國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系

學士論文

Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Bachelor Thesis

阻抗式微流體晶片應用於 MUC1 適體感測之研究

The Study of an Impedimetric Microfluidic Chip Applied for MUC1 Aptasensing

賴知佑

Chih-Yu Lai

指導教授：陳林祈 博士

Advisor: Lin-Chi Chen, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

致謝

依稀回想起兩年前的今天，第一步踏入403實驗室的我還是一位剛從大二社團、校友會中卸下各種活動的小子，自認見過半邊天的我才正開始發現自己也才窺視完自己房內小小窗外的天空，原來還有數不清全新的世界正等待著被探索呢。

謝謝陳林祈老師兩年來在研究上給我無數指導與鼓勵，感謝老師在自己橫衝直撞追求研究成果時不厭其煩地導正並提供許多指引的方向並且給出許多數據探討延伸的理論分析。感謝陳倩瑜老師於升大三至大三時在生醫資訊方面和機器學習方面技能的增長，還有在相關競賽上學長們的協助。感謝侯詠德老師於大二下教授生化概論以及給我的肯定，帶領我踏入一個全新的領域。感謝三位老師撥冗擔任學士專題口試，和數不清引導我至今的師長。

謝謝噹噹學長兩年在幾乎各種方面的指導，從 SELEX 到各式各樣的微製程，還有學士論文撰寫上的幫助與討論；也謝謝登凱學長與我分享那麼多實驗技巧與研究方法，謝謝黃喬學姊於升大三暑假帶的 ELONA 實驗。謝謝珮瑋、修瑋、婉茹、靜容、柔宣、伊敏學姊，裕夫、奇翰學長平時的協助與指導，感謝 403 每一位學長姐、同學、學弟聖丰以及唯里，能夠每天踏入一個充滿和樂與歡笑聲的環境是多麼幸福快樂的事情。

實驗室與實驗室之餘，這麼長一段時間下來陪伴我走過各種風風雨雨，不論在歡笑或挫折中在我身邊的惟甄與家人們，謝謝你們的鼓勵與關心。

還有更多一時想不到或許瑣碎但改變著我，一起度過兩年討論、教導、協助與陪伴的大家，謝謝你們。

摘要

癌症居臺灣死亡率最高位連續三十多年之久，已成為學術界眾多之研究項目。其中異常糖化之黏液素蛋白1(MUC1)在許多人類上皮性癌(epithelial cancer)之細胞表面過度表現，使此一腫瘤標誌之偵測與抑制成為近年癌症預防及治療的新趨勢。生物感測器之研究發展近幾十年吸引學術界廣大的注意力，其主要功能為利用接受器(receptor)、傳感器(transducer)以及感測器(detector)將一生物訊息轉換為可偵測之訊號，其中電化學阻抗頻譜法(electrochemical impedance spectroscopy，簡稱 EIS)於近十年生物分析應用上蓬勃發展。近年整合於微流體(microfluidics)上之阻抗式晶片的發展成為新趨勢，利用阻抗式微流體晶片，可偵測之目標物如致病菌、醣類、蛋白質…等，微流體因其體積小，故可降低電化學偵測時溶液所需用量，又同時具有即時偵測、可攜式且高通量發展的潛力。適體(aptamers)為一種能與特定目標分子結合之寡核苷酸(oligenucleotides)或肽分子(peptides)，可藉由修飾特定分子藥物於適體上，使與之結合的目標物發生特定作用達到標靶治療(target therapy)的效果，阻抗式適體感測器(impedimetric aptasensors)即以適體為傳感元件(sensing element)並且以電化學中的阻抗法進行目標物之量測。

鑑於此，本研究以標準金電極之適體感測器為出發點，利用 EIS 驗證 MUC1 適體與 MUC1 結合之有效性，再透過微製程製作微型金電極之適體感測器，最終利用 EIS 感測 MUC1 並透過等效電路模型分析其靈敏度、專一性與其中元件之電學特性。其總尺寸約$25.4 \times 25.4 \times 6.7$mm。利用標準金電極製作適體感測器以及對於 MUC1 的量測之每一步驟利用 EIS 分析並且透過 Randles 等效電路參數匹配得出其電荷轉移電阻(R_{ct})在與 512nM MUC1 反應後增加 36381Ω。微型金電極製程中載玻片於熱蒸鍍後其金屬厚度為金(電極主材料)/鉻(黏著層)：80nm/20nm。微型金電極適體感測器進行 MUC1 偵測，從 Bode plot 計算其偵測極限可達 0.42nM、靈敏度為 0.92°/log(nM)且等效電路匹配後電雙層恆相位元件(CPE)中 Q_{dl} 與 n 參數隨濃度變化關係約為 $Q_{dl} = 6.92 + 6.19\log(C_{MUC1})$ (nF/Hz^{n-1}) 及 $n = 0.839 - 8.23 \times 10^{-3}\log(C_{MUC1})$ 。與當今阻抗式微流體晶片生物感測器研究比較可達相近之偵測極限，並且使用 MUC1 之 DNA 適體，達到簡單、免標記、降低檢體與試劑用量的目的。

關鍵字：黏液素蛋白1(mucin1, MUC1)、DNA 適體(DNA aptamer)、阻抗式微流體晶片(impedimetric microfluidic chip)

目錄

致謝 ……i

摘要 ……ii

圖目錄 ……v

表目錄 ……vi

符號說明 ……vii

第一章　緒論 ……1

1.1 前言 ……1

1.2 研究目的 ……2

1.3 研究架構 ……3

第二章　文獻探討 ……4

2.1 MUC1 與腫瘤標誌 ……4

2.2 阻抗式微流體晶片與應用 ……5

2.3 阻抗式適體感測器 ……6

2.4 等效電路模型 ……8

2.4.1 溶液電阻(R_S) ……8

2.4.2 電荷轉移電阻(R_{ct}) ……8

2.4.3 電雙層恆相位元件(CPE) ……9

2.4.4 擴散阻抗(Z_W) ……9

2.4.5 Randles 等效電路……10

第三章　研究方法 ……11

3.1 實驗儀器與設備 ……11

3.2 實驗材料 ……11

3.3 實驗藥品 ……12

3.4 基於標準金電極之適體感測器建構 ……13

3.4.1 標準金電極研磨與清洗 ……13

3.4.2 EIS 感測條件與參數 ……14

3.4.3 DNA 適體 S2.2 固定 ……14

3.4.4 MUA Blocking ……14

3.4.5 MUC1 量測 ……14

3.5 微型金電極與微流體晶片製作 ……15

3.5.1 微型金電極設計 ……15

3.5.2 S1813 正光阻塗佈 ……16

3.5.3 金屬熱蒸鍍 ……..16
3.5.4 PDMS 微流道設計與製作 ……..16
3.5.5 晶片封裝 ……..17
3.6 基於微型金電極之適體感測器建構 ……18
3.6.1 裝置儀器架設 ……18
3.6.2 微流體式 EIS 感測 ……...……..18
3.6.3 DNA 適體 S2.2 固定 ……...18
3.6.4 MCH Blocking ……..18
3.6.5 MUC1 量測 ……...……..18
3.7 對稱式微型金電極等效電路模型匹配 ……...19
第四章 結果與討論 ……..20
4.1 基於標準金電極之適體感測器建構 ……..20
4.1.1 研磨與清洗之 CV 分析 ……..……20
4.1.2 適體感測器製程與 MUC1 之 EIS 感測分析 ……20
4.2 對稱式微型金電極 ……22
4.2.1 流速、偏壓與震幅對 EIS 之影響分析 ……22
4.2.2 適體感測器製程與 MUC1 之 EIS 感測分析 ……..……23
4.3 對稱式微型金電極等效電路模型之數據分析 ……...25
4.3.1 溶液電阻(R_S) ……..25
4.3.2 電荷轉移電阻(R_{ct}) ……..26
4.3.3 電雙層恆相位元件(CPE) ……...26
4.3.4 擴散阻抗(Z_W)……...27
第五章 結論於未來展望 ……28
5.1 結論 ……..28
5.2 未來展望 ……..29
參考文獻 ……30
附錄 ……..34

圖目錄

圖 1-1 阻抗式微流體晶片應用於 MUC1 適體感測之研究架構 ……3
圖 2-1 等效電路模型電路元件
(a) 等效電阻
(b) 等效電容
(c) 等效恆相位元件
(d) 等效擴散阻抗
(e) 以電雙層恆相位元件構成之 Randles 等效電路 ……10
圖 3-1 阻抗式適體感測器製程與MUC1 量測原理圖 ……..……..13
圖 3-2 阻抗式微流體晶片製程 ……15
圖 3-3 阻抗式微流體晶片電極設計圖 (a)上視圖 (b)上視圖(放大至中間電極區) ….15
圖 3-4 微流道 PDMS 平面圖 (a)前視圖 (b)上視圖 ……..17
圖 3-5 阻抗式微流體晶片 (a)斜視圖 (b)實體照片 ……..17
圖 3-6 對稱式微型金電極等效電路模型 ……...……19
圖 4-1 裸標準金電極於 0.5M 硫酸水溶液之 CV 圖 ……20
圖 4-2 利用標準金電極製作 MUC1 適體感測器與 MUC1 量測 Nyquist plot …….21
圖 4-3 流速 1μL/s、偏壓 0.224V 下針對不同六種震幅進行 EIS 分析之 Bode plot
(a)阻抗絕對值與頻率關係圖
(b)相位角與頻率關係圖 …..……...……22
圖 4-4 利用微型金電極製作 MUC1 適體感測器與 MUC1 量測 Bode plot
(a)阻抗絕對值與頻率關係圖
(b)相位角與頻率關係圖
(c)相位角與頻率關係圖(放大圖) ……23
圖 4-5 電化學阻抗頻譜中頻率與 1000nM MUC1 和基準的相位差及相關係數的平方 R^2 之關係圖 ……..24
圖 4-6 電化學阻抗頻譜 8105Hz 下 MUC1 濃度與相位角檢量線關係圖 ……..24
圖 4-7 等效電路中溶液阻抗(R_s)與蛋白質濃度關係圖及回歸線 ……...…….25
圖 4-8 等效電路中電荷轉移電阻(R_{ct})與蛋白質濃度關係圖及回歸線 ….……..26
圖 4-9 等效電路中電雙層恆相位元件(CPE)阻抗中 (a)Qdl 及(b)n 與蛋白質濃度關係圖及回歸線 ……...27

表目錄

表 2-1 阻抗式微流體晶片研究比較 ……..7

表 2-2 等效電路各元件阻抗值一覽表 ……10

符號說明

Z	阻抗(impedance)
Ø	相位角(phase)
R_s	溶液電阻(solution resistance)
R_{ct}	電荷轉移電阻(charge transfer resistance)
i	電流(current)
i_0	交換電流(exchange current)
β_a	陽極之 Tafel 係數
β_c	陰極之 Tafel 係數
η	過電位(overpotential)
ω	頻率(frequency)
C_{dl}	電雙層電容(double layer capacitance)
CPE	電雙層恆相位元件(double layer constant phase element)
Q_{dl}	恆相位元件之電容參數
n	恆相位元件之次方參數
Z_W	Warburg 阻抗、擴散阻抗(Warburg impedance)
Y_0	擴散導納(diffusion admittance)
ε	匹配誤差(fitting error)
$w_{\lvert Z\rvert/\emptyset}$	誤差權重(fitting error weight)
n_f	EIS 中頻率個數值(number of frequencies)
$\lvert Z\rvert_{cal,i}$	匹配程式中第 i 個頻率(f_i)下計算出之阻抗絕對值$\lvert Z\rvert$
$\lvert Z\rvert_{in,i}$	實驗數據得到且輸入進程式、在第 i 個頻率下之$\lvert Z\rvert$
$\emptyset_{cal,i}$	匹配程式中第 i 個頻率(f_i)下計算出之Ø
$\emptyset_{in,i}$	實驗數據得到且輸入進程式、在第 i 個頻率下之Ø
R	線性回歸相關係數(linear correlation coefficient)

第一章　緒論

1.1　前言

癌症居臺灣死亡率最高位連續三十多年之久(行政院國民健康局，2016)，已成為學術界眾多之研究項目。DNA 的突變或者經遺傳而得到的缺陷基因將影響正常細胞的訊息傳導路徑，中斷與阻礙的路徑導致細胞增殖與凋亡之平衡的過程受到改變，不受調控且不斷增值的細胞最終轉變成腫瘤，其中惡性腫瘤會轉移至身體其他部位並行侵略，引發癌症[1]。黏液素蛋白1(mucin 1，簡稱 MUC1)屬於黏液素(mucins)的一種、為一類高分子量蛋白家族，其在體內之膠狀分泌物中扮演著重要的角色(如：潤滑、協助細胞傳訊、構築化學障蔽)[2]；然而存在於腫瘤細胞表面且過度表達的異常糖基化 MUC1可促進腫瘤細胞之生存、擴散與腫瘤內血管生成[3]，使之與眾多人類癌症具關聯性[4]，近年 MUC1已成為癌症預防及治療的新趨勢[3]。

