

國立臺灣大學理學院化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis



利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測活細胞釋放之  
神經傳導物

An ultra-sensitive nanowire-transistor biosensor for detecting  
neurotransmitters release from living cells under stimulation

謝映竹

Ying-Jhu Hsieh

指導教授： 陳逸聰 博士

Dr. Yit-Tsong Chen

中華民國 一零四年 一月

Jan. 2015

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測活細胞釋放之神  
經傳導物

An Ultra-sensitive Nanowire-Transistor Biosensor for  
Detecting Neurotransmitters Release from Living cells  
under Stimulation

本論文係謝映竹君（學號 R01223191）在國立臺灣大學化學系完  
成之碩士學位論文，於民國 104 年 01 月 29 日承下列考試委員審查通  
過及口試及格，特此證明。

口試委員：

陳逸聰

（簽名）

（指導教授）

戴程青

潘建源

楊吉水

系主任、所長

（簽章）

# 誌謝



兩年碩士生涯要在此刻畫下句點，因為身旁許多人的幫助，讓我能夠順利取得碩士學位。首先，我要感謝我的指導教授—陳逸聰博士，在我大學畢業後，聘請我為研究助理，協助我成功申請上研究所。謝謝老師在這兩年半來提供我豐富的資源，教導我做研究應具備的態度，不厭其煩督促我努力學習。感謝潘建源教授與戴桓青教授在百忙之中，願意抽空擔任我的碩士學位口試委員。謝謝潘教授提供我們在生物研究上的想法，指導我進行細胞實驗。謝謝戴教授對於我的研究給予許多具有建設性的建議。

謝謝李博仁學長教會我許多實驗與技巧，即使在離開實驗室後，也總是耐心地為我解答研究上的疑問。謝謝楊婉鈴學姐，在我剛來到實驗室時，教導我許多實驗。謝謝劉佳融學長提供我場效應電晶體晶片，也經常出現一些驚人之舉，帶給我們歡笑。謝謝葉乃馨同學幫我培養細胞，一起經歷了很多失敗的實驗過程，仍然熱心積極地協助我。謝謝廖均達學長介紹家教給我，讓我有緣認識到為人慷慨又貼心的學生家長。謝謝盧怡穎學姊，在我陷入困境時，給予鼓勵與支持，與我分享撫慰人心的音樂。謝謝蔡田峻學長給予我許多實驗上的建議，指引我找出研究問題的答案。謝謝陳彥溪學長教我使用研究所需的軟體。謝謝和我同時入學的郭嘉，總是熱心幫忙我解決問題，而你對研究的熱情也感染了我。謝謝巧貞學姊，妳對科學研究嚴謹的態度，是我們的好榜樣。謝謝 Subhasree 在我口試的前幾個月，幫助我做實驗和修改論文摘要。謝謝子庭、祈昂、欽富、旭正、郭嘉以及佳融，你們是我的好夥伴，和你們聊天、吃飯和哈哈大笑時，讓我暫時忘了所有的煩惱。

謝謝我的朋友 Tracy、姿蓓和幽嵐找我聚餐聊天，把我拉出枯燥乏味的生活。謝謝一打、小曼曼、丁丁、雅雅、米樂，未來的每一年我們都要繼續相約一起旅行。謝謝我現在的室友阿鄧，出國旅行總是不忘買美味的小點心給我。謝謝我的

摯友陳小袖，我們一起經歷了高中、大學和研究所的成長過程，不論我做什麼，妳總是最挺我的那個人，陪伴我哭，陪伴我笑，陪伴我度過人生中的低潮，謝謝妳這九年多來對我的照顧與關心。

最後，我要謝謝我親愛的家人們，謝謝我的爸媽用心養育我，你們是我最棒的後盾，給予我最大的自由，讓我選擇我想做的事。謝謝從我小時候就對我疼愛有加的大姑姑。謝謝我的爺爺與奶奶，總是給予我許多關愛。謝謝身邊所有關心我、照顧我以及陪伴我的所有家人和朋友，沒有你們就沒有現在的我。


# 摘要



過去十年來，由於矽奈米線場效應電晶體 (silicon nanowire field-effect transistor, SiNW-FET) 具有可調控的導電性與生物相容性，其作為生物感測器，在生物學研究的應用上廣受矚目。將矽奈米線表面修飾受體，SiNW-FET 即可即時性並且選擇性偵測特定的目標分析物，同時 SiNW-FET 亦具有高靈敏度與免標記等特性。到目前為止，SiNW-FET 已經成功地被應用於偵測蛋白質、DNA、癌症標記物、病毒以及其他生化分子。

本論文中兩個研究主題，第一個研究主題是以超靈敏奈米線電晶體生物感測器偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放的多巴胺。多巴胺 (dopamine, DA) 是重要的神經傳導物，負責神經細胞的訊號傳遞，並且與許多疾病有關。然而，在這些病患血液或尿液中的 DA 濃度非常低，而現有的電化學感測器對 DA 的偵測極限約為  $10^{-9}$  M，要用於檢測這些疾病是非常困難的。在此研究中，我們藉由在網路式 (multiple-parallel-connected, MPC) 矽奈米線場效應電晶體上修飾去氧核糖核酸適體 (DNA-aptamer)，建構出一個具有高靈敏度與選擇性 DA 感測器，稱之為 (MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET)。實驗結果證明 MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 對 DA 的偵測極限可低於  $10^{-11}$  M 且其可區分開其他化學相似物 (包含抗壞血酸、鄰苯二酚、苯乙胺、酪胺酸、腎上腺素和正腎上腺素)，選擇性地偵測 DA。MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 更進一步應用於即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放的 DA，實驗結果顯示以缺氧刺激使 PC12 細胞釋放 DA 的機制中，細胞內鈣離子的上升主要是細胞外的鈣離子經由鈣離子通道運送到細胞內而所導致的，而並非儲存在細胞內胞器的鈣離子釋放出來所引起。

第二個研究主題是以修飾 DNA-aptamer 之矽奈米線場效應電晶體偵測神經肽 Y。神經肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是重要的神經傳導物，負責神經細胞



的訊號傳遞且與許多疾病有關。目前常用於偵測與定量多巴胺的方法有酵素結合免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 與液相層析質譜儀 (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS/MS)，然而這兩種方法皆無法進行即時偵測，因此在細胞釋放神經傳導物研究的應用上有所限制。在本研究中，我們藉由在 SiNW-FET 上修飾 DNA-aptamer 作為受體，建構出一個可即時性與選擇性偵測 NPY 的生物感測器，稱之為 NPY-specific aptamer/SiNW-FET。實驗結果顯示 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 NPY 的線性工作範圍為  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  M 且偵測極限為 24 nM，且其亦成功地被應用於即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺。

在本研究中，本實驗室的李博仁博士與劉佳融研究助理負責製作 MPC SiNW-FET；陳彥溪研究助理與潘建源教授實驗室的葉乃馨同學負責培養 PC12 細胞；我負責量測 MPC SiNW-FET 的電性，確認其品質，並且將其應用於偵測多巴胺和神經肽 Y 等生化分子。

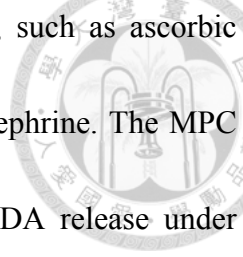
關鍵字：矽奈米線場效電晶體、多巴胺、神經肽 Y、適體、生物感測器

# Abstract



Over the past decade, silicon nanowire field-effect transistors (SiNW-FETs) with their tunable conductivity and biocompatibility have become significant biosensors. Moreover, the thin silicon oxide sheathes on SiNW-FETs are easily functionalized with selected receptors prior to bio-detections, providing strong and specific binding affinity for biomolecules. Because of strong interaction between the receptors and biomolecules, modified SiNW-FETs have been employed for the detections of protein, DNA, cancer markers, viruses, and other biochemical species.

The first part of this thesis focuses on the detection of dopamine (DA) released from living PC12 cells under hypoxic stimulation using an ultrasensitive SiNW-FET biosensor. DA is an important neurotransmitter which plays crucial roles in neuronal signal transduction and causes several critical illnesses. However, it is difficult to detect the extremely low DA content in patients using existing electrochemical biosensors with detection limits typically around nanomolar levels ( $\sim 10^{-9}$  M). This thesis describes a DNA-aptamer modified multiple-parallel-connected (MPC) SiNW-FET (referred as MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET) device for ultrasensitive and selective DA detection. The MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET has been employed to improve the detection limit of DA to  $< 10^{-11}$  M and the

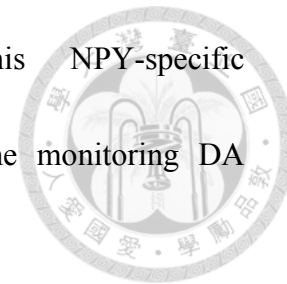


specifically distinguishing ability from other chemical analogues, such as ascorbic acid, catechol, phenethylamine, tyrosine, epinephrine, and norepinephrine. The MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET was also employed to monitor DA release under hypoxic stimulation from living PC12 cells in real time. The experimental results revealed that the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that is required to trigger DA secretion is dominated by an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx, rather than the release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores.

The second project of the thesis focuses on the detection of neuropeptide Y (NPY) using a DNA-aptamer modified SiNW-FET. NPY is an important neurotransmitter and is related with several critical diseases. Two most common detection and quantification techniques for NPY are enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS). However, both techniques lack the real-time detection ability for NPY and are not suitable for cellular investigation. Herein, we report a DNA-aptamer modified SiNW-FET (referred to as NPY-specific aptamer/SiNW-FET) applicable for the real-time and selective detection for NPY. The linear working range of the NPY-specific aptamer/SiNW-FET for NPY detection spanned from  $10^{-7}$  to  $10^{-5}$  M and the limit of NPY detection is 24 nM. The NPY-specific aptamer/SiNW-FET has shown a detection specificity that is able to distinguish NPY from other



neurotransmitters, such as dopamine. Furthermore, this NPY-specific aptamer/SiNW-FET has been successfully applied for real-time monitoring DA release from living PC12 cells under hypoxic stimulation.



Key words : SiNW-FET; dopamine; neuropeptide Y; aptamer; biosensor

# 目錄



誌謝.....	ii
摘要.....	iv
Abstract.....	vi
目錄.....	ix
圖目錄.....	xii
表目錄.....	xv
簡稱用語對照表.....	xvi
<b>第一章 序論.....</b>	<b>1</b>
1.1 文獻回顧.....	1
1.1.1 生物感測器.....	1
1.1.2 矽奈米線場效電晶體生物感測器.....	3
1.1.3 矽奈米線場效應電晶體的製備.....	6
1.2 研究動機與目的.....	10
1.2.1 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測 PC12 細胞釋放之多巴胺...10	
1.2.2 利用修飾去氧核醣核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵測神經肽 Y 15	
<b>第二章 實驗方法.....</b>	<b>18</b>
2.1 網絡式矽奈米線場效應電晶體的製作.....	18
2.1.1 金奈米粒子的合成.....	18
2.1.2 硼參雜矽奈米線的合成.....	20
2.1.3 晶片製程.....	23
2.1.4 元件電性量測.....	27

2.1.5 感測溶液槽的製備.....	30
2.2 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺.....	31
2.2.1 矽奈米線表面修飾.....	31
2.2.2 多巴胺與其他分子之偵測.....	34
2.2.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺.....	37
2.2.4 朗謬耳吸附方程式.....	38
2.3 利用修飾去氧核糖核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵測神經肽 Y.....	40
2.3.1 矽奈米線表面修飾.....	40
2.3.2 神經肽 Y 與其他分子之偵測.....	42
2.3.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之神經肽 Y.....	43
<b>第三章 實驗結果與討論.....</b>	<b>44</b>
3.1 網絡式矽奈米線場效應電晶體的製作.....	44
3.1.1 矽奈米線合成結果.....	44
3.1.2 元件電性分析.....	46
3.2 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺.....	48
3.2.1 表面修飾證明.....	48
3.2.2 多巴胺與其他分子之偵測.....	49
3.2.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺.....	54
3.3 利用修飾去氧核糖核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵測神經肽 Y.....	57
3.3.1 表面修飾證明.....	57
3.3.2 神經肽 Y 與其他分子之偵測.....	58
3.3.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之神經肽 Y.....	65
<b>第四章 結論.....</b>	<b>68</b>

參考文獻.....69

附錄.....73



# 圖目錄



圖 1-1 場效應電晶體奈米感測器之結構.....	5
圖 1-2 p 型奈米線場效應電晶體之工作原理.....	5
圖 1-3 以 "top-down" 方法製作 SiNW-FET 之流程圖.....	7
圖 1-4 以 "bottom-up" 方法製作 SiNW-FET 之流程圖.....	9
圖 1-5 多巴胺之化學結構。.....	10
圖 1-6 DA-specific aptamer 的結構示意圖.....	14
圖 1-7 在缺氧刺激下細胞釋放多巴胺之機制示意圖.....	14
圖 1-8 神經肽 Y 之結構.....	17
圖 2-1 (A) 以 VLS 機制合成矽奈米線示意圖。(B) 矽與金的二元相圖.....	20
圖 2-2 CVD 合成系統示意圖.....	22
圖 2-3 MPC SiNW-FET 之外層電極光罩設計圖.....	24
圖 2-4 接觸轉印矽奈米線之流程圖。.....	25
圖 2-5 MPC SiNW-FET 之內層電極之光罩設計圖.....	26
圖 2-6 (A) $I_{sd}$ - $V_{sd}$ 量測系統 (B) 晶片與探針台.....	27
圖 2-7 $I_{sd}$ - $V_{sd}$ 量測系統示意圖.....	27
圖 2-8 (A) 打線機 (B) 感測溶液槽實驗裝置.....	28
圖 2-9 $I_{sd}$ - $V_g$ 量測系統示意圖.....	29
圖 2-10 (A) PDMS 化學結構式 (B) 感測溶液槽.....	30
圖 2-11 DA-specific aptamer 固定化之流程圖.....	32
圖 2-12 NPY-specific aptamer 固定化之流程圖.....	41
圖 3-1 硼摻雜矽奈米線之光學影像圖.....	44

圖 3-2 硼摻雜矽奈米線之 SEM 影像圖 .....	45
圖 3-3 硼摻雜矽奈米線之 HR-TEM 與 ED 影像圖 .....	45
圖 3-4 MPC SiNW-FET 之光學影像圖 .....	46
圖 3-5 p-type SiNW-FET 的 $I_{sd}$ - $V_{sd}$ 圖 .....	47
圖 3-6 p-type SiNW-FET 的 $I_{sd}$ - $V_g$ 圖 .....	47
圖 3-7 二氧化矽基板/矽基底表面修飾 FITC-aptamer 之螢光影像圖 .....	48
圖 3-8 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 與 PTMS-modified SiNW-FET 量測	50
圖 3-9 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的多巴胺 (DA) 之實驗 結果 .....	52
圖 3-10 $C_{DA}$ 和 $\Delta V_g^{cal}/V_g^{cal,max}$ 之半對數圖 .....	52
圖 3-11 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測 10 pM DA 之電訊號變化 圖 .....	53
圖 3-12 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的腎上腺素 (EP) 與正 腎上腺素 (NE) 之實驗結果 .....	53
圖 3-13 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞 釋放 DA 之電訊號變化圖 .....	55
圖 3-14 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測不同缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 DA 之電訊號變化圖 .....	56
圖 3-15 在二氧化矽基板/矽基底上修飾 FITC-aptamer 後之螢光影像圖 .....	57
圖 3-16 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 與 PTMS-modified SiNW-FET 量測 NPY 等分子之實驗結果 .....	59
圖 3-17 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 1) .....	61
圖 3-18 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 2) .....	61

圖 3- 19 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 3) .....	62
圖 3- 20 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 4) .....	63
圖 3- 21 $C_{\text{NPY}}$ 和 $\Delta V_g^{\text{cal}}/V_g^{\text{cal,max}}$ 之半對數圖 .....	64
圖 3- 22 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞 釋放 NPY 之電訊號變化圖 .....	66
圖 3- 23 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測不同缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 NPY 之電訊號變化圖 .....	67

# 表目錄



表 1-1 比較不同的電化學多巴胺感測器之偵測極限 .....	13
表 1-2 比較不同分析方法量測 NPY 之偵測極限 .....	17
表 2-1 不同濃度磷酸鹽緩衝溶液的 Debye length 和離子強度 .....	35
表 3-1 aptamer-NPY 複合物之解離常數 .....	64



# 簡稱用語對照表



AA — ascorbic acid, 抗壞血酸

APTMS — 3-aminopropyl trimethoxysilane

Au NPs — gold nanoparticles, 金奈米粒子

BOE — buffer of oxide etching, 氫氟酸

CFS — chronic fatigue syndrome, 慢性疲勞症候群

CNT-FET — carbon nanotube field-effect transistor, 奈米碳管場效應電晶體

CT — catechol, 鄰苯二酚

CVD — chemical vapor deposition, 化學氣相沉積法

D — drain electrode, 汲極

DA — dopamine, 多巴胺

DTT — dithiothreitol

ED — electron diffraction, 電子繞射儀

ELISA — Enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合免疫吸附法

EP — epinephrine, 腎上腺素

ER — endoplasmic reticulum, 內質網

FITC — Fluorescein isothiocyanate

G — conductance, 電導

HR-TEM — high-resolution transmission electron microscopy, 高解析度穿透式電子顯微鏡

$I_{sd}$  — source-drain current, 源-汲極電流

ITO — indium tin oxide

$K_d$  — dissociation constant, 解離常數

LC-MS/MS — liquid chromatography–mass spectrometry, 液相層析質譜儀 MBS —



3-maleimidobenzoic acid N-hydroxy succinimide ester

MC — mitochondria, 粒線體

MFC — mass flow controller, 質量流量控制器

MPC SiNW-FET — multiple-parallel-connected silicon nanowire field-effect transistor, 網絡式矽奈米線場效應電晶體

MPTMS — 3-Mercaptopropyl trimethoxysilane

NE — norepinephrine, 正腎上腺素

NPY — neuropeptide Y, 神經肽 Y

PBS — phosphate buffer saline

PDMS — polydimethylsiloxane

PEA — phenethylamine, 苯乙胺

PET — polyethylene terephthalate

PTMS — propyl trimethoxysilane

PTSD — posttraumatic stress disorder, 創傷後壓力症候群

RIE — reactive ion etching, 反應性離子蝕刻

S — source electrode, 源極

SAMs — self-assembled monolayers, 自組裝單分子膜

SELEX — systematic evolution of ligands by exponential enrichment

SEM — scanning electron microscopy, 電子顯微鏡

SiNW-FET — silicon nanowire field-effect transistor, 矽奈米線場效應電晶體

T — thymine, 胸腺嘧啶

TNT — titanate nanotubes

TR — tyrosine, 酪胺酸

U — uracil, 尿嘧啶

VLS — vapor-liquid-solid, 氣-液-固

$\lambda_D$  — debye length

# 第一章 序論



## 1.1 文獻回顧

### 1.1.1 生物感測器

生物感測器 (biosensor) 是一種用於定性與定量分析生化分子的重要工具，由具特異性的生物辨識元件 (bioreceptor)、轉換元件 (transducer) 以及電子系統所組成的分析裝置，可以將待測分子之生化性訊號轉變成電子訊號。生物辨識元件可依其特性分為兩大類，第一類是催化型生物辨識元件，如酵素、微生物和組織等可選擇性地催化待測分子，所產生之代謝產物經由轉換元件將生化性訊號轉變成電子訊號；第二類為親和型生物辨識元件，如抗體、受體與核酸等對特定的待測分子具有親和力，當這類生物辨識元件與待測分子結合時，所產生之電化學、光、熱或質量變化由轉換元件偵測而轉換成電子訊號，電子訊號再經由後端的電子系統放大與處理後，呈現為具有意義的物理量[1]。依照轉換元件的不同，可將生物感測器分類為電化學生物感測器、半導體場效應電晶體感測器、光纖生物感測器與壓電晶體生物感測器。與傳統分析方法比較，生物感測器具有高靈敏度 (high sensitivity)、高選擇性 (excellent selectivity)、免標記 (label-free) 和即時偵測 (real-time detection) 等特性，且其所需樣品量少、方便、快速、體積小。

生物感測器的研究至今已超過半個世紀，被廣泛地應用在臨床檢驗[2]、毒性測試[3]、生物分析[4]、食品產業[5]與環境監測[6]等領域，由於這些領域應用上的需求，新穎的生物感測技術仍持續發展中。若要應用於生物系統的研究中，一個功能良好的生物感測器需具備堅固、超靈敏度、選擇性、快速反應與即時偵測等基本特性。由於矽奈米線場效應電晶體 (silicon nanowire field-effect transistor, SiNW-FET) 具有上述等優點，且其具有可調控的導電性、生物相容性和表面容易進行生物辨識元件的固定化等特性，近十年來，SiNW-FET 被廣泛地應用於偵

測蛋白質、DNA、癌症標記物、病毒等生化分子，顯示出 SiNW-FET 提供一個實用且具有潛力的偵測平台，將來可在推廣至更多生物學的研究上。






## 1.1.2 矽奈米線場效電晶體生物感測器

過去二十年來，科學家們致力於研究奈米材料，了解到當物質縮小到奈米尺度時，表面積對體積比 (surface-to-volume ratio) 會大幅增加，使得奈米材料擁有獨特的物理、化學以及電子性質[7]。而過去十五年來，科學家們更進一步將各種不同的奈米材料 (例如：量子點、奈米粒子、奈米管[8]、奈米線[9]等) 作為感測元件，設計出多種的感測器裝置，其中以一維半導體材料奈米管/奈米線場效應電晶體 (nanowire/nanotube field-effect transistors, NW/NT-FETs) 應用在生物研究上受到很大的矚目，這類一維半導體材料包含矽奈米線 (silicon nanowires, SiNWs)、奈米碳管 (carbon nanotubes, CNTs) 等，奈米管/奈米線場效應電晶體的最大特色是擁有很高的靈敏度 (high sensitivity)，主要是因為一維奈米材料的尺寸和生化分子 (例如：蛋白質、核酸、細胞以及病毒等等) 的尺寸大小相當[7]，生化分子與奈米管/奈米線的交互作用可以導致 NW/NT-FETs 表面物理化學性質的顯著改變，除此之外，奈米管/奈米線擁有很高的表面積對體積比 (surface-to-volume ratio)，使得 NW/NT-FETs 表面電位的微小改變就可以造成顯著的電訊號變化。基於上述兩個因素，生化分子所施加的電場較能夠影響整個 NW 或 NT 內部的載子密度，而不像對二維平面 FET 的影響只侷限在表面的區域，使 NW/NT-FETs 具有高靈敏度的特性。

場效應電晶體 (field-effect transistor, FET) 是一種藉由電場效應，以控制半導體內部電流的電子元件。一般而言，場效應電晶體為三電極系統，此三電極分別是源極 (source, S)、汲極 (drain, D) 以及閘極 (gate, G)，其中源極和汲極以 p 型或是 n 型半導體通道作為連接，透過閘極施加不同強度的電場以調控半導體通道的電導 (conductance，以 G 符號表之，為電阻之倒數)，故名場效應電晶體。以 p 型半導體為例，當在閘極施加一負電壓時，將導致主要電荷載子 (電洞) 的累積，使得電導上升；而在閘極施加一正電壓時，會導致電洞載子的減少，使電導下降。



矽奈米線場效應電晶體 (silicon nanowire field-effect transistor, SiNW-FET) 生物感測器是以共價鍵 (covalent bond) 或是靜電作用力 (electrostatic force) 將受體 (receptor) 修飾在矽奈米表面上，受體對於待測分子 (target molecule) 有高度的選擇性與親和力 (affinity)，當受體與待測分子結合於矽奈米線之表面時，待測分子所帶的電荷產生之電場類似閘極提供一電壓於矽奈米線場效應電晶體 (圖 1-1)。以 p 型矽奈米線場效應電晶體為例，說明其工作原理 (圖 1-2)，當具有正電荷的待測分子與固定於矽奈米線表面之受體分子結合時，具有正電荷的待測分子所施加之電場，會導致矽奈米線內部的電洞載子的減少，使電導下降；反之，若是具有負電荷的待測分子，其所施加之電場，則會導致矽奈米線內部的電洞載子的增加，使電導上升。

與奈米碳管相較之下，矽奈米線具備許多的優勢，首先，矽奈米線的表面有自然生成的二氧化矽作為絕緣層，當 SiNW-FET 在生理緩衝溶液下使用時，此絕緣層可以避免漏電流的發生，且矽奈米線與常用的鎳或鈦金屬電極之間的接觸為歐姆接觸，因此 SiNW-FET 的工作原理是單純的場效應。而奈米碳管的表面缺乏絕緣層，且其與鎳或鈦金屬電極之間的接觸非歐姆接觸[10, 11]，使得 CNT-FET 的工作原理較為複雜，其電訊號改變同時由場效應[12]、電子轉移 (electron transfer)[12] 和蕭特基能障變化 (schottky barrier variation)[13] 所貢獻。此外，矽奈米線通道內的載子特性可藉由摻雜 (doping) 不同的元素 (例如：磷或硼) 來決定通道的載子種類，且可容易地調控任意摻雜濃度[14, 15]。

由於 SiNW-FET 具有免標記 (label-free)、高選擇性 (excellent selectivity)、高靈敏度 (high sensitivity) 與即時偵測 (real-time detection) 等特性[9]。近幾年來，SiNW-FET 被廣泛地應用於生物醫學檢測上，成功建立起蛋白質[9, 16, 17]、DNA[18]、腫瘤標誌物[19]與病毒[20, 21]的偵測方法，顯示出 SiNW-FET 提供了一個實用且具有潛力的偵測平台[22]。

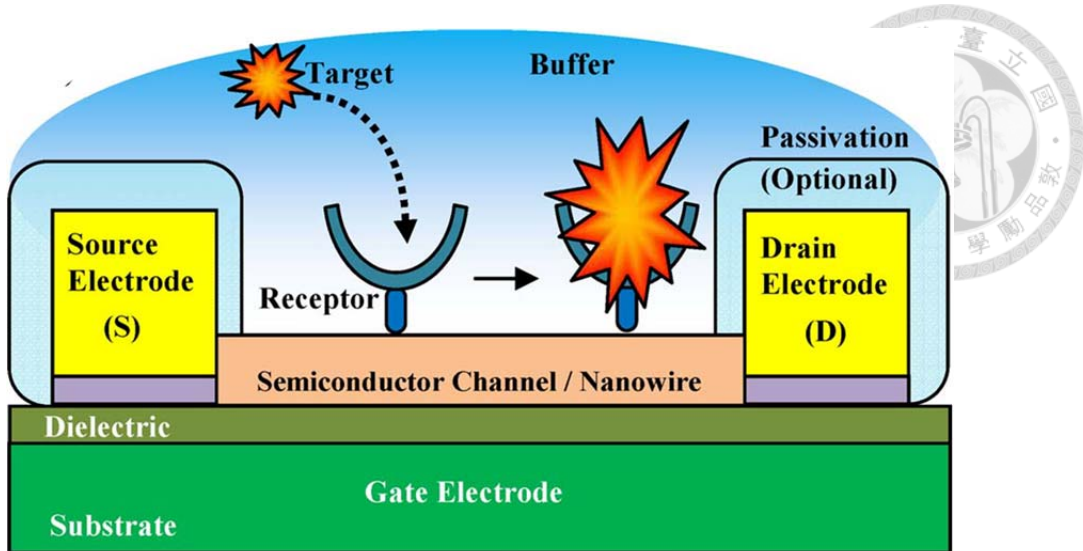


圖 1-1 場效應電晶體奈米感測器之結構[23]。

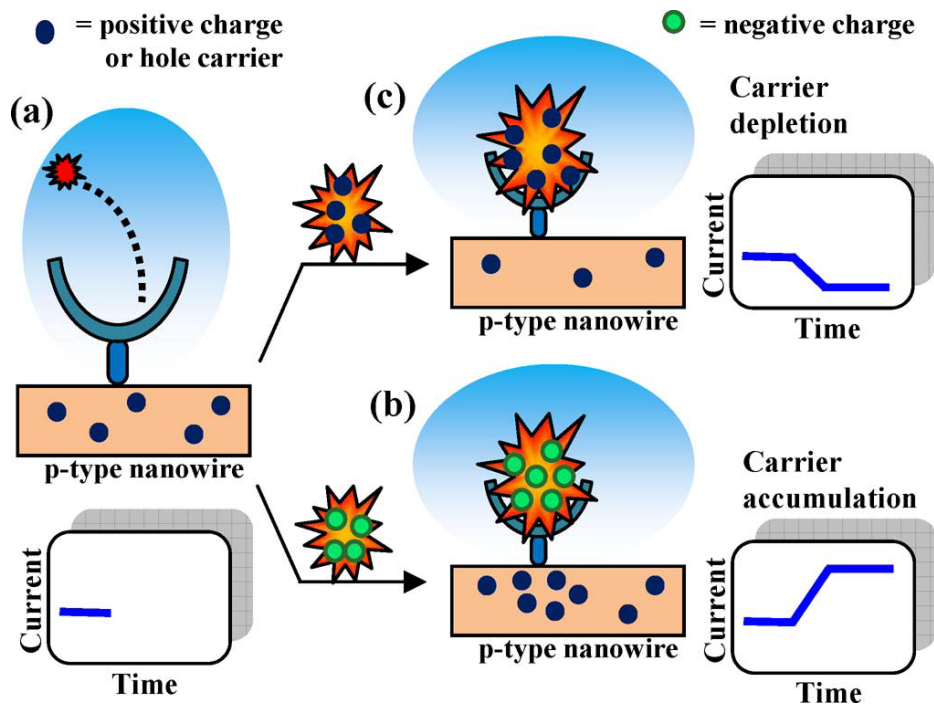


圖 1-2 p 型奈米線場效應電晶體之工作原理[23]。

### 1.1.3 矽奈米線場效應電晶體的製備

製作 SiNW-FET 的方法主要分為兩種，第一種製作方法稱為 ”top-down” (由上而下)，”top-down” 方法是結合微影製程與電子束技術在單晶矽晶片上進行物理性蝕刻，以定義出 SiNW-FET 的圖形。第二種製作方法稱為 ”bottom-up”，一般來說，此方法會先以化學氣相沉積法 (chemical vapor deposition, CVD) 合成矽奈米線，接著將矽奈米線組裝於矽晶片上，並以光微影技術製作電極。

#### “Top-down” SiNW-FET

“Top-down” 方法是以各種技術在絕緣層覆矽 (silicon-on-insulator, SOI) 晶圓上加工製作出 SiNW-FET。如圖 1-3 所示，SOI 晶圓的結構包含三個部分：矽晶圓基底、二氧化矽夾層 (厚度約 200-400 nm)、頂部矽層 (厚度約 50-100 nm)。藉由反應性離子蝕刻 (reactive ion etching, RIE)、離子植入 (ion implantation)、電子束微影製程 (electron-beam lithography) 和熱蒸鍍 (thermal evaporation) 等技術在 SOI 晶圓上定義矽奈米線與電極，以製作出 SiNW-FET 裝置。在典型的 ”Top-down” 製程中，第一步 (圖 1-3 (i)) 是以離子植入法將頂部矽層低密度摻雜硼或磷，決定矽奈米線為 p 型或 n 型半導體屬性；第二步 (圖 1-3 (ii)) 以光罩設計圖案定義出特定區域，並高密度摻雜此區域，製作出高導電度的源/汲極區域；第三步 (圖 1-3 (iii)) 為利用 RIE 法刻劃出微米尺寸的源/汲極；第四步 (圖 1-3 (iv)) 是利用電子束微影製程和 RIE 法刻劃出奈米尺寸的矽奈米線；最後，以熱蒸鍍法製作背向閘極 (back-gate)，並於 SiNW-FET 裝置上覆蓋一絕緣層 (例如： $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SiO}_2$  或  $\text{Si}_3\text{N}_4$ )。

相較於 ”bottom-up” 方法，由於 ”top-down” 方法需仰賴高解析度的微影技術來製作 SiNW-FET，使其製程較為複雜且需要更多昂貴的儀器。而其優點是使用工業上標準的半導體技術來製作所需的 SiNW-FET 樣式，可任意控制矽奈米線排列的位置，並且有效率地製作出高品質的 SiNW-FET。



