

# 第一章 緒論

## 1-1 生物晶片之發展

生物晶片的概念起源於二十世紀 80 年代後期，廣義而言是指應用半導體策略以矽晶片、玻璃或高分子為基材，微小化技術整合微機電、光電、化學、生化、醫學工程及分子生物學等領域，用以執行醫療檢驗、環境檢測、食品檢驗、新藥開發、基礎研究、化學合成等用途的精密微小化設備；生物晶片技術的主要特點是其分析精確性高、分析速度快，所需使用的檢體樣品及試劑少，並且一次實驗就可獲得整體性(平行化)的實驗數據。因此，生物晶片被認為可廣泛應用於基因功能研究、新藥開發、臨床檢驗、菌種篩選等方面。

生物晶片按其用途可分為樣品製備、生化反應、結果檢測三大類，而縮微晶片實驗室(Lab-on-a-chip)是上述三類晶片的集成。

### 1. 樣品製備晶片（微流體晶片）<sup>1</sup>:

典型的樣品製備晶片包括(A)三維結構過濾器、(B)介電電泳(dielectrophoresis)晶片，它們可用於分離濃縮特定種類的細胞。

#### (A) 細胞微過濾用分離晶片

微過濾用晶片是利用在矽晶片上刻出各種形狀的過濾通道，通道

大小為幾個微米。然後在矽片上黏合上一個玻璃蓋片而完成。舉例來說，血球晶片微過濾器的工作原理是根據人白血球的尺寸比紅血球大的特點，使血流過微過濾器時只讓血漿和尺寸較小的紅血球及血小板通過而攔截住尺寸較大的白血球。

## (B) 介電電泳分離晶片<sup>2</sup>

處於同一交頻電場中的不同種類細胞，由於它們的介電性質不同，所受的介電力方向的大小也將不同。對於兩種具有不同介電性質的細胞，可以藉由選擇適當的細胞懸浮液及所加電場頻率，使得它們的電極化能力分別大於或小於周圍懸浮液的電極化能力。這樣當它們處於不均勻電場中時，就會分別在各表面產生與所加電場相同或相反的電偶極矩、而受正向和負向介電力的作用，分別移到電場強度最強或最弱的不同區域。舉例來說，利用此介電電泳晶片便可將細菌或病毒從血液檢品中分離出來。細胞介電分離技術具有許多特點。第一，不需要抗體。第二，電場並不會破壞細胞的結構和功能。初步研究証明細胞經過這類電場作用後，其生長及分裂性質不會改變。第三，這操作系統容易調控，便於自動化。第四，可與其它方法結合使用，以達到最佳的分離效果。

## 2. 生物化學反應晶片

典型的生化反應晶片是核酸擴增反應晶片(PCR Chip)，它是在

晶片表面運用微細加工技術蝕刻出反應槽，並在其底部或反面製作微型電極陣列或附加加熱器組。藉由調控施加於電極或加熱器組的電壓，使反應槽內的溫度可得到精確的控制，形成核酸擴增反應所需的溫度時間譜。由於其體積小、表面積大，反應槽的溫度可作迅速改變。因此，通常需數小時的 PCR 反應可在晶片上 10 分鐘完成。

### 3. 檢測型晶片

#### (A) 毛細管電泳晶片<sup>3-5</sup>

毛細管電泳晶片的分離原理與普通毛細管電泳原理相同。只是利用各種微細加工技術在矽片、玻璃或塑膠表面刻蝕通道，並與另一平面材料黏合形成管道，以代替毛細管作分離工作。與常規毛細管電泳相比，毛細管電泳晶片具有更高的分析檢測速度。它可用於突變檢測和 DNA 解序等生化分析。

#### (B) 親和結合型晶片 (DNA Chip, Protein Chip)

又稱作微陣列型晶片 (Microarray Biochip)<sup>6</sup>，為當前研發與應用較廣的生物晶片；其原理是利用生物探針與特定對象進行高專一性/選擇性之反應，一旦反應發生後，有很簡易、快速的方法可以偵測到發生之反應而達到檢測之目的。

