

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

以液介電泳原理開發
應用於 DNA 分析之新式毛細管電泳晶片

A New Capillary Electrophoresis Microchip by Liquid
Dielectrophoresis for DNA Analysis

研究生：邵啟煥

指導教授：范士岡 助理教授

徐文祥 教授

中華民國九十七年六月

以液介電泳原理開發

應用於 DNA 分析之新式毛細管電泳晶片

A New Capillary Electrophoresis Microchip by Liquid

Dielectrophoresis for DNA Analysis

研 究 生：邵啟煥

Student：Chi-Huan Shao

指 導 老 師：范士岡

Advisor：Shih-Kang Fan

徐文祥

Wensyang Hsu



Thesis

Submitted to Institute of Mechanical Engineer

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in

Mechanical Engineering

June 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年六月

以液介電泳原理開發

應用於 DNA 分析之新式毛細管電泳晶片

研究生：邵啟煥

指導教授：范士岡、徐文祥

國立交通大學機械工程學系（研究所）碩士班

摘要

近年來毛細管電泳晶片發展十分快速，並且在 DNA 的分析測試上扮演重要角色。但目前毛細管電泳晶片皆封閉式流道架構，尚無開放式流道，開放式流道優點為製程簡易、可整合數位流體式晶片，如聚合酶連鎖反應數位流體晶片；因此本論文目的為嘗試利用液介電泳原理創造出開放式液體流道，藉由開放式流道進行毛細管電泳之進樣、分離與偵測。

藉由液介電泳電極設計，在 100 kHz，100 V 此特殊頻率之交流電場下，可將液體限制在液介電泳電極上方之垂直交流電場附近，而使緩衝液形成一開放式流道，並使用螢光物質(FITC)觀察到在兩側施加一直流電場時，液體出現電滲流之流動行為。利用分段式進樣與螢光偵測的方式，可在毛細管電泳之直流電場 26.6 V/cm 下，初步將三種不同片段長度(3 kb、5 kb、8 kb)之 DNA 進行進樣、分離與偵測。實驗中嘗試使用十字型、數位式以及分段式三種不同進樣方式，以及測試不同介電層材料，目標為達到以開放式流道為架構之新式毛細管電泳晶片。

關鍵字：毛細管電泳、液介電泳、開放式流道、DNA

A New Capillary Electrophoresis Microchip by Liquid Dielectrophoresis for DNA Analysis

Student: Chi-Huan Shao

Advisors: Shih-Kang Fan¹

Wensyang Hsu²

¹Institute of Nanotechnology, ²Department of Mechanical
Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) microchip has played an important role in DNA analysis in recent years. However, all CE microchips nowadays are built by close channel. We have developed a novel capillary electrophoresis microchip by an open channel technique without channel walls. The open channel here is created by utilizing liquid dielectrophoresis (LDEP) principle to confine liquids above the LDEP electrodes and form a open channel around the vertical AC electric field at 100 kHz, 100 V. While we applied a parallel DC electric field, electroosmotic flow (EOF) was observed by FITC doping in buffer solution. The device has demonstrated injection, separation and detection of DNA between two parallel plates. The sample can be transported by electroosmotic flow at parallel DC electric field. DNA was preliminary analyzed at DC electric field with amplitude of 26.6 V/cm in an open channel micro CE chip by fluorescence microscope.

Keywords: capillary electrophoresis(CE), liquid dielectrophoresis (LDEP), open channel, DNA

致謝

兩年或許只是人生中的一段經歷，但我卻從中成長了不少，不僅從此踏入微機電與奈米領域，更學習到做人處事的方法，這些種種的成長都要感謝我身邊的一群要好朋友以及幫忙我的人事物，如果沒有他們就沒有如此精彩的研究所生活。

首先要感謝兩位指導教授徐文祥教授以及范士岡教授的諄諄教誨，讓我學習如何面對不同的工作環境，接觸更廣泛的領域，養成負責任的態度。再來要感謝楊涵評、邱誠樸、魏仁宏等學長在我實驗上的建言以及幫助，如果沒有他們實驗將困難重重。再來要感謝駿偉、家聖、元德、毅家、耀文等學長的照顧以及同窗的李岳剛、葉昶志、陳玟蓉、潘姍婷、陳靖文、林上哲、彭于豪的互相激勵與成長，還有胡皓宇、廖淳旭、蔣鎧宇、林軒宇、王澤璋、陳俐淇、許青翔、簡家齊、林帝宇、林庭旭等學弟妹們伴我度過兩年的研究生涯。還要感謝交大應化所蘇秀麗以及清大黃蘊慈學姐在實驗上的幫忙。沒有你們也就沒有我今天的成就。

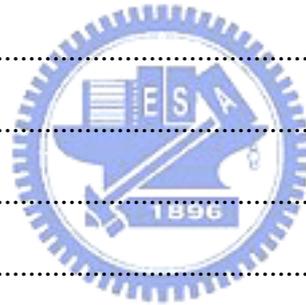
最後要感謝我的家人默默在我背後給我的支持與鼓勵。謝謝各位！

啟煥

目錄

摘要.....	iii
致謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	viii
表目錄.....	x
第一章 緒論.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 文獻回顧.....	2
1.2.1 毛細管電泳發展史.....	2
1.2.2 毛細管電泳晶片流道發展.....	4
1.2.3 液介電泳回顧.....	6
1.3 研究目標.....	7
第二章、原理與概念設計.....	8
2.1 毛細管電泳原理.....	8
2.1.1 電泳 (Electrophoresis)	9
2.1.2 電滲流 (Electroosmotic Flow)	9
2.1.3 分析物粒子的淨流速.....	10
2.2 液介電泳原理.....	11
2.3 概念設計.....	13
2.3.1 結構設計.....	14
2.3.2 電極設計.....	15
2.3.3 進樣設計.....	16
第三章、製作流程.....	20

3.1 上板製作流程.....	21
3.2 下板製作流程.....	22
3.2.1 下板製程—ITO 電極.....	22
3.2.2 下板製程—金電極.....	24
3.2.1 下板製程—白金電極.....	25
第四章、實驗測試與結果.....	26
4.1 實驗架設.....	26
4.2 實驗測試.....	27
4.2.1 電極測試.....	27
4.2.2 介電層測試.....	28
4.2.2 進樣測試.....	29
4.3 實驗結果.....	32
4.3.1 螢光物驅動.....	32
4.3.2 DNA 偵測.....	34
第五章、結論與建議.....	37
5.1 結論.....	37
5.1 開放式流道晶片.....	37
5.2 DNA 分離與偵測.....	37
5.2 建議與未來工作.....	38
參考文獻.....	39



圖目錄

圖 1-1、玻璃基材微流道[8].....	4
圖 1-2、以 Parylene 式微流道 [10].....	5
圖 1-3、PDMS 式微流道 [11].....	5
圖 1-4、液介電泳流動情形[13].....	6
圖 2-1、十字形電泳晶片的進樣和分離	8
圖 2-2、電滲流示意圖	9
圖 2-3、毛細管電泳分離示意圖	10
圖 2-4 液介電泳現象[17].....	11
圖 2-5 LDEP 示意圖	12
圖 2-6 概念設計圖	13
圖 2-7 結構設計圖	14
圖 2-8 電極設計圖	15
圖 2-9 十字型進樣示意圖	16
圖 2-10 十字型進樣試片與光罩圖	17
圖 2-11 數位式進樣示意圖	17
圖 2-12 十字型進樣試片與光罩圖.....	18
圖 2-13 分段式進樣示意圖	18
圖 2-14 分段式進樣試片與光罩圖	19
圖 3-1、上板製程	21
圖 3-2、ITO 下板製程.....	23
圖 3-3、金下板製程	24
圖 3-4、白金下板製程	25
圖 4-1、實驗架設圖	26

圖 4-2、十字型流道螢光粒子圖	29
圖 4-3、數位式進樣	30
圖 4-4、分段式進樣	30
圖 4-5、螢光物驅動情形	33
圖 4-6、DNA 分離情形.....	35
圖 4-7、螢光強度對位置變化圖	35
圖 4-8、同一位置下，DNA 螢光強度對時間變化圖.....	36
圖 5-1、ANSYS 電場模擬圖	37



表目錄

表 1-1、DNA 診斷市場.....	1
表 4-1、電極材料比較表	27
表 4-2、介電層材料比較表	28
表 4-3、進樣方式比較表	31
表 4-4、螢光物驅動實驗環境.....	32
表 4-5、DNA 實驗環境.....	34



第一章 緒論

1.1 研究動機

自從 1950 年代發現了 DNA 開始，人類在生技研究 DNA 上日益的重視已不容忽略。根據 Business Communications Company, Inc.於 2004-Aug-18 日報告書(表 1-1) 預估全球 DNA 診斷市場規模將在 2009 年達到 126 億美元。主要原因是被廣泛應用於製藥、臨床醫學和生物醫學上。應用於臨床人類疾病的診斷與監測，目前市場規模有 25 億美元，預估以 13.7% 成長，2009 年達 47 億美元。應用於實驗醫學的 DNA 診斷市場規模，主要是用於診斷疾病及其易感性(Disease Susceptibility)、胎兒性別測定、器官組織移植和捐血血液篩選。應用最廣泛是於生物製藥和生物技術產業，佔整體 DNA 診斷市場的 52%。主要是用於各種基因的診斷。然而在現今社會注重效率和時間下，毛細管電泳晶片有效的縮短了 DNA 分析的時間，更擁有了微小化以及攜帶方便的優點，符合時代的潮流，更是目前 Lab-on-a-chip 的發展主流之一，結合 DNA 分析的另重點聚合酶連鎖反應 Polymerase Chain Reaction (PCR)，將可有效的增殖和分離 DNA，相信未來將許多生化反應檢測整合在一微小晶片上，成為一個生化檢測系統，將是指日可待。

表 1 1、DNA 診斷市場

全球微流體系統 晶片及裝置市場	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2008	AAGR % 2002-2008
產值 (\$百萬美元)	12.0	19.9	207.5	475.8	611.2	743.2	950.1	1950.2	15.5%

1.2 文獻回顧

1.2.1 毛細管電泳發展史

近年來，毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE) 已成為分析化學領域中發展最快的一種微量分離技術。其原理是將帶有不同電荷或質量的離子，利用其質荷比的不同，在緩衝溶液中受到外加直流電場的作用時會產生不同的遷移速率，進而達到分離的目的。

電泳技術發展百年多的歷史，早在 1808 年就發現電泳現象，但在 1937 年才發展成為一種分離方式，由瑞典科學家 Tiselius 設計了世界上第一台自由電泳儀，建立了移界電泳法 (moving boundary, EP)，成功地將人類血清蛋白質分離，使得人們更瞭解血清的成份，藉此偉大突破發展，在 1948 年更榮獲諾貝爾獎[1]。1979 年 Mikkers[2] 提出以 200 μm 內徑的玻璃毛細管和聚四氟乙烯毛細管進行區帶電泳 (zone electrophoresis) 試驗，成功利用較小內徑的毛細管來控制焦耳熱。

1981 年，Jorgenson 和 Lukacs[3] 提出以內徑 75 μm 的玻璃毛細管柱，在充滿緩衝溶液的毛細管兩端施加 30 kV 的電壓來分離衍生化的胺基酸，同時利用螢光偵測器作線上偵測，有效的提高偵測靈敏度，確立了毛細管區帶電泳的理論與基礎是利用離子所帶電荷及分子本身大小的比值不同，將彼此分離。而毛細管區帶電泳是一種僅能分離帶電物質的技術，中性物質因本身不帶電，在電場中只會受到電滲流的影響而造成遷移，其本身中性物質和中性物質之間在電場中並不會有速度上的差異，因此早期無法應用毛細管區帶電泳來進行分離。

日本科學家 Terabe[4] 在 1984 年突破了這個限制，發展出微胞電動毛細管層析技術 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC or MEKC)，在緩衝溶液中加入介面活性劑，當介面活性劑達到臨界微胞濃度

(critical micelle concentration, CMC)以上時，介面活性劑形成微胞，利用中性物質在微胞相及溶液相間不同的分配係數而達到分離的效果。

