



國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

以酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略
發展快速篩檢胰臟癌相關的微小核醣核酸片段之
電化學生化感測器

Electrochemical Biosensor for Pancreatic Cancer-specific MicroRNA
Based on Enzyme-powered DNA Nanomachine Amplification Strategy

張立斌

Lik-Bin Chong

指導教授：何佳安 博士

Advisor : Prof. Ja-An Annie Ho

中華民國 106 年 7 月

July 2017

謝誌



在碩士班短短的兩年內能如期完成這篇論文，我要特別感謝我的指導教授何佳安老師，感謝老師給予我許多在專業領域或學術領域的指導，將跨領域學習的我培養成為具有一技之長之專業人士。此外，也要感謝老師在日常生活中給予我的關心，支持與鼓勵，讓我可以專心于學術研究中。

研究所求學之生涯上，更是感謝 Hotliposome 大家庭內所有實驗室成員的陪伴與協助。感謝 Amily 學姐細心指導我實驗的操作，鞭策我實驗的進度，並輔助我解決實驗上遇到的種種瓶頸和修正我錯誤的觀念。此外，也要感謝學姐耐心地不斷與我討論我論文寫作和上台報告內容的錯誤，讓我可以即時修改。Amily 學姐於本論文之完成過程中扮演著極其重要之角色。感謝英風學長在我剛接觸實驗時，給予我實驗設計及方向的種種建議，並總是給予我加油打氣，讓我遇到難題的時候可以重新振作起來，繼續向前。感謝李穎學姐和幼瑾學姐給予電化學方面的專業指導，讓我在短時間內學會電化學修飾與分析技術。謝謝學長姐給予我實驗上的協助和支持。謝謝我的同學們：郁夫與嘉予在碩士班期間互相加油打氣和討論，在我情緒低落時肯花時間聽我發牢騷並給予我安慰和鼓勵。感謝學弟妹們這一年來的陪伴。

在系辦工讀的這兩年，更是感激大哥哥大姐姐，給予我無微不至的關懷。感謝慈圓姐姐每天早上都為我準備早餐和水果，並時常關心我的身體健康，讓我能維持健康的身軀迎接碩士生涯路上的各種挑戰。感謝富美姐姐肯讓我隨時調整工讀的時間，讓我的實驗能順利完成。

最後感謝我親愛的家人在背後默默地支持我，讓我繼續念碩士班。雖然已經快兩年沒回家了，可是家人還是定時與我視訊，關心我目前的狀況並給予關心。

雖然離鄉背井獨自一人來到台灣深造的路途艱辛，可是因為有你們的存在，讓我覺得我並不是一個人，讓我有勇氣接受種種挑戰。

中文摘要



雖然胰臟癌的發生事件比起其它癌症來得低，可是它卻是造成癌症相關死亡事件的第四名殺手。由於罹患胰臟癌的病人不會表現出特異的性狀，且胰臟癌的偵測與診斷存在一定的困難性，因此胰臟癌確診病人的五年存活率只有 6% 左右。根據先前的文獻指出，罹患上胰臟癌的病人會大量表現某些特定循環性的微型核醣核酸 (microRNAs)，並可在病人血液中被偵測出。在本研究中，我們應用酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略，發展用於檢測胰臟癌相關之生物標記分子 miR-221 的電化學生化感測平臺。此平臺主要含蓋三部分，分別為(1). 聚合酶輔助目標分子之循環反應 (Polymerase-assisted Target Recycling)、(2). 外切酶剪切反應 (Exonuclease Digestion) 和(3). 電化學訊號的輸出 (Electrochemical Signal Output)。我們首先以膠體電泳的方式先進行產物初步之分析，證明當受質 Hairpin (H)、目標分子 miR-221 (M)、聚合酶 (P)、外切酶 (E) 四大元件缺乏其一時，DNA Nanomachine 則無法運作，最終產物 P2 就無法成功產出。接著我們進行一系列條件之最佳化，其中包括緩衝溶液的選擇、受質使用的濃度、聚合酶和剪切酶的濃度比，以獲得最多的最終產物 P2。在電化學偵測的部分，我們先確認最終產物 P2 可以為誘導股，並與修飾在工作電極表面亞甲藍標定的探針進行雜合，進而造成電化學訊號之改變。接著我們進行阻隔劑 (Blocking agent) 和鍍金時間之最佳化，以得到最佳之實驗操作條件。藉由標準曲線 (Calibration curve) 的結果顯示，我們所設計的電化學生化感測器的偵測極限為 9.6 pM。我們將 20 fmol 的 miR-221 添加入血清中，所測得之回收率 (Recovery rate) 接近百分之百。該感測平台被證實具有可偵測血清中之 microRNA 之可行性和潛力。此外，我們也使用不同分析物 (目標分子和其同源家族成員) 進行 DNA Nanomachine 之選擇性測試，結果顯示所研發的電化學感測器只會針對目標分子 miR-221 展現出訊號之改變，從而證實我們所研發的電化學感測器具有良好之選擇性。

關鍵字：胰臟癌、微型核醣核酸、電化學生化感測器、聚合酶、外切酶

ABSTRACT

Pancreatic cancer with a single-digit survival rate, at ~7%, has the highest mortality rate among all cancers. Similar to lung cancer, pancreatic cancer patients seldom exhibit disease-specific symptoms until late disease stage; therefore an establishment of early detection method for pancreatic cancer is important to classify pancreatic cancer at earlier stages. MicroRNAs (miRNAs) are a class of highly conserved non-coding RNA consisted of approximately 22 nucleotides that regulate gene expression by either degradation of mRNAs or translational repression at the post-transcriptional level. MicroRNAs are voted as potential biomarkers for therapeutics and point-of-care diagnostics, as their aberrant expressions are always associated with diseases and even various cancers. In this study, a novel isothermal electrochemical biosensor was designed for sensitive and selective detection of circulating pancreatic cancer-related microRNA. The amplification strategy was based on dual enzyme-empowered target recycling performed by polymerase and exonuclease. Initially, the presence of target miRNA selectively unfolded a hairpin probe (H), followed by the polymerase-triggered elongation of the H along with the strand displacement of target miR. While the target miR went on a new cycle of H unfolding, a blunt end of the He was formed and digested by the exonuclease, resulting in the release of intermediate DNA product (P1). The released P1 was able to hybridize with a new H, initiating a new round of exonuclease-assisted digestion of H, yielding a final DNA product (P2). Finally, a “signal-off” electrochemical biosensor was established when the signal inducer P2 hybridized with a methylene blue-labelled complementary hairpin probes (P2C) that immobilized on a gold nanostructured screen printed electrode (AuNC@SPCE) through gold-thiol bond. Under optimal condition, this biosensor offered an excellent sensitive platform towards the detection of target miR, with detection limit of 25 pM together with a dynamic range

of six orders of magnitude. In addition, an excellent selectivity was achieved in discriminating its homologous inter-family members. We have herein successfully demonstrated a biosensing platform for the detection of pancreatic cancer-related miR and the biosensor holds a potential in the early diagnosis of pancreatic cancer to improve the survival rate in the future.

Keyword: pancreatic cancer, microRNA, methylene blue, screen printed electrode

目錄



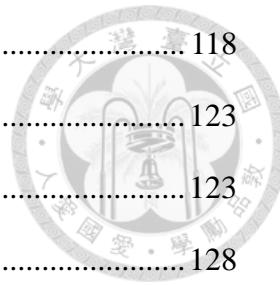
第一章 緒論	1
1.1. 胰臟癌 (Pancreatic cancer).....	1
1.1.1. 認識胰臟.....	1
1.1.2. 人類胰臟癌.....	1
1.1.3. 胰臟癌之診斷.....	4
1.2. 微型核醣核酸 (MicroRNA).....	5
1.2.1. miRNA 生合成與作用機制	5
1.2.2. miRNA 與癌症	8
1.2.3. 循環性 miRNA (Circulating microRNA).....	10
1.2.4. miR-221 做為胰臟癌之生物指標	11
1.2.5. miRNA 之偵測方法.....	13
1.3. 脫氧核醣核酸奈米機器 (DNA Nanomachine)	19
1.3.1. 以鏈交換反應為基礎之 DNA 奈米機器	19
1.3.2. 溫度調控之 DNA 奈米機器	20
1.3.3. 酵素驅動型奈米機器	21
1.4. 等溫核酸放大技術 (Isothermal Amplification).....	22
1.4.1. 酵素驅動型等溫核酸放大技術.....	22
1.4.2. 非酵素驅動型核酸放大技術.....	25
1.5. 酵素輔助核酸目標循環 (Enzyme-assisted Target Recycling).....	27
1.5.1. 典型之輔助目標物循環法.....	30
1.5.2. 5'→3'外切酶分析法	30
1.5.3. 入侵分析法 (Invader Assay)	31
1.5.4. Lambda exonuclease 輔助目標分子循環法	32



1.6. DNA 生化感測器 (DNA Biosensor).....	33
1.6.1. 生物元件之修飾法.....	33
1.6.2. 電化學生化感測器.....	35
1.7. 電化學偵測法.....	37
第二章 實驗材料與方法	39
2.1. 核酸序列.....	39
2.2. 實驗試劑與材料.....	41
2.3. 實驗儀器.....	44
2.4. 緩衝溶液.....	46
2.5. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	47
2.6. 酵素驅動型核酸奈米機器 (DNA Nanomachine) 產物之鑑定	48
2.7. Hairpin 5'端 overhang 鹼基數目之最佳化	48
2.8. 反應緩衝溶液之最佳化.....	49
2.9. 受質 H 濃度之最佳化.....	49
2.10. P2C (Complementary Sequence of P2) 之最佳化	50
2.11. 酵素濃度比例之最佳化.....	50
2.12. 選擇性 (Selectivity) 之測試.....	51
2.12.1. 受質 H 之專一性測試.....	51
2.12.2. KF 之專一性延長測試	51
2.12.3. λ 之專一性剪切測試.....	51
2.12.4. P2C 之專一性測試.....	51
2.13. 鍍金時間 (Gold electrodeposition time) 之最佳化	53
2.13.1. 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-4-}$ 為電化學訊號分子	53
2.13.2. 以 P2C-MB 探針上之 MB 為電化學訊號之分子	56
2.14. P2C-MB 固定化濃度之最佳化	59



2.15. P2C-MB 於工作電極之密度鑑定	62
2.16. 阻隔劑 (Blocking agent) 之最佳化.....	65
2.16.1. 以經不同阻隔劑處理之電極量測不同濃度亞甲藍溶液之校正曲線所 得之 slope 和 R^2 進行比較	65
2.16.2. 經不同阻隔劑處理之電極對 BSA 非專一性吸附之抗性.....	67
2.17. 工作電極表面之鑑定.....	70
2.18. 電化學生化感測器應用於目標分子 miR-221 之分析	71
2.19. 電化學生化感測器之選擇性測試.....	72
2.20. 儲存天數 (Storage time) 對於氧化電化學訊號之影響.....	73
2.21. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較	76
2.22. 血清 (Serum) 中目標分子 miR-221 之回收率 (Recovery rate)	77
第三章 實驗結果與討論	79
3.1. 實驗設計	79
3.2. 酵素驅動型核酸奈米機器 (DNA Nanomachine) 產物之鑑定	86
3.3. Hairpin 5'端 overhang 鹼基數目之最佳化	90
3.4. 反應緩衝溶液之最佳化.....	95
3.5. 受質 H 濃度之最佳化.....	99
3.6. P2C (Complementary Sequence of P2) 之最佳化	101
3.7. 酵素濃度比例之最佳化.....	105
3.8. 選擇性 (Selectivity) 之測試.....	109
3.8.1. 受質 H 之專一性測試.....	110
3.8.2. KF 之專一性延長測試	112
3.8.3.. λ 之專一性剪切測試.....	114
3.8.4. P2C 之專一性測試.....	116
3.9. 網版印刷碳電極工作電極製備條件之最佳化.....	118



3.9.1. 鍍金時間 (Gold electrodeposition time) 之最佳化	118
3.9.2. P2C-MB 固定化濃度之最佳化	123
3.9.3. P2C-MB 於工作電極之密度鑑定	123
3.9.4. 阻隔劑 (Blocking agent) 之最佳化.....	128
3.9.5. 工作電極表面之鑑定.....	135
3.10. 電化學生化感測器應用於目標分子 miR-221 之分析	137
3.11. 電化學生化感測器之選擇性測試.....	142
3.12. 儲存天數 (Storage time) 對於氧化電化學訊號之影響.....	144
3.13. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較	148
3.14. 血清 (Serum) 中目標分子 miR-221 之回收率 (Recovery rate)	151
第四章 結論	153
第五章 參考文獻	155

圖 目 錄



圖 1- 1. 美國之癌症發生率及死亡率	3
圖 1- 2. 胰臟癌病患之症狀	3
圖 1- 3. 胰臟癌治療準則	5
圖 1- 4. miRNA 之生合成路徑及其作用機制.....	7
圖 1- 5. miRNA 可做為致癌基因或抑癌基因.....	9
圖 1- 6. miRNA 之可能來源.....	10
圖 1- 7. 北方墨點法示意圖	15
圖 1- 8. 微陣列示意圖	16
圖 1- 9. 螢光原位雜交示意圖	17
圖 1- 10. 即時定量反轉錄 PCR 之示意圖	18
圖 1- 11. 以鏈交換反應為基礎之 DNA 奈米機器	20
圖 1- 12. 溫度調控之 DNA 奈米機器.....	20
圖 1- 13. 酵素驅動型奈米機器	21
圖 1- 14. 滾環式擴增法示意圖	23
圖 1- 15. 鏈置換擴增法示意圖	24
圖 1- 16. 解鏈酶扩增示意圖	25
圖 1- 17. 雜交鏈式反應示意圖	26

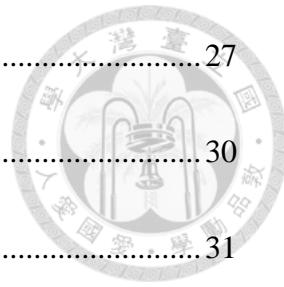


圖 1- 18. 酶素輔助核酸目標循環的分類	27
圖 1- 19. 典型之輔助目標物循環法示意圖	30
圖 1- 20. 5' →3' Exonuclease assay 示意圖	31
圖 1- 21. Invader assay 示意圖	31
圖 1- 22. λ 辅助目标分子循环法示意圖	32
圖 1- 23. DNA 生化感測器之組成元件.....	33
圖 1- 24. 生物元件之修飾法	34
圖 1- 25. Signal-off 系統示意圖	35
圖 1- 26. Signal-on 系統示意圖.....	36
圖 2- 1. SPCE 之不同層次之修飾.....	70
圖 3- 1. 以酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略之電化學生化感測平臺 ...	81
圖 3- 2. 髮夾構型的脫氧核醣核酸（DNA Hairpin，H）的序列設計及其功能...	82
圖 3- 3. DNA Nanomachine 反應溫度之最佳化.....	83
圖 3- 4. P2C 的序列設計	85
圖 3- 5. 酵素驅動型核酸奈米機器的主要元件和 AND gate 示意圖	86
圖 3- 6. 使用 Nupack 針對 200 nM H 和 200 nM M 在鈉離子濃度和鎂離子濃度分 別為 0.05 M 和 0.01 M，反應溫度為 37 °C 的條件之下進行雜合所得之 分析結果.....	87

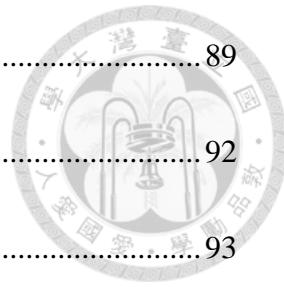


圖 3- 7. DNA Nanomachine 運作結果之條帶對應圖.....	89
圖 3- 8. λ 在沒有目標分子 miR-221 存在之下對於 H 的影響	92
圖 3- 9. H1 與 H2 之序列設計	93
圖 3- 10. Hairpin 5' 端 overhang 鹼基數目的最佳化.....	94
圖 3- 11. λ 酶素活性測試之原理	97
圖 3- 12. λ 在不同反應緩衝溶液之酶素活性	97
圖 3- 13. KF 酶素活性測試之原理	98
圖 3- 14. KF 在不同反應緩衝溶液之酶素活性	98
圖 3- 15. 受質 H 濃度之最佳化	100
圖 3- 16. P2C1 與 P2C2 之序列設計	102
圖 3- 17. 使用 Nupack 針對 200 nM P2 和(A) 200 nM P2C1 (B) 200 nM P2C2 雜合 所得之分析結果.....	102
圖 3- 18. P2C 之最佳化	103
圖 3- 19. 酶素濃度比例之最佳化(以最終產物進行比較).....	106
圖 3- 20. 酶素濃度比例之最佳化 (以 P2C 消耗程度進行比較).....	108
圖 3- 21. DNA Nanomachine 選擇性測試之檢查站	109
圖 3- 22. 受質 H 之專一性測試	111
圖 3- 23. KF 之專一性延長測試	113
圖 3- 24. λ 之專一性剪切測試	115



圖 3- 25. P2C 之專一性測試	117
圖 3- 26. 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-4-}$ 为 signal reporter 之實驗操作流程	118
圖 3- 27. 金奈米粒子於碳電極工作電極之電沉積時間對於 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-4-}$ 氧化電流 的影響.....	119
圖 3- 28. 以 P2C-MB 为 signal reporter 之實驗操作流程.....	121
圖 3- 29. 金奈米粒子於碳工作電極之電沉積時間對於 P2C-MB 氧化電流的影響	121
圖 3- 30. 金奈米粒子於碳工作電極之電沉積時間對於 P2C-MB 氧化電流的影響	122
圖 3- 31. P2C-MB 固定化濃度之最佳化.....	124
圖 3- 32. 修飾於工作電極之探針密度對於雜合率和訊號差異表現之影響	127
圖 3- 33. P2C-MB 於工作電極之密度鑑定.....	127
圖 3- 34. MCH 阻隔之原理	130
圖 3- 35. 不同組合的阻隔劑對於游離 MB 氧化電流訊號之影響	131
圖 3- 36. 不同濃度之游離亞甲藍所得之校正曲線	132
圖 3- 37. 不同組合的阻隔劑之抗 BSA 能力	134
圖 3- 38. 工作電極表面不同層次之修飾	135
圖 3- 39. 工作電極表面之循環伏安法 (CV) 鑑定	136
圖 3- 40. 電化學感測器應用於 100 nM 目標分子 miR-221 之分析	138



圖 3- 41. 電化學生化感測器應用於不同濃度目標分子 miR-221 分析所得之校正曲線.....	140
圖 3- 42. 目標分子 miR-221 使用濃度對於起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 下降幅度之影響.....	141
圖 3- 43. 電化學生化感測器之選擇性測試	143
圖 3- 44. 儲存天數對於 MB 氧化電流訊號之影響	145
圖 3- 45. 儲存天數對於 MB 氧化電流訊號之影響。以氮氣密封法進行包裝後，並置於 4°C 之環境進行電極之儲存.....	147
圖 3- 46. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較實驗之操作流程.....	149
圖 3- 47. 準確度和精密度之示意圖	149
圖 3- 48. 血清中目標分子 miR-221 之回收率	152



表目錄

表 1- 1. 組成胰島之細胞與其分泌之激素	1
表 1- 2. 胰臟癌分期之特性與其病患之中位存活時間	3
表 1- 3. 胰臟癌之診斷工具及其限制性	4
表 1- 4. 罹患胰臟癌的病患與 miRNA 的關係.....	12
表 1- 5. 健康受試者、罹患良性腫瘤之病患與罹患胰臟癌之病患的血漿 miR-221 表現量	13
表 1- 6. miRNA 偵測方法之優缺點.....	14
表 1- 7. 酶素驅動型等溫核酸放大技術之比較	22
表 1- 8. 非酶素驅動型等溫核酸放大技術之比較	25
表 1- 9. 應用於酶素輔助核酸目標循環法的限制性內切酶及其所辨認之序列 ...	28
表 1- 10. 應用於酶素輔助核酸目標循環法的內切酶和外切酶與其作用	29
表 1- 11. 生物元件不同修飾法之比較	34
表 2- 1. 核酸序列與其修飾	39
表 2- 2. SPCE 工作電極表面清洗之循環伏安法 (CV) 參數設定	54
表 2- 3. 鍍金用之計時電流法參數設定	54
表 2- 4. 電極表面鑑定之循環伏安法 (CV) 參數設定	55

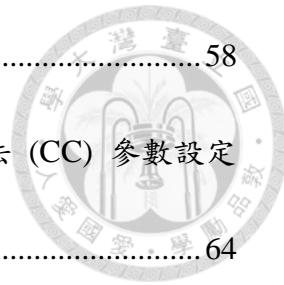


表 2- 5. 方波伏安法 (SWV) 參數設定.....	58
表 2- 6. 工作電極表面 P2C-MB 之密度鑑定使用的計時庫倫法 (CC) 參數設定	64
.....	
表 3- 1. 利用 Mfold 針對單獨的 H 和 MicroRNA/Hairpin duplex 在鈉離子濃度為 1 M，反應溫度為 37 ⁰ C 的條件之下進行熱力學函數的分析	87
表 3- 2. λ 對於不同受質的轉變數(K_{cat}).....	92
表 3- 3. 各種緩衝液之成分組成及其在 25 ⁰ C 之 pH 值	96
表 3- 4. 準曲線所得之 slope 和 R ²	132
表 3- 5. 針對不同濃度之目標分子 miR-221 進行分析所得訊號規化值之相對標準 偏差 (n=4).....	140
表 3- 6. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較 (n=3)	150

第一章 緒論



1.1. 胰臟癌 (Pancreatic Cancer)

1.1.1. 認識胰臟

胰臟 (Pancreas) 又稱為胰腺，位於腹部 (Abdomen) 和胃 (Stomach) 之後方，為同時兼具內分泌 (Endocrine) 和外分泌 (Exocrine) 功能之器官。外分泌區主要由腺泡細胞 (Acinic cell) 和將分泌物導入小腸的導管所組成。腺泡細胞可分泌多種消化酶 (Digestive enzyme) 以促進食物之消化與人體之吸收，其中包含：澱粉酶 (Trypsin)、胰蛋白酶 (Chymotrypsin) 與脂肪酶 (Lipase)，而導管可分泌碳酸氫鹽 (Bicarbonate)¹ 以中和胃酸之微鹼性；外分泌區主要由胰島 (Pancreatic islets) 所組成，其內含有 5 種分泌不同激素之細胞 (表 1-1)²。

β-細胞	分泌胰島素 (Insulin)
α-細胞	分泌胰升糖素 (Glucagon)
δ-細胞	分泌生長抑素 (Somatostatin)
PP-細胞	分泌胰多肽 (Pancreatic polypeptide)
ε-細胞	分泌生長激素釋放肽 (Gherlin)

表 1-1. 組成胰島之細胞與其分泌之激素。

1.1.2. 人類胰臟癌

胰臟管線癌 (Adenocarcinomas) 佔了所有胰臟腫瘤中之 90%³，其中有 80% 於胰臟腺體之前端發生。根據美國癌症聯合委員會 (American Cancer Society) 的資料顯示⁴，胰臟癌主要分為四期，如表 1-2 所示。其分期是依據腫瘤之大小與淋巴結和遠處器官是否有轉移現象而進行決定⁵。於美國癌症協會之新發生事件排名中，如圖 1-1 顯示，胰臟癌分別在男生與女生排名第十名和第九名⁶；而根據台灣衛生福利部之癌症登記報告中，胰臟癌的發生率的排名於男生和女生都為第 13 位。雖然胰脏癌的发生率與其它癌症相比之下來得低，可是它於美國癌症

相关死亡率的排名位居第四名，而在台湾的癌症相关死亡率的排名於男生與女生分別為第 8 位和第 5 位。胰臟癌進一步被預計在 2020 年左右成為美國癌症相關死亡原因的第二名⁷。由於胰臟位於腹部之深處使得腫瘤的生成不易被察覺，而且罹患上胰臟癌之病人在早期時不會表現明顯之症狀，通常只是體重的減輕(Weight loss)、腹部之疼痛 (Abdominal pain)、噁心 (Nausea)、嘔吐(Vomiting) 與黃疸 (Jaundice) 等⁸，如圖 1-2 所示。當症狀明顯出現時，常意味著腫瘤已擴散至鄰近之器官與組織，進而導致最好之治療時機被耽誤。胰臟癌為高度轉移性 (Metastasis) 和入侵性之癌症，並且對於化學療法 (Chemotherapy) 具有抗性⁹。上述之原因導致罹患上胰臟癌之病患的五年存活率 (Relative survival rate) 為癌症當中最低，約只有 6%¹⁰。胰臟癌之高危險群主要包括有抽煙 (Smoking) 習慣之人¹¹、年紀超過 50 歲之人口、糖尿病 (Diabetes) 之患者¹²。此外，胰臟癌風險之增加與囊腫性纖維化 (Cystic fibrosis)¹²、膽囊切除手術 (Cholecystectomy)¹³與胃切除手術 (Gastrectomy)¹⁴ 有密切之關係。

分類	特征	淋 巴 結 之轉移	遠 處 器 官 之轉移	中 位 存 活 時 間 (月)
IA	腫瘤之最大直徑為 2 cm。	無	無	24.1
IB	腫瘤之最大直徑超過 2 cm。	無	無	20.6
IIA	腫瘤已擴散至鄰近之器官與組 織，但未涉及腹腔靜脈與上腸 繫膜動脈。	無	無	15.4
IIB	腫瘤已擴散至腹腔靜脈與上腸 繫膜動脈。	局部性	無	12.7
III	腫瘤已擴散至腹腔靜脈與上腸 繫膜動脈。	有	無	10.6
IV	腫瘤已擴散至腹腔靜脈與上腸 繫膜動脈。	有	有	4.5

表 1-2. 胰臟癌分期之特性與其病患之中位存活時間 (Median survival time)⁵。

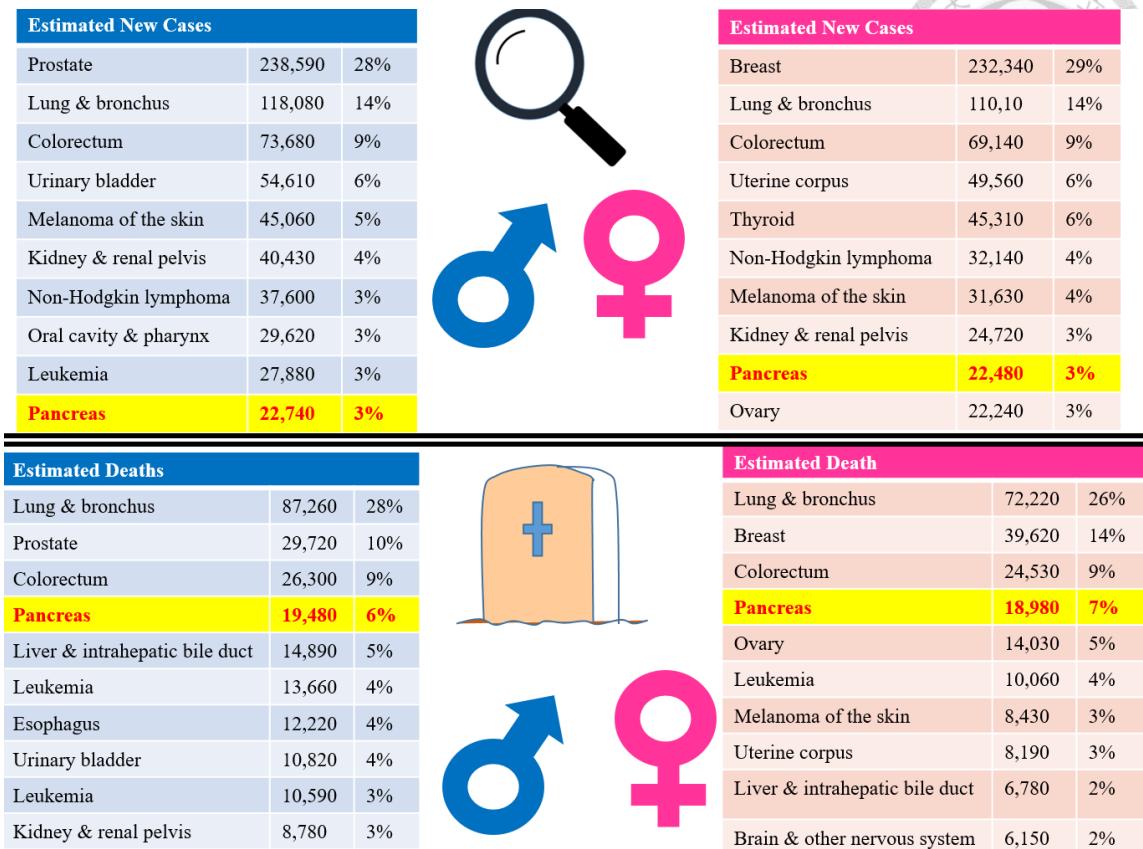


圖 1- 1. 美國之癌症發生率及死亡率

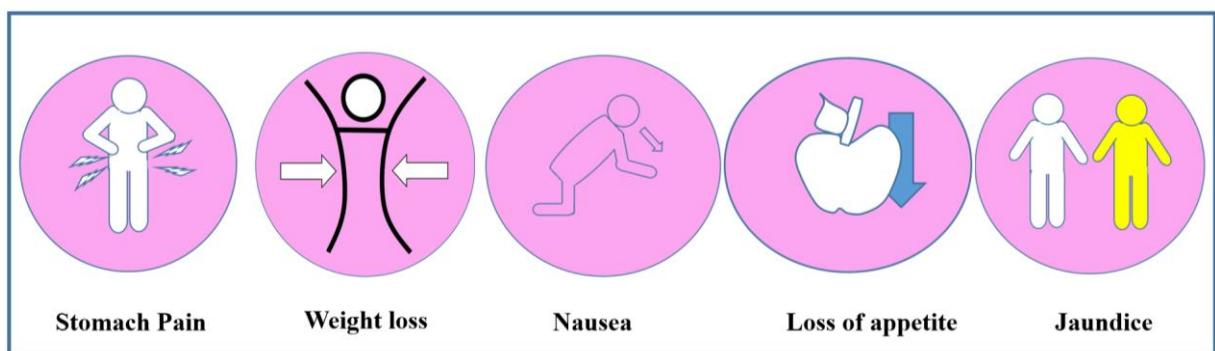


圖 1- 2. 胰臟癌病患之症狀



1.1.3. 胰臟癌之診斷

目前臨牀上常用的血中胰臟癌標記分子 (Tumor marker) 有癌抗原 19-9 (CA 19-9)。當選用 CA19-9 為胰臟癌之檢查項目時，其敏感性 (Sensitivity) 和選擇性 (Selectivity) 分別為 70% - 92% 和 68 - 92%，並不適合針對體積較小之腫瘤進行偵測¹⁵。由於有些疾病如阻塞性黃疸 (Obstructive jaundice) 或良性腫瘤會導致 CA19-9 濃度的上升，因此陽性預測值 (positive predictive value) 只可達到 0.5-0.9%，限制了此檢測方法之可用性。常做為胰臟癌之診斷工具有腹部超音波 (Abdominal ultrasonography)¹⁶、電腦斷層掃描 (Computer Tomography, CT)¹⁷ 和逆行性膽道胰管內視鏡攝影 (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)¹⁸。然而上述診斷工具都存在著一定的限制性，如表 1-3。圖 1-3 為臺北榮民總醫院所提供之胰臟癌治療準則。

診斷工具	缺點
腹部超音波	易受到胰臟前方大量脂肪、腸氣、軟組織、骨骼的干擾而使得偵測大受限制
CT	常無法針對小於 2 cm 之腫瘤進行偵測
ERCP	必須將內視鏡從口腔置入十二指腸以進行胰臟癌之檢測，因此為高度侵入性之偵測方法

表 1-3. 胰臟癌之診斷工具及其限制性

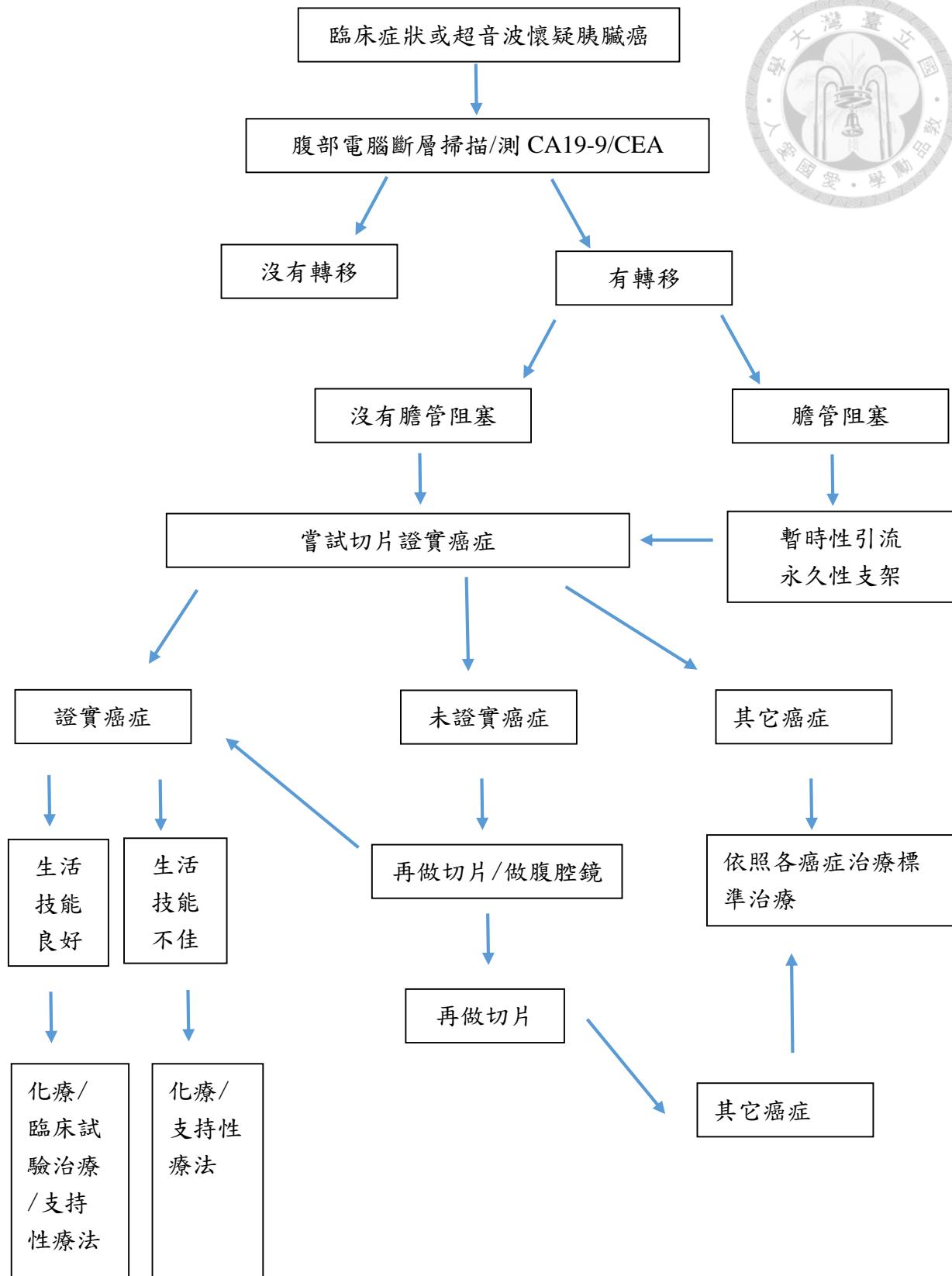


圖 1-3. 胰臟癌治療準則



1.2. 微型核糖核酸 (MicroRNA)

微型核糖核酸 (MicroRNA, miRNA) 為一小片段長度約只有 22 個核苷酸 (Nucleotide) 的單股非編碼 RNA (Non-coding RNA)。miRNA 轉錄 (Transcription) 自 DNA，可是無法順利進一步轉譯 (Translation) 成蛋白質。目前已有幾千種 miRNA 成功於各式各樣之動物和植物¹⁹ 發現。由於真核生物之 miRNA 的序列具有高度之保留性，因此可在不同物種間 (Species) 發現相似度極高之序列²⁰⁻²¹。miRNA 為基因表現之調節器，可參與細胞之增生 (Proliferation)、細胞週期 (Cell cycle) 之進程與細胞性凋亡 (Apoptosis)²²。Bantam 為果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 中被研究較為清楚的一個 miRNA，如果 Bantam 於組織中大量表現時，會促進細胞之分裂而導致細胞之程序性死亡 (Programmed cell death) 能成功被抑制²³；當 miR-1 於小鼠體內過量表達時，會使心肌細胞喪失其增殖之能力²⁴。由於 miRNA 的異常表現量常伴隨著多種疾病之發生，例如癌症²⁵⁻²⁶、糖尿病 (Diabetes)²⁷、神經系統疾病²⁸ 與心血管疾病²⁹⁻³⁰，因此釐清 miRNA 具有可做為疾病之生物性指標的潛力。

1.2.1. miRNA 生合成及作用機制

miRNA 之生物合成主要分為 3 個步驟，分別為轉錄、核加工和核輸出，其過程涉及一系列酵素之使用³¹，如圖 1-4 所示。在動物核內 (Nucleus)，RNA 聚合酶會與 DNA 序列附件的啟動子 (Promoter) 進行結合而將 miRNA 基因轉錄成具有 5'端帽及多聚腺苷酸尾 (Poly-A tail)，長度約為幾百個核苷酸之初級轉錄產物 primary miRNA (Pri-miRNA)³²。DiGeorge 綜合症關鍵區 8 (DGCR8) 會辨認 pri-miRNA 的雙股 RNA 結構，隨後與 Drosha 形成微加工複合體 (Microprocessor complex)³³。此複合體會針對 Pri-miRNA 之髮夾進行 11 個核苷酸之剪切，而釋放出前 miRNA (Pre-miRNA)。接著核細胞穿梭蛋白 Exportin-5 會辨認 pre-miRNA 髮夾之 3'末端，並以主動運輸的方式將 pre-miRNA 由細胞核運送到細胞質

(Cytoplasm)³⁴。於細胞質內，RNaseIII 內切酶 Dicer 會將 pre-miRNA 進行切割，進而產生核苷酸長度約為 22 個的 miRNA：miRNA 雙股³⁵。miRNA：miRNA 雙股會進一步進行解螺旋，形成成熟之 miRNA。隨後此成熟之 miRNA 與 RISC (RNA-induced silencing complex) 核酸蛋白進行結合而形成可調控基因表現之 miRNP。當 mRNA 與 miRNA 之序列完全互補時，mRNA 會進行降解 (Degradation)；反之，當 mRNA 與 miRNA 之序列不完全互補時，蛋白質之轉譯會被抑制³⁶。

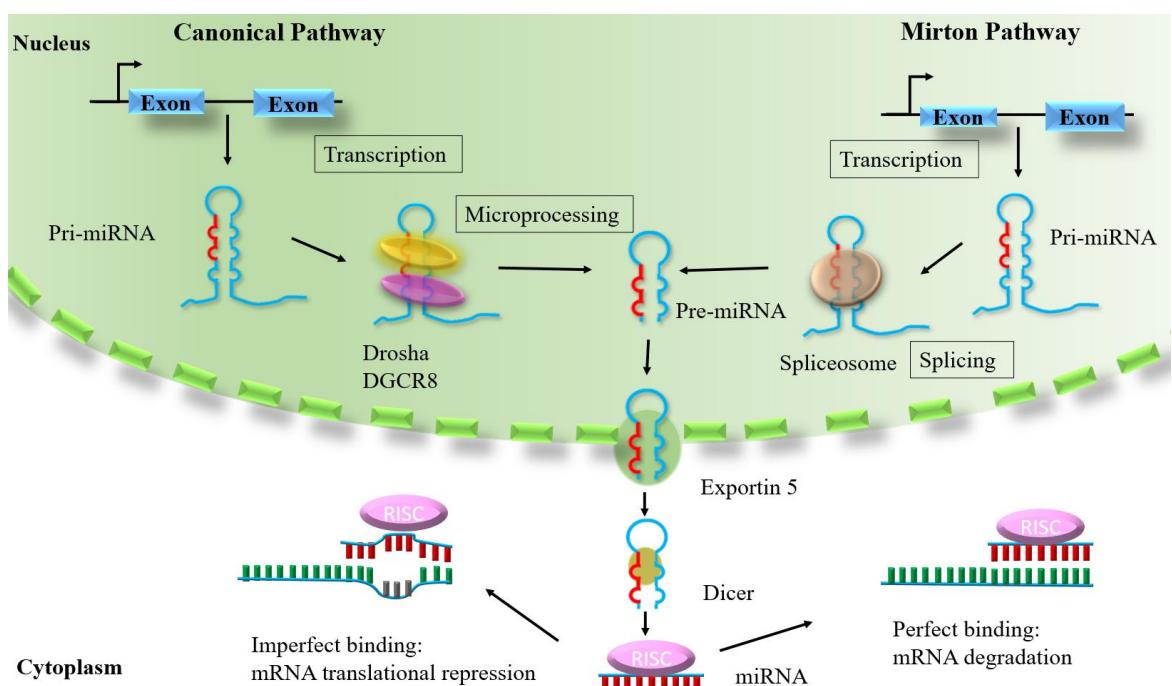


圖 1-4. miRNA 之生合成路徑及其作用機制。(參考 reference 31 重繪製圖)



1.2.2. miRNA 與癌症

miRNA 不但參與生理反應例如脂質之代謝以及胰島素之分泌，而且還參與與生命相關的調控機制例如細胞的分化與發育。Calin 之研究團隊於 2002 年首次發現 miRNA-15a/miRNA-16-1 cluster 於罹患慢性淋巴性白血病 (Chronic lymphocytic leukemia) 的病人身上會出現基因缺失或表現量降低之現象³⁷。後續的許多研究也成功證明特定 miRNA 的異常表現常伴隨著癌症的生成³⁸⁻³⁹。近年來，miRNA 於不正常的癌症組織中被發現可做為致癌或抑癌性調節因子⁴⁰。與正常細胞相比之下，如果 miRNA 在癌症細胞中的表現量會增加，就稱為致癌 (Oncogenic) miRNA；反之，如果 miRNA 在癌症細胞中的表現量與正常細胞相比之下降低，就稱為抑癌 (Tumor suppressor) miRNA。致癌 miRNA 能刺激細胞之增生和抑制細胞之死亡而導致腫瘤之生長；抑癌 miRNA 能阻止細胞之分裂或導致細胞之死亡。miR-21 為最早歸類於致癌 miRNA 的其中一種 miRNA，它與許多癌症例如大腸癌、乳癌、胰臟癌有密切之關係⁴¹。Let-7a 為抑癌 miRNA，可通過調控癌基因 *c-Myc* 的表現，進而抑制腎癌細胞之增殖⁴²。miRNA 有潛力成為癌症之生物標記，主要有三大原因：(1). 當癌症發生時，miRNA 的表現會失調，(2). 在人類癌症中 miRNA 之表現樣式具有組織之特異性，(3). 在福馬林固定石蠟包埋 (Formalin-fixed paraffin-embedded) 之組織樣品中，miRNA 可穩定存在。

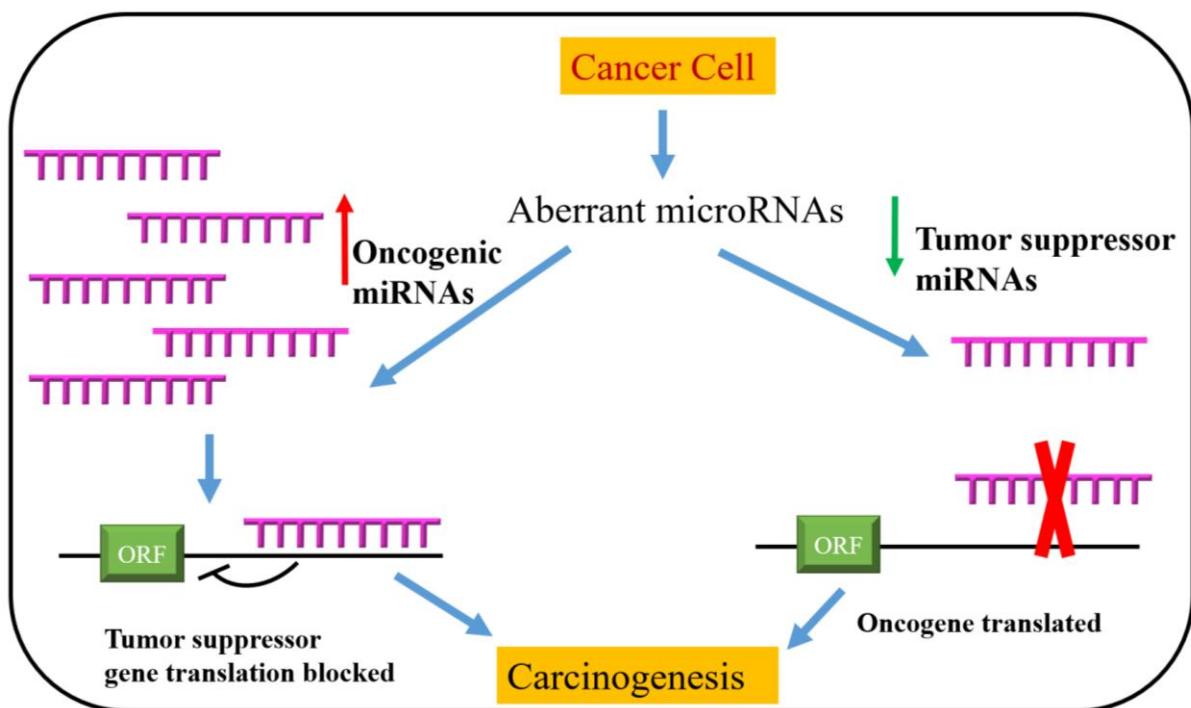


圖 1-5. miRNA 可做為致癌基因或抑癌基因。(參考 reference 40 重繪制圖)



1.2.3. 循環性 miRNA

循環性 miRNA (Circulating miRNA) 為一群可在體液如血液、尿液、唾液獲得之 miRNA。自從於 2008 年從血清 (Serum) 和血漿 (Plasma) 中成功鑑定出循環性 microRNA 以後，目前已有超過 600 篇之文章證實血清或血漿內的循環性 microRNA 可做為疾病的生物標記。循環性 miRNA 的可能來源分為兩種，第一種以被動滲透的方式從破裂之細胞內釋放出來，另一種則通過細胞之主動分泌⁴³。一部分循環性 miRNA 被細胞釋放到多泡體 (Multivesicular bodies)⁴⁴ 和外泌體 (Exosome)⁴⁵ 的囊泡，進而可以防止 RNase 之降解；另一部分 miRNA 與 Argonaute 2 (Ago 2)⁴⁶ 蛋白形成具有高度穩定性之 Ago2/miRNA 蛋白複合物，賦予 miRNA 可在細胞外穩定存在之能力；根據文獻指出，循環性 miRNA 對於 RNase 之裂解，反復之凍融循環，劇烈的實驗操作條件具有抗性，可穩定存在⁴⁷。而在 2009 年的 Mraz 等人的研究指出，即使將血清樣品存放於 -20 °C 至 -80 °C 的環境下進行保存幾個月，然而 miRNA 並無顯著降解之現象⁴⁸。循環性 miRNA 具有潛力成為癌症之生物標記的主要兩大原因為：(1). miRNA 於人類血清和血漿具有高度穩定性，(2). 可以以較低入侵的方式取得 miRNA。

