

## 第三章 原型塑膠薄層電泳晶片之研發

### 3-1 電泳晶片之製程

#### (一) 電泳晶片微管道之製作

本研究之塑膠薄層電泳晶片管道之切割工作，是藉由結合兩片厚約 100  $\mu\text{m}$  的刀片(如圖 3-1)來作為切割工具，直接於第二層膠模上切割出十字，再以打孔機於第一及第二層膠模上打孔，而後以護貝機將三層膠模接合在一起。

#### (二) 進樣方式

與大多數塑膠晶片設計相同，本研究也採取十字型晶片設計<sup>23</sup>，而其操作模式主要可分為注射(injection)以及分離(separation)兩個階段；『注射』，也就是「進樣」，是指在其中一條微管道上施加直流電壓，以推動樣品之流動。『分離』則是使用另一條垂直相交之微管道，當樣品流動至兩條微管道相交處時，藉由施加另一電壓而驅動樣品進入分離管道並進行電泳分離。

由於本研究為了易於施加電壓；因此便在晶片孔洞上以 AB 膠黏合上塑膠微量吸管頭，以作為儲存槽(圖 3-2)。

### 3-2 電泳晶片流速之測定

#### (一) 基本流速之測定

當塑膠薄層電泳晶片製作完成後，我們便開始測試其性質；而首先也最為必要的就是流速之測定。實驗之裝置配備如圖 3-3 所示，而以長度 5 cm 之單一管道晶片為測試模板，以 Rhodamin B 為指示標記， $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  (20mM, PH7.4) 為緩衝液，300v/cm 電壓下；藉由量測染料從一端之儲存槽流動至另一端的時間，來代表其流速。實驗重複 10 次，並計算其平均值以及標準差。

實驗步驟為：

1. 注入緩衝液於儲存槽中，再以針筒推入管道中
2. 將兩端多餘之緩衝液吸出
3. 在兩端儲存槽個別加入 20  $\mu\text{l}$  之樣品及緩衝液
4. 加電壓於儲存槽以開始進行電泳

而在每一次實驗結束後皆須做清洗管道之工作，以避免染料之殘留；

清洗步驟為：

在一端之儲存槽中注入適量之二次水，再以針筒推入管道中，直至另一端儲存槽後；再將二次水抽出即可。

測量結果如 Table.1 所示，

Table.1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	標準差
Time (sec)	50	48	55	52	54	51	53	49	49	52	51.3	$\pm 2.31$

由實驗結果中顯示同一晶片中，同一緩衝液環境下，給予相同電壓時，其

流速相當穩定，亦即其流速之量測具再現性。

## (二) 不同電壓、緩衝液流速之不同

在證明其電泳系統之穩定性後，我們便開始測試不同電壓下之流速變化，而由於因應質譜介面之研發，因此除了一般毛細電泳常用之磷酸系統外，我們也選用較適於質譜分析之  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{Formic acid}(1/1/0.1\%)$  為緩衝液。

實驗方法如以上所述，以相同之實驗步驟個別測量上述兩種緩衝液在

100-500 v/cm 電壓下之流速：

實驗結果如 Table.2 中所示，而將其速度表示於圖 3-4 中。由 Table.2 中，我們得知兩種緩衝液之流速皆隨電壓上升而有線性關係，磷酸系統之流速略快於 ACN 系統，但此兩種緩衝液之流動方向相反。

Table.2

緩衝液	$\text{Na}_2\text{HPO}_3$ (20mM)	$\text{H}_2\text{O} + \text{ACN} + \text{Formic acid}$
流動方向	由正極到負極	由負極到正極
電壓 100 v/cm	1.58 (cm/min)	1.2 (cm/min)
200 v/cm	3.75 (cm/min)	2.73 (cm/min)
300 v/cm	6.0 (cm/min)	4.62 (cm/min)
400 v/cm	7.14 (cm/min)	6.38 (cm/min)
500 v/cm	(電流過大而產生斷路)	8.82 (cm/min)

## 3-3 電泳分離系統系統架構:

實驗之電泳分離系統主要如圖 3-5 所示，是由一組 (A)最高電壓 3kv 之

電源供應器及 (B)微安培電流計 和 (C)電泳晶片所組成。當進行電泳分離時，電源供應器供給高電壓以推動樣品進行分離工作，我們可藉由三用電表量測電流變化以監控電泳系統之流動情形。本研究之十字型薄層電泳晶片如圖 3-6 (1)所示，垂直之管道為注射樣品之通道，長度約 3 cm；而水平之管道為樣品分離之通道，長度約 6 cm。藉由粗糙度量測儀(中興大學精密工程研究所)來測量管道上任兩點之深度，其結果如 3-7 所示，分別為  $77.200\ \mu\text{m}$  以及  $79.192\ \mu\text{m}$ ；寬度約為  $100\ \mu\text{m}$ ；而樣品之進樣量約為垂直與水平管道交叉處之體積。如以上所示，分別在管道末端之孔洞上黏合上塑膠微量吸管頭，以作為儲存槽，並作為電極放置處，而分別代號為 1、2、3、4；其中，1 為樣品儲存槽；2 為樣品廢液儲存槽；3 為緩衝液儲存槽；4 為緩衝液廢液儲存槽。