1987 年，Cohen 和 Karger[5]將傳統的凝膠電泳技術應用在毛細管，提出了毛細管凝膠電泳技術 (capillary gel electrophoresis)。此外還有利用不連續的緩衝溶液系統所造成的電場差異使得分析物依照其在不同電場下有不同電泳速率進行分離，稱為毛細管等速電泳法 (capillary isotachopheresis, CITP) 技術[6]。

由於毛細管電泳技術具有：(1) 分離效率高；(2) 樣品用量少；(3) 分析速度快等特性，近年來毛細管電泳得以在各方面應用持續發展，為人類帶來更多的貢獻。



1.2.2 毛細管電泳晶片流道發展

在 1989 年 Manz[7]提出微小化全自動分析的概念(Micro-total Analysis System-TAS)，其目的是希望將實驗中進行的生化或一般化學反應整合在微小的晶片上,以減少試劑的用量、人為操作污染等問題，一方面也達到全自動分析的目的，因此稱為實驗室晶片(Lab-on-a-chip)，由於分析步驟是藉由流體在晶片上微管道內完成整個流程，因此又稱為微流體晶片。而實驗室晶片與微陣列晶片(Microarray)不同的是晶片上有微流體管道，其製作方式是利用微機電製程的蝕刻技術在基材上形成三圍空間的通道，與另一平面材料黏合形成微管道，在微管道內可進行對液體的多樣操控以配合分析流程。

在 1994 年 Woolley[8]等人發展出毛細管電泳連續流體式微晶片，其特色是將以往需要龐大設備才能執行的毛細管電泳，利用微機電製程技術應用到毛細管電泳晶片上，以蝕刻玻璃的方式，先在其中一片玻璃蝕刻出三維空間的流道，再利用接合技術與另一片玻璃黏合形成管道，其結構如圖 1-1 所示，雖然電泳的歷史發展已久，但此時才算是真正的進入電泳晶片的時代。

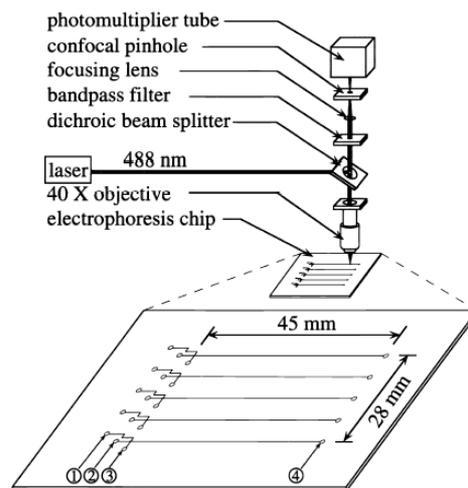


圖 1-1、玻璃基材微流道[8]

接下來 1998 年 Paulus[9]等人開始嘗試利用塑膠(Henry Plastics, Fremont, CA)結合玻璃的方式製作管道，有別於以往全用玻璃當流道材質的差別，塑

膠更容易圖刻以及接合，製程上也較為容易，此後高分子材料如：Parylene 和 PDMS 便開始成為毛細管電泳晶片的主流，2000 年 Webster[10]等人利用 Parylene 材料製作流道，如圖 1-2。2001 年 Hong[11]等人利用高分子材料 PDMS 結合 PMMA 製作微流道，如圖 1-3。其最大的原因是因為高分子材料製程容易，且接合部份也容易克服，因此近年來大部分微晶片流道皆利用高分子材料為流道主體。但目前電泳晶片皆為封閉式實體流道，尚無開放式流道。

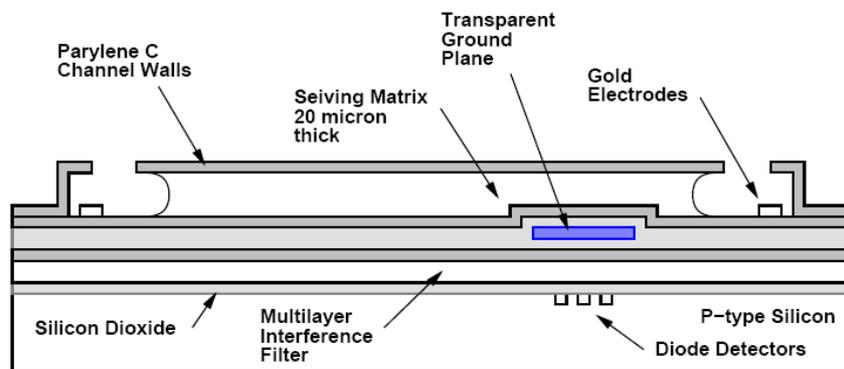


圖 1-2、以 Parylene 式微流道 [10]

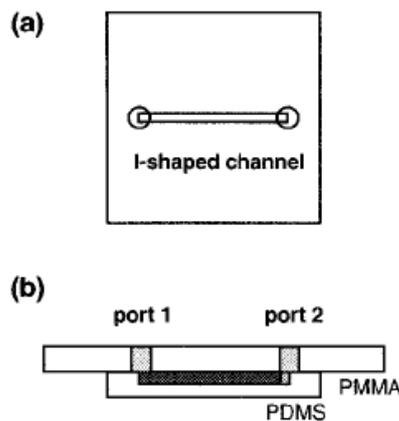


圖 1-3、PDMS 式微流道 [11]

1.2.3 液介電泳回顧

1978年由英國學者Pohl[12]開始提出介電泳(dielectrophoresis)之理論並開始發展，其原理現象主要為在一非均勻電場之下，不帶電粒子受到電場的極化作用後，開始產生移動現象，近年來許多生物晶片便是利用此介電泳技術來操控生物分子，是生物微操控領域中相當重要的技術之一。

在2001年，T. B. Jones[13]提出液介電泳(liquid dielectrophoresis)現象，與過去介電泳不同為其主要在描述利用液體與其周圍液體之介質介電常數高低不同，在非均勻電場下所產生之液體驅動力，進而達到操控液體之流動現象如下圖 1-4。

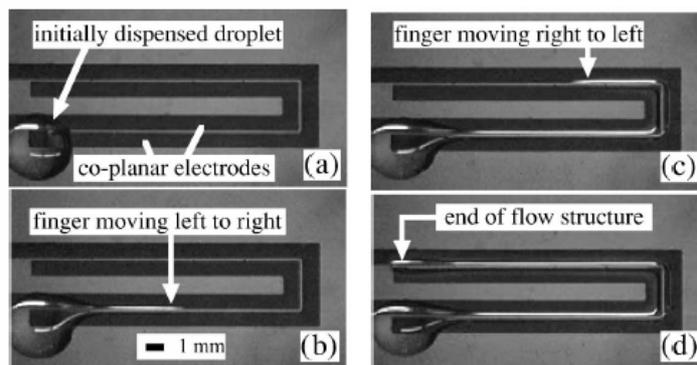


圖 1-4、液介電泳流動情形[13]

2006年Fan[14]等人在上下平行板定義液介電泳電極，利用上下板電極所造成之非均勻電場操控液介電泳現象，更以此在兩平行板間創造開放式液體流道，並可利用液體符合電極形狀之優勢達成更精準操控液體體積以及複雜形狀之液體流道，開放式流道具有製程簡單無需外加幫浦、試劑用量更少、可整合數位化流體等優勢，發展日趨蓬勃多元。

1.3 研究目標

由文獻回顧可知，毛細管電泳晶片目前大部分皆以高分子材料當成管道材料，其原因不外乎為容易成型和接合，然而在目前晶片微小化的趨勢下，連續流體式微流道的晶片整合跟開放式流體比較起來，整合較為困難，製程也比數位式流體複雜且成本高，針對不同的需求，也需要不同的複雜流道設計和外加幫浦，相當不方便，反觀數位流體，只需要改變電極形狀，即可利用電位控制來達到控制流體的目的，且試劑用量也大為縮減，並可減少外加裝置如幫浦和管線等，種種優點都顯示數位流體在未來必為主流，因此在 DNA 分析晶片佔重要一環的毛細管電泳，勢必須要整合成生物晶片，

本實驗目標為利用液介電泳的原理，創造出一個可以整合數位流體之開放式毛細管電泳分離流道，藉此發展出新式毛細管電泳晶片，並設法在此電泳晶片上達成 DNA 之進樣、分離與偵測。

第二章、原理與概念設計

2.1 毛細管電泳原理

毛細管電泳(capillary electrophoresis)其原理是在充滿溶液的管柱兩端施加高電壓（10–30 kV），由於待測物因電荷大小、體積、形狀、電荷密度、質量和分離電解質作用力的不同，造成不同的移動速度，而達到分離的目的。圖 2-1 是十字形電泳晶片的進樣和分離。

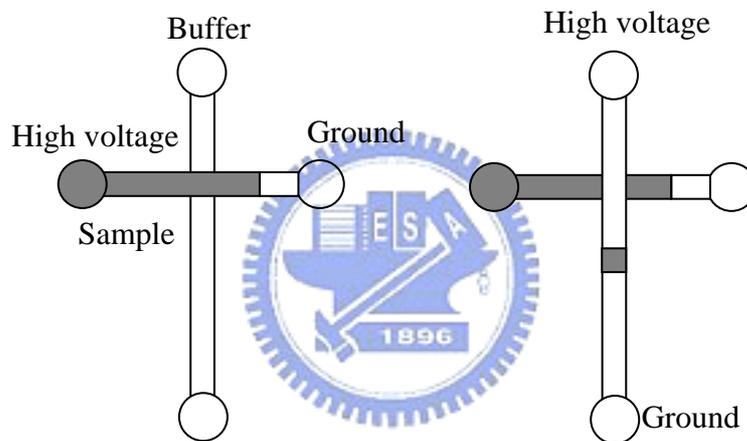


圖 2-1、十字形電泳晶片的進樣和分離

在外加電場之作用下，帶電粒子在毛細管內的速度和方向受電泳（Electrophoresis）和電滲流（Electroosmotic Flow）兩種效應加成影響。

2.1.1 電泳 (Electrophoresis)

電泳是帶電粒子在電場中遷移速度之差異，造成分析物分離的一種方式。圖 2-3 (a) 是帶正電荷粒子受電場影響會往負極移動，帶負電荷粒子會往正極移動，而中性粒子因不受電場影響，所以滯留在原處不動。

2.1.2 電滲流 (Electroosmotic Flow)

毛細管的材質大多為熔矽 (fused silica)，毛細管內的表面帶有矽醇基 Si-OH，會與水反應形成共軛酸-鹼對，其當毛細管內電解質溶液之 $\text{pH} > 3$ 時，毛細管內的表面會因 H^+ 解離而帶負電荷，因異性電相吸的緣故，溶液中帶正電荷的陽離子會受到管壁 Si-O⁻ 負電荷的吸引而聚集，在液固介面（毛細管壁附近）形成正、負帶電荷的電雙層(double layer)。其中吸附在管壁上無法移動之離子層稱為“固定層”(stern layer)，在固定層外則是陽離子相對於陰離子較多之擴散層(diffuse layer)。當毛細管兩端施加電壓時，溶液中帶正電荷的陽離子受電場吸引，而往負極方向移動。由於陽離子的密度高於陰離子，陽離子移動的同時會與周圍的水分子水合，造成整個管柱內之溶液都會一起往負極移動，如圖 2-2、2-3(b)。

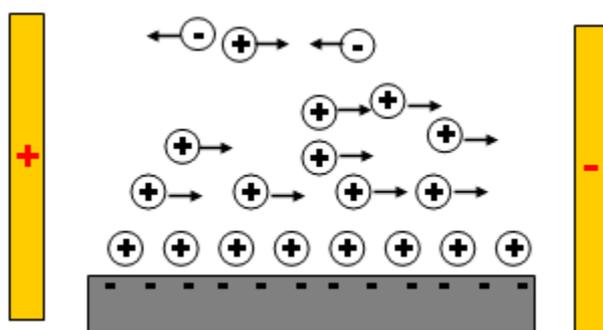


圖 2-2、電滲流示意圖

2.1.3 分析物粒子的淨流速

分析物粒子在毛細管電泳中之遷移速度(migration velocity)，如圖 2-3 (c)，是由電泳之流速和電滲流之流速加成而得。一般而言，電滲流的流速都大於電泳流速，此兩流速加成後，分析物粒子幾乎都朝向電極的負端移動。因帶正電荷之粒子，其電泳和電滲流的遷移方向相同，所以往負端的流速最快；其次是中性粒子，因不帶電荷，所以其遷移速度便等於電滲流的流速；最後，遷移速度最慢的是帶負電荷的粒子，因電泳與電滲流之遷移速度相反，所以往負端的方向最慢，如圖 2-3(c) 所示，因此當 DNA 的長度和電荷比不同時，藉由電泳的不同速率，便可分離。