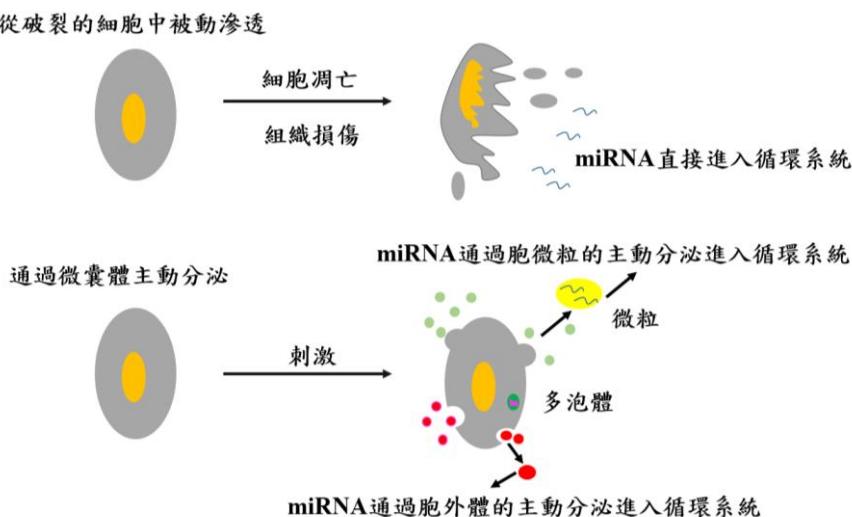


圖 1-6. miRNA 之可能來源。(參考 reference 43 重繪制圖)



1.2.4. miR-221 做為胰臟癌之生物指標

根據文獻指出，miRNA 的異常表現常伴隨著胰臟癌的發生，如表 1-4⁴⁹⁻⁵⁹。Lee 之團隊於 2006 年使用即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR) 技術針對胰臟癌組織及癌附近之正常組織進行 miRNA 表現量之比較，從而發現在胰臟癌組織中有約有 100 個 miRNA 的表現量有異常之現象。其結果顯示在胰臟癌組織表現量會明顯上調 (Upregulated) 的 miRNA 包括 miR-221、miR-21 與 miR-155；而表現量會明顯下調 (Downregulated) 之 miRNA 則包括 miR-345 與 miR-139⁶⁰。Bloomstom 之研究團隊亦於 2007 年成功以微陣列 (Microarray) 之偵測方法發現 miR-221、miR-21 與 miR-155 在胰臟癌組織之樣本中會過度表現。除此之外，更有文獻指出可在罹患胰臟癌的病患之血漿中可偵測到過度表現的 miR-221，如表 1-5⁵¹。基於 miR-221 會在胰臟癌之病患大量表現和 miR-221 為循環性 miRNA 可在血漿中被偵測到之兩大因素，因此我們判斷 miR-221 具有做為人類胰臟癌的分子生物標記。

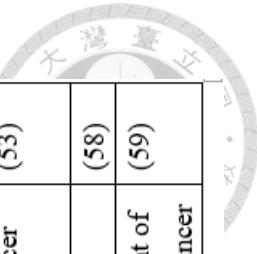


表 1-4. 患胰臟癌的病患與 miRNA 的關係

miRNA	Function	Reported activity for pancreatic cancer	Refs
miR-21	OncomiR	Expressed in early PDA	(49)
miR-181b	OncomiR	miRNA-181b sensitizes PDAC cells to gemcitabine by targeting BCL-2	(50)
miR-221	OncomiR	Plasma miR-221 concentrations were significantly higher in PCa patients. Useful biomarker for cancer detection, monitoring tumor dynamics and predicting malignant outcomes	(51)
miR-27a-3p	OncomiR	Used as a biomarkers for PC diagnosis	(52)
miR-100	OncomiR	Regulates IGF1-receptor expression in metastatic pancreatic cancer cells	(53)
miR-34 family	Tumor suppressor miR	Targeting the anti-apoptotic mRNAs such as BCL2, MYCN	(54)
miR-124	Tumor suppressor miR	miR-124 is downregulated and epigenetically silenced in pancreatic cancer	(55)
miR-217	Tumor suppressor miR	Frequently downregulated miR-217 can regulate KRAS and function as a tumor suppressor in PDAC. Useful therapeutic agent for miRNA-based PDAC therapy	(56)
miR-148a	Tumor suppressor miR	An inappropriate therapeutic Tool for PC	(57)
miR-138	Tumor suppressor miR	Regulates IGF1-receptor expression in metastatic pancreatic cancer cells	(53)
miR-15a-3p	Tumor suppressor miR	Induces apoptosis	(58)
miR-216a	Tumor suppressor miR	Downregulated expression of miR-216a suggests the involvement of miR-216a in the tumorigenesis and development of pancreatic cancer	(59)

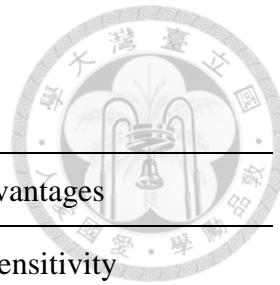
Plasma miR-221 concentration (amol/ μ L)

Sample	n	Mean	95% CI	p-value
Pancreatic tumor	47	0.0396	0.0287-0.0505	P < 0.001
Benign tumor	9	0.0161	0.0094-0.0227	p = 0.539
Normal control	30	0.0158	0.0113-0.0202	

表 1-5. 健康受試者、罹患良性腫瘤之病患與罹患胰臟癌之病患的血漿 miR-221 表現量。

1.2.5. miRNA 之偵測方法

精確地知道 miRNA 在特定細胞、組織或體液的表現量是在建立 miRNA 做為嶄新的診斷生物標記之關鍵。然而 miRNA 的一些內在特徵使得偵測技術無法以高度選擇性和特異性的方式取得 miRNA 圖譜 (Expression profile)。由於成熟的 miRNA 缺乏 poly-A-tail 和 5'cap，進而限制選擇性純化 (Selective purification) 的使用。成熟的 miRNA 較小，平均長度約為 22 個核苷酸，因此所設計的探針引物 (Primer) 無法有效地去與身為模板 (Template) 的 miRNA 進行互補結合，進而限制一系列偵測工具的使用。miRNA 只占了 RNA 樣本量的 0.01%，往往低於偵測工具所能偵測之最低範圍。部分同源家族 miRNA 的序列組成具有高度相似性，使得 miRNA 偵測方法的特異性嚴重受到挑戰⁶¹。目前，常用於 miRNA 的偵測技術主要北方墨點法 (Northern blotting)、微陣列 (Microarray)、即時定量反轉錄 PCR (Real-time qRT-PCR)、原位雜合 (*In situ* hybridization, ISH) 與熒光原位雜交 (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)。然而這些 miRNA 偵測方法都存在著限制性，如表 1-6 所示³¹。



Analytical technique	Advantages	Disadvantages
Northern blotting	Ability to discovery new miRNAs	Low sensitivity
RT-PCR	Accurate and sensitive	Low throughput More expensive
Deep sequencing	Potential to discover novel miRNA	High cost, infrastructure requirements, run length
ISH	Attractive technology that is used for cellular localization	Low affinity of routine RNA probes
FISH	Simultaneous quantitation of miRNA	Complicated workflow Low sensitivity
Microarray	Simultaneous diagnosis of large numbers of miRNAs Small sample volume required to detect miRNA levels Low cost	Non-quantitative nature, needs more experimental validation

表 1-6. miRNA 偵測方法之優缺點³¹

1.2.5.1. 北方墨點法 (Northern blotting)



北方墨點法為常用之 miRNA 偵測方法。它可針對 RNA 分子的大小 (Size) 和豐度 (Abundance) 進行分析。其分析步驟包含兩部分，分別為轉印 (Blotting) 和雜合 (Hybridization)。原理如圖 1-7 所示，經由膠體電泳 (Gel electrophoresis) 的使用使得 miRNA 成功於 RNA 樣品內按分子之大小分離出來。隨後將經膠體分離後的 miRNA 片段轉印到尼龍膜上 (Nylon membrane)，由於核酸可與尼龍膜形成共價鍵因此 miRNA 片段可成功固定於膜上。最後以具有放射性標記或 biotin、digoxigenin 等非放射性標記之單股核酸探針與目標分子進行互補配對。結果所顯示的 RNA 條帶之相對位置表示 miRNA 的分子大小；而條帶之強度則表示 miRNA 的含量⁶²。

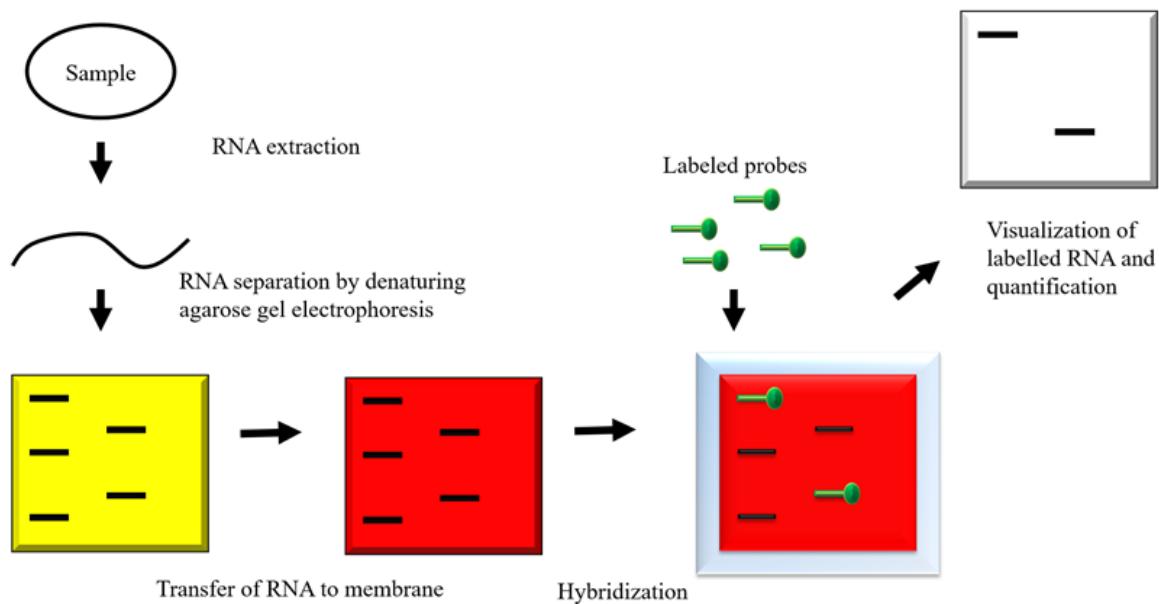


圖 1-7. 北方墨點法示意圖 (參考 reference 31 重繪製圖)



1.2.5.2. 微陣列 (Microarray)

由於微陣列為高通量 (High throughput) 之偵測方法，可以同一時間進行大量樣品之分析，因此受到研究人員之注意。首先先以聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 將特定基因之片段進行放大 (Amplification)，隨後進行純化並固定於晶片上以做為探針 (Probe)。如圖 1-8 所示，將從細胞萃取之 miRNA 進行反轉錄 (Reverse transcription) 而形成 cDNA，隨後分別標記上不同螢光波長之分子，例如 cy3 搭配 cy5 的使用。隨後將上述 cDNA 與晶片上的探針進行互補雜。經過激發光進行激發後，兩種不同波長之螢光可以被收集，進而評估基因之表現⁶³。

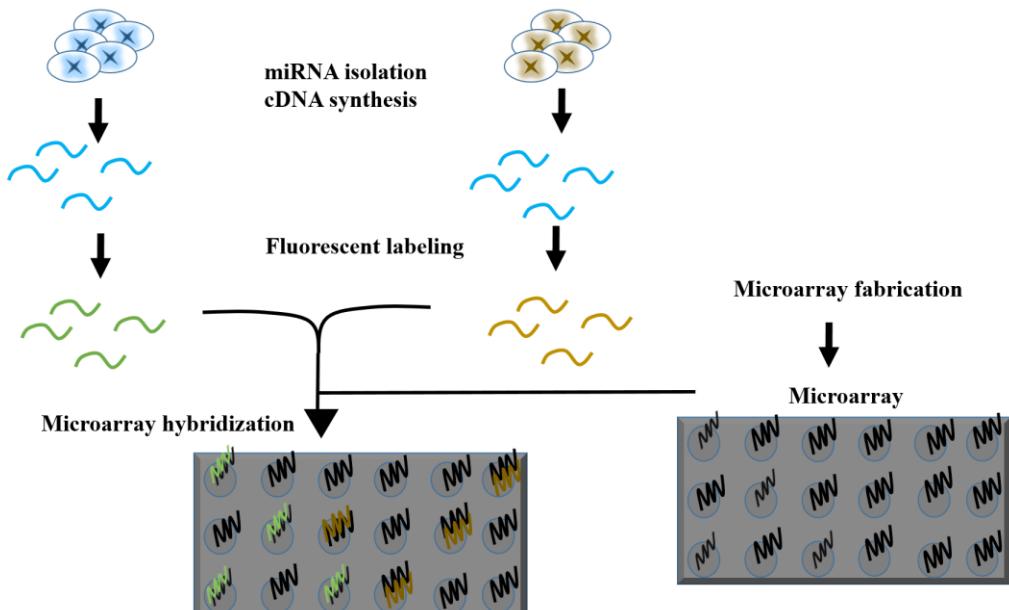


圖 1-8. 微陣列示意圖 (參考 reference 31 重繪製圖)

1.2.5.3. 融光原位雜交 (Fluorescence *in situ* hybridization)

如圖 1-9 所示，在小片段的 DNA 探針上以缺口轉化法 (Nick translation) 標定上帶有螢光分子修飾之核苷酸。隨後以高溫加熱的方式將帶有標定之雙股進行變性 (Denaturation)。用福馬林 (Formalin) 將組織固定於切片上，並將帶有標定的單股核酸探針加入，以進行互補配對。螢光標定的核酸探針可用螢光顯微鏡觀

測到其螢光，進而可確定目標分子的存在。由於此 miRNA 檢測方法為將探針直接送入固定好之細胞或組織內，因此可以直接觀察 miRNA 表現量的變化和 miRNA 在細胞或組織內的分佈情形⁶⁴。

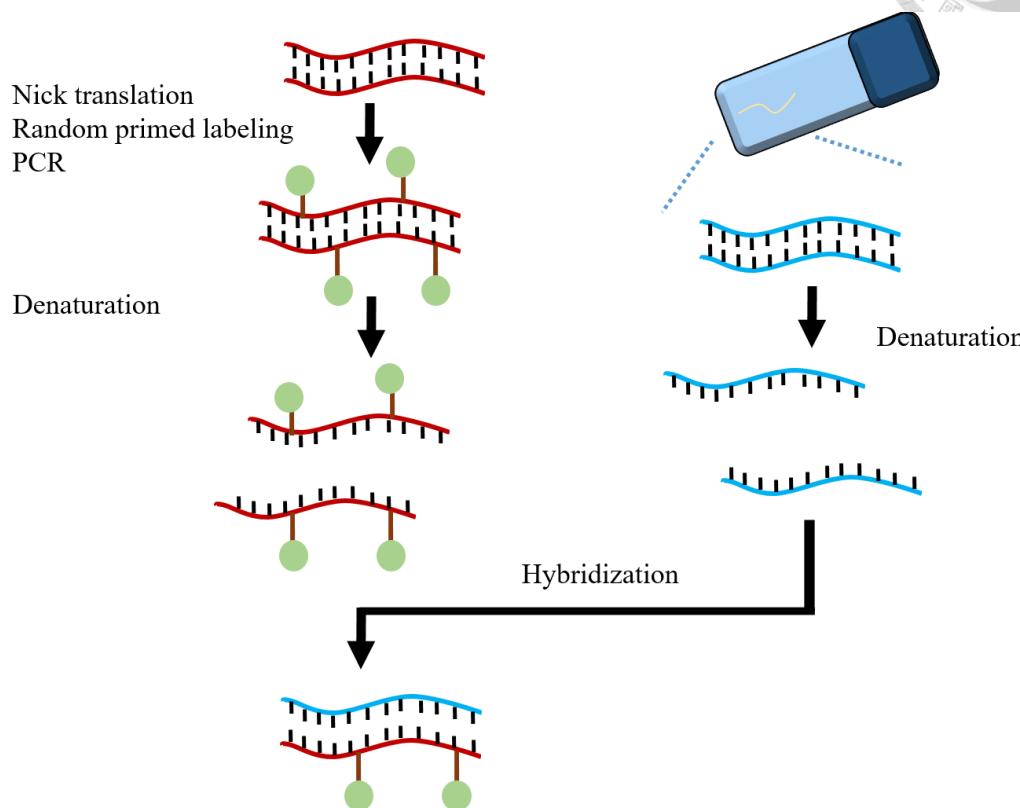


圖 1-9. 螢光原位雜交示意圖（參考 reference 64 重繪製圖）

1.2.5.4. 即時定量反轉錄 PCR (Real-time qRT-PCR)

目前已經成功商業化之 miRNA 分析試劑組分為兩種，可針對目標 miRNA 分子進行高度敏感性之分析，其偵測極限 (Detection limit) 可達至 pM 到 aM。第一種為使用具有髮夾結構與 5' 端具有 overhang 之 DNA 做為探針，當目標 miRNA 分子時進入反應系統時，可與探針 5' 端 overhang 的部位進行互補配對，啟動反轉錄 (Reverse transcription) 反應，進而產生反轉錄產物。隨後使用 RT-PCR 對反轉錄產物進行定量⁶⁵，如圖 1-10A 所示；另外一種方法為使用 poly A 聚合酶

將 miRNA 3'端加上長度約為 200-300 nt 的 poly-A tail，隨後使用帶有 oligo dT 且部分序列與 miRNA 3'端互補的探針與延長後之 miRNA 進行互補配對，啟動反轉錄之反應⁶⁶，如圖 1-10B 所示。

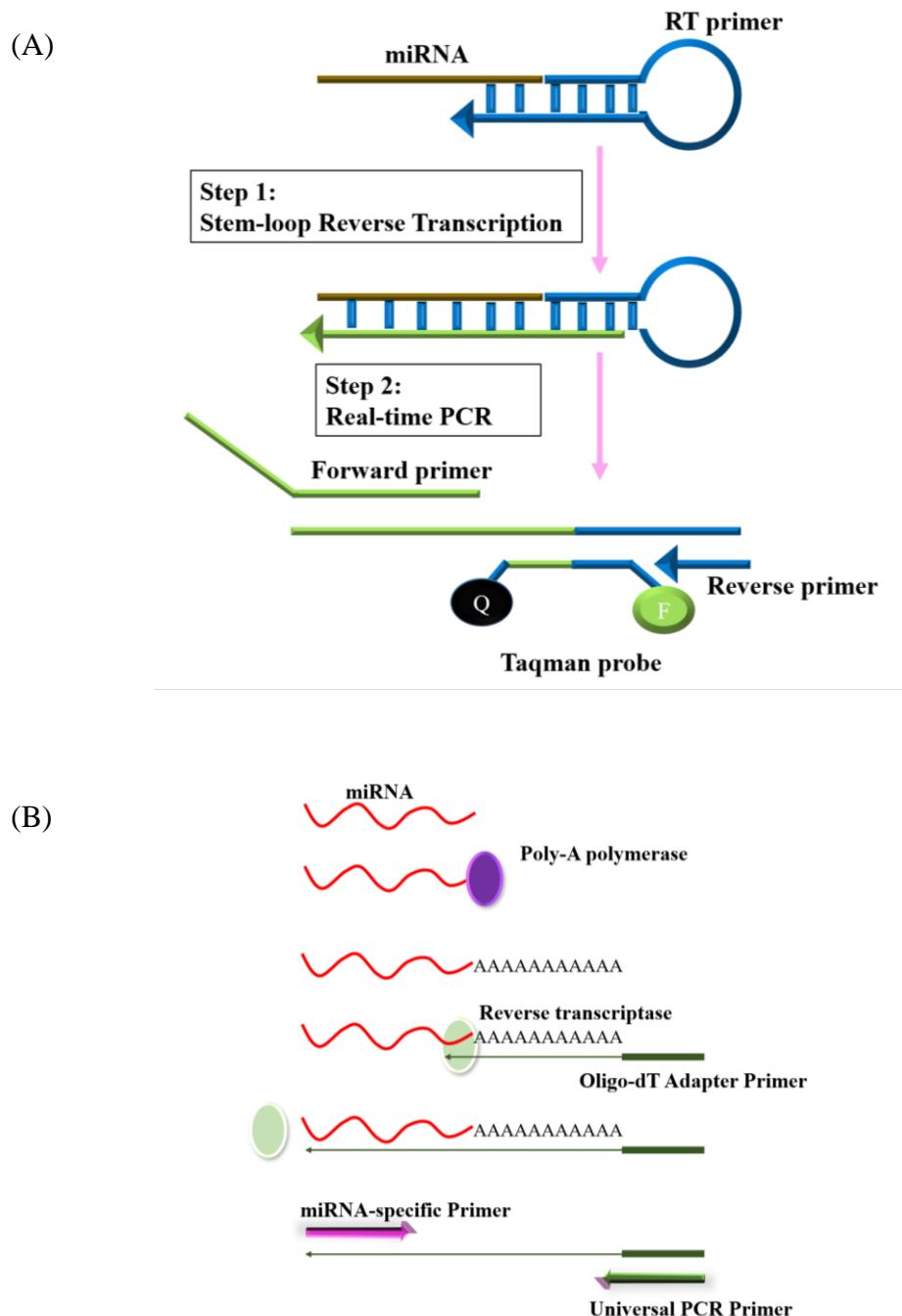


圖 1-10. 即時定量反轉錄 PCR 之示意圖。(參考 reference 66 重繪製圖)



1.3. 脫氧核糖核酸奈米機器 (DNA Nanomachine)

DNA 作為生命遺傳物質，人們幾乎已經熟知其生化性質和生物學意義。作為一種納米等級的分子，DNA 為各領域的重要元件，因為它具有自身的可編程性、結構的多樣性和變化的可控性等。利用鹼基的精確配對和序列可編程的特性，人們可以將設計好的 DNA 序列編織成 1-D (Dimensional)、2-D 甚至是 3-D⁶⁷。藉由 DNA 結構的多樣性，人們可通過適當的序列設計和實驗條件去控制 DNA Nanomachine 的操作。DNA 奈米機器的運作需要消耗能量，而通常作為燃料來驅動 DNA 的移動主要分為三種，分別為具有特異性之 DNA 雙鏈、內切酶或脫氧核糖核酸分解酶和溶液的環境條件如 pH 值和溫度。

1.3.1. 以鏈交換反應為基礎之 DNA 奈米機器

單股 DNA 的自由度與雙股 DNA 相比之下較低，而且柔性也較強。單股 DNA 在溫和實驗操作條件之下會選擇性與鹼基數目最多，互補性最強之另一單股 DNA 進行互補配對結合。藉由通過控制 DNA 的雙股形成或變性 (Denaturation)，進而可驅動奈米機器之運作。於前人所使用的 toehold-mediated strand displacement 的 DNA 動態奈米技術實驗中，成功證實新單股核酸的添加可使核酸合成物如雙股核酸分子進行重組⁶⁸⁻⁶⁹，如圖 1-11 所示。於此反應中，雙股核酸分子由輸出股 (Output strand) 和含有少部分稱為 toehold 之單股區域的基質股 (Substrate strand) 所組成。輸入股 (Input strand) 可與 toehold 的區域進行互補配對結合，以 branch migration (分支移位) 的方式將單股的輸出股給置換掉。所釋放的單股產物輸出股可利用分子信標 (Molecular beacon)⁷⁰⁻⁷¹ 或具有鑲嵌能力之染劑 (Dye)⁷² 進行偵測。

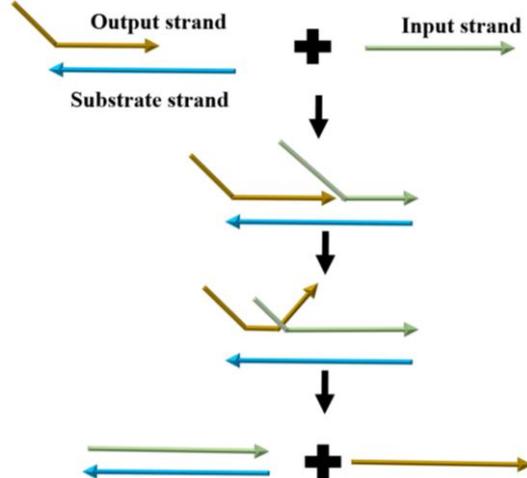


圖 1-11. 以鏈交換反應為基礎之 DNA 奈米機器。(參考 reference 68 重繪製圖)

1.3.2. 溫度調控之 DNA 奈米機器

T_m (Melting temperature) 為有 50% 雙股 DNA 已變性成單股，而另外 50% 雙股 DNA 仍可以雙股形式存在之溫度。Issambert 之研究團隊於 2006 成功設計了溫度調控之 DNA 奈米機器。如圖 1-12 所示，所設計的單股 DNA 含有四段子序列，分別為兩段 P 序列和兩段 P' 序列，其中 P 與 P' 可進行互補配對而形成雙股 DNA，並使用三段非配對序列將上述 4 條序列進行連接。在常溫下 ($T_m > T$)，所設計之序列分別以長棒狀和雙節棍狀穩定存在。作者進一步使用 95°C 之高溫進行雙股 DNA 之變性，而形成不規則之結構。隨後再降低反應溫度。結果顯示單股 DNA 會依據降溫之速度而決定其二級結構。雙節棍構型在快速降溫的實驗操作條件下占優勢；反之，長棒狀構型則在緩慢降溫之實驗操作條件下占優勢⁷³。

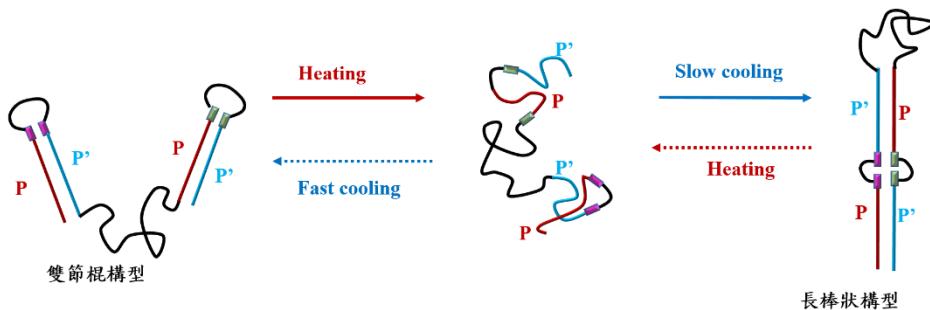


圖 1-12. 溫度調控之 DNA 奈米機器。(參考 reference 73 重繪製圖)

1.3.3. 酵素驅動型奈米機器

Yang 研究團體成功於 2016 年研發一種以剪切酶驅動之 DNA 奈米機器。如圖 1-13 所示，將末端標記上螢光分子的訊號 DNA 探針 (Signal reporter) 修飾於金奈米粒子 (Gold nanoparticle, AuNP) 的表面，此時由於螢光分子與金奈米粒子的距離最為接近，因此螢光會被猝滅。以保護性探針 (Protecting probe) 與 DNA 步行者 (DNA walker) 進行互補配對，使得 DNA walker 無法與 signal reporter 進行結合。當目標分子進入反應系統時，會以 toehold-mediated strand displacement 的方式將保護性探針從 DNA walker 上給置換出來，進而導致 DNA walker 回復單股。此時，DNA walker 可進一步與 signal reporter 進行互補配對，並啟動具有序列專一性之限制性內切酶 (Restriction endonuclease) 的裁剪作用，成功將螢光分子釋放至環境中。此時螢光分子遠離金奈米粒子，因此螢光會恢復⁷⁴。

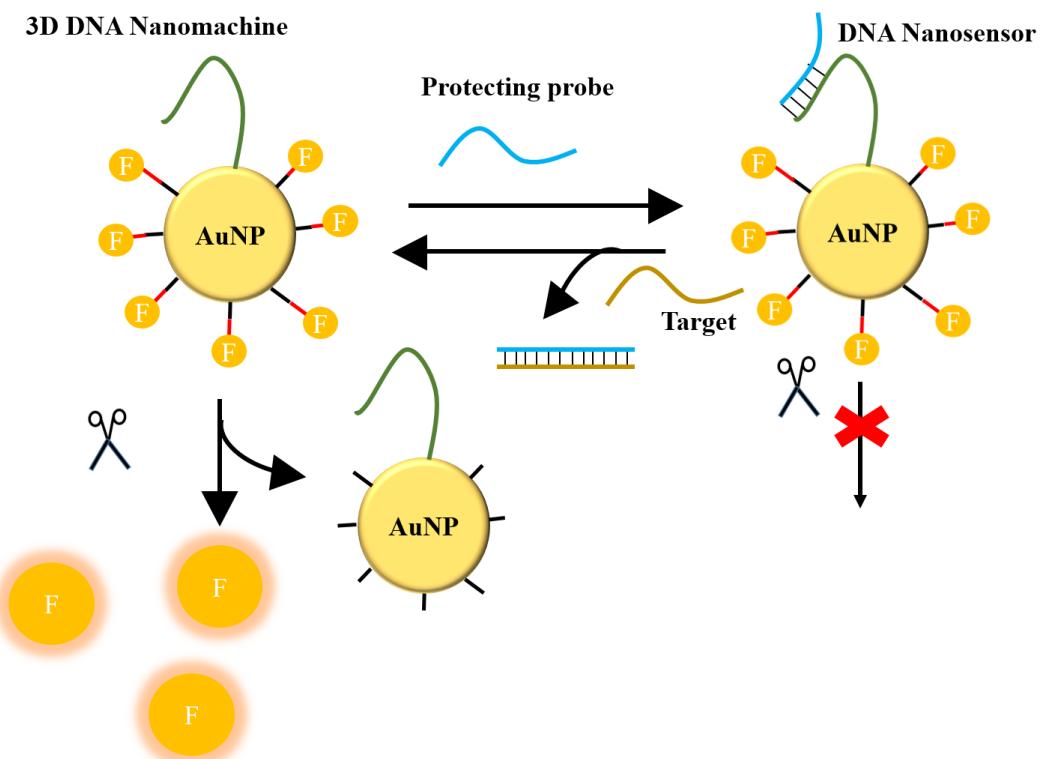


圖 1-13. 酵素驅動型奈米機器。(參考 reference 74 重繪製圖)



1.4. 等溫核酸放大技術

Kary Mullis 之研究團隊成功於 1983 年提出聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 之技術能將少量的目標基因在短時間內進行放大 (Amplification)，以達到可偵測之範圍內。目前，PCR 已廣泛應用於臨床之診斷和基礎之研究。臨床醫學上之應用主要包括病原菌於尿液或血液等樣本之鑑定、遺傳疾病和癌症之診斷，而生活上之應用則包括親緣鑑定。PCR 的三個主要步驟為 DNA 雙股之變性 (Denaturation)、引物 (Primer) 與單股 DNA 的接合 (Annealing)、聚合酶的延長作用 (Extension)，其反應溫度分別為 95°C 、 50°C 和 60°C 。由於 PCR 的步驟涉及到升降溫循環 (Thermal cycle)，而且無法應用於活體細胞或組織內核酸的偵測，因此使得 PCR 的使用受到限制。為了解決 PCR 升降溫循環之缺點，目前已經出現各式各樣之等溫核酸放大機制，主要分為兩種，分別為酵素驅動型 (Enzymatic) 放大和非酵素驅動性 (Nonenzymatic) 放大。

1.4.1. 酵素驅動型等溫核酸放大技術

較常用的技術有 RCA (Rolling circle amplification)、SDA (Strand displacement amplification) 和 HAD (Helicase-dependent amplification)，如表 1-7 所示。

	Enzyme	Template	Performance	Reference
RCA	Ligase	Circular	10^9 fold amplification in 1.5 h	75
	DNA polymerase	ssDNA		
SDA	Nicking enzyme	ssDNA	10^7 fold amplification in 1.5 h	76
	DNA polymerase			
HAD	Helicase	dsDNA	10^6 fold amplification in 1.5 h	77
	DNA polymerase			

表 1-7. 酵素驅動型等溫核酸放大技術之比較。



1.4.1.1. 滾環式擴增法 (Rolling circle amplification, RCA)

如圖 1-14 所示，當目標分子存在時，目標分子可與掛鎖式 (Padlock) 探針進行互補配對。隨後連接酶 (Ligase) 將掛鎖式探針進行連接，而形成封閉之環狀 (Circular) DNA 模板。具有鏈置換 (Strand displacement) 功能之 DNA 聚合酶，例如聚合酶 phi29⁷⁸，以環狀 DNA 為模板，進行 RCA 反應，當聚合酶再次回到起始點時，會將聚合後的產物給置換出來進而成功製造出一條具有不斷重複序列之長鏈 DNA⁷⁹。RCA 已被應用於檢測多種疾病之相關之基因，例如甲型流感 H1N1 和 H3N2 之突變⁸⁰ 與豬第二型環狀病毒 (Porcine circovirus type 2, PCV2)⁸¹。

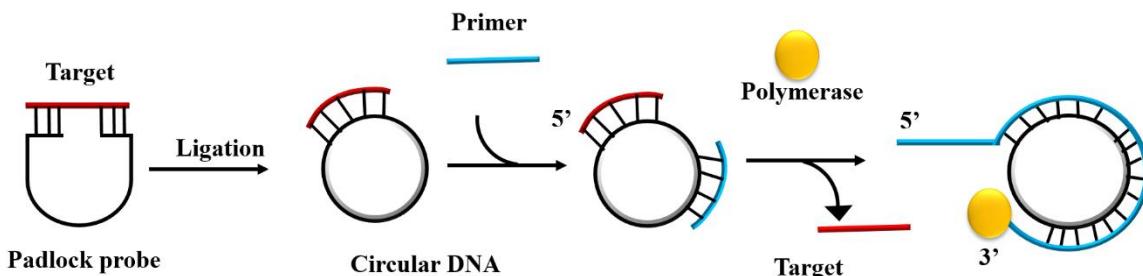


圖 1-14. 滾環式擴增法示意圖 (參考 reference 79 重繪製圖)

1.4.1.2. 鏈置換擴增法 (Strand displacement amplification, SDA)

本系統之設計涉及兩種酵素之使用，分別為具有切割位點專一性之限制性內切酶 (Restriction endonuclease) 和具有鏈置換活性之 DNA 聚合酶。如圖 1-15 所示，雙股 DNA 上含有內切酶可辨認之區域，進而可以啟動內切酶之裁剪作用，將雙股 DNA 其中一股產生缺口。此時 DNA 聚合酶可結合至切口處，進行延長之作用，在製造出新的互補 DNA 時，同時也可將舊的單股 DNA 給置換出。所產生之 DNA 雙股產物也會出現可被內切酶辨認之序列，因此可繼續進行內切酶裁剪之作用和 DNA 聚合酶鏈置換之作用。藉由上述步驟之重複進行，大量的單股 DNA 產物可被取得⁸²。SDA 已被應用於傳染性疾病之檢測，包括砂眼披衣菌 (*Chlamydia trachomatis*) 和淋病奈特氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)⁷⁶。

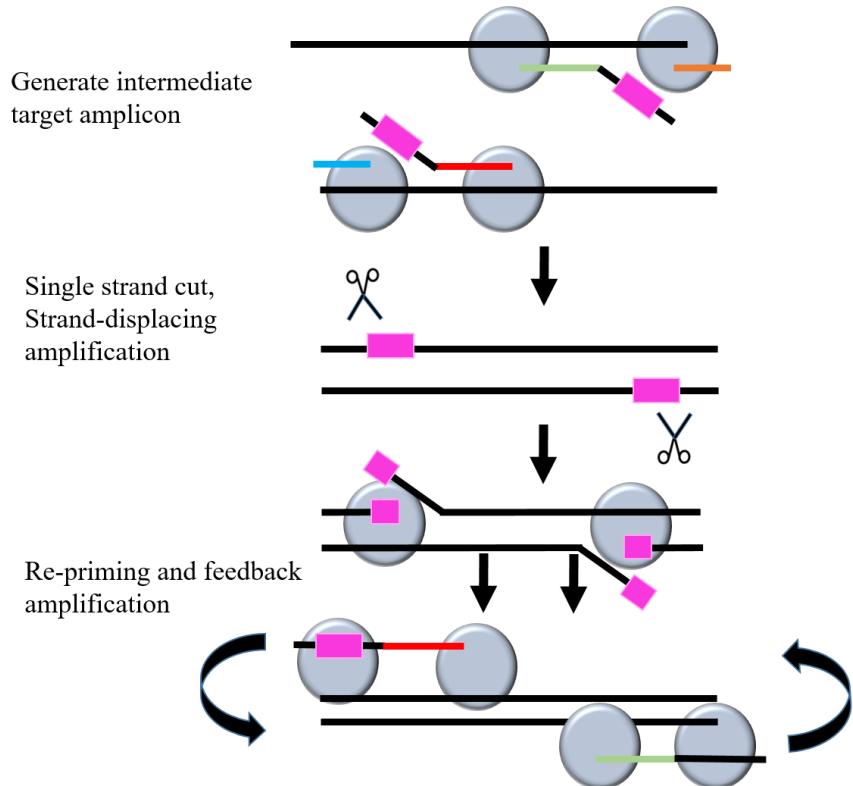


圖 1-15. 鏈置換擴增法示意圖 (參考 reference 82 重繪製圖)

1.4.1.3.解鏈酶扩增技术（Helicase Dependent Amplification, HDA）

HAD 為 New England Biolabs (NEB) 之研究團隊於 2004 年所發明的一種嶄新等溫核酸放大技術。如圖 1-16 所示，解旋酶 (Helicase) 將 DNA 雙股解開，隨後 DNA 单链結合蛋白 (Single-stranded DNA-binding protein, SSB) 與 DNA 單股之區域進行結合，穩定新解開的單股 DNA，防止它重新回復成雙股 DNA。解開的單股 DNA 可做為引子與所提供的模板進行互補配對，並啟動 DNA 聚合酶之聚合作用，而合成互補股。解旋酶又可進一步將新合成的雙股 DNA 解成單鏈 DNA，以作為下一個模板之引子。藉由上述步驟重複進行，指數式之放大 (Exponential amplification) 形式可被達成⁸³。

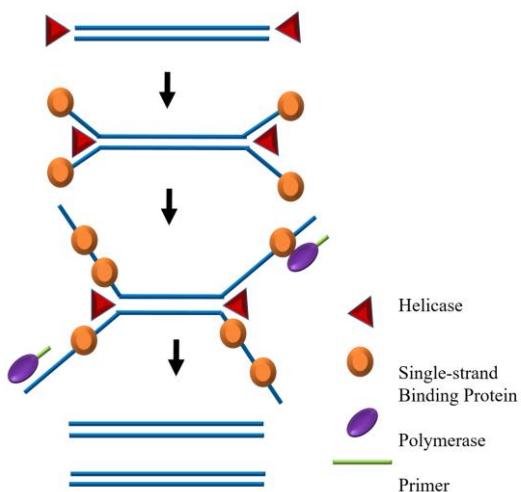


圖 1-16. 解鏈酶擴增示意圖 (參考 reference 83 重繪製圖)

1.4.2. 非酵素驅動型等溫核酸放大技術

儘管酵素之使用，例如聚合酶對於核酸之放大具有很好之效能，可是它們對於照護檢驗 (Point of care, POC) 存在著一定之挑戰性。具體來說，酵素在 POC 裝置通常較不穩定，因為它們必須需要特殊之處理條件，其中包括運輸、儲存和操作時的溫度。為了提高穩定性，酵素必須以凍乾 (Lyophilized) 或凝膠 (Gel) 之形式進行運輸⁸⁴。非酵素驅動型等溫核酸放大技術由於整個擴增過程並沒有涉及任何酵素之使用，因此可避免非特異性擴增之干擾。較常用的技術有 HCR (Hybridization chain reaction) 與 catalytic DNA circuit 如表 1-8 所示。

Technique	Detection scheme	LOD (M)	General feature	Reference
HCR	Fluorescent/luminescent	10^{-14} - 10^{-15}	Isothermal linear amplification, long incubation time	85
Catalytic DNA circuit	Fluorescent	10^{-11}	Isothermal linear or exponential amplification	86

表 1-8. 非酵素驅動型等溫核酸放大技術之比較。

1.4.2.1. 雜交鏈式反應 (Hybridization chain reaction, HCR)

Pierce 研究團隊於 2004 年提出 HCR 之技術⁸⁵，其優勢為擴增過程不涉及酵素之使用和反應條件較溫和與較易控制。如圖 1-17 所示，HCR 之原料包括兩條交錯互補之髮夾 DNA 探針。當缺乏目標分子時，此兩種髮夾 DNA 探針會穩定存在，不會進行雜合反應；反之，當目標分子存在時，目標分子會作為啟動器 (Initiator) 將其中一種 DNA 探針之莖環結構給打開，上述莖環結構打開後的 DNA 探針會進一步與另外一種 DNA 探針進行互補配對，將後者之莖環結構給打開。DNA 探針的髮夾結構會相續被打開，而成功形成由兩種不同 DNA 探針交替配對雜合之聚合物。已有研究將 HCR 應用於 DNA⁸⁷、miRNA⁸⁸ 與蛋白質⁸⁹ 之檢測。

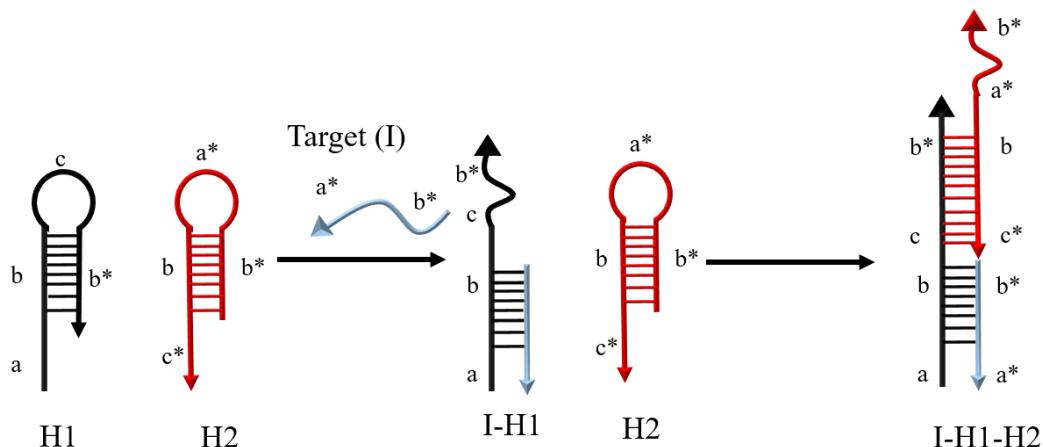


圖 1-17. 雜交鏈式反應示意圖 (參考 reference 84 重繪製圖)



1.5. 酶素輔助核酸目標循環

由於探針和目標分子只能以 1:1 之方式進行互補配對形成複合物，進而產生訊號，因此當進行少量目標分子之偵測時，所能達到之偵測極限會受到限制。為了改善雜合分析技術之偵測極限，它們往往搭配目標放大、探針放大或訊號放大之策略，如圖 1-18 所示。常用之酵素輔助核酸目循環大致可分為三種，分別為典型之分析法、5'-3' 外切酶分析法(5'→3'Exonuclease assay)、入侵分析法(Invader assay)。常用之特殊限制性內切酶、核酸內切酶與外切酶分別以表 1-9 與表 1-10 顯示⁹⁰。

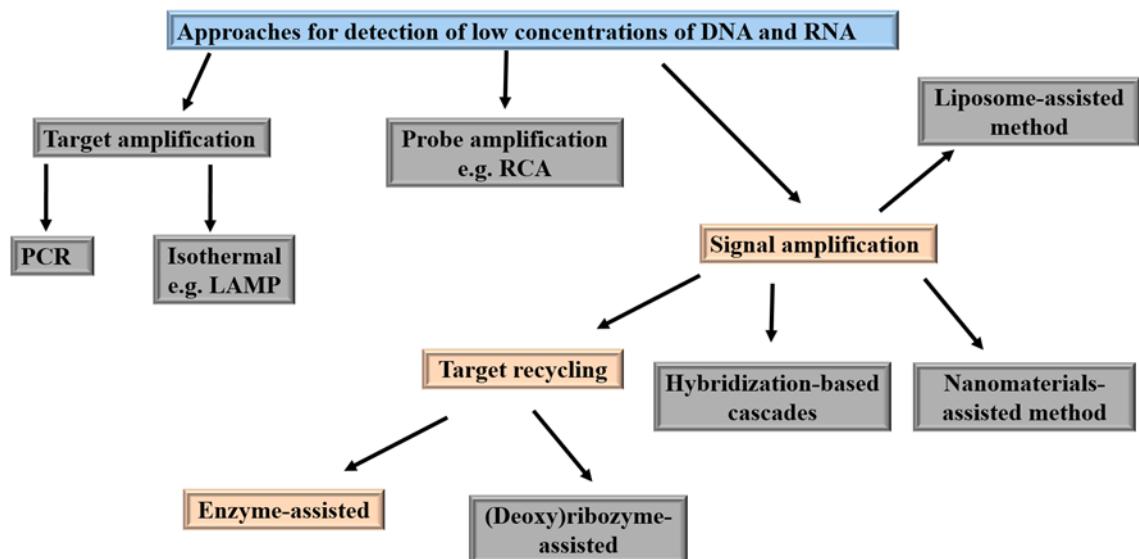


圖 1-18. 酶素輔助核酸目標循環的分類 (參考 reference 90 重繪製圖)



Restriction enzyme	Cleavage site	Signal readout	LOD	Reference
Nt.AlwI	5'-GGATCNNNN [↓] N-3' 3'-CCTAGNNNN N-5'	Colorimetric	50 aM	⁹¹
Nt.BstNBI	5'-GAGTCNNNN [↓] N-3' 3'-CTCAGNNNN N-5'	Fluorescent	6.2 pM	⁹²
Nt.BbvCI	5'-CC [↓] TCAGC-3' 3'-GGAGTCG-5'	Fluorescent	50 pM	⁹³
Nb.BsmI	5'-GAATGC N-3' 3'-CTTACG [↓] N-5'	Fluorescent	1 fM	⁹⁴
Nt.BsmAI	5'-GTCTCN [↓] N-3' 3'-CAGAGN N-5'	Fluorescent	1 fM	⁹⁵

表 1-9. 應用於酵素輔助核酸目標循環法的限制性內切酶及其所辨認之序列。



Enzyme	Activity	Preferential substrate
Endonuclease		
AP endonuclease	Incising the apurinic/apyrimidinic (AP) sites from DNA backbone	dsDNA with an AP site
Duplex-specific Nuclease	DNA cleavage	dsDNA and DNA/RNA hybrids
RNase H	Endonucleolytic RNA hydrolysis	RNA–DNA hybrids
RNase HII	Endonucleolytic RNA hydrolysis	RNA–DNA hybrids
Exonuclease		
Lambda exonuclease	5' – 3' stepwise removal of dNMP	dsDNA with a 5'-phosphorylated end
T7 exonuclease	5' – 3' stepwise removal of dNMP	dsDNA and DNA–RNA hybrids
Exonuclease III	3'- 5' stepwise removal of dNMP	dsDNA with blunt or recessed 3'-end

表 1-10. 應用於酵素輔助核酸目標循環法的內切酶和外切酶與其作用。⁹⁰



1.5.1. 典型之輔助目標物循環法

如圖 1-19 所示，目標核酸分子與探針進行互補雜合後，會被核酸內切酶或外切酶進行辨認，並啟動它們的裁剪作用 (Digestion)，將所設計之探針進行剪切。隨後目標核酸分子可再度釋放到反應環境中，進入下一個循環，與其它未被反應之探針進行互補雜合，再度啟動酵素之裁剪作用，進而可達到訊號放大之效果⁹⁰。

