

東海大學化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

Tunghai University

Master Thesis

電化學接枝芳基重氮化合物法於分析新德里金屬乙內

醯胺酶基因之應用

Electrochemical Grafting of Aryl Diazonium Compounds

for Analysis of the New Delhi Metallo-beta-lactamase

(NDM)-coding Gene

研究生：郭萃敏 (Tsui-Ming Kuo)

指導教授：莊旻傑 博士 (Min-Chieh Chuang, Ph.D.)

中華民國 104 年 1 月

誌謝

剛完成碩士學位的我內心對未來充滿了期待，但在即將離開 LEB 實驗室的同時，也對許多人、事、物覺得感謝與懷念。

最先必須感謝家人的支持並每每給予我關心和鼓勵，對於我的幫助與意義難以簡言表達。回想當初，很謝謝我的指導教授 莊旻傑老師收我當第一個學生，老師對我付出的教導與關心讓我學習到專業上的知識外，也讓我的個性更加堅毅並且養成更好的習慣與看待事物的觀念，身為老師的第一個學生很難得的可以有許多機會讓老師親自教學實驗技巧，也花了許多時間教導我有邏輯性的思考問題，並且提供許多機會到別的實驗室學習不同的技術和研究內容，讓我的視野變廣同時認識了許多的朋友。

特別感謝台灣大學 何佳安老師讓我在實驗室整修的前幾個月在貴實驗室學習，謝謝韋晴、雨萱學姐帶領我進入 DNA 的世界，在我還一竅不通的時候細心的帶著我學習，也感謝當時實驗室的每個同學平時對我的關心與照顧，另外，非常感謝交通大學 李耀坤老師與我們實驗的合作，支持我的研究並使研究內容更加豐富且有意義，謝謝模沅學長幫我合成我所需要的藥品，讓我對有機合成的領域有更深入的了解，也花了許多自己做研究的時間幫助我快速學會電化學接枝芳基重氮化合物的方法，此外還有平常與我一同討論實驗與分享生活的博仁、彰璟、智仁學長和所有的實驗室同仁都對我很好，讓我在交大實驗室的生活感到很自在，也感謝李耀坤老師對我的鼓勵與教導，讓我更有信心做研究。

最後，再次感謝我的指導教授給予我的幫助與教導，讓我可以做我有興趣的生化感測研究，並且讓我學習到許多，也讓我認識許多人，感謝東海大學的所有老師與同學們，在東海大學做學生的這六年多，充滿了記憶與感情，感謝實驗室的學弟妹陪伴我度過每一天，讓我在夜晚的實驗室也生活不孤單，這兩年多的生活充滿的歡笑與回憶，也有艱辛與困難但都走過來了，我覺得很開心完成了我的碩士學位，也感謝我身旁的每一個人，在此致上萬分感謝。

摘要

抗生素的濫用促使病原體產生耐藥性，隨著情況日益嚴重更出現了多重抗藥性的案例，為了避免多重抗藥性基因傳播開來，使用抗生素前的檢測變得極為重要，因此，本研究以含有新德里金屬乙內醯胺酶 (New delhi metallo-beta-lactamase, NDM) 的超級細菌作為偵測目標，發展一個電化學接枝芳基重氮化合物法修飾的核酸感測平台，以達到快速修飾且準確偵測多重抗藥性基因 *bla*_{NDM} 的目標。

藉由同時感測兩段 NDM 活性座的編碼基因與一段對 NDM 具有特異性的基因序列，三段基因序列同時出現時方呈現應答訊號，精確的指出分析物是否對多種乙內醯胺類的抗生素具有抗藥性；其中，我們設計及合成 4-amino-N-(2-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzamido)ethyl)benzamide (MD) 及 3-((4-aminophenyl)dimethylammonio)propane-1-sulfonate (SC)，作為修飾核酸探針及抗表面吸附之用途，使用電化學接枝法將上述兩種芳基重氮化合物修飾於金電極，並預先使用 para-phenylenediamine (PPDA) 進行芳基重氮化合物修飾電極的電化學性質測試與其偶合 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) 形成類似 MD 分子的構形，在自組裝單層膜 (Self-assembly monolayer, SAM) 之抗吸附系統中的感測特性，分析重氮化合物濃度、電化學修飾條件的沈積圈數所造成的改變，隨後於 MD 與 SC 修飾之電極探討重氮化合物修飾方式 (接續沈積或同時沈積)、及兩種重氮化合物濃度比例等對於感測效力的影響，得到 0.1 mM 總重氮化合物濃度並以 1:1 混合比例修飾的平台可達到 S/N 為 19 的感測效力，相較於接續沈積，同時沈積被證實可得到較佳的再現性。我們的研究證實使用電化學還原接枝方法同時將具功能化的兩種芳基重氮化合物修飾於電極表面，相較於傳統經常使用自組裝單層膜的技術，可有效降低修飾時間、簡化所需的步驟、且減少使用的化學藥品，並提供更佳或相等感測特性的抗藥性基因感測平台。

Abstract

The abuse of antibiotics increase pathogens to produce resistance gene then the multidrug resistance gene (MDR gene) emerged with the situation become worse. To prevent the MDR gene spreading, it have to make the right decision for taking the antibiotics. For this reason, we take the superbug having New delhi metallo-beta-lactamase (NDM) be the sample to develop an electrobiosensor which modified by electrochemical grafting diazonium compounds. Construct a rapid-modifying and precise platform to detect the *bla*_{NDM}.

The accurate analysis was supported by detect two encoding gene from binding site of NDM and one specific gene of *bla*_{NDM}, when simultaneously sensing these three genetic sequences to generate output current. On the other side, we synthesize two aniline compounds, 3-((4-aminophenyl)dimethylammonio)propane-1-sulfonate (SC) and 4-amino-N-(2-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzamido)ethyl)benzamide (MD), to use the MD coupling the thiol-modified nucleotide probe, and SC to resist non-specific binding. Diazotized MD and SC to product both aryl diazonium compounds then using electrochemical grafting method to deposition two molecules on the gold electrode. Before to construct the MD and SC modified platform, we use the commercial compounds, para-phenylenediamine (PPDA) coupling m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), and preparing the anti-fouling modified by self-assembly monolayer (SAM) system, then to analyze the electrochemical character of ary diazonium-modified electrode and the effect of modified concentration and cycles with nucleotide sequences detection. After that, consider the conditions of modified PPDA to deposite the MD and SC platform, then study the ways of modified for two compounds (two step or co-deposition) and the ratio of concentration with two compounds to compare the sensing.

Finally, this platform modified by co-deposition MD and SC with the ratio for 1:1 in total concentration 0.1 mM, then obtain the sensing for S/N ratio with 19. This way is better than two step modified process with higher S/N ratio and reproducible. In our research, we succeed using electrochemical grafting method to functionalized surface by diazonium compounds. Comparing to the traditional method of functionalized surface, self-assembly monolayer , the platform have short-term for modified, simple modifying-steps and few chemical material of using, and offer a nice or better electrobiosensor for detecting the MDR gene.



目錄

第一章 緒論.....	1
1.1 超級細菌 (Superbug).....	1
1.2 印度新德里金屬- β -內醯胺酶.....	3
1.3 檢測多重抗藥性的方法	5
1.4 自組裝單層膜 (Self assembly monolayer, SAM).....	7
1.5 芳基重氮化合物	12
第二章 實驗材料與方法.....	17
2.1 藥品與試劑	17
2.2 實驗儀器與材料	19
2.3 去氧核糖核酸 (DNA) 序列.....	20
2.4 合成 4-amino-N-(2-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzamido)ethyl)benzamide (MD).....	22
2.5 合成 3-((4-aminophenyl)dimethylammonio)propane-1-sulfonate (SC).....	25
2.6 對苯二胺 (PPDA) 連接 MBS 修飾的電極製備.....	28
2.7 共沉積 MD 與 SC 修飾的電極製備.....	31
2.8 PPDA 與 MBS 修飾電極之核酸感測.....	32
2.9 MD 與 SC 修飾修飾電極之核酸感測.....	33
2.10 MD 修飾電極的核酸感測.....	34
2.11 SC 修飾電極的抗吸附測試流程.....	35
2.12 兩步驟修飾 MD 與 SC 的電極製備與核酸感測.....	35
2.13 重氮化合物修飾電極的性質測試	35
2.14 芳基重氮化合物修飾電極之 AFM 分析.....	36
2.15 芳基重氮化合物修飾電極之 ATR-FTIR 分析	36

第三章 結果與討論.....	37
3.1 化合物 MD 的結構與功能.....	37
3.2 感測 <i>bla</i> _{NDM} 基因的偵測機制.....	41
3.3 檢測芳基重氮化合物的合成結果.....	43
3.4 電還原芳基重氮化合物的修飾過程.....	44
3.5 電化學接枝芳基重氮化合物的修飾結果.....	45
3.6 PPDA 修飾濃度與 CV 圈數對核酸感測的影響.....	48
3.7 阻礙效應 (Barrier effect) 對核酸感測的影響.....	50
3.8 PPDA 修飾濃度對電極性質的影響.....	52
3.9 不同 PPDA 修飾濃度的核酸感測效果.....	54
3.10 修飾 MD 和 SC 電極的表面檢測.....	57
3.11 MD 修飾條件對核酸感測與電極性質的影響.....	59
3.12 不同濃度 MD 修飾電極的感測效果.....	61
3.13 SC 修飾電極的抗吸附效果.....	62
3.14 兩步驟修飾 MD 與 SC 電極的核酸感測效果.....	63
3.15 共沉積 MD 與 SC 電極的核酸感測效果.....	65
3.16 不同比例共沉積 MD 與 SC 的核酸感測效果.....	67
3.17 不同分析物濃度的核酸感測效力.....	69
第四章 結論.....	70
第五章 參考資料.....	71

圖目錄

圖 1.1 檢測具有 NDM-1 的病原體對不同抗生素的耐藥性 ¹⁴ 。	4
圖 1.2 NDM 水解 β -內醯胺類抗生素的反應機制 ¹⁷ 。	4
圖 1.3 以改良霍奇測試法檢測病原體是否具有耐藥性的感測結果 ³² 。	6
圖 1.4 自組裝單層膜的分子結構與交互作用力 ³⁵ 。	8
圖 1.5 自組裝單層膜的反應機制 ³⁴ 。	8
圖 1.6 以 STM 觀察自組裝單層膜的表面形態 ⁴³ 。	10
圖 1.7 兩步驟形成混合分子的自組裝單層膜示意圖 ⁴⁸ 。	11
圖 1.8 重氮化反應機制圖。	12
圖 1.9 紫外/可見光譜圖，(A) 4-氨基苯甲酸經重氮化反應可能產生的衍生物，(B) 以不同比例的 NaNO_3 進行重氮化反應後的溶液 ⁵⁹ 。	14
圖 1.10 芳基重氮化合物修飾之多層膜產生的反應機制圖 ⁵⁸ 。	15
圖 1.11 以不同電壓進行芳基重氮化合物修飾的表面狀態之 AFM 圖 ⁶¹ 。	15
圖 1.12 以兩種重氮化合物修飾之電極固定酵素的示意圖 ⁶⁹ 。	16
圖 2.1 核酸探針的基因序列選擇流程圖 ⁷² 。	21
圖 2.2 合成 MD 的反應機制圖。	22
圖 2.3 合成 SC 的反應機制圖。	25
圖 2.4 (A) ESI-MS, (B) ^1H NMR, and (C) ^{13}C NMR spectra of aniline-sulfobetaine ⁷³ 。	27
圖 2.5 PPDA 與 MBS 修飾於金電極的反應機制圖。	29
圖 2.6 芳基重氮化合物修飾之自製電化學反應槽。	30
圖 2.7 共沉積 SC 和 MD 於金電極的反應機制圖。	32
圖 2.8 核酸序列感測流程的示意圖。	34
圖 3.1 重氮化合物 MD 之 ^1H -NMR (300MHz, d_6 -DMSO, 25 °C) 鑑定圖譜。	38
圖 3.2 重氮化合物 MD 之 ^{13}C -NMR (75MHz, d_6 -DMSO, 25°C) 鑑定圖譜。	39

圖 3.3 重氮化合物 MD 之 ESI-Mass 鑑定圖譜。	40
圖 3.4 多重抗藥性 <i>bla</i> _{NDM} 的核酸序列偵測機制示意圖。	42
圖 3.5 (A) 葡萄糖氧化酶和辣根過氧化酶的酵素催化反應式 (B) 四甲基聯 苯胺 (TMB) 於空白金電極上的循環伏安圖。	42
圖 3.6 以紫外/可見光光譜圖觀察重氮化反應後芳基重氮化合物的形成。 ..	43
圖 3.7 以電化學接枝法修飾芳基重氮化合物的循環伏安圖。	44
圖 3.8 (A) 修飾前空白金電極；(B) 0.2 mM PPDA 修飾電極，表面形態的 3D AFM 影像圖。	46
圖 3.9 (A) 修飾前空白金電極；(B) 0.2 mM PPDA 修飾電極，表面形態的 2D AFM 影像圖。	46
圖 3.10 PPDA 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。	47
圖 3.11 不同 PPDA 濃度和 CV 圈數修飾對核酸序列感測電流值的影響。	49
圖 3.12 不同 PPDA 條件修飾後的 (A) 核酸感測平台得到的電流值，(B) 核酸 感測後的受質溶液呈色變化，(C) 感測 TMB 緩衝溶液的循環伏圖。	51
圖 3.13 不同 PPDA 濃度修飾後的 (A) 電極表面示意圖，(B) 感測 TMB 緩衝 溶液的循環伏安圖。	53
圖 3.14 不同 PPDA 修飾濃度對核酸序列感測電流值的影響。	55
圖 3.15 不同 PPDA 修飾濃度對核酸序列感測後所得到 TMB _{ox} 吸收值 (650 nm) 的影響。	56
圖 3.16 MD 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。	58
圖 3.17 SC 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。	58
圖 3.18 不同 MD 條件修飾電極的 (A) 核酸感測電流值，(B) 核酸感測後的 受質溶液呈色情況，(C) 核酸感測後的受質溶液於 650 nm 的 TMB _{ox} 吸收值，(D) 感測 TMB 緩衝溶液的循環伏安圖。	60

圖 3.19 不同濃度 MD 修飾後的核酸感測電流值。.....61

圖 3.20 比較空白金電極與 0.1 mM SC 修飾電極的背景電流值大小。.....62

圖 3.21 兩步驟修飾 MD 與 SC 的 (A) 核酸感測電流訊號，(B) 機制示意圖。
.....64

圖 3.22 最佳化的 SC 與 MD 共沉積於感測平台的檢測效果。.....66

圖 3.23 不同比例共沉積 SC 與 MD 後的核酸感測電流值。.....68

圖 3.24 不同濃度分析物濃度所偵測得電流值。.....69



第一章 緒論

1.1 超級細菌 (Superbug)

1961 年，第一種超級細菌金黃葡萄球菌 (Multiple-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 出現¹，此病原體於當時抑制住多種抗生素的藥效，甚至最後一線所使用的廣效性抗生素仍無法抑制，造成病情難以控制且快速蔓延至世界各處。隨後將此類對多種抗生素具有耐藥性的多重抗藥性 (Multidrug resistant; MDR) 微生物稱為超級細菌^{1,2}。自 1960 年代，具有多重抗藥性的超級細菌不斷產生並造成全球性的公共衛生安全問題，如抗萬古黴素腸球菌² (Vancomycin resistance enterococcus, VRE)、內含克雷伯肺炎桿菌碳青黴烯酶³ (Klebsiella pneumoniae carbapenemase, KPC) 的病原體和 2008 年發現具有新德里金屬-β-內醯胺酶 (New delhi metallo-beta-lactamase, NDM) 的細菌⁴等。

超級細菌的產生應歸咎於抗生素的濫用，促使其形成的主因可區分為兩類，第一類是病原體本身具有抗藥性時，病人服用不適當的抗生素或是不足的劑量，使體內大多數的細菌死亡而具有耐藥性的細菌在沒有其他細菌競爭的環境下大量生長，進而增加抗藥性細菌的數量；第二類為細菌受到抗生素的刺激時，進行細胞壓力反應以穩定外來的刺激，這類反應大多會產生超氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 副產物，細菌膜內含有過量的 ROS 時將使基因受到破壞，增加基因突變的機率，也等於提高抗藥性基因的產生⁵⁻⁷。抗藥性基因源自於基因的突變，正常細胞在生長與分裂的過程中發生基因突變的機率小於十萬分之一，但在抗生素濫用的情況下則促使抗藥性基因自病原體內產生，提高對抗生素具有耐藥性的機率，使得人類無法使用第一線抗生素有效的控制住病情。

世界衛生組織 (World health organization, WHO) 於 2014 年的報導中提出了一段警訊，指出病原體對當今所使用的抗生素具抗藥性，將成為嚴重的世界衛生問題，當病原體對抗生素耐藥性的情況越來越普遍時，代表人們將面對沒有抗生素可以醫治病情的情況。伴隨這個情況將產生醫院的醫療費用增高及病情不易控制等問題⁸，由於抗藥性的案例增加，醫院無法使用便宜且低副作用的一線抗生素有效地治療病人，取而代之的第二線抗生素不僅價格昂貴且具較明顯副作用，將威脅公共衛生安全與社會經濟負擔^{8,9}。尤其近年來所出現的超級細菌需使用最後一線的抗生素才得以控制病情，醫療上的困難將從提高的醫療成本與副作用增加演變成抗生素研發的困難，這個現象亦從近 20 年來新型抗生素的誕生逐年減少得到證實⁸，當新型藥物的研發不足，具抗藥性病菌卻快速增加，不久的將來，全球的病情將可能無法再依賴抗生素獲得治療¹⁰。



1.2 印度新德里金屬-β-內醯胺酶

2008 年，新型的超級細菌在印度首都新德里出現，造成病原體具有多重抗藥性的酵素被命名為印度新德里金屬-β-內醯胺酶 (New delhi metallo-beta-lactamase, NDM)^{4,11}，其為碳青黴烯酶類 (Carbapenemases) 的一種¹²，可讓多種 β-內醯胺類抗生素被水解後失去原有的藥效，這使得作為最後一道防線的碳青黴烯類抗生素也無法克制病原體的生長，目前大多的案例僅剩老虎黴素 (Tygacil) 及克痢黴素 (Colistin) 可以有效治療病情¹²⁻¹⁴ (圖 1.1)。

第一個病例發現於一位於瑞典旅行的印度病患，表現此 NDM 酵素的編碼基因被命名為 *bla_{NDM-1}*^{4,14,15}。常見具有 NDM 的超級細菌包括克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumonia*) 和大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，由於一開始 *bla_{NDM-1}* 的序列是存在於質粒 (Plasmid) 上¹⁵，此特性使得 NDM 的編碼基因可以利用水平轉移傳給同種或其他種的菌株，這類的傳播方式較大多數位於染色體上的抗藥性基因更容易造成傳染¹⁶，目前病情的蔓延方式主要藉由到疫區旅行的遊客帶至其他地區，而其感染的能力和發病症狀則與帶有 *bla_{NDM-1}* 菌株的不同而改變。

NDM 為一種 β-內醯胺酶，以 β-內醯胺為骨架的抗生素為基質進行水解反應。然而，β-內醯胺酶分為四大類，分別為 Class A、B、C、D¹⁷⁻¹⁹，其中 Class A、C、D 的活性位點是利用酵素上的絲胺酸 (Serine) 與基質進行交互作用，而 Class B 與其他類不同的地方則是一或二個鋅離子做為活性中心以維持其酵素活性度，因此 Class B 這類的金屬蛋白質 (Metalloproteins) 也被稱為金屬 β-內醯胺酶¹⁸⁻²¹。其與 β-內醯胺類基質的作用機制為打斷碳氮鍵使其內醯胺環開啓後失去抗生素的功效¹⁹⁻²¹ (圖 1.2)，觀察 NDM 與不同抗生素結合後的晶體結構可以發現，水解反應的進行主要是當抗生素與 NDM 活性座結合後，藉由將受質與酵素的距離拉

近促使開環的反應，部份情況亦和受質與鄰近胺基酸殘基產生氫鍵以穩定抗生素與 NDM 結合的構形才得以使抗生素被水解¹⁷，透過了解 NDM 與抗生素的交互作用與反應機制有助於發展避免抗藥性的研究。

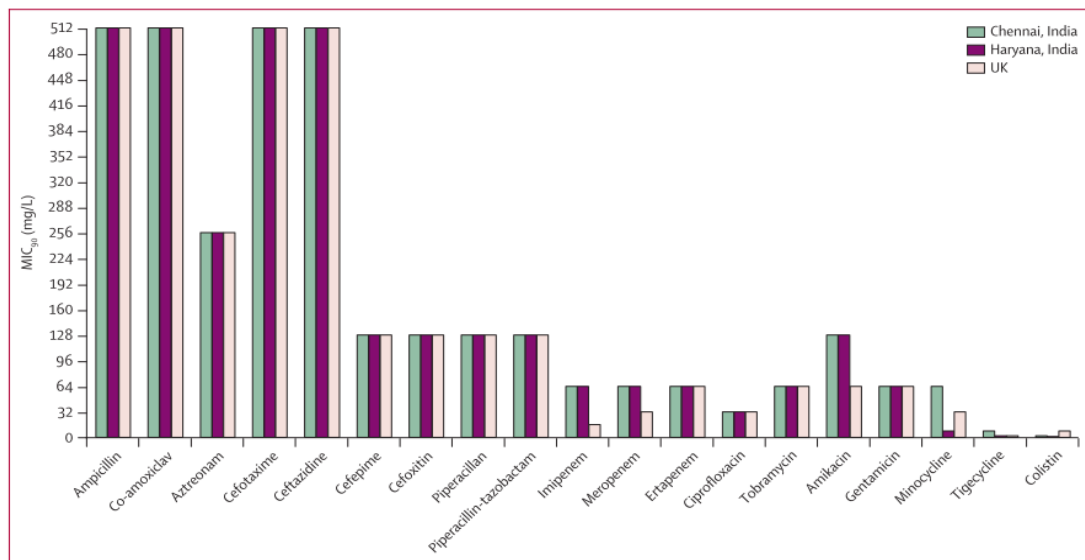


圖 1.1 檢測具有 NDM-1 的病原體對不同抗生素的耐藥性¹⁴。

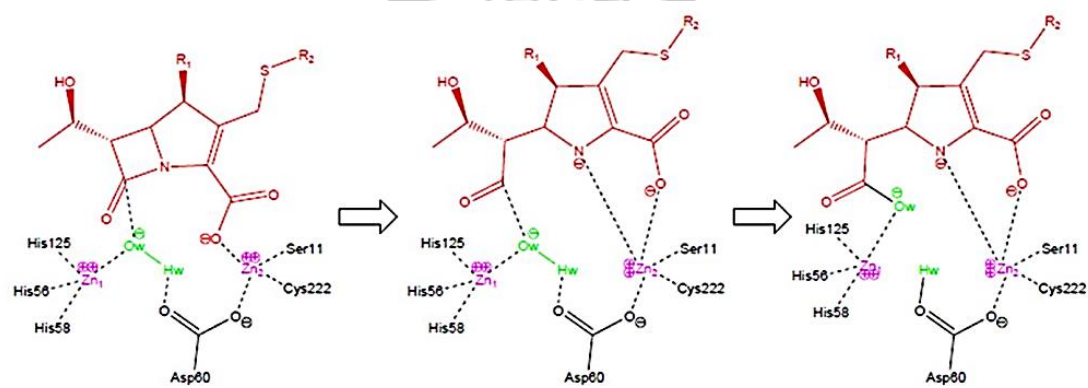


圖 1.2 NDM 水解 β-內醯胺類抗生素的反應機制¹⁷。

1.3 檢測多重抗藥性的方法

抗生素的不當使用促使病原體產生抗藥性，為了避免此情況日益嚴重且甚至面臨可治療的抗生素普遍失效，因此研發許多技術用於偵測病原體是否具有抗藥性並提供醫院的做為檢測，目前主要的偵測方法分為兩類^{21,22}，第一類是檢測病原體抗藥性的效力，第二類是以生物分子檢測來進行抗藥性基因的辨識。抗藥性效力的分析方法有 Epsilometer 測試²³ (Epsilometer test, Etest)、改良霍奇測試^{24,25} (Modified hodge test, MHT)、紫外光光譜儀²¹ (UV spectrophotometry) 等，皆須經細胞培養後做抗生素添加，隨後觀察細胞是否有因為抗生素的處理而死亡或是抗生素的結構是否被水解使得原來的抗生素的紫外光吸收值改變。而偵測特異性基因 (Specific gene) 的方法有基因定序²⁶ (Genetic sequencing)、即時聚合酶連鎖反應²⁷ (Real time polymerase chain reaction, qPCR)、探針雜交 (Probe hybridization) 等，可偵測分析物中是否具有抗藥性基因序列。