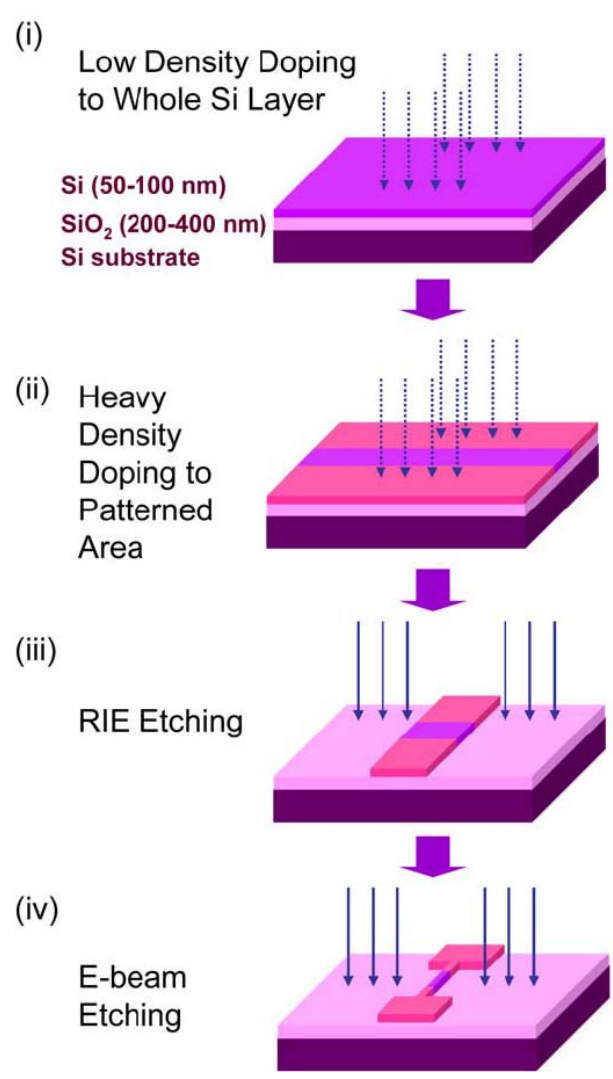


圖 1-3 以 "top-down" 方法製作 SiNW-FET 之流程圖[22]。

## “Bottom-up” SiNW-FET

在以 “bottom-up” 方法製作 SiNW-FET 的過程中，首先會以 CVD 方法合成矽奈米線，接著可藉由各種不同的技術將所合成的矽奈米線排列於矽晶片上，最後利用光微影製程 (photolithography) 與熱蒸鍍法完成 SiNW-FET 的製作。

圖 1-4 描述 “bottom-up” 方法製作 SiNW-FET 之流程，第一步 (圖 1-4 (i)) 以 CVD 方法合成矽奈米線，是依據氣-液-固 (vapor-liquid-solid, 簡稱 VLS) 之生長機制，其中金奈米粒子作為生長矽奈米線的催化劑，合成出的矽奈米線直徑大小取決於金奈米粒徑大小[24]，在生成矽奈米線的過程中通入  $B_2H_6$  或  $PH_3$  以摻雜硼或磷，決定矽奈米線之半導體特性；第二步 (圖 1-4 (ii)) 是以接觸轉印法 (contact printing) 或其他技術使矽奈米線排列於矽基底上；第三步 (圖 1-4 (iii)) 是先以旋轉塗佈法將兩層光阻 (分別為 LOR3A 和 S1805) 被覆於矽基底上，藉由特定的光罩圖形曝光、除去照光後之光阻，定義出源/汲極圖案；第四步 (圖 1-4 (iv)) 是以熱蒸鍍法鍍上金屬作為源/汲極；最後一步 (圖 1-4 (v)) 是使用去光阻液 (remover PG) 清除殘餘的光阻層，便完成 SiNW-FET 之製作。

相較於 “top-down” 方法，“bottom-up” 方法只需花費較少的成本便可以合成具有高結晶度、可隨意指定摻雜密度與容易調控直徑大小之矽奈米線。雖然以 “bottom-up” 方法可製作出高品質的 SiNW-FET，然而，由於無法有效控制排列於矽基底上的矽奈米線之位置，使 SiNW-FET 的產率下降，導致此方法在產業應用上受到限制。

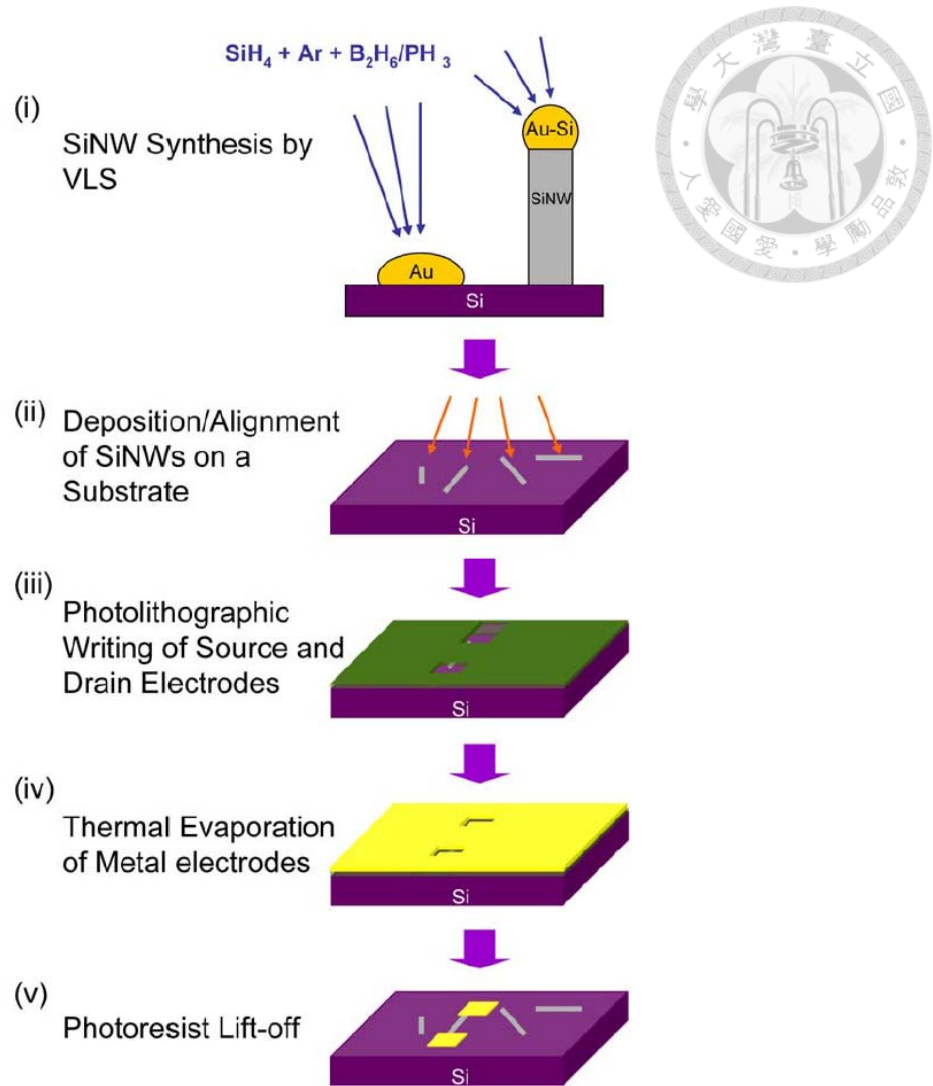


圖 1-4 以 "bottom-up" 方法製作 SiNW-FET 之流程圖[22]。



## 1.2 研究動機與目的

### 1.2.1 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測 PC12 細胞釋放之多

#### 巴胺

多巴胺 (Dopamine, 簡稱 DA), 全名為 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylamine 是一種結構簡單的有機化學分子, 屬於單胺類 (monoamine) 物質中的兒茶酚胺類 (catecholamine), 其化學結構為一個胺基 (amine group) 藉由碳鏈連接到兒茶酚 (catechol) 分子上 (圖 1-5)。

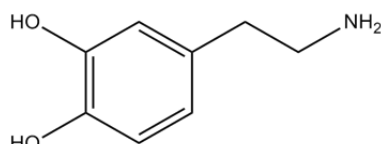


圖 1-5 多巴胺之化學結構。

DA 是一種神經傳遞物 (neurotransmitter), 在神經、心血管以及泌尿系統中扮演許多重要的角色, 調控著多種的生理活動。當哺乳動物缺氧時, 頸動脈體中的 glomus cell 會釋放多巴胺, 藉由 DA 活化傳入神經纖維, 將缺氧的訊息傳遞給大腦, 以加快呼吸的速率與血液循環, 使身體裡的器官可以再度獲得氧氣[25]。除了調控生理活動, DA 也與許多重要的疾病有關, 位於大腦底部的基底核 (basal ganglia) 神經細胞主要分泌多巴胺, 負責命令大腦指揮肌肉的運動, 這類神經細胞的退化使多巴胺分泌量不足而導致帕金森氏症 (Parkinson's disease)[26]。而腦內多巴胺分泌過量則會導致思覺失調症 (Schizophrenia), 此疾病之患者具有幻聽、妄想以及思想紊亂等症狀[27]。在臨床檢驗上, 檢測血液或尿液中的多巴胺濃度可以用於診斷嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytomas) 與副神經節瘤 (paragangliomas), 這類癌症患者的血液或尿液中的 DA 濃度比正常人要高出許多倍[28, 29]。因此, 對於細胞的研究以及生物醫學診斷而言, 能夠快速地偵測並且準確定量 DA 是相當重要的課題。

在目前用以偵測 DA 的工具中, 以具有快速與便利性等優勢的電化學方法

為主，然而 DA 的氧化電位與存在於尿液、血液以及中樞神經系統中的其他物質之氧化電位有重疊，會造成偵測上的干擾，例如抗壞血酸 (ascorbic acid，簡稱 AA，亦稱為維生素 C)。另一方面，不論是帕金森氏患者的細胞外液，或是嗜鉻細胞瘤或副神經節瘤患者之尿液/血液樣品中，其 DA 濃度皆低於  $10^{-10}$  M [30]。然而，目前電化學方法所能達到的偵測極限為  $10^{-9}$  M (表 1-1)，要以電化學方法偵測到如此低的多巴胺濃度是相當困難的。因此，我們希望能以 SiNW-FET 為基礎，設計出一個具有高偵測靈敏度和選擇性的 DA 感測器。

SiNW-FET 已成功應用在許多生化分子的偵測上，但大多數的偵測都是以帶有大量電荷的蛋白質、DNA 等大分子，這些大分子具有較強的電場，因此容易被 SiNW-FET 所偵測[31, 32]。而要以 SiNW-FET 偵測像 DA 這類帶電荷少的小分子相對上較為困難，截至今日，只有少數的小分子已被成功由 SiNW/CNT-FET 所偵測，例如三磷酸腺苷 (adenosine-5'-triphosphate)[33]與麩胺酸 (glutamate)[34]。在本研究中，為了偵測 DA，我們建立了網絡式 (multiple-parallel-connected) 矽奈米線場效應電晶體，簡稱為 MPC SiNW-FET，相較於單一通道之 SiNW-FET，MPC SiNW-FET 具有較高的靈敏度和較好的訊雜比 (signal-to-noise ratio)，有助於偵測帶電荷少的小分子。

我們從文獻中，挑選出一個可選擇性與 DA 結合之去氧核糖核酸適體 (DNA-aptamer)[35, 36]，我們簡稱之 DA-specific aptamer (圖 1-6)。以共價鍵將其固定在 MPC SiNW-FET 的 SiNW 表面上 (簡稱為 DA-specific aptamer/SiNW-FET)。DA-specific aptamer 為單股的 DNA，由 57 個核苷酸所組成，序列為 5'-GTCTCTGTGTGCGCCAGAGAACAACACTGGGGCAGATATGGGC CAGCACAGAATGAGGCC-3'，此序列一開始為 Mannironi 等人利用 SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 技術從一個大量、隨機序列的 RNA 母體 ( $10^{14}\sim 10^{15}$ ) 中篩選而出[36]，後來 Walsh 與 DeRosa 將 RNA aptamer 轉換成 DNA 的形式，也就是以胸腺嘧啶 (Thymine, T) 取代尿嘧

啶 (Uracil, U)，並且證明轉換後的 DNA aptamer 亦同樣具有與 DA 選擇性結合的功能[35]。被篩選出來的 DNA aptamer 會形成特定的結構，具有高度親合力 (affinity) 與選擇性 (selectivity)，能與目標分子結合形成複合物 (complex)，其與 DA 之間主要的作用力為氫鍵。相較於常被使用作為受體的蛋白質 (例如：抗體或酵素)，DNA aptamer 具有許多的優點，例如其尺寸較小，當 DA 與之結合時，可更靠近 SiNW 的表面，使 SiNW 感受到較強的電場，而產生較大的電訊號改變。除此之外，DNA aptamer 具有較好的化學與熱穩定性，在變性 (denaturation) 之後，仍然能夠摺疊回特定的結構，恢復其與目標分子結合的能力。

除了偵測 DA，我們將以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 測試 DA-specific aptamer 與其他分子的結合能力，探討此 aptamer 對於 DA 的選擇性如何。這些分子具有與 DA 相似的化學性質或是結構，包含抗壞血酸 (ascorbic acid, AA)，其氧化還原電位與 DA 非常接近，為存在於血液與細胞外液中最主要的干擾物；鄰苯二酚 (catechol, CT) 和苯乙胺 (phenethylamine, PEA) 的結構與 DA 相似；酪胺酸 (tyrosine, TR) 為生物體合成 DA 的前驅物 (precursor)；腎上腺素 (epinephrine, EP) 以及正腎上腺素 (norepinephrine, NE) 與 DA 同屬於兒茶酚胺類，兩者皆是人體中重要的神經傳導物質。我們期望建立一個具有高偵測靈敏度和選擇性佳的多巴胺感測器，並進一步應用在細胞釋放 DA 之研究上。

對哺乳動物的細胞而言，足夠的氧氣是生存的必要條件，當環境中的氧氣不足時，細胞為了能夠忍受缺氧 (hypoxia) 的環境而產生反應，例如神經細胞會釋放神經傳導物質。PC12 細胞株來源於大鼠腎上腺髓質 (rat adrenal medulla) 的嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma)，其主要合成 DA 和 NE，在一些藥物的刺激下會釋放出它們，其可經由神經生長因子 (nerve growth factor) 誘導分化為類神經細胞，是常用於神經科學相關研究的體外模型。PC12 細胞在缺氧刺激下，會經由胞吐作用 (exocytosis) 釋放出 DA，在這過程中牽涉到細胞內鈣離子濃度的上

升[37]。然而，在缺氧刺激使 PC12 細胞釋放 DA 的機制中 (圖 1- 7)，細胞內鈣離子濃度的上升究竟是由於細胞外的鈣離子流入細胞內[38]，還是儲存在細胞內胞器的鈣離子釋放出來所造成[39]，這部分的說法仍然是具有爭議性的。因此，我們將利用 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測缺氧刺激後的 PC12 細胞釋放之 DA，並且試著去解答細胞內鈣離子的濃度上升是由哪個途徑所造成的。

<b>Material</b>	<b>Surface modification</b>	<b>Linear working range (M)</b>	<b>Detection limit (M)</b>	<b>Ref.</b>
<b>Glassy carbon</b>	TNT	$10^{-7} - 10^{-5}$	$10^{-7}$	[40]
<b>PET</b>	Au nanowires	$10^{-7} - 10^{-4}$	$10^{-8}$	[41]
<b>Carbon fiber</b>	Tyrosinase	$10^{-8} - 10^{-4}$	$10^{-9}$	[42]
<b>ITO</b>	CNT	$10^{-8} - 10^{-6}$	$10^{-8}$	[43]
<b>Graphene</b>	Porphyrin	$10^{-8} - 10^{-5}$	$10^{-8}$	[44]

表 1- 1 比較不同的電化學多巴胺感測器之偵測極限。TNT：titanate nanotubes；PET：polyethylene terephthalate；ITO：indium tin oxide；CNT：carbon nanotube。

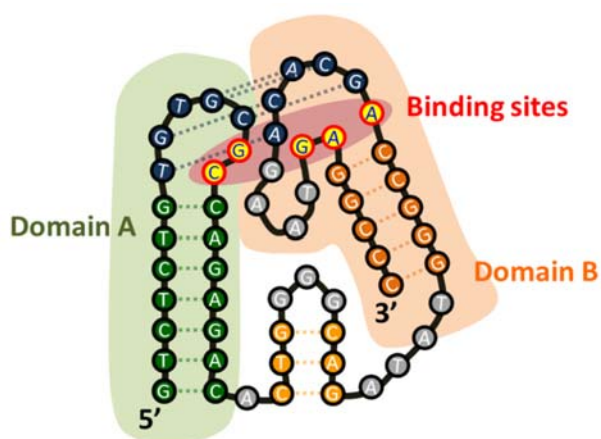


圖 1- 6 DA-specific aptamer 的結構示意圖。DA-specific aptamer 的結構包含兩個主要的 stem-loop domains (Domain A 與 Domain B)，有 5 個核苷酸是與多巴胺結合的位置，其中 2 個核苷酸在 Domain A，3 個在 Domain B。兩個 loop 因為鹼基配對而有交互作用，以藍色虛線表示。

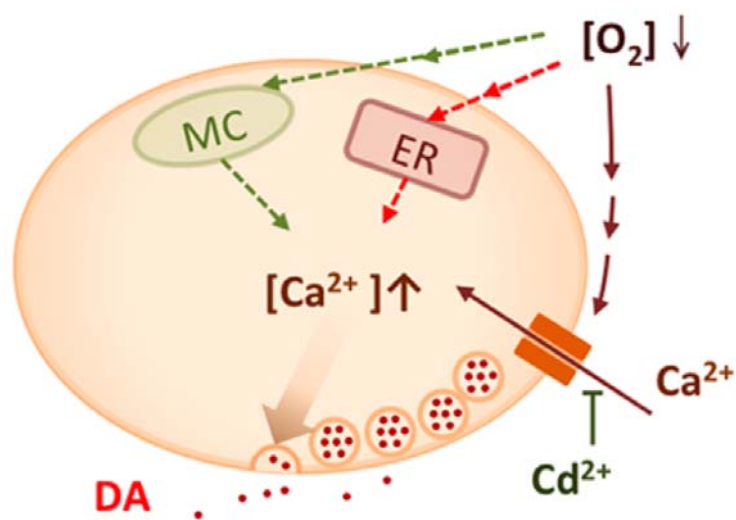


圖 1- 7 在缺氧刺激下細胞釋放多巴胺之機制示意圖。在細胞釋放多巴胺的機制中，細胞內鈣離子濃度的上升的原因，被推論為是由細胞外鈣離子流入（實線箭頭），或是收集儲存於胞器內的鈣離子（虛線箭頭）。MC: 粒線體; ER: 內質網。



## 1.2.2 利用修飾去氧核糖核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵測神經

### 肽 Y

神經肽 Y (neuropeptide Y, 簡稱 NPY) 是一種由 36 個胺基酸所組成的神經肽，1982 年，Tatemoto 和 Mutt 從豬的大腦分離出 NPY，並且解開其序列 (Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>)[45, 46]。在 NPY 的結構中 (圖 1-8)，N 端有 polyproline helix，C 端有  $\alpha$ -helix，polyproline helix 會朝著 C 端的  $\alpha$ -helix 彎曲，形成髮夾狀結構，使之能與細胞膜上特定的受體結合[47]。

NPY 在哺乳類動物體內扮演著神經傳遞物的角色，廣泛地表現在中樞與周邊神經系統中，調控著各種的生理活動，例如：食物攝取、血壓、生理時鐘 (circadian rhythm)、焦慮與壓力反應。除此之外，NPY 也與許多疾病息息相關，例如：創傷後壓力症候群 (posttraumatic stress disorder, 簡稱 PTSD)，其是指人在遭遇重大創傷後，其心理狀態產生焦慮性失調之病症，可能會造成此病症之經驗包含身體或心靈上遭到威脅、嚴重物理性傷害 (例如：經歷嚴重的車禍、天然災害、遭受暴力虐待或目睹親人的突然死亡)，根據研究指出當大腦中的 NPY 濃度較低時，遭受創傷後的人們發展出 PTSD 的可能性會增加[48]。在臨床診斷方面，NPY 可作為慢性疲勞症候群 (chronic fatigue syndrome, 簡稱 CFS) 的生物標記 (biomarker)，CFS 的病因複雜，非單一因素所引起，絕大部分的患者都與工作緊張、壓力過大以及長期生活作息不正常等有關，其症狀有長期 (連續六個月以上) 原因不明的疲勞、身體虛弱、肌肉疼痛、喉嚨痛與頭痛，且病患即使在經過適當的睡眠後，仍無法改善這些症狀。相較於健康的人們，CFS 患者的血液中被發現存在著較高濃度的 NPY[49]。因此，能夠快速地偵測並且準確定量 NPY，對於神經細胞的基礎研究以及生物醫學診斷是相當重要的課題。

目前常用來定量 NPY 的分析方法有酵素結合免疫吸附法 (Enzyme-linked

immunosorbent assay, 簡稱 ELISA) 與液相層析質譜儀 (Liquid chromatography-mass spectrometry, 簡稱 LC-MS/MS), 雖然 ELISA 與 LC-MS/MS 對於 NPY 都有極佳的偵測靈敏度 (表 1-2), 但兩者皆無法即時性地偵測 NPY, 使得其在神經細胞研究的應用上受到限制。因此, 我們希望能以 SiNW-FET 為基礎, 設計出一個具有高偵測靈敏度、選擇性與可即時偵測的 NPY 感測器, 並將其應用於即時偵測細胞釋放神經傳遞物質 NPY。

為了使 SiNW-FET 可以選擇性地偵測 NPY, 我們從文獻中[50], 挑選出一個對 NPY 有適當的結合親和力與選擇性的 DNA-aptamer, 稱之為 NPY-specific aptamer, 其為單股 DNA, 由 80 個核苷酸所組成, 序列為 5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATGCAAACCACAGCCTGAGTGGTTAGCGTATGTCATTTACGGACCTATGCGTGCTACCGTGAA -3', 是藉由 SELEX 技術所篩選出來。根據文獻, 此 NPY-specific aptamer 與 NPY 的解離常數為  $300 \pm 200$  nM。我們以共價鍵的方式將 NPY-specific aptamer 固定在 SiNW 的表面上, 修飾後的 SiNW-FET, 簡稱之為 NPY-specific aptamer/SiNW-FET。

我們希望將 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 應用於即時偵測細胞釋放 NPY。我們使用 PC12 細胞株作為研究的模型, 其來源於大鼠腎上腺髓質 (rat adrenal medulla) 的嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma), PC12 細胞會合成 DA 與 NPY 等神經傳遞物, 在特定的刺激下, 會經由胞吐作用 (exocytosis) 釋放出神經傳遞物。我們將以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測 NPY 與 DA, 測試 NPY-specific aptamer 對於 NPY 的選擇性, 並且進一步即時偵測經缺氧刺激的 PC12 細胞所釋放之 NPY。

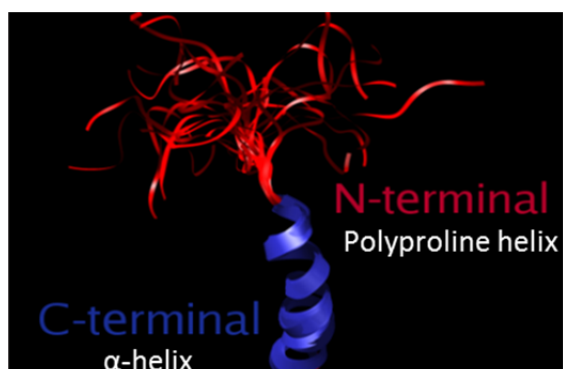


圖 1-8 神經肽 Y 之結構[51]

Method	Linear working range	Detection limit	Ref.
ELISA	$10^{-11}$ - $10^{-8}$ M	17 pM	[52]
LC-MS/MS	N.A.	< 30 pM	[53]

表 1-2 比較不同分析方法量測 NPY 之偵測極限

## 第二章 實驗方法



### 2.1 網絡式矽奈米線場效應電晶體的製作 (cowork with 李博仁

博士、劉佳融 研究助理)

我們利用 “bottom-up” 製程方法製作網絡式矽奈米線場效應電晶體 (multiple-parallel-connected silicon nanowire field-effect transistor, 簡稱為 MPC SiNW-FET) 晶片，製作程序包含金奈米粒子的合成、硼摻雜矽奈米線的合成以及晶片電極的製作。我們將合成的金奈米粒子作為催化劑，以化學氣相沉積法合成 SiNW，利用光學顯微鏡觀察奈米線合成的結果，接著以接觸轉印的方式將 SiNW 轉移到已製作外層電極的晶片上，再製作內層電極與進行熱退火 (thermal annealing) 處理，即完成晶片的製作，最後對 MPC SiNW-FET 元件進行電性量測與分析，挑選出品質好的晶片進行實驗。

#### 2.1.1 金奈米粒子的合成

金奈米粒子 (gold nanoparticles, Au NPs) 是合成 SiNW 所需的催化劑，其粒徑大小會直接影響 SiNW 的直徑大小，因此我們希望合成直徑 20 nm 的 Au NPs，合成直徑小於 20 nm 之 SiNWs。我們以氧化還原法合成 Au NPs，其反應式及部分產物如下所式：



其中四氯金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) 是作為金的來源，而檸檬酸鈉 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 在反應中扮演還原劑與分散劑的角色，反應時，檸檬酸根將四氯金酸 (三價金離子) 還原成金原子，金原子便開始聚集成 Au NPs，而具負電荷的檸檬酸根離子 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) 會吸附於 Au NPs 的表面，其表面因為具有負電性，故粒子間會產生負負相斥的作用力，使其能穩定於溶液中。反應時，檸檬酸鈉的濃度會影響合成出的 Au NPs 粒徑大小，當檸檬酸鈉的濃度高時，因檸檬酸根離子的吸附，原子聚集成粒子的時間變短，因此所得的粒徑較小，反之，檸檬酸鈉濃度低時，可以有較長

的時間聚集成粒徑較大的粒子。



### 金奈米粒子合成流程：

#### 1. 藥品配製

3 mM 四氯金酸溶液：稱取0.51 g 四氯金酸溶解於 50 mL 去離子水中。

38.8 mM 檸檬酸鈉溶液：稱取0.2 g 檸檬酸鈉溶解於 20 mL 去離子水中。

2. 取 5 mL 的 3 mM 四氯金酸溶液和 10 mL 去離子水加至 20 mL 樣品瓶中，放入磁石攪拌子，放置加熱板上，一邊攪拌一邊加熱至沸騰。

3. 溶液沸騰後，加入 0.75 mL 檸檬酸鈉溶液，反應時間為 10 min。可觀察到溶液顏色由透明黃色轉變為黑色，最後轉變為酒紅色。

4. 靜置冷卻後，放入4 °C 冰箱保存。

## 2.1.2 硼參雜矽奈米線的合成

我們是以化學氣相沉積 (chemical vapor deposition, CVD) 的方式，並以金奈米粒子作為催化劑，經由氣相-液相-固相 (vapor-liquid-solid, VLS) 的生長機制合成矽奈米線，VLS 生長機制最早在 1964 年由 Wagner 所提出[54]。

VLS 生長機制分為三個階段 (圖 2-1)，首先，將金奈米粒子加熱到金與矽的共熔溫度 (363 °C) 以上，通入反應氣體  $\text{SiH}_4$  後， $\text{SiH}_4$  會吸附到金的表面，並且受到金的催化而分解成矽原子和氫氣，此時矽原子溶入金奈米粒子形成液態合金 (liquid alloy)。在第二階段中，持續通入反應氣體，矽原子繼續溶入金粒子中，當達到過飽和 (supersaturation) 狀態，便有矽原子開始析出，此為成核 (nucleation) 的過程。成核後，持續通入  $\text{SiH}_4$ ，會使得矽原子繼續溶入金粒子中，接著在成核的固/液介面便會持續生長出單晶矽奈米線。在 CVD-VLS 生長過程中，矽奈米線的直徑取決於金奈米粒子的直徑大小。

合成矽奈米線時，我們會同時通入 diboran ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ) 氣體，以得到硼參雜的矽奈米線，並且藉由調整通入  $\text{B}_2\text{H}_6$  的流量，改變參雜的密度，使矽奈米線的性質達到最佳化。

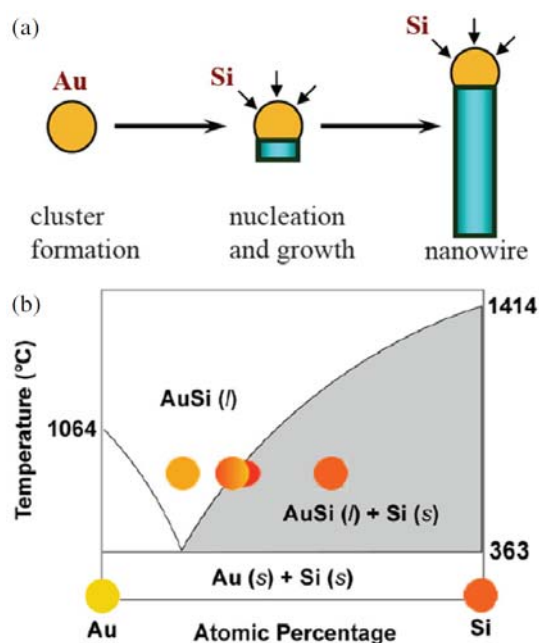


圖 2-1 (A) 以 VLS 機制合成矽奈米線示意圖。(B) 矽與金的二元相圖[55]。

### 硼參雜矽奈米線之合成步驟 (圖 2-2)：



1. 將四吋矽晶圓切割成適當大小 (大約 3 cm x 1.5 cm) 的破片，依序以丙酮-異丙醇-去離子水沖洗破片，再以氮氣吹乾。
2. 利用氧氣電漿 (100 W, 200 s) 清除破片表面的有機雜質。
3. 以微量吸管吸取 0.1% poly-L-lysine (w/v, Sigma) 滴在破片上，使溶液能完全覆蓋表面，靜置 2 min，以去離子水清洗破片後，用氮氣吹乾表面。此時破片表面因 poly-L-lysine 而為正電性。
4. 以微量吸管吸取自行合成之金奈米粒子水溶液，將其滴上並且完全覆蓋於破片表面，靜置 10 s 後，以去離子水沖洗破片，再以氮氣吹乾表面。此時，以靜電作用力將具有負電性的金奈米粒子吸附在表面有 poly-L-lysine 的破片上。
5. 以氧氣電漿 (100 W, 5 min) 清潔修飾金奈米粒子的破片表面。
6. 將破片送入石英管，放置於高溫爐中心。
7. 開啟 dry pump 抽真空，將管內的氣體抽除乾淨，待壓力值下降到 0.02 torr 後，切換以 diffusion pump 抽真空 1 hr。
8. 流入 20 sccm 的高純度 Ar 氣體，設定 15 min 升溫至 460 °C。
9. 當溫度達到穩定的 460 °C 時，通入 SiH<sub>4</sub> (6 sccm) 和 B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (12 sccm)，並調整電動閥門，設定總壓為 25 torr。
10. 當所有氣體流量與石英管內壓力值穩定後，開始計時，合成時間約 15 min。
11. 合成時間完畢後，關閉 SiH<sub>4</sub> 和 B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 的閥門，持續通入 Ar 氣體，並以 pump 抽去管內的反應氣體，關閉高溫爐使石英管降溫。
12. 待溫度下降 70 °C 以下，以 Ar 氣體破真空並取出破片。
13. 以光學顯微鏡檢查矽奈米線的生長結果。