在以  $\text{H}_2\text{O} + \text{ACN} + \text{Formic acid}$  作為緩衝液時，

實驗步驟為：

- (1)首先將緩衝液注入管道中，再加入樣品於樣品儲存槽中。圖 3-6 (2)
- (2)在 2 加電壓(此時 1 接地)，以促使樣品由儲存槽 1 向 2 移動以進行『進樣』圖 3-6 (3)
- (3)進樣完成後，便停止 2 之電壓供給，改加電壓於 4(此時 3 接地)，以推通垂直與水平管道交叉處之樣品進入樣品分離通道進行電泳『分離』圖 3-6 (4)

### 3-4 塑膠薄層電泳晶片質譜介面之製作及測試

#### (一) 微電噴灑離子化質譜儀偵測技術<sup>24</sup>

電噴灑離子化法(Electrospray Ionization, ESI)是一種直接將溶液中的極性分子在大氣壓力下經由電噴灑的過程轉變成氣相離子以供質譜儀進行偵測之技術，其過程如圖 3-8 所示：在正離子偵測模式下，在管道出口端提供高正電壓，讓部分溶液解離且正離子受到電場吸引而分佈於出口端之液面上；隨著電壓之提高，會使得正離子產生強大之電場力而將因表面張力形成之球型液面擠壓成圓錐狀；當電場力大於表面張力時，尖端液面會噴出而形成含多量正電荷之液滴，此現象即為「電噴灑」。而此種穩定產生噴灑之錐形液面則稱為泰勒錐(Taylor cone)，圖 3-9；而帶電荷之液滴在飛行過程中其體積隨著溶劑不斷揮發而縮小，使得其內部正離子排斥力也隨之增加因而突破表面形成更小之液滴；當液滴夠小時，溶液內之分子會隨正離子單獨脫出，離子化進入質譜儀內進行質量的分離。

電噴灑離子化法與其他離子化方法相較之下有著分子量測定範圍大、靈敏度高、不易破壞分子結構之軟性離子化特質、大氣壓下操作簡易等優點；此外，電噴灑離子化法能直接分析具極性之液體樣本，相當適合與晶片做整合來進行各項分析工作<sup>25</sup>。

#### (二) 電噴灑噴嘴之製作

一般而言，大多研究是採用直接將毛細管連接在晶片末端管道口或是以聚二甲基矽烷(PDMS)灌模技術製作毛細管噴嘴。而本研究之塑膠薄層電泳晶片由於具有剪裁容易、接合簡單之特點，因此採取直接在微管道出口端作修飾的方式來製作質譜介面。其製作過程 (圖 3-10) 為：

- (1).首先在護貝膠模上切割出管道，再以打孔機製作出樣品儲存槽
- (2).在末端管道旁之膠膜上以油漆筆塗佈(以便於碳層之沾附)
- (3).在油漆層上以碳筆塗佈作為導電之用。
- (4).延伸一段鋁箔以便於電壓的施加
- (5).加上上下兩層膠模再送入護貝機黏合
- (6).以小剪刀修剪出尖端以作為電噴灑噴頭。

### (三) 電噴灑噴嘴之測試

製作完成之塑膠薄層電泳晶片質譜介面其外型如圖 3-11、3-12 所示，樣品儲存槽上接上塑膠微量吸管頭以便於樣品儲存以及電極放置；其測試過程為：首先以針筒將溶液推送並充滿著整個管道中，接著在鋁箔加上高電壓以開始進行電噴灑。在電噴灑過程中，我們藉由結合顯微鏡、CCD (Charged Coupled Device，充電耦合裝置)攝影鏡頭及影像擷取卡及電腦的連結裝置來直接觀察及紀錄電噴灑現象。圖 3-13 為電噴灑噴嘴之尖端圖，其中下方灰色部分為導電用之碳層；隨著電壓的逐漸增加，噴嘴之尖端也

漸漸出現泰勒錐；當電壓加至 2.2kV 時，開始出現電噴灑現象。在證明本研究之電噴灑噴嘴可進行電噴灑後，我們便接著將其實際應用於質譜分析上；我們以 horse heart myoglobin 作為分析樣品，藉由本研究之塑膠薄層電泳晶片質譜介面將其噴灑離子化，直接進入 LCQ 離子阱質譜儀分析 [圖 3-14，LCQ (Thermo Finnigan USA)，於彰化師範大學化學系進行實驗，屬於離子阱式液相層析質譜儀，可進行多次質譜]，並設定質量分析範圍為質荷比 500~2000。分析結果如圖 3-15 所示；在此圖譜中，我們可看到許多帶不同質荷比之同一離子，即本實驗之樣品—horse heart myoglobin。