電化學阻抗頻譜法(electrochemical impedance spectroscopy，簡稱 EIS)因其可量測分析許多生物感測器(biosensor)不同之製作過程而成為常見的生物感測方法之一；除此之外，其簡單、靈敏度高以及免標記的特性更加拓展其與不同技術應用合併之可能性[5]。阻抗式微流體晶片更降低電化學偵測時溶液所需用量，又同時具有即時偵測、可攜式且高通量發展的潛力[6]。

適體(aptamers)為一種能夠篩選的方式而能與特定目標分子進行鍵結之寡核苷酸或肽分子[7]，利用適體作為傳感元件(sensing element)製作成的生物感測器具有對目標分子高專一性、親和性、低免疫源性及低毒性之特性[8]，使近年來廣受多方研究與探討[9]。

故本研究期望建立一可應用於 MUC1 適體感測之阻抗式微流體晶片，以 MUC1 的 DNA 適體進行濃度偵測，以達到簡單、免標記、降低試劑用量之目的，並利用等效電路模型(equivalent circuit)分析微觀狀態下晶片中各元件之電學特性。

1.2 研究目的

本研究期望建立可利用適體感測技術偵測 MUC1 之阻抗式微流體晶片，目標如下：

(1) 標準金電極之適體感測器：

I. 標準金電極適體感測器開發與製作

II. MUC1 量測

(2) 微型金電極之適體感測器：

I. 微型金電極製作

II. PDMS 微流道製作

III. 微型金電極適體感測器開發製作

IV. MUC1 量測

V. 等效電路模型參數匹配

最後利用等效電路模型所匹配而得的參數計算靈敏度、專一性與其中元件之電學特性，達到簡單、免標記、降低試劑用量之目的。

1.3 研究架構

本研究以標準金電極之適體感測器為出發點，利用 EIS 驗證 MUC1 適體與 MUC1 結合之有效性，再透過微製程製作微型金電極之適體感測器，最終利用 EIS 感測 MUC1 並透過等效電路模型分析其靈敏度、專一性與其中元件之電學特性。

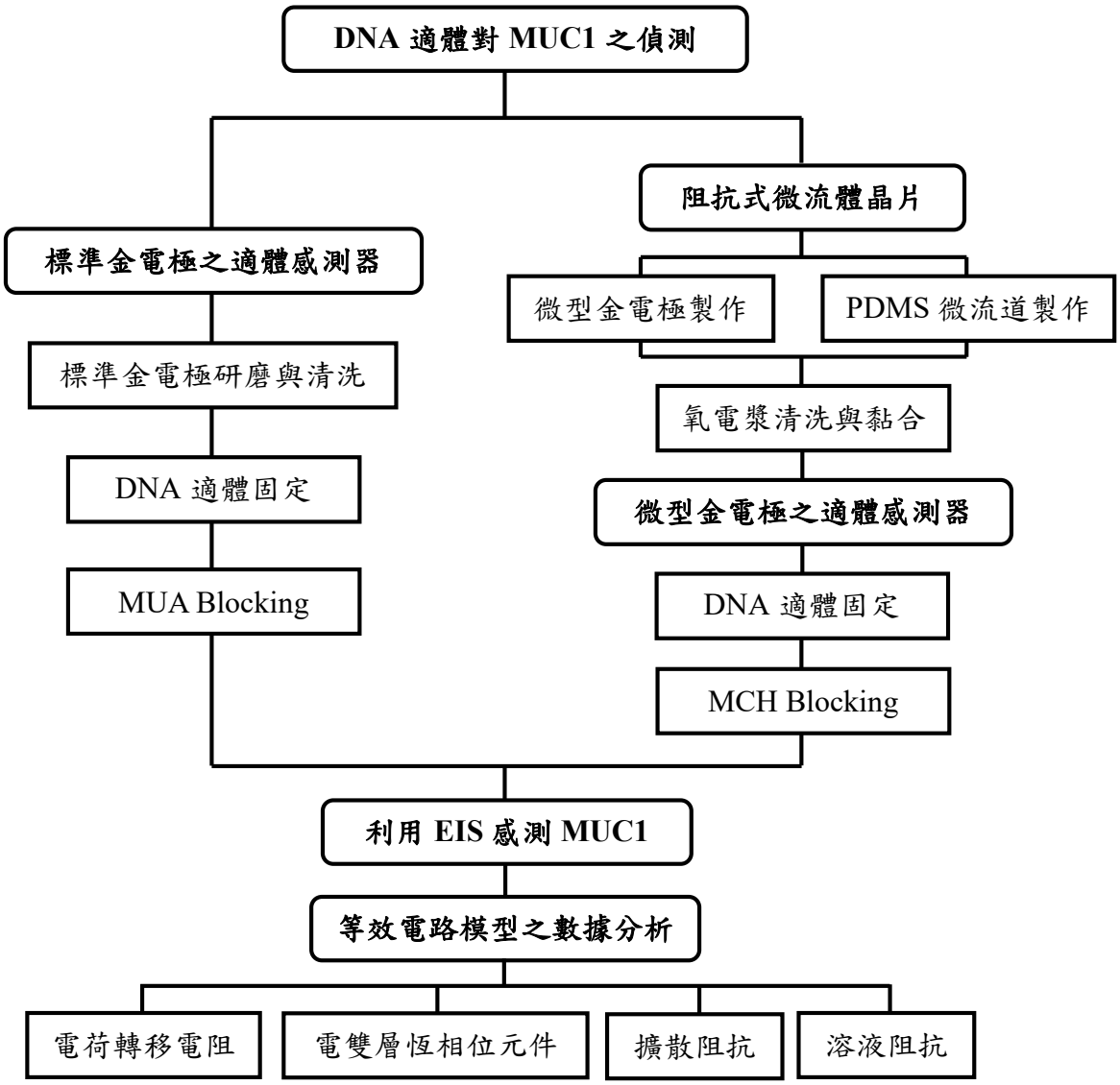


圖 1-1 阻抗式微流體晶片應用於 MUC1 適體感測之研究架構

第二章　文獻探討

2.1 MUC1 與腫瘤標誌

腫瘤標誌是一種存在血液、尿液或是身體組織內部的生物標誌，其含量會因一或多種癌症之病發而提升，因此可藉由偵測腫瘤標誌的量進而推測是否患有特定的癌症。MUC1 是一位於細胞表面之穿膜糖蛋白(transmembrane glycoprotein)，其延伸出細胞表面外之高度糖化域(heavily glycosylated extracellular domain)約 200 至 500nm[10]；MUC1 在健康的組織內扮演著保護上皮組織的角色，延伸出去之帶負電糖鏈形成一個物理屏障且可避免物質黏附，此可避免病原體群聚[11, 12]。

異常糖化之 MUC1 在許多人類上皮性癌(epithelial cancer)之細胞表面過度表現且受高度關注[13]。MUC1 對疾病擴散之重要性在一利用老鼠模型的研究中被闡述：缺乏 MUC1 基因的老鼠比起帶有正常 MUC1 基因的老鼠在多瘤病毒 T 抗原高度表現之下、乳癌的自發性發展有明顯大量之時間延遲[14]；類似的趨勢於另一自發性發展胰管腺癌之老鼠模型亦被發表[15, 16]。MUC1 於惡性腫瘤中相關的功能包含與特定生長因子相關之細胞生長[17]、細胞代謝[18]、腫瘤擴散[19]、阻礙細胞凋亡[20]…等，使 MUC1 成為一個重要的腫瘤標誌。

Steven P. Treon 團隊發現可溶性 MUC1(soluble MUC1，簡稱 sMUC1)在多發性骨髓瘤(multiple myeloma)患者之骨髓漿細胞中平均含量為 31.76 U/mL(範圍為 5.69 至 142.48 U/mL)，健康人士中平均含量為 9.68 U/mL(範圍為 0.65 至 39.83 U/mL) ($P < 0.001$)[21]。M.S. SIMMS 團隊於膀胱癌(bladder cancer)中發現在 T4 期病人血清中 MUC1 含量為 35.0 ± 67.2 U/mL (靈敏度 47%)，健康人士血清中 MUC1 含量為 2.0 ± 1.4 U/mL[22]。

另有市售之 MUC1 Human 的 ELISA 套組，由 Thermo Fisher Scientific 公司所提供之 CA15-3 ELISA 套組其對於 MUC1 之偵測極線可達 4mU/mL，可用於細胞培養上清液、血清、血漿內之偵測(Thermo Fisher Scientific, USA)。

2.2 阻抗式微流體晶片與應用

生物感測器之研究發展近幾十年吸引學術界廣大的注意力，其主要功能為利用接受器(receptor)、傳感器(transducer)以及感測器(detector)將一生物訊息轉換為可偵測之訊號(如：螢光、電流、阻抗…等)。生物系統中許多特定的反應能夠在兩電極間產生一可偵測之電流、電位、電荷累積等導電性質，相對地，可用在生物感測技術上之電化學反應又有許多如電位法(potentiometry)、電流法(amperometry)、伏安法(voltammetry)、阻抗法(impedimetry)與其他光學之偵測方式。其中阻抗頻譜法(impedimetric spectroscopy)於近十年生物分析應用上蓬勃發展並受熱烈關注[23-25]。在電化學阻抗頻譜(electrical impedance spectroscopy，簡稱 EIS)中，許多如阻抗、電容、電導之電學性質利用頻譜掃描監控，其比較一個小震幅周期性正弦波之電壓與頻率之關係；此技術具高準確度、響應時間短與高靈敏度之特性。

對於阻抗與頻率之關係可作成Nyquist plot與Bode plot。其中Nyquist plot以橫軸為阻抗實部(Re(Z))，縱軸為阻抗虛部(Im(Z))；Bode plot以橫軸為頻率(frequency)，縱軸為阻抗絕對值(|Z|)或是相位角(Phase，符號Ø)。

近十年，整合於微流體(microfluidics)上之阻抗式晶片的發展亦成為新趨勢，可透過主動或被動幫浦驅動微流體內液體之流動，亦可利用如微型閥(microvalves)、微型混合器(micromixers)、多工器(multiplexers)等裝置整合控制液體流動的方向。微流體因其體積小，故可降低電化學偵測時溶液所需用量，又同時具有即時偵測、可攜式且高通量發展的潛力。

利用阻抗式微流體晶片，可偵測之目標物如致病菌、醣類、蛋白質…等，Padmapriya P.Banada 團隊透過阻抗式微流體晶片分析低導電溶液促進李斯特菌 (L. monocytogenes)生長的能力[26]，Tura A.團隊分析流經微流道之葡萄糖濃度變化在不同頻率下與阻抗的關係[27]，Taemin Lim 團隊以金電極為工作電極(working electrode，簡稱 WE)、利用三極式電化學阻抗頻譜法偵測凝血酶(thrombin)且達到 0.1ng/mL 之偵測極限與 10^{-1}-10^{5}ng/mL 之偵測範圍[28]。

2.3 阻抗式適體感測器

適體(aptamers)為一種能與特定目標分子結合之寡核苷酸(oligonucleotides)或肽分子(peptides)，可藉由修飾特定分子藥物於適體上，使與之結合的目標物發生特定作用來達到標靶治療(target therapy)的效果，且利用此種方式可抑制多種致癌物[8]。

使適體專一性地結合至目標物可透過配體指數增強系統進化技術(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment，簡稱 SELEX)[29]，其為一演化適體的分子生物學技術，SELEX 流程起始為隨機寡核苷酸序列的合成，接著為重複圈數之專一性篩選與聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction，簡稱 PCR)放大；隨機寡核甘酸序列對於其目標分子之專一性與親和性將隨圈數之增加而上升，最後利用定序之技術得到幾條與目標分子有高專一性與親和性之特定寡核甘酸序列，MUC1 之 DNA 適體 S2.2 亦是利用此種技術篩選出[30]。

阻抗式適體感測器(impedimetric aptasensors)以適體為傳感元件(sensing element)並且以電化學中的阻抗法進行目標物之量測。Abd-Elgawad Radi 團隊率先於 2005 年發展出一可偵測凝血酶(thrombin)且可重複使用之阻抗式適體感測器[31]，其透過於 thrombin 適體(thrombin binding aptamer，簡稱 TBA)之 3’端修飾硫醇基(thiol group)使之可以在金電極表面形成自組裝單分子膜(self-assembled monolayer，簡稱 SAM)的方式將 TBA 固定於電極表面[32]；並且以 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$作為氧化還原探針(redox probe)進行 EIS 量測。

