

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

利用可重複使用之矽奈米線場效應電晶體

偵測小分子核糖核酸

Detection of MicroRNA with a Reusable Silicon

Nanowire Field-Effect Transistor



曾令瑋

Ling-Wei Tseng

指導教授：陳逸聰 博士

Advisor: Yi-Tsong Chen, Ph.D.

中華民國 101 年 6 月

June, 2012

謝誌

比起過去念書的日子，兩年的碩士的確是新的挑戰，回顧過去的那段日子，首先感謝指導老師陳逸聰教授給予我這個機會進入這間實驗室，並且從許多討論與溝通的機會，培養我們獨立思考與解決問題的能力，進而使我在面對生活或未來工作上擁有積極的態度。感謝林詩舜老師的指導，在實驗上總是能指引我們尋求解決困境的方向。再者更要謝謝一路教導我的凱莉學姊，除了實驗上給我好多的協助外，也適時提醒我處事的態度，雖然學姐先離開了實驗室，我也度過一段難熬的過渡期，不過我永遠不會忘記學姐這段日子給予的栽培。還有曾跟我同一組的耕慧學姐，你總是在我感到低落時對我伸出援手，陪我說說笑笑，想必是我們生日只差一天，所以才這麼心意相投吧。在原分所 322 和化學系 316 的日子，謝謝博仁學長、可欣學長、均達學長、怡穎學姐、建維學長、博任學長，你們不但在實驗上給予我協助，也如同哥哥、姊姊們般照顧我，帶給實驗室歡樂，真的非常慶幸能夠遇見各位。我最親愛的好麻吉婉鈴，謝謝妳從大學以來的一路扶持，有妳在我真的很安心，願我們將來都開心幸福。元錫、耀文、柏辰等學弟們，謝謝你們給我的鼓勵以及歡笑，未來你們也要加油，朝自己的理想大步邁進。最後也要謝謝生技所 411 的每個美女們的照顧，尤其是如天使一般的孟眉學姊，帶著我這門外漢做實驗，從你身上我學到好多，實在無法言喻我的感謝。當然，最要感謝的是一直陪伴著我的家人，從備取的失落、備取上的歡喜、直到實驗和生活上的點滴甘苦，都伴我走過，你們是我繼續努力的動力，為你們我會做更好的人！最後，是這些日子以來，當我垃圾桶的朋友們，謝謝你們在我身邊，認識你們真的是我的福氣。謝謝你們成就了現在的我。

摘要

小分子核糖核酸 (microRNA) 為非蛋白質編碼且含有 22 個核苷酸的核糖核酸分子，其對於目標 RNA 可進行分解或轉譯抑制，因此在動、植物中扮演重要的調控角色。研究指出，當植物受病毒入侵後，已存在於植物體中的 miRNA 能作為提前對抗感染的防禦機制，成熟 miRNA 所形成的 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 會將互補的目標病毒 mRNA 切斷，使病毒無法轉譯成蛋白質，進而達成防禦的目的。由於病毒感染植物後，特定 miRNA 的量會急遽增加，因此本論文中將藉由靈敏之矽奈米線場效電晶體 (silicon nanowire field-effect transistor, SiNW-FET) 來偵測特定 miRNA，以決定植物感染與否。此外在哺乳動物方面，近期研究發現 miRNA 的突變或過量表現與人類癌症有關，若抑制腫瘤之 miRNA 的生物合成步驟中有缺陷，或是會致癌的 miRNA 於不當時間或組織中過度增殖，皆會造成腫瘤的產生。因此，特定 miRNA 在癌症細胞及正常細胞中的數量會有所差異，且能作為生物標誌物。在本論文中，我們將使用 SiNW-FET 偵測 miRNA 生物標誌物，以作為一種早期診斷的方法。SiNW-FET 由於擁有極佳的靈敏度、高度選擇性、不需標記、以及即時偵測等優點，可廣泛的應用在生物及化學物種的偵測，包含蛋白質、核酸、小分子、和病毒等。首先，我們利用化學鍵結方法將 DNA 探針以雙硫鍵修飾於 SiNW-FET 表面，而後可藉由 DNA-RNA 雜交來偵測特定的目標 miRNA。當檢測結束後，以二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 將雙硫鍵切斷，便可再次進行偵測，而達成重複使用 SiNW-FET 元件的目的。檢測將分為三部分，首先測單一片段的合成 RNA，結果顯示 SiNW-FET 可以成功得藉由 DNA 作為檢測 RNA

的探針。接著，則自植物之總 RNA 中，偵測與植物葉片生長有關的 miR159 之特定 RNA，並以人類的總 RNA 作為控制組，實驗結果說明了 SiNW-FET 有良好的選擇性，能由不同片段的 RNA 中偵測到目標序列，並且證明 SiNW-FET 擁有重複使用的能力，再現性佳。最後，我們選擇乳癌生物標誌物之一的 miR21，作為目標來比較癌細胞和正常細胞。在高濃度下，由於目標物在 SiNW-FET 表面達到飽和，因而難以區別癌細胞與正常細胞，但當濃度逐漸降低後，即可觀察出 miR21 在癌細胞中的量，明顯比正常細胞來的多。此說明 SiNW-FET 的高靈敏度，在低濃度下偵測能力不減，且能顯著分辨致病與健康的樣品。由以上實驗得知 SiNW-FET 不但提供了很好的平台來偵測 miRNA 的生物標記，並可作為診斷植物致病與癌症樣品的有效工具。



關鍵字：矽奈米線場效電晶體；生物感測器；小分子核糖核酸；癌症生物標誌物。

Abstract

MicroRNAs (miRNA) of around 22 nucleotides and long non-protein-coding RNAs can play an important regulatory role in animals and plants by targeting mRNA for cleavage or translational repression. Recent research finding shows that miRNAs, which had already existed in a cell before viruses invaded, help to serve as an advanced preparation to counteract infection. Viral mRNA might be regulated by the cleavage directed by miRNA-programmed RNA-induced silencing complex (RISC). Since plant virus infections resulted in a dramatic increase in miRNA, we detected specific miRNA with a sensitive silicon nanowire field-effect transistor (SiNW-FET) biosensor to confirm if the plant was infected. In addition, recent studies have evidenced that miRNA mutation or mis-expression is responsible for various human cancers. The reduction or deletion of some significant miRNAs, acting as tumor suppressors, might lead to the tumor formation during miRNA biogenesis. The amplification or overexpression of the specific miRNA at inappropriate time or in wrong tissues would also result in tumor formation. Therefore, different amounts of specific miRNA from cancer cells and normal cells could make miRNA act as a biomarker for cancer diagnosis. In this study, SiNW-FETs were utilized to detect a specific miRNA biomarker for early cancer diagnosis. Based on its high sensitivity and selectivity, real-time response, and label-free detection capabilities, SiNW-FET has been widely used in a variety of detections, including protein, nucleic acid, small molecules, and virus.

Here, we immobilized DNA probes on the SiNW-FET surface via a disulfide linker, which was then applied to detect target RNAs through DNA-RNA hybridization. After detection, dithiothreitol (DTT) was employed to cleave the disulfide linker, concurrently removing the DNA-RNA complex and allowing for the SiNW-FET device reusable. Our experiments show that a DNA-modified SiNW-FET is able to probe target miRNAs from a cocktail solution, such as the detection of miR159 in total RNA extracted from leaves. Moreover, the reusable SiNW-FET has made it possible to fast screen various target RNAs by easily replacing different DNA probes. Finally, miR21, a biomarker of breast cancer, was selected as the target sequence to diagnose cancer and normal cells. However, it was difficult to distinguish cancer cells from normal ones at high sample concentrations, because of the binding saturation on the SiNW-FET sensing device. Fortunately, distinction became apparent as the concentration decreased, where the amount of miR21 from cancer cells was measured to be more than that from normal cells. As a conclusion, a SiNW-FET modified with specific DNA probes not only provides an excellent platform for miRNA biomarker detections, but also exhibits the potential in biomedical applications for early cancer diagnosis.

Keywords: silicon nanowire field-effect transistor, biosensor, microRNA, cancer biomarker.

目錄

謝誌	I
摘要	II
Abstract	IV
目錄	VI
圖目錄	VIII
表目錄	X
簡稱用語對照表	XI
第一章 序論	1
1-1 感測小分子核糖核酸 (microRNA) 之研究目標	1
1-1.1 小分子核糖核酸在動、植物內之機制	1
1-1.2 研究動機與實驗構思	7
1-2 以奈米場效電晶體作為生物感測器	10
1-2.1 發展簡史	10
1-2.2 應用與發展	15
第二章 實驗方法	21
2-1 矽奈米線場效電晶體的製作	21
2-2 表面修飾	25
2-3 樣品製備	27
2-3.1 緩衝溶液與二硫蘇糖醇 (DTT)	27
2-3.2 去氧核糖核酸 (DNA) 探針	30
2-3.3 核糖核酸 (RNA) 樣品	30
2-4 電性量測系統	36
2-5 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)	39

第三章 實驗結果與討論.....	43
3-1 表面修飾證明.....	43
3-2 電性量測與即時定量聚合酶連鎖反應結果.....	45
3-2.1 單一片段合成核醣核酸檢測.....	45
3-2.2 植物樣品檢測.....	47
3-2.3 癌細胞檢測.....	50
第四章 結論.....	53
參考文獻.....	54



圖目錄

圖 1-1 miRNA 的生物合成步驟與機制	3
圖 1-2 植物 miRNA 對病毒感染的防禦機制	5
圖 1-3 腫瘤抑制 miRNA 與致癌的 miRNA 致病原因	6
圖 1-4 以 SiNW 生物感測器研究 PNA 偵測 DNA	8
圖 1-5 以 SiNW 生物感測器偵測 miRNA	8
圖 1-6 奈米物質與生化分子尺寸之示意圖	10
圖 1-7 NMOS 和 SiNW 示意圖	12
圖 1-8 Top-down 以及 Bottom-up 的製程步驟	13
圖 1-9 蛋白質間交互作用	16
圖 1-10 DNA 雜交研究	17
圖 1-11 腫瘤檢測	18
圖 1-12 可重複使用之 SiNW-FET	19
圖 1-13 三維 SiNW-FET	20
圖 2-1 SOI 晶片截面圖	22
圖 2-2 SOI 晶片外觀與放大圖	22
圖 2-3 網絡式 SiNW-FET 截面圖	23
圖 2-4 網絡式晶片外電極設計圖及放大圖	23
圖 2-5 p-型矽奈米線場效電晶體之 I-V _g 圖	24
圖 2-6 可重複使用之 SiNW-FET 實驗流程圖	26
圖 2-7 DTT 結構式和反應機構	29
圖 2-8 癌細胞 MCF-7 與健康細胞 M10	32
圖 2-9 細胞計數板	34

圖 2-10 PDMS 微流體通道的母模與示意圖	36
圖 2-11 實驗裝置	37
圖 2-12 實驗系統架設	38
圖 2-13 水解探針 (hydrolysis probe) 作用方式	40
圖 2-14 RT-PCR 基本原理	41
圖 3-1 螢光晶片示意圖與實驗結果	44
圖 3-2 合成 RNA 電訊號圖	45
圖 3-3 合成 RNA 的 RT-PCR 結果	46
圖 3-4 SiNW-FET 和 RT-PCR 偵測菸草及人類細胞中 miR159 序列	48
圖 3-5 針對 miR159 序列和 miR168 序列所做的 RT-PCR	49
圖 3-6 不同濃度下偵測癌細胞和正常細胞中 miR21 序列	51
圖 3-7 針對 miR21 序列對不同濃度的細胞樣品作 RT-PCR	52



表目錄

表 2-1 反轉錄反應中所含的各反應物體積	42
表 2-2 定量聚合酶連鎖反應中所含的各反應物體積	42



簡稱用語對照表

RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
RISC	RNA-induced silencing complex
SiNW-FET	Silicon nanowire field-effect transistor
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilane
MBS	3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester
MPTMS	3-mercaptopropyltrimethoxysilane
DTT	dithiothreitol
MOSFET	metal-oxide-semiconductor field effect transistor
S/N	signal to noise ratio
λ_D	Debye-Hückel screening length
PDMS	polydimethylsiloxane
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

第一章 序論

1-1 感測小分子核糖核酸 (microRNA) 之研究目標

1-1.1 小分子核糖核酸在動、植物內之機制

1993 年，Victor Ambros 與他的研究團隊發現一段控制線蟲幼蟲成長的 *lin-4* 基因，其產物並非蛋白質，而是生成小片段的核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 分子^{1,2}。並且他們也發現到此 *lin-4* RNAs 擁有在 *lin-14* 基因 3'端非轉錄區多個位置互補的反股，這會使 *lin-4* RNA 對 *lin-14* 產生抑制的行為，因而在沒有明顯改變 *lin-14* 訊息 RNA 的水平下降低 *LIN-14* 蛋白的表現量^{2,3}，這些小型的調控 RNA 即為小分子核糖核酸 (microRNA 或 miRNA)。MiRNA 為約 22 個核苷酸的內源單股 RNA 分子，其在動、植物中藉由針對訊息 RNA (messenger RNA, mRNA) 的切割或抑制轉譯而扮演重要的調控角色，且它為非編碼 RNA，因而無法轉譯成蛋白質。近來，已知的 miRNA 功能包含細胞增殖與細胞死亡的調控、蒼蠅 (fly) 的脂肪代謝、線蟲 (nematode) 的神經分化、哺乳類造血譜系分化 (hematopoietic lineage differentiation) 的調控、以及植物葉片與花朵生長的控制⁴等。

圖 1-1 (a) 為 miRNA 的生物合成步驟⁵。首先，miRNA 基因會先在細胞核中經由 RNA 聚合酶 II (ribonuclease II) 轉錄成較長的初級 miRNA (primary miRNA) 產物，且自行摺疊成莖環結構。此初級 miRNA 再被核糖核酸酶 III 切割而成為前導 miRNA (precursor miRNA)，接著一些蛋白質會將其帶出細胞核至細胞質中。接下來一種稱作 Dicer 的核糖核酸酶 III (ribonuclease III) 把前導 miRNA 切割成約 22 個核苷酸的 miRNA: miRNA* 的雙股分子，且 miRNA* 會被降解掉 (星號通常表示為降解股)。脫離雙股結構的成熟 miRNA 會和多種

蛋白質形成 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC)，而此複合體便可依其所攜帶的 miRNA 與具互補序列的目標 mRNA 連接，並進行其功能。

對目標進行切割或抑制轉譯兩種反應機制，取決於 miRNA 和其目標的互補程度高低¹：若 miRNA 和目標序列並非完全互補，則會抑制目標基因的蛋白質轉譯；如果和目標 mRNA 完美互補，則會將此段 mRNA 切斷 (圖 1-1 (b)和(c))。分解 mRNA 的機制常發生於植物體中，但大部分哺乳動物的 miRNA 通常則是進行轉譯抑制⁶。且在抑制轉譯的機制中，miRNA 只會降低目標基因轉錄後表現出的蛋白質量，並且幾乎不影響 mRNA 的數量。