圖 3-1 刀片之尖端切面圖



圖 3-2 塑膠薄層電泳晶片之俯視圖



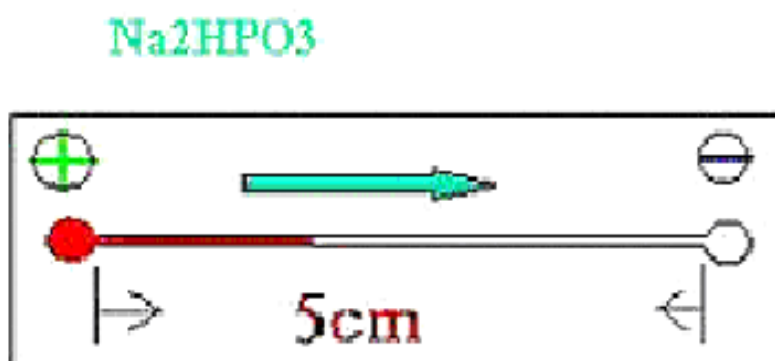


圖 3-3 以  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  為緩衝液之流速測定實驗配置圖

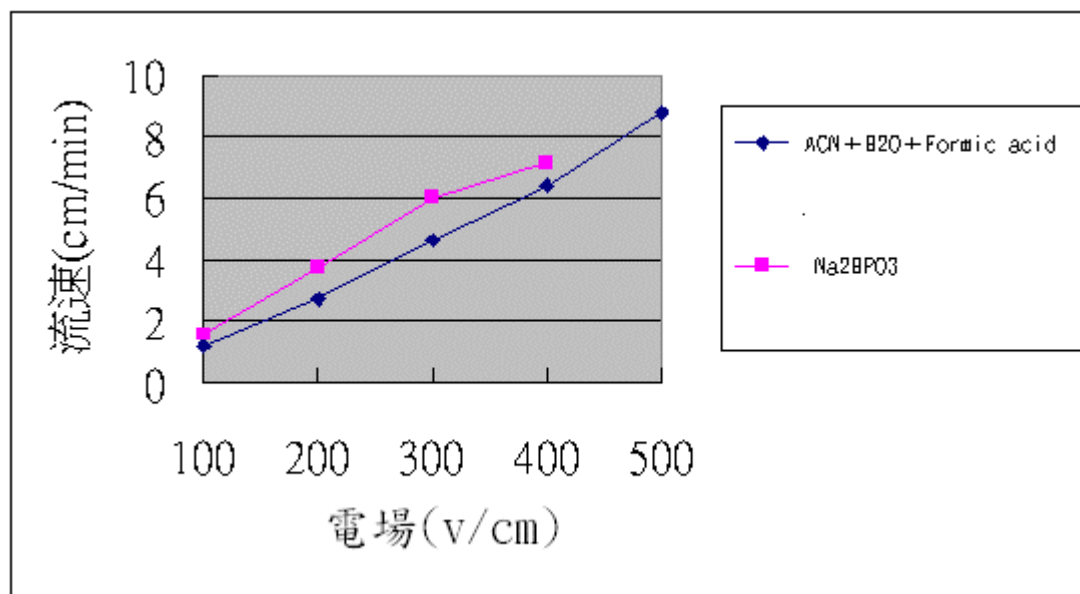


圖 3-4 以  $\text{ACN} + \text{H}_2\text{O} + \text{Formic acid}$  及  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  為緩衝液之  
電場 (V/cm) 流速關係圖