Abd-Elgawad Radi 團隊之研究中利用面積 1.6mm^2 之金工作電極，且以三極式電化學系統量進行適體感測器製程，其流程大致與本研究中利用標準金電極製作適體感測器之流程相同；其利用之等效電路模型亦相同，等效電路模型將於 2.4 被提及。

上述提及、近年利用阻抗式微流體晶片之研究與本研究整理於表 2-1，比較不同電極幾何形狀、操作變因(溶液或電極)、電極材料、原理與偵測極限。

表 2-1 阻抗式微流體晶片研究比較

電極材料 (主要/接著層)	原理	操作變因	電極幾何	偵測極限	文獻
Au/Cu (0.15/35μm)	不同濃度 Cry1Ab/適體固定於磁珠導入溶液中	溶液	圓盤狀	15pM	[33]
Au/Ti (200/15 nm)	不同數量之細菌存在於溶液中	溶液	指叉狀	10cells/mL	[34]
Au/Ti (100/10 nm)	電極之間溶液中不同濃度之 NaCl	溶液	棒狀	0.1μM	[35]
Au/Ti/W (100/10/10 nm)	不同濃度 thrombin/適體固定於磁珠導入溶液中	溶液	指叉狀	10pM	[36]
Au/COC (100/未知 nm)	利用介電泳將微粒限制於電極周圍	電極	指叉狀	未知	[37]
Au/Ti (150/5 nm)	固定於電極上之單股或雙股 DNA	電極	指叉狀	未知	[38]
Au/Ti (80/20 nm)	固定於電極上不同濃度 miRNA/單股 DNA	電極	圓盤狀	1pM	[39]
Au/COC (50/未知 nm)	固定於電極上不同濃度 IgG1/Protein A	電極	長方形	未知	[40]
Au	固定於電極上不同濃度霍亂毒素/抗體	電極	指叉狀	10pM	[41]
Au/Ti (100/10 nm)	固定於電極上不同濃度肌紅蛋白/抗體	電極	板狀	未知	[42]
Au/Cr (200/10 nm) Au/COC (100/未知 nm)	固定於電極上不同濃度 IgG/抗體	電極	指叉狀	未知	[43]
Au/Cr (200/5 nm)	固定於電極上不同濃度 IgE/適體	電極	正方形	0.1nM	[44]
Au/Cr (80/20 nm)	固定於電極上不同濃度 MUC1/適體	電極	正方形	0.42nM	本研究

2.4 等效電路模型

電化學系統各元件特徵需利用合適的模型輔助阻抗頻譜之數據解讀，而模型最後將應用於實驗數據的估計，估算所有可以充分描述實驗的元件參數，此方法亦可用來預測系統在各種條件變化下的行為。

其中等效電路模型(Equivalent circuit model)最常用於解釋阻抗頻譜之數據。這些模型都是搭配的眾所周知的被動元件如電阻、電容、電感以及其他特殊元件如恆相位元件(constant phase element，簡稱 CPE)和 Warburg 阻抗(符號 Z_W)。這些元件會透過串、並聯構成更加複雜的等效電路，電化學系統中各元件(如：電極、溶液…等)之電學特性將可利用一或數個電子元件呈現其中。以下將簡介本研究使用的等效電路中用到的各元件，並將其阻抗值整理列出於表 2-2。

2.4.1 溶液電阻(R_s)

電路元件中電阻(resistance，符號 R)的阻抗為 $Z_R = R$，其阻抗與頻率無關，亦沒有虛部數值，且通過電阻的電流始終與其兩端電壓同相，於等效電路中的圖形符號於圖 2-1(a)。

參考電極(reference electrode，簡稱 RE)與工作電極(working electrode，簡稱 WE)之間的電位差即為歐姆電阻(ohmic resistance)或溶液電阻(solution resistance，符號 R_s)。可以使用 R_s 代入模型中表示，其值取決於電解質的電導率(κ)和電極之幾何形狀。

2.4.2 電荷轉移電阻(R_{ct})

當電極的電壓值被迫遠離其開路電壓時將會被極化，此極化電極表面引起的電化學反應便會產生電流，電流的大小由反應物朝向和遠離電極的反應動力和擴散控制。此電流可利用著名的 Butler-Volmer 方程式解釋[45]：

$$i = i_0(e^{\beta_a \eta} - e^{\beta_c \eta}) \qquad \text{式 2-1}$$

其中 i 為量測之電流，i_0 為交換電流，η為過電位，β_a與β_c分別為陽極與陰極之 Tafel 係數，當η夠小則式 2-1 可被轉換為

$$i_0 = \frac{\beta_a \beta_c}{\beta_a + \beta_c}\left(\frac{1}{R_{ct}}\right) \qquad \text{式 2-2}$$

其中 R_{ct} 為電荷轉移電阻(charge transfer resistance)，其經常出現於電化學阻抗頻譜之等效電路模型中。

2.4.3 電雙層恆相位元件(CPE)

電路元件電容(C)的阻抗為$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$，電容的阻抗為頻率的函數且只有一虛部數值存在，其阻抗會隨著頻率增加而降低；此外，通過電容的電流會相對於電壓具有-90°之相位差。

電雙層(electrical double layer)存在於在電極與電解質之間的界面，當離子從溶液接近電極表面時，此電雙層就會形成。電極中的電荷與這些離子電荷相距幾Å，又電雙層電容(double layer capacitance，符號 C_{dl})取決於許多變量，包括電極電位、溫度、離子濃度、離子類型、氧化物層、電極粗糙度、雜質吸附等，C_{dl} 於等效電路中之圖形符號於圖 2-1(b)。

然而用理想的電容器模擬電化學現象是假設所研究的表面是均勻的，然並非實際情況，此種缺乏均勻性、不完美電容之現象可以恆相位元件(constant phase element，簡稱 CPE)表達。其阻抗值為$Z_{CPE} = \frac{1}{Q_{dl}(j\omega)^n}$，可於等效電路中以 CPE 代表電極表面之不完美電容的電性，其中 Q_{dl} 為不完美電容值，n 為不受頻率影響之一參數 ($0 \leq n \leq 1$) [46]。

當$n = 1$則$Z_{CPE} = \frac{1}{j\omega Q_{dl}}$即為電容之阻抗值，當$n = 0$則$Z_{CPE} = \frac{1}{Q_{dl}} = R_{dl}$即如同電阻之阻抗值。此外，當$n = 0.5$時，CPE 相當於一 Warburg 阻抗，於 2.4.4 所述。不完美之電雙層電容通常是用 CPE 模擬，其在等效電路中圖形符號如圖 2-1(c)。

2.4.4 擴散阻抗(Z_W)

在電化學系統中，介面間離子之擴散現象十分常見，而 Warburg 阻抗(Z_W)或擴散阻抗用於模擬此種現象，有許多建立在不同假設的表達方式皆用於描述擴散阻抗。在半無限擴散層(semi-infinite diffusion layer)的假設下，阻抗為$Z_W = \frac{1}{Y_0(j\omega)^{0.5}}$，其中係數 Y_0 為擴散導納。擴散阻抗具有相同的實部和虛部，造成在 Nyquist plot 中 45°之相位角。擴散阻抗於等效電路中圖形符號如圖 2-1(d)。

2.4.5 Randles 等效電路

Randles 等效電路為一個由電雙層電容(C_{d1})和進行法拉第反應(Faradic reaction)的阻抗並聯後再與溶液電阻(R_s)串聯而成的電路，廣泛用於電化學阻抗頻譜中對於其阻抗隨頻率變化之解釋。其中時常以電雙層恆相位元件(CPE)代替 C_{d1}，且進行法拉第反應的阻抗常以一串連的電荷轉移阻抗(R_{ct})及擴散阻抗(Z_W)表示，圖 2-1(e)為利用 CPE、R_s、Z_W 及 R_{ct} 構成之典型 Randles 等效電路。

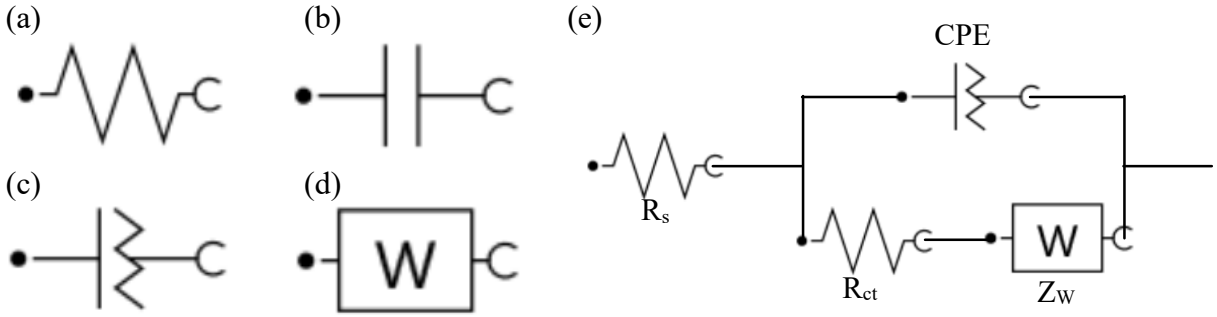


圖 2-1 等效電路模型電路元件 (a)等效電阻 (b)等效電容 (c)等效恆相位元件 (d)等效擴散阻抗 (e)以電雙層恆相位元件構成之 Randles 等效電路

表 2-2 等效電路各元件阻抗值一覽表

元件名稱	符號	阻抗 (Z)
溶液電阻(solution resistance)	R_s	R_s
電荷轉移電阻(charge transfer resistance)	R_{ct}	R_{ct}
電雙層恆相位元件 (electrical double layer constant phase element)	CPE	$\frac{1}{Q_{dl}(j\omega)^n}$
擴散阻抗(Warburg impedance)	Z_W	$\frac{1}{Y_0(j\omega)^{0.5}}$

第三章　研究方法

3.1　實驗儀器與設備

恆溫箱 (Incubator)

電化學分析儀器 (CH Instrument)

抽風櫃 (Fume Hood)

超音波清洗機 (Ultrasonic Cleaner)

旋轉塗佈機 (Spin Coater)

加熱板 (Hot Plate)

曝光機 (功率 6mW/cm^2) (Mask Aligner)

抽真空機 (Vacuumizer)

熱蒸鍍機 (Evaporator)

氧電漿清洗機 (O_2 Plasma)

蠕動幫浦 (Peristaltic Pump)

3.2　實驗材料

標準金電極 (Standard Au Electrode) (半徑 1mm，圓盤型)

鉑電極 (Pt Electrode)

銀/氯化銀電極 (Ag/AgCl Electrode)

氮氣 (N_2)

4 吋晶圓 (4” Wafer)

光罩 (Mask)

鑽石刀

載玻片 (Microscope Slide)

耐熱膠帶 (Heat-Resistant Tape)

金蒸鍍粒 (Au Evaporation Slug)

鉻蒸鍍粒 (Cr Evaporation Slug)

矽膠導管 (Silicon Tube)

3.3 實驗藥品

Mucin1 (MUC1)

MUC1 適體 S2.2 (5'SH-$(CH_2)_6$-GCA GTT GAT CCT TTG GAT ACC CTG G-3')

硫酸 (Sulfuric Acid) (H_2SO_4)

1、0.3、0.05μm 氧化鋁粉末 (Aluminum Slurry)

乙醇 95% (95% Ethanol)

食人魚水 (Piranha Solution) (v/v 3:1 H_2SO_4 /H_2O_2)

赤血鹽 (Potassium Ferricyanide) ($K_3[Fe(CN)_6]$)

氯化鉀 (Potassium Chloride) (KCl)

SELEX 緩衝液(50mM Tris、100mM NaCl、4mM KCl、2.5mM $MgCl_2$・$6H_2O$、1mM $CaCl_2$・$2H_2O$ 溶於去離子水，用 HCl 滴定至 pH = 7.5)

PBS 緩衝液(1.76mM KH_2PO_4、137mM NaCl、2.68mM KCl、8.06mM Na_2HPO_4・$7H_2O$ 溶於去離子水，pH = 7.4)

6-Mercaptohexanol (MCH)

11-Mercaptoundecanoic acid (MUA)

Tween® 20

丙酮 (Acetone)

甲醇 (Methanol)

乙醇 (Ethanol，簡稱 EtOH)

S1813 正光阻 (Positive Photoresist)

HDMS 正光阻附著劑

SU-8 2050 負光阻 (Negative Photoresist)