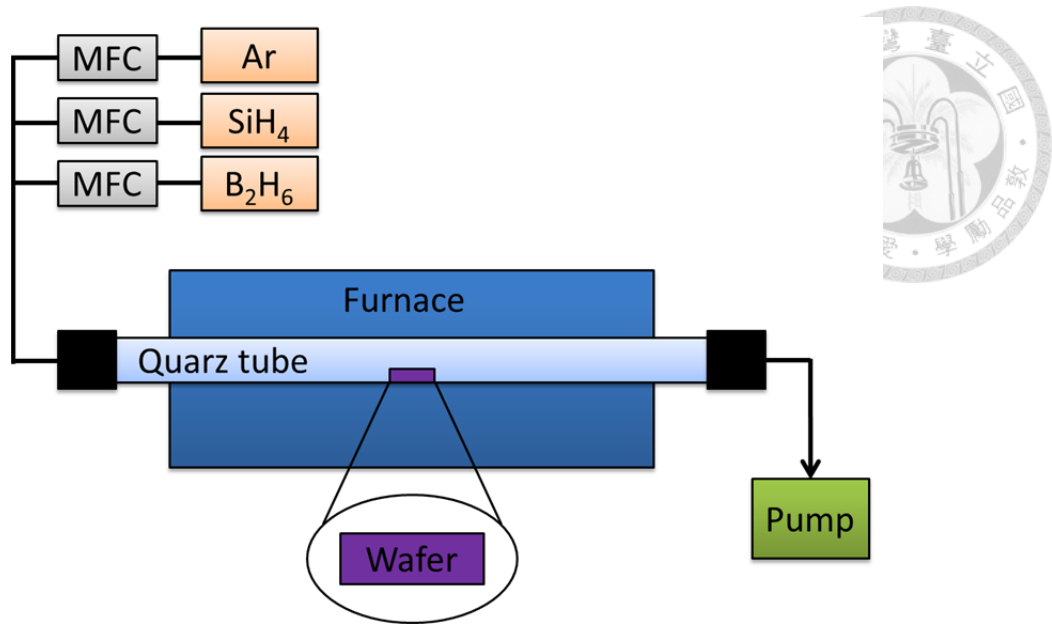


圖 2-2 CVD 合成系統示意圖。使用 Ar、SiH<sub>4</sub> 和 B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 等三種氣體，以質量流量控制器 (mass flow controller, MFC) 控制氣體流量，反應氣體流入置於高溫爐 (furnace) 中的石英管 (quarz tube) 進行反應，pump 抽除管內氣體。



### 2.1.3 晶片製程

晶片的製程依序可分為外層電極、矽奈米線的接觸轉印、內層電極以及熱退火。首先，我們以黃光微影技術 (photolithography) 在矽晶片上製作好外層電極，接著利用接觸轉印的方式將矽奈米線轉移到欲製作內層電極處，轉印後，以光學顯微鏡觀察矽奈米線數量，達一定數量便可進行內層電極的製作。同樣以黃光微影技術完成內層電極，為了使內層電極與矽奈米線接觸的更好，會以氫氟酸除去奈米線表面的二氧化矽，再鍍上電極。最後將晶片進行熱退火處理，使電極與奈米線形成化合物，而達到歐姆接觸 (Ohmic contact)。

#### 外層電極製作流程：

1. 以氧氣電漿 (100 W, 200 s) 清潔四吋矽晶圓表面，去除表面的有機物。
2. 以旋轉塗佈機將 LOR5B 光阻塗佈於晶圓表面，並以加熱板 185 °C 烘烤 5 min，待冷卻後，再塗佈 S1813 光阻，並以 115 °C 烘烤 1.5 min。徒步完成後，光阻 LOR5B 和 S1813 的厚度各約為 300 nm 和 500 nm。
3. 以光罩對準機 (mask aligner) 將外層電極的光罩 (圖 2-3) 對準於晶圓上後，以波長範圍 350 ~ 430 nm 的光曝光 8.5 s。
4. 將晶圓浸泡到顯影液 (MF-319, Shipley) 中，待約 1 min 後，圖案顯現，以去離子水清洗並用氮氣吹乾。
5. 以氧氣電漿 (30 W, 1 min) 清潔晶圓表面殘留的光阻。
6. 將晶圓放入蒸鍍機 (evaporator) 的腔體中，抽真空至  $10^{-7}$  torr 以下後，開始蒸鍍金屬電極，第一層為鉻金屬 (膜厚約 5 nm)，第二層鍍上金金屬 (膜厚約 60 nm)。
7. 將鍍上金屬的晶圓浸泡到 PG remover 中將光阻徹底清除，若清除不夠乾淨，將溶液加熱到 60 °C。最後以丙酮和乙醇清洗表面並用氮氣吹乾。
8. 最後將晶圓塗佈一層 S1805 光阻作為保護層，並使用晶圓切割機，將晶圓上的電極陣列切割成 14 mm x 14 mm 的晶片，即完成外層電極的製作。

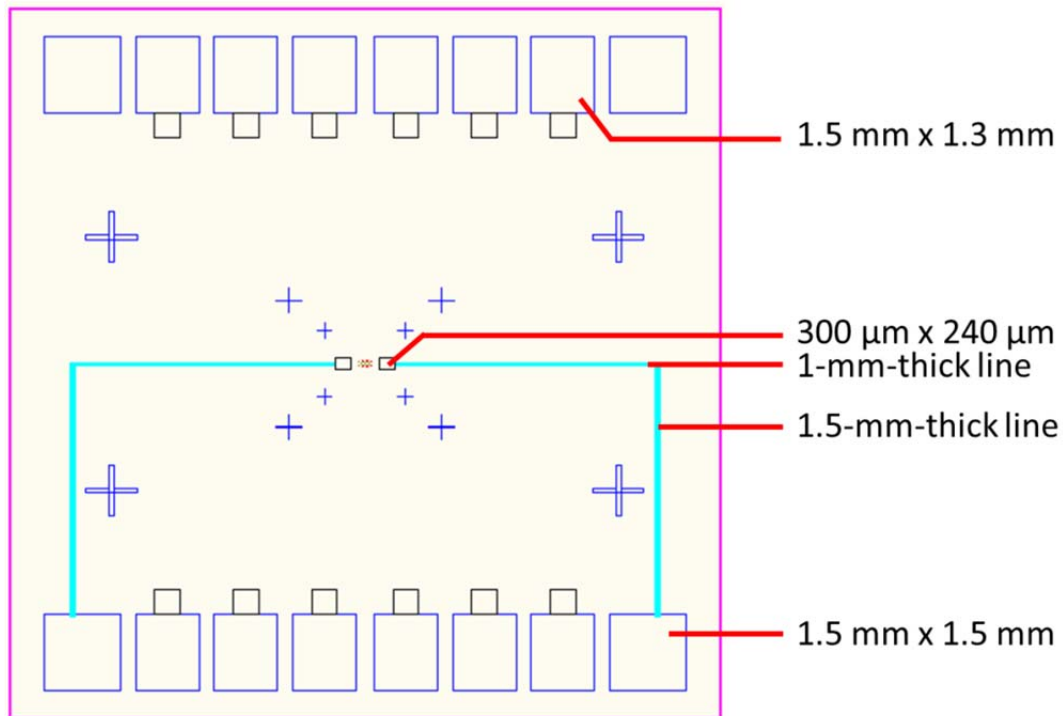


圖 2-3 MPC SiNW-FET 之外層電極光罩設計圖。其尺寸為 14 mm x 14 mm，中間的兩個長方形 (300  $\mu\text{m}$  x 240  $\mu\text{m}$ ) 為 liquid gate，外部的 12 個長方形 (1.5 mm x 1.3 mm) 為六組源-汲極電極的外部電極，兩個正方形 (1.5 mm x 1.5 mm) 為 liquid gate 的外部電極，十字形的圖案用來當作光罩對準的標記。

#### 矽奈米線的接觸轉印 (圖 2-4)：

1. 將含有矽奈米線的破片切割成適當大小後，以氮氣槍輕吹表面，去除因切割表面所產生的碎屑。
2. 將破片黏貼於工具上，將含有奈米線的那一面與已製作好外層電極的晶片接觸，並以適當力道移動工具，使矽奈米線得以轉印到晶片表面的欲製作內層電極處。
3. 移開破片與工具，即完成接觸轉印步驟。

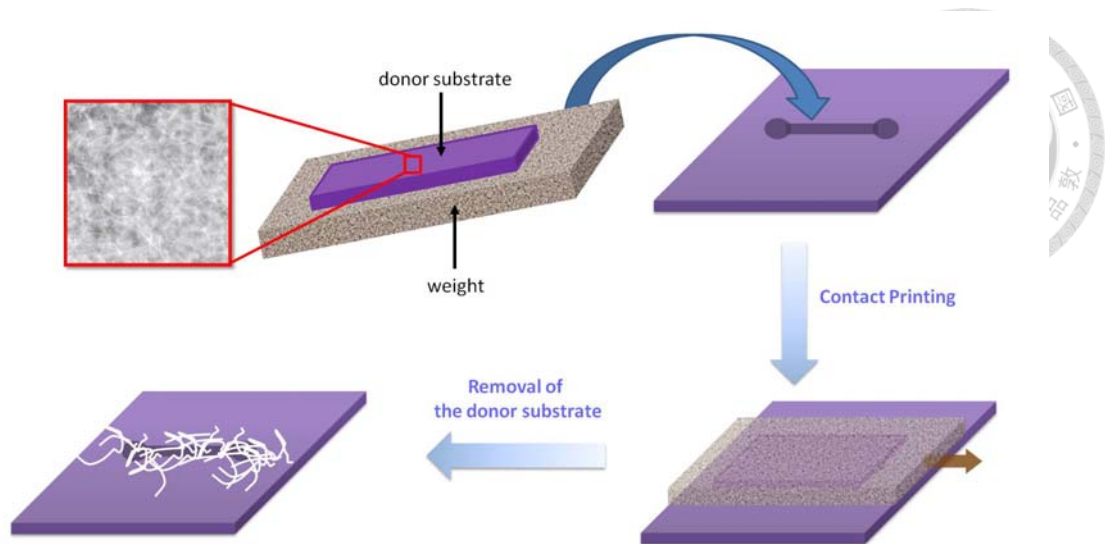


圖 2-4 接觸轉印矽奈米線之流程圖。

#### 內層電極製作流程：

1. 利用旋轉塗佈機將 LOR5B 光阻塗佈到晶片上，以 185 °C 烘烤 5 min，接著塗佈 S1813 光阻，並以 115 °C 烘烤 1.5 min。
2. 以光罩對準機 (mask aligner) 將內層電極的光罩 (圖 2-5) 對準於晶片上後，以波長範圍 350 ~ 430 nm 的光曝光 8.5 s。
3. 將晶片浸泡到顯影液 (MF-319, Shipley) 中，待約 1 min 後，圖案顯現，以去離子水清洗並用氮氣吹乾。
4. 以氧氣電漿 (30 W, 1 min) 清潔晶片表面殘留的光阻。
5. 將晶片浸泡於氫氟酸 (buffer of oxide etching, BOE) 約 5 s，用去離子水清洗並以氮氣吹乾。
6. 迅速將晶片放入蒸鍍機的腔體中，抽真空至  $10^{-7}$  torr 以下後，開始蒸鍍金屬電極，第一層為鎳金屬 (膜厚約 70 nm)，第二層鍍上鋁金屬 (膜厚約 100 nm)。
7. 將鍍上金屬的晶片浸泡到 PG remover 中將光阻徹底清除，若清除不夠乾淨，將溶液加熱到 60 °C。最後以丙酮和乙醇清洗表面並用氮氣吹乾，即完成內層電極的製作。

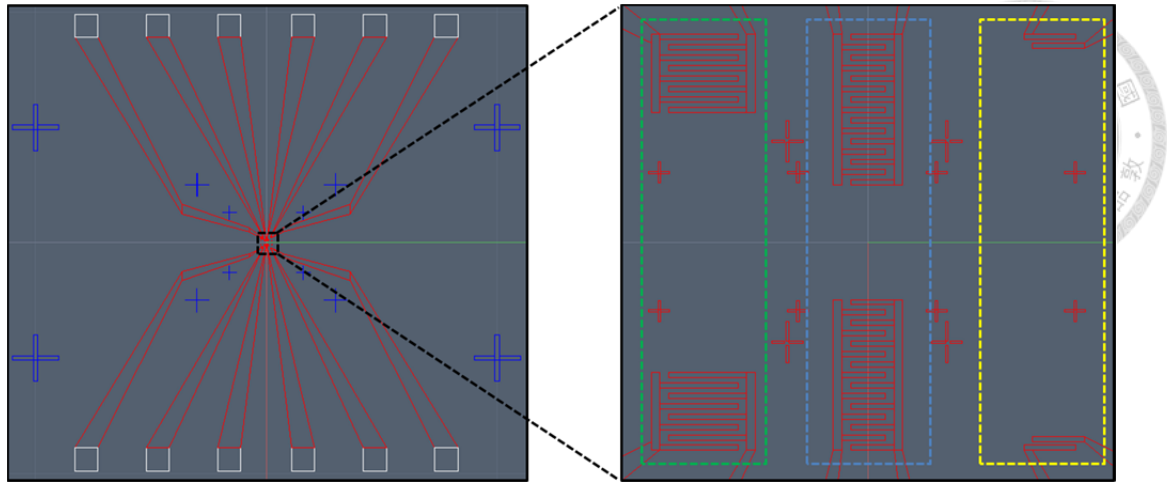


圖 2- 5 MPC SiNW-FET 之內層電極之光罩設計圖。內層電極設計圖中，有六組源-汲極電極，其中右邊兩組為一源極對應一汲極的設計 (黃色框)，中間兩組為七源極與八汲極互相交錯的設計 (寬 25  $\mu\text{m}$ ) (藍色框)，左邊兩組為四源極與四汲極互相交錯的設計 (寬 45  $\mu\text{m}$ ) (綠色框)。

#### 熱退火 (thermal annealing) :

完成內層電極後，將晶片置於退火爐 (ULVAC-RIKO MILA-3000)，抽真空至 100 torr 以下後，通入 forming gas (10%  $\text{H}_2$ /90%  $\text{N}_2$ )，升溫至 360  $^\circ\text{C}$ ，持續 2 min，即完成熱退火。此步驟是為了使鎳金屬電極與矽奈米線形成歐姆接觸。



## 2.1.4 元件電性量測

完成 MPC SiNW-FET 的製作後，我們會先在空氣下量測各別元件的電阻以及源-汲極電流對偏壓 ( $I_{sd}-V_{sd}$ ) 的曲線，確認金屬電極與矽奈米線為歐姆接觸後，在 0.1x PBS 溶液中，量測元件的源-汲極電流對閘極電壓 ( $I_{sd}-V_g$ ) 曲線，選出跨導 (Transconductance) 500 nS 以上的元件來進行實驗。

### $I_{sd}-V_{sd}$ 量測系統 (圖 2- 6) :

$I_{sd}-V_{sd}$  量測系統包含探針台 (probe station) 與數位型多功能三用電表(digital multimeter, Keithley 6487)，圖 2- 7 為量測系統示意圖，其中 Keithley 6487 作為電壓源並且量測電流，Labview 程式控制量測系統以及紀錄訊號。量測時，偏壓  $V_{sd}$  掃描範圍為 200 mV 到 -200 mV。

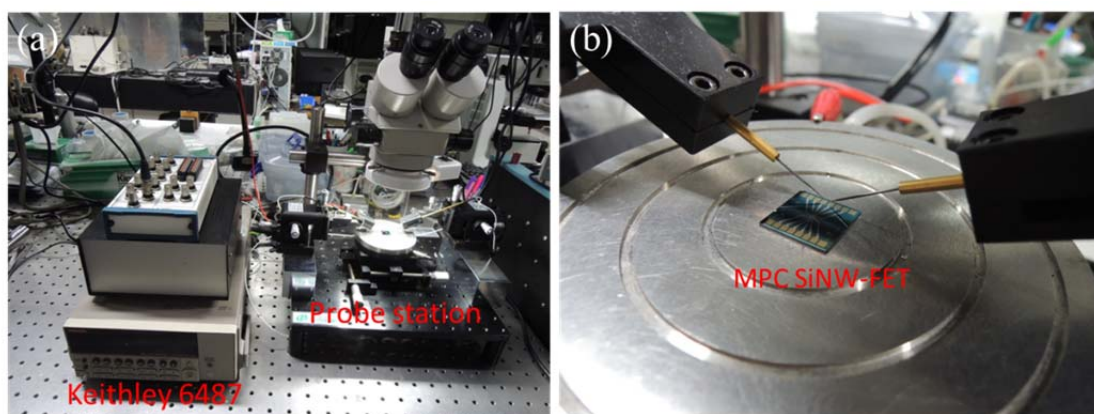


圖 2- 6 (A)  $I_{sd}-V_{sd}$  量測系統 (B) 晶片與探針台。

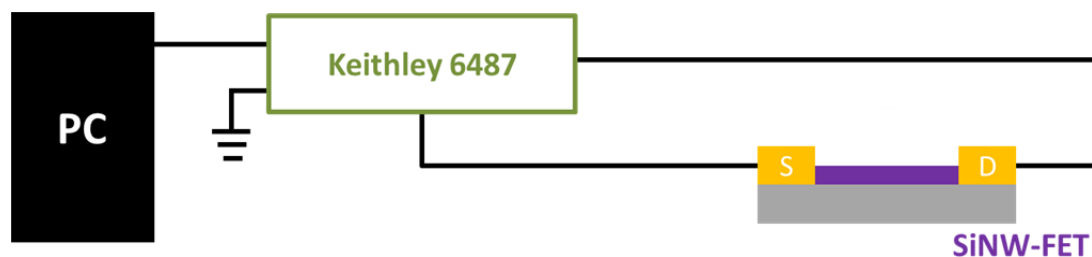


圖 2- 7  $I_{sd}-V_{sd}$  量測系統示意圖。

### $I_{sd}-V_g$ 量測系統：

在量測  $I_{sd}-V_g$  曲線之前，須建立感測溶液槽實驗裝置以連接量測系統，首先，以銅膠將晶片黏著於十字形的外接電路板上，利用打線機 (wire binder) (圖 2-8 (A))將所選元件之外層電極與電路板上的電極連接，接著將一感測溶液槽架設在晶片上，整個電路板再以雙面膠黏著於壓克力座上，即完成感測溶液槽實驗裝置(圖 2-8 (B))。量測時，以電線將此裝置連接於量測系統。

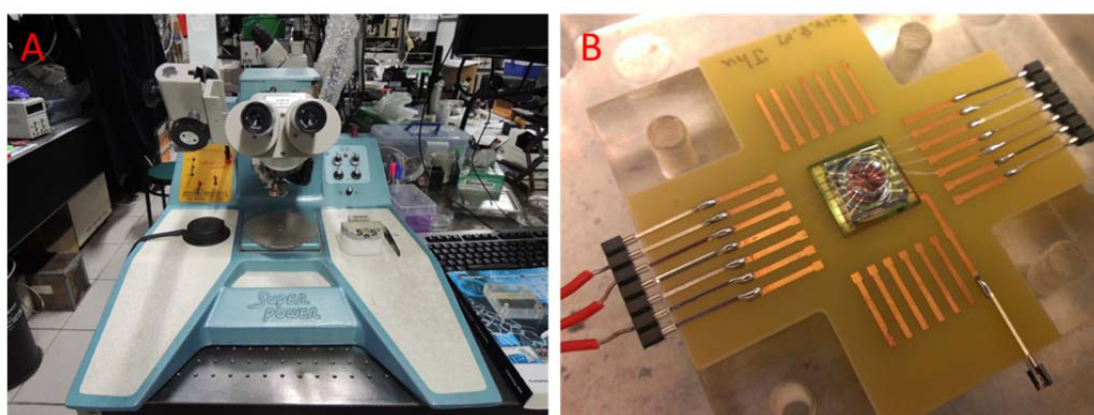


圖 2-8 (A) 打線機 (B) 感測溶液槽實驗裝置。

$I_{sd}-V_g$  量測系統示意圖如圖 2-9 所示，利用鎖相放大器 (Lock-in amplifier, Stanford Research SR830) 擷取訊號，其能鎖定電路中特定的相位與頻率，過濾其他的雜訊並且得到正確的訊號，白金電極作為閘極浸泡到樣品溶液中，藉由 Labview 程式負責控制資料擷取卡 (DAQ card) 施加閘極電壓並且記錄訊號。量測時，鎖相放大器的參數設定為  $V_{sd} = 10 \text{ mV}$ 、modulation frequency = 79 Hz、time constant = 100 ms，閘極電壓  $V_g$  掃描範圍為 200 mV 到 -200 mV。

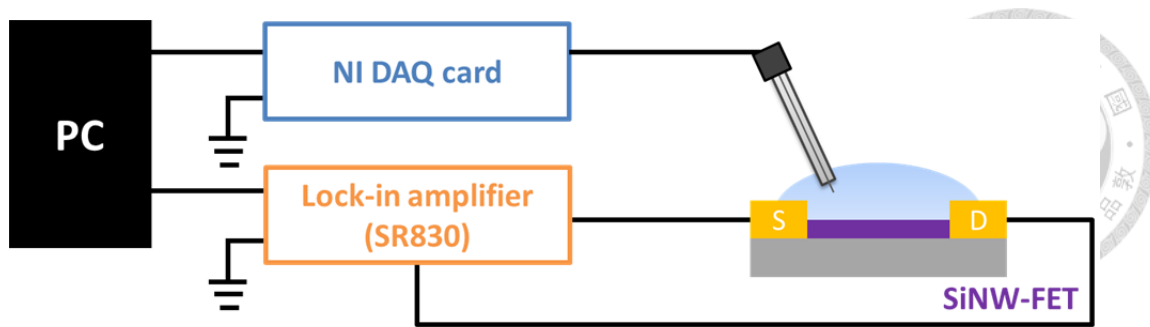


圖 2-9  $I_{sd}$ - $V_g$  量測系統示意圖。

## 2.1.5 感測溶液槽的製備

由於進行生物感測實驗時是在液相環境中，為了避免樣品溶液接觸到未經絕緣層覆蓋的外層電極部分，我們在晶片上架設一個感測溶液槽來隔離。感測溶液槽的製作是將 polydimethylsiloxane (PDMS, 喬越實業有限公司) 之 A 劑 (Sylgard-184 silicone elastomer) 和 B 劑 (Sylgard-184 silicone elastomer curing agent) 以體積比 10:1 的比例混和均勻後，倒入以培養皿盛裝之母模中，利用真空幫浦抽氣，去除因攪拌所產生之氣泡，抽氣至氣泡完全消失後，將其放入烘箱中，以 80 °C 烘烤約 15 min (烘烤時間愈長，PDMS 的硬度會愈高)，待冷卻後，切割成適當大小，即完成感測溶液槽的製作。

感測溶液槽母模的製作是將 200  $\mu$ l 的 tip 直立在培養皿中所完成，tip 底部的外徑約為 7 mm。製作完成的感測溶液槽，其底部半徑、長、寬和高各約為 7 mm、11 mm、9 mm、2.5 mm (圖 2-10 (b))。

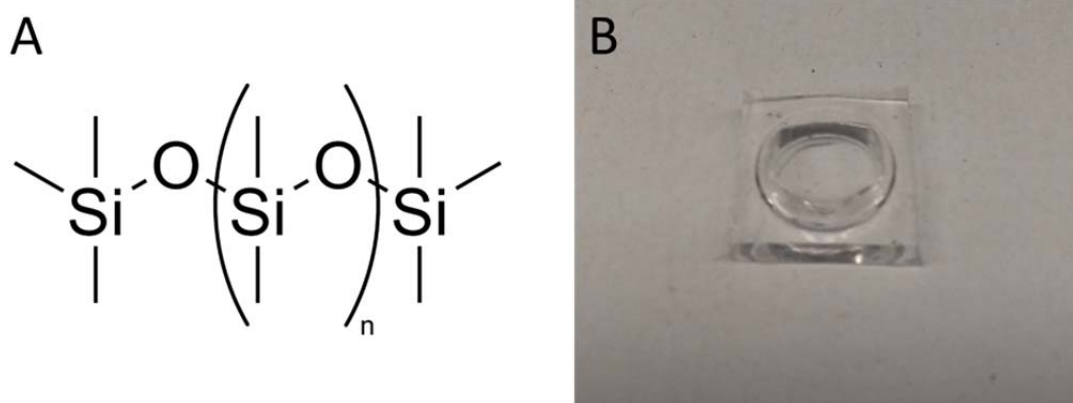


圖 2-10 (A) PDMS 化學結構式 (B) 感測溶液槽。



## 2.2 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測缺氧刺激下的

**PC12 細胞釋放之多巴胺** (cowork with 李博仁 博士和陳彥溪 研究助理)



### 2.2.1 矽奈米線表面修飾

我們以兩種化學鍵結分子將 DA-specific aptamer 以共價鍵固定在 SiNW 的表面上，修飾過程共有三個步驟。第一步是在矽奈米表面上修飾 3-aminopropyl trimethoxysilane (APTMS, Sigma-Aldrich) 與 propyl trimethoxysilane (PTMS, Sigma-Aldrich) 這兩種化學鍵結分子，APTMS 的兩端具有不同的官能基，一端為甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>)，另一端為一級胺基 (-NH<sub>2</sub>)，而 PTMS 的兩端則分別為甲氧基與甲基 (-CH<sub>3</sub>)，APTMS 和 PTMS 的甲氧基會與矽奈米線表面的矽醇基 (Si-OH) 反應產生鍵結，形成自組裝單分子膜 (self-assembled monolayers, SAMs)，此時矽奈米線表面有一級胺基，可作為受體與矽奈米線表面的連結。加入 PTMS 的目的是為了調整矽奈米線表面的 APTMS 密度，以避免後續修飾到矽奈米線上的受體與受體之間的立體阻礙 (steric hindrance)，彼此可能會因為交纏在一起，而無法折疊成正常的形狀，進而影響偵測靈敏度。另一方面，PTMS 填補空隙，可避免矽奈米線表面與待測物或干擾物有非選擇性的交互作用 (non-specific interaction)。第二步是修飾 3 maleimidobenzoic acid N-hydroxy succinimide ester (MBS, Sigma-Aldrich) 於 APTMS 上，MBS 與 APTMS 的一級胺基反應後形成醯胺鍵。最後一步是修飾 DA-specific aptamer，我們所購買的是 5' 端以雙硫鍵連接的 DNA 二聚體 (disulfide DNA-dimer, 生工有限公司)，因此先以 dithiothreitol (DTT, J. T. Baker) 切斷雙硫鍵，使 DNA-aptamer 的硫醇基可與 MBS 的 maleimide group 反應形成鍵結，藉此將 DA-specific aptamer 固定在矽奈米線表面 (圖 2-11)。

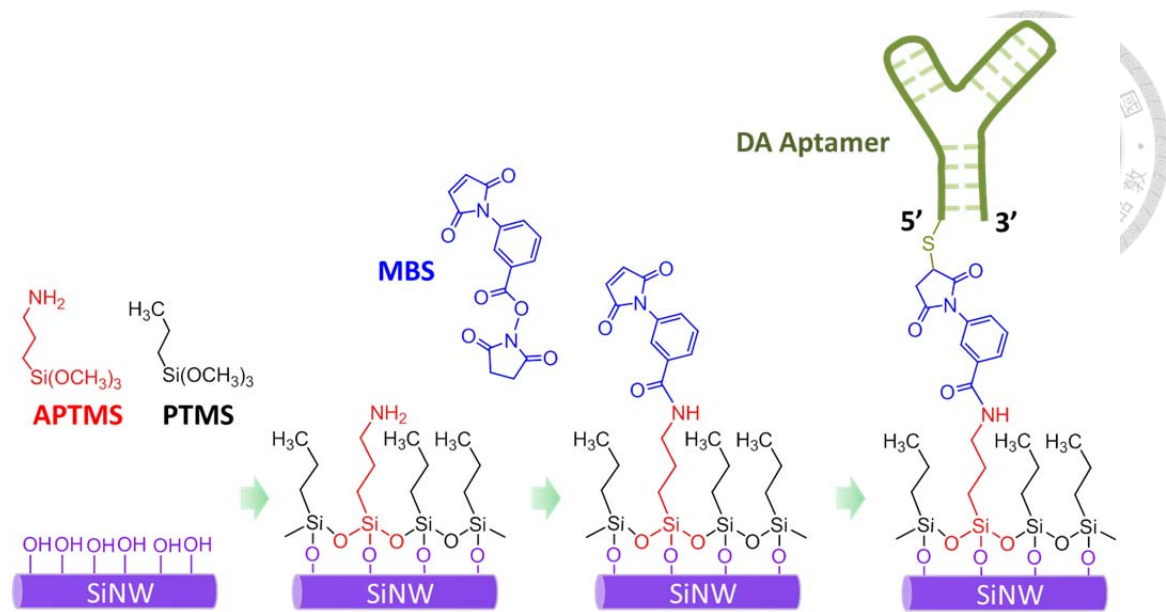


圖 2- 11 DA-specific aptamer 固定化之流程圖。

### 1. 修飾 APTMS 與 PTMS

將製作好的 bare SiNW-FET 晶片依序以丙酮-異丙醇-去離子水沖洗並以氮氣吹乾，將晶片浸泡於含有 0.2 vol % APTMS 與 0.8 vol % PTMS 之 99.5% 乙醇溶液中，反應 15 min 後，以加熱板 110 °C 烘烤 10 min。加熱是為了使 APTMS 和 PTMS 形成良好的自組裝單分子膜。

### 2. 修飾 MBS

將已修飾 APTMS 與 PTMS 之 SiNW-FET 晶片浸泡於 1 mM MBS 溶液 (溶於 1:9 (v/v) 的 DMSO 和 1x PBS) 中 30 min，修飾完成後，以去離子水沖洗晶片表面，再以氮氣吹乾。

### 3. 修飾 DA-specific aptamer

配製含有 1  $\mu$ M DA-specific aptamer 與 16.7 mM DTT 之 1x PBS 溶液，將已修飾 MBS 之晶片浸泡於此溶液中 1 hr，修飾完成後，以去離子水沖洗晶片表面，再以氮氣吹乾。

我們另外購買 3' 端修飾有 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 的 DA-specific aptamer，簡稱為 FITC-aptamer，利用螢光影像來證明此修飾方法是

否能成功將 DA-specific aptamer 固定在  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  基板上。FITC 是一種螢光基團，其最大吸收波長為 495 nm，最大放光波長為 520 nm。



## 2.2.2 多巴胺與其他分子之偵測

此實驗分為兩個部分，第一個部分是以修飾 DA-specific aptamer 之 MPC SiNW-FET 偵測多巴胺 (DA)、抗壞血酸 (AA)、鄰苯二酚 (CT)、苯乙胺 (PEA)、酪胺酸 (TR)、腎上腺素 (EP) 以及正腎上腺素 (NE)，探討這些分子與 DA-specific aptamer 之間的結合親和力 (binding affinity)。第二個部分是以僅修飾 PTMS 之 MPC SiNW-FET 偵測上述七種分子，做為控制組實驗。

實驗時，我們將欲偵測的分子以 0.1 倍磷酸鹽緩衝溶液 (0.1x phosphate buffer saline, 0.1x PBS, 含有 13.7 mM NaCl、270  $\mu$ M KCl、1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 200  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) 配製成所要的濃度，吸取所調配之樣品溶液 100  $\mu$ l 滴在晶片上，利用 2.1.4 元件電性量測節所述之  $I_{sd}$ - $V_g$  量測系統進行偵測，掃描並記錄  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線。鎖相放大器的參數設定為  $V_{sd} = 10$  mV、modulation frequency = 79 Hz、time constant = 100 ms，閘極電壓  $V_g$  掃描範圍為 200 mV 到 -200 mV。實驗完成後，處理數據並利用 Langmuir adsorption isotherm model 求出解離常數 (dissociation constant,  $K_d$ )。

### 緩衝溶液的選擇：

SiNW-FET 的偵測原理是基於目標分子與受體結合時，目標分子的電荷改變矽奈米線的表面電位，進而改變矽奈米線中的載子濃度，使偵測的電訊號改變。一般生物感測實驗會在生理緩衝溶液中進行，而緩衝溶液中含有高濃度的鹽類，由於靜電吸引力，這些離子會在帶電荷的目標分子周圍形成電雙層 (electrical double layer)，遮蔽目標分子所產生的電場，此現象即為所謂的 Debye screening，目標分子的電位  $V(r)$  會隨著距離以指數方式下降，可表示為  $V(r) e^{-r/\lambda_D}$ ， $r$  為目標分子與受體之結合位置 (binding site) 到矽奈米線表面的距離， $\lambda_D$  為 Debye length，其定義如下列公式：



