

國立交通大學

材料科學與工程學系

奈米科技碩士班

碩 士 論 文



微電極陣列於心肌細胞動作電位量測研究

**Extraction of cardiac action potential with
microelectrode array**

研究生：吳珮琳 (Pei-Lin Wu)

指導教授：許鈺宗 教授 (Prof. Jeng-Tzong Sheu)

中華民國一百零一年十一月

微電極陣列於心肌細胞動作電位量測研究

**Extraction of cardiac action potential with
microelectrode array**

研究生：吳珮琳

Student：Pei-Lin Wu

指導教授：許鈺宗 教授

Advisor：Prof. Jeng-Tzong Sheu

國立交通大學

材料科學與工程學系

奈米科技碩士班

碩士論文

A thesis

Submitted to Graduate Program for Nanotechnology
Department of Materials Science and Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master

in Nanotechnology

October, 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 101 年 11 月

微電極陣列於心肌細胞動作電位量測研究

研究生：吳珮琳

指導教授：許鈺宗 教授

國立交通大學

材料科學與工程學系奈米科技碩士班

中文摘要

本篇論文的主要研究目的是在建立一生物電訊號的量測平台，藉以瞭解生物訊息是如何傳遞的。然而記錄生物電生理訊號的方式有很多，在本篇論文中是採用微電極陣列（microelectrode array, MEA）來獲取細胞的電生理訊號。利用微電極陣列量測細胞電生理訊號之前，可透過電阻抗量測來了解微電極之阻抗特性或細胞貼附與否。因為量測到的細胞電生理訊號強度會受到細胞貼附的程度所影響，故對電極表面進行修飾使細胞更容易貼附於電極上是必要的。由於細胞的電生理訊號很小，易被雜訊所覆蓋，因此需要將所得之訊號經過適當的濾波放大處理，使訊號更加清晰。故本篇論文使用鎖相放大器對訊號進行處理，並藉由 NI-DAQ 將訊號擷取且數位化後儲存至電腦。由於心肌細胞所造成的電生理訊號比神經細胞大，因此在初期建立生物電訊號的量測平台時，以心肌細胞來進行實驗室比較可行的。基於上述的介紹，本篇論文成功利用直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形微電極，記錄到心肌細胞的電生理訊號；而當添加腎上腺素（epinephrine）至心肌細胞時，利用此量測系統可觀察到心肌細胞跳動強度與頻率之變化。

Extraction of cardiac action potential with microelectrode array

Student : Pei-Lin Wu

Advisor : Prof. Jeng-Tzong Sheu

Institute of Nanotechnology, Department of Materials Science and Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

The objective in this research is to set up a measurement platform which could record the electric signal called action potential from living cells. Then we can understand the communication of cells. However, there are many kinds of method to record the action potential. In this research, we use the microelectrode array (MEA) to capture the electrophysiological signals. Comparison to the traditional patch-clamp technique, it is non-invasive for cell. On the other hand, the microelectrode array could be used to impedance measurement. By the result of the impedance measurement, we know the characteristics of electrodes and the adhesion of cells. Because the electrophysiological signal is weak, the signal processing is by the lock-in amplifier then acquisition through NI-DAQ. Base on the above strategy, we demonstrate the recording of the electrophysiological signals by circular electrode which diameter is 20, 40, 60, 80, and 100 μ m. Otherwise, the increase of contraction rate was measurement by our measurement system after the treatment of epinephrine.

誌謝

兩年的研究生活即將步入尾聲，在漫長的人生道路上又樹立了一個新的里程碑，回顧一路走來的歷程，除了知識的累積，對於生活體驗和人生態度也增添了不少見解。

首先衷心地感謝指導教授許鈺宗老師，願意提供一個機會，讓我得以在一個良好的實驗環境下，進行研究；此外，也感謝老師兩年多來在研究方面的指導與邏輯思考的訓練。感謝口試委員潘扶民教授、林鶴南教授以及廖奕翰教授所給予的指教與見解；並感謝應化系廖奕翰教授提供生物實驗技術，感謝逸群學長一路上提供精闢的建議與看法以及大衛學長在實驗方面的教導與協助。感謝生科系文鴻學長對於細胞培養的經驗傳授。

還記得剛進實驗室的時候，對於儀器使用和設備操作都不熟悉，很多地方都需要仰賴學長們的指教與幫助。在此感謝振嘉學長提供寶貴的實驗經驗與面對挫折的處理態度，感謝皓恆學長總是願意放下手邊的事情，幫助我們解決問題，實驗室的大小事情，他都熱心協助；感謝志偉學長耐心地提供實驗上的協助以及見解、感謝儒政學長在實驗方面的幫忙，感謝柏鈞學長、東育學長、振翔學長、Kathy 以及畢業的學長姐：俊良學長、于聖學長、承樺學長、新怡學姐和子瑄學姐的勉勵，感謝一起奮鬥兩年的夥伴們：宜澤、崇陞、宗翰和華安，不論課業、研究或是生活，我們都能互相砥礪與分享，感謝學弟妹們：筱淋、婉琪、嘉哲、佩瑜、舒鈺、仲廷、毓烜的幫忙；很幸運能夠加入這個氣氛融洽的大家庭，在研究之餘還有大夥兒能一起運動舒壓，偶而一次的實驗室出遊也都留下許多美好的回憶。

最後感謝我的家人與朋友，感謝我的父母一直以來所付出的關心與支持，感謝我的朋友們，總是願意聽我訴說。感謝你們的用心關懷，讓我能夠完成學業，順利邁入下一個人生階段。

目錄

中文摘要	I
Abstract.....	II
誌謝	III
表目錄	VII
圖目錄	VIII
第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 生物感測器簡介.....	1
1.1.2 心臟組織簡介[3].....	2
1.2 細胞電特性[3]	5
1.2.1 膜電位的基本物理特性.....	6
1.2.2 神經之靜止膜電位.....	9
1.2.3 神經細胞之動作電位.....	11
1.2.4 心肌細胞之動作電位.....	15
1.3 文獻回顧	17
1.4 研究動機及目標	5
1.5 論文架構	6
第二章 微電極陣列系統	7
2.1 微電極與溶液間的介面現象	7
2.2 微電極陣列之設計與製作	10
2.2.1 微電極之設計.....	10
2.2.2 微電極製作	12
2.2.3 成長樹枝狀結構.....	15

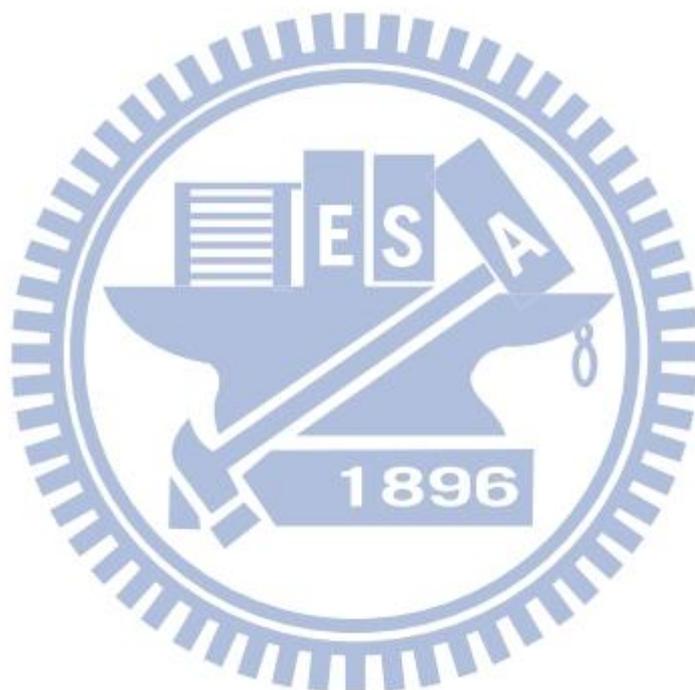
2.3 微電極陣列系統架設與前處理	18
2.3.1 微電極陣列系統架設.....	18
2.3.2 微電極陣列系統之前處理.....	19
第三章 訊號處理	20
3.1 訊號處理簡介	20
3.2 lock-in amplifier 量測原理	23
第四章 細胞培養	26
4.1 材料的生物相容性	26
4.2 細胞貼附對量測的影響	27
4.3 修飾 laminin 於金電極表面	28
4.4 心肌細胞培養	30
4.5 細胞對電極之貼附性	32
第五章 實驗結果與討論	35
5.1 電極阻抗量測	35
5.1.1 降低電極阻抗之因素.....	35
5.1.2 實驗結果與討論.....	36
5.2 細胞電生理訊號量測	45
5.2.1 訊號量測與分析.....	45
5.2.2 腎上腺素對心肌細胞跳動的影響.....	55
5.2.3 以微電極陣列量測 HeLa 電生理訊號.....	57
5.2.4 量測波形之探討.....	60
5.3 表面平坦之金電極其訊號量測結果	64
第六章 總結與未來展望	68
6.1 總結	68

6.2 未來展望	68
參考文獻	69



表目錄

表 1.2.1、鈉離子和鉀離子在細胞膜內外的濃度分布	8
表 2.2.1、微影製程參數	14
表 5.1.1、在頻率為 15 kHz 時，各個電極之電阻抗變化	39
表 5.1.2、阻抗擬合參數	43
表 5.2.1、訊號處理流程圖	48
表 5.2.1、各項擬合參數	55



圖目錄

圖 1.1.1、生物感測器的基本架構	2
圖 1.1.2、心臟血液循環示意圖 圖 1.1.3、心臟電位傳遞示意圖	3
圖 1.1.4、心臟各部位之電位變化	4
圖 1.1.5、心肌纖維排列示意圖	5
圖 1.2.1、擴散造成細胞膜內外的電位差異	7
圖 1.2.2、鈉鉀幫浦作用示意圖	9
圖 1.2.3、神經纖維之靜止膜電位組成	11
圖 1.2.4、神經細胞之動作電位	12
圖 1.2.5、對電壓敏感之鈉通道在不同時期的狀況	13
圖 1.2.6、對電壓敏感鉀鈉通道在不同時期的狀況	14
圖 1.2.7、神經纖維之動作電位傳遞	15
圖 1.2.8、心肌細胞之動作電位	16
圖 1.2.9、seal resistance 與動作電位之關係[4].....	17
圖 1.2.10、細胞跨膜電位與膜外電位之關係[5]	17
圖 1.3.1、膜片箝制技術示意圖	2
圖 1.3.2、微電極陣列示意圖	3
圖 1.3.3、量測儀器架設圖	5
圖 2.1.1、電雙層形成之示意圖	7
圖 2.1.2、金屬與溶液間之界面的等校電路示意圖	8
圖 2.2.1、三明治之微電極陣列結構	10
圖 2.2.2、微電極陣列製作流程	13
圖 2.2.3、微電極結構示意圖-電極間距約為 150 μm	13
圖 2.2.4、樹枝狀金成長示意圖[26]	15
圖 2.2.5、利用電化學方式成長樹枝狀金示意圖	16

圖 2.2.6、成長樹枝狀結構前後之微電極表面形貌	17
圖 2.2.7、金之樹枝狀結構 SEM 圖	18
圖 2.3.1、微電極陣列系統架設之示意圖	18
圖 3.1.1、一般訊號處理之流程圖	20
圖 3.1.2、訊號處理之流程示意圖	21
圖 3.1.3、LabVIEW 模擬心肌細胞跨膜電位之輸出波形	21
圖 3.1.4、LabVIEW 撰寫心肌細胞跨膜電位之程式碼	22
圖 3.1.5、 V_L 越大，輸出訊號越清晰.....	23
圖 3.2.1、鎖相放大器的參考頻率與待測訊號頻率之相位關係圖	24
圖 4.2.1、細胞貼附於基板上之示意圖	27
圖 4.3.1、修飾硫醇分子前後之電流變化	29
圖 4.3.2、修飾 laminin 前後之細胞貼附面積的變化 (***: $P < 0.001$)	30
圖 4.4.1、心肌細胞萃取流程圖	31
圖 4.5.1、細胞貼附於電極表面形成阻抗之示意圖	32
圖 4.5.2、不同直徑之工作電極其正規化之阻抗值-頻率圖	33
圖 4.5.3、細胞貼附於電極表面之 SEM 圖	34
圖 5.1.1、電極阻抗之實部與雜訊的關係圖	35
圖 5.1.2、電極與放大器間之阻抗匹配示意圖[39]	36
圖 5.1.3、電極阻抗與頻率之關係圖	38
圖 5.1.4、以複數平面表示阻抗與相位角之關係	40
圖 5.1.5、各個電極之電容量測結果	42
圖 5.1.6、等校電路示意圖	42
圖 5.1.7、阻抗擬合結果	45
圖 5.2.1、量測平台示意圖	46
圖 5.2.2、LabVIEW 程式碼	46
圖 5.2.3、有細胞貼附與無細胞貼附之電性量測結果	47

圖 5.2.4、依照表 5.2.1 的流程對沒有細胞貼附之電性量測結果進行訊號處理	49
圖 5.2.5、以不同電極尺寸量測心肌細胞膜外電位之結果	51
圖 5.2.6、以不同電極尺寸的量測結果進行快速傅立葉轉換之結果	53
圖 5.2.7、不同電極尺寸所量測到的訊號大小	54
圖 5.2.8、心肌細胞添加腎上腺素前後的電性變化	56
圖 5.2.9、心肌細胞添加腎上腺素前後的電性變化之快速傅立葉轉換結果	57
圖 5.2.10、HeLa 貼附於微電極陣列之情形	58
圖 5.2.11、HeLa 添加腎上腺素前後的電性變化	59
圖 5.2.12、HeLa 添加腎上腺素前後的電性變化之快速傅立葉轉換結果	60
圖 5.2.13、實際量測時，電訊號流動的路徑圖	61
圖 5.2.14、利用直徑 60 μm 的圓形電極，實際量測所得的波形	61
圖 5.2.15、利用 LabVIEW 軟體模擬出的心肌細胞跨膜電位	62
圖 5.2.16、心肌細胞的細胞核螢光染色圖形	63
圖 5.2.17、細胞數目固定為 800 個，延遲時間為 0.3 ms 的模擬結果	63
圖 5.3.1、表面平坦之金電極在不同電極尺寸下的量測結果	65
圖 5.3.2、表面平坦之金電極在不同電極尺寸下的量測訊號進行快速傅立葉轉換後之結果	67

第一章 緒論

1.1 研究背景

1.1.1 生物感測器簡介

根據國際純粹與應用化學聯合會 (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 的定義- "A chemical sensor is a device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytically useful signal." [1], 化學感測器 (chemical sensors) 是一種微小化的訊號轉換器 (transducer), 能夠將化學訊息轉換成易量測的電子訊號; 將同樣地概念延伸至生物醫學的領域, 即構成所謂的生物感測器 (biosensor), 是一種能夠將生物訊息轉換成電子訊號的裝置, 基本架構如圖1.1.1; 在生物體上原本就存在特定的受體 (acceptor), 用來接收特定的生物分子, 也就是圖中的檢測物; 當生物受體與檢測物結合, 有可能產生離子、電子、熱或氣體等各式各樣的感應產物, 利用轉換器可將這些感應產物轉換成電子訊號, 並經過適當的訊號處理之後, 即可從生物體上得到想要的訊息。而根據轉換器的不同, 可將生物感測器分為: 電化學生物感測器 (Electrochemical Biosensor)、半導體離子感測器 (Ion Sensitive Field Effect Transistor, ISFET)、光纖生物感測器 (Fiber-optic biosensor) 和壓電晶體生物感測器 (Piezoelectric quartz crystal biosensor) 等。由於生物感測器涉及的研究範圍非常廣泛, 幾乎包含了所有生命活動在分子、細胞和系統各層次的物理、化學和生物資訊感測, 從感測進行的條件上, 又可分為體內 (in vivo) 感測和體外 (in vitro) 感測, 前者的即時性和動態性好, 而後者的測量條件穩定、易於控制; 另外, 根據創傷的程度還可分為侵入式 (invasive) 和非侵入式 (noninvasive) 感測。

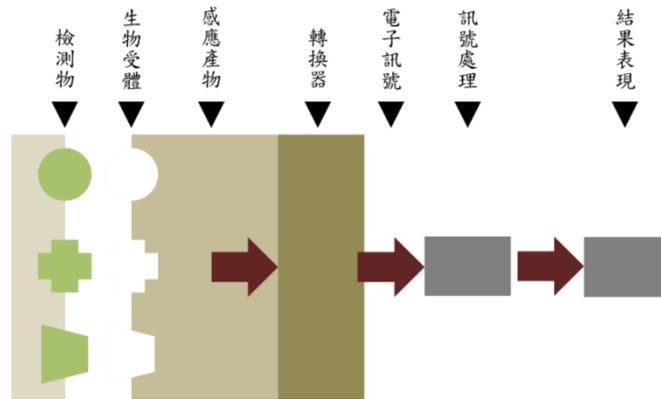


圖 1.1.1、生物感測器的基本架構

在眾多分類的生物感測器當中，細胞生物感測器 (cell-based biosensor) 是其中一項長期受到重視的議題[2]，它能夠直接從細胞接收並轉換生物訊息為電子訊號；因此可將細胞生物感測器作為生物體和電子量測儀器之間的介面 (archetypal interface)；除此之外，因為細胞生物感測器的靈敏度高，選擇性極優且反應快速，像是生物醫藥 (biomedicine)、環境監測 (environmental monitoring) 和藥物篩檢 (pharmaceutical screening) 等，都可見其應用；目前因應生物培養技術、微機電工程和基因工程的蓬勃發展，細胞生物檢測器的應用層面有了更進一步的拓展。

在本篇論文中，是結合生物與半導體製程技術，製作出微電極陣列 (microelectrode array, MEA) 當作細胞生物感測器，在細胞與電性量測儀器之間提供適當的介面，將細胞產生的訊息轉換成電子訊號，並經過適當的訊號處理過程後，利用量測儀器紀錄生物細胞的電生理訊號。

1.1.2 心臟組織簡介[3]

心臟是提供人類生命所需能量的重要器官，是一個由心肌細胞 (cardiac muscle cell) 所組成的強而有力的幫浦，內部是中空的腔室，分為心房 (atrium) 和心室 (ventricle)。圖 1.1.2 描述的是心臟血液循環路徑；當心臟舒張的時候，靜脈中的血液流進心房，心

房收縮，血液流入心室，心室收縮，推動血液進入動脈。而心臟的收縮與舒張是自發性的，不需要經由神經來刺激，這是因為心臟有特殊的機制來維持節律性，並將動作電位傳遞給心肌，使得心臟得以規則地收縮，圖 1.1.3 所示即為心臟傳遞動作電位的示意圖；心臟中的竇房結(SA node)，又稱為心臟的節律點，是主要引發及控制心臟跳動的構造，位於右心房上壁靠近上腔靜脈開口處的一組特化神經肌肉纖維組織，能像神經元一樣產生電性衝動；當竇房結開始去極化，電性衝動會經由心肌傳遞至房室結(AV node)，在傳遞過程中，心房的心肌細胞去極化，使得心房收縮，並將血液送進心室。一般而言，心房與心室之間的電訊號約差 0.1 秒的時間，目的是為了確保心房收縮會在心室收縮之前完成。當心房收縮完成，再藉由心臟舒張將血液自靜脈吸入，同時心室的心肌細胞去極化，導致心室收縮，血液流進動脈，完成一次循環。

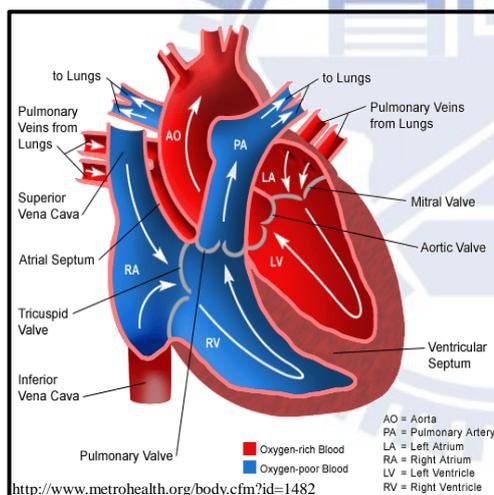


圖 1.1.2、心臟血液循環示意圖

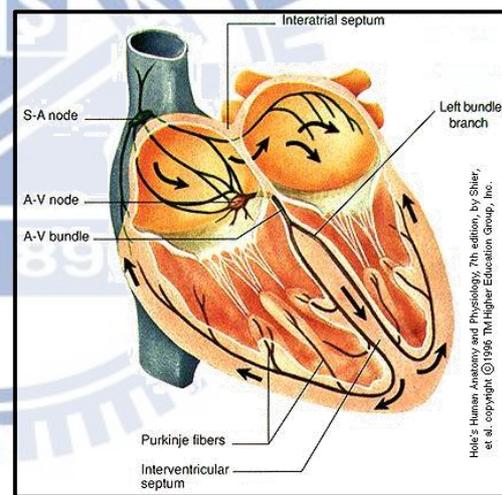


圖 1.1.3、心臟電位傳遞示意圖

因為心臟的電性衝動傳遞和心臟的血液循環系統有如此密不可分的關係，因此藉由量測心臟的電位變化，可了解心臟的功能與狀態。圖 1.1.4 為心臟各部位的電位變化，一般所熟知的心電圖即是由這些電位變化共同組成。

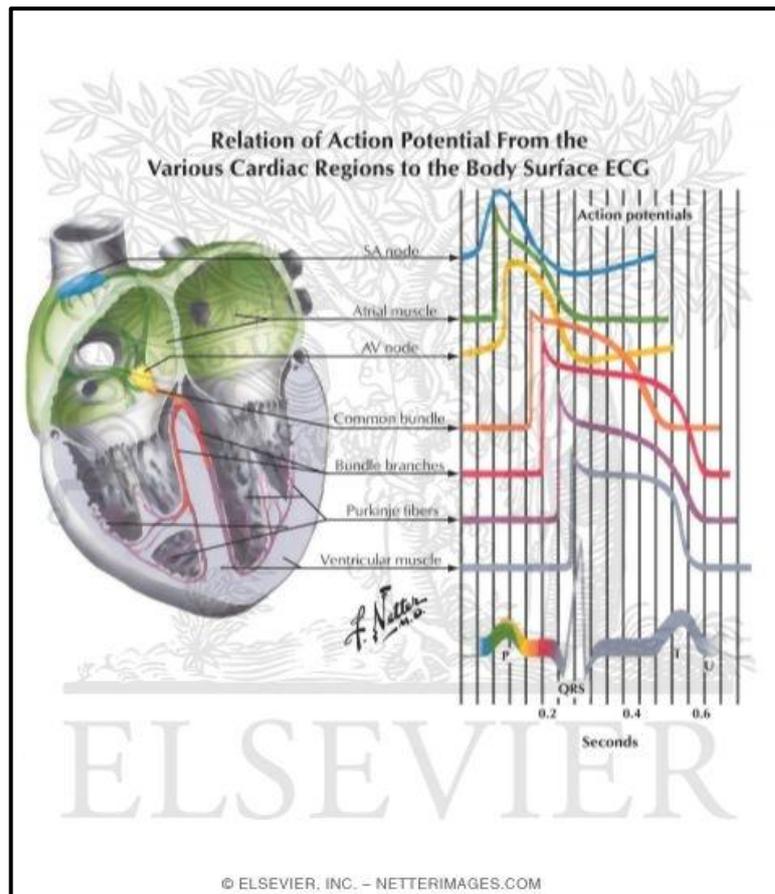


圖 1.1.4、心臟各部位之電位變化

■ 心肌細胞簡介

心臟由三種主要的心肌構成：心房肌、心室肌及特化的興奮與傳導纖維。心房肌和心室肌的收縮方式和骨骼肌很像，但收縮時間較長；而因為特化的興奮及傳導纖維其所含的收縮纖維較少，故與骨骼肌相比收縮力較差，但在心臟的興奮系統與傳遞系統中，能迅速地傳導興奮的訊號。

由圖 1.1.5 可看出心肌纖維的排列呈現網狀的纖維分叉，然後再接合，最後又分叉。和骨骼肌一樣心肌也具有橫紋，橫跨心肌纖維的暗色地稱為肌間盤 (intercalated disk)，是分隔細胞間的細胞膜；也就是說，心肌纖維是由許多心肌細胞彼此依序相連而成。而和一般細胞不同的是心肌細胞的細胞膜彼此融合，形成一個非常容易擴散離子的高滲透接合處，稱為 gap junction。因此通過肌間盤的電阻只有心肌纖維外膜電阻的四分之一；

就功能的觀點來看，因為離子容易沿著心肌纖維的軸向運動，所以動作電位在穿越肌間盤至另一個心肌細胞的阻力很小，因此只要其中一個細胞受到興奮，動作電位就會散布至所有細胞，由一個傳到另一個，最終將散佈於整個網狀聯結。

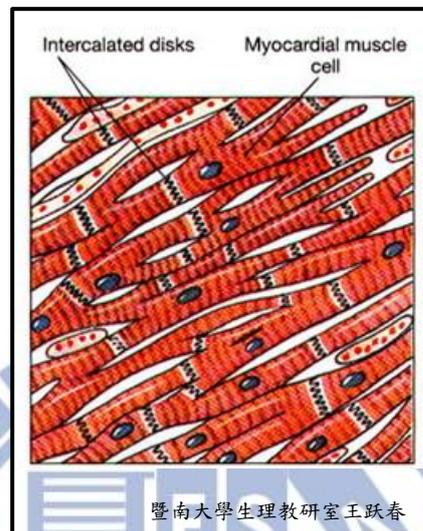


圖 1.1.5、心肌纖維排列示意圖

在本篇論文中，是選用雞胚胎的心肌細胞進行實驗。因為和神經細胞的動作電位相比，心肌細胞所產生的動作電位較大，對於初期建立動作電位量測系統來說，是比較好的選擇。

1.2 細胞電特性[3]

電位現象存在於所有細胞的細胞膜兩側，而部分細胞如神經細胞與肌肉細胞是具有可興奮性的，即這些細胞能夠在細胞膜上產生電化學的衝動，有些細胞還可利用這種衝動沿著細胞膜傳遞訊息。

1.2.1 膜電位的基本物理特性

在細胞內部或外部的液體都是屬於電解液，含有相同濃度的陽離子及陰離子。一般來說，有少數過量的陰離子堆積在細胞膜內側，而有同樣少數過量的陽離子堆積在細胞膜外側，於是乃在細胞膜內外之間造成了電位差，稱之為膜電位。

造成膜電位的兩種基本方式是（1）膜內外兩側離子濃度差異造成離子擴散，造成膜內外兩側電荷的不平衡；（2）離子透過細胞膜上的主動運輸，所造成兩側電荷的不平衡。

■ 擴散造成的膜電位

圖 1.2.1 描述的是細胞在沒有鈉或鉀的主動運輸時的情形，單純是由離子濃度差異引起離子擴散，而產生的電位差。圖 1.2.1 之（a）和（b）圖分別表示鉀和鈉離子在細胞膜內外的分布情形；圖 1.2.1（a）顯示鉀離子濃度在細胞膜內很高，但在細胞膜外很低；且細胞膜對鉀離子的通透性大，而其他離子則不易穿過細胞膜，故膜內外的鉀離子濃度有很大的差異，所以鉀離子有強烈擴散至膜外的傾向，於是帶著正電的鉀離子跑到膜外，在膜外累積正電荷，但陰離子沒有隨著鉀離子擴散到膜外，使膜內帶有負電荷。當累積的電位差大到能夠阻止鉀離子繼續向外擴散時，將此電位稱為鉀離子的 Nernst 電位。圖 1.2.1（b）顯示相同的擴散效應，鈉離子在膜外為高濃度而在膜內為低濃度。鈉離子也是帶正電，而此時細胞膜只對鈉離子有高的通透性，其他離子則不能通過。故鈉離子傾向擴散至膜內，產生外負內正的膜電位。同樣地，當膜電位高得足以阻止鈉離子由外往內繼續擴散時，此時的膜電位稱為鈉離子的 Nernst 電位。在神經和肌肉衝動的傳遞過程中，許多膜電位的變化乃是快速改變擴散膜電位的結果。

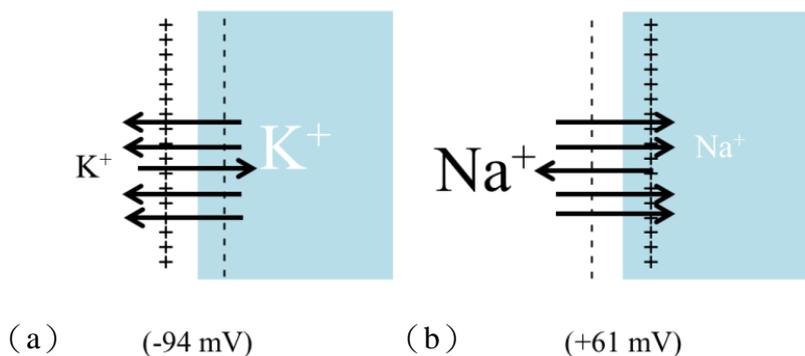


圖 1.2.1、擴散造成細胞膜內外的電位差異

當膜內外兩側存在有某一種離子的濃度差時，會引起此離子通過細胞膜，因而產生了膜電位。膜電位的大小由離子朝兩側擴散趨勢的比例來決定，如 (1.2.1) 式：

$$\text{Nernst potential} = -61 \log \frac{C_i}{C_o} \dots \quad (1.2.1)$$

稱為 Nernst 方程式，而產生的電位稱為 Nernst 電位；其中 C_i 是膜內的離子濃度， C_o 是膜外的離子濃度。利用 Nernst 方程式計算細胞膜的膜電位，表 1.2.1 分別列出鈉離子和鉀離子於細胞膜內外的濃度分布；以鈉離子來說，在正常細胞的細胞膜內鈉離子濃度大約有 14 mEq/l，而膜外大約有 142 mEq/l，所以其比值為 0.10，代入 (1.2.1) 式，可得細胞膜內鈉離子的 Nernst 電位為 +61 mV。而鉀離子在細胞膜內約為 140 mEq/l，外部則為 4 mEq/l，其比值為 35，同樣代入 (1.2.1) 式，可得鉀離子的 Nernst 電位為 -94 mV。

由上述可知，如果只依靠單一離子擴散，所得到的電位差和一般在靜止狀態下的膜電位並不相同；一般在靜止狀態下的膜電位，平均為 -90 mV；因此接著將討論當細胞膜可以通過數種不同離子時，膜電位的計算方式。

表 1.2.1、鈉離子和鉀離子在細胞膜內外的濃度分布

ion	intracellular (mEq/l)	extracellular (mEq/l)	ratio	Nernst Potential (mV)
Na ⁺	14	142	0.1	+ 61
K ⁺	140	4	35.0	- 94

