

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	030024
參展科別	化學
作品名稱	自組裝DNA探針於GNP@PANI電極以檢測miRNA

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	何佳安 江慧玉
作者姓名	吳朵羚

關鍵詞	<u>DNA probe、miRNA、GNP@PANI電極</u>
-----	-----------------------------------

作者簡介



我是北一女中第五屆科學班的吳朵羚。高一到高二，非常榮幸有機會能進到臺大生化科技學系的實驗室進行專題研究，並參加台灣國際科展。這一路上發生了很多，我也學到了很多，受了各方人員很多幫助，才能站上這個舞台。首先我要向何佳安教授致謝，感謝您願意信任我、在我遇到問題時能引導我解決。接著，我要感謝實驗室的林佩穎學姐，手把手的教導我實驗技術、和我討論實驗設計與結果。最後，我要感謝北一女中的江慧玉老師，指導我撰寫報告書以及發表海報與簡報時的技巧。感謝您們的指導，我才能順利完成這份作品。

2025 年臺灣國際科學展覽

研究報告

區別：北區

科別：化學科

作品名稱：自組裝 DNA 探針於 GNP@PANI 電極
以檢測 miRNA

關鍵詞：DNA probe、miRNA、GNP@PANI 電極

編號：

（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

自組裝 DNA 探針於 GNP@PANI 電極以檢測 miRNA

摘要

在許多疾病，如癌症、心血管等疾病中，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 RT-qPCR，然而此技術成本高、操作繁瑣且耗時。本研究自行設計可抓取目標 miR-155 的 DNA 分子探針，透過化學合成與修飾將此探針接合在奈米金-聚苯胺 (GNP@PANI) 電極上，組裝出具靈敏度與特異性的 DNA 分子電極。實驗結果顯示：此自組裝探針電極具有良好的線性檢量關係，偵測極限可達 0.1 nM。在摻雜多種 miRNA 的樣品中，此電極仍具有極佳的專一性，回收率高達 101.5 %。應用於含生物基質的尿液樣本，可不受背景干擾，其檢測差異僅約 0.4 %。本研究採用電化學技術來檢測 miRNA，不但成本低、操作簡便，且可依據目標分子進行客製化設計，為新一代檢測技術開創前景。

Abstract

In many diseases, such as cancer and cardiovascular conditions, the expression levels of microRNA (miRNA) serve as valuable diagnostic indicators. Currently, miRNA detection commonly relies on RT-qPCR; however, this technique is costly, labor-intensive, and time-consuming. In this study, we designed a DNA molecular probe specifically for targeting miR-155. Through chemical synthesis and modification, we attached this probe to a gold nanoparticle-polyaniline (GNP@PANI) electrode, creating a highly sensitive and specific DNA molecular electrode. The experimental results demonstrate that this self-assembled probe electrode exhibits an excellent linear detection range, with a detection limit as low as 0.1 nM. In samples containing multiple types of miRNA, the electrode maintained remarkable specificity, achieving a recovery rate of up to 101.5%. When applied to urine samples containing biological matrices, the detection was unaffected by background interference, with a detection variation of only approximately 0.4%. This study utilizes electrochemical technology for miRNA detection, offering a low-cost, easy-to-operate method that can be custom-designed for specific target molecules, paving the way for a new generation of detection technologies.

壹、前言

一、研究動機

膀胱癌是泌尿系統中第二常見的癌症，且切除腫瘤之後仍有一定的復發率，因此患者需要定期追蹤與治療。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；前者雖然診斷準確性高，卻有著侵入性的危險、費用高且患者較難接受等問題，後者雖然為非侵入性診療，但其診斷準確性約 11~76 %，且無法及早偵測到病灶較不顯著的惡性疾病，恐造成未及早發現而延遲治療的遺憾 (ref [9])。在文獻(ref [10]) 中研究發現：miR-155 在膀胱癌患者的尿液檢測樣品中，會有過度表現的徵狀，此可作為治療前的評估標準；以 miR-155 作為疾病診療前的生物評估指標，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。

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，miR-155 即為其中一種。現今的研究多採用 RT-qPCR，不但耗時且需較高的技術需求。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檢測 miRNA 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 DNA probe 在雜合前、後的電流訊號差異，可作為定性、定量依據。

二、研究目的及研究問題

- (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

貳、 研究方法或過程

一、 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	Acrylamide	丙烯醯胺
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	
6-Mercapto-1-hexanol (簡稱 MCH)		6-硫醇基-1-己醇	
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：間隔條、玻璃板、樣本梳、垂直電泳槽、電源供應器、鑄膠套件	

二、 研究原理

(一) 實驗設計

研究目標 miR-155 為一段 23 個核苷酸長的 miRNA，其序列為 5'-UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GU -3'，如圖 3-1 示意。在人體中，miR-155 與許多方面的身體機能有關，例如如免疫反應與癌症發展。



圖 3-1 miR-155 之序列 (自繪)

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。

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 5'端接上亞甲藍分子，3'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 形成髮夾彎構型，當 DNA probe 分子與目標 miRNA 結合時，其構型發生變化，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。

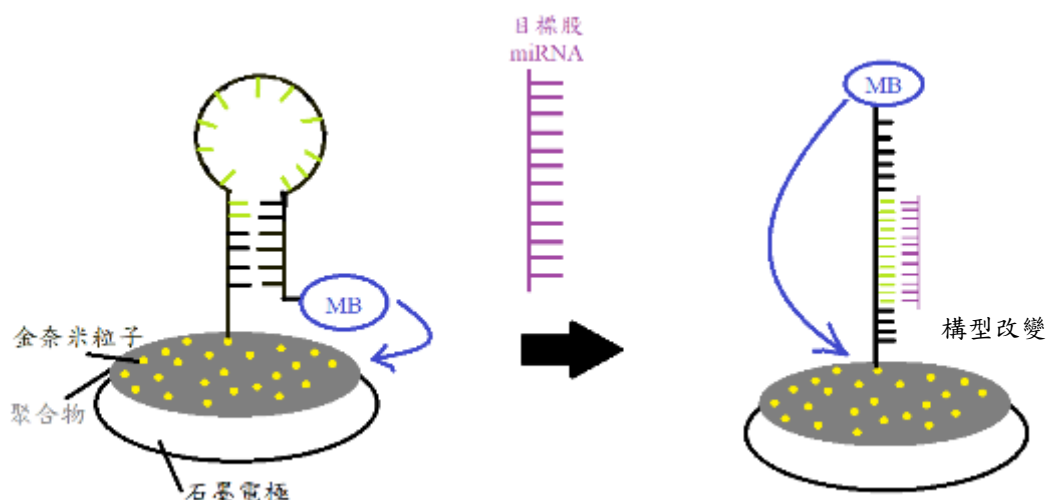


圖 3-2 電化學 DNA probe 電極檢測原理示意圖 (自繪)

(二) 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，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)

(三) 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)

三、研究架構

實驗依據鹼基配對設計適合的 DNA 探針分子，先以電泳分析確認自行設計之探針的可行性，再進一步研究化學修飾電極的條件；從合成聚苯胺為起點，再利用其還原力產生奈米金粒子，完成電化學效能佳的修飾電極。結合自行設計的 DNA 探針分子與自製的修飾電極，完成檢測裝置並進行效能評估，實驗設計流程如下圖 3-5。

