

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

創新之奈米操控/檢測平台應用於單分子膜蛋白動態研究--
奈米細胞膜片電位箝制晶片-包覆式微液滴操控，脂質雙層
膜型成，電生理訊號量測整合平(子計畫三)(3/3)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型

計畫編號：NSC 99-2627-M-009-001-

執行期間：99年08月01日至100年07月31日

執行單位：國立交通大學奈米科技研究所

計畫主持人：范士岡

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 100 年 09 月 29 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

創新之奈米操控/檢測平台應用於單分子膜蛋白動態研究--
奈米細胞膜片電位箝制晶片-包覆式微液滴操控，脂質雙層膜
型成，電生理訊號量測整合平(子計畫三)(3/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2627-M-009-001-

執行期間：99年8月1日至100年7月31日

執行機構及系所：國立交通大學奈米科技研究所

計畫主持人：范士岡

共同主持人：

計畫參與人員：林依縈、許耀文、黃郁珊

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查

詢

中華民國 100 年 9 月 28 日

中文摘要

人工的脂質雙層膜被廣泛的運用在膜蛋白的電生理量測及研究上，而近年來對於實驗室晶片的發展，讓建構人工脂質雙層膜的技術擴展到微流體晶片上。本子計劃成功的以數位微流體晶片技術，發展出以介電濕潤驅動包覆式液珠而形成脂質雙層膜的系統，可在微米等級的孔洞上，形成懸浮式的脂質雙層膜，並以光學觀測和電訊號的量測進行脂質雙層膜成膜確認，所測量到的脂質雙層膜比電容為 $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、厚度為 4.8 nm ，和文獻符合。之後我們在脂質雙層膜上嵌入膜蛋白以電生理訊號進行離子通道的研究，我們成功的以本計畫建構的晶片系統對 Gramicidin 和 α -Hemolysin 進行電生理量測，我們得到 α -HL 的導電率在 $1 \text{ M}/0.1 \text{ M}$ 的電解液中為 500 pS ，而在 0.1 M 得電解液中為 100 pS ，和文獻中的結果也十分相近。另外更進一步的利用光學螢光觀測 V-PPase 水解焦磷酸並傳輸質子的生理運動，藉著 V-PPase 傳輸質子所造成螢光分子的衰退，來驗證其嵌入脂質雙層膜之生理運動。

為了方便觀察成膜的過程，我們對於此系統做最佳化。我們將矽晶圓的成膜孔洞改成乾膜光阻(PerMx)使得整個晶片呈現透明以便在光學系統上觀察更清晰，並將原來的方形孔洞改成圓形孔洞，且縮小孔洞面積使其有效的提升脂質雙層膜的維持時間，最後，搭配兩種標定不同螢光脂質分子形成兩顆不同的包覆式液滴進而在本晶片上形成非對稱脂質雙層膜(Asymmetric)並量測，其計算得其厚度為 5.62 nm ，成膜維持時間 31 分鐘。

在未來，我們將會設計出加（電）壓成膜系統，其目的為希望能主動掌控成膜的過程並在全油環境執行，希望能讓成膜環境更穩定，最後再著手於平面式的銀/氯化銀電極使得晶片的功能更完整。

關鍵字：介電濕潤，脂質雙層膜，離子通道，V-PPase，電生理量測。

Abstract

Artificial lipid bilayer membrane (BLM) was prevalently applied in the electrophysiological research of membrane proteins. Recently, researchers make efforts to introduce the technique of microfluidics into BLM formation to realize bio-assays in a single chip. In this study, we developed a system to form a BLM suspending across a $100\ \mu\text{m}^2$ hole with the assistance of encapsulated droplet manipulated by EWOD (electrowetting-on-dielectric) and thus the formed BLM was inspected by optical and electrical analyses. Herein, the measured specific capacitance and thickness of the BLM were $0.5\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ and $4.8\ \text{nm}$, respectively, in accordance with the literature. In addition, gramicidin and α -hemolysin were incorporated and studied by transmembrane current measurements after BLM formation, where the conductance of single ion channel of α -hemolysin was $500\ \text{pS}$ in upper droplet/lower droplet $0.1\ \text{M}/1\ \text{M}$ KCl solution and $100\ \text{pS}$ in upper droplet/lower droplet $0.1\ \text{M}/0.1\ \text{M}$ KCl solution. Furthermore, the PPI hydrolysis and the induced proton transportation of V-PPase were studied under a fluorescent microscope, where the decay of fluorescent molecules was caused by proton transportation of V-PPase to confirm the physical movement of BLM.

In order to observe clearly process of BLM and to increase its lifetime, we improved the system. First, the opaque silicon-based hole was substituted by transparent dry photoresist (PerMx). Second, we diminished the area of hole and changed its dimensions from $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ square-shaped hole to $50\text{-}\mu\text{m}$ -diameter circle-shaped one. Finally, an asymmetric BLM whose thickness was $5.62\ \text{nl}$ for $31\ \text{min}$ was formed by a encapsulated droplet with Rhodamine B molecules and another one with Fluorescein molecules.

In the future, we will design the applied electric field BLM system for controlling efficiently the process of BLM. In addition, in order to form a stable and durable BLM, the droplet will be manipulated in the oil filler medium. Finally, the co-planar Ag/AgCl electrodes will be also integrated into the chip to complete the system.

Key words: electrowetting, lipid bilayer membrane, electrophysiology, ion channel, V-PPase.

一、前言：

微小化技術的發展，開啟了文明史上新的一頁。上個世紀以來，人們開始思考，尺寸的縮小，對於現階段的科技與生活將帶來如何的衝擊。體積以房間為單位計算的第一代電腦，現在可由筆記本大小的膝上型電腦取代，元件體積縮小的極限拓展，不僅造成可攜式產品誕生，更成就了反應及處理速度的極致發揮。微機電系統 (Microelectromechanical systems, MEMS) 便是這一波進步的主力戰將，是以微電子製程為出發點，製造微小元件的新領域，將微電子控制與微結構、微致動器、微感測器等元件，功能性的整合出多變化的系統，廣泛應用於各個領域，包括汽車、通訊、航太、能源、儀器工業、顯示科技、醫學工程、生物技術等；因此，微機電系統發展至今已成為兼具學術研究及產業發展潛力的技術平台。

然而隨著世代的推進，微米尺度的元件已經不能滿足於人們對於科技的渴求，奈米等級元件的發展已然成為下一波發展的趨勢，因應而生的便是奈米機電系統 (Nanoelectromechanical systems, NEMS)。有別於一般微小化製作之微機電技術，奈米機電技術不但承襲了微機電技術之黃光微影製程，更引入了逆向操作之自組裝技術，利用分子在元件表面自行組裝而形成奈米尺度級的結構。曾有人說：「科技是為了解釋生命的意義而存在」，將微機電系統整合於生物醫學領域的概念便是如此，能更進一步且更有效的進行生物研究。

發展最多的例子便是將微機電系統運用於檢測型的生物晶片上，其特色便是可大大減少生物樣本的需求量、以陣列式平行處理來縮短檢測時間、增加靈敏度並可進行模組化，形成功能齊全的微小晶片模組[1-3]。這樣的生物晶片大多是屬於微流體系統晶片，結合了微尺寸的結構製程和流體的驅動，可應用在各式各樣不同的生化分析、檢測，比如說基因的定序或分離、蛋白質分子篩選、生物細胞研究等等。近期也持續微小化朝向可攜帶式的元件，達成 Point-of-care (POC)，再加上配合了光學、電子電路的訊號，集聚了控制、傳輸、反應、分離，偵測分析於一體，可謂新時代生物醫療診斷之整合。

而本實驗便是利用微機電技術開發出可形成人工的類細胞膜環境之晶片，藉以提供一可研究離子通道型膜蛋白的平台，對於一般蛋白質生理研究和藥物的傳輸與開發上皆有很大的幫助，以實現「實驗室晶片(Lab on a chip)」的目標。

二、研究目的：

各式細胞上的膜蛋白種類成千上萬，至今仍有許多尚未被解密。了解膜蛋白的生理現象和機制，不論是對於相關疾病能清楚掌握，在藥物的傳遞和研發新藥上，也會有所幫助。而由於膜蛋白必需存在於細胞膜上才能表現其生理運動的特性，而原始研究膜蛋白所利用的細胞膜片箝制技術，一方面要準備表面結構單純的細胞過程複雜，另一方面箝制技術操作較為困難且需要熟練度，因此建構出可形成人工脂質雙層膜的系統晶片，並同時具備電性和光學上的觀測，將是更有效且方便的研究平台。另外，從前面回顧的現存各種成膜系統中我們可以將之比較並發現，動態的數位微流體的成膜系統比起一般的微流道系統，能有更多的變化和功能，可更微小化的以液珠為單位而非整個流道，晶片的製程也更簡單快速且低成本，並能在同一晶片中即分離成數個單一的系統，是更有效率的實驗室型晶片。

於是我們希望能結合實驗室本身發展完善的數位微流體操控技術，結合電生理量測，開發出建構人工脂質雙層膜的微系統晶片。我們選擇利用一些典型的離子通道蛋白來測試我們的系統，除此之外也希望能實際的將此系統運用在研究其他的膜蛋白。

本子計畫目的為建立並改善人工合成脂質雙層膜之晶片，希望藉由微機電系統的優勢結合生物分子的特性，進而達到能快速並簡易的合成人工的脂質雙層膜，提供一個膜蛋白之研究平台。此外，藉由嵌入 α -hemolysin，驗證人工脂質雙層膜的存在與在此平台上觀測通道蛋白之可行性。在原始的成膜系統中，我們最主要遭遇到的問題是等待雙層膜形成所需的時間較長，而因為液珠揮發的問題，造成成膜後能維持的時間減短。原始系統中薄化的機制是藉由 Decane 溶液的自然揮發，帶著兩層單層膜慢慢靠近而形成脂質雙層膜，可以說是較為被動的等待其自然形成。因此，我們希望能在薄化的過程中，對其施加一壓力，加速薄化所需要的時間。並且為更加主動控制與觀測此人工合成脂質雙層膜系統，也設計出加壓薄化系統希望能掌控成膜的過程，縮短成膜所需時間，並發展平面式的銀/氯化銀電極進而整合電生理偵測訊號系統與介電濕潤驅動系統，使得此平台能對脂質雙層膜有更多樣性的操控與應用。最後結合子計畫一的研究，將膜蛋白 V-PPase 以微粒體 (Microsome) 的形式嵌入脂質雙層膜中，並同時以生理電訊號量測與光學觀測來觀測並記錄其活性和運動的模式。

三、 文獻探討：

細胞膜存在於大部分細胞中，藉以區隔細胞內部和外界環境，並具有控制物質進出細胞的重要功能[4]。細胞膜的構成分子為脂質(lipid)、一些初階的蛋白質(protein)及少量的醣類(sugar)。脂質是一種兩性分子(amphoteric molecular)，結構如圖一，是構成細胞膜的基質，會自動整齊的排列成雙層膜的模式，因此稱之為脂質雙層膜(Lipid bilayer)。

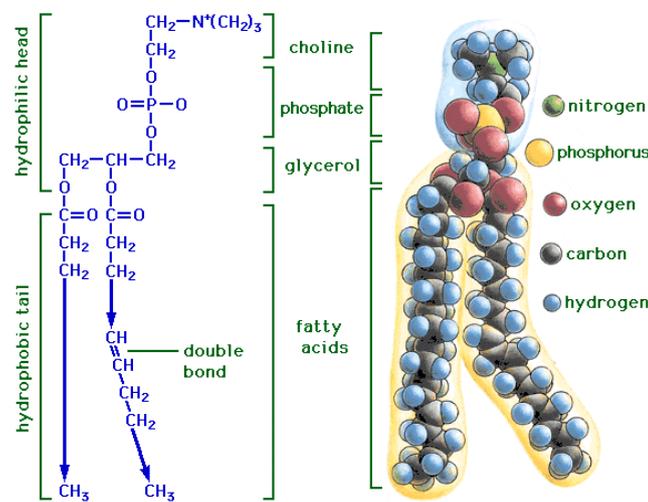


圖 1 脂質結構模型[5]

脂質雙層膜上除了有一些維持結構的分子，如醣類、膽固醇(Cholesterol)外，還有許多各式各樣的蛋白質鑲嵌其中並具有流動性，而有一大部分位於膜上的蛋白質是橫跨於細胞膜上，連繫著細胞膜內外，管理著物質的進出[6]，稱為膜蛋白。膜蛋白常常和一些常見疾病的發生，直接或間接地有些關係，更甚至在治療疾病或藥物研發中，扮演著非常重要的角色。因此對於膜蛋白的研究，一直是十分重要。由於膜蛋白必須在細胞膜上才能完整地表現其特性與功能，所以往往必須是直接到細胞膜上研究膜蛋白。而原始研究膜蛋白所利用的細胞膜片箝技術，一方面要準備表面結構單純的細胞過程複雜，另一方面箝制技

術操作較為困難且需要熟練度，因此建構出可形成人工脂質雙層膜的系統晶片，並同時具備電性和光學上的觀測，將是更有效且方便的研究平台。因此如何有效、迅速、簡單的形成一人工脂質雙層膜，便成為研究膜蛋白時的一項重要課題。而近年來，微機電系統被開發且部份應用於微流體系統的生物晶片，此種晶片結合了微尺寸的結構製程和流體的驅動，可以用來做各式各樣不同的生化分析、檢測，比如說基因的定序或分離、蛋白質分子篩選、生物細胞研究等等。不僅能做到輕薄短小、可攜帶式晶片，對於檢體的需求量也可大大的減少，分析速度也可藉由陣列式平行處理來提升。在眾多不同的流體驅動方式中，介電濕潤是一個十分有高效率且簡單的方法。

由於介質表面特性不一，兩種不互溶的介質接觸時會在介面中產生電雙層(Electrical double layer, EDL)，圖 2，電雙層由 Helmholtz 在 1853 年利用數學運算將其模型為一簡單的對稱電容[7]。而在 1875 年，Lippmann 團隊提出若將電雙層視為一電容，則介面中的表面張力可藉由充於此電容的電能進行控制，如下式：

$$\gamma = \gamma_0 - \frac{1}{2}CV^2 \quad (3-1)$$

其中 γ 、 γ_0 和 C 分別表示施加電壓時表面張力、初始表面張力以及電雙層之比電容。然而對於一顆在固體介質上的液珠來說，其固液氣三相接觸的邊界上存在著三種表面張力，分別是固氣、液氣以及固液間的表面張力平衡，如圖 1.3。

