

私立東海大學化學工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松博士

DNA 生物感測器製備及其於 DNA 分析之應用

Preparation of DNA biosensor and its application for DNA  
analysis

研究生：賴孟村 撰

中華民國 97 年 7 月

## 中文摘要

核酸分析於生物化學以及分子生物學的研究中扮演著重要的角色，它被廣泛的應用於傳染病、流行病、癌症以及遺傳疾病等的臨床檢測以及食品衛生檢驗、法醫檢測、環境監控等方面。由於利用放射性同位素標定核酸探針的傳統核酸分析方法存在安全性的考量，因此非放射性標定 DNA 探針的技術更受到大家的重視。由於電化學方法具有高靈敏度與操作簡便等優點，因此電化學 DNA 感測器為一種具有發展性的生物感測器。

本研究探討三種電極分別為：(1)於碳糊電極上(CPE)修飾對氨基苯甲酸(4-ABA)、(2)將多層奈米碳管(MWNT)酸處理作為碳糊電極材料以及(3)先於白金絲上聚合二氧乙烯噻吩(PEDOT)，然後再修飾對氨基苯甲酸，接著利用 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)與 N-羥基琥珀酰亞胺(NHS)為表面活化劑與媒合劑，將一端修飾有氨基(-NH<sub>2</sub>)之單鏈 DNA(ssDNA)固定於具有羧基(-COOH)之電極表面上，經雜合作用後將具有電化學活性之道諾霉素(DNM)嵌入雙鏈 DNA(dsDNA)的鹼基對中，通過微分脈衝伏安法(DPV)檢測嵌入之道諾霉素之波峰電流，可以識別不同濃度之完全互補之單鏈 DNA 當完全互補序列濃度介於 20 nM~100 nM 範圍內，利用所製成之電極感測所得波峰電流與濃度有良好之線性關係，檢測靈敏度可達  $2.6802 \mu\text{A nM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ，此外本電極亦可應用於檢驗具有錯配之單鏈 DNA，並可藉由提高雜合溫度來提高檢測之特異性。

關鍵字：生物感測器(biosensor)、道諾霉素(daunomycin, DNM)、微分脈衝伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV)、錯配(mismatch)

## **ABSTRACT**

The nucleic acid analysis plays an important role in biochemistry and molecular biology researches. It has been widely used in clinical examinations of infections, epidemics, cancers, heredity diseases, as well as the examinations of food sanitation and environmental monitoring. Due to the safety considerations of the traditional nucleic acid analysis by using radioactive labeled nucleic acid probe, the techniques that use nonradioactive DNA probe have received many attentions. Recently, the electrochemical DNA sensor has provided the nucleic acid analysis with high sensitivity and simple procedure, thus is a promising approach in the development of biological DNA measurement.

The current research has constructed 4-ABA/CPE/Pt, MWNT/CPE/Pt, and 4-ABA/PEDOT/Pt electrodes, then used EDC and NHS as crosslinker agents to covalently attach the single strand DNA probe through the amino group at its 3' terminal to the surface of electrode that had been modified with carboxyl groups. The constructed DNA electrodes were then hybridized with target oligo DNA under a proper condition, and then DNM intercalated into the hybrid DNA structure. Due to the electrochemical activity of DNM, DPV can be employed to quantify the amount of DNM bound, and the concentration to target DNA as well. In this study, we have compared the performances of three types of electrode, and we emphasized the 4-ABA/PEDOT/Pt electrode because of its higher stability and sensitivity. Our results have demonstrated that the 4-ABA/PEDOT/Pt electrode exhibited a nice linear correlation between the peak current and the concentration of target DNA in the range of 20 nM ~ 100 nM, and the sensitivity was estimated as  $2.6802 \mu\text{A nM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ . Meanwhile, it



was able to distinguish the target DNA with or without mismatched bases.

Finally, the sensitivity of the electrode was further improved by optimizing the annealing temperature.

Key words: biosensor, daunomycin(DNM), Differential Pulse Voltammetry(DPV), mismatch.

## 誌謝

本篇論文的完成，首先要感謝恩師 顧野松老師於這兩年中在課業與研究上的指導，使得我從剛進實驗室的一無所知，經過老師細心的指導漸漸的瞭解如何找資料以解決實驗上的問題，使我在這段日子裡受益良多，在此向老師致上最誠摯的感謝。此外感謝兩位口試委員杜景順教授以及蔡明瞭教授在百忙中給予本論文的指正並提供寶貴的建議，使得論文更加嚴謹與充實。

感謝建中學長與筱惇學長帶我進入生物感測器的領域，指導我在基礎實驗上的學習，奠定了我日後實驗上的基礎，也感謝華良學長給予了許多領域上的知識讓我受益良多，感謝北極學長平時跟我一起話家常度過很多個煩悶的日子以及帶給我很多有關於資訊上得知識，感謝方婷學姐於實驗及處世方面給予的許多建議及幫忙，感謝東柏學長與 Kenji 學長於生活與球技上給予的指導，感謝博派的滷蛋哥在百忙中抽空陪我去騎著單車繞了一圈台灣以及博派的小綠姐平時情義相挺的幫忙，還有實驗室夥伴治緯學長、亮均、佳霖、政峰，以及實驗室的專題生心潔、立昇、森迪、建成、裕暉、芳雯、俐穎、姿岑、淑雯，感謝你們的幫忙，沒有你們就無法順利完成這一切。

此外感謝淨棋與馨蔚在英文上的幫忙，以及天乙、順福、月巴雲、芳梅與楷柟在我感到煩悶時的鼓勵，也要感謝同學胖胖、柏樺、孟倫、柄良、漢華、凱新、佳穎、秀玲以及學弟本強、良源平時的幫忙及鼓勵，有了你們的陪伴讓我的研究生活過的多采多姿。

最後，感謝我的爸媽多年來給我的照顧以及支持，給了我一個沒有後顧之憂的環境可以讓我好好的在課業上打拼，也要感謝老妹平時給予的關懷，還有感謝阿公、阿嬤、阿姨&姨丈們、舅舅&舅媽、姑姑&姑丈，還有表兄弟姐妹們，最後僅以此文獻給大家，感謝所有幫助我以及關心我的人，並與你們一起分享我的喜悅。

## 目錄

|  |           |
|--|-----------|
| 摘要.....                                    | III       |
| ABSTRACT.....                              | V         |
| 誌謝.....                                    | VII       |
| 目錄.....                                    | IX        |
| 圖目錄.....                                   | XIII      |
| <b>第一章 緒論.....</b>                         | <b>1</b>  |
| 1-1 生物感測器簡介.....                           | 1         |
| 1-2 電化學 DNA 生物感測器之簡介.....                  | 3         |
| 1-3 核酸探針簡介.....                            | 4         |
| 1-4 聚二氧乙烯噻吩簡介.....                         | 5         |
| 1-5 對氨基苯甲酸簡介.....                          | 6         |
| 1-6 道諾霉素簡介.....                            | 7         |
| 1-7 研究動機與方法.....                           | 9         |
| <b>第二章 實驗藥品與儀器簡介.....</b>                  | <b>11</b> |
| 2-1 實驗儀器設備.....                            | 11        |
| 2-2 實驗藥品.....                              | 13        |
| 2-3 實驗引子.....                              | 15        |
| 2-4 實驗流程.....                              | 16        |
| <b>第三章 探討以碳粉與多層奈米碳管為 DNA 生物感測器之材料.....</b> | <b>17</b> |
| 3-1 實驗目的.....                              | 17        |
| 3-2 實驗原理.....                              | 18        |
| 3-2-1 核酸探針固定化原理.....                       | 18        |
| 3-2-2 道諾霉素於 DNA 生物感測器之應用.....              | 20        |

|         |                                    |    |
|---------|------------------------------------|----|
| 3-2-3   | 多層奈米碳管表面羧酸基化之原理 .....              | 22 |
| 3-2-4   | 微分脈衝伏安法 .....                      | 24 |
| 3-3     | 實驗步驟 .....                         | 26 |
| 3-3-1   | 4-ABA/CPE 電極之製備 .....              | 26 |
| 3-3-1-1 | CPE 電極之製備 .....                    | 26 |
| 3-3-1-2 | 4-ABA 循環伏安法聚合流程 .....              | 27 |
| 3-3-1-3 | 4-ABA 定電壓法聚合流程 .....               | 27 |
| 3-3-2   | 酸處理多層奈米碳管(MWNT)電極之製備流程 .....       | 28 |
| 3-3-2-1 | 酸處理 MWNT 之處理流程 .....               | 28 |
| 3-3-2-2 | 製備酸處理 MWNT 電極 .....                | 28 |
| 3-3-3   | 工作電極之導電度測試 .....                   | 30 |
| 3-3-4   | DNA 生物感測器感測完全互補序列之靈敏度 .....        | 31 |
| 3-3-4-1 | 實驗操作程序 .....                       | 31 |
| 3-4     | 實驗結果與討論 .....                      | 33 |
| 3-4-1   | 電極之掃描式電子顯微鏡分析 .....                | 33 |
| 3-4-2   | 電極之穿透式電子顯微鏡分析 .....                | 40 |
| 3-4-3   | 能量分散式光譜儀(EDS)元素分析 .....            | 44 |
| 3-4-3-1 | 多層奈米碳管經酸處理前後比較 .....               | 44 |
| 3-4-4   | 電極之傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)分析 .....        | 46 |
| 3-4-5   | 經酸處理之奈米碳管親水性提昇之觀察 .....            | 48 |
| 3-4-6   | 碳糊電極(CPE)之電化學反應特性 .....            | 50 |
| 3-4-6-1 | 4-ABA/CPE 電極之製備 .....              | 50 |
| 3-4-6-2 | 碳糊電極(CPE)修飾前後之電極導電度變化 .....        | 51 |
| 3-4-6-3 | 未經修飾電極感測道諾霉素 .....                 | 53 |
| 3-4-6-4 | 修飾不同濃度對胺基苯甲酸對 DNA 感測器靈敏度之影響 .....  | 55 |
| 3-4-6-5 | 聚合不同圈數 4-ABA 對 DNA 感測器靈敏度之影響 ..... | 57 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3-4-6-6    | 修飾不同濃度之 DNA 探針對 DNA 感測器靈敏度之影響.....            | 59        |
| 3-4-7      | 以奈米碳管為碳糊電極材料之電化學反應特性 .....                    | 61        |
| 3-4-7-1    | 奈米碳管經酸處理前後製成 MWNT/CPE 之導電度變化.....             | 61        |
| 3-4-7-2    | MWNT/CPE 感測道諾霉素 .....                         | 63        |
| 3-4-7-3    | 以酸處理多層奈米碳管為電極材料對 DNA 感測器靈敏度之影響.....           | 64        |
| 3-5        | 綜合討論.....                                     | 66        |
| <b>第四章</b> | <b>探討以 4-ABA/PEDOT/Pt 為 DNA 生物感測器之材料.....</b> | <b>67</b> |
| 4-1        | 實驗目的.....                                     | 67        |
| 4-2        | 實驗原理.....                                     | 68        |
| 4-2-1      | PEDOT 電化學聚合原理 .....                           | 68        |
| 4-3        | 實驗步驟.....                                     | 69        |
| 4-3-1      | 白金絲之前處理 .....                                 | 69        |
| 4-3-2      | 製備 PEDOT/Pt 電極.....                           | 69        |
| 4-3-3      | 製備 4-ABA/PEDOT/Pt 電極.....                     | 71        |
| 4-3-4      | DNA 感測器感測完全互補序列之靈敏度.....                      | 71        |
| 4-3-5      | DNA 感測器感測錯配序列之靈敏度.....                        | 72        |
| <b>4-4</b> | <b>實驗結果與討論.....</b>                           | <b>75</b> |
| 4-4-1      | 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之表面形態.....                   | 75        |
| 4-4-2      | 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)分析 .....    | 79        |
| 4-4-3      | 4-ABA/PEDOT/Pt 電極修飾前後之電極導電度變化.....            | 82        |
| 4-4-4      | DNA 於電極上對感測之影響.....                           | 83        |
| 4-4-5      | 感測不同濃度之完全互補目標引子對 DNA 感測器靈敏度之影響.....           | 86        |
| 4-4-6      | 感測含錯配鹼基之目標 DNA 探針對 DNA 感測器靈敏度之影響 ..           | 89        |
| 4-4-7      | 感測不同比例之完全互補與含錯配之目標 DNA.....                   | 99        |

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| 4-5 綜合討論.....           | 103        |
| <b>第五章 實驗結論與建議.....</b> | <b>104</b> |
| 5-1 實驗結論.....           | 104        |
| 5-2 建議.....             | 106        |
| <b>參考文獻.....</b>        | <b>108</b> |

## 圖目錄

|   |    |
|---|----|
| 圖 1- 1 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)之化學結構圖 .....                | 6  |
| 圖 1- 2 對氨基苯甲酸之化學結構式.....                                      | 6  |
| 圖 1- 3 道諾霉素化學結構式.....   | 8  |
| 圖 1- 4 道諾霉素電化學氧化還原反應機構圖.....                                  | 8  |
| 圖 2- 1 實驗架構.....  | 16 |
| 圖 3- 1 EDC 與 NHS 活化羧酸基流程圖.....                                | 19 |
| 圖 3- 2 道諾霉素兩平面呈 59°(A)、137°(B)與 159°(C)時嵌入 DNA 結構示意圖<br>..... | 21 |
| 圖 3- 3 羧化奈米碳管示意圖.....   | 23 |
| 圖 3- 4 微分脈衝伏安法施加電位波形圖.....                                    | 25 |
| 圖 3- 5 電化學分析儀裝置圖.....   | 29 |
| 圖 3- 6 未經修飾之碳粉的 SEM 圖(1000 倍).....                            | 34 |
| 圖 3- 7 未經修飾之碳粉的 SEM 圖(5000 倍).....                            | 34 |
| 圖 3- 8 碳粉以循環伏安法聚合 4-ABA 之 SEM 圖(1000 倍).....                  | 35 |
| 圖 3- 9 碳粉以循環伏安法聚合 4-ABA 之 SEM 圖(5000 倍).....                  | 35 |
| 圖 3- 10 奈米碳管未經酸處理之 SEM 圖(5000 倍).....                         | 37 |
| 圖 3- 11 奈米碳管未經酸處理之 SEM 圖(30000 倍).....                        | 37 |
| 圖 3- 12 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(5000 倍).....                           | 36 |
| 圖 3- 13 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(30000 倍).....                          | 36 |
| 圖 3- 14 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(5000 倍).....                           | 39 |
| 圖 3- 15 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(30000 倍).....                          | 39 |
| 圖 3- 16 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖.....                               | 41 |
| 圖 3- 17 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖.....                               | 41 |
| 圖 3- 18 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖.....                               | 42 |



|   |    |
|---|----|
| 圖 3- 19 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖 .....                                   | 42 |
| 圖 3- 20 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖 .....                                   | 43 |
| 圖 3- 21 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖 .....                                   | 43 |
| 圖 3- 22 多層奈米碳管酸處理前後之能量分散式光譜儀元素分析圖 .....                           | 45 |
| 圖 3- 23 多層奈米碳管經酸處理前後之 FTIR 訊號相除比較圖 .....                          | 47 |
| 圖 3- 24 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管(B)經超音波震盪後之親水性比較圖 .....                    | 49 |
| 圖 3- 25 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管 (B)經 1hr 靜置之親水性比較圖 .....                  | 49 |
| 圖 3- 26 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管 (B)經離心之親水性比較圖 .....                       | 49 |
| 圖 3- 27 碳糊電極聚合 4-ABA 之循環伏安圖 .....                                 | 50 |
| 圖 3- 28 修飾對氨基苯甲酸碳糊電極(4-ABA/CPE)與未修飾碳糊電極(CPE)感測<br>赤血鹽之循環伏安圖 ..... | 52 |
| 圖 3- 29 以碳糊電極用循環伏安法感測不同濃度道諾霉素之循環伏安圖 .....                         | 54 |
| 圖 3- 30 碳糊電極修飾不同濃度對氨基苯甲酸感測道諾霉素之微分脈衝伏安圖<br>.....                   | 56 |
| 圖 3- 31 在碳糊電極上聚合不同圈數之 4-ABA 感測道諾霉素之微分脈衝伏安圖<br>.....               | 58 |
| 圖 3- 32 修飾不同濃度之 DNA 探針感測不同濃度目標 DNA 之微分脈衝伏安圖<br>.....              | 60 |
| 圖 3- 33 MWNT/CPE 以循環伏安法感測赤血鹽 .....                                | 61 |
| 圖 3- 34 以循環伏安法感測赤血鹽比較酸處理前後奈米碳管為碳糊電極材料 ..                          | 62 |
| 圖 3- 35 以奈米碳管為碳糊電極材料感測道諾霉素之循環伏安法圖 .....                           | 63 |
| 圖 3- 36 以經酸處理之多層奈米碳管為電極材料做感測之影響圖 .....                            | 65 |
| 圖 4- 1 二氧乙烯噻吩聚合過程圖 .....  | 68 |
| 圖 4- 2 電化學分析系統裝置圖 .....   | 70 |
| 圖 4- 3 以白金為工作電極之實驗流程圖 .....                                       | 74 |
| 圖 4- 4 Pt 電極表面形態 (200 倍 SEM 圖) .....                              | 76 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 4- 5 Pt 電極表面形態 (10000 倍 SEM 圖).....   | 76 |
| 圖 4- 6 PEDOT/Pt 電極表面之形態 (200 倍 SEM 圖).....  | 77 |
| 圖 4- 7 PEDOT/Pt 電極表面之形態 (10000 倍 SEM 圖).....                                      | 77 |
| 圖 4- 8 4-ABA/PEDOT/Pt 電極表面之形態(200 倍 SEM 圖).....                                   | 78 |
| 圖 4- 9 4-ABA/PEDOT/Pt 電極表面之形態(10000 倍 SEM 圖).....                                 | 78 |
| 圖 4- 10 PEDOT/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖.....  | 80 |
| 圖 4- 11 4-ABA/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖.....  | 80 |
| 圖 4- 12 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖.....  | 81 |
| 圖 4- 13 電極修飾聚合物前後感測赤血鹽之循環伏安圖.....   | 82 |
| 圖 4- 14 不同電極(PEDOT/PT、 4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt)<br>以微分脈衝伏安法感測比較圖..... | 84 |
| 圖 4- 15 不同電極(4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt) 以微分脈衝伏<br>安法感測比較圖.....          | 85 |
| 圖 4- 16 雜合不同濃度之完全互補目標 DNA 對感測器電化學訊號之微分脈衝伏安<br>圖.....                              | 87 |
| 圖 4- 17 雜合完全互補目標 DNA 之濃度對波峰電流圖.....   | 88 |
| 圖 4- 18 雜合溫度 55°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖...91                                  | 91 |
| 圖 4- 19 雜合溫度 56°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖...92                                  | 92 |
| 圖 4- 20 雜合溫度 57°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖...93                                  | 93 |
| 圖 4- 21 於不同雜合溫度下感測 DJ2 序列之微分脈衝伏安圖.....  | 94 |
| 圖 4- 22 於不同雜合溫度下感測 DJ3 序列之微分脈衝伏安圖.....  | 95 |
| 圖 4- 23 於不同雜合溫度下感測 DJ4 序列之微分脈衝伏安圖.....  | 96 |
| 圖 4- 24 於不同雜合溫度下感測 DJ5 序列之微分脈衝伏安圖.....  | 97 |
| 圖 4- 25 各目標 DNA(DJ2、 DJ3、 DJ4 與 DJ5)於不同溫度下對所得波峰電流高<br>度之影響圖.....                  | 98 |

|  |     |
|--|-----|
| 圖 4- 26 感測不同比例之完全互補與含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖           | 101 |
| 圖 4- 27 感測固定完全互補目標 DNA 濃度添加含錯配鹼基目標 DNA 比例之微分脈衝伏安法圖 | 102 |

## 第一章 緒論

### 1-1 生物感測器簡介

近年來，生物感測器因為具備專一性高、靈敏度高、分析速度快、使用簡便、體積小、不需前處理、可連續分析、適合商業化等優點，而被廣泛的應用在許多領域，其中包含了醫療檢測、環境檢測、藥物開發等多方面。生物感測器主要由兩個部份構成，第一部份為生物元件(biological component)，主要包含具有偵測待測物質能力之生物分子(biomelecules)，第二部份則是物理或化學轉化器(physical or chemical transducer)，其功用為偵測、轉化及判讀生物分子所產生的訊號，進而提所需要的感測資訊，表 1-1 所列為常見之生物元件與物理轉化器。

生物感測器依據生物元件所產生之訊號方式的不同可分成兩大類，一類為催化型生物感測器，此類感測器之生物元件對待測物質具有選擇性之催化能力，並將其催化反應所產生的變化，如產生之電子轉移或是其產物之形成，藉由轉化元件偵測後，將訊號表達出來；而另一類為親合型生物元件，此類感測器之生物元件對待測物質不具有催化能力，但因與待測物之間具有特異親和力而彼此結合，兩者結合時所產生的電化學、光、熱或是質量變化，可藉由轉化元件偵測後，將訊號表達出來。本研究所製作之 DNA 生物感測器利用序列互補之 DNA 間具有特異性結合的特性，待測 DNA 與電極片上之探針 DNA 雜合後加入電化學指示劑道諾霉素嵌入雙股 DNA 而產生的電化學訊號變化，最後藉由電化學交流阻抗

分析儀將電化學訊號放大並呈現出來，所以應歸類為親和性生物元件型感測器。

以下將對 DNA 生物感測器、核酸探針、製作 DNA 生物感測器所使用的材料，包含聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)、對氨基苯甲酸(4-ABA)及作為電化學指示劑的道諾霉素(DNM)做更詳細之介紹。

表 1-1 常見的生物元件與物理化學轉換器(Byfield and Abuknesha, 1994)

| <b>Biological components</b> | <b>Transducer</b> |
|------------------------------|-------------------|
| Cofactors                    | Optical           |
| Antibodies                   | Fluorescence      |
| Receptors                    | Absorbance        |
| Enzymes                      | Electrochemical   |
| Enzyme systems               | Amperometric      |
| Membranes                    | Potentiometric    |
| Organelles                   | Conductimetric    |
| Cells                        | Piezo-electric    |
| Tissues                      | Calorimetric      |
| Organisms                    | Acoustic          |
|                              | Mechanical        |

## 1-2 電化學 DNA 生物感測器之簡介

電化學 DNA 生物感測器為 90 年代所發展出的一種新的基因感測技術，是由一個固定了特定 DNA 片段之電極，及能檢測具電化學活性之識別元素所構成，探針 DNA 為單鏈 DNA(或 ss-DNA)片段，長度從數十個到上千個核苷酸不等，一般皆採用人工合成之寡聚去氧核糖核酸，探針(probe)DNA 與被檢測之目標(target)DNA 為序列互補之關係；由於單鏈 DNA 與其序列互補之 DNA 雜合時具有高度之序列選擇性，將探針 DNA 固定在電極表面製成 DNA 修飾電極，即使得此電極對於序列互補之 DNA 擁有極強的分子識別功能。在適當之溫度、pH 值及離子強度下，電極表面之 DNA 探針能夠藉由與目標 DNA 有選擇性之雜合，形成雙鏈 DNA(或 ds-DNA)，接著可以使用具有電化學活性之雜合指示劑來識別，進而達到了定性定量檢測目標 DNA 序列之目的。

相較於目前常用的基因檢測方法如光譜法、聚合酶鏈式反應(PCR)與放射性同位素標定法，電化學法檢測因其快速、靈敏、低消耗、低成本與活體檢測等優點而在臨床診斷以及藥物分析上受到重視；一般在醫學上病毒的檢測或者是親子鑑定所檢測的 DNA 序列，都是利用特定儀器檢測後再經數個的工作天後才能夠得知送檢 DNA 樣品的序列，除了時間上的耗費，所需的成本也是一個考量，因此希望能夠開發出除了可以迅速檢驗出 DNA 序列的感測器，並且能夠降低檢測所需的成本。

目前 DNA 固定方法主要有直接吸附法(Pang and Abruna, 1998, Su, et al.,

1994)、蛋白質結合法(Liu, et al., 1996)與直接共價結合法(Millan and Mikkelsen, 1993, Millan, et al., 1994, Millan, et al., 1992)三種方式。目前有較多的研究致力於將 DNA 固定在電極上並應用於 DNA 生物感測器，如 Wang 等人，利用碳糊電極在通正電的條件下將帶負電之 DNA 磷酸骨架吸附在電極上，製成電化學 DNA 生物感測器(Wang, et al., 1996)；Qi 與 Wang 等人則是分別利用奈米碳管與玻璃碳為電極材料製成電極，在吡咯溶液中加入 DNA 探針，在聚吡咯膜形成的同時將探針固定在膜之三維網狀結構內，製成電極(Qi, et al., 2007, Wang, et al., 1999)；Wong 等人則是在核酸探針上修飾硫醇並與黃金電極產生金硫鍵結，進而將核酸探針固定在電極上(Wong, et al., 2005)。

### 1-3 核酸探針簡介

80 年代以後人們致力於建立非同位素標記技術，其中應用最為廣泛的是生物素標記的核酸探針。用探針進行基因診斷的關鍵首先是要取得探針。

探針是一段有特定序列、一定長度(數十個至近千個核苷酸)的單鏈核酸片段，也可以是一完整基因的一條鏈，或是其一部分的片斷；或靠人工合成之特定序列，通常在應用時皆必須加以標記，然後通過核酸之間選擇性雜合來檢查標本中序列互補之 DNA。對基因探針進行標記最常用的方法為同位素標記和非同位素標記兩大類。

同位素標記的核酸探針，通常使用半衰期較短的放射性同位素(如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ )，雖然操作較為簡便，但在用於常規使用時卻會有易環境污染、操作者個人安全、

放射性同位素廢物處理等問題。由於這些限制，非放射性標記探針，在生物特定核酸的定序及定量檢測方面，得以迅速發展。目前應用核酸探針較具實用價值的領域有遺傳病的產前診斷、致病病原體的檢測、癌基因的檢測和診斷及用於個體識別、親子關係鑑定及法醫物證等。

#### 1-4 聚二氧乙烯噻吩(Poly(3,4-ethylenedioxythiophene),PEDOT)簡介

聚二氧乙烯噻吩是一種新型的導電性高分子，是在 1991 年由德國 Bayer 公司首先合成出來(Jonas and Schrader, 1991)，具有導電率高、環境穩定性好、薄膜容易製作且透明性高等優點，分子結構如圖 1-1 所示。聚二氧乙烯噻吩目前應用於許多方面，例如在抗靜電包裝、電化學容器、製備發光二極管與太陽能電池等領域上，皆佔有一席之地。目前較受到注目的發展則是可成為超導體的原料以及訊息儲存的材料，由於有上述多種的優點與潛在的發展性，因此受到科學家們的重視，也使得聚二氧乙烯噻吩成為導電性高分子裡熱門的研究對象之一。

聚二氧乙烯噻吩、聚吡咯與聚苯胺等常見之導電性高分子，一樣皆可採用電化學氧化還原法聚合在所需之載體上，但由於聚苯胺對環境污染的問題較高，穩定性也較聚二氧乙烯噻吩差，並且聚二氧乙烯噻吩在導電度以及環境穩定性都高於聚吡咯，因此本研究選用聚二氧乙烯噻吩來當作電極之材料。



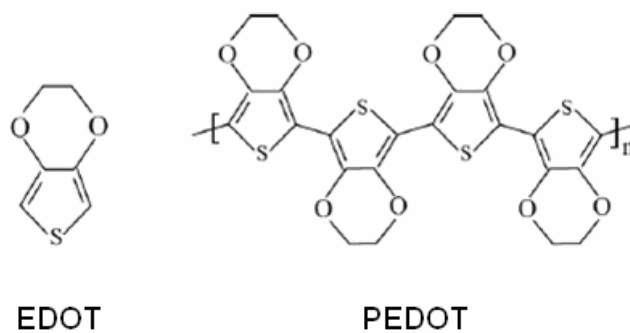


圖 1-1 二氧乙烯噻吩(EDOT)與聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)之化學結構圖(Xiao, et al. 2007)

### 1-5 對氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid, 4-ABA)簡介

對氨基苯甲酸通常的縮寫為 4-ABA 或 PABA，是維生素 B 的複合物之一，其結構中之苯環上有一個羧酸基(-COOH)與一個氨基(-NH<sub>2</sub>)，如圖 1-2 所示。

4-ABA 通常為一種淡棕黃色晶體，純品為無色針狀晶體，久置空氣或者曝光太久容易氧化而變成黃色，並可穩定的溶於酸鹼溶液中，易溶於沸水、醇、醚、乙酸乙酯和冰醋酸，稍溶於冷水；此外，4-ABA 是生物合成葉酸的一個中間體，也存在自然界中多種食物裡(Budavari, 1996)，其存在的形式多以游離態或者以酯類(ester)化合物為主。

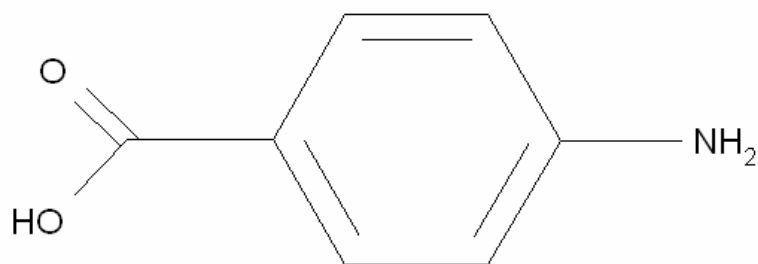


圖 1-2 對氨基苯甲酸之化學結構式

## 1-6 道諾霉素(daunomycin, DNM)簡介

去氧核糖核酸(DNA)為生物傳遞遺傳訊息的主要工具。許多小分子能夠與DNA發生交互作用並破壞其結構，進而影響到基因的調控和表達的功能，小分子與DNA作用可分為表面結合、溝槽結合與嵌入結合三種模式(Jiang, et al., 2007)，Zhao與Barthwal等人分別利用共振拉曼光譜(Resonance Raman spectroscopy, RR)(Zhao, et al., 1994)以及核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)(Barthwal, et al., 2006) 分析DNM與DNA之間的交互作用，經實驗指出DNM與DNA作用是通過與G≡C鹼基對之間的作用而嵌入DNA的雙股螺旋結構中，這種嵌入作用並不會破壞鹼基對之間的氫鍵結合，也不會影響到道諾霉素的活性。相反的，DNM對於單股DNA僅具微弱的交互作用能力(Changhou, et al., 1999)。

道諾霉素是一種被臨床廣泛使用具有高度抗癌細胞活性的蔥環類藥物，尤其適用在急性白血病的治療，核酸為此類藥物主要作用的目標。此化合物由一個平坦的疏水四環素環與一個六碳氨基糖所構成(如圖1-3)，兩者之間通過糖苷鍵相連，且由於環上有一部分為醌式結構，得到電子後會於使結構帶負電，使得道諾霉素可以參與電子轉移反應而具有電化學活性(Sun, et al., 1998)，其反應機構如圖1-4。

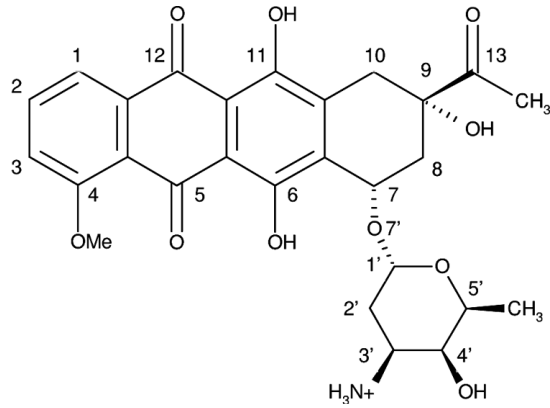


圖1-3 道諾霉素化學結構式(Trieb, et al., 2004)