偵測特異性基因的方法中，常見的分析方法是利用即時聚合酶連鎖反應做分析，必須先經過 PCR 的方式將欲偵測的片段放大，再利用分子信籤 (Molecular beacon) 做為特異性基因序列的分子探針，當特異性基因序列與分子信籤互補時則會藉由雜合反應將分子信籤的構型打開，最後偵測分子信籤上修飾的螢光染劑所放出的螢光訊號大小做分析和定量^{28,29}。然而，從檢體萃取出來的 DNA 首先會先經過 PCR 放大的方式將分析樣品的量增加並且讓偵測序列變短以利於分子探針的感測，因此必須設計兩段 PCR 反應時所使用的引子 (Primer) 與偵測特異性基因分子信籤探針，然而，這類的偵測方法只能用於基因序列已被確認的偵測目標且其花費較高並需專業的技術人員進行核酸序列設計與數據的分析，不過生物分子檢測的方法具有高準確性與靈敏度且可較快速的得到分析結果^{21,27-29}。

抗藥性效力的分析方法主要以細胞培養的方式去觀察病原體是否具有耐藥性。其中經常使用的是改良霍奇測試^{30,31}，是將瓊脂培養基塗抹上一般不具抗藥性的菌株（如大腸桿菌）並將含有抗生素的紙錠輕壓固定於培養基的中心，隨後將欲測試的病原體由中心往培養皿的邊緣塗抹一條直線，讓此培養皿於 37°C 下反應 24 小時後觀察細胞生長的狀態，如圖 1.3 所示，當抗生素經瓊脂擴散後抑制了一般菌株在紙錠周圍的生長並在培養皿中心產生一圈透明環，但同時可以發現若測試的病原體對此抗生素具有抗藥性時，則細胞仍有往中心生長的情況，表示檢測的病原體對此抗生素是有耐藥性的³²。將以改良霍奇測試得到的結果藉由基因檢測的方式進行驗證時卻發現其中的誤判的比率可高達 32 %³³，因此這樣的檢測方式較適合用於研究的初步檢驗，但對實際應用於醫療檢驗上仍是有疑慮的。

有效預防抗藥性的情況傳播開來必須依靠病人正確的服用對的抗生素，因此醫院在以抗生素做為醫療時的選用變得加倍重要，若可以提供一個便宜、快速且準確性高的分析方法則可使病原體產生抗藥性的機率降低並將具有抗藥性的微生物抑制，將減少病人服用藥物的劑量且避免疫情更加嚴重。

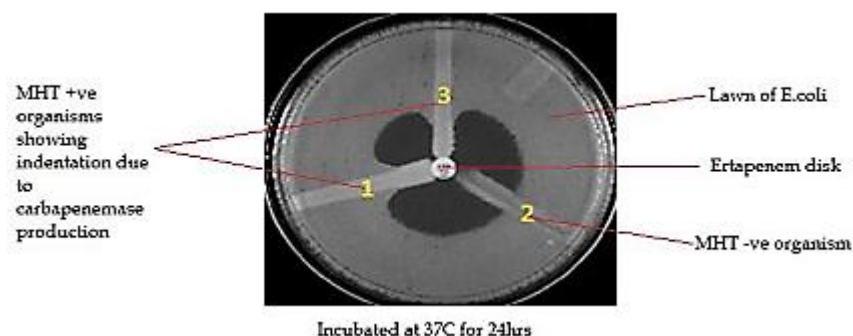


圖 1.3 以改良霍奇測試法檢測病原體是否具有耐藥性的感測結果³²。

1.4 自組裝單層膜 (Self assembly monolayer, SAM)

表面修飾的技術廣泛應用於各個領域，伴隨著修飾上物質的不同使基材有物理、化學或是生物性質上的改變，然而，奈米科學的領域裡以自組裝單層膜修飾表面為其中一種常見的方法，經自發反應有效的在基材表面形成一有序的單分子層，以達成改變基材性質或連接欲固定的受體於表面³⁴⁻³⁶，大多利用此修飾改變表面的濕潤、黏度、電子傳遞效能，以及應用於生物模擬、生物辨識或是奈米與微米等級的裝置建構³⁴。

1946年 Zisman 首先以自組裝單層膜修飾鉑金屬表面，藉由有機小分子與基材具有特異性吸附，經長時間的自發性反應形成排列整齊的單分子層。此類的分子是由三個部分所組成，分別為頭基 (Head group)、長鏈分子 (Spacer group) 和末端基 (Terminal group)；其與基材上的作用如圖 1.4 所示，頭基與特定基材產生化學性吸附並讓分子有效的固定於表面；長鏈分子大多是由烷碳鏈組成，藉由各分子間碳鏈和碳鏈的交互作用力 (如凡得瓦爾力) 使分子排列的整齊有序；末端基則可藉由表面具有的特殊官能基以改變基材的性質。修飾的過程 (如圖 1.5) 通常是將基材表面浸於含有小分子的液體中，分子經擴散作用靠近表面並以物理性吸附的方式附著，隨後分子上的頭基與基材產生化學吸附將分子固定，當固定於表面的分子數量增多時分子間開始產生排列的現象，經由長時間的反應使分子逐漸排列成有序的狀態。常見的自組裝單層膜有三類：有機矽烷 (Alkylsilane) 於二氧化矽上形成 Si-O 鍵、烷基硫醇 (Alkylthiol) Au-S 的作用力固定於金，以及羧酸基分子吸附於金屬氧化物 (如 Al_2O_3) 所形成的分子層。

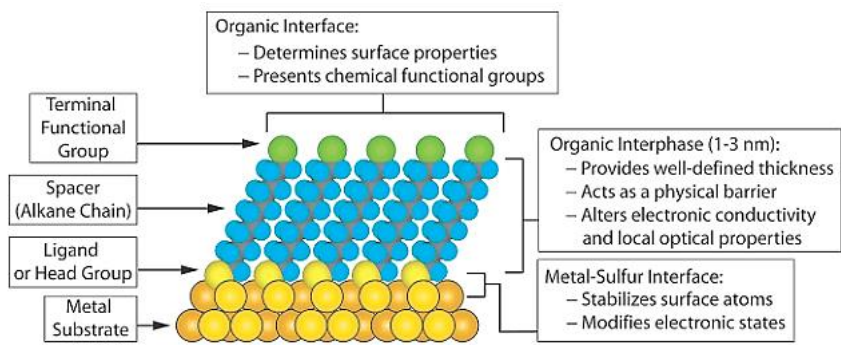


圖 1.4 自組裝單層膜的分子結構與交互作用力³⁵。

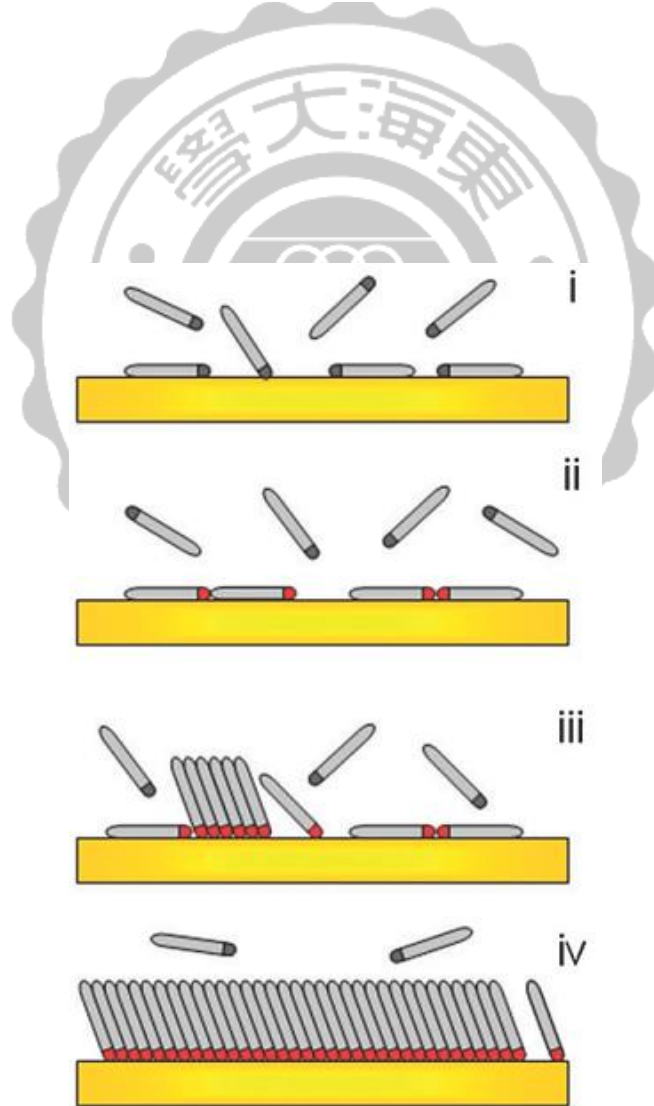


圖 1.5 自組裝單層膜的反應機制³⁴。

自組裝單層膜的形成方法簡易，然而要有效的控制分子層所建構的狀態與分布卻相較不容易。分子排列的速率與形態受到許多因素影響，例如反應的時間與溫度、吸附物的濃度和性質、基材的乾淨度、溶劑的種類等^{36,37}，許多反應條件皆會使形成的單層膜有所不同，基材表面的純淨度不佳會使頭基與基材間作用力降低，造成表層排列的分子狀態不穩定且零亂；反應時所使用分子濃度和反應溫度的高低皆會改變單層膜形成的快慢和密度³⁸，通常所使用的濃度範圍為 1 μM ~ 1 mM 並反應 12~18 小時以完成自組裝單層膜的修飾，若將反應的時間加長分子依舊會持續排列，表面的狀態在 7~10 天內仍會有變化³⁷，因此若要精確的控制單分子層的形態和密度，必須有效的掌控許多的反應條件才可以修飾出理想的單分子膜。

良好的控制反應條件可有效的形成理想的自組裝單層膜，但有機分子於基材表面建構的過程與分子排列的形態則需要以微觀的方式進行分析。於 80 年代，自組裝單層膜廣泛被應用在修飾基材的同時，掃描穿隧式顯微鏡 (Scanning tunneling microscopy, STM) 被發明，隨後開啟了以分子層級觀察自組裝單層膜的形成與構造，利用原子力顯微鏡 (Atomic force microscope, AFM) 與 STM 是最常見的觀察方法，其中以經常使用的烷基硫醇分子吸附於金上所形成的單分子膜為例³⁹⁻⁴¹，因為金在大氣中不易氧化，硫醇分子可有效的吸附於表面形成 Au-S 鍵結，但其吸附上的分子密度則受到金表面金屬晶格排列的影響，一般烷基硫醇分子吸附於金上的排列被視為 $\sqrt{3}\times\sqrt{3}R30^\circ$ 的排列結構^{40,41}，而由圖 1.6 所示，推論自組裝單層膜的形成是以先吸附上基材的分子做為核心，伴隨著其他分子的聚集形成同一方向排列的分子區塊，隨著分子區塊的面積增長則會遇到由不同核心所形成的分子區塊，因排列的方向性不具一致性而使不同分子區塊交界處產生邊

界的缺陷或是空洞，則讓分子層的排列狀態不均勻^{38,42,43}。除此之外，當吸附分子的結構不同也會改變分子排列的規則性，如 Snow 等人⁴⁴以 X 射線光電子能譜儀 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 的研究發現，不同的碳數的鏈長和修飾的步驟或方法都會造成不同的單分子層，其中以直接讓單一分子吸附的實驗中可觀察到碳鏈的長度越長，排列於表面的分子越多；而以分次修飾烷基與羧酸基硫醇分子的實驗發現，碳鏈越長的分子越容易被隨後修飾上的羧酸基分子取代，表示由長碳鏈吸附分子所形成的分子膜結構較穩定。藉由儀器觀察自組裝單層膜表面分子的排列，則可以發現分子與分子間的排列狀態在不同條件下的構形改變和密度的不同。

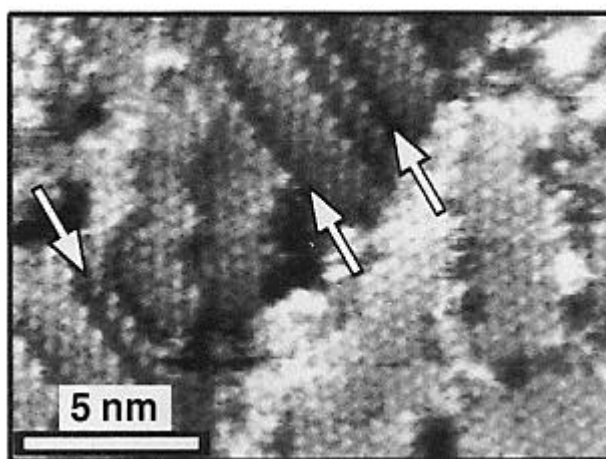


圖 1.6 以 STM 觀察自組裝單層膜的表面形態⁴³。(白色箭頭所指的位置為不同分子區塊邊界所形成的空白處)

將表面修飾上有機分子層並藉由分子末端所露出的官能基不同可應用於許多領域，然而，於生物模擬⁴⁵、分子檢驗⁴⁶或細胞培養⁴⁷等研究中，時常需要利用表面修飾上不同的官能基以有效的固定多種分子或模擬出多功能的生物形態，

此時將兩種或兩種以上的分子共同吸附於表面形成一個混合的單分子層是一種廣泛使用的方法，其主要的修飾方式是將基材浸入多種硫醇分子的混合液中，使不同的分子同時吸附於表面以完成多種官能基修飾於表面的目標。如前文所述，分子膜的形成是由多個核心經分子聚集後產生不同方向性的分子層⁴¹，而相同的分子傾向聚集在一起，造成表面呈現不同種類分子聚集的區塊，而 Lennox 等人⁴⁸以分次修飾兩種分子於基材的方式形成混合的單分子層，如圖 1.7 所示，起初單一分子修飾的表層中含有未吸附的空白區塊與不同排列方向的分子層，隨後修飾上的另一種分子會先吸附於空白處，經反應時間增長，後修飾上的吸附物質將原本排列不規則的分子以替代與脫去的方式移除表面，最後達到一個穩定的分布狀態。多種吸附物質組成的分子層為不均勻的表面且空白區域較多，因此修飾上分子的密度通常也較低^{40,41}。

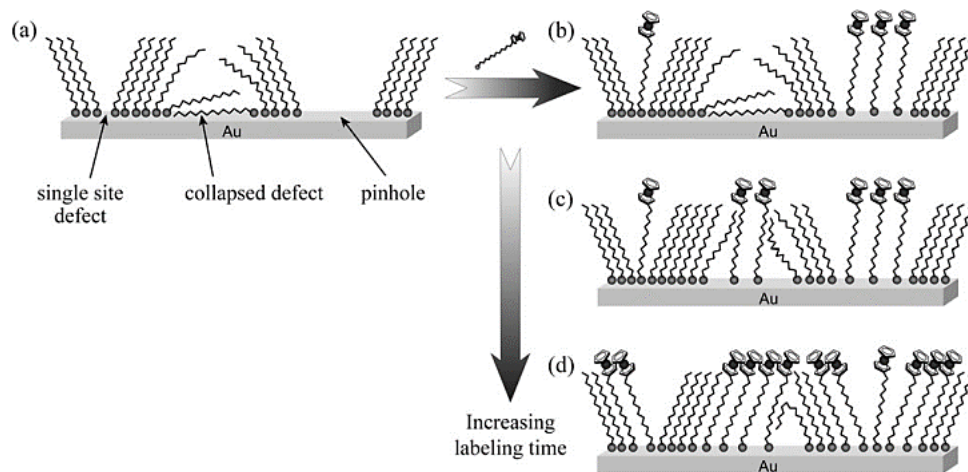


圖 1.7 兩步驟形成混合分子的自組裝單層膜示意圖⁴⁸。

1.5 芳基重氮化合物

芳基重氮化合物是苯胺與亞硝酸鹽於酸性環境下反應後所產生的產物，由 Peter Griess 在 1858 年提出並將此反應命名為重氮化反應 (Diazotation)⁴⁹。直至 1992 年 Pinson 首次將此化合物修飾於碳電極上作為表面修飾連接物⁵⁰，並於近二十幾年來的研究中做為另一種有效的表面修飾技術，大多應用於金屬 (Au, Ag, Cu)、半導體 (Si, GaAs) 或聚合物的修飾⁵¹⁻⁵³。

芳基重氮化合物在酸性的水溶液中製備，於室溫環境下結構不穩定，末端的偶氮基容易脫去形成氮氣，因此進行重氮化反應時應於低溫進行，可藉由將其合成為氟硼酸重氮鹽的方式將其固化後乾燥存放⁵¹。合成此化合物的反應機制如圖 1.8 所示，亞硝酸根在酸性溶液中經質子化產生亞硝離子 (Nitrosonium ion) 後再與苯胺上的一級胺反應形成芳基重氮化合物，此時若將基材浸入芳基重氮化合物的溶液中，並使用電化學法施加電壓使芳基重氮化合物還原成芳基自由基，隨後與基材產生共價鍵則完成基材表面芳基化的修飾，修飾後的基材大多會隨著固定上芳基化合物的數量和厚度的不同，造成基材在感測物質電子傳遞的效果受到修飾物的阻礙效應 (Barrier effect)^{51, 54}，使得基材在感測電化學物質的氧化還原電流值時得到較低的訊號值。

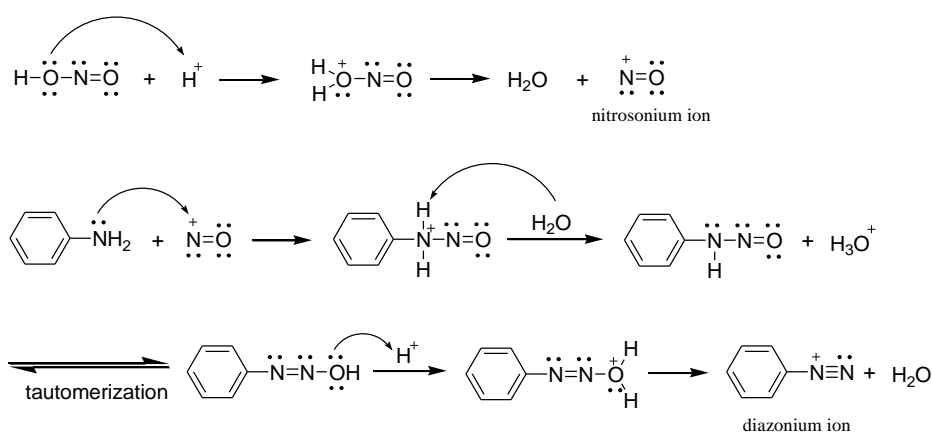


圖 1.8 重氮化反應機制圖。

影響表面修飾後形態的因素可以分為兩大類，第一部分是修飾溶液的組成⁵⁴，第二部分是修飾方法。修飾溶液的組成會因重氮化反應時的苯胺化合物濃度⁵⁵、亞硝酸鈉濃度⁵⁶、pH 值⁵⁷與反應時間⁵⁸改變；而修飾方法目前主要為定電壓與循環伏安法兩種^{58,59}，文獻表示修飾後效果因不同苯胺化合物而有所變化。然而，第一部份的修飾溶液為進行重氮化反應後的混合液，當混合液中的組成不同時，可改變合成的結果，其中亞硝酸鈉與苯胺化合物的比例不同時，可能會使的重氮化的反應效率不佳或是產生重氮氫氧化物 (Diazohydroxide) 和重氮酸鹽 (Diazoate) 等衍生物^{56, 59, 60}，Nowicka 等人⁵⁹以 4-氨基苯甲酸 (4-Aminobenzoic acid) 重氮化後的溶液修飾基材，並觀察在不同亞硝酸鹽濃度的反應條件下其芳基化合物的修飾情形，其中圖 1.9(A) 為各種可能產生衍生物的紫外/可見光吸收峰圖譜，而圖 1.9(B) 為 4-氨基苯甲酸與不同濃度的亞硝酸鹽反應後的紫外/可見光吸收峰圖譜以及圖中右上角為不同比例的 4-氨基苯甲酸與亞硝酸鹽反應後於 265 nm 波長所得到的吸收值，由其觀察重氮化合物產生的量，可以發現亞硝酸鹽比例的改變使重氮化的產物有所增減且產生衍生物的量也不同，隨後作者將其不同濃度比例的溶液進行電化學修飾並以石英晶體微天秤 (Quartz crystal microbalance, QCM) 觀察固定上基材分子的多寡，最後，統整其結果推斷以 1:1 的苯胺化合物與亞硝酸鹽修飾的表面狀態較佳。

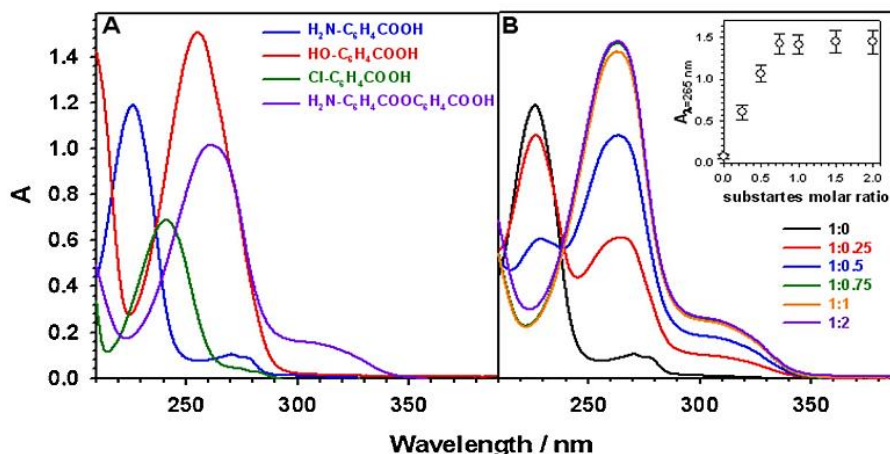


圖 1.9 紫外/可見光譜圖，(A) 4-氨基苯甲酸經重氮化反應可能產生的衍生物，
(B) 以不同比例的 NaNO_3 進行重氮化反應後的溶液⁵⁹。

以芳基重氮化合物修飾表面的技術雖然快速且穩定，但其修飾的分子層卻時常出現多層的構形^{52,61}，形成多分子層的原因來自於芳基重氮化合物被還原後產生的芳基自由基容易與鄰近分子苯環上的鄰位 (Ortho position) 碳原子形成鍵結，使得未與表面鍵結的分子傾向與固定於基材上的分子鍵結⁵⁸ (如圖 1.10)，這樣的多分子層結構難以控制且分子間的鍵結不規則，對於其修飾後應用於偶合反應的效能造成影響，此外，較厚的分子層通常電子傳導的效果較差，使得電極感測物質氧化還原的能力降低⁶²。因此發展了一些方法試著避免多分子層的形成，如調整修飾的濃度、圈數、電位等條件^{58,59} 以得到近似於單層膜的表面，或是藉由改變苯胺化合物的結構^{62,63} 與添加自由機捕捉劑⁶⁴ (Radical scavenger) 的方式避免芳基自由基與固定於基材的分子鍵結，其中改變苯胺分子結構的方法是將苯環接上較大分子的官能基，使芳基自由基因為立體障礙的關係無法靠近表層分子；而於重氮化反應的溶液中添加 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 驅使過多的芳基自由基與 DPPH 反應進而避免多分子層的形成；然而，大多是以改變修飾的條件並針對不同的苯胺化合物在不同條件的修飾下，利用 AFM、QCM 或是紅外反射吸收光譜儀 (Infrared reflectance absorption spectroscopy, IRRAS) 觀察表層的修飾狀態後挑選出最佳的修飾條件，McCreery 等人⁶¹ 藉由 AFM 觀察在不同電壓的修