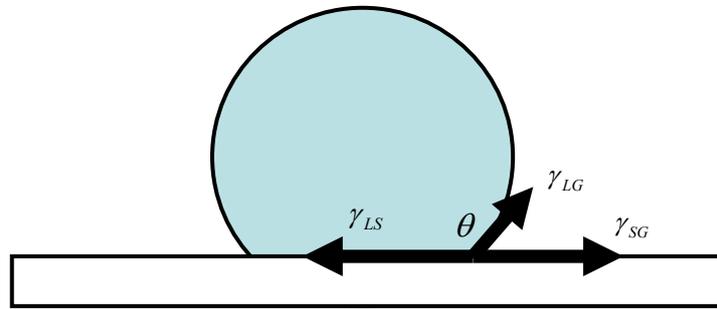


圖 2 三相表面張力平衡示意圖

因此，方程式(3-1)之 Lippmann's equation 可結合方程式(3-2)的 Young's equation 成為方程式(3-3)的 Lippmann-Young's equation[8]：

$$\gamma_{LS} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} \cos \theta \quad (3-2)$$

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{1}{2\gamma_{LG}}CV^2 \quad (3-3)$$

方程式(2-3)即為電濕潤的中心思想，其物理意義是可藉由在電雙層中施加電壓而改變元件表面的親疏水性，並反應在元件上液珠的接觸角(contact angle)，見圖 3。

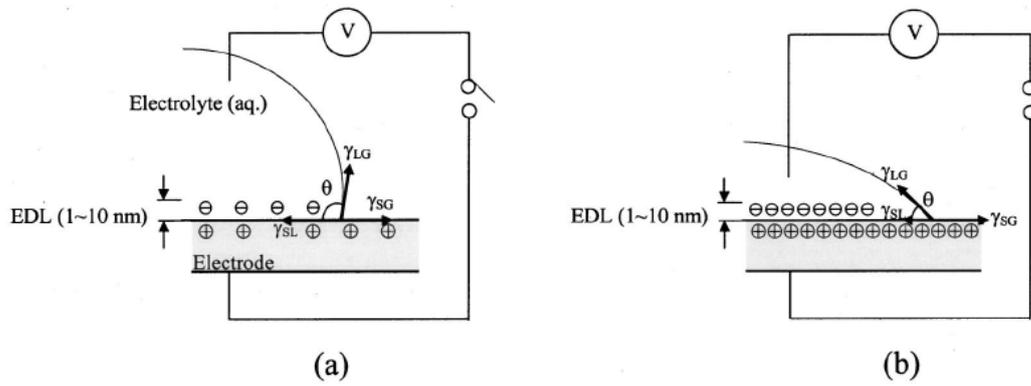


圖 3 電濕潤示意圖[9]

但由於電雙層只能容忍相對小的跨壓，過大的電壓會破壞電雙層形成的電容，因此接觸角的變化往往受到極限電壓的限制。之後在電極及液體介面之間插入一介電質代替電雙層作為方程式(3-2)中的電容[9]，除了有效增加電容中可容忍之跨壓，更可透過介電質表面改質降低表面能，使液滴初始接觸角提高，進而在電濕潤現象中達到更多接觸角變化量。至此電濕潤現象演化為介電濕潤現象 (Electrowetting-on-dielectric, EWOD)如圖四。

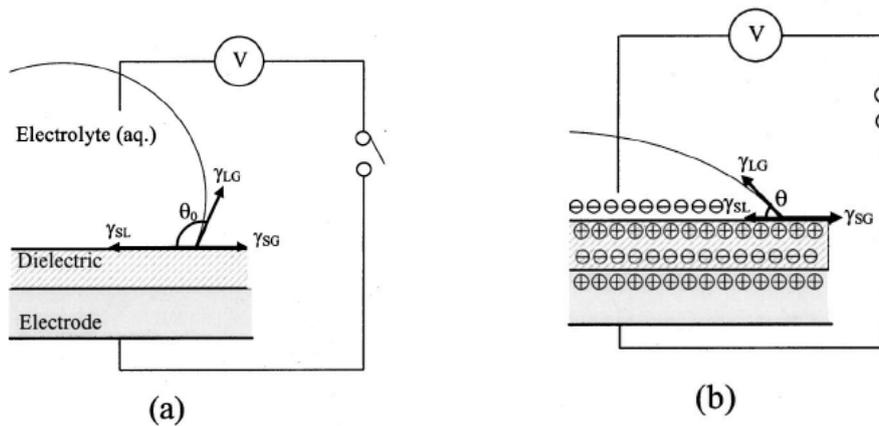


圖 4 介電濕潤示意圖[9]

介電濕潤 (electrowetting-on-dielectric, EWOD) 是一種藉由施加電壓來改變表面親疏水特性的現象。如圖4 (a) 所示，在一導體基板上沉積一表面疏水的介電層，將液珠置於此介電層上，液珠上方有一探針電極與液體接觸。當無任何電壓加於導體基板與探針之間時，液珠在疏水性介電層上接觸角 θ_0 大於90度。當有一電壓加於導體基板與探針之間時，此時固體表面疏水性會隨所加的電壓大小而改變，足夠的電壓可使疏水性表面轉變為親水性(接觸角 $\theta(V)$ 小於90度)，如圖4 (b) 所示。此現象在適當之材料選擇與施加電壓下，有很好的重現性。利用此原理可設計各式數位微流體晶片[10]如圖5所示，於上下兩平板之間夾一墊片(Spacer)，並讓液珠在該三明治空間結構移動。下板有控制電極 (Control electrode)，其上覆蓋一層介電材料以進行介電濕潤現象，上板則是整片的接地電極 (Ground electrode)，並於最後在上下兩板旋塗疏水性薄膜，增加液珠的起始接觸角。透過控制電極的選擇施加電壓可改變部分元件的親疏水性而達到傳遞液滴的效果，如此就可非常簡單的以小電壓快速的驅動微流體，進行各種的應用。

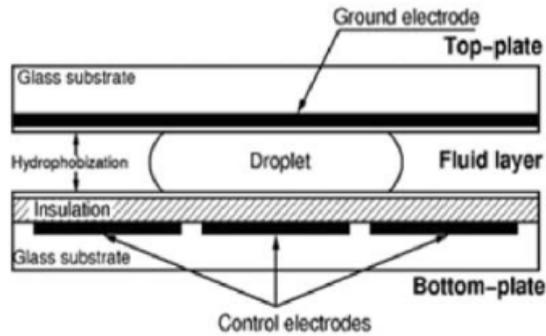


圖 5 數位微流體晶片設計[10]

人工的脂質雙層膜，依照成膜的機制主要分為兩種形式：支撐式脂質雙層膜(Support lipid bilayer)和懸浮式脂質雙層膜(Suspend lipid bilayer)。支撐式脂質雙層膜的形成方法主要有三種。第一種方法為Langmuir-Blodgett method (LB method)，首先將脂質分子整齊的排列在水和空氣的介面上，之後將基板穿越這層介面後拉出，基板的表面將會覆蓋著一層脂質單層膜，再將其沾附另一層單層膜而形成雙層膜[11]。第二種方法，是將懸浮在溶液中的脂質小囊泡吸附並自動溶解，平鋪在基材載片上，形成脂質雙層膜[12,13]。第三種方法，是結合第一種和第二種方法，先以LB方式在載片上形成一單層膜，再利用脂質小囊泡溶解吸附上去形成雙層膜[14]。支撐在固體基材上的脂質雙層膜是比較堅固穩定的，通常這樣的人工脂質雙層膜會運用在表面特性分析研究上，這是一般懸浮式人工脂質雙層膜較無法做到的。支撐式的脂質雙層膜雖然堅固適合做表面特性分析研究，但仍有其缺點，其中最主要的是因為雙層膜的下方有支撐物，不論使用的載片為何種材料，都將會影響到脂質雙層膜上嵌入的膜蛋白，可能使其功能或特性減弱，整個人工環境和懸浮式的脂質雙層膜比較起來是較不接近真實細胞膜的狀態。

懸浮式的脂質雙層膜，如圖 6[15]，也被稱為 Black lipid membrane (BLM)，主要用於對離子通道型的膜蛋白進行電生理分析研究。

60 年代，由 Muller 團隊發表了第一篇建構懸浮式脂質雙層膜的文章 [16,17]，從此就陸續有團隊對各種不同的離子通道型蛋白，透過建構懸浮式脂質雙層膜的方式來研究 [18-19]。常見的 BLM 形成方式有典型的 Painting method、Folded method，和近年來新興且熱門的微流道成膜方式。這些方式都是將雙層膜形成在一微米、甚至更小的尺寸且表面疏水的孔洞上，且孔洞兩邊是完全隔開並充滿電解質溶液，以利於進行電生理訊號量測。

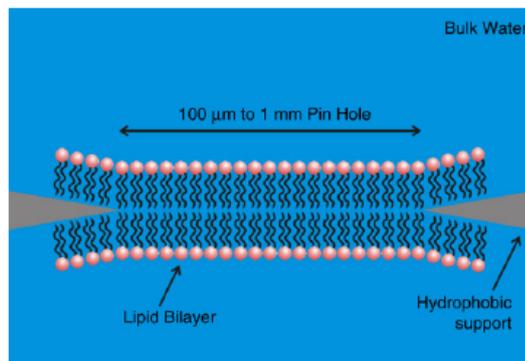


圖 6 懸浮式的脂質雙層膜[15]。

從 2004 年至今，日本東京大學的 Takeuchi 團隊發表了許多關於這樣研究的論文[20]。

最初是以 Painting 的概念出發，設計出以流道組成的成膜晶片，並將研究電生理訊號的 Patch clamp 電極結合在晶片上，而透明的流道材料也利於同時以顯微鏡觀測成膜現象。其晶片結構如圖 7(a)，實驗步驟和光學觀測結果如圖 7(b)。

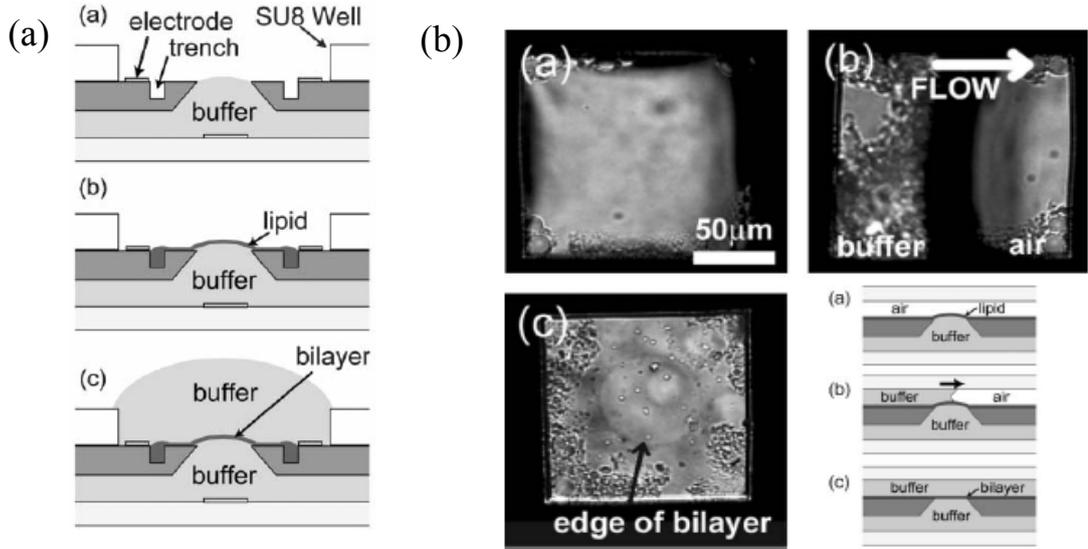


圖 7 微流道成膜系統結構和實驗結果[20]

此系統的實驗步驟為先在下流道注入電解質溶液，而後於上流道通入含有脂質分子的有機溶液，再將上流道的脂質溶液換為電解質溶液通入，當流經洞口時會順便將過多的脂質溶液沖出流道，此時上下流道間的孔洞上便形成了脂質膜，經過薄化最後形成懸浮式的脂質雙層膜，可在光學觀測中看到，影像中出現的邊界我們將之定義為 Plateau-Gibbs border[21]。不過這樣的方式無法準確的控制脂質溶液的量的，成膜的成功率偏低且薄化所需時間長，因此其研究團隊更近一步開發出，利用靜水壓力壓迫脂質膜而加速薄化，可快速且準確地形成脂質雙層膜的晶片系統 [22]，如圖 8。

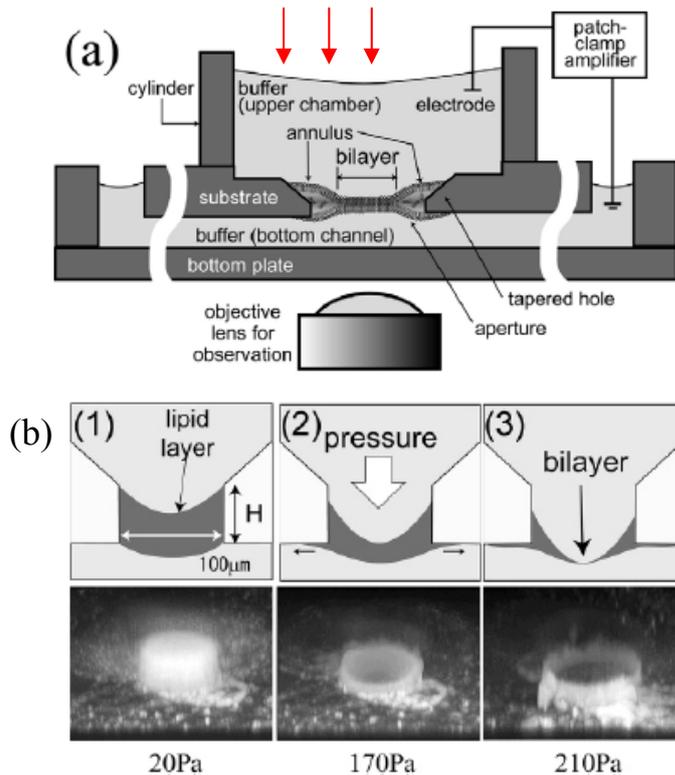


圖 8 以壓力促進脂質膜薄化[22]

非對稱脂質雙層膜(Asymmetric lipid bilayer)指的是脂質雙層膜的內外兩層單層脂質分子的組成不同，而此種非對稱的雙層膜在生物體內其實是很常見的，包括革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)和人體中紅血球的細胞質膜都具有非對稱雙層膜的特性。非對稱脂質雙層膜不僅更仿生，細胞質膜兩單層膜脂質分佈的改變在生物上的功用與電生理性質上的差異也是一個值得研究的議題。

