

國立台灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics.

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

金屬奈米粒子標記於 DNA 微陣列晶片應用

Application of Metal Nanoparticles (MNPs) Labeling to

DNA Microarray

The logo of National Taiwan University is a circular seal. It features a central bell (the symbol of the university) surrounded by a wreath. The outer ring of the seal contains the university's name in Chinese characters: '國立台灣大學' at the top and '勵品學安' at the bottom. The seal is rendered in a light gray, semi-transparent style.

吳政舉

Cheng-Chu Wu

指導教授：宋孔彬 博士

Adviser: Kung-Bin Sung, Ph.D.

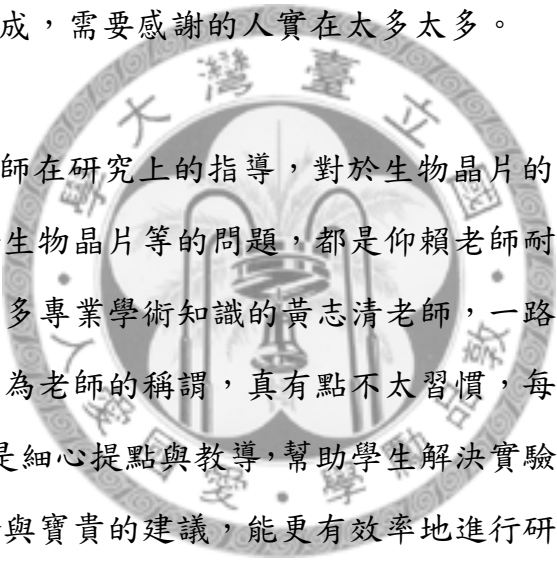
中華民國 98 年 7 月

July, 2008

謝誌

最先感謝宋孔彬老師的耐心指導、諄諄教誨及研究上的協助，必且包容學生在研究的路上總總愚拙，使學生能夠以更積極的態度學習、研究，學習著如何獨立思考、培養解決問題能力，以及賦予學生自由的研究空間；同時以身作則建立起實驗室裡相處融洽的優良環境，令學生受益匪淺，而論文也得以順利進展。

這本論文的完成，需要感謝的人實在太多太多。



感謝莊曜宇老師在研究上的指導，對於生物晶片的背景提供相當多的指點，每每有關於生物晶片等的問題，都是仰賴老師耐心的教導。感謝在化學方面給予相當多專業學術知識的黃志清老師，一路上從博士後的學長稱呼到後來須改口為老師的稱謂，真有點不太習慣，每在研究之間需要化學專業背景時，總是細心提點與教導，幫助學生解決實驗上的困難與問題，並提供自身的經驗與寶貴的建議，能更有效率地進行研究。感謝從大學便總是讓我不斷打擾的林乃君老師，每每遇到學術上的問題，總是向老師尋求協助，無論是在大學的專題討論，抑或是研究所之後所遇到有關生物上的問題，而老師對於論文的細心改正也讓論文內容更為充實與嚴謹。感謝李百祺所長，對於實驗上提供相當多儀器設備的支援，使實驗得以進行的相當順利。

研究所的日子，跑的實驗室也相當的多，也受到相當多人的幫助：謝謝張換宗老師實驗室博士後的決蔚學長、博士班的己維學長、宗宏學長以

及國毓學長，在化學方面的實驗提供了許多有形與無形的協助；謝謝楊啟伸老師實驗室的憨哥、傳園和敬哲，不僅僅是在生物方面的實驗提供相當多的知識與實驗步驟上的協助，更提供了一個在研究之餘可以嘴砲的好地方；謝謝莊曜宇老師實驗室博班的政瑩學長與妍君學姐，對於生物晶片方面提供許多的指點與實驗上的幫忙；感謝李百祺老師實驗室博班的寶育學長，對於儀器設備上的支援總是不遺餘力。

在這邊要特別感謝實驗室博士班的克槃學長、德玉學姐、國山學長以及碩士班的柏禎學長，在研究的路上總是讓我一問再問，而學長姐們也總是給予熱情的教導與討論，總是不厭其煩的讓我對於不會的部分從零基礎到一定程度上的熟練，特別感謝德玉學姐的協助、指導，無論是在實驗還是論文的部分，處處都有學姐伸出援手的時刻。實驗室的學長姐瑋真、連晉、俊佑，同學怡璋，學弟妹念中、俊宇和璟偉，感謝你們的支持與協助，實驗室的生活過得非常的充實，充滿著活力與歡樂，感謝辛苦的醫師們：南仔、庭嘉和振荃，跟你們多聊聊總是會有許多不同的收穫。我想說，在研究所的兩年之中，有你們真好

最後感謝的是親愛的父母，因為有您們的照顧與支持，使我能夠在安穩的環境下求學，也給予我莫大的空間可以無憂無慮地做自己想做的事，往後若能有一點成就，都要歸功於您們；弟弟振毅，感謝你在論文印製的過程任勞任怨的協助，幫助我論文後製得以順利的進行。

吳政舉

台大，仲夏

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VI
中文摘要.....	VII
Abstract.....	VIII
第壹章 緒論.....	1
第貳章 研究背景與動機.....	3
2.1 DNA 分子簡介.....	3
2.2 生物晶片簡介.....	5
2.2.1 微陣列晶片 (Microarray).....	6
2.2.2 實驗室晶片 (Lab-on-a-chip).....	10
2.3 金屬奈米粒子簡介.....	12
2.4 研究動機.....	15
第參章 文獻回顧.....	17
3.1 金奈米粒子應用領域.....	17
3.1.1 標記 (Labeling) 與成像 (Visualizing).....	17
3.1.2 輸送媒介 (A vehicle for delivery).....	17
3.1.3 生醫感測 (Biosensor).....	18
3.2 奈米粒子的光學效應.....	19
3.2.1 區域性表面電漿共振效應 (Localized Surface Plasmon Resonance).....	19
3.2.2 尺度對於 LSPR 的影響.....	20
3.2.3 形狀對於 LSPR 的影響.....	20
3.3 金奈米粒子於 DNA 之應用.....	21

3.4	奈米粒子標記技術.....	23
3.4.1	量子點 (Quantum dots).....	23
3.4.2	金奈米粒子 (Gold nanoparticles).....	24
第肆章	實驗設計與材料方法	26
4.1	實驗設計	26
4.1.1	一對一單股 DNA 於微陣列晶片上雜交反應.....	26
4.1.2	微陣列晶片上 DNA 三明治雜交反應.....	27
4.1.3	系統偵測方式：	28
4.2	材料與方法	29
4.2.1	微陣列晶片製作	29
4.2.2	奈米粒子合成	37
4.2.3	探針 DNA 修飾於金奈米粒子表面	39
4.2.4	DNA 雜交反應	42
4.2.5	微陣列晶片掃描	47
第伍章	實驗結果與討論	49
5.1	探針 DNA 修飾於金奈米粒子表面	49
5.1.1	BSA 應用於金奈米粒子表面修飾	49
5.1.2	金奈米粒子上 DNA 數量	53
5.2	金屬奈米粒子散射光譜	56
5.2.1	奈米粒子散射光譜	56
5.2.2	DNA 修飾奈米粒子散射光譜	60
5.3	DNA 三明治雜交反應 (DNA sandwich hybridization)	72
5.3.1	DNA 三明治雜交反應初步測試	72
5.3.2	傅立葉光譜儀掃描系統應用於晶片掃描	74
5.3.3	樣本濃度於系統的極限偵測	78
5.4	金屬奈米粒子與螢光分子比較	79
5.5	混合兩種奈米粒子光譜系統初步測試	80

第陸章 結論與未來建議..... 83
參考文獻..... 84



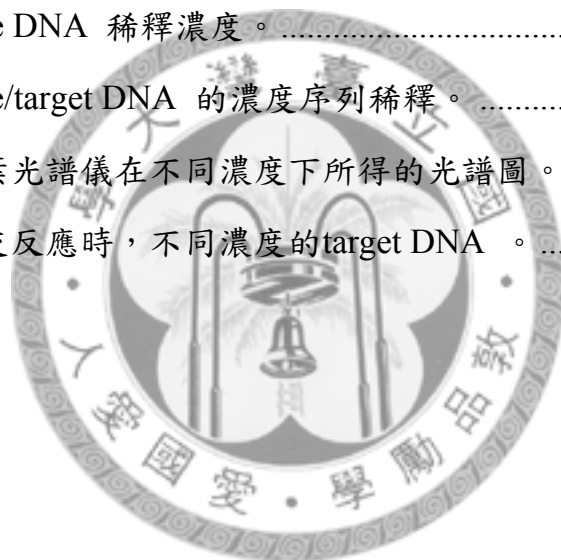
圖目錄

圖 1：四種不同的核酸鹼基。.....	4
圖 2：A 與 T、C 與 G 之間彼此以氫鍵相連。.....	4
圖 3：UV-vis extinction spectra of Ag nanoparticle arrays on mica substrates.	14
圖 4：不同大小尺寸的量子點有不同的螢光波長。.....	23
圖 5：不同大小的金奈米粒子溶液。.....	24
圖 6：capture- DNA 與 probe-DNA 雜交反應.....	26
圖 7：三明治雜交反應流程圖示。.....	27
圖 8：以醛基修飾表面為基礎之微陣列晶片製作流程圖。.....	29
圖 9：基材矽烷化改質：矽烷化反應流程圖。.....	32
圖 10：胺基基材表面進行醛基化修飾反應流程圖。.....	34
圖 11：暗視野顯微鏡示意圖與顯微鏡及掃描的晶片實照。.....	47
圖 12：傅立葉轉換光譜儀 (FTS) 示意圖 (77).....	48
圖 13：thiol- DNA (probe-DNA) 修飾於金奈米粒子表面流程圖。.....	50
圖 14：經BSA修飾及未修飾的金奈米粒子吸收光譜。.....	51
圖 15：時間對 Au-probe DNA 的影響。.....	51
圖 16：單顆金奈米粒子上的 DNA 數量。.....	53
圖 17：估計單顆金奈米粒子表面所含 DNA 數量流程圖。.....	54
圖 18：不同金屬奈米粒子散射光譜圖。.....	56
圖 19：晶片表面上 32 nm 金奈米粒子與雜質散射光譜。.....	58
圖 20：32 nm 金奈米粒子與雜質散射光譜強度。.....	58
圖 21：40 nm 銀奈米粒子與金奈米粒子的原始散射光譜信號強度差異。.....	59
圖 22：32 nm 金奈米粒子與 DNA 修飾金奈米粒子表面散射光譜圖。...61	
圖 23：在暗視野顯微鏡下所得 32 nm 金奈米粒子影像。.....	61

圖 24：40 nm 金奈米粒子平均光譜。.....	64
圖 25：40 nm 銀奈米粒子平均光譜。.....	64
圖 26：一對一單股 DNA 雜交反應示意圖。.....	66
圖 27：一對一單股 DNA 雜交反應於暗視野顯微鏡下所得影像。.....	67
圖 28：不同區域所得的32nm金奈米粒子光譜圖。.....	68
圖 29：低濃度 Au-probe-DNA 雜交反應光譜圖。.....	69
圖 30：不同濃度的 Au-probe DNA 於晶片上進行一對一單股 DNA 雜交反應 CCD 影像。.....	70
圖 31：不同濃度 Au- DNA 於晶片上的一對一的單股 DNA 雜交反應。.....	71
圖 32：三明治雜交反應實驗控制組與對照組示意圖。.....	72
圖 33：三明治雜交反應實驗控制組與對照組於暗視野顯微鏡下所得影像。.....	72
圖 34：不同Au-probe/target DNA 濃度下，散射光譜影像與測量光譜圖。.....	73
圖 35：利用傅立葉光譜儀的操作介面圖。.....	74
圖 36：商用光譜儀與傅立葉光譜儀針對單點的光譜比較。.....	75
圖 37：傅立葉光譜儀於大範圍的晶片表面金奈米粒子掃描。.....	75
圖 38：不同濃度下Au-probe/target DNA 進行三明治雜交反應強度。.....	76
圖 39：不同 target DNA 濃度進行雜交反應所得的光譜強度。.....	78
圖 40：螢光系統在不同濃度下的信號強度值。.....	79
圖 41：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米混合之 CCD 影像。.....	80
圖 42：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米之混合光譜.....	81
圖 43：暗視野顯微鏡下金、銀奈米粒子影像。.....	82
圖 44：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米混合光譜與原始單粒子光譜比較。.....	82

表目錄

表 貳-1：基因晶片研究上相關的廠商與機構。.....	8
表 貳-2：不同型式的蛋白質晶片。.....	9
表 參-1：Mirkin 團隊對於金奈米粒子應用 DNA 領域的研究.....	21
表 伍-1：Thiol-DNA 序列及相關資訊。.....	52
表 伍-2：單顆金奈米粒子紅移實驗所用之 DNA 序列.....	60
表 伍-3：金奈米粒子平均光譜紅移實驗所用之 DNA 序列.....	63
表 伍-4：Au-probe DNA 稀釋濃度。.....	69
表 伍-5：Au-probe/target DNA 的濃度序列稀釋。.....	76
表 伍-6：由傅立葉光譜儀在不同濃度下所得的光譜圖。.....	77
表 伍-7：進行雜交反應時，不同濃度的target DNA 。.....	78



中文摘要

目前在微陣列晶片 (microarray) 分析中，對於基因表現 (gene expression) 的測量與定量越來越為重要，目前最常使用的便是螢光表現量的偵測方式為架構，然而使用螢光標記時我們需要將目標物放大 (target amplification) 以期得到較為足夠的信號源，再者螢光偵測所需的儀器系統也較為複雜，而偵測上容易受到螢光本身及螢光背景值的影響，因此我們希望可以發展一套更為簡單、低成本且快速的偵測方式。

本研究目標主要為發展金屬奈米粒子 DNA 檢測平台，利用各種不同金屬奈米粒子散射光譜的不同來達到多樣信號源的目的。在本論文中主要著重在金奈米粒子於 DNA 晶片的應用，由金奈米粒子區域表面電漿共振的特性，我們可以得到其散射光譜及粒子影像。論文中提出了金奈米粒子應用於 DNA 晶片的製備流程：包括晶片表面修飾、金奈米粒子與 DNA 的三明治交反應流程、估算金奈米粒子表面 DNA 分子數、金奈米粒子應用的偵測極限以及不同奈米粒子的初步實驗結果。

與 Cy3 螢光標記方法互相比較，本論文提出的金屬奈米粒子光學標記方法，大約有 1000 倍靈敏度的增加。利用本實驗室所發展的傅立葉光譜儀系統掃描，可達到大面積的散射光譜掃描，與商用的微陣列晶片掃描儀器比較，也較為簡便且成本為低。

本研究所發展的金屬奈米粒子 DNA 檢測平台，利用實驗室所建構的傅立葉光譜儀光譜掃描，可以讓我們達到低成本、快速掃描且高靈敏的偵測方式。

關鍵字：微陣列晶片、金奈米、DNA、散射光譜

Abstract

DNA microarray is a powerful tool allowing simultaneous detection of many different target molecules present in a sample. By using these techniques, large-scale parallel analyses can be performed in short time periods. Fluorescence technology has been the gold standard for detection of DNA on microarrays due to its high sensitivity, dynamic range, and multiplexing capabilities. Despite these attributes, fluorescence labeling typically requires target amplification to obtain sufficient amounts of target and complex instrumentation is needed for detection, ultimately limiting its utility in the applications described above.

The development of a metal nanoparticle-based detection methodology for sensitive and specific DNA microarray is described. The technology utilizes gold and silver nanoparticles derivatives with thiol modified oligonucleotides that are designed to bind complementary DNA targets. Scattered light from nanoparticle-tagged biomolecules can be imaged and quantified extremely sensitively. It allows for detection and quantization by measuring evanescent wave induced light scatter with low-cost optical detection systems. Compared to

Cy3-based fluorescence, gold nanoparticle probes provide for a ~ 1000 -fold increase in sensitivity.



Key words: microarray, gold nanoparticle, DNA, scattering spectra

第壹章 緒論

在一八六五年，孟德爾（Gregor Johann Mendel, 1822~1884）《雜交實驗》之論文 (1) 建立起世人對基因的概念，並開啟了人類對於基因的研究。

基因，是 DNA (Deoxyribonucleic acid) 分子上一段核苷酸 (nucleotide) 的順序，負責著遺傳信息傳遞。每個基因由成百上千個核苷酸所組成，一個 DNA 分子可以包含幾個乃至幾千個基因 (2)。生命現象的基礎都建構在基因之上，包括了生物的生長、發育及遺傳等各種不同的生理現象及生化反應 (3)。在生物體中，基因的表現千變萬化，各式複雜的基因調節及生化代謝網路，沒有辦法用個別或少數的基因來解釋完全。為了瞭解生物的各种生命現象，就必須先了解基因在不同的情況下如何的表現；因此，有了北方墨漬雜交法 (Northern hybridization) 的發明，用以偵測特定基因的表現情形。隨著基因序列不斷的被定序出來，到了九零年代，科學界已經能夠了解的基因約有五千個；科學家利用基因在染色體中的密度間接估算，明顯地指出生物體內基因數量之龐大，而一次只能針對一個基因進行研究的北方墨漬雜交法顯然不符需求。

在美國官方推展人類基因體計畫的推行下，科學家們完成了三十億鹼基對的解讀，也讓我們有機會得以了解基因遺傳密碼背後的全貌 (4)；而隨著基因體計畫所發展出來的生物晶片技術，可以迅速達到基因功能的分析，這也帶動了生物晶片技術之更新，使功能基因體學 (functional genomics) 分析也成為二十一世紀最熱門的研究主題之一。

生物晶片影響深遠，除了其發展必須將微機電、光電、化學、生化、醫

學工程及分子生物學、計算機科學等融合為一體，成為一高度交叉的新技術，用以執行醫療檢驗、環境檢測、食品檢驗、新藥開發、基礎研究、軍事防禦、化學合成等用途，具有重大的基礎研究價值，也能夠明顯的看到產業化前景。由於使用生物晶片的技術可以將不同的探針同時固定於基質上，所以科學家可以在一次的實驗內，對不同的生物分子進行檢測與分析，從而解決傳統核酸墨漬雜交法（Southern Blotting、Northern Blotting）等技術複雜、自動化程度低、檢測目標分子數量少、低通量（low throughput）的不足。目前生物晶片技術包括了微陣列（microarray）、基因晶片（DNA chip）、蛋白質/抗體晶片（protein/antibody array）、及實驗室晶片（lab on a chip）等，其中基因晶片是發展及應用較為成熟的技術，已經被廣泛的應用在生物醫學領域上，為現代醫學科學及醫學診斷學的發展提供了強有力的工具，使新基因的發現、基因診斷、藥物篩選、給藥個性化等方面取得重大突破。在本論文所著重探討的便是基因晶片這一部份。



第貳章 研究背景與動機

2.1 DNA 分子簡介

1952 年 X 光晶體專家魏爾金斯 (Marice Wilkins, 1916-2004) 和富蘭克林 (Rosalind Franklin, 1920—1958)，初步測量出 DNA 是一種聚合物，包含了許多重複的去氧核糖 (deoxyribose)、磷酸、4 個有機鹼基等。華生 (James Watson, 1928—) 和克里克 (Francis Crick, 1916—2004) 兩位依據富蘭克林所拍攝的 X 光繞射圖及其相關資料，開始推敲 DNA 的結構，在 1953 年提出了最早的 DNA 結構精確模型 (5)。DNA 的結構確認，奠定了基因、醫學和分子生物的基礎，了解生物都利用相同的 4 個鹼基「密碼」語言來經營「生命」。

在了解 DNA 結構之後，科學家們也發現：DNA 的鹼基順序決定了蛋白質的胺基酸順序，如同一種遺傳密碼 (genetic code)，依照 DNA 上鹼基的排列順序指示，便能夠構成特定生理運作的蛋白質。每三個鹼基成為一密碼子，每一密碼子都暗示著一種特定的胺基酸。於是，我們了解，特定的基因在細胞核內先轉錄成 mRNA，mRNA 攜帶著來自 DNA 所賦予的訊息，在細胞質中轉譯合成出特定功能的蛋白質，進行指定的生理功能運作，以完成最初基因的指令。有時，一個異於正常的鹼基都會造成基因序列的改變，這可能導致嚴重的生理缺陷。因此，藉由 DNA 的篩檢技術，可及早發現基因缺陷造成的遺傳疾病，以達及時治療的目的。

DNA 是由四種核酸所組成而成，核酸分子可分成三個主要的部份：鹼基、五碳糖及磷酸根，而每個部份之間利用共價鍵互相連結在一起。在這四

種核酸內，分別含有不同的鹼基，分別是：腺嘌呤（adenine, A）、鳥糞嘌呤（guanine, G）、胸腺嘧啶（thymine, T）和胞嘧啶（cytosine, C）。由於特定化學結構上的吻合，鹼基與鹼基之間可藉由氫鍵作用力，將 A、T 與 C、G 之間形成特定的配對，在 A、T 之間形成兩個氫鍵鍵結，而 G、C 之間形成三個氫鍵鍵結。這樣特殊的配對模式便構成我們常聽到的 DNA 雙股螺旋體結構。

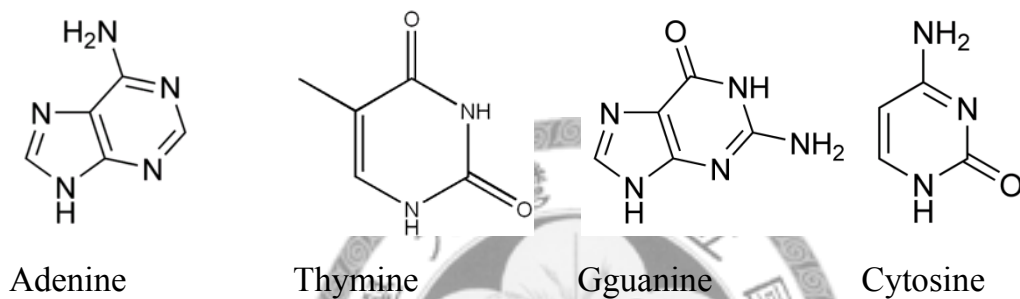


圖 1：四種不同的核酸鹼基。

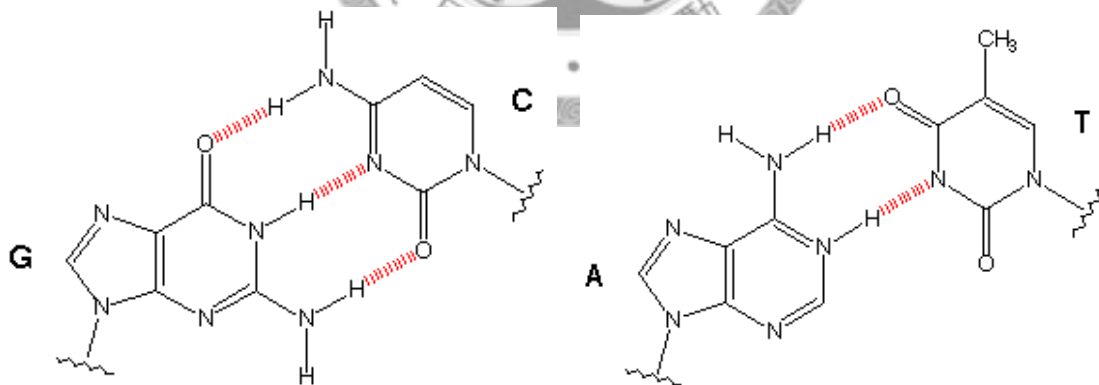


圖 2：A 與 T、C 與 G 之間彼此以氫鍵相連。

因為特定鹼基配對組合的緣故，科學家可由一股已知的 DNA 序列推測出另一股互補的 DNA 序列。例如，序列為 5'-ATCGATCG-3'，則其互補序列可知為 3'-TAGCTAGC-5'。當兩者序列完全吻合時，其兩股 DNA 之

間的氫鍵吸引力為最強；相對的，若有一個鹼基甚至更多的鹼基無法完成配對，就會使雙股 DNA 之間的吸引力減弱，甚至無法互相吸引。而利用兩條單股 DNA 之間的鹼基互相配對，形成雙股螺旋形式的鹼基配對結合過程，在學術上的名詞稱作「雜合反應」(hybridization)，利用這樣的特性，科學家可以對特定的 DNA 進行基因檢測。基因晶片的檢測原理，就是利用這種鹼基互相配對結合來作為基礎，而目前生物晶片發展迅速且成熟，使得以往要花數年才能完成的基因調控表現量的分析，利用此項新科技在一星期內便可檢測成千上萬個基因在各種不同疾病狀態或是藥物影響下的活性變化。

2.2 生物晶片簡介

從早期的放射免疫檢測法 (Radioimmunoassay, RIA)、酵素結合免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，及直到最近的核酸探針分析法 (DNA Probe Analysis)，在生醫檢測上的發展都是朝著降低成本、提高靈敏度、微量分析及快速檢測等方向努力。在人類基因體計畫展開之時，傳統的檢測方式已不能負荷科學家們的需求，隨之因應而生的便是“生物晶片”技術。利用這樣的技術，科學家們可以在短時間內完成大量篩檢、平行分析的檢測，同時具有高靈敏度與低樣品量的優勢，更進一步的可以運用分子生物學、基因資訊、分析化學等原理進行設計，以矽晶圓、玻璃或高分子為基材，配合微機電自動化、奈米科技或電性量測等等來製作高科技元件，有如半導體晶片一般能快速進行繁複運算，來達到最佳化的目的，使生物晶片具有更快速、精確、低成本之生物分析檢驗優勢。

2.2.1 微陣列晶片 (Microarray)

Brown 的研究團隊於1995年首度提出微陣列晶片的研究原理 (6)，經過這幾年的持續發展，加上它的實驗花費，包括晶片及周邊儀器價格的逐年降低，使得微陣列分析在運用上變為更加地廣泛。簡單的說，所謂的微陣列技術，是指在微小面積的基材上植上高密度的生物探針，已進行大量篩檢與平行分析，而微陣列晶片上面所置放的生物探針，一般為互補 DNA (complementary DNA, cDNA)、基因體DNA片段，可適用於大量基因表達、篩檢及比對等研究，在基因檢測、基因表現比較、突變分析、序列分析及新藥物開發等都有廣泛的應用 (7-12)。

流程大致如下 (1) 經由聚合鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)，配合化學方法操作，將 DNA 固定於載玻片之上。(2) 分為實驗組與對照組，將 DNA 以不同波長的螢光分子標示，與載玻片上的基因進行雜交反應 (hybridization)。(3) 以雷射光激發後，偵測放射出來的兩種波長螢光用來估量基因表現的程度。此為目前技術最成熟，使用最廣泛的生物晶片類型。

而廣義的生物晶片則是以上述所提的微陣列晶片技術作為基礎，應用的範圍相當廣泛，視其上所放置之探針材料與性質又可分為：基因晶片、蛋白質/抗體晶片、組織晶片及實驗室晶片等，其製作方式及內涵各有不同，僅就常見的基因晶片與蛋白質晶片做介紹。

2.2.1.1 基因晶片 (Gene Chip)

基因晶片又稱 DNA 陣列 (DNA array) 或 DNA 晶片 (DNA chip)。是一塊帶有 DNA 微陣列塗層的特殊玻璃片，經由一次檢驗，即可提供大量基因序列相關資訊。基因晶片之製作方法係以光刻 (photolithography) 技術直接在玻璃或矽晶片上合成特定序列的寡核酸 (Oligonucleotide)，再以螢光分子標記待測物進行雜交反應，藉由分析完全配對 (Perfect match) 與錯誤配對 (Mismatch) 的寡核酸雜交訊號差異，便可計算出基因表現的強度及差異。此亦為技術成熟的生物晶片類型之一，目前在基因晶片研究上有名的廠商與機構如表 貳-1 所示。

2.2.1.1 蛋白質晶片 (Protein Chip)

目前蛋白質晶片主要分為三種形式，如表 貳-2 所示。利用微陣列晶片檢測 DNA 片段的觀念，亦可應用於蛋白質的檢測。因此，蛋白質微陣列晶片的設計與製作，與 DNA 晶片頗為類似。先將成千上萬種蛋白質植入固定在數微米見方的格子中，檢測樣品中的各種蛋白質，會與固定在微陣列的特定蛋白質反應。如同 DNA 微陣列的偵測方法，樣品中的蛋白質已事先以螢光官能基標籤以便呈色。再使用顯微鏡放大成像，完成偵測。蛋白質之間的反應，通常是利用抗體與抗原之間特殊的辨認機制來完成，此與 DNA 片段利用各種鹼基對之間特定的對應關係決定序列不同。

到目前為止，對於所有關於疾病發生與進展的蛋白質，其抗原對抗體的辨識反應並非都已充分了解。此外，這些抗體的合成與純化技術，亦非完全純熟。因此，必須等到抗原蛋白質研究與抗體製備技術獲得突破性進展後，

微陣列蛋白質晶片的技術才會廣泛應用於多種新藥的研究上。

表 貳-1：基因晶片研究上相關的廠商與機構。

Company	Introduction
Affymetrix	全美第一家發展 DNA 晶片技術的公司，並且擁有 DNA 晶片製造技術的專利權。晶片以光阻微影 (photo-resist lithography) 方式所製成，每個探針約有20-25mer。
Nanogen	致力於發展電子 DNA 晶片的技術。其發展的晶片的面積小，且利用電子吸引力原理，雜交 (Hybridization) 時只需15秒即可完成。
Sequenom	具特殊偵測技術，利用雷射光激發不同重量檢品。系統靈敏度達到可檢定出只有一個分子大小的差別。可應用於大規模的篩選人類族群中單一核醣核酸的個體差異 (single nucleotide polymorphism, SNP)。
Illumina	DNA 晶片是目前號稱上面探針密度最高的晶片。最大優點是這種晶片面積小、製造簡單。
Hyseq	第一個把 DNA 晶片應用在基因定序上的公司。整個方法的原理是把所有可能的核醣核酸基序列放在晶片上，然後將未知的基因放在晶片上，應該只有序列完全相同的探針可以與之互補，因而得知未知基因的序列。

表 貳-2：不同型式的蛋白質晶片。

Type	Introduction
Pure protein arrayed “Functional Array”	large-scale functional chips (target protein arrays) constructed by immobilising large numbers of purified proteins and used to assay a wide range of biochemical functions, such as protein-protein, protein-DNA, protein-small molecule interactions and enzyme activity, and to detect antibodies and demonstrate their specificity.
Protein binders arrayed “Capture Array”	the analytical capture arrays carry affinity reagents, primarily antibodies, but may also be alternative protein scaffolds, peptides or nucleic acid aptamers, and are used to detect and quantitate analytes in complex mixtures such as plasma/serum or tissue extracts.
Complex samples arrayed “Reverse Array”	lysate (reverse protein) arrays in which the complex samples – such as tissue lysates - are printed on the surface and targets then detected with antibodies overlaid on them.

