

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

整合氧化鋅奈米線與微流道血漿分離元件
之生醫感測平台研究

**A Biosensing Platform Integrating ZnO Nanowires
and Blood Plasma Separation Microfluidic Device**

研究生：吳嘉哲 (Chia-Che Wu)

指導教授：許鉦宗 教授 (Prof. Jeng-Tzong Sheu)

中華民國一百零二年七月

整合氧化鋅奈米線與微流道血漿分離元件
之生醫感測平台研究

A Biosensing Platform Integrating ZnO Nanowires and
Blood Plasma Separation Microfluidic Device

研究生：吳嘉哲

Student : Chia Che 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

July, 2013

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百零二年七月

整合氧化鋅奈米線與微流道血漿分離元件之生醫感測平台研究

學生：吳嘉哲

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

本論文整合氧化鋅奈米線元件與微流道血漿分離元件於一系統進行全血生物分子感測；首先微流道重力分離血漿系統，將血液有效過濾掉造成螢光訊號干擾的血球部分，接著結合生物相容性極佳的氧化鋅奈米柱結構，增加可感測的表面積範圍，造成偵測濃度獲得突破，以提升感測元件的靈敏度。感測修飾分子則利用自組裝技術(Self-assembly technique)，氧化鋅奈米線元件成長在元件玻璃表面後，依序修飾 3-氨基丙基三甲氧基甲矽烷(Amino Propyl Triethoxy Silane, APTES)與生物素(Biotin)，檢體的準備則於全血中參入不同濃度鏈黴抗生素蛋白(Streptavidin)，爾後利用螢光分析鑑定元件之分子感測靈敏度，實驗證實整合氧化鋅奈米線元件與微流道血漿分離元件有效提升到感測器的靈敏度。最後利用聚二甲基矽氧烷(PDMS)的透氣特性，發展自動吸取流體機制，使其不必施給外加力便可操作，研究透過以上之結合，目的為達成高偵測靈敏度、製程方便以及自行供給驅動力，整合這些優勢，提供到未來可攜式生醫晶片的普及上建立基礎。

A Biosensing Platform Integrating ZnO Nanowires and Blood Plasma Separation Microfluidic Device

Student : Chia-Che Wu

Advisor : Prof. Jeng-Tzong Sheu

**Institute of Nanotechnology, Department of Materials Science and Engineering
National Chiao Tung University**

Abstract

In this thesis, a biosensing platform integrating zinc oxide nanowires and blood plasma separation microfluidic device was demonstrated and investigated; Plasma microfluidic system utilizing gravity separation was prepared for effective filtering of the blood cells that usually caused signal interference in fluorescence intensity identification. The ZnO nanowire with biocompatibility nanopillar structure was optimized for the increase of the surface area in capture of target molecules. Prior to sensing, both Amino Propyl Triethoxy Silane (APTES) and Biotin were modified on the ZnO nanowire via self-assembly technique for Streptavidin detection. Whole blood samples spiked with various concentrations of Streptavidin were adopted to characterize the efficiency of the proposed system and the limit of detection (LOD). Fluorescence images confirmed the enhancement of the proposed sensing platform; with ZnO nanowire the LOD was enhanced from 42 pM to 4.2 pM. Finally, an automatic fluid flow mechanism was demonstrated to increase the feasibility of the proposed system. It is believed that by integrating these features the proposed platform can be beneficial to future point-of-care applications.

致謝

首先感謝我的指導教授許鈺宗老師，兩年碩士班生涯中，老師用心的指導及生活上的關心，因此讓我能專心致力於學業上，加上研究方面豐富的資源，使得在實驗路上不予匱乏，獲得紮實且完整的訓練，並能順利完成碩士學位。

感謝口試委員們撥空參加論文口試，口試委員潘扶民教授、張鼎張教授、陳振嘉學長給予的建議及提問，讓本研究整體架構能更趨完整。

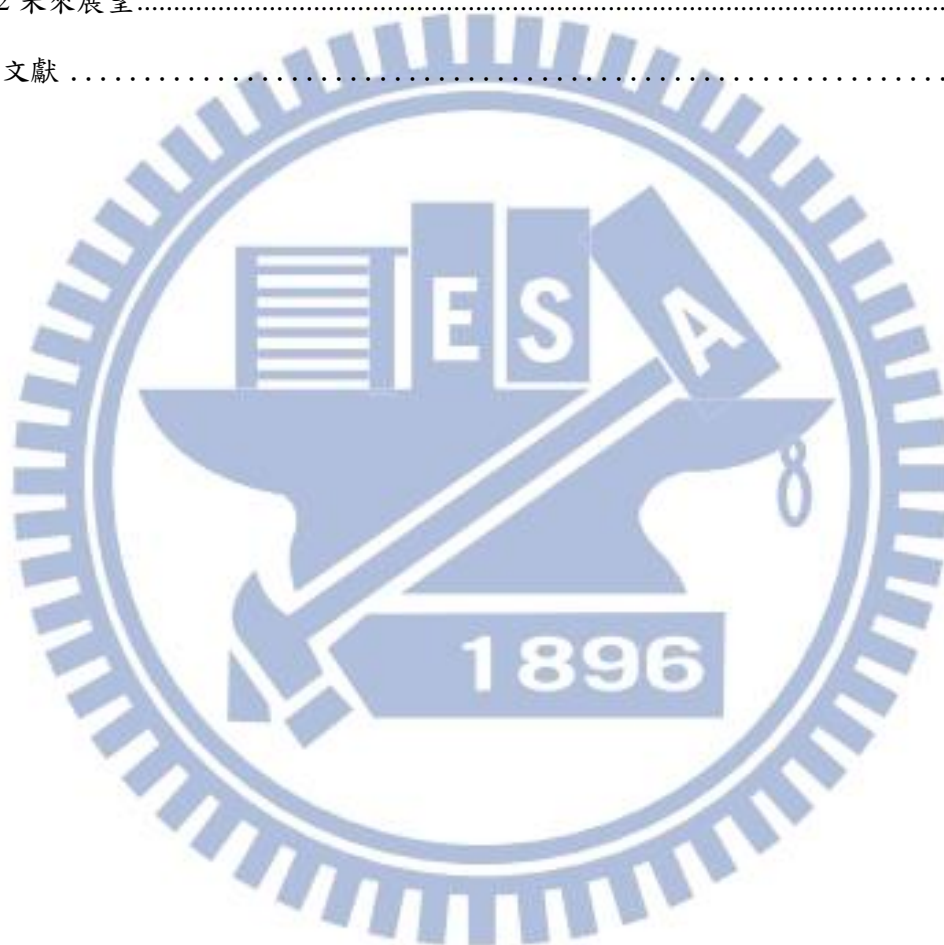
接著，非常幸運能加入實驗室，夥伴們感情融洽而且對於實驗交流也毫不藏私。首先要先感謝振翔學長在研究上給予的引導，能不厭其煩與我討論實驗進度以及讓我學習到做研究思考的細膩及邏輯性，沒有你的話我的研究恐怕會問題百出，感謝皓恆學長處理實驗室內的大小事，照顧學弟妹不遺餘力，讓大家能放心的致力於研究上，感謝儒政學長提供大夥歡笑，不只一起奮鬥了碩一的修課，也在實驗室裡一起打拼，不時也能交換研究或生活上的心得，感謝東育及志偉學長，在我碩士班兩年中的幫忙及照顧，感謝宗翰學長教導我所有實驗細節，讓我有獨自完成研究的能力，同學筱淋、婉琪共同奮鬥了碩士班兩年生涯，期望未來畢業後都能各自達成理想，學弟妹仲廷、毓烜、舒鈺處理實驗室雜事及分擔實驗，謝謝你們的貢獻使實驗室能順利運作。

最後要感謝養育我的父母親，你們給予我最安穩的生長環境，讓我在求學階段能沒有後顧之憂，給予空間讓我自由選擇想要走的道路，做我的最大後盾全力支持我，有你們我才能完成碩士學業，期待我在未來的路途上能繼續完成既定的夢想並突破種種的挑戰及難題。

目錄

中文摘要	I
Abstract	II
致謝	III
目錄	IV
圖目錄	VI
表目錄	IX
第一章 緒論	1
1-1 研究背景	1
1-2 血液分離機制	5
1-3 氧化鋅特性及感測	12
1-4 自動吸取流體機制	16
1-5 研究動機	17
1-6 論文架構	18
第二章 血液微流體感測系統理論模擬及製程	19
2-1 微流道結構與流場模擬	19
2-2 微流道結構設計	26
2-3 微流道製作	29
2-4 氧化鋅奈米柱生長製作	32
2-5 修飾 Biotin- Streptavidin	36
2-6 PDMS 材料與實驗關係	39
第三章 實驗結果與討論	40
3-1 血液分離微流體系統之分離率	40
3-1-1 血球干擾	42
3-1-2 血液分離率	44

3-2 修飾不同濃度之 Streptavidin	46
3-3 氧化鋅奈米柱結構增加感測靈敏度.....	49
3-4 2D 血液微流體感測系統偵測及運用範圍	52
3-5 自動吸取流體系統實做.....	55
第四章 結論與未來展望	57
4-1 結論.....	57
4-2 未來展望.....	57
參考文獻	59



圖目錄

圖 1-1-1、醫檢處檢查表單。	1
圖 1-1-2、血液檢測程序示意圖。	2
圖 1-1-3、螢光檢測流程示意圖。	3
圖 1-1-4、加州理工學院 Heath 團隊實驗流程示意圖。	4
圖 1-1-5、加州理工學院 Heath 團隊螢光強度結果。	4
圖 1-2-1、血液組成示意圖。	5
圖 1-2-2、普林斯頓大學 Sturm 團隊分離粒子實驗架構圖。	6
圖 1-2-3、密西根大學健康系統 Toner 團隊分離血液實驗裝置圖。	7
圖 1-2-4、賓夕法尼亞州立大學 Zahn 團隊微流道分離血液 SEM 圖。	8
圖 1-2-5、血液重力過濾原理圖。 f_g : 重力, f_d : 拖曳力	9
圖 1-2-6、柏克萊加州大學 Luke P. Lee 團隊血液分離機制示意圖。	10
圖 1-2-7、重力分離血液系統 3D 結構圖。	11
圖 1-3-1、水熱法示意圖。	12
圖 1-3-2、化學氣相沉積示意圖。	13
圖 1-3-3、分子束磊晶示意圖。	13
圖 1-3-4、濺鍍示意圖。	14
圖 1-3-5、氧化鋅參雜生長機制。	14
圖 1-3-6、氧化鋅結構與生物分子修飾及螢光關係圖。	15
圖 1-4-1、自動吸取流體之 PDMS 裝置原理圖。	16
圖 2-1-1、血液物理特性參數。	19
圖 2-1-2、運用流體力學 Navier–Stokes 公式進行模擬。	20
圖 2-1-3、血球物理特性參數。	21
圖 2-1-4、運用重力學公式進行模擬。	22
圖 2-1-5、COMSOL 模擬圖(改變 X 軸)。	23

圖 2-1-6、COMSOL 模擬圖(改變 Y 軸)。	23
圖 2-1-7、COMSOL 模擬改變微流道設計出入口端之流速關係圖。	24
圖 2-1-8、COMSOL 模擬改變微流道設計血球沉積關係圖。	25
圖 2-2-1、3D 微流道結構光罩圖。	26
圖 2-2-2、3D 微流道結構 OM 圖。	26
圖 2-2-3、2D 微流道結構光罩圖。	27
圖 2-2-4、2D 微流道結構 OM 圖。	27
圖 2-2-5、重力分離血液系統 2D 結構圖。	28
圖 2-2-6、2D 結構實景圖。	28
圖 2-3-1、旋光阻機。	30
圖 2-3-2、SU8 厚度 SEM 圖。	31
圖 2-3-3、高解析度光罩直接對準曝光機。	31
圖 2-4-1、氧化鋅 SEM 圖(X10,000)。	33
圖 2-4-2、氧化鋅 SEM 圖(X50,000)。	33
圖 2-4-3、氧化鋅 EDS 圖。	33
圖 2-4-4、生長氧化鋅奈米柱結構實驗裝置圖。	34
圖 2-4-5、LabVIEW 控溫程式介面。	35
圖 2-4-6、電源供應器。	35
圖 2-5-1、EDTA 抗凝血儲血管。	37
圖 2-5-2、修飾 Biotin- Streptavidin 流程圖(a)修飾 APTES (b)修飾 Biotin (c)修飾 Streptavidin。	37
圖 2-5-3、表面修飾感測實驗操作平台。	38
圖 3-1-1、全血於計數盤上的 OM 圖。	40
圖 3-1-2、分離後之血漿於計數盤上的 OM 圖。	41
圖 3-1-3、血漿過濾示意圖。	42
圖 3-1-4、修飾後以 PBS 1X 洗淨之 BF 圖。左圖:分離，右圖:未分離。	43
圖 3-1-5、血漿分離螢光差異圖。左上:螢光波長 546 nm/分離，右上:螢光波長	

546 nm/未分離，左下:螢光波長 488 nm/分離，右下:螢光波長 488 nm/未分離.....	43
圖 3-2-1、2D 結構螢光圖。Streptavidin-546 濃度上往下依序: 42 nM、4.2 nM、 420 pM、42 pM、4.2 pM.....	46
圖 3-2-2、3D 結構螢光圖。Streptavidin-546 濃度上往下依序: 42 nM、4.2 nM、 420 pM、42 pM、4.2 pM.....	47
圖 3-3-1、氧化鋅奈米柱 OM 圖。.....	49
圖 3-3-2、氧化鋅奈米柱與微流道 OM 圖。.....	50
圖 3-2-2、氧化鋅提升螢光強度螢光圖。Streptavidin-546 濃度上往下依序: 42 nM、 4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM.....	50
圖 3-4-1、沉積血液空間長度變化光罩圖。左:1 mm，中:2 mm，右:3 mm.....	52
圖 3-4-2、沉積血液空間深度變化光罩圖。左:1 mm，中:2 mm，右:3 mm.....	52
圖 3-5-1、氧電漿機(抽氣作用).....	55
圖 3-5-2、注射幫浦固定流速注入與自動吸取流體之 PDMS 裝置螢光比較圖。 前:幫浦固定流速 20 μ L/hr，後:自動吸取流體機制.....	56

表目錄

表 1-2-1、柏克萊加州大學 Lee 團隊微流道比例與血液分離效率比較表。.....	10
表 2-3-1、SU8-2050 實驗參數。.....	30
表 3-1-1、血漿分離螢光強度差異表。.....	44
表 3-1-2、血液分離率實驗統整表。.....	45
表 3-2-1、3D 結構與 2D 結構濃度與螢光強度關係表。.....	48
表 3-3-1、氧化鋅奈米柱結構與平面結構濃度與螢光強度關係表。.....	51
表 3-4-1、流道長度與流速之分離效率表。.....	53
表 3-4-2、流道深度與流速之分離效率表。.....	54
表 3-5-1、注射幫浦固定流速注入與自動吸取流體之 PDMS 裝置螢光強度表。.....	56



第一章

緒論

1-1 研究背景

目前在醫學領域中，對血液進行檢測是非常重要的課題，透過檢測血液，能初步診斷到相當多的疾病，例如：A 型肝炎、B 型肝炎、愛滋病…等等，一般醫檢處檢查表如圖 1-1-1，括號內為血液檢查可分析的病理，但採血進行繁瑣的檢驗過程，不僅耗損人力成本，經濟效益差而且也相當的耗時，一個正常血液檢測程序包含：血漿血球分離>加入抗凝血劑>血液檢體運送>生物標記檢測>結果分析，如圖 1-1-2。