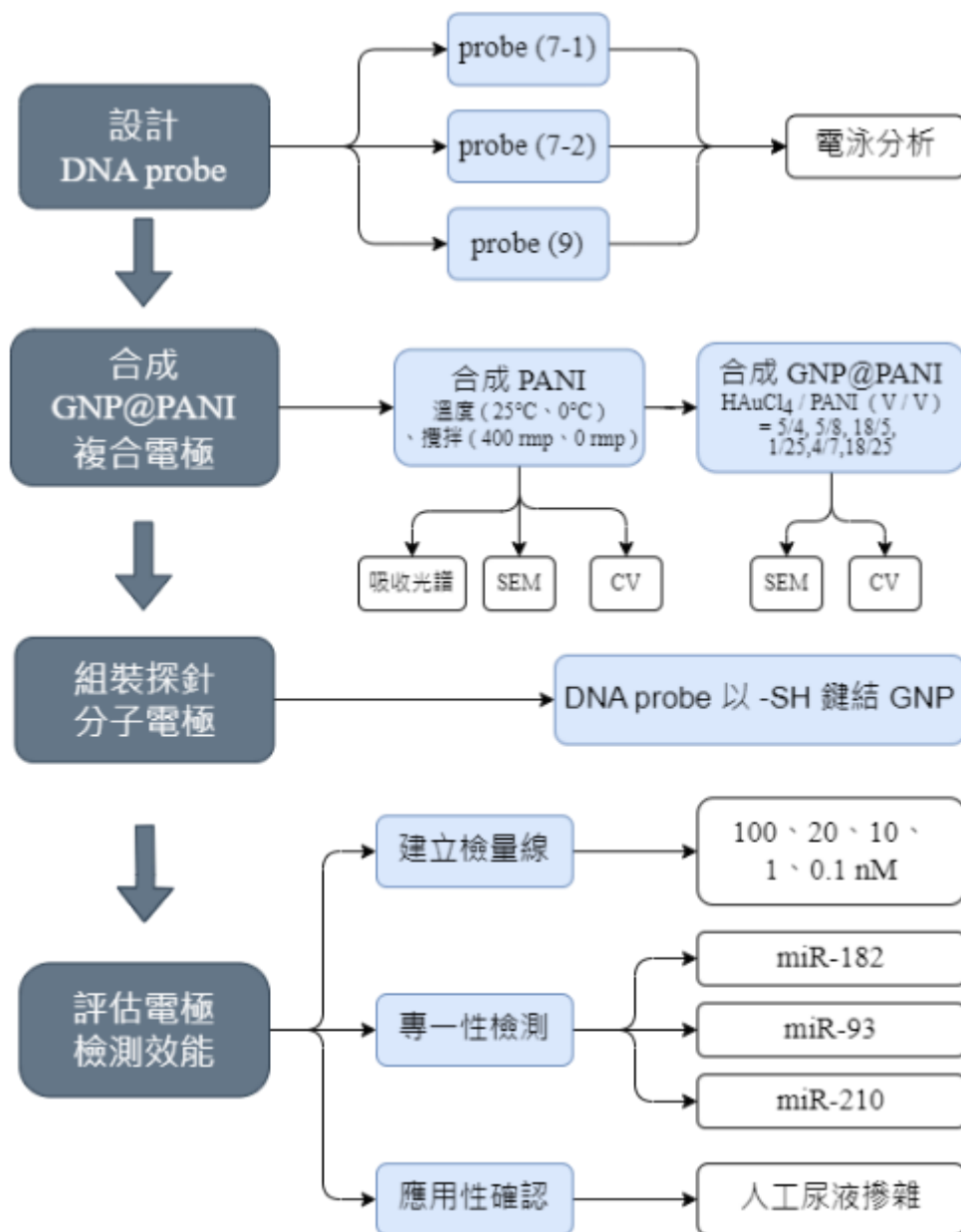


圖 3-5 實驗流程圖 (自繪)

四、研究方法與步驟

(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。

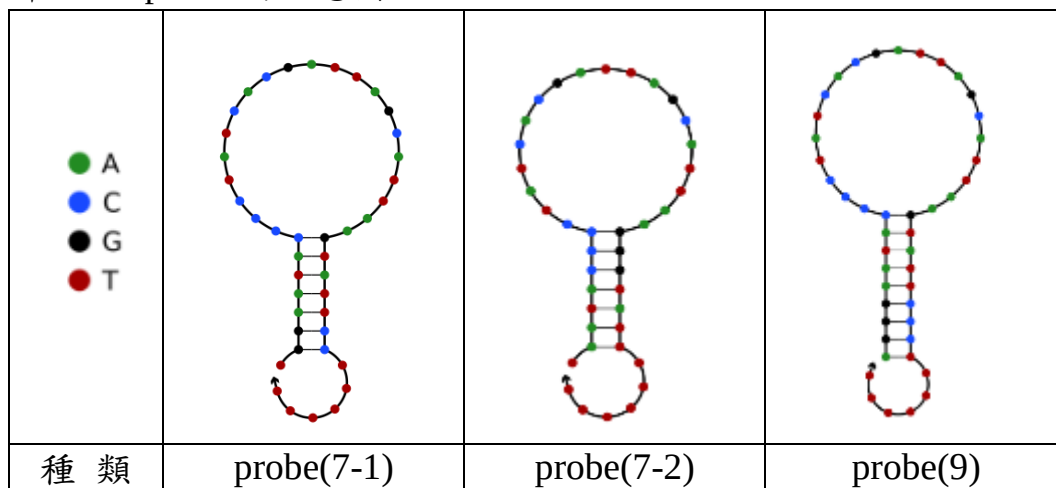


圖 3-6 設計 DNA probe 結構示意圖 (自繪)

2. DNA probe 電泳分析

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 下表中第 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 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) 下表中的 3' 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

(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 5 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。以交流阻抗分析 (AC Impedance, IMP) 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 H₂AuCl₄(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 溶液
(作者自攝)

	聚苯胺溶液 (mL)	H ₂ AuCl ₄ (mL)	HCl (mL)
實驗組(A)	0.2	0.25	0.55
實驗組(B)	0.4	0.25	0.35

- (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 5 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。

4. GNP@PANI 複合電極保存測試

- (1) 將合成好的 GNP@PANI 複合電極放入乾燥箱保存
- (2) 分別在合成當日、三日後及七日後進行 CV 測試。

(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 清洗電極四次，接著置放 6 μ L MCH solution 於電極表面，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，依序稀釋或配製 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) 選擇不同種類的 miRNA，如 miR-210、miR-93、miR-182 以及目標 miR-155。配製上述各種 miRNA 溶液如下表。
- (2) 表中除了目標 miR-155 外，其他 miRNA 分子的濃度皆較抓取目標 miR-155 高了 5 倍，藉以鑑識、確認電極的辨識及抓取能力。

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

(3) 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 。

(4) 重複進行上述實驗三次，確認反應條件的可重複性。

2. 摻雜測試

(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. 按下表條件配製溶液，其中 pool 是指含有[miR-210]、[miR-182]、[miR-93]各 100 nM。

組別	1	2	3	4
miRNA	miR-155 (100 nM)	pool	miR-155 (100 nM)	pool
背景環境	HEPES	HEPES	Artificial urine	Artificial urine