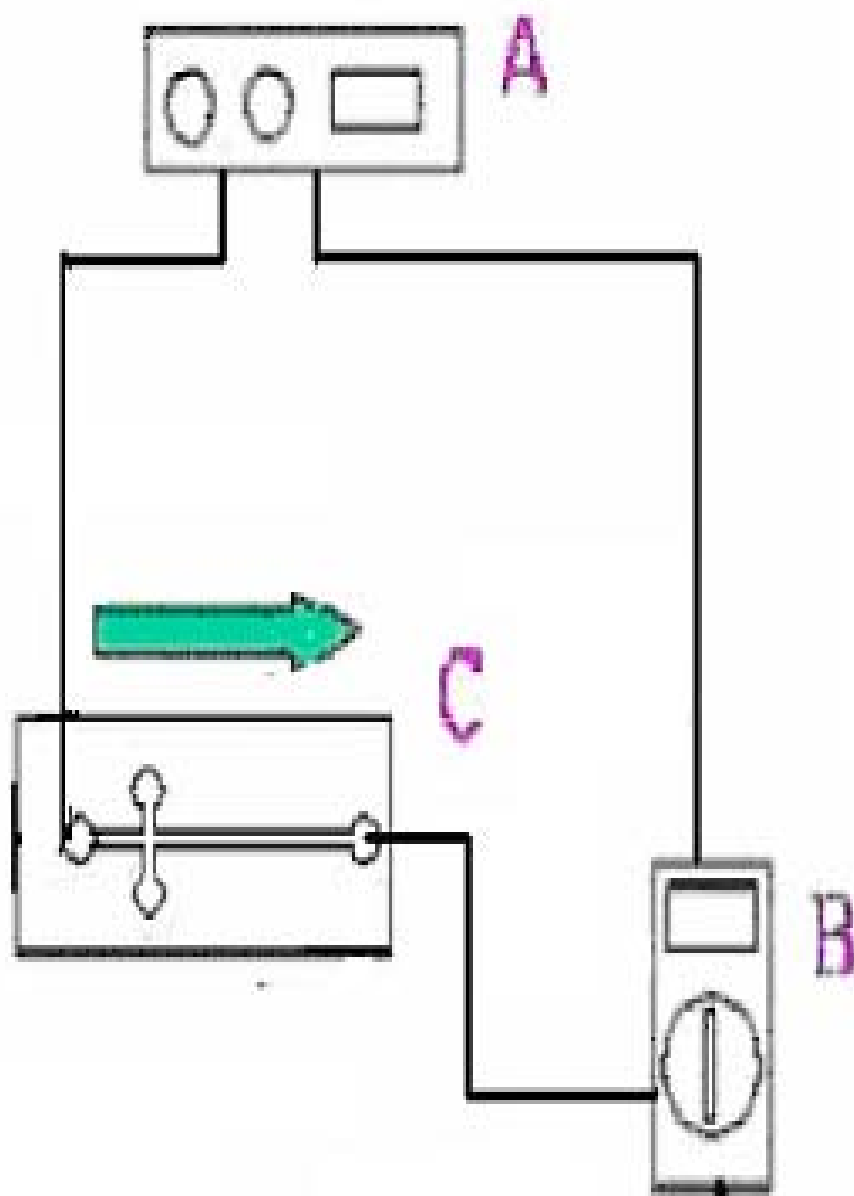


圖 3-5 電泳分離系統架構圖

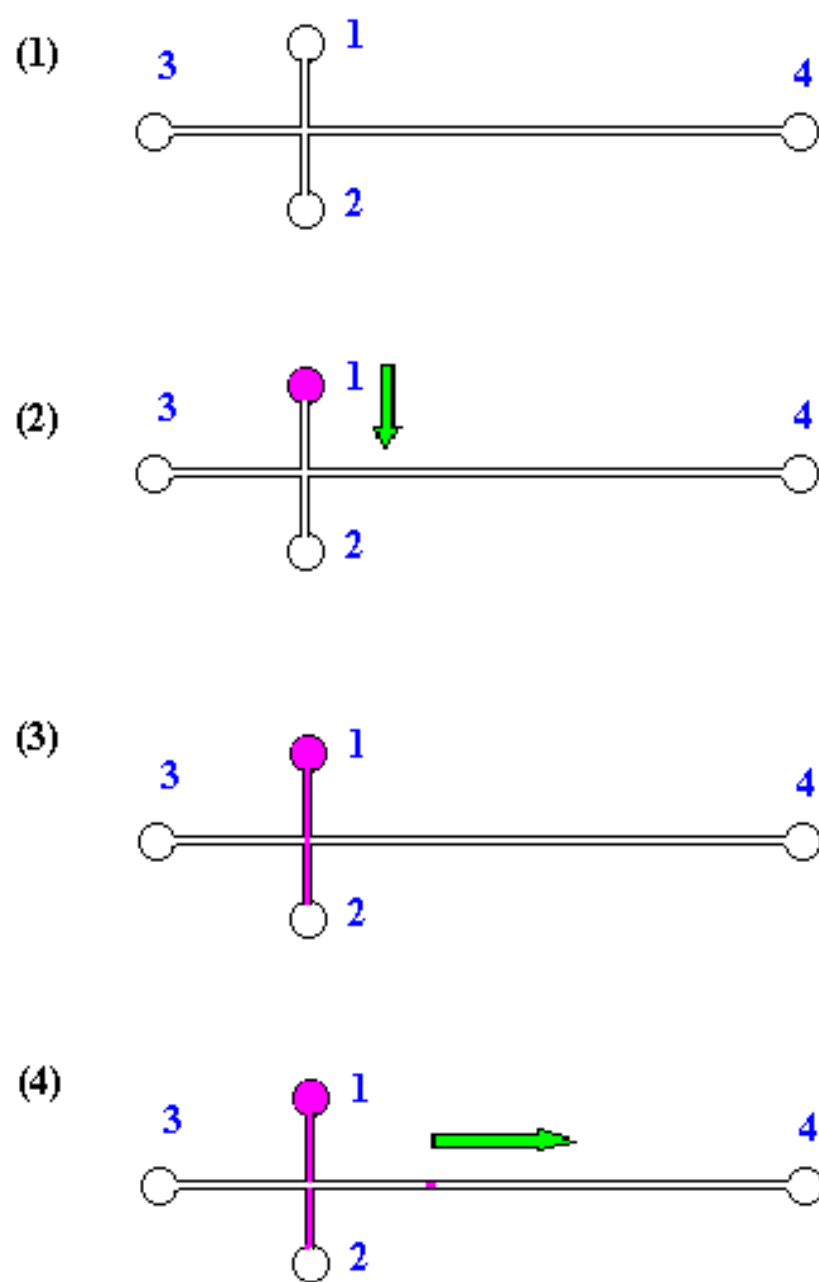