尿液與糞便檢查		一般及特殊生化檢查		血清免疫	
<input type="checkbox"/> Urine Routine 尿液常規	100	<input type="checkbox"/> HbA1c 糖化血紅素	300	<input type="checkbox"/> HAVAb A肝抗體-G	400
<input type="checkbox"/> Pregnancy test 懷孕試驗	200	<input type="checkbox"/> Glucose AC / PC 血糖	70	<input type="checkbox"/> HAV IgM A肝抗體-M	500
<input type="checkbox"/> Stool Routine 糞便常規	100	<input type="checkbox"/> Insulin 胰島素血清檢驗	400	<input type="checkbox"/> HBsAg B肝抗原	200
<input type="checkbox"/> FOBT 糞便潛血	150	<input type="checkbox"/> BUN 尿素氮	70	<input type="checkbox"/> HBsAb B肝抗體	300
<input type="checkbox"/> Semen Analysis 精液分析	240	<input type="checkbox"/> Creatinine 肌酸酐	70	<input type="checkbox"/> HBeAg B肝e抗體	400
血液檢查		<input type="checkbox"/> Uric Acid 尿酸	70	<input type="checkbox"/> HBeAb B肝e抗體	400
<input type="checkbox"/> CBC 血液常規檢查	200	<input type="checkbox"/> Cystatin C 胱蛋白C	400	<input type="checkbox"/> Anti-HBc B肝核心抗體	400
<input type="checkbox"/> ESR 紅血球沉降速率	100	<input type="checkbox"/> Microalbumin 尿微量白蛋白	600	<input type="checkbox"/> HCVAb C肝抗體	700
<input type="checkbox"/> PT 凝血酶原時間 ☆	200	<input type="checkbox"/> Total Protein 總蛋白	100	<input type="checkbox"/> HBV DNA B型肝炎病毒核酸定量	3000
<input type="checkbox"/> APTT 部分凝血活酶時間 ☆	200	<input type="checkbox"/> Albumin 白蛋白	100	<input type="checkbox"/> HCV RNA C型肝炎病毒核酸定量	4500
<input type="checkbox"/> HB-EP 血色紫質分析	400	<input type="checkbox"/> GOT 肝酵素 *	70	<input type="checkbox"/> VZV IgG 水痘病毒抗體-G	350
<input type="checkbox"/> G6PD 露豆症	250	<input type="checkbox"/> GPT 肝酵素 *	70	<input type="checkbox"/> Toxoplasma IgG 弓形蟲-G	350
<input type="checkbox"/> Blood Type 血型	50	<input type="checkbox"/> Total/Direct Bilirubin 總膽紅素 *	140	<input type="checkbox"/> Measles IgG 麻疹病毒抗體-G	350
<input type="checkbox"/> Rh Factor Rh因子	100	<input type="checkbox"/> ALP Phosphatase 鹼性磷酸酶	70	<input type="checkbox"/> Rubella IgG 德國麻疹病毒抗體-G	350
血清免疫檢查		<input type="checkbox"/> γ-GT 醅醇轉氨酶	150	<input type="checkbox"/> STS / RPR 梅毒	100
<input type="checkbox"/> Widal / Weil-Felix test 登革熱疾病試驗	300	<input type="checkbox"/> Triglyceride 三酸甘油脂	150	<input type="checkbox"/> TPPA 梅毒螺旋體	300
<input type="checkbox"/> RA 類風濕性關節炎因子	200	<input type="checkbox"/> Cholesterol 總膽固醇	70	<input type="checkbox"/> HIV (AIDS) 愛滋病毒抗體	700
<input type="checkbox"/> hCRP 反應性蛋白	300	<input type="checkbox"/> HDL-Chol 高密度-膽固醇	200	<input type="checkbox"/> HSV 1/2 IgG 疱疹病毒抗體-G	700
<input type="checkbox"/> C3 血液補體-3	250	<input type="checkbox"/> LDL-Chol 低密度-膽固醇	200	<input type="checkbox"/> HSV 1 & 2 IgM 疱疹病毒抗體-M	750
<input type="checkbox"/> C4 血液補體-4	250	<input type="checkbox"/> Troponin-I 心腔梗轉蛋白I	500	血清免疫檢查	
<input type="checkbox"/> IgA 免疫球蛋白A	250	<input type="checkbox"/> LDH 乳酸脫氫酶 *	200	<input type="checkbox"/> Amoebic Ab 阿米巴蟲試驗	500
<input type="checkbox"/> IgG 免疫球蛋白G	250	<input type="checkbox"/> CPK 肌酸磷酸化酶	250	<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori 幽門桿菌抗體	600
<input type="checkbox"/> IgM 免疫球蛋白M	250	<input type="checkbox"/> Lipase 解脂酶	250	<input type="checkbox"/> Chlamydia Ag 衣菌試驗	500
<input type="checkbox"/> IgE 免疫球蛋白E	400	<input type="checkbox"/> Amylase 澱粉酶	100	<input type="checkbox"/> Chlamydia DNA 衣菌菌檢查	800
<input type="checkbox"/> ANA 抗組織核抗體	300	<input type="checkbox"/> Vitamin B12 維生素B12	600	<input type="checkbox"/> Gonorrhea DNA 淋病雙球菌檢查	800
<input type="checkbox"/> MAST 梅毒過敏原免疫試驗	3000	<input type="checkbox"/> Folate 葉酸免疫分析	600	<input type="checkbox"/> GBS Culture B型溶血性鏈球菌培養	400
腫瘤標記檢查		<input type="checkbox"/> Ferritin 鐵蛋白	600	<input type="checkbox"/> Aerobic Culture 嗜氣細菌培養鑑定	400
<input type="checkbox"/> AFP 肝癌	400	<input type="checkbox"/> Iron and TIBC 鐵和總鐵結合能力	400	<input type="checkbox"/> AST 藥物敏感性試驗	400
<input type="checkbox"/> CA-125 卵巢、子宮肌瘤	800	<input type="checkbox"/> Na 鈉 <input type="checkbox"/> K 鉀 * <input type="checkbox"/> Cl 氯	70 each	檢驗體：血清檢查	
<input type="checkbox"/> CA-153 乳癌	1000	<input type="checkbox"/> Ca 鈣 <input type="checkbox"/> P 磷	70 each	<input type="checkbox"/> 產檢 041	250
<input type="checkbox"/> CA-199 胰臟、大腸癌	800	<input type="checkbox"/> Mg 鎂	150	<input type="checkbox"/> 產檢 045	400
<input type="checkbox"/> CEA 直腸、肺癌	600	<input type="checkbox"/> BAP 骨質增生性鹼性磷酸酶	500	<input type="checkbox"/> Free β-hCG & PAPP-A	1200
<input type="checkbox"/> PSA 攝護腺癌	500	<input type="checkbox"/> 25-OH Vitamin D3 維生素D(避光)	1200	<input type="checkbox"/> OGTT (75g) 口服葡萄糖耐量試驗	350
<input type="checkbox"/> Free PSA/PSA ratio 攝護腺癌	1000	<input type="checkbox"/> Prolactin 催乳素	400	<input type="checkbox"/> Glucose 1Hr (糖耐-50g)	70
<input type="checkbox"/> NSE 肺小細胞癌 *	1000	<input type="checkbox"/> Progesterone 黃體酮劑	400	<input type="checkbox"/> Cord Blood IgE 聯血免疫球蛋白E	400
<input type="checkbox"/> Cyfra 21-1 肺非小細胞癌	1000	<input type="checkbox"/> Estradiol、E2 二氮基雌激素	500	<input type="checkbox"/> 成人健檢 → 健康 <input type="checkbox"/> C 檢 → 3000	
<input type="checkbox"/> CA72-4 腸胃腫瘤	800	<input type="checkbox"/> LH 黃體化激素	400	<input type="checkbox"/> A 檢 → 400 <input type="checkbox"/> D 檢 → 3500	
<input type="checkbox"/> SCC 鱗狀細胞癌、子宮頸癌	1000	<input type="checkbox"/> FSH 濾泡刺激素	400	<input type="checkbox"/> B 檢 → 1000 <input type="checkbox"/> E 檢 → 4800	
<input type="checkbox"/> EB VCA-IgA 鼻咽癌	400	<input type="checkbox"/> β-hCG 人類絨毛膜刺激素	500	其他檢查	
常用藥物檢查		<input type="checkbox"/> AMH 抗穆勒氏管刺激素	1600	<input type="checkbox"/> Apo E genotyping 阿茲海默症風險因子	1500
<input type="checkbox"/> Amphetamine 安非他命檢測	600	<input type="checkbox"/> Testosterone 睪丸酮	400	<input type="checkbox"/> 5-HTTLPR 憂鬱症風險因子	1500
<input type="checkbox"/> Morphine(Heroin)嗎啡(海洛因)檢測	600	<input type="checkbox"/> T3 三碘甲腺氨酸	300	<input type="checkbox"/> Cotinine 尼古丁	1200
<input type="checkbox"/> Cannabinoids 大麻檢測	600	<input type="checkbox"/> T4 四碘甲腺氨酸	250		
<input type="checkbox"/> Cocaine 古柯鹼檢測	600	<input type="checkbox"/> TSH 甲狀腺刺激素	400		
<input type="checkbox"/> Phencyclidine 天使塵檢測	600	<input type="checkbox"/> Free T3 游離三碘甲腺氨酸	500		
		<input type="checkbox"/> Free T4 游離四碘甲腺氨酸	500		

圖 1-1-1、醫檢處檢查表單。



圖 1-1-2、血液檢測程序示意圖。[1]

隨著時代且技術演進，現今感測元件已達到相當穩定，而且偵測極限也日漸突破，感測範圍更是與人類生活息息相關，舉凡生物分子、光、電、熱、氣體等感測器也相繼問世，而在血液檢測運用上為了追求更快速便捷的檢測效率，感測器的概念確實是值得研究關注的。

在目前市面上開發最完整且研究透徹的血液感測器為血糖儀，只要滴入少量全血，便可在幾秒鐘就獲得其分析結果，而整體血糖儀架構，優勢在於檢測快速、穩定，並能大量生產，這些優點皆是未來感測器研究開發的重要指標。

其中生醫感測器定義為使用固定化生物分子(immobilized biomolecules)結合換能器，用來偵測生體內或生體外的環境化學物質或與之起特異性交互作用後產生回應的一種裝置，整體發展已有部分達到上市的水平，是個正於開發中的新興領域。

本研究所囊括的感測領域為生物分子的鍵結，透過檢測生物分子(本研究以 Biotin 接合帶螢光的 Streptavidin)，監測樣本隨外界或是內在誘發之生理化學反應將此變異量轉換成特定信號(如電化學、螢光、光譜、質譜分析等等)。

生醫晶片的概念則是將繁瑣的生化反應過程微縮至一極小晶片中，有效降低樣品量、實驗成本、反應時間，而現今生醫感測器共同追求目標則是，更小尺度的晶片設計以及更高的偵測極限。

本論文所應用的檢測系統為螢光檢測法，以特定波長且能量集中的光束(如雷射)去激發與待測物相接之螢光，藉由讀取螢光強度以獲知待測位置及其濃度，理論方面是由短波長之激發光激發螢光分子，分子吸收此波長之能量後產生能階躍遷，再藉由散射出更長波長的放射光而回到穩定態，因待測物之濃度無法直接測量，所以將螢光分子標定於待測物上，藉由發出的光強度，知待測物定性及定量上之濃度。螢光檢測為目前微型化技術中，於靈敏度及選擇性具較佳性能，機制如圖1-1-3。

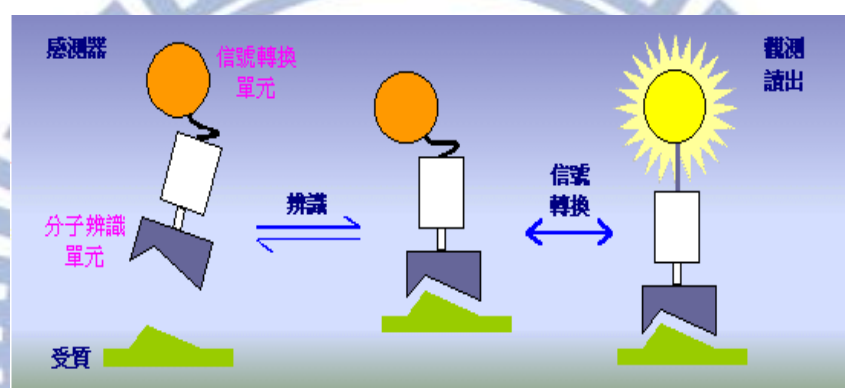


圖1-1-3、螢光檢測流程示意圖。[1]

在一般的生醫研究當中，通常為了製造適合活細胞或細菌適合生存的環境，而去配置仿生溶液(如 PBS buffer)，但本研究是運用全血當實驗溶液，直接萃取人體的全血進行分離並且修飾生物分子，將可能面臨的難題先行克服，對於未來實際運用於人體上更是邁進一大步。

美國加州理工學院 Heath 團隊[1]在此領域中有著相當深入的研究，也是以人體全血直接透過微流道結構分離出血漿，再行後段生物分子感測，一序列不同生物分子專一性分別到所欲接合的部位，此概念稱為血液序列條碼(blood barcode)，如圖 1-1-4，接著在針對此系統整理出可有效感測的生物分子種類並且分析螢光強度，如圖 1-1-5。

1-2 血液分離機制

血液中約為 55% 血漿以及 45% 血球跟血小板所組成，如圖 1-2-1，其中血漿含 90% 的水，由於本生醫感測平台使用的感測方式為利用光學原理，判斷血漿的分離率以及螢光偵測強度，所以血液組成顏色會影響結果上之判讀，造成偵測結果上的干擾，針對血液上顏色分析可得知，血漿顏色為淡黃色接近透明，並不會影響感測結果，然而血球部分，尤其紅血球當中血紅素，對於感測結果會造成極大干擾，使得偵測靈敏度大為降低，所以在血液檢體的生物感測器設計時，分離血液的效率必定需顧及，當今利用微流道技術進行血液分離並且結合感測器系統，減少了繁瑣的過濾血液程序，在單一系統內能做連續且即時感測的改善，而其中過濾血液的微流道設計，在學術演進當中，也有相當進展，分離血液方法之進程如下。

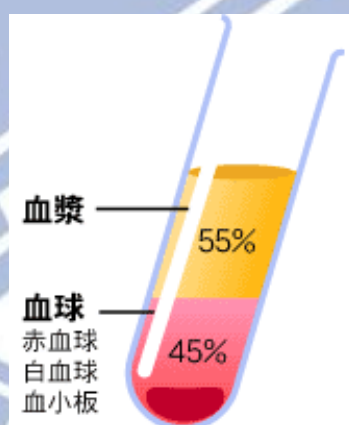


圖 1-2-1、血液組成示意圖。[1]

(1) 柱狀結構

藉由血液當中血球及血漿的尺度大小不盡相同，設計出微流道系統，當血液流過時，血球被柱狀結構所阻擋，只有血漿流過，達成血球血漿分離之目的，此技術必須統整血液黏滯係數、血球大小，且配合微流道結構以及控制流體速度，使血液達成分離效果，因此柱狀結構微流道系統進展，首先以非血液

的流體，內含與血球大小相似的粒子進行一系列模擬和實驗，包括結構、流體、粒子性質...等等，撇開各種生物相容等複雜問題，於 2004 年有了初步貢獻[2]，如圖 1-2-1，在此為全血液在微流道系統中分離的機制寫下首頁，透過前述完整的研究才突破至全血的分離，爾後 2007 年成功以微流道柱狀結構系統分離血液並感測[3]，如圖 1-2-2，不過缺點在於，考慮到元件製程、血球的可壓縮性以及血液中各種複雜組成的話，微流道柱狀結構系統無法完全阻擋並達分離效果，因此本設計仍有修正空間。

