

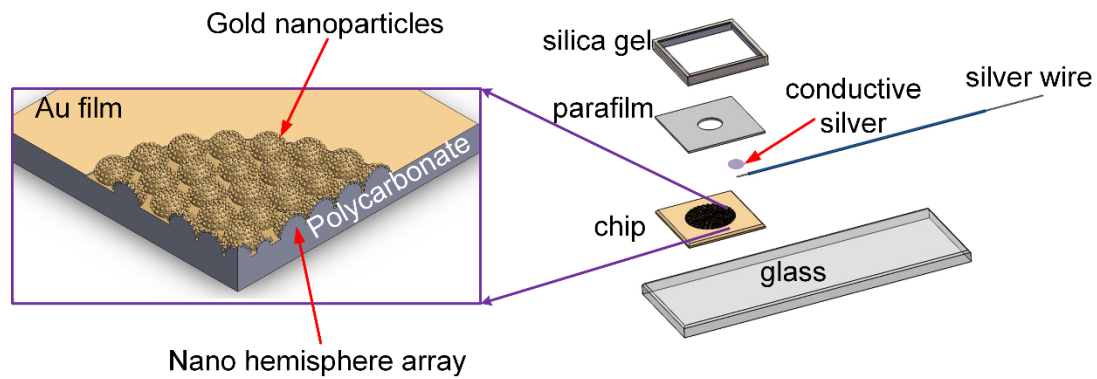
一、 近五年之主要研究成果說明

共同主持人王國禎院長近五年奈米生醫感測器相關研究成果分述如下。

本技術以陽極氧化鋁膜(Anodic aluminum oxide, AAO)之 3D 奈米半球陣列阻障層結構為基板，再於奈米半球陣列結構上均勻沈積大小 20 nm 之金奈米顆粒，發展高靈敏度之奈米生醫感測器。最後再將生物探針(抗體或受體、DNA、Aptamer) 接附於奈米金顆粒上，用以偵測相對應之待測物。此奈米結構生醫感測器已與台中榮總風濕免疫科蔡肇基醫師合作，成功應用於塵蟎過敏原 Der p2 檢測、過敏病人血清檢測、過敏病人 DNA 單核苷酸變異(SNP)與單倍型核苷酸變異(Haplotype) 檢測，亦與台中榮總肝膽胃腸科吳俊穎醫師合作成功開發 B 型肝炎病毒 DNA 檢測晶片；高醫大神經科楊淵韓主治醫師合作成功應用於阿茲海默症先期檢測；中研院基因體中心謝世良特聘研究員、中研院生醫所林宜玲教授合作檢測登革熱病毒、日本腦炎病毒外套結構之醣蛋白與人體 Fc receptors 之結合(科技部生物司醣科學計畫-發展高度靈敏的奈米生物偵測儀來研究醣基與凝集素之間的交互作用)。研究成果有三篇論文獲 Biosensors and Bioelectronics 接受發表(Electrochemistry 1/28)、二篇獲 Sensors & Actuators B: Chemical 接受發表(Instruments & Instrumentation 2/58)、一篇獲 Nanomedicine: NBM 接受發表(Medicine, Research & Experimental 11/128)、三篇獲 Inter. J. Nanomedicine 接受發表(Pharmacology & Pharmacy 37/256)，並於 2016 獲二項國家新創獎。

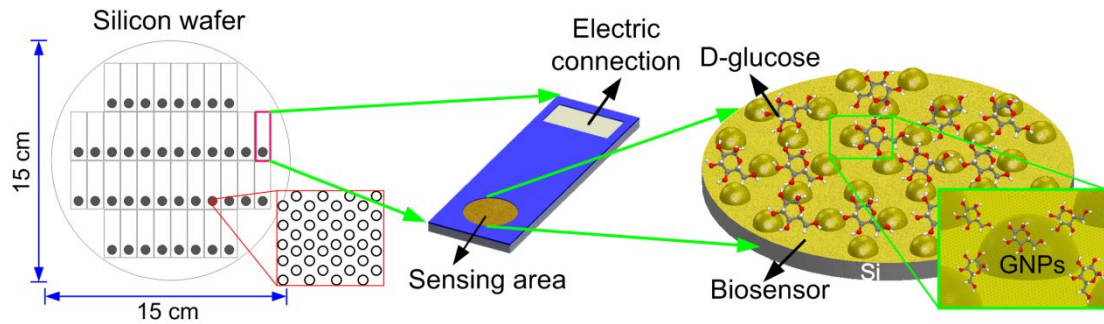
本技術之成果亦與台中榮總研究團隊、精亞科技(熱壓成型專用機台開發、PC 奈米結構熱壓成型)、慧芳公司(奈米模具開發)合作開發檢測平台量產技術，新創**瑞霸生技**公司(2014/09/15)，以奈米模鑄技術結合奈米壓印技術量產奈米結構生醫檢測晶片。

