甲酸的聚合電壓，來維持 PEDOT 膜的完整性，但是以此方法卻會影響對胺基苯甲酸的聚合，導致使其不易聚合於 PEDOT 的膜上，進而影響了探針 DNA 的接合，電極表面無法提供固定探針 DNA 時所需的羧酸基團，也就使目標 DNA 無法與電極進行雜交，故於本節實驗中，實驗改變不同的聚合 PEDOT 時掃描的圈數所製備之 PEDOT/Pt 電極，經由 SEM 圖的觀察，是否能維持 PEDOT 膜的完整性。



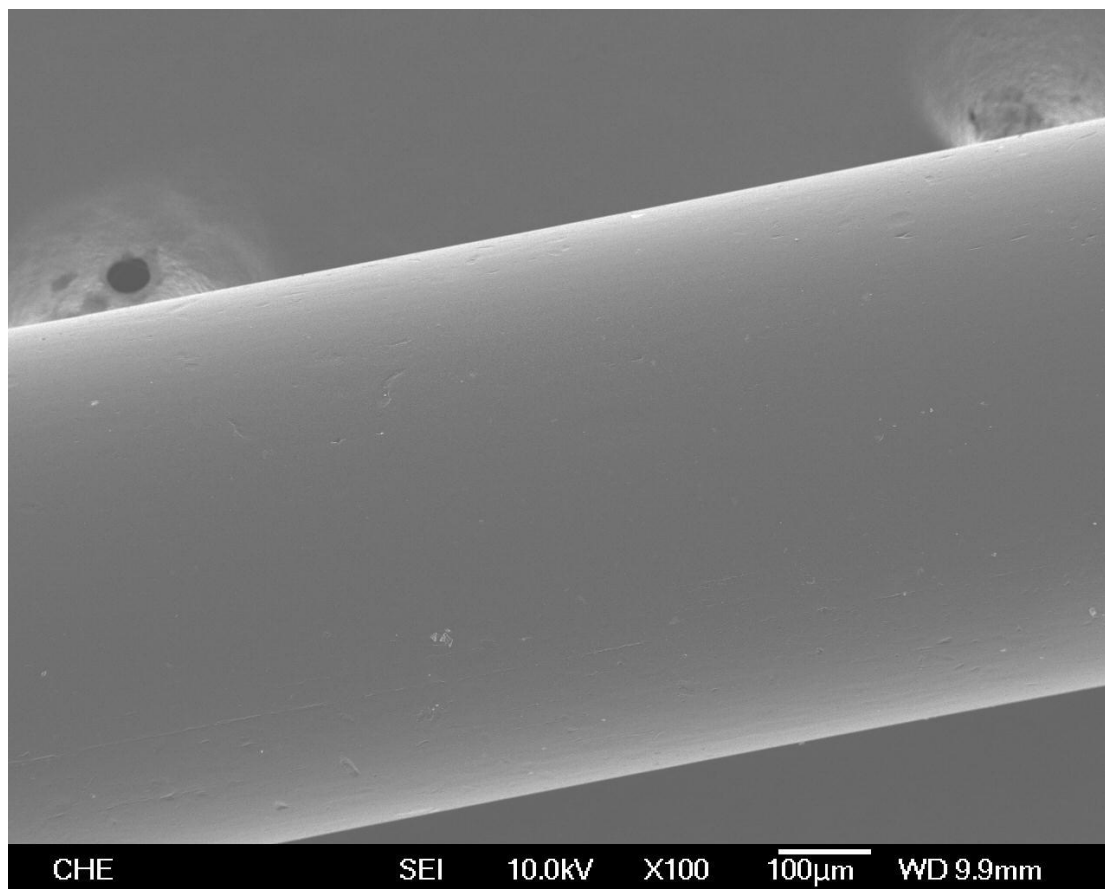


圖 4- 7PEDOT/Pt 電極表面型態

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C

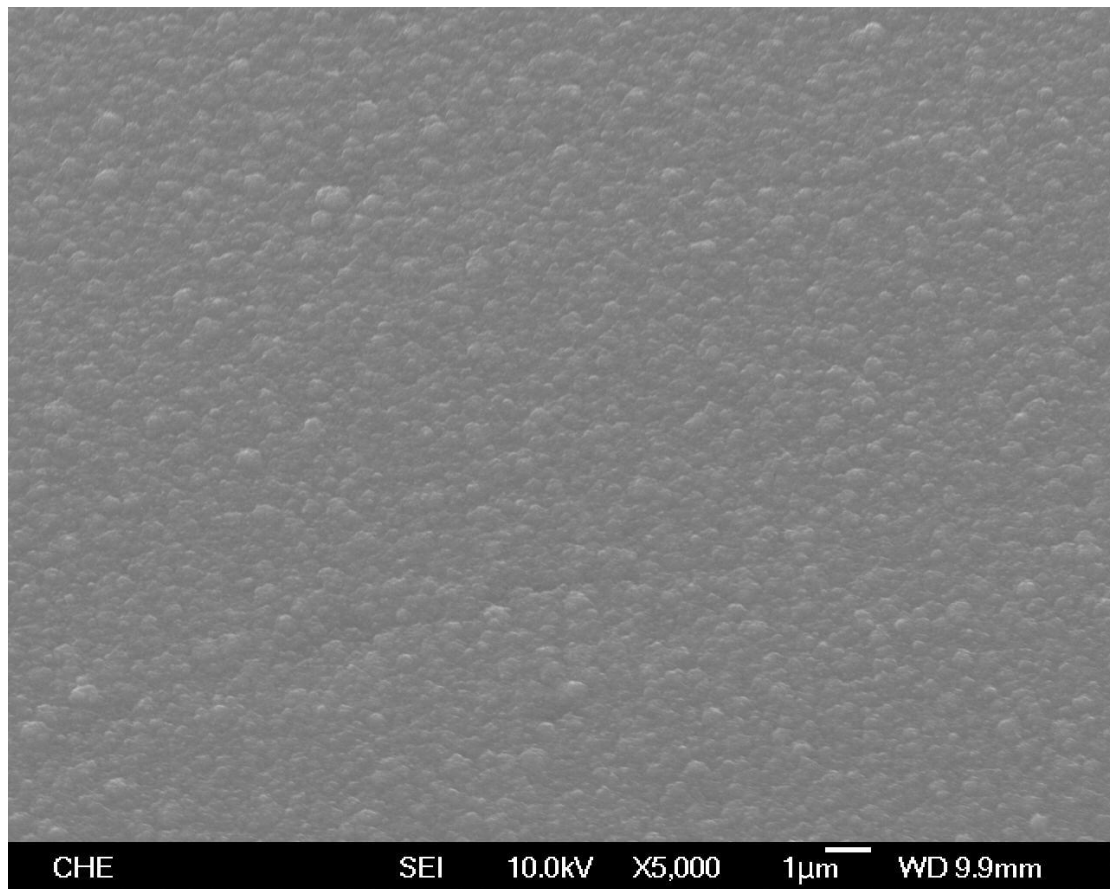


圖 4- 8PEDOT/Pt 電極表面型態

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：5 圈

聚合溫度：25°C

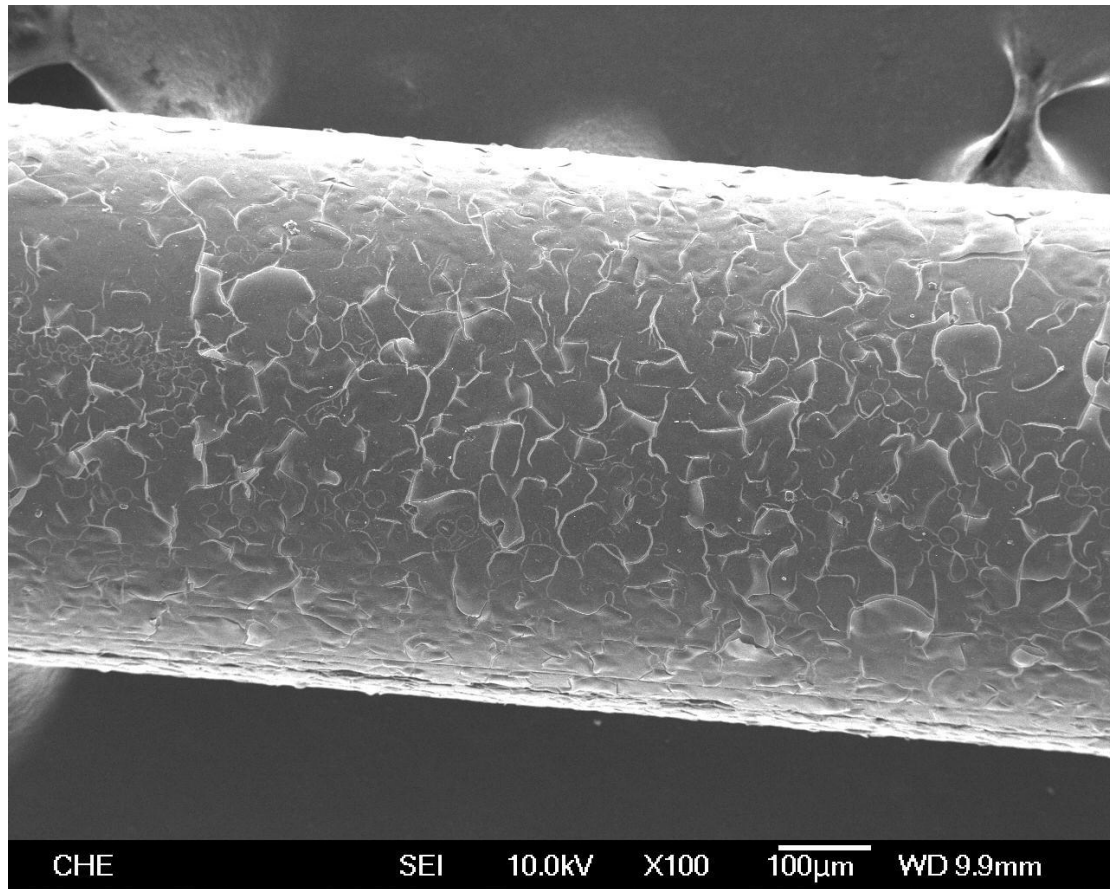


圖 4- 94ABA/PEDOT/Pt 整體結構

PEDOT 聚合方法： 循環伏安法	4-ABA 聚合方法： 定電壓法	經定電壓處理後再 以循環伏安法再次
聚合溶液： 0.01 M EDOT/0.1 M LiClO ₄	聚合溶液： 3mM 4-ABA/0.1 M LiClO ₄	聚合 4-ABA
掃描速率：10 mV/s	聚合電壓：1.0 V	掃描範圍：0V~0.9V
聚合圈數：5 圈	聚合時間：1800 秒	掃描速率：50 mV/s
聚合溫度：25 °C		聚合圈數：30 圈
		聚合溫度：25 °C

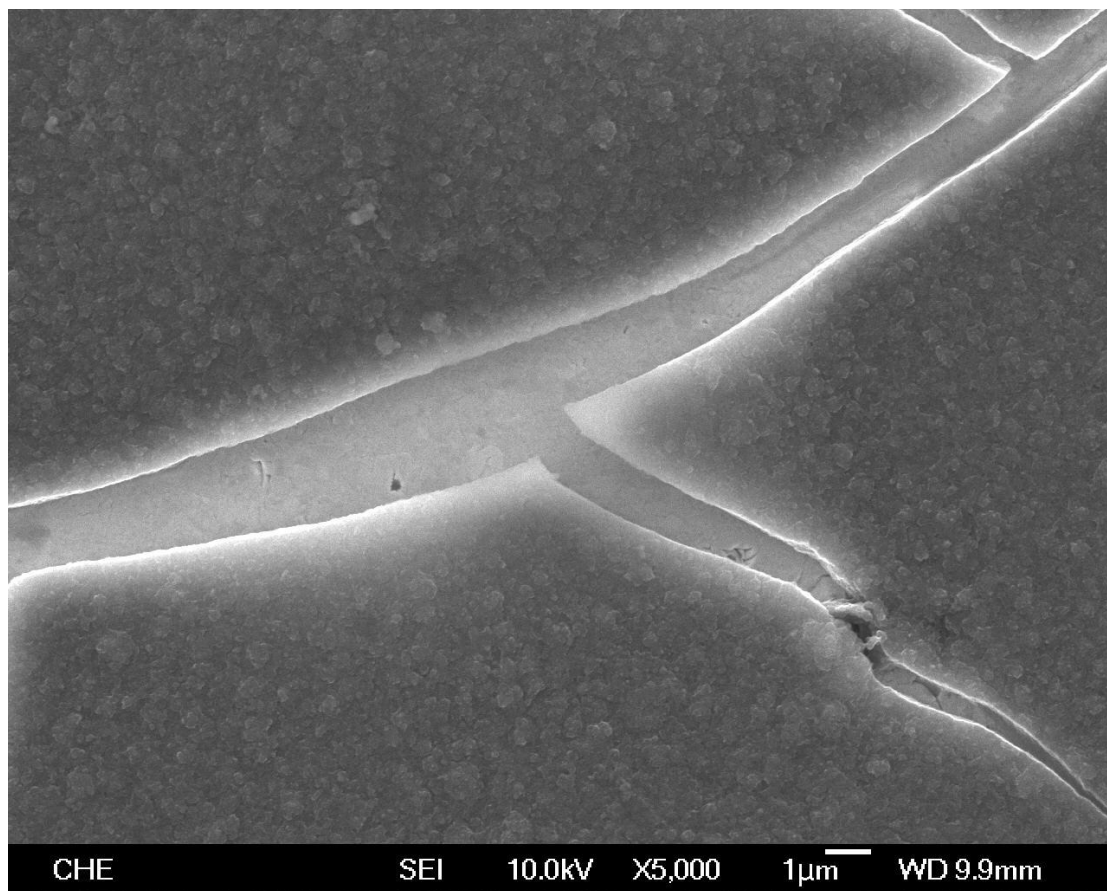


圖 4- 104ABA/PEDOT/Pt 裂縫

PEDOT 聚合方法： 循環伏安法	4-ABA 聚合方法： 定電壓法	經定電壓處理後再 以循環伏安法再次
聚合溶液： 0.01 M EDOT/0.1 M LiClO ₄	聚合溶液： 3mM 4-ABA/0.1 M LiClO ₄	聚合 4-ABA
掃描速率：10 mV/s	聚合電壓：1.0 V	掃描範圍：0V~0.9V
聚合圈數：5 圈	聚合時間：1800 秒	掃描速率：50 mV/s
聚合溫度：25 °C		聚合圈數：30 圈
		聚合溫度：25 °C

4-2-2 掃描圈數對電極表面的影響

由前一節中實驗可以知道，聚合對氨基苯甲酸，對於 PEDOT 電極表面會產生裂縫，進而導致後續的實驗製程中，常發生電極表面剝落的現象發生，故於此節實驗中，來改變實驗的條件，看是否對於裂縫問題能夠有所改善，由於文獻中已經對於 4-ABA 聚合電壓有所探討，故於本節實驗中，思考是否於電化學聚合 EDOT 單體時，將其掃描圈數增加，經由增加聚合 EDOT 的掃描圈數亦增加了聚合時間，實驗是否能使 PEDOT 聚合於 Pt 表面時更加緻密，推測於 PEDOT 之結構較為穩固的前提下，再行聚合對氨基苯甲酸是否降低裂縫的產生，實驗後藉由觀察 SEM 結構圖，觀察對裂縫的產生情形。

原製程中於聚合 EDOT 時的圈數為掃描 5 圈，而實驗將掃描的圈數改為掃描 10 圈及 20 圈後觀察 PEDOT/Pt 電極結構的改變，另外將不同掃描圈數的 PEDOT/Pt 電極再進行聚合對氨基苯甲酸，最後經由 SEM 觀察其結構是否有所不同，重要的觀察裂縫問題能否有所改善。