飾下得到的表層狀態 (如圖 1.11)，並依表層的厚度與均勻度來判斷何種條件修飾最近似於單分子層，因此選擇均勻度高且厚度最接近單一分子長度的大小做修飾。

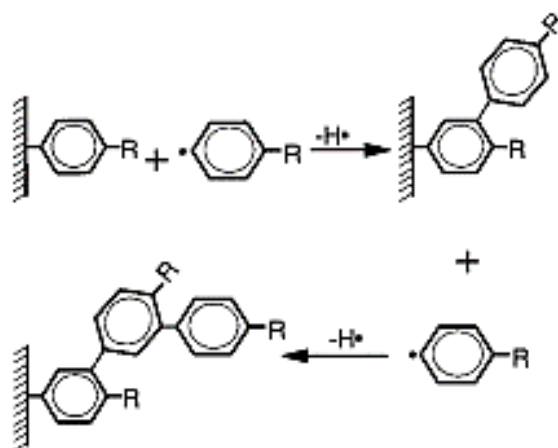


圖 1.10 芳基重氮化合物修飾之多層膜產生的反應機制圖⁵⁸。

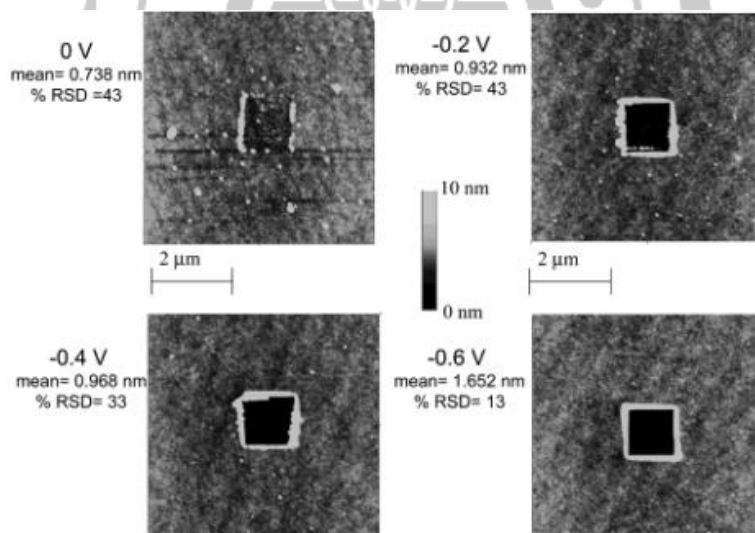


圖 1.11 以不同電壓進行芳基重氮化合物修飾的表面狀態之 AFM 圖⁶¹。

如同前文所述，多種官能基修飾的基材應用於許多領域，因此同時將多種分子修飾於表面的技術更顯重要，然而，以芳基重氮化合物進行共修飾基材的研究相較於 SAM 的方式少得多，由 Gooding 首次以兩種芳基重氮化合物修飾的電極做蛋白質的電化學研究⁶⁵，這樣的多分子層接著被應用於酵素固定⁶⁶、生物感測

平台⁶⁷與抗吸附修飾⁶⁸等，目前發現影響其分子修飾的因素有兩種，一個為芳基重氮化合物的還原電位大小，多種分子電還原時還原電位較低的分子容易在同樣的修飾電位條件下，擁有較高比例的分 子修飾密度⁶⁹；另一個是藉由改變不同分子的濃度比例^{66,68}，當分子於多種分子中的比例較高時，其則有較高的擴散效力可以使分子靠近基材產生鍵結。其中，Gooding 等人將兩種重氮化合物修飾於電極 (如圖 1.12)，一種分子用來與酵素鍵結，另一種利用分子上修飾聚乙二醇 (poly (ethylene glycol), PEG) 做為抗蛋白質的非特異性吸附且稀釋固定上酵素的密度之應用，作者利用調控不同的分子比例以挑選出此平台的最佳修飾條件。若能控制此種以芳基重氮化合物共修飾的平台，則能產生一個不同分子間分布較 SAM 均勻且構形穩定的表面修飾，對於其他表面修飾的研究發展將會有很大的幫助。

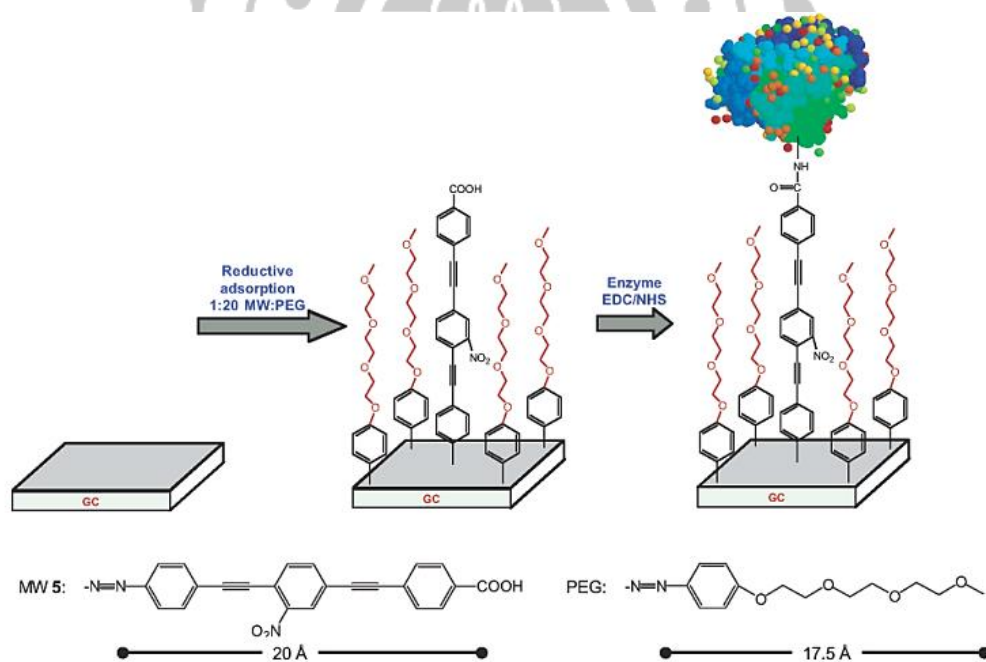


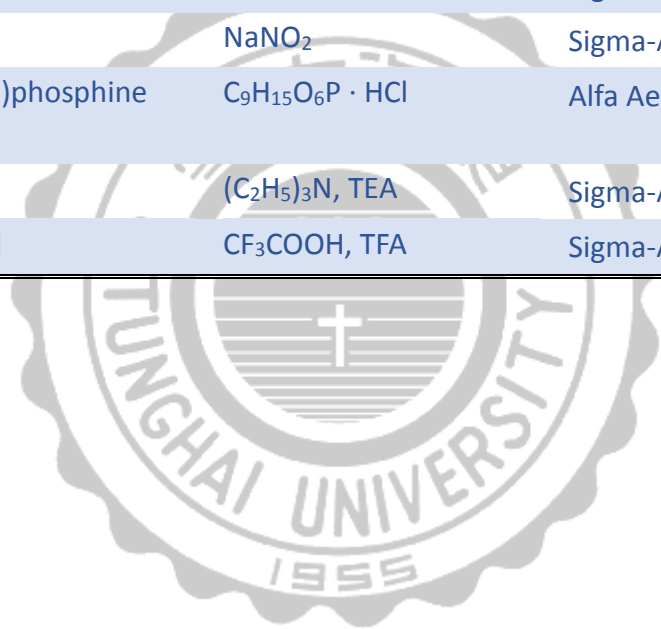
圖 1.12 以兩種重氮化合物修飾之電極固定酵素的示意圖⁶⁹。

第二章 實驗材料與方法

2.1 藥品與試劑

藥品名稱	化學式/縮寫	廠牌
1,3-Propanesultone	$C_3H_6O_3S$	Sigma-Aldrich
1,4-Dioxane	$C_4H_8O_2$	Sigma-Aldrich
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	$C_{16}H_{20}N_2$, TMB	Sigma-Aldrich
1-Hydroxybenzotriazole hydrate	$C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$, HOBT	Sigma-Aldrich
3-Mercaptopropionic acid	$HS(CH_2)_2COOH$, 3-MPA	Sigma-Aldrich
4-Aminobenzoic acid	$H_2NC_6H_4CO_2H$	Sigma-Aldrich
Albumin bovine serum	BSA	Sigma-Aldrich
Acetic anhydride	$(CH_3CO)_2O$	Sigma-Aldrich
Ammonium formate	HCO_2NH_4	Sigma-Aldrich
Avidin glucose oxidase conjugated	Av-GOx	Rockland
Benzyl chloroformate	$ClCO_2CH_2C_6H_5$	Sigma-Aldrich
Boc-4-aminobenzoic acid	$(CH_3)_3CO_2CNHC_6H_4CO_2H$	Sigma-Aldrich
Casein from bovine milk		Sigma-Aldrich
Citric acid monohydrate	$C_6H_8O_7$	Merck
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$	J. T. Baker
Dichloromethane	CH_2Cl_2 , DCM	Sigma-Aldrich
Diethyl ether	$(CH_3CH_2)_2O$	Sigma-Aldrich
Di-tert-butyl dicarbonate	$[(CH_3)_3COCO]_2O$	
Dithiothreitol	DTT	Amresco
Dimethyl sulfoxide	DMSO	Riedel-de Haën
Ethyl acetate	$CH_3COOC_2H_5$, EtOAc	Sigma-Aldrich
FITC antibody [HRP]	α -FITC-HRP	Novus Biological
Hexane	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Sigma-Aldrich
Hydrochloric acid	HCl	Sigma-Aldrich
m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester	MBS	Thermo Scientific
Magnesium chloride hexahydrate	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich

Maleic anhydride	C ₄ H ₂ O ₃	Sigma-Aldrich
Methanol	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine	(CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ NH ₂	Sigma-Aldrich
p-Phenylenediamine	C ₆ H ₈ N ₂ , PPDA	Alfa Aesar
Palladium on carbon	Pd/C	Sigma-Aldrich
Potassium phosphate dibasic	K ₂ HPO ₄	J. T. Baker
Potassium phosphate monobasic	KH ₂ PO ₄	J. T. Baker
Pyridine	C ₅ H ₅ N	Sigma-Aldrich
Sodium acetate anhydrous	CH ₃ COONa	Sigma-Aldrich
Sodium chloride	NaCl	Sigma-Aldrich
Sodium hydroxide	NaOH	Sigma-Aldrich
Sodium nitrite	NaNO ₂	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride	C ₉ H ₁₅ O ₆ P · HCl	Alfa Aesar
Triethylamine	(C ₂ H ₅) ₃ N, TEA	Sigma-Aldrich
Trifluoroacetic acid	CF ₃ COOH, TFA	Sigma-Aldrich



2.2 實驗儀器與材料

儀器/材料名稱	型號	廠牌
Atomic force microscope 原子力顯微鏡	PicoPlus	Molecular Imaging
ATR-FTIR spectrometer 傅立葉變換全反射紅外光譜儀	Spectrum 100	PerkinElmer
Centrifuge 離心機	C1801	Labnet
Mixing block 恆溫乾浴反應槽	MB-101	BIOER TECHNOLOGY
Multi-channel electrochemical analyzer /workstation 多通道電化學分析儀	CHI 1021C	CH Instruments
Multimode microplate spectroscopy 多功能微量光譜儀	SpectraMax M2 ^e	Molecular Devices
Orbital shaker 往返式振盪器	MS-NOR	Major Science
Orbital shaking incubator 迴轉式 振盪恆溫培養箱	S300	Firstek
pH meter 酸鹼度計	UB-10	DENVER INSTRUMENT
Vortex 震盪器	G-560	Scientific Industries
Bare gold chip	SC1000-16X-B	GeneFluidics

2.3 去氧核糖核酸 (DNA) 序列

Name	Sequence (5'→3')	Description
1	AA AGT TGG GCG CGG TTG CTG -(CH ₂) ₃ -SH	Capture probe
2	Biotin-(CH ₂) ₆ -TTTTT G GCA TCA CCG AGA TTG CCGAG	Biotin-tag probe
3	FITC-(CH ₂) ₆ -TTTTT CTT GTC CTG ATG CGC	FITC-tag probe
4	GCG CAT CAG GAC AAG TTT TTT TTC AGC AAC CGC GCC CAA CTT TTT TTT TTT CTC GGC AAT CTC GGT GAT GCC	Target

偵測序列的選擇是統整 NDM 在 Protein data bank (PDB) 中的晶體結構後確立，在 21 個 NDM 蛋白質結構裡共有 9 個是分別與 7 種不同的 β-內醯胺類抗生素結合所得到的晶體，由以下的方式定義出在 β-內醯胺類抗生素周圍可能的活化位點。先將抗生素分子的中心作為圓心並以 1.5 倍的抗生素大小為半徑畫出一個立體圓球，挑選包含於圓球內的胺基酸殘基 (Amino acid residues) 並找出至少有四個以上連續的胺基酸片段，將其對應核酸序列做為被選擇的偵測序列，因此將三段連續的胺基酸片段(a.a. 73-76, 121-125, and 218-224) 對照 *bla*_{NDM-1} 序列找出其對應的 DNA 片段，將這幾條片段依照 *bla*_{NDM-1} 序列評估其保守性 (Conservation) 並經由 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)⁷⁰ 比對其於微生物全序列中的特異性，選取序列保守性與特異性較佳的兩條片段 GCGCATCAGGACAAG (a.a. 652-672), 與 CTCGGCAATCTCGGTGATGCC (a.a. 361-375) 做為偵測的目標序列。此外，並再以 UPS (Unique probe selector)⁷¹ 於 *bla*_{NDM-1} 全序列中尋找一段特異性的核酸片段，將這三段選取核酸片段其互補的基因序列設計為探針作為多重抗藥性 *bla*_{NDM} 的核酸檢測，其序列如上表。

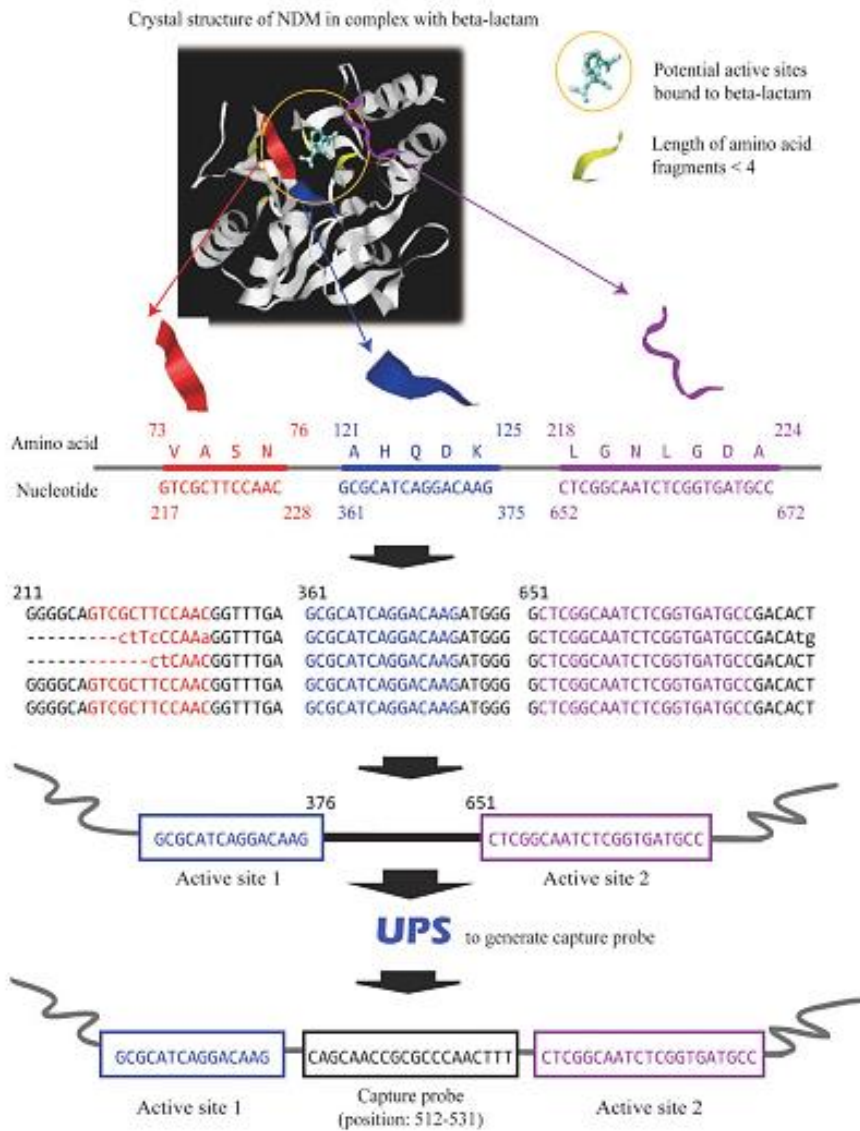


圖 2.1 核酸探針的基因序列選擇流程圖⁷²。

2.4 合成 4-amino-N-(2-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzamido)ethyl)benzamide (MD)

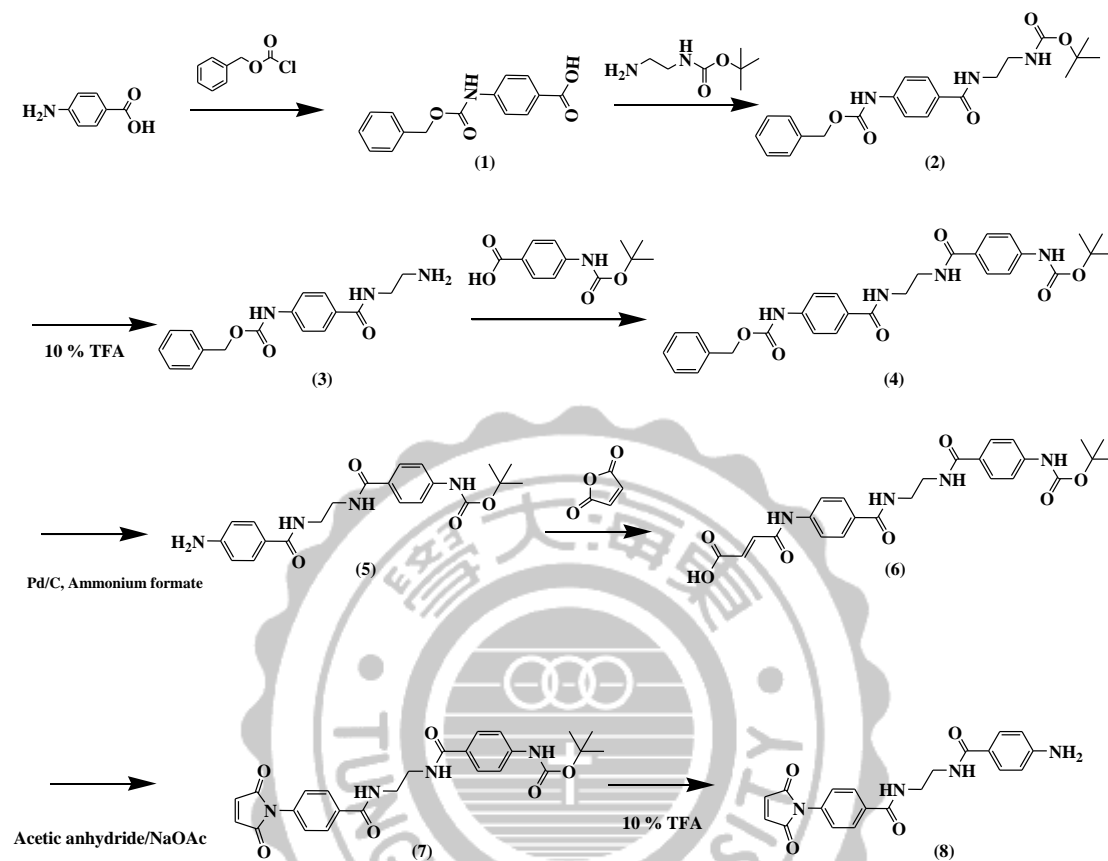


圖 2.2 合成 MD-aniline 的反應機制圖。

- 將 4-aminobenzoic acid (20 g, 145.9 mmol) 加入 1,4-dioxane/water (100 mL of each) 並在冰浴下劇烈攪拌 15 分，使其完全溶解，接著倒入 1 M NaOH (aq) (100 mL) 和 benzyl chloroformate (31.3 mL, 218.8 mmol) 持續反應 16 小時，反應完成後 (以 TLC 確認)，隨後用 1 M HCl (aq) 將溶液調為 pH=2~3 使反應終止，並用 EtOAc 萃取三次，分離出有機層以 1 M HCl (aq) 和飽和鹽水潤洗三次，經減壓濃縮得到白色粉末，再將此粉末以 hexane 溶解進行再結晶則可得到高純度的產物(1) (37.5 g, yield: 95%)。