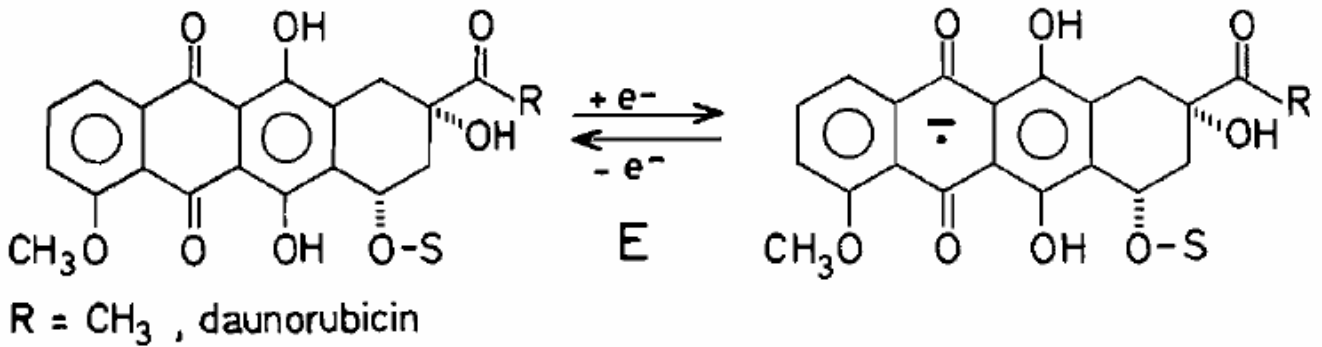


圖1-4 道諾霉素電化學氧化還原反應機構圖(Malatesta, et al., 1984)

於1994年Hashimoto等人利用了石墨電極上具有低氧化電位和高電流密度之道諾霉素對單鏈DNA(ss-DNA)與雙鏈DNA(ds-DNA)之電化學識別進行了研究，並首先將其作為電化學雜合指示劑應用於目標DNA之檢測，獲得了 $10^{-8}$  g/ml的檢測極限(Hashimoto, et al., 1994)，並由此揭開了利用道諾霉素作為電化學DNA生物感測器之電化學指示劑的大門。

## 1-7 研究動機與方法

最新的人類基因解碼結果顯示，人類基因約有 3 萬個，不過目前已知其功能的基因卻還不到其十分之一。透過了解疾病與特定基因間的關係，使得疾病的診斷與治療將可更加精確。

人類基因解碼後許多引發疾病與誘導癌症之基因序列被找出，但仍有許多學者正積極的研究並尋找新的致病基因序列。如何快速檢測出樣品中是否有含致病基因存在以及該致病基因於樣品中濃度的多寡，是一個值得研究的方向；由於電化學 DNA 生物感測器能夠憑藉 DNA 本身具有的特異性親和力，能快速的識別特定序列之 DNA，因此製作可以快速檢驗特定致病基因之電化學 DNA 生物感測器為一個值得探討的研究方向。

如何有效的將探針 DNA 穩定的固定在電極上，為製作 DNA 生物感測器的關鍵影響因素。本論文則是探討 DNA 電化學感測於碳糊電極(CPE)及白金電極上之研究(DNA/4-ABA/CPE、DNA/MWNT/CPE 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt)，此系統是先在電極上修飾羧酸基接著以 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC)與 N-羥基琥珀硫亞氨(N-Hydroxysuccinimide, NHS)為表面活化劑與媒合劑，將一端修飾氨基(-NH<sub>2</sub>)之單股探針 DNA 固定在電極上(Teh, et al., 2005)，然後藉由電化學方法來偵測與之互補的目標 DNA，但由於 DNA 雙股之間是以氫鍵互相結合，無共價鍵的生成及電子轉移，無法依靠雜合目標 DNA 就能有電化學訊號之產生，因此需要添

加電化學雜合指示劑來幫助產生電化學的訊號，選擇一個好的雜合指示劑除了可以提供檢測之外，亦可提高感測器的選擇性與靈敏度。

目前常見的雜合指示劑有亞甲基藍(Methylene blue, MB)、溴化乙錠(Ethidium Bromide, EtBr)與道諾霉素等。亞甲基藍為目前使用率最高的電化學雜合指示劑之一，其作用與 DNA 中之 G 鹼基(鳥糞嘌呤)產生共價作用(Kara, et al., 2002, Yang, et al., 2002)，因為 ss-DNA 其雙股螺旋結構被破壞，大部分鹼基都暴露於外在環境，而 ds-DNA 中的 G 鹼基卻受到外圍雙股螺旋的磷酸骨架屏蔽，因此反應活性明顯比 ss-DNA 來的低(約 200 倍)(Tani, et al., 2001)，因此若使用 MB 為 DNA 生物感測器之電化學指示劑，得到的訊號與雜合濃度成反比，對於檢測互補序列濃度有所侷限。溴化乙錠因具扁平結構而可以嵌入 DNA 之結構內，長久以來普遍應用於 DNA 之染劑，由於 EtBr 與 DNA 結合後影響到核酸複製之過程，進而導致癌症之發生，因此被認定為是一種有毒性之致癌物質或突變劑，因此處理含 EtBr 之溶液與廢液時得更加小心。由於道諾霉素能夠識別 ss-DNA 與 ds-DNA，及能夠嵌入 DNA 雙股螺旋分子結構的鹼基中又不會改變 DNA 之結構，並具有電化學活性，因此挑選道諾霉素作為本實驗所使用之電化學指示劑。

## 第二章 實驗藥品、儀器與流程簡介

### 2-1 實驗儀器設備

本論文所使用的儀器設備如下表 2-1 所示：

表 2-1 本論文使用儀器設備一欄表

| 儀器名稱  | 製造商名稱                           | 型號                              |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Electrochemical Analyzer<br>(電化學分析儀)                            | CH Instruments<br>(Austin, USA) | CHI621B                         |
| FESEM<br>(場發式掃描電子顯微鏡)   | JEOL<br>(Tokyo, Japan)          | JSM-7000F                       |
| Fourier-Transform<br>Infrared Spectrometer(FTIR)<br>(霍氏轉換紅外光譜儀) | Bomem<br>(Canada)               | DA8.3                           |
| Hotplate Stirrer<br>(磁石攪拌加熱器)                                   | LabTECH<br>(Beijing, China)     | LMS-1003                        |
| Micro-Electronic Balance<br>(微量電子天秤)                            | OHAUS<br>(New Jersey, USA)      | AR1530                          |
| Micro-Pipette<br>(微量移液吸取器)                                      | Eppendorf<br>(Hamburg, Germany) | Research<br>1000/200/100/20/2.5 |
| Oven<br>(烘箱)  | DENG YNG<br>(Taipei, Taiwan )   | DOV30                           |
| pH meter<br>(酸鹼度計)  | Suntex<br>(Taipei, Taiwan )     | SP-701                          |

|  |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| refrigerator( 4°C & -20°C)<br>(一般冰箱)         | TECO<br>(Taipei, Taiwan )                    | RE7222                |
| TEM<br>(穿透式電子顯微鏡)                            | JEOL<br>(Tokyo, Japan)                       | JEM-2010              |
| Ultrapure Water system<br>(超純水機)             | Barnstead<br>(Dubuque, Iowa, USA)            | NANO<br>pure Dlamond™ |
| UV/visible Spectrophotometer<br>(紫外線及可見光光譜儀) | Spectronic<br>instruments<br>(New York, USA) | Genesys2              |
| Vortex-Mixer<br>(試管震盪器)                      | Scientific Industries<br>(New York, USA)     | VORTEX-2 GENIE        |
| Thermostat Bath<br>(恆溫水浴槽)                   | FIRSTEK<br>(Taipei, Taiwan )                 | B206                  |

## 2-2 實驗藥品

本論文所使用的實驗藥品相關資訊如下表 2-2 所示：

表 2-2 本論文使用藥品一欄表

| 藥品名稱   | 廠商                                    | 產品序號         | 藥品等級     |
|--|---------------------------------------|--------------|----------|
| 4-Aminobenzoic acid<br>(4-ABA)                                 | Sigma<br>(St. Louis, MO, USA)         | A9878-25G    | 99%      |
| Daunorubicin Hydrochloride<br>(DNM)                            | Sigma<br>(St. Louis, MO, USA)         | D8809-1MG    |          |
| 2,3-Dihydrothieno[3,4- <i>b</i> ]-1,4<br>-dioxin<br>(EDOT)     | Aldrich<br>(St. Louis, MO, USA)       | 483028-10G   |          |
| Dipotassium<br>hydrogenphosphate                               | Showa<br>(Tokyo, Japan)               | 1645-8150    |          |
| Disodium<br>hydrogenphosphate                                  | Kento<br>(Tokyo, Japan)               | 37243-00     |          |
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylamin<br>opropyl)carbodiimide HCl<br>(EDC) | Pierce<br>(Boston, USA)               | 22980        |          |
| Graphite   | Fluka<br>(Buchs, Switzerland)         | 50870        | ≤0.1mm   |
| Hydrochloric acid  | Merck<br>(Darmstadt, Germany)         | 1.00317.2000 | Analysis |
| Lithium perchlorate  | Sigma-Aldrich<br>(St. Louis, MO, USA) | 20528-1      | 95%      |



|                                      |                               |              |          |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------|----------|
| Multi-wall Carbon Nanotube<br>(MWNT) | 東成昌<br>(Taipei, Taiwan)       |              | 95%      |
| N-Hydroxysuccinimide<br>(NHS)        | Pierce<br>(Boston, USA)       | 24500        |          |
| Nitric acid                          | Merck<br>(Darmstadt, Germany) | 1.00456.1000 | Analysis |
| Paraffin oil                         | Fluka<br>(Buchs, Switzerland) | 76235        |          |
| Potassium<br>dihydrogenphosphate     | Kento<br>(Tokyo, Japan)       | 32379-00     |          |
| Potassium chloride(KCl)              | Showa<br>(Tokyo, Japan)       | 1630-5150    |          |
| Platinum                             | 麗山<br>(Tainan, Taiwan)        | PT35004      | 99.95%   |
| Sodium chloride                      | Merck<br>(Darmstadt, Germany) | 1.6404.1000  | Analysis |
| Silver                               | 麗山<br>(Tainan, Taiwan)        | AG35004      | 99.95%   |
| Sodium hydroxide                     | Merck<br>(Darmstadt, Germany) | 1.06498.1000 | Analysis |
| Sulfuric acid                        | Merck<br>(Darmstadt, Germany) | 1.00781.1000 | Analysis |

## 2-3 DNA 引子

本論文所使用的 DNA 引子相關資訊如下表 2-3 所示：

表 2-3 本論文使用之引子一欄表

| 引子編號    | 序列(5'→3')                           | 備註                | TM(°C) |
|---------|-------------------------------------|-------------------|--------|
| THU-DJ1 | CGCCGGCCACGAGAATAGC <i>CaminoC6</i> | 3'端修飾氮根           | 52.4   |
| THU-DJ2 | GCTATTCTCGTGGCCGGCG                 | 與 THU-DJ1 完全互補    | 52.4   |
| THU-DJ3 | GCTATTCTC <u>A</u> TGGCCGGCG        | 與 THU-DJ1 有一個鹼基錯配 | 50.3   |
| THU-DJ4 | GCTATTCT <u>TAG</u> GGCCGGCG        | 與 THU-DJ1 有三個鹼基錯配 | 50.3   |
| THU-DJ5 | GCTATTC <u>CTAG</u> AGCCGGCG        | 與 THU-DJ1 有五個鹼基錯配 | 50.3   |

## 2-4 實驗流程

分別以碳粉、奈米碳管及白金為工作電極，經過修飾 4-ABA 或酸處理使電極於表面生成羧酸基後，用 EDC 與 NHS 將一端修飾氨基之 DNA 探針與電極形成肽鍵後固定於電極表面，製成 DNA 生物感測器。感測時感測器先與待感測之目標 DNA 行雜合作用形成雙股 DNA，浸入道諾霉素溶液中使道諾霉素嵌入雙股 DNA 之間，最後以 DPV 法檢測嵌入雙股 DNA 之道諾霉素，並討論因檢測樣品之不同所得之訊號。

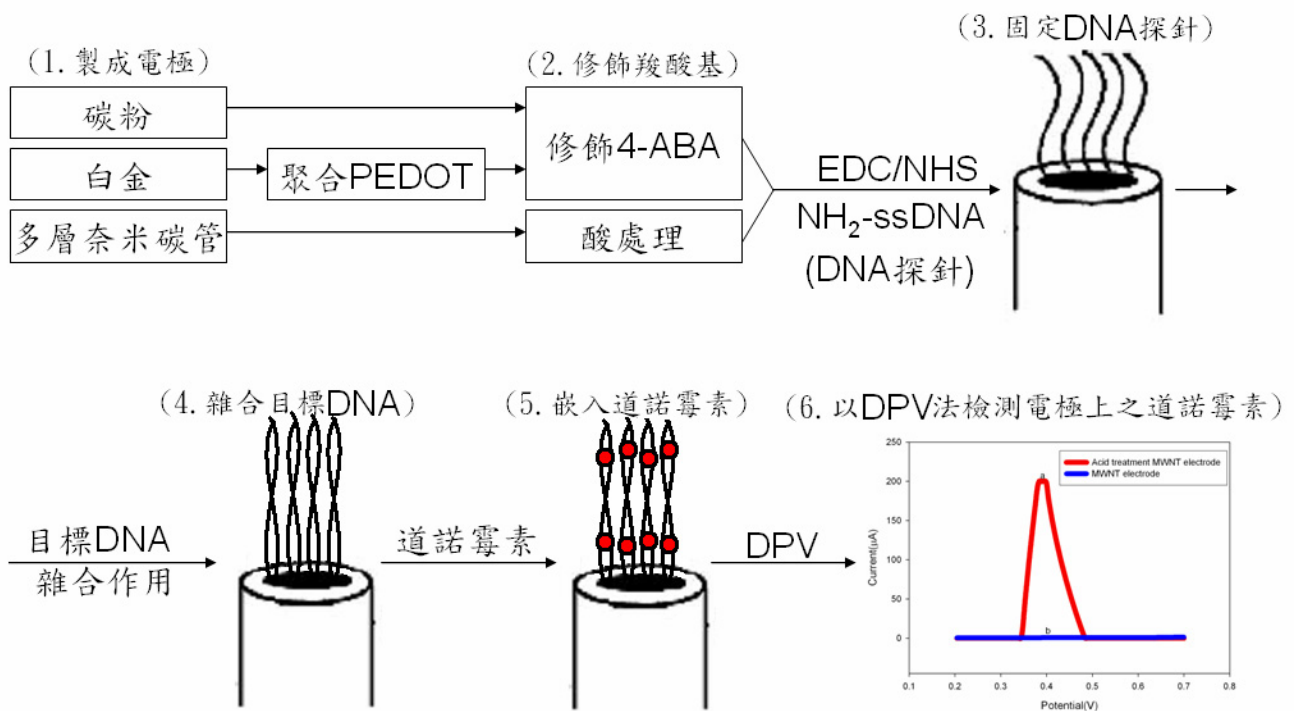


圖 2-1 實驗架構

### 第三章 探討以碳粉與多層奈米碳管為 DNA 生物感測器之材料

#### 3-1 實驗目的

在許多研究中，碳粉(carbon powder)與多層奈米碳管(MWNT)常被應用於製作 DNA 之生物感測器，其原因除了它們易製作成電極之外，單位體積之總表面積大也是一個受矚目的優點；因此本章節的主要目標為使用碳粉與多層奈米碳管來製成 DNA 生物感測器，並通過實際的感測，討論不同修飾條件對 DNA 生物感測器感測效果之影響。

## 3-2 實驗原理

### 3-2-1 核酸探針固定化原理

如何將核酸探針穩定的固定在電極片上為製備 DNA 生物感測器之關鍵，由於形成共價鍵比物理吸附以及氫鍵吸附等方法都要來的穩固，因此將核酸探針通過共價鍵固定在電極片上為最合適之方式。以何種共價鍵鍵結則由電極上之自由官能基與核酸探針之末端官能基決定，而生成共價鍵難易程度則也是主要的考量因素。

圖 3-1 為 EDC 與 NHS 交互作用後將羧酸基與氨基形成共價鍵之流程圖，從圖中可以看到含有羧酸基的編號 1 分子，先與官能基媒合活化劑 EDC 進行反應後形成一個不穩定之反應中間體，接著再與輔助媒合劑 NHS 反應形成一個半穩定之中間體，最後加入含有氨基之編號 2 分子與半穩定之中間體反應，結果在編號 1 與編號 2 兩分子之間形成肽鍵並將兩分子以共價鍵連結，形成一個穩定的型態。

本研究首先在電極上修飾羧酸基(-COOH)而在核酸探針上修飾氨基(-NH<sub>2</sub>)，然後利用 EDC 與 NHS 活化羧酸基後，使羧酸基與氨基形成肽鍵(peptide bond) (Sehgal and Vijay, 1994)，最後將核酸探針以共價鍵之方式固定在電極片上，製成 DNA 生物感測器。

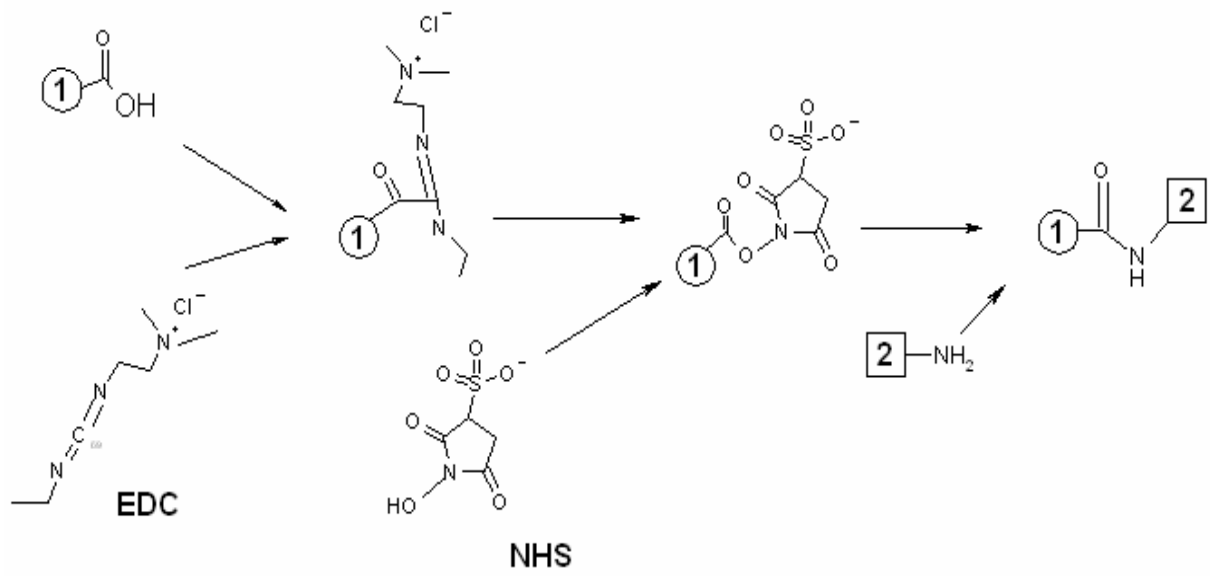


圖 3-1 EDC 與 NHS 活化羧酸基流程圖

### 3-2-2 道諾霉素於 DNA 生物感測器之應用

道諾霉素以糖苷鍵連結之兩平面具有彈性，當兩平面處於不同角度時與雙鏈 DNA 作用方式亦不同。圖 3-2 之 (A)、(B) 與 (C) 為當糖苷鍵連接兩平面角度呈  $59^\circ$ 、 $137^\circ$  與  $159^\circ$  時道諾霉素嵌入 DNA 的示意圖，在  $59^\circ$  的型態道諾霉素與鳥嘌呤(G) 產生 3 個氫鍵， $137^\circ$  型態時道諾霉素與胞嘧啶(C) 產生 2 個氫鍵， $159^\circ$  型態時道諾霉素與胞嘧啶(C) 與胸腺嘧啶(T) 分別產生 2 個氫鍵與 1 個氫鍵。

本研究主要是希望利用道諾霉素嵌入雙股 DNA 結構之後，利用其具有產生電化學氧化還原的訊號之結構，接上電化學分析儀後產生電化學訊號，藉此可以了解與探針互補之目標 DNA 的濃度，同時亦可利用道諾霉素對單鏈 DNA 交互作用差之特性，感測目標 DNA 與探針 DNA 為互補或是錯配之程度。

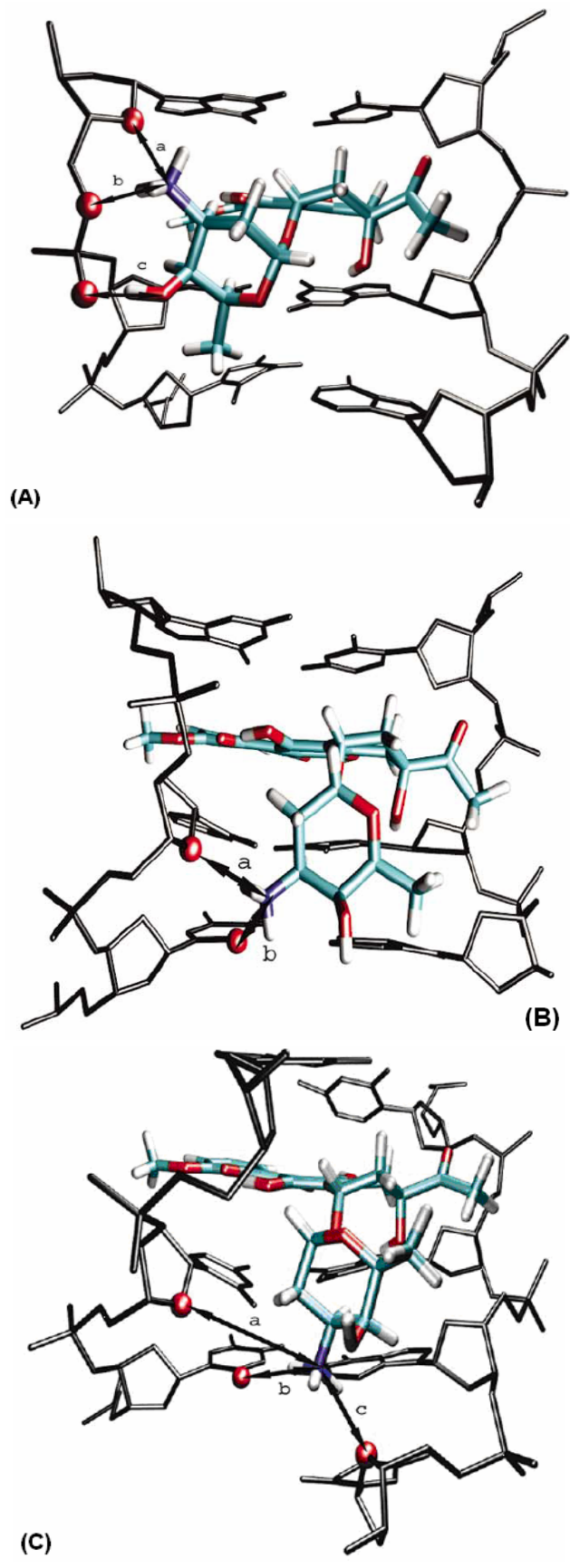


圖3-2 道諾霉素兩平面呈 $59^\circ$  (A)、 $137^\circ$  (B)與 $159^\circ$  (C)時嵌入DNA結構示意圖

(Trieb, et al., 2004)



### 3-2-3 多層奈米碳管表面羧酸基化之原理

奈米碳管為1991年由Iijima利用電弧法合成C<sub>60</sub>分子時，偶然於陰極發現針狀物(Iijima, 1991)，其管狀結構具數十層石墨網狀結構，具有優異的機械性質，其抗拉強度為20GPa，楊氏係數為1TPa，並在其他方面有許多特質如高表面積、高韌性、高熱導度及導電性，因此具有潛在的用途。但由於奈米碳管之間具有吸引力，易聚集在一起不易分散於水或有機溶液中，為了提高其應用價值，將奈米碳管表面官能基化可以幫助奈米碳管分散於溶劑中，也可增加奈米碳管與其他物質的結合能力。奈米碳管的官能基化研究最初是以奈米碳管的化學切斷作用開始。有研究指出，利用強酸溶液對奈米碳管進行化學切斷作用，可以得到開口之奈米碳管(Tsang, et al., 1994)。在之後的研究中，發現開口後的奈米碳管頂端含有一定數量的官能基團，如羧基、羰基等(Hiura, et al., 1995, Lago, et al., 1995)。此外，奈米碳管的長度為數十微米到數百微米，且可反應的位點會很有限，有研究利用硫酸與硝酸比為3：1(v/v)的混合酸液，經超音波震盪處理後，可將奈米碳管切成100~300 nm且兩端開口的小碳管(Kuznetsova, et al., 2001)。而在反應的過程中碳管的管壁或頭尾末端會因反應而成含氧的官能基，其中包括羧基、羰基及醇基。

多層奈米碳管之氧化作用機制為：當硫酸與硝酸混合後產生SO<sub>2</sub>與NO<sub>2</sub>和自由氧原子，如果兩個自由氧原子與奈米碳管結構中的一個碳原子結合，即形成CO<sub>2</sub>氣體分子，此過程造成奈米碳管結構破損甚至產生斷裂之行為，因此酸處理奈米碳管一方面可使得奈米碳管產生切斷之效應，將原本長的碳管切成數百nm

長之小碳管，另一方面使得奈米碳管斷裂處的碳原子由於不飽和而被活化，容易被氧化成羧酸基或其他官能基團。當一個氧原子與一個碳原子結合時，可能在奈米碳管上形成一個羰基(C=O)，並進而與水中的H<sup>+</sup>、OH<sup>-</sup>以及自由氧原子等結合形成羧酸基(-COOH)，或羥基(-OH)等含氧的官能基，其氧化作用的主要化學反應如下(魏向辰，2007)：

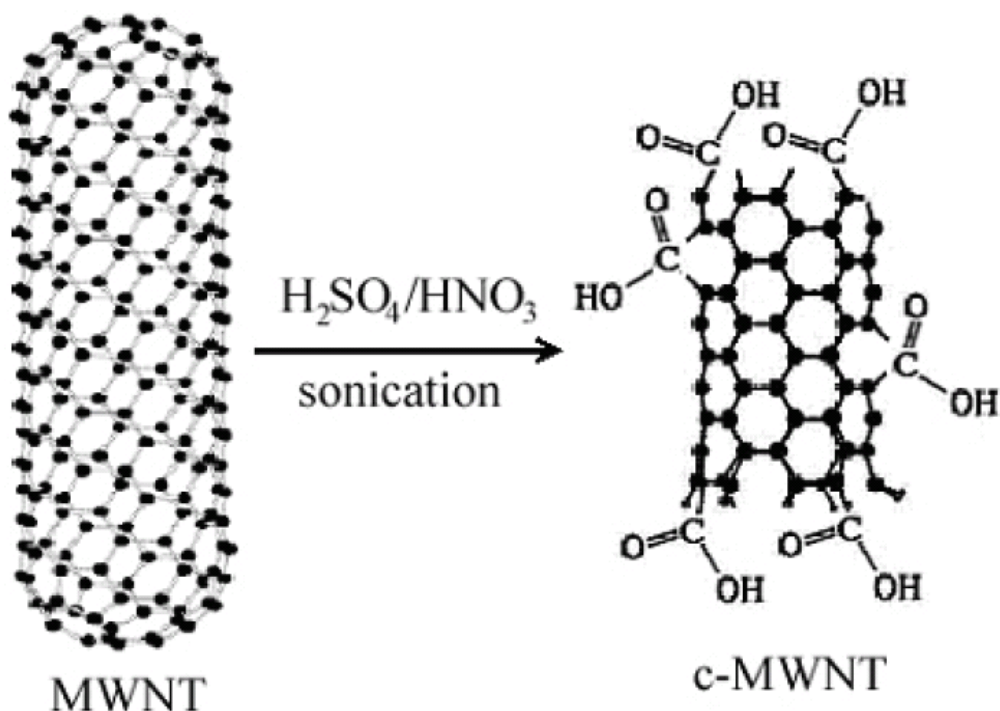
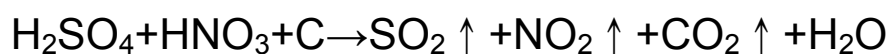


圖3-3 羧化奈米碳管示意圖(林彥文, 2004)

### 3-2-4 微分脈衝伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV)

圖3-4為微分脈衝伏安法所施加之電位波形圖，其電位施加方式是從一固定的初始電位開始( $E_i$ )開始，週期性的將一固定振幅的脈衝電位(pulse amplitude,  $\Delta E$ )施加在一隨時間做線性增加的電位掃描線上，直到設定之末電位( $E_f$ )為止，施加的脈衝電位之週期稱為脈衝週期(pulse period,  $T$ )，而脈衝電位持續的時間稱為脈衝寬度(pulse width,  $P$ )，然後分別在每一次施加脈衝電位前16.7ms (sample width,  $S_1$ )與施加脈衝電位結束前16.7ms(sample width,  $S_2$ )分別測量電流，而將這兩點所測得的電流值相減的電流差( $\Delta i=i_2-i_1$ )即為測得訊號。此種電位掃描方式最大的優點是能夠削減背景電流，以提高訊號對電流的比值(S/N)。其方法是利用瞬間施加上脈衝電位後，法拉第電流(faraday current,  $I_f$ )與充電電流(charging current,  $I_c$ )皆會急速上升，接著兩者皆會隨著時間而降低，其中充電電流降低的速度遠高於法拉第電流，因此在脈衝電壓結束前取電流時( $S_2$ )，充電電流已經降得很低，且與在 $E_{S_1}$ 所測得的充電電流幾乎相等，故 $i_2-i_1$ 所得之 $\Delta i$ 值幾乎是由待分析物氧化或還原所得的電流訊號。