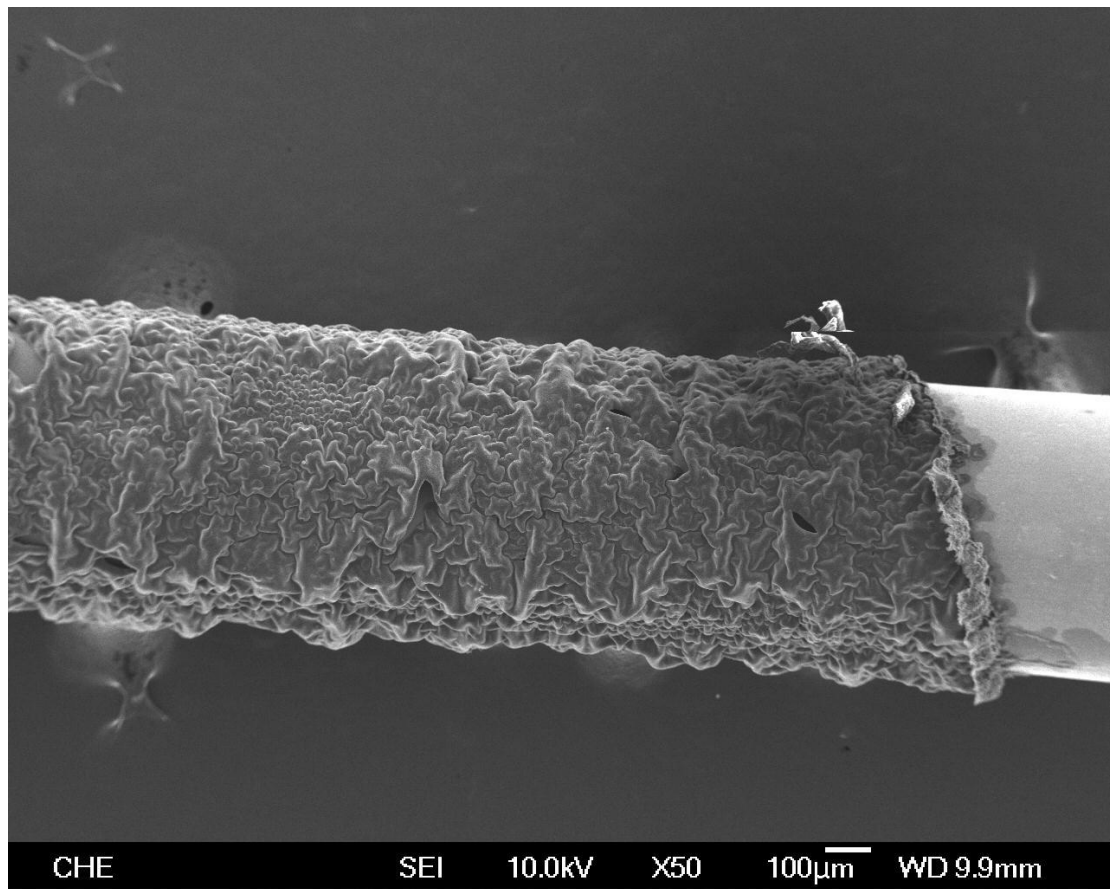


圖 4-11 PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 20 圈)

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：20 圈

聚合溫度：25 °C

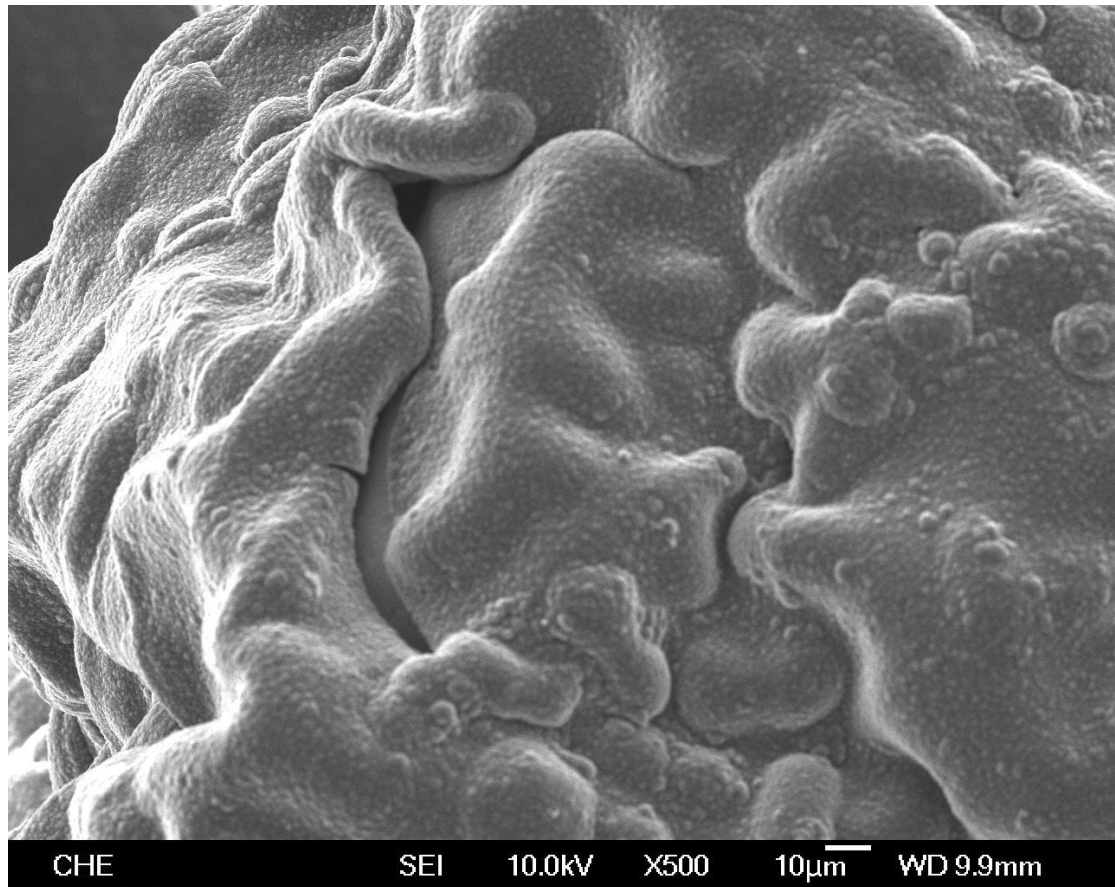


圖 4- 12 PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 20 圈)

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：20 圈

聚合溫度：25°C

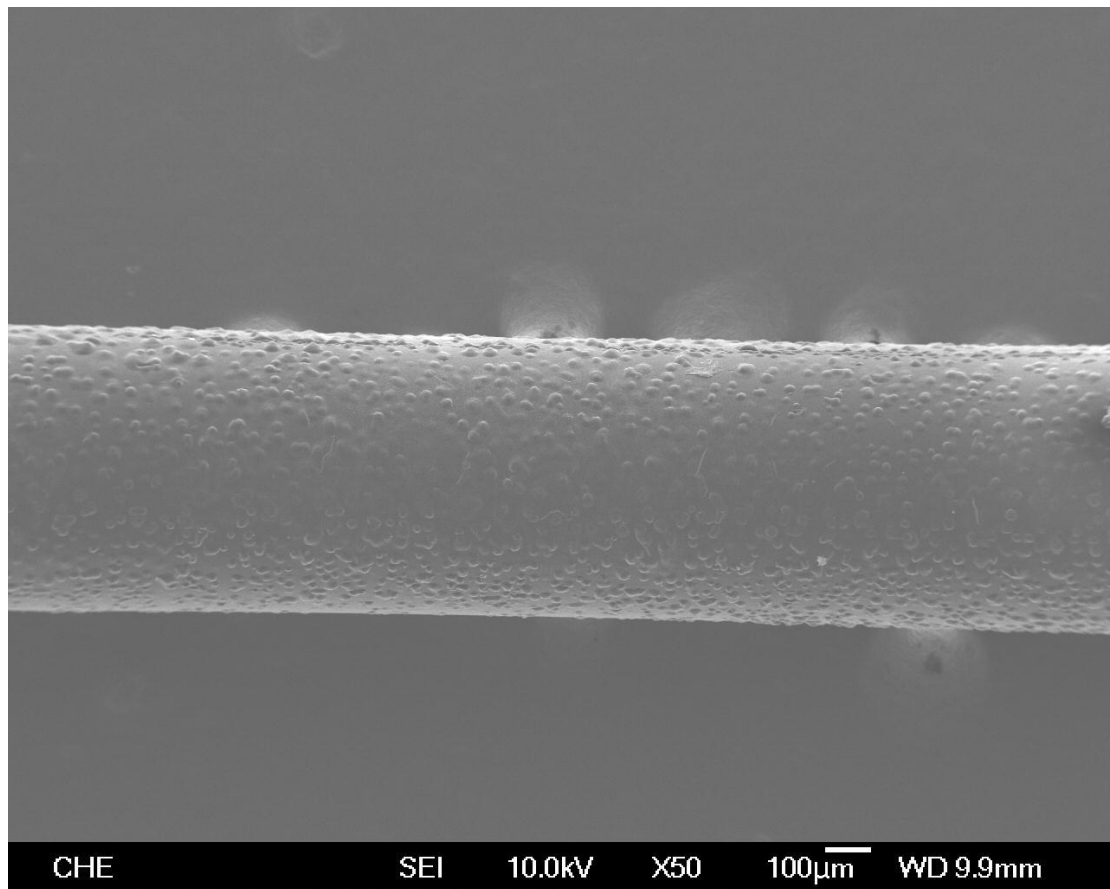


圖 4- 13 PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 10 圈)

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：10 圈

聚合溫度：25°C

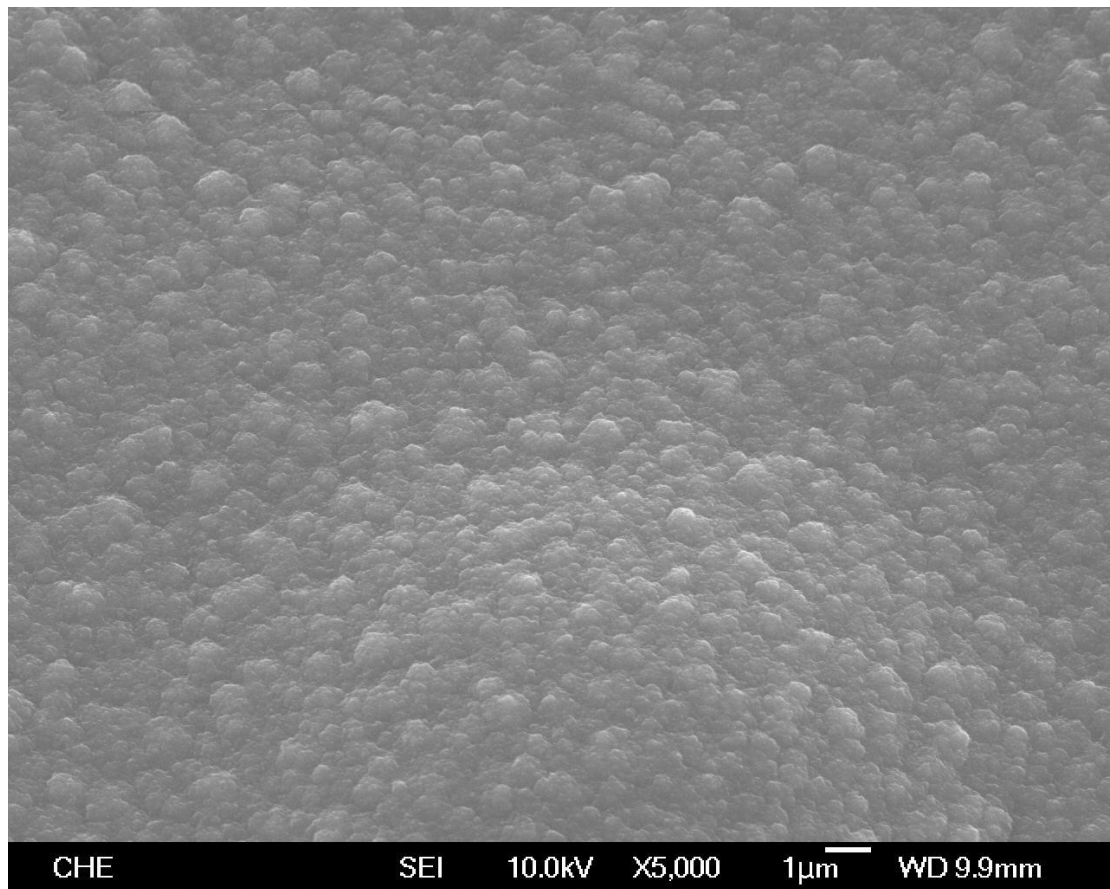


圖 4-14 PEDOT/Pt 表面結構圖(聚合圈數 10 圈)

工作電極：Pt

聚合溶液：0.1 M EDOT / 0.1 M LiClO₄

掃描範圍：0 V~1 V

掃描速率：10 mV/s

聚合圈數：10 圈

聚合溫度：25°C

將聚合 EDOT 的圈數改為聚合 10 圈及 20 圈後，由圖 4- 11 可觀察出，聚合 20 圈所製備的 PEDOT/Pt 電極，整體結構呈現許多層層的堆疊所形成不規則結構的皺摺波浪狀，表面上許多類似水滴狀的呈現，非常的不平整且有許多的裂縫，推測在實驗中所使用的白金絲規格下，對於聚合 PEDOT 的圈數若過多，會導致 PEDOT 的表面崩裂後仍在不斷地進行聚合，由圖 4- 12 放大倍率觀察結構，發現表面像是聚合至飽和後仍在繼續進行聚合所產生 PEDOT 不斷地聚合在崩解的表面，導致最後聚合完 PEDOT 整體呈現表面很多突起的不規則結構，從實驗的過程中也發現電極表面有些許的脫落，導致白金絲裸露，但雖然結構很不完整，依然於下節實驗聚合 4-ABA 觀察聚合的情形。

而將聚合 PEDOT 之圈數由 5 圈改為 10 圈後，由圖 4- 13 可觀察出，不規則的堆疊已經消失了，取而代之的是較平整表面上許多顆粒狀，也沒有裂縫的產生，接著由放大倍率的圖 4- 14 中觀察，表面的 PEDOT 所聚合成的顆粒狀突起相較於 5 圈所聚合的表面顆粒略顯更大，推測掃描 20 圈中經過 1 掃描 10 圈的結構後再不斷地行聚合故導致表面的崩裂，但聚合圈數 10 圈於 SEM 結構圖中跟掃描圈數 5 圈不同的在於其表面綜觀下並不平滑，而是很明顯的顆粒狀是在於一平整表面上，結構上 PEDOT 聚合了較厚層的結構，而是否這樣的結構對於聚合對氨基苯甲酸能抑制 PEDOT 裂縫的形成，有待下節實驗來說明。

總結來說改變掃描圈數對於 PEDOT/Pt 電極的製程，由原先掃描圈數 5 圈的結構平滑平整的表面，放大倍率觀察為細小的顆粒突起，將掃描圈數 10 圈，PEDOT 聚合的更厚層，整體平整表面無裂縫，表面上有較大的顆粒突起。而將掃描圈數加到 20 圈後，PEDOT 的表面崩解，呈現不規則的皺摺形狀，故由 SEM 中可以知道掃描圈對於結構的改變很大，而是否於不同的 PEDOT 的表面結構，能使後來聚合對氨基苯甲酸時，能使表面的裂縫減少或是消失，故於下節實驗中實驗不同 EDOT 聚合掃描圈數下，再行聚合對氨基苯甲酸後，由 SEM 觀察結構，並加以比較。



4-2-3 PEDOT 聚合圈數對聚合 4-ABA 之影響

由上節實驗中我們知道改變聚合 EDOT 時的圈數，對於 PEDOT/Pt 電極表面產生了不同型態的結構改變，由文章 4-2-1 節中提到，原本實驗中聚合圈數為 5 圈時，PEDOT/Pt 表面是呈現很平整平滑的型態，但經過聚合對氨基苯甲酸後，電極的表面綜觀下呈現點電極表面碎片的結構，放大倍率檢視發現電極表面呈現很多裂縫結構，故以此型態作為指標基準參考。

經由改變聚合 EDOT 的圈數實驗後，儘管當聚合圈數加至 20 圈後的 PEDOT/Pt 表面結構產生崩裂的皺摺結構，但是依然實驗繼續聚合對氨基苯甲酸，故於本節實驗中，實驗經由改變聚合圈數後所製備之 PEDOT/Pt 電極，再經由聚合對氨基苯甲酸的步驟，對於表面結構的影響是否會產生不同結構的呈現，並加以討論。

