


## 一、導論

### 1.1 自動 DNA 定序



目前，DNA 的定序方法稱為**自動 DNA 定序(automated DNA sequencing)**，此方法的基本概念是由 Fred Sanger 於 1977 所發表的論文而來的<sup>1</sup>，利用四種標準核苷酸(dNTPs)A、C、G、T 和四種改造的核苷酸(ddNTPs)A\*、C\*、G\*、T\*。改造的核苷酸在雷射激發後，會發出不同顏色的螢光，並且會在併入合成中的互補 DNA 股時，終止 DNA 的複製反應。

將八種核苷酸混合後，再加入先前利用**聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)**大量複製的待定序 DNA 數百萬個、特定的引子(primer)與 DNA 聚合酶(DNA polymerase)後，便會開始產生 DNA 複製反應，在反應的過程中，隨時有可能因為四種改造的核苷酸之一的加入，而終止反應，形成長度不同、且片段的 DNA 序列。之後，利用**膠體電泳法(gel electrophoresis)**，分出長短不同的序列，經過雷射激發便可知道改造的核苷酸待定序列中的位置，進而完整的將序列定出來<sup>2</sup>。

## 1.2 奈米洞的應用

前述方法雖然能將 DNA 序列定出來，但耗費的時間、資源相當多，因此，就有人研究快速辨別核苷酸分子鏈序列的方法<sup>3、4、5</sup>，利用外加電場下的  $\alpha$ -hemolysin 的通道，如圖 1，讓核苷酸分子鏈穿過，並在 1-2 毫秒內完成，如圖 2 所示之裝置示意圖。觀察電流下降的情形，如圖 3，可分辨出此核苷酸分子鏈是由何種核苷酸所組成，並且也利用模擬探討了在這樣裝置下的分子鏈捕獲率<sup>6</sup>，如圖 4。

後來也引起許多人做了相關研究，包括理論分析、模擬、實驗<sup>7-11</sup>，並且試著去運用不同的實驗方式，期望能獲得更多的、更精確的電流訊息，從而瞭解核苷酸分子於通道內部之運動模式<sup>12、13</sup>。