TMAH (S1813 顯影液(Developer))

PDMS (polydimethylsiloxane) 主劑／硬化劑

3.4 基於標準金電極之適體感測器建構

本研究首先確認以金電極為基底、MUC1 適體 S2.2 為感測元件建構適體感測器之可行性與有效性，圖 3-1 為阻抗式適體感測器製程與 MUC1 量測原理圖。首先將 5'端修飾硫醇基之 S2.2 固定於電極表面，其後利用 MUA 進行 blocking，最後與特定濃度之 MUC1 反應，因 MUC1 與 S2.2 具有親和性及專一性，可增進靈敏度並且與不同蛋白質作區隔。$Fe(CN)_6^{3-/4-}$於每一步將更難到達電極表面，使電荷轉移難度提升、阻抗增加。

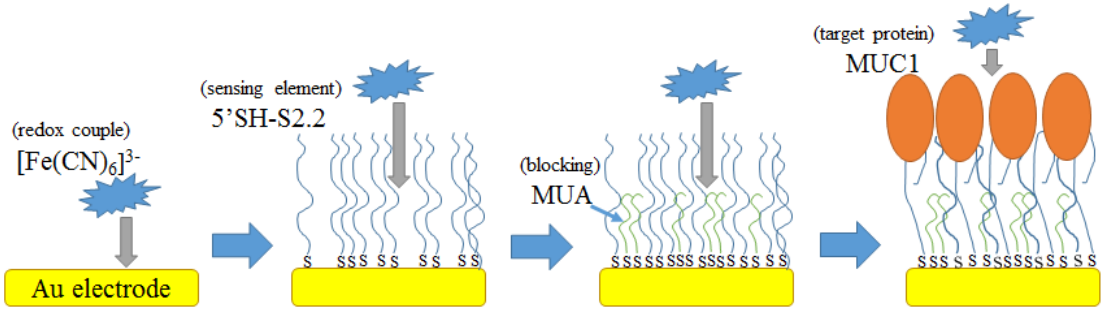


圖 3-1 阻抗式適體感測器製程與 MUC1 量測原理圖

3.4.1 標準金電極研磨與清洗

將培養皿貼上一小塊電極研磨布、並將 1μm 氧化鋁粉末倒於其上，以些許 DIW 潤濕後將電極輕觸以 8 字畫法來回畫 100 圈研磨金電極表面，雖後用 DIW 沖洗。依序以相同步驟套用在 0.3、0.05μm 之氧化鋁粉末上。

研磨完畢後，將金電極置於食人魚水中浸泡 10 分鐘(食人魚水具高度腐蝕性，因此此步驟於抽風櫃中進行)、以 DIW 清洗後利用氮氣吹乾並重複此步驟一次，最後置於 0.5M 硫酸水溶液中並以掃描速率(scan rate)100mV/s、階梯勢(step potential)10mV/step 進行循環伏安法 (Cyclic Voltammetry，簡稱 CV) 分析。

3.4.2 EIS 感測條件與參數

標準金電極之適體感測器之每一步製程及 MUC1 之量測將利用 EIS 進行分析，並以溶於添加 0.1M KCl 之 PBS 緩衝液 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$為氧化還原探針(redox probe)，以鉑電極(Pt)為對電極、銀／氯化銀(Ag/AgCl)電極為參考電極。本研究利用 CH Instrument CHI614B 作為電化學阻抗頻譜分析儀器，在偏壓(bias voltage)0.224V、震幅(amplitude)0.005V、最低頻率 10^{-1}Hz、最高頻率 10^{5}Hz 之條件下進行量測。

3.4.3 DNA 適體 S2.2 固定

本次研究中以 MUC1 適體 S2.2 作為傳感元件[30]，於 5’端利用硫醇基(-SH)先行修飾(在此稱為 5’SH-S2.2)，取出 5’SH-S2.2 先加熱至 95°C 5 分鐘後置於 5°C 回溶 30 分鐘，再透過滴定塗裝法(drop-coating method)將 10μM 10μL 5’SH-S2.2 滴於標準金電極上靜置 17 小時形成自組裝單分子膜(self-assembled monolayer，簡稱 SAM)，隨後浸泡於 0.1% Tween® 20 三分鐘並利用 DIW 沖洗。

3.4.4 MUA Blocking

將標準金電極浸泡 1 小時於 1mM MUA 中後浸泡於 95% EtOH 三分鐘，最後以氮氣吹乾，此步驟可阻擋掉在金電極表面上未被 5’SH-S2.2 覆蓋而裸露之區域，減少其他分子之非專一性吸附。

3.4.5 MUC1 量測

將標準金電極浸泡 1 小時於先前利用 PBS 緩衝液稀釋之 512nM MUC1 中，之後浸泡於 0.1% Tween® 20 三分鐘並利用 DIW 沖洗去除非專一性吸附之 MUC1，最後進行 EIS 量測。

3.5 微型金電極與微流體晶片製作

本研究利用正光阻塗佈於載玻片上，以光罩製造出電極圖形並於熱蒸鍍金屬電極後利用浸泡在丙酮超音波震盪的方式將蒸鍍在光阻上的金屬去除，形成一對稱式正方形微型金電極。利用鋁模倒入 PDMS 翻模成微流道，最後透過夾具將微流道與載玻片夾住的方式製作出微流體微型金電極晶片，其製程示意圖如圖 3-2。

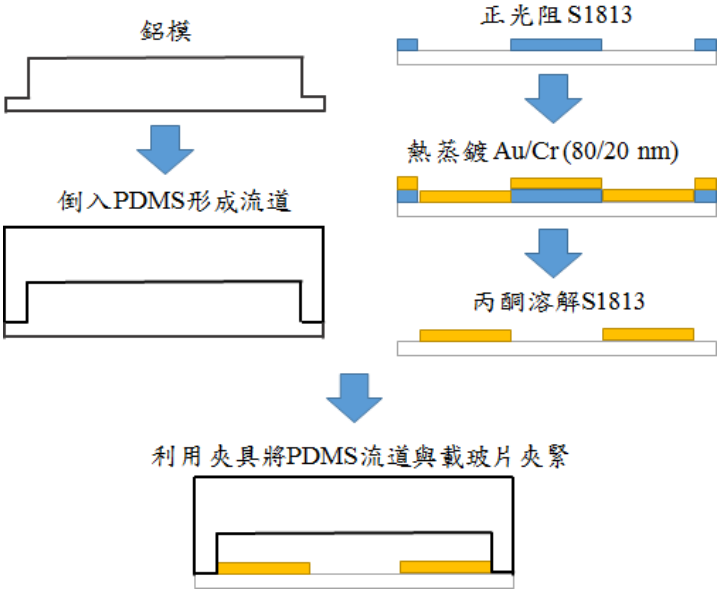
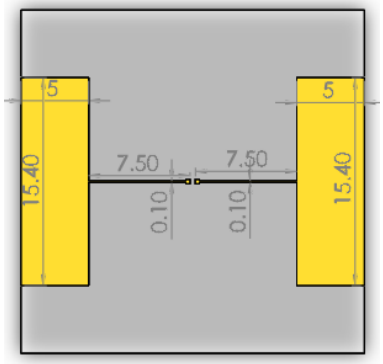


圖 3-2 阻抗式微流體晶片製程

3.5.1 微型金電極設計

微型金電極製作於一以鑽石刀裁切過後、面積 25.4×25.4mm (1×1in)之載玻片上，如圖 3-3，一對 0.3×0.3mm 之對稱式金電極於正中央，並利用 0.1mm 寬之金電極線連到載玻片的兩側以連接至儀器。主要量測區域為正中央之對稱式金電極。

(a)



(b)

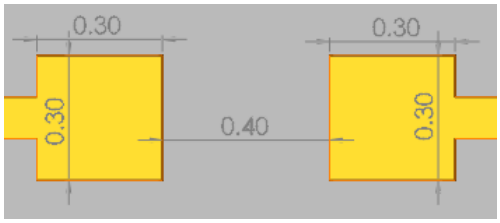


圖 3-3 阻抗式微流體晶片電極設計圖 (a)上視圖 (b)上視圖(放大至中間電極區)

3.5.2 S1813 正光阻塗佈

首先以鑽石刀將載玻片切成一25.4×25.4mm(1×1in)之正方形載玻片，依序將載玻片浸泡於丙酮、甲醇、DIW 中並且各以超音波震盪器震盪 10 分鐘，後用空氣槍吹去表面殘存的液滴並且置於 120°C 加熱版烤乾。將 HDMS 滴於載玻片上以旋轉塗佈機 1000rpm 旋轉 30 秒、120°C 加熱板烤 1 分鐘，再利用玻璃滴管將 S1813 正光阻(保存於 4°C)均勻滴於載玻片上旋轉塗佈 1000rpm 20 秒、4000rpm 60 秒。

以 115°C 軟烤 5 分鐘並置於室溫下冷卻，於曝光機(功率 6mW/cm^2)放上光罩對準後曝光 10 秒，再浸入 TMAH 顯影 1 分鐘，最後利用 DIW 輕沖洗並用 130°C 烤 10 分鐘，完成後將會在載玻片非金屬電極區形成一層 1.3-1.8μm 厚之 S1813 正光阻。

3.5.3 金屬熱蒸鍍

本研究以鉻(Cr)為電極與載玻片間的接著層(adhesive layer)且以金(Au)為電極本身之材料，利用熱蒸鍍方式根據其蒸鍍條件依序將 Cr 20nm、Au 80nm 鍍於載玻片表面，最後將載玻片泡於丙酮置於超音波震盪器震盪 5 分鐘使 S1813 溶解並被震掉後取出，利用空氣槍吹去表面液滴並置於 120°C 烤乾完成微型金電極的製作。

3.5.4 PDMS 微流道設計與製作

PDMS 微流道利用一先前以 CNC 機器加工過之鋁模翻模製成。首先將 PDMS 以 A 劑：B 劑 = 10：1 體積比倒入紙杯中攪拌均勻，利用抽真空機將其中的氣泡抽走後倒入以鋁箔紙包裝好的鋁模中，置於 150°C cure 10 分鐘使 PDMS 變硬，最後利用刀片切割成所需形狀並且打洞，其尺寸如圖 3-4 所示。

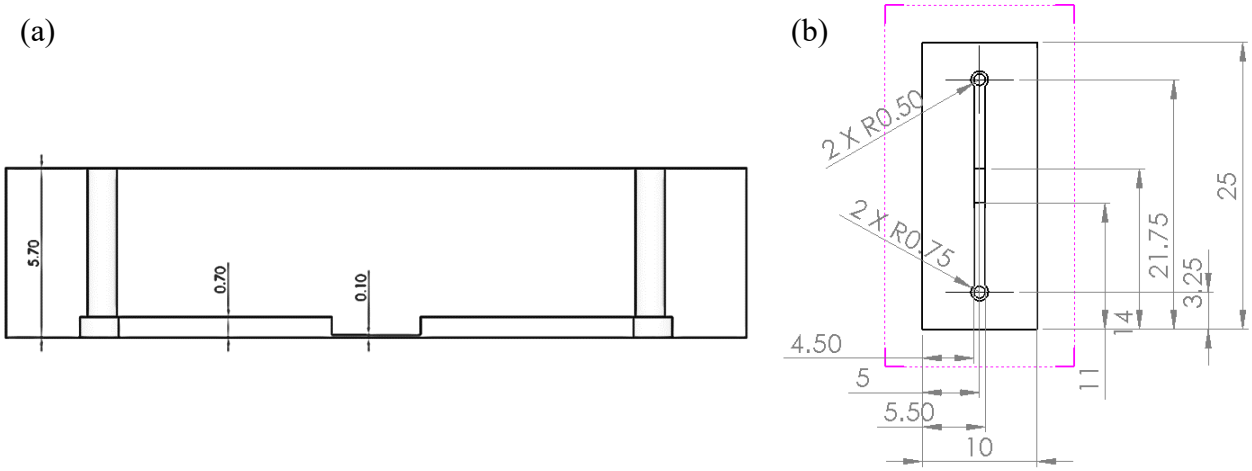


圖 3-4 微流道 PDMS 平面圖 (a)前視圖 (b)上視圖

3.5.5 晶片封裝

因未來有發展流道中流體流過不同區域之電極的可能性，本研究利用 3D 列印的夾具與夾子將 PDMS 緊押在微型金電極載玻片上，因 PDMS 彈性與軟的特性，可使底面平整的 PDMS 流道在液體流經時不出現漏液之情形，製作完成之阻抗式微流體晶片如圖 3-5。