2.2.2 實驗室晶片 (Lab-on-a-chip)

所謂的實驗室晶片泛指能整合多種化學、生物分析功能於單一小型晶片上，即是以一個晶片來完成一般實驗室所進行之生化分析，利用半導體製程、微機電等技術將小至幾個微升 (microliter) 甚至奈升 (nanoliter) 容積的液體，導入佈滿毛細管道的晶片中，讓液體在設計好之微小環境中進行與一般實驗室相同的反應工作在此系統上可包含待測物的純化、反轉錄及聚合鏈鎖反應、核酸標記、基因晶片雜交及偵測反應等，亦即所謂微型全分析系統 (Micro-totalanalysis systems, μ -TAS) 的概念。實驗室晶片與一般實驗室設備相比，其優點為：

1. 結構簡單，所需之反應物及試劑均大量減少，實驗成本大幅降低。
2. 反應時間短，實驗效率提高。

本論文的研究方向便是著重 DNA 微陣列 (DNA microarray) 上進行討論。近年來 DNA 微陣列的技術已經在各領域被有效且廣泛的應用，例如基因監控 (13)、疾病檢測、單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism) (14-18) 及 DNA 定序 (19) 等，而具體且精確的將基因表現量化，對於基礎的藥物開發與臨床研究也變得日益重要。這是因為技術本身的多重檢測性、高速處理程序還有低成本的優勢。

現行商用化的基因晶片掃描系統普遍採用的是以 Cy3、Cy5 雙色螢光掃描系統。以 GenePix 4000B scanner (Axon instruments) 為例，利用兩束雷射：cy5 channel 雷射波長為 635 nm，cy3 channel 雷射波長為 532 nm，激發產生雙色螢光顯示，其中一組為實驗組、一組為對照組。

如果可以在這樣的架構之上增加雷射激發的數目，那麼便可以增加系統的偵測模式 (20)。不過，若採用多發雷射激發系統，必須考量幾個因素：(1) 多發雷射激發的設計會增加系統本身的成本，(2) 多發雷射的激發會有光譜重疊 (overlap) 的現象，為了改善光譜重疊的情況，近來的研究結合了量子點技術，可以使偵測的標記數增加 (21)，在此我們希望可以發展出另外一種偵測方法以改善傳統的雙色螢光系統。



2.3 金屬奈米粒子簡介

奈米科技無疑是近十年來眾所矚目的新興領域。尤其最近幾年，世界各國競相投入大筆經費，更說明了它的重要性。

所謂奈米，指的是一長度單位，奈米的英文全名是 nanometer，簡寫為 nm，它與微米 (μm) 同樣是長度的單位。奈米代表一個為十億分之一公尺的尺寸大小，也就是 $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$ 。一奈米大約是 10 個氫原子的併排寬度，若以人類身體構造為例，頭髮的平均直徑大約在 350 微米 (10^{-6} m) 左右，也就是說約有 350,000 奈米，紅血球的直徑約為 7,500 奈米。

奈米科技是科學家近十幾年來為人類知識所開發出來的一項新領域，也就是探討與奈米材料有關的物理、生物與化學性質的學問。奈米材料和一般的材料又有什麼不同？顧名思義，奈米材料專指奈米大小的材料。經過十幾年的研究，科學家已對奈米材料有相當的了解。當物質以奈米級的大小存在時，它所代表的意義並不只是尺寸的縮小，許多不同於巨觀世界的物質特性，如光學性質、磁性、電性、導熱性等，亦隨著尺度縮小有了不同的差異性，例如金屬奈米粒子與傳統大顆粒金屬之化學性質截然不同，金屬奈米粒子之比表面積大，使表面能量在全體能量中的比例大幅增加，致使金屬奈米粒子熔點下降，活化能降低及化學反應性增加，光、電、力、磁學等物性也產生改變。

「黃金」是非常受人喜愛的金屬，以前述所提光學性質改變為例，在一般人的認知中，黃金是帶有金屬色澤的黃澄澄顏色，但是，當縮小至奈米等級大小的金粒子形式存在時，原本的光學性質會因尺度的改變而有所不同。

由於金奈米粒子的光學特異性，在很早以前，金奈米粒子就已被人們所應用，例如大英博物館的變色羅馬杯（Lycurgus Cup）及歐洲許多大教堂的彩繪玻璃（Stained glass）等，而真正對於金奈米粒子的研究可以追溯到 1857 年 Michael Faraday 所發表的文章。在十九世紀，法拉第（Michael Faraday），利用氯化金（gold chloride）還原出含奈米金的溶液，他發現在玻璃器皿中溶液竟然呈現紅寶石色，完全不同於印象中黃金該有的顏色。當時法拉第並不清楚原因為何，現在我們知道金奈米粒子的紅色，是量子效應所致。從可見光與金奈米粒子的相互作用關係來看，當粒徑等於或是大於入射光的波長時，粒子會吸收及散射入射光；但是當粒徑遠小於入射光的波長時，吸收的效應就相對地大多了。吸收這些光的能量之後，金奈米粒子的自由電子雲會因而被極化，隨著光波的頻率震盪。因為吸收了較多的綠光以及藍光，所以分散在水溶液之中的金奈米粒子小球會呈現清楚的紅色。

科學家後來發現，而隨著金奈米粒子粒徑的逐漸縮小，顏色開始產生變化：可從粒徑約為 50 nm 的綠色，到粒徑小至約 13 nm 的暗紅色。不但如此，當奈米粒子的直徑、形狀稍作變化時，也會顯現出不同的顏色，例如粒子長短軸長度的比值愈大，或是說粒子的長度愈長，便會吸收較長波長的光。一般而言，圓形的奈米粒子較易製備，而製造三角形與三稜鏡形奈米粒子雖較困難，但均已找出製備的方法。金屬奈米粒子的形狀與大小，對於光的散射與吸收有決定性的影響 (22)。因此我們可以藉由調控金屬奈米粒子的形狀和大小，來達到特定波長的光散射與吸收 (圖 3)。

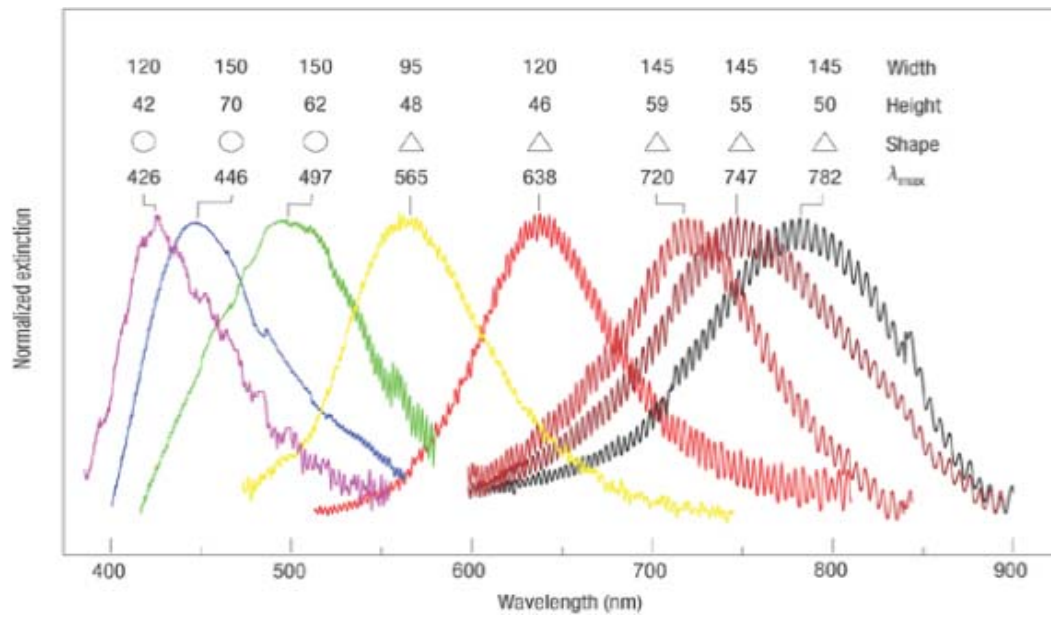


圖 3：UV-vis extinction spectra of Ag nanoparticle arrays on mica substrates.

(22)

雖然對於金奈米粒子的研究已超過一百年，但應用生醫領域上卻僅僅只在近十幾年的時間。雖然金奈米粒子應用在生醫上發展的時間並不長，但由於其奈米尺寸對於金本身在巨觀與微觀本質造成的物性、化性上的差異，使得其應用非常的廣泛。

金奈米粒子是一種惰性金屬材料，而將新的材料應用在生物上，首重的便是生物相容性的問題，但目前為止金奈米粒子仍然被視為生具有物相容性的材料之一，有關任何急性毒性的研究 (23) 目前也沒有發現。

2.4 研究動機

在現行的 DNA 微陣列晶片檢測上，多是利用螢光標記染色法，將螢光技術應用在 DNA 的偵測上已是標準的金科玉律，因為在目前的各種技術應用上，螢光相對的具有高靈敏度 (sensitivity)、較寬的動態偵測範圍 (dynamic range)，以及重要的多工特性 (24-26)。儘管螢光技術有這麼多優點，但在傳統的螢光標記應用上，還是擺脫不了需要經過樣本放大的過程。因為取得的待測 DNA 往往濃度不足，必須經過 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反應來放大待測目標 DNA 的數量，然而從待測 DNA 的萃取、純化，到完成一特定序列的 PCR 反應需要花費相當多的時間才能得到足夠的樣本數量以供偵測。再者，螢光訊號本身會有所謂隨時間衰減 (decay) 的問題，以及如：光漂白 (photo bleaching)、消光 (quenching)、再吸收 (reabsorbing) 及螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 等等的問題，而將螢光應用在生物晶片上，在晶片掃描時亦有背景螢光的干擾。此外在螢光偵測技術上也需要複雜的儀器輔助，這些儀器往往成本高昂、設計複雜，可偵測的樣本也需要經過複雜的步驟處理，不僅消耗了大量時間，也消耗了大量的人力、物力成本，這也限制了螢光技術的應用廣泛性。因此發展一套具有高靈敏度、低成本且樣本製作過程單純的 DNA 檢測方法是勢在必行的。

綜合上述所言，現行的 DNA 微陣列晶片面臨到一些困難與瓶頸，包括 (1) DNA 樣本製備需要經過 PCR 反應得到足夠的偵測數量，而 PCR 反應耗時，且使成本增加。(2) 掃描時，晶片易受到背景螢光的干擾，而螢光本身先天的限制，對於訊號偵測亦有其限制存在，因此在定量上也增加了許多誤差。(3) 對於螢光偵測的輔助儀器往往會增加實驗成本，及樣本製備時

間，在實驗上消耗了大量的人力和物力。(4) 現有 DNA 微陣列晶片多以雙光雷射為主，多增加雷射激發數目會增加系統本身設計的成本，而螢光的波段範圍也限制了雷射增加的選擇性。

因此，開發一套具有更高靈敏度、低成本，足以用在檢測上具有簡便，快速的偵測系統便是目前發展的趨勢。而在過去的這些年，一個朝著這樣目標發展的方向便是奈米粒子標記方法。近年來，由於生物奈米科技的進步及逐漸受到重視，生物晶片技術的發展上也被很多科學家拿來與奈米科技作結合，本研究即是結合奈米粒子標記的技術，希望能在跨領域的重疊中，尋找出更具突破性的檢測方法與檢測條件，達成檢測低成本、高敏感、快速化的目標，期望能以跨領域技術的結合，設計出簡單、快速、容易偵測的基因晶片。



第參章 文獻回顧

3.1 金奈米粒子應用領域

3.1.1 標記 (Labeling) 與成像 (Visualizing)

金奈米粒子早期的應用僅在標記方面，大量的金奈米粒子集中標記，可以使一個區域面積有較高的對比度，方便成像及觀察。超過 20 nm 大小的金奈米粒子可以利用光學顯微鏡，例如使用相位差 (phase contrast) 或干涉相位差 (Differential Interference Contrast, DIC) 顯微鏡直接觀察影像 (27)。而利用金奈米粒子的散射光，以達到觀察目的，則可使用暗視野顯微鏡 (dark field microscopy) 來做偵測 (28)，由於散射光的波長會因金奈米粒子的大小和形狀而有所不同，可利用這樣的特性發展不同的多種標記(29,30)。將金奈米粒子應用在標記與成像上，提供了許多方面的便利性，例如免疫染色 (immunostaining) (31,32)、單分子追蹤 (Single particle tracking) (33-35)，X-ray 對比劑等 (36)。

3.1.2 輸送媒介 (A vehicle for delivery)

利用金奈米粒子當作載體，將特定分子傳輸至細胞內的技術已發展一段時間，這些分子藉由吸附在金奈米粒子表面來達到導入細胞內部的目的，這些分子進入細胞後將會從金奈米粒子表面分離，執行特定目的。導入細胞內部的的方法包括了基因槍 (gene gun) (37) 及細胞吸收 (Cell uptake) (38,39) 等，其中細胞吸收的主要應用在基因治療 (40,41) 與標靶藥物 (42) 等方面，更多的應用可以參考 Ghosh 等人所發表的文獻 (43)。

3.1.3 生醫感測 (Biosensor)

若我們將先前所提到金奈米粒子應用於標記的模式視為一種被動偵測的應用，那麼將金奈米粒子應用於生物感測 (biosensor) 將可視為一主動式的應用。在生物感測的目標中，我們著重在專一性樣品分子的感測，而且可以確實的得知我們所監測樣品的濃度。通常我們會利用光學的特性來做為一種檢測方法。舉例來說，金奈米粒子會因其本身大小及形狀的差異性而有不同的光學性質，同時也因為其奈米尺寸的緣故，在生物分子感測的尺度上相當適合。將金奈米粒子作為生物感測器的應用非常廣泛，包括了表面電漿共振 (surface plasmons resonance) (44,45)，螢光淬熄 (fluorescence quenching) (46-48)、表面增強拉曼光譜 (Surface-Enhanced Raman Scattering , SERS) (49,50) 以及金奈米粒子染色 (gold stains) (51-53) 等等。

綜合上述所敘，金奈米粒子對於生物上的應用是非常的有利與廣泛，主要是因為金奈米粒子本身的性質：生物相容性高、尺寸與形狀造成的光學特異、金奈米粒子膠體的穩定性、表面電漿共振性質等等，而且金奈米粒子的合成技術相對的容易，與生物分子的連接亦可直接完成，不需要透過間接的方式達到相連，這種種微觀性質，讓金奈米粒子在生物的應用上逐漸嶄露新利基。

3.2 奈米粒子的光學效應

當一束光照射到金奈米粒子上，會有特定的光被吸收且有特定的光被散射出來，如此我們才能看到特定的顏色，例如金奈米粒子特別會與 520 nm 波長附近的光作用，其可見光散射光譜 (light scattering spectra) 有明顯的共振現象，這樣的特性稱之為表面電漿共振 (surface plasmon resonance) ，而這樣的現象不只是金奈米粒子獨有，其它奈米級的金屬粒子，如銅、銀等，亦有這樣的現象。

3.2.1 區域性表面電漿共振效應 (Localized Surface Plasmon Resonance)

金奈米粒子的尺度大小比可見光波長要來得小 (400 nm~700 nm) ，因此，金奈米粒子對於光的吸收效應，相對來說遠比散射效應為大。當吸收入射光能量之後，其表面自由電子雲被極化，因而發生光波頻率震盪 (collective dipolar oscillation) 現象，而這樣的共振效應若侷限於奈米粒子或者是奈米結構的尺度上，則稱為區域性表面電漿共振 (localized surface plasmon resonance, LSPR) (54) ，而法拉第當年觀察到奈米金溶液呈現紅色，正是這個原因。

金奈米粒子受到入射光的電磁場影響後，金奈米粒子的表面自由電子被激發，於是吸收某特定波長的光子能量產生瞬間誘導式偶極，並以此特定頻率進行集體式的偶極震盪。也就是說，奈米金屬粒子會吸收某一特定波長的光子能量，而使得原本分布均勻的自由電子在粒子束縛的範圍內，依電場方向而生成不均勻的分布。一旦共振的現象發生，某個特定波長的光會被吸收

和散射，如此就可以得到特定的峰值。金屬奈米粒子吸收光譜中的特性吸收波帶，被稱為表面電漿共振波帶 (plasmon resonance absorption band)。

3.2.2 尺度對於 LSPR 的影響

金奈米粒子因為粒子大小不同而有不同的散射光譜產生，這樣的現象在 1908 年時，Mie 藉由觀察到懸浮溶液中金粒子的顏色，利用 Maxwell equations 去計算出金屬球體在電磁場下的消光截面積 (extinction cross section)，成功地解釋當金屬粒子的粒徑大小遠小於激發光源的波長時，我們見到溶液中的金粒子顏色會異於巨觀下金的顏色，而在奈米尺度下也會因其大小的不同而有不同的散射情形 (55)。另外也藉由相關理論 (56) 來描述這起源於非對稱形狀以及偶極之間相互作用力，所造成在電磁場下產生的表面電漿共振吸收。

3.2.3 形狀對於 LSPR 的影響

金奈米粒子可以分為球形對稱及非球形對稱兩種，除了大小之外，其形狀的不同也會造成光學性質上的不同。我們經由散射光譜的測量知道，如果為球形對稱，會吸收 520 nm 左右波長的光子能量，溶液呈紅色，而非球形對稱的金奈米粒子，因其本身形狀非對稱型，會有不同方向的共振頻率，於是另一個落在有別於 520 nm 的波峰位置。這現象由另一位學者 Gans 利用長短軸比 (aspect ratio, R) 去延伸 Mie 的理論，將圓形奈米粒子推廣到非圓形奈米粒子，如棒狀 (rod)、圓柱狀 (cylindrical shape)，模擬出真實的表面電漿共振情形，因此控制金奈米粒子長短軸的比值將會造成不同的溶液顏色變化(30)。

除了奈米粒子的大小及形狀之外，LSRP 亦會受到金屬種類 (57)、周遭環境 (58) 等因素而改變。

3.3 金奈米粒子於 DNA 之應用

將金奈米粒子與 DNA 結合應用，首見於 1996 年的 Nature 期刊 (59)。由美國西北大學 Mirkin 博士所帶領的研究小組，利用金奈米粒子發展出可逆的奈米粒子組裝方法 (59)，在 1997 年，同一個研究小組利用金奈米粒子的光學特性與 DNA 專一性形成的雙股螺旋結構，發表金奈米粒子 DNA 感測器 (60)。1998 年，他們利用大小不同的金奈米粒子與不互補的 DNA 序列，進行自組裝結構試驗 (61)。爾後，Mirkin 的團隊陸續發表了相關研究，奠定了金奈米粒子於 DNA 相關技術之基礎。

表 參-1：Mirkin 團隊對於金奈米粒子應用 DNA 領域的研究

Homogeneous detection	
1998	Selective colorimetric polynucleotide detection based on Au nanoparticle probes which align in a “tail-to-tail” fashion onto a target polynucleotide (62).
2000	Understanding the factors that control the optical properties of DNA -linked gold nanoparticle aggregates containing oligonucleotide linkers of varying length (24–72 base pairs) (63).
2000	The colorimetric approach was limited by its sensitivity, with a detection limit in the low pico-molar to nano-molar target concentration range. A small improvement was achieved when different size nanoparticles (50- or 100-nm probes) were employed (64).

2001	Modest multiplexing capabilities were introduced using nanoparticles exhibiting different surface Plasmon bands(65).
2003	Using a specific DNA target as a linking molecule to aggregate Au-NPs with complementary probe sequences allows one to take advantage of the novel optical properties of dispersed versus aggregated gold particles for use in DNA detection (61).
Heterogeneous detection	
2000	The scanometric assay was developed, which is a sandwich assay involving an immobilized capture strand on a chip, a target sequence, and a gold nanoparticle probe(66).
2001	Gold nanoparticles, 50 and 100 nm in diameter, each specific for a target sequence of interest, could be used to simultaneously detect target sequences with dual color readout(67).
2002	Electrical readout was realized by functionalizing microelectrode gaps with intervening target capture sequences for the detection of sandwiched targets using gold nanoparticle probes(68).
2002	The readout of multi-spectral fingerprints is possible by using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)(69).