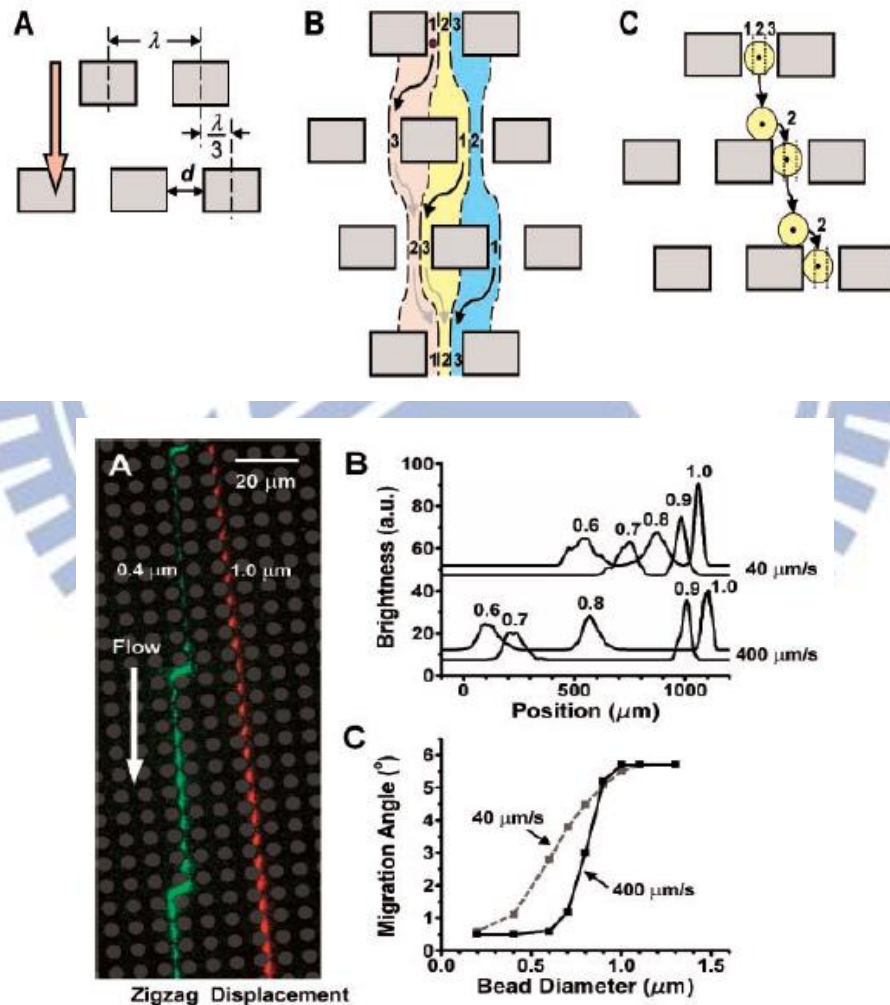


圖 1-2-2、普林斯頓大學 Sturm 團隊分離粒子實驗架構圖。[2]

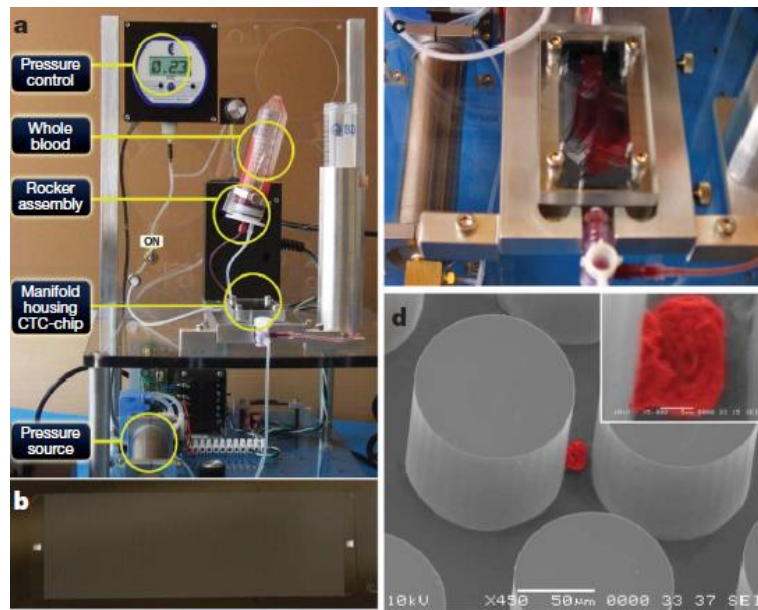


圖 1-2-3、密西根大學健康系統 Toner 團隊分離血液實驗裝置圖。[3]

(2) Zweifach–Fung 效應

2006 年發展了新概念的微流道架構，可有效分離血液當中的血球及血漿，如圖 1-2-4，利用 Zweifach–Fung 效應[4]，原理為在流體中的粒子在流經微流道分叉處時，會選擇流速較快的微流道主線流動，而非流速較慢的分支流動，所以設計系統，使血球沿著流速較快的微流道流動，並在分支蒐集分離出的血漿，接著進行感測，運用此理論，因此達到分離血液效果，不過微流道設計必須顧忌主流道與分支的比例設計，會使整體流道太複雜造成製程上的困難，再者，理想中的血液感測器是從分離血液階段到後段感測所有程序一體成型，而非如本結構一樣是過濾出血漿後還要另外收集才能進行下一個步驟，因此仍有待改善。

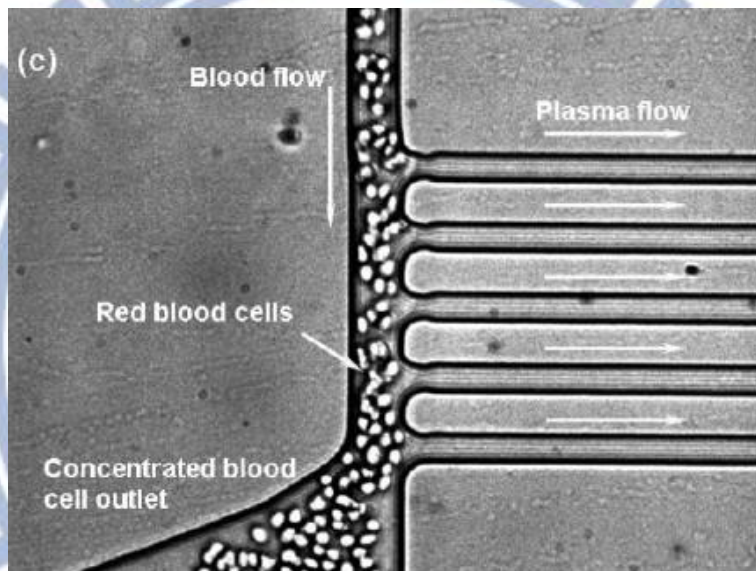
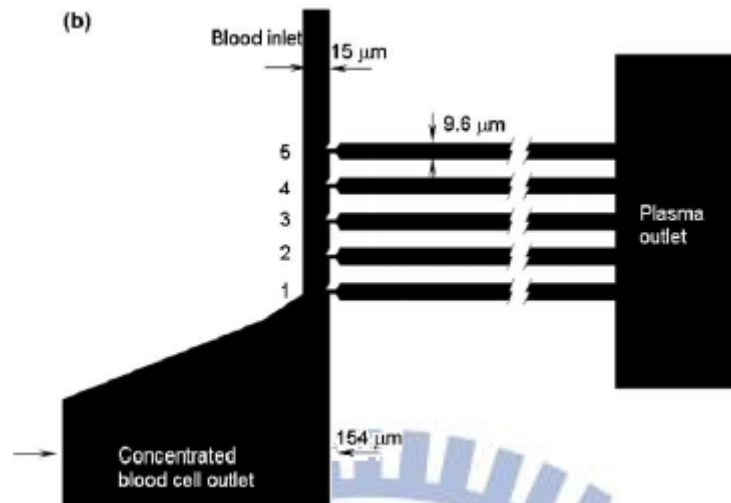


圖 1-2-4、賓夕法尼亞州立大學 Zahn 團隊微流道分離血液架構
及 SEM(Scanning Electron Microscopy)圖。[4]

(3) 重力結構

考慮血球尺寸及比重，相較於血漿受重力有顯著影響，造成血球向下堆積，達成血漿分離效果，且此系統只需簡單的推進力控制流體前進，在地球上任何地方(即存在重力處)便可作用，這對感測器未來的普及性有著相當大之貢獻，於 2011 年此分離血液方式才初次發表[5]，如圖 1-2-5，顧及分離作用力是重力，且機制還處於起步，仍有相當大的發展空間有待突破。

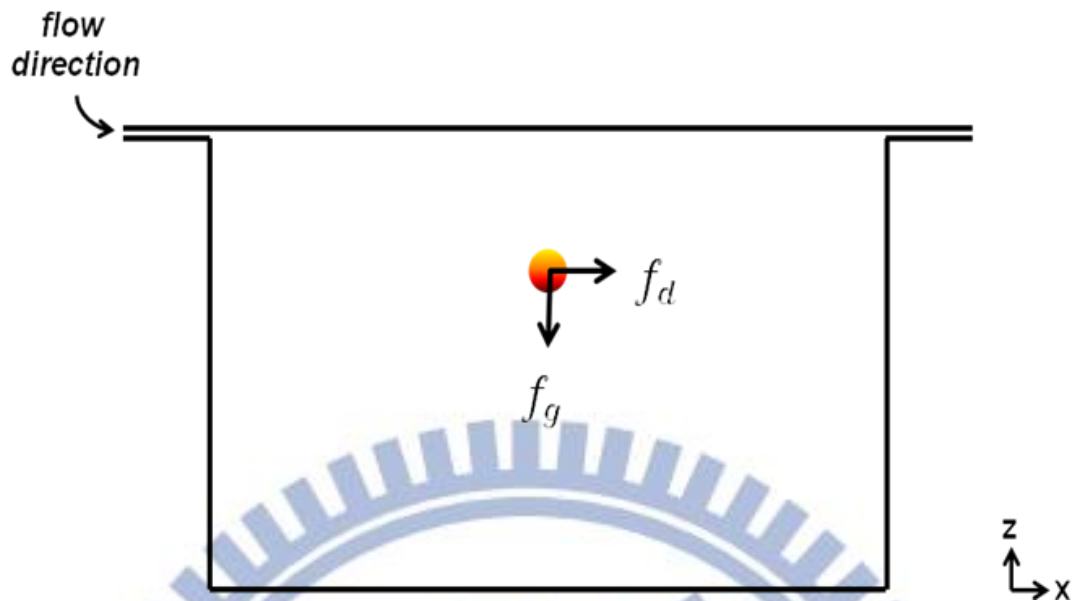


圖 1-2-5、血液重力過濾原理圖。 f_g :重力， f_d :拖曳力.[5]

本研究設計概念參照柏克萊加州大學 Luke P. Lee 團隊的過濾血液系統，如圖 1-2-6，採用原理為考慮血液組成的尺度、重量、黏滯係數等相關特性，透過重力作用驅動，將血球與血漿分離，撇開血球的阻礙，以利於後段感測效率的提升，而且在此設計上，從全血滴進至產生結果皆在單一元件中就完成，符合生醫感測器的最理想目標，文中提到，在微流道設計中，血液做沉積的位置，流道長以及流道深有著影響分離效果的關鍵，如表 1-2-1，可知當 h_1/h_0 比例須至少為 6.25， L/h_0 比例則至少為 2.5，再搭配圖中所整理之流速便可使血液達到分離血漿的效果。（ h_0 為流道高度， h_1 為沉積區域深， L 為沉積區域長）

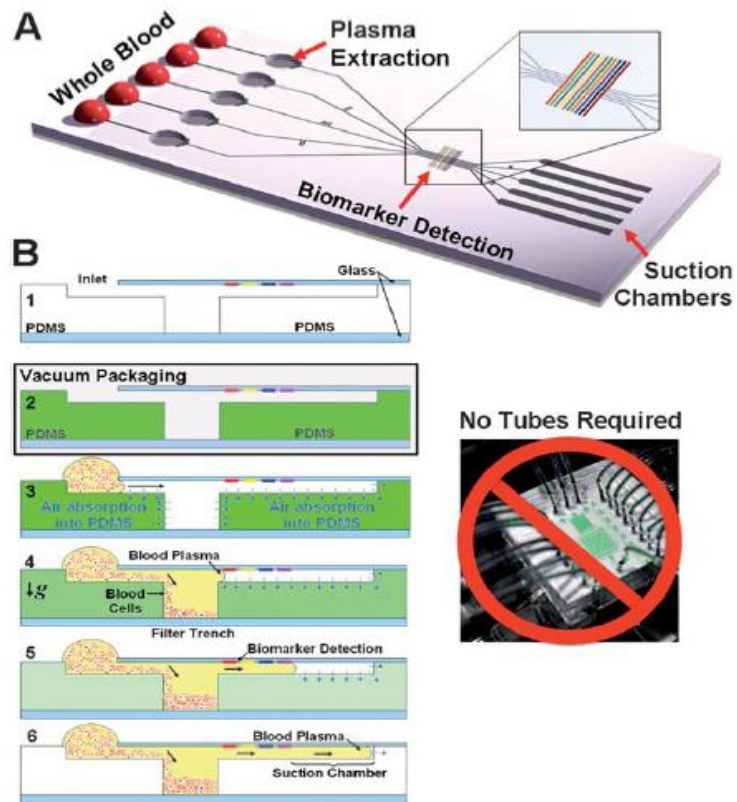
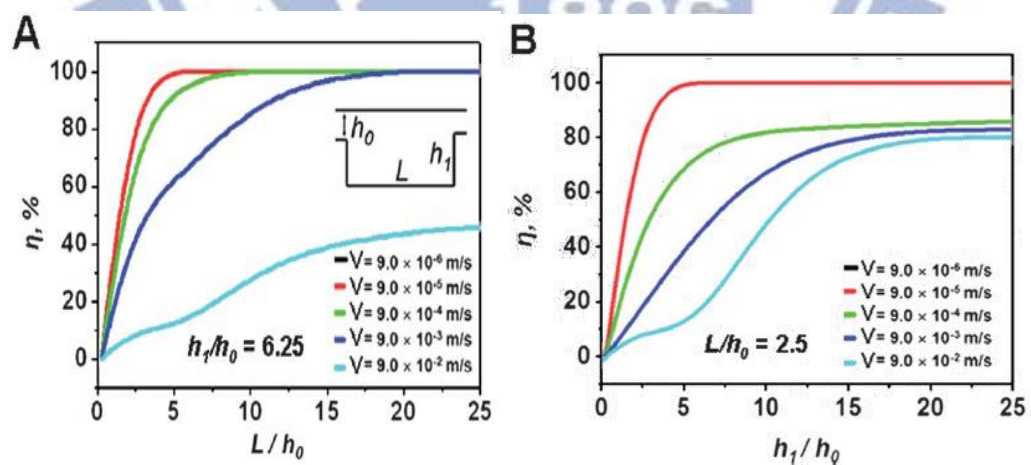


圖 1-2-6、柏克萊加州大學 Luke P. Lee 團隊血液分離機制示意圖。[5]

表 1-2-1、柏克萊加州大學 Lee 團隊微流道比例與血液分離效率比較表。[5]



不過此分離血液系統缺點在於，它是由三層結構所組成，如圖 1-2-7，因此主要會遇到兩個大問題；(1) **流道對準** 由於是各自建立不同的微流道結構並且組成，血液沉積處也必須手工挖洞，在接合的步驟時會遇到對準的問題，造成每次接合都會有誤差，使得實驗結果出現偏差。(2) **層間接合** 此系統有賴於層與層之間緊密接合，才能使得流體順利推進，沒有漏液或是堵塞等現象發生，若需接合的接面變多時，會產生更多的變因，進而降低實驗成功率。

因此本研究以重力驅動為基礎，延伸此概念設計微流道結構，構想能否以更快速度更高感測靈敏度達成血液感測目的之元件，以縮小微流道尺度為手段，亦能達到血球血漿分離目的，使整體感測所耗時間剪短，並運用方式再使感測靈敏度提高，以追求更完善的血液感測元件。

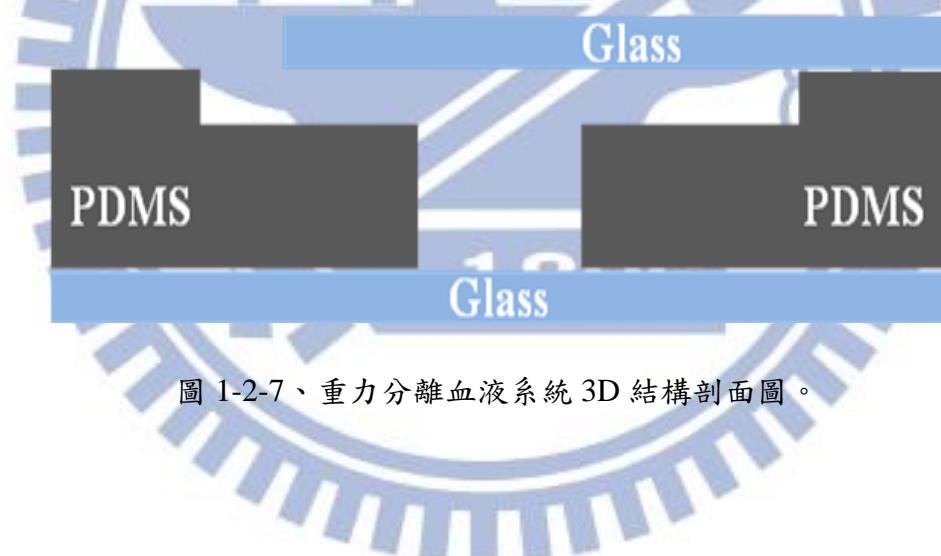


圖 1-2-7、重力分離血液系統 3D 結構剖面圖。

1-3 氧化鋅特性及感測

氧化鋅(ZnO)為鋅的氧化物，難溶於水，可溶於酸鹼，在半導體、壓電材料、化工領域皆具重大用處，其生物相容性佳的特性也使之在生醫產業中運用巨增，本文強調於生物分子修飾部分，所以只介紹於生醫領域之優勢。