2. 取各溶液 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。

參、 研究結果與討論

一、自行設計的三款 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

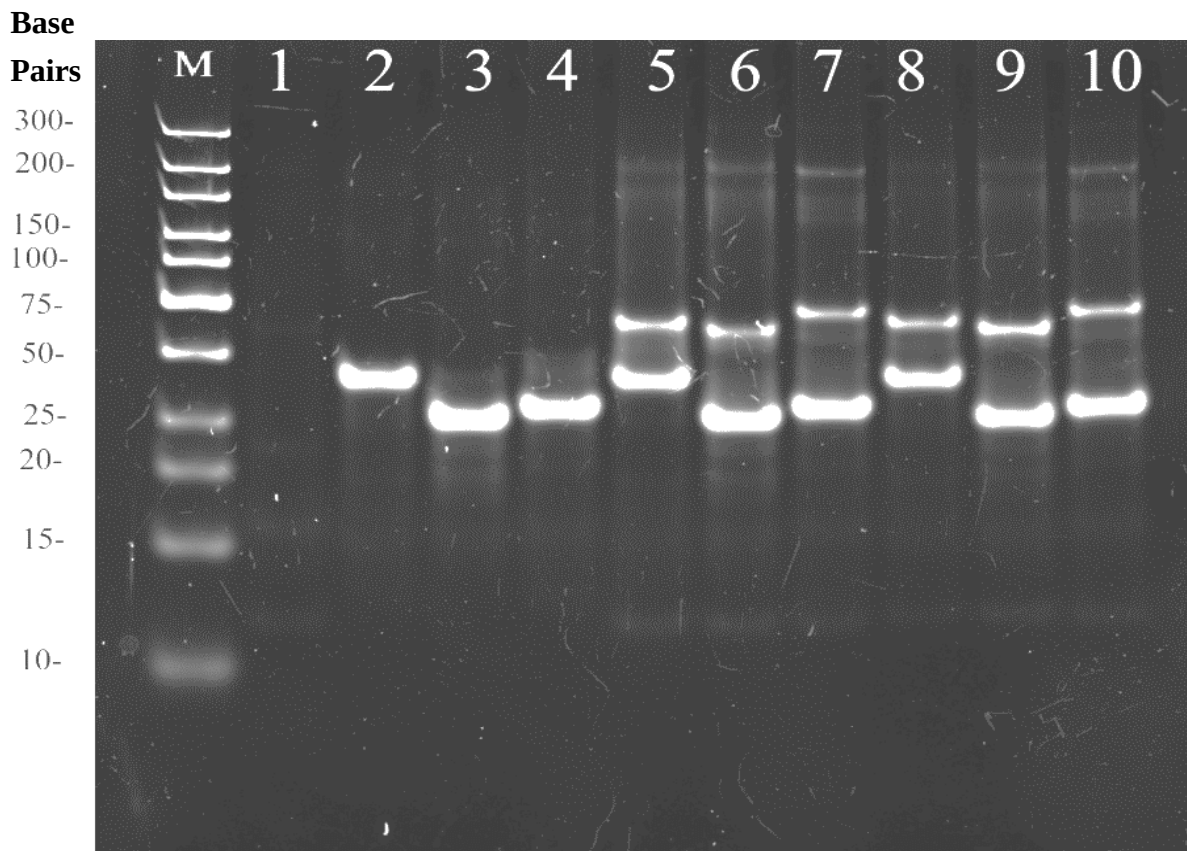


圖 4-1 不同條件下三種 DNA 探針之電泳分析圖 (實驗結果 作者自攝)

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 0.25 μ M , (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

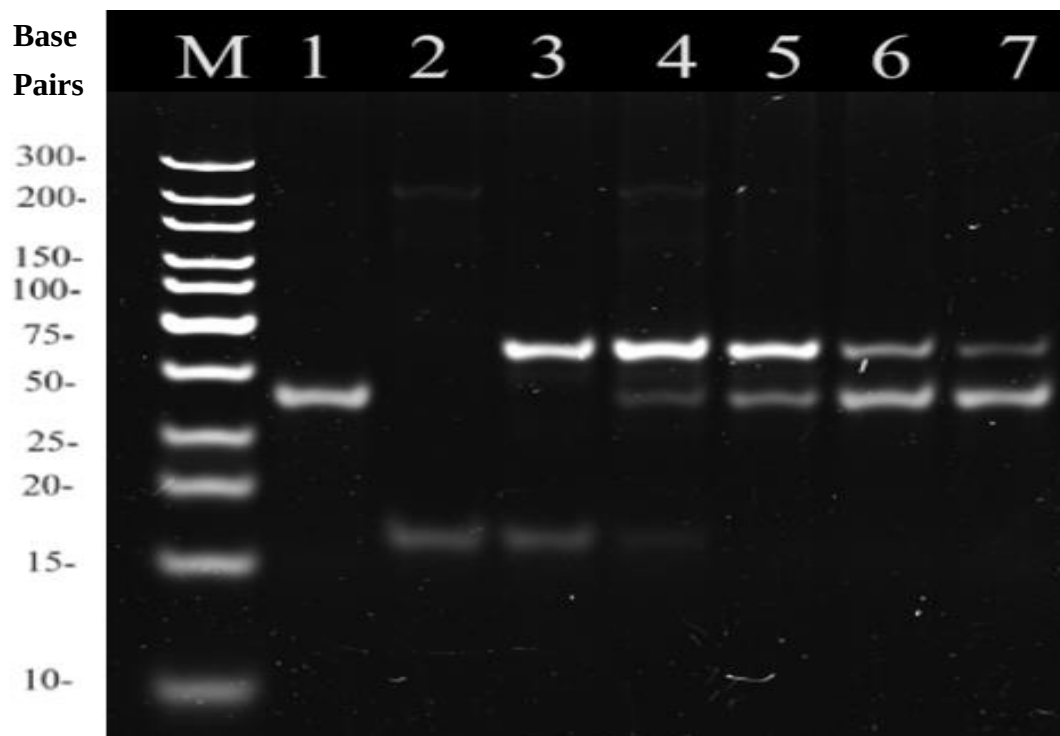


圖 4-2 探針(7-1)與 miR-155 之電泳分析圖
(實驗結果 作者自攝)

(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. 依據實驗設計表 4-5。完成苯胺聚合後，進行吸收光譜的檢測及比對。

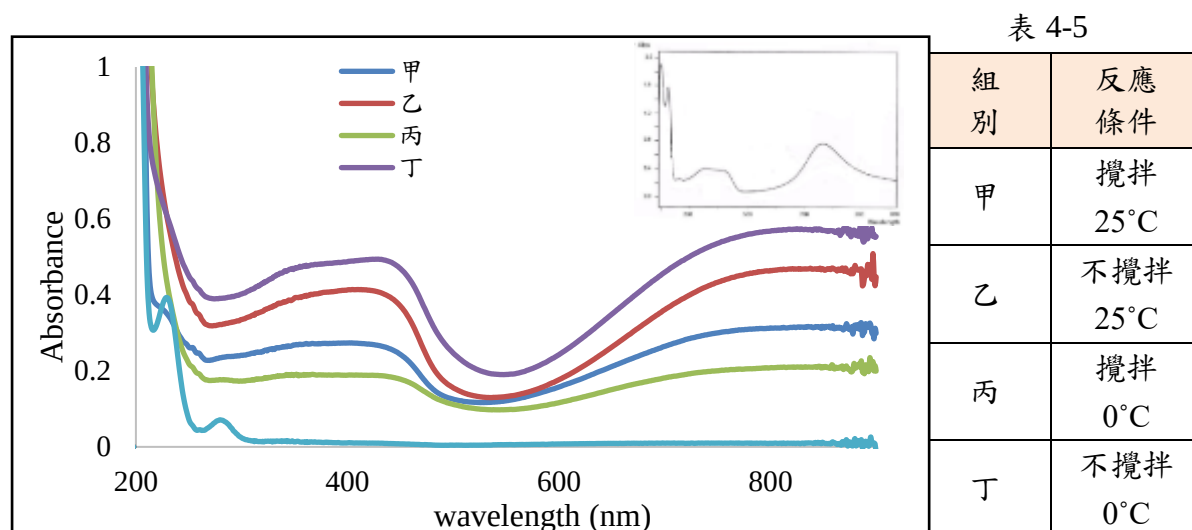


圖 4-3 聚苯胺與苯胺的吸收圖譜 (實驗結果 作者自繪)
(右上為文獻[5]中聚苯胺吸收圖譜)