目前人工非對稱脂質雙層膜的形成方法大多是以脂質體為基礎藉由將脂質體沉降到另一介面時於介面形成非對稱脂質雙層膜，有將包覆一層單層脂質分子的液滴沉降至含另一種脂質分子的液體中而於介面形成非對稱脂質雙層膜如圖 1.24(a)後偵測標定在脂質分子上的螢光做分析如圖 9(b)(c)[23]。

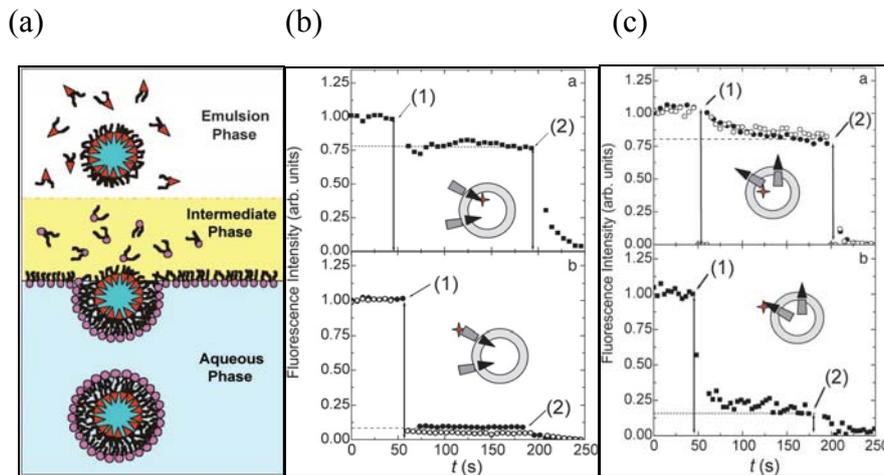


圖 9 沉降脂質體形成非對稱脂質雙層膜(a)原理(b)(c)偵測標定螢光脂質分子[23]。

也有將脂質體沉降在固體基材上形成支撐式脂質雙層膜而後搭配原子力顯微鏡(AFM)與螢光顯微鏡之研究[24]。此外更有利用脂質體的前製備方式將脂質體包覆於水相後待其擴散至液滴表面時自發形成單層膜 [25]，選用不同特性的脂質分子不僅可以做不同螢光的光學觀測如圖 10(a)也可做不同的電生理訊號量測與分析如圖 10(b)。

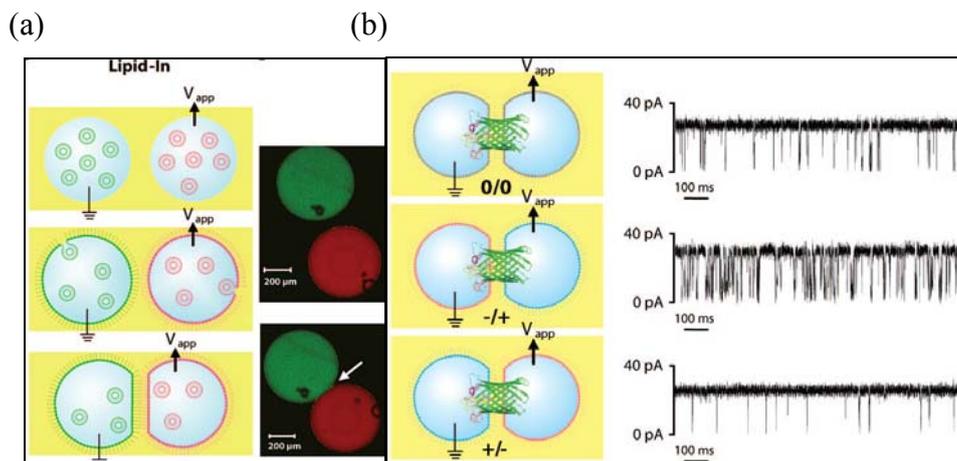


圖 10 液滴形成非對稱脂質雙層膜(a)螢光非對稱(b)電性非對稱雙層膜 [25]。

利用不同的方法、選取不同的脂質分子，建構與生物體中細胞膜更加相似的脂質雙層膜結構，對於往後無論是針對細胞膜的研究或是細胞膜與蛋白質或其他胞器的交互作用都能夠有更深一層的認識是建構此類雙層膜之優點，但相對的偵測的方法同時也受建構系統的不同而限制能夠得到資訊的多寡與類型。

α -Hemolysin (圖 11) [26]是由鏈球菌 (*Streptococcus*) 分泌的一種毒素，具有溶血性，

主要針對紅血球細胞進行破壞、瓦解細胞，使得富含鐵離子的血紅素（Heme）從紅血球中釋放出來，進而讓細菌本身獲得養分。一般常見的肺炎、腦膜炎...等等，都與這樣的細菌和毒素有關係。 α -hemolysin 同樣也是以單體的方式存在，進入脂膜雙層膜後，會由七個單體聚合形成一蘑菇狀的管狀通道，通道最窄處直徑約為 1.5 nm，可讓帶電離子甚至分子通過，除了破壞細胞內外離子梯度平衡造成細胞破裂外，近年來更有團隊將 α -hemolysin 這樣的特性，用於開發更方便快速的 DNA 定序晶片。

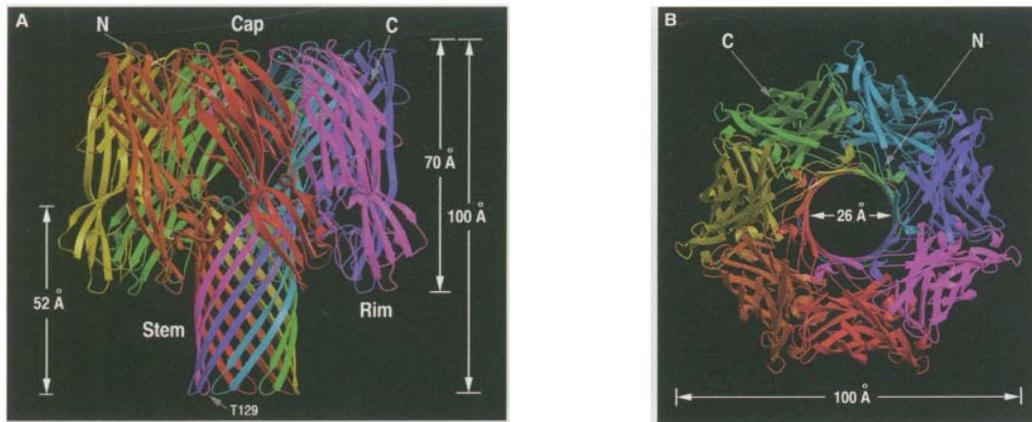


圖 11 α -Hemolysin 的結構圖[26]。(a) 側視圖；(b) 上視圖。

Gramicidin 是由 6 個抗生物質組合成的混合物總稱，可從短芽孢桿菌(*Bacillus brevis*)提煉出來，其中包含 Gramicidin A、Gramicidin B 和 Gramicidin C 各佔 80%、14%和 6% [27]。而本實驗所使用的是其中的 Gramicidin A。Gramicidin 普遍在醫學上將之用來作為抗生素，因為其可在細菌的細胞膜上形成孔洞，即為離子通道 (Ion channel)，破壞細菌細胞內外正常離子濃度梯度的平衡，進而使細菌死亡，達到治療的效果。

Gramicidin 原本在溶液中是以單體(Monomer)的形式存在，當進入脂質雙層膜之後，會與另一個單體接合成二聚物(dimer)，形成一可橫跨脂質雙層膜的管狀通道，並具有選擇性的讓帶一正電價的離子通過，例如 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 等離子。離子通過時便會產生電流，可以用電生理量測技術偵測。圖 12 是 Gramicidin 的結構，(a)為側視圖、(b)為上視圖，可明顯看出是其管狀通道[28]。

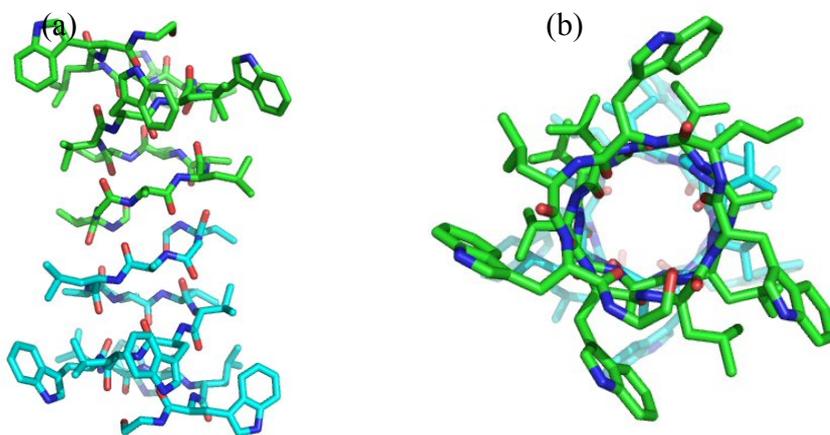


圖 12 Gramicidin 的結構 [28]

V-PPase，即「質子傳送焦磷酸水解酶」的簡稱，是普遍存在於大部份的陸生植物細胞內液泡膜上的質子傳送系統[29]。V-PPase 由單一胜肽鏈所構成，分子量約 80 kDa。焦磷酸(Pyrophosphate，簡稱為 PPi)是一種具有高能量磷酸酐鍵(Phosphoanhydride bonds)的分

子，普遍存在於生物體內，是許多簡單生物合成反應的副產物。V-PPase 能夠利用水解焦磷酸時所產生的能量，做主動運輸作用將質子(H^+)由細胞質傳送到液泡中，產生液泡膜內外質子梯度及膜電位差異，藉以驅動其他次級主動運輸的進行。另外，V-PPase 在植物液泡中常和三磷酸腺苷(ATPase)共存[30]，ATPase 是以水解 ATP 獲得能量進而傳輸質子。

過去幾年 V-PPase 僅能從控制基因序列複製而成，直到 2004 年清大生科潘榮隆教授的團隊，發展出直接從植物細胞中將之純化分離出來的技術[31]。V-PPase 的詳細結構及酵素作用機制目前仍尚未釐清，除了傳統上可利用蛋白質晶體學等實驗方式對其進行研究外，我們希望能利用本膜蛋白研究晶片對其進行研究。

V-PPase 和 ATPase 的反應機制示意圖如圖 13[32]。首先我們利用 V-PPase 水解 PPi 後即會傳送質子的特性，觀測這運動所造成溶液酸性改變而使螢光強度衰退的現象，先證實 V-PPase 成功的嵌入膜中，進而對其做電性的量測，希望能找出其傳遞質子的機制。

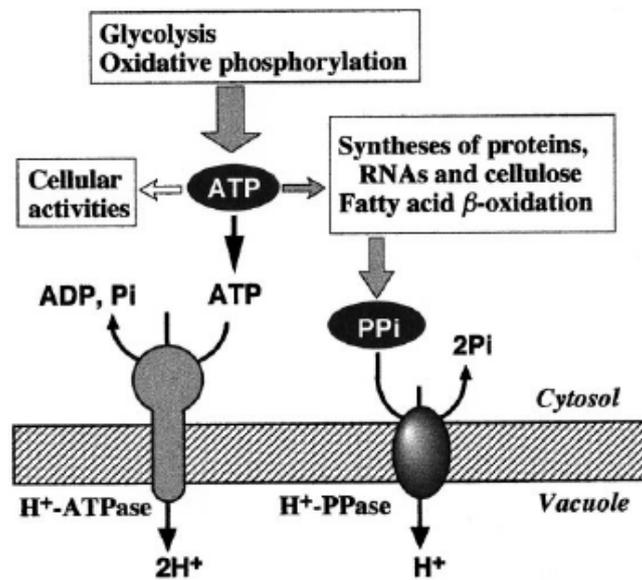


圖 13 V-PPase 和 ATPase 的反應機制示意圖 [32]

四、研究方法：

1. 人工脂質雙層膜的形成機制與現象觀測以及蛋白質的電生理訊號量測

脂質分子是一個兩性分子，同時具有疏水端和親水端，所以在油水介面上會自動排列形成單層膜，如圖 14。

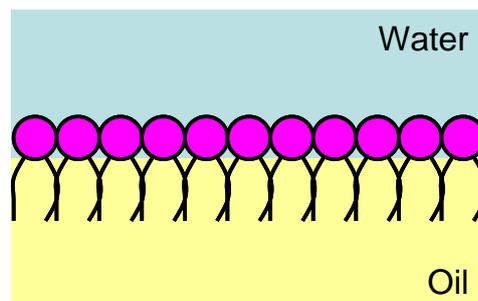


圖 14 脂質分子排列在油水介面

因此在此系統中，我們用包覆式微液珠提供這樣的油水介面，將含有脂質分子(Lipid)的有

機溶液(Decane)包覆在電解質溶液(KCl)外，脂質分子便會在介面上排列成單層膜，兩個液珠便有兩層單層膜，如圖 15(a)。之後以介電濕潤原理驅動微液珠，讓兩顆液珠在欲成膜的孔洞上相遇，如圖 15(b)。兩層單層膜會因為 decane 溶劑的揮發而慢慢靠近，我們稱這階段為薄化，當兩層單層膜靠近到一個程度後，便會受分子間凡得瓦力的作用而互相吸引，進而排列成脂質雙層膜，如圖 15(c)。