首先探討氧化鋅的製備方式，主要可由用途、溫度、形態、製備場所…等等，區分為許多不同型態，以下列出幾點實驗室常見的氧化鋅製備方法 (1)水熱法 (2)化學氣相沉積 (3)分子束磊晶 (4)濺鍍，分別就特性及優缺點做闡述。

(1) 水熱法

水熱合成法(Hydrothermal)為常見的無機合成法，於各領域材料合成技術中皆有廣泛運用，原理為將需反應的原料封閉於空間當中，如圖 1-3-1，使之處於非平衡態的合成體系中，能使生成的材料擁有較優良性質，優勢為粒徑小、分佈均勻、連續生產、成本低，而且本實驗需定義位置在微流道系統生成氧化鋅奈米柱，因此水熱法為最適合的方式。

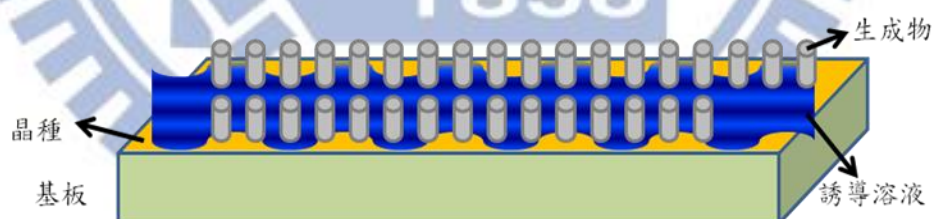


圖 1-3-1、水熱法示意圖。

(2) 化學氣相沉積

CVD(Chemical Vapor Deposition)，在半導體產業中常用來成長薄膜的技術，如圖 1-3-2，將晶圓暴露於一種或多種前驅物上，利用在基板表面發生的化學反應或化學分解來產生欲沉積的薄膜，反應過程伴隨之副產品，會被主氣流帶走，不會留在反應腔內，以保持產物純度，此製程缺點必須作用於極高溫，且化學及熱力關係反應間關連尚未清楚，因此難以確保生成產物品質。

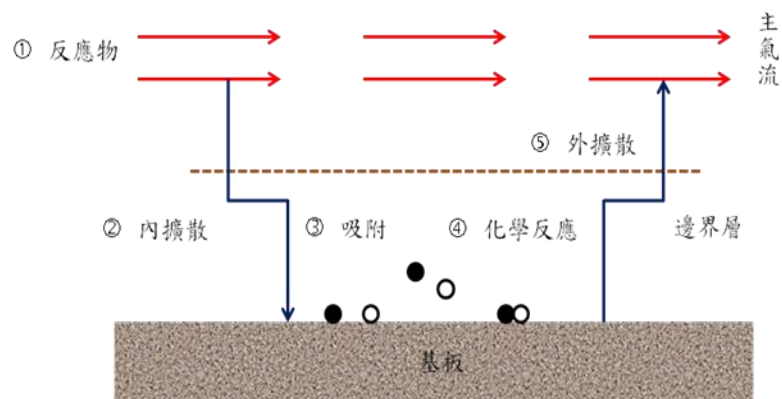


圖 1-3-2、化學氣相沉積示意圖。[6]

(3) 分子束磊晶

MBE(Molecular Beam Epitaxy)以真空蒸鍍方式進行磊晶沉積，以極高熱速率沉積於基板上，可精準控制其生成的厚度及晶格結構，如圖 1-3-3，但此製程方式真空條件要求嚴謹，且無法有效掌握其均勻度，考量需求以及效應評估，此製程方式較適合對於產物晶向結構有要求之使用。

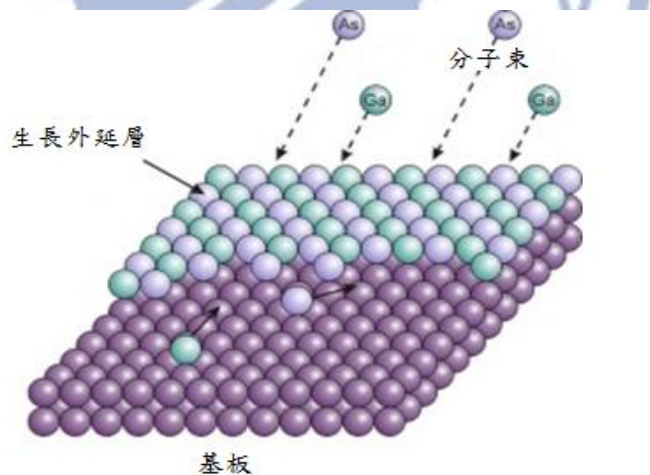


圖 1-3-3、分子束磊晶示意圖。[7]

(4) 濺鍍

為物理氣相澱積之一種技術，以靶中的原子被高能量離子撞擊進而離開固體進入氣體的過程，過程中離子來自於電漿，在充有惰性氣體的真空系統中，透過高壓電場作用，使得靶材的原子或分子沉積於標地物上形成薄膜，如圖

1-3-4，但有鑑於本研究需定義生成結構位置，因此不採納這個製程方式。

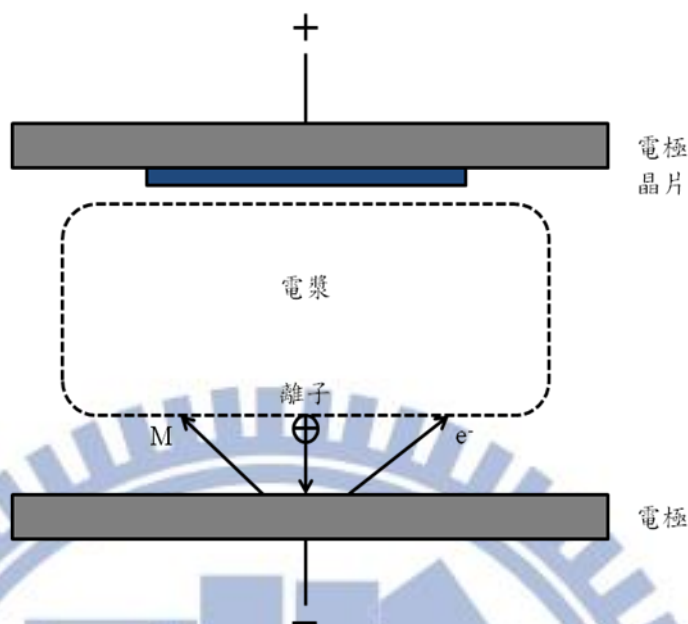


圖 1-3-4、濺鍍示意圖。[8]

生醫晶片的微小化及高偵測極限的目標，不僅在元件尺度或結構設計方面下工夫，也有賴不同材料間之結合，以水熱法生長氧化鋅奈米柱之優勢在於，可依不同形貌的氧化鋅奈米柱外型需求，透過參雜不同的元素使其生長，對於增加或減少所欲表面積，可靠著生長針狀、柱狀、平面狀等表面形貌決定，生長機制如圖 1-3-5，透過不同元素的誘發，使氧化鋅往不同晶向生長或抑止發展，造成結構上有所差異。[6]

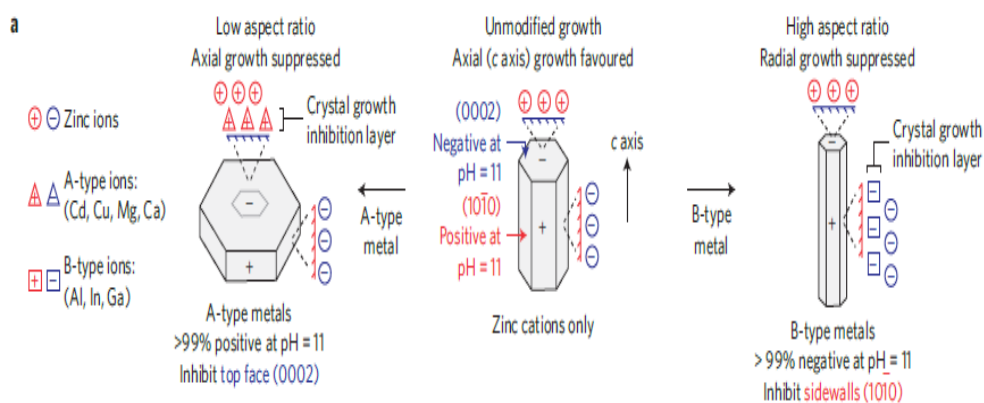


圖 1-3-5、氧化鋅參雜生長機制。[9]

靠著氧化鋅相當強的穩固結構，能確保修飾標的並不會隨時間或外力而消失，以及高生物相容性，對於生醫修飾不具排斥性，並且可隨其想要生長的形貌以及位置，設計微流道結構，運用水熱生長法，生長氧化鋅奈米鋅結構，因此在提高感測極限的媒介中，為一常用的材料。

利用氧化鋅結構增加其感測表面積的研究成果已相當成熟，透過此機制結合於生物分子修飾方面，也有極佳的發展，如圖 1-3-6，靠氧化鋅結構助長可附著的面積，造成螢光強度提升，增加感測靈敏度的極限。[10][11]

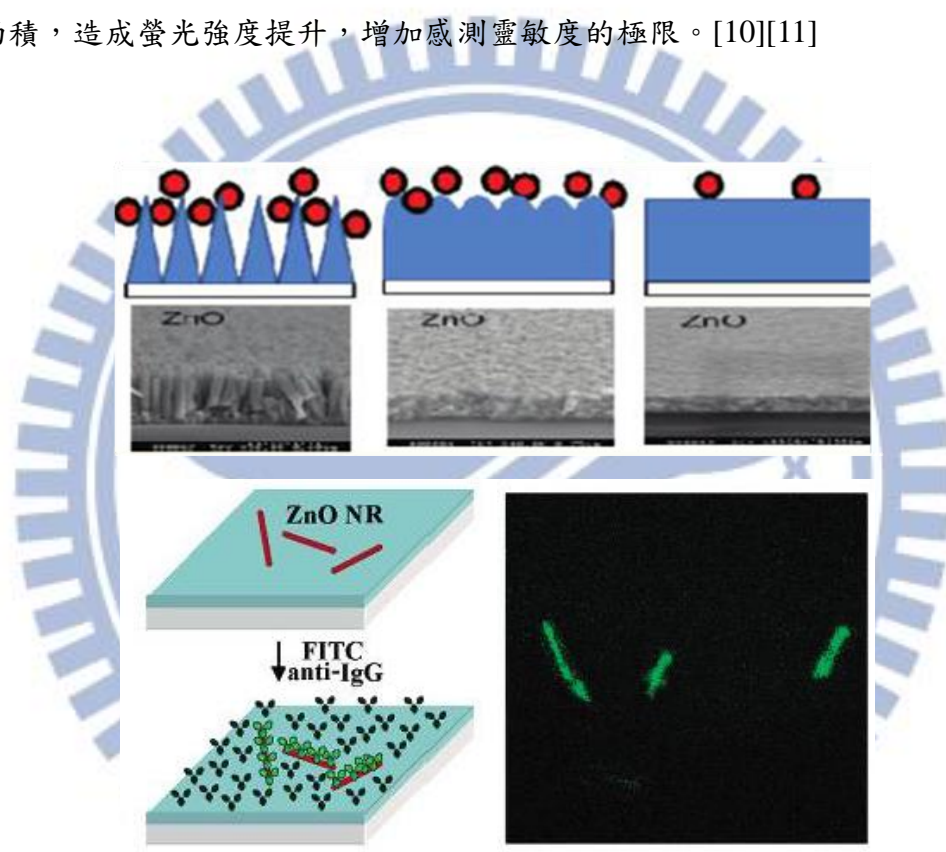


圖 1-3-6、氧化鋅結構與生物分子修飾及螢光關係圖。[10][11]

有賴於氧化鋅結構的結合，如前圖所示，螢光偵測結果可看到，對元件表面整體進行修飾後，顯示螢光強度差異位於氧化鋅奈米線部分，其提升的差距將有助於感測上濃度的極限下探，因此本研究將以此概念，運用在於血液感測平台上。

1-4 自動吸取流體機制

科技的發展日新月異，任何進步大多希望能節省資源且發揮最大效能，在微流道系統中，往往需要推進器的施加外力，才能使流體能夠移動，而這往往造成元件的複雜化及在普及上遇到困難，於開發可攜式元件的理想相互抵觸，因此有賴於 PDMS 此材料的透氣特性，先在出入口端打洞完成後，進行抽氣，使得 PDMS 內的空氣被抽出，接著封住出入口端，再進行抽氣，外緣的 PDMS 空氣會繼續被抽出，而內部流道則在開啟入口端時，PDMS 吸入空氣的力量驅使流體向前流動，因而不需要施加外力，此機制示意如圖 1-4-1。[9]

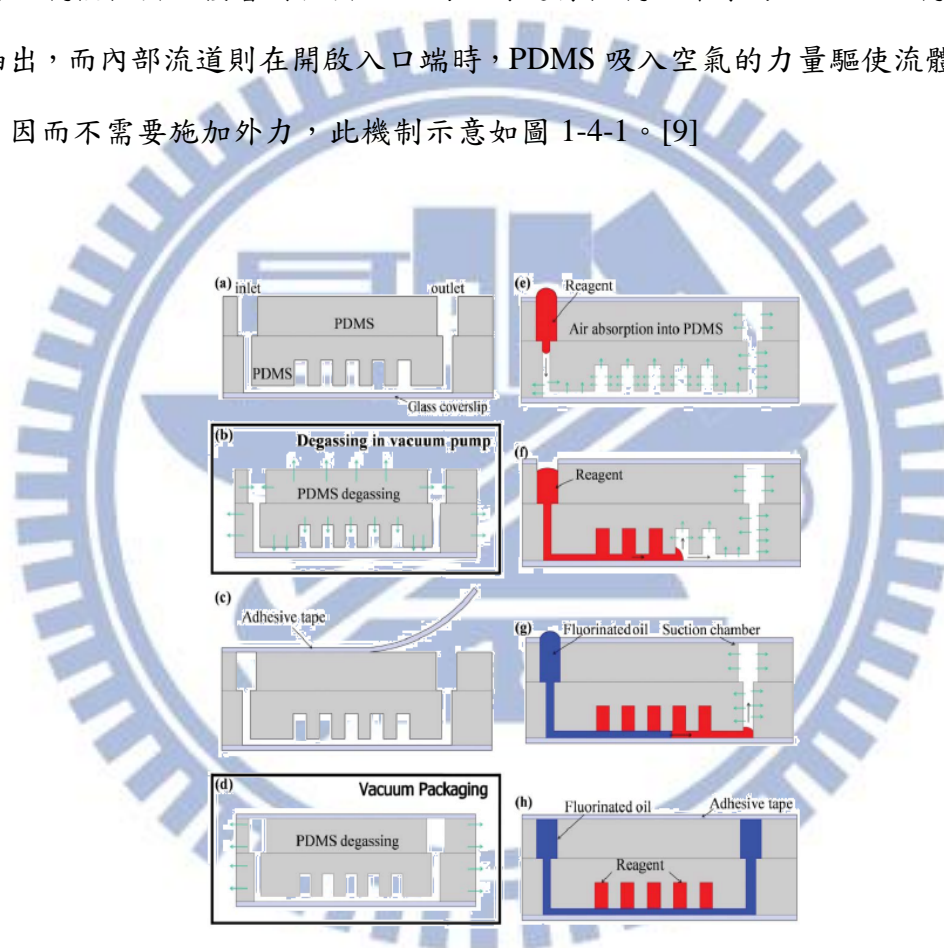


圖 1-4-1、自動吸取流體之 PDMS 裝置原理圖。[12]

1-5 研究動機

生物分子感測器為目前結合生物、化學、電子、材料等專業學科，集合成的跨領域產物，不僅在學術上追求更微小精密的元件，偵測極限也不斷地突破，對於生物醫學上對人類的貢獻更是無遠弗屆。

血液為生物體中，組成複雜且物化性特殊的檢體，相當多疾病可藉由直接採集血液，並可初步得知是否感染該疾病，因此開發以血液直接做為感測檢體之元件，為當前研究上努力的目標，目標為除了省時也能普及，意指不需要配製仿生溶液，可直接用全血做為檢體。

