

第四章 薄層電泳晶片之改進與研發

由於本實驗之塑膠薄層電泳晶片與一般傳統之塑膠電泳晶片在材質及製程上有相當大之差異，因此在過程中也遭遇到許多問題，如電噴灑噴頭尖容易裂開，十字型管道相交處切割不良。在本章中，我們針對這些缺失做改進；並利用薄層特性，來設計新型薄層晶片。

4-1 雙面 PE 膠膜之使用

由於在製作薄層晶片質譜介面時，必須在晶片末端以剪刀修剪出電灑噴嘴，且藉由顯微鏡頭檢視出口，以確認噴嘴尖錐之成型；在此同時，卻也發現到晶片接合面容易裂開，而造成使用壽命不長之隱憂。

針對此種現象，便開始著手於晶片之改良；期間曾嘗試各種增加晶片接合力之方法，如加入黏著劑、提高護貝機溫度、以及改變進樣方式來減低微管道壓力；然而這些方法皆是無法得到良好的效果。

就本實驗採用之護貝膠膜而言，其結構是由一層 **PET (Polyethylene terephthalate)** 加上一層 **PE (Polyethylene)** 所組成，(圖 4-1 為其化學結構式)；由於在晶片接合時(如圖 4-2 所示)，黏著力是來自於加高溫之 PE，所以在晶片的三層結構中只有一面是緊密結合 {PE+PE (接面 2.3)}，而另一面 {PE+PET (接面 1.2)} 則較不牢靠，在受到壓力時，就極易裂開。因此，本研究便改以市面上較少見之雙面 PE 之護貝膠膜(PE+EVA+

PET+EVA+PE)來作為晶片基材。

藉由結合顯微鏡、CCD (Charged Coupled Device，充電耦合裝置)攝影鏡頭、影像擷取卡及電腦的連結裝置，可得到晶片之切面圖，並藉此瞭解晶片之接合情形。圖 4-3 為一般之單面 PE 護貝膠膜，可明顯分辨出顏色較深之 PE 層以及顏色較淺之 PET 層；而圖 4-4 則是未改良前之晶片切面，即三片單面 PE 護貝膠膜之接合，將其與圖 4-5 中比較，可明顯看出在第一層與第二層膠膜中有空隙產生，即 PE 與 PET 之間。圖 4-6 則是雙面 PE 之護貝膠膜切面圖，其結構是由兩層 PE 加上兩層 EVA (乙烯-醋酸乙烯酯樹脂，ethylene-vinyl acetate resin)加上一層 PET 所組成，其厚度為 PE：50 μm ，EVA：25 μm ，PET：5 μm ；而圖 4-7 則是改良後之晶片切面，即一層雙面 PE 之護貝膠膜加上二層單面 PE 護貝膠膜；由於其接合處皆是由 PE+PE，因此在一般外力下，管道之壓力承受度大幅增加，晶片的耐用性也隨之提高。在未改改良前，平均每一片在使用約 5 次後，便漸漸因針筒注入的壓力過大或電灑放電而有裂開之現象；而改使用雙面膠膜後，就完全無此方面之疑慮，大幅增加了電泳晶片的壽命。

4-2 電泳晶片管道之切割

在研究之初期，是直接以手夾住 2 片厚約 100 μm 的刮鬍刀片來

切割管道；此種方式雖然簡單、方便，但卻有著穩定性不高的缺點。因此便嘗試將刀片以 AB 膠作黏合固定，希望能做出較安定之切割工具，然而卻因刮鬍刀片質性較軟，在做切割時容易變形，相對的也不易切割出完整之管道。基於此項考量，便改採以一般用於切膠之刀片做切割。

雖然切膠刀片的質地較硬，但相較於刮鬍刀片(見圖 4-8)，其厚度較寬，割出之管道也較大，因此在切割前，必須先做前製備的工作。前製備如圖 4-9 中所示：首先以夾子將兩片割膠刀片做初步固定，再以 AB 膠做二次固定，使兩刀片呈現一固定夾角；以拉近兩刀片尖端的間距，來達到縮小切割範圍之目的。圖 4-10 中則是以此切割方式製作出之晶片切面圖，寬度約 $90\mu\text{m}$ 。由於兩刀片是以斜角之方式做切割，因此管道也略成梯形，而晶片接合時，護貝機的熱壓過程也可能造成管道邊緣的些微變形。

4-3 四層膠膜晶片

(一) 緣由

一般而言，電泳晶片大多採取十字型晶片設計來作為進樣方式，因此本研究出初期也採取相同之設計；圖 4-11 為本實驗之十字型管道，藉由顯微鏡放大可清楚看出管道相交處的管壁形狀不如預期般平

整，歸咎其原因應在於切割管道時需先完成其中一條管道後，再切割出與其垂直相交之管道；在切割第二條管道時，會破壞第一條管道的完整性。為了解決此問題，曾試著在切割上做改良，如將膠膜黏於雙面膠上，再進行切割，以增加固定性；以及在切割第二條管道時，分成兩段式切割等等。以上方法雖然能增進管道之平整性，但離預期之目標仍有相當程度之差距。

由於有了雙面 PE 之護貝膠膜，因此我們構思，若是於個別兩層薄膜切割管道，再行接合，便不會有上述之缺陷產生。

(二) 製程

四層薄膜晶片之結構如圖 4-12 所示；

(1)首先於第 2 層薄膜上切割出樣品注入管道，以及使用打孔機製作樣品儲存槽、樣品廢液儲存槽、緩衝液儲存槽、緩衝液廢液儲存槽。

(2)再於第 3 層薄膜上切割分離用之管道，以及製作緩衝液儲存槽、緩衝液廢液儲存槽。

(3)最後再加上第 1、4 層薄膜進行護貝接合。

圖 4-13 為四層薄膜晶片之十字型管道圖，與先前三層薄膜設計相較之下，管道相交處並無突起或碎屑產生；也證明了四層薄膜設計是簡單且可完整切割出十字型管道。

(三) 實驗

在四層薄膜晶片製作完成後，我們以 Rhodamin B 作為樣品，ACN + H₂O + Formic acid 作為緩衝液來觀測其進樣情形，其進樣流程如圖 4-14 中所示；

實驗步驟為：

1. 首先在儲存槽中注入適量之二次水，再以針筒推入管道中做清洗工作，藉此以清除碎屑及雜質；清洗完成後，將水抽出。
2. 以相同方式將緩衝液注入管道中，在抽出各儲存槽中多餘之緩衝液後；注入 20 μ l 樣品於(1)樣品儲存槽，以及注入 20 μ l 緩衝液於(2)樣品廢液儲存槽、(3)緩衝液儲存槽、(4)緩衝液廢液儲存槽中。
3. 在(2)樣品廢液儲存槽加 200v/cm 之電壓，而(1)樣品儲存槽接地以注入樣品於注入管道中。
4. 在(4)緩衝液廢液儲存槽加 300v/cm 電壓，而(3)緩衝液儲存槽接地以推動管道相交處之 Rhodamin B 進入分離管道中

圖 4-15 為四層薄膜晶片十字型管道進樣圖。在圖 1 中可看到樣品充滿於管道 1、2 間，但有少許之擴散現象產生；圖 2 中，我們分別於 3、4 接地以消除此種現象。圖 3 至 5 為 Rhodamin B 開始進入分離管道之

過程；當樣品充滿於管道 1、2 後，去除管道 1、2 間電場後，再改加 300v/cm 電壓於管道 3、4 間，管道相交處之 Rhodamin B 因受到電場推動而向 4 前進。

(四) 結語

就四層膠膜晶片而言，其相較於傳統十字型晶片而言，並無極大差異，然而對於本研究來說，卻十分重要；在實驗之初，為了配合護貝膠膜基材之特性，在不斷的改良切割後，刀片切割法已可穩定的製作出微管道；然而在面對十字型管道切割時，卻是束手無策，一直無法刻畫出完整之十字管道。我們嘗試過許多種方式來製作微管道，如以加熱之細鐵絲或刀片來製作微管道或是以電腦刻字切割微管道等等。而經歷各項測試後，結果仍不理想。直到四層膠膜晶片之設計出現，才解決了此項問題；因此，四層膠膜晶片設計對塑膠薄層電泳晶片樣品注入的穩定性而言，有極大之助益。

4-4 冂字型晶片設計及製作

(一) 緣由

十字型晶片設計之特點在於其樣品注入量小，約為十字管道相交處之體積；然而其實際樣品需要量則不只如此，約為樣品儲存槽加上注入管道之總體積，而遠遠大樣品消耗量。由於在本研究之塑膠薄層