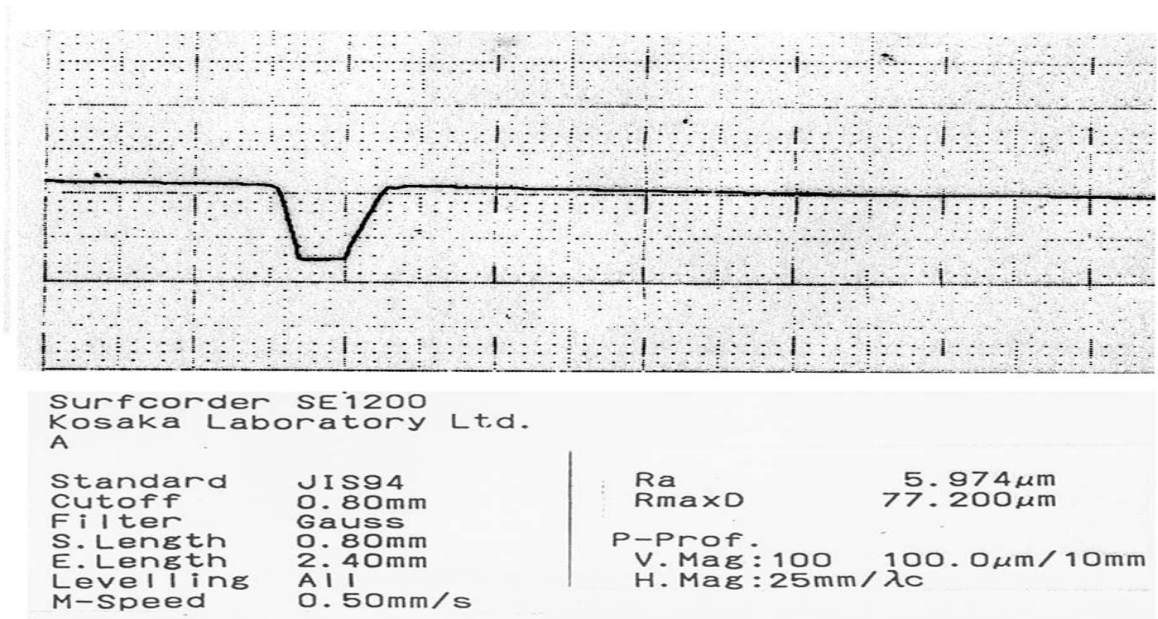
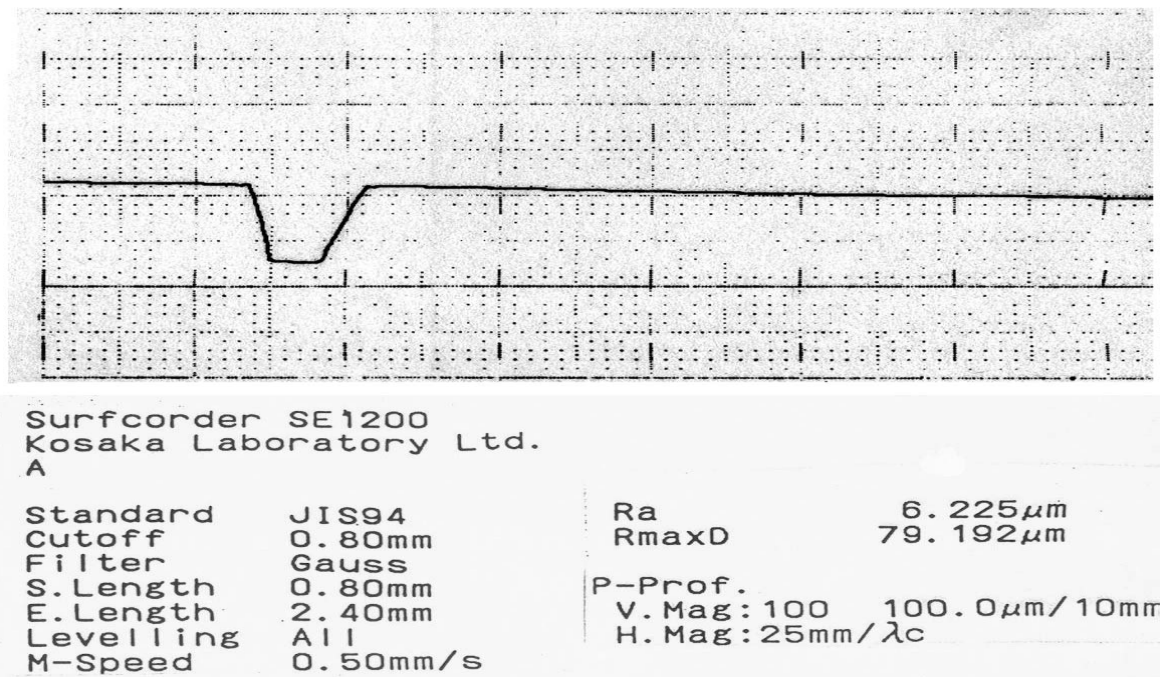


