

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 化學科

第二名

050204

自組裝 DNA 探針於 GNP@PANI 電極以檢測
miRNA

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 吳朵羚	指導老師： 江慧玉
---------------	--------------

關鍵詞： DNA probe、miRNA、GNP@PANI 電極

自組裝 DNA 探針於 GNP@PANI 電極以檢測 miRNA

摘 要

在許多疾病中，如癌症、心血管或神經疾病等，檢測微核糖核酸 (microRNA，簡稱 miRNA) 的表現水平可作為診斷指標。現行檢測 miRNA 多使用 qRT-PCR 技術，雖然有其特異性，然而成本高、操作複雜、耗時長為其缺點。本研究開發自行設計可抓取目標股 miRNA 的 DNA 探針，藉由合成修飾技術，將此探針固定在金奈米與聚苯胺 (GNP@PANI) 的修飾電極上，製備出具高靈敏度與特異性的分子電極。實驗結果顯示：此自組裝的分子探針電極具有良好的線性檢量關係，偵測極限可達 0.1 nM；其極佳的專一性可應用於尿液樣本的檢測，且回收率高達 101.7%。本研究採用電化學技術來檢測 miRNA，具有成本低、操作簡便、檢測快速等特點，且裝置易於小型化，便於攜帶與使用，適合於資源有限的地區和現場檢測。

壹、 前言

一、 研究動機

微核糖核酸 (microRNA，簡稱 miRNA) 是一段約 19~24 個核苷酸分子的非編碼 RNA，具有調節基因表現的功能，例如增殖、分化與凋亡，且會影響癌症的發生機制。生物課時老師提到 miRNA 是處於分子生物學中心法則外的新興研究分子，只是現今的研究多採用 qPCR，不但耗時且需較高的技術需求。此外，在化學課程中，老師曾介紹過電化學儀搭配電極修飾技術，能夠“客製化”地依據檢測物質的電化學性質來進行設計、研究，因此本研究希望能設計一個低成本、快捷且恆溫下可操作的 miRNA 檢測裝置：使用含氮鹼基配對原理，設計可雜合 miRNA 的 DNA probe，再利用石墨電極作為基底材質，修飾上導電聚合物，再以其還原力將奈米金吸附密合於聚合纖維上，最後採用鍵結方式接上優化後的 DNA probe，即成為用於檢測 miRNA 的 DNA probe 電極。利用電化學儀器檢測雜合前、後 DNA probe 的電流訊號差異，可作為定性、定量依據。

二、研究目的

本研究之研究目的為：

- (一) 設計可抓取目標 miRNA 的 DNA 探針分子
- (二) 探討合成奈米金@聚苯胺(後續簡稱 GNP@PANI) 修飾電極之最佳條件
- (三) 將 DNA 探針分子連接至 GNP@PANI 電極，確認其完整性
- (四) 利用自行設計、自製的 DNA 探針分子，進行檢測 miRNA 之效能評估

三、文獻回顧

(一) 現行 miRNA 檢測方法——RT-qPCR

定量 RNA 時，現今方法多使用定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real time PCR, 簡稱 RT-qPCR) 進行。針對目標物設計具有專一性的引子，以核酸複製技術放大樣品中的特定核酸片段，再通過螢光回報的核酸量，藉由系統偵測到訊號時已經過的複製回數 (Cycle threshold value, 簡稱 CT 值) 來推測樣品中目標核酸的含量。

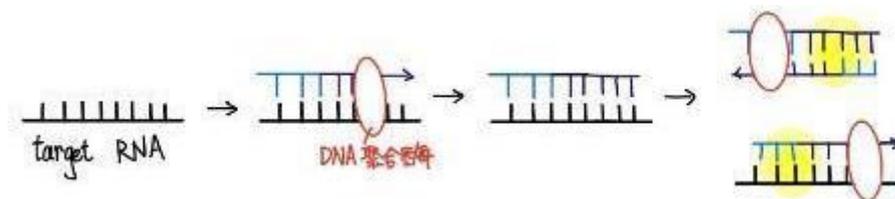


圖1-1 qPCR 原理示意圖 (自繪)

(二) miR-155

miR-155 為一段具有 23 個核苷酸長 miRNA，其序列為 5'-UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GU -3'。在人體中，miR-155 與許多方面的身體機能有關，例如免疫反應與癌症發展。在免疫方面，腫瘤壞死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , 簡稱 TNF- α) 可在巨噬細胞及單核球中影響 miR-155 的表現，且 miR-155 參與調控體內 B 細胞和 T 細胞的發育；在多種癌症中，miR-155 的表現量異常升高。由於 miR-155 在多種疾病與發展中扮演著重要角色，特別是癌症，因此，miR-155 被認為是個潛在的癌症診斷指標(ref [6])。

(三) 尿液中的 miR-155 與膀胱癌

膀胱癌是泌尿系統中第二常見的癌症，且患者在腫瘤切除之後，仍有一定的復發率，因此患者需要長期接受定期追蹤與治療。目前醫療上多是採用侵入性的膀胱鏡檢查，或是進行尿液採樣的細胞學分析來追蹤疾病復發跡象，前者雖然診斷準確性高，卻有著侵入性危險性、費用高且患者較難接受等問題；後者雖然為非侵入性診療法，但是其診斷的準確性約為 11~76 %，且此方法無法偵測到程度較低的惡性疾病，恐造成未能及早發現、治療的遺憾 (ref [9])。

在文獻(ref [10]) 中研究發現：在膀胱癌患者的檢測樣品中，miR-155 在尿液的上清液中會有過度表現的現象，此可作為治療前的評估條件；以 miR-155 為診療前的生物指標，若能以安全且有效、省時的方式來檢測 miR-155，應可提高診療評估基準，提升治療時效。因此我們希望可以開發一個以非侵入性、能檢測尿液樣品中 miR-155 之檢測電極，希冀能提供給膀胱癌治療法一個可行、有效的追蹤方法。

貳、 研究設備及器材

一、實驗藥品

藥品	中文名稱	藥品	中文名稱
Aniline	苯胺	Hydrochloric acid	氫氯酸
Chloroauric acid	四氯金酸	Ammonium persulfate	過硫酸銨
DNA probe	DNA 探針	2-Mercaptoethanol	巰基乙醇
Graphite oxide	氧化石墨	Sodium hydroxide	氫氧化鈉
Tetramethylethylene diamine (簡稱 TEMED)		四甲基乙二胺	
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain		核酸凝膠染料	
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (簡稱 TCEP)		三(羧乙基) 膦	
Acrylamide		丙烯醯胺	
Bis-acrylamide		N,N'-亞甲基雙丙烯醯胺	
Sodium dihydrogen phosphate		磷酸二氫鈉	

各種緩衝溶液及其組成			
Phosphate buffered saline (簡稱 PBS) Buffer : 組成有 NaCl、KCl、Na ₂ HPO ₄ 、KH ₂ PO ₄			
Sodium chloride	氯化鈉	Potassium chloride	氯化鉀
Sodium phosphate	磷酸氫二鈉	Potassium Phosphate	磷酸二氫鉀
Tris-Borate-EDTA (簡稱 TBE) Buffer : 組成有 Tris、boric acid、EDTA			
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (簡稱 Tris)			三羥甲基胺基甲烷
Ethylenediaminetetra acetic acid (簡稱 EDTA)			乙二胺四乙酸
Boric acid			硼酸
HEPES Buffer : 組成有 NaCl、MgCl ₂ 、Na ₂ HPO ₄			
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid			HEPES
magnesium chloride			氯化鎂
microRNA : 包含 miR-155、miR-182、miR-93、miR-210			

二、實驗儀器

儀 器	器材或設備
電化學分析儀	電磁攪拌板
聚合酶連鎖反應儀	掃描式電子顯微鏡
紫外線/可見光分光光譜儀	網版印刷石墨電極
電泳分析：間隔條、玻璃板、樣本梳、垂直電泳槽、電源供應器、鑄膠套件	

參、 研究過程或方法

一、研究原理

(一) 實驗設計概念

1. 檢測原理

含氮鹼基之間，如腺嘌呤(A) 與胸腺嘧啶 (T)、鳥嘌呤 (G) 與胞嘧啶 (C)，可藉由氫鍵作用力相互配對。運用這個配對原理，發想並先設計出可與目標 miRNA 互補配對的單股 DNA probe，運用此 DNA probe 來捕捉目標 miRNA。



圖3-1 miR-155之序列 (自繪)

實驗檢測及定量的響應方式是採用電化學法。將自創定製化的 DNA probe，其探針分子的一端接上亞甲藍分子，另一端則接上具有巰基 (-SH)，使其可接在披覆有奈米金的修飾電極上。如圖3-2，在檢測操作之前，電極上的 DNA probe 之構形為髮夾彎，當 DNA probe 分子與目標 miRNA 結合時，其構型會發生變化，因而改變亞甲藍分子與電極之間的距離，進而產生電化學訊號的變化，藉此電流訊號的差異可判斷或量化檢測 miRNA 之效能。

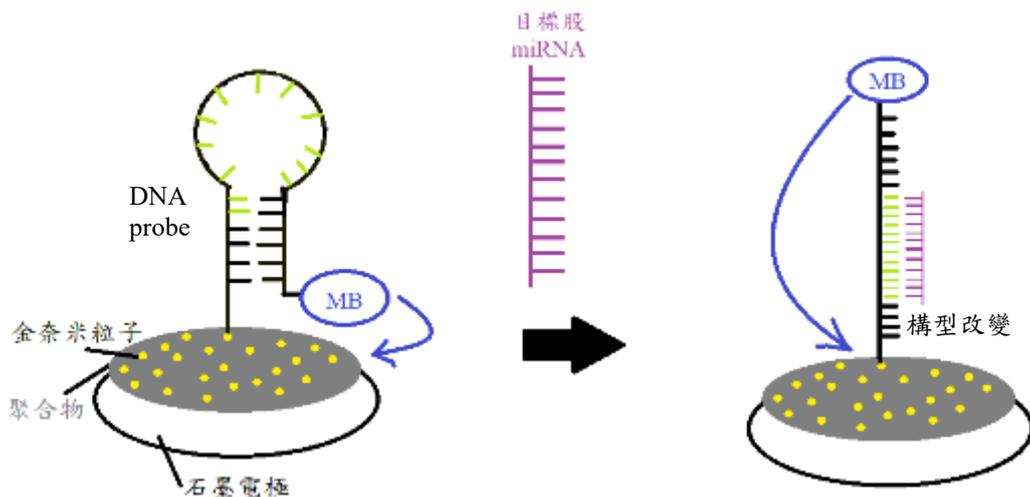


圖3-2 電化學 DNA probe 電極檢測原理示意圖 (自繪)

2. 電化學三電極系統

本實驗採用電化學三電極系統的網版印刷電極。如圖 3-3，網版印刷電極是利用一個細微孔洞的網版，此孔洞面積約 0.035 cm^2 ，此電極的基底材料為碳材石墨（多為經處理過的氧化石墨），在此孔洞分列工作電極（Working Electrode，簡稱 WE）、輔助電極（Counter Electrode，簡稱 CE）以及參考電極（Reference Electrode，簡稱 RE）。進行檢測時，WE 與 CE 連接成迴路，且主要反應發生在 WE 區域；RE 通常有數種，較常使用 Ag/AgCl 作為參考電極，其相對於 SHE（標準氫電極）的電位為 0.197 V 。為了優化自創 DNA probe 的檢測效能，本研究會在 WE 上進行一系列化學修飾，並探討此修飾電極的電化學性質。



圖3-3 網版印刷石墨三電極(自繪)

3. 修飾電極

查閱文獻（ref[11]）得知：目前檢測 miRNA 的電化學電極多是採用黃金箔片，或是鍍上奈米金粒子（Gold nanoparticle，簡稱 GNP,）；然而，直接使用黃金箔片電極不但成本較高，且在石墨電極直接鍍上金材後，此電極檢測表現不夠穩定、效能不佳，因此本研究設計先以導電聚合物修飾於石墨電極上，再利用其還原性基團，與含金離子溶液反應後，使奈米金可披覆沉積於電極表面，此方式可達到穩定電極表面能的功效，並製得 GNP@聚合物修飾電極，如圖 3-4 示意。

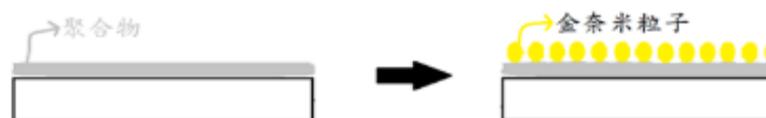


圖3-4 GNP@聚合物之修飾電極示意圖 (自繪)