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，確認實驗成功合成聚苯胺。

2. 以 SEM 進一步確認修飾在石墨電極上的聚苯胺，進行表面形貌鑑定。

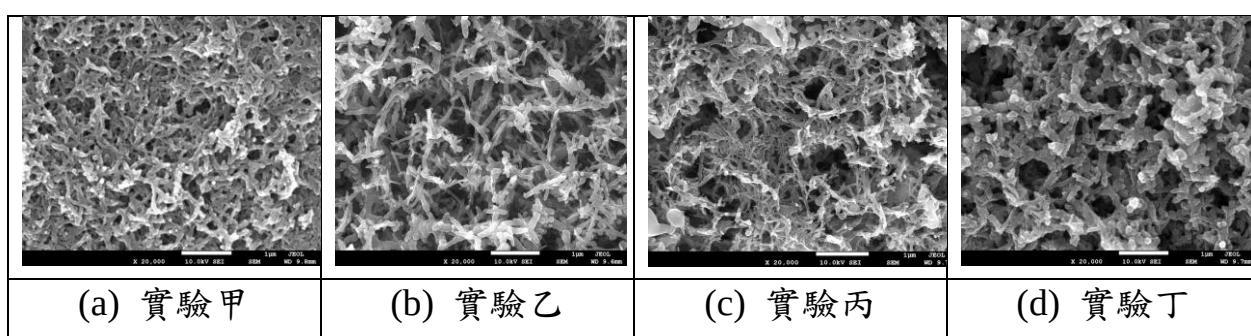


圖 4-4 不同條件下的聚苯胺纖維結構的 SEM 圖 (實驗結果 作者自攝)

上圖 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 CV 圖：將不同條件(甲~丁)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。

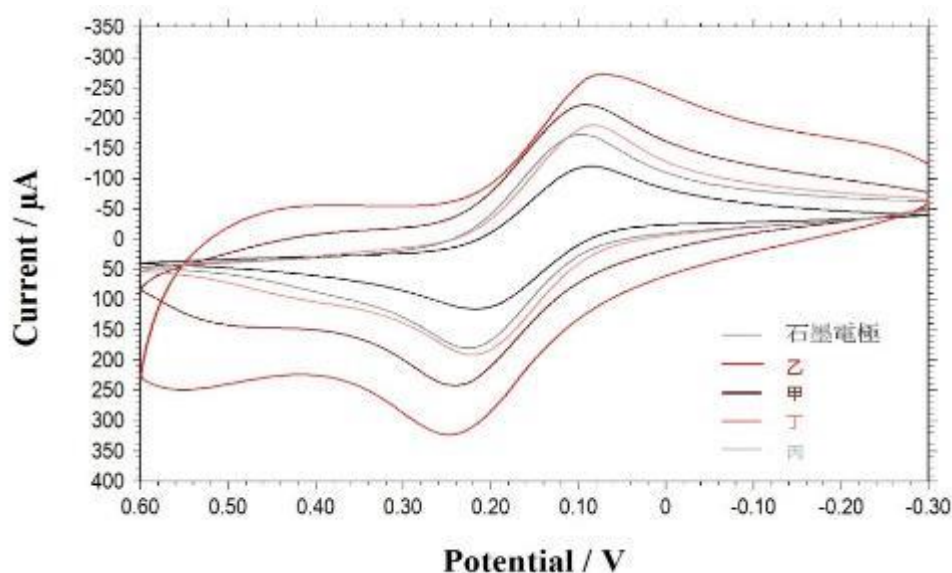


圖 4-5 聚苯胺-石墨電極與石墨電極之 CV 圖 (實驗結果 作者自繪)

2. 電極的電流、電阻：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。

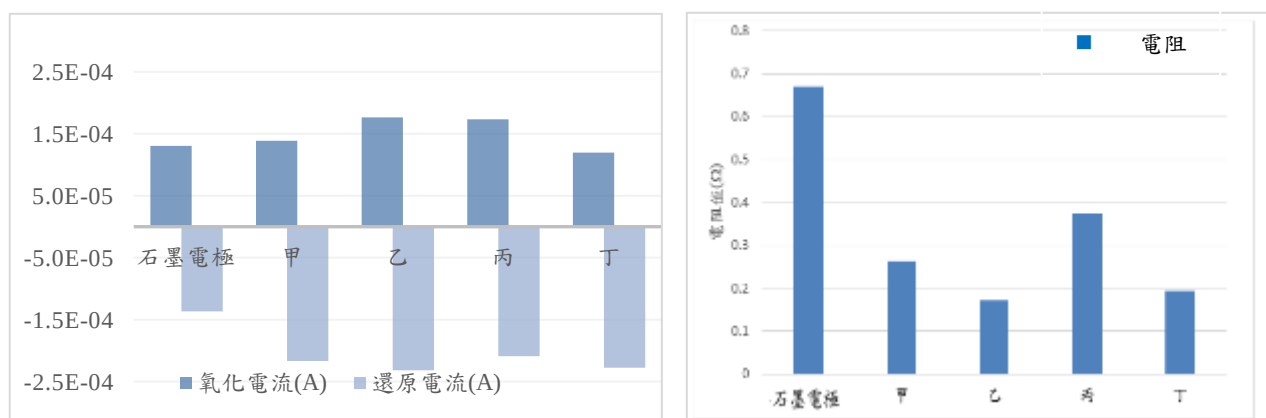


圖 4-6 聚苯胺-石墨電極、石墨電極之電流、電阻比較 (實驗結果 作者自繪)

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，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。在電流與電阻表現上，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，後續將以實驗組乙為條件進行後續實驗。