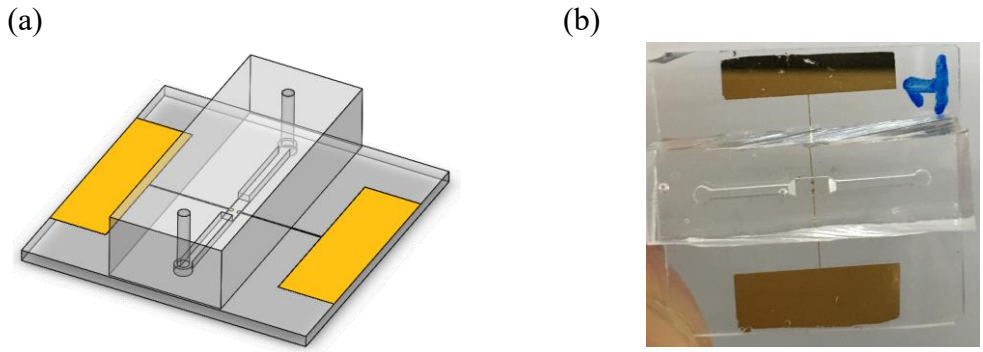


圖 3-5 阻抗式微流體晶片 (a)斜視圖 (b)實體照片

3.6 基於微型金電極之適體感測器建構

3.6.1 裝置儀器架設

本研究利用蠕動幫浦(peristaltic pump)連接矽膠導管、塑膠導管至晶片出口，晶片入口亦以塑膠導管連接至液體存放處。利用負壓方式使晶片於入口處將液體吸入，並且將幫浦液體排出之膠管接回原液體存放處，形成循環回收式液體流動，此方法可減少液體之總使用量。

3.6.2 微流體式 EIS 感測

微型金電極適體感測器每一步製程及 MUC1 之量測將利用 EIS 進行分析，將流速調至 1uL/s，並以溶於添加 0.1M KCl 之 PBS 緩衝液 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$為氧化還原探針，將金電極其中一端接上對電極與參考電極，另一端接上工作電極進行二極式感測。在偏壓 0.224V、震幅 10mV、最低頻率 10^1Hz、最高頻率 10^5Hz 之條件下進行量測。

3.6.3 DNA 適體 S2.2 固定

取出 5’SH-S2.2 先加熱至 95°C 5 分鐘後置於 5°C 回溶 30 分鐘，再將 1μM 5’SH-S2.2 溶於 1mL SELEX 緩衝液中，並且利用上述循環回收式流動將 5’SH-S2.2 流經微流道金電極 13 小時。

3.6.4 MCH Blocking

將 1mM MCH 溶於 10mL 95% EtOH，以循環回收方式 blocking 1 小時，再於流道中用 EtOH 以非回收式、流速 5μL/s 之條件流過將非專一性吸附之 MCH 洗去。

3.6.5 MUC1 量測

將 MUC1 利用 PBS 緩衝液由 1000nM 以 4 倍稀釋至 0.98nM 且每管總體積 750μL，以循環回收方式流過 45 分鐘後直接進行 EIS 量測。本研究亦以凝血酶(thrombin)作為對照組進行專一性分析。

3.7 對稱式微型金電極等效電路模型匹配

本研究利用兩個與溶液電阻(solution resistance，簡稱 R_s)串聯之 Randles circuit 作為等效電路模型(圖 3-6)，其中以 R_{ct} 為電荷轉移電阻、等相位元件(CPE)為兩電極表面出現之不完美電容、Y_0 為 Warburg element，與等效電路模型相關之介紹詳見 2.4 章節。

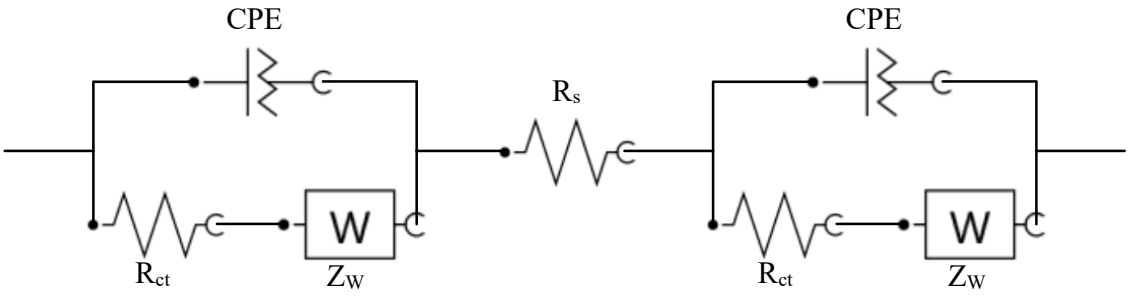


圖 3-6 對稱式微型金電極等效電路模型

利用 EIS 可得到 Bode plot，即阻抗絕對值($|Z|$)與相位角($\emptyset$)在不同頻率(f)下之變化作圖，本研究使用 Bode plot 與一開發之等效電路模型元件參數匹配程式，找到使匹配誤差 ε 最小之各元件參數值，其中 ε 定義為：

$$\varepsilon = w_{|Z|/\emptyset}\sum_{i=1}^{n_f}[\log(\frac{|Z|_{cal,i}}{|Z|_{in,i}})]^2 + \sum_{i=1}^{n_f}(\emptyset_{cal,i} - \emptyset_{in,i})^2 \qquad \text{式 3-1}$$

$|Z|_{cal,i}$為在一隨意給定之 Q_{dl}、n、R_{ct}、Y_0、R_s 下在第 i 個頻率(f_i)下計算出之$|Z|$，$|Z|_{in,i}$為利用實驗數據得到且輸入進程式、在第 i 個頻率下之$|Z|$；$\emptyset_{cal,i}$為在一隨意給定之 Q_{dl}、n、R_{ct}、Y_0、R_s 下在第 i 個頻率(f_i)下計算出之$\emptyset$，$\emptyset_{in,i}$為利用實驗數據得到且輸入進程式、在第 i 個頻率下之$\emptyset$，總共有n_f個頻率值，$w_{|Z|/\emptyset}$為誤差權重、可調整之並改變$|Z|$與$\emptyset$在參數匹配時的相對重要性。因|Z|隨頻率變化範圍在幾個數量級之間而相位角之範圍為-90至$90°$，因此將計算出的數值與實驗數值相除並取對數而後平方得到單一頻率之誤差。

等效電路模型元件參數匹配程式之程式碼於附錄 S.1 中。

第四章　結果與討論

4.1　基於標準金電極之適體感測器建構

4.1.1　研磨與清洗之 CV 分析

在利用氧化鋁粉末研磨與食人魚水清洗完標準金電極後，利用 CV 所得到循環伏安圖如圖 4-1，可見裸標準金電極於 1.2V 與 1.5V 間具有多個重疊特徵氧化峰，而金的特徵還原峰於 0.94V 清晰而見，符合文獻中所提及[47]，顯示清洗完畢之標準金電極表面具有足夠程度之清潔與平整性且可進行後續的製程。

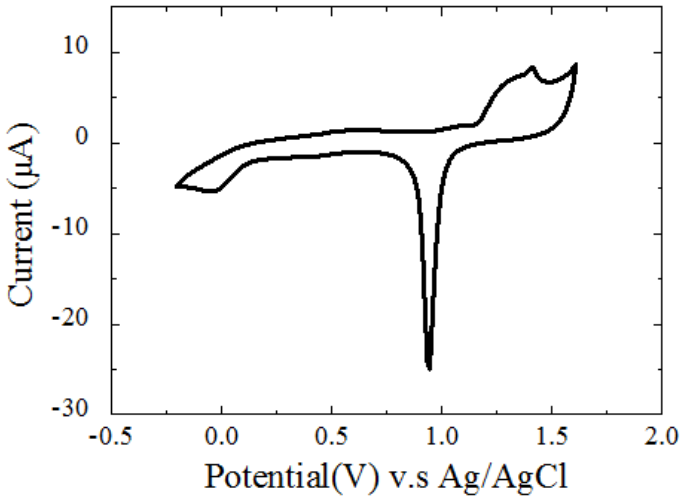


圖 4-1 裸標準金電極於 0.5M 硫酸水溶液之 CV 圖，掃描速率 100mV/s、階梯勢 10mV/step

4.1.2　適體感測器製程與 MUC1 之 EIS 感測分析

利用文獻[31]所使用修正過後的 Randles 等效電路模型進行 EIS 量測數據之電路元件參數匹配，此電路包含溶液電阻(R_s)、電荷轉移電阻(R_{ct})、電雙層恆相位元件(CPE)以及擴散阻抗(Z_W)；其中 R_{ct} 可以直接靈敏地隨電極表面特性改變而有所變化[44]，因此針對 R_{ct} 進行比較分析。Randles 等效電路於 Nyquist plot 中低頻率主要為擴散限制反應(diffusion limited process)、高頻率主要為電荷轉移限制反應(charge transfer limited process)，且圖中每一條曲線半圓越大代表 R_{ct} 越大[48]。

利用標準金電極製作 MUC1 適體感測器與 MUC1 量測之 Nyquist plot 於圖 4-2，當標準金電極研磨清洗完畢時$R_{ct} = 190.4\Omega$，且於 Nyquist plot 內有一極小半圓(因比例關係不可見於圖 4-2 內)，顯示 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$在電極表面有極快的電荷轉移速率。將 10μM 10μL 5'SH-S2.2 滴於電極表面 17 小時後測得$R_{ct} = 13282.5\Omega$，相較於裸金電極有大幅增加，顯示 5'SH-S2.2 有成功固定於金電極表面並且形成自組裝單分子膜(SAM)。1mM MUA 於電極表面 Blocking 1 小時後$R_{ct} = 13744.0\Omega$，更加地降低電荷轉移速率。

最後，512nM MUC1 與適體結合 1 小時過後$R_{ct} = 50125.0\Omega$，更劇烈阻擋電荷轉移，顯示此適體感測器確實能夠偵測 MUC1，雖至此一階段無法確認其靈敏度與專一性，然此結果初步驗證利用金電極進行適體感測器製程與 MUC1 偵測的可行性與有效性。

另外溶液阻抗(R_s)平均值為174.1Ω，此數值將於 4.4.1 與微流體晶片之 R_s 進行比較。

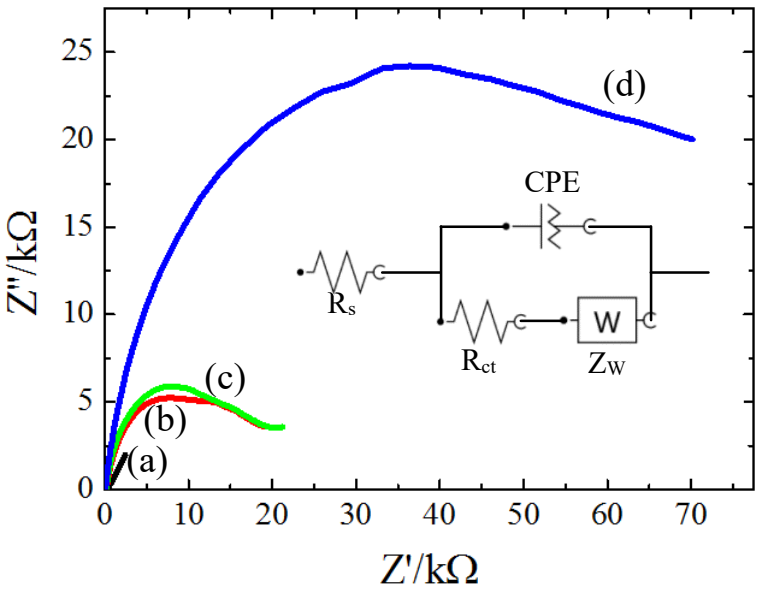


圖 4-2 利用標準金電極製作 MUC1 適體感測器與 MUC1 量測 Nyquist plot (a)裸金電極 (b)金/適體 (c)金/適體/MUA (d) 金/適體/MUA 電極浸於 512nM MUC1 1 小時

4.2 對稱式微型金電極

4.2.1 流速、偏壓與震幅對 EIS 之影響分析

本研究於阻抗式微流體晶片製作完成後、適體感測器製程開始前先進行流道內流速、偏壓與震幅對阻抗影響之分析。其中流速有 1μL/s 及 5μL/s，偏壓(bias voltage)有 0V 及 0.224V，震幅(voltage amplitude，符號 A)有 0.5mV、1mV、5mV、10mV、50mV 及 100mV。

