

第一章、 簡介

第一節、 研究動機引言、背景：

a. STM 與 AFM 技術之發展

在 21 世紀中，最讓人矚目的便是生物科技與奈米科技。然而，1980 年代對生物科技與奈米科技之發展成為一個重要之分水嶺；因為新式的掃描技術-掃描穿隧顯微術(Scanning Tunneling Microscopy)的問世，使得對於奈米級影像之掃描觀察、控制原子排列以及由 bottom-up 製造奈米元件提供了一個更有利的工具(Chen CJ 1993; Cohen and Lightbody 1999; Bonnell DA 2001)。在科學發展史上，顯微技術一直隨著人類科技文明而不斷地突破；科學研究及工業技術，也隨著新的顯微技術的發明而推升至更微小的世界。近十年來，工業界的半導體電路技術由次微米 (submicron, $< 1 \text{ micron} = 10^{-6} \text{ m}$) 推向深次微米 ($< 0.13 \mu \text{ m}$)，新的電子元件也越做越小；實驗室正積極進行的超薄膜及超晶格 (superlattice) 技術，也要求到原子層甚至是單一原子的精確控制；很多人將奈米(nanometer, $1 \text{ nanometer} = 10^{-9} \text{ m}$) 大小的結構視為未來的明星材料。由此看來，人類對更高解析度顯微術的需求相當迫切。

光學顯微鏡是最早被發展出來增進人類微觀視野的工具。傳統的光學顯微鏡所能提供的最佳解析度，大約等於其使用光源的波長

($\sim 1\mu\text{m}$), 這樣的解析度已不符目前的需求。為達到 $\sim 1\text{nm}$ 的解析度, 使用的光源必須是 X-ray; 然而製作能使 X-ray 聚焦的鏡片並不容易。因此利用物質波的原理, 電子束便成為取代可見光源的必然選擇; 同時, 以電或磁場效應設計的透鏡也應運而生, 造就了電子顯微鏡的時代。1940 年代發展出來的掃描電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope , 簡稱 SEM), 將解析度提高至約 20 埃 (\AA , $1\text{\AA} = 10^{-10}\text{m}$, 原子直徑約為 2-3 \AA), 而成為現代科技中一項重要技術(Dawes CJ 1979; Chescoe and Goodhew 1990)。其主要原理與傳統光學顯微鏡類似, 只不過以電子取代了光波, 玻璃鏡片換成了電磁鏡片。雖然電子顯微鏡的解析度已經大幅的提升, 但是在掃描樣本的製備上卻很不便利; 近來表面物理性質之研究日趨重要, 需要一個方便觀測表面材質變化之掃描儀器, 在當時電子顯微鏡所能提供的並不適合各實驗室的需求。

掃描穿隧顯微術最早在 1980 年代早期, 由瑞士 IBM 研究實驗室兩名研究員 Binnig & Rohrer 提出, 是一種可以對導體的樣本, 提供表面特性影像之檢測工具(Chen CJ 1993; Cohen and Lightbody 1999; Bonnell DA 2001)。利用它能解析出晶體表面的原子結構及電子分佈情形, 發明人 G. Binnig 及 H. Rohrer 因此於 1986 年獲頒諾貝爾物理獎。此技術有效並穩定地操控金屬探針, 且利用量子力學的電子穿

隧原理，藉探針在距樣本表面僅約幾個原子大小的範圍內來回掃描，讓原子的排列具體地呈現。利用此技術除了可以掃描出樣本的表面之外，也可以用來控制單一原子之移動，藉由控制原子之排列，來形成圖形；透過這種技術使製造原子級的材料和元件，已不再只是夢想。自 STM 發明後，各式的掃描探針顯微技術亦蓬勃發展起來。因為 STM 掃描必須在可導電的材質上，在掃描上有了限制；因此廠商不斷開發具有特定用途的顯微技術。例如：藉由原子之間的作用力來掃描之技術，原子力掃描技術(Atomic Force Microscope，簡稱 AFM)。在探針加上一層磁性材料，以磁力顯微術(Magnetic Force Microscope，簡稱 MFM)來量測電子結構。其他的後續研發尚包括摩擦力顯微術(Friction Force Microscopy，簡稱 FFM)、靜電力顯微術(Electrostatic Force Microscope，簡稱 EFM)、近場光學顯微術(Scanning Near-field Optical Microscope，簡稱 SNOM 或 NSOM)、及磁力共振顯微術(Magnetic Resonance Force Microscopes，簡稱 MRFM)等(Cohen and Lightbody 1999; Bonnell DA 2001)。

AFM 是由 STM 發明人之一 Binnig、美國史丹福大學教授 Quate、及 IBM 的 Gerber 率先發展的(Cohen and Lightbody 1999)，主要動機是希望有類似 STM 的空間解析能力，但不必受限於可導電的材料。AFM 的原理是利用針尖原子與樣本表面原子間的微弱作用力作為回

饋，固定針尖與樣本表面之間作用力的大小，以維持針尖能在樣本上方以固定距離掃描，從而得知樣本表面的高低起伏。其基本架構與 STM 相似，但探針結構不同，AFM 探針(如圖 1)，必須能夠量測到原子間的微弱作用力才行。AFM 的空間解析能力僅略遜於 STM，在某些情況下亦可解析出原子結構，但不像 STM 必須受限於導體樣本。最新的 AFM 技術甚至可用來觀看柔軟脆弱的生物分子，應用在工業上的潛力也是無庸置疑的。AFM 的掃描方式主要分成以下三種(Cohen and Lightbody 1999; Bonnell DA 2001):

(1)接觸式(Contact mode)：探針在掃描時總是接觸材料的表面，在此操作模式下，探針與樣本表面間的作用力是原子間排斥力 (repulsive force)。由於排斥力對距離非常敏感，所以接觸式 AFM 較容易得到原子解析度，但因探針與樣本間的接觸面積極小，雖然其作用力很小，約只有 10^{-6} ~ 10^{-10} 牛頓，仍會損壞樣本，尤其是軟性材質，但是較大的作用力通常會取得較佳的解析度，所以選擇適當的作用力便十分重要了。

(2)非接觸式(Non-contact mode)：探針與材料表面總維持著一定的距離，利用原子間的長吸引力—凡得瓦力(Van derwaals force)來運作，不過此力對距離變化的敏感度小，因此必須使用調變技術來增強訊號雜訊比，其基本構想是讓探針與一陶瓷震盪片

接觸，再加入弦波電壓至震盪波，使探針在其共振頻率作小震盪，然後偵測其振幅或相位；當探針與樣本靠近時，由於凡德瓦爾力的作用，振幅便會變小，而相位也會改變；因此只要將振幅或相位送至回饋電路，便能得到等作用力圖像，這也就是樣本的高解析度影像。非接觸式 AFM 一般只有 50nm 的解析度，不過在真空中即可得到原子級的解析，此操作方式的發展原因乃是為了解決接觸式損害樣本的缺點。

(3)輕敲式(Tapping mode)：輕敲式原子力掃描術(Tapping Mode-Atomic Force Microscope，以下簡稱 TM-AFM)介於接觸式和非接觸式之間，探針以高頻在 z 方向振動，但其振幅較非接觸式小，而且每一振動週期中，探針在振盪底部和樣本表面接觸一次。與非接觸式比較，由於此式直接接觸樣本表面，因此解析度提高為 5 至 10nm；而與接觸式比較，雖然解析度較差，但破壞樣本的機率卻大為降低，同時也較不受摩擦力的干擾。由於高頻率敲擊的影響，對很硬的物體而言，探針針尖可能受損，而對很軟的樣本，則樣本仍可能會遭到破壞。

總而言之，從三百多年前虎克(Robert Hooke, 1635~1703)使用顯微鏡觀察軟木塞的蜂窩組織細微結構，並且命名為細胞 (Cell) 之

後，探索生物細微結構的影像分析，一直是生物學家重要的活動之一。隨著顯微鏡技術的進步，解析度由光學顯微鏡的微米 (μm , 10^{-6}m)，到電子顯微鏡的奈米 (nm , 10^{-9}m) 範圍。由於光同時存在有粒子性與波動性二種物理特性，而其波動性的繞射特性，造成了我們選擇使用的觀測波長反映了解析度 (波長愈短，解析能力愈高)，因此選擇電子源為短波長的電子顯微鏡(Dawes CJ 1979; Chescoe and Goodhew 1990)，可以讓我們看到最細微的生物細胞結構。

普通光學顯微鏡的解析度可達到 $0.2\ \mu$ ($1\text{mm}=1000\ \mu\text{m}$)，為肉眼的 500 倍；而電子顯微鏡的解析度幾乎可達到肉眼的 50 萬倍，由於它高度的解析度才把生物學又帶進了一個新的領域。電子顯微鏡的構造與光學顯微鏡的構造其原理是相似的，只是電子顯微鏡除了本體外還有真空排氣裝置以及電力系統。電子顯微鏡本體有一電子束源，就如光學顯微鏡有一光源，光的聚焦靠透鏡，而電子束的聚焦則靠磁場線圈。由於電子束有被水分或空氣分散的性質，因此所有電子顯微鏡標本的準備一定要經過乾燥處理的過程才能觀察，所以電子顯微鏡無法觀察活的生物體或細胞。這樣對於研究生物科技來說是一大不便，因此掃描探針顯微鏡便成為研究生物科技的重要工具。

b. STM / AFM 對 DNA 掃描之發展

近年來在生物科技的發展突飛猛進，在 DNA 的研究解碼上，各國

也都爭相的投入經費與人力在 DNA 的研究上。然而，因為 DNA 的直徑尺度僅僅只有奈米的大小；所以在觀察與研究分析上是一大考驗。加上 DNA 本身是生物分子，在樣本的處理與製備上，也是一大挑戰。由於探針式掃描顯微技術(Scanning Probe Microscopy，簡稱 SPM) (Bonnel DA 2001) 能夠有原子級的解析度，在樣本的準備上又比電子顯微鏡來的簡便許多；因此許多的研究便開始使用 SPM 技術來掃描微小的結構。因為生物分子本身比較脆弱、尺度又小，目前在 DNA 的研究上較常用於掃描 DNA 之技術為 AFM 與 STM 兩種；因為這兩種技術的解析度能達到原子級的尺度，因此可用來研究 DNA 之結構。而 AFM 是應用原子之間的作用力來掃描出樣本的影像，因此只能夠在輪廓上做分析與研究。而 STM 是利用電子的穿隧效應來描繪出掃描的影像，除了可以掃描出清晰的 DNA 立體幾何圖像之外，可藉由導電的特性來分析出樣本不同的化學性質與導電特性。

在 1990 年代 STM 開始使用於研究 DNA，但因為侷限於 STM 的掃描性質，需要可以導電的基板，因此遲遲無法有更進一步的進展。到 1986 年，由於 AFM 之開發，利用 TM-AFM 掃描 DNA 才得到清晰的 DNA 影像。由掃描的圖像中，可清楚地看到 DNA 推論模型的雙股螺旋結構。(Maaloum M 2003)

第二節、 文獻評述：

a. STM,AFM 與電子顯微鏡之比較

為了突顯掃描探針顯微術之優異性，表 1. 列舉了掃描電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope , 簡稱 SEM)、 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy , 簡稱 TEM)、 掃描穿隧顯微鏡 (STM) 及原子力顯微鏡 (AFM) 之簡單功能比較。很明顯地，STM 在空間解析度上優於另三者，尤其是垂直表面 (z) 方向，電子顯微鏡不太能分辨 10nm 以下的高度差，用 STM 就不難達到 0.01nm 的解析度。再者，放入電子顯微鏡觀察之前，非金屬樣本需事先處理。但有些樣本如生物分子，在乾燥及鍍導電膜等程序處理過後，往往與原始狀態有所不同。另一方面，電子顯微鏡的高能量電子束對某些樣本(尤其是脆弱的生物分子) 具有破壞性。STM 則不具破壞性，樣本也通常不需事先處理，更可在真空、空氣、甚至水溶液等各種環境下操作，限制很少；再加上其造價低於電子顯微鏡，體積小，設計彈性又很高，因此易與其它系統整合；若與光學顯微鏡結合，可以說是「鉅細靡遺」。當然，STM 也有些缺點，如不導電樣本或表面高度落差過大的材料就不適用。況且，STM 掃描速度仍比不上 SEM，產品成熟度及穩定性也還不夠；這些主要是因 STM 技術發展時間尚短，商業化產品近數年才出現。STM 可測量出材料樣本的導電性與電阻，可以觀測到其