二、實驗研究架構圖

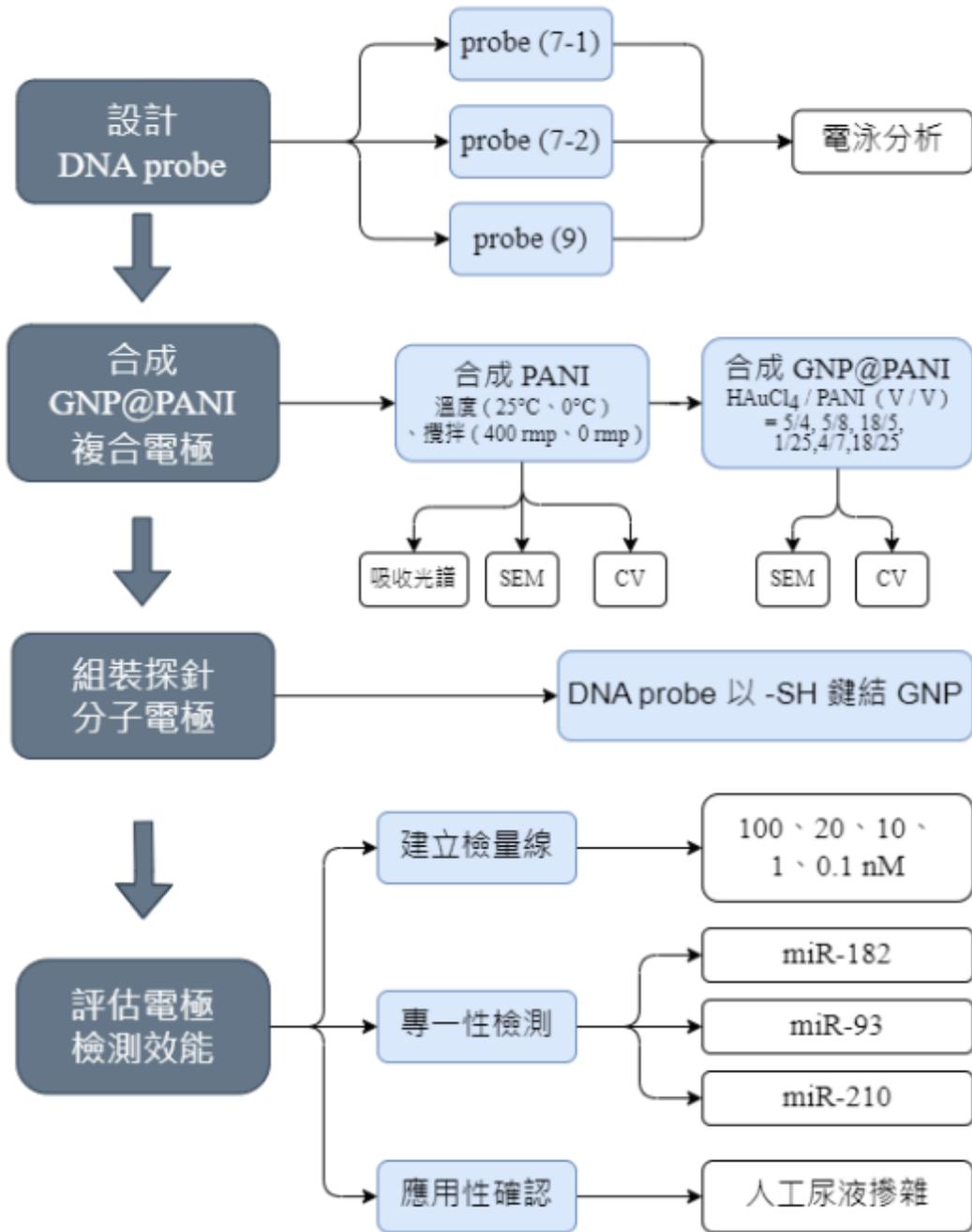


圖3-5 實驗設計與流程架構圖 (自繪)

三、研究方法及步驟

(一) 設計 DNA probe 分子

1. 依據 miR-155 的序列，先設計 probe (7-1)；再探討改變 probe 與 miR-155 連接之位置，設計出第二款 probe (7-2)。此外，改變此探針基部鍵結鹼基對的數目，改以 9 對鹼基配對的 probe (9)。下列圖 3-6 為此三款設計 DNA probe 的示意圖。

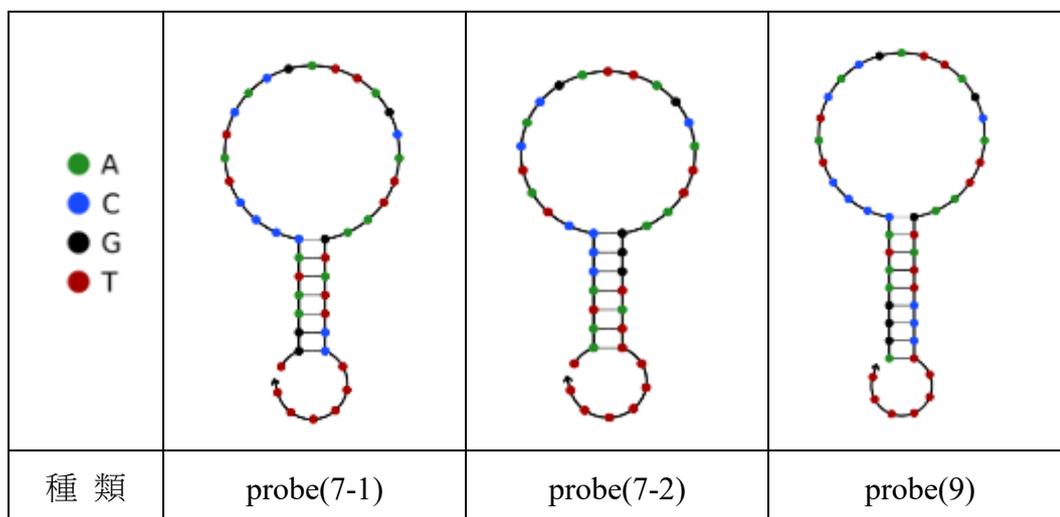


圖3-6 設計 DNA probe 結構示意圖 (自繪)

2. DNA probe 電泳分析

採用 DNA 電泳分析方法，設計如下表中各組實驗條件，探討三款 DNA probe 分子抓取目標物 miR-155 之效能。

- (1) 將 DNA probe 加熱後，再經冷卻 1 小時，使其形成髮夾彎結構，並以表格內條件使 miR-155 與 DNA probe 反應 1 小時。
- (2) 以 0.5X TBE buffer、15%聚丙烯醯胺，在 80 V 下進行 100 分鐘的電泳試驗。之後在 1X SYBR Gold 中浸泡膠體 10 分鐘，取出，將膠體照射紫外線觀察結果。
- (3) 表中第 1 組為目標股 miR-155，第 2、3、4 組為純粹的 probe (7-1)、probe (7-2)及 probe (9)。第 5~7 組為 probe (7-1)、probe (7-2)及 probe(9)在 PBS 中與 miR-155 反應的組別。第 8~10 組則是在 HEPES 的反應組。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miR-155 1 μ M, (μ L)	3	0	0	0	3	3	3	3	3	3
probe (7-1) 1 μ M, (μ L)	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
probe (7-2) 1 μ M, (μ L)	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
probe (9) 1 μ M, (μ L)	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2
PBS (μ L)	7	8	8	8	5	5	5	0	0	0
HEPES (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5

3. probe(7-1)與不同濃度 miR-155 的電泳分析

- (1) 進一步使用 probe(7-1)與 miR-155 進行電泳分析，實驗條件如下表。
- (2) 表中的 1' 組是使 miR-155 與 probe(7-1)完全反應的控制組(Control，簡稱 C)；第 2'~5'組分別為定量的 probe(7-1)與 200 μ M、100 μ M、50 μ M 與 25 μ M miR-155 反應的實驗組。第 6'組為純粹的 miR-155、第 7'組為純 probe (7-1)。

	1'	2'	3'(C)	4'	5'	6'	7'
probe (7-1) 1 μ M, (μ L)	0	2	2	2	2	2	2
miR-155 1 μ M, (μ L)	2	0	2	2	0	0	0
miR-155 0.5 μ M, (μ L)	0	0	0	0	2	0	0
miR-155 0.25M, (μ L)	0	0	0	0	0	2	0
miR-155 0.125 μ M, (μ L)	0	0	0	0	0	0	2
HEPES (μ L)	8	8	6	6	6	6	6

- (3) 先將 probe(7-1)加熱後，再冷卻 1 小時，使其形成髮夾彎結構。混合 probe(7-1)與 miR-155 後，再緩緩加熱至 95 $^{\circ}$ C 促使兩者完全反應，隨後再緩慢降至室溫，使 probe 與目標物強迫雜合，此即成為 1' 控制組。
- (4) 以 0.5X TBE buffer、15%聚丙烯醯胺，施加電壓 80 V 以進行 100 分鐘的電泳試驗。隨後於 1X SYBR Gold 中浸泡膠體 10 分鐘，取出後照射紫外線觀察結果。

(二) 製備修飾電極

1. 苯胺的聚合反應

- (1) 取 0.3 mL 苯胺與 9.7 mL、1.0 M HCl 混合，配製為溶液 A。稱取 0.366 g APS，以 1.0 M HCl 配製成 10 mL 溶液，標示為溶液 B。
- (2) 將 A、B 兩溶液快速混合，分別控制攪拌與否及溫度進行實驗，交叉組成四個實驗組（如下表），反應時間皆為 30 分鐘。

實驗組	甲	乙	丙	丁
實驗條件	攪拌+25°C	不攪拌+25°C	攪拌+0°C	不攪拌+0°C

- (3) 以掃描式電子顯微鏡觀察製備所得之聚合物的纖維結構。
- (4) 分別將不同實驗條件的產物進行凍乾，以乾燥粉狀保存。

2. 聚苯胺-石墨修飾電極

- (1) 取 2 mg 的實驗組(甲)條件下所得之聚苯胺乾燥粉末，將其溶於 1 mL、1.0 M HCl(aq)中，配製成實驗組(甲)的聚苯胺溶液。
- (2) 同上述操作步驟，得到實驗組(乙)、實驗組(丙)、實驗組(丁)的聚苯胺溶液。
- (3) 先吸取實驗組(甲)的聚苯胺溶液 2 μ L 置於網版印刷電極系統的工作電極上。再將其置於烘箱中，以 50°C 加熱 20 分鐘後，靜置冷卻。使用去離子水清洗上述電極，並以氮氣吹乾。同上述步驟操作，得到實驗組(乙)、實驗組(丙)、實驗組(丁)的聚苯胺-石墨修飾電極。以開路電位量測法(Open Circuit Potential-Time，簡稱 OCP)測量其電阻，再以循環伏安法 (Cyclic voltammetry，簡稱 CV)進行氧化還原電流之檢測。

3. GNP@PANI 複合電極

- (1) 將 2 mg 實驗組(乙)之聚苯胺溶於 1 mL、1 M HCl(aq)中，配製聚苯胺溶液
- (2) 採用不同比例將聚苯胺溶液與 1M HCl(aq)混合後，在攪拌下緩緩滴入 0.1 M HAuCl₄(aq)，並使其反應 2 小時。此過程需不斷攪拌，確保反應完全。
- (3) 各實驗組比例如下表所示：



GNP@PANI 實物照
(作者自行拍攝)

	聚苯胺溶液 (mL)	HCl (mL)	HAuCl ₄ (mL)
實驗組(A)	0.2	0.55	0.25
實驗組(B)	0.4	0.35	0.25

- (4) 將表中反應後的溶液以 8000 rpm 離心 10 分鐘，抽取 0.8 mL 上清液，並加入同量去離子水，重複此操作兩次。吸取上表(A)組 2 μ L 的產物置於三電極系統的工作電極上，再將其置於烘箱中，陰涼風乾 18 小時。同前述操作步驟，製得(B)組 GNP@PANI 複合電極。
- (5) 以掃描式電子顯微鏡觀察上述實驗條件製備所得之聚合物纖維結構；再以 CV 法測試兩組複合電極的氧化還原電流。

(三) 製備 DNA probe 電極

1. 組裝探針電極

- (1) 如下表配製各項溶液；將 probe solution 靜置 30 分鐘，以活化 probe(7-1)。

溶液名稱	組成
probe solution	以 HEPES 為溶劑，配製 1.0 μ M probe(7-1)與 5.0 mM TCEP
blocking buffer	100 nM NaCl 與 10mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄
MCH solution	以 HEPES 為溶劑，配製 1.0 mM MCH
electrolyte solution	50 nM NaCl 與 5mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄

- (2) 取 6 μ L 的 probe solution 置於 GNP@PANI 複合電極上，靜置 90 分鐘使其反應。再以 blocking buffer 清洗上述電極四次，接著置放 6 μ L MCH solution 於上述電極表面，靜置 1 小時，以去除未連接的 probe (7-1)。
- (3) 後續再以 blocking buffer 清洗電極表面四次，完成 DNA probe 電極。

2. 建立檢量線

- (1) 以 electrolyte solution 為電解液，施以方波伏安法(square wave voltammetry，簡稱 SWV) 進行檢測，讀取電極上亞甲藍分子的還原電流訊號 I_0 。
- (2) 以 HEPES 為溶劑，依序配製 0.1、1.0、10、20、100 nM 的 miR-155 溶液。
- (3) 將 6 μ L miR-155 溶液置於 DNA probe 電極上，靜置使其反應 45 分鐘；再以 blocking buffer 清洗後，採用 electrolyte solution 為電解液施以 SWV 進行檢測。
- (4) 重複進行上述實驗三次 (三重複)，確認 DNA probe 電極的健側效能與再現性。

(四) DNA probe 電極的專一性測試

1. 不同種類 miRNA 的檢測

- (1) 配製等濃度、不同種類的 miRNA 溶液，如下表。表中設計目標分子 miR-155 的濃度較其他 miRNA 的濃度小了 5 倍，以確認電極的辨識及抓取能力。

組別	[miR-210]	[miR-193]	[miR-182]	[miR-155]	Blank
miRNA 種類	miR-210	miR-193	miR-182	miR-155	
[miRNA] (nM)	500	500	500	100	0

- (2) 取表中各溶液 6 μ L，滴加在 DNA probe 電極上靜置 45 分鐘；後續同樣以 SWV 檢測各組電流訊號 I_n 。
- (3) 重複進行上述實驗三次，確認反應條件的可重複性。

2. 摻雜性測試

- (1) 選用 miR-182 與目標 miR-155 分別配製下列溶液，比例如下表。

組別	一	二	三	四
[miR-155] (nM)	100	50	0	0
[miR-182] (nM)	0	50	100	0

- (2) 取上表中的溶液各 6 μ L，滴在 DNA probe 電極上靜置 45 分鐘；後續同樣以 SWV 檢測各組電流訊號 I_n 。
- (3) 重複進行上述實驗三次，確認反應條件的可重複性。

(五) 人工尿液摻雜試驗

1. 分別以 HEPES buffer 及市售人工尿液為溶劑，配製 100 nM 的 miR-155，如下表

組別	HEPES	人工尿液
[miR-155] (nM)	100	100

2. 取兩溶液各 6 μ L，分別滴在 DNA probe 電極上靜置 45 分鐘；後續同樣以 SWV 檢測各組電流訊號 I_n 。
3. 重複進行上述實驗三次，確認反應條件的可重複性。

肆、研究結果

一、三款 DNA probe 電泳分析

實驗將設計好的 DNA probe 分子依據表4-1，進行電泳分析檢測。

表4-1 三款 DNA probe 分子的電泳設計

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miR-155 1 μ M, (μ L)	3	0	0	0	3	3	3	3	3	3
probe (7-1) 1 μ M, (μ L)	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
probe (7-2) 1 μ M, (μ L)	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
probe (9) 1 μ M, (μ L)	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2
PBS (μ L)	7	8	8	8	5	5	5	0	0	0
HEPES (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5