圖 4-3 為流速 1μL/s、偏壓 0.224V 下針對不同六種震幅進行 EIS 分析之 Bode plot，可見(a)中以震幅越大時阻抗絕對值隨頻率之改變大致趨向一平整之直線。然而在(b)中，震幅 50mV 及 100mV 時、相位角在 10^2-10^4Hz 間具有明顯上升(趨近 0)且不平整之斷層，且唯有 10mV 在頻率大於 10^2Hz 時呈現一平整的曲線。因此本研究針對對稱式微型金電極之 EIS 量測之震幅皆使用 10mV。

此外針對不同的流速以及偏壓，利用與上述相同的方法找出一最適值，發現在流速為 1μL/s 以及偏壓為 0.224V 之組合下量測出之 Bode plot 曲線最為平整(資料未列出)，因此亦利用上述二值作為後續 EIS 量測之參數。

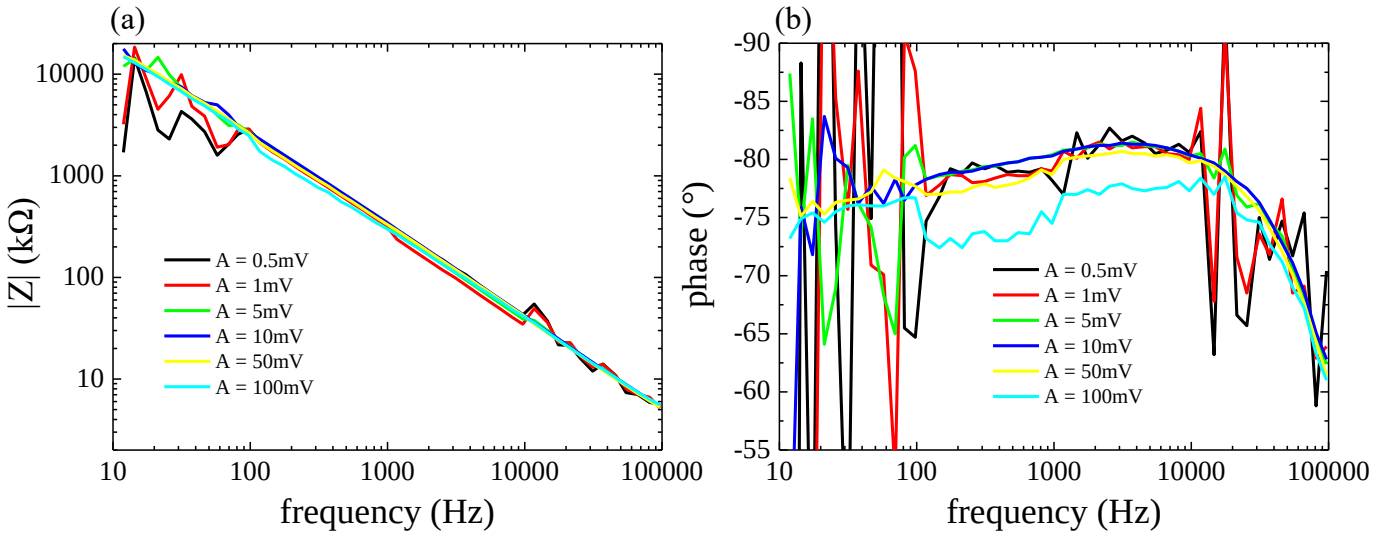


圖 4-3 流速 1μL/s、偏壓 0.224V 下針對不同六種震幅進行 EIS 分析之 Bode plot

(a)阻抗絕對值與頻率關係圖 (b)相位角與頻率關係圖

4.2.2 適體感測器製程與 MUC1 之 EIS 感測分析

利用阻抗式微流體晶片製作MUC1適體感測器與MUC1偵測的每一個步驟中，其 EIS 量測結果之 Bode plot 呈現於圖 4-4，(a)裡面裸金電極(Bare)與 5'SH-S2.2 適體固定後電極之阻抗隨頻率之變化幾乎相同，另外 MCH blocking 後與 MUC1 偵測之阻抗隨頻率變化亦幾乎相同；(b)裡面可見裸金電極與 5'SH-S2.2 相位角走勢於高頻率幾乎重疊，在低頻率則 5'SH-S2.2 相位角些許變大(趨近 0)；(c)為(b)中藍色虛線區域之放大圖，可見相位角大致隨 MUC1 濃度增大而變大(趨近 0)。

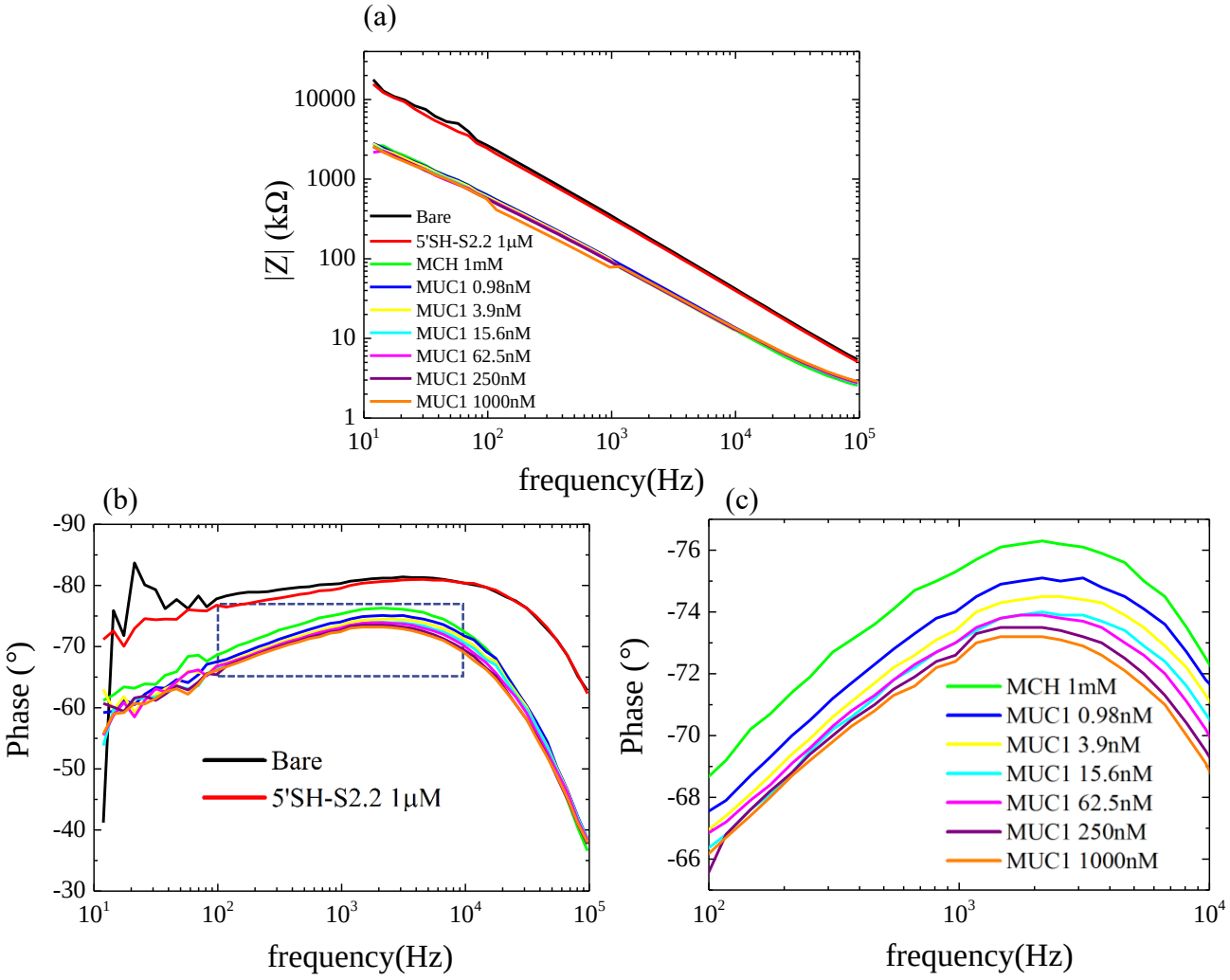


圖 4-4 利用微型金電極製作 MUC1 適體感測器與 MUC1 量測 Bode plot

(a)阻抗絕對值與頻率關係圖 (b)相位角與頻率關係圖 (c)相位角與頻率關係圖(放大圖)

又圖 4-4(c)中可知於 10^2-10^4Hz 間相位角之變化量大致與取對數之 MUC1 濃度成線性關係，因此希望藉此找出相位角對於 MUC1 濃度之靈敏度與其偵測極限。利用與 1mM MCH 反應 1 小時後之微型金電極相位角為基準(baseline)並以此與 1000nM MUC1 反應後之微型金電極的相位差求得與頻率的關係；另外將不同頻率下、相位角與取對數之 MUC1 濃度的關係進行線性回歸分析，得到相關係數的平方(R^2)與頻率之關係如圖 4-5。

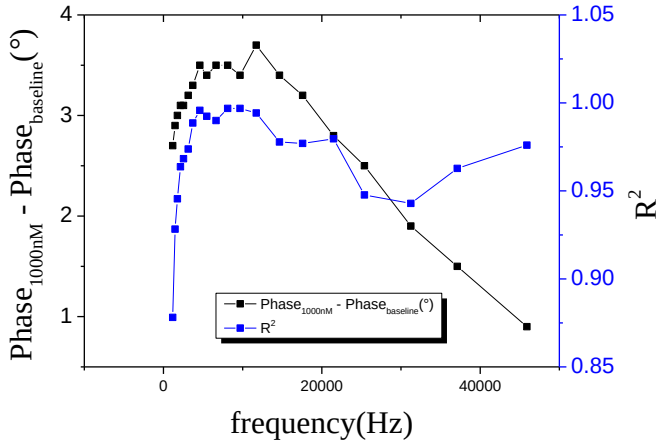


圖 4-5 電化學阻抗頻譜中頻率與
1000nM MUC1 和基準的相位差及相關係數的平方 R^2 之關係圖

其中取相關係數的平方最高的幾個頻率(8105、9668Hz)，再從中取相位差最大的一個頻率(8105Hz)，作出相位角與 MUC1濃度之關係圖，如圖4-6。可從圖中計算得偵測極限(LOD)為0.42nM(檢量線與基準線相交處濃度之3倍)、靈敏度(SEN)為 0.92°/log(nM)。

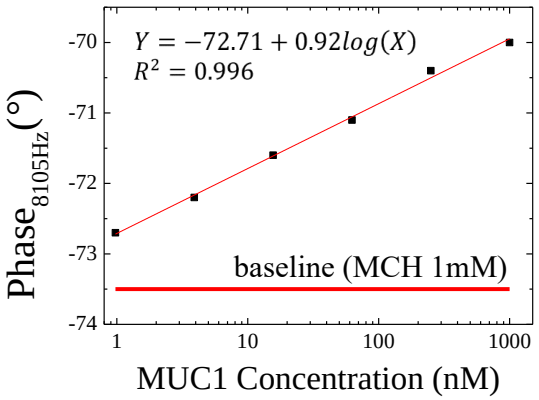


圖 4-6 電化學阻抗頻譜 8105Hz 下 MUC1 濃度與相位角檢量線關係圖

相位角(Ø)於阻抗(Z)中之定義為 Nyquist plot 中(Re(Z), Im(Z))與實數軸所構成的夾角，即 $\tan\emptyset = \frac{Im(Z)}{Re(Z)}$ ，故相位角相較於阻抗更難以解釋其電學特性，需要利用等效電路模型求得各元件之參數值並且尋找其規律。

4.3 對稱式微型金電極等效電路模型之數據分析

本研究利用 3.7 所提及等效電路參數匹配方式尋找電路中各元件最佳參數值，其中各元件阻抗值如表 2-2；期望藉所匹配出各元件參數隨與不同 MUC1 濃度之溶液反應的變化，進一步探討微流體晶片中電極、溶液之電性改變。

基於 4.2.2 中所發現相位角與取對數之 MUC1 濃度具線性關係，在以下之參數匹配皆尋找元件參數值與取對數之 MUC1 濃度之線性回歸線。另以 thrombin 為對照組，此方法可初步探討此適體感測器針對 MUC1 之專一性。

4.3.1 溶液電阻(R_s)

溶液電阻(solution resistance，簡稱 R_s)描述兩電極間溶液所含電阻，其與取對數之 MUC1 或 thrombin 濃度值關係圖如圖 4-7。其數值皆落於 1500-2000Ω 間，又針對 MUC1 濃度進行線性回歸分析，結果為一條趨近平行之直線(相關係數$R = -0.00287$)。產生此結果原因為 EIS 感測時微流道所流過之溶液成分與流速皆固定，而電極發生之電性改變亦不會影響 R_s。