但是仍未能分辨出單顆核苷酸穿過時的效應，歸納其原因為：

1. 分子鏈穿過時間只有幾毫秒，時間太短儀器無法有效分辨。
2. 熱擾動使得分子鏈上同種核苷酸的數目無法由電流圖辨別出。

由於通道長度的關係，阻塞效應是由數顆核苷酸所貢獻的結果，使得單顆效應無法表現出來。

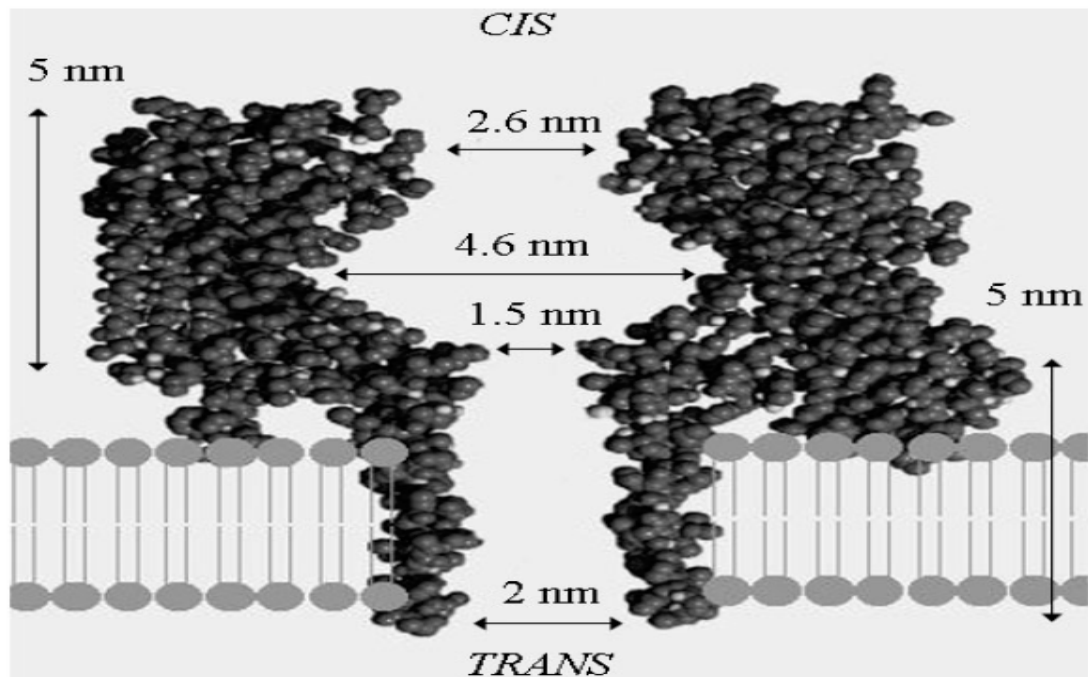


Fig-1.  $\alpha$ -hemolysin 之結構圖<sup>3</sup>。

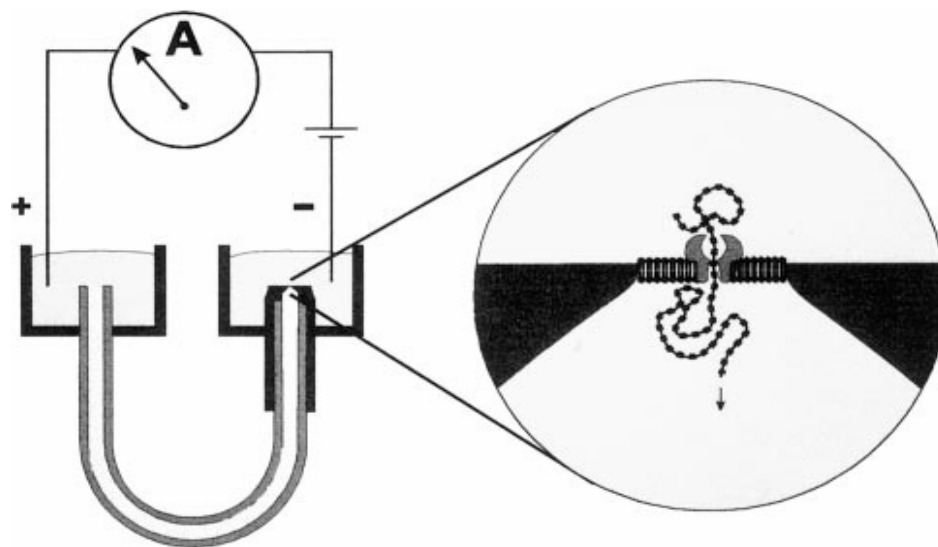


Fig-2. 實驗裝置示意圖<sup>3</sup>。

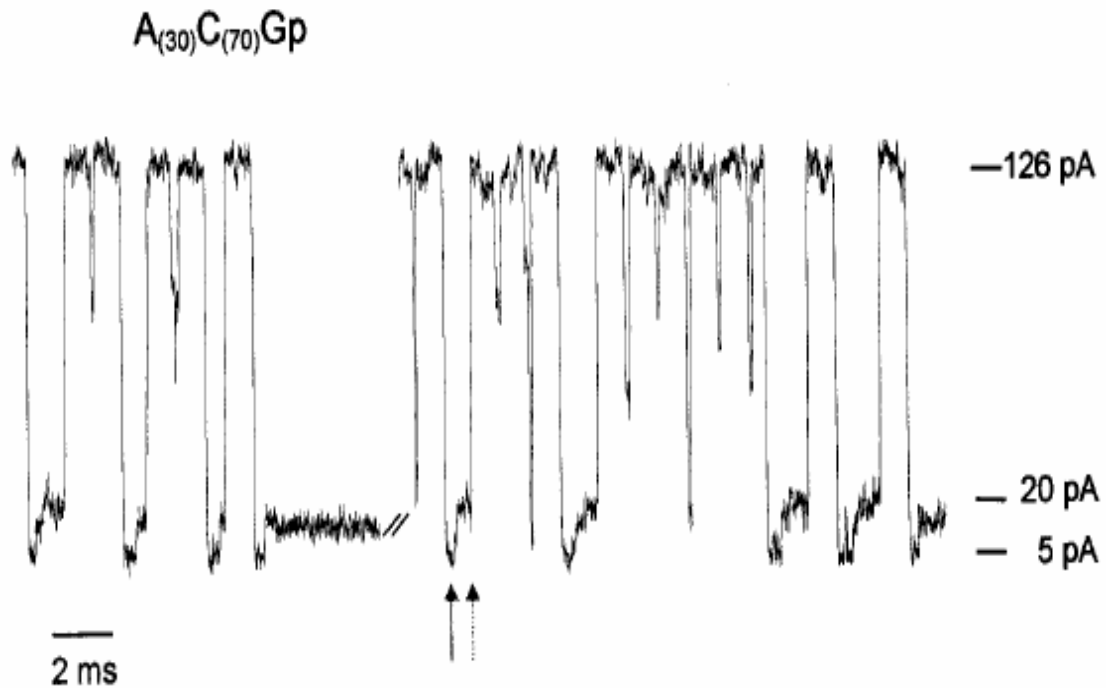