2. Cbz-ABA (**1**) (2 g, 7.38 mmol) 以 DMF (10 mL) 溶解後與 EDC (1.56 g, 8.12 mmol) 和 HOBt (1.5 g, 11.1 mmol) 在室溫下混合後反應 2 小時，再添加 N-boc-ethylenediamine (1.18 g, 7.38 mmol) 與 triethylamine (1.2 mL, 11.1 mmol) 到混合液中劇烈攪拌 8 小時以上，完成反應後 (以 TLC 確認) 倒入冰水使產物沉澱，過濾取出固體並以 diethyl ether/hexane 溶解進行再結晶即可得到產物(**2**) (2.5 g, yield: 82 %)。
3. 將 Cbz-aniline-EDA-boc (**2**) (2.5 g, 6.05 mmol) 加入 DCM (20 mL) 和 trifluoroacetic acid (2 mL) 劇烈攪拌反應 8 小時，完成反應後 (以 TLC 與茚三酮染色確認)，經減壓濃縮去除溶劑後得到產物(**3**) (1.85 g, 97%)。
4. 秤取 N-boc-4-aminobenzoic acid (1.13 g, 4.79 mmol)、EDC (1.10 g, 5.27 mmol) 和 HOBt (0.97 g, 7.19 mmol) 溶於 DMF (5 mL) 中劇烈攪拌 2 小時，再添加 Cbz-aniline-EDA (**3**) (1.5 g, 4.79 mmol) 和 triethylamine (0.73 g, 7.19 mmol) 到混合液中劇烈攪拌 8 小時以上，完成反應後，倒入冰水使產物沉澱並過濾取出白色固體，以 diethyl ether/hexane 溶解進行再結晶即可得到產物(**4**) (2.3 g, yield: 90 %)。
5. 將 Cbz-aniline-EDA-ABA-boc (**4**) (2 g, 3.76 mmol) 溶解於 methanol (50 mL) 並加入 10 % Pd/C (0.2 g, 10% w/w) 和 ammonium formate (1.9 g, 30.1 mmol，溶於 2 mL water 與 20 mL methanol) 於 40 °C 劇烈攪拌 12 小時，反應完成後，將混合液以 celite 過濾並經減壓濃縮得到產物(**5**) (1.45 g, yield: 97 %)。
6. Aniline-EDA-ABA-boc (**5**) (1 g, 2.51 mmol) 溶於 pyridine (20 mL) 在 0 °C 下劇烈攪拌 15 分，加入 maleic anhydride (0.29 g, 3 mmol) 混合均勻後反應 6 小時以上再用 TLC 確認，隨後用 EtOAc (200 mL) 萃取再以 1 M HCl (aq) 和飽和鹽水潤洗三次，將有機層取出並經減壓濃縮得到產物(**6**) (0.9 g, yield: 72 %)。
7. 秤取 maleic-ABA-EDA-ABA-boc (**6**) (0.9 g, 1.81 mmol) 和 sodium acetate (0.9 g, 11 mmol) 加入 acetic anhydride (10 mL) 於 120 °C 劇烈攪拌 2 小時，將混合液

靜置至室溫再倒入冰水使產物沉澱並過濾取出固體，經水清洗後在 65 °C 下真空乾燥得到產物**(7)** (0.6 g, yield: 66 %)。

8. Boc-aniline-EDA-pBM **(7)** (0.2 g, 0.42 mmol) 加入 DCM (20 mL) 再混合 trifluoroacetic acid (2 mL) 於室溫下攪拌 2 小時，去保護基後 (以 TLC 確認)，隨後經減壓濃縮去除溶劑後得到產物**(8)** (0.15 g, yield: 94 %)。



2.5 合成 3-((4-aminophenyl)dimethylammonio)propane-1-sulfonate (SC)

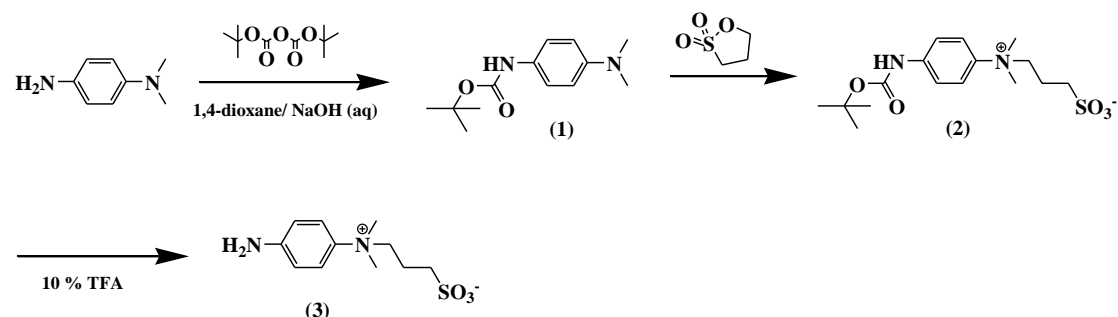


圖 2.3 合成 SC 的反應機制圖。

1. 將 N,N-dimethyl-1,4-phenylene diamine (DMPD) (10 g, 73.45 mmol) 溶於 dichloromethane (50 mL) 後添加 triethylamine (TEA) (29.7 g, 29.39 mmol) 並在 0 °C 的環境下劇烈攪拌 10 分。
2. 將 di-*t*-butyl dicarbonate (17.64 g, 80.82 mmol) 溶於 dichloromethane (25 mL) 並與上步驟的溶液混合後放置冰浴中反應 12 小時，完成反應後 (以 TLC 確認) 經真空乾燥得到產物，以 EtOAc/hexane 溶解進行再結晶即可得到化合物**(1)** (13.88 g, yield 80 %)。
3. 將化合物**(1)** (8 g, 33.88 mmol) 溶於 DCM (50 mL) 再加入 1,3-propanesultone (4.13 g, 33.88 mmol) 於 75 °C 迴流裝置反應 48 小時，待反應完成後，將溶液先冷卻至 23 °C 再放置 -20 °C 冰箱冷凍使產物沉澱出來。
4. 將沉澱物過濾並以 dichloromethane (50 mL) 清洗三次，經真空乾燥得到淺黃色固體的化合物**(2)** (9.1 g, yield: 75 %)。
5. 將化合物**(2)** (5 g, 13.96 mmol) 溶於 DCM (20 mL) 並加入 trifluoroethanoic acid (2 mL, 10%) 在 23 °C 的環境下攪拌反應 8 小時，完成反應後 (以 TLC 確認) 經濃縮使溶劑被去除，將剩餘的產物加入 methanol (20 mL) 並再次濃縮後得到粉紅色固體的化合物**(3)** (3.42 g, yield: 95 %)。

6. 將最後得到的產物以 ^1H NMR, ^{13}C NMR, and ESI-MS 進行化合物的確認. (^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ = 1.83-1.98 (m, 2H), 2.83-2.87(t, 2H), 3.67 (s, 6H), 4.04-4.1 (t, 2H), 7.65-7.69 (d, 2H), 7.93-7.96 (t, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ = 18.92, 46.86, 54.53, 67.63, 122.86, 125.45, 132.26, 143.74 ppm. ESI-MS (positive mode) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 259.1$)



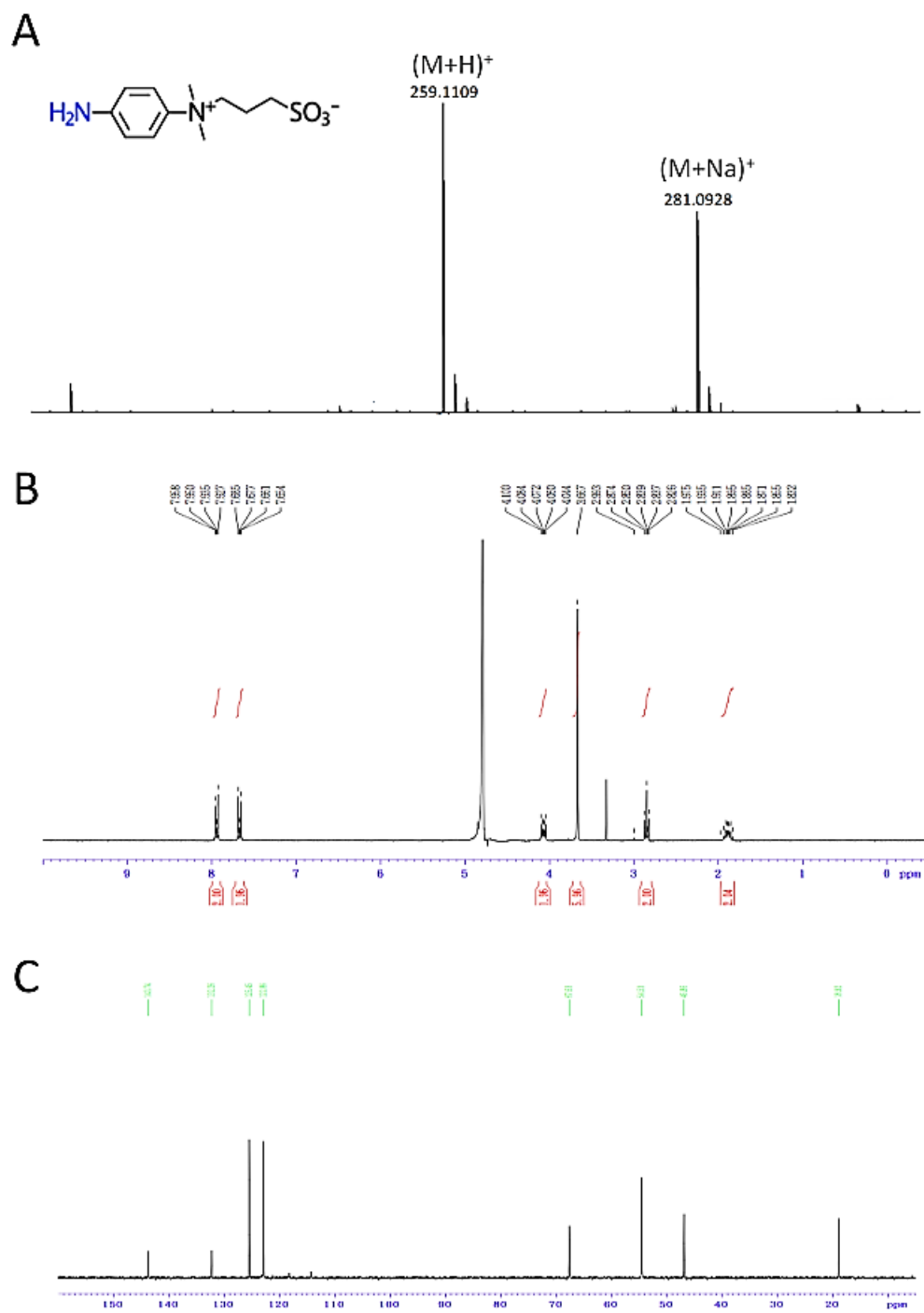


圖 2.4 (A) ESI-MS, (B) ^1H NMR, and (C) ^{13}C NMR spectra of aniline-sulfobetaine.

2.6 對苯二胺 (PPDA) 連接 MBS 修飾的電極製備

此檢測平台是建立於 16-sensor 金電極陣列晶片中，每一個感測器由一圓形金工作電極 (直徑 2.5 mm) 外圍環繞參考金電極與輔助金電極所構成。

利用 PPDA 連接 MBS 修飾電極作為表面官能化以固定捕捉探針 (capture probe) (如圖 2.5)：

1. 配製三種水溶液: (1) PPDA (2) 亞硝酸鈉 (3) 鹽酸，將三種溶液混合配製成等莫耳濃度 PPDA 與亞硝酸鈉於 0.5 M 鹽酸混合液，在冰浴的環境下以 120 rpm，每兩圈反轉的方式反應 15 分鐘，使芳香胺化合物反應成芳基重氮化合物。

修飾濃度	NaNO ₂ (mM)	HCl (M)
0.01 mM PPDA	0.01	0.5
0.05 mM PPDA	0.05	
0.1 mM PPDA	0.1	
0.2 mM PPDA	0.2	
0.4 mM PPDA	0.4	
0.6 mM PPDA	0.6	
1 mM PPDA	1	
10 mM PPDA	10	

2. 將上步反應所得到的混合液滴至自製的電化學反應槽 (圖 2.6)，使用循環伏安法施加 0~-1 V (vs. Ag/AgCl) 以掃描速率 0.1 V/s 的方式掃一、二或五圈進行電還原，藉由電還原所產生的芳基自由基與金電極形成鍵結。電化學修飾後立即以二次去離子水直接沖洗電極表面 30 秒，再以氮氣吹乾。

3. 將 MBS 溶於 DMSO 再以 WB 溶液 (Wash buffer ; pH 7.4, 10 mM phosphate, 170 M NaCl, 1 mM MgCl₂) 稀釋成 0.5 mM MBS 溶液 (含 1 % DMSO) , 將 5 μL 此溶液滴至 PPDA 修飾的電極反應 30 分鐘, 使 PPDA 與 MBS 自發性以形成共價鍵的方式結合。

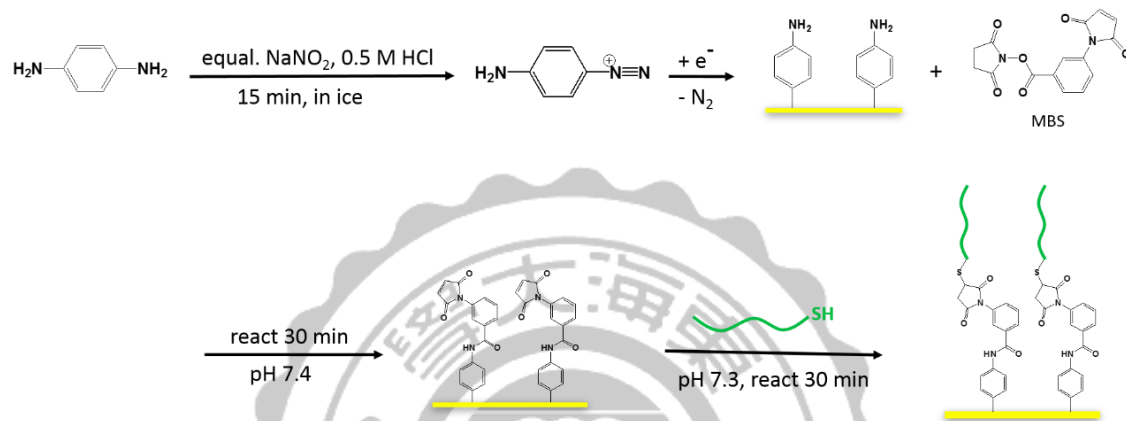


圖 2.5 PPDA 與 MBS 修飾於金電極的反應機制圖。

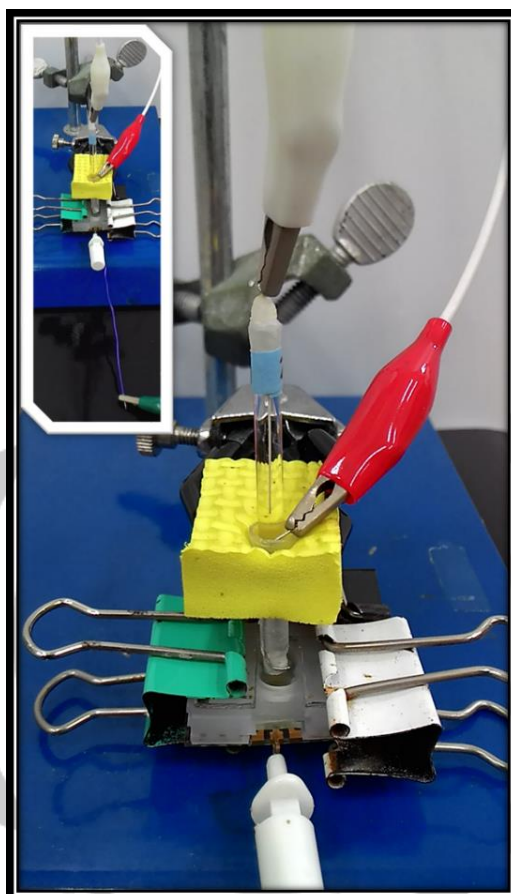


圖 2.6 芳基重氮化合物修飾之自製電化學反應槽。

2.7 共沉積 MD 與 SC 修飾的電極製備

利用共沉積 MD 與 SC 修飾電極作為表面官能化以固定捕捉探針 (如圖 2.7)：

1. 配製四種水溶液: (1) SC (2) MD (3) 亞硝酸鈉 (4) 鹽酸，將四種溶液混合配製成等莫耳濃度的芳香胺化合物與亞硝酸鈉於 0.5 M 鹽酸混合液，並在冰浴的環境下以 120 rpm，每兩圈反轉的方式反應 15 分鐘，使芳香胺化合物反應成芳基重氮化合物。

- MD 與 SC 的總濃度為 0.1 mM

	9:1	3:1	1:1	1:3	1:9	1:19
SC (mM)	0.09	0.075	0.05	0.025	0.01	0.005
MD (mM)	0.01	0.025	0.05	0.075	0.09	0.095

2. 將上步反應所得到的混合液滴至自製的電化學反應槽，使用循環伏安法施加 0~-1 V (vs. Ag/AgCl) 以掃描速率 0.1 V/s 的方式掃一圈進行電還原，藉由電還原所產生的芳基自由基與金電極形成鍵結，電化學修飾完立即以二次去離子水直接沖洗電極表面 30 秒後以氮氣吹乾，即完成同時修飾 SC 與 MD 的電極。

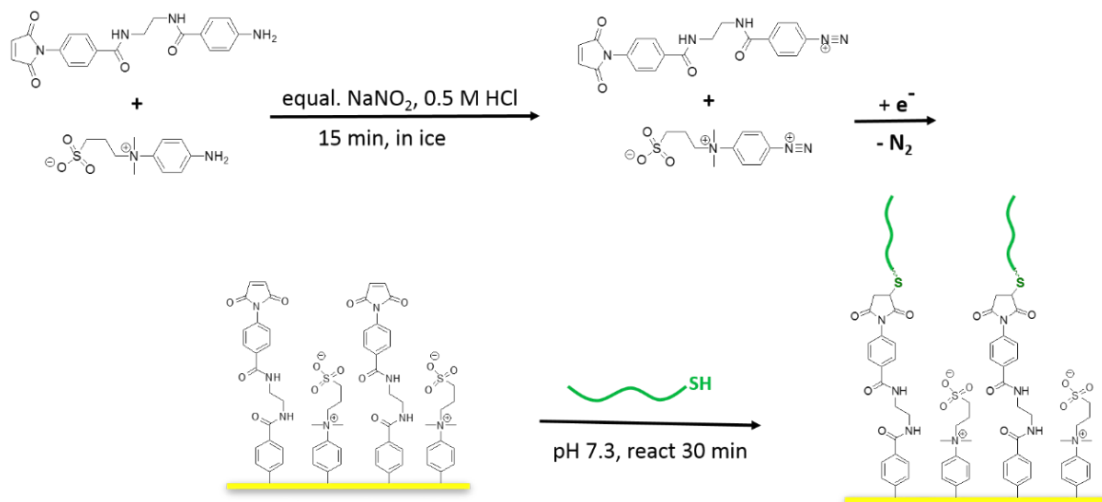


圖 2.7 共沉積 SC 和 MD 於金電極的反應機制圖。

2.8 PPDA 與 MBS 修飾電極之核酸感測

- 預先將 500 nM 修飾硫醇基的捕捉探針與 0.1 mM 三 (2-羧基乙基) 磷酸鹽 (TCEP) 配製於 IB 溶液 (Immobilization buffer ; $\text{pH } 7.3$, 10 mM phosphate , 1 M NaCl , 1 mM MgCl_2) 於 25°C 下反應 1 小時打斷雙硫鍵，將 $5 \mu\text{L}$ 此混合液滴至重氮化合物修飾電極室溫反應 30 分鐘後以去離子水沖洗和氮氣吹乾，即可讓電極上露出的馬來酰亞胺官能基與硫醇基自發性形成鍵結，使核酸固定於電極。
- 將核酸探針固定於電極後，以 0.1 mM MPA 混合於 WB 溶液，並取 $5 \mu\text{L}$ 此混合液滴至工作電極上，於室溫反應 1 小時後以去離子水沖洗和氮氣吹乾，隨後再以 0.1 mM DTT 溶於 WB 溶液，並取 $5 \mu\text{L}$ 此混合液滴至工作電極上，於室溫反應 1 小時後以去離子水沖洗和氮氣吹乾，即完成以自組裝單層膜作為抗吸附的修飾。

3. 將 500 nM 修飾 FITC-conjugated 探針和 biotinylated 探針與核酸分析物 (4) 配製於 HB 溶液 (Hybridization buffer ; 2.5 % BSA in IB) 在 25°C 下反應 15 分鐘，使分析物與兩條核酸探針雜交後，將 4 μ L 此混合液滴至核酸修飾電極室溫反應 30 分鐘，使分析物與電極上修飾的核酸序列進行雜交，再以 WB 溶液潤洗和氮氣吹乾。
4. 將 α -FITC-HRP (10 μ g/mL) 與 Av-GOx (50 μ g/mL) 混合於 BB 溶液 (Binding buffer ; 0.5 % casein in WB)，並取 2 μ L 此混合液滴至工作電極上，於室溫反應 30 分鐘後以 WB 溶液潤洗和氮氣吹乾，使訊號探針以親和性的作用力將酵素結合體固定於電極。
5. 將 250 mM glucose 與 0.1 mg/mL TMB 混合於 150 mM phosphate/ citrate buffer (pH 5.0, 含 1 % DMSO) 中，取 35 μ L 完全覆蓋感測電極，讓受質與酵素作用 3 分鐘後，立即計時安培法 (Chronoamperometry) 施加 -150 mV 後取第 60 秒反應已經較穩定的電流值做為感測結果。
6. 將上步完成電化學偵測的受質溶液立即吸取出來，並以多功能微量光譜儀進行紫外/可見光光譜儀偵測，觀察其溶液於 650 nm 的吸收值大小。

2.9 MD 與 SC 修飾修飾電極之核酸感測

其感測流程即為省略步驟 2.的 2.6 實驗步驟，去除 MPA 與 DTT 兩種做抗吸附的反應步驟，以先前電化學修飾於表面的 SC 作為替代化合物。

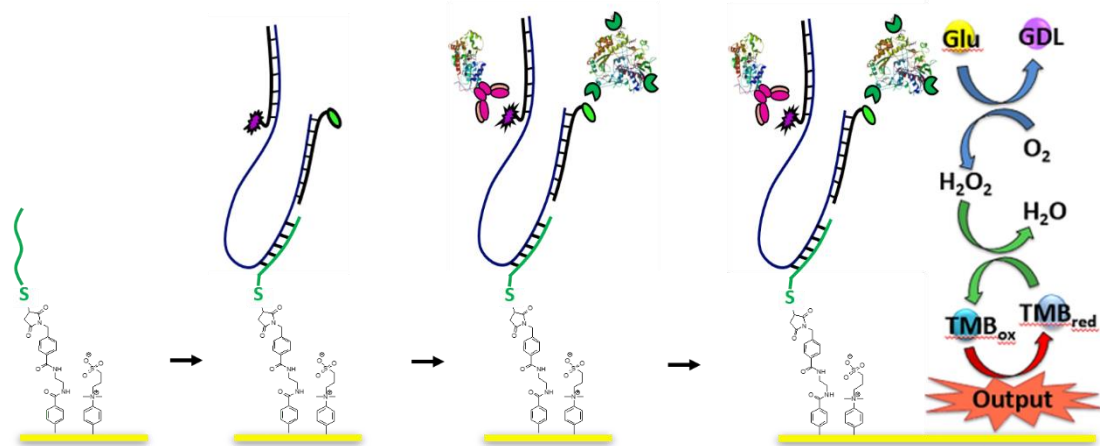


圖 2.8 核酸序列感測流程的示意圖。

2.10 MD 修飾電極的核酸感測

1. 配製三種水溶液：(1) MD (3) 亞硝酸鈉 (4) 鹽酸，將三種溶液混合配製成等莫耳濃度的芳香胺化合物與亞硝酸鈉的 0.5 M 鹽酸混合液，並在冰浴的環境下以 120 rpm，每兩圈反轉的方式反應 15 分鐘，使芳香胺化合物反應成芳基重氮化合物。

修飾濃度	NaNO ₂ (mM)	HCl (M)
0.3 mM MD	0.3	0.5
0.2 mM MD	0.2	
0.1 mM MD	0.1	
0.025 mM MD	0.025	