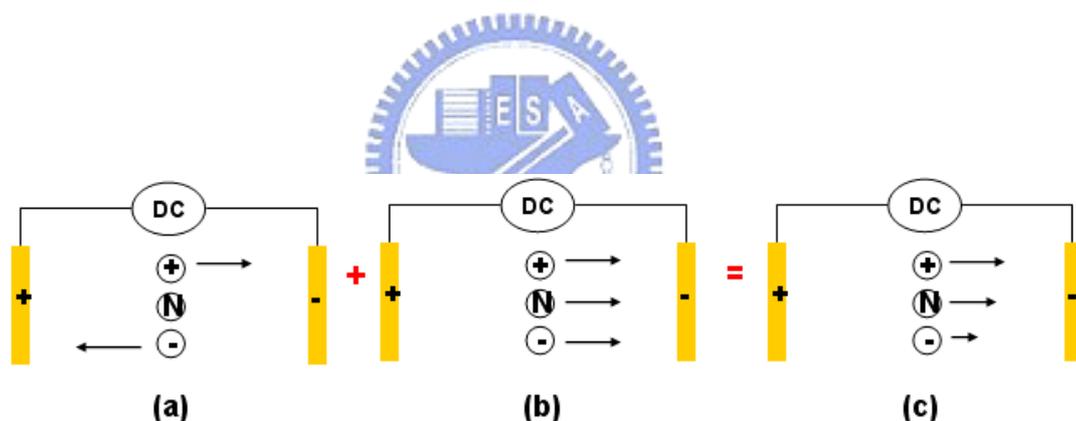


圖 2-3、毛細管電泳分離示意圖

2.2 液介電泳原理

電泳現象的基本前提為：必須要有帶電的懸浮微粒。才可藉由電場驅動這些帶電懸浮微粒，然而液介電泳 Liquid dielectrophoresis(LDEP)則是利用不同頻率的電訊號對介電層具有不同的穿透率，當低頻訊號時，大部分電場壓降落在介電層上，使得介電層容易崩潰產生電解，當高頻訊號時，電場壓降逐漸轉移到液體層，可減少介電層壓降較不易電解，此時因為不同之液體具有不同的介電常數差異，使得在其介面產生液介電泳力量，高介電常數之液體會傾向往電場較強之地方移動，如下圖 2-4，因此利用上下板之電極形狀，在電極施加高頻電場訊號時，由於水的介電常數比油的介電常數還要來的高，在定義之電極形狀處會有較高之電場強度，此時水會以符合電極形狀之方式進行流動，如下圖 2-5，在高頻電場訊號下藉由此方式便可在預先定義好之電極形狀上創造出開放式之液體流道。

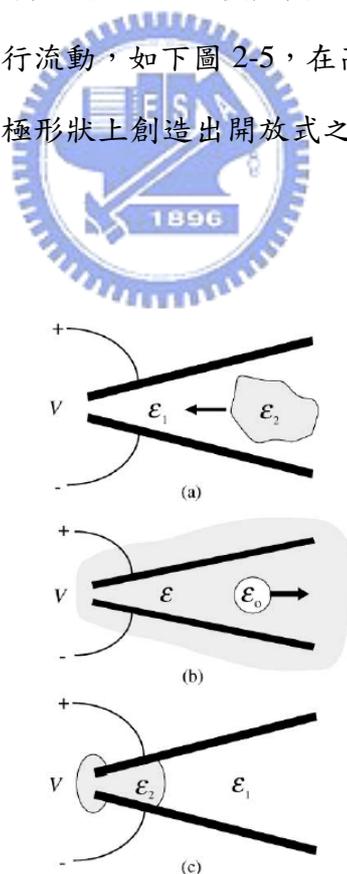


圖 2-4 液介電泳現象[17]

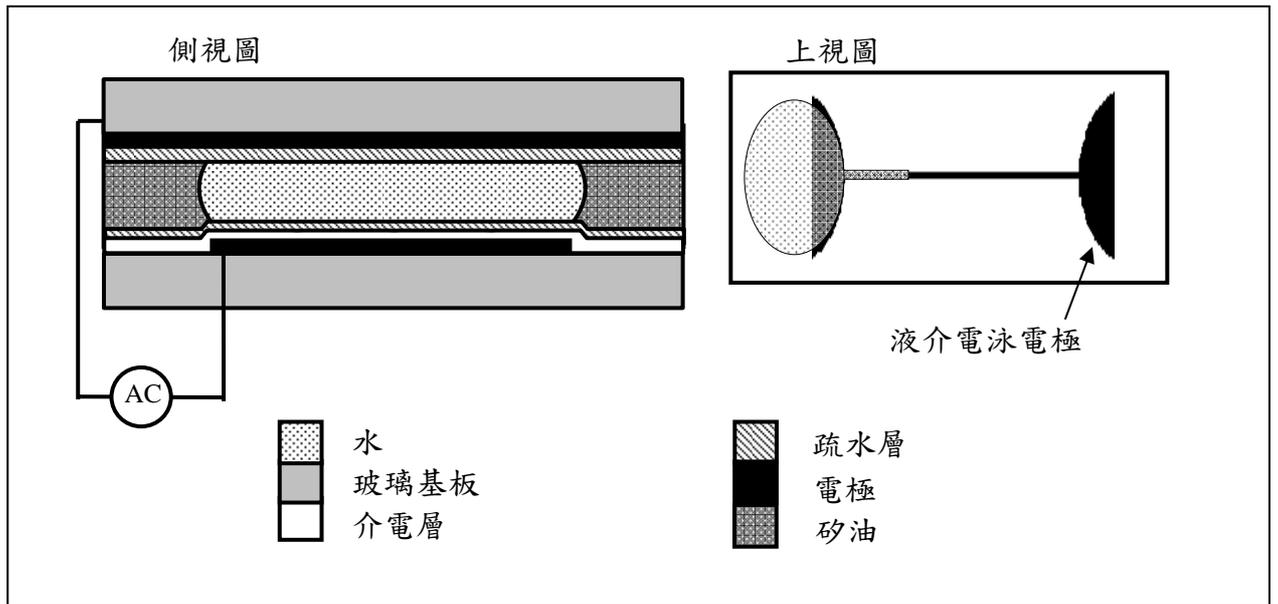


圖 2-5 LDEP 示意圖



2.3 概念設計

本概念設計為同時利用液介電泳原理以及毛細管電泳原理，在兩平行板間高頻電場訊號下，利用電極形狀設計，使得液體以符合電形狀之方式流動成為開放式液體流道，並在此液體流道上利用毛細管電泳原理進行分離與偵測。

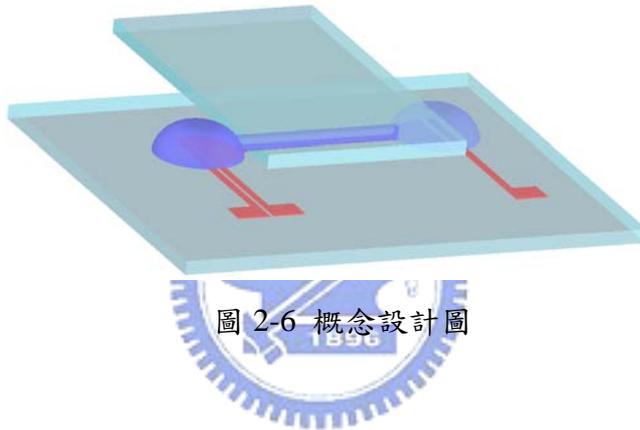


圖 2-6 概念設計圖

2.3.1 結構設計

有別於一般液介電泳設計，除了在上下板有高頻電場訊號外，橫向部份需施加直流電場使產生毛細管電泳現象，因此上下板之電極皆需要有介電層保護，以避免液介電泳 AC 電極與毛細管電泳 DC 電極藉由液體互相導通發生電解，如下圖 2-7，而毛細管電泳電極需要與緩衝液接觸以在兩端產生高壓 DC 電場進行毛細管電泳分離，為此 DC 電極上之介電層需移除，使之可以接觸到緩衝液，最外層之疏水層目的為使液體流道更加符合設計之電極形狀，避免因表面親水而使流道難以控制在電極形狀上，為了可以直接觀察螢光配合螢光偵測方式，在上下板的基材選擇上則以透光性佳的玻璃材質為主。

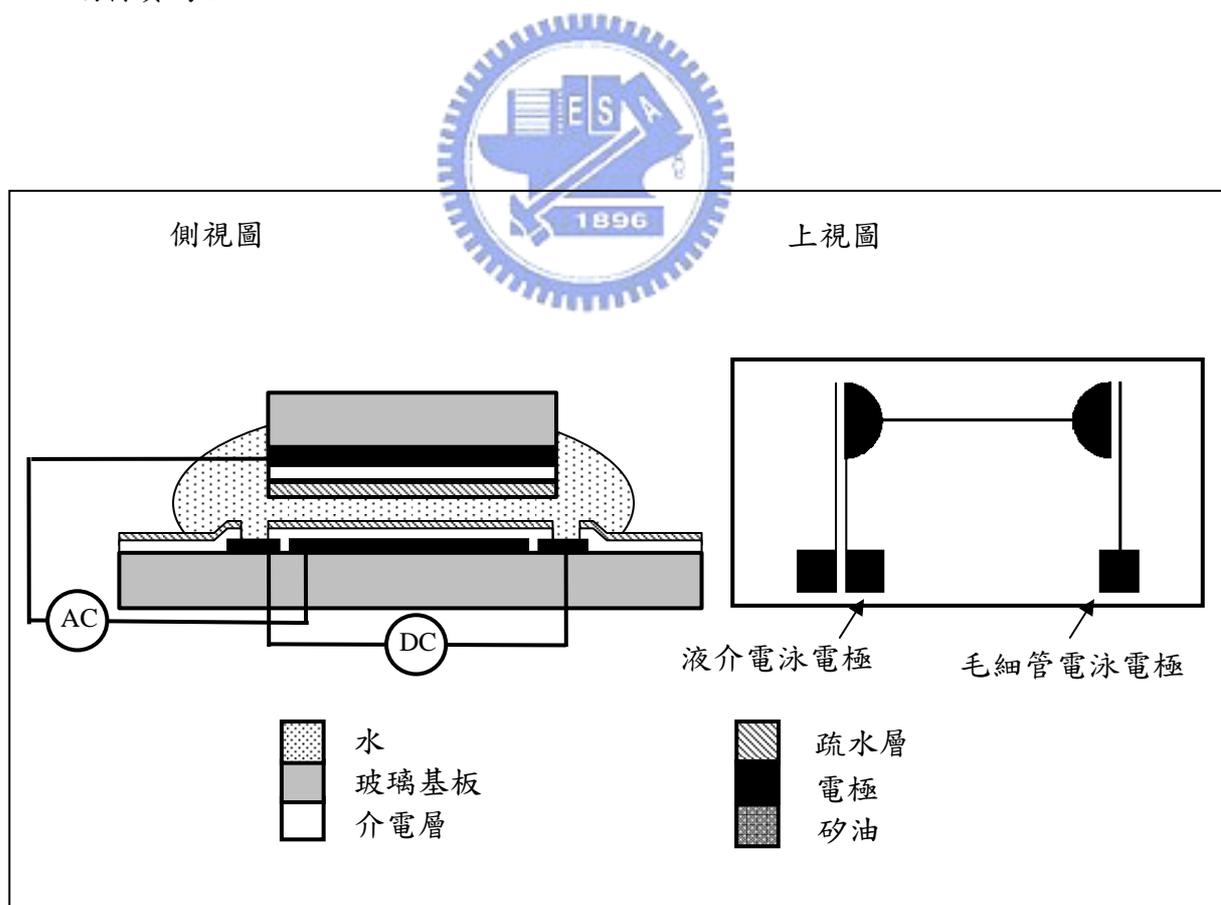


圖 2-7 結構設計圖

2.3.2 電極設計

初始電極設計為下圖 2-8，毛細管 DC 電極外部有環狀液介電泳電極包圍，使開放式液體流道可以接觸到兩端 DC 電極，然而此電極設計方式上板玻璃需利用鑽孔方式鑽出兩個洞，使成為毛細管電泳反應槽避免電解氣泡累積，但因玻璃在鑽孔過程中，邊界容易凹凸不平使得附近之介電層與電極製程不穩定，容易產生電解且不容易操控液體，因此改良之電極設計為將舊式電極簡化，啞鈴狀之電極為液介電泳流道之形成電極，左右兩側電極為毛細管電泳 DC 電極，因此控制上板玻璃尺寸比啞鈴狀電極小，可利用液介電泳力量將左右兩側緩衝液拉近兩板之間，且此電極設計可避免上板玻璃過於複雜的加工過程使邊界粗糙不平，以減少電解現象之產生，同時降低左右兩側之緩衝液電解反應也可減少對毛細管電泳分離流道之影響。