它的掃描方式所無法得到的資訊，藉由掃描不同的區塊其中組成成分之不同，可分析出材料之特性、與不同之處。

b. AFM 掃描空氣中與溶液中 DNA 之結果

在近來的研究中(Schaper and others 1993; Lyubchenko and Shlyakhtenko 1997; Tanigawa and Okada 1998; Shlyakhtenko and others 1999; Katsumata and others 2001; Medalia and others 2002; Maaloum M 2003; Liu and others 2005; Song and others 2005) , AFM 可在分子、原子尺度下用來對物質進行觀察，在生物學上用來對 DNA、蛋白質進行構形(Comformation)分析，還可用來進行在原位置的分子剪切、DNA 特定位點的觀察研究，使 AFM 成為解決生物學難題的理想工具。TM-AFM 能在大氣下、真空中、及接近生理條件的液相內直接進行表面單分子的觀測。此外 AFM 所使用的基板不受導電性的限制，只要表面夠平坦(如雲母等)便可用來當作基板，因此在樣本的製備上選擇性更多也更方便。近年來有大量的 DNA 研究，都是使用 TM -AFM 在不同基板上(如雲母、石墨、黃金等基板)，利用離子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等)、精胺(spermine)、3-氨基三乙氧基矽烷(3-aminotriethoxysilane)、硫基等不同的方式來固定 DNA，以便進行 DNA 之掃描與分析。利用離子固定 DNA 在基板上，配合不同的基板與離子間的作用力，來製作散佈良好且易於掃描的樣本。不論在真

空、大氣、或是溶液中的條件下，TM-AFM 都可得到清晰良好的 DNA 影像。而這些已被肯定的結果，也使得 TM-AFM 在 DNA 的研究上已經奠定了相當扎實的基礎。

c. STM 掃描 DNA 之結果

然而，AFM 對 DNA 之觀察，僅止於構形上的研究。雖然可以清楚掃描出原子級的影像，能看到 DNA 雙股螺旋的結構(Tanigawa and Okada 1998; Maaoum M 2003)，但是對於其它的特性便無法再做更深入的研究。而 STM 可以對 DNA 的性質，做更進一步的研究與分析，除了基本的結構之外，更能了解材料本身的電阻與導電性質。利用 STM 的掃描技術，可測量出 DNA 的電阻與導電性，可以觀測到其它的掃描方式所無法得到的資訊。藉由掃描不同的區塊組成成分的不同，可分析出材料的特性。

從 STM 的掃描技術問世之後，許多人便開始嘗試使用 STM 掃描出原子級的 DNA 影像。1989 年，Beebe 等人(Beebe, Wilson and others 1989)利用高定向熱解石墨(Highly Oriented Pyrolytic Graphite，以下簡稱 HOPG)當作基板，使用 STM 在大氣中掃描 DNA。掃描的影像，不但得到清晰的 DNA 結構，雙股螺旋的溝槽和雙股間的螺距都可清楚的觀測到。同年，Lee 等人(Lee, Arscott and others 1989)，也在 HOPG 的基板上掃描出 DNA 影像。除了 DNA 的螺旋結構，也量測出 DNA 螺旋的直徑。接著同一組人，甚至在 HOPG 上掃描出清晰的 Z-DNA 左旋結構(Arscott, Lee and others 1989)。延續著上面的發現，Driscoll 等人(Driscoll, Youngquist and Baldeschieler 1990)，

將 DNA 散佈在 HOPG 上，利用 STM 在超高真空中掃描出 DNA 原子級的影像，更由其中觀察到 DNA 上的鹼基對(base pair)。在他們的研究中，更量測出螺距寬、溝槽寬、DNA 分子的直徑，還有鹼基對的角度；與 X 光繞射的模型相比，極為符合。

可是在 1991 年，Clemmer 等人(Clemmer and Beebe 1991)指出，當要使用 HOPG 來當作 STM 研究生物分子的基板時，都會使用新撕開的乾淨表面來當作基板。而在撕開的 HOPG 上，不同層石墨階梯之間的斷面，會有生物分子 DNA 的假仿影像(Mimic DNA)，而誤導研究者。1992 年，Heckl 和 Binnig (Heckl and Binnig 1992)再對 HOPG 上的 DNA 假像做更進一步的分析。他們發現，在 HOPG 上不同層面間的晶格界面(Domain Wall)，會在 STM 的掃描下呈現出各種類似 DNA 的結構圖。在乾淨的 HOPG 表面上，可以見到像是雙股螺旋、單股螺旋或是有鹼基對的影像。因此，之前所發現的 DNA 原子級影像令人質疑。

自從石墨上的 DNA 假仿影像被發表後，很長一段時間在 STM 掃描 DNA 的研究上一直沒有新進展。後來，日本的川合知二實驗室(Tanaka and Kawai 1997)，選擇了單晶 Cu(111)來當作基板，並利用 STM 在超高真空中掃描出肯定的 DNA 影像。他們利用特殊的脈衝噴霧方式(pulse injection method)，使 DNA 散佈在 Cu(111)的表面上。因此，所得到的 STM 影像，不再有石墨 DNA 假仿影像的干擾。在 1999 年，

川合知二的團隊利用 STM 掃描出高解析度的 DNA 結構圖(Tanaka, Hamai and others 1999)；在超高真空中，使用 STM 得到肯定的 DNA 螺紋結構。在 2003 年，他們更清楚的掃描出 DNA 上的鹼基對(Tanaka and Kawai 2003)。

第三節、待決問題：

前面所提到的 Beebe 等人 (Beebe, Wilson and others 1989 ; Lee, Arscott and others 1989; Arscott, Lee and others 1989; Driscoll, Youngquist and Baldeschwieler 1990) , 為了使用 STM 而選擇了可以導電, 表面平坦且易於處理的石墨當作基板。卻因為石墨結構的假仿影像, 使人誤以為是 DNA 的細微結構。後來, 的川合知二團隊選擇了單晶的 Cu(111) 當作基板 (Tanaka and Kawai 1997 ; Tanaka, Hamai and others 1999 ; Tanaka and Kawai 2003) , 雖然滿足了原子級的平坦且可導電, 但是單晶金屬十分昂貴, 在重覆使用上的處理也十分不便。因此, 該如何選擇一個適當的材料當作基板, 不但達到原子級平坦、可導電, 並且能夠清楚的掃描 DNA 影像卻不會有假仿影像的誤會, 在基板的處理上更要簡便而利於研究的進行, 將是第一個要面臨的問題。

川合知二實驗室所掃描出的 DNA 影像, 雖然已經是良好的 DNA 影像, 可看到雙股螺旋結構 (Tanaka, Hamai and others 1999) , 也可以清楚看到 DNA 上的鹼基對 (base pair) (Tanaka and Kawai 2003) , 但是他們所掃描的 DNA 是在超高真空的環境下, 經過乾燥處理後的 DNA 可能變性。縱然可以看到清楚 DNA 影像, 不過還是與大氣或溶液中存在的 DNA 有所差異, 最接近 DNA 常態的條件應該是在大氣或溶液

中。再者超高真空的條件，也使得研究 DNA 更加不便。不論在研究或是分析上，在大氣或溶液中的 DNA 形貌更值得研究與探討。因此，該如何在大氣的條件下，得到像川合知二團隊的結果值得我們去挑戰。

一般在製備 DNA 樣本時，會將處理好的 DNA 溶液滴在基板上，再利用各種不同的方式(例如：自然乾燥、濾紙吸乾、氮氣吹乾等方法)，使 DNA 散佈在基板的表面上。由於在液滴乾燥的過程中，溶液表面張力會將 DNA 拖走，最後甚至會形成一個 DNA 聚集堆。所以如何讓 DNA 均勻散佈在基板的表面，又不被溶液表面張力所影響，將是製作一個良好樣本的極大難題。為了要使 DNA 均勻散佈在單晶 Cu(111) 上，川合知二團隊更開發了脈衝噴射方式(pulse injection method) (Tanaka and Kawai 1997)，使每一個噴霧出來的霧珠中，近乎只有一個 DNA 分子。藉由分散的霧珠，而達到良好的 DNA 散佈。不過，脈衝噴射方式(pulse injection method)是使用在無塵真空的環境中，不便於使用在大氣的條件下。因此，我們應致力於開發在大氣的條件下，製作一個 DNA 散佈良好，並且能固定於基板的樣本製作流程。

第四節、推論題目：

針對前面所提出的各個問題，我們明白要利用 STM 掃描 DNA 影像的研究仍有幾個問題必須克服。首先便是基板的選擇必須要達到原子級平坦、可導電並且不能存在 DNA 假仿影像，再來便是如何在大氣的環境下使 DNA 固定在基板上，並製作均勻分佈的 DNA 樣本，以便利用 STM 在大氣下掃描出清晰的 DNA 影像。

關於基板的選擇，既然在石墨上會有假仿影像使人誤判，而單晶的金屬價格卻又昂貴，處理上也十分不便；因此，可能的替代材料可為金箔(純度為 99.99%)。因為黃金為導電性最好的金屬，加上黃金也相當的安定不易氧化。雖然高純度的金箔價格也不便宜，但可以將金箔裁剪成許多的小金片，不但利於操作，相對的價格也比較便宜。原始的金箔表面十分粗糙、崎嶇不平，卻可以利用退火(anneal)處理的方式，使金箔表面原子重新排列，形成多晶的黃金表面，這些小小的單一晶格面與單晶的金屬一樣可達到原子級的平坦。在黃金的表面上，不但沒有假仿影像的干擾，反而還有晶格的特徵(Au(111)紋路)作為背景，可用來輔助 STM 掃描時影像真偽的判別(Ting SJY 1994)。除此之外，金箔的使用上比單晶的金屬更簡便。單晶金屬要重複使用時，必須要經過繁複的表面處理程序。小片的金箔片使用一次後就更換新片，不用再經過繁複的處理程序，所以更利於研究使用。

關於 DNA 的固定，則必須先將 DNA 以共價鍵的方式，將含有硫基或雙硫基的有機分子連結到 DNA 上。利用金與硫基之間良好的親和性，將 DNA 吸附在黃金的表面上。使得 DNA 較不容易被溶液的表面張力拖走，以便達到良好的 DNA 分佈，利於 STM 的掃描。

由於在大氣或溶液中存在的 DNA，是最接近 DNA 常態的條件。所以本研究的主要目的，即是如何建立一套 DNA 樣本的製作程序，並在大氣中使用 STM 掃描 DNA 的影像。希望藉著本研究的實驗，能提供分子生物學在 DNA 的研究上，一項更有利的工具。

第二章 研究方法

本研究的實驗方法主要分三大步驟：Au 基板的製備，STM 探針的製備和 DNA 樣本的製備。

第一節、Au 基板的製備

1. 切割 Au 基板：實驗中使用的黃金基板純度為 99.99% 以上，厚度為 0.1 mm 之金箔(Aldrich,USA)。將金箔切割為長 3mm、寬 2 mm 之長方片，並且在右上角切下一截角，便於分辨正反面。
2. 清潔洗滌 Au 基板：將切割好的金箔用載玻片壓平後，置於燒杯內加入洗滌劑用超音波振盪器作清洗；振盪兩次(各 60 分鐘)，再更換蒸餾水清洗振盪三次(各 60 分鐘)。
3. 高溫鍛燒退火：將洗滌乾淨的金箔片放置於陶瓷座上，再放入高溫爐中。用 1060 °C (黃金之熔點在一大氣壓下為 1064 °C)，在高溫爐中鍛燒四天四夜。
4. 保存 Au 試片：將鍛燒四天四夜退火後之金箔片，保存於高溫爐中維持在 night mode 100 °C 的環境下保存。如此便完成黃金基板之準備，在每次使用前，加溫到 1060 °C 再退火到室溫。
Au 基板準備完成。