#### 4. 縮微晶片實驗室 (Lab-on-a-Chip)<sup>7</sup>

生物晶片發展的最終目標是要將樣品製備，化學反應到結果檢測的整個分析過程集成在一個晶片上，以獲得所謂的微型全分析系統 (Micro total analytical system,  $\mu$ -TAS) 或縮微晶片實驗室 (Lab-on-a-Chip)。而這種縮微晶片實驗室不僅可以使設備縮小攜帶方便，更能節省實驗試劑和樣本，增加實驗的效率

#### 1-2 毛細管電泳原理

##### 電泳分離

電泳(electrophoresis)是用來分離物質的一種技術，其原理是利用荷電離子在高電壓的作用之下，於介電質中以不同的速度向電荷反方向遷移所造成的物質分離現象。

而粒子在電解質溶液中的速度主要受到帶電荷量及分子量兩個因素所影響。其速度可以下式來表示

$$v = \mu_{ep} E$$

其中  $v$  : 離子遷移速度  $\mu_{ep}$  : 離子遷移率  $E$  : 電場強度

而離子遷移率則由其所受的電場力與通過溶液時的摩擦力的平衡所決定。

其中電場力可表示成

$$F_e = q E$$

$q$  : 離子帶電量

一般離子摩擦力可表示為：

$$F_f = -6 \pi \eta r v$$

$\eta$  : 溶液黏度     $r$  : 球型離子半徑     $v$  : 離子的遷移速度

在電泳的過程中，當電場力與摩擦力達到平衡狀態時，其兩種力的大小相等而方向相反，而表示為

$$qE = 6 \pi \eta r v$$

因此可以得知帶電粒子在電場下的遷移速度為：

$$v = (q / 6 \pi \eta r) E$$

電泳遷移率( $\mu_e$ 或 $\mu_{ep}$ )即單位電場下離子的遷移速度可以表示為：

$$\mu_e = v / E = q / 6 \pi \eta r v$$

## 電滲透流

一般而言，毛細管材質為熔融石英(fused silica)，當毛細管表面受到鹼液浸泡後，表面的矽醇官能基( $\text{Si-OH}$ )會解離成帶負電的 $\text{Si-O}^-$ ，而當毛細管在充滿緩衝液時，溶液中的正離子會由於管壁的靜電引力而形成電雙層。第一層是由溶液中帶正電的物質經不可逆吸附作用在管壁所形成的固定層(stern layer)，第二層乃是離管壁稍遠處也有過多的帶正電物質被吸引，其電荷密度隨著管壁而成指數趨勢遞減所形成

的擴散層(diffusion layer)(圖1-1)。由於溶液在毛細管內電荷分布不均勻，因此造成溶液與管壁間的電位差。若把溶液中央部分(bulk solution)定為零電位，第一層與第二層間電位為 $\Phi_\zeta$ ，管壁電位為 $\Phi_0$ ；在固定層中電位由 $\Phi_0$ 降至 $\Phi_\zeta$ ；在擴散層中電位由 $\Phi_\zeta$ 降至零電位。在毛細管內溶液各處電位與 $\Phi_\zeta$ 的差距為Zeta電位( $\zeta$  potential)。由於Zeta電位之存在，而使得電場作用時，擴散層中之正離子會驅使整個溶液朝向負極流動，即為所謂的電滲透流(electro-osmosis flow, EOF)

$$\mu_{\text{eof}} = \varepsilon \xi / \eta$$

其中  $\mu_{\text{eo}}$ ：電滲透流遷移率  $\varepsilon$ ：溶液介面常數

$\xi$ ：zeta電位  $\eta$ ：溶液黏度

在電泳的過程中，帶電粒子本身具有離子遷移率 $\mu_e$ ，而溶液本身具有電滲透流的遷移率 $\mu_{\text{eof}}$ ，所以電泳的過程實際遷移速度為