2. 將上步反應所得到的混合液滴至自製的電化學反應槽，使用循環伏安法施加 0~-1V (vs. Ag/AgCl) 以掃描速率 0.1V/s 的方式掃一圈進行電還原，藉由電還原所產生的芳基自由基與金電極形成鍵結，電化學修飾完立即以二次去離子水直接沖洗電極表面 30 秒後以氮氣吹乾，即完成 MD 修飾的電極。

3. 隨後依照 2.6 的實驗步驟進行接下來的核酸感測。

2.11 SC 修飾電極的抗吸附測試流程

將 0.1 mM SC 修飾電極 (修飾條件與 2.8 的步驟 1.和步驟 2.相同) 與空白電極同時依照 2.7 的實驗步驟進行反應,並將其中加入的分析物去除當作背景實驗,觀察其電極經非特異性吸附核酸探針與蛋白質所得到的電流值大小,以辨別兩種電極所得到背景值的差異。

2.12 兩步驟修飾 MD 與 SC 的電極製備與核酸感測

先用 0.1 mM MD 修飾電極表面 (以 2.8 中步驟 1.和 2.的方法進行修飾),並立即再以 0.1 mM SC 進行第二步的修飾 (同上步驟 0.1 mM MD 的修飾方法),即完成電化學的修飾步驟,隨後的核酸序列感測步驟同 2.7。

2.13 重氮化合物修飾電極的性質測試

利用對苯二胺形成的重氮化合物進行電還原修飾於金電極 (條件及步驟如 2.6 所述),修飾完後立即用上述的方式以二次去離子水沖洗並氮氣吹乾,隨後滴 45 μ L 的 0.1 mg/mL TMB buffer (phosphate/ citrate buffer, pH 5.0, 含 1% DMSO) 以循環伏安法觀察電極表面經由重氮化合物修飾後的電化學性質。

Technique: Cyclic Voltammetry

Potential (V)	Scan rate (V/s)	Sweep segments
-0.6~+0.6	0.25	8

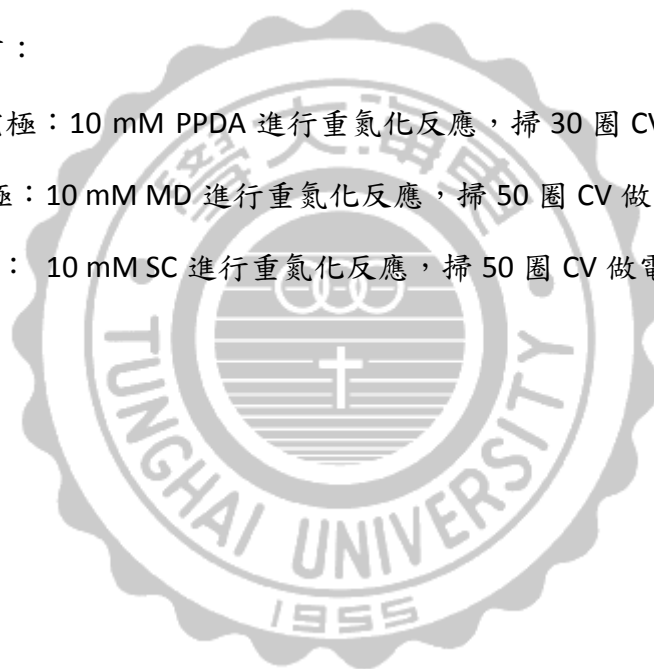
2.14 芳基重氮化合物修飾電極之 AFM 分析

觀察電極表面於 0.2 mM PPDA 的芳基重氮化合物修飾前和修飾後的差別，藉由表面粗糙度的改變以確認經電化學接枝法成功的將分子修飾於表面。

2.15 芳基重氮化合物修飾電極之 ATR-FTIR 分析

將經不同芳基重氮化合物修飾的電極藉由 ATR-FTIR 觀察其表面修飾上化合物所具有的特殊官能基訊號，以確認用此電化學接枝法成功的修飾電極，其分別的修飾條件如下：

- (1) PPDA 修飾電極：10 mM PPDA 進行重氮化反應，掃 30 圈 CV 做電化學修飾。
- (2) MD 修飾電極：10 mM MD 進行重氮化反應，掃 50 圈 CV 做電化學修飾。
- (3) SC 修飾電極：10 mM SC 進行重氮化反應，掃 50 圈 CV 做電化學修飾。



第三章 結果與討論

3.1 化合物 MD 的結構與功能

於共沉積 MD 與 SC 修飾的核酸感測平台中，藉由電極上 MD 分子所露出的馬來醯亞胺 (Maleimide) 官能基與末端已修飾硫醇基 (Thiol group) 的捕捉核酸探針(capture probe)形成鍵結，以此將核酸探針固定於電極表面才可進行隨後的核酸序列感測。由於捕捉探針是固定於 MD 與 SC 修飾的混合分子層上，假若 MD 的末端官能基馬來醯亞胺被包埋在此混合層中，預計會影響捕捉探針的固定效果，於是在合成步驟中分別以 N-叔丁氧羰基乙二胺 (N-boc-ethylenediamine) 和 4-(N-叔丁氧羰基氨基)苯甲酸 (Boc-4-aminobenzoic acid) 與前一步產物反應，經由兩次胺基和羧基的脫水反應形成鍵結而使分子長度增加，使得 MD 上的馬來醯亞胺官能基可以露在混合分子層的表面，讓捕捉探針有效的與表面修飾的官能基反應並將其固定於表面。

分別以 $^1\text{H-NMR}$ (圖 3.1)、 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖 3.2) 和 ESI-Mass (圖 3.3) 鑑定所合成的 MD 化合物，最後於 ESI-Mass 的圖譜中得到明顯的 $\{M+H\}^+ = 379.0$ 訊號，確定合成出分子量為 378 的 MD 化合物。

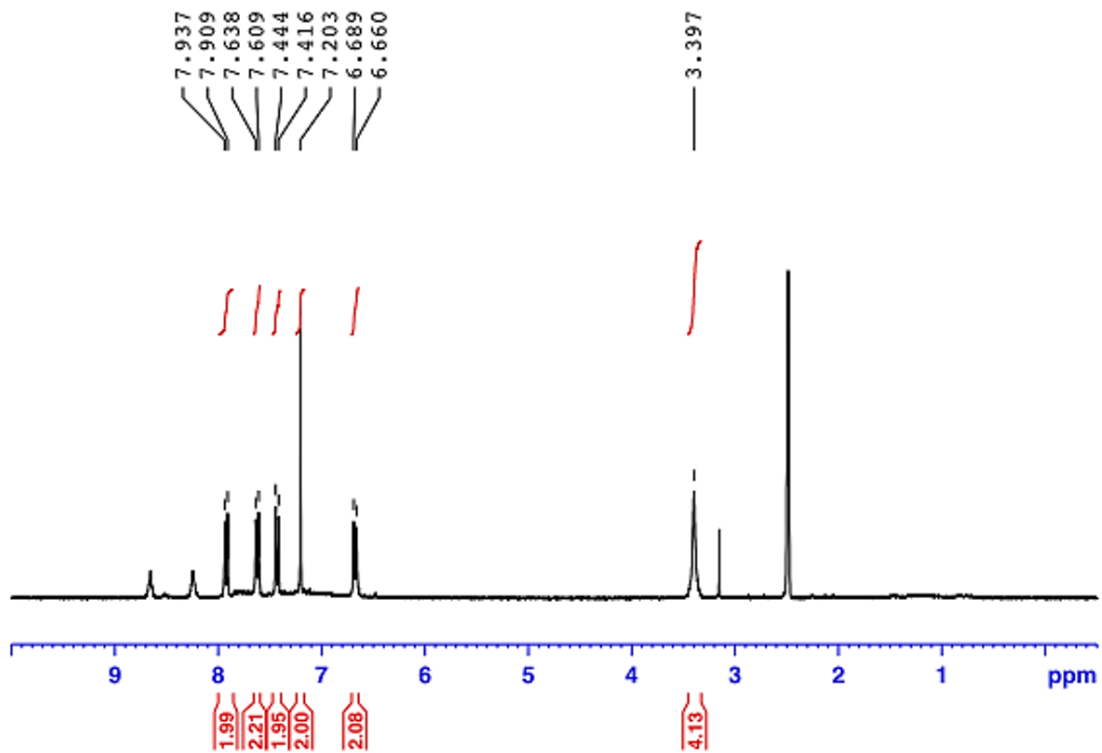


圖 3.1 重氮化合物 MD 之 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 25°C) 鑑定圖譜。 $\delta =$
 3.40 (m, 4H, CH_2), 6.66~6.69 (d, 2H, benzene), 7.20 (s, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.41~7.44
 (d, 2H, benzene), 7.61~7.64 (d, 2H, benzene), 7.91~7.94 (d, 2H, benzene).

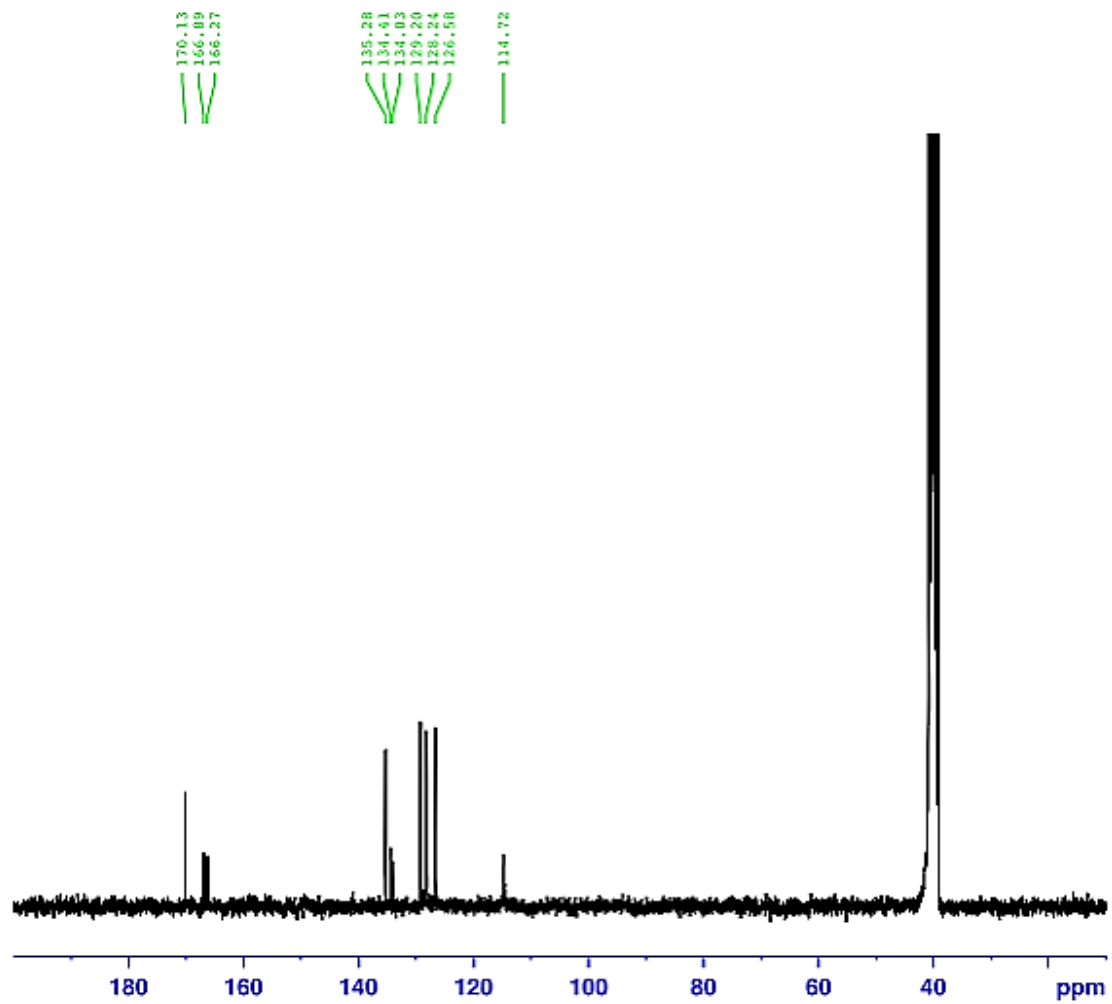


圖 3.2 重氮化合物 MD 之 ^{13}C -NMR (75MHz, d_6 -DMSO, 25°C) 鑑定圖譜。 $\delta =$
40.2, 114.7, 126.6, 128.2, 129.2, 134.0, 134.4, 135.3, 166.3, 166.9, 170.1.

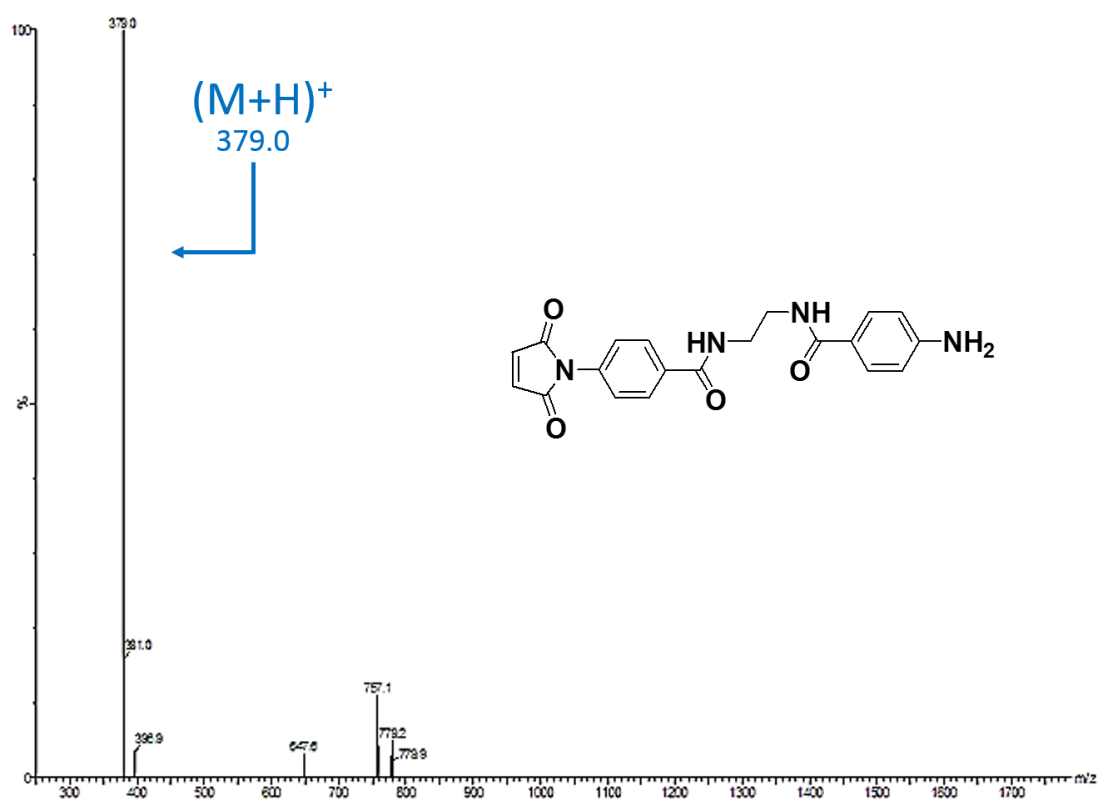


圖 3.3 重氮化合物 MD 之 ESI-Mass 鑑定圖譜。 $\{M+H\}^+$ (calculated): 379.13, found: 379.0.

3.2 感測 *bla*_{NDM} 基因的偵測機制

針對具有 NDM 病原體基因序列的感測，在此建立一個同時偵測三條基因序列的感測平台，用來判別病原體是否具有多重抗藥性。藉由三條核酸探針的雜合反應與兩個親和力鍵結的作用完成有效率的基因序列感測，經三條核酸探針分別選自於兩段活化位點的編碼基因 (II, III) 與一段特異性基因 (I)，並與 Biotin 和 Avidin-GOx 加上 FITC 和 Anti-FITC antibody [HRP] 兩種物質間特異的親和力作用以達到專一性的辨別效力。

偵測平台的設計如圖 3.4 所示，首先利用電還原重氮化合物的方式讓電極表面修飾上馬來醯亞胺的官能基，在中性溶液下使捕捉探針 (1) 自發性的以共價鍵結固定於電極，經由這條核酸探針將具有 NDM 特異性基因 (I) 的 DNA 分析物補捉於電極，隨後同時讓修飾有 FITC 和 Biotin 的報告探針 (2,3) 與分析物進行雜交，假若分析物上具有基因片段 (II) 和 (III) 則可將下個步驟加入的 Av-GOx 和 α -FITC-HRP 利用 α -FITC 和探針 (2) 上的 FITC 以及 Avidin 和探針 (3) 上的 Biotin 將 HRP 和 GOx 兩種酵素抓住，最後在酵素受質葡萄糖 (Glucose) 和四甲基聯苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 的混合溶液中進行酵素催化的連鎖反應，如圖 3.5 (A) 所示葡萄糖在有氧氣的環境下經 GOx 的催化氧化產生 H_2O_2 ，並隨即與 TMB_{red} 在 HRP 的催化下氧化成 TMB_{ox} ，藉由偵測 TMB_{ox} 的還原電流大小做為訊號來源。觀察圖 3.5 (B) 中 TMB 在於電極的循環伏安圖做為偵測時施加電位的參考依據，在滴上酵素受質溶液後反應 3 分鐘並利用計時安培法施加 -0.15 V 的電壓使 TMB_{ox} 還原，將此得到的還原電流值做為感測訊號，並同時以紫外/可見光吸收光譜儀 (UV-vis spectrophotometer) 觀察 TMB_{ox} 產生的量。

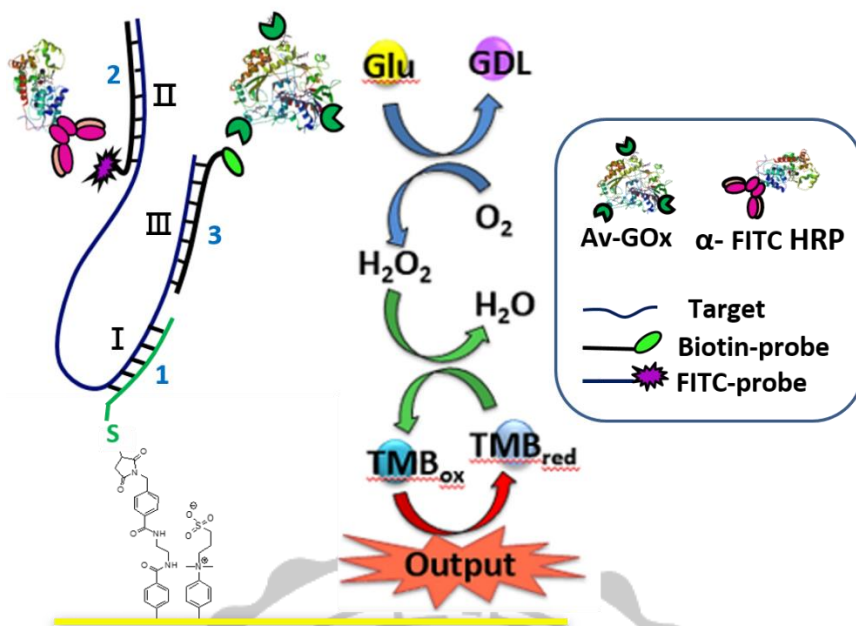


圖 3.4 多重抗藥性 *bla*_{NDM} 的核酸序列偵測機制示意圖。

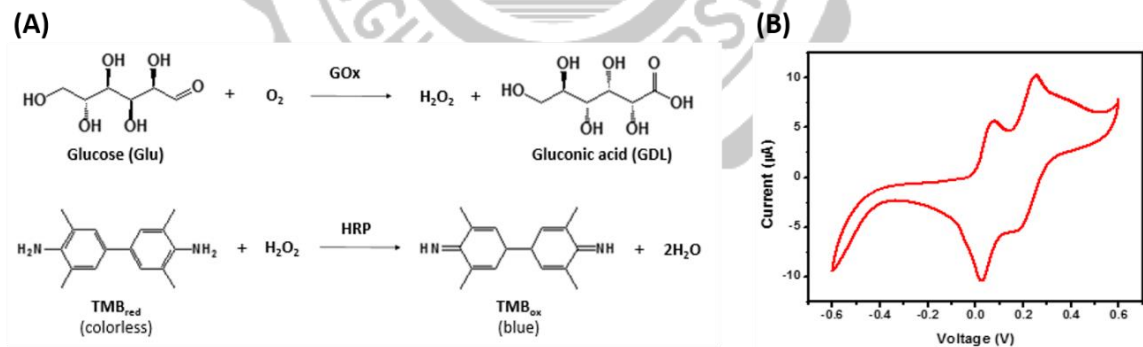


圖 3.5 (A) 葡萄糖氧化酶和辣根過氧化酶的酵素催化反應式 (B) 四甲基聯苯胺 (TMB) 於空白金電極上的循環伏安圖 (0.1 mg/mL TMB in phosphate/citrate buffer, pH 5.0)。

3.3 檢測芳基重氮化合物的合成結果

將苯胺化合物和亞硝酸鈉於酸性水溶液中進行重氮化反應可以得到芳基重氮化合物，藉由紫外/可見光光譜圖觀察重氮化合物於 330~380 nm 的吸收峰值可以觀測重氮化合物產生的情形，並確認此反應流程成功的產生重氮化合物。

如圖 3.6 所示，黑色曲線為未進行重氮化反應的 PPDA 溶液圖譜，紅色曲線為剛將反應物加在一起的混合液圖譜，而藍色曲線為反應 15 分鐘後完成重氮化的 PPDA 溶液圖譜。發現當反應物混合在一起後就快速進行重氮化反應，並於 354 nm 觀察到 PPDA 重氮化後的吸收峰；而在冰上進行 15 分鐘的重氮化反應後的溶液於 354 nm 的吸收值變大，表示經 15 分鐘的反應時間使得 PPDA 重氮化反應的更完全，可以得到更高濃度的芳基重氮化合物。

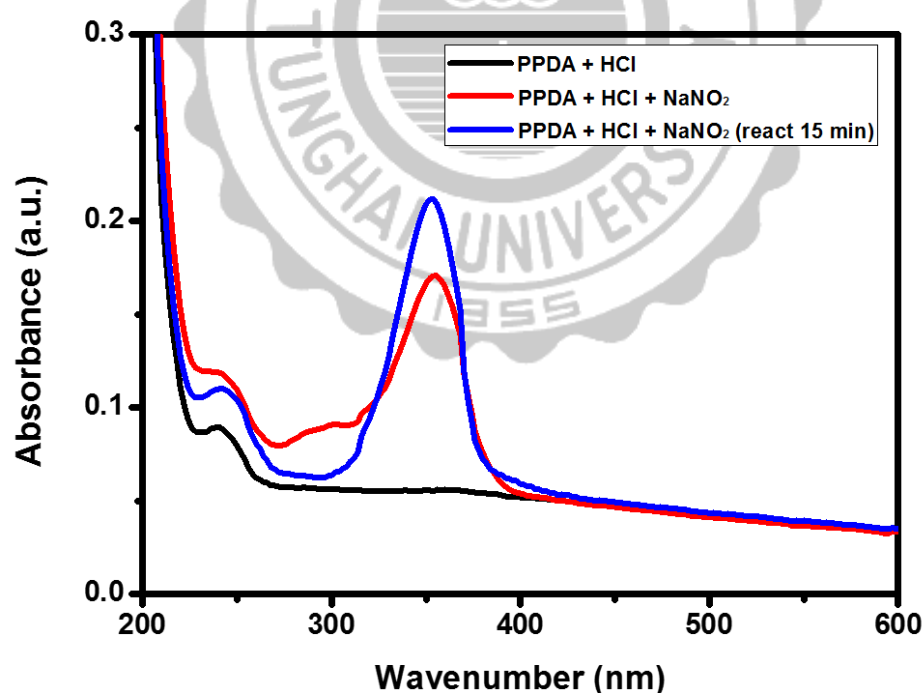


圖 3.6 以紫外/可見光光譜圖觀察重氮化反應後芳基重氮化合物的形成。(0.1 mM PPDA, 1 mM NaNO₂ in 0.5 M HCl aqueous solution)