與 4.1.2 標準金電極適體感測器之 R_s(174.1Ω)比較，微型金電極適體感測器 R_s 約略多了一個數量級。對於一圓盤電極$R_s = (4\kappa r)^{-1}$，其中 r 為電極半徑、κ為溶液電導率[49]；因微型金電極兩電極面積和 0.18mm^2、標準金電極電極面積 3.14mm^2，則 R_s 之差異主要來自於兩電極等效半徑的不同。

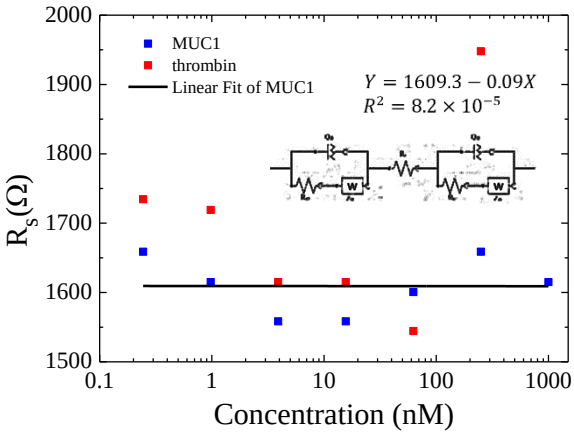


圖 4-7 等效電路中溶液電阻(R_s)與蛋白質濃度關係圖及回歸線

4.3.2 電荷轉移電阻(R_{ct})

電荷轉移電阻(R_{ct})與電極表面固定之物質阻擋 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$行電荷轉換的程度相關，亦與電極表面粗糙程度有關[44]，本研究中以微型金電極適體感測器與不同濃度 MUC1 或 thrombin 反應後，其 EIS 分析後之數據以等效電路參數匹配方式得出的 R_{ct} 與取對數濃度關係作圖如圖 4-8。

可見 R_{ct} 大致隨 MUC1 濃度增加而降低，然而與 thrombin 並無明顯關係，其數值約略落在 2.8-6.0MΩ 間。

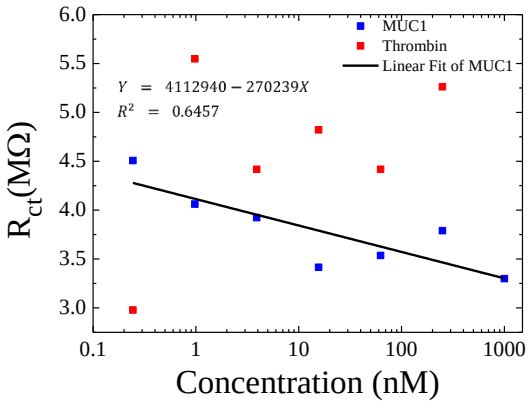


圖 4-8 等效電路中電荷轉移電阻(R_{ct})與蛋白質濃度關係圖及回歸線

4.3.3 電雙層恆相位元件(CPE)

等效電路中之恆相位元件(CPE)阻抗值為$Z_{CPE} = \frac{1}{Q_{dl}(j\omega)^n}$ (見 2.4)，可於等效電路中以 CPE 代表電極表面之不完美電容的電性，其中 Q_{dl} 可比擬一不完美電容值，n 為不受頻率影響之一參數($0 \le n \le 1$)[46]。當$n = 1$則$Z_{CPE} = \frac{1}{j\omega Q_{dl}}$即同電容之阻抗值，當$n = 0$則$Z_{CPE} = \frac{1}{Q_{dl}} = R_{dl}$即同電阻之阻抗值。

本研究中以微型金電極適體感測器與不同濃度 MUC1 或 thrombin 反應後，其 EIS 分析後之數據以等效電路參數匹配方式得出的 Q_{dl} 及 n 與取對數濃度關係作圖如圖 4-9。可見 Q_{dl} 皆落於 60-90nF，n 皆落於 0.81-0.86，且不論 MUC1 或是 thrombin 其取對數之濃度與 Q_{dl} 及 n 之相關係數 R 皆大於 0.9 (R^2>0.81)，具高度相關性。

針對 MUC1 及 thrombin 分別對其取對數之濃度與 Q_{dl} 及 n 進行線性回歸分析，

可見 Q_{dl} 隨 MUC1 與 thrombin 濃度增加而變大，證實蛋白質固定於電極表面上使電極能儲存更多電荷；且 MUC1 不論 Q_{dl} 本身或是 Q_{dl} 隨濃度上升增加的幅度皆較 thrombin 大，Q_{dl} 隨 MUC1 濃度變化之靈敏度(SEN)為 6.19(nF/Hz^{n-1})/log(nM)，則此適體感測器對於 MUC1 專一性略大於 thrombin。

以次方係數 n 而言，n 隨 MUC1 或 thrombin 濃度增加而降低，顯示此不完美電容隨濃度增加而使之特性更趨近於電阻，又 MUC1 相較於 thrombin 其 n 值為小。

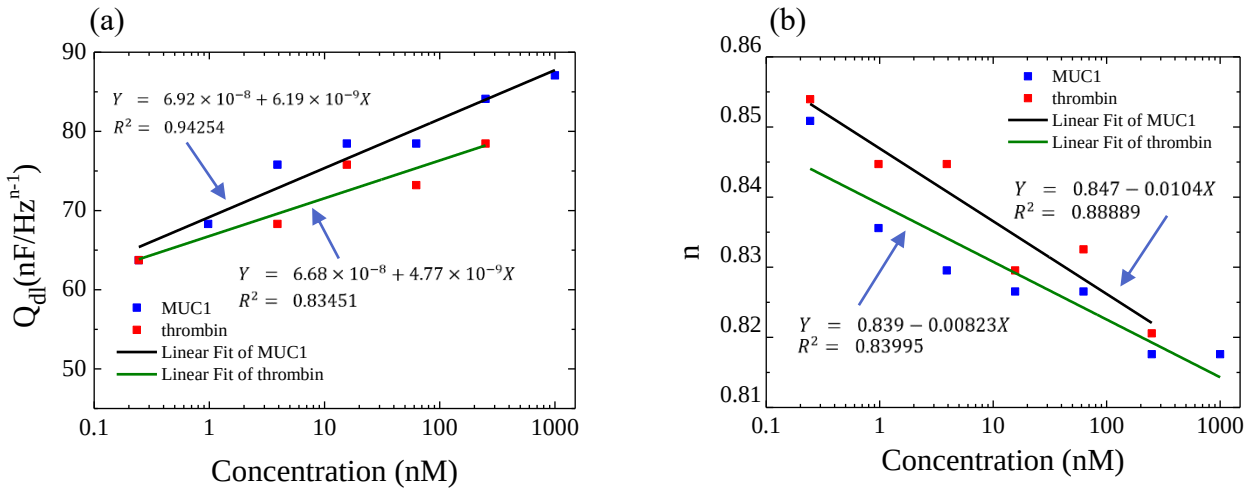


圖 4-9 等效電路中電雙層恆相位元件阻抗中 (a)Q_{dl} 及(b)n 與蛋白質濃度關係圖及回歸線

4.3.4 擴散阻抗(Z_W)

擴散阻抗之定義為$Z_W = \frac{1}{Y_0(j\omega)^{0.5}}$，於 Nyquist plot 中為一條相位角為 45°之直線，然而本研究中參數匹配後 Y_0 值皆為參數匹配設定中可能的最小值或最大值。初步推測原因為微流道中，因電極間之距離只有 0.4mm 且微流道高度僅 0.1mm，較無標準金電極適體感測器中兩電極距離夠大的特徵可使擴散現象得以主導；又因利用微型金電極適體感測器測量 MUC1 時頻率範圍為 10^1-10^5Hz，因此其反應主要為高頻範圍之電荷轉移限制反應(charge transfer limited process)，使數據中沒有出現 Z_W 主導的變化，進而使參數匹配時出現數值過於極端之情形，此亦可能影響 R_{ct} 之值。

第五章　結論與未來展望

5.1　結論

本研究利用以微製程方式製作之阻抗式微流體晶片，進而發展成能以 MUC1 適體偵測 MUC1 之適體感測器，其總尺寸約25.4 × 25.4 × 6.7mm。達到簡單、免標記、降低檢體與試劑用量的目的。

使用標準金電極以及微型金電極皆成功偵測 MUC1，針對標準金電極可獲得以下結論：

1. 利用氧化鋁研磨與食人魚水清洗完畢之標準金電極其於 0.5M 硫酸水溶液中於 1.2-1.5V 之間出現數個重疊金特徵氧化鋒，且於 0.94V 出現一明顯可見之金特徵還原峰。顯示清洗完畢之標準金電極表面具有足夠程度之清潔與平整性且可進行後續的製程。
2. 應用於 MUC1 適體感測器之製程與 MUC1 偵測上，電化學阻抗頻譜(EIS)分析後其電荷轉移電阻(R_{ct})之值依序為：裸金電極 190.4Ω、金/適體電極 13282.5Ω、金/適體/MUA 電極 13744.0Ω 且與 512nM MUC1 反應 1 小時後 50125.0Ω。

針對使用微型金電極可獲得以下結論：

3. 裸微型金電極其流速於1μL/s、施加偏壓於0.224V時，震幅於10mV進行EIS分析之Nyquist plot及Bode plot的曲線較其它震幅平整。
4. 本研究之微型金電極適體感測器進行MUC1偵測，從Bode plot計算其偵測極限可達0.42nM、靈敏度為0.92°/log(nM)。
5. 應用於 MUC1 偵測之等效電路模型中，其溶液電阻(R_s)幾乎不隨濃度改變。電雙層恆相位元件(CPE)中 Q_{dl} 隨取對數之 MUC1 濃度變大而以線性關係上升、n 則以線性關係降低。

5.2 未來展望

本研究以標準金電極製作 MUC1 適體感測器時因只有量測單一濃度，無法測量與比較出其靈敏度與偵測極限；又因無利用對照組而無法量測其專一性。故希望於未來加入以上兩種量測，達到標準金電極更進一步之偵測分析。

另外因在微製程製作微型金電極時程序參數未最佳化，造成金屬蒸鍍後仍可利用膠帶黏貼撕下並隨之脫落。而微型金電極推測洗滌程序簡單，造成 MUC1 以及 thrombin 過多非專一性吸附於微流道壁面導致量測之專一性偏低。

本研究將此定義為第一代阻抗式微流體晶片適體感測器(Microfluidic Impedimetric Aptasensor 1st Generation，簡稱 MIA v.1)，未來期待於每一代演進針對不同之功能(即時量測、多工、智慧型手機應用)以及不同之量測能力(偵測極限、靈敏度、專一性)進行改善，進而發展出更高階之次世代產品。

參考文獻

1. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter., *Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* 2002, New York: Garland Science.
2. Marin, F., et al., *Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution.* Current Topics in Developmental Biology, 2007. **80**: p. 209-276.
3. Nath, S. and P. Mukherjee, *MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression.* Trends in Molecular Medicine, 2014. **20**(6): p. 332-342.
4. Niv, Y., *MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2008. **14**(14): p. 2139-2141.
5. Macdonald, J.R. and E. Barsoukov, *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications.* History, 2005. **1**(8).
6. Liu, Y., et al., *Multilayer-Assembled Microchip for Enzyme Immobilization as Reactor Toward Low-Level Protein Identification.* Analytical Chemistry, 2006. **78**(3): p. 801-808.
7. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.* Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-822.
8. Brody, E.N. and L. Gold, *Aptamers as therapeutic and diagnostic agents.* Reviews in Molecular Biotechnology, 2000. **74**(1): p. 5-13.
9. Shieh, Y.-A., et al., *Aptamer-Based Tumor-Targeted Drug Delivery for Photodynamic Therapy.* ACS Nano, 2010. **4**(3): p. 1433-1442.
10. Hattrup, C.L. and S.J. Gendler, *Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins.* Annual Review of Physiology, 2008. **70**(1): p. 431-457.
11. Yolken, R.H., et al., *Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis.* Journal of Clinical Investigation, 1992. **90**(5): p. 1984-1991.
12. Schroten, H., et al., *Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction.* Infection and Immunity, 1992. **60**(7): p. 2893-2899.
13. Betge, J., et al., *MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in colorectal cancer: expression profiles and clinical significance.* Virchows Archiv, 2016. **469**(3): p. 255-265.
14. Spicer, A.P., et al., *Delayed Mammary Tumor Progression in Muc-1 Null Mice.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(50): p. 30093-30101.
15. Besmer, D.M., et al., *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA) mice lacking*

Mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. Cancer research, 2011. **71**(13): p. 4432-4442.