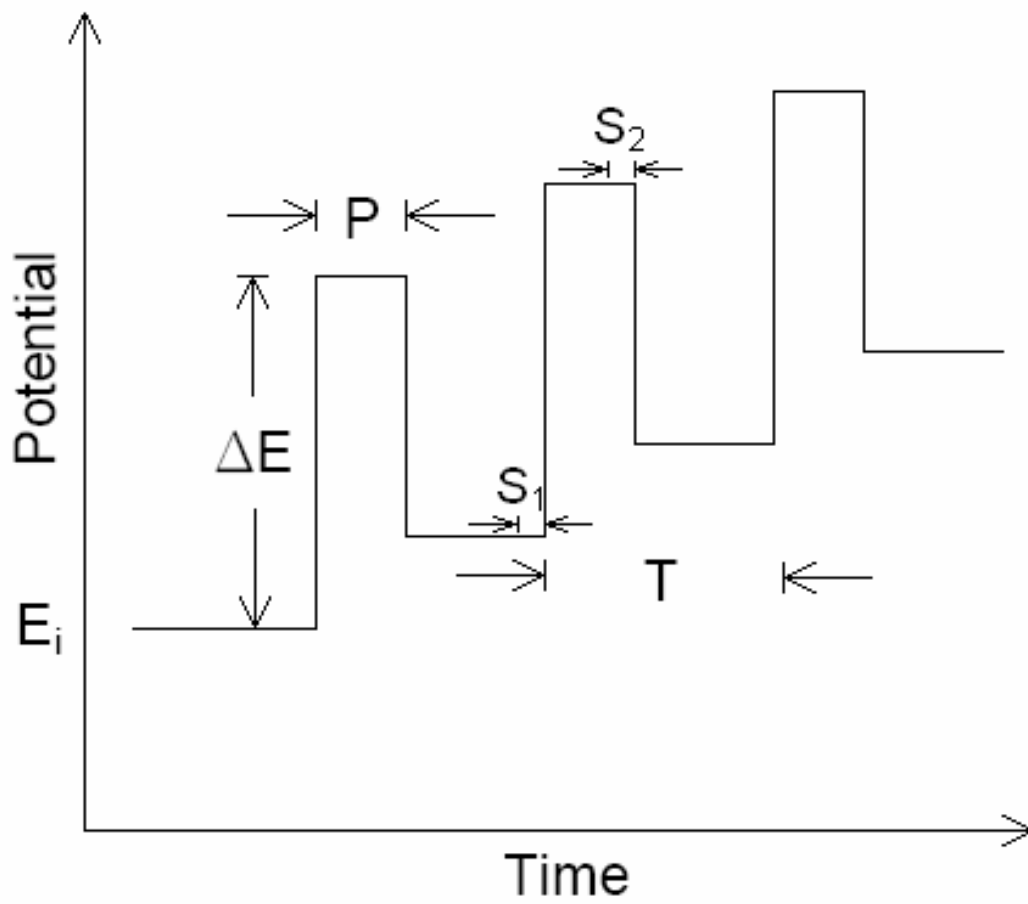


圖3-4 微分脈衝伏安法施加電位波形圖

### 3-3 實驗步驟

本研究中所使用之電極材料，分為碳粉、多層奈米碳管(MWNT)。碳粉製成碳糊電極後利用循環伏安法或定電流法聚合 4-ABA，多層奈米碳管則是經過酸處理後製成碳糊電極；於電極表面生成羧酸基(-COOH)之後，使用 EDC 與 NHS 將羧酸基活化，藉此將已修飾氨根(-NH<sub>2</sub>)之核酸探針以形成肽鍵之方式固定在電極上，製成所需之 DNA 生物感測器，以下分別加以說明。

#### 3-3-1 4-ABA/CPE 電極之製備

##### 3-3-1-1 CPE 電極之製備

1. 將直徑 0.3 cm 之聚乙烯(PE)管切成 1.0 cm 的長度，並保持切面之平整。
2. 截取適當長度之導線，剝去 0.5 cm 之絕緣部份將導線部份放入塑膠管，接著用熱融膠封住，待熱融膠冷卻後秤取碳糊電極容器之重量，完成電極容器之製作。
3. 將秤取的 0.2 g 之碳粉與 0.0656 g 之石蠟油以 3:1(W/W)的比例混合，並在瑪瑙鉢上混合均勻後填入步驟 2. 製成之碳糊電極容器內，待填至電極容器內部緊實後將電極表面磨至光滑，最後秤取電極片總重量後，求得填入電極容器內碳糊的總重，並放入 4°C 冰箱保存待用。

### 3-3-1-2 4-ABA 循環伏安法聚合流程

1. 稱取 0.01 g 之 4-ABA，溶解至 0.1 M 之  $\text{LiClO}_4$  溶液中，配製成 6 mM 之 4-ABA 溶液 12.3 ml。
2. 取步驟 1. 之溶液 3 ml，稀釋成 3 mM 之 4-ABA 溶液 6 ml，將 3-3-1-1 節所製成之電極片置入 4-ABA 溶液中，直至電極表面完全沒入溶液中。
3. 將步驟 2. 之裝置如圖 3-5 所示完成線路連結。
4. 啟動電化學分析儀做循環伏安實驗掃描，掃描電位範圍為 0.0~1.4 V，掃描速率為  $10 \text{ mV S}^{-1}$ ，掃描圈數為 20 圈，溫度為  $25^\circ\text{C}$ 。
5. 以上述方法製備好 4-ABA/CPE 之電極後，用鱷魚夾固定在試管內保存待用。

### 3-3-1-3 4-ABA 定電壓法聚合流程

1. 稱取 0.01 g 之 4-ABA，溶解至 0.1 M 之  $\text{LiClO}_4$  溶液中，配製成 6 mM 之 4-ABA 溶液 12.3 ml。
2. 取步驟 1. 之溶液 3 ml，稀釋成 3 mM 之 4-ABA 溶液 6 ml，將 3-3-1-1 節所製成之電極片置入 4-ABA 溶液中，直至電極表面完全沒入溶液中。
3. 將步驟 2. 之裝置如圖 3-5 所示完成線路連結。
4. 啟動電化學分析儀做定電壓實驗掃描，電壓定為 1.0 V，時間為 2400 秒。
5. 以上述方法製備好 4-ABA/CPE 之電極後，用鱷魚夾固定在試管內保存待用。

### 3-3-2 酸處理多層奈米碳管(MWNT)電極之製備流程

#### 3-3-2-1 酸處理 MWNT 之流程

1. 在血清瓶內以 3:1(v/v)的比例混合 97%的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  與 65%的  $\text{HNO}_3$ 。
2. 秤取 0.2 g 之多層奈米碳管加入血清瓶。
3. 在 25°C 與 50°C 下超音波震盪 3 小時。
4. 使用濾紙過濾酸處理後之多層奈米碳管，並用去離子水沖洗至濾液之 pH 值為 7。
5. 使用冷凍乾燥機乾燥 8 小時，收集並稱重後放入乾燥箱內保存待用。

#### 3-3-2-2 製備酸處理 MWNT 電極

1. 將直徑 0.3 cm 之 PE 管切成 1.0 cm 的長度，並保持切面之平整。
2. 截取適當長度之導線，剝去 0.5 cm 之絕緣部份將金屬部份放入塑膠管，接著用熱融膠封住，待熱融膠冷卻後秤取碳糊電極容器之重量，完成電極容器之製作。
3. 取經酸處理之多層奈米碳管 0.1312 g 與石蠟油 0.0656 g 以 2:1(W/W)的比例混合，並在瑪瑙鉢上混合均勻後填入步驟 2.製成之電極容器內，待填至電極容器內部緊實後將電極表面磨至光滑，最後秤取電極片總重量後，放入冰箱保存待用。

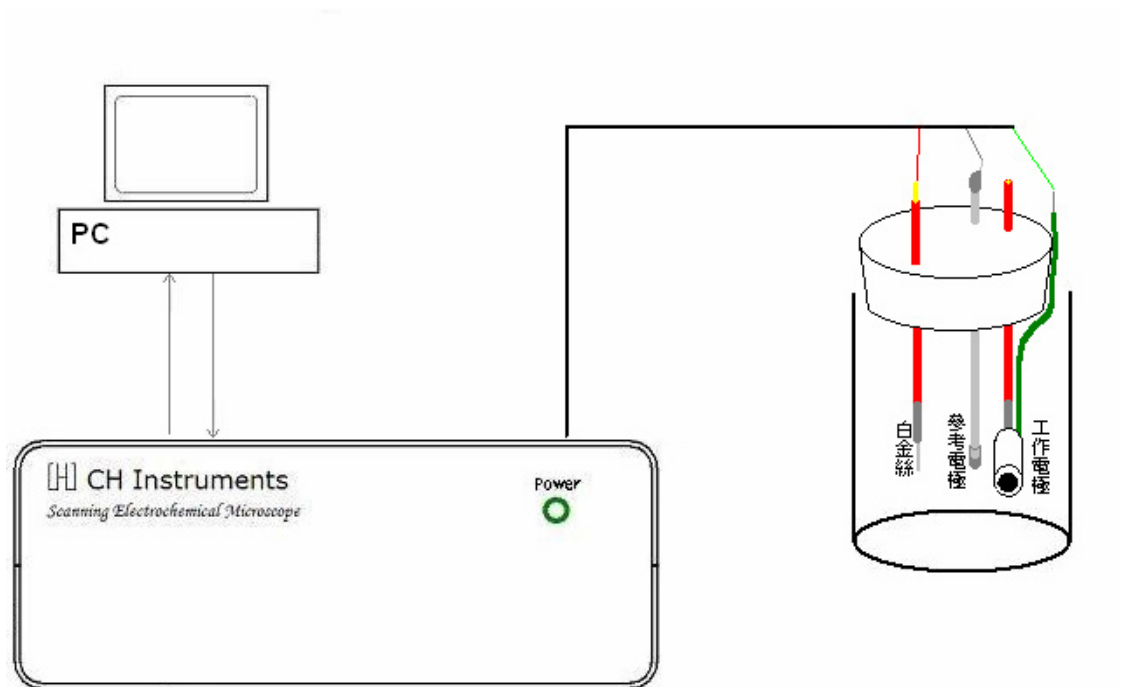


圖 3-5 電化學分析儀裝置圖



### 3-3-3 工作電極之導電度測試

1. 秤取 1.6463 g 之赤血鹽與適量之去離子水，配製成 0.01 M，500 ml 之赤血鹽溶液。
2. 取上述步驟中之 0.01 M 赤血鹽溶液 30 ml 於 100 ml 燒杯中，將所製備完成之工作電極(4-ABA/CPE 或 MWNT/CPE)分別置入赤血鹽溶液中，直至電極表面完全沒入溶液中。
3. 將步驟 2. 中之電解槽如圖 3-5 所示完成線路連結。
4. 啟動電化學分析儀做循環伏安實驗掃描，掃描電位範圍為-0.5~0.8 V，掃描速率為 20 mV S<sup>-1</sup>，掃描圈數為 10 圈。

### 3-3-4 DNA 生物感測器感測完全互補序列之靈敏度

此實驗為本研究中最主要之部份，本實驗中利用前述步驟所得之各工作電極 (4-ABA/CPE 或 MWNT/CPE) 為感測電極片，實驗裝置如前述之圖 3-4 所示；其中參考電極為 Ag/AgCl，相對電極為白金絲，實驗中以 PBS 緩衝液(pH=7.4) 為感測溶液。

#### 3-3-4-1 實驗操作程序

1. 秤取 0.0096 g 之 EDC 與 0.0092 g 之 NHS，溶入 1 ml 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH=7.0)，配製成 EDC 為 50 mM，NHS 為 80 mM 之溶液(Lin, et al., 2007)。
2. 將前述步驟完成之各工作電極(4-ABA/CPE 或 MWNT/CPE)固定於鱷魚夾上並將電極面朝上，滴上步驟 1.所配製成之溶液 20  $\mu$ l，在室溫下(25 $^{\circ}$ C)反應 1 小時。
3. 待步驟 2.完成後先以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖洗，接著在電極片上滴不同濃度(1.75  $\mu$ M 與 3.50  $\mu$ M)之核酸探針溶液(DJ1) 20  $\mu$ l，在室溫下(25 $^{\circ}$ C)反應 12 小時。
4. 待步驟 3.取出各工作電極後，先以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖去未與電極連接之核酸探針，接著滴上不同濃度之目標引子(DJ2) 20  $\mu$ l，在 55 $^{\circ}$ C 之條件下反應 1 小時。
5. 取出步驟 4.所製成之工作電極後，以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖去未與電極上

探針雜合之目標引子，之後以鱷魚夾固定在試管內待用。

6. 取 3  $\mu\text{l}$  之 1 mM 道諾霉素溶入 2997  $\mu\text{l}$  之 PBS 緩衝液(pH=7.4), 配製成 1  $\mu\text{M}$  之道諾霉素溶液，接著將步驟 5. 所製成之工作電極表面完全浸入後，磁石攪拌 15 分鐘。
7. 取 6 ml 之 PBS 緩衝液為感測溶液，將步驟 6. 所製成之各工作電極置入，直至電極表面完全沒入溶液中。
8. 將步驟 7. 之電解槽如圖 3-5 所示完成線路連接。
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 0.2~0.7 V，振幅( amplitude )為 0.05 V，脈寬( pulse width )為 0.06 秒，脈衝週期( pulse period )為 0.2 秒。

### 3-4 實驗結果與討論

#### 3-4-1 電極之掃描式電子顯微鏡分析

在利用 SEM 分析電極表面型態之前，先利用濺鍍機於樣品表面鍍上白金，以增加導電度，提高 SEM 掃描的清晰度；所有製備得到之電極表面樣品，SEM 型態分析之放大倍率均控制在 1000~5000 倍。

##### a. 未經修飾與經對胺基苯甲酸(4-ABA)修飾之碳糊電極

碳糊電極擁有生產成本低與製作方法簡便之優點，卻在電極表面無法提供官能基以便作 DNA 固定化之用，因此可以在電極表面進行修飾，來提供所需之官能基，並達到本研究製備 DNA 生物感測器之目標。

圖 3-6 與圖 3-7 為未經修飾對胺基苯甲酸之碳糊電極表面的 SEM 分析結果，而圖 3-8 與圖 3-9 為碳糊電極經循環伏安法聚合對胺基苯甲酸之後所得到之 SEM 表面型態分析之結果。比較圖 3-6 與圖 3-8 之差異，顯示碳粉在修飾前後均具片狀形態，但從圖 3-6 發現在聚合對胺基苯甲酸之前，碳粉呈現一個顏色較為均勻的型態，且碳粉碎片之表面較為完整平滑，反觀經過聚合對胺基苯甲酸之後，在碳粉碎片之上出現裂縫且顏色也變深，這應為經修飾對胺基苯甲酸步驟後碳粉碎片被對胺基苯甲酸包覆而導致呈現顏色變深之現象。

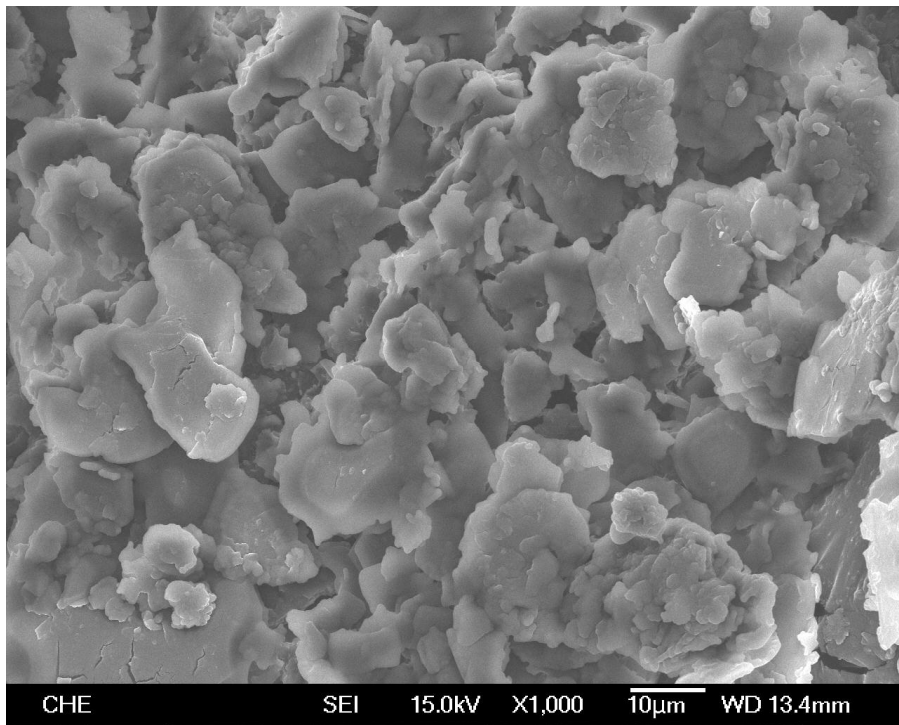


圖 3-6 未經修飾之碳粉的 SEM 圖(1000 倍)

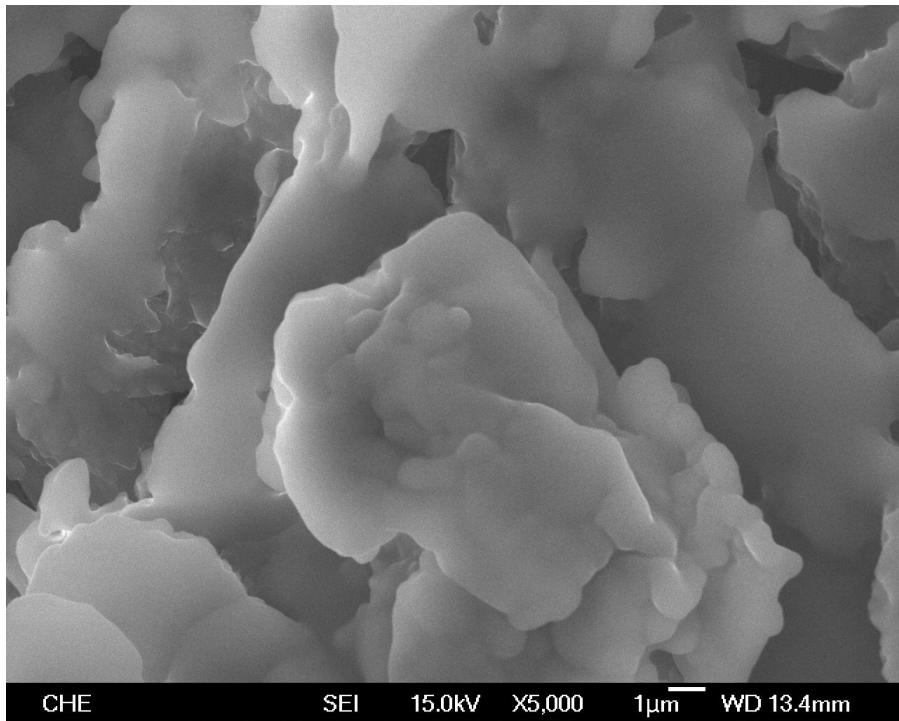


圖 3-7 未經修飾之碳粉的 SEM 圖(5000 倍)

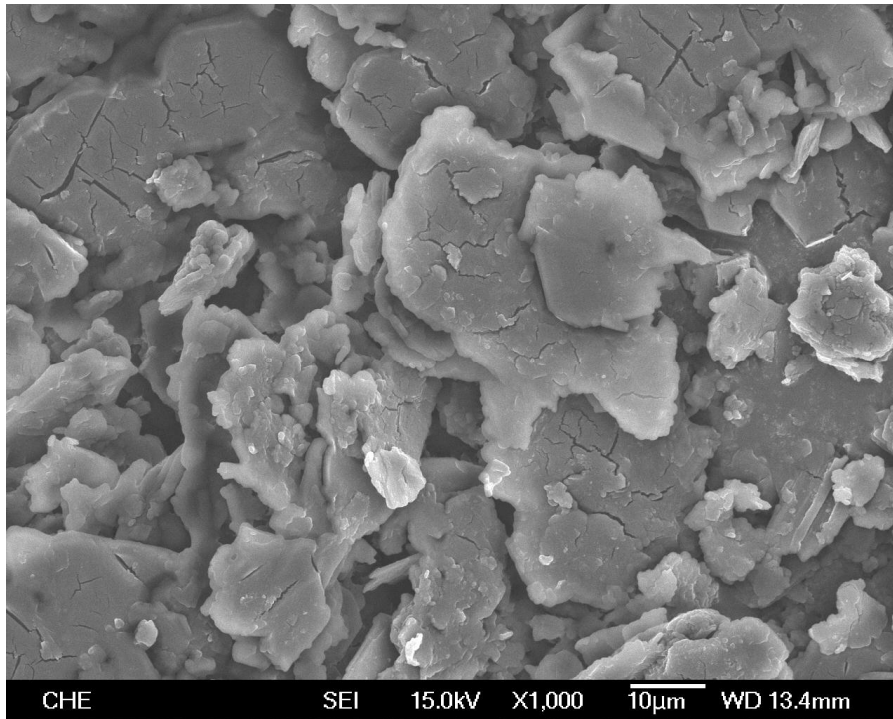


圖 3-8 碳粉以循環伏安法聚合 4-ABA 之 SEM 圖(1000 倍)  
聚合液：[4-ABA]=3mM, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1M  
掃描範圍:0.0~1.4V, 掃描速率:10mV/s, 掃描圈數:20

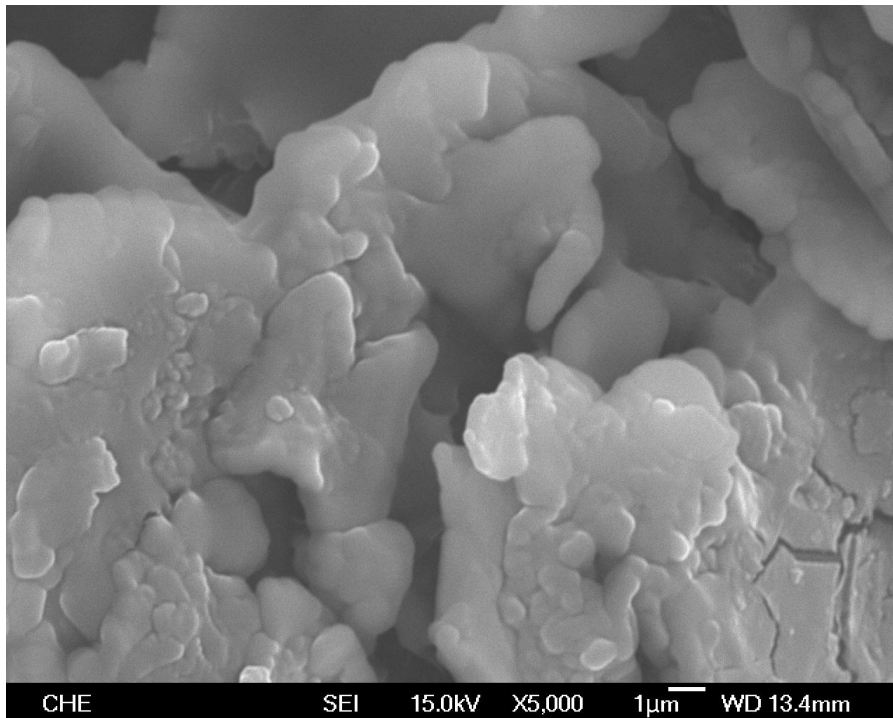


圖 3-9 碳粉以循環伏安法聚合 4-ABA 之 SEM 圖(5000 倍)  
聚合液：[4-ABA]=3mM, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1M  
掃描範圍:0.0~1.4V, 掃描速率:10mV/s, 掃描圈數:20

## b. 經酸處理前後之多層奈米碳管

奈米碳管為 90 年代所發現之一種新的碳結構，因為其管徑與型態之不同可以使奈米碳管擁有金屬導體或半導體之特性，尤其作為電極使用時，其高導電之性質亦是一個令人矚目的特性，且奈米碳管之表面存在著許多化學活性高之缺陷，可以應用化學方法在奈米碳管之表面缺陷進行修飾而得到羧酸基(-COOH)，進而達到本研究製作 DNA 生物感測器之目標。

圖 3-10 與圖 3-11 為多層奈米碳管經酸處理前之 SEM 細微型態分析之結果，而圖 3-12 與圖 3-13 則是在 25°C 條件下經酸處理氧化後所得到之 SEM 細微型態分析之結果，圖 3-14 與 3-15 則是在 50°C 條件下經酸處理氧化後所得到之 SEM 細微型態分析之結果。由圖中可以清楚的看到，未經酸處理的多層奈米碳管長度較長可以達到數十微米，但經過了 25°C 與 50°C 條件下的酸處理之後，奈米碳管長度則只剩數微米與數百奈米，證明經酸處理之多壁奈米碳管表面被破壞而造成斷裂，並使得原本的長度會縮短，此現象符合文獻中利用強氧化劑氧化奈米碳管之表面缺陷處而形成羧酸基，並造成碳管之斷裂，導致碳管長度的縮短(魏向辰，2007)。

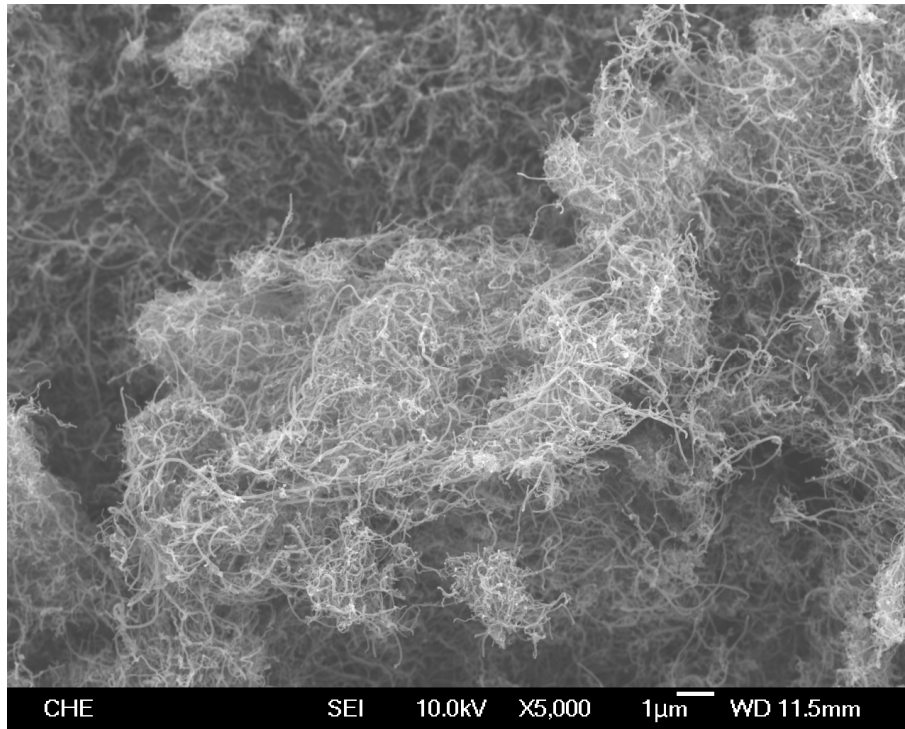


圖 3-10 奈米碳管未經酸處理之 SEM 圖(5000 倍)

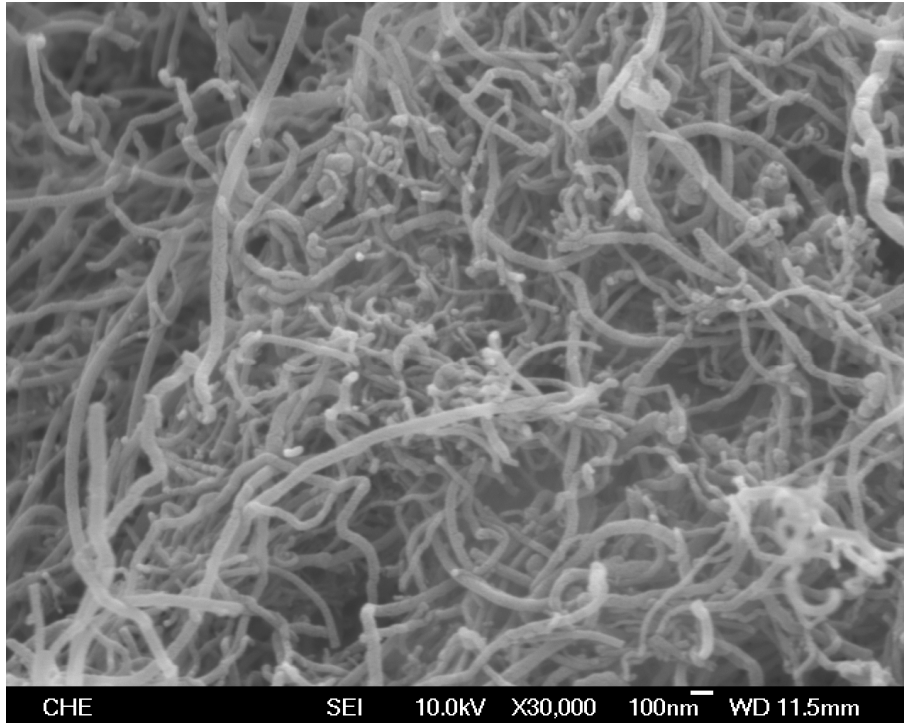


圖 3-11 奈米碳管未經酸處理之 SEM 圖(30000 倍)



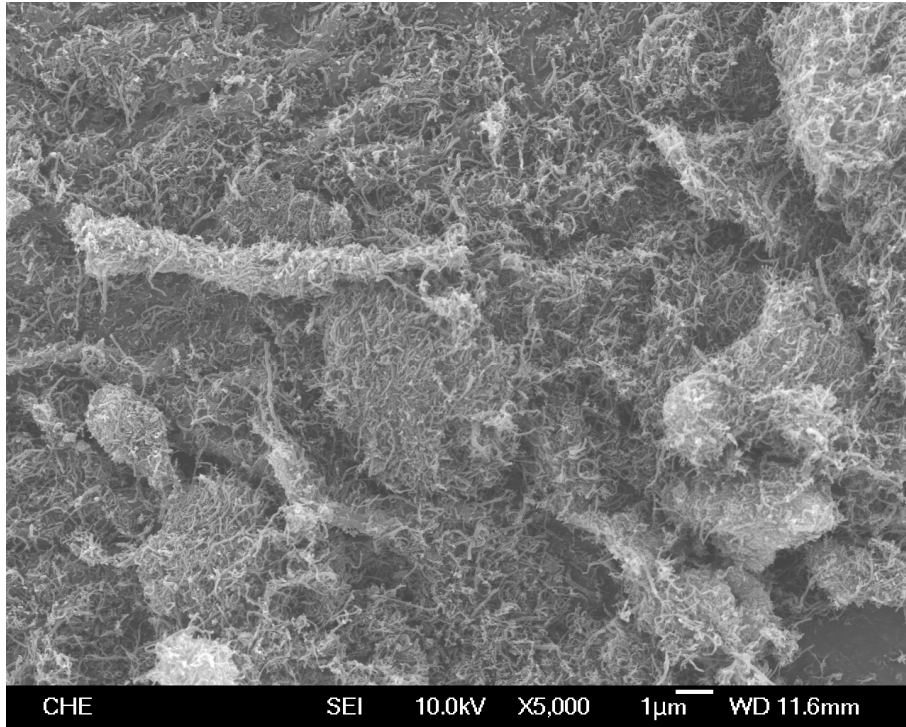


圖 3-12 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(5000 倍)  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:25°C

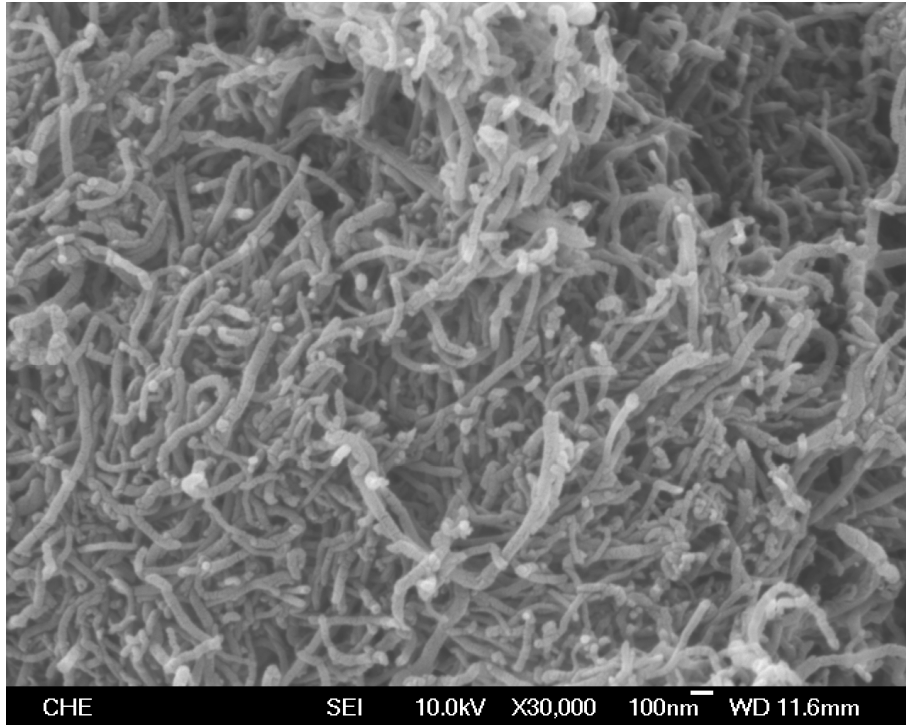


圖 3-13 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(30000 倍)  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:25°C