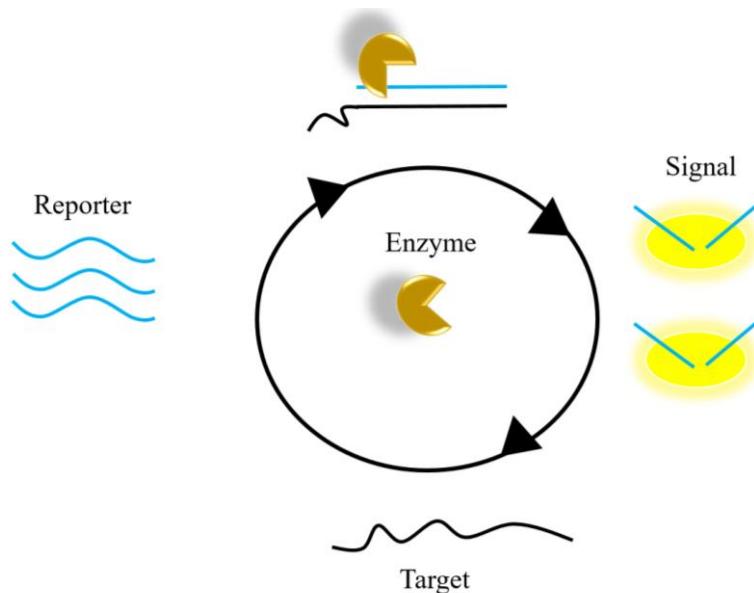


圖 1-19. 典型之輔助目標物循環法示意圖 (參考 reference 90 重繪製圖)

1.5.2. 5'→3'Exonuclease assay

核酸探針分別於 5' 端與 3' 端分別修飾上螢光分子 (Fluorophore) 和猝滅劑 (Quencher)。如圖 1-20 所示，當目標分子存在時，會與核酸探針進行互補配對。DNA 聚合酶利用 5'→3' 內切酶活性將探針進行水解 (Hydrolysis)，進而將螢光分子釋放至溶液中。



Exonuclease

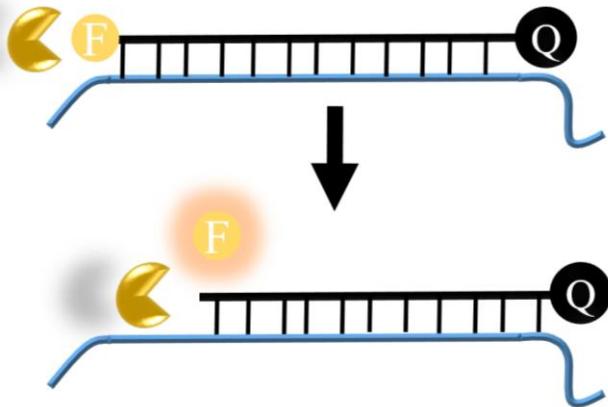


圖 1-20. $5' \rightarrow 3'$ Exonuclease assay 示意圖 (參考 reference 90 重繪製圖)

1.5.3. Invader assay

如圖 1-21 所示，帶有螢光分子和猝滅劑標記之探針可與入侵探針和目標分析物形成特殊之 flap 結構，進而啟動 flap 內切酶之剪切活性。Flap 內切酶只針對由信號探針、模板與侵入探針所組成的 invasive complex 結構進行特異性之辨識，並將信號探針游離的部分進行裁剪，釋放螢光分子至溶液中，所測得之螢光值上升。

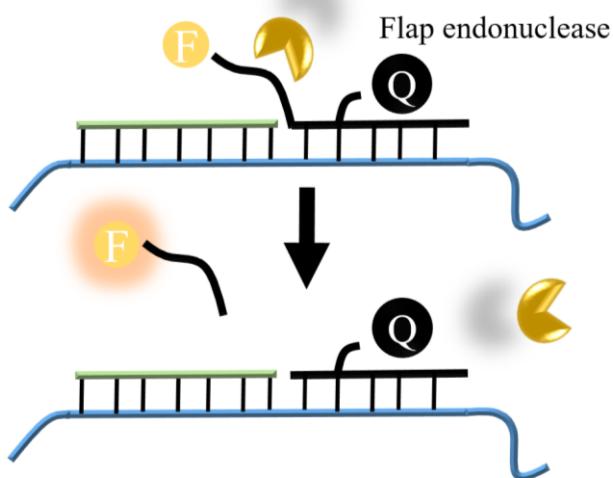


圖 1-21. Invader assay 示意圖 (參考 reference 90 重繪製圖)

1.5.4. Lambda exonuclease 辅助目标分子循环法

Lambda exonuclease 為一種高持續性之核酸外切酶，由含有 Lambda 噬菌體外切核酸酶過表達基因的大腸桿菌純化而得，其特性是以雙股 DNA 為優選受質，並選擇性從 5'端磷酸化的部分進行剪切而釋放出單核苷酸，進而將雙股 DNA 轉換成單股 DNA。此外，λ 外切核酸酶不具有 5'端羥基裁剪之活性，也無法由 DNA 的切刻或缺口處起始發揮其剪切功效。Kong 研究團隊於 2014 年成功使用 lambda exonuclease 研發嶄新生化感測器 (Biosensor)。原理如圖 1-22 所示，先將帶有亞甲藍 (Methylene blue, MB) 標定和 5'端修飾上磷酸根 (Phosphate group) 的 DNA 探針以硫金鍵之方式修飾於金電極。在沒有目標分子存在之下，Lambda exonuclease 無法針對單股之磷酸化進行辨認，此時探針維持髮夾之結構，Methylene blue 與金電極之工作電極表面距離較遙遠，因此無法進行有效之電子傳遞，進而所測得之電化學訊號較弱；當目標 DNA 分子進入系統與 DNA 探針進行互補配對時，成功啟動 lambda exonuclease 的裁剪活性，而將 DNA 探針與目標 DNA 分子的互補區域進行裁剪，進而使目標 DNA 分子脫離探針，而重新釋放至反應系統中，與其它未反應之 DNA 探針再次進行雜合。裁剪後之 DNA 探針由於已失去髮夾之結構，因此會呈現下垂之現象，使得 MB 分子與工作電極之距離變得較接近，所測得之電化學訊號呈現上升之趨勢⁹⁶。

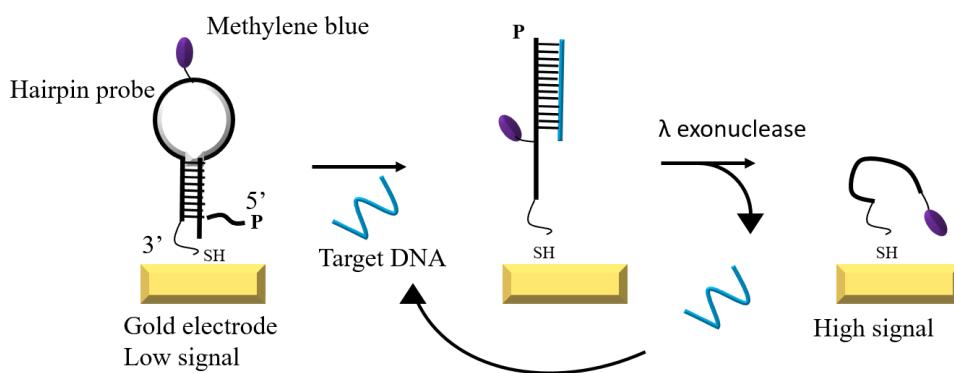


圖 1-22. λ 辅助目标分子循环法示意圖 (參考 reference 96 重繪製圖)



1.6. DNA 生化感測器

如圖 1-23 所示，生化感測器之定義為由固定化之生物分子和換能器 (Transducer) 兩個關鍵部分所組成的一種整合性裝置，將所取得之生物資訊進一步轉換成可量化和讀取之電子訊號⁹⁷。Clark 與 Lyon 於 1962 年成功提出以葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase) 為生物感測器元件的酵素電極之概念，通過血醣與葡萄糖氧化酶的反應，可針對血液中的血醣濃度進行量測⁹⁸。生化感測器的研發熱潮隨後掀起，並應用於食品安全與疾病之檢測。

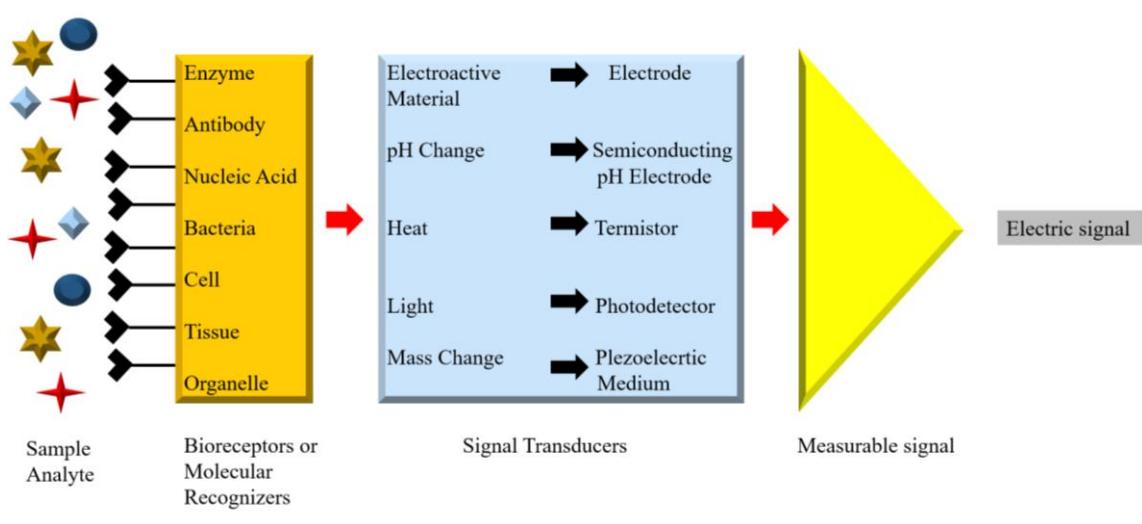


圖 1-23. DNA 生化感測器之組成元件 (參考 reference⁹⁹ 重繪製圖)

1.6.1. 生物元件之修飾法

當生物元件在換能器表面上以較有次序、較緊密之方式進行排列時，能促進目標待測物質 (Analyte) 與生物元件的結合，進而改善生物感測器之辨識能力¹⁰⁰。常用之修飾法主要分為四種，如圖 1-24 和表 1-11 所示。

方法	原理	優點	缺點
吸附 (Adsorption)	凡得瓦爾力 親疏水力	步驟簡單，固定之生物元件的活性不易失去。	容易受到環境的因素例如 pH 值與溫度限制
包埋 (Encapsulation)	利用高分子材料進行酵素之包埋	步驟簡單，花費時間短	擴散阻礙層較大，酵素活性易失去
架橋 (Cross-linking)	以具有多官能基之反應物為橋樑進行鍵結	化學鍵結較穩定	難以控制固定的反應
共價鍵結 (Covalent-binding)	自吸附法修飾膜	能良好固定於表面的生物元件之比例高	步驟複雜，固定時間較長

表 1-11. 生物元件不同修飾法之比較。

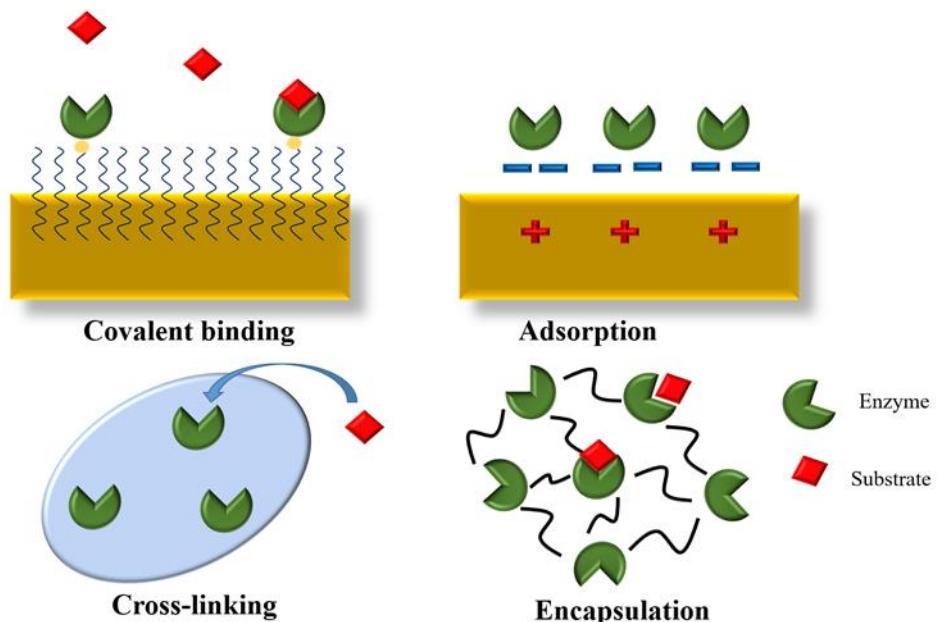


圖 1-24. 生物元件之修飾法 (參考 reference 100 重繪製圖)



1.6.2. 電化學生化感測器

電化學技術的優點為所需之分析樣品體積較小、所需之分析時間較短與具有高度靈敏性¹⁰¹。基於通過 DNA 探針構型的轉換獲得不同電流的訊號而研發的 EDNA 感測器主要分為兩種類型，分別為訊號的關閉系統 (Signal-off) 和訊號的開啟系統 (Signal-on)。

1.6.2.1 Signal-off system

藉由目標分子誘導 DNA 探針構型的改變，進而導致修飾於 DNA 探針上的電化學活性分子遠離工作電極，使最終電流訊號較起始電流訊號弱。如圖 1-25 所示，在沒有訊號誘導股存在之下，DNA 探針是以髮夾之構型存在於工作電極表面上，此時修飾於 3' 端的 MB 電化學活性分子與工作電極的距離最接近，因此可以進行有效之電子傳遞，所測得的電化學訊號較大。反之，當訊號誘導股進到系統與 DNA 探針進行互補配對時，會將 DNA 探針之髮夾結構打開，使得 MB 與工作電極之距離大大增加，抑制有效之電子傳遞，進而導致電化學訊號下降¹⁰²。

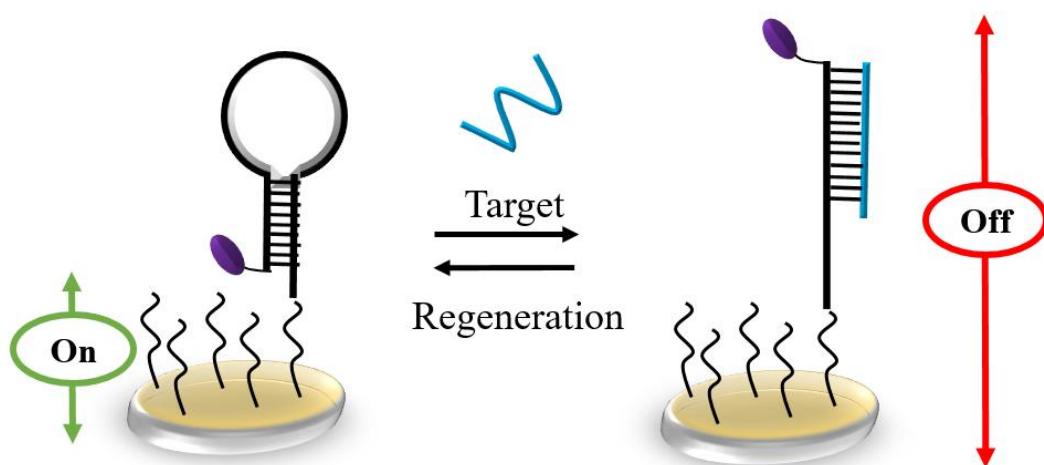


圖 1-25. Signal-off 系統示意圖。(參考 reference 102 重繪製圖)



1.6.2.2. Signal-on system

藉由目標分子誘導 DNA 探針構型的改變，進而導致修飾於 DNA 探針上的電化學活性分子接近工作電極，使最終電流訊號較起始電流訊號強。如圖 1-25 所示，在沒有訊號誘導股存在之下，DNA 探針與互補股進行互補配對而形成結構較為堅硬 (Rigid) 的雙股 DNA 結構，此時標定在 DNA 探針 3'端之 MB 分子远离工作電極表面，無法進行有效之電子傳遞，所測得之電化學訊號較弱；反之，當訊號誘導股進入系統時，以 toehold-mediated strand displacement 之方式將探針置換出來，使得探針可以回復髮夾之構型，此時標定在 DNA 探針 3'端之 MB 分子最為接近工作電極表面，可進行有效之電子傳遞，所測得的電化學訊號較強¹⁰³。

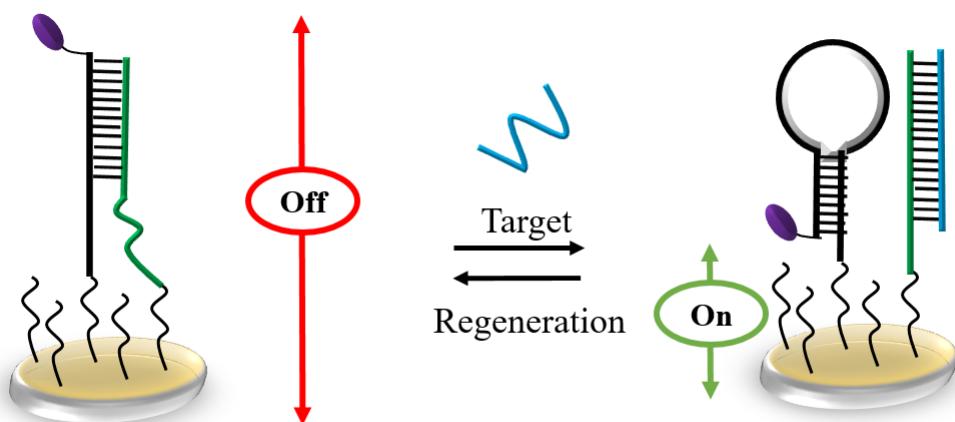


圖 1-26. Signal-on 系統示意圖。(參考 reference 103 重繪製圖)

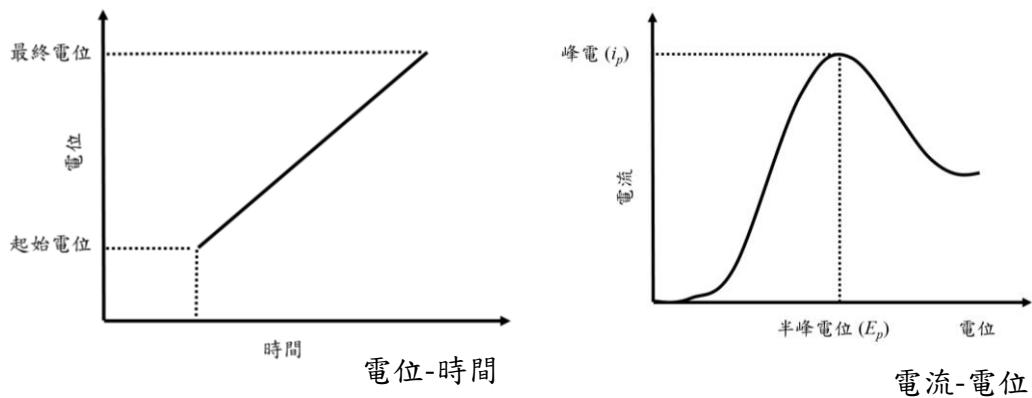


1.7. 電化學偵測法

電化學廣泛被應用於各個領域，包括能源儲存、光電科技、感測技術、電子產業與腐蝕控制等。電化學反應的定義為伴隨著電荷如電子轉移的一種化學反應，而電化學研究則是基於電化學活性分子的氧化還原進行偵測。依據偵測原理的差異可分為電位法 (Potentiometry)、電流法 (Amperometry)、伏安法 (Voltammetry) 及阻抗法 (Impedance method)。較常被應用之電化學分析方法為伏安法，根據電位掃描方式的不同又可細分為：

(1) 線性掃描伏安法 (Linear sweep voltammetry, LSV)

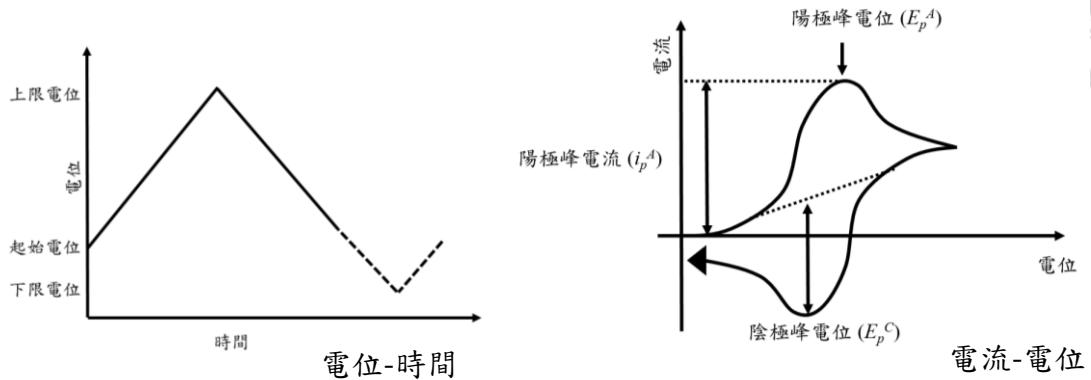
當以固態電極進行研究時，此法較常被使用。隨著時間的改變，電極電位會呈線性之增加或減少。電位之變化速率或方向會影響測量之結果。典型的 LSV 之圖主要分為兩種，分別為電位-時間圖與電流-電位圖。LSV 的偵測極限為 10^{-5} M 左右，為了提高電流的靈敏度，通常可藉由增加掃描之速率。其缺點為背景電流會因掃描速率太快而提高。



(2) 循環伏安法 (Cyclic voltammetry, CV)

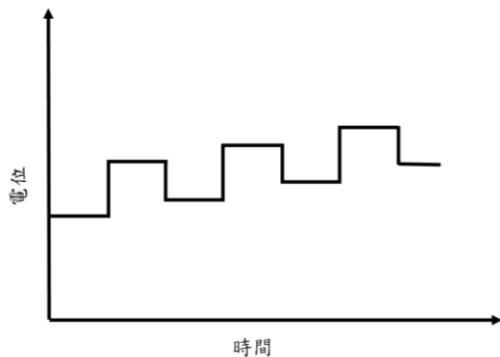
此法為重要之電化學偵測法，可用以鑑定各種氧化還原對之特性，為 LSV 的延伸。隨著時間的改變，掃描電位會呈線性之增加或減小。在實驗操作中，必須設定轉換電位，以讓儀器原先往正或負電位進行掃描後可回頭再往相反方向進行掃描。典型的 CV 圖主要分為兩種，分別為電位-時間圖與電流-電位圖。藉由

偵測結果所得之峰值電位(E_p)、電流值(i_p)及形狀，可探討溶液環境中的物質的電化學特性及其反應之可逆性。



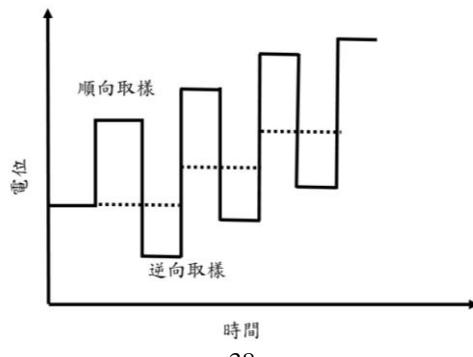
(3) 微分脈衝伏安法 (Differential pulse voltammetry, DPV)

將一個週期且振幅固定之脈波施加於直流電位上，以進行測量。為了提高靈敏度，可將脈波結束前所測得之電流與脈衝前的背景電流訊號進行相減。



(4) 方波伏安法 (Square wave voltammetry, SWV)

隨著時間的改變，掃描電位會呈階梯狀的上升或降低。與 DPV 的主要差異為 SWV 的脈衝電位為一正負對稱之連續脈衝。可藉由順向電流和逆向電流的相減，徹底扣除背景訊號值之干擾，進而改善靈敏度。



第二章 實驗材料與方法



2.1 核酸序列

miR-221 與 miR-21 為核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA) 序列，經由 RNase-free 高效液相色譜法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 進行純化；延長後之 H^e 為去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 序列，經由標準脫鹽 (Standard desalting) 進行純化。兩端分別修飾硫基 (Thiol group) 與亞甲藍 (Methylene blue, MB) 的 DNA 序列，經由 HPLC 進行純化。以上之核酸序列皆購買於 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)。未經過任何修飾之 DNA 序列，經由聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行純化，購買於生工有限公司 (MDBio, Taiwan)。

表 2-1. 核酸序列與其修飾

序列之名稱	序列及其修飾
miR-221 (23 nt)	5'-AGCUACAUUGUCUGCUGGUUUC-3'
miR-21 (22 nt)	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'
miR-222 DNA Analog (21 nt)	5'-AGCTACATCTGGCTACTGGGT-3'
miR-4288 DNA Analog (17 nt)	5'-TTGTCTGCTGAGTTCC-3'
miR-744 DNA Analog (22 nt)	5'-TGCAGGGCTAGGGCTAACAGCA-3'
H1 (69 nt)	5'-Phosphate-GAAACCCAGCAGACAATGTAG CTGCGCTGACTCCCATCTACCGGTAAAGCT ACATTGTCTGCCAGCGC-3'



H2 (73 nt)	5'-Phosphate-TTTGAAACCCAGCAGACAAT GTAGCTGCGCTGACTCCCATCTACCGGTAA AGCTACATTGTCTGCCAGCGC-3'
H^e (100 nt)	5'-TTTGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTG CGCTGACTCCCATCTACCGGTAAAGCTACAT TGTCTGCCAGCGCAGCTACATTGTCTGCT GGGTTCAAAA-3'
P1 (67 nt)	5'-ACTCCCATCTACCGGTAAAGCTACATTG TCTGCCAGCGCAGCTACATTGTCTGCTGG GTTTCAAAA-3'
P2 (40 nt)	5'-ACTCCCATCTACCGGTAAAGCTACATTG TCTGCCAGCGC-3'
P2C1 (50 nt)	5'-GCGCTGGGCAGACAATGGAACACATT CTTCAGCATGCCATTGTCTGC-3'
P2C2 (50 nt)	5'-GCGCTGGGCAGACAATGGAACACATT CTTCAGCATGCCATTGTCTGC-3'
Thiol-P2C (50 nt)	5'-SH-(CH ₂) ₆ -GCGCTGGGCAGACAATGGCAA CACATTCTTCAGCATGCCATTGTCTGC-3'
P2C-MB (50 nt)	5'-SH-(CH ₂) ₆ -GCGCTGGGCAGACAATGGCAA CACATTCTTCAGCATGCCATTGTCTGC- MB-3'



2.2 實驗試劑與材料

藥品名稱	化學式/縮寫	來源廠商
6-Mercapto-1-hexanol	6-MCH	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acrylamide/Bis-acrylamide, 29:1		MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)
Ammonium persulfate	APS	MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)
Boric acid	H ₃ BO ₃	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
Bovine serum albumin	BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cutsmart Buffer (10×)		New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DNA Gel Loading Dye (6×)		Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Deoxynucleotide Triphosphate	dNTP	Roche (Indianapolis, Indiana, USA)
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	EDTA-Na ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder		Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Hydrochloric acid	HCl	Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO, USA)

Hydrogen peroxide solution,

Sigma-Aldrich

35%

(St. Louis, MO, USA)

Hydrogen tetrachloroaurate (III) HAuCl₄.3H₂O

Alfa Aesar

trihydrate

(ward Hill, MA, USA)

Klenow fragment (3'→5' exo-)

New England Biolabs

(Beverly, MA, USA)

Lambda Exonuclease

New England Biolabs

(Beverly, MA, USA)

Lambda Exonuclease Reaction

New England Biolabs

Buffer

(Beverly, MA, USA)

Methylene blue

Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO, USA)

NEBuffer 2 (10×)

New England Biolabs

(Beverly, MA, USA)

Poly(ethylene glycol)

PEG

Sigma-Aldrich

Average Mn 950-1050

(St. Louis, MO, USA)

Potassium chloride

KCl

J.T.Baker

(Philipsburg, NJ, USA)

Potassium hexacyanoferrate (III)

K₃Fe(CN)₆

Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO, USA)

Potassium hexacyanoferrate (II)

K₄Fe(CN)₆.3H₂O

Sigma-Aldrich

O

(St. Louis, MO, USA)

Potassium phosphate dibasic

K₂HPO₄

J.T.Baker

(Philipsburg, NJ, USA)

Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	J.T.Baker (Philipsburg, NJ, USA)
Protector RNase Inhibitor		Roche (Indianapolis, Indiana, USA)
Sodium chloride	NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium hydroxide	NaOH	J.T.Baker (Philipsburg, NJ, USA)
Sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
Sodium phosphate dibasic	Na_2HPO_4	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
Sulfuric acid	H_2SO_4	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SYBR Green Nucleic Acid Gel Stain		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tetranethylethylenediamine	TEMED	MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	TRIS Base	J.T.Baker (Philipsburg, NJ, USA)



2.3 實驗儀器

儀器名稱	型號	來源廠商
電化學分析儀 (Electrochemical analyzer/workstation)	CHI 1030 a CHI 1030 CHI 660b	CH Instructments (Austin, TX, USA)
網版印刷碳電極拋棄試片 (Disposable screen-printed carbon electrode, SPCE)	50×13 mm; working electrode: 3-mm diameter disk; a carbon working electrode, a carbon counter electrode and a silver pseudoreference electrode	Zensor R&D (Taichung, Taiwan)
酸鹼度計 (pH meter)	PB-10	Sartorius AG (Göttingen, Germany)
核酸增值儀 (Thermal cycler)	C1000	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
垂直式電泳系統 (Mini-protean tetra system)		BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
冷凍乾燥機 (Freeze dryer)	Modulyod-1115	Thermo Electron Corporation (Massachusetts, America)
水浴槽 (Thermostatic bath)	B601D	Firstek (New Taipei City, Taiwan)
高速離心機 (High speed centrifuge)	Z36HK	Hermle (Baden-Wurttemberg, Germany)
迴旋式震盪培養箱	S300S	Firstek

(Orbital shaking
incubator)

ChemiDocTM Touch 影像 1708370
系統

(ChemiDocTM touch
imaging system)

**Varioskan LUX 多功能微
量盤式分析儀** VLBLATD2

(Varioskan LUX
multimode
Microplate reader)

即時定量聚合酶連鎖反應 CFX-384
器

Real time PCR

(New Taipei City, Taiwan)

BIO-RAD

(Hercules, CA, USA)

Thermos Scientific
(Vantaa, Finland)

BIO-RAD
(Hercules, CA, USA)



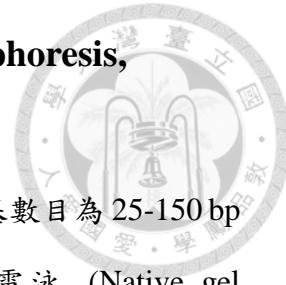
2.4 緩衝溶液

緩衝溶液 (Buffer)	成分
Electrolyte buffer	50 mM NaCl, 5mM sodium phosphate, pH 7.0
Immobilization buffer	1 M potassium phosphate, pH 7.0
Blocking buffer	100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0
10×TBE buffer	1000 mM Tris, 830 mM Boric acid, 10 mM EDTA
1×Cutsmart buffer	50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 100 µg/ml BSA, pH 7.9
1×Lambda Exonuclease reaction buffer	67 mM Glycine-KOH, 2.5 mM MgCl ₂ , 50 µg/ml BSA, pH 9.4
1×NEBuffer 2	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7.9

2.5 · 聚丙烯醯胺膠體電泳(Polyacrylamide gel electrophoresis,

PAGE)

製備 15% 之聚丙烯醯胺膠體 (Polyacrylamide gel) 針對核酸鹼基數目為 25-150 bp 之樣品進行分析。所使用之凝膠電泳分為不變性凝膠電泳 (Native gel electrophoresis) 和變性凝膠電泳 (Denatured gel electrophoresis)。



不變性凝膠電泳 (Native gel electrophoresis) :

應用於探討核酸之間的雜合程度，讓核酸以自身之構型在電泳進行遷移 (migration)。

15% 聚丙烯醯胺膠體之成分为：

1. Acrylamide : Bisacrylamide = 29:1
2. 1×TBE Buffer
 - 0.1 M Tris
 - 83 mM Boric acid
 - 1 mM EDTA
3. 1% APS
4. 0.1% TEMED

电泳緩衝液 (Electrophoresis buffer) 為 0.5×TBE Buffer。

於室溫下施加 80 V 之電壓進行 110 分鐘之電泳分析。隨後將電泳後之膠片以 1×SYBR Gold 溶液浸染 15-20 分鐘。最後以 ChemiDocTM Touch Imaging System 照膠成像。使用 Image J 做为影像之定量分析軟體。

變性凝膠電泳 (Denatured gel electrophoresis) :

應用於核酸產物之鑑定。變性劑 (Denaturant) 具有干擾氫鍵 (Hydrogen bond) 形成之特性，可打開核酸的二級結構 (Secondary structure) 或互補配對之雙股核酸。

1. Acrylamide:Bisacrylamide = 29:1
2. 1×TBE Buffer
 - 0.1 M Tris
 - 83 mM Boric acid



- 1 mM EDTA
- 3. 1% APS
- 4. 0.1% TEMED
- 5. 7 M Urea

电泳緩衝液 (Electrophoresis buffer) 為 0.5×TBE Buffer。

在進行樣品分析前，將所製備的膠片置於溫度為 50⁰C 之水浴槽，並施加 35 V 之電壓執行 30 分鐘之預電泳 (Pre-run)。預電泳後，先將樣品槽進行清洗，以讓尿素不會殘留在樣品槽。隨後於溫度為 50⁰C 之水浴槽施加 70 V 之電壓進行 100 分鐘之電泳分析。將電泳後之膠片以 1×SYBR Gold 溶液浸染 15-20 分鐘。最後以 ChemiDocTM Touch Imaging System 照膠成像。使用 Image J 做為影像之定量分析軟體。

2.6. 酵素驅動型核酸奈米機器 (DNA Nanomachine) 產物之鑑定

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37⁰C，反應總體積 10 μL 下，使用 200 nM 受質 H、200 nM 目標分子 miR-221、200 nM 中間產物 P1、0.2 U/μL KF、0.02 U/μL λ 於 1×Cutsmart Buffer 進行反應，隨後以 denaturing 15% PAGE 進行分析。

2.7. Hairpin 5'端 overhang 鹼基數目之最佳化

實驗 A 之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37⁰C，反應總體積 10 μL 下，使用 200 nM H1 處以不同濃度的 λ (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.001 U/μL) 並於 1×Cutsmart Buffer 進行反應，隨後以 PAGE 進行分析。

實驗 B 之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37⁰C，反應總體積 10 μL 下，使用 200 nM H2 處以不同濃度的 λ (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002,

0.001 U/ μ L) 並於 1×Cutsmart Buffer 進行反應，最後以 15% PAGE 進行分析。



2.8. 反應緩衝溶液之最佳化

(1). KF 在不同反應緩衝溶液之聚合 (Polymerization) 活性測試

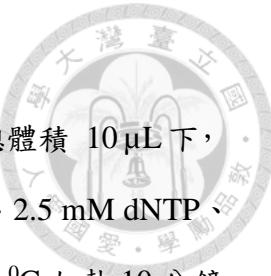
反應總體積 20 μ L 下，使用 200 nM 受質 H、200 nM 目標分子 miR-221、0.1 U/ μ L KF、0.25 mM dNTP 分別於反應緩衝液為 1×Cutsmart Buffer、1×Lambda Exonuclease Reaction Buffer、1×NEBuffer 進行反應，並以 RT-PCR 進行分析。實驗之操作條件為於 37 $^{\circ}$ C 的溫度下進行 360 個循環數 (Cycle number) 之螢光測定。

(2). λ 在不同反應緩衝溶液之剪切 (Digestion) 活性測試

反應總體積 20 μ L 下，使用 200 nM 受質 H、200 nM 中間產物 P1、0.1 U/ μ L λ 分別於反應緩衝液為 1×Cutsmart Buffer、1×Lambda Exonuclease Reaction Buffer、1×NEBuffer 2 進行反應，並以 RT-PCR 進行分析。實驗之操作條件為於 37 $^{\circ}$ C 的溫度下進行 360 個循環數之螢光測定。

2.9. 受質 H 濃度之最佳化

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37 $^{\circ}$ C，反應總體積 10 μ L 下，使用 200 nM 目標分子 miR-221、0.2 U/ μ L KF、0.02 U/ μ L λ 處以不同濃度之受質 H (200, 400, 600, 800 nM) 並於 1×Cutsmart Buffer 進行反應，最後以 denaturing 15% PAGE 進行分析。



2.10. P2C (Complementary Sequence of P2) 之最佳化

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37^0C , 反應總體積 $10 \mu\text{L}$ 下，使用 600 nM 受質 H、 200 nM 目標分子 miR-221、 $0.2 \text{ U}/\mu\text{L}$ KF、 2.5 mM dNTP、 $0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$ λ 於 $1\times$ Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物於 95^0C 加熱 10 分鐘將酵素去活化後再分別與 200 nM P2C1 和 200 nM P2C2 於 37^0C 反應 1 小時，最後以 15% PAGE 進行分析。

2.11. 酵素濃度比例之最佳化

(1). 以最終產物 P2 之產量進行比較

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37^0C , 反應總體積 $10 \mu\text{L}$ 下，使用 600 nM 受質 H、 200 nM 目標分子 miR-221、 2.5 mM dNTP 處以不同濃度比之 KF 和 λ ，並於 $1\times$ Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95^0C 加熱 10 分鐘將酵素去活化，最後以 denaturing 15% PAGE 進行分析。所設計的五種 KF 和 λ 比例分別為 $40:1$ ($0.2 \text{ U}/\mu\text{L}:0.005 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $20:1$ ($0.2 \text{ U}/\mu\text{L}:0.01 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $10:1$ ($0.2 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $5:1$ ($0.1 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $5:2$ ($0.05 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)。

(2). 以消耗 P2C 之量進行比較

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37^0C , 反應總體積 $10 \mu\text{L}$ 下，使用 600 nM 受質 H、 200 nM 目標分子 miR-221、 2.5 mM dNTP 處以不同濃度比之 KF 和 λ ，並於 $1\times$ Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95^0C 加熱 10 分鐘將酵素去活化，最後以 15% PAGE 進行分析。所設計的三種 KF 和 λ 比例分別為 $10:1$ ($0.2 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $5:1$ ($0.1 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)、 $5:2$ ($0.05 \text{ U}/\mu\text{L}:0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$)。



2.12. 選擇性 (Selectivity) 之測試

2.12.1. 受質 H 之專一性測試

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C , 反應總體積 $10\ \mu\text{L}$ 下，
使用 $600\ \text{nM}$ 受質 H 分別與 $200\ \text{nM}$ 分析物 (miR-221, microRNA-222 DNA analog,
microRNA-4288 DNA analog, microRNA-744 DNA analog) 於 $1\times$ Cutsmart Buffer
進行反應。最後以 15% PAGE 進行分析。

2.12.2 . KF 之專一性延長測試

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C , 反應總體積 $10\ \mu\text{L}$ 下，
使用 $600\ \text{nM}$ 受質 H、 $0.05\ \text{U}/\mu\text{L}$ KF、 $2.5\ \text{mM}$ dNTP 分別與 $200\ \text{nM}$ 分析物 (miR-
221, microRNA-222 DNA analog, microRNA-4288 DNA analog, microRNA-744
DNA analog) 於 $1\times$ Cutsmart Buffer 進行反應。最後以 15% PAGE 進行分析。

2.12.3 λ 之專一性延長測試

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C , 反應總體積 $10\ \mu\text{L}$ 下，
使用 $600\ \text{nM}$ 受質 H、 $0.05\ \text{U}/\mu\text{L}$ KF、 $2.5\ \text{mM}$ dNTP、 $0.02\ \text{U}/\mu\text{L}$ λ 分別與 $200\ \text{nM}$
分析物 (miR-221, microRNA-222 DNA analog, microRNA-4288 DNA analog,
microRNA-744 DNA analog) 於 $1\times$ Cutsmart Buffer 進行反應。最後以 denaturing
 15% PAGE 進行分析。

2.12.4 P2C 之專一性延長測試

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C , 反應總體積 $10\ \mu\text{L}$ 下，
使用 $600\ \text{nM}$ 受質 H、 $0.05\ \text{U}/\mu\text{L}$ KF、 $2.5\ \text{mM}$ dNTP、 $0.02\ \text{U}/\mu\text{L}$ λ 分別與 $200\ \text{nM}$

分析物 (miR-221, microRNA-222 DNA analog, microRNA-4288 DNA analog, microRNA-744 DNA analog) 於 1×Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95 °C 加熱 10 分鐘將酵素去活化後與 200 nM P2C 於 37 °C 反應 1 小時，最後以 15% PAGE 進行分析。





2.13. 鍍金時間 (Gold electrodeposition time) 之最佳化

2.13.1. 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 為電化學訊號分子

參考電極之活化

取 $2 \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

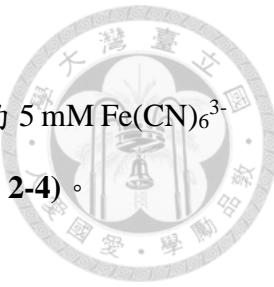
使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4 \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，分別施予 30、45、60、75、90 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



循環伏安法 CV 鑑定

將配置於 100 mM phosphate buffer (內含 0.15 M NaCl , pH 7.0) 的 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

¹⁴- 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行循環伏安法 (CV) 之鑑定 (表 2-4)。

表 2-2. SPCE 工作電極表面清洗之循環伏安法 (CV) 參數設定

Init E (V)	0
High E (V)	1.7
Low E (V)	0
Scan rate (V/s)	0.1
Sweep segments	20
Sample interval (V)	0.001
Quiet time (Sec)	0
Sensitivity (A/V)	1.0e-0.5

表 2-3. 鍍金用之計時電流法參數設定

Init E (V)	-0.66
Sample interval (V)	0.1
Sampling time (sec)	60
Quiet time (Sec)	0
Sensitivity (A/V)	1.0e-0.3



表 2-4. 電極表面鑑定之循環伏安法 (CV) 參數設定

Init E (V)	-0.3
High E (V)	0.6
Low E (V)	-0.3
Final E (V)	0.6
Scan rate (V/s)	0.1
Sweep segments	20
Sample interval (V)	0.001
Quiet time (Sec)	0
Sensitivity (A/V)	1.0e-0.4



2.13.2. 以 P2C-MB 探針上之 MB 為電化學訊號之分子

參考電極之活化

取 $2\ \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4\ \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，分別施予 30、45、60、75、90 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



P2C-MB 之修飾

將尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 P2C-MB 溶於將固定化緩衝溶液 (Immobilization buffer: 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0)，並放入核酸增值儀內，加熱至 95 °C 後緩慢降溫至室溫使 P2C-MB 形成髮夾 (Hairpin) 之構型。隨後配置成含有 1.0 μM 之 P2C-MB 與 200 μM DTT 之混合液，並於室溫下進行反應 15 分鐘將 DNA 修飾的雙硫鍵 (Disulfide bond) 還原。取 6 μL 之混合液至 SPCE 之作電極表面，隨後置放於 4 °C 且潮濕之環境約 18 小時。

Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時，避免 DNA 的非專一性吸附現象。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。

方波伏安法 (SWV) 鑑定

將 40 μL 的電解質緩衝溶液 (5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-4)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的起始氧化電流訊號 I_{Initial}。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。

誘導股 P2 之添加

取 6 μL 濃度為 100 nM 之誘導股 P2 到工作電極表面，在室溫反應 45 分鐘。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。將 40 μL 的電

解質緩衝溶液 (5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的最終氧化電流訊號 I_{Final}。



表 2-5. 方波伏安法 (SWV) 參數設定

Init E (V)	-0.4
High E (V)	-0.15
Incr E (V)	0.004
Amplitude (V)	0.025
Frequency (Hz)	15
Quiet time (Sec)	0
Sensitivity (A/V)	1.0e-06



2.14. P2C-MB 固定化濃度之最佳化

參考電極之活化

取 $2\mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱸魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4\mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW :950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱸魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，施予 60 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



P2C-MB 之修飾

將尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 P2C-MB 溶於將固定化緩衝溶液 (Immobilization buffer: 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0)，並放入核酸增值儀內，加熱至 95 °C 後緩慢降溫至室溫使 P2C-MB 形成髮夾 (Hairpin) 之構型。隨後分別配置成濃度為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 μM 之 P2C-MB 與 200 μM DTT 之混合液，並於室溫下進行反應 15 分鐘將 DNA 修飾的雙硫鍵 (Disulfide bond) 還原。取 6 μL 之混合液至 SPCE 之工作電極表面，隨後置放於 4 °C 且潮濕之環境約 18 小時。

Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時，避免 DNA 的非專一性吸附現象。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

方波伏安法 SWV 鑑定

將 40 μL 的電解質緩衝溶液 (5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的起始氧化電流訊號 I_{Initial}。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。



誘導股 P2 之添加

取 $6 \mu\text{L}$ 濃度為 100 nM 之誘導股 P2 到工作電極表面，在室溫反應 45 分鐘。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。將 $40 \mu\text{L}$ 的電解質緩衝溶液 ($5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM NaCl , pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的最終氧化電流訊號 I_{Final} 。



2.15. P2C-MB 於工作電極之密度鑑定

參考電極之活化

取 $2\ \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4\ \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，施予 60 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



P2C-MB 之修飾

將尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 P2C-MB 溶於將固定化緩衝溶液 (Immobilization buffer: 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0)，並放入核酸增值儀內，加熱至 95 °C 後緩慢降溫至室溫使 P2C-MB 形成髮夾 (Hairpin) 之構型。隨後配置成含有 1.0 μM 之 P2C-MB 與 200 μM DTT 之混合液，並於室溫下進行反應 15 分鐘將 DNA 修飾的雙硫鍵 (Disulfide bond) 還原。取 6 μL 之混合液至 SPCE 之作電極表面，隨後置放於 4 °C 且潮濕之環境約 18 小時。

Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時，避免 DNA 的非專一性吸附現象。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。

計時庫倫法 (CC) 鑑定

使用低離子強度之緩衝溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行計時庫倫法 (Chronocoulometry, CC) 之鑑定 (表 2-6)。將配置於上述低離子強度之 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 的 50 μM Ru(NH₃)₆³⁺ 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行第二次之計時庫倫法 (CC) 鑑定 (表 2-6)。



表 2-6. 工作電極表面 P2C-MB 之密度鑑定使用的計時庫倫法 (CC) 參數設定

Init E (V)	-0.3
Final E (V)	0.6
Number of steps	2
Pulse width (sec)	0.25
Sample interval (V)	0.00025
Quiet time (Sec)	2
Sensitivity (A/V)	1.0e-0.5



2.16. 阻隔劑 (Blocking agent) 之最佳化

2.16.1 以經不同阻隔劑處理之電極量測不同濃度亞甲藍溶液之校正曲線所得之 slope 和 R^2 進行比較

參考電極之活化

取 $2 \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4 \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，施予 60 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。分別使用五種不同組合之阻隔劑 (MCH, Cut, MCH+Cut, MCH followed by Cut, Cut followed by MCH) 於 SPCE 電極表面進行阻隔，避免 DNA 之非專一性吸附。第一組:將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer，加 6μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。第二組:取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。第三組:將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時。第四組:將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer, 加 6μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。用二次去離子水沖洗電極 4 次後放乾，隨後再取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。第四組:取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。用二次去離子水沖洗電極 4 次後放乾，隨後再取 6 μL 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。