而若想得到非對稱脂質雙層膜只需改變兩單顆包覆式液滴

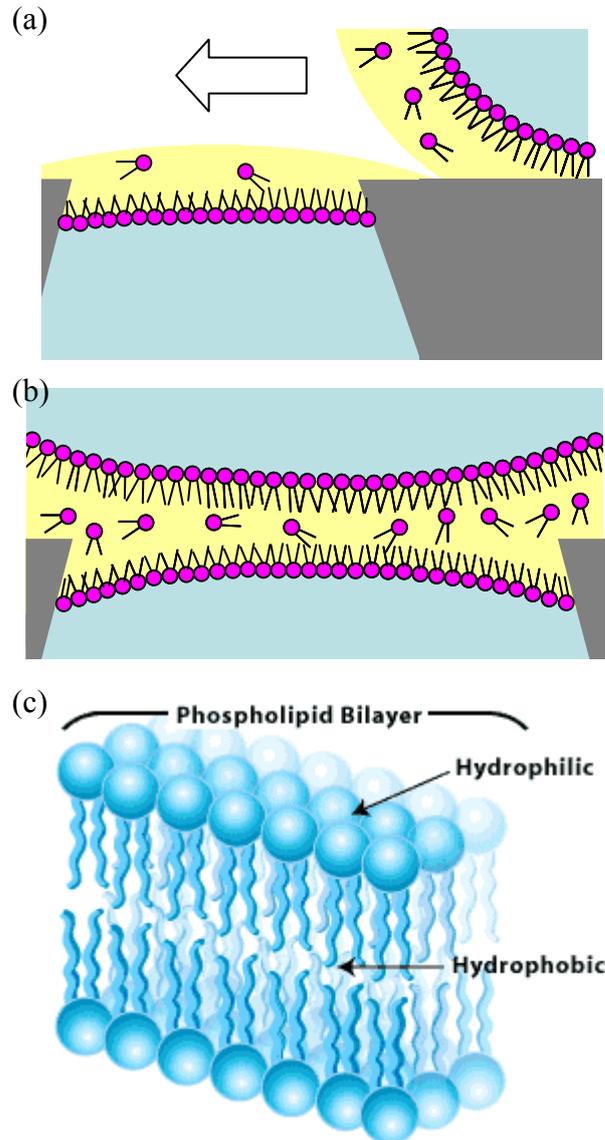


圖 15 脂質雙層膜的形成

成膜的現象可同時以光學和電性量測兩方面來觀測。我們將整個成膜的平台，架設在倒立式螢光顯微鏡 (Olympus IX-71) 下，使用相位差模式觀察並以即時的黑白攝影機 (Olympus DP30BW) 做影像紀錄。除了光學觀測成膜現象外，也可藉電性量測更進一步的來檢測膜的厚度。當兩顆液珠在洞口相遇後，分別把兩根探針式的銀/氯化銀電極插入液珠中(如圖 16)，並施以交流電壓，此電壓為方波、頻率 200 Hz、電壓大小為 2 mV_{PP}。此時交流電壓就是施加在一個電容上，因此產生充放電電流，同樣從銀/氯化銀探針接收送回，經過放大器和雜訊消器後由示波器顯示訊號，並紀錄數據。最後將得到的充放電電流數據加以計算分析，便可從中得到當時膜的厚度。

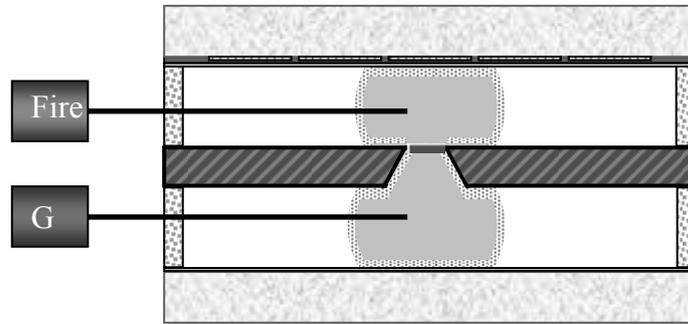


圖 16 銀/氯化銀電極插入液珠示意圖

蛋白質的電生理量測中，我們使用 α -Hemolysin，以 25 μ g/ml 的濃度加入液珠中，待脂質雙層膜形成後，根據其本身特性會在脂質雙層膜上自組裝成離子通道，當我們在上面施以 150 mV 的直流電作為箝制電位，便會得到離子通過通道而產生的電流訊號，同樣經過銀/氯化銀電極、細胞箝制訊號放大器和雜訊消除器，最後以示波器紀錄訊號。

2. 成膜系統晶片設計

2.1 矽晶片成膜系統

操控包覆式微液珠形成脂質雙層膜的系統，為一個三明治結構，如圖 17 (a)。最上層是以介電濕潤原理驅動液珠的電極。我們在玻璃基材上濺鍍上銅和黏著層鈦，厚度約為 2000 \AA / 200 \AA ，再以微影製程技術將之圖形化，形成 10 個相互間隔為 20 μm 且兩兩一組的指叉型電極，如圖 17 (b)，之後再依序旋塗上一層 5~6 μm 的 AZ-4620 為介電層和一層 55 nm 的 Teflon (Dupont) 為疏水層。中間層是用以成膜、具有孔洞的矽晶片。我們在四吋 250 μm 厚的 (100) 矽晶圓上，先以化學氣相沉積法在表面沉積 500 nm 低應力的氮化矽，再以微影製程技術和反應式離子蝕刻法將之圖形化，之後便以圖形化後的氮化矽為遮罩，用 20% 的氫氧化鉀 (KOH) 做濕蝕刻，在矽晶圓上形成陣列式、邊長為 100~130 μm 的正方形孔洞，最後再配合孔洞位置將晶圓裁切成 1 mm \times 2 mm 大小的晶片，並以氣相沉積系統 (PDS 2010 LABCOTER™ 2, Cookson Electronics Inc.) 在晶片表面沉積約 1 μm 厚的 Parylene 薄膜，主要目的是使晶片表面呈疏水性，接觸角約為 90°，可幫助脂質雙層膜的生成，另外也讓矽晶片在系統中保持絕緣的狀態。最下層則是同樣旋塗有疏水層的玻璃基材，三層皆以 300 μm 的隔隙物隔開。

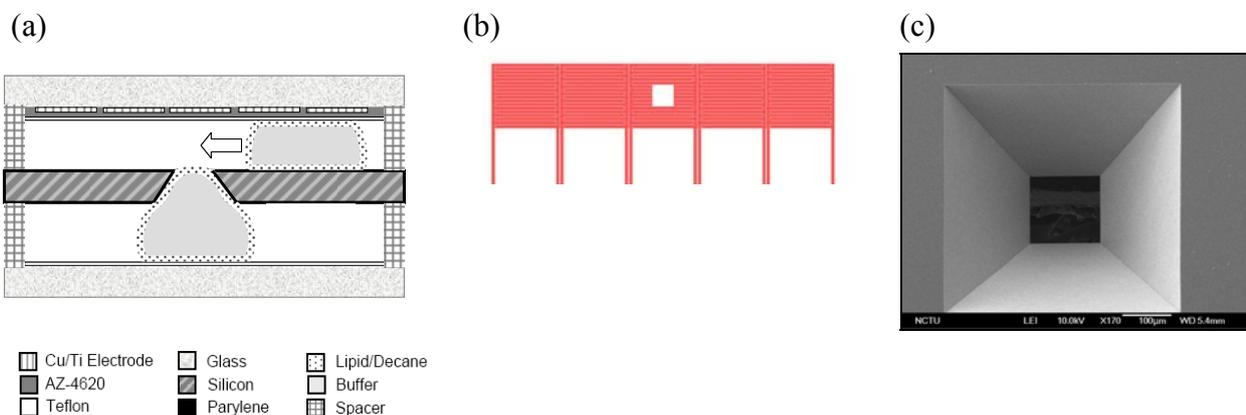


圖 17 矽晶片成膜系統設計。(a) 結構側視圖；(b) 指叉型電極設計；(c) 矽晶片孔洞

2.2 乾膜光阻(PerMx)成膜系統

晶片整體架構與矽晶片系統相同為三明治結構(圖 18(a))，最上層是以介電濕潤原理驅動液珠的電極，電極改以 ITO 玻璃為基板以微影製程技術將其圖形化，設計也由前述指插型電極改為大小為 $1 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ 且兩兩一組的共平面式電極增加電極的有效工作面積(圖 18(b))。之後再依序旋塗上一層 $2 \mu\text{m}$ 的 SU-8 為介電層和一層 55 nm 的 Teflon (Dupont) 為疏水層。如此一來原先不透明的共平面電極晶片藉由選用透明基材與介電層則可呈現一透明之元件對於光學影像也更加清晰、實驗操作上也更加簡便。中間層是用以成膜、具有孔洞的乾膜光阻(PerMx)。我們只需對厚度 $15 \mu\text{m}$ 的乾膜光阻作簡易的微影製程，即可隨著光罩設計的不同，改變成膜孔洞的外型與大小能有效率的降低孔洞邊緣對脂質雙層膜的應力效應，並延長脂質雙層膜的穩定時間。在乾膜中間顯影出一直徑 $50 \mu\text{m}$ (圖 18(c))同時也在乾膜孔洞表面沉積約 $1 \mu\text{m}$ 厚的 Parylene 薄膜，主要目的是使表面呈疏水性，接觸角約為 90° ，可幫助脂質雙層膜的生成，另外也讓乾膜在系統中保持有生物相容性。最下層則是同樣旋塗有疏水層的玻璃基材，三層皆以 $300 \mu\text{m}$ 的隔隙物隔開。

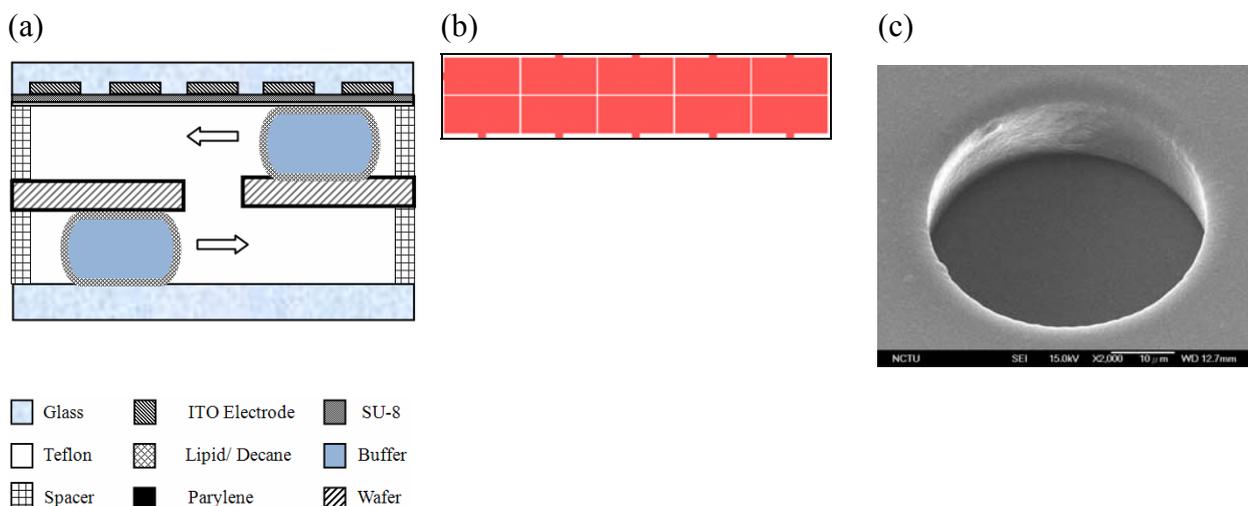


圖 18 乾膜光阻成膜系統設計。(a) 結構側視圖；(b) 共平面電極設計；(c) 乾膜光阻孔洞

3. 典型離子通道蛋白嵌入脂質雙層膜

3.1 Gramicidin

Gramicidin 的置入實驗，主要目的是要印證雙層膜的形成。實驗架設(圖 19)類似於成膜實驗的架設，只是上下液珠皆加入 Gramicidin 溶液，之後同樣移動上液珠至孔洞與下液珠接觸，待脂質雙層膜形成後，Gramicidin 的單體分子會自動進入膜中並和另一個單體分子接合形成雙體，及為離子通道。在等待成膜的過程中，我們會以銀/氯化銀電極施加一交流電，以偵測脂質膜之電容的充放電電流，當觀察發現此電流有明顯的增加時，表示膜開始薄化，此時切換成輸出 150 mV 的直流電(FG 上電壓輸出設定為 750 mV ，Patch Clamp 上縮小倍率設定 $\div 10$)，作為箝制電壓(Voltage clamp)，當脂質雙層膜形成後，蛋白質會在短時間內形成離子通道，我們即可在電性量測中看到電流的變化。本實驗參數在表 1 內。

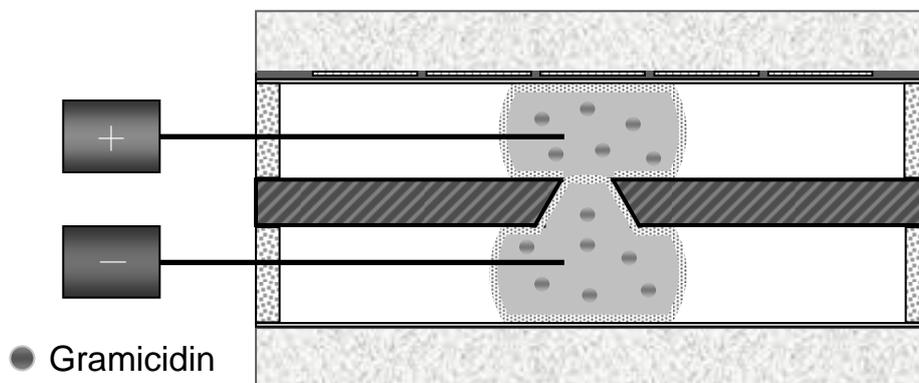


圖 19 Gramicidin 置入實驗架設圖

表 1 Gramicidin 置入實驗的參數表

Both droplets	KCl solution	Lipid solution	Protein: Gramicidin
Final Concentration	0.1 M	24 mg/ml	10^{-7} M
EWOD signal	Voltage	Frequency	wave
	120 V _{RMS}	1 kHz	Sine wave

3.2 α -Hemolysin

如同前一節 Gramicidin 的實驗， α -hemolysin 的實驗也是為了證明脂質雙層膜的 formation，且更進一步的，因為 α -hemolysin 的導電率較 Gramicidin 為高，在我們無法有效降低系統中的雜訊時，為了能真正觀察到單一通道的 formation，於是選擇單一通道所能造成電流值較高的 α -hemolysin。

實驗架設和前面實驗類似，且我們另外嘗試了各種不同的膜蛋白濃度和電解液濃度，各組的蛋白質濃度參數整理表 2，而其他在每次實驗皆固定的參數，則列在表 3 中。實驗結果與討論將在下一節中詳述。

表 2 α -hemolysin 各組不同的參數實驗整理

	電解質溶液(KCl)		蛋白質溶液(α -HL)	
	上液珠	下液珠	上液珠	下液珠
AA	0.1 M	1 M	—	25 μ g/ml
BB	0.1 M	0.1 M	—	25 μ g/ml
CC	0.1 M	1 M	25 μ g/ml	—
DD	0.1 M	0.1 M	25 μ g/ml	25 μ g/ml
EE	0.1 M	0.1 M	12.5 μ g/ml	12.5 μ g/ml
FF	0.1 M	0.1 M	—	50 μ g/ml