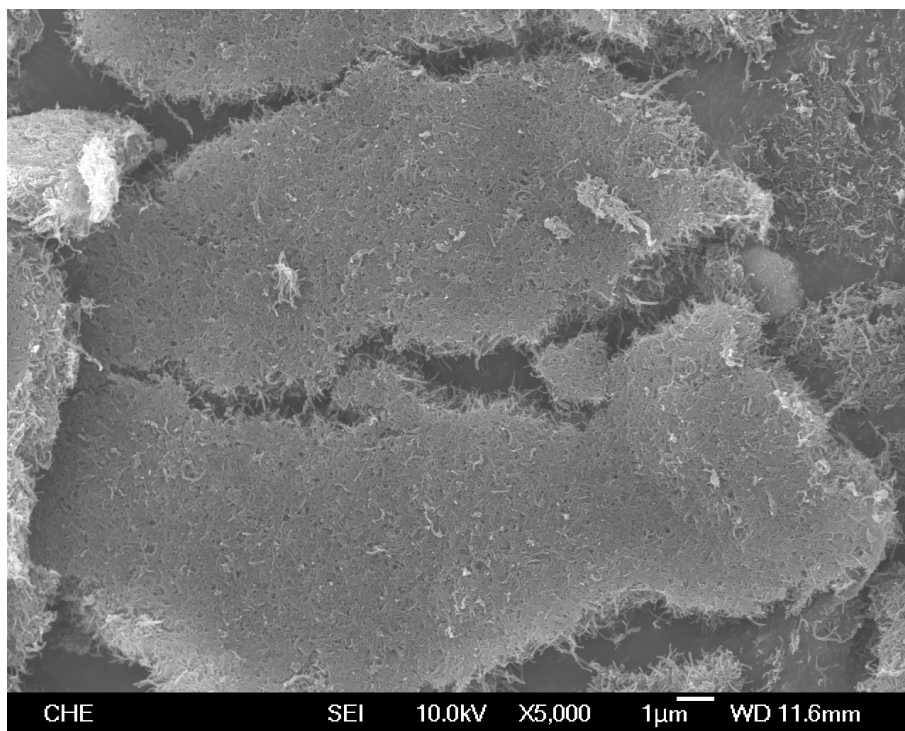


圖 3-14 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(5000 倍)  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:50°C

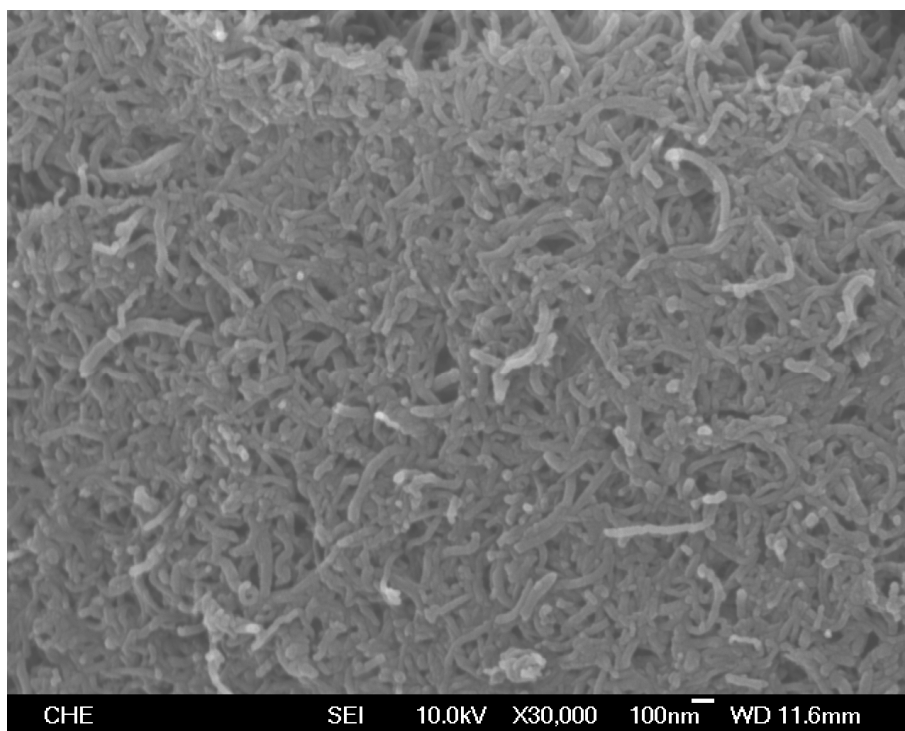


圖 3-15 酸處理奈米碳管之 SEM 圖(30000 倍)  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:50°C

### 3-4-2 電極之穿透式電子顯微鏡分析

穿透式電子顯微鏡是利用高能量電子束(一般約在 100 keV~1 MeV)穿透厚度低於 100 nm 之待測樣品，和樣品內的各種組織產生不同程度之散射，散射後之電子束以不同路徑通過後續的透鏡組合，形成明暗對比之影像，接著利用 CCD 轉成數位訊號後，於電腦螢幕上顯現並儲存影像。

圖 3-16 到圖 3-18 為多層奈米碳管經酸處理前之 TEM 細微型態分析之結果，圖 3-19 與圖 3-21 為多層奈米碳管經酸處理後之 TEM 細微型態分析之結果；從圖中可看到經酸處理前後之多層奈米碳管在各 TEM 圖中呈現多層次之樣貌，且未經酸處理之多層奈米碳管之最外層管壁都呈現完整的樣貌，反觀經酸處理後之多層奈米碳管，在較小的放大倍率下與經酸處理前之 TEM 圖並無太大之差別，但在倍率較大之 TEM 圖即可看見碳管之最外層呈現模糊之樣貌，說明經酸處理後之多層奈米碳管外層被強氧化劑給氧化，並造成碳管之管壁的破壞，進而導致碳管的斷裂，碳管斷裂處是否符合文獻所說生成羧基等官能基，則需進一步做確認。



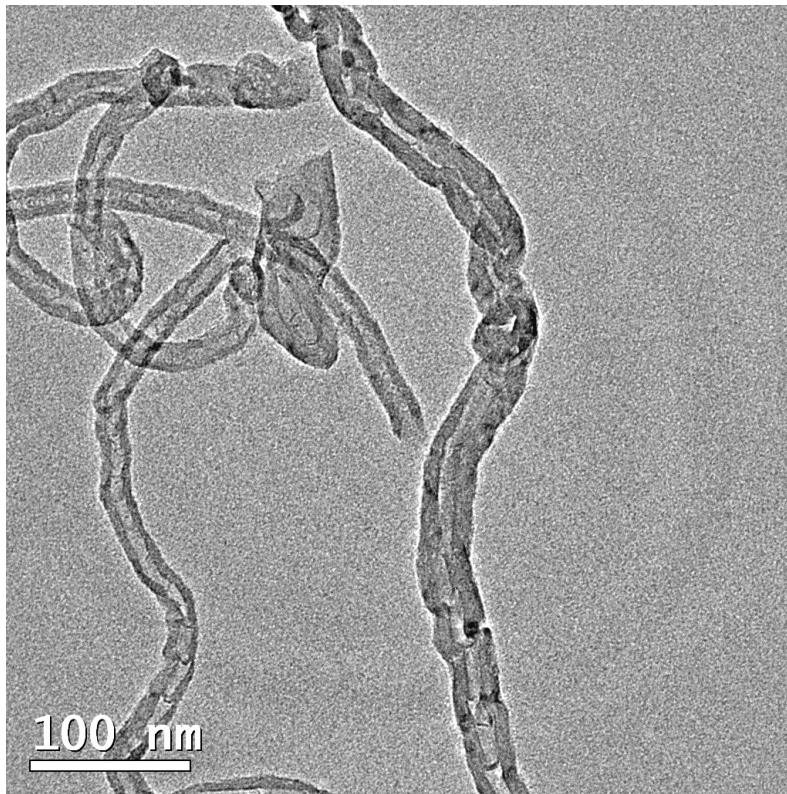


圖 3-16 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖

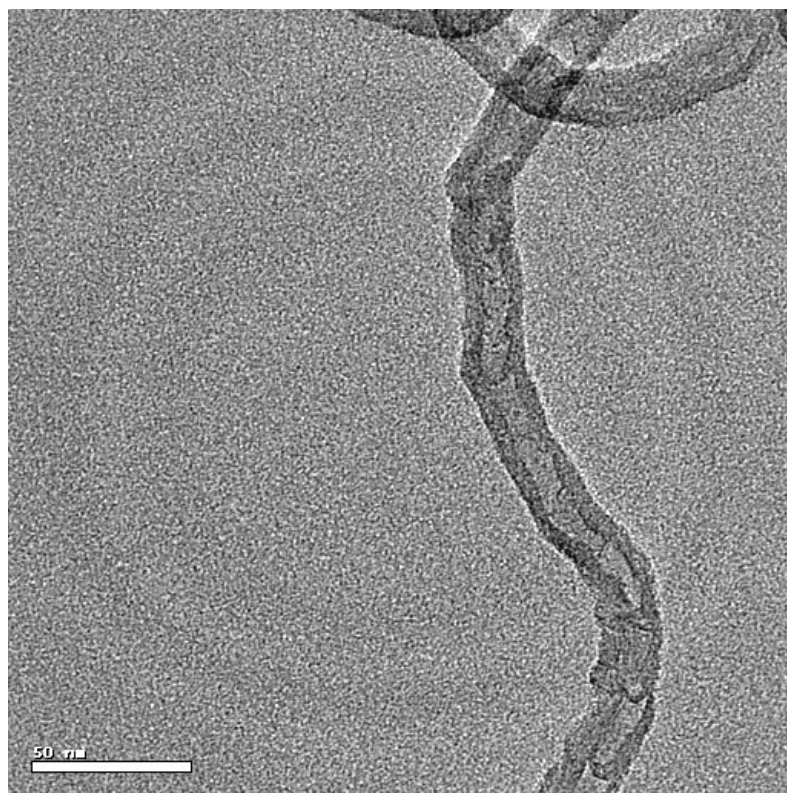


圖 3-17 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖

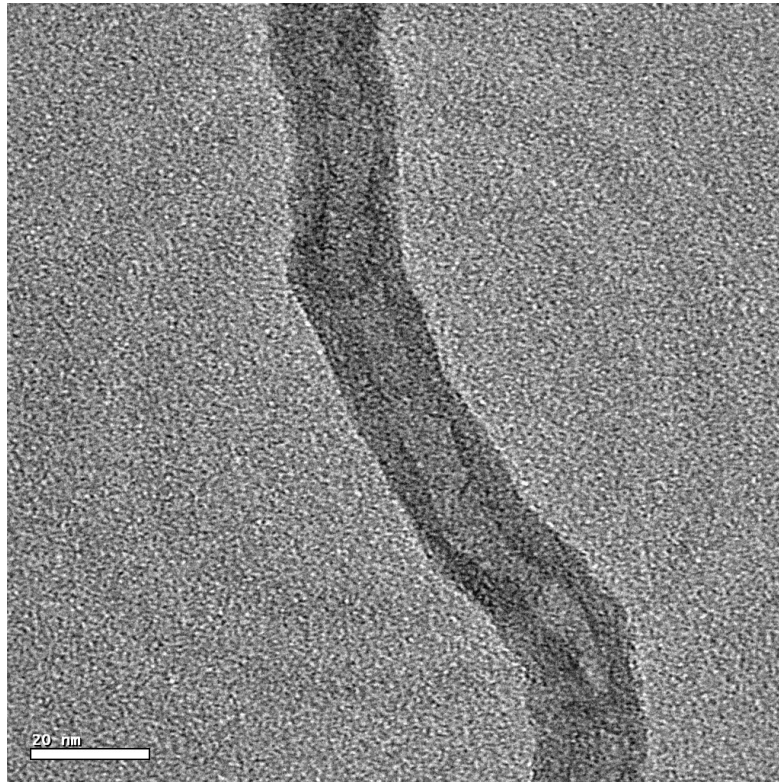


圖 3-18 多層奈米碳管未經酸處理之 TEM 圖

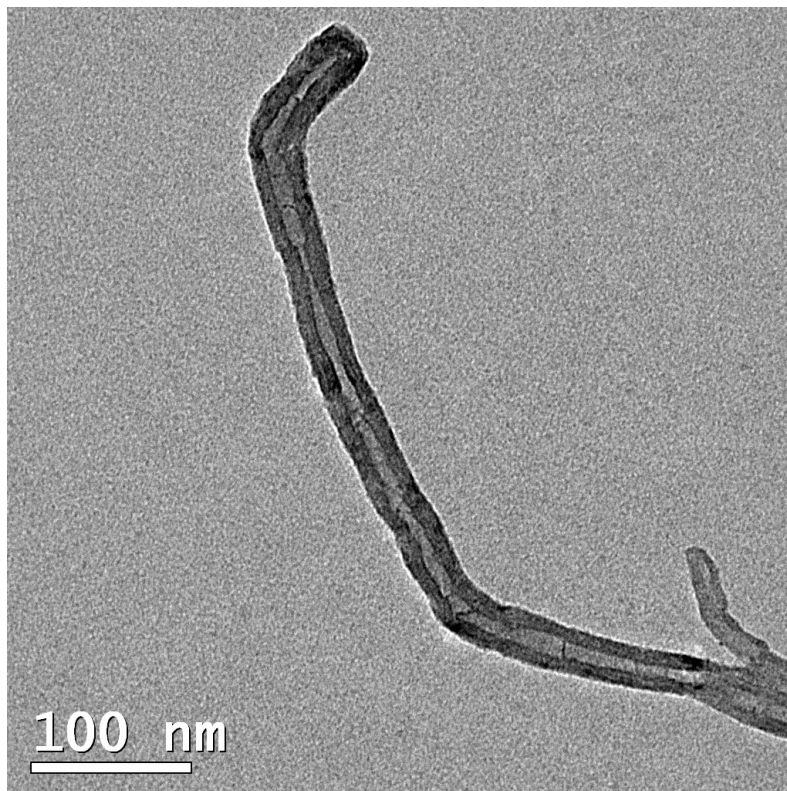


圖 3-19 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖  
酸處理條件:[ $\text{H}_2\text{SO}_4$ : $\text{HNO}_3$ ]=3:1, 溫度: $25^\circ\text{C}$

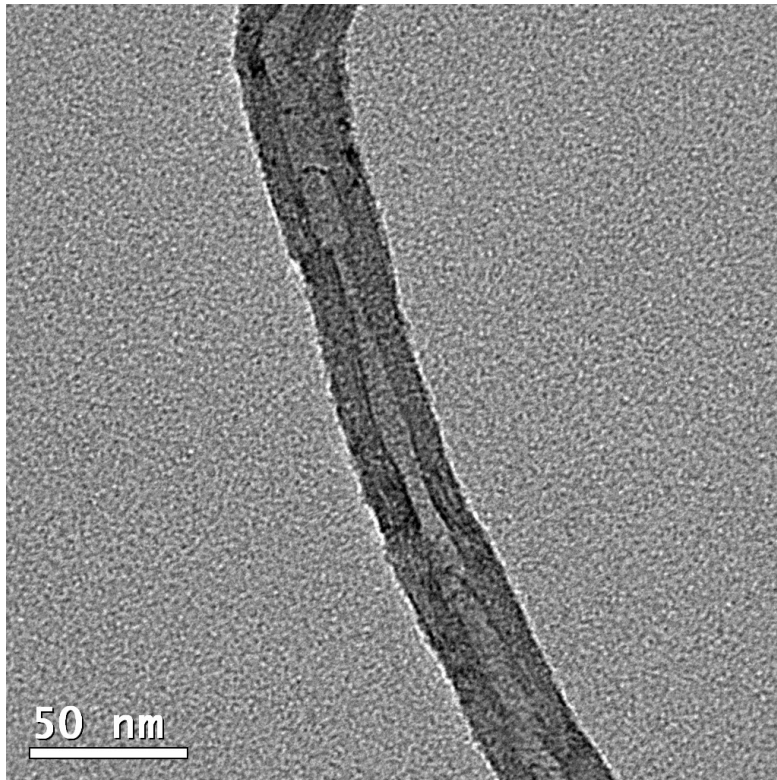


圖 3-20 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:25°C

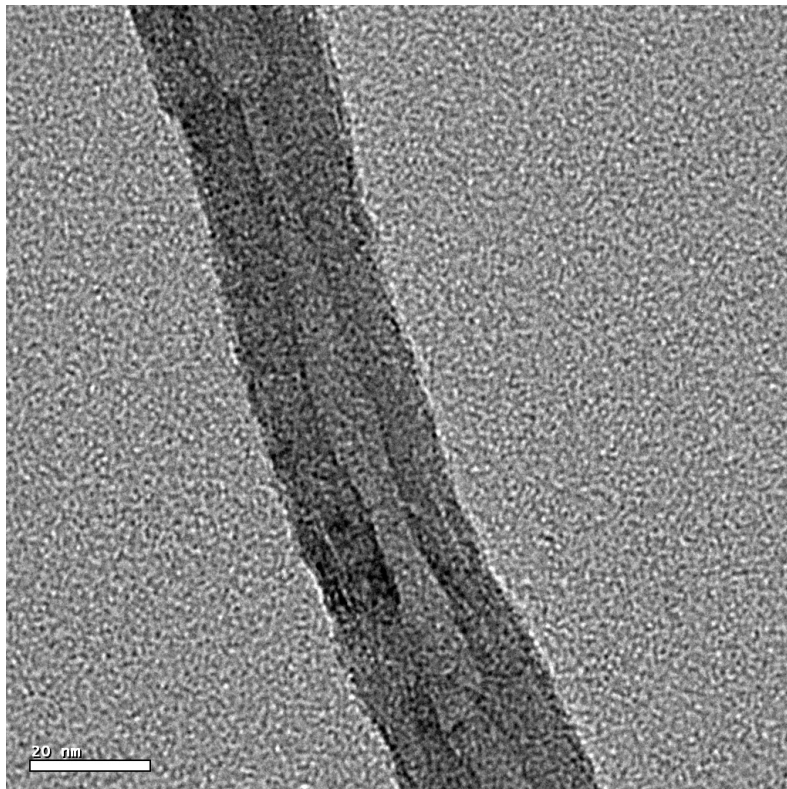


圖 3-21 多層奈米碳管經酸處理之 TEM 圖  
酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:25°C

### 3-4-3 能量分散式光譜儀(EDS)元素分析

當電子束撞擊樣品中組成成份元素之原子時，特定能量上之電子可能被撞離原有軌域而形成二次電子，其他較高能階之電子就會過來補充，此種電子在不同能階上的跳動將釋出能量，並以X射線表現。由於不同元素之原子每一電子能階各不相同，從所接收到的X光之波長或能量便可判定其為何種元素的哪一個電子能階所釋出，再利用放大器作訊號放大，最後在螢幕上顯示光譜，藉此可分析樣品中組成成份元素之種類。

#### 3-4-3-1 多層奈米碳管經酸處理前後比較

圖 3-22 為比較多層奈米碳管經酸處理前後之能量分散式光譜儀元素分析圖，從圖中可看到未經酸處理之多層奈米碳管碳元素的比例為 93.6 % 且無氧元素之存在，但經過酸處理之後碳元素的比例下降至 87.3 %，而氧元素之比例則提高至 9.1 %，雖然可能有部分為未清洗乾淨之  $H_2SO_4$  所提供之氧原子，但硫元素所佔之比例極少，經按 S:O=1:4 比例扣除後，在多層奈米碳管管壁上仍有約 7.0 % 之氧元素存在，證明多層奈米碳管之管壁經過酸處理之後被氧化，造成氧元素之訊號產生，說明含氧官能基的存在。

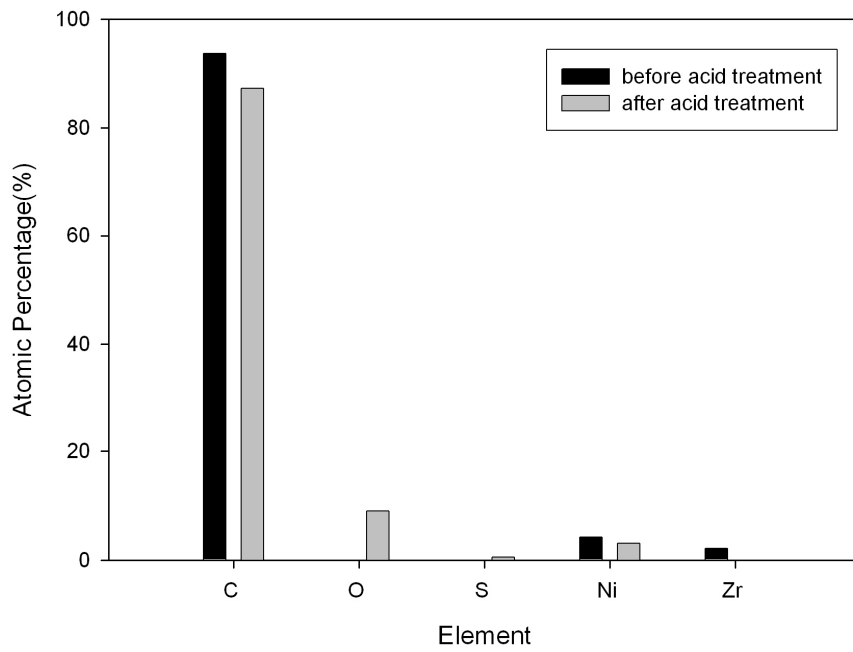


圖 3-22 多層奈米碳管酸處理前後之能量分散式光譜儀元素分析圖  
 酸處理條件:[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>]=3:1, 溫度:25°C



#### 3-4-4 電極之傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)分析

紅外線光譜乃是利用待研究物質對紅外線輻射吸收之特性，將其轉成分子轉動動能或振動能，分子中如存在特殊官能基則往往會吸收特定之波長；因本研究所需之羧酸基可分成兩種基本的官能基，C=O 與 O-H，其特定吸收峰之波長分別在  $1680\text{ cm}^{-1}\sim 1750\text{ cm}^{-1}$  之間與  $3230\text{ cm}^{-1}\sim 3550\text{ cm}^{-1}$  之間，在本研究中波長範圍選取為  $450\text{ cm}^{-1}\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。

##### a. 多層奈米碳管經酸處理前後之對照

圖 3-23 為奈米碳管經酸處理前後之紅外線光譜訊號對照圖，由於使用紅外線光譜儀偵測奈米碳管時，不易產生明顯之波峰訊號，為了得到較易觀察之波峰，因此以經酸處理多層奈米碳管之紅外線光譜數據，除以未經酸處理多層奈米碳管所得之紅外線光譜儀數據，所得之數據整理後即為經酸處理後之所生成之主要官能基波峰吸收訊號；由圖中可看到幾個明顯之波峰，分別列於表 3-1 之中，由此可以確定經酸處理之奈米碳管管壁被強氧化劑氧化而生成了羰基(C=O)、羥基(-OH)及羧酸基(-COOH)等官能基。

表 3-1 多層奈米碳管經酸處理之紅外線光譜分析波峰與官能基對照表

| 波峰( $\text{cm}^{-1}$ ) | 官能基 |
|------------------------|-----|
| 858                    | C-H |
| 1262                   | C-O |
| 1599                   | C=C |
| 1754                   | C=O |
| 3225                   | O-H |

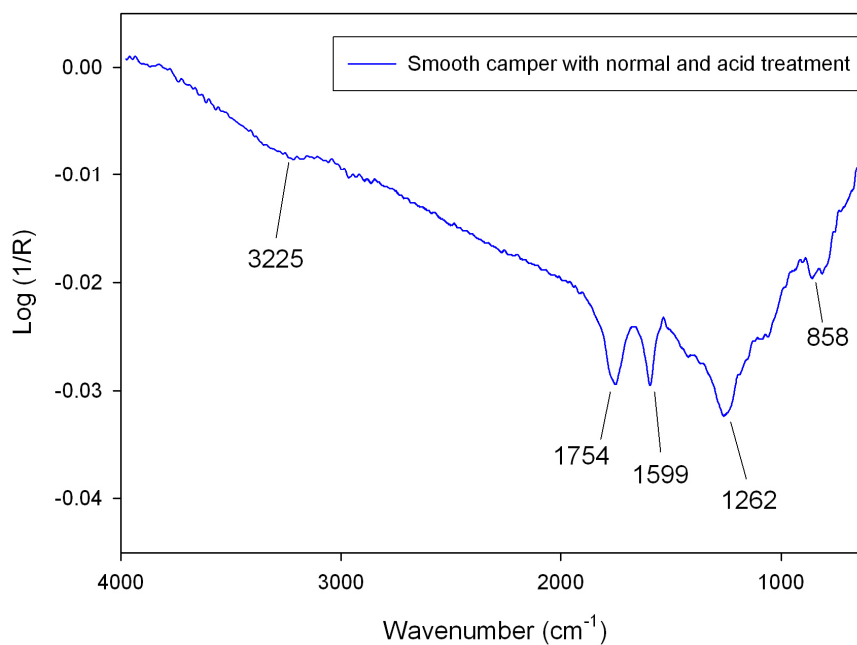


圖 3-23 多層奈米碳管經酸處理前後之 FTIR 訊號相除比較圖

酸處理條件: $[\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3]=3:1$ , 溫度: $25^\circ\text{C}$

### 3-4-5 經酸處理之奈米碳管親水性提昇之觀察

取未經處理與經酸處理後之多層奈米碳管樣品加入去離子水後經超音波震盪，圖 3-24(A)為經酸處理之多層奈米碳管，(B)為未經酸處理之多層奈米碳管，圖 3-25 為經過一小時靜置後兩管之比較情形，而圖 3-26 為使用離心機以 10000 rpm 離心 10 min 後之結果；從圖中可以清楚的看到未經處理之碳管一開始經超音波震盪後，在水中之分散性仍然不佳，反觀經酸處理之碳管很均勻的分散在水中。經過一小時之後，經酸處理之碳管仍然很均勻的分散在水中，但是未經酸處理之碳管已經很明顯的看到沈澱之現象；經過離心之後經酸處理之碳管還是很均勻的分散在水中，未經酸處理之碳管則大部分都沈澱在試管底部。

由此可以很清楚的看到，經酸處理之碳管的親水性比未經酸處理之碳管來的好，證明經酸處理之後碳管壁生成了親水之官能基團，才能夠使其在水中有較好的分散，不因為靜置或離心而沈澱。

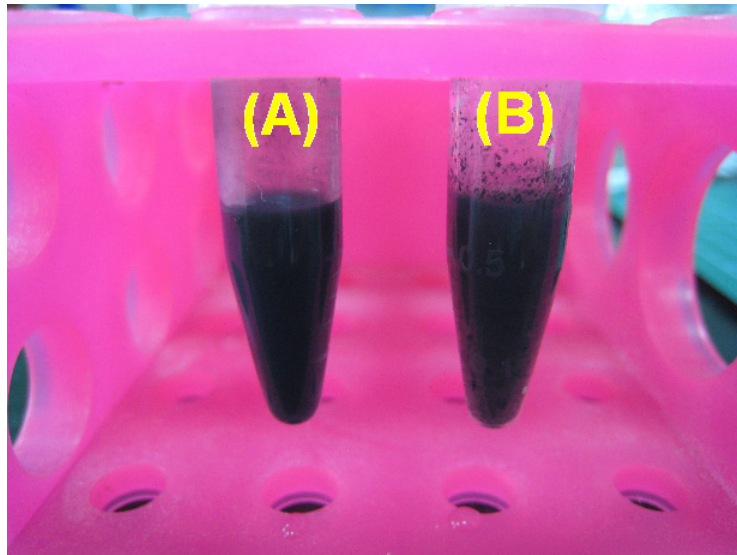


圖 3-24 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管(B)經超音波震盪後之親水性比較圖

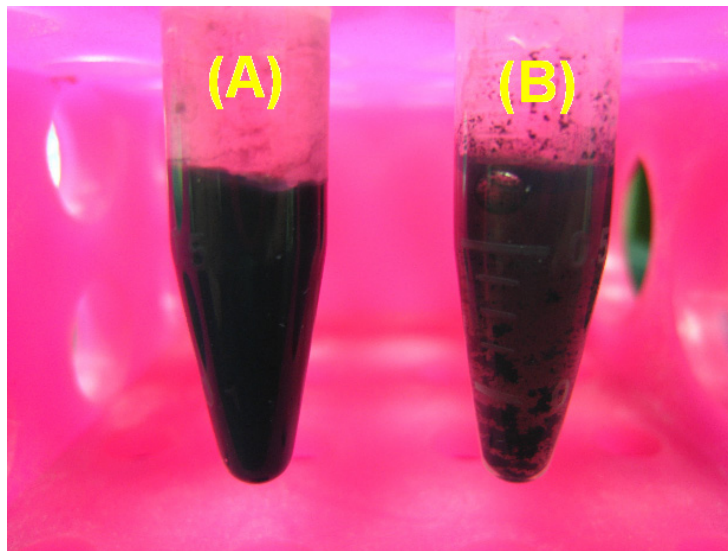


圖 3-25 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管 (B)經 1hr 靜置之親水性比較圖

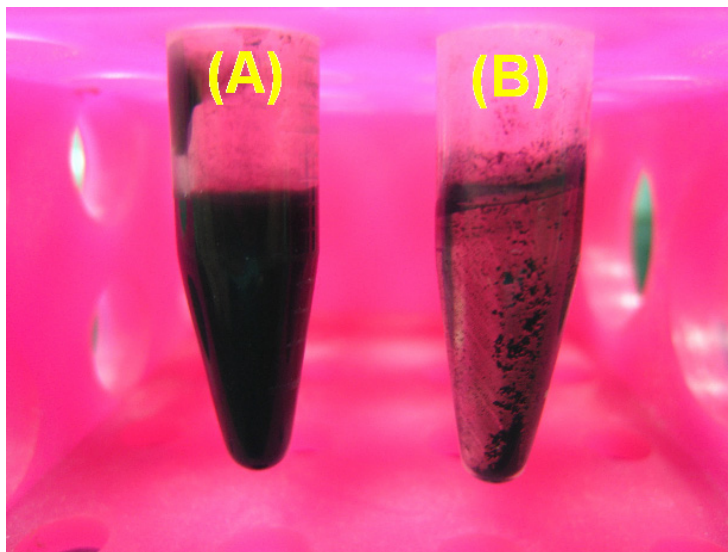


圖 3-26 碳管經酸修飾(A)與未修飾碳管 (B)經離心之親水性比較圖

### 3-4-6 碳糊電極(CPE)之電化學反應特性

#### 3-4-6-1 4-ABA/CPE 電極之製備

圖 3-27 為使用 CPE 電極在含 3.0 mM 對胺基苯甲酸的 0.1 M LiClO<sub>4</sub> 溶液，經不同圈數之循環伏安法處理，可以發現在 0.358 V 與 0.267 V 兩電壓下分別產生了氧化與還原波峰，波峰電流會隨著掃描圈數之增加而增加，其原因為隨著掃描圈數的增加而沈積在電極上之對胺基苯甲酸膜厚度也隨之增加，導致電化學活性面積的增加，因此聚合產生之氧化與還原波峰電流增加。