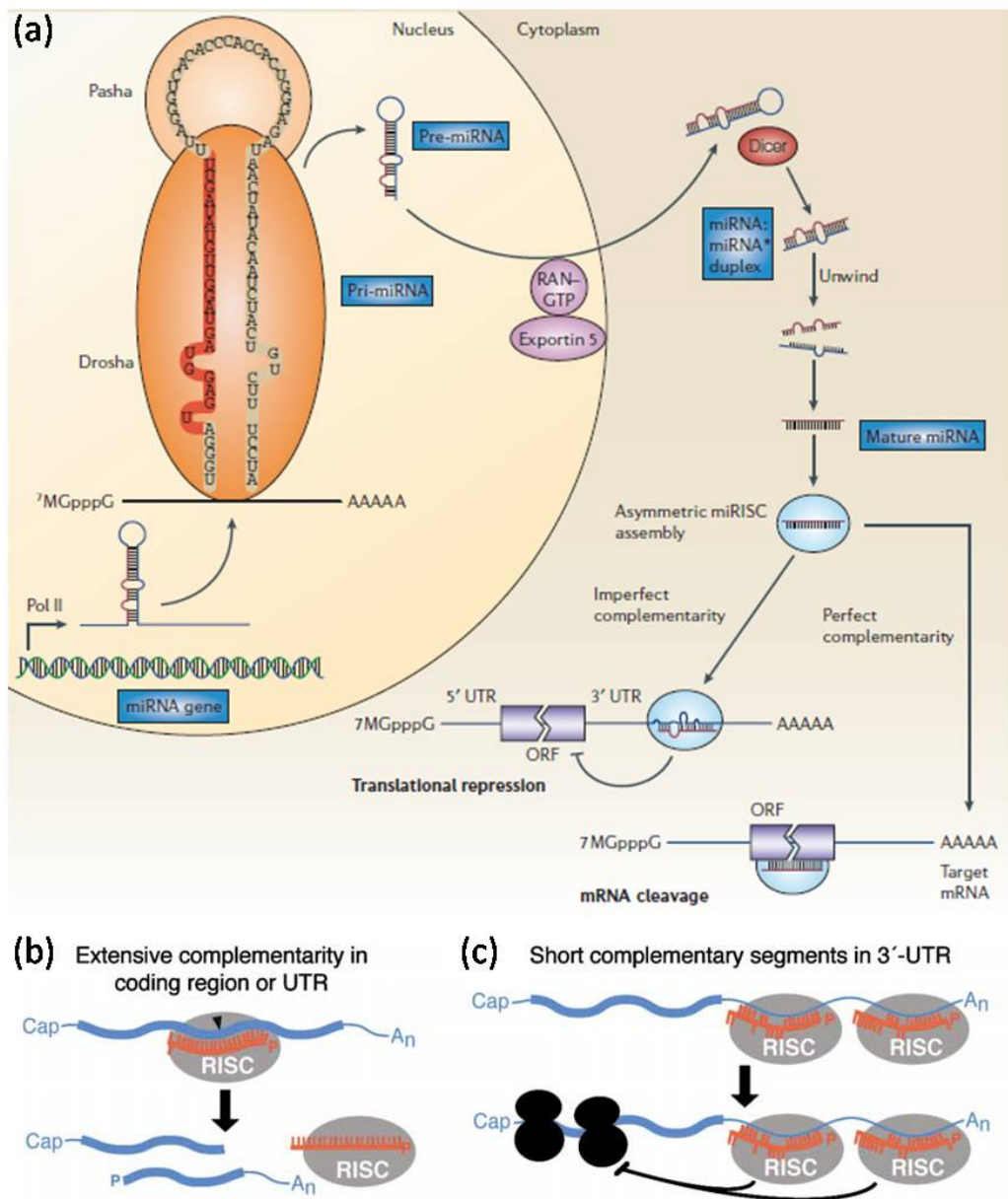


圖 1 - 1 (a) miRNA 的生物合成步驟。miRNA 基因會先在細胞核中經由 RNA 聚合酶 II 轉錄成較長的初級 miRNA (pri-miRNA)，再被核糖核酸酶 III 切割而成為前導 miRNA (pre-miRNA)，並被帶至細胞質中。接下來 Dicer 把 pre-miRNA 切割成約 22 個核苷酸的 miRNA:miRNA* 的雙股分子，並降解 miRNA*。脫離雙股結構的成熟 miRNA 會和多種蛋白質形成 RISC，而此複合體便可依其所攜帶的 miRNA 與具互補序列的目標 mRNA 連接，並進行其功能。(b) miRNA 分解特定 mRNA。(c) miRNA 抑制特定 mRNA 轉譯。^{1, 6}

以下將分別介紹 miRNA 在植物內與癌症中扮演的角色與作用機制。

(a) 植物的 miRNA

在演化過程中，受病毒感染的原始植物演化出一系列的機制對抗病毒感染，其中一種便是基因沉默 (gene silencing)。在植物中發現的原始基因沉默類似須完全互補的同源型基因沉默 (homology-dependent gene silencing)，此機制最早發現於受菸草花葉病毒 (*Tobacco mosaic virus*) 感染的植物中⁷，作為抵禦入侵的方法，然而由於病毒易突變使得此策略的效率不高。演化過程裡，短干擾 RNA (short-interfering RNA, siRNA) 基因沉默成為一種保護遺傳密碼的機制，當病毒入侵，會進行複製並傳播至鄰近細胞中，此時寄主植物啟動 siRNA 沉默機制來對抗病毒 RNA，調控其表現量，並且經病毒移動的路徑傳遞沉默信號⁸，此特點可賦予對周圍細胞的免疫接種⁹。然而此機制只會發生在植物被感染後，植物防禦信號和病毒間的傳遞競爭，結果無法預測，因此需要一個主動的機制。內源的 miRNA 即存在這種預備的特性，在植物受病毒入侵時，已存在於植物體中的 miRNA 能作為提前對抗感染的防禦機制，成熟 miRNA 所形成的 RISC 複合體會將互補的目標病毒 mRNA 切斷，達成防禦目的 (圖 1-2)⁵。miRNA 和目標 RNA 之間允許有三個或更多的鹼基非互補 (mismatch)，如此可以擴大目標的範圍，且易使 RISC 複合體和被分解的目標 RNA 分離，增加反應的速率。某種程度來說，miRNA 沉默作用被當作 siRNA 沉默作用的救援機制，且這兩個不同的機制對目標 mRNA 的破壞會彼此合作。

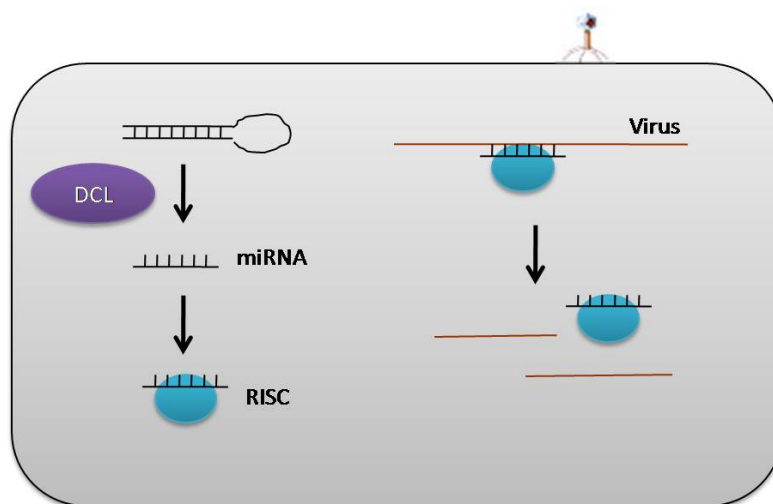


圖 1 - 2 植物 miRNA 對病毒感染的防禦機制示意圖。在植物受病毒入侵時，已存在於植物體中的 miRNA 所形成的 RISC 複合體會將互補的目標病毒 mRNA 切斷，達成防禦目的。

(b) 癌症與 miRNA

miRNA 的表現與許多癌症有相關，這些基因被認為是腫瘤抑制子 (tumor suppressor) 或是致癌基因 (oncogene)，近期研究指出，絕大部分人類 miRNA 位於和癌症有關的基因組區域內，此表示 miRNA 在癌症發展的過程扮演了關鍵的功能¹⁰。身為腫瘤抑制子的 miRNA 會因為生物合成的步驟中產生缺陷，使得成熟的 miRNA 減少而使得目標致癌蛋白不當增生而造成腫瘤的產生。另一方面，致癌的 miRNA 在不當時間或組織中增殖，會消滅 miRNA 目標腫瘤抑制基因的表現，進而造成癌症發生。兩者 miRNA 失調的結果包含細胞不正常增殖、損害增加或新生血管的增生，並且降低細胞凋亡及組織的去分化 (圖 1-3)⁶。特定的 miRNA 失調會造成不同的腫瘤發生，例如本論文中所採用的 miR21 在許多腫瘤中皆有過度增殖的現象，如乳癌細胞；而 miR143 和 miR145 在大腸癌組織中則是表現量降低¹¹⁻¹³。

由於下列因素，miRNA 成為理想的癌症生物標記物，來作為偵測癌症的有利工具¹⁴：

1. 癌症組織中，特定的 miRNA 表現量會異常。
2. miRNA 的表現擁有病症特定性或組織特異性。
3. miRNA 是相對穩定的分子。

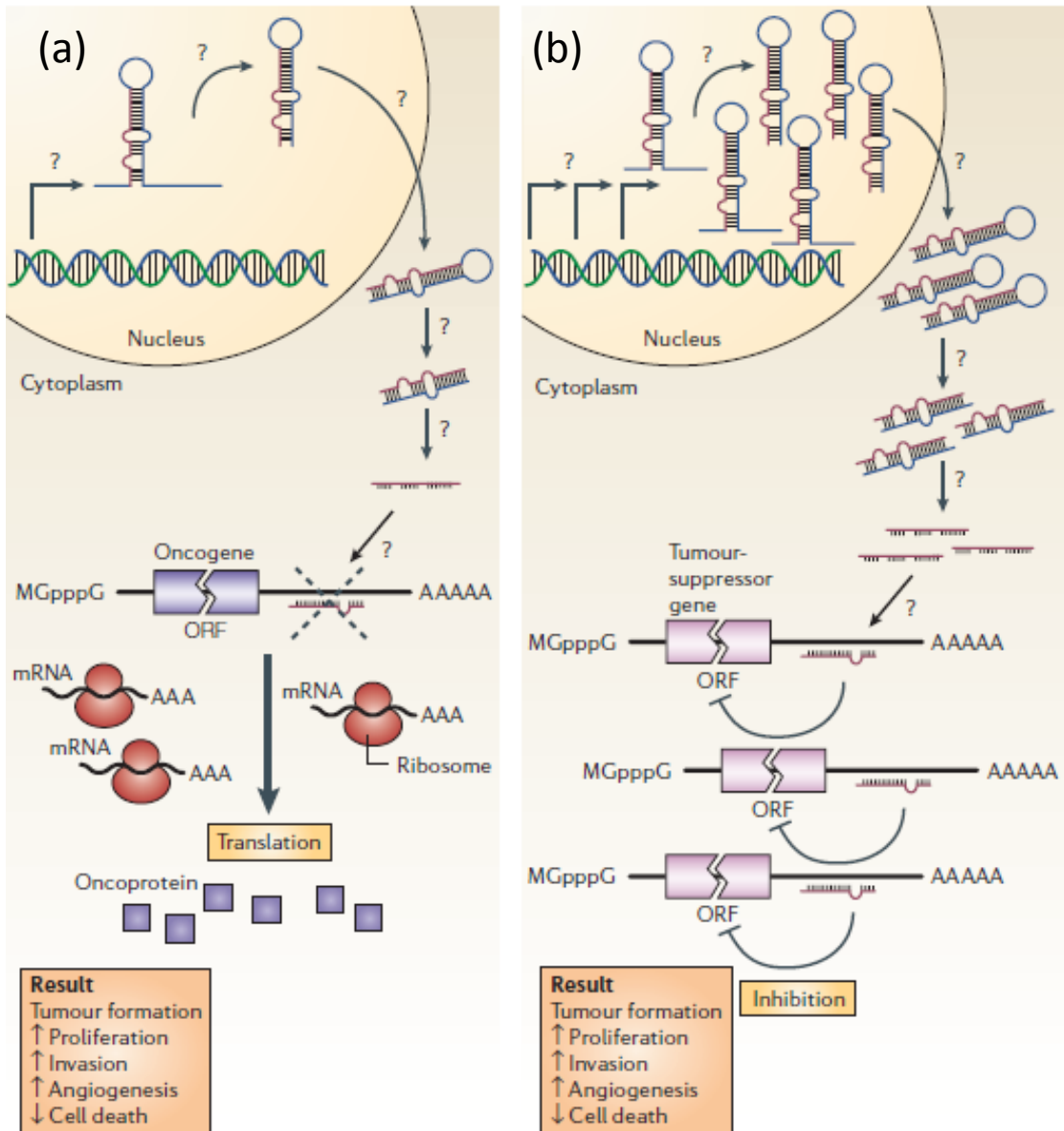


圖 1 - 3 (a) 腫瘤抑制 miRNA 在生物合成步驟產生缺陷而造成腫瘤。

(b) 致癌的 miRNA 在不當時間或組織中增殖造成腫瘤的產生。⁶

1-1.2 研究動機與實驗構思

於上一節中提到，植物受病毒感染後，特定 miRNA 的量會急遽增加以進行防禦機制¹⁵；此外，某些特定的致癌 miRNA 明顯的增加或抑制腫瘤的 miRNA 減少，皆會造成人體內的癌細胞生成⁵。因此，本實驗希望利用偵測 miRNA 作為快速診斷病毒感染以及癌細胞樣品的方法。

在以往偵測 miRNA 的方法中，常利用的方法為微陣列 (microarray) 或北方點墨法 (Northern blot)¹⁶，然而這些技術一般需要較多的樣品量，且還要加入其他反應試劑，提升了實驗的複雜度¹⁷。隨著奈米科技的成長，發展出擁有極佳的靈敏度、高度選擇性、不需標記、以及即時偵測等優點的矽奈米線場效電晶體 (silicon nanowire field-effect transistor, SiNW-FET)，廣泛的應用在生物及化學物種的偵測上。在早期的研究中，利用與 DNA 結構類似的中性分子肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA)，修飾在矽奈米線表面，用來偵測 DNA (如圖 1-4)，其結果顯示此技術可以輕易的自電訊號中區分正常以及突變的序列¹⁸。

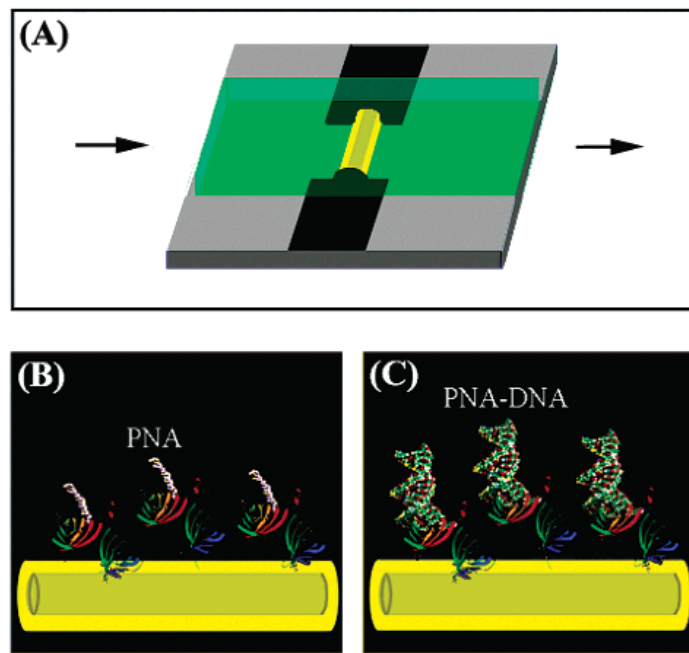


圖 1 - 4 利用微流體通道 (綠色區域) 依箭頭方向，流經 SiNW (黃色標記) 表面固定上 PNA，以便偵測特定 DNA¹⁸。

接著，在另一項研究中，將表面修飾有 PNA 的 SiNW 作 miRNA 的偵測 (圖 1-5)，其發現此項技術具有對非互補 RNA 的選擇性，並且指出當 DNA 取代 PNA 作為探偵時，其與 RNA 結合所產生的導電度會明顯下降，原因是 DNA 和 RNA 彼此的負電荷所造成的排斥¹⁹。

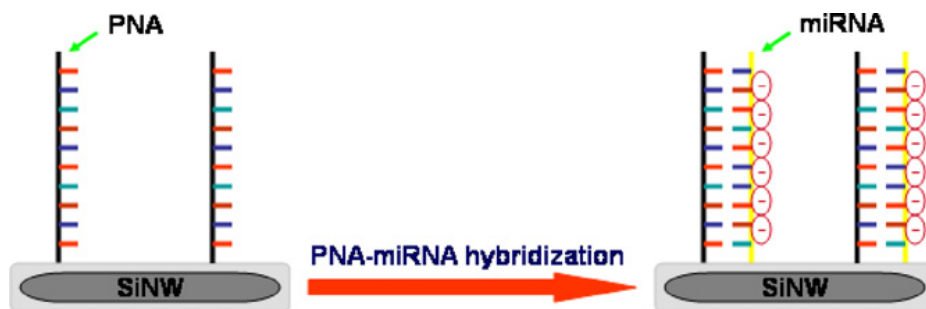


圖 1 - 5 在 SiNW 生物感測器表面修飾上 PNA 偵測 miRNA¹⁹。

在本論文中，雖然 PNA 的不帶電性質易於和 RNA 作結合，不過其合成成本較高，不易作為診斷的工具，因此仍選擇 DNA 當作偵測特定 miRNA 的探針。此外，將 DNA 固定在感測器表面，一般會使用 APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) 和 MBS (3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester) 修飾在 SiNW 上，使 DNA 與矽奈米線表面以化學鍵結固定。然而經上述方式修飾後的元件只具有一次使用性，不但浪費，若將表面完全清除再次修飾，更會傷害元件。因此在本實驗使用 MPTMS (3-mercaptopropyltrimethoxysilane) 取代 APTMS 的修飾，並改以帶有硫醇基 (thiol group) 的 DNA 作探針，使表面與 DNA 之間形成雙硫鍵 (disulfide bond)。當偵測結束時，以二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 分子流經元件表面，可將雙硫鍵切斷，恢復成硫醇基 (thiol group) 的表面，即可再次修飾新的 DNA，繼續下次的檢測。因此，本論文希望藉由可重複使用的 SiNW-FET，作為偵測 miRNA 的生物標記，並可作為診斷植物致病與癌症樣品的有效工具。