表 3 α -hemolysin 各組實驗中固定的參數

兩顆液珠內的電解質溶液	Final vlume	Contents	
	1.5 μ l	包含 KCl 溶液和 α -HL 溶液	
液珠外包覆的脂質溶液	Concentration	Volume	
	24 μ g/ml	0.1 μ l	
EWOD signal	Voltage	Frequency	Wave
	120 V _{RMS}	1 kHz	Sine wave

3.3 V-PPase

如圖 20，我們在上方液珠內放入 PPi 分子，下方液珠則加入含有 V-PPase 的微粒體分子。螢光分子我們使用的是 Acridine Orange，將其預先加在下液珠中，而當兩顆液珠接觸後，由於此螢光分子是以單體存在且體積很小，可以穿透脂質雙層膜而分散在上下液珠和微粒體中。此螢光分子在酸性溶液中(pH 值低的環境)，會兩兩結合成 Dimer，此時螢光會熄滅(Quench)。所以 V-PPase 是否有嵌入脂質雙層膜的驗證方式便是觀察螢光的熄滅。

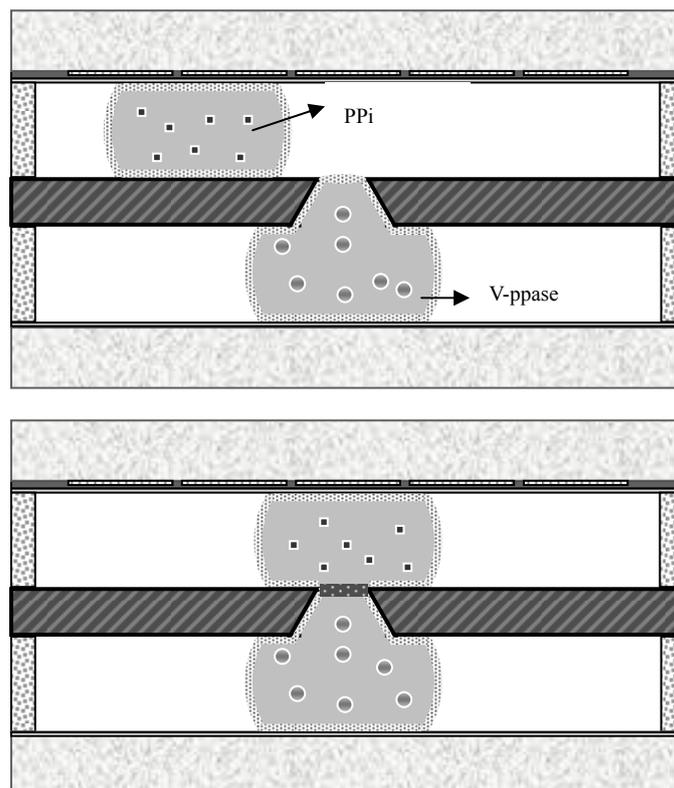


圖 20 V-PPase 實驗的架設圖

當我們以介電濕潤的力量驅動液珠，使之移動到孔洞上和另一液珠互相接觸、經過薄化而形成雙層膜後，含有 V-PPase 的微粒體會溶進雙層膜中，而 V-PPase 將會嵌入膜中。此時橫跨脂質雙層膜的 V-PPase 會接觸到上液珠的電解液，裡面含有 PPi 分子，就如同動物看到了食物，V-PPase 會和 PPi 反應，將之水解，產生能量而傳送質子(氫離子)至膜的另一邊。每一次的水解反應將會讓一個質子被傳輸，下方液珠內累積的氫離子便會隨著時間而

累積，變成酸性溶液，螢光將熄滅。因此我們可以從螢光強度的改變來證明 V-PPase 的嵌入和活性。實驗中所用到各成分分子的濃度和體積參數在下表 3.4 中列出，其中 VPPase、PPi 和 AO 螢光分子皆是由清大生科所潘榮隆教授實驗室所提供。

上液珠	電解液(KCl)	Microsome	螢光分子(AO)	脂質溶液
Final concentration	50 mM	7.15 $\mu\text{g/ml}$	0.125 mM	24 mg/ml
下液珠	電解液(KCl)	NH ₄ PPi		脂質溶液
Final concentration	50 mM	50 mM		24 mg/ml

表 2 V-PPase 實驗參數表

4. 加壓式成膜系統的機制及實驗方法

介電濕潤效應會改變液體內部的壓力，我們利用這樣的現象，在上液珠移動到孔洞並和下液珠接觸後，同樣利用驅動電極對液珠施與電壓，讓上液珠持續保持親水狀態，內部壓力變低，此時上下液珠便會因內部壓力的不同而在接觸的介面上(膜)產生一壓力差，進而推擠脂質膜使之壓縮變薄。

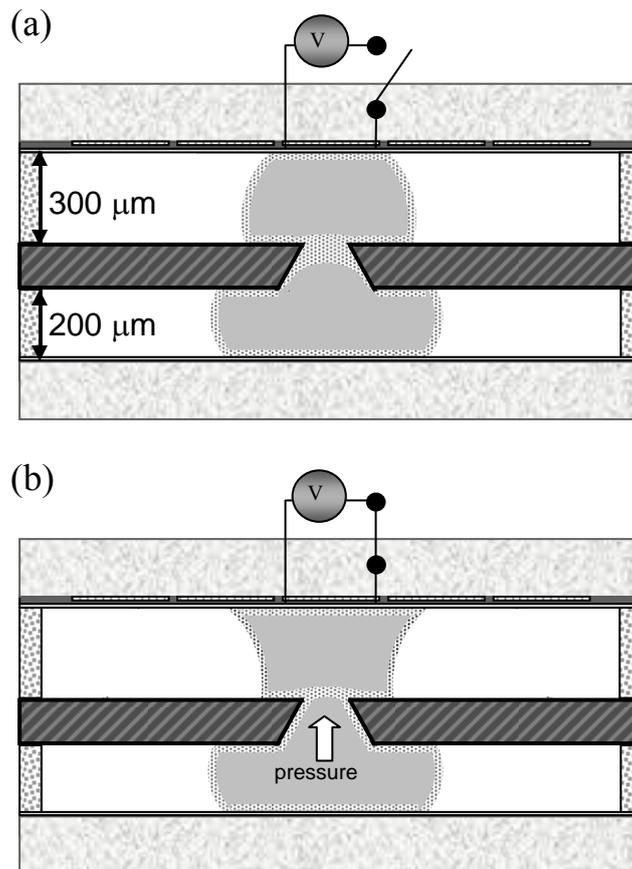


圖 21 加壓式成膜系統

實驗示意圖如圖 21，(a)為尚未施加電壓時的狀態，兩顆液珠在表面皆為疏水性，另外可從晶片結構上看出我們減少了下液珠所在空間的間隔，改為 200 μm ，並增加下液珠的體積，這些皆是為了提高下液珠內部的壓力，提高上下液珠的壓力差。(b)為電極上施加了 1 kHz

的交流電壓後，上液珠和表面轉為親水，內部壓力下降，使得上下液珠壓力差增加，壓縮兩液珠間的脂質溶液，以達到加快薄化時間的目的。

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{r} \right) \quad (4.1)$$

$$\frac{1}{r} = - \frac{\cos \theta_1 + \cos \theta_2}{d} \quad (4.2)$$

$$\cos \theta_v = \cos \theta_0 + \frac{1}{2} \frac{C}{\gamma} \left(\frac{V}{2} \right)^2 \quad (4.3)$$

由以上公式我們可以知道當施加的電壓越大，會使液珠越親水，內部的壓力便越小，所以理論上我們施加的電壓越大，可達到越大的壓力差。實驗開始前我們先以計算的方式估計需要施加的電壓大小，利用本實驗團隊過去曾經以不同方式測量過瞬間成膜所需要的壓力作為參考，其值為 142.43 pa。

利用前述之公式先計算在未施加電壓時，因液珠大小不同和間隔大小不同所造成的壓力差。公式 4.1 中的 γ 表示氯化鉀水溶液在 Decane 溶液中的表面張力，其值為 47.5 N/m； R 我們用液珠上視的半徑代入。公式 4.2 中的 $\cos \theta_1$ 為液珠和 Teflon 表面的接觸角，其值為 140° ； $\cos \theta_2$ 為液珠和 Parylene 表面的接觸角，其值為 90° ； d 是液珠上下板的間距，上液珠為 300 μm ，下液珠為 200 μm 。最後我們算出，未施加電壓前上下液珠即存在一壓力差，其值為 51.7 pa，方向由下往上。

所以需要達到 142.43 pa 的成膜壓力，需以介電濕潤改變上液珠內部的壓力超過 90.73 pa，要達到這樣的壓力改變，上液珠和 Teflon 介面的接觸角必須從原來的 140° 變成 78.87° ，利用公式 4.3 我們可以算出，若以 6 μm 厚的介電層，我們需要施加超過 351.48 V_{RMS} 的電壓，才能達到這樣的條件。

5. 平面式銀/氯化銀電極

除了加壓薄化和全油環境外，我們希望能藉由直接製作在晶片中、平面式的銀/氯化銀電極，來降低原始針狀電極在使用時所造成的變數，例如插針時的外力造成雙層膜破裂，另外也能更有效的整合驅動及量測在同一個晶片中。

目前已完成了電極的設計和基本的製程，以及電極的氯化。銀/氯化銀電極和原本的 EWOD 共平面電極製作在同一基板上，改換成銀做為電極的金屬。光罩設計如圖 22(a)，完成後的截面圖為圖 22(b)。利用微影製程技術將金屬圖型化後，再利用另一層光罩將介電層開一個窗口，讓電性量測的電極露出。

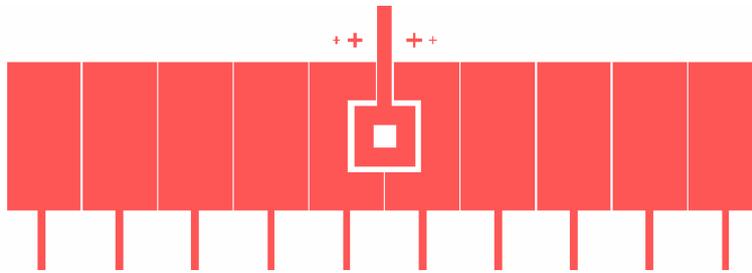


圖 22(a) 平面式銀氯化銀電極的光罩設計

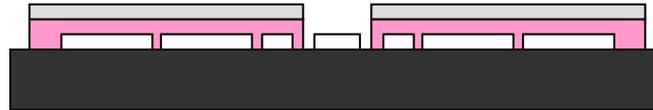


圖 22(b) 平面式銀氯化銀電極的截面圖

圖 22 平面式銀氯化銀電極

五、結果與討論

1. 矽晶片成膜系統形成對稱脂質雙層膜

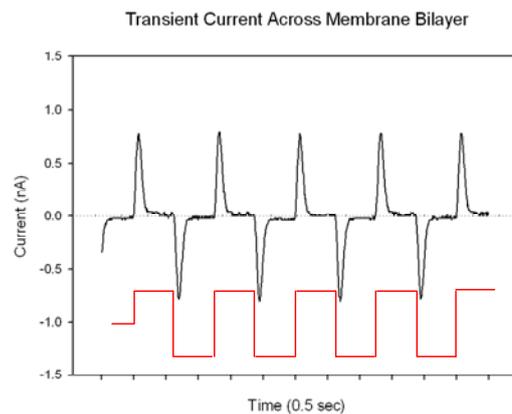


圖 23 成膜實驗電容充放電電流圖

成膜實驗中直接偵測到的充放電電流，經過計算後得到的是電路模型中的總電容 (C_{total})。我們將得到的數據換算回電流值後以 Sigmaplot 軟體重新繪圖，圖 23。將電流值對時間做積分，也就圖中每個高峰內的面積，大約為 110 pF。之後再扣掉所量測到的 Parylene 電容 91 pF，其中已經包含寄生電容，可得到膜電容約為 19 pF。而光學觀測所看到的成膜範圍面積(圖 24)，約為 $61 \mu\text{m} \times 61 \mu\text{m}$ ，因此可得脂質雙層膜的比電容約為 $0.51 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ，和文獻中相符。此次成膜實驗參數如表.5。

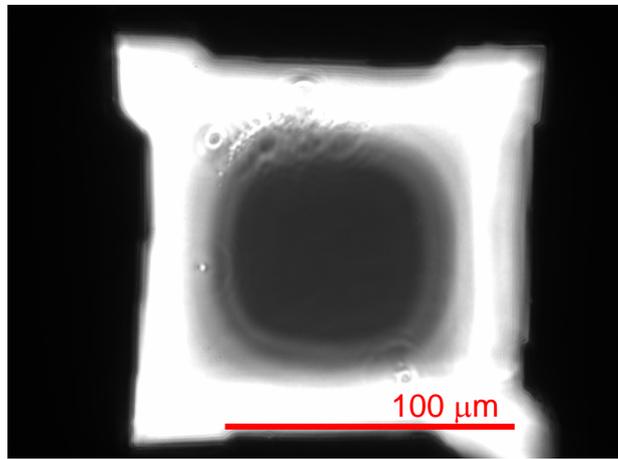


圖 24 成膜範圍面積

Both droplets	KCl solution	Lipid solution
Concentration	0.1 M	24 mg/ml
Volume	1.5 μl	0.1 μl

表 5 成膜實驗參數 b

另外依據公式

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{t}$$

代入膜的比電容值、真空介電常數(ϵ_0)為 8.85×10^{-12} 和脂質分子的介電常數為 2.7，可計算出膜的厚度為 4.8 nm，同樣也非常接近理論上的 5 nm，因此我們可以證實脂質雙層膜的形成。

2. 乾膜光阻成膜系統形成非對稱之質雙層膜

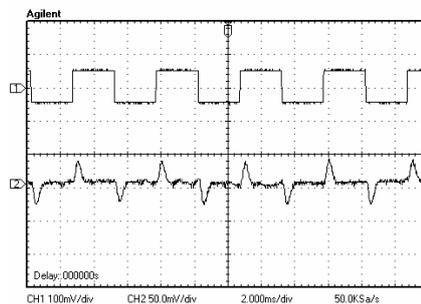


圖 25 成膜實驗電容充放電圖

成膜實驗中直接偵測到的充放電電流，經過計算後得到的是電路模型中的總電容 (C_{total})。我們將電流值對於時間做積分，也就圖中每個高峰內的面積(圖 25)之後再扣掉所量測到的 Parylene 電容，可得到膜電容。而光學觀測所看到的成膜範圍面積如圖 26。此次成膜實驗參數如表 6。