晶片，有著輕薄短小，彎曲自如之特性，因而可採取類似傳統毛細電泳之進樣方式，而衍生出可方便控制進樣量之「 Γ 字型晶片設計」。

(二) 製程

一般毛細電泳之實驗流程如圖 4-16 所示，主要可分為三個步驟；分別為(1)注入緩衝液(2)注入樣品(3)電泳分離。而本實驗也採取相同之實驗設計。 Γ 字型晶片如圖 4-17 中所示，其名稱乃取自於外觀形狀而來；在製程上大多與十字型晶片相同，只是少去了進樣用之管道而不用切割十字位置，而是將兩端作適當剪裁，並將其彎曲成 Γ 字型，改採以毛細作用或電動進樣作進樣工作。

(三) 實驗

在本研究中，我們混和 Rhodamin B (紅色) 以及 Xylene cyanole (藍色)作為分離樣品 (紫色)，ACN+H₂O+Formic acid 作為緩衝液，以上述之方式作進樣，並在晶片兩端加上 300v/cm 之電壓以觀測樣品之分離現象；

實驗步驟為：

- (1) 首先如圖 4-18 中所示，將 Γ 字型晶片之一端插入裝有緩衝液之 200 μ l 之微離心管，另一端則以中之小鐵夾夾上細橡皮管及針筒製成之特殊抽取器來吸取緩衝液；
- (2) 當管道中充滿緩衝液時，再如圖 4-19 中所示，分別將兩端置於

裝有染料及緩衝液之 $200\ \mu\text{l}$ 之微離心管，利用毛細作用作進樣工作。圖 4-20 為以此方法做進樣之晶片尖端。

- (3) 將已進樣之冂字型晶片的兩端個別插入裝有緩衝液之微離心管(圖 4-21)，在一端加上 300kV 之電壓(此時另一端接地)，開始進行電泳分離。

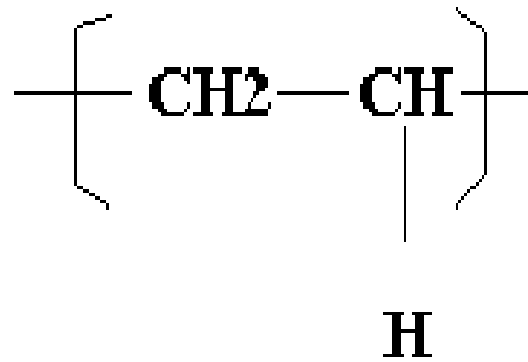
在電泳分離前，為了方便觀察必須先將冂字型晶片之底部加上一層厚紙板(如圖 4-22)，以作為進行電泳分離時晶片的固定之用。實驗結果如圖 4-23 所示，原本吸入之紫色樣品因受到電場力而分離為紅色帶及藍色帶。也證明冂字型晶片之分離能力。

(四) 結語

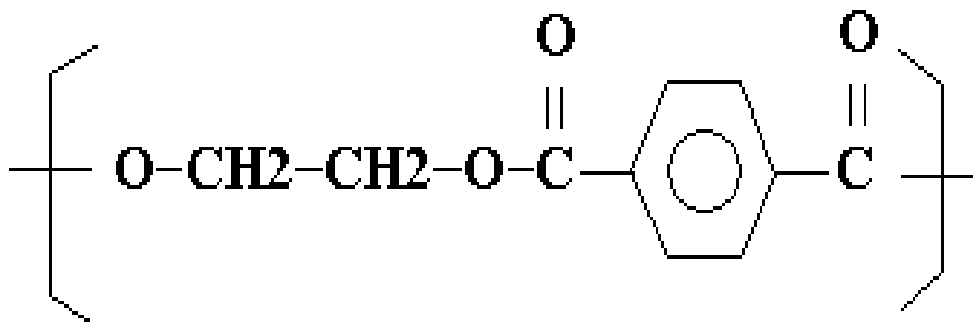
冂字型晶片在設計上明顯不同於傳統塑膠晶片，無論是外型上或是進樣方式上都有著相當大的差異；其設計理念主要是來自於傳統毛細電泳之進樣方式，再結合塑膠薄層電泳晶片的性質所產生之特殊設計。

圖 4-24 為傳統塑膠電泳晶片側視圖，其進樣方式是採用十字型晶片設計；在圖 4-25、4-26 中我們可看到傳統塑膠電泳晶片、塑膠薄層電泳晶片以及冂字型晶片之外形差異。其中薄層電泳晶片與傳統塑膠電泳晶片相較之下，雖然皆屬於十字型晶片設計，但製程上較為簡便，

且體積明顯小了許多。而冂字型晶片傳統塑膠電泳晶片相比，則顯得更加輕薄短小，進樣過程也較為簡便，且其樣品消耗量更遠低於一般十字型晶片。



PE (Polyethylene)



PET (Polyethylene terephthalate)

