國立臺灣大學生物資源暨農學院生物機電工程學系

碩士論文

Department of Biomechatronics Engineering
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University

Master Thesis

用於偵測生物標記物之電容式生物感測器開發

Capacitive Biosensor for Detecting Protein Biomarkers

蔡佩珈

Pei-Chia Tsai

指導教授：鄭宗記 博士

Advisor: Tzong-Jih Cheng, Ph.D.

中華民國 112 年 6 月

June, 2023

doi:10.6342/NTU202301818

致謝

在這兩年的研究時光要感謝的人跟際遇數不盡。首先，我要感謝我的指導教授，不管研究上或是處事上都給予了我寶貴的指導和建議，接納來自不同領域的我，並且在我遇到困難時給予我方向，讓我順利完成我的碩士學業。同時我也要感謝108實驗室的同學和學長以及其他 Biolan 的大家，在各自忙碌的就學階段給了我許多啟發跟幫助，搭造了溫暖的實驗環境讓我在實驗的路上不孤獨。

再來，我也要感謝我的家人讓我可以專心在課業上努力，以及我大學時期開始一起奮鬥且踏入台大校園的同學們，是彼此心靈的避風港，互相取暖。此外，非常感謝的是大學實習時候的主管，時常給予生化實驗藥品上及耗材的support，同時也是我面對困難以及挫折時候的擺渡人，適當的給予我滿滿的心靈雞湯，教導我除了課業以外的許多知識，讓我對研究中充滿了正向且積極的態度。

最後，我要感謝撥空出席並且擔任口試委員的師長們，包括中國醫藥大學康一龍教授、中興大學 吳靖宙教授、交通大學 李博仁教授、台灣大學 陳林祈教授，給予我在實驗成果上以及碩士論文呈現上的專業建議。感謝所有提及、未提及的人以及兩年在身旁的人們和我遇到的種種酸甜苦辣，在我完成兩年的碩士學位後，都將成為我成長得養分，陪我邁向下一個人生階段，謝謝！

蔡佩珈 謹誌

國立台灣大學生物機電工程學研究所 中華民國一一二年六月

doi:10.6342/NTU202301818

摘要

生物感測器一直以來透過靈敏度和高特異性快速地針對待測分子進行的檢測，在各個領域具有高度的應用價值。近年來，醫療檢驗體系中為了落實照護點的概念，儘管有許多高精度的技術和設備結合了半導體製程或是微奈米加工技術將檢測機構微小化帶來了便利性，卻帶來許多挑戰難以成為市售的產品，也因此提高了相對簡易且成本較低的檢測機構開發需求。本文將以低成本且可攜帶的電容生物感測器的開發為主旨，以研究電化學感測器為基礎探討常見的界面分子結合策略以及利用阻抗頻譜分析和電阻、電容、電感零件分析測試儀（LCR 錶）分析自組裝單層（SAM）絕緣度和蛋白修飾後的電容尺度，再以類比轉數位模組結合網印碳電極組成電子式的生物感測器透過電容變化實現分子感測之目的。本文以自製金電極取代市售柱狀金電極，提高分析效率，在製備好自組裝單層後將蛋白透過交聯劑固定在金電極，由阻抗量測確效，研究過程中電化學量測工具有不同分析的適性及絕緣性，阻抗過大會造成分析上的不準確性。最後選用實驗室開發的類比轉數位模組結合拋棄式網印碳膠電極，以聚丙烯酸樹脂作為感測界面絕緣層，再以硝化纖維素薄膜作為吸附層，將 10 mg/ml 為蛋白（抗原）固定化在感測界面進行抗體結合。目前在結果部分可以在電容值變化上確認生物辨識元件之步驟，透過雷射顯微鏡分析感測介面上的絕緣層與吸附層物理性狀，了解生辨識元件之製程效果，以電容值變化分析抗原固定以及抗體結合之成果，同時，利用雙辛可寧酸測定法（Bicinchoninic acid assay, BCA）和增強型化學發光試劑（Enhanced chemiluminescence, ECL）光呈色分別對抗原以及抗體進行吸附與結合效果的確效與電容變化結果比對，在不同濃度抗原吸附在感測界面後整體電容訊號變化倍率提升了約 5 倍（**Δ**Capacitance/fold 值從 0.01%提升至 0.05%），最後在抗原抗體結合後可以看到電容下降的現象，在抗體濃度為 0-25 μg/ml 具有分辨性，達到檢測之目的，

doi:10.6342/NTU202301818

日後若能調整訊大小或優化電極與或是感測界面的材料，進而將感測的敏感度提高、訊號放大，相信必能在分子檢測上提供另種選擇。

關鍵字：電容式生物感測器、硝化纖維素、生物標記物、自組裝單層、電化學阻抗頻譜分析

doi:10.6342/NTU202301818

Abstract

Biosensors have always been valuable in various fields due to their ability to quickly and accurately detect target molecules. Recently, there has been a movement to implement the Point-of-Care Testing concept in medical testing systems by combining high-precision technologies and equipment with semiconductor processes or micro-nano processing technologies to miniaturize detection mechanisms and improve convenience. However, this has created challenges in commercializing these technologies and thus increased the demand for simpler, more cost-effective detection mechanisms.

This thesis focuses on the development of a low-cost and portable capacitive biosensor. It explores common interface molecule binding strategies based on electrochemical sensors and analyzes the insulation and protein-modified capacitance degrees using impedance spectroscopy and LCR meter analysis of self-assembled monolayers (SAMs). A capacitive biosensor is then constructed using an analog-to-digital converter module combined with screen-printed carbon electrodes to achieve molecular sensing through changes in capacitance. Homemade gold electrodes are used instead of commercial cylindrical gold electrodes to improve analysis efficiency. After the SAM is prepared, the protein is fixed to the gold electrode via a crosslinker, and impedance measurements confirm the effectiveness of the process. During the study, it is found that the electrochemical measurement tool has different suitability and limitation for analysis, and excessive impedance can cause inaccuracies in analysis.

doi:10.6342/NTU202301818

To overcome this problem, a disposable screen-printed carbon electrode is combined with a laboratory-developed analog-to-digital converter module. A polyacrylic acid resin is used as the insulation layer, and a nitrocellulose film is used as the adsorption layer to immobilize the protein (antigen) at the sensing interface for antibody binding at a concentration of 10 mg/ml. This study has confirmed that changes in capacitance value can be used to confirm the steps of the biometric recognition component. By analyzing the physical properties of the insulation layer and adsorption layer on the sensing interface through laser microscopy, the processing effect of the biometric recognition component can be understood, and capacitance value changes can be analyzed for the results of antigen fixation and antibody binding. Additionally, the Bicinchoninic Acid (BCA) Assay and Enhanced chemiluminescence (ECL) cold light colorimetry were used to verify the adsorption and binding effects of antigens and antibodies, and were compared to the capacitance change results. Different concentrations of antigens were applied to the sensing interface resulting in an overall increase in the capacitance signal ratio of approximately 5 times (the ΔCapacitance/fold value increased from 0.01% to 0.05%). The antigen-antibody binding led to a decrease in capacitance, providing a resolution for antibody concentrations of 0-25 μg/ml and meeting the detection objectives. In the future, amplifying the signal and increasing the sensor's sensitivity can be achieved through signal size adjustment or optimization of the electrode and sensing interface materials, providing an alternative choice for molecular detection.

Keywords : Capacitive biosensor, Nitrocellulose, Biomarkers, Self-assembled monolayers, Electrochemical impedance spectroscopy

doi:10.6342/NTU202301818

目錄

致謝 ..... **I**

摘要 ..... **II**

ABSTRACT ..... **IV**

目錄 ..... **VI**

圖目錄 ..... **IX**

表目錄 ..... **XII**

前言 **1**

1.1 研究背景 1

1.2 研究目的 3

1.3 研究架構 5

第二章 文獻回顧 **6**

2.1 生物標記物 6

2.2 生物感測器 8

2.2.1 電化學生物感測器 8

2.2.2 EIS-based 生物感測器 10

2.2.3 電化學生物感測器之電容式感測方法 12

2.2.4 電化學感測器的感測界面設計 13

2.2.5 生化分析工具中的分子親和材料 15

2.3 電容式生物感測器的發展 17

第三章 研究方法 **19**

3.1 實驗藥品與材料 19

doi:10.6342/NTU202301818

3.2 實驗儀器 19
3.3 電化學感測器製程 20
3.3.1 CD 金電極的製備 20
3.3.2 蛋白於金電極之化學性結合方法 20
3.4 電化學感測系統有效性之驗證 21
3.4.1 電化學阻抗圖譜法（EIS）及衍伸之電化學電容圖譜法 ECS 21
3.4.2 CD 金電極表面電化學分析與感測分析 22
3.4.3 CD 金電極連接電阻、電容、電桿零件測試儀的電容量測 23
3.5 電子式電容感測器結合網印碳電極感測蛋白分子 24
3.5.1 電子式電容感測架構 24
3.5.2 抗原的固定化程序 25
3.6 抗原吸附效果及抗體抗原專一性結合的生化試驗確效 26
3.6.1 雙辛可寧酸測定法蛋白與銅離子反應實驗 26
3.6.2 ECL 冷光呈色對抗體結合的確效 26
3.6.3 雷射顯微鏡分析生物辨識元件之薄膜厚度 26
第四章 結果與討論 28
4.1 以電化學阻抗圖譜法（EIS）測定蛋白 28
4.1.1 以柱狀金電極/自製 CD 金電極確認蛋白固定之方法 28
4.1.2 自製 CD 金電極之電化學特性與蛋白固定化參數 33
4.1.3 蛋白固定於自製辨識元件之電化學阻抗定量分析 39
4.1.4 ECS 對於蛋白定量可行性頻估 43
4.2 以 EIS 波德圖及 LCR 錶測定固定於 SAM 上的蛋白 45
4.2.1 EIS 波德圖分析 45
4.2.2 LCR 錶進行電容分析 48
4.3 電容式 ANTI-BSA 生物感測器 53

doi:10.6342/NTU202301818

4.3.1 電容感測模組性能.....53
4.3.2 絕緣層與吸附層的建構與特性.....55
4.3.3 硝化纖維素膜吸附層性能.....62
第五章 結論與未來展望 73
參考文獻.....75

doi:10.6342/NTU202301818

圖目錄

圖 1- 1 本實驗之架構圖 5

圖 2- 1 典型的奈氏圖（NYQUIST PLOT）與蘭德斯電路（RANDLE CIRCUIT）
.....10

圖 2- 2 阻抗（Z）之實部（Z’）、虛部（Z’’）關係圖.....12

圖 3- 1 自製 CD 金電極極三極式電極架構示意圖 20

圖 3- 2 電化學感測器感測界面化學製程反應機制圖 21

圖 3- 3 三極式電極架構 23

圖 3- 4 CD 金電極連接 LCR METER 之電容量測示意圖.....23

圖 3- 5 電子式電容感測器架構 24

圖 3- 6 生物辨識元件感測界面示意圖 25

圖 4- 1 蛋白固定於柱狀金電極化學程序之 EIS 量測響應.....28

圖 4- 2 不同鍊長的自組裝單層於金電再透過交聯劑與蛋白結合之 EIS 圖。.....29

圖 4- 3 同一根柱狀金電極進行 40 MM 的 MUA2 小時、6 小時、24 小時修飾之
EIS 圖.....30

圖 4- 4 文獻中不同濃度的 EDC/NHS 於 MUA 上的組抗分析 31

圖 4- 5 蛋白質固定於製備好 MUA（2HR）的柱狀金電極過程之 EIS 量測.....32

圖 4- 6 蛋白質固定於製備好 MUA（24HR）的柱狀金電極過程之 EIS 量測.....33

圖 4- 7 以循環伏安法分析自製 CD 金電極.....35

圖 4- 8 長時間製備 40 MM MUA 於 CD 金電極之 CV 圖 36

圖 4- 9 REDOXLESS 不同時間長短 MUA 修飾於金電極之 EIS 轉 ECS.....38

doi:10.6342/NTU202301818

圖 4- 10 兩小時製備的 MUA 加上以不同濃度與修飾時間的 EDC/NHS 進行阻抗量測.....39
圖 4- 11 不同濃度的蛋白藉由 0.4/0.1 MM 的 EDC/NHS 修飾於長時間（20 小時）製備 MUA 單層分子於金電極的阻抗比較 41
圖 4- 12 不同濃度的蛋白藉由 0.004/0.001 MM 的 EDC/NHS 修飾於長時間（20 小時）製備 MUA 單層分子於金電極的阻抗比較 42
圖 4- 13 在 WITH REDOX 情形下以 EIS 量測進行蛋白固定過程分析.....43
圖 4- 14 在 WITHOUT REDOX 情形下進行 ECS 分析蛋白結合 44
圖 4- 15 不同鏈長的 SAM 形成單層分子後的 EIS 及波德圖分析 45
圖 4- 16 蛋白修飾於 MPA 短時間與長時間修飾之波德圖 47
圖 4-17 蛋白修飾於 MUA 短時間與長時間修飾之波德圖 48
圖 4- 18 不同時間 MUA 修飾於金電極之 LCR 錶的電容值與 D/R 值量測.....50
圖 4- 19 蛋白固定於金電極之 LCR METER 電容值與 D 值量測結果.....50
圖 4- 20 不同蛋白固定於製備了硝化纖維素薄膜與絕緣層的碳電極的 LCR METER 電容值與 D 值量測結果 51
圖 4- 21 1000 倍稀釋（藍色）2500 倍稀釋（紅色） AL_2O_3 溶液吸附於金電極上之動態電容變化.....54
圖 4- 22 有無串連電容量測模式的檢測性能 55
圖 4- 23 AR 絕緣層電容值與溶劑揮發時間（A）披覆量（B）關係圖 56
圖 4- 24 AR 絕緣層為基準製備 NC 吸附層薄膜的電容值變化 57
圖 4- 25 雷射顯微鏡量測碳膠與基板到 PET 之距離 58
圖 4- 26 雷射顯微鏡表面 3D 輪廓分析（A）絕緣層與吸附層結構示意圖（B）58
圖 4-27 BSA 吸附於 NC、CHITOSAN 吸附層的 BCA ASSAY 反應結果.....59
圖 4- 28 不同批覆量的 CHITOSAN（實線）與蛋白吸附（虛線）在不同厚度的 AR 絕緣層的電容變化倍率 60
圖 4- 29 CHITOSAN 在不同 PH 下的物化性質 61

doi:10.6342/NTU202301818

圖 4- 30 幾丁聚醣披覆的金電極在不同酸鹼度之 EIS 奈氏圖 61
圖 4- 31 不同酸鹼環境下的蛋白於 NC 披覆層的吸附效果 63
圖 4- 32 NC 披覆層的電容值變化率與蛋白吸附濃度關係圖 64
圖 4- 33 蛋白吸附的動態電容響應 65
圖 4- 34 不同蛋白濃度動態吸附的斜率比較 66
圖 4- 35 有無蛋白吸附之 NC 披覆電極界面於 T20 溶液的電容量測.....68
圖 4- 36 不同濃度的蛋白吸附於碳電極後進行界面活性劑與 PBS 之清洗 69
圖 4- 37 25 MG/ML ANTI-BSA 與不同濃度 BSA 結合效果 70
圖 4- 38 10 MG/ML BSA 對不同濃度的 ANTI-BSA 的吸附結果.....71
圖 4- 39 不同濃度抗體與 10 MG/ML BSA 結合後的 ECL 呈色分析 72

doi:10.6342/NTU202301818

表目錄

表 2- 1 在不同癌症類型中常見的生物標誌物 7
表 2- 2 依據分析物分類的電化學感測器類型 9

表 4- 1 不同蛋白濃度結合與自組裝單層進行 EIS 量測的 RCT 原始數據.....41
表 4- 2 不同蛋白濃度結合與自組裝單層進行 EIS 量測的 RCT 原始數據.....42
表 4- 3 碳膠與基材和 PET 之相對高度原始數據（N=4） 58
表 4- 4 動態量測的斜率數據統計 66

doi:10.6342/NTU202301818

前言

1.1 研究背景

根據衛福部110年國人前十大死因統計結果(衛生福利部 2022)，癌症始終處於第一名的位置屹立不搖，而突如其來席捲全球的新冠肺炎造成全球傷亡人數慘重，因肺炎而死亡的人口數擠身於統計結果的第三名。在疫情下的時代在短時間內所要達到針對病情一條龍的規劃，從預防階段的疫苗開發到病毒的檢測、試劑的快速量產甚至到治療的藥物開發無一不深刻感受醫療產業的重要性。令人聞風喪膽的癌症對於生命的威脅往往不得而知，早在十年前，許多新興的醫療產業像是精準醫學或是預防醫學，推動各種檢測項目，除了一般的身體指數也包含一些疾病相關的分子檢測，更會根據遺傳基因檢測提供個人化的保健方針，達到疾病檢測與預防的效果。在分子層面，生物體各種疾病是以分子尺度為起始進行的，人類避之唯恐不及的癌症大多由基因異常為起始，而後衍伸出細胞異常增生而導致腫瘤，而這些基因所產出的不正常蛋白質為一種生物標記物（biomarkers）表現，目前許多科學家致力研究用生物標記物於醫療體系中的應用場合。

從整個醫療體系來看，疾病的預防與治療是醫療體系的終極目的，但不論是預防或是治療，醫療檢驗是絕大部分醫療行為作出診斷做決策的依據，也因次此醫療檢驗是整體醫療體系下至關重要的一環。醫療院所中，檢驗中心大部分採用的是大型自動化電腦機台，檢測結果具有高度靈敏度，其餘像是病理部則是需要倚靠專業人員做病理組織的切片染色分析才能進行下一步的診斷，將疾病檢測系統平民化甚至不需要經由專業人士操作，是在醫療層面上的一大福祉也可以達到照護點（Point-of-care testing, POCT）的理念。不論是從目前所面臨的疾病發展還是從醫療檢驗的角度來看，種種跡象證明了「分子檢測」的重

doi:10.6342/NTU202301818

要性，若能開發一套簡易、快速、可攜帶的生物感測系統或許能在醫療產業上解決許多分子偵測的問題。

生物感測器的發展已有數十載，跨領域實現了生化、醫學、與機電系統整合為一體的工程，在分子檢測上，依據多元的待測物類型，設計適合的生物辨識元件於感測系統，再透過轉換器將生物訊號轉換輸出成可分析之訊號，其具有高度選擇性以及即時性所以被於廣泛的應用在食品安全檢測、環境檢測、生物醫學檢測等領域。以現實面的角度看生物感測器應用在醫療檢測的研究領域中，往往結合了奈米、光電、半導體技術，而感測器的種類多樣且感測界面設計甚至是生物辨識元件方面更是五花八門，尤其最讓人詬病的是受限於界、面修飾的問題以至於無法帶離實驗室為產業界或是一般人使用之產品。

doi:10.6342/NTU202301818

1.2 研究目的

常見用於感測生醫分子的生物感測器分為標記與非標記感測器，標記感測器通常藉由螢光、冷光或放射物質來標記感測物進行感測；非標記物感測依照不同感測原理將生物結合訊號透過聲、電、光學等訊號處理再進行分析，例如：電化學感測器、表面電漿共振（Surface plasma resonance, SPR）(Olaru et al., 2015) 感測器、壓電晶體感測器（Piezoelectric crystal sensors）(Ngeh-Ngwainbi et al., 1990)等，由於標記過程中的樣品的處理和反應品質與感測結果有很大的關係，而非標記物感測可以避免這項缺點，同時不會有試劑以及螢光反應的時效問題，更能提高檢測效率，大部分的生物感測器都朝向非標記形式發展(Daniels et al., 2007; Vestergaard, et al., 2007)。

非標記感測中，電化學感測器最普遍的的方法為電化學阻抗頻譜法（Electrochemical impedance spectroscopy, EIS），主要藉由電子轉移現象分析電極界面的變化，其相對低成本、操作簡單與高度的設計彈性，造就了在感測分子上的優勢，往往在電極表面上以化學方式將分子固定化就可以進行定量，但可惜的是辨識元件端的設計必須考量到整體分子界面綜合電性外，同時需要考慮到分子、電極、量測溶液pH等間接造成的阻抗響應問題，因此，在生物感測元件這部分生化領域研究人員發展了無數的化學方法，達到分析物生物辨識元件結合的最終目的，換能器的選擇更是不勝枚舉，因此不難得知少有實際案例能夠在現實當中被量產與供人使用。

本研究期望藉由電容值進行生物標記物感測分析，開發出無標記感測的電容量測系統，在無需使用反應試劑、光敏劑或放射線物質的情況下，利用常見的化學材料方法將低成本的拋棄式電極界面上設計成為生物辨識元件。為了尋找穩定的絕緣材料以及蛋白固定方法，本文中先進行電化學方式探討自組裝單層於金電極結合蛋白分子並定量的可行性以及限制的探討，作為電容開發的基

doi:10.6342/NTU202301818

礎，而後提高絕緣性在電容感測體系上採用類比轉數位電容量測模組達到製程簡易、低成本、可攜式的優勢，最後進行蛋白類型分子的感測並定量。

doi:10.6342/NTU202301818

1.3 研究架構

本研究欲達到以電容值進行蛋白分子感測的最終目的，整體研究可分為兩部份，前半段會使用市售的光碟片（Compact disc, CD）製成電極（以下簡稱為自製 CD 金電極）測試蛋白分子與生物辨識元件的結合策略，利用電化學阻抗頻譜（EIS）和 LCR 錶（LCR meter）了解蛋白分子透過化學修飾之方法固定於金電極的阻抗、電容資訊與整體修飾的絕緣度，了解生物結合以及材料於電極上的電容訊號大小及其在電容感測器開發的可行性。後半段，將感測器分為辨識元件與電容量測模組如圖 1-1，電容量測模組部分，會測試電容量測模組量測範圍，設計並調整感測界面的製程參數包括：電極、絕緣性材料以及固定辨識物（抗原）於界面的方法和材料，最後進行目標物抗體分子的量測。

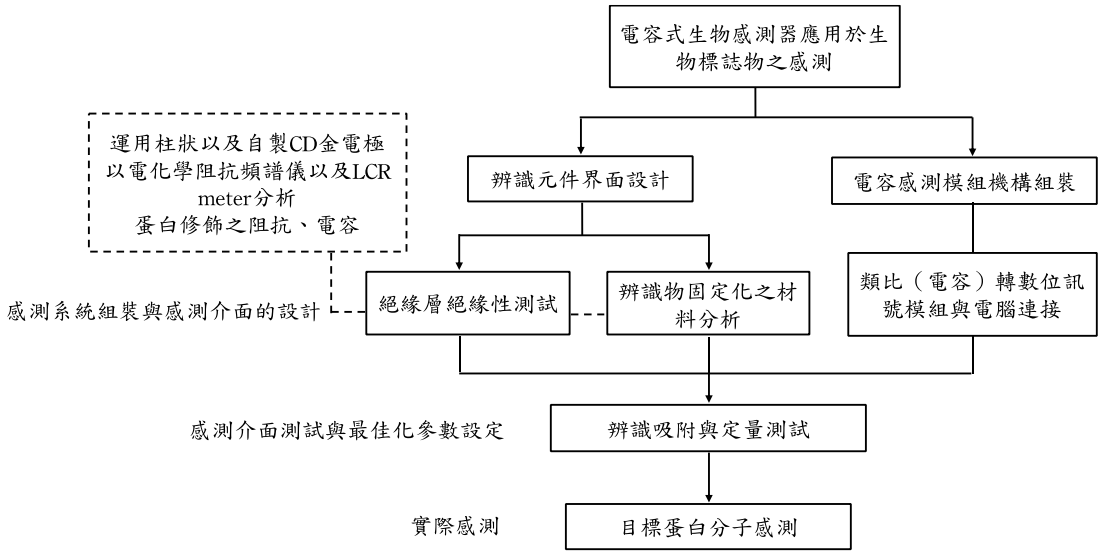


圖 1- 1 本實驗之架構圖

doi:10.6342/NTU202301818

第二章 文獻回顧

2.1 生物標記物

根據美國食品藥物管理局（Food and Drug Administration，FDA）於 2018 年擬定的生物標記物資格以及驗證架構指引草案《Biomarker Qualification: Evidentiary Framework Guidance for Industry and FDA Staff》提供了生物標記物開發單位在判定生物標記物的一個準則，裡面提到在定義生物標記物的時候必須考慮到四個面向：需求評估(Needs Assessment)、使用情境（Context of use, COU）、風險利益評估（Assessment of Benefits and Risks）、確定足以支持 COU 的科學證據（FDA, 2018），其中，COU 是指國家衛生院（NIH）與食品藥物管理局(FDA)生物標記物小組策定生物標記物，依照生物標記物在臨床上的用途可分為：診斷、監測、預測、藥物反應、預後、安全性和易感染性/風險六種相關的生物標誌物(Biomarkers Definitions Working, 2001)。近年來，許多臨床單位積極透過蛋白質體學、基因組學來研究生物標記物，漸漸地使生物標記物作為生物程序中的代表標誌，使其在各疾病研究出高度相關性並運用在臨床藥物開發、疾病進展的監測等，期盼能輔助各種臨床醫療用途。(Ren et al., 2021; Vaidya et al., 2010; Vlahou et al., 2015)

生物標記物（biomarkers）在生醫領域中具有廣泛的用途，可以作為細胞、組織、器官功能異常發生病變的生化標誌，在疾病檢測中生物標記物是目前許多臨床診斷的重點偵測對像。以分子的角度來看，生物體疾病的進展中最小單位即是以分子尺度進行，通常基因異常會製造出功能異常的蛋白分子促使產生不正常的細胞，人類避之唯恐不及的癌症正是如此，腫瘤的產生常常與異常的蛋白質息息相關。在許多疾病中都有固定且認定的生物標記物，尤其癌症，許多科學家表明了許多癌症中相關的生物標記物，如表 2-1，或是以生物標記物來研究藥物開發過程的遞送效能(Cho et al., 2011; Karsdal et al., 2009; Topkaya et al.,

doi:10.6342/NTU202301818

2016)，生物標記物的型態多樣，可以是離子、蛋白、核酸、抗體等形式，可以透過生物標記物的偵測獲得疾病及治療的進展。這也造就可攜帶式的生物感測器生物感測器成為了許多大型、昂貴和複雜醫療設備的替代方案，(Kanaparthi et al., 2019)。

表 2- 1 在不同癌症類型中常見的生物標誌物，取自(Topkaya et al., 2016)

Cancer Type	Biomarkers
Breast	miR-155, miR-261, CA15-3, EGFR, VEGF165, BRCA l, ErbB2, HER2, Mucin-1
Prostate	miR-103a, miR-106a, miR-107, PSA, Pro2PSA, GSTP1, p63, PCA3
Liver	miR-100-5p, mir-122, α-Fetoprotein, HCCR-1
Lung	miR-106a-5p, miR-10b-5p, miR-141-3p, KRAS, ALK, CEA
Melanoma	mir-221 , ERK, EGFR, HER3, NCOA3
Gastric	miR-29c, miR-148a, CA19-9, CEA
Brain	miR-10b, MGMT, COX-2, p14arf
Ovarian	miR-92, miR-93, miR-126, CA 125, HE4, Mesothelin
Bladder	miR-126, miR-141-3p, NMP22, FDP, IL-8, hOGG1, COX-2, BTA

以癌症來說，癌症在所有疾病中是最致命疾病，很多慢性疾病都會導致癌症的耗發，早期的篩檢和治療在癌症的是一件重要的一部分，可增加病人康復的機會與減少癌症轉移所引發的死亡。當今檢測癌症的技術包含了超音波、X 光、MRI、PET、CT 掃描和組織切片檢查，其中幾個傳統方法耗時且敏感性低，且在照影設備下所獲得的結果往往很難有良性或惡性之分(Chinen et al., 2015)，而像近期聚合酶鏈鎖反應利用基因組檢測方法和 DNA 定序，雖然可用於檢測癌症相關的生物標誌物，但對一般民眾來說普遍昂貴，而且需要進行侵入式採檢。對抽血檢驗單位來說，在分離血清時使用免疫分析技術，如 ELISA 來檢測癌症的生物標誌物是一個常規並同時具有高專一性與高敏感性技術。可惜它們生產成本高，待測時間偏長，有時還會因為癌症在早期階段而檢測不到低濃度的生物標誌物，而局限此方法在晚期的癌症。因此，開發一種新的低成本、高靈敏度、並且快速的方法來診斷癌症是一件尚未滿足的市場需求。隨著時代的進步，研究人員已經陸續開發出生物感測器來可使用血液、痰液、尿液和其他

doi:10.6342/NTU202301818

生物體液中發現的不同生物標誌物來檢測癌症。一但可量產，生物感測器將會大大的提高醫療水平和提升生活健康的品質。(Alharthi et al., 2021)

2.2 生物感測器

感測器的形式在各個領預的定義的不盡相同，生物感測器的應用領域廣泛，應用在藥物開發、環境監測、疾病偵測以及食品品質監測等(Bhalla et al., 2016)，一般而言，生物感測器包含了三個部分：生物感測元件(Biosensing element)、換能器（Transducer）、訊號處理器(Signal processor)，換能器會將分析物語辨識元件結合的訊號轉換成可量化的電、光、聲、熱等訊號(Korotkaya, 2014)，最後將訊號傳輸至訊號處理系統進行分析，最常見之以電訊號針對分子型待測物進行分析的感測器類型即為電化學感測器。