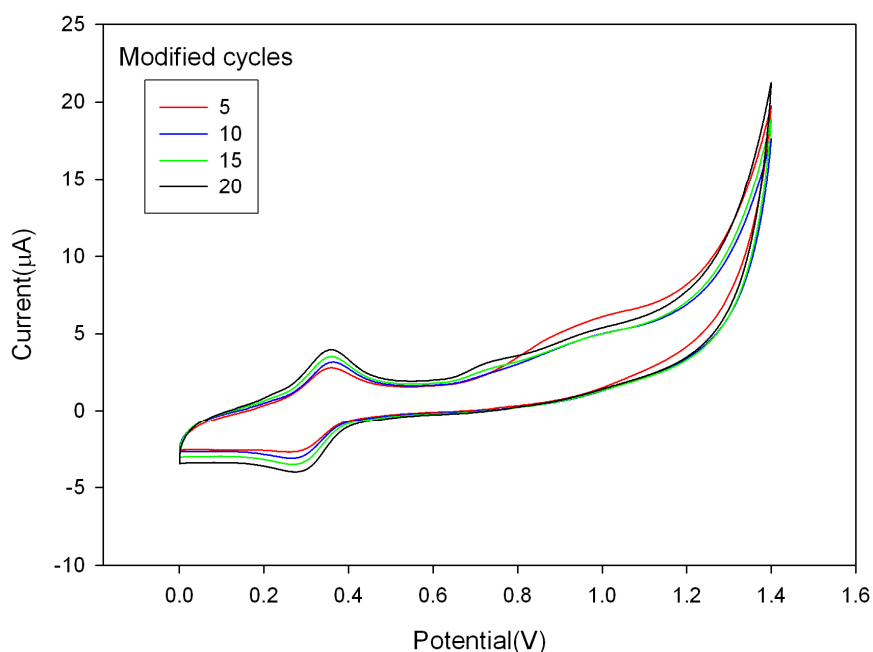


圖 3-27 碳糊電極聚合 4-ABA 之循環伏安圖

聚合液：[4-ABA]=3.0 mM, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1M

工作電極：CPE

掃描範圍：0.0 V~1.4 V(vs. Ag/AgCl)

掃描速率：10 mV/s

溫度：25°C

### 3-4-6-2 碳糊電極(CPE)修飾前後之電極導電度變化

圖 3-28 為碳糊電極聚合對胺基苯甲酸前後以循環伏安法感測赤血鹽比較圖；從圖中可以看到在聚合對胺基苯甲酸之前，碳糊電極感測赤血鹽具有明顯的氧化波峰及還原波峰，但經過聚合對胺基苯甲酸之後，其循環伏安法圖顯示感測赤血鹽波峰電流下降與文獻研究相同(Yang, et al., 2006)，此現象有兩種原因：第一個原因為聚合於碳糊電極表面之 4-ABA 對於赤血鹽不具活性，在經聚合對胺基苯甲酸之後，對胺基苯甲酸於電極表面生成一層聚合物後阻擋了電極表面與赤血鹽溶液之接觸，因此檢測不出赤血鹽之氧化還原波峰；第二個原因為 4-ABA 為一種導電度不佳之物質，當 4-ABA 於電極表面生成一層聚合物後，降低了電極之導電度，因此使得感測得到赤血鹽的氧化及還原波峰變小。因為赤血鹽為一種電化學活性高之化合物，因此認為第二個原因為主要降低赤血鹽氧化還原波峰之原因，但確切的原因還是得靠近一步實驗來做確認。

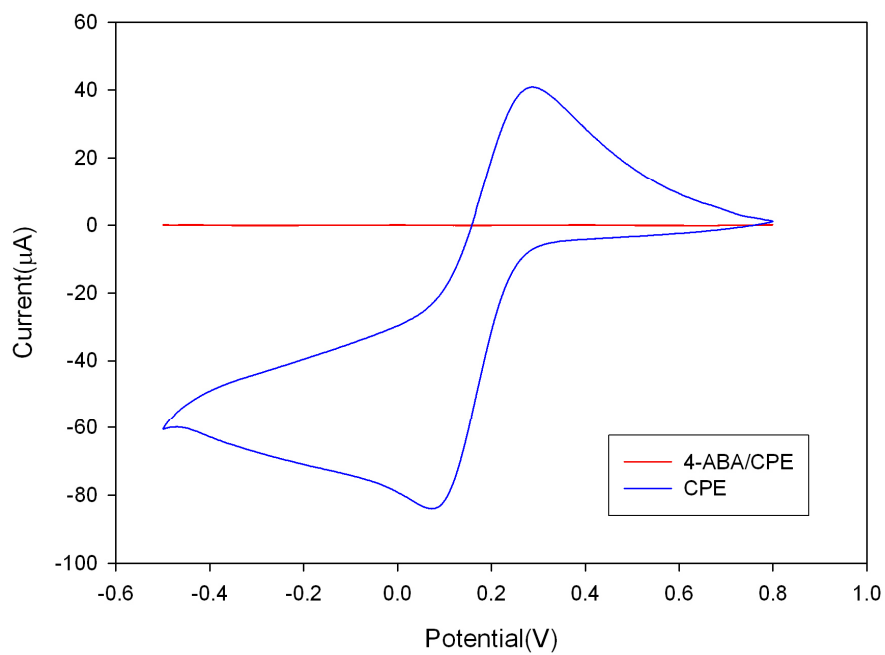


圖 3-28 修飾對氨基苯甲酸碳糊電極(4-ABA/CPE)與未修飾碳糊電極(CPE)感測赤血鹽之循環伏安圖

工作電極：4-ABA/CPE 與 CPE  
 掃描範圍：-0.5 V~0.8 V(vs. Ag/AgCl)  
 掃描速率：20 mV/s  
 赤血鹽濃度：0.1 M  
 溫度：25°C

### 3-4-6-3 未經修飾電極感測道諾霉素

由於道諾霉素在本研究中扮演一個指示劑之角色，因此要先測試道諾霉素是否擁有一個好的電化學氧化還原特性，圖 3-29 為使用未聚合對胺基苯甲酸之碳糊電極，以循環伏安法感測不同濃度之道諾霉素；從圖中可以清楚看到當 PBS 緩衝液中無道諾霉素存在時，並不會出現氧化及還原之波峰，但於 PBS 緩衝液中添加道諾霉素使得濃度成為  $1\mu\text{M}$  之後，經循環伏安法感測後可以看到在電壓為  $0.5\text{ V}$  時產生了電流為  $0.3\mu\text{A}$  之氧化波峰，並在電壓為  $0.4\text{ V}$  時產生了電流為  $0.2\mu\text{A}$  之還原波峰，增加道諾霉素濃度至  $2\mu\text{M}$  之後，在電壓為  $0.5\text{ V}$  時產生了電流高度為  $0.6\mu\text{A}$  之氧化波峰，並在電壓為  $0.4\text{ V}$  時產生了電流高度為  $0.4\mu\text{A}$  之還原波峰，而波峰之電流會隨著濃度增加而增加並有著良好之線性關係，證明道諾霉素為一個電化學活性高之物質，因此可應用在本實驗並作為電化學之指示劑。



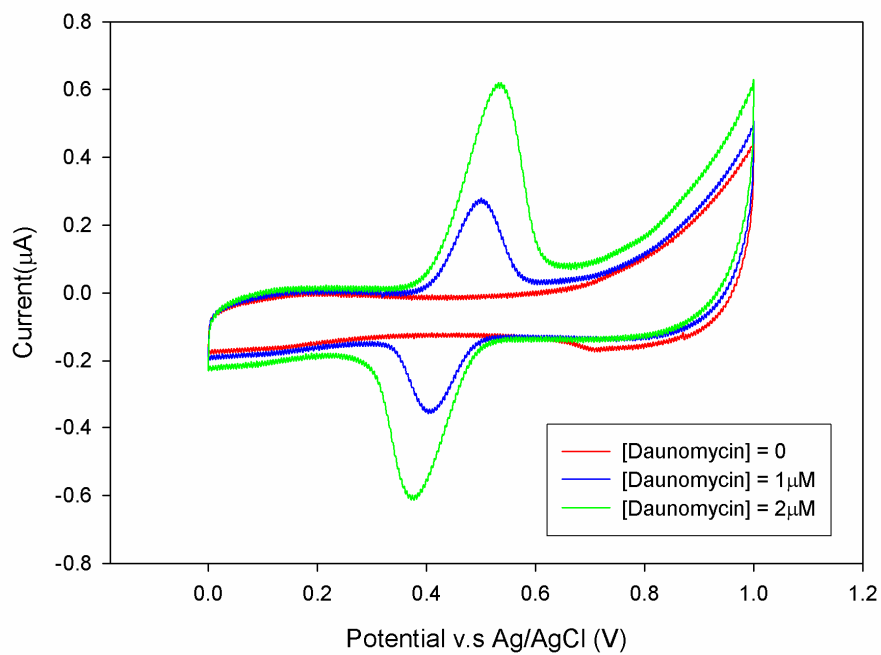


圖 3-29 以碳糊電極用循環伏安法感測不同濃度道諾霉素之循環伏安圖

工作電極：CPE

掃描範圍：0.0 V~1.0 V(vs. Ag/AgCl)

掃描速率：50 mV/s

緩衝液：PBS (pH=7.4)

道諾霉素濃度：0 ~ 2 µM

掃描圈數：10 圈

溫度：25°C

#### 3-4-6-4 修飾不同濃度對胺基苯甲酸對 DNA 感測器靈敏度之影響

本實驗探討以循環伏安法聚合不同濃度之對胺基苯甲酸以微分脈衝伏安法感測目標 DNA 之影響，如圖 3-30 所示可以看到在修飾相同濃度之探針 DNA 並感測相同濃度之目標 DNA，當對胺基苯甲酸濃度為 6.0 mM 與 9.0 mM 時，以微分脈衝伏安法感測電流之波峰高度分別為 0.3  $\mu\text{A}$  與 0.4  $\mu\text{A}$ ，反觀當對胺基苯甲酸濃度為 1.5 mM 與 3.0 mM 之情況下，微分脈衝伏安法感測電流之波峰高度分別為 1.9  $\mu\text{A}$  與 1.8  $\mu\text{A}$ ，說明在對胺基苯甲酸濃度過高會抑制感測訊號，而降低其濃度則可增加訊號。此結果也顯示對胺基苯甲酸的聚合所導致導電性的下降，但考慮到濃度太低又會造成固定在電極上之探針 DNA 數量的減少，因此本研究以後之實驗選擇修飾對胺基苯甲酸的濃度為 3.0 mM。

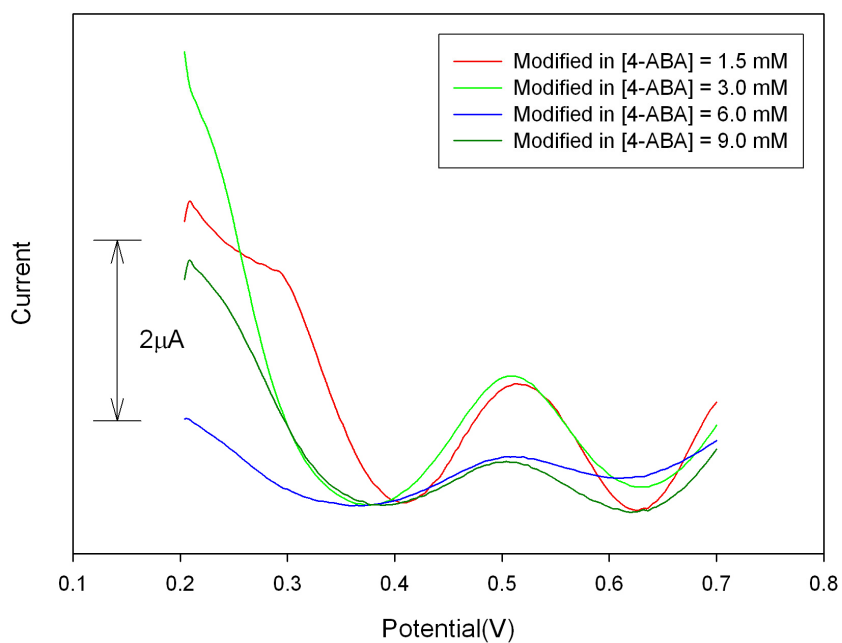


圖 3-30 碳糊電極修飾不同濃度對胺基苯甲酸感測道諾霉素之微分脈衝伏安圖

工作電極：4-ABA/CPE

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

緩衝液：PBS (pH=7.4)

溫度：25°C

#### 3-4-6-5 聚合不同圈數 4-ABA 對 DNA 感測器靈敏度之影響

本實驗探討利用循環伏安法於碳糊電極上聚合對胺基苯甲酸時的聚合圈數對以微分脈衝伏安法感測之影響，圖 3-31 為以循環伏安法聚合 3.0 mM 之對胺基苯甲酸，改變不同聚合圈數對感測之影響；從圖中可以看到修飾相同濃度之探針 DNA 並感測相同濃度之目標 DNA 之條件下，對胺基苯甲酸聚合圈數為 10 圈與 30 圈之情況下，微分脈衝伏安法感測電流之波峰高度分別為 0.4  $\mu\text{A}$  與 0.8  $\mu\text{A}$ ，而在聚合 20 圈之條件下，所得之波峰訊號高度為 1.8  $\mu\text{A}$ ，說明在電極上聚合過多對胺基苯甲酸會導致電極導電度的下降而聚合過少對又會使羧基的數量減少，進而造成固定之探針 DNA 數量減少，最後導致微分脈衝伏安法感測電流之波峰電流降低，因此選擇以循環伏安法聚合 20 圈之對胺基苯甲酸作為之後實驗之條件。

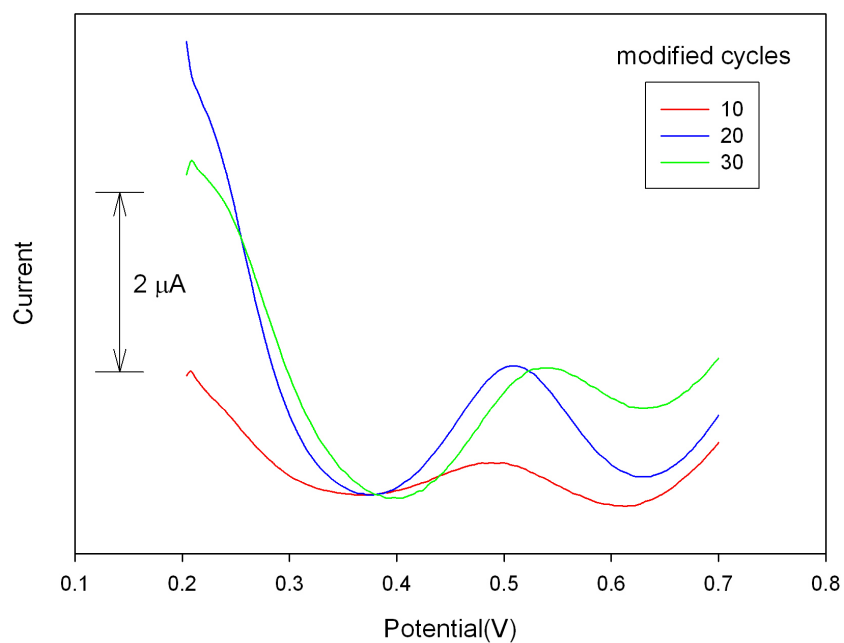


圖 3-31 在碳糊電極上聚合不同圈數之 4-ABA 感測道諾霉素之微分脈衝伏安圖

工作電極：4-ABA/CPE

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

緩衝液：PBS (pH=7.4)

溫度：25°C

### 3-4-6-6 修飾不同濃度之 DNA 探針對 DNA 感測器靈敏度之影響

為了進一步改善感測條件，本實驗探討了於電極上修飾不同濃度之 DNA 探針以感測不同濃度之目標 DNA，圖 3-32 為分別在電極片上修飾 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針，並以微分脈衝伏安法分別感測 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之目標 DNA；從圖中可以看到在電極上修飾 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針時，感測 1.75  $\mu\text{M}$  之目標 DNA 所得之微分脈衝伏安法波峰訊號皆約為 0.3  $\mu\text{A}$ ，說明於電極片上修飾 1.75  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針已經足夠，增加 DNA 探針也不會提高感測所得到之波峰訊號。

而在電極上修飾 1.75  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針後，分別以微分脈衝伏安法感測 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之目標 DNA 時，發現微分脈衝伏安法波峰訊號為 0.3  $\mu\text{A}$  與 0.6  $\mu\text{A}$ ，且當目標 DNA 的濃度增加兩倍時 DPV 感測電流之波峰高度也隨之增加兩倍，顯示目標 DNA 的濃度與微分脈衝伏安法檢測之訊號呈現一個很好的線性關係。

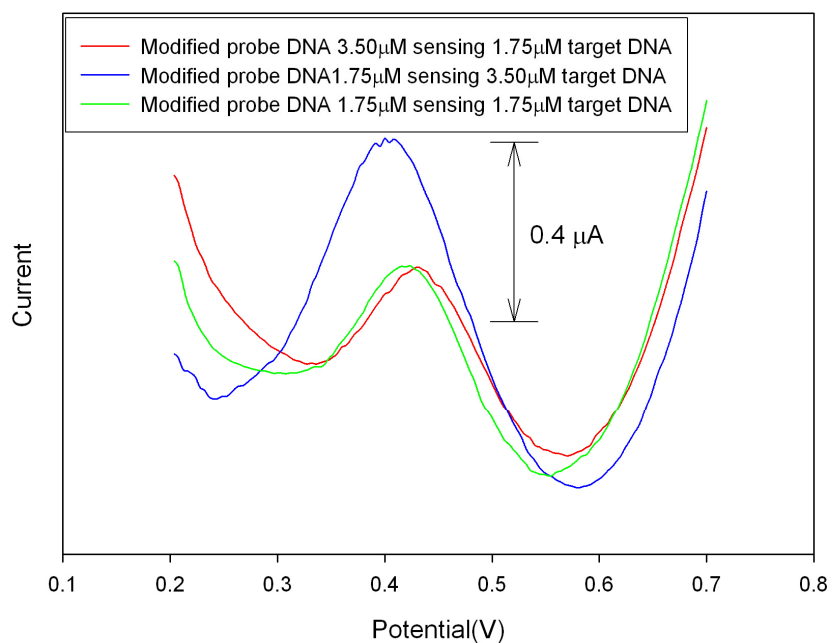


圖 3-32 修飾不同濃度之 DNA 探針感測不同濃度目標 DNA 之微分脈衝伏安圖

工作電極：DNA/4-ABA/CPE

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

緩衝液：PBS (pH=7.4)

溫度：25 $^{\circ}$ C

### 3-4-7 以奈米碳管為碳糊電極材料之電化學反應特性

#### 3-4-7-1 奈米碳管經酸處理前後製成 MWNT/CPE 之導電度變化

圖 3-33 為未經酸處理之奈米碳管製成碳糊電極後感測赤血鹽之循環伏安法檢測圖，圖中可以清楚的看到氧化及還原波峰，而從圖 3-34 可看到使用經酸處理後之奈米碳管所製成之碳糊電極，其背景電流遠大於使用未經酸處理奈米碳管製成之碳糊電極，證明經酸處理後碳管被切斷導致於相同體積下可填充時可填充較緊密，除了導致導電度增加，同時也增加了電極表面的活性面積。

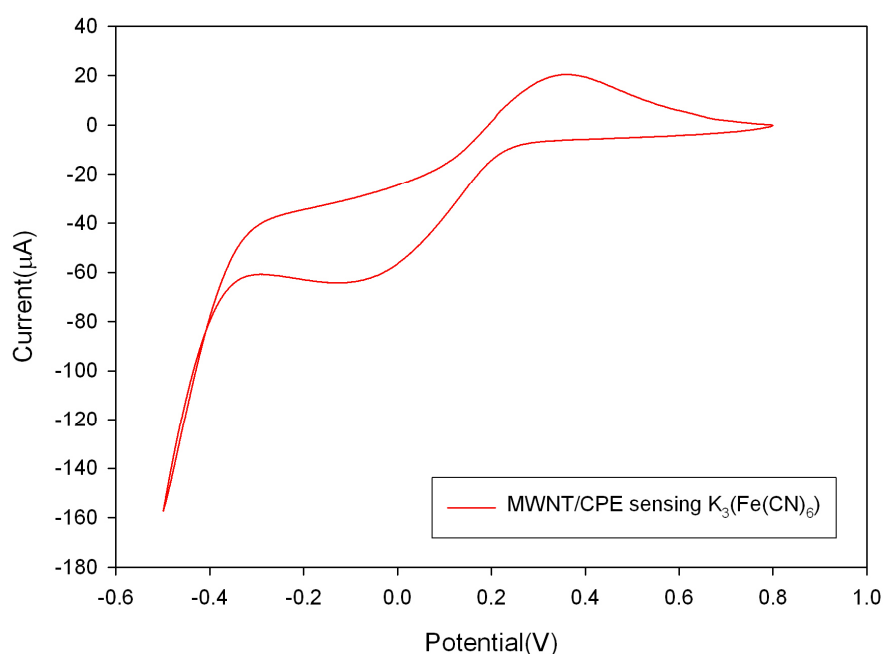


圖 3-33 MWNT/CPE 以循環伏安法感測赤血鹽

工作電極：MWNT/CPE  
掃描範圍：-0.5 V~0.8 V(vs. Ag/AgCl)  
掃描速率：20 mV/s  
赤血鹽濃度：0.1 M  
溫度：25°C



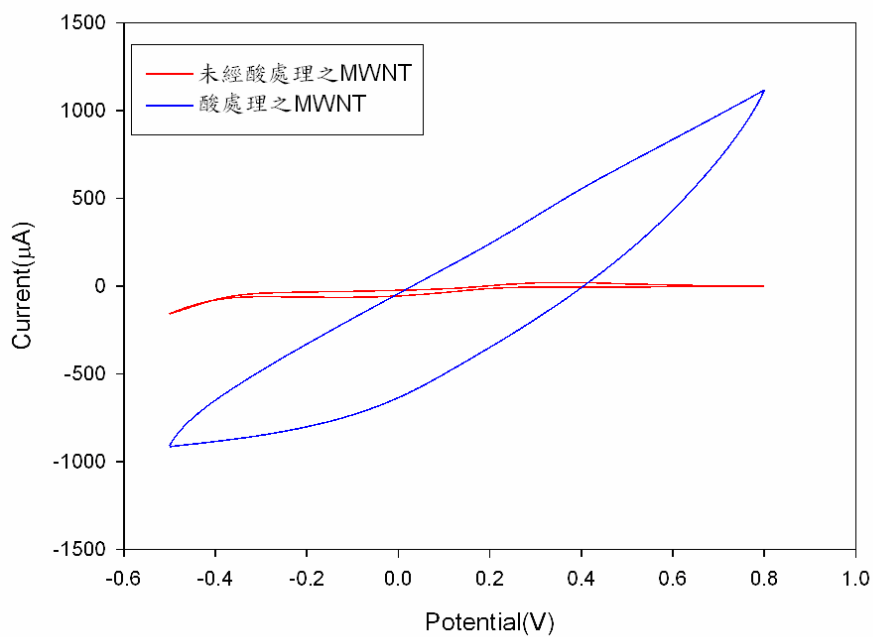


圖 3-34 以循環伏安法感測赤血鹽比較酸處理前後奈米碳管為碳糊電極材料

工作電極：MWNT/CPE  
 掃描範圍：-0.5 V~0.8 V(vs. Ag/AgCl)  
 掃描速率：20 mV/s  
 赤血鹽濃度：0.1 M  
 溫度：25°C

### 3-4-7-2 MWNT/CPE 感測道諾霉素

為了測試道諾霉素在以奈米碳管為材料之碳糊電極上是否仍具有電化學之活性，圖 3-35 為以奈米碳管為材料製成之碳糊電極，以循環伏安法感測不同濃度道諾霉素之結果，從圖中可以看到當背景溶液未加入道諾霉素時，並無明顯成對的氧化及還原波峰，但經過添加道諾霉素之後在電壓為 0.5 V 時產生了氧化波峰，且波峰之電流高度會隨 DNM 濃度增加而增加，說明以奈米碳管為電極材料之碳糊電極仍然可以使用道諾霉素作為電化學指示劑。

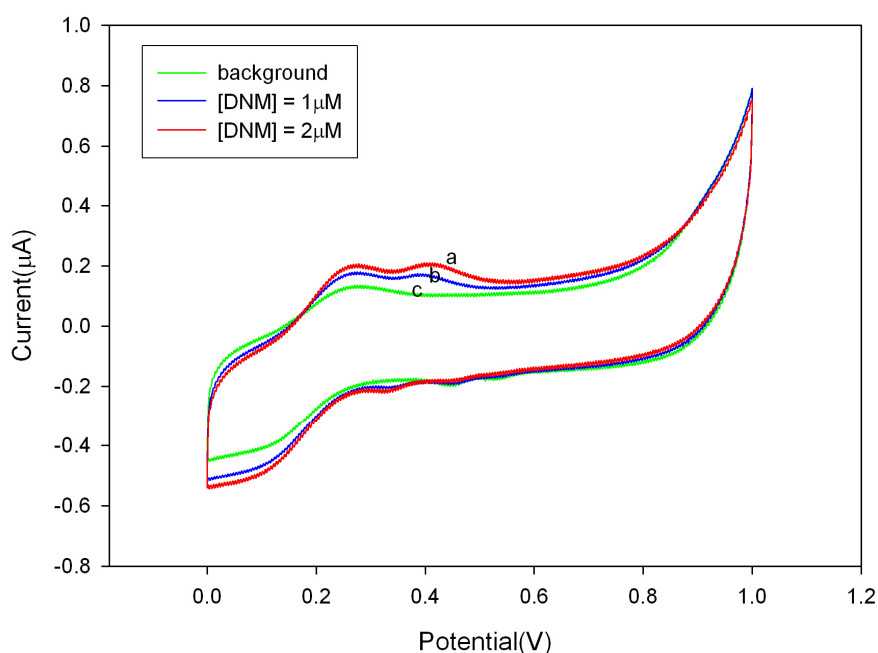


圖 3-35 以奈米碳管為碳糊電極材料感測道諾霉素之循環伏安法圖

工作電極：MWNT/CPE

掃描範圍：0.0 V~1.0 V(vs. Ag/AgCl)

掃描速率：50 mV/s

緩衝液：PBS (pH=7.4)

道諾霉素濃度：0 ~ 2  $\mu\text{M}$

溫度：25 $^{\circ}\text{C}$

### 3-4-7-3 以酸處理多層奈米碳管為電極材料對 DNA 感測器靈敏度之影響

圖 3-36 比較了以經酸處理前後之奈米碳管為電極材料製成的 MWNT/CPE 與 DNA/MWNT/CPE 之 DNA 生物感測器以微分脈衝伏安法感測嵌入電極上雙鏈 DNA 的道諾霉素之結果，從圖中可以看到經酸處理前之奈米碳管為材料，使用微分脈衝伏安法檢測並無明顯之波峰訊號；反觀以經酸處理之奈米碳管為電極材料，在電極上修飾 3.50 $\mu$ M 之核酸探針後，並與 3.50 $\mu$ M 之完全互補目標探針做雜合之作用，在 0.4V 電壓下所得到之波峰訊號相當明顯，波峰高度為 200 $\mu$ A，說明以碳管為材料可以得到比以碳粉為材料之碳糊電極更佳之感測靈敏度。

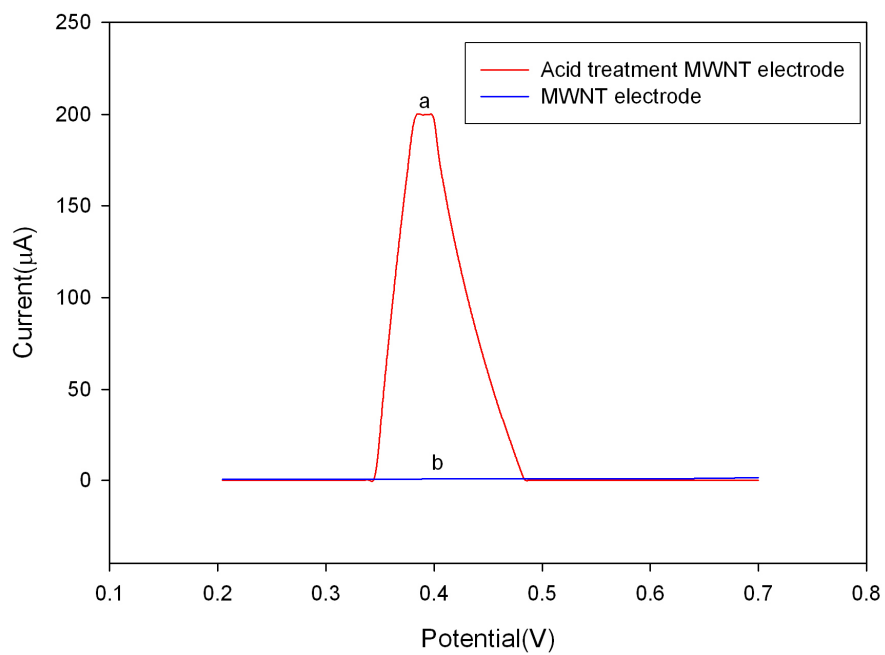


圖 3-36 以經酸處理之多層奈米碳管為電極材料做感測之影響圖

工作電極：MWNT/CPE 與 DNA/MWNT/CPE

掃描範圍：0.2V~0.7V(vs. Ag/AgCl)

振幅：50mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

緩衝液：PBS (pH=7.4)

溫度：25°C

### 3-5 綜合討論

經由 FTIR 確認 4-ABA/CPE 電極與 MWNT/CPE 電極已成功的於電極表面修飾羧基，再經過固定探針 DNA、雜合目標 DNA 以及嵌入道諾霉素等步驟，使用微分脈衝伏安法檢測，都可以於 0.4V 得到波峰電流訊號，但兩電極的經檢測後所得之波峰電流高度相差極大，MWNT/CPE 約為 4-ABA/CPE 的 200 倍而對於 MWNT/CPE 電極使用循環伏安法感測道諾霉素所得之波峰電流只有 0.2  $\mu\text{A}$ ，因此可排除上述之差別是由於道諾霉素滲入電極內而導致；兩種電極製作過程上之差異在於使用經酸處理奈米碳管之碳糊電極材料時，若添加的碳管與石蠟油採用與碳糊電極相同的比例為 4:1 時，碳管仍呈現乾燥之狀態，考慮到石蠟油添加比例過高會影響其導電度，因此碳管與石蠟油比例採用 2:1，即使如此經感測之步驟後 MWNT/CPE 電極表面仍容易剝落，容易影響感測之效果；雖然其導電度較普通碳粉高，但穩定度不佳這個缺點則是有改進的空間，可考慮將經酸處理碳管應用其他修飾或是應用於其他電極來增加其穩定性。

## 第四章 探討以 4-ABA/PEDOT/Pt 為 DNA 生物感測器之材料

### 4-1 實驗目的

有鑑於第三章以碳糊電極作為 DNA 生物感測器所測出來之波峰訊號只有 1~2 個微安培，雖然使用以 MWNT 為電極材料可以得到較佳之感測靈敏度，但是電極之穩定性不佳。為了提昇感測之靈敏度及穩定性，因此使用白金絲為材料再以對胺基苯甲酸(4-ABA)進行修飾，但因對胺基苯甲酸之修飾會造成導電度之下降，且其穩定性也不佳，因此改用在白金絲上先鍍上一層聚二氧乙烯噻吩 (PEDOT)，之後再以對胺基苯甲酸修飾來提供所需之羧酸基，而羧酸基則可經由 EDC 和 NHS 之交互作用將修飾了氮根之核酸探針固定在電極片上，如此一來除了可以改善 DNA 生物感測器之導電度與穩定性，與碳糊電極相比也能大幅的縮小電極體積，方便於臨床測量之應用。

本章節除了探討所建立的 DNA 生物感測器在感測與探針 DNA 互補之目標 DNA 濃度之效果外，也探討了目標 DNA 中含錯配鹼基對感測所造成之影響。同時，通過調整雜合溫度來增加鑑別度，最後探討感測樣品中同時含有錯配與完全互補目標 DNA 對感測之影響，以模擬實際於臨床測量應用時可能遭遇之情況。