圖 3-6 十字型晶片之進樣過程圖



(A) 管道 A 點，深度為 77.200 μm



(B) 管道 B 點，深度為 79.192 μm

圖 3-7 以粗糙度量測儀測量微管道之深度圖

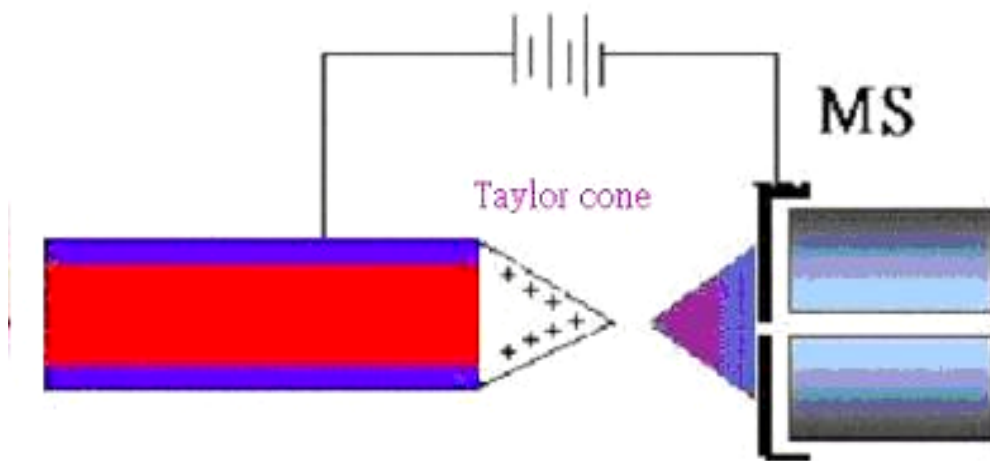


圖 3-8 電噴灑離子化過程圖

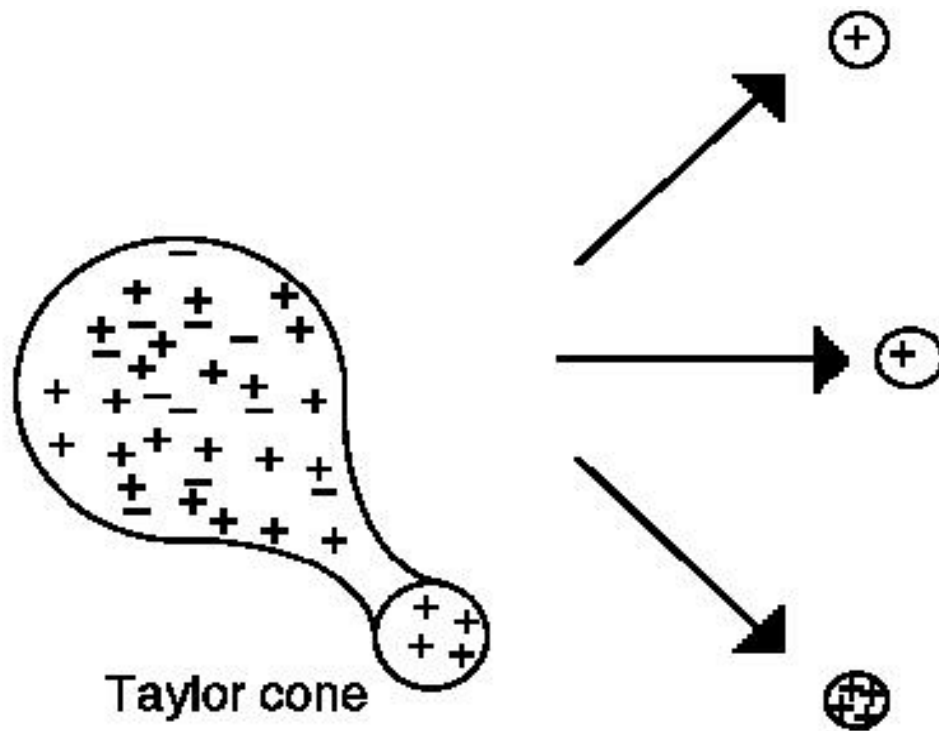
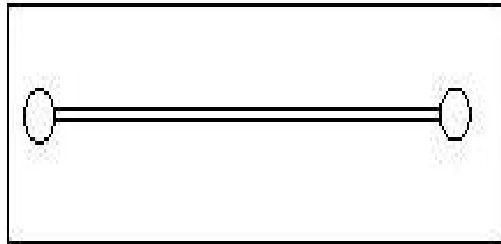
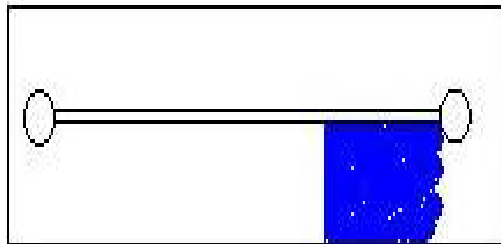


圖 3-9 泰勒錐及帶電荷離子形成圖

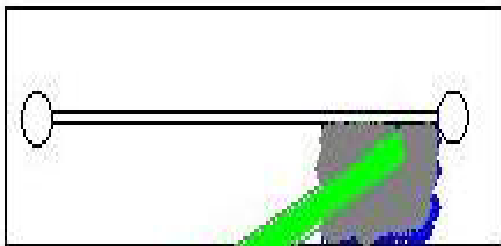
(1)