3.4 奈米粒子標記技術

近年，發展更高靈敏度、低成本，足以用在檢測上具有簡便及快速偵測方式的基因晶片，已是大家努力的目標，而將量子點 (quantum dots, QDs) 奈米標記技術或是應用金屬奈米粒子 (metal nanoparticles, MNPs) 在基因晶片上便是其中之一 (62,70)。

3.4.1 量子點 (Quantum dots)

所謂的量子點，指的是以半導體材料所製成的螢光奈米顆粒。量子點半導體顆粒有隨尺寸變化而改變螢光波長的特性，當量子點的顆粒越小，顏色便會越趨近於光譜的藍色端。與傳統的有機染料分子相比，量子點的螢光標記亮度強、光穩定性佳、發光光譜窄且能發射多種不同的波長，這些特性使得科學家將其應用在基因晶片上(71-73)，至今仍在發展當中。

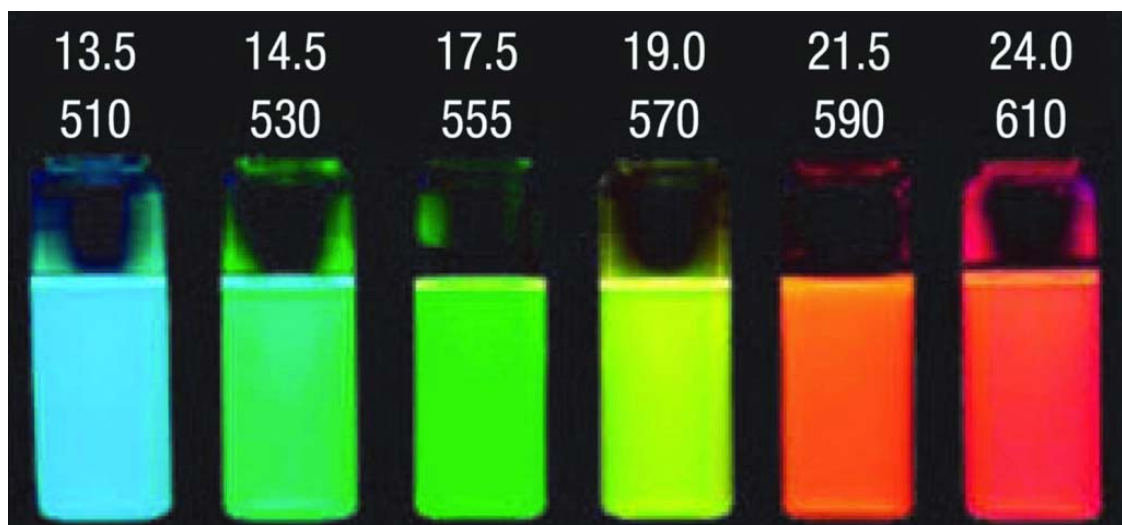


圖 4：不同大小尺寸的量子點有不同的螢光波長。

由左至右的量子點大小為 13.5~24.0 nm (上排數字)，波長依序由 510 nm ~ 610 nm (下排數字)。

3.4.2 金奈米粒子 (Gold nanoparticles)

第一個將金奈米粒子應用在微陣列晶片上是在2000年同樣由 Mirkin 博士的團隊所提出 (66)。目前有很多的研究已經將 MNPs 應用在 DNA 微陣列晶片上，不過偵測的信號僅限於一種 (74-76) 或兩種 MNPs (67) 當作信號源。對於 MNPs 擁有各種不同的性質，包括：形狀、大小和種類等等，我們可以利用這些性質上的不同來當作不同的標記模式，希望可以建置多種 MNPs 標記方法來增加我們的信號源偵測。因此我們利用不同種類 MNPs 本身散射光譜的不同，來發展多樣性 MNPs DNA 檢測平台，以期改善傳統的 Cy3, Cy5 雙色螢光系統。

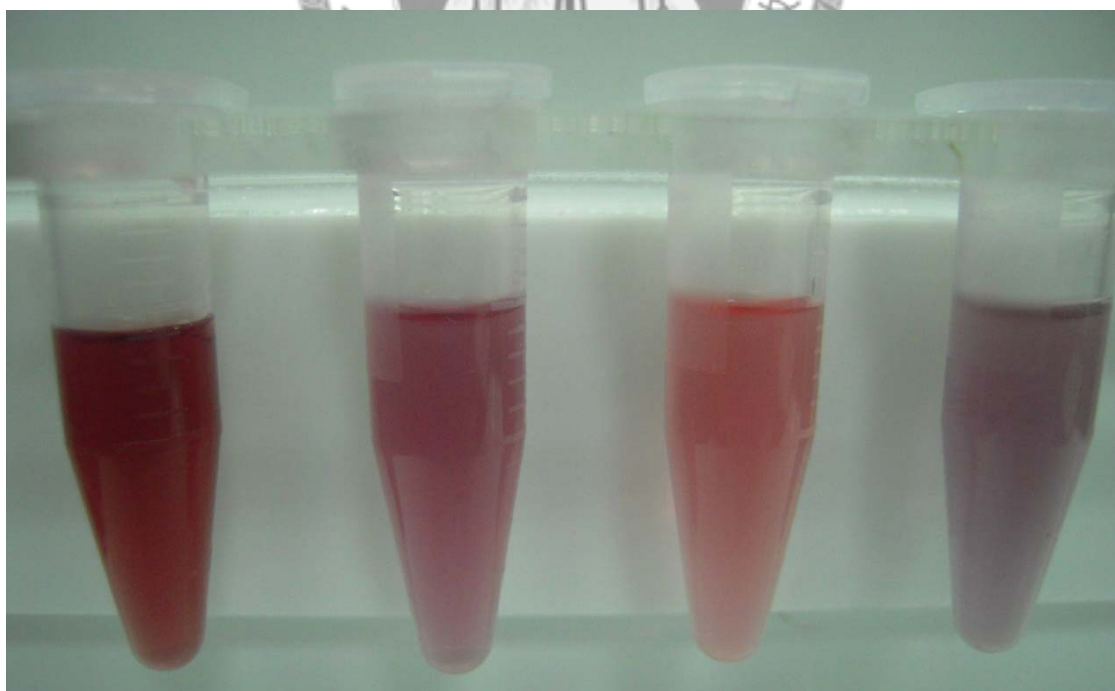


圖 5：不同大小的金奈米粒子溶液。

由左至右分別為13 nm、32 nm、40 nm、56 nm，其中 13、32、56 nm 的金奈米粒

子由台大化學系張煥宗老師實驗室提供，40 nm 金奈米粒子則購至英國 BBInternational公司 (台灣進階公司代理)。

在本論文研究中，我們將使用金奈米粒子及其它金屬奈米粒子 (Metal Nano-Particles, MNPs) 來當作 DNA 偵測的信號標記 (tag)。由於 MNPs 本身的散射光信號強烈，對於 DNA 偵測靈敏度將會帶來有效的提升，不用像傳統螢光標記需要經過目標物放大 (target amplification) 的過程。靈敏度的提升可以降低信號源 (MNPs) 的使用量，因此可以建構多樣性的檢測方式以取代傳統的雙色系統。跟傳統的螢光系統相比，如 GenePix 4000B scanner ，利用 MNPs 也會減少螢光所帶來的光漂白 (photo bleaching) ，淬熄 (quenching) ，再吸收 (reabsorbing) ，和共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 等現象。



第肆章 實驗設計與材料方法

4.1 實驗設計

4.1.1 一對一單股 DNA 於微陣列晶片上雜交反應

實驗目的：

檢測以 MNPs 做為 DNA 標記的可行性

實驗設計：

將帶有奈米金 (nano-gold) 標記的 probe-DNA 與晶片上的 target-DNA 進行雜交反應(圖 6)。

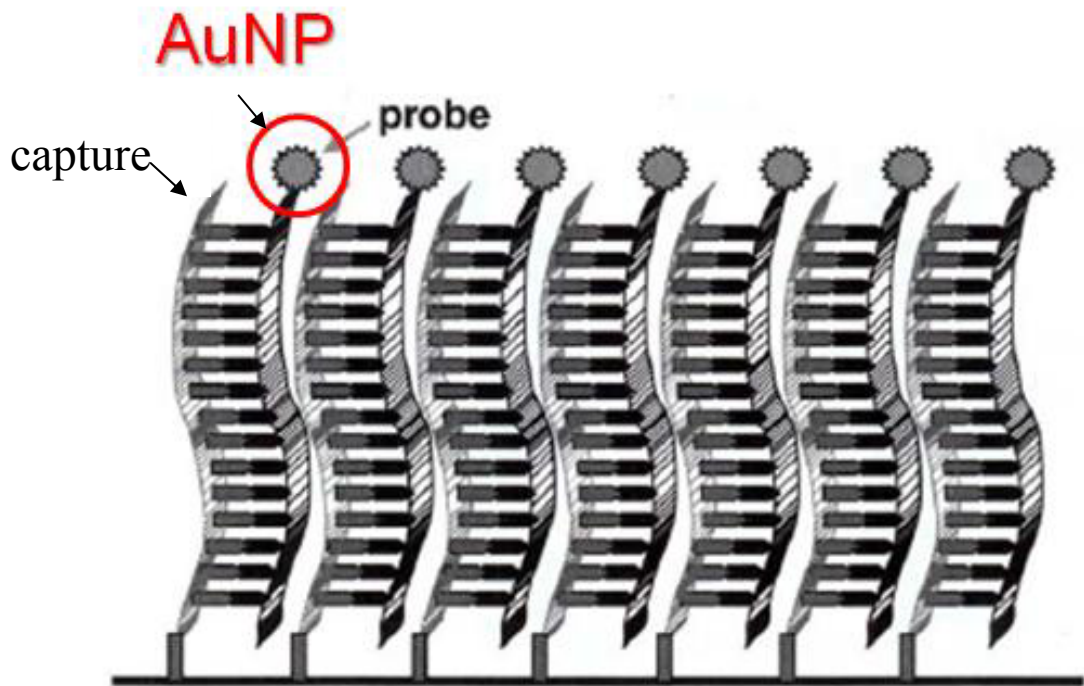


圖 6：capture-DNA 與 probe-DNA 雜交反應

4.1.2 微陣列晶片上 DNA 三明治雜交反應

實驗目的：

藉由 probe-DNA 及 capture-DNA 與 target-DNA 完成 sandwich hybridization (圖 7)。

實驗設計：

將完成第一次雜交反應組合而成的 Au-probe/target-DNA 與晶片上的 capture-DNA 進行第二次雜交反應，此實驗設計稱之為三明治雜交反應 (Sandwich Hybridization)。金奈米粒子則做為偵測的信號源。(圖 7)。

• Sandwich hybridization

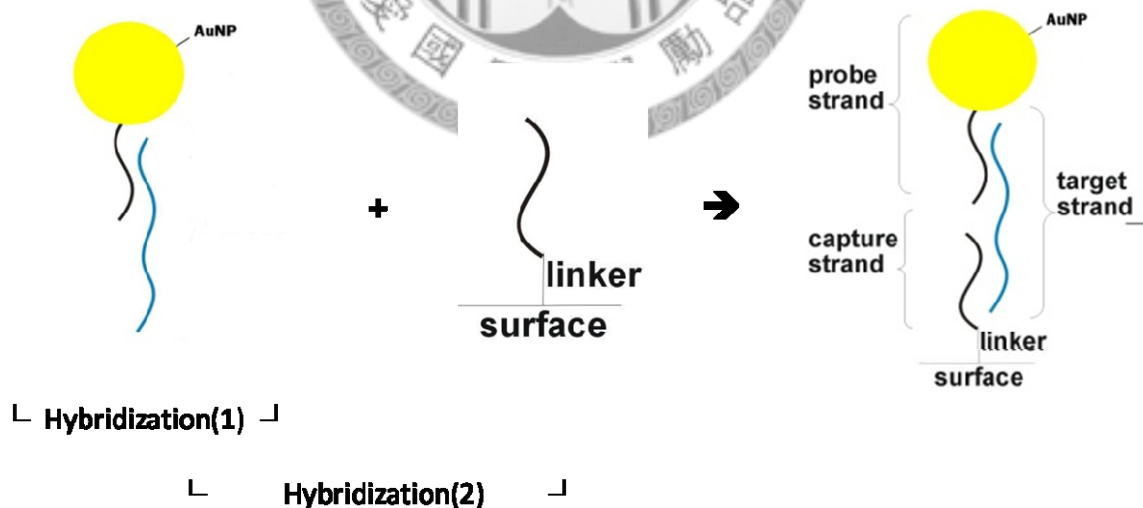


圖 7：三明治雜交反應流程圖示。

4.1.3 系統偵測方式：

暗視野式光譜掃描：

一般的光學顯微鏡掃描方式，利用簡單光學系統設計達到偵測目的。

傅立葉光譜儀掃描 (FTS)：

利用本實驗室學長姐(賴柏禎學長、曾德玉學姐)所建置的傅立葉光譜儀光學掃描系統(77)，以期可以達到快速且大面積的掃描方式。



4.2 材料與方法

4.2.1 微陣列晶片製作

晶片製作原理

一般玻片基材表面為二氧化矽結構，為了使 capture- DNA 得以接至基材表面以製作微陣列晶片，必須對基材表面進行改質。因此，首先我們以食人魚酸進行清洗以去除表面雜質，同時使表面二氧化矽結構露出氫氧根基團 (hydroxyl group, -OH)，接著分別進行矽烷化表面改質、醛基化取代，使得最後基材表面末端露出醛基 (aldehyde group, -CHO)，此時所露出的醛基基團可與 capture- DNA 一端的胺基 (amino group, -NH₂) 進行反應，完成微陣列晶片的製作 (圖 8)。

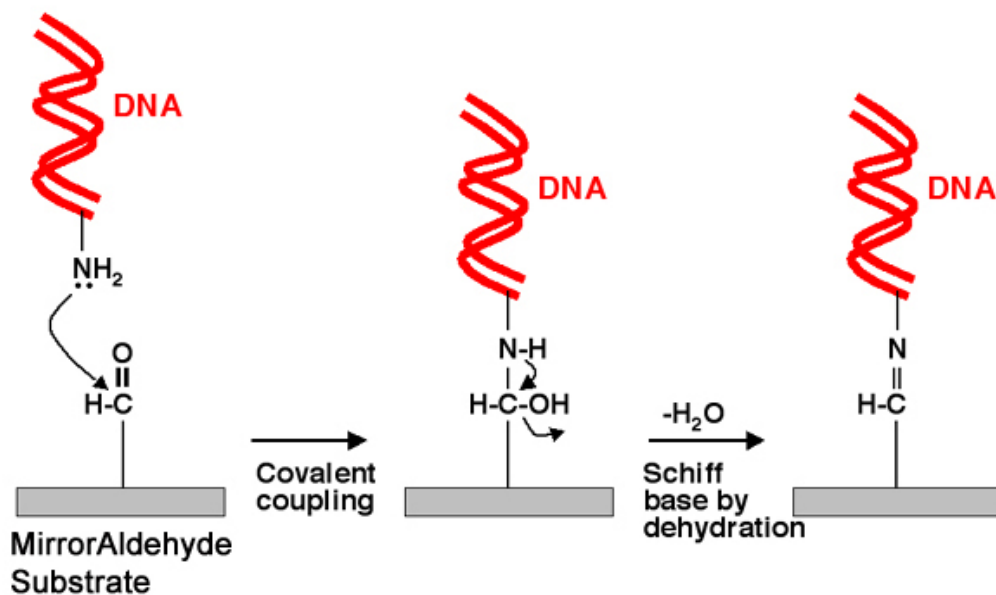


圖 8：以醛基修飾表面為基礎之微陣列晶片製作流程圖。

基材表面末端露出醛基，此醛基基團可與 capture- DNA 一端的胺基進行反應，完成微陣列晶片的製作。

<http://www.arrayit.com/index.html>

4.2.1.1 基材表面潔淨

目的：

表面潔淨的目的主要在於清除所有的微量污染物，包括有機污染物、表面的灰塵微粒及金屬污染物等。

藥品

酸式清洗液 (piranha cleaning solution)：

三份硫酸 [sulfuric acid (H_2SO_4)] 混合一份雙氧水 [hydrogen peroxide (H_2O_2), 35%]。

注意：此反應非常激烈，硫酸須緩慢的倒入雙氧水中。反應開始時，會產生大量的熱與氣泡。

鹼式清洗液 (base piranha cleaning solution)：

兩份氨水 [ammonium hydroxide (NH_4OH), 25%] 混合一份雙氧水 [hydrogen peroxide (H_2O_2), 35%]。

步驟

方法一：酸式食人魚溶液潔淨法 (Piranha Clean) (78)

- (1). 在進行清洗玻片的步驟前，現場調配清洗液 (cleaning solution)。
- (2). 將玻片排列於染色架 (staining jars, rack) 上，再放置到染色壺 (staining jars)，於純水中超音波 (ultrasone bath) 震洗 10 分鐘。
- (3). 置換至已配好之清洗液中，浸泡 30 分鐘。
- (4). 置換至純水中浸泡 5 分鐘，重複兩次
- (5). 用氮氣吹乾。

(6). 清洗完成的後處理，可分下列兩流程：

I. 進行下一步驟：玻片表面修飾。

II. 於室溫下保存在無灰塵容器中

方法二：鹼式食人魚溶液潔淨法 (Base Piranha Clean)

(1). 在進行清洗玻片的步驟前，現場調配清洗液 (cleaning solution)。

(2). 將玻片排列於染色架 (staining jars, rack) 上，再放置到染色壺 (staining jars) 中，加入清洗液。

(3). 溶液開始產生氣泡屬於正常現象 (氧氣氣泡)。

(4). 在溶液中浸泡20分鐘，給予適當的緩慢攪拌。

(5). 將清洗液倒出，用純水清洗三次。

(6). 將玻片移至煮沸的純水中浸泡 10 分鐘。

(7). 將玻片移至純水中浸泡，用超音波震洗 20 分鐘。

(8). 以離心機離心去除水分，1500 rpm、3 分鐘。

(9). 清洗完成的後處理，可分下列兩流程：

I. 進行下一步驟：玻片表面修飾。

II. 置於 80°C 下 30 分鐘，保存在室溫下。

4.2.1.2 基材矽烷化改質：矽烷化修飾 (Silane modification)

目的：

使基材表面末端原本的二氧化矽 (SiO_2) ，改質成為末端帶胺基 (amine group) 的形式(79)。

原理：

矽烷化作用是使基材表面二氧化矽的O-H鍵與水解後之 3-丙氨三乙氧基矽烷 (3-Aminopropyltriethoxysilane , APTES) 的 Si-R 鍵取代形成 Si-O 鍵，此時 APTES 分子一端的 Si 原子將和基材表面上 SiO_2 的氧原子之間形成 siloxane 鍵，取代原本基材表面上的氫氧根，而連接在 APTES 另一端的胺基 (amine group) 則會位在遠離基材表面的方向。

表面矽烷化後的基材表面，必須再經過去離子水反覆的清洗，以氮氣吹乾，再放置在烘箱內 105°C 、 45 分鐘，目的是為使 APTES 分子之間形成交聯結構 (crosslink)。

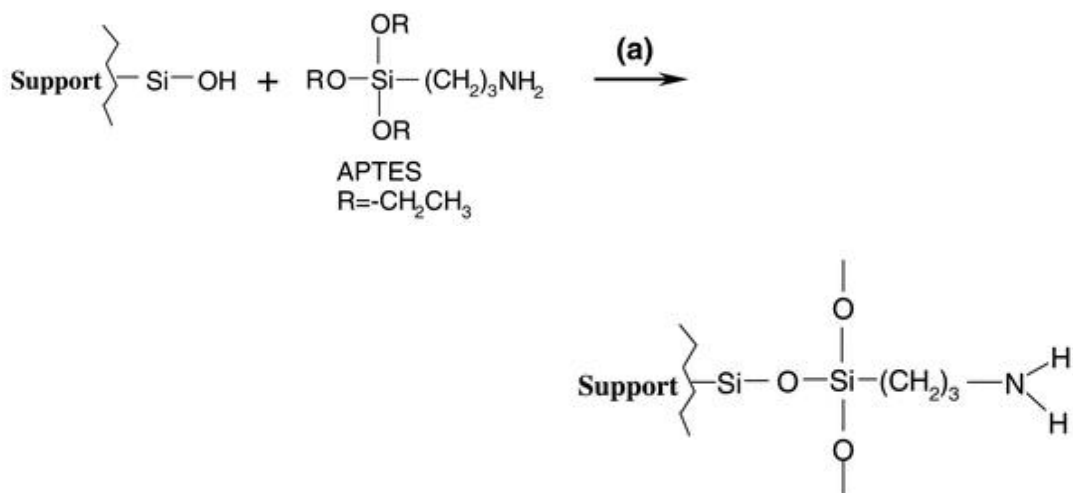


圖 9：基材矽烷化改質：矽烷化反應流程圖。

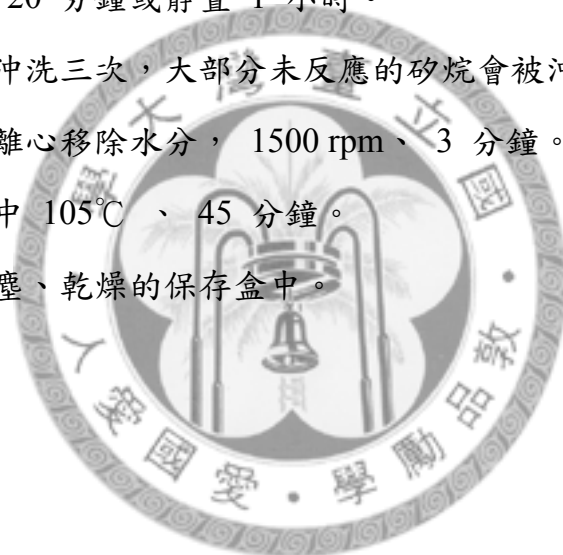
藥品

3-丙氨三乙氧基矽烷 (3-Aminopropyltriethoxysilane 99%, APTES) : Sigma。

矽烷塗層溶液 (coating solution) : APTES 5% in H₂O。

步驟

- (1). 配置新的矽烷塗層溶液。
- (2). 將預清洗過的玻片放置到適當的容器中 (須為塑膠製品，如塑膠染色壺)，倒入已配好的塗層溶液，使所有基材浸泡在溶液液面下，超音波震盪 20 分鐘或靜置 1 小時。
- (3). 用二次水沖洗三次，大部分未反應的矽烷會被沖洗掉。
- (4). 以離心機離心移除水分，1500 rpm、3 分鐘。
- (5). 置於烘箱中 105°C、45 分鐘。
- (6). 保存在無塵、乾燥的保存盒中。



4.2.1.3 基材醛基化改質：醛基修飾

目的：

將經過矽烷化修飾，帶有胺基修飾的基材再度改質，令其形成末端帶有醛基修飾的基材表面 (80)。

原理：

利用兩端帶有醛基的戊二醛進行反應，其中一端的醛基會與帶有胺基修飾的基材表面進行反應，形成共價性鍵結，取代表面原有的胺基基團(amine group)，在完成共價鍵結之後，顯露在基材表面的便是戊二醛的另一端醛基。表面醛基化之後，必須再經過去離子水反覆的清洗，以去除多餘未反應的戊二醛分子，最後以氮氣吹乾，此時表面的醛基可以和胺基修飾的分子再進行相同的共價鍵結反應。

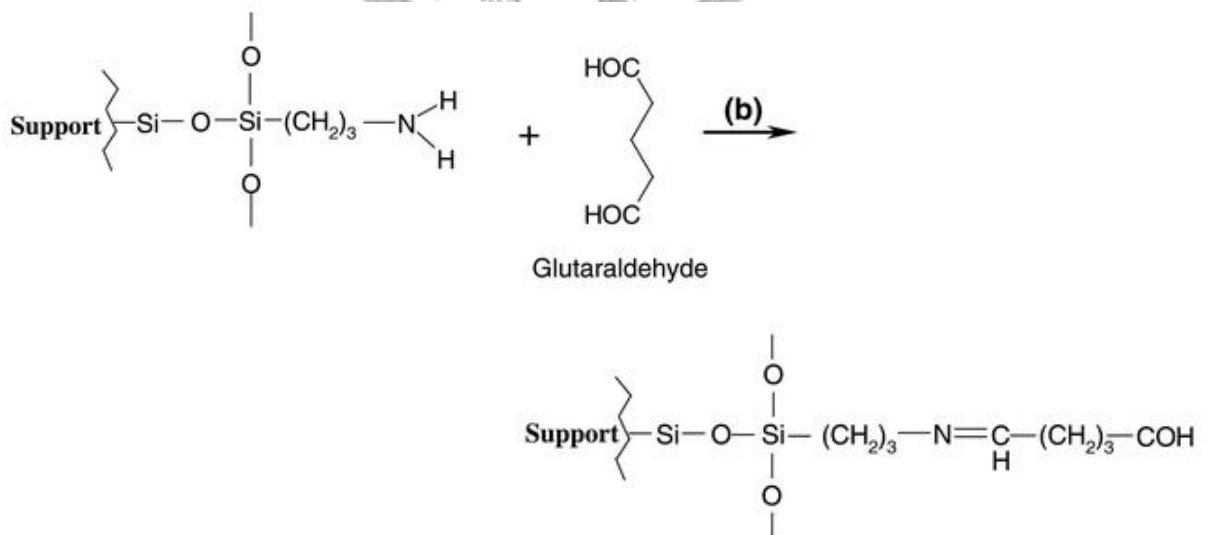


圖 10：胺基基材表面進行醛基化修飾反應流程圖。

藥品

戊二醛 (glutaraldehyde solution 50%) : Sigma。

步驟：

- (1). 將矽烷化完成的基材用二次水清洗，接著浸泡於 5% 的戊二醛溶液 (5% glutaraldehyde in 0.1M PBS, pH 7.4) 中靜置2小時。
- (2). 依序用甲醇、丙酮及二次水各清洗三次。
- (3). 以離心機離心去除水分， 1500 rpm、 3 分鐘。



4.2.1.4 DNA 修飾於醛基化基材表面

目的：

將一端帶有胺基 (amino group, $-\text{NH}_2$) 修飾的 capture-DNA 與醛基修飾的基材表面進行反應，使基材表面帶有特定的 DNA 序列。

原理：

帶有胺基修飾的 capture-DNA 會與醛基化表面基材進行反應，形成共價性鍵結。完成共價鍵結之後，顯露在基材表面的便是帶有特定序列的 capture-DNA。在 capture-DNA 於基材表面反應完成之後，經過阻層溶液 (blocking solution) 的阻層反應後，基材表面再經反覆的清洗，目的在使基材表面未反應的醛基基團還原成氫氧根基團。

材料與藥品：

Capture-DNA sequence (5' to 3') : (Sigma)

OC-DNA : Amine- TTTTTTTTTTTTCTGTCTCGCAATAGTGAGAT 。

NC-DNA : GTTGTCATACCAGGATTTTTTTTTTTT-Amine 。

Blocking solution :

Dilute 1.0 g NaBH_4 in 300ml 1X PBS + 100ml 99% ethanol 。

步驟

- (1). 將 DNA 溶於 sodium carbonate buffer (0.1M, pH9.0) 中，打點至基材表面，於密閉潮濕環境下 (humidity chamber) 靜置 12~16 小時。
- (2). 以純水沖洗，浸泡於 blocking solution 30分鐘，0.2% SDS 2分鐘，再以純水沖洗去除清洗液。以離心去除水分，1500 rpm、3 分鐘。

4.2.2 奈米粒子合成

4.2.2.1 金奈米粒子

目的：

合成金奈米粒子，以提供 DNA 分子作為信號源標記。

原理：

在 1973 年，Frens (81) 提出一個簡單合成金奈米粒子的方法，使用檸檬酸鈉還原法來製備粒徑均一的金奈米粒子溶液。以檸檬酸鈉為還原劑將四氯金酸還原為金奈米粒子，藉由調控還原劑之用量比例，以合成不同粒徑之金奈米粒子；當檸檬酸鈉/四氯金酸比例高時，製備所得之金奈米粒子粒徑小，反之亦然。本實驗中不同大小的金奈米粒子則根據文獻來配製(82)。

步驟：

I. 13 nm Gold nanoparticles (GNPs)：

250 mL 的 1 mM NaAuCl_4 溶液在冷凝回流系統中加熱到沸騰後，迅速加入 38.8 mL 之 25 mM trisodium citrate，持續攪拌 15 min，以確保所有的金離子都能夠被還原成 GNPs，然後移開加熱源，讓 GNPs 溶液回到室溫，再保存於 4°C 冰箱。在反應過程中，三價金離子錯合物會由原來的黃色變成無色(一價金離子)，再由無色變成黑色(金奈米晶種)，最後由黑色到紫色到紅玫瑰色的 GNPs。

II. 32 和 56 nm Gold nanoparticles:

0.01% NaAuCl_4 50 mL 在冷凝回流系統中加熱到沸騰後，分別加入 0.5 和 0.3 mL 之 1% trisodium citrate，持續攪拌 15 min，然後移開加熱源，讓GNPs 溶液回到室溫，保存於 4°C 環境下。



4.2.3 探針 DNA 修飾於金奈米粒子表面

4.2.3.1 探針 DNA 修飾

目的：

在金屬奈米粒子表面，以所設計的探針 DNA (probe-DNA) 修飾 (78,83,84)。

原理：

硫醇 (thiol-) 分子本身易與金、銀奈米粒子之間形成所謂的金硫鍵、銀硫鍵，而這些鍵結本身為一種配位共價鍵，之間具有很強的吸引力，通常在一般的環境條件下不容易被破壞。我們將探針 DNA 的一端以硫醇分子作修飾，使探針 DNA 得以借由硫醇分子與金屬奈米粒子表面形成鍵結，達到以金屬奈米粒子作為探針 DNA 標記的目的。

材料

Probe-DNA sequence (5' to 3') : (integrated DNA technologies, IDT)