16. Tinder, T.L., et al., *MUC1 Enhances Tumor Progression and Contributes Toward Immunosuppression in a Mouse Model of Spontaneous Pancreatic Adenocarcinoma.* The Journal of Immunology, 2008. **181**(5): p. 3116.
17. Sahraei, M., et al., *MUC1 regulates PDGFA expression during pancreatic cancer progression.* Oncogene, 2012. **31**(47): p. 4935-4945.
18. Chaika, N.V., et al., *MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(34): p. 13787-13792.
19. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
20. Yin, L., S. Kharbanda, and D. Kufe, *Mucin 1 Oncoprotein Blocks Hypoxia-inducible Factor 1α Activation in a Survival Response to Hypoxia.* Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(1): p. 257-266.
21. Treon, S.P., et al., *Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma.* Blood, 2000. **96**(9): p. 3147.
22. Simms, et al., *MUC1 mucin as a tumour marker in bladder cancer.* BJU International, 1999. **84**(3): p. 350-352.
23. Tomčík, P., *Microelectrode Arrays with Overlapped Diffusion Layers as Electroanalytical Detectors: Theory and Basic Applications.* Sensors (Basel, Switzerland), 2013. **13**(10): p. 13659-13684.
24. Yi-Yu, L., et al., *Cell growth characterization using multi-electrode bioimpedance spectroscopy.* Measurement Science and Technology, 2013. **24**(3): p. 035701.
25. Yeh, C.H., et al., *Electro-microchip DNA-biosensor for bacteria detection.* Analyst, 2010. **135**(10): p. 2717-2722.
26. Banada, P.P., et al., *Performance evaluation of a low conductive growth medium (LCGM) for growth of healthy and stressed Listeria monocytogenes and other common bacterial species.* International Journal of Food Microbiology, 2006. **111**(1): p. 12-20.
27. Tura, A., et al., *Impedance spectroscopy of solutions at physiological glucose concentrations.* Biophysical Chemistry, 2007. **129**(2): p. 235-241.
28. Lim, T., et al., *Microfluidic biochips for simple impedimetric detection of thrombin based on label-free DNA aptamers.* BioChip Journal, 2017. **11**(2): p. 109-115.
29. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential*

enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science, 1990. **249**(4968): p. 505.

30. Ferreira, C.S.M., C.S. Matthews, and S. Missailidis, *DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers.* Tumor Biology, 2006. **27**(6): p. 289-301.
31. Radi, A.-E., et al., *Reusable Impedimetric Aptasensor.* Analytical Chemistry, 2005. **77**(19): p. 6320-6323.
32. Vericat, C., et al., *Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system.* Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1805-1834.
33. Jin, S., et al., *A Novel Impedimetric Microfluidic Analysis System for Transgenic Protein Cry1Ab Detection.* 2017. **7**: p. 43175.
34. Jiang, J., et al., *Smartphone based portable bacteria pre-concentrating microfluidic sensor and impedance sensing system.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **193**: p. 653-659.
35. Ashish, V.J., C. Joan, and Z. Jiang, *An impedimetric approach for accurate particle sizing using a microfluidic Coulter counter.* Journal of Micromechanics and Microengineering, 2011. **21**(4): p. 045036.
36. Wang, Y., et al., *Development of an aptamer-based impedimetric bioassay using microfluidic system and magnetic separation for protein detection.* Biosensors and Bioelectronics, 2014. **59**: p. 106-111.
37. Zou, Z., S. Lee, and C.H. Ahn, *A Polymer Microfluidic Chip With Interdigitated Electrodes Arrays for Simultaneous Dielectrophoretic Manipulation and Impedimetric Detection of Microparticles.* IEEE Sensors Journal, 2008. **8**(5): p. 527-535.
38. Nadja E Solis-Marcano, M.L.-N., Brismar Pinto-Pacheco, Carlos R. Cabrera, *Capacitive Biosensing Technique for the Detection of DNA Modification and Hybridization Process Using Tailored Interdigital Microelectrode Arrays.* 46th International Conference on Environmental Systems, 2016(Electrochemistry Capacitance).
39. Capaldo, P., et al., *Circulating Disease Biomarker Detection in Complex Matrices: Real-Time, In Situ Measurements of DNA/miRNA Hybridization via Electrochemical Impedance Spectroscopy.* ACS Sensors, 2016. **1**(8): p. 1003-1010.
40. Vandenryt, T., et al., *Combining Electrochemical Impedance Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance into one Simultaneous Read-Out System for the Detection of Surface Interactions.* Sensors (Basel, Switzerland), 2013. **13**(11): p. 14650-14661.

41. Chiriaco, M.S., et al., *EIS microfluidic chips for flow immunoassay and ultrasensitive cholera toxin detection.* Lab on a Chip, 2011. **11**(4): p. 658-663.
42. Tweedie, M., et al. *Fabrication of impedimetric sensors for label-free Point-of-Care immunoassay cardiac marker systems, with passive microfluidic delivery*. in *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 2006.
43. Zou, Z., et al., *Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement.* Sensors and Actuators A: Physical, 2007. **136**(2): p. 518-526.
44. Xu, D., et al., *Label-Free Electrochemical Detection for Aptamer-Based Array Electrodes.* Analytical Chemistry, 2005. **77**(16): p. 5107-5113.
45. J. O'M. Bockris, A.K.N.R., M. Gamboa-Aldeco, *Modern Electrochemistry 2A. Fundamentals of Electrodics.* 2000. **Second Edition**: p. p.1083.
46. Kochowski, S. and K. Nitsch, *Description of the frequency behaviour of metal–SiO2–GaAs structure characteristics by electrical equivalent circuit with constant phase element.* Thin Solid Films, 2002. **415**(1): p. 133-137.
47. Ma, W., et al., *Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system.* Nat. Protocols, 2013. **8**(3): p. 439-450.
48. Aurbach, D., et al., *Common Electroanalytical Behavior of Li Intercalation Processes into Graphite and Transition Metal Oxides.* Journal of The Electrochemical Society, 1998. **145**(9): p. 3024-3034.
49. Autolab. *Autolab Application Note EIS03 - Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Part 3 – Data Analysis* 2011 7/1; Available from: http://www.metrohm-autolab.com/download/Applicationnotes/Autolab_Application_Note_EIS03.pdf.

附錄

S.1 等效電路模型匹配程式碼

```
#include<cstdio>
#include<cmath>
#define pi 3.14159265
const int MAXN = 10010; //最多能夠輸入的頻率數量
double freq[MAXN],inz[MAXN],inp[MAXN];
      //儲存第 i 個頻率之頻率值、實驗得到並且輸入的|Z|、相位角

int main(){
   //宣告變數
   int nf,i;
   double rct,rs,qdl,w,n; //
   double rct_l,rct_h,rs_l,rs_h,qdl_l,qdl_h,w_l,w_h,n_l,n_h;
   int rct_n,rs_n,qdl_n,w_n,n_n,progress;
   double rct_r,rs_r,qdl_r,w_r,n_r;
   double rcti,rsi,qdli,wi,ni;

   double errabs,errph,tmperr;
   double A,Ac,As,B,Brct,x,y,re,im,abs,ph;
   double abs_to_ph_weight;
   double best_rct,best_rs,best_qdl,best_err,best_w,best_n;

   //從與程式同一個資料夾的 in.txt 輸入數據以及各元件參數範圍
   freopen("in.txt","r",stdin);
   scanf("%d",&nf);
   printf("number of freq: %d\n",nf);

   scanf("%d%d%d%d%d",&rct_n,&rs_n,&qdl_n,&w_n,&n_n);
   printf("rct_cutn rs_cutn qdl_cutn w_cutn:\n%d, %d, %d, %d, %d\n",rct_n,rs_n,qdl_n,w_n,n_n);

   scanf("%lf%lf%lf%lf%lf%lf%lf%lf%lf%lf",&rct_l,&rct_h,&rs_l,&rs_h,&qdl_l,&qdl_h,&w_l,&w_h,&n_l,&n_h);
   printf("min max range of rct, rs, qdl(uF^(1/n)), w, n:\n%lf, %lf, %lf, %lf, %lf, %lf, %lf, %lf, %lf, %lf\n",
            rct_l,rct_h,rs_l,rs_h,qdl_l*1e6,qdl_h*1e6,w_l,w_h,n_l,n_h);

   scanf("%lf",&abs_to_ph_weight);
   printf("|Z| to phase weight: %lf\n",abs_to_ph_weight);

   printf("Frequency(1/s)    |Z|(Ohm)    Phase(deg):\n");
   for(i=0;i<nf;i++)
      scanf("%lf%lf%lf",&freq[i],&inz[i],&inp[i]);

   rct_r = pow(rct_h/rct_l,1/double(rct_n))+0.00001;
   rs_r = pow(rs_h/rs_l,1/double(rs_n))+0.00001;
   qdl_r = pow(qdl_h/qdl_l,1/double(qdl_n))+0.00001;
   w_r = pow(w_h/w_l,1/double(w_n))+0.00001;
   n_r = pow(n_h/n_l,1/double(n_n))+0.00001;
   printf("rct_r=%lf, rs_r=%lf, qdl_r=%lf, w_r=%lf, n_r=%lf\n",rct_r,rs_r,qdl_r,w_r,n_r);

   printf("Done input\n"),

   //計算最佳參數值
   best_err = 1e9;
   progress=0;
```

```
for(rcti=rct_l;rcti<=rct_h;rcti*=rct_r)
   for(rsi=rs_l;rsi<=rs_h;rsi*=rs_r,progress++){
      printf("Progresss : %.1lf%%\n",double(progress)*100/rs_n/rct_n);
      for(qdli=qdl_l;qdli<=qdl_h;qdli*=qdl_r){
         for(wi=w_l;wi<=w_h;wi*=w_r){
            for(ni=n_l;ni<=n_h;ni*=n_r){
               errabs=errph=0.0;
               for(i=0;i<nf;i++){
                  //對稱式金電極

                  B = 1/wi/sqrt(2*freq[i]);
                  Brct = B + rcti;
                  A = 1/qdli/pow(freq[i],ni);
                  Ac = A*cos(ni*pi/2);
                  As = A*sin(ni*pi/2);

                  x = Brct/(pow(Brct,2.0)+pow(B,2.0)) + Ac/A/A;
                  y = B/(pow(Brct,2.0)+pow(B,2.0)) + As/A/A;

                  re = 2*x/(x*x+y*y)+rsi;
                  im = -2*y/(x*x+y*y);
                  abs = sqrt(re*re+im*im);
                  ph = atan(im/re)*180/pi;

                  //更新誤差值
                  errabs+=pow(log10(abs)-log10(inz[i]),2.0);
                  errph+=pow(ph-inp[i],2.0);
               }
               tmperr=errabs*abs_to_ph_weight+errph;

               //比較誤差值(如果誤差值比最好的誤差值小則更新)
               if(best_err>tmperr){
                  best_err=tmperr;
                  best_rct=rcti;
                  best_rs=rsi;
                  best_qdl=qdli;
                  best_w = wi;
                  best_n = ni;
                  printf("Best rct: %.0lf, rs: %.0lf, qdl(uF^(1/n)): %.8lf, w: %.8lf, n: %.3lf (best_err: %.2lf,errabs:
                           %.2lf,errph: %.2lf)\n",
                  best_rct,best_rs,best_qdl*1e6,best_w,best_n,
                  pow(best_err/nf,0.5),pow(errabs/nf,0.5),pow(errph/nf,0.5));
               }
            }
         }
      }
   }

//將計算結果輸出至 out.txt
printf("%.15lf\n%.15lf\n%.15lf\n%.15lf\n%.15lf\n",best_rct,best_rs,best_qdl,best_w,best_n);
freopen("out.txt","w",stdout);
printf("rct %.15lf rs %.15lf qdl %.15lf w %.15lf n .15lf\n",best_rct,best_rs,best_qdl,best_w,best_n);
printf("Freq(Hz) |Z|(Ohm) Phase(deg) input |Z| input P\n");
for(i=0;i<nf;i++){
   B = 1/best_w/sqrt(2*freq[i]);
   Brct = B + best_rct;
   A = 1/best_qdl/pow(freq[i],best_n);
   Ac = A*cos(best_n*pi/2);
```

```
        As = A*sin(best_n*pi/2);

        x = Brct/(pow(Brct,2.0)+pow(B,2.0)) + Ac/A/A;
        y = B/(pow(Brct,2.0)+pow(B,2.0)) + As/A/A;

        re = 2*x/(x*x+y*y)+best_rs;
        im = -2*y/(x*x+y*y);
        abs = sqrt(re*re+im*im);
        ph = atan(im/re)/pi*180;
        printf("%lf    %lf    %lf    %lf    %lf\n",freq[i],abs,ph,inz[i],inp[i]);
    }

    return 0;
}
```