Fig-3. 實驗所看到的電流訊號，可發現兩種電流訊號 A、C 在圖上箭頭所指的地方，其中黑色實線的箭頭所指的地方是由 polyC 所造成的<sup>6</sup>。

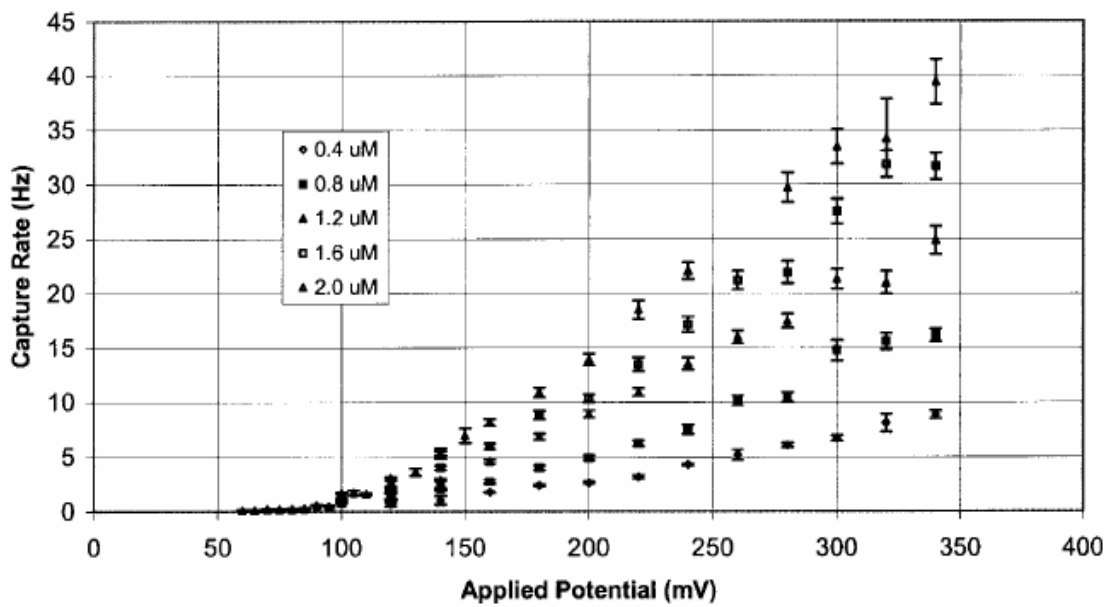


Fig-4. 利用蒙地卡羅模擬的分子鏈捕獲率與外加電場的關係<sup>6</sup>。

### 1.3 奈米洞的改進

另外，有人提出使用固態的奈米洞來作為偵測的媒介，而非用膜蛋白  $\alpha$ -hemolysin 的通道，便有人著手研究如何挖出一個直徑只有幾奈米大小的洞，早先提出的方式是利用離子束進行雕刻<sup>15、16</sup>，裝置如圖 5。