在實際的情況下，細胞膜並不只對單一離子具有通透性，因此，當細胞膜對多種離子都具有穿透性時，其擴散電位的形成取決於三個主要因素：(1) 每個離子電荷的極性；(2) 細胞膜對每種離子的穿透力 (P)；(3) 每個離子在細胞膜內側 (i) 及外側 (o) 濃度 (C)。而膜電位的計算可由 Goldman 方程式 (又稱 Goldman-Hodgkin-Katz 方程式) 獲得：

$$\text{Potential} = -61 \log \frac{\sum C_i P_i}{\sum C_o P_o} \dots \quad (1.2.2)$$

現在假設有兩個帶正電荷的陽離子(鈉離子和鉀離子)及一個帶負電的陰離子(氯離子)，同時擴散過細胞膜，則利用 Goldman 方程式，列出如同 (1.2.3) 式的方程式，即可算出由鈉離子、鉀離子和氯離子擴散所造成的膜電位：

$$\text{Potential} = -61 \log \frac{C_{Na^+} P_{Na^+} + C_{K^+} P_{K^+} + C_{Cl^-} P_{Cl^-}}{C_{Na^+} P_{Na^+} + C_{K^+} P_{K^+} + C_{Cl^-} P_{Cl^-}} \dots \quad (1.2.3)$$

而鈉離子、鉀離子和氯離子是參與細胞產生膜電位的幾個最重要的離子，這些離子在膜內外兩側的濃度差可間接決定膜電位差之大小。此外，每個離子對細胞膜的通透性大小，與所造成的電位差之間有正比關係。也就是說，假設鉀離子和氯離子不能通過細胞膜，則膜電位將完全由鈉離子決定，故膜電位將等於鈉離子的 Nernst 電位。同樣地，如果其中一種離子不能通過細胞膜，則膜電位將由另外兩種離子來決定。

■ 主動運輸造成的膜電位

圖 1.2.2 所示為另一種造成膜電位的方式，稱為主動運輸，是由”鈉鉀幫浦”來作用的；鈉鉀幫浦每次把三個鈉離子幫浦出去時，可將兩個鉀離子幫浦到細胞中，所以每次鈉鉀幫浦作用之後，細胞內部便失去一個正電荷，而細胞內的陰離子大部分是不可穿過細胞膜的，因此細胞膜兩側的電荷分布為外正內負。

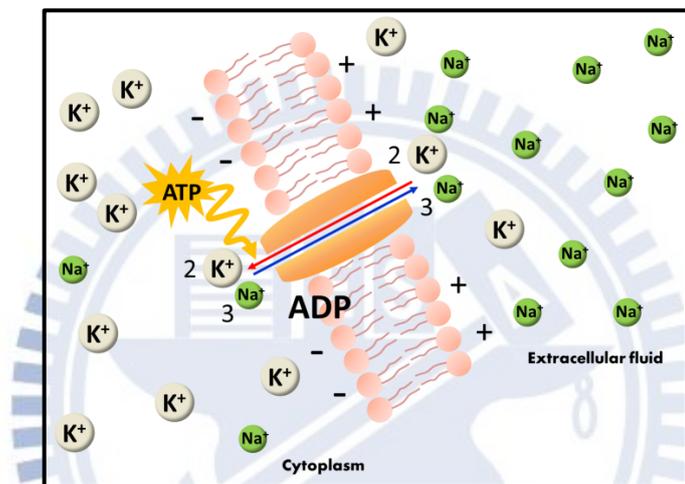


圖 1.2.2、鈉鉀幫浦作用示意圖

鈉鉀幫浦的作用除了構成靜止膜電位之外，也負責細胞膜內外正常鈉離子和鉀離子濃度差之建立。也就是說，不斷地將鈉離子送到細胞外，降低細胞內部鈉離子的濃度；並將鉀離子送入細胞膜內，使得細胞內部維持高濃度的鉀離子。換句話說，當細胞有神經衝動傳遞時，細胞膜內外的鈉離子和鉀離子濃度差會降低，此時就需要依靠鈉鉀幫浦重新建立起適當的濃度梯度。

1.2.2 神經之靜止膜電位

神經纖維在沒有傳遞神經訊息的時候，其靜止膜電位為 -90 mV ；也就是說，神經

纖維內部之電位比外部組織間液多了 90 mV 的負電位，而組成靜止膜電位的來源有三：

■ 鉀離子擴散電位的貢獻

假設細胞膜只允許鉀離子擴散通過，根據 (1.2.1) 式，其 Nernst 電位為 -94 mV。也就是說，假使這是決定神經靜止膜電位的唯一因素，則神經纖維內部的電位即為 -94 mV。

■ 鈉離子擴散電位的貢獻

如同前面章節所介紹的，神經細胞膜上除了對鉀離子具有通透性以外，鈉離子也可經由擴散進出細胞膜，因為有兩種離子參與擴散反應，因此膜電位的計算必須使用 Goldman 方程式，其膜電位為 -86 mV。

■ 鈉鉀幫浦的貢獻

最後，將鈉鉀幫浦的作用納入考慮；綜合以上三種因素同時運作，所構成之淨膜電位為 -90 mV，這和鉀離子的 Nernst 電位 (-94 mV) 是相近的，這是因為在靜止狀態下，細胞膜對鉀離子的通透性非常大，而鈉離子只有微弱的通透性；圖 1.2.3 即是描述三種因素同時運作的情況下，構成 -90 mV 的淨膜電位。

此外，單由鉀離子和鈉離子擴散所造成之膜電位大約是 -86 mV，和正常情況下的靜止膜電位 (-90 mV) 還有 -4 mV 的差距，表示鈉鉀幫浦作用所造成之膜電位為 -4 mV。

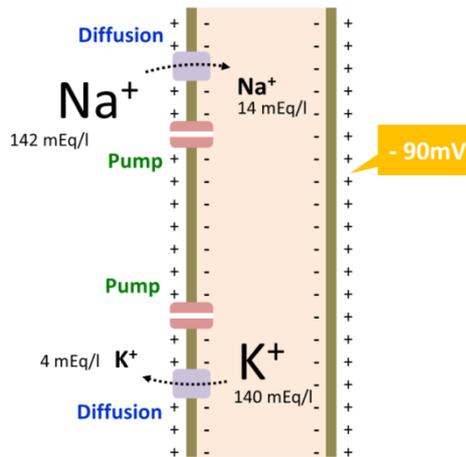


圖 1.2.3、神經纖維之靜止膜電位組成

1.2.3 神經細胞之動作電位

神經訊息是由動作電位（action potential）來傳遞，這是一種快速變化的膜電位（membrane potential）。每個動作電位一開始都是由靜止負電位（resting membrane potential, RMP，靜止膜電位）突然變成正電位，然後幾乎同樣快速地變回負電位，完成一次神經衝動；動作電位沿著神經纖維移動，直到纖維末梢為止，藉以傳遞訊息。

一個動作電位的週期，主要可分為三個時期，如圖 1.2.4：

■ 靜止期（resting）

動作電位產生之前的膜電位稱為靜止膜電位（resting membrane potential, RMP）；此時的細胞膜被稱為“已極化的”，因為在這個時期的細胞膜有極大的負電位。

■ 去極化期（depolarization）

此時細胞膜對鈉離子的通透性突然大增，於是允許大量鈉離子進入神經軸突內。正常的已極化電位（- 90 mV）消失，而電位往正的方向快速上升，稱為去極化

(depolarization)。在大型的神經纖維中，去極化時期的膜電位會超越零點 (overshoot) 而稍呈正電位，但是在小纖維和中樞神經系統的神經元中，其電位只會接近零，而不會超越成為正電位。

■ 再極化期 (repolarization)

在鈉離子對膜的通透性變高之後，鈉離子通道關閉，鉀離子快速擴散至膜外，重建正常負電位的靜止膜電位，稱為膜的再極化 (repolarization)。

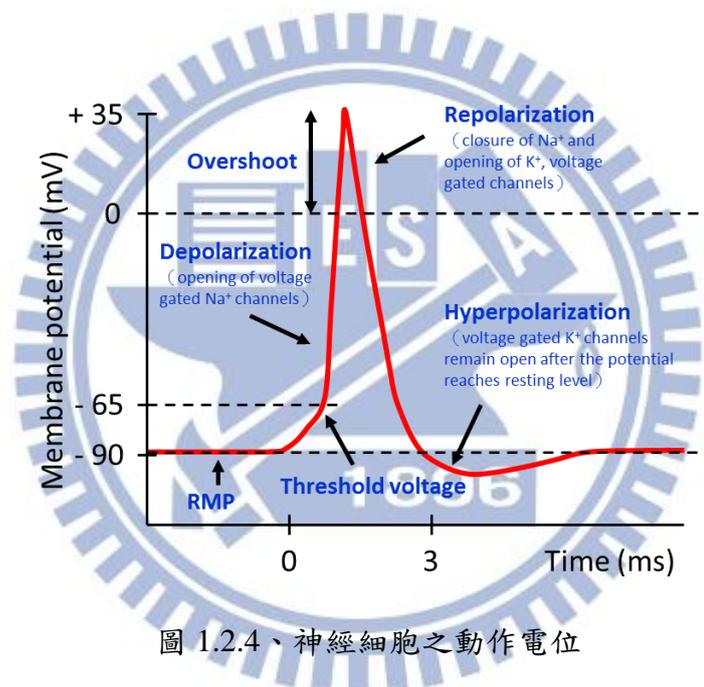


圖 1.2.4、神經細胞之動作電位

為了瞭解細胞膜去極化和再極化的機制，接著介紹神經細胞膜上另外兩種運輸通道的性質，即：對電壓敏感之鈉通道和鉀通道。圖 1.2.5 顯示鈉通道在三個不同時期下的開關情形；鈉通道有兩個門，靠近細胞膜外側的稱為活化門 (activation gate)，靠近細胞膜內側的則為去活化門 (inactivation gate)。由圖中可以看出在正常靜止膜電位時，活化門是關閉的，如此可避免鈉離子由鈉通道進入細胞內部；而去活化門是開著的，此時它並不會對鈉離子的運動造成阻礙。而當膜電位上升時，活化門被活化導致結構改變，而呈現開放的狀態，此時鈉離子能自由地穿過鈉通道到達細胞內部，其通透性大約增加

500-5000 倍。鈉通道作用的最後階段，電位增加不但使活化門打開，同樣也使去活化門關閉，但是去活化門是在活化門打開萬分之幾秒後才會關閉，也就是說，去活化門的關閉較慢，而打開活化門是種非常快速的過程。因此鈉通道打開只維持萬分之幾秒的開啟，它會馬上關閉，鈉離子再也不能進入膜內，此時膜電位開始恢復到靜止狀態，這便是再極化之過程。

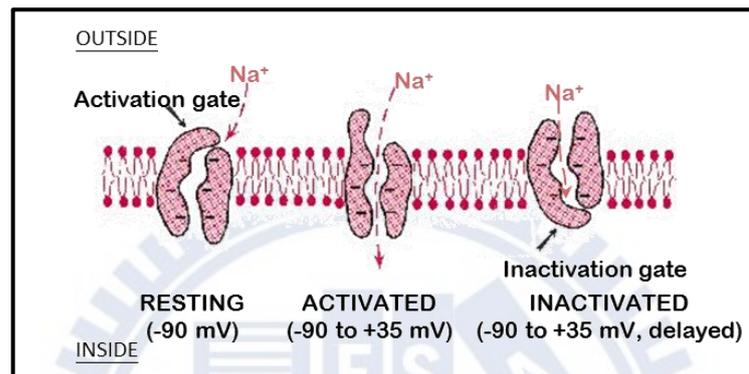


圖 1.2.5、對電壓敏感之鈉通道在不同時期的狀況

鈉離子通道去活化的過程有一個非常重要的特點，那就是：當膜電位未回到接近原來靜止膜電位之程度時，去活化門是不會再度開啟的。因此如果神經纖維不能先再極化，則鈉離子通道將不可能再打開。

圖 1.2.6 顯示鉀離子通道的兩種不同狀態：一個是在靜止狀態下，另一個是在有動作電位的情況下。靜止狀態時，鉀離子通道是關閉的，可防止鉀離子跑出；但當膜電位由 -90 mV 往正電位方向升高時，此種電位變化會使得鉀離子通道緩慢地打開，進而允許鉀離子往外擴散；由於開啟的速度緩慢，所以鉀離子通道打開時，鈉離子通道正在去活化時期，也就是鈉離子通道正在關閉中，於是進入細胞內的鈉離子減少了，且同時離開細胞膜內的鉀離子增加了，故加速了細胞再極化的過程，因此細胞在能在萬分之幾秒內恢復到原本的靜止膜電位。

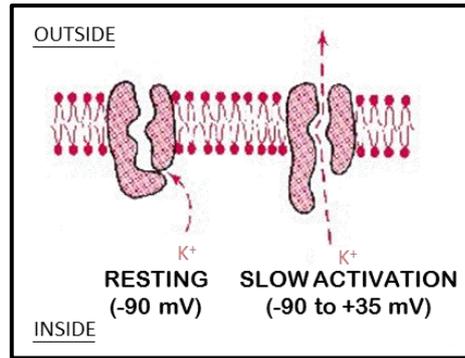


圖 1.2.6、對電壓敏感鉀鈉通道在不同時期的狀況

在神經細胞結束動作電位之後，從圖 1.2.4 可以看到膜電位變得比原本的靜止膜電位還要低，這是因為快速地電位變化，使得離子通道反應不及所造成的現象，稱之為過極化（hyperpolarization）。

從上面的敘述，我們已經瞭解透過膜內外鈉、鉀離子的變化與動作電位之間的關係，但要如何才能夠觸發一個動作電位產生呢？在一般神經纖維沒有受刺激的情況下，並不會有動作電位產生，但當神經纖維受到一個刺激，使得膜電位迅速由 -90 mV 上升至約 -65 mV 時，便可產生動作電位，是故此一電位值被稱為動作電位起始之閾值（threshold）；低於閾值的刺激無法引發動作電位，而高於閾值的刺激無論強弱，都能引發固定強度的動作電位，此一現象稱為全有全無律（all or none law），適用於所有可興奮的組織細胞。

神經細胞在膜上某一位置接受刺激產生動作電位之後，此位置附近的膜會被興奮，而導致動作電位的傳導，其機制如圖 1.2.7 所示；箭頭方向為動作電位傳遞之方向，將軸突（axon）部分放大來看，鈉離子所造成的正電流向膜內流動，然後沿著軸突中心移動，當膜內累積之正電荷超過閾值，便引發動作電位，使得對電壓敏感的鈉離子通道活化，開啟了一系列的動作電位變化；而去極化產生的局部路徑電流，沿著細胞膜流動，造成更多區域被去極化。因此，去極化之進行是沿著神經纖維的兩個方向在前進，這種沿著神經或肌肉纖維的去極化過程稱為神經或肌肉衝動。

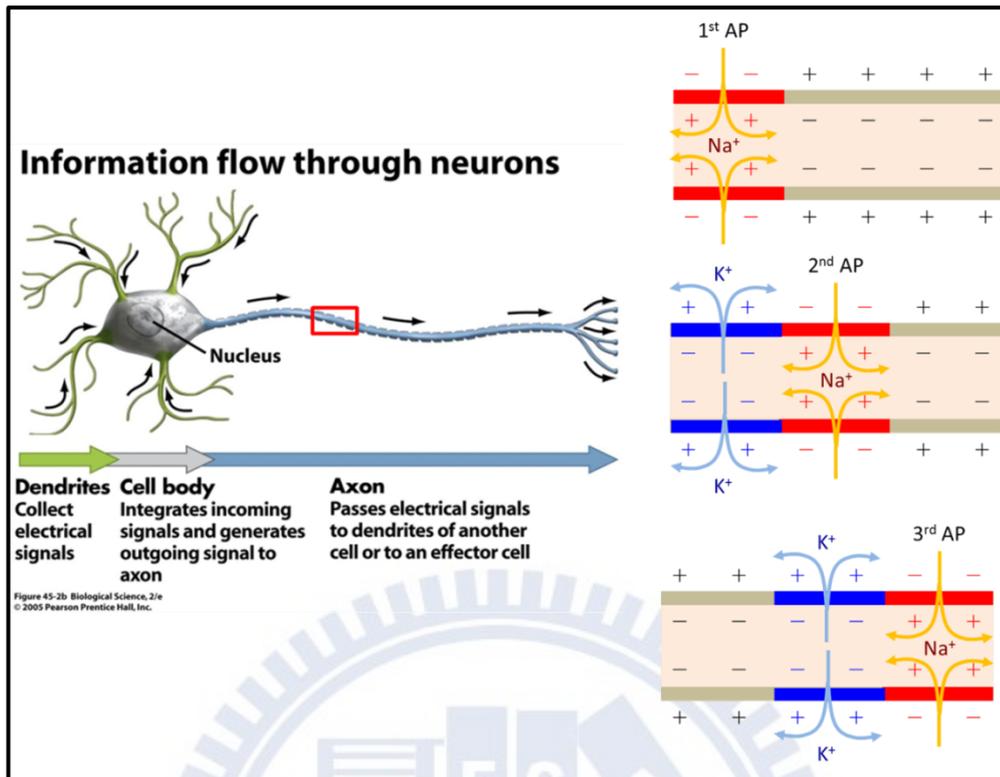


圖 1.2.7、神經纖維之動作電位傳遞

一旦神經纖維被刺激產生動作電位之後，去極化的現象會傳遍整個神經纖維，直到傳到膜上某一點的電性衝動無法產生足夠大的動作電位，以至於無法使鄰近地區的膜產生極化現象，去極化的傳導亦隨之停止。

1.2.4 心肌細胞之動作電位

在某些情況下，細胞膜的再極化並非緊接著去極化現象出現，而是在去極化之後出現了電位不變的高原曲線（plateau），並維持數毫秒後，才有再極化出現，如圖 1.2.8 所示，此高原曲線大大地延遲了去極化的時間。心肌細胞的動作電位正是屬於此型，心肌細胞的高原期可維持 0.2 到 0.3 秒之久，心肌細胞在這個時期內一直保持收縮的狀態。

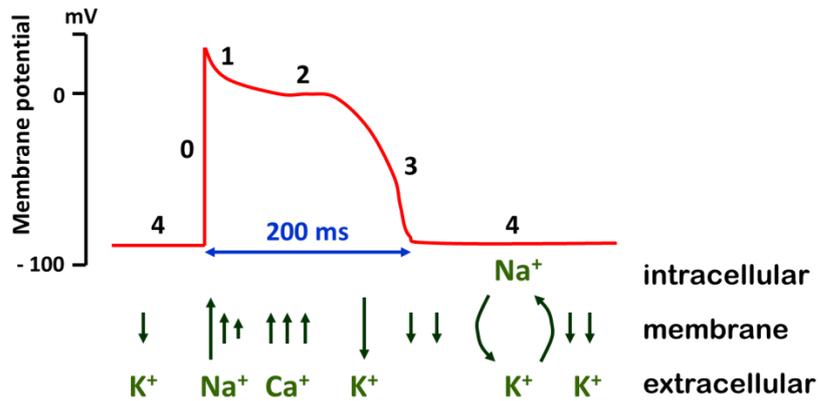


圖 1.2.8、心肌細胞之動作電位

動作電位的高原曲線之成因主要有兩個：第一，在心肌細胞中有兩種不同的通道參與去極化過程：(1) 鈉離子通道，又稱為快速通道；(2) 鈣鈉離子通道，又稱為慢速通道，它可容許大量的鈣離子和少量的鈉離子通過。在心肌細胞中，快速通道的活化造成去極化的正電位，而慢速通道則是造成高原曲線的主要因素。第二是因為在某些可興奮之組織中，鉀離子通道被活化的時間很長，通常在高原期之末才會開啟，於是造成膜電位延遲返回靜止值。但是，在高原期之末，鉀離子通道打開了，於是動作電位便迅速地從高原期回到靜止期的狀態。

關於動作電位的描述截至於此都是針對細胞膜內外的差異來討論，但若只是膜外電位的變化，其電位差異則是來自於細胞外液與細胞膜外微小的電位變化，因此電位改變的量較小。

根據 core-conductor theory，細胞的跨膜電流 (I_{total}) 可表示為：

$$I_{total} = K \frac{d^2V_m}{dt} = C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{ionic} \dots \quad (1.2.4)$$

$$K = \frac{a}{2Rv^2} \dots \quad (1.2.5)$$

V_m 為跨膜電位； C_m 是單位面積的膜電容； I_{ionic} 是離子通過膜上離子通道所造成的電流； K 為常數項，與細胞纖維半徑(a)、axoplasm resistance (R)和導電速率(conduction velocity, v)有關，其中 axoplasm resistance 又和 seal resistance (R_{seal}) 相關。由 (1.2.4) 式可知， I_{total} 和 V_m 的二次導數成正比；當電流流過 seal resistance (介於細胞與電極之間，用來表

示細胞和電極緊密貼附的程度), 在電極上產生的電壓等於 I_{total} 和 R_{seal} 的乘積, 如(1.2.6) 式與圖 1.2.9 :

$$V = I_{total}R_{seal} \dots (1.2.6)$$

實際量測到的電壓變化, 依據細胞貼附的緊密程度, 可能是膜內外電位的一次導數、二次導數或三次導數, 如圖 1.2.10; 細胞與電極之間愈緊密, 量測所得到的訊號與跨膜電位愈接近。

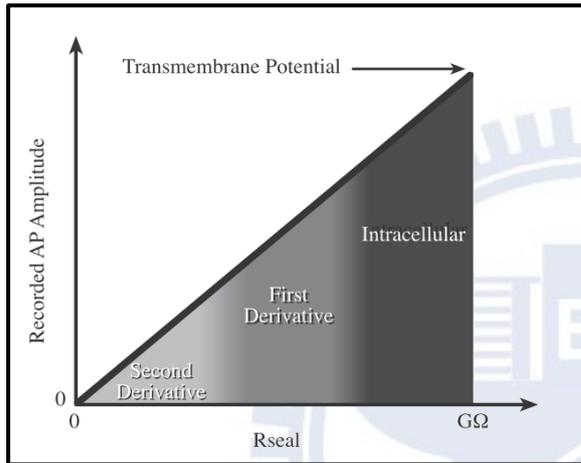


圖 1.2.9、

seal resistance 與動作電位之關係[4]

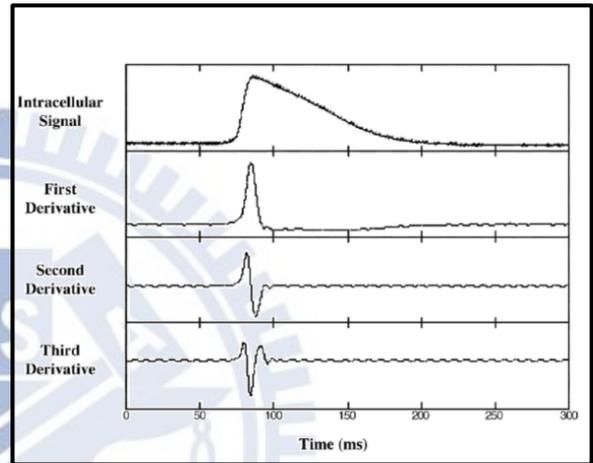


圖 1.2.10、

細胞跨膜電位與膜外電位之關係[5]

1.3 文獻回顧

過去在細胞電生理的研究中, 常用膜片箝制技術 (patch-clamp technique) 作為電生理學中研究離子通道機制的工具[6]。傳統膜片箝制方式是將玻璃微電極貼附在細胞上, 施予玻璃微電極適當的吸力, 使細胞膜向微電極內部凹陷呈 Ω 狀, 確保細胞膜和微電極間是緊密吸附的 (R_{seal} 約 10-100 $G\Omega$), 在膜內外施加一定程度的電壓, 觀察細胞膜上的離子流動所造成的電流變化; 圖 1.3.1 所示即是描述四種基本的膜片箝制技術, 分別為貼附式 (cell attached)、膜外朝外 (outside-out patch)、膜內朝外 (inside-out patch) 和全細胞 (whole cell recording) 式。利用膜片箝制技術所得到的資訊雖然精確, 但操作

技術複雜，必須經過長時間的訓練，累積足夠的經驗，才能使用；且膜片箝制技術每次量測只能夠紀錄少量的離子通道，效率不彰。此外，因為膜片箝制技術是將玻璃微電極深入細胞進行量測，對於細胞來說是一種侵入性的量測方式，因此若要長時間持續觀察細胞的電生理特性，膜片箝制技術尚無法達成此一需求；是故為了能夠長時間觀察細胞訊號傳遞的電傳導特性，必須設法維持細胞正常情況下的生理狀態。

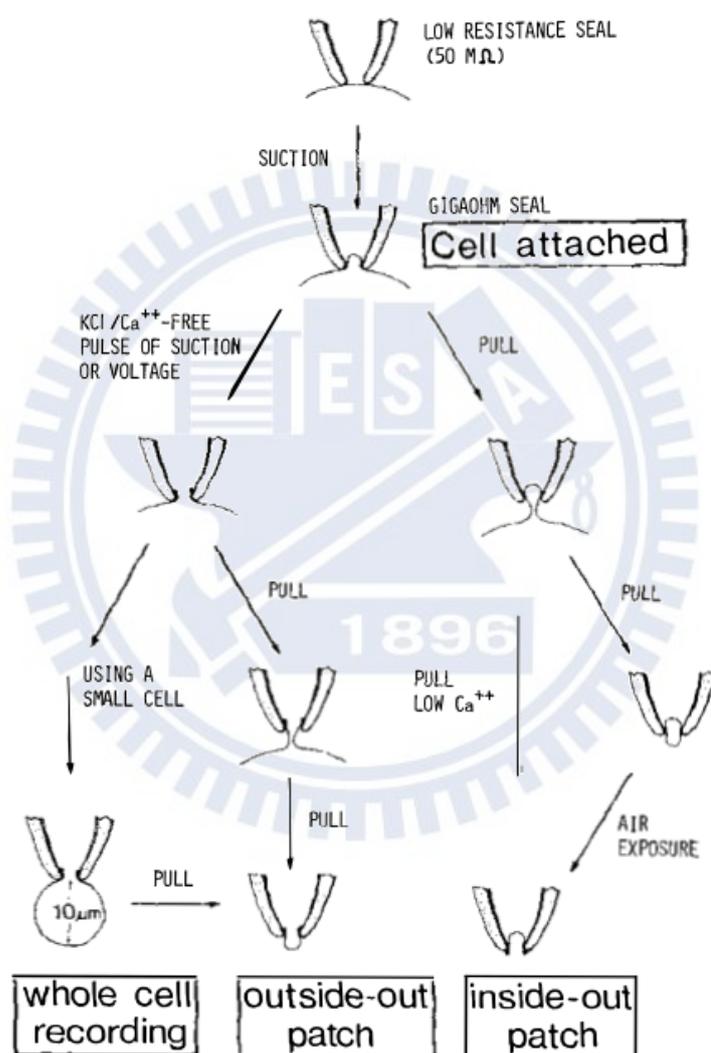


圖 1.3.1、膜片箝制技術示意圖

為了達到上述的目的，陸續有學者提出各種非侵入式的量測方式，其中利用微電極陣列（microelectrode array）量測細胞膜外電位[7-15]便是方法之一；細胞膜的電位變化可藉由電極感測膜外電場的變化得知。利用微電極陣列除了對細胞的傷害性小之外，還

可以利用微電極給予細胞刺激，使細胞產生動作電位，藉此觀測細胞電生理傳遞的資訊，了解細胞如何傳遞訊息。1972年，Thomas 等人是最早將細胞培養在微電極陣列上，進行膜外電位量測的團隊[10]；他們是在玻璃基板上鍍金後，再沉積鉑黑（platinum black）當作電極材料，量測膜外電位；其微電極陣列系統的剖面圖示於圖 1.3.2。在此一研究發表之後，開始有各種不同的微電極陣列設計被提出，包括電極的材料選擇、形狀和大小等，都成為研究的議題[16]。而微電極陣列的應用也拓展到各式各樣不同的細胞和生物組織上進行量測；1977年，Gross 等人也陸續發表出相關的研究成果，並用於量測神經組織的電性訊號[17]。

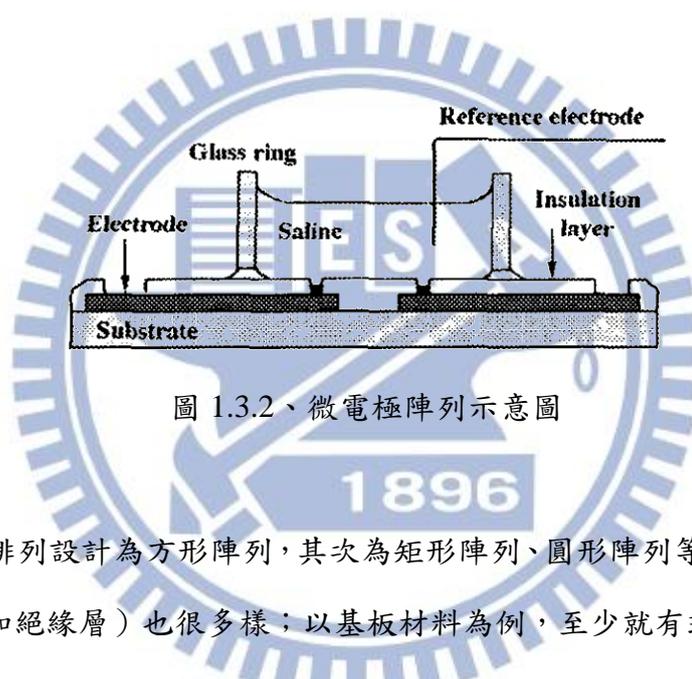


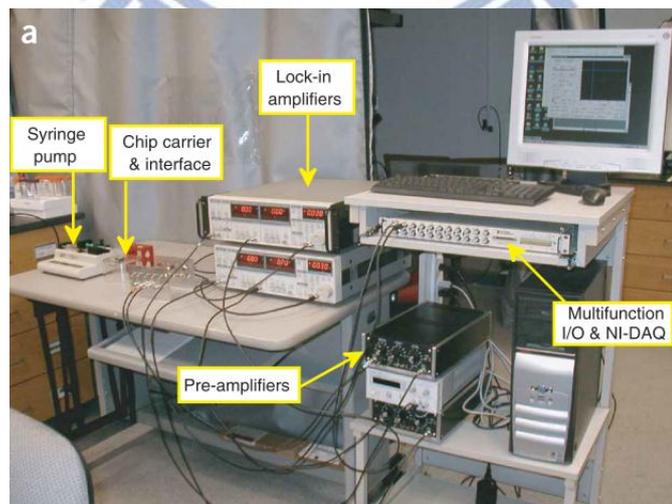
圖 1.3.2、微電極陣列示意圖

常見的電極排列設計為方形陣列，其次為矩形陣列、圓形陣列等。而材料的選擇（例如：基板、電極和絕緣層）也很多樣；以基板材料為例，至少就有玻璃、矽晶片或高分子材料三種[16]。電極形狀則多以方形或圓形為主。另外，考量到生物和電性的條件，電極的尺寸大小要能與細胞的大小愈接近愈好；這是因為當細胞有動作電位產生時，膜上的離子流動會造成膜外的電位改變，而微電極陣列的量測方式，就是利用金屬電極去感受其表面的電位變化，因此當電極的尺寸大小與細胞貼附的大小一致時，能夠有效感測表面電位變化的電極面積最大，理論上來說訊雜比（signal to noise ratio, SNR）較佳。而為了營造良好的量測環境，必須慎選紀錄電極的材料，通常會選用生物相容性（biocompatibility）良好且阻抗低的材料，並且此微電極陣列要能夠刺激（stimulation）細胞或記錄（recording）細胞產生的動作電位；要能達到這種要求，電極的阻抗大小佔了很重要的因素；一般而言，電阻抗要小；常被用來當作電極材料的有氧化銻錫