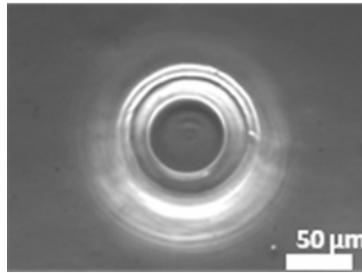


圖 26 成膜範圍面積

	Aqua phase 0.5 μl	Oil shell 0.1 μl
Upper droplet	0.1 M KCl with 0.005 μg/μl α- HL	2 mM DPhPC doped with 1 mol % of lipid is labeled Rhodamine B
Lower droplet	0.1 M KCl with 0.005 μg/μl α- HL	2 mM DPhPC doped with 2 mol % of lipid is labeled Fluorescein

表 6 成膜實驗參數

另外依據公式

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{t}$$

代入膜的比電容值、真空介電常數(ϵ_0)為 8.85×10^{-12} 和脂質分子的介電常數為 2.7，可計算出膜的厚度為 4.83 nm，同樣也非常接近理論上的 5 nm，因此我們可以證實脂質雙層膜的形成。

3. 典型離子通道蛋白嵌入脂質雙層膜

3.1 Gramicidin

由於 Gramicidin 的導電率很小，也就是給與相同的箝制電壓下，所能得到的電流值很小。每個 Gramicidin 通道的導電率約為 12 pS [33]，所以在我們施加的 150 mV 電壓下，將會產生 1.8 pA 的電流值。但是在我們的量測系統中，由於設備稍嫌不足，最低雜訊為 5 pA 左右，所以無法看到單一蛋白質嵌入雙層膜中所造成電流階梯狀的上昇。而為了能更有效的量測到電流值，我們提高了加入的蛋白質濃度，約為一般實驗使用的 100 倍，結果得到的總電流值約為 500-600 pA 間(圖 26)，經過計算大約有 300 個離子通道在脂質雙層膜上。

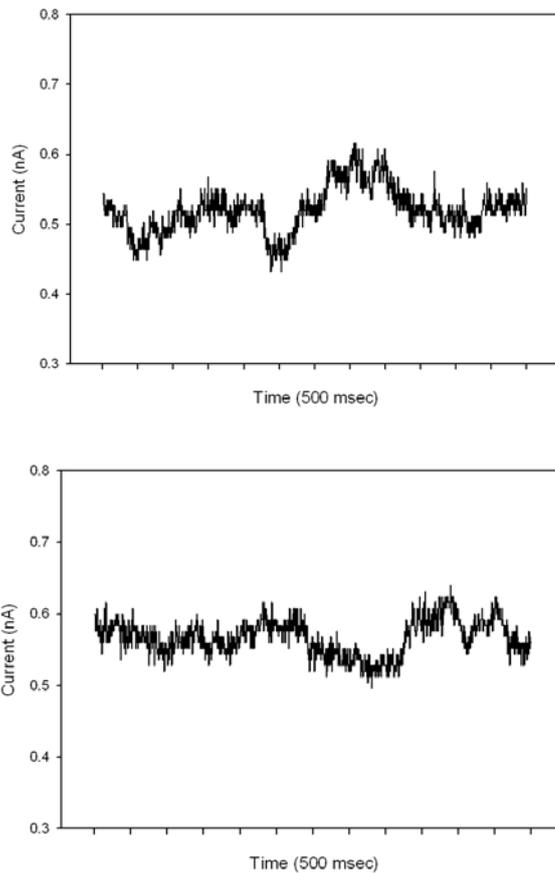


圖 26 Gramicidin 離子通道的電流訊號

3.2 α -Hemolysin

A 組實驗中，我們將上下液珠的電解質濃度設定成有梯度存在，上液珠是 0.1 M、下液珠是 1 M。原因是論文指出電解質的濃度差有助於蛋白質的嵌入[34]，於是我們希望能藉此增加實驗的成功率。實驗結果如圖 27 所示，在脂質雙層膜成功的形成後， α -hemolysin 的單體便在雙層膜中結合成離子通道，在我們所施加的 Voltage clamp 電壓(150 mV)刺激下，可以偵測到電流。

從圖中我們可以看到明顯的階梯狀電流變化，即表示單一的離子通道形成，而每個階梯的電流值約為 80 pA，換算後導電率約為 500 pS。而從文獻[35]中我們得知，導電率和電解質溶液的濃度有關，並成線性的關係，在 0.1 M 的氯化鉀溶液中導電率為 90 pS，而在 1 M 的氯化鉀溶液中則為 900 pS。而我們的實驗環境是介於 1 M 和 0.1 M 的氯化鉀溶液間，所以得到如此的導電率數值是合理的。圖 27(a)是較前期的電流訊號圖，之後電流總值會漸漸上升，之後便會出現飽和的現象，是一種動態平衡，蛋白質仍會不斷的嵌入和脫離，但總電流值不會明顯的上升，如圖 27(b)。而實驗 A 飽和的總電流值大約為 800 pA，此時膜上大約有 10 個 α -hemolysin。

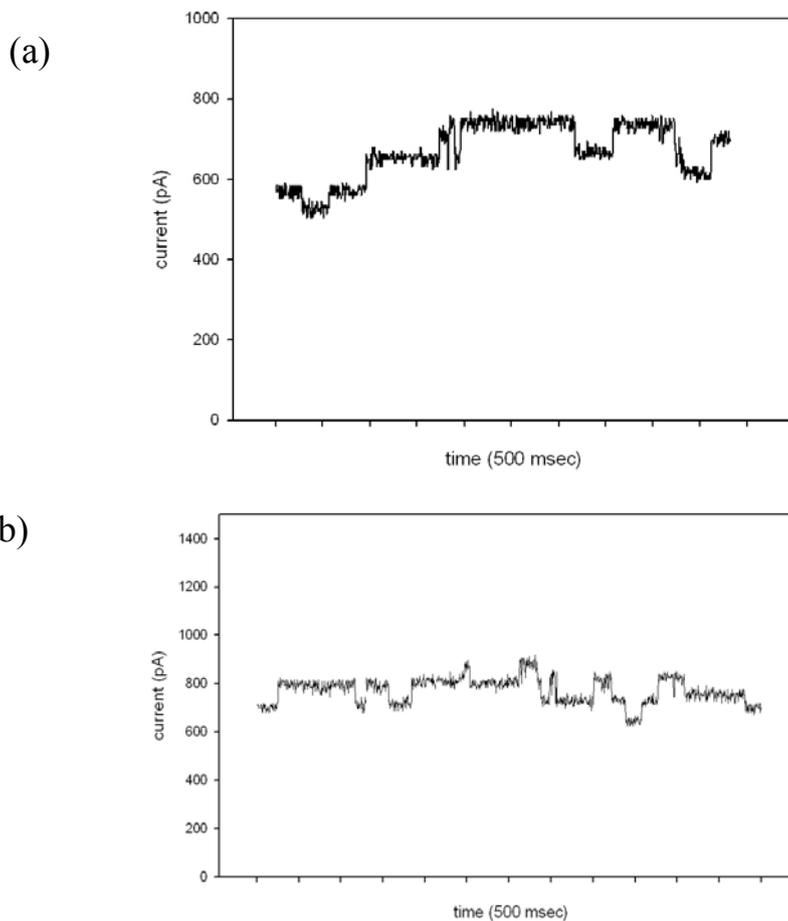
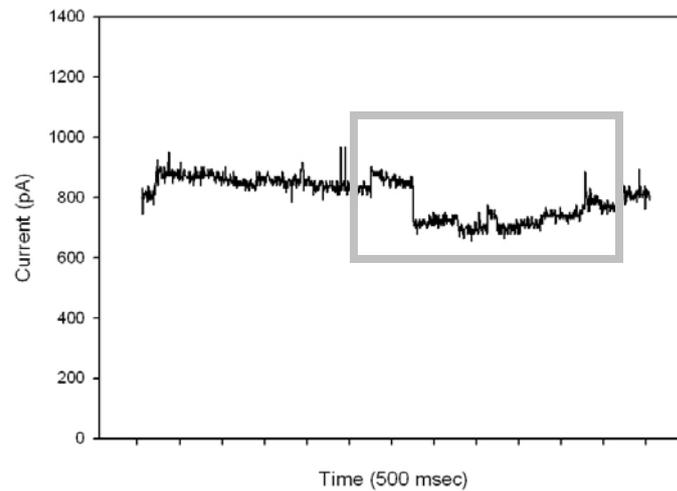


圖 27 α -hemolysin 實驗之 A 組的結果

雖然實驗結果合理，但我們仍希望能更準確的得到在某特定濃度環境下的數據結果。所以我們將兩顆液珠中氯化鉀的濃度改為相同濃度，0.1 M，進行實驗 B 和 C。但在接近 10 次的實驗中，卻發生就電性和光學的結果上顯示脂質雙層膜已形成，但是卻無蛋白質嵌入膜中所產生的電流訊號。這部份有待更多次重複的實驗來驗證。

因此，我們稍微改變了實驗的設定，同樣是上下液珠保持相同濃度的氯化鉀溶液(0.1 M)，但蛋白質則改為同時添加於上下兩顆液珠中，是為實驗 D 和 E。在實驗 D 中，蛋白質濃度為 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；而實驗 E 中，蛋白質濃度為 D 的一半 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。實驗結果的數據分別在圖 28 和圖 29 中。

(a)



(b)

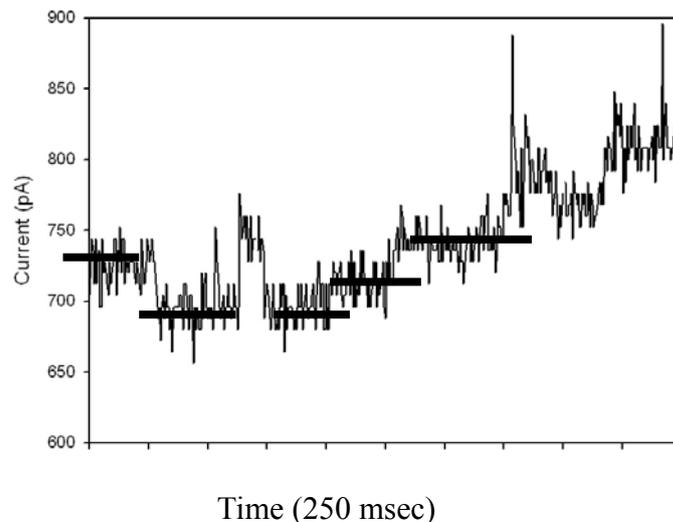
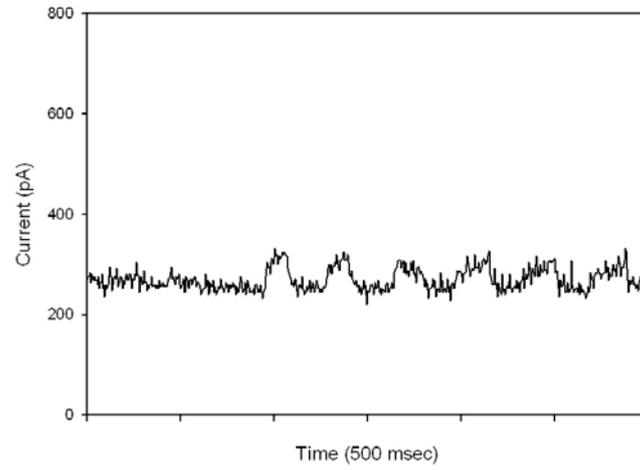


圖 28 α -hemolysin 實驗之 D 組的結果

實驗 D 的圖 28(a)是巨觀的數據，比起實驗 A 的結果來說是較為雜亂的，無法看出明顯階梯狀的電流訊號。我們認為是因為 α -HL 置入膜上的數量較多，且置入和脫離的替換速度快，導致無法有平穩的電流訊號。所以當我們將框線中的部分放大來細看，如圖 28(b)，即可以看到階梯狀的訊號，最小的階梯差值大約為 15 pA，而其他也大約是 15 pA 的倍數，經過計算可得到約為 100 pS 的導電率，相當符合文獻中在 0.1 M 氯化鉀溶液中的 90 pS [35]。實驗中蛋白質嵌入脂質雙層膜的速度非常快，經過 10 秒左右電流訊號就上升到達一飽和的電流值，約為 800 pA，並在此電流值附近維持一動態的飽和平衡狀態，而此時膜上約有 50 到 60 個 α -hemolysin。由於達到此飽和電流值的速度太快，所以沒有記錄到總電流值上升的數據。

圖 29(a)是實驗 E 前期的電流訊號圖，此時離子通道嵌入脂質雙層膜中的數量慢慢上升，總電流值約為 250-300 pA 左右，而圖 29(b)則是達到飽和後的電訊號圖，電流總值約為 600-700 pA，此實驗中離子通道形成的速度較慢，經過較長的時間才達到飽和。從圖 29(b)中可看到電流訊號呈現不明顯的階梯形狀，每個訊號階段大約為 16 pA，飽和時膜上約有 40-50 個通道。

(a)



(b)

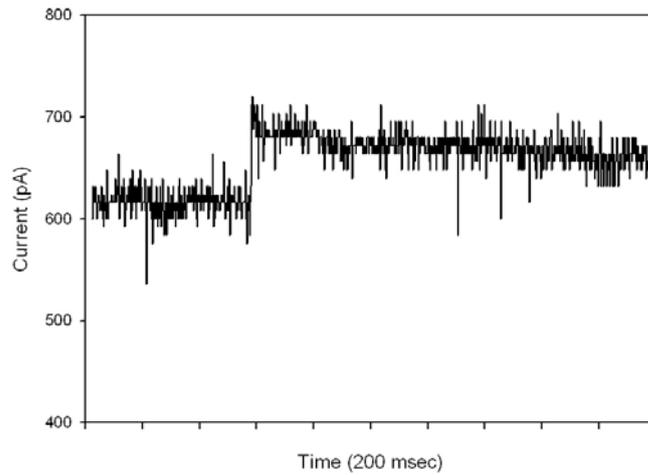
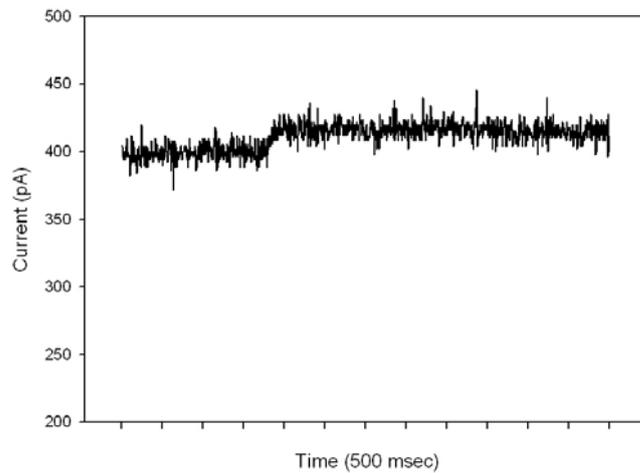