(2)



(3)



(4)

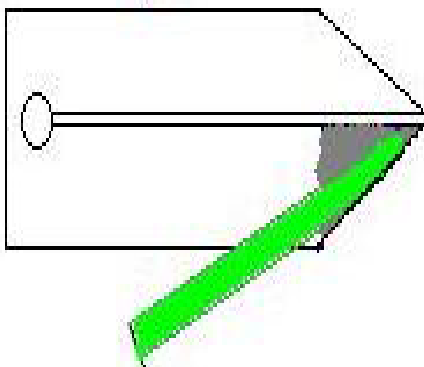
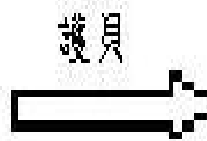


圖 3-10 電噴灑噴嘴之製作流程圖



圖 3-11 一般(上)與自行研發之薄層(下)塑膠-電泳質譜晶片之比較圖

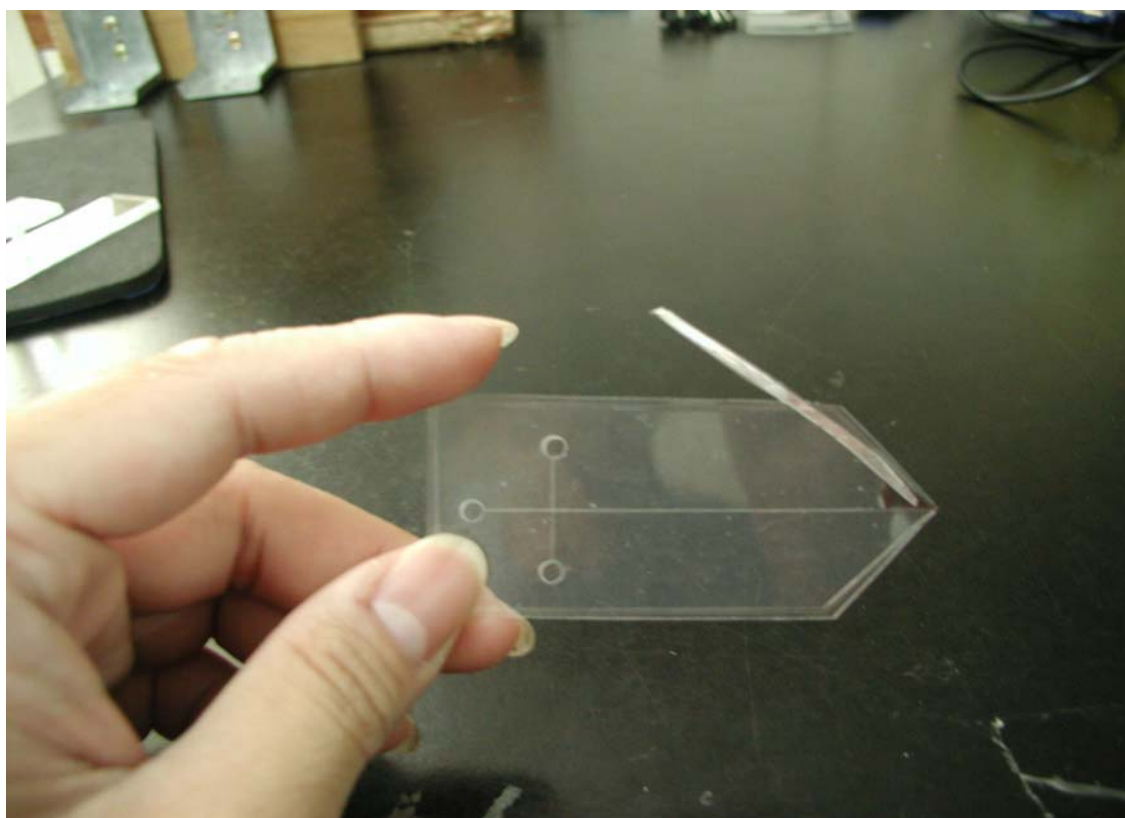


圖 3-12 自行研發之薄層塑膠-電泳質譜晶片正視圖