利用上述方式所做出來的奈米洞直徑大小可小至 1.8 奈米，如下圖 6，並且利用上述方法所作之奈米洞也可用來做為 DNA 穿透的偵測器<sup>16</sup>。

另一套製作奈米洞的方法是一塊矽製的膜，將膜的兩側氧化，產生厚約 40 奈米的二氧化矽層，利用電子束平板印刷術 (electron-beam lithography) 及反應性離子蝕刻 (reactive-ion etching) 在二氧化矽層挖出一個面積為  $1 \times 1$  微米平方的凹陷，接著用氫氧化鉀濕蝕刻法 (KOH wet etch) 得到一個厚約 30 奈米的二氧化矽層，最後使用聚焦離子束顯微鏡 (focused ion-beam (FIB) microscope) 薄化至約小於 10 奈米<sup>18</sup>，這樣便完成初步準備工作，如圖 7。

接著利用 TEM 的聚焦電子束 (focused electron-beam FEB) 將表面的原子鑽除出，產生直徑小於 50 奈米的洞，如圖 8，

調低 FEB 的強度後，射向洞口，可將洞的直徑縮小，圖 9 為直徑由 6 奈米縮小至 2 奈米左右之 TEM 連續照片。

也有部分研究關注於改良膜的特性，使得 DNA 穿透發生率提高，像是運用原子層積法(atomic layer deposition)<sup>19</sup>，在洞所在的膜表面鍍上金屬氧化物(例如：三氧化二鋁  $\text{Al}_2\text{O}_3$ )，可以增加 DNA 穿透率、減低雜訊、作為保護膜，另外，透過控制鍍膜的次數，可以控制洞的直徑大小，如圖 10。

基於使用生物通道  $\alpha$ -hemolysin 未能表現出單顆核苷酸的效應，以及固態奈米洞的發展，在此論文中利用電腦模擬，與單股 DNA 的分子特性，如帶電性、分子大小，搭配不同形式的電場的作用，透過固態奈米洞的輔助，研究如何利用物理方法使單顆核苷酸的電流阻塞效果表現出來，並且發展一套簡單的演算模式，來將單股 DNA 中的核苷酸序列標定出來。