(indium-tin oxide, ITO)、金 (gold, Au)、銱 (iridium, Ir) 或鉑 (platinum, Pt)；亦可在這些電極上沉積鉑黑 (platinum black) 或氮化鈦 (titanium nitride, TiN)，藉由改變電極表面形貌，增加電極的表面積，除了可降低電極阻抗外，也提升了感測面積。

在記錄細胞電生理的研究中，除了要有電極能夠將細胞的訊息轉換成電位變化之外，因為細胞膜外電位變化非常微弱，大約是 μV 的大小，因此必須連接濾波放大器，將訊號做適當的處理；簡單的說，就是將不必要的雜訊濾除並放大細胞的膜外電位。小訊號的處理過程首先會將訊號進行兩階段放大，再經由濾波器處理之後送出。2009 年，Charles M. Lieber 在 NANO LETTERS 所發表的研究成果中，是利用自製的前級放大器 (Home-made preamplifier) 將訊號放大之後，再交由鎖相放大器 (lock-in amplifier) 對訊號進行濾波處理，最後經由 NI-DAQ 將量測所得之心臟電生理訊號擷取出來紀錄之；圖 1.3.3(a) 所示為 Lieber 團隊所使用之量測儀器的架構圖，包括：放置元件的載台 (chip carrier & interface)、前級放大器 (Pre-amplifiers)、鎖相放大器 (Lock-in amplifier) 和 Multifunction I/O & NI-DAQ；圖 1.3.3 (b) 為心臟電訊號的量測示意圖，紅色箭頭所指為心臟組織，黃色箭頭所指為銀/氯化銀參考電極，放大心臟組織的部分，如圖 1.3.3(c)。

[18-20]



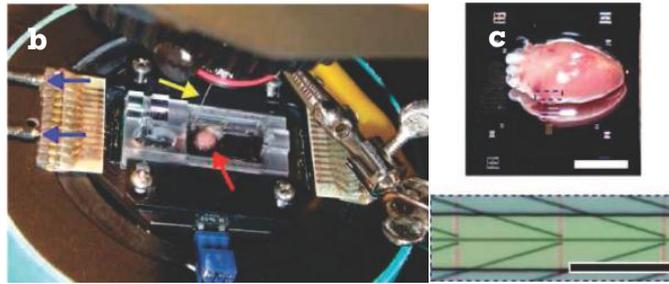


圖 1.3.3、量測儀器架設圖

在本篇論文中，將利用微電極陣列 (microelectrode array, MEA) 在細胞與電性量測儀器之間提供適當的介面，將細胞產生的訊息轉換成電子訊號，接著利用量測儀器紀錄生物細胞的電生理訊號。而使用 MEA 記錄心肌細胞的動作電位 (action potential, AP)。

1.4 研究動機及目標

為了解生物訊號的傳遞，首先必須先簡化複雜的生物網絡。在研究細胞電生理訊號的研究上，傳統上是使用膜片箝制技術來量測，通常是利用玻璃微電極對單一個細胞進行研究，是將玻璃微電極伸進細胞膜內，量測細胞膜內外的電生理訊號，雖然訊雜比 (signal to noise ratio, SNR) 佳，但微電極穿刺的方式對細胞而言是具有侵略性的破壞性量測，量測之後，細胞無法存活，不利於長時間的觀察或量測；而且一次只能夠對一個細胞進行量測。另外，膜片箝制技術為了達到細胞穿刺的目的，還必須先將細胞固定不動 (大部分的細胞是會移動的)，增加了實驗操作的困難度。因此為了能夠長時間觀察細胞訊號傳遞的電傳導特性，必須要維持細胞的活性與存活率；使用微電極陣列不但可達上述之目的，且能夠整合多個微小的電極在一個微小的基板上，故可同時對多個細胞進行量測。本篇論文是希望利用微電極陣列來建立一套用於量測細胞動作電位的量測平台。

1.5 論文架構

本篇論文主要架構可分為微電極陣列、訊號處理和資料擷取三大部分，將於接下來的章節逐一介紹；大綱如下：

第二章將介紹微電極在電解質溶液中的特性，包括電極和溶液之間的反應、電極本身的電阻抗和雜訊的關係；以及微電極陣列的設計、製作和前處理；最後在介紹整個系統的架設方式。

第三章將介紹訊號處理的流程與儀器設備以及量測的原理。

第四章將介紹如何自心臟組織萃取心肌細胞，包括心肌細胞培養的流程、種盤密度。

第五章將對實驗結果進行討論和分析。

第六章總結。



第二章 微電極陣列系統

2.1 微電極與溶液間的介面現象

當金屬電極浸泡在電解質溶液中時，在電極表面會快速地生成一帶電的界面層，使得電極與溶液之間形成電場[21]，如圖 2.1.1 所示。當電極浸入電解質溶液後，首先吸附 water dipole 在電極表面，形成水合層 (hydration sheath)，亦稱 inner Helmholtz plane (IHP)；接著 solvated ion 在 water dipole 之後形成 outer Helmholtz plane (OHP)；而電雙層 (electrical double layer) 就是由上述的反應所形成的。

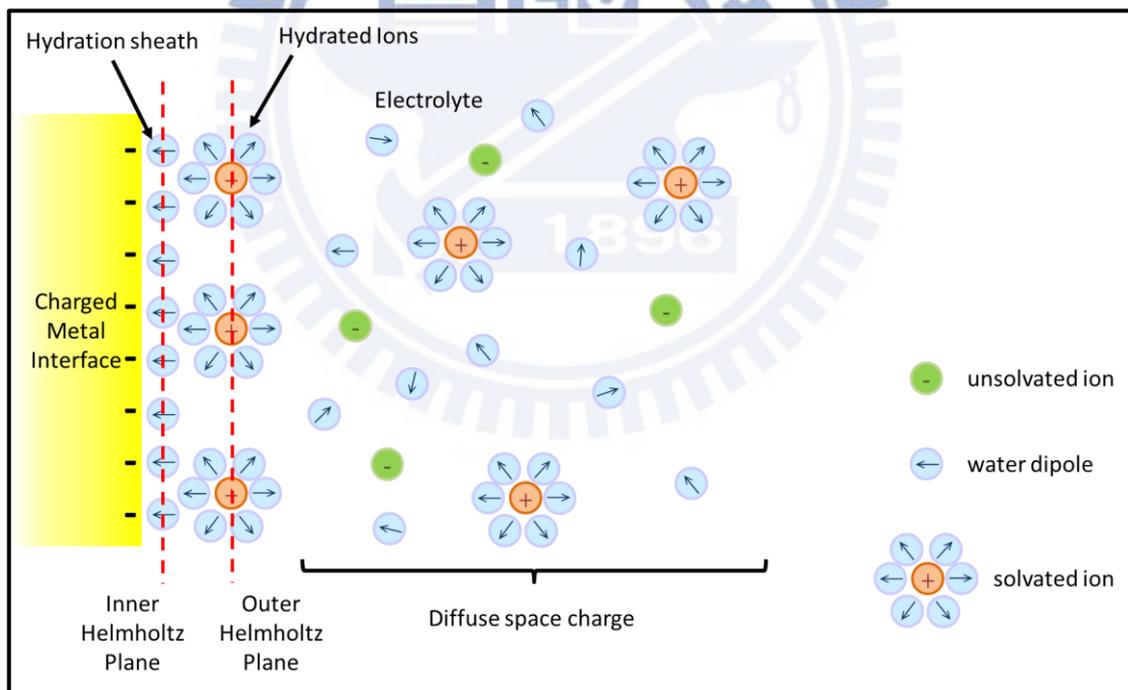


圖 2.1.1、電雙層形成之示意圖

有關於金屬微電極與溶液之間的介面現象，可藉由建立一合理的等校電路來做進一步的探討[22, 23]。在本篇論文中，將使用 4294A 精密阻抗分析儀對金屬微電極陣列進

行阻抗量測；其原理是對所欲量測之金屬微電極施加一定振幅（Amplitude）及頻率（Frequency）的交流電壓，並於穩定狀態下測量其響應電流的振幅和相位（Phase），由此得到金屬微電極的阻抗；將實驗結果繪製成圖，然後根據所得圖形的樣式，提出合理的等效電路，接著利用軟體（ZView）分析此等效電路，計算出相關的電學參數，以判斷電極介面所產生的各種物理現象；一個典型的等效電路圖形包含：電解液所造成的歐姆（ohmic）電阻（ R_s ）、從整體溶液到電極表面的離子擴散阻抗，稱為 Warburg 阻抗（ Z_w ）、電雙層電容（ C_l ）和當有氧化還原物質存在時所造成的電子傳遞阻抗（ R_t ）等，圖 2.1.2 所描述的即為此一等效電路的示意圖。圖中每一個電學符號所表示的物理意義，將於接下來的內容作進一步的陳述。

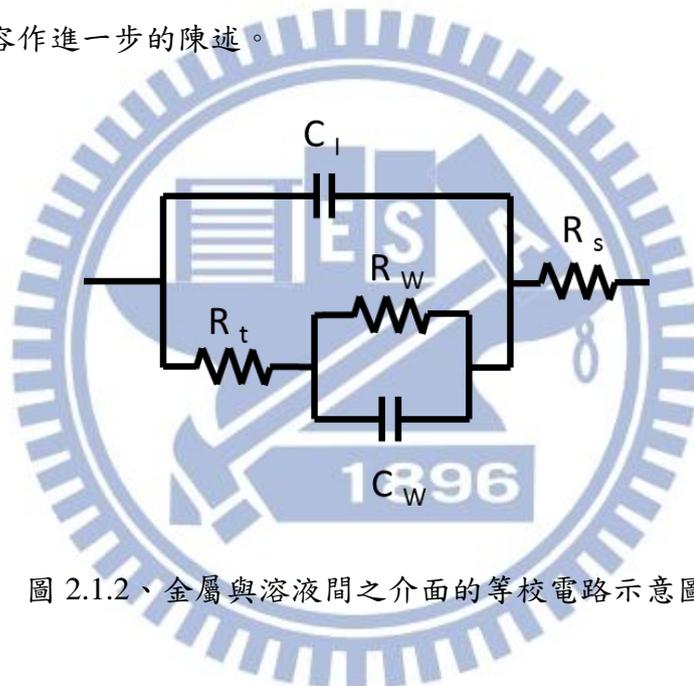


圖 2.1.2、金屬與溶液間之介面的等效電路示意圖

介面電容（interfacial capacitance, C_l ），是由 C_H （Helmholtz model）和 C_G （Gouy-Chapman model）串聯而成；分別是由兩個不同的理論基礎所構成。由 Helmholtz 在 1879 年所提出的 Helmholtz model，其概念是假設介面上的電荷是固定在 OHP 不動的，故可視為一簡單的電容項（ C_H ）：

$$C_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d_{OHP}} \dots \quad (2.1.1)$$

ϵ_0 為真空介電常數（ 8.85419×10^{-12} F/m）， ϵ_r 為溶液的相對介電常數， A 為電極面積， d_{OHP} 為 OHP 至電極表面的距離；此 C_H 為定值。但實際上，電容是會隨著電壓而改變的；施加電壓時，離子會更貼近電極表面；因此 Gouy 和 Chapman 修正 Helmholtz model，他們

假設介面上的電荷是可移動的、是會隨著電壓改變的，如下：

$$C_G = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{L_D} \cosh\left(\frac{zV}{2V_T}\right) \dots \quad (2.1.2)$$

L_D 為 Debye length， z 為離子價數， V 為外加電壓， V_T 為 thermal voltage (kT/q)；其中， L_D 表示為：

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r V_T}{2N_i z^2 q}} \dots \quad (2.1.3)$$

N_i 為離子濃度， q 為一個電子所擁有的電荷量 (1.60219×10^{-19} C)。然而，介面電容並不全由 C_G 構成，1924 年 Stern 結合 Helmholtz model 和 Gouy-Chapman model，將 C_H 和 C_G 串聯成的電容項 (C_I)，更能符合實際介面電容 (C_I) 的表現：

$$\frac{1}{C_I} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \dots \quad (2.1.4)$$

除了介面電容以外，在電極與電解質溶液之間還有電荷轉移的現象發生，其所造成的電阻 (R_t) 表示為：

$$R_t = \frac{V_T}{J_0 z A} \dots \quad (2.1.5)$$

J_0 為電流密度。而圖 2.1.1 之等效電路中的 R_W 和 C_W ，是用來表示在高頻情況下，離子擴散的行為，可用 (2.1.6) 和 (2.1.7) 式表示：

$$R_W = \frac{V_T}{2z^2 A q N_i \sqrt{\pi f D}} \dots \quad (2.1.6)$$

$$C_W = \frac{z^2 A q N_i}{V_T} \sqrt{\frac{D}{\pi f}} \dots \quad (2.1.7)$$

其中， f 為頻率 (Hz)， D 為擴散常數。

此外，由電極到對電極之間還有一項 spreading resistance (R_s)，是描述溶液中，電極到對電極之間電流分布的效應。對圓形電極來說， R_s 的定義如 (2.1.8) 式：

$$R_s = \frac{\rho \sqrt{\pi}}{4\sqrt{A}} = \frac{\rho}{4r} \dots \quad (2.1.8)$$

ρ 為溶液的電阻係數， r 為圓形電極半徑。

2.2 微電極陣列之設計與製作

2.2.1 微電極之設計

微電極陣列結構是三明治結構[2]，如圖 2.2.1，是先將金屬導電層 (metallic layer) 鍍在絕緣基板 (substrate) 上以作為電極和電極走線的部分，接著再鍍上防護層 (passivation layer) 以遮蔽其餘非工作電極的區域 (如：電極走線)；此外，要使用微電極陣列作為一個細胞生物感測器，用來製作微電極陣列的材料必須具有生物相容性 (biocompatibility)，且必須提供良好的生物親和力以利於細胞貼附，除了滿足這兩個條件以外，最重要的是必須要能夠維持細胞本身的電特性。

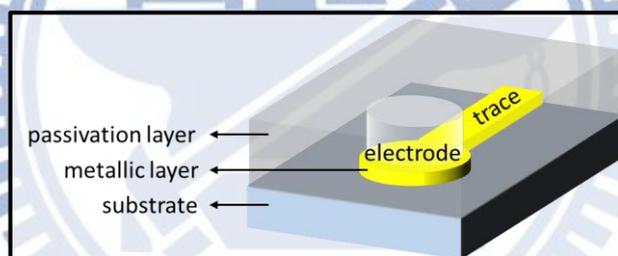


圖 2.2.1、三明治之微電極陣列結構

常用來作為基板的材料有矽 (silicon)、玻璃 (glass) 和高分子 (polymer)；而在本篇論文中是採用矽當作基板材料，因為可適用於積體電路製程；雖然矽是一種半導體材料，但可藉由在矽上方成長二氧化矽達到絕緣的目的。而常用來作為防護層的材料則有 Si_3O_4 或 $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ，兩者的不同在於所形成之防護層的介電常數。若是只利用 Si_3O_4 作為防護層，介電常數為 7.5；而利用 SiO_2 和 Si_3O_4 交錯形成的防護層，則因為加入了介電常數為 3.9 的 SiO_2 ，其介電常數會降低。一般而言，會希望防護層的介電常數小於 2.7，這是因為當電極浸泡在電解質溶液中時，在電極和電極走線的部分分別會有電極耦合所造成的電容項 (C_c) 與電極走線耦合所造成的電容項 (C_p)，表示為 (2.2.1)

和 (2.2.2) 式。

$$C_c = 2\varepsilon_0\varepsilon_r l \left[0.03 \left(\frac{w}{d} \right) + 0.83 \left(\frac{t}{d} \right) - 0.07 \left(\frac{t}{d} \right)^{0.222} \right] \left(\frac{s}{d} \right)^{-1.34} \dots \quad (2.2.1)$$

$$C_p = \frac{1.15\varepsilon_0\varepsilon_r lw}{d} + 2.8\varepsilon_0\varepsilon_r l \left(\frac{t}{d} \right) \dots \quad (2.2.2)$$

其中， ε_0 為真空介電常數 (8.85419×10^{-12} F/m)， ε_r 為防護層的相對介電常數， l 、 w 和 d 分別為電極走線的長度、寬度和高度， s 則為電極與電極之間的距離。在本篇論文中是使用 SU8-2005 作為防護層，厚度為 $5 \mu\text{m}$ ，介電常數 (ε_r) 為 3.6；若將各項數值代入 (2.2.1) 和 (2.2.2) 式，則可發現相對於金屬微電極浸泡在電解質溶液中時所造成介面電容項 (C_I)， C_c 與 C_p 可以忽略不計。

位於此三明治結構最核心的部分是金屬導電層，是直接與細胞接觸並記錄其電性變化的重要位置，因此必須選用具有良好生物相容性與傳導特性的材料。一般而言，金屬微電極的電阻抗要越小越好，因為其所造成的 thermal noise 小，能夠捕獲細胞膜外電位之訊號的機率也會提升。在本篇論文中是選用金來製作微電極，並藉由增加表面積，來降低電極本身的阻抗大小。

選定好製作的材料，接著微電極的設計又是如何呢？理論上來說，將電極做成與細胞大小相近的尺寸，是最能夠有效接收細胞訊號的設計。因為電極暴露於電解質溶液中的面積最少，產生的漏電流最小；同時電極能夠感受到的細胞訊號最多。此外，根據 Breckenridge et al. 的研究[24]指出，當施加 400 nA 的電流於微電極陣列中的其中一個電極，並記錄鄰近電極所感受到的電性變化，發現當電極間距為 $30 \mu\text{m}$ 時，由鄰近電極所記錄到的訊號比原先的訊號衰減了 50%，當電極間距增加到 $128 \mu\text{m}$ 時，只剩 10% 的訊號強度；由此可以看出，為了避免電極之間的交互 (cross-talk) 影響，電極間距要大於 $100 \mu\text{m}$ 比較適當。

2.2.2 微電極製作

在本篇論文是使用矽晶片當作材料，利用標準的黃光微影製程定義出直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形工作電極；之所以將工作電極做成圓形，是因為和矩形的電極形狀相比，圓形電極在有細胞貼附的情況下，所產生的 dead volume 較少；而電極尺寸大小的設計概念，除了考量 thermal noise 的影響之外，還需考慮電極與細胞大小的關係。電極與 passivation 材料分別選用金與 SU8，兩者都能提供良好的細胞相容性與足夠的細胞貼附性。

圖 2.2.2 是製作微電極陣列的流程圖。首先在矽晶圓表面成長 1000 Å 的濕式氧化層 (wet oxide) 當作絕緣層，依序再鍍上 20 nm Ti 當作附著層 (adhesion layer)，和 300 nm 的 Au 金屬層，接著以正光阻 (FH6400) 定義圖形後，採用濕式蝕刻的方式得到定義好的圖案，蝕刻參數如圖 2.2.2 所示；再將晶片浸泡在丙酮中，以超音波震盪器震盪 5 分鐘以去除光阻。而 passivation layer 則是使用負光阻 (SU8-2005)，同樣利用黃光微影的方式定義出需要 passivation 的位置，如此一來，便完成整個 MEA 的製程步驟了；圖 2.2.3 (a) 是本篇論文所設計的微電極陣列示意圖，一個微電極陣列元件的尺寸大小為 20.5 mm X 20.0 mm，位於元件中心的工作電極為圓形，位於元件下側邊緣的矩形電極則為粘接金屬導線至外部用；工作電極和矩形電極之間的電極走線寬度為 40 μm ，在元件的四個角落上設計 alignment key 以利於定義 passivation layer 的位置，此外在元件右上角設計一組測試結構，用來測試元件是否可以正常工作；將圖中虛線框內放大，如圖 2.2.3 (b) 所示，直徑 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形工作電極分別各有 6 個，且彼此間距各為 150 μm ，以降低電極之間的交互 (cross-talk) 影響。詳細的製程參數示於表 2.2.1。

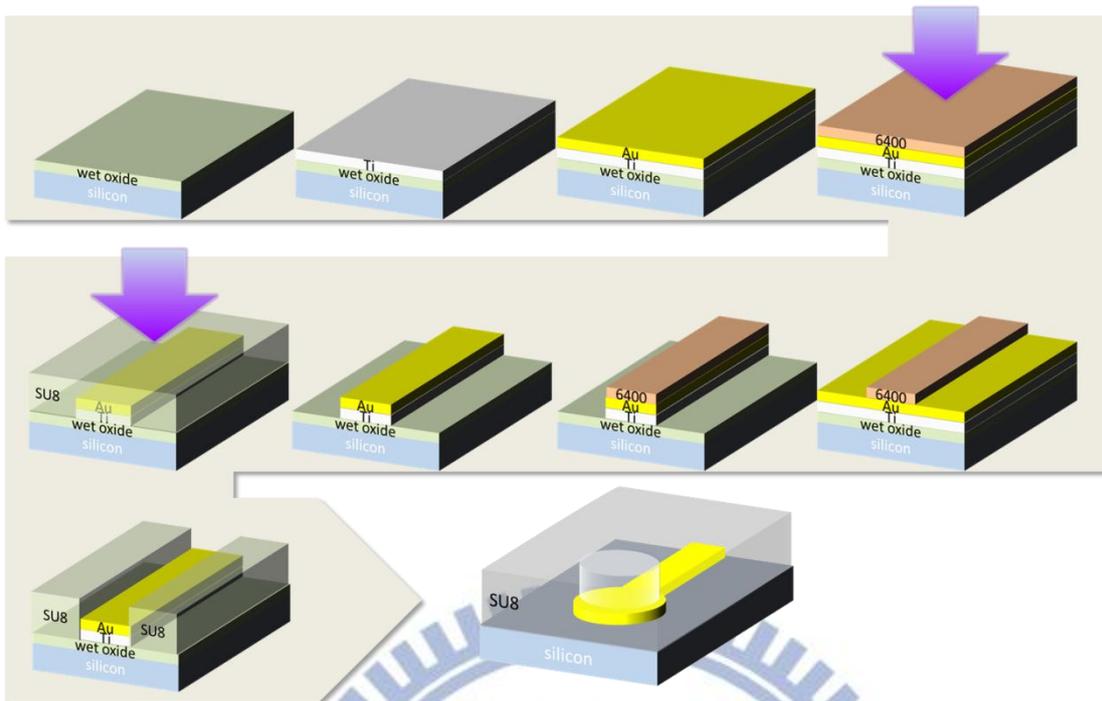


圖 2.2.2、微電極陣列製作流程

- 金的蝕刻液為 $KI : I_2 : H_2O = 6.8 g : 1.7 g : 180 ml$
- 鈦的蝕刻液為 $BOE : H_2O_2 : H_2O = 1 : 1 : 10$

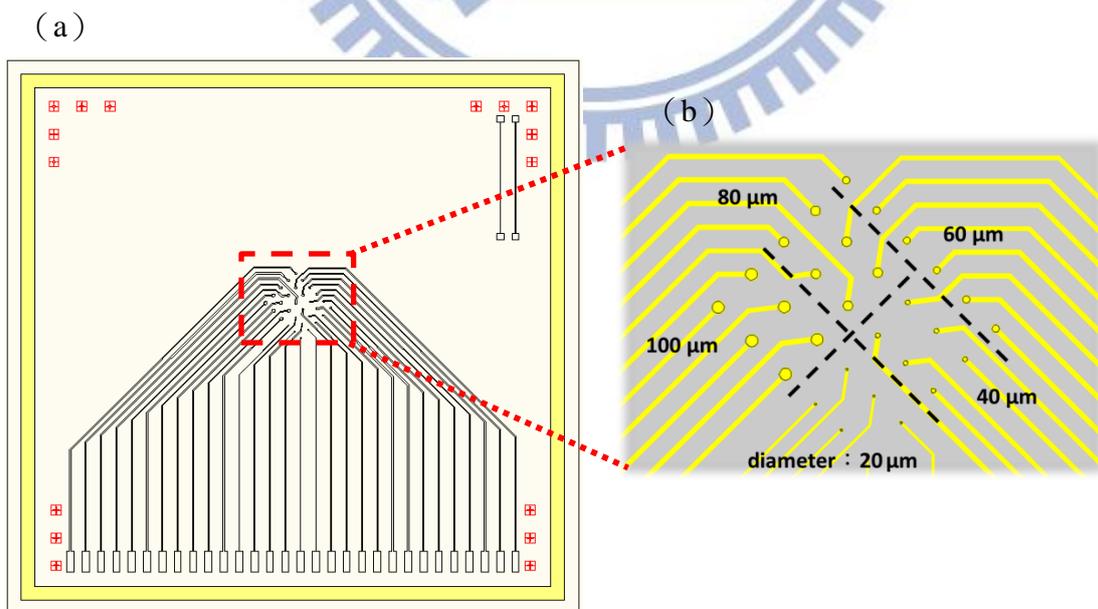


圖 2.2.3、微電極結構示意圖-電極間距約為 $150 \mu m$

表 2.2.1、微影製程參數

	FH6400		SU8-2005	
旋轉塗佈轉速	500 rpm	1 sec	500 rpm	5 sec
	500 rpm	10 sec	500 rpm	10 sec
	3000 rpm	1 sec	3000 rpm	10 sec
	3000 rpm	10 sec	3000 rpm	30 sec
軟烤	90 °C	90 sec	65 °C	1 min
			95 °C	2 min
			65 °C	1 min
曝光強度	130 mJ/cm ²		130 mJ/cm ²	
曝後烤			65 °C	1 min
			95 °C	3 min
			65 °C	1 min
顯影	30 sec (FDH5)		30 sec (SU8 developer)	
定影	30 sec (DI)		30 sec (IPA)	
硬烤			65 °C	5 min
			65 °C	10 min
			95 °C	5 min
			95 °C	10 min
			150 °C	15 min
			150 °C	30 min
			25 °C	125 min

2.2.3 成長樹枝狀結構

為了使金屬微電極具有低阻抗的電極特性，在本篇論文中是利用含有 cysteine 的四氯金酸 (HAuCl_4) 溶液在金電極表面成長三軸對稱的樹枝狀結構；藉由增加電極表面積的方式，降低電極阻抗，成長的機制如圖 2.2.4。起初金奈米粒子會沉積在 (111)、(110) 和 (100) 的晶面上，但在電鍍的過程中，溶液中的 cysteine 會在金奈米粒子表面形成薄膜，使得表面電阻增加，進而造成表面的電化學活性下降。但由於表面晶向不同，吸附於多晶金上之 cysteine 的穩定度也不一樣，由小至大依序為 (111) < (100) < (110)；因此當施加特定電壓於金電極上時，可促使表面吸附的 cysteine 產生還原脫附反應，此關係已由 Takeo Ohsaka 等人藉由循環伏安法 (Cyclic Voltammetry) 證實[25]。故當施加 -0.7 至 -0.9 V 的電壓時，原本吸附在 (111) 面上的 cysteine 會脫附，而 (100) 和 (110) 面上的則否；因此金奈米粒子會沿著 <111> 方向沉積，最後形成三軸對稱的樹枝狀結構。另外，值得注意的是，如果 cysteine 的濃度太高，那麼 (111) 晶面仍會被遮蔽，反而抑制了樹枝狀金的成長。

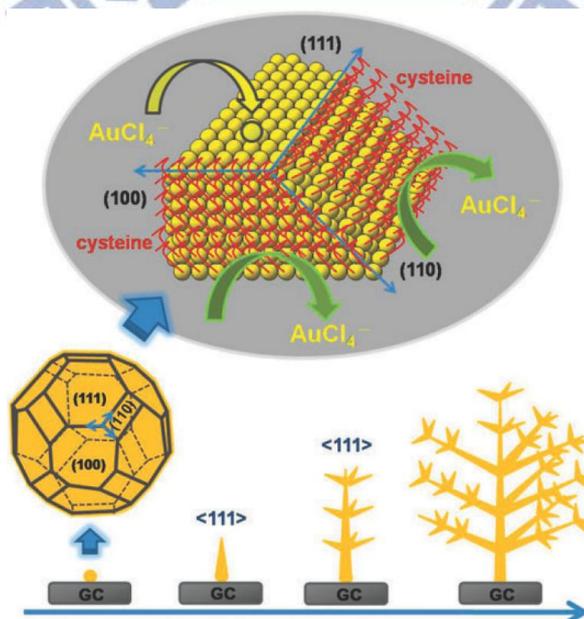


圖 2.2.4、樹枝狀金成長示意圖[26]

在本篇論文中，成長樹枝狀結構的溶液配置如下：2 mM 的 HAuCl_4 、0.5 M 的 H_2SO_4 和 0.1 mM cysteine，cysteine 的濃度要小於 1 mM，否則金的晶面將全被 cysteine 遮蔽。接著利用電化學沉積的方式，將金奈米粒子沉積於金電極表面；

圖 2.2.5 為利用電化學方式成長金的樹枝狀結構示意圖。在電鍍開始之前，先將金電極浸泡在混和溶液中 15 分鐘，再用去離子水沖洗，去除非化學性吸附的 cysteine，再插入銀/氯化銀參考電極和 Pt 對電極，給一頻率為 5 Hz 的方波，目的是為了減少擴散限制（diffusion limitation）的效應，避免影響金粒子電鍍沉積於金電極基板上的速率；此方波的脈衝分別設定在 -0.8 至 +0.2 V。當施加的電壓小於 +0.8 V，在 HAuCl_4 溶液中的 Au^{3+} 離子會被還原到金電極表面。