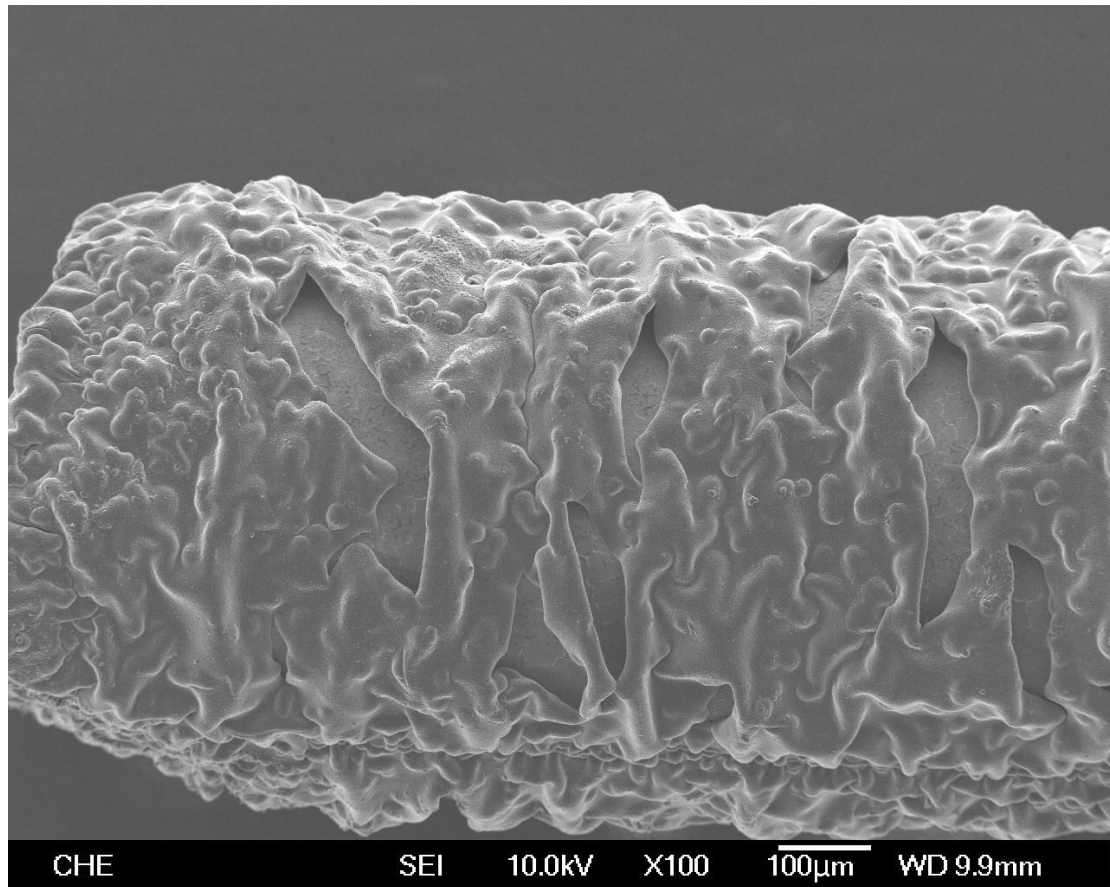


圖 4- 15PEDOT/Pt 電極聚合 20 圈後聚合 4-ABA 結構圖

<p>PEDOT 聚合方法：</p>	<p>4-ABA 聚合方法：</p>	<p>經定電壓處理後再</p>
<p>循環伏安法</p>	<p>定電壓法</p>	<p>以循環伏安法再次</p>
<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合 4-ABA</p>
<p>0.01 M EDOT/0.1 M LiClO₄</p>	<p>3mM 4-ABA/0.1 M LiClO₄</p>	<p>掃描範圍：0V~0.9V</p>
<p>掃描速率：10 mV/s</p>	<p>聚合電壓：1.0 V</p>	<p>掃描速率：50 mV/s</p>
<p>聚合圈數：20 圈</p>	<p>聚合時間：1800 秒</p>	<p>聚合圈數：30 圈</p>
<p>聚合溫度：25 °C</p>		<p>聚合溫度：25 °C</p>

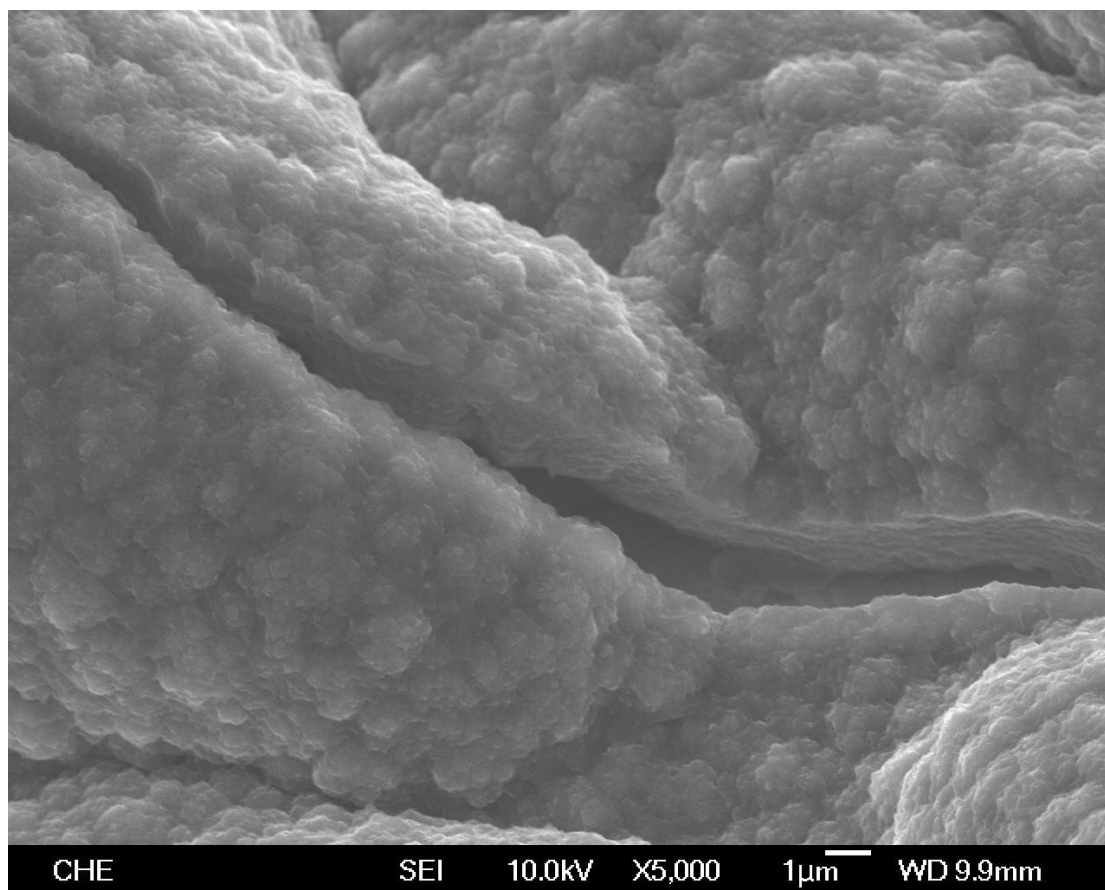


圖 4- 16PEDOT/Pt 電極聚合 20 圈後聚合 4-ABA 結構圖

<p>PEDOT 聚合方法：</p>	<p>4-ABA 聚合方法：</p>	<p>經定電壓處理後再</p>
<p>循環伏安法</p>	<p>定電壓法</p>	<p>以循環伏安法再次</p>
<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合 4-ABA</p>
<p>0.01 M EDOT/0.1 M LiClO₄</p>	<p>3mM 4-ABA/0.1 M LiClO₄</p>	<p>掃描範圍：0V~0.9V</p>
<p>掃描速率：10 mV/s</p>	<p>聚合電壓：1.0 V</p>	<p>掃描速率：50 mV/s</p>
<p>聚合圈數：20 圈</p>	<p>聚合時間：1800 秒</p>	<p>聚合圈數：30 圈</p>
<p>聚合溫度：25 °C</p>		<p>聚合溫度：25 °C</p>

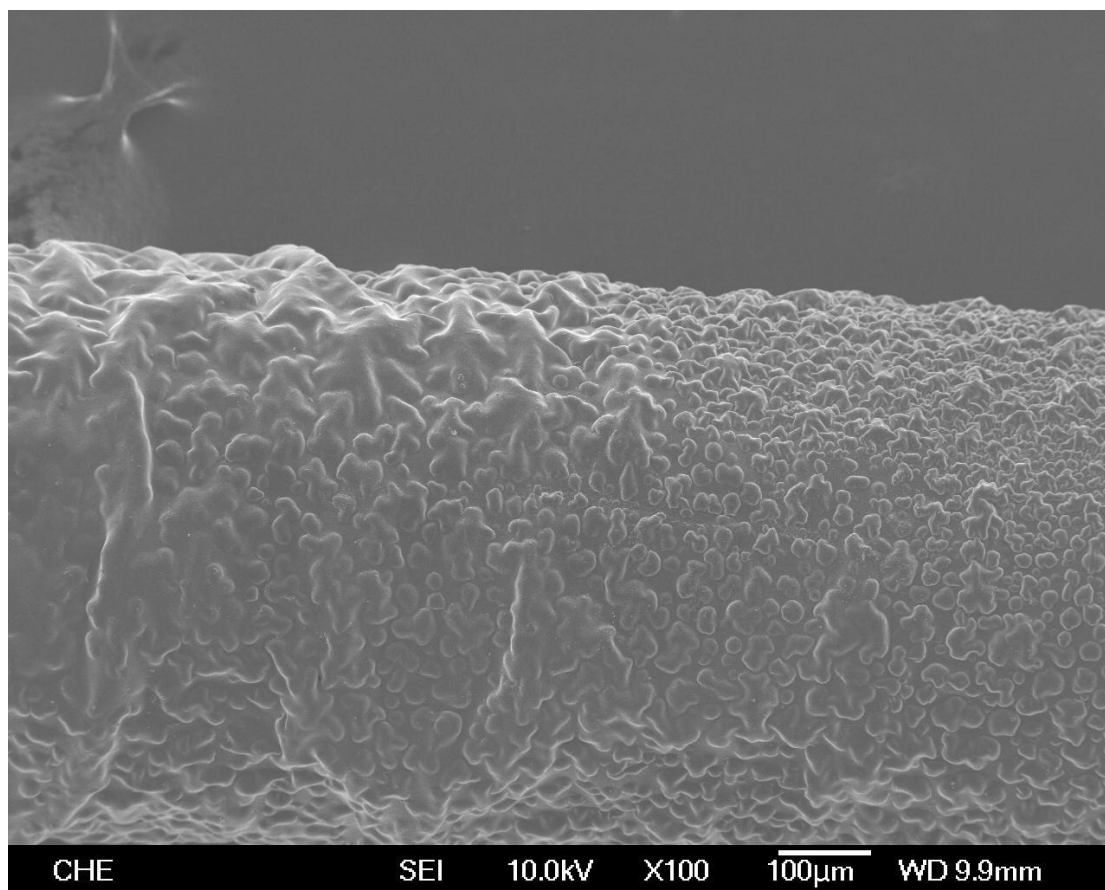


圖 4- 17PEDOT/Pt 電極聚合 10 圈後聚合 4-ABA 結構圖

<p>PEDOT 聚合方法：</p>	<p>4-ABA 聚合方法：</p>	<p>經定電壓處理後再</p>
<p>循環伏安法</p>	<p>定電壓法</p>	<p>以循環伏安法再次</p>
<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合溶液：</p>	<p>聚合 4-ABA</p>
<p>0.01 M EDOT/0.1 M LiClO₄</p>	<p>3mM 4-ABA/0.1 M LiClO₄</p>	<p>掃描範圍：0V~0.9V</p>
<p>掃描速率：10 mV/s</p>	<p>聚合電壓：1.0 V</p>	<p>掃描速率：50 mV/s</p>
<p>聚合圈數：10 圈</p>	<p>聚合時間：1800 秒</p>	<p>聚合圈數：30 圈</p>
<p>聚合溫度：25 °C</p>		<p>聚合溫度：25 °C</p>

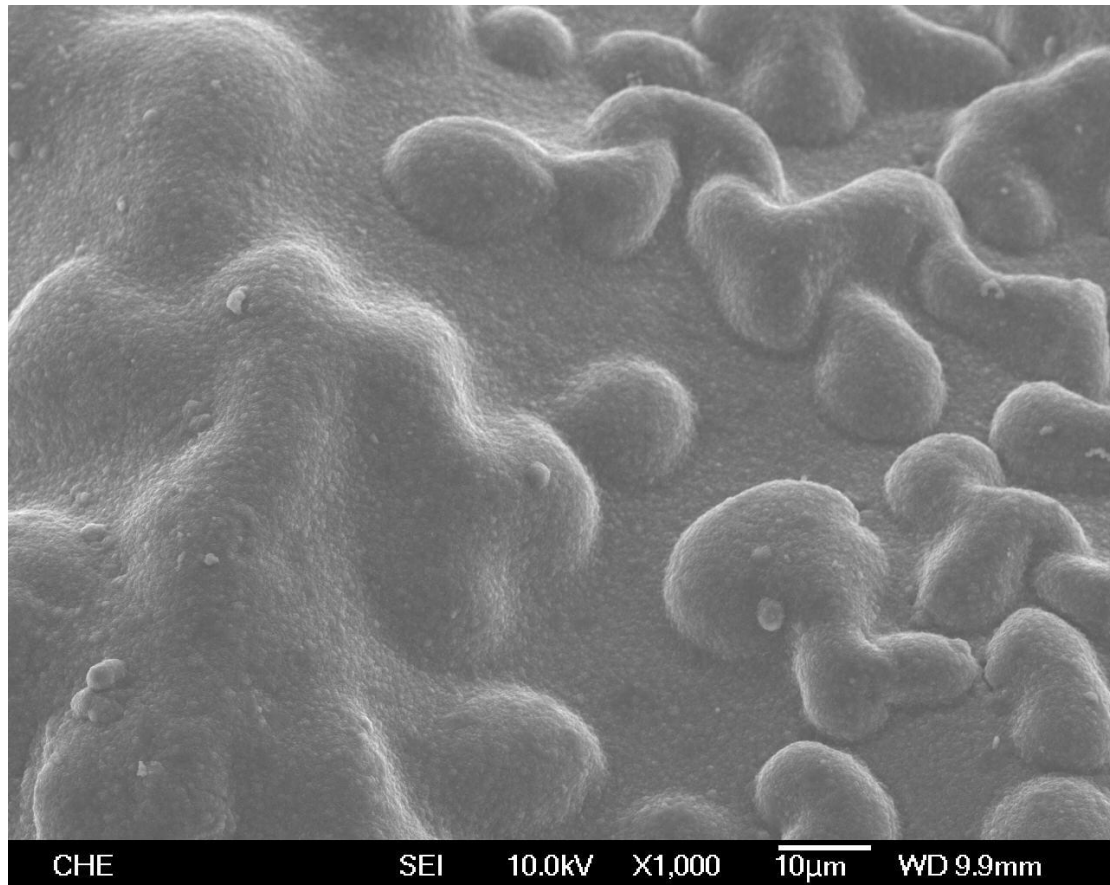


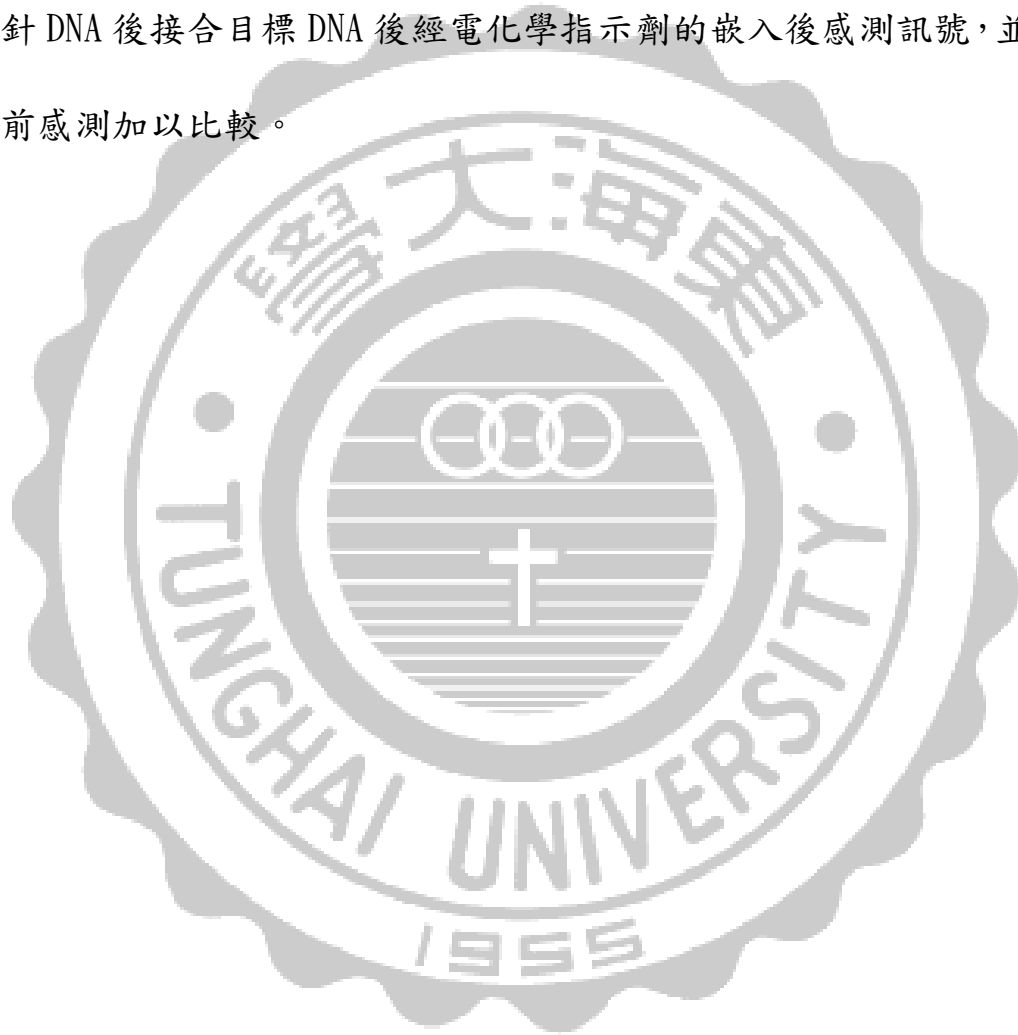
圖 4- 18PEDOT/Pt 電極聚合 10 圈後聚合 4-ABA 之 SEM 圖