## 4-2 實驗原理

### 4-2-1 PEDOT 電化學聚合原理

由於導電聚合物聚二氧乙烯噻吩(PEDOT)擁有高的導電度( $>10^2$  S/cm)、良好的化學穩定性與熱穩定性之優點(Groenendaal, et al., 2000; Groenendaal, et al., 2003)，因此可以應用在許多領域，如固體電解質之陽極材料、塑料抗靜電塗料、可充電電池與感測器材料等)。同時電化學聚合之 PEDOT 的特性也引起廣泛的研究。

實驗所用之二氧乙烯噻吩(EDOT)加入電解質溶液中，在攪拌或長時間放置於室溫下之條件下可微溶於水溶液中，由於噻吩環上之次乙二氧基使得二氧乙烯噻吩較噻吩更具反應活性，於 0.95 V 之電壓下即可在電極表面產生電化學聚合，聚合過程為陽離子自由基聚合，其機制如圖 4-2 所示。(Fang, et. al., 1995)

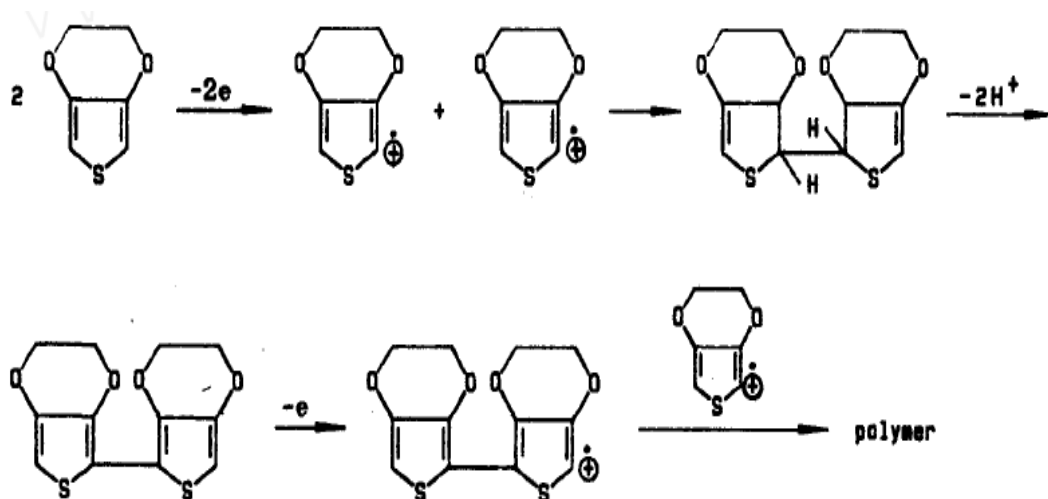


圖 4-1 二氧乙烯噻吩聚合過程圖(Fang, et. al., 1995)

### 4-3 實驗步驟

#### 4-3-1 白金絲之前處理

1. 將直徑 0.6 mm 白金絲置入 3.0 M NaOH 中，浸泡 15 分鐘。
2. 將鹼洗後之白金絲，以大量的蒸餾水沖洗數次。
3. 將白金絲置入 3.0 M HCl 中，浸泡 15 分鐘。
4. 將酸洗後之白金絲，以大量的蒸餾水沖洗數次。
5. 置入烘箱烘乾後放入乾燥箱備用。

#### 4-3-2 製備 PEDOT/Pt 電極

1. 秤取 1.4215 g 二氧乙烯噻吩單體與 10.6390 g  $\text{LiClO}_4$  加入去離子水至 1000 ml，待攪拌至完全溶解，配製成含 0.01 M 之二氧乙烯噻吩單體的 0.1 M 的  $\text{LiClO}_4$  溶液。
2. 以 0.3 mm 的白金絲為工作電極相對電極，取步驟 1.之溶液 6ml，將之浸入液面 0.5 cm，並同樣以 0.3 mm 的白金絲工作電極，Ag/AgCl 為參考電極，裝置成如圖 4-2 所示之電化學分析裝置。
3. 啟動電化學分析儀做循環伏安實驗掃描，掃描電位為 0.0~1.0 V，掃描速率為  $10 \text{ mV S}^{-1}$ ，掃描圈數為 5 圈，溫度為  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。
4. 將聚合完畢之電極浸入去離子水內 4 小時，使用鱷魚夾固定於試管內待用。



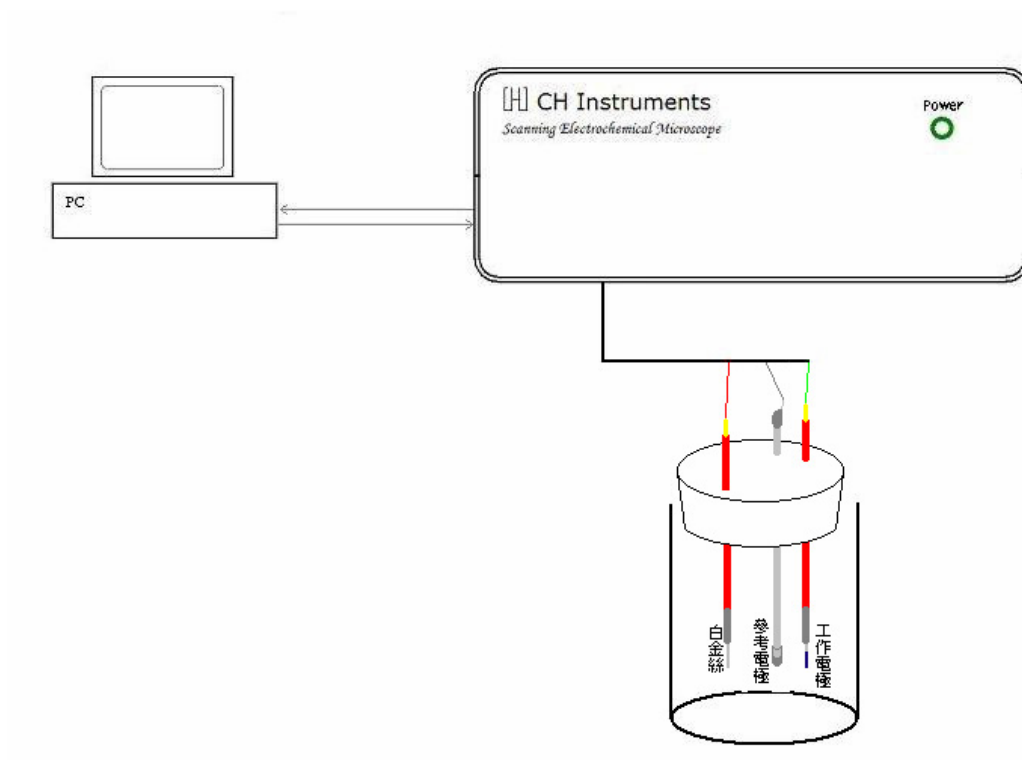


圖 4-2 電化學分析系統裝置圖

#### 4-3-3 製備 4-ABA/PEDOT/Pt 電極

1. 秤取 0.01 g 之對氨基苯甲酸粉末，溶解至 12.3 ml 的 0.1 M LiClO<sub>4</sub> 溶液中，配製成 6 mM 之對氨基苯甲酸溶液。
2. 取步驟 1.之溶液 3 ml，稀釋成 3 mM 之氨基苯甲酸溶液 6 ml，將 4-3-2 節所製成之電極片(PEDOT/Pt)置入對氨基苯甲酸溶液中，直至電極表面完全沒入溶液中。
3. 以 3-1-3-2 節製作成之 PEDOT/Pt 為工作電極，Ag/AgCl 為參考電極，白金絲為相對電極，將步驟 2.之裝置如圖 4-2 所示完成線路連結。
4. 於 25°C 之環境下啟動電化學分析儀做定電壓實驗掃描，電壓定為 1.0 V，修飾時間為 4000 秒。
5. 修飾氨基苯甲酸結束後使用鱷魚夾固定在試管內待用。

#### 4-3-4 DNA 感測器感測完全互補序列之靈敏度

1. 秤取 0.0282 g EDC 與 0.0276 g NHS，分別溶入 3 ml 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH=7.0)，配製成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液。
2. 將步驟 1.所配製成之溶液，分別以 0.05 M 之磷酸緩衝液(pH=7.0)稀釋，得到 EDC 濃度為 5 mM，NHS 濃度為 8 mM 之溶液。
3. 取步驟 2. 配製之溶液 3 ml 將前述步驟完成之工作電極(4-ABA/PEDOT/Pt)浸入，在室溫下(25°C)反應 1 小時。

4. 以去離子水配製 100 nM 之核酸探針溶液(DJ1)3 ml，將步驟 3.取出之工作電極浸入核酸探針溶液，在 25°C 條件下反應 12 小時。
5. 待步驟 4.取出各工作電極後，先以 PBS 緩衝液 (pH=7.4) 沖去未與電極連接之核酸探針，接著浸入不同濃度之目標 DNA(DJ2)，在 55°C 之條件下反應 1 小時。
6. 取出步驟 5.所製成之工作電極後，以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖去未與電極連接之目標 DNA，之後以鱷魚夾固定在試管內待用。
7. 取 3  $\mu$ l 之 1 mM 道諾霉素溶入 2997  $\mu$ l 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)，配製成 1  $\mu$ M 之道諾霉素溶液，接著將步驟 6.所製成各工作電極完全浸入後，磁石攪拌 15 分鐘。
8. 以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖洗後另取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)為感測溶液，將步驟 7.所製成之各工作電極置入，直至電極完全沒入溶液中。
9. 將步驟 8.之電解槽如圖 4-2 所示完成線路連接。
10. 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 0.2~0.7V，脈衝電位(amplitude)為 0.05V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝週期(pulse period)為 0.2 秒。

#### 4-3-5 DNA 感測器感測錯配序列之靈敏度

1. 秤取 0.0282 g EDC 與 0.0276 g NHS，分別溶入 3 ml 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH=7.0)，配製成 50 mM 的 EDC 溶液，與 80 mM 的 NHS 溶液。

2. 將步驟 1.所配製成之溶液，分別以 0.05 M 之磷酸緩衝液(pH=7.0)稀釋，得到 EDC 濃度為 5 mM，NHS 濃度為 8 mM 之溶液。
3. 取步驟 2. 配製之溶液 3 ml 將前述步驟完成之工作電極(4-ABA/PEDOT/Pt)浸入，在室溫下(25°C)反應 1 小時。
4. 以去離子水配製 100 nM 之核酸探針溶液(DJ1)3 ml，在步驟 3.取出之工作電極浸入核酸探針溶液，在 25°C 條件下反應 12 小時。
5. 待步驟 4.取出各工作電極後，先以 PBS 緩衝液 (pH=7.4) 沖去未與電極連接之核酸探針，接著浸入不同濃度之目標 DNA(DJ3、DJ 4 與 DJ 5)，在 55°C 之條件下反應 1 小時。
6. 取出步驟 5.所製成之工作電極後，以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖去未與電極連接之目標 DNA，之後以鱷魚夾固定在試管內待用。
7. 取 3  $\mu$ l 之 1 mM 道諾霉素溶入 2997  $\mu$ l 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)，配製成 1  $\mu$ M 之道諾霉素溶液，接著將步驟 6.所製成各工作電極完全浸入後，磁石攪拌 15 分鐘。
8. 以 PBS 緩衝液(pH=7.4)沖洗後另取 6 ml 之 PBS 緩衝液(pH=7.4)為感測溶液，將步驟 7.所製成之各工作電極置入，直至電極完全沒入溶液中。
9. 將步驟 8.之電解槽如圖 4-2 所示完成線路連接。
10. 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 0.2~0.7V，脈衝電位(amplitude)為 0.05V，脈衝寬度(pulse width)為 0.06 秒，脈衝週期(pulse period)為 0.2 秒。

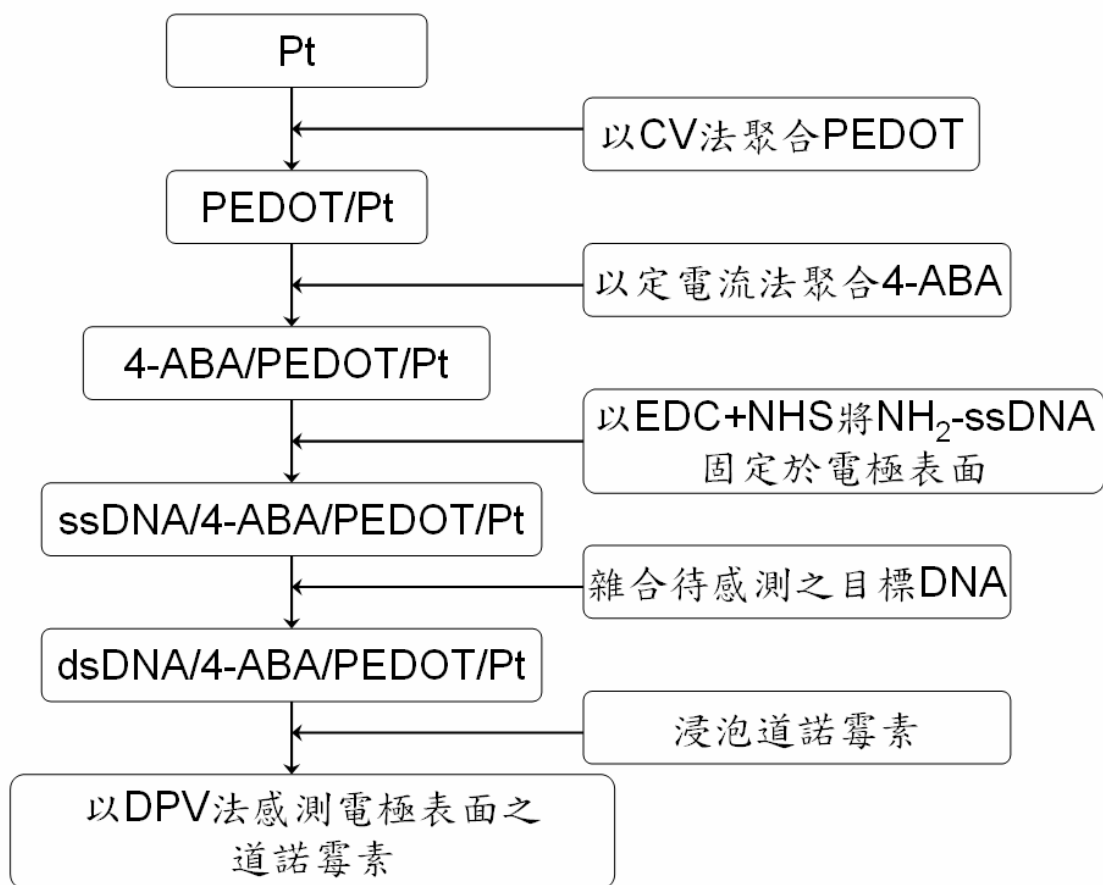


圖 4-3 以白金為工作電極之實驗流程圖

## 4-4 實驗結果與討論

### 4-4-1 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之表面形態

以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察白金絲表面形態如圖 4-4 與圖 4-5 所示，圖 4-6 與圖 4-7 為在白金絲上聚合聚二氧乙烯噻吩(PEDOT/Pt 電極)之表面形態，圖 4-8 與圖 4-9 則為 PEDOT/Pt 電極，再經對胺基苯甲酸修飾後(4-ABA/PEDOT/Pt)之表面形態。從圖 4-4 與圖 4-5 中可以看到白金絲表面呈平滑的形態，而經聚合二氧乙烯噻吩之後其表面變得較為粗糙，有局部隆起(如圖 4-6 與 4-7 所示)，放大後可以更清楚看到隆起部份由大小在數十奈米的顆粒所組成之結構，而 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之表面如圖 4-8 與圖 4-9，可以看到電極表面經對胺基苯甲酸修飾又變得較為平滑，顯示聚對胺基苯甲酸膜的形成，然而放大後可發現表面呈碎片之結構，其結構與圖 3-9 聚合於碳糊電極表面之對胺基苯甲酸相同，同時也發現仍然留有數十奈米的聚二氧乙烯噻吩顆粒，說明以此步驟聚合對胺基苯甲酸為可行之實驗方法，但是否於電極上留有本研究所需之羧酸基則待更進一步的確認。

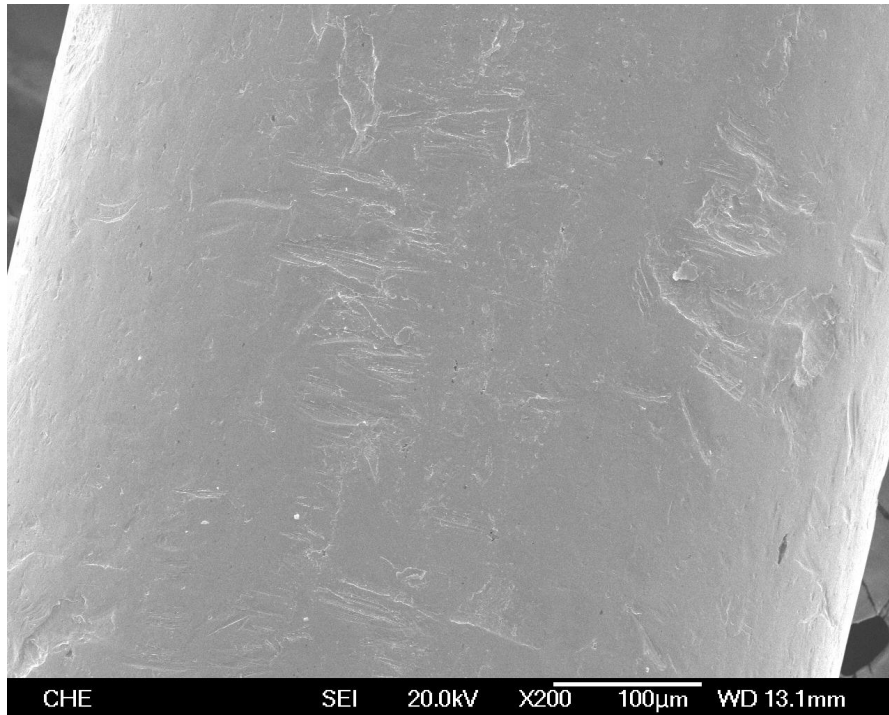


圖 4-4 Pt 電極表面形態 (200 倍 SEM 圖)

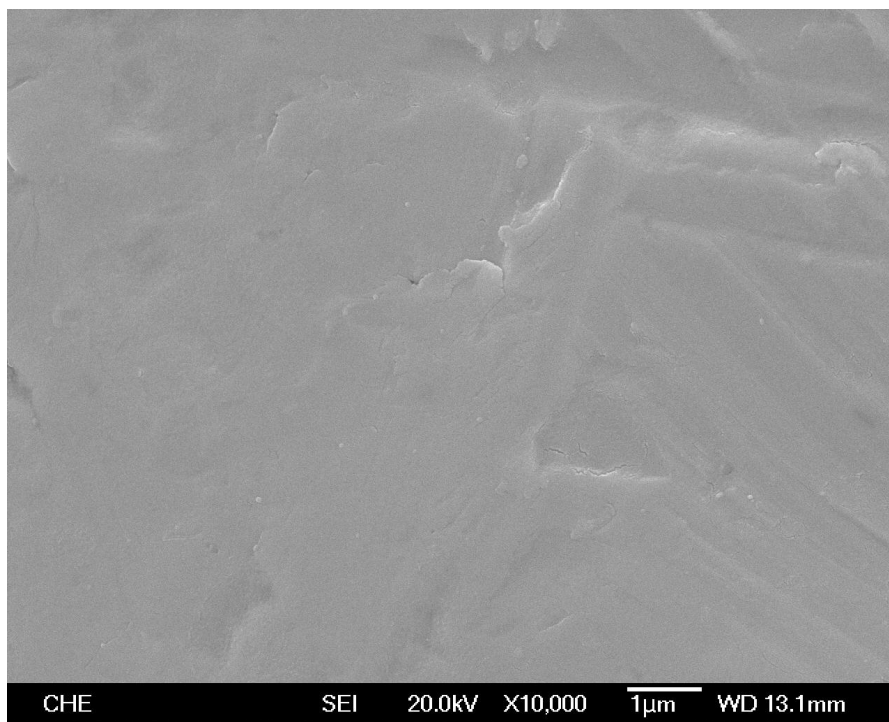


圖 4-5 Pt 電極表面形態 (10000 倍 SEM 圖)

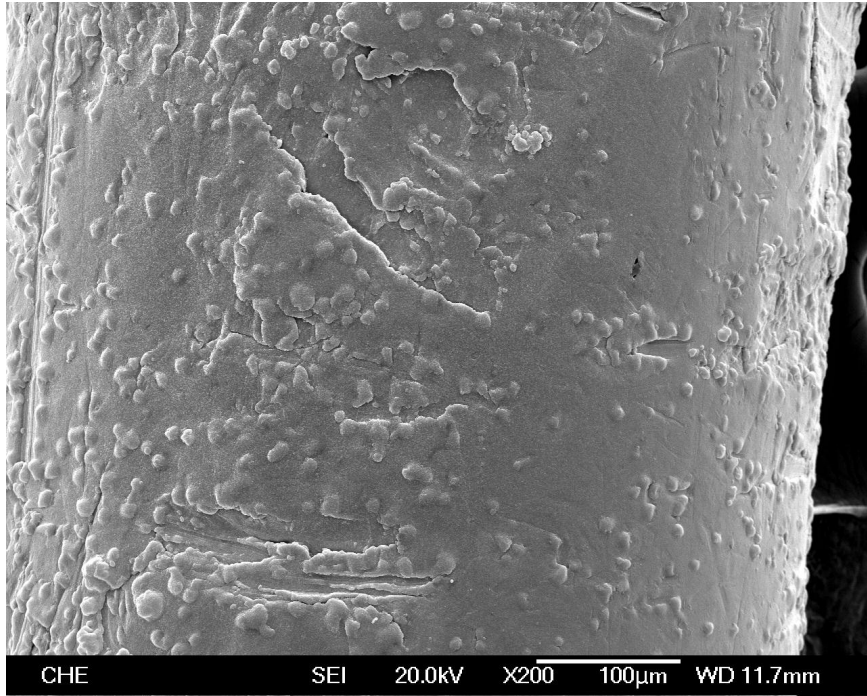


圖 4-6 PEDOT/Pt 電極表面之形態 (200 倍 SEM 圖)

聚合液:[EDOT]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：循環伏安法，掃描範圍：0~1 V，掃描速率：20 mV/s，溫度:25°C

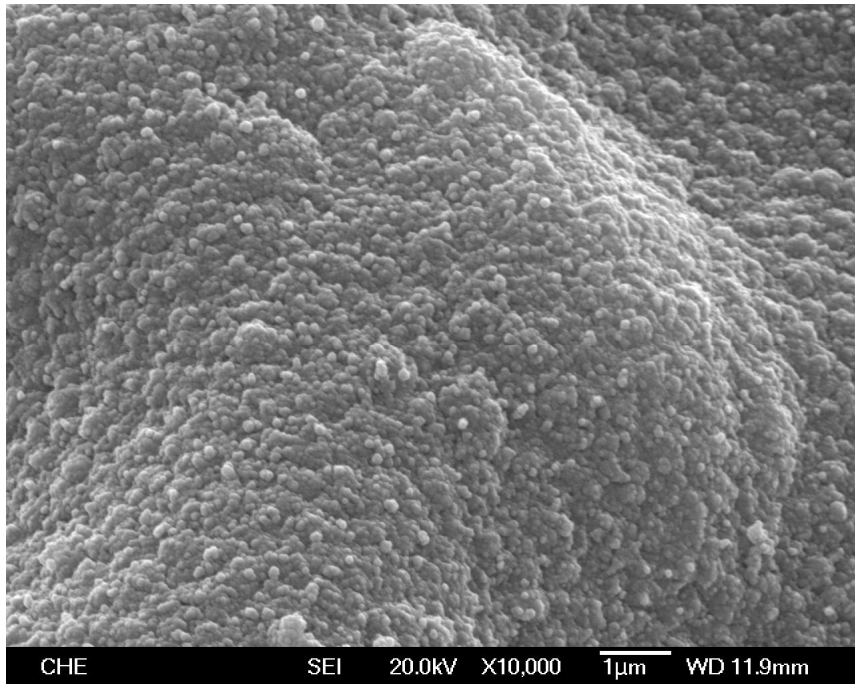


圖 4-7 PEDOT/Pt 電極表面之形態 (10000 倍 SEM 圖)

聚合液:[EDOT]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：循環伏安法，掃描範圍：0~1 V，掃描速率：20 mV/s，溫度:25°C



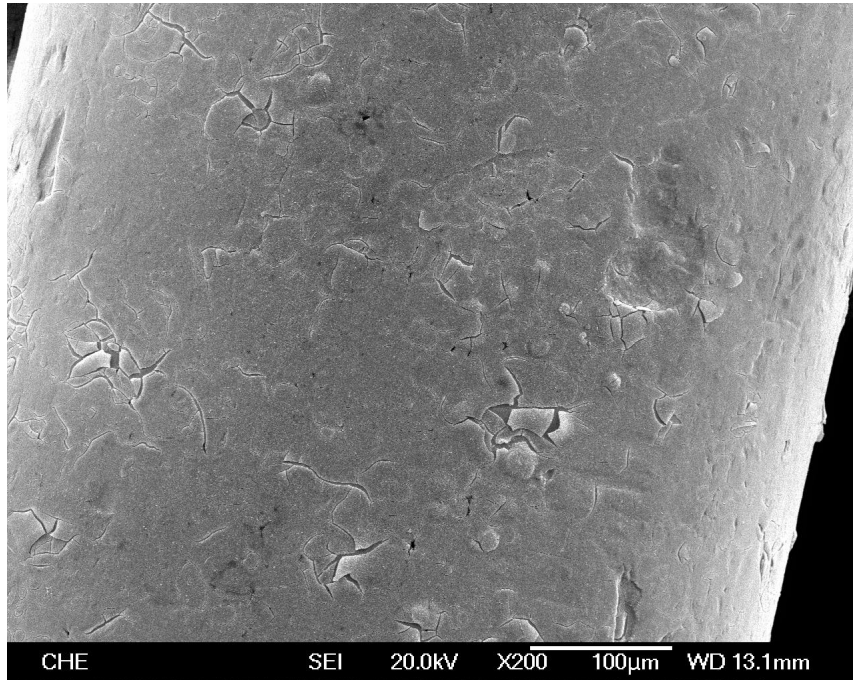


圖 4-8 4-ABA/PEDOT/Pt 電極表面之形態(200 倍 SEM 圖)

聚合液:[4-ABA]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：定電壓，施加電位：1.0 V，掃描時間：4000 秒，溫度:25°C

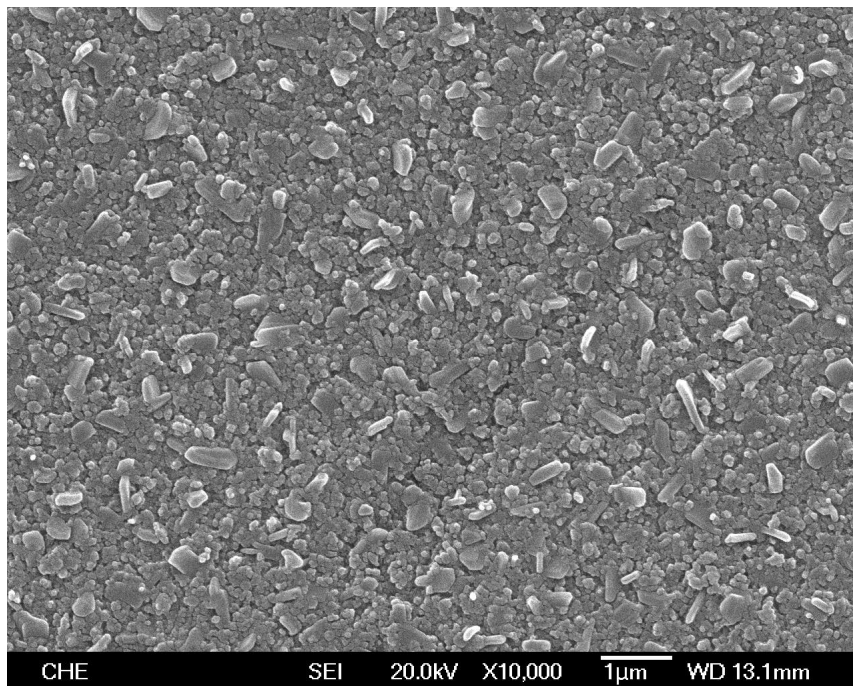


圖 4-9 4-ABA/PEDOT/Pt 電極表面之形態(10000 倍 SEM 圖)

聚合液:[4-ABA]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：定電壓，施加電位：1.0 V，掃描時間：4000 秒，溫度:25°C

#### 4-4-2 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)分析

為了確認 4-ABA/PEDOT/Pt 電極上擁有所需之羧酸基，因此利用紅外線光譜進行分析，圖 4-10 為在白金上聚合二氧乙烯噻吩(PEDOT/Pt 電極)之紅外線光譜分析圖，圖 4-11 為在白金上聚合對胺基苯甲酸(4-ABA/Pt 電極)之紅外線光譜分析圖，圖 4-12 為先在白金上聚合聚二氧乙烯噻吩之後，再聚合對胺基苯甲酸(4-ABA/PEDOT/Pt 電極)之紅外線光譜分析圖。

從圖 4-11 可以看到幾個明顯的波峰，所代表之官能基分別列於表 4-1 中，從表中可得到 C=O 基( $1718\text{ cm}^{-1}$ )、C-O 基( $1094\text{ cm}^{-1}$ )與 O-H 基( $3505\text{ cm}^{-1}$ )，證明成功在白金上聚合了對胺基苯甲酸以進行羧酸基(-COOH)之修飾；從 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之紅外線光譜分析圖(圖 4-12)來看，除了 PEDOT/Pt 原本就存在之特徵峰，同時也存在著上述幾個能代表羧酸基之特徵峰，因此可以證明在白金絲上先鍍上聚二氧乙烯噻吩再修飾對胺基苯甲酸，以產生羧酸基亦是可行的。

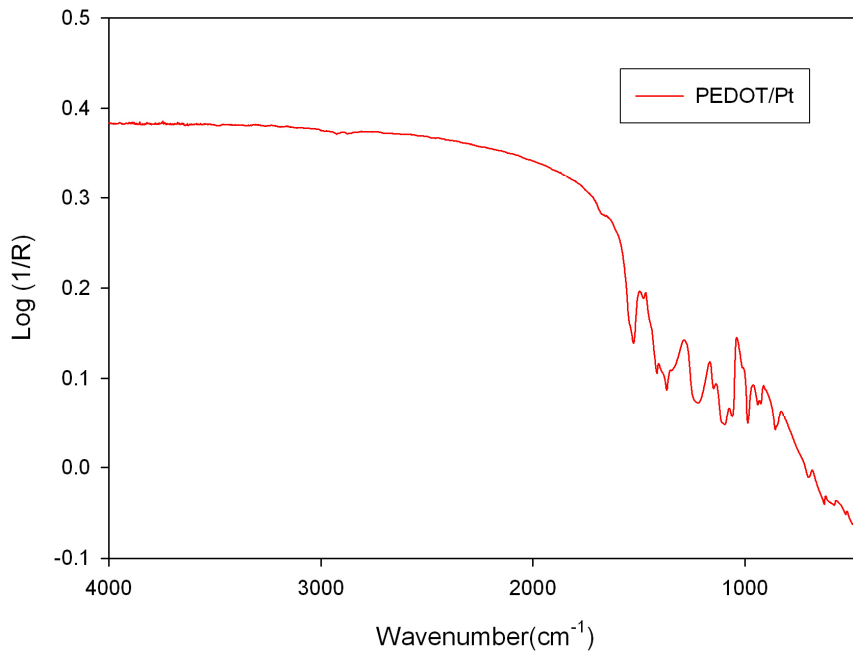


圖 4-10 PEDOT/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖

聚合液:[EDOT]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：循環伏安法，掃描範圍：0~1 V，掃描速率：20 mV/s，溫度:25°C