$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 N_A e^2 I}}$$

$\epsilon_0$  為真空的介電常數； $\epsilon_r$  為溶液的介電常數； $k_B$  為波茲曼常數； $T$  為絕對溫度； $N_A$  為亞佛加厥常數； $e$  為基本電荷 ( $1.6 \times 10^{-19}$  C)； $I$  為溶液中電解質的離子強度，其定義如下列公式：

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

$c_i$  是離子  $i$  的莫耳濃度， $z_i$  是離子  $i$  所帶的電荷數。 $\lambda_D$  可經過換算改寫為下列公式：

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{1}{8\pi l_B N_A I}}$$

其中  $l_B$  為 Bjerrum length (0.7 nm)。

由上述的公式可知，當溶液的離子強度愈高， $\lambda_D$  會愈短，造成的遮蔽效應會更加嚴重，導致所偵測到的電訊號變化較小，降低矽奈米線場效應電晶體的偵測靈敏度，因此我們會根據目標分子與受體之結合位置到矽奈米線表面的距離，選擇適當的生理緩衝溶液進行實驗，由於 DA-specific aptamer 與 DA 之結合位置到矽奈米線表面的距離約為 3 nm，我們選擇在 0.1x PBS 溶液 ( $\lambda_D = 2.4$  nm) 下進行實驗。


PBS (pH 7.2)	$\lambda_D$ (nm)	離子強度 (mM)
x1	0.7	150
x0.1	2.4	15
x0.01	7.4	1.5

表 2-1 不同濃度磷酸鹽緩衝溶液的 Debye length 和離子強度。

### 樣品溶液準備：

將欲偵測的分子溶解於 0.1x PBS (pH 7.2)，並以稀釋的方式配製不同濃度的樣品溶液。所配製的多巴胺濃度為 0.1 pM、0.3 pM、1 pM、3 pM、10 pM、30 pM、100 pM、300 pM、1 nM、3 nM、10 nM、30 n 以及 100 nM；抗壞血酸濃度為 1  $\mu$ M；鄰苯二酚濃度為 1  $\mu$ M；苯乙胺濃度為 1  $\mu$ M；酪胺酸濃度為 1  $\mu$ M；腎上腺素濃度為 1 pM、3 pM、10 pM、30 pM、100 pM、300 pM、1 nM、3 nM、10 nM、30 n 以及 100 nM；正腎上腺素濃度為 0.65 pM、2 pM、6.5 pM、20 pM、65 pM、200 pM、650 pM、2 nM、6.5 nM 以及 20 nM。

### 2.2.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺



我們將 PC12 細胞培養在 DA-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，使用 I-t 量測系統即時偵測 PC12 細胞在缺氧環境的刺激下，釋放 DA 所造成的電訊號變化。此實驗分為兩個部份，第一個部分要證明 DA-specific aptamer /SiNW-FET 可以成功偵測到 PC12 細胞在缺氧刺激下所釋放出的 DA，以不同濃度的缺氧緩衝溶液 (CO<sub>2</sub> reduced buffer) 刺激 PC12 細胞，量測其釋放出的 DA。第二個部分是要探討在缺氧刺激下 PC12 細胞釋放出 DA 的機制中，細胞內鈣離子濃度的上升是由細胞外的鈣離子流入細胞內所造成，還是收集儲存在細胞內胞器的鈣離子，導致細胞內鈣離子濃度上升。實驗時，加入 Cd<sup>2+</sup> 離子 (1 mM CdI<sub>2</sub>) 將 Ca<sup>2+</sup> 離子通道阻塞住，使鈣離子無法經由鈣離子通道從細胞外流到到細胞內，再以缺氧緩衝溶液刺激 PC12 細胞，量測其是否釋放出 DA。

#### PC12 細胞株培養：

PC12 細胞株來源於大鼠腎上腺髓質 (rat adrenal medulla) 的嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma)，培養在 Dulbecco's modified Eagle's medium (含有 10% 馬血清與 5% 胎牛血清)，37°C，含有 10% CO<sub>2</sub> 之大氣中，每兩天更換一次培養液。要進行細胞實驗的當天，加入不含鈣離子與鎂離子的生理緩衝溶液使細胞懸浮於培養液中，以離心機使細胞沉降，倒出上清液，加入適量的培養液，調整適當的細胞密度，將含有 PC12 細胞的培養液加至 DA-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上的感測溶液槽中，在 37°C 下，靜置 2 小時，使細胞沉降在晶片上。進行電訊號量測實驗前，以 1x PBS 溶液輕輕地置換培養液三次，清除細胞的代謝物。

#### 缺氧緩衝溶液準備：

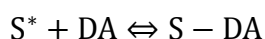
以玻璃樣品瓶盛裝 15 ml 0.1x PBS 溶液，將與氮氣管線連接的鋼針浸入

0.1x PBS 溶液，通入氮氣 (純度: 5N) 15 min，流速須控制在每秒冒出 3~5 顆氣泡，即得完全去除氧氣的 0.1x PBS 溶液。藉由混和不同體積比的有氧 0.1x PBS 溶液與去氧 0.1x PBS 溶液，製備出 35%  $C_{O_2}$  reduced buffer 與 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer。

## 2.2.4 朗謬耳吸附方程式

朗謬耳吸附方程式 (Langmuir Adsorption Equation) 是描述定溫下分子在固體表面化學吸附 (chemical Adsorption) 情況與濃度的關係。化學吸附是指一表面上有特定活性區域，這些區域會與目標物結合進而產生化學反應。化學吸附有下面幾項特點：一、表面上只有特定活性區域會與目標物結合，且活性區域對目標物有選擇性；二、目標物在表面上只會單層 (monolayer) 吸附。DA 與修飾在矽奈米表面上的 DA-specific aptamer 的結合符合化學吸附的條件，為了得知 DA 與 DA-specific aptamer 的解離常數 (dissociation constant,  $K_d$ )，我們利用朗謬耳吸附方程式來模擬 DA 與 DNA aptamer 的結合情況。

公式推導：首先，修飾於矽奈米線表面的 DA-specific aptamer ( $S^*$ ) 會與 DA 結合形成 S-DA 複合物 (S-DA complex)：



當此系統達成平衡時，可以推導出平衡方程式：

$$K_{eq} = \frac{[S - DA]}{[S^*][DA]} = K_a = \frac{1}{K_d}$$

$K_a$  為  $S^*$  與 DA 的結合常數 (association constant)。而  $[S-DA]$  與  $\theta$  值 (有與 DA 結合的 DA-specific aptamer 數量占全部 DA-specific aptamer 數量的比值) 成正比； $[S^*]$  則與  $1-\theta$  值 (未與 DA 結合的 DA-specific aptamer 數量占全部 DA-specific aptamer 數量的比值) 成正比，以上述關係將平衡方程式改寫成：

$$b = \frac{\theta}{(1 - \theta)C_{DA}} = \frac{1}{K_d}$$

$b$  被稱為朗謬耳吸附常數 (Langmuir adsorption constant)， $C_{DA}$  為多巴胺濃度。



接著將方程式移項整理，得到朗謬耳方程式如下所示：

$$\theta = \frac{bC_{DA}}{1 + bC_{DA}} = \frac{\Delta V_g^{\text{cal}}}{\Delta V_g^{\text{cal,max}}}$$

$\theta$  值為有與 DA 結合的 DA-specific aptamer 數量占全部 DA-specific aptamer 數量的比值，也就等同於當前 DA 濃度與平衡時 S-DA 濃度之間的比值，當前 DA 濃度所造成的電訊號變化量為  $\Delta V_g^{\text{cal}}$ ，而在高 DA 濃度時，所造成的飽和電訊號變化量為  $\Delta V_g^{\text{cal,max}}$ ，因此  $\theta$  值可等於  $\Delta V_g^{\text{cal}}/\Delta V_g^{\text{cal,max}}$ 。最後將  $b=1/K_d$  關係式代入方程式，得到最終的朗謬耳方程式如下所示：

$$\frac{C_{DA}}{\Delta V_g^{\text{cal}}} = \frac{1}{\Delta V_g^{\text{cal,max}}} \cdot C_{DA} + \frac{1}{\Delta V_g^{\text{cal,max}}} \cdot K_d$$

處理數據時，以 DA 濃度 ( $C_{DA}$ ) 為 X 軸，DA 濃度除以電訊號變化量 ( $C_{DA}/\Delta V_g^{\text{cal}}$ ) 為 Y 軸作圖，利用最小平方法 (least-squares) 擬合出一條斜直的趨勢線，此線的斜率為  $1/\Delta V_g^{\text{cal,max}}$ 、截距為  $K_d/\Delta V_g^{\text{cal,max}}$ ，將截距除以斜率即可得 DA-specific aptamer 與 DA 的解離常數  $K_d$ ，其倒數為結合常數  $K_a$ 。



## 2.3 利用修飾去氧核糖核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵

測神經肽 Y (cowork with 李博仁 博士、葉乃馨 同學)



### 2.3.1 矽奈米線表面修飾

我們從文獻中挑選出一個可選擇性與 NPY 結合的 NPY-specific aptamer 作為受體，為了將 NPY-specific aptamer 固定於矽奈米線表面，我們會在 bare SiNW-FET 晶片上進行三個修飾步驟。如圖 2-12 所示，第一步是在矽奈米表面上修飾 3-mercaptopropyl trimethoxysilane (MPTMS, Sigma-Aldrich) 與 propyl trimethoxysilane (PTMS, Sigma-Aldrich) 這兩種化學鍵結分子，MPTMS 的兩端具有不同的官能基，一端為甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>)，另一端為硫醇基 (-SH)，而 PTMS 的兩端則分別為甲氧基與甲基 (-CH<sub>3</sub>)，MPTMS 和 PTMS 的甲氧基會與矽奈米線表面的矽醇基 (Si-OH) 反應產生鍵結，形成自組裝單分子膜，此時矽奈米線表面含有硫醇基，可作為受體與矽奈米線表面的連結。加入 PTMS 的目的是為了調整矽奈米線表面的 MPTMS 密度，以避免後續修飾到矽奈米線上的受體與受體之間的立體阻礙 (steric hindrance)，彼此可能會因為交纏在一起，而無法折疊成正常的形狀，進而影響偵測靈敏度。第二步是修飾 3-maleimidobenzoic acid N-hydroxy succinimide ester (MBS, Sigma-Aldrich)，MBS 的 maleimide group 會與 MPTMS 的硫醇基反應形成共價鍵。最後一步是將 NPY-specific aptamer 修飾於矽奈米線表面，所購買的是 5'端修飾有一級胺基的 NPY-specific aptamer (NH<sub>2</sub>-aptamer, 生工有限公司)，NPY-specific aptamer 的一級胺基與 MBS 反應後形成醯胺鍵，藉此使 NPY-specific aptamer 固定於矽奈米線表面。

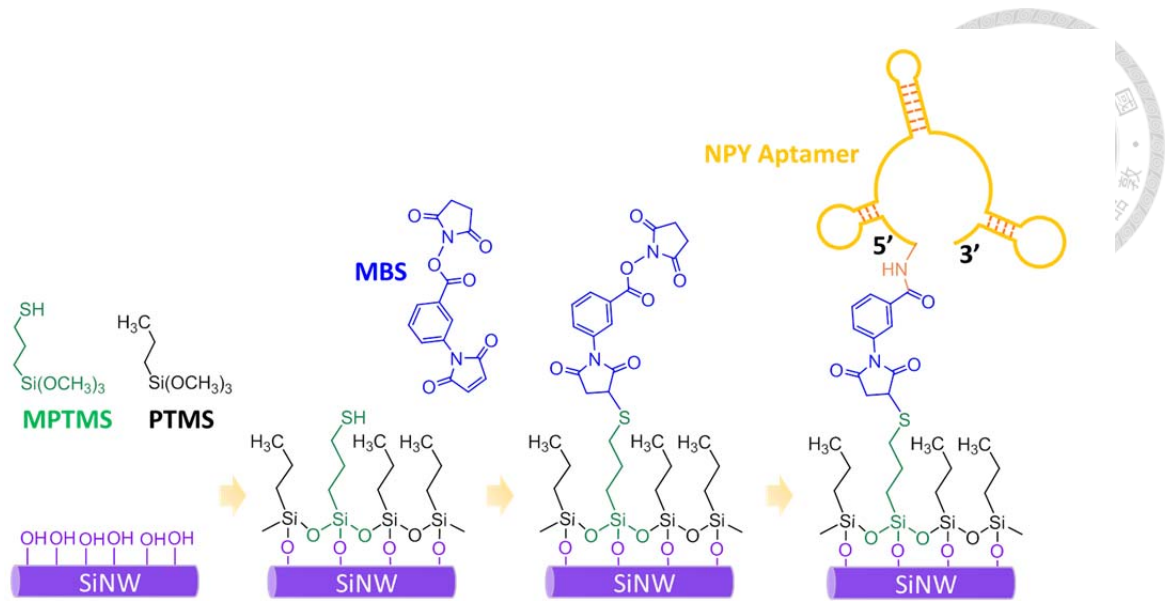


圖 2-12 NPY-specific aptamer 固定化之流程圖。

### 1. 修飾 MPTMS 與 PTMS

將製作好的 bare SiNW-FET 晶片依序以丙酮-異丙醇-去離子水沖洗並以氮氣吹乾，將晶片浸泡於含有 0.2 vol % MPTMS 與 0.8 vol % PTMS 之 99.5% 乙醇溶液中，反應 15 min 後，以加熱板 110 °C 烘烤 10 min。加熱是為了使 MPTMS 和 PTMS 形成良好的自組裝單分子膜。

### 2. 修飾 MBS

將已修飾 MPTMS 與 PTMS 之 SiNW-FET 晶片浸泡於 1 mM MBS 溶液 (溶於 1:9 (v/v) 的 DMSO 和 1x PBS) 中，30 min 後，以去離子水沖洗晶片表面，再以氮氣吹乾。

### 3. 修飾 NPY-specific aptamer

配製含有 1  $\mu$ M NPY-specific aptamer 之 1x PBS 溶液，將已修飾 MBS 之晶片浸泡於此溶液中，反應 2 hr 後，以去離子水沖洗晶片表面，再以氮氣吹乾。

我們另外購買 3'端修飾有 fluorescein isothiocyanate (FITC) 的 aptamer，簡稱為 FITC-aptamer，利用螢光影像來證明此修飾方法是否能成功將 NPY-specific aptamer 固定在 SiO<sub>2</sub>/Si 基板上。FITC 是一種螢光基團，其最大吸收波長為 495 nm，最大放光波長為 520 nm。

### 2.3.2 神經肽 Y 與其他分子之偵測

此實驗分為三個部分，第一個部分是以 PTMS-modified SiNW-FET 偵測神經肽 Y (NPY) 與多巴胺 (DA)，作為控制組實驗。第二個部分是以修飾 NPY-specific aptamer 之 SiNW-FET 偵測上述兩種分子，探討這兩種分子與 NPY-specific aptamer 之間的結合親和力 (binding affinity)。

實驗時，我們將欲偵測的分子以 0.1 倍磷酸鹽緩衝溶液 (0.1x phosphate buffer saline, 0.1x PBS, 含有 13.7 mM NaCl、270  $\mu$ M KCl、1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 200  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) 稀釋配製成所要的濃度，吸取所調配之樣品溶液 100  $\mu$ L 滴在晶片上，利用 2.1.4 元件電性量測節所述之  $I_{sd}$ - $V_g$  量測系統進行偵測，掃描並記錄  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線。鎖相放大器的參數設定為  $V_{sd} = 10$  mV、modulation frequency = 79 Hz、time constant = 100 ms，閘極電壓  $V_g$  掃描範圍為 200 mV 到 -200 mV。實驗完成後，處理數據並利用 Langmuir adsorption isotherm model 求出解離常數。

#### 樣品溶液準備：

將欲偵測的分子溶解於 0.1x PBS (pH 7.2)，並以稀釋的方式配製不同濃度的樣品溶液。所配製的 NPY 濃度為 1 nM、3 nM、10 nM、30 nM、100 nM、300 nM、1  $\mu$ M、3  $\mu$ M 以及 10  $\mu$ M；DA 濃度為 100  $\mu$ M。

### 2.3.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之神經肽 Y

我們將 PC12 細胞培養在 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，使用 I-t 量測系統即時偵測 PC12 細胞在缺氧環境的刺激下，其釋放 NPY 所造成的電訊號變化。此實驗分為兩個部分，第一個部分為控制組實驗，在未培養 PC12 細胞的 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 上，置換 70% 缺氧緩衝溶液 ( $\text{CO}_2$  reduced buffer)，觀察是否產生訊號變化。第二個部分，是將 PC12 細胞培養於 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，分別以 35%、55% 和 70% 缺氧緩衝溶液刺激 PC12 細胞，量測其釋放出的 NPY 所造成之電訊號變化，並進一步分析 NPY 濃度。

#### PC12 細胞株培養：

PC12 細胞株源自大鼠腎上腺髓質 (rat adrenal medulla) 的嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma)，培養在 Dulbecco's modified Eagle's medium (含有 10% 馬血清與 5% 胎牛血清) 37°C，含有 10%  $\text{CO}_2$  之大氣中，每兩天更換一次培養液。要進行細胞實驗的當天，加入不含鈣離子與鎂離子的生理緩衝溶液使細胞懸浮於培養液中，以離心機使細胞沉降，倒出上清液，加入適量的培養液，調整適當的細胞密度，將含有 PC12 細胞的培養液加至 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上的感測溶液槽中，在 37°C 下，靜置 2 小時，使細胞沉降在晶片上。進行電訊號量測實驗前，以 1x PBS 溶液輕輕地置換培養液三次，清除細胞的代謝物。

#### 缺氧緩衝溶液準備：

以玻璃樣品瓶盛裝 15 ml 0.1x PBS 溶液，將與氮氣管線連接的鋼針浸入 0.1x PBS 溶液，通入氮氣 (純度: 5N) 15 min，流速須控制在每秒冒出 3~5 顆氣泡，即得完全去除氧氣的 0.1x PBS 溶液。藉由混和有氧 0.1x PBS 溶液與去氧 0.1x PBS 溶液，製備 35%、55% 和 70%  $\text{CO}_2$  reduced buffer。

## 第三章 實驗結果與討論



### 3.1 網絡式矽奈米線場效應電晶體的製作

#### 3.1.1 矽奈米線合成結果

我們以 20 nm 的金奈米粒子作為催化劑，藉由氣相沉積法與 VLS 的成長機制合成硼摻雜矽奈米線，其中矽硼比約為 4000:1。合成完畢後，會以光學顯微鏡觀察矽奈米線的生長情形，圖 3-1 為以不同倍率之物鏡觀察矽奈米線之影像圖，其長度大於 15  $\mu\text{m}$ 。我們以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) 分析矽奈米線的直徑大小，並且以高解析度穿透式電子顯微鏡 (high-resolution transmission electron microscopy, HR-TEM) 和電子繞射儀 (electron diffraction, ED) 檢視矽奈米線的結晶性。根據 SEM 的結果 (圖 3-2)，矽奈米線的直徑約在 25~30 nm 之間。HR-TEM 與 ED 的實驗結果 (圖 3-3) 指出矽奈米線表面的二氧化矽氧化層厚度約為 2~3 nm，矽奈米線為單晶結構，其成長方向為沿著米勒指數 (Miller index) [111] 之晶格方向呈軸向成長，相鄰晶格面的間距約為 0.32 nm。

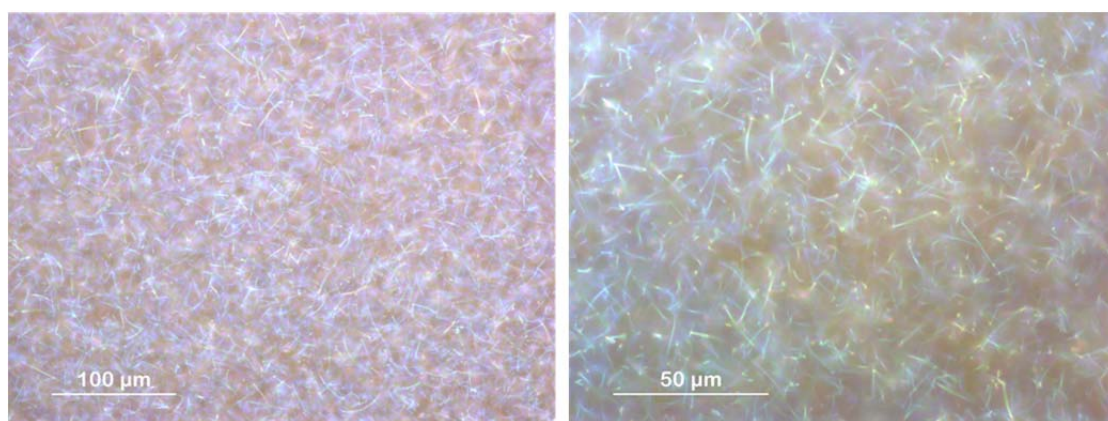


圖 3-1 硼摻雜矽奈米線之光學影像圖。

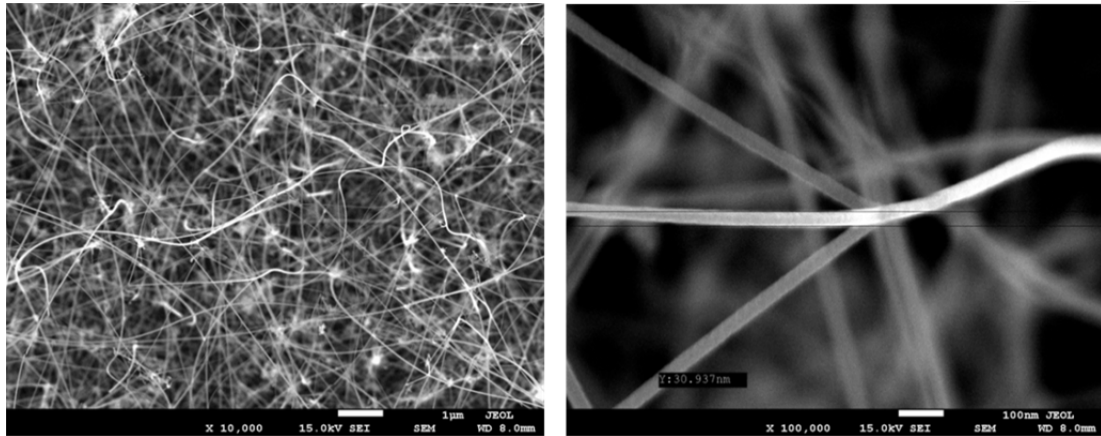


圖 3-2 硼摻雜矽奈米線之 SEM 影像圖。矽奈米線的直徑約為 25~30 nm 之間。

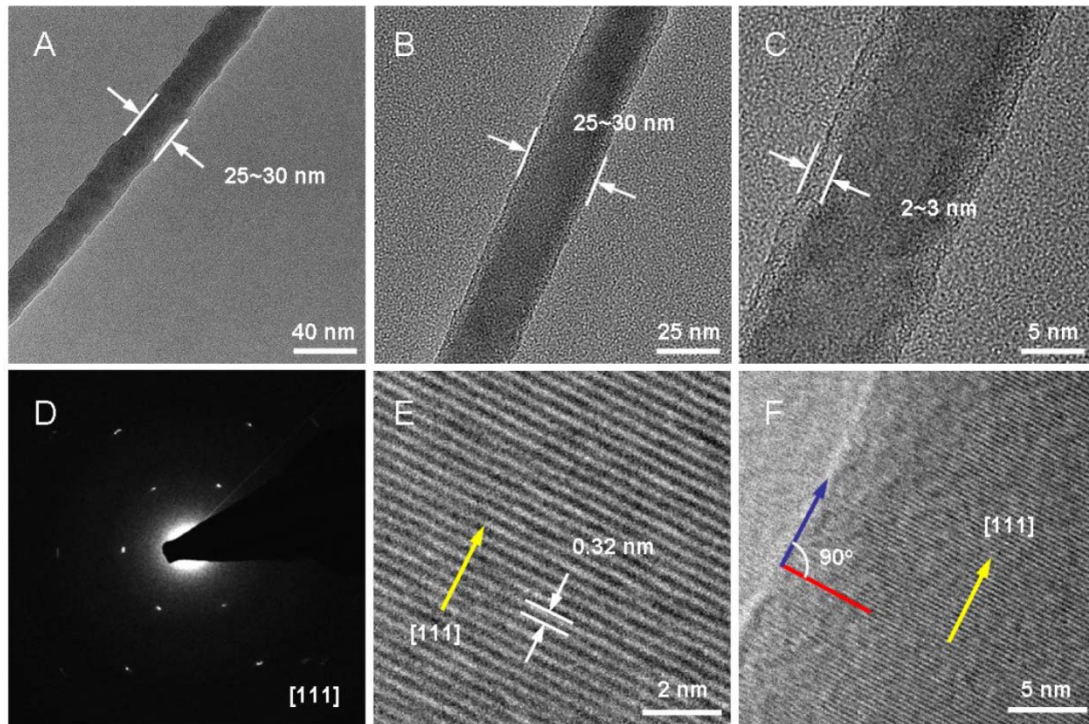


圖 3-3 硼摻雜矽奈米線之 HR-TEM 與 ED 影像圖。(A-B) 矽奈米線之直徑約 25~30 nm。(C) 矽奈米線氧化層的厚度約 2~3 nm。(D) 根據 ED 的影像圖，可判斷矽奈米線為單晶結構。(E) HR-TEM 的影像指出矽奈米線為 [111] (黃色箭頭) 的晶格方向且晶格面相距約 0.32 nm (白色箭頭)。(F) 矽奈米線的成長方向 (藍色箭頭) 為沿著晶格方向 [111] (黃色箭頭) 軸向成長，晶格面的形成則與奈米線成長方向成  $90^{\circ}$  (紅色線)[56]。



### 3.1.2 元件電性分析

製作完成的 MPC-SiNW FET 如圖 3- 4 所示，我們分別量測元件的  $I_{sd}-V_{sd}$  圖與  $I_{sd}-V_g$  圖，並分析其特性。

量測元件的  $I_{sd}-V_{sd}$  圖時， $V_{sd}$  掃描範圍設定為 -200 到 +200 mV，背部閘極  $V_g$  設定為 0。由量測之  $I_{sd}-V_{sd}$  曲線中 (圖 3- 5)，觀察到電流與  $V_{sd}$  成正比的關係，表示符合歐姆定律，因此可以確定矽奈米線與金屬電極的接觸為歐姆接觸。

量測元件的  $I_{sd}-V_g$  圖時， $V_{sd}$  設定為 10 mV，在 0.1x PBS 環境下量測，以白金電極作為閘極浸泡於溶液中， $V_g$  掃描範圍設定為 -200 到 +200 mV。由量測之  $I_{sd}-V_g$  曲線中 (圖 3- 6)，觀察到  $V_g$  與  $I_{sd}$  成反比的關係，表示矽奈米線具有 p 型半導體的性質，並計算  $I_{sd}-V_g$  圖之斜率，可得元件的跨導 (transconductance,  $d I_{sd} / dV_g$ )，跨導愈高代表元件的靈敏度愈高，由圖得到跨導為 1000 nS，MPC SiNW-FET 的跨導通常大於 600 nS，相較於傳統的單條矽奈米線場效應電晶體 (跨導介於 10~100 nS 之間)，MPC SiNW-FET 的靈敏度大幅提升。

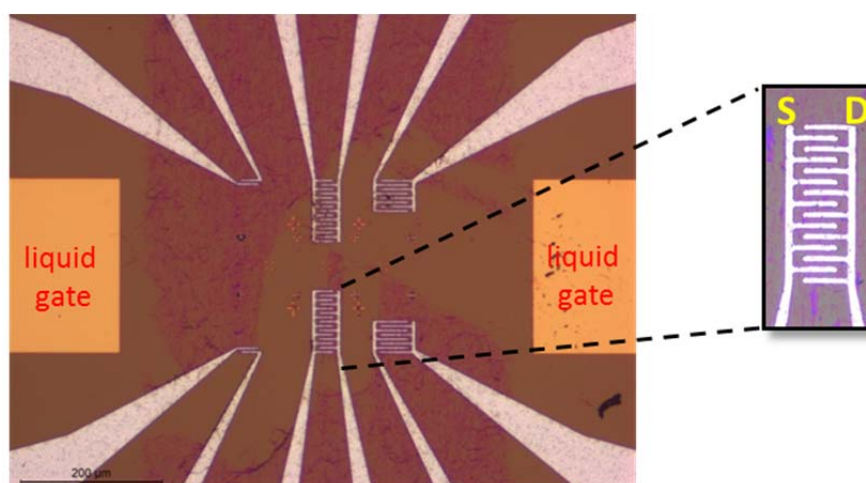


圖 3- 4 MPC SiNW-FET 之光學影像圖。實驗中所使用的 MPC SiNW-FET 是位於中間的兩組源/汲極，是七源極與八汲極互相交錯的設計，左右兩邊的金電極可作為液相閘極。S：源極；D：汲極。



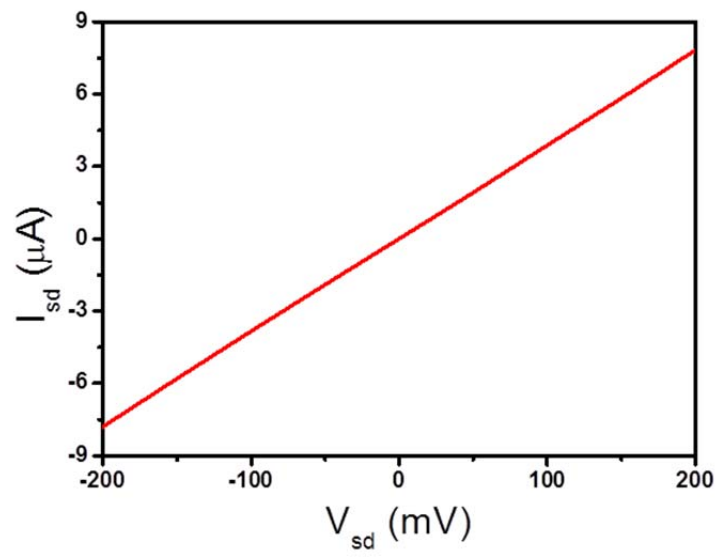


圖 3-5 p-type SiNW-FET 的  $I_{sd}$ - $V_{sd}$  圖

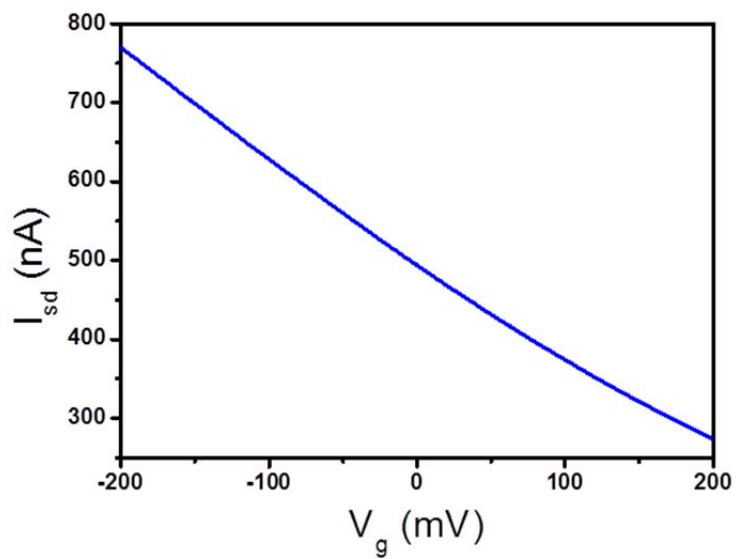


圖 3-6 p-type SiNW-FET 的  $I_{sd}$ - $V_g$  圖

## 3.2 利用超靈敏矽奈米線場效應電晶體偵測缺氧刺激下的

### PC12 細胞釋放之多巴胺

本研究已被發表在 Journal of the American Chemical Society，相關資料如附錄所示。

#### 3.2.1 表面修飾證明

實驗中，以 APTMS 和 MBS 這兩種化學鍵結分子將 DA-specific aptamer 固定於矽晶片表面。我們以觀察螢光影像證明表面修飾方法是否成功。結果如圖 3-7 所示，在二氧化矽基板/矽基底上修飾 FITC-aptamer 的區域觀察到螢光，而未修飾有 FITC-aptamer 的區域則無螢光產生，證明此修飾方法可成功將 DA-specific aptamer 固定於矽晶片上。因為矽晶片表面與 SiNW 表面皆為二氧化矽，可間接證明此修飾方法可成功將 DA-specific aptamer 固定於 SiNW 表面。