<p>PEDOT 聚合方法： 循環伏安法</p> <p>聚合溶液： 0.01 M EDOT/0.1 M LiClO₄</p> <p>掃描速率：10 mV/s</p> <p>聚合圈數：10 圈</p> <p>聚合溫度：25 °C</p>	<p>4-ABA 聚合方法： 定電壓法</p> <p>聚合溶液： 3mM 4-ABA/0.1 M LiClO₄</p> <p>聚合電壓：1.0 V</p> <p>聚合時間：1800 秒</p>	<p>經定電壓處理後再 以循環伏安法再次 聚合 4-ABA</p> <p>掃描範圍：0V~0.9V</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>
---	---	--

由圖 4- 15 中觀察，PEDOT/Pt 聚合圈數調整為 20 圈後，再行聚合對氨基苯甲酸後的 SEM 圖結構中，整體的結構與聚合圈數 20 圈時的 PEDOT/Pt 電極表面結構很類似，整體呈現不規則的結構，也很明顯的發現表面崩解的裂縫，故於上一節實驗中觀察到聚合 20 圈後的 PEDOT/Pt 結構已經崩解，再經由聚合 4-ABA 的處理，表面仍然是崩裂的狀態，由圖 4- 16 放大倍率後檢視，可明顯看到聚合的層數很厚，但是裂縫非常明顯，亦即此聚合的步驟對於電極表面的破壞更為嚴重，無法達到降低裂縫的目的。

再由圖 4- 17 中觀察，此圖為聚合圈數 10 圈製備之 PEDOT/Pt 電極，再行聚合對氨基苯甲酸 SEM 結構圖，綜觀結構可以發現電極表面很多顆粒狀的結構，也有些地方呈現塊狀的呈現，而由上節實驗中所知，聚合圈數調整為 10 圈之 PEDOT/Pt 電極結構中可發現電極表面也是聚合 PEDOT 所產生的顆粒狀表面，故推測以此電極表面的情況下再行聚合對氨基苯甲酸後，整體的結構與 PEDOT/PT 結構類似，但是顆粒狀的結構更為明顯，但從圖 4- 18 中放大倍率檢視，與原本的聚合 4-ABA 圖相比(圖 4- 10)，已無碎裂、碎片的結構，而是依然為顆粒狀的表面結構，整體無碎片狀產生，也無名顯之裂縫發生，推測將聚合 EDOT 的圈數增加為 10 圈後，使 PEDOT 的結構較為完整，雖然產生較大的顆粒狀 PEDOT 結構，但是經由聚合對氨基基本甲酸的步驟後，原

本所要避免的裂縫也從結構圖中觀察的確沒有裂縫的產生了，故原本實驗前所推測之聚合較完整厚層的 PEDOT 能使聚合 PEDOT 聚合於白金絲上更為緻密，導致聚合 4-ABA 後對表面無顯著裂縫的產生，但對於感測的效果是否會有所增加，故於下節實驗中實驗將此電極進行接合探針 DNA 後接合目標 DNA 後經電化學指示劑的嵌入後感測訊號，並與之前感測加以比較。



4-2-4 改變 PEDOT/Pt 電極聚合掃描圈後之感測結果比較

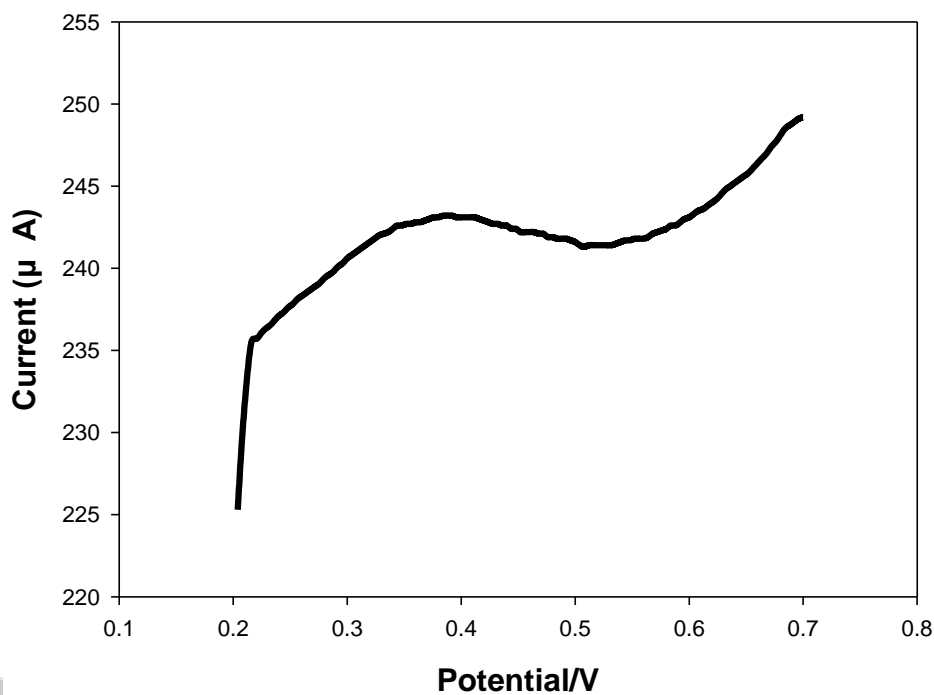


圖 4- 19 PEDOT/Pt 聚合圈數 10 圈之感測圖

工作電極：ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

PEDOT/Pt 聚合圈數：10 圈

探針 DNA、目標 DNA：THU-DJ1、THU-DJ2

掃描 Buffer:PBS buffer

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 sec

脈衝週期：0.2 sec

感測數值 PEDOT/Pt 聚合圈數	波峰位置 (V)	波峰電流 (μA)	峰高 (μA)
5 圈	0.404	179.4	9.4
10 圈	0.392	243.2	4.7

表 4- 1 不同 PEDOT 聚合圈數製備之電極感測 DNA

本節主要探討，於開始製備 PEDOT/Pt 時，由上節的結論，即將聚合圈數加至 10 圈後再經聚合 4-ABA、接合探針 DNA、接合目標 DNA 步驟後浸泡 DNM 後於 PBS 中 DPV 感測所得之圖與原聚合圈數 5 圈聚合所製備之電極相互對照，圖 4-19 為聚合圈數 10 圈所得之感測圖，圖中可看出掃描電壓約 0.4 V 具有波峰的產生，但相對於圖 4-5 對照後可發現波峰略有位移的產生，波峰也較寬，推測由於聚合圈數較多，導致電極上具有的 PEDOT 膜較厚接著由表 4- 1 進一步的數據處理中知道，掃描 10 圈之感測電流較 5 圈多了約 $0.6e^{-4} A$ ，故由前所知降低了裂縫，增加了感測的導電度，但掃描 10 圈之波峰高約為掃描五圈的一半，說明了聚合 4-ABA 的效果降低導致影響了探針 DNA 的接合，故推測可對聚合 4-ABA 的步驟同時也進行修改，如於改變聚合 PEDOT 圈數的條件下調整 4-ABA 聚合的條件及數值，故由本節之結果增加 PEDOT 聚合圈數雖然提昇了感測導電度但也略為降低了感測訊號。

4-3 以 BSA 取代 4-ABA 提供縮酸基

實驗室所製備的電極以 4-ABA 提供羧酸基，可以使末端修飾氨根之探針 DNA 與電極表面以共價鍵接合，但由前面實驗中所提到，聚合 4-ABA 時對於 PEDOT/Pt 電極膜表面會產生一定程度的影響，故思考實驗能否以別的製程來製備電極，從文獻中有提到有關蛋白質跟 DNA 的接合，本文章實驗以牛血清蛋白 BSA 作為取代 4-ABA 提供基團，藉由 EDOT 溶液加入 BSA，再由電化學聚合 PEDOT 時使蛋白質吸附於表面接著透過交聯劑與探針 DNA 接合，達到固定探針的目的，希冀能實驗出以不同的製程方式將原本 4-ABA 製程之電極來取代，達成最終感測目標 DNA 的目的，於本文章中稱此電極為 BSA 製程之電極。

4-3-1 探討 BSA 加入濃度

加入 BSA 來提供羧酸根基團，但不希望影響聚合 PEDOT 膜的製程，及影響最後感測的結果，故分別加入不同 BSA 濃度，先將 BSA 加入 pH=7 的磷酸 Buffer 中攪拌 30min 後，再加入 EDOT 溶液將電極聚合成 PEDOT，觀察聚合時之循環伏安聚合 PEDOT 圖的變化以及最後加入 DNM 感測目標 DNA 的結果比較圖，另外也實驗加入 BSA 是否影響電極的導電性，故首先將 BSA 製備之電極以循環伏安法掃描赤血鹽觀察氧化還原訊號之差異。

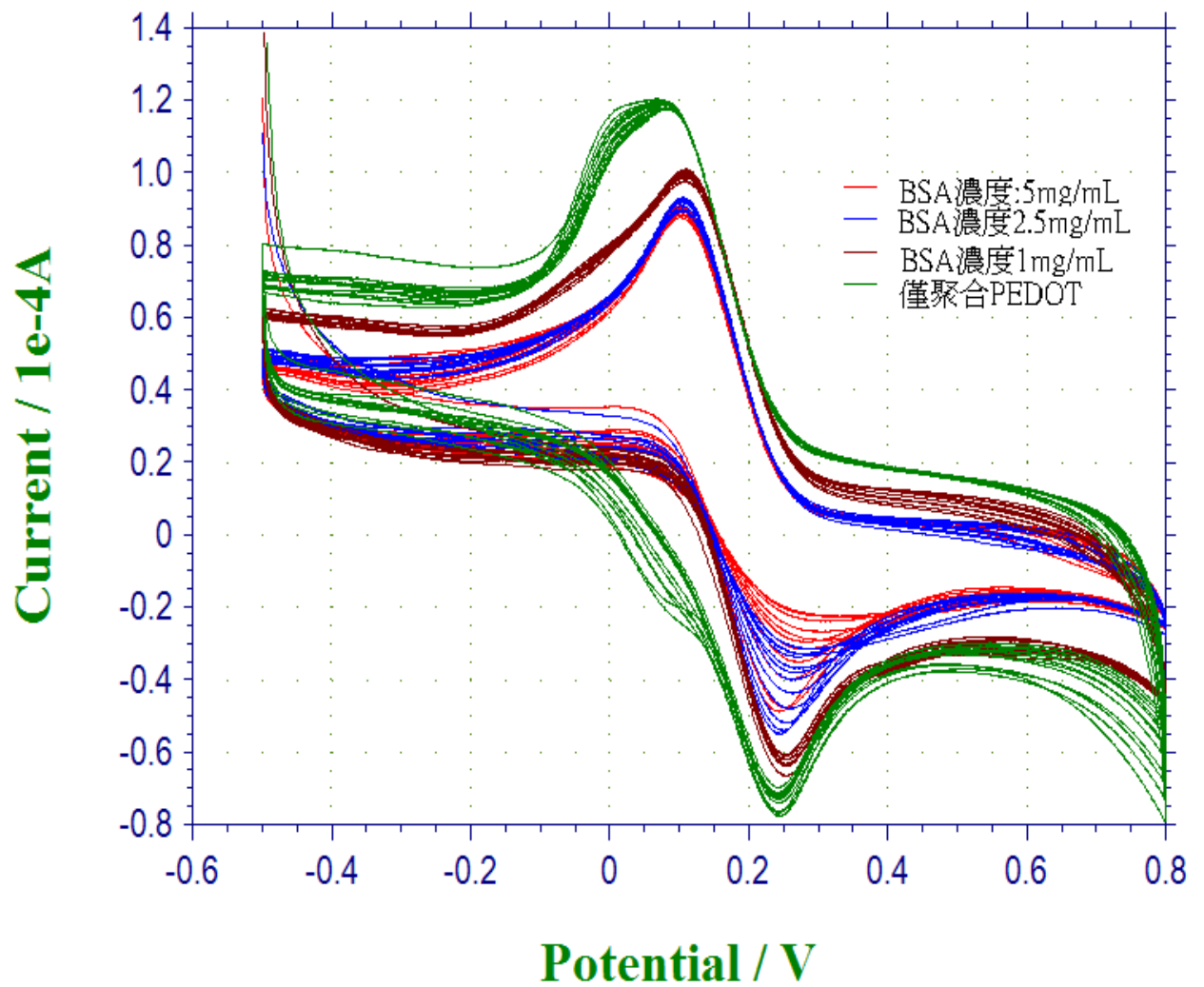


圖 4- 20 不同濃度之 BSA/PEDOT/Pt CV 感測赤血鹽比較

工作電極：不同 BSA 濃度製備之 BSA/PEDOT/Pt 電極

赤血鹽濃度：0.01M

掃描電壓：-0.5 V~0.8 V

首先實驗聚合 PEDOT 時加入 BSA 是否對於電極的導電性會有很大的影響或改變，故將不同濃度的 BSA 製備成的 BSA/PEDOT/Pt 電極，於配置好的赤血鹽溶液中以循環伏安法掃描，由圖 4-20 的整理圖可知，加入 BSA 後的感測圖跟只聚合 PEDOT 電極相比，整體的氧化還原峰皆降低了，由於文獻中指出磷酸 Buffer 對於聚合 PEDOT 並無顯著影響，故推測加入 BSA 後對於 PEDOT 的聚合過程產生了阻擾。可知實驗要使 BSA 能附著於 PEDOT 的表面，也因此略降低的 PEDOT 電極的導電性。

而由不同 BSA 加入濃度所製成之電極相比，可以知道 BSA 濃度為 1 mg/mL 時，波峰電流值較其他兩者稍大，推測當此實驗所加入之 BSA 越多越易影響導電效果，但當 BSA 濃度超過 2.5 mg/mL 後，整體氧化還原峰的電流值相近，推測 BSA 加入量到達一定量時，電極表面所附著的蛋白質也會略趨於飽和，故當再加入更多量之 BSA 對於電極的蛋白質的附著未必會有好的效果。

故總結來說加入 BSA 之後對於導電性是會有所影響，但可以知道加入 BSA 後的電極，由掃描赤血鹽的圖觀察，氧化還原反應峰反應還是很明顯，故雖然對導電性有些許的影響，但還是藉由往後的實驗，由感測結果來觀察是否能達到實驗目的即接合探針。