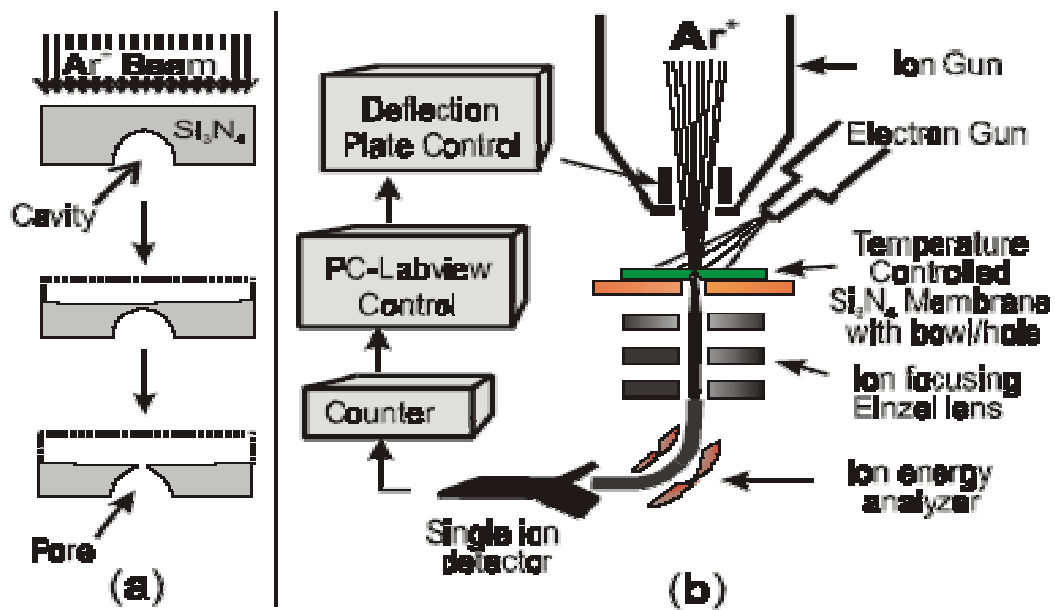


Fig-5. a)利用  $\text{Ar}^+$ 束移走膜上的物質  
 b)回饋控制離子束雕刻裝置示意圖<sup>15</sup>

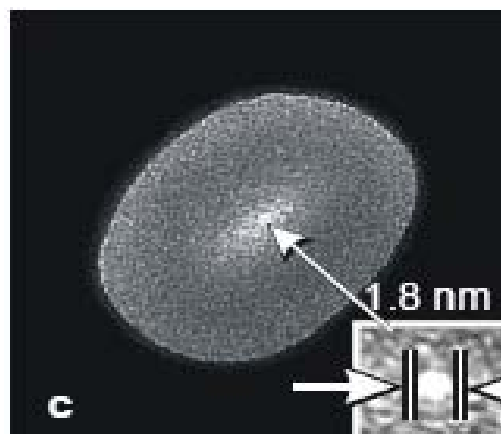


Fig-6. 完成後之 TEM 照片<sup>15</sup>。

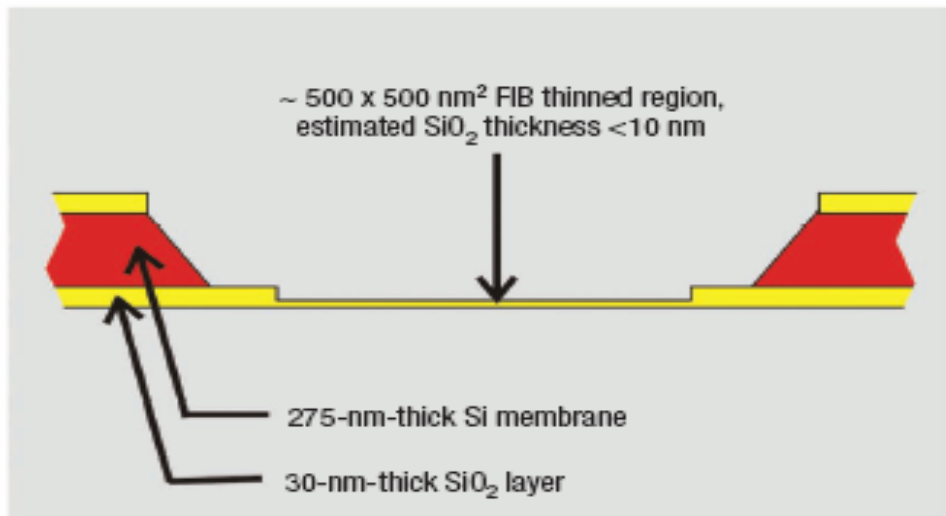


Fig-7. 準備完成之樣品示意圖<sup>18</sup>。

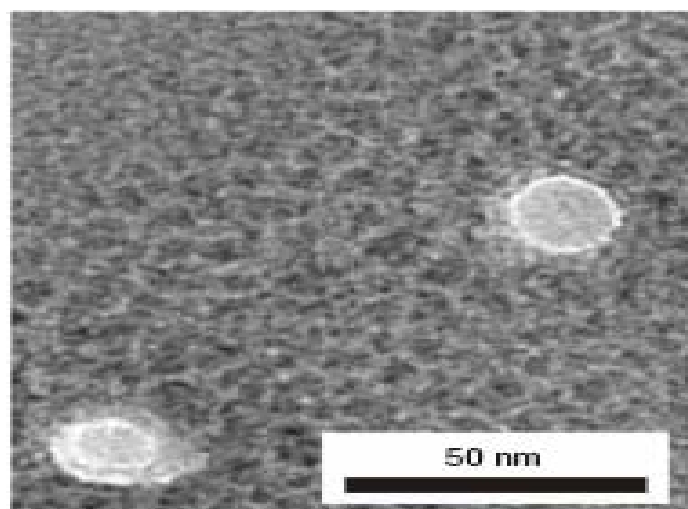