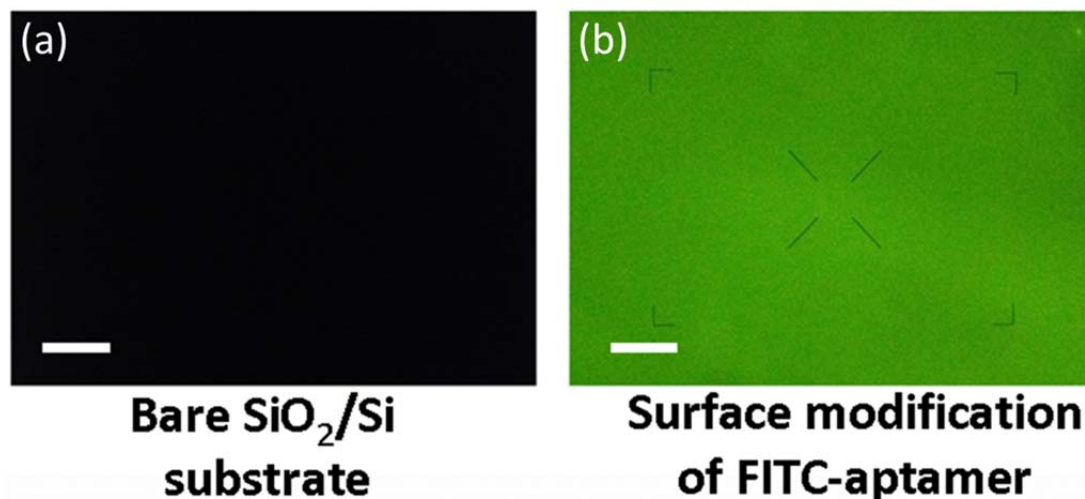


圖 3-7 二氧化矽基板/矽基底表面修飾 FITC-aptamer 之螢光影像圖。(A)空白二氧化矽基板/矽基底之螢光影像。(B)在二氧化矽基板/矽基底上修飾 FITC-aptamer 後之螢光影像。比例尺為 100  $\mu$ M。



### 3.2.2 多巴胺與其他分子之偵測

以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 DA 以及其他與之結構相似的分子，實驗結果如圖 3-8 (A) 所示，在 pH = 7.2 的緩衝溶液環境中，DA (pI = 9.7) 帶有正電荷，當它靠近 DNA aptamer 並與之結合時，由於其所造成的電場，使 p 型 SiNW 的電洞載子減少，電流因此下降 ( $I_{sd}$ - $V_g$  曲線向下偏移)。以 0.1x PBS 的  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線為基準，10 nM 的 DA 使  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線有明顯的向下偏移，濃度為 1  $\mu$ M 的 ascorbic acid (AA)、catechol (CT)、phenethylamine (PEA) 以及 tyrosine (TR) 幾乎沒有造成  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線的偏移，而濃度為 10 nM 的 epinephrine (EP) (pI = 9.4) 與 norepinephrine (NE) 雖有造成  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線向下偏移，但偏移變化量較 DA 所造成的偏移要小。圖 3-8 (B) 為控制組實驗結果，以 PTMS-modified SiNW-FET 進行量測，結果顯示 DA 以及其他與之結構相似的分子皆不會造成  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線的偏移。由於每一個 SiNW-FET 具有不同的跨導，因此以不同的 SiNW-FET 量測相同濃度的欲偵測分子，所造成的電流變化量也會有所不同，為了避免這樣的差異，必須依照每個 SiNW-FET 的  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線，將目標分子與受體結合所產生的電流變化量 ( $\Delta I_{sd} = I_{target} - I_{buffer}$ ) 轉換成  $V_g$  變化量 (稱為 calibrated response，以  $\Delta V_g^{cal}$  表示)。所有的實驗數據皆在  $V_g = -90$  mV 的位置計算出所對應的  $\Delta I_{sd}$ ，並將  $\Delta I_{sd}$  除以  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線之斜率，換算為  $\Delta V_g^{cal}$ 。將圖 3-8 (A) 與 (B) 的實驗數據換算為  $\Delta V_g^{cal}$  後，以圖 3-8 (C) 作為總結，其 Y 軸為相對的  $\Delta V_g^{cal}$  (以 DA 的  $\Delta V_g^{cal}$  為 100%)，X 軸為所偵測的分子，以紅色表示 DA-specific aptamer/SiNW-FET，藍色表示 PTMS-modified SiNW-FET，雖然與 DA 同屬於兒茶酚胺類的 EP 與 NE 所造成的  $\Delta V_g^{cal}$  分別為  $25 \pm 4\%$  與  $50 \pm 5\%$ ，但即使將其他四種不屬於兒茶酚胺類的分子之濃度提高為 DA 的 100 倍，其所造成的  $\Delta V_g^{cal}$  皆低於 10%。

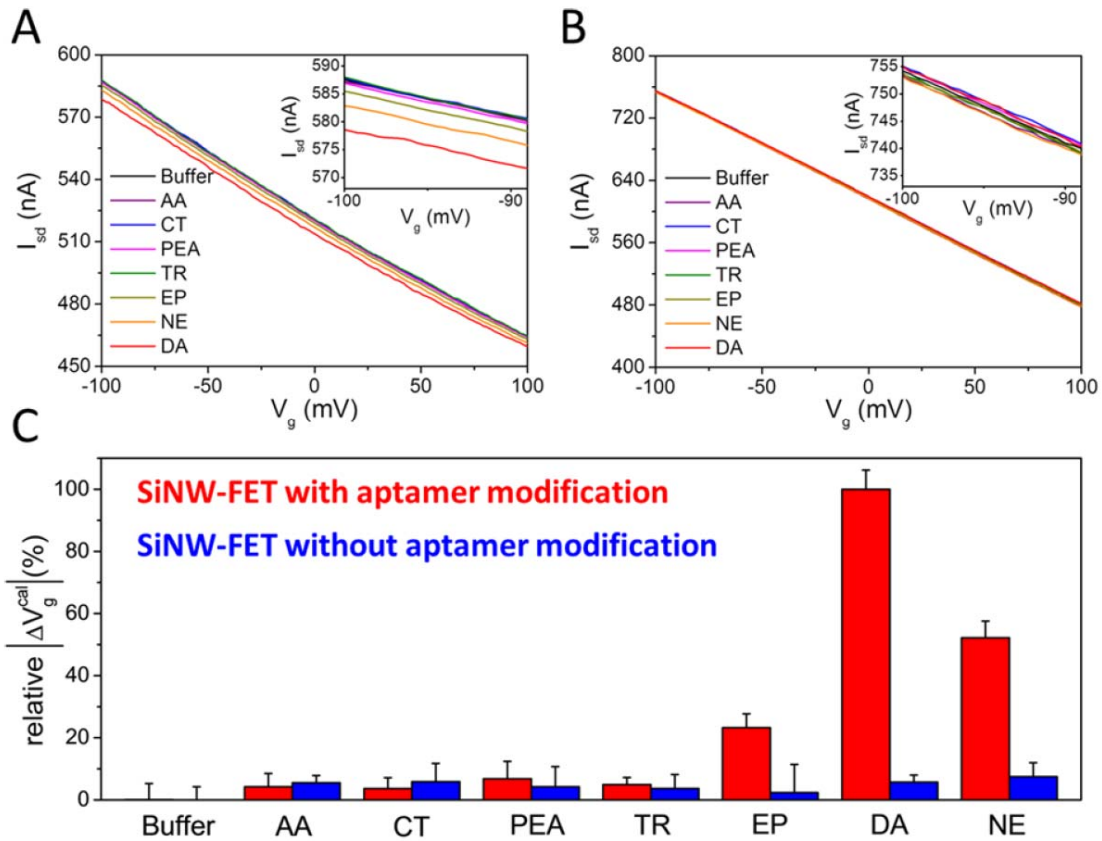


圖 3- 8 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 與 PTMS-modified SiNW-FET 量測 DA 等分子之實驗結果。(A) 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 進行量測之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線。(B) 以 PTMS-modified SiNW-FET (without aptamer modification) 進行量測之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線，量測的樣品有 0.1x PBS、1  $\mu$ M ascorbic acid (AA)、1  $\mu$ M phenethylamine (PEA)、1  $\mu$ M tyrosine (TR)、10 nM epinephrine (EP)、10 nM dopamine (DA) 與 10 nM norepinephrine (NE)。(C) 相對  $\Delta V_g^{cal}$  對不同的分子之作圖 (以 DA 的  $\Delta V_g^{cal}$  為 100%)，error bar 為三次實驗結果的標準差。

由於 EP 與 NE 也對 DA-specific aptamer/SiNW-FET 造成不可忽略的訊號改變，我們進一步量測不同濃度的 DA、EP 以及 NE，並將實驗數據以最小平方方法擬合到朗謬耳吸附方程式，計算出 DA-specific aptamer 與這三種分子的解離常數 ( $K_d$ )，探討 DA-specific aptamer 與它們之間的親和力。量測的濃度範圍為  $10^{-13}$  到  $10^{-7}$  M，圖 3-9 (A) 是以 DA-specific aptamer/SiNW FET 量測不同濃度的 DA 之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線，接著將數據換算為  $\Delta V_g^{cal}$ ，得到圖 3-9 (B) DA 的濃度 ( $C_{DA}$ ) 與  $\Delta V_g^{cal}/\Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖，可以觀察到當 DA 大於某個濃度後，由於矽奈米線上面所有的 aptamer 的結合區域皆被 DA 所佔據， $\Delta V_g^{cal}$  達到飽和，即為  $\Delta V_g^{cal,max}$ 。如圖 3-9 (B) 中的插圖 ( $C_{DA}$  對  $C_{DA}/\Delta V_g^{cal}$  作圖) 所示，我們接著以最小平方方法將數據擬合到朗謬耳吸附方程式，計算出 aptamer-DA 複合物的解離常數為  $120 \pm 10$  pM。除此之外，DA-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 DA 的線性工作範圍為  $10^{-11}$  到  $10^{-8}$  M (圖 3-10)。圖 3-11 為即時偵測 10 pM DA 之電訊號變化圖，其電導改變量大約為 100 nS 且訊雜比大於 5。以相同的方法求出 aptamer-EP 複合物與 aptamer-NE 複合物之解離常數，分別為  $6.03 \pm 1.85$  nM 與  $910 \pm 270$  pM (圖 3-12 (A) 與 (B))。由於 aptamer-DA 複合物的解離常數是三者之中最小的，顯示 DA-specific aptamer 對 DA 有較好的結合親和力，其對 DA 的親和力大約是 EP 的 50 倍以及 NE 的 8 倍。

由於 DA-specific aptamer 對於 DA 有較高的結合親和力，我們可以將 DA-specific aptamer/SiNW-FET 實際應用在即時偵測細胞釋放 DA 與臨床診斷上。

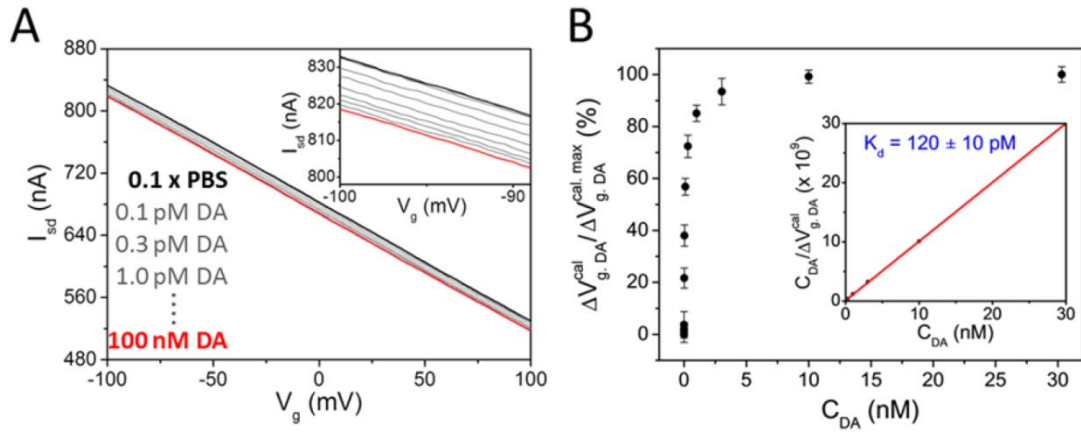


圖 3-9 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的多巴胺 (DA) 之實驗結果。(A) 不同濃度的 DA ( $C_{DA} = 0 - 100$  nM) 之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線，右上方的插圖為局部放大圖 (B)  $C_{DA}$  和  $\Delta V_g^{cal} / \Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖，插圖為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-DA 複合物之  $K_d = 120 \pm 10$  pM。

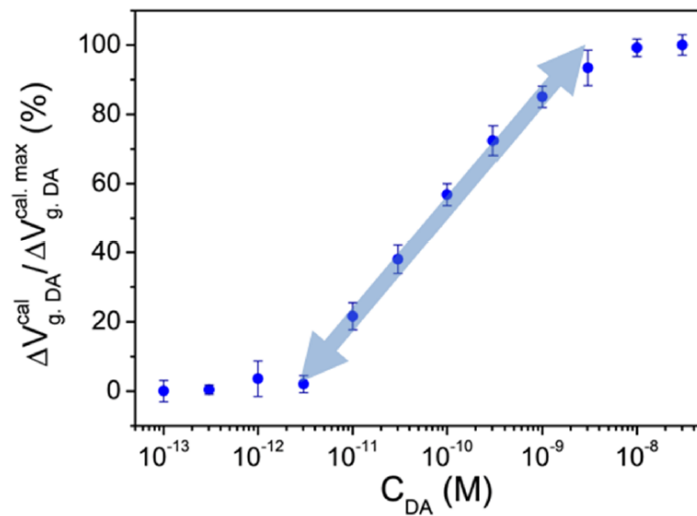


圖 3-10  $C_{DA}$  和  $\Delta V_g^{cal} / \Delta V_g^{cal,max}$  之半對數圖。以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 DA 之線性工作範圍為  $10^{-11}$  到  $10^{-8}$  M。

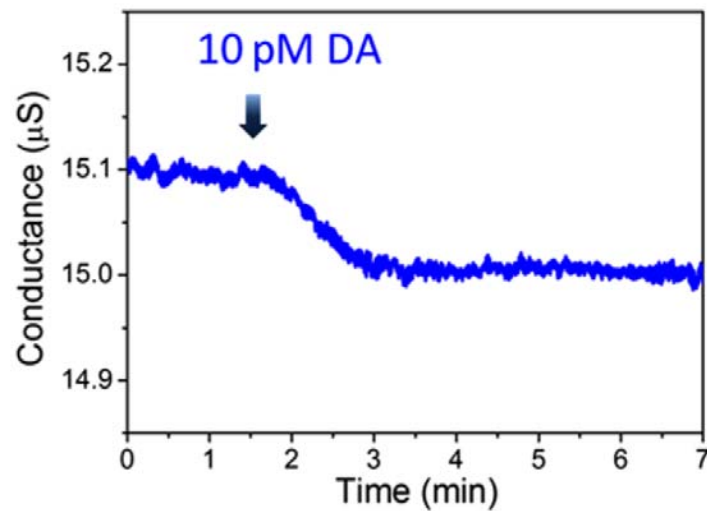


圖 3- 11 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測 10 pM DA 之電訊號變化圖。

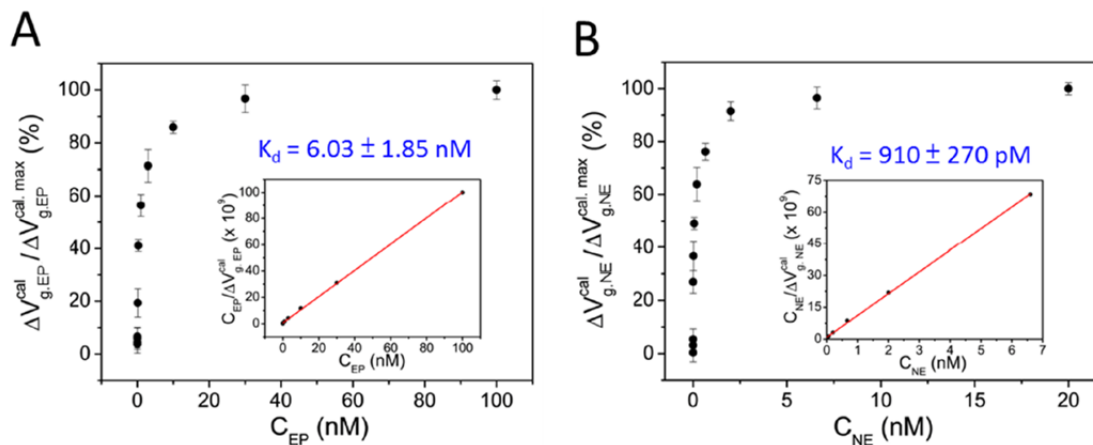


圖 3- 12 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的腎上腺素 (EP) 與正腎上腺素 (NE) 之實驗結果 (A)  $C_{EP}$  和  $\Delta V_g^{cal} / \Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖，插圖為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-EP 複合物之  $K_d = 6.03 \pm 1.85$  nM。(B)  $C_{NE}$  和  $\Delta V_g^{cal} / \Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖，插圖為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-NE 複合物之  $K_d = 910 \pm 270$  pM。

### 3.2.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之多巴胺

為了進一步將 DA-specific aptamer/SiNW-FET 實際應用到細胞研究上，我們以  $I_{sd}$ -t 量測系統即時偵測經缺氧刺激後的 PC12 細胞所釋放之 DA，並且進行實驗以探討在缺氧刺激下 PC12 細胞釋放出 DA 的機制中，細胞內鈣離子濃度的上升是由細胞外的鈣離子流入細胞內所造成，還是收集儲存在細胞內胞器的鈣離子，導致細胞內鈣離子濃度上升。

進行 PC12 細胞釋放多巴胺之實驗時，如圖 3-13 下方之插圖所示，PC12 細胞直接培養於 DA-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，開始即時偵測電訊號的變化，將緩衝溶液置換為 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 後，PC12 細胞受到刺激釋放出 DA，電導逐漸下降且在 30 s 內達到平衡 (圖 3-13)。我們也進行了控制組實驗，在沒有 PC12 細胞之 DA-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，將緩衝溶液置換為 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 後，並未觀察到電導的改變 (圖 3-13 上方之插圖)。除此之外，以 35%  $C_{O_2}$  reduced buffer 進行刺激，並未觀察到電導的改變 (圖 3-14 上方之藍色線段)，表示弱的缺氧刺激並不足以使 PC12 細胞釋放出 DA。

為了探討在缺氧刺激下 PC12 細胞釋放出多巴胺的機制中，細胞內鈣離子濃度的上升是由細胞外的鈣離子流入細胞內所造成，還是收集儲存在細胞內胞器的鈣離子，導致細胞內鈣離子濃度上升，實驗時，加入 1 mM  $Cd^{2+}$  離子阻塞鈣離子通道，使細胞外的鈣離子不能經由鈣離子通道而被輸送到細胞內，接著將緩衝溶液置換為 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer (含有 1 mM  $Cd^{2+}$  離子) 後，並未觀察到電導有明顯的改變 (圖 3-14 下方之綠色線段)，代表 PC12 細胞沒有釋放出 DA，此結果證明以缺氧刺激使 PC12 細胞釋放多巴胺的機制中，細胞內鈣離子的上升，是細胞外的鈣離子經由鈣離子通道運送到細胞內而所導致的。

上述實驗結果證明我們成功將 DA-specific aptamer/SiNW-FET 應用在即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之 DA。當施加缺氧濃度達到 70% 以上的強缺氧刺激，才足以引起細胞膜電位去極化 (membrane potential depolarization)，去



極化後，電壓門控鈣通道 (voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel) 會被活化，使細胞外鈣離子可經由鈣通道流入細胞內，細胞內鈣離子濃度的上升引發 PC12 細胞釋放出 DA；而施加弱缺氧刺激 (如 35%  $\text{CO}_2$  reduced buffer) 時，並未偵測到 DA，推測弱缺氧刺激不足以引起細胞膜電位去極化。除此之外，在加入  $\text{Cd}^{2+}$  離子作為鈣離子通道阻斷劑後，對細胞進行缺氧刺激，並未偵測到 DA，此實驗結果證明以缺氧刺激使 PC12 細胞釋放多巴胺的機制中，細胞內鈣離子的上升主要是細胞外的鈣離子經由鈣離子通道運送到細胞內而所導致的。

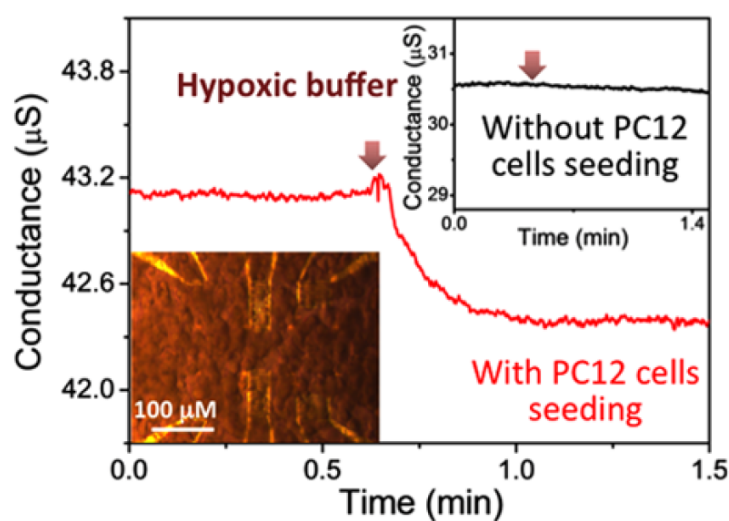


圖 3- 13 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 DA 之電訊號變化圖。下方之插圖為 PC12 細胞培養於 DA-specific aptamer/SiNW-FET 上的光學顯微鏡影像。紅色線為以 70%  $\text{CO}_2$  reduced buffer 刺激 PC12 細胞釋放 DA 之電訊號變化圖。上方之插圖為控制組實驗，在未培養 PC12 細胞的 DA-specific aptamer/SiNW-FET 上，置換 70%  $\text{CO}_2$  reduced buffer。箭頭指向的位置表示加入 70%  $\text{CO}_2$  reduced buffer 之時間點。

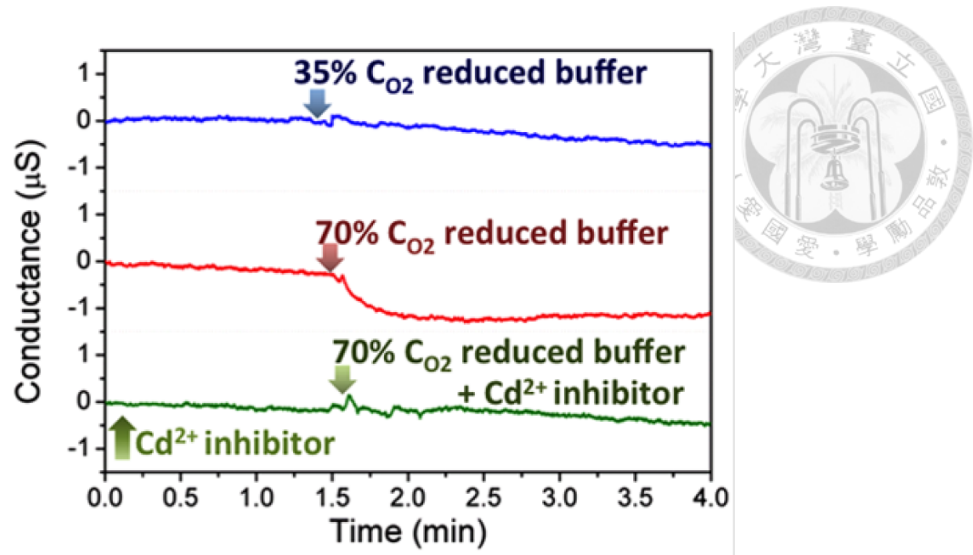


圖 3- 14 以 DA-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測不同缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 DA 之電訊號變化圖。上方的線段為加入 35%  $C_{O_2}$  reduced buffer 進行刺激，中間的線段為加入 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer，下方的線段為加入含有 1 mM  $CdI_2$  之 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer。

### 3.3 利用修飾去氧核醣核酸適體之矽奈米線場效應電晶體偵測神經肽 Y



#### 3.3.1 表面修飾證明

實驗中，以 MPTMS 和 MBS 這兩種化學鍵結分子將 NPY-specific aptamer 固定於矽晶片表面。我們以觀察螢光影像證明表面修飾方法是否成功。結果如圖 3-15 所示，在二氧化矽基板/矽基底上修飾有 FITC-aptamer 的區域觀察到螢光，而未修飾有 FITC-aptamer 的區域則無螢光產生，證明此修飾方法可成功將 NPY-specific aptamer 固定於矽晶片上。因為矽晶片與 SiNW 表面皆為二氧化矽，故可間接證明此修飾方法可成功將 NPY-specific aptamer 固定於 SiNW 表面。

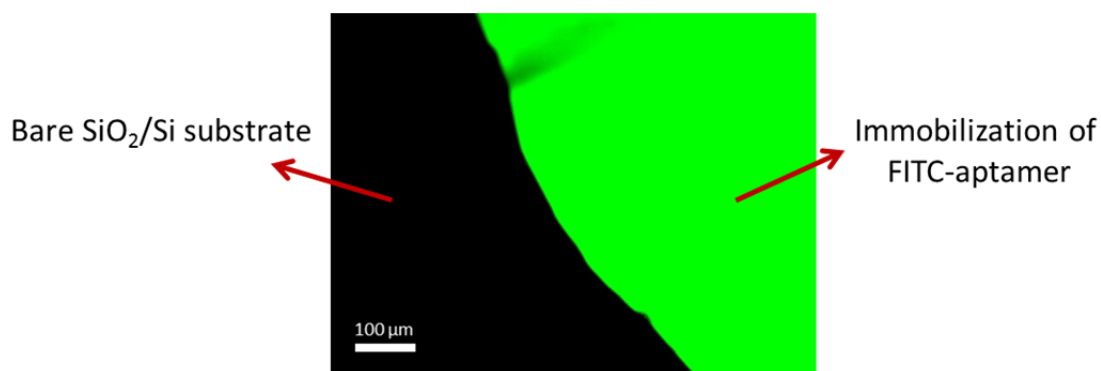


圖 3-15 在二氧化矽基板/矽基底上修飾 FITC-aptamer 後之螢光影像圖。

### 3.3.2 神經肽 Y 與其他分子之偵測

我們分別以 PTMS-modified SiNW-FET 與 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測 1  $\mu\text{M}$  NPY 和 100  $\mu\text{M}$  DA，測試 NPY-specific aptamer 對 NPY 的選擇性。

以 PTMS-modified SiNW-FET 偵測 NPY 與 DA，實驗結果如圖 3-16 (A) 所示，不論是 1  $\mu\text{M}$  NPY 或 100  $\mu\text{M}$  DA 皆沒有使  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線產生明顯的偏移。圖 3-16 (B) 為以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 進行量測之實驗結果，以 0.1x PBS 的  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線為基準，1  $\mu\text{M}$  NPY 造成  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線有顯著地向下偏移，而 100  $\mu\text{M}$  DA 則未使  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線有明顯的偏移。1  $\mu\text{M}$  NPY 造成  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線向下偏移的原因是因為在  $\text{pH} = 7.2$  的緩衝溶液環境中，NPY ( $\text{pI} = 9.2$ ) 帶有正電荷，當它與 NPY-specific aptamer 結合時，靠近矽奈米線表面，由於其所造成的電場，使 p 型 SiNW 內部的電洞載子減少，電流因此下降 ( $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線向下偏移)。

我們進一步將電流變化量 ( $\Delta I_{\text{sd}} = I_{\text{target}} - I_{\text{buffer}}$ ) 轉換成  $V_{\text{g}}$  變化量 (稱為 calibrated response，以  $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}$  表示)。將圖 3-16 (A) 和 (B) 的實驗數據換算為  $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}$  後，以圖 3-16 (C) 表示，其 Y 軸為相對的  $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}$  (以 NPY 的  $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}$  為 100%)，X 軸為所偵測的分子，以藍色表示 PTMS-modified SiNW-FET，紅色表示 NPY-specific aptamer/SiNW-FET。當矽奈米線表面修飾 PTMS 時，1  $\mu\text{M}$  NPY 和 100  $\mu\text{M}$  DA 皆沒有明顯地訊號改變，表示 PTMS-modified SiNW 與這兩種分子之間沒有太大的交互作用。當矽奈米線修飾有 NPY-specific aptamer 時，相較於 1  $\mu\text{M}$  NPY 的訊號變化量，100  $\mu\text{M}$  DA 所造成的訊號變化量約是 10%。顯示相較於 DA，NPY-specific aptamer 確實對 NPY 有著更好的結合親和力。

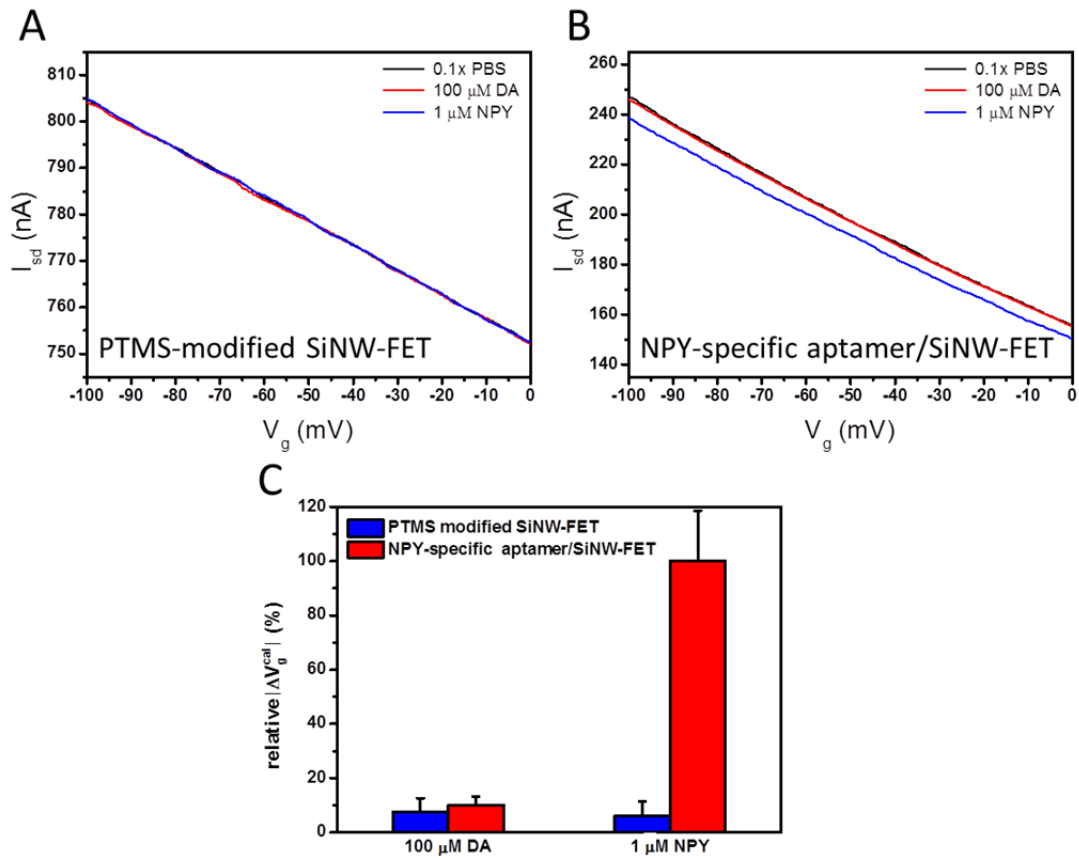


圖 3- 16 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 與 PTMS-modified SiNW-FET 量測 NPY 等分子之實驗結果。(A) 以 PTMS-modified SiNW-FET 進行量測之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線 (B) 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 進行量測之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線,量測的樣品有 0.1x PBS、1  $\mu$ M NPY 和 100  $\mu$ M DA。(C)相對  $\Delta V_g^{cal}$  對不同的分子之作圖 (以 NPY 的  $\Delta V_g^{cal}$  為 100%), error bar 為三次實驗結果的標準差。