本研究主題所追求之目標有三項 (1)**血液分離** 感測元件中必須具備分離血液的機制，因為血球本身會嚴重影響感測結果的判讀。(2)**感測極限** 追求更高的感測極限為生物分子感測器之原則，透過氧化鋅結構以及微流道系統的結合，以達到提升感測極限之目的。(3)**普及使用** 生物分子感測器終極目標為作用於人類身上，能達到快速、準確、方便操作等作用，因此設計全自動化並且不需要任何外加作用力場的元件為首要目標。(如:血糖儀)

將上述三大原則做整合，集中於單一個元件系統中，能達到只採集極少量血液，便可完成生物分子感測之實驗目的，不必像醫院利用繁雜的離心血液系統再行檢測，往往需要數個工作天，不只耗時而機台也相當占空間且昂貴，若能運用本研究系統的概念延伸，必能達到省時、低成本、高檢測極限的目標，朝血液的生醫感測晶片全面普遍化又更進一步。

1-6 論文架構

本論文分為四個章節。第一章為「緒論」，首先簡介血液運用在生物感測器的研究，接著回顧血液分離機制的進程，然後結合到氧化鋅奈米柱如何增進螢光偵測方面的優勢，並且介紹自動吸取流體機制，期盼以上整合能打下未來在生醫晶片普及化的基石。

第二章為「血液微流體感測系統理論模擬及製程」，針對在微流道系統中，造成血液分離的主要機制重力場，利用 COMSOL 模擬其流體與流道的關係，並以此結論做為感測系統的設計方針，接著是完整的元件製程論述。

第三章為「實驗結果與討論」，運用螢光檢測法，利用自組裝技術 (Self-assembly technique) 於元件玻璃的表面修飾上 Amino Propyl Triethoxy Silane (APTES) 與 Biotin，再將不同濃度 Streptavidin 加入全血中流進系統中進行感測，結論包含到氧化鋅結構增加螢光偵測靈敏度比較、感測系統的偵測及運用範圍、自動吸取流體機制之結合。

第四章為「結論及未來展望」，將本研究整體總結，並且提出此生物感測器可再發展的願景及建議。

第二章

血液微流體感測系統理論模擬及製程

2-1 微流道結構與流場模擬

引用前述在 2011 年發表的以重力機制分離出血漿的論文，如表 1-2-1 所示，血液分離的效率僅與沉積腔體的長與深有關聯，因此承襲本研究要降低血液量及過濾時間快速的需求，所以將沉積腔體的體積縮減，仍要不失血漿過濾的效應，因此針對微流道構造與流體速率的關係進行模擬，使用的模擬軟體為 Comsol Multiphysics 4.3 版本。

血液相關的模擬，所有血液的物理特性參數如圖 2-1-1，其中打勾部分是在針對流體力學及重力學相關模擬時必須運用到的參數項，因此透過搜尋，將血液黏滯係數 $3\text{e-}3\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 及比重 1125 kg/m^3 參數釐清，才可進行模擬。

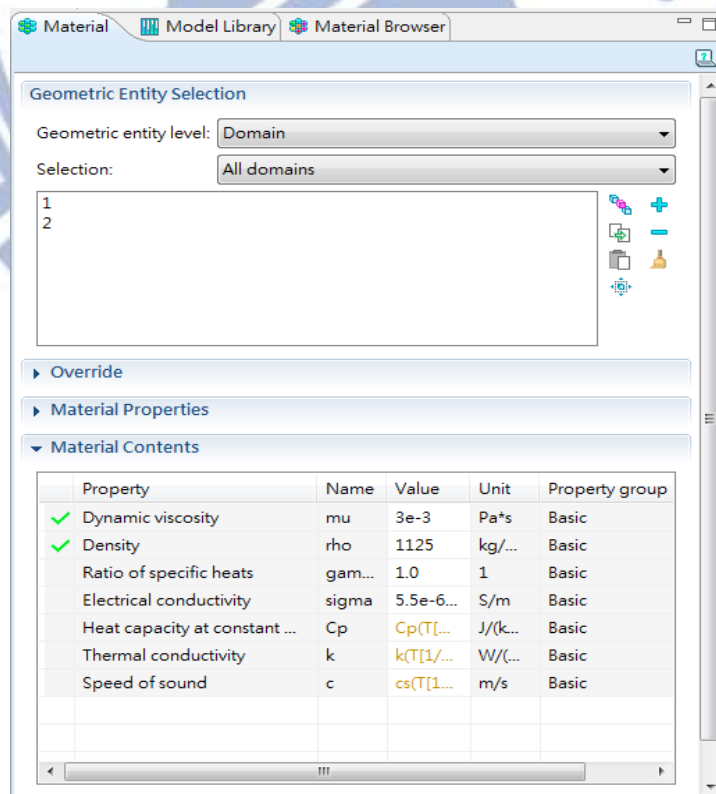


圖 2-1-1、血液物理特性參數。

以上對於血液的流體性質與微流道關係的模擬部分，首先使用的公式為影響血液流動之流體力學 Navier–Stokes equations，此公式為描述像液體和空氣之流體物質運動的方程式，作用於特定區域內流體的動態平衡，其中建立了流體中粒子的動量改變率及留體內部壓力及黏滯力關係，公式為下列兩平衡式組成，重要參數分別代表(\mathbf{u} :流速、 ρ :流體密度、 μ :黏滯係數、 p :壓力、 \mathbf{f} :外加力場)。

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot \left[-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T) - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \mathbf{u})\mathbf{I} \right] + \mathbf{F} \quad (2.1.1)$$

$$\nabla \cdot (\rho\mathbf{u}) = 0 \quad (2.1.2)$$

考慮到血液在微流道中的流動行為，可觀察為流體作用，配合各流體獨有的雷諾數，本實驗血液雷諾數若結合適當流速，可促使血液產生層流，對重力分離機制有相當助益，模擬當中使用層流中運用 Navier–Stokes equations 進行模擬，如圖 2-1-2。

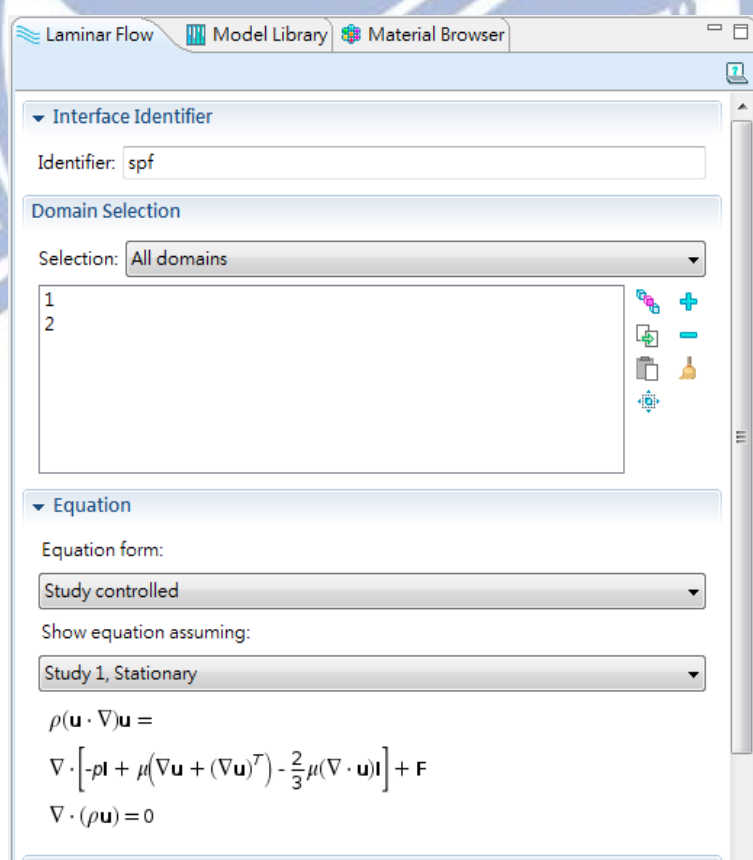


圖 2-1-2、運用流體力學 Navier–Stokes 公式進行模擬。

本實驗分離機制為依靠重力將尺度及比重相對大的血球沉積，以達成分離之效果，因此在模擬中加上粒子間之作用，參照血球的比重 1250 kg/m^3 以及直徑 10 um 參數，如圖 2-1-3，代入重力項公式，如圖 2-1-4，重要參數分別代表 (m_p : 粒子重量、 ρ_p : 粒子密度)。

$$F = m_p g \frac{(\rho_p - \rho)}{\rho_p} \quad (2.1.3)$$

透過上述公式彙整，模擬出微流道與流體行為的結論，可用此為微流道設計的基礎，觀察流速的變化，判斷其設計是否可行。

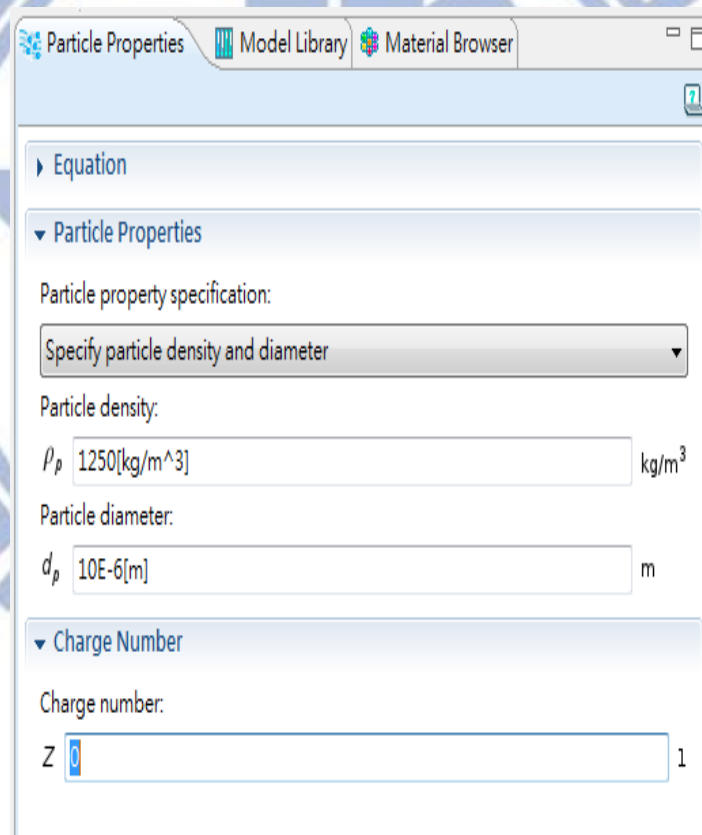


圖 2-1-3、血球物理特性參數。

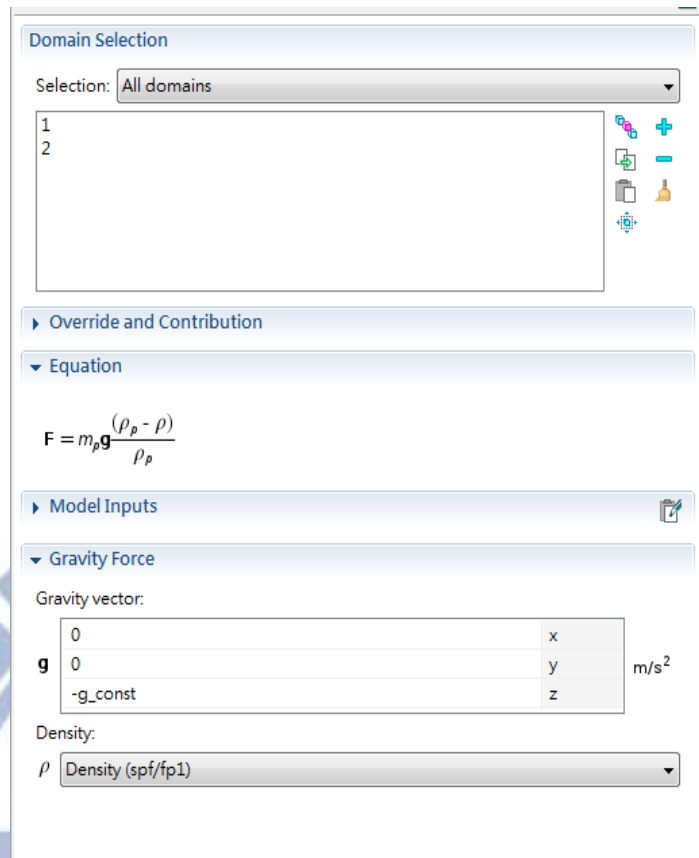


圖 2-1-4、運用重力學公式進行模擬。

進行模擬目的在於觀察，若在沉積空間上流體速率的高點彼此太過相近，會導致血球無法向下沉積，就直接經過微流道，因此先以模擬方式初估流體趨勢，模擬數值代入其血液性質及微流道尺度，數據如下。

粒子與流道寬相對直徑 $2.5e-1$ ，粒子(即血球)比重 $1.125e3 \text{ kg/m}^3$ ，流道高 100 um ，而沉積空間體積長 x 寬 x 高，長分別從 $2000-1000-100 \text{ um}$ 遞減，寬 x 高為 $2000 \text{ um} \times 2000 \text{ um}$ ，初始流速 $8.675e-4 \text{ m/s}$ ，進行改變 X 軸模擬。

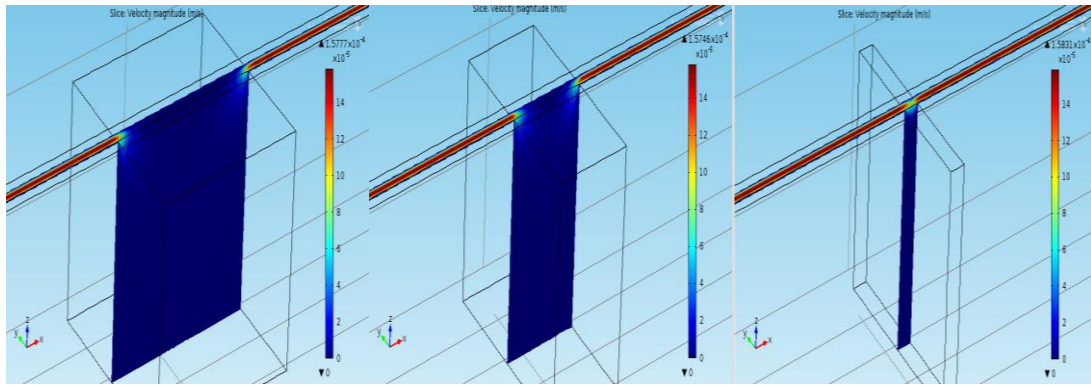


圖 2-1-5、COMSOL 模擬圖(改變 X 軸)。

由圖 2-1-5 可看出，若沉積血液的空間長度越窄，微流體流速高點越接近，因此就無血漿分離之效果，因此縮減 X 軸方向長並不可行。

另外針對沉積血液的空間寬度做縮減，寬分別從 2000-1000-100 μm 遞減，長 x 高為 2000 μm x 2000 μm ，剩餘數據與前者相同，進行改變 Y 軸模擬。

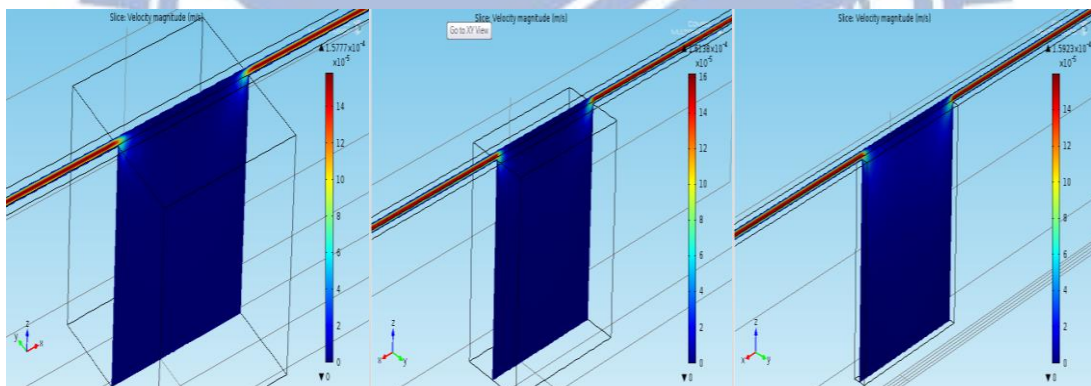


圖 2-1-6、COMSOL 模擬圖(改變 Y 軸)。

由圖 2-1-6 可看出，若沉積血液的空間寬度越窄，微流體流速高點並無影響，血漿分離之效果依然存在，只是能容納的存血量減少，也能因此較快收集到過濾後的血漿並減少血液的需求量，所以縮減 Y 軸方向長設計納入考量。

