

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

塑膠薄型微電泳晶片之研究與質譜界面之製作

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-040-003-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學毒理學研究所

計畫主持人：張耀仁

計畫參與人員：吳雅雪，湯家麟，李秉鐸

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

塑膠薄型微電泳晶片之研究
與
質譜界面之製作

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號： NSC 92-2113-M-040-003
執行期間： 92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：張耀仁

計畫參與人員：吳雅雪，湯家麟，李秉鐸

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學 毒理學研究所

中 華 民 國 92 年 10 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

塑膠薄型微電泳晶片之研究與質譜界面之製作

The development and study of polymeric thin-film microchips for electrophoresis and mass spectrometry

計畫編號：NSC92-2113-M-040-003

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：張耀仁 中山醫學大學毒理所

計畫參與人員：吳雅雪，湯家麟，李秉鐸

一. 摘要

近年來，各項生化分析工具的微小化，使得分析物消耗量及分析時間大幅減少，已成為一股新的研究趨勢。其中毛細管電泳技術相較於傳統平板膠電泳而言，具有分析迅速、樣品需要量、分析效率高及可自動化之優勢，而結合微小化技術之毛細電泳晶片，更是樣品分析上的一大利器。在本研究中，採用 PE/PET 為電泳晶片基材，採用切割的方式製作出微管道，再配合高溫護貝技術，進行晶片接合。換句話說，本研究將原來三度空間製程，簡化成兩度空間製程，在割製原型完全不需要考慮到管道深度的問題，而有簡化製程、大幅縮短晶片製作時間、以及降低製作成本之優點。其次，針對塑膠薄型電泳晶片做性質上的探討，最後根據塑膠薄型電泳晶片易於裁剪的特性，製作一體成型的電灑法塑膠噴頭，而衍生出塑膠微電灑質譜晶片。總結本實驗之製程，皆以簡單、迅速為取向；期待能夠以更短的時間、更少的成本來大量化的製作出高效率之生醫分析工具。

關鍵字：毛細管電泳，塑膠電泳晶片，微電灑質譜晶片。

Abstract

Over the last years, the miniaturization of biochemical analytical tools has become an expanding field. Indeed, such devices allow decreasing both the consumption of analytes and the duration of analyses. Comparing to traditional slab gel electrophoresis, capillary electrophoretic methods show an advantage of fast analysis, low sample consumption, high analyzing efficiency, and automation. Recently the

developments of chip-based separation devices are increased speed and reliability at reduced sample consumption and cost, particularly microchip electrophoresis. In this study, a polymeric thin-film microchip for electrophoresis and mass spectrometry was developed. The micro channel is fabricated by micro blade method in PE/PET films, and then sealed by lamination. Because the fabrication without considering the depth of micro channel, it reduces manufacture process from the 3-dimension to 2-dimension in CE chip fabrication. By this way, we take advantage of simply fabrication process and less fabricating time and cost. The characterization of the polymeric thin-film electrophoresis microchip was tested and nanoESI chip was developed according to easy cutting, and sealing of the thin film. The merits and limitations of those approaches are discussed. To summarize, depending on simplification and rapidity; we looking forward to fabricate high efficiency analytical tools with less time and cost. Therefore, there is also potential for development of disposable diagnostic systems for biomedical applications.

二. 前言

毛細管電泳 (CE) 是近十多年來崛起的一種重要分離技術¹⁻³，由於具有進樣少、省溶劑、分離速度快與分離效率高的優點；再加上具有廣泛的應用性，諸如：有機酸、無機離子、殺蟲劑、染料、表面活性劑、維生素、掌性化合物，甚至於氨基酸、DNA、蛋白質、醣類、細胞或病毒之生化分析皆可進行³⁻⁹；近年來在人類基因體計劃中，成功發展出 96 條毛細管電泳儀器，成為高產能四色 DNA 定序儀，在 DNA 定序上成為關鍵性之儀器，加速了人類基因解碼計劃的完成與後續計劃，更證明了毛細管電泳的重要性。而將毛細管電泳微小化¹⁰⁻¹⁶，成為微電泳晶片，也常常成為發展微縮實驗室晶片的初期目標。