OP-DNA : AGTGATAACGCTGTCTTTTTTTTTTTT-Thiol

NP-DNA : Thiol- AAAAAAAAAAAAAAAAAA

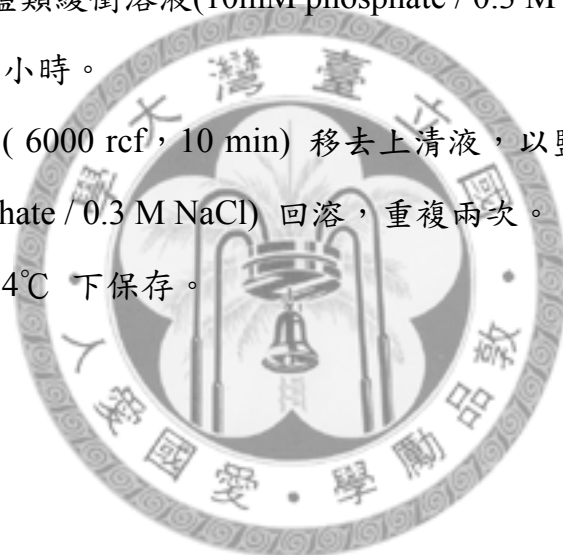
步驟：

取一端帶有硫醇修飾的 DNA (thiol- modified DNA) 與金奈米粒子 (32 nm、40 nm、56 nm) 混合於磷酸緩衝液中，使最後 DNA 濃度為 0.5 nmol 。靜置 16 小時加入鹽類緩衝溶液 (0.1 M NaCl / 10 mM PBS, pH 7.0) ，目的為提高 DNA 在金奈米粒子表面的吸附量，再靜置 48 小時，之後用離心

機以 6000 rcf，10 分鐘離心，移去上清液，用前述鹽類緩衝溶液回溶離心後所得的沉澱物。再重複離心、鹽類回溶的步驟，確保移去未吸附至金奈米粒子表面的 DNA 分子 (free DNA)。

流程

- (1). 取 DNA (100 μ M, 5 μ L)，與金奈米粒子 445 μ L 混合。
- (2). 加入磷酸緩衝液 (phosphate buffer, 10mM)，最後為 500 μ L。
- (3). 靜置 16 小時。
- (4). 加入鹽類緩衝溶液 (10mM phosphate / 0.3 M NaCl) 10 μ L 後，靜置 48 小時。
- (5). 離心 (6000 rcf，10 min) 移去上清液，以鹽類緩衝液 (10 mM phosphate / 0.3 M NaCl) 回溶，重複兩次。
- (6). 置於 4°C 下保存。



4.2.3.2 金奈米粒子表面 DNA 數量估計

目的：

評估金奈米粒子表面所負荷的 DNA 數，以減少 DNA 用量的損失。

原理：

利用 DTT (dithiothreitol) 與金奈米粒子表面的強力鍵結，取代原本修飾於金奈米粒子表面的 probe-DNA，利用螢光染劑 (OliGreen, for ssDNA) 定量來估算由金奈米粒子表面所取代出來 probe-DNA 數量。OliGreen 是2001年新發現的一種染劑，擁有極高靈敏度。本實驗利用 OliGreen 測量ssDNA的數量。OliGreen 偵測dT 時會有較大的螢光強度，dG 次之，而偵測到dA與dC 時的螢光強度最弱。

設備 與藥品：

螢光光譜儀 (美國Varian公司，型號為Cary Eclipse)

二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) : Sigma

螢光染劑 (OliGreen dye) : Invitrogen

步驟：

將先前實驗以 probe-DNA 修飾完成的金奈米粒子溶液，加入 DTT 溶液 10 mM，靜置12 小時，以 12000 rpm 離心，取出上清液加入 OliGreen dye 作為螢光標記，靜置 3~5 分鐘，以螢光光譜儀測量吸收值，利用標準品濃度換算之。

4.2.4 DNA 雜交反應

4.2.4.1 金奈米粒子標記雜交反應模型

目的：

將我們所製得的晶片上的 capture- DNA 與 Au-probe-DNA 進行雜交反應，檢測以MNPs 做為 DNA 標記的可行性。

原理：

藉由單股 DNA 在互相配對成功時(A 對 T，G 對 C)，會以氫鍵鍵結形成雙股螺旋結構來進行互補黏合，完成雙股螺旋 DNA 結構，此雙股 DNA 的其中一條帶有金奈米粒子信號標記，完成之後進行晶片掃描。

材料

Capture-DNA : (Sigma)

P1-DNA : Amine-。

Probe-DNA : (Sigma)

P2-DNA : -Thiol

步驟：

取 probe-DNA 標記上金奈米粒子，接著與晶片上的 capture- DNA 進行雜交反應，靜置12~16小時後，沖洗晶片，以去除未完成雜交反應的 probe-DNA 。將完成的晶片進行光譜掃描，分析資料，流程如下：

- (1). 配置雜交反應緩衝液 (3~5X SSC + 0.1% SDS)，將 Au-probe-DNA 與緩衝液以體積比 1:9 相混合，至微陣列晶片上反應。

- (2). 在 42°C 下靜置 12~16 小時。
- (3). 第一次沖洗晶片，以清洗液(2X SSC, 0.2% SDS)沖洗 10 分鐘。
- (4). 第二次沖洗晶片，以清洗液(2X SSC)沖洗 10 分鐘
- (5). 第三次沖洗晶片，以清洗液 (0.2X SSC)沖洗 10 分鐘
- (6). 去除晶片表面水分後進行掃描。



4.2.4.2 三明治雜交反應(Sandwich hybridization)

目的：

將微陣列晶片上的捕捉 DNA (capture-DNA) 與第一次雜交反應後，完成標記帶有探針 DNA (probe-DNA) 的目標 DNA (target-DNA) 進行第二次雜交反應，最後會形成一三明治結構的雙股螺旋 DNA ，即 target-DNA 的一端與 probe-DNA 相連接，而另外一端則是與 capture-DNA 相互連接

原理：

藉由單股 DNA 在互相配對成功時(A 對 T，G 對 C)，會以氫鍵鍵結形成雙股螺旋結構來進行互補黏合，在單一錯誤配對或甚至更多錯誤配對發生時，雙股結構會顯得不易形成，這樣的特性可以建構專一性檢測平台。我們在目標 DNA 的一端加上多個 T 鹼基 (poly T sequence)，藉此用以與帶有多個 A 鹼基(poly A sequence) 修飾的金奈米粒子互相結合，使目標 DNA 一端帶有信號源。在完成信號標記之後與微陣列晶片上的捕捉 DNA 進行雜交反應，完成後進行晶片掃描。

材料

OC-DNA (Capture-DNA, Sigma) :

5'- GTTGTCATACCAGGATTTTTTTTTTTT - Amine - 3' 。

OT-DNA(Target-DNA,Sigma) :

5'- TCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTG
GACCTCATGGCCCACATGTTTTTTTTTTTTTTT - 3'

OP-DNA (Probe-DNA,integrated DNA technologies, IDT) :

5'- Thiol -AGTGATAACGCTGTCTTTTTTTTTTTT - 3'

步驟：

取帶有 poly A sequence 與一端帶有 poly T sequence 的目標 DNA 相互混和，在緩衝溶液中 (5X SSC / 0.5% Tween 20, 50 μ L) 進行第一次雜交反應，靜置 12~16 小時，target/probe- DNA 組態完成。依照 DNA 修飾於金奈米粒子表面的步驟，將第一次完成雜交反應的 target/probe-DNA 與金奈米粒子形成鍵結。形成硫-金鍵結後，離心兩次以去除未形成鍵結的雙股 DNA。將此帶有金奈米粒子標記的半雙股螺旋結構 target/probe-DNA 種植在微陣列晶片上，進行第二次雜交反應，靜置 12~16 小時後，沖洗晶片，以去除未完成雜交反應的 target/probe-DNA。將完成的晶片進行光譜掃描，分析資料。

流程：

第一次雜交反應

- (1). 取 100 μ M 的 probe-DNA 及 100 μ M 的 target- DNA 以體積比 1:1 相互混合，最後濃度各自為 20 μ M。混合完成後，加熱至 95 $^{\circ}$ C，而後在室溫下靜置 30 分鐘。
- (2). 取金奈米粒子溶液 215 μ L，probe/target-DNA (0.2 μ M)，10 mM 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH 7.0)，相互混合，最後總體積為 250 μ L，在室溫下靜置 24 小時。
- (3). 加入 10 μ L 的 0.3 M NaCl (pH 7.0) / 10 mM phosphate，混合均勻後，室溫下靜置 48 小時。
- (4). 加入 BSA 靜置 30 分鐘，再以 6000g 4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘。
- (5). 移去上清液，用二次水補滿，將金奈米粒子回溶至水溶液中。
- (6). 重複(4)、(5)兩次，準備進行第二次雜交反應，無立即使用時，可在 4 $^{\circ}$ C 下保存數天。

第二次雜交反應

- (1). 配置雜交反應緩衝液 (3~5X SSC + 0.1% SDS)，將 Au-probe/target-DNA 與緩衝液以體積比 1:9 相混合，
- (2). 在 42°C 下靜置 12~16 小時。
- (3). 第一次沖洗晶片，以清洗液 (2X SSC, 0.2% SDS) 沖洗10分鐘。
- (4). 第二次沖洗晶片，以清洗液 (2X SSC) 沖洗10分鐘
- (5). 第三次沖洗晶片，以清洗液 (0.2X SSC) 沖洗10分鐘
- (6). 去除晶片表面水分後進行晶片掃描。



4.2.5 微陣列晶片掃描

4.2.5.1 暗視野式光譜掃描

利用暗視野顯微鏡 (dark field microscope) (85,86) 得到金屬奈米粒子的散射光，並導入商用光譜儀 (Acton SpectraPro 2150i) 後進行光譜解析。

有別於亮視野顯微鏡 (Bright field microscope)，暗視野顯微鏡不將來自光源的光直接射入觀察系統，當視野下無物體時，也就沒有光的散射發生，在暗視野下即呈現一片漆黑，無法觀察到任何物體；當有物體時，在物體與光的交互作用下，物體所產生的散射光，在暗視野的背景中相對明亮、清晰可見，如同夜晚的星星一般，光害愈少、背景越暗就有星星愈清楚的感覺。因此，我們可以得知，光線並非直接由視野射入觀察者的眼睛，而是先與物體產生交互作用後，再由物體的散射光線進入到觀察系統，於是形成背景為暗，而物體為亮的情形。而由暗視野顯微鏡得到的散射光，將其導入商用光譜儀 (Acton SpectraPro 2150i) 進行光譜解析，可得到光譜資料以供判讀。

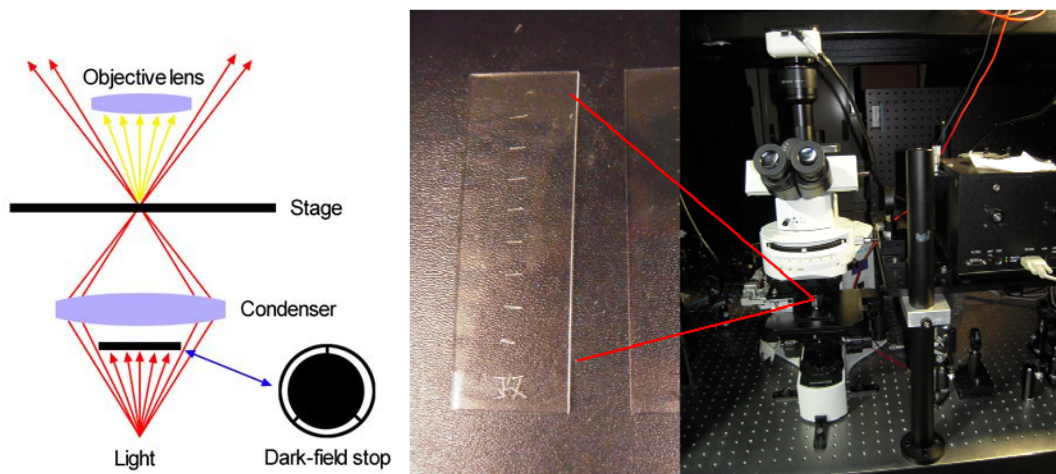


圖 11：暗視野顯微鏡示意圖與顯微鏡及掃描的晶片實照。

4.2.5.2 傅立葉光譜儀光譜掃描

利用本實驗室所建立的光學掃描系統：傅立葉轉換光譜儀 (Fourier transform spectrometry, FTS) (77)，可大面積且快速的獲得玻片表面上金屬奈米粒子之光譜。圖 12 為傅立葉轉換光譜儀的架設示意圖。傅立葉轉換光譜儀為一基礎架設之多光譜影像系統，藉由改變 Michelson 干涉儀中兩道光束之光路程差產生光譜的資訊，利用電荷耦合器 (CCD) 擷取干涉強度，並表示成隨光路程差產生強度變化之干涉圖形 (interferogram)，最後再對干涉圖形做傅立葉轉換獲得光譜。

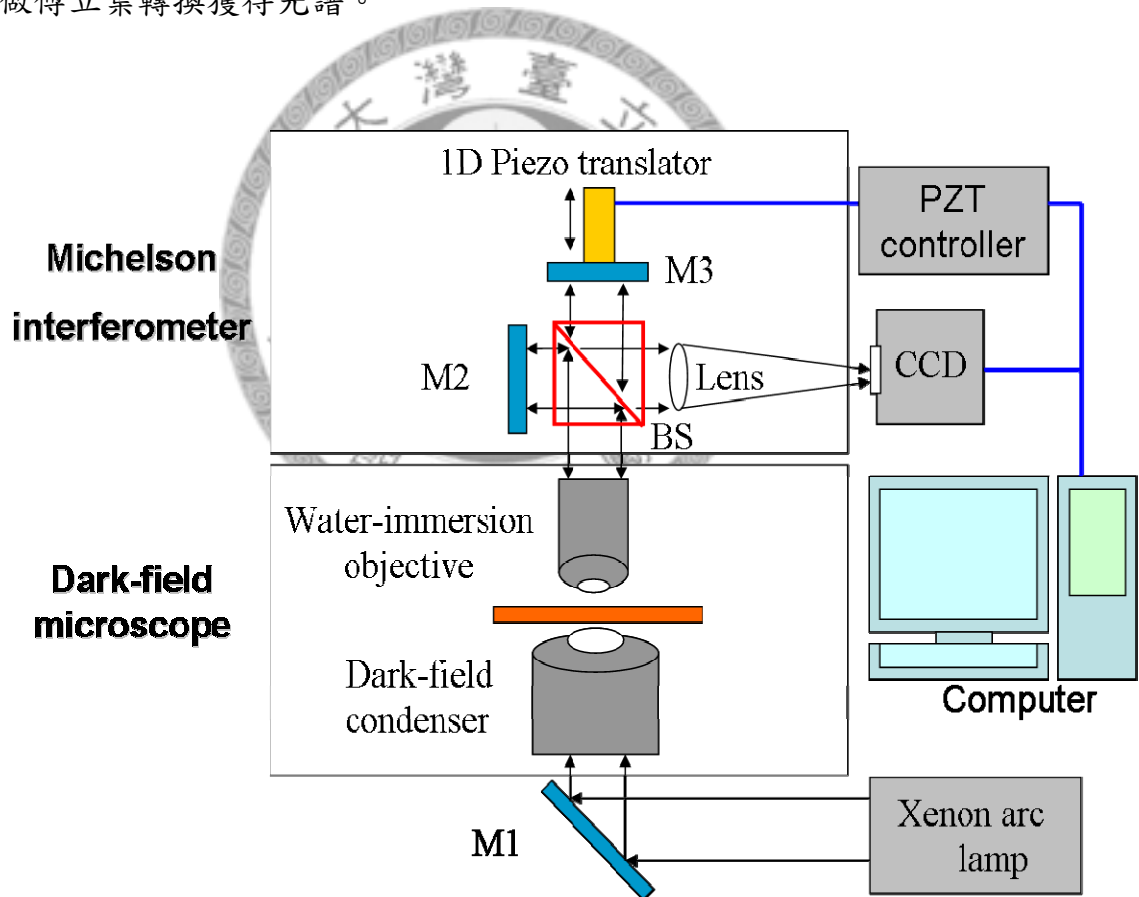


圖 12：傅立葉轉換光譜儀 (FTS) 示意圖 (77)。

第五章 實驗結果與討論

5.1 探針 DNA 修飾於金奈米粒子表面

5.1.1 BSA 應用於金奈米粒子表面修飾

實驗結果

我們依照過去文獻所提的實驗方法進行 DNA 與金奈米粒子接合的實驗，將帶有 thiol- 修飾的 probe-DNA 接至金奈米粒子表面 (78,83)，將 thiol-DNA 與金奈米粒子以適當的比例混合，而後再利用離心的方法，用以移除未與金奈米粒子表面產生鍵結的 DNA 分子 (Free DNA)，然而我們在離心步驟之後所遇到的問題，便是回溶 Au-probe-DNA 時，溶液會發生顏色改變的現象 (圖 13, A)。我們藉由吸收光譜來鑑定之，亦得到吸收光譜有紅移的現象發生，此一現象即是金奈米粒子產生聚集 (圖 14)。為解決 thiol-DNA 修飾於金奈米粒子上聚集的問題，我們於 thiol- DNA 與金奈米粒子混和反應完成後，進行離心之前，加入 bovine serum albumin (BSA) (圖 13, B)，來達到防止金奈米粒子聚集的問題 (78,87)。

我們在 Au-probe-DNA 混合反應與離心步驟之間加入 BSA，是為了避免在離心步驟之後產生金奈米粒子的聚集，比較 Au-probe-DNA 在加入 BSA 及未加入 BSA 兩者的吸收光譜圖 (圖 14)，我們發現，加入 BSA 之後，光譜紅移的現象相對變得不明顯，可以推知，BSA 的確降低了金奈米粒子發生聚集的機會。

在我們的實驗過程中，偶會遇到與過去文獻方法一致的情況，即在離心

之後並不會有聚集的現象發生。若我們將所配製好的 Au-probe-DNA 溶液放置 3~5 天後，仍會有金奈米粒子聚集的現象產生，因此，我們可以推測，在實驗過程中，離心之後雖未有聚集的現象發生，但 Au-probe-DNA 本身依舊是朝著聚集的反應方向在進行，而 Au-probe-DNA 3~5 天聚集產生也會限制我們在三明治雜交反應的進行。因此在修改步驟之後(加入 BSA)，我們也測定其對時間的反應性。如我們發現，在加入 BSA 之後，除了避免離心時對於 Au-probe-DNA 造成聚集的發生，同時也降低了時間對我們所得 Au-probe-DNA 的聚集影響(圖 15)。

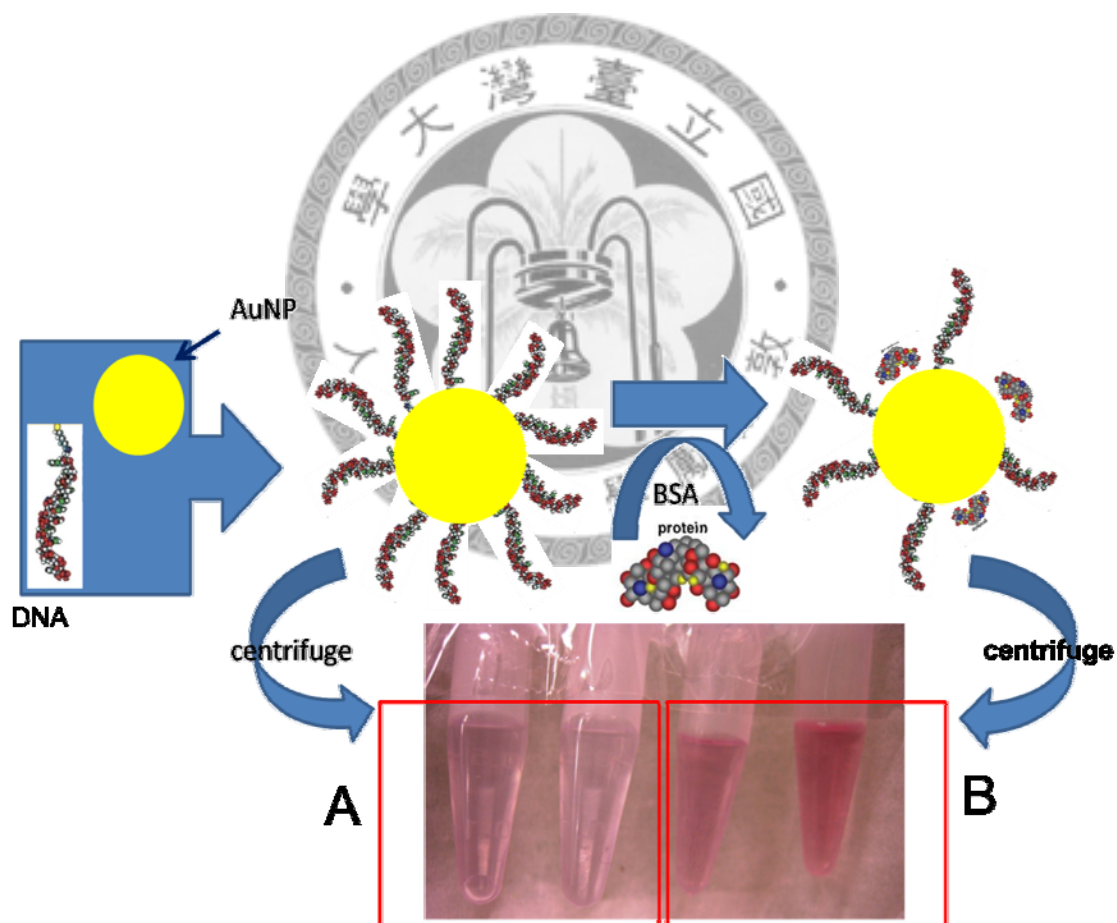


圖 13：thiol- DNA (probe-DNA) 修飾於金奈米粒子表面流程圖。

Gold nanoparticle、DNA 與 BSA 皆為示意圖，圖中所示大小並非其原本實際尺寸大小。

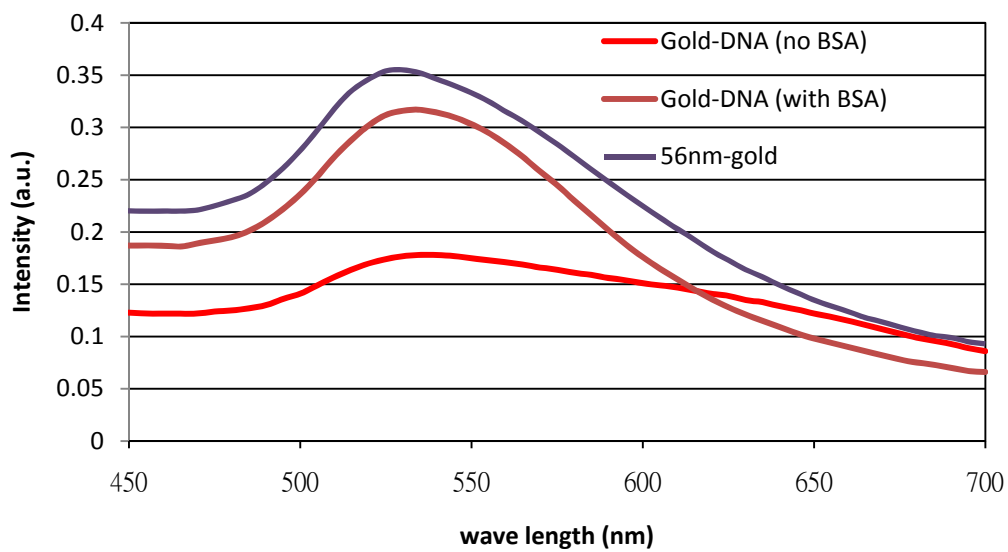


圖 14：經BSA修飾及未修飾的金奈米粒子吸收光譜。

56 nm-gold 為標準 56 nm 金奈米吸收光譜。可以明顯發現，在離心之前加入 BSA，吸收光譜並不會有明顯的偏移，可避免金奈米粒子聚集的發生。

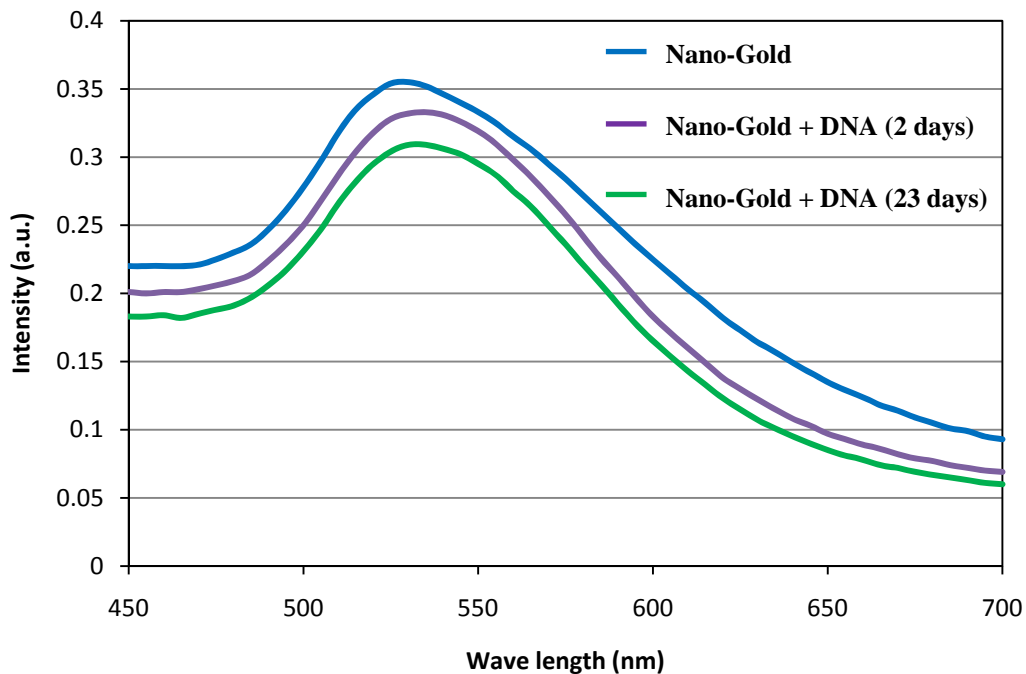


圖 15：時間對 Au-probe DNA 的影響。

完成 Au-probe-DNA 反應之後，分別在反應完成後、2 天後、23 天後分別量測吸收光譜，並無明顯的偏移產生。

實驗討論

BSA 會自發性的與金奈米粒子反應而附著在其表面上 (87)，利用這樣的特性，我們對於原本的實驗設計做了適度的修改。在 thiol-DNA 吸附在金奈米粒子表面之後，我們加入 BSA，而加入的 BSA 會吸附在金奈米粒子外層，可以形層一包覆型態將金奈米粒子包覆於其中 (87)。當金奈米粒子外層有著 BSA 分子包覆存在，可以避免在離心時產生聚集現象。