圖 4-1 PE 及 PET 之化學結構式

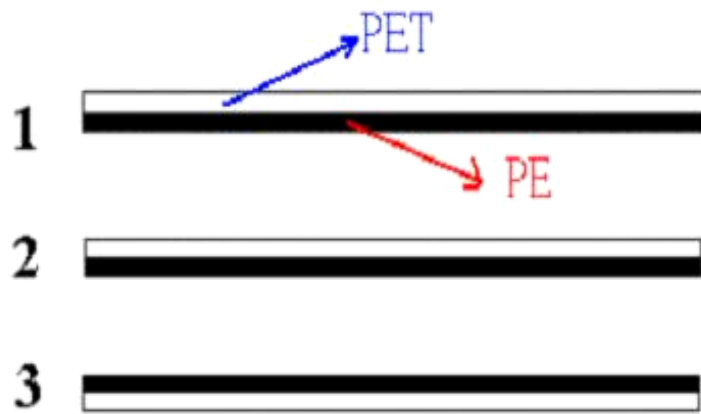


圖 4-2 單層 PE 護貝膠膜之電泳晶片結構圖

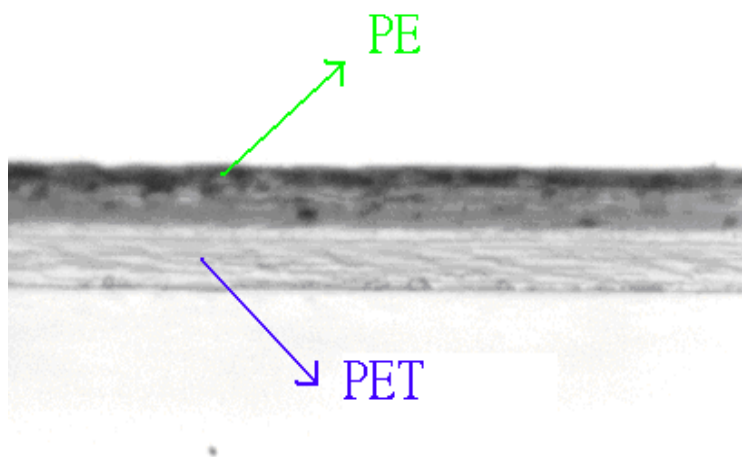


圖 4-3 單層 PE 護貝膠膜之切面圖

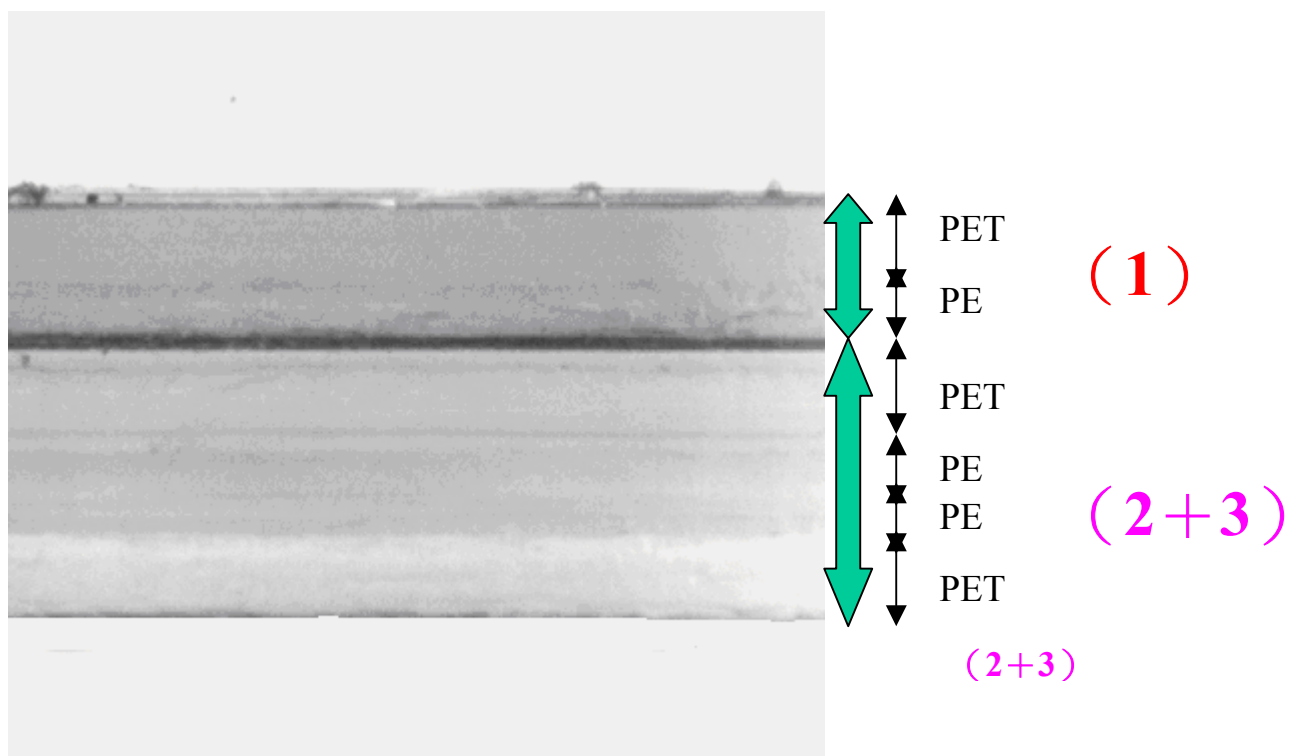


圖 4-4 單層 PE 護貝膠膜之電泳晶片切面圖(未產生空隙)

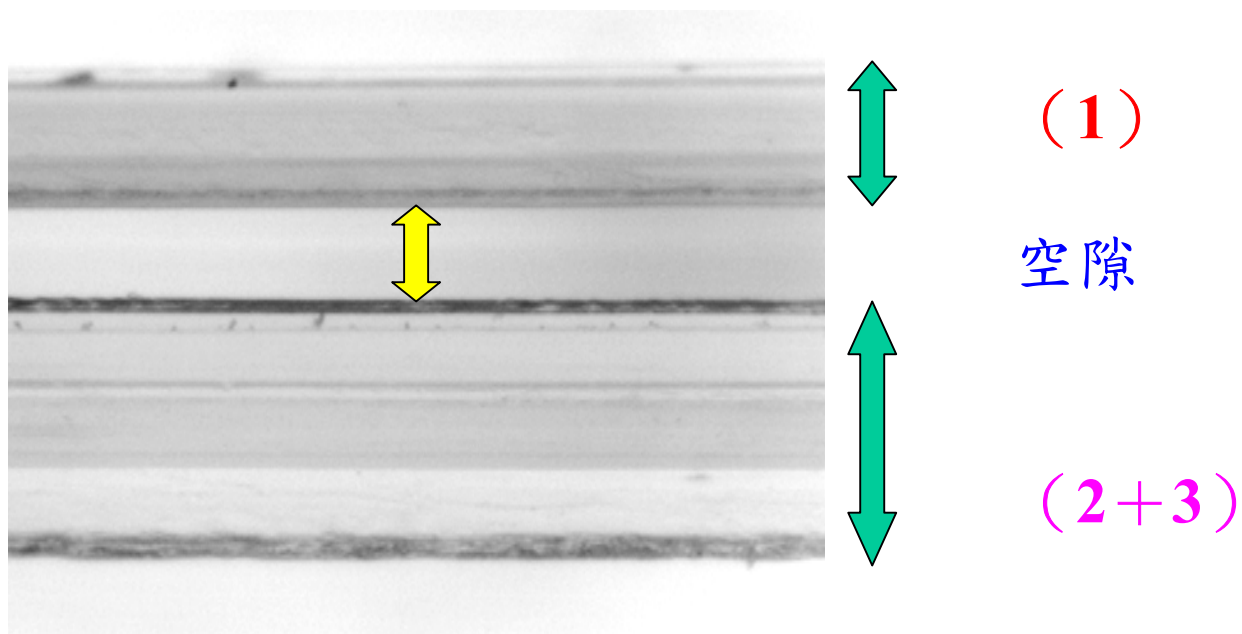


圖 4-5 單層 PE 護貝膠膜之電泳晶片切面圖(產生空隙)