毛細管電泳微小化研究:利用半導體製程與微

裝置(microdevice)技術,在玻璃、石英玻璃及塑膠等不同的材質上挖出毛細溝槽,發展為微電泳晶片,受到各界極大的重視。由於大多數的毛細管電泳本來就是在熔融石英(fused-silica)的毛細管中進行,對玻璃類材質的表面化學性質與電滲透流的掌控早就有充分的研究,再配合半導體微製程技術,挖出數十微米的毛細溝槽可說是水到渠成。早期的微電泳晶片都是在玻璃材質上,以濕蝕刻的方式完成。而另一種不同於濕蝕刻的方式,稱之為「乾蝕刻」(dry etching),相對化學性質的濕蝕刻,乾蝕刻雖花費較高,但其可得較具方正構形的管道。

微電泳晶片的基本原理和毛細管電泳極為相似,應用的層面也類似,除了其樣品與緩衝液消耗量大幅的減少外,最吸引人的是:其分析的時間大幅縮短:由以分計時變成以秒計時;同時毛細管電泳晶片可以設計成可進行樣品前濃縮,來增加靈敏度。而為了增加分離效果,也可以填充各種顆粒,將固相萃取(SPE)或毛細電動層析(CEC)等整合在電泳晶片上¹⁷。在偵測器的配合上,除了可套用雷射引致螢光法(LIF)外,也成功的製造晶片型電化學偵測界面¹⁸⁻¹⁹,而在質譜儀的銜接上,亦可結合微電灑法質譜界面(nano-ES/MS)²⁰⁻²¹。

以往微電泳晶片大多是在玻璃材質上加工,藉由微影蝕刻等標準製程,進行光阻塗佈,烘烤,曝光,顯影,烘烤,蝕刻,去光阻等等製作。然而,玻璃材質昂貴,製作時複雜,除了需要精良的設備外,上下板黏合時需要極高的溫度與控制技術,可說是費工、費時、高經濟成本。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塑膠材質成本低廉,挖製微管道容易,同時上下板黏合時,只需要攝氏 150 度以下低溫,又容易大量製造成為拋棄式晶片,因此成了當前微電泳晶片的發展重點。近年來已成功的發展方法,利用線壓(wire imprinting)²²、雷射刻痕(laser ablation)²³⁻²⁶等方法製作原型晶片,或以半導體製程技術製作母模,結合原有塑膠翻製技術,如射出成型、鑄模、壓模等方式大量製造。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。

二. 實驗方法:

藥品及材料

Acetonitrile 購自美國 B.J.Baker 公司, Formic acid 購自於美國 Sigma 公司, Rhodamin B 購自於美國 CHROMA-GESELLSCHAFT 公司, Xylene cyanole 購自於美國 Sigma 公司, 電源供應器購自於美國 EG&G 公司, 護貝機購自台灣 L.A.Master 公司, 打孔機由德國 KNOPEX 公司所生產, 割膠刀片購自於美國 V.W.R 公司, 刮鬍刀片由日本 LION 公司所生產, 單面護貝膠膜購自於台灣 MAS 公司, 雙面 PE 護貝膠膜購自於日本 Lamin Card 公司, horse heart myoglobin 購自於美國 Sigma 公司, AB 膠購於台灣 G&Y 公司, Na₂HPO₃ 購自於德國 MERCK 公司, 二次水為 MilliQ 系統。

本研究之薄層塑膠電泳晶片乃採用一般市面上之護貝膠模(PE/PET)作為晶片基材,採多層護貝膠模結合而成。首先以特製之刀片在第二層膠模上切割出微管道,在管道切割過程中,刀片切割的角度,以及薄膜的固定都會影響到管道的成形。接著以打孔機在第一及第二層膠模上打孔,最後以護貝機作接合將切割好管道之薄膜夾於兩片護貝膠膜之中,再送入護貝機中做護貝工作即完成。整個接合工作費時約 3 秒鐘,且十分簡單而無技術上之考量。在護貝時,影響護貝品質最重要的因素於護貝樣品之平整性以及護貝機的溫度。若是護貝樣品不平整,則會造成成品彎曲或是表面產生皺摺;而護貝溫度不夠時,則會造成黏著效果不佳的後果。護貝完成之晶片再將剪裁後的塑膠微量吸管頭黏上孔洞,以便於施加電壓及存放樣品及緩衝液。