在實驗步驟加入 BSA 之後，除解決在離心時產生的聚集問題，對於 Au-probe-DNA 存放的時間也隨之延長，相對於原先未加入 BSA 所完成的 Au-probe-DNA 只能存放 3-5 天的時間，加入 BSA 的 Au-probe-DNA 可以延長放置至少三個星期 (圖 15)，對於實驗樣品的製備與使用提高了其本身的可用性。

Probe-DNA 藉著 thiol- 修飾的一端與金產生硫金鍵結吸附於金奈米粒子表面上，因此，一般的 DNA 必須經過 thiol- 修飾的反應才可供使用。本論文所使用的 thiol-DNA (表 伍-1) 分別購自 Sigma 與 IDT，然而在 thiol-DNA 與金奈米粒子混合反應時，使用購自 Sigma 的 thiol-DNA 在混合反應的步驟時，用肉眼即可觀察到聚集的產生，使用 IDT 的 thiol-DNA 便沒有這樣的問題發生，因此在本論文實驗所用到的 thiol-DNA 皆從 IDT 訂購而得。

表 伍-1：Thiol-DNA 序列及相關資訊。

相同的序列，分別構自 Sigma 與 IDT

Name	Purification	Sequence (from 5' to 3')
NP-1	HPLC	Thiol-AAAAAAAAAAAAAAAAA

5.1.2 金奈米粒子上 DNA 數量

實驗結果

在 Au-probe-DNA 實驗步驟中聚集產生現象的問題解決之後，我們開始針對所下的 probe-DNA 濃度作定量的測試。如圖 16 所示，使用 56 nm 金奈米粒子，約莫在加入 DNA $0.5 \mu\text{M}$ ，可以使 56 nm 金奈米粒子表面達到飽和吸附量，此時每個金奈米粒子表面約有 240 - 250 條 DNA 分子；使用 32 nm 金奈米粒子，約莫在加入 DNA $0.25 \mu\text{M}$ ，可使 32 nm 金奈米粒子達到飽和吸附量，此時表面約有 210 - 220 條 DNA 分子。

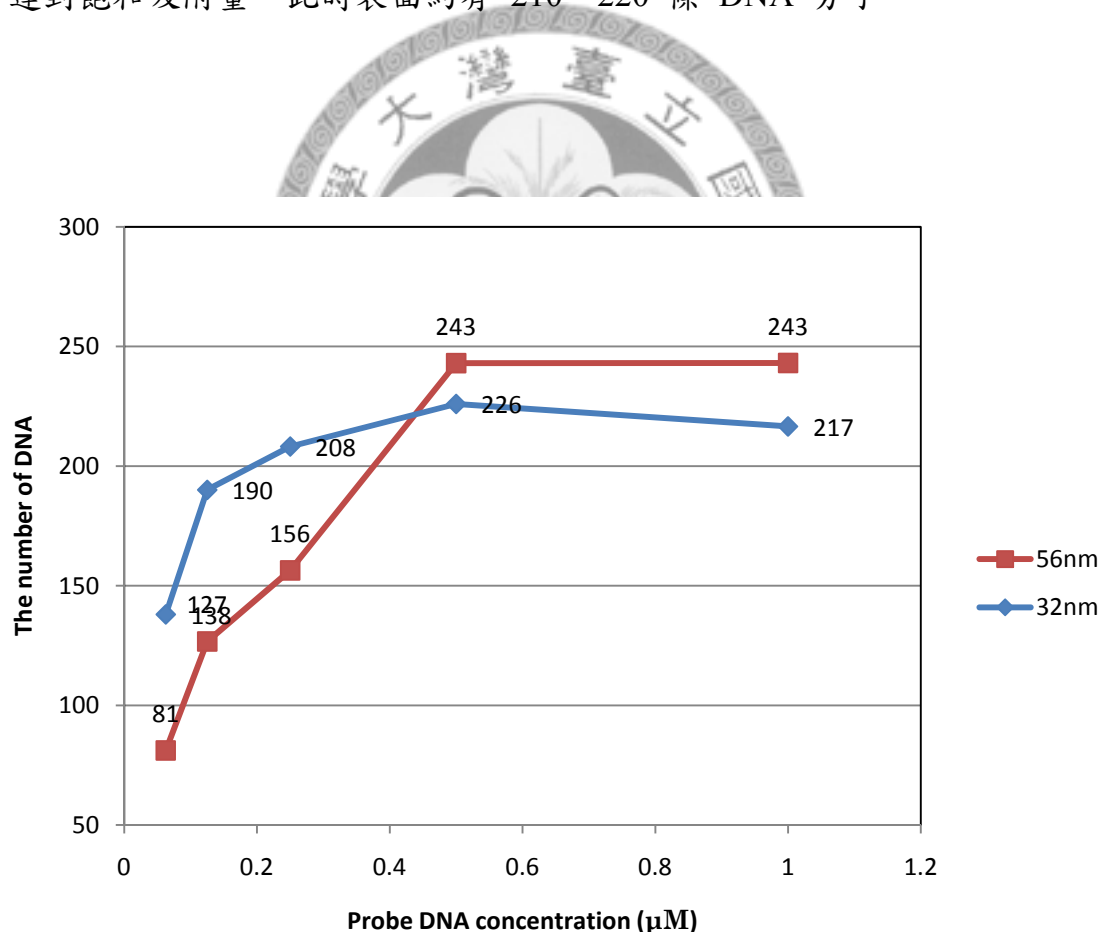


圖 16：單顆金奈米粒子上的 DNA 數量。

縱軸為每個金奈米粒子上 DNA 的數量 (DNA / gold nanoparticle)。橫軸為 thiol-DNA 與金奈米粒子混合時所給予的 DNA 初始濃度。

實驗討論

探討金奈米粒子表面的 DNA 數量，目的是為了解後續我們將要進行雜交反應時，對於雜交反應效率的評估，在另一方面，也提供我們確認所給予的 probe-DNA 初始濃度是否適合。

實驗設計參照 Hurst 於 2006 年所發表的文章稍作修改(88)，利用 Oligreen 螢光染劑定量方式，根據標準品的濃度換算，間接求得上清液所含 DNA 濃度。DNA / gold nanoparticle 的計算方式為：由 DTT 所取代出來的 DNA 濃度扣除游離 DNA 濃度，在除上金奈米粒子濃度所得，如所示

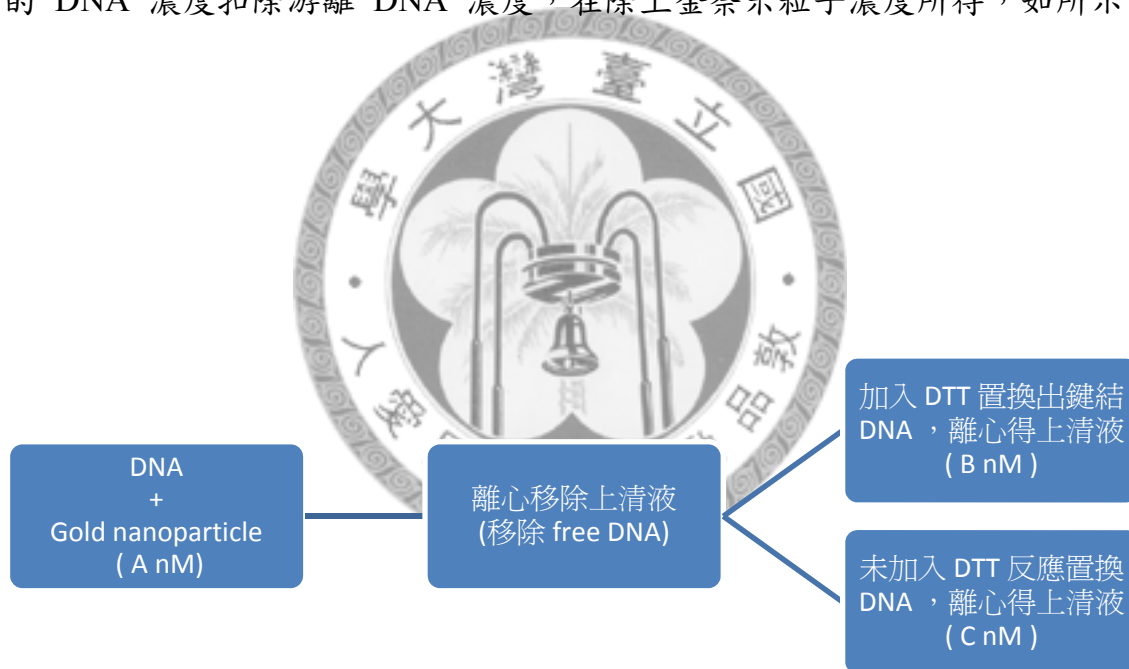


圖 17：估計單顆金奈米粒子表面所含 DNA 數量流程圖。

$\text{DNA} / \text{gold nanoparticle} = (B - C) / A$ ，其中 A = 單位體積所含金奈米粒子數， B = 單位體積所含 DNA 莫耳數 (包括被置換出的 DNA 及第一次離心所留下未鍵結的 free DNA 總莫耳數)， C = 單位體積所含 DNA 莫耳數 (第一次離心所留下未鍵結的 free DNA 莫耳數)。

與前人實驗所得相互比較 (88)，Hurst 利用 15 nm 金奈米粒子計算求得飽和情況下，DNA / gold nanoparticle 的值約在 50 ~ 60 之間，在本論文實驗中，利用 32 nm 金奈米粒子所得飽和情況下，DNA / gold nanoparticle 的值約在 210 ~ 220 之間。根據 15 nm 與 32 nm 金奈米粒子的半徑比可求得兩者表面積比約為 1:4，而兩者的 DNA / gold nanoparticle 比也約略等於 1:4，以單位面積的數量比來比較，本論文所得實驗結果與前人研究是相當接近的。

在比較 56 nm 金奈米粒子時，所得的比值關係卻無明顯的正相關。以單位面積的 DNA 數量比來推算，理論的 DNA / gold nanoparticle 值應介於 600 ~ 800 之間，而我們實驗所得的 DNA / gold nanoparticle 值僅在 250 附近，有相當明顯的差距，但在 Hurst 的研究中亦得這樣的結果。

Thiol-DNA 與金奈米粒子之間的鍵結尚有 DNA 分子的空間效應、金奈米粒子形狀均勻度及化學反應平衡等因素影響之。若以其中化學平衡因素討論之，我們可以推測此飽和吸附量應為 thiol-DNA 與金奈米粒子產生鍵結的一個化學上的反應平衡，破壞此平衡，應有可能使金奈米粒子表面所帶的 DNA 分子數量有所提升。DNA 與金奈米粒子的鍵結仍有許多其它因素值得探討，在此我們只對目前實驗設計下所得的 DNA / gold nanoparticle 值作初步評估，以便後續實驗的進行，而其它因素的深入研究探討，則非本論文所討論的主題。

5.2 金屬奈米粒子散射光譜

5.2.1 奈米粒子散射光譜

不同種類的奈米粒子會有不同的光譜，例如金奈米粒子與銀奈米粒子。而相同種類的粒子也會因為其大小的不同及形狀的不同也會有不同的光譜產生，圖 18 可知不同種類的奈米粒子 (gold and silver nanoparticle)，大小不同的同種金奈米粒子 (gold nanoparticle)，以及形狀不同的同種金奈米粒子 (gold nano-particle and nano-rod) 都有其特定的光譜，從圖 18 中，我們也可以篩選出在未來適用於標記信號源的奈米粒子，例如銀奈米球、金奈米粒子球與金奈米粒子棒三種標記。而 32 奈米金與 56 奈米金的大小雖然有所不同，但由於光譜解析太過相近，在未來應用時有可能發生彼此重疊 (overlap) 的情形，這會造成光譜重疊，不易解析，在此我們不建議這兩種大小不同的金奈米粒子球同時用於標記信號源使用。

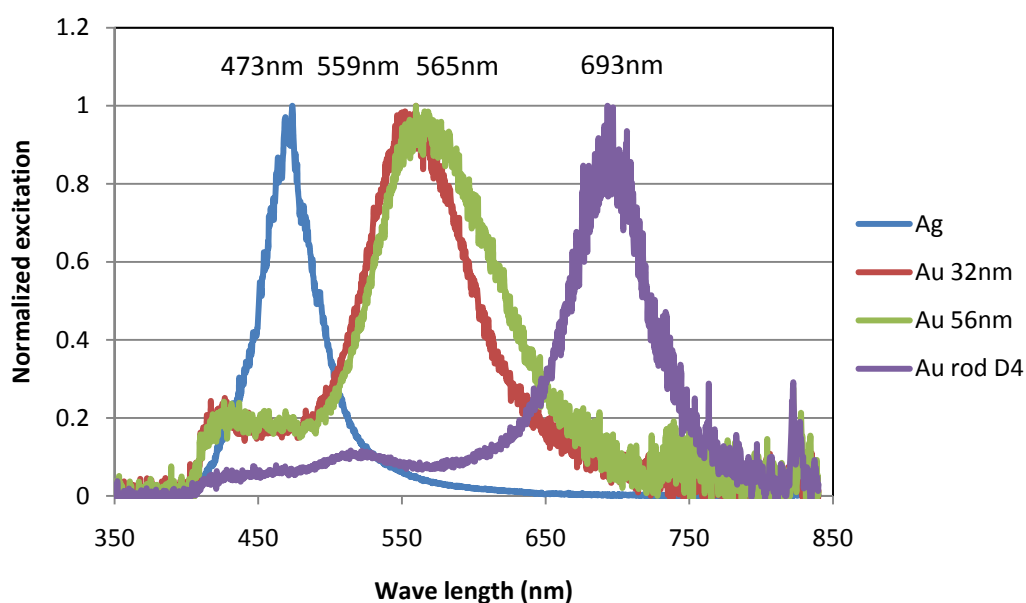


圖 18：不同金屬奈米粒子散射光譜圖。

Ag 為銀奈米粒子， Au 為金奈米粒子， Au rod 為金奈米棒。

實驗結果與討論

在進行金奈米粒子光譜掃描時，晶片表面的潔淨是非常重要的，若晶片表面有雜質的存在，那麼將會影響到我們對於光譜的解析，因為在暗視野顯微鏡的架構下，入射光亦會與這些雜質發生交互作用而產生散射光，因此雜質本身也會有自己的光譜產生，如圖 19，雖然這些雜質會有自己的光譜產生，但是其峰點 (peak) 位置仍與金奈米粒子有所差異性存在，因此我們亦可將雜質視為另外一種粒子而進行光譜解析，最後去除掉雜質光譜因素，仍可獲得我們所要的資訊。

我們將圖 19 的數據正規化處理還原成原始數據，可以發現，金奈米粒子的信號與雜質信號強度比有明顯的差異性，圖 20 顯示為金奈米粒子與雜質光譜的信號強度差異，以強度做為區分時，雜質與金奈米粒子重疊的部分仍可被解決，進行解析。

將金奈米粒子與銀奈米粒子光譜相互比較，在同一濃度下，銀奈米粒子的光譜信號強度比銅濃度的金奈米粒子高出許多(圖 21)。過去不少文獻即利用銀奈米粒子散射光譜信號較金奈米粒子明顯 (89,90)，因此藉由銀奈米粒子做為金奈米粒子信號放大的媒介使用。同樣地，我們對於銀奈米粒子用做信號標記源時，若能評估銀奈米粒子與雜質信號的強度差異性，銀奈米粒子與雜質粒子的光譜，在適當的數據處理之下，是可以排除掉雜質光譜的影響。

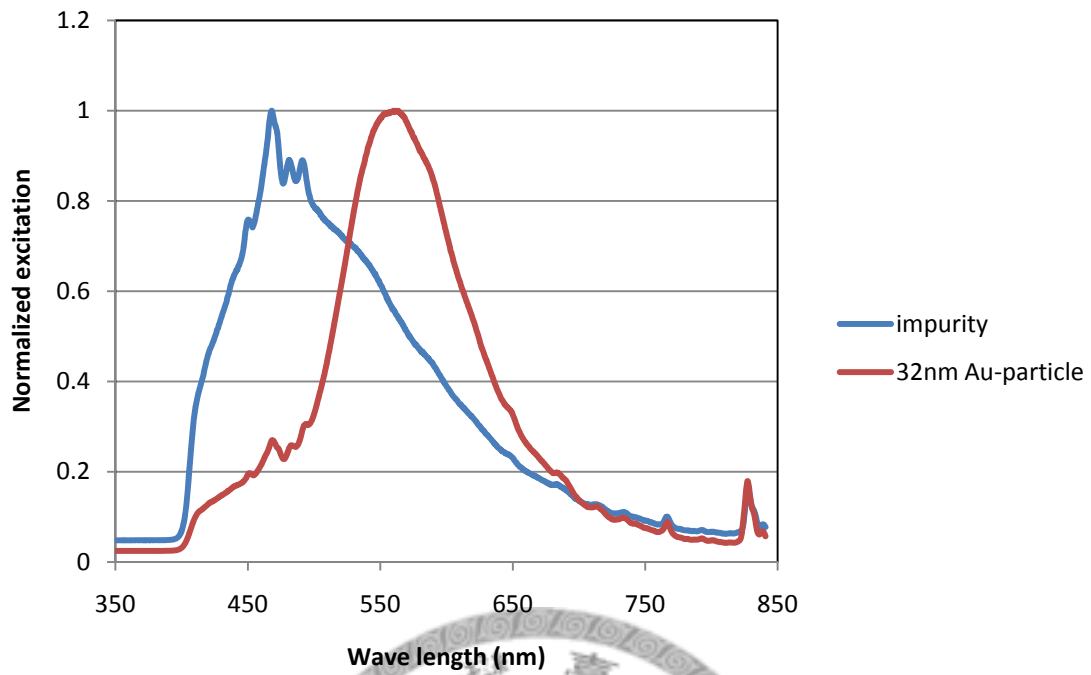


圖 19：晶片表面上 32 nm 金奈米粒子與雜質散射光譜。

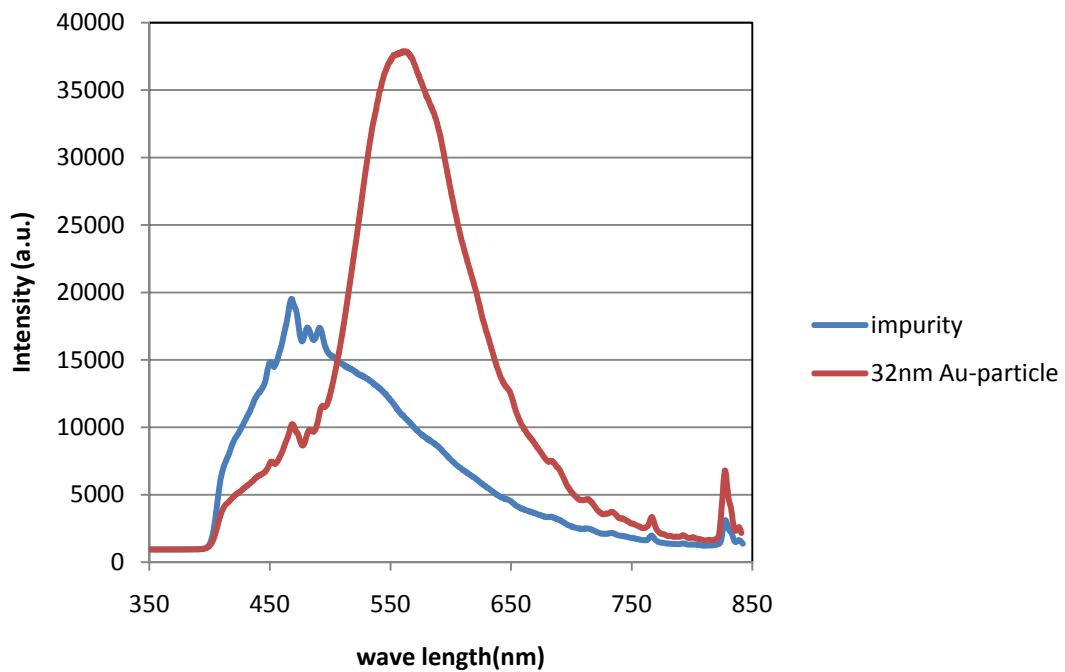


圖 20：32 nm 金奈米粒子與雜質散射光譜強度。

商用光譜儀：Acton SpectraPro 2150i。

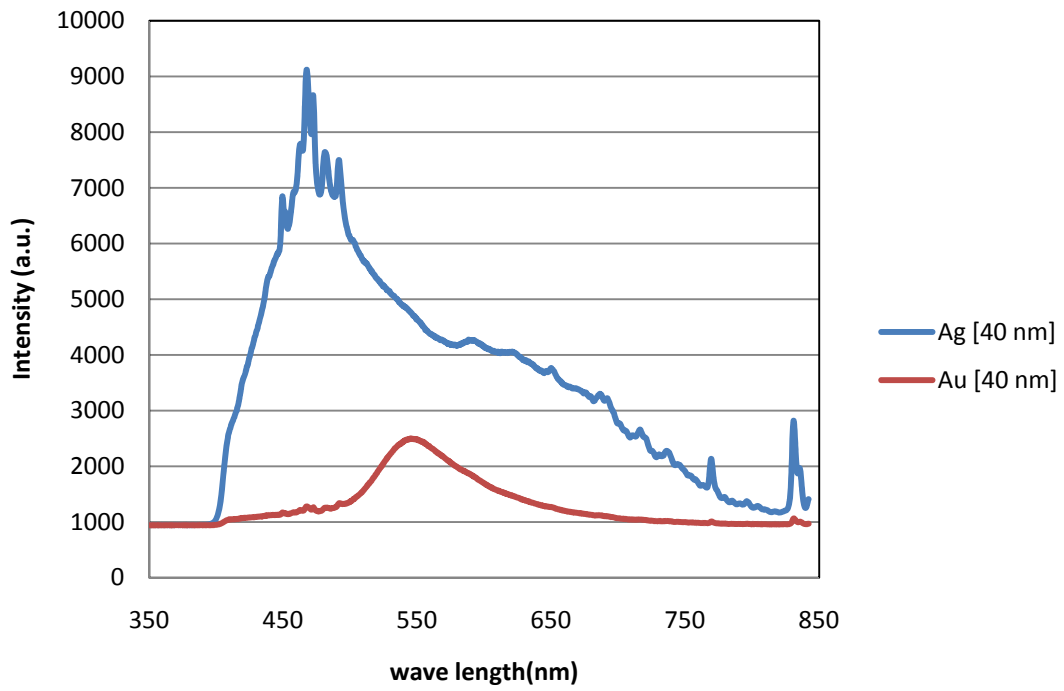


圖 21：40 nm 銀奈米粒子與金奈米粒子的原始散射光譜信號強度差異。

Ag 為銀奈米粒子，Au 為金奈米粒子。光譜儀：Acton SpectraPro 2150i，奈米粒子濃度皆為 1.49 pM。



5.2.2 DNA 修飾奈米粒子散射光譜

5.2.2.1 奈米粒子與 DNA 修飾奈米粒子的散射光譜

文獻指出，在接上 DNA 分子修飾的金奈米粒子會產生紅移的現象(91)，而金奈米粒子容易也會因為彼此靠得太近而產生紅移的現象(92)，圖 22 為金奈米粒子在 DNA 分子接上前後的光譜差異，圖 23 則顯微鏡底下真實金奈米粒子影像。在這裡我們分兩部份來討論：

一、以單顆光譜比較

在接上 DNA 分子(表 伍-2)之後，金奈米粒子的光譜明顯的發生紅移的現象，而每顆金奈米粒子紅移程度卻也不盡相同，如圖 22 所示。這樣的結果對我們之後使用金奈米粒子當作標記可能會是個問題，因為受制於金奈米粒子接上 DNA 造成光譜的不同，對信號源標記數據分析難度將會提高。然而，在後續的實驗中，我們發現利用金奈米粒子應用在 DNA 晶片上，不是只有 DNA 分子本身會對金奈米粒子造成紅移的影響，而在晶片上，同時也會因為 Au-probe/target-DNA 的密度高低不同以及 DNA 修飾於金奈米表面時造成的聚集現象而有紅移的現象發生，對於其它因素的影響將在後文討論。

表 伍-2：單顆金奈米粒子紅移實驗所用之 DNA 序列

Name	Particle size	Sequence (5' to 3')
OP-DNA	32 nm	AGTGATAACGCTGTCTTTTTTTTTTTTTT-thiol

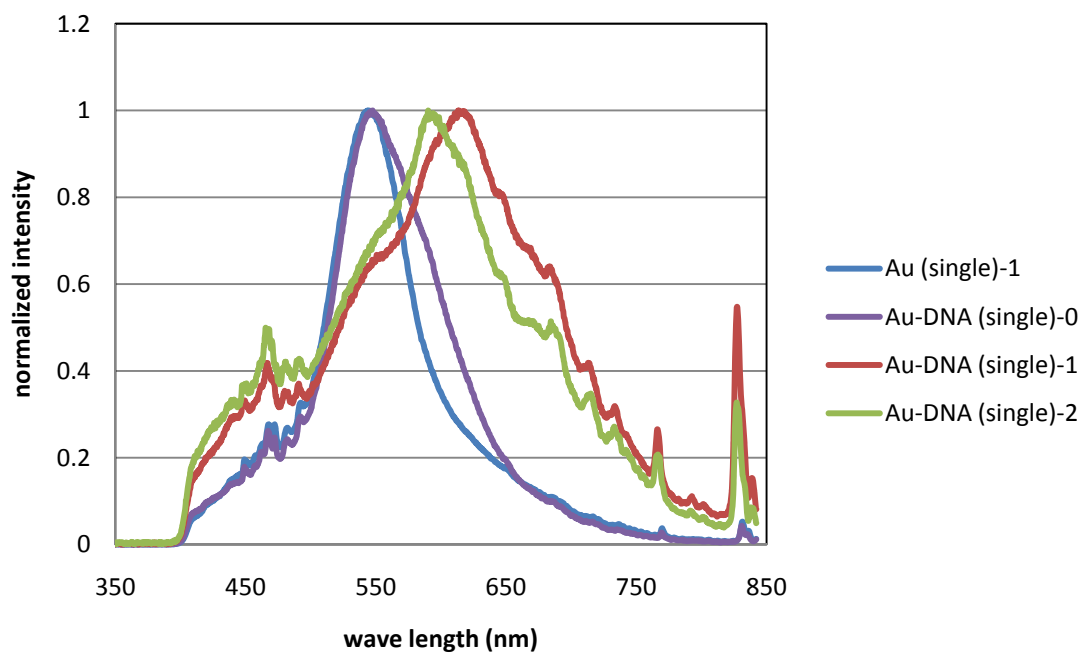
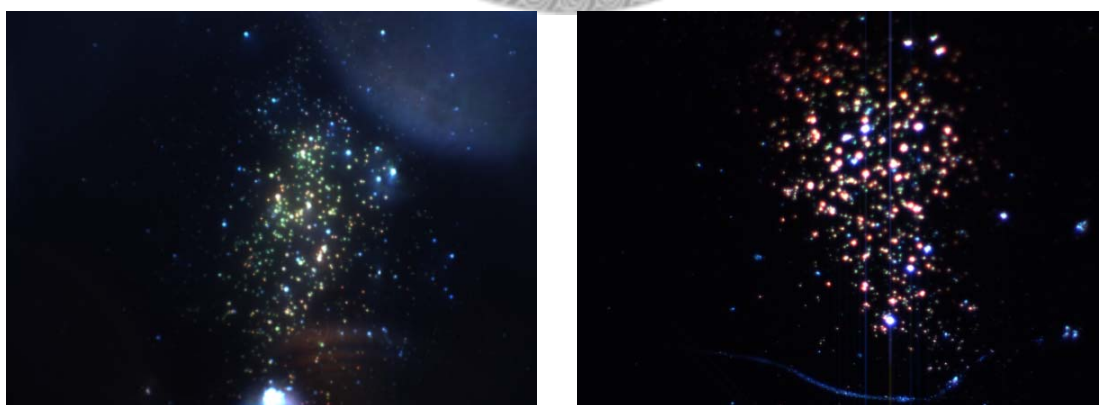