$$V = V_e + V_{\text{eof}} = (\mu_e + \mu_{\text{eof}})E$$

### 1-3 毛細管電泳晶片之發展及製作

#### (一) 毛細管電泳晶片之發展<sup>8</sup>

在1967年時，S.Hjerten<sup>9</sup>首先將毛細管應用於電泳技術中，以內徑1-3mm之石英管進行分離工作；在1981年時，J.W.Jorgenson<sup>10</sup>以內

徑 $75\text{ }\mu\text{m}$ 之毛細管進行電泳分離，再以螢光進行偵測，此方法也是現今毛細管電泳之基本架構。其原理為在高電場環境下，以毛細管內所產生之電滲透流為推進力，利用各離子遷移速度的不同而達到分離的目的。相較於傳統的平板膠電泳而言，毛細管電泳有著分離時間短、樣品消耗量少、分離解析度高及靈敏度好等優勢。

在1992年時，Harrison<sup>11</sup>及其研究團隊首先將毛細管電泳系統引入晶片模式，首次開發微小化之毛細管電泳晶片。此團隊應用微機電技術在玻璃晶片上蝕刻出管道以進行樣品分離工作，並輔以光學偵測系統作偵測。毛細管電泳晶片相較於傳統毛細管電泳而言，有著速度更快、樣品消耗量更少等優勢，而隨著微加工技術和樣品處理技術的提升，毛細管電泳晶片將可成為快速、高通量的有力分析工具。

## (二) 毛細管電泳晶片之材質

### (A) 石英或玻璃材質：

由於毛細管大多由熔融石英製成，因此早期晶片大多也以熔融石英或是玻璃為材質，以濕式蝕刻法於玻璃表面蝕刻出管道，再以高溫接合法於管道上接合上另一層石英後，便完成整個晶片的製作。

由於熔融石英晶片的表面具有活性的官能基(Si-OH)，因此可藉由衍生化反應減少吸附以增加分析生物分子的效率；但石英晶片卻有著材質昂貴、製作不易等考量，而大大限制其應用性。

(B)塑膠（高分子）材質<sup>12. 13. 14. 15.</sup>：

基於石英材質的限制，因此近來年的趨勢便偏向於使用一些具有高透光性之高分子材料如PMMA<sup>16</sup> ( Poly methyl methacrylate)、PC ( Polycarbonate )以降低成本及省去衍生化的步驟。以PMMA材質而言，在實驗中，可選擇以線壓法<sup>16</sup>或是雷射加工<sup>17.18.19.20</sup>等技術直接作出管道；而在大量製作時，可先以濕式蝕刻的技術在石英材質上製作模板，再利用熱壓法<sup>21</sup>的方式於PMMA表面壓製出微管道，再於管道上覆蓋一層PMMA即完成晶片之製作。

## 1-4 研究動機

由於塑膠原料成本遠低於熔融石英材質，因此近年來已有許多研究選取塑膠作為晶片材質。在塑膠晶片的製程中，主要可分為微管道製作及晶片的接合；一般而言，多數研究是使用鑄模法或是壓模法等技術直接作出管道，再以高溫作接合工作。然而這些方法普遍皆存有步驟煩複、時間冗長、以及所需器材較昂貴之缺點；特別在晶片測試階段，原型晶片的製作與改良十分不方便。由於塑膠質軟易切割，因此本研究欲以簡單的管道製作技術，再輔以快速黏合技術來發展塑膠薄層晶片，初期以電泳分離晶片以及電泳質譜晶片為主題。在研究過程中，測試此種塑膠薄層電泳晶片之基本性質，並針對各項缺失作出改良。