方波伏安法 (SWV) 鑑定

將濃度為 10、20、30、40、50 μM 亞甲藍 (Methylene blue, MB) 配置於解質緩衝溶液 (5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.0) 取 40 μL 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)。

2.16.2 經不同阻隔劑處理之電極對 BSA 非專一性吸附之抗性



參考電極之活化

取 $2\ \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4\ \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱷魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，施予 60 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



P2C-MB 之修飾

將尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 P2C-MB 溶於將固定化緩衝溶液 (Immobilization buffer: 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0)，並放入核酸增值儀內，加熱至 95 °C 後緩慢降溫至室溫使 P2C-MB 形成髮夾 (Hairpin) 之構型。隨後配置成含有 1.0 μM 之 P2C-MB 與 200 μM DTT 之混合液，並於室溫下進行反應 15 分鐘將 DNA 修飾的雙硫鍵 (Disulfide bond) 還原。取 6 μL 之混合液至 SPCE 之工作電極表面，隨後置放於 4 °C 且潮濕之環境約 18 小時。

Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。分別使用五種不同組合之阻隔劑 (MCH, Cut, MCH+Cut, MCH followed by Cut, Cut followed by MCH) 於 SPCE 電極表面進行阻隔，避免 DNA 之非專一性吸附。第一組:將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer，加 6μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。第二組:取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。第三組:將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時。第四組:將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer, 加 6μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。用二次去離子水沖洗電極 4 次後放乾，隨後再取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。第四組:取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。用二次去離子水沖洗電極 4 次後放乾，隨後再取 6 μL 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。



方波伏安法 (SWV) 鑑定

將 $40 \mu\text{L}$ 的電解質緩衝溶液 ($5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM NaCl , pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的起始氧化電流訊號 I_{Initial} 。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。

誘導股 P2 之添加

取 $6 \mu\text{L}$ 濃度為 100 nM 之誘導股 P2 到工作電極表面，在室溫反應 45 分鐘。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。將 $40 \mu\text{L}$ 的電解質緩衝溶液 ($5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM NaCl , pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的最終氧化電流訊號 I_{Final} 。



2.17. 工作電極表面之鑑定

將未經過任何修飾之裸電極 (Bare SPCE) 與三種不同修飾後的電極 (PEG@SPCE, AuNP@PEG@SPCE, P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE)，如圖 2-1 所示，分別以循環伏安法 (CV) 進行表面之鑑定。循環伏安法 CV 參數如表 2-3 所示，將配置於 100 mM phosphate buffer (內含 0.15 M NaCl, pH 7.0) 的 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行循環伏安法 (CV) 之鑑定 (表 2-4)。

	參考電極活化	工作電極之清洗	PEG 之修飾	鍍金	P2C-MB 修飾	Blocking
Bare SPCE						
PEG@SPCE						
AuNP@PEG@SPCE						
P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE						

圖 2-1. SPCE 之不同層次之修飾。紅色陰影 (Shading) 表示上述 SPCE 經過之修飾。



2.18. 電化學生化感測器應用於目標分子 miR-221 之分析

DNA Nanomachine 產物之生成

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C ，使用 600 nM 受質 H、0.05 U/ μL KF、2.5 mM dNTP、0.02 U/ μL λ 分別與不同濃度之目標分子 miR-221 (1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 nM) 於 1×Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95°C 加熱 10 分鐘將酵素去活化。

電化學生化感測器之偵測

取 40 μL 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM NaCl, pH 7.0) 做為電解質溶液滴於經過修飾和改質後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE，並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之起始氧化電流訊號 I_{Initial} (表 2-5)。隨後，將 DNA Nanomachine 操作完畢後之反應液加到上述電極之工作表面上，於室溫下進行互補雜合 45 分鐘，之後並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之最終氧化電流訊號 I_{Final} (表 2-5)。



2.19. 電化學生化感測器之選擇性測試

DNA Nanomachine 產物之生成

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C ，使用 600 nM 受質 H、0.05 U/ μL KF、2.5 mM dNTP、0.02 U/ μL λ 分別與 200 nM 和 100 nM 分析物（目標分子 miR-221、microRNA-21、microRNA-222 DNA analog、microRNA-4288 DNA analog、microRNA-744 DNA analog）於 1×Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95°C 加熱 10 分鐘將酵素去活化。

電化學生化感測器之偵測

取 40 μL 5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM NaCl, pH 7.0) 做為電解質溶液滴於經過修飾和改質後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE，並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之起始氧化電流訊號 I_{Initial} (表 2-5)。隨後，將 DNA Nanomachine 操作完畢後之反應液加到上述電極之工作表面上，於室溫下進行互補雜合 45 分鐘，之後並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之最終氧化電流訊號 I_{Final} (表 2-5)。

2.20. 儲存天數 (Storage time) 對於氧化電化學訊號之影響



參考電極之活化

取 $2\ \mu\text{L}$ 35% H_2O_2 覆蓋于網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 的參考電極表面上，於室溫下反應 5 分鐘，同時持續移除表面所生成之氣泡，接著再加上等體積的 3 M KCl，在室溫下反應 5 分鐘，隨後用兩次去離子水沖洗電極 6 次，最後以氮氣 (Nitrogen) 將電極表面吹乾。

工作電極之清洗

使用自製三電極系統，將 0.1 M H_2SO_4 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱸魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以循環伏安法 (CV) 清洗 SPCE 的工作電極表面 (表 2-2)，隨後以二次去離子水沖洗電極 6 次，之後以氮氣將電極表面吹乾。

PEG 的修飾

滴 $4\ \mu\text{L}$ 的 8mg/ml PEG (MW : 950-1050) 到工作電極，隨後置於 37°C 的 shaking incubator 蒸干 1 小時，之後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

鍍金

使用自製三電極系統，將含有 0.1 M KCl 的 5 mM HAuCl₄ 倒入反應槽，以甘汞電極作為參考電極，白金絲為輔助電極，利用鱸魚夾夾住 SPCE 的工作電極導線，以計時電流法給予定電壓的方式 (表 2-3)，施予 60 之電壓時間 (Sampling time)，使金納米粒子電沉積予 SPCE 的工作電極表面，隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。



P2C-MB 之修飾

將尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 P2C-MB 溶於將固定化緩衝溶液 (Immobilization buffer: 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0)，並放入核酸增值儀內，加熱至 95 °C 後緩慢降溫至室溫使 P2C-MB 形成髮夾 (Hairpin) 之構型。隨後配置成含有 1.0 μM 之 P2C-MB 與 200 μM DTT 之混合液，並於室溫下進行反應 15 分鐘將 DNA 修飾的雙硫鍵 (Disulfide bond) 還原。取 6 μL 之混合液至 SPCE 之作電極表面，隨後置放於 4 °C 且潮濕之環境約 18 小時。

Blocking

用 blocking buffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗電極 4 次後放乾。將 2 mM 6-Mercaptohexanol 配製在 Blocking buffer，隨後與 2×Cutsmart Buffer 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cutsmart Buffer 濃度分別為 1 mM 和 1×之混合液。取 6 μL 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時，避免 DNA 的非專一性吸附現象。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極。

電極之保存

保存方式 1 為直接將修飾和改良後之電極置於 4 °C 之環境進行保存；保存方式 2 則為將經過修飾和改良後之電極置於包裝袋內，並充入氮氣以降低包裝容器內之氧氣濃度，最後進行密封並於 4 °C 之環境進行保存。分別於儲存天數為 1、3、5、7、14、21、28 天之後將電極取出以進行 I_{Initial} 和 I_{Final} 之測量。

方波伏安法 (SWV) 鑑定

將 40 μL 的電解質緩衝溶液 (5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到

P2C-MB 上 MB 的起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。



誘導股 P2 之添加

取 $6 \mu\text{L}$ 濃度為 100 nM 之誘導股 P2 到工作電極表面，在室溫反應 45 分鐘。隨後用二次去離子水以划 8 字清洗方式來回三次清洗電極並放乾。將 $40 \mu\text{L}$ 的電解質緩衝溶液 ($5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM NaCl , pH 7.0) 覆蓋於 SPCE 之三電極表面進行方波伏安法 (SWV) 之鑑定 (表 2-5)，進而得到 P2C-MB 上 MB 的最終氧化電流訊號 I_{Final} 。

2.21. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較



(1) 同日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較

DNA Nanomachine 產物之生成

實驗之操作條件為固定反應時間 1 小時及反應溫度 37^0C ，使用 600 nM 受質 H、
0.05 U/ μL KF、2.5 mM dNTP、0.02 U/ μL λ 分別與不同濃度之目標分子 miR-221
(100, 10, 1 nM) 於 1×Cutsmart Buffer 進行反應。所產生之產物在 95^0C 加熱 10 分
鐘將酵素去活化。

電化學生化感測器之偵測

在同一天，取 40 μL 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM NaCl, pH 7.0) 做為電解質
溶液滴於經過修飾和改質後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE ($n=3$)，並以方波伏
安法 (SWV) 量測 MB 之起始氧化電流訊號 I_{Initial} 。隨後，將 DNA Nanomachine
操作完畢後之反應液加到上述電極之工作表面上，於室溫下進行互補雜合 45 分
鐘，之後並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之最終氧化電流訊號 I_{Final} 。之後將同
日所得之數據進行比較。

(2) 隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較

在另外一天，重新修飾新一批的 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE ($n=3$)，並重複
DNA Nanomachine 產物之生成和電化學生化感測器之偵測的步驟，進而得到 I_{Initial}
和 I_{Final} 。之後再將同日與隔日所得之數據進行比較。

2.22. 血清 (Serum) 中目標分子 miR-221 之回收率 (Recovery rate)

本實驗分兩部分進行，第一部分為直接以核酸試劑組 (Extraction kit) 進行大鼠血清之萃取；第二部分之實驗為將合成訂製之目標分子 miR-221 添加於 50 μL 的大鼠血清並經過 RNA 萃取之步驟。於本實驗中所使用的微量吸管(Pipetman)、微量吸管頭 (Tip)、二次去離子水 (ddH₂O) 與微量試管(Eppendorf)皆為 RNase-free。萃取所採用之試劑皆為分生試劑之等級。使用 miRNeasy serum/plasma kit 進行萃取的步驟如下：

1. 將 20 U RNase inhibitor 添加至 50 μL 的血清，混合均勻後再將 250 μL QIAzol 裂解試劑(Lysis reagent)加入，上下搖動微量試管使其混合液混合均勻，隨後於室溫下靜置 5 分鐘。
2. 加入 50 μL choroform,劇烈搖晃約 15 秒，隨後於室溫下靜置 3 至 5 分鐘。
3. 以 12,000 g 於 4 °C 離心 15 分鐘。
4. 將上清液 (Supernatant) 轉置到新的微量試管，避免吸到中間的白色 DNA 沉澱物與下層之有機相。
5. 加上體積量為上清溶液總體積之 1.5 倍的 95% 酒精，並用微量吸管使其混合均勻，並將上述混合液 (最大體積量為 700 μL) 轉置到附有 2 mL 收集管的 RNeasy MinElute spin column。以 10,000 g 於室溫下離心 15 秒。隨後將收集管內之廢液去除。
6. 將 700 μL Buffer RWT 加入 spin column 中，以 10,000 g 於室溫下離心 15 秒。隨後將收集管內之廢液去除。
7. 重複步驟 (6)。
8. 將 500 μL Buffer RPE 加入 spin column 中，以 10,000 g 於室溫下離心 15 秒。隨後將收集管內之廢液去除。
9. 將 500 μL 80% 酒精加入 spin column 中，以 10,000 g 於室溫下離心 4 分鐘。隨後將 spin column 移置新的 2 mL 收集管。

- 
10. 將 spin column 的上蓋打開，以 13,000 g 於室溫下離心 5 分鐘以去除 spin column membrane 內的酒精，防止殘留之酒精影響 RNA 之回收率。
 11. 將 spin column 移置到新的 1.5 mL 收集管，加入 14 µL RNase-free 而離去離子水到膜之正中央，以 13,000 g 於室溫下離心 1 分鐘以將 RNA 沖洗出來，隨後於-20 °C 進行保存。

第三章 實驗結果與討論



3.1. 實驗設計

實驗設計如圖 3-1 所示。我們使用酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略，發展用於檢測胰臟癌相關之生物標記分子 miR-221 的電化學生化感測平臺。此平臺主要由三部分組成：

- 一. Klenow Fragment (KF) 輔助目標分子之循環反應 (KF-assisted Target Recycling)
- 二. λ 外切酶剪切反應 (Lambda Exonuclease Digestion)
- 三. 電化學訊號的輸出 (Electrochemical Signal Output)

第一部分為 KF 輔助目標分子之循環反應 (KF-assisted Target Recycling)。本實驗中所設計的受質 (Substrate) 為一脫氧核醣核酸組成之髮夾構型 (DNA Hairpin, H)，其序列設計如圖 3-2 所示，H 由五段子序列所組成：子序列①，子序列①'，子序列②，子序列②'和子序列③。為了專一性辨識並補抓目標分子 miR-221，H 的子序列①之核酸序列設計與目標分子完全互補。當目標分子缺乏時，H 的子序列①和子序列①'會進行互補配對雜合而形成莖環結構 (Stem-loop) 中之莖 (Stem) 區域，使 H 能穩定以髮夾構型存在。當目標分子 miR-221 存在時，目標分子 miR-221 會以 toehold-mediated strand displacement 的方式與做為 toehold 之子序列①上 5' 端 overhang 進行互補打開 H 的莖環結構。同時，H 的子序列②與子序列②'也會進行互補雜合，而使得 H 轉換成新髮夾的結構，此目標分子 miR-221 與 H 結合之 RNA/DNA 複合雙股稱之為 MicroRNA/Hairpin duplex。Klenow Fragment (KF) 是一種具有單股置換活性但缺乏外切酶活性的 DNA 聚合酶¹⁰⁴。當上述 RNA/DNA 複合雙股形成後，KF 會辨認 H 的 3' 端並以 H 的子序列①為模板 (Template) 進行聚合反應 (Polymerization)，進而形成延長後的 H^e (Elongated hairpin, 100 nt)。在 H^e 的形成過程中，目標分子 miR-221 也會被 KF 進行單股置換 (Strand displacement) 而釋出，以達到目標分子 miR-221 之循環反應。

經釋出之目標分子 miR-221 可以與其它更多的受質 H 進行互補雜合，啟動 KF 將 H 延長，製造出更多的 H^e 產物，以做為第二部分反應之原料。

第一部分所產生的 H^e 設計用以啟動第二部分 λ 外切酶剪切反應。Lambda Exonuclease (λ) 是一種以雙股 DNA 為優選受質，並選擇性地從 5' 端磷酸化的部分進行剪切而釋放出單核苷酸 (Mononucleotide) 的外切酶¹⁰⁵。所形成的 H^e 因具有完整的雙股 (H^e 的子序列①和子序列②分別與序列①'和子序列②'完全互補配對)，並且在 5' 端的部分預先修飾有磷酸根分子，因此 λ 可以進行辨認 H^e，並由 H^e 的 5' 端往 3' 端的方向開始進行剪切 (Digestion)，進而產生中間產物 (Intermediate product, P1)。由於 P1 的子序列①和子序列②可與 H 的子序列①和子序列②完全互補，故可啟動第二次的 toehold-mediated strand displacement，將新的 H 的莖環結構打開，形成 P1/Hairpin duplex 的 DNA 複合雙股，並且會啟動第二部分的 λ 外切酶剪切反應，進而產生最終產物 (Final product, P2)。此單股產物也扮演著訊號誘導股的角色，啟動第三部分的反應。

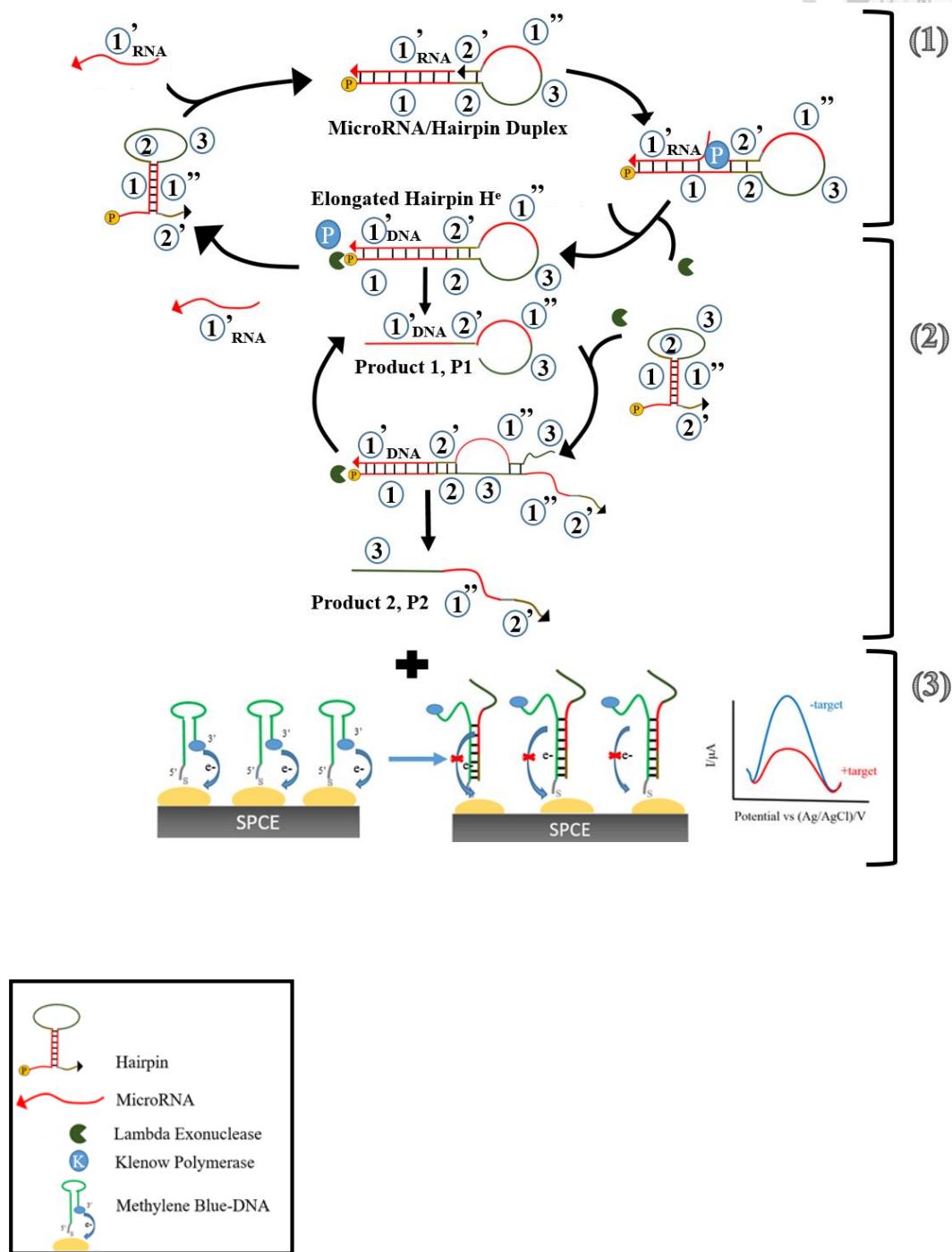


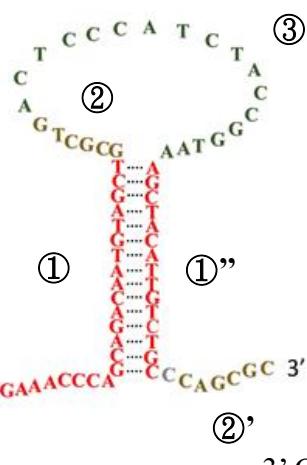
圖 3-1. 以酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略之電化學生化感測平臺

1. Klenow Fragment 輔助目標分子之循環反應 (KF-assisted Target Recycling)
2. λ 外切酶剪切反應 (Lambda Exonuclease Digestion)
3. 電化學訊號的輸出 (Electrochemical Signal Output)



Loop

(24 nt)



5' Phosphorylation

讓 λ 辨認 KF 延長後的
產物

Stem

防止 nontarget 啟動下游的反
應，只允許 target 將 hairpin
給打開

②'

3' Overhang

防止 KF 的 nonspecific elongation

5' Overhang

防止 λ 的 nonspecific digestion

圖 3-2. 髮夾構型的脫氧核醣核酸（DNA Hairpin, H）的序列設計及其功能

由於反應溫度不僅會影響酵素 (Enzyme) 之工作效率，也會影響目標分子 miR-221 與受質 H 進行互補配對之效率。因此我們在設定系統反應溫度時，會以核酸分子之 melting temperature (T_m) 值和酵素反應活性溫度之兩參數進行最佳化調整。在適當溫度情況之下，酵素的工作效率與溫度的上升成正比，因其可增加受質與酵素活性部位 (Active site) 的碰撞 (Collision) 機率；反之，當溫度過高時，會造成酵素本身三級結構內的氫鍵 (Hydrogen bond) 被破壞，導致酵素變性(Denaturation)而失活。本論文所設計之 DNA Nanomachine 的操作過程中會涉及兩種酵素的使用，分別為 Klenow Fragment (KF) 和 Lambda Exonuclease (λ)，所設計的反應溫度則必須兼顧此兩種酵素可作用之範圍，以利於最多的產物之生成。根據文獻指出¹⁰⁶⁻¹⁰⁷，KF 和 λ 的最佳活性溫度 (Optimal temperature) 皆為 37 $^{\circ}\text{C}$ ，表示其在 37 $^{\circ}\text{C}$ 時可發揮最大的催化活性。由於本論文中，酵素所作用之受質為雙股核酸分子，當所形成的雙股核酸分子 T_m 值低於反應溫度時，其雙股間之雜合效率則會大幅度降低；反之，不完全互補的兩股在反應溫度較低的情況之下則容易會出現非專一性的配對。根據 Mfold 分析軟體的核酸分析結果可得知在鈉離子濃度和鎂離子濃度分別為 0.05 M 和 0.01 M，且反應溫度為 37 $^{\circ}\text{C}$ 的條件之下，miR-221 和 H 所形成的 MicroRNA/Hairpin 此 RNA/DNA 複合雙股的 T_m 值為 76.7 $^{\circ}\text{C}$ 。由此推斷在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的溫度條件進行反應，目標分子 miR-221 與受質 H 的雜合配對仍可順利形成，兩酵素工作效率也可發揮最大效率，故我們最終選擇 37 $^{\circ}\text{C}$ 為 DNA Nanomachine 的操作溫度。

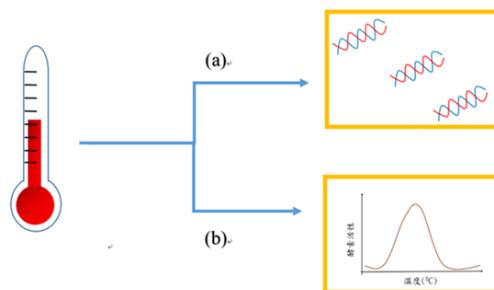


圖 3-3. DNA Nanomachine 反應溫度之最佳化。(a) T_m 值的考量 (b) 兩種酵素的最佳活性溫度。

第三部分為電化學訊號的輸出，所採用的方法為訊號關閉 (Signal-off) 之策略。首先，網版印刷碳電極 (Screen-printed carbon electrode, SPCE) 先進行工作電極的修飾，其主要步驟含蓋：

1. 以 H_2SO_4 以循環伏安法 (Cyclic voltammetry, CV) 清洗工作電極
2. 以金奈米粒子通過計時庫倫法 (Chronocoulometry, CC) 電鍍在 SPCE 上
3. 聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 的修飾
4. P2C-MB 的修飾
5. 由 6-巯基己-1-醇 (6-Mercaptohexanol, MCH) 和 Cutsmart Buffer (Cut) 所組成之混合液於工作電極表面上的 blocking

在清洗的過程中，工作電極上的不純物質或雜質 (Impurities) 可以成功地被移除，以得到一乾淨的電極表面，確保其它物質不會影響後續的實驗結果；金奈米粒子的修飾可以通過其優良的導電度之性質改善 SPCE 的電子傳遞效率和獲得較大的電極表面積之特性改善工作電極；PEG 的修飾可以防止蛋白質的非專一性吸附 (Nonspecific absorption)，使系統所參與的酵素在工作電極上不因酵素蛋白質本身不導電之性質而影響電化學訊號分子的氧化還原電流 (Redox current) 訊號；藉由硫金鍵 (Thiol-gold bond) 的方式將 5'端帶有硫基的髮夾修飾於已鍍上金奈米分子的 SPCE (AuNP@SPCE)。所設計的髮夾稱之為 P2C-MB，其序列如圖 3-4 所示，3'端標記上電化學活性分子亞甲藍 (Methylene blue, MB)。MCH 可將傾倒單股 DNA 給置換掉，避免單股 DNA 與電極產生 N-Au 鍵結，影響雜交率。此外，Cutsmart Buffer 內的牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 成分和 MCH 可將修飾在工作電極上的金奈米粒子彼此間之空隙處進行阻隔，防止物質之非特異性吸附。當沒有訊號誘導股 P2 時，經 P2C-MB 修飾後之工作電極所測量的法拉第電流 (Faradaic current) 為 $I_{Initial}$ 表示。由於此時的 P2C-MB 是維持髮夾結構，MB 分子與工作電極表面的距離最為接近，進而可以產生最有效，且最快速的電子傳遞 (Electron transfer)。當 P2 當做訊號誘導股引入到電極上時，因其會與 P2C-MB 進行互補雜合反應，將 P2C 的髮夾構型打開，形成結構較為堅硬 (Rigid) 的

雙股 DNA 結構，此時標定在 P2C 3' 端之 MB 分子遠離工作電極表面，MB 訊號分子之電子傳遞效率下降，所量測之 MB 氧化還原電流的訊號 (I_{Final}) 因而下降。通過電流訊號改變程度的大小，可定量分析目標分子 miR-221。為了優化感測器的表現，一系列之反應條件將進行最佳化測試。

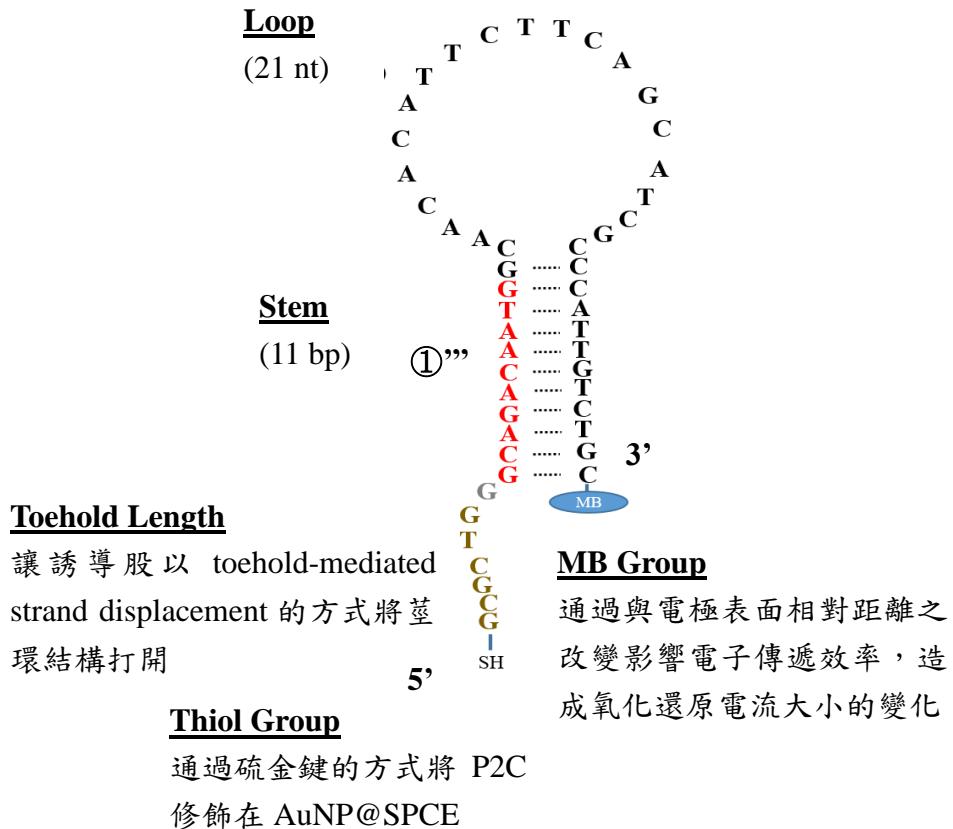


圖 3-4. P2C 的序列設計：5' 端修飾上 thiol group，3' 端修飾上 MB group。

3.2. 酵素驅動型核酸奈米機器 (DNA Nanomachine) 產物的鑑定

酵素驅動型核酸奈米機器的主要元件為 Hairpin (H)，目標分子 miR-221，Klenow Fragment (KF) 和 Lambda Exonuclease (λ)，如圖 3-5 所示。為了確保唯有全部元件都存在之條件下，DNA 奈米機器始以啟動，以 DNA 電泳膠圖 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行初步分析。

在第一部分偵測平臺中，當目標分子 miR-221 存在時，會與受質 (Substrate) Hairpin (H) 的子系列①進行互補配對，形成第一個中間產物 MicroRNA/Hairpin duplex，為 RNA : DNA 之複合雙股，使反應溶液中的 KF 能辨認此複合雙股的 3' 端，進而從 3' 端的位置開始進行延長，再產生新的第二個中間產物 2-Elongated Hairpin (H^e)。藉由延長後之 H^e 上 5' 端修飾之磷酸根和其 stem 雙股區域，啟動第二部分的 λ 外切酶剪切反應，使得 H^e 被剪切，產生第三個中間產物 Product 1 (P1)。裁剪後之 P1 再與溶液中的 H 進行配對雜合，啟動第二次的 λ 外切酶剪切反應，產生最終產物-Product 2 (P2)。

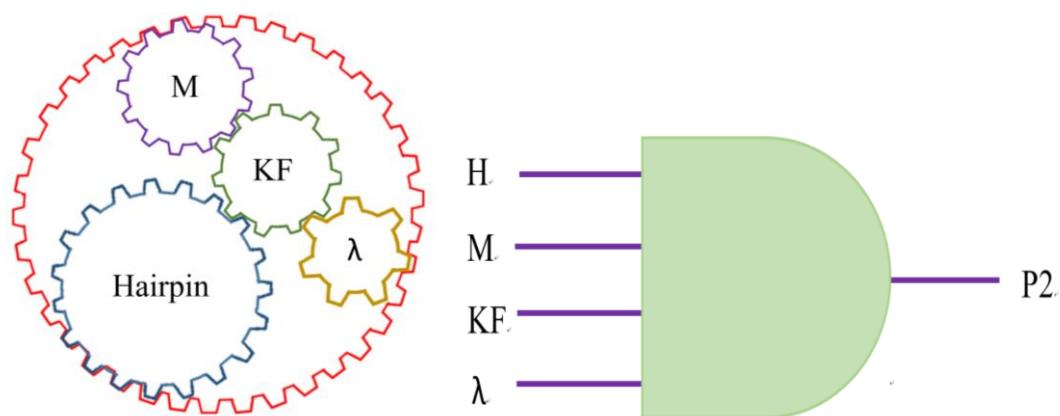


圖 3-5. 酵素驅動型核酸奈米機器的主要元件和 AND gate 示意圖。

在本實驗的設計中，H 的子序列①與目標分子 miR-221 的鹼基互補數目會影響 H 被打開之效能，故以核酸分析軟體 Nupack 和 Mfold 進行初步的構型穩定性分析。當反應涉及到一個或多種相互作用的核酸分子時，Nupack 分析軟體可以針對核酸分子本身的二級結構 (Secondary structure) 和其核酸分子間之雜合率進行精確的分析和設計¹⁰⁸⁻¹⁰⁹。而 Mfold 包含核酸折疊 (Folding)，雜合 (Hybridization) 和 Tm 值 (Melting temperature) 的預測¹¹⁰。藉由 Nupack 的分析結果得知，如圖 3-6 所示，當 H 的子序列①為 11-mer 時，200 nM miR-221 在鈉離子濃度和鎂離子濃度分別為 0.05 M 和 0.01 M，反應溫度為 37 °C 的條件下，可以完全打開 200 nM H 的髮夾結構，進而形成 RNA:DNA 複合雙股。根據 Mfold 的分析結果，如表 3-1 所示，所形成複合雙股的熵 (Entropy) 比起單獨存在的 H 來得小，而且前者的 Tm 值與後者相比之下也較大，故推斷所形成的複合雙股較為穩定。

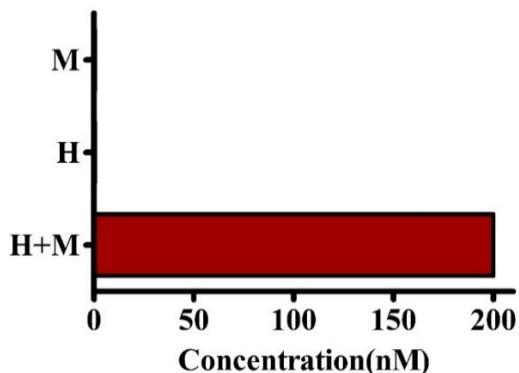


圖 3-6. 使用 Nupack 針對 200 nM H 和 200 nM M 在鈉離子濃度和鎂離子濃度分別為 0.05 M 和 0.01 M，反應溫度為 37 °C 的條件之下進行雜合所得之分析結果。

	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/K)	Tm (°C)
Hairpin	-15.48	-139.4	-399.55	75.7
Hairpin/MicroRNA Duplex	-29.6	-184.6	-499.9	78.1

表 3-1. 利用 Mfold 針對單獨的 H 和 MicroRNA/Hairpin duplex 在鈉離子濃度為 1 M，反應溫度為 37 °C 的條件之下進行熱力學函數的分析。

藉由 PAGE 分析之結果圖 3-7，組別 1 至組別 5 為模擬條帶，分別為組別 1：73 nt 的受質 H、組別 2：23 nt 的目標分子 miR-221、組別 3：100 nt 的中間產物 2，H^e、組別 4：67 nt 的產物，P1、組別 5：50 nt 的最終產物，P2。組別 6 為 H 與 M 所組成。由於本實驗採用變性凝膠電泳 (Denatured gel electrophoresis) 進行樣品之分析，故無法探討 H 與 M 之雜合程度。膠圖顯示由 H，M，KF 三元件經混合均勻反應後之組別 7 出現對應於組別 3 模擬條帶的新條帶，表示當這三種元件存在時，可以如預期地產生 H^e。組別 8 和 9 分別為 H、λ 和 H、M、λ 所組成，是做為 λ 外切酶剪切反應的負向控制組 (Negative control)，用以確認 5' 端磷酸化的雙股 DNA 為 λ 外切酶之優選受質。經由組別 8 和組別 9 的實驗結果發現，並沒有出現明顯的 P1 和 P2，得證在缺乏 KF 存在時，DNA Nanomachine 無法正常運作產生最終產物 P2。由組別 10 可見，當 H、P1、λ 三種成分進行反應後，可以看到對應于組別 5 的 P2 之條帶產生，證實產物 P1 可啟動第二次 λ 外切酶的反應，進而使得 H 被剪切而形成最終產物 P2，符合實驗設計的預期結果。組別 11 為全部元件 (H, M, KF, λ) 都存在的情況之下，DNA Nanomachine 才可以正常地運作，因此可以看到對應于組別 5 的 P2 之條帶產生。從膠圖的結果可知，當其中一個元件缺乏時，DNA Nanomachine 就無法運作而產生最終產物 P2，進而無法驅使第三部分電化學平台之反應。

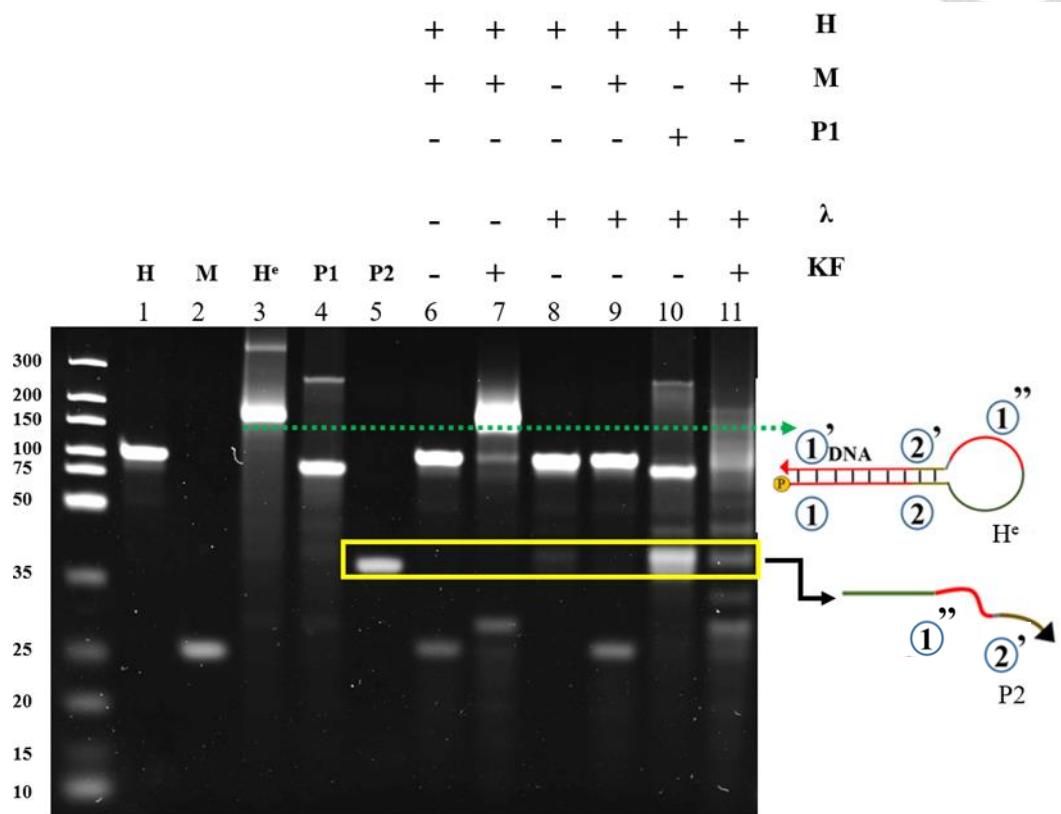


圖 3-7. DNA Nanomachine 運作結果之條帶對應圖。7 M urea，15% acrylamide 的 Denatured Gel 以 70 V 在 55 °C 電泳分析 100 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。(1): 200 nM H。(2): 200 nM M。(3): 200 nM 模擬產物 H^e 。(4): 200 nM 模擬產物 P1。(5): 200 nM 模擬產物 P2。(6): 200 nM H 與 200 nM M 於 37 °C 下反應 1 小時。(7): 200 nM H、200 nM M、0.05 U/ μ L KF 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。(8): 200 nM H 與 0.02 U/ μ L λ 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。(9): 200 nM H、200 nM M、0.02 U/ μ L λ 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。(10): 200 nM H、200 nM P1, 0.02 U/ μ L λ 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。(11): 200 nM H、200 nM M、0.05 U/ μ L KF 與 0.02 U/ μ L λ 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。

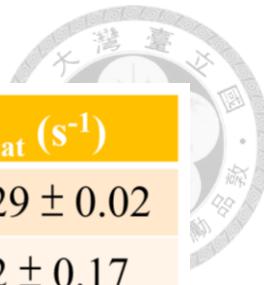


3.3. Hairpin 5'端 overhang 鹼基數目的最佳化

根據前人的文獻指出，Lambda Exonuclease (λ) 對於受質 H 的喜好程度順序為 5' recessed \geq blunt $>>$ 5' overhang¹⁰⁵，其作用之轉變數 (Turnover number, K_{cat}) 如表 3-2 所示。 K_{cat} 為單位時間內每莫耳酵素所能催化之受質莫耳數，可用以表示酵素催化能力的強弱。當 K_{cat} 數值越大時，所代表之催化能力越強。 λ 對於 5' P blunt 的轉變數分別為 5' OH blunt, 5' P recessed 和 5' P overhang 的 7.58, 4.78, 0.61 倍。

Hairpin (H) 做為本系統中受質用以啟動 DNA Nanomachine 的重要關鍵，因此我們先設計了兩種 H 以進行 λ 非特異性之剪切 (Nonspecific digestion) 的比較。如圖 3-8 所示，如果反應為 on 的狀態之下，H 會被 λ 剪切成較小的核酸片段 (DNA fragment)，H 濃度會明顯地下降；如果反應為 off 的狀態之下， λ 無法對 H 造成非特異性的剪切，因此 H 的濃度會維持不變。所設計的兩種 H，它們的 5' 端 Overhang 的鹼基數目 (Base number) 分別為 8 和 12，如圖 3-9 所示，分別稱之為 H1 及 H2，其主要差別在於 H2 的 5' 端 overhang 的部分比 H1 多了四個胸腺嘧啶 (Thymine, T)。當實驗操作條件固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C，於 200 nM 的受質 H 且不添加目標分子 miR-221 之下，處以不同濃度的 λ (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.001 U/ μ L) 進行反應，用以探討 λ 的非特異性剪切功能是否會被啟動，進而產生訊號洩露 (Leakage)。由圖 3-10A 使用 H1 做為受質的膠體電泳結果所示，組別 1 為 H1 之模擬條帶，做為對照組 (Control group)；組別 6 為經過 0.001 U/ μ L 的 λ 處理後的 H1，從結果可發現該最低濃度的 λ 尚未見 H1 非特異性剪切之反應，故 H1 條帶的亮度仍維持不變。隨著 λ 濃度漸提升，組別 5 為 0.005 U/ μ L λ 與 H1 進行反應後，H1 條帶的亮度開始出現明顯地下降，推論有部分的 H1 已被 λ 進行非特異性剪切，造成 H1 的減少；當組別 2 中使用更高濃度 λ (0.02 U/ μ L) 時，所有的 H1 已被 λ 進行非特異性剪切而消耗，因此 H1 的條帶位置完全消失。由實驗結果得知，H1 即使有 8 nt 的 overhang 存在，仍無可

避免高濃度的 λ 進行非特異性剪切。圖 3-10B 則為使用 H2 做為受質的膠體電泳分析結果，組別 1 為 H2 之模擬條帶，用以做為對照組。組別 2 至 9 為使用不同濃度的 λ 與 H2 進行反應 (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002, 0.001 U/ μ L)，由上述 8 個組別的結果可發現，無論 λ 的濃度高低之改變，H2 的條帶亮度並無明顯變化，可穩定以 H2 存在於系統之中，可知 λ 對於 H2 的非特異性剪切程度非常低。從上述兩個電泳分析的比較結果可得出，H1 的設計 (5' 端 overhang 的鹼基數目為 8 個) 並無法有效地去抑制 λ 的非特異性剪切。除非將 λ 的濃度調整降至 0.001 U/ μ L 時，但就不可避免會影響後續之產物 (P1, P2) 產生之效能，顯然 H1 的設計並不符合我們的實驗需求。反之，多加了 4 個鹼基之 H2 可使用之 λ 工作濃度區間可高至 0.02 U/ μ L，表示 H2 對 λ 的非特異性剪切具有很好的抗性 (Resistance)，因此選擇 H2 為最佳化設計條件做為 DNA Nanomachine 的受質元件。



Structure		K_{cat} (s ⁻¹)
5'	5'OH blunt	0.29 ± 0.02
5'P	5'P blunt	2.2 ± 0.17
5'P	5'P recessed (10 bases)	3.6 ± 0.03
5'P	5'P overhang (10 bases)	0.46 ± 0.07

表 3-2. λ 對於不同受質的轉變數(K_{cat})。

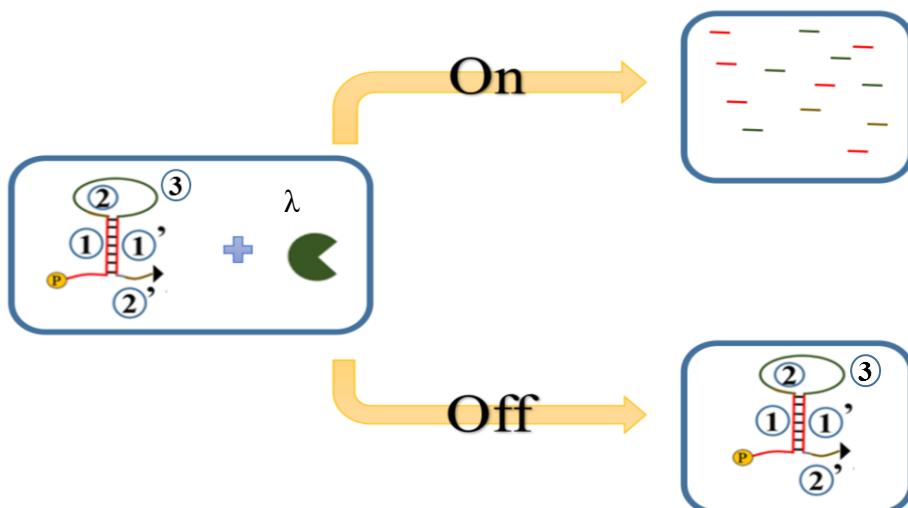


圖 3-8. λ 在沒有目標分子 miR-221 存在之下對於 H 的影響。

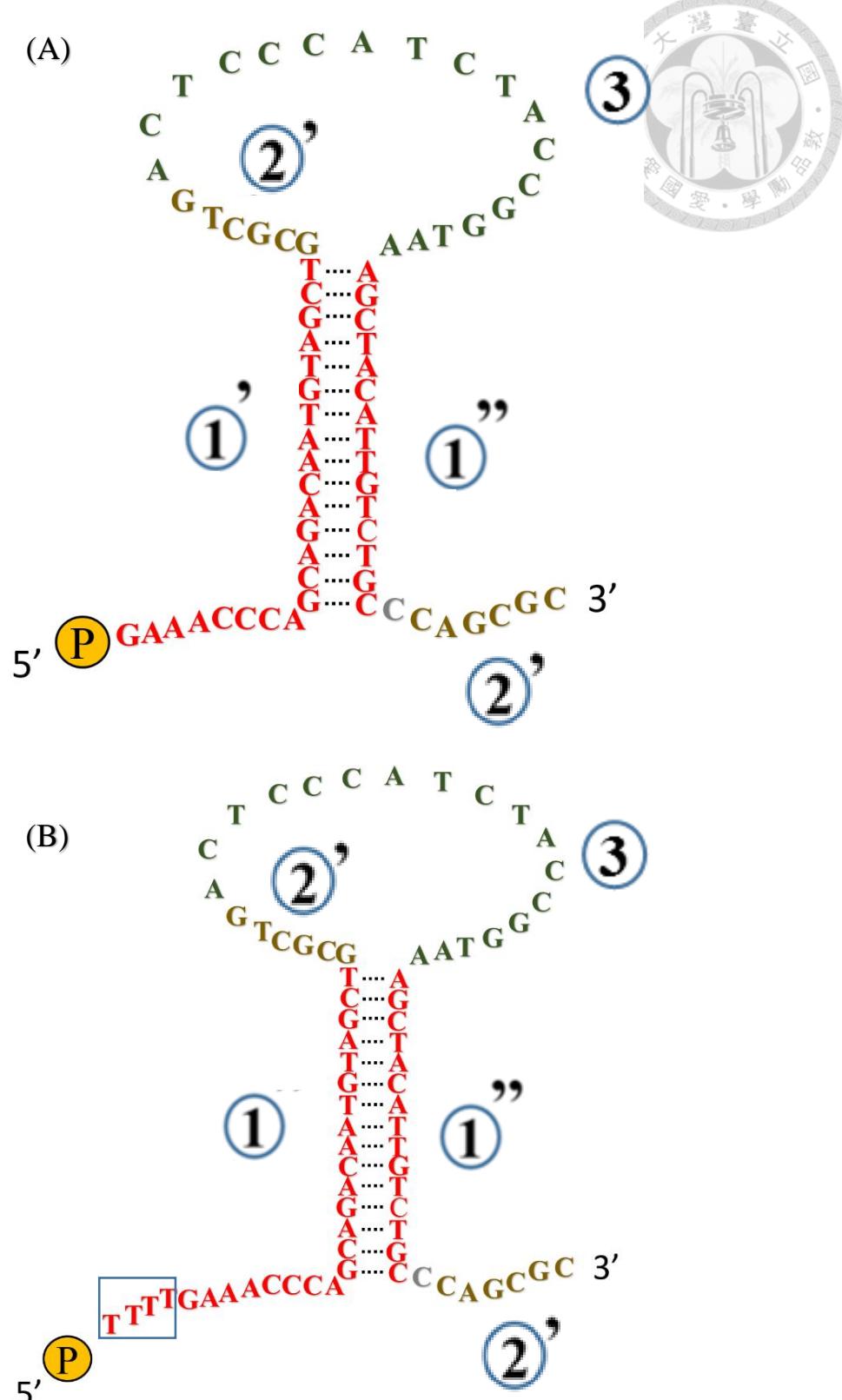


圖 3-9. 不同 H 的結構圖示。(A)為 H1，總鹼基數目數目為 69，5' 端 overhang 鹼基數目為 8；(B)為 H2，總鹼基數目數目為 73，5' 端 overhang 鹼基數目為 12。