2.2.1 電化學生物感測器

電化學生物感測器顧名思義是利用電極界面上的分子電化學機制，以電學的原理將生物辨識元件上的生化訊號轉換成電訊號處理。

電化學生物感測器可以從 1906 年的研究開始說起，當時 Cremer 等人發現了液體中酸的濃度與玻璃膜兩側液體的間產生的電位呈現正比，隨後 Hughes 在 1922 完成了量測 pH 的電極(Hughes, 1922)。第一個真正備受關注的生物感測器的於 1962 年問世，Clark 展示了於 1953 年開始開發了偵測葡萄糖的電流酵素電極，在電極上固定葡萄糖氧化酵素(glucose oxidase, GOx)，藉由葡萄糖氧化酵素和氧氣催化反應過程中發生溶氧現象的氧化還原反應，透過電流訊號得知溶氧濃度來量化葡萄糖濃度，是一個典型電化學感測器的例子。(Newman et al., 2006)

doi:10.6342/NTU202301818

電化學感測器依據不同的分析物的形式與結合策略所使用的換能器形式有幾種方法：測量電化性物質氧化還原產生電流的電流法（Amperometry），若在控制電位情形下量測電流極為伏安法（Voltammetry）；測量電極間電位差的電位法（Potentiometry）像是酸鹼度測定儀（pH meter）(Eggins, 2002; Grieshaber et al., 2008; Thévenot et al., 2001)或透過測量分析物像是酶、互補的抗原抗體固定在電極表面上所造成的電導變化的電導法（Conductometry）等，如表 2-2 中的量測技術與換能模式部分所示。(Cullen et al., 1990; Grieshaber et al., 2008)。

表 2- 2 依據分析物分類的電化學感測器類型，整理自(Bergveld et al., 1993)

Analytes	Receptor/Chemical recognition system	Measurement technique/ Transduction mode
Ions	mixed valence metal oxides	*potentiometric, voltammetric*
	permselective, ion-conductive inorganic crystals	
	trapped mobile synthetic or biological ionophores	
Dissolved gases, vapours, odours	inert metal electrode	*amperometric*
Substrates	enzyme(s)	*amperometric or potentiometric*
Various proteins , Antibody/antigen, low molecular weight substrates, ions	antigen/antibody oligonucleotide duplex, aptamer, specific ligands	*amperometric, potentiometric or impedimetric*, piezoelectric, optical, surface plasmon resonance

在生醫感測中，結合前一張章節提及的生物標記物，最常見的分析物莫過於蛋白類型的分析物，包括抗原抗體、適體等等，在電化學感測領域中可望透過將這些作為疾病標誌的分子固定在電極表面再透過電訊號的方式進行偵測，下一章個將接續說明電化學感測器的應用。

doi:10.6342/NTU202301818

2.2.2 EIS-based 生物感測器

電化學阻抗圖譜法（EIS）是最常見免標記電化學感測方法之一，由恆電位儀施加一個正弦波電位，在大範圍 從 1 mHz 至大於 1 MHz 的頻率下獲得電壓電流的相位差資訊經計算得到複數阻抗（Z）得到奈氏圖（Nyquist plot）圖型，透過系統中蘭德斯電路（Randle circuit）以等效電路模擬分析各種數值如圖 2-1 所示，以供電化學體系中在電路中的對應物件（電阻器、電容器、電感器）對電子和離子流動的響應，因為電極動力學、氧化還原反應、擴散現象和電極表面的分子親和作用可以皆被認為阻礙交流電路中電子流動的協同因素，進而研究影響電化學系統的電導率、電阻或電容的固有材料特性或特定過程(J. R. Macdonald et al., 2021)。

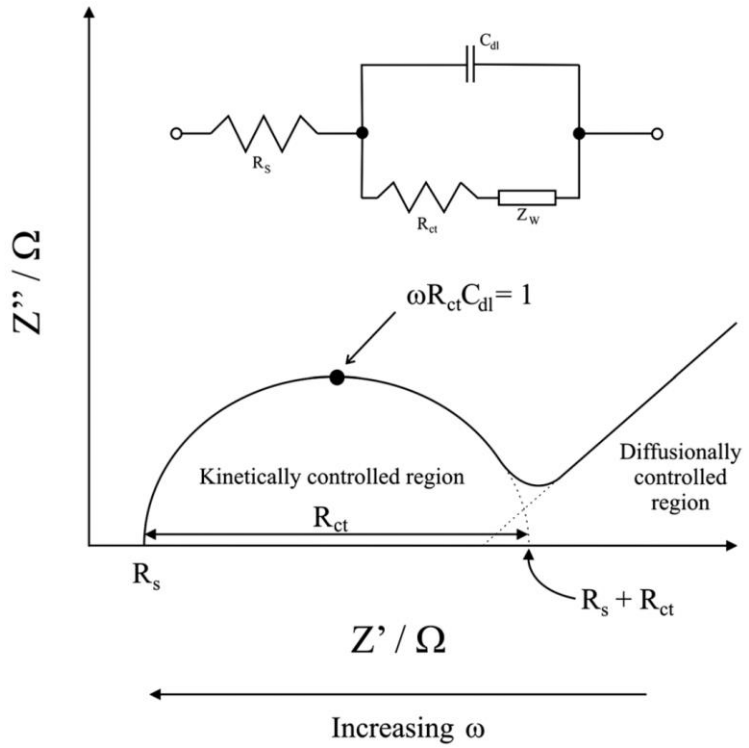


圖 2- 1 典型的奈氏圖（Nyquist plot）與蘭德斯電路（Randle circuit），取自(Macdonald, 2006)

doi:10.6342/NTU202301818

在 EIS 方法中有兩種過程，第一種是發生氧化還原反應時產生得阻抗遵循法拉第，第二種是基於直流所產生的阻抗，其電氣特性是由雙電層電容所提供的遵循非法拉第過程(Prodromidis, 2010) 。通常在 EIS 分析中，會在溶液中添加氧化還原對（Redox couple）進行量測，遵循法拉第程序產生氧化還原現象，將電荷轉移的阻抗（Rct）作為分析的依據，一旦待測物與原本製備好的辨識層結合，界面電子轉移阻抗就會變大，即會反應在 Rct 上，許多阻抗型感測器以此方法對生醫相關的蛋白分子像是 DNA(Dinckaya et al., 2011)、抗原抗體(Ahmed et al., 2013)、適體(Conroy et al., 2009)等，這些文獻中皆以氧化還原反應進行阻抗分析，有些搭配循環伏安法(Cyclic Voltammetry, CV)進行氧化還原電流的量測或以更高精準度的微分脈衝伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV) 進行電流分析，為臨床檢測帶來希望。

儘管這些免標記物的電化學感測器可以藉由電訊號的方式提高檢測敏感度，但卻出現了許多感測設計上需要克服的問題，像是在 Ram 等人的研究中比較 EIS 電化學技術 和 ELISA 生化技術的差別，在 ELISA 證實 HRP 跟 Avidin 或胺化的 Avidin 沒有特異性吸附的情況下， ELISA 分析中可以透過吸光值回推結合的分子數量，但 EIS 中的阻抗的響應在很大程度上取決於它們的電荷，反而在電訊號上無法直觀的定量(Ram et al., 2016)。有許多表面物質帶電性的影響阻抗變化的議題，在 Lacina 等人研究中用膠體電泳確認不同蛋白的電性後進行感測器表面的修飾測器表面上不同帶電性蛋白分子的電性對阻抗變化的影響，將帶正電荷的蛋白會造成阻抗下降，帶負電荷的蛋白會造成阻抗上升。但在 Sopousek 等人研究中發現在不同大小金奈米粒子進行正電荷的蛋白（cBSA）與負電荷的（BSA）修飾，大顆粒奈米粒子造成的孔洞較大上，使得結合蛋白的帶電性影響效應比 NP 造成的阻力效應還要大，可以看出帶正電的蛋白造成阻抗下降的情形，在奈米粒子較小的情況下縫隙較小，表面修飾下顛覆了帶正電

doi:10.6342/NTU202301818

蛋白造成阻抗下降的概念，其餘也受到像是溶液中離子濃度的影響，影響阻抗的差異(Lacina et al., 2018; Sopousek et al., 2021)

綜觀來說 EIS 的阻抗響應反應了整體包括分子大小（SAM 是否緻密）、結合蛋白帶電性、量測溶液的背景離子濃度和氧化還原物質濃度的綜合效應，在不同電化學感測器中的電極樣式以及電化學反應的差異性會產生多樣化非典型的 Nyquist plot 圖，例如兩個半圓甚至三個半圓，導致分析上的複雜度增加(Wang et al., 2021) 因此在阻抗式電化學感測發展中有複雜的效應需要釐清。

2.2.3 電化學生物感測器之電容式感測方法

電化學量測系統中，除了可以透過 EIS 非法拉第過程的電雙層電容描述電極界面上存在的儲能效應以電學的角度看，交流電路中的阻抗是電阻器、電容器的阻抗總合，阻抗包含電阻（R）與電抗（X）如圖 2-2 ，而虛部的電抗意義是電容抗（X_C），可以計算出電容值此概念可以連結 Nyquist Plot 圖中的實部（Z’）、虛部（Z’’），如以下公式：

$$X_C = \frac{1}{\omega C} = \frac{1}{2\pi f C} \tag{2-7}$$

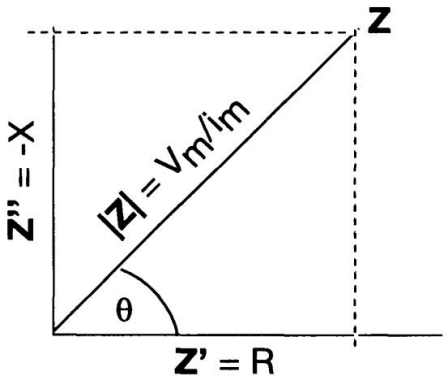


圖 2- 2 阻抗（Ｚ）之實部（Z’）、虛部（Z’’）關係圖。阻抗元件根據相位角可計算出電阻（Resistance, R）和電抗（Reactance, X）。取自(Berney, 2004)

doi:10.6342/NTU202301818

而 2007 年於東京大學的研究較完整的描述了電化學阻抗和複數電容的關係，文中通過 EIS 輸入及輸出得信號比較電極反應來並計算阻抗（impedance）或導納（admittance），過程中推導出將 EIS 的 Z domain 計算轉換到 C domain 而延伸成（Electrochemical capacitance spectroscopy, ECS）(Itagaki et al., 2007)， 在許多情況下可以藉由電容轉換進行界面分子修飾所導致的電容特性分析。

從 1980 年開始，基於無需標定物的免疫親合型電容生物感測器開始發展，藉由電極間或是電極在溶液中表面的介電特性變化來觀察待測物的親和現象(Mirsky et al., 2013)，在溶液中進行量測時電荷排列於電極表面的能力類似於儲存電荷的電容器，當界面化學發生改變後就會有電容的響應，由電解溶液與工作電極界面的介電特性和厚度的變化計算出電容值，如下列公式：

$$C = \varepsilon\varepsilon_0 \frac{A}{d} \tag{2-8}$$

上式中的 ε 為介質之間的介電常數，ε_0 是自由介質的介電常數，A 是電極的表面積，而 d 是絕緣層的厚度。從方程式可以知道絕緣層的厚度的增加時，電容值會降低，同樣的，當待測物與修飾於表面的辨識層結合時，電容可以藉由串聯的總電容來表示(Erturk et al., 2017)：

$$\frac{1}{Ct} = \frac{1}{Cdl} + \frac{1}{Cbm} \tag{2-9}$$

電極周圍電子位移導致電容減小，也就是電容式生物傳感器的檢測基礎，
Cdl 代表介電層，Cbm 為修飾生物分子層。從公式可見，在電容串連的情況下會由最小的電容主導整體電容，因此在設計辨識層需要盡可能將絕緣層的電容提高，否則會引響分析物結合後的電容變化(Berggren et al., 2001)。

2.2.4 電化學感測器的感測界面設計

在生物感測器中，生物辨識元件主要由電極為基本材料，通常扮演著固液界面訊號形式轉換的重要角色，用作生物分子固定和電化學反應發生的固態區

doi:10.6342/NTU202301818

域，為了提高界面的負載力和反應的訊號量，目前許多複合性奈米材料能夠增加生物分子的結合面積以及提高的電子信號傳出效果，例如：奈米碳管（CNT）、石墨烯、金奈米粒子（AuNPs）、二氧化矽奈米粒子等(Cho et al., 2020)，其中，金具有穩定的化性及易與氨基、硫醇基等官能基的反應的優勢，使得金奈米粒子與金電極一直是電化學感測的主力材料之一，尤其在感測生化分子上金奈米粒子可以透過簡單的程序處理將金奈米粒子均勻附著在奈米碳管上，在電極表面上顯現出良好的電催化活性(Shi et al., 2009)。

自組裝單分子層（Self-Assembled Monolayers，SAMs）的應用非常廣泛，在電化學體系中常用來對電極表面的金屬進行改質的動作，透過烷基硫醇修飾金、銀、銅等金屬表面， SAM可以作為電子傳輸屏障像是長鏈或芳香環類的分子構造提供絕緣性，控制電子在電極和溶液之間的傳輸速率，改變電化學的反應速率並提高感測的靈敏度和選擇性，此外，其頭端（Head group）會在表面形成穩定的單層分子結構與再透過尾端（Functional group）具備羧基等官能基透過交聯劑與蛋白結合以達到在感測領域中的成效(Creager et al., 2001; Eckermann et al., 2010; Park et al., 2016)，在製備SAM的過程中，相對短鏈的SAM會在數分鐘內排列形成，較常鏈的SAM則需要幾個小時甚至隔夜製備達成較完整的單層薄膜，多數的SAM在金屬表面的法線夾角約為30度，而製備的過程以及完整度可透過原子顯微鏡觀察(Woodward et al., 1996)。

儘管SAM可以自發性的在金屬界面上自發性形成單層分子但穩定性的薄膜且是相當成熟的方法，多樣化的SAM末端帶有不同的官能基結構以及在修飾情形下也存在著缺陷的可能性，許多科學家研究如何將SAM更有效率及完整的排列，在Kanyong等人的研究中指出二茂鐵於SAM上面進行循環伏安法量測，進行氧化還原反應讓末端二茂鐵基團在氧化時，烷基鏈會因為極化更垂直於電極表面，達到更緻密的效果(Kanyong et al., 2020; She et al., 2012) 。在感測器體系中的SAM做為電子阻隔層後，文獻中就有許多針對大分子蛋白質、DNA、抗原

doi:10.6342/NTU202301818

抗體藉由交聯劑與SAM尾端官能基反應以共價鍵的形式將帶有胺基的蛋白固定在電極上的方法。

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亞胺/N-羥基琥珀醯亞胺（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide, EDC/NHS）是十分常見的交聯劑，用於感測器與蛋白類分子親和反應或是材料與材料間結合的用途。在近期阻抗式感測器檢測SARS-CoV2抗原抗體的發展中Bojórquez等人運用了 EDC/NHS將抗原固定在帶有羧基Poly(ethylene glycol)2-mercaptoethyl ether acetic acid 修飾的金電極表面(Sandoval Bojórquez et al., 2023)。此交聯劑同樣在Patricia Khashayar的無標記物感測器開法中，用於將I型膠原C端肽(CTX-1)的抗體固定在修飾了穀胱甘肽（GSH）的奈米金粒子上(Khashayar et al., 2017)。更有學者比較不同交聯劑包括：乙二醛 (GO)、戊二醛 (GA)、環氧氯丙烷 (ECH) 以及EDC/NHS四種不同交聯劑，將功能化的碳納米管固定到殼聚醣薄膜後以電化學EIS、CV量測分析界面，發現ECH與EDC/NHS作為交聯劑的組別表面皆具有良好的電化學活性(Pauliukaite et al., 2009)。

為了將目標物結合至辨識元件也就是電極上，形成可分析的生物訊號，在設計感測界面時，需考慮到分子間與材料的的親疏水性、共價鍵與帶電性的基本特性，也因此造成蛋白固定於感測界面上是一個龐大的工程，欲想開發出具有高敏感度以及成本低廉且實用的感測器，或許在電極材料、SAM 以及交聯分子甚是分析工具的選擇上，都有許多困難，需要多方嘗試。

2.2.5 生化分析工具中的分子親和材料

電化學感測器領域中運用生化的機制或材料的例子有很多，像是疫親和型的生物感測器是利用抗原抗體結合的原理，臨床常用分析蛋白的生物技術中酵素結合免疫吸附分析法（ELISA），同樣是將檢體中的抗原和固定量的專一性抗體進行結合，然後用酵素標定的二抗做連結進而進行呈色反應，此方法類似於須標記的生物感測器，除了需要準備多種實驗試劑和具有經驗的專業人員進

doi:10.6342/NTU202301818

行操作，它的檢測時間既費時又不適合在低濃度下進行測量，因此，在許多免標記物生物感測器的發展中，低生產成本及更有效率的感測方式可說是生物感測器具有發展的潛力的極大原因。

生物檢測技術中像是西方墨點法（Western blot）、Bicinchonininc acid assay (BCA assay)等等，這些定量蛋白的方式以及運用的材料都可以在感測器發展中辨識元件介面設計上提供了靈感。近期 2020-2022 年特殊傳染性肺炎(COVID-19)時期第一線所使用的抗原蛋白辨識快篩產品當中的快篩盤，其中所用的白色紙質材料主要為硝化纖維素薄膜（Nitrocellulose），在傳統生物化學實驗室中常見出現於過濾膜，或是作為色層分析濾紙的基材此材料與聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene difluoride, PVDF）皆可以讓蛋白質藉由帶電性或是疏性吸附在上面兩種市售的材料皆類似於紙張構造的形式，基於低成本及能夠快速製造高穩定性的幾項優點是市售快篩產品的主要材料。

許多文獻皆說明了分析工具當中的材料的重要性，界面材料檢會直接影響到分析物結合效果，其中一篇提到酵素結合免疫吸附分析法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)對濾紙的性質非常敏感，來自單一供應商 50 種不同的類型的濾紙在同樣修飾下訊號強度變化可以超過一個數量級(Holstein et al., 2016; Pelton, 2009)。Halder 學者們研究了牛血清白蛋白 (BSA)、β-乳球蛋白 (β-lg)、明膠、溶菌酶和 DNA 在不同 pH 值、離子強度和溫度以及存在不同離子容液環境中吸附到纖維素上的程度(Halder et al., 2005)。可見感測介面的材料在整體開發中也是相當重要的部分。

其餘像是在生醫研究領域中常用來包裹蛋白質進行藥物傳遞的材料幾丁聚醣（Chitosan），許多研究指出幾丁聚醣的高度生物相容性，以及酸鹼敏感的特性，透過改變 chitosan 在不同的 pH 值下提升材料的製備以及蛋白結合效果。使用殼聚醣及其衍生物作為藥物載體的主要目的是增強大分子治療藥物（肽、蛋白質和抗原以及質粒 DNA）的吸收(Bivas-Benita et al., 2004)。這些關於蛋白質在不同材料表面吸附特性的洞察，強調了界面特性、蛋白質帶電性和疏水性之

doi:10.6342/NTU202301818

間的相互作用對於分析及使用的穩定性。相較之下原本電化學生物感測器中的自組裝單分子層（Self-assembled monolayers, SAM)常會透過修飾蛋白來固定抗體或其他蛋白，相較於 Nitrocellulose，這種製備通常很耗時，因為形成一個排列緻密的單層分子大多數需要花上幾個小時，且不同形態上的缺陷，導致在後續蛋白質修飾難以作為穩定的界面材料。

由於在蛋白與分析工具界面結合的形式多樣通常並非可用單一物化現象完成，在感測器的開發中，可說蛋白固定於感測界面上是一個龐大的工程，生物檢驗技術與市售檢測產品提供了更多已經商品化且更穩定的方法與材料選擇，可將分子固定界面上，因此，如何使用簡易的方式達到最大效益是需要多方嘗試。

2.3 電容式生物感測器的發展

基於電雙層（Electric double layer, EDL）理論的電容感測技術在許多領域中被廣泛應用，當修飾電極與電解質溶液中的待測物接觸時，固定於電極上的抗體形成了類似於兩個金屬片組成的電容器，這兩個金屬片之間被一層介電質隔開。在電容式生物感測器中，如果絕緣層過厚，可能會形成不良的雙電層，導致靜電相互作用減弱，進而影響電容量測的準確性。這將使得電極無法正確地表現為一個電容器，而使用RC電路所量測得到的電容值可能無法作為可靠的參考。因此，在設計修飾電極時，需要注意絕緣層的厚度，以確保良好的雙電層形成，從而實現準確的電容量測。(Teeparuksapun et al., 2022)。

在目前電容感測器的發展中以微型化電子設備進行電容訊號量測進而達到感測目的居多，以對被測電容和參考電容同時進行充放電經由電流積分和低通濾波器濾波最後由放大器放大訊號等將數值轉換為電壓或是再以數位訊號輸出，此為典型的電容量測電路中的功能，在 Teeparuksapun等人一系列的研究中以(RC) 電路作為模型最電容進行量測，使用電容器 （220 nF ± 20% ）串聯電阻器（3.31 kΩ ± 1%）將電容讀數與從電位脈衝系統與與一開始文獻中的電容與濃

doi:10.6342/NTU202301818

度線性關係圖進行比對然後根據電位響應計算電容值(Erlandsson et al., 2014; Teeparuksapun et al., 2009)。

在模組化感測器的開發過程中LCR meter可以作為電容器的訊號量測的對照，在Georgas等人的研究中針對SARS-CoV-2病毒檢測的PoC設備開發，以LCR meter進行電容與阻抗量測對微控制器的電子電路校準(Georgas et al., 2022)，即便LCR meter在是固態元件量測的工具，因其利於動態的即時量測以及訊號的高度穩定，有些文獻開始在液相中以LCR meter對電極進行電容值的量測，將LCR meter連接電腦進行電容值的記錄及計算，在生醫領域中也有在電極界面上分析待測物結合或生物環境監測的例子，Han等人利用細胞在電極上吸附後的界面阻抗與電容變化來監測細胞的生長環境由此建構 3D 的培養環境(Lee et al., 2016)，加上近期以單晶片多電極結合奈米粒子進行子宮頸癌症相關的生物標記物研究(Lee et al., 2022)，也有學者在兩個平面鋁電極之間的抗體-抗原相互作用後在低頻區量測電容變化(de Vasconcelos et al., 2009)

微小的設備是目前電容是感測器很重要的一部份，儘管有學者提出微型裝置像是以類比數位訊號轉換器(Analog-to-digital converter, ADC)的植入式電化學傳感器測量神經遞質活動的能力(Kimble et al., 2017)，將電容訊號轉換成數位訊號分析，ADC還未被應用在分子感測的研究中，大部分的電容式感測器還是以已經成熟的電容量測儀為主像是在電化學分析工具當中的恆電位儀、LCR 錶等，故如果能對這項技術的深入研究和掌握，將對相關領域的科研和產業發展產生積極的影響。接下來的篇幅將探討電化學生物感測器與電子式電容感測器結合碳電極的開發，達成研究之蛋白質檢測的目標。

doi:10.6342/NTU202301818

第三章 研究方法

3.1 實驗藥品與材料

11-巯基十一烷酸（11-Mercaptoundecanoic acid, MUA）、3-巯基丙酸（3-Mercaptopropionic acid, MPA）、二甲基亞砜（Dimethyl sulfoxide, DMSO）、16-巯基十六烷酸（16-Mercaptohexadecanoic acid, MHA）、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞胺（N-Ethyl-N′-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC）、羥基琥珀醯亞胺（N-Hydroxysuccinimide, NHS）、硝化纖維素（Nitrocellulose）、牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）、Anti-BSA (Bovine Serum Albumin) Antibody、BCA Assay購買自Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）。卵白蛋白（ovalbumin）購買自Acros Organics (New Jersey, USA)。ECL Western blotting detection kit 購買自Advansta Inc.（San Jose, CA, USA)。TNF-α購買自Cell Signaling Technology Inc. （Danvers, Massachusetts, USA)。70%硝酸（HNO3）購買於Labscan, Asia Co, Ltd.（Thailand）。磷酸二氫鈉（Na2HPO4）、磷酸二氫鉀（KH2PO4）、赤血鹽（Ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$）及黃血鹽（Ferrocyanide, K4Fe(CN)6）購買自Nacalai Tesque（Tokyo, Japan）。柱狀金電極（CHI101）購買自CH instruments Inc.（Austin, Texas）。絕緣保護漆PLASTIK 70購買自KONTAKT CHEMIE（Germany）。網印碳電極（screen-printed carbon electrodes, SPCE）為實驗室提供。雙面膠購買自3M （台灣）型號為300LSE、冷裱膜（單面膠）購買自北極熊（台灣）、CD金電極為自行製作。

3.2 實驗儀器

恆電位儀（Autolab PGSTAT-30）購買自Eco Chemie B.V. CO.（Utrecht, Netherlands）。電阻、電容、電感零件分析測試儀（LCR-819）購買自Good

doi:10.6342/NTU202301818

Will Instrument CO.LTD.（台灣），分光光度計(v-730 spectrophotometer)購買自JASCO化學分析儀器公司。

3.3 電化學感測器製程

3.3.1 CD 金電極的製備

先將CD片泡於30%硝酸溶液中，去除表面塑膠薄膜，順帶清洗表面，利用切割機切割單面膠與雙面膠，再將已經切割好的壓克力、雙面膠、單面膠、清洗過的CD依序疊合，再用桌上型平口鉗平均受力將中間的空氣移除，成品CD金電極的俯視圖與剖面圖如圖3-1所示。

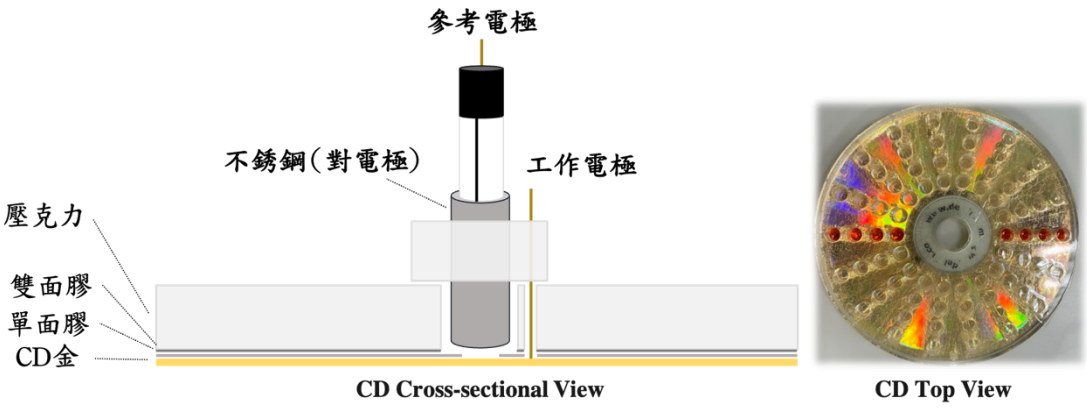


圖 3- 1 自製 CD 金電極極三極式電極架構示意圖

3.3.2 蛋白於金電極之化學性結合方法

先 DMSO 中配置 40 mM 的 3-Mercaptopropionic acid（MPA）、11-Mercaptoundecanoic acid（MUA）、16-巯基十六烷酸（16-Mercaptohexadecanoic acid, MHA），以 10 μl體積滴在自製金電極上，形成自組裝單層分子結構（SAM），以 PBS 清洗後，再用交聯劑 0. 4/0. 1mM 的 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 以及 NHS (N-hydroxysuccinimide)

doi:10.6342/NTU202301818

混合液滴在電極上經由化學反應 40 分鐘和 PBS 清洗，最後將蛋白溶液放入電極槽中反應，反應化學機制以短鏈的 MPA 為例如下圖 3-2 所示。

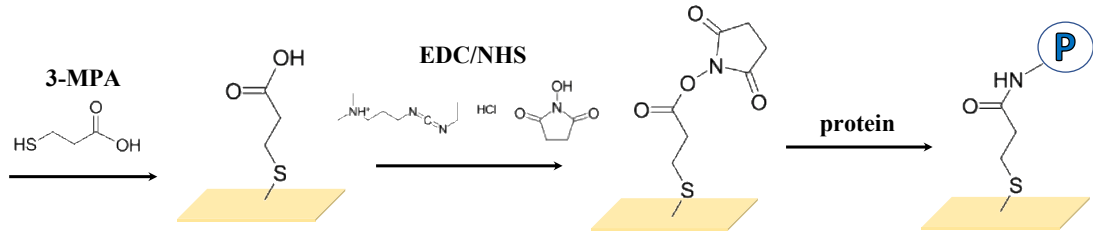


圖 3- 2 電化學感測器感測界面化學製程反應機制圖

3.4 電化學感測系統有效性之驗證

3.4.1 電化學阻抗圖譜法（EIS）及衍伸之電化學電容圖譜法 ECS

電化學阻抗圖譜（EIS）交流電中經由相位差資訊經計算得到阻抗（Z）複數，包含實部（Z’）跟虛部（Z’’）即電阻與電抗，由 NOVA v.1.1 software 等效電路分析 EIS 得到的 Nyquist Plot 圖計算溶液組抗（Rs）、角頻率（ω）、電荷轉移阻抗（Rct）、電雙層電容（Cdl）等資訊，其相關性由下列公式 2-1、2-2、2-3 表示：

$$Z = Z' + jZ'' \tag{2-1}$$

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 R_{ct}{}^2 C_{dl}{}^2} \tag{2-2}$$

$$Z'' = \frac{R_{ct}{}^2 C_{dl}\,\omega}{1 + \omega^2 R_{ct}{}^2 C_{dl}{}^2} \tag{2-3}$$