縮減 Y 軸方向長時，縮減比例與整體可容納體積成正比關係，考慮到整體容納體積與流速關係，能初步推斷其過濾時間，能明顯得知，若是以快速得到極少量檢體為目的，可將 Y 軸長縮減最多至與微流道寬同長，此結構將為以重力

機制分離血漿平台中，可容納血量構思中，最節省檢體量的微流道設計。

若欲改變微流道的設計，則流體的行為必定受到影響，因此針對流體在實驗中使用到的微流體分別就三大類進行模擬，首先為微流道於沉積空間之正中間，接著為微流道於沉積空間之邊緣，最後則是縮減沉積空間寬度至與微流道同寬，三者流體在出入口端時，可流竄的方向從多到少，因此模擬流速，確保流體行為不變，在改變微流道設計的前提下，分離血漿的效果才可進行。

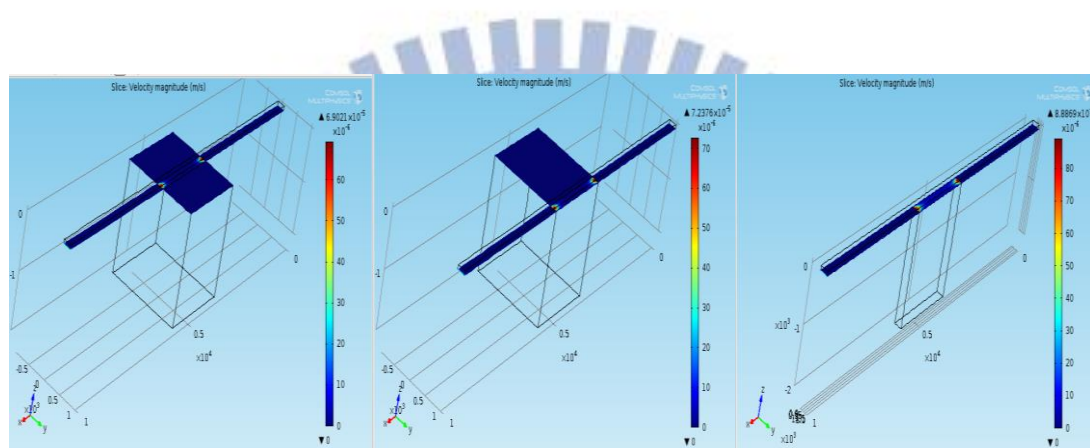


圖 2-1-7、COMSOL 模擬改變微流道設計出入口端之流速關係圖。

由圖 2-1-7 可看出，改變微流道結構時，出入口端的流速高點從左到右分別為 $6.9021 \times 10^{-5} \text{ m/s}$, $7.2376 \times 10^{-5} \text{ m/s}$, $8.8869 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ ，改變幅度極小，因此可初步判斷，改變到微流道結構時，其流體在出入口端可流竄的方向數，並不會影響到血漿分離的機制。

接著進行粒子(意指血球)分離的模擬，針對血球於微流道結構分離行為進行模擬，相關參數如前述的流場模擬參數，模擬結果如圖 2-1-8，圖中藍色小點為粒子，分別代表不同沉積區域的長度，若長度越長其沉積效果較顯著，而長度越小時，血球不易向下沉積，導致血液沉積效果變差。

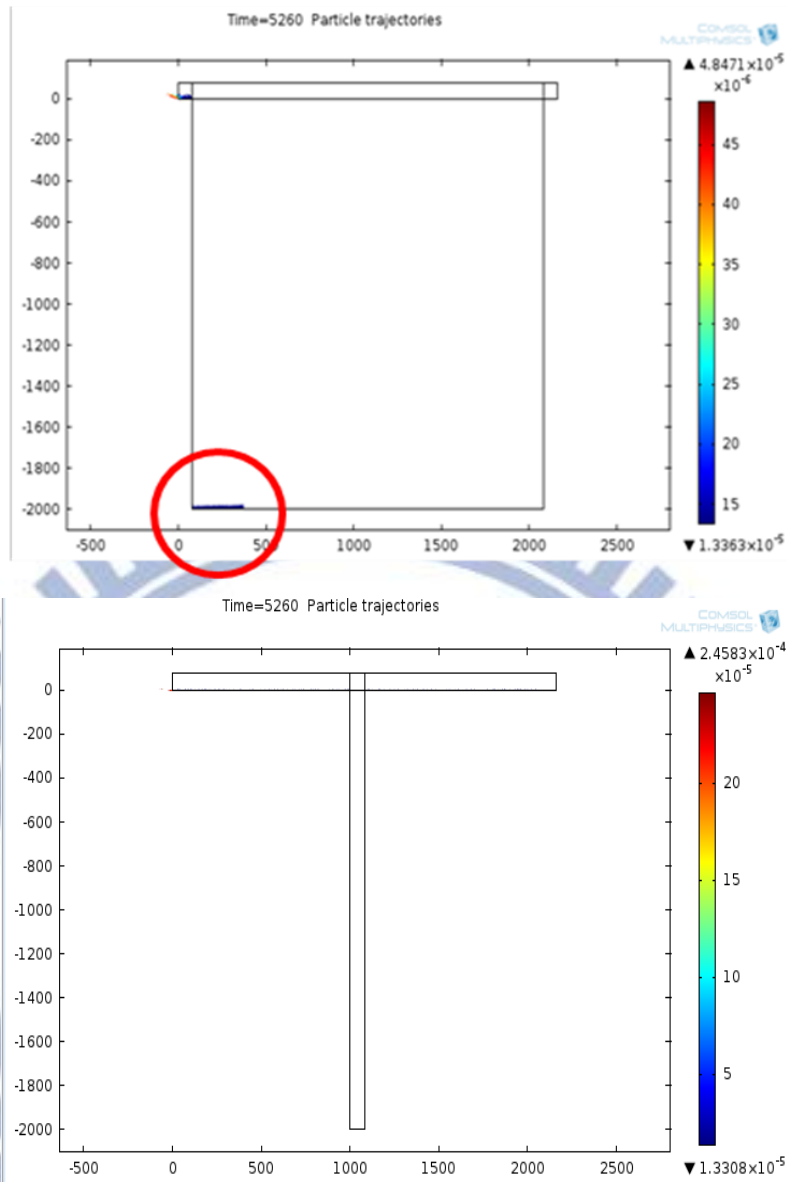


圖 2-1-8、COMSOL 模擬改變微流道設計血球沉積關係圖。

綜合上述模擬，可做為之後在設計微流體結構上的參照準則，使用重力機制分離血漿的微流道，在顧及尚有分離效果的狀況下，可以微縮到的最小沉積空間體積為長度與微流道高比例需大於 2.5，而深度與微流道高比例需大於 6.5，寬度則最小可與微流道同寬，以此概念就可將微流道直接設計為整體元件高就為微流道高度，以縮小沉積體機為手段，達到檢體少量且快速感測之目的，而元件系統也可因此減少一層，降低實驗的不穩定性，只要依照可以過濾血漿的比例設計，接著將元件系統 90 度直立，便可達分離效果。

2-2 微流道結構設計

本實驗利用 AutoCAD 2010 設計光罩圖檔，設計兩組微流道結構，3D 結構出入口端半徑 1.5 mm，中間流道寬 100 μm ，如圖 2-2-1 及圖 2-2-2，而承襲 2-1 節模擬結果推論，沉積血液處寬度縮小除了附載血液的量減少，分離血液的效果並不會因此消失，所以有了 2D 結構的構想，首先確保拍攝螢光尺度能一致，過濾出的微流道部分也是設計 100 μm ，如圖 2-2-3 及圖 2-2-4，並且在 2D 結構設計一系列中間沉積血液分離部分能有不同尺度的容量，長度從 1 mm-5 mm 共 5 種尺寸，深度也從 1 mm-5 mm 共 5 種尺寸，利用實驗數據得到此結構的分離血液效果，建立出適用此 2D 結構的流速對照表。



圖 2-2-1、3D 微流道結構光罩圖。

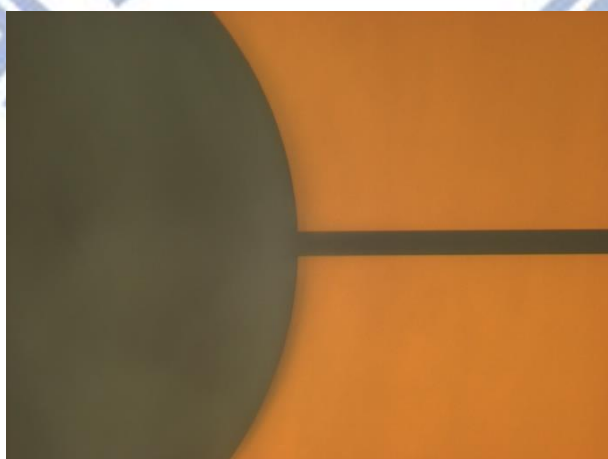


圖 2-2-2、3D 微流道結構 OM 圖。

上述兩種結構感測部分的微流道寬度皆為 100 μm ，差別在於操作方式以及結構，3D 微流道結構如圖 1-2-7，為三層結構，利用重力於中間挖洞處沉積，而 2D 的概念則在於，結構的流道高度即為沉積血液處的寬度，因此造就整體 2D 結構在同一流道高度中完成，而其尺度極小，若看成忽略一軸，即為 2D 微流道結構，而且本設計的製程較簡單，只有兩層結構，如圖 2-2-5。

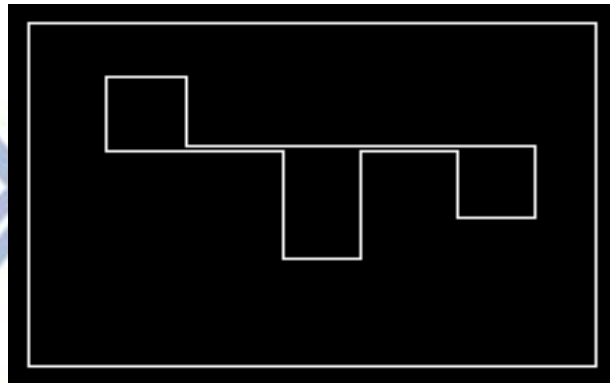


圖 2-2-3、2D 微流道結構光罩圖。



圖 2-2-4、2D 微流道結構 OM 圖。



圖 2-2-5、重力分離血液系統 2D 結構圖。

至於操作方式，兩者結構卻不盡相同，由於都以重力驅使血球與血漿分離，因此結構中都有使血液進行沉積的空間，差別在於 2D 結構中必須將元件直立，如圖 2-2-6，才可使血液流動時，依靠重力在經過此空間時，進行血液沉積進而分離。

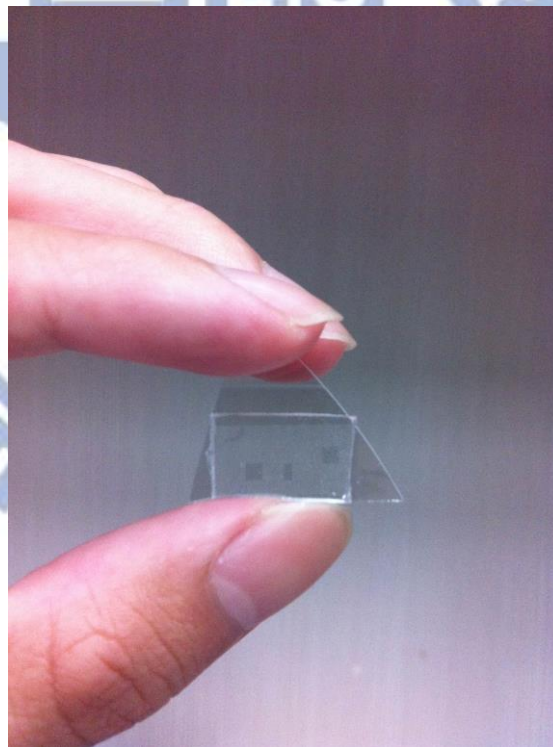


圖 2-2-6、2D 結構實景圖。

2-3 微流道製作

(1) 晶圓清洗

將經過濕式蝕刻的 SiO_2 晶圓依序置於丙酮、異丙醇、酒精、去離子水當中，分別以超音波震盪器震洗各五分鐘，最後再用氮氣吹乾。

(2) 曝光顯影

以 2-2 節設計之光罩進行 SU8 母模製作，將晶圓先旋上 ominecoat，目的為讓晶圓與 SU8 光阻更緊密接合，利用旋光阻機旋上光阻，如圖 2-3-1，ominecoat 數值先以每秒鐘 100 轉加速度到 500 轉維持 5 秒鐘，接著以每秒鐘 300 轉加速度到 3000 轉維持 30 秒鐘，接著進行 ominecoat bake，溫度 200°C 維持 1 分鐘，結束後直接旋 SU8-2050 光阻，本實驗所使用之 ominecoat 以及 SU8-2050 光阻皆為 MICRO CHEM 公司生產，而在曝光前後分別進行軟烤及曝後烤，本實驗 SU8-2050 光阻所定義厚度為 100 μm ，如圖 2-3-2，SU8-2050 光阻數值先以每秒鐘 100 轉加速度到 500 轉維持 10 秒鐘，接著以每秒鐘 300 轉加速度到 1700 轉維持 30 秒鐘，軟烤及曝後烤時間如表 2-3-1，使用高解析度光罩直接對準曝光機進行曝光，如圖 2-3-3，曝光時間強度為 $250 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ，上述程序結束後進行顯影，將晶圓放置於適量的 SU8 顯影液中以轉速 40 rpm 搖晃 12 分鐘，然後使用異丙醇定影，達沒有白色液體反應出現即可，最後進行硬烤，硬烤程序為在 150°C 持溫 1 分鐘，然後以每分鐘 1°C 下降持續至室溫為止。

(3) PDMS 流道

配置 DOW CORNING SYLGARD 184 高分子膠體 (PDMS)，A、B 劑比例為 10:1 的 PDMS，經過攪拌後，抽真空將裡面空氣抽出，接著放入母模定義流道，抽真空約 1 小時，放置於 90°C 加熱以定型，加熱時間至少 2 小時，之後進行脫模。

(4) 玻璃-PDMS 接合

分別將經處理後的玻璃及 PDMS 要接合的面，進行氧電漿處理，氧電漿機台型號 PCD 150 Plasma Cleaner 為在材料表面產生一些-OH 基，以提升表面親水性及浸潤性，來增加表面接合度，首先通入 750 mtorr 氧氣，反應瓦數為 50 W，時間為 2 分鐘，處理完畢後，將兩物接合並以重物加壓於溫度 90 °C 維持 1-2 小時。



圖 2-3-1、旋光阻機。

表 2-3-1、SU8-2050 實驗參數。

	軟烤	曝後烤
65°C	5	3
95°C	10	7
65°C	5	3

(單位:分鐘)