第二節、STM 探針的製備

實驗中使用 0.25mm 的鎢 (W) 絲，以電化學的方法，在 KOH 溶液中進行電磨 (Electropolishing)，並利用自動斷電控制系統取得良好的探針，將製作好的探針去氧化處理後，再滴上透明無色的指甲油 (成分:Butyl Acetate 丁基醋酸鹽, Nitrocellulose Ethyl Acetate 硝化纖維素乙基醋酸鹽)。

1. KOH 藥劑配製 :先取 50ml 的 KOH 顆粒置於燒杯中，再加入蒸餾水使溶液體積為 375ml。待其完全溶解後備用。
2. 電磨條件和自動斷電控制系統 (Ibe, Bey and others 1990) :實驗準備如下，先將直徑為 0.25mm 的鎢絲 (W, 純度為 99.9+%, Aldrich, USA) 剪成約 5.5cm 長，彎直備用。Pt/Ir (Pt 70%, Ir 30%) 環接負電、鎢絲接正電，一起放入上一步驟所製備的 KOH 溶液中。將 Pt/Ir 作成的電極環恰完全沒入於液面下並且緊貼液面，將鎢絲在圓環的中心點沒入液中 2mm 深。開啟自動斷電控制系統，定電壓以 12 伏特進行電磨。利用自動斷電控制系統。使電路在下節鎢絲斷離的一瞬間便切斷電路。此時上節鎢絲形成非常尖細的鎢針，如圖 2 所示。剪下完成的鎢針。重複步驟 2，製作 15 支鎢針，待處理。

3. 探針去氧化處理 : 製作完成之探針因為表面有一層氧化物, 必須再利用氫氟酸 (HF), 去除針尖之氧化物(Ekva11, Wahlstrom and others 1999)。將探針放置於? 氟龍製作的針座上。用氫氟酸 (HF) 淹過探針, 浸泡 3 分鐘。取出後將探針用蒸餾水清洗去除殘留的氫氟酸 (HF), 再用酒精清洗去除吸附在探針上的水。將去氧化處理好的探針置於低真空乾燥皿中, 靜置一天乾燥。
4. 探針防漏電處理 : 為了要掃描水中的 DNA, 必須先克服探針在水中漏電的因素 (Magnussen and others 1996; Noda, Wan and Osawa 2001), 使得探針只有在針尖處會放電。因此, 將去氧化處理過且乾燥後的探針, 由針尖上方滴下 2 滴指甲油, 置於收納盒中, 在室溫下乾燥 4 天。待指甲油完全乾燥後, 將探針收至針盒, 放入低真空乾燥皿中灌入氬氣(Ar)保存。在氬氣的環境中, 可減緩氧化並且保持乾燥。STM 探針準備完成。

第三節、DNA 樣本的製備

1. DNA 溶液之準備 : 為了使冰凍冷藏過的 DNA(X174RF II 、

DNA ,NEBioLab, USA)分子 , 一個一個分開並且展開成圓

圈狀 , 所以加入了 Tris 和 EDTA 以及 NaCl , 配方如下表 :

Working	Reagent	Store	Stock	Preparation	Dilution	Vol.(μ l)
10mM	Tris-HCl(pH7.5)	+4 ^o C	1M		1/100	10
1mM	EDTA		0.5M		1/500	2
1M	NaCl		5M		1/5	200
0.1ng/ μ l	FX174RF II	+4 ^o C	1.00 μ g/ μ l	NEBioLab	1/10000	0.1
	H ₂ O					787.9(~788)
						Total : 1000 μ l

2. DNA 透析 : 將準備好之 DNA 溶液取 500 μ l 放入透析管中 , 使用去

離子水透析 15 分鐘 ; 重複透析三次。

3. Linker - FastTag

(1) 取一微量離心管 , 注入 10 μ l (0.1ng/ μ l) DNA 溶液加上 10 μ l

FastTag Reagent (VECTOR LABORATORIES, USA)。 [反應須在暗房中進行]

(2) 將微量離心管置於冰水槽中 , 打開管蓋。使用水銀燈在 DNA 溶液上方 10 cm 處照光 30 分鐘。

(3) 照光處理完成後 , 用去離子水將溶液體積加至 80 μ l , 再加入

80 μ l 0.1M 的 Tris (PH 9.5)緩衝液。

(4) 加入 160 μ l 的二級丁醇(2-butanol) , 混合均勻後使用離心機離心。離心之後會產生上下兩層溶液 , 將上層的溶液去除 , 再加入 160 μ l 的二級丁醇至溶液中。混合均勻後再次離心 , 取出下層分離出的溶液(約 80 μ l) 。 FastTag 處理完成。

4. DNA 再透析(去除二級丁醇,2-butanol) :將 FastTag 處理好的 DNA 溶液 , 以去離子水透析 15 分鐘 ; 重複透析五次。DNA 試劑準備完成。

5. 取 5 μ l 準備完成的 DNA 試劑(1pg/ μ l) , 滴在已鍛燒過的金箔片上(金箔片已事先用銀膠固定在基座上)。30 分鐘後 , 用去離子水清洗金箔片 20 秒。清洗完時 , 在金箔片上留下一滴水滴 , 使用氮氣吹乾。

6. 將處理好的樣本放在低真空乾燥皿內 , 灌入氫氣待乾燥。DNA 樣本準備完成。

第三章、實驗結果與討論

在基板的製備上(Ting SJY 1994)，為了準備能夠使用 STM 掃描 DNA 原子級影像的平坦表面，我們使用高溫爐，讓金箔在 1060 °C(接近黃金熔點 1064 °C)的高溫中鍛燒四天四夜，再讓金箔緩慢降溫至常溫。這樣的加熱過程稱之為退火(anneal)。每次在使用金箔之前，都會再加熱到 1060 °C 鍛燒一小時，再降到常溫。利用這樣的退火方式，確實可以使黃金表面重新形成晶格面，達到原子級平坦的表面。經過鍛燒的黃金表面，在顯微鏡下可清楚的看到有許多的晶格面形成。由圖 3a 中可看到在退火處理前，黃金表面並無晶格面；經過退火處理後，則有許多晶格面形成，如圖 3b。而在 STM 掃描的影像中，也可以清楚的看到 Au(111)的晶格紋路，如圖 4a-b。利用黃金結構的特徵，可以有效的幫助我們在掃描中判斷出影像的真偽。在基板的製備上，可以說相當的成功。

擁有良好的 Au 基板後，接下來開始就 DNA 的固定來做探討。為了使 DNA 能有效的固定在黃金的表面上，所以選擇帶有硫基的化合物 Cysteamine(SIGMA, USA)，其分子式為 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ，來當作 DNA 與 Au 之間的連結。因為在 Cysteamine 的分子結構上，一端有單硫基，另一端有氨基。硫基與 Au 之間有良好的親和力，而氨基在水中可有適當的比例帶正電，可吸引帶負電的 DNA 分子。藉由這種連結的方

式，將 DNA 固定在 Au 的表面上，而得到均勻散佈的 DNA 樣本。我們為了在 Au 表面均勻的佈上單分子層的 Cysteamine，作過許多嘗試。後來發現，不論是 Au 基板用浸泡式或是化學氣相沉積 (Chemical Vapor Deposition, 簡稱 CVD)，雖然有時會有均勻的散佈，如圖 5。但是都無法重複得到良好的單層。用浸泡式的方法，會在 Au 基板上附著很厚一層的 Cysteamine。而用 CVD 的方式，效果比浸泡式來的好，卻仍然無法保證達到均勻的單層分佈。再加上溫度也會影響 CVD 的速率，因此很難得到良好 Cysteamine 沉積的 Au 基板。此外，在掃描 DNA 影像時，Cysteamine 的沉積不但會影響到 Au 基板的平坦表面，有時連黃金的晶格特徵都無法辨別，如圖 6。甚至 Cysteamine 本身在 STM 掃描下若有晃動，就會造成無法確認的絲狀紋路，如圖 7。我們努力得到良好 Au 基板的平坦表面，反而會被 Cysteamine 混淆，而影響到掃描 DNA 影像的判斷。因此，決定將連結 DNA 與 Au 的方式換成 FastTag (VECTOR LABORATORIES, USA)。FastTag 是一個長鏈分子，透過水銀燈照光，觸發反應使 FastTag 直接以共價鍵連接在 DNA 上。而 FastTag 本身帶有雙硫基，可使 DNA 附著在 Au 的表面上，圖 8 為反應示意圖 (Vextor Labs. 1976)。基於黃金上的晶格特徵，我們觀察到更肯定的 DNA 影像。利用透析的方式，我們已經把除了 DNA 以外大部分的分子都去除，剩下的幾乎只有用 FastTag 反應過的 DNA 存在

溶液中。去除了其他分子的干擾之後，在黃金表面上就只有處理過的 DNA。在 Au 的晶格面上，如圖 9，許多 DNA 如網狀一般的吸附在黃金晶格階梯上。如圖 10，密密麻麻的 DNA 吸附在黃金表面上。而在圖 11 中，可看到許多絲狀 DNA 吸附在黃金表面上，也看到了圓圈型的 DNA 散佈在其中(如箭頭所示)。圖 12 為單獨留下的清晰 DNA 分子，捲曲在一起疊在一層 DNA 上。

在找尋 DNA 的實驗過程中，我們也觀察到了 DNA 的另一個現象。在我們的 DNA 樣本中，有包含了凝聚起來並未鬆開的 DNA Condensation unit (Bloomfield VA 1997; Katsumata, Kigasawa and Utsuno 2001; Liu, Zhou and others 2005)。由圖 13 中可以清楚的看到，大小相近的球狀物。這些是 X174RF-II DNA 經過凝聚之後所形成的 Condensation unit。要把這些凝聚的 DNA 球鬆開，必須加入 NaCl (Duguid and Bloomfield 1995; Rybenkov, Vologodskii and Cozzarelli 1997a; Rybenkov, Vologodskii and Cozzarelli 1997b)，並且不斷的搖晃使凝聚的 DNA 能夠鬆開，進而變為單一分子。這種凝聚的現象，在 λ -DNA 也觀察到同樣的情況，如圖 14。在圖中可看到，有許多大小相近的條狀物，這些就是 λ -DNA 的 Condensation unit。因為 DNA 分子不同，所凝聚後的形狀也有差異。

在實驗中，水對於 DNA 的分佈、掃描影像的清晰度，均有很大的

影響。圖 15 所示樣本，是將已經用 FastTag 處理好的 X174RF-II DNA，滴 10 μ l 在 Au 基板上 30 分鐘，用去離子水清洗 20 秒，氮氣吹乾後，再滴上 2 μ l 的酒精 最後放到低真空乾燥皿 10 分鐘使其乾燥。此樣本在初始掃描得到圖 15a，一小時後在相同位置掃描得圖 15b。比較兩圖發現，經過一小時後樣本更為乾燥時，掃描的影像更為清晰。在圖 16 中也可以發現，帶有水份的 DNA 會使影像清晰度受到影響。為了嘗試掃描水中的 DNA 影像，所以使用指甲油(成分 Butyl Acetate 丁基醋酸鹽, Nitrocellulose Ethyl Acetate 硝化纖維素乙基醋酸鹽)，將探針覆蓋上一層防水不導電的保護膜(Magnussen and others 1996; Noda, Wan and Osawa 2001)。使探針在進入水中後能夠只有針尖會放電，不會因其它部位漏電而無法掃描。圖 17 是用 STM 在去離子水中，掃描 X174RF-II Condensation unit 的影像。測試後發現，經過防水處理的探針，確實能在去離子水中掃描出清楚的影像。除此之外，利用防水處理過的探針，掃描還未完全乾燥的樣本，也可以得到較為清晰的影像。

第四章、結論

總結以上，利用 STM 掃描大氣下 DNA 影像正是我們所追求的目標。雖然還沒有達到原子級解析的 DNA 影像，但是也確實找出了 DNA 樣本製備的條件。其中最大的成功，便是良好基板的選擇。在實驗中，Au 的晶格特徵讓我們更輕易的判別掃描影像是否可信。DNA 影像在 Au 晶格特徵的襯托下，也更為肯定。而在實驗的操作上，金箔片也相當的便利。不需要繁複的處理程序，卻也可以達到與單晶金屬相同的原子級平坦表面。在基板的選擇與製備上，可說相當的成功。