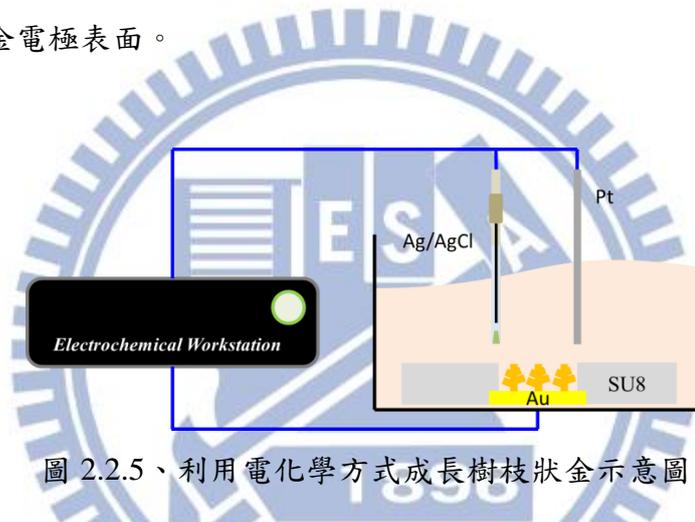


圖 2.2.5、利用電化學方式成長樹枝狀金示意圖

根據上述的實驗條件，以電化學方式沉積金奈米粒子 30 分鐘；在沉積之前，為了去除可能殘留的光阻，事先要以氧氣電漿清潔元件表面（500 mTorr，50 W，5 min）後，才進行電化學沉積。利用 SEM 檢視成長出來的結構。圖 2.2.6 (a-1)、(b-1)、(c-1)、(d-1) 和 (e-1) 分別是直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的微電極在成長樹枝狀結構之前的形貌，表面十分平坦；而 (a-2)、(b-2)、(c-2)、(d-2) 和 (e-2) 則是成長樹枝狀結構以後的形貌，電極表面明顯變的粗糙；將表面成長樹枝狀結構的電極放大來看，結果如圖 2.2.7 所示，(a) 為俯視圖，可以明顯看到確實有樹枝狀結構形成在金電極表面；(b) 為成長樹枝狀結構之金電極剖面圖，圖中虛線框內的樹枝狀結構高度約 900 nm。

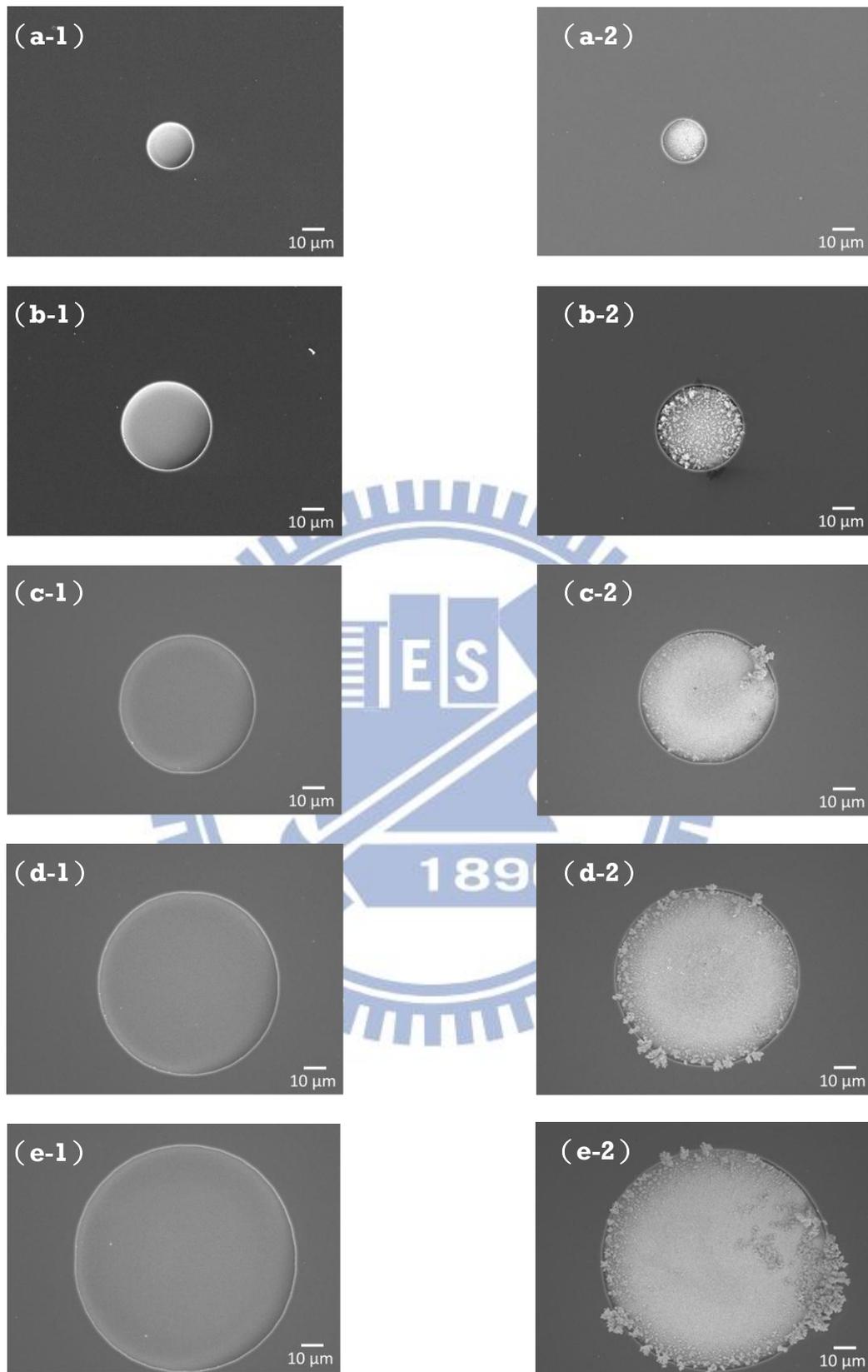


圖 2.2.6、成長樹枝狀結構前後之微電極表面形貌

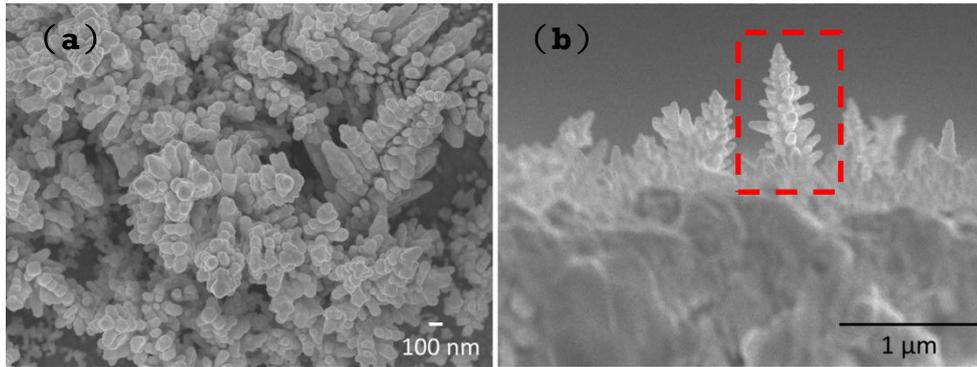


圖 2.2.7、金之樹枝狀結構 SEM 圖

2.3 微電極陣列系統架設與前處理

2.3.1 微電極陣列系統架設

欲使用微電極陣列系統量測細胞的電生理訊號，必須選擇具有生物相容性的材料來建構細胞生長的空間，以維持細胞生長所需的環境，而此環境至少能夠讓細胞的生命週期維持數周（實驗所需的時間），且細胞仍具有電特性。在本篇論文中是選用壓克力當作 culture chamber 的材料；並利用 PCB 將訊號連接到後端放大器，微電極陣列系統架設如圖 2.3.1 所示。

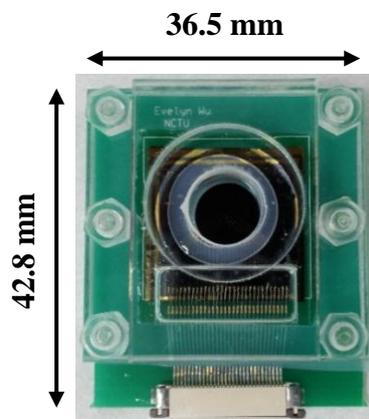


圖 2.3.1、微電極陣列系統架設之示意圖

2.3.2 微電極陣列系統之前處理

為了能夠在元件上培養細胞，除了要架設細胞成長的腔體之外，還須將微電極陣列系統做好清潔的前處理步驟；整個處理的作業流程如下：

1. 將具有樹枝狀結構的金電極元件浸泡在 Piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 5:2$) 中，靜置 10 分鐘，去除表面有機物和雜質；接著取出元件，浸泡在 DI water 中 10 分鐘後，以氮氣吹乾備用。
2. 將 PCB 和零件組浸泡於 70 % 的酒精中，以超音波震盪器清洗 10 分鐘，滅菌清潔之。
3. 將 Acrylic chamber 浸泡在 70 % 的酒精中 15 分鐘後，移至 DI water 中，以超音波震盪器清洗 10 分鐘，清潔之。
4. 架設微電極陣列系統。
5. 在金電極表面修飾 5 $\mu\text{l/ml}$ 的 laminin。
6. 種植細胞於元件上，密度為 1.5E6 cells/ml。

步驟 5 和 6 將於後面的章節做詳細的介紹。

第三章 訊號處理

3.1 訊號處理簡介

因為細胞的電生理訊號非常微弱，在訊號傳遞的過程中，往往伴隨著很多雜訊在內，導致訊號無法被偵測出來，因此有必要將訊號做適當地處理，以利於訊號偵測。圖 3.1.1 是描述一般在進行細胞電生理紀錄時，訊號處理的流程圖。當訊號由微電極陣列系統（MEA）接收之後，會先將訊號放大，再進行濾波的動作；而不是先濾波再放大，這是因為先濾波的動作，容易將微小的訊號當作雜訊而被濾除，進而造成訊號流失。而放大的部分，會採取兩階段放大，而不是一次就將訊號放大到所需要的等級，若是採單一階段放大，那麼因為放大器的放大倍率是由所連接的電阻來決定的，當電阻愈大，能夠放大的倍率愈大；但必須要注意的是，連接的電阻愈大，產生的 thermal noise 愈嚴重；因此再放大的這一個步驟，會採兩階段放大，來達到需要的放大的倍率，以避免訊號失真。



圖 3.1.1、一般訊號處理之流程圖

訊號經過放大之後，接著送進濾波器做處理。因為細胞的電生理訊號是由某一特定頻寬的頻率所組成的，因此會將訊號交由帶通濾波器（Band-pass filter）來處理；首先將訊號送進高通濾波器（High-pass filter, HPF）將低頻的雜訊濾除，只允許高頻的訊號（高於此 HPF 截止頻率（cut-off frequency）的訊號）通過；接著訊號流經低通濾波器（Low-pass filter, LPF），作用恰與 HPF 相反，它只允許低頻的訊號（低於此 LPF 截止頻率的訊號）通過；如此便可讓特定頻寬的訊號通過，得到細胞的電生理訊號。

利用上述的概念，將微電極陣列系統 (MEA) 接收的訊號，利用鎖相放大器 (Lock-in amplifier) 進行放大和濾波後，在經由 DAQ 擷取訊號並送入 PC 端紀錄；圖 3.1.3 即為本篇論文中的訊號處理之流程示意圖。使用鎖相放大器的原因和其量測原理，將在後面的章節一併說明。



圖 3.1.2、訊號處理之流程示意圖

為了檢測圖 3.1.2 的訊號處理方式是否可以正常運作，在本篇論文中利用 LabVIEW 軟體模擬心肌細胞的跨膜電位（如圖 3.1.3）來進行檢測工作；圖 3.1.3 所示為一個典型的心肌細胞跨膜電位。圖 3.1.4 是利用 LabVIEW 撰寫心肌細胞跨膜電位的程式碼，首先將跨膜電位的波形輸出寫成 subVI，並建立輸入模擬訊號的路徑，如圖中虛線框部分；接著利用適當的圖形化語言設定模擬訊號的輸出通道 (ao0) 與輸出方式 (Continuous Samples) 即可。

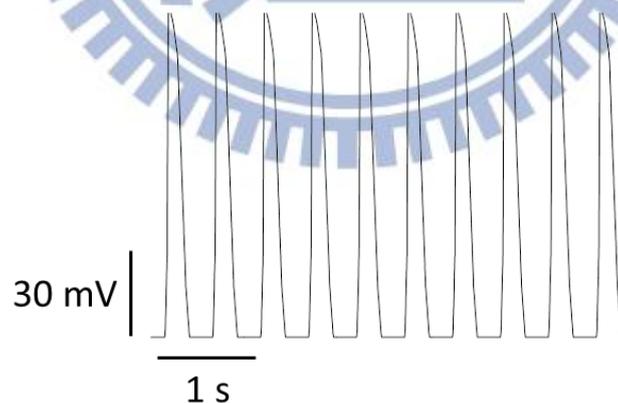


圖 3.1.3、LabVIEW 模擬心肌細胞跨膜電位之輸出波形

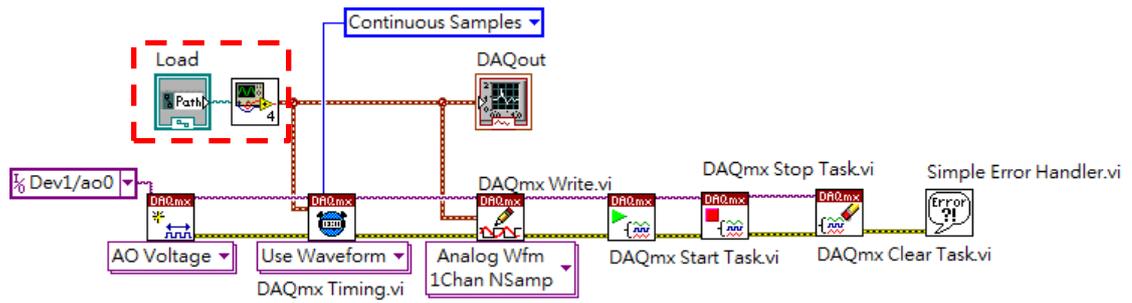


圖 3.1.4、LabVIEW 撰寫心肌細胞跨膜電位之程式碼

將模擬的跨膜電位，通過微電極陣列系統送進鎖相放大器進行訊號處理，並紀錄之。而根據公式 (3.2.2)，待測訊號 (V_{sig}) 基本上是不變的，在此假設為定值，而 V_{psd} 和 V_L 之間有正相關；也就是說，當增加參考訊號 (V_L) 的振幅大小，經由鎖相放大器運算後，能夠得到比較清晰的訊號。圖 3.1.5 (a) - (c) 表示給不同參考訊號 (V_L) 時，鎖相放大器所得到的電壓輸出。當待測訊號 (V_{sig}) 固定時，改變參考訊號的大小分別為 $1 V_{pp}$ 、 $2 V_{pp}$ 和 $3 V_{pp}$ ，實驗結果分別依序如圖 3.1.5 (a) - (c)；圖中黑色線表示由 DAQ 記錄到的初始波形，將此波形進一步平滑化後，以紅色線示於圖中；當參考訊號逐漸變大，輸出訊號不但有變大的趨勢，且解析出來的波形和原始的輸入訊號也較接近，訊雜比 (SNR) 較佳。

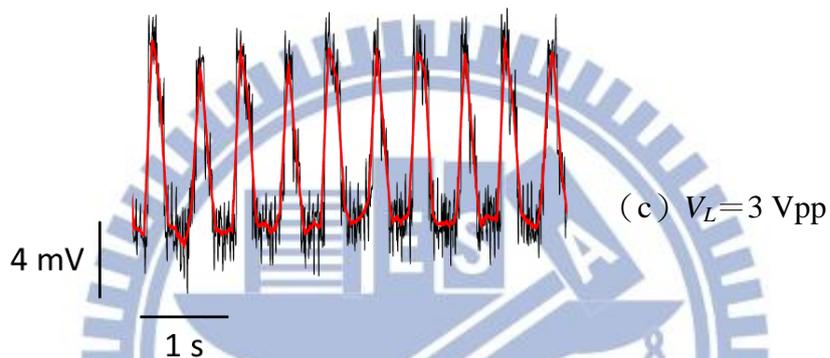
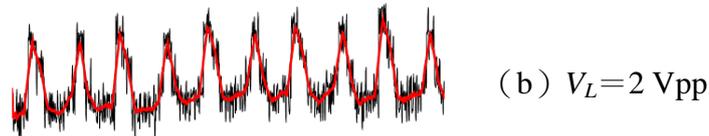
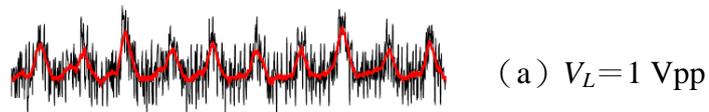


圖 3.1.5、 V_L 越大，輸出訊號越清晰

3.2 lock-in amplifier 量測原理

鎖相放大器 (Lock-in amplifier) 被使用來偵測和量測非常小的交流訊號 (約幾個 nV)，甚至當訊號被比它大數千倍的雜訊所掩蓋時，也可以做正確的量測。鎖相放大器是利用相位敏感偵測 (phase-sensitive detection, PSD) 的技術，在特定的參考頻率與相位下，鎖住欲量測的訊號成分。而在參考頻率以外的雜訊則會被濾掉，且不影響量測結果。因此，在許多研究領域上都可見其應用[27, 28]。

使用鎖相放大器時需要一組參考頻率 (可由鎖相放大器自己產生或由函數波形產生器 (function generator) 供給)。一般在量測時會固定參考頻率，而鎖相放大器從這一固定的參考頻率中，進行量測。如圖 3.2.1 (a) 中，參考的訊號為一個方波，頻率為 ω_r 。

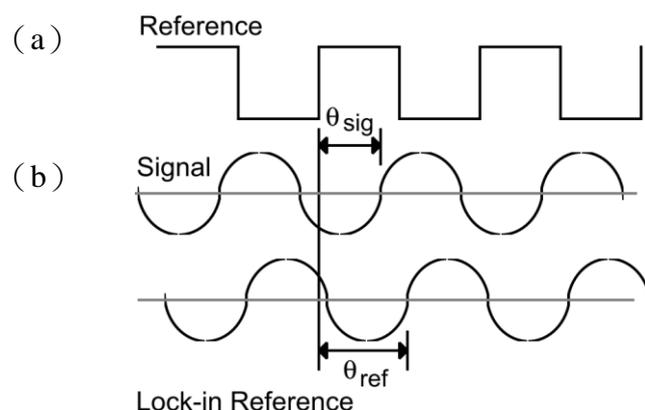


圖 3.2.1、鎖相放大器的參考頻率與待測訊號頻率之相位關係圖

現假設有一待測訊號 $V_{sig} \sin(\omega_r t + \theta_{sig})$ ，我們利用鎖相放大器本身產生一個正弦波 (sine wave) 的參考訊號 $V_L \sin(\omega_L t + \theta_{ref})$ ；將待測的訊號送入鎖相放大器經過放大後，再經由相位敏感偵測器或 multiplier 將待測訊號與參考訊號相乘，得到：

$$\begin{aligned}
 V_{psd} &= V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \theta_{sig}) \sin(\omega_L t + \theta_{ref}) \\
 &= 1/2 V_{sig} V_L \cos[(\omega_r - \omega_L)t + \theta_{sig} - \theta_{ref}] \\
 &\quad - 1/2 V_{sig} V_L \cos[(\omega_r + \omega_L)t + \theta_{sig} + \theta_{ref}] \dots \quad (3.2.1)
 \end{aligned}$$

兩個交流訊號，一個為 difference frequency component $(\omega_r - \omega_L)$ ，另一個為 sum frequency component $(\omega_r + \omega_L)$ 。若將輸出的訊號通過一個低通濾波器，則交流訊號的部分將會被全部濾除。但若 $\omega_r = \omega_L$ ，則 difference frequency component 會從交流訊號變成直流訊號，那麼經過濾波器之後將得到：

$$V_{psd} = 1/2 V_{sig} V_L \cos(\theta_{sig} - \theta_{ref}) \dots \quad (3.2.2)$$

這是一個非常好的訊號，與訊號振幅成比例。

在實際應用上，輸入鎖相放大器的訊號除了待測的訊號外，還額外夾雜了雜訊部分。只有當訊號的頻率與鎖相放大器的參考頻率非常相近時，才能夠被相位敏感偵測器與低通濾波器測到；而參考頻率以外的雜訊，經由相位敏感偵測器輸出後，再藉由低通濾波器衰減雜訊的部分。而與參考訊號頻率相近的雜訊，在通過相位敏感偵測器後，會產生非常小的交流訊號輸出，這些訊號的衰減程度決定於低通濾波器的頻寬 (bandwidth)；

當頻寬非常窄，雜訊衰減的效果非常好；反之則會讓雜訊通過相位敏感偵測器。

由前面的敘述可知，使用鎖相放大器進行量測時，需要一個與待測訊號頻率相同的參考訊號，而這兩者間的相位必須不隨時間變化，否則輸出的訊號會因為 $\cos(\theta_{sig} - \theta_{ref})$ 隨時間變化，而不為一個直流訊號。換句話說，參考訊號必須被待測訊號鎖相 (phase-locked)。鎖相放大器使用鎖相迴路 (phase-locked-loop, PLL) 來產生參考訊號，而此需要一個由外部提供的參考訊號。PLL 會使鎖相放大器中內含的內部參考震盪器 (internal reference oscillator) 與外來的參考訊號鎖相，並產生一個頻率為 ω_{ref} ，相位為 θ_{ref} 的參考訊號。由於 PLL 是動態追蹤外部參考訊號的頻率，因此當參考訊號隨時間變動時，鎖相放大器的輸出結果仍不受影響。



第四章 細胞培養

4.1 材料的生物相容性

為了建構一個適合細胞生長的空間，首先必須要考慮的是所選用的材料，是否具有生物相容性 (biocompatibility)。所謂的生物相容性是指某種物質或材料在體內或體外的環境下，能夠讓生命單位接受或容納的能力。而在本篇論文中，會與細胞直接接觸的材料有金、二氧化矽和 SU 8，其中又會在平坦的金電極上再成長樹枝狀的結構，因此分別對這些材料進行生物相容性的測試；測試的方式是利用心肌細胞，對四種材料進行細胞培養，看細胞是否能夠貼附在材料上並具有細胞活性，結果如圖 4.1.1，(a) 為平坦的金、(b) 是有成長樹枝狀結構的金、(c) 為二氧化矽、(d) 為 SU 8；測試結果顯示這四種材料對心肌細胞而言，都具有良好的生物相容性。

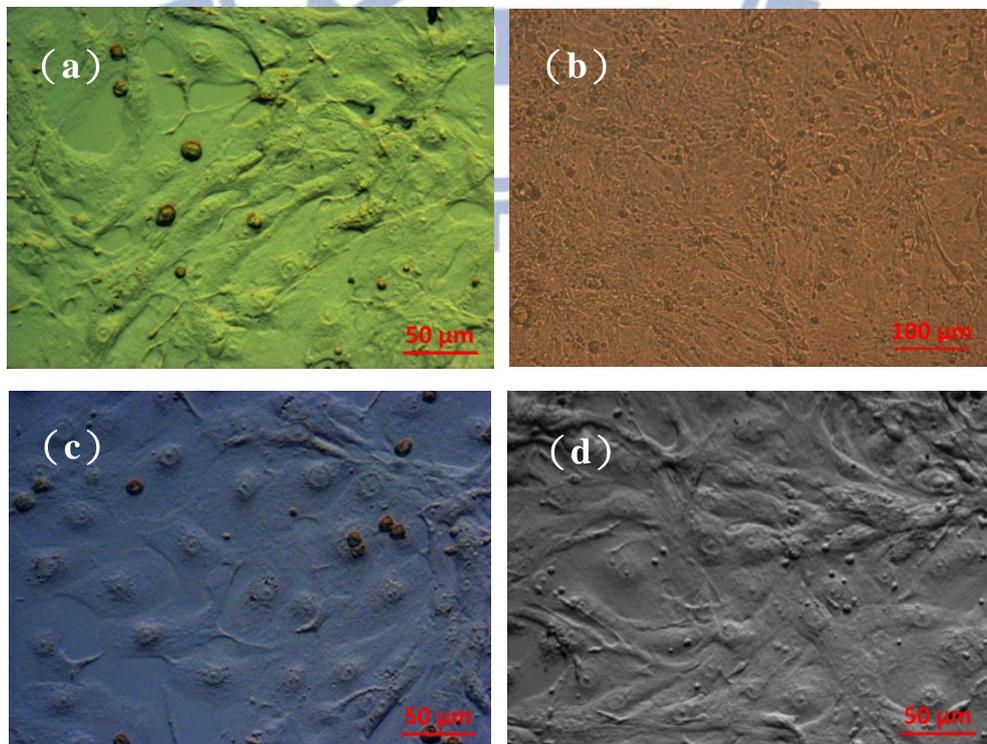


圖 4.1.1、各種材料的生物相容性

4.2 細胞貼附對量測的影響

當細胞貼附時，細胞與基板表面仍有間隙存在[4]，如圖 4.2.1：在 focal contact 的部分，間距約 1-15 nm，而細胞膜的其他部分與基板的間距之多可達 100 nm。細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 是一種透明黏稠狀的物質，充斥在細胞與各種纖維之間，含有層黏連蛋白 (laminin) 及纖維連接蛋白 (fibronectin) 等兩種特殊的醣蛋白；其中 laminin 有將細胞與細胞或細胞與基底膜綁在一起的功能，與細胞的固定有關；因此，在本論文研究中，將用 laminin 來修飾金屬電極表面，增加細胞的貼附性；如果細胞的貼附性不好，會產生電流分流路徑，使得訊號強度衰減。

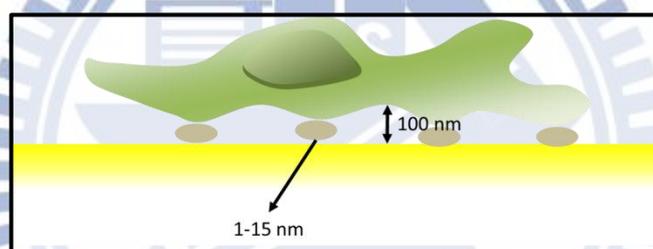


圖 4.2.1、細胞貼附於基板上之示意圖

在細胞與基板表面之間的空隙一般是由溶液所佔滿的，在等效電路上是利用一個電阻 R_{seal} (seal resistance) 來解釋其所造成的現象[9]。所有貼附在電極表面的細胞膜，其所產生的膜電流都會流經 R_{seal} 才到達電極表面，因此訊號會有某種程度上的衰減；而 Breckenridge 在 1995 年經由實驗證實[24]，所得訊號大小與 R_{seal} 呈一線性關係，如圖 1.2.9。當 R_{seal} 愈大，所得之訊號愈接近跨膜電位的大小；反之，所得訊號為跨膜電位的一次導數或二次導數。

4.3 修飾 laminin 於金電極表面

根據章節 4.2 所描述的，為了增加細胞與電極之間的貼附性，在本篇論文中將利用 laminin[29-31]修飾於金電極表面，來提升細胞的貼附性[31, 32]。首先以帶有 11 個碳鏈的 MUA(11-mercaptoundecanoic acid)和帶有 3 個碳鏈的 MPA(3-mercaptopropionic acid) 硫醇分子以 1:9 的比例混合[33-35]之後，將金電極在避光的環境下浸泡於此混合溶液中 24 小時，使金電極表面和硫醇分子之間能以金硫鍵的共價鍵方式產生鍵結；接著利用 150 mM EDC (ethyl-dimethylaminopropyl carbodiimide) 和 30 mM NHS (N-Hydroxysuccinimide) 的混合溶液，活化 MUA 和 MPA 上的羧基(carboxyl group, -COOH)，時間約 15 至 20 分鐘；待活化的步驟完成後，即可加入 laminin 使兩者以胜肽鏈鍵結。[36]

在修飾硫醇分子的步驟中，之所以將短碳鏈 (MPA) 和長碳鏈 (MUA) 的硫醇分子混合，是為了增加表面的立體障礙，使下一步修飾的 laminin 更能夠有效地與硫醇分子鍵結。為驗證硫醇分子確實有和金電極產生鍵結，在本篇論文中，利用循環伏安法 (Cyclic Voltammetry) 分別對修飾前後的金電極做量測；當金電極表面沒有修飾硫醇分子時，在金的氧化和還原峰上，會有明顯的峰值出現；而當金電極表面修飾有硫醇分子時，因為此硫醇分子不導電，所以對金電極掃電壓時，其表面幾乎沒有電流 (即：沒有氧化和還原的峰值)，如圖 4.3.1。

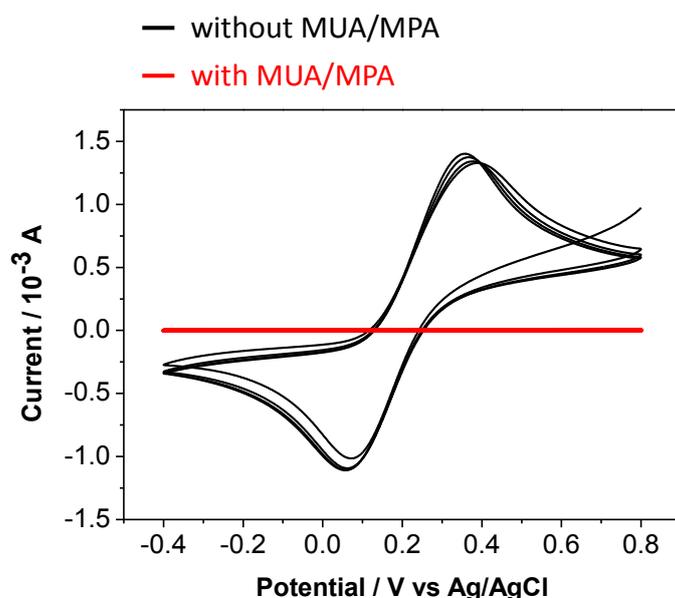


圖 4.3.1、修飾硫醇分子前後之電流變化

確定上述的修飾條件可行之後，接著活化硫醇分子另一端帶有羧基的部分，然後修飾濃度為 $5 \mu\text{l/ml}$ 的 laminin 至少 1 小時，待完成整個修飾過程後，便可將微電極陣列系統儲存備用。

在本篇論文中，是利用 HCS CellMask™ Stains 對心肌細胞的細胞質進行螢光染色後，觀察細胞貼附的型態；螢光染色步驟如下：

1. 去除培養液，加入 4 % 的 paraformaldehyde 後，置於常溫 15 分鐘。
2. 去除 paraformaldehyde，並以 PBS 沖洗 2-3 次。
3. 加入 0.1 % 的 Triton® X-100，同樣置於常溫 15 分鐘。
4. 去除 Triton® X-100，並以 PBS 沖洗 2-3 次。
5. 加入適量的 HCS CellMask™ Staining solution，置於常溫 30 分鐘。
6. 以 PBS 沖洗 2-3 次。

接著利用螢光顯微鏡觀察，並藉由 ImageJ 軟體，計算細胞的貼附面積。圖 4.3.2 分別是有修飾 laminin 和沒有修飾 laminin 的金電極，實際培養細胞後，細胞貼附面積的差異；可以看出表面佈有 laminin 的金電極，其細胞貼附的面積較大，為 $2767 \pm 1107 \mu\text{m}^2$ ，而沒有修飾 laminin 的金電極，其細胞貼附的面積為 $1880 \pm 708 \mu\text{m}^2$ 。