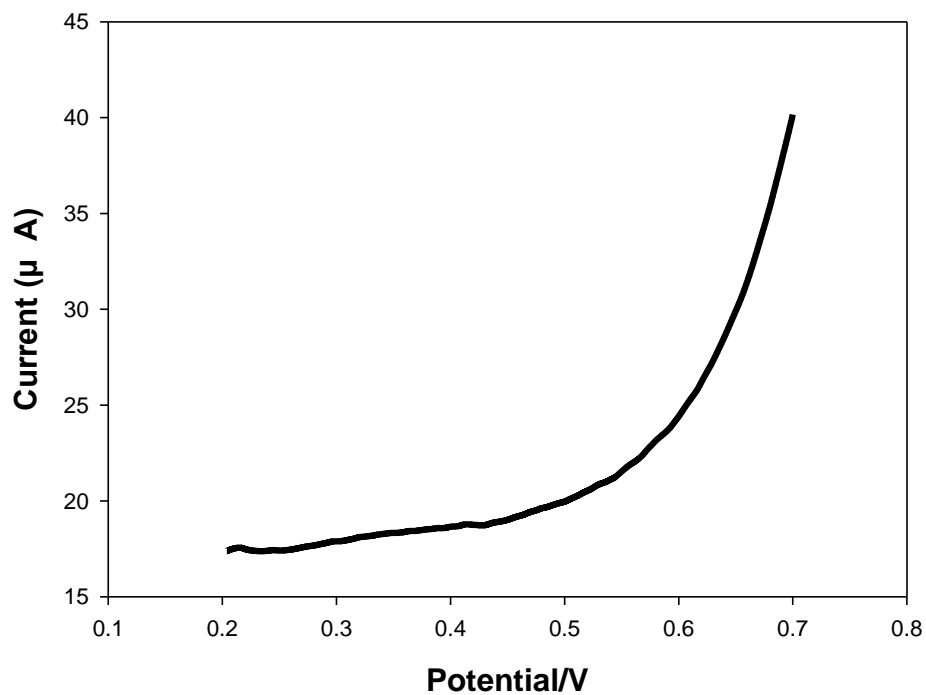


圖 4- 21BSA 加入量 5mg/mL 感測圖

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

BSA 添加量：5mg/mL

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

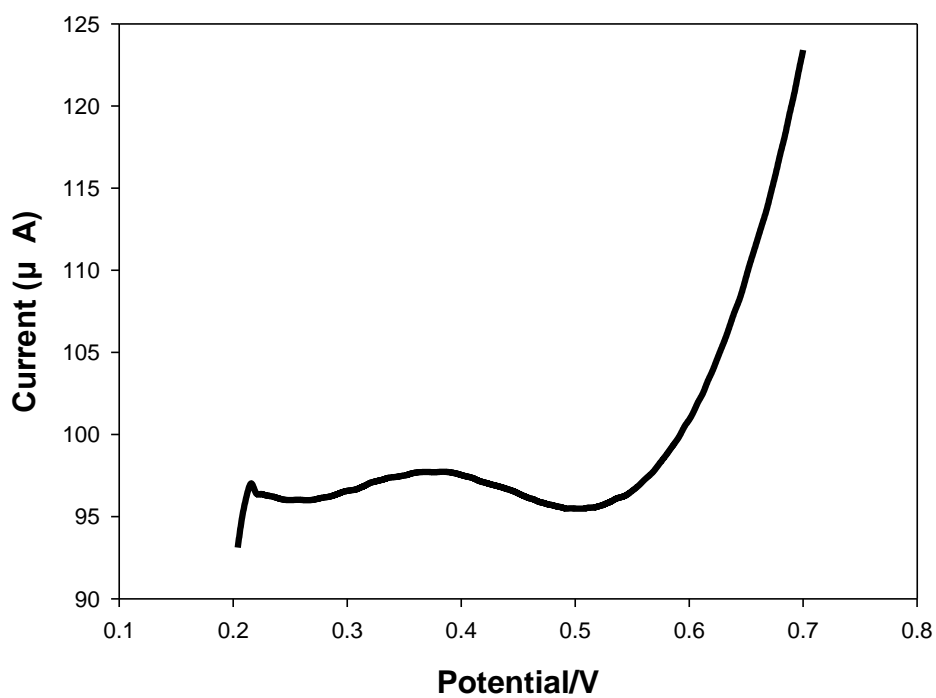


圖 4- 22BSA 加入量 2.5mg/ mL 感測圖

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

BSA 添加量：2.5mg/mL

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

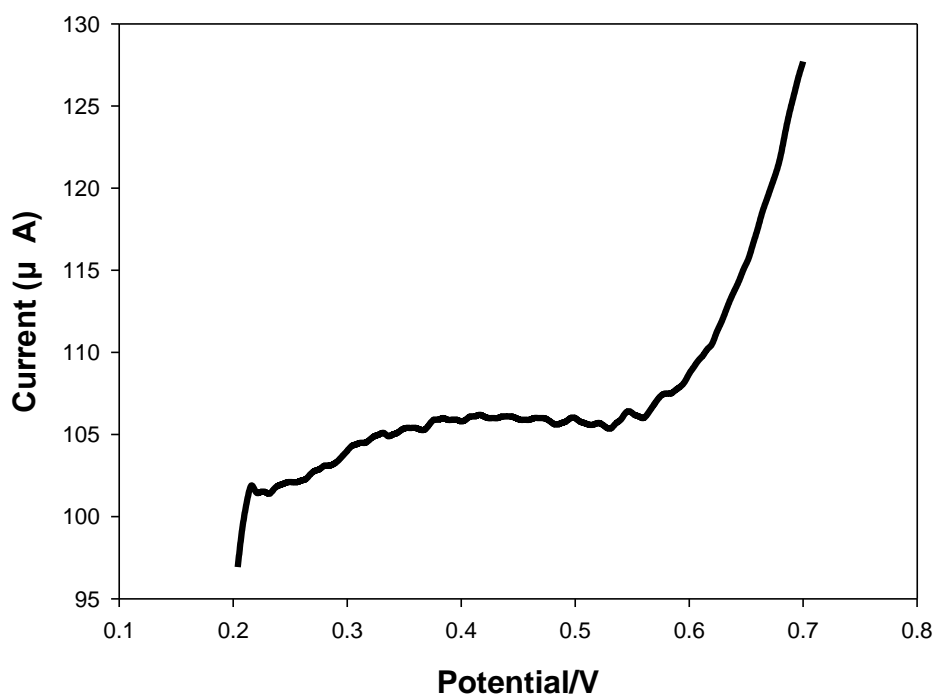


圖 4-23 BSA 加入量 1mg/mL 感測圖

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

BSA 添加量：1mg/mL

掃描 Buffer: PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

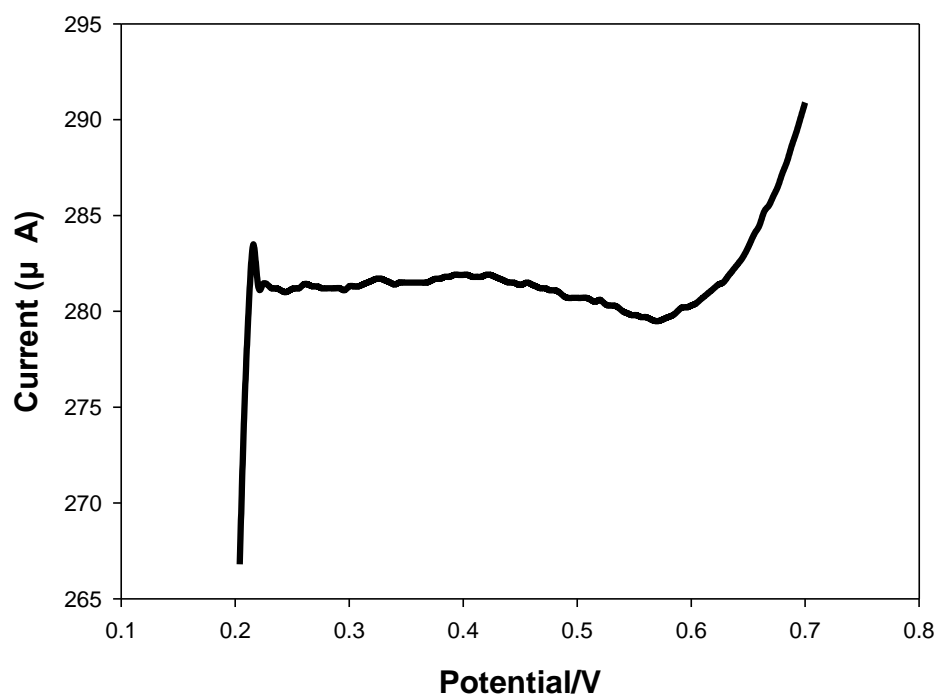


圖 4- 24BSA 加入量 0.1mg/mL 感測圖

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

BSA 添加量：0.1mg/mL

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

由四張感測圖中可以觀察到，BSA 添加量 5 mg/mL 圖 4- 21 及 0.1mg/mL 圖 4- 24 兩張感測圖中並沒有明顯的感測波峰，推測當 BSA 添加量過大使電極表面過多的蛋白質基團使 4-ABA 難以接合，而當 BSA 添加量過小導致電極表面蛋白質含量過低，兩者皆影響了接合探針 DNA 的效果，進而導致目標雙股 DNA 的形成受阻，影響最終加入道諾霉素後之 DPV 感測效果，另外將圖 4- 21 BSA 加入量 5mg/mL 感測圖、圖 4- 22、圖 4- 23、圖 4- 24 經由數據處理整理成下表：

BSA 加入濃度	數值	波峰位置 (V)	波峰電流 (μ A)	峰高 (μ A)
5mg/mL	無波峰			
2.5mg/mL		0.376	97.7	2.0
1mg/mL		0.381	105.9	2.3
0.1mg/mL	無波峰			

表 4- 2 BSA 加入濃度之感測數據比較

由表 4- 2 中可知道，BSA 添加量為 1mg/mL 時，峰高較大，且整體的感測電流值也較高，故於之後的優化製程等實驗中選擇以 BSA 含量為 1mg/mL 作為實驗的 BSA 添加量。

4-3-2 交聯劑之選擇

原本製備之電極利用 4-ABA 與探針 DNA 之接合是以 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞酸鹽(EDC)與 N-縮基琥珀硫亞氨(NHS)做為交聯劑，利用兩個交聯劑作為媒合劑及表面活化劑，目的為活化羧酸基，接著末端修飾氨根之探針 DNA 序列將會以共價鍵的方式固定於電極表面，最後再以電化學分析儀 DPV 感測與探針 DNA 雜合之目標 DNA 序列。

而將 BSA 取代 4-ABA 後，實驗不同的交聯劑是否對於接合探針 DNA 有不同的影響，利用最後感測目標 DNA 之感測訊號觀察何種交聯劑較為適合，而由於本實驗利用加熱 BSA 解鏈為一端氨基一端為羧酸基之蛋白質結構，目的為利用蛋白質之一端胺基與末端修飾胺基之 DNA 序列接合，從文獻中指出常利用於蛋白質以共價間接合的交聯劑以戊二醛最為廣泛，另外亦有文獻使用甲醛及乙二醛，戊二醛可與許多官能基的蛋白質產生反應，如氨基、硫醇基、苯酚及咪唑等等，文獻中指出戊二醛與蛋白質間的反應於中性環境下的活性是最高的，故實驗將交聯劑改為戊二醛、甲醛，並加以比較感測波峰，決定 BSA 製程之電極較適合的交聯劑，提高對於探針 DNA 的接合效果。

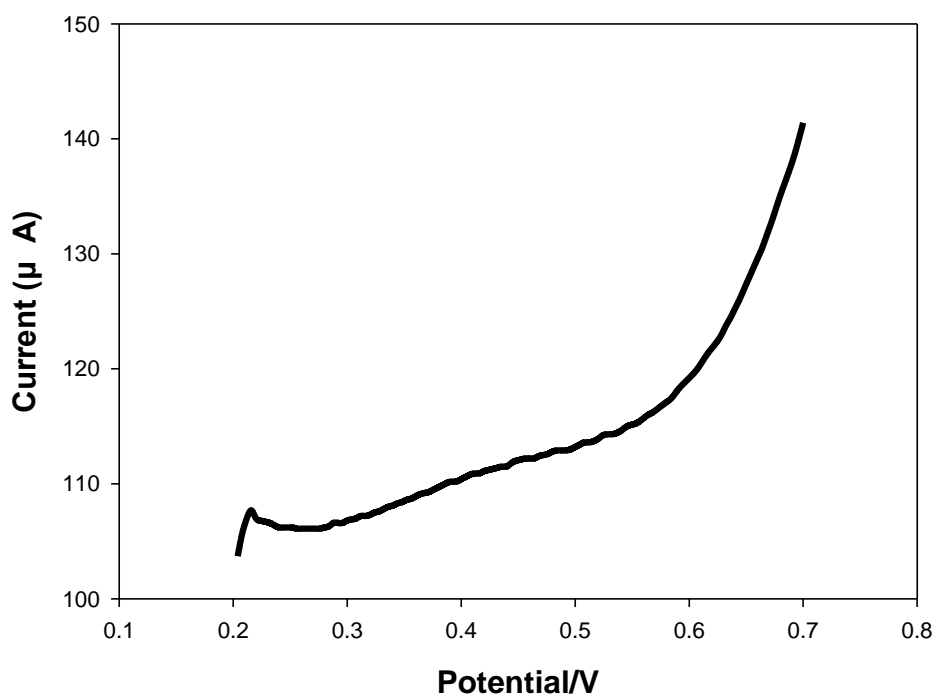


圖 4- 25 交聯劑為 EDC 及 NHS 感測效果

工作電極：DJ2/DJ1/4-ABA/PEDOT/Pt

交聯劑：EDC 及 NHS

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍 0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

一開始製備以 BSA 提供羧酸基取代 4-ABA 的實驗時，交聯劑沿用 4-ABA 製備之電極的交聯劑 EDC 及 NHS，由圖 4- 25 交聯劑為 EDC 及 NHS 感測效果感測結果可知，於約 0.4 V 並無明顯波峰，推測由於 EDC 及 NHS 於 4-ABA 製備之電極中，NHS 及 EDC 相互作用，由 4-ABA 提供之羧酸基分子會先與 EDC 形成不穩定之中間體，之後再與 NHS 反應形成穩定之中間體，最後再和含氨基分子之末端修飾氨根之探針 DNA 形成醯胺鍵之共價鍵結合，成穩定的型態。

但由於將原先電極製備以 BSA 取代 4-ABA，實驗目的希望 BSA 能嵌在 PEDOT 表面，而透過交聯劑使末端修飾氨基之探針 DNA 能與蛋白質之氨基以共價鍵接合，故 EDC 及 NHS 作為羧酸基與氨基之接合的交聯劑，將其應用於 BSA 製程之電極中以氨基與氨基間的交聯劑是不恰當的，故從感測結果得知無明顯感測波峰，應證出應找尋其他交聯劑而非沿用之前的交聯劑。找尋了文獻(Marquie,2001)，選擇了甲醛、戊二醛作為實驗的交聯劑，實驗是否能使探針 DNA 能與 PEDOT 表面蛋白質提供的氨根產生較好的鍵結。

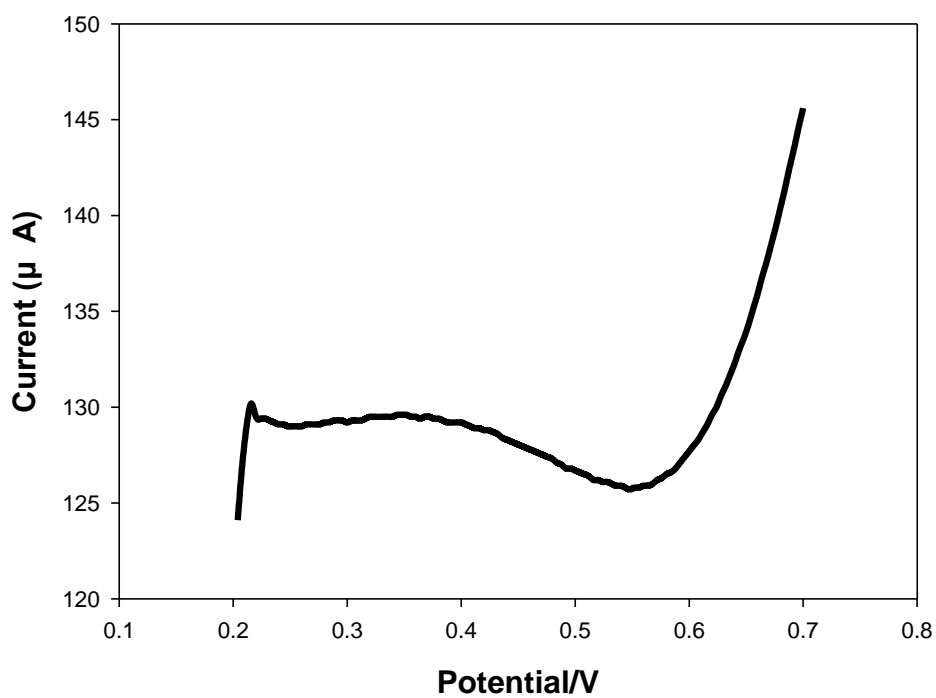


圖 4-26 交聯劑為甲醛感測結果

工作電極：ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

交聯劑：甲醛

掃描 Buffer: PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

由文獻中指出應用於與蛋白質共價鍵接合的交聯劑，有提到過甲醛。故於本電極製程中實驗以甲醛應用於本次實驗，由感測圖 4- 26 觀察，0.35V 附近有些許的凸起，經由數據處理後：

交聯劑 \ 數值	波峰位置 (V)	波峰電流 (μ A)	峰高 (μ A)
甲醛	0.386	129.0	2.0

表 4- 3 交聯劑為甲醛之感測結果

但實驗中遇到些許的問題，即使用甲醛於本實驗時，多組的實驗中並非每一組皆能有感測波峰，推測由文獻資料中有提及，甲醛與蛋白質的接合常會形成一種不穩定的狀態，故可能因此原因影響了甲醛在此實驗當中交聯劑接合探針 DNA 的角色，故雖然使用甲醛具有波峰的呈現，但因其有再現性的問題，需思考經由些特別處理維持其再現性以改善此問題。