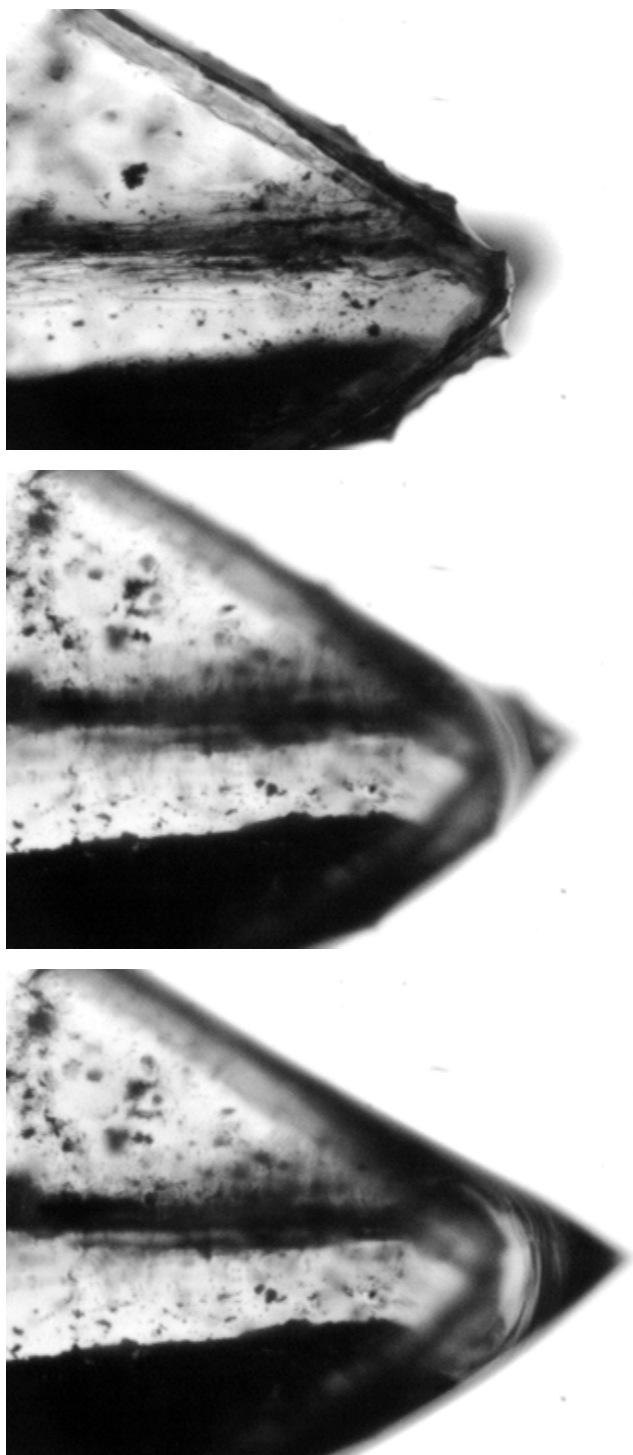


圖 3-13 薄層塑膠-電泳質譜晶片泰勒錐形成過程圖，  
電壓 2.2kv 時，開始產生電噴灑





圖 3-14 LCQ 液相層析質譜質譜分析儀圖

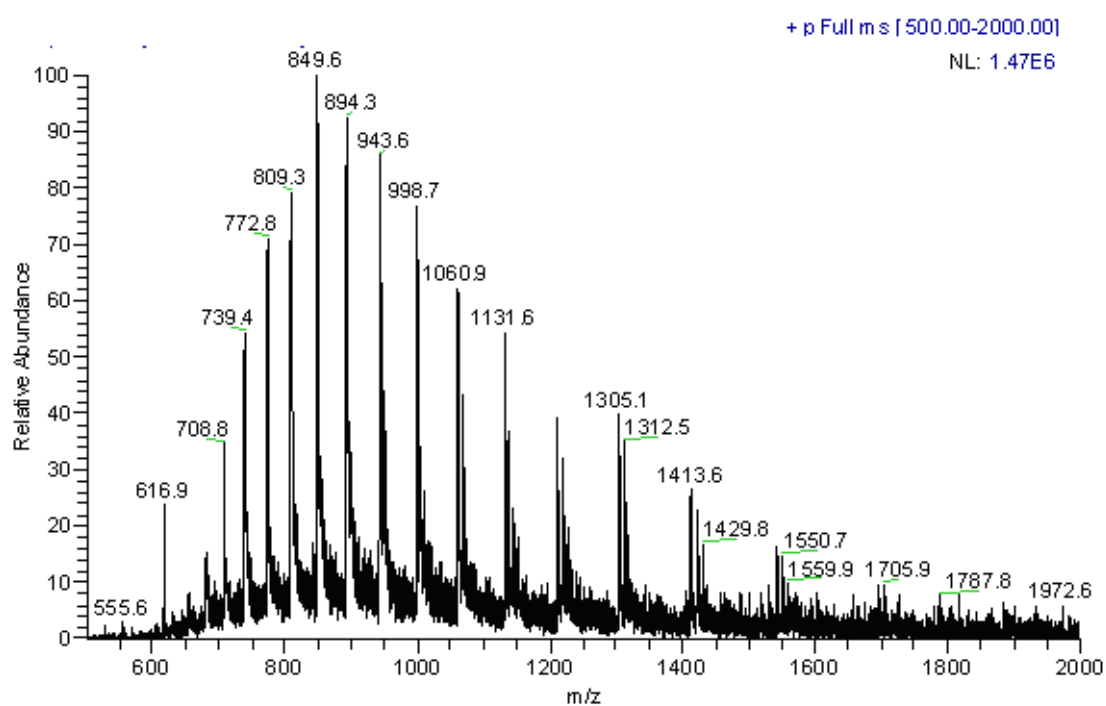


圖 3-15 以薄層塑膠-微電灑-蛋白質電泳質譜晶片測得之 horse heart myoglobin 圖。

(濃度為 10 pmol/ul)