1-2 以奈米場效電晶體作為生物感測器

1-2.1 發展簡史

生物定量及分析對於生物醫學應用與細胞偵測極其重要，而電化學感應器由於能夠將生物資訊直接轉換成電訊號，使偵測更為方便且快速，因此提供一個絕佳的平台來分析生物樣品中的組成。電化學感測器之材料與方法的研究已歷經數十年，在過去二十年中，如量子微粒、奈米粒子、奈米線、奈米管和奈米薄膜等奈米材料已被用於奈米級感測器的研發中。尺寸在1 - 100 nm大小的奈米物質與核酸、蛋白質、病毒以及細胞等生物分子的大小相近 (圖1-6)²⁰，因此對於這些生物分子所造成的作用會特別顯著。此外，由於這些奈米物質尺寸縮小，而擁有較大的表面積對體積比 (surface-to-volume ratio)，讓表面的原子決定了物性、化性甚至是電子性質。再者，有些奈米物質的表面易進行化學修飾，例如矽奈米線表面的二氧化矽 (SiO₂)，而適合用於奈米級感測器的應用²¹。

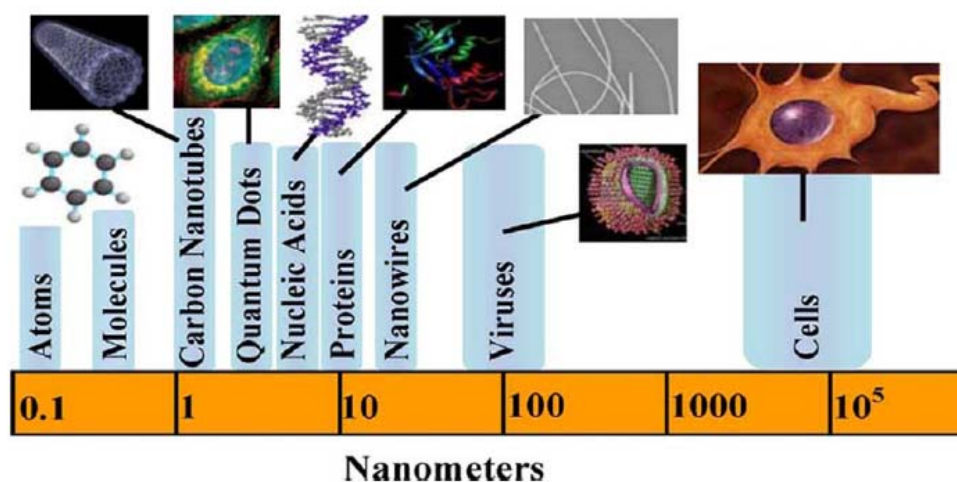


圖 1 - 6 奈米物質與生化分子尺寸之示意圖²⁰。

至目前為止，許多奈米級感測技術已應用於生物研究及應用，生物監測系統需要快速且精確的偵測，因此絕佳靈敏度、特異性、快速樣品傳遞、和低成本等特點就被考慮進奈米級感測器的設計和製程中，而場效應電晶體 (field-effect transistor, FET) 因可將表面受體分子與目標分子作用的資訊轉換成易讀取的電訊號，而適合作為感測器。

FET擁有三個電極，分別為源極 (source)、集極 (drain)、以及閘極 (gate)，源極與集極間為半導體通道，而通道的大小受閘極所控制，調控源極和集極之間的電流大小。FET的種類依閘極的結構來區分，最常見的稱為金氧半場效電晶體 (metal-oxide-semiconductor field effect transistor, MOSFET)，大多使用於電腦與通訊相關的電子設備中，閘極是由金屬、氧化層和半導體依序疊在一起所形成類似電容的結構 (氧化層當作介電質)，現代的半導體技術能在矽晶圓表面形成結構緻密的二氧化矽 (SiO_2) 層，而且介面的品質可以有效的被控制，故MOSFET元件均以矽晶圓作基板材料。MOSFET依導通用的載體可分成利用電子流工作的n通道MOS (n-channel MOSFET, NMOS) 和利用電洞流來工作的p通道MOS (p-channel MOSFET)。圖1-7(a) 為n型金氧半場效電晶體 (NMOS) 的截面圖，若於閘極慢慢加上正電壓，閘極的金屬導體會堆積一些正電荷，而氧化層另一邊則會吸引等量的負電，使得靠近氧化層的p型半導體內形成通道，此時載子數目增加使通道加寬，造成源極和集極間電流增加；相反的，若在閘極施以負電壓則會使電流減少。

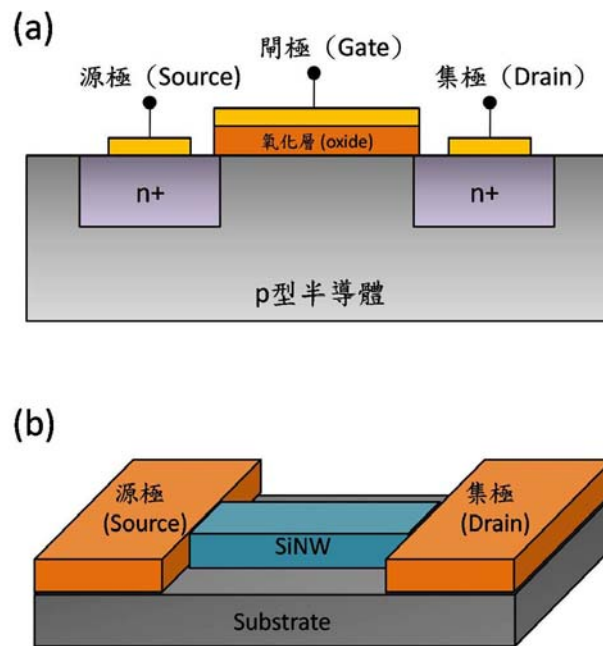


圖 1 - 7 (a) n型金氧半場效電晶體 (NMOS) 示意圖。
(b) 奈米線場效電晶體 (SiNW) 示意圖。

在本論文中所使用的為SiNW-FET，如圖1-7(b)所示，其工作原理和MOSFET相似，差別在於以矽奈米線取代傳統MOSFET的二維材料，並可藉由參雜 (doping) 不同的元素來控制通道的載子種類²²。由於SiNW-FET元件具有一維載子通道的性質，外界分子在閘極所施加的電場較能貫穿通道，而非侷限在表面的區域，因此造成的電場效應會遠大於二維平面FET。

SiNW-FET有兩種主要製程方法，分別是由上至下 (top down) 和由下到上 (bottom up)，如圖1-8所示²¹。Top-down的方法是藉由黃光顯影 (lithographic) 技術結合電子束 (electron beam) 蝕刻來定義SiNW-FET；而bottom-up則是先合成矽奈米線後，再經由光顯影或電子束顯影法來合成電極並完成元件。

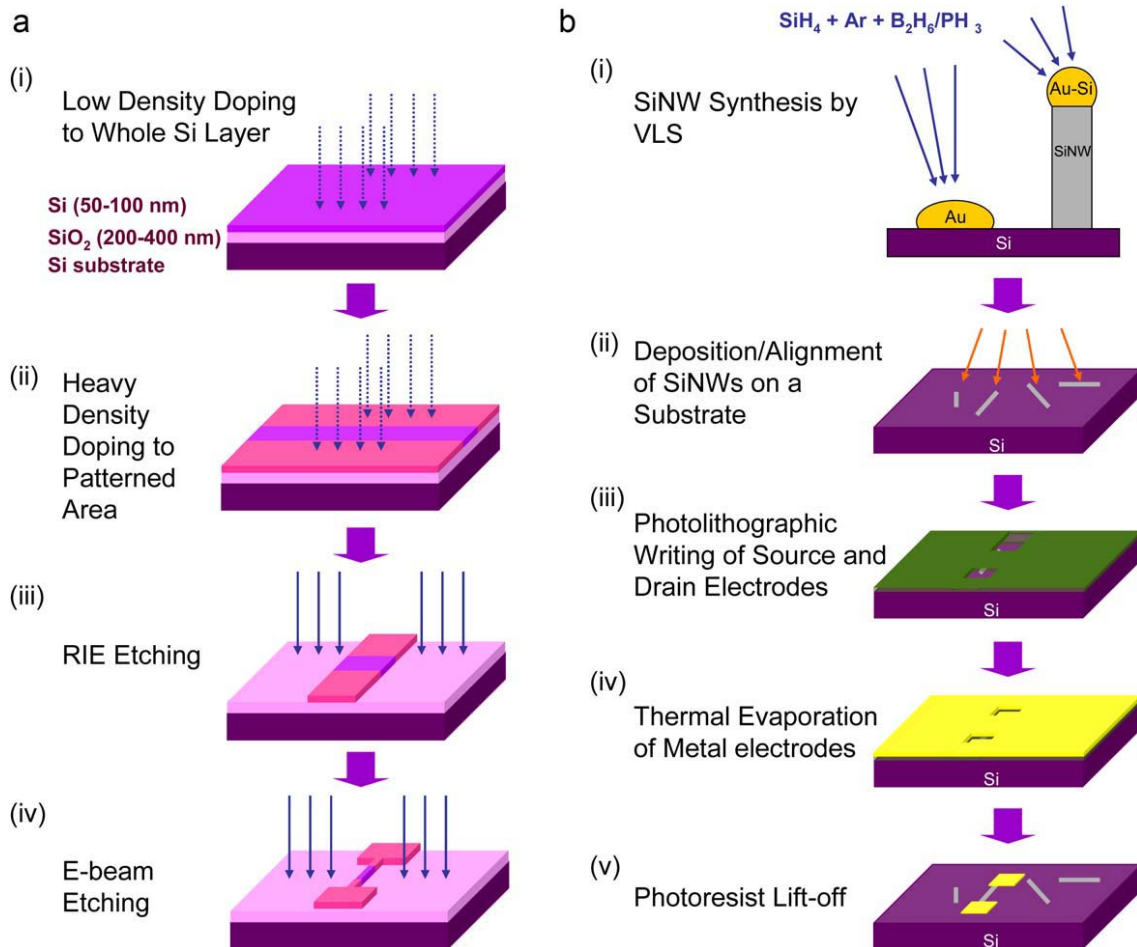


圖 1 - 8 (a) Top-down 製程流程：(i) 在矽層摻雜低密度的硼或磷；(ii) 以光罩定義電極位置，並高度摻雜於此區域；(iii) 以 RIE 蝕刻出微米級的電極；(iv) 以電子束蝕刻成奈米級 SiNW。

(b) Bottom-up 製程流程。(i) 以 CVD-VLS 機制合成 SiNW；(ii) 將 SiNW 鋪於晶片表面；(iii) 光罩定義出電極位置；(iv) 熱蒸鍍沉積金屬於晶片表面；(v) PG remover 除去光阻完成電極。²¹

圖 1-8(a) 為傳統 top-down 製程 SiNW-FET 的步驟。首先會在矽層摻雜低密度的硼 (boron) 或磷 (phosphorous)，參雜的種類與比例會決定其為 n 或 p 型半導體及其性質，接著在光罩 (photomask) 設計的電極位置施以高密度摻雜來定義源極和集極，並且以反應式離子蝕刻 (reactive ion etching, RIE) 完成電極與奈米級的矽奈米線，最後利用熱蒸鍍法 (thermal evaporation) 製作背向閘極 (back-gate)，並於晶片正面的矽奈米線上鍍上絕緣層。相較於 bottom-up 的製程，top-down 方法由於要仰賴高解析度的光顯影技術而變得較為複雜，因而需選用電子束顯影法等昂貴的設備來製備。此外，此方法所製作出的矽奈米線最小寬度僅約為 100 nm，因此克服這兩項缺點成為 top-down 製程首要的課題。不過利用此方法製造出的元件較穩定且再現性高，具有較高的耐用度，而能與現今工業製程接軌。

Bottom-up 的製程中(圖 1-8(b))，先以化學氣相沉積法 (chemical vapor deposition, CVD)經由氣-液-固 (vapor-liquid-solid, VLS)²³ 的生長機制合成矽奈米線，此合成步驟通常會利用金屬奈米粒子催化矽奈米線的生長，且金屬奈米粒子大小還決定了矽奈米線的粗細。合成出的矽奈米線接著會懸浮在乙醇溶液中，並且散佈於矽基底的表面。此時，兩層光阻 (LOR3A 和 S1805) 以旋轉塗佈 (spin coating) 的方式覆蓋於矽基底表面，透過光罩定義出電極位置，再以熱蒸鍍法在源極和集極位置鍍上金屬。最後以去光阻劑 (remover PG) 移除光阻層，即完成製作步驟。比起 top-down 的製程，以 bottom-up 的方法合成出的矽奈米線擁有高結晶度、可調控摻雜密度、可控制矽奈米線上氧化層薄度、以及易掌控其直徑大小的優點。然而基底上的矽奈米線可能呈現性質無法完全均一，會造成元件的良率不易掌控，使此因素成為工業應用發展上的限制。

1-2.2 應用與發展

如何有效率及穩定的將生化分子與奈米元件整合為一重要議題，而 SiNW-FET 可以利用共價鍵 (covalent bond) 或是靜電作用力 (electrostatic force) 等固定化技術，將生物受體 (receptor) 修飾在矽奈米線表面，接著利用分析物本身所帶的電荷作為閘極電壓，即可進行免標記、高靈敏度及高選擇性的即時偵測。近年來，SiNW-FET 已成功廣泛運用於蛋白質間交互作用的偵測、DNA 雜交研究、檢測生物體之病毒感染、監控腫瘤細胞、即時記錄神經細胞電訊號等，而 SiNW-FET 的發展也達成可重複使用的目的，並且設計出三維的 SiNW-FET。接下來將分別介紹 SiNW-FET 的應用與發展。



1. 蛋白質間的交互作用

一般蛋白質間的結合常數 (association constant, K_a) 約在 10^6 - 10^9 M^{-1} ，較抗體與抗原結合之 $K_a > 10^9$ M^{-1} 要微弱的多，而不易測量，因此希望發展出一個快速且能準確檢測蛋白質間交互作用的方法。近年研究發展出可重複使用的 SiNW-FET，作為蛋白質交互作用的偵測平台，其方法將鈣調素 (calmodulin, CaM) 修飾在矽奈米線表面，偵測鈣離子及可和 CaM 作用的蛋白質。結果 (圖 1-9) 說明利用 SiNW-FET 可證明系統具有選擇性 CaM 與 N-型閘門鈣離子通道 (voltage-gate Ca^{2+} channel, VGCC) 有直接交互作用，此外，研究中還利用穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 與穀胱甘肽轉移酶 (glutathione S-transferase, GST) 之可逆結合性質，將 SiNW-FET 重複使用以提高其實用性²⁴。

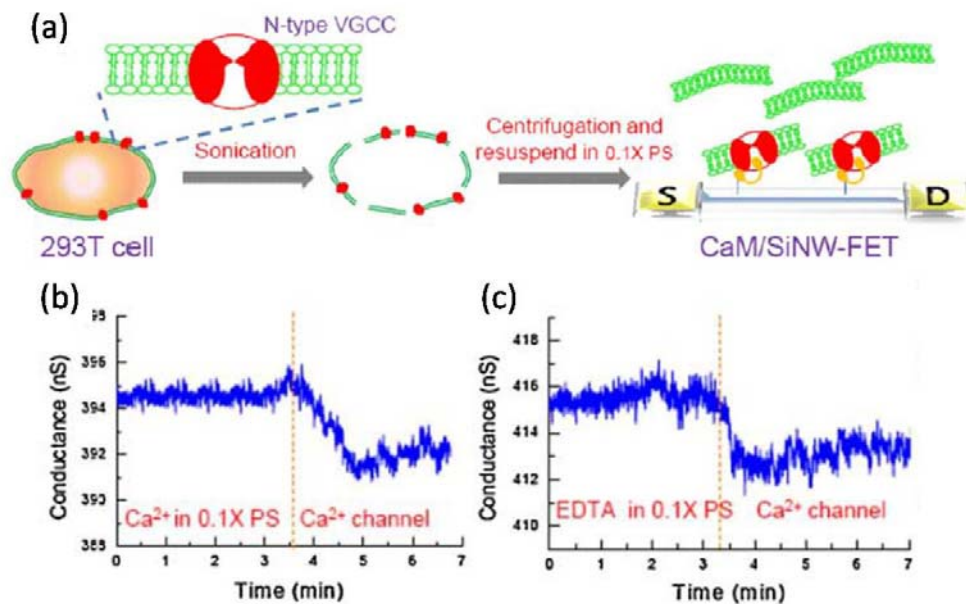


圖 1-9 利用 SiNW-FET 偵測 CaM 與離子及 N-型 VGCC 之交互作用。

(a) N-型 VGCC 經細胞表現與純化後，導入 SiNW-FET 量測。

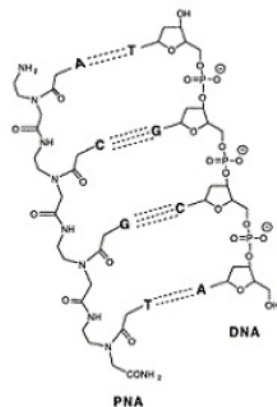
(b-c) N-型 VGCC 與 CaM 結合之電訊號圖。²⁴

2. DNA 雜交研究

除了針對蛋白質間相互作用的研究，SiNW-FET 亦可作為 DNA 或 RNA 的檢測工具。由於 DNA 或 RNA 的磷酸骨架帶有大量的負電荷，可利用感應電場作偵測，使 SiNW-FET 成為檢測 DNA 或 RNA 很有力的工具。肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 是一種與 DNA 相似的人工合成聚合物，常用於生物研究，特別是在 DNA 或 RNA 的雜交上。由於 PNA 不具有帶電的磷酸骨架，使 PNA-DNA 或 PNA-RNA 間沒有電荷的排斥力，結合能力比起 DNA-DNA 或 DNA-RNA 來的更大。在圖 1-10 中的研究將 PNA 修飾於 p-型 SiNW-FET 表面來做免標記的 DNA 即時偵測，由於 DNA 帶負電荷的磷酸骨架，可使 PNA-DNA 結合後導電度明顯增加²⁵。