至於 DNA 樣本的製備上，有許多的問題是我們始料未及的。例如，表面張力對 DNA 的影響、DNA 的凝聚現象 (Condensation Unit)、Cysteamine 所產生的影響、氮氣吹乾後的 DNA 分佈狀態等。隨著實驗的進行，逐漸的抽絲剝繭找出解答，也終於得到了製作 DNA 樣本的製備方法。相信在之後的研究工作中，可以利用這些基礎在大氣下掃描出更高解析度的 DNA 影像。配合防水處理的 STM 探針，更可對水中的 DNA 分子做進一步的研究與分析。？ 分子生物學，提供更多的資訊。

參考文獻

- Arcscott PG, Lee G, Bloomfield VA, Evans DF. 1989. Scanning tunnelling microscopy of Z-DNA. *Nature* 339:484-486.
- Beebe TP, Jr., Wilson TE, Ogletree DF, Katz JE, Balhorn R, Salmeron MB, Siekhaus WJ. 1989. Direct observation of native DNA structures with the scanning tunneling microscope. *Science* 243:370-372.
- Bloomfield VA. 1997. DNA Condensation by multivalent cations. *Biopoly* 44:269-282.
- Bonnell DA. 2001. Scanning probe microscopy and spectroscopy :theory, techniques, and applications. New York: Wiley-VCH. 493 p
- Chen CJ. 1993. Introduction to scanning Tunneling microscopy. New York: Oxford University Press. 412 p.
- Chescoe D and Goodhew PJ. 1990. The operation of transmission and scanning electron microscopes. Oxford : Oxford University Press. 86 p.
- Clemmer CR, Beebe TP, Jr. 1991. Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscope studies. *Science* 251:640-642.
- Cohen SH and Lightbody ML. 1999. Atomic force microscopy/ scanning tunneling microscopy 3. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 210 p.
- Dawes CJ. 1979. Biological techniques for transmission and scanning electron microscopy. Burlington, Vt: Ladd Research Industries. 303 p.
- Driscoll RJ, Youngquist MG, Baldeschwieler JD. 1990. Atomic-scale imaging of DNA using scanning tunneling microscopy. *Nature* 346:294-296.
- Duguid JG, Bloomfield VA. 1995. Aggregation of melted DNA by divalent metal ion-mediated cross-linking. *Biophysical Journal* 69:2642-2648.
- Ekvall I, Wahlstrom E, Claesson D, Olin H and Olsson E. 1999. Preparation and characterization of electrochemically etched W tips for STM. *Meas. Sci. Technol.* 10:11-18.

- Heckl WM, Binnig G. 1992. Domain walls on graphite mimic DNA. *Ultramicroscopy* 42-44:1073-1078.
- Ibe JP, Bey PP, Jr., Brandow SL, Brizzolara RA, Burnham NA, Dilella DP, Lee KP, Marrian CRK, Colton RJ. 1990. On the electrochemical etching of tips for scanning tunneling microscopy. *J. Vac. Sci. Technol. A* 8:3570-3575.
- Katsumata S, Kigasawa H, Utsuno K. 2001. AFM study on condensation of DNA by spermidine. In: Yao YD, Cheng HY, Chang CS, editors. *Appc 2000: Proceedings of the 8th asia-pacific physics conference: Taipei, Taiwan, 7-10 August 2000*. Singapore: World Scientific. p 731-733.
- Lee G, Arscott PG, Bloomfield VA, Evans DF. 1989. Scanning tunneling microscopy of nucleic acids. *Science* 244:475-477.
- Liu Z, Li Z, Zhou H, Wei G, Song Y, Wang L. 2005. Immobilization and condensation of DNA with 3-aminopropyltriethoxysilane studied by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 218:233-239.
- Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS. 1997. Visualization of spercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:496-501.
- Maaloum M. 2003. A close encounter with DNA. *Eur Biophys J* 32:585-587.
- Magnussen OM, Ocko BM, Wang JX and Adzic RR. 1996. In-situ X-ray diffraction and STM studies of bromide adsorption on Au(111) electrodes. *J. Phys. Chem.* 100: 5500-5508.
- Medalia O, Englander J, Guckenberger R, Sperling J. 2002. AFM imaging in solution of protein-DNA complexes formed on DNA anchored to a gold surface. *Ultramicroscopy* 90:103-112.
- Noda H, Wan LJ, Osawa M. 2001. Dynamics of adsorption and phase formation of p-nitrobenzoic acid at Au(111) surface in solution: A combined surface-enhanced infrared and STM study. *Phys. Chem. Chem. Phys* 3:3336.

- Rybenkov VV, Vologodskii AV, Cozzarelli NR. 1997a. The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA. I. sedimentation analysis. *J. Mol. Biol.* 267:299-311.
- Rybenkov VV, Vologodskii AV, Cozzarelli NR. 1997b. The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA. II. Equilibrium catenation. *J. Mol. Biol.* 267:312-323
- Schaper A, Pietrasanta LI, Jovin TM. 1993. Scanning force microscopy of circular and linear plasmid DNA spread on mica with a quaternary ammonium salt. *Nucleic Acids Research* 21-25:6004-6009.
- Shlyakhtenko LS, Gall AA, Weimer JJ, Hawn DD, Lyubchenko YL. 1999. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate. *Biophysical Journal* 77:568-576.
- Song Y, Li Z, Liu Z, Wei G, Wang L, Sun L. 2005. Immobilization of DNA on 11-Mercaptoundecanoic Acid-Modified Gold(111) Surface for Atomic Force Microscopy Imaging. *Microscopy Research and Technique* 68:59-64.
- Tanaka H, Hamai C, Kanno T, Kawai T. 1999. High-resolution scanning tunneling microscopy imaging of DNA molecules on Cu(111) surfaces. *Surface Science* 432:L611-L616.
- Tanaka H, Kawai T. 1997. Scanning tunneling microscopy imaging and manipulation of DNA oligomer adsorbed on Cu(111) surfaces by a pulse injection method. *J. Vac. Sci. Technol. B* 15-3:602-604.
- Tanaka H, Kawai T. 2003. Visualization of detailed structures within DNA. *Surface Science* 539:L531-L536.
- Tanigawa M, Okada T. 1998. Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica. *Analytica Chimica Acta* 365:19-25.
- Ting SJY. 1994. Scanning probe microscopy of DNA: the methods of sample preparation. *Tunghai Journal* 35:77-86.

Vextor Labs. 1976. Labeling Reaction.

<<http://www.vectorlabs.com/products.asp?catID=102&locID=609339>>.

表 1. 不同顯微鏡技術之比較

	SEM	TEM	STM	AFM
橫向解析度	5nm	0.5nm	原子級	2~10nm
縱向解析度	10nm	N/A	0.01nm	0.1nm
放大倍率	$10\sim 10^6$	$3 \times 10^5\sim 10^6$	$5 \times 10\sim 10^8$	$5 \times 10^2\sim 10^8$
成像範圍	1mm	0.1mm	0.1mm	0.1mm
成像環境	真空	真空	不限	不限
樣品處理	需鍍導電膜	複雜	無	無

STM 在空間解析度上優於另三者，尤其是垂直表面（z）方向。

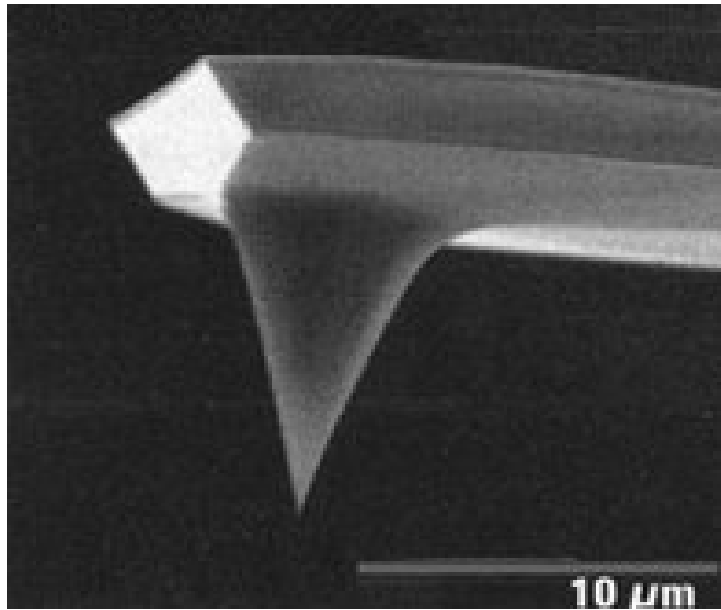


圖 1a. AFM 探針。

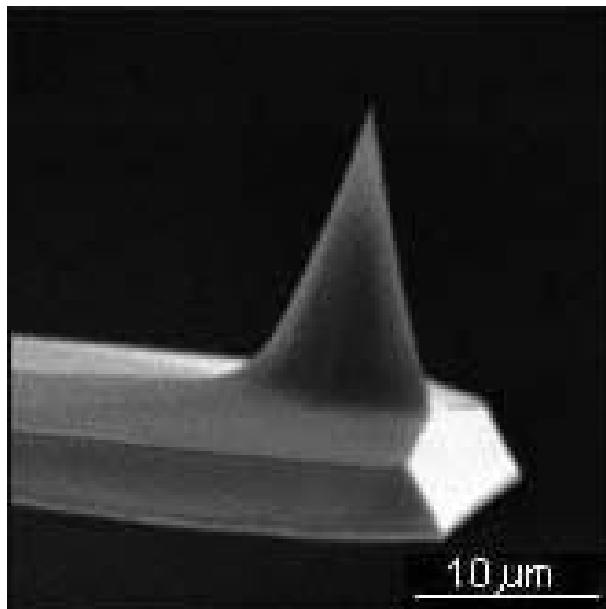


圖 1b. AFM 探針。

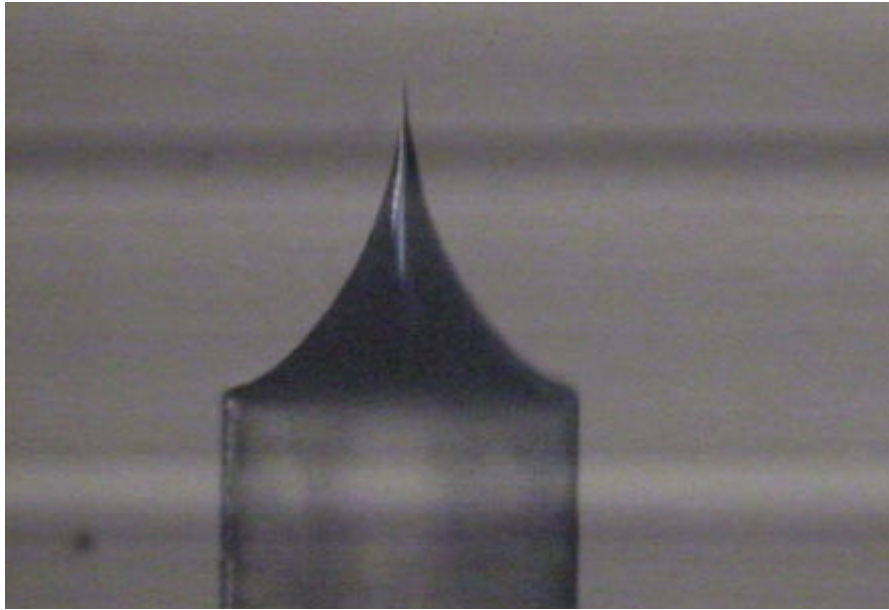


圖 2a. 使用自動斷電系統得到的鎢針，鎢絲直徑為 0.25mm。(188X)