3.4 電還原芳基重氮化合物的修飾過程

芳基重氮化合物是合成於苯胺化物與亞硝酸鈉的酸性混合液中，將電極直接浸入此溶液中，並藉由電化學儀器在電極上施加電位，使重氮化合物還原並形成自由基後與電極以共價鍵的方式鍵結，即可完成芳基重氮化合物的修飾（機制如圖 3.7 插圖）所示。

圖 3.7 為電極在酸性水溶液系統中修飾的電化學圖，圖中於大約 -0.5 V 開始產生一個明顯的還原電流，由於本實驗使用低濃度 PPDA，因此圖形中無法觀察到芳基重氮化合物接受電子所形成的還原峰，因此本實驗選擇以循環伏安法進行電修飾的方法，以 $0\sim-1\text{ V}$ 的電位範圍掃描使重氮化合物進行還原反應。

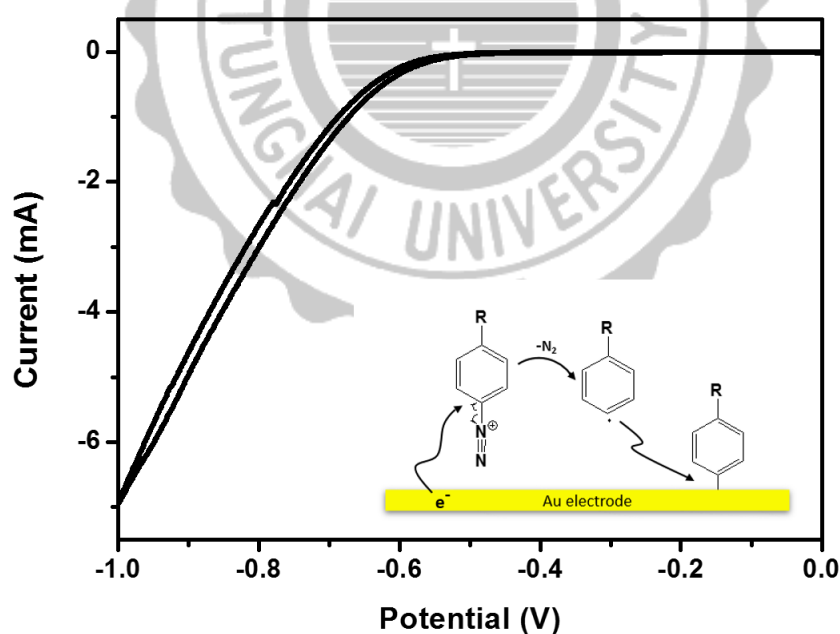


圖 3.7 以電化學接枝法修飾芳基重氮化合物的循環伏安圖。(0.1 mM PPDA mixture, potential = $0\sim-1\text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), scan rate = 0.1 V/s , 1 cycle)

3.5 電化學接枝芳基重氮化合物的修飾結果

利用重氮化反應後的 PPDA 溶液進行電化學修飾，藉由電還原產生的芳基自由基與電極上的金原子以共價鍵結合，將一級胺的官能基修飾於表面並完成電化學修飾。經由 AFM 與 ATR-FTIR 的檢測確認電極表面成功的以電化學接枝芳基重氮化合物法修飾表面。

觀察圖 3.8 的 3D AFM 影像圖可以明顯的發現，修飾前的電極 (圖 3.8(A)) 表面高低起伏大且不平整；修飾後的電極 (圖 3.8(B)) 表面變得平緩許多，表示 PPDA 分子已固定於電極表面而使得粗糙度降低。由圖 3.9 的 2D AFM 影像圖及表面輪廓圖中可進一步觀察兩電極於同樣約 10 μm 的直線範圍裡整體的高低差 (Z 軸的值)，修飾前的電極為 4.2 nm；修飾後的電極為 2.2 nm，表示經 PPDA 鍵結於金電極上使得表面的粗糙度降低將近一半，即可證實 PPDA 已被修飾於電極上。

並利用 ATR-FTIR 觀察特定波數的訊號峰，進一步證實電極已固定上 PPDA 且完成表面官能化。圖 3.10 為 PPDA 修飾電極的 ATR-FTIR 圖譜，主要觀察 3341、1610 和 1513 cm^{-1} 的訊號峰，其分別代表的官能基為 N-H 的伸張振動 (Stretching vibration)、 $-\text{NH}_2$ 的擺動振動 (Bending vibration) 和苯環的振動 (Phenyl ring vibration)，由此證明表面固定了 PPDA 分子且修飾一級胺的官能基於電極。

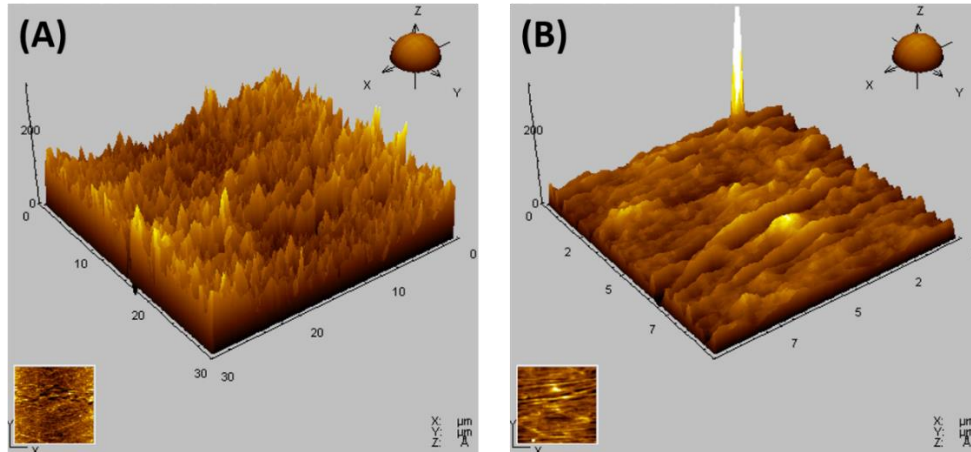


圖 3.8 (A) 修飾前空白金電極；(B) 0.2 mM PPDA 修飾電極，表面形態的 3D AFM 影像圖。

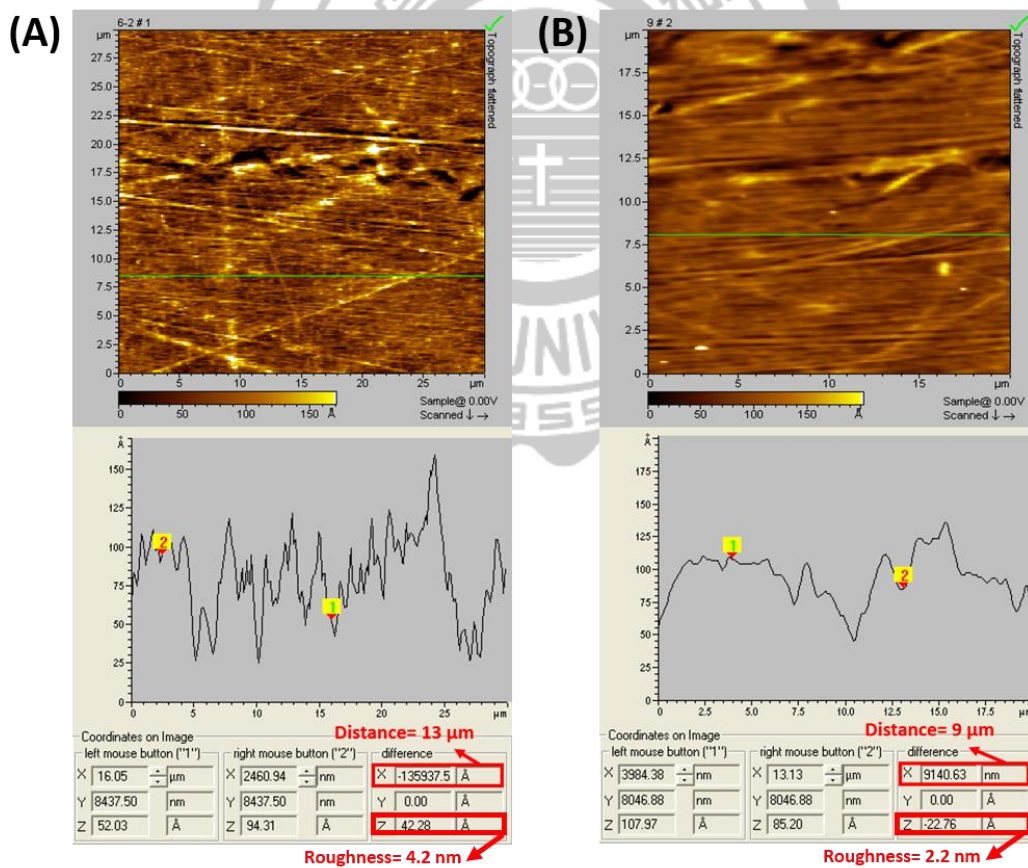


圖 3.9 (A) 修飾前空白金電極；(B) 0.2 mM PPDA 修飾電極，表面形態的 2D AFM 影像圖。

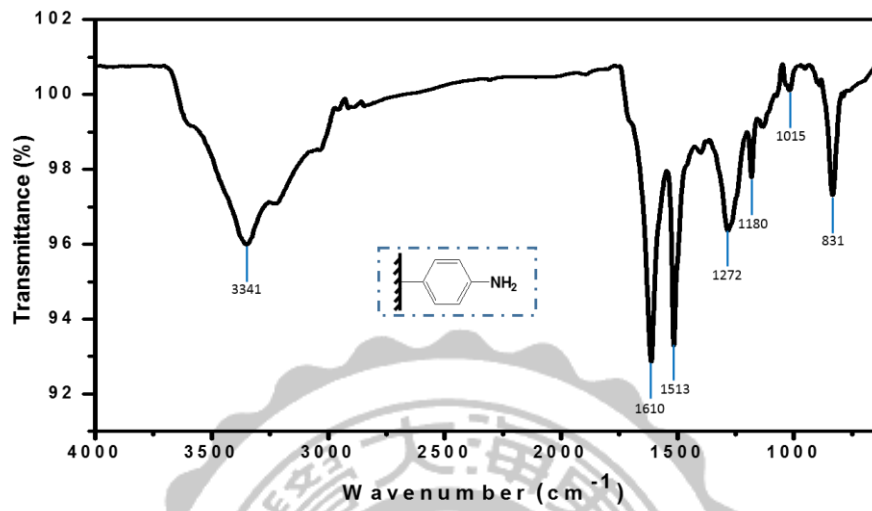


圖 3.10 PPDA 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。

3.6 PPDA 修飾濃度與 CV 圈數對核酸感測的影響

首先將 PPDA 化合物修飾於金電極使表面露出一級胺的官能基，隨後再與過量的 MBS 反應，使一級胺與 N-羥基丁二醯亞胺 (N-hydroxysuccinimide) 進行自發反應讓電極修飾上馬來醯亞胺的官能基，即可將末端修飾硫醇基的核酸探針與馬來醯亞胺自發性的形成共價鍵以將其固定於電極。

因此，PPDA 修飾於電極的密度與形態則直接的影響末端修飾硫氫基的捕捉碳針固定於電極上的多寡，而捕捉碳針於表面數量的增減將相對的改變核酸分析物與其進行雜合反應的效率，最終影響核酸序列感測的效果。我們探討改變修飾濃度與修飾的 CV 圈數來調控 PPDA 於表面修飾上的情況，圖 3.11 中是以不同條件修飾 PPDA 於電極後的核酸感測電流值，所使用的 PPDA 濃度分別為 1 和 10 mM 並分別以循環伏安法修飾 1、2 和 5 圈，比較其應答的電流值後可以發現隨著修飾的圈數增加，得到感測的電流值越小；且修飾的濃度較高時，得到的電流值訊號再現性越低。

較高的修飾濃度與增加修飾圈數皆會使表面修飾上的芳基化合物增多，隨著表面的化合物增多，可能使得修飾分子的密度提高或是形成多層分子層，其中修飾濃度可改變重氮化合物擴散至電極的傾向，濃度越高，重氮化合物被還原的量越多，形成越多的芳基自由基可與電極形成鍵結，然而，芳基自由基的增加也同時促使分子間進行聚合反應，進而提高多分子層形成的機會；此外，修飾圈數的不同影響的是進行電還原的機會，修飾的圈數越多，等同於電還原的時間越久，讓重氮化合物形成芳基自由基的量則越多，並隨著修飾時間增加芳基自由基與電極產生鍵結的量也越多。

由圖 3.11 可得知修飾濃度與圈數皆會影響 PPDA 修飾的情形，並都傾向於較低的修飾濃度與圈數可以得到較大的核酸感測電流值，因此在本系列實驗中挑選了最低的修飾圈數進行修飾，並將於隨後的實驗再更詳盡的做修飾濃度的最佳化測試。

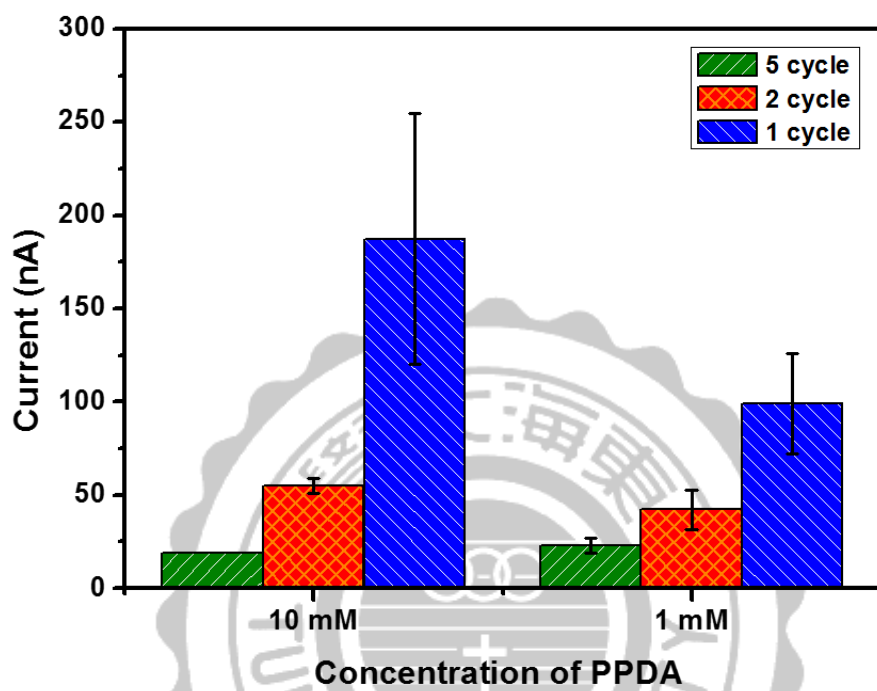


圖 3.11 不同 PPDA 濃度和 CV 圈數修飾對核酸序列感測電流值的影響。

3.7 阻礙效應 (Barrier effect) 對核酸感測的影響

由於在圖 3.11 的實驗結果中發現低濃度和較少圈數的修飾條件所得到的核酸感測訊號值較大，因此以 1 mM PPDA 修飾 2 圈 CV、1 mM PPDA 修飾 1 圈 CV 和 0.1 mM PPDA 修飾 1 圈 CV 的修飾條件再次做核酸感測電流值的探討。

如圖 3.12(A) 發現本系列的實驗與圖 3.11 的結果相同，較低濃度與較少圈數修飾條件所得到的感測電流值最大，但在電化學感測後隨即將反應的受質溶液吸取放入微量管觀察發現 (如圖 3.12(B))，測得三種不同電流值大小的電極其反應溶液所呈現的藍色深淺度卻相近，由於藍色的顏色來自於 TMB_{ox} 的產生，所以藉由觀察受質溶液的藍色深淺度即可表示電極表面經酵素連鎖反應所得到的 TMB_{ox} 的量，換句話說，感測電流值的大小應該與受質溶液的深淺度呈正相關係，因為兩種方式皆是以 TMB_{ox} 為偵測物質，但實驗結果並非相同；由於光學呈色的方式是直接反應酵素催化所得到 TMB_{ox} 的量，於是推斷為電化學感測的結果受到其他因素的影響而使得感測電流值與光學呈色的結果有差異。

追溯回實驗的第一步驟，探討芳基重氮化合物修飾後的電極狀態，分析感測電流是否受到不同條件所製備的修飾層之影響，因此將三種經由不同條件修飾 PPDA 的電極滴上 TMB 緩衝溶液並藉由掃循環伏安圖的方式觀察 TMB 分子於不同電極上的氧化還原行為，如圖 3.12(C) 所示，以 0.1 mM PPDA 修飾 1 圈 CV 的電極其偵測到 TMB 氧化還原峰電流值最大；1 mM PPDA 修飾 1 圈 CV 的電極次之；而 1 mM PPDA 修飾 2 圈 CV 的電極最小，此現象證明芳基重氮化合物修飾的電極會受到表面修飾上分子的多寡而產生不同程度的阻礙效應 (Barrier effect)，並且顯著的影響電極進行電化學感測的結果。

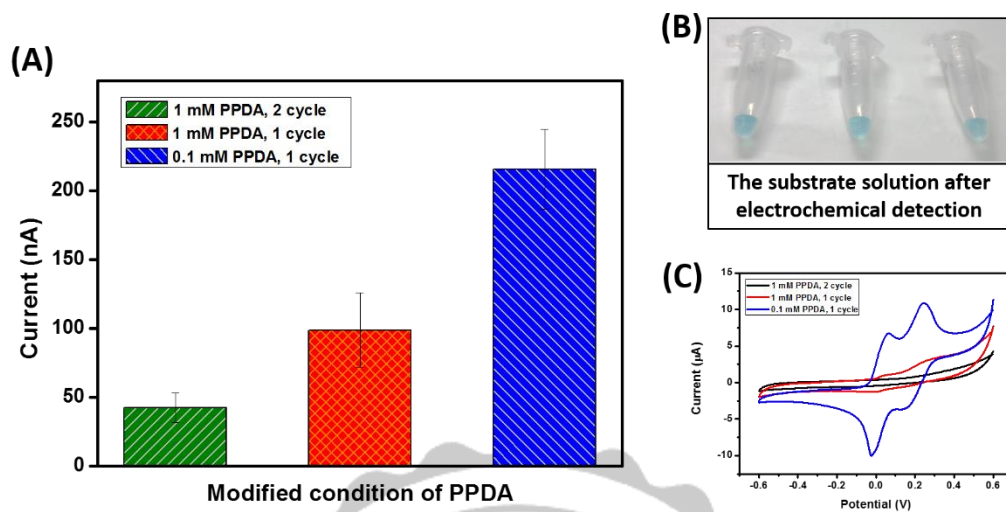


圖 3.12 不同 PPDA 條件修飾後的 (A) 核酸感測平台得到的電流值，(B) 核酸感測後的受質溶液呈色變化，(C) 感測 TMB 緩衝溶液的循環伏安圖 (0.1 mg/mL TMB in phosphate/ citrate buffer, pH 5.0)。

3.8 PPDA 修飾濃度對電極性質的影響

芳基重氮化合物修飾的電極大多會因阻礙效應而影響偵測平台感測的訊號大小，為避免此現象並同時有效將電極表面官能化以固定核酸探針，在此改變電還原時重氮化合物的濃度，觀察在不同修飾條件下電極對感測 TMB 氧化還原的效力。

由於芳基化合物修飾於電極會覆蓋電極的活性面積，影響電極感測 TMB 氧化還原的能力，並且直接影響最後偵測平台的電流訊號。藉由改變電還原的修飾濃度以控制電極表面的修飾狀態，以圖 3.13 (A) 的示意圖做解釋，在低濃度的修飾條件下電極表面的芳基分子較少，水溶液中的 TMB 容易擴散至電極接受或丟出電子，因而得到較大的氧化還原電流值；在高濃度的修飾條件下，電極的面積被較多芳基分子占據，水溶液中 TMB 擴散至電極進行氧化還原的反應受到阻礙，使得 TMB 的氧化還原電流值變小。如圖 3.13 (B) 所示，觀察 0.1、0.2、0.4、0.6、1 mM PPDA 修飾後電極浸入 0.1 mg/mL TMB 溶液中掃描的循環伏安圖，發現隨著修飾時 PPDA 濃度越高 TMB 的氧化還原峰值越小。然而，修飾濃度不同所造成電極表面的改變，主要是因為修飾的分子濃度越高可以提高擴散於電極進行電還原修飾的量，進而增加分子修飾於電極的密度；此外，由於較高的重氮化合物濃度會加速其在水溶液中分子自行聚合以及芳香自由基與修飾上電極的芳基分子在其苯環上鄰位的碳原子鍵結形成第二層分子，使電極表面修飾上較厚的芳基分子層而阻礙 TMB 擴散至電極的過程，因而降低感測 TMB 氧化還原的行為。

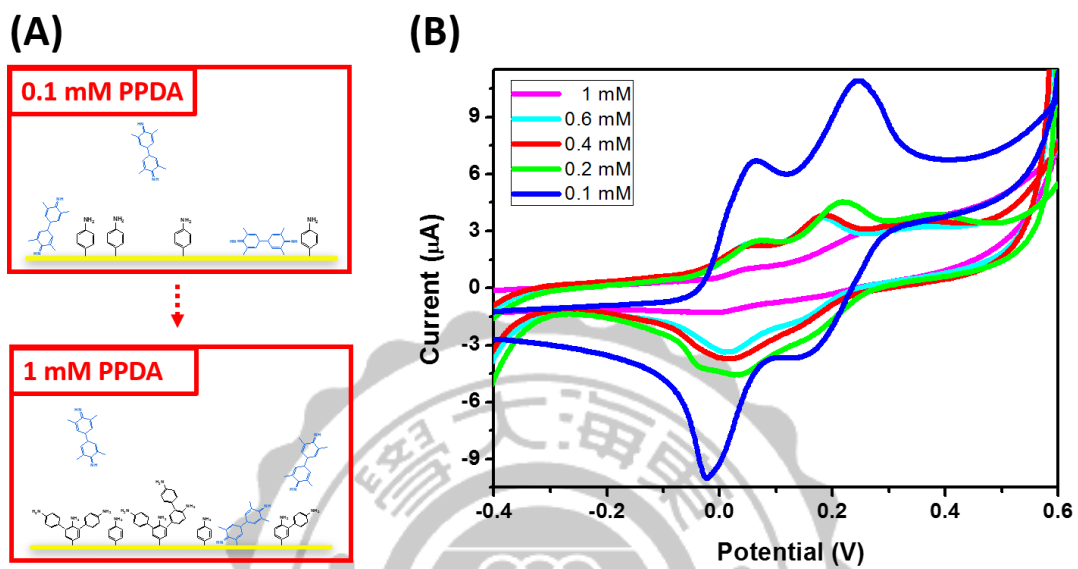


圖 3.13 不同 PPDA 濃度修飾後的 (A) 電極表面示意圖，(B) 感測 TMB 緩衝溶液的循環伏安圖 (0.1 mg/mL TMB in phosphate/ citrate buffer, pH 5.0)。