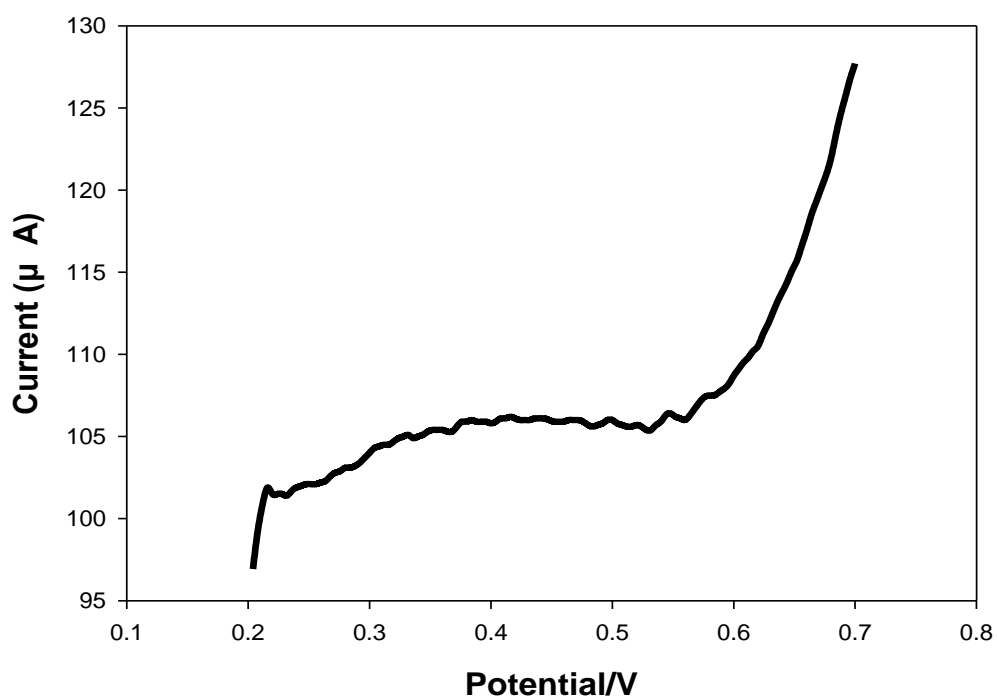


圖 4-27 交聯劑為戊二醛感測結果

工作電極：ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

交聯劑：戊二醛

掃描 Buffer: PBS buffer

掃描範圍：0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

許多文獻中常使用於和蛋白質接合的為利用戊二醛，而於本實驗中，透過戊二醛兩端的羧酸基，一端與蛋白質的胺基接合，而另一端羧酸基與末端修飾胺根之探針 DNA 鍵結，達成電子傳遞目的。由圖 4- 27 觀察，掃描電壓約 0.4 V 附近亦有波峰凸起，而最後將所實驗之三種交聯劑之感測結果整理成下表並加以比較討論：

交聯劑 \ 數值	波峰位置 (V)	波峰電流 (μA)	峰高 (μA)
EDC、NHS	無		
甲醛	0.386	129.0	2.0
戊二醛	0.381	105.9	2.3

表 4- 4 電極浸泡不同交聯劑感測比較

由感測結果表 4- 4 整理，EDC 及 NHS 由於實驗官能基之不同，故於 BSA 製程之電極無法達成有效的交聯目的故不使用，甲醛及戊二醛的感測波峰峰高雖然相近，但由於甲醛於本次實驗中的再現性並不佳，推測因文獻中有指出其與蛋白質之鍵結不穩定狀態，故影響感測結果，故雖然甲醛的感測電流較高，但因其有製備須待處理的問題，故從本次實驗中選擇戊二醛當作之後使用之交聯劑。

4-4 優化製程

在實驗以 BSA 取代 4-ABA 的電極製備之後，由前幾節實驗確認了實驗中所要加入的 BSA 量，並實驗了於 BSA 製備之電極中所選擇使用的交聯劑，有了初步的感測波峰產生，但由於跟 4-ABA 製備之電極的感測結果比較相比整體的波峰與電流值有所差別，故希望能透過一些對於 BSA 電極製備中的製程加以優化，實驗是否能找尋最適化的製程來提昇 BSA 製程之電極的感測波峰，故去探討 BSA 製備之電極中，一些可能影響探針 DNA 接合於 PEDOT 表面的因素，或是影響 BSA 附著於 PEDOT 表面的原因，實驗並加以探討，優化 BSA 製備之電極的製程達成較好的感測的目標 DNA 的效果。

4-4-1 BSA 前處理溫度

於 BSA 製備之電極初期，一開始 EDOT 溶液聚合成 PEDOT 時，並無經任何處理直接將 BSA 加入，而最終感測結果也並無訊號，而在查了資料後，文獻中指出對於 BSA 有些實驗會先經由熱處理等方式來使其解鏈，因由於蛋白質在受到酸鹼溶液、界面活性劑、有機溶劑、熱源、紫外線等外在因素或是處理之後，會造成其結構性的破壞，而此作用通常稱之為變性作用(denaturation)，而於本實驗中我們選擇透過加熱的方式，使 BSA 蛋白質結構解鏈，及所謂的經由熱變性的方式，

改變蛋白質的結構，而使 BSA 解鏈之後的氨基能裸露於 PEDOT 表面，再經由交聯劑使其與末端修飾氨基之探針 DNA 共價接合，由文獻中指出 BSA 的變性溫度約為 68°C，故一開始選擇將 BSA 先於磷酸 Buffer 中攪拌後加熱至 70°C(曾楷涵, 2011)，另外也選擇加熱至 100°C 沸騰溫度，來實驗是否不同的 BSA 前處理的加熱溫度，對於 BSA 製程之電極最終感測效果是否有所影響。



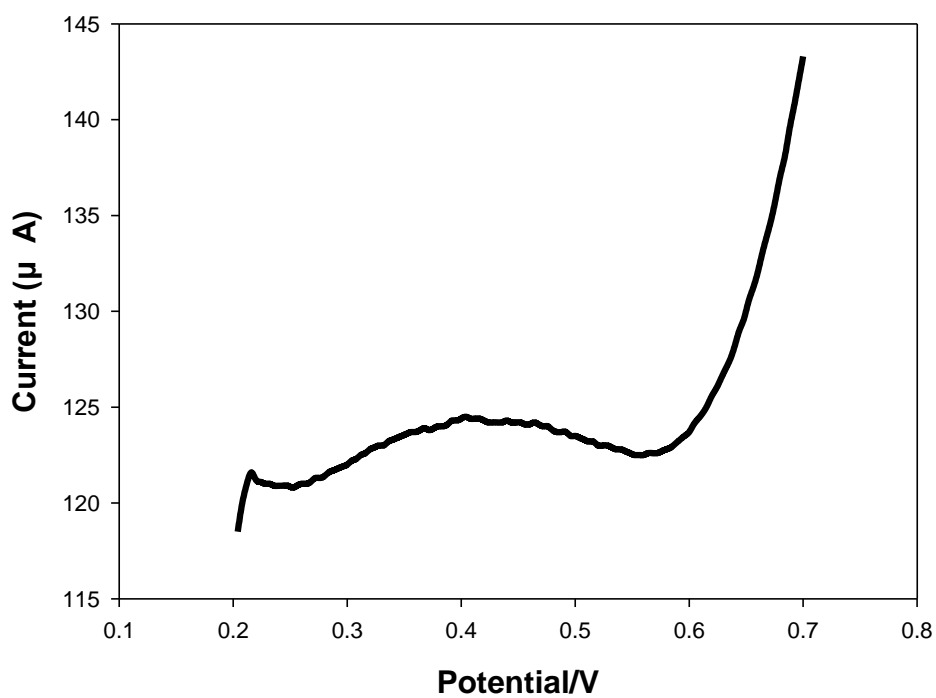


圖 4- 28 BSA 前處理溫度 100°C

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

BSA 前處理加熱溫度：100°C

掃描 Buffer:PBS buffer

掃描範圍 0.2V~0.7V (vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 sec

脈衝週期：0.2sec

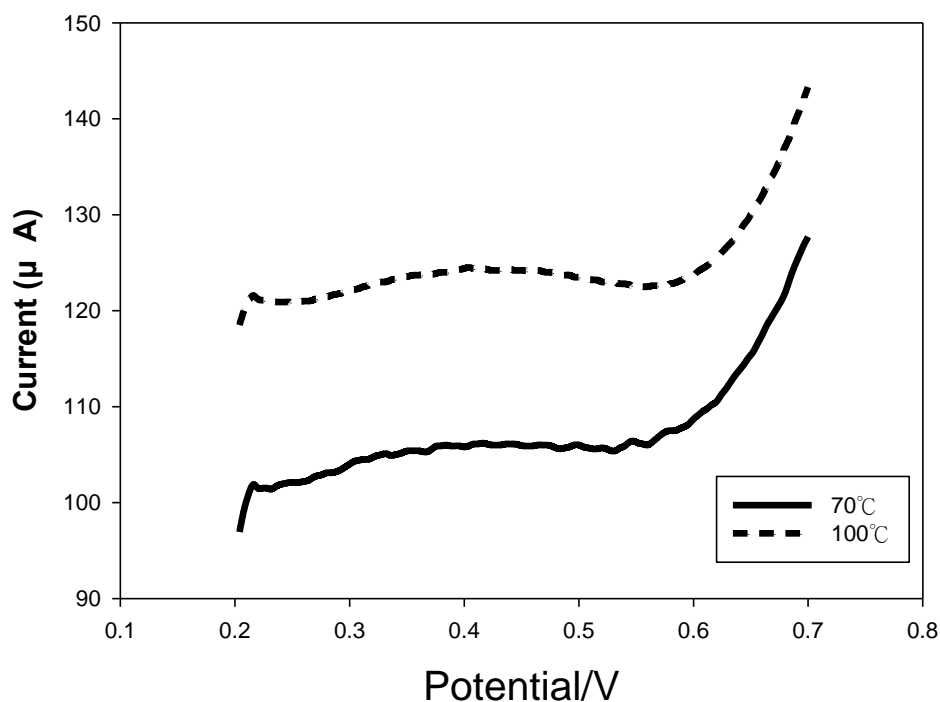


圖 4-29 改變不同 BSA 加熱溫度感測比較圖

圖 4-28 為先將 BSA 前處理加熱溫度調整至 100°C 的感測圖，於掃描電壓約 0.35V 有波峰凸起，另外為了比較是否提高 BSA 加熱溫度能增加感測波峰，故也將前處理溫度 70°C 的感測圖加入比較，從圖 4-29 中可以很明顯發現整體波峰電流值的差異，加熱至 100°C 後，電流值約提高了 $0.2e^{-4}$ A，另外再將圖經由數據處理之後整理成下表：

BSA 加熱溫度	數值	波峰位置 (V)	波峰電流 (μA)	峰高 (μA)
70°C		0.381	105.9	2.3
100°C		0.405	124.5	2.7

表 4- 5 不同 BSA 前處理加熱溫度感測影響

由表 4- 5 中可以知道，當溫度提高為 100°C 後整體的峰高跟電流值都有所提昇，推測可能加熱溫度更高使蛋白質解鏈的更完全，因而使較多的氨基裸露於 PEDOT 的表面，增加了探針 DNA 的接合，進而影響了目標 DNA 雜合的數目，而整體電流值的提升，推測可能因 BSA 加熱溫度提高，解鏈效果提升，增加了電極表面的電子傳遞，而兩個溫度相比較可知選擇 BSA 前處理溫度 100°C，使得最後得到較佳感測的效果。

4-4-2 改變交聯步驟

4-1 章節所提到的 4-ABA 電極製程，其中提到的交聯步驟，是先將製備好的 4-ABA/PEDOT/Pt 電極浸入含探針 DNA 及交聯劑 EDC、NHS 及磷酸 BUFFER 的微量離心管中使其進行交聯，故同樣的將此步驟沿用至 BSA 取代 4-ABA 的電極製程中，將製備好的 BSA/PEDOT/Pt 電極浸入含戊二醛及探針 DNA 及磷酸 BUFFER 的微量離心管中進行交聯，為了優化製程，考慮到了於此種交聯步驟中，是否會導致 BSA 容易先與交聯劑相互接合，而無法專一的達成交聯探針 DNA 的目的，亦即以此交聯步驟進行實驗是否可能使蛋白質與交聯劑相互作用而已，而降低了接合探針 DNA 的效率，導致最終影響目標 DNA 的雜交量，降低了感測訊號，因有此疑慮，故實驗更動交聯步驟是否能增進最終感測的效果，另外也考慮將交聯的時間拉長是否也對於探針 DNA 更有助益指最後感測訊號能有所增加。

首先思考將 BSA/PEDOT/Pt 電極先浸入含戊二醛及磷酸 Buffer 的微量離心管中，使其交聯，並實驗多組浸泡時間相互比較，將電極浸入交聯劑溶液後，再以相同浸泡時間將其浸入含探針 DNA 及磷酸 Buffer 的微量離心管中，以此改變交聯步驟的目的，即可避免只有交聯劑及蛋白質間兩相互作用而無進行接合探針 DNA 的情形產生，依據此步驟，實驗是否交聯劑戊二醛完整的與電極表面的蛋白質作用產

生共價鍵，再浸入探針 DNA 中與探針 DNA 交聯，達成較好的接合效果。

另外原本於 4-ABA 製程之電極，於交聯步驟時的時間為 2 hr，但由於想使 BSA 製程之電極的交聯效果更佳，以提昇最終感測，故除了考慮到了改變交聯步驟之外，另外也加入時間的變因，亦即調整 BSA/PEDOT/Pt 電極浸泡於交聯劑溶液、探針 DNA 溶液中的時間，再加以分析比較，將最終感測圖綜合比較找尋最適化的交聯步驟與交聯時間。



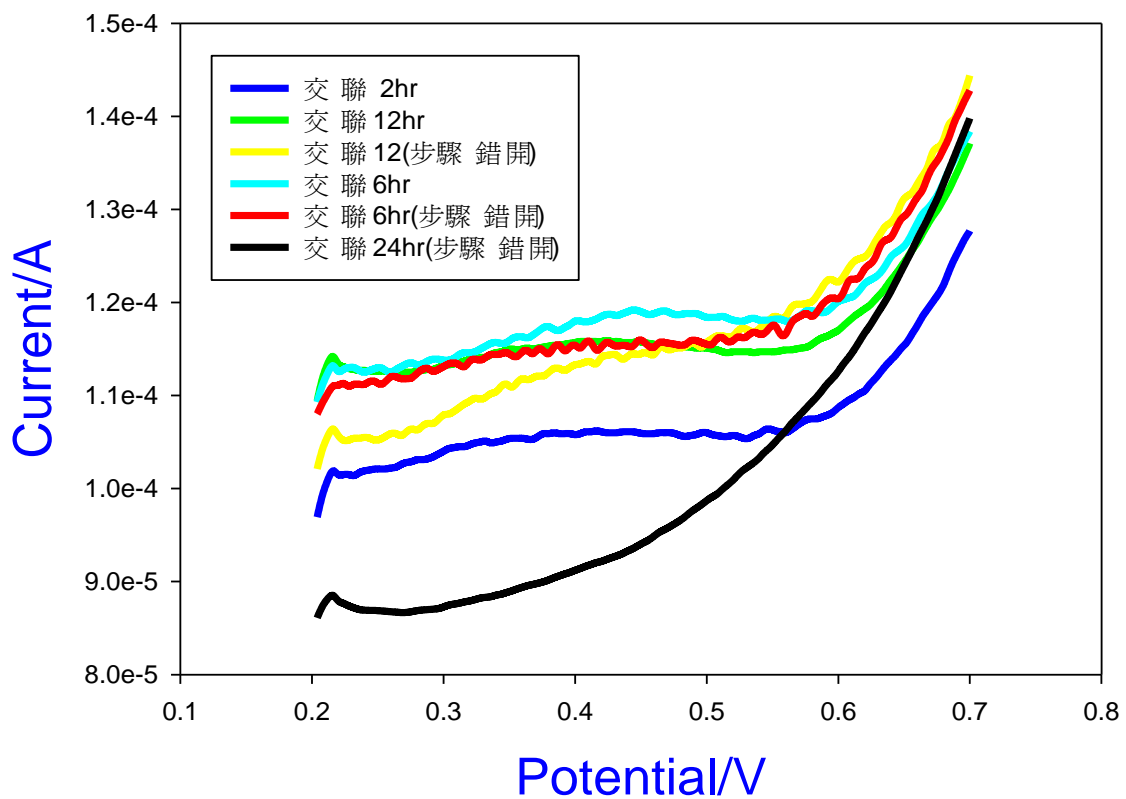


圖 4- 30 改變交聯步驟及時間感測比較圖

由圖 4- 30 可觀察出不同的交聯時間及交聯步驟是否分開的最終感測圖，圖中標示的步驟分開，即是前面所提及的先將電極浸入戊二醛溶液後再浸入探針 DNA 溶液，從圖中可以觀察出將浸泡戊二醛及探針 DNA 的時間各增加到 24hr 後，無波峰產生，感測電流值也較低，故交聯時間不宜太長，導致交聯效果不佳，接著經數據處理後將其他組的數值加以整理後如下表：