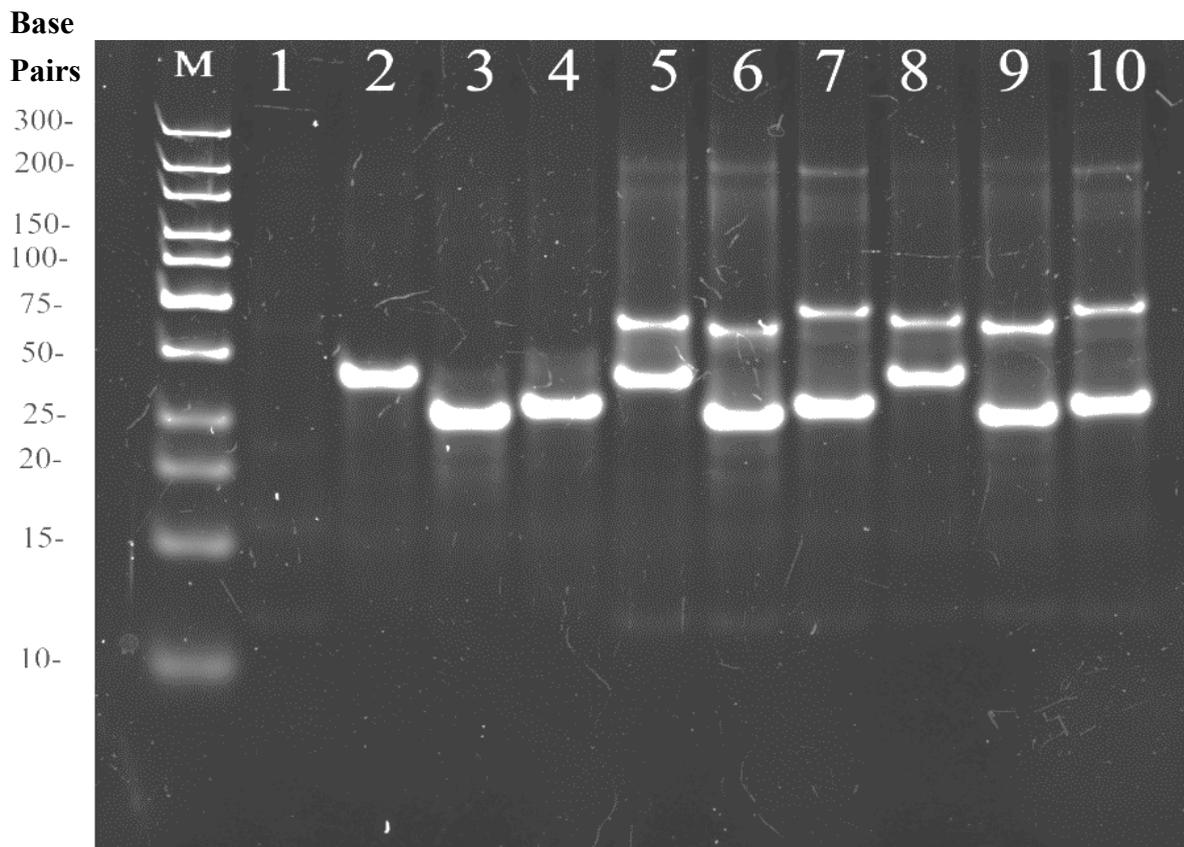


圖4-1 不同條件下三種 DNA 探針之電泳分析圖 (實驗結果自行拍攝)

表4-1中，”1”表示 miR-155，”2~4”組分別為三款 DNA probe，”5~7”組為三款 DNA probe 於 PBS 中與 miR-155反應的實驗組，”8~10”組為三款 DNA probe 於 HEPES 中與 miR-155反應的實驗組。此實驗的電泳結果如下頁圖4-1。

- (一) 觀察實驗電泳圖，實驗”5~7”、”8~10”兩個實驗組皆顯現雜合股，可得知三款 DNA probe 不同緩衝溶液中皆具有抓取目標物 miR-155 的能力。
- (二) 進一步定量分析電泳訊號的亮度。進一步探討探針抓取 miR-155 之檢測效能，計算式如下；各組探針效能如表 4-2。

$$\text{探針效能(\%)} = \left(1 - \frac{\text{實驗組(5.6.7.8.9.10)中探針訊號亮度}}{\text{對應(2.3.4)探針訊號亮度}}\right) \times 100\%$$

表4-2 DNA probe 檢測 miR-155之探針效能

組別	5	6	7	8	9	10
探針效能(%)	16	21	8	39	32	15

1. 比較不同種類的緩衝溶液，三款 DNA probe 在 HEPES buffer 的抓取效果較佳。由於 HEPES buffer 中含有鎂離子使 DNA 探針較穩定，不易形成其他構型，因此抓取 miRNA 具有較佳的能力。
2. 實驗添加的 mir-155 與 DNA probe 莫耳數相等，在電泳分析確認探針效能後，可看出與目標股 miR-155 反應後，可知：

$$\text{probe(7-1)} > \text{probe(7-2)} > \text{probe(9)}$$

顯示 probe(7-1) 在 HEPES buffer 下對 miR-155 具有較佳的抓取能力，後續將繼續探討此部分。

二、 probe(7-1)與不同濃度 miR-155的電泳分析

由於 probe (7-1)在 HEPES 中對於 miR-155 具有較佳的抓取能力，因此進行表 4-3 的實驗內容。

表4-3 probe(7-1)與不同濃度之 miR-155的電泳條件

	1'	2'	3'(C)	4'	5'	6'	7'
probe (7-1) 1 μ M , (μ L)	0	2	2	2	2	2	2
miR-155 1 μ M , (μ L)	2	0	2	2	0	0	0
miR-155 0.5 μ M , (μ L)	0	0	0	0	2	0	0
miR-155 0.25M , (μ L)	0	0	0	0	0	2	0
miR-155 0.125 μ M , (μ L)	0	0	0	0	0	0	2
HEPES (μ L)	8	8	6	6	6	6	6

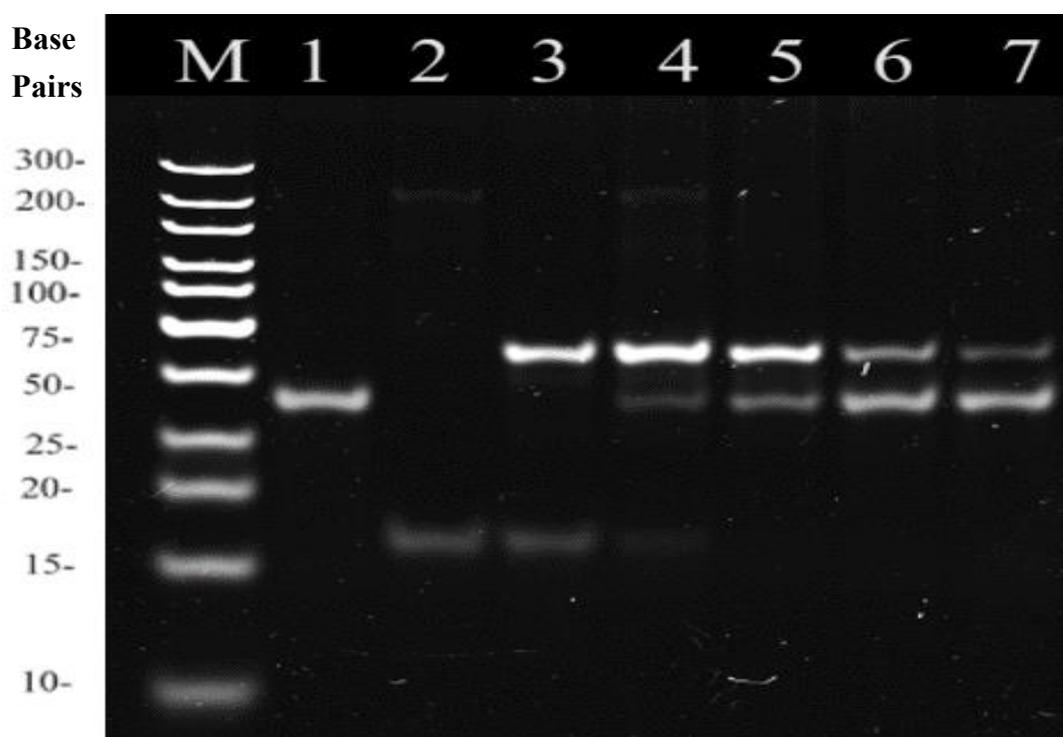


圖4-2 探針(7-1)與 miR-155之電泳分析圖
(實驗結果自行拍攝)

(一)表 4-3 中「1'」為純 probe(7-1)、「2'」純之 miR-155 空白組，「3'」為控制組，使 probe(7-1)完全與目標物雜合。「4'~7'」則是等量 probe(7-1)分別與不等濃度之 miR-155 反應的實驗組。

1. 由電泳分析結果可看出，實驗組4'~7'皆有表現出分子量較大的雜合股訊號，顯示 probe (7-1)的確對於不同濃度的 miR-155都具有抓取能力，只是在第6'、7'兩組的訊號非常接近，顯示其濃度限制。
2. 進一步比較訊號峰亮度，以「3'」控制組基準，比較實驗組中雜合股的訊號強度與完全反應之控制組的相對強度，可得知其雜合百分率，計算式如下，各組數值如表4-4。

$$\text{雜合率(\%)} = \frac{\text{雜合股訊號亮度}}{\text{控制組雜合股訊號亮度}} \times 100\%$$

表4-4 probe(7-1)與不同濃度 miR-155反應訊號比值結果

組別	4'	5'	6'	7'
雜合率 (%)	83	52	14	11

3. 由於第4'~7'組為 miR-155濃度逐漸降低，可見雜合股訊號漸弱，在定性分析上可做為判斷。
4. 從電泳分析結果，檢測訊號與目標物濃度未成比例，且 miR-155的偵測極限只有 21 nM，無法進行濃度更低的微量檢測，因此後續將改以電化學檢測，將 DNA probe 接於修飾電極上製成 DNA probe 檢測電極。

三、聚苯胺-石墨電極

(一) 聚苯胺的合成與鑑定

1. 依據實驗設計如表4-5。完成苯胺聚合後，進行吸收光譜的檢測及比對。

表4-5

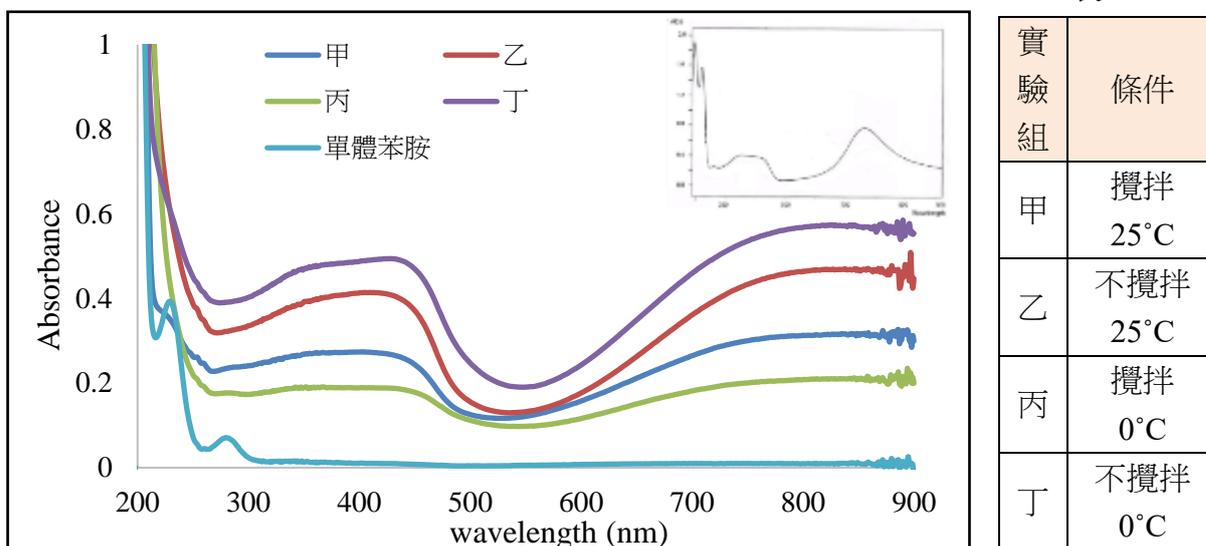


圖4-3 聚苯胺與苯胺的吸收圖譜 (實驗結果整理自繪) (右上插圖來自 ref[5])

由圖 4-3 的吸收光譜，進行苯胺的聚合反應後，比對實驗甲~丁四組的圖譜皆與單體苯胺不同，具有顯著差異；進一步與文獻[5]的聚苯胺吸收光譜 (右上插圖) 比對，明顯可看出實驗四組皆具有相似的吸收圖譜，於波長 350、430 以及 810 nm 處皆有吸收峰，確認實驗成功合成製得聚苯胺。

2. 使用 SEM 進一步確認已修飾在石墨電極上的聚苯胺，進行表面形貌鑑定。

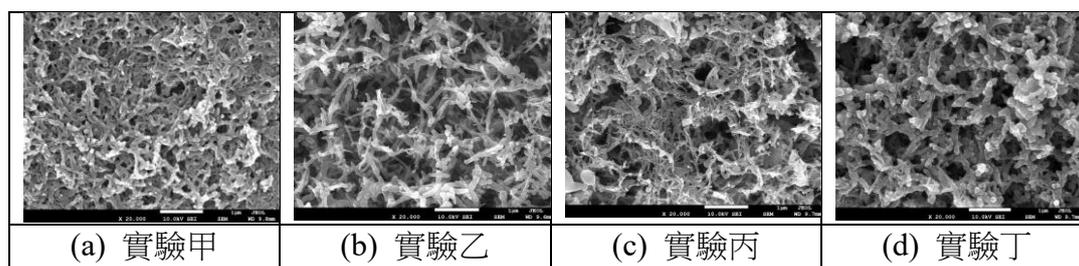


圖4-4 不同條件下的聚苯胺纖維結構的 SEM 圖 (實驗結果自行拍攝)

圖4-4的(a)~(d)依序是實驗組甲、乙、丙、丁的聚苯胺表面形貌。從 SEM 圖可以觀察到：苯胺在相同溫度下，聚合時不進行攪拌 (乙、丁) 所製得的纖維較攪拌組 (甲、丙) 的產物來得粗枝，且具有較大孔隙，預期後續吸附、反應形成奈米金粒子時，乙、丁兩組應會有較佳的效果。