圖 4-6 雙面 PE 之護貝膠膜切面圖

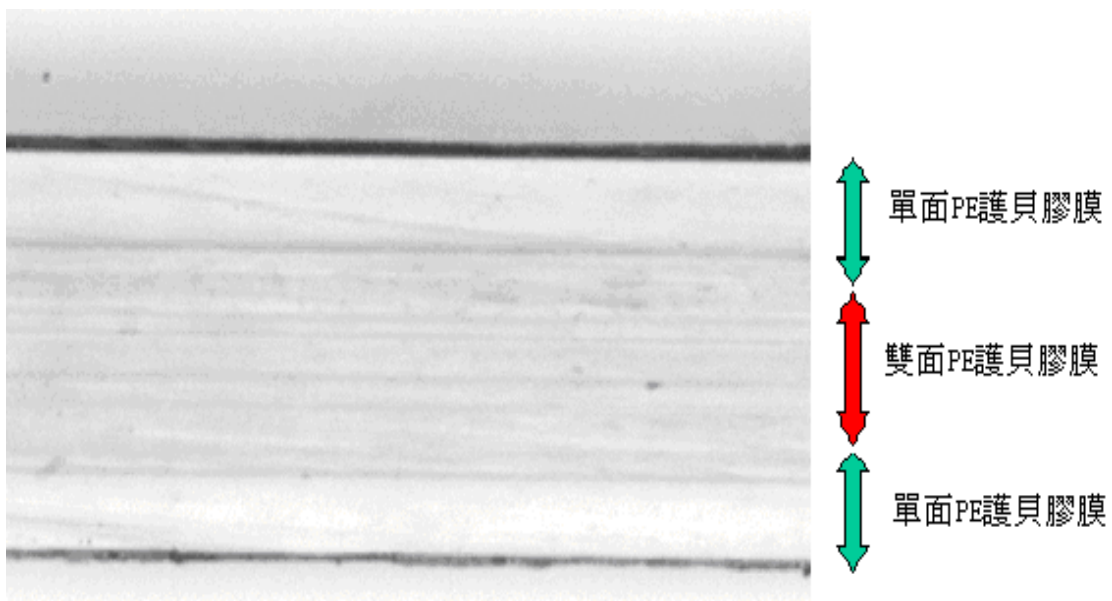


圖 4-7 以一層雙面 PE 之護貝膠膜加上二層單面 PE 護貝膠膜

接合而成之電泳晶片切面圖

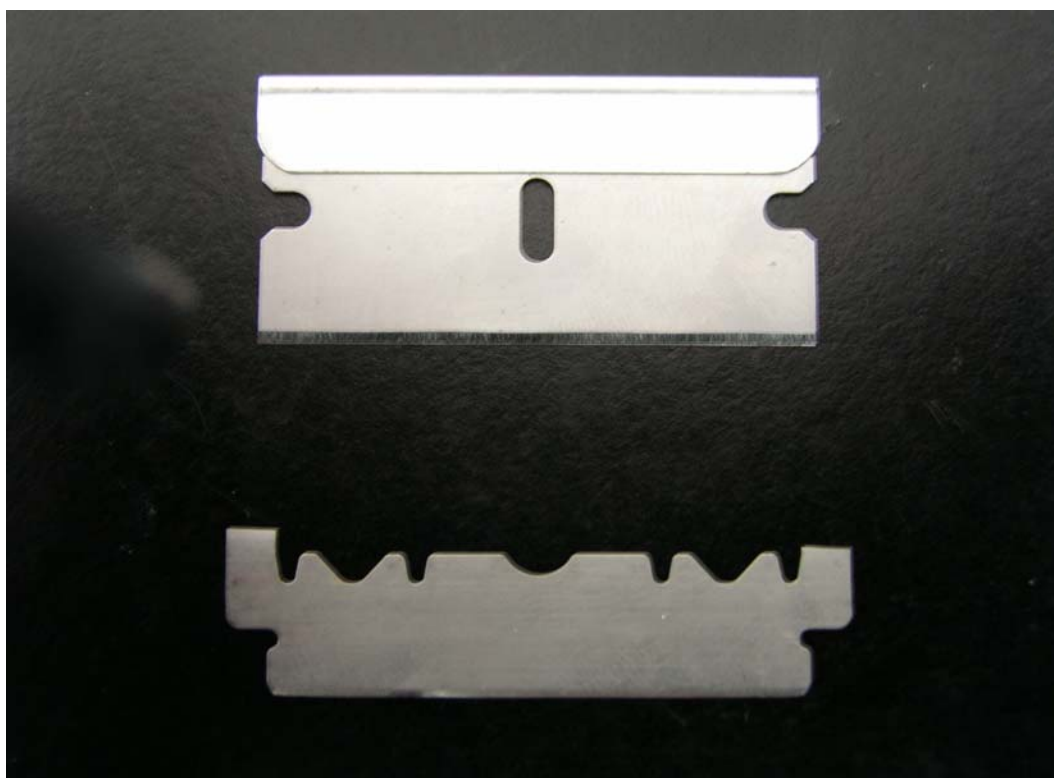


圖 4-8 割膠刀片(上方)以及刮鬍刀片(下方)之比較圖

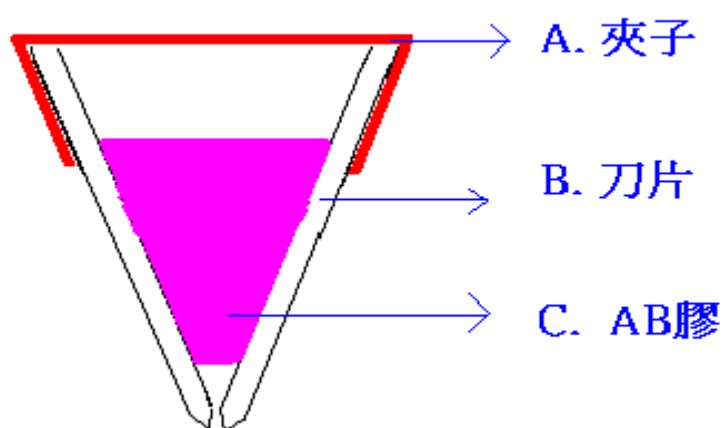


圖 4-9 切割工具之前製備圖

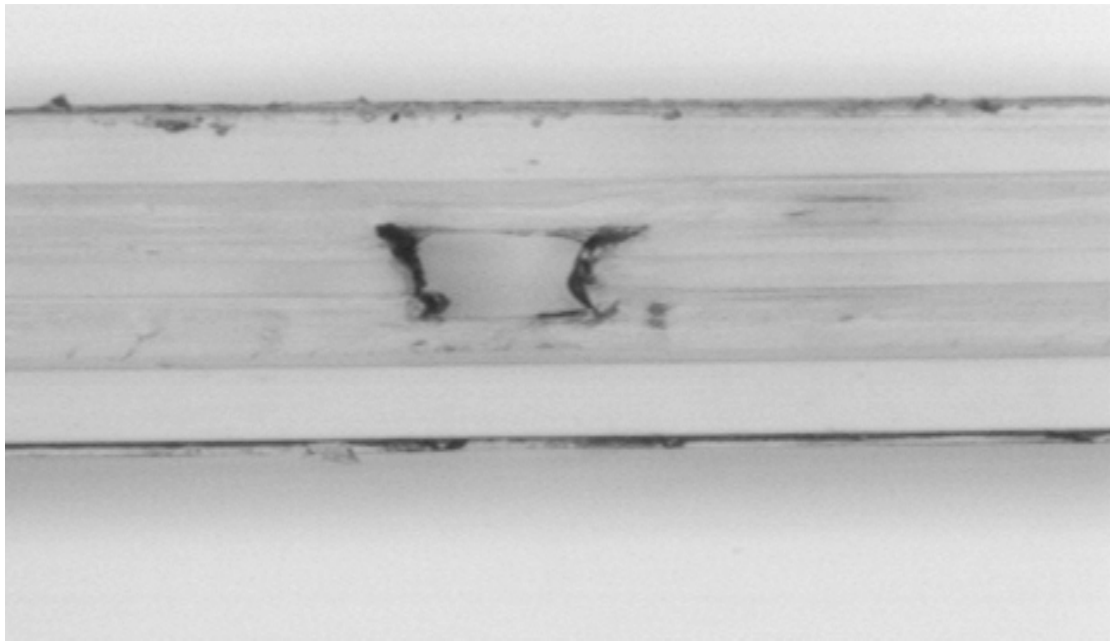


圖 4-10 (上)無前製備 (下)經前製備之割膠刀片所製作出之晶片切面圖

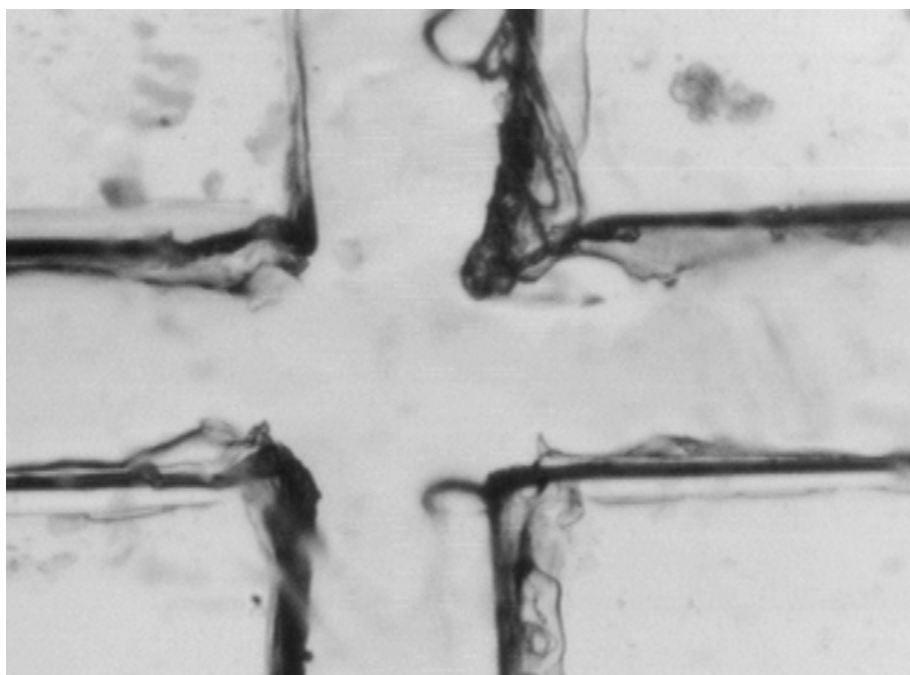