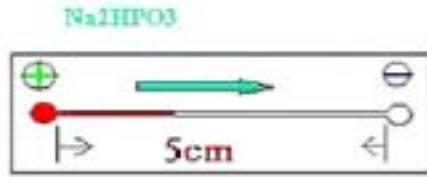
四. 結果與討論

塑膠薄層電泳晶片之研發

在電泳晶片的製程中,最重要的步驟便是管道之切割以及晶片的接合。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 μm 的刀片,來作為切割工具,直接於第二層膠膜上切割出十字,再以打孔機於第一及第三層膠膜上打孔,而後以護貝機將多層膠膜接合在一起。

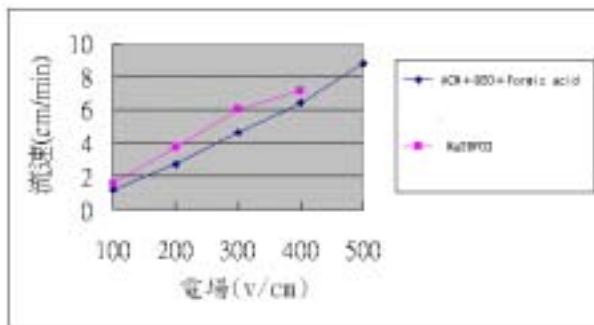
與大多數塑膠晶片設計相同,本研究也採取十字型晶片設計,研究為了易於施加電場;因此便在晶片孔洞上以 AB 膠黏合上塑膠微量吸管頭,以作為儲存槽。當塑膠薄層電泳晶片製作完成後,我們便開始測試其性質;首先是流速之測定。

實驗之裝置配備如下,我們以長度 5 cm 之單一管道晶片為測試模板,以 Rhodamin B 為指示標記, Na₂HPO₃ (20mM, PH7.4)為緩衝液, 300v/cm 電壓下;藉由量測染料從一端流動至另一端之儲存槽的時間,來代表其流速。實驗重複 10 次,並計算其平均值以及標準差。



圖一、以 Na_2HPO_3 為緩衝液之流速測定實驗圖。

其次是測試不同電壓下之流速變化，我們除了測試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緩衝液 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{Formic acid}(1/1/0.1\%)$ 為。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。實驗結果如圖二所示。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 $\text{H}_2\text{O} + \text{ACN} + \text{Formic acid}$ 系統，但此兩種緩衝液之流動方向相反。