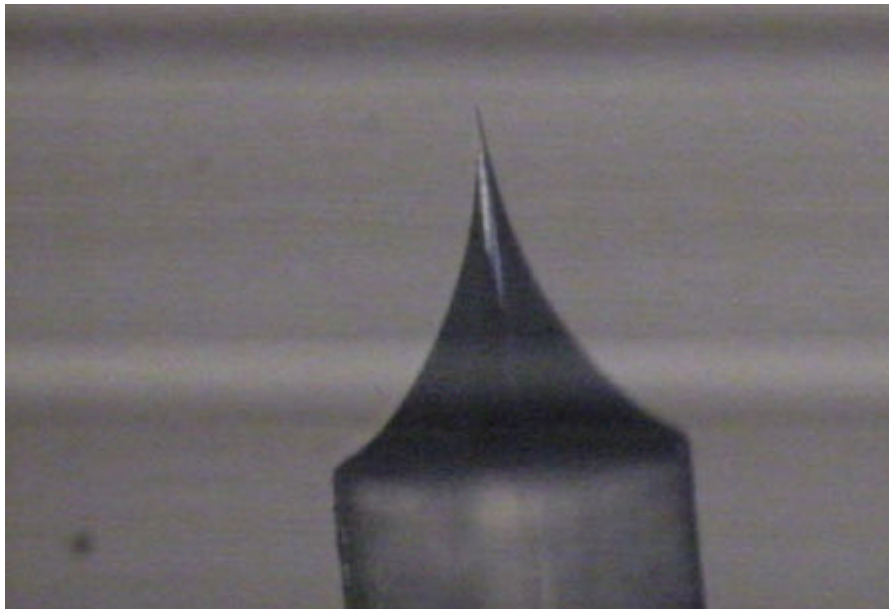


圖 2b. 使用自動斷電系統得到的鎢針，鎢絲直徑為 0.25mm。(188X)



圖 3a.退火處理前，黃金表面並無晶格面。(325X)

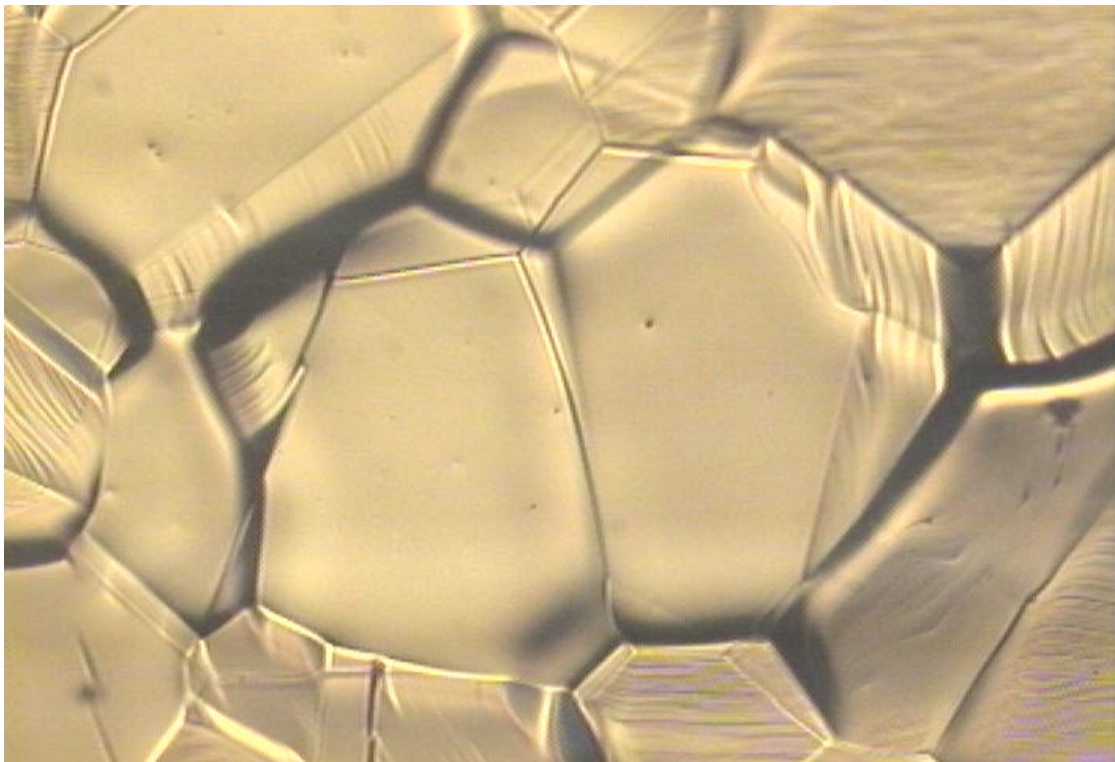


圖 3b.退火處理後，黃金表面有許多晶格面形成。(325X)