電化學電化學電容圖譜（ECS）將 EIS 的 Z domain 中獲得的實部（Z’）跟虛部（Z’’）經由數學轉換到 C domain 公式如下：

doi:10.6342/NTU202301818

$$C = \frac{1}{j\omega Z} = C' + jC'' \quad (2\text{-}4)$$

$$C' = -\frac{Z''}{\omega(Z'^2 + Z''^2)} \quad (2\text{-}5)$$

$$C'' = \frac{Z''}{\omega(Z'^2 + Z''^2)} \quad (2\text{-}6)$$

除了在 EIS 中以電雙層電容描述界面儲存電荷的現像模擬電容器的概念，在無氧化還原試劑的情況下也使用此轉換方式以複數電容了解界面的電容現象。

3.4.2 CD 金電極表面電化學分析與感測分析

常見的電化學生物感測器架構中為了提高感測靈敏度，常以惰性金屬例如：金，作為電極的主要材料，儘管有市售的拋棄式金電極，為了縮減成本與提高分析效率，本研究先利用了傳統CD片中的金薄膜做為工作電極開發了一片具有72孔的電極，比照傳統三極式電化學感測器的設置實際量測系統架設如下圖3-3所示，以Ag/AgCl為參考電極（白色）、自製CD金電極為工作電極（綠色）、自製adapter的不銹鋼柱為對極（紅色）。以三極連接恆電位儀，表面透過電化學阻抗頻譜（EIS）、循環伏安法（CV）分析其表面狀況，量測溶液為含0.1mM KCl的10 mM $K_4(Fe(CN)_6)/K_3(Fe(CN)_6)$，電化學阻抗頻譜（EIS）設定偏壓為0.23Ｖ進行範圍10K Hz到0.1 Hz的頻譜分析，循環伏安法（CV）設定電壓範圍-0.2 V到0.6 V之間，掃瞄速度為0.05V/sec進行量測。

doi:10.6342/NTU202301818

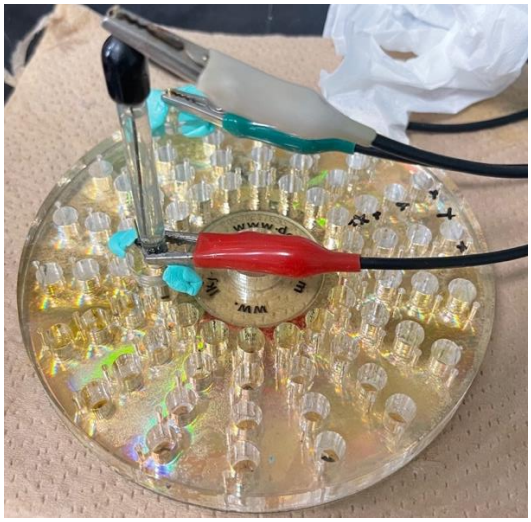


圖 3- 3 三極式電極架構

3.4.3 CD 金電極連接電阻、電容、電桿零件測試儀的電容量測

如上一章節所述以自製的 CD 金電極連接電阻、電容、電桿零件測試儀分析時為了符合連接體系，本實驗以壓力圓片與不鏽鋼柱彈性金屬探針焊接成 adaptor，如圖 3-4，分別以單芯線連接 LCR meter 在 0.1 M PBS（pH=7.0）溶液中進行量測，量測頻率設定 1k Hz，設定內部偏壓為 0.5Ｖ。

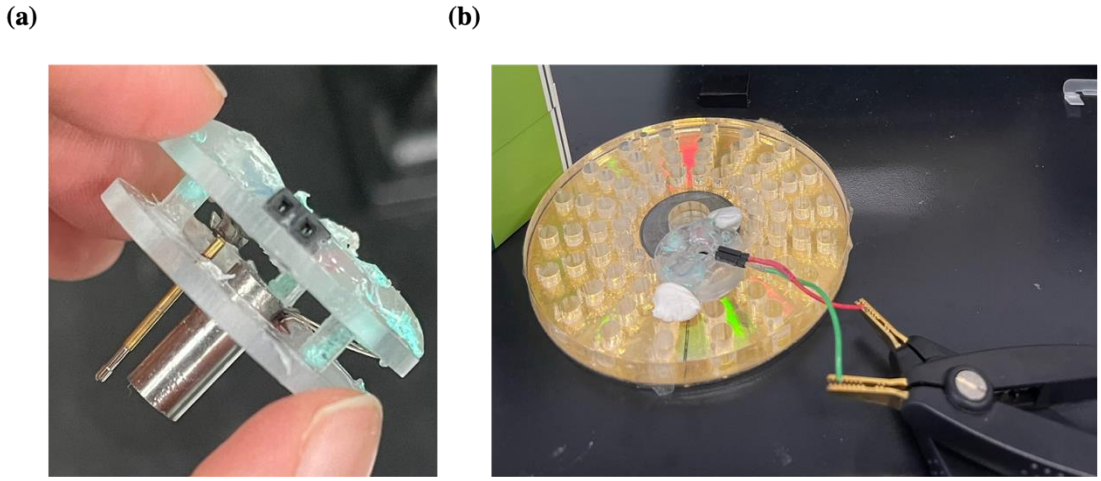


圖 3- 4 CD 金電極連接 LCR meter 之電容量測示意圖。（a）自製 adaptor 中不鏽鋼柱作為對極，金屬探針連接底部 CD 金形成工作電極

doi:10.6342/NTU202301818

3.5 電子式電容感測器結合網印碳電極感測蛋白分子

3.5.1 電子式電容感測架構

電子式電容生物感測器以碳電極，如以下圖 3-4，結合電容（類比）轉數位模組連接電腦中的 Labview 進行量測，將碳電極界面的生化反應經由電容訊號轉數位訊號的方式分析。生物辨識元件是由化學製程將辨識分子固定於碳電極而成，而本實驗所使用的類比轉數位模組，其功能區塊圖如下圖 3-5，此模組電容輸入範圍為±4 pF，最多至 17 pF 的共模電容（common-mode capacitance），可以通過可編程的數字電容轉換器（ CAPDAC）進行訊號運作。核心由二階調節器（Σ-Δ or charge balancing）與三階數位濾波器組成（Digital filter）作為電容輸入的轉換器。其餘此模組集結多功器（Multiplexer）、激發源（Excitation source）（EXCA/EXCB）和用於電容輸入的 CAPDAC、時鐘（Clock generator）等進行電訊號以及數位訊號的產生。

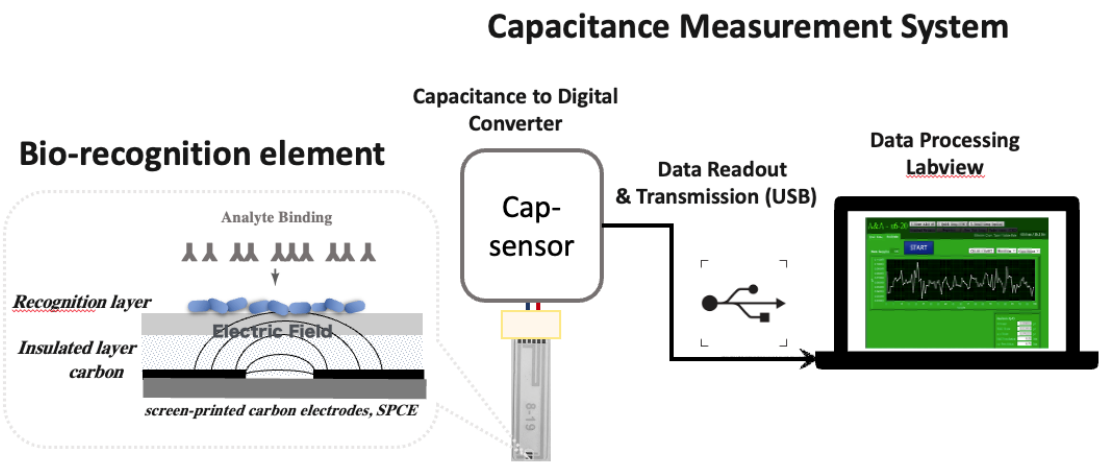


圖 3- 5 電子式電容感測器架構

doi:10.6342/NTU202301818

3.5.2 抗原的固定化程序

使用常見的絕緣保護劑（KONTAKT CHEMIE PLASTIK 70）作為絕緣膜的材料，其中以丙烯酸樹脂（Acrylic resin, AR）主要成分，一開始嘗試了噴的方式，但難以控制噴頭與電極的距離與按壓噴頭的力度，造成絕緣膜的厚度電容值差異大，所以後來改用滴落（Drop-coating）的方式製備絕緣膜，考量到揮發性溶液在取用的時候所造成的濃度差異，使用因此在絕緣層製作前先將 AR 搜集至微量離心管中靜置固定時間再以固定體積滴在碳電極的工作區域進行電容值的量測，可以藉由電容值大小反映出絕緣膜的厚度，同時作為絕緣層製備的品管標準。本研究選擇了硝化纖維素（Nitrocellulose, NC）、幾丁聚醣（Chitosan）兩種材料，分別以液態硝化纖維素（NC）與製備在醋酸的幾丁聚醣以滴落（Drop coating）在工作電極表面上形成薄膜，之後浸泡至 BSA 溶液中進行吸附動作。將 AR 蒐集（噴）於微量離心管中開蓋存放 15 分鐘後，以 0.9 μl 體積滴於網印碳電極的通做區域上並自然烘乾。將製備好絕緣層的碳電極表面的藍色保護膜撕下，以 0.9 μl NC 滴在電極上自然烘乾。再將碳電極泡在蛋白溶液中透過疏水性吸附在 NC 上，將 Anti-BSA 滴於吸附完 BSA 的感測電極反應區上，以最高濃度 25 μg/ml 的 Anti-BSA 與 0.01-100 mg/ml 的 BSA 進行反應而後用 PBS 清洗，最後確認以 10 mg/ml 為 BSA 蛋白最佳濃度，所有感測界面的製程架構如以下圖 3-6 所示。

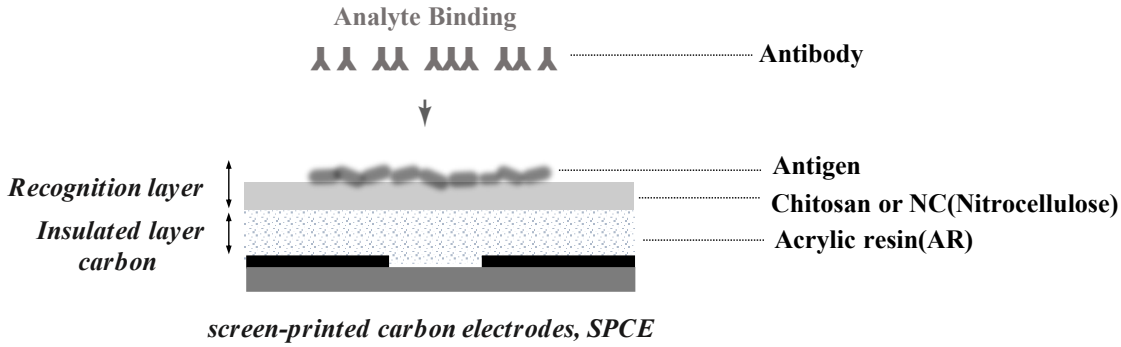


圖 3- 6 生物辨識元件感測界面示意圖

doi:10.6342/NTU202301818

3.6 抗原吸附效果及抗體抗原專一性結合的生化試驗確效

3.6.1 雙辛可寧酸測定法蛋白與銅離子反應實驗

本實驗選用西方墨點法蛋白樣品定量製備程序中的雙辛可寧酸測定法（Bicinchoninic acid assay, BCA assay）方法，在此生化分析工具中蛋白定量法（Protein assay）是藉由染色後的吸光值與標準曲線回推蛋白質的濃度。由於本實驗的待測物濃度以及材料上的限制，無法利用吸光值判讀濃度，只能透過肉眼觀測比較顏色的變化，將抗原（BSA）固定於感測界面後直接將 BCA 混合試劑直接滴於碳電極工作區域，並放於 37 度培養箱中反應 30 分鐘，等試劑中的銅離子被蛋白分子還原，即會從原本的淡青色依照蛋白濃度變成紫色。

3.6.2 ECL 冷光呈色對抗體結合的確效

將碳電極浸泡於牛血清白蛋白（BSA）溶液中三小時。接著，簡單的 PBS 清洗三次後，滴上濃度為 25 μg/ml 的 anti-BSA 抗體。在滴上抗體後，讓樣品靜置一小時，抗體就會跟著牛血清白蛋白結合。接下來，用 PBS 清洗掉多餘的 anti-BSA，只有與牛血清白蛋白結合的抗體會留在電極表面上。為了進一步檢測抗體與牛血清白蛋白之間的結合情況，滴上與 anti-BSA 對應的二抗，濃度為 1:200000。這種二抗會帶有 HRP 酵素並與 anti-BSA 結合，形成一種複合物。最後再進行三次 PBS 的清洗，在電極界面滴上 ECL 試劑進行反應，試劑含有受質會與 HRP 結合持續發出冷光，此時就能透過 UVP 照影系統來得到實驗結果。

3.6.3 雷射顯微鏡分析生物辨識元件之薄膜厚度

將生物辨識元件（碳電極）使用 VK-9500 3D profile microscope (Keyence, Japan) 雷射顯微鏡以 20X 物鏡進行碳電極表面輪廓的掃描分析，再以 10X 物鏡進行二維分別掃描製備了絕緣層（丙烯酸樹脂）與吸附層（硝化纖維素薄膜）

doi:10.6342/NTU202301818

後的碳電極表面高度，以碳電極表面的白色 PET 為基準，將二維高度圖進行疊圖，以凹槽中的平坦區域相對高度值進行平均（約 400 筆高度點），與 PET 最高點處相比並計算高度差，以此分析絕緣層與硝化纖維素薄膜厚度。

doi:10.6342/NTU202301818

第四章 結果與討論

4.1 以電化學阻抗圖譜法（EIS）測定蛋白

4.1.1 以柱狀金電極/自製 CD 金電極確認蛋白固定之方法

本研究在電化學體系中所使用的修飾方法，如章節 3.3.2 中所提到的化學反應機制，先以市售的柱狀金電極浸泡在濃度為 40 mM 的巯基丙酸（MPA）2 小時中形成自組裝單層分子薄膜，再以 4mM 的 EDC/NHS 作為交聯劑與在 SAM 表層的羧基反應，最後與卵白蛋白（Ovalbumin, OVA）的胺基結合，可見圖 4-1 透過電化學阻抗頻譜分析 Nyquist plot 圖，在每一個步驟中 Rct 的變化表明了界面上分子堆疊厚度以及帶電性的綜合影響所致的阻抗結果，初步的證實每個步驟的成功修飾導致界面上有不同的物化性質。

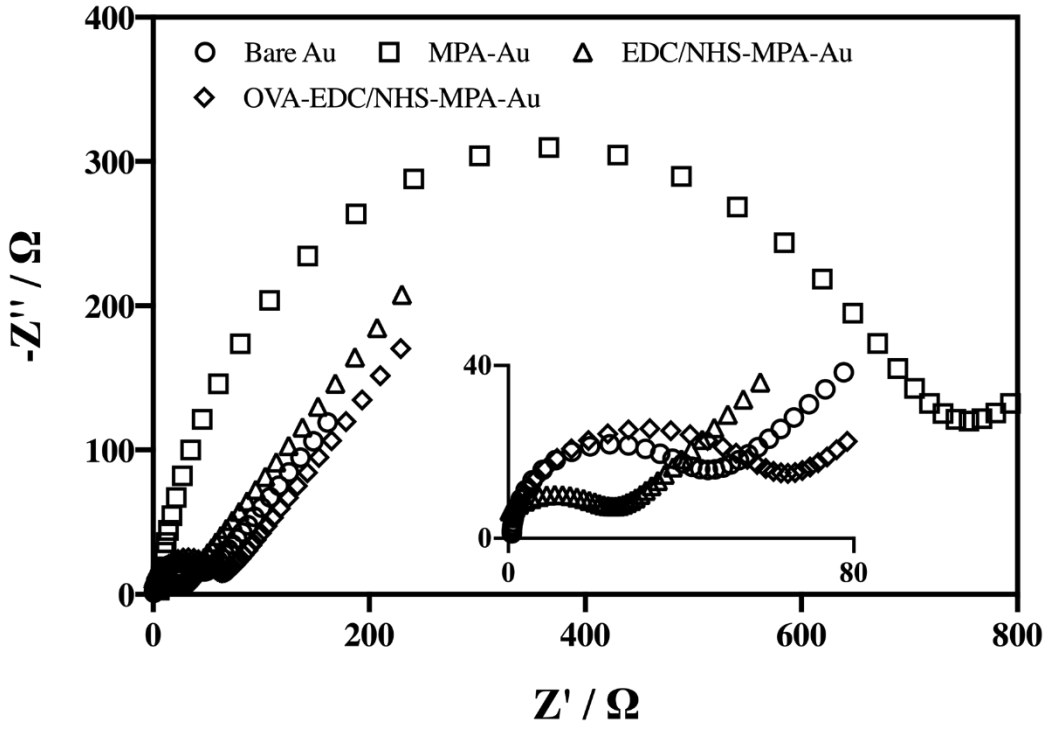


圖 4-1 蛋白固定於柱狀金電極化學程序之 EIS 量測響應。金電極浸泡至濃度為 40mM 的 3-MPA 中 2 小時進行修飾，之後再以去離子水清洗並浸泡至 4mM 的

doi:10.6342/NTU202301818

EDC/NHS 中 1 小時一樣以去離子水清洗，最後滴上 1% OVA 吸附 1 小時。每個修飾步驟皆進行 EIS 量測。EIS 偏壓設定為 0.23V，量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

進一步地進行不同具有不同碳鏈長度的 SAM 分子進行修師包括：MPA（3C）、MUA（11C）、MHA（16C）修飾以及蛋白結合後的阻抗比較，如圖 4-2，在測試三種長度的碳鏈後，依照阻抗大小可見 11C-MUA 相對其餘兩種長度的 SAM 分子在電化學分析儀器中可見其具有較好的絕緣度，因此以 11 個 C 的 MUA 作為 SAM 分子的最佳選擇，不同的碳鏈的 SAM 分子接上蛋白後阻抗皆下降同樣與圖 4-1 有相同趨勢。

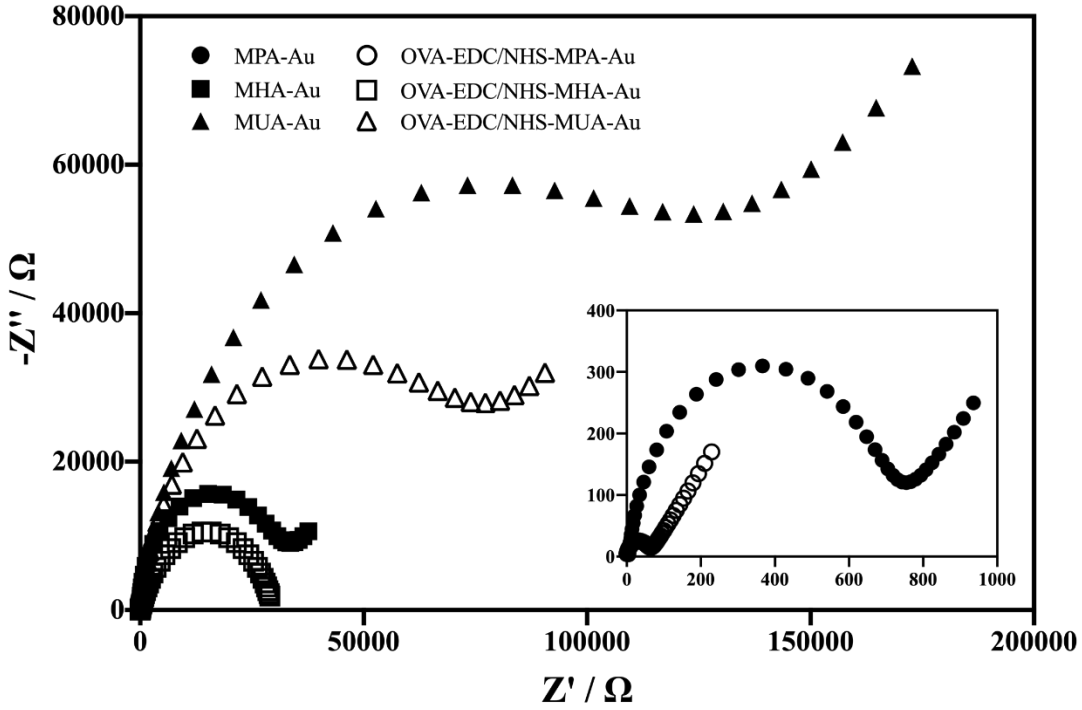


圖 4- 2 不同鍊長的自組裝單層於金電再透過交聯劑與蛋白結合之 EIS 圖。
將電極浸泡於 40mM 的 3-MPA、11- MUA、16-MHA 兩小時透過交聯劑與 1% 蛋白結合。每個修飾步驟皆進行 EIS 量測。EIS 偏壓設定為 0.23V，量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

doi:10.6342/NTU202301818

雖然在 SAM 易於金表面形成單層分子結構，修飾時間與排列的緻密程度息息相關，還需進行濃度與時間等最佳參數的評估，將同樣一支柱狀金電浸泡在 40mM 的 11-MUA 以不同長度的時間進行 SAM 的製備進行 EIS 分析，由圖 4-3 呈現，在 2 小時不足以形成穩定的 SAM，在 6 小時到 24 小時之間變化不大，表示到達一定的致密度。於此發現，修飾時間越長 SAM 越緻密阻抗越大，雖然可以觀察圖形辨別出不同修飾時間所致的阻抗差異，但即便是 2 小時的 SAM 已經無法形成完整的半圓，雖然可以以仿效電路圖 fitting 出 Rct 數值，但實際在定量上的精確度還有待商榷。

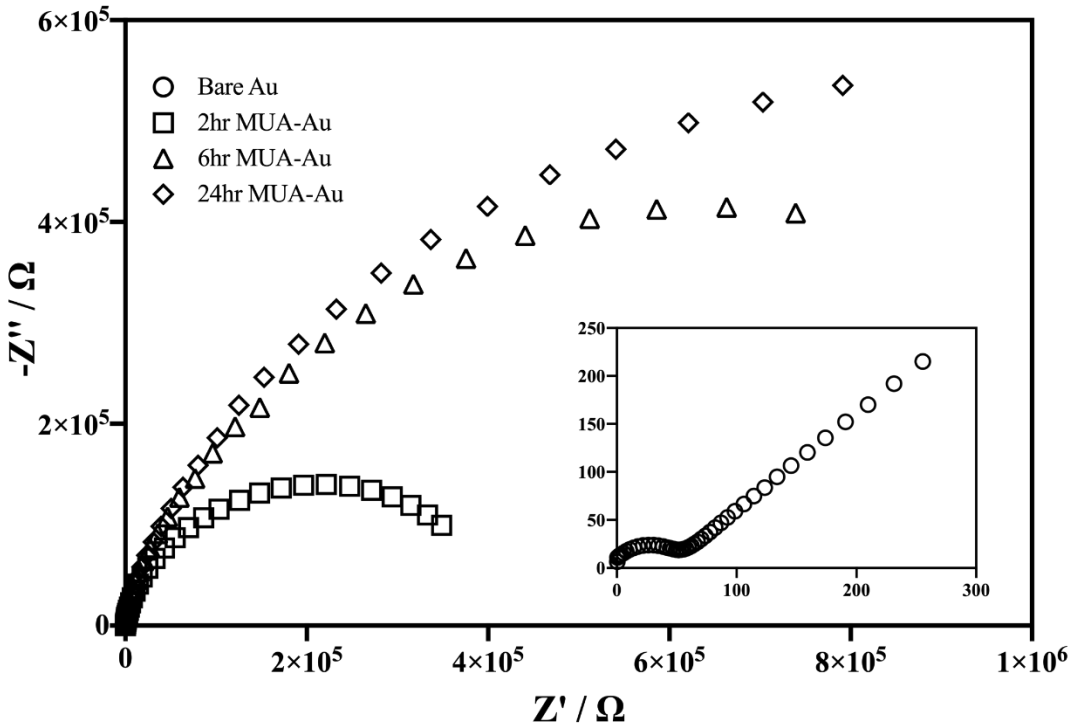


圖 4- 3 同一根柱狀金電極進行 40 mM 的 MUA2 小時、6 小時、24 小時修飾之 EIS 圖。EIS 於 10 mM $K_4(Fe(CN)_6)/K_3(Fe(CN)_6)$溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

doi:10.6342/NTU202301818

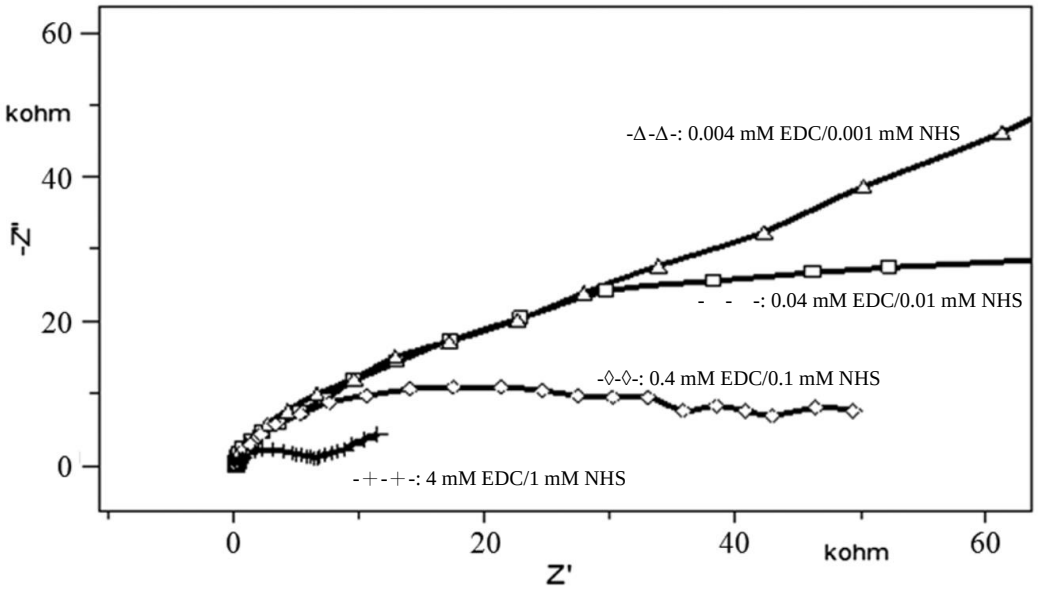


圖 4- 4 文獻中不同濃度的 EDC/NHS 於 MUA 上的組抗分析。(Bahadir et al., 2016)

依據文獻中實際的探討不同濃度的 EDC/NHS 在修飾了兩小時 MUA 的阻抗比較，可以了解到相對濃度較高的 EDC/NHS 活化 SAM 表面羧基後形成的活性酯會導致阻抗下降，如圖 4-4 Bahadir 等人的研究。接下來，在圖 4-5、4-6 分別呈現製備了 2 小時與 24 小時的 SAM 之後以同濃度 0.4/0.1 mM 的 EDC/NHS 與 OVA 結合，顯示了雖然在長時間修飾的情況下提高了緻密度，但同時在排列緻密的情況下蛋白結合的變化幅度更不明顯。

doi:10.6342/NTU202301818

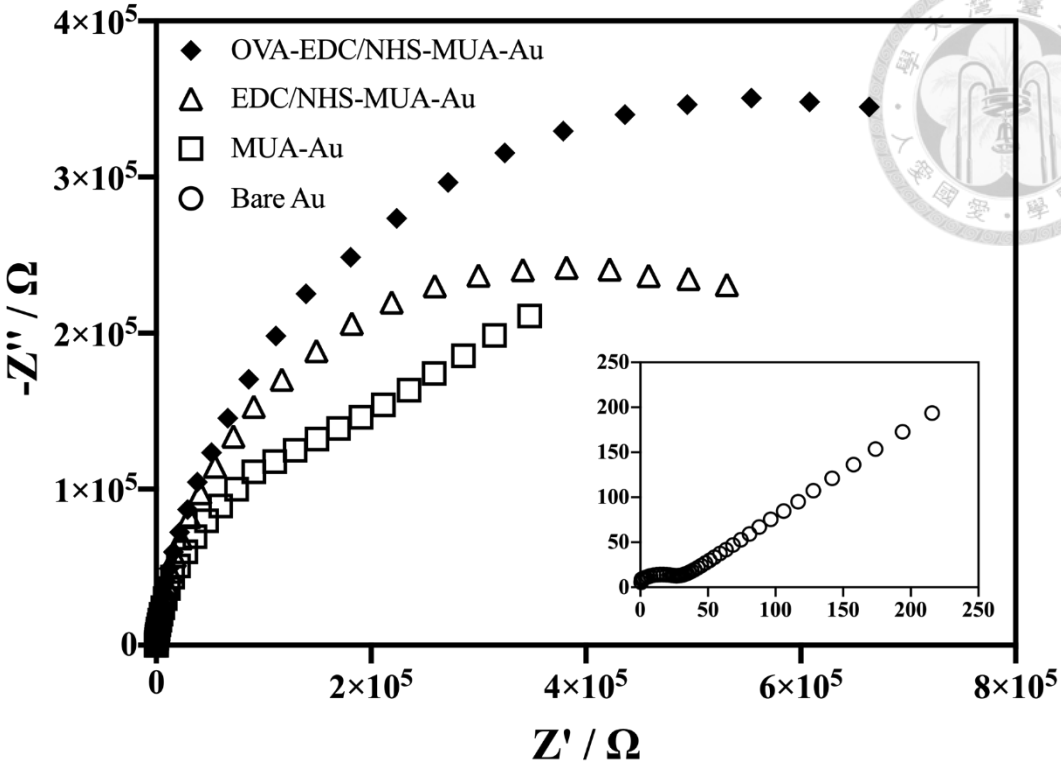


圖 4- 5 蛋白質固定於製備好 MUA（2hr）的柱狀金電極過程之 EIS 量測。以柱狀金電極浸泡於 40mM 的 MUA 2 小時，以去離子水清洗表面再浸泡在 0.4mM/0.1mM 的 EDC/NHS 中 1hr，最後將 1%OVA 滴在電極上，每個修飾步驟皆進行 EIS 量測。EIS 於 10 mM $K_4(Fe(CN)_6)/K_3(Fe(CN)_6)$溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

doi:10.6342/NTU202301818

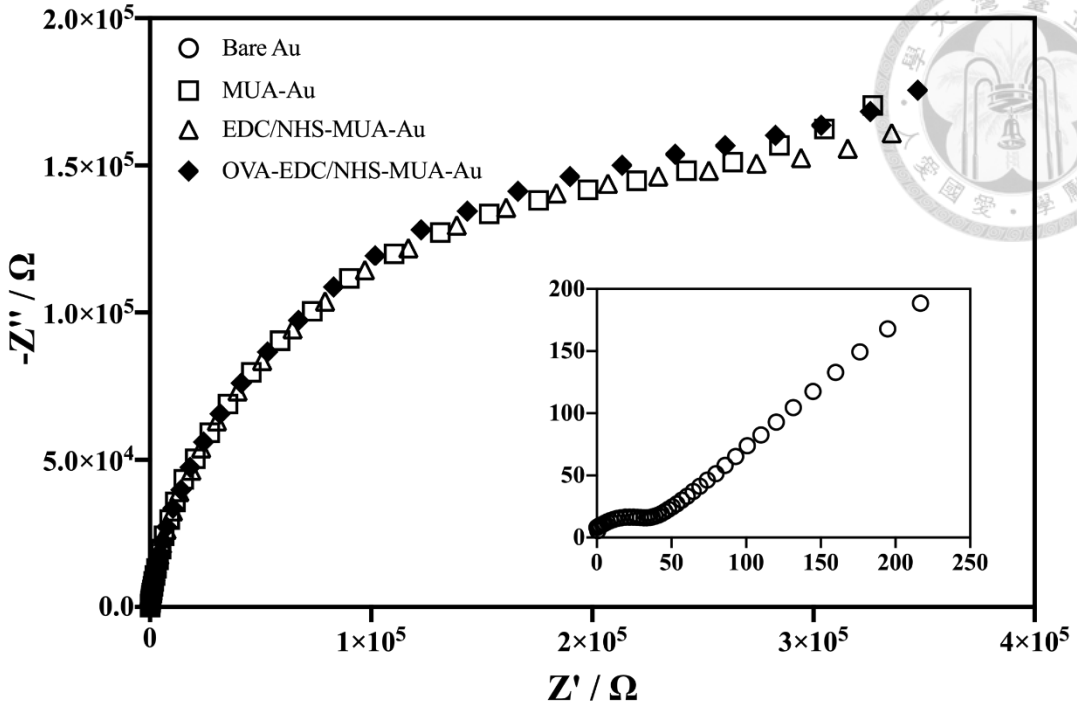


圖 4- 6 蛋白質固定於製備好 MUA（24hr）的柱狀金電極過程之 EIS 量測。以柱狀金電極浸泡於 40mM 的 MUA 24 hr 後，去離子水清洗表面再浸泡 0.4mM/0.1mM 的 EDC/NHS 中 1hr，最後將 1%OVA 滴在電極上，每個修飾步驟皆進行 EIS 量測。EIS 偏壓設定為 0.23V，量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