(a)



(b)

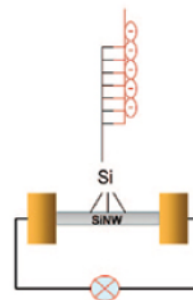


圖 1 - 10 (a) PNA 與 DNA 結合示意圖。(b) 實驗裝置。²⁵

3. 腫瘤檢測

生物標誌物 (biomarker) 是可用作指出特定疾病或生物體的生理狀態的生物分子，因此偵測特定生物標記物可作為某些疾病的篩檢。然而這類生物標記物在血液中的濃度極低，因此臨床檢驗上須要能夠快速且精準的診斷方式。近年有研究設計陣列形式的 SiNW-FET 以同時檢測多種腫瘤標誌物 (圖 1-11)，其由修飾三種不同抗體的 SiNW-FET 元件組成，且對應的三種抗原皆為臨床診斷的腫瘤標記物，分別為前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA)、癌胚抗原 (cancinoembryonic antigen, CEA) 以及粘蛋白-1 (mucin-1)。當有對應的抗原與抗體結合時，會造成 SiNW-FET 的導電度改變，即表示此檢體來源很可能為腫瘤病患。儘管 SiNW-FET 對腫瘤標記物的檢測很有效，然而血液樣品的生物汙染或量測時的非特異性鍵結皆可能影響偵測結果，此外血液中的高離子強度會使得 Debye-Hückel 長度變短，而造成 FET 量測時的遮蔽效應，因此對於 SiNW-FET，血液樣品的前處理會格外重要²⁶。

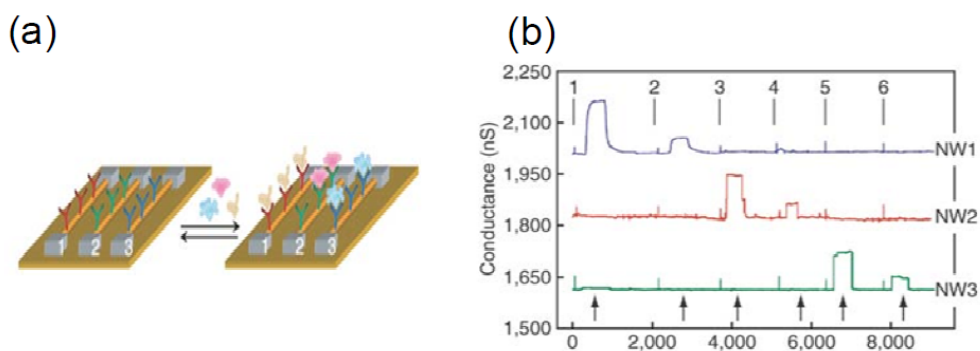


圖 1 - 11 (a) 利用修飾腫瘤標記物的 SiNW-FET 陣列檢測示意圖。

(b) 分別流入不同濃度的三種抗原所反應的電訊號圖。²⁶

4. 可重複使用之 SiNW-FET

進行 SiNW-FET 的量測時，通常將特定抗體修飾於元件表面上，以偵測相對應的特定抗原，然而抗體與抗原間的結合力很強，反應後很難將其完全清除，而無法重複使用同一晶片造成浪費與操作上的不便，因此便發展出以 GSH-GST 之可逆的系統設計，如圖 1-12 所表示。利用 GSH 和 GST 間可逆結合的性質，將 GSH 先修飾在 SiNW-FET 上，同時以基因重組技術在特定蛋白質接上 GST，此特定蛋白即可修飾在元件上，而後開始檢測可與其作用之物質。當量測完畢，以高濃度 GSH (≥ 1 mM) 清洗表面，便能再次修飾特定蛋白於元件上，進行下一次的檢測。採用這種方法可以達到定量檢測、快速有效的多次利用裝置而降低成本的目的²⁷。

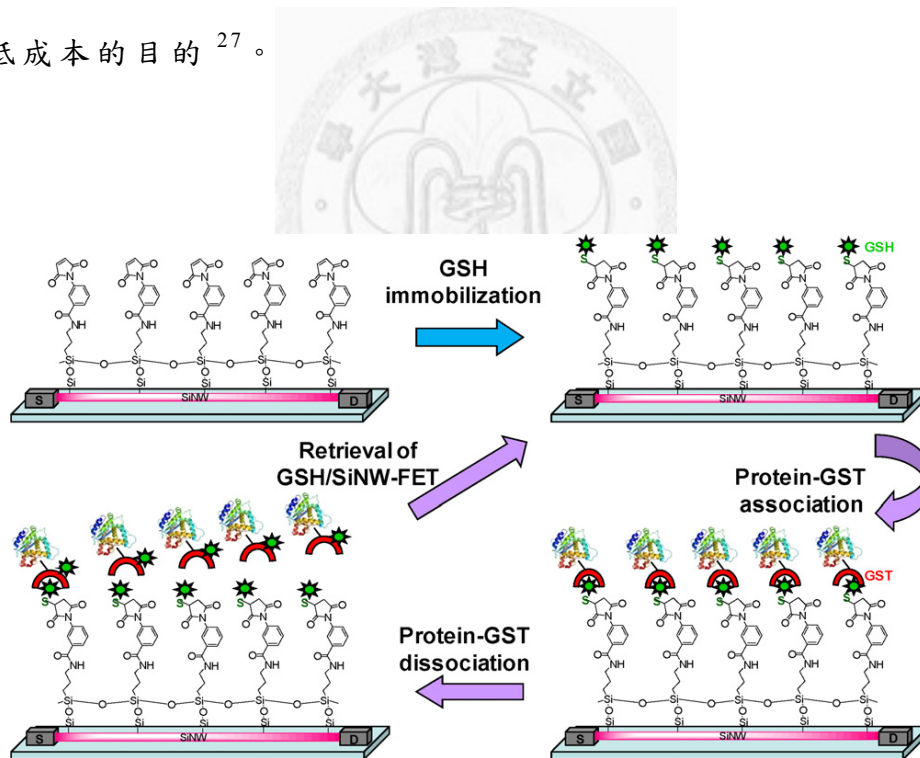


圖 1 - 12 可重複使用之 SiNW-FET²⁷。

5. 三維之 SiNW-FET

SiNW-FET 的裝置一般是設計在平面的基底上，使得不易偵測三維空間中樣品的訊息，因此需要一個可動式三維奈米場效電晶體，方可與細胞作接觸甚至細胞內部的測量。近期研究顯示，藉由改變反應壓力及反應氣體的組成，以 CVD 反應經過 VLS 的生長機制可以合成出彎曲的矽奈米線，並運用微電極製作技巧，設計出可動式三維 SiNW-FET (圖 1-13(a-c))。此外，在彎曲奈米線外修飾一層磷脂雙層膜，其便可無破壞性的進入細胞內，成功量測細胞內的電訊號 (圖 1-13(d-f))²⁸。

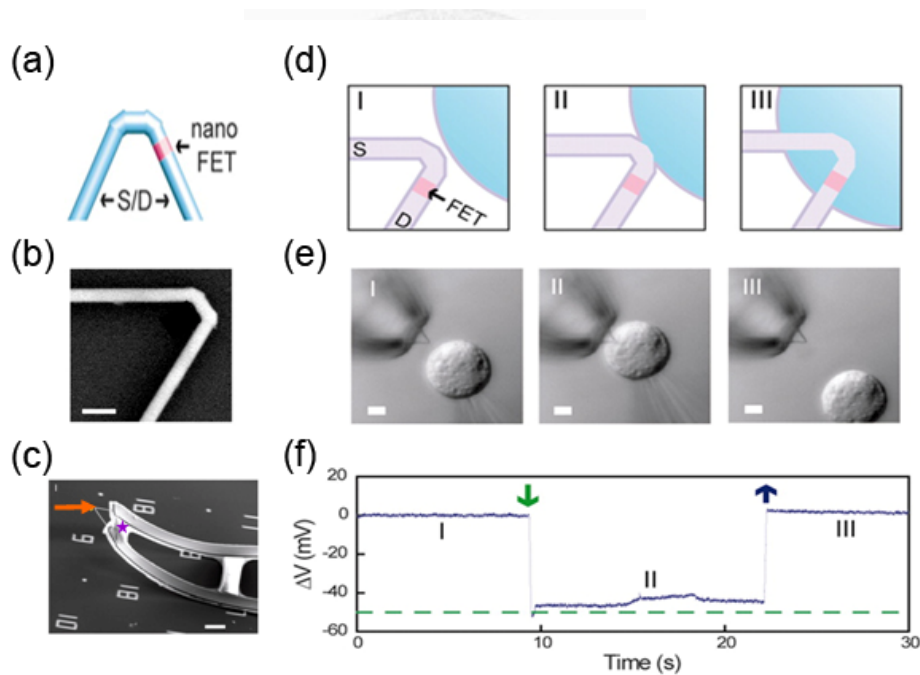


圖 1 - 13 三維 SiNW-FET 探針之 (a) 示意圖、(b) 掃描式電子顯微鏡影像 (scanning electron microscope, SEM)、與 (c) 光學顯微鏡影像。三維 SiNW-FET 探針進入細胞並偵測電壓之 (d) 示意圖、(e) 光學顯微鏡影像、及 (f) 電訊號圖。²⁸

第二章 實驗方法

2-1 矽奈米線場效電晶體的製作

本實驗所使用的感測晶片有兩種，其一是由中研院物理所陳啟東老師所提供以 top-down 方式製成的 n-型 SiNW-FET，而另一種是本實驗室於中研院奈米核心設施以 bottom-up 方式完成的 p-型 SiNW-FET。

以 top-down 方式製成的晶片材料採用四吋的 SOI (silicon-on-insulator) 晶圓：晶圓表面是 50 nm 厚的矽，而中間為 390 nm 的二氧化矽 (SiO_2) 絕緣層，晶圓最底層則是矽基底。首先在矽晶圓表面摻雜低密度 ($10^{15} \text{ atom/cm}^3$) 的磷 (phosphorous)，並以光罩定義電極位置。接著以離子植入技術 (ion implantation, 11 eV) 高度摻雜 ($10^{19} \text{ atom/cm}^3$) 於電極位置，植入深度約 40 nm，再用反應式離子蝕刻法 (reactive ion etching, RIE) 切割出電極部分，且以電子束微顯影製程技術 (electron-beam lithography) 和反應性離子蝕刻法將奈米級的矽奈米線蝕刻出來。而後置於 900°C 的氧氣環境下，熱處理 20 分鐘，使表面產生約 10 nm 厚的二氧化矽絕緣層，其不但可與水溶液絕緣，也易於進行後續的表面修飾步驟。此外，在電極位置會以熱蒸鍍法 (thermal evaporation) 鍍上 50 nm 金和 10 nm 鎳的金屬層，最後將晶圓切割成許多 $14 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$ 的晶片，即完成 SiNW-FET 的製作。圖 2-1 為 SOI 晶片的截面圖，奈米線寬度約 100 nm，而線與線之間約有 $2 \mu\text{m}$ 的距離；圖 2-2 則是 SOI 晶片的實際影像以及光學顯微鏡下的放大圖。

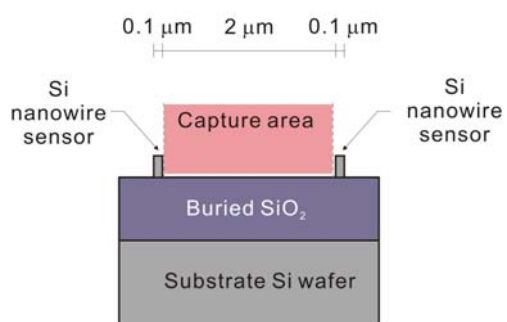


圖 2 - 1 SOI 晶片截面圖。

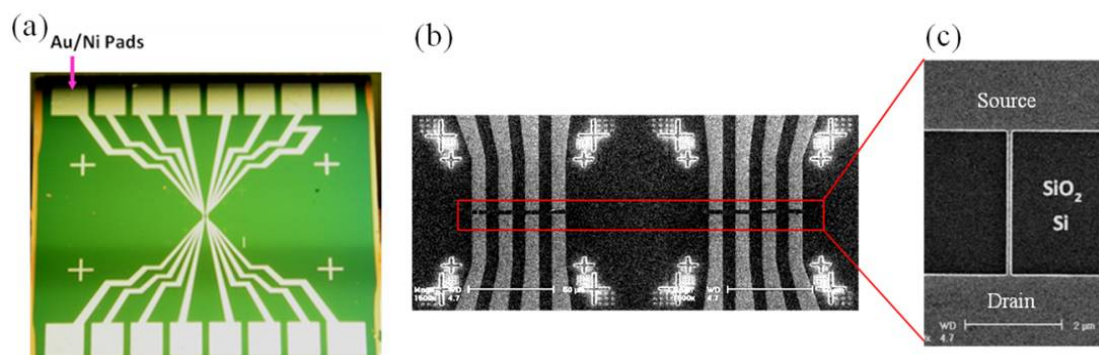


圖 2 - 2 (a) 14 mm × 14 mm 的 SOI 晶片。(b) 晶片中央 8 組元件放大圖。(c) 單根矽奈米線的 SEM 影像。

Bottom-up 的製程方法是參考 Lieber 等人發表於 Nature protocol 的參數²⁹和本實驗室改良過後的結果。首先在晶片上先製作 1.5 mm × 1.5 mm 大小的外部電極 (圖 2-4(a))，接著以氣-液-固三相化學氣相沉積法 (VLS-CVD)²³ 將金奈米粒子和矽烷 (silane) 在氧化矽的破片表面長出矽奈米線。含有矽奈米線的破片接著會被切割成合適的大小，並以氮氣槍輕吹表面後，將其以適當的力道將合成後的矽奈米線以接觸轉印 (contact printing) 的方式抹於晶片表面，最後用黃光顯影技術和熱蒸鍍方式完成內電極，並於電極表面鍍上一層鋁的防水層 (圖 2-3)。圖 2-4(b) 為實驗所使用的網絡式晶片，黃色區域是內電極，分別為一對、八對、和四對 source 和 drain 共 6 組電極，此多個平行電極的設計藉由並聯多根矽奈米線，能夠讓電流值增加、提高訊噪比 (signal to noise ratio, S/N)，達成靈敏的元件系統³⁰。



圖 2 - 3 網絡式 SiNW-FET 截面圖。

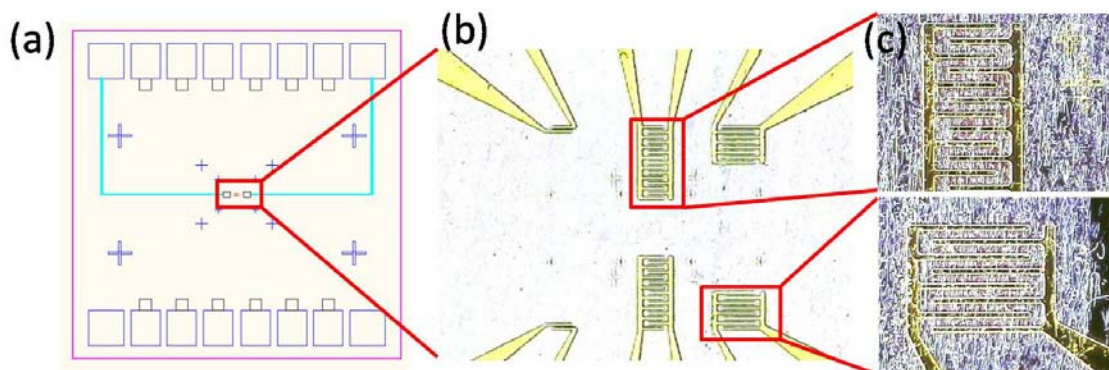


圖 2 - 4 (a) 網絡式晶片外電極設計圖。(b) 晶片內電極的放大圖。(c) 單獨一組電極的放大圖，白色細線為矽奈米線。

無論 n-型或是 p-型的 SiNW-FET，製作完成的元件，我們會藉由電阻或跨導 (transconductance) 的性質來判斷此元件是否可用。通常用 $I-V_g$ (圖 2-5) 表示元件的跨導 G : 在固定偏壓 (V_{sd}) 下，電流 (I_{sd}) 隨外場電壓 (V_g) 變化的改變量，即 $G = \frac{dI_{sd}}{dV_g}$ 。若此改變量高低表示元件對外場電壓的靈敏度，數值越高表示越靈敏，越適合進行偵測實驗的元件。量測時在源極與集極間施加 0.03V，再由參考電極自水閘門 (water gate) 給予 -0.5 V 到 0.5 V 的掃描範圍。施加正電壓時，因為矽奈米線的電洞排斥而使通道變窄，造成電流下降；反之，若給負電壓則電流增加。