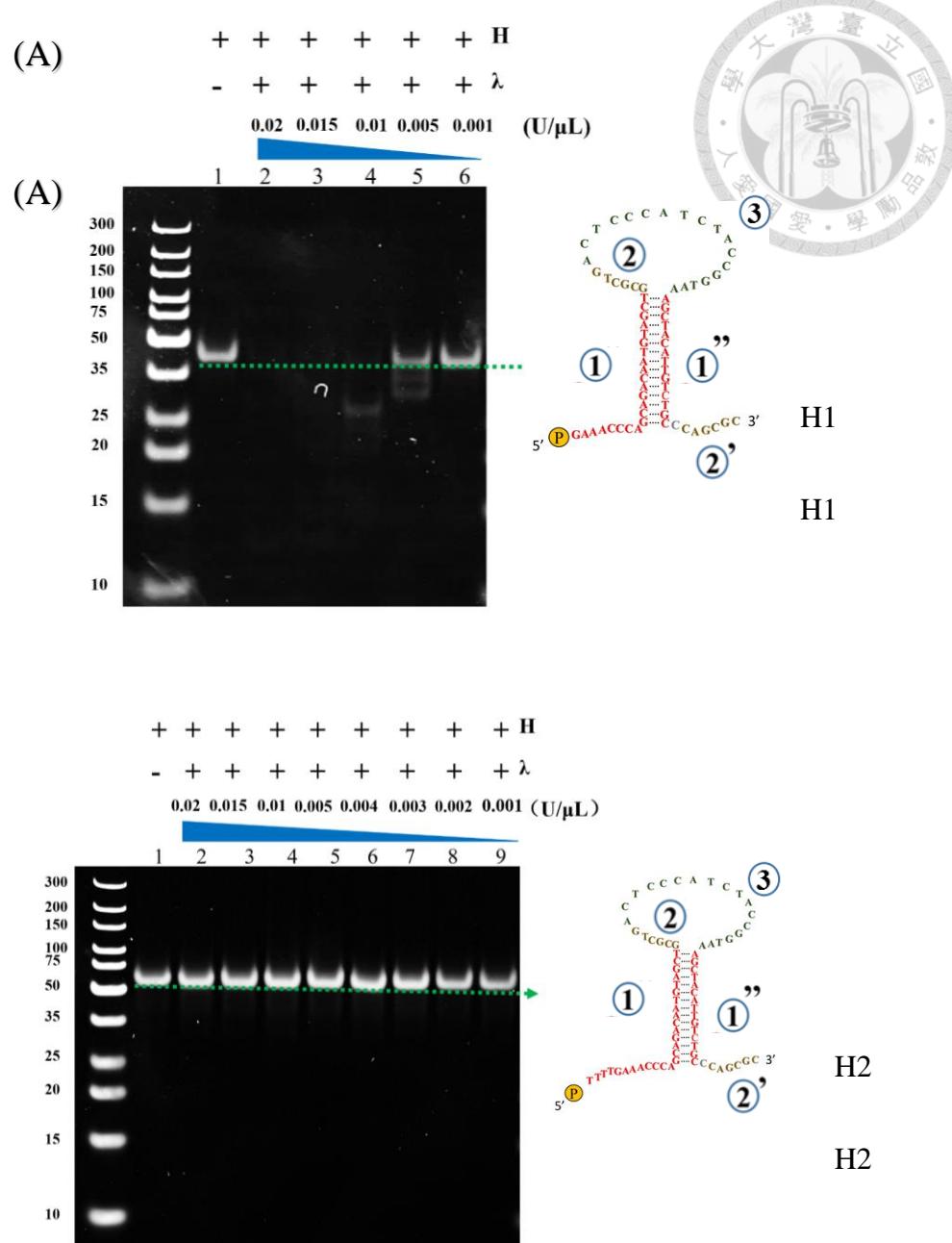


圖 3-10. Hairpin 5'端 overhang 鹼基數目的最佳化。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。15% acrylamide 的 Native Gel 以 70 V 在 25 °C 電泳分析 110 分鐘。

(A) (1): 200 nM H1。(2) - (6): 200 nM H1 與不同濃度之 λ (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.001 U/μL) 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。

(B) (1): 200 nM H2。(2) - (9): 200 nM H2 與不同濃度之 λ (0.02, 0.015, 0.01, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002, 0.001 U/μL) 於 37 °C 下反應 1 小時後再以 95 °C 加熱 10 分鐘。



3.4. 反應緩衝溶液之最佳化

緩衝溶液 (Buffer) 是指添加微量的酸 (Acid) 或鹼 (Base) 或進行稀釋 (Dilution) 時，其 pH 值並沒有顯著改變之溶液。它可通過維持溶液中酸鹼度和離子濃度的恆定來影響酵素之活性。根據 New England Biolabs (NEB) 廠商所提供的資料顯示 Lambda Exonuclease (λ) 和 Klenow Fragment (KF) 分別在 Lambda Exonuclease Reaction Buffer 和 NEBuffer 2 有各自之最佳酵素活性。而 Cutsmart Buffer 做為緩衝溶液時， λ 和 KF 的酵素活性分別為 50-100% 和 100%。故選擇此三種緩衝溶液 (Lambda Exonuclease Reaction Buffer, NEBuffer 2, Cutsmart Buffer) 來進行反應緩衝溶液之最佳化測試。三種緩衝溶液之組成如表 3-3 所示。利用定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction, Q-PCR) 搭配 SYBR Green I 可嵌入雙股 DNA 增強螢光訊號能性質，可用以測量反應中核酸分子作用螢光的變化。當雙股 DNA 存在時，SYBR Green I 會與其小溝 (Minor groove) 進行結合¹¹¹，並釋放出螢光，因此當雙股 DNA 在逐漸增加的情況之下，所測得的螢光也會有上升的趨勢。如圖 3-11 所示，首先先將 P1 與 H 在 37 °C 的溫度之下反應 1 小時進行雜合配對形成 P1/H duplex，再添加 SYBR Green 1 和 λ 以 Q-PCR 進行分析。於本實驗中，使用 P1 與 H 進行反應而非目標分子 miR-221 的原因為 λ 對於雙股 DNA 的轉變數較大。如圖 3-12 所示，其起始的相對螢光值都較高，可是經過 100 循環數 (Cycle number) 後，可以看到螢光值大幅度地下降，因此可以推斷 λ 在這三種 buffer 之下，都具有剪切之活性。為了探討 KF 在上述三種緩衝溶液是否具有酵素活性，將目標分子 miR-221 與 H 在 37 °C 的溫度之下反應 1 小時，以進行雜合配對形成 MicroRNA/H duplex，之後再添加 SYBR Green 1 和 KF，如圖 3-13 所示。由於起始反應物為 RNA/DNA duplex，因此 SYBR Green I 嵌入其雙股區域之效能較差，進而導致沒有明顯之 SYBR Green I 訊號。由實驗結果圖 3-14 可發現，當所選用之緩衝溶液為 NEBuffer 2 或 Cutsmart Buffer 時，其螢光值都有上升的趨勢，其中又以使用 Cutsmart Buffer 做為反應緩

衝溶液時所測得的螢光值上升的幅度最大，因此可推斷 KF 在 NEBuffer 2 或 Cutsmart Buffer 具有酵素活性，其中又以 Cutsmart Buffer 的效果最佳；另一方面，當以 Lambda Exonuclease Reaction Buffer 為反應緩衝溶液時，螢光值維持在 0 左右，從而證明 KF 在 Lambda Exonuclease Reaction Buffer 無法展現其酵素活性。故選擇 Cutsmart Buffer 為 DNA Nanomachine 之反應緩衝溶液。

成分		在 25 °C 之 pH 值
1×NEBuffer 2	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	7.9
1×Lambda Exonuclease Reaction Buffer	67 mM Glycine-KOH 2.5 mM MgCl ₂ 50 μg/ml BSA	9.4
1×Cutsmart Buffer	50 mM Potassium Acetate 20 mM Tris-acetate 10 mM Magnesium Acetate 100 μg/ml BSA	7.9

表 3-3. 各種緩衝液之成分組成及其在 25 °C 之 pH 值。

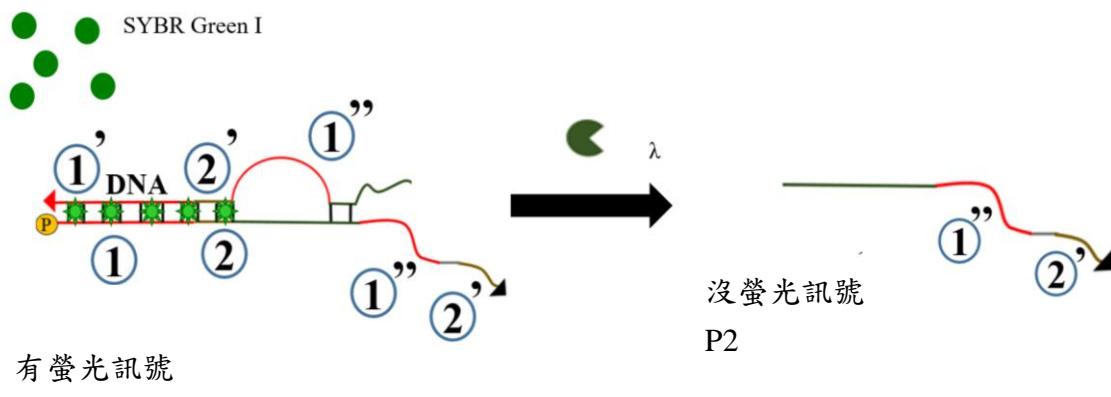


圖 3-11. λ 酵素活性測試之原理。當起始材料為 P1/Hairpin duplex 時，為 DNA/DNA 複合體，SYBR Green I 會與其進行結合，因此可以觀察較強之螢光訊號；當 λ 發揮其剪切作用時，會從 5' 端磷酸化的部分開始剪切，而釋放出單股產物 P2，因此螢光訊號會大幅度地降低。

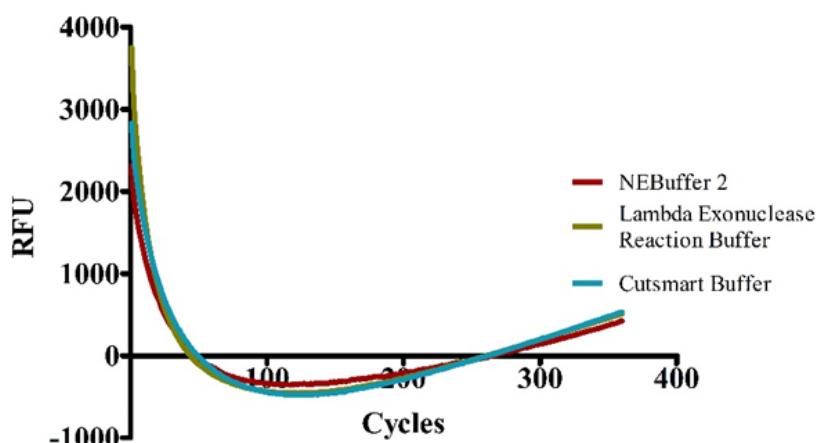


圖 3-12. λ 在不同反應緩衝溶液之酵素活性。實驗條件為 200 nM H 與 200 nM P1 在緩衝溶液分別為 Lambda Exonuclease Reaction Buffer、NEBuffer 2、Cutsmart Buffer 下在 37 °C 的溫度反應 1 小時，之後添加 0.5 × SYBR Green I 與 0.1 U/ μ L λ 在核酸即時定量儀器內 37 °C 的溫度進行 360 個循環數之螢光測定。

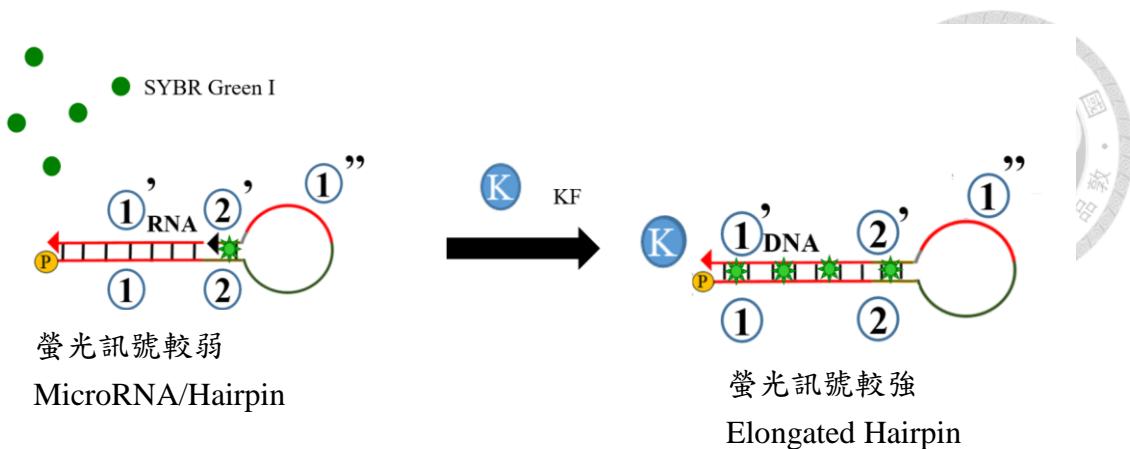


圖 3-13. KF 酵素活性測試之原理。當起始材料為 MicroRNA/Hairpin duplex 時，為 RNA/DNA 複合體，螢光訊號較微弱；當 KF 發揮其延長作用時，會從 H 的 3' 端開始進行聚合作用，而形成 Elongated hairpin，因此螢光訊號會大幅度地上升。

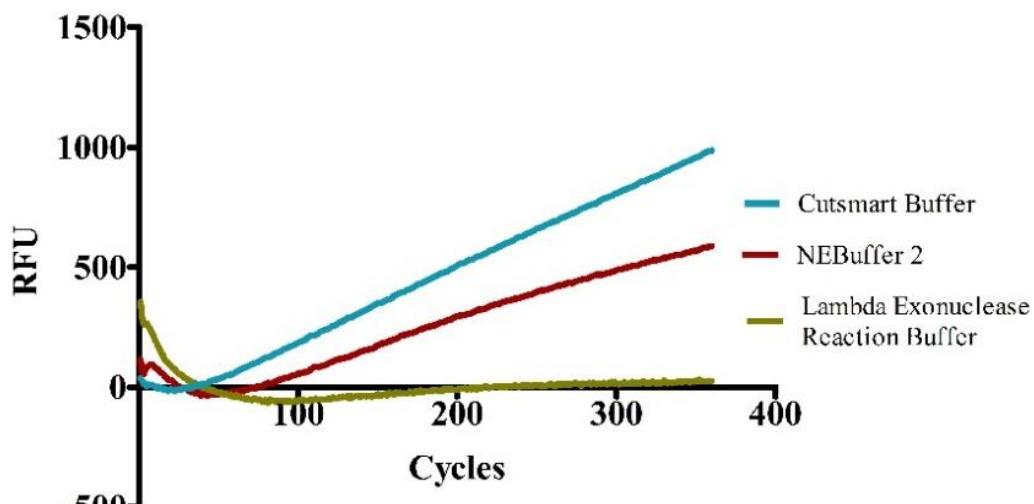


圖 3-14. KF 在不同反應緩衝溶液之酵素活性。實驗條件為 200 nM H 與 200 nM M 在緩衝溶液分別為 Lambda Exonuclease Reaction Buffer、NEBuffer 2、Cutsmart Buffer 下在 37 °C 的溫度反應 1 小時，之後添加 0.5 × SYBR Green I 與 0.1 U/μL KF 在核酸即時定量儀器內 37 °C 的溫度進行 360 個循環數之螢光測定。

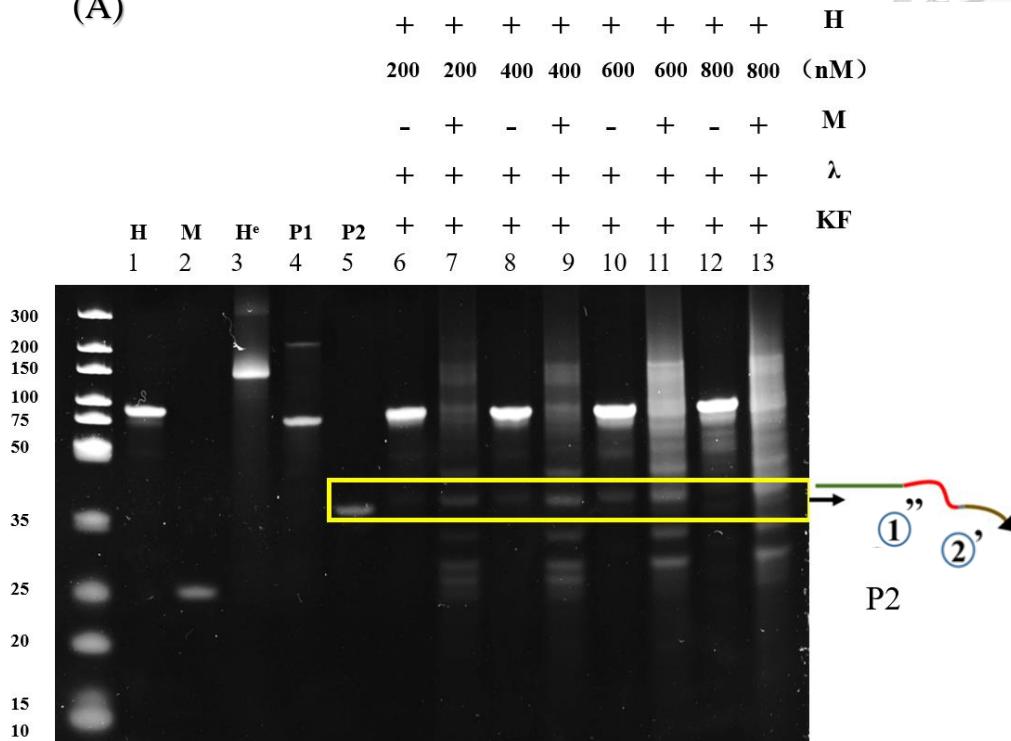


3.5. 受質 H 濃度之最佳化

在本研究中，H 不僅做為啟動 DNA Nanomachine 之開關，其也扮演系統中非限量試劑之受質，因此我們探討本研究中 H 使用濃度對於最終產物 P2 產量之影響，進而可達到最大量產物之生成。當實驗操作條件固定反應時間 1 小時及反應溫度 37°C ，將目標分子 miR-221，KF， λ 的濃度分別固定為 200 nM ， $0.2\text{ U}/\mu\text{L}$ 和 $0.02\text{ U}/\mu\text{L}$ ，探討與不同濃度的 H (200 nM ， 400 nM ， 600 nM ， 800 nM) 進行反應時，經 DNA Nanomachine 操作後所能產生最終產物 P2 之量。如圖 3-15A 為 DNA 膠體電泳分析結果顯示，組別 1 至組別 5 為模擬條帶，分別為 1: 受質 H；2: 目標分子 miR-221；3: H^{e} ；4: P1；5: P2。組別 6、8、10、12 分別為 KF 和 λ 在與不同濃度的受質 H (200 nM ， 400 nM ， 600 nM ， 800 nM) 作用下之缺乏目標分子 miR-221 存在時的負向控制組 (Negative control)；而組別 7、9、11、13 分別為 DNA Nanomachine 使用不同濃度的 H (200 nM ， 400 nM ， 600 nM ， 800 nM) 為受質進行反應之實驗組 (Experiment group)。藉由 DNA PAGE 分析之結果之圖 3-15A 顯示，在此不同受質 H 濃度之下，DNA Nanomachine 都可被驅動產生最終產物 P2。進一步以影像分析軟體 Image J 定量實驗組別 7 (200 nM H)、組別 9 (400 nM H)、組別 11 (600 nM H)、組別 13 (800 nM H) 的最終產物 P2 之條帶位置，並分別與未加入目標分子 miR-221 做為負向控制組進行比較。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別取得規化量值 (Normalized signal) 做為後續的分析。由定量規化分析結果圖 3-15B 得知，當 H 的濃度為 600 nM 時，可產生最多的 P2。此因在固定酵素濃度和反應時間之下，由於受質濃度的增加會促進反應的加速，因此 P2 產物的量會隨著受質濃度的上升而增加。另一外面，當使用 800 nM H 為實驗受質時，卻無法觀察明顯之 P2 產量的增加，推論反應速率已達最大。結果顯示，使用 600 nM 做為 H 受質濃度為本實驗最佳條件。



(A)



(B)

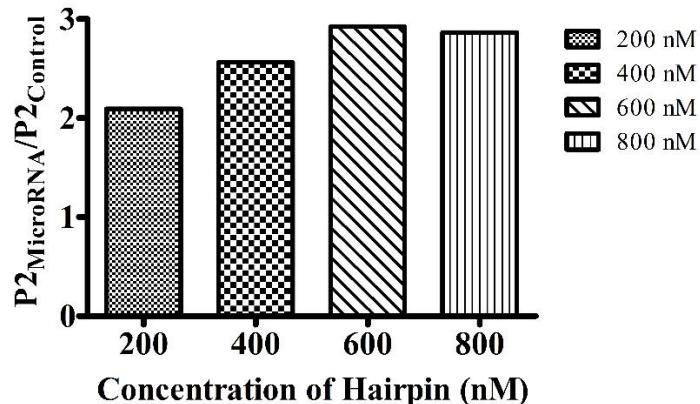


圖 3-15. 受質 H 濃度之最佳化。(A) 7 M urea, 15% acrylamide 的 Denatured Gel 以 70 V 在 55 °C 電泳分析 100 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。實驗的操作條件為 200 nM M、0.2 U/ μ L KF、0.02 U/ μ L λ ，反應時間 1 小時及反應溫度 37 °C，各組別 7、9、11、13 之受質 H 濃度分別為 200 nM、400 nM、600 nM、800 nM。其皆含相對應之負向控制組，為缺乏目標分子 miR-221 的情況下進行之反應。(B) 經影像分析軟體 Image J 分析 P2 條帶後所得之規化結果。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別。



3.6. P2C (Complementary Sequence of P2) 序列設計之最佳化

當 DNA Nanomachine 操作完畢後，會產生最終產物 P2，因此我們設計與 P2 序列互補之 P2C (Complementary Sequence of P2) 去辨認 P2 並產生電化學訊號之改變。在偵測電化學訊號之前，先以 DNA 電泳膠圖分析兩種不同 P2C 之設計。此兩種 P2C 分別為 P2C1 和 P2C2，其 stem 的鹼基數目分別為 22 和 24 個，如圖 3-16 所示，來了解：(1) DNA Nanomachine 所產生之產物是否會與 P2C 探針進行互補配對。(2) 所設計 P2C 之專一性。在本實驗的設計中，P2C 的 stem 的鹼基數目會影響與 P2 互補之效果。以核酸分析軟體 Nupack 先進行初步的構型分析，如圖 3-17 顯示，當所使用之 P2C 為 200 nM P2C1 時，約有 90% 的 P2C1 會與 200 nM 的 P2 在 37 °C，Na 離子濃度為 50 mM，Mg 離子濃度為 10 mM 的環境之下形成 P2/P2C1 duplex。當將 P2C1 換成 P2C2 時，在相同環境之下其互補雜合率可提升至 95%。在本次實驗中，以 200 nM M、200 nM H、0.2 U/μL KF 與 0.02 U/μL λ 來驅動 DNA Nanomachine 之操作，所產生之最終產物在 95 °C 加熱 10 分鐘將酵素去活化後再與 200 nM P2C 在 37 °C 反應一小時，再以 DNA 膠體電泳進行分析。藉由圖 3-18 之電泳分析結果，組別 7 為 200 nM P2 與 200 nM P2C 在逐漸降溫之情況下進行互補配對，可以發現當使用 P2C2 為探針時所產生的 duplex 條帶訊號強度比 P2C1 來得強，從而可判斷 P2C2 與最終產物 P2 互補配對之能力較強。組別 9、11、13 為 P2C1 與 DNA Nanomachine 操作後之產物進行反應之三重複，結果顯示 P2C1 之條帶位置之亮度有明顯之下降。當使用 P2C2 進行反應時，如圖 3-18B 所示，P2C2 的條帶亮度也同樣有下降之趨勢，從而推斷 DNA Nanomachine 所產生的最終產物 P2 可與 P2C1，P2C2 進行雜合配對，進而消耗 P2C1 和 P2C2。當進一步使用 Image J 定量 P2C1 及 P2C2 之條帶強度，並各自除以沒有添加目標分子 miR-221 之負向控制組所取得之量化值進行 P2C 消耗程度之分析。條帶分析結果顯示，P2C2 的消耗程度比 P2C1 來得多，有可能是因為 P2C2 的 stem 的區域比 P2C1 少了兩個鹼基配對，使得互補股 P2 在相同

的操作條件之下，在互補配對過程更容易將 P2C2 之髮夾構造給打開。此實驗結果符合 Nupack 之初步分析結果，故選擇 P2C2 序列做為第三部分電化學活性分子標記探針的序列。

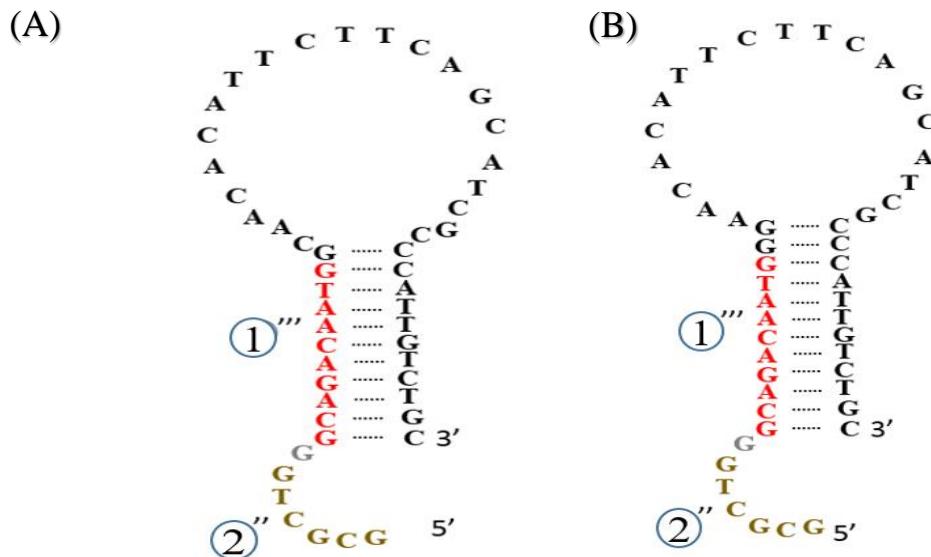


圖 3-16. 不同 P2C 的結構圖示。(A). 為 P2C1，總鹼基數目數目為 50 個，stem 的鹼基數目為 12 bp；(B). 為 P2C2，總鹼基數目數目為 50 個，stem 的鹼基數目為 11 bp。

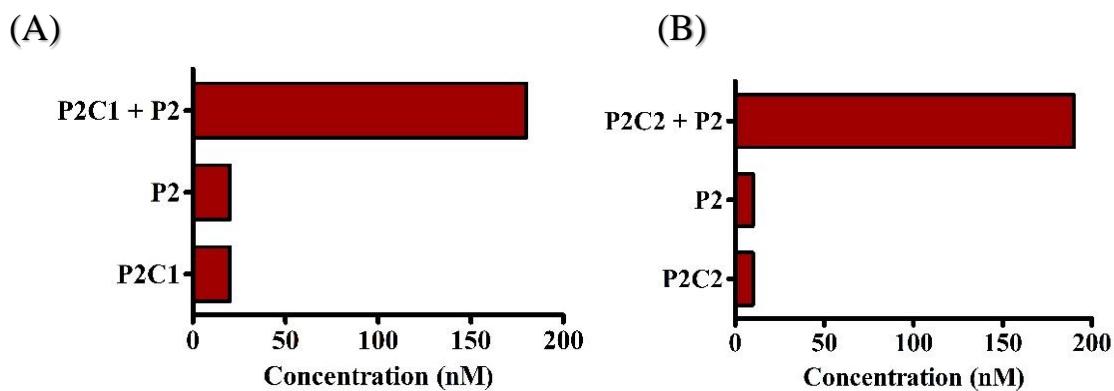
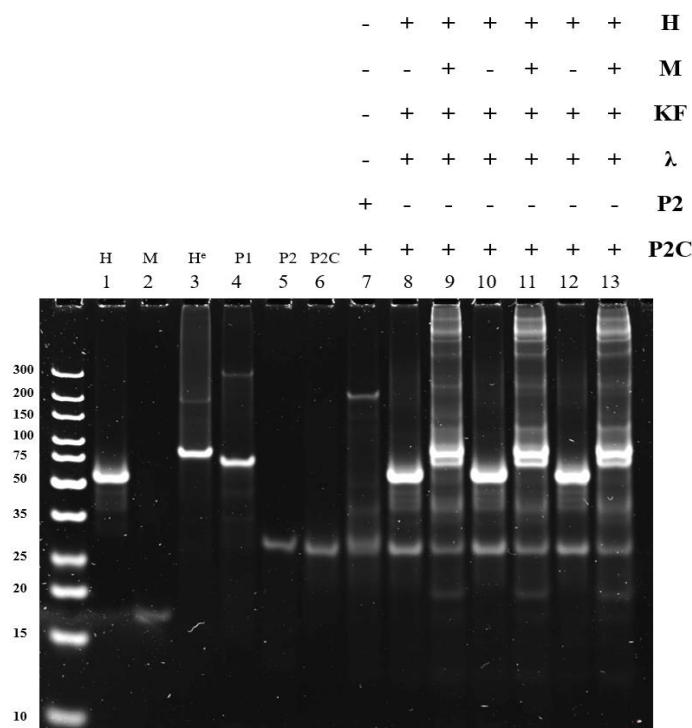


圖 3-17. 使用 Nupack 針對 200 nM P2 和(A) 200 nM P2C1 (B) 200 nM P2C2 雜合所得之分析結果。



(A)



(B)

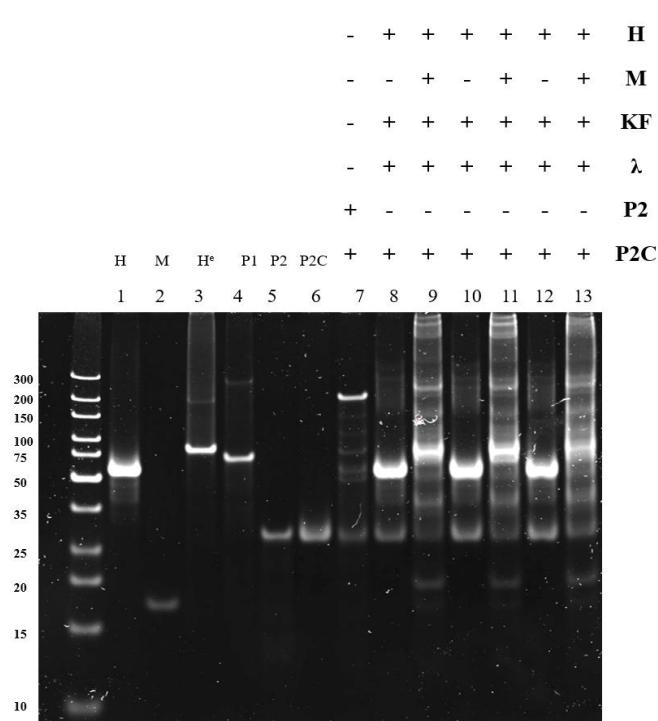


圖 3-18. P2C 之最佳化。15% acrylamide 的 Native Gel 以 70 V 在 25 °C 電泳分析 110 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。(A). 使用 P2C1 為實驗之探針 (B). 使用 P2C2 為實驗之探針。組別 7 為 P2 與 P2C 在逐漸降溫情況之下反應兩小時 (起始溫度為 95 °C，每隔 5 分鐘降 2 - 3 °C)。組別 8、10、12 為負向控制組之三重複，將 600 nM H，0.05 U/ μ L KF 與 0.02 U/ μ L λ 反應後之混合物再與 P2C 於 37 °C 下反應 1 小時。組別 9、11、13 為實驗組之三重複，將 200 nM H、200 nM M、0.2 U/ μ L KF 與 0.02 U/ μ L λ 反應後之混合物再與 P2C 於 37°C 下反應 1 小時。



(C)

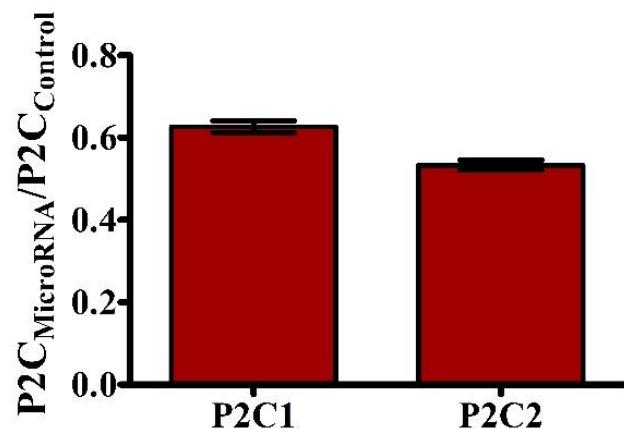


圖 3-18C. Image J 之膠圖定量結果，所得之規化量值為實驗組之 P2C 條帶強度除以負向控制組之 P2C 條帶強度。

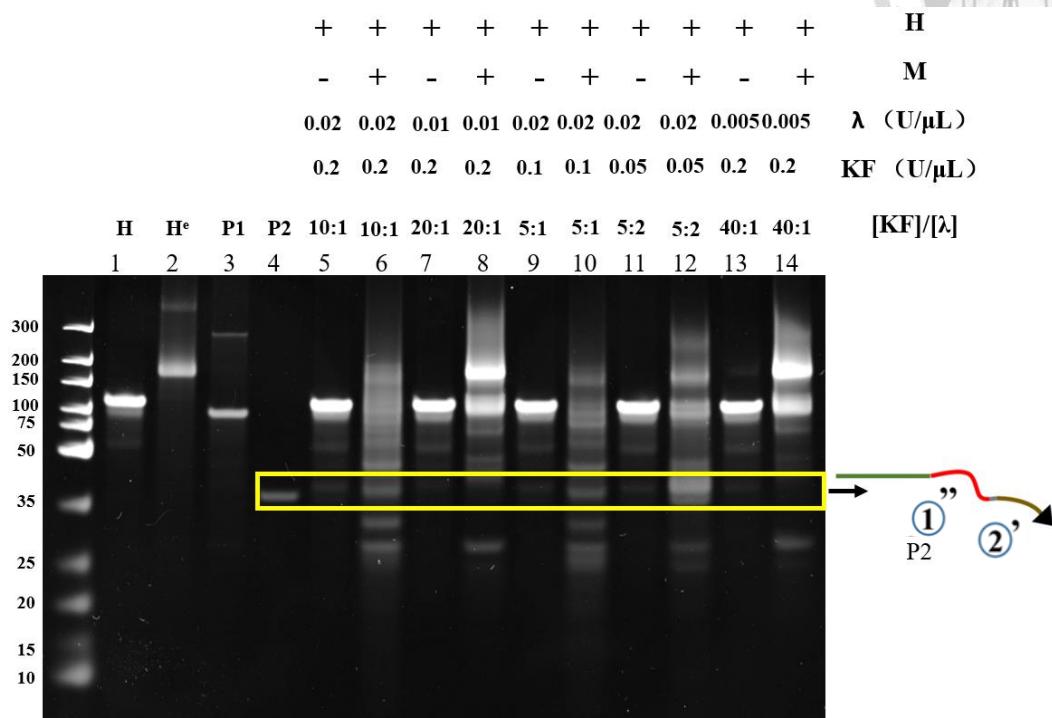


3.7. 酵素濃度比例之最佳化

在本次實驗中，是以 lab in a tube 的概念來驅動 DNA Nanomachine，意指將所有材料都同時置放於同一個工作環境，因此各個材料彼此間會相互影響。根據前人的實驗指出¹¹²，兩種不同種類酵素之使用濃度比例會影響產物之生成量，例如在進行單鏈置換擴增法 (Strand displacement amplification) 時，其核酸之放大速率決定於聚合酶 (Polymerase) 和限制性內切酶 (Restriction endonuclease) 的使用濃度比例。在本次實驗中，所涉及到的酵素有兩種，分別為 DNA 聚合酶 (Klenow fragment, KF) 和外切酶 (Lambda exonuclease, λ)。故探討本研究中上述兩種酵素使用濃度對於最終產物 P2 產量之影響，進而可達到最大量產物之生成。所設計五種 KF 和 λ 濃度比例分別為 40:1 (0.2 U/ μ L:0.005 U/ μ L)、20:1 (0.2 U/ μ L:0.01 U/ μ L)、10:1 (0.2 U/ μ L:0.02 U/ μ L)、5:1 (0.1 U/ μ L:0.02 U/ μ L)、5:2 (0.05 U/ μ L:0.02 U/ μ L)，藉由 DNA 膠體電泳進行最終產物 P2 產量之分析。圖 3-19A 為膠體電泳分析之結果，組別 1 至組別 4 為模擬條帶，分別為 1: 受質 H；2: H^e ；3: P1；4: P2。組別 5、7、9、11、13 分別為 200 nM H 處以不同濃度比例之 KF 和 λ (40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 5:2) 作用下之負向控制組；而組別 6、8、10、12、14 分別為 DNA Nanomachine 以不同濃度比例之 KF 和 λ (40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 5:2) 操作之實驗組。藉由電泳分析結果圖 3-19A 顯示，當所使用 KF 和 λ 的濃度比為 10:1、5:1 或 5:2 時，可以產生較明顯的 P2 條帶。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別取得規化量值 (Normalized signal) 做為後續的分析。由 Image J 定量結果 圖 3-19B 可以得出當使用 KF 和 λ 的濃度比為 5:2 時，所產生的 P2 條帶亮度最強，因此選擇 KF : $\lambda = 5 : 2$ 時為最佳化條件。



(A)



(B)

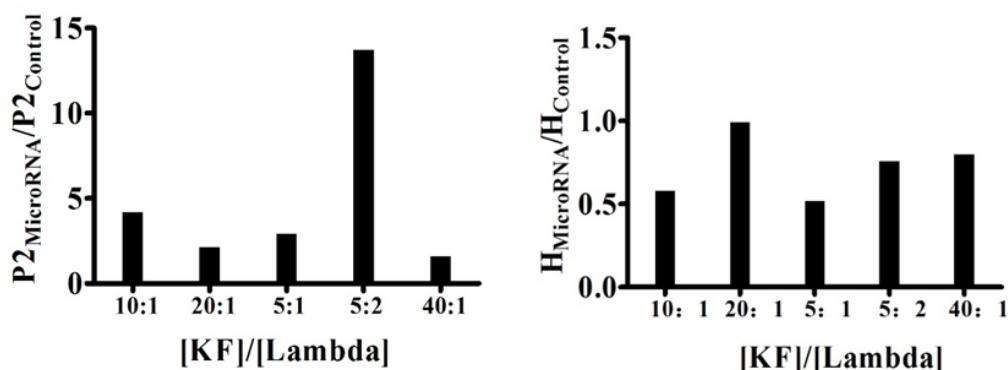


圖 3-19.(A). 酵素濃度比例之最佳化。7 M urea, 15% acrylamide 的 Denatured Gel 以 70 V 在 55 °C 電泳分析 100 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。實驗的操作條件為 200 nM M、600 nM H，反應時間 1 小時及反應溫度 37 °C，各組別 6、8、10、12、14 之 KF 和 λ 濃度比例分別為 10:1、20:1、5:1、5:2、40:1。其皆含相對應之負向控制組，為缺乏目標分子 miR-221 的情況下進行之反應。(B). 經影像分析軟體 Image J 分析 P2 條帶和條帶後所得之規化結果。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別。



根據前面的實驗結果可以得知，當所使用的 KF: λ 濃度比為 10:1、5:1 或 5:2 來驅動 DNA Nanomachine 時，皆可產生明顯的 P2 條帶。在此實驗中，我們探討在使用上述三種不同濃度比之酵素進行 DNA Nanomachine 之操作而得到之混合液對於 P2C 消耗程度之影響。組別 8、10、12 為 KF 與 λ 不同濃度之負向控制組，而組別 9、11、13 則為相對應濃度之有加入目標分子 miR-221 之實驗組。藉由電泳膠圖 3-20A 顯示，在有目標分子 miR-221 存在之下，上述三種濃度比所驅動之 DNA Nanomachine 所產生的混合液都能與 P2C 進行反應，進而消耗 P2C，因此 P2C 之條帶強度有明顯之下降，其中又以 K F : λ 濃度比為 5:2 時，P2C 的消耗程度最高。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2C 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別取得規化量值 (Normalized signal) 做為後續的分析。由 Image J 定量結果圖 3-20B 可以得出當使用 KF 和 λ 的濃度比為 5:2 時，P2C 的條帶亮度訊號值最小。故選擇 KF 和 λ 的濃度比為 5:2 為後續實驗之最佳化條件。

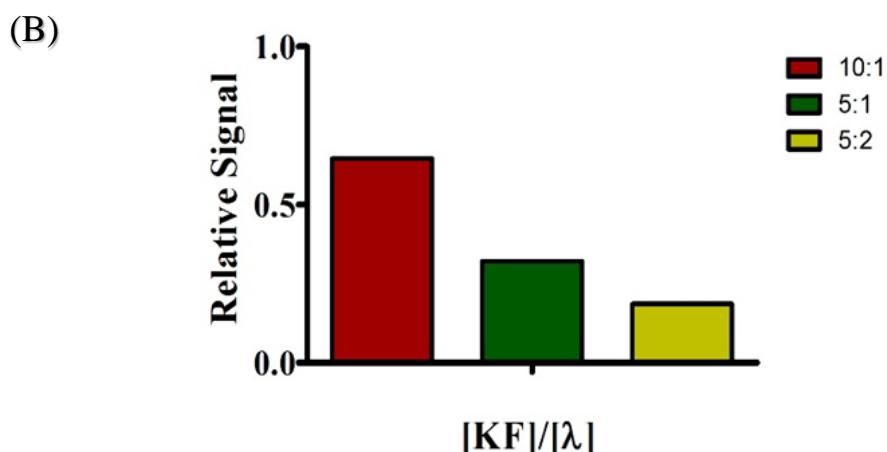
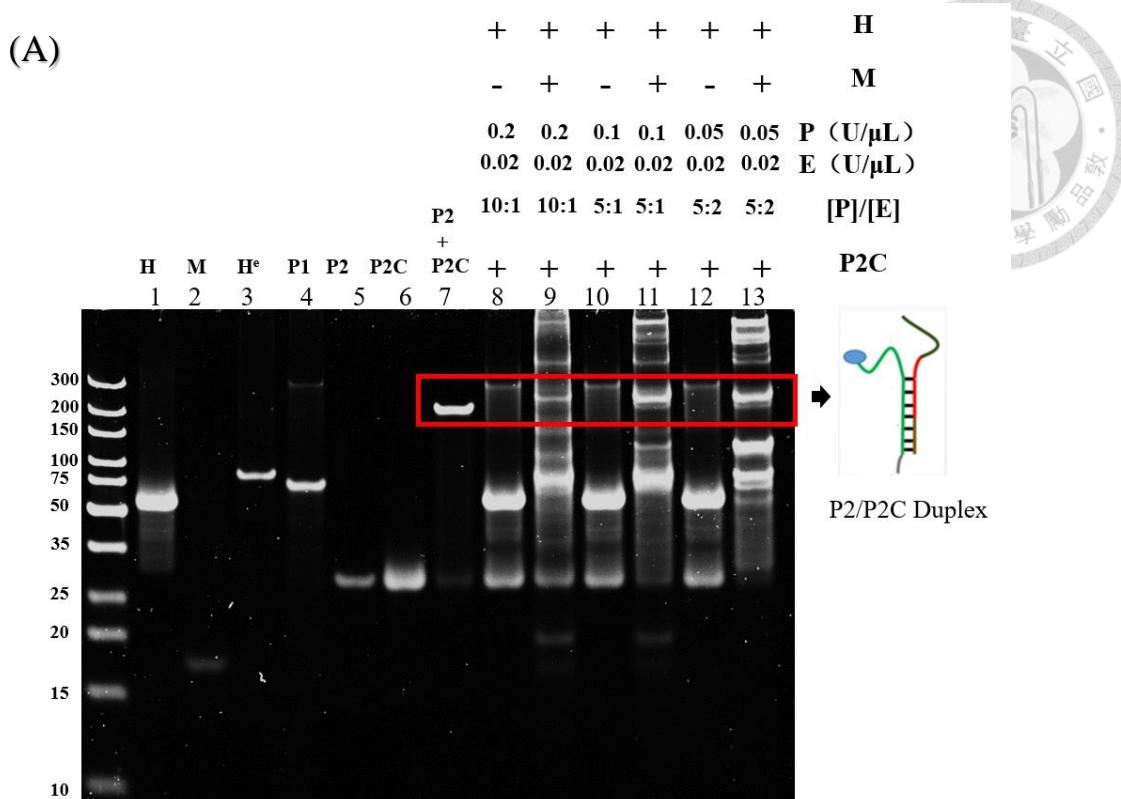


圖 3-20. (A). 酵素濃度比例之最佳化。15% acrylamide 的 Native Gel 以 80 V 在 25 °C 電泳分析 110 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。第一步驟之實驗操作條件為 200 nM M、600 nM H，反應時間 1 小時及反應溫度 37 °C，各組別 9、11 與 13 之 KF 和 λ 濃度比例分別為 10:1、5:1 和 5:2。組別 8、10 與 12 為相對應之負向控制組，為缺乏目標分子 miR-221 的情況下進行之反應。(B). 經影像分析軟體 Image J 分析 P2C 條帶後所得之規化結果。以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2C 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別。