本團隊、台中榮總吳俊穎醫師研究團隊、瑞霸生技結合立陶宛及拉脫維亞二國之醫療團隊，申請歐盟 2017 Horizon 2020 之奈米生醫計畫- Nanobiosensor detecting antibiotics resistance in Helicobacter pylori (幽門桿菌抗藥性檢測)，構想書已獲審查通過(通過率 39/126)，正式計畫也於 6/9 繳交審查中。此外；申請人亦獲俄羅斯科學院 Kuznetsova Iren Evgenyevna 教授邀請，合作撰寫 2018-2020 年臺俄(MOST-RSF) 雙邊創新科技領域合作專題研究計畫- Design, fabrication and study of the new hybrid integrated sensors based on nanoelectronic, acoustoelectronic, and electrochemical technologies for biological applications，計畫書已於六月底繳交雙邊科技部。



除 3D 奈米半球陣列阻障層結構為基板之三維結構奈米生醫感測器，研究團隊亦開發不同奈米結構之葡萄糖感測器，主要有樹枝狀奈米結構、奈米金仙人掌球結構、金鎳同軸奈米柱結構等。自 2014 年起與昇陽國際半導體合作執行科技部開發型產學計畫，開發以微影熱熔製程製作奈、微米複合結構電極之**無酵素葡萄糖生醫檢測晶片**，主要製程乃是於 8 吋晶圓上利用黃光微影結合光阻熱熔製程製作出微米級(3 μm)之光阻半球陣列結構，再於光阻半球陣列結構上濺鍍金奈米薄層電極，接著進行切割與晶片封裝(250 個/8" wafer)，最後再以自我組裝法於半球結構上沈積均勻分佈之奈米金顆粒(約 10-20 nm)，便完成生醫感測電極基板，即可用於葡萄糖濃度檢測。此感測晶片可檢測葡萄糖濃度之線性範圍為 55.6 μM 到 13.89 mM，靈敏度達 749.2 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ，檢測極限為 9 μM ，顯示此無酵素葡萄糖感測晶片有極佳之感測效能。此外，本感測晶片可有效檢測葡萄糖變化，精確度達 ± 0.18 mg/dL，遠優於 FDA 規範之 ± 20 mg/dL 與 ISO 15197 規範之 ± 15 mg/dL。研究成果有一篇論文獲 Biosensors and Bioelectronics 接受發表(Electrochemistry 1/28)、一篇獲 Sensors & Actuators B: Chemical 接受發表(Instruments & Instrumentation 2/58)、二篇獲 J. Electrochemical Society 接受發表(Materials Science, Coatings & Films 2/19)、一篇獲 Nanotechnology 接受發表(Physics, Applied 27/147)，並二次獲美國機械工程學會 International Conference on Micro- and Nanosystems 最佳論文獎(2014 and 2015)，一次國家新創獎(2016)，博士後研究員許哲瑋亦獲 2015 臺灣綜合大學系統年輕學者創新研發成果-佳作。

接續與昇陽國際半導體合作之產學計畫(2016/06-2017/05)進一步優化奈、微米複合結構電極之性能、降低非檢測目標物之干擾、簡化製程程序與降低成本支出，使無酵素葡萄糖感測晶片得以商品化，並應用於基改食品、農藥殘留、重金屬殘留等食安相關檢測上。2017/06-2018/05 之產學計畫將繼續以所發展之晶片應用於蝴蝶蘭病毒檢測，昇陽國際半導體亦規劃成立相關部門，推動晶片商品化。



二、對外提供技術之說明。請詳述本計畫目前已掌握之技術，其重要性及國內外有關技術之研究情況、重要參考文獻之評述等。

請依下列順序撰寫

1. 感測器項目（請選擇）

- 葡萄糖生物感測器
- 生物親和性感測器

2. 技術名稱：(1)無酵素葡萄糖檢測晶片

(2)用於檢測或/及定量B型肝炎病毒之平台及其方法

(3)檢測MD2基因啟動子突變之探針、晶片與方法

3. 技術重要性、內容描述與產業應用：

(1)無酵素葡萄糖檢測晶片

目前有許多技術皆被用於葡萄糖檢測。一般來說，電化學及光學方法為目前最常用之方法，其中又以電化學感測器為目前主要葡萄糖檢測機器，主要原因在於其實用性、簡單性及低成本。以電化學為基礎之血糖感測器，需要透過葡萄糖特異性氧化酶（GOx）為催化劑，使葡萄糖被催化氧化為葡萄糖酸內酯。雖然使用酵素之優點在於對於葡萄糖之高度反應及葡萄糖檢測之良好特異性，惟，酵素需要被固定於試片上，會增加製作之複雜度，並且，酵素之活性會受到環境影響或是降解，以致於試片不穩定。

為能改善先前技術之缺失，本發明之主要目的在於提供一種無酵素葡萄糖感測晶片，其係不需要使用酵素而能夠達到準確檢測樣本中葡萄糖濃度之功效。本發明之另一目的係在於提供一種無酵素葡萄糖感測晶片，其能夠有效簡化製程，降低製造成本。本發明之次一目的係在於提供一種無酵素葡萄糖感測晶片，其係能夠解決酵素所引起之不穩定、品質不良等問題，而使晶片具有高穩定性。