圖 22：32 nm 金奈米粒子與 DNA 修飾金奈米粒子表面散射光譜圖。

Au (single) 表單顆 32 nm 金奈米粒子光譜， Au-DNA (single) 表示 DNA 修飾的 32 nm 單顆金奈米粒子的光譜。以 SpectraPro 2150i 量測得之。



(A)

(B)

圖 23：在暗視野顯微鏡下所得 32 nm 金奈米粒子影像。

(A) 32 nm 金奈米粒子 (B) DNA 修飾於 32 nm 金奈米粒子

實驗討論

本節最前段提到，金奈米粒子接上 DNA 分子後會有紅移的現象產生，而圖 22 所示，所得金奈米粒子光譜的紅移現象程度並不均勻，有的金奈米粒子有明顯的紅移，有的金奈米粒子則無明顯紅移現象，我們推測此紅移的現象不僅是 DNA 修飾於金奈米粒子表面的單一因素所造成的，同時也跟金奈米粒子之間的距離及金奈米粒子聚集現象產生有所關聯。

本實驗所得金奈米粒子光譜的是將金奈米粒子固定於經 polymer (poly vinyl pyrrolidone, MW=1.3×10⁶) 修飾的基材上，因此，金奈米粒子的濃度將會影響基材表面上金奈米粒子的密度，當金奈米粒子濃度高時，基材表面的金奈米粒子密度也隨之為高，可知金奈米粒子之間的距離也會相當的接近，根據文獻所提，金奈米粒子的距離對於紅移亦有相當程度的影響(92)。

在先前 probe-DNA 修飾於金奈米表面的實驗，提到金奈米粒子與 DNA 反應過程有聚集現象的產生，在實驗中，我們加入 BSA，於外層包覆 Au-probe-DNA 降低其聚集現象產生的機率，根據我們先前所得的實驗結果也得到確認。然而，此結果是藉由量測金奈米粒子溶液的吸收光譜作為驗證，而此吸收光譜是為一平均光譜，只能證明絕大部份的金奈米粒子並無聚集的現象發生，當討論單顆金奈米粒子時，便有聚集現象發生的可能性，在此實驗中所量測的紅移現象，也可能是金奈米粒子產生聚集所造成。

綜合上述所言，我們所得的紅移程度不一的結果可能包括了 DNA 本身對於金奈米粒子造成的影響，而金奈米粒子彼此之間的距離與金奈米粒子本身所產生的聚集現象，都可能是造成紅移的因素。

二、 金奈米粒子平均光譜

我們面積總合的方式進行光譜量測 (SpectraPro 2150i) 的計算, 即累加多個像素的光譜資訊作平均, 得出一平均的金奈米粒子光譜(圖 24)。單顆金奈米粒子光譜紅移的現象在光譜總和平均之後相對變得不明顯, 這對我們利用金奈米粒子來當作信號源有正面的肯定性, 然而從平均光譜圖的比較, 可以觀察到由 DNA 修飾的金奈米粒子光譜仍有些許紅移的現象, 而從前段討論單一金奈米粒子光譜會有紅移現象不一的情形可以知道, 此些許紅移的現象可能是由不同紅移現象的金奈米粒子光譜所造成。而利用銀奈米粒子測量光譜討論也同時成立(圖 25), 在此不再重複敘述討論。

本實驗在金奈米粒子上接上雙股 DNA 進行實驗, DNA 序列如表伍-3 所示, 實驗流程為: (1) NP-DNA 與 NT-DNA 進行雜交反應形成雙股 DNA (2) 雙股 DNA 利用 thiol 修飾之一端於金奈米粒子及銀奈米子表面產生鍵結。



表 伍-3: 金奈米粒子平均光譜紅移實驗所用之 DNA 序列

Name	Particle soze	Sequence (from 5' to 3')
NP-DNA	40 nm	Thiol-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
NT-DNA		TCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTG GTGGACCTCATGGCCACATGTTTTTTTTTTTTTTTT

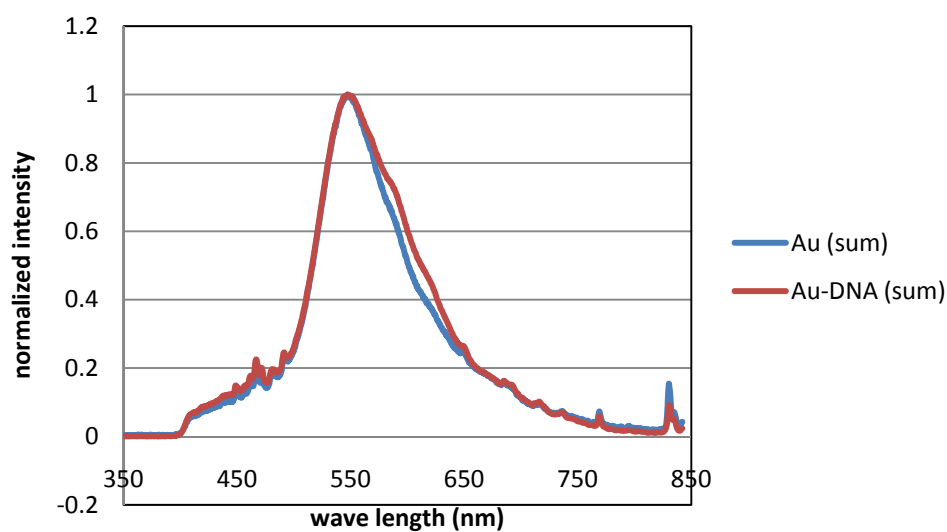


圖 24：40 nm 金奈米粒子平均光譜。

Au (sum) 表示 40 nm 金奈米粒子平均光譜； Au-DNA (sum) 表示 DNA 修飾的 40 nm 金奈米粒子的平均光譜。以 SpectraPro 2150i 量測得之。

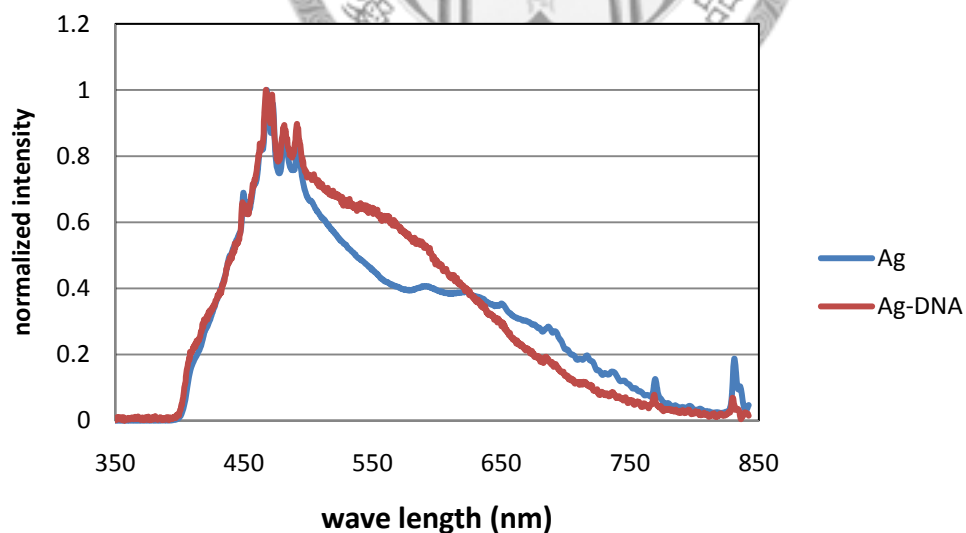


圖 25：40 nm 銀奈米粒子平均光譜。

Ag 表示 40 nm 銀奈米粒子平均光譜； Ag-DNA 表示 DNA 修飾的 40 nm 銀奈米粒子的平均光譜。以 SpectraPro 2150i 量測得之。

5.2.2.2 一對一單股 DNA 雜交反應下散射光譜

實驗設計的一開始，我們先針對利用金奈米粒子當作 DNA microarray 信號源做簡單的模型測試。

首先我們先進行一對一的單股 DNA 雜交反應，即 Au-probe DNA 直接與晶片表面上的 capture-DNA 進行一對一的雜交反應，

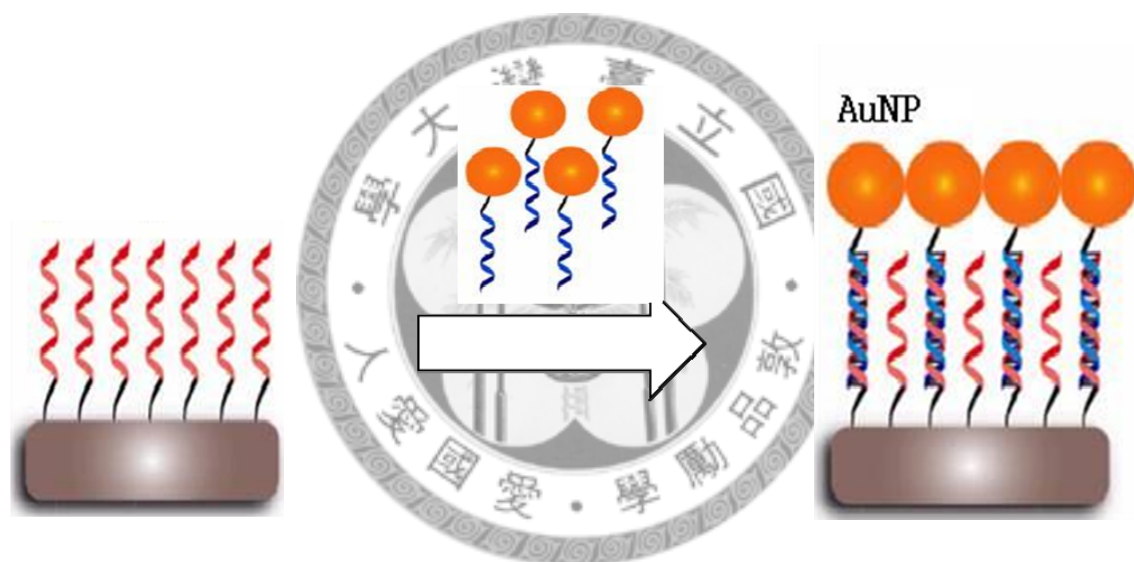


圖 26 為此實驗設計的示意圖。在完成雜交反應之後，我們利用暗視野顯微鏡 (dark field microscopy) 觀察其影像差異，圖 27 為 microarray 上分別加入 Au-probe DNA 至表面接有 capture-DNA (positive) 及未接有 capture-DNA (negative) 兩區域的差異，可以明顯的從影像看出在 positive 的區域有大量的金奈米粒子可被偵測，而 negative 的區域相對之下沒有像 positive 區域具有這麼多粒子的可被觀察，而所觀察到影像中則除了雜質粒子外，還包含了非特異性吸附 (nonspecific) 的 Au-probe DNA。

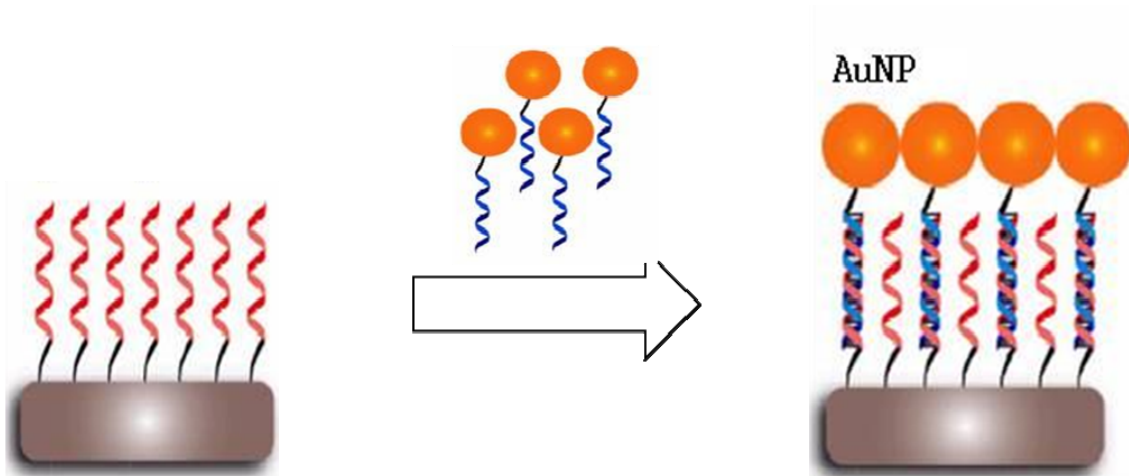
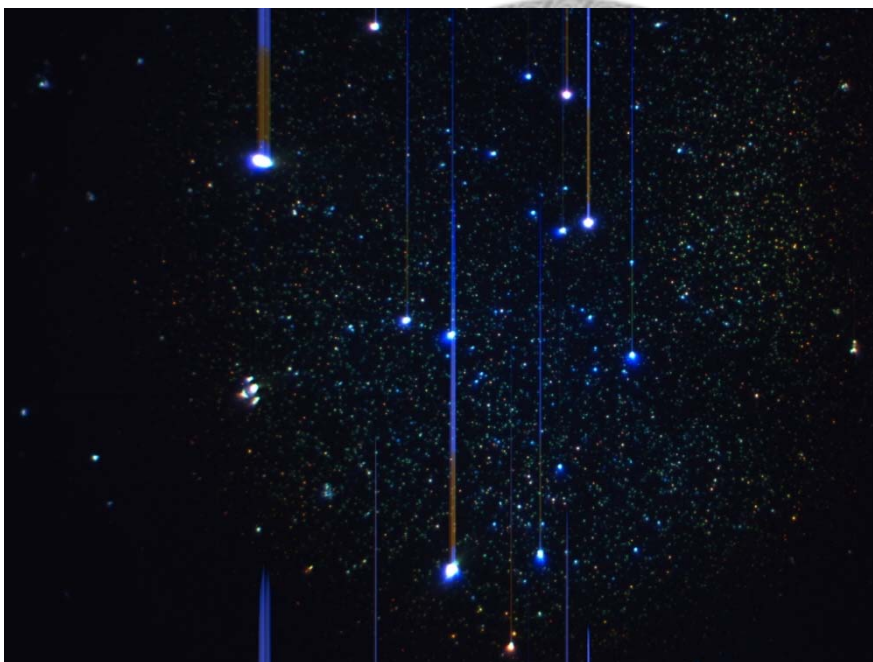
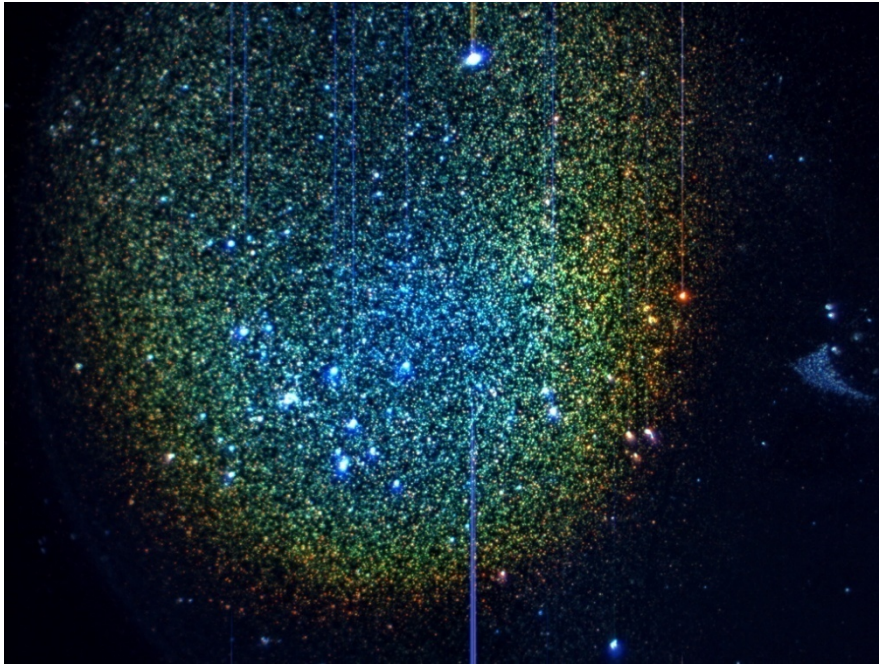


圖 26：一對一單股 DNA 雜交反應示意圖。



(A) Negative



(B) Positive

圖 27：一對一單股 DNA 雜交反應於暗視野顯微鏡下所得影像。

(A) Negative 表 DNA 修飾的金奈米粒子接至晶片未含capture DNA 區域，(B) Positive 表 DNA 修飾的金奈米粒子接至晶片含capture DNA 區域。

我們將所得到的 positive 區域 (Au-probe-DNA + capture DNA) 進行光譜掃描，圖 28 顯示在 positive 區域所得的散射光譜，同樣的我們仍發現所得的光譜的最大峰值有向 600 nm 靠近的趨勢，根據我們先前的推測，這是因為金奈米粒子濃度太高使得彼此靠的距離太近所造成的紅移現象。

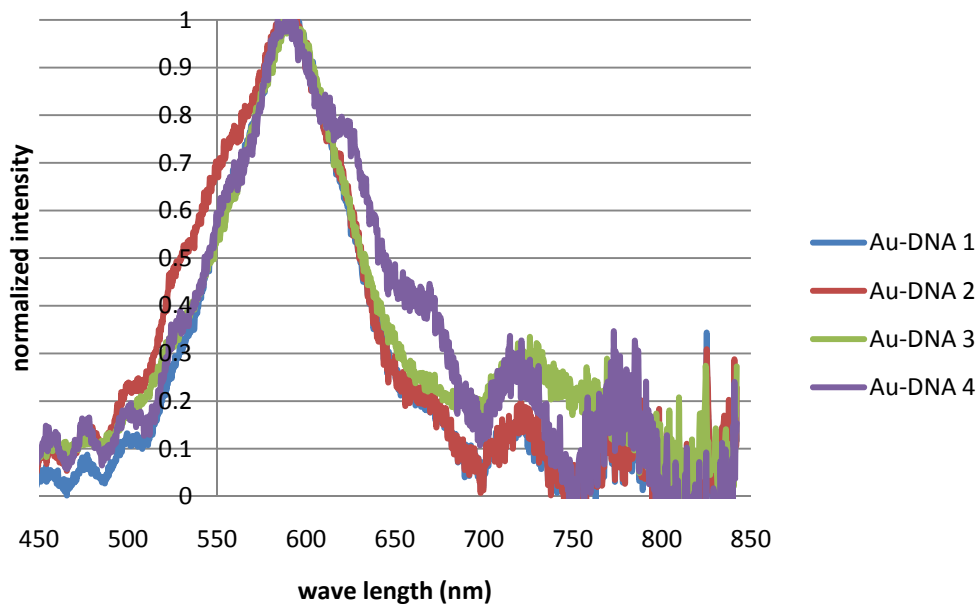


圖 28：不同區域所得的32nm金奈米粒子光譜圖。

在我們降低 probe-DNA 的密度之後進行光譜掃描，我們發現所得光譜不像圖 28 一樣得到峰值較為靠近波長 600 nm，而所得的峰值是落在波長 550 nm 附近(圖 29)，在中文獻(91)所提到，DNA 分子會對金奈米粒子造成紅移的影響，然而在我們的測量之中，不只是DNA分子對金奈米粒子造成紅移影響，我們的數據也顯示(圖 29)， Au-probe-DNA 的密度也會對我們光譜掃描造成紅移的現象，若可以找出適合的 Au-probe DNA 密度則可以降低金奈米粒子彼此靠得太近造成的紅移現象，但在降低 Au-probe DNA 密度的同時，我們也必須考慮到訊號強度的問題，因此找出適合的 Au-probe DNA 的密度是必須實行的。

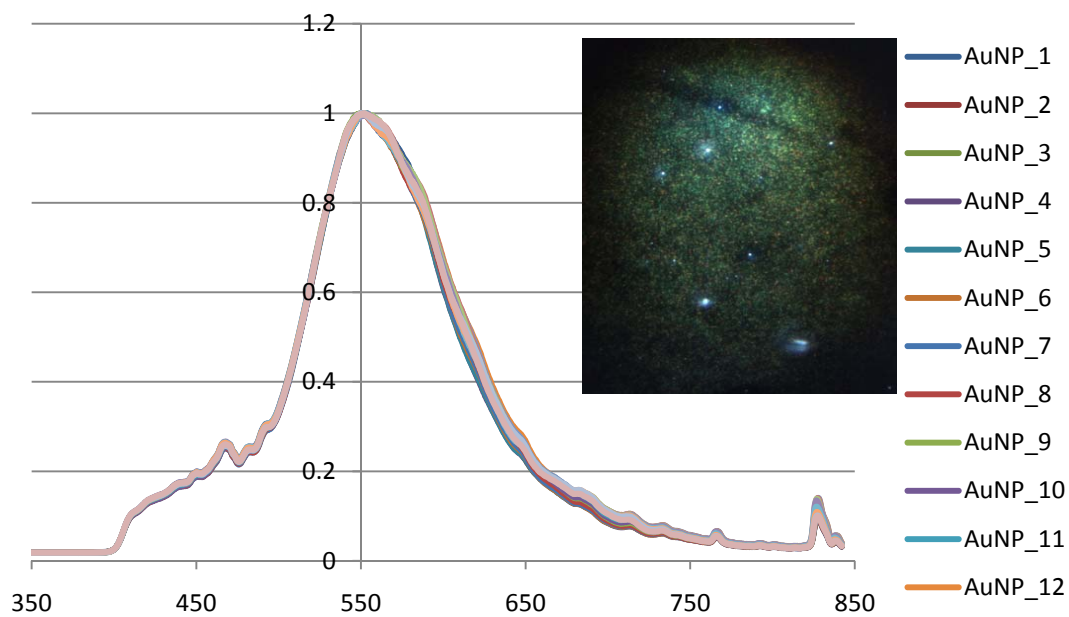


圖 29：低濃度 Au-probe-DNA 雜交反應光譜圖。
與高濃度比較，降低濃度有助於峰值往短波長方向移動。

承續 Au-probe DNA 密度對訊號強度造成影響的討論，我們依序對 Au-probe DNA 做不同濃度的稀釋(表 伍-4)，再依照先前一對一 DNA 雜交反應的實驗設計進行 Au-probe-DNA 濃度不同對訊號強度的實驗。圖 30 則為不同濃度下所得的金奈米粒子影像，從影像的角度來看，可以看出金奈米粒子在晶片表面的密度似乎有明顯的差異性，進行強度分析時(圖 31)，我們可以得到金奈米粒子在 15 pico molar 已經達到偵測極限，因此我們可以求得在晶片接上較低的 Au-probe DNA 濃度，同時也允許信號的可得性。

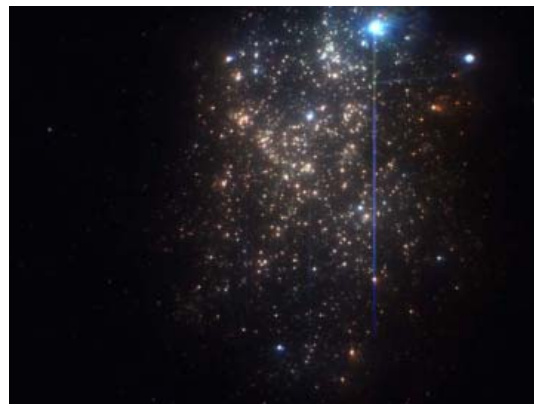
表 伍-4：Au-probe DNA 稀釋濃度。

編號	A	B	C	D	E	F
濃度	1X	0.5X	0.25X	0.125X	0.0625X	0.03125X

其中，1X = 0.3 nM



1X



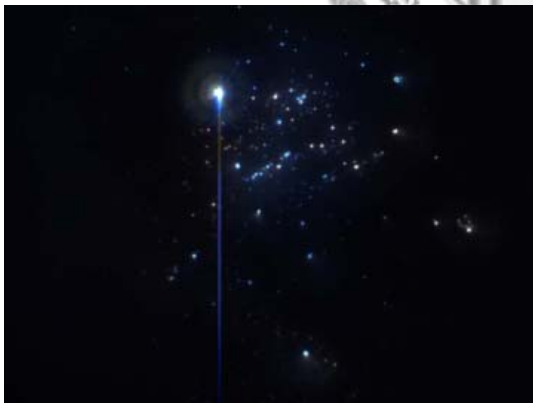
0.5X



0.2X



0.1X



0.05X



0.02X

圖 30：不同濃度的 Au-probe DNA 於晶片上進行一對一單股 DNA 雜交反應 CCD 影像。

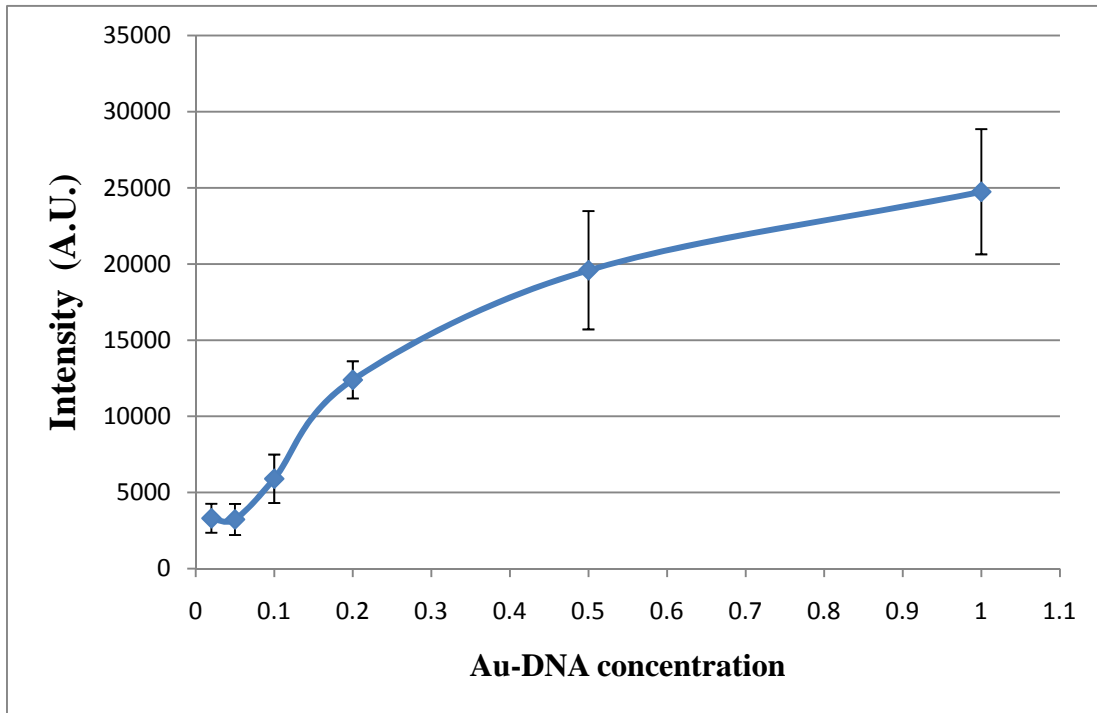


圖 31：不同濃度 Au- DNA 於晶片上的一對一的單股 DNA 雜交反應。



5.3 DNA 三明治雜交反應 (DNA sandwich hybridization)

5.3.1 DNA 三明治雜交反應初步測試

在完成一對一 DNA 雜交反應的測試之後，我們著手進行三明治雜交反應的測試，同樣的我們定有 capture DNA 的區域為 positive，另則為 negative (圖 32)，圖 33 則為 Au-probe/target DNA 接至無 capture DNA 區域的差異性，。