接下來，我們量測不同濃度的 NPY，並將實驗數據以最小平方擬合到朗謬耳吸附方程式，計算出 NPY-specific aptamer 與 NPY 的解離常數 ( $K_d$ )，探討 aptamer 與 NPY 之間的結合親和力。量測的濃度範圍為  $10^{-9}$  到  $10^{-5}$  M，圖 3-17 (A) 是以 NPY-specific aptamer/SiNW FET 量測不同濃度的 NPY 之  $I_{sd}-V_g$  曲線，接著將數據換算為  $\Delta V_g^{cal}$ ，得到圖 3-17 (B) NPY 的濃度 ( $C_{NPY}$ ) 與  $\Delta V_g^{cal}/\Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖，可以觀察到當 NPY 大於某個濃度後，由於矽奈米線上面所有的 aptamer 的結合區域皆被 NPY 所佔據， $\Delta V_g^{cal}$  達到飽和，即為  $\Delta V_g^{cal,max}$ 。如圖 3-17 (B) 中的插圖 ( $C_{NPY}$  對  $C_{NPY}/\Delta V_g^{cal}$  作圖) 所示，我們接著以最小平方方法將數據擬合到朗謬耳吸附方程式，計算出 aptamer-NPY 複合物的解離常數為 260 nM。我們以另外三個不同的 NPY-specific aptamer/SiNW FET 裝置重複量測不同濃度的 NPY，實驗結果如圖 3-18、圖 3-19 以及圖 3-20 所示，以最小平方方法分別將三次數據擬合到朗謬耳吸附方程式，計算出 aptamer-NPY 複合物的解離常數分別為 330 nM、320 nM 和 290 nM。四次實驗結果得到 aptamer-NPY 複合物的解離常數是  $300 \pm 32$  nM (表 3-1)，而文獻中以親和力毛細管電泳所量測到的 aptamer-NPY 複合物的解離常數為  $300 \pm 200$  nM[50]，我們的實驗結果與文獻值十分接近。

由  $C_{NPY}$  和  $\Delta V_g^{cal}/\Delta V_g^{cal,max}$  之半對數圖 (圖 3-21) 可知，NPY-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 NPY 的線性工作範圍為  $10^{-7}$  到  $10^{-5}$  M 且其偵測極限為 24 nM。

根據上述結果，可證明以 NPY-specific aptamer/SiNW FET 偵測 NPY 的實驗具有再現性。

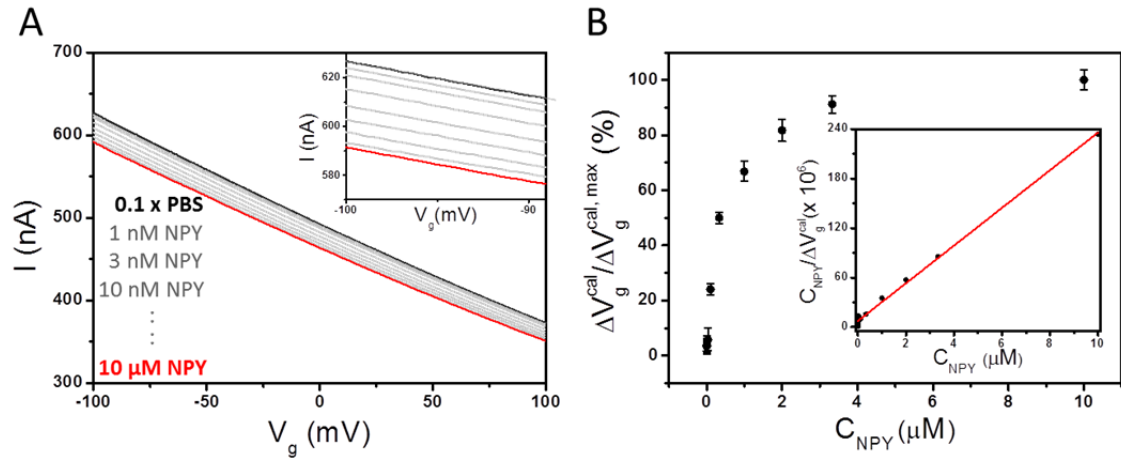


圖 3- 17 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 1)。(A)不同濃度的 NPY ( $C_{\text{NPY}} = 0 - 10 \mu\text{M}$ ) 之  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線，右上方的插圖為局部放大圖 (B)  $C_{\text{NPY}}$ 和 $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}/\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal,max}}$  之關係圖，插圖為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-NPY 複合物之  $K_{\text{d}} = 260 \pm 65 \text{ nM}$ 。

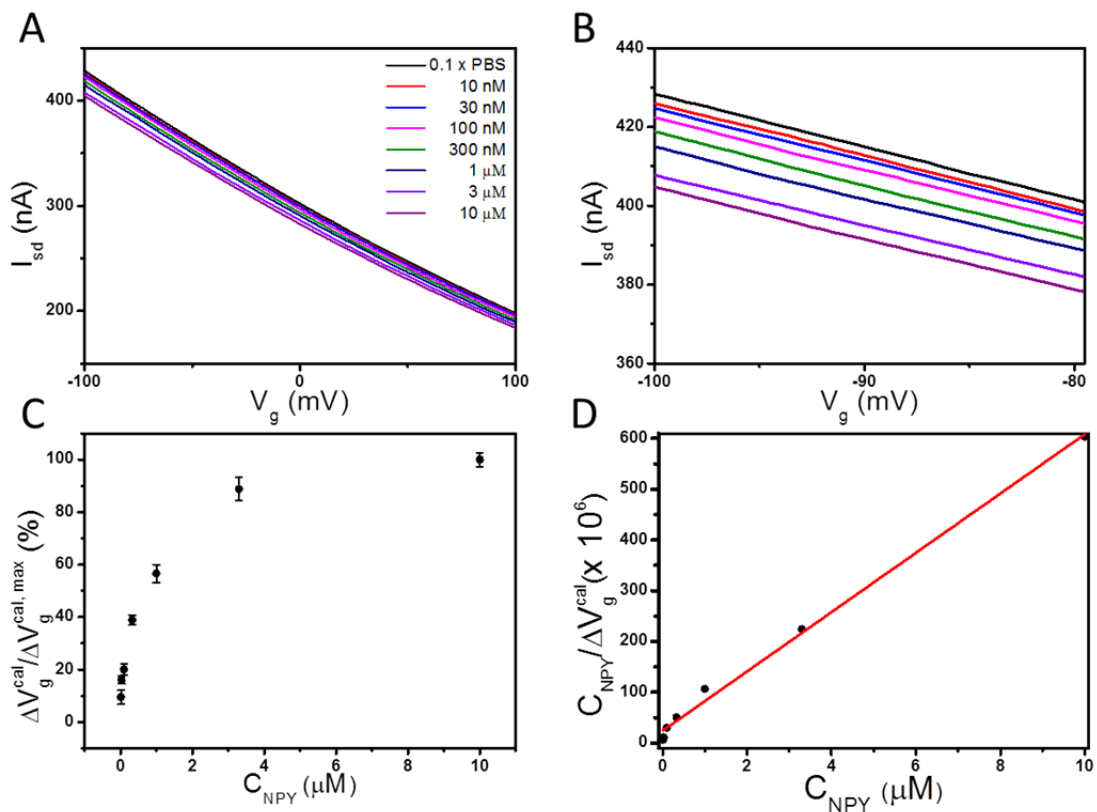


圖 3- 18 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 2)。(A) 不同濃度的 NPY ( $C_{\text{NPY}} = 0 - 10 \mu\text{M}$ ) 之  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線。(B) 為 (A) 的局部放大圖 (C)  $C_{\text{NPY}}$ 和 $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}/\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal,max}}$  之關係圖。(D) 為朗謬耳吸附方程式擬

合曲線，aptamer-NPY 複合物之  $K_d = 330 \pm 110 \text{ nM}$ 。

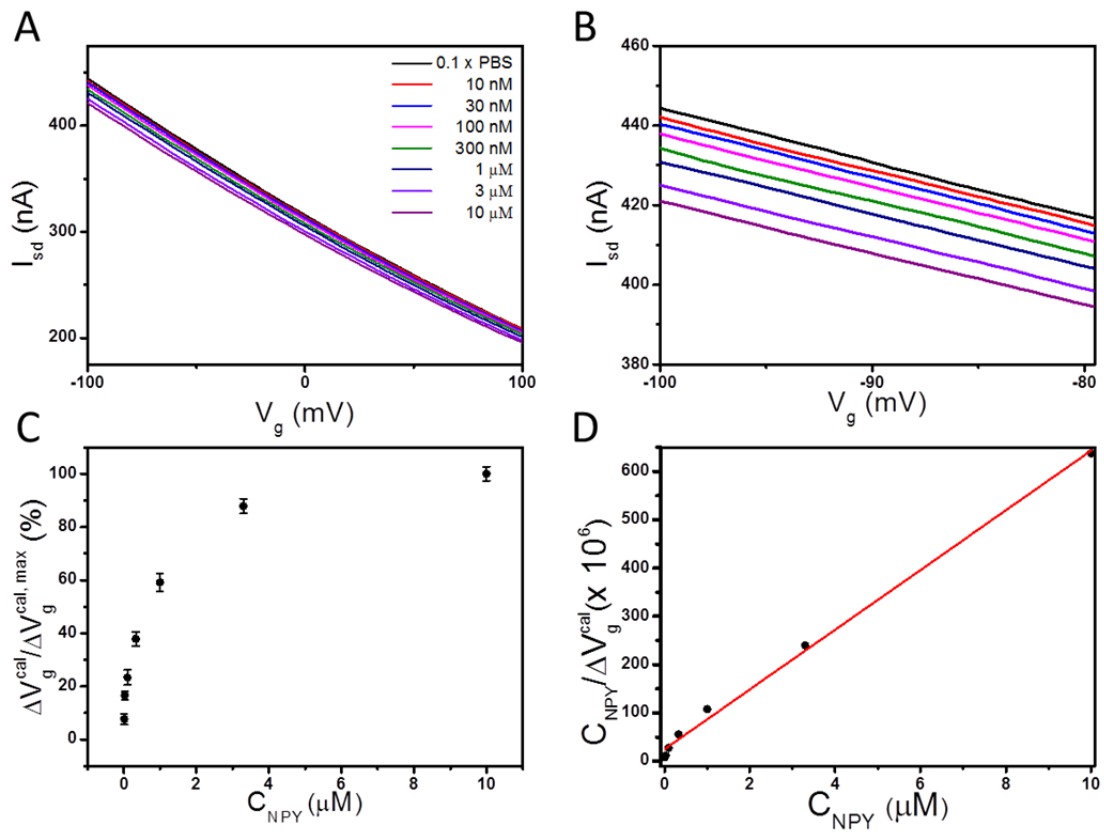


圖 3- 19 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 3)。(A) 不同濃度的 NPY ( $C_{NPY} = 0 - 10 \mu\text{M}$ ) 之  $I_{sd}$ - $V_g$  曲線。(B) 為 (A) 的局部放大圖 (C)  $C_{NPY}$ 和 $\Delta V_g^{cal}/\Delta V_g^{cal,max}$  之關係圖。(D) 為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-NPY 複合物之  $K_d = 320 \pm 110 \text{ nM}$ 。



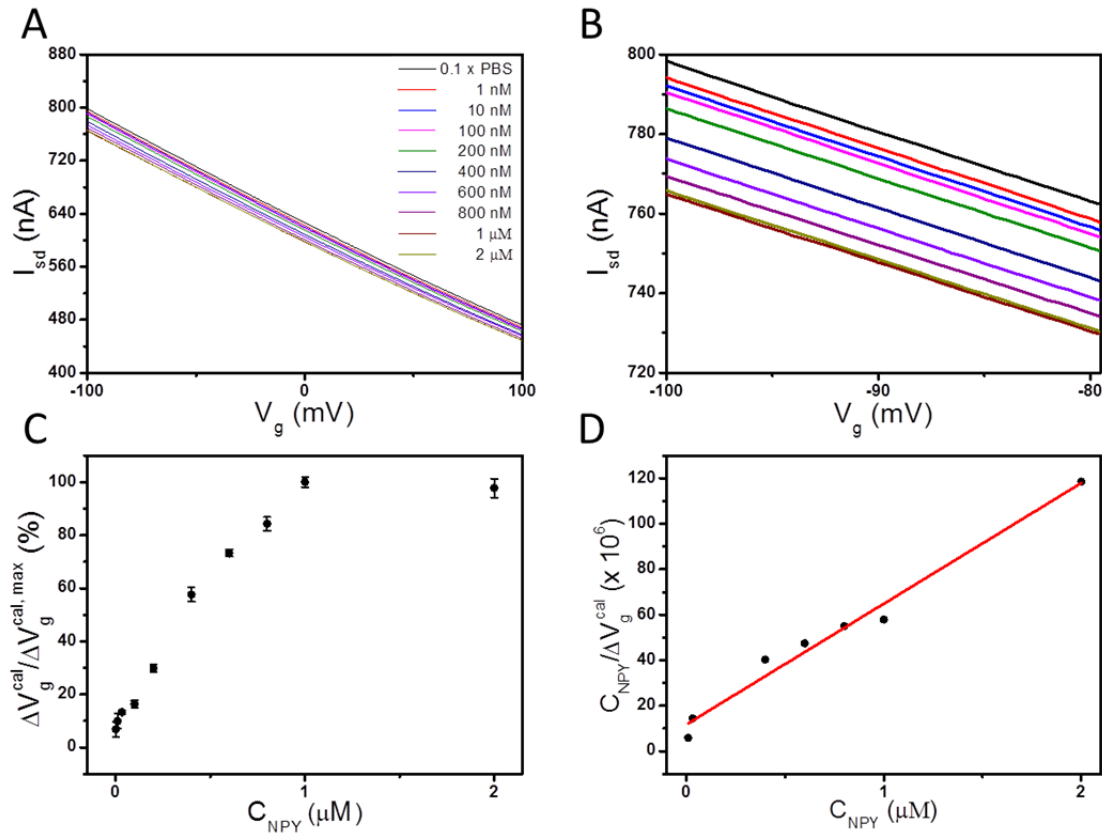


圖 3- 20 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 量測不同濃度的 NPY 之實驗結果 (Device 4)。(A) 不同濃度的 NPY ( $C_{\text{NPY}} = 0 - 10 \mu\text{M}$ ) 之  $I_{\text{sd}}-V_{\text{g}}$  曲線。(B) 為 (A) 的局部放大圖 (C)  $C_{\text{NPY}}$ 和 $\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal}}/\Delta V_{\text{g}}^{\text{cal,max}}$  之關係圖。(D) 為朗謬耳吸附方程式擬合曲線，aptamer-NPY 複合物之  $K_{\text{d}} = 290 \pm 85 \text{ nM}$ 。

The dissociation constant ( $K_d$ ) of the aptamer-NPY complex:  
(in 0.1x PBS)

Device 1	260 ± 65 nM
Device 2	330 ± 110 nM
Device 3	320 ± 110 nM
Device 4	290 ± 85 nM
平均	300 ± 32 nM

表 3- 1 aptamer-NPY 複合物之解離常數。

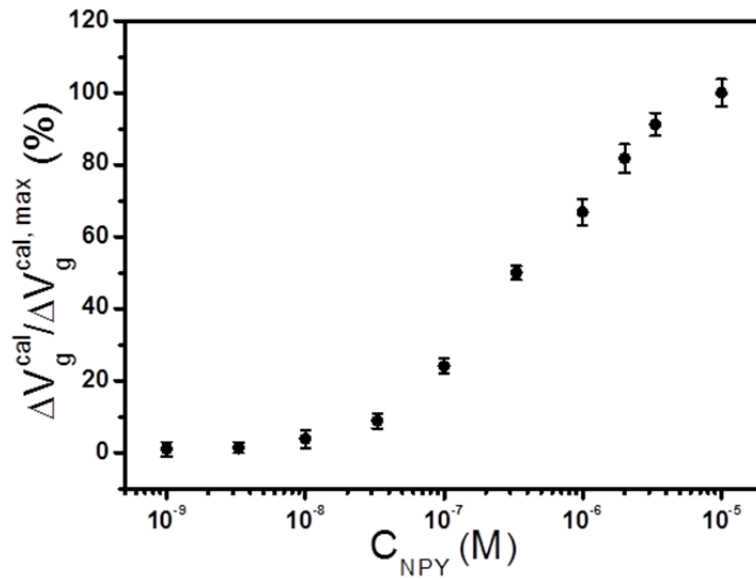


圖 3- 21  $C_{NPY}$  和  $\Delta V_g^{cal} / \Delta V_g^{cal,max}$  之半對數圖。以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 偵測 NPY 之線性工作範圍為  $10^{-7}$  到  $10^{-5}$  M，偵測極限為 24 nM。

### 3.3.3 偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放之神經肽 Y

我們進一步將 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 應用於細胞研究上，實驗中，以  $I_{sd-t}$  量測系統即時偵測經缺氧刺激後的 PC12 細胞所釋放之 NPY。

首先，我們進行了控制組實驗，在沒有培養 PC12 細胞之 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上將緩衝溶液置換為 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 後，並未觀察到電導的改變 (圖 3-22 (A))。接著，進行 PC12 細胞釋放 NPY 之實驗時，PC12 細胞直接培養於 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 晶片上，開始即時偵測電訊號的變化，將緩衝溶液置換為 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 後，PC12 細胞受到刺激釋放出 NPY，電導逐漸下降且約在 30 s 後達到平衡 (圖 3-22 (B))。我們利用圖 3-21 之數據擬合出校正曲線 (calibration curve)，並計算出 PC12 細胞釋放出的 NPY 濃度為 36 nM。

除此之外，我們分別以 35%  $C_{O_2}$  reduced buffer 和 55%  $C_{O_2}$  reduced buffer 刺激 PC12 細胞，在 35%  $C_{O_2}$  reduced buffer 和 55%  $C_{O_2}$  reduced buffer 的刺激下，皆未觀察到電導的改變 (圖 3-23 的綠色線段與藍色線段)，表示弱的缺氧刺激並不足以使 PC12 細胞釋放出 DA。我們重複以 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 刺激 PC12 細胞，所觀察到電導的變化 (圖 3-23 的紅色線段) 是因為 PC 12 細胞釋放出 NPY 而引起的，以校正曲線計算出 NPY 的濃度為 31 nM。

實驗結果證明我們可以成功將 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 應用於即時偵測 PC12 細胞釋放的 NPY。當施加缺氧濃度達到 70% 的強缺氧刺激，才足以引起細胞膜電位去極化 (membrane potential depolarization)，去極化後，電壓門控鈣通道 (voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel) 會被活化，使細胞外鈣離子可經由鈣通道流入細胞內，細胞內鈣離子濃度的上升引發 PC12 細胞釋放出 NPY；而施加弱缺氧刺激 (如 35% reduced  $C_{O_2}$  和 55% reduced  $C_{O_2}$ ) 時，並未偵測到 NPY，因此我們認為弱缺氧刺激不足以引起細胞膜電位去極化。

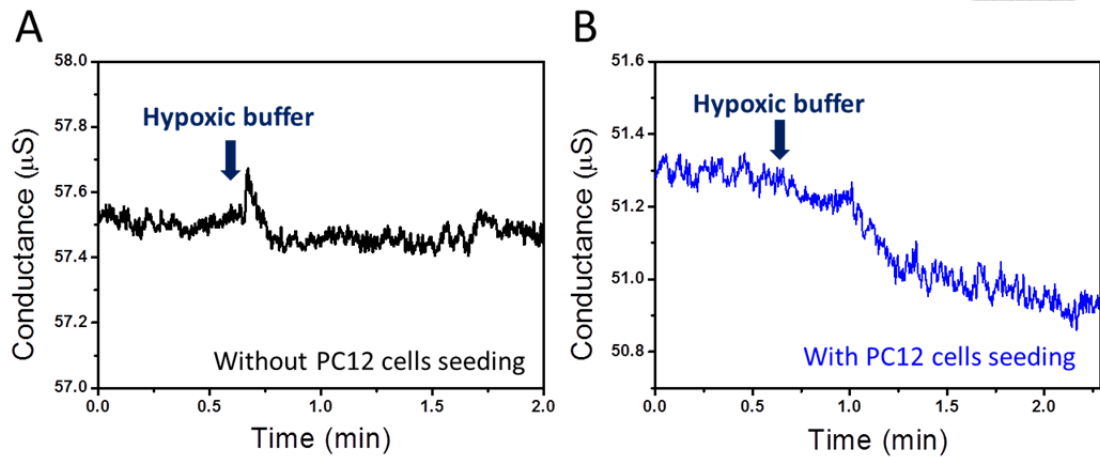


圖 3- 22 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 NPY 之電訊號變化圖。(A) 為控制組實驗，在未培養 PC12 細胞的 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 上，置換 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer。(B)以 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 刺激 PC12 細胞釋放 NPY 之電訊號變化圖。箭頭指向的位置表示加入 70%  $C_{O_2}$  reduced buffer 之時間點。

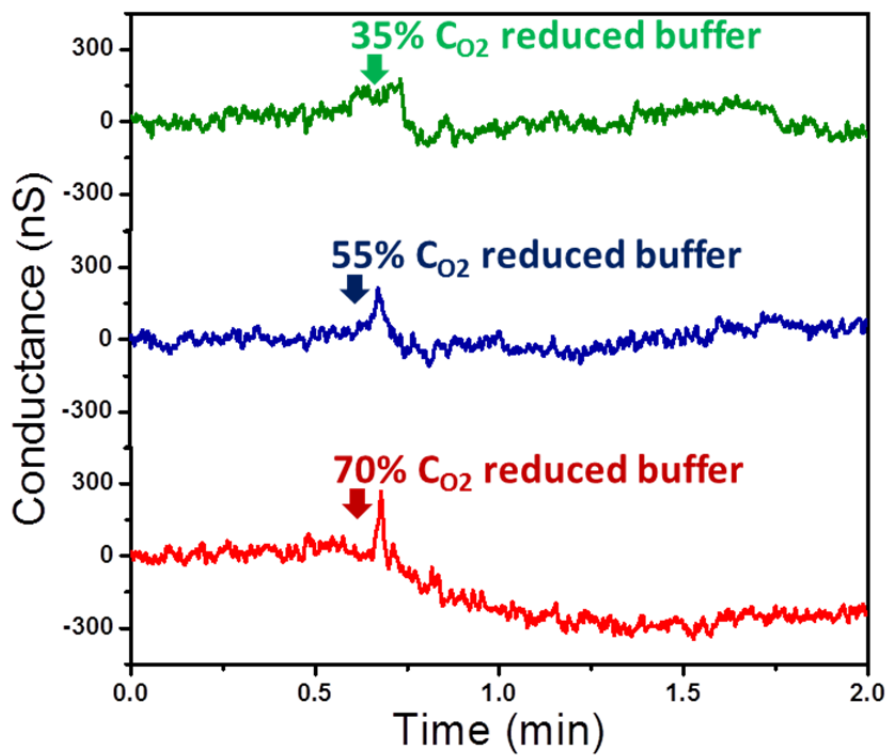


圖 3- 23 以 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 即時偵測不同缺氧刺激下的 PC12 細胞釋放 NPY 之電訊號變化圖。上方的線段為加入 35% CO<sub>2</sub> reduced buffer 進行刺激，中間的線段為加入 55% CO<sub>2</sub> reduced buffer 進行刺激，下方的線段為加入 70% CO<sub>2</sub> reduced buffer 進行刺激。

## 第四章 結論

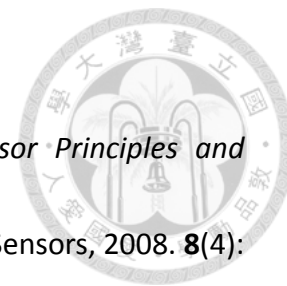


本論文包含兩個不同的研究主題，在第一個研究中，我們證明具有高度靈敏度與選擇性的 MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 可成功地應用為 DA 感測器。MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 對於 DA 具有強結合親和力，是 EP 的 50 倍以及 NE 的 8 倍，且 MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 可區別出 DA 和其他化學相似物 (包含 AA、EP 和 NE) 的訊號，而現有的電化學方法則無法區分。除此之外，MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 的高靈敏度大幅改進偵測 DA 的偵測極限，低於 10 pM，而其線性工作範圍為  $10^{-11} \sim 10^{-8}$  M。我們進一步將 MPC DA-specific aptamer/SiNW-FET 應用於即時偵測細胞釋放 DA 的研究中，成功偵測到 70% 缺氧刺激後的 PC12 細胞釋放的 DA，並且證明以缺氧刺激使 PC12 細胞釋放 DA 的機制中，細胞內鈣離子的上升，主要是細胞外的鈣離子經由鈣離子通道流入細胞內而所導致的。

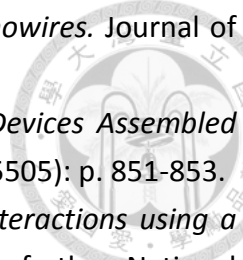
第二個研究中，我們證明 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 可成功地作為 NPY 感測器。NPY-specific aptamer/SiNW-FET 可選擇性偵測 NPY，區分出 NPY 和另一個神經傳導物 DA 的訊號，其偵測 NPY 的線性工作範圍為  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  M，偵測極限為 24 nM。接著，我們將 NPY-specific aptamer/SiNW-FET 應用於即時偵測細胞釋放 NPY 的研究中，成功偵測到 PC12 細胞在 70%  $\text{CO}_2$  reduced buffer 的刺激下，釋放出 NPY 的訊號變化。實驗結果顯示，當施加缺氧濃度達到 70% 的強缺氧刺激，才足以引起細胞膜電位去極化，使 PC12 細胞釋放 NPY；而缺氧濃度為 35% 和 55% 的弱缺氧刺激並不足以引起細胞膜電位去極化。

總結上述兩個研究結果，具有免標記、高選擇性、高靈敏度以及即時偵測等優點的 SiNW-FET，可用於即時偵測活細胞釋放 DA 和 NPY 等神經傳導物，並且具有潛力作為細胞生物學研究與臨床疾病診斷的分析工具。

## 參考文獻

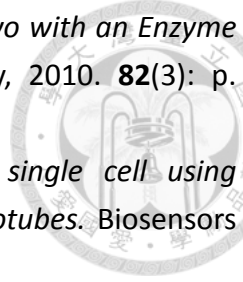


1. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. Sensors, 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
2. Wang, Y., et al., *Electrochemical Sensors for Clinic Analysis*. Sensors, 2008. **8**(4): p. 2043-2081.
3. Farré, M. and D. Barceló, *Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(5): p. 299-310.
4. Qavi, A., et al., *Label-free technologies for quantitative multiparameter biological analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(1): p. 121-135.
5. Viswanathan, S., H. Radecka, and J. Radecki, *Electrochemical biosensors for food analysis*. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2009. **140**(8): p. 891-899.
6. Rodriguez-Mozaz, S., M. Lopez de Alda, and D. Barceló, *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(4): p. 1025-1041.
7. Curreli, M., et al., *Real-Time, Label-Free Detection of Biological Entities Using Nanowire-Based FETs*. Ieee Transactions on Nanotechnology, 2008. **7**(6): p. 651-667.
8. Kim, S.N., J.F. Rusling, and F. Papadimitrakopoulos, *Carbon nanotubes for electronic and electrochemical detection of biomolecules*. Advanced Materials, 2007. **19**(20): p. 3214-3228.
9. Cui, Y., et al., *Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species*. Science, 2001. **293**(5533): p. 1289-1292.
10. Heinze, S., et al., *Carbon Nanotubes as Schottky Barrier Transistors*. Physical Review Letters, 2002. **89**(10): p. 106801.
11. Javey, A., et al., *Carbon Nanotube Field-Effect Transistors with Integrated Ohmic Contacts and High- $\kappa$  Gate Dielectrics*. Nano Letters, 2004. **4**(3): p. 447-450.
12. Gruner, G., *Carbon nanotube transistors for biosensing applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(2): p. 322-335.
13. Byon, H.R. and H.C. Choi, *Network Single-Walled Carbon Nanotube-Field Effect Transistors (SWNT-FETs) with Increased Schottky Contact Area for Highly Sensitive Biosensor Applications*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(7): p. 2188-2189.

- 
14. Cui, Y., et al., *Doping and electrical transport in silicon nanowires*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(22): p. 5213-5216.
  15. Cui, Y. and C.M. Lieber, *Functional Nanoscale Electronic Devices Assembled Using Silicon Nanowire Building Blocks*. Science, 2001. **291**(5505): p. 851-853.
  16. Lin, T.-W., et al., *Label-free detection of protein-protein interactions using a calmodulin-modified nanowire transistor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(3): p. 1047-1052.
  17. Lin, S.-P., et al., *A reversible surface functionalized nanowire transistor to study protein-protein interactions*. Nano Today, 2009. **4**(3): p. 235-243.
  18. Hahm, J. and C.M. Lieber, *Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors*. Nano Letters, 2004. **4**(1): p. 51-54.
  19. Zheng, G.F., et al., *Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(10): p. 1294-1301.
  20. Patolsky, F., et al., *Electrical detection of single viruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(39): p. 14017-14022.
  21. Zhang, G.-J., et al., *Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and rapid detection of Dengue virus*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2010. **146**(1): p. 138-144.
  22. Chen, K.I., B.R. Li, and Y.T. Chen, *Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation*. Nano Today, 2011. **6**(2): p. 131-154.
  23. Curreli, M., et al., *Real-Time, Label-Free Detection of Biological Entities Using Nanowire-Based FETs*. Nanotechnology, IEEE Transactions on, 2008. **7**(6): p. 651-667.
  24. Cui, Y., et al., *Diameter-controlled synthesis of single-crystal silicon nanowires*. Applied Physics Letters, 2001. **78**(15): p. 2214-2216.
  25. Urena, J., et al., *Hypoxia Induces Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Entry and Quantal Dopamine Secretion in Carotid-Body Glomus Cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(21): p. 10208-10211.
  26. Kim, J.-H., et al., *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 50-56.
  27. Meyer-Lindenberg, A., et al., *Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia*. Nat Neurosci, 2002. **5**(3): p.



- 267-271.
28. *Biochemical and Clinical Manifestations of Dopamine-Producing Paragangliomas: Utility of Plasma Methoxytyramine*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005. **90**(4): p. 2068-2075.
29. Pacak, K., et al., *Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium*. Nat Clin Pract End Met, 2007. **3**(2): p. 92-102.
30. Davis, K.L., *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. American Journal of Psychiatry, 1991. **148**(11): p. 1474-1486.
31. Chen, K.-I., B.-R. Li, and Y.-T. Chen, *Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation*. Nano Today, 2011. **6**(2): p. 131-154.
32. Zayats, M., et al., *Label-Free and Reagentless Aptamer-Based Sensors for Small Molecules*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(42): p. 13666-13667.
33. Wang, W.U., et al., *Label-free detection of small-molecule-protein interactions by using nanowire nanosensors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(9): p. 3208-3212.
34. Lee, G.J., et al., *Neurotransmitter detection by enzyme-immobilized CNT-FET*. Current Applied Physics, 2009. **9**(1, Supplement): p. S25-S28.
35. Walsh, R. and M.C. DeRosa, *Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **388**(4): p. 732-735.
36. Mannironi, C., et al., *In Vitro Selection of Dopamine RNA Ligands†*. Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9726-9734.
37. Kumar, G.K., et al., *Release of dopamine and norepinephrine by hypoxia from PC-12 cells*. Vol. 274. 1998. C1592-C1600.
38. Miao, Y.-L., et al., *Calcium influx-mediated signaling is required for complete mouse egg activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(11): p. 4169-4174.
39. Syntichaki, P. and N. Tavernarakis, *The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?* Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(8): p. 672-684.
40. Liu, A., et al., *Biosensing Properties of Titanate Nanotube Films: Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate and Uric Acid*. Advanced Functional Materials, 2006. **16**(3): p. 371-376.
41. Hsu, M.-S., et al., *Gold Nanostructures on Flexible Substrates as Electrochemical Dopamine Sensors*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2012. **4**(10): p. 5570-5575.