圖 4-11 手工切割十字型管道放大圖

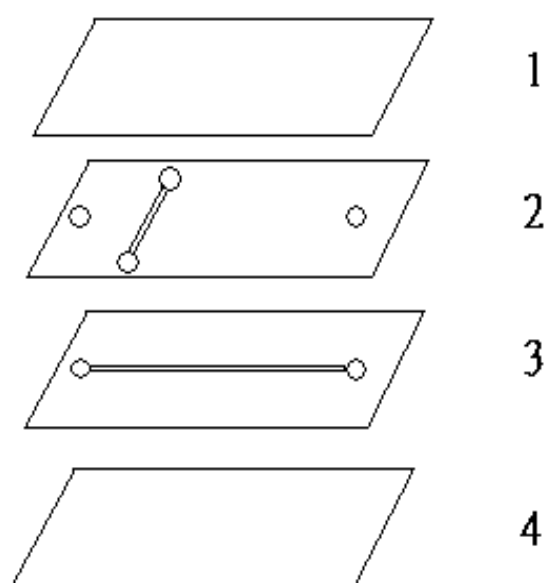


圖 4-12 四層薄膜晶片之結構圖

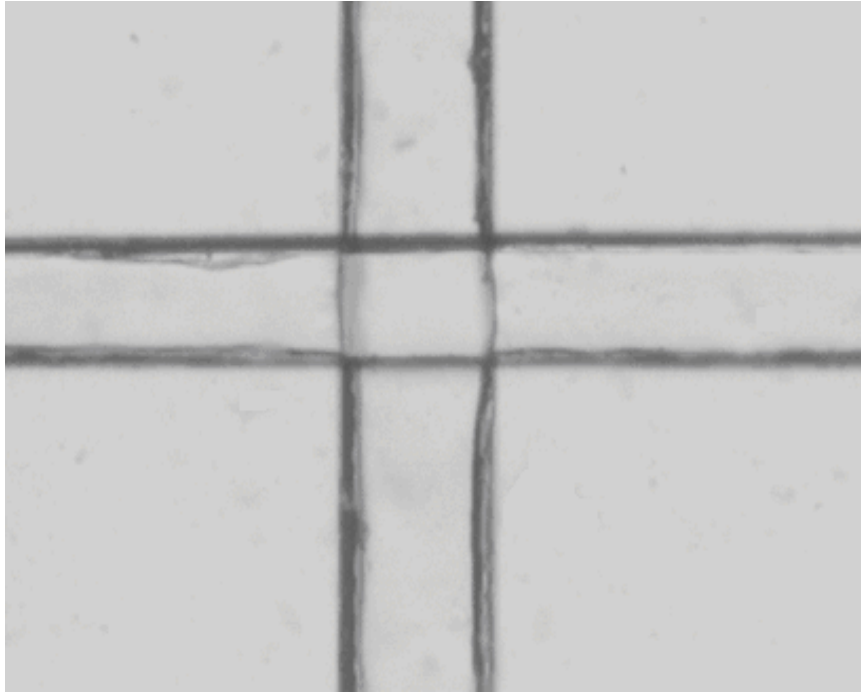


圖 4-13 四層薄膜晶片之十字型管道圖

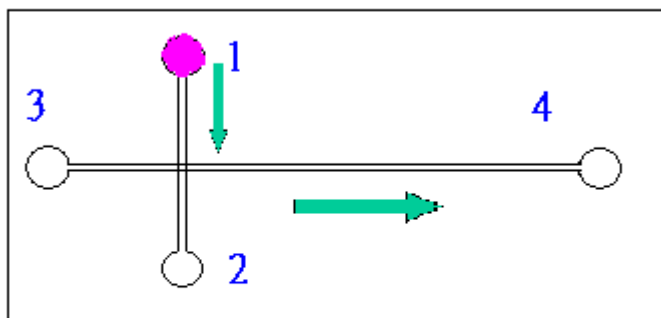


圖 4-14 四層薄膜晶片之進樣流程圖

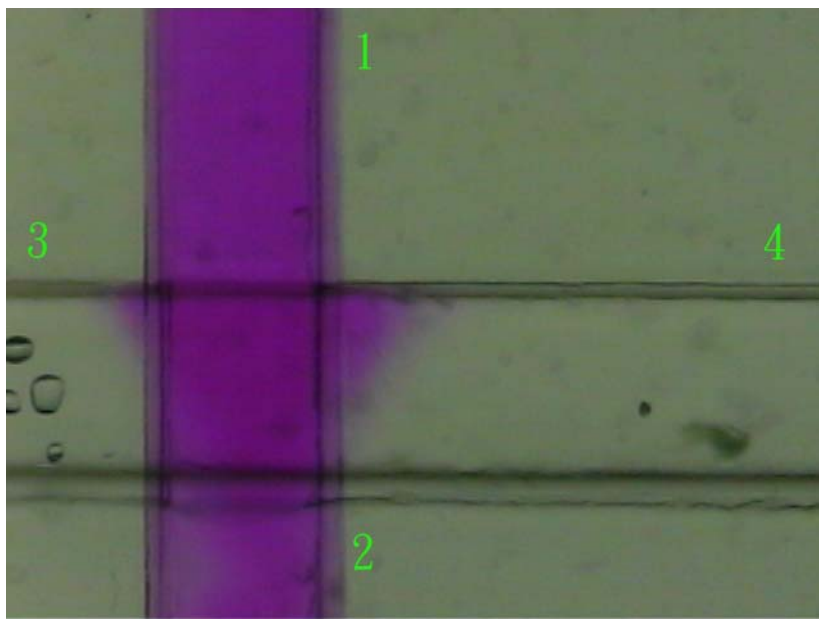


圖 4-15-1 四層薄膜晶片十字型管道進樣圖(2.4 未接地)

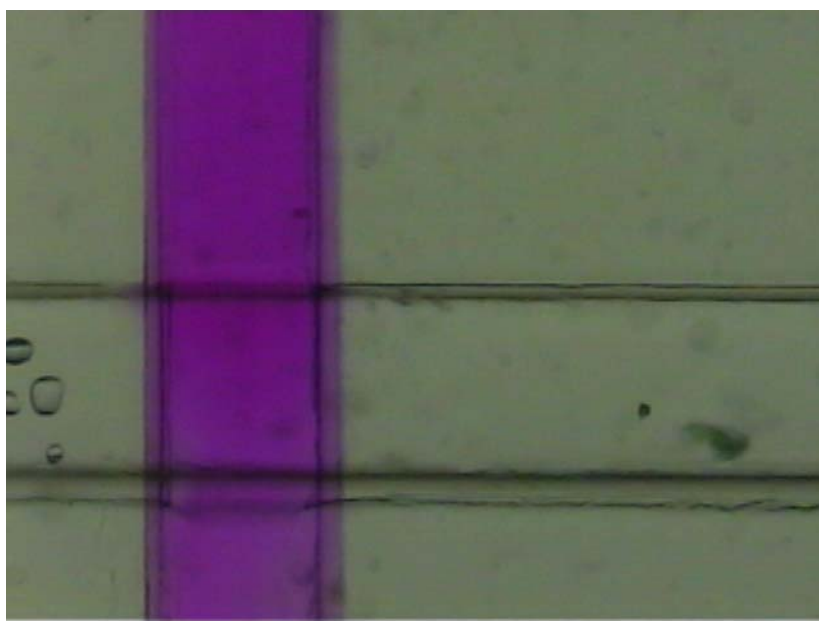


圖 4-15-2 四層薄膜晶片十字型管道進樣圖(2.4 接地)