(2)用於檢測或/及定量B型肝炎病毒之平台及其方法

習知之檢測 B 型肝炎病毒(Hepatitis B virus; HBV)技術係使用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR)，將檢體進行 PCR 後，可將基因片段數量擴增，若是檢體中含有 B 型肝炎病毒，則病毒之基因亦將被擴增達到能明確辨認之程度，然而 PCR 反應完成之後需要後續檢驗以對結果做進一步分析，手續諸多繁瑣，為簡化該檢驗步驟，係發明即時聚合酶連鎖反應(Real-time polymerase chain reaction; Real-time PCR)，在使用 PCR 進行檢測反應時，同時使用螢光染劑加入該反應中，俾使病毒基因透過 PCR 被擴增的同時該螢光染劑立即對病毒基因進行專一性結合標記，反應完成後使用螢光探測儀器測試螢光標記即可確

認有無病毒存在於檢體中，但 Real-time PCR 需要多種特殊儀器與獨特試劑，就一般即效性檢測技術來說仍不盡理想。

有鑑於此，本發明所揭露之檢測B型肝炎病毒生物晶片能有效且快速的針對病毒做篩檢，且無需使用多種特殊的儀器與試劑便能取得明確的結果，大幅提高檢驗效率。

(3)檢測MD2基因啟動子突變之探針、晶片與方法

塵蟎所攜帶蛋白質Der p2是造成氣喘、異位性皮膚炎和過敏等的主要來源，Der p2會與過敏病人呼吸道中之類鐸受體(Toll like receptors)之骨髓細胞分化基因啟動子MD-2蛋白質結合，引起體內之免疫反應，產生過敏病症，而近年來之研究已發現過敏病人之MD-2乃是由第33對的8號染色體之基因突變所造成，過敏基因突變之檢測將可提升過敏病症之先期診斷與治療成效。由於基因突變乃是單核苷酸之變異，因此需以高靈敏度之生醫感測器來檢測。本發明揭露一種檢測MD2基因啟動子突變之探針、晶片與方法，主要是利用奈米半球型的微陣列結構作為感測基板，以針對MD2基因啟動子區域上的特定突變位點設計檢測探針，利用電阻值的差異來區分具有突變與正常的病患。

4. 參考文獻

- [1] 中華民國發明專利第I 530685號
- [2] 中華民國發明專利I 493041號
- [3] 中華民國發明專利I 93041號
- [4] 中華民國發明專利I 585403號
- [5] Chen, C. C., Lai, Z. L., **Wang, G. J.***, and Wu, C. Y.**, Polymerase chain reaction-free detection of hepatitis B virus DNA using a nanostructured impedance biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 77, 603-608. (2016)
- [6] Tung, Y. T., **Chang, C. C.***, Y. L. Lin, Hsieh, S. L., and **Wang, G. J.***, Development of double-generation gold nanoparticle chip-based dengue virus detection system combining fluorescence turn-on probes, *Biosensors & Bioelectronics*, 77-90-98. (2016)
- [7] Hsu, C. W., Su, F. C., Peng, P. Y., Young, H. T., Liao, S., and **Wang, G. J.***, Highly sensitive non-enzymatic electrochemical glucose biosensor using a photolithography fabricated micro/nano hybrid structured electrode, *Sensors and Actuators B*, 230, 559-565. (2016)
- [8] Hsu, C. W., Feng, W. C., Su, F. C., and **Wang, G. J.***, A novel electrochemical glucose biosensor with a silicon nanowire array electrode, *J. Electrochemical Society*, 162(10), B1-B5. (2015)
- [9] Hsu, C. W. and **Wang, G. J.***, Highly sensitive glucose biosensor based on Au-Ni coaxial nanorod array having high aspect ratio, *Biosensors & Bioelectronics*, 56, 204-209. (2014)
- [10] Tung, Y. T., Wu, M. F., **Wang, G. J.***, and Hsieh, S. L.**, Nanostructured electrochemical biosensor for the detection of the weak binding between the Dengue Virus and the CLEC5A receptor, *Nanomedicine: NBM*, 10, 1335-1341 (2014)
- [11] Chin, Y. T., Liao, E. C., Wu, C. C., **Wang, G. J.***, and Tsai, J. J.*, Detection of the haplotype mutations of the MD-2 gene promoter associated with Der

- p2-induced allergy using a nanostructured biosensor, *Inter. J. Nanomedicine*, 9, 403-412. (2014)
- [12] Chin, Y. T., Liao, E. C., Wu, C. C., **Wang, G. J.***, and Tsai, J. J.**, Label-free detection of single-nucleotide polymorphisms associated with myeloid differentiation-2 using a nanostructured biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, 49, 506-511. (2013)
- [13] Tsai, J. J., Liu, Y. F., Liao, E. C., Chen, J. L., and **Wang, G. J.***, Reduction of incubation time and enhancement of analyte adhesion uniformity of impedance biosensors using microvibration method, *Sensors & Actuators B: Chemical*, 178, 404-411.

5. 開發該技術可提供之設備名稱

- [1] 陽極氧化鋁膜製程設備
- [2] 電化學儀
- [3] 濺鍍機