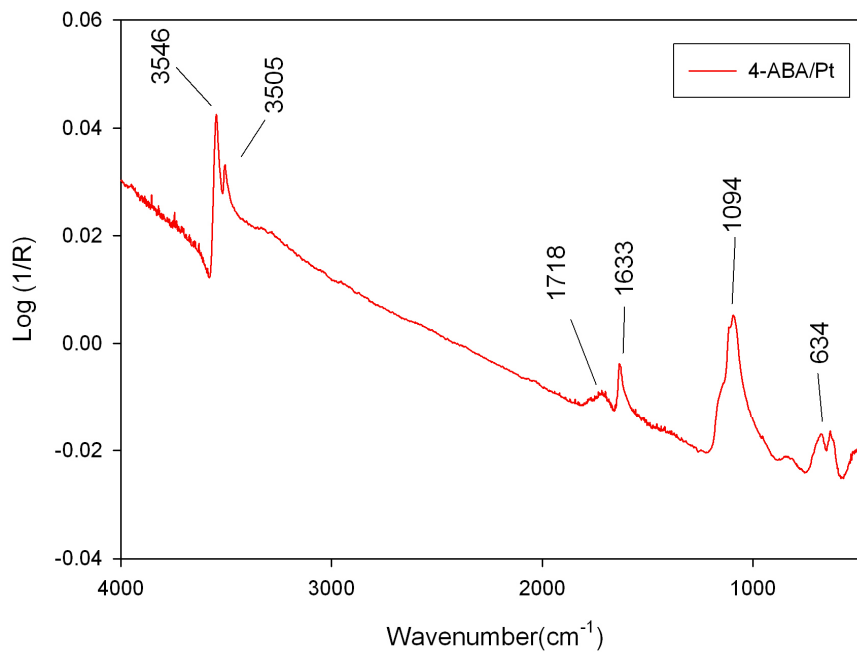


圖 4-11 4-ABA/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖

聚合液:[4-ABA]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：定電壓，施加電位：1.0 V，掃描時間：4000 秒，溫度:25°C

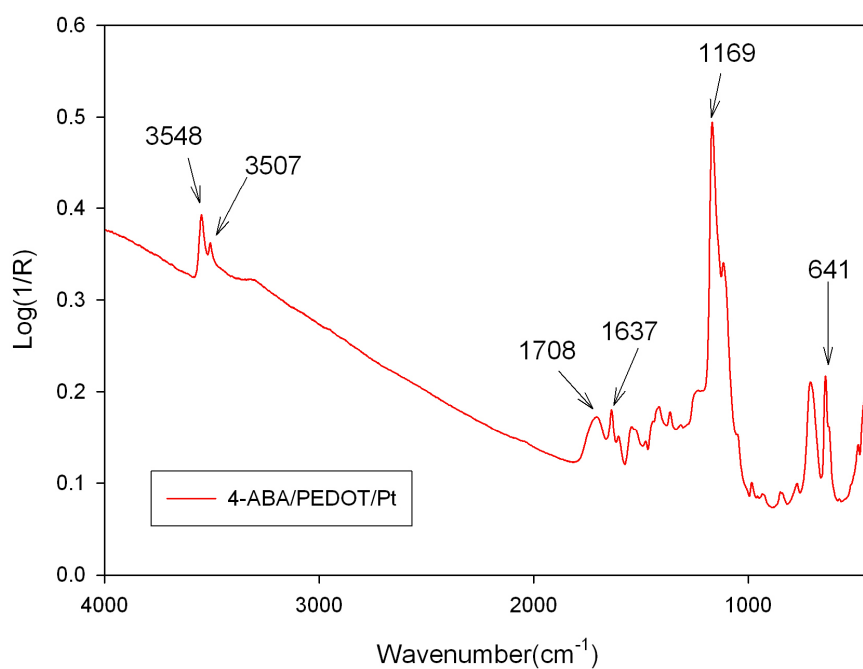


圖 4-12 4-ABA/PEDOT/Pt 電極之紅外線光譜儀訊號圖

聚合液:[4-ABA]=0.01 M, [LiClO<sub>4</sub>]=0.1 M

聚合方法：定電壓，施加電位：1.0 V，掃描時間：4000 秒，溫度:25°C

表 4-1 白金鍍上胺基苯甲酸之紅外線光譜分析波峰與官能基對照表

| 波峰(cm <sup>-1</sup> ) | 官能基  |
|-----------------------|------|
| 641                   | C-O  |
| 851                   | C-H  |
| 1169                  | C-O  |
| 1637                  | C=C  |
| 1708                  | C=O  |
| 3507                  | O-H  |
| 3548                  | -NH- |

#### 4-4-3 4-ABA/PEDOT/Pt 電極修飾前後之電極導電度變化

在確定了白金電極表面可以成功的提供羧酸基之修飾，我們探討了經由聚合二氧乙烯噻吩(PEDOT/Pt)，再聚合對胺基苯甲酸電極的修飾對其感測赤血鹽之影響。從圖 4-13 的循環伏安法(CV)圖中可以看到感測相同之赤血鹽濃度時，PEDOT/Pt 電極感測得到之氧化及還原波峰電流都較使用 4-ABA/PEDOT/Pt 電極感測所得之訊號要來的高，說明聚二氧乙烯噻吩具有較佳的導電度，但經過聚對胺基苯甲酸進一步修飾後，雖能夠提供本研究所需之羧酸基，卻也降低了整個電極之導電度。

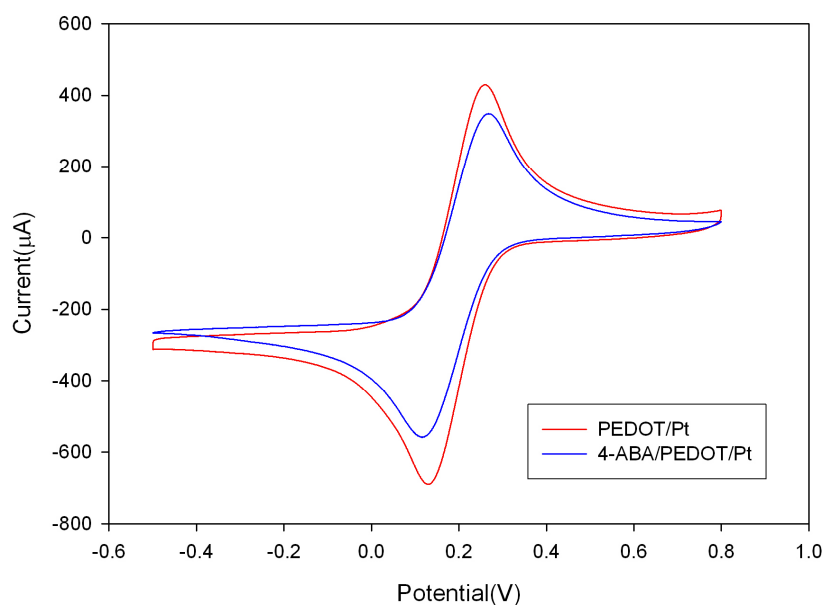


圖 4-13 電極修飾聚合物前後感測赤血鹽之循環伏安圖

工作電極：4-ABA/CPE 與 CPE

掃描範圍：-0.5 V~0.8 V(vs. Ag/AgCl)

掃描速率：20 mV/s

掃描圈數：20 圈

赤血鹽濃度：0.1 M

感測溫度：25°C

#### 4-4-4 DNA 於電極上對感測之影響

為了了解固定在電極上之 DNA 對電極感測訊號之影響，實驗中比較了三種電極(PEDOT/Pt、4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt)以微分脈衝伏安法檢測的感測結果。電極均分別經過 4-3-4 節的步驟 5.到步驟 10.的處理；從圖 4-14 中可以看到 PEDOT/Pt 電極的微分脈衝伏安圖感測電流相當大，也顯示了導電性高分子 PEDOT 良好的導電性，適合作為電極的導電介質，但在 0.35 V 之電壓下並無 DPV 電流波峰之產生。由於 PEDOT/Pt 電極所測得之背景電流太大，不易觀察 4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 兩電極之微分脈衝伏安感測電流訊號，因此將 PEDOT/Pt 之數據去除後畫出圖 4-15。從圖 4-15 中可以看到 4-ABA/PEDOT/Pt 電極在 0.35 V 之電壓下也無明顯之波峰，但 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 電極卻在 0.35 V 之電壓下產生了 10  $\mu$ A 之波峰電流，因此可說明電極上之 DNA 會產生可感測之微分脈衝伏安波峰訊號，也證明了利用本研究方法感測 DNA 的可行性。

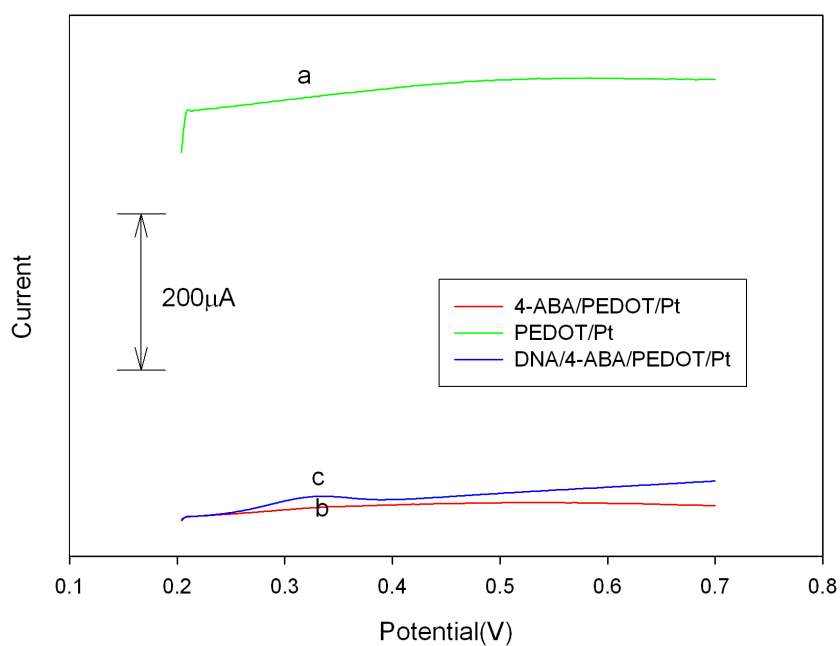


圖 4-14 不同電極(PEDOT/PT、4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt)

以微分脈衝伏安法感測比較圖

工作電極：(a)PEDOT/PT、(b)4-ABA/PEDOT/Pt 與  
(c)DNA/4-ABA/PEDOT/Pt

掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)

脈衝振幅：50 mV

脈衝寬度：0.06 秒

脈衝週期：0.2 秒

感測緩衝液：PBS (pH=7.4)

感測溫度：25°C

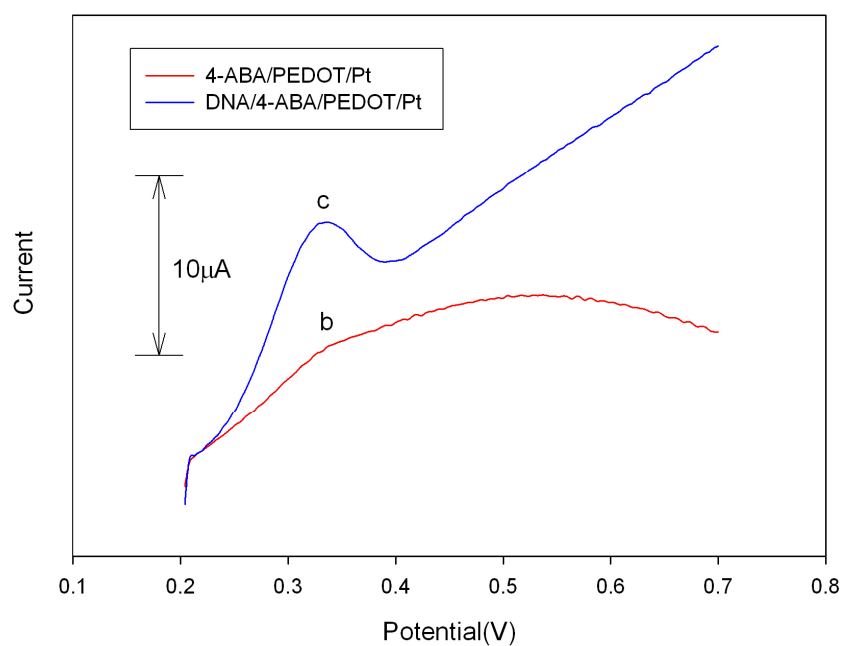


圖 4-15 不同電極(4-ABA/PEDOT/Pt 與 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt) 以微分脈衝伏  
安法感測比較圖

工作電極：(b)4-ABA/PEDOT/Pt 與(c)DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C



#### 4-4-5 感測不同濃度之完全互補目標 DNA 及 DNA 感測器之靈敏度

利用已經製備好之 4-ABA/PEDOT/Pt 電極為工作電極，瞭解不同濃度之目標 DNA 以微分脈衝伏安法感測對感測之影響，此實驗中使用與探針 DNA 完全互補之目標 DNA(DJ2)，其濃度分別為 33.3 nM、66.7 nM、80.0 nM 與 100 nM，各濃度下所得之實驗結果如圖 4-16 所示。從圖中可以看到於 0.35 V 下感測之微分脈衝伏安波峰電流會隨著目標 DNA 的濃度增加而增加。將波峰電流對目標 DNA 的濃度作圖可得圖 4-17，由圖中可知此電極對於完全互補之目標 DNA (DJ2 序列)在其濃度 20.0~100.0 nM 範圍內，0.35 V 感測電壓下的微分脈衝伏安波峰電流值與目標 DNA 的濃度有良好的線性關係。

於本實驗中作為工作電極白金絲直徑為 0.03 cm 且經修飾長度為 0.50 cm，工作電極面積為  $0.047\text{cm}^2$ ，算出使用本工作電極以微分脈衝伏安法感測完全互補序列之目標 DNA 其靈敏度為  $2.6802\ \mu\text{A}\ \text{nM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 。

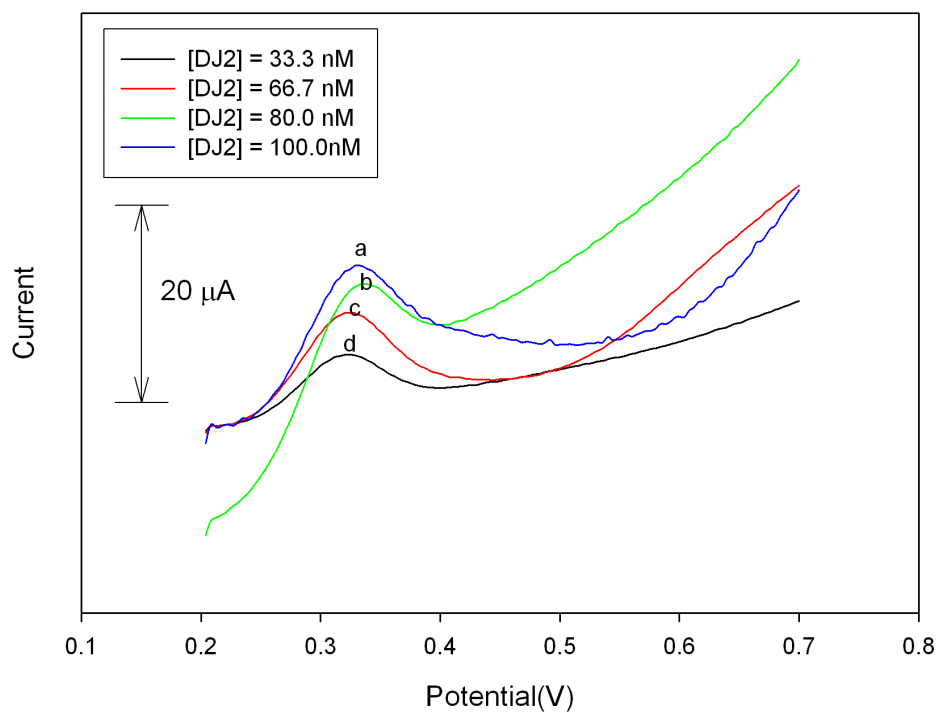


圖 4-16 雜合不同濃度之完全互補目標 DNA 對感測器電化學訊號之微分脈衝伏

安圖

a.[DJ2]=100.0 nM, b.[DJ2]=80.0 nM, c.[DJ2]=66.6 nM, d.[DJ2]=33.3 nM,

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

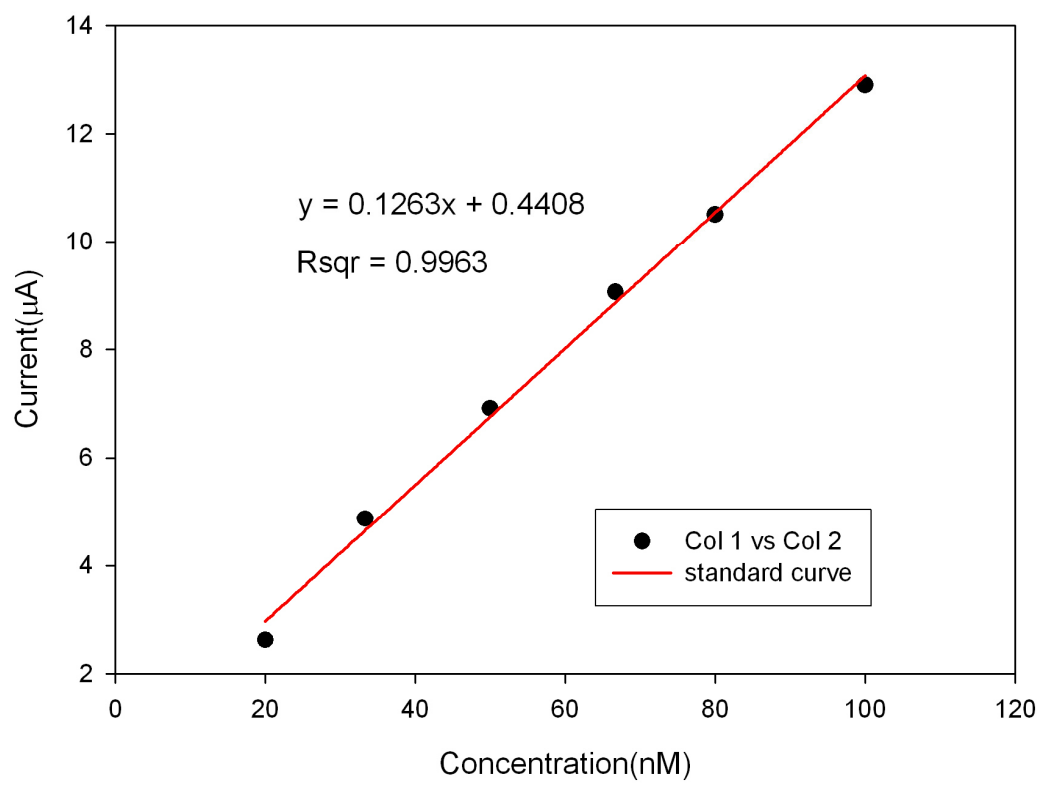


圖 4-17 雜合完全互補目標 DNA 之濃度對波峰電流圖

#### 4-4-6 感測含錯配鹼基之目標 DNA 探針對 DNA 感測器靈敏度之影響

除了能定量感測目標 DNA 之外，期待所製備之 DNA 生物感測器也能應用在判別目標 DNA 是否會含有錯配之鹼基。為此，設計出與探針 DNA 具錯配鹼基之目標 DNA，分別為含 1 個鹼基錯配之 DJ3 序列、含 3 個鹼基錯配之 DJ4 序列與含 5 個鹼基錯配之 DJ5 序列，以探討含錯配鹼基之目標 DNA 對感測的影響。

利用所製備之 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 為工作電極，以 DPV 法感測鑲於 DNA 上之道諾霉素，其所得微分脈衝伏安法圖譜結果如圖 4-18 所示，並將所得之波峰電流高度畫成圖 4-25。由微分脈衝伏安法圖譜可以得知在 0.35 V 電位有一還原波峰訊號，在各目標 DNA 濃度皆相同之情況下，隨著具錯配鹼基之增加，其波峰電流高度由完全互補的 12.9  $\mu\text{A}$  降低至五個鹼基錯配的 3.4  $\mu\text{A}$ ，說明當目標 DNA 上具有與探針 DNA 錯配之鹼基時，其波峰訊號會隨著鹼基錯配數量增加而降低。由於當目標 DNA 具有錯配之鹼基存在時，以氫鍵方式結合形成的雙股 DNA 穩定性降低，以至於在相同雜合溫度與相同目標 DNA 濃度之條件下雜合在電極上之目標 DNA 數量減少，也使得嵌入雙股 DNA 上之道諾霉素數量降低，最後導致其波峰訊號降低。

由於 DNA 之雜合受溫度的影響非常明顯，因此可以利用升高雜合溫度來提高 DNA 生物感測器對目標 DNA 的鑑別度，圖 4-19 與圖 4-20 則分別為在 56  $^{\circ}\text{C}$  與 57  $^{\circ}\text{C}$  之環境下利用所製備之 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 為工作電極，以微分脈

衝伏安法感測鑲於 DNA 上之道諾霉素，其所得之微分脈衝伏安法圖譜。

將各目標 DNA(DJ2、DJ3、DJ4 與 DJ5 等目標 DNA 序列)感測訊號於不同溫度下分別畫成圖 4-21 到圖 4-24，由此可以看到錯配鹼基越多對於含相同濃度的目標 DNA，提高雜合的溫度均使得以微分脈衝伏安法感測得到之波峰訊號下降。

將各感測條件下所得到之波峰電流高度整理得到圖 4-25。由圖中可得知在各目標 DNA 濃度皆相同之情況下，隨著雜合溫度的提高，感測完全互補之目標 DNA 所得之還原波峰訊號由 55°C 的 12.9  $\mu\text{A}$  明顯下降至 56°C 的 9.5  $\mu\text{A}$ ，而當溫度進一步提昇至 57°C，其波峰電流則稍微下降至 9.1  $\mu\text{A}$ 。但在感測具有 5 個鹼基錯配之目標 DNA 時其所得之波峰訊號則由 55°C 的 3.4  $\mu\text{A}$  大幅的下降至 56°C 的 1.8  $\mu\text{A}$ ，最後明顯的下降至 57°C 的 0.9  $\mu\text{A}$ ，由此實驗可以看到當目標 DNA 含有與探針 DNA 錯配的鹼基時，其波峰電流則受雜合溫度的影響更加顯著，故可以利用提高雜合溫度來提高 DNA 生物感測器對鹼基錯配之目標 DNA 的鑑別度，實驗結果說明本實驗中所製成之 DNA 生物感測器在 57 °C 之環境下進行雜合，可以達到較佳之感測鑑別度。