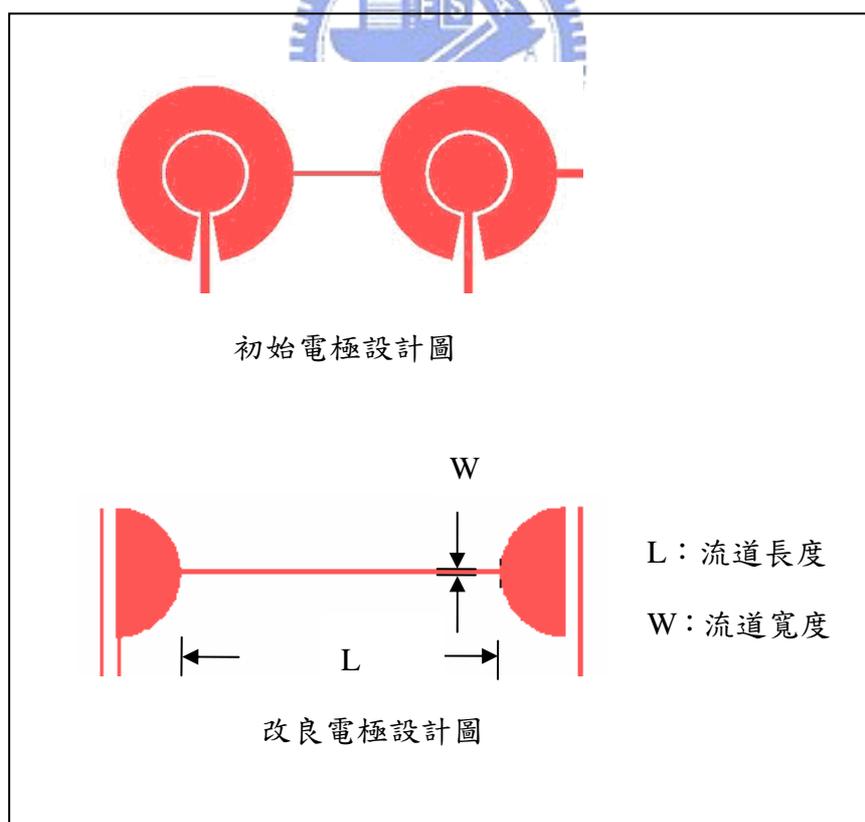


圖 2-8 電極設計圖

2.3.3 進樣設計

進樣設計在毛細管電泳部份扮演相當重要的角色，有別於傳統封閉式流道電泳晶片，開放式流道電泳晶片有更大的設計變化，結合不同的驅動與操作方式，本實驗設計三種不同的進樣方式電極：十字型進樣方式、數位元式進樣方式和分段式進樣方式。

十字型進樣方式如下圖 2-9 所示，利用液介電泳可使流體符合電極形狀之特性，設計十字形狀之電極，使產生十字形流道，接著在上端滴入待測物，操縱垂直方向之 DC 電場，使產生電滲流由上往下流動，再操縱橫向之 DC 電場，使之進樣一段樣品並開始進行毛細管電泳分離。

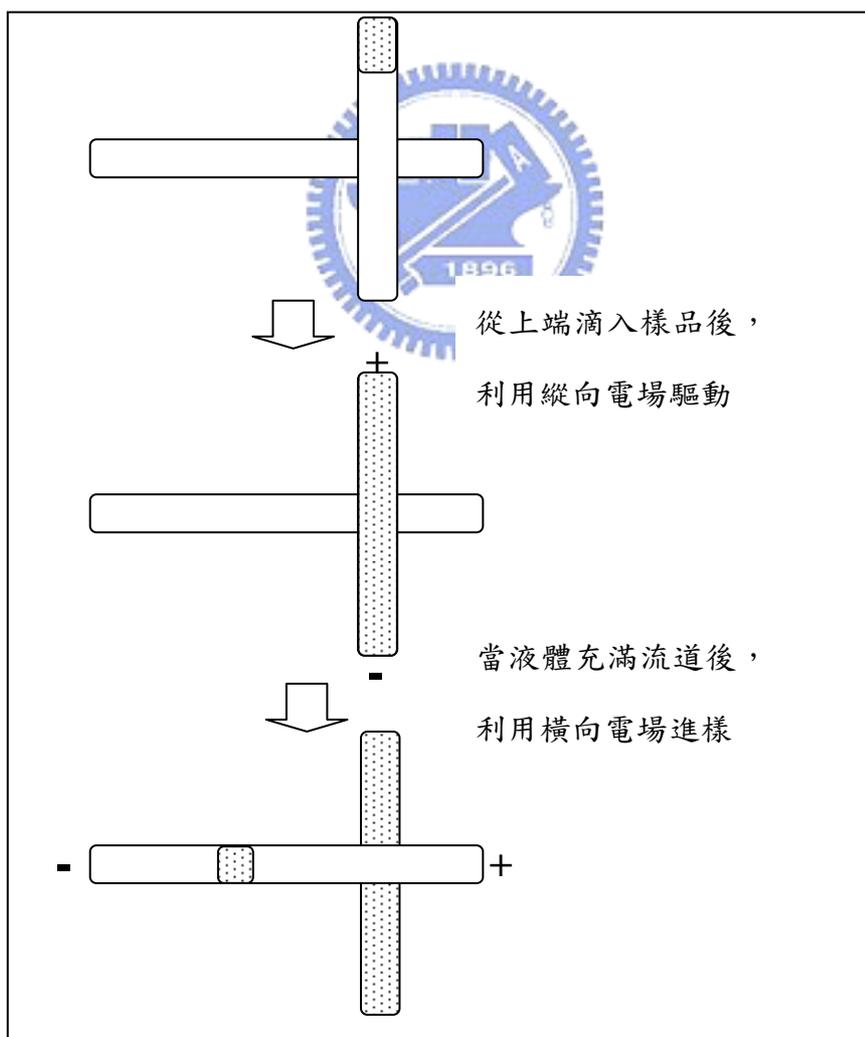


圖 2-9 十字型進樣示意圖

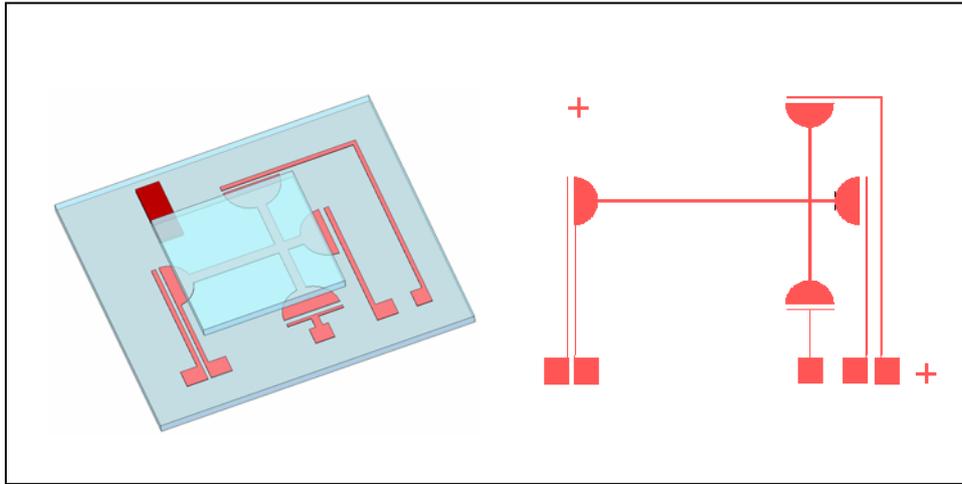


圖 2-10 十字型進樣試片與光罩圖

數位元式進樣方式如下圖 2-11 所示，與十字型進樣方式不同為只需要創造出單一流道即可，利用下方之方形電極設計，可以利用電溼潤驅動方式，將單一樣品液滴，藉由控制方形電極之電場，操控液滴移動使靠近開放式液體流道，而使樣品液滴被拉進液體流道內達成進樣目的。

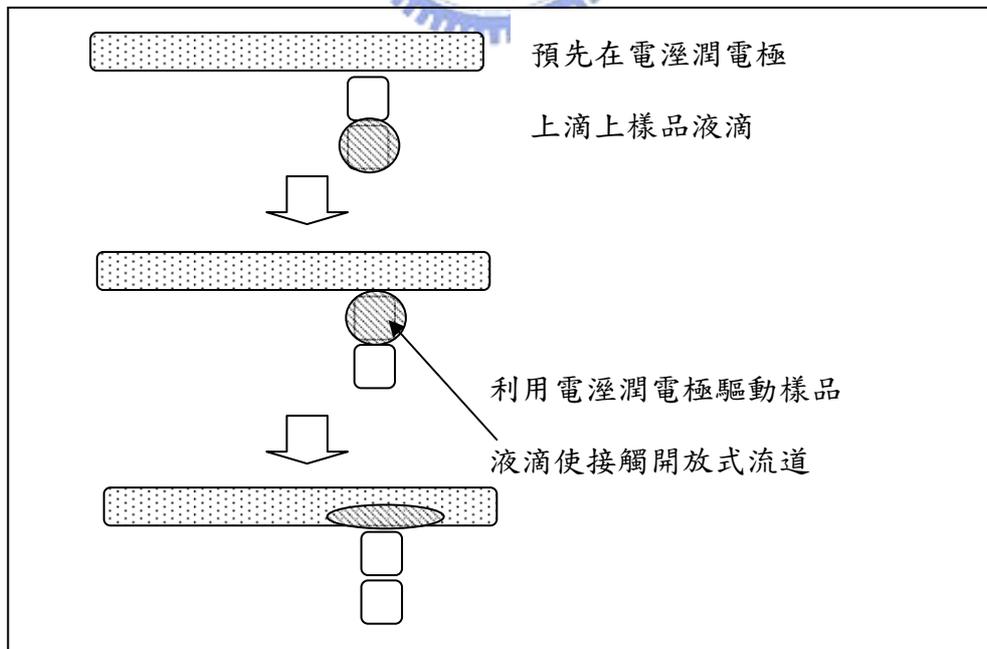


圖 2-11 數位式進樣示意圖

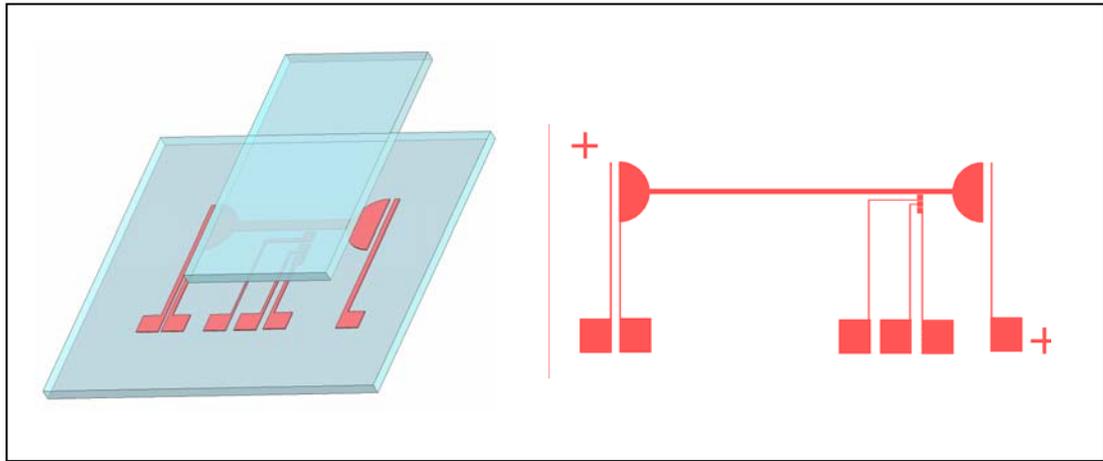


圖 2-12 十字型進樣試片與光罩圖

分段式進樣方式如下圖 2-13 所示，預先在毛細管電泳流道上滴入樣品液滴，再藉由左右兩端緩衝液進入時間不同，使電泳流道在充滿緩衝液時，即已將液滴樣品注入，此進樣電極比十字型和數位元式電極更為簡化，且可減少操控電極之數目與位置，降低介電崩潰之可能性。