- 
42. Njagi, J., et al., *Amperometric Detection of Dopamine in Vivo with an Enzyme Based Carbon Fiber Microbiosensor*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(3): p. 989-996.
  43. Shi, B.-X., et al., *Monitoring of dopamine release in single cell using ultrasensitive ITO microsensors modified with carbon nanotubes*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(6): p. 2917-2921.
  44. Wu, L., et al., *Electrochemical detection of dopamine using porphyrin-functionalized graphene*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **34**(1): p. 57-62.
  45. Tatemoto, K., *Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1982. **79**(18): p. 5485-5489.
  46. Tatemoto, K., M. Carlquist, and V. Mutt, *Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide*. Nature, 1982. **296**(5858): p. 659-660.
  47. Fuhlendorff, J., et al., *The antiparallel pancreatic polypeptide fold in the binding of neuropeptide Y to Y1 and Y2 receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(20): p. 11706-11712.
  48. Sah, R. and T.D. Geraciotti, *Neuropeptide Y and posttraumatic stress disorder*. Molecular Psychiatry, 2013. **18**(6): p. 646-655.
  49. Fletcher, M.A., et al., *Plasma neuropeptide Y: a biomarker for symptom severity in chronic fatigue syndrome*. Behavioral and Brain Functions, 2010. **6**: p. 76.
  50. Mendonsa, S.D. and M.T. Bowser, *In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(26): p. 9382-9383.
  51. Monks, S.A., et al., *Solution structure of human neuropeptide Y*. J Biomol NMR, 1996. **8**(4): p. 379-90.
  52. Vijay-Kumar, M., et al., *Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5*. Science, 2010. **328**(5975): p. 228-231.
  53. Pavlyuk, O.M.K., Madhavi; Hagen, Joshua; Naik, Rajesh *Human performance biomarker binding peptides for neuropeptide Y and methods of using the same* 2013, The United States of America as represented by the Secretary of the Air Force (Washington, DC, US)
  54. Wagner, R.S. and W.C. Ellis, *Vapor-Liquid-Solid Mechanism of Single Crystal Growth*. Applied Physics Letters, 1964. **4**(5): p. 89-90.
  55. Lu, W. and C.M. Lieber, *Semiconductor Nanowires*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2006. **39**(21): p. R387-R406.

56. Li, B.-R., et al., *Biomolecular recognition with a sensitivity-enhanced nanowire transistor biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. **45**: p. 252-259.



## 附錄

An Ultra-Sensitive Nanowire-Transistor Biosensor for Detecting Dopamine Release from Living PC12 cells under Hypoxic Stimulation



# An Ultrasensitive Nanowire-Transistor Biosensor for Detecting Dopamine Release from Living PC12 Cells under Hypoxic Stimulation

Bor-Ran Li,<sup>†</sup> Ying-Jhu Hsieh,<sup>‡</sup> Yan-Xi Chen,<sup>‡</sup> Ya-Ting Chung,<sup>§</sup> Chien-Yuan Pan,<sup>§</sup> and Yit-Tsong Chen<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup>Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, P.O. Box 23-166, Taipei 106, Taiwan

<sup>‡</sup>Department of Chemistry and <sup>§</sup>Department of Life Science, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei 106, Taiwan

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Dopamine (DA) is an important neurotransmitter that is involved in neuronal signal transduction and several critical illnesses. However, the concentration of DA is extremely low in patients and is difficult to detect using existing electrochemical biosensors with detection limits typically around nanomolar levels ( $\sim 10^{-9}$  M). Here, we developed a nanoelectronic device as a biosensor for ultrasensitive and selective DA detection by modifying DNA-aptamers on a multiple-parallel-connected (MPC) silicon nanowire field-effect transistor (referred to as MPC aptamer/SiNW-FET). Compared with conventional electrochemical methods, the MPC aptamer/SiNW-FET has been demonstrated to improve the limit of DA detection to  $< 10^{-11}$  M and to possess a detection specificity that is able to distinguish DA from other chemical analogues, such as ascorbic acid, catechol, phenethylamine, tyrosine, epinephrine, and norepinephrine. This MPC aptamer/SiNW-FET was also applied to monitor DA release under hypoxic stimulation from living PC12 cells. The real-time recording of the exocytotic DA induced by hypoxia reveals that the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that is required to trigger DA secretion is dominated by an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx, rather than the release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores.

Dopamine (DA) is an important neurotransmitter that plays many important roles in the nervous, cardiovascular, and renal systems and regulates various physiological activities. When mammals do not have enough oxygen, their brains send out signals, through DA, to increase the breathing rate and blood circulation to reoxygenate the organs.<sup>1</sup> In addition to regulating physiological activities, DA is also related to several critical illnesses. In the basal ganglia of the brain, DA is a neurotransmitter that plays a vital role in Parkinson's disease, which is a notorious nervous dysfunction associated with vibrating limbs during the early stages and dementia in the advanced stages.<sup>2</sup> Schizophrenia has been shown to increase DA activity in the dopaminergic pathway and to reduce DA in the cortex.<sup>3</sup> Clinically, an abnormal DA level in either the urine or blood indicates pheochromocytomas and paragangliomas,<sup>4,5</sup> which are rare tumors arising in neural crest tissue. Consequently, quickly detecting and accurately quantifying DA levels is important for cellular investigation and biomedical diagnosis.

Among the existing tools that detect DA, electrochemical methods are dominant because of their speed and convenience. However, the oxidation potential of DA overlaps with that of many other substances in urine, blood, and the central nervous system (e.g., ascorbic acid (AA)). Moreover, the concentration of DA in the extracellular fluid of Parkinson's disease patients and in the urine/blood of patients with pheochromocytomas or paragangliomas is extremely low ( $< 10^{-10}$  M)<sup>6</sup> and very difficult to detect at the normal concentrations of a clinical sample using conventional electrochemical methods (typically with detection limits no better than nanomolar, as listed in Table S1 of the Supporting Information (SI)). Therefore, a new DA sensor with high detection sensitivity and target selectivity is highly desired.

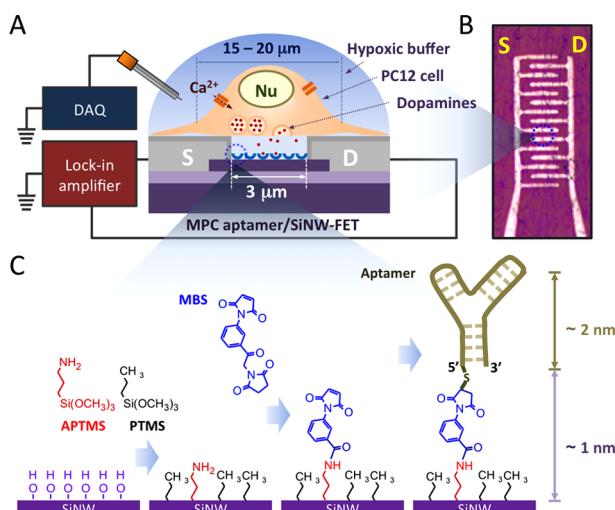
Over the past decade, silicon nanowire field-effect transistors (SiNW-FETs) have attracted great attention for applications in ultrasensitive biomolecular detections.<sup>7-16</sup> A SiNW has a large surface-to-volume ratio, which allows a small variation in the local charges on the wire surface to result in a significant conductance change inside the SiNW-FET due to an electric-field effect. SiNW-FETs modified with selected receptor molecules can be used as biosensors to detect specific targets in real-time with label-free, sensitive, and selective sensing. By judiciously selecting a suitable DA recognizer to attach to the SiNW-FET, these functionalized, nanoelectronic devices can be excellent biosensors for the highly sensitive and selective detection of DA.

The bioanalytes used for molecular recognition with SiNW-FETs are mostly large in size, have high molecular weights, and carry large charges, which can exert a strong electric field that facilitates detection by FETs.<sup>7,17</sup> It is comparatively challenging for FET-based biosensors to recognize weakly charged, small molecules, such as DA. To date, only a few small molecules have been studied with SiNW-FETs (and/or carbon nanotube-FETs), e.g., the label-free detections of adenosine-5'-triphosphate<sup>18</sup> and glutamate.<sup>19</sup> For sensing DA in this study, we built a multiple-parallel-connected (MPC) SiNW-FET with greater reliability and higher sensitivity than a traditional single-channel SiNW-FET. This higher sensitivity is essential for recognition of weakly charged, small biomolecules.

As illustrated in Figure 1A, the electrical measurements of an MPC SiNW-FET were conducted with a lock-in amplifier, and

Received: August 16, 2013

Published: October 14, 2013



**Figure 1.** (A) Illustration of the experimental setup of a DNA-aptamer-modified MPC SiNW-FET device for detecting exocytotic DA under hypoxic stimulation from living PC12 cells. (B) Optical microscopy image of an MPC SiNW-FET device. S = source; D = drain. (C) Procedure for immobilization of the DNA-aptamer on an MPC SiNW-FET (details in sections S3 and S4 of the Supporting Information). Abbreviations: APTMS, (3-aminopropyl)trimethoxysilane; PTMS, propyltrimethoxysilane; MBS, 3-maleimidobenzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester. The drawing is not to scale.

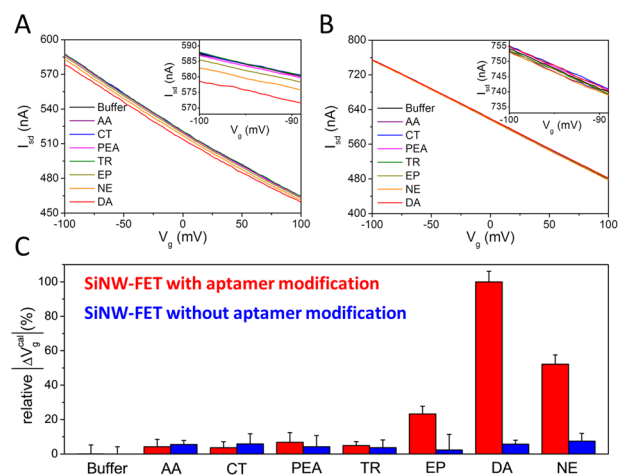
the solution gate voltage was supplied by a data acquisition (DAQ) system through a platinum electrode. Details of the device fabrication and the electrical measurements of the MPC SiNW-FETs are described in sections S1–S5 of the SI. Each unit of the MPC SiNW-FET devices comprises hundreds of p-type single-crystalline SiNWs ( $\sim 20$  nm in diameter each) as conducting channels, which were connected by two sets of comb-like source and drain electrodes (Figure 1B and details in Figure S1A of the SI). Electrical characterizations of MPC SiNW-FETs reveal that the nanoelectronic devices have ohmic contacts (Figure S1B) and high transconductance with a typical value of 600 nS at a source–drain bias voltage ( $V_{sd}$ ) of 10 mV (Figure S1C). Compared with a traditional SiNW-FET, whose conducting channel is composed of only a single or a few SiNWs, the MPC SiNW-FET system possesses remarkably higher detection sensitivity (i.e., larger transconductance) and a better signal-to-noise ratio (S/N) in electrical measurements (Figure S2).

In this work, we chose a DNA-aptamer<sup>20,21</sup> with high specific binding to DA as the receptor to be modified on an MPC SiNW-FET. The immobilization of the DNA-aptamers was designed to modify only the SiNWs surface without contaminating the surrounding substrate of the FET chip, which substantially enhances the detection sensitivity, as we demonstrated earlier.<sup>22,23</sup> The DNA-aptamer-modified MPC SiNW-FET (referred to as aptamer/SiNW-FET hereafter) has several advantages for molecular recognition by affinity-based biosensors. First, an aptamer has a smaller molecular size than conventional receptors (e.g., enzymes or antibodies); therefore, the captured DA molecules are closer to the SiNW-FET during the sensing measurement, resulting in a stronger electrical field exerted from the DA that modulates the conductance inside SiNW-FET and gives optimal detection signals. Second, an aptamer formed by oligonucleic acids is thermally stable. This stability is in sharp contrast to proteins and antibodies, which may lose their functionality irreversibly under thermal/chemical

attacks. Moreover, denatured aptamers are able to recover their function by self-refolding.

An artificial single-strain DNA oligonucleotide of 57-mer (HS-5'-GTC TCT GTG TGC GCC AGA GAC ACT GGG GCA GAT ATG GGC CAG CAC AGA ATG AGG CCC-3', synthesized by MDBio) was adopted as the aptamer for DA sensing. The sequence was *in vitro*-selected from random RNA pools<sup>21</sup> and was confirmed to retain DA affinity in the DNA form.<sup>20</sup> Although the crystal structure of this DA binding aptamer is still unresolved, the tertiary structure, according to the biochemical data from previous research,<sup>21</sup> should be highly compact and consists of two major stem-loop domains enclosing five DA binding sites (Figure S3). The immobilization procedures of the aptamers on an MPC SiNW-FET are illustrated schematically in Figure 1C (details in sections S3 and S4 of the SI). We first test the binding ability of the aptamer to various molecules including AA (which is the major interfering molecule present in cells and has a redox potential close to DA), catechol (CT) and phenethylamine (PEA) (structurally similar to DA), tyrosine (TR) (a biomolecule involved in the DA metabolism), and epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) (other catecholamines).

Figure 2A plots the relationships between the source–drain current ( $I_{sd}$ ) and the gate voltage ( $V_g$ ) of an aptamer/SiNW-FET

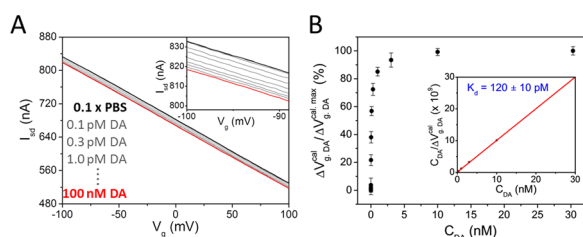


**Figure 2.**  $I_{sd}$ – $V_g$  curves measured with (A) an aptamer/SiNW-FET and (B) a PTMS-modified SiNW-FET without aptamer modification (referred to as a bare SiNW-FET hereafter) for the detection of 0.1× PBS buffer, 1  $\mu$ M ascorbic acid (AA), 1  $\mu$ M catechol (CT), 1  $\mu$ M phenethylamine (PEA), 1  $\mu$ M tyrosine (TR), 10 nM epinephrine (EP), 10 nM dopamine (DA), and 10 nM norepinephrine (NE). (C) Calibrated responses ( $\Delta I_{sd}^{cal}$ ) of the various biochemicals relative to that of DA (100%). The error bars present the standard deviations of three measurements.

device in response to various molecules dissolved in 0.1× phosphate-buffered saline (PBS, composed of 13.7 mM NaCl, 270  $\mu$ M KCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 200  $\mu$ M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NaOH, pH 7.2). While 10 nM DA caused a prominent shift of the  $I_{sd}$ – $V_g$  curve, AA, CT, PEA, and TR at 1  $\mu$ M had little effect on the curves, and 10 nM of EP and NE induced limited changes. As a control test (Figure 2B), a bare SiNW-FET device without modification of the DNA-aptamer had no response to these molecules. To avoid variation among the different devices,<sup>24</sup> the measured current change due to the receptor–target binding ( $\Delta I_{sd}$  at  $V_g = -90$  mV, relative to the buffer solution in Figure 2A) was converted to the change in  $V_g$  (termed the calibrated

response and represented by  $\Delta V_{g,DA}^{cal}$  as illustrated in Figure S4) according to the  $I_{sd}-V_g$  transfer curve of the FET device used. Changes induced by the tested buffers containing AA (1  $\mu$ M), CT (1  $\mu$ M), PEA (1  $\mu$ M), TR (1  $\mu$ M), EP (10 nM), DA (10 nM), and NE (10 nM) are summarized in Figure 2C. Although those two catecholamines of EP and NE caused significant  $\Delta V_{g,DA}^{cal}$  of  $25 \pm 4\%$  and  $50 \pm 5\%$ , respectively, all other non-catecholamines induced changes less than 10% despite the 100-fold greater concentration that was used. These results indicate the specificity of the DNA-aptamer in distinguishing catecholamines from other molecules. Moreover, the association of DA with an aptamer of mutations at the binding sites (referred to as mut-aptamer) is very weak as shown in Figure S5, where 10 nM DA induced only a small change of  $\Delta V_{g,DA}^{cal} < 10\%$  in a mut-aptamer/SiNW-FET.

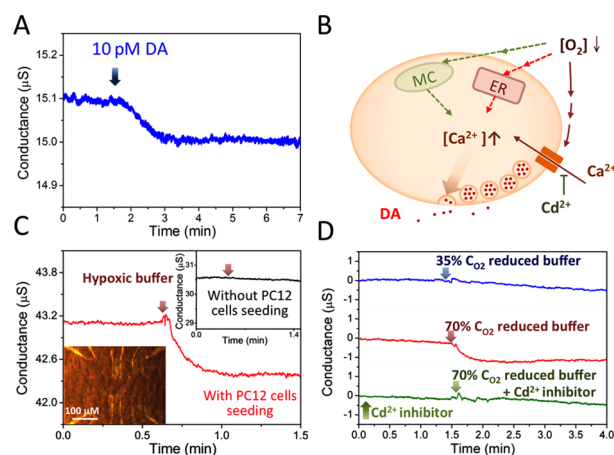
We next determined the binding affinity of the DNA-aptamer to various catecholamines. The test was carried out with the analytes at  $10^{-13}$ – $10^{-7}$  M in  $0.1\times$  PBS. Figure 3A shows the  $I_{sd}-V_g$



**Figure 3.** (A) Measured  $I_{sd}-V_g$  curves of an aptamer/SiNW-FET in response to different DA concentrations ( $C_{DA} = 0-100$  nM in  $0.1\times$  PBS at pH 7.2). The magnified scale is shown in the inset. (B) Normalized plot of  $\Delta V_{g,DA}^{cal}/\Delta V_{g,DA}^{cal,max}$  (where  $\Delta V_{g,DA}^{cal,max}$  is the saturated  $\Delta V_{g,DA}^{cal}$ ) as a function of  $C_{DA}$  is summarized from the data in (A). The inset shows the least-squares fit to the Langmuir adsorption isotherm model (section S6 of the SI), yielding  $K_d = 120 \pm 10$  pM for the aptamer-DA complex.

$V_g$  plots of the aptamer/SiNW-FET measured at various DA concentrations ( $C_{DA}$ ), where the data were subsequently converted to the calibrated response ( $\Delta V_{g,DA}^{cal}$ ) as a function of  $C_{DA}$  in Figure 3B. The inset in Figure 3B plots the  $C_{DA}/\Delta V_{g,DA}^{cal}$  against various  $C_{DA}$ , and the dissociation constant ( $K_d$ ) of the aptamer-DA complex was  $120 \pm 10$  pM, which was determined from the least-squares fit to the Langmuir adsorption isotherm model (details in section S6 of the SI).<sup>7,22</sup> As displayed in Figure S6, the linear working range of the aptamer/SiNW-FET biosensor for DA detection spanned from  $10^{-11}$  to  $10^{-8}$  M. Similarly, the  $K_d$  values of the aptamer-EP and aptamer-NE complexes were  $6.03 \pm 1.85$  nM and  $910 \pm 270$  pM, respectively (Figure S7). These data show that the affinity of the DNA-aptamer for DA is approximately 50- and 10-fold over EP and NE, respectively. Because of this affinity for DA and additional biological DA in some living systems (e.g., PC12 cells contain 10-fold more DA than other catecholamines<sup>25</sup> and dopaminergic neurons synthesize exclusively DA), this aptamer/SiNW-FET can be used as a unique biosensor for practical DA detection in cellular investigation and clinical diagnosis.

In addition to selectivity and sensitivity, real-time detection allows the SiNW-FET biosensor to monitor the cellular response to drug treatment or environmental alteration. Although many time-dependent measurements using techniques that do not have real-time responses have been used to detect the DA release from cells, these measurements usually require hours of work for sample collection and DA recognition using HPLC purification and mass identification. In comparison, Figure 4A shows a



**Figure 4.** (A) Real-time recording of 10 pM DA by aptamer/SiNW-FET. The analytes were driven by a micropump (0.3 mL/h) through a PDMS microfluidic channel. (B) Illustration of a hypothetical mechanism of cellular DA secretion under hypoxic stimulation. The escalation of intracellular  $Ca^{2+}$  to trigger DA exocytosis is speculated to occur via the pathway of either extracellular  $Ca^{2+}$  influx (solid lines)<sup>20</sup> or intracellular  $Ca^{2+}$  store release<sup>21</sup> (dashed lines). (C) Real-time recording of PC12 cells that are seeded with aptamer/SiNW-FET (bottom inset: optical microscopy image) in response to the addition of 70%  $CO_2$  reduced hypoxic buffer (section S8 of the SI). Top inset shows a control test using the same aptamer/SiNW-FET but without cells seeding. Arrows indicate the addition of hypoxic buffer. (D) Real-time recordings of the DA release from PC12 cells under different hypoxic stimulations: (upper trace) 35%  $CO_2$  reduced buffer, (middle trace) 70%  $CO_2$  reduced buffer, and (bottom trace) 70%  $CO_2$  reduced buffer containing 1 mM  $CdI_2$ .

representative real-time recording using an aptamer/SiNW-FET, where 10 pM DA was detected ( $S/N > 5$ ) with a conductance change of  $\sim 100$  nS within 1.5 min at a flow rate of 0.3 mL/h. In a further test of the aptamer/SiNW-FET, we attempted to conduct real-time recordings of the DA release under hypoxic stimulation from living PC12 cells.

For mammalian cells, adequate oxygen is essential for their survival; therefore, mammals undergo hypoxia-induced cellular processes to tolerate an oxygen deprivation environment. Such examples include the release of transmitters from neuronal cells. The hypoxic effect on PC12 cells induces the release of DA through exocytosis, which involves an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in the stimulus–secretion coupling.<sup>26</sup> However, the cellular mechanism of coupling hypoxic stimulation with DA secretion is complicated; whether the pathway involved in increasing intracellular  $Ca^{2+}$  and triggering DA exocytosis via either extracellular  $Ca^{2+}$  influx<sup>27</sup> or release of intracellular  $Ca^{2+}$  stores<sup>28</sup> (as illustrated in Figure 4B) is still under debate. In this test, we tried to apply the aptamer/SiNW-FET to resolve these controversial pathways. The experimental setup of an aptamer/SiNW-FET for real-time recording of the exocytotic DA under hypoxic stimulation from living PC12 cells is illustrated in Figure 1A, where PC12 cells cultured in a polydimethylsiloxane (PDMS) well (section S7 of the SI) were applied directly on the SiNW-FET device (bottom inset of Figure 4C). As shown in Figure 4C, a progressive increase in the DA efflux was recorded while the PC12 cells suffered from a hypoxia of a 70% decrease in the environmental  $O_2$  concentration ( $CO_2$ ); meanwhile, the increase in DA reached equilibrium within 0.5 min. As a control experiment, no significant change in electrical conductance was

observed with an aptamer/SiNW-FET without cell seeding (upper inset of Figure 4C). Moreover, the DA release by hypoxic stimulation is not linearly correlated to the reduced  $\text{CO}_2$ , where the exocytotic DA could not be detected until the  $\text{CO}_2$  was reduced by more than 70% (Figure 4D). This observation indicates that the deoxygenization via minor hypoxic stimulation (e.g., 35% reduced  $\text{CO}_2$ ) is not sufficient to trigger the membrane potential depolarization, leading to the activation of the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels to elevate the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and trigger neurotransmitter release. In addition, after the  $\text{Ca}^{2+}$  channels had been blocked by cadmium ions (by adding 1 mM  $\text{CdI}_2$ ), PC12 cells failed to release DA in spite of hypoxic stimulation (Figure 4D). These results reveal that the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that triggers the DA secretion following hypoxic stimulation is dominated by the influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

In summary, an MPC aptamer/SiNW-FET was demonstrated for the first time to be a reliable DA sensor. Furthermore, the nanoelectronic biosensor possesses the advantages of high sensitivity and selectivity and can be used in real-time, label-free detections. The MPC aptamer/SiNW-FET has a strong binding affinity for DA that is at least 10-fold over the rival catecholamines of NE and EP; these three catecholamines could not be discerned using conventional electrochemical methods. The ultrasensitive MPC aptamer/SiNW-FET, capable of probing DA down to  $10^{-11}$  M, can be used as a practical biosensor to detect DA at the extremely low concentration level ( $<10^{-10}$  M) in the extracellular fluid of Parkinson's disease patients and in the urine/blood of patients with pheochromocytomas or paragangliomas.<sup>6</sup> Using this MPC aptamer/SiNW-FET for DA detection, we have successfully monitored DA release from living PC12 cells following hypoxia-induced cellular secretion. DA secretion following hypoxic stimulation has been verified to be coupled with extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Finally, this novel bionanoelectronic device, which is capable of integrating with living cell systems, adds a new item to the biosensor toolbox for the future studies of cell biology and clinical disease diagnosis.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Figures S1–S8 and methods. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

ytchem@ntu.edu.tw

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the National Science Council of Taiwan under NSC 101-2627-M-002-004 and 101-2627-M-002-013. B.-R.L. was supported by a postdoctoral fellowship from Academia Sinica. Technical support from NanoCore, the Core Facilities for Nanoscience and Nanotechnology at Academia Sinica, is acknowledged.

## ■ REFERENCES

- (1) Urena, J.; Fernandezchacon, R.; Benot, A. R.; Detoledo, G. A.; Lopezbarneo, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 10208.
- (2) Kim, J. H.; Auerbach, J. M.; Rodriguez-Gomez, J. A.; Velasco, I.; Gavin, D.; Lumelsky, N.; Lee, S. H.; Nguyen, J.; Sanchez-Pernaute, R.; Bankiewicz, K.; McKay, R. *Nature* **2002**, *418*, 50.
- (3) Meyer-Lindenberg, A.; Miletich, R. S.; Kohn, P. D.; Esposito, G.; Carson, R. E.; Quarantelli, M.; Weinberger, D. R.; Berman, K. F. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 267.
- (4) Pacak, K.; Eisenhofer, G.; Ahlman, H.; Bornstein, S. R.; Gimenez-Roqueplo, A. P.; Grossman, A. B.; Kimura, N.; Mannelli, M.; McNicol, A. M.; Tischler, A. S. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol.* **2007**, *3*, 92.
- (5) Eisenhofer, G.; Goldstein, D. S.; Sullivan, P.; Csako, G.; Brouwers, F. M.; Lai, E. W.; Adams, K. T.; Pacak, K. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2068.
- (6) Davis, K. L.; Kahn, R. S.; Ko, G.; Davidson, M. *Am. J. Psychiatry* **1991**, *148*, 1474.
- (7) Chen, K. I.; Li, B. R.; Chen, Y. T. *Nano Today* **2011**, *6*, 131.
- (8) Cui, Y.; Wei, Q. Q.; Park, H. K.; Lieber, C. M. *Science* **2001**, *293*, 1289.
- (9) Bunimovich, Y. L.; Shin, Y. S.; Yeo, W.-S.; Amori, M.; Kwong, G.; Heath, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16323.
- (10) Stern, E.; Klemic, J. F.; Routenberg, D. A.; Wyrembak, P. N.; Turner-Evans, D. B.; Hamilton, A. D.; LaVan, D. A.; Fahmy, T. M.; Reed, M. A. *Nature* **2007**, *445*, 519.
- (11) Lin, T. W.; Hsieh, P. J.; Lin, C. L.; Fang, Y. Y.; Yang, J. X.; Tsai, C. C.; Chiang, P. L.; Pan, C. Y.; Chen, Y. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 1047.
- (12) Lin, S. P.; Pan, C. Y.; Tseng, K. C.; Lin, M. C.; Chen, C. D.; Tsai, C. C.; Yu, S. H.; Sun, Y. C.; Lin, T. W.; Chen, Y. T. *Nano Today* **2009**, *4*, 235.
- (13) Gao, X. P. A.; Zheng, G. F.; Lieber, C. M. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 547.
- (14) Zhang, G. J.; Chua, J. H.; Chee, R. E.; Agarwal, A.; Wong, S. M. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2504.
- (15) Pui, T. S.; Agarwal, A.; Ye, F.; Huang, Y. X.; Chen, P. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2746.
- (16) Zheng, G. F.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W. U.; Lieber, C. M. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1294.
- (17) Zayats, M.; Huang, Y.; Gill, R.; Ma, C. A.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13666.
- (18) Wang, W. U.; Chen, C.; Lin, K. H.; Fang, Y.; Lieber, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 3208.
- (19) Lee, G. J.; Lim, J. E.; Park, J. H.; Choi, S. K.; Hong, S.; Park, H. K. *Curr. Appl. Phys.* **2009**, *9*, S25.
- (20) Walsh, R.; DeRosa, M. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 732.
- (21) Mannironi, C.; DiNardo, A.; Fruscoloni, P.; TocchiniValentini, G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
- (22) Li, B. R.; Chen, C. W.; Yang, W. L.; Lin, T. Y.; Pan, C. Y.; Chen, Y. T. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 252.
- (23) Lin, T. Y.; Li, B. R.; Tsai, S. T.; Chen, C. W.; Chen, C. H.; Chen, Y. T.; Pan, C. Y. *Lab Chip* **2013**, *13*, 676.
- (24) Ishikawa, F. N.; Curreli, M.; Chang, H. K.; Chen, P. C.; Zhang, R.; Cote, R. J.; Thompson, M. E.; Zhou, C. W. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3969.
- (25) Ahnert-Hilger, G.; Brautigam, M.; Gratzl, M. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7842.
- (26) Kumar, G. K.; Overholt, J. L.; Bright, G. R.; Hui, K. Y.; Lu, H. W.; Gratzl, M.; Prabhakar, N. R. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1998**, *274*, C1592.
- (27) Miao, Y. L.; Stein, P.; Jefferson, W. N.; Padilla-Banks, E.; Williams, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 4169.
- (28) Syntichaki, P.; Tavernarakis, N. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 672.

[Supporting Information]



## **An Ultra-Sensitive Nanowire-Transistor Biosensor for Detecting Dopamine Release from Living PC12 Cells under Hypoxic Stimulation**

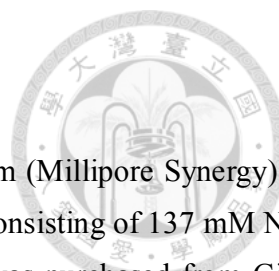
Bor-Ran Li,<sup>†</sup> Ying-Jhu Hsieh,<sup>‡</sup> Yan-Xi Chen,<sup>‡</sup> Ya-Ting Chung,<sup>||</sup> Chien-Yuan Pan,<sup>||</sup> and  
Yit-Tsong Chen<sup>†‡\*</sup>

<sup>†</sup> Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, P.O. Box 23-166, Taipei 106, Taiwan

<sup>‡</sup> Department of Chemistry, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei 106, Taiwan

<sup>||</sup> Department of Life Science, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei 106, Taiwan.





## **S1. Materials and reagents**

Deionized (DI) water ( $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) obtained from a purification system (Millipore Synergy) was used throughout the experiments. The phosphate buffered saline ( $1\times \text{PBS}$ ), consisting of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NaOH at pH 7.4, was purchased from Gibco. The chemicals 3-aminopropyl trimethoxysilane (APTMS), propyl trimethoxysilane (PTMS), dimethyl sulfoxide (DMSO), and 3-maleimidobenzoic acid N-hydroxy succinimide ester (MBS) were purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals were also purchased commercially: dithiothreitol (DTT) from J. T. Baker, the single-strain DNA-aptamer from MDBio, and polydimethylsiloxane (PDMS) from Sil-More Industrial.

## **S2. SiNW synthesis**

Single-crystalline boron-doped SiNWs (Si:B = 4000:1) were synthesized catalytically with the assistance of 20 nm gold nanoparticles in a chemical vapor deposition (CVD) reaction through the vapor-liquid-solid (VLS) growth mechanism. Gold nanoparticles were dispersed onto a Si wafer chip with a 400-nm oxide layer that had been incubated in 0.1% aqueous solution of poly l-lysine for 10 min to increase the adhesion of the gold nanoparticles. After the deposition of gold nanoparticles, the substrate was washed with DI water, blown dry with  $\text{N}_2$  gas, and cleaned in oxygen plasma (100 W and 50 sccm  $\text{O}_2$  for 300 s). The p-type SiNWs were grown from the CVD reaction at 460 °C for 12.5 min in 10 sccm Ar, 6 sccm  $\text{SiH}_4$  (10% in He), and 15 sccm  $\text{B}_2\text{H}_6$  (100 ppm in He) at a total chamber pressure of 25 torr. The diameters of the as-synthesized SiNWs were generally between 20 and 30 nm. The quality of the as-synthesized SiNWs was examined using high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and electron diffraction (ED) (JEM-2000FXII). The experimental details of SiNW synthesis can be found in Refs. S1-S4.