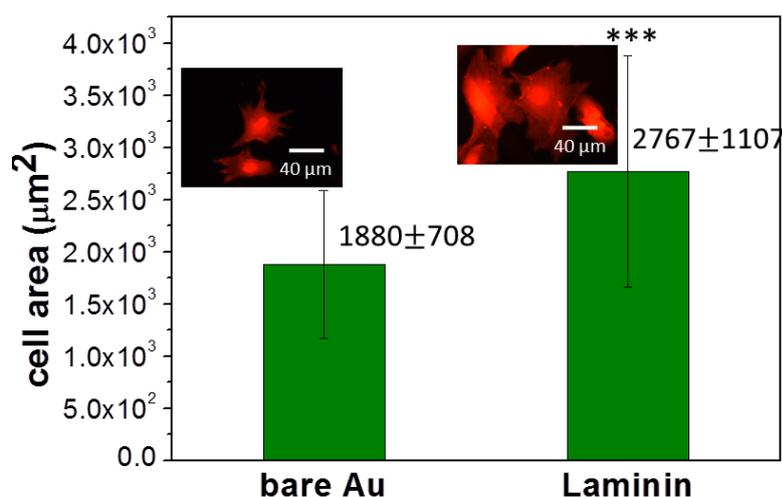


圖 4.3.2、修飾 laminin 前後之細胞貼附面積的變化 (***)：P < 0.001)

4.4 心肌細胞培養

在本篇論文中是採用已受精的雞蛋，經過 12 天的孵化過程，待雞胚胎發育出具有功能性的心臟組織；將心臟取出後接著萃取、純化得到心室肌的心肌細胞；利用計數盤算出細胞密度，在每個元件上都種植相同密度 (1.5E6 cells/ml) 的細胞數，待細胞貼附後，經過四至五天的培養，心肌細胞開始會有自發性跳動的行為，表示有動作電位產生，使得心肌細胞具有收縮的能力，此時即可進行細胞膜外電位的電性量測。另外，培養心肌細胞的環境必須在 37 °C、5% CO₂ 的濕式培養箱中，如此才能保有心肌細胞自發性跳動的行為。

心肌細胞培養步驟如下 (全程在無菌操作台中操作)：

1. 再進行 primary culture 之前，先將配好的 HBSS、TS 和 TSS 溶液置於 37 °C 的恆溫水浴槽進行回溫備用。
2. 利用刀具將蛋殼從鈍端敲破，將雞胚胎置於 100 mm 培養皿中，以剪刀及鑷子取出心臟置於裝有 HBSS 的培養皿，移除周邊黏膜和血管後，接著去除心房留下心室，並將心臟組織切成約 1 mm 的大小 (有助於萃取細胞)；如圖 4.4.1。

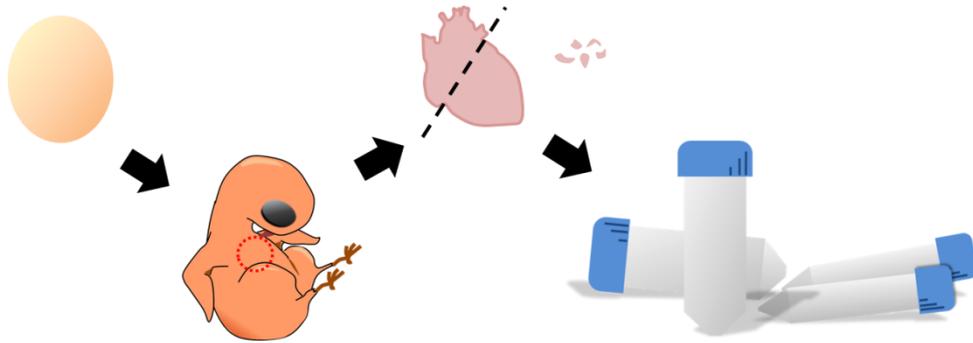


圖 4.4.1、心肌細胞萃取流程圖

3. 將切好的組織置入 50 ml 的離心管中，並加入適量的 HBSS 來回沖洗以去除不必要的血球等部分。
4. 加入 10 ml TS，置於 38°C 恆溫水浴槽（可增加酵素活性）加熱 8 分鐘；在加熱的同時還要一邊搖晃，使細胞能夠充分地釋出。
5. 去除上層懸浮液，重複步驟 4。
6. 取出上層懸浮液，移至含有 15 ml TSS 的 50 ml 離心管中，以 4 °C、1200 rpm、5 min 的條件離心 5 分鐘。離心完成後，移除上清液，加入 5 ml TSS，再離心一次。
7. 重複步驟 4 與步驟 6 各三次；將 CM 回溫備用。
8. 完成最後一次離心步驟之後，再加入 5 ml TSS，並以 70 μ m strainer 過濾後再一次離心。
9. 離心完成後，去除上清液，加入 10 ml 的培養液（medium）回溶，置於 100 mm 培養皿中，放入培養箱 45 分鐘；此動作稱為”前置盤（preplating）”，這是因為在此細胞懸浮液中，除了含有心肌細胞之外，還有纖維母細胞，而纖維母細胞在放進培養箱約 20 分鐘後，會很快地附著在培養皿上，而心肌細胞尚保持懸浮的狀態，故此動作能有效地將所要的心肌細胞分離出來。
10. 經過 45 分鐘之後，取出細胞懸浮液置於離心管中離心。
11. 去除上清液，根據所需要的種盤密度，加入適量的培養液，將細胞養在預先清洗好的元件上。
12. 經 12~18 小時後，更換新的培養液；之後每 2~3 天更換一次即可。

4.5 細胞對電極之貼附性

在前面章節 1.2.4 和章節 4.2 的敘述裡，都有提到細胞貼附於電極的緊密程度會影響量測出來的訊號表現，因此在本篇論文中藉由 ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing) 的技術來監測細胞貼附與否。當有細胞覆蓋於電極上方的情況下，施加一交流訊號於電極時，訊號會流過細胞與電極之間、細胞與細胞之間或是直接穿越細胞，如圖 4.5.1 所示；而在電極表面因為有細胞貼附，限制了訊號流動造成阻抗變化，而阻抗的變化則會受到細胞的覆蓋率、細胞間的緊密程度、細胞與電極之間的空間大小等因素影響 [37, 38]。

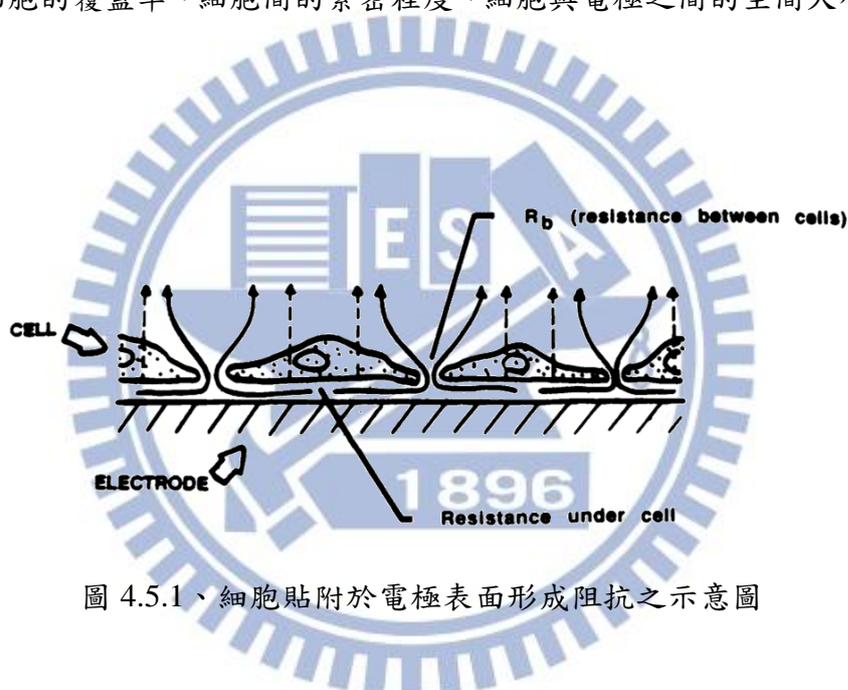


圖 4.5.1、細胞貼附於電極表面形成阻抗之示意圖

因為細胞膜具有電容的特性，因此細胞對不同頻率的電流會呈現出不同的阻抗值，當低頻訊號流入細胞時，細胞膜會呈現高阻抗的狀態，因此電流只會流經細胞表面，而不會穿透到細胞內部；當高頻訊號流入時，細胞膜會呈現短路的現象，使得電流可以輕易地通過細胞內部。而根據 Giaever 和 C.R. Keese 等人的研究，當有細胞貼附時，在正規化之阻抗值-頻率圖中會出現一個峰值；因此可藉由量測阻抗的變化來得知細胞貼附與否。在本篇論文中分別對於不同尺寸的電極（直徑為 20、40、60、80 和 100 μm ），將細胞貼附前後的阻抗值利用 (4.5.1) 式做正規化 (normalize)

$$\text{NIC} = \frac{|Z_{\text{cell}} - Z_{\text{blank}}|}{Z_{\text{blank}}} \times 100 \% \dots (4.5.1)$$

Z_{cell} 為有細胞貼附的電極阻抗值， Z_{blank} 則是沒有細胞貼附的電極阻抗值；將正規化後的結果與頻率做圖，如圖 4.5.2 所示；在正規化之阻抗值-頻率圖中可以明顯看出在 1 kHz 到 100 kHz 的頻率範圍內，細胞貼附前後之阻抗有顯著的變化；而沒有細胞貼附的電極其阻抗變化幾乎不變。因此可以確定細胞是有貼附在電極上方的。

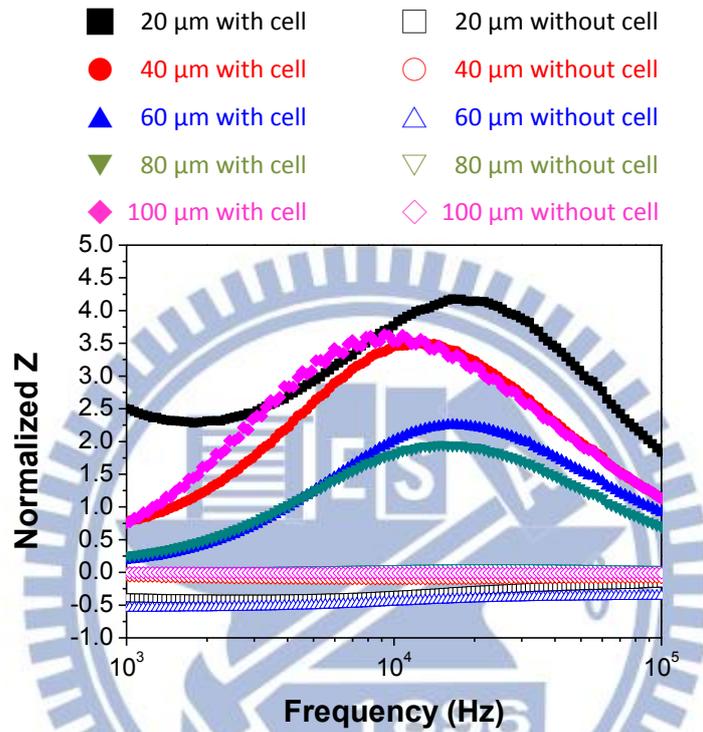


圖 4.5.2、不同直徑之工作電極其正規化之阻抗值-頻率圖

圖 4.5.3 是利用 SEM 觀察細胞貼附於電極的實際情形，(a) 至 (e) 分別為直徑 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形工作電極在有細胞貼附的情況下，將之乾燥固定化後，以 SEM 觀察的圖，可以看到細胞完全覆蓋住電極表面；將尺度微縮，如圖 4.5.3 的 (f) 圖，可以看到細胞沿著樹枝狀結構貼附的情形。

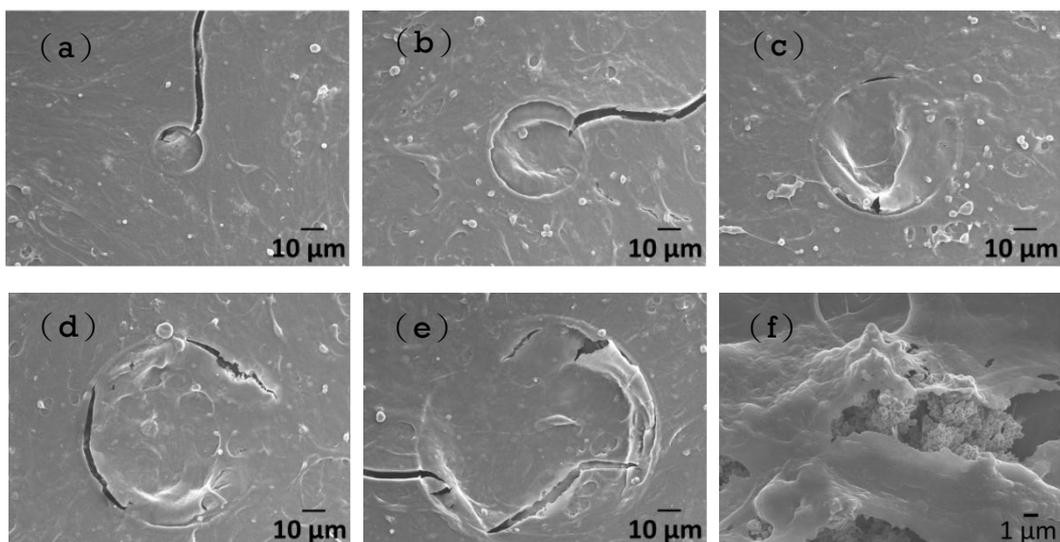


圖 4.5.3、細胞貼附於電極表面之 SEM 圖



第五章 實驗結果與討論

5.1 電極阻抗量測

5.1.1 降低電極阻抗之因素

■ Thermal noise

根據電阻 (resistance, R) 的定義，如 (5.1.1) 式電阻和電極面積 (A) 成反比，和電極材料的電阻率 (electrical resistivity, ρ) 及電極長度 (l) 成正比；而電阻抗也有類似的關係。

$$R = \rho \frac{l}{A} \dots (5.1.1)$$

電極阻抗和雜訊之間的關係如 (5.1.2) 式， k 為波茲曼常數 (1.38×10^{-23} J/K)， T 為絕對溫度， R 是電極阻抗的實部， Δf 為頻寬。因此，由上述可知，當電極的面積越大，電極阻抗越小，所造成的 thermal noise 也越小；圖 5.1.1 為阻抗和雜訊的關係圖。

$$V_{rms\ noise} = \sqrt{4kTR\Delta f} \dots (5.1.2)$$

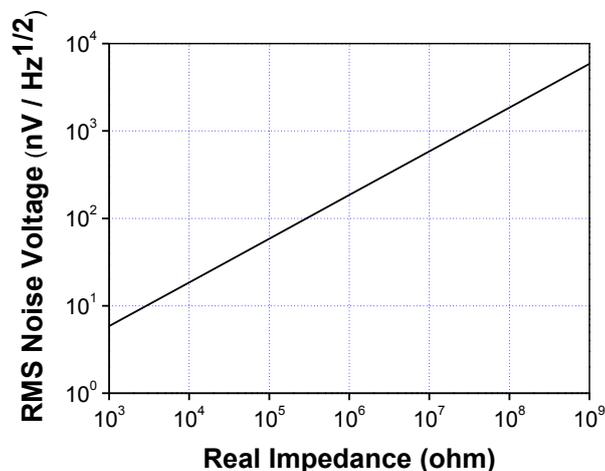


圖 5.1.1、電極阻抗之實部與雜訊的關係圖

■ 阻抗匹配

此外，訊號經由電極傳遞到放大電路的過程，也會有訊號衰減的情況。因為在放大電路或儀器內，會有一輸入阻抗(Z_a)，如圖 5.1.2；而根據分壓定理，若 Z_a 和 $Z_{\text{electrode}}$ （圖中虛線框的部分）的差異不大，則訊號衰減嚴重；而若 Z_a 趨近於無限大， $Z_{\text{electrode}}$ 無限小，則在此理想情況下訊號沒有衰減的現象。但實際的情況並不會趨於理想，因此，必須盡可能地減少 $Z_{\text{electrode}}$ ，避免量測訊號流失太多。

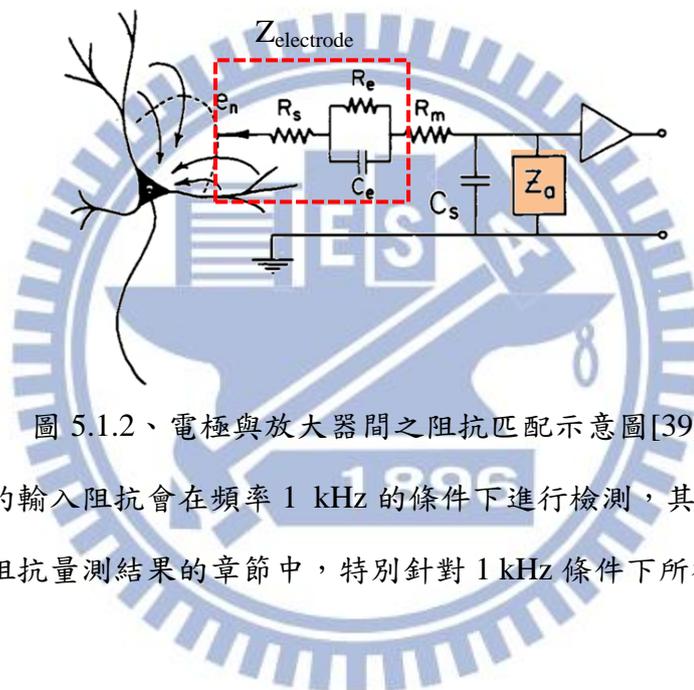


圖 5.1.2、電極與放大器間之阻抗匹配示意圖[39]

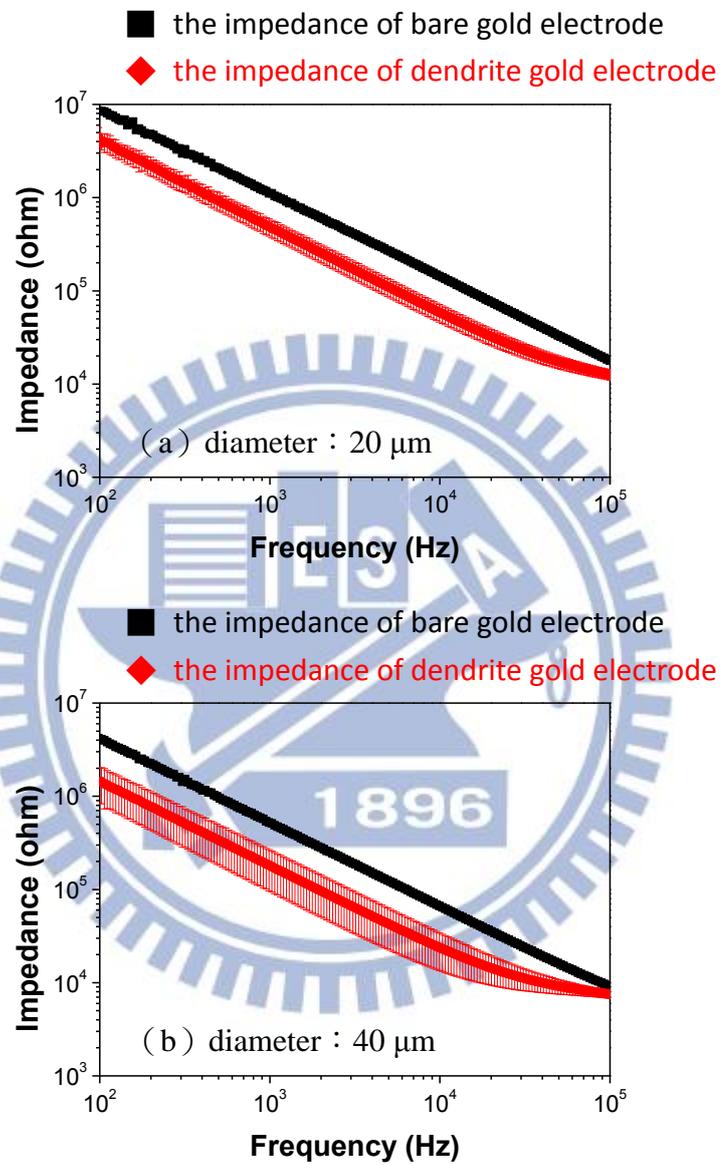
一般放大器的輸入阻抗會在頻率 1 kHz 的條件下進行檢測，其值皆大於 10 M Ω ，因此在後續討論阻抗量測結果的章節中，特別針對 1 kHz 條件下所得之阻抗進行討論。

5.1.2 實驗結果與討論

■ 阻抗量測結果

圖 5.1.3 是實際量測電極阻抗的結果，由 (a) 至 (e) 分別是直徑 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形電極之量測結果，從圖中可以看到頻率範圍在 100 Hz 到 100 kHz 的阻抗變化，黑色是表面沒有成長樹枝狀結構的金電極，紅色則是成長樹枝狀結構以後的金電極阻抗值；可以明顯看出隨著電極幾何面積 (geometric area, A_G) 變大，量測所得之

電阻抗越小；而在表面成長樹枝狀結構的金電極，雖然電極的幾何面積沒有增加，但藉由成長樹枝狀結構增加了表面積 (surface area, A_s) 的大小，因此電極阻抗有明顯的下降趨勢。



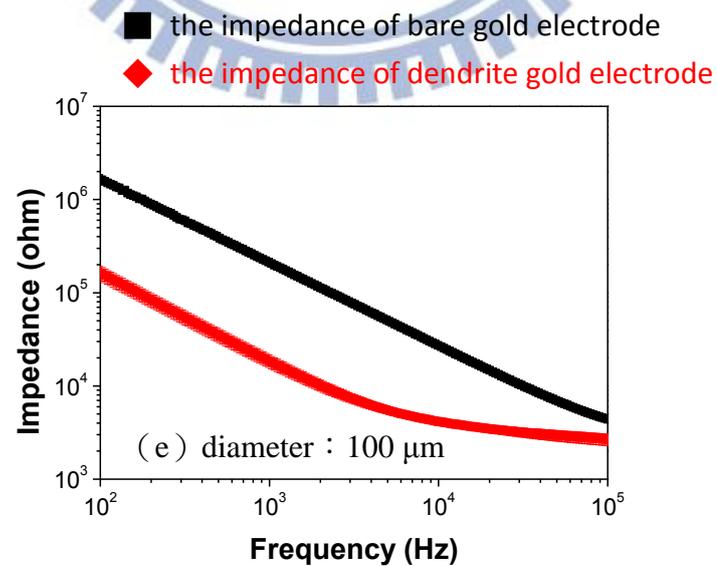
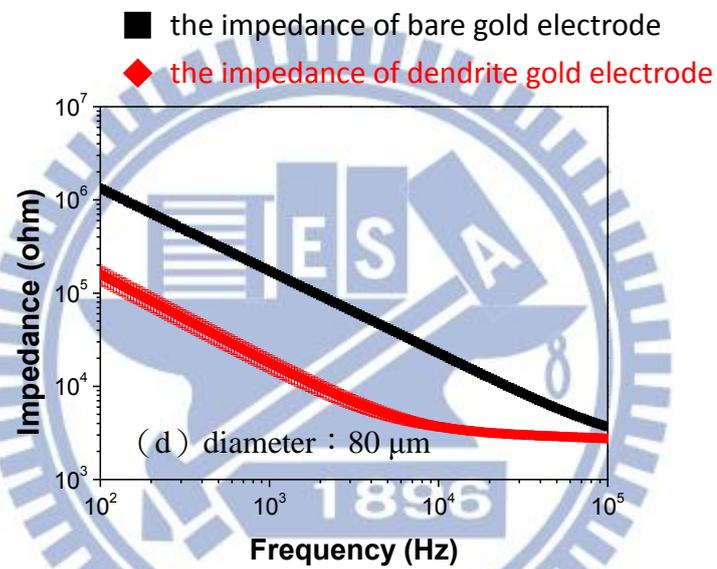
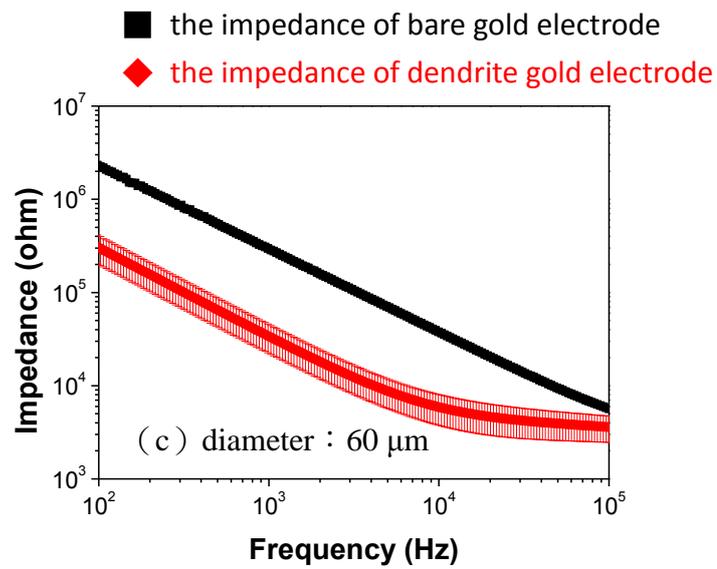


圖 5.1.3、電極阻抗與頻率之關係圖

根據章節 5.1.1 的介紹，將五種不同直徑大小的電極，在頻率 15 kHz 時的阻抗變化，整理於表 5.1.1。尚未成長樹枝狀結構之前的電極阻抗，由直徑 20 μm 到 100 μm 依序為 97.0 ± 3.7 、 45.2 ± 0.3 、 25.9 ± 1.2 、 15.6 ± 0.3 和 18.6 ± 1.2 k Ω ；成長樹枝狀結構之後，由於表面積增加了，故阻抗都有下降的趨勢，依序為 40.3 ± 8.3 、 17.2 ± 6.7 、 5.0 ± 1.8 、 3.3 ± 0.3 和 3.7 ± 0.3 k Ω 。利用 (5.1.1) 計算出阻抗的下降百分比，列於表 5.1.1。

$$\text{Impedance reduction} = \frac{Z_{\text{Bare}} - Z_{\text{Dendrite}}}{Z_{\text{Bare}}} \times 100 \% \dots (5.1.1)$$

從表 5.1.1 的實驗結果中，以直徑 60、80 和 100 μm 的工作電極，其阻抗下降的幅度最明顯，分別為 80.68%、78.72% 和 80.16%。

表 5.1.1、在頻率為 15 kHz 時，各個電極之電阻抗變化

Electrode diameter (μm)	Impedance (k Ω)		Impedance reduction (%)
	Bare Au	Dendrite	
20	97.0 ± 3.7	40.3 ± 8.3	58.41
40	45.2 ± 0.3	17.2 ± 6.7	61.92
60	25.9 ± 1.2	5.0 ± 1.8	80.68
80	15.6 ± 0.3	3.3 ± 0.3	78.72
100	18.6 ± 1.2	3.7 ± 0.3	80.16

而電極阻抗主要由電阻和電容所構成，其關係如下：

$$R = Z \cos \theta \dots (5.1.3)$$

$$\frac{1}{C} = (2\pi f)Z \sin \theta \dots (5.1.4)$$

利用複數平面可表示成圖 5.1.4，橫軸為阻抗的實部 ($\text{Re}(Z)$)，用來表示電阻；縱軸為阻抗的虛部 ($\text{Im}(Z)$)，用來表示電容。當相位角 (θ) 由 -90° 往 0° 變化，表示電極阻抗 (Z) 逐漸由電阻來主導。圖 5.1.5 是量測五種不同電極大小在 100 Hz 至 100 kHz

之頻率範圍的相位變化圖，由 (a) 至 (e) 依序為直徑 20 μm 到 100 μm 的金電極；當金電極成長樹枝狀結構後，在頻率大於 1 kHz 的部分，電阻對阻抗的影響逐漸增加，電容則相反；同樣的效應，在圖 5.1.3 的紅色曲線也可看出。而沒有樹枝狀結構的金電極則是在頻率大於 10 kHz 以後，才觀察到類似的現象；但圖 5.1.3 的黑色曲線，並沒有顯著的變化。