四、GNP@PANI 複合電極

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

(一) 電極的表面形貌

以 SEM 檢測各組 GNP@PANI 複合電極的表面形貌，如下圖 4-7。

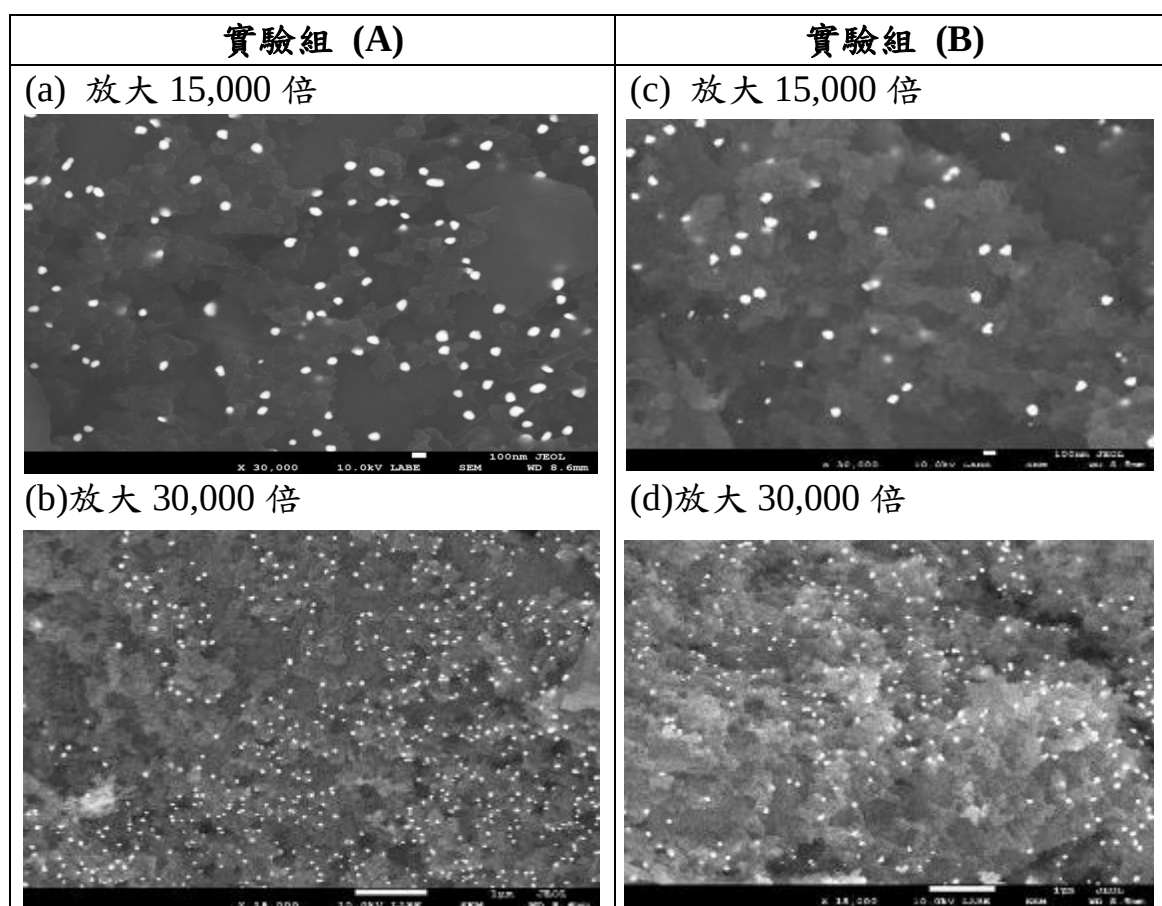


圖 4-7 各組 GNP@PANI 修飾電極在不同放大倍率下的 SEM 圖 (實驗結果 作者自攝)

上列 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)中具有較多的奈米金粒子(GNP)，顯示此條件下可修飾較多的 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

依據 SEM 檢測的表面形貌，選擇圓形亮點較多的實驗組(A)之 GNP@PANI 電極進行表面元素分析。如下圖所示，圖中(a)為電極表面形貌的 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，可確認成功形成奈米金且修飾在聚苯胺-石墨電極的表面。

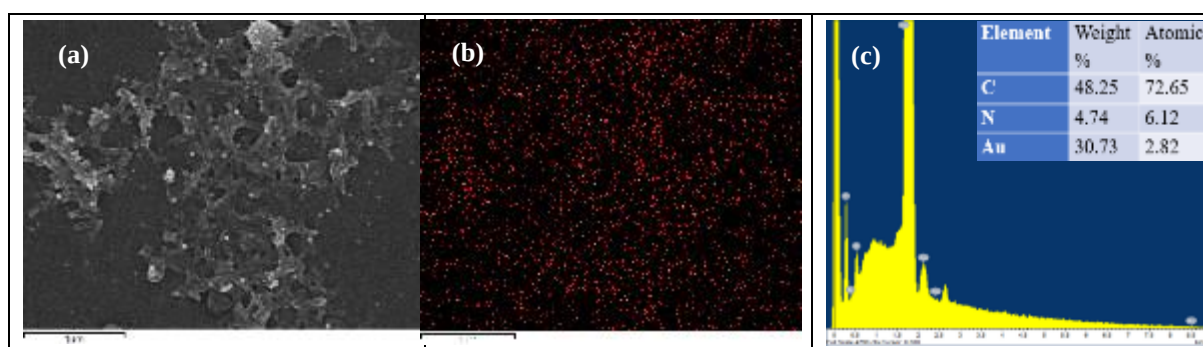


圖 4-8 實驗組(A)之表面元素比例分析 (實驗結果 作者自攝、繪)

(三) 電極的電化學性能

1. 確認 GNP@PANI 電極之檢測靈敏性

實驗過程進行化學修飾，為確認複合電極的檢測靈敏性以便後續接上探針分子，因此進行電極性能檢測。如下圖 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。

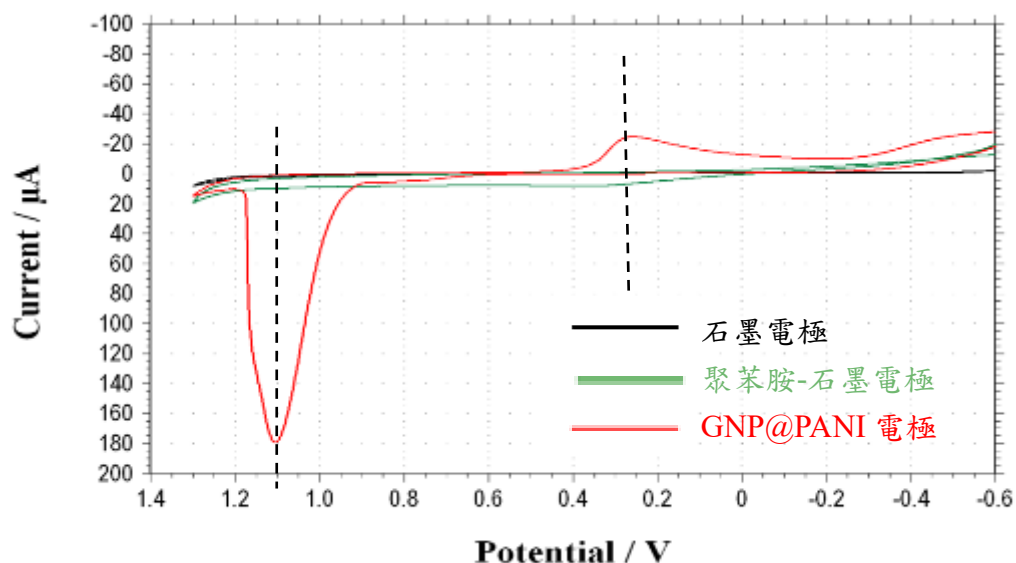


圖 4-9 三種不同電極的之 CV 圖比較 (實驗結果 作者自繪)

由圖 4-9 可看出，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 1.1 V 處為奈米金粒子所表現的氧化峰，0.25V 處則為奈米金粒子的還原訊號峰。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。

2. 確認 GNP@PANI 電極之穩定度

圖 4-10 為 GNP@PANI 複合電極在製備完成的當天、保存三天以及七天後，分別再次進行 CV 測試的結果。由圖中可見經過保存後，電極仍表現出接近的電流訊號大小，顯示此自製合成的電極至少可穩定存放一週。