交聯步驟 及時間	數值	波峰位置 (V)	波峰電流 (μ A)	峰高 (μ A)
2hr		0.381	105.9	2.3
6hr		0.436	119.2	3.4
6hr(步驟分開)		0.371	115.1	1.8
12hr		0.423	115.9	4.6
12hr(步驟分開)		0.401	113.3	2.5

表 4- 6 改變交聯步驟及時間感測數值比較

從表 4- 6 的整理中可以知道不改變交聯步驟情況下，直接將 BSA/PEDOT/Pt 電極浸入含戊二醛、探針 DNA 及磷酸 Buffer 的管中，經接合目標 DNA 及 DNM 後感測的結果發現，隨著浸泡時間拉長 12hr 時，波峰的呈現最佳，即在不改變交聯步驟的條件下，將時間拉長為 12hr 對於交聯的效果最好，提昇了探針 DNA 與 PEDOT 表面蛋白質的接合效率，故提高了最終的感測波峰。另外觀察將交聯步驟分開，即先將電極浸入戊二醛溶液後再浸入探針 DNA 溶液，更改交聯步驟的感測結果，可以發現時間拉長至 6hr、12hr，步驟分開的最終感測峰高皆不及原本的步驟，故從此實驗可以知道更改交聯步驟對峰高的提昇無助益，但從實驗結果得知依原本的交聯步驟，將交聯時間拉長至 12hr 能得到較佳的感測結果。

4-4-3 優化製程整理

由前幾節的實驗中，對於 BSA 製程之電極有了初步優化的結果，交聯記得使用由結果得知選擇了戊二醛，對於接合探針 DNA 有較佳的效果，另外 BSA 的加熱前處理，可以將溫度提高來增加 BSA 的解鍊，更有利於其嵌入於 PEDOT 表面，使探針 DNA 接合量增加，對於交聯步驟的時間增加至 12 小時亦加強了交聯的效率，這些都對於後續感測的波峰皆有助益。

前面介紹了 BSA 製備之電極的概念及方法，並且針對實驗步驟中許多條件加以調整進行優化，初步製備出的電極對於感測有了些許的結果，但是與 4-ABA 製程相比所感測的訊號大小還是有所差別，故雖然 BSA 製備之電極以實驗的時間看來，其能同時進行多組的實驗，因為其無需像 4-ABA 製程需經由電化學處理的步驟，大大增加了實驗排成的靈活度和實驗時間，但是由實驗結果發現訊號並不如 4-ABA 出色，故思考是否將最後的電化學指示劑調整，看是否對於不同嵌入條件的指示劑，對於 BSA 製程能有產生較佳的訊號。

4-5 電化學指示劑選擇

原本以 4-ABA 提供羧酸基之電極製備，最終是以加入道諾霉素為指示劑，嵌入經與探針 DNA 雜交之目標 DNA 的雙股 DNA(ds-DNA)中，藉以增強電化學 DPV 感測訊號，但由於對於 BSA 製程之電極感測目標 DNA 之效果不明顯，故思考是否找尋其他替代之指示劑來實驗，從文獻中指出，道諾霉素(daunomycin, DNM)、甲烯藍(Methylene Blue, MB)因其皆具有與 DNA 良好的親核力故常用來作為氧化還原的嵌入劑，很容易與 DNA 產生鍵結，另外指出以電化學法將 MB 嵌入於已改質的雙股 DNA 電極上(Liu, 2006)，以循環伏安法掃描，還原峰約落在 -0.25V (Pinar, 2002)，且具有很名顯之感測波峰。(Shana, 1997)

故將實驗步驟最後加入電化學指示劑 DNM 的步驟，改為加入甲烯藍(Methylene Blue, MB)，實驗 BSA 製程之電極是否能感測出訊號及與 4-ABA 製程之電極感測 MB 相互比較。

4-5-1 指示劑改為 MB 後 BSA 製程之電極感測

此實驗主要是將電化學指示劑改為甲烯藍(Methylene Blue, MB)後,以 BSA 製程之電極經 MB 指示劑嵌入雙股 DNA 後能否感測出訊號,故實驗一樣以 BSA 加入量為 1mg/mL、交聯劑為戊二醛、交聯時間 12hr 等前節實驗所決定的較佳之實驗條件進行實驗,最後浸入 MB 後,最後進行 DPV 感測並加以比較感測圖。

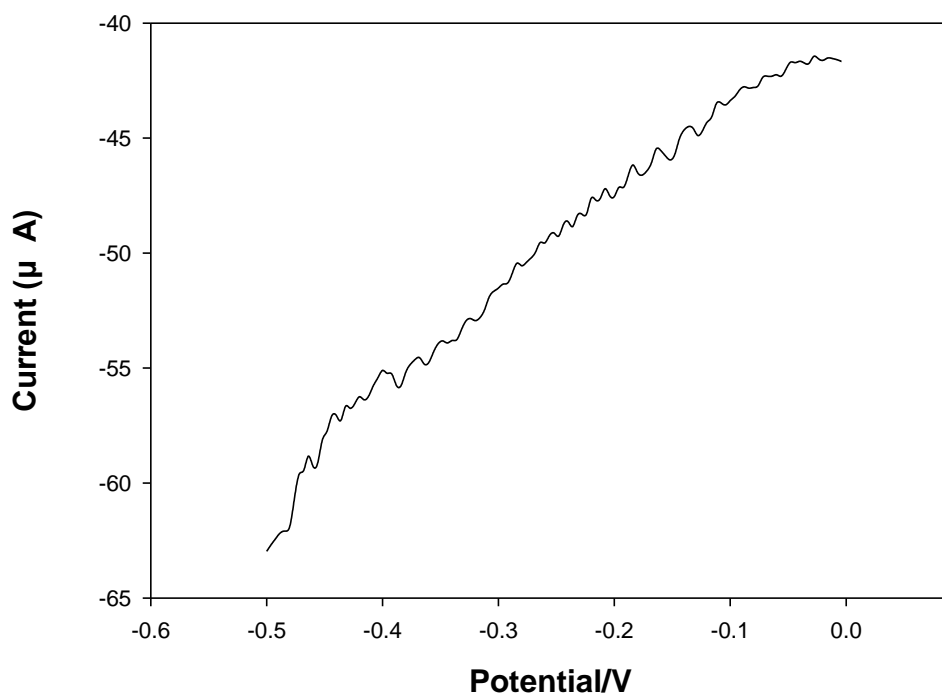


圖 4- 31 電極無盡泡 MB 之感測圖

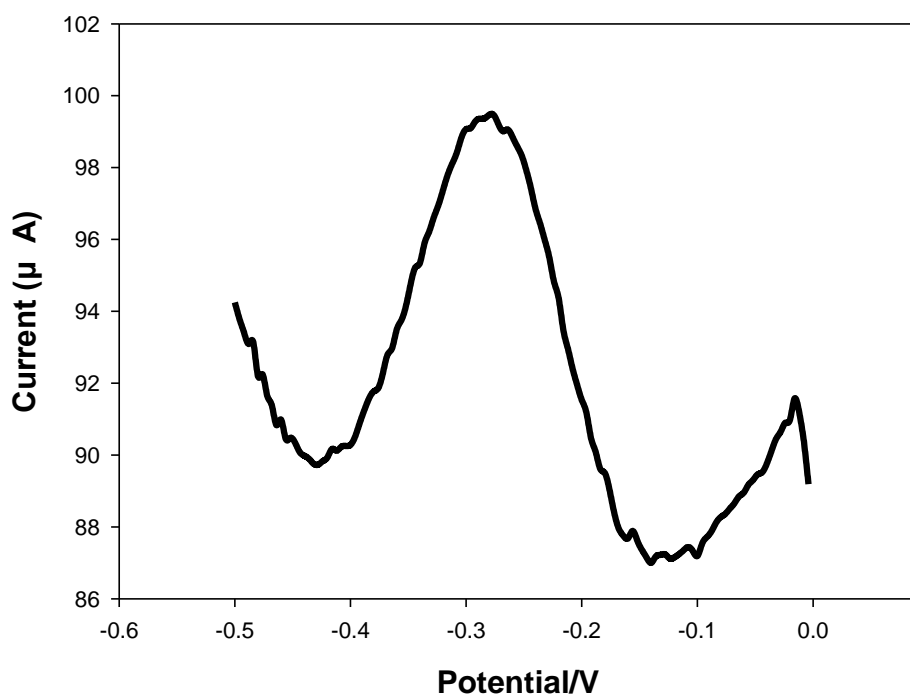


圖 4- 32 交聯劑為 MB 之感測圖

工作電極：ds-DNA/BSA/PEDOT/Pt

電化學指示劑：甲烯藍(Methylene Blue)

交聯劑：戊二醛

交聯時間：12hr

掃描 Buffer：PBS buffer

掃描範圍：-0.5 V~0V

脈衝振幅：50 mV

脈衝週期：0.2sec

圖 4-31 為 DJ2/DJ1/BSA/PEDOT/Pt 電極無浸入 MB，於 PBS buffer 中進行感測，可以發現沒有浸泡電化學指示劑 MB，完全沒有感測波峰的產生，而圖 4-32 為將 BSA 製程之電極浸入與前實驗 DNM 相同濃度的 MB 溶液中後，再於 PBS Buffer 中進行 DPV 感測，從圖中可以發現，與文獻中所知道的 MB 感測波峰掃描電壓約在 -0.25 V ，圖中在此掃描電壓下的確出現了非常明顯之波峰，故推測以 BSA 製程之電極在浸泡 MB 後，能讓 MB 嵌入於雙股 DNA 中產生感測波峰。

4-5-2 BSA 對感測之影響

但為了驗證是否此波峰的產生是目標 DNA 雜交後的雙股 DNA 所造成，故實驗於 BSA 製備之電極實驗中不加入 BSA，此作法即將 BSA 電極製程中在不加入蛋白質的情況下，也就是在 PEDOT 表面無提供基團的情況下，依照理論來推斷，PEDOT 表面若無基團能經由交聯劑與探針 DNA 反應產生鍵結，理應無法使探針固定於 PEDOT 表面，導致之後的目標 DNA 也無法與探針 DNA 進行雜交，而最後也無法經由電化學指示劑嵌入 DNA 產生訊號，依據此理論推測，將相同的 BSA 製備之電極製程實驗步驟中，不進行加入 BSA 的步驟，實驗在其他變因相同的情況下，是否能驗證前節實驗所感測的波峰為 MB 嵌入雙股 DNA 所產生之波峰，亦即能達識別目標 DNA 之目的。

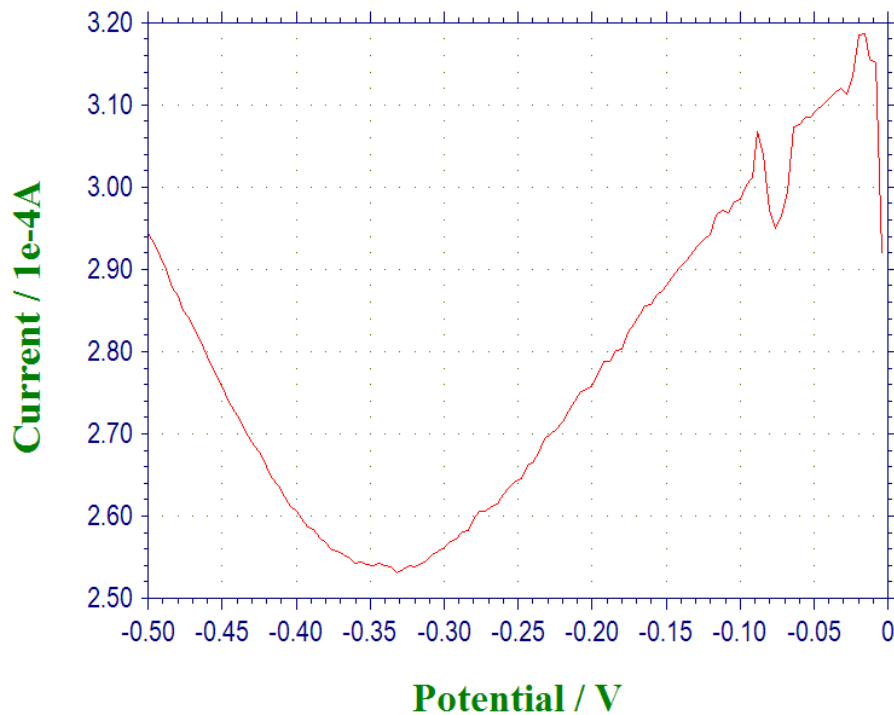


圖 4- 33 無加入 BSA 之電極感測結果

工作電極：BSA 製程之電極不加入 BSA

電化學指示劑：MB ($1 \mu\text{M}$)

交聯劑：戊二醛

交聯時間：12hr

掃描 Buffer：PBS Buffer

掃描範圍： $-0.5\text{V} \sim 0\text{V}$

脈衝振幅：50 mV

脈衝週期：0.2sec

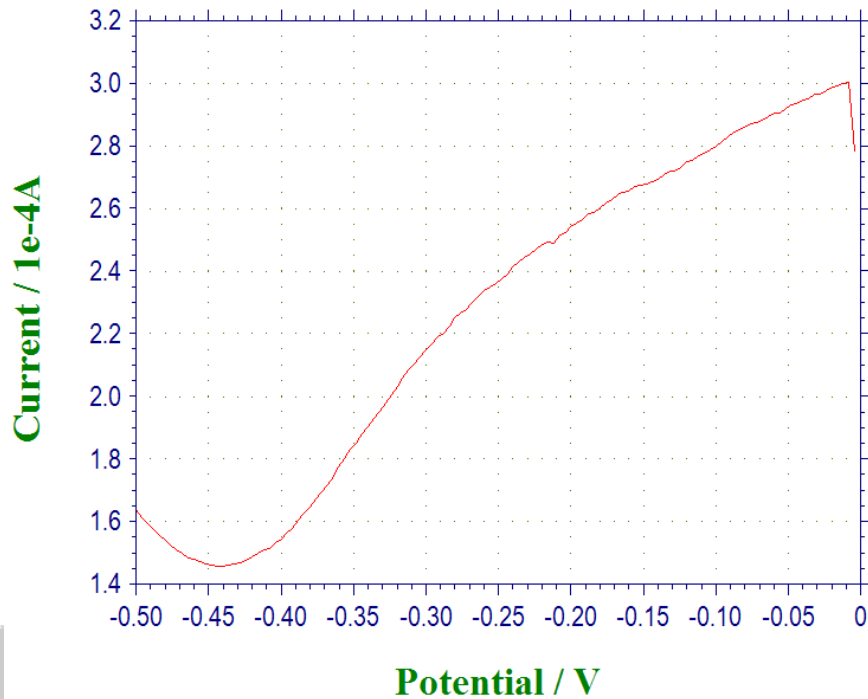


圖 4-34 不同 MB 濃度之無加入 BSA 之電極感測結果

工作電極：BSA 製程之電極不加入 BSA

電化學指示劑：MB (10mM)

交聯劑：戊二醛

交聯時間：12hr

掃描 Buffer：PBS Buffer

掃描範圍：-0.5V ~ 0V

脈衝振幅：50mV

脈衝週期：0.2sec

由圖 4- 33 中可以發現不加入 BSA 之製備電極，從最終加入 MB 後的感測訊號無法感測出波峰，故推測在不加入 BSA 的情況下的確影響了探針 DNA 的固定化，無法透過交聯劑與 PEDOT 表面基團作用形成鍵結，進而使目標 DNA 無法於電極表面行雜交成雙股 DNA，導致 MB 無法嵌入雙股 DNA 產生訊號，故最終感測不出波峰。另外實驗了透過增加電化學指示劑 MB 的濃度來加以實驗是否增加 MB 濃度依然無法感測出訊號，故實驗了將相同電極浸入濃度提升 100 倍之 MB 溶液中，由圖 4- 34 感測結果圖中可知，將浸泡 MB 之濃度提昇 100 倍後依然無法感測出訊號，有此可知此電極無法有效的接合探針 DNA 導致影響雙股 DNA 之雜交，使 MB 的確無法嵌入 DNA 中，故無法產生訊號。

4-5-3 4-ABA 製程之電極改變指示劑感測

由於前實驗改變了指示劑，想要雙重驗證是否探針 DNA 確實與目標 DNA 雜交後形成之雙股 DNA 使電化學指示劑嵌入產生訊號，故將之前實驗結果之 4-ABA 製程之電極，將電極製備好後，最後浸泡電化學指示劑步驟改為浸泡 MB(甲烯藍，Methylene Blue)，實驗是否一樣能在約-0.25 V 的掃描電壓下感測出波峰。

電極製備為將 4-ABA/PEDOT/Pt 製備完成後，浸泡交聯劑及探針 DNA 之磷酸 Buffer 後，浸入目標 DNA，將離心管置於雜合器中進行雜交，最後再浸泡 MB，最終在 PBS 溶液中行 DPV 法掃描，得到感測結果。並將結果與 BSA 製程之電極感測加以比較，並探討波峰高低之原因。