(二) 聚苯胺-石墨電極的電化學性質

1. 電極的 CV 圖：將實驗組甲~丁不同條件下進行苯胺聚合，使反應後的聚苯胺修飾在石墨電極上；以電化學裝置量測其循環伏安圖(CV)，如圖 4-5。

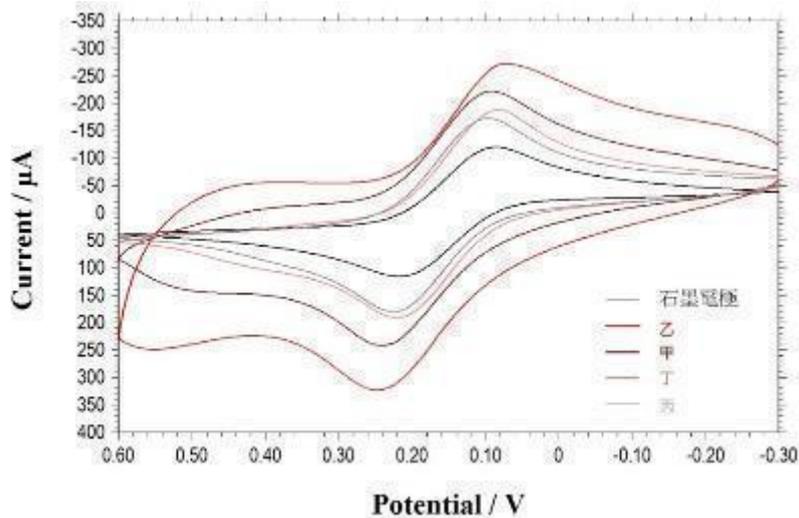


圖4-5 聚苯胺-石墨電極與石墨電極之 CV 圖 (實驗結果整理自繪)

2. 電極的電流、電阻表現：由圖 4-5 的 CV 圖，可得知各電極的氧化、還原電流值，並檢測其電阻，如圖 4-6。

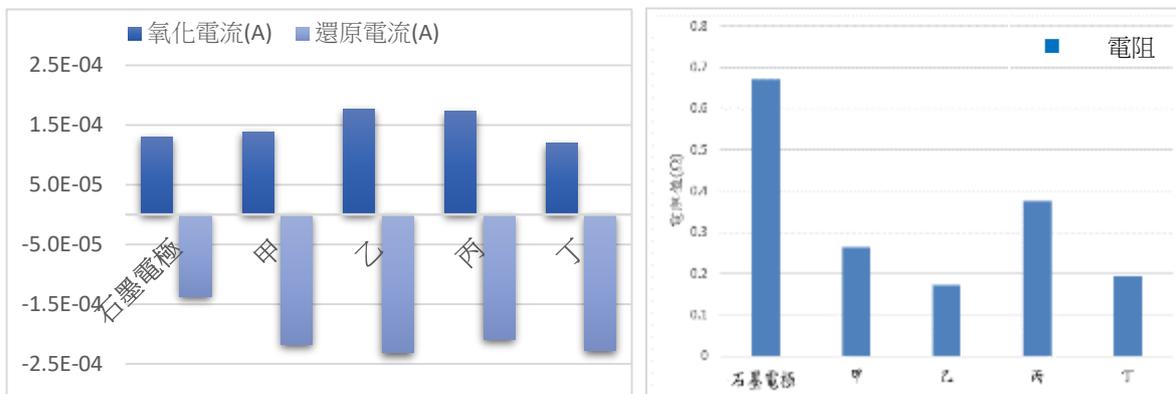


圖4-6 聚苯胺-石墨電極、石墨電極之電流、電阻比較 (實驗結果整理自繪)

3. 經過修飾的聚苯胺-石墨電極，其 CV 曲線具對稱性，且電流訊號明顯增大，皆優於原本的石墨電極。在實驗組甲~丁中，以乙組條件合成聚苯胺所製成的聚苯胺-石墨電極，其電流訊號最高，顯示檢測靈敏度較佳。
4. 在電極的電流與電阻表現上，乙組電極具有最大電流、最小電阻，明顯為較佳的電化學檢測電極。因此後續將以實驗組乙為條件進行後續實驗。

四、GNP@PANI 複合電極

(一) 電極的表面形貌

以實驗組乙的條件製備聚苯胺，再分別以下表4-6條件添加 $\text{HAuCl}_4(\text{aq})$ 於修飾電極，使其反應以製成 GNP@PANI 複合電極。

表4-6 聚苯胺修飾奈米金之條件

	聚苯胺溶液(mL)	HCl(mL)	$\text{HAuCl}_4(\text{mL})$
實驗組(A)	0.2	0.55	0.25
實驗組(B)	0.4	0.35	0.25

以 SEM 檢測各組 GNP@PANI 複合電極的表面形貌如下圖 4-7。

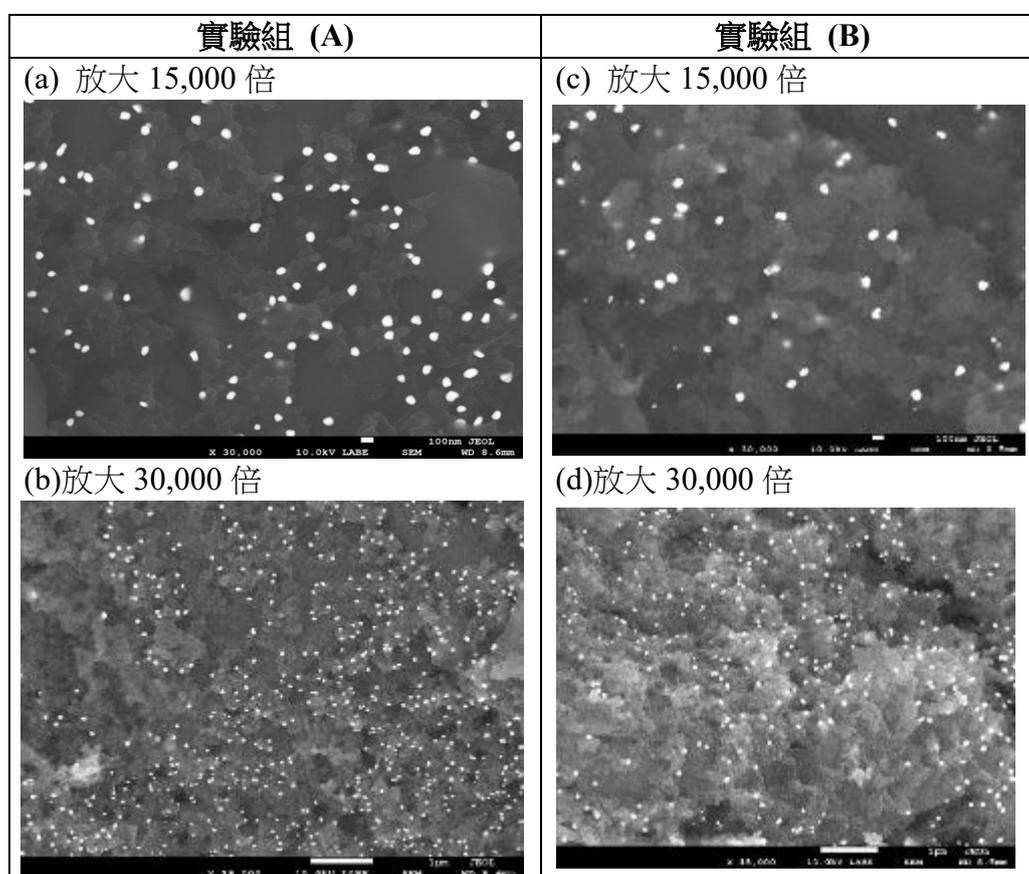


圖4-7 各組 GNP@PANI 修飾電極在不同放大倍率下的 SEM 圖 (實驗結果自行拍攝)

SEM 圖中出現的圓形亮點即為奈米金粒子，可看出在實驗組(A)中含有較多的奈米金，顯示此條件下可修飾上較多的 GNP。後續將再進一步檢測電極表面元素，分析其組成比例以確認之。

(二) 電極的表面元素分析

依 SEM 檢測的表面形貌，選擇亮點較多的實驗組(A)之 GNP@聚苯胺電極進行表面元素分析，如圖4-8。圖中(a)為電極的表面形貌 SEM 圖，比對聚苯胺的 SEM 圖，此電極上明顯出現較亮的球狀物質；(b)圖中的紅點顯示為金元素；再由(c)圖的表面元素成分比例，可確認奈米金成功形成且修飾在聚苯胺-石墨電極的表面。

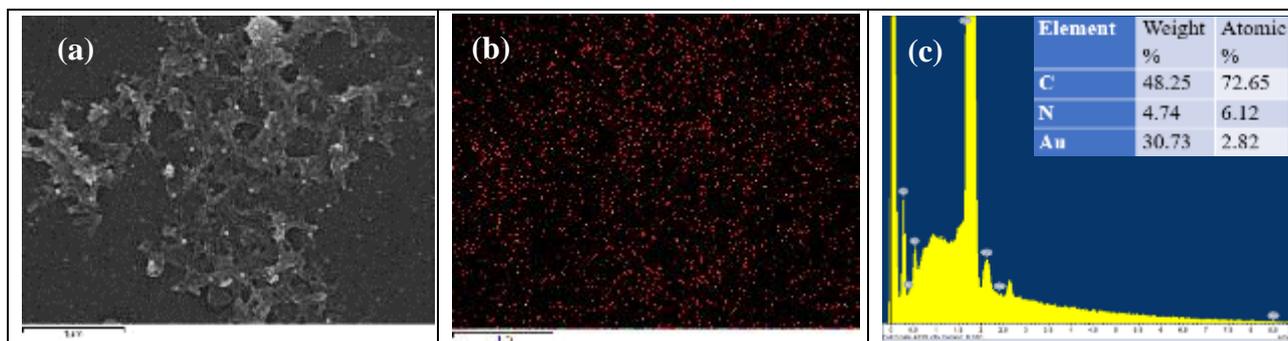
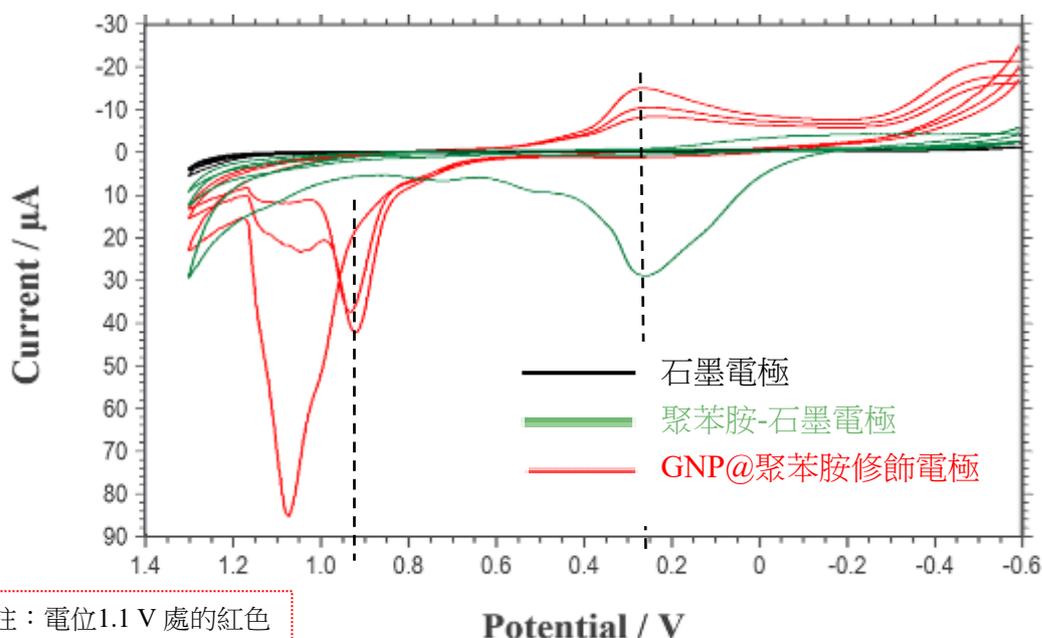


圖4-8 實驗組(A)之表面元素比例分析 (實驗結果自行拍攝)

(三) 電極的電化學性能

下圖4-9為 GNP@PANI 複合電極、聚苯胺-石墨電極以及石墨電極的 CV 疊圖。GNP@PANI 修飾電極的氧化還原峰電流值明顯大於其他兩者。在電位0.9V 處為奈米金粒子所表現的氧化峰，0.25V 處則為奈米金的還原峰。同樣量測電極的氧化、還原電流，可確認 GNP@PANI 修飾電極較其他兩種電極為佳。



註：電位1.1 V 處的紅色氧化峰為 GNP@PANI 修飾電極的第一次掃描

圖4-9 三種不同電極的之 CV 圖比較(實驗結果整理自繪)