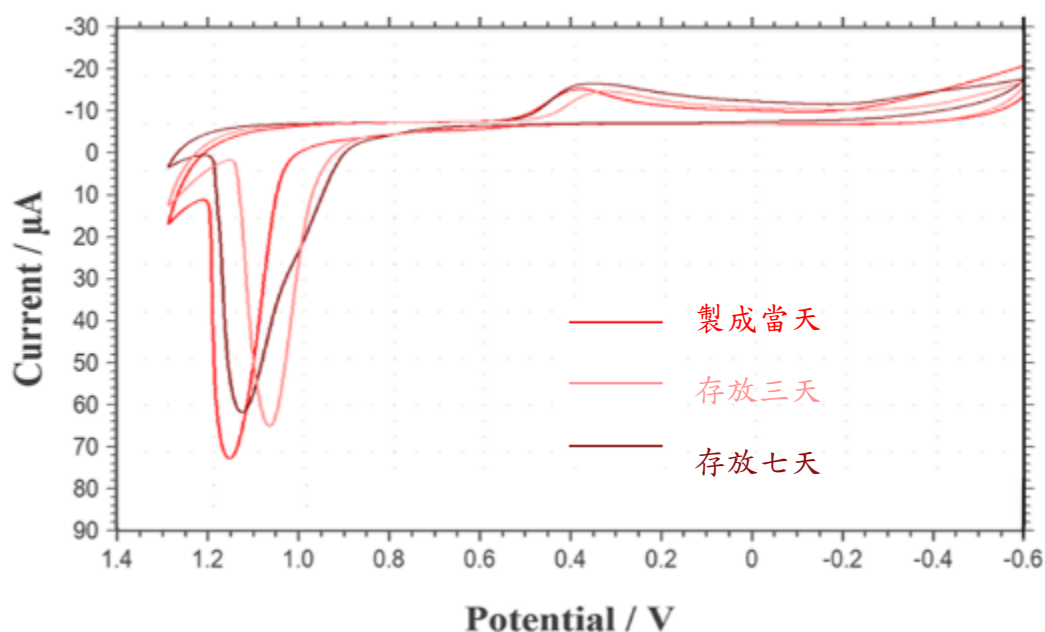


圖 4-10 存放時間不同電極之 CV 圖比較
(實驗結果 作者自繪)

五、 DNA probe 電極

(一) 檢量線與偵測極限

1. 將 probe(7-1)以硫-金共價鍵(~S—Au)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. 藉由電流降低程度來了解抓取 miR-155 比率。計算方式如下式，其中 $I(\%)$ 表示電流降低率，意即 DNA probe 電極與 miR-155 的雜合率。表 4-7 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 4-11 的檢量線：

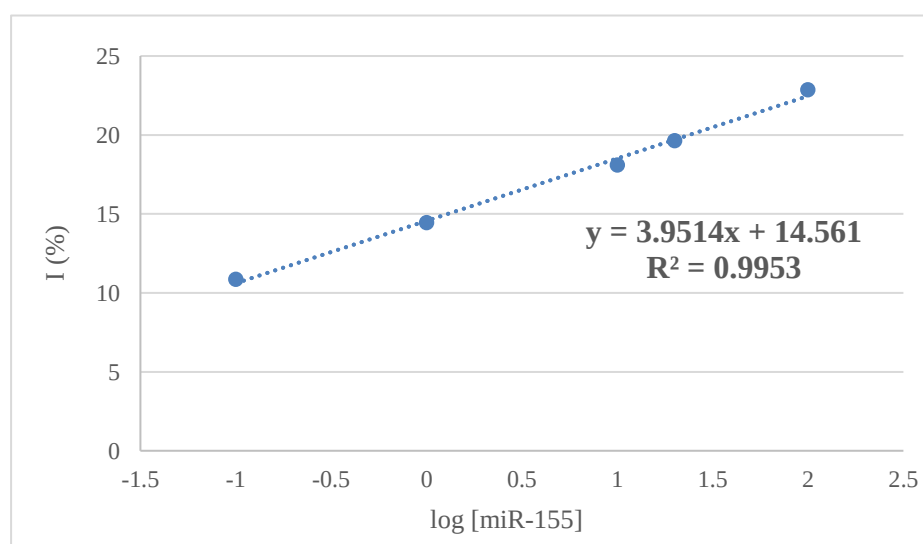


圖 4-11 檢量線 (實驗結果 作者自繪)

本實驗方法建立的檢量線，其 R^2 值達 0.9953，具有良好線性關係；且 $[\text{miR-155}]$ 低於 0.1 nM 即無檢測訊號，因此檢測極限為 0.1 nM。

(二) 電極檢測的專一性

1. 不同種類 miRNA 的檢測

以下表 4-8 反應條件分別配製 miR-155 與它種 miRNA 溶液，實驗設計其他種類的 miRNA 濃度皆比目標 miR-155 高了 5 倍，藉此瞭解電極的專一性與靈敏度。

表 4-8 不同種類 miRNA 之實驗組與其對應 I (%) 值

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

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，如下圖 4-12。

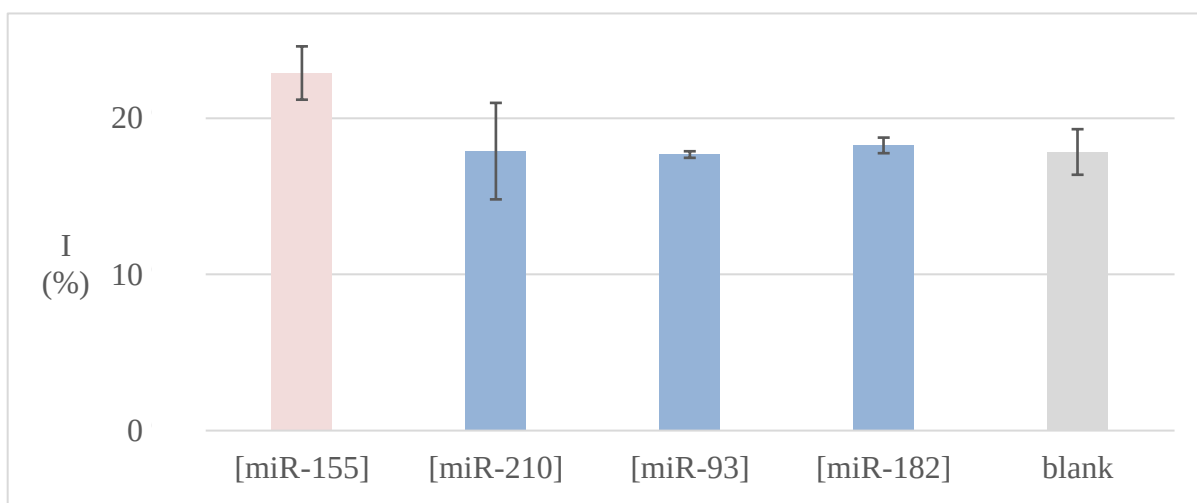


圖 4-12 不同種類 miRNA 專一性測試 (實驗結果 作者自繪)

- (1) 由圖 4-12 觀察得知：自製 DNA probe 電極檢測 miR-155 的訊號數值最為明顯；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。
- (2) 即使其他非目標 miRNA 的濃度比目標 miR-155 分子高達 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。

(3) 在此專一性試驗中，選擇不同種類的 miRNA 分子。比較這些 miRNA 分子的序列，如下表 4-9，其中以 miR-182 與目標 miR-155 的序列最為相近，且上述實驗結果也可發現：miR-182 的 I(%) 值明顯較其他非目標 miRNA 分子的訊號為大，因此進一步確認 miR-182 與目標 miR-155 混合、摻雜時，此自製檢測電極之靈敏度。

表 4-9 不同種類之 miRNA 分子序列

miRNA	序列	與 miR-155 相同的鹼基數
miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	/
miR-210	AGCCCCUGCCCACCGCACACUG	4
miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	6
miR-182	UGGCAAUGGUAGAACUCACACU	7