4.1.2 自製 CD 金電極之電化學特性與蛋白固定化參數

電化學感測體系中的工作電極，常以惰性金屬金為材料，具有高度化學穩定性、良好的電子傳遞效率、修飾與製備技術成熟。為了提高分析效率，本研究以早期的CD片中的金開發成自製CD金電極。為了確保其製成穩定性與電極的可用性，我們使用循環伏安法將製作好的自製CD金電極與市售柱狀金電極進行比對，在量測前將市售柱狀金電極使用氧化鋁進行物理性清洗和食人魚水（H_2SO_4：H_2O_2 = 3：1（v/v））進行化學性清洗；自製的CD金電極泡於30%硝酸中進行化學性的清洗去除表的塑膠再貼上單雙面膠與壓克力形成金電極，而後進行CV的量測，結果如圖4-7的CV圖，與市售的柱狀金電極相比，自製的CD

doi:10.6342/NTU202301818

金電極 Ipa = -158.100 ± 33.285 μA 、Ipc = 189.317 ± 34.357 μA、ΔE = 0.164 ± 0.58 V。

doi:10.6342/NTU202301818

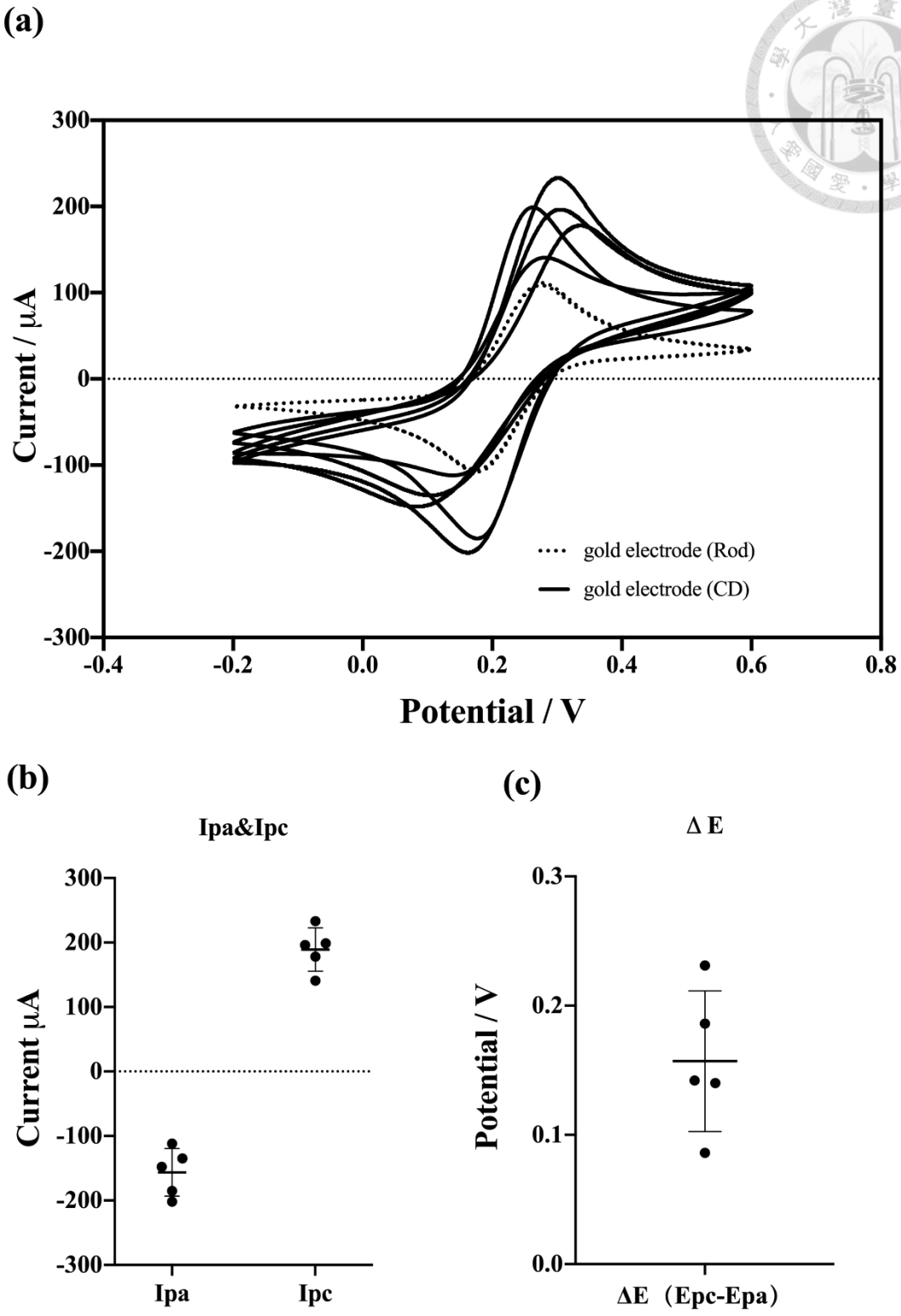


圖 4- 7以循環伏安法分析自製CD金電極。（a）實現為市售柱狀金電極、虛線為自治CD金電極的CV圖（b）。CV掃引於0.1 M PBS（pH=7.0）溶液中量測，電位為-0.2-0.6V（vs. Ag/AgCl），掃描速率為0.1 V/sec。

doi:10.6342/NTU202301818

從眾多文獻中皆表明，不同碳鏈長的 SAM 的緻密度與感測器的靈敏度和穩定性息息相關(Anandan et al., 2009)，本章節以 CV、EIS 衍伸的 ECS 電化學方式分析 MUA 自組裝單層分子在不同時間下修飾於金電極的結果。大部分的阻抗式電化學感測器在電化學體系 EIS 的分析中往往需要需要在良好的導體下組建穩定的分子屏障，但在章節 4.1.2 可以看到 MUA 在同濃度但在不同修飾時間下形成成的單層分子很難再有氧化還原試劑（redox couple）中進行 EIS 分析圖透過組抗分析，而後以循環伏安法非分析長時間 24 與 48 小時間的 MUA 修飾可見雖然可以在氧化還原電流的下降上看出 48 小時的更為緻密，但從兩重複下可見具有較低的重複性，如圖 4-8 所示。

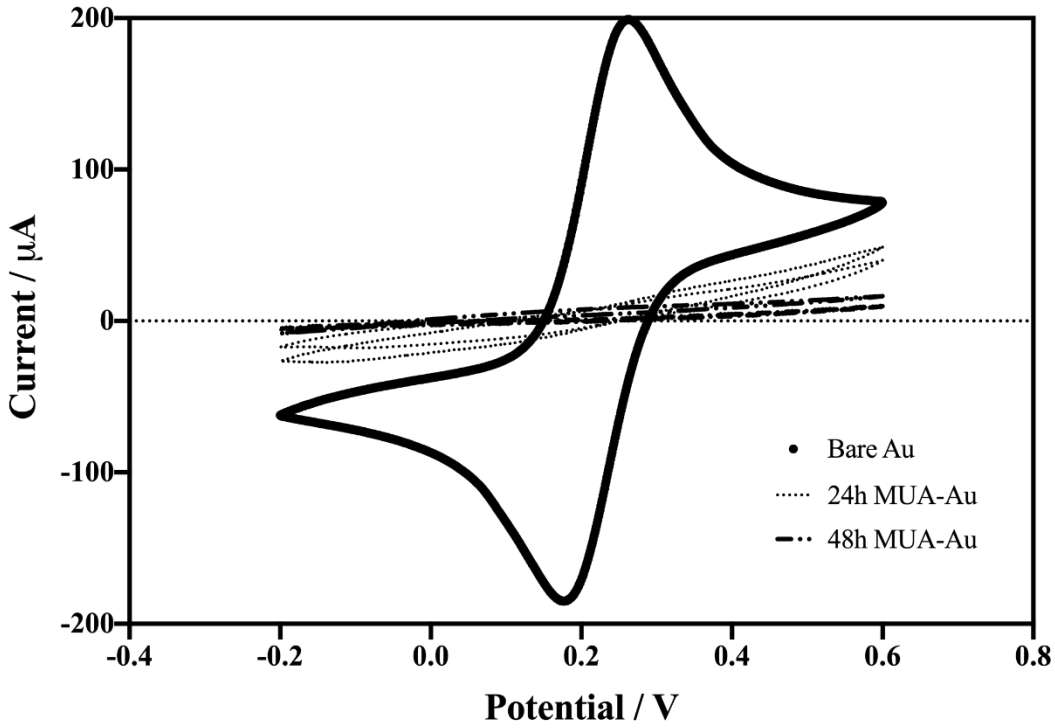


圖 4- 8 長時間製備 40 mM MUA 於 CD 金電極之 CV 圖。CV 掃引電位為-0.2-0.6V，掃描速率為 0.05V/sec 於中量測。

回朔到2007年。日本東京的一群學者Itagaki等人在多孔電極的相關研究中，探討20 世紀中期所發明EIS體系以來電化學阻抗分析中典型等效電路與複數電容（Complex capacitance C）的關係，儘管電化學體系中大多以電雙層電容描述界面儲存電荷的現像模擬變容器的概念，將電化學阻抗由Ｚdomain 轉換成Ｃ

doi:10.6342/NTU202301818

domain （第二章節有提到），此轉換方法在不同學者的研究中有不同的觀點，隨著電化學感測器的發展，分子行感測成為重要的應用之一，生化分子於電極上修飾後，在溶液中分子表層的等效電容可能不在單單是存在雙電層電容，而是複合的電容(Bueno et al., 2014)。

EIS體系中以溶液中的氧化還原試劑在量測過程中作用，在Baradoke等人的研究中以無還原氧化試劑的狀況下量測，藉由在阻抗轉換為電容C’’ (ω) = $Z'/\omega Z^2$ 與 $C'(\omega) = Z''/\omega Z^2$進行複數電容分析，依然具有良好的敏感度，同時避免在複雜的氧化還原反應中感測界面（SAM）的缺陷或其他因素影響電子傳遞造成的量測不穩定性(Baradoke et al., 2020)

doi:10.6342/NTU202301818

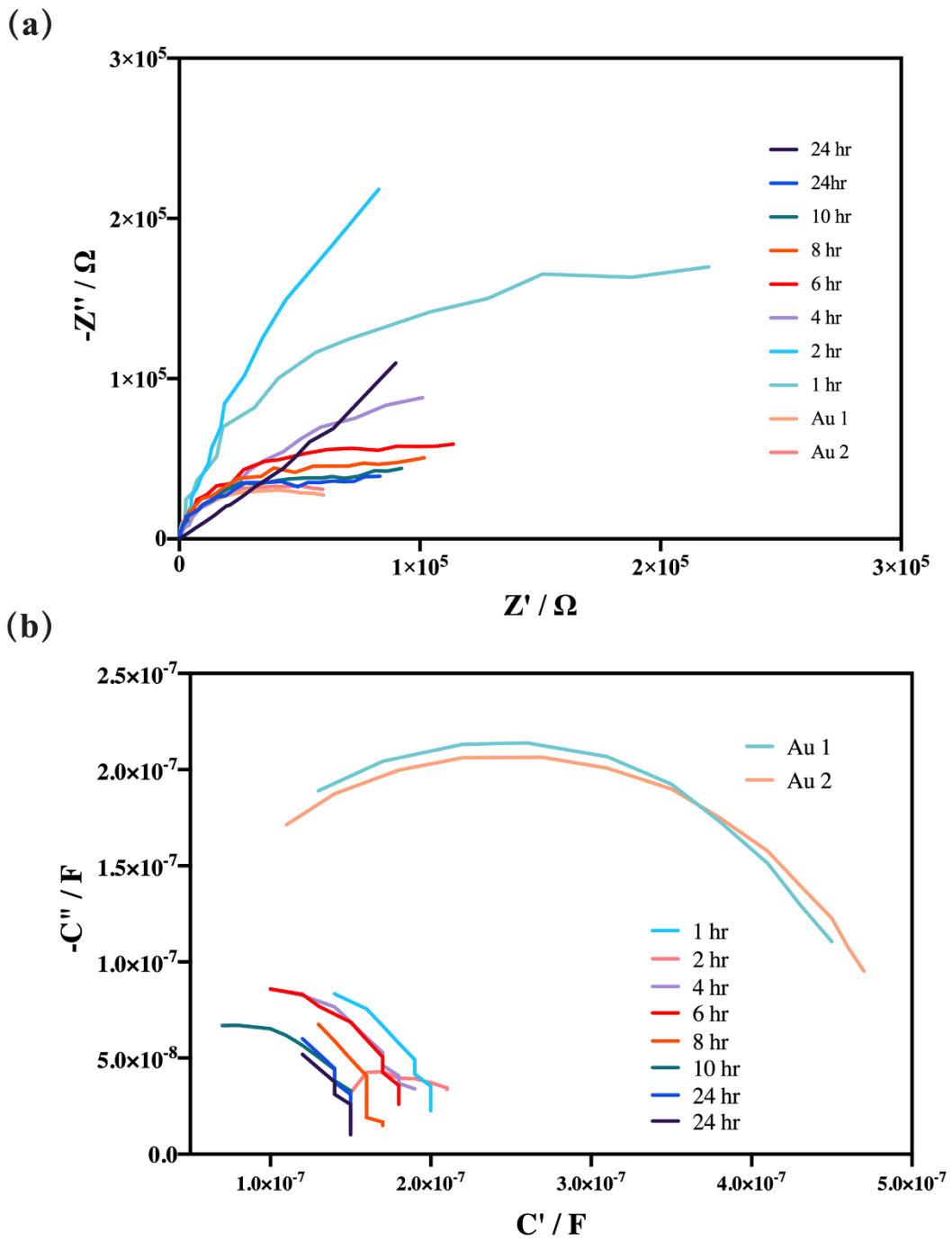


圖 4- 9 Redoxless 不同時間長短 MUA 修飾於金電極之 EIS 轉 ECS。EIS 於 10 mM $K_4(Fe(CN)_6)$/K3(Fe(CN)6)溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

doi:10.6342/NTU202301818

在SAM修飾的金電極表面上，可以使用交聯劑EDC/NHS將蛋白分子固定在金電極表面上是相當成熟的技術，在這項步驟中MUA末端的羧基與NHS縮和所生成的中間產物具有電化學活性，因此與在製備過程中加上EDC/NHS與MUA分子進行阻抗量測的比較下，濃度越高的EDC/NHS與自組裝單層反應阻抗值越小，(Bahadir et al., 2016)，本章節以製備兩小時40 mM的MUA於金電極，加上不同濃度的EDC/NHS以短時間和長時間進行反應，進行EIS量測，結果如圖3-10所示，濃度為0.4/0.1的EDC/NHS的與MUA反應5 min的結果於反映的過渡期並沒有完全反應，而以相同濃度反應40 min以及低濃度0.004/0.001 min反應40 mM有相同的阻抗效果，為了確保反應的一致性，決定以0.4/0.1 mM反應為EDC/NHS修飾參數。

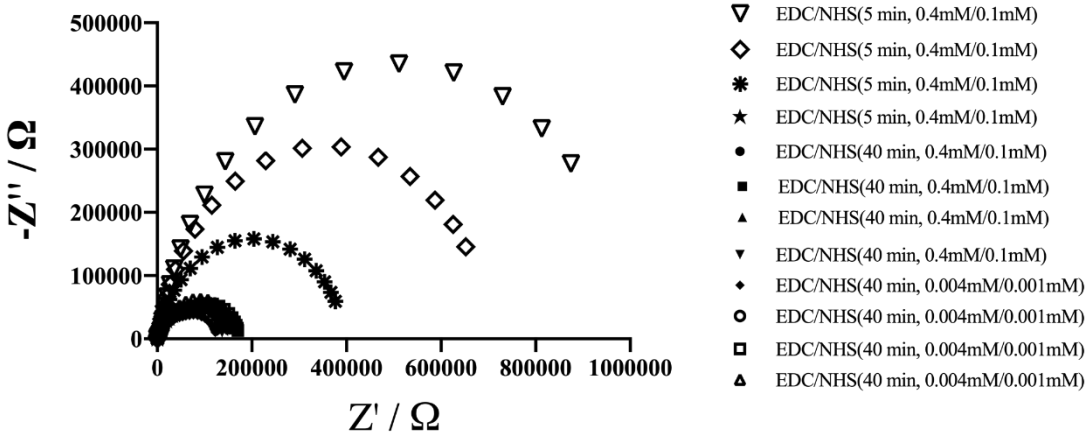


圖 4- 10 兩小時製備的 MUA 加上以不同濃度與修飾時間的 EDC/NHS 進行阻抗量測。將 CD 金電加上 40 mM 的 MUA 進行兩小時的修飾後，結合不同時間及濃度的交聯劑 EDC/NHS 進行阻抗量測。

4.1.3 蛋白固定於自製辨識元件之電化學阻抗定量分析

分子在金屬表面上修飾後形成的物理性屏障是電子轉移阻抗增加的主要因素，所以電化學阻抗式的感測器擅長利用阻抗增加與修飾的成果或是待側物濃度進行比較。本研究在自製 CD 金電極上製備了自組裝單層後與金電極相比電

doi:10.6342/NTU202301818

子轉移阻抗相比皆為增加，再加上交聯劑 EDC/NHS 後電容值下降，不同的 EDC/NHS 修飾濃度與時間會影響組抗值的大小在前一章節有提到，本章節以濃度 0.4/0.1 mM 、0.004/0.001mM 的 EDC/NHS 修飾 20 小時製備的單層分子界面，再與不同濃度蛋白結合，在等效電路模擬下分析蛋白結合後與自裝單層的界面 Rct 的變化，將 Rct 變化倍率與蛋白濃度繪製出之關係圖，可見圖 4-11 與圖 4-12 的（e），隨著蛋白濃度提升阻抗變化倍率提升且電容下降，同時也可以觀察到在濃度較高的交聯劑使整體阻抗大幅下降，以致與蛋白結合後的組抗變化雖然數值為負，整體蛋白濃度為 0.1-1 mg/ml 的檢測上敏感度略高，而在較低濃度的交聯劑加上蛋白後的阻抗變化在蛋白濃度為 0.5-1mg/ml 時變化幅度減少。本研究欲以 EIS 探討電化學體系的蛋白結合策略與生化訊號，在參數選擇上以長時間（十小時以上）進行單層分子修飾，再與 0.4/0.1 mM 交聯劑 20 分鐘完全活化 MUA 單層分子尾端之羧基，最後與蛋白進行結合。

初步以 EIS 作為蛋白分子定量之工具，可以看到在此體系中了解到單層分子作為絕緣平台需要有適當的分子長度使整體阻抗大小座落在一般可分析的頻域範圍，才可以透過 EIS 等效電路模擬 Rct 大小，若參考文獻之方法將 EIS 進行電容的轉換或許能夠在阻抗較大的情況下有較好的分辨率，或是需要回歸到 EIS 在交流電下在不同頻率獲得的資訊再進行更深入的探討。

doi:10.6342/NTU202301818

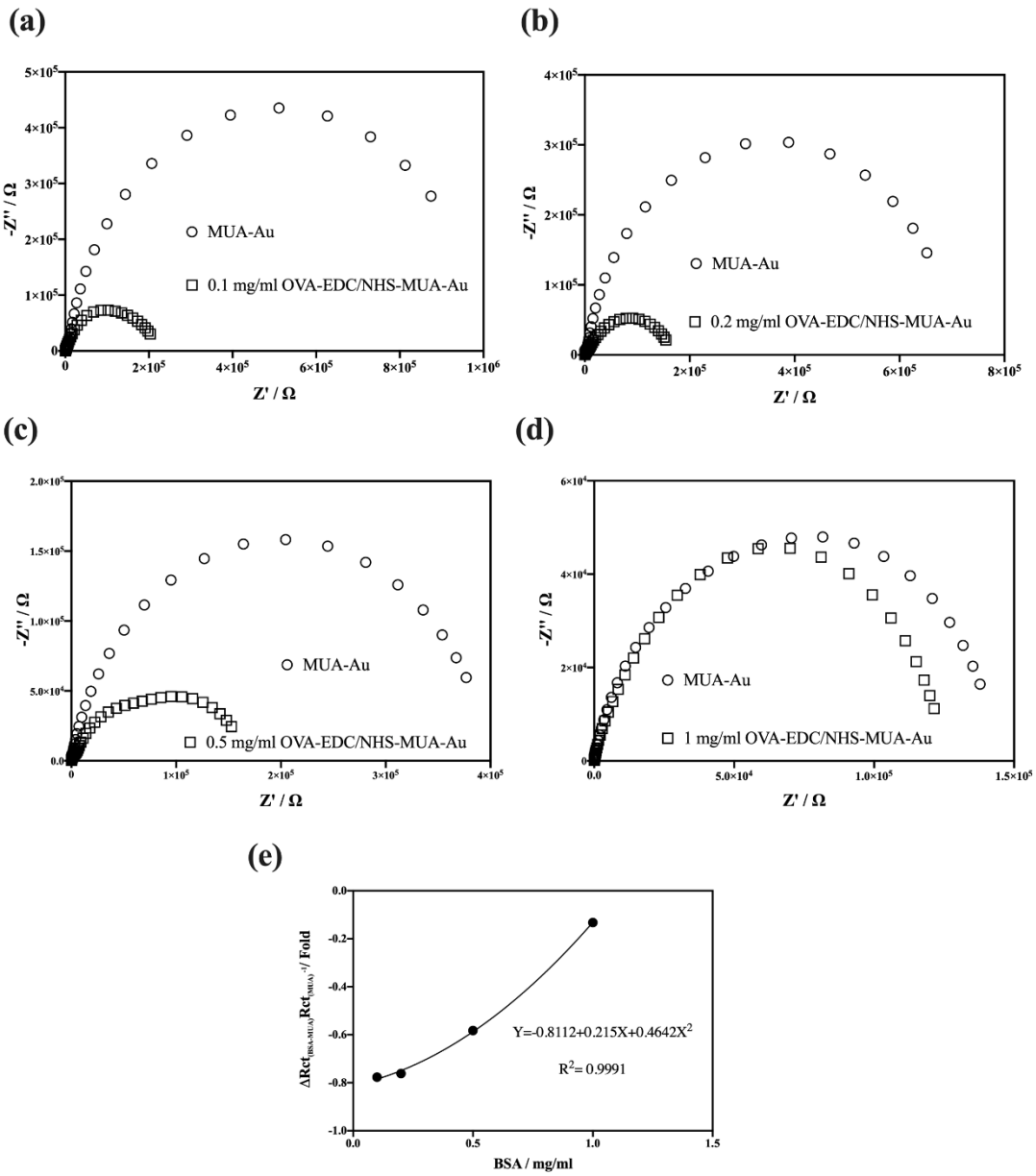


圖 4- 11 不同濃度的蛋白藉由 0.4/0.1 mM 的 EDC/NHS 修飾於長時間（20 小時）製備 MUA 單層分子於金電極的阻抗比較。蛋白濃度為（a）0.1 mg/ml、（b）0.2 mg/ml、（c）0.5 mg/ml、（d）1 mg/ml（e）不同濃度蛋白結合後的變化倍率與蛋白濃度關係。

表 4- 1 不同蛋白濃度結合與自組裝單層進行 EIS 量測的 Rct 原始數據

$Rct_{(BSA)}$	**224.6**	**168.66**	**167.53**	**125.74**
$Rct_{(MUA)}$	**1007.44**	**707.72**	**401.613**	**145**
Protein C.(mg/ml)	**0.1**	**0.2**	**0.5**	**1**
$\Delta Rct_{(BSA-MUA)}/Rct_{(MUA)}$	**-0.77706**	**-0.76169**	**-0.58286**	**-0.13283**

doi:10.6342/NTU202301818

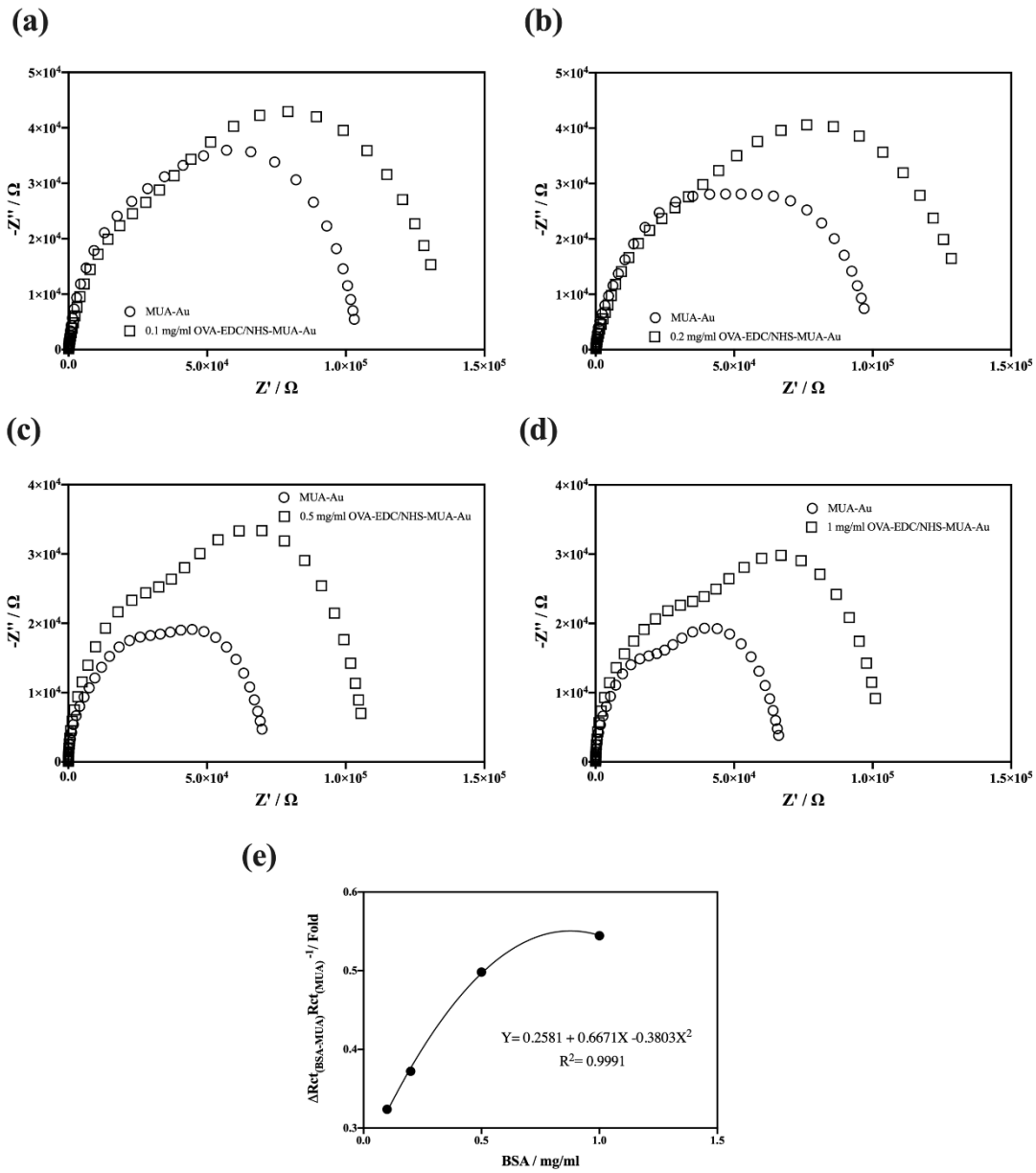


圖 4- 12不同濃度的蛋白藉由0.004/0.001 mM 的EDC/NHS修飾於長時間（20小時）製備MUA單層分子於金電極的阻抗比較。蛋白濃度為（a）0.1 mg/ml、（b）0.2 mg/ml、（c）0.5 mg/ml、（d）1 mg/ml（e）不同濃度蛋白結合後的變化倍率與蛋白濃度關係。