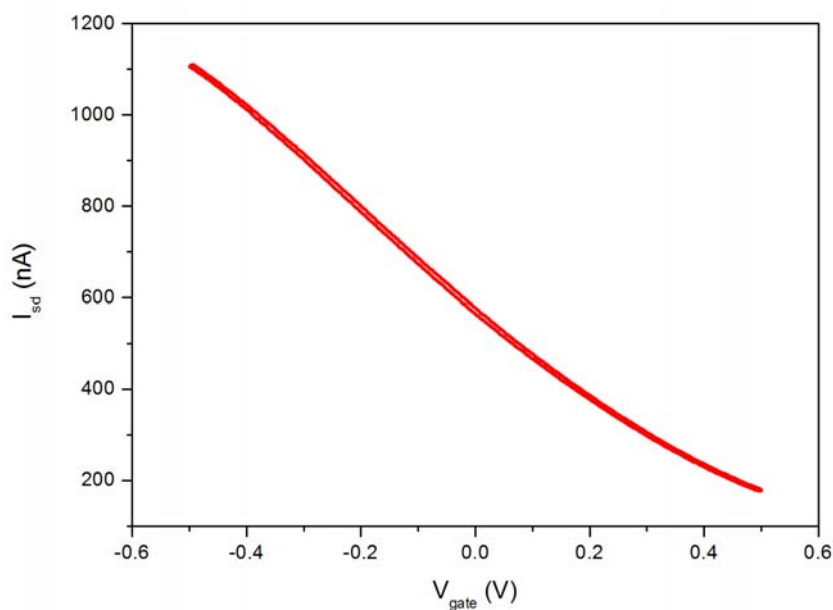


圖 2 - 5 p-型矽奈米線場效電晶體於水中之 $I-V_g$ 圖。

2-2 表面修飾

一般而言，通常 DNA 以化學鍵結的方式固定在修飾 APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) 以及 MBS (3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester) 的矽奈米線上，然而這個方法在一次測量後，元件只能將表面的修飾完全除去後才能進行重複使用，此舉多少會對矽奈米線表面的氧化層及防水層造成破壞，降低實驗的再現性，並且增加實驗操作的複雜度。

此實驗參考本實驗室先前的實驗技術，以 3-硫丙基三甲氧基矽烷 (3-mercaptopropyltrimethoxysilane, MPTMS) 和矽奈米線表面的矽醇 (silanol) 結合，使矽線表面成為巰基 (sulfhydryl group)。經由表面的巰基形成雙硫鍵，便能讓修飾有硫醇基的 DNA 固定在奈米線上，進而可偵測特定片段的互補 RNA。當偵測結束後，僅需要以弱還原劑二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 即可切斷 DNA 與奈米線的雙硫鍵，將表面的 DNA-RNA 雜交去除，恢復原先只有 MPTMS 修飾後的元件表面。藉此方法，我們便可在不傷害元件的前提下進行重複使用。

表面修飾詳細步驟 (圖 2-6)：

1. 首先使用氧電漿 (oxygen plasma) 以 30 瓦、50 sccm 清潔晶片 60 秒，將表面的有機物氧化成二氧化碳後去除。
2. 將清潔後的晶片於 1% 的 MPTMS 酒精溶液中浸泡 30 分鐘。由於硫醇基易氧化的特性，空氣下表面的硫醇基可能形成分子間的雙硫鍵或形成氧化硫，因此在修飾 DNA 探針前，先利用 DTT 還原確定表面為硫醇基，避免降低後續的修飾效率。
3. 自微流道流入 DNA 溶液，將 DNA 探針固定於元件表面，即可進行樣品偵測。完成偵測後，以 DTT 流經元件表面讓雙硫鍵斷裂，便可重複使用繼續下次偵測。

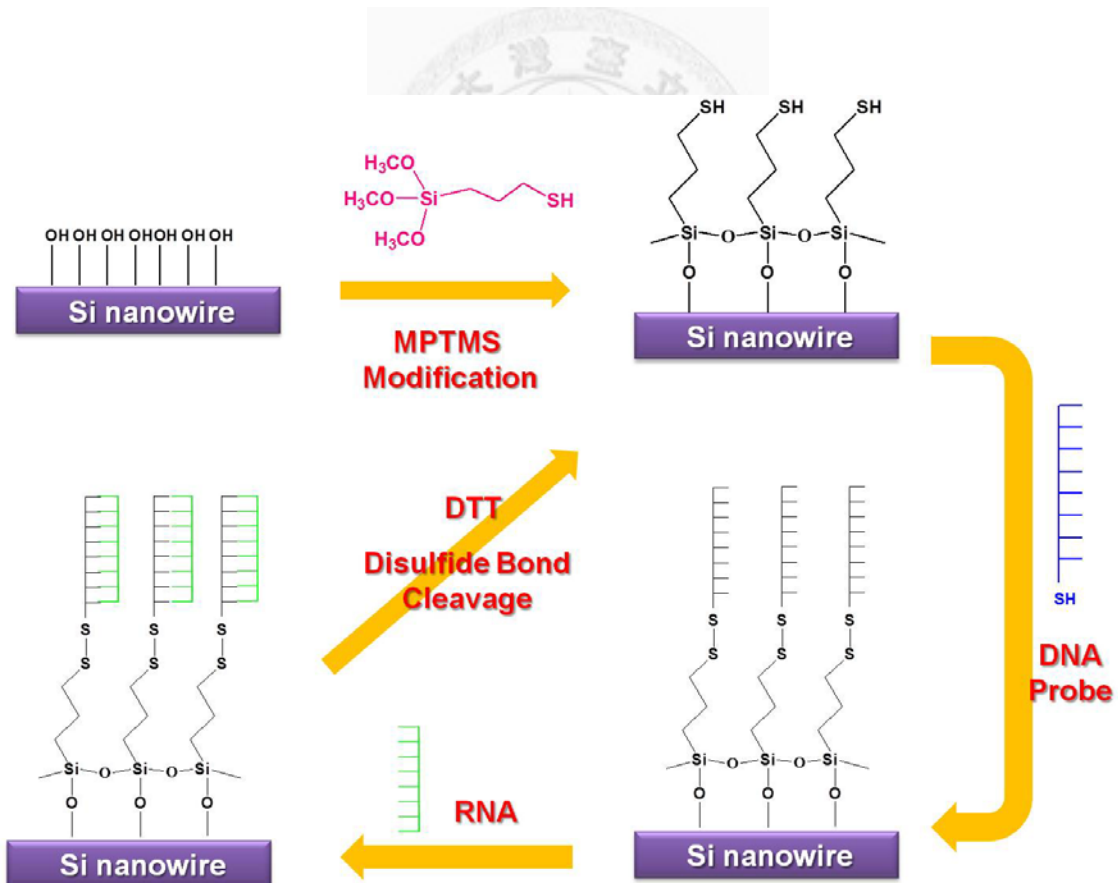


圖 2 - 6 可重複使用之 SiNW-FET 實驗流程圖。

2-3 樣品製備

2-3.1 緩衝溶液與二硫蘇糖醇 (DTT)

為了與生理條件相同的環境，本實驗使用的緩衝溶液為以單純含有磷酸共軛鹽，而無其他多餘鹽類調節滲透壓的基礎緩衝溶液 (phosphate buffer solution)，簡稱 PS 溶液。0.1× PS 配方：0.24 mM NaH_2PO_4 和 0.76 mM Na_2HPO_4 。此緩衝溶液以超純水配置而成，並以 1N NaOH 和 1N HCl 的標準液調至 pH 7.4。

SiNW-FET 測量時，緩衝溶液環境對 FET 感測表現有很大的影響。當溶液存在高濃度鹽類，接受器和分析物間造成 FET 電導改變的電場會因緩衝液的高離子強度 (ionic strength) 給部分遮蔽，因此會降低測量時的訊號強度，此即為 Debye-Hückel 屏蔽效應 (shielding effect)³¹。

FET 量測的電位 $V(r)$ 會因 FET 表面到接受器和分析物鍵結位置的距離 (r_{bs})，呈現指數變化，表示如下

$$V(r) \propto \frac{r}{\lambda_D}$$

λ_D 為 Debye-Hückel 長度，其定義為

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

其中 ϵ_0 為真空介電常數 (permittivity)， ϵ_r 為溶液介電常數， k_B 為波茲曼常數 (Boltzmann constant)， T 為絕對溫度， N_A 為亞佛加厥常數 (Avogadro's number)， e 是基本電荷， I 為緩衝溶液的離子強度，計算

方式為

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2,$$

C 為離子莫耳濃度 (molar concentration), Z 為離子電荷數 (charge number)。

由方程式了解電解質離子強度越強, λ_D 則越短, 使得對 FET 量測會造成越大的遮蔽效應。經由上述式子所算出不同緩衝溶液的 Debye-Hückel 長度:

	1× PBS	1× PS	0.1× PS
λ_D (nm)	0.7	1.9	6.1

在本實驗中, 由於 0.1× PS 的 λ_D 與 DNA 探針修飾高度 (6 nm) 差不多, 不易有遮蔽效應而能進行有效的量測。其他樣品處理皆使用此磷酸緩衝溶液 0.1× PS 作溶解或稀釋溶液, 且確保每個樣品的 pH 值皆於 7.4 的範圍中。

二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 是小分子的有機還原劑，圖 2-7(a) 為 DTT 分子結構，其還原態下為線性分子，被氧化後成為含有雙硫鍵的六圓環結構 (圖 2-7(b))。DTT 的還原力受 pH 值影響，在 pH 大於 7 時才能發揮其還原力，隨著 pH 值的降低，DTT 的有效還原力也隨之降低。本實驗裡，我們配製濃度為 5 mM 的 DTT，並將 pH 調整到 7.4 來進行反應。

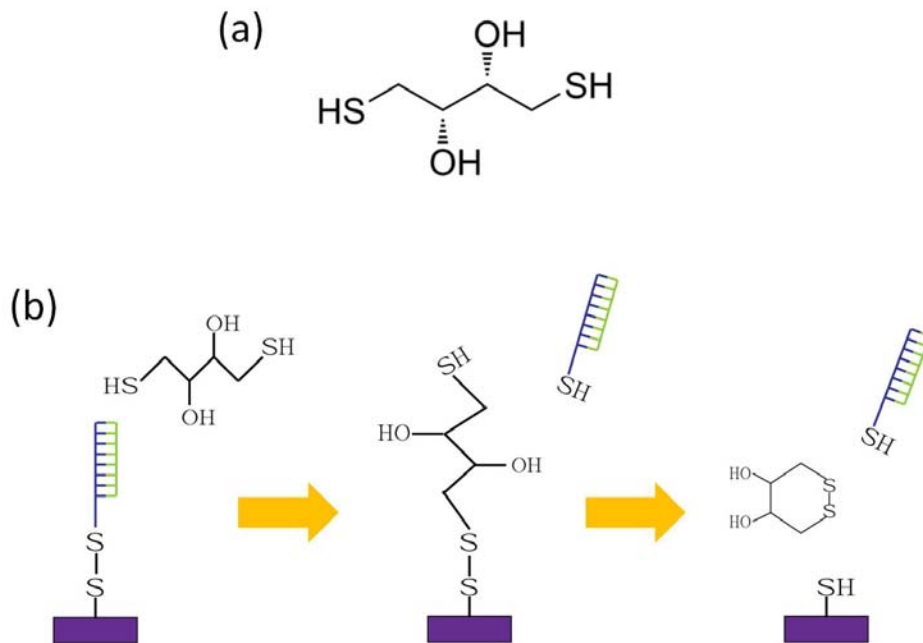


圖 2 - 7 (a) DTT 結構式。(b) DTT 切除雙硫鍵的反應機構。

2-3.2 去氧核糖核酸 (DNA) 探針

在本實驗中我們使用了三種 DNA 探針做偵測，分別為

- 合成 RNA 探針：

5' - AACGTACGCGGAATACTTCGA - 3'

- miR159 探針

5' - TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA - 3'

- miR21 探針

5' - TCAACATCAGTCTGATAAGCTA - 3'

以上三段 DNA 引子皆是向生化公司訂購的化學合成 DNA，並且修飾硫醇官能基 (thiol group) 在 5' 尾端位置，以便將其固定在矽奈米線表面。實驗中皆以 0.1× PS 緩衝溶液溶解或稀釋。



2-3.3 核糖核酸 (RNA) 樣品

本論文實驗檢測的 RNA 樣品分為 3 部分，分別是合成 RNA、植物 RNA 樣品、以及人類細胞 RNA 樣品，以下將依序詳盡說明其製備方法。

(a) 合成 RNA

實驗中量測的合成 RNA 是向生化公司所訂購，其序列為 5' - UCGAAGUAUCCGCGUACGUU - 3'。實驗中以 0.1× PS 溶解買來的樣品，並稀釋至 2 μM 做偵測。

(b) 植物樣品

本實驗使用的植物樣品為生物科技研究所林詩舜老師所提供的阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)。以下為萃取植物 RNA 的詳細步驟。

1. 首先將葉片秤重約 1 克，加入 1 mL trizol 後磨碎至粉狀。
2. 室溫下浸在 trizol 中約 5 分鐘，樣品漸漸液化。
3. 加 500 μ L 的氯仿 (chloroform) 萃取 1 mL 的植物液，以旋轉混合機混合 5 分鐘，在 4°C 中 13000 轉下離心 15 分鐘。
4. 小心吸取上層液，再次重複上個步驟。
5. 將上層液小心取出後加入 500 μ L 的異丙醇 (isopropanol)，混合 5 分鐘後，4°C 中 13000 轉下離心 10 分鐘。
6. 除去上清液，加入 100% 酒精以震盪機清洗沉澱物，4°C 中 7500 轉下離心 5 分鐘。
7. 於抽氣箱內風乾完全，加入 20-50 μ L 0.1 \times PS 回溶沉澱物，加熱 65°C 約 10 分鐘，最後使用光譜分析儀測定 RNA 溶液的濃度。

(c) 人類細胞樣品

本實驗使用的細胞樣品由中研院農業生物科技中心的徐麗芬教授提供，並於生物科技研究所林詩舜老師實驗室進行細胞培養。癌細胞的樣品為乳癌細胞的 MCF-7 細胞株³²，正常細胞樣品則為 M10 細胞株，圖 2-8 為光學顯微鏡下的細胞圖。細胞培養流程可分為：解凍細胞、更換細胞培養基、繼代培養、凍存細胞。接下來將詳述細胞培養的材料與流程以及抽取細胞 RNA 的步驟。

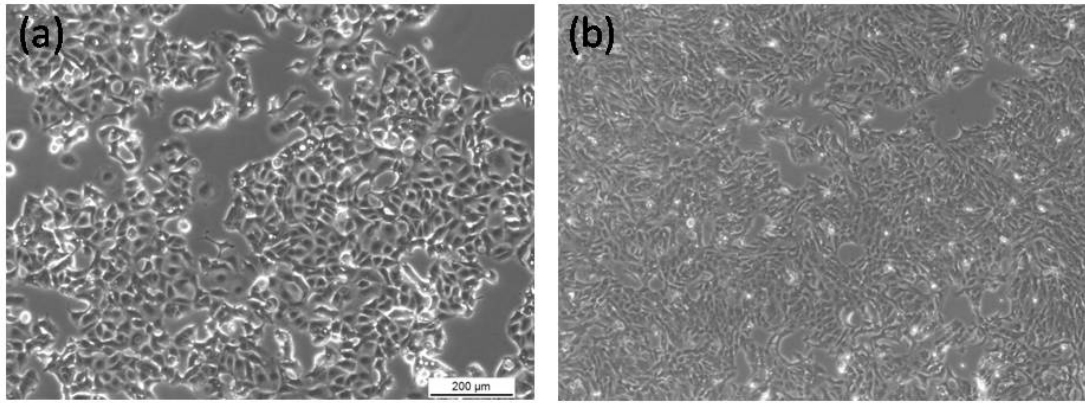


圖 2 - 8 光學顯微鏡下的 (a) 癌細胞 MCF-7 與 (b) 健康細胞 M10。

➤ 細胞培養材料

- 基礎細胞培養基 (medium) : Minimum Essential Medium (MEM), GIBCO
(含 Earle's salts, L-glutamine, non-essential amino acids, 不含 NaHCO_3)
- 緩衝液 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), Sigma
- 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), GIBCO
- 青黴素/鏈黴素 (penicillin/streptomycin, P/S), Caisson
- 5× 胰蛋白酶 (0.25% trypsin), GIBCO
- 緩衝液 1× PBS (phosphate buffer saline): 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4
- 細胞抗凍液 : 20% DMSO, 溶於細胞培養基
- 50 mL 與 15 mL 離心管、2 mL 抗凍管、75T 細頸瓶

細胞培養基配方 : 1 L MEM, 3.6 g HEPES, 10% FBS, 1% P/S

➤ 細胞培養流程

所有細胞培養的步驟皆必須要在細胞培養室中操作，並且進入操作台進行實驗前，須徹底將器具以及操作人員以 70% 酒精消毒，因為過程中若沾染其他雜菌，易引發細胞遭受汙染而造成實驗失敗，因此成功的消毒是非常重要的。