3.9 不同 PPDA 修飾濃度的核酸感測效果

利用改變 PPDA 的修飾濃度以調控電極表面固定上捕捉探針的多寡，並觀察經由改變此修飾條件後所得到的核酸感測電流值，但 PPDA 修飾的於電極表面的形態可能會因為修飾濃度過高而形成多分子層的構造，進而使得核酸感測的結果受到影響。

以 0.025~1 mM 的範圍內挑選七種濃度進行 PPDA 的修飾並做核酸感測，將其感測後所得到的 TMB_{ox} 還原電流值統整於圖 3.14，可以觀察到電流值從低濃度到高濃度的變化趨勢，起初是逐漸增加，至 0.1 mM 的濃度時得到最高的電流訊號，接著電流值降低後又有些微上升的傾向。我們將這樣的結果分為三個部分(綠色、橙色和藍色) 並分別以其相對應的電極表面示意圖做解釋，如圖 3.14 所示，綠色部分的電流值大小隨濃度增加而提高，推測是因為濃度增加使得 PPDA 修飾的密度增加，捕捉探針的量同樣增多，感測電流的大小也隨之變大；橙色部分的電流值為相對最大的，此時表面修飾的 PPDA 密度較高，可以固定較多的捕捉探針於電極，藉此得到較大的電流值；藍色部分的電流值開始因濃度增加而下降，隨後又緩慢上升，推測一開始因 PPDA 修飾的密度過高使得捕捉探針過度的密集，影響分析物與其雜交而降低了酵素固定的量，或是由於 PPDA 形成多分子層的結構，使表面露出的官能基排列零亂，影響其與捕捉探針進行偶合反應的效率並降低感測電流值的大小，隨後電流值又緩慢隨修飾濃度增加而上升，推測是多分子層最外層露出的官能基有些許因濃度提高而增加，但電流值的大小除了會受表面固定捕捉探針的狀態外，仍有可能因形成多分子層而阻礙感測電流值的高低，於是在針測完感測電流後，隨即將其電極上的溶液吸出進行紫外/可見光吸收光譜儀檢測 TMB_{ox} 的量。

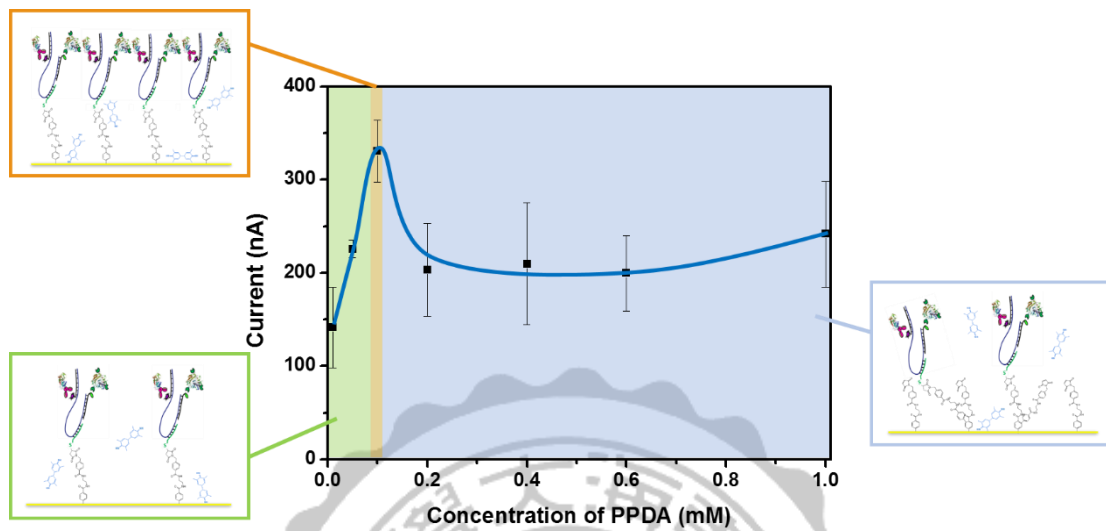


圖 3.14 不同 PPDA 修飾濃度對核酸序列感測電流值的影響。



將做完電化學感測的酵素受質溶液吸取出來並偵測其於 650 nm 的吸收值大小以觀察核酸反應機制中經酵素催化反應後所得到 TMB_{ox} 的多寡，由於此吸收值為直接分析酵素連鎖反應所得到的產物並不會受到電極本身感測氧化還原的效力影響，因此測得的吸收值大小反應的即為捕捉探針修飾於電極的狀態。

觀察圖 3.15 中吸收值大小受 PPDA 修飾濃度影響的趨勢與圖 3.14 中感測電流值大小的變化相近，吸收值於低濃度的條件下，如綠色區部分吸收值會隨濃度增加而上升；於橙色部分的吸收值升到最大；至藍色部分的吸收值起初隨濃度增加而下降，隨後又因濃度提高使得吸收值漸漸上升，而此結果的推論與圖 3.14 相同，因此藍色部分的推測可以大致排除 PPDA 修飾電極被鈍化所造成的影響，證實其電流訊號值主要呈現的為捕捉探針修飾的狀態，藉此確認於此濃度範圍的修飾並不會影響電化學感測的分析。

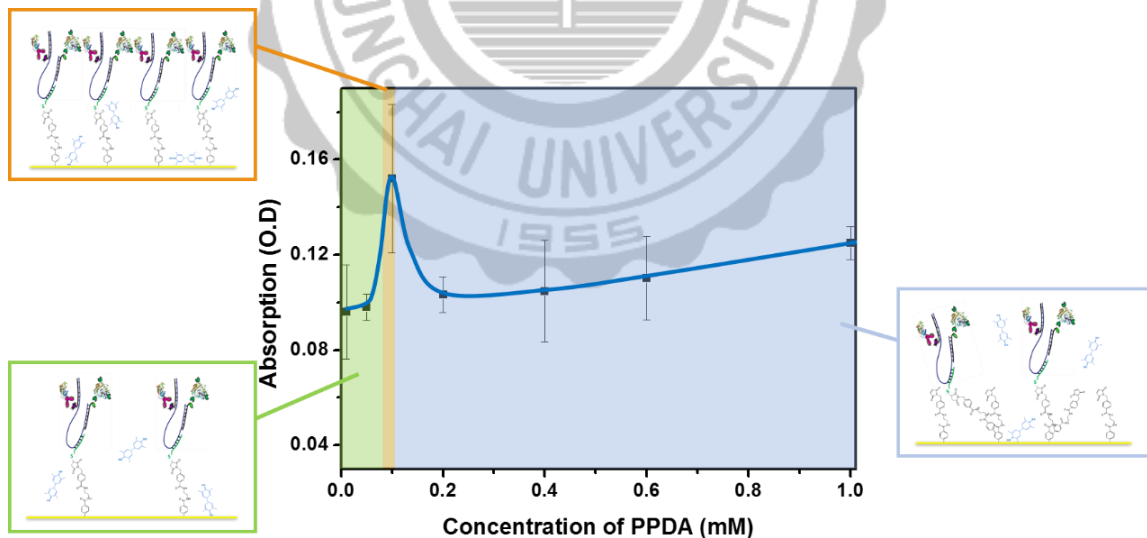


圖 3.15 不同 PPDA 修飾濃度對核酸序列感測後所得到 TMB_{ox} 吸收值 (650 nm) 的影響。

3.10 修飾 MD 和 SC 電極的表面檢測

經由上述 PPDA 修飾電極的性質探討及 PPDA 結合 MBS 的核酸感測平台分析，已確立此電化學接枝法的修飾效果與核酸感測平台的偵測效力。隨後將核酸感測平台所修飾的芳基重氮化合物改為 MD 與 SC，即可避免傳統自組裝單層膜法固定核酸探針時所需的長時間修飾，並且省略 MPA 與 DTT 做電極表面抗吸附修飾的步驟與時間，以達到快速固定核酸探針、簡化抗吸附修飾的流程和減少化合物使用種類的目的。

將合成出的 MD 與 SC 做核酸感測的應用前，利用 ATR-FTIR 確認這兩種化合物修飾上電極後的表面狀態，其中圖 3.16 為 MD 修飾電極的 ATR-FTIR 圖譜，圖中可以找到 3348、1704、1513 和 1344 cm^{-1} 的訊號峰，分別代表的官能基為 NH 的伸張振動、C=O 的伸張振動、苯環的振動和 C-N 的伸張振動，證實表面固定上 MD 分子且成功修飾馬來醯亞胺的官能基於電極；而圖 3.17 為 SC 修飾電極的 ATR-FTIR 圖譜，圖中得到 927 cm^{-1} 為四級胺 (N^+) 的訊號峰，1210、1043 cm^{-1} 代表 SO_3^- 的官能基，1643、3449 cm^{-1} 為 SC 修飾後表層吸附上水分子的 OH 訊號峰，藉此證明表面固定上 SC 分子且修飾磺基甜菜鹼 (Sulfobetaine) 的官能基於電極。

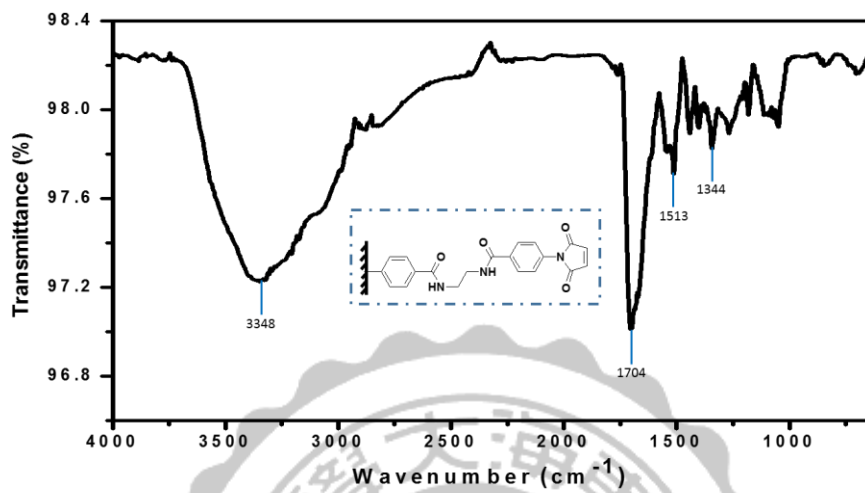


圖 3.16 MD 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。

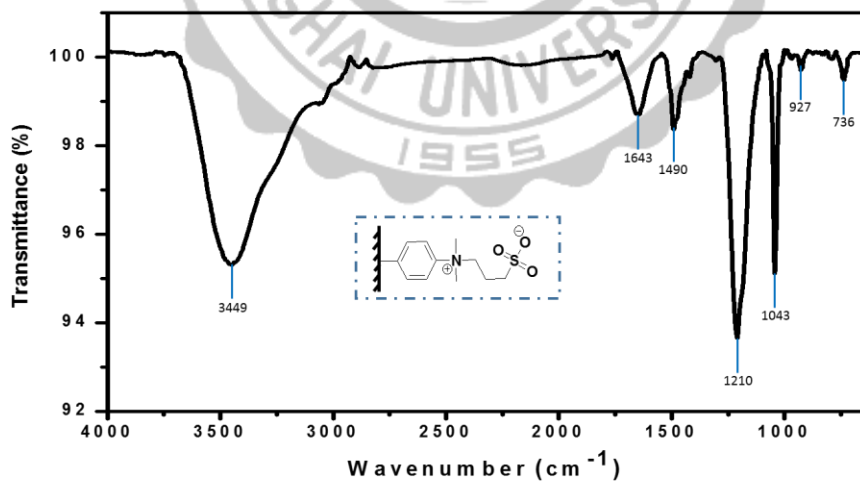


圖 3.17 SC 修飾電極的 ATR-FTIR 光譜圖。

3.11 MD 修飾條件對核酸感測與電極性質的影響

經由先前探討 PPDA 修飾的核酸感測平台中，發現不同 PPDA 修飾條件會改變電極的電化學性質，進而影響電化學感測平台的偵測效力。然而，為探討以 MD 修飾的核酸感測平台與 PPDA 修飾的平台的差異，及其可能造成的電化學性質變化，因此使用 MD 進行不同修飾條件對電極性質與核酸感測的觀察。

將不同條件修飾的 MD 電極進行核酸感測，如圖 3.18(A) 所示，隨著修飾的濃度或圈數越高，得到的感測電流值就越小；接著將偵測完感測電流值的受質溶液吸取至微量管中 (如圖 3.18(B))，並以紫外/可見光光譜儀偵測溶液於 650 nm 的吸收值，藉此觀察不同電極表面所產生 TMB_{ox} 的量，由圖 3.18(C) 中可以發現在 10mM MD 的修飾濃度下，不同修飾圈數的電極得到近乎相同的吸光值，同時對照圖 3.18(A) 中 10mM MD 修飾 1、2 和 5 圈後的感測電流值卻有明顯的大小差異，則表示感測電流值無法準確的反映電極表面 TMB_{ox} 產生的情況，因此，將不同濃度和圈數修飾的電極浸至 TMB 的緩衝溶液中，利用觀察 TMB 的氧化還原峰的方式辨別電極對感測 TMB 的效力，如圖 3.18(D) 所示，修飾濃度和圈數越多的電極其得到 TMB 氧化還原峰越小，則表示隨著 MD 分子固定於電極的量越多，電極感測 TMB 電子傳遞的效能越差，代表其電極受阻礙效應的影響越大。

統整上述 MD 修飾平台的性質和感測效力則發現其皆與 PPDA 修飾平台相近，由於此兩種化合物的構形與特性仍有些許差異，因而使得其結果並非完成一致，但趨勢相同。

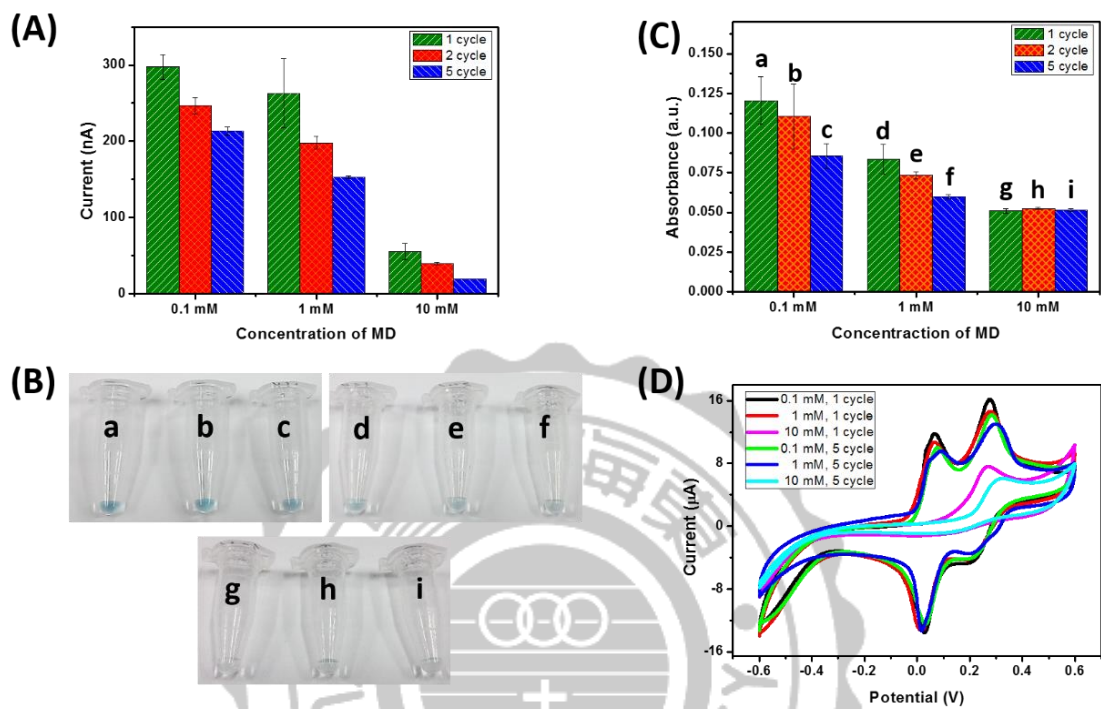


圖 3.18 不同 MD 條件修飾電極的 (A) 核酸感測電流值，(B) 核酸感測後的受質溶液呈色情況，(C) 核酸感測後的受質溶液於 650 nm 的 TMB_{ox} 吸收值，(D) 感測 TMB 緩衝溶液的循環伏安圖 (0.1 mg/mL TMB in phosphate/citrate buffer, pH 5.0)。

3.12 不同濃度 MD 修飾電極的感測效果

為建立一個 MD 與 SC 共沉積的核酸感測平台，因此預先分別確立兩種化合物修飾於電極的效果。藉由先前修飾 PPDA 的條件做為參考，以改變 MD 修飾濃度來觀察其核酸感測電流值的大小，作為 MD 修飾條件的最佳化。

參考圖 3.14 中所得到的結果，挑選 0.025、0.1、0.2 和 0.3 mM MD 的修飾濃度做觀察 (如圖 3.19)，可以發現電流值大小因濃度增加而上升，且於 0.1 mM 的條件下得到較高的訊號值，隨後當濃度過高使得電流值下降。此 MD 修飾後的感測電流值變化趨勢與 PPDA 修飾的感測平台相近，且於 0.1 mM 的電流值大小兩種平台皆得到大約 300 nA 左右的訊號值，證明以我們所合成的 MD 進行修飾後得到的表層狀態與 PPDA 類似且可以用 MD 取代 PPDA 與 MBS 兩步驟修飾的反應，即可達到簡化實驗步驟與減少使用的化學藥品種類的優點。

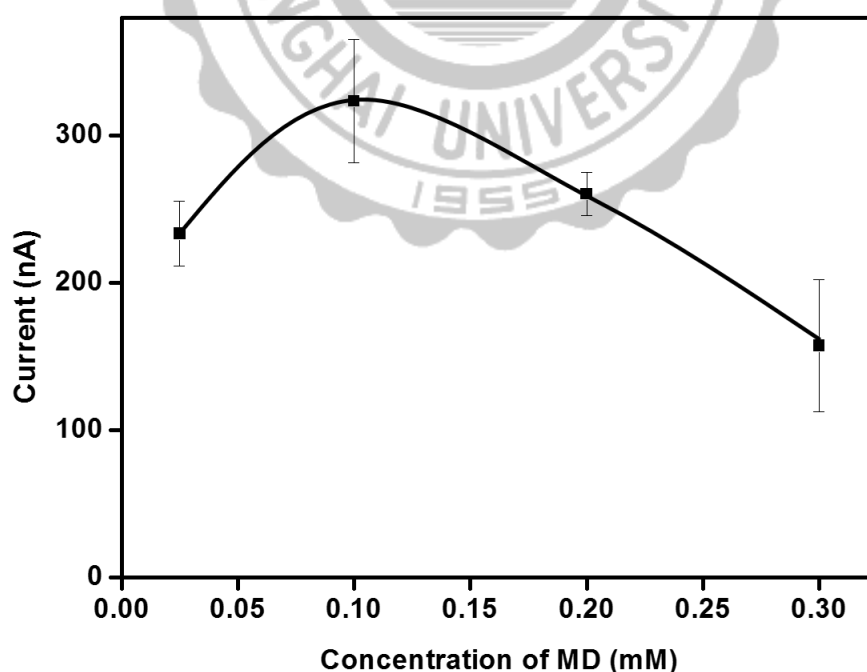


圖 3.19 不同濃度 MD 修飾後的核酸感測電流值。

3.13 SC 修飾電極的抗吸附效果

觀察 PPDA 與 MD 在不同濃度下所得到的感測電流值時，發現兩種化合物經電化學修飾後所得到的核酸感測結果皆於 0.1 mM 濃度下得到最大感測電流，雖然不同化合物的性質可能會造成相同修飾條件下所得到的修飾結果有所不同，但以本實驗中所使用的電化學修飾條件下，其影響不大，因此，直接使用 PPDA 與 MD 最佳化後的修飾條件進行 SC 的修飾，並確認其修飾後的表面特性。

由於修飾 SC 的表面傾向吸附一層微薄水分子，降低酵素與核酸經非特異性吸附所造成的背景值，圖 3.20 中比較空白金電極與修飾 SC 電極的背景電流值，空白金電極藉由非特異性吸附所得到的平均電流值為 30 nA；以 0.1 mM SC 修飾的電極所得到的平均電流值為 13 nA，即可證明以 SC 修飾的電極可以有效降低 60% 背景電流。

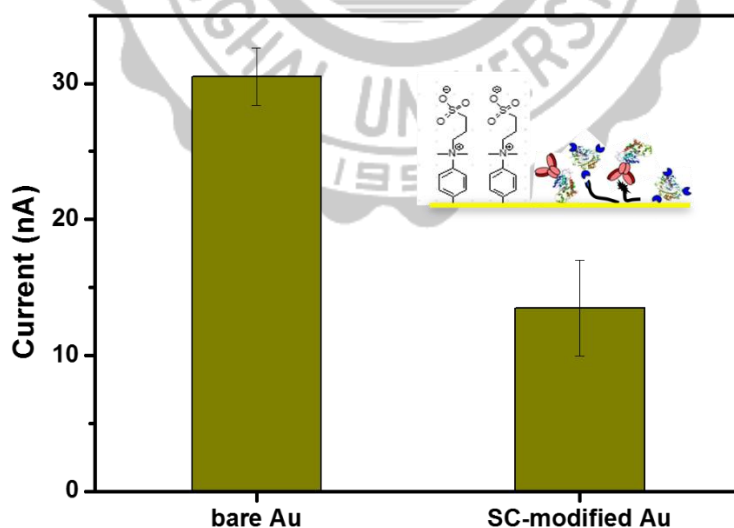


圖 3.20 比較空白金電極與 0.1 mM SC 修飾電極的背景電流值大小。

3.14 兩步驟修飾 MD 與 SC 電極的核酸感測效果

上述的實驗證實了 SC 與 MD 分別具有預期的功能，為建構 MD 與 SC 混合的表面分子層，分別探討兩種修飾的方法，一種是將 MD 與 SC 依續進行電還原修飾，另一種方法以 MD 與 SC 的混合液同時共沉積於電極；由於共沉積 MD 與 SC 的表面狀態會受到許多因素所影響，如化合物的性質或還原電位的不同使得在共沉積的情況下有相互競爭的關係，讓沉積的狀態可能無法單純由濃度來調控表面修飾的分子層。因此，優先嘗試兩步驟沉積的方式，第一步以最佳化後的濃度 0.1 mM 修飾 MD，第二步再用 0.1 mM SC 進行電沉積做為抗吸附的修飾，利用這樣的修飾方法觀察其應用於核酸感測的效果。