表 4- 2 不同蛋白濃度結合與自組裝單層進行 EIS 量測的 Rct 原始數據

$Rct_{(BSA)}$	**137.94**	**136.67**	**107.44**	**104.2**
$Rct_{(MUA)}$	**104.2**	**99.6**	**71.71**	**67.46**
Protein c.(mg/ml)	**0.1**	**0.2**	**0.5**	**1**
$\Delta Rct_{(BSA-MUA)}/Rct_{(MUA)}$	**0.3238**	**0.372189**	**0.498257**	**0.544619**

doi:10.6342/NTU202301818

4.1.4 ECS 對於蛋白定量可行性頻估

儘管雖使用等效電路模擬求得Rct值在定性上可以略透過電子轉移阻抗的變化倍率與修飾蛋白濃度有良好的濃度趨勢，但實際在定量上並非是典型的法拉第程序下所得的Nyquist plot圖，因此在分析上只能作為模擬分析後的定性參考。在有redox couple (黃血鹽/赤血鹽)溶液中EIS的量測下，複數阻抗的實部與虛部分作轉換為複數電容得虛部與實部，可以明顯地看到自組裝單層分子的修飾、蛋白分子的修飾與金電極的電容在實部上的差距為五倍，如圖3-8，相較圖3-9單純在PBS中量測，再有氧化還試劑下較能將蛋白質修飾與單層分子修飾分開，看出電容值的差異。

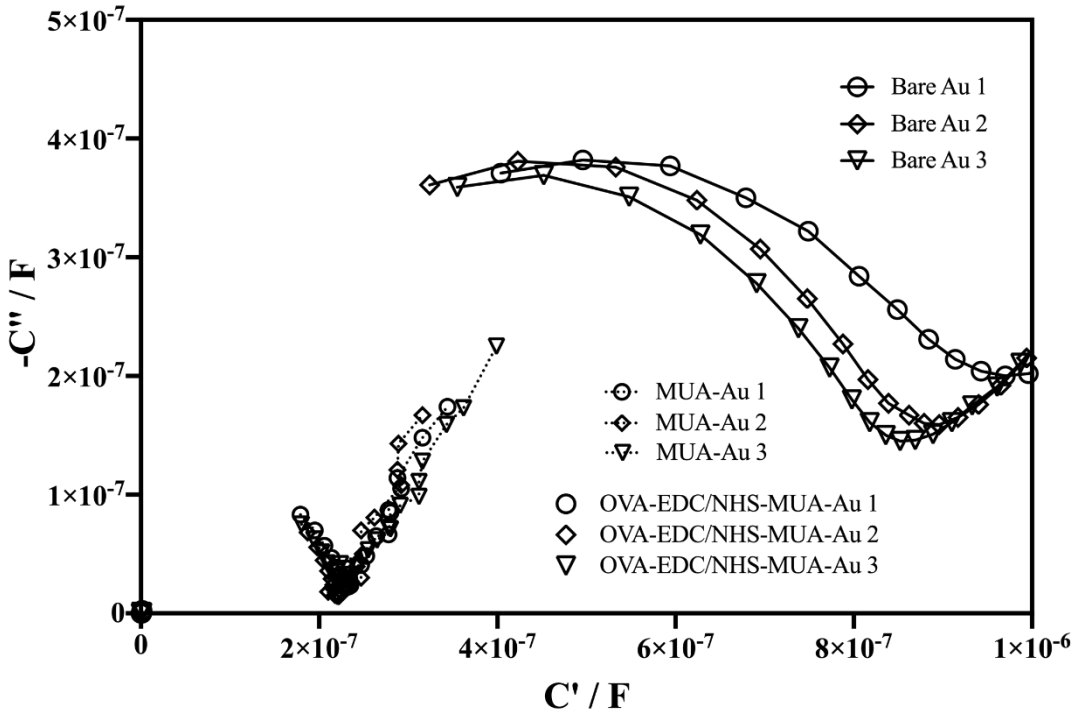


圖 4- 13 在 with redox 情形下以 EIS 量測進行蛋白固定過程分析。EIS 於 10 mM $K_4(Fe(CN)_6)/K_3(Fe(CN)_6)$溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。

doi:10.6342/NTU202301818

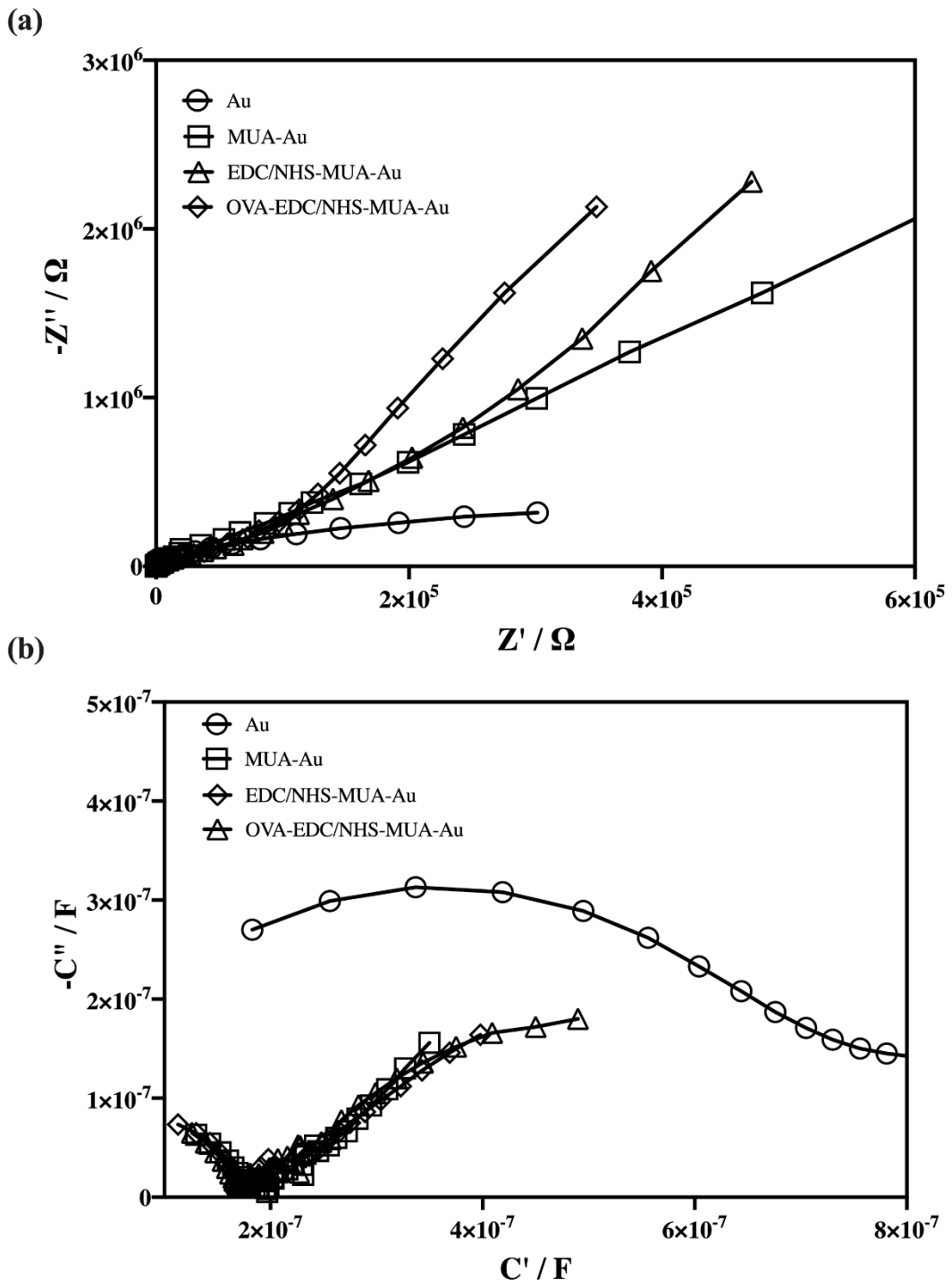


圖 4- 14 在 without redox 情形下進行 ECS 分析蛋白結合。EIS 於 10 mM PBS 溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10 kHz - 0.1 kHz。將 EIS 依照論文中轉換為複數電容。

doi:10.6342/NTU202301818

4.2 以 EIS 波德圖及 LCR 錶測定固定於 SAM 上的蛋白

4.2.1 EIS 波德圖分析

以阻抗頻譜在交流電體系所獲得的頻率與相位角、阻抗等資訊來探討MPA和MUA在不同時間下修飾效果與蛋白結合分析，在實驗過程中本研究觀察頻率從0.1-10k Hz在相位角的差別，結果如圖4-15，MPA在修飾30分鐘以上相位角不超過-70度，MUA在修飾30分鐘以上相位角為-90度，在EIS的奈氏圖中理想狀態為相位角接近45度時，可以以模擬的Rct與Cdl分析阻抗及界面上電雙層電容，交流電體系中電壓電流的相位差越接近90度時可以代表偏向電容性的量測與LCR錶中的D值有類似的代表意義，表示形成的膜絕緣度較好，顯示MUA修飾具有一定的緻密度。

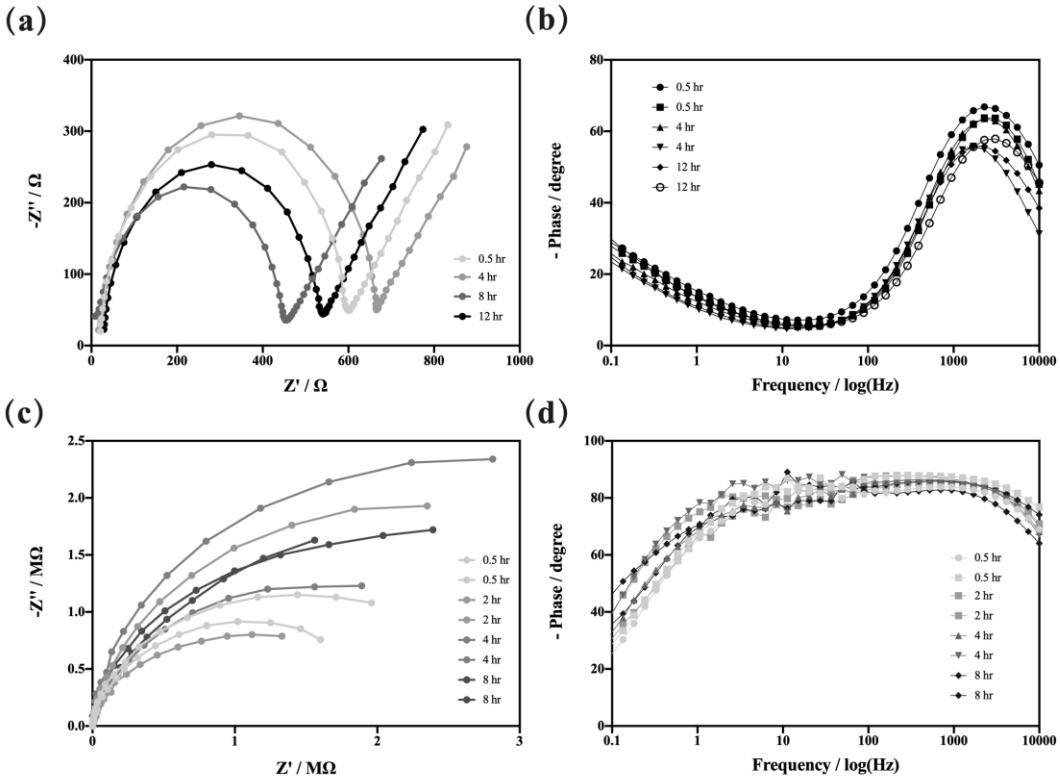


圖 4- 15 不同鏈長的 SAM 形成單層分子後的 EIS 及波德圖分析

接下來更深入的探討蛋白修飾於SAM後，在不同頻率下的電容與阻抗資訊，圖4-16（a）、（b）可以看到MPA作為SAM透過EDC/NHS交聯劑在蛋白修飾後，

doi:10.6342/NTU202301818

在阻抗變化的部分，不管在0.5小時還是4小時皆可以在頻率 0.1-1k Hz具有分辨性，蛋白濃度越大阻抗越大。轉換為電容後，在圖4-16（c）、（d）可辨電容實部的頻率區段為 0.1-10 Hz，隨著蛋白濃度越大電容值越小，最終在頻率為1 log Hz的地方進行Z、C’變化量與蛋白濃度做圖。同樣的，在MUA作為SAM的體系下可以在圖4-17（a）、（b）中看到可分析總阻抗的頻段為 0.1-1 Hz，而（c）、（d）電容實部可辨的頻率僅為0.1 Hz，因以，以MPA為SAM的修飾體系下，可以在中高頻率就可以分析阻抗與電容相關資訊，但以MUA為SAM的修飾體系下，僅能在低頻位置分析阻抗與電容資訊。在慣用的EIS分析中，需要根據不同的修飾體系與阻抗大小，選擇適合的分析頻段，雖然此章節能夠作為定量的參數，但因為在前幾章節有提到的阻抗較大的狀況下，在界面電化學反應的細節響應，難以確認電腦擬合計算而得的Rct是否具有合適性，後面章節會以其他的分析工具進行探討。

doi:10.6342/NTU202301818

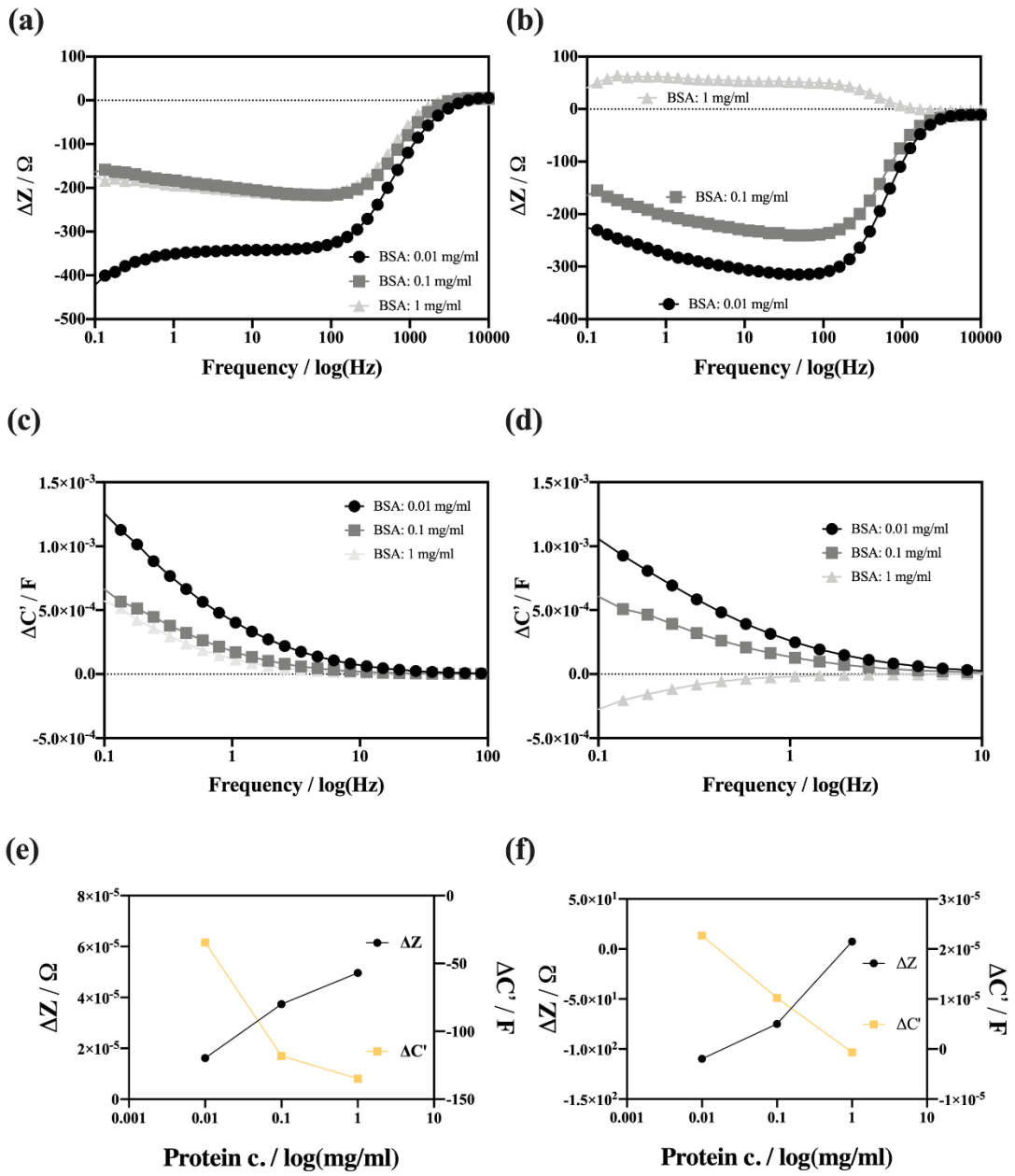


圖 4- 16 蛋白修飾於 MPA 短時間與長時間修飾之波德圖（a）0.5 小時（b）4 小時的總阻抗變化量（c）0.5 小時（d）4 小時的電容變化量，（e）0.5 小時（f）4 小時的阻抗與電容變化量與蛋白濃度之關係

doi:10.6342/NTU202301818

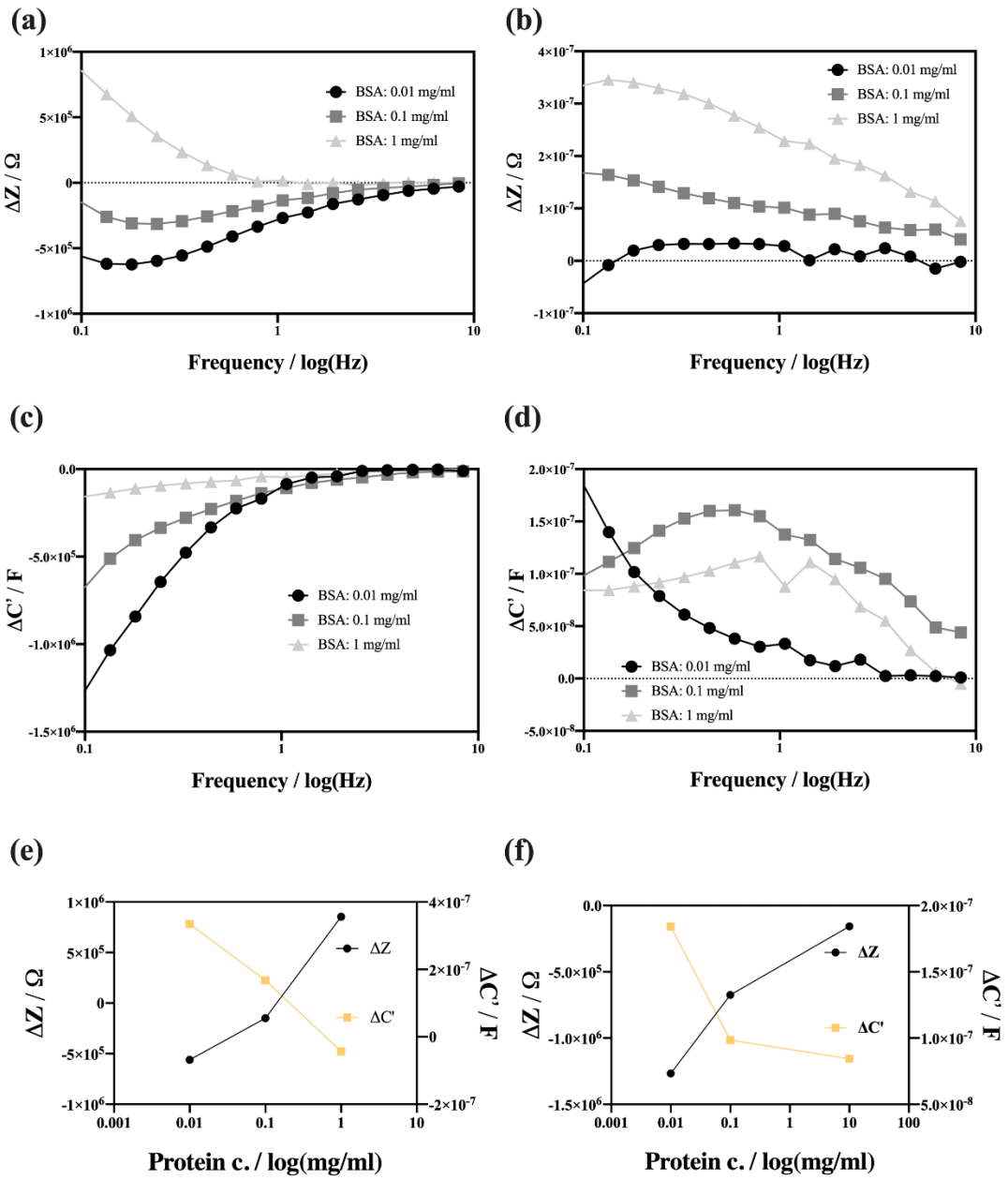


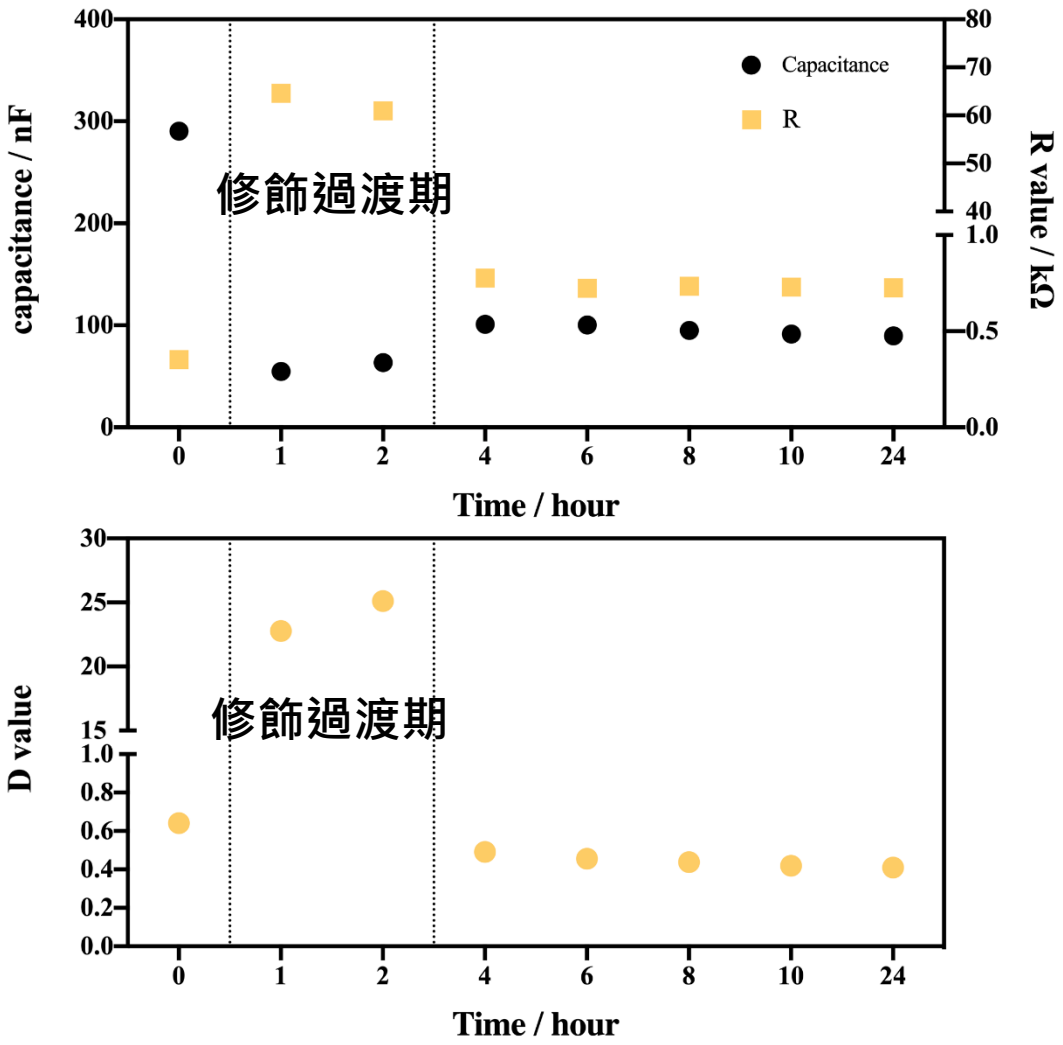
圖 4-17 蛋白修飾於 MUA 短時間與長時間修飾之波德圖（a）0.5 小時（b）4 小時的總阻抗變化量（c）0.5 小時（d）4 小時的電容變化量，（e）0.5 小時（f）4 小時的阻抗與電容變化量與蛋白濃度之關係

4.2.2 LCR 錶進行電容分析

本研究中嘗試以 LCR meter 量測自組裝單層修飾於金電極之電容值，相關文獻明確指出有提到欲提升自組裝修飾的完整性以及致密度必須延長修飾時間，透過 EIS 可以看到溶液當中固液界面電化學反應過程的阻抗變化，又或者轉換

doi:10.6342/NTU202301818

為電容值。為了以更直觀的方式獲得電容值，以 LCR meter 直接連接電極進行電容值量測，LCR 錶利用交流訊號的相位差來測量電容的特性，在交流電路中，電流落後於電壓相位角為負，表示有電容器存在，由此內部電路計算出電容的值。在量測電容的同時一般會搭配 D 值與R值進行比較，D 值表示為逸散因子（dissipation factor），在電容量測下 D 值越小代表量測的結果偏向電容性量測，表示修飾的具有一定程度的絕緣性，R值則表示為阻抗。在圖 4-18 中，可以看到 MUA 修飾時間為四小時以上時可以有相對穩定的 D/R 值，觀察 D 值大小約為 0.5 左右，電容值為 100 nF 以上，可以從 D/R 值的變化推測長鍊 MUA 單層分子在四小時後會形成較穩定的薄膜。



doi:10.6342/NTU202301818

圖 4- 18 不同時間 MUA 修飾於金電極之 LCR 錶的電容值與 D/R 值量測。將 40 mM 的 MUA 修飾於自製金電極不同時間後進行清洗，在 0.1 M PBS（pH=7.0）溶液中進行量測，量測頻率設定 1k Hz，設定內部偏壓為 0.5 V。

在蛋白固定化流程的也可以看到電容值的外，D 值與單純碳電極比較也有明顯相同下降的結果，如圖 4-19，但在 LCR 錶量測下，難以藉由電容值的變化看的到蛋白修飾後的變化，推測在帶有電化學活性(EDC/NHS 分子)以及電性分子（OVA 蛋白）在界面後介電層的變化使得 D 值並無明顯下降，雖然電容值有明顯下降，但絕緣度不夠，並非是純電容性的量測，此結果可以與本研究之電子式電容量測模組所量到的電容值變化進行比對。

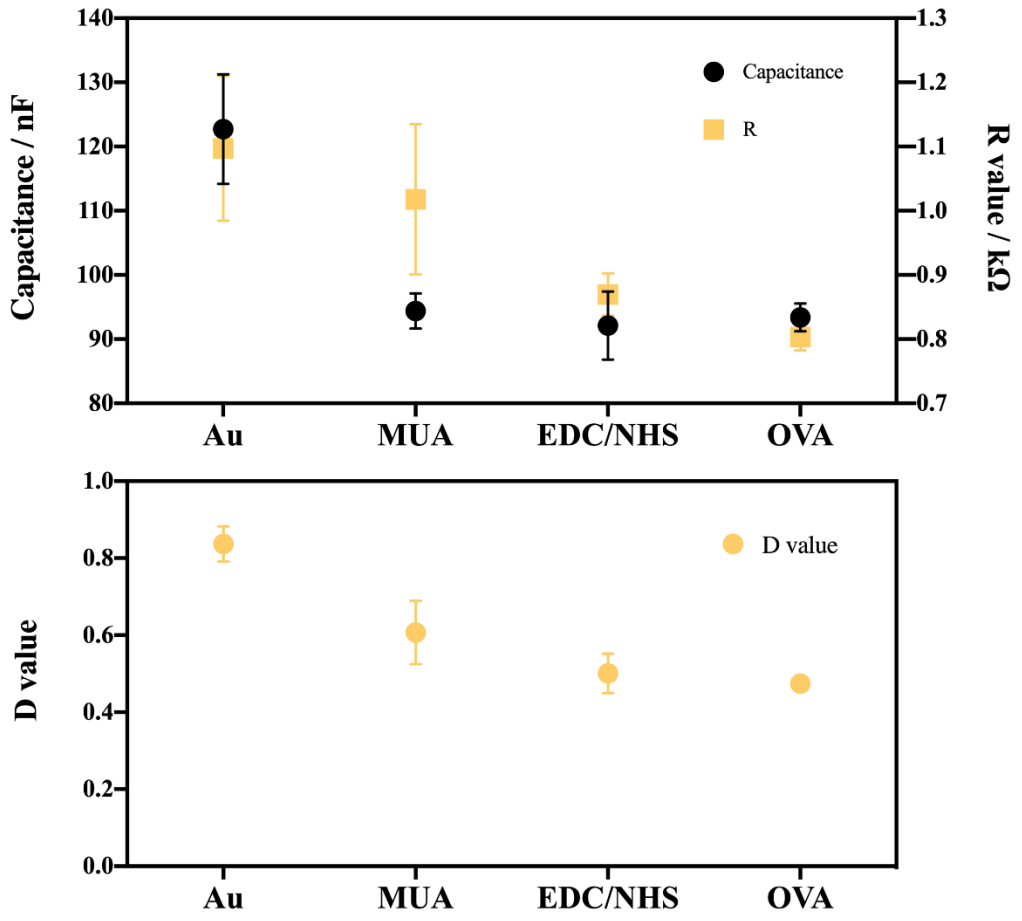


圖 4- 19 蛋白固定於金電極之 LCR meter 電容值與 D 值量測結果。將金電極進行 40 mM 24 小時修飾，再藉由 0.4/0.1 mM 的 EDC/NHS，將 1 mg/ml OVA 蛋白

doi:10.6342/NTU202301818

固定於金電極 4 小時。LCR meter 在 0.1 M PBS（pH=7.0）溶液中進行量測，量測頻率設定 1k Hz，設定內部偏壓為 0.5Ｖ。

透過與圖 4-20 比較不同修飾體系的絕緣度差別，本實驗嘗試以碳電極結合絕緣材料以及生化分析中的蛋白親和材料將蛋白固定於碳電極上，進行 LCR 錶的量測，可見在碳電極的體系中蛋白修飾後整體的電容值達到 pF 的級別，D 值約為 0.02 可見在此體系絕緣層在電極批覆與 NC 吸附層薄膜製備後使整體達到較高的絕緣度，。