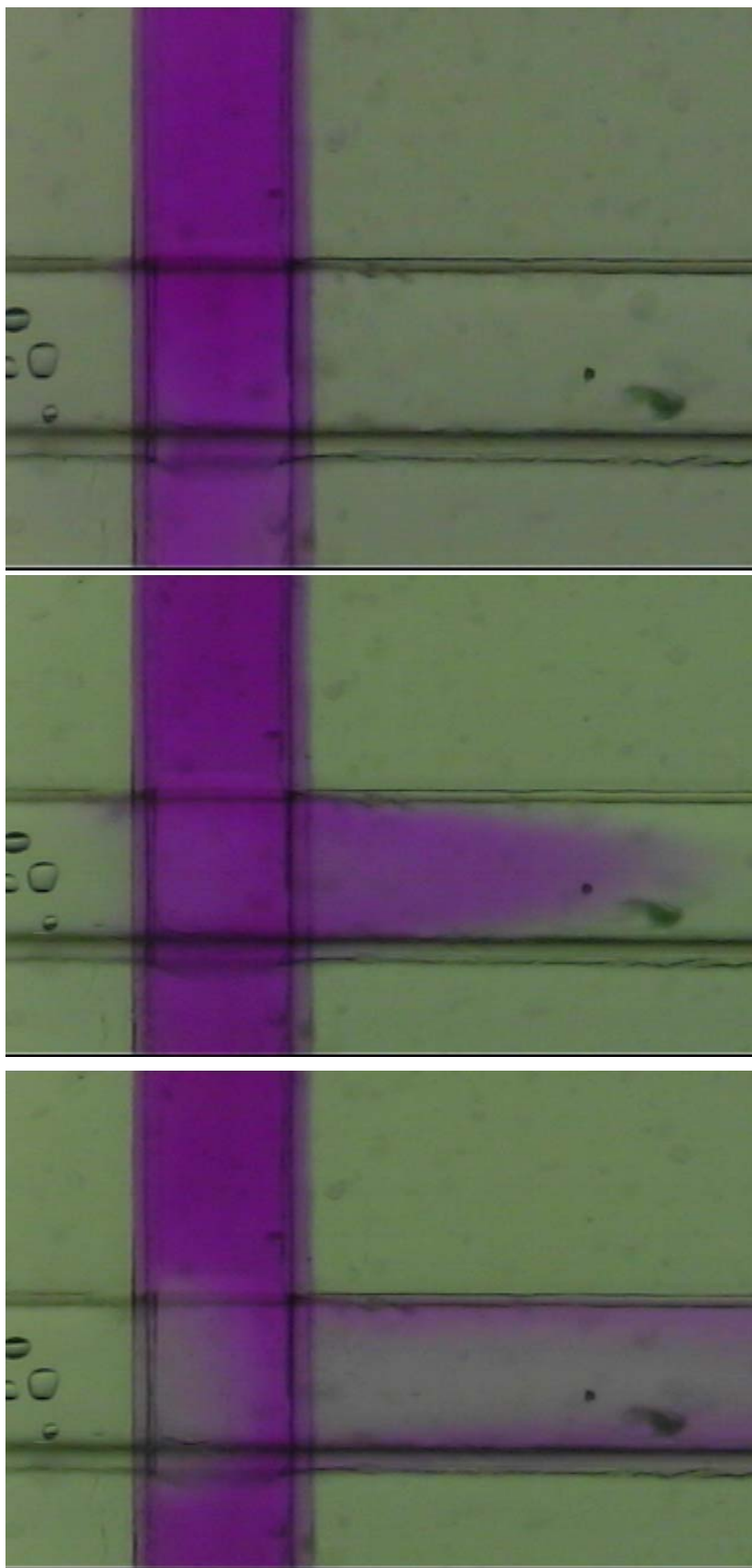


圖 4-15-3~4-15-5 Rhodamin B 開始進入分離管道之連續過程圖

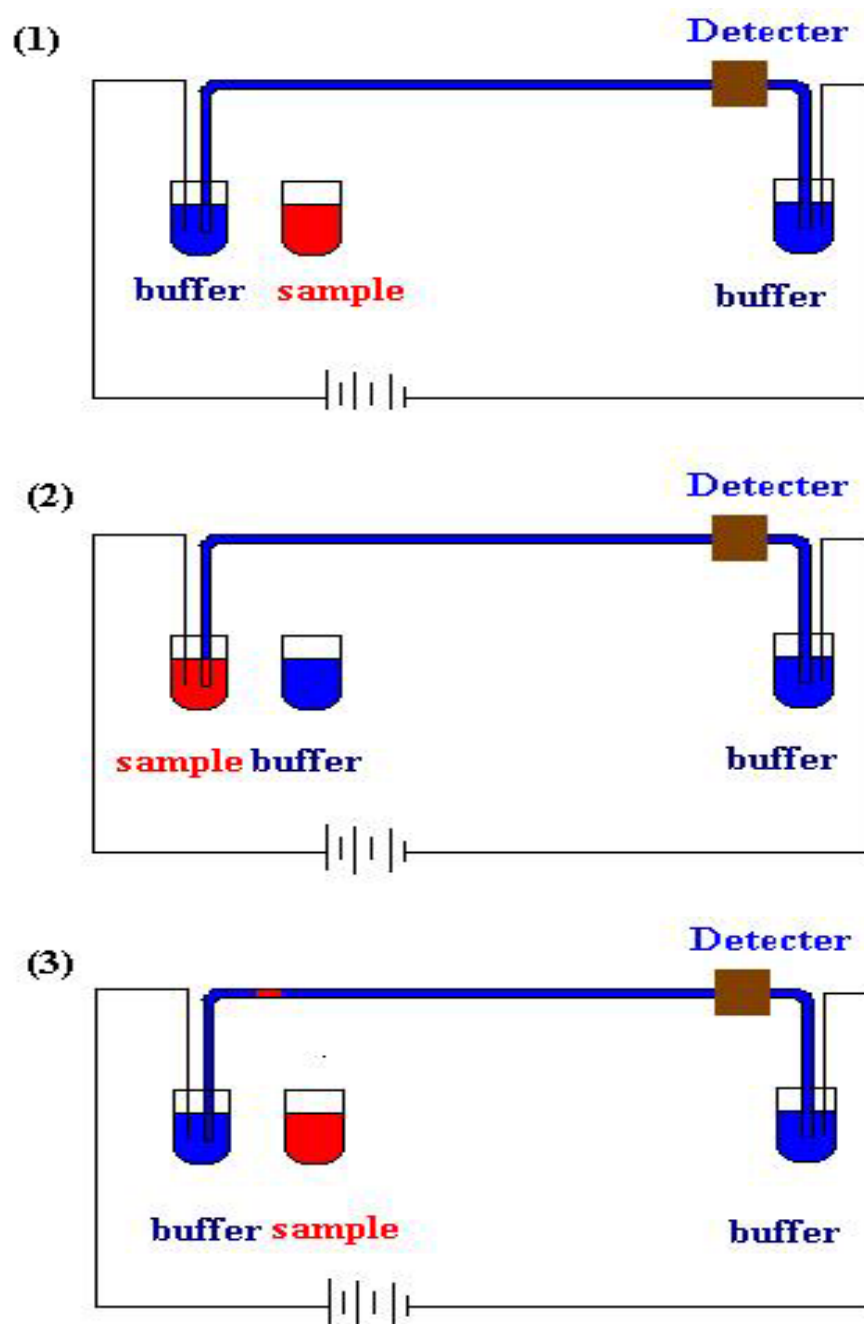


圖 4-16 傳統毛細電泳進樣過程圖(1)注入緩衝液(2)注入樣品(3)電泳分離

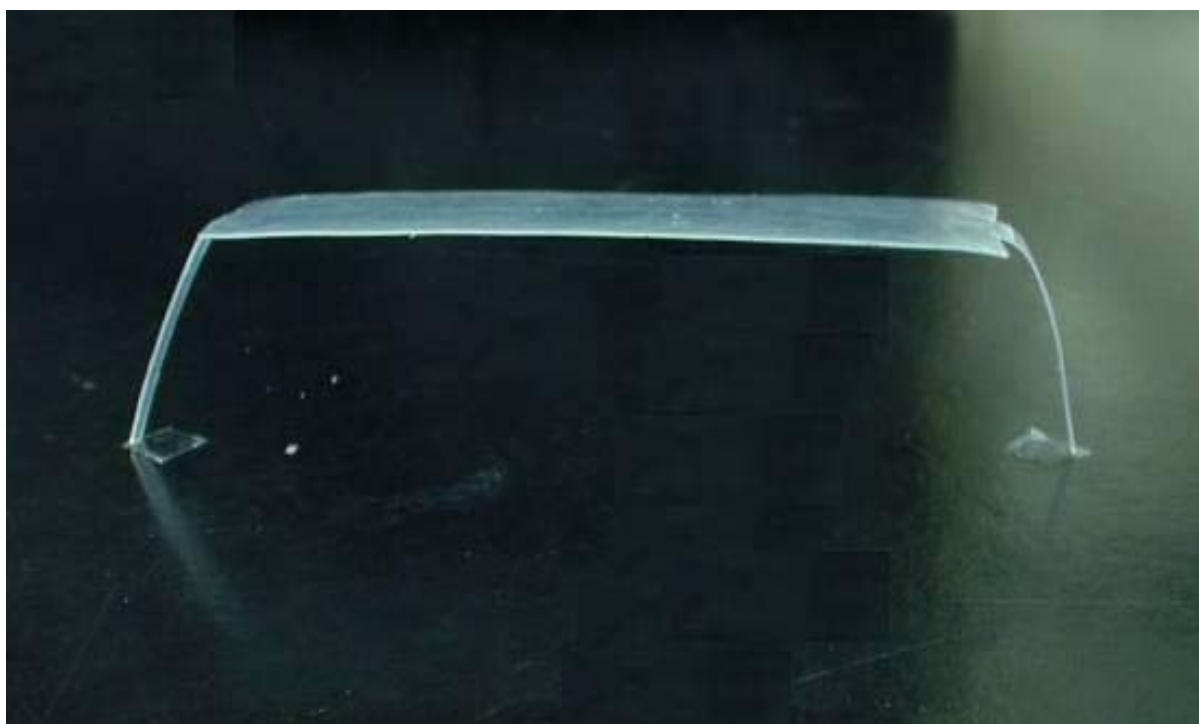


圖 4-17-1 冂字型晶片之側視圖



圖 4-17-2 冂字型晶片之斜視圖