● 解凍細胞

將細胞自液態氮桶中小心取出，置於 37°C 水浴槽快速回溫，回溫剩一點點冰時，以細胞用定量吸液管吸出所有細胞液至 15 mL 離心管，1200 轉離心 5 分鐘。離心後小心的吸除上清液以便除去凍存液中的 DMSO。打散細胞且加入 1 mL 細胞培養基後移至細頸瓶中，最後慢慢加細胞培養基至總體積為 15 mL。平放入 37°C 細胞培養箱中，天天觀察。

● 更換細胞培養基

當細胞成長 2 至 3 天後，細胞培養基中的細胞代謝物會增加影響細胞生長，因此需定期更換。吸出所有的變黃的細胞培養基，以 5 mL 1× PBS 洗過細胞後，加入新的細胞培養基。最後平放回細胞培養箱中。

● 繼代培養

當細胞在細頸瓶中達到 80% 得滿盤程度時，則要進行此步驟。吸去所有細胞培養基後，用 5 mL 1 × PBS 洗過細胞後，吸掉剩餘 2 mL PBS 再加入 2 mL 2× trypsin，目的是將貼壁細胞懸浮。將細頸瓶置回細胞培養箱中放 5 分鐘，取出觀察並拍打，確認瓶上的細胞已全數懸浮。吸起所有細胞收集在 15 mL 離心管中，加入 1 mL 細胞培養基停

止 trypsin 作用，再取 5 mL 細胞培養液回收細頸瓶內細胞至前述離心管中，1200 轉離心 5 分鐘。倒去上清液，先以 1 mL 細胞培養基打散沉澱的細胞，再加至總體積 10 mL。取 100 μ L 細胞液稀釋至 1 mL 後計算細胞數目。最後將細胞液平分在兩個細頸瓶中，以細胞培養基加至 15 mL，將細頸瓶放回細胞培養箱中繼續培養。

細胞計數方法：

將注入細胞稀釋液的計數板置於光學顯微鏡下觀察，以計數器記錄圖 2-9 中 A、B、C、D 以及正中心區域內的細胞數量（避免重複計算），再將計算的細胞數 N 代入下列的公式中即可得到培養的總細胞數 (cells/ mL)。

$$(N/5) \times 10 \times 10^4 \times 10$$

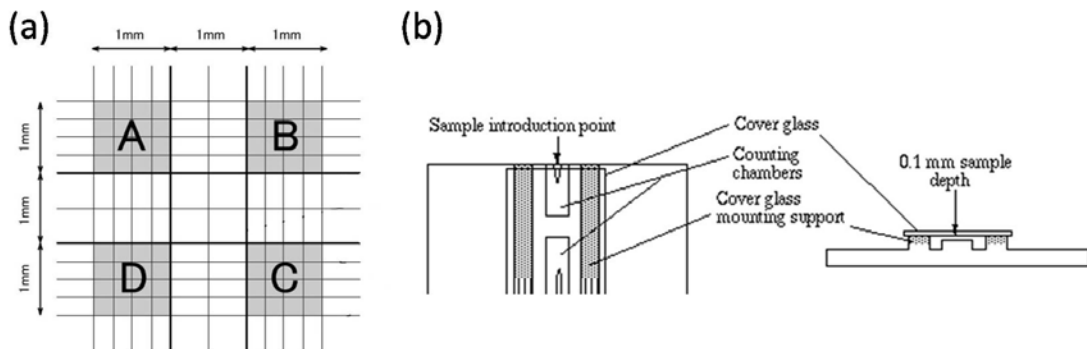


圖 2 - 9 (a) 細胞計數板內網格。(b) 細胞計數板外觀。

● 凍存細胞

當有多餘細胞時，我們便會進行以下的動作。去除細胞培養基後是以 trypsin 使細胞懸浮，並計算細胞總數。接著再次離心留下沉澱的細胞，每管抗凍小管加入 900 μL 含細胞的細胞培養液，並且慢慢滴入 900 μL 含 20% DMSO 的細胞培養液。於 -20°C 放 2 小時，再於 -80°C 放置過夜，最後冰存在液態氮桶中長期保存。

➤ 抽取細胞 RNA

當細胞長至 70% 滿時，便可抽取細胞的 RNA。去除細胞培養基且以 5 mL $1\times$ PBS 清洗後，加入 3 mL trizol，輕拍與沖提將細胞全數懸浮，分裝在三管反應管中，再進行與植物相同的氯仿萃取步驟：

1. 加 500 μL 的氯仿 (chloroform) 萃取 1 mL 的細胞液，以旋轉混合機混合 5 分鐘，在 4°C 中 13000 轉下離心 15 分鐘。
2. 小心吸起上層液，再次重複上個步驟。
3. 將上層液小心取出後加入 500 μL 的異丙醇 (isopropanol)，混合 5 分鐘後， 4°C 中 13000 轉下離心 10 分鐘。
4. 除去上清液，加入 100% 酒精以震盪機清洗沉澱物， 4°C 中 7500 轉下離心 5 分鐘。
5. 於抽氣箱內風乾完全，加入 20-50 μL $0.1\times$ PS 回溶沉澱物，加熱 65°C 約 10 分鐘，最後使用光譜分析儀測定 RNA 溶液的濃度。

2-4 電性量測系統

(a) 微流體通道製作

架設量測系統前我們會先製作微流體通道，其可限制溶液只會在奈米線附近通過。製做步驟如下：

1. 製作首先將 polydimethylsiloxane (PDMS, SYLGARD 184 silicone elastomer) A 劑與 B 劑以 10:1 的體積比例混合，置入備有由黃光顯影製程之母模 (圖 2-10(a)) 的玻璃皿中，每個母模尺寸為： $6.25\text{ mm} \times 0.5\text{ mm} \times 0.05\text{ mm}$ 。
2. 以幫浦抽氣迫使混合劑中氣泡被趕出，須直到所有可見氣泡均被抽出，呈現透明貌。
3. 接著放入 80°C 烘箱烤乾約 15 分鐘，可依所需軟硬度與黏度調整烘乾時間。
4. 冷卻後將硬化後的 PDMS 取下，裁切成適合的大小，最後以適當管徑的鋼管將微流道兩端鑽孔，穿入聚乙烯管 (polyethylene, PE) 後整個微流通道就完成了 (圖 2-10(b))。

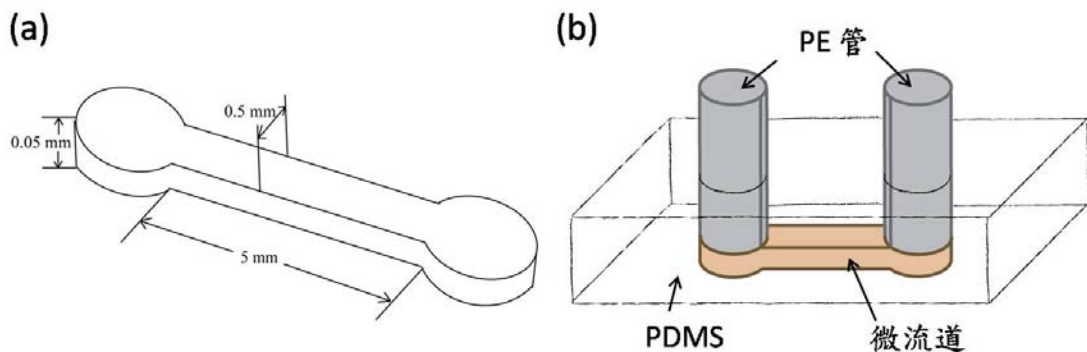


圖 2-10 (a) 經黃光顯影製程之母模。(b) PDMS 微流體通道示意圖。

(b) 架設量測系統

當晶片完成 MPTMS 的修飾後，將晶片以銅膠固定在塑膠電路板上，利用超音波打線器 (SPB-U668) 將晶片上的電極連接到塑膠電路板上 (圖 2-11(a))，並在晶片上架設 PDMS 的微流體通道，須注意要將微流通道覆蓋於奈米線偵測位置。以壓克力板將塑膠電路板與 PDMS 結合，並以螺絲固定 (圖 2-11(b))。然後利用針筒抽拉泵浦 (syringe pump, KD-101, KD-Scientific) 以 0.3 mL/hr 的流速將溶液導入通道以經過奈米線表面。接上電線連接訊號處理系統，即可進行電訊號的測量。整個實驗系統與量測皆於光學桌上進行，此外使用參考電極 (reference electrode) 接地以確保溶液的電位保持在 0 V，不會因為流動造成的液體與晶片表面磨擦，而產生多餘的雜訊。且為了避免靜電干擾，外頭會以銅製的法拉第籠 (Faraday cage) 罩住實驗系統。

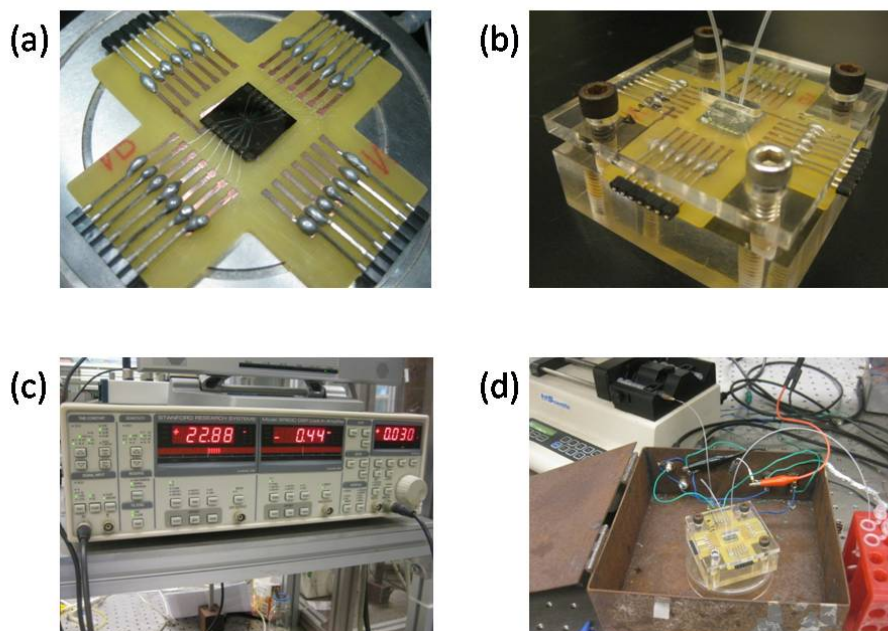


圖 2 - 11 (a) 塑膠電路板上之晶片。(b) 以壓克力板固定 PDMA 微流體通道。(c) 鎖相放大器。(d) 流體系統架設完成圖。

量測電流的系統，是依靠鎖相放大器 (lock-in amplifier, Stanford Research SR830) (圖 2-11(c)) 做為訊號放大與雜訊處理，其能鎖定電路中特定的相位與頻率，並且過濾掉雜訊而獲得準確的訊號資訊，此外，以 Labview 程式記錄這些大量實驗訊號。量測時，以鎖相放大器施加 0.03 V、79 Hz 的交流電壓 V_{sd} 。整個實驗系統的架設表示在圖 2-12 中。

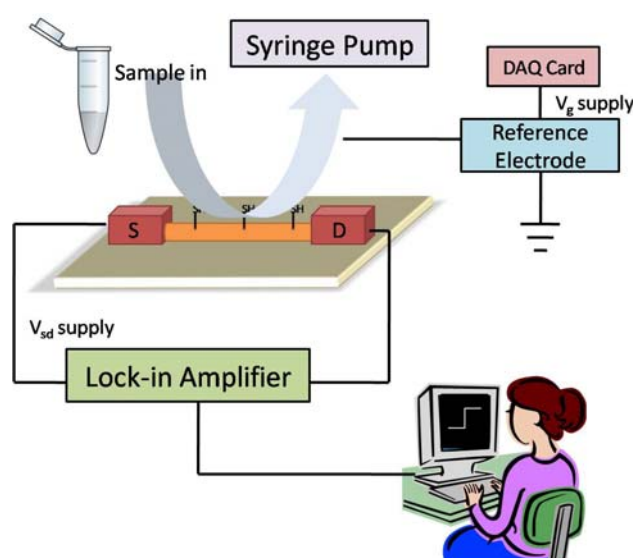


圖 2 - 12 實驗系統架設。

(c) 樣品量測

當樣品準備齊全且量測系統架設完畢後，即可開始進行電性量測。在前述 2-2 節中提及，導入 $1 \mu\text{M}$ 的 DNA 溶液 30 分鐘，將 DNA 探針固定在矽奈米線表面。接著，可流入 5 分鐘的 $0.1\times$ PS 緩衝溶液清洗表面，以帶走未鍵結在表面上的 DNA 分子，此時再讓待測的 RNA 樣品溶液流入 10 分鐘作偵測，即可得樣品檢測結果。當偵測結束後，最後加入 DTT 將表面結合的 DNR-RNA 去除，過程約 30 分鐘，而後繼續下次檢測。

2-5 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

在 RNA 的檢驗中，即時定量聚合酶連鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 是很常採用的方法，因此本實驗利用此方法做為二次應證。PCR 的基本原理是利用人工的方法，以聚合酶經過反覆相同的程序來擴增特定 RNA 片段。當反應循環數逐次增加時，反應管中的自特定 RNA 反轉錄出的 cDNA 量也隨之增加。於 PCR 反應中添加特定的螢光物質，此時特定螢光物質會與 cDNA 結合並顯現螢光。因此反應管中的 cDNA 越多，所發出的螢光也就會越強，並達到偵測的閾值 (threshold)。當螢光到達閾值時，對應其所進行到的循環數 (cycle) 稱為 Ct 值，若 cDNA 越多，Ct 值會越小。本實驗中採用 Universal ProbeLibrary (UPL) 探針法，探針的 5'端為螢光基團 (fluorophore)，3'端則是接上消光基團 (quencher)，並且專一性的與目標序列結合。當激發螢光基團時，由於螢光基團和消光基團間距離夠短，會發生螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的現象，使螢光基團的螢光受消光基團吸收而消失。接著 Taq DNA 聚合酶會延伸序列，其所帶的水解酵素會將探針分解，使螢光基團和消光基團分解而發出螢光，並延伸的序列取代了探針結合位置。因此，只要探針能夠與目標序列結合，即可被 DNA 聚合酶分解，藉由觀察到的螢光強度便可推算 PCR 累積的產物 (圖 2-13)。

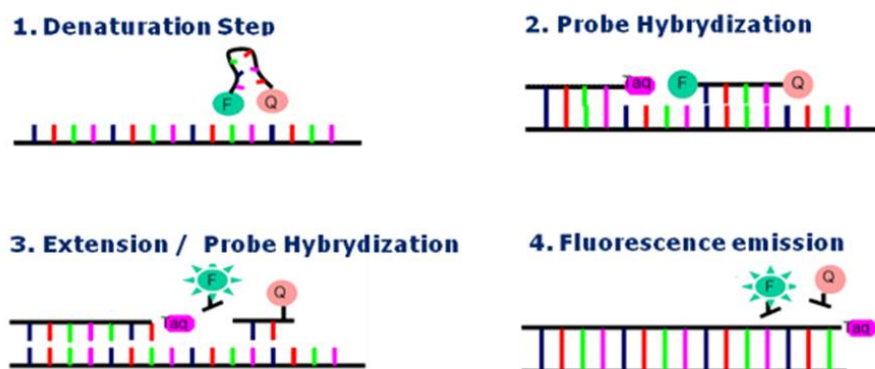


圖 2 - 13 水解探針 (hydrolysis probe) 作用方式：探針的 5'端為螢光基團，3'端則是接上消光基團，並且專一性的與目標序列結合。當激發螢光基團時，由於螢光基團和消光基團間距離夠短，會發生 FRET 的現象，使螢光基團的螢光受消光基團吸收而消失。接著 DNA 聚合酶延伸序列，其所帶的水解酵素會將探針分解，使螢光基團和消光基團分解而發出螢光，並延伸的序列取代了探針結合位置。

RT-PCR 的 RNA 偵測含有兩個步驟 (圖 2-14)，首先莖環反轉錄引子 (stem-loop RT primer) 接在目標 RNA 3 端的位置，啟動目標 RNA 的反轉錄步驟。接著反轉錄的產物藉 RNA 特定的正向引子 (forward primer) 和通用反向引子 (universal reverse primer) 經由 PCR 的步驟被擴增，最後以 Universal ProbeLibrary 探針法定量³³。