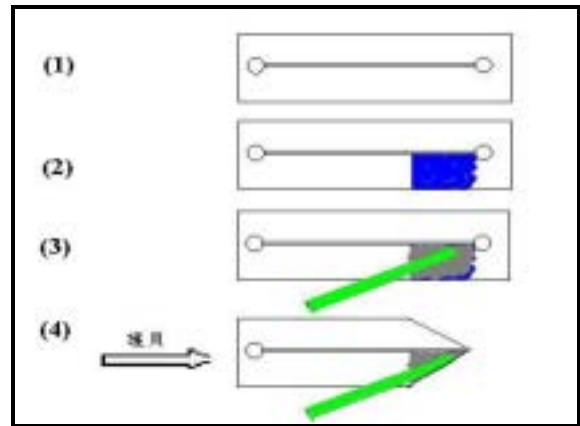


圖二、不同緩衝液之電場(v/cm)流速關係圖

原型塑膠薄層電泳晶片之研發

一般而言，電噴灑噴嘴之製作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裁剪的方式來製作質譜介面。

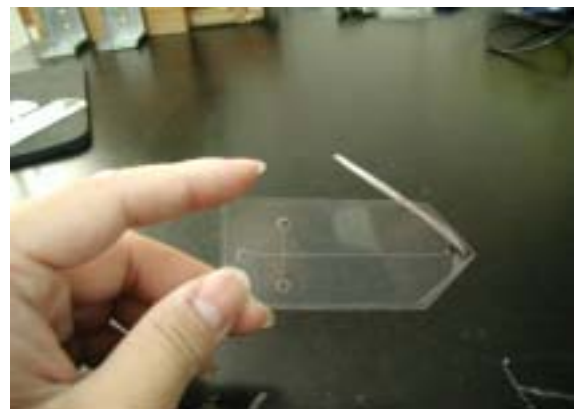
其製作過程 (圖三) 為：(1) 首先在護貝膠模上切割出管道，再以打孔機製作出樣品儲存槽(2) 在末端管道旁之膠膜上以油漆筆塗佈 (以便於碳層之沾附)(3) 在油漆層上以碳筆塗佈作為導電之用。(4) 延伸一段鋁箔以便於電壓的施加，隨後放入上下兩層膠模送入護貝機黏合，最後以小剪刀修剪出尖端以作為電噴灑噴頭。製作完成之塑膠薄層電泳晶片質譜界面其外型如圖四與圖五所示。其測試過程為：首先以針筒將溶液推送並充滿著整個管道中，接著在鋁箔加上高電壓以開始進行電噴灑。在電噴灑過程中，我們藉由拍攝系統 (結合顯微鏡、CCD 攝影鏡頭、影像擷取卡及電腦) 來觀察及紀錄電噴灑現象。



圖三、電噴灑噴嘴之製作流程圖



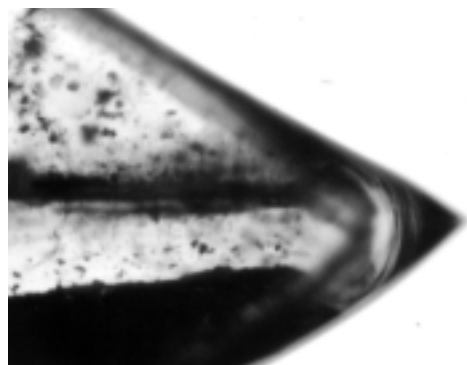
圖四 一般(上)與薄層(下)塑膠-電泳質譜晶片圖



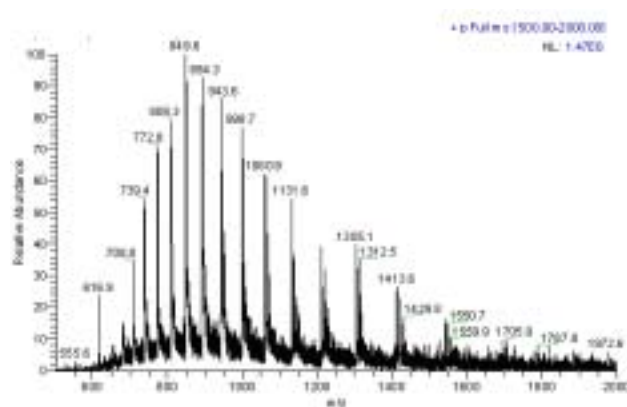
圖五 本研究之薄層塑膠電泳質譜晶片正視圖

圖六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；研究觀測到：當電壓逐漸增加，噴嘴之尖端也漸漸出現泰勒錐；當電壓加至 2.2kv 時 (距離為 1cm)，開始出現電噴灑現象。隨後，我們將質譜晶片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質譜晶片將其噴灑離子化，直接進入 LCQ 質譜儀分析 (Thermo Finnigan)，設定質量分析範圍為質荷比 500-2000。分析結果如圖七所示；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。



圖五 薄層塑膠電泳質譜晶片泰勒錐圖



圖七 薄層塑膠微電灑質譜晶片測得之蛋白質質量圖。(horse heart myoglobin 濃度為 10 pmol/ul)

5. 結論

本研究中，為了突破傳統晶片製作繁瑣之缺點，因而採用以塑膠膠膜為微電泳晶片材料，輔以切割法製作微管道，最後再以簡易操控之護貝技術完成晶片接合工作。與其他塑膠晶片製程相比，薄層晶片具有以下特點：首先是把製作毛細溝槽的難度降低，由原來三度空間降低成兩度空間的製程。其次，整個製程十分快速，切割與熱護貝只需數分鐘即可完成。同時此塑膠晶片厚度不到 300 微米，其重量極輕、攜帶保存十分方便；而當以光學類偵測器作檢測時，其穿透度更勝於一般之塑膠微流晶片（遠大於 3 厘米）。