五、DNA probe 電極

(一) 檢量線與偵測極限

1. 將 probe(7-1)以~S—Au 共價鍵結連接於 GNP@PANI 修飾電極上，進行第一次 SWV，得到電流訊號值 I_0 。再與目標 miR-155 反應後，進行第二次 SWV，量測電流訊號值 I_n 。
2. 藉由電流降低程度了解抓取 miR-155 比率，計算方式如下；其中 I 表示電流降低率，即 DNA probe 電極與 miR-155 的雜合率。下表呈現 miR-155 在不同濃度下，檢測電極抓取 miR-155 的雜合率(I 值)。

$$I(\%) = \frac{|I_0 - I_n|}{I_0} \times 100\%$$

表4-7 不同濃度 miR-155實驗組與其對應 I 值

組別 (n)	1	2	3	4	5
[miR-155] (nM)	100	20	10	1.0	0.1
I (%)	22.9	19.6	18.1	14.4	10.9

3. 藉由 $\log[\text{miR-155}]$ 對 I 作圖，得到下圖 4-10 的檢量線：

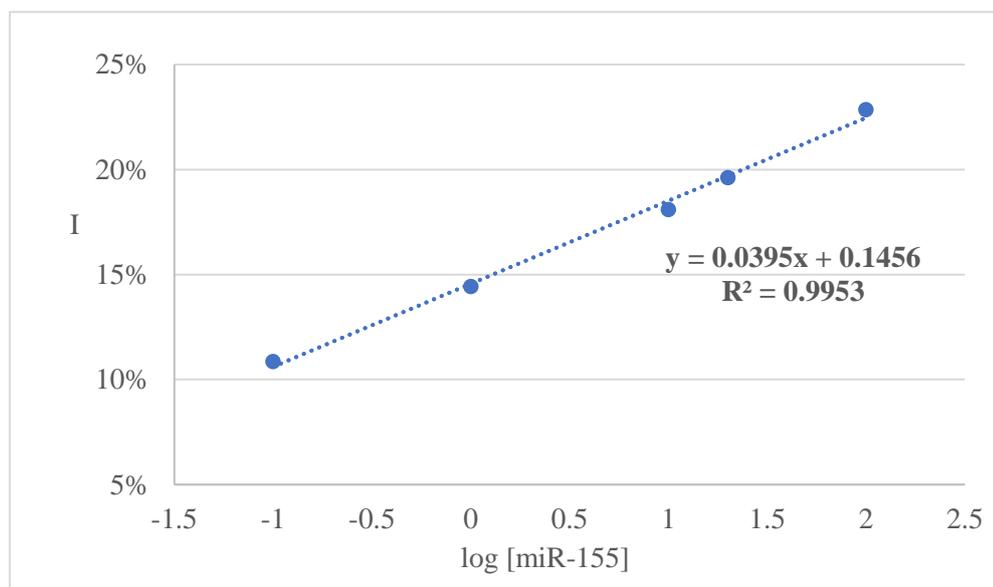


圖4-10 檢量線 (實驗結果整理自繪)

(二) 電極檢測的專一性

1. 不同種類 miRNA 的檢測

- (1) 以下表 4-8 反應條件分別配製 miR-155 與它種 miRNA 溶液，進行電極檢測專一性的試驗。

表4-8 不同種類 miRNA 之測試實驗組與其對應 I 值

組別	[miR-210]	[miR-93]	[miR-182]	[miR-155]	Blank
miRNA 種類	miR-210	miR-93	miR-182	miR-155	
[miRNA] (nM)	500	500	500	100	0
I (%)	17.9	17.7	18.3	22.9	17.9

- (2) 測量第一次 SWV 之電流值，以及第二次 SWV 電流值，再進一步計算其雜合狀況及雜合率 (I 值)，以各組 I 值進行作圖、比較。

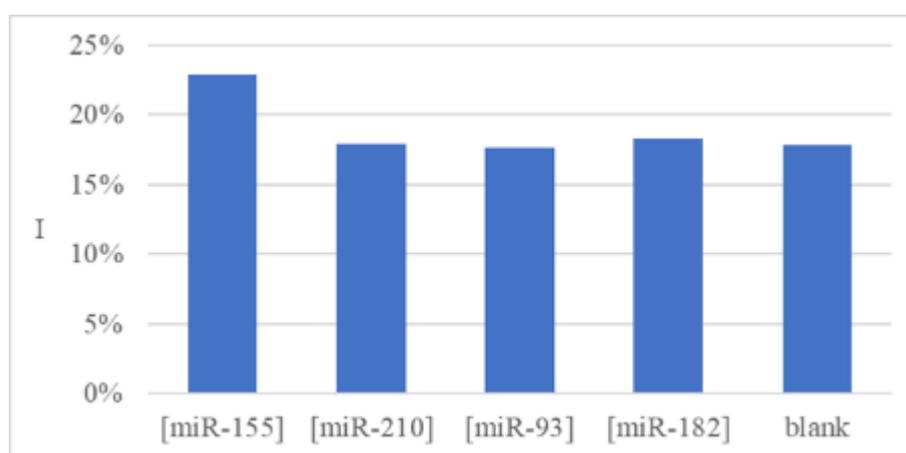


圖4-11 不同種類 miRNA 專一性測試 (實驗結果整理自繪)

- (3) 從圖 4-11 可觀察得知：此自製 DNA probe 電極檢測到 miR-155 的訊號數值最明顯；反之 miR-210、miR-93 以及 miR-182 此三組之 I 值皆小於 miR-155，且與空白組 (Blank) 幾乎相同。
- (4) 即使其他非目標 miRNA 的濃度高於目標 miR-155 分子達 5 倍的情況下，這些非目標 miRNA 的 I 值仍與 Blank 組相近，顯示此電極對於 miR-155 具有專一性，不會抓取其他 miRNA 分子。
- (5) 此試驗中，以 miR-182 的 I 值較其他非目標 miRNA 為大，為了進一步確認 miR-182 對此電極的影響，進行混合摻雜測試。

2. miR-182 混合摻雜測試

(1) 以表 4-9 反應條件配製 miR-155 與 miR-182 之混合溶液，進行摻雜測試。

表4-9 miR-182摻雜測試實驗組與其對應 I 值

組別	一	二	三	四
[miR-155] (nM)	100	50	0	0
[miR-182] (nM)	0	50	100	0
I (%)	22.9	21.3	9.88	9.66

(2) 同樣測量第一次 SWV 之電流值，以及第二次 SWV 電流值，在進一步計算其雜合狀況及雜合率 (I 值)，再以各組 I 值與條件作圖。

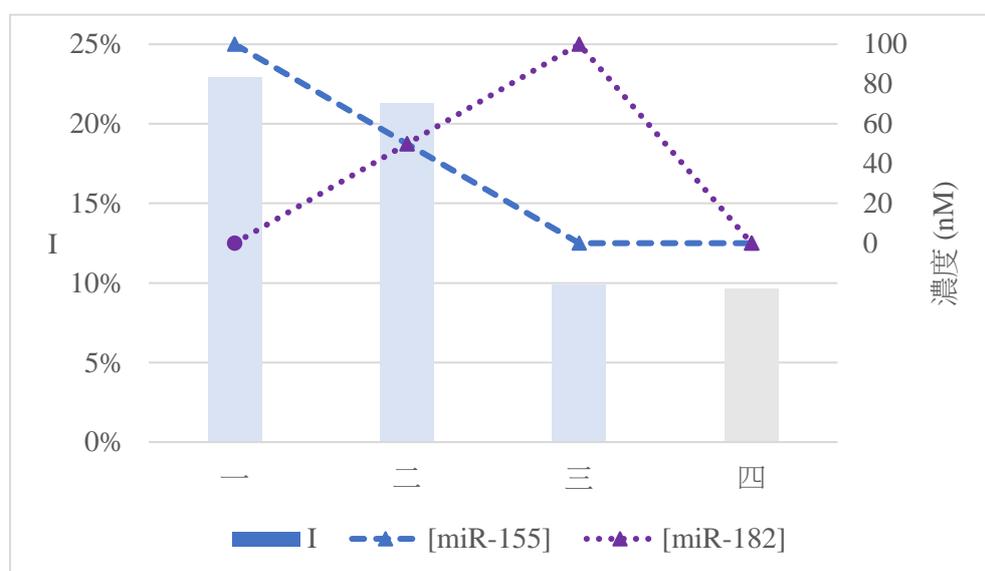


圖4-12 專一性測試各實驗組 I 值 (實驗結果整理自繪)

(3) 從圖中可知：在相同總濃度的組別中，電流值隨 miR-155 的濃度下降，顯示此 DNA probe 電極檢測不受 miR-182 濃度影響

(4) 第四組為實驗空白對照組，其檢測訊號 (I 值) 與僅有 miR-182 的第三組幾乎相同，顯示此 DNA probe 電極不會抓取 miR-182。

3. 綜合上述 1、2 的試驗，顯示此 DNA probe 電極對於 miR-155 具有專一性。

(三) 人工尿液摻雜試驗

1. 分別以 HEPES buffer 及市售人工尿液為溶劑，配製 100 nM 的 miR-155

表4-10 人工尿液摻雜試驗各實驗組與其對應 I 值

組別	HEPES	人工尿液
[miR-155] (nM)	100	100
I (%)	22.9	22.1

2. 同樣測量第一次 SWV 之電流值，以及第二次 SWV 電流值，再進一步計算其雜合狀況及雜合率 (I 值)。

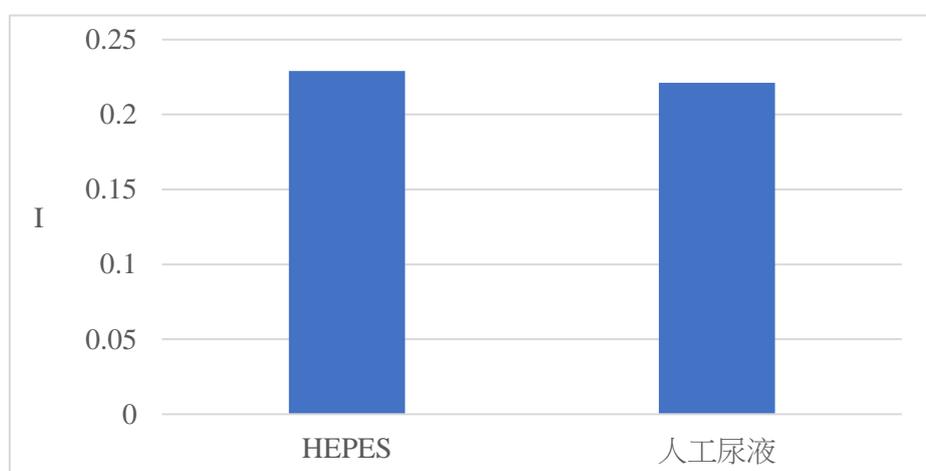


圖4-13 工尿液摻雜試驗之實驗組 I 值 (實驗結果整理自繪)

3. HEPES buffer 所配製的 miR-155 溶液可視為沒有生物基質干擾的標準樣品，而人工尿液則可視為實際採樣之樣品。由此實驗結果得知：此兩組檢測的 I 值相近，顯示 miR-155 在含生物基質環境的人工尿液中，同樣可由 DNA probe 電極檢測，且此探針的檢測校能不受環境影響。
4. 由此實驗證明，本研究設計開發的 DNA probe 電極具有應用於真實樣品的潛力。

伍、討 論

一、設計 DNA probe 分子

(一) 設計概念說明

由於 DNA probe 的構型為髮夾彎，在抓取 miR-155 的過程中，其構型的伸展會受到髮夾彎鹼基配對數目的影響，因此本研究設計三款 DNA probe。

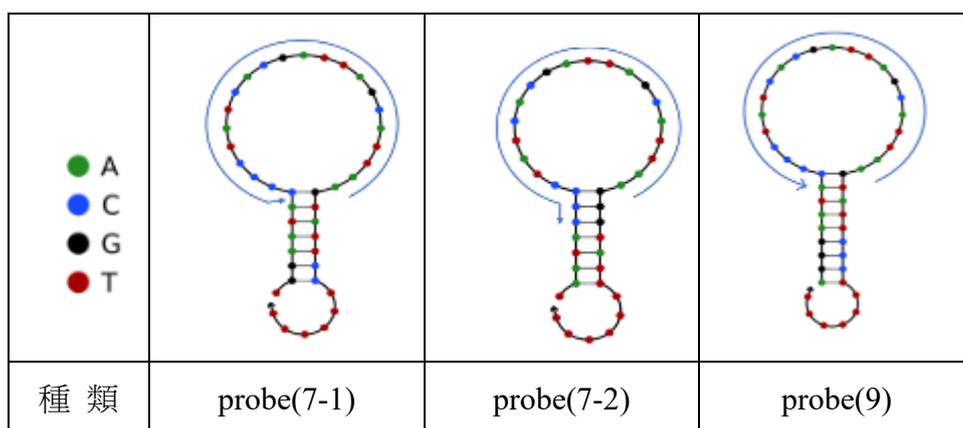


圖5-1 三款自創設計的 DNA probe 結構示意圖 (自繪)

1. 上圖 5-1 中，藍色箭頭表示 DNA probe 分子抓取 miR-155 對應到序列的鹼基順序。
2. probe(7-1)與 probe(7-2)的差異在於”髮夾環”上裸露的鹼基個數；probe(7-2)的裸露的鹼基個數較少，預期 probe(7-2) 雜合 miR-155 時，分子構形會較難打開。
3. probe(9)與 probe(7-1)、probe(7-2)的差異為”髮夾莖部”的鹼基個數，因其個數較多，預期其基部鍵結數增加會使阻力明顯增大，其構型會較前兩者更難打開。

(二) 電泳分析結果

1. 從電泳分析實驗結果證實：probe(7-1)抓取 miR-155 的能力最佳。由於髮夾環與莖部連接處具有轉折彎處，以分子結構的穩定性而言，此位置較不穩定、能量高，且髮夾環內的鹼基因其結構體積必定具有立障，因此 probe(7-1)的開展效能較佳。
2. 比較電泳分析結果，probe(7-2)與 probe(9)的雜合股螢光強度以 probe(7-2)較佳；從表 4-2 計算出的探針效能也可確認 probe(7-2)較佳，與設計初期的預測相符合。

二、本實驗採用電化學檢測法，為提高精確度與靈敏度，最重要的是電極的效能與穩定度。

- (一) 實驗採用導電性聚苯胺先修飾在石墨電極上。本研究製備聚苯胺的反應是在酸性環境下，利用苯胺鹽類與過硫酸銨進行氧化聚合反應，反應式如下。反應過程中，苯胺因

過硫酸銨氧化劑的存在先被氧化，隨即發生聚合反應；由於產物在酸性環境中，其結構上的 N 原子會被質子化，因此沉澱後可藉由過濾得到。

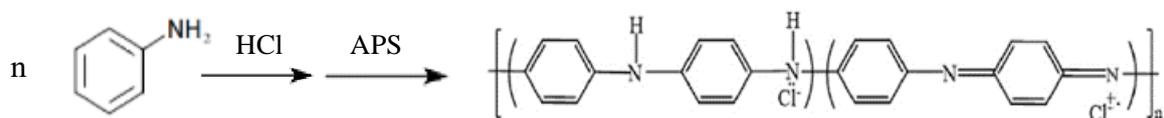


圖5-2 苯胺的聚合過程與反應式 (自繪)