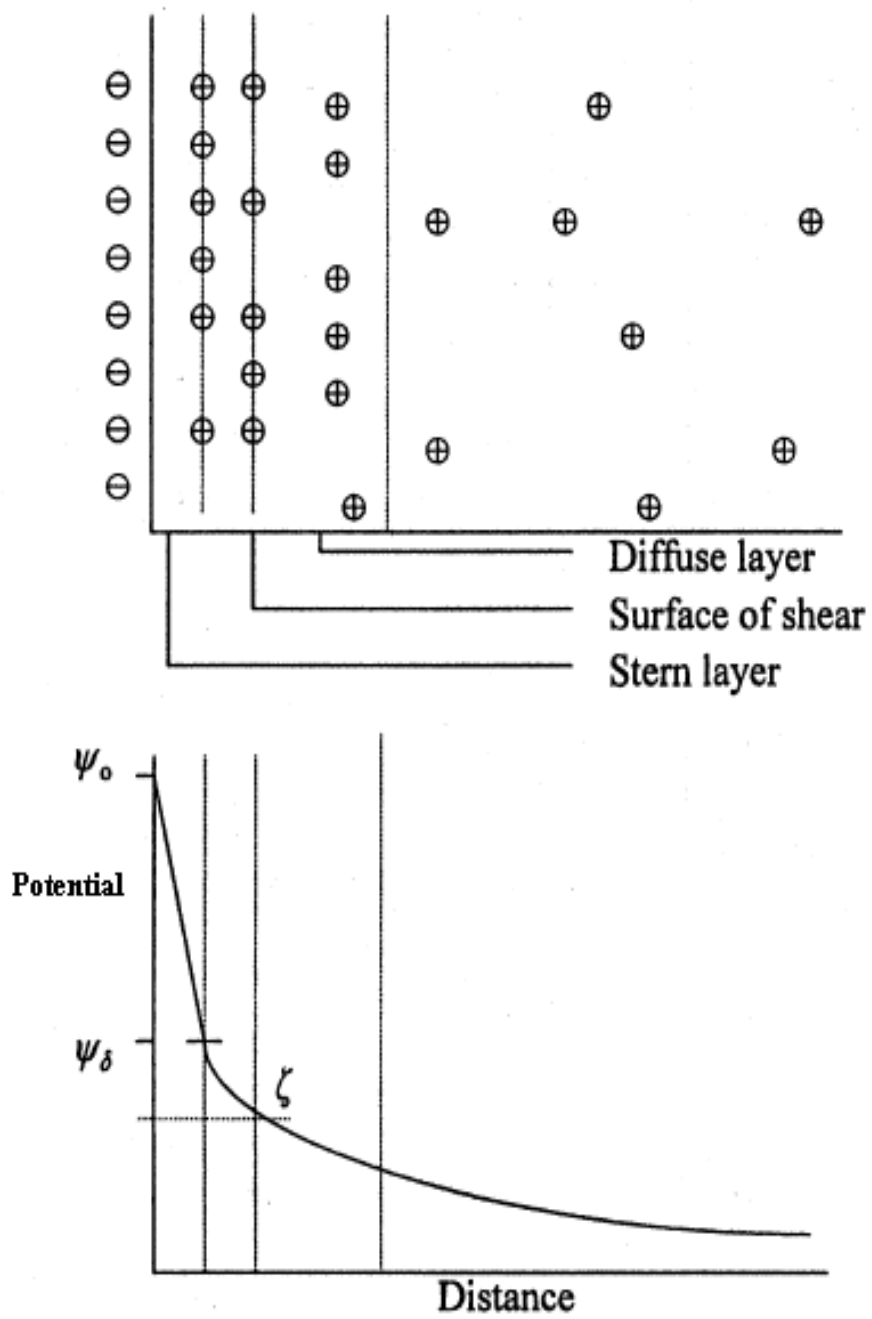


圖1-1 毛細管管壁電雙層結構圖及其電位圖