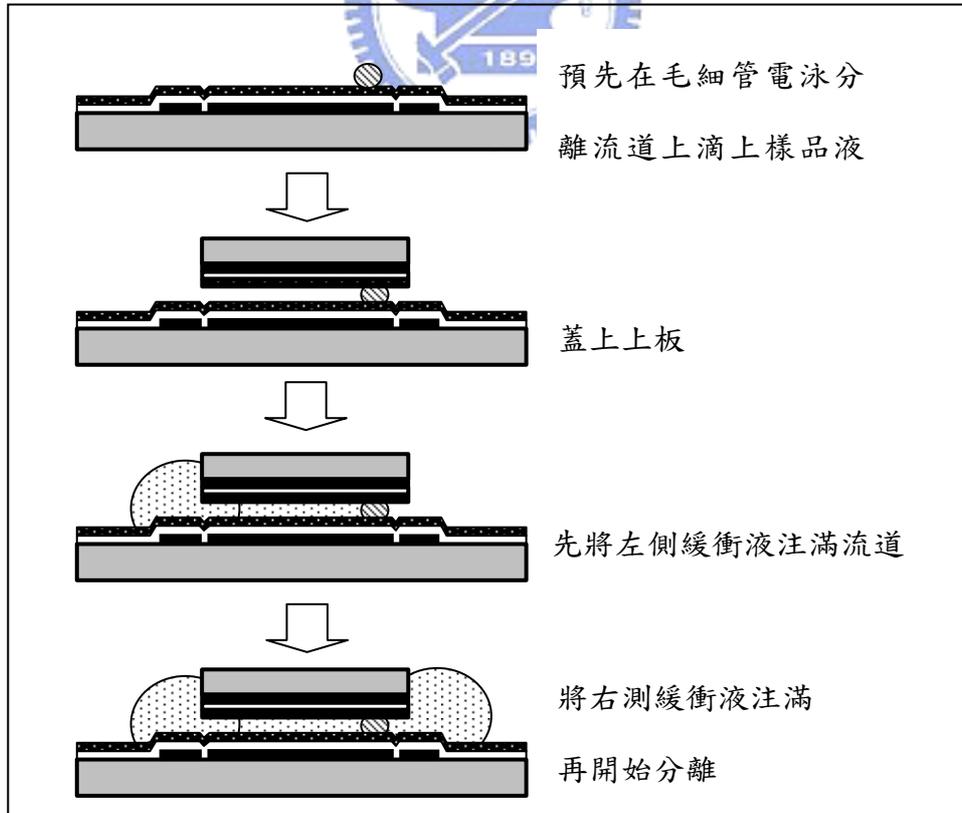


圖 2-13 分段式進樣示意圖

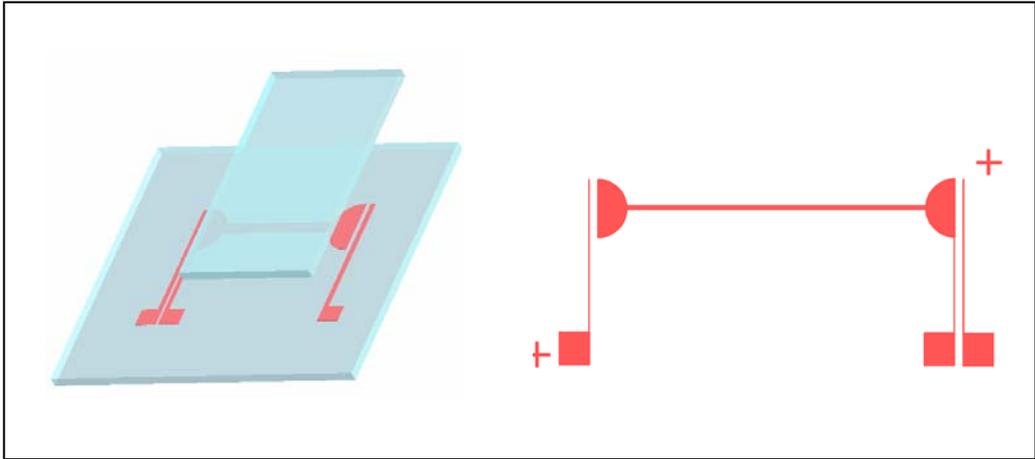


圖 2-14 分段式進樣試片與光罩圖



第三章、製作流程

製程流程上，主要分成上板和下板的製程。上板的電極材質選擇為氧化銦錫玻璃 (indium tin oxide glass, ITO glass)，成本較低，市面上即可買到，且透光性佳，可進行之後的螢光強度量測。下板為主要設計的部分，以金屬覆蓋玻璃當電極材質(金 Au、白金 Pt)或直接以 ITO 玻璃上之導電層當電極。選擇玻璃當作上下板主要的考量為方便觀測流體的流動狀態以及方便之後的螢光測量。在介電層的選擇上以 SU8 和 Parylene 為主，原因為比其他類介電層如：AZ-4620、FH-6400、GM-1040、二氧化矽(Oxide)、氮化矽等在介電強度與附著性表現上較佳。玻璃尺寸則是利用鑽石玻璃切割刀自行切割製作。



3.1 上板製作流程

上板的製作較為簡單，圖(a)，首先將 ITO 玻璃利用鑽石玻璃切割刀切割，尺寸大小根據流道長度而定，再以丙酮和異丙醇各五分鐘清洗兩次後去水烤(120°C，5 分鐘)，圖(b)，再利用 Parylene 沈積系統沈積 Parylene，Parylene 的厚度約為 2 μm，圖(c)，最後利用旋塗的方法將鐵弗龍旋塗在 Parylene 之上，鐵弗龍的厚度約為 55nm(1% Teflon，3000rpm，30 秒)。

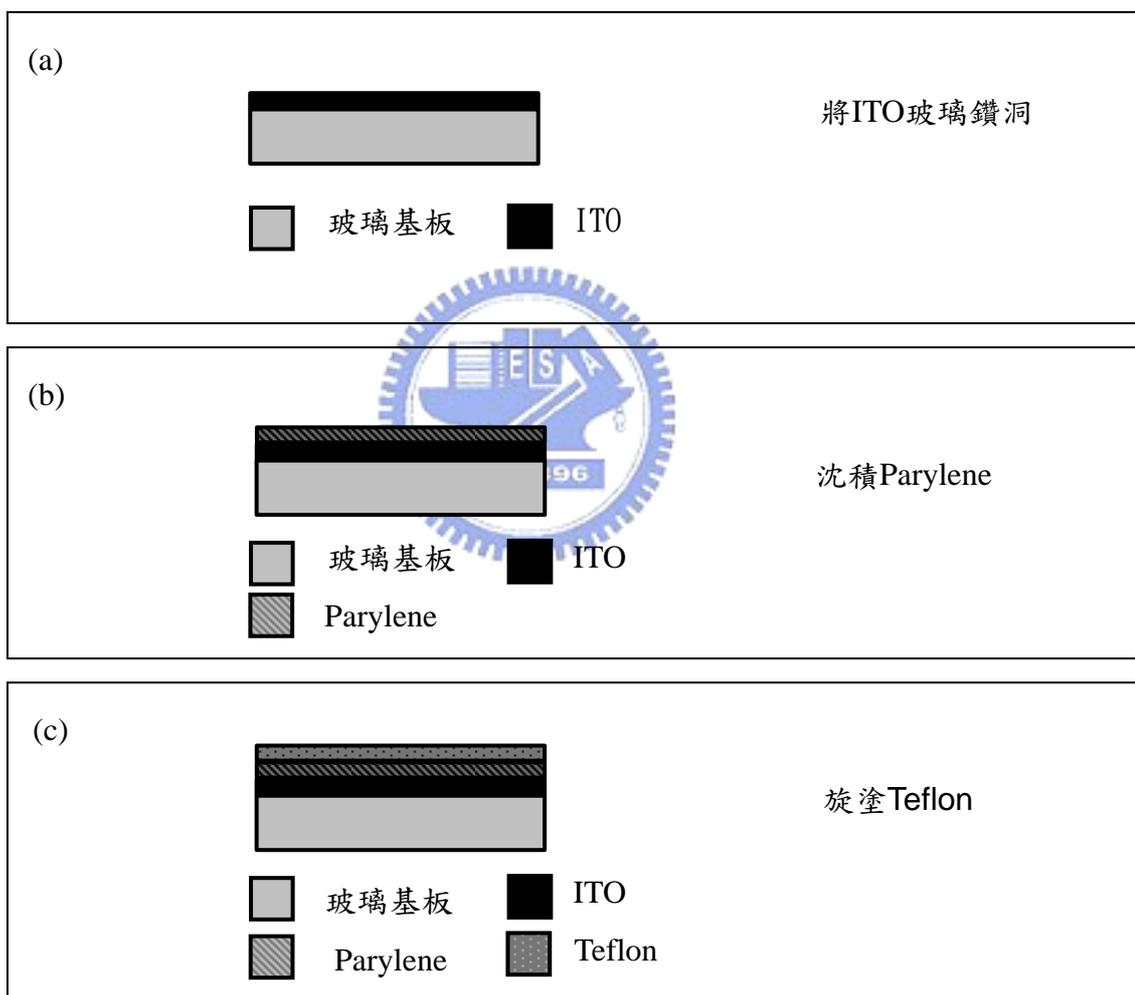


圖 3-1、上板製程

3.2 下板製作流程

3.2.1 下板製程－ITO 電極

ITO 電極下板為具有導電層之 ITO 玻璃，黃光製程方面以 Az-4620 為主要光阻。圖(a)，同上板以丙酮和異丙醇各五分鐘清洗兩次後去水烤(120°C，5 分鐘)。圖(b)，以黃光顯影方法，旋塗上光阻 Az-4620 後(5 μm，3000rpm，30 秒)軟烤 3 分鐘、90°C，曝光 5 秒後顯影(約 2 分鐘)之後再硬烤(120°C，5 分鐘)以加強光阻強度，再以王水(H₂NO₃:HCl:H₂O = 1:3:6)進行電極蝕刻後，以丙酮清除光阻並去水烤，再以真空膠帶貼住 pad，此動作可以省去一道光罩並減少時間的花費。圖(c)，旋塗介電層，選用 SU8 當作下板介電層。圖(d)，旋塗鐵氟龍。使用時再把真空膠帶撕去，以酒精些微清洗 pad。DC 電極開洞部份因需配合不同之介電層材料而有不同之作法，目前尚未試片尚未整合 DC 電極開洞。