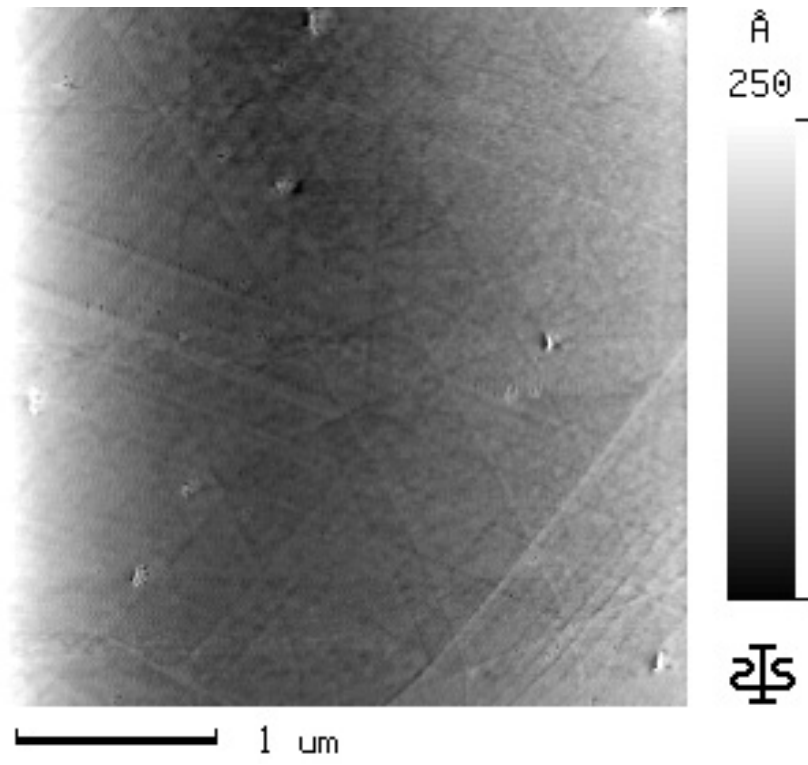


圖 4a. Au(111) 的晶格紋路。

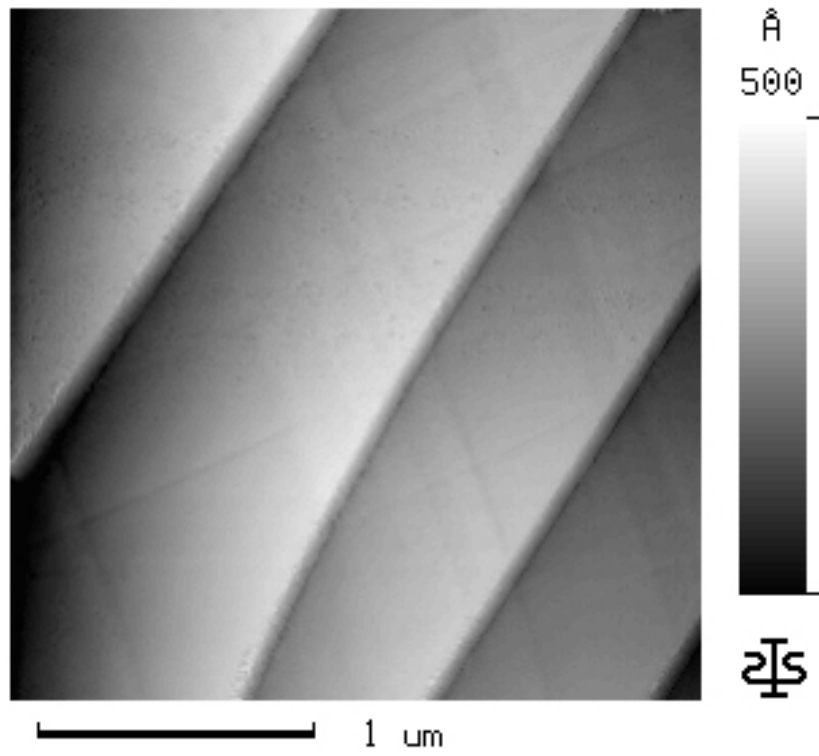


圖 4b. Au 晶格階梯。

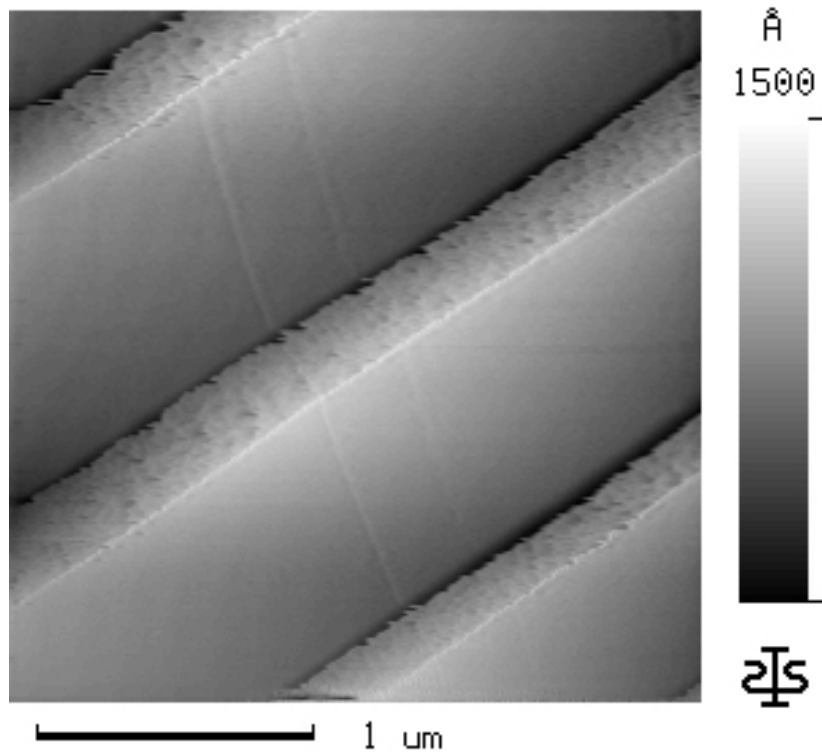


圖 5a. 均勻的 Cysteamine 散佈在 Au 晶格階梯上。

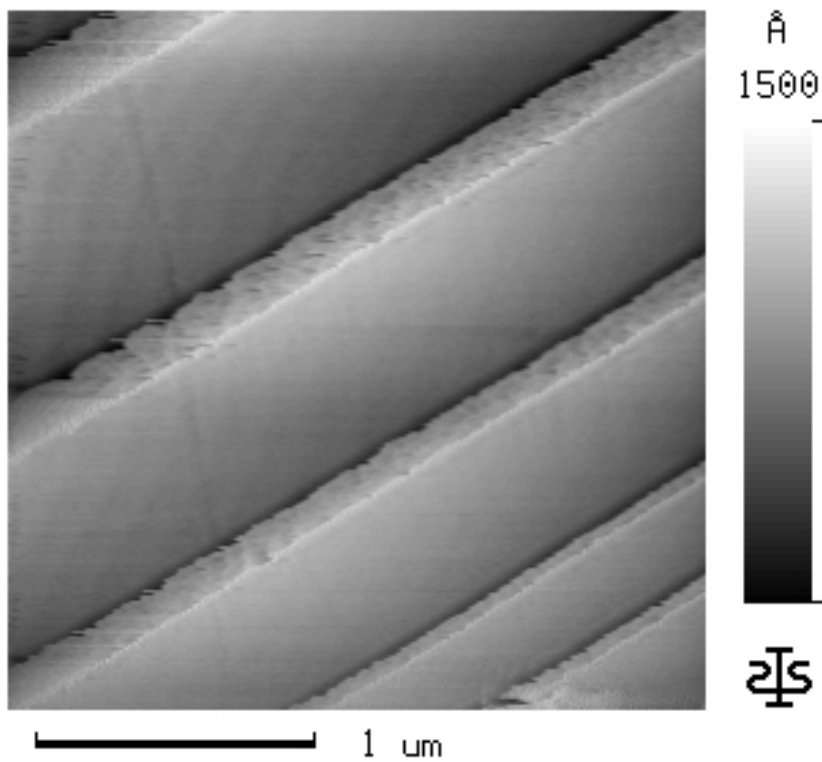


圖 5b. 均勻的 Cysteamine 散佈在 Au 晶格階梯上。

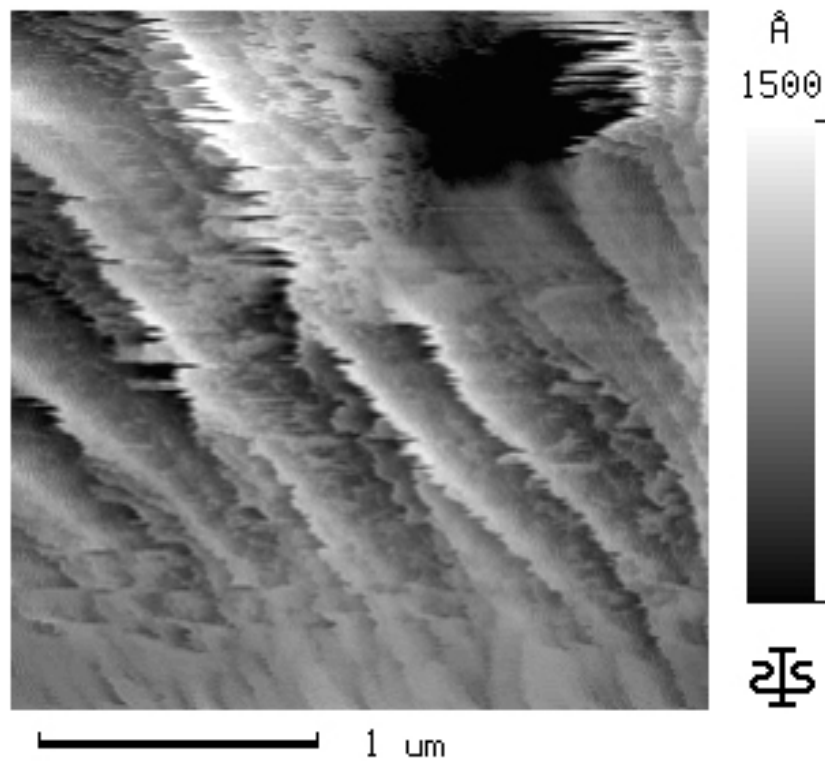


圖 6. 較厚的 Cysteamine , 已看不見金的表面結構。

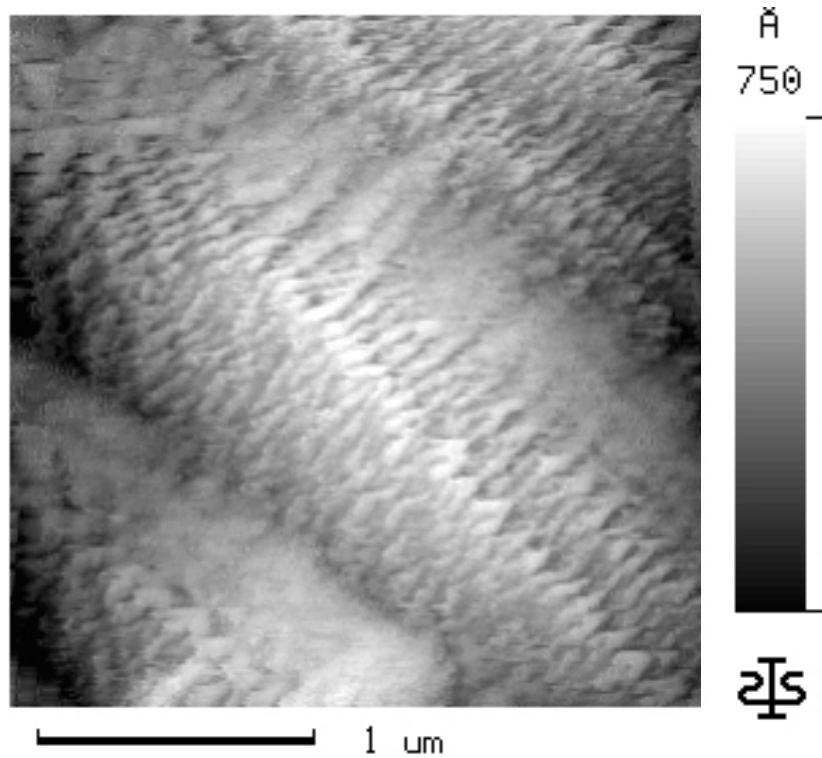


圖 7a. 附著在金表面的 Cysteamine，有無法確認的絲狀紋路
(STM 在去離子水中掃描的影像)。

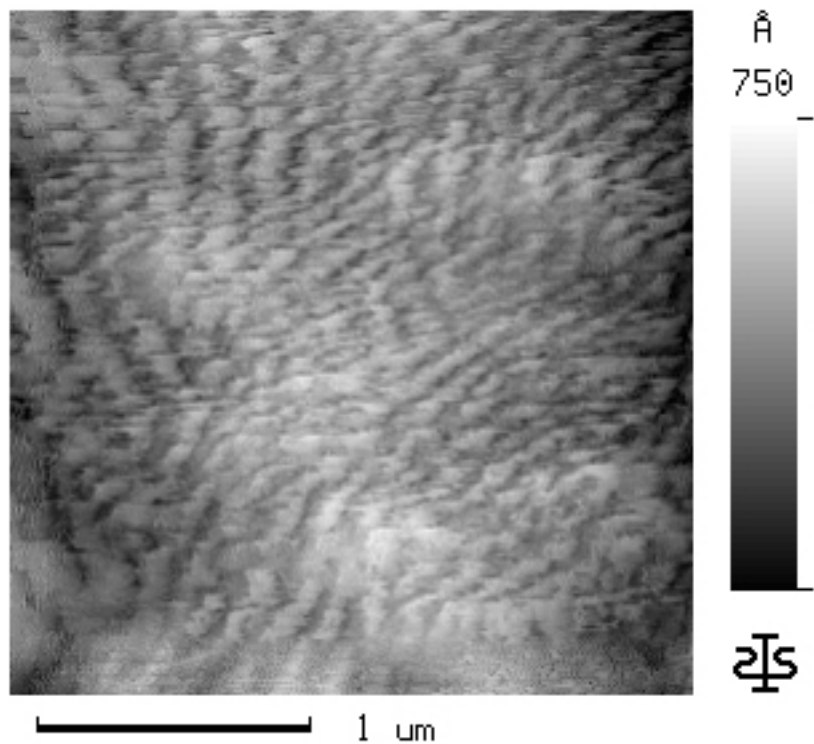


圖 7b. 無法清楚看到黃金表面 (STM 在去離子水中掃描的影像)。

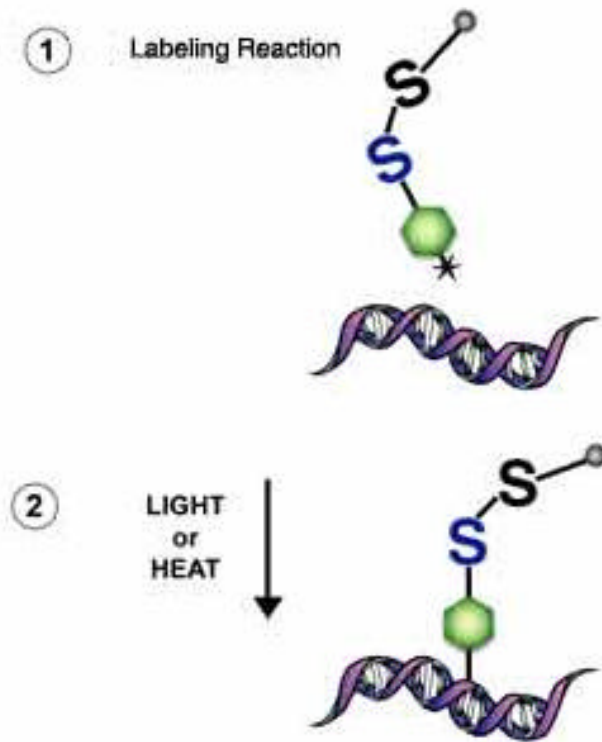


圖 8. FastTag 利用光觸發反應，以共價鍵連結到 DNA 分子上。

(示意圖) (Vextor Labs. 1976)