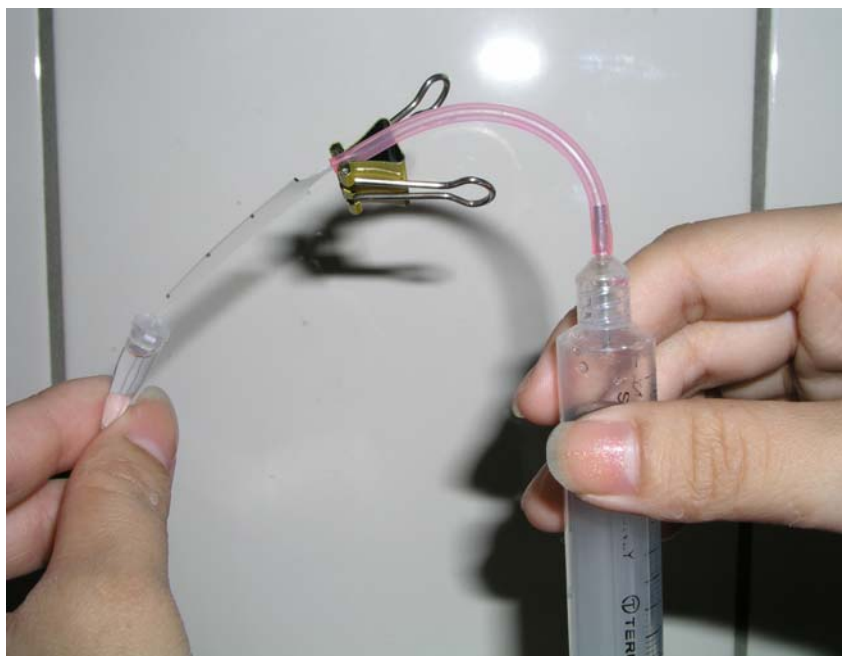


圖 4-18 冂字型晶片之抽取裝置圖

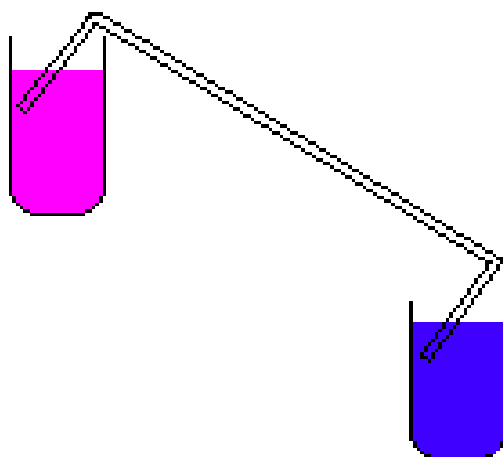


圖 4-19 冂字型晶片之進樣過程圖

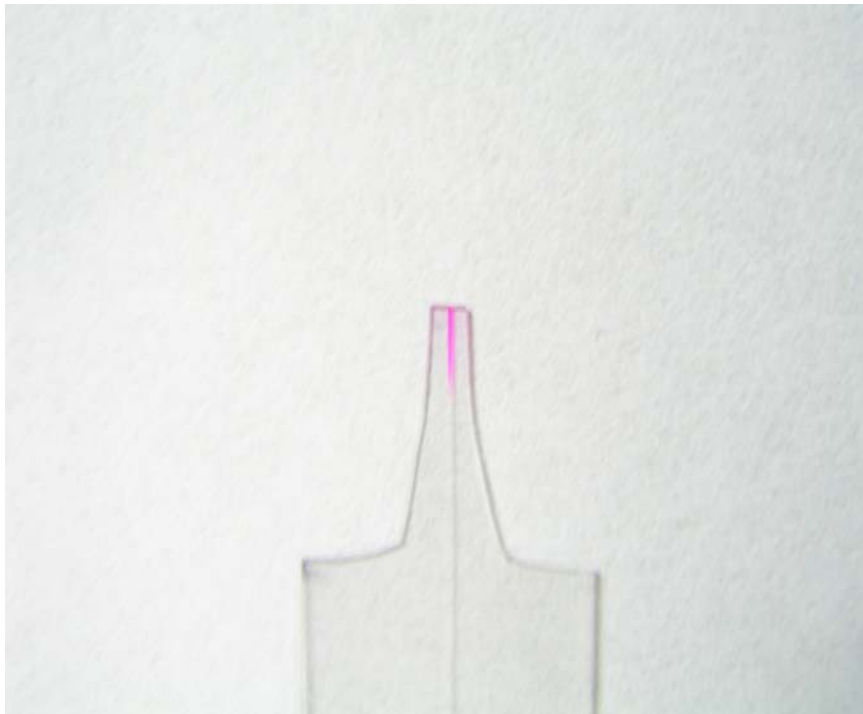


圖 4-20 冂字型晶片之進樣尖端圖

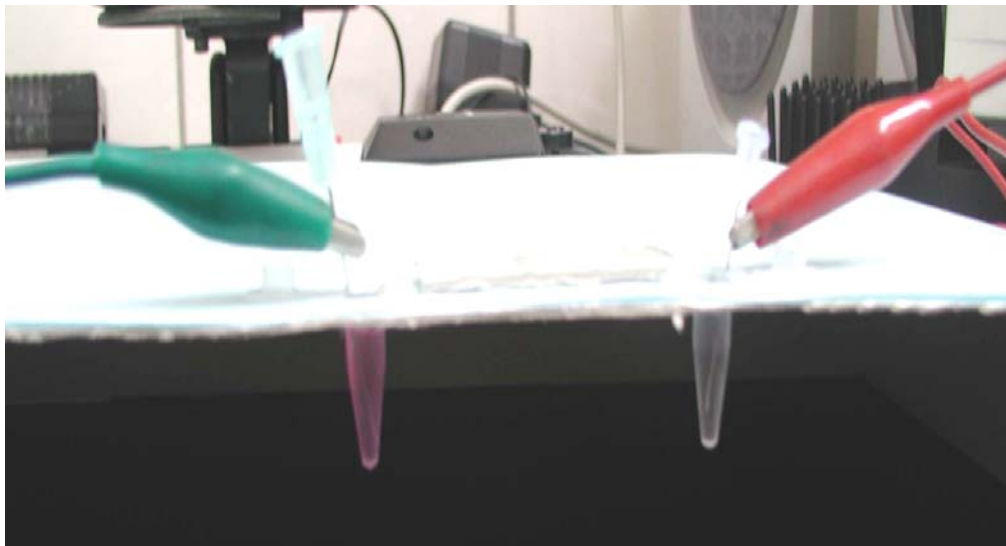


圖 4-21 冂字型晶片之電泳裝置側視圖

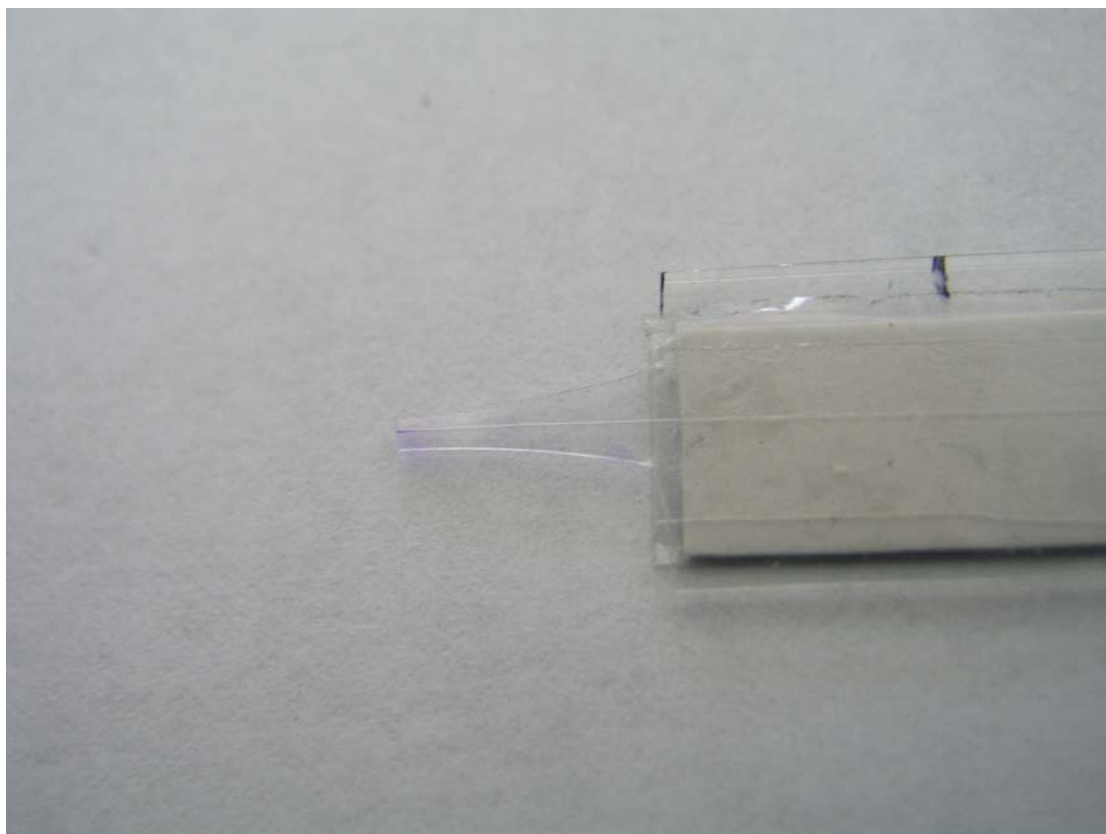