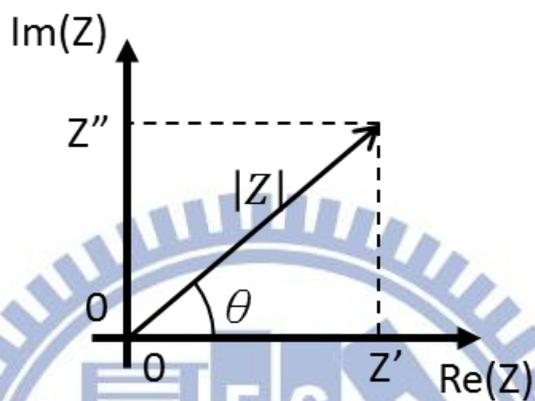
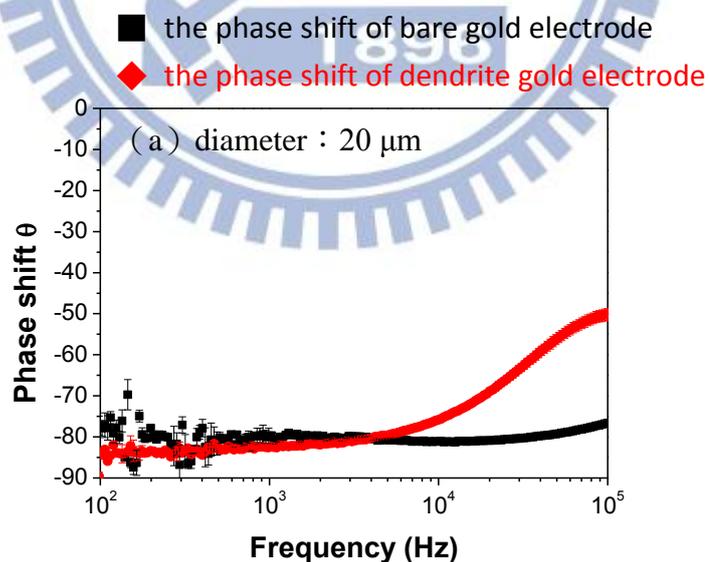
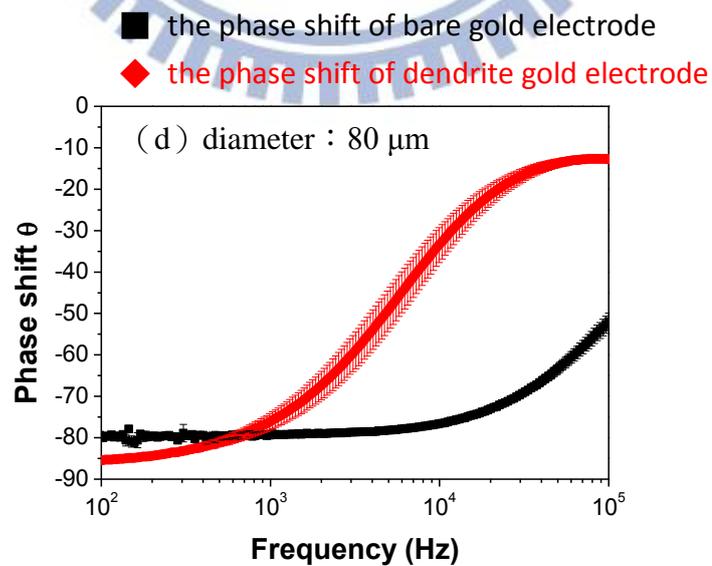
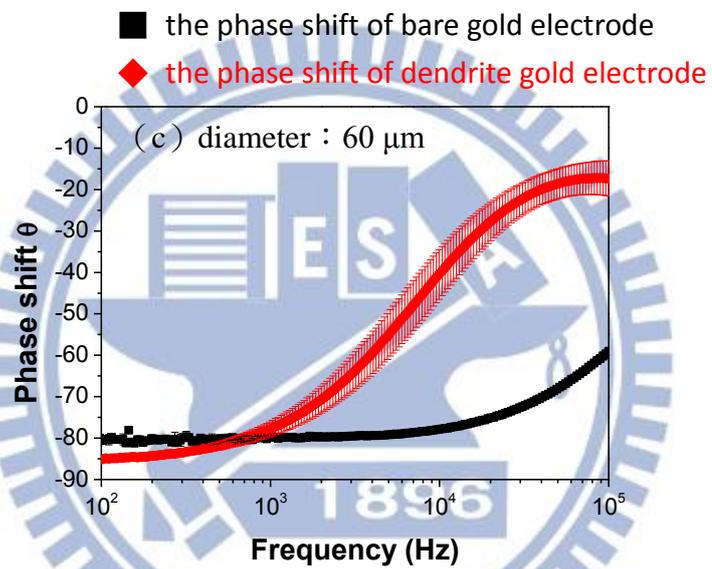
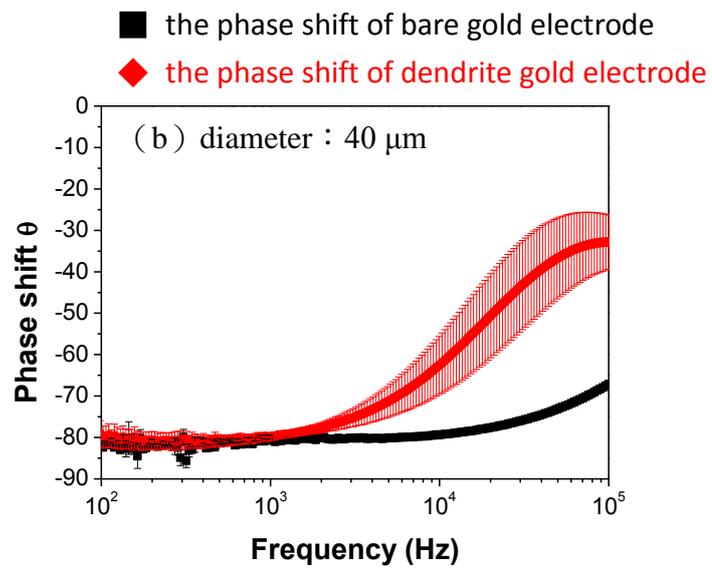


圖 5.1.4、以複數平面表示阻抗與相位角之關係





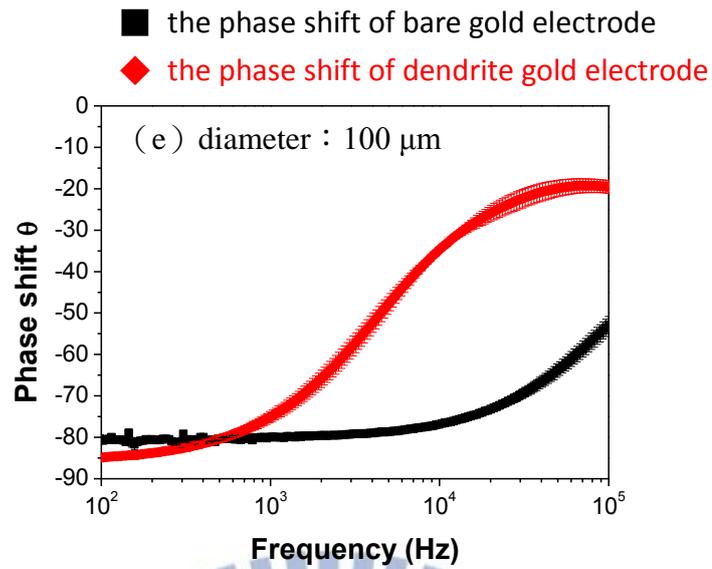


圖 5.1.5、各個電極之電容量測結果

■ 電極阻抗擬合

根據圖 5.1.6 的等校電路，將阻抗量測(量測條件為 50 mV, 100 Hz-100 kHz)結果，利用 ZView 軟體進行擬合；擬合參數整理於表 5.1.2，擬合結果示於圖 5.1.7，由 (a) 至 (e) 依序分別為直徑 20、40、60、80 和 100 μm 圓形電極進行擬合之結果；比較實際量測的結果和擬合出來的阻抗圖譜，可以看到誤差值不大，各項參數的誤差值不超過 7 %。

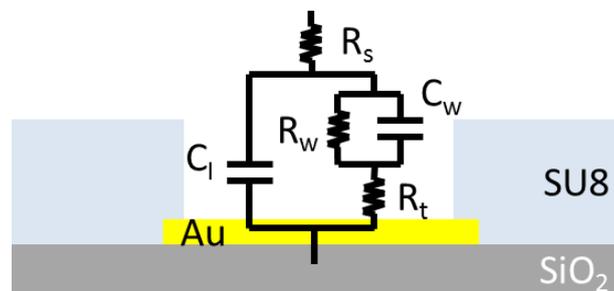
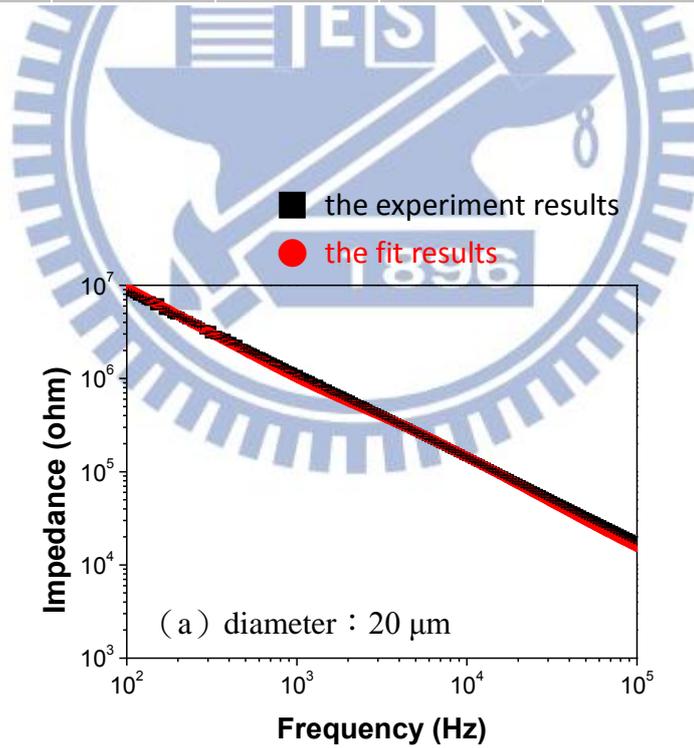
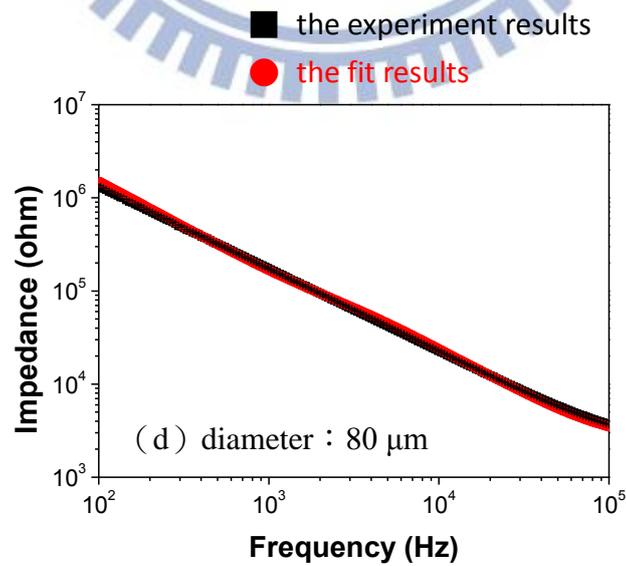
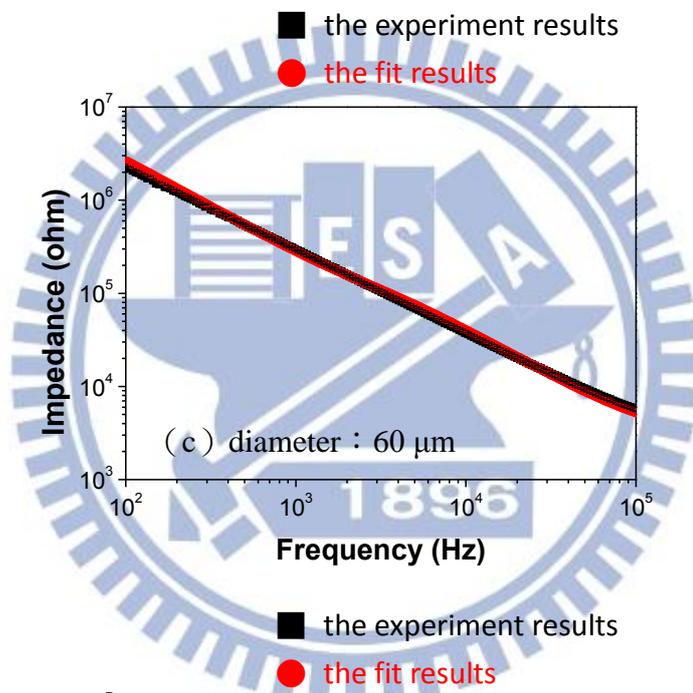
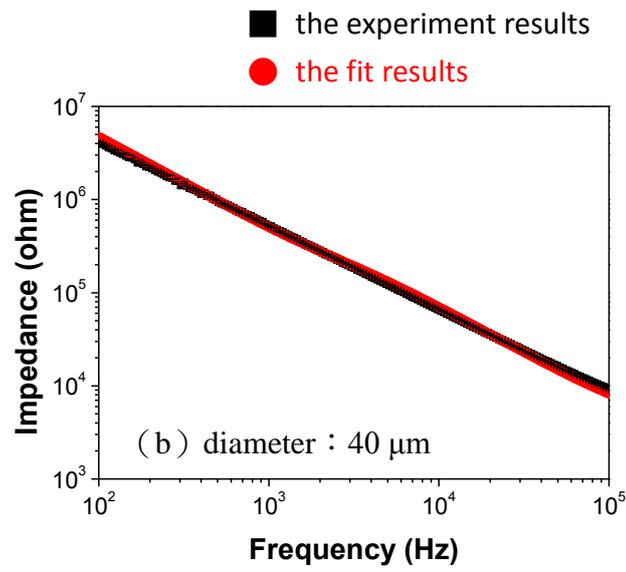


圖 5.1.6、等校電路示意圖

表 5.1.2、阻抗擬合參數

Parameters	Electrode diameter (μm)				
	20	40	60	80	100
C_I (F)	1.084E-10	2.230E-10	3.878E-10	6.618E-10	5.336E-10
R_t (Ω)	1.3244E6	6.7026E6	3.4930E6	2.3161E6	2.5094E6
R_w (Ω)	4.6775E7	2.5227E7	1.3489E7	6.2274E6	8.6695E6
C_w (F)	6.025E-11	1.136E-10	2.123E-10	3.908E-10	2.973E-10
R_s (Ω)	5026	4008	3245	2502	2849





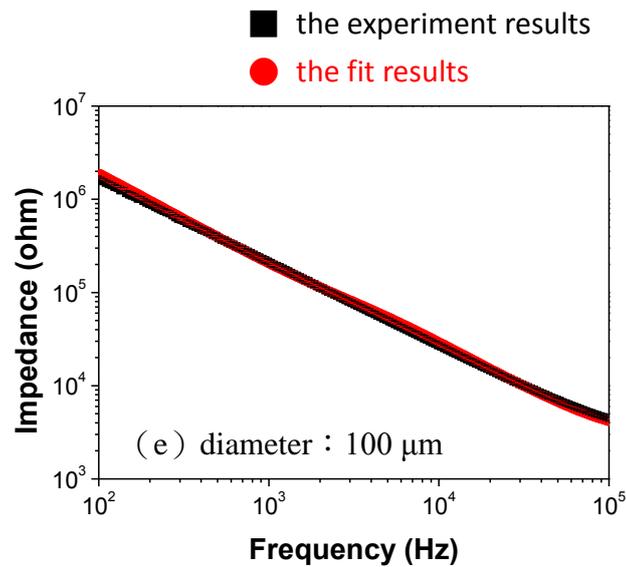


圖 5.1.7、阻抗擬合結果

5.2 細胞電生理訊號量測

5.2.1 訊號量測與分析

圖 5.2.1 是結合微電極陣列系統、訊號處理和資料擷取程式的量測平台示意圖；由鎖相放大器（Lock-in amplifier）輸出一個頻率 15 kHz、振幅 30 mVpp 的交流電訊號到金電極，與細胞的電生理訊號混合之後，再送回鎖相放大器將訊號進行濾波放大的動作，接著由 NI-DAQ 擷取（取樣頻率為 50 kHz）量測訊號，最後由 PC 端接收。圖 5.2.2 是利用 LabVIEW 撰寫資料擷取的程式碼。

圖 5.2.3 分別是(a)有細胞貼附（cell）與(b)沒有細胞貼附（blank）之電性量測結果，有細胞貼附的量測結果顯示出明顯的規律性變化。因此對於有細胞貼附的量測結果，再利用軟體做進一步的處理與分析，流程如表 5.2.1 所示；將原始資料每 1000 點取一次平均做平滑化（smoothing），使得量測訊號更加明顯可見；接著利用快速傅立葉轉換（Fast Fourier Transform, FFT）將時域的資料進行頻譜分析。由於一個波形的傅立葉轉換是指把這個波形分解成許多不同頻率的正弦波之和；如果這些正弦波加起來能夠成為原來的

波形，即確定了這個波形的傅立葉轉換。傅立葉轉換出來的圖形可顯示出每一個被確定的正弦波其振幅和頻率，故可將傅立葉轉換看成時間函數在頻率上的表示。

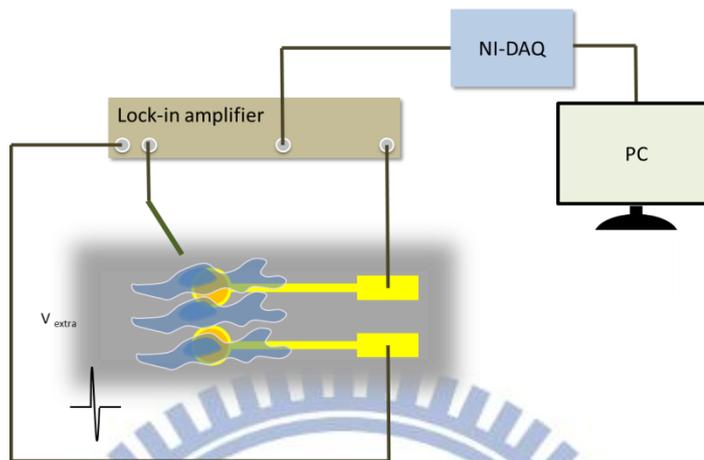


圖 5.2.1、量測平台示意圖

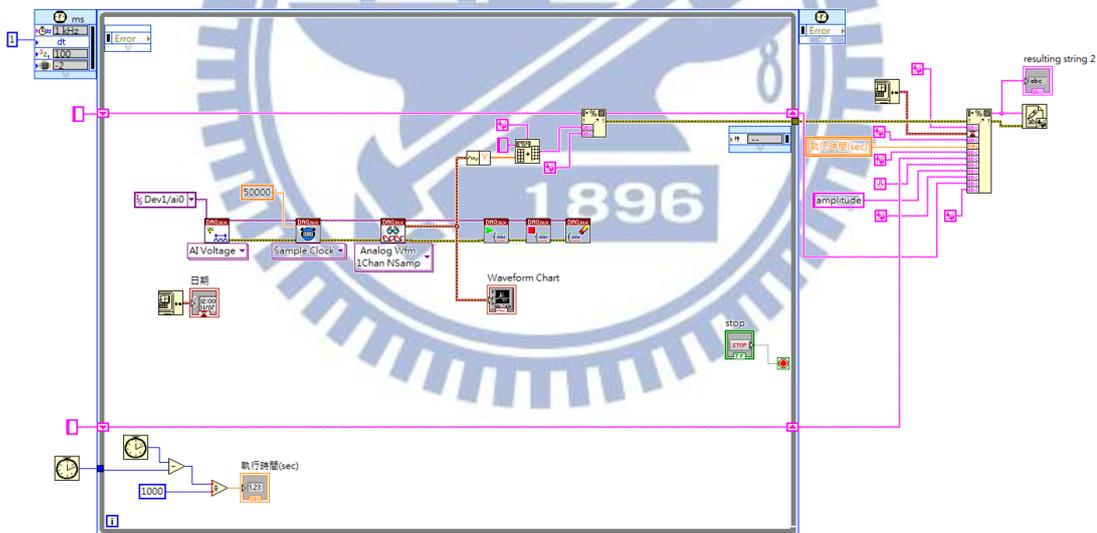


圖 5.2.2、LabVIEW 程式碼

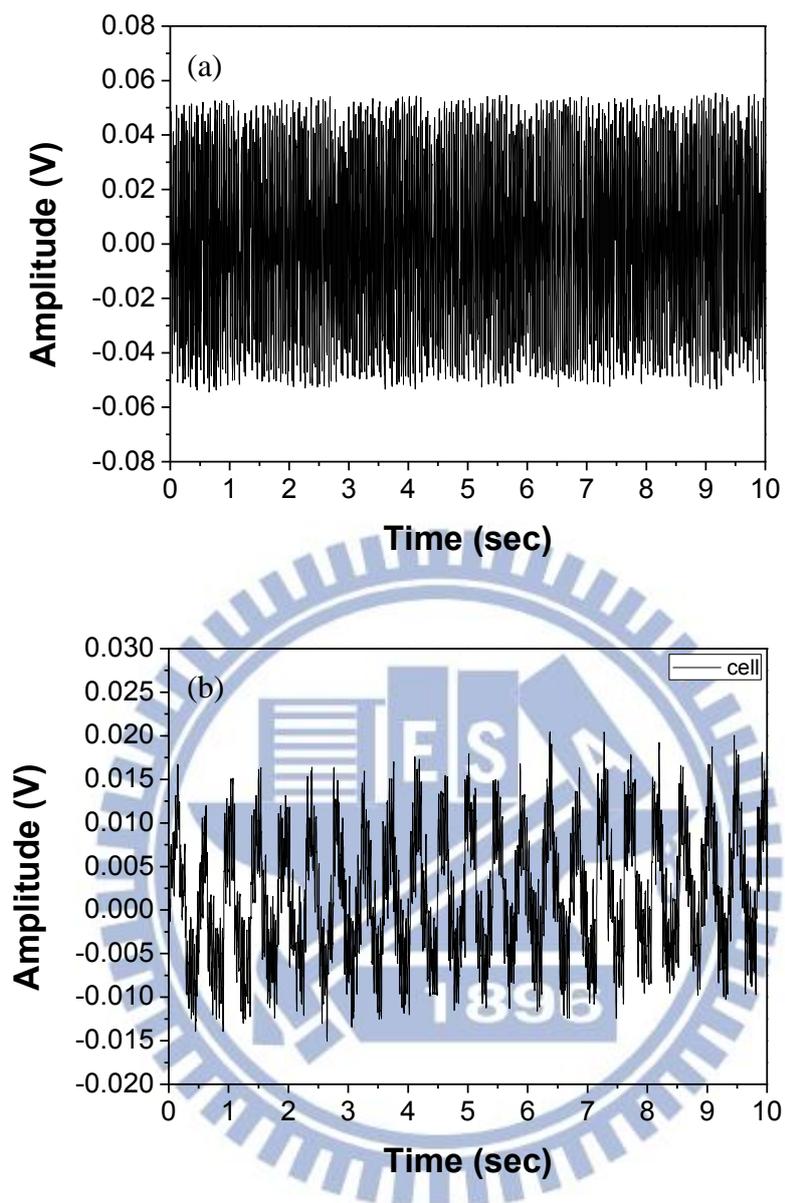
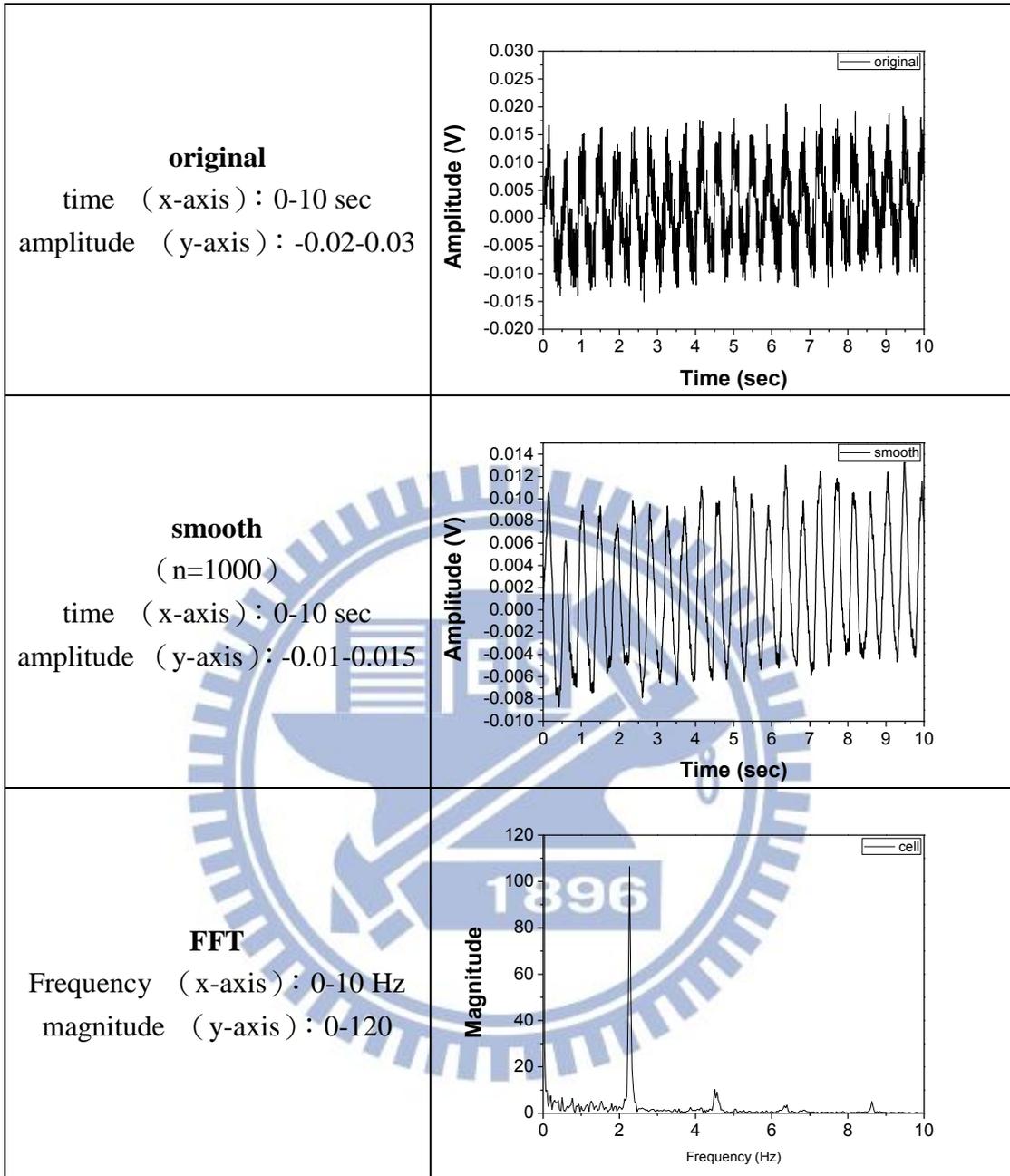


圖 5.2.3、有細胞貼附與無細胞貼附之電性量測結果

表 5.2.1、訊號處理流程圖



將沒有細胞貼附的電性量測結果，同樣依照表 5.2.1 的流程進行訊號處理，結果如圖 5.2.4 所示；(a) 為沒有細胞貼附時所量測到的原始訊號，(b) 是將此原始訊號經過平滑化後的結果，(c) 為此原始訊號快速傅立葉轉換之結果，峰值最明顯的位置在頻率 20 Hz -40 Hz 之間，其次為 70 Hz -90 Hz 之間，而在頻率 0 Hz- 10 Hz 的範圍內，並沒有特別顯著的峰值被解析出來。

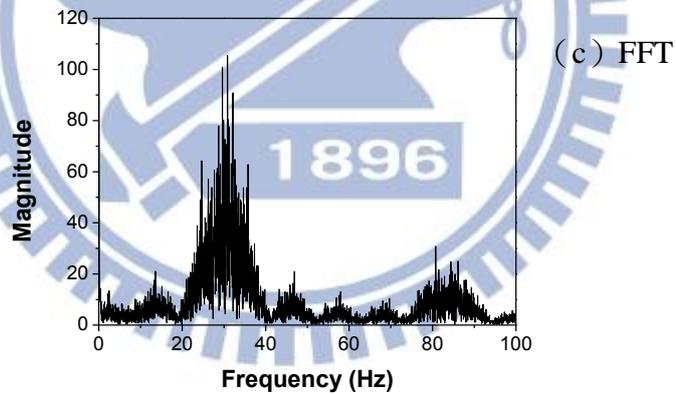
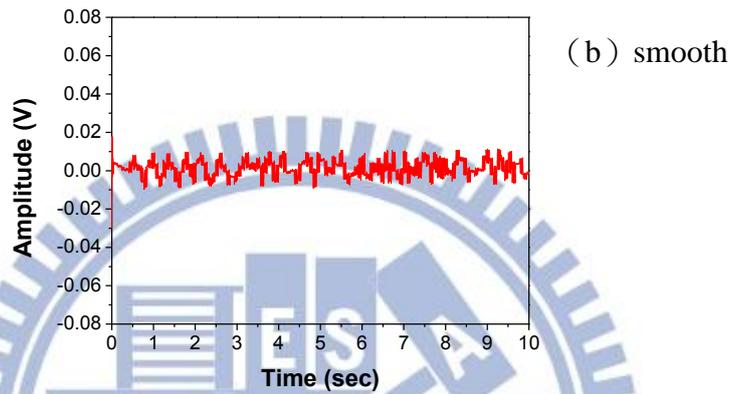
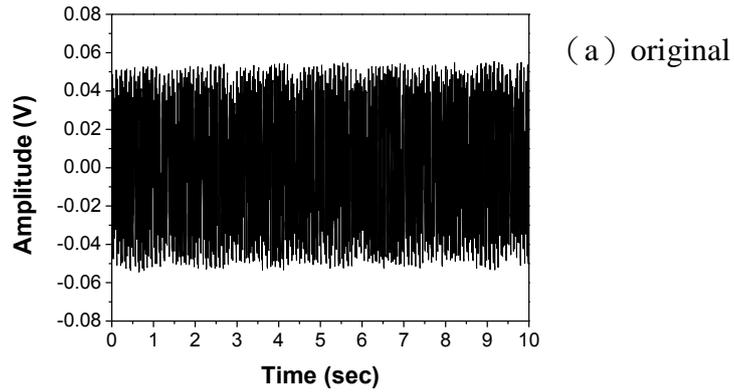
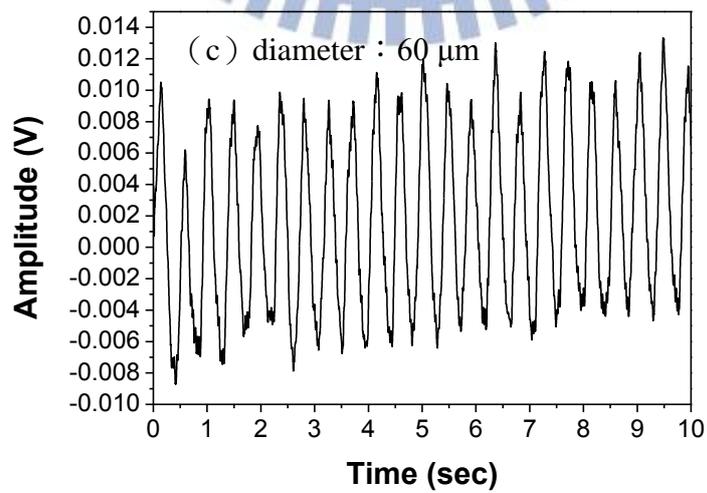
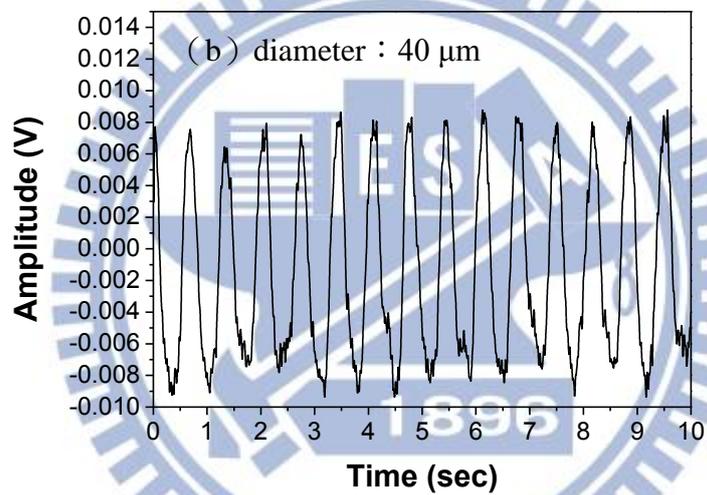
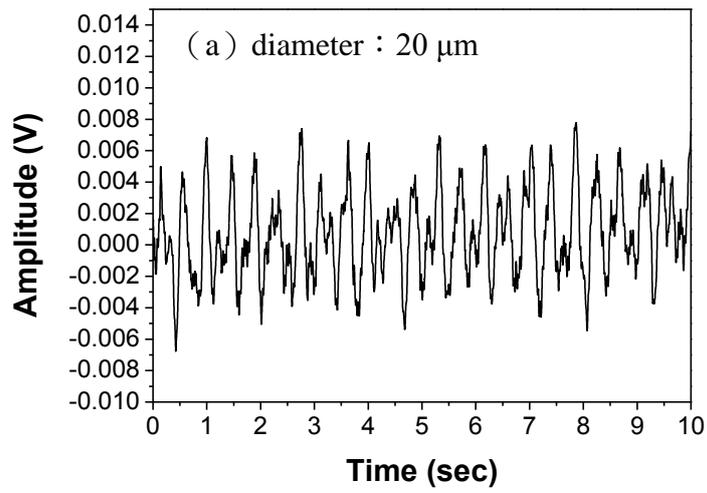