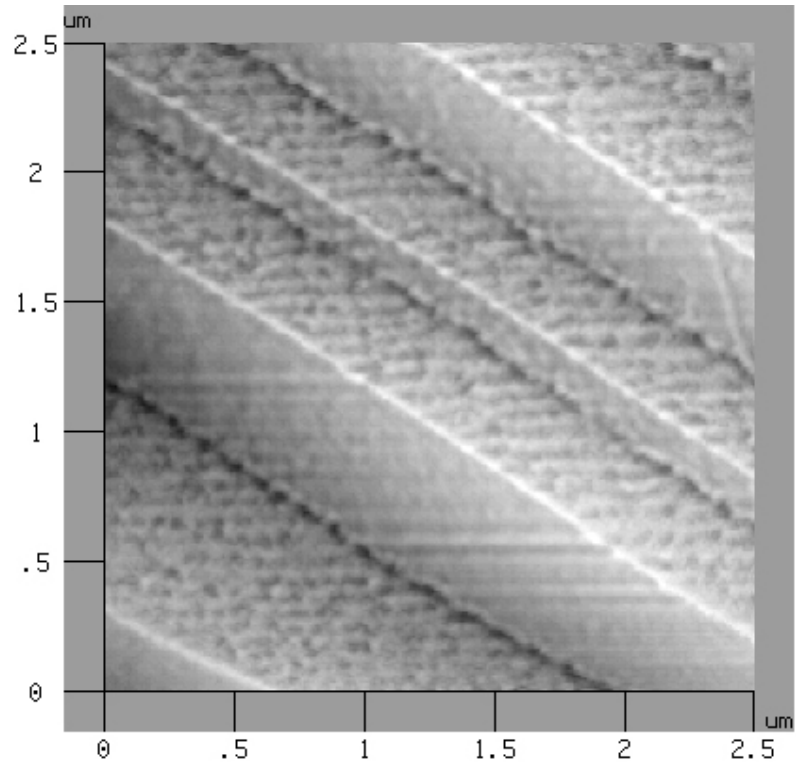


圖 9. 一層 DNA 如網狀一般吸附在黃金晶格階梯上。

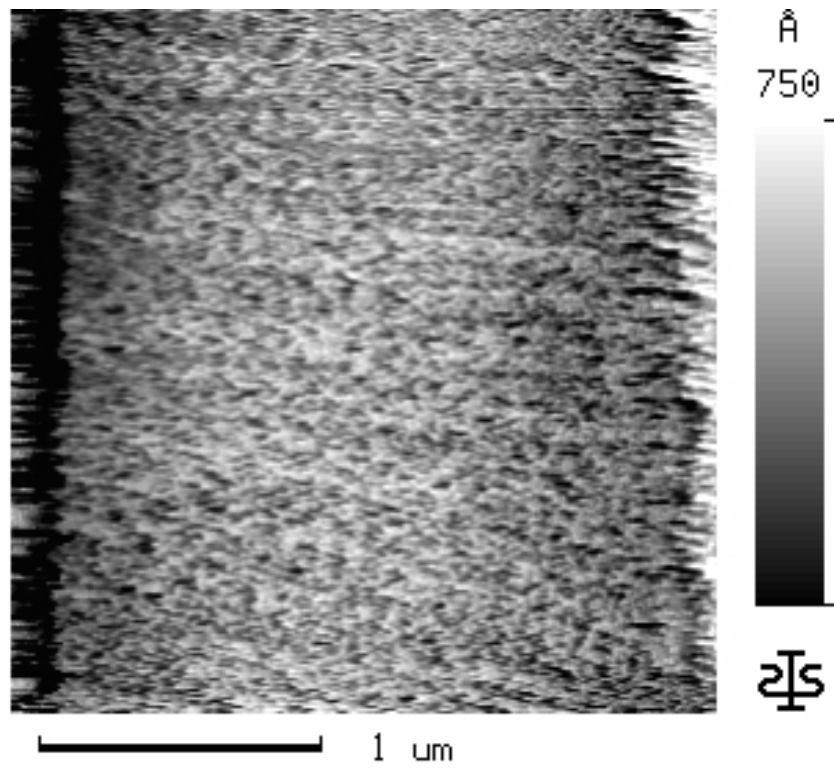


圖 10. 密密麻麻的 DNA 吸附在黃金表面上。

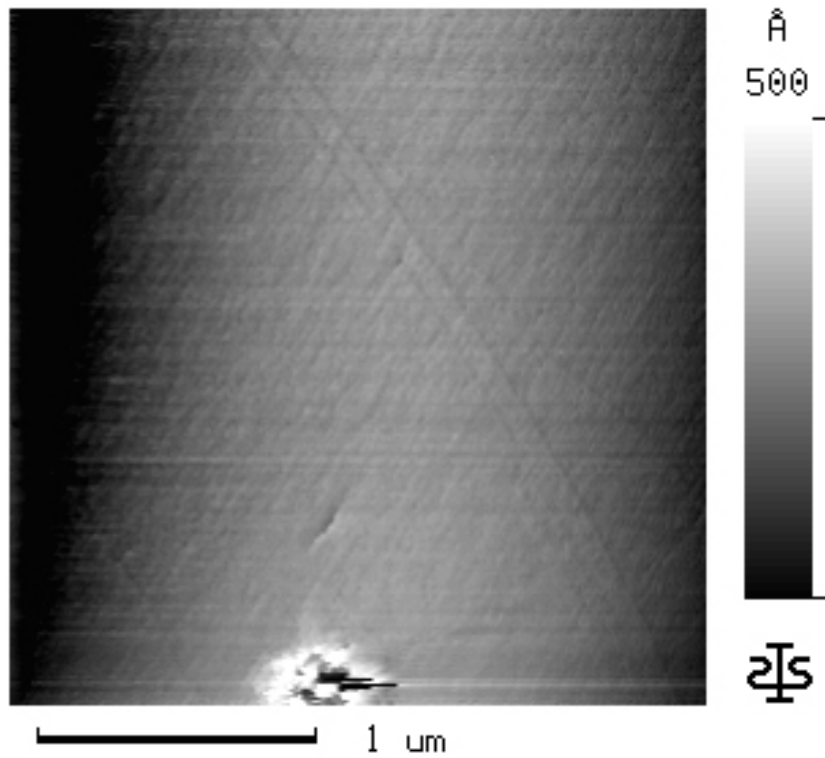


圖 11a. 一層 DNA 吸附在黃金表面上比較 ab 可明顯看出 DNA 的散佈

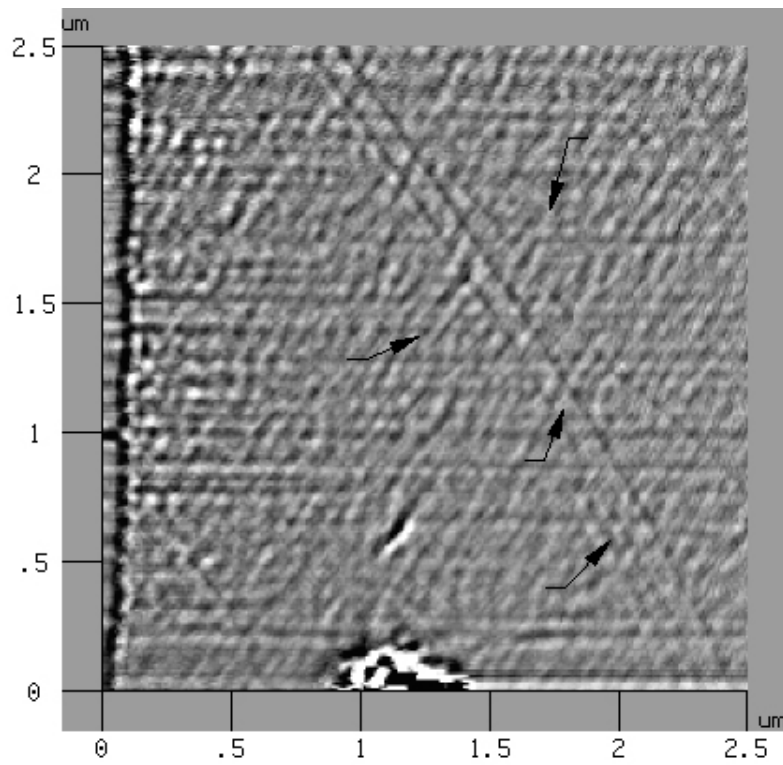


圖 11b. 圓圈型的 DNA 散佈在其中。(如箭頭所示)

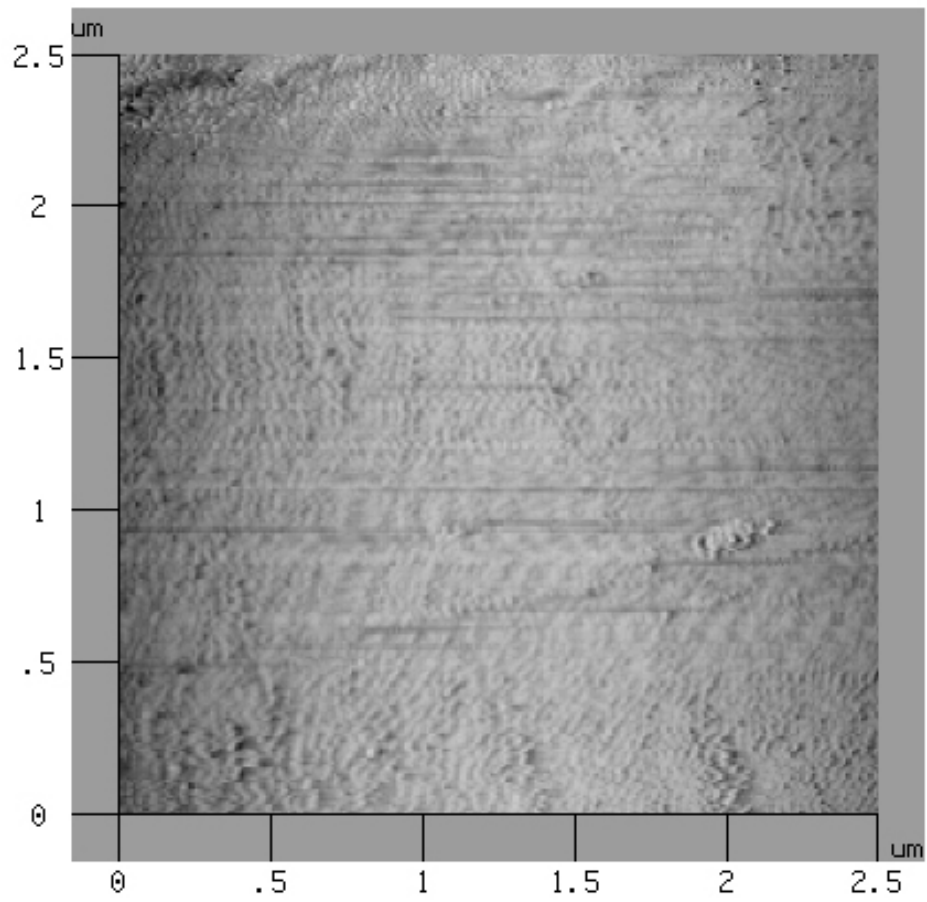


圖 12. 在黃金表面上單獨留下的清晰 DNA 分子，捲曲在一起。

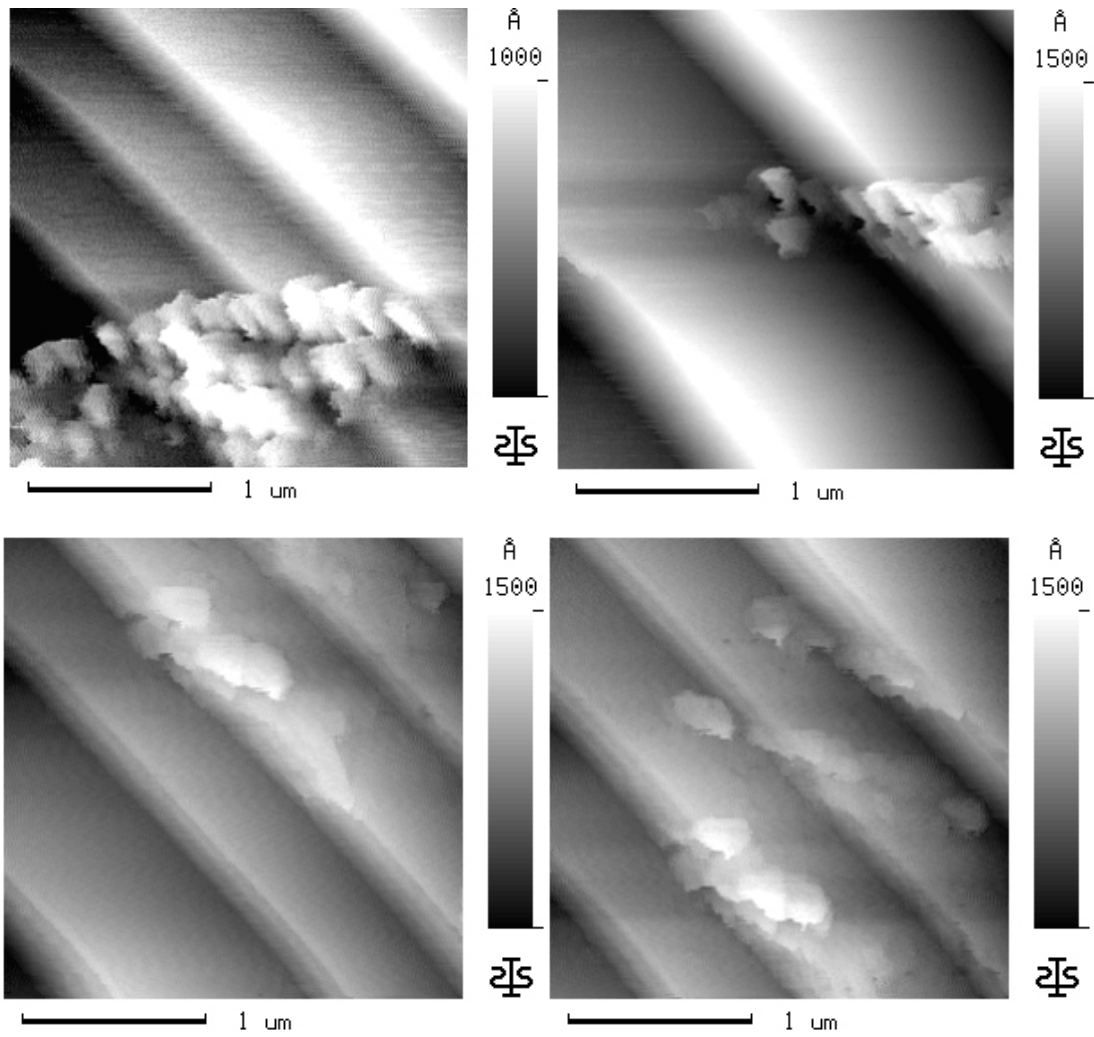


圖 13. 在 Au 基板的階梯上看到許多的球狀物，不論大小或是形狀都很相近。這些就是 X174RF-II DNA 經過凝聚之後所形成的 Condensation unit。