以兩步驟修飾 MD 與 SC 之電極進行核酸感測的結果如圖 3.21(A) 所示，將感測結果平均後得到的訊號值為 227 nA，背景值為 28 nA，並得到 S/N 比值為 8 的感測效力，其中訊號值較單一沉積 MD 的訊號值小 29%，而背景值較單一沉積 SC 的訊號值大 115%，推測造成其變化的原因來自 MD 與 SC 修飾於表面的狀態，如圖 3.21(B) 的示意圖所示，首先經 0.1 mM MD 修飾後，電極表面大多被固定上 MD 分子，隨後再用 0.1 mM SC 時，SC 可能會去佔據其餘空白的表面，或是與固定上電極的分子鍵結並形成多層分子層，但因為空白電極的部分較少，使得 SC 傾向與分子鍵結形成多層膜的構形，然而，多分子層的形成是因芳基自由基分子和苯環鄰位上的碳原子產生鍵結，由於經自由基反應修飾的分子層其構形較難控制且再現性不佳，使得背景電流值提高且不穩定；另外，感測訊號值的減少亦可能是來自於第二次 SC 修飾時電位的施加使得固定在電極上的 MD 有些許脫落，或是 SC 所形成的多分子層包埋住 MD 上的馬來醯亞胺官能基，阻礙 MD 與捕捉探針鍵結而造成訊號降低。

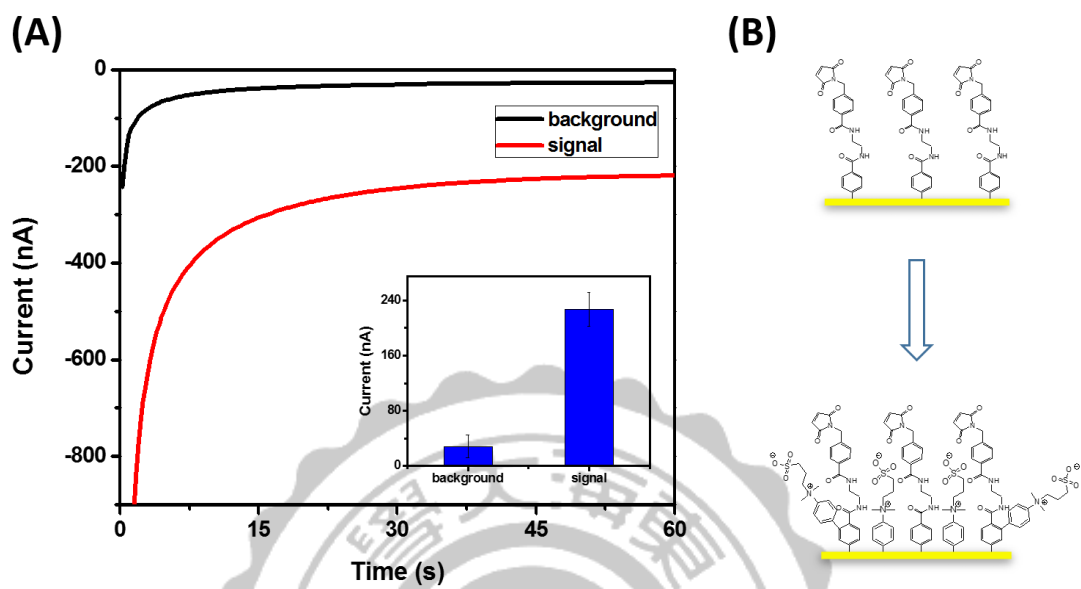


圖 3.21 兩步驟修飾 MD 與 SC 的 (A) 核酸感測電流訊號，(B) 機制示意圖。

3.15 共沉積 MD 與 SC 電極的核酸感測效果

隨後測試共沉積 MD 與 SC 修飾電極的核酸感測效力，將兩種分子混合於重氮化反應的溶液中，並以電化學接枝法修飾 SC 與 MD 於電極表面，當這兩個分子同時被沉積於電極時，其分別於表面修飾的密度和狀態的不同預計將會影響核酸感測的結果。

共沉積 MD 與 SC 修飾電極的核酸感測結果如圖 3.22 所示，將感測結果平均後得到的訊號值為 136 nA，背景值為 7 nA，其訊號值較單一沉積 MD 的訊號值小 57%，而背景值較單一沉積 SC 的訊號值小 46%，推測 MD 於電極上的密度較低使得固定於表面的捕捉探針數量變少造成訊號值降低；而 SC 可能較容易進行電還原反應因此表面的密度並無明顯的改變，再加上 MD 的修飾讓表面的分子密度較單一沉積 SC 的電極更加密集，因此得到較低的背景值。

比較兩步驟與共沉積 MD 與 SC 修飾平台的核酸感測結果，藉由觀察兩種修飾方法所得到的 S/N 比值，前一種的 S/N 比值為 8；而後一種的為 19，且前一種方法所得到的背景值再現性較差，造成每次 S/N 比值的差異變大，因此選擇以共沉積 MD 與 SC 的方式修飾感測平台。

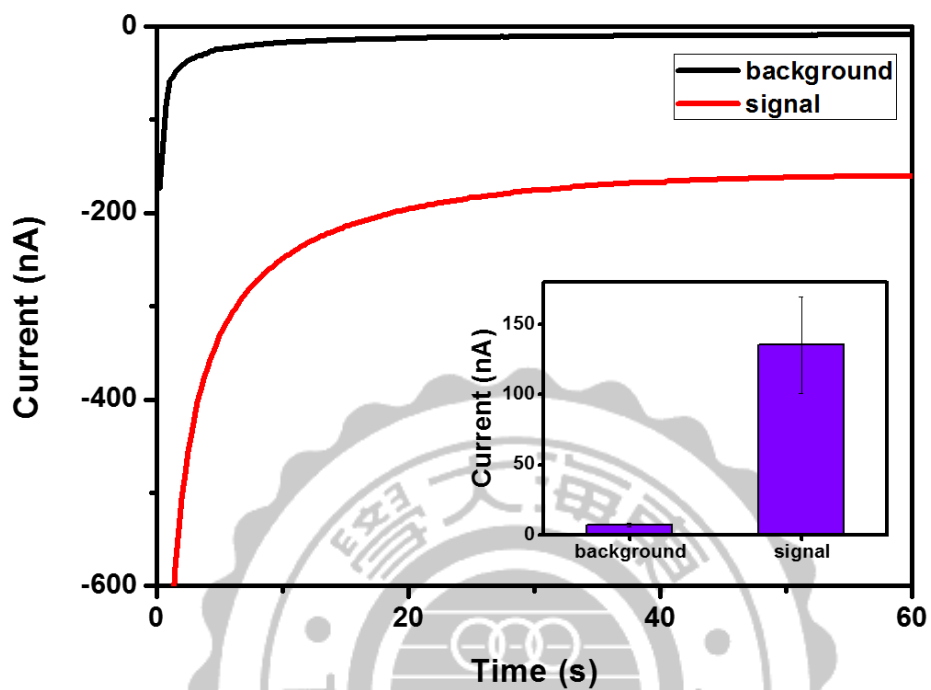


圖 3.22 最佳化的 SC 與 MD 共沉積於感測平台的檢測效果。(0.05 mM MD, 0.05 mM SC, total concentration = 0.1 mM, 1 cycle of CV)

3.16 不同比例共沉積 MD 與 SC 的核酸感測效果

利用調整 MD 與 SC 進行重氮化反應時的濃度比例，欲藉此改變兩分子修飾於表面上的密度關係，進而做表面修飾的調控並進行核酸感測效力的最佳化。

同樣使用總濃度 0.1 mM 的苯胺化合物進行重氮化反應，分別測試 SC : MD 比例為 9:1、3:1、1:1、1:3、1:9、1:19 的苯胺化合物做修飾，其感測結果如圖 3.23 所示，隨著 MD 的比例增加其得到的電流值變大，但當 MD 的比例超過 1:1 時其電流值隨 MD 比例提高而下降，但背景電流幾乎並未因不同比例的修飾有明顯改變。當 MD 的比例越高則傾向於表面修飾的量較多，因此可以發現 MD 的比例變高時，MD 修飾於電極的密度較高則可固定較多的捕捉探針，使得電流訊號上升；然而當超過 1:1 的狀態時可能因為多分子層的形成而使得電流值逐漸下降，其中可以發現在不同的修飾條件下其背景電流值皆大約為 8 nA，推測是由於 SC 較容易與電極形成鍵結，其原因可能是 SC 的重氮化合物其還原電位較靠近正電位或是其化合物的性質所造成，所以使得背景電流值不易隨著化合物濃度比例的改變而影響。

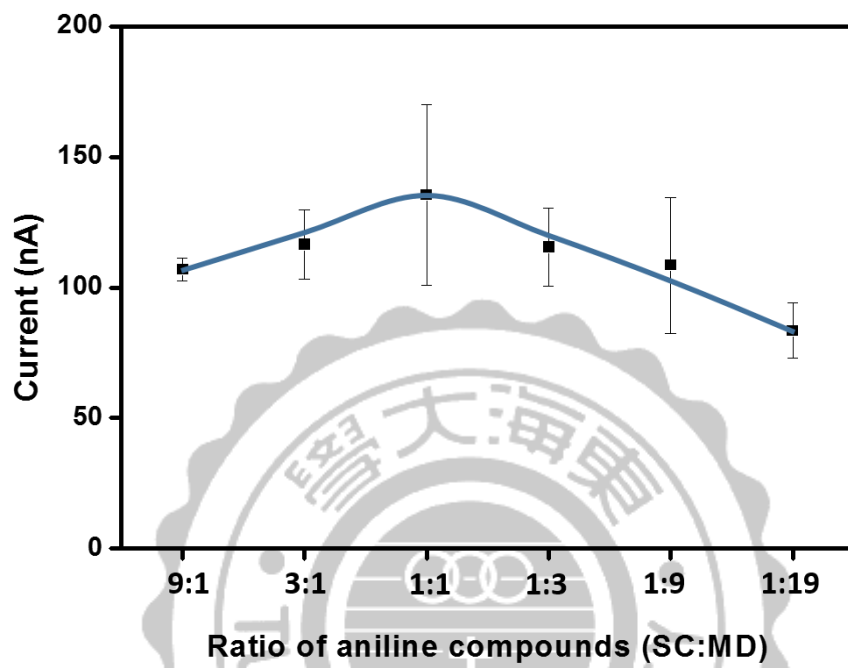


圖 3.23 不同比例共沉積 SC 與 MD 後的核酸感測電流值。

3.17 不同分析物濃度的核酸感測效力

利用最佳化後的核酸感測平台偵測不同濃度的分析物，分別測試 1、10、50、100 nM 的分析物濃度所得到的電流值大小，如圖 3.24 所示，電流值隨濃度增大而提高，於 1 nM 的低濃度時得到 S/N 比值為 7 的感測效力，並計算出一條檢量線 $y = 0.824x + 55.086$, $R^2 = 0.9906$ 於 1~100 nM 分析物的濃度範圍。

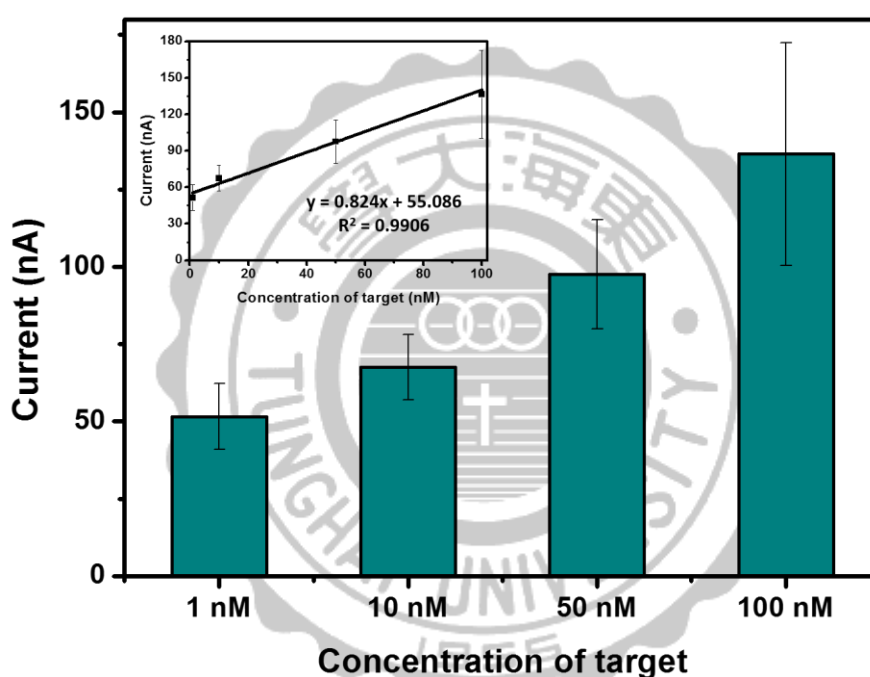


圖 3.24 不同濃度分析物濃度所偵測得電流值。

第四章 結論

本研究成功利用電化學接枝芳基重氮化合物法建立多重抗藥性基因 *bla*_{NDM} 的電化學感測平台，經電化學修飾 MD 與 SC 達到快速固定核酸探針與抗吸附的表面功能化，並於此平台同時偵測兩段 NDM 活化位點的編碼基因與一段 *bla*_{NDM} 特異性基因，以完成準確分析 *bla*_{NDM} 的檢測。

首先以商用的化合物 PPDA 耦合 MBS 的修飾平台作為電化學性質的分析與核酸感測效力的探討，調控電化學修飾時 PPDA 的濃度和修飾圈數，觀察在不同修飾條件下電極感測 TMB 電子傳遞的能力，以及偵測核酸序列的靈敏度。發現高濃度和多圈數的修飾會使得電極鈍化，其核酸感測電流值也會受到阻礙效應的影響而讓訊號值降低，然而，經修飾條件最佳化後以 0.1 mM PPDA 修飾一圈 CV 的感測平台可以有效避免阻礙效應的影響並得到 330 nA 的電流訊號值，參考此最佳化條件並以不同濃度 MD 修飾的平台進行核酸感測，同樣於 0.1 mM 的修飾濃度下得到 323 nA 的最高電流值，且成功以一種 MD 分子替代 PPDA 和 MBS 兩種化合物的表面修飾，接著觀察以 0.1 mM SC 修飾電極其抗吸附的效果，比較未修飾電極可降低 56% 的背景電流值。為了形成兩種芳基重氮化合物的混合分子層，分別測試兩種修飾的方法；第一種是兩步驟分次沉積 MD 以及 SC，此方法得到的平均訊號值為 227 nA，背景值 28 nA，S/N 比值為 8.1；第二種是以 MD 與 SC 的混合液同時進行共沉積，則得到平均訊號值為 136 nA，背景值 7 nA，S/N 比值為 19.4，因此選擇再現性與靈敏度較佳的共沉積法修飾混合分子層且藉由改變兩分子於混合液的濃度比以完成最佳化，最後，利用 1:1 的 MD 與 SC 混合液做為核酸感測平台的修飾條件，並且得到一條 $y = 0.824x + 55.086$, $R^2 = 0.9906$ 的檢量線。

第五章 參考資料

1. S. Yadav, M. Goyal and V. Singh, *JARBS*, 2012, 4, 259-261.
2. B. L. Johnston and E. Bryce, *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 2009, 180, 627-631.
3. L. Poirel, T. R. Walsh, V. Cuvillier and P. Nordmann, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2011, 70, 119-123.
4. P. Nordmann, L. Poirel, T. R. Walsh and D. M. Livermore, *Trends in microbiology*, 2011, 19, 588-595.
5. D. J. Dwyer, M. A. Kohanski and J. J. Collins, *Current opinion in microbiology*, 2009, 12, 482-489.
6. G. Storz and J. A. Imlay, *Current opinion in microbiology*, 1999, 2, 188-194.
7. A. Fleming, *British journal of experimental pathology*, 1929, 10, 226.
8. A. J. Alanis, *Archives of medical research*, 2005, 36, 697-705.
9. A. P. Johnson, A. Pearson and G. Duckworth, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2005, 56, 455-462.
10. A. Hernandez, *Queen's Health Sciences Journal*, 2013, 6.
11. D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee and T. R. Walsh, *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 5046-5054.
12. J. Rolain, P. Parola and G. Cornaglia, *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16, 1699-1701.
13. G. A. Menezes and P. S. Menezes, *Internet Journal of Medical Update*, 2013, 8, 1-3.
14. K. K. Kumarasamy, M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske and S. Irfan, *The Lancet infectious diseases*, 2010, 10, 597-602.
15. A. P. Johnson and N. Woodford, *Journal of medical microbiology*, 2013, 62, 499-513.
16. M. N. Alekshun and S. B. Levy, *Cell*, 2007, 128, 1037-1050.
17. P. Nordmann, T. Naas and L. Poirel, *Emerging infectious diseases*, 2011, 17, 1791-1798.
18. J.-F. Wang and K.-C. Chou, *PloS one*, 2011, 6, e18414.
19. D. T. King, L. J. Worrall, R. Gruninger and N. C. Strynadka, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134, 11362-11365.
20. Z. Liang, L. Li, Y. Wang, L. Chen, X. Kong, Y. Hong, L. Lan, M. Zheng, C. Guang-Yang, H. Liu, X. Shen, C. Luo, K. K. Li, K. Chen and H. Jiang, *PloS one*, 2011, 6, e23606.

21. R. A. Bonnin, T. Naas, L. Poirel and P. Nordmann, *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50, 1419-1421.
22. P. Nordmann and L. Poirel, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2013, 68, 487-489.
23. A. Manoharan, R. Pai, V. Shankar, K. Thomas and M. Lalitha, *Indian Journal of Medical Research*, 2003, 117, 81-87.
24. C. G. Carvalhaes, R. C. Picao, A. G. Nicoletti, D. E. Xavier and A. C. Gales, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2010, 65, 249-251.
25. D. Girlich, L. Poirel and P. Nordmann, *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50, 477-479.
26. T. Naas, G. Cuzon, P. Bogaerts, Y. Glupczynski and P. Nordmann, *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49, 1608-1613.
27. G. Cuzon, T. Naas, P. Bogaerts, Y. Glupczynski and P. Nordmann, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2013, 76, 502-505.
28. T. Naas, A. Ergani, A. Carrer and P. Nordmann, *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55, 4038-4043.
29. J. Monteiro, R. H. Widen, A. C. Pignatari, C. Kubasek and S. Silbert, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2012, 67, 906-909.
30. K. Lee, C. K. Kim, D. Yong, S. H. Jeong, J. H. Yum, Y. H. Seo, J. D. Docquier and Y. Chong, *Journal of microbiological methods*, 2010, 83, 149-152.
31. F. Pasteran, T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport and A. Corso, *Journal of clinical microbiology*, 2009, 47, 1631-1639.
32. A. Amjad, I. Mirza, S. Abbasi, U. Farwa, N. Malik and F. Zia, *Iranian journal of microbiology*, 2011, 3, 189.
33. B. A. Sultan, E. Khan, F. Hussain, A. Nasir and S. Irfan, *JOURNAL OF THE PAKISTAN MEDICAL ASSOCIATION*, 2013, 63, 955-960.
34. C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro and R. C. Salvarezza, *Chemical Society reviews*, 2010, 39, 1805-1834.
35. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo and G. M. Whitesides, *Chem Rev*, 2005, 105, 1103-1170.
36. D. K. Schwartz, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2001, 52, 107-137.
37. A. Ulman, *Chem Rev*, 1996, 96, 1533-1554.
38. R. Yamada, H. Wano and K. Uosaki, *Langmuir*, 2000, 16, 5523-5525.
39. A. A. Gewirth and B. K. Niece, *Chem Rev*, 1997, 97, 1129-1162.
40. C. Vericat, M. E. Vela and R. C. Salvarezza, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2005, 7, 3258-3268.
41. T. Sawaguchi, Y. Sato and F. Mizutani, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2001, 3, 3399-3404.

42. C. A. McDermott, M. T. McDermott, J.-B. Green and M. D. Porter, *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, 99, 13257-13267.
43. C. Schönenberger, J. Sondag-Huethorst, J. Jorritsma and L. Fokkink, *Langmuir*, 1994, 10, 611-614.
44. A. W. Snow, G. G. Jernigan and M. G. Ancona, *The Analyst*, 2011, 136, 4935-4949.
45. E. Ostuni, B. A. Grzybowski, M. Mrksich, C. S. Roberts and G. M. Whitesides, *Langmuir*, 2003, 19, 1861-1872.
46. W. C. Liao, M. C. Chuang and J. A. Ho, *Biosensors & bioelectronics*, 2013, 50, 414-420.
47. E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama and G. M. Whitesides, *Langmuir*, 2001, 17, 5605-5620.
48. L. Yoon Suk Lee and R. Bruce Lennox, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2007, 9, 1013-1020.
49. S. V. Heines, *J Chem Educ*, 1958, 35, 187.
50. M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson and J. M. Saveant, *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114, 5883-5884.
51. J. Pinson and F. Podvorica, *Chemical Society reviews*, 2005, 34, 429-439.
52. M. Khoshroo and A. A. Rostami, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2010, 647, 117-122.
53. S. Mahouche-Chergui, S. Gam-Derouich, C. Mangeney and M. M. Chehimi, *Chemical Society reviews*, 2011, 40, 4143-4166.
54. C. Saby, B. Ortiz, G. Y. Champagne and D. Bélanger, *Langmuir*, 1997, 13, 6805-6813.
55. R. Wistar and P. D. Bartlett, *Journal of the American Chemical Society*, 1941, 63, 413-417.
56. J. Lyskawa and D. Bélanger, *Chemistry of materials*, 2006, 18, 4755-4763.
57. R. Polsky, J. C. Harper, D. R. Wheeler, S. M. Dirk, D. C. Arango and S. M. Brozik, *Biosensors & bioelectronics*, 2008, 23, 757-764.
58. J. K. Kariuki and M. T. McDermott, *Langmuir*, 2001, 17, 5947-5951.
59. A. M. Nowicka, M. Fau, A. Kowalczyk, M. Strawski and Z. Stojek, *Electrochimica Acta*, 2014, 126, 11-18.
60. J. Agullo, S. Canesi, F. Schaper, M. Morin and D. Belanger, *Langmuir*, 2012, 28, 4889-4895.
61. F. Anariba, S. H. DuVall and R. L. McCreery, *Analytical chemistry*, 2003, 75, 3837-3844.
62. L. Lee, H. Ma, P. A. Brooksby, S. A. Brown, Y. R. Leroux, P. Hapiot and A. J. Downard, *Langmuir*, 2014, 30, 7104-7111.

63. C. Combellas, F. Kanoufi, J. Pinson and F. I. Podvorica, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130, 8576-8577.
64. T. Menanteau, E. Levillain and T. Breton, *Langmuir*, 2014, 30, 7913-7918.
65. G. Liu and J. J. Gooding, *Langmuir*, 2006, 22, 7421-7430.
66. G. Liu, M. N. Paddon-Row and J. Justin Gooding, *Electrochemistry Communications*, 2007, 9, 2218-2223.
67. B. Prieto-Simon, C. Saint and N. H. Voelcker, *Anal Chem*, 2014, 86, 1422-1429.
68. A. L. Gui, H. M. Yau, D. S. Thomas, M. Chockalingam, J. B. Harper and J. J. Gooding, *Langmuir*, 2013, 29, 4772-4781.
69. G. Liu, M. Chockalingham, S. M. Khor, A. L. Gui and J. J. Gooding, *Electroanalysis*, 2010, 22, 918-926.
70. M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezhuk, S. McGinnis and T. L. Madden, *Nucleic Acids Res*, 2008, 36, W5-W9.
71. S. H. Chen, C. Z. Lo, S. Y. Su, B. H. Kuo, C. A. Hsiung and C. Y. Lin, *Bmc Genomics*, 2010, 11.
72. Y. H. Lai, Y. C. Liao, J. J. Mu, T. M. Kuo, Y. H. Hsu and M. C. Chuang, *Chemical communications*, 2014, 50, 12018-12021.