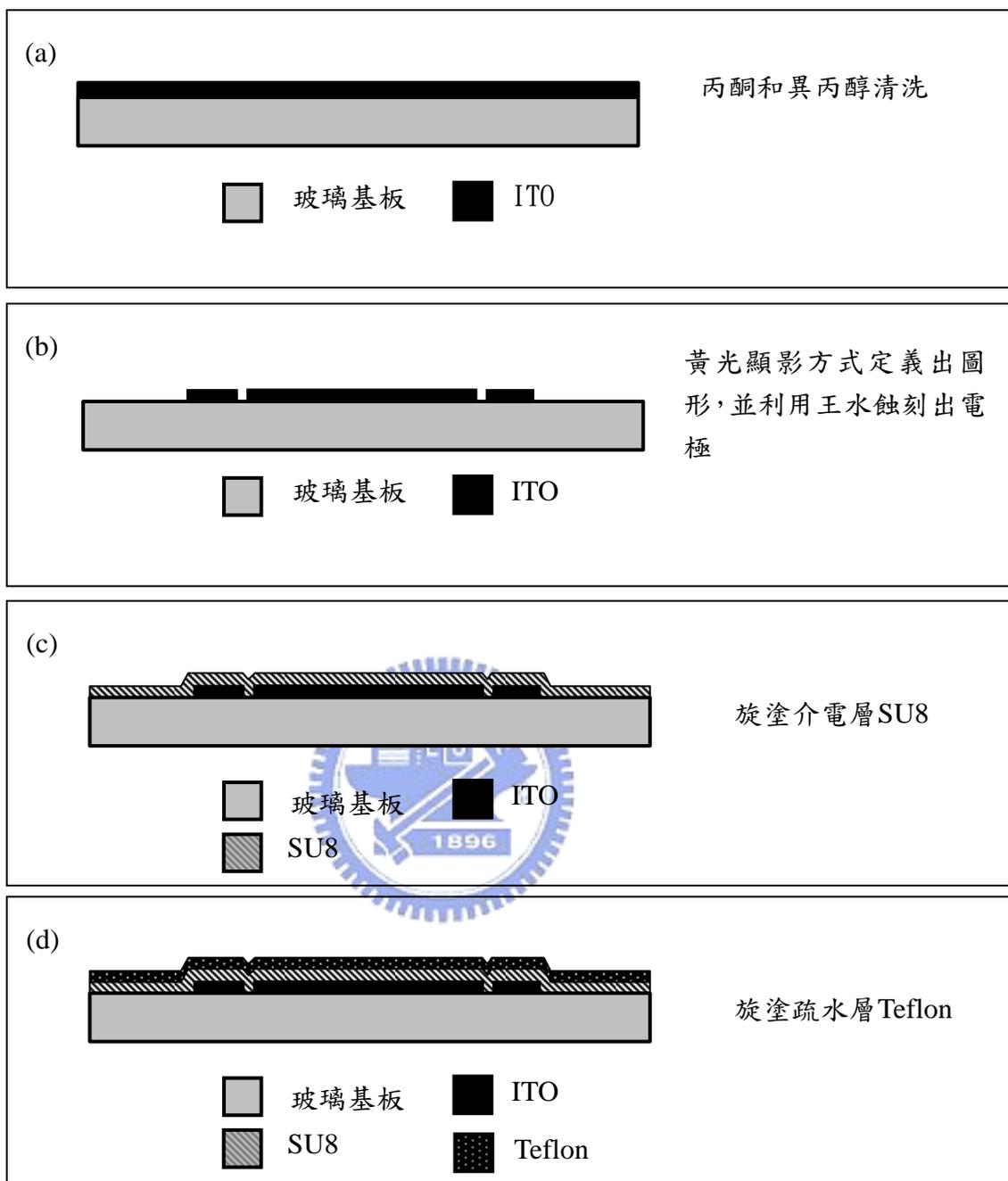


圖 3-2、ITO 下板製程

3.2.2 下板製程－金電極

金電極下板製作流程與 ITO 電極下板大致相同，主要差別為其導電層金(Au)需事先利用 Sputter 機台在玻璃基材上濺鍍，因為金和玻璃的附著(Adhesion)度並不是很好，所以需在金和玻璃之間先濺鍍上鉻(Cr)當作黏著層，接著進行黃光微影製程定義電極形狀，再旋塗介電層和疏水層。

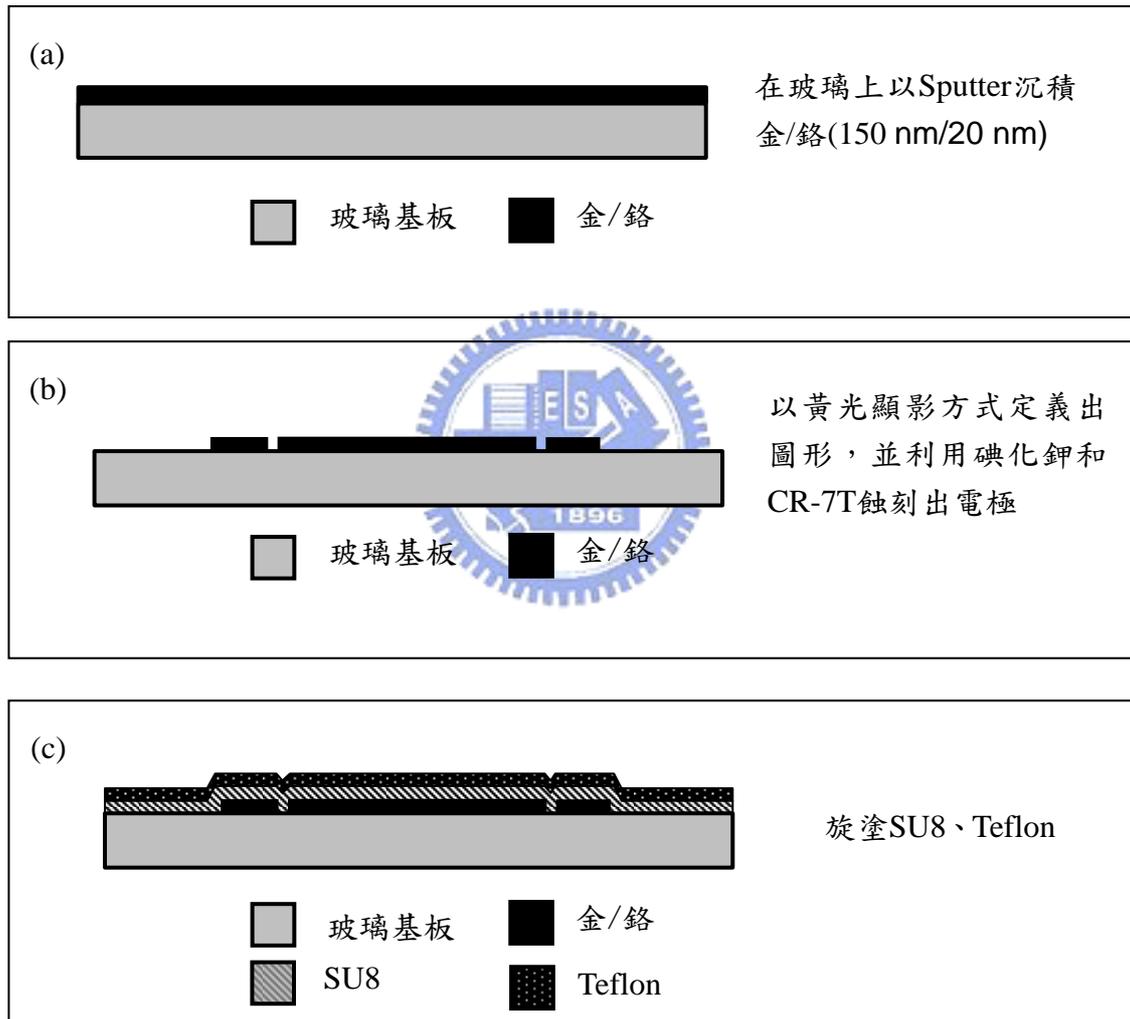


圖 3-3、金下板製程

3.2.1 下板製程－白金電極

白金電極下板製程與上述兩電極最大不同為需使用 Lift-off 製程，在利用 Sputter 濺鍍白金之前，需事先在玻璃基板上利用光阻定義出相反的圖形，再濺鍍上白金(Pt)/鈦(Ti)，鈦當作白金和玻璃之黏著層，之後再以丙酮清除光阻並去水烤，接著即可旋塗介電層與疏水層。

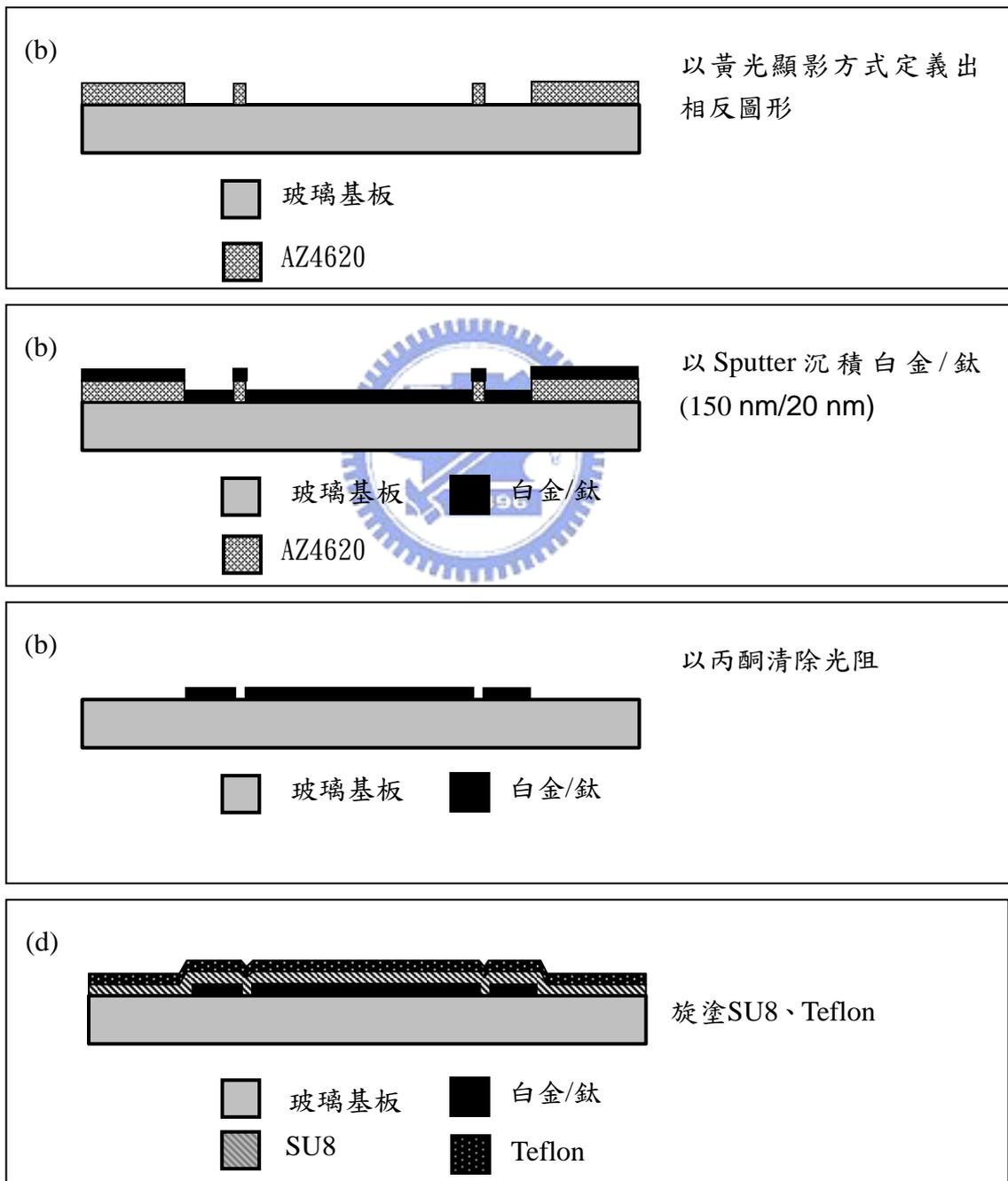


圖 3-4、白金下板製程

第四章、實驗測試與結果

4.1 實驗架設

實驗中利用兩台波形產生器(FG)和放大器(Amp)，分別產生 AC 和 DC 訊號以控制液介電泳開放式流道和毛細管電泳，並以倒立式螢光顯微鏡(TIRFM)連接個人電腦(PC)紀錄和觀察螢光強度，在 DC 迴路部份串接上 DC meter 以觀察電流變化，兩板間以雙面膠或投影片定義上下板間距，DC 電場以探針座架設金探針接觸緩衝液，AC 電場則是以夾具方式連接。