3.8. 選擇性 (Selectivity) 之測試

由於真實樣本 (Sample) 的複雜度高，所含之 microRNA 種類繁多，因此可能對 DNA Nanomachine 之運作產生干擾。故針對 DNA Nanomachine 進行一系列之專一性測試，確認 DNA Nanomachine 只有在目標分子 miR-221 的存在之下方能啟動。DNA Nanomachine 之選擇性主要從四方面進行測試，如圖 3-21 所示，分別為

1. 受質 H 之專一性測試

(600 nM H + 200 nM A)

2. KF 之專一性延長測試

(600 nM H + 200 nM A + 0.02 U/ μ L KF)

3. λ 之專一性剪切測試

(600 nM H + 200 nM A + 0.02 U/ μ L KF + 0.05 U/ μ L λ)

4. P2C 之專一性測試

(600 nM H + 200 nM A + 0.02 U/ μ L KF + 0.05 U/ μ L λ + 200 nM P2C)

H 為受質 hairpin, A 為分析物質 (目標分子 miR-221 或非目標分子 miR-222 DNA Analog、miR-4288 DNA Analog 與 miR-744 DNA Analog), KF 為 Klenow Fragment, λ 為 Lambda Exonuclease, P2C 為與最終產物 P2 互補之序列。

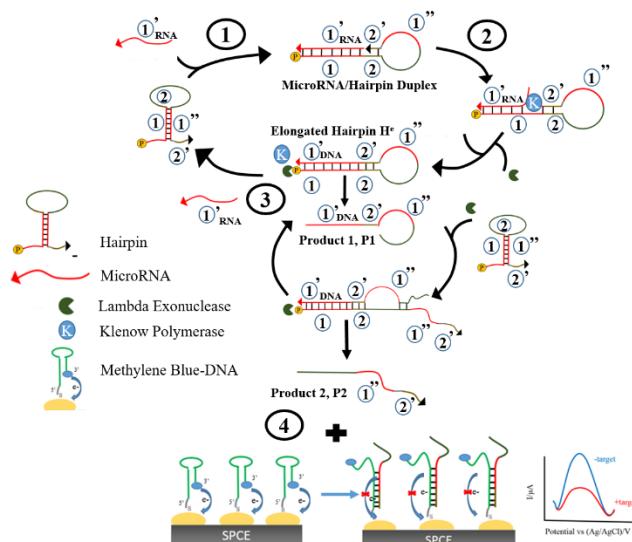


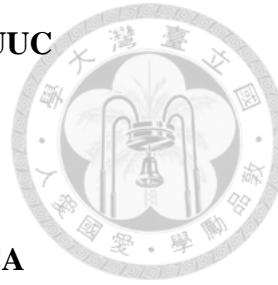
圖 3-21. DNA Nanomachine 選擇性測試之檢查站 (Checkpoint)。



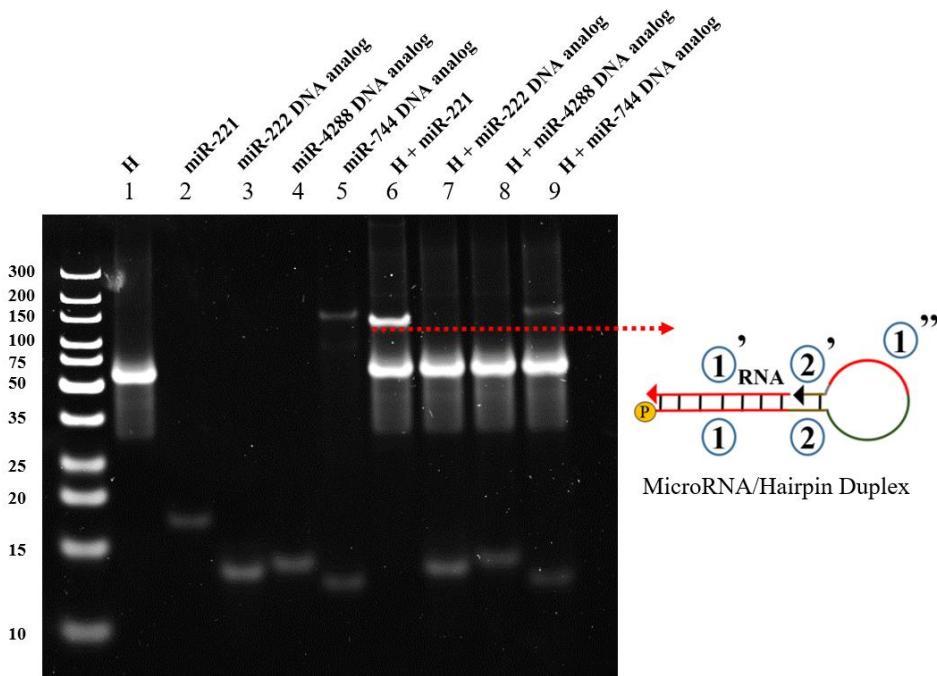
3.8.1. 受質 H 之專一性測試

受質 H 之髮夾構型的打開 (Unfold) 將會啟動下游反應的發生，因此我們探討本實驗中所設計的 H 是否具有良好之專一性，在可被目標分子 miR-221 辨識的情況之下，同時也可以防止其它非目標分子 (Nontarget) miRNA 之非專一性結合 (Nonspecific binding)。我們利用 miRbase 搜尋人類物種 miR-221 (hsa-miR-221) 之同源序列，進而獲得兩個基因同源序列，分別為內同源性家族成員 (Intra-family member) miR-222 和間同源性家族成員 (Inter-family member) miR-4288。miRBase 是一個公共的序列数据库，其提供各種物種 (Species) 之 miRNA 序列数据等相關訊息¹¹³。故我們選擇 miR-221、miR-222 DNA Analog、miR-4288 DNA Analog 與 miR-744 DNA Analog 進行受質 H 之專一性測試。在本次實驗中，所使用的 miR-744 DNA Analog 則做為加擾控制組 (Scrambled control)。圖 3-22A 為膠體電泳分析之結果，組別 1 至組別 5 為模擬條帶，分別為 1: 受質 H；2：目標分子 miR-221；3: miR-222 DNA Analog；4: miR-4288 DNA Analog；5: miR-744 DNA Analog。組別 6 所使用之分析物 (Analyte) 為目標分子 miR-221, miR-221 會以 toehold-mediated strand displacement 的方式選擇性地將 H 的莖環結構給打開，並與子序列 1 進行互補雜合，形成 RNA/DNA 複合物，因此可在比 H 條帶更高之位置發現新條帶的產生。組別 7、8、9 所使用之分析物為非目標分子，由膠圖結果並未有相同新條帶訊號之生成。若進一步使用 Image J 針對新條帶的位置進行定量圖 3-22B，定量結果顯示當使用 miR-221 為分析物時，新條帶位置所產生的訊號約為非目標分子的 11 倍左右，從而推斷所設計之受質 H 具有良好之專一性，只與目標分子 miR-221 進行互補配對。

MicroRNA₂₂₁ : AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
DNA₂₂₂ : AGCTACAT**CTGGCTACTGGGT**
DNA₄₂₈₈ : TTGTCTCTGCTG**A**GTTTCC
DNA₇₄₄ : TCGGGGGCTAGGGCTAACAGCA



(A)



(B)

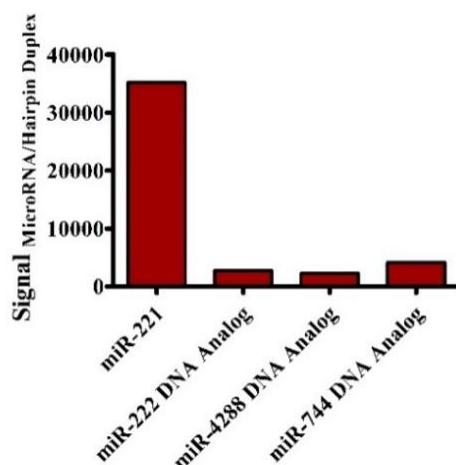


圖 3-22. (A). 受質 H 之專一性測試。15% acrylamide 的 Native Gel 以 80 V 在 25 °C 電泳分析 110 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。實驗的操作條件為 600 nM H，反應時間 1 小時及反應溫度 37 °C，各組別 6、7、8、9 之分析物分別為 miR-221、miR-222 DNA Analog、miR-4288 DNA Analog 與 miR-744 DNA Analog。
 (B). 經影像分析軟體 Image J 分析新條帶位置之數據。



3.8.2. KF 之專一性延長測試

在證實第一個檢查站所設計之 H 可以有效防止非目標分子的結合後，我們進一步探討本實驗中所使用之聚合酶 Klenow Fragment 是否會在非目標分子存在之影響下，產生非特異性產物。所使用之分析物同 3.8.1，包括 miR-221、miR-222 DNA Analog、miR-4288 DNA Analog 與 miR-744 DNA Analog，為第二個檢查站之檢視條件。圖 3-23 為膠體電泳分析之結果，組別 1 至組別 6 為模擬條帶，分別為 1: 受質 H；2：目標分子 miR-221；3: miR-222 DNA Analog；4: miR-4288 DNA Analog；5: miR-744 DNA Analog；6: KF 延長後之產物 H^e。組別 8 為 KF 作用之負向控制組，為目標分子 miR-221 不存在之下，在比對組別 6 之 H^e相對位置並沒有新條帶之訊號產生，從而推斷 KF 並無法對受質 H 進行非專一性延長作用。組別 9 為使用目標分子 miR-221 為分析物，從膠圖結果可以發現在 microRNA/Hairpin duplex 條帶和 H 條帶的中間有新條帶的產生，與模擬條帶 H^e 之位置相對應，合理推論為 KF 延長後之產物 H^e。然而在組別 10~12 為使用非目標分子做為分析物。由膠圖結果發現在 H^e 相對應之位置並沒有任何新條帶之訊號。上述結果證明 KF 只有在目標分子 miR-221 存在之下，才能發揮其延長至作用，進而產生延長後之產物 H^e。

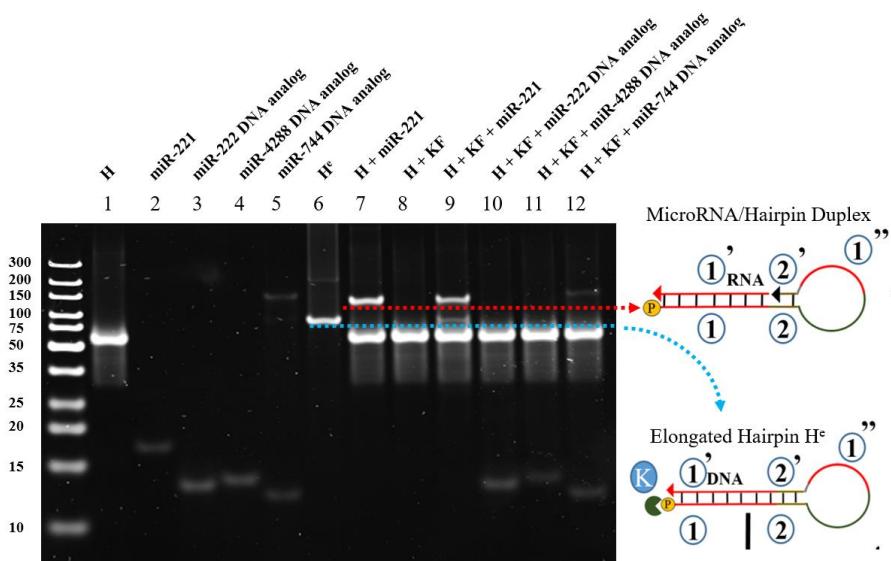


MicroRNA₂₂₁ : AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC

DNA₂₂₂ : AGCTACAT**CTGGCTACTGGGT**

DNA₄₂₈₈ : TTGTCTCTGCTG**A GTTTCC**

DNA₇₄₄ : TGC~~GGGG~~CAGGGCTAACAGCA



H : 5' TTTGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTCGCTGACTCCCCTTACCGTAAAGCTACATTGCTGCCAGCGC3'
H^c: 5' TTTGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTCGCTGACTCCCCTTACCGTAAAGCTACATTGCTGCCAGCGC**AGCTA**
CATTGCTGCTGGGTTCAAAA 3'

圖 3-23. KF 之專一性延長測試。15% acrylamide 的 Native Gel 以 80 V 在 25 °C 電泳分析 110 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。(1): 600 nM H。(2)-(5) 200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog)。(6): 200 nM H^c。(7): 600 nM H 與 200 nM M 於 37 °C 下反應 1 小時。(8): 200 nM H 與 0.05 U/μL KF 於 37 °C 下反應 1 小時。(9-12): 600 nM H, 200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog) 與 0.05 U/μL KF 於 37 °C 下反應 1 小時。



3.8.3. λ 之專一性剪切測試

在本次專一性之測試中，我們使用最佳化條件所得之 KF 和 λ 濃度比為 5:2 的條件下，以不同分析物來啟動 DNA Nanomachine。在 3.8.1 和 3.8.2 章節的實驗中，證明了目標分子 miR-221 的出現會才會與 H 進行互補配對，將其髮夾之構型打開，KF 才能發揮其延長之功效，產生 H^e 。而本次實驗的目的在於證實 DNA Nanomachine 只會受到目標分子 miR-221 啟動 λ 之專一性剪切，而產生最終產物 P2。圖 3-24 為膠體電泳分析之結果，組別 1 至組別 7 為模擬條帶，分別為 1: 受質 H；2：目標分子 miR-221；3: miR-222 DNA Analog；4: miR-4288 DNA Analog；5: miR-744 DNA Analog；6: KF 延長後之產物 H^e ；7: 第一產物 P1；8: 最終產物 P2。組別 9 為 λ 作用之負向控制組，為目標分子 miR-221 不存在之下，在 P2 之相對位置並沒有發現新條帶之訊號，從而推斷 λ 並無法對受質 H 進行非專一性剪切作用。組別 10 為使用目標分子 miR-221 為分析物來啟動 DNA Nanomachine，從膠圖結果可以發現在模擬條帶 P2 之相對位置有新條帶的產生。然而在組別 11~13 為使用非目標分子做為分析物來驅動 DNA Nanomachine，由膠圖結果發現在 P2 相對應之位置並沒有任何新條帶之訊號。上述結果證明 λ 必須在目標分子 miR-221 和 KF 存在之下，才能對 H 發揮其剪切作用，進而產生最終產物 P2，也驗證了本研究所設計之 DNA Nanomachine 必須具備四個主要元件 (H, miR-221, KF, λ) 之下，才能被驅動。



MicroRNA₂₂₁ : AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC

DNA₂₂₂ : AGCTACAT**CTG GCT A**CTGGGT

DNA₄₂₈₈ : TTGTCTCTGCTG**A**GTTTCC

DNA₇₄₄ : TGC~~GGGG~~C~~TAGGG~~CTAACAGCA

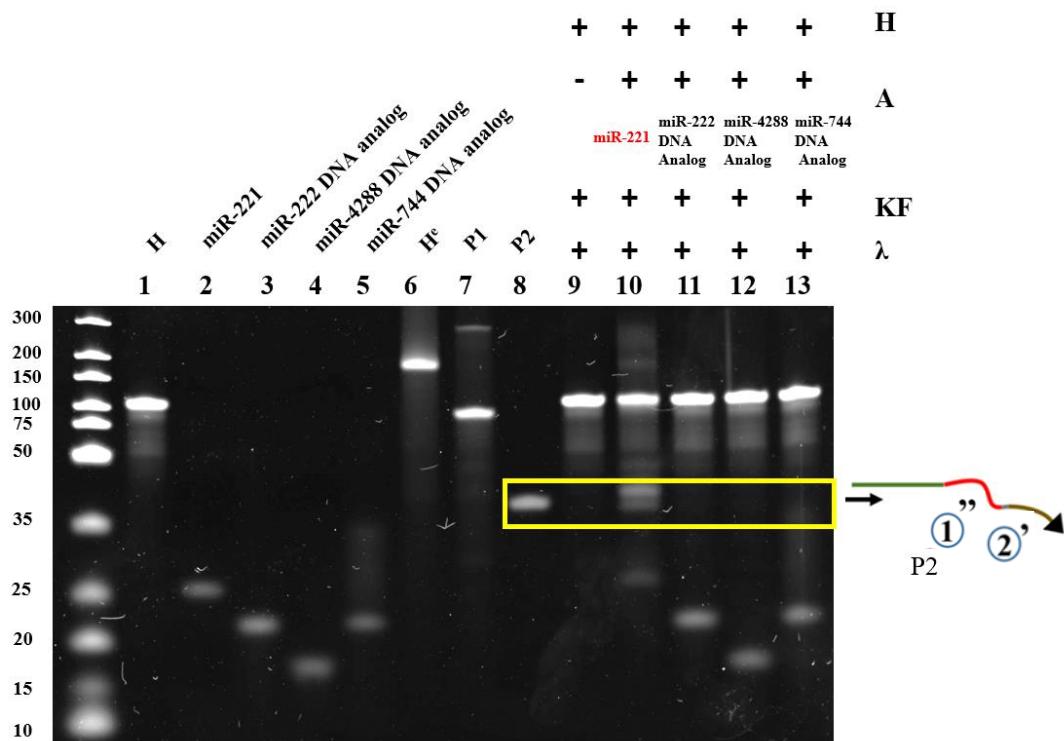


圖 3-24. λ 之專一性剪切測試。7 M urea , 15% acrylamide 的 Denatured Gel 以 70 V 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 電泳分析 100 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。(1): 600 nM H。(2)-(5) 200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog)。(6): 200 nM H^c。(7): 200 nM P1。(8): 200 nM P2。(9): 600 nM H 與 0.02 U/ μL λ 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 1 小時後再以 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 10 分鐘。(10-13): 600 nM H、200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog)、0.05 U/ μL KF 與 0.02 U/ μL λ 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 1 小時後再以 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 10 分鐘。



3.8.4 P2C 之專一性測試

在本研究中所設計之 P2C (Complementary sequence of P2) 探針可用以針對 P2 進行辨認和補抓。我們使用最佳化所得之條件探討 P2C 是否只會被目標分子 miR-221 驅動之 DNA Nanomachine 所產生之產物消耗，而不會被其他非目標分子驅動之 DNA Nanomachine 所產生之混合液消耗。由膠圖結果圖 3.25 顯示，組別 9 為 P2 與 P2C 在逐漸降溫的情況下進行雜合配對，在 H 條帶的上端出現新的條帶，推斷為 P2/P2C duplex。組別 10 為負向控制組，在缺乏目標分子 miR-221 時，DNA Nanomachine 無法進行操作，因此沒有最終產物之生成，所以沒有明顯 P2C 之消耗和 P2/P2C 條帶之生成。組別 11 為使用目標分子 miR-221 為分析物來驅動 DNA Nanomachine 之操作，並將其所產生之最終產物在 95 °C 加熱 10 分鐘將酵素去活化後再與 200 nM P2C 在 37 °C 進行雜合一小時。藉由膠圖之結果可發現，在 P2/P2C duplex 之相對位置有出現明顯之條帶，而且 P2C 條帶之亮度有明顯之下降，從而證明所產生之產物可以與 P2C 進行互補配對，進而消耗 P2C。組別 12~14 為 P2C 與非目標分子所驅動 DNA Nanomachine 所產生之混合物進行反應，由膠圖結果之 P2/P2C duplex 的相對位置並沒有發現明顯條帶之訊號。證明本研究所設計之探針 P2C 具有良好之專一性，當所使用之分析物為目標分子 miR-221 時，P2C 才會被消耗。

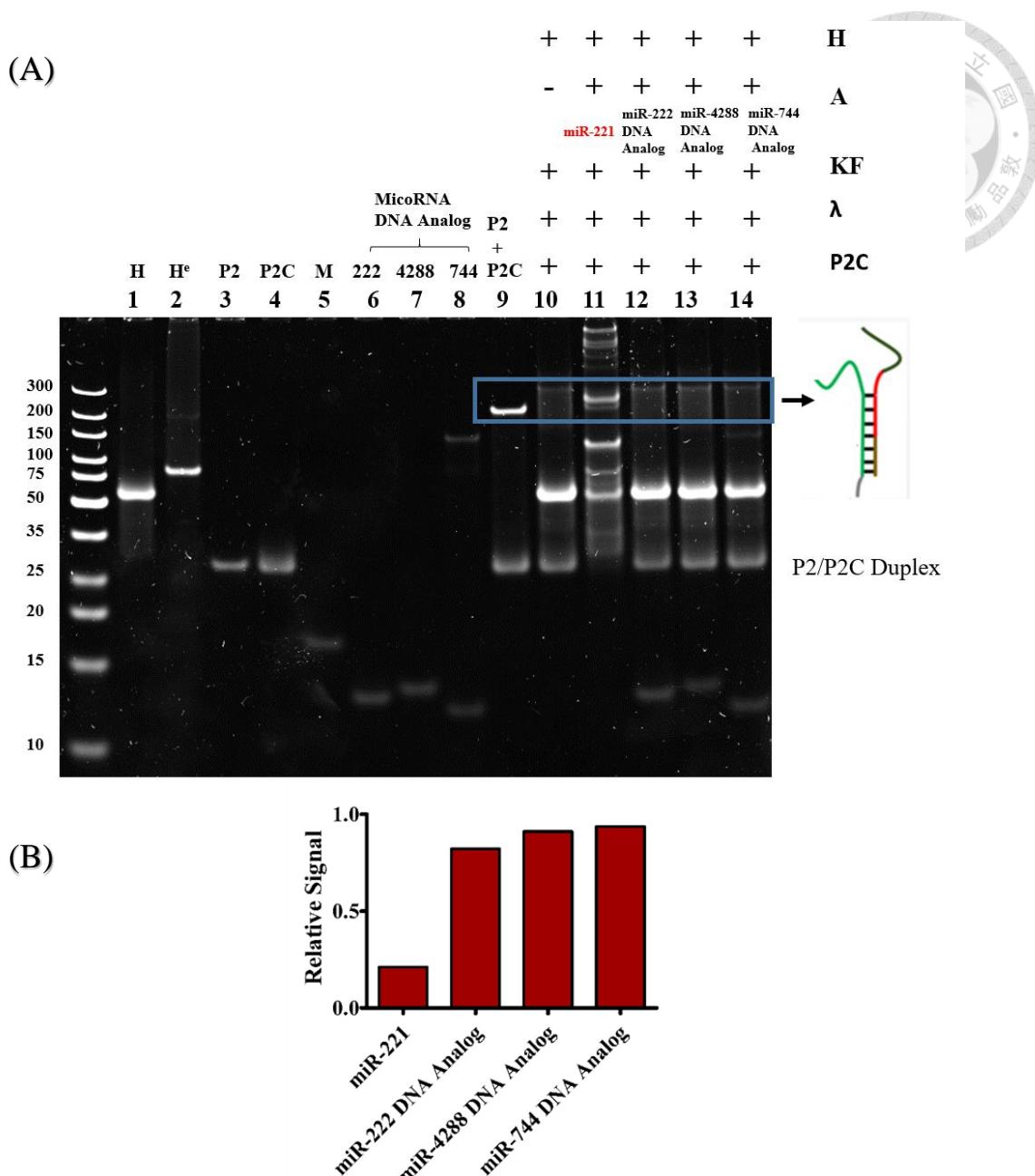


圖 3-25. P2C 之專一性測試。15% acrylamide 的 Native Gel 以 80 V 在 55 °C 電泳分析 110 分鐘。Duplex DNA ladder (10 - 300 bp)。(A) (1): 600 nM H。(2): 200 nM H^e。(3): 200 nM P2。(4): 200 nM P2C。(5) - (8): 200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog)。(9): 為 P2 與 P2C 在逐漸降溫情況之下反應兩小時 (起始溫度為 95 °C，每隔 5 分鐘降 2 - 3 °C)。(10): 為負向控制組，將 600 nM H、0.05 U/μL KF 與 0.02 U/μL λ 反應後之混合物再與 P2C 於 37 °C 下反應 1 小時。(11-14): 將 600 nM H、200 nM A (miR-221, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog)、0.05 U/μL KF 與 0.02 U/μL λ 反應後之混合物再與 P2C 於 37 °C 下反應 1 小時。(B) Image J 之膠圖定量結果，所得之規化量值為以加入目標分子 miR-221 之組別產生之 P2C 條帶亮度除以未加入目標分子 miR-221 時之組別。



3.9. 網版印刷碳電極工作電極製備條件之最佳化

3.9.1 鍍金時間之最佳化

在電化學的實驗中，工作電極常以金奈米粒子進行改質的主要兩個原因為：

- 由於金奈米粒子可與具有特殊官能基 (Functional group) 之化合物 (-NH₂, -SH, -CH₂)形成鍵結¹¹⁴。藉由此特性，可讓末端修飾上硫基 (-SH) 的 DNA 能以硫金鍵的方式修飾於工作電極表面。
- 未經修飾前的碳電極之導電度較不理想，但經由金奈米粒子修飾後，可藉由金奈米粒子其較大的表面積和優良導電度之性質改善電子傳遞效率¹¹⁵。由於鍍金時間的長短會影響金奈米粒子之密度，影響探針修飾於工作電極上的密度，進而改變訊號表現之差異，因此在此實驗中我們探討不同的鍍金時間對於探針上修飾之 MB 電化學分子之電化學訊號之表現。

第一部分為使用 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/-4-}$ 做電化學訊號之分子。於本實驗中，在固定 PEG 和 HAuCl₄ 的使用濃度 (8 mg/mL PEG in ddH₂O 和 5 mM HAuCl₄ in 0.1 M KCl)，以計時電流法給予不同之電壓時間 (Sampling time)，分別為 30、45、60、75、90 秒，使金奈米粒子成功修飾於工作電極表面上，最後以循環伏安法 (Cyclic voltammetry, CV) 進行鑑定，如圖 3-26 所示。循環伏安法 (CV) 可藉由改變電位去影響氧化還原之電流方向。在施加一循環電位下，起始電位以恆定之速率達到一終點電位，並以相同之速率返回起始電位進行掃描。藉由圖 3-27 可發現，無論所使用的電沉積時間 (Electrodeposition time) 為 30、45、60、75 還是 90 秒，所測得之電流值並沒有顯著之差異。

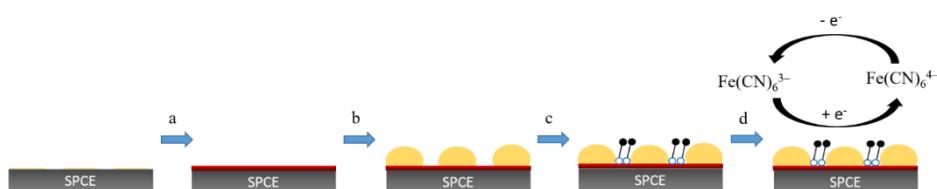
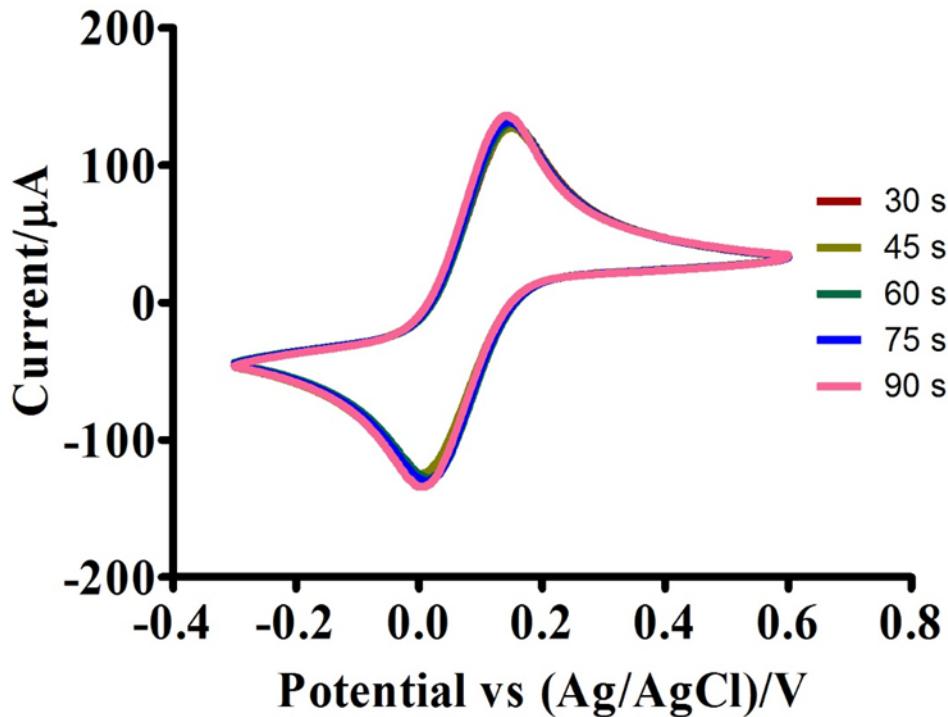


圖 3-26. 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/-4-}$ 为 signal reporter 之實驗操作流程。a. PEG 之修飾 b. 金奈米粒子之修飾 c. MCH 與 Cut 混合液之 blocking d. 使用循環伏安法 (CV) 量測 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/-4-}$ 之氧化電流值。



鍍金時間 (S)	ΔE_p (V)	I_{pa} (μA)
30	0.164	132.9
45	0.174	127.8
60	0.164	136.8
75	0.152	132.2
90	0.141	148.5

圖 3-27. 金奈米粒子於碳電極工作電極之電沉積時間對於 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化電流的影響。(A). 循環伏安法 (CV) 圖譜，以循環伏安法 (CV) 由起始電位 -0.3 V 往正之方向進行掃描。使用參數：掃描速率(Scan rate): 0.1 V/s。實驗組之鍍金時間分別為 30、45、60、75、90 s。(B). 波峰與波谷間之電位差值 (ΔE_p) 與氧化電流值 (I_{pa})。

第二部分為使用 P2C-MB 探針上之 MB 為電化學訊號之分子。此實驗之前置作業與第一部分一樣。於工作電極表面修飾上 PEG 後，經計時電流法給予不同之電壓時間 (30, 45, 60, 75, 90 s) 讓金奈米粒子電沉積 (Electrodeposition) 於工作電極表面上，隨後再以 $1 \mu\text{M}$ 的 P2C-MB 進行修飾，隔天再以方波伏安法 (SWV) 測量 P2C-MB 上 MB 的起始氧化電流訊號 I_{Initial} 。隨後再將合成之濃度為 100 nM 之 P2 與電極上修飾之 P2C-MB 於室溫下進行反應 45 分鐘，再測其氧化電流訊號 I_{Final} ，如圖 3-28 所示。藉由圖 3-29 可發現，隨著金奈米粒子電沉積時間之增加，所測得之 I_{Initial} 也隨之上升。以加入誘導股 P2 之組別所產生之氧化電流值除以未加入誘導股 P2 時所測得之氧化電流值取得相對訊號值做為後續的分析。由相對訊號分析結果圖 3-30A 得知，當使用的金奈米粒子電沉積時間為 60 s ，相對訊號值為最小，表示 100 nM 誘導股 P2 所能誘發之電化學訊號變化是最大的。此外，我們也比較不同鍍金時間所得的相對訊號之相對標準偏差 (Relative standard deviation, RSD)，如圖 3-30B 所示。相對標準偏差為標準差 (Standard deviation, SD) 與平均值 (Mean) 之比值再換算成百分比，用以表示實驗結果之精密度 (Precision)。RSD 越小，表示精密度越高，再現性越高，因此可信賴程度也越大。藉由圖 3-30B 之結果可發現，當使用的金奈米粒子電沉積時間為 60 s ，相對訊號值是最小的，為 2.62% 。故選擇 60 s 為後續實驗之金奈米粒子之電沉積時間。

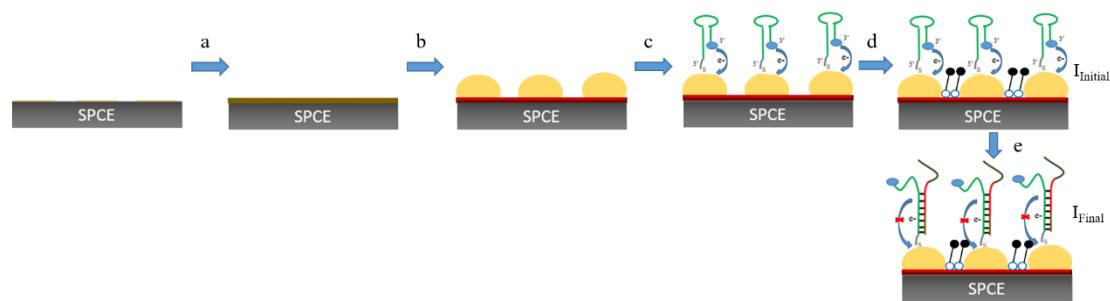


圖 3-28. 以 P2C-MB 为 signal reporter 之實驗操作流程。a. PEG 之修飾 b. 金奈米粒子之修飾 c. P2C-MB 之修飾 d. MCH 與 Cut 混合液之 blocking, 並測其 I_{Initial} 。將 100 nM P2 引入到電極與 P2C-MB 進行雜合配對 45 分鐘，再測其氧化電流訊號 I_{Final} 。

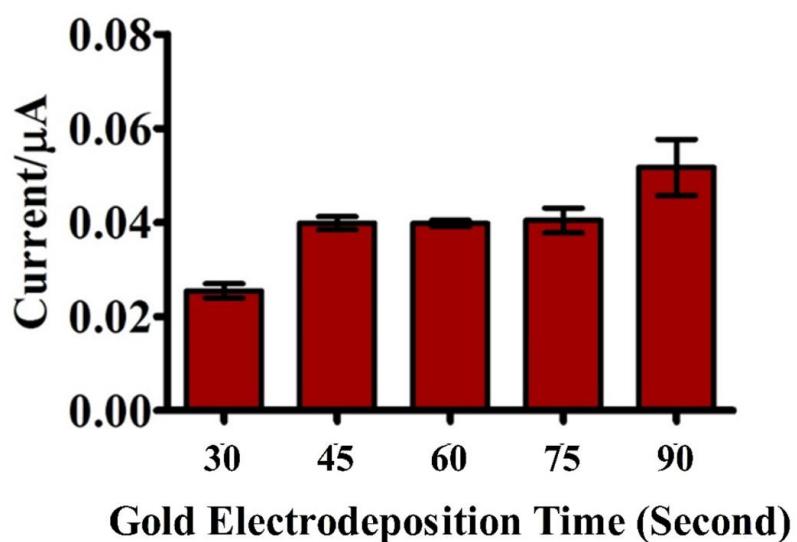
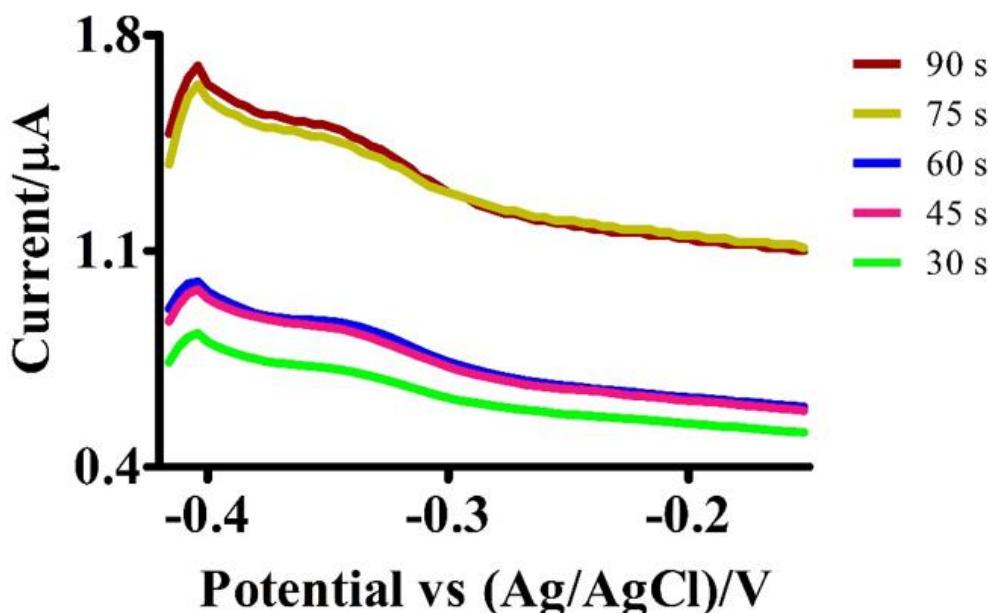
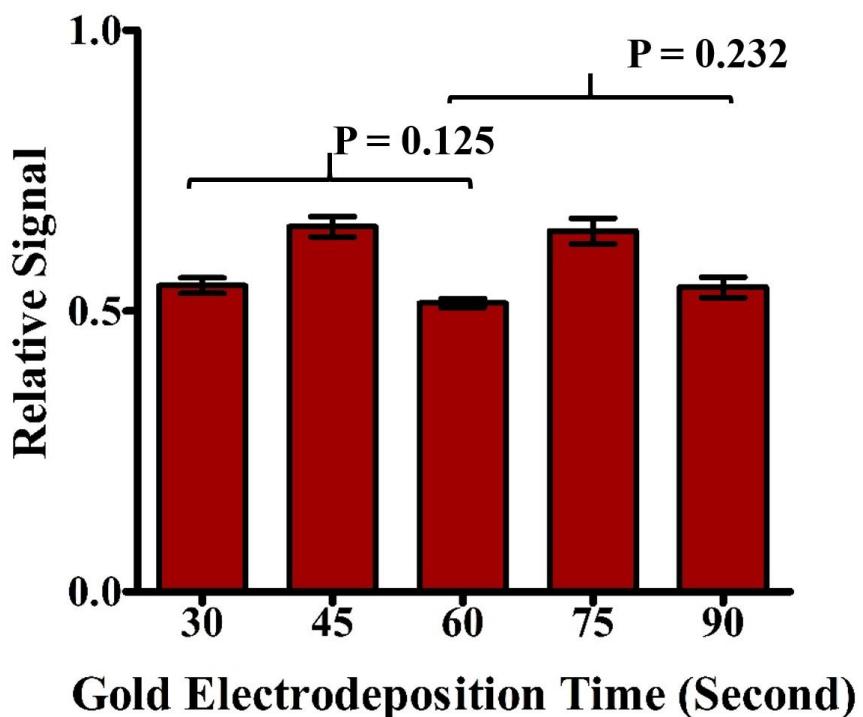


圖 3-29. 金奈米粒子於碳工作電極之電沉積時間對於 P2C-MB 氧化電流的影響。
(A). 方波伏安法 (SWV) 之圖譜，以方波伏安法 (SWV) 由-0.42 V 往-0.15 V 之方向進行掃描。使用參數：振幅 (Amplitude): 0.025 V, 頻率 (Frequency): 15 Hz。電解質溶液為 5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM NaCl, pH 7.0)。實驗組之鍍金時間分別為 30、45、60、75 和 90 s。(B). 不同鍍金時間所測得之 $I_{Initial}$ 。



Gold Electrodeposition Time (s)	RSD (%)
30	4.46
45	4.78
60	2.62
75	6.19
90	5.83

圖 3-30. 金奈米粒子於碳工作電極之電沉積時間對於 P2C-MB 氧化電流的影響。
(A). 不同鍍金時間之相對訊號值。以加入誘導股 P2 之組別所產生之氧化電流值除以未加入誘導股 P2 時所測得之氧化電流值取得相對訊號值。(B). 不同鍍金時間之相對標準偏差 ($n=3$)。



3.9.2. P2C-MB 固定化濃度之最佳化

電化學訊號表現之差異不但會受到金奈米粒子電沉積時間所影響，此外也取決於所固定之核昔酸探針 (Immobilization oligonucleotide) 之濃度。故探討本實驗中 P2C-MB 固定化之濃度對於電化學訊號表現差異之影響，達到最大訊號差異之表現。實驗的操作條件為固定其金奈米粒子沉積時間 60 s，處以不同濃度的 P2C-MB (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM) 於工作電極表面進行固定化，並以方波伏安法 (SWV) 測量其 MB 之起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 。隨後再將合成之濃度為 100 nM 之 P2 與電極上修飾之 P2C-MB 於室溫下進行反應 45 分鐘，再測其氧化電流訊號 I_{Final} 。藉由圖 3-31A 之方波伏安法 (SWV) 分析結果所示，經過 0.5 或 1 μM P2C-MB 於工作電極表面進行固定化後，MB 的氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 可被偵測到，分別為 0.22 μA 與 0.62 μA。反正，當使用 0.1、0.05、0.01 μM P2C-MB 固定化於工作電極時，MB 氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 則無法測得。圖 3-31B 為 ΔI 值之結果分析，以未加入誘導股 P2 時所測得之氧化電流值 $I_{Initial}$ 與加入誘導股 P2 之組別所產生之氧化電流值 I_{Final} 進行相減後再除以 $I_{Initial}$ 。當 P2C-MB 固定化之濃度為 1 μM 時，氧化電流間差異較大，約為 32%，而且其標準偏差較 P2C-MB 固定化之濃度為 0.5 μM 時低。故選擇 1 μM P2C-MB 做為後續實驗之固定化濃度。

$$\Delta I = \frac{I_{Initial} - I_{Final}}{I_{Final}}$$

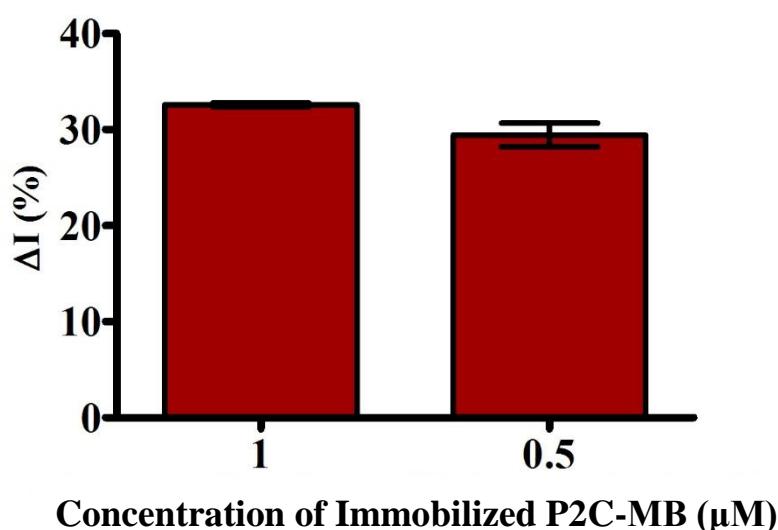
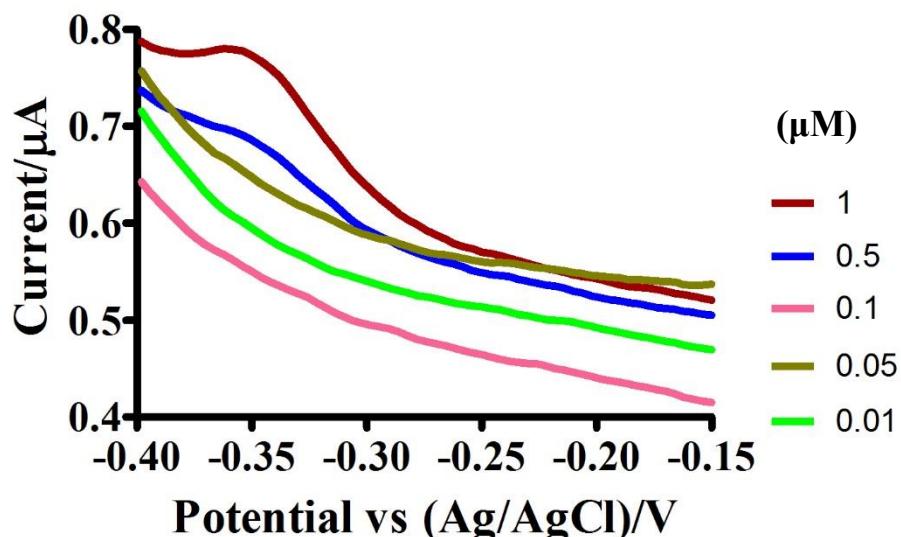


圖 3-31. P2C-MB 固定化濃度之最佳化。(A). 方波伏安法 (SWV) 之圖譜，以方波伏安法 (SWV) 由 -0.42 V 往 -0.15 V 之方向進行掃描。使用參數：振幅 (Amplitude): 0.025 V，頻率 (Frequency): 15 Hz。電解質溶液為 5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM NaCl, pH 7.0)。實驗組之 P2C-MB 固定化濃度為 0.01、0.05、0.1、0.5、1 μM。(B). ΔI 值之結果分析，以未加入誘導股 P2 時所測得之氧化電流值與加入誘導股 P2 之組別所產生之氧化電流值進行相減再除以 I_{Initial}。



3.9.3 P2C-MB 於工作電極之密度鑑定

工作電極表面之 DNA 密度 (Density) 會影響電化學訊號之表現。根據前人的文獻指出，電化學訊號之表現差異在 DNA 修飾於工作電極之密度為 3.9×10^{10} ~ 2.1×10^{12} molecules/cm² 之區間時可達到最好¹¹⁶。如圖 3-32 所示，當修飾於工作電極之 DNA 密度小於 3.9×10^{10} molecules/cm² 時，所測得之電流訊號較小。此外在低密度之探針修飾之下，由於探針彼此之間的距離比探針的長度來得大，導致與互補股雜合後之探針仍可與電極進行碰撞 (Collision)，進而影響訊號無法做大幅度之改變；反之，當修飾之 DNA 密度大於 2.1×10^{12} molecules/cm² 時，探針與互補股之間的互補雜合效率會被抑制，進而影響構型之改變。故我們探討成功修飾於工作電極表面之 P2C-MB 密度，以確保其修飾量不但可以提供較大之起始電流訊號 $I_{Initial}$ ，並且不會影響探針與互補股之間的雜合。由於本實驗中所設計之探針 P2C-MB 其 5' 端帶有硫基，故可以硫金鍵的方式修飾於 AuNP@PEG@SPCE 之工作電極表面上。於本實驗中，我們將經過前置修飾和改質後的 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 先置於低離子強度 (Ionic strength) 之緩衝溶液 (10 mM Tris-HCl, pH7.4)，並以計時庫倫法 (Chronocoulometry, CC) 測量其工作電極表面，測得第一個計時庫倫法 (CC) 圖譜。之後，我們再將上述 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 置於含有 50 μM Ru(NH₃)₆³⁺ 之 10 mM Tris-HCl，進一步以計時庫倫法 (CC) 測其工作電極表面，測得第二個計時庫倫法 (CC) 圖譜。由於 Ru(NH₃)₆³⁺ 為帶正電之電化學活性分子，而 DNA 之磷酸骨架之磷酸根分子則為帶負電。藉由靜電吸引力 (Electrostatic attraction) 之作用，使用計時庫倫 (CC) 計算成功被 P2C-MB 補抓 Ru(NH₃)₆³⁺ 之數目，再以 Steel 所提出之電化學定量法 (Electrochemical quantitation)，量測 P2C-MB 成功修飾於工作電極表面之密度。將上述以 Tris-HCl 和含有 Ru(NH₃)₆³⁺ 之 Tris-HCl 為電解質所測得之 CC 圖譜轉換成 Anson plots，進而可分別取得此兩個圖譜在反應起始時間為 0 時的 Y 截距 (Y-intercept)，分別稱之為 Q_{dl} 和 Q ，如圖 3-33 所示。藉由 Cotrrell 方程式之