(二) 本實驗採用的網版印刷電極內為氧化石墨，因此會先經過 NaOH(aq) 處理；除了清潔電極外，還可將表面多種含氧官能基團，如羥基(-OH)、羧基(-COOH)或環氧基(-O-)進行活化。當 PANI 修飾上石墨電極，這些含氧基團能與 PANI 結構中的-NH 形成氫鍵，或是與 N 原子的孤電子對同樣生成氫鍵作用力，如圖 5-3 所示。這個較強作用力使 PANI 緊密附著於石墨電極上，且於石墨層與層之間穩定存在，形成聚苯胺-石墨電極。

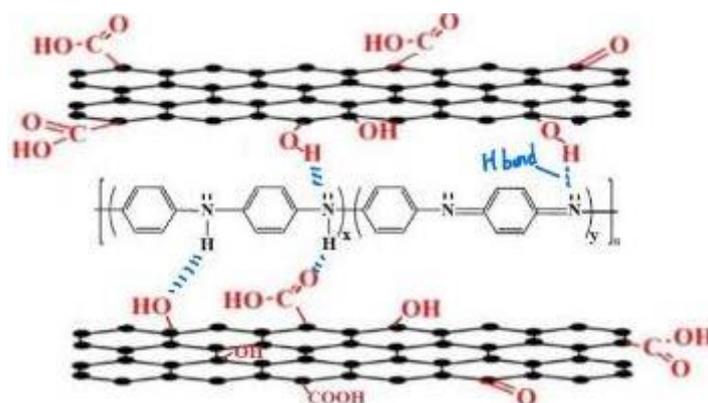


圖5-3 聚苯胺與氧化石墨間作用力 (自繪)

(三) 此外，利用聚苯胺的還原力可將四氯金酸溶液還原成金奈米粒子(GNP)，使 GNP 可緊密吸附於聚苯胺材料上，形成 GNP@PANI 複合電極。

三、實驗檢測的訊號是利用電極上亞甲藍分子的氧化還原反應。亞甲藍基團的氧化態與還原態如圖 5-4 所示；在本實驗中，亞甲藍基團最初處於還原態，施加電壓後可檢測到此分子的氧化電流；由於這個過程具有可逆性，因此亞甲藍可做為檢測指標。

(一) 為了較好的量化檢測結果，電化學檢測訊號是利用 DNA probe 電極上，亞甲藍分子距離電極表面的遠近所產生的氧化還原訊號大小。

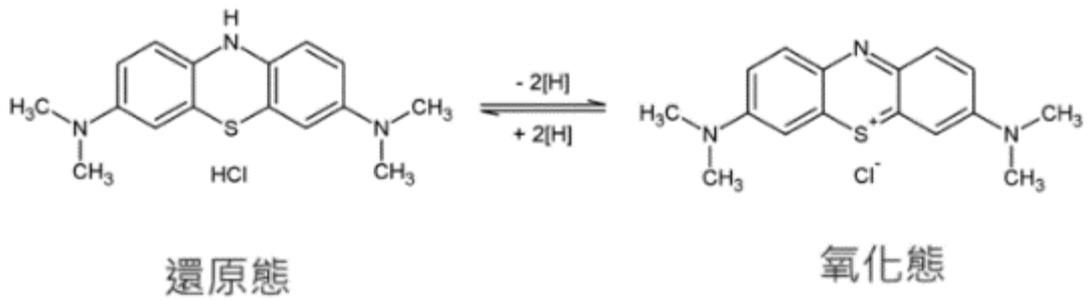


圖5-4 亞甲藍分子的氧化與還原 (自繪)

(二) 將 DNA probe 分子的 5'端修飾具還原活性的亞甲藍分子；為穩定接在 GNP@PANI 修飾電極上，在 DNA probe 分子 3'端修飾硫醇基團 (-SH)，使探針分子可因硫—金 (~S—Au) 共價鍵的鍵結而穩定地連接在修飾電極上，如圖 5-5 示意。

(三) 進行檢測時，DNA probe 若與目標物 miR-155 結合，此設計分子的構型會發生變化，改變亞甲藍分子與電極的距離，進而產生電化學訊號改變。圖 5-6 為製作完成的 DNA probe 電極

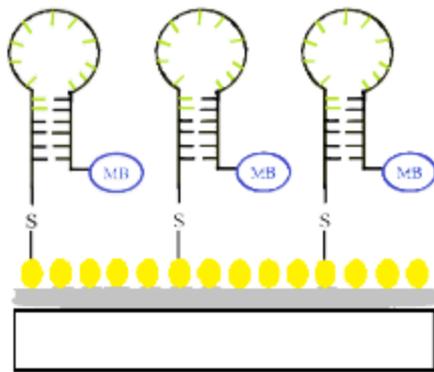


圖5-5 DNA probe 的 S-Au 鍵結 (自繪)



圖5-6 DNA probe 電極 (作者自行拍攝)

四、在確認電極對於目標物專一性的實驗中，表 4-9 中的第二組，

即[miR155] = 50 nM, [miR-182] = 50 nM 的 I 值為 0.213；運用檢量線進行計算：

$$0.213 = 0.0395x + 0.1456, \text{ 可得 } x = 1.076$$

$$\text{即 } [\text{miR-155}] = 10^{1.706} = 50.85 \text{ (nM)}$$

計算此實驗組的回收率為 101.7%，顯示此 DNA probe 具有相當高的準確性。

陸、結 論

本研究運用生物鹼基配對原理，結合化學修飾分子以及電化學檢測技術，成功地合成出新式、便捷、準確且具有選擇性的檢測 miRNA 裝置。

運用具導電性的聚苯胺 (PANI) 高分子先接於石墨電極上，再利用其結構上的胺基將 $\text{HAuCl}_4(\text{aq})$ 還原，使金奈米粒子 (GNP) 連接修飾在電極上，成為 GNP@PANI 修飾電極。利用奈米金(Au)與硫醇(-SH) 間極佳的鍵結能力，將自製設計的 DNA probe 接至 GNP@PANI 電極上，使其成為 DNA 分子電極。此方法運用材料的化學性質來製作檢測電極，不但便利、效率佳，且成本低易操作，目前實驗已成功從自設計的三款探針確認 probe (7-1)對 miR-155 的抓取能力最佳，且與修飾成功的 GNP@PANI 複合電極組合成完整的分子電極裝置。實驗確立此檢測裝置的良好檢量關係，其偵測極限可達0.1 nM，此外，也確認此 DNA 分子電極對於 miR-155具有極佳的專一性，回收率高達101.7%，且在人工尿液的檢測幾乎不受基質影響，具有應用於檢測真實樣品的潛力。期望在此目標測試成功後，可以替換目標 miRNA，再根據目標設計客製化探針，發展其泛用性，成為新一代非侵入性的檢測方法。

柒、參考資料及其他

- 一、SSu-Chia Chen , Kuan-Ting Chen, Amily Fang-Ju Jo.(2021). Polydopamine-gold composite-based electrochemical biosensor using dual-amplification strategy for detecting pancreatic cancer-associated microRNA. *Biosensors and Bioelectronics*,173, 1-4.
- 二、Zhe Yang, Yichao Wu, Jianqiang Wang, Bin Cao, and Chuyang Y. Tang(2016). In Situ Reduction of Silver by Polydopamine: A Novel Antimicrobial Modification of a Thin-Film Composite Polyamide Membrane. *Environmental Science & Technology Article*,50, 9543–9550.
- 三、Wei Zhang, Yan Tang, Jia Liu, Yujie Ma, Ling Jiang, Wei Huang, Feng-wei Huoe and Danbi Tian.(2014). An electrochemical sensor for detecting triglyceride based on biomimetic polydopamine and gold nanocomposite. *Journal of Materials Chemistry B*,2, 8490–8495.

- 四、 Ju-Won Jeon, Se Ra Kwon and Jodie L.Lutkenhaus. (2015). Polyaniline nanofiber/electrochemically reduced graphene oxide layer-by-layer electrodes for electrochemical energy. *Journal of Materials Chemistry A*,3,3757-3767.
- 五、 Bernhard Wessling.(2010). New Insight into Organic Metal Polyaniline Morphology and Structure. *Polymers*, 2, 786-798.
- 六、 Faraoni, I., Antonetti, Francesca Romana , Cardone, John, & Bonmassar, E. (2006). MiR-155 Gene: A Typical Multifunctional MicroRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(6), 497–505.
- 七、 Botti, V., Cannistraro, S., Bizzarri, A.R.(2022). Interaction of miR-155 with Human Serum Albumin: An Atomic Force Spectroscopy, Fluorescence, FRET, and Computational Modelling Evidence. *Int. J. Mol. Sci*, 23(18), 10728.
- 八、 Liu, C., Jiang, dongneng, Xiang, G., Liu, L., Liua , F., & Pu, xiaoyun. (2014). An Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Mycobacterium Tuberculosis, Based on Signal Amplification of Graphene and a Gold Nanoparticle–Polyaniline Nanocomposite. *Analyst*, 139(21), 5460–5465.
- 九、 Zhang, X., Zhang, Y., Liu, X., Fang, A., Wang, J., Yang, Y., Wang, L., Du, L., & Wang, C. (2016). Direct quantitative detection for cell-free miR-155 in urine: a potential role in diagnosis and prognosis for non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*, 7(3), 3255–3266.
- 十、 Wang, G., Chan, E. S., Kwan, B. C., Li, P. K., Yip, S. K., Szeto, C. C., & Ng, C. F. (2012). Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clinical genitourinary cancer*, 10(2), 106–113.
- 十一、 Rowe, A. A., White, R. J., Bonham, A. J., & Plaxco, K. W. (2011). Fabrication of electrochemical-DNA biosensors for the reagentless detection of nucleic acids, proteins and small molecules. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (52), 2922.

【評語】 050204

此一研究工作主要利用奈米金(Au)與硫醇(-SH) 間極佳的鍵結能力，將設計的 DNA probe 接至 GNP@PANI 電極上，使其成為 DNA 分子電極。實驗確立此檢測裝置的良好檢量關係，其偵測極限可達 0.1 nM，此 DNA 分子電極對於 miR-155 具有極佳的專一性。下列幾點建議：

- 1) 在數據呈現上，除了放入圖片以外，應要加以說明，解釋數據為什麼符合、或是不符合預期。做了很多實驗，在執行上也執行不錯，但是，似乎對於『為何要進行這樣的實驗』以及『為何這這實驗可以給我們答案』不是很清楚。可以再加強。
- 2) 作品完整度夠，唯引言或文獻回顧的部分應多說明此一研究和最接近的發表文獻工作上的差異和創新性。
- 3) 此外，指導的實驗室中是否有學長姊(或研究生)進行相似性的工作或研究（膀胱癌）。此部分應多加說明。

作品簡報

自組裝DNA探針於

GNP@PANI電極以檢測miRNA

前言

在生物體中，微核糖核酸 (microRNA ， 簡稱miRNA) 可調控轉錄後基因表現，且miRNA 的異常表現與癌症等疾病有關，因此作為重要的生物指標。現今檢測miRNA 多使用 RT-qPCR ，不但費時、須反覆改變溫度，且技術成本較高，因此本研究希望能開發快捷、準確且低成本的 miRNA 檢測裝置。實驗採用電化學檢測方法，於石墨電極修飾上聚苯胺 (PANI) 與奈米金 (GNP) ，再將自行設計可雜合 miRNA 的 DNA probe 連接在複合電極表面，成為檢測 miRNA 的分子探針電極。利用開發的分子探針電極在檢測前、後的電化學訊號差異，可作為定性且定量的分析工具。

研究目的

採用客製化概念，研究設計具有專一性抓取 miR-155 的 DNA probe。使用化學方法進行電極表面修飾，再接上 DNA probe 以完成分子探針，進行一系列電化學檢測。

- 一. 設計並開發可抓取目標 miRNA 的 DNA probe
- 二. 探討最佳反應條件，修飾並合成 GNP@PANI 複合電極
- 三. 確認 DNA probe 組裝連接至 GNP@PANI 複合電極之材料條件
- 四. 針對實驗研究所製得的分子探針，進行檢測目標 miRNA 之效能評估

研究動機與原理

■ 檢測目標 miR-155

5'-UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU-3'