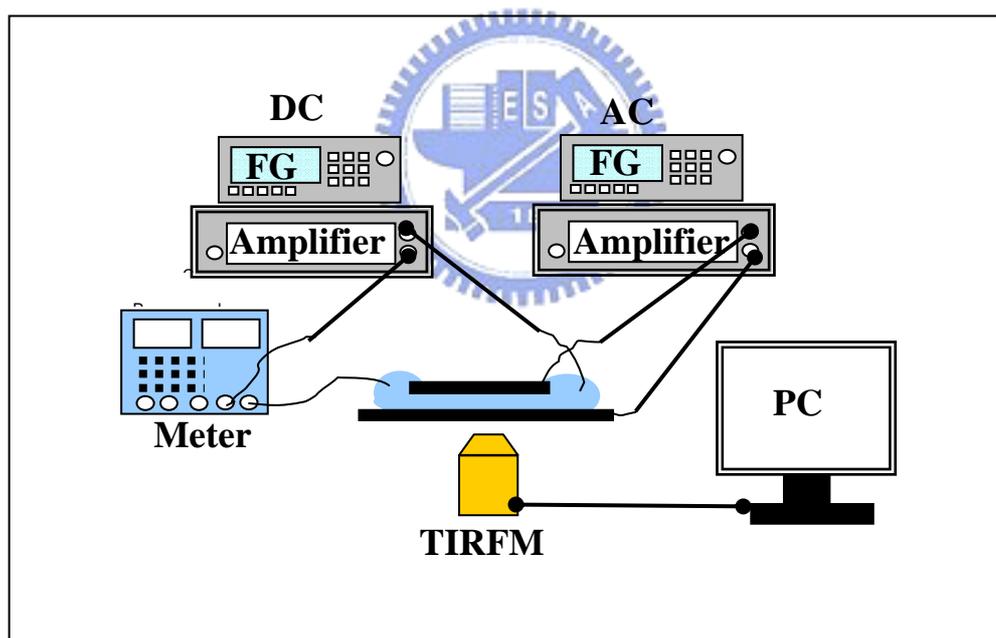


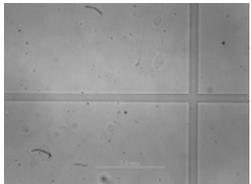
圖 4-1、實驗架設圖

4.2 實驗測試

4.2.1 電極測試

由於毛細管電泳之電極需接觸緩衝液施加直流電場，因此需選擇惰性金屬以降低電解效應，避免過於激烈電解影響電泳分離以及破壞電極金屬，一般毛細管電泳晶片經常使用白金(Pt)或金(Au)，因此實驗中嘗試以 Sputter 濺鍍白金和金兩種不同金屬去作為 DC 電極接觸緩衝液，製程在第三章已有詳加敘述，此方式須去除在 DC 電極上方之介電層才可接觸緩衝液，SU8 介電層可利用第二道黃光微影製程定義開洞區域，然而後續實驗發現此方式 SU8 介電層在經過顯影液等化學藥品浸泡過後，更容易產生介電崩潰等現象，且白金與金電極為不透光之金屬，使得觀測方式只可使用正立式螢光顯微鏡，因此實驗之試片使用 ITO 電極作為液介電泳電極，方便倒立式或正立式螢光顯微鏡觀察，毛細管電泳電極部份則以探針座架設金探針接觸緩衝液。

表 4-1、電極材料比較表

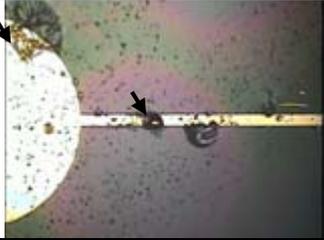
	OM 圖	比較
白金(Pt)		<ul style="list-style-type: none"> ● 電極可直接接觸緩衝液作為 DC 電極 ● 只可使用正立式螢光顯微鏡觀察
金(Au)		
氧化銦錫(ITO)		<ul style="list-style-type: none"> ● 電極不可接觸緩衝液 ● 可使用正立式或倒立式螢光顯微鏡觀察

4.2.2 介電層測試

介電層在液介電泳部份扮演重要的角色，為避免液介電泳之電極因接觸緩衝液而與毛細管電泳電極短路產生電解現象，而影響開放式液體流道之形狀穩定，因此上下兩板皆具有介電層，實驗中發現試片在上板邊界會有電場集中現象，此部份介電層須承受高電場強度，為試片中最容易電解之區域，在嘗試過 AZ-4620、FH-6400、GM-1040、二氧化矽(Oxide)、氮化矽等其他介電層後，以 SU8 和 Parylene 之介電強度、附著性較佳。

然而實驗中發現，上板邊界在製程中因切割容易造成邊界粗糙現象，而 SU8 介電層在旋塗時，邊界會產生 Edge Bead 效應，使得塗佈不均勻，因此上板使用 SU8 介電層容易在邊界產生電解現象。但如果上下板皆使用 Parylene 介電層時，反而因 Parylene 之介電強度較低，而易產生介電崩潰造成電解。最後實驗上板應用 Parylene 沈積使降低邊界部份因覆蓋問題造成電解現象，而下板部份則利用 SU8 作為介電層以加強試片之介電強度。

表 4-2、介電層材料比較表

	測試結果	OM 圖
上板:SU8 下板:SU8	上板邊界覆蓋性差 →容易電解	
上板: Parylene 下板: Parylene	介電強度低 →容易電解	
上板: Parylene 下板:SU8	同時兼顧覆蓋性 以及介電強度問題	

4.2.2 進樣測試

在毛細管電泳分離中，本實驗設計三種方式去達到進樣目的，分別為：十字型進樣、數位元式進樣和分段式進樣。

十字型進樣為一般常見毛細管封閉式流道常使用之進樣方式，利用兩條流道之重疊面積作為進樣量的控制，先驅動進樣流道使樣品注滿整條流道，再驅動分離流道使樣品開始進行毛細管電泳分離，然而十字型進樣流道在此開放式電泳晶片應用時，十字型進樣需控制兩個不同方向之流動，在上板邊界有四個反應電場，造成在此四個區域容易產生嚴重電解現象，使十字流道之形狀難以穩定，製程上在上板部份邊界易有缺陷，使得十字型進樣方式無法穩定進行毛細管電泳分析。



圖 4-2、十字型流道螢光粒子圖

數位元式進樣方式則結合開放式流道電泳晶片優點，可利用電溼潤電極驅動從其他區域運送樣品液滴進入毛細管電泳分離流道，有別於十字行進樣流道，此方式可大幅減少樣品量之浪費，且可結合其他生物反應晶片如數位式 PCR 晶片等，實驗中成功利用電溼潤電極從外部傳輸樣品液滴進

入分離流道，但數位式進樣在進入分離流道時，容易因邊界擴散問題，造成樣品液滴在流道邊界有大面積擴散，使進樣區段變長，進而造成後續毛細管電泳分離以及偵測困難，降低毛細管電泳分離效率。

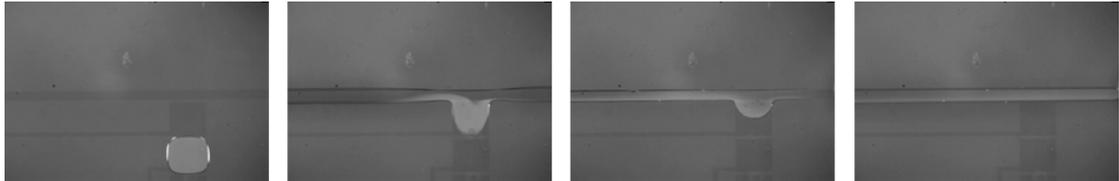


圖 4-3、數位式進樣

在十字型進樣以及數位元式進樣方式遇到困難後，便試圖去解決邊界擴散問題以及使流道簡化，而分段式進樣便可解決這兩項問題，利用液介電泳流道優點，預先在流道上滴入樣品液滴，再先後注入左右兩端之緩衝液，可順利進行毛細管電泳分析，且由於流道簡化後，減少電解現象以及製程缺陷等問題，為目前較穩定之進樣方式，但相對在進樣位置控制方面，因緩衝液進入時間不同而較難精準控制。

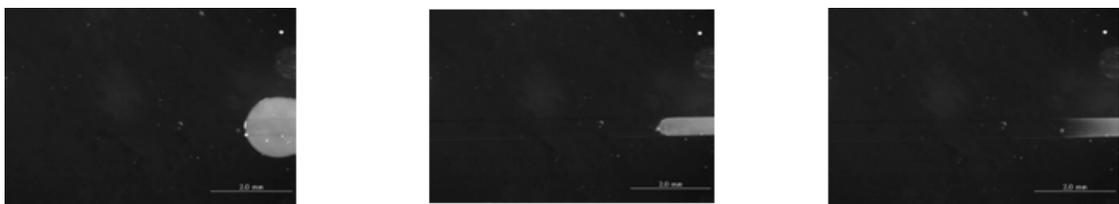
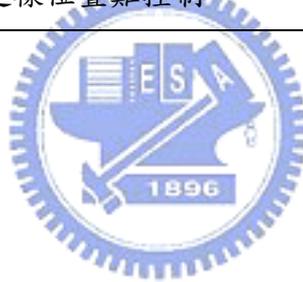


圖 4-4、分段式進樣

表 4-3、進樣方式比較表

	比較
十字型進樣	<ul style="list-style-type: none"> • 上板製程與架設困難 • 需控制兩個方向的流動 <p>→流道形狀不穩定且容易介電崩潰</p>
數位式進樣	<ul style="list-style-type: none"> • 自動化進樣 • 可定量樣品體積 <p>→樣品容易延邊界擴散</p>
分段式進樣	<ul style="list-style-type: none"> • 製程簡單 • 減少擴散 <p>→進樣位置難控制</p>

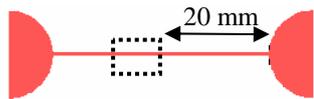


4.3 實驗結果

實驗中目的為驅動和分離待測物，實驗中嘗試去驅動和分離螢光素以及 DNA，並利用倒立式螢光顯微鏡去觀測毛細管電泳之驅動和分離情況，在測試過試片製程、介電層選擇以及進樣方式之可能性後，最後選擇以上板 Parylene 介電層、下板 SU8 介電層、分段式進樣為最佳。

4.3.1 螢光物驅動

表 4-4、螢光物驅動實驗環境

實驗環境	
流道環境	10cSt 矽油
緩衝液	10 mM borate buffer (pH 9) + 5 mM SDS(介面活性劑)
上板材質	ITO 玻璃 + Parylene(2 μm) + Teflon(55 nm)
下板材質	ITO 玻璃 + SU8-2002(1.5 μm) + Teflon(55 nm)
偵測物	異硫氰酸螢光黃(FITC)+螢光素(Fluorescein)
流道尺寸	寬度 500 μm 高度 25 μm 長度 30 mm
進樣方式	分段式進樣
毛細管電泳電場	13.3 V/cm
液介電泳電場	100 kHz ~100 V
拍攝倍率	1.25X
拍攝位置	

實驗環境如上表 4-4，在矽油的環境下，利用液介電泳原理將硼酸緩衝液拉入創造開放式流道，藉由兩端之 DC 電場(13.3 V/cm)去驅動螢光黃分析物，如下圖 4-5，藉由電滲流原理利用兩端之電場梯度，使得分析物得以流動，實驗中發現電滲流方向為由高電位流向低電位，推論流道表面帶有負電荷，使電雙層感應為正電荷，因此緩衝液由高電位流向低電位。

而異硫氰酸螢光黃與螢光素在鹼性緩衝液環境下，個別會帶有不同之負電量，原本希望能順利觀察兩種不同螢光物藉由漂移速率之不同而分離成兩個區段，然而實驗中並沒有明確觀察到此兩種螢光之分離，推斷原因為漂移速率在此環境下差異不夠大，可能原因為 DC 電場梯度不夠大、分離流道距離過短、兩物質之質荷比接近，因此只觀測到電滲流之流動。