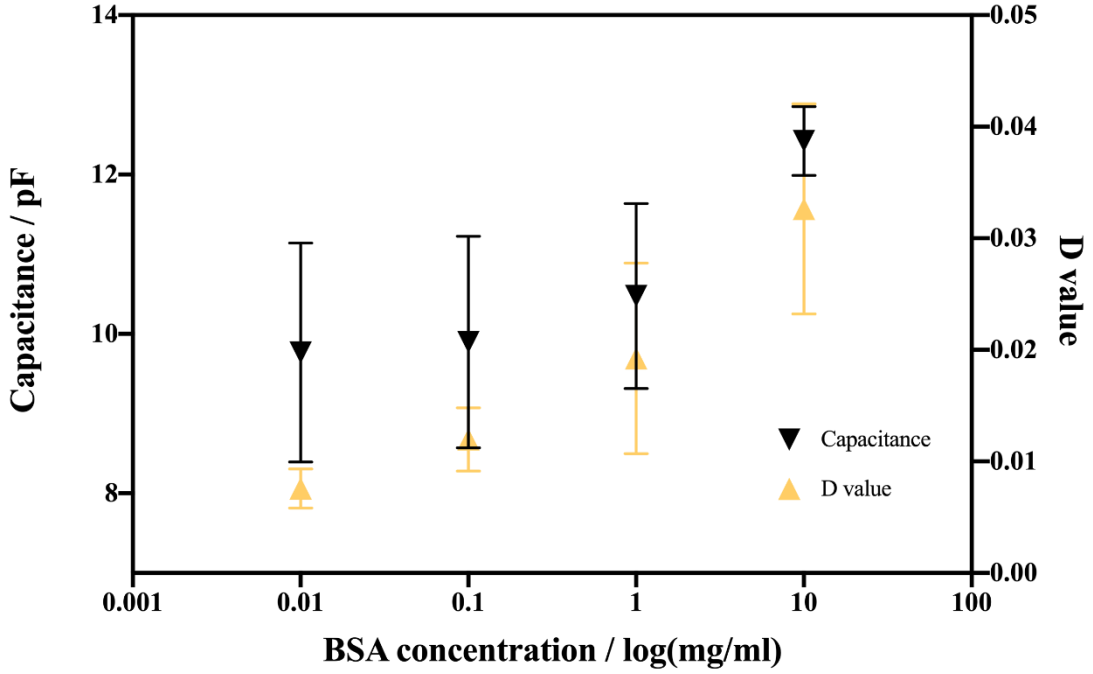


圖 4- 20 不同蛋白固定於製備了硝化纖維素薄膜與絕緣層的碳電極的 LCR meter 電容值與 D 值量測結果。LCR meter 在 0.1 M PBS（pH=7.0）溶液中進行量測，量測頻率設定 1k Hz，設定內部偏壓為 0.5Ｖ。

在絕緣度上的比較可以藉由 LCR meter 量測比較金電極與碳電極體修飾體系下的差別，除了可以從電容值看的出量級的差異外，在 D 值也看到碳電極的修飾體系下近似於 0，代表在電子式電容量測模組的發展中此體系絕緣度較適合作為辨識元件的發展，而隨著蛋白濃度提高 D 值變大標準差越大的情形似乎

doi:10.6342/NTU202301818

與後面章節所量到的電容結果相呼應。接下來，將進行本研究的重點關於電子式電容感測模組的成果的論述。

doi:10.6342/NTU202301818

4.3 電容式 anti-BSA 生物感測器

4.3.1 電容感測模組性能

4.3.1.1 界面厚度效應

本實驗使用電子式電容感測器模組量測嘗試在以 SAM 做為絕緣層透過交聯劑固定蛋白於金電極的電化學體系（章節 4.1）中進行量測，發現在第一個量測模式（無串連 5 pF 電容元件）下超過量測範圍，在第二個量測模式（串連 5 pF 電容元件）皆近似模組短路之電容值，原因可在上個章節使用 LCR meter 量測電容值與 D 值的結果的推測其絕緣度上的不足。

在 SAM 絕緣層於金電極的體系中的改用單面膠作為絕緣層（在自製金電極製作過程中不將單面膠進行切割），以稀式極濃的氧化鋁溶液進行沉降在單面膠後，用電容量測模組 Mode 1（無串連 5 pF）進行電容值的量測，可見圖 4-21，兩種不同濃度的氧化鋁溶液沉降在界面上，具有相同電容值下降的趨勢。以冷裱膜當作絕緣層，電容值在未串連 5pF 的情況下電容值約為 13 pF，可觀察相對低濃度的 Al_2O_3 (2500 倍稀釋)在 4000 秒後達到平衡，相對高濃度的 Al_2O_3 (1000 倍稀釋)在 3600 秒達到平衡。

從此結果可以直接觀察到電極間絕緣厚度的增加導致電容值的下降，在量測得過程中因位觸碰到金電極使得原本接觸在絕緣層表面的氧化鋁離開表面而造成的電容值上升，可以從動態的電容響應顯現感測器的靈敏度。

doi:10.6342/NTU202301818

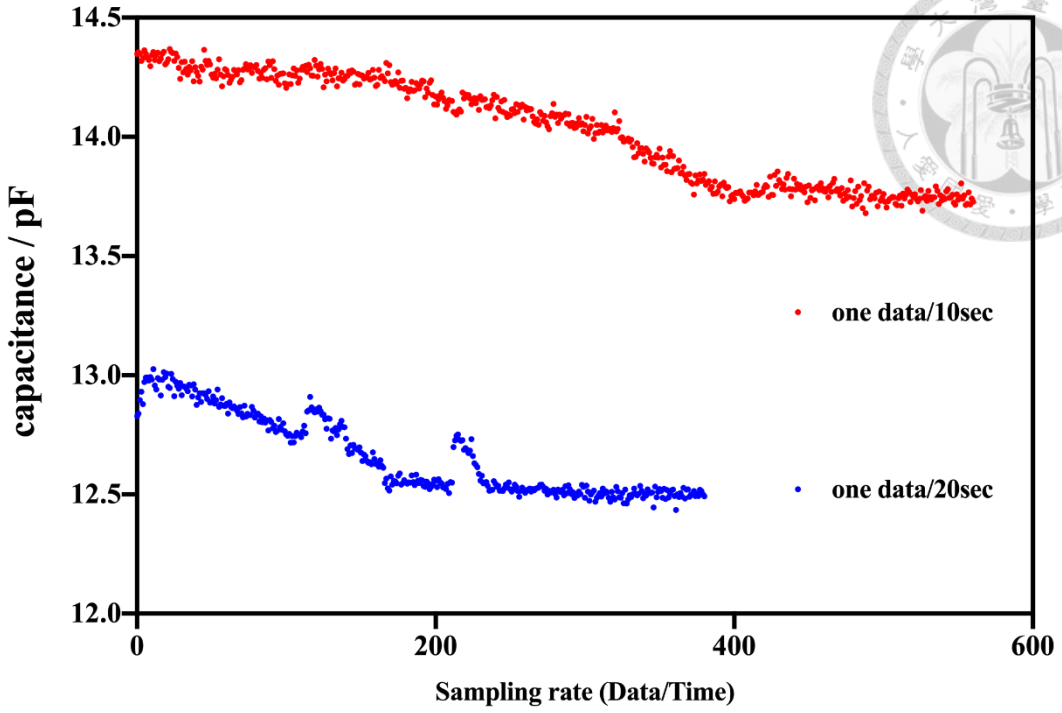


圖 4- 21 1000 倍稀釋（藍色）2500 倍稀釋（紅色） Al_2O_3 溶液吸附於金電極上之動態電容變化。在金電極體系中將不同濃度的氧化鋁溶液滴在 CD 金電極孔洞的單面膠上進行沉降以及動態電容值量測。

4.3.1.2 有無串聯電容之量測模式

本研究所使用的類比轉數位模組具備兩種量測模式分別為模式一的 EXCA & CIN2（無串連5 pF電容元件）和模式二的 EXCB & CIN1（串連5 pF電容元件），為了確立量測的電容值與實際電容值的關係與不同模式的感測性能，使用固態電容作為假體（Dummy）直接連接電容量測模組進行電容值量測，結果如圖4-22，模式一（圖中標示為Mode 1）的敏感度較高在1-20pF的電容範圍內假體電容與實際電容線性斜率接近1，兩種模式雖然在假體電容在10 pF內與測得電容皆為線性關係，雖然模式二（圖中標示為Mode 2）可以測量較廣的電容範圍，可見兩者敏感度不同且可量測的電容範圍也不盡相同，因此為了達到較好的感度，本研究選用模式一作為量測模式。在研究中，嘗試使用此模組模式一對電化學體系中MUA修飾後的金電極進行量測，結果為超出量測範圍

doi:10.6342/NTU202301818

（out of detection range）而模式二進行量測時，則是約為4 pF（接近量測範圍的上限），根據章節4.2.2 LCR 錶的量測結果，SAM修飾後的電容值為nF等級，因此若能精進材料與方法或許有機會以模式二此架構進行感測器的發展。

以上得出在整體絕緣度較小電容值若在20 pF內可以使用模式一進行量測，敏感度較高，若修飾體系有一定絕緣度但電容值變化較大，或是整體電容值較大情況下應選擇使用串連5 pF的模式二進行測量。

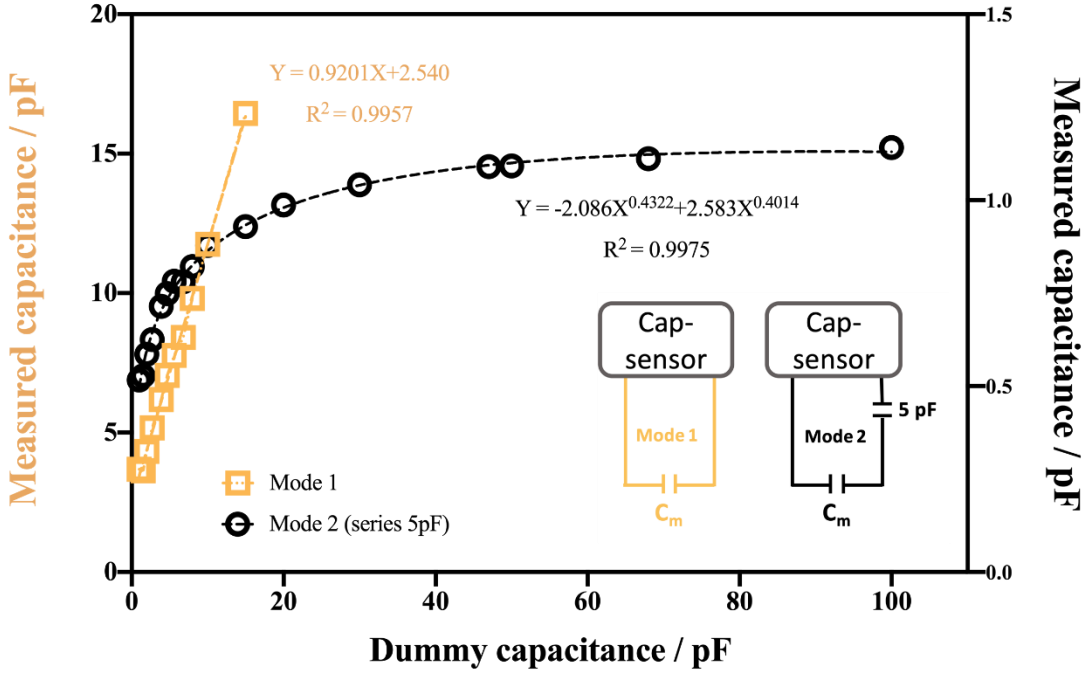


圖 4- 22 有無串連電容量測模式的檢測性能。以 1-100 pF 固態電容作為假體直接連接電容模組分別在模式一（黃色）、模式二（黑色）進行電容值的量測。

4.3.2 絕緣層與吸附層的建構與特性

4.3.2.1 AR 絕緣層與 NC 吸附層的製備條件

在將AR /NC製備上由於皆為液體狀，且溶劑為揮發性液體，所以在濃度及體積上會影響形成的膜厚，至製備過程中將絕緣噴漆噴進微量離心管搜丙烯酸樹脂（AR）使溶劑揮發一段時間，避免製作出薄膜厚度的不穩定性，圖4-23可以觀察溶劑揮發時間、液體體積與電容值穩定度的關係，在離心管存放15分鐘，以此為基礎，體積為0.9 μl所形成的絕緣層較穩定，整體電容值為5 pF，因此而

doi:10.6342/NTU202301818

在AR/NC製備參數上的選擇為將AR 噴進微量離心管靜置15分鐘後以0.9 μl 滴在但電極上形成絕緣層。經多次的實驗收集數據並分析以絕緣層參數固定後同樣將0.9 μl的NC溶液滴在絕緣層上披覆的電容值變化，圖4-24 中NC 膜製作好後的電容值變化倍率大多為-0.05～0.1之間（黃色區塊），以此作為評斷NC薄膜是否良好的標準，良率為92%（N= 5, n>10），可以作為日後製程上的品管依據。

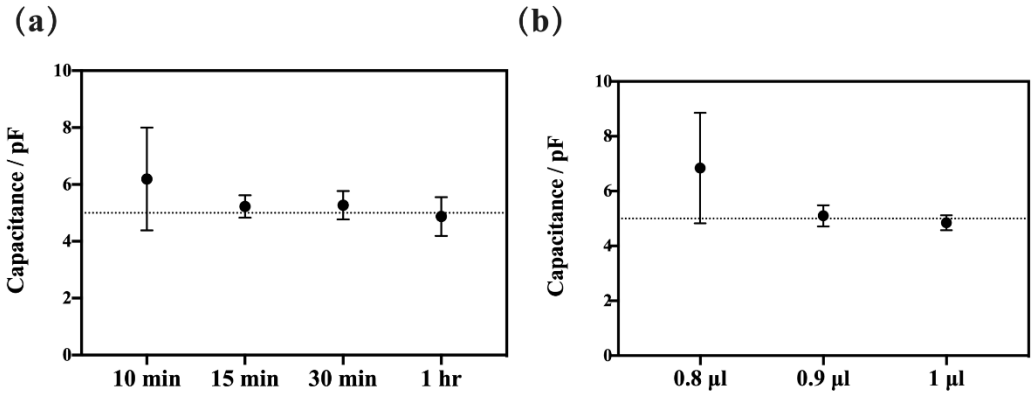


圖 4- 23 AR絕緣層電容值與溶劑揮發時間（a）披覆量（b）關係圖。（a）蒐集AR於離心管中存放不同時間，取1 μl體積滴於碳電極工作區域形成絕緣膜（b）AR於離心管中存放15分鐘後，取不同體積滴於碳電極工作區域後自然烘後碳電極連接量測模組進行電容值量測。

doi:10.6342/NTU202301818

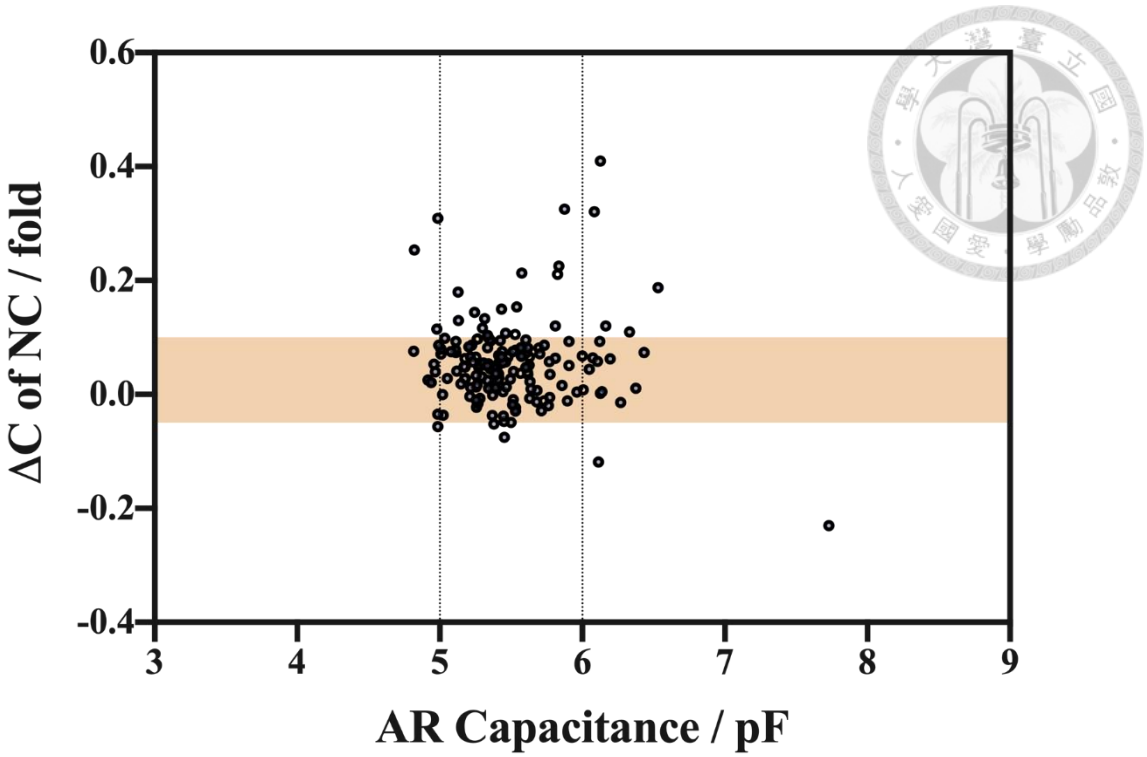


圖 4- 24 AR絕緣層為基準製備NC吸附層薄膜的電容值變化。將 AR至於離心管中存放15分鐘，取0.9　l體積於碳電極工作區域後形成薄膜，進行電容值量測與變化倍率計算。

4.3.2.2 AR 絕緣層 NC 吸附層的型態尺寸

在碳電極的 AR 絕緣層與 NC 吸附層製備完後，經由雷射顯微鏡分析表面特徵，觀察 AR/NC 在碳電極上披覆的物理特徵與是否將電極間凹槽處量測區域覆蓋，以圖 4-25 數據首先可以觀察到（a）碳膠表面的粗糙度高，隨著 AR/NC 製備完後表面的粗糙度下降，此論述可以從原始數據表 4-3 中不同條件下在凹槽處 PET 到碳膠電極的數值與標準差得到資訊，分別比較 AR/NC 批覆後的數據中，以 PET 的膜為基準作為最高點計算凹槽處基板（substrate）與碳膠（Carbon）跟最高點的高度差，可以得出：碳膠電厚度約為 16.48±7.7 μm，AR 在碳膠上為 1.35 μm 在基板上為 2.05 μm，而 NC 在碳膠上為 3.67 μm 在基板上為 2.44 μm。以圖 4-26 中的（a）碳電極 3D 表面輪廓影像可以看到碳膠兩者之

doi:10.6342/NTU202301818

間的實際情況，以計算後的數據建構出 AR/NC 的尺寸模型，在此實驗後確定兩個碳電極之間的凹槽並未完全填平還保有電極間的最敏感的區域。

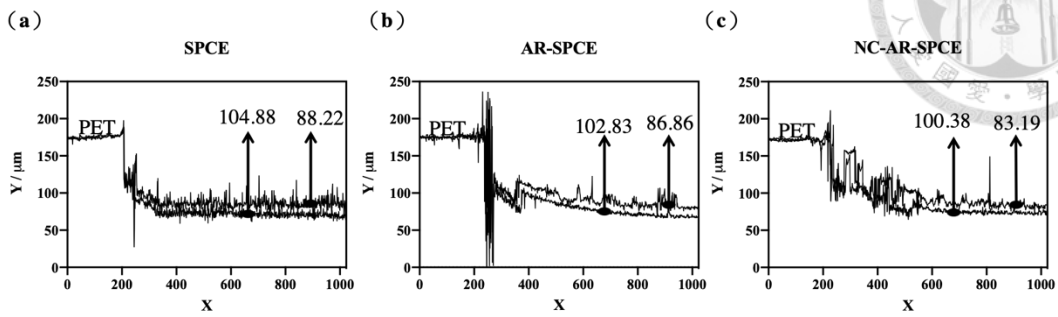


圖 4- 25 雷射顯微鏡量測碳膠與基板到 PET 之距離。數據中選擇第 0 到 100 比數據與第 600 到 1000 筆數據進行相減計算平均值相減後得到（a）未修飾碳電極（b）AR 絕緣層批覆碳電極（c）AR 絕緣層與 NC 吸附層批覆碳電極表層 PET 到凹槽中碳膠與白色基板的距離。

表 4- 3 碳膠與基材和 PET 之相對高度原始數據（n=4）

	SPCE		AR-SPCE		NC-AR-SPCE	
	PET基材	凹槽	PET基材	凹槽	PET基材	凹槽
PET到碳膠（μm）	174.72±1.62	86.5±7.08	174.95±1.48	88.08±6.62	172.97±1.3	89.77±5.56
PET到基板（μm）	173.77±1.65	68.89±3.4	174.62±2.09	71.79±3.59	172.76±0.98	72.38±2.21

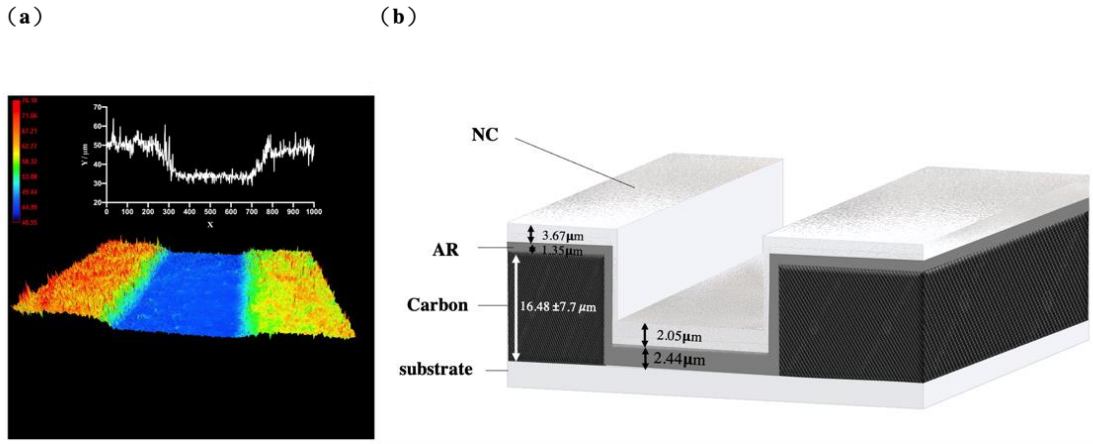


圖 4- 26 雷射顯微鏡表面 3D 輪廓分析（a）絕緣層與吸附層結構示意圖（b）。將未製備 AR/NC 的 碳電極進行以雷射顯微鏡（VK9510）進行表面 3D 掃描表面輪廓（ a ）製備好 AR 絕緣層與 NC 吸附層的碳電極分別進行 2D 掃描分析相對高低差繪製出（b）。

doi:10.6342/NTU202301818

4.3.2.3 硝化纖維素與幾丁聚醣吸附層的蛋白吸附效果

為了確認在製備好絕緣層的電極感測界面上，蛋白是否透過吸附在硝化纖維素薄膜、幾丁聚醣吸附層上間接固定在生物辨識元件，以 BCA 試劑驗證硝化纖維素薄膜、幾丁聚醣吸附層對於蛋白吸附的有效性，如圖 4- 27 圖中左側可見 0.05、100 mg/ml 的 BSA 在硝化纖維素薄膜上吸附的效果，右側可見 0.05、100 mg/ml 的 BSA 在幾丁聚醣上吸附的效果，BCA 試劑與蛋白反應會有顏色的變化由淡綠色轉變為紫色，紫色越明顯代表蛋白濃度越高，可見由紅色框框中有蛋白吸附與無蛋白吸附（Control）比較後，確認此兩種材料確實能將蛋白固定在感測界面上。

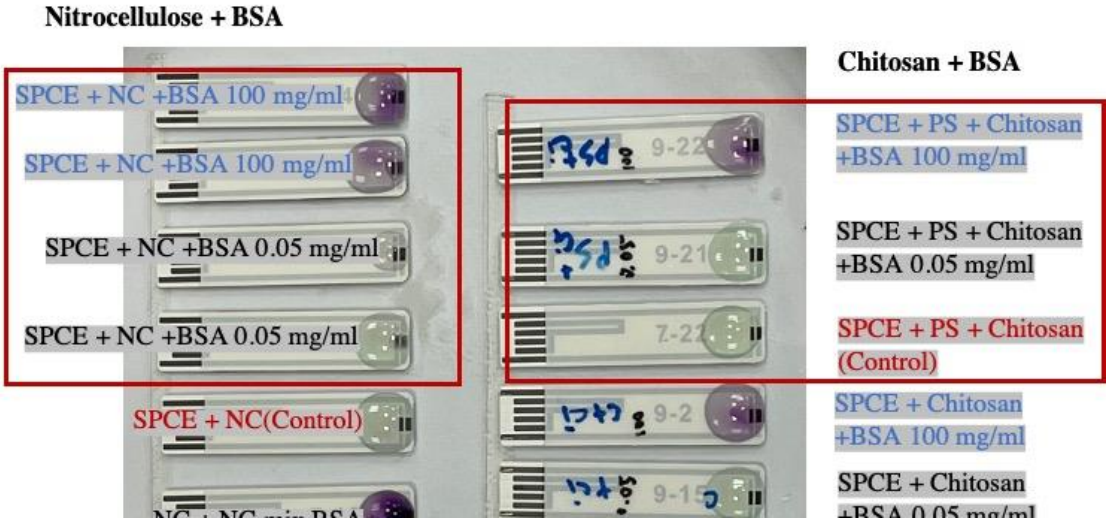


圖 4-27 BSA 吸附於 NC、Chitosan 吸附層的 BCA assay 反應結果。將製備好 NC 和 Chitosan 薄膜的碳電極後浸泡於 0.05、100 ml/mg 蛋白溶液後以 PBS 清洗，再將 BCA 混合試劑滴在電極區進行反應，反應後直接在自然光下進行照射。

本實驗為了要了解蛋白與 Chitosan 在製備上得參數，先比較不同絕緣厚度下不同體積得幾丁聚醣製備與蛋白吸附後的電容變化可以從圖 4-28 中觀察，在絕緣層越薄（above 7pF）的清況下 chitosan 在絕緣層上形成薄膜的電容變化為負，當絕緣層越厚 Chitosan（below 5pF）在絕緣層上形成薄膜的電容變化為正，

doi:10.6342/NTU202301818

再將製備好 chitosan/AR 的碳電極泡在 BSA 中進行結合，蛋白結合後的電容變化為虛線部分可以看到當 AR 越薄電容變化幅度較大。

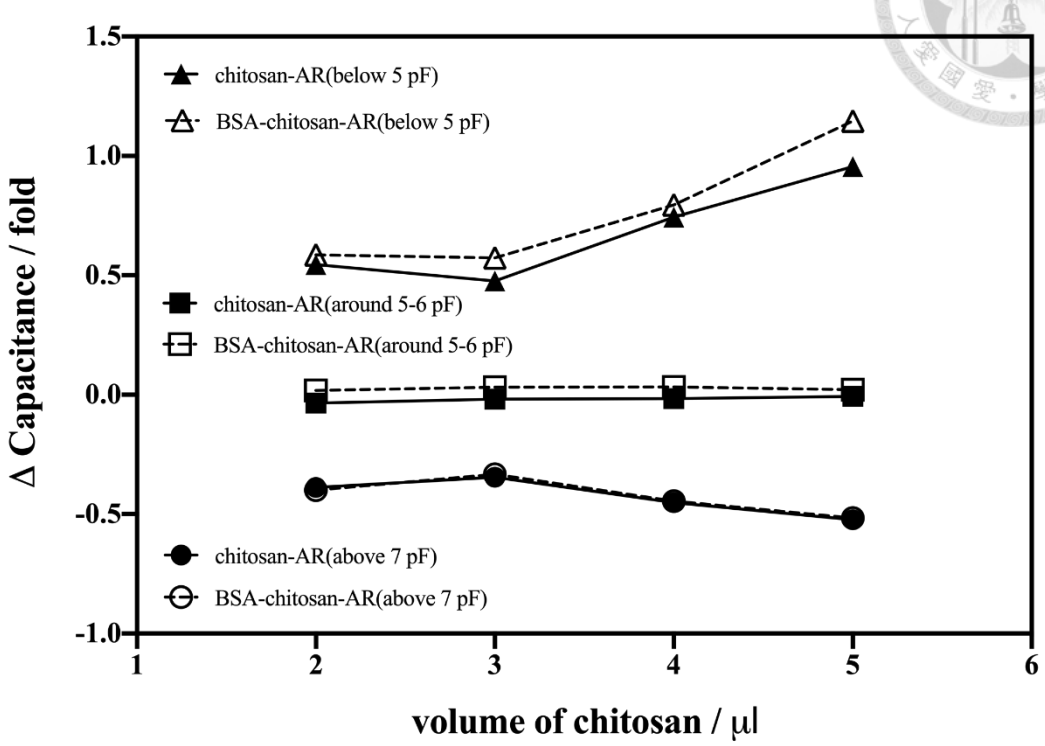


圖 4- 28 不同批覆量的 Chitosan（實線）與蛋白吸附（虛線）在不同厚度的 AR 絕緣層的電容變化倍率。將度同體積 AR 滴於碳電極工作區域（此時色保護膜未撕除所以不會影響其他區域），絕緣層形成後進行電容值量測，依電容值分類，進行不同體積的幾丁聚醣吸附層製備，最後浸泡至蛋白溶液中進行吸附。