使用¹¹⁷，可以成功計算P2C-MB於工作電極之密度。由於反應起始時間為0，Cotrell方程式可進一步簡單化。



Cotrell方程式：

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0 \quad (1)$$

簡化後之Cotrell方程式：

$$Q = Q_{dl} + nFA\Gamma_0 \quad (2)$$

Q : Charge (5.463×10^{-7} C)

n : The number of electrons per reduced molecule (1)

F : Faraday constant (96485 C equiv⁻¹)

A : Electrode area (0.07 cm²)

Q_{dl} : Capacitive charge (4.84×10^{-7} C)

$nFA\Gamma_0$: Charge arising from the reduction of Γ_0 (mol cm⁻²) of the adsorbed Ru(NH₃)₆³⁺

將Q與 Q_{dl} 相減後所得之 $nFA\Gamma_0$ 代入方程式3進行運算。

$$\Gamma_{DNA} = \Gamma_0(z/m)N_A \quad (3)$$

Γ_{DNA} : Probe surface density in molecules

m : Number of bases in the probe (50 bases)

z : Charge of the redox molecule (3)

N_A : Avogadro's number (6.02×10^{23} mol⁻¹)

經過上述方程式進行運算後，我們成功於AuNP@PEG@SPCE修飾上 3.33×10^{11} molecules/cm²之P2C-MB，是位於 $3.9 \times 10^{10} \sim 2.1 \times 10^{12}$ molecules/cm²之區間，表示電化學訊號之表現差異可以達到最佳之程度，符合後續實驗操作之需求。

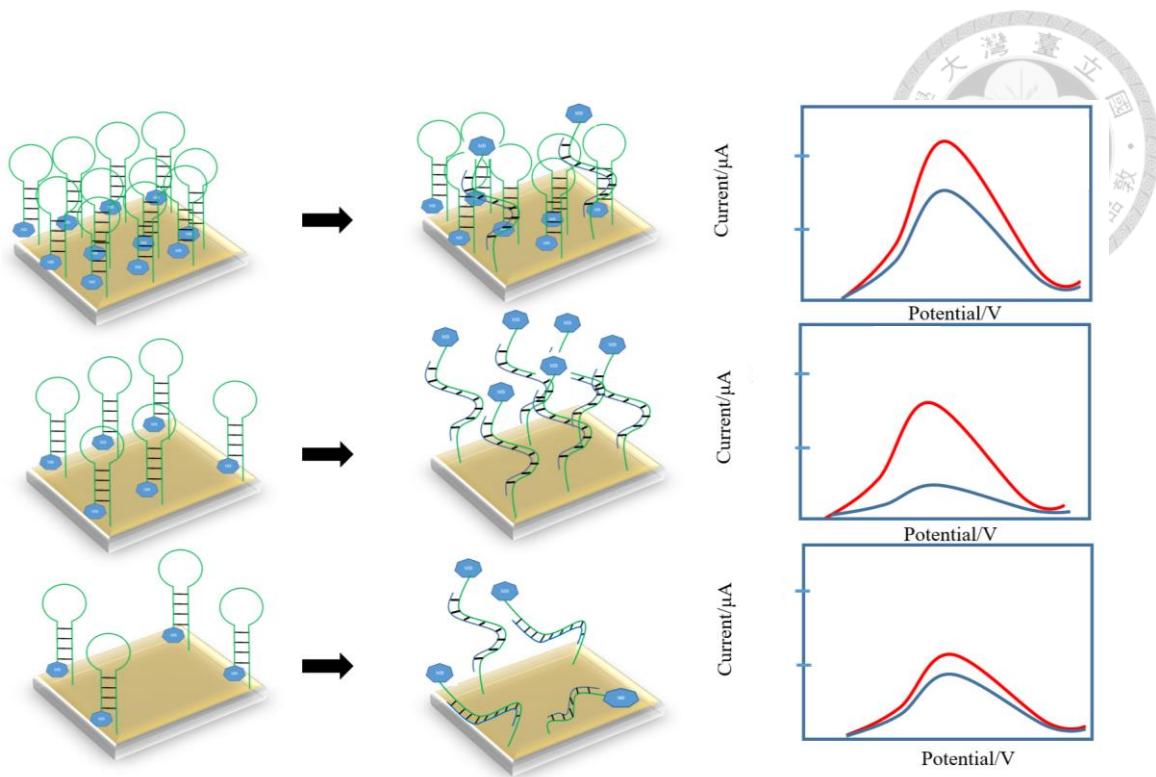


圖 3-32. 修飾於工作電極之探針密度對於雜合率和訊號差異表現之影響。

(A). 高密度之探針 ($> 2.1 \times 10^{12}$ molecules/cm²); (B). 中密度之探針 ($3.9 \times 10^{10} \sim 2.1 \times 10^{12}$ molecules/cm²); (C). 低密度之探針 ($< 3.9 \times 10^{10}$ molecules/cm²)。紅線為目標分子不存在時所測得的電流強度; 而藍線為目標分子進入系統後所測得的電流訊號。

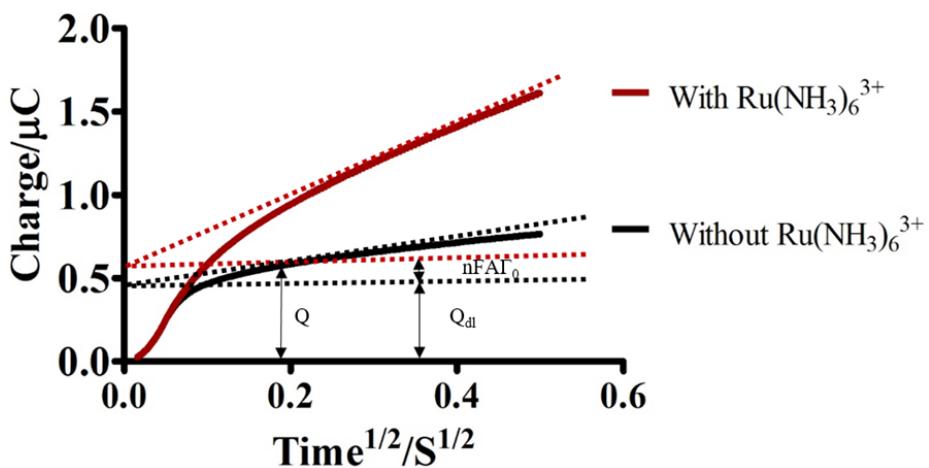


圖 3-33. P2C-MB 於工作電極之密度鑑定。以計時庫倫法 (CC) 由起始電位 0 V 往正之方向 -0.3 V 進行掃描。黑線為 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 於 Tris-HCl 進行掃描所對應之圖譜；紅線則為 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 於含有 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 之 Tris-HCl 進行掃描所對應之圖譜。



3.9.4. 阻隔劑 (Blocking agent) 之最佳化

由於金奈米粒子可與硫基形成鍵結，因此尾端修飾上硫基官能團 (-SH) 之 DNA 探針 (Probe) 可以金硫鍵 (Gold-thiol bond) 的方式修飾在經奈米金修飾後之網版印刷碳電極，同時探針也會因鹼基上的氮與金基質產生 N-Au 鍵結而吸附在金基質表面使得少數單股 DNA 無法垂直站立，而如同水草般倒下，導致互補股與探針之雜交率大大降低。常作為阻隔劑的試劑有牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 和 2-巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol, MCH)。根據前人的論文指出¹¹⁸，MCH 可以當做阻隔劑的主要三個原因是因為它具有溶於水之特性可適用於水溶液和可置換無法垂直站立之探針。除此之外，MCH 本身所含之碳數與 thiol-DNA 一樣，因此具有相同的長度，進而可以解決立體障礙之困境，如圖 3-34 所示。由於 BSA 具有高效能，價錢較便宜和生物可降解性之特性，因此被選為廣泛使用之阻隔劑。BSA 具有疏水端和親水端，可以防止探針在疏水性表面之非專一性吸附，並促進它們在水相之溶解度。於本實驗中，在固定鍍金時間為 60 s (5 mM HAuCl₄)，再以 PEG (8 mg/mL PEG in ddH₂O) 修飾後之工作電極，分別處以不同組合之阻隔劑 (MCH, Cut, MCH + Cut, MCH followed by Cut, Cut followed by MCH) 對工作電極進行阻隔後，再以方波伏安法 (Square wave voltammetry, SWV) 量測濃度為 10、20、30、40、50 μM 之游離亞甲藍 (Free methylene blue) 之水溶液之氧化電流訊號，探討不同組合之阻隔劑對於亞甲藍氧化電流訊號之影響。第一組：將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer，加 6 μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。第二組：取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。第三組：將 1 mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH) 配製於 Blocking buffer，加 6 μL 之混合溶液到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 1 小時。用二次去離子水沖洗電極 4 次後放乾，隨後再取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。。第四組：取 6 μL 1×Cut 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘。用二次去離子水沖洗電

極 4 次後放乾，隨後再取 $6\text{ }\mu\text{L }1\text{ mM 6-Mercaptohexanol (6-MCH)}$ 到 SPCE 之工作電極表面，室溫反應 45 分鐘第五組：將 $2\text{ mM 6-Mercaptohexanol}$ 配製在 Blocking buffer，隨後與 $2\times\text{Cut}$ 進行混合，形成 6-Mercaptohexanol 和 Cut 濃度分別為 1 mM 和 $1\times$ 之混合液。取 $6\text{ }\mu\text{L}$ 的混合溶液到 SPCE 電極表面，在室溫反應 1 小時。使用由上述修飾製備後的電極以方波伏安法 (SWV) 量測空白水溶液。測得訊號為起始訊號 (I_{Initial})，用以規化每一片電極本身之異質性。同時，對照組以沒有進行任何阻隔劑製備之電極來進行不同濃度亞甲藍氧化電流訊號之測量，用以比較阻隔前後的差異。藉由方波伏安法 (SWV) 之結果圖 3-35 顯示，隨著亞甲藍濃度的增加，在約 -0.26 V 處所測得之氧化電流訊號也隨之上升，進而推斷亞甲藍的氧化峰(Oxidation peak)座落於 -0.26 V 。圖 3-36 為不同濃度之游離亞甲藍所得之校正曲線(Calibration Curve)。藉由表 3-4 的分析結果可以得知，當使用的阻隔劑為 MCH、MCH + Cut、MCH followed by Cut、Cut followed by MCH 時，濃度檢量線所獲得之斜率 (Slope) 是較高的，分別為 3.31 、 2.99 、 3.13 和 3.01 。斜率約大所代表的意義是不同濃度所測得之氧化電流差異越大，因此在後續的實驗越更能從所測量到之電流值精準地回推與 P2C 反應之 P2 濃度。故我們選擇 MCH、MCH + CB、MCH followed by CB、CB followed by MCH 這四種阻隔劑做為下一個實驗之最佳化。

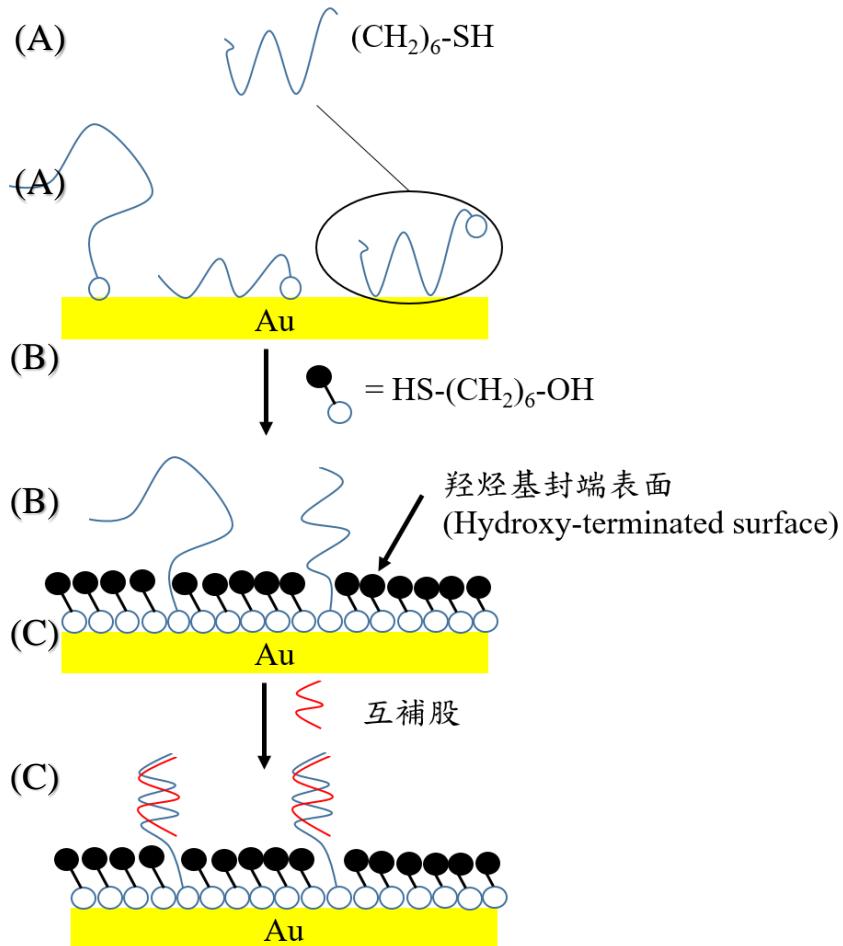


圖 3-34. A. 單股 DNA (HS-ssDNA) 會以兩種方式吸附在金基質上，分別為專一性之吸附-探針的 SH 基團與金基質之金硫鍵和非專一性吸附-鹼基上的氮與金基質之 N-Au 鍵結。B. 在工作電極修飾上 MCH 後，可以防止 DNA 磷酸骨架和金基質之非專一性吸附，而只剩下以金硫酸鍵結之 ss-DNA。C. 與互補股雜合後之探針。(參考 reference118 重繪製圖)

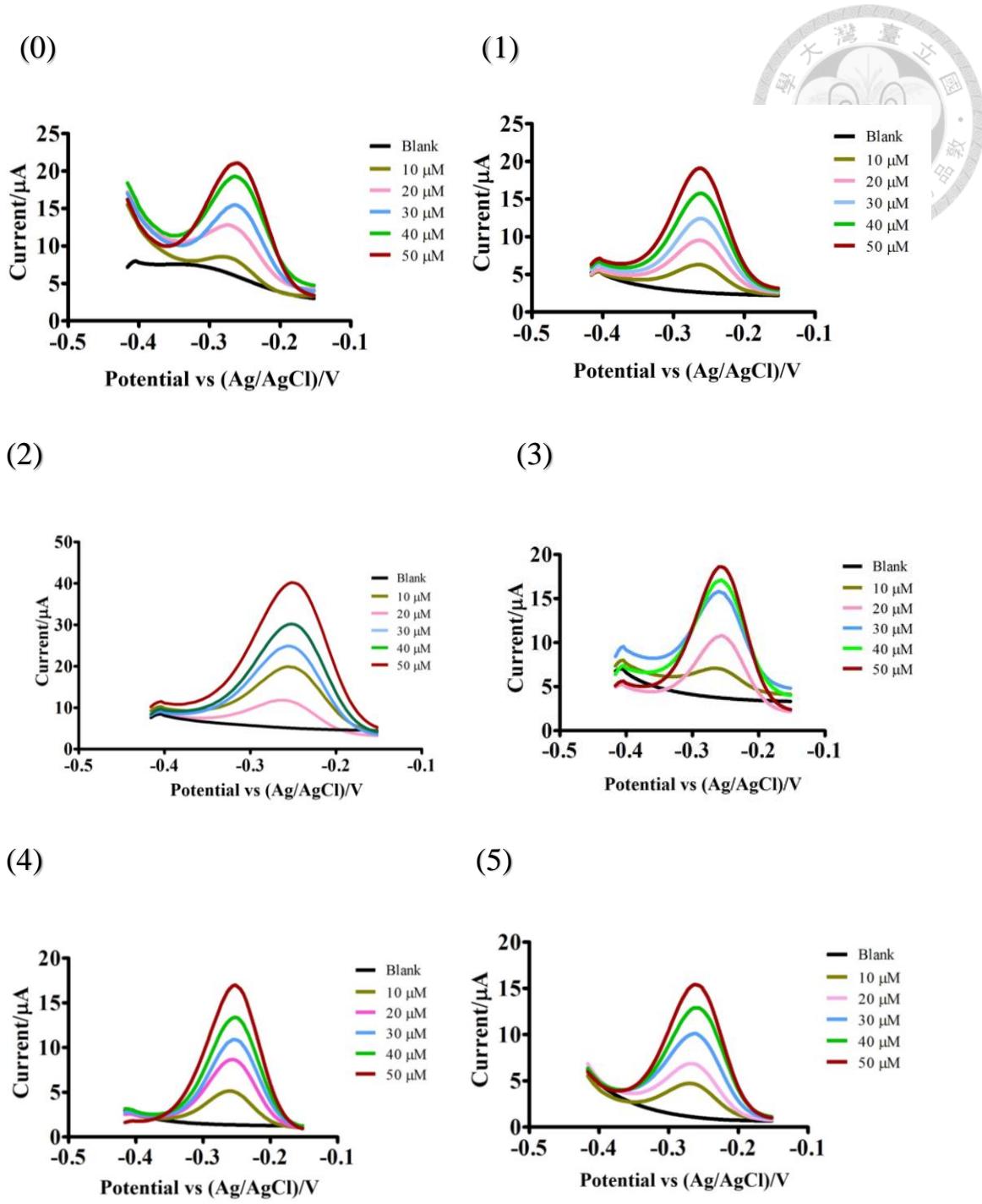
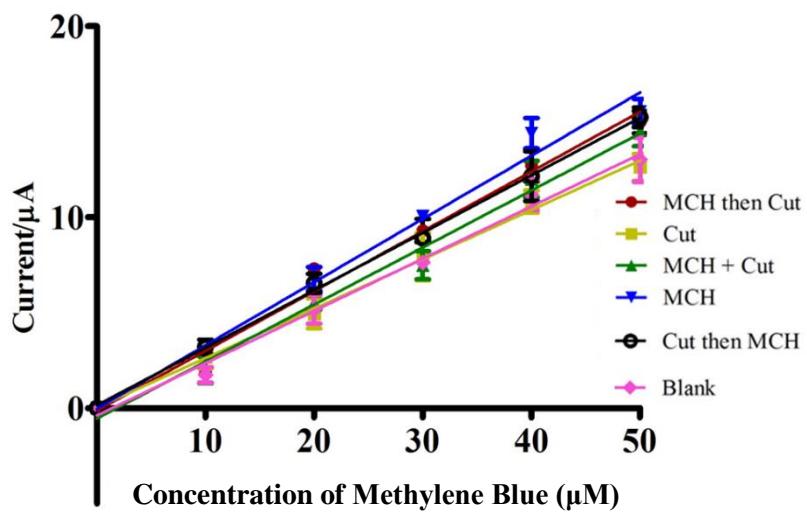


圖 3.35. 不同組合的阻隔劑對於游離 MB 氧化電流訊號之影響。以方波伏安法 (SWV) 由-0.5 V 往-0.2 V 之方向進行掃描。使用參數：振幅 (Amplitude): 0.025 V，頻率(Frequency): 15 Hz。組別 0 為未經過任何阻隔的製備；組別 1 為單獨使用 MCH 與工作電極反應 1 小時。組別 2 為單獨使用 Cut 與工作電極作用 45 分鐘；組別 3 為先使用 MCH 進行阻隔一小時，緊接著再利用 Cut 阻隔 45 分鐘。組別 4 的阻隔劑使用順序與組別 E 相反；組別 5 為使用兩種不同之阻隔劑之混合液進行同一時間之阻隔，反應時間為 1 小時。



(A)



(B)

Group	Blocking	Slope	R^2
0	Blank	2.74	0.9923
1	MCH	3.31	0.9861
2	Cut	2.58	0.9966
3	MCH followed by Cut	3.13	0.982
4	Cut followed by MCH	3.01	0.9985
5	MCH + Cut	2.99	0.9889

圖 3.36. A. 不同濃度之游離亞甲藍所得之校正曲線。所使用之阻隔劑包括 MCH、Cut、MCH + Cut、MCH followed by Cut、Cut followed by MCH。B. 校準曲線所得之 slope 和 R^2 。

牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 為分子量為 66.5 KDa，並且由 585 個氨基酸所組成之球蛋白 (Globular protein)。BSA 廣泛應用於生化應用或充當模擬蛋白的主要兩個主要原因為，(1) 由於 BSA 具有較好之穩定性，因此對於許多生化反應不會造成顯著之不良影響。(2) 由於 BSA 為取自牛之血清蛋白，因此取得來源較為容易，成本相對較低。在我們的研究中，我們會使用兩種酵素進行 DNA Nanomachine 之運作，因此擔心上述兩種酵素會與電極工作表面進行非專一之吸附，進而影響電化學之訊號。故我們使用 BSA 去模擬蛋白質之環境，探討不同之阻隔劑對於抗 BSA 吸附之能力。於本實驗中，在固定鍍金時間為 60 s (5 mM HAuCl₄)，再以 PEG (8 mg/mL PEG in ddH₂O) 修飾後之工作電極，將帶有 MB 標記之 P2C 修飾於工作電極之表面，隔天再以上個實驗優化所得之阻隔劑 (MCH, MCH + CB, MCH followed by CB, CB followed by MCH) 對工作電極進行阻隔，並以方波伏安法 (SWV) 量測起始 MB 之氧化電流訊號 $I_{Initial}$ ，如圖 3-37 所示。最後，再將溶於 ddH₂O 之 0.01 mg/mL BSA 與工作電極在室溫反應 30 分鐘，並以方波伏安法 (SWV) 量測最終 MB 之氧化電流訊號 I_{Final} 。以 I_{Final} 除以各自的 $I_{Initial}$ ，進而取得相對訊號值 (Relative signal) 進行後續數據之分析。藉由方波伏安法 (SWV) 偵測結果圖 3-37A 所示，當使用 MCH 為阻隔劑時，它會對電極造成較大之背景值，導致修飾在 P2C 之 MB 的氧化電流訊號被遮蓋。由相對訊號值之結果圖 3-37E，可發現當使用 MCH + Cut 為阻隔劑的時候，其相對訊號值是最大的，進而證明當使用此種阻隔劑時，可以對 BSA 非專一吸附具有較高之抗性，因此與 BSA 反應後所測的 MB 之氧化電流訊號並沒有大幅度降低之現象。

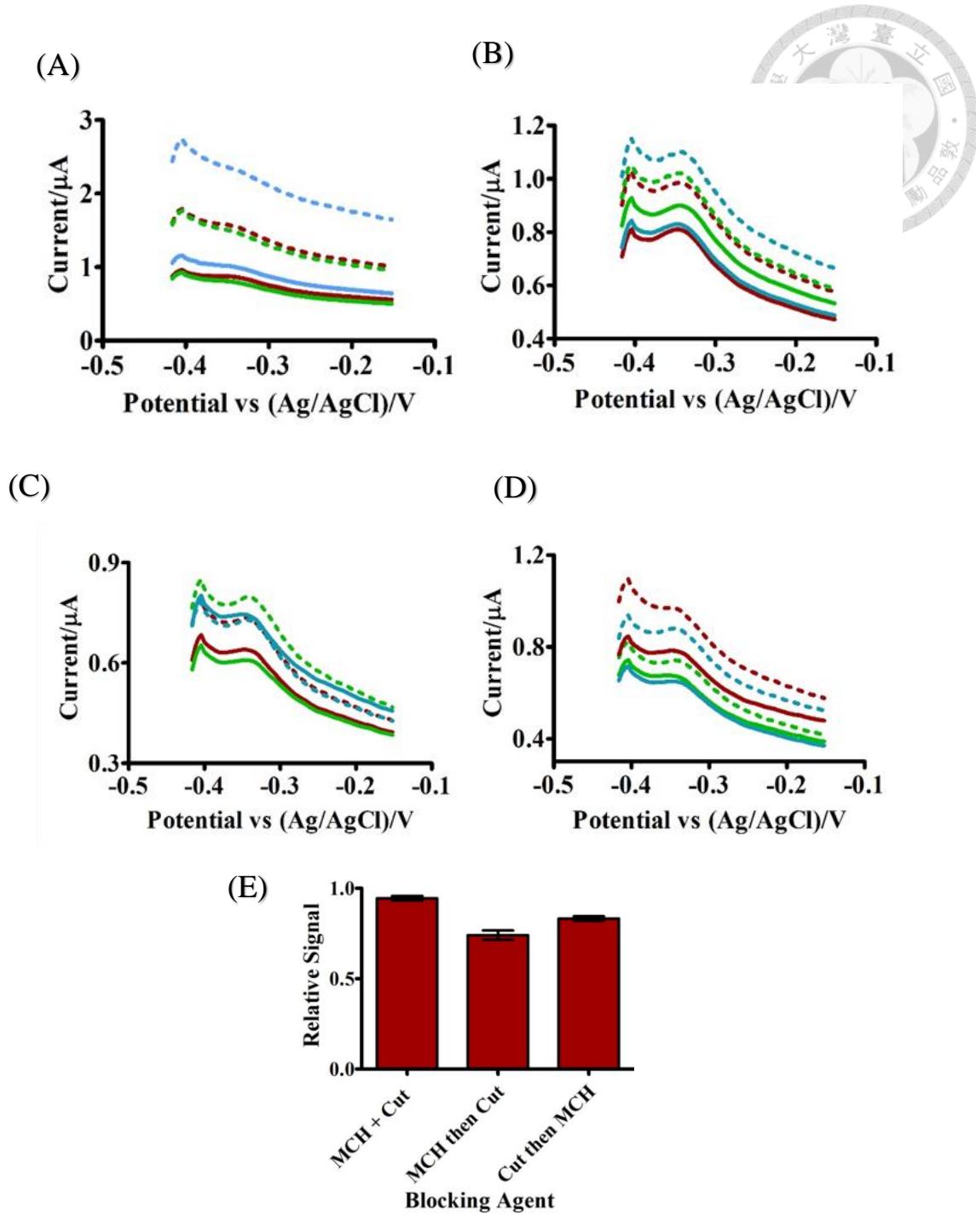


圖 3.37. 不同組合的阻隔劑之抗 BSA 能力。以方波伏安法 (SWV) 由-0.5 V 往-0.2 V 之方向進行掃描。使用參數：振幅 (Amplitude): 0.025 V, 頻率 (Frequency): 15 Hz。(A). 為單獨使用 MCH 與工作電極反應 1 小時；(B). 為使用兩種不同之阻隔劑之混合液進行同一時間之阻隔，反應時間為 1 小時。(C). 為先使用 MCH 進行阻隔一小時，緊接著再利用 Cut 阻隔 45 分鐘。(D). 阻隔劑的使用順序與組別 e 相反。(E). 以方波伏安法 (SWV) 量測後所得之相對訊號值，為 I_{Final} 除以各自之 I_{Initial} 。



3.9.5. 工作電極表面之鑑定

由於工作電極表面之導電性會因不同物理化學修飾有所變化，故在此實驗中，我們藉由探討電極導電度之改變做為鑑定不同物質之修飾。我們以 PEG、金奈米粒子和 P2C-MB 進行工作電極之修飾，進而分別形成 PEG 修飾後之 SPCE (PEG@SPCE)、鍍金後之 SPCE (AuNP@PEG@SPCE) 與經 P2C-MB 修飾後之 SPCE (P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE)，如圖 3-38 所示。將上述三種不同修飾之電極與 SPCE 裸電極 (Bare electrode) 置於溶於 100 mM phosphate buffer (0.15 M NaCl, pH 7.0) 之 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ，以循環伏安法 (SWV) 進行分析，觀察 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 之變化。藉由圖 3-39 可發現，由於 SPCE 裸電之導電度較差，所測得之 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化電流訊號較小，為 72.69 μA 。經金奈米粒子進行工作電極之改質後，導電度獲得提升，所測得之氧化電流訊號為 149.5 μA ，其值為裸電極之兩倍。由於 P2C-MB 的磷酸根骨架 (Phosphate backbone) 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 都為負電物質，因此彼此間會互相排斥 (Repulsion)，進而導致所測得的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化電流訊號與 AuNP@PEG@SPCE 相比之下，電流值下降至 114.6 μA 。

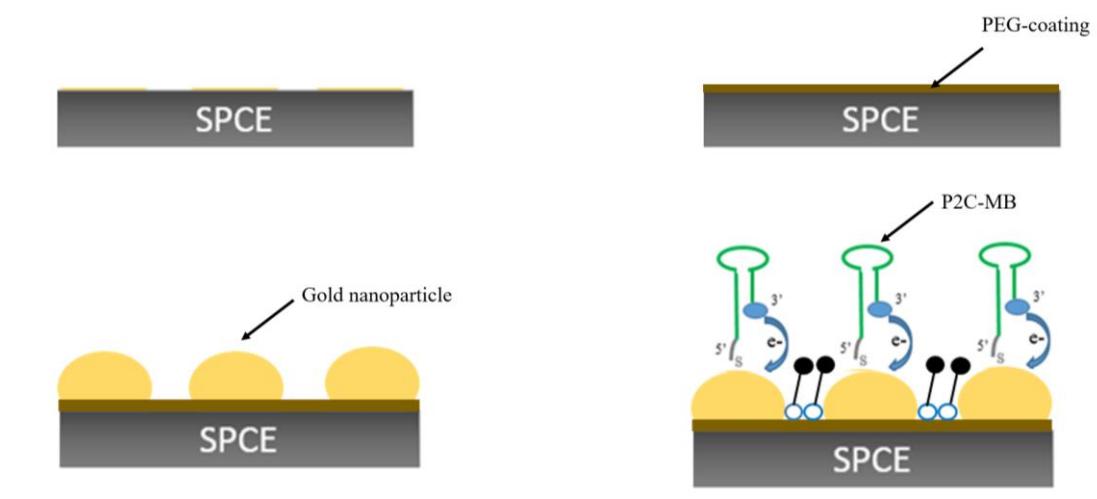
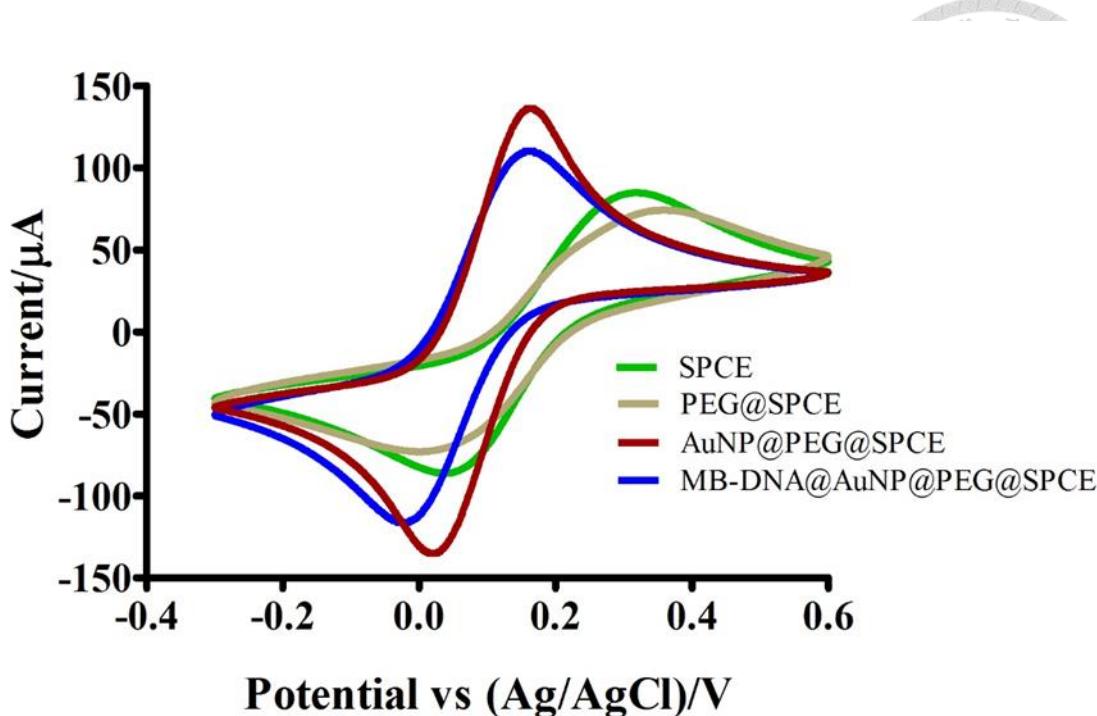


圖 3-38. 工作電極表面不同層次之修飾。(A). 未經任何改質之裸電極 (Bare SPCE); (B). PEG 覆蓋後之 SPCE (PEG@SPCE); (C). 金奈米粒子電沉積後之電極 (AuNP@PEG@SPCE); (D) 探針修飾後之電極 (P2C-MB@ AuNP@PEG@SPCE)。



Electrode Surface	ΔE_p (V)	I_{pa} (μA)
SPCE	0.3	72.69
PEG@SPCE	0.326	55.02
AuNP@PEG@SPCE	0.162	149.5
MB-DNA@AuNP@PEG@SPCE	0.163	114.6

圖 3-39. 工作電極表面之循環伏安法 (CV) 鑑定。(A). 循環伏安法 (CV) 圖譜，以循環伏安法 (CV) 由起始電位 -0.3 V 往正之方向進行掃描。使用參數：掃描速率 (Scan rate): 0.1 V/s。SPCE、PEG@SPCE、AuNP@PEG@SPCE 與 MB-DNA@AuNP@PEG@SPCE 為分析之組別。(B). 波峰與波谷間之電位差值 (ΔE_p) 與氧化電流值 (I_{pa})。

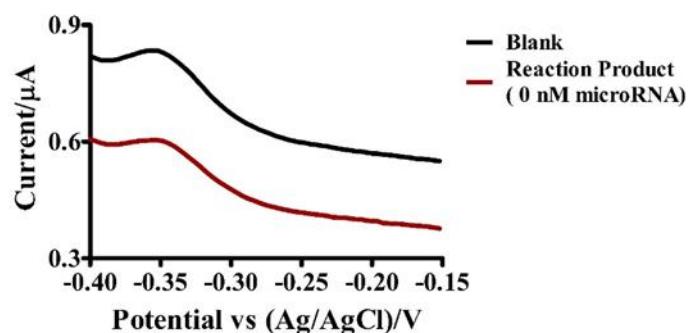
3.10. 電化學生化感測器應用於目標分子 miR-221 之分析

在結果與討論之章節 3.3 至章節 3.7 和結果與討論章節 3.9.1 至章節 3.9.3，我們已經分別針對 DNA Nanomachine 和電化學感測器之表現進行一系列之反應條件優化，得到最佳之實驗操作條件。在本節實驗中，我們先使用高濃度之目標分子 miR-221 確認經由 DNA Nanomachine 產生之反應液可順利開啟電極上修飾之訊號探針。於本實驗中分別設計了兩個組別進行比較，實驗組以 100 nM 目標分子進行 DNA Nanomachine 之驅動，而空白組則沒有添加目標分子 miR-221 進行分析。我們以目標分子 miR-221 與 DNA Nanomachine 之元件 (H , KF , λ) 於 37 °C 下反應 1 小時。由於 DNA Nanomachine 在目標分子 miR-221 存在之下方可成功被驅動，進而啟動 Klenow Fragment (KF) 輔助目標分子之循環反應 (KF-assisted Target Recycling) 和 λ 外切酶剪切反應 (Lambda Exonuclease Digestion)，而釋放出訊號誘導股 P2。我們取 40 μ L 5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM NaCl, pH 7.0) 做為電解質溶液滴於經過修飾和改質後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE，並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 。隨後，將 DNA Nanomachine 操作完畢後之反應液加到上述電極之工作表面上，於室溫下進行互補雜合 45 分鐘，之後並以方波伏安法 (SWV) 量測 MB 之最終氧化電流訊號 I_{Final} 。以 I_{Final} 除以 $I_{Initial}$ 進而取得相對訊號值。當缺乏訊號誘導股 P2 時，由於 P2C-MB 為髮夾結構，修飾於 3' 端之 MB 電化學活性分子與工作電極之距離可達到最近之程度，約為 2.38 nM，因此電子傳遞可以最快速並最有效之方式進行，進而導致所量測之 MB 氧化電流訊號為最大。DNA Nanomachine 操作完成後所產生之反應液內含誘導股 P2，因此可與修飾於 AuNP@PEG@SPCE 表面上之 P2C-MB 進行互補雜合，將 P2C 髮夾結構打開，使得修飾於 P2C 之 3' 端上的 MB 遠離電極表面，MB 之氧化電流值因而下降。藉由圖 3-40 發現，當使用 100 nM 目標分子為分析物時，相對值為 45%，而空白組之相對訊號值則為 71%，彼此相差 26%，從而判斷目標分子 miR-221 可以使得 MB 分子與電極表面距離增加，進而導致

氧化電流值之下降。然而空白組仍有相對訊號值之下降，主要兩個推測原因為：

1. 本實驗所使用的兩種酵素仍有機會與工作電極表面進行非專一性之吸附，進而導致修飾於 P2C 上之 MB 無法進行有效之電子傳遞。
2. 本實驗所採用的方式為 lab-in-a-tube，因此反應液可能含有其它非目標分子之核酸與 P2C 進行非專一性之互補配對，而導致 P2C-MB 之髮夾構型打開。

(A)



(B)

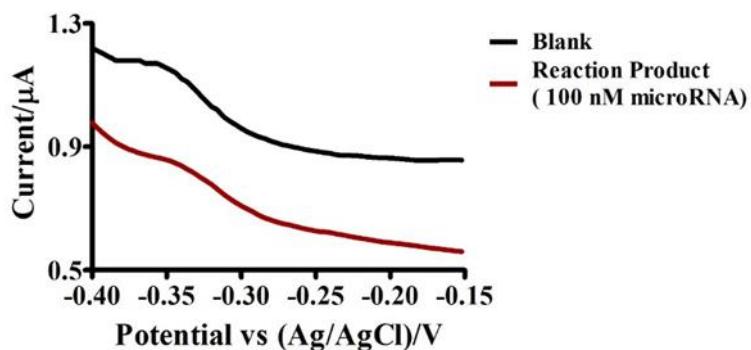


圖 3-40. 電化學感測器應用於目標分子 miR-221 之分析。以方波伏安法 (SWV) 由-0.42 V 往-0.15 V 之方向進行掃描。使用參數：振幅 (Amplitude): 0.025 V，頻率 (Frequency): 15 Hz。黑線為 MB 之起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ ，紅線則為 MB 之最終氧化電流訊號 I_{Final} 。(A). 使用目標分子 miR-221 濃度為 0 時進行實驗全反應所得出之相對應圖譜。(B). 使用目標分子 miR-221 濃度為 100 nM 時進行實驗全反應所得出之相對應圖譜。

之後，我們進一步使用電化學生化感測器應用於不同濃度目標分子 miR-221 (1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 nM) 之分析。以加入不同濃度目標分子 miR-221 之組別產生之相對訊號值除以未加入目標分子 miR-221 時之組別所產生之相對訊號值，取得規劃量值做為後續之分析。



$$\frac{\left(\frac{I_{Final}}{I_{Initial}}\right)_{Sample}}{\left(\frac{I_{Final}}{I_{Initial}}\right)_{Blank}} \times 100\%$$

隨後，將所得之訊號規劃量值與目標分子 miR-221 使用濃度而得出一檢量線 (Calibration curve)，如圖 3-41 所示。藉由圖 3-41 顯示，規劃量值隨著目標分子 miR-221 使用濃度之提高而有下降之趨勢，從而判斷當目標分子 miR-221 使用濃度越高時，能驅動 DNA Nanomachine 產生越多之最終產物 P2，導致越多的 MB 成功遠離電極表面，進而使得氧化電流訊號下降之幅度越大，如圖 3-42 所示。根據標準曲線之公式，我們成功計算出電化學生化感測器之最低偵測極限 (Limit of detection, LOD) 為 9.6 pM。偵測極限之定義為樣品中所含之目標分子可被偵測出之最低濃度或能與空白組進行區分之最低濃度²¹。

$$LOD = Blank's\ mean + 3\ Std$$

此外，我們也將在各個目標分子 miR-221 使用濃度所得出之相對應之訊號規化值進行相對標準偏差之比較。如表 3-5 所示，其相對標準偏差值都小於 5%，從而證實此平台之穩定度。

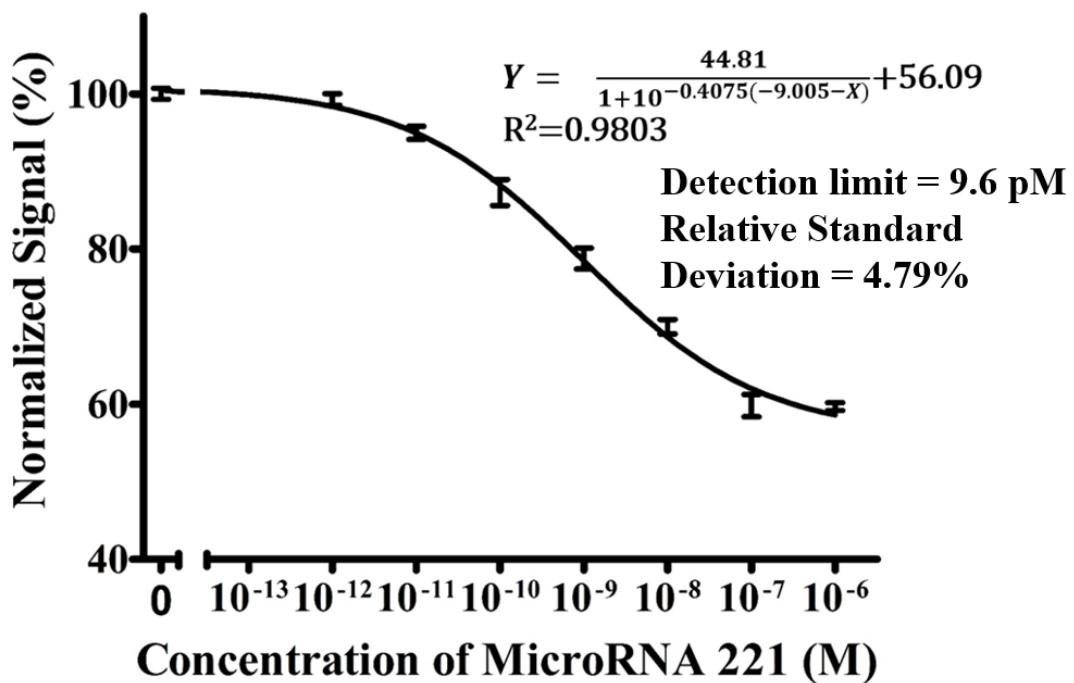


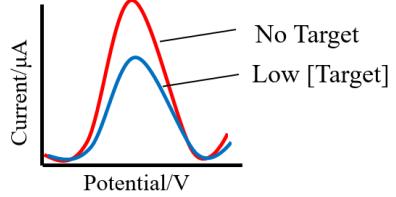
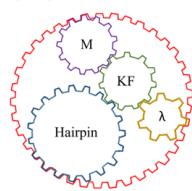
圖 3-41. 電化學生化感測器應用於不同濃度目標分子 miR-221 分析所得之校正曲線。以所得之訊號規化值對目標分子 miR-221 所使用濃度作圖 (n=4)。

Concentration of miR-221 (M)	RSD (%)
10^{-12}	1.52
10^{-11}	1.80
10^{-10}	3.86
10^{-9}	3.45
10^{-8}	2.71
10^{-7}	4.79
10^{-6}	1.69

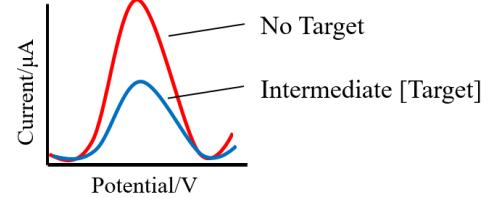
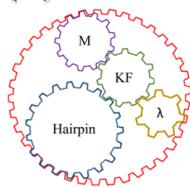
表 3-5. 針對不同濃度之目標分子 miR-221 進行分析所得訊號規化值之相對標準偏差 (n=4)。



(A)



(B)



(C)

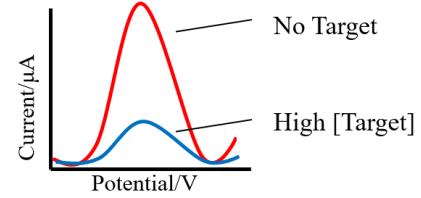
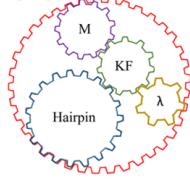


圖 3-42. 目標分子 miR-221 使用濃度對於起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 下降幅度之影響。(A). 使用低濃度之目標分子 miR-221 進行分析；(B). 使用中農濃度之目標分子 miR-221 進行分析；(C). 使用高濃度之目標分子 miR-221 進行分析。

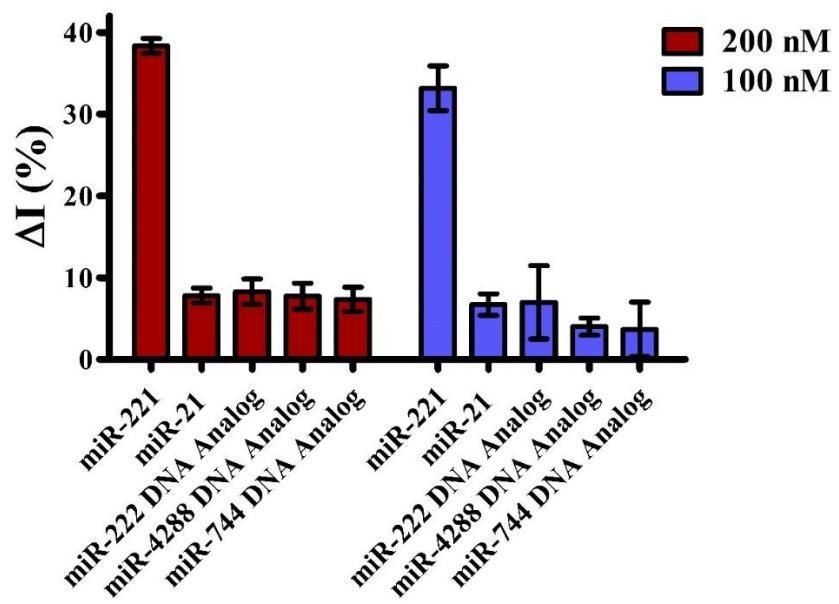


3.11. 電化學生化感測器之選擇性測試

在結果與討論之章節 3-8，我們已經針對 DNA Nanomachine 進行一系列之專一性測試，其中包含受質 H 之專一性測試、KF 之專一性延長測試、λ 之專一性剪切測試與 P2C 之專一性測試，確認 DNANanomachine 只有在目標分子 miR-221 存在之下方能啟動。在本實驗中，我們進一步探討所設計的電化學感測平台是否具有良好之專一性，藉以驗證目標分子 miR-221 存在系統中所產生之 P2 誘導股會使得 MB 之氧化電流訊號有大幅度之改變，而非目標分子所導致之背景電流訊號改變則應與空白組無顯著之差異。在最佳化實驗操作條件下，分別使用濃度為 200 nM 和 100 nM 目標分子 miR-221 和同濃度之非目標分子 (miR-21, miR-222 DNA Analog, miR-4288 DNA Analog, miR-744 DNA Analog) 來驅動 DNA Nanomachine 之運作，並將 DNA Nanomachine 操作完畢後之反應液滴於 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE，於室溫下反應 45 分鐘。 $I_{Initial}$ 與 I_{Final} 分別為與 DNA Nanomachine 混合液反應前後所分別測得之 MB 電化學氧化訊號。以 I_{Final} 除以 $I_{Initial}$ 進而取得相對訊號值 (Relative signal)。我們近一步使用空白組 (Blank) (未添加任何核酸當做分析物) 所得之相對訊號值與實驗組所得之相對訊號值進行相減後，再除以空白組之相對訊號值所得之數值再乘以 100% 用以量化不同濃度之目標分析物 (ΔI)。

$$\Delta I = \frac{Relative\ Signal_{Blank} - Relative\ Signal_{Analyte}}{Relative\ Signal_{Blank}} \times 100\%$$