2. 混合摻雜 miR-182 之測試

以表 4-10 條件配製 miR-155 與 miR-182 之混合溶液，進行摻雜測試。同樣進一步計算其雜合率，再以各組 I 值與條件作圖，如圖 4-13。

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

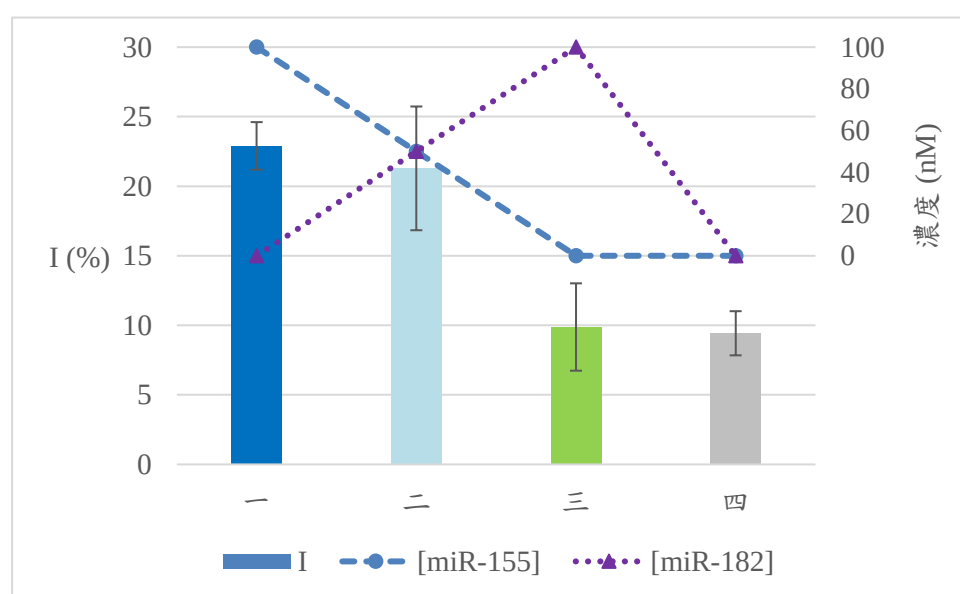


圖 4-13 miR-182 混合摻雜測試專一性測試 (實驗結果 作者自繪)

- (1) 從圖 4-13 可知：實驗一~三組皆為相同總濃度，僅依據其中 miR-155 的含量，檢測之電流值明顯隨著 miR-155 濃度減少而降低，顯示此 DNA probe 電極檢測不受 miR-182 濃度影響
- (2) 實驗中第四組為空白對照組，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) 表 4-10 中的第二組，即 $[miR155]=50\text{ nM}$, $[miR-182]=50\text{ nM}$ 的 I 值為 $0.213 = 21.3\%$ ；運用檢量線進行計算：

$$21.3 = 3.9514x + 14.561, \text{ 可得 } x = 1.705$$

$$\text{即 } [miR-155]=10^{1.705} = 50.75\text{ (nM)}$$

計算此組的回收率為 101.5%，顯示此 DNA probe 具有相當高的準確性。

綜合以上試驗測試，實驗結果證明：本研究自製的 DNA probe 電極不受其他 miRNA 分子影響，抓取 miR-155 不但具有專一性且回收率極高。

(三) 人工尿液摻雜試驗

分別以下表 4-11 條件配製溶液後進行反應。表中的 pool 是指含有 $[miR-210]$ 、 $[miR-182]$ 、 $[miR-93]$ 各 100 nM 的混合溶液。同樣進行實驗測量電流值後，再進一步計算其雜合狀況及雜合率 (I 值)，如圖 4-14。

表 4-11 人工尿液摻雜試驗各實驗組與其對應 I 值

組別	1	2	3	4	blank
miRNA	miR-155 (100 nM)	pool	miR-155 (100 nM)	pool	
背景環境	HEPES	HEPES	Artificial urine	Artificial urine	HEPES
I (%)	22.9	15.8	23.0	15.9	15.1

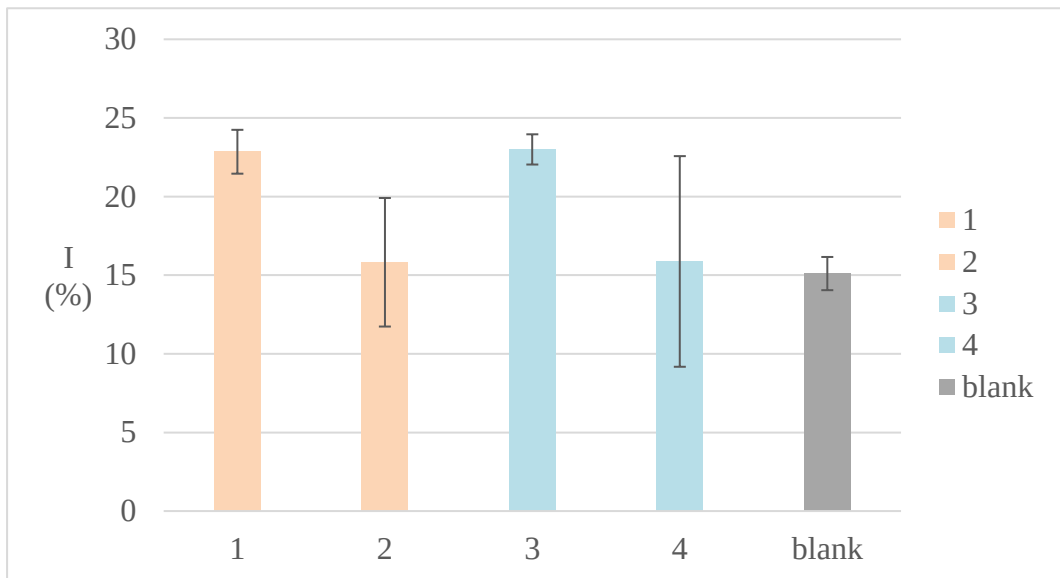


圖 4-14 人工尿液摻雜試驗 I 值結果 (實驗結果 作者自繪)

1. 在此實驗中，實驗 1、2 組為背景環境 HEPES buffer，此設計可視為不具生物基質干擾的標準樣品。而實驗 3、4 組的背景為人工尿液，此可設計作為模擬實際採樣之樣品。
2. 比較添加目標 miR-155 的 1、3 組與非目標 miRNA 之 pool 的 2、4 組，兩者的 I 值明顯具有差異。不含 miR-155 的 pool (2、4 組)其 I 值與空白組(blank)相近，可知在混合不同種類的 miRNA 之情況下，此探針電極的檢測效能仍可不受影響。
3. 比較不同背景環境下，檢測目標 miR-155 的結果：由第 1、3 組這兩組的數值，以組 1 作為沒有基質干擾的理論基礎，來評估模擬真實樣之組 3 的檢測差異，僅約為 0.4%，顯示此自製探針電極可應用於具有生物基質之真實樣品的檢測；此外，實驗第 2、4 兩組的實驗結果同樣接近，顯示電極檢測的專一性亦不受生物基質環境所影響。
4. 由此仿真實樣品的實驗證明：本研究所設計開發的 DNA probe 電極抓取目標 miR-155 專一性極佳，除了不受他種 miRNA 之干擾，亦不受生物基質所影響，具有可應用於真實樣品的潛力。

六、討論

(一)設計 DNA probe 分子

1. 設計概念說明

由於 DNA probe 的構型為髮夾彎，在抓取 miR-155 時，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。