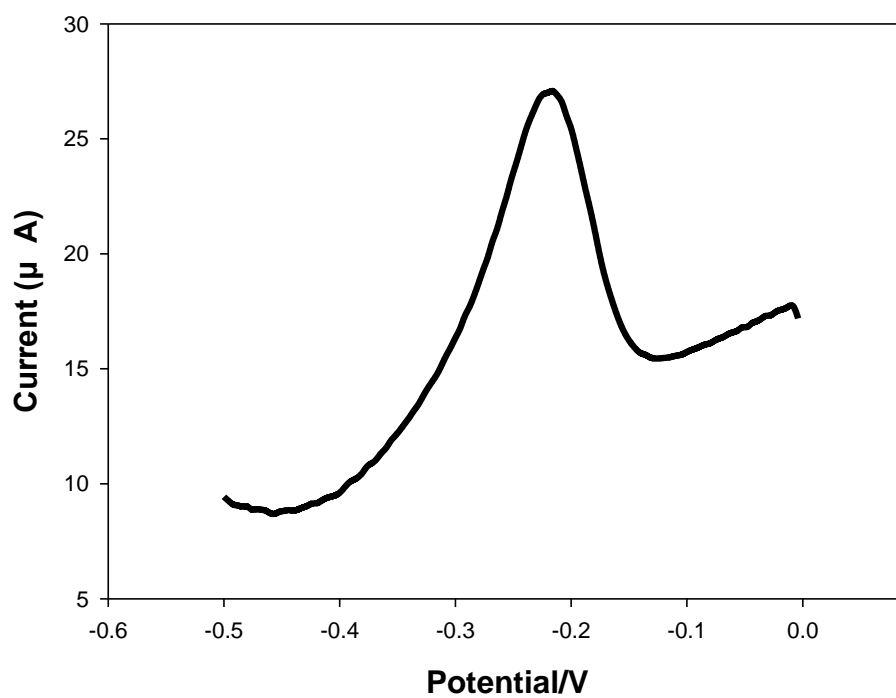


圖 4-35 4-ABA 電極浸泡 MB 感測結果

工作電極：ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

電化學指示劑：MB ($1 \mu\text{M}$)

掃描 Buffer：PBS Buffer

掃描範圍：-0.5V ~ 0V

脈衝振幅：50mV

脈衝週期：0.2sec

由圖 4-35 中可知，DJ2/DJ1/4-ABA/PEDOT/Pt 電極在最後浸泡同 DNM 濃度之 MB 後，掃描電壓約於-0.25 V 時有很明顯的波峰，亦即因電極表面有雜交後的目標雙股 DNA，而 MB 能嵌入其中產生了感測訊號。

故由此實驗可利用前實驗所確立的 4-ABA 製程之電極為能有效感測目標雙股 DNA 之電極，所以利用它來測試是否能對於同樣具有電化學指示劑功能的 MB 一樣能因電極含有雙股 DNA 嵌入之後產生訊號，由感測結果可知，4-ABA 之電極對於浸入 MB 之後的 DPV 感測，能有效的產生訊號，故也因此驗證，確立了可於 BSA 製程之電極最後浸入電化學指示劑 MB 的確能有效的感測目標雙股 DNA。

4-6 4-ABA 製程之電極與 BSA 製程之電極比較

數值 實驗電極	波峰位置 (V)	波峰電流 (μA)	峰高 (μA)
4-ABA 製程之電極	-0.281	27.1	14.0
BSA 製程之電極	-0.219	99.4	11.1

表 4- 7 交聯劑為 MB 不同製程電極感測比較

首先由表 4- 7 的數據整理圖中可以觀察到，整體波峰的電流值中由 BSA 所製備之電極是高於 4-ABA 製程之電極的感測結果，推測由於 4-ABA 因表面結構常因聚合 4-ABA 而有所破壞，而間接影響了電子的傳遞，但由峰高中觀察 4-ABA 電極還是略高於 BSA 製程之電極，說明了固定探針的效果較好，增加了目標 DNA 的雜交數目，由於從其前幾節實驗結果得知，若以道諾霉素為指示劑時，4-ABA 能感測出較明顯的訊號，但實際應用上道諾霉素的條件較為嚴苛，另外 MB 對於一些特別的錯配 DNA 感測效果於應用上較為狹窄。(Treadway, 2002)

兩者製程相比較，BSA 製程對於表面的破壞較低，實驗過程中也可以同時進行多組的實驗，對於簡化製程具有顯著的效益，但對於感測訊號的提昇仍需做更多優化電極的改質等，雖由改變指示劑中得到了感測訊號，但對於道諾霉素的嵌入感測略顯不足，尤須未來加以實驗探討。

第五章 實驗結論與建議

5-1 實驗結論

1. 文章中主要探討以 PEDOT 聚合於白金絲所製備之電極的條件下，經由不同方式的修飾電極，使其能接合探針 DNA 使目標 DNA 能與其雜交，再藉由電化學指示劑放大訊號，而由實驗結果首先對於以對氨基苯甲酸(4-ABA)修飾於 PEDOT 表面提供羧酸根基團使末端修飾氨根之探針 DNA 與其接合，文章中探討了由 PEDOT/Pt 與 4-ABA/PEDOT/Pt 電極掃描赤血鹽的 CV 圖可知，聚合 4-ABA 影響了電極的導電度。另外實驗中為了確認感測訊號，將 4-ABA 製程之電極各步驟之電極皆浸泡電化學指示劑道諾霉素(DNM)後感測 DPV，由結果得知 ds-DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 僅有此電極感測出明顯的訊號，確立了此製程並作為後續探討之依據。
2. 由於研究中發現，將製備好之 PEDOT/Pt 電極表面呈現平滑的結構，放大倍率觀察是有由許多小顆粒所構成的平滑表面，但經由聚合對氨基苯甲酸後，常會使 PEDOT 表面會產生裂縫，進而導致容易讓白金絲裸露，故對於感測有所影響，於文章中實驗了調整製備 PEDOT/Pt 聚合的圈數，由原本聚合的五圈，調整為 10 圈及 20 圈，經由 SEM 觀察其結構，此外也將不同 PEDOT 聚合圈數製備

之電極聚合 4-ABA，同樣由 SEM 觀察結構，由實驗結果可知，掃描圈數 20 圈對於實驗中所使用之白金絲規格條件下，聚合圈數過多導致不管聚合 4-ABA 與否，整體表面皆呈現皺摺狀的堆疊整體結構呈崩裂的狀態，而掃描圈數 10 圈之 PEDOT/Pt 電極呈現比原本掃描 5 圈平整表面上有較大的顆粒狀，經由聚合 4-ABA 後，顆粒狀更為明顯，有些許塊狀的堆疊，但整體結構中卻發現沒有明顯裂縫的產生，推測因 PEDOT/Pt 聚合的圈數增加使 PEDOT 聚合於白金絲上更為緻密結構，降低了文獻中提及的氧化降解的情形，最後由感測的結果相比較聚合 10 圈電極，於較無裂縫的情形下，感測峰仍低於聚合 5 圈之電極感測，故思考對於聚合 4-ABA 的條件能加以調整來增加探針 DNA 的接合效果。

3. 文中除了提到以 4-ABA 修飾 PEDOT 以接合探針 DNA 外，文章中也致力於測試不同的感測電極製備方式，故將原 4-ABA 修飾 PEDOT 改為加入 BSA，藉由聚合 PEDOT 時使 BSA 能嵌入於 PEDOT 表面，並於實驗中首先探討了 BSA 的加入濃度，由感測結果來選擇本製程所需 BSA 加入量選擇為 1 mg/mL，也測試適合本製程之交聯劑，考慮到不同官能基團的接合，實驗了：1. EDC、NHS 2. 戊二醛 3. 甲醛，經由感測後，EDC 及 NHS 由於官能基團所需之不同無法達交聯目的，甲醛因再現性的問題需改進，故實驗結果選擇了許多

研究中常使用的戊二醛來作為製程之交聯劑。

4. 將 BSA 製備之電極基本架構完成後，接著進行製程的優化，首先探討了 BSA 前處理時所加熱的溫度不同，由結論知分別將 BSA 前處理加熱溫度選擇 70 °C 及 100 °C，由實驗感測結果觀察，100 °C 對於 BSA 解鏈的情形更加的完善，使之裸露於 PEDOT 表面更利於探針 DNA 之接合，故優化將 BSA 前處理加熱溫度提高。另外對於交聯步驟及交聯時間也做了不同的探討，由實驗結果更改交聯步驟對於增加感測訊號無實質效益，但經由增加了交聯時間至 12 小時對於感測的結果較好，推測交聯時間過長或過短皆影響了探針 DNA 的接合，故導致了最後感測的結果。
5. 最後實驗中探討了以不同的電化學指示劑，測試 BSA 製程之電極的感測訊號，故將原使用的 DNM 更改為甲烯藍(MB)，由實驗結果，將 BSA 製備之電極感測掃描電壓約於-0.25 V 有很明顯之感測波峰，並由無加入 BSA 所製備之電極浸泡 MB 後感測，無感測訊號，藉此知實驗中 BSA 製備之電極具有感測的效果，另外亦由 4-ABA 製程之電極感測，經由實驗結果相互比較後，雖 BSA 製程之電極感測的電流值較高，但對於接合探針 DNA 的效果略低，影響了感測波峰，故雖然 BSA 製程降低了製程的時間及便利性，但對於如何更強化接合探針 DNA 仍待後續之研究。

5-2 建議

1. 對於對氨基苯甲酸修飾 PEDOT 時對於表面的影響，除了改變 PEDOT/Pt 聚合時的圈數之外，亦可實驗同樣更動聚合 4-ABA 的圈數及掃描方法，由文獻中又提及聚合 4-ABA 使用不同的方法掃描亦或是使用不同的聚合電壓，皆可將變因加入，實驗在不同的聚合 PEDOT 掃描的圈數下能得到不同的結果，以降低裂縫的產生增加感測的結果。
2. 另外對於電極的處理，由許多文獻中有提及，利用塗佈的方式來增加電極的導電性，可實驗將聚合後的 PEDOT/Pt 電極，以塗佈的方式浸泡於 DMSO、THF、sorbitol、Glycerol 等有機溶劑中，並以掃描赤血鹽感測導電性差異，若是對於電極導電的改質有益，能對於感測訊號的幫助有所助益。
3. 以 BSA 製程之電極於電化學指示劑為道諾霉素時的感測效果並不如預期，思考未來能以不同的方式如利用電化學的掃描方法使 BSA 利用電子傳遞的接合接於 PEDOT 的表面，由於接合探針為感測器中很重要的部份，故若以此方式能強化 BSA 於 PEDOT 上的接合，應對於接合探針 DNA 的量能有明顯的助益。
4. 另外對於電極的接合方法，文獻中提到許多利用黃金電極為工作電極，利用硫醇基的鍵結來接合 DNA，可利用此電極簡化製程。

第六章 參考文獻

- Alexey P. Soldatkina, b, E-mail the corresponding author, Jean Montoriolc, E-mail the corresponding author, William Santc, Claude Martelela, Corresponding author contact information, E-mail the corresponding author, Nicole Jaffrezic-Renaulta. (2002). Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and. *Talanta*, *58*, pp. 351 - 357.
- Anish Kumar M. Soyoun Jung Taeksoo Ji . (2011). Protein Biosensors Based on Polymer Nanowires, Carbon. *sensors*, *11*, pp. 5087-5111.
- Audrey Sassolas, Be´atrice D. Leca-Bouvier, and Loïc J. Blum*. (2008). DNA Biosensors and Microarrays. *American Chemical Society*, *108*, pp. 109-139.
- Benyoucef, A., Huerta, F., Vázquez, J. L., Morallon, E. (2005). Synthesis and in situ FTIRS characterization of conducting polymers obtained from aminobenzoic acid isomers at platinum electrodes. *European Polymer Journal*, *41*(4), pp. 843-852.
- Byfield, M. P. and Abuknesha, R. A. (1994). Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors&Bioelectronics*, *9*(373).
- Elicia L. S. Wong, Freya J. Mearns, Justin J. Gooding. (2005). Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer. *Sensors and Actuators B*, *111-112*(7).
- Henry J. Snaith, Henry Kenrick, Marco Chiesa, Richard H. Friend. (2005). Morphological and electronic consequences of modifications to the polymer anode 'PEDOT:PSS' . *Polymer*, *46*(8), 頁 2573 - 2578.
- L. B. Groenendaal, F. Jonas, D. Freitag, H. Pielartzik, and J. R. Reynolds. (2000). Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future. *Advanced Materials*, *12*(7), pp. 481-494.
- L. Groenendaal, G. Zotti², P.-H. Aubert³, S. M. Waybright³, J. R. Reynolds³. (2003). Electrochemistry of Poly(3,4-alkylenedioxythiophene) Derivatives. *Advanced Materials*, *15*(11), pp. 855-879.
- Liu, T. (2006). ELECTROCHEMICAL STUDIES OF ELECTRON TRANSFER.

- California Institute of Technology Pasadena, California.*
- Marco Mascini · Ilaria Palchetti · Giovanna Marrazza. (2000). DNA electrochemical biosensors. *Fresenius J Anal Chem*, 369, pp. 15-22.
- Marquie', C. (2001). Chemical Reactions in Cottonseed Protein Cross-Linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), p. 4676-4681.
- Myszka*, D. G. (1999). Improving biosensor analysis. *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION*, 12, pp. 279 - 284.
- Pinar Kara, Kagan Kerman, Dilsat Ozkan, Burcu Meric, Arzum Erdem,. (2002). Electrochemical genosensor for the detection of interaction. *Electrochemistry Communications*, 4, pp. 705-709.
- Rahman, M., Kumar, Pankaj, Park, Deog-Su, Shim, Yoon-Bo. (2008). Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers. *Sensors*, 8(1), pp. 118-141.
- Rui Ren a, b , Cuicui Leng b , Shusheng Zhang. (2010). A chronocoulometric DNA sensor based on screen-printed electrode doped with. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, pp. 2089 - 2094.
- S. K. M Jönssona, Corresponding author contact information, E-mail the corresponding author, J Birgersonb, X Crispinb, G Greczynskib, W Osikowiczb, A. W Denier van der Gonc, W. R Salaneckb, M Fahlmana. (2003). The effects of solvents on the morphology and sheet resistance. *Synthetic Metals*, 139, 頁 1 - 10.
- Shana O. Kelley and Jacqueline K. Barton*. (1997). Electrochemistry of Methylene Blue Bound to a DNA-Modified. *Bioconjugate Chem*, 8, pp. 31-37.
- T Gregory Drummond1, Michael G Hill2 & Jacqueline K Barton1. (2003). Electrochemical DNA sensors. *Nature biotechnology*, 21(10).
- Tae Young Kim Chang Mo Park, Jong Eun Kim, Kwang S. Suh. (2005). Electronic, chemical and structural change induced by organic. *Synthetic Metals*, 149, 頁 169 - 174.
- Tarushee Ahujaa, Irfan Ahmad Mira, Devendra Kumara, Rajesh. (2008年8月). Potentiometric urea biosensor based on BSA embedded

- surface modified polypyrrole film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(1), 頁 140 - 145.
- Thomas Ming-Hung Lee, † Lu-Lu Li, ‡ and I-Ming Hsing. (2003). Enhanced Electrochemical Detection of DNA. *Langmuir*, 19, pp. 4338 - 4343.
- Treadway, C. R., M. G. Hill, and J. K. Barton. (2002). Charge transport through a molecular [pi]-stack: double helical DNA. *Chemical Physics*, 281(2-3), pp. 409-428.
- 吳森迪, 顧野松. (2011). 探討 DNA 電化學感測器之製程及其於 DNA 分析之應用. 東海大學.
- 汪庆祥, 袁显龙, 焦奎. (2007年6月). 非标记电化学 DNA 杂交指示剂. *化学进展*, 19(6).
- 屈海云 程圭芳 彭惠琦 何品刚 方禹之. (2001年12月). 抗癌药物柔红霉素的光谱电化学研究. *高等学校化学学报*, 22(12).
- 林明瑜、蕭在莒、林群倫、蕭程允、陳文逸、楊裕雄. (2008). 下一代生物感測器發展現況與趨勢. *科儀新知*, 30(3), 頁 64-72.
- 曾楷涵. (2011). 利用外差式光學偏光儀研究三氟乙醇與甘油對膠原蛋白熱變性之影響. 清華大學.
- 賴孟村, 顧野松. (2007). DNA 生物感測器製備及其於 DNA 分析之應用. 東海大學.
- 賴麗珍. (2009). 生物感測器. *科儀新知*, 30(6), 頁 39-46.
- 謝振傑. (2006). 光纖生物感測器. *物理雙月刊*, 28(4).