## **S3. Device fabrication**

Using a bottom-up technique, we fabricated selective surface modified (SSM) SiNW-FETs with the receptors modifying only the SiNW surface without contaminating the surrounding substrate of the Si wafer chip. The SSM SiNW-FETs can substantially increase their detection sensitivity, in comparison with the traditional all area modification (AAM) SiNW-FETs. In this approach, the strategy was to modify the SiNWs with a chemical linker of APTMS using a thermal-evaporation method prior to photolithographic fabrication of the device. The experimental details of the thermal-evaporation method can be found in Ref. S2. Briefly, a Si-wafer chip containing the as-synthesized SiNWs was

suspended in a sealed three-neck flask, which was pre-loaded with a 1:9 (v/v) solution of APTMS and PTMS. The flask was evacuated for 1 min at room temperature and incubated for 1 hr at 40 °C; meanwhile, the thermally evaporated APTMS and PTMS molecules were immobilized on the SiNW surface to form APTMS-modified SiNWs. On average, only ~10% of the SiNW surface contains APTMS as the active sites (amine groups) to be modified with aptamers (~2 nm in size). The modified PTMS on the 90% SiNW surface was used to not only adjust the density of the immobilized APTMS to avoid the steric hindrance of the immobilized aptamers, but also form a chemically inert surface to prevent non-specific binding in the later biosensing measurements.

The as-prepared APTMS-modified SiNWs were transferred onto a photoresist (S1805)-patterned Si wafer with a 400-nm oxide layer using a contact printing method. The SiNW-FET devices were fabricated following standard photolithographic procedures. The metal contact regions (defined by photolithography) were cleaned with oxygen plasma (100 sccm and 30 W); meanwhile, the native silica sheath of a SiNW in the contact area was removed with a buffered oxide etching (BOE) solution. Metal layers (70 nm Ni and 100 nm Al) were deposited consecutively using thermal evaporation on the areas defined by the pattern. The separation between the source and drain electrodes is 3 μm. After liftoff, the SiNW-FET devices were further annealed in forming gas (10% H<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>) at 360 °C for 3 min to ensure good electrical contact between the SiNW and the metal electrodes.

#### **S4. Immobilization of the aptamer**

To anchor DNA-aptamers on the APTMS-modified SiNW-FETs, the chip containing the APTMS-modified SiNW-FET devices was immersed for 30 min in a 1:9 (v/v) solution of DMSO and 1× PBS containing 1 mM MBS. After the MBS had reacted with APTMS through the formation of an amide bond, the chip was rinsed with DI water, blown dry with N<sub>2</sub> gas, and immersed for 1 hr in a solution of 1× PBS containing 1 μM DNA-aptamer (disulfate DNA-dimer) and 100 mM DTT. After the sulfhydryl group of the DNA-aptamer had reacted with the maleimide group of MBS to immobilize the DNA-aptamer on the APTMS/SiNW-FETs (forming aptamer/SiNW-FETs), the chip was washed again with 1× PBS and DI water, and finally, blown dry with N<sub>2</sub> gas. To demonstrate the successful immobilization of DNA-aptamers on SiO<sub>2</sub>/Si surface, we used FITC-tagged aptamer (5'-HS-GTC TCT GTG TGC GCC AGA GAC ACT GGG GCA GAT ATG GGC CAG CAC AGA ATG AGG CCC-FITC-3', referred to as FITC-aptamer) to show that the FITC-aptamers can be nicely immobilized on a SiO<sub>2</sub>/Si substrate via the chemical linkers of MBS and APTMS (with the same modification process presented in Fig. 1C). Like the fluorescent images shown in Fig. S8A, while the FITC-aptamer could not be modified directly on a bare SiO<sub>2</sub>/Si substrate (left panel, no fluorescence), the FITC-aptamers were effectively immobilized on a MBS/APTMS-modified SiO<sub>2</sub>/Si substrate (right panel,

strong green fluorescence). The homogenous, uniform fluorescence image indicates the excellent modification of FITC-aptamers on the SiO<sub>2</sub>/Si surface. The modification of DNA-aptamers on a SiNW-FET can also be examined by measuring the shift in the source-drain current vs. gate voltage ( $I_{sd}-V_g$ ) curves. As depicted in Fig. S8B, the shift of the  $I_{sd}-V_g$  curve after the DNA-aptamer modification is caused by a gating effect on the SiNW-FET due to the negatively charged DNA-aptamers, consequently increasing the conductance of the p-type SiNW-FET.

## S5. Electrical measurement

In the electrical measurements of SiNW-FETs (Fig. 1), the source-drain current vs. gate voltage ( $I_{sd}-V_g$ ) and the  $I_{sd}$  as a function of elapsed time ( $I_{sd}-t$ ) were acquired with a lock-in amplifier (Stanford Research System, SR830) at  $V_{sd} = 10$  mV, a modulation frequency of 79 Hz, and a time constant of 100 ms. In the biosensing measurements, the samples were dissolved in 0.1× PBS (Debye-Hückel length = 2.4 nm) allowing SiNW-FETs to effectively detect signals without severe electrolytic screening. The sample solution was either dropped directly onto the SiNW-FET devices, or delivered to the sensing devices through a polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic channel (6.26 mm (length) × 500 μm (width) × 50 μm (height)) driven by a syringe pump (KD-101, KD Scientific). A platinum electrode, immersed in the sample solution, was used as a solution gate with the voltage supplied by a data acquisition system (National Instruments, DAQ-NI2110) and was maintained at ground potential to minimize electrical noise throughout the real-time electrical measurements.<sup>S2-S11</sup>

## S6. Dissociation constant

The dissociation constant ( $K_d$ ) of the aptamer-DA complex was determined by a least-squares fit of the  $\Delta V_{g,DA}^{cal} - C_{DA}$  data (Fig. 3B) to the Langmuir adsorption isotherm model<sup>S2</sup>

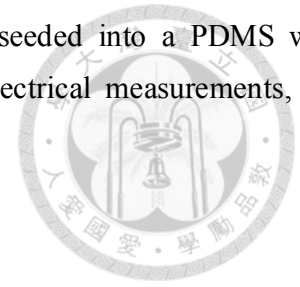
$$\frac{C_{DA}}{\Delta V_{g,DA}^{cal}} = \frac{1}{\Delta V_{g,DA}^{cal,max}} \cdot C_{DA} + \frac{1}{\Delta V_{g,DA}^{cal,max}} \cdot K_d, \quad (\text{Eq. S1})$$

where the relative  $\Delta V_{g,DA}^{cal}$  is defined as  $\Delta V_{g,DA}^{cal} (\%) = (\Delta V_{g,DA}^{cal} - \Delta V_{g,0}^{cal}) / \Delta V_{g,0}^{cal} \times 100(\%)$ ,  $\Delta V_{g,0}^{cal}$  is the calibrated response at  $C_{DA} = 0$  that induces no detectable signal, and  $\Delta V_{g,DA}^{cal,max}$  is the saturated calibrated response at high  $C_{DA}$ .

## S7. Culture PC12 Cells on SiNW-FET devices

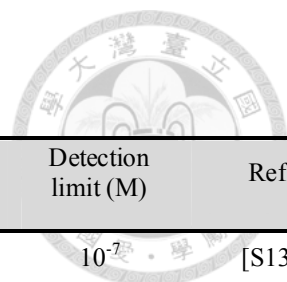
The PC12 cell line, derived from pheochromocytoma of the rat adrenal medulla, was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (containing 10% horse serum and 5% fetal bovine serum, Invitrogen) at 37 °C in an atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub>, and the medium was changed every other

day.<sup>S2,S12</sup> Cultured cells were re-suspended with Eagle's medium and reseeded into a PDMS well directly on the aptamer/SiNW-FET devices at 37 °C for 2 hr. Before electrical measurements, the cultured cells were gently washed with 1× PBS buffer three times.



### **S8. Oxygen reduced buffers**

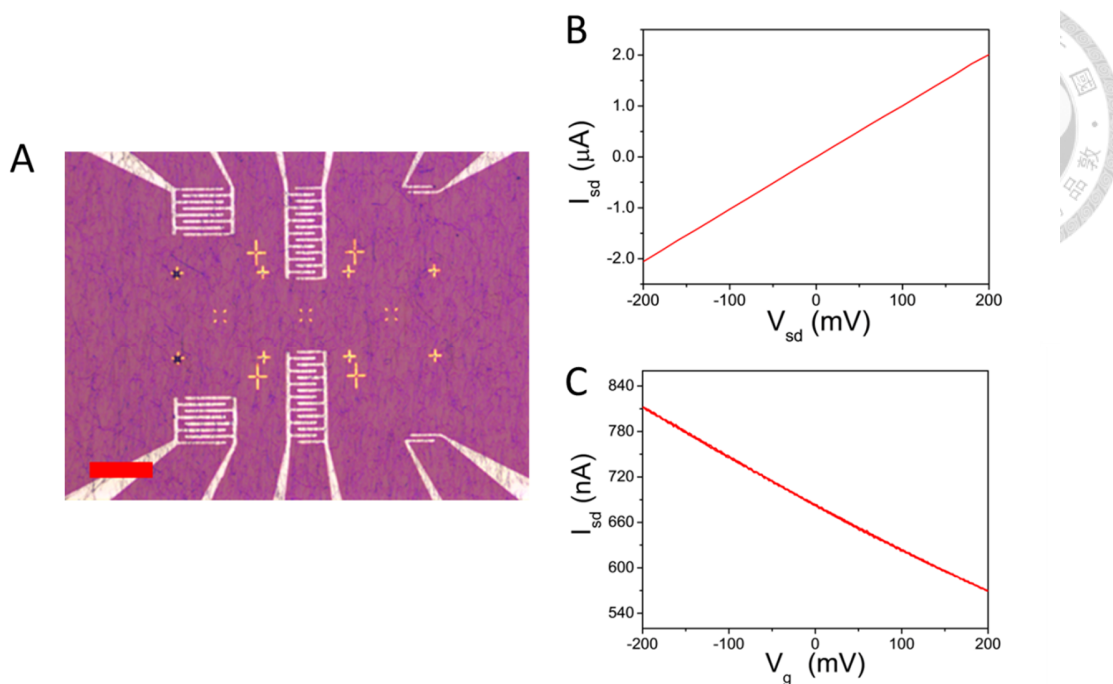
In this work, anaerobic buffer was prepared by continuously bubbling 0.1× PBS buffer, sealed in a clean glass flask, with pure N<sub>2</sub> gas (purity: 5N) through a steel needle for 15 min. Buffer prepared in this way is a fully deoxygenized buffer that does not oxidize reduced methyl viologen (blue) to the oxidized form (colorless). Subsequently, various C<sub>O2</sub> reduced buffers were prepared by volume-to-volume mixing the aerobic and anaerobic buffers.



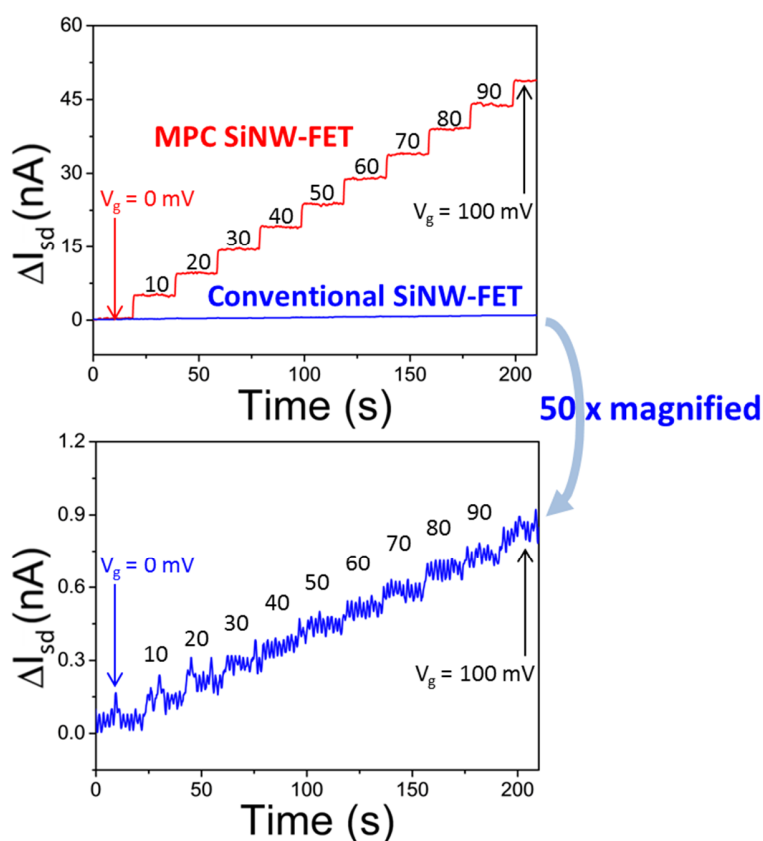
**Table S1. Comparison of the detection limits of various DA biosensors**

Biosensing technique	Material	Surface modification	Linear working range (M)	Detection limit (M)	Ref.
Electrochemical detection	Glassy carbon	TNT	$10^{-7} - 10^{-5}$	$10^{-7}$	[S13]
	PET	Au nanowires	$10^{-7} - 10^{-4}$	$10^{-8}$	[S14]
	Carbon fiber	Tyrosinase	$10^{-8} - 10^{-4}$	$10^{-9}$	[S15]
	ITO	CNT	$10^{-8} - 10^{-6}$	$10^{-8}$	[S16]
	Graphene	Porphyrin	$10^{-8} - 10^{-5}$	$10^{-8}$	[S17]
Field-effect transistor	SiNW	Aptamer	$10^{-11} - 10^{-8}$	$10^{-11}$	This work

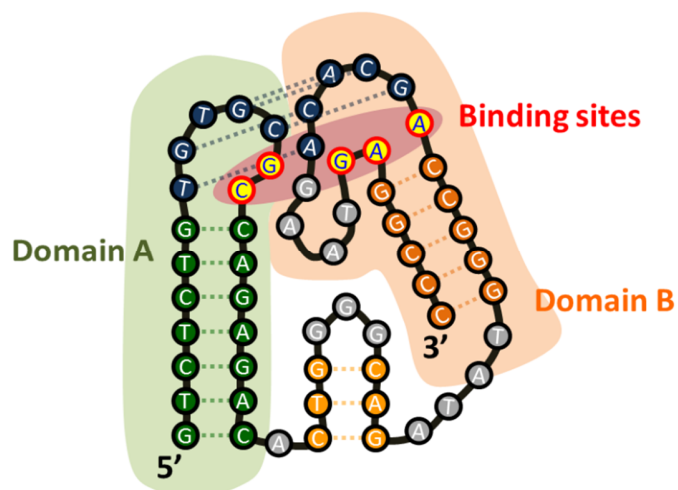
TNT: titanate nanotubes; PET: polyethylene terephthalate; ITO: indium tin oxide; CNT: carbon nanotube; SiNW: silicon nanowire



**Figure S1.** (A) Bright-field optical microscopy image of an MPC SiNW-FET device. Scale bar is 20  $\mu\text{m}$ . The FET device contains six pairs of FET units, where four FET units (at the left-side) consisting of comb-like electrodes (MPC-system) were employed for experiments, and the other two FET units (at the right-side) containing two parallel electrodes were used as a control for comparison. Each MPC-FET unit comprises hundreds of p-type single-crystalline SiNWs ( $\sim 20$  nm in diameter each) as conducting channels, which were connected by two sets of comb-like source and drain electrodes. (B) A representative plot of the measured source-drain current as a function of the bias voltage ( $I_{sd}$ - $V_{sd}$ ) shows that MPC SiNW-FETs form ohmic contacts. The  $I_{sd}$ - $V_{sd}$  curves were scanned in ambient condition with a digital multimeter (Keithley 6487). (C) The source-drain current vs. the gate voltage ( $I_{sd}$ - $V_g$ ) plot of a bare MPC SiNW-FET shows that the FET-device is of high transconductance with a typical value of  $>600$  nS as measured in  $0.1\times$  PBS buffer at  $V_{sd} = 10$  mV. The  $I_{sd}$ - $V_g$  measurement was conducted with a lock-in amplifier (Stanford Research System, SR830) at  $V_{sd} = 10$  mV, a modulation frequency of 79 Hz, and a time constant of 100 ms. The  $V_g$  was scanned with a data acquisition system (National Instruments, DAQ BNC-2110) via an Ag/AgCl reference electrode.

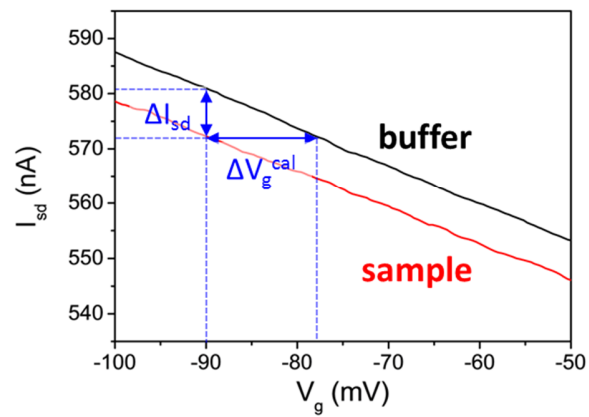


**Figure S2.** Comparison of the detection sensitivities of a MPC SiNW-FET (red trace) and a conventional SiNW-FET with a conducting channel consisting of only a single SiNW (blue trace). The  $\Delta I_{sd}$  vs. elapse time plots were measured as a function of applied (solution) gate voltage ( $V_g$ ). The  $V_g$  was applied through an Ag/AgCl reference electrode from 0 to 100 mV with an increasing rate of 10 mV/step. Signal acquisition of the electrical measurements was conducted with that lock-in amplifier described in S5. Relative to the measurement by conventional SiNW-FET, a significant improvement (more than 100-fold) in the S/N ratio of the signals measured by MPC SiNW-FET is clearly observed.

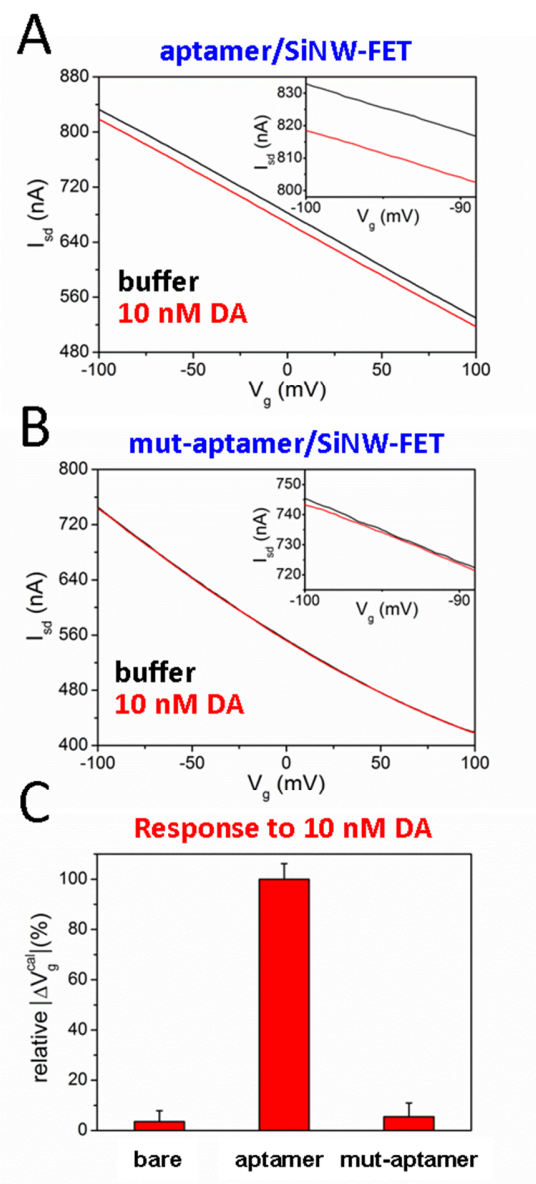


**Figure S3.** A schematic representation of the structure of the DNA-aptamer, which contains two major stem-loop domains (Domain A and Domain B) including five DA binding sites on the loops (2 on Domain A and 3 on Domain B). The interaction of the two loops is indicated by the blue dashed lines.<sup>S18</sup>

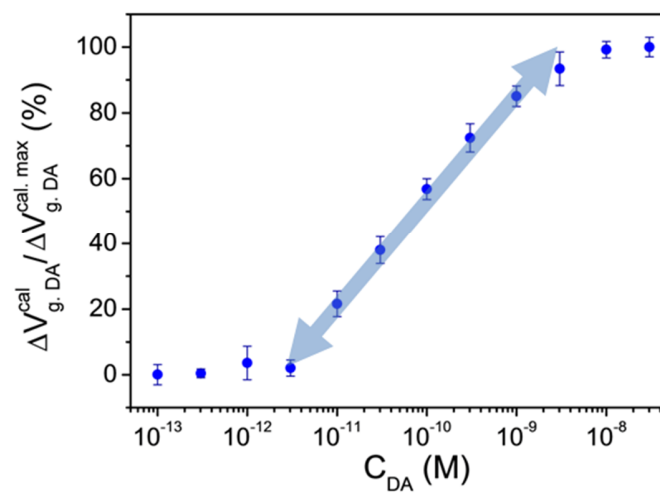




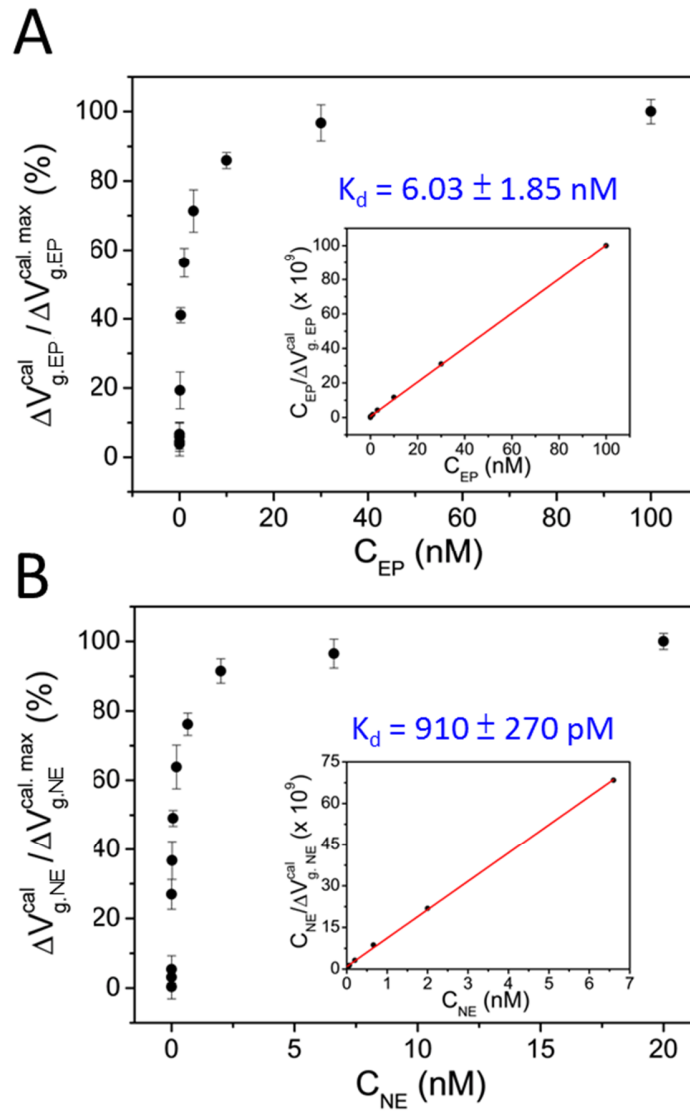
**Figure S4.** To avoid device-to-device variation in the detection sensitivity with different FETs, the measured current change due to the receptor-target binding ( $\Delta I_{sd}$  at  $V_g = -90$  mV, relative to the buffer solution) was converted to the change in  $V_g$  (termed the calibrated response and represented by  $\Delta V_g^{cal}$ ) according to the  $I_{sd}$ - $V_g$  transfer curve of the FET device used.<sup>S2,S19</sup>



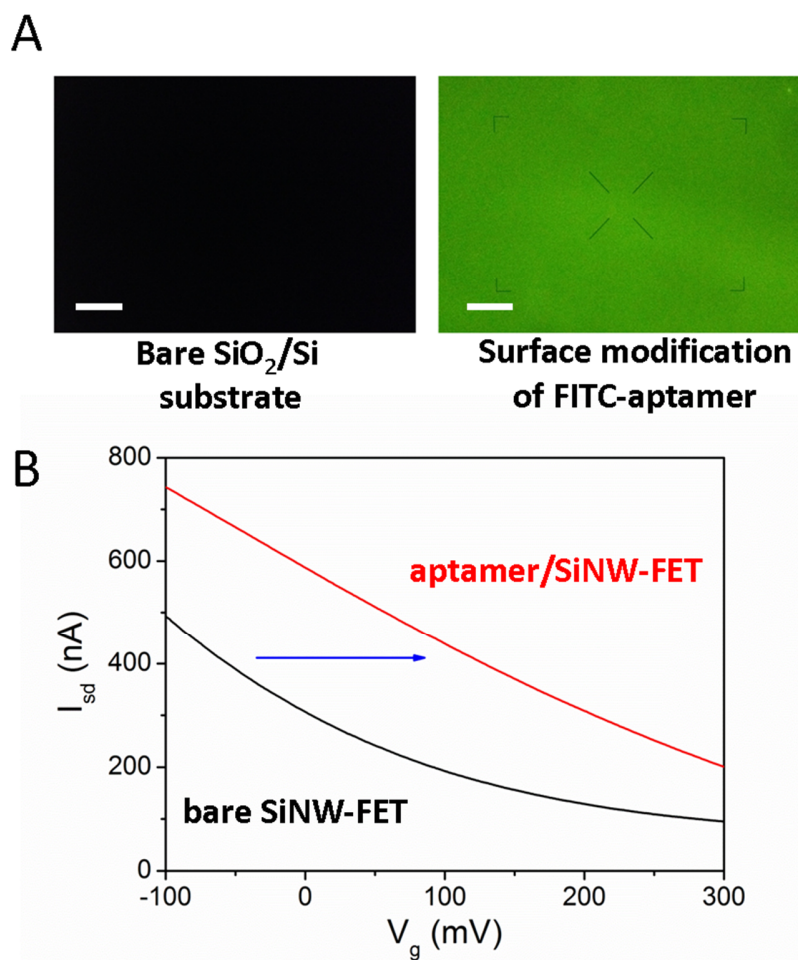
**Figure S5.** The  $I_{sd}$ - $V_g$  curves measured with (A) an aptamer/SiNW-FET and (B) a mut-aptamer SiNW-FET for the detection of 10 nM DA in 0.1× PBS buffer. (C) A comparison of the calibrated responses ( $\Delta V_g^{cal}$ ) of a bare SiNW-FET and a mut-aptamer/SiNW-FET to that of an aptamer/SiNW-FET (100%). The error bars present the standard deviations of three measurements. The sequence of the mutated aptamer is 5'-GTC TCT GTG TGC AAC AGA GAC ACT GGG GCA GAT ATG GGC CTG CAC AGA ATT TTGG CCC-3'.



**Figure S6.** A semi-log plot of  $\Delta V_{g,DA}^{cal} / \Delta V_{g,DA}^{cal,max}$  as a function of  $C_{DA}$ . The linear working range for detecting DA by aptamer/SiNW-FET spans from approximately  $10^{-11}$  to  $10^{-8}$  M, as marked by the double arrows.



**Figure S7.** (A) The plot of  $\Delta V_{g,EP}^{cal} / \Delta V_{g,EP}^{cal,max}$  as a function of  $C_{EP}$ . The inset shows a least-squares fit (to Eq. S1) of the measured  $C_{EP} / \Delta V_{g,EP}^{cal}$  vs.  $C_{EP}$  data to yield  $K_d = 6.03 \pm 1.85 \text{ nM}$  for the aptamer-EP complex. (B) Similar treatment gives  $K_d = 910 \pm 270 \text{ pM}$  for the aptamer-NE complex.



**Figure S8.** (A) Fluorescent images of a bare SiO<sub>2</sub>/Si substrate and a FITC-aptamer-modified SiO<sub>2</sub>/Si surface. (B) The  $I_{sd}$ - $V_g$  curves measured with a bare SiNW-FET (black trace) and an aptamer/SiNW-FET (red trace) in 0.1× PBS buffer. Scale bar is 100  $\mu$ m.

## REFERENCES

- (S1) Patolsky, F.; Zheng, G. F.; Lieber, C. M. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1711.
- (S2) Li, B. R.; Chen, C. W.; Yang, W. L.; Lin, T. Y.; Pan, C. Y.; Chen, Y. T. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 252.
- (S3) Lin, T. W.; Hsieh, P. J.; Lin, C. L.; Fang, Y. Y.; Yang, J. X.; Tsai, C. C.; Chiang, P. L.; Pan, C. Y.; Chen, Y. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 1047.
- (S4) Yang, Y. H.; Wu, S. J.; Chin, H. S.; Lin, P. I.; Chen, Y. T. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 846.
- (S5) Wang, C. W.; Pan, C. Y.; Wu, H. C.; Shih, P. Y.; Tsai, C. C.; Liao, K. T.; Lu, L. L.; Hsieh, W. H.; Chen, C. D.; Chen, Y. T. *Small* **2007**, *3*, 1350.
- (S6) Lin, S. P.; Pan, C. Y.; Tseng, K. C.; Lin, M. C.; Chen, C. D.; Tsai, C. C.; Yu, S. H.; Sun, Y. C.; Lin, T. W.; Chen, Y. T. *Nano Today* **2009**, *4*, 235.
- (S7) Lin, T. Y.; Li, B. R.; Tsai, S. T.; Chen, C. W.; Chen, C. H.; Chen, Y. T.; Pan, C. Y. *Lab Chip* **2013**, *13*, 676.
- (S8) Chang, K. S.; Sun, C. J.; Chiang, P. L.; Chou, A. C.; Lin, M. C.; Liang, C.; Hung, H. H.; Yeh, Y. H.; Chen, C. D.; Pan, C. Y.; Chen, Y. T. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 137.
- (S9) Chen, K. I.; Li, B. R.; Chen, Y. T. *Nano Today* **2011**, *6*, 131.
- (S10) Tsai, C. C.; Chiang, P. L.; Sun, C. J.; Lin, T. W.; Tsai, M. H.; Chang, Y. C.; Chen, Y. T. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 135503.
- (S11) Chiang, P. L.; Chou, T. C.; Wu, T. H.; Li, C. C.; Liao, C. D.; Lin, J. Y.; Tsai, M. H.; Tsai, C. C.; Sun, C. J.; Wang, C. H.; Fang, J. M.; Chen, Y. T. *Chem-Asian J.* **2012**, *7*, 2073.
- (S12) Tsai, C. C.; Hung, H. H.; Liu, C. P.; Chen, Y. T.; Pan, C. Y. *Plos One* **2012**, *7*, e33849.
- (S13) Liu, A. H.; Wei, M. D.; Honma, I.; Zhou, H. S. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 371.
- (S14) Hsu, M. S.; Chen, Y. L.; Lee, C. Y.; Chiu, H. T. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2012**, *4*, 5570.
- (S15) Njagi, J.; Chernov, M. M.; Leiter, J. C.; Andreescu, S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 989.
- (S16) Shi, B. X.; Wang, Y.; Zhang, K.; Lam, T. L.; Chan, H. L. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2917.
- (S17) Wu, L.; Feng, L. Y.; Ren, J. S.; Qu, X. G. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 57.
- (S18) Mannironi, C.; DiNardo, A.; Fruscoloni, P.; TocchiniValentini, G. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
- (S19) Ishikawa, F. N.; Curreli, M.; Chang, H. K.; Chen, P. C.; Zhang, R.; Cote, R. J.; Thompson, M. E.; Zhou, C. W. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3969.