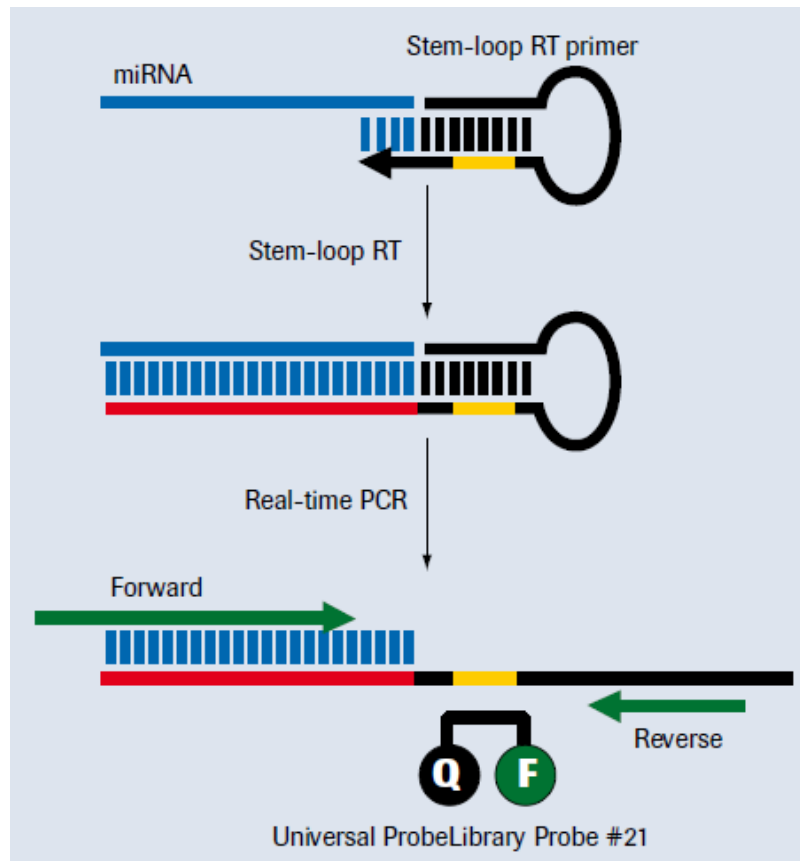


圖 2 - 14 RT-PCR 基本原理：步驟 1，目標 miRNA (藍色序列)經 stem-loop RT primer 反轉錄成 cDNA (紅色序列)；步驟 2，加入的 forward primer 和 universal reverse primer 擴增 cDNA，且 probe #21 結合於黃色區段，進行水解探針作用。³³

以下為實驗步驟：

1. 反轉錄 (Reverse Transcription)。

將所有反應物依表 2-1 所示體積混合於反應管中，置於 PCR 機器 (T3000 thermocycle, Biometra) 中進行反轉錄反應：① 16°C 30 分鐘；② 30 個循環含 30°C 30 秒，42°C 30 秒，50°C 1 秒；③ 85°C 5 分鐘；④ 4°C。

RNA	1 μ M stem-loop RT primer	10 mM dNTP	10 \times buffer	25 mM MgCl ₂	0.1 M DTT	RNase OUT	Super Script III
4.5	0.3	1	1	2	1	0.1	0.1

表 2-1 反轉錄反應中所含的各反應物體積 (μ L)。

2. 定量聚合酶連鎖反應 (qPCR)。

將上一步驟反應後的溶液 (cDNA) 和表 2-2 中的反應物，依所示體積重複 3 次添加在 PCR 陣列反應槽中。以離心機在 2000 轉下平衡 2 分鐘，最後置於 qPCR 機器 (Roche lightcycle 480) 進行聚合酶連鎖反應：① 95°C 10 分鐘；② 45 個循環含 95°C 5 秒，60°C 10 秒，72°C 1 秒。

cDNA	0.5 μ M forward primer + 0.5 μ M universal reverse primer	2 \times master solution	10 μ M probe #21
2.9	1 + 1	5	0.1

表 2-2 定量聚合酶連鎖反應中所含的各反應物體積 (μ L)。

第三章 實驗結果與討論

3-1 表面修飾證明

為了確定表面修飾是否成功並且 DNA 能夠與 RNA 雜交，我們使用了螢光作驗證。我們使用能與表面的 DNA 探針作結合的螢光 RNA (FITC-RNA)，若可以看到螢光反應則表示為成功的修飾。

在同為 SiO₂ 基底的矽晶圓上，我們利用旋轉塗佈 (spin coating) 的方式上光阻，接著使用傳統黃光製程技術 (photolithography)，製作出特定的圖案 (pattern)，如圖 3-1(a) 所示，便可使用前章所述的修飾方法進行螢光的修飾證明。

1. 首先將破片在丙酮中沖洗 15 分鐘。
2. 浸於 1% MPTMS 的酒精溶液中 30 分鐘。
3. 以 PG 去除劑 (PG remover) 浸泡破片，並放置於烘箱中 (70°C) 30 分鐘將光阻去除。
4. 將破片自烘箱取出後，PG 去除劑倒於廢液桶回收，再重複上一步驟。
5. 把 DNA 探針溶液以 0.1× PS 稀釋後滴於破片修飾 30 分鐘。
6. 經氮氣槍吹乾再以 0.1× PS 稀釋後的 FITC-RNA 滴在破片上避光修飾 30 分鐘。
7. 最後使用螢光顯微鏡擷取影像觀察結果。

圖 3-1(b) 為螢光的結果圖，可以看到沒有光阻的矽基質部分呈現明顯的綠色螢光反應，表示 FITC-RNA 可以固定在晶片表面，顯示修飾是成功的。因此，在接下來的實驗中，我們都將遵循這樣的修飾模式，藉由表面固定 DNA 探針，來偵測樣品中的目標 RNA 序列。

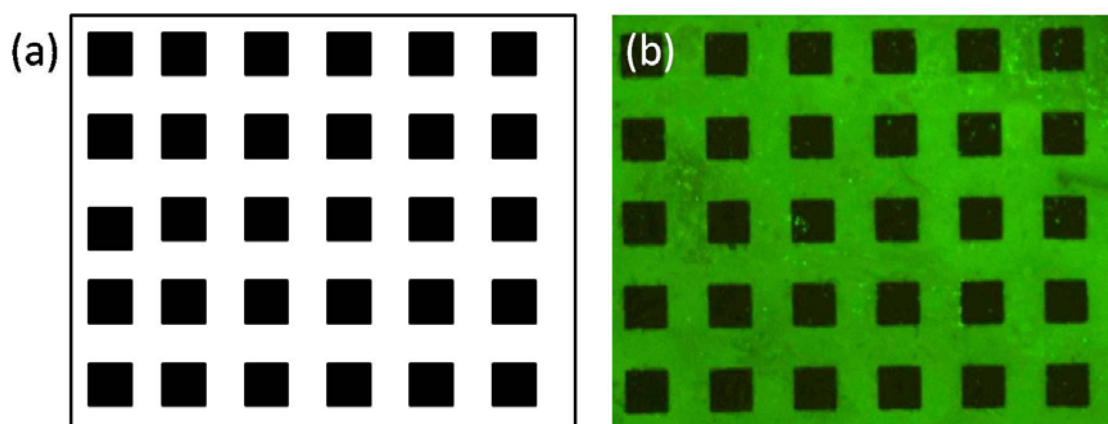


圖 3 - 1 (a) 螢光晶片示意圖，黑色部分為光阻位置，白色部分為矽晶圓板表面。(b) 綠色螢光顯示成功修飾上 FITC-RNA。

3-2 電性量測與即時定量聚合酶連鎖反應結果

在 DNA-RNA 間作用力的電性量測，皆於 $0.1\times$ PS 緩衝溶液的環
境下所進行的。以下實驗結果將分為三大部分，接著將分別依序說明。

3-2.1 單一片段合成核糖核酸檢測

首先，我們先利用只具單一片段的合成 RNA 進行檢測。此電訊號
量測時，使用的是 n-型的 SOI 晶片，由於 RNA 帶有負電荷的磷酸骨
架，使 RNA 與 DNA 探針結合後所產生的導電度會下降，從圖 3-2 所
示，看出合成 RNA 和 DNA 探針結合後，導電度下降，與預期結果相
同。此外，在合成 RNA 流進矽奈米線後開始與 DNA 探針結合，直到
結合完畢達成平衡時的時間，大約經過了 5 分鐘之久。對於此情況的
解釋，我們推測因為 DNA 和 RNA 皆是負電荷的磷酸骨架，當它們結
合時，會因為彼此所帶的負電而產生排斥力，導致當兩者結合到達平
衡需要花較長的時間。

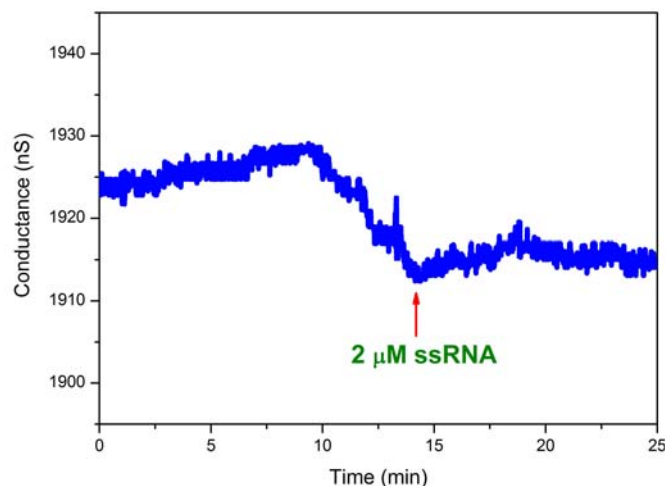


圖 3 - 2 以 n-型 SiNW-FET 檢測單一片段的合成 RNA。紅色箭頭處為
流進矽奈米線區域的 RNA 和 DNA 探針結合達成平衡後的基線。

接著我們將未流進 SiNW-FET 做偵測的合成 RNA 樣品，以及自表面以 DTT 切除後收集的 DNA-RNA 樣品，一同進行 RT-PCR 檢測。圖 3-3 左圖為螢光強度對循環數作圖，右圖則是轉換後的相對濃度。結果顯示，SiNW-FET 確實可藉由 DNA 探針捕捉到預期中的 RNA 序列。不過由於 RT-PCR 的結果是以相對濃度作表現，因此經過 DNA 探針捕捉後的 RNA 明顯得少了許多，不過這也表示 SiNW-FET 的偵測靈敏度很高，只需要少量的樣品即可求得訊號。

總結以上實驗結果，我們知道藉由固定在 SiNW-FET 表面的 DNA 探針，可以專一性的與特定片段的 RNA 作結合，並觀察到 DNA 和 RNA 間電荷排斥力會延遲平衡發生的時間，因此以下將藉此技術偵測特定片段 miRNA 以研究動、植物的生理狀態。

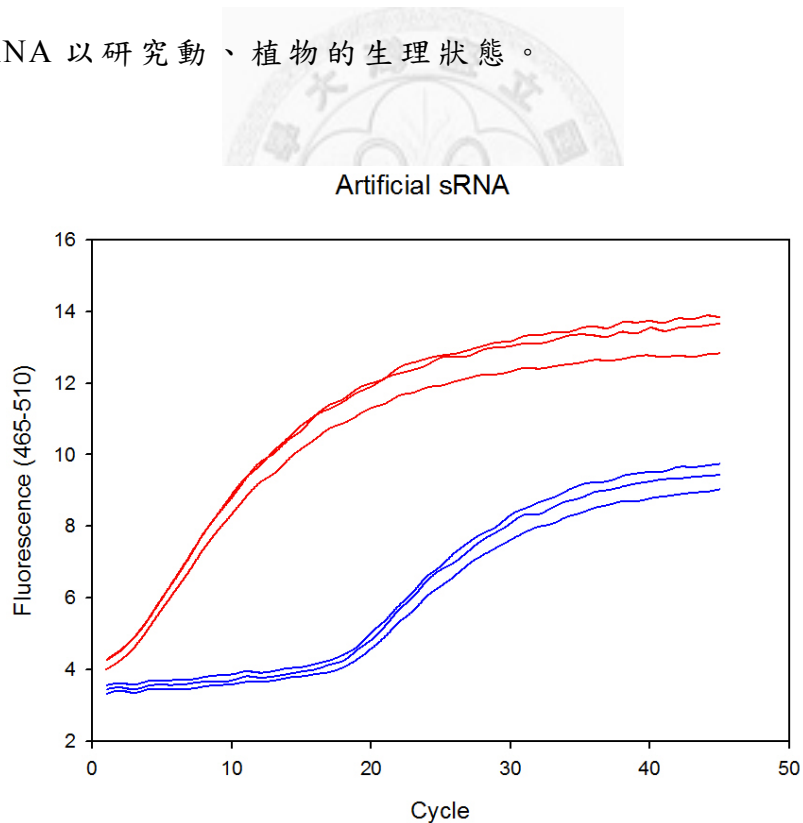


圖 3 - 3 合成 RNA 的 RT-PCR 結果。紅色表示未流進 SiNW-FET 的 RNA 樣品，藍色為以 DTT 切除表面 DNA-RNA 後收集的樣品。

3-2.2 植物樣品檢測

在這段的實驗中，我們採用 miR159 做為偵測目標，此 miR159 序列在過去文獻中指出與菸草葉片生長有關^{4, 34}，且不論在感病或健康的植株中均存在。若此實驗結果能成功偵測此片段 RNA，而後即可作為植物感病研究的一項利器。

將自植物中萃取出的總 RNA 稀釋，以帶有與 miR159 互補的 DNA 探針的 SiNW-FET 晶片做偵測。由結果可得知，利用 SiNW-FET 可以自含多種 RNA 的總 RNA 中偵測到目標的 RNA 片段，並且當我們以 DTT 去除表面結合的 DNA-RNA，再次固定 DNA 探針重複實驗後，元件依舊呈現相同的訊號反應，證明了此可重複使用的 SiNW-FET 具有高度選擇性以及良好的再現性。

由於人類細胞是不含有 miR159 這段 RNA 序列的，因此我們將人類細胞內的總 RNA 作為對照組。在電訊號圖 (圖 3-4(a)) 顯示出，以 miR159 互補的 DNA 探針確實未在人類樣品中偵測到 miR159 的存在，符合我們預期的結果；此外，我們使用 RT-PCR 針對 miR159 序列分別檢測菸草以及人類細胞的總 RNA (圖 3-4(b))，其結果也是只有菸草樣品有訊號出現，再次證實 SiNW-FET 的選擇性高，能夠區別兩項不同的樣品，因此我們可以將此技術運用在檢驗植物感病與否的研究上。

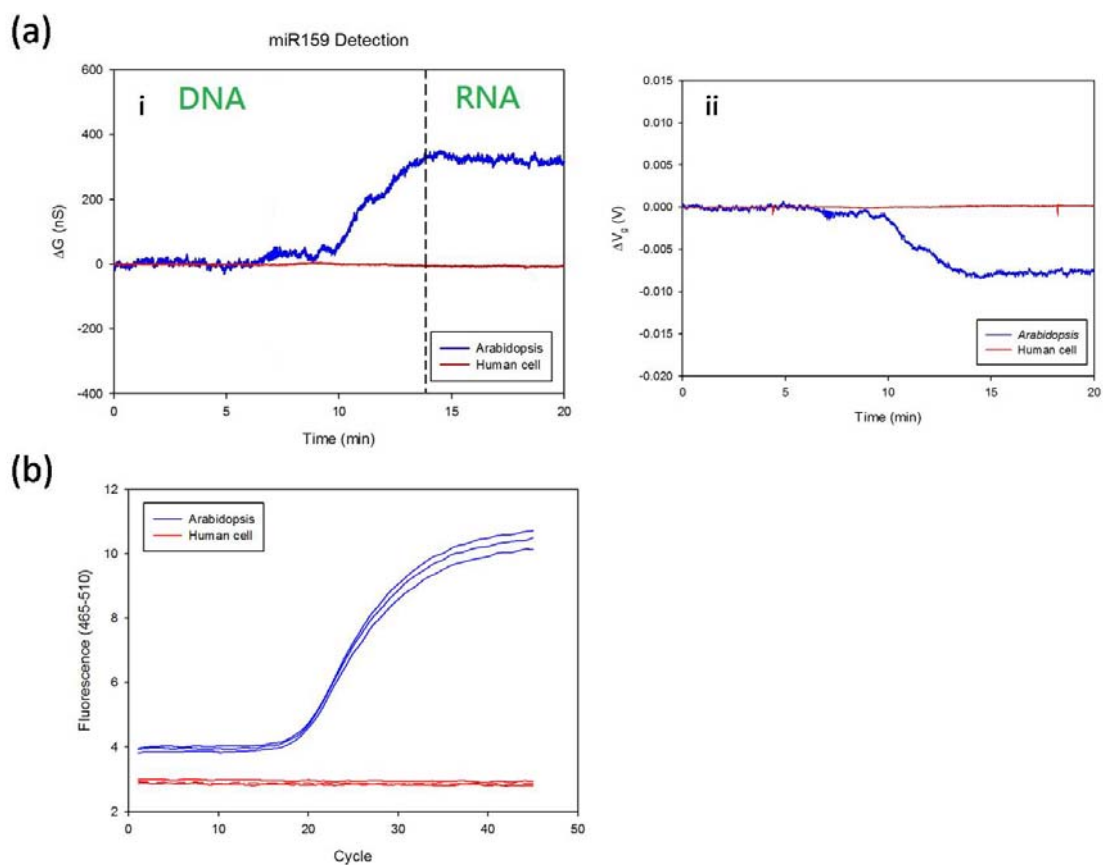


圖 3 - 4 (a) 以 p-型 SiNW-FET 偵測菸草及人類細胞中 miR159 序列。
 (b) 以 RT-PCR 針對 miR159 序列檢驗菸草及人類細胞。