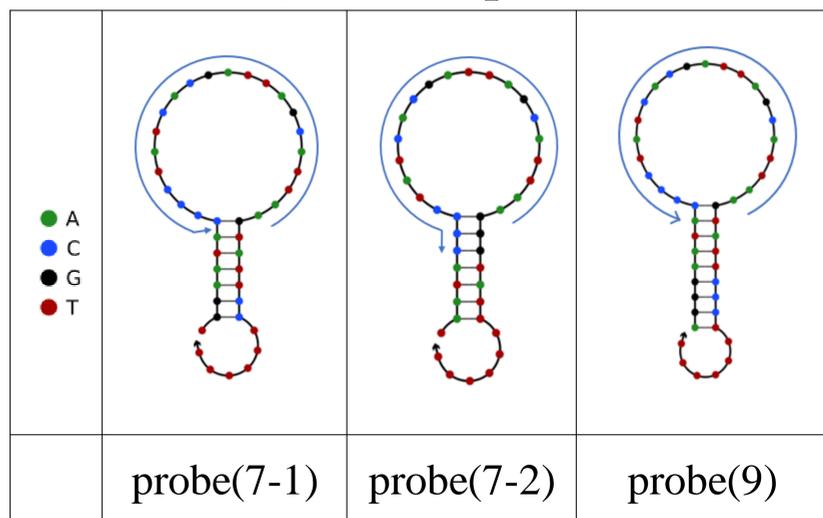
➢ 影響人體機能

- 造血、免疫、發炎、癌症等等
- 在膀胱癌患者尿液的中過度表現

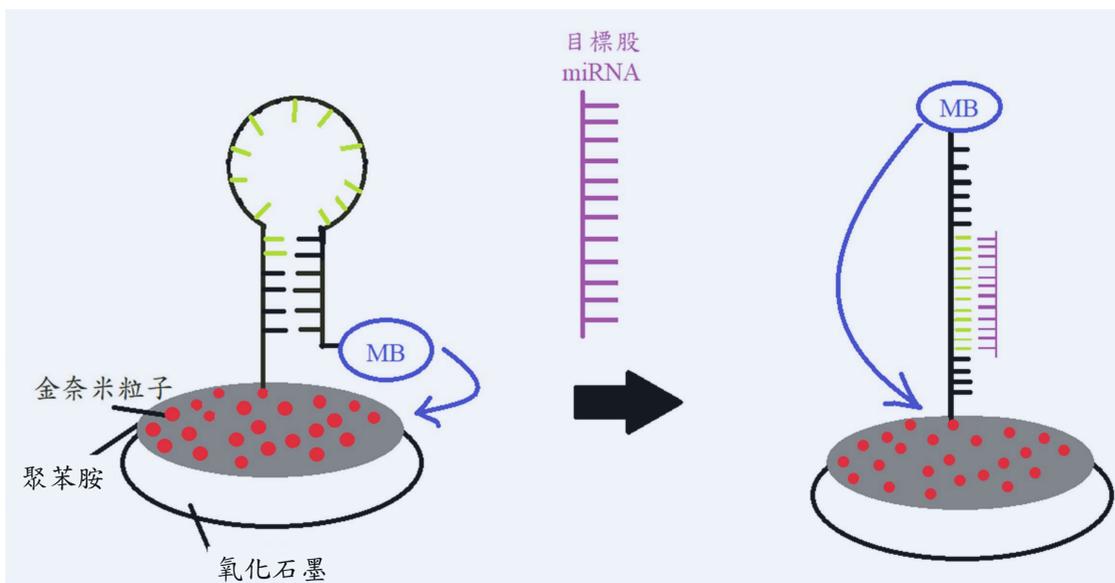
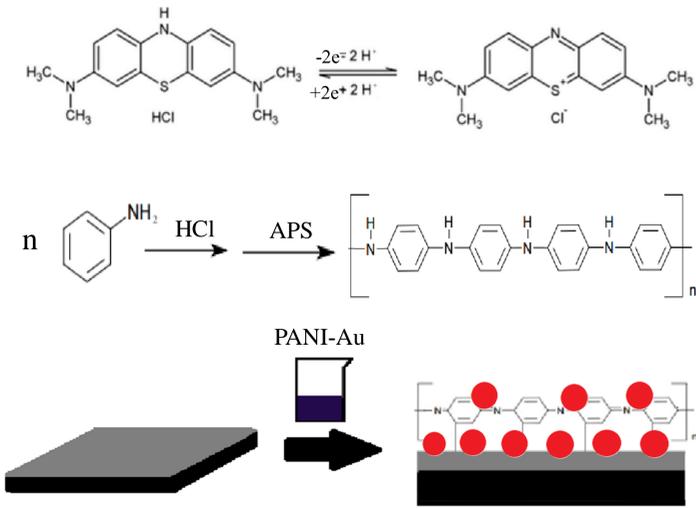
➢ 現行檢測法：RT-qPCR



■ 自行設計的 DNA probe



■ 實驗檢測原理

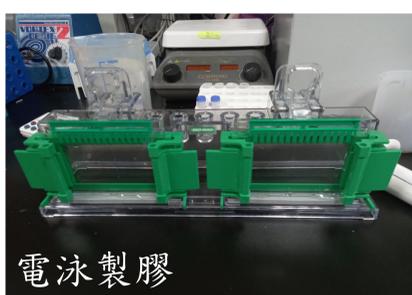


圖形皆為作者自行繪製

研究過程與方法

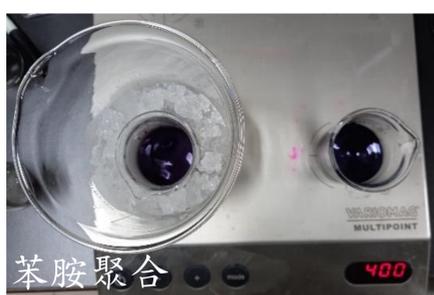
設計 DNA probe

- 鹼基配對原理
- DNA probe
- 電泳檢測分析



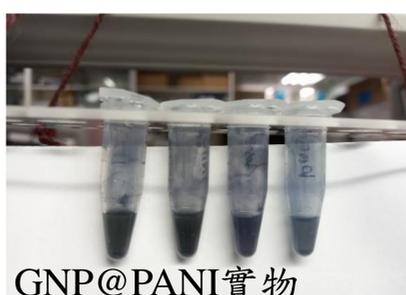
合成 GNP@PANI 複合電極

- 溫度 (0, 25°C) ; 攪拌 (0, 400 rpm)
- H_{AuCl₄} / PANI = 5/4, 5/8, 18/5, 1/25, 4/7, 18/25



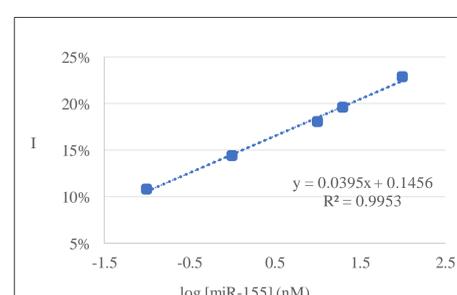
組裝分子探針電極

- DNA probe 以 -SH 鍵結 GNP
- 電極表面 probe 的飽和濃度



評估檢測電極效能

- 檢測電流訊號、雜合率、檢量線、專一性、回收率



圖形、照片皆為作者自行繪製、拍攝

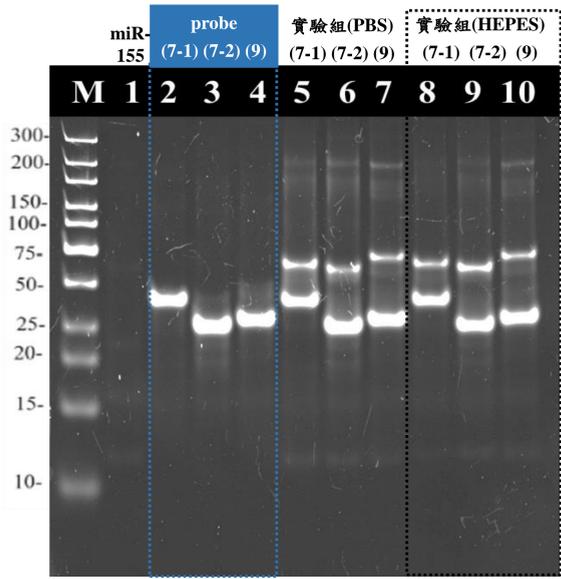
研究結果

DNA probe的電泳檢測

(A)三款DNA probe之電泳圖

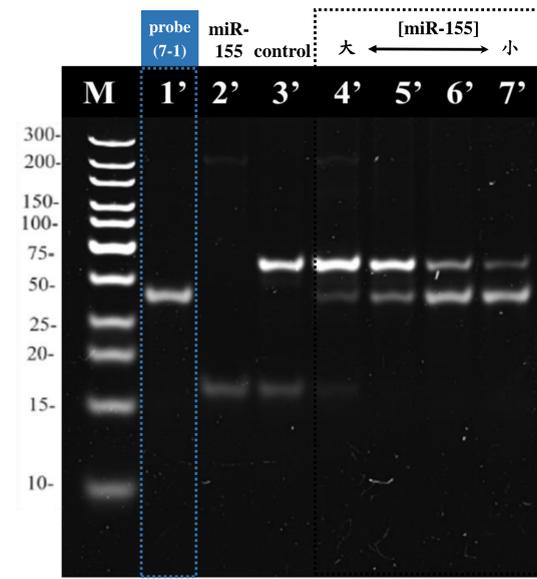
(B) probe(7-1)與 miR-155之電泳圖

(C) probe(7-1)專一性測試



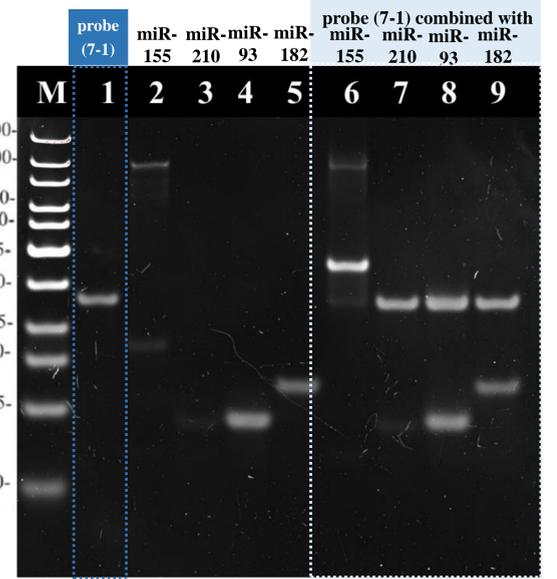
$$\text{探針效能 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{實驗組探針訊號}}{\text{對應探針訊號}}\right) \times 100\%$$

組別	5	6	7	8	9	10
探針效能(%)	16	21	8	39	32	15



$$\text{雜合率 (\%)} = \frac{\text{雜合股訊號亮度}}{\text{控制組雜合股訊號亮度}} \times 100\%$$

組別	4'	5'	6'	7'
雜合率 (%)	83	52	14	11

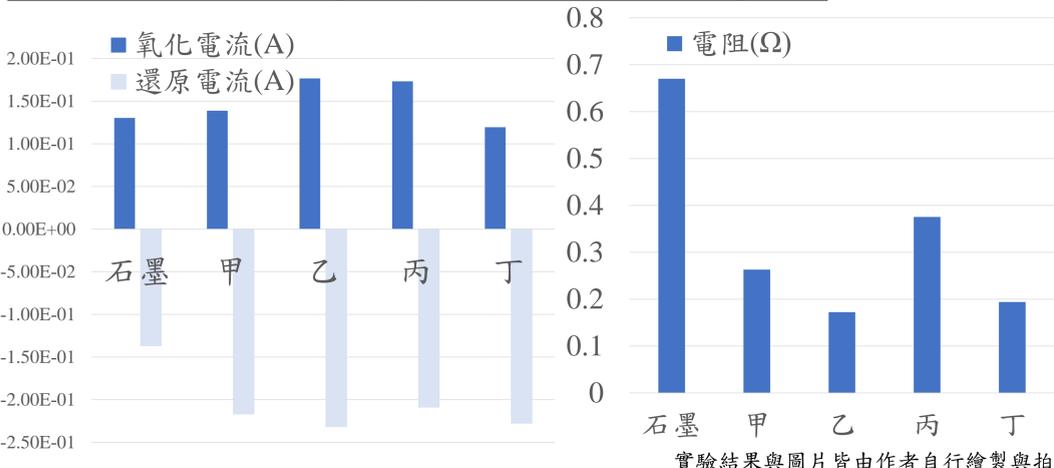
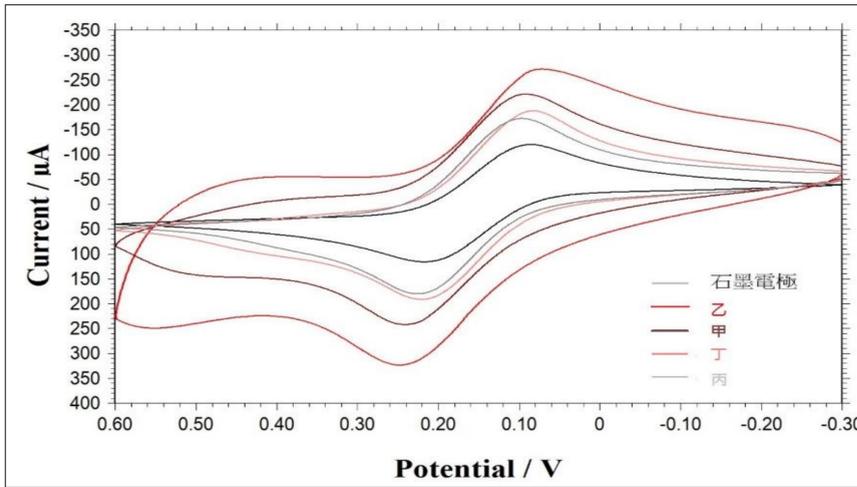
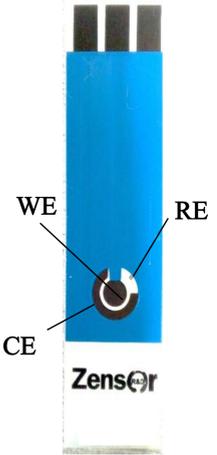
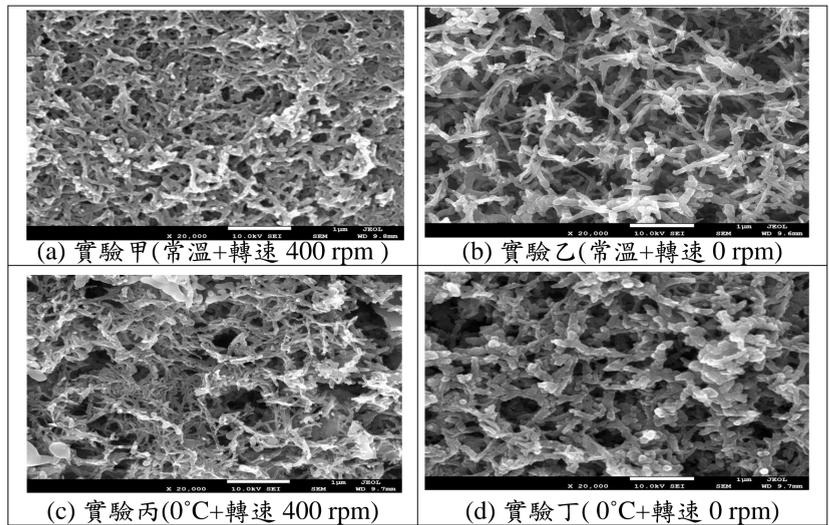
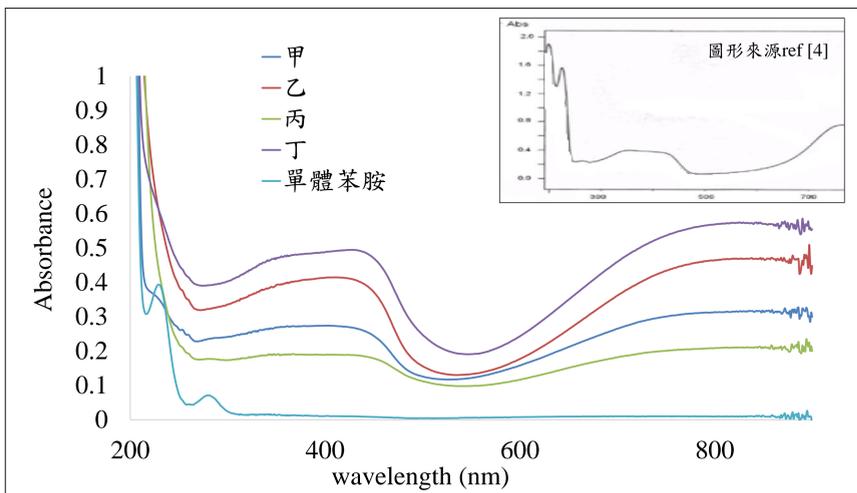