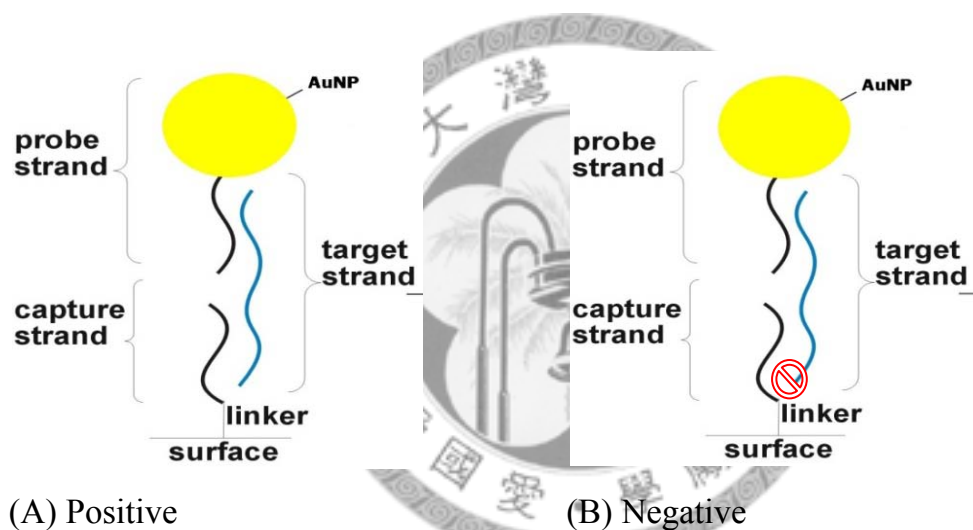


圖 32：三明治雜交反應實驗控制組與對照組示意圖。



(A) Positive

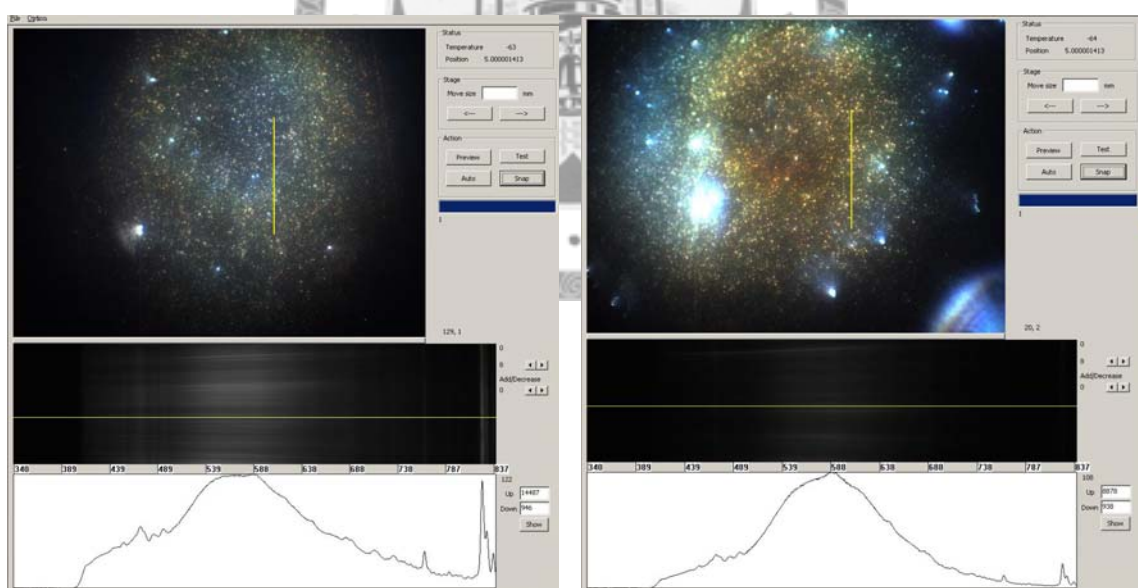


(B) Negative

圖 33：三明治雜交反應實驗控制組與對照組於暗視野顯微鏡下所得影像。

從圖 33 影像中我們可以看出 positive 與 negative 兩區域的差異性，初步的影像判斷可以得知我們所進行的 DNA sandwich hybridization 是可行的，得到影像之後我們進行光譜掃描。

我們“一對一雜交反應所得的光譜”所得的推測與“DNA 三明治雜交反應所得光譜”兩者做初步的測試比對，我們一開始對 DNA 三明治雜交反應所下的 Au-probe/target DNA 濃度似乎有點高，由所得光譜比預期的寬了許多(圖 34 (A))，由前面的實驗推測是因為 Au-probe/target DNA 的高濃度使得金奈米粒子彼此之間距離不一，造成光譜寬分布的現象，照先前所推測，我們降低 Au-probe/target DNA 的濃度再進行測試，所得的光譜圖有略為窄化現象，而峰值也較為明顯(圖 34 (B))。



(A)

(B)

圖 34：不同Au-probe/target DNA 濃度下，散射光譜影像與測量光譜圖。

(A) 較高濃度的Au-probe/target DNA。 (B) 較低濃度的Au-probe/target DNA。

5.3.2 傅立葉光譜儀掃描系統應用於晶片掃描

我們目前所採用的商用光譜掃描系統只能針對小區域(點 or 線)進行掃描，這樣的掃描效率並不高，而針對特殊小區域掃描也未能顯現整個大區域的一般性，因此在我們實驗室發展了一套傅立葉光譜影像掃描系統，以利我們進行大面積奈米粒子掃描。

首先我們先測試商用光譜儀與傅立葉光譜儀光譜的比較，圖 35 顯示單點的金奈米粒子光譜解析，所得的光譜圖(圖 36)與我們利用商用光譜儀所得的光譜圖相當接近，雖然峰值位置有些許的不同，但我們在先前實驗也討論過，對於晶片表面金奈米粒子紅移的現象包含了金奈米粒子之間距離的影響，而所測得的光譜形狀彼此也相當，因此我們認為這樣的誤差性是可以被允許的。

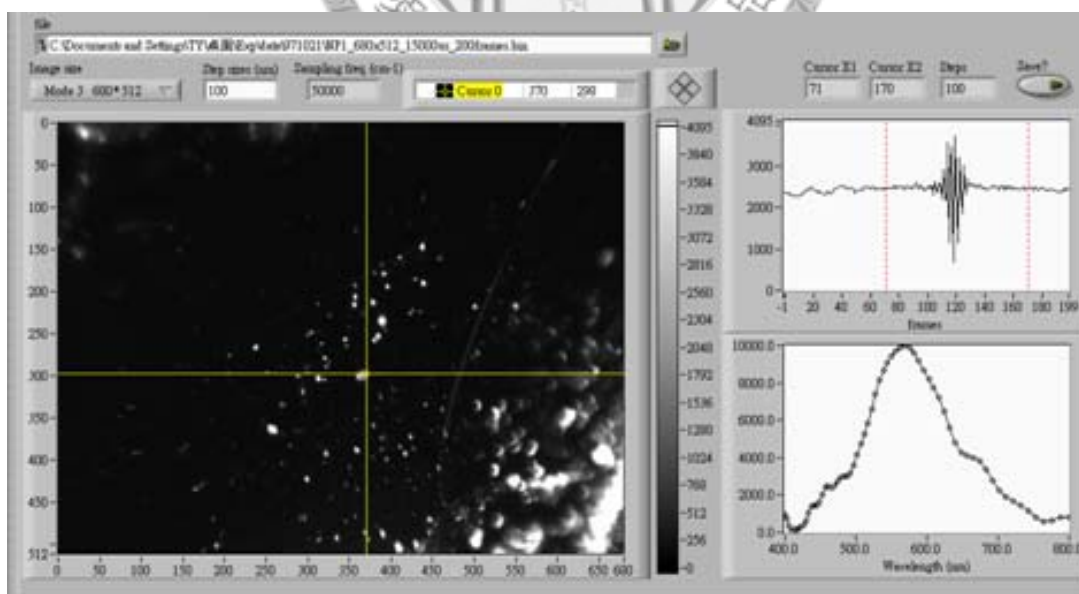


圖 35：利用傅立葉光譜儀的操作介面圖。

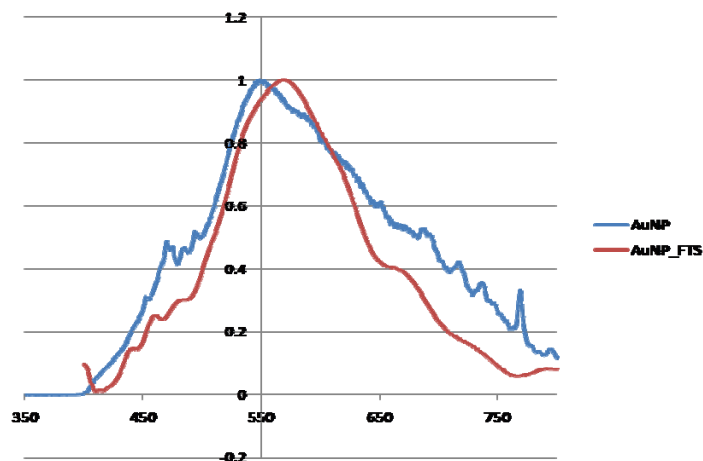


圖 36：商用光譜儀與傅立葉光譜儀針對單點的光譜比較。

在前面我們提到，原有的商用光譜儀只能針對極小區域範圍的掃描，而我們利用傅立葉光譜儀掃描是為了達到大面積快速掃描的目的，同樣的我們也就必須測試在大面積區域掃描下所得到的光譜圖，圖 37 顯示了大區域面積的掃描同樣的可以得到我們先前所測試的光譜圖，而較商用光譜儀更進一步的是掃描面積的增加，掃描時間的減少。

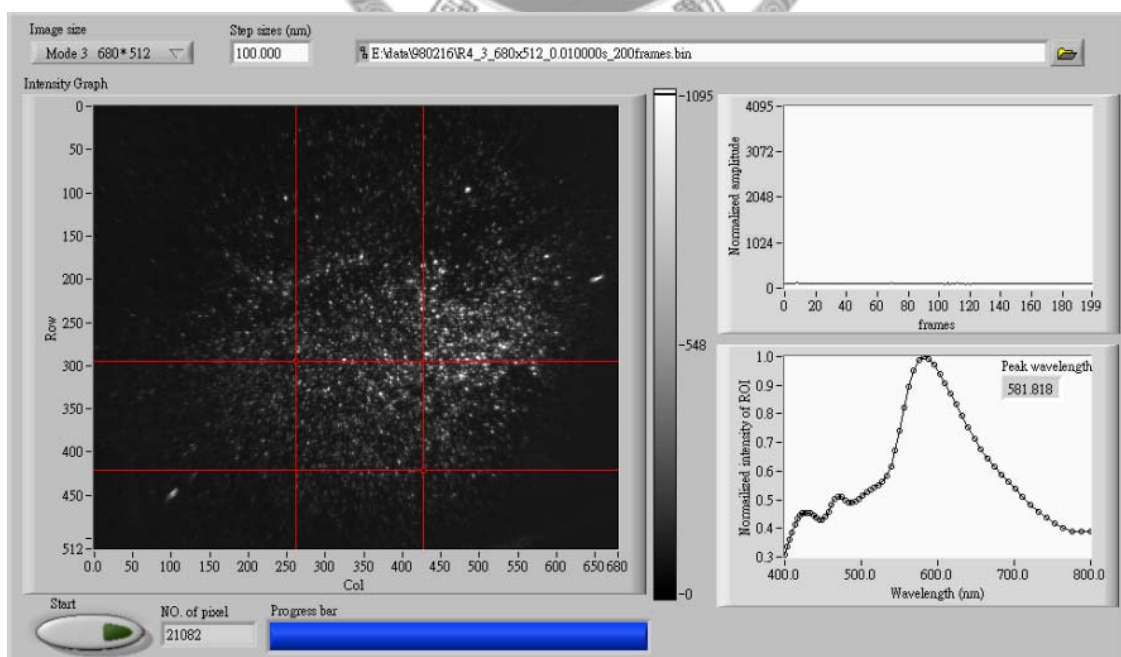


圖 37：傅立葉光譜儀於大範圍的晶片表面金奈米粒子掃描。

在三明治雜交反應中，我們也再次測試 Au-probe/target DNA (56 nm nano-gold)濃度於晶片表面上密度對於金奈米粒子光譜紅移現象及信號偵測的影響。可以得到，隨著濃度的下降(表 伍-5)，金奈米粒子光譜紅移的現象也逐漸下降，當濃度下降至 $2^{-4} \sim 2^{-5} X$ 時 (約 7.2~3.6 pico molar)，已經來到系統的偵測極限(圖 38)，而隨著濃度的下降，所得光譜圖形也慢慢接近我們原本對 Au-probe/target DNA 預期所得的光譜圖形(表 伍-6)。

表 伍-5：Au-probe/target DNA 的濃度序列稀釋。

Au-probe/target DNA	1	2	3	4	5	6	7
濃度 1X= 58 pM	1X	$2^{-1}X$	$2^{-2}X$	$2^{-3}X$	$2^{-4}X$	$2^{-5}X$	$2^{-6}X$

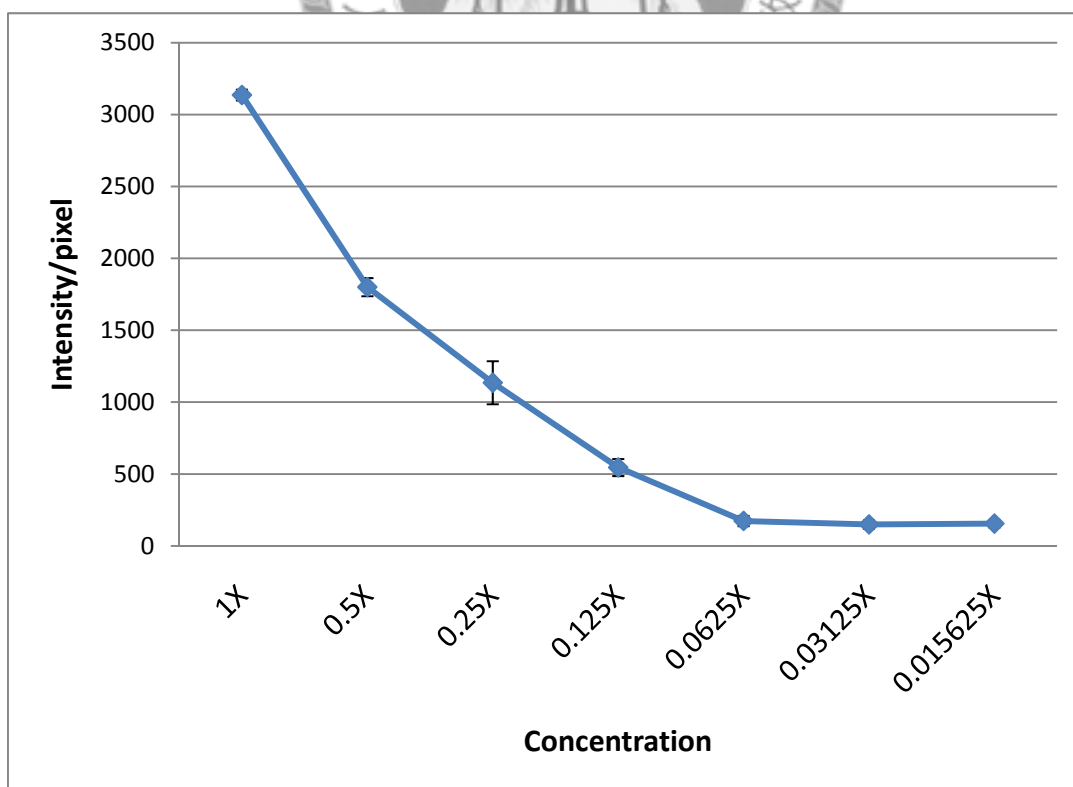
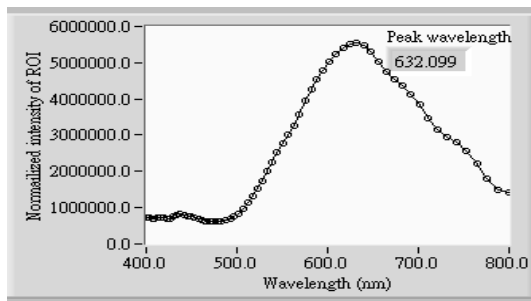


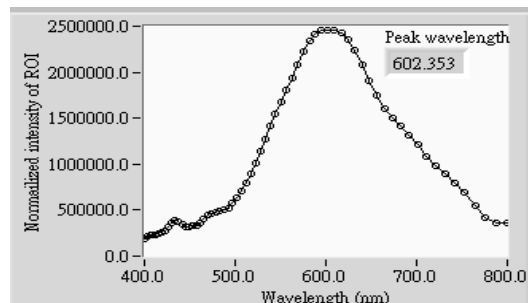
圖 38：不同濃度下Au-probe/target DNA 進行三明治雜交反應強度。

表 伍-6：由傅立葉光譜儀在不同濃度下所得的光譜圖。

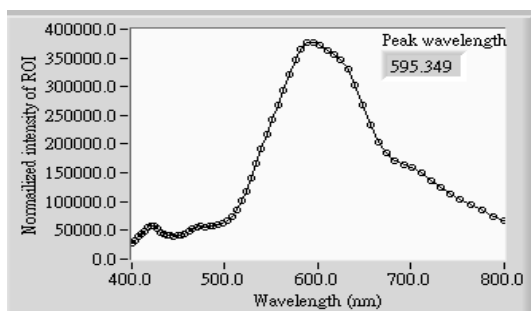
1



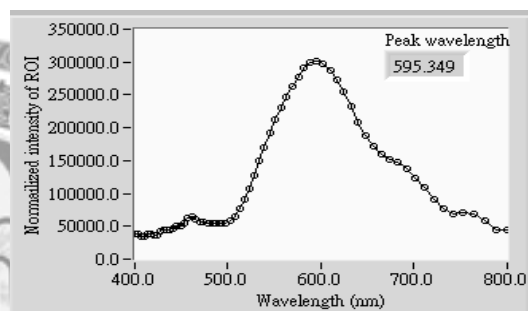
2



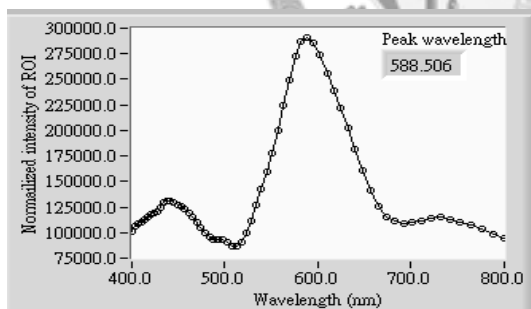
3



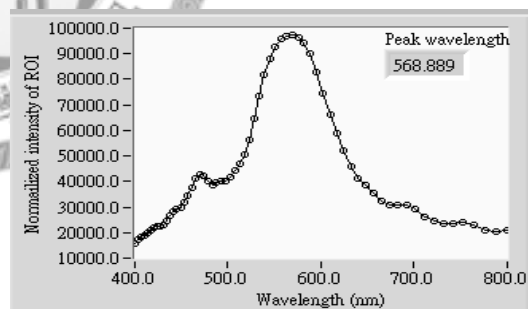
4



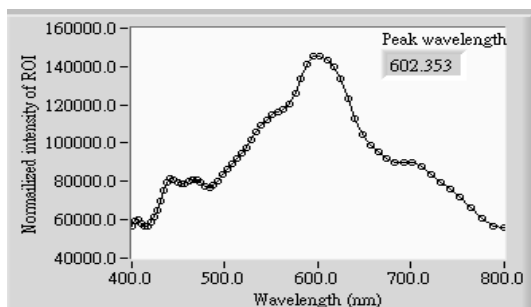
5



6



7



5.3.3 樣本濃度於系統的極限偵測

接著我們改變target- DNA 的濃度，即在第一次雜交反應時，我們固定probe DNA 的濃度，與不同濃度的target- DNA 進行雜交反應(表 伍-7)

表 伍-7：進行雜交反應時，不同濃度的target DNA 。

Probe	20	20	20	20	20	20	20	20
	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
Target	20	2	0.2	0.02	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-6}
	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM

由圖 39 可以得知我們對於金奈米粒子用於三明治雜交反應的偵測範圍(dynamic range) 約略有 5 個數量級(2~20000 pM)，而偵測極限約在 target-DNA 濃度 0.02 ~0.2 pM 之間。

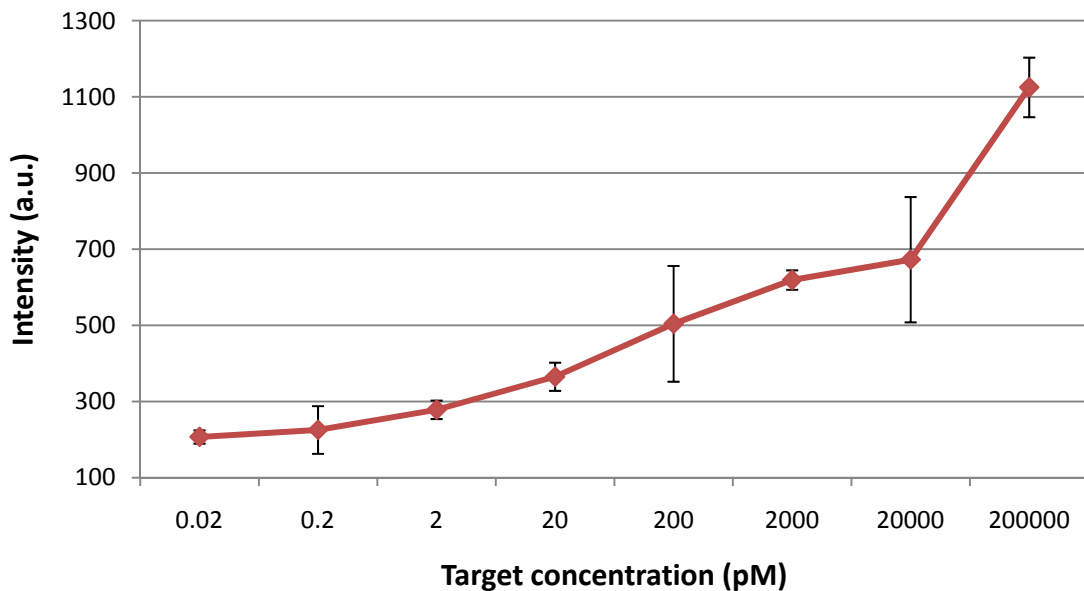


圖 39：不同 target DNA 濃度進行雜交反應所得的光譜強度。

5.4 金屬奈米粒子與螢光分子比較

初步的系統與螢光分子比較，由圖 40 可以得知螢光的偵測極限約在濃度為 0.1 nM，與先前我們在金奈米粒子方式比較，金奈米粒子所得測極限約在 target-DNA 濃度為 0.02 ~ 0.2 pM 之間，偵測強度比螢光系統來的提升 1000~10000 倍左右，然而這樣的推測目前只是估計而已，因為我們討論的金奈米粒子架構與螢光架構系統本身有所不同，無論是偵測標準還是偵測方式。因此，我們還需要對兩個系統做系統上的比較修正才能更準確的評估，評估金奈米粒子應用在生物晶片上是否能有顯著的提升。