將未流進 SiNW-FET 的植物總 RNA (圖 3-5 紅色標記)，以及經 miR159 互補 DNA 捕捉後再以 DTT 切下收集的樣品(圖 3-5 藍色標記)，兩者皆針對 miR159 和 miR168 兩種序列進行 RT-PCR 的檢測。圖 3-5 的實驗結果說明，miR159 和 miR168 兩種 RNA 均存在於植物體中，但經過 miR159 互補 DNA 篩選後，只有在針對 miR159 作的 RT-PCR 結果中顯示有 RNA 的存在。而針對 miR168 的 RT-PCR 結果雖也有螢光反應，但當半閾值的循環數在 40 以上時，可能是引子間相

互作用而產生的現象，則我們將其認為沒有 RNA 的反應。此表現又再次證明利用 SiNW-FET 修飾 DNA 探針做特定片段 RNA 的偵測，具有高度專一性，對於診斷方面的研究，可信度很高。

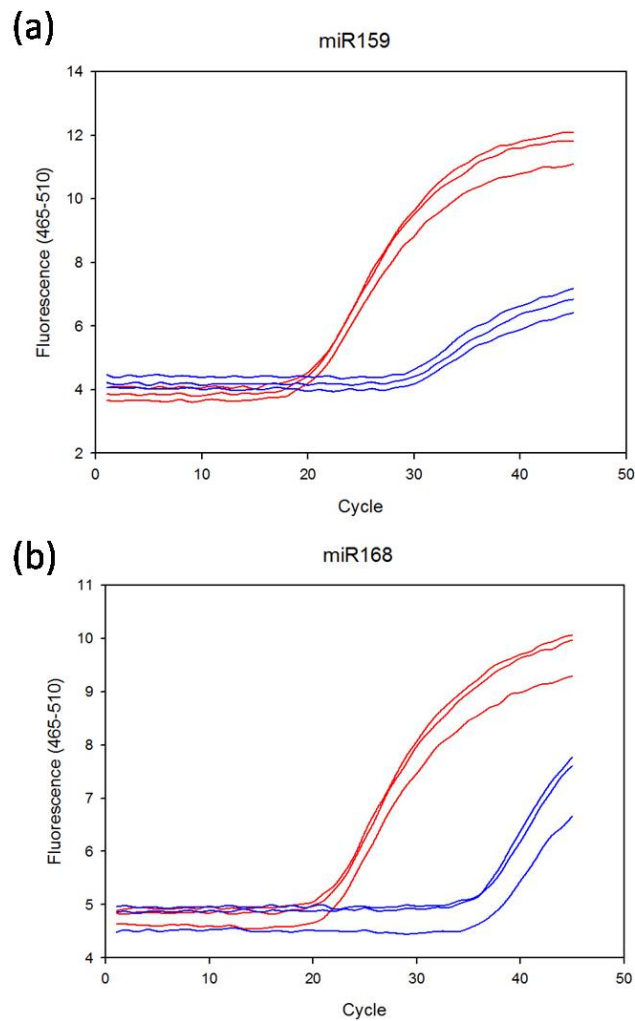


圖 3 - 5 SiNW-FET 偵測 miR159 序列前 (紅) 後 (藍) 的 RT-PCR 結果。(a) 針對 miR159 序列所做的 RT-PCR。(b) 針對 miR168 序列所做的 RT-PCR。

3-2.3 癌細胞檢測

在 1-1 節中提及，特定的 miRNA 異常增加會造成腫瘤的生成，過去的文獻也指出，miR21 這段 RNA 在乳癌中比起正常細胞有過度表現的現象^{6, 13}，因此在這部分實驗中，我們分別偵測乳癌細胞和正常細胞中 miR21 這段乳癌標記物，藉由 RNA 量的不同產生的電導差異，分辨兩項樣品。

實驗一開始我們是將癌細胞和正常細胞的總 RNA 稀釋至 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 做偵測，不過在圖 3-7 的結果中，看到兩者的導電度差異幾乎無法做區分，此現象和我們預期的結果有很大的出入。因此我們推測是否在較高濃度下，兩項樣品中所含的 RNA 數量在表面均達到飽和。根據以上的推論，我們逐步降低兩者總 RNA 的濃度，從圖 3-6 中可以發現，癌細胞與正常細胞間電導差的差異越來越明顯，表示兩者的 miR21 量有很顯著的差異，顯示我們可以利用 SiNW-FET 正確的區分癌症樣品和健康樣品，且靈敏度佳。

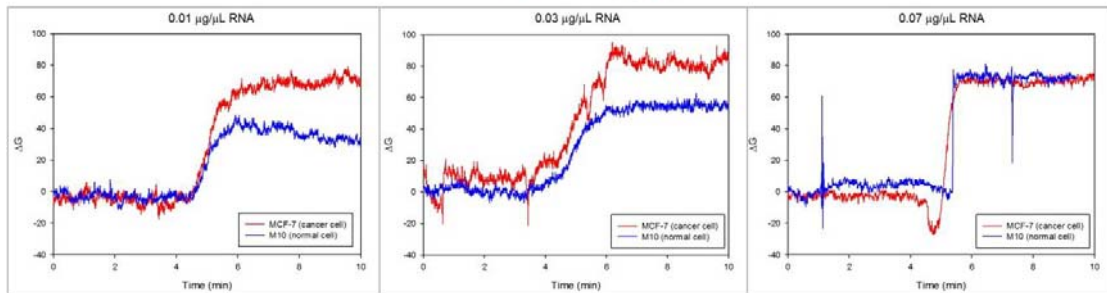
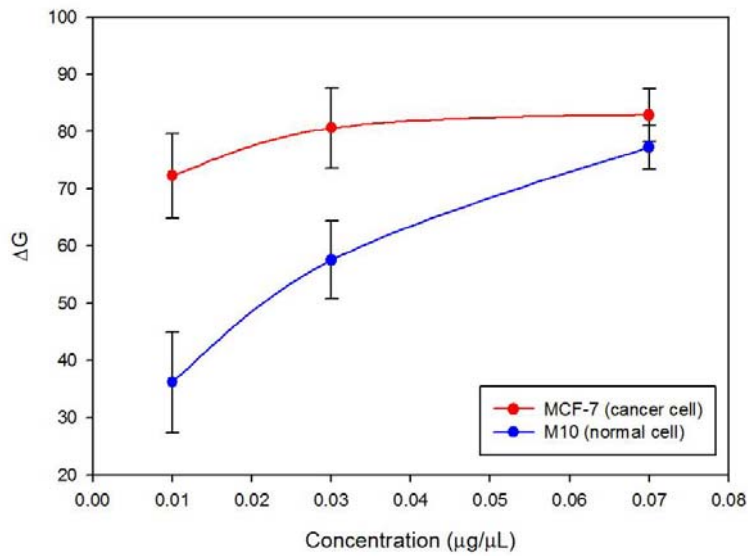


圖 3 - 6 不同濃度下偵測癌細胞 (紅) 和正常細胞 (藍) 中 miR21 的電訊號圖以及電導差對濃度圖。

另外此實驗結果還印證了我們的推論是合理的：針對較高濃度的總 RNA 作偵測，癌細胞和正常細胞內的 miR21 數量雖彼此有差異，但其量應該還是比固定在 SiNW 表面的 DNA (約 10^6 條) 來的多，使得兩樣品在偵測時，表面 DNA 捕捉到的 RNA 皆達飽和，因此所產生的導電度改變差異不大。

除了電訊號的量測，我們將乳癌細胞株與健康細胞株的不同濃度樣品，針對 miR21 序列作 RT-PCR 的檢測。圖 3-7 的結果裡，只有 0.03 μg 和 0.07 μg 的乳癌細胞 MCF-7 兩項樣品中，看到目標序列存在的螢光訊號，在 0.01 μg 的乳癌細胞以及所有的正常細胞中皆沒有看到訊號，從此現象中得知，對於低濃度的樣品偵測，SiNW-FET 可以比 RT-PCR 有更好的靈敏度，且不需標記的即時偵測，提供了生物醫學上早期診斷的優良平台。

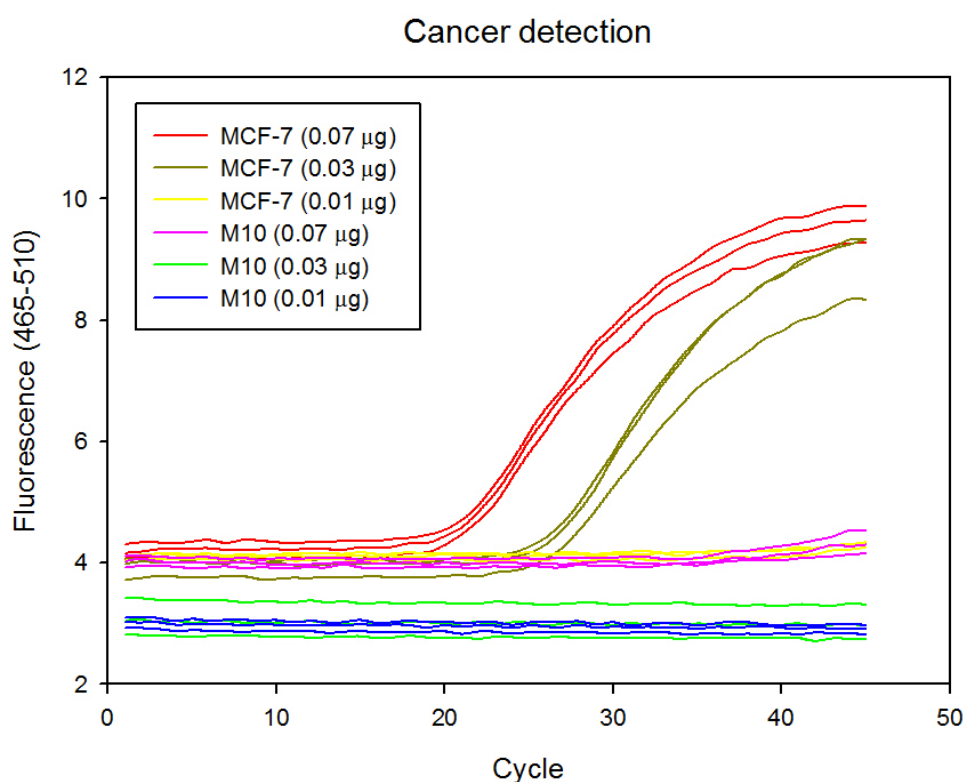


圖 3 - 7 將不同濃度的細胞樣品針對 miR21 序列作 RT-PCR 的檢測結果。(MCF-7 為乳癌細胞株，M10 為健康細胞株。)

第四章 結論

我們改良過去 DNA 的修飾方式，使矽奈米線表面形成硫醇官能基，順利的將帶有硫醇基的 DNA 探針以雙硫鍵固定於矽奈米線表面，並且成功的偵測到目標的 miRNA 序列。在本論文中採用雙硫鍵的修飾方式，並以 DTT 做表面清除，而達到重複利用的目的。

在單一片段合成 RNA 的量測中，從電訊號的資訊得到，RNA 與 DNA 結合時的電荷改變所產生的電流改變，且結合時會因為兩者間電荷排斥，造成平衡時間的增加。此外，以 RT-PCR 分析收集自偵測後的表面樣品，證實了表面探針確實捕捉到目標的序列，也說明明確可以 DNA 作為探針，專一性的偵測特定序列的 RNA 片段。

接著檢測植物總 RNA 中的 miR159 序列，並以人類總 RNA 做為對照組，不但依舊能看到明顯的 DNA-RNA 結合後產生的電訊號，並且重複此量測達三次，每項樣品所反映出的電訊號基線也未偏移，顯示此可重複使用的 SiNW-FET 再現性佳。此外，針對 miR159 以及 miR168 作 RT-PCR，雖偵測前含有兩種序列，但檢測後收集的樣品中只有 miR159 的存在，說明明確 SiNW-FET 的高選擇性，能夠輕易地自含有多種序列中的總 RNA 中，捕捉到目標序列，其專一性質適合利用於診斷方面。對於癌症以及健康樣品的檢測，我們針對乳癌生物標記物 miR21 作量測，成功的在低濃度下區分出乳癌樣品和正常樣品，且以 RT-PCR 做二次確認，結果顯示 SiNW-FET 高度的靈敏度。

總結實驗結果，SiNW-FET 擁有免標記、高選擇性、高靈敏度、以及即時偵測的優點，提供了很好的平台來偵測 miRNA 的生物標記，並可作為診斷植物致病與癌症樣品的有效工具。

參考文獻

1. Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
2. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The C-Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small Rnas with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
3. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* **75**, 855-62 (1993).
4. Palatnik, J.F. et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257-263 (2003).
5. Tang, G.L., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development* **17**, 49-63 (2003).
6. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* **6**, 259-269 (2006).
7. Carr, J.P., Marsh, L.E., Lomonosoff, G.P., Sekiya, M.E. & Zaitlin, M. Resistance to Tobacco Mosaic-Virus Induced by the 54-Kda Gene Sequence Requires Expression of the 54-Kda Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 397-404 (1992).
8. Lu, Y.D., Gan, Q.H., Chi, X.Y. & Qin, S. Roles of microRNA in plant defense and virus offense interaction. *Plant Cell Reports* **27**, 1571-1579 (2008).
9. Plasterk, R.H.A. RNA silencing: The genome's immune system.

- Science* **296**, 1263-1265 (2002).
10. Calin, G.A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2999-3004 (2004).
 11. Iorio, M.V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research* **65**, 7065-7070 (2005).
 12. Michael, M.Z., O'Connor, S.M., Pellekaan, N.G.V., Young, G.P. & James, R.J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research* **1**, 882-891 (2003).
 13. Si, M.L. et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* **26**, 2799-2803 (2007).
 14. Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J. & Kerin, M.J. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol* **2009**, 950201 (2009).
 15. Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M. & Jeang, K.T. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing (vol 22, pg 607, 2005). *Immunity* **22**, 773-773 (2005).
 16. Koshiol, J., Wang, E., Zhao, Y.D., Marincola, F. & Landi, M.T. Strengths and Limitations of Laboratory Procedures for MicroRNA Detection. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **19**, 907-911 (2010).
 17. Catuogno, S. et al. Recent Advance in Biosensors for microRNAs Detection in Cancer. *Cancers (Basel)* **3**, 1877-1898 (2011).
 18. Hahm, J. & Lieber, C.M. Direct ultrasensitive electrical detection of

- DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors. *Nano Letters* **4**, 51-54 (2004).
19. Zhang, G.J., Chua, J.H., Chee, R.E., Agarwal, A. & Wong, S.M. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **24**, 2504-2508 (2009).
20. Curreli, M. et al. Real-Time, Label-Free Detection of Biological Entities Using Nanowire-Based FETs. *Ieee Transactions on Nanotechnology* **7**, 651-667 (2008).
21. Chen, K.I., Li, B.R. & Chen, Y.T. Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation. *Nano Today* **6**, 131-154 (2011).
22. Cui, Y., Duan, X.F., Hu, J.T. & Lieber, C.M. Doping and electrical transport in silicon nanowires. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 5213-5216 (2000).
23. Wagner, R.S. & Ellis, W.C. Vapor-Liquid-Solid Mechanism of Single Crystal Growth (New Method Growth Catalysis from Impurity Whisker Epitaxial + Large Crystals Si E). *Applied Physics Letters* **4**, 89-& (1964).
24. 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* **107**, 1047-1052 (2010).
25. Zhang, G.J. et al. DNA sensing by silicon nanowire: Charge layer distance dependence. *Nano Letters* **8**, 1066-1070 (2008).
26. Zheng, G.F., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W.U. & Lieber, C.M.

- Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology* **23**, 1294-1301 (2005).
27. Lin, S.P. et al. A reversible surface functionalized nanowire transistor to study protein-protein interactions. *Nano Today* **4**, 235-243 (2009).
28. Tian, B.Z. et al. Three-Dimensional, Flexible Nanoscale Field-Effect Transistors as Localized Bioprobes. *Science* **329**, 830-834 (2010).
29. Patolsky, F., Zheng, G.F. & Lieber, C.M. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species. *Nature Protocols* **1**, 1711-1724 (2006).
30. Javey, A., Nam, S., Friedman, R.S., Yan, H. & Lieber, C.M. Layer-by-layer assembly of nanowires for three-dimensional, multifunctional electronics. *Nano Letters* **7**, 773-777 (2007).
31. Stern, E. et al. Importance of the debye screening length on nanowire field effect transistor sensors. *Nano Letters* **7**, 3405-3409 (2007).
32. Fix, L.N., Shah, M., Efferth, T., Farwell, M.A. & Zhang, B. MicroRNA expression profile of MCF-7 human breast cancer cells and the effect of green tea polyphenon-60. *Cancer Genomics Proteomics* **7**, 261-77 (2010).
33. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R.M., Wood, M., Walton, E.F. & Hellens, R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3** (2007).
34. Rhoades, M.W. et al. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520 (2002).