probe(7-1)與四種不同miRNA的結合
→出現雜合股，確認抓取專一性

組別	6	7	8	9
雜合股	O	X	X	X

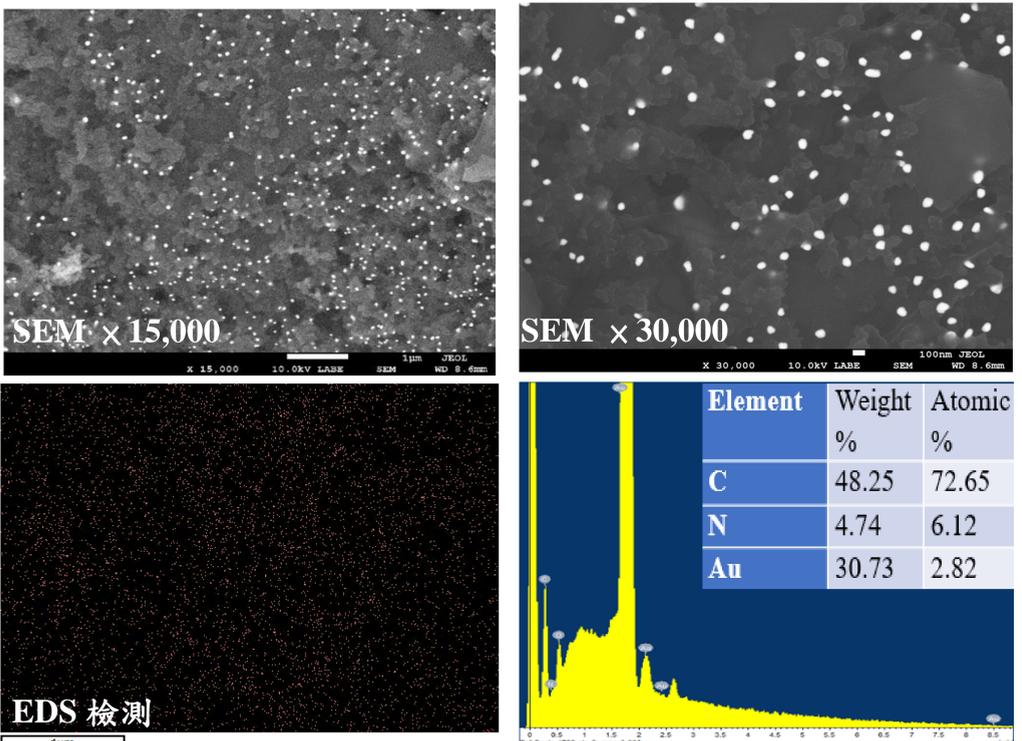
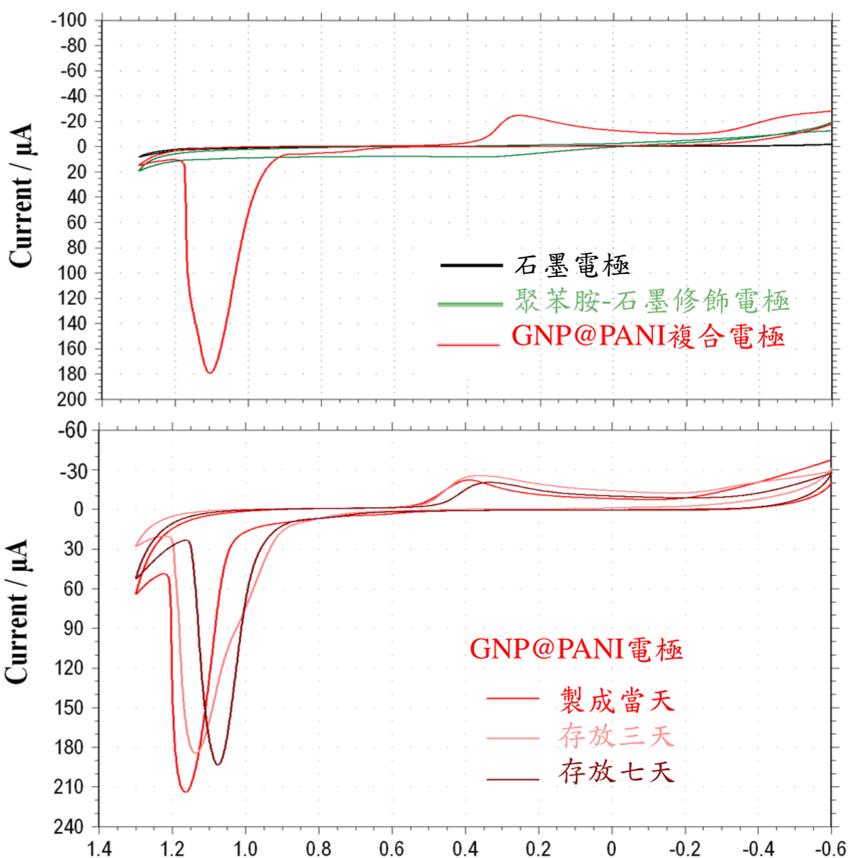
實驗結果與圖片皆由作者自行繪製與拍攝

聚苯胺-石墨修飾電極



實驗結果與圖片皆由作者自行繪製與拍攝

GNP@PANI複合電極



- GNP@PANI複合電極 > 聚苯胺-石墨修飾電極 > 石墨電極
- GNP@PANI複合電極穩定性高，可存放時間至少一週

實驗結果與圖片皆由作者自行繪製與拍攝

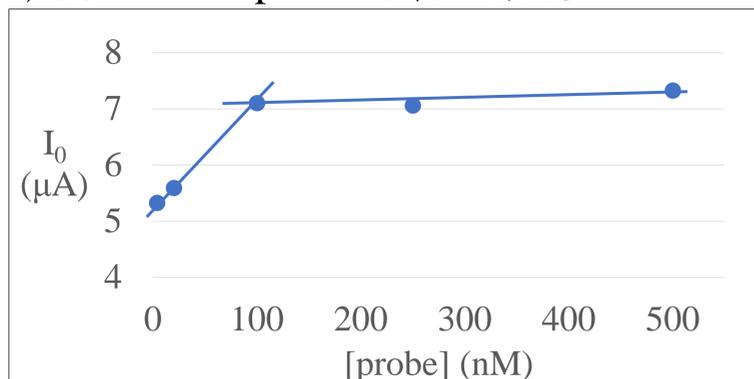
DNA 分子探針效能檢測

■ DNA 分子探針電極：

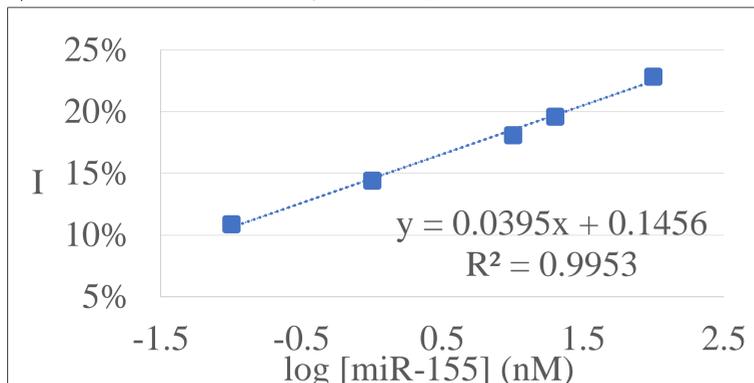
I_0 為空白電流值； I_n 為檢測後電流值； I 為電流降低比率

$$I(\%) = \frac{|I_0 - I_n|}{I_0} \times 100\%$$

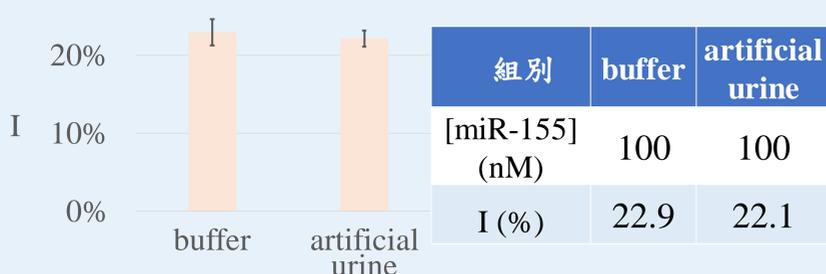
(A) 接合 DNA probe 的最佳濃度



(B) DNA 分子探針的檢量線



■ 生物基質檢測的應用

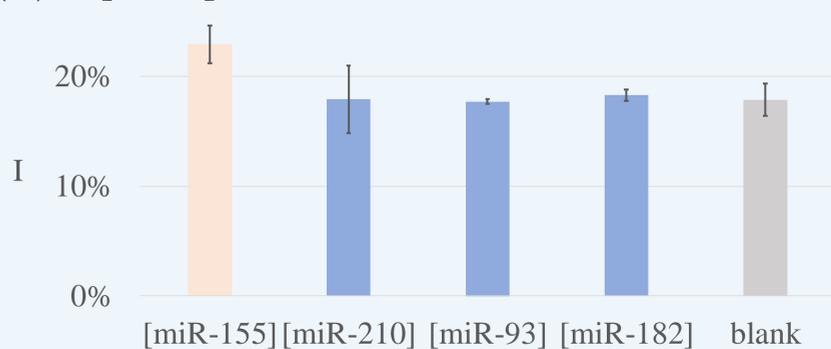


➤ 電極檢測法的誤差率

$$\frac{(22.9 - 22.1)}{22.9} \times 100\% = 3.49\%$$

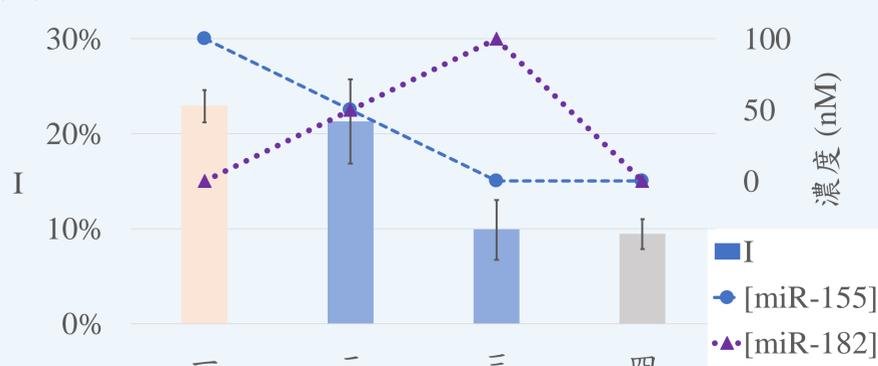
■ DNA 分子探針的專一性

(C)-1 [種類]



組別	[miR-155]	[miR-210]	[miR-93]	[miR-182]	blank
C_M (nM)	100	500	500	500	0
I (%)	22.9	17.9	17.7	18.3	17.9
miRNA	序列				相同鹼基數
miR-155	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU				/
miR-210	AGCCCCUGCCCACCGCACACUG				4
miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG				6
miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU				7

(C)-2 [濃度]



組別	一	二	三	四
[miR-155] (nM)	100	50	0	0
[miR-182] (nM)	0	50	100	0
I (%)	22.9	21.2	13.0	12.9

➤ 回收率評估

運用檢量線： $0.212 = 0.0243x + 0.1706$

$\therefore x = 1.703$ ；又 $[miR-155] = 10^{1.703} = 50.54$ ；

即 miR-155 的濃度為 50.54 nM，

回收率為 101.1%

圖形曲線皆由作者自行繪製

結 論

- 一. 本研究依據基部鍵結數目以及預期結合位點，設計了三種探針分子；以DNA電泳分析確立：結合位點在髮夾環的 probe (7-1) 抓取 miR-155 的效能為最佳。
- 二. 運用化學鍵結概念及反應方法進行電極修飾；實驗探討出合成聚苯胺 (PANI) 的最佳條件，再利用聚苯胺的還原力使金奈米粒子 (GNP) 得以還原形成，建構出 GNP@PANI 修飾至石墨電極上的 GNP@PANI 複合電極。
- 三. 使用電化學分析的循環伏安法檢測實驗合成的修飾電極，由CV圖確認電極檢測電流大小為：GNP@PANI 複合電極 > 聚苯胺-石墨修飾電極 > 石墨電極，且製備完成的 GNP@PANI 複合電極至少可穩定存放一週。
- 四. 將 DNA probe (7-1) 鍵結在 GNP@PANI 複合電極表面，成為檢測 miR-155 的分子探針。此開發法的檢量線 R^2 值高達0.9953，且偵測靈敏度較電泳分析提高100倍。此外，此探針對 miR-155 具有專一性，回收率高達101.1%，且不受生物基質(人工尿液)環境影響。
- 五. 本研究已成功開發出檢測 miRNA 的分子探針電極，相較於現今的檢測法，使用電化學方法不但靈敏度高，且快速便捷。運用化學修飾能針對檢測目標物進行客製化設計，應用更具廣泛性，可成為非侵入性的新一代檢測方法。

參考資料

- 一. Su-Chia Chen, Kuan-Ting Chen, Amily Fang-Ju Jo.(2021). Polydopamine-gold composite-based electrochemical biosensor using dual-amplification strategy for detecting pancreatic cancer-associated microRNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 173, 1-4.
- 二. Zhe Yang, Yichao Wu, Jianqiang Wang, Bin Cao, and Chuyang Y. Tang(2016). In Situ Reduction of Silver by Polydopamine: A Novel Antimicrobial Modification of a Thin-Film Composite Polyamide Membrane. *Environmental Science & Technology Article*, 50, 9543-9550.
- 三. Ju-Won Jeon, Se Ra Kwon and Jodie L.Lutkenhaus. (2015). Polyaniline nanofiber/electrochemically reduced graphene oxide layer-by-layer electrodes for electrochemical energy. *Journal of Materials Chemistry A*, 3, 3757-3767.
- 四. Bernhard Wessling.(2010). New Insight into Organic Metal Polyaniline Morphology and Structure. *Polymers*, 2, 786-798.