圖 4-22 電泳分離前之冂字型晶片圖



圖 4-23 冂字型晶片電泳分離圖

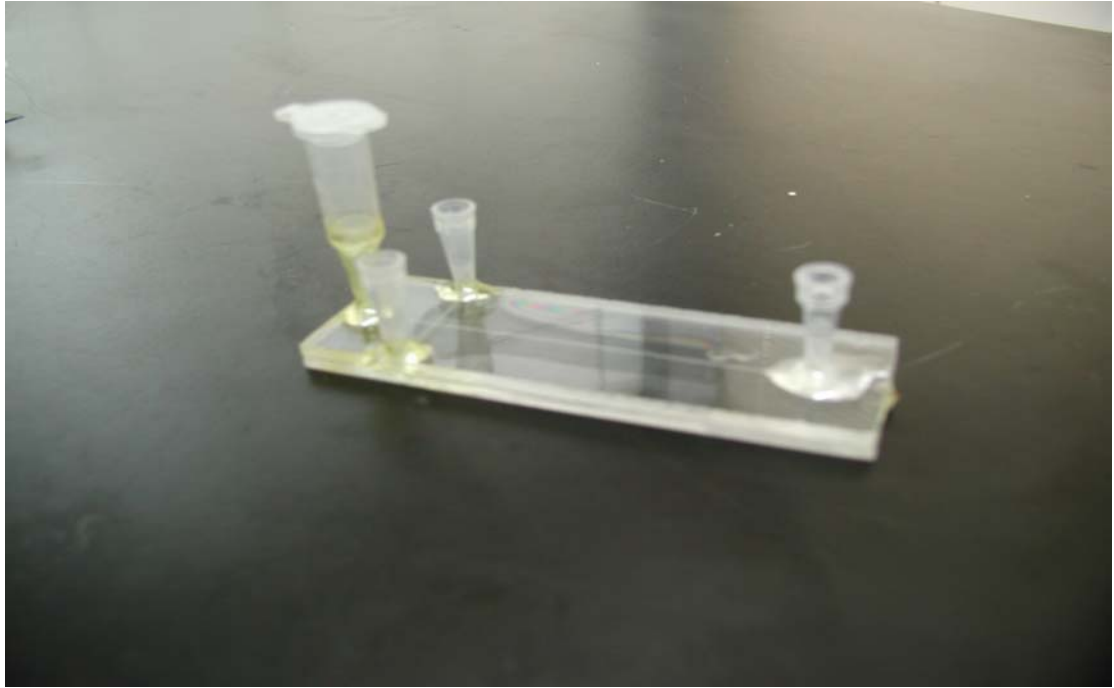


圖 4-24 傳統塑膠電泳晶片側視圖

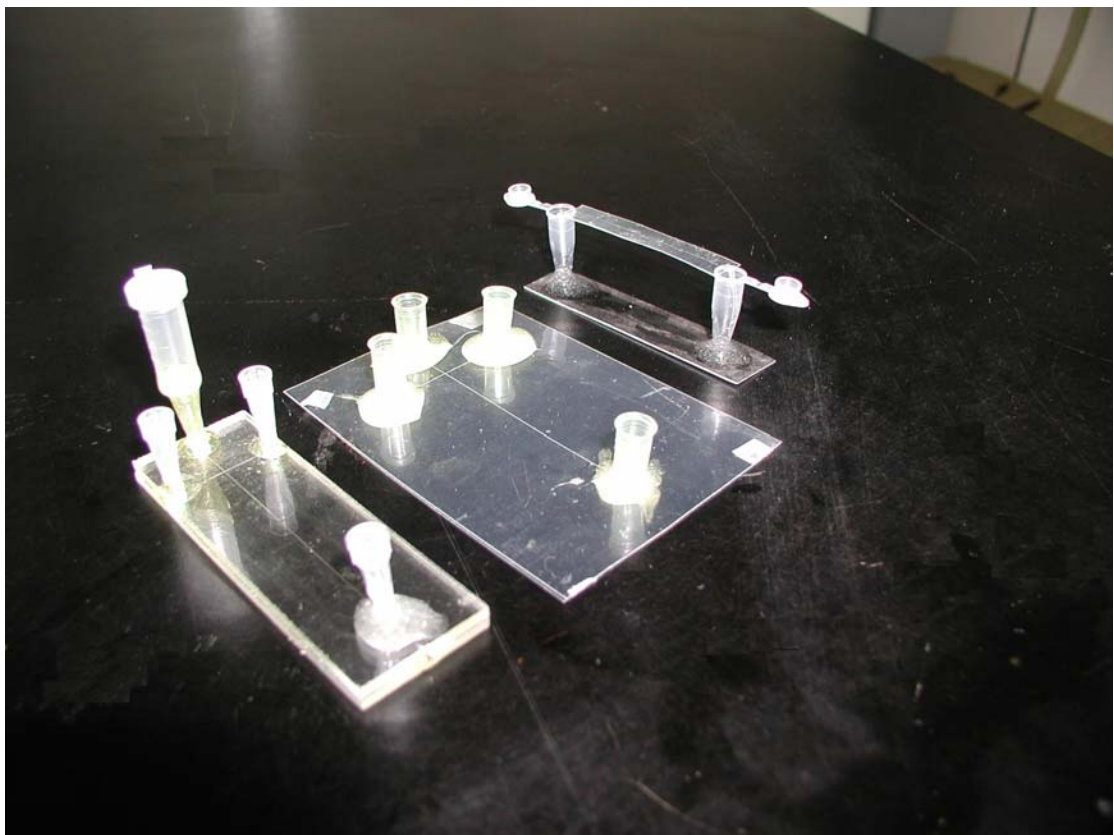


圖 4-25 傳統塑膠電泳晶片、塑膠薄層電泳晶片、U字型晶片之側面對照圖

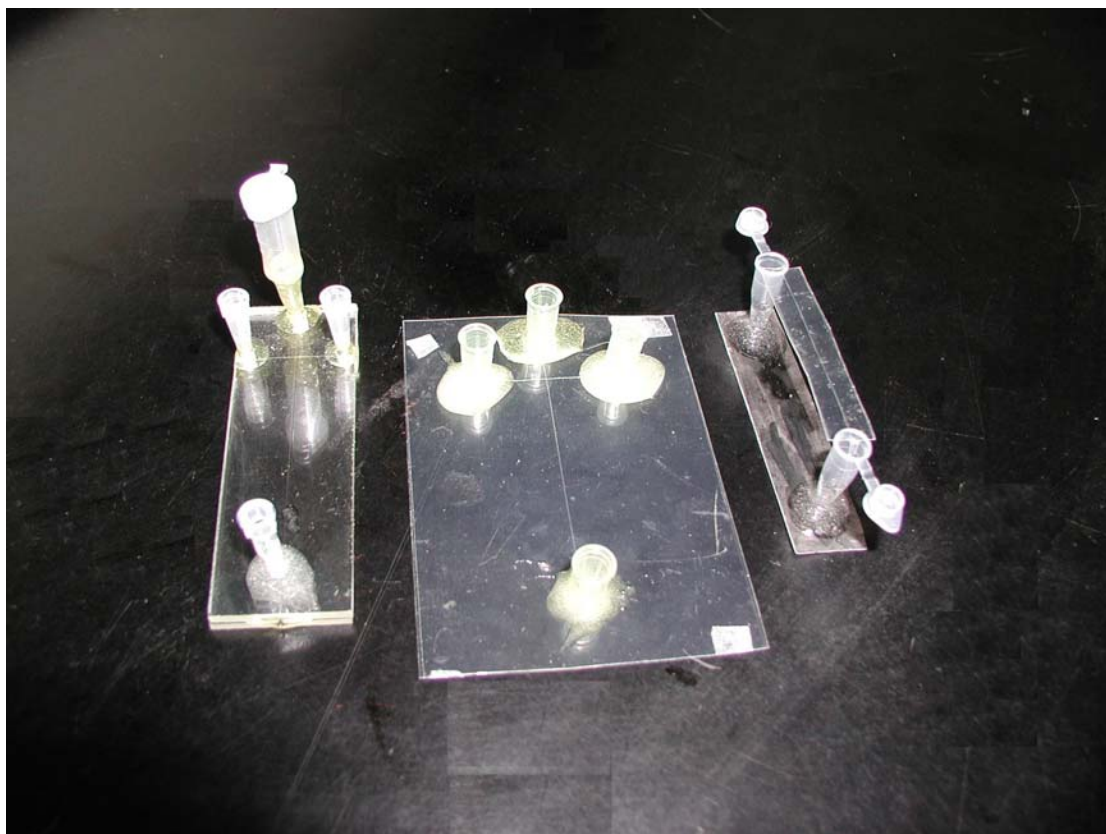


圖 4-26 傳統塑膠電泳晶片、塑膠薄層電泳晶片、U字型晶片之俯視圖