圖 29 α -hemolysin 實驗之 E 組的結果

最後我們將蛋白質濃度提高，但只將其加入單邊的液珠中，為實驗 F。同樣地，蛋白質嵌入脂質雙層膜中，達到飽和電流值時約為 400 pA 左右，如圖 30，每個訊號階段的差值約為 17 pA，換算成每個蛋白通道的導電率約為 110 pS，和文獻相符。此雙層膜上約有 20-25 個通道蛋白。



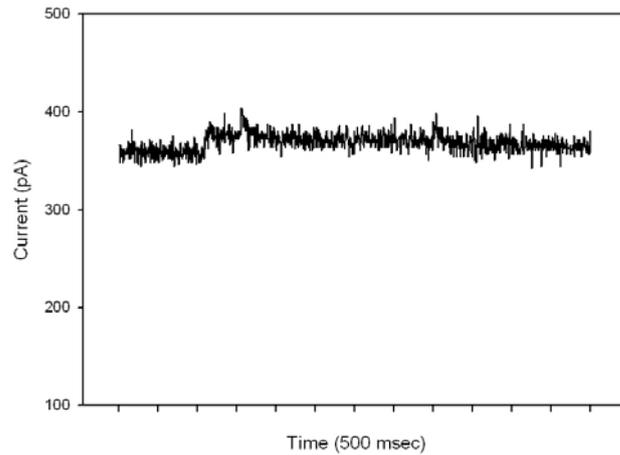


圖 30 α -hemolysin 實驗之 F 組的結果

經過實驗 A-F，我們可推論出，蛋白質嵌入脂質雙層膜中的機率和其中各參數的關係：雙層膜的兩端溶液中皆有蛋白質存在時，比較容易進行嵌入；蛋白質濃度較高，嵌入膜中的機率和速度也較快；電解質溶液(KCl)有濃度差時，也會幫助較高濃度端的蛋白質嵌入脂質雙層膜。另外，我們也可以從實驗結果中發現，僅單邊液珠有蛋白質的實驗裡(A 和 F)，最終飽和時脂質雙層膜上蛋白質的總數相較兩邊皆放蛋白質的實驗(D 和 E)來說較少，這可能也和蛋白質嵌入的機率有關。

我們成功的利用 α -HL 的嵌入來證明脂質雙層膜的存在，並進一步的探討了不同環境對於離子通道蛋白嵌入的影響，表現了此晶片對於蛋白質研究的效用。

3.3 V-PPase

最初，我們先以螢光量測的系統進行測試實驗。在測試實驗 A 中，我們將 AO 螢光分子和 V-PPase 加入同液滴中，並觀察其螢光強度的變化，結果為圖 31 中的曲線 A。另外我們也直接在液珠內將 PPi 溶液和含有螢光分子的 V-PPase 溶液混合，為實驗 B，PPi 會直接和 V-PPase 反應並使螢光強度下降，而結果在圖 31 的曲線 B 中。各實驗組的內容物如表 7。

	KCl	Microsome	PPi	AO	Lipid
A	+	+	-	+	+
B	+	+	+	+	+
C	+	+	-	+	+
D	+	+	+	+	-
E	+	+	+	+	+

表 7 各組測試實驗所含的內容物比較

由測試實驗中我們發現，雖然有加入 PPi 的 B 組螢光強度如預期般下降的幅度非常大且所需時間很短，但是在無 PPi 的 A 組中螢光強度卻也有降低的現象，我們認為這是螢光的自然衰退(natural bleach)。

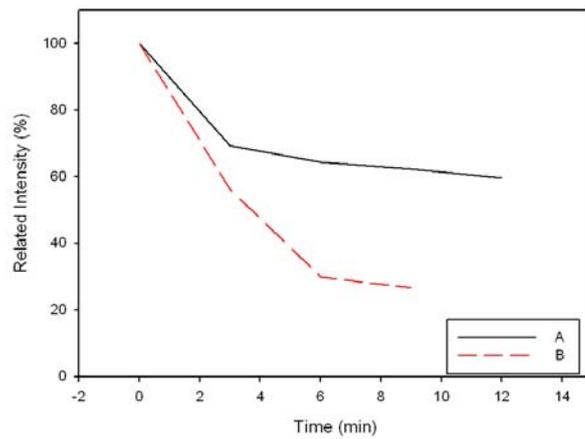


圖 31 測試實驗 A 和 B 的結果數據

螢光的自然衰退較難避免，所以在實驗結果中必須同時考慮此自然衰退所造成的強度減弱，因而進行了對照組 C。我們依照 V-PPase 置入的實驗參數(表 7)，但不加入會造成螢光強度降低的 PPi 溶液。在這組實驗中，膜形成後 V-PPase 會嵌入雙層膜中，但沒有 PPi 與之反應而無法進行氫離子的傳輸，也因此理論上實驗結果應該只有螢光的自然衰退現象。圖 32 是對照組 C 的結果，三次的實驗結果皆非常相近，可以發現螢光強度會減弱但會在 10 分鐘後穩定，之後僅會有小幅度的衰退，並維持將近 50 分鐘。

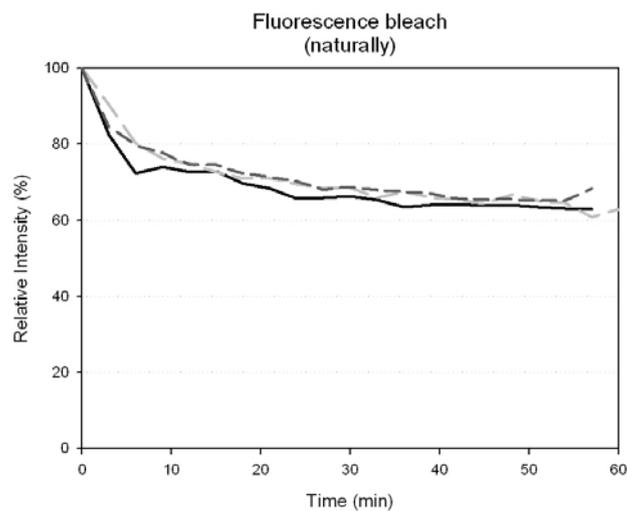


圖 32 螢光自然衰退的結果 C

另外，我們希望看到 PPi 在此系統中直接和 V-PPase 反應所造成的螢光減弱，我們利用兩顆無脂質溶液包覆的液珠，當上方液珠移到孔洞和下方液珠接觸後，由於沒有脂質分子的阻擋，所以上下分子直接混合接觸，因此我們將看到 PPi 分子會直接和 V-PPase 反應而造成螢光大量的熄滅，此即為對照組 D。圖 33 為實驗的結果，可看出比起對照組 C，螢光確實是快速的熄滅。

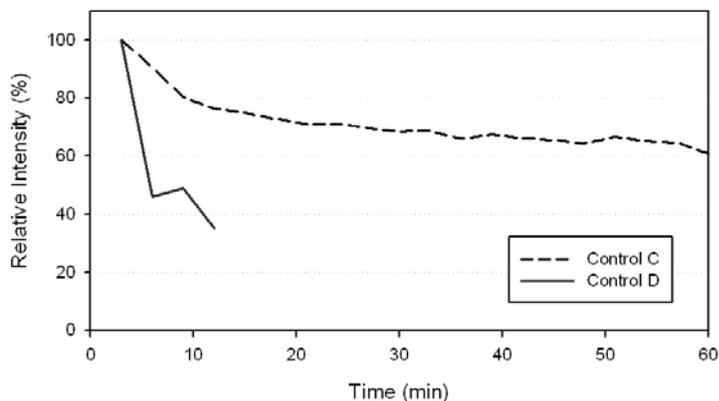


圖 33 對照組 D 的結果

最後我們在成膜實驗中嵌入 V-PPase，並讓其和另一液珠的 PPI 分子反應並傳輸氫離子，進而造成螢光的減弱，為實驗 E。理論上此實驗的結果應該介於對照組 C 和 D 的兩條曲線之間，因為只有嵌入膜上的 V-PPase 才能造成螢光減弱，而此數量將會較少。實驗的參數已在表 7 中提過，而實驗結果為圖 34。

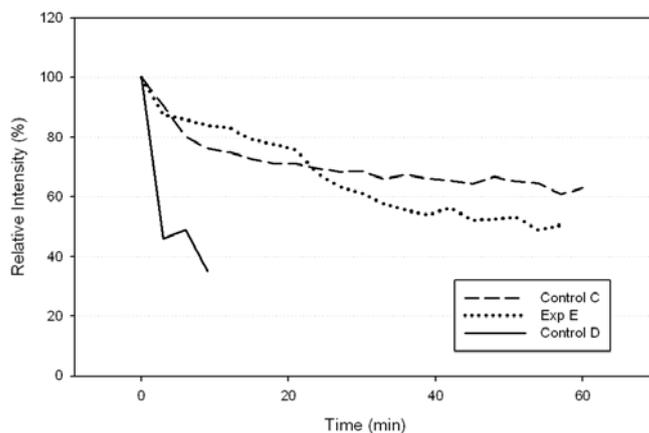


圖 34 實驗組 E 的結果

實驗的結果還算符合預期，尤其是數據圖中曲線兩次下降的部份，可以很直觀的將之解釋為，第一階段下降是螢光的自然衰退現象開始穩定，第二次的階段下降則是 V-PPase 傳輸質子所造成的螢光熄滅結果。

不過只有一次的實驗結果不足以代表成功，我們希望能有更多更確定的實驗結果，例如找出辦法證實螢光強度的衰退是 V-PPase 生物現象所造成的。我認為可以結合前面章節所使用的離子通道蛋白，Gramicidin，在螢光熄滅後，以另一顆液珠傳輸進來，在脂質雙層膜上形成離子通道，這將可以重新的平衡兩邊氫離子的濃度，使得螢光再度點亮，如此便可以證明螢光的熄滅是從 V-PPase 的運動而來。

4. 加壓式成膜系統

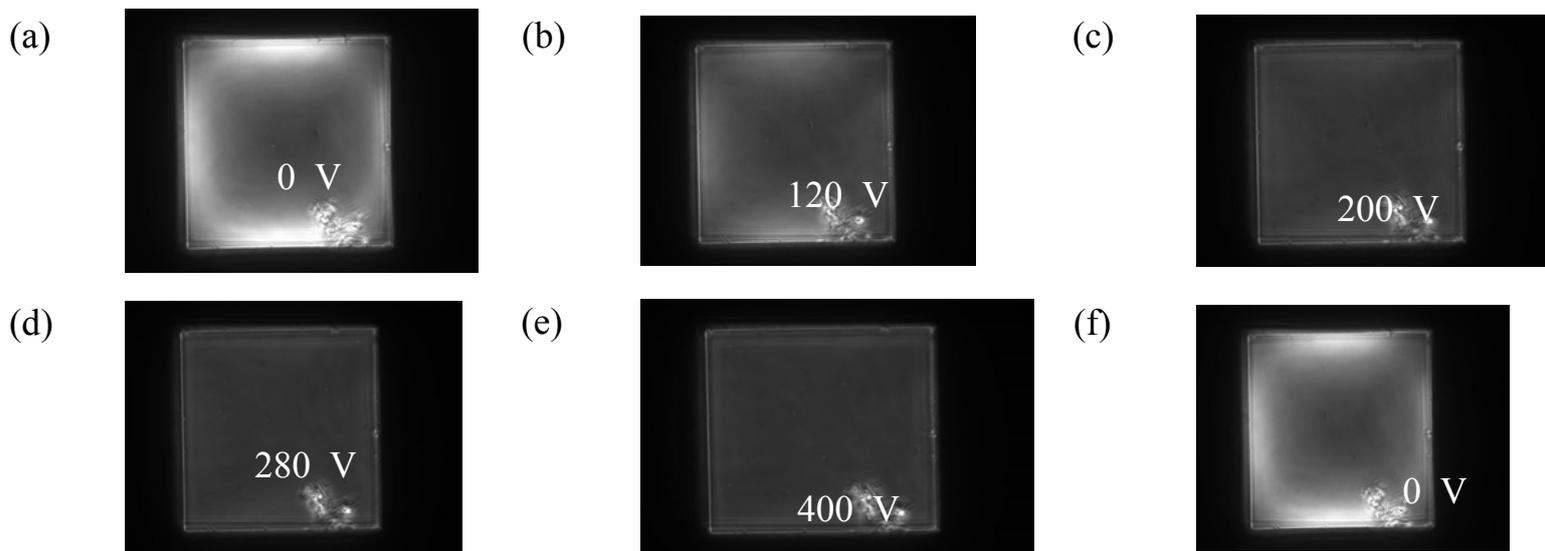


圖 35 施加不同電壓下膜厚不同

雖然理論計算的結果是施加 $350 V_{RMS}$ 左右的電壓可達到成膜，但在實驗結果上卻不是如此，在經過多次的實驗後，我們發現每次的實驗結果皆不一致。在相位差法的光學觀測下，我們可看到施加不同電壓時膜厚的不同，如圖 22，會隨著電壓增加而亮度變暗，即表示膜後變薄。圖 35(a)是一開始尚未加電壓的狀態；(b)-(e)一直緩緩增加電壓到 400 V，電壓增加速度每秒 4 V，每增加 40 V 會停止增加，等待 10 分鐘後再繼續增加電壓；(f)是電壓到達 400 V 之後又緩緩下降到 0 V 後的狀態，膜厚和最初狀態似乎相差不大。

這是其中一次實驗，電壓加到儀器可施加的極限(400 V)仍無法成膜。但在其他許多次的實驗中，卻也有在電壓上升途中膜就破掉的結果，而唯一有一次實驗是在施加到 240 V，並等待約 10 分鐘後，成膜成功。

如此大的結果差異，我們認為是因為無法準確的定量脂質/癸烷溶液的濃度，造成需要薄化的厚度每次也都不相同，所以無法找到一個固定的成膜所需電壓值，使得實驗困難。

雖然此方法對於加速薄化上是可行的，也有成功的例子，但是卻增加了成膜實驗更多的不確定性，很容易因為施加電壓超過其需要的大小而讓膜瞬間破掉。我們認為可以結合加壓薄化和原本的揮發薄化，給與施加一較低電壓(大約 240 V)，之後放置等待揮發，雖然仍需等待薄化的時間，不過比起不加電壓來說，還是有稍微加速的效果。