為了更深入考量了解兩種材料在不同環境下的適用性，接下來進行不同環境下的結合效果測試，例如：酸鹼環境，許多研究指出幾丁聚醣為對環境酸鹼敏感度高的材料，因此也有許多藉由調節酸鹼度來控制幾丁聚醣的應用，在文獻中 Buckhout-White 等人的研究中以微流道電沉積法將幾丁聚醣製備在電極表層形成一層薄膜，透過 pH 對幾丁聚醣結構的調控使得在大於幾丁聚醣本身 pKa 的大小時，圖 4-29 可見，使結構改變形成更堅硬的膜以增加薄膜製備的品質。在本實驗中直接將幾丁聚醣用滴落（Drop coating）方式在柱狀金電極上形成薄膜後，浸泡在不同酸鹼溶液中，接者使用 EIS 量測觀察幾丁聚醣薄膜阻抗的變

doi:10.6342/NTU202301818

化，如圖 4-30 所示，可以看到隨著 pH 值上升阻抗有變大的趨勢，可見在鹼性的行況下確實能夠讓幾丁聚醣薄膜結構變得緊密。

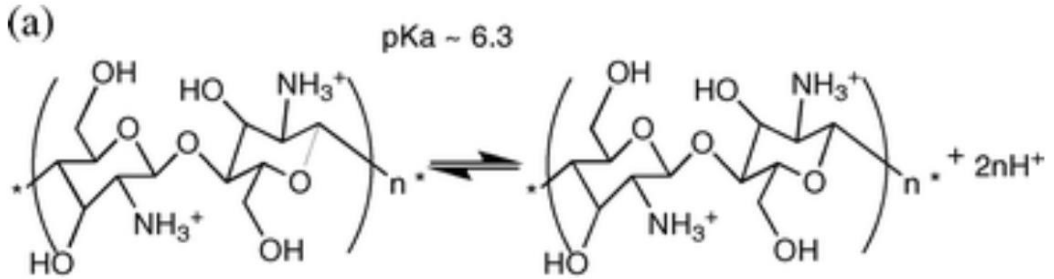


圖 4- 29 Chitosan 在不同 pH 下的物化性質，圖片取自(Buckhout-White et al., 2009)

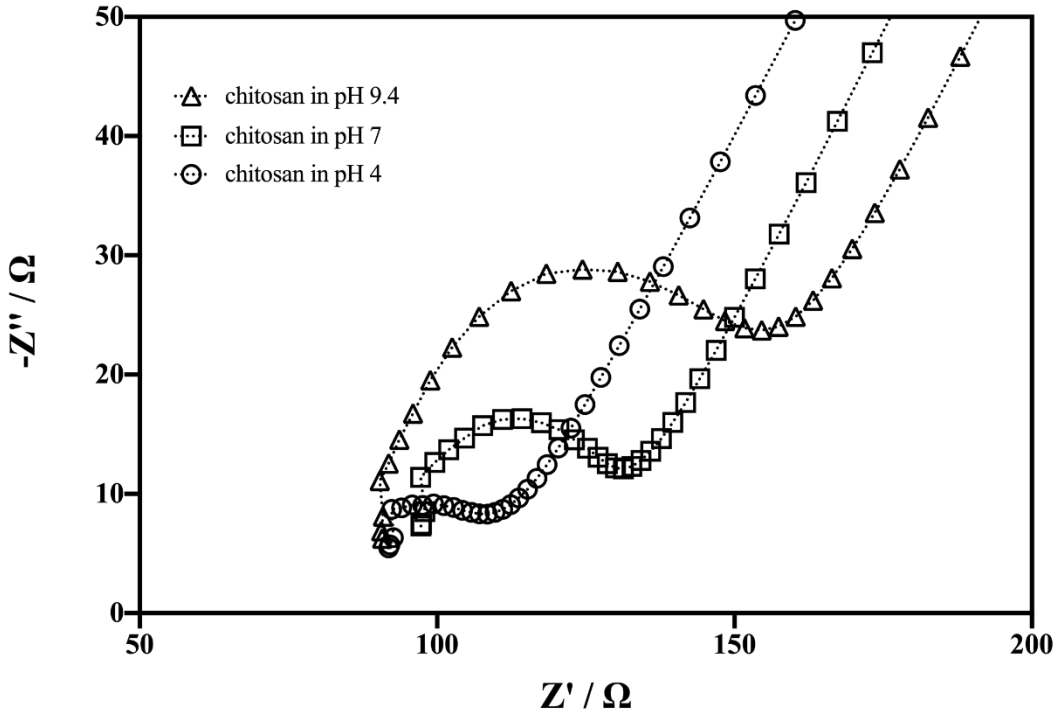


圖 4- 30 幾丁聚醣披覆的金電極在不同酸鹼度之 EIS 奈氏圖。將 Chitosan 滴於柱狀金電極形成薄膜後，浸泡至不同 pH 之 PBS 半小時，使用 EIS 分析阻抗大小。EIS 於 10 mM $K_4(Fe(CN)_6)$/K3(Fe(CN)6)溶液中量測，偏壓設定為 0.23V（vs. Ag/AgCl），量測頻率為 10k-0.1k Hz。

doi:10.6342/NTU202301818

Chitosan 作為吸附層應用在感測器中具有應用的潛力一部分歸因於 pH 對其具有調節性的優勢(Kim et al., 2015)，Chitosan 為帶正電的聚合物，在中性的情況下 Chitosan 的結構更偏向非水溶性物質，且加上鹼性環境中蛋白多帶負電的情況下，本實驗原先推測在中性的環境中能與 Chitosan 有不錯的結合效果，但在研究過程中 Chitosan 於酸性環境中進行蛋白吸附的的電容值變化倍率較高，且在中性環境下進行不同濃度蛋白吸附的電容變化結果並無規律性，在不同酸鹼環境下的變化較不穩定，考量到現實當中的使用情境（一般檢驗檢體的酸鹼環境）加上實驗結果顯示硝化纖維素具有較好的適用性，因此並沒有將 Chitosan 做為吸附層進行後續的實驗，在下一章會 NC 作為吸附層接續說明。

4.3.3 硝化纖維素膜吸附層性能

4.3.3.1 硝化纖維素吸附層的蛋白吸附效果

在感測器中，蛋白固定於不同材料上的親和能力是許多物化作用所形成的結過，包括：靜電力、疏水性、凡德瓦力、氫鍵等，其中在生物分析材料表面例如：硝化纖維素薄膜（Nitrocellulose, NC）與聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene difluoride, PVDF）影響蛋白是否吸附於表面的主要原因為親疏水性與界面電性，而硝化纖維素更是市售快篩劑產品中作為與生物標記分子結合的主要材料。本研究期望針對疾病相關蛋白行分子或抗體進行檢測，因此考慮到是受檢測產品以及生化分析工具中對NC使用的普及性，本研究將市售的液態NC作為蛋白親和材料。

考慮到本實驗所使用之材料為液態且溶劑為amyl acetate，想要了解本研究NC/AR製備的碳電極在不同pH環境中的進行BSA蛋白吸附的效果，如圖4-31可以看到在中性環境中進行BSA蛋白的吸附後以在PBS（pH=7）中量測電容值的變化倍率與不同濃度的蛋白質在吸附後具有單調性的變化。推測在酸性的環境下低濃度蛋白質透過電性吸附與硝化纖維素薄膜結合效果好，電容變化倍率較高，但隨著蛋白濃度提高，蛋白間距離變短產生分子之間電性斥力，因此結合

doi:10.6342/NTU202301818

效果變差，在鹼性情況下蛋白與硝化纖維素薄膜單純以疏水性吸附力，導致結合效果最差。

在一些文獻中研究了以靜電仿絲生成具有不同孔洞大小的硝化纖維素薄膜探討其蛋白吸附能力，表示了此材料在蛋白固定化的成熟性，Low等人研究了在不同的酸鹼環境下蛋白與硝化纖維素薄膜的界面吸附特性，以BSA等電點為考量，由於在不同酸鹼環境下的硝化纖維素薄膜以流動電位量測界面電性呈現皆為負電，因此在酸性的環境下主要是以電性吸附為主導，但同時蛋白與蛋白間卻存在電性斥力，考慮到蛋白帶電性、界面電性與界面疏水性之巨觀影響，以實際的實驗結果驗證BSA蛋白在電中性環境下對於疏水性材料具有最佳吸附能力 (Low et al., 2013)。

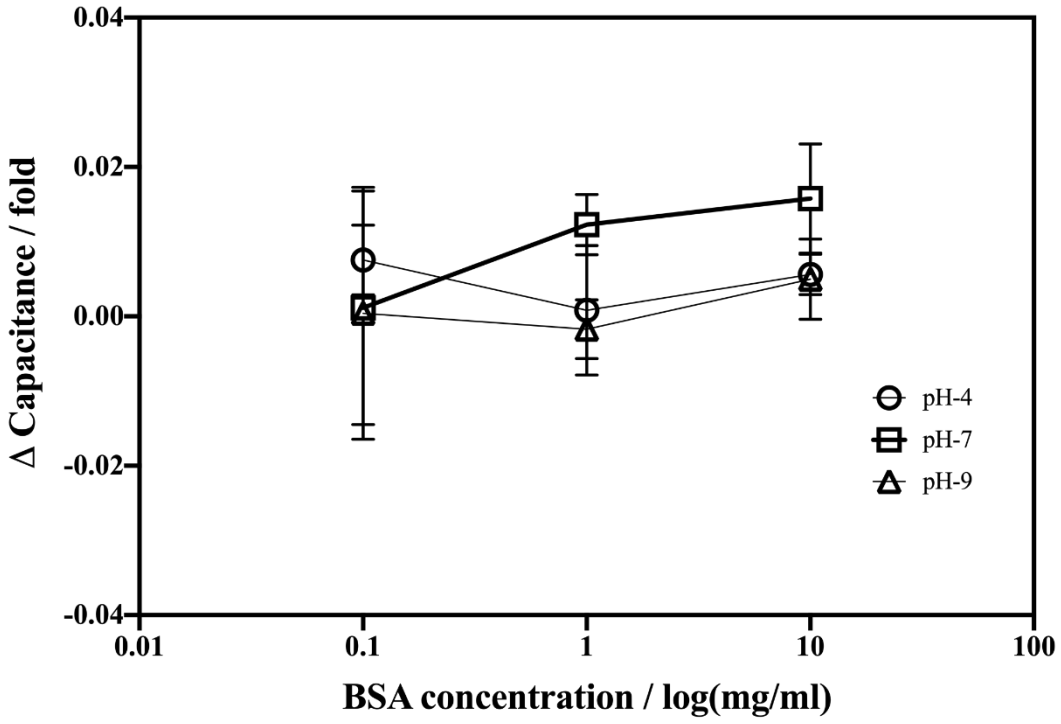


圖 4- 31 不同酸鹼環境下的蛋白於 NC 披覆層的吸附效果。製備完 AR/NC 的碳電極泡入酸鹼環境下的且不同濃度的蛋白溶液進行浸置三小時，以 PBS 清洗後在 pH=7 中性環境中量測電容變化。

doi:10.6342/NTU202301818

在中性下環境下進行更多不同濃度蛋白吸附的電容變化與生化實驗分析結果如圖4-32，隨著蛋白濃度提高電容變化倍率越大此結果可與章節4.2.2的圖4-19對照，不論透過電容量測模組或是LCR錶的電容變化與濃度趨勢一致，利用BCA assay 進行蛋白染色作為蛋白吸附後的生化驗證，可以看到圖中碳電極片在自然光的拍攝下，前面工作區域由原本青綠色，當試劑遇蛋白分子中銅離子轉變為紫色的實際情況，驗證了抗原固定化的效果。

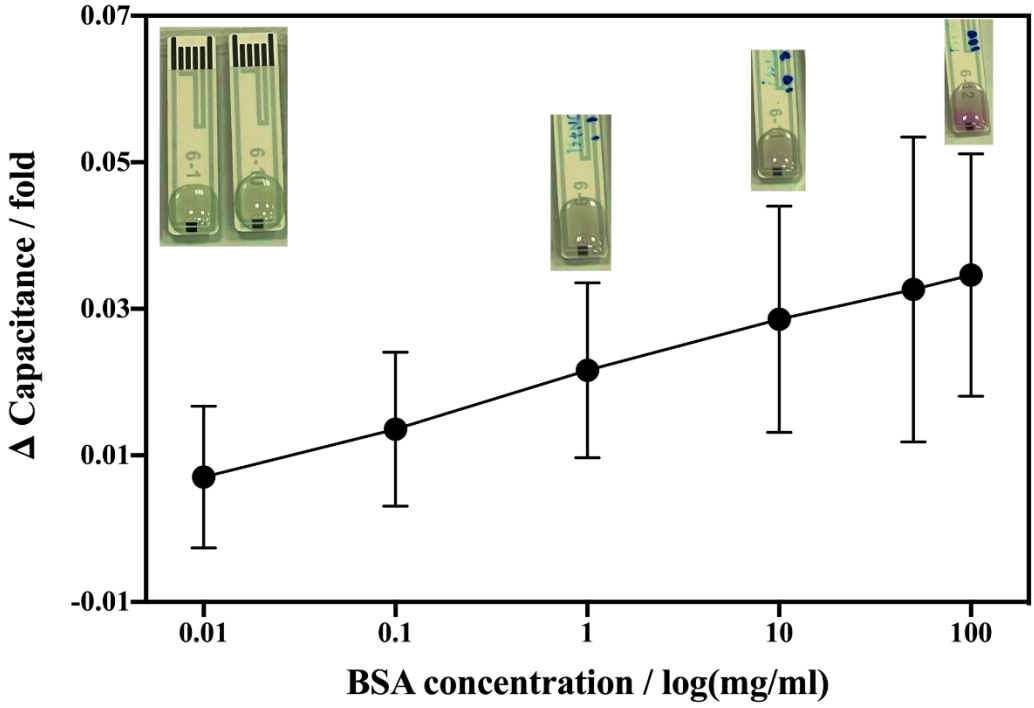


圖 4- 32 NC披覆層的電容值變化率與蛋白吸附濃度關係圖。將製備好NC/AR的碳電極浸泡在不同濃度的蛋白溶液中進行吸附3小時，以PBS清洗進行電容量測，量測完後將BCA反應試劑100 μl滴於電極前端（工作區域）於37度環境加熱30分鐘。

硝化纖維素（NC）在生化分析工具中作為蛋白親和材料上的發展相當成熟，卻極少使用在感測器的領域中。文獻中雖以蛋白在等電點時與NC效果最佳，但考量到文獻中製備NC薄膜的方式與本實驗的差異性，在本實驗中蛋白吸附於NC在不同酸鹼環境下的結果結果以中性環境吸附效果最佳剛好與一般檢體酸鹼

doi:10.6342/NTU202301818

環境下符合，因此，本研究選擇以NC作為生物辨識元件中的蛋白吸附層材料，在一般中性環境下進行蛋白的固定化。

4.3.3.2 BSA 吸附於硝化纖維素膜之動態響應

在抗原固定階段，以電容動態變化觀測蛋白吸附於NC薄膜的過程，分別將披覆NC/AR的碳電極浸泡至蛋白溶液與單純PBS溶液進行2000秒內的電容動態量測，結果如圖 4-33 發現單純PBS（BSA濃度為0）在量測過程中電容值上升，而在蛋白溶液中電容值同樣上升，但上升幅度較小。訊號變化斜率與濃度關係如圖 4-34所示，隨著蛋白濃度提高斜率越小，推測白吸附越多電極上造成厚度變厚同時阻絕電子累積表面之效應以致電容上升幅度變小所致，且2000秒內與1000秒內有相同效果。在表 4-4為斜率與蛋白濃度的原始統計數據，斜率與蛋白質濃度成反比，比較2000秒與1000秒的RSD值，可見2000秒的RSD值較小，推測其比1000秒具有較高的參考價值。

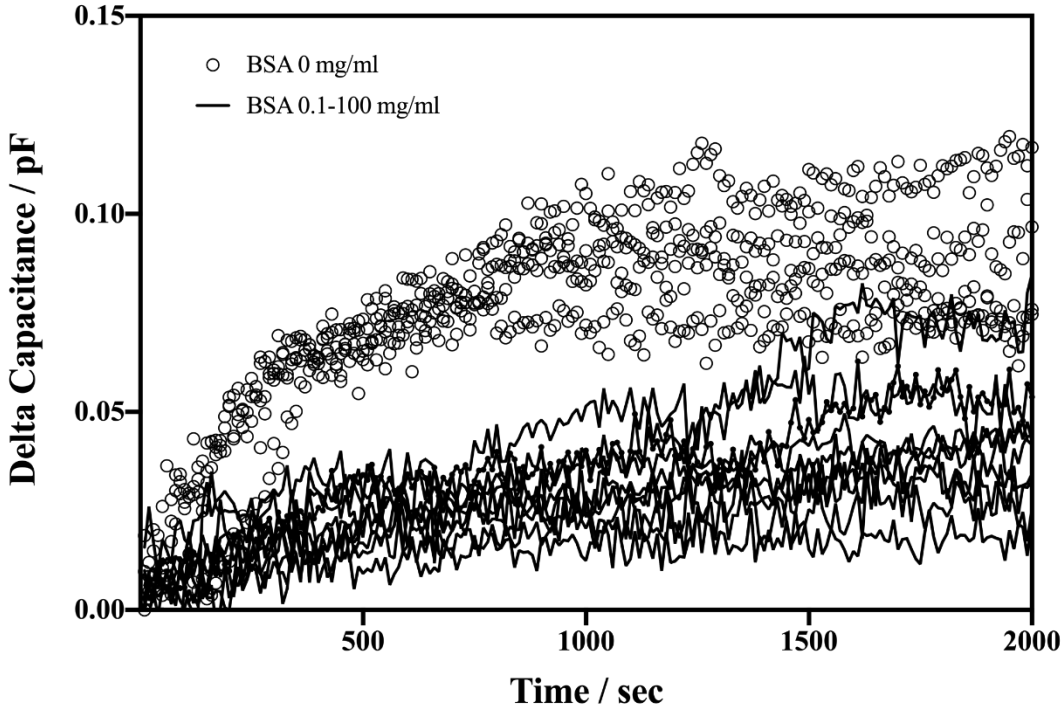


圖 4- 33 蛋白吸附的動態電容響應。將製備 AR 絕緣層/NC 吸附層的碳電極泡進濃度為 0.1-100 mg/ml 的蛋白溶液（實線）與 PBS（圓圈）進行動態電容值量測。

doi:10.6342/NTU202301818

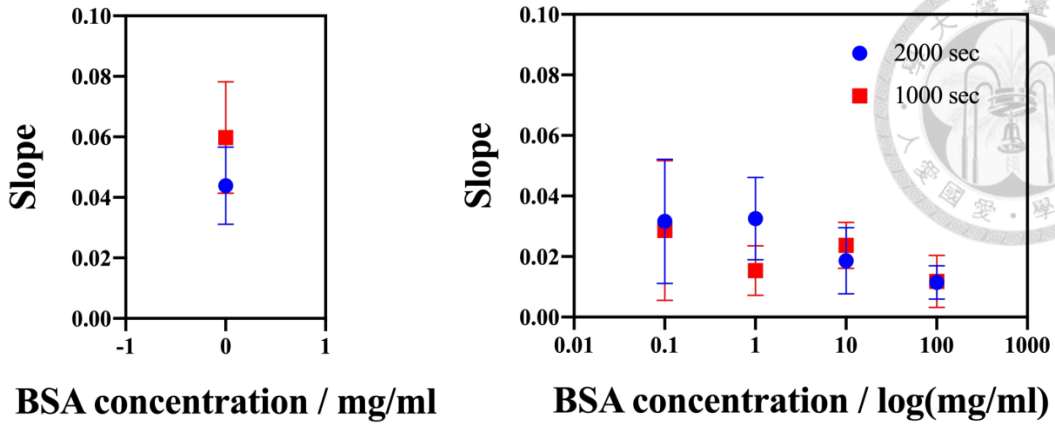


圖 4- 34 不同蛋白濃度動態吸附的斜率比較。將動態電容量測的電容結果X軸曲log 後的不同濃度下的斜率統計。

表 4- 4 動態量測的斜率數據統計

2000 sec				
BSA Con. (mg/ml)	Mean	SD	RSD	N
0	0.043837	0.012823	29.25165	3
0.1	0.031645	0.020513	64.82156	4
1	0.032517	0.013631	41.91914	3
10	0.018591	0.010917	58.72408	3
100	0.011489	0.005509	47.95227	3
1000 sec				
BSA Con. (mg/ml)	Mean	SD	RSD	N
0	0.059797	0.018406	30.7808	3
0.1	0.028613	0.02312	80.80298	4
1	0.01538	0.008197	53.29765	3
10	0.023687	0.007603	32.0976	3
100	0.011759	0.008652	73.57705	3

doi:10.6342/NTU202301818

4.3.3.3 蛋白與界面活性劑於 NC 吸附層界面之作用

在前兩節可見蛋白吸附於電極級以終點量測得結果與動態吸附於電極的即時動態量測結果，欲想要更加的確信蛋白吸附於電極電容增加的現象，本實驗嘗試以界面活性劑將蛋白脫離電極表面進行電容值得量測，預期得到電容值有負向減少的現象。

界面活性劑分子通常吸附在兩相之間像是空氣和水、油和水以及感測電極和溶液等之間的界面上，除了常見民生需用品中得洗滌劑，在研究當中也有文獻指出界面活性劑在電極上的吸附會電化學感測界面上的修飾物結構增加反應效率(Fendler et al., 2006)，是與分子作用下的增益結果。根據其他學者研究表明蛋白質與 Tween20 在界面震盪時會產生泡沫，且在一定的比例下通過靜電和疏水性作用產生更穩定泡沫膜(Zhang et al., 2013)。

為了瞭解是否可以將蛋白自 NC 薄膜上清洗下來，將已吸附與未吸附蛋白的 NC/AR 披覆電極浸泡於 0.5% Tween 20 界面活性劑反覆進行震盪及 PBS 清洗，在 200 秒、300 秒、500 秒後進行電容值量測電容響應如圖 4-35 所示，有吸附（藍、綠）與未吸附（黑、黃）的組別，以 PBS 清洗後在 T20 溶液中震盪以並動態量測都有電容值增加的現象而考量到界面活性劑會吸附於電界面上是經過證實的，在實驗室的其他研究中同也有針對界面活性劑吸附於拋棄式碳電極的研究(Cheng et al., 2023)，若沒有有效的清除界面活性劑在表面的殘留，推測除了蛋白吸附後會造成電容值上升，界面活性劑在界面上的吸附作用同樣會造成界面的電容值增加。因此推測在這樣的清洗動作下或者清洗的試劑與方法並未有效的將蛋白清洗下來，需要再了解介面活性劑在分子清洗上的運用與相關資訊。

doi:10.6342/NTU202301818

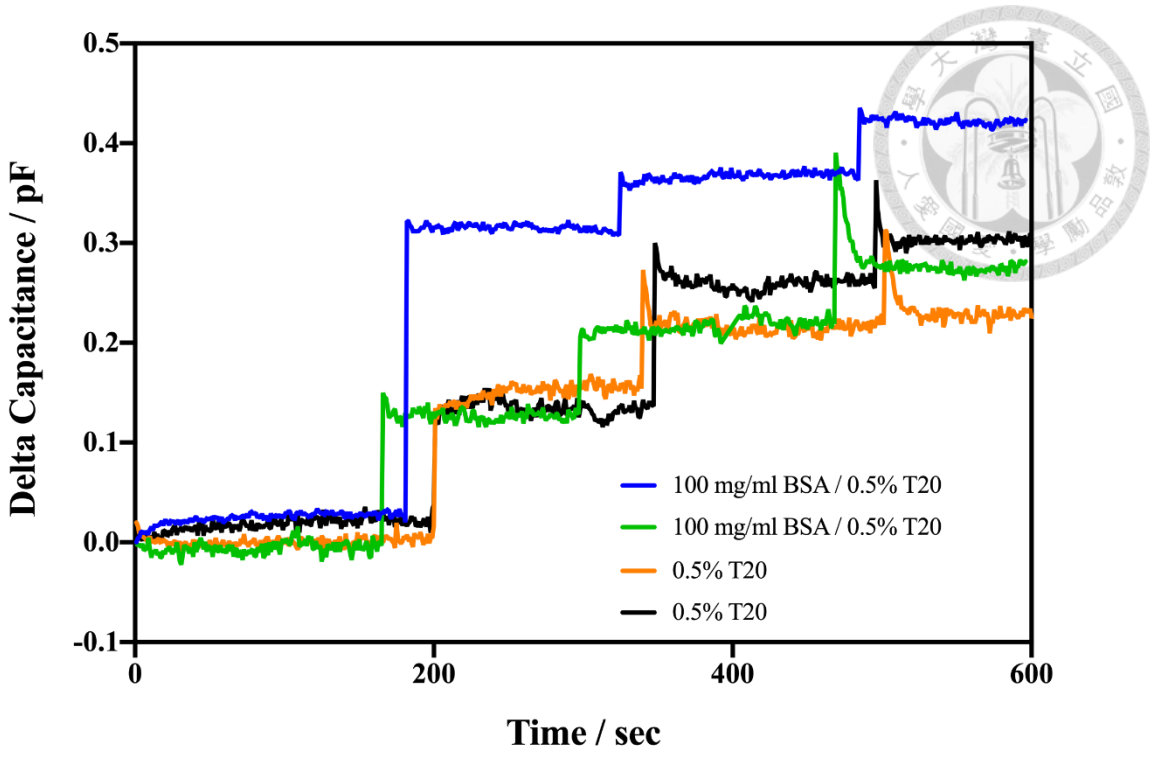


圖 4- 35 有無蛋白吸附之 NC 披覆電極界面於 T20 溶液的電容量測。將吸附與未吸附蛋白的 NC/AR 披覆碳電極先測量電容起始值，200 秒、300 秒、500 秒時將以 PBS 清洗並浸泡在 T20 中震盪 20 秒再接續進行電容量測。

生化分析工具中的蛋白洗滌劑緩衝溶液有界面活性劑成分，像是 Tween 系列的界面活性劑，在西方墨點法 western blot、DAPI 染色法程序中主要以 Tween 20 為主，參考其使用的濃度大多為 0.05%至 0.5%（v / v）且須搭配足量的緩衝溶液清洗。改良原先的清洗方法認為是否以足量的緩衝溶液是清洗的關鍵，本實驗將不同濃度蛋白吸附於製備好 NC/AR 的碳電極，以 PBS 清洗和 T20 與 PBS 清洗兩種不同清洗方式的比較，可以觀察圖 4-36，在 300、600、900 秒進行兩種不同方式的清洗量測並計算電容值變化量，蛋白濃度越大的組別中以單純 PBS 清洗的黑色線條可以看出電容值微微上升的趨勢，對照藍色線條以 T 20 先沖洗再加上 PBS 清洗後電容值明顯下降，在蛋白濃度較低的組別中兩種方法有相同趨勢，差別在界面上的蛋白在相對稀少的情況下，較難看出蛋白脫離

doi:10.6342/NTU202301818

界面後的電容變化。結合前一張圖的結果表示單純以 T20 溶液清洗不具有清洗效果而必須要搭配足量的 PBS 才具有沖洗效果。

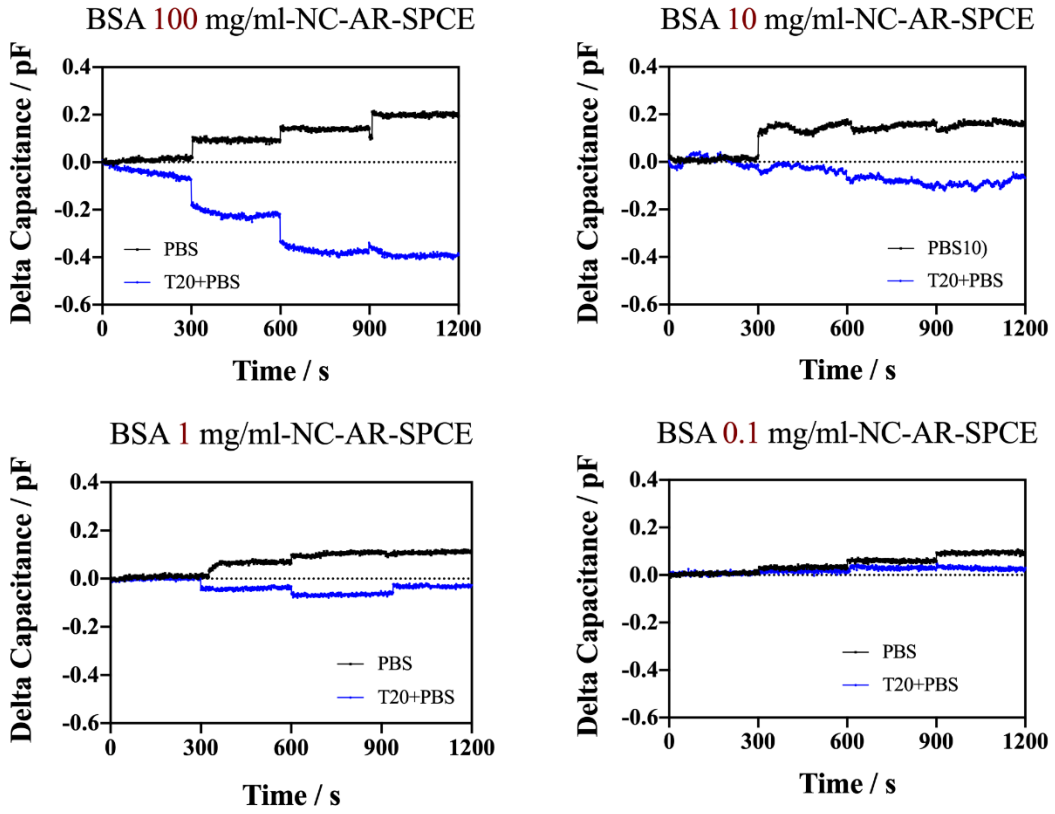


圖 4- 36 不同濃度的蛋白吸附於碳電極後進行界面活性劑與 PBS 之清洗。將製備好 NC/AR 的 SPCE 泡進不同濃度蛋白進行吸附，吸附後在 300、600、900 秒進行 PBS 溶液（黑色）清洗以及 Tween 20 和三次 PBS 溶液（藍色）清洗，過程中以量測電容並計算電容值變化量。