表 2-3-1、SU8-2050 實驗參數。

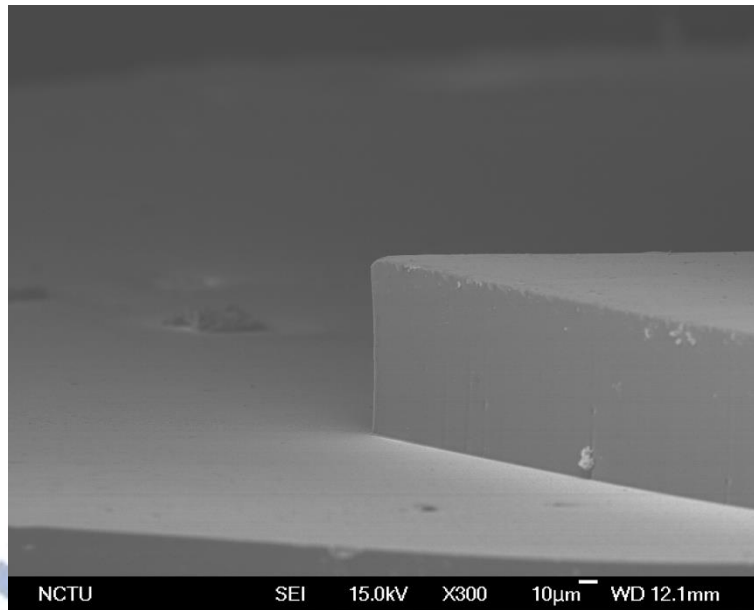


圖 2-3-2、SU8 厚度 SEM 圖。

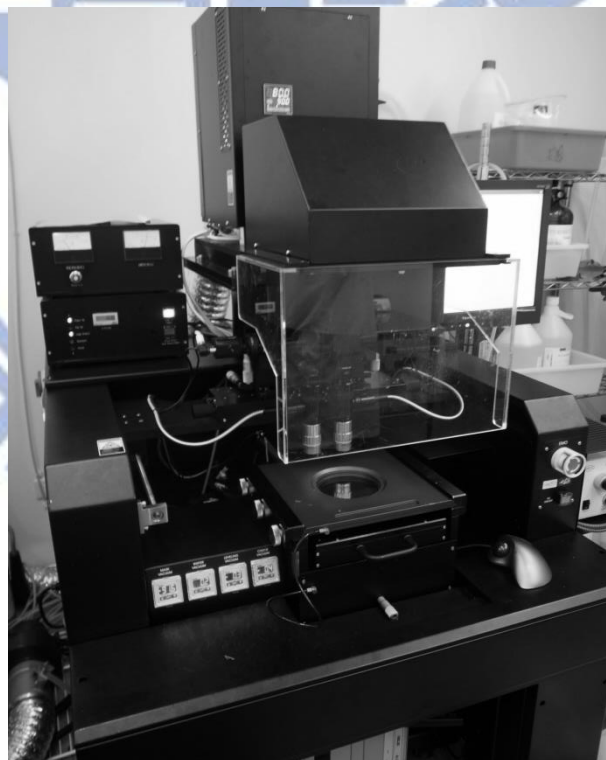


圖 2-3-3、高解析度光罩直接對準曝光機。

2-4 氧化鋅奈米柱生長製作

(1) 氧化鋅晶種生成

將玻璃空片利用濺鍍方式生成氧化鋅晶種，實驗參數為工作壓力 10^{-2} torr，瓦數 50 W，Ar:O₂ 流量比 20:20，時間一個小時，氧化鋅晶種厚度 50 nm。

(2) 誘導溶液製備

配置誘使晶種生長奈米柱的溶液，先以體積百分濃度 10 mM 的 ZnSO₄ 以及 300 mM 的 NH₄Cl 以及 1 mM 的 Al₂(SO₄)₃·13~14H₂O 加入在 500 c.c 的去離子水當中並且攪拌均勻，以上化學品皆來自昭和化學株式會社，接著另外配置調控 pH 值的溶液，以體積比 30% NaOH 加入於去離子水當中，過程中溶液反應放熱，所以必須打開瓶蓋，並以水冷卻瓶身且不停搖晃，直到溶液均勻產生泡泡。

(3) 誘導溶液配置

利用 SUNTEX 智慧型 pH 值控制器，調配上述兩種溶液，兩者以相當比例混合，將 pH 值控制於 11.4，因為此酸鹼度可藉由水熱法，順利誘導晶種生長達到最佳形貌，生成針柱狀結構，SEM 圖像倍率 10,000 和 50,000 如圖 2-4-1 及圖 2-4-2 以及 EDS 圖如圖 2-4-3，增加體表面積，提升可感測的部分。

(4) 水熱法生長氧化鋅

利用圖 2-4-4 實驗裝置，溫度部分藉由 TEC 溫度控制器，為致冷晶片 (Thermoelectric Cooling Module)，以 LabVIEW 軟體程式控溫，介面如圖 2-4-5 而藉上下層壓克力以螺絲栓緊擠壓，造成適合水熱法生成的環境條件，接著接以鐵氟龍管用微量注射器控制流速，流進誘導溶液使晶種生長氧化鋅奈米柱結構，實驗參數為控溫於 65°C，流速 750 uL/hr，生長時間 30 分鐘，以此參數生長之氧化鋅奈米柱，外觀形貌為針柱狀，可有效增加生物分子沾附的表面積，並使感測效率提高。

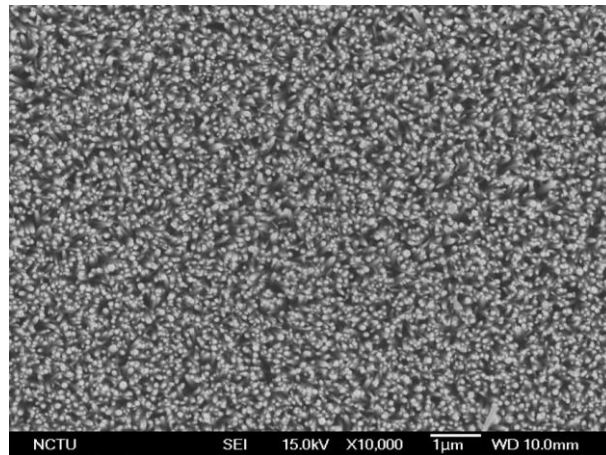


圖 2-4-1、氧化鋅 SEM 圖(X10,000)。

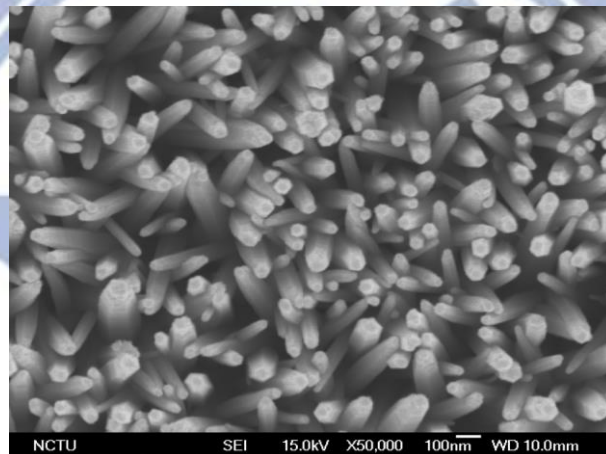


圖 2-4-2、氧化鋅 SEM 圖(X50,000)。

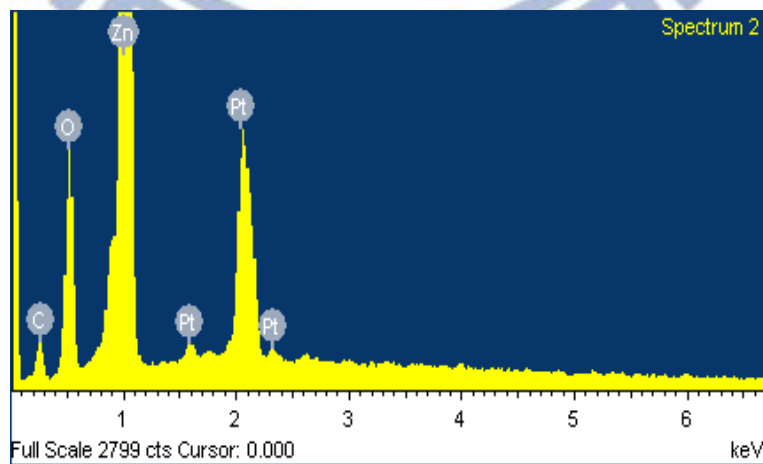


圖 2-4-3、氧化鋅 EDS(Energy Dispersive Spectrometer)圖。

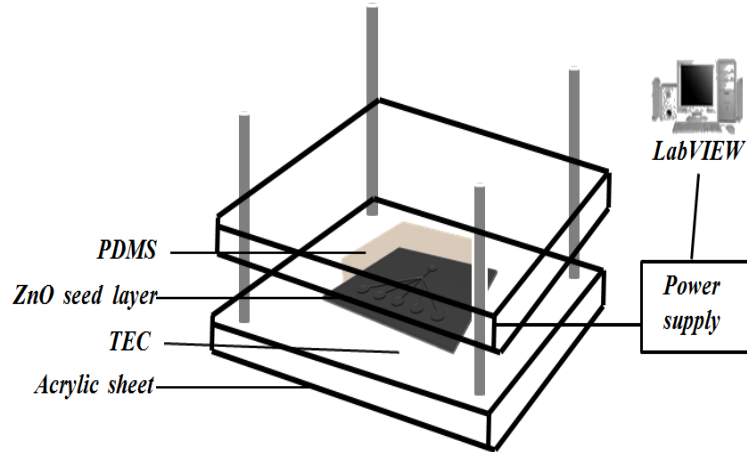


圖 2-4-4、生長氧化鋅奈米柱結構實驗裝置圖。

利用水熱法機制生長氧化鋅時，必須給予溫度，以轉換氧化鋅生長的能量，本實驗利用 LabVIEW 軟體寫一套控溫的程式，如圖 2-4-5，藉著 Agilent e3646a 電源供應器施給電壓，如圖 2-4-6，透過程式調控參數，再外接至 TEC 板上，溫度則直接反映於面板表面，在透過與鍍有 ZnO 晶種層的玻璃直接接觸，達到溫度傳遞的效果，如圖所示，操作介面上在 Setpoint 處設定所欲調控的溫度，單位為 $^{\circ}\text{C}$ ，Proportional 為 10，Integral 為 0.05，Derivative 為 0.001，設定完成後，於操作介面中間座標處，橫軸為時間(秒)，縱軸為溫度($^{\circ}\text{C}$)，其中紅線為期望溫度，本實驗預設為 65°C ，綠線則為實際溫度，溫度會隨著時間逼近期望溫度，實驗會在溫度達到期望溫度並且穩定時，才進行計時 30 分鐘，以此控制氧化鋅生長的時間，以此參數製程氧化鋅結構可獲得最大的體表面積，有助於修飾上提升螢光強度之目的。

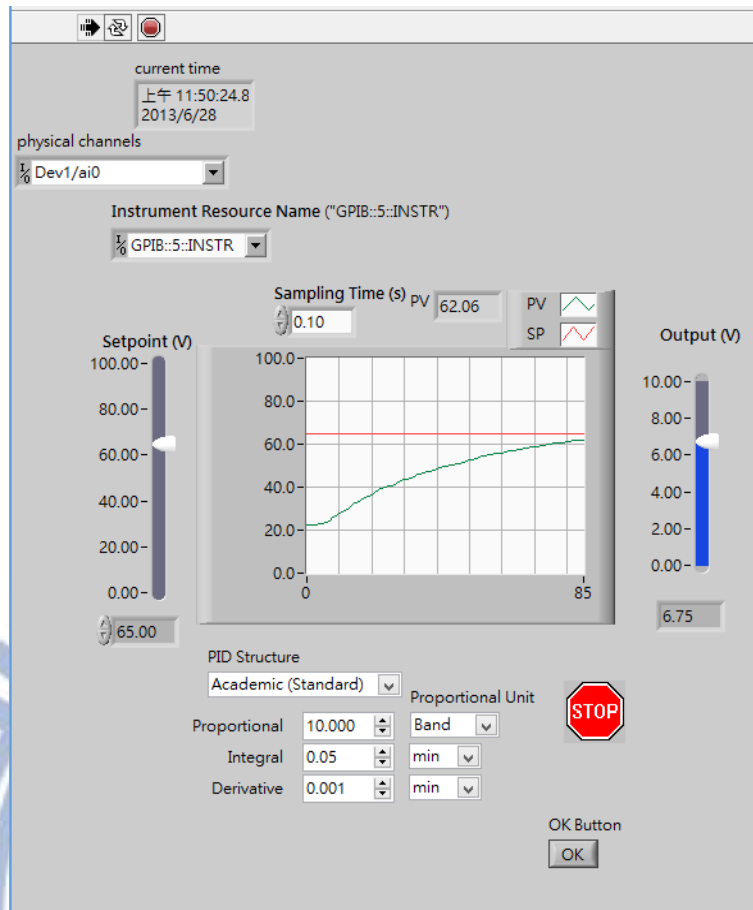


圖 2-4-5、LabVIEW 控溫程式介面。



圖 2-4-6、電源供應器。

2-5 表面修飾 Biotin- Streptavidin

根據前幾小節，過濾血漿以及氧化鋅奈米柱結構，皆是為了使感測的靈敏度提升，本研究利用的生物分子修飾為鍵結力強的 Biotin-Streptavidin，運用有接附螢光的 Streptavidin 驗證，若分子間成功鍵結，利用螢光偵測原理便能以螢光顯微鏡觀察螢光分子之激發光，並利用像素強度大小定義其螢光強度值，以下為實驗的修飾步驟。

(1) 試片清洗

將實驗用玻璃，依序沉淨在丙酮、異丙醇、酒精、去離子水當中，置於超音波震盪器各震洗 5 分鐘，最後則以去離子水沖洗至玻璃潔淨，然後以氮氣槍吹乾。

(2) 修飾 APTES(Amino Propyl Triethoxy Silane)

以體積比 1：50 將 APTES 溶於去離子水當中，將清洗乾淨之玻璃試片浸泡於溶液中，先放置於超音波震盪器震 1 分鐘，接著靜置 9 分鐘，最後將玻璃試片在 10 分鐘內以去離子水不斷於超音波震盪器內震洗約 3~4 次，結束後用氮氣將玻璃試片吹乾。

(3) 修飾 Biotin

將 NHS-Biotin 溶於 PBS 1X 中，配置成濃度 1mg/ml 溶液，以滴管吸取適量溶液，滴在玻璃試片表面，並確認試片表面皆與溶液接觸，反應時間 2 小時。

(4) 試片清洗

將試片以去離子水沖洗，再用氮氣槍吹乾。

(5) 修飾 Streptavidin

將有接合螢光(波長 546/488 nm)之 Streptavidin 溶於全血當中，其中全血的保存是放置在含有 EDTA 抗凝血劑的紫頭管當中，如圖 2-5-1，EDTA 為乙二胺四乙酸($C_{10}H_{16}N_2O_8$)，EDTA 不會破壞血球結構，適合用來做為分離血液

的抗凝血功能，相繼配成濃度從 10^{-8} M 至 10^{-12} M 共五位不同濃度的 Streptavidin-全血溶液，而對照組為無修飾 Streptavidin 的全血，以 2-2 節之步驟設計的系統進行全血之過濾，並且進行修飾，修飾時間為 30 秒，流速分別為 3D 結構 50 uL/hr，2D 結構 20 uL/hr，修飾完畢後再流 1X PBS 進行洗淨一分鐘，以確保修飾的生物分子有確實接合，爾後進行螢光拍攝，修飾 Biotin-Streptavidin 流程簡圖如圖 2-5-2。



圖 2-5-1、EDTA($C_{10}H_{16}N_2O_8$)抗凝血儲血管。

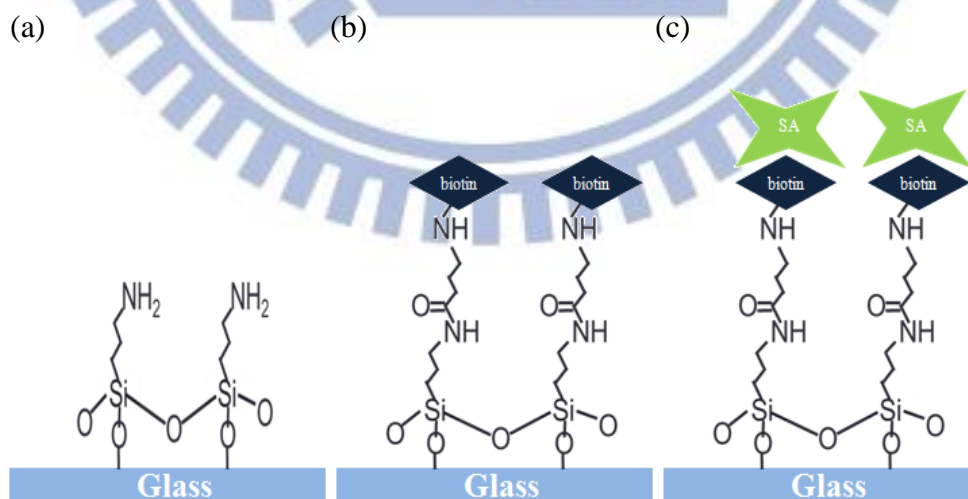


圖 2-5-2、修飾 Biotin- Streptavidin 流程圖(a)修飾 APTES (b)修飾 Biotin (c)修飾 Streptavidin。

表面修飾感測實驗操作平台，如圖 2-5-3 所示，藉由注射幫浦控制流體流速，將載體裝置於針筒內以注射幫浦推進，以鐵氟龍管引導至平台內，檢測結果以光學顯微鏡系統觀察，包含螢光感測，經過平台過濾後的廢液則由出口端經鐵氟龍管流出，再行收集。