圖 5.2.4、依照表 5.2.1 的流程對沒有細胞貼附之電性量測結果進行訊號處理

基於上述的資料處理方法，接著分別利用直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形工作電極進行量測，實驗結果如圖 5.2.5；其中 (a) 至 (e) 依序為直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的微電極對心肌細胞進行量測的結果。快速傅立葉轉換之結果則示於圖 5.2.6。由圖中可看出直徑 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形電極在頻率 1-3 Hz（細胞的跳動頻率）的位置有明顯的峰值出現，其中又以直徑 60 μm 的圓形電極所記錄到的電位變化最為明顯，其次為直徑 40 和 100 μm 的圓形電極。



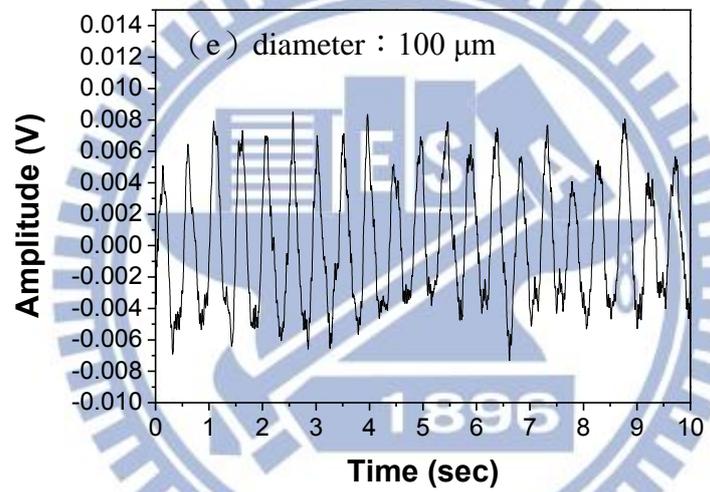
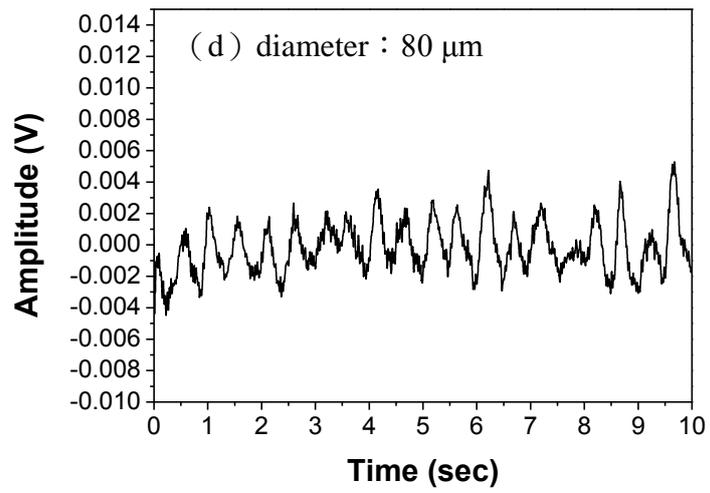
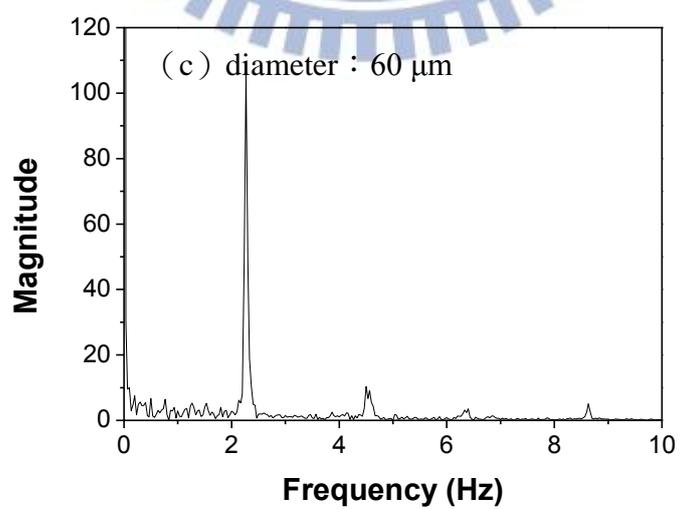
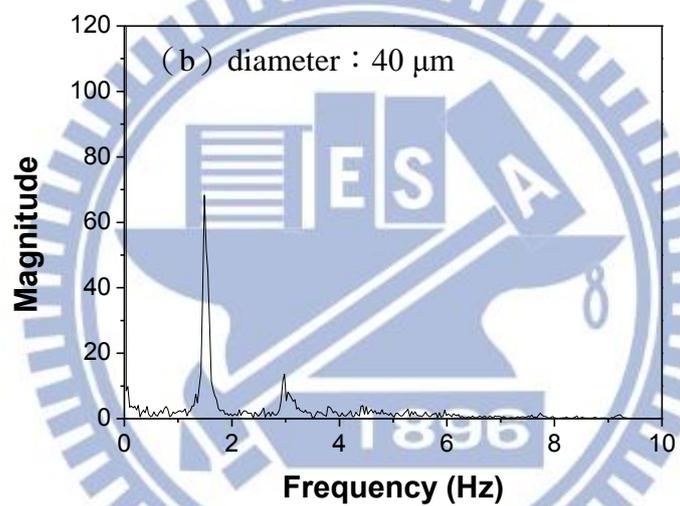
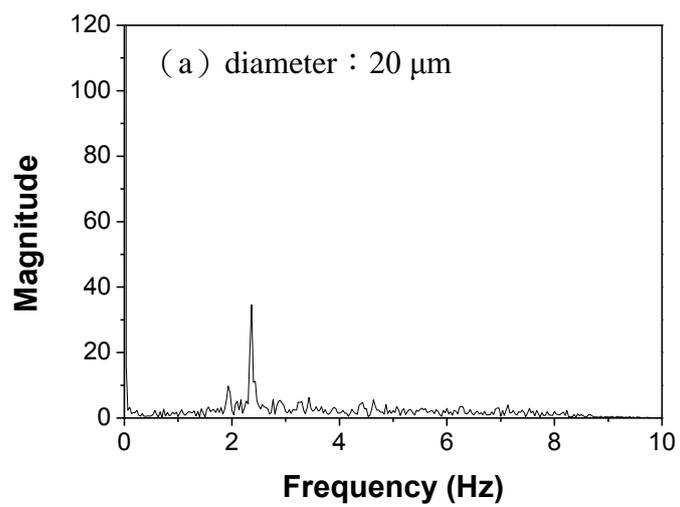


圖 5.2.5、以不同電極尺寸量測心肌細胞膜外電位之結果



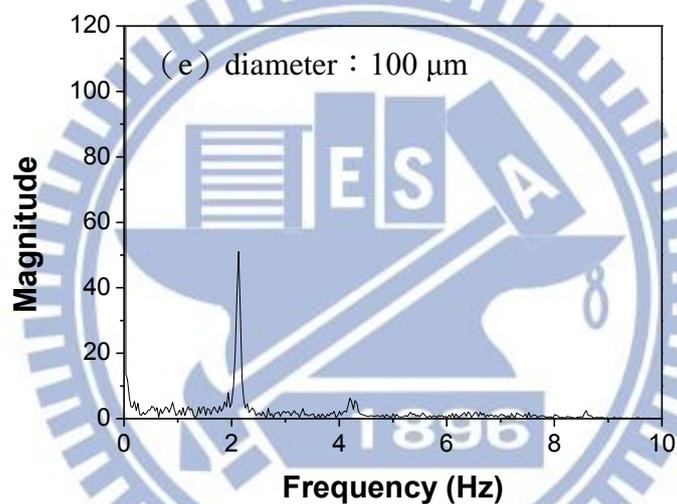
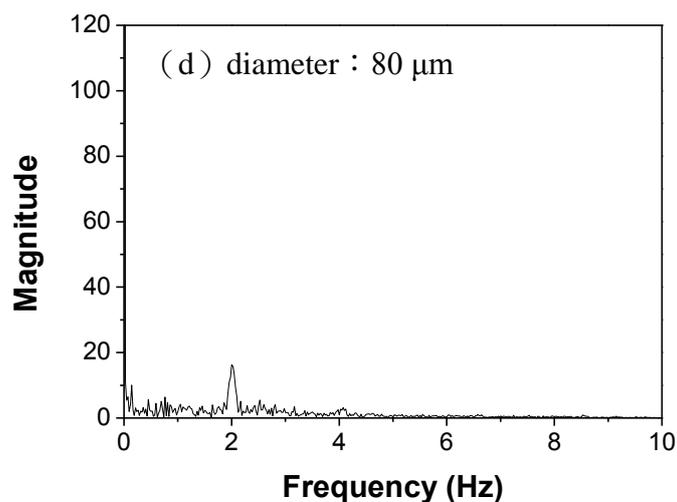


圖 5.2.6、以不同電極尺寸的量測結果進行快速傅立葉轉換之結果

由圖 5.2.5 的量測結果，可以看到不同電極所量測到的訊號大小各有不同，故本篇論文在同樣條件下的微電極陣列系統上輸入一模擬訊號（圖 3.1.3），並藉由相同的量測方式記錄訊號，結果如圖 5.2.7，由（a）至（e）依序為直徑 20、40、60、80 和 100 μ m 的工作電極所記錄到的波形，其訊號大小也都不相同。

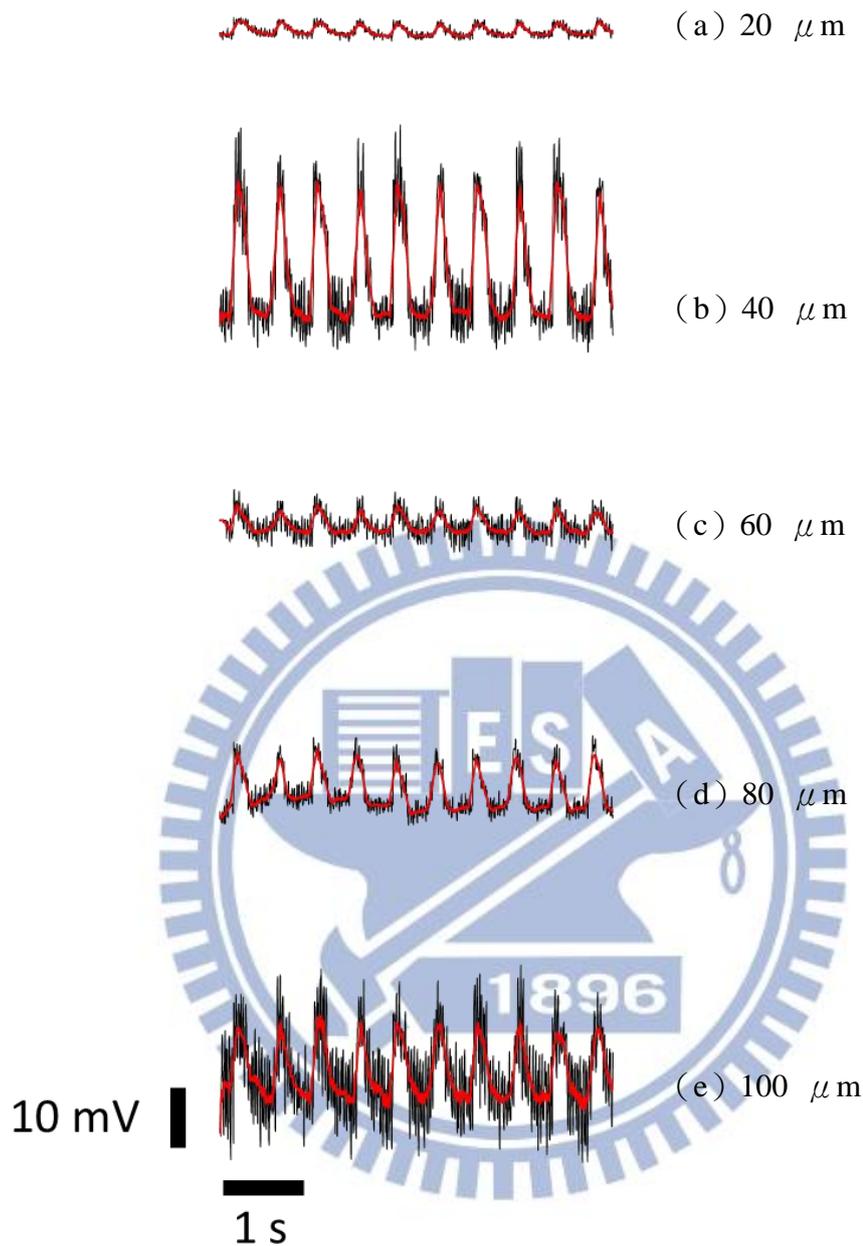


圖 5.2.7、不同電極尺寸所量測到的訊號大小

接著對各個電極進行阻抗量測分析，並利用章節 2.1 所提到的等效電路（圖 2.1.2）進行擬合，擬合結果如表 5.2.1；將量測結果與擬合結果相互對照，直徑 40 和 100 μm 的工作電極，其擬合所得之 R_s 的參數都比直徑 20、60 和 80 μm 的工作電極來的小，其中直徑 40 μm 的工作電極所記錄到的訊號又比直徑 100 μm 的工作電極所記錄到的訊號來的大，比較兩者的 R_s 後，發現直徑 40 μm 的工作電極其 R_s 小於直徑 100 μm 的工作電

極之 R_s 。由模擬的結果來看，當 R_s 小於 3000 Ω 時，由電極所記錄到的訊號最大。

表 5.2.1、各項擬合參數

Parameters	Electrode diameter (μm)				
	20	40	60	80	100
C_I (F)	5.49E-11	1.37E-10	1.64E-10	1.62E-10	1.97E-10
R_t (Ω)	2.02E5	2.77E4	1.14E4	1.14E4	7.48E3
R_w (Ω)	7.75E5	5.21E4	1.03E4	1.38E4	9.70E3
C_w (F)	3.53E-11	8.06E-10	1.81E-9	1.84E-09	1.86E-09
R_s (Ω)	3902	2414	3362	3359	2739

5.2.2 腎上腺素對心肌細胞跳動的影響

腎上腺素 (epinephrine) 是一種激素和神經傳導物質，當作用於心臟時，會使心臟的收縮力增加，傳導速度變快；在醫學上，當心臟停止跳動時，常被用來刺激心臟，是一種強效的心臟興奮劑。在本篇論文中，藉由腎上腺素對心肌細胞的影響，觀察量測訊號是否會隨著添加腎上腺素而變化，藉此確定所量測到的訊號確實為心肌細胞所造成的；結果如圖 5.2.8，(a) 是還沒有添加腎上腺素的訊號量測結果，(b) 為添加腎上腺素後的量測結果(腎上腺素濃度為 20 μM)，從訊號量測結果來看，量測訊號確實有隨著添加腎上腺素而變化，不單是頻率加快，振幅也上升；同樣對訊號做快速傅立葉轉換，結果分別示於圖 5.2.9 (a) 和 (b)；(a) 是添加腎上腺素之前的訊號量測結果，(b) 為添加腎上腺素之後的量測結果，從圖中可以明顯看到加入濃度為 20 μM 的腎上腺素後，心肌細胞的電生理訊號由原本頻率 1.5 Hz 增加到 2 Hz，訊號強度也有顯著的增加。

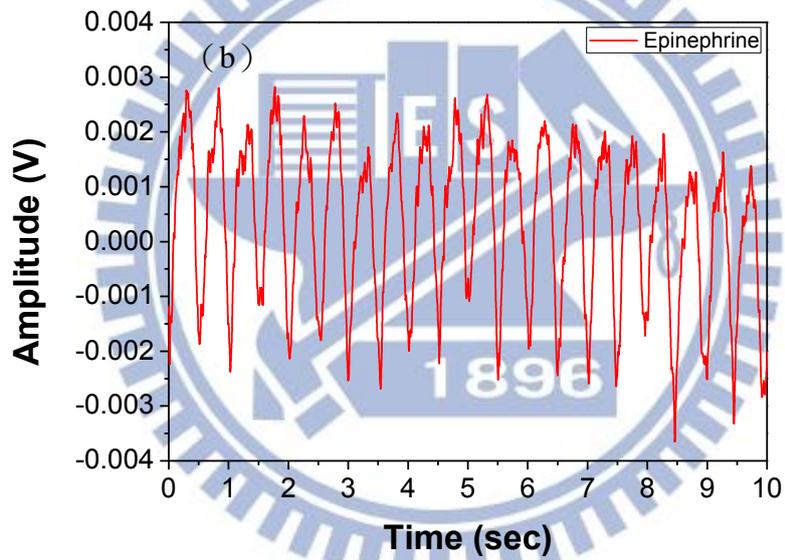
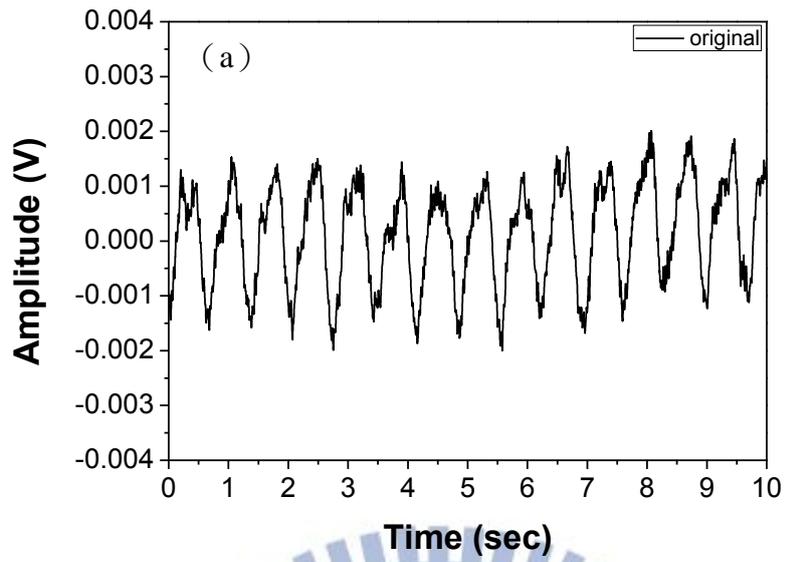


圖 5.2.8、心肌細胞添加腎上腺素前後的電性變化

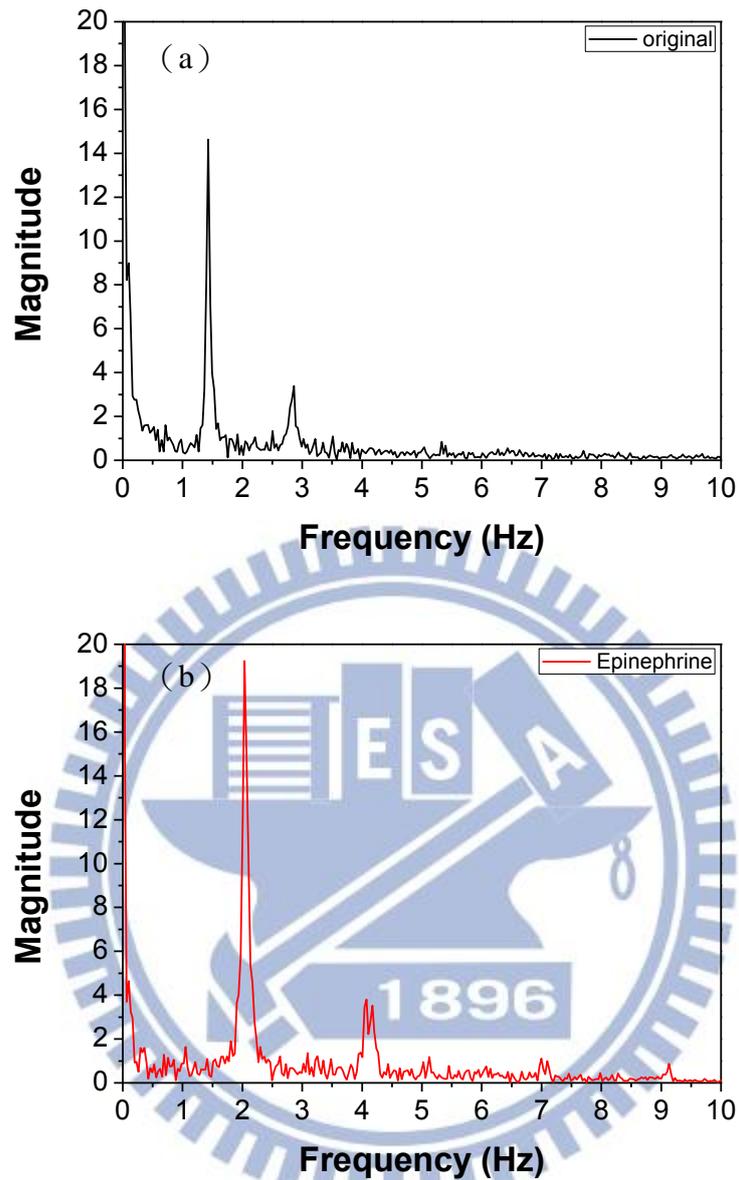


圖 5.2.9、心肌細胞添加腎上腺素前後的電性變化之快速傅立葉轉換結果

5.2.3 以微電極陣列量測 HeLa 電生理訊號

由於 HeLa 本身並不具有自發性跳動的行為，因此當微電極陣列上方貼附的細胞為 HeLa 時，在相同的實驗條件與環境下，不應該有訊號出現；故可藉此驗證所量測到的訊號，確實是因為心肌細胞跳動所造成的，而不是因為有細胞貼附或是添加藥物，造成

環境改變，而得之訊號。因此，我們在微電極陣列上種植細胞密度為 $1.5E6$ cells/ml 的 HeLa，在相同的實驗條件與環境下，量測訊號變化；圖 5.2.10 為 HeLa 培養於微電極陣列之情形，圖中之圓形電極為直徑 $60\ \mu\text{m}$ 的金電極；量測結果則如圖 5.2.11，(a) 是還沒有添加腎上腺素的訊號量測結果，圖中並沒有規律性的訊號出現，(b) 為添加腎上腺素後的量測結果(腎上腺素濃度為 $20\ \mu\text{M}$)，從訊號量測結果來看，添加腎上腺素也沒有規律性的訊號出現；同樣對訊號做快速傅立葉轉換，結果分別示於圖 5.2.12 (a) 和 (b)；(a) 為添加腎上腺素之前的訊號量測結果，(b) 為添加腎上腺素之後的量測結果，從頻譜分析圖中也沒有在特定頻率上出現明顯的峰值。由此推斷當微電極陣列上貼附的細胞為具有自發性跳動行為的心肌細胞時，經由鎖相放大器量測出來的訊號，確實為心肌細胞跳動所造成的。

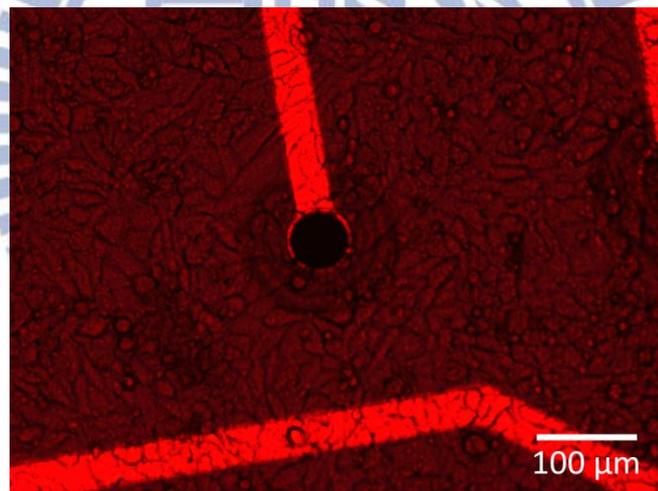


圖 5.2.10、HeLa 貼附於微電極陣列之情形

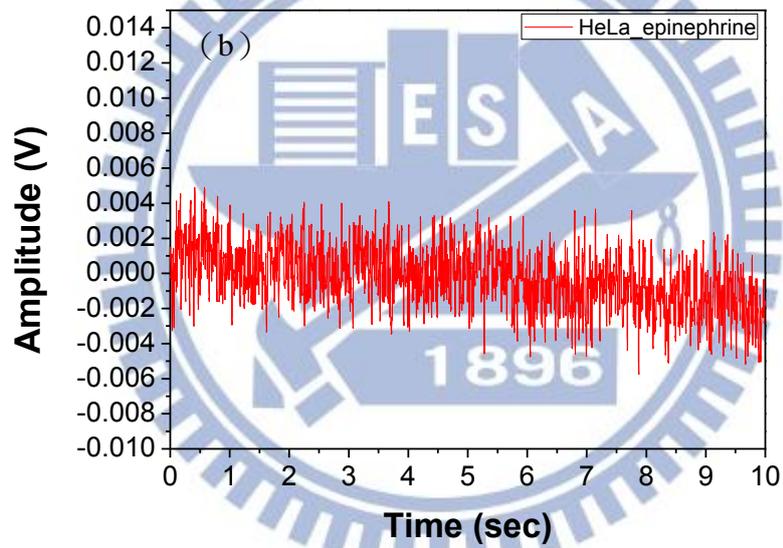
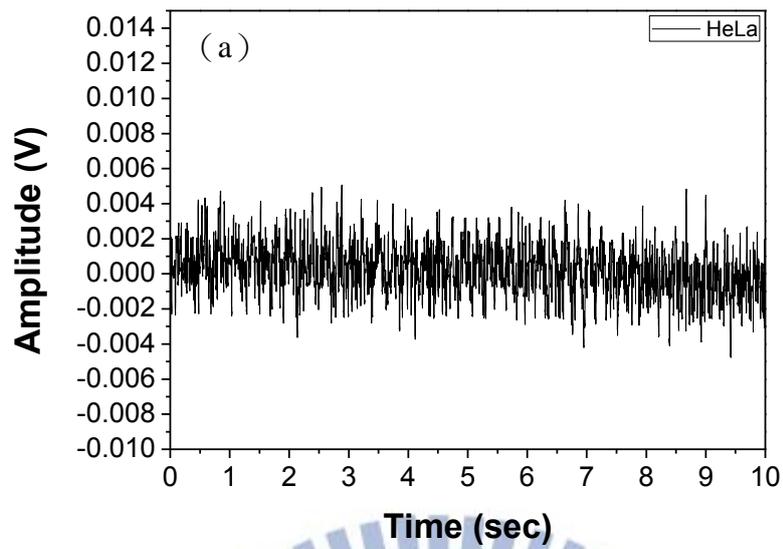


圖 5.2.11、HeLa 添加腎上腺素前後的電性變化

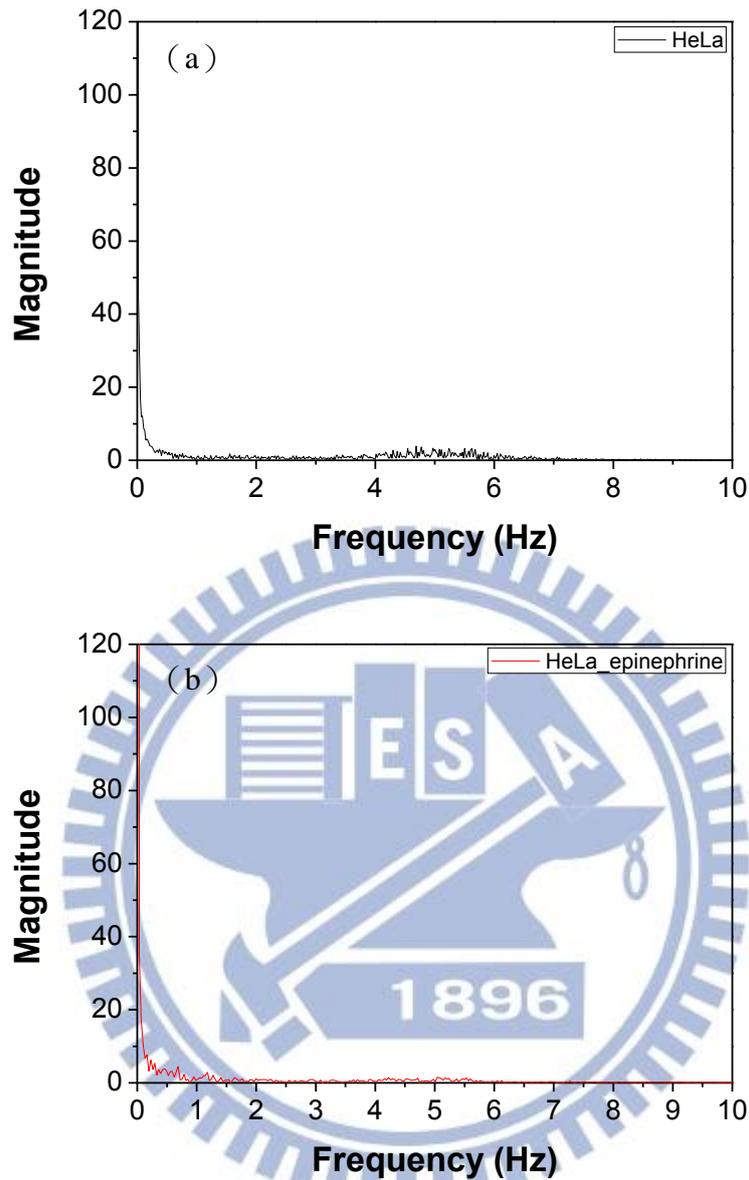


圖 5.2.12、HeLa 添加腎上腺素前後的電性變化之快速傅立葉轉換結果

5.2.4 量測波形之探討

在章節 1.2.4 曾經提過經由微電極陣列系統所量測到的電壓變化，依據細胞貼附的緊密程度，可能是跨膜電位的一次導數、二次導數或三次導數，如圖 1.2.10；當細胞與電極之間愈緊密，量測所得到的訊號與跨膜電位愈接近。那麼在本篇論文中，所量測到

的訊號是屬於哪一種呢？圖 5.2.13 是表示實際在進行量測時，電訊號流動的路徑圖；鎖相放大器的參考訊號由 V_{in} 輸入，接著訊號流經細胞，再經由鄰近的金電極將訊號送回鎖相放大器處理(V_{out})；由於參考訊號不斷從一個細胞跑到下一個鄰近的細胞，在細胞與細胞之間傳遞，且不斷橫跨細胞膜，故本篇論文假設量測所得的波形(如圖 5.2.14)與跨膜電位相近。