本研究亦針對薄型塑膠電泳晶片作性質上的探討，如以 Rhodamin B 染料作標記來量測其流速、流

向，以及在不同緩衝液及不同電壓下之變化，與一般 PMMA 塑膠電泳晶片極類似；此外，藉著本研究發展出之微電噴灑噴嘴，將 horse heart myoglobin 直接送入液相質譜儀 (LC/MS) 作分析的實驗，也顯示薄型塑膠電泳晶片可直接與質譜儀連接，進行各項生化分析。

在進行下一階段之研究-將塑膠薄型電泳晶片實際應用於生化分析上之前，仍有問題尚待解決；例如分離 DNA 時，緩衝液過於黏稠，而有不易推送之慮；進行蛋白質分析過程中，如何減少吸附之影響等皆需要再努力。本研究之最終目的在於以最低的成本來快速製作出可拋式之塑膠晶片；若再配合縮微晶片實驗室 (Lab-on-a-Chip) 設計概念將可大幅縮短整體分析時間。此種大量、快速、可自動化及低成本之分析工具，將有助於疾病偵測、醫藥研發、及蛋白質研究上，以期收到事半功倍之效。

參考文獻

1. Jorgenson, J.W. LuKacs, K.D. *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1298-1304.
2. Li, S. G.Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Elsevier: Amsterdam, 1992.
3. Foret, F. Krivankova, J. Bocek, P. *Capillary Zone Electrophoresis*. N. Y.: VCH, 1993.
4. Kuhn, R. Kuhn, S. H. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer-Verlag: Berlin, 1993.
5. Landers, J. P., Ed. *Handbook of Capillary Electrophoresis*; CRC: Boca Raton, FL, 1994.
6. Drossman, H.; Luckey, J. A.; Kostichka, A. J.; D' Cunha, J.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* 1990, 62, 900-903.
7. Swerdlow, H.; Gesteland, R. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 1415-1419.
8. Cohen, A. S.; Najarian, D. R.; Karger, B. L. *J. Chromatogr.* 1990, 516, 49-60.
9. Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettingner, J. C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H. M. *J. Chromatogr.* 1992, 593, 253-258.
10. Jacobson, S. C.; Hergenroeder, R.; Koutny, L. B.; Warmack, R. J.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 1107-1113.
11. Jacobson, S. C.; Hergenroeder, R.; Moore, A. W., Jr.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4127-4132.
12. Woolley, A. T.; Mathies, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 11348-11352
13. Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.*

- 1996, 68, 720-723.
14. Chiem, N.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* 1997, 69, 373.
 15. Liu, S.; Shi, Y.; Ja, W. W.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* 1999, 71, 566-573
 16. Figeys, D.; Aebersold, R. *Anal. Chem.* 1998, 71, 3721-3727.
 17. Gavin, P. F.; Ewing, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 8932-8936.
 18. Wang, J.; Tian, B.; Sahlin E. *Anal. Chem.* 1999, 71, 5436-5440.
 19. Hadd, A. G.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1999, 71, 5206-5212.
 20. Zhang, B; Foret, F.; Karger. B. L. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1051-1022.
 21. Martynova, L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M.; Kramer, G.; Christensen, R. G.; MacCrehan, W. A. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4783-4789.
 22. Roberts, M. A.; Rossier, J. S.; Bercier, P.; Girault, H. *Anal. Chem.* 1997,69, 2035-2042.
 23. Xu, J.; Locascio, L.; Gaitan, M.; Lee, C. S. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1930-1933
 24. McCormick, R. M.; Nelson, R. J.; Alonso-Amigo, M. G.; Benvegna, D. J.; Hooper, H. H. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626-2630.
 25. Soper, S. A.; Ford, S. M.; McCarley, R. L.; Kelly, K.; Murphy, M. C. *Anal. Chem.* 2000, 72, 642A-651A.
 26. Bianchi, F.; Chevolot, Y.; Mathieu, J.H.; Girault, H. *Anal. Chem.* 2001,73, 3845-3853