由圖 3-43 可發現，當所使用之分析物為 200 nM 或 100 nM 目標分子 miR-221 時所獲得之 ΔI 為最高，分別為 38% 和 33%。然而，使用非目標分子所獲得之 ΔI 則落在 -1.88 至 12.64%，約為非目標分子為分析物所得之 ΔI 的四倍，有顯著之差異。上述實驗結果課證明唯有在目標分子 miR-221 存在之下 MB 之氧化電流訊號才會有大幅度下降之趨勢。因此，我們推斷所設計之電化學感測平台能有效地偵測目標分子和所驅動之 DNA Nanomachine 產物。



核酸濃度為 100 nM	Minimum ΔI (%)	Maximum ΔI (%)
miR-221	28.04	37.39
miR-21	4.41	9.06
miR-222 DNA Analog	-1.88	12.64
miR-4288 DNA Analog	1.92	5.27
miR-7244 DNA Analog	-0.85	10.20
核酸濃度為 200 nM	Minimum ΔI (%)	Maximum ΔI (%)
miR-221	35.89	40.05
miR-21	6.01	9.77
miR-222 DNA Analog	5.43	12.29
miR-4288 DNA Analog	2.44	10.83
miR-7244 DNA Analog	4.83	9.95

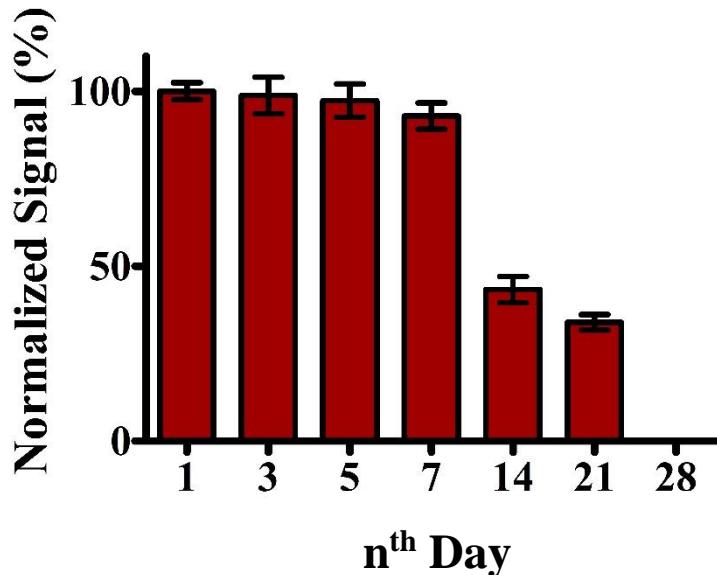
圖 3-43. (A). 電化學生化感測器之選擇性測試。紅色柱狀圖為使用所設計之電化學感測平台針對 200 nM 目標分子和非目標分子進行；藍色柱狀圖則為使用所設計之電化學感測平台針對 200 nM 目標分子和非目標分子進行。 ΔI 為空白組所得之相對訊號值與實驗組所得之相對訊號值進行相減，並除以空白組之相對訊號值再乘以 100%。(B). 各群之 min 和 max 訊號值。

3.12. 儲存天數 (Storage time) 對於氧化電流訊號之影響

即使有大量學術人才和龐大經費都投資於生化感測器之研發，然而目前商業化的生化感測器只有血糖計。為使學術界所研發之生化感測器與產業界進行接軌，生化感測器之保存方式與使用壽命扮演著極其重要之關鍵。故我們於本實驗中探討儲存天數 (Storage time) 對於 MB 氧化電流訊號之影響。我們將經過修飾和改良後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 置於 4⁰C 之環境進行保存，分別在儲存天數為 1、3、5、7、14、21 與 28 天之後將 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 取出進行量測。加入 100 nM 合成之 P2 前後所測得之 MB 氧化電流訊號分別以 $I_{Initial}$ 和 I_{Final} 表示， $I_{Initial}$ 與 I_{Final} 進行相減後之差異值再除以 $I_{Initial}$ 所取得相對訊號值做為規化量值。我們近一步使用天數為 3、5、7、14、21 與 28 天時所得之相對訊號值與第一天製備之電極之反應比較，以獲得相對訊號量值。如圖 3-44 所示，在第七天所測得之相對值仍然保有 92.9%；而在第 14 天和第 21 天所測得之規化量值已掉落至 43.27% 和 33.97%；當保存天數為最後一天（第 28 天）時，於 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 並未發現 MB 之起始氧化電流訊號 $I_{Initial}$ 。造成相對量值隨著儲存天數的增加而下降的兩個推斷原因為：(1). 修飾於 AuNP@PEG@SPCE 工作電極表面上之 P2C-MB 已不能以髮夾之構型穩定固於電極表面。(2). 修飾於 P2C 3' 端之 MB 已被氧化。故我們推斷上述之 4⁰C 低溫保存方法只能讓 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 的保存期限達到 7 天。

$$\text{Relative Signal} = \frac{I_{Initial} - I_{Final}}{I_{Initial}}$$

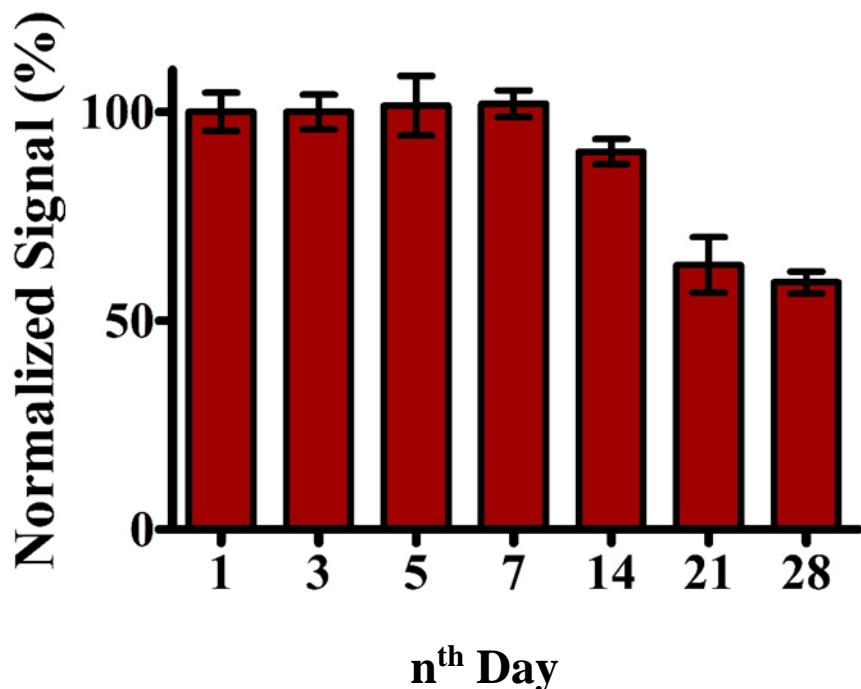
$$\text{Normalized Signal} = \frac{\text{Relative Signal}_{N Days}}{\text{Relative Signal}_{First Day}} \times 100\%$$



Days	Mean (%) ± Standard Deviation
1	100 ± 4.25
3	98.78 ± 9.09
5	97.32 ± 8.26
7	92.90 ± 6.46
14	43.27 ± 6.51
21	33.97 ± 3.82

圖 3-44. (A). 儲存天數對於 MB 氧化電流訊號之影響。於 4 °C 且潮濕之環境進行電極之儲存。規化量值為以第 n 天 (3, 5, 7, 14, 21, 28) 所測得之相對訊號值除以第一天所得之相對訊號值。(B). 各實驗天數所得之平均值 (Mean) 和標準偏差 (Standard deviation)。

為了能使 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 之保存期限延長，因此我們進一步使用氮氣密封充填法 (Nitrogen-filled seal) 之保存方法進行測試。於本實驗中，我們將經過修飾和改良後之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 置於包裝袋內，並充入氮氣以降低包裝容器內之氧氣濃度，最後進行密封並於 4°C 之環境進行保存，分別在儲存天數為 1、3、5、7、14、21 與 28 天之後將 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 取出進行量測。計算方式如同前者 4°C 之保存方式。如圖 3-45 顯示，在第 14 天所測得之相對量值仍然保有 90.45%；而在第 21 天和第 28 天所測得之相對量值已掉落至 63.32% 和 59.14%。故此種氮氣密封充填法之保存方式可將 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 之保存期限延長至 14 天，與單純 4°C 低溫保存之方式相比之下，增加了 7 天之保存期限。



Days	Mean (%) \pm Standard Deviation
1	100 ± 7.94
3	99.93 ± 7.27
5	101.44 ± 12.43
7	101.9 ± 5.53
14	90.45 ± 5.14
21	63.32 ± 11.47
28	59.14 ± 4.52

圖 3-45. (A). 儲存天數對於 MB 氧化電流訊號之影響。以氮氣密封法進行包裝後，並置於 4 °C 之環境進行電極之儲存。規化量值為以第 n 天 (3, 5, 7, 14, 21, 28) 所測得之相對訊號值除以第一天所得之相對訊號值。(B). 各實驗天數所得之平均值和標準偏差。

3.13. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較

於本實驗中，同日 (Intraday) 之定義為於同一天修飾一批 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 並於同一天進行電極之間氧化電流訊號之比較；而隔日 (Interday) 則為將不同天修飾之 P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE 於當天修飾完後分別進行量測所得之氧化電流訊號進行比較。為了確保系統之穩定性，我們將所設計之電化學生化感測器分別以同日及隔日之方式進行不同濃度目標分子 miR-221 之分析。加入 100 nM 合成之 P2 前後所測得之 MB 氧化電流訊號分別以 $I_{Initial}$ 和 I_{Final} 表示，以 I_{Final} 除以 $I_{Initial}$ 進而取得相對訊號值。以加入不同濃度目標分子 miR-221 之組別產生之相對訊號值除以未加入目標分子 miR-221 時之組別所產生之相對訊號值，取得規劃量值。將所得之規化值代入圖 3-41 校正曲線之公式進而推算出所對應之目標分子 miR-221 濃度，如圖 3-46 所示。準確度 (Accuracy) 為平均數與所得之數據在每次測量間之差距。當它們彼此間數值差距越大，代表其準確度越低；而精密度 (Precision) 則為個別所求得之數據之間的密集程度，代表實驗的再現性和數據之可靠性。當多次求得之數據彼此之間差異很小，代表精密度高，如圖 3-47 所示。於本實驗中，準確度與精密度之公式分別為 obtained concentration 除以 nominal concentration 和 obtained concentration 的標準偏差 (Standard Deviation, SD) 除以其平均值 (Mean)。藉由表 3-6 可得知，無論是同日或隔日，其準確度和精密度分別位於 98~102% 和 0~10% 之區間，從而證實所設計之電化學偵測平台具有絕佳之準確度和不錯之精密度。

$$Accuracy = \frac{Obtained\ Concentration}{Nominal\ Concentration}$$

$$Precision = \frac{Standard\ Deviation_{Obtained\ Concentration}}{Mean_{Obtained\ Concentration}} \times 100\%$$

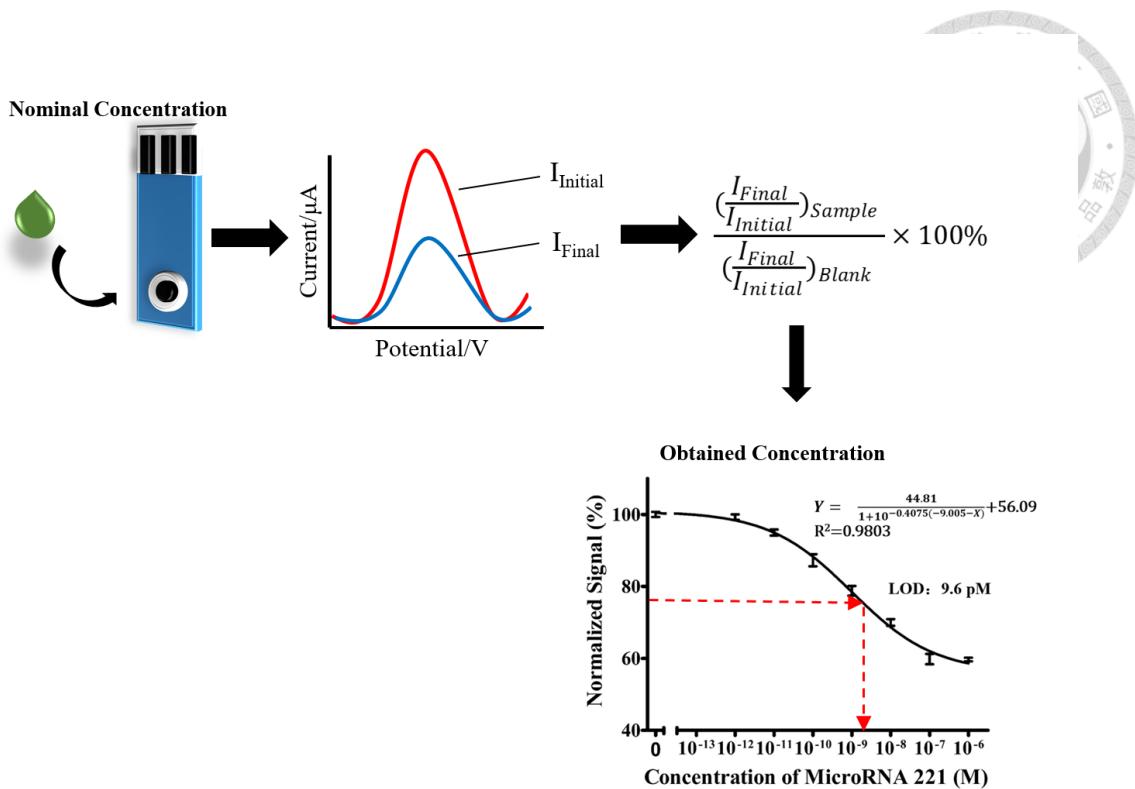


圖 3-46. 實驗之操作流程。將 DNA Nanomachine 操作完畢後之反應液滴於工作電極表面以得出相對訊號值。相對訊號值為 I_{Final} 除以 $I_{Initial}$ 。將計算所得之規化量值代入標準曲線之公式求得所相對應之目標分子 miR-221 濃度。



圖 3-47. 準確度和精密度之示意圖。



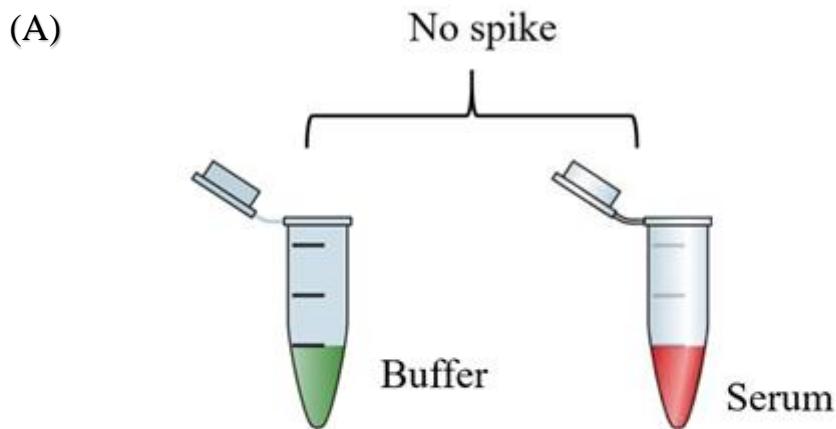
Nominal Concentration (10^X M)	Obtained Concentration (10^X M)	Precision (%)	Accuracy (%)
Intraday			
X= -7	X= -6.92 ± 0.396	5.72	98.86
X= -8	X= -8.10 ± 0.188	2.32	101.25
X= -9	X= -8.96 ± 0.271	3.02	99.56
Interday			
X= -7	X= -7.047 ± 0.703	10	100.67
X= -8	X= -8.16 ± 0.003	0.39	102
X= -9	X= -9.00 ± 0.255	2.6	100.01

表 3-6. 同日與隔日目標分子 miR-221 濃度準確度和精密度之比較 (n=3)。準確度為 obtained concentration 除以 nominal concentration；精密度則為 obtained concentration 的標準偏差 (Standard Deviation, SD) 除以其平均值 (Mean)。

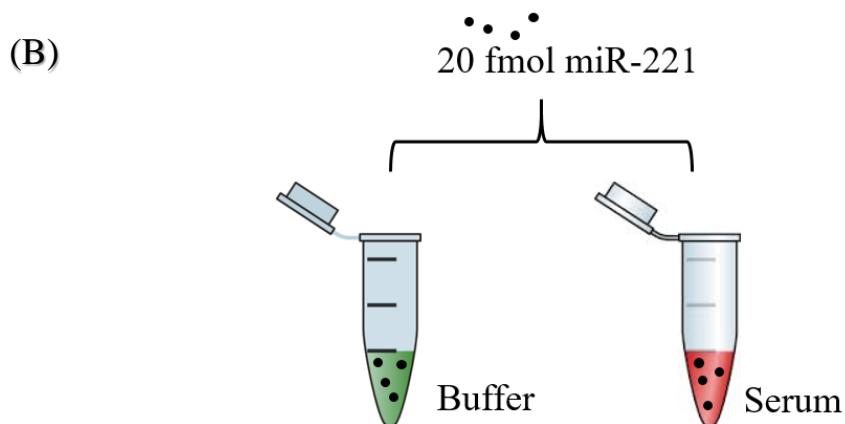
3.14. 血清 (Serum) 中目標分子 miR-221 之回收率 (Recovery rate)

血清 (Serum) 為血漿 (Plasma) 移除纖維蛋白 (Fibrinogen) 後所剩下之混合物，其成分包含各種多肽 (Peptides)、白蛋白 (Albumin)、IgG、IgA、生長因子等。血清內之主要組成分 BSA 會與許多物質進行非專一性之結合，而抗原則會影響特定抗體之純化 (Purification)。由於血清為複雜之混合物，因此我們探討從血清內萃取所得之混合液是否會對電極造成基質效應 (Matrix effect) 和目標分子 miR-221 注射入 (Spike) 血清後所得之回收率。本實驗分為兩個部分進行。於第一部分之實驗，我們以核酸萃取試劑組 (Extraction kit) 進行血清之萃取 (Extraction)，並將其混合液用以啟動 DNA Nanomachine。對照組則為使用緩衝溶液 (1×Cutsmart Buffer) 進行 DNA Nanomachine 之驅動。 $I_{Initial}$ 與 I_{Final} 分別為經過 DNA Nanomachine 反應液處理前後所測得之 MB 電化學氧化訊號。以 I_{Final} 除以 $I_{Initial}$ 進而取得相對訊號值。我們進一步以血清所得之相對訊號值除以緩衝溶液所得之相對訊號值。由計算結果圖 3-48A 可發現其值為 99.99%，故可判斷血清內所含的干擾物質 (Interfering species) 或非目標核酸分子是無法順利驅動 DNA Nanomachine 之運作，因此所測得之相對訊號值趨與對照組無顯著之差異。於第二部分之實驗，我們將 20 fmol 的目標分子 miR-221 分別注射入緩衝溶液和血清。隨後，將上述緩衝溶液和萃取後之血清進行 DNA Nanomachine 之驅動。計算方式與第一部分實驗一樣。回收率為血清所得之相對訊號值除以緩衝溶液所得之相對訊號值。藉由計算結果圖 3-48B 所得之回收率為 105.39%，故可判斷所設計之電化學偵測平台具有高敏感性和低基質干擾之特色。

$$Recovery\ Rate = \frac{Relative\ Signal_{20\ fmol\ miR-221}}{Relative\ Signal_{Blank}} \times 100\%$$



$$\frac{\text{Signal}_{\text{Serum}}}{\text{Signal}_{\text{Buffer}}} = 99.99 \pm 3.35 (\%)$$



$$\text{Recovery rate} = 105.39 \pm 1.76 (\%)$$

圖 3-48. (A). 血清內之干擾物質與非目標核酸分子對於氧化電流訊號之影響。
(B). 血清中目標分子 miR-221 之回收率。

第四章 結論



本研究涉及設計與發展偵測胰臟癌 (Pancreatic cancer) 相關生物標記分子 miR-221 之電化學分子感測平台。胰臟癌是極為嚴重，且最具侵略性的一種惡性腫瘤 (Tumor)，分別為台灣男性和女性十大死因中的第 8 名和第 10 名。目前常做為胰臟癌之診斷工具有腹部超音波 (Abdominal ultrasonography)，電腦斷層掃描 (Computer Tomography, CT) 和逆行性膽道胰管內視鏡攝影 (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)。然而上述診斷工具都存在著一定的限制性。腹部超音波容易受到胰臟前方大量脂肪的干擾而使得偵測大受限制；CT 常無法偵測小於 2 cm 之腫瘤；由於 ERCP 必須將內視鏡從口腔置入十二指腸以進行胰臟癌之檢測，因此為高度侵入性之偵測方法。因此，我們期望開發具有高度專一性與敏感性且快速特色之電化學生化感測平台，以較低侵入性 (Minimally invasive) 之血液樣品來針對胰臟癌相關之生物標記分子 miR-221 進行偵測。

本研究所研發的電化學生化感測器建立於目標分子 miR-221 的存在來啟動 DNA Nanomachine 之運作：Klenow Fragment (KF) 輔助目標分子之循環反應 (KF-assisted Target Recycling) 與 λ 外切酶剪切反應 (Lambda Exonuclease Digestion)。藉由實驗結果顯示，本研究所設計之 DNA Nanomachine 必須具備四個主要元件 (H, miR-221, KF, λ) 之下，方能被驅動，進而產生最終產物 P2。當 P2 當做訊號誘導股引入到電極上時，成功與修飾於工作電極表面之 P2C-MB 進行互補雜合反應，使標定在 P2C 3' 端之 MB 分子遠離工作電極表面，MB 氧化還原電流的訊號 I_{Final} 因而下降。為了優化電化學生化感測器的表現，一系列之優化實驗 (受質 H 之濃度，反應緩衝液之選擇，酵素使用濃度，阻隔劑採用種類，鍍金時間，P2C-MB 固定化濃度) 皆已進行最佳化之測試。

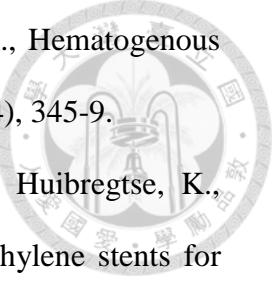
偵測平台於最佳化之操作條件進行測試後，確定其 LOD 為 9.6 pM，因此可判斷於本論文中所設計之以酵素驅動型核酸分子奈米機器為放大策略之電化學生化感測器成功應用於胰臟癌相關之生物標記分子 miR-221 的偵測。

最後，我們針對感測試片 (P2C-MB@AuNP@PEG@SPCE) 之保質期 (Shelf life) 長短進行測試，結果發現低溫保存之保質期僅 7 天。若以氮氣密封充填保存感測試片則可將其保存期限延長至 14 天。我們期望所研發之生化感測器能與產業進行接軌而成功成為商業化之產品，並做為診斷胰臟癌之液態切片樣品的感測平台。

第五章 參考文獻



1. Bardeesy, N.; Sharpless, N. E.; DePinho, R. A.; Merlino, G., The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model. *Semin Cancer Biol* **2001**, *11* (3), 201-18.
2. Elayat, A. A.; el-Naggar, M. M.; Tahir, M., An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *Journal of anatomy* **1995**, *186* (Pt 3), 629-37.
3. Seufferlein, T.; Bachet, J. B.; Van Cutsem, E.; Rougier, P., Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2012**, *23 Suppl 7*, vii33-40.
4. Edge, S. B.; Compton, C. C., The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* **2010**, *17* (6), 1471-4.
5. Hidalgo, M., Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* **2010**, *362* (17), 1605-17.
6. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **2013**, *63* (1), 11-30.
7. Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M., Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* **2014**, *74* (11), 2913-21.
8. Keane, M. G.; Horsfall, L.; Rait, G.; Pereira, S. P., A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open* **2014**, *4* (11), e005720.

- 
9. Kamisawa, T.; Isawa, T.; Koike, M.; Tsuruta, K.; Okamoto, A., Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas* **1995**, *11* (4), 345-9.
 10. Davids, P. H.; Groen, A. K.; Rauws, E. A.; Tytgat, G. N.; Huibregtse, K., Randomised trial of self-expanding metal stents versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction. *Lancet* **1992**, *340* (8834-8835), 1488-92.
 11. Iodice, S.; Gandini, S.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B., Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* **2008**, *393* (4), 535-45.
 12. Permert, J.; Ihse, I.; Jorfeldt, L.; Vonschenck, H.; Arnqvist, H. J.; Larsson, J., Pancreatic-Cancer Is Associated with Impaired Glucose-Metabolism. *Eur J Surg* **1993**, *159* (2), 101-107.
 13. Lin, G.; Zeng, Z.; Wang, X.; Wu, Z.; Wang, J.; Wang, C.; Sun, Q.; Chen, Y.; Quan, H., Cholecystectomy and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control* **2012**, *23* (1), 59-67.
 14. Gong, Y.; Zhou, Q.; Zhou, Y.; Lin, Q.; Zeng, B.; Chen, R.; Li, Z., Gastrectomy and risk of pancreatic cancer: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control* **2012**, *23* (8), 1279-88.
 15. DiMagno, E. P.; Reber, H. A.; Tempero, M. A., AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* **1999**, *117* (6), 1464-84.
 16. Rickes, S.; Unkrodt, K.; Neye, H.; Ocran, K. W.; Wermke, W., Differentiation of pancreatic tumours by conventional ultrasound, unenhanced and echo-enhanced power Doppler sonography. *Scand J Gastroenterol* **2002**, *37* (11), 1313-20.
 17. Hessel, S. J.; Siegelman, S. S.; McNeil, B. J.; Sanders, R.; Adams, D. F.; Alderson, P. O.; Finberg, H. J.; Abrams, H. L., A prospective evaluation of computed

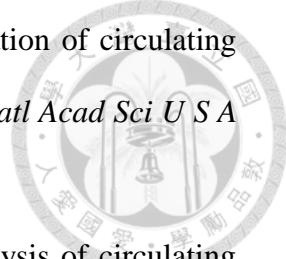
- tomography and ultrasound of the pancreas. *Radiology* **1982**, *143* (1), 129-33.
18. Niederau, C.; Grendell, J. H., Diagnosis of pancreatic carcinoma. Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas* **1992**, *7* (1), 66-86.
19. Solofoharivelox, M. C.; van der Walt, A. P.; Stephan, D.; Burger, J. T.; Murray, S. L., MicroRNAs in fruit trees: discovery, diversity and future research directions. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **2014**, *16* (5), 856-65.
20. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116* (2), 281-97.
21. Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Meyer, J.; Borkhardt, A.; Tuschl, T., New microRNAs from mouse and human. *RNA* **2003**, *9* (2), 175-9.
22. Hwang, H. W.; Mendell, J. T., MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British journal of cancer* **2006**, *94* (6), 776-80.
23. Brennecke, J.; Hipfner, D. R.; Stark, A.; Russell, R. B.; Cohen, S. M., bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **2003**, *113* (1), 25-36.
24. Poy, M. N.; Eliasson, L.; Krutzfeldt, J.; Kuwajima, S.; Ma, X.; Macdonald, P. E.; Pfeffer, S.; Tuschl, T.; Rajewsky, N.; Rorsman, P.; Stoffel, M., A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* **2004**, *432* (7014), 226-30.
25. Iorio, M. V.; Croce, C. M., MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* **2012**, *4* (3), 143-59.
26. Lu, J.; Getz, G.; Miska, E. A.; Alvarez-Saavedra, E.; Lamb, J.; Peck, D.; Sweet-Cordero, A.; Ebert, B. L.; Mak, R. H.; Ferrando, A. A.; Downing, J. R.; Jacks, T.; Horvitz, H. R.; Golub, T. R., MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **2005**, *435* (7043), 834-8.
27. Pandey, A. K.; Agarwal, P.; Kaur, K.; Datta, M., MicroRNAs in diabetes: tiny

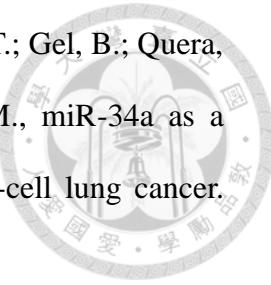
- players in big disease. *Cell Physiol Biochem* **2009**, *23* (4-6), 221-32.
28. Davis, T. H.; Cuellar, T. L.; Koch, S. M.; Barker, A. J.; Harfe, B. D.; McManus, M. T.; Ullian, E. M., Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* **2008**, *28* (17), 4322-30.
29. Quiat, D.; Olson, E. N., MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest* **2013**, *123* (1), 11-8.
30. Small, E. M.; Frost, R. J.; Olson, E. N., MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* **2010**, *121* (8), 1022-32.
31. De Planell-Saguer, M.; Rodicio, M. C., Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal Chim Acta* **2011**, *699* (2), 134-52.
32. Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K. H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **2004**, *23* (20), 4051-60.
33. Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Radmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **2003**, *425* (6956), 415-9.
34. Murchison, E. P.; Hannon, G. J., miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* **2004**, *16* (3), 223-9.
35. Lund, E.; Dahlberg, J. E., Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2006**, *71*, 59-66.
36. Garzon, R.; Marcucci, G.; Croce, C. M., Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (10), 775-89.
37. Calin, G. A.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Negrini, M.; Bullrich, F.; Croce, C. M., Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci*

U S A **2002**, *99* (24), 15524-9.

38. Garzon, R.; Calin, G. A.; Croce, C. M., MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* **2009**, *60*, 167-79.
39. Volinia, S.; Calin, G. A.; Liu, C. G.; Ambs, S.; Cimmino, A.; Petrocca, F.; Visone, R.; Iorio, M.; Roldo, C.; Ferracin, M.; Prueitt, R. L.; Yanaihara, N.; Lanza, G.; Scarpa, A.; Vecchione, A.; Negrini, M.; Harris, C. C.; Croce, C. M., A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (7), 2257-61.
40. Paranjape, T.; Slack, F. J.; Weidhaas, J. B., MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* **2009**, *58* (11), 1546-54.
41. Pfeffer, S. R.; Yang, C. H.; Pfeffer, L. M., The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res* **2015**, *76* (6), 270-7.
42. Liu, Y.; Yin, B.; Zhang, C.; Zhou, L.; Fan, J., Hsa-let-7a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma cell lines by targeting c-myc. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *417* (1), 371-5.
43. Zhang, S. Y.; Xie, J. Y.; Liang, H. W.; Chen, X.; Zhang, C. Y., The Origin, Function and Diagnostic Potential of Extracellular microRNA in Human Body Fluids. *Prog Biochem Biophys* **2013**, *40* (7), 603-616.
44. Gibbings, D. J.; Ciaudo, C.; Erhardt, M.; Voinnet, O., Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **2009**, *11* (9), 1143-9.
45. Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J. J.; Lotvall, J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* **2007**, *9* (6), 654-U72.
46. Arroyo, J. D.; Chevillet, J. R.; Kroh, E. M.; Ruf, I. K.; Pritchard, C. C.; Gibson, D. F.; Mitchell, P. S.; Bennett, C. F.; Pogosova-Agadjanyan, E. L.; Stirewalt, D. L.;

Tait, J. F.; Tewari, M., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (12), 5003-8.

- 
47. Kroh, E. M.; Parkin, R. K.; Mitchell, P. S.; Tewari, M., Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) (vol 50, pg 298, 2010). *Methods* **2010**, *52* (3), 268-268.
 48. Mraz, M.; Malinova, K.; Mayer, J.; Pospisilova, S., MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Bioph Res Co* **2009**, *390* (1), 1-4.
 49. Sicard, F.; Gayral, M.; Lulka, H.; Buscail, L.; Cordelier, P., Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther* **2013**, *21* (5), 986-94.
 50. Cai, B.; An, Y.; Lv, N.; Chen, J.; Tu, M.; Sun, J.; Wu, P.; Wei, J.; Jiang, K.; Miao, Y., miRNA-181b increases the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine in vitro and in nude mice by targeting BCL-2. *Oncol Rep* **2013**, *29* (5), 1769-76.
 51. Kawaguchi, T.; Komatsu, S.; Ichikawa, D.; Morimura, R.; Tsujiura, M.; Konishi, H.; Takeshita, H.; Nagata, H.; Arita, T.; Hirajima, S.; Shiozaki, A.; Ikoma, H.; Okamoto, K.; Ochiai, T.; Taniguchi, H.; Otsuji, E., Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *British journal of cancer* **2013**, *108* (2), 361-9.
 52. Wang, W. S.; Liu, L. X.; Li, G. P.; Chen, Y.; Li, C. Y.; Jin, D. Y.; Wang, X. L., Combined serum CA19-9 and miR-27a-3p in peripheral blood mononuclear cells to diagnose pancreatic cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **2013**, *6* (4), 331-8.
 53. Huang, J. S.; Egger, M. E.; Grizzle, W. E.; McNally, L. R., MicroRNA-100 regulates IGF1-receptor expression in metastatic pancreatic cancer cells. *Biotech Histochem* **2013**, *88* (7), 397-402.



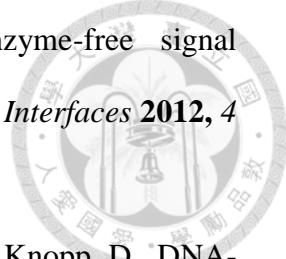
54. Gallardo, E.; Navarro, A.; Vinolas, N.; Marrades, R. M.; Diaz, T.; Gel, B.; Quera, A.; Bandres, E.; Garcia-Foncillas, J.; Ramirez, J.; Monzo, M., miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* **2009**, *30* (11), 1903-1909.
55. Wang, P.; Chen, L.; Zhang, J.; Chen, H.; Fan, J.; Wang, K.; Luo, J.; Chen, Z.; Meng, Z.; Liu, L., Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* **2014**, *33* (4), 514-24.
56. Zhao, W. G.; Yu, S. N.; Lu, Z. H.; Ma, Y. H.; Gu, Y. M.; Chen, J., The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (10), 1726-1733.
57. Delpu, Y.; Lulka, H.; Sicard, F.; Saint-Laurent, N.; Lopez, F.; Hanoun, N.; Buscaill, L.; Cordelier, P.; Torrisani, J., The rescue of miR-148a expression in pancreatic cancer: an inappropriate therapeutic tool. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e55513.
58. Druz, A.; Chen, Y. C.; Guha, R.; Betenbaugh, M.; Martin, S. E.; Shiloach, J., Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA Biol* **2013**, *10* (2), 287-300.
59. Hou, B.; Jian, Z.; Chen, S.; Ou, Y.; Li, S.; Ou, J., [Expression of miR-216a in pancreatic cancer and its clinical significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2012**, *32* (11), 1628-31.
60. Lee, E. J.; Gusev, Y.; Jiang, J.; Nuovo, G. J.; Lerner, M. R.; Frankel, W. L.; Morgan, D. L.; Postier, R. G.; Brackett, D. J.; Schmittgen, T. D., Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* **2007**, *120* (5), 1046-54.
61. Pritchard, C. C.; Cheng, H. H.; Tewari, M., MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* **2012**, *13* (5), 358-369.

62. Varallyay, E.; Burgyan, J.; Havelda, Z., MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* **2008**, *3* (2), 190-196.
63. Liu, C. G.; Calin, G. A.; Meloon, B.; Gamliel, N.; Sevignani, C.; Ferracin, M.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Zupo, S.; Dono, M.; Alder, H.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C. M., An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (26), 9740-4.
64. Speicher, M. R.; Carter, N. P., The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **2005**, *6* (10), 782-792.
65. Chen, C.; Ridzon, D. A.; Broomer, A. J.; Zhou, Z.; Lee, D. H.; Nguyen, J. T.; Barbisin, M.; Xu, N. L.; Mahuvakar, V. R.; Andersen, M. R.; Lao, K. Q.; Livak, K. J.; Guegler, K. J., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (20), e179.
66. Shi, R.; Chiang, V. L., Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* **2005**, *39* (4), 519-25.
67. Seeman, N. C., At the crossroads of chemistry, biology, and materials: Structural DNA nanotechnology. *Chem Biol* **2003**, *10* (12), 1151-1159.
68. Zhang, D. Y.; Seelig, G., Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat Chem* **2011**, *3* (2), 103-113.
69. Zhang, D. Y.; Winfree, E., Control of DNA Strand Displacement Kinetics Using Toehold Exchange. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (47), 17303-17314.
70. Connolly, A. R.; Trau, M., Rapid DNA detection by beacon-assisted detection amplification. *Nat Protoc* **2011**, *6* (6), 772-8.
71. Little, M. C.; Andrews, J.; Moore, R.; Bustos, S.; Jones, L.; Embres, C.; Durmowicz, G.; Harris, J.; Berger, D.; Yanson, K.; Rostkowski, C.; Yursis, D.; Price, J.; Fort, T.; Walters, A.; Collis, M.; Llorin, O.; Wood, J.; Failing, F.; O'Keefe,

- C.; Scrivens, B.; Pope, B.; Hansen, T.; Marino, K.; Williams, K.; et al., Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clin Chem* **1999**, *45* (6 Pt 1), 777-84.
72. Guo, Q. P.; Yang, X. H.; Wang, K. M.; Tan, W. H.; Li, W.; Tang, H. X.; Li, H. M., Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37* (3).
73. Viasnoff, V.; Meller, A.; Isambert, H., DNA nanomechanical switches under folding kinetics control. *Nano Lett* **2006**, *6* (1), 101-4.
74. Yang, X.; Tang, Y.; Mason, S. D.; Chen, J.; Li, F., Enzyme-Powered Three-Dimensional DNA Nanomachine for DNA Walking, Payload Release, and Biosensing. *ACS Nano* **2016**, *10* (2), 2324-30.
75. Johne, R.; Muller, H.; Rector, A.; van Ranst, M.; Stevens, H., Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol* **2009**, *17* (5), 205-11.
76. Hellyer, T. J.; Nadeau, J. G., Strand displacement amplification: a versatile tool for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **2004**, *4* (2), 251-61.
77. Jeong, Y. J.; Park, K.; Kim, D. E., Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cell Mol Life Sci* **2009**, *66* (20), 3325-36.
78. Linck, L.; Resch-Genger, U., Identification of efficient fluorophores for the direct labeling of DNA via rolling circle amplification (RCA) polymerase phi29. *Eur J Med Chem* **2010**, *45* (12), 5561-6.
79. Yan, L.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Gamson, A. S.; Roembke, B. T.; Nakayama, S.; Sintim, H. O., Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* **2014**, *10* (5), 970-1003.

80. Steain, M. C.; Dwyer, D. E.; Hurt, A. C.; Kol, C.; Saksena, N. K.; Cunningham, A. L.; Wang, B., Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification. *Antivir Res* **2009**, *84* (3), 242-248.
81. Henriksson, S.; Blomstrom, A. L.; Fuxler, L.; Fossum, C.; Berg, M.; Nilsson, M., Development of an in situ assay for simultaneous detection of the genomic and replicative form of PCV2 using padlock probes and rolling circle amplification. *Virol J* **2011**, *8*.
82. Walker, G. T.; Little, M. C.; Nadeau, J. G.; Shank, D. D., Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89* (1), 392-6.
83. Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H., Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep* **2004**, *5* (8), 795-800.
84. Tijero, M.; Diez-Ahedo, R.; Benito-Lopez, F.; Basabe-Desmonts, L.; Castro-Lopez, V.; Valero, A., Biomolecule storage on non-modified thermoplastic microfluidic chip by ink-jet printing of ionogels. *Biomicrofluidics* **2015**, *9* (4), 044124.
85. Dirks, R. M.; Pierce, N. A., Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (43), 15275-8.
86. Seelig, G.; Soloveichik, D.; Zhang, D. Y.; Winfree, E., Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science* **2006**, *314* (5805), 1585-8.
87. Chen, Y.; Xu, J.; Su, J.; Xiang, Y.; Yuan, R.; Chai, Y. Q., In Situ Hybridization Chain Reaction Amplification for Universal and Highly Sensitive Electrochemiluminescent Detection of DNA. *Anal Chem* **2012**, *84* (18), 7750-7755.
88. Yang, L.; Liu, C.; Ren, W.; Li, Z., Graphene surface-anchored fluorescence sensor

for sensitive detection of microRNA coupled with enzyme-free signal amplification of hybridization chain reaction. *ACS Appl Mater Interfaces* **2012**, *4* (12), 6450-3.

- 
89. Zhang, B.; Liu, B. Q.; Tang, D. P.; Niessner, R.; Chen, G. N.; Knopp, D., DNA-Based Hybridization Chain Reaction for Amplified Bioelectronic Signal and Ultrasensitive Detection of Proteins. *Anal Chem* **2012**, *84* (12), 5392-5399.
 90. Gerasimova, Y. V.; Kolpashchikov, D. M., Enzyme-assisted target recycling (EATR) for nucleic acid detection. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (17), 6405-38.
 91. Bi, S.; Cui, Y.; Li, L., Dumbbell probe-mediated cascade isothermal amplification: a novel strategy for label-free detection of microRNAs and its application to real sample assay. *Anal Chim Acta* **2013**, *760*, 69-74.
 92. Wei, F.; Wang, J.; Liao, W.; Zimmermann, B. G.; Wong, D. T.; Ho, C. M., Electrochemical detection of low-copy number salivary RNA based on specific signal amplification with a hairpin probe. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (11), e65.
 93. Kong, R. M.; Zhang, X. B.; Zhang, L. L.; Huang, Y.; Lu, D. Q.; Tan, W.; Shen, G. L.; Yu, R. Q., Molecular beacon-based junction probes for efficient detection of nucleic acids via a true target-triggered enzymatic recycling amplification. *Anal Chem* **2011**, *83* (1), 14-7.
 94. Zou, B.; Ma, Y.; Wu, H.; Zhou, G., Ultrasensitive DNA detection by cascade enzymatic signal amplification based on Afu flap endonuclease coupled with nicking endonuclease. *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (32), 7395-8.
 95. Yin, B. C.; Liu, Y. Q.; Ye, B. C., Sensitive detection of microRNA in complex biological samples via enzymatic signal amplification using DNA polymerase coupled with nicking endonuclease. *Anal Chem* **2013**, *85* (23), 11487-93.
 96. Xu, H.; Wang, L.; Ye, H.; Yu, L.; Zhu, X.; Lin, Z.; Wu, G.; Li, X.; Liu, X.; Chen, G., An ultrasensitive electrochemical impedance sensor for a special BRCA1

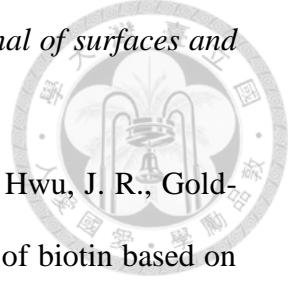
breast cancer gene sequence based on lambda exonuclease assisted target recycling amplification. *Chem Commun (Camb)* **2012**.



97. Turner, A. P., Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (8), 3184-96.
98. Clark, L. C., Jr.; Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* **1962**, *102*, 29-45.
99. Cagnin, S.; Caraballo, M.; Guiducci, C.; Martini, P.; Ross, M.; Santaana, M.; Danley, D.; West, T.; Lanfranchi, G., Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors (Basel)* **2009**, *9* (4), 3122-48.
100. Rodriguez-Delgado, M. M.; Aleman-Nava, G. S.; Rodriguez-Delgado, J. M.; Dieck-Assad, G.; Martinez-Chapa, S. O.; Barcelo, D.; Parra, R., Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trac-Trend Anal Chem* **2015**, *74*, 21-45.
101. Marques, L. P.; Cavaco, I.; Pinheiro, J. P.; Ribeiro, V.; Ferreira, G. N., Electrochemical DNA sensor for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clin Chem Lab Med* **2003**, *41* (4), 475-81.
102. Lai, R. Y.; Walker, B.; Stormberg, K.; Zaitouna, A. J.; Yang, W., Electrochemical techniques for characterization of stem-loop probe and linear probe-based DNA sensors. *Methods* **2013**, *64* (3), 267-75.
103. Yu, Z. G.; Lai, R. Y., Effect of signaling probe conformation on sensor performance of a displacement-based electrochemical DNA sensor. *Anal Chem* **2013**, *85* (6), 3340-6.
104. Derbyshire, V.; Freemont, P. S.; Sanderson, M. R.; Beese, L.; Friedman, J. M.; Joyce, C. M.; Steitz, T. A., Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science* **1988**, *240* (4849), 199-201.

105. Mitsis, P. G.; Kwagh, J. G., Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA. *Nucleic Acids Res* **1999**, 27 (15), 3057-63.
106. Daniel, R. M.; Peterson, M. E.; Danson, M. J.; Price, N. C.; Kelly, S. M.; Monk, C. R.; Weinberg, C. S.; Oudshoorn, M. L.; Lee, C. K., The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochem J* **2009**, 425 (2), 353-60.
107. Mullis, K. B.; Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **1987**, 155, 335-50.
108. Dirks, R. M.; Bois, J. S.; Schaeffer, J. M.; Winfree, E.; Pierce, N. A., Thermodynamic analysis of interacting nucleic acid strands. *Siam Rev* **2007**, 49 (1), 65-88.
109. Zadeh, J. N.; Steenberg, C. D.; Bois, J. S.; Wolfe, B. R.; Pierce, M. B.; Khan, A. R.; Dirks, R. M.; Pierce, N. A., NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *J Comput Chem* **2011**, 32 (1), 170-3.
110. Zuker, M., Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **2003**, 31 (13), 3406-15.
111. Dragan, A. I.; Pavlovic, R.; McGivney, J. B.; Casas-Finet, J. R.; Bishop, E. S.; Strouse, R. J.; Schenerman, M. A.; Geddes, C. D., SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc* **2012**, 22 (4), 1189-99.
112. Jou, A. F. J.; Chen, Y. J.; Li, Y.; Chang, Y. F.; Lee, J. J.; Liao, A. T.; Ho, J. A. A., Target-Triggered, Dual Amplification Strategy for Sensitive Electrochemical Detection of a Lymphoma-associated MicroRNA. *Electrochim Acta* **2017**, 236, 190-197.
113. Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S., miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **2011**, 39 (Database issue), D152-7.
114. He, H. X.; Zhang, H.; Li, Q. G.; Zhu, T.; Li, S. F. Y.; Liu, Z. F., Fabrication of designed architectures of Au nanoparticles on solid substrate with printed self-

assembled monolayers as templates. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2000**, *16* (8), 3846-3851.

- 
115. Ho, J. A.; Chiu, J. K.; Hong, J. C.; Lin, C. C.; Hwang, K. C.; Hwu, J. R., Gold-nanostructured immunosensor for the electrochemical sensing of biotin based on liposomal competitive assay. *J Nanosci Nanotechnol* **2009**, *9* (4), 2324-9.
116. Ricci, F.; Lai, R. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Sumner, J. J., Effect of molecular crowding on the response of an electrochemical DNA sensor. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23* (12), 6827-34.
117. Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J., Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal Chem* **1998**, *70* (22), 4670-7.
118. Herne, T. M.; Tarlov, M. J., Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J Am Chem Soc* **1997**, *119* (38), 8916-8920.