不過此加壓成膜系統卻也有一致命的缺點，所施加的電壓將會嚴重干擾電性量測的訊號，兩者將無法同時進行，也因此少了一項判斷雙層膜形成的重要指標。

5. 平面式銀/氯化銀電極

由圖 22(b)中可看出電極上除了介電層外還有疏水層 Teflon，要將 Teflon 從電極上移除，我們嘗試了最簡單的方式，在欲顯露出的電極施加 10 V 的直流電，讓 Teflon 層發生電崩潰，即可令電極顯露出來，如圖 36，無 Teflon 處為親水表面。

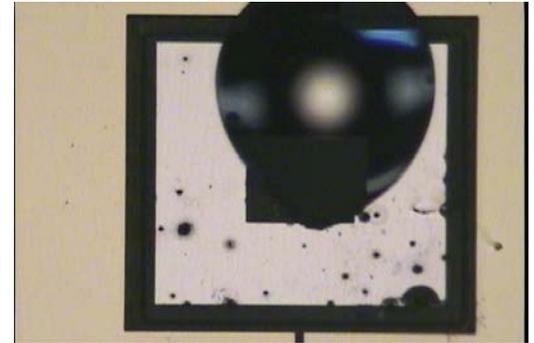
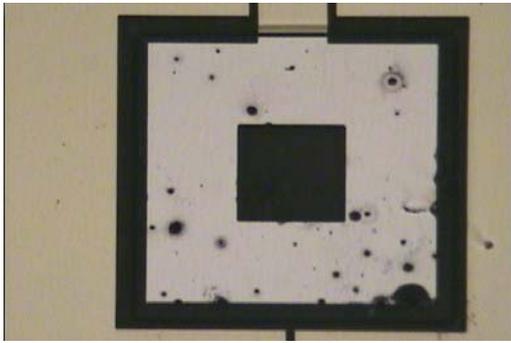


圖 36 移除 Teflon 後的銀電極

之後便將銀電極拿去進行氯化，因為銀電極厚度只有 200 nm，所以和針狀電極不同，在氯化時要更小心的控制時間，圖 37 為氯化後氯化銀表面的 SEM 照片，但我們無法從其中判斷其是否緻密。

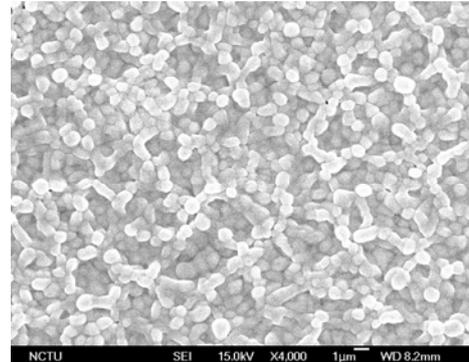
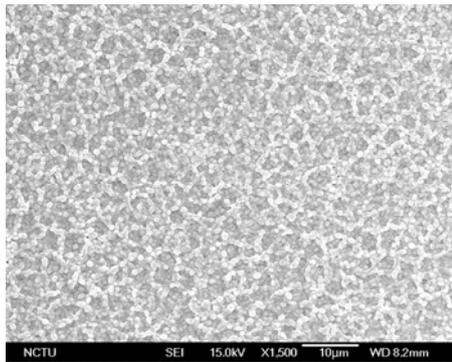


圖 37 氯化後表面的 SEM 圖

我們以不同的氯化時間為標準，製作不同厚度的氯化銀，並將之拿來量測同一個電容，希望找出較適合的氯化厚度。我們將三片同一批 sputter 打的銀片(厚度 200 nm)分別在鹽酸中氯化 30 秒、60 秒、120 秒。結果 120 秒的銀反應時間太久，大部份的銀反而被酸蝕刻掉。

六、參考資料

1. A. Berg and T. S. J. Lammerink, "Micro Total Analysis Systems: microfluidic aspects, integration concept and applications," *Top. Curr. Chem.*, vol. 194, pp. 22-49, 1998.
2. P. R. Selvaganapathy, E. T. Carlen, and C. H. Mastrangelo, "Recent progress in microfluidic devices for nucleic acid and antibody assays," *Proc. IEEE*, vol. 91, pp. 954-975, 2003.
3. J. W. Hong, V. Studer, G. Hang, W. F. Anderson, and S. R. Quake, "A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture," *Nat. Biol.*, vol. 22, pp. 435-439, 2004.
4. P. L. Yeagle, "Regulation of membrane function through composition, structure, and dynamics," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 568 (1), pp. 29-34, 1989.
5. L. Martin, "An Emerging Model of Cell Membrane Structure," Connexions Web site, <http://cnx.org/content/m15250/1.2/>, Oct 15, 2007.
6. S. J. Singer and Garth L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes," *Science*, vol. 175, pp. 720 - 731, 1972.
7. H. Helmholtz, "Über einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern, mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche," *Ann. Phys. Chem.*, vol. 89,

pp. 211-233, 1853.

8. M. G. Lippmann, "Relations entre les phenomenes electrique et capillaires," Ann. Chim. Phys. vol. 5, pp. 494-549, 1875.
9. H. Moon, S. K. Cho, R. L. Garrell, and C. J. Kim "Low voltage electrowetting-on-dielectric," J. Appl. Phys., vol. 92, pp. 4080-4087, 2002.
10. M. G. Pollack, R. B. Fair, Shenderov, and D. Alexander, "Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics," Lab Chip, vol. 2, pp. 96-101, 2002.
11. L.K. Tamm, H.M. McConnell, "Supported phospholipid bilayers," Biophys. J., vol. 47, pp. 105-113, 1985.
12. A. A. Brian, H. M. McConnell, "Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes," Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol.81, pp. 6159-6163, 1984.
13. H. M. McConnell, T. H. Watts, R. M. Weis, and A. A. Brian, "Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system," Biochim. Biophys. Acta., vol. 864, pp.95-106, 1986.
14. E. Kalb, S. Frey, L. K. Tamm, "Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers," Biochim. Biophys. Acta., vol. 1103, pp. 307-316, 1992.
15. E. T. Castellana, P. S. Cremer, "Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design," Surf. Sci. Rep., vol. 61, pp. 429-424, 2006.
16. P. Muller, D.O. Rudin, H. Ti Tien, W.C. Wescott, "Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System," Nature, vol. 194, pp. 979-980, 1962.
17. P. Muller, D.O. Rudin, H. Tien, and W.C. Wescott, "Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution," J. Phys. Chem., vol. 67, pp. 534-535, 1963.
18. P. Labarca, R. Coronado, C. Miller, "Thermodynamic and kinetic studies of the gating behavior of a K^+ - selective channel from the sarcoplasmic reticulum membrane," J. Gen. Physiol., vol. 76, pp. 397-324, 1980.
19. R. Latorre, C. Vergara, and C. Hidalgo, "Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -dependent K^+ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 79, pp. 805-809, 1982.
20. H. Suzuki, K. Tabata, Y. Kato-Yamada, H. Noji, and S. Takeuchi, "Planar lipid bilayer reconstitution with a micro-fluidic system," Lab Chip, vol. 4, pp. 502-505, 2004.
21. H. T. Tien, "Black Lipid Membranes at Bifaces: Formation characteristics, optical and some thermodynamic properties," J. Gen. Physiol., vol. 52, pp. 125-144, 1968.
22. H. Suzuki, K. V. Tabata, H. Noji, and S. Takeuchi. "Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip," Biosens. Bioelectron., vol. 22, pp. 1111-1115, 2006.
23. Sophie Pautot, Barbara J. Frisken, and D. A. Weitz, "Engineering asymmetric vesicles," PNAS, vol. 100, pp. 10718-10721, 2003.
24. Wan-Chen Lin, Craig D. Blanchette, Timothy V. Ratto, and Marjorie L. Longo, "Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study," Biophysical Journal, vol. 90, pp. 228-237, 2006.

25. William L. Hwang, Min Chen, Bri'd Cronin, Matthew A. Holden, and Hagan Bayley, "Asymmetric Droplet Interface Bilayers" J. AM. CHEM. SOC. , vol. 130, pp. 5878–5879, 2008.
26. J. Park, C. Kim, J. Baek, M. Cha, J. Kim, S. Park, J. Lee, and B. Kime, "Micro pumping with cardiomyocyte–polymer hybrid," Lab Chip, vol. 7, pp. 1367–1370, 2007.
27. M. A. Holden, D. Needham, H. Bayley, "Functional bionetworks from nanoliter water droplets," J. Am. Chem. Soc., vol. 129, pp. 8650-8655, 2007.
28. B. A. Wallace, "Structure of gramicidin A," Biophys. J., vol. 49, pp. 295-306, 1986.
29. P. A. Rea, R. J. Poole, "Vacuolar H⁺-Translocating Pyrophosphatase," Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., vol. 44, pp. 157-180, 1993.
30. L. Taiz, "The Plant Vacuole," J. Exp. Biol., vol. 172, pp. 113-122, 1992.
31. Y. Y. Hsiao, R. C. Van., S. H. Hung., H. H. Lin., R. L. Pan, "Roles of histidine residues in plant vacuolar H⁺-pyrophosphatase," Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1608, pp. 190-199, 2004.
32. M. Maeshima, "Vacuolar H⁺-pyrophosphatase," Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1465, pp. 37-51, 2000
33. V. Borisenko, T. Loughheed and J. Hesse, "Simultaneous Optical and Electrical Recording of Single Gramicidin Channels," Biophys. J., vol. 84, pp. 612–622, 2003.
34. M. Zagnoni, M. E. Sandison, P. Marius, A. G. Lee and H. Morgan, "Controlled delivery of proteins into bilayer lipid membranes on chip," Lab Chip, vol. 7, pp. 1176–1183, 2007.
35. G. Menestrina, "Ionic Channels Formed by Staphylococcus aureus Alpha-Toxin: Voltage-Dependent Inhibition by Divalent and Trivalent Cations," J. Membrane Biol., vol. 90, pp. 177-190, 1986.

七、計畫成果自評部份：

S.-K. Fan, Y.-W. Hsu, and C.-H. Chen, "Encapsulated Droplets with Metered and Removable Oil Shells by Electrowetting and Dielectrophoresis," Lab Chip, vol. 11, 2011, pp. 2500-2508.

S.-K. Fan, H. Yang, and W. Hsu, "Droplet-on-a-Wristband: Chip-to-Chip Digital Microfluidic Interfaces between Replaceable and Flexible Electrowetting Modules," Lab Chip, vol. 11, 2011, pp. 343-347.

T.-H. Liu, S.-H. Hsu, Y.-T. Huang, S.-M. Lin, T.-W. Huang, T.-H. Chuang, S.-K. Fan, C.-C. Fu, F.-G. Tseng, R.-L. Pan, "The Proximity between C-termini of Dimeric Vacuolar H⁺-pyrophosphatase Determined Using Atomic Force Microscopy and Gold Nanoparticle Technique," FEBS Journal, vol. 276, 2009, pp. 4381-4394.

S.-K. Fan, W.-J. Chen, T.-H. Lin, T.-T. Wang and Y.-C. Lin, "Reconfigurable liquid pumping in electric-field-defined virtual microchannels by dielectrophoresis," Lab Chip, vol. 9, 2009, pp. 1590–1595.

S.-K. Fan, C.-P. Chiu and J.-W. Lin, "Electrowetting on polymer dispersed liquid crystal," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, 2009, 164109.

S.-K. Fan, T.-H. Hsieh and D.-Y. Lin, "General digital microfluidic platform manipulating dielectric and conductive droplets by dielectrophoresis and electrowetting," *Lab Chip*, vol. 9, 2009, pp. 1236-1242.

S.-K. Fan, C.-P. Chiu, and P.-W. Huang, "Transmittance Tuning by Particle Chain Polarization in Electrowetting-Driven Droplets," *Biomicrofluidics*, vol 4, 2010, 043011.

Yi-Ying Lin, Ching-Wen Chen, Li-Chi Chen, and Shih-Kang Fan, "Formation of Droplets Interface Bilayer by Coplanar EWOD Device" NEMS 2011, Kaohsiung, Taiwan, Feb. 2011, pp. 1005-1008.

L.-C. Chen, C.-W. Chen, and S.-K. Fan, "Bilayer Lipid Membrane Formation by Electrowetting-Actuated Encapsulated Droplets," *uTAS 2009*, Jeju, Korea, Nov. 2009, pp. 1067-1069

Y.-W. Hsu, C.-H. Chen, and S.-K. Fan, "Formation, Transportation, and Evaporation of Encapsulated Droplets," *IEEE Int. Conf. on Nano/Molecular Medicine and Engineering*, Tainan, Taiwan, Oct. 2009, 3A2-3.

Y.-W. Hsu, C.-H. Chen, and S.-K. Fan, "Water Droplet Encapsulation by A Quantitative and Removable Oil Shell," *Transducers 2009*, Denver, CO, USA, June 21-25, 2009, pp. 1995-1998.

C.-W. Chen, Y.-W. Hsu, Y.-C. Chang, C.-H. Chen, and S.-K. Fan, "Digital microfluidic packaging by droplet-level encapsulation," *Asia-Pacific Conference on Transducers (APCOT '08)*, Tainan, Taiwan, Jun. 2008, Oral Session (2), pp. 40-43.

Y.-C. Chang, C.-W. Chen, and S.-K. Fan "Droplet-Based Bilayer Lipid Membrane Formation," *NanoMed*, Macao, China, Aug. 2007.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/09/29

國科會補助計畫	計畫名稱: 奈米細胞膜片電位箝晶片-包覆式微液滴操控, 脂質雙層膜型成, 電生理訊號量測整合平台(子計畫三)(3/3)
	計畫主持人: 范士岡
	計畫編號: 99-2627-M-009-001- 學門領域: 以尖端物理/化學方法探索生物系統跨領域研究

無研發成果推廣資料

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：范士岡		計畫編號：99-2627-M-009-001-					
計畫名稱：創新之奈米操控/檢測平台應用於單分子膜蛋白動態研究--奈米細胞膜片電位箝制晶片-包覆式微液滴操控，脂質雙層膜型成，電生理訊號量測整合平(子計畫三)(3/3)							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	4	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	7	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	6	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>成果並發表於 IEEE NEMS 會議中，獲得何志明院士最佳論文獎</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

此計畫發展之脂質雙層膜晶片