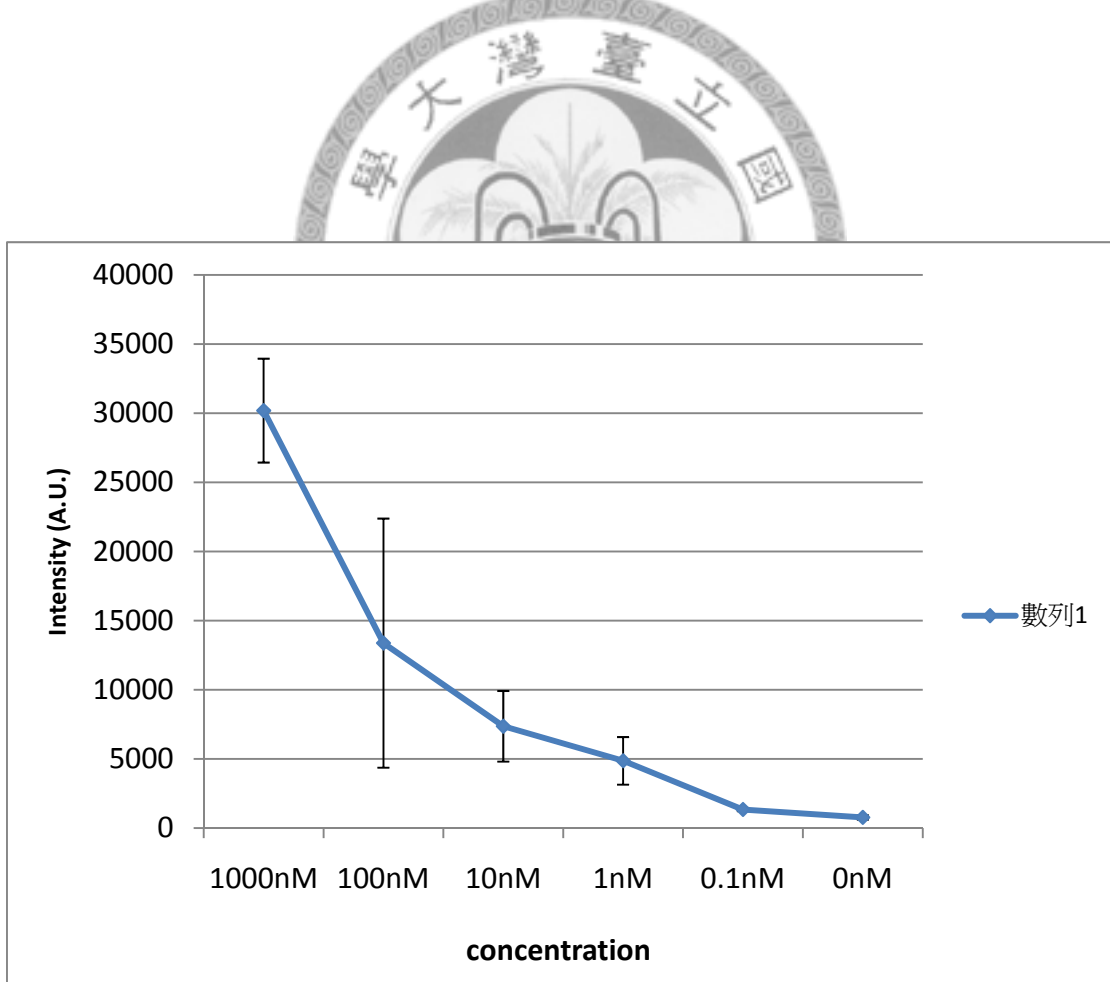


圖 40：螢光系統在不同濃度下的信號強度值。

5.5 混合兩種奈米粒子光譜系統初步測試

我們期望利用奈米粒子來達到傳統生物晶片螢光系統更快速、更靈敏的目標，同時，傳統螢光系統因為螢光吸收光與放射光的限制，系統普遍以雙雷射系統來進行晶片掃描，而我們在發展快速也高靈敏度的同時，也期望能夠使用不同的奈米粒子來達到多重標記的目的，而奈米粒子的LSPR效應會受到尺度大小、奈米粒子形狀等等因素的影響，更方便我們發展不同的標記信號。在應用至 DNA sandwich hybridization 之前，我們先進行金奈米粒子與銀奈米粒子，在不加任何修飾的情況下混合所得的光譜圖形，圖是在暗視野顯微鏡下，由 CCD 所擷取的影像，從影像可以觀察到銀奈米粒子的散射光信號非常的強，若將曝光時間縮短至金奈米粒子無法在影像呈現時，依舊可得到銀奈米的粒子影像。



圖 41：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米混合之 CCD 影像。

圖中銀奈米粒子與金奈米粒子的濃度比為 5:1。

進行光譜掃描時，在不同的區域所得的混合光譜都不盡相同，隨著金奈米粒子與銀奈米粒子分布的情形，各有光譜強度足以覆蓋對方光譜的情形發生，而圖 42 中所得到的雙峰光譜圖形是在較為均勻的區域所得。我們是利用 polymer (PVP) 將晶片表面進行塗層修飾，而在我們過去的實驗中發現，金奈米粒子對於此塗層修飾有較高的吸附力，而銀奈米對於此塗層修飾的吸引力稍嫌不足，圖是在相同濃度下所得到的金奈米粒子與銀奈米吸附於晶片上的影像，可以發現金奈米粒子的密集程度較銀奈米為高，這樣的前提之下，很容易在混合光譜的偵測下有表面不均勻的問題產生。

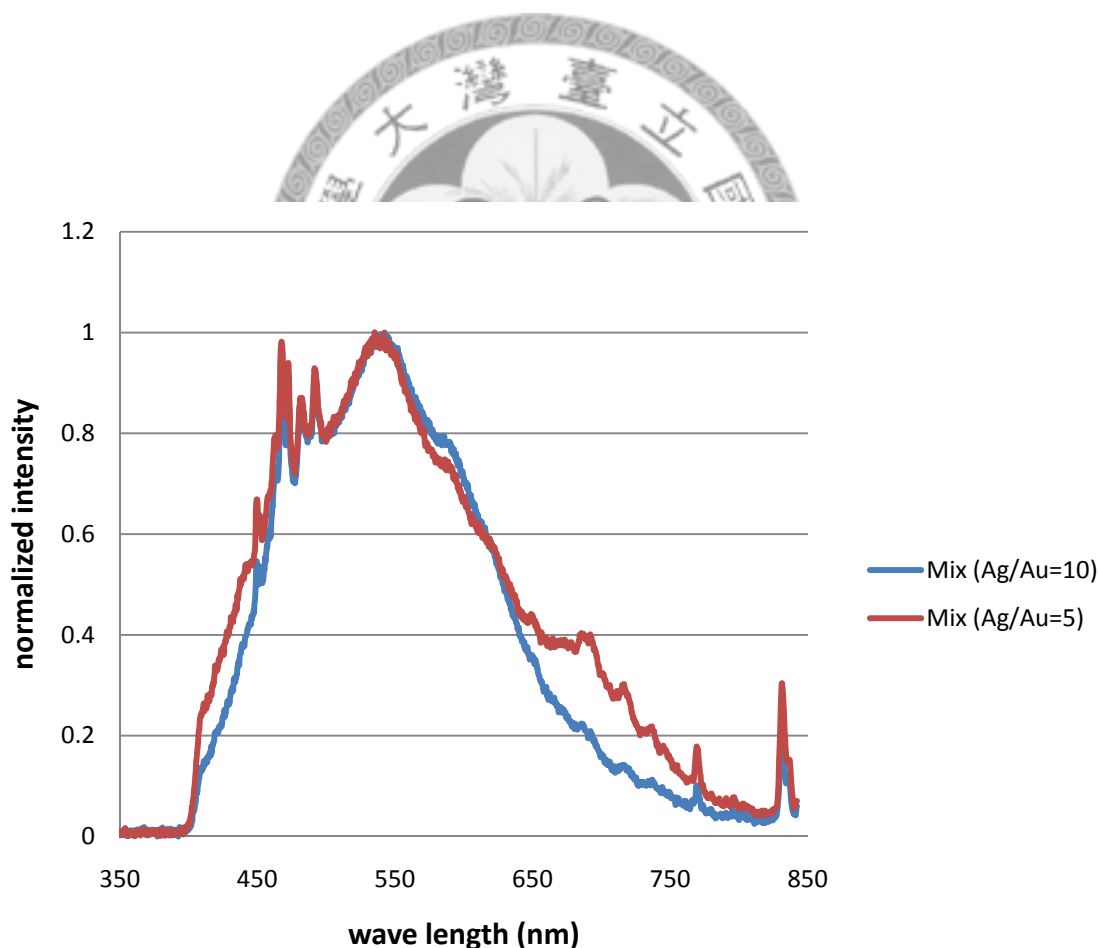


圖 42：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米之混合光譜

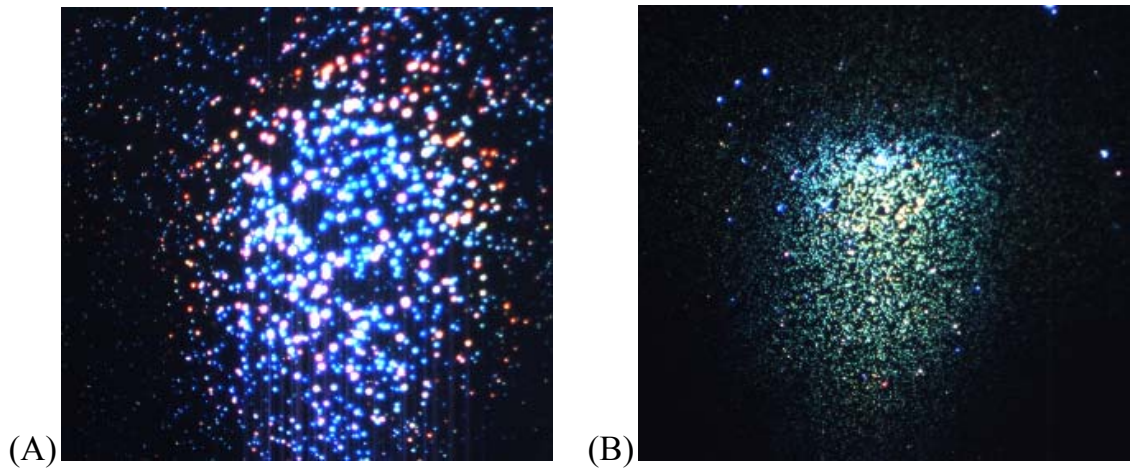


圖 43：暗視野顯微鏡下金、銀奈米粒子影像。

(A) 40 nm 銀奈米粒子。 (B) 40nm 金奈米粒子。

我們將所得的雙峰光譜圖形與單種奈米粒子的光譜圖形相互比較，該出現峰值的位置都有其光譜呈現，而後續將利用不同奈米粒子標記在 probe-DNA 上進行三明治雜交反應，此架構便會與我們利用 polymer 塗層來偵測奈米粒子的架構有所不同，對於金奈米粒子與銀奈米的粒子濃度比例還待之後確認。

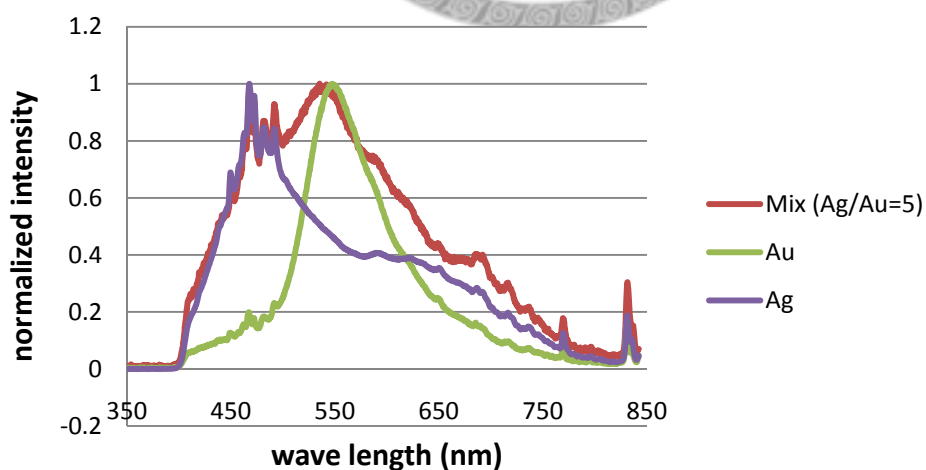


圖 44：40 nm 金奈米粒子與 40 nm 銀奈米混合光譜與原始單粒子光譜比較。

第陸章 結論與未來建議

在本論文中我們提出了利用金屬奈米粒子應用於 DNA 微陣列晶片上，同時利用本實驗室所發展的傅立葉光譜轉換儀進行掃描，可以達到大面積且快速的光譜分析，而我們利用三明治雜交的方法，首先將金奈米粒子連結 DNA (probe DNA) 做為一橋梁與我們欲偵測的樣品(本論文中為 target DNA) 形成一帶有金奈米粒子信號源的樣品，再進行第二次的雜交反應，完成整個晶片樣本的製作，最後所得的偵測極限(limit of detection) 也較傳統的螢光系統為低。

在本論文探討奈米粒子應用於 DNA 微陣列仍有許多可以探討與延伸的地方。(1)與現行的螢光系統做一相互比較，由於兩種系統架構本身上的不同，必須對兩系統做一方法上的修正，以期更精確的比較兩系統的靈敏度與偵測極限等等。(2)利用不同的金屬奈米粒子進行三明治雜合反應，包括利用銀奈米，金奈米粒子棒、不同大小的金奈米粒子球，來做為不同的標記源，以期改善現有雙色螢光系統，達到多種信號源標記的系統架設。

參考文獻

1. Mendel, G. and uber Pflanzen-hybriden, V. (1866) Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brunn. *Abhandlungen 1865*, **4**, 3–47.
2. Pearson, H. (2006) Genetics: What is a gene? *Nature*, **441**, 398-401.
3. McAdams, H. and Shapiro, L. (1995) Circuit simulation of genetic networks. *Science*, **269**, 650-656.
4. Collins, F.S. (1995) Ahead of schedule and under budget: the Genome Project passes its fifth birthday. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10821-10823.
5. Walson, J.D. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature*, **171**, 737.
6. Schena, M. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467.
7. Chen, H.W. (2005) Transcriptome analysis in blastocyst hatching by cDNA microarray*. *Human Reproduction*, **20**, 2492.
8. Melle, C. (2003) Biomarker Discovery and Identification in Laser Microdissected Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with ProteinChip® Technology, Two-dimensional Gel Electrophoresis, Tandem Mass Spectrometry,

- and Immunohistochemistry*. *Molecular and Cellular Proteomics*, **2**, 443.
9. Coppée, J.-Y. (2008) Do DNA microarrays have their future behind them? *Microbes and Infection*, **10**, 1067-1071.
 10. Chen, H.W. (2002) Global analysis of differentially expressed genes in early gestational decidua and chorionic villi using a 9600 human cDNA microarray. *Molecular Human Reproduction*, **8**, 475.
 11. Zhi-Bei Zheng, Y.-D.W., Xi-Lin Yu, Shi-Qiang Shang,. (2008) DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses. *Journal of Medical Virology*, **80**, 1042-1050.
 12. Kwon, J.-a., Lee, H., Lee, K.N., Chae, K., Lee, S., Lee, D.-k. and Kim, S. (2008) High Diagnostic Accuracy of Antigen Microarray for Sensitive Detection of Hepatitis C Virus Infection. *Clin Chem*, **54**, 424-428.
 13. Pollack, J.R. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, **23**, 41.
 14. Kimura, N., Oda, R., Inaki, Y. and Suzuki, O. (2004) Attachment of oligonucleotide probes to poly carbodiimide-coated glass for microarray applications. *Nucl. Acids Res.*, **32**, e68-.
 15. Song, J.Y., Park, H.G., Jung, S.-O. and Park, J. (2005) Diagnosis of HNF-1{alpha} mutations on a PNA zip-code microarray by single base

- extension. *Nucl. Acids Res.*, **33**, e19-.
16. Yim, S.-C., Park, H.G., Chang, H.N. and Cho, D.-Y. (2005) Array-based mutation detection of BRCA1 using direct probe/target hybridization. *Analytical Biochemistry*, **337**, 332-337.
 17. Park, H.G., Ham, H.O., Kim, K.H. and Huh, N. (2005) Oligonucleotide chip for the diagnosis of HNF-1[alpha] mutations. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 637-644.
 18. Park, H.G., Yang Song, J., Hwan Park, K. and Hwan Kim, M. (2006) Fluorescence-based assay formats and signal amplification strategies for DNA microarray analysis. *Chemical Engineering Science*, **61**, 954-965.
 19. Marshall, A. and Hodgson, J. (1998) DNA chips: An array of possibilities. *Nat Biotech*, **16**, 27-31.
 20. Lindroos, K., Sigurdsson, S., Johansson, K., Ronnblom, L. and Syvanen, A.-C. (2002) Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucl. Acids Res.*, **30**, e70-.
 21. Shepard, J.R.E. (2006) Polychromatic Microarrays: Simultaneous Multicolor Array Hybridization of Eight Samples. *Analytical Chemistry*, **78**, 2478-2486.
 22. Haes, A., Haynes, C. and Van Duyne, R. (2001). Warrendale, Pa.; Materials Research Society; 1999, Vol. 636, pp. 4-4.

23. Ellen . Connor, Judith Mwamuka, Anand Gole, Catherine . Murphy and Michael . Wyatt. (2005) Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity13. *Small*, **1**, 325-327.
24. Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*.
25. Lipshutz, R.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, **21**, 20.
26. Kwok, P.-Y. (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **2**, 235-258.
27. Tkachenko, A.G., Xie, H., Liu, Y., Coleman, D., Ryan, J., Glomm, W.R., Shipton, M.K., Franzen, S. and Feldheim, D.L. (2004) Cellular Trajectories of Peptide-Modified Gold Particle Complexes: Comparison of Nuclear Localization Signals and Peptide Transduction Domains. *Bioconjugate Chemistry*, **15**, 482.
28. Souza, G.R., Christianson, D.R., Staquicini, F.I., Ozawa, M.G., Snyder, E.Y., Sidman, R.L., Miller, J.H., Arap, W. and Pasqualini, R. (2006) Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 1215-1220.

29. Jin, R., Cao, Y., Mirkin, C.A., Kelly, K.L., Schatz, G.C. and Zheng, J.G. (2001) Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. *Science*, **294**, 1901-1903.
30. Sonnichsen, C. (2002) Plasmon resonances in large noble-metal clusters. *New Journal of Physics*, **4**, 93.
31. Page Faulk, W. and Malcolm Taylor, G. (1971) Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, **8**, 1081-1083.
32. De Mey, J., Lambert, A.M., Bajer, A.S., Moeremans, M. and De Brabander, M. (1982) Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus endosperm* with the immuno-gold staining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 1898-1902.
33. Lasne, D., Blab, G.A., Berciaud, S., Heine, M., Groc, L., Choquet, D., Cognet, L. and Lounis, B. (2006) Single Nanoparticle Photothermal Tracking (SNaPT) of 5-nm Gold Beads in Live Cells. *Biophysical Journal*, **91**, 4598-4604.
34. Kusumi, A. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics*

- and Biomolecular Structure*, **34**, 351.
35. Cognet, L., Tardin, C., Boyer, D., Choquet, D., Tamarat, P. and Lounis, B. (2003) Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 11350-11355.
36. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Focella, T.M. and Smilowitz, H.M. (2006) Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol*, **79**, 248-253.
37. Chen, D.R. (2000) A novel approach for introducing bio-materials into cells. *Journal of Nanoparticle Research*, **2**, 133.
38. Wagner, E. (1994) Delivery of drugs, protein and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **14**, 113.
39. Yang, P.-H., Sun, X., Chiu, J.-F., Sun, H. and He, Q.-Y. (2005) Transferrin-Mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake. *Bioconjugate Chemistry*, **16**, 494-496.
40. Salem, A.K., Searson, P.C. and Leong, K.W. (2003) Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nat Mater*, **2**, 668-671.
41. Ow Sullivan, M.M., Green, J.J. and Przybycien, T.M. (2003) Development of a novel gene delivery scaffold utilizing colloidal gold-polyethylenimine

- conjugates for DNA condensation. *Gene Ther*, **10**, 1882-1890.
42. Javier Rojo, Vicente D'Amico, Jes M. de la Fuente, Inmaculada Segura, Africa G. Barrientos, Hans H. Riese, Antonio Bernad and Soledad Penadés. (2004) Gold Glyconanoparticles as New Tools in Antiadhesive Therapy. *ChemBioChem*, **5**, 291-297.
43. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C.K. and Rotello, V.M. (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1307-1315.
44. Raschke, G., Kowarik, S., Franzl, T., Sonnichsen, C., Klar, T.A., Feldmann, J., Nichtl, A. and Kurzinger, K. (2003) Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering. *Nano Letters*, **3**, 935-938.
45. Jain, P.K., Eustis, S. and El-Sayed, M.A. (2006) Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 18243-18253.
46. Oh, E., Hong, M.-Y., Lee, D., Nam, S.-H., Yoon, H.C. and Kim, H.-S. (2005) Inhibition Assay of Biomolecules based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) between Quantum Dots and Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 3270-3271.

47. Dubertret, B., Calame, M. and Libchaber, A. (2001) Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, **19**, 365-370.
48. Wang, Z., Kanaras, A.G., Bates, A.D., Cosstick, R. and Brust, M. (2004) Enzymatic DNA processing on gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, **14**, 578-580.
49. Campion, A. (1998) Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, **27**, 241.
50. Kneipp, K., Kneipp, H. and Kneipp, J. (2006) Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold Nanoaggregates From Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells. *Accounts of Chemical Research*, **39**, 443-450.
51. Blab, G.A., Cognet, L., Berciaud, S., Alexandre, I., Husar, D., Remacle, J. and Lounis, B. (2006) Optical Readout of Gold Nanoparticle-Based DNA Microarrays without Silver Enhancement. *Biophysical Journal*, **90**, L13-L15.
52. M. T. Castañeda, S. Alegret and A. Merkoçi. (2007) Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles. *Electroanalysis*, **19**, 743-753.
53. Joseph Wang. (2007) Nanoparticle-Based Electrochemical Bioassays of Proteins. *Electroanalysis*, **19**, 769-776.

54. E. Hutter and J. Fendler. (2004) Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Advanced Materials*, **16**, 1685-1706.
55. Haes, A., Stuart, D., Nie, S. and Van Duyne, R. (2004) Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms. *Journal of Fluorescence*, **14**, 355-367.
56. Link, S. and El-Sayed, M.A. (2000) Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, **19**, 409 - 453.
57. Lamprecht, B., Krenn, J.R., Schider, G., Ditlbacher, H., Salerno, M., Felidj, N., Leitner, A., Aussenegg, F.R. and Weeber, J.C. (2001) Surface plasmon propagation in microscale metal stripes. *Applied Physics Letters*, **79**, 51-53.
58. Jensen, T.R., Duval, M.L., Kelly, K.L., Lazarides, A.A., Schatz, G.C. and Van Duyne, R.P. (1999) Nanosphere Lithography: Effect of the External Dielectric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, **103**, 9846-9853.
59. Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C. and Storhoff, J.J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, **382**, 607-609.
60. Elghanian, R., Storhoff, J.J., Mucic, R.C., Letsinger, R.L. and Mirkin, C.A.

- (1997) Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science*, **277**, 1078-1081.
61. Mucic, R.C., Storhoff, J.J., Mirkin, C.A. and Letsinger, R.L. (1998) DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 12674-12675.
62. Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A. and Letsinger, R.L. (1998) One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 1959-1964.
63. Storhoff, J.J., Lazarides, A.A., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L. and Schatz, G.C. (2000) What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 4640-4650.
64. Reynolds, R.A., Mirkin, C.A. and Letsinger, R.L. (2000) Homogeneous, Nanoparticle-Based Quantitative Colorimetric Detection of Oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 3795-3796.
65. Cao, Jin, R. and Mirkin, C.A. (2001) DNA-Modified Core? hell Ag/Au Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 7961-7962.

66. Taton, T.A., Mirkin, C.A. and Letsinger, R.L. (2000) Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. *Science*, **289**, 1757-1760.
67. Taton, T.A., Lu, G. and Mirkin, C.A. (2001) Two-Color Labeling of Oligonucleotide Arrays via Size-Selective Scattering of Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 5164-5165.
68. Park, S.-J., Taton, T.A. and Mirkin, C.A. (2002) Array-Based Electrical Detection of DNA with Nanoparticle Probes. *Science*, **295**, 1503-1506.
69. Cao, Y.W.C. (2002) Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, **297**, 1536.
70. Niemeyer, C.M. (2001) Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie(International ed.)*, **40**, 4128.
71. Gerion, D., Chen, F., Kannan, B., Fu, A., Parak, W.J., Chen, D.J., Majumdar, A. and Alivisatos, A.P. (2003) Room-Temperature Single-Nucleotide Polymorphism and Multiallele DNA Detection Using Fluorescent Nanocrystals and Microarrays. *Analytical Chemistry*, **75**, 4766-4772.
72. Liang, R.-Q., Li, W., Li, Y., Tan, C.-y., Li, J.-X., Jin, Y.-X. and Ruan, K.-C. (2005) An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucl. Acids Res.*, **33**,

e17-.

73. Alastair . Wark, Hye in Lee and Robert . Corn. (2008) Multiplexed Detection Methods for Profiling MicroRNA Expression in Biological Samples. *Angewandte Chemie International Edition*, **47**, 644-652.
74. Reichert, J., Csaki, A., Kohler, J.M. and Fritzsche, W. (2000) Chip-Based Optical Detection of DNA Hybridization by Means of Nanobead Labeling. *Analytical Chemistry*, **72**, 6025-6029.
75. Bao, P., Frutos, A.G., Greef, C., Lahiri, J., Muller, U., Peterson, T.C., Warden, L. and Xie, X. (2002) High-Sensitivity Detection of DNA Hybridization on Microarrays Using Resonance Light Scattering. *Analytical Chemistry*, **74**, 1792-1797.
76. Oldenburg, S.J., Genick, C.C., Clark, K.A. and Schultz, D.A. (2002) Base pair mismatch recognition using plasmon resonant particle labels. *Analytical Biochemistry*, **309**, 109-116.
77. 賴柏禎. (2008) 利用傅立葉轉換光譜影像技術快速測量金屬奈米粒子散射光譜. 國立台灣大學電機工程研究所碩士論文.
78. Festag, G., Steinbr ck, A., Wolff, A., Csaki, A., M ller, R. and Fritzsche, W. (2005) Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *Journal of Fluorescence*, **15**, 161-170.

79. Seitz, O., Chehimi, M.M., Cabet-Deliry, E., Truong, S., Felidj, N., Perruchot, C., Greaves, S.J. and Watts, J.F. (2003) Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **218**, 225-239.
80. Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L. and Remacle, J. (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, **280**, 143-150.
81. Frens, G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, **241**, 20.
82. Jana, N.R., Gearheart, L. and Murphy, C.J. (2001) Seeding Growth for Size Control of 5-20 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir*, **17**, 6782-6786.
83. Storhoff, J.J., Marla, S.S., Bao, P., Hagenow, S., Mehta, H., Lucas, A., Garimella, V., Patno, T., Buckingham, W., Cork, W. *et al.* (2004) Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 875-883.
84. Thaxton, C.S., Georganopoulou, D.G. and Mirkin, C.A. (2006) Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*, **363**, 120-126.

85. Nehl, C., Liao, H. and Hafner, J. (2006) Optical properties of star-shaped gold nanoparticles. *Nano Lett*, **6**, 683-688.
86. Huang, X., Jain, P.K., El-Sayed, I.H. and El-Sayed, M.A. (2007) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, **2**, 681-693.
87. Brewer, S.H., Glomm, W.R., Johnson, M.C., Knag, M.K. and Franzen, S. (2005) Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir*, **21**, 9303-9307.
88. Hurst, S.J., Lytton-Jean, A.K.R. and Mirkin, C.A. (2006) Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Analytical Chemistry*, **78**, 8313-8318.
89. Wang, J., Polsky, R. and Xu, D. (2001) Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization. *Langmuir*, **17**, 5739-5741.
90. Cai, H., Wang, Y., He, P. and Fang, Y. (2002) Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Analytica Chimica Acta*, **469**, 165-172.
91. Liu, G.L., Yin, Y., Kunchakarra, S., Mukherjee, B., Gerion, D., Jett, S.D., Bear, D.G., Gray, J.W., Alivisatos, A.P., Lee, L.P. *et al.* (2006) A nanoplasmonic

molecular ruler for measuring nuclease activity and DNA footprinting. *Nat Nano*, **1**, 47-52.

92. Rechberger, W., Hohenau, A., Leitner, A., Krenn, J.R., Lamprecht, B. and Aussenegg, F.R. (2003) Optical properties of two interacting gold nanoparticles. *Optics Communications*, **220**, 137-141.