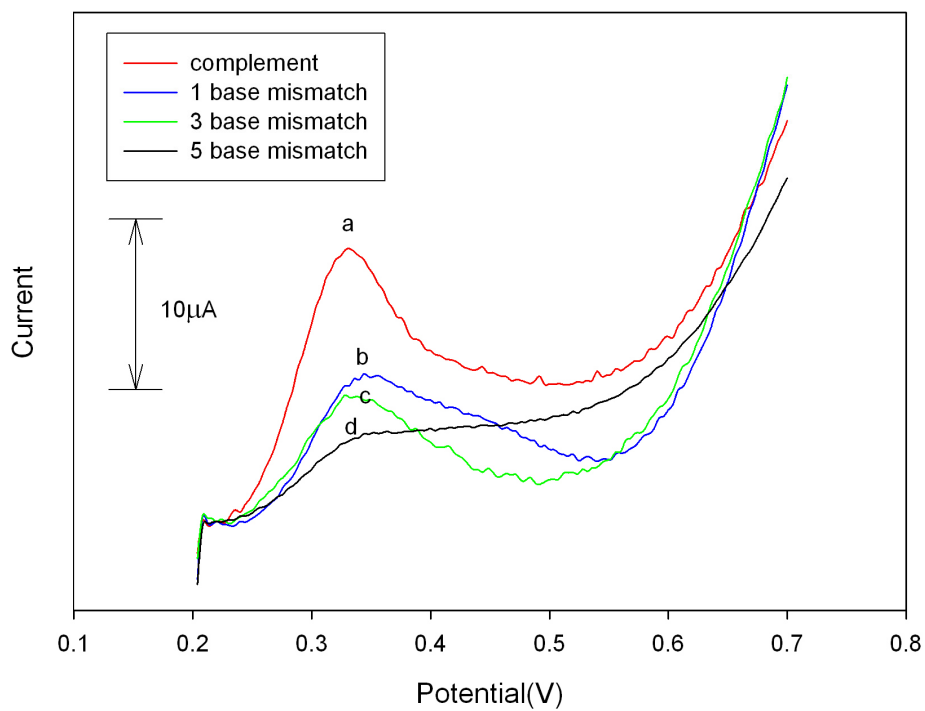


圖 4-18 雜合溫度 55°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖

a. [DJ2]=100nM, b. [DJ3]=100nM, c. [DJ4]=100nM, d. [DJ5]=100nM

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

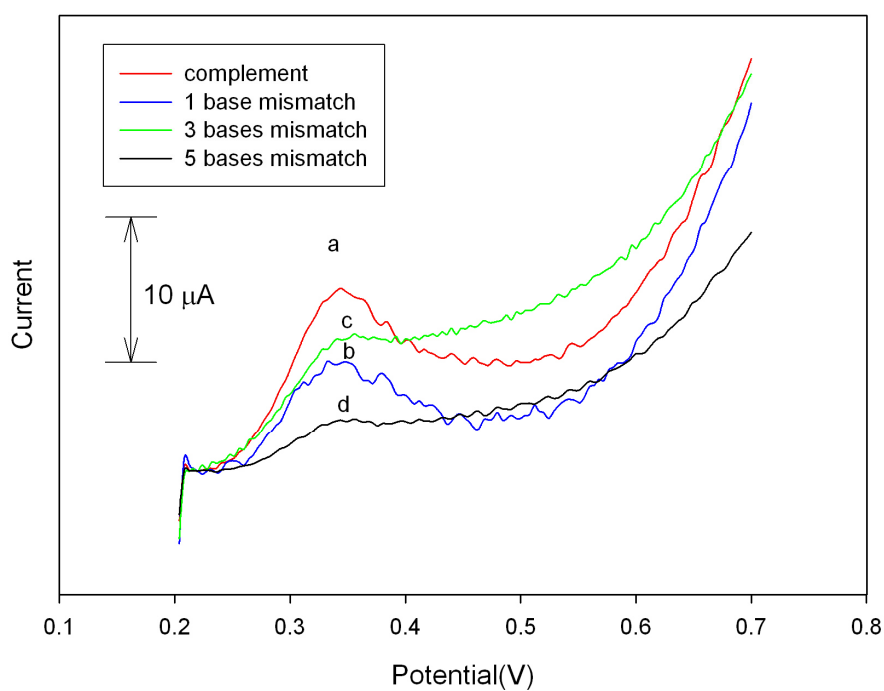


圖 4-19 雜合溫度 56°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖

a. [DJ2]=100nM, b. [DJ3]=100nM, c. [DJ4]=100nM, d. [DJ5]=100nM

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

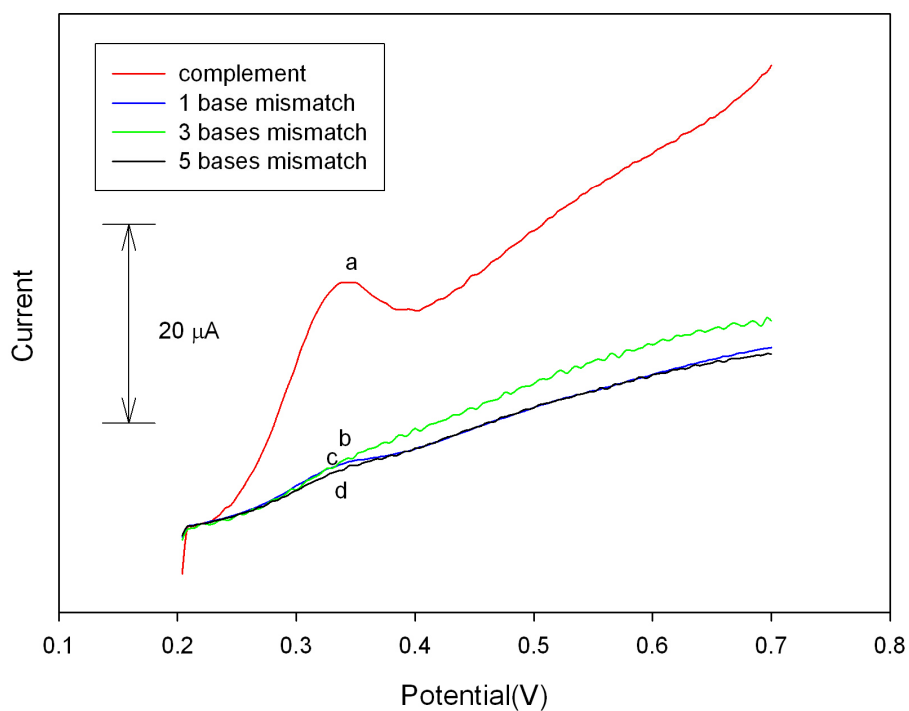


圖 4-20 雜合溫度 57°C 感測同濃度含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖

a. [DJ2]=100nM, b. [DJ3]=100nM, c. [DJ4]=100nM, d. [DJ5]=100nM

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C



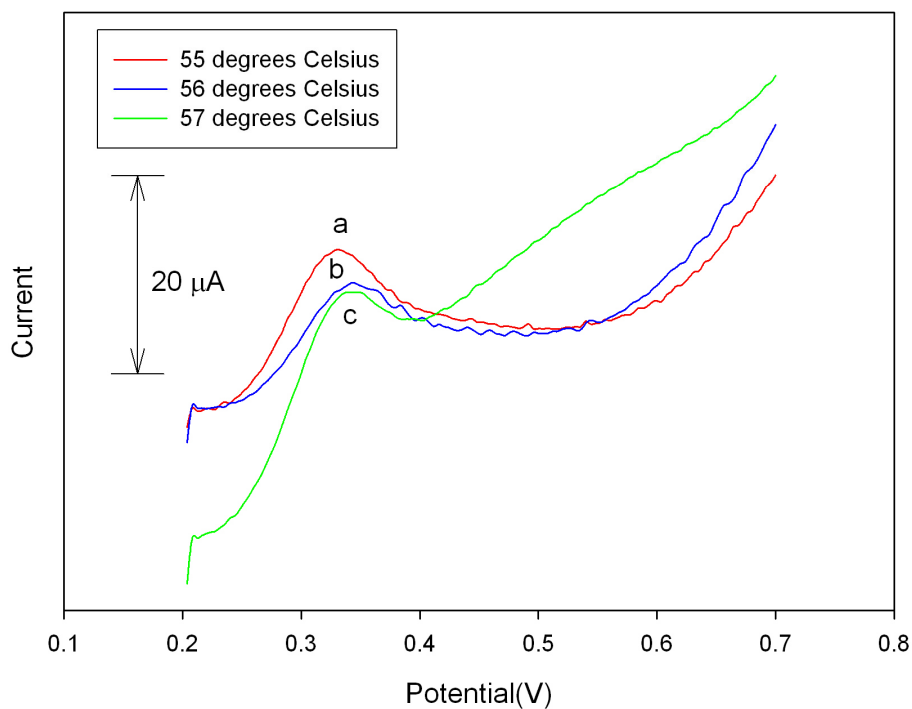


圖 4-21 於不同雜合溫度下感測 DJ2 序列之微分脈衝伏安圖

a.55°C, b. 56°C, c. 57°C

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

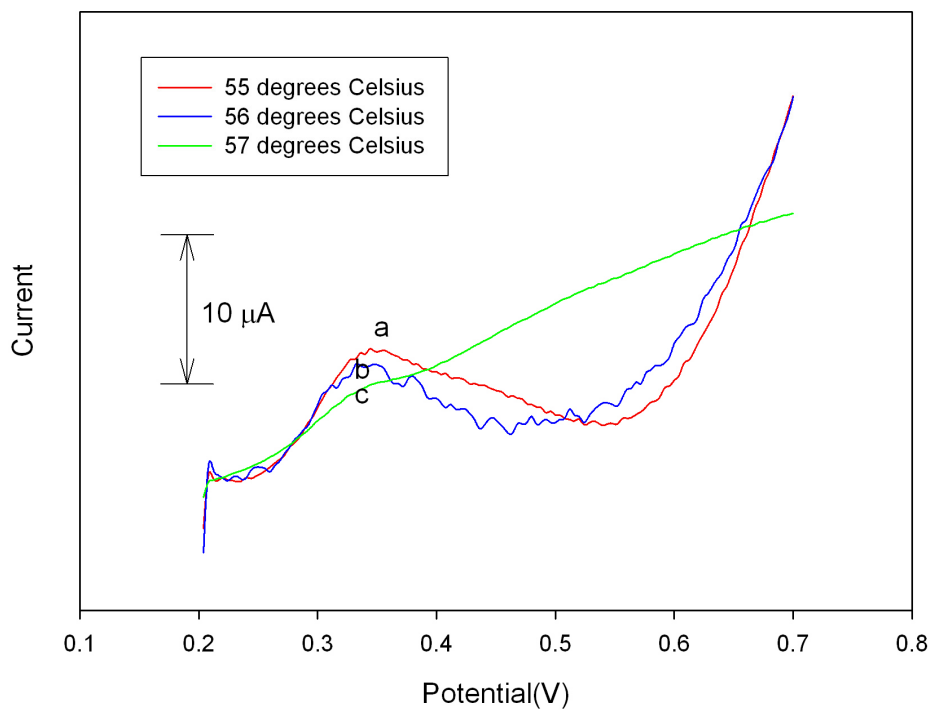


圖 4-22 於不同雜合溫度下感測 DJ3 序列之微分脈衝伏安圖

a.55°C, b. 56°C, c. 57°C

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

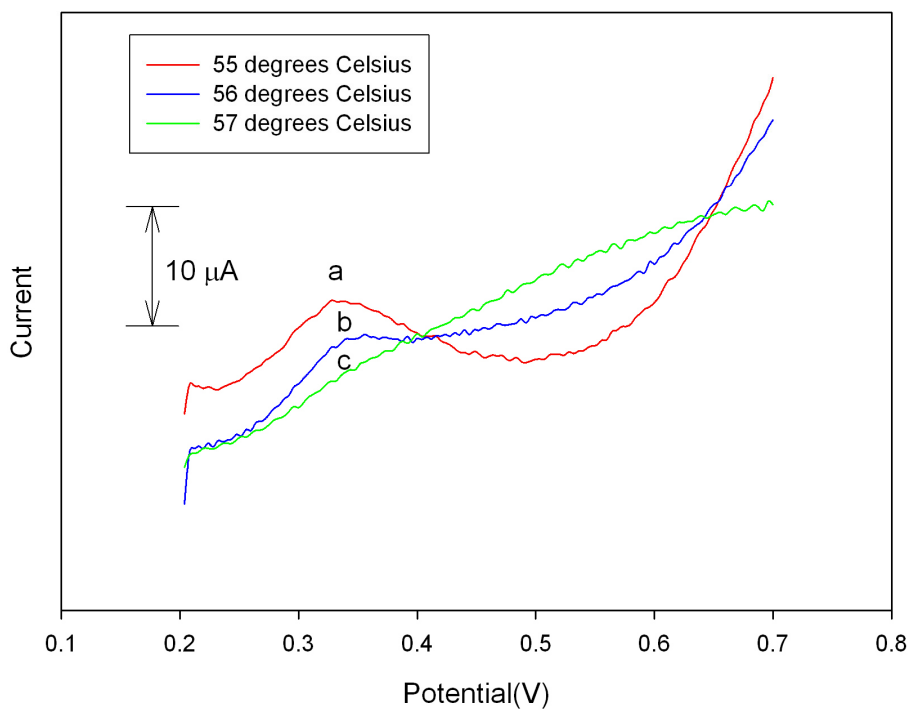


圖 4-23 於不同雜合溫度下感測 DJ4 序列之微分脈衝伏安圖

a. 55°C, b. 56°C, c. 57°C

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

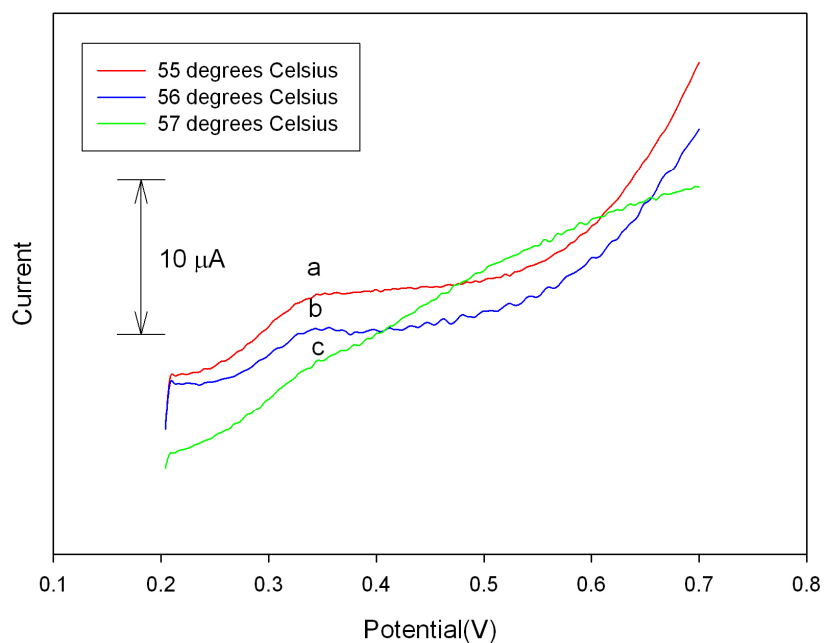


圖 4-24 於不同雜合溫度下感測 DJ5 序列之微分脈衝伏安圖

a.55°C, b. 56°C, c. 57°C

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 脈衝振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

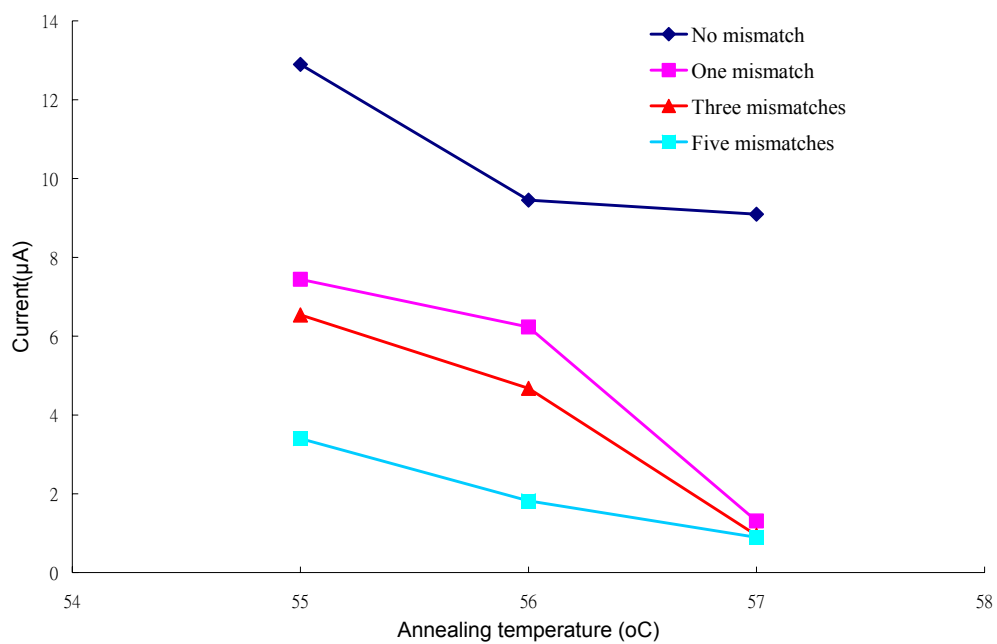


圖 4-25 各目標 DNA(DJ2、DJ3、DJ4 與 DJ5)於不同溫度下對所得波峰電流高度之影響圖

#### 4-4-7 感測不同比例之完全互補與含錯配之 DNA

在利用本實驗所製成之 DNA 生物感測器應用於臨床感測時，會碰到幾個問題，其中一個問題就是在待感測的樣品中，可能會同時存在著與探針 DNA 完全互補與具錯配鹼基之序列，因此考慮在待測樣品中同時加入不同比例之完全互補與具有錯配鹼基的目標 DNA，來探討實際應用時可能遇到的情況。此實驗分成兩個部份，第一部份為固定總目標 DNA 的濃度皆為 100 nM 時，選擇完全互補之目標 DNA(DJ2)與具 1 鹼基錯配之目標 DNA(DJ3)，配製比例分別為 100:0、60:40、40:60 與 20:80 之待測溶液，第二部份則是固定完全互補之目標 DNA(DJ2)濃度皆為 100 nM 接著添加不同比例之具 1 鹼基錯配之目標目標 DNA(DJ3)，配製比例分別為 100:0、100:6.67、100:20 與 100:26.67 之待測溶液，來實際模擬感測時可能會遇到之情況。

利用所製備之 DNA/4-ABA/PEDOT/Pt 為工作電極，以 DPV 法感測鑲於 DNA 上之道諾霉素，其所得微分脈衝伏安法圖譜結果如圖 4-26 與 4-27 所示。在感測各比例之樣品時，在相同的總目標 DNA 濃度情況下，隨著具錯配鹼基之目標 DNA 比例的增加，其還原波峰電流高度由 12.9  $\mu\text{A}$  降低至 1.5  $\mu\text{A}$ ；而在固定完全互補目標 DNA(DJ2)濃度的情況下，隨著添加 DJ3 的濃度越高，其還原波峰電流高度由 12.9  $\mu\text{A}$  降低至 2.6  $\mu\text{A}$ 。因此，實驗證明具錯配鹼基之目標 DNA 會與完全互補之目標 DNA 競爭電極上之 DNA 探針，而產生雜合，但具錯配鹼基的目標 DNA 與 DNA 探針的雜合穩定性差，在感測的過程中使得穩定雜合在電極上的目

標 DNA 數量減少，同時道諾霉素嵌入在錯配雜合之 DNA 上的數量也比鑲在完全配對之 DNA 上的數量少，因此，錯配鹼基之目標 DNA 的比例增加，導致感測得到之波峰訊號降低。

而在實際應用時，我們可以先使用本實驗所製成之 DNA 生物感測器檢測與 DNA 探針序列完全互補的目標 DNA，然後再感測相同 DNA 濃度的未知樣品，可藉由波峰訊號的減弱得知樣品中是否含有具錯配之序列，因此本實驗所製成之 DNA 生物感測器亦可用於感測樣品中同時含有完全互補與具錯配鹼基之目標 DNA，已達到基因篩選之目的。

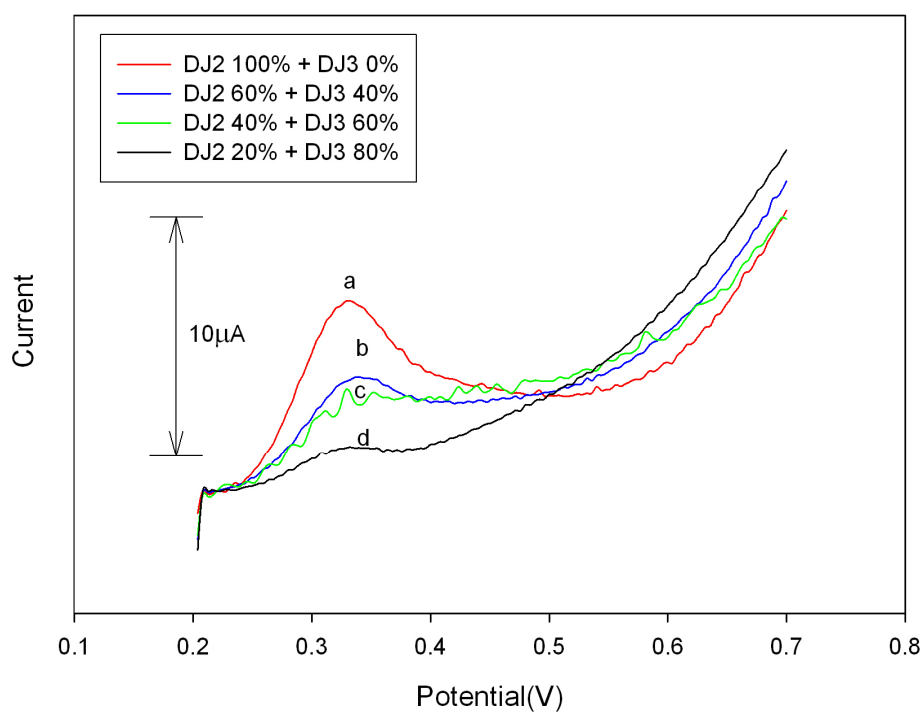


圖 4-26 感測不同比例之完全互補與含錯配鹼基目標 DNA 之微分脈衝伏安圖

DJ2:DJ3= 100:0(a)、60:40(b)、40:60(c)與 20:80(d)

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C



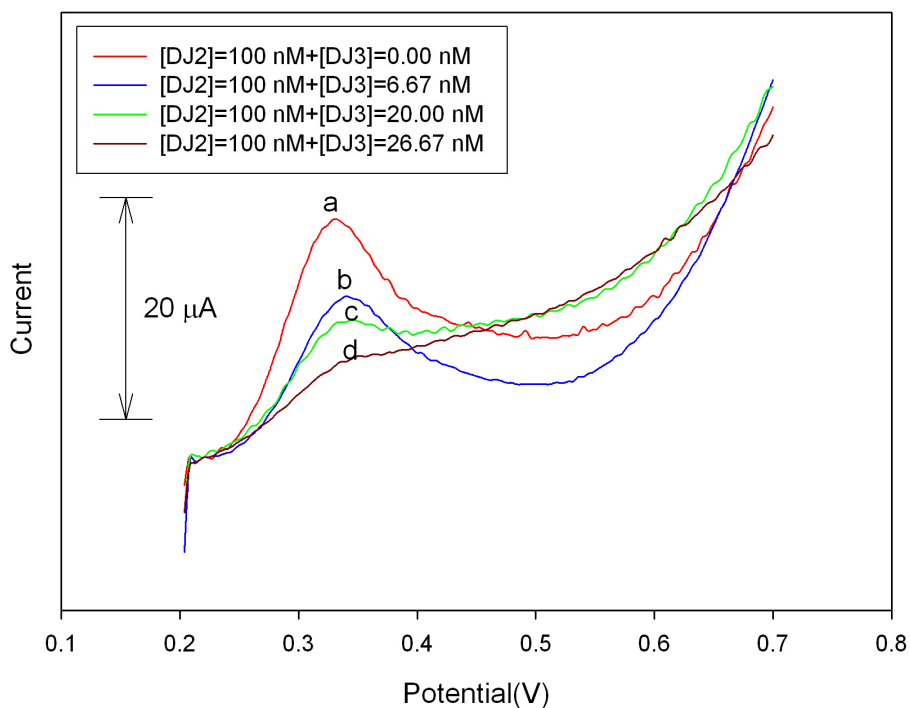


圖 4-27 感測固定完全互補目標 DNA 濃度添加含錯配鹼基目標 DNA 比例之微分脈衝伏安法圖

DJ2:DJ3= 100:0(a)、100:6.67(b)、100:20(c)與 100:26.67(d)

工作電極：DNA/4-ABA/PEDOT/Pt  
 掃描範圍：0.2 V~0.7 V(vs. Ag/AgCl)  
 振幅：50 mV  
 脈衝寬度：0.06 秒  
 脈衝週期：0.2 秒  
 感測緩衝液：PBS (pH=7.4)  
 感測溫度：25°C

#### 4-5 綜合討論

本研究所製成之 DNA 生物感測器用來感測具錯配鹼基之目標 DNA 時，可以得到鹼基錯配數量越多則波峰電流越小的關係，說明當錯配鹼基越多時 DNA 兩股序列之間的穩定度變小，因此容易脫落而導致道諾霉素無法嵌入，最後導致電化學訊號的下降；此外亦可利用此特性，提高雜合溫度來增加 DNA 生物感測器之鑑別度。檢測 DNA 樣品中，若同時含有互補以及含錯配鹼基之目標 DNA 序列時，也會造成電流訊號的下降，說明兩序列於雜合作用時會有競爭的效果，最後導致雜合上去的互補序列數量減少，而導致道諾霉素無法嵌入，但同時也可利用此特點來判斷檢測樣品中是否含有錯配鹼基的依據。

相較 Teh 等學者以玻璃碳電極聚合 4-ABA 製成之 DNA 生物感測器，以亞甲基藍為電化學指示劑，其感測之極限為 0.5 ng/ $\mu$ l(Teh, et. al., 2005)，相較本研究所製成之 DNA 生物感測器感測極限為 20 nM，依 DJ2(分子量 5812)換算後為 0.116 ng/ $\mu$ l，可感測之極限值較文獻低；此外，較少文獻討論感測含錯配鹼基之目標 DNA，或是提高溫度討論 DNA 生物感測器之鑑別度，甚至是檢測樣品中同時含有互補及錯配鹼基之目標 DNA，因此本研究實驗的結果為 DNA 生物感測器之應用開啟了一個新的領域。

## 第五章 實驗結論與建議

本研究目的是以電化學方法來定性定量檢測 DNA，為此建立了 4-ABA/CPE、MWNT/CPE 與 4-ABA/PEDOT/Pt 三種電極。在確認了實驗方法可行之後，又針對不同條件進行了分析。綜合第三章與第四章之結果，於 5-1 節中歸納出以下結果，並就待改進或需進一步探討之處，於 5-2 節中歸納出幾點建議。

### 5-1 實驗結論

1. 於直徑 3 mm 之碳糊電極表面修飾官能基時，使用循環伏安法聚合對胺基苯甲酸，感測之波峰電流高度會隨著聚合圈數增加與對氨基苯甲酸濃度增加而下降。實驗顯示，聚合圈數為 20 圈，且對氨基苯甲酸聚合濃度為 3 mM 時可得到最佳之感測效果。
2. 於碳糊電極上分別修飾 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針感測 1.75  $\mu\text{M}$  之目標探針所得之波峰訊號分別為 0.32  $\mu\text{A}$  與 0.34  $\mu\text{A}$ ，說明於碳糊電極表面修飾 1.75  $\mu\text{M}$  之核酸探針已經接近修飾飽和，修飾濃度再提高亦不會增加碳糊電極表面核酸探針的量；而當於電極上修飾 1.75  $\mu\text{M}$  之 DNA 探針感測 1.75  $\mu\text{M}$  與 3.50  $\mu\text{M}$  之目標探針得到之波峰訊號分別為 0.32  $\mu\text{A}$  與 0.66  $\mu\text{A}$ ，峰值訊號隨目標 DNA 濃度增加而增加，且與感測目標探針濃度成正比。

3. 於 50°C 之條件下酸處理奈米碳管時，可將原本長度數十微米長之奈米碳管切成數百奈米之長度，其切斷效果比於 25°C 下酸處理之效果更佳，但酸處理溫度過高會導致碳管加速溶解最後導致回收率的下降。
4. 將經酸處理之奈米碳管經 FTIR 檢測後，確定碳管經酸處理後呈現 C=O 基 (1754  $\text{cm}^{-1}$ )、C-O 基 (1262  $\text{cm}^{-1}$ ) 與 O-H 基 (3225  $\text{cm}^{-1}$ ) 等代表羧基的特徵峰，顯示修飾成功，可供本實驗所用。
5. 使用經酸處理之奈米碳管作為 DNA 生物感測器之材料時，所製成之碳糊電極具有高靈敏度，檢測所得之波峰高度可以達 200  $\mu\text{A}$ 。
6. 為了解決對胺基苯甲酸導電度低的問題，因此在白金絲上先鍍聚二氧乙烯噻吩後，再修飾對胺基苯甲酸，經 FTIR 檢測確定電極上有 C=O 基 (1692  $\text{cm}^{-1}$ )、C-O 基 (1085  $\text{cm}^{-1}$ ) 與 O-H 基 (3513  $\text{cm}^{-1}$ ) 等代表羧基的特徵峰，顯示羧基之存在。
7. 利用製備好之 4-ABA/PEDOT/Pt 電極，檢測完全互補之目標 DNA(DJ2) 時，在濃度範圍從 20.0 到 100.0 nM 時，於 0.35 V 下所產生之波峰電流與目標 DNA 濃度有良好之線性關係，其靈敏度為 2.6802  $\mu\text{A nM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 。
8. 感測完全互補之 DJ2 序列，當溫度從 55°C 提高至 57°C 時，波峰電流高度由 12.9  $\mu\text{A}$  降至 9.1  $\mu\text{A}$ ，下降比例為 29%，反觀於相同檢測條件下感測 DJ3、DJ4 與 DJ5 的時候，下降比例分別為 82%、85% 與 74%，說明提高雜合溫

度可使本研究所製成之 DNA 生物感測器增加感測之特異性。

9. 於目標 DNA 總濃度相同之情況下 DJ2 與 DJ3(具一鹼基錯配之目標 DNA) 之比例由 100:0 變成 20:80，其檢測得到之波峰電流高度由 12.9  $\mu\text{A}$  降低至 1.5  $\mu\text{A}$ ；固定 DJ2 濃度而將 DJ3 濃度從 0 nM 提高至 26.67 nM，其還原波峰電流高度由 12.9  $\mu\text{A}$  降低至 2.6  $\mu\text{A}$ ，說明在完全互補之目標 DNA 中摻雜中具錯配鹼基之目標 DNA 會導致檢測之波峰電流的下降，因此可藉此感測結果應用於檢測真實樣品是否含有錯配之 DNA 存在。

## 5-2 建議

1. 多層奈米碳管經酸處理後於表面生成了羧酸基，可以應用於本研究作為製作電極之材料，但與石蠟油按 2:1(w/w)混合時，碳管呈現乾燥之狀態，製成之碳糊電極在應用於感測樣品時相當容易剝落，建議可以尋找一個較佳之應用方式將碳管固定在電極上，如將碳管溶於水中與導電性高分子共聚合，並探討其感測特性。
2. 碳糊電極感測 DNA 時產生較為明顯的波峰但其波峰電流卻皆小於 2  $\mu\text{A}$ ，推測與其導電度較低有關，可以使用其他如玻璃碳電極等，導電度較高之電極材料製作電極，並探討其感測特性。
3. 本研究中所使用之引子皆為 19 mer 鹼基，討論了其濃度以及具錯配鹼基對感測所造成之影響，由於實際目標 DNA 長度不一，因此可以探討目標 DNA

長度對於本研究製成之 DNA 生物感測器之影響。

4. 目前本研究中於電極上固定之 DNA 探針濃度為 100 nM，感測目標 DNA 濃度範圍介於 20 nm 至 100 nm，為了能夠增加可應用之範圍，較廣的感測濃度範圍與其感測條件有待進一步探討。
5. 由於電極上是以共價鍵方式固定 DNA 探針，而目標 DNA 是以氫鍵與 DNA 探針結合，因此可探討提高溫度(90~95°C)、加鹼或者是加入化學藥品使之解離後，再次應用並討論感測之效果。
6. 利用聚合酵素鏈鎖反應(PCR)來大量生產已知致病基因之目標 DNA(如大腸直腸癌等)序列，並使用本實驗製成之 DNA 生物感測器來做檢測。

## 參考文獻

林彥文，吳宗明博士。聚苯胺/奈米碳管導電複合材料之製備與電性研究。國立中興大學材料工程學研究所 碩士論文 (2004)

魏向辰，楊思明博士。導電高分子與多層奈米碳管複合材料之研究。國立中央大學化學工程與材料工程研究所 碩士論文 (2007)

Barthwal, R., Sharma, U., Snivastava, N., Jain, M., Awasthi, P., Kaur, M., Barthwal, S. K. and Govil, G., "Structure of daunomycin complexed to d-tgatca by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy", *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 27 (2006).

Budavari, S., *The merck index : An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, Merck, Whitehouse Station, NJ (1996).

Byfield, M. P. and Abuknesha, R. A., "Biochemical aspects of biosensors", *Biosensors & Bioelectronics* **9**, 373 (1994).

Changhou, Z., Xingyan, S., Shenghui, L., Chun, X., Yuzhi, F. "Study of the Interaction of DNA with Anticancer - drug DRN." *Department of Mathematics , East China Normal University , Shanghai*, Thesis, (1999).

Elicia L.S. Wong, Mearns, F. J. and Gooding, J. J., "Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer", *Sensors and Actuators B: Chemical* **111-112**, 7 (2005).

Fang H. Q., Hou S. F., Chen H. Y., "Investigation on the Electrochemical Polymerization and Electrochemical Behavior of 3,4-Ethylenedioxy-thiophene in Aqueous Solution", *Department of Chemistry, Nanjing University, Najing*, Thesis, (1995)

Groenendaal, B. L., Jonas, F., Freitag, D., Pielartzik, H. and Reynolds, J. R., "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: Past, present, and future", *Advanced Materials* **12**, 481 (2000).

- Groenendaal, L., Zotti, G., Aubert, P. H., Waybright, S. M. and Reynolds, J. R., "Electrochemistry of poly(3,4-alkylenedioxythiophene) derivatives", *Advanced Materials* **15**, 855 (2003).
- Hashimoto, K., Ito, K. and Ishimori, Y., "Novel DNA sensor for electrochemical gene detection ", *Analytica Chimica Acta* **286**, 6 (1994).
- Hiura, H., Ebbesen, T. W. and Tanigaki, K., "Opening and purification of carbon nanotubes in high yields", *Advanced Materials* **7**, 275 (1995).
- Iijima, S., "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature* **354**, 56 (1991).
- Jiang L. L., Hu J. H., Chen F., C. P., He Z. K., "Interaction Between Daunomycin and Deoxyribonucleic Acid Using Ru(phen)<sub>2</sub>dppx<sup>2+</sup> as Spectroscopic Probe", *Department of Chemistry, Hubei Key Laboratory of Bioinorganic Chemistry & Materia Medica, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan*, Thesis, (2007)
- Jonas, F. and Schrader, L., "Conductive modifications of polymers with polypyrroles and polythiophenes", *Synthetic Metals* **41**, 831 (1991).
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z. and Ozsoz, M., "Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA", *Electrochemistry Communications* **4**, 705 (2002).
- Kuznetsova, A., Popova, I., Yates, J. T., Bronikowski, M. J., Huffman, C. B., Liu, J., Smalley, R. E., Hwu, H. H. and Chen, J. G. G., "Oxygen-containing functional groups on single-wall carbon nanotubes: Nexafs and vibrational spectroscopic studies", *Journal of the American Chemical Society* **123**, 10699 (2001).
- Lago, R. M., Tsang, S. C., Lu, K. L., Chen, Y. K. and Green, M. L. H., "Filling carbon nanotubes with small palladium metal crystallites - the effect of surface acid groups", *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1355 (1995).



- Lin, X. H., Wu, P., Chen, W., Zhang, Y. F. and Xia, X. H., "Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia by using methylene blue", *Talanta* **72**, 468 (2007).
- Malatesta, V., Penco, S., Sacchi, N., Valentini, L. and Vigevani, A., "Electrochemical deglycosidation of anthracyclines: Stereoelectronic requirements", *Can. J. Chem.* **62**, 2845 (1984).
- Millan, K. M. and Mikkelsen, S. R., "Sequence-selective biosensor for DNA-based on electroactive hybridization indicators", *Analytical Chemistry* **65**, 2317 (1993).
- Millan, K. M., Saraullo, A. and Mikkelsen, S. R., "Voltammetric DNA biosensor for cystic-fibrosis based on a modified carbon-paste electrode", *Analytical Chemistry* **66**, 2943 (1994).
- Millan, K. M., Spurmanis, A. J. and Mikkelsen, S. R., "Covalent immobilization of DNA onto glassy-carbon electrodes", *Electroanalysis* **4**, 929 (1992).
- Pang, D. W. and Abruna, H. D., "Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules", *Anal Chem* **70**, 3162 (1998).
- Qi, H., Li, X. X., Chen, P. and Zhang, C. X., "Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode", *Talanta* **72**, 1030 (2007).
- Sehgal, D. and Vijay, I. K., "A method for the high-efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation", *Analytical Biochemistry* **218**, 87 (1994).
- Shenghui Liu, Jiannong Ye, Pingang He and Fang, Y., "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode ", *Analytica Chimica Acta* **335**, 5 (1996).

- Su, H. B., Kallury, K. M. R., Thompson, M. and Roach, A., "Interfacial nucleic-acid hybridization studied by random primer p-32 labeling and liquid-phase acoustic network analysis", *Analytical Chemistry* **66**, 769 (1994).
- Sun, X. Y., He, P. G., Liu, S. H., Ye, J. N. and Fang, Y. Z., "Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications", *Talanta* **47**, 487 (1998).
- Tani, A., Thomson, A. J. and Butt, J. N., "Methylene blue as an electrochemical discriminator of single- and double-stranded oligonucleotides immobilised on gold substrates", *Analyst* **126**, 1756 (2001).
- Teh, H. F., Gong, H. Q., Dong, X. D., Zeng, X. T., Tan, A. L. K., Yang, X. H. and Tan, S. N., "Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface", *Analytica Chimica Acta* **551**, 23 (2005).
- Trieb, M., Rauch, C., Wellenzohn, B., Wibowo, F., Loerting, T., Mayer, E. and Liedl, K. R., "Daunomycin intercalation stabilizes distinct backbone conformations of DNA", *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **21**, 713 (2004).
- Tsang, S. C., Chen, Y. K., Harris, P. J. F. and Green, M. L. H., "A simple chemical method of opening and filling carbon nanotubes", *Nature* **372**, 159 (1994).
- Wang, J., Cai, X. H., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P. A. M. and Dontha, N., "DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus", *Analytical Chemistry* **68**, 2629 (1996).
- Wang, J., Jiang, M., Fortes, A. and Mukherjee, B., "New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films", *Analytica Chimica Acta* **402**, 7 (1999).

- Yang, G. C., Shen, Y., Wang, M. K., Chen, H. J., Liu, B. F. and Dong, S. J., "Copper hexacyanoferrate multilayer films on glassy carbon electrode modified with 4-aminobenzoic acid in aqueous solution", *Talanta* **68**, 741 (2006).
- Yang, W. R., Ozsoz, M., Hibbert, D. B. and Gooding, J. J., "Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes", *Electroanalysis* **14**, 1299 (2002).
- Yinghong Xiao, Chang Ming Li, Shucong Yu, Qin Zhoua, V. S. L. and Moochhala, S. M., "Synthesis and characterization of p-toluenesulfonate incorporated poly(3,4-ethylenedioxythiophene) ", *Talanta* **72**, 532 (2007).
- Zhao X. j., Jiang S., Lu D. S., Fan Y. C., Li Z.G., "Interaction of Anticancer-drug ADM with DNA Studied by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy", *National Lab of Laser Technology, Huazhong University of Science and Technolgy, Wuhan*, Thesis (1994)