圖 4-5、螢光物驅動情形

4.3.2 DNA 偵測

表 4-5、DNA 實驗環境

實驗環境	
流道環境	10cSt 矽油
緩衝液	1x TBE buffer (pH 8.3)
上板材質	ITO 玻璃 + Parylene(2 μm) + Teflon(55 nm)
下板材質	ITO 玻璃 + SU8-2002(1.5 μm) + Teflon(55 nm)
偵測物	DNA (3 kb+ 5kb+ 8kb) (kb：千鹼基對)
流道尺寸	寬度 500 μm 高度 100 μm 長度 30 mm
進樣方式	分段式進樣
毛細管電泳電場	26.6 V/cm
拍攝倍率	1.25X ; 40X
拍攝位置	

在測試螢光素之驅動分離後，可利用電滲流順利驅動樣品，然而卻沒有分離成功，因此開始嘗試分離不同片段長度之 DNA，由於雙股 DNA 本身並沒有螢光可以觀察，因此事先在 DNA 試劑中混和核酸染劑(Nucleic Acid Stain)，使 DNA 帶有螢光染劑，進而進行螢光激發觀察，上表 4-5 為 DNA 分離之實驗環境，緩衝液為常用之 DNA 毛細管電泳緩衝液 5X TBE(0.45M Tris base、0.45M Boric acid、10mM Na₂EDTA，pH8.3 @25°C。)稀釋成 1X TBE，同樣利用液介電泳原理創造開放式液體流道後，以分段式

進樣方式進行毛細管電泳分離，在離進樣位置約 10 mm 處，利用倒立式螢光顯微鏡以 1.25 倍率觀察，如下圖 4-6，由於 DNA 螢光強度在此環境下，因為擴散以及環境影響使得螢光訊號微弱不易觀察，為此利用 NI Vision 程式分析其螢光強度分佈圖，如下圖 4-7，在同一條分佈曲線下隨時間變化，由螢光強度分佈圖中可觀測到 DNA 由高電位流向低電位，與螢光素之電滲流方向相同。

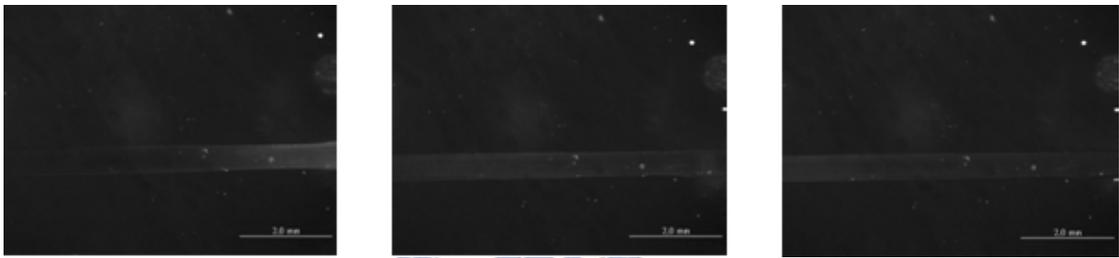


圖 4-6、DNA 分離情形

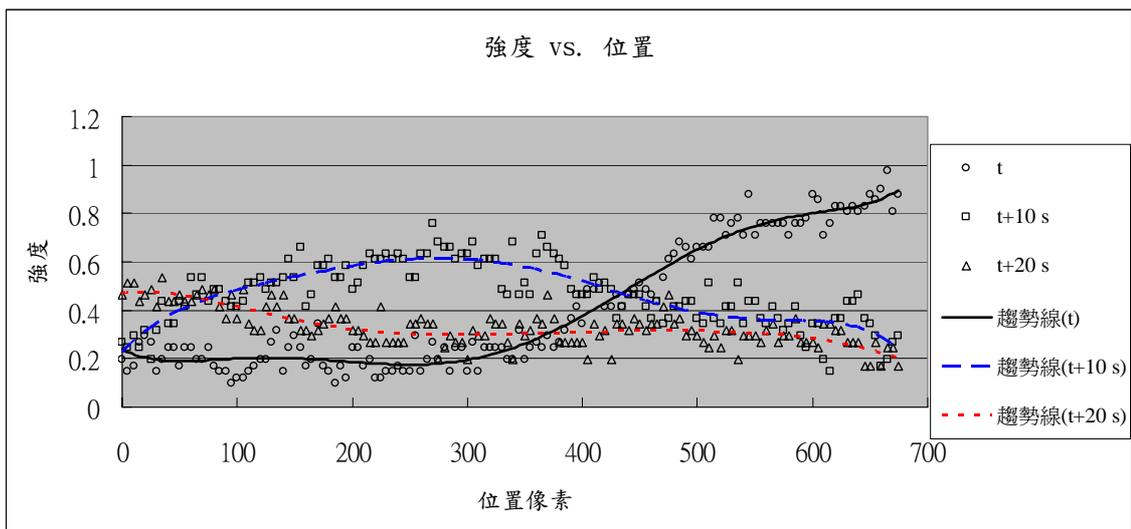


圖 4-7、螢光強度對位置變化圖

由於 DNA 之螢光訊號微弱不易觀察變化，因此使用更高倍率之鏡頭 (40X) 在分離距離約 20mm 位置處，拍攝流道內之螢光強度隨時間變化圖，並設計 NI Vision LabVIEW 程式針對螢幕畫面取平均螢光強度後，對 DNA 分析物流動過程之螢光強度與時間作圖，如下圖 4-8，由圖中可觀察出螢光強度變化有三個不同區域，其應為三個不同 DNA 片段長度之流動情形，然而因分離效應與距離不夠，只能觀測出初步分離之情形。

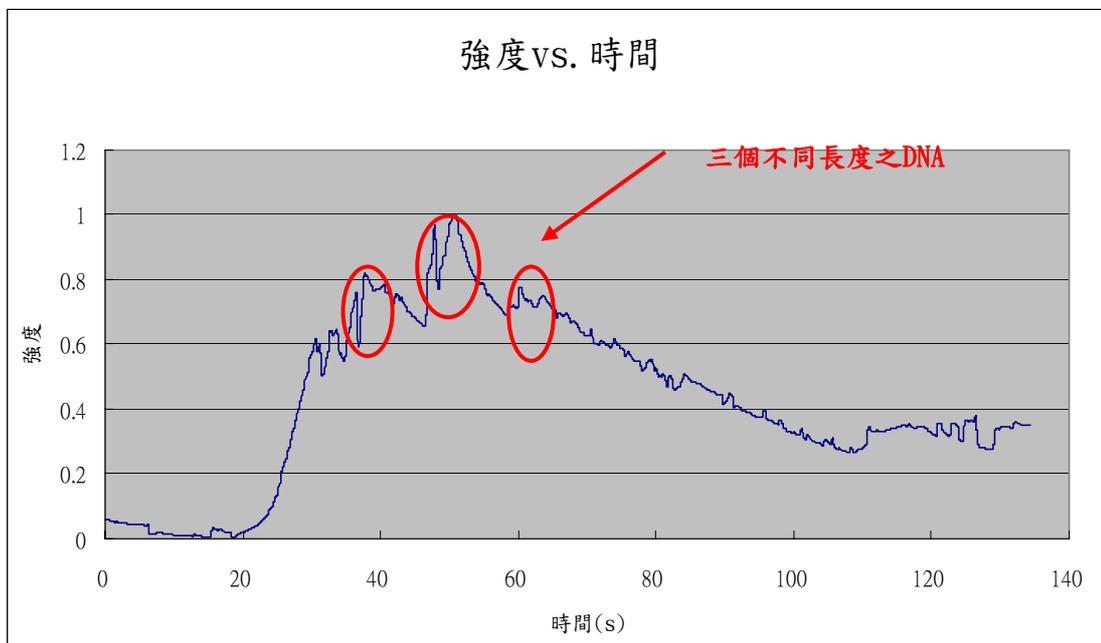


圖 4-8、同一位置下，DNA 螢光強度對時間變化圖

第五章、結論與建議

5.1 結論

5.1 開放式流道晶片

在 Lab-on-a-chip 技術下，利用液介電泳電極在上下兩板間創造開放式液體流道，在此開放式流道環境下，並利用 DC 電場造成電滲流順利驅動螢光物或 DNA 等待測物，結合倒立式螢光顯微鏡觀察到螢光物質流動情形。

實驗中發現在上下板邊界處，容易產生電解現象，原因為 DC 電極與上下板液介電泳電極距離近，在不同電位情況下，邊界為電場集中區域，經由 ANSYS 軟體電場模擬後同樣發現此為電場最高區域。



圖 5-1、ANSYS 電場模擬圖

5.2 DNA 分離與偵測

藉由分段式進樣方式，在開放式流道電泳晶片基礎上，毛細管電場梯度 26.6 V/cm 、液介電泳電場 $100 \text{ kHz } 100 \text{ V}$ 情況下，初步將三種不同片段長度之 DNA 分離並偵測。

5.2 建議與未來工作

實驗平台可改進方向為：1、改善製程：改善介電層強度：改變邊界設計、更換介電層材料。2、改善分離效益：測試分離距離、DC 電場、緩衝液 pH 值、進樣量等參數最佳化。3、改善偵測方式：結合雷射誘發螢光偵測方式。4、電滲流表面分析：分析 LDEP 電場對 EOF 之影響。

改善製程為穩定試片品質以減少電解現象，避免因介電層之品質差異造成試片重現性低，可以尋找介電崩潰強度以及覆蓋緻密性更佳之介電層材料更換，也可利用不同之邊界電極設計，以期降低電場集中之現象。

實驗中之分離效應可測試不同之參數如：測試分離距離、DC 電場、緩衝液 pH 值、進樣量等，達到分離效應最佳化，配合電滲流表面分析研究，以期利用不同之液介電泳電場影響電滲流大小進而改善分離效應，減少流道長度即可達到電泳分析效應。

實驗中因 DNA 之螢光訊號微弱不易觀察，可結合如雷射誘導螢光等不同偵測方式，使其偵測效果更佳，如能改善數位式進樣方式之擴散問題，配合其他數位流體晶片，未來可將其整合為一數位流體晶片，使其成為整合型全生物檢測測晶片。

參考文獻

1. A. Tiselius, "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures," *Soc.*, Vol. 33, pp. 524-531 (1937).
2. F. E. P. Mikkers, F. M. Eveeraers and T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, Vol. 169, pp. 11-20 (1979).
3. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, "Capillary zone Electrophoresis," *Science*, Vol. 222, pp. 266-272 (1983).
4. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando, "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries," *Anal. Chem.*, Vol. 56, pp. 111-113 (1984).
5. A. S. Cohen and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, Vol. 397, pp. 409-417 (1987).
6. Y. Yan, R. Dadoo, R. N. Zare, D. J. Rakestraw, D. S. Anex, *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp. 2726-2730 (1996).
7. A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, *Sens. Actuators*, B1(1990) 244-248
8. A. T. Woolley, R. A. Mathies, "Ultra-High-Speed DNA Sequencing Using Capillary Array Electrophoresis Chips," *Natl. Acad. Sci.* (1994)
9. A. Paulus, S. J. Williams, A. P. Sassi, P. Kao, H. Tan, "Integrated Capillary Electrophoresis using Glass and Plastic Chips for Multiplexed DNA Analysis," *Microfluidic Devices and Systems* (1998)
10. J. R. Webster et al, "MONOLITHIC CAPILLARY ELECTROPHORESIS DEVICE WITH INTEGRATED FLUORESCENCE DETECTOR," *American Chemical Society* (2000)
11. J. W. Hong et al, "Microfabricated Polymer Chip for Capillary Gel Electrophoresis," *Biotechnol. Prog.* (2001)
12. H. A. Pohl, "The motion and precipitation of suspensions in divergent electric fields," *Journal of Applied Physics*, vol. 22, pp. 869, (1951)
13. T. B. Jones, "Liquid dielectrophoresis on the microscale," *Journal of Electrostatics* 51-52 (2001) 290-299
14. S. K. Fan et al, "Integrated Digital and Analog Microfluidics by EWOD and LDEP," *IEEE* (2006) 1414-1417