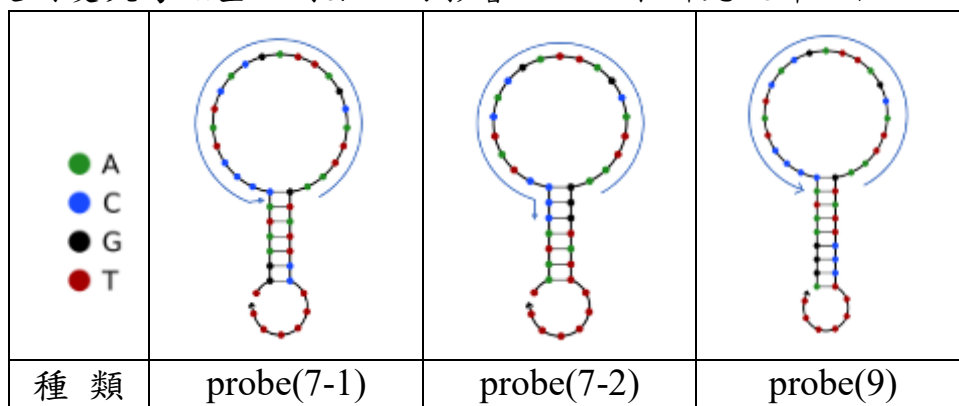


圖 4-15 三款自創設計的 DNA probe 結構示意圖 (自繪)

2. 上圖 4-15 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。
3. 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。
4. 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。

(三)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。

1. 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。

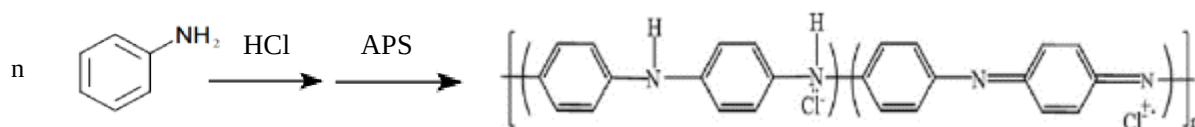


圖 4-16 苯胺的聚合過程與反應式 (自繪)

2. 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($-\text{OH}$)、羧基($-\text{COOH}$)或環氧基($-\text{O}-$)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 $-\text{NH}$ 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 4-17 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。

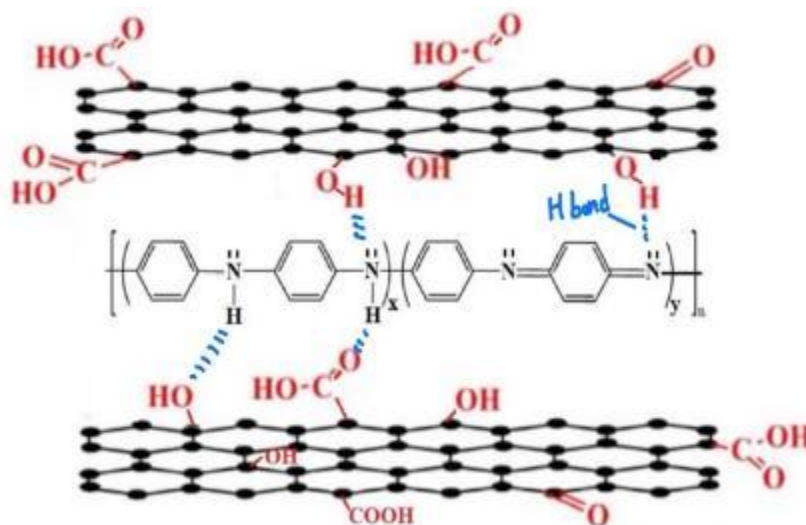


圖 4-17 聚苯胺與氧化石墨間作用力 (自繪)

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

(四)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 4-18 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。

- 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。

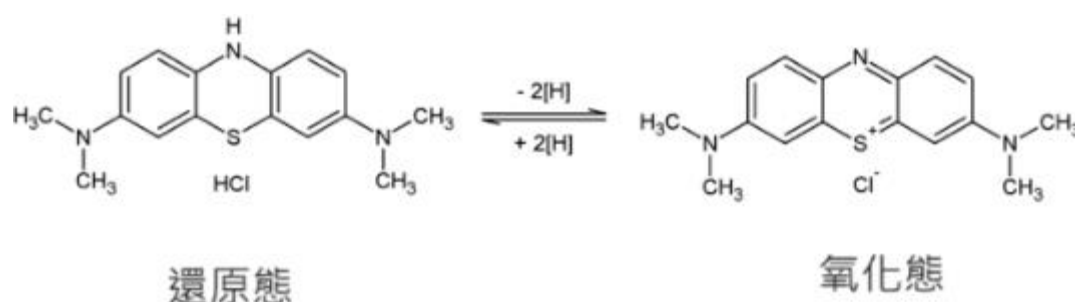


圖 4-18 亞甲藍分子的氧化與還原
(自繪)

- 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 4-19 示意。
- 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 4-20 為製作完成的 DNA probe 電極

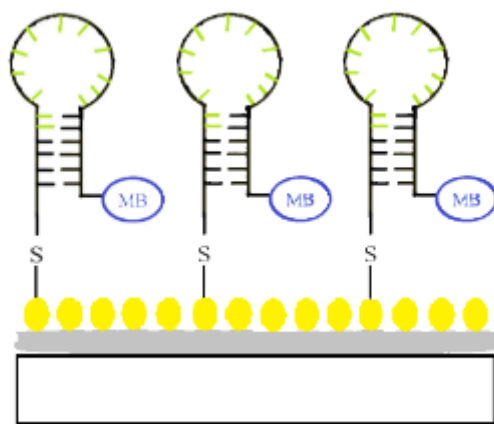


圖 4-19 DNA probe 的 S-Au 鍵結 (自繪)



圖 4-20 DNA probe 電極 (作者自攝)

肆、結論與應用

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，成功地自製合成出新式、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) 高分子先吸附於氧化石墨電極上，再利用其結構上的胺基 ($-\text{NH}_2$) 將 $\text{HAuCl}_4(\text{aq})$ 還原，使金奈米粒子 (GNP) 連接修飾於電極表面，形成 GNP@PANI 修飾電極。利用奈米金的金原子 (Au) 與硫醇 ($-\text{SH}$) 間極佳的鍵結能力，將自製設計的 DNA probe 接合至 GNP@PANI 電極上，使其成為 DNA 分子電極。此過程運用材料的化學性質來組裝、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 DNA 分子電極。經由實驗已確立此檢測裝置具有良好的檢量關係，其偵測極限可達[miR-155]為 0.1 nM；此外，也實驗確認此 DNA 分子電極對於 miR-155 具有極佳的專一性與靈敏度，其回收率可達 101.5 %。在檢測實際樣品的應用方面，研究採用具有生物基質的人工尿液，實驗確知此 DNA 分子電極的檢測不受基質背景影響，檢測結果僅相差 0.4 %，具有應用於檢測真實樣品的潛力。

在此目標 miRNA 的檢測、測試成功之後，期待後續將選擇其他同樣具有醫療評估標準的 miRNA 分子，同樣根據本研究的實驗設計，進行客製化的探針研發、修飾與組裝，發展其泛用性，成為新一代非侵入性的檢測方法。

伍、 參考資料

- 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】 030024

設計可抓取目標 miR-155 的 DNA 分子探針，透過化學合成與修飾將此探針接合在奈米金-聚苯胺(GNP@PANI)電極上，組裝出具靈敏度與特異性的 DNA 分子電極。實驗論述清楚，然實驗設計較缺新穎性。此外，探討背景干擾時需使用適當的基質與控制組比較，以應用於含生物基質的尿液樣本。