Fig-8. 在 FIB 照射後<sup>18</sup>。

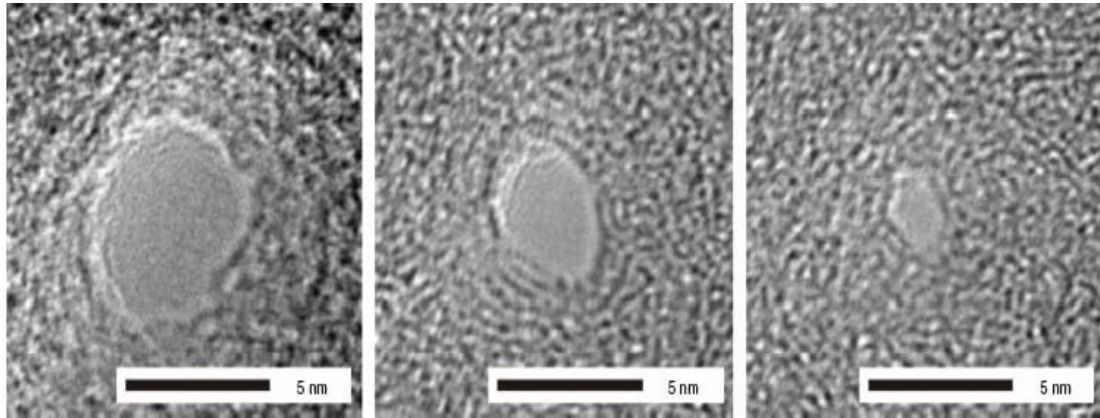


Fig-9. 由左至右之洞口直徑由 6nm 縮小至 2nm<sup>18</sup>。

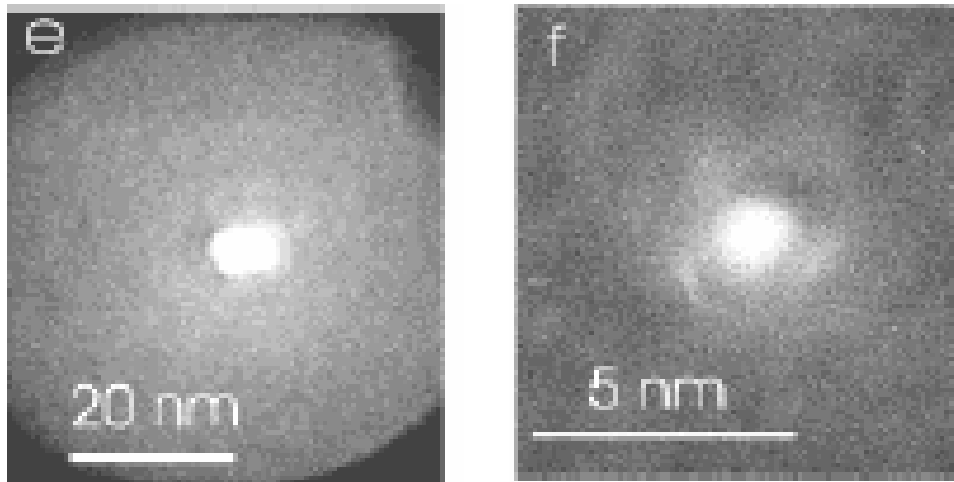


Fig-10. 左圖為未鍍膜，約直徑 7.1nm；右圖為鍍上 24 層 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 後，直徑變為約 2.0nm<sup>18</sup>。