由章節 4.3.3.1 的結果確認 BSA 確實能吸附於製備好 NC/AR 的碳電極上，且電容值的變化被率為增加，在此章節以界面活性劑清洗感測界面上吸附的蛋白可見變容變化是下降的，更加證實蛋白吸附與脫離的現象與電容變化具有具有一致性。

doi:10.6342/NTU202301818

4.3.4 Anti-BSA 感測器的製備與性能測定

為了進一步了解何種濃度的蛋白吸附於所發展的感測器感測界面製備上具有最大之 Anti-BSA 抗體專一性結合效益，將固定濃度的抗體與不同抗原吸附於 NC/AR 製備的碳電極進行電容量測。依照圖 4-37 不同濃度的 BSA 與同濃度的 anti-BSA 結合的電容值變化上，大致上變化倍率皆是負的，濃度為 10-100 mg/ml 的 BSA 接上抗體後一變化更為明顯（n>3），但可以發現濃度為 50 和 100 mg/ml 的 BSA 與抗體結合後變化差異大，因此選擇蛋白濃度為 10 mg/ml 進行抗原製備的濃度參數。

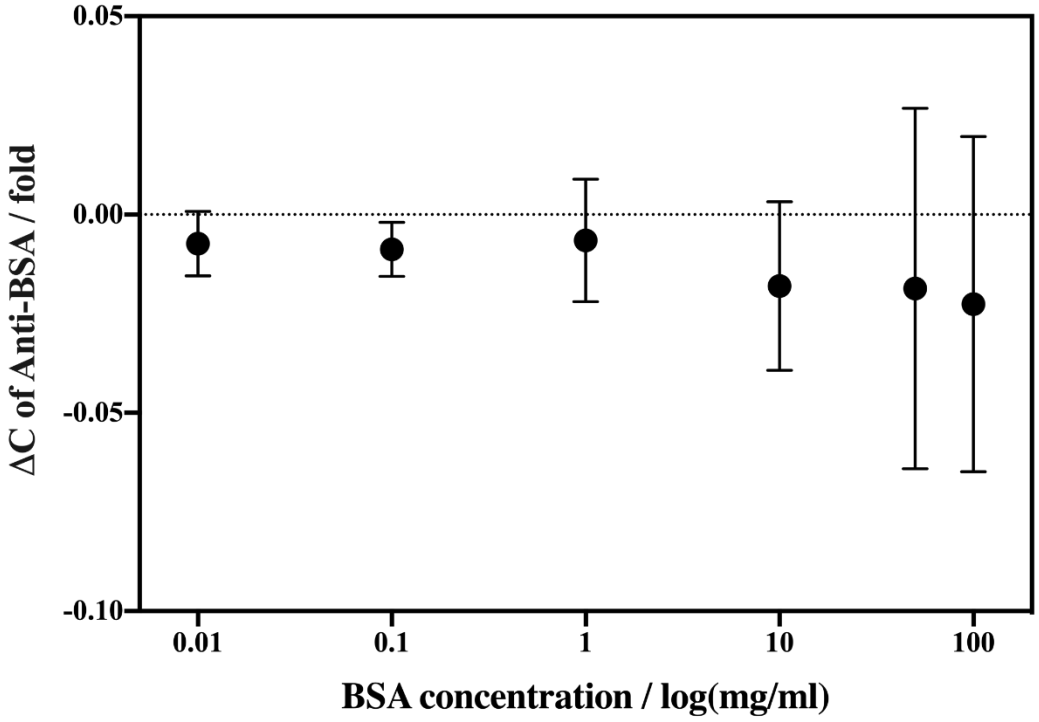


圖 4- 37 25 μg/ml Anti-BSA 與不同濃度 BSA 結合效果。將製備好 NC 與絕緣層的碳電極泡進不同濃度的的蛋白溶液進行吸附，然後量測的電容值作為初始電容值再將 25 μg/ml 的 Anti-BSA 滴在電極反應區，一小時後用 PBS 清洗最後進行電容值的量測計算電容變化量。

doi:10.6342/NTU202301818

以蛋白濃度為 10 mg/ml 吸附於 NC/AR 製備之碳電極後於反應區滴上 0.125 - 2.5 μg/ml 的 Anti-BSA 抗體與 TNF-a 抗體進行專一性結合測試一小時後量測電容進行變化倍率計算，如圖 4-38，在 Anti-BSA 的結果中電容變化倍率隨著濃度增加呈現負向關係，而大於 2.5 μg/ml 電容值變化變得趨緩達到飽和狀態，在 Anti-TNF-a 的結果中電容值並沒有隨著濃度具單調性變化，所以推測本研究對於 Anti-BSA 抗體的感測具有選擇性與專一性。

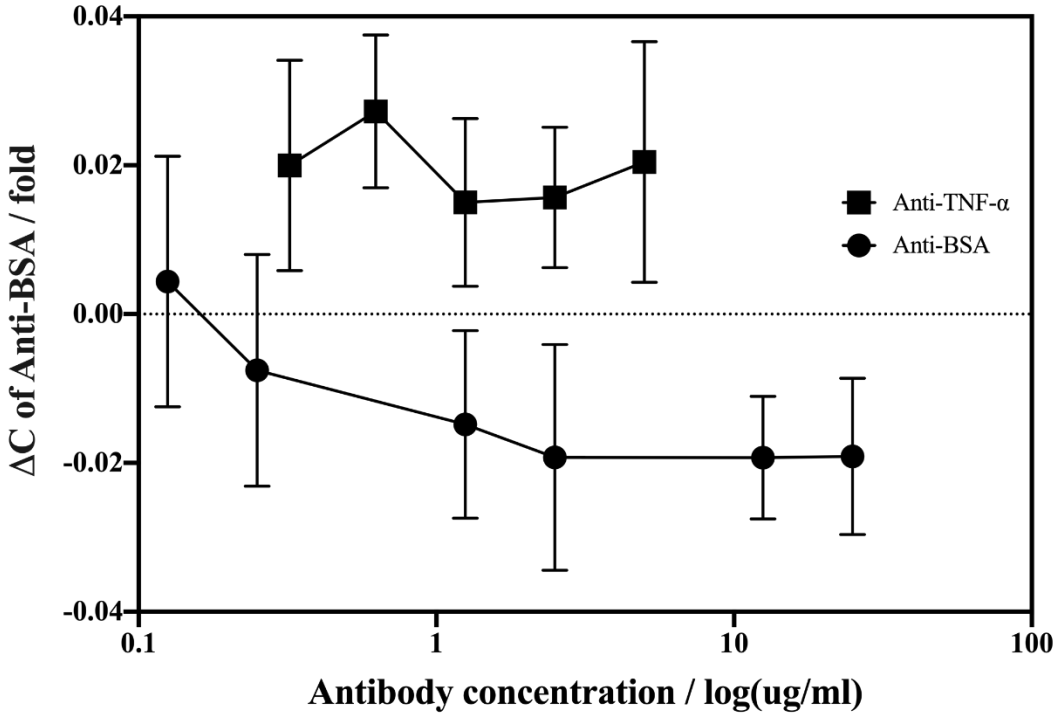


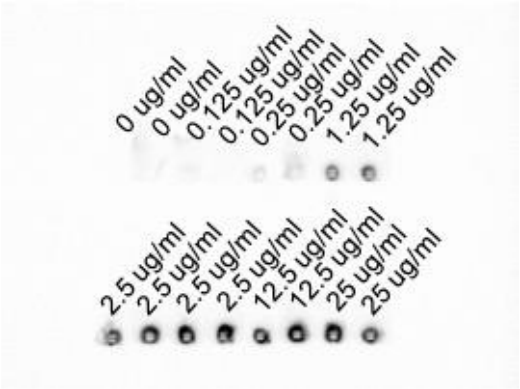
圖 4- 38 10 mg/ml BSA 對不同濃度的 Anti-BSA 的吸附結果。將製備好 NC 與絕緣層的碳電極泡進濃度 10 mg/ml 的蛋白溶液進行吸附，然後量測的電容值作為初始電容值再將不同濃度的 Anti-BSA 滴在電極反應區，一小時後用 PBS 清洗最後進行電容值的量測計算電容變化量。

除了以電容值得變化倍率觀測抗體結合效果，本研究同時經由 ECL 冷光呈色實驗驗證抗體的結合效果，圖 4- 39 可見隨著圖中標示的抗體濃度增加，冷光造影結果所呈現的顏色變化越明顯，也能再次的以生化的分析方式證明 Anti-

doi:10.6342/NTU202301818

BSA 抗體確實能夠與此體系中 NC/AR 製備的碳電極和結合，達到本研究中的電子式電容感測模組進行抗體感測的最終目的。

（a）



（b）

圖 4- 39 不同濃度抗體與 10 mg/ml BSA 結合後的 ECL 呈色分析。將製備好 NC 與絕緣層的碳電極泡進濃度 10 mg/ml 的蛋白溶液進行吸附，然後量測的電容值作為初始電容值再將不同濃度的 Anti-BSA 滴在電極反應區，一小時後用 PBS 清洗最後將二抗滴在結合區再淋上 ECL 混合試劑進行冷光造影。

doi:10.6342/NTU202301818

第五章 結論與未來展望

電化學感測體系下以自組裝單層作為穩定的絕緣層的同時也需要考慮到感測的敏感度，自組裝單層的碳鏈越長阻抗越大，若要形成緻密且穩定的絕緣層，其排列所需的時間越長，同時，過大的阻抗在電化學體系中難以單純透過 EIS 中法拉第程序來以等效電路模擬出電子轉移阻抗的大小達到定量的目的。由此了解到電化學體系中的不同，感測工具也有不一樣的適用性，在長練的 MUA 作為 SAM 的修飾體系中阻抗過大無法以典型的 Nyquist Plot 圖分析段子轉移阻抗大小，作為蛋白定量的工具，此時，或許以 EIS 衍伸的 ECS 具有較高解析度明顯觀察到蛋白分子透過交聯劑固定於 SAM 單層分子的電容差別，但同樣並未解決不同濃度蛋白定量上的問題。研究過程回歸以 EIS 分析儀器所得到的電學相關資訊以波德圖探討 MPA 和 MUA 兩種不同鍊長的單層分子作為 SAM 的修飾體系中，需要以不同頻率才能做為組抗與電容定量的參數，整體在阻抗較小（MPA）情況下可在高頻區分析，而阻抗較大的情況下（MUA），只能在較低頻區域分析其阻抗與電容大小。

以 LCR 錶量測已自製金電極電化學修飾體系的電容及對應的 D 值分析材料 4 小時以上長時間在金表面上可形成較穩定之單層分子，同時發現在 SAM 於金電極上不及樹脂於碳電極的絕緣效果，AR/NC 製備的碳電極整體電容值約為 10 pF、D 值約為 0.02，由電容值與 D 值判斷碳電極的整體絕緣度相較於金電極的電化學的修飾體系較適合本研究中的電子式電容量測模組的開發。在本研究中電容感測模組達到了分子感測的目標，以常見的 BSA 蛋白作為抗原，將其固定在製備好 NC 吸附層與 AR 絕緣層之碳電極作為辨識元件，並與 Anti-BSA 抗體結合，透過分析抗原抗體的濃度與量測到電極界面的電容變化關係，不同濃度在抗原固定於 NC/AR 製備的碳電極階段，在最高蛋白濃度吸附下整體電容訊號變化倍率提升了約 5 倍（**Δ**Capacitance/fold 值從 0.01%提升至 0.05%），針對抗體進行結合後可以看到電容下降的現象與眾多文獻中電容感測的結果相符合

doi:10.6342/NTU202301818

(Garrote et a l, 2020; Berggren et al, 1997)，目前本研究發展之感測器對濃度為 0-25 μg/ml 之 Anti-BSA 具有分辨性，且透過同樣發法對其它抗體進行測試後發現並無結合效果，已證實除了達到專一性的感測目的。在整體模組架構方面，我們已經初步發展了生物辨識元件（碳電極）的製備和抗原固定化方法，同時以電容的終點量測法和生化染色的方式確認了抗原抗體與界面結合的有效性。最後，本研究的發展以較低成本且易於製備的方式進行，但在整體的感測的敏感度上與終端使用上的步驟與實際應用上的問題等，還需進行考量和優化，期待日後有機會能將其發展為市售的產品。

doi:10.6342/NTU202301818

參考文獻

衛生福利部。2022。110 年國人死因統計結果。台北：衛生福利部。網址：https://www.mohw.gov.tw/cp-16-70314-1.html。上網日期：2022-08-30。

Ahmed, A., Rushworth, J. V., Wright, J. D., & Millner, P. A. (2013). Novel impedimetric immunosensor for detection of pathogenic bacteria Streptococcus pyogenes in human saliva. *Analytical Chemistry, 85*(24), 12118-12125.

Alharthi, S. D., Bijukumar, D., Prasad, S., Khan, A. M., & Mathew, M. T. (2021). Evolution in Biosensors for Cancers Biomarkers Detection: A Review. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion, 7*(2), 42. doi:10.1007/s40735-020-00463-7

Anandan, V., Gangadharan, R., & Zhang, G. (2009). Role of SAM Chain Length in Enhancing the Sensitivity of Nanopillar Modified Electrodes for Glucose Detection. *Sensors (Basel), 9*(3), 1295-1305. doi:10.3390/s90301295

Bahadir, E. B., & Sezginturk, M. K. (2016). A comparative study of short chain and long chain mercapto acids used in biosensor fabrication: A VEGF-R1-based immunosensor as a model system. *Artif Cells Nanomed Biotechnol, 44*(2), 462-470. doi:10.3109/21691401.2014.962743

Baradoke, A., Hein, R., Li, X., & Davis, J. J. (2020). Reagentless Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Polyaniline Interface. *Anal Chem, 92*(5), 3508-3511. doi:10.1021/acs.analchem.9b05633

Berggren, C., & Johansson, G. (1997). Capacitance Measurements of Antibody−Antigen Interactions in a Flow System. Analytical Chemistry, 69(18), 3651-3657. doi:10.1021/ac970203e

Berggren, C., Bjarnason, B., & Johansson, G. (2001). Capacitive biosensors. Electroanalysis, 13(3), 173-180. doi:Doi 10.1002/1521-

doi:10.6342/NTU202301818

4109(200103)13:3<173::Aid-Elan173>3.0.Co;2-B

Bergveld, P., & TheÂvenot, D. (1993). In Advances in Biosensors, Supplement 1 (APF Turner, ed.). In: JAI Press, London, UK.

Berney, H. (2004). Capacitance affinity biosensors. In *Ultrathin Electrochemical Chemo-and Biosensors* (pp. 43-65): Springer.

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem, 60*(1), 1-8. doi:10.1042/EBC20150001

Biomarkers Definitions Working, G. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther, 69*(3), 89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989

Bivas-Benita, M., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L. M. C., Junginger, H. E., Borchard, G., Ottenhoff, T. H. M., & Geluk, A. (2004). Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine, 22*(13), 1609-1615. doi:https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.044

Buckhout-White, S. L., & Rubloff, G. W. (2009). Spatial resolution in chitosan-based programmable biomolecular scaffolds. *Soft Matter, 5*(19), 3677-3681. doi:10.1039/B820356C

Bueno, P. R., Mizzon, G., & Davis, J. J. (2012). Capacitance Spectroscopy: A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B, 116*(30), 8822-8829. doi:10.1021/jp303700f

Cheng, T.-J., Hsiao, H.-Y., Tsai, P.-C., & Chen, R. L. C. (2023). Redoxless Electrochemical Capacitance Spectroscopy for Investigating Surfactant Adsorption on Screen-Printed Carbon Electrodes. *Chemosensors, 11*(6), 343.

doi:10.6342/NTU202301818

Retrieved from https://www.mdpi.com/2227-9040/11/6/343

Chinen, A. B., Guan, C. M., Ferrer, J. R., Barnaby, S. N., Merkel, T. J., & Mirkin, C. A. (2015). Nanoparticle probes for the detection of cancer biomarkers, cells, and tissues by fluorescence. *Chemical reviews, 115*(19), 10530-10574.

Cho, I. H., Kim, D. H., & Park, S. (2020). Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomater Res, 24*, 6. doi:10.1186/s40824-019-0181-y

Cho, W. C. (2011). [Proteomics and translational medicine: molecular biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and prediction of therapy outcome]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 14*(8), C6-9. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2011.08.12

Conroy, P. J., Hearty, S., Leonard, P., & O'Kennedy, R. J. (2009). *Antibody production, design and use for biosensor-based applications.* Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.

Creager, S. (2001). Self-assembled Monolayer Films: Electrochemical Properties. In K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilschner, E. J. Kramer, S. Mahajan, & P. Veyssière (Eds.), *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* (pp. 8299-8304). Oxford: Elsevier.

Cullen, D. C., Sethi, R. S., & Lowe, C. R. (1990). Multi-analyte miniature conductance biosensor. *Analytica Chimica Acta, 231*, 33-40. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86394-1

da Silva, D. J. R., & Diniz, F. B. (2014). Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of Concanavalin A Adsorption on Glassy Carbon Electrode: An Analysis of Capacitance Dispersion. *Electrochimica Acta, 119*, 99-105. doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.021

Daniels, J. S., & Pourmand, N. (2007). Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis, 19*(12), 1239-1257.

doi:10.6342/NTU202301818

doi:10.1002/elan.200603855

de Vasconcelos, E. A., Peres, N. G., Pereira, C. O., da Silva, V. L., da Silva, E. F., & Dutra, R. F. (2009). Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor. *Biosensors and Bioelectronics, 25*(4), 870-876. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.050

Dinckaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., Altuğ, Ç., & Akkoca, A. (2011). Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics, 26*(9), 3806-3811.

Eckermann, A. L., Feld, D. J., Shaw, J. A., & Meade, T. J. (2010). Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coord Chem Rev, 254*(15-16), 1769-1802. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.023

Eggins, B. R. (2002). *Chemical sensors and biosensors* (Vol. 2): John Wiley & Sons.

Erlandsson, D., Teeparuksapun, K., Mattiasson, B., & Hedström, M. (2014). Automated flow-injection immunosensor based on current pulse capacitive measurements. *Sensors and Actuators B: Chemical, 190*, 295-304. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.076

Erturk, G., & Mattiasson, B. (2017). Capacitive Biosensors and Molecularly Imprinted Electrodes. *Sensors, 17*(2). doi:ARTN 39010.3390/s17020390

Fendler, J. (2012). *Catalysis in micellar and macromoleular systems*: Elsevier.

Garrote, B. L., Santos, A., & Bueno, P. R. (2020). Label-free capacitive assaying of biomarkers for molecular diagnostics. Nature Protocols, 15(12), 3879-3893. doi:10.1038/s41596-020-0390-9

Georgas, A., Agiannis, K., Papakosta, V., Priftis, P., Angelopoulos, S., Ferraro, A., & Hristoforou, E. (2022). A Biosensor Platform for Point-of-Care SARS-CoV-2

doi:10.6342/NTU202301818

Screening. *Biosensors (Basel), 12*(7). doi:10.3390/bios12070487

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel), 8*(3), 1400-1458. doi:10.3390/s80314000

Halder, E., Chattoraj, D. K., & Das, K. P. (2005). Adsorption of biopolymers at hydrophilic cellulose-water interface. *Biopolymers, 77*(5), 286-295. doi:10.1002/bip.20232

Holstein, C. A., Chevalier, A., Bennett, S., Anderson, C. E., Keniston, K., Olsen, C., . . . Yager, P. (2016). Immobilizing affinity proteins to nitrocellulose: a toolbox for paper-based assay developers. *Anal Bioanal Chem, 408*(5), 1335-1346. doi:10.1007/s00216-015-9052-0

Hughes, W. S. (1922). The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. *Journal of the American Chemical Society, 44*, 2860-2867. doi:DOI 10.1021/ja01433a021

Itagaki, M., Suzuki, S., Shitanda, I., & Watanabe, K. (2007). Electrochemical impedance and complex capacitance to interpret electrochemical capacitor. *Electrochemistry, 75*(8), 649-655.

Kanaparthi, S., Supraja, P., & Singh, S. G. (2019). Chapter 7 - Smart, Portable, and Noninvasive Diagnostic Biosensors for Healthcare. In Inamuddin, R. Khan, A. Mohammad, & A. M. Asiri (Eds.), *Advanced Biosensors for Health Care Applications* (pp. 209-226): Elsevier.

Kanyong, P., & Davis, J. J. (2020). Homogeneous functional self-assembled monolayers: Faradaic impedance baseline signal drift suppression for high-sensitivity immunosensing of C-reactive protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 856*, 113675. doi:https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113675

Karsdal, M. A., Henriksen, K., Leeming, D. J., Mitchell, P., Duffin, K., Barascuk,

doi:10.6342/NTU202301818

N., . . . Christiansen, C. (2009). Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development. *Biomarkers, 14*(3), 181-202. doi:10.1080/13547500902777608

Khashayar, P., Amoabediny, G., Larijani, B., Hosseini, M., Verplancke, R., De Keersmaecker, M., . . . Vanfleteren, J. (2017). A highly sensitive electrochemical biosensor based on AuNP-modified gold electrodes for selective determination of serum levels of crosslaps. *3 Biotech, 7*(5), 312. doi:10.1007/s13205-017-0919-y

Kim, E., Xiong, Y., Cheng, Y., Wu, H.-C., Liu, Y., Morrow, B. H., . . . Payne, G. F. (2015). Chitosan to Connect Biology to Electronics: Fabricating the Bio-Device Interface and Communicating Across This Interface. *Polymers, 7*(1), 1-46. Retrieved from https://www.mdpi.com/2073-4360/7/1/1

Kimble, C. J., Boesche, J. B., Eaker, D. R., Kressin, K. R., McIntosh, M. B., Lujan, J. L., . . . Asp, A. J. (2017, 7-10 May 2017). *Multifunctional system for observing, measuring and analyzing stimulation-evoked neurochemical signaling.* Paper presented at the 2017 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA).

Korotkaya, E. (2014). Biosensors: design, classification, and applications in the food industry. *Foods and raw materials, 2*(2), 161-171.

Lacina, K., Sopousek, J., Cunderlova, V., Hlavacek, A., Vaclavek, T., & Lacinova, V. (2018). Biosensing based on electrochemical impedance spectroscopy: Influence of the often-ignored molecular charge. *Electrochemistry Communications, 93*, 183-186. doi:10.1016/j.elecom.2018.07.015

Lee, M., Park, S. J., Kim, G., Park, C., Lee, M.-H., Ahn, J.-H., & Lee, T. (2022). A pretreatment-free electrical capacitance biosensor for exosome detection in

doi:10.6342/NTU202301818

undiluted serum. *Biosensors and Bioelectronics, 199*, 113872. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113872

Lee, S. M., Han, N., Lee, R., Choi, I. H., Park, Y. B., Shin, J. S., & Yoo, K. H. (2016). Real-time monitoring of 3D cell culture using a 3D capacitance biosensor. *Biosens Bioelectron, 77*, 56-61. doi:10.1016/j.bios.2015.09.005

Low, S. C., Shaimi, R., Thandaithabany, Y., Lim, J. K., Ahmad, A. L., & Ismail, A. (2013). Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties. *Colloids Surf B Biointerfaces, 110*, 248-253. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.001

Macdonald, D. D. (2006). Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta, 51*(8-9), 1376-1388.

Macdonald, J. R. (1992). Impedance spectroscopy. *Annals of biomedical engineering, 20*, 289-305.

Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors, 21*(19), 6578. Retrieved from https://www.mdpi.com/1424-8220/21/19/6578

Mirsky, V. M. (2013). *Ultrathin electrochemical chemo-and biosensors: technology and performance* (Vol. 2): Springer Science & Business Media.

Newman, J. D., & Setford, S. J. (2006). Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology, 32*(3), 249-268. doi:Doi 10.1385/Mb:32:3:249

Ngeh-Ngwainbi, J., Suleiman, A. A., & Guilbault, G. G. (1990). Piezoelectric crystal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics, 5*(1), 13-26. doi:https://doi.org/10.1016/0956-5663(90)80023-7

Olaru, A., Bala, C., Jaffrezic-Renault, N., & Aboul-Enein, H. Y. (2015). Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. *Critical*

doi:10.6342/NTU202301818

Reviews in Analytical Chemistry, 45(2), 97-105. doi:10.1080/10408347.2014.881250

Park, C. S., Colorado, R., Jamison, A. C., & Lee, T. R. (2016). Thiol-Based Self-Assembled Monolayers: Formation, Organization, and the Role of Adsorbate Structure. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*: Elsevier.

Pauliukaite, R., Ghica, M. E., Fatibello-Filho, O., & Brett, C. M. A. (2009). Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite−Epoxy Composite Electrode. *Analytical Chemistry, 81*(13), 5364-5372. doi:10.1021/ac900464z

Pelton, R. (2009). Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28*(8), 925-942. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.05.005

Prodromidis, M. I. (2010). Impedimetric immunosensors—A review. *Electrochimica Acta, 55*(14), 4227-4233.

Ram, Y., Yoetz-Kopelman, T., Dror, Y., Freeman, A., & Shacham-Diamand, Y. (2016). Impact of Molecular Surface Charge on Biosensing by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electrochimica Acta, 200*, 161-167. doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.162

Ren, A., Prassas, I., Sugumar, V., Soosaipillai, A., Bernardini, M., Diamandis, E. P., & Kulasingam, V. (2021). Comparison of two multiplexed technologies for profiling >1,000 serum proteins that may associate with tumor burden. *F1000Res, 10*, 509. doi:10.12688/f1000research.53364.1

Sandoval Bojórquez, D. I., Janićijević, Ž., Palestina Romero, B., Oliveros Mata, E. S., Laube, M., Feldmann, A., . . . Baraban, L. (2023). Impedimetric

doi:10.6342/NTU202301818

Nanobiosensor for the Detection of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies. *ACS Sensors*, *8*(2), 576-586. doi:10.1021/acssensors.2c01686

She, Z., Difalco, A., Hähner, G., & Buck, M. (2012). Electron-beam patterned self-assembled monolayers as templates for Cu electrodeposition and lift-off. *Beilstein J Nanotechnol*, *3*, 101-113. doi:10.3762/bjnano.3.11

Shi, Y., Yang, R., & Yuet, P. K. (2009). Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst. *Carbon*, *47*(4), 1146-1151. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.12.049

Sopousek, J., Veznik, J., Houser, J., Skladal, P., & Lacina, K. (2021). Crucial factors governing the electrochemical impedance on protein-modified surfaces. *Electrochimica Acta*, *388*. doi:ARTN 138616

10.1016/j.electacta.2021.138616

Teeparuksapun, K., Hedström, M., & Mattiasson, B. (2022). A Sensitive Capacitive Biosensor for Protein a Detection Using Human IgG Immobilized on an Electrode Using Layer-by-Layer Applied Gold Nanoparticles. *Sensors*, *22*(1), 99. Retrieved from https://www.mdpi.com/1424-8220/22/1/99

Teeparuksapun, K., Kanatharana, P., Limbut, W., Thammakhet, C., Asawatreratanakul, P., Mattiasson, B., . . . Thavarungkul, P. (2009). Disposable electrodes for capacitive immunosensor. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, *21*(9), 1066-1074.

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(1), 121-131. doi:https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4

doi:10.6342/NTU202301818

Topkaya, S. N., Azimzadeh, M., & Ozsoz, M. (2016). Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers Detection: Recent Advances and Challenges. *Electroanalysis, 28*(7), 1402-1419. doi:10.1002/elan.201501174

Vaidya, V. S., & Bonventre, J. V. (2010). *Biomarkers : in medicine, drug discovery, and environmental health*. Hoboken, N.J.: Wiley.

Vestergaard, M., #039, delanji, Kerman, K., & Tamiya, E. (2007). An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors, 7*(12), 3442-3458. Retrieved from https://www.mdpi.com/1424-8220/7/12/3442

Vittal, R., Gomathi, H., & Kim, K.-J. (2006). Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. *Advances in Colloid and Interface Science, 119*(1), 55-68. doi:https://doi.org/10.1016/j.cis.2005.09.004

Vlahou, A., Makridakis, M., & Springer Science+Business Media. (2015). *Clinical proteomics : methods and protocols* (Second Edition. ed.). New York: Humana Press.

Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M., & Orazem, M., E. (2021). Electrochemical impedance spectroscopy. *Nature Reviews Methods Primers, 1*, 41 (21pages). doi:10.1038/s43586-021-00039-w

Woodward, J. T., & Schwartz, D. K. (1996). In Situ Observation of Self-Assembled Monolayer Growth. *Journal of the American Chemical Society, 118*(33), 7861-7862. doi:10.1021/ja961524v

Zhang, H., Xu, G., Liu, T., Xu, L., & Zhou, Y. (2013). Foam and interfacial properties of Tween 20–bovine serum albumin systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 416*, 23-31. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.10.028

doi:10.6342/NTU202301818