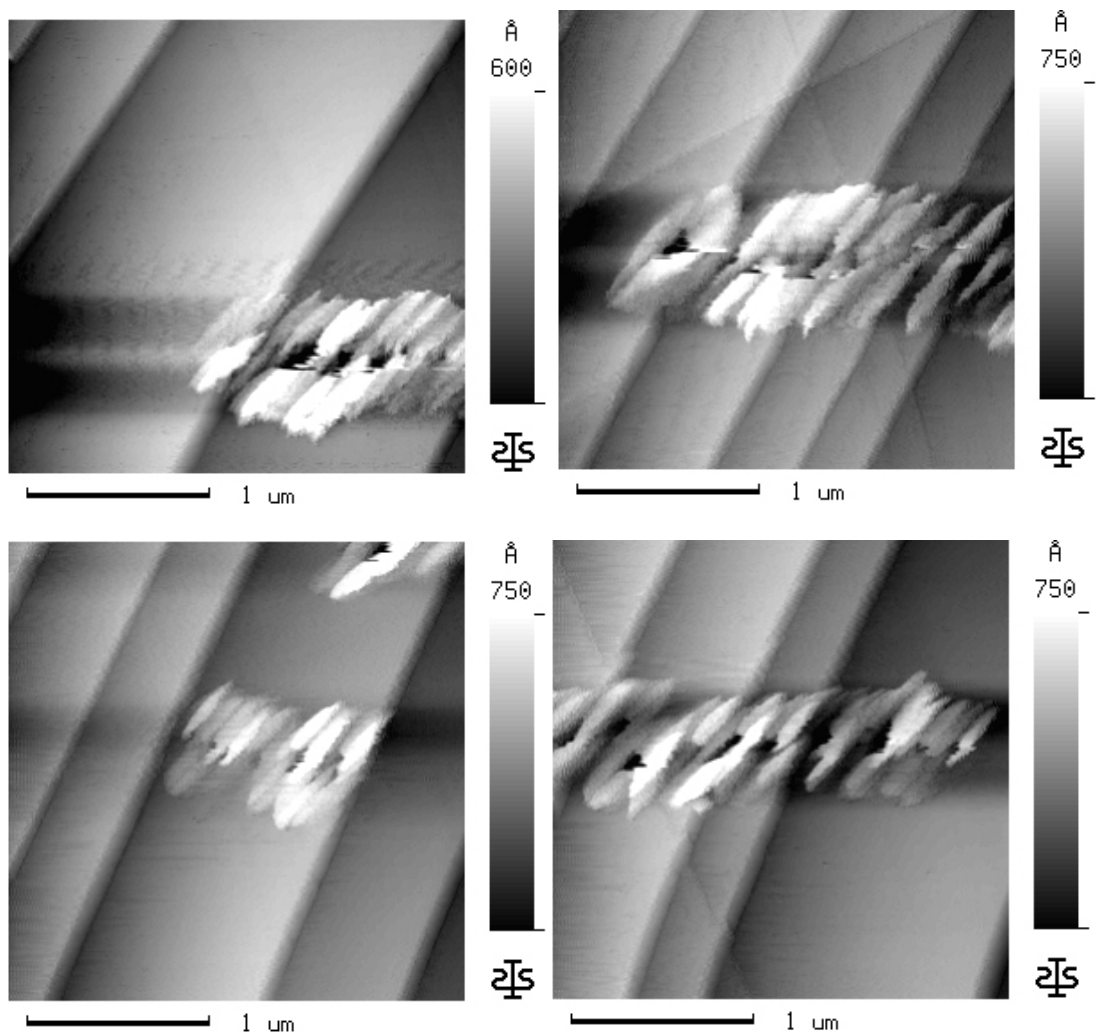


圖 14. 在黃金晶格階梯上， λ -DNA 的 Condensation unit。每一個 Condensation unit 的大小、形狀都十分接近。

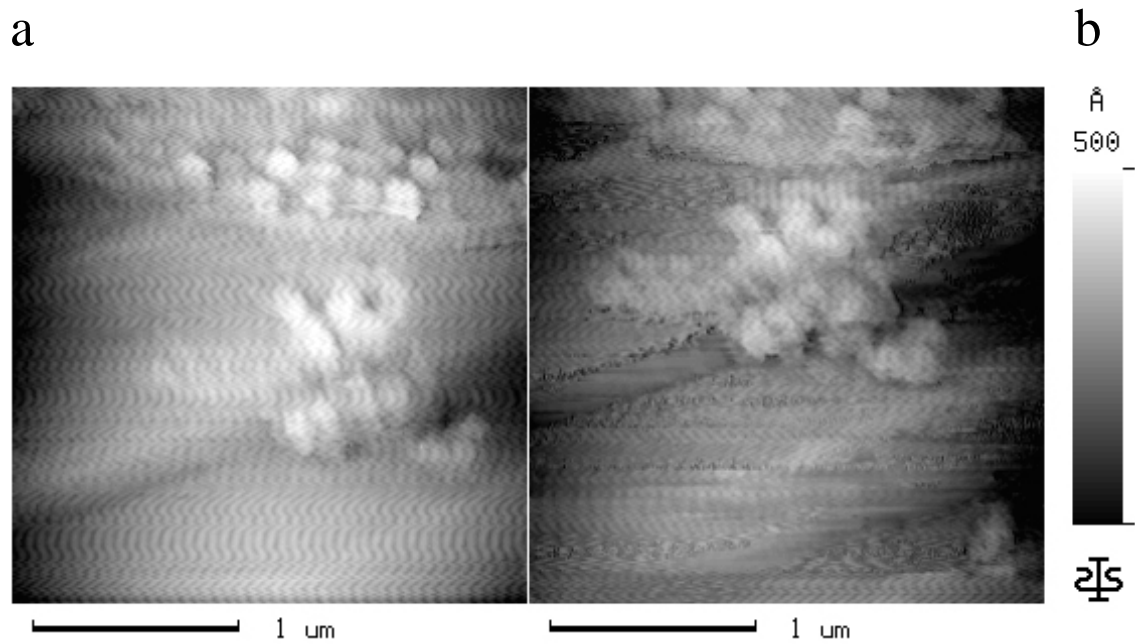


圖 15. 在初始掃描得到圖 15a，一小時後在相同位置掃描得圖 15b。

比較兩圖發現，經過一小時後樣本更為乾燥時，掃描的影像更為清晰。由此可見，水份對 STM 掃描的影響。

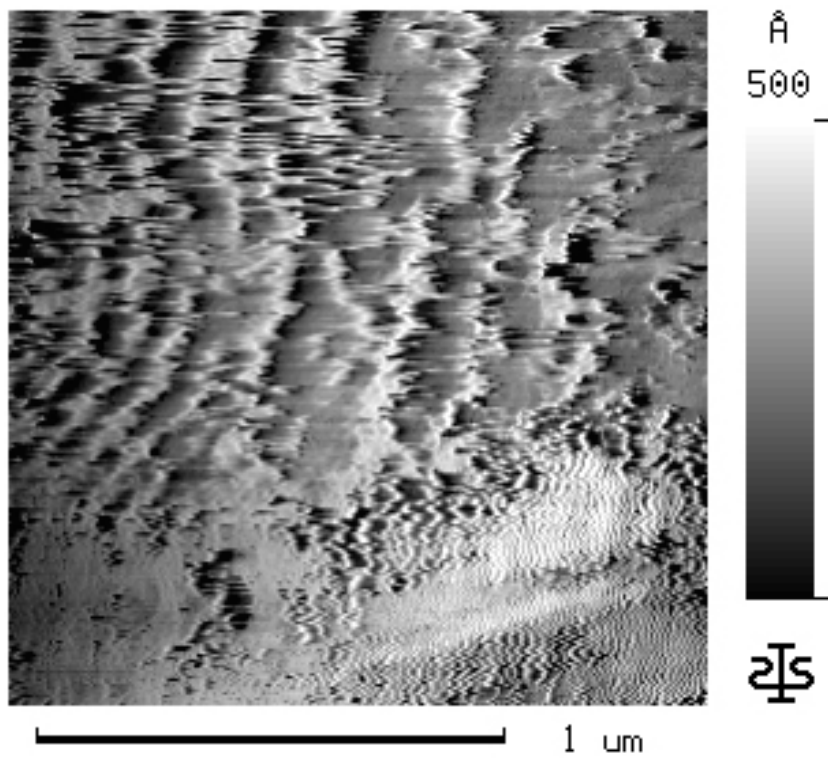


圖 16. 由圖中可明顯看出，上半部有 DNA 分佈。帶有水份的 DNA 會使影像清晰受到影響。

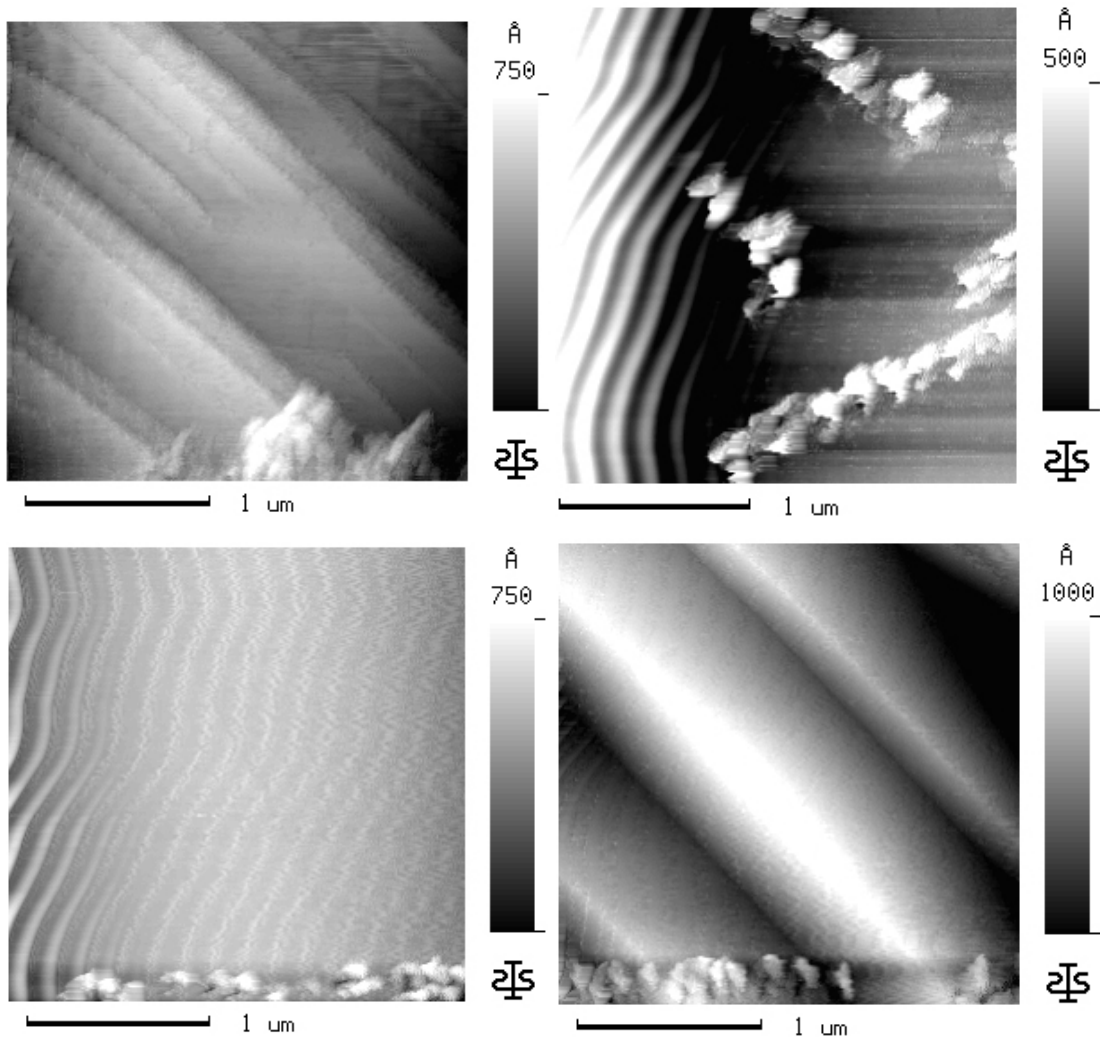


圖 17. STM 在去離子水中，掃描的 Condensation unit 與大氣中掃描的影像相近，DNA 的分佈密度也一致。在去離子水中，也可以得到良好的掃描影像，看見清楚的黃金特徵。

作者簡歷

- 徐中文
- 性別：男
- 生於 1979 年 8 月 18 日
- 新竹縣竹東鎮客家人
- 學歷：新竹省立高中畢業、私立東海大學物理系畢業、私立東海大學物理系碩士班
- 現為東海大學物理系研究所 研究生，即將畢業。