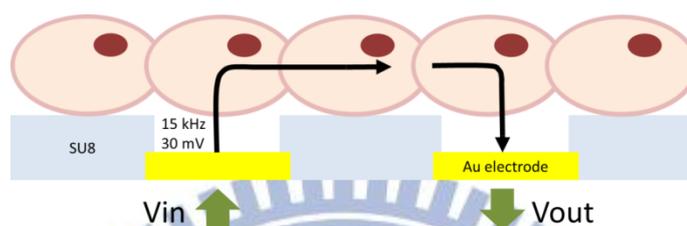


圖 5.2.13、實際量測時，電訊號流動的路徑圖

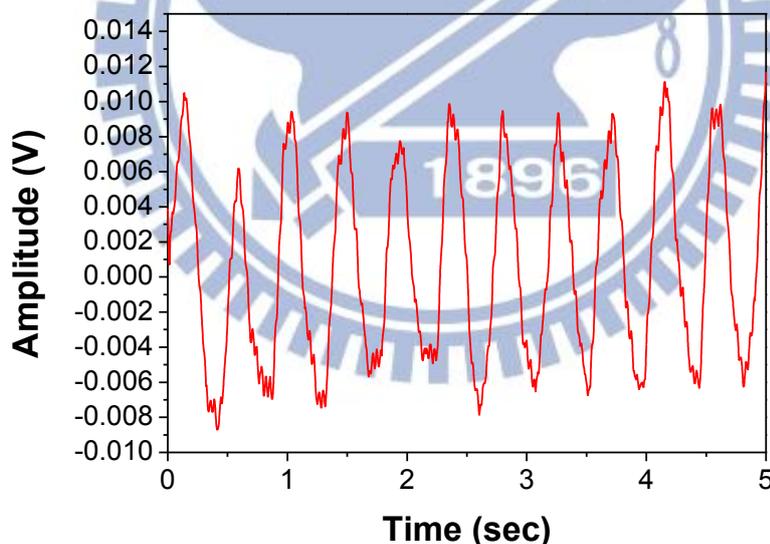


圖 5.2.14、利用直徑 $60 \mu\text{m}$ 的圓形電極，實際量測所得的波形

基於上述的假設，我們利用 LabVIEW 軟體模擬出心肌細胞的跨膜電位，如圖 5.2.15，和實際量測到的波形比較(圖 5.2.14)，仍有些出入。而根據文獻指出[40]，由心臟組織分離出來的心肌細胞，雖然其細胞與細胞之間仍是藉由 gap junction 連接，但因為細胞與細胞之間 gap junction 的耦合(coupling)程度仍不及心臟組織中的心肌細胞，所以在將動

作電位由一個細胞傳遞到下一細胞時，延遲的時間(time delay)較長，可達 500 μs ；而一般正常的心臟組織其延遲的時間約 100 μs 。因此本篇論文利用模擬出來的心肌細胞跨膜電位，在固定的細胞數下，模擬不同延遲時間所表現出來的波形變化。

由於心肌細胞屬於單核細胞，因此可藉由細胞核染色的方式，計算貼附在微電極陣列上的細胞數目。本篇論文是利用 Hoechst 33342 螢光染劑將心肌細胞的細胞核染色，再進行細胞計數；螢光染色流程如下：

1. 去除培養液，以培養液或 PBS 沖洗 2-3 次。
2. 加入 4 % paraformaldehyde，於 37 °C 的培養箱中靜置 20-30 分鐘。
3. 去除 paraformaldehyde，以 PBS 沖洗 3 次。
4. 加入 Hoechst 33342，於 37 °C 的培養箱中避光靜置 30 分鐘。
5. 去除 Hoechst 33342，以 PBS 靜置 3 分鐘後，再用 PBS 沖洗 2-3 次。

結果如圖 5.2.16，(b)為包含兩個直徑 60 μm 的圓形電極之螢光染色結果，其所含的細胞數目約為 552 ± 78 個，將圖中虛線方框放大示於(a)，虛線方框所示為兩電極之間細胞核染色的情形，數目約為 176 ± 37 個；而從(a)的螢光染色結果，可以看出貼附在微電極陣列上的細胞並非單層。

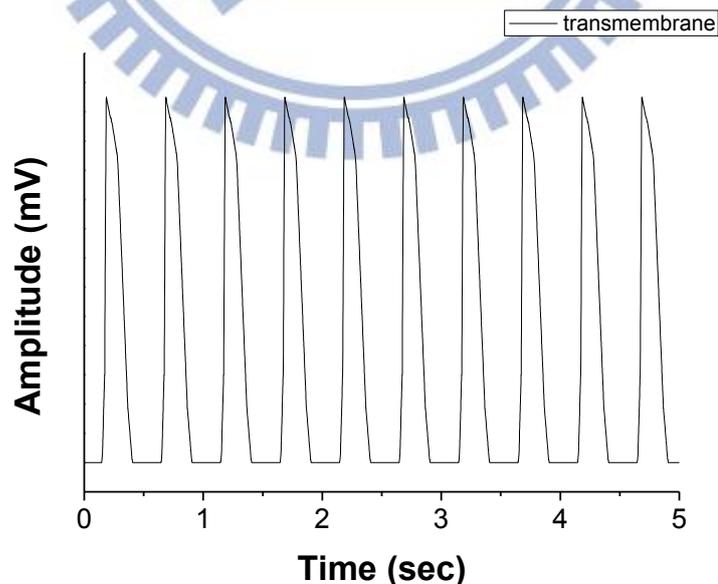


圖 5.2.15、利用 LabVIEW 軟體模擬出的心肌細胞跨膜電位

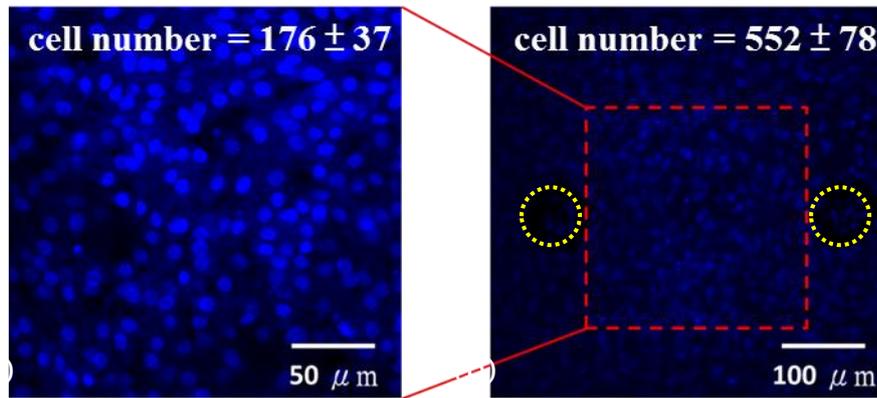


圖 5.2.16、心肌細胞的細胞核螢光染色圖形

依據細胞計數的結果，將細胞數目固定在 170 至 1000 個之間，分別對不同的延遲時間進行模擬，模擬結果以細胞數目為 800 個，每個細胞之間傳遞訊息的延遲時間為 0.3 ms 的情況下，較為合理，如圖 5.2.17；與實際量測到的波形比較(圖 5.2.14)，也較為相似。

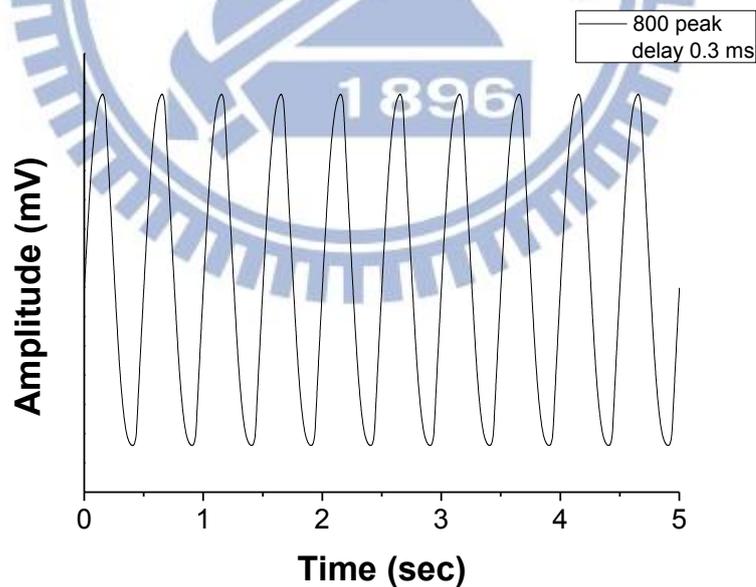
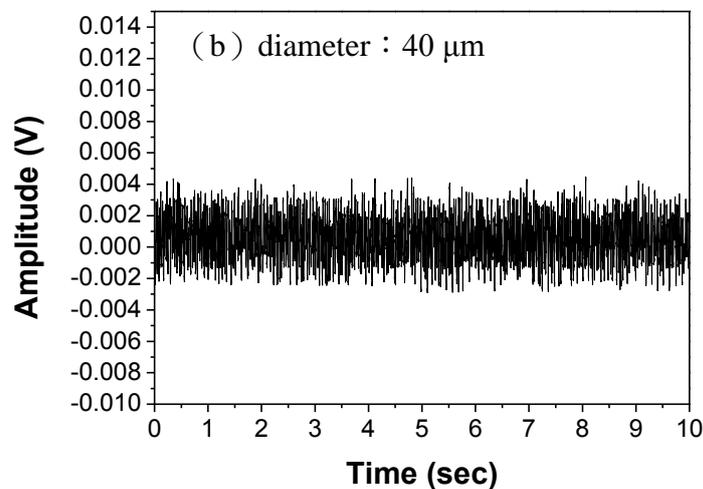
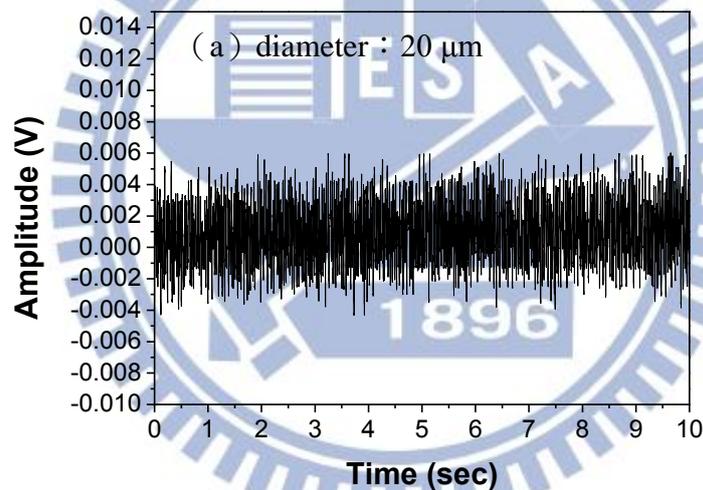


圖 5.2.17、細胞數目固定為 800 個，延遲時間為 0.3 ms 的模擬結果

5.3 表面平坦之金電極其訊號量測結果

章節 5.2 主要在探討表面有成長樹枝狀結構的金電極其動作電位的量測結果，而表面沒有成長樹枝狀結構的金電極，也就是表面平坦之金電極的動作電位量測結果，示於圖 5.3.1；快速傅立葉轉換之結果則示於圖 5.3.2。其中由 (a) 至 (e) 依序為直徑為 20、40、60、80 和 100 μm 的微電極之量測與分析結果。由圖 5.3.1 的訊號量測結果顯示，沒有規律性的訊號被記錄下來；而將所得訊號進一步以快速傅立葉轉換後，由圖 5.3.2 中可看出直徑 20、40、60、80 和 100 μm 的圓形電極在頻率 0 Hz- 10 Hz 的頻率範圍內，沒有明顯的峰值被解析出來。



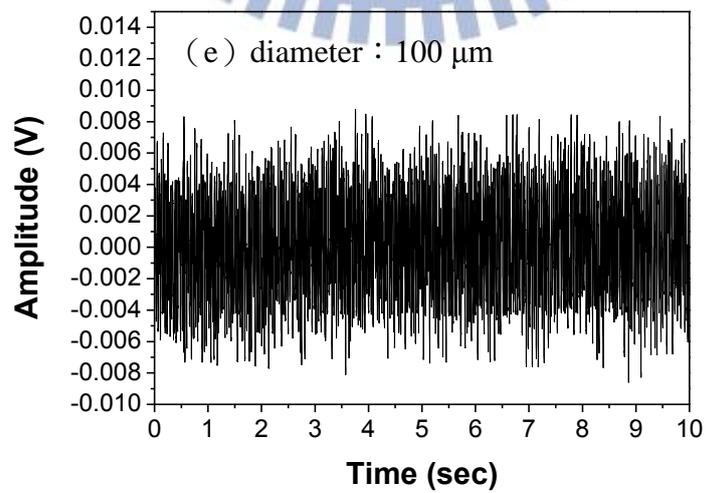
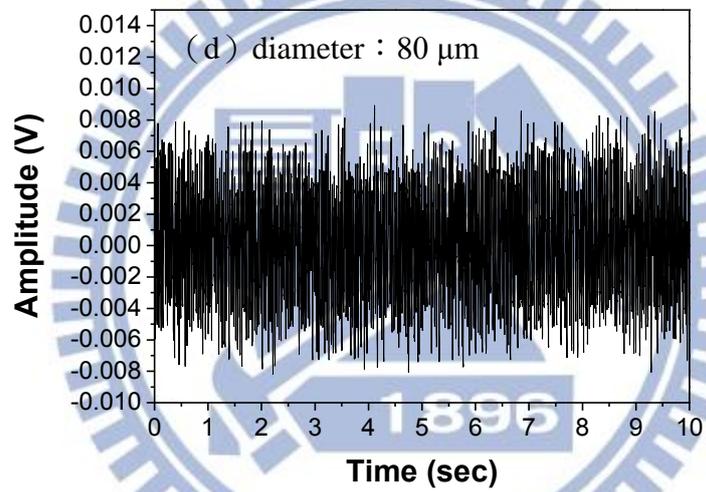
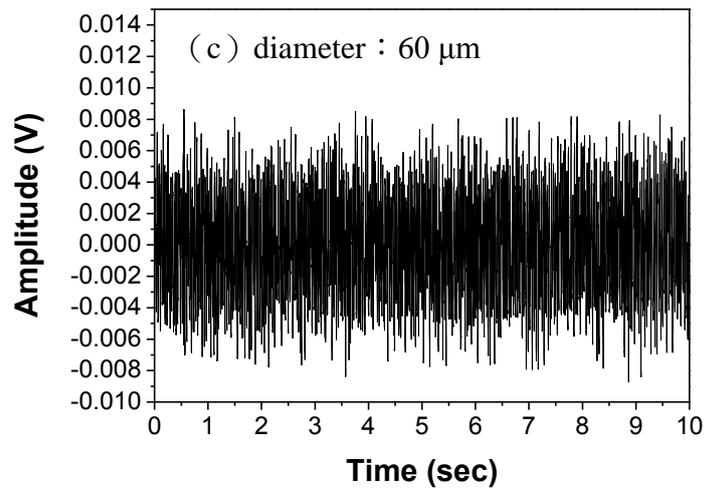
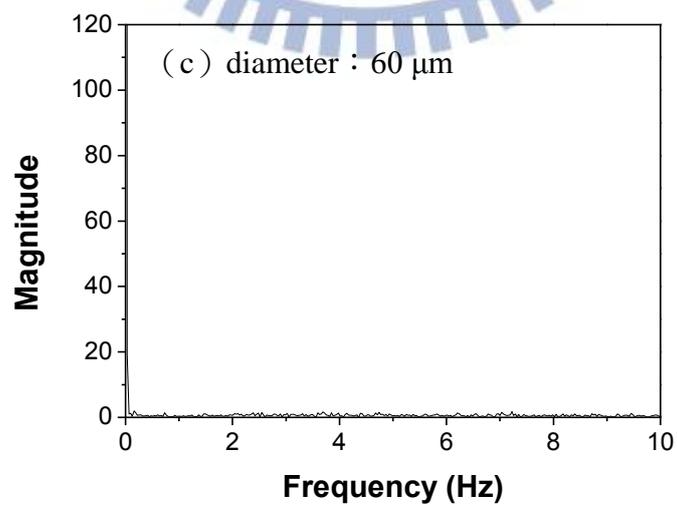
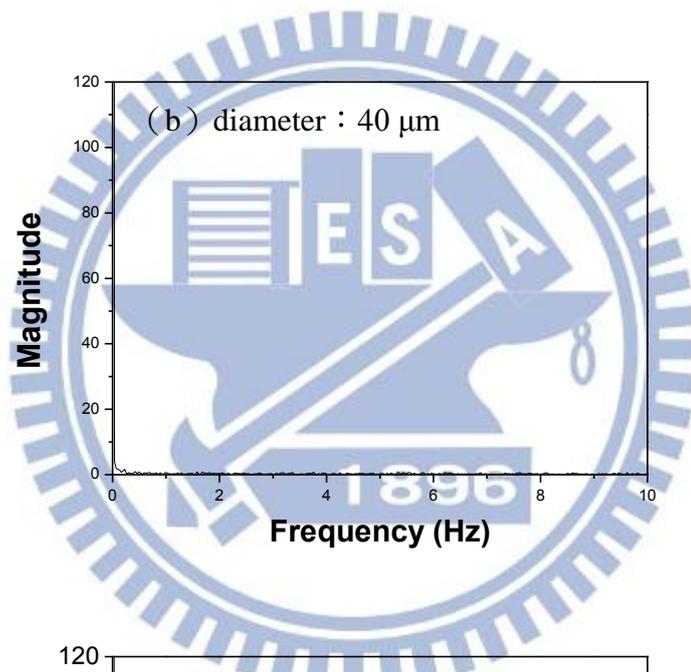
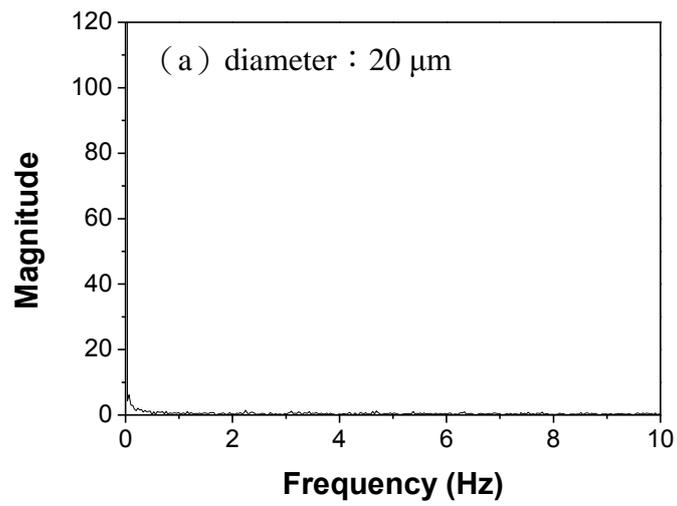


圖 5.3.1、表面平坦之金電極在不同電極尺寸下的量測結果



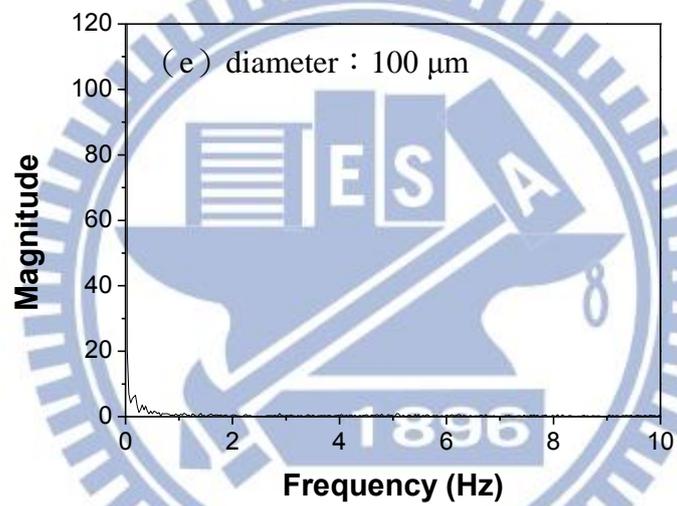
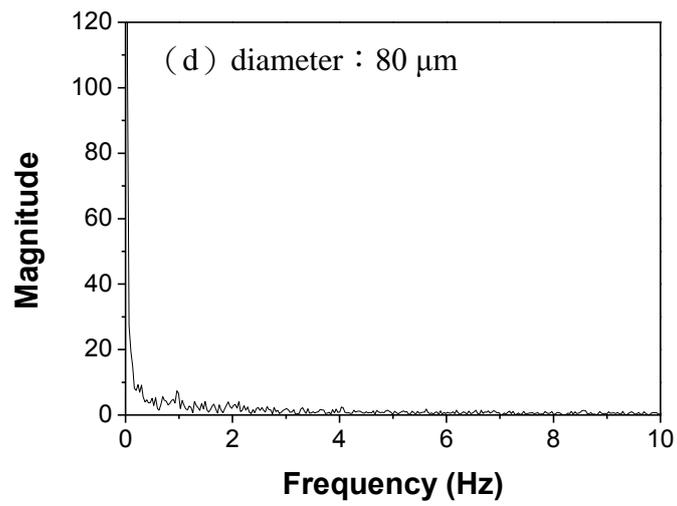


圖 5.3.2、表面平坦之金電極在不同電極尺寸下的量測訊號
進行快速傅立葉轉換後之結果

第六章 總結與未來展望

6.1 總結

為了能夠量測心肌細胞的膜外電位，本篇論文主要分為三大部分，分別是（1）微電極陣列系統、（2）訊號的濾波放大過程與（3）資料擷取、處理與分析。

首先設計一組具有五種不同直徑大小的微電極陣列，並利用基本的黃光微影製程，將此一微電極陣列製作於矽晶片上，接著以壓克力和 PCB 建構微電極陣列系統，並藉由細胞培養過程，來確保其生物相容性。此外，利用電化學沉積方式在金電極上方成長樹枝狀結構的金，以提升電極與細胞接觸之表面積；又在金電極上修飾 laminin 增加細胞的貼附性。由於細胞電生理訊號十分微弱，因此本篇論文利用鎖相放大器作為訊號濾波放大的處理。最後，以 LabVIEW 將資料擷取並記錄下來，進行快速傅立葉轉換對訊號做頻譜分析；並藉由腎上腺素對心肌細胞之影響，來觀察電性量測的變化。

6.2 未來展望

在本篇論文中，已建立起一個可用於量測細胞電生理訊號的簡易平台，且已經能夠利用所設計的微電極陣列系統，對分離出來的心肌細胞進行電生理量測。而根據章節 5.2.4 所討論的內容，我們假設所量測到的訊號是為心肌細胞的跨膜電位，且由於心肌細胞之間 gap junction 的耦合(coupling)程度不同，以至於訊號傳遞會有延遲的現象；根據模擬的結果，若當細胞與細胞之間的訊號延遲為 $300 \mu\text{s}$ 的情況下，當細胞數目愈來愈多，所得之波形與一般跨膜電位的波形也愈來愈不同；而細胞數目的多寡，可藉由改變兩個相鄰電極的間距而改變，因此，未來可藉由嘗試縮短兩個相鄰電極之間的距離，使得量測波形與一般跨膜電位的波形更為相近。由於細胞的電位變化往往可以反映出細胞許多的生理現象，因此，在未來可實際利用此量測平台，做進一步的生醫量測。

參考文獻

- [1] A. Hulanicki, S. Glab, and F. Ingman, "CHEMICAL SENSORS DEFINITIONS AND CLASSIFICATION," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 63, pp. 1247-1250, Sep 1991.
- [2] *Cell-Based Biosensors Principles and Applications*, 2010.
- [3] 李旺祚, 1991 新編 GUYTON 生理學, 1991.
- [4] D. A. Borkholder, "CELL BASED BIOSENSORS USING MICROELECTRODES " 1998.
- [5] G. T. A. KOVACS, "Electronic sensors with living cellular components," *Proceedings of the IEEE*, vol. 91, pp. 915-929, 2003.
- [6] B. Sakmann and E. Neher, "PATCH CLAMP TECHNIQUES FOR STUDYING IONIC CHANNELS IN EXCITABLE-MEMBRANES," *Annual Review of Physiology*, vol. 46, pp. 455-472, 1984.
- [7] D. A. Borkholder, B. D. DeBusschere, and G. T. A. Kovacs, "An approach to the classification of unknown biological agents with cell based sensors," *Technical Digest. Solid-State Sensor and Actuator Workshop*, pp. 178-182, 1998.
- [8] F. O. Morin, Y. Takamura, and E. Tamiya, "Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 100, pp. 131-143, 2005.
- [9] L. Berdondini, P. Massobrio, M. Chiappalone, M. Tedesco, K. Imfeld, A. Maccione, M. Gandolfo, M. Koudelka-Hep, and S. Martinoia, "Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures," *Journal of neuroscience methods*, vol. 177, pp. 386-396, 2009.
- [10] C. A. Thomas, P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells," *Experimental Cell Research*, vol. 74, pp. 61-66, 1972.
- [11] A. Mohr, W. Finger, K. J. Fohr, W. Gopel, H. Hammerle, and W. Nisch, "Performance of a thin film microelectrode array for monitoring electrogenic cells in vitro," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 34, pp. 265-269, Aug 1996.
- [12] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani, "A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice," *Journal of neuroscience methods*, vol. 93, pp. 61-67, Oct 1999.
- [13] M. Reppel, F. Pillekamp, Z. J. Lu, M. Halbach, K. Brockmeier, B. K. Fleischmann, and J. Hescheler, "Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity," *Journal of electrocardiology*, vol. 37, pp. 104-109, 2004.
- [14] K. Ju-Hyun, K. Gyumin, N. Yoonkey, and C. Yang-Kyu, "Surface-modified microelectrode array with flake nanostructure for neural recording and stimulation,"

- Nanotechnology*, vol. 21, pp. 085303 (8 pp.)-085303 (8 pp.)085303 (8 pp.), 26 2010.
- [15] L. Qingjun, Y. Weiwei, X. Lidan, D. Liping, H. Ning, and W. Ping, "Extracellular potentials recording in intact olfactory epithelium by microelectrode array for a bioelectronic nose," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 25, pp. 2212-2217, 15 2010.
- [16] S. F. Cogan, "Neural Stimulation and Recording Electrodes," *Annual Review of Biomedical Engineering* pp. 275-309, 2008.
- [17] E. R. G.W. Gross, G.W. Kreutzberg, A. Meyer, "A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro," *Neuroscience Letters*, vol. 6, pp. 101-105, 1977.
- [18] F. Patolsky, G. Zheng, and C. M. Lieber, "Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species," *Nature Protocols*, vol. 1, pp. 1711-1724, 2006.
- [19] T. Cohen-Karni, B. P. Timko, L. E. Weiss, and C. M. Lieber, "Flexible electrical recording from cells using nanowire transistor arrays," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, pp. 7309-7313, May 5 2009.
- [20] B. P. Timko, T. Cohen-Karni, G. H. Yu, Q. Qing, B. Z. Tian, and C. M. Lieber, "Electrical Recording from Hearts with Flexible Nanowire Device Arrays," *Nano Letters*, vol. 9, pp. 914-918, Feb 2009.
- [21] S.-M. P. Byoung-Yong Chang, "Electrochemical Impedance Spectroscopy," *Annual Review of Analytical Chemistry*, pp. 207-229, 2010.
- [22] A. Yufera, D. Canete, and P. Daza, "A Microelectrode-Cell Sensor Model for Real Time Monitoring " presented at the The Second International Conference on Sensor Device Technologies and Applications, Nice/Saint Laurent du Var, France, 2011.
- [23] X. Q. Huang, D. Nguyen, D. W. Greve, and M. M. Domach, "Simulation of microelectrode impedance changes due to cell growth," *Ieee Sensors Journal*, vol. 4, pp. 576-583, Oct 2004.
- [24] L. J. Breckenridge, R. J. A. Wilson, P. Connolly, A. S. G. Curtis, J. A. T. Dow, S. E. Blackshaw, and C. D. W. Wilkinson, "ADVANTAGES OF USING MICROFABRICATED EXTRACELLULAR ELECTRODES FOR IN-VITRO NEURONAL RECORDING," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 42, pp. 266-276, Oct 1995.
- [25] K. Arihara, T. Ariga, N. Takashima, T. Okajima, F. Kitamura, K. Tokuda, and T. Ohsaka, "Multiple voltammetric waves for reductive desorption of cysteine and 4-mercaptobenzoic acid monolayers self-assembled on gold substrates," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 5, pp. 3758-3761, 2003.
- [26] T. H. Lin, C. W. Lin, H. H. Liu, J. T. Sheu, and W. H. Hung, "Potential-controlled electrodeposition of gold dendrites in the presence of cysteine," *Chemical Communications*, vol. 47, pp. 2044-2046, 2011.

- [27] J. Pancrazio, J. Whelan, D. Borkholder, W. Ma, and D. Stenger, "Development and application of cell-based biosensors," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 27, pp. 697-711, 1999.
- [28] H. Yu, H. Cai, W. Zhang, L. Xiao, Q. Liu, and P. Wang, "A novel design of multifunctional integrated cell-based biosensors for simultaneously detecting cell acidification and extracellular potential," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 1462-1468, 2009.
- [29] K. M. Yamada, "CELL SURFACE INTERACTIONS WITH EXTRACELLULAR MATERIALS," *Ann. Rev. Biochem*, pp. 761-799, 1983.
- [30] R. W. F. Wiertz, *Regulation of in vitro cell-cell and cell-substrate adhesion* 2010.
- [31] H. S. Koh, T. Yong, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, "Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3574-3582, Sep 2008.
- [32] O. Palyvoda, C. C. Chen, and G. W. Auner, "Culturing neuron cells on electrode with self-assembly monolayer," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 22, pp. 2346-2350, Apr 2007.
- [33] M. Veisheh, M. H. Zareie, and M. Q. Zhang, "Highly selective protein patterning on gold-silicon substrates for biosensor applications," *Langmuir*, vol. 18, pp. 6671-6678, Aug 2002.
- [34] F. Rusmini, Z. Y. Zhong, and J. Feijen, "Protein immobilization strategies for protein biochips," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1775-1789, Jun 2007.
- [35] Rajesh, V. Sharma, V. K. Tanwar, S. K. Mishra, and A. M. Biradar, "Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myoglobin (Mb) in aqueous solution," *Thin Solid Films*, vol. 519, pp. 1167-1170, Nov 2010.
- [36] L. C. S.-L. Chris R. Taitt, George P. Anderson, and Frances S. Ligler *Surface Modification and Biomolecule Immobilization on Polymer Spheres for Biosensing Applications* vol. 726, 2011.
- [37] C. M. Lo, C. R. Keese, and I. Giaever, "Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing," *Biophysical Journal*, vol. 69, pp. 2800-2807, Dec 1995.
- [38] I. Giaever and C. R. Keese, "MICROMOTION OF MAMMALIAN-CELLS MEASURED ELECTRICALLY," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, pp. 7896-7900, Sep 1991.
- [39] D. A. ROBINSON, "The Electrical Properties of Metal Microelectrodes," *PROCEEDINGS OF THE IEEE*, vol. 56, pp. 1065-1071, 1968.
- [40] S. Rohr, "Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential," *Cardiovascular research*, vol. 62, pp. 309-322, May 2004.