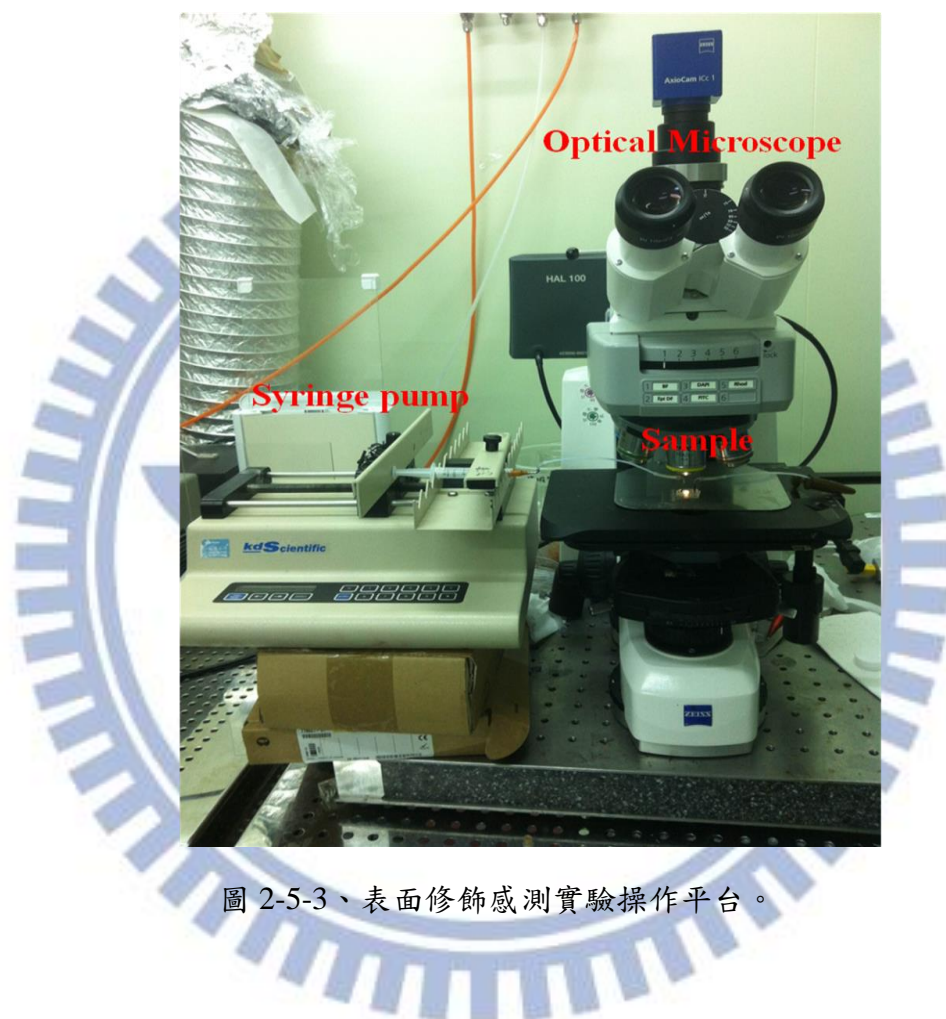


圖 2-5-3、表面修飾感測實驗操作平台。

2-6 PDMS 材料與實驗關係

PDMS(polydimethylsiloxane)，聚二甲基矽氧烷是一種高分子有機矽化合物，具光學透明，在一般狀態下通常惰性、無毒、不易燃且生物相容性佳。本篇研究大量使用此物質，在此簡單介紹其適用性。

(1) 高強度

PDMS 為高分子聚合物，化學分子鍵結為交叉結合，其結構強度強，運用於本研究需要負擔應力壓迫時，可保持結構不被破壞。

(2) 高縱橫比

微流道系統中，高度通常不到 100 微米，而整體微流道長度則相當錯綜複雜，本實驗，在氧化鋅奈米柱結構生長以及血液過濾之過程中都需要微流道系統的架設，因此有賴於高縱橫比的 PDMS 材料。

(3) 透氣性佳

於本實驗應用階段中，希望元件系統本身可以不依賴外加力的供給，便可使載體流動，藉由 PDMS 的可透氣性，當內含氣體的 PDMS 受大氣壓迫時，釋放的氣體可促使流體移動。

(4) 製程優勢

PDMS 製作成本低廉且製程容易，從 AB 膠混合至脫模成品產出，花費時間不到半天，且易大量製造，對於此元件未來若發展於市場當中，將會是相當大之優勢。

(5) 表面特性

透過打氧電漿，可將 PDMS 原本疏水性的表面，因為失去-OH 基，而變成親水性表面，也可加強跟 PDMS 或玻璃的鍵結，使兩者黏合效果佳，對於漏液以及鍵結不完全的問題可獲得改善。

第三章

實驗結果與討論

3-1 血液分離微流體系統之分離率

血液分離效率，是攸關本研究感測靈敏度的一大變因，若分離效率差，使得血球及血漿區分鑑別度低時，檢體的顏色將受紅血球影響，嚴重影響光學顯微鏡的判讀，因此造成感測靈敏度不高，低濃度幾近無法判別。

一般計算血球或細胞的技術，會使用計算細胞數目可用的血球計數盤或是自動粒子計數器(Coulter counter)，可依實驗需要使用做區別，透過不同刻度上面積大小的占滿顆數計算其細胞或血球數目，因此於這實驗先對於過濾前及後的全血以及血漿，進行計數盤的觀察，由圖 3-1-1 為全血於計數盤上的 OM 圖，而圖 3-1-2 為過濾後的血漿於計數盤上的 OM 圖。

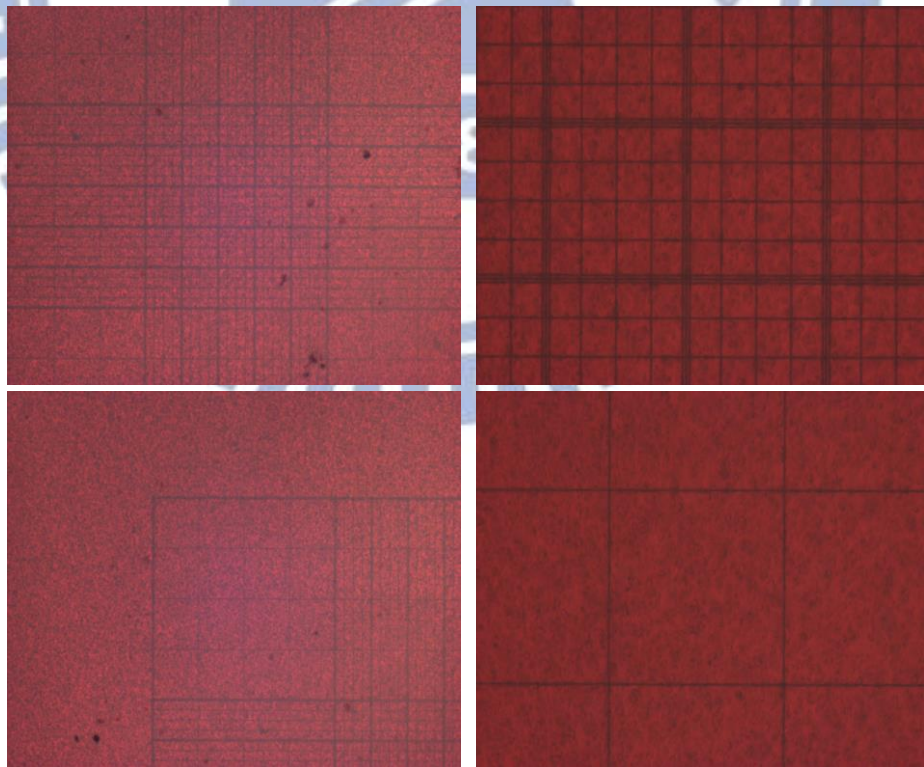


圖 3-1-1、全血於計數盤上的 OM 圖。

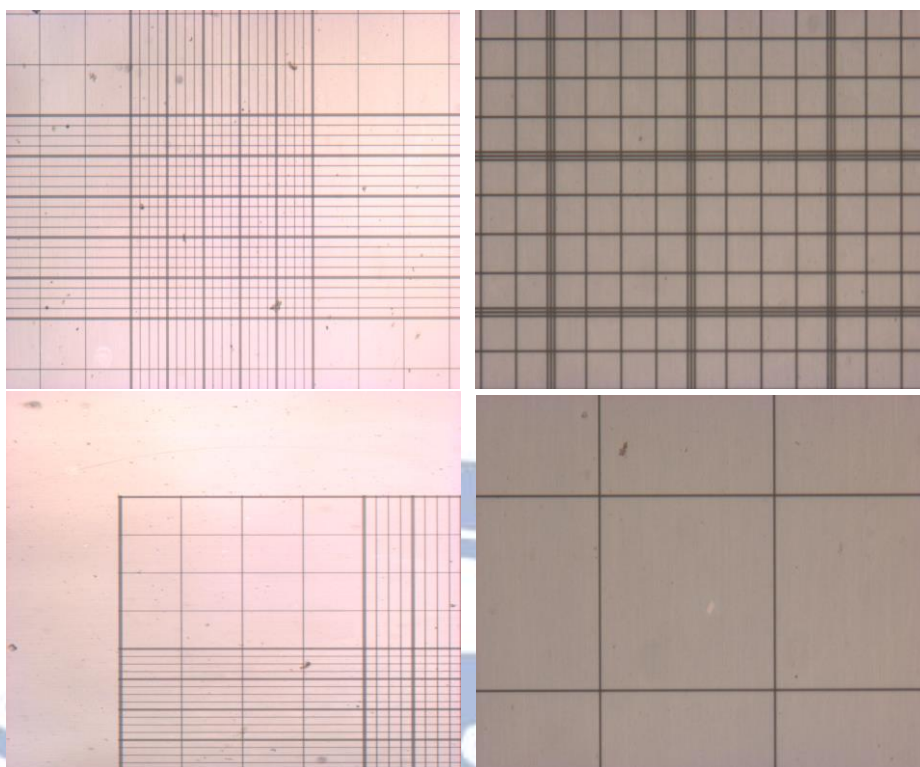


圖 3-1-2、分離後之血漿於計數盤上的 OM 圖。

由細胞計數盤可觀察到，兩者的圖像可明顯觀察出過濾前後的眾多血球及血紅素造成的影響，血液經過過濾平台可濾掉相當多會造成後段感測上干擾的東西，因此初步以此方式證實，經過濾後的產物確實能從血液中過濾血球，但為了使實驗能一貫採用光學系統觀察感測，而不必另取樣品額外觀察其效率，在血漿分離效率使用光學系統進行分析，爾後可一連串接著進行螢光檢測。

由於以光學方式鑑別，因此可就圖片的像素分析其分離效率，引自於柏克萊加州大學 Luke P. Lee 團隊於 2011 年發表的論文當中，在血漿分離率定義上，以光學顯微鏡觀察其分離狀況，利用分離前後微流道內流體的像素，代入公式得到分離率，其血漿分離效率公式如下，

$$\eta_{\text{pixel}} = 100 \cdot \left[1 - \frac{V - V_i}{V_f - V_i} \right] \quad (3.1.1)$$

首先確保在光學顯微鏡拍攝時，其所有曝光條件皆要一致，以保持各數據能於同等基準下討論，以下為公式中參數解釋， V 為區域中像素強度值， V_f 為區域

中全血的像素強度值， V_i 為區域中的初始狀態，意指尚未流過流體時，微流道的區域中像素強度值，其示意如圖 3-1-3。

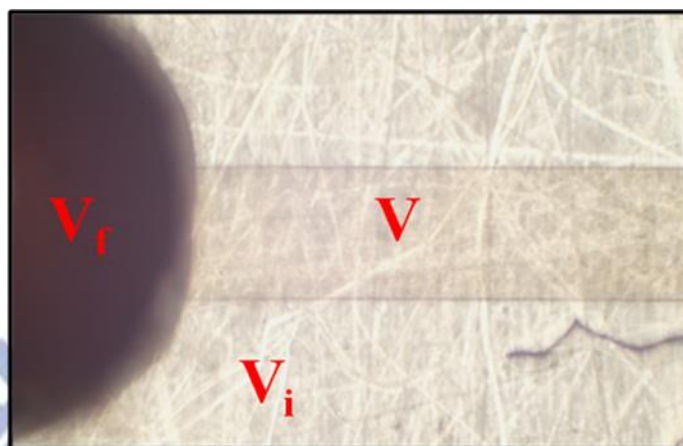


圖 3-1-3、血漿過濾示意圖。

3-1-1 血球干擾

本小節一開始有提及血漿分離效率，將會是造成爾後生物分子修飾差異性的重大因素，因此進行螢光強度圖的比較，以及修飾完畢後以 PBS buffer 回復洗淨的光學顯微鏡圖，來驗證對照出，血球使螢光強度降低的影響及造成的原因是否確實為血球干擾，設計實驗證實。

於實驗步驟上，先於玻璃基板上修飾 APTES 接 Biotin，組成分離血漿感測平台，接著將含 Streptavidin 的血液檢體，分別進行以注射幫浦固定流速 20 uL/hr 及 20 uL/min 打檢體進入感測平台，細部的實驗步驟參照 2-3 節，目的在於前者的流速能達成分離血漿的功用，而後者的流速會使全血毫無分離效果直接就流經感測區，因此可初步判斷血球是否為造成螢光強度降低的原因，修飾上激發兩種不同螢光波長，以此雙重驗證，並且將經過修飾後以 PBS 1X 洗淨，以此舉證實血球的干擾確實存在，如圖 3-1-4，而血漿分離螢光差異如圖 3-1-5。



圖 3-1-4、修飾後以 PBS 1X 洗淨之 BF 圖。(左圖:分離，右圖:未分離)

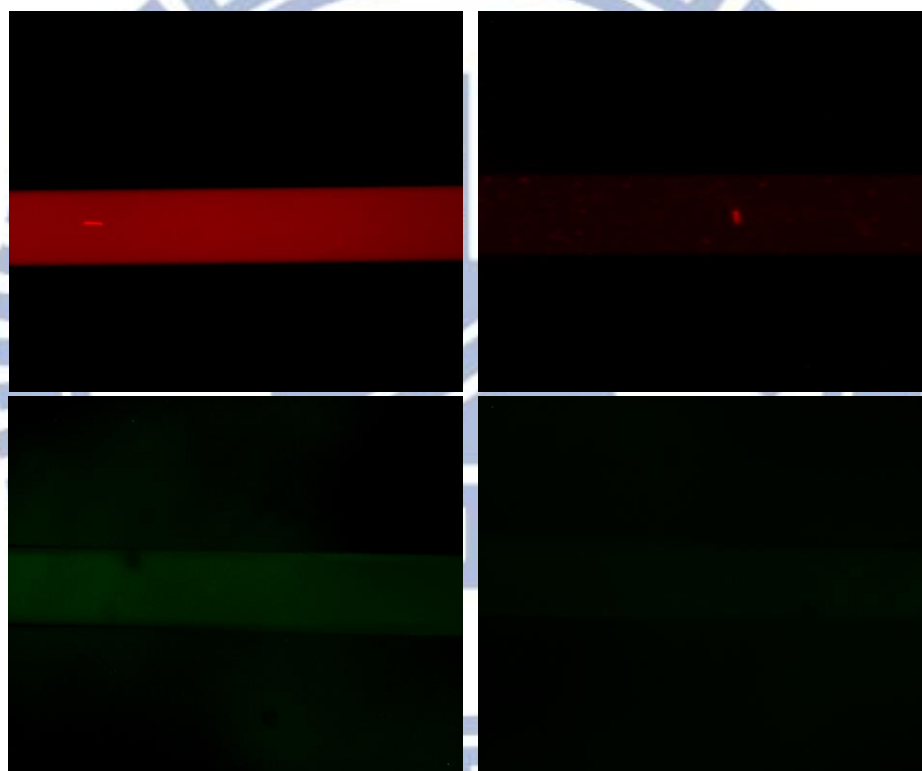


圖 3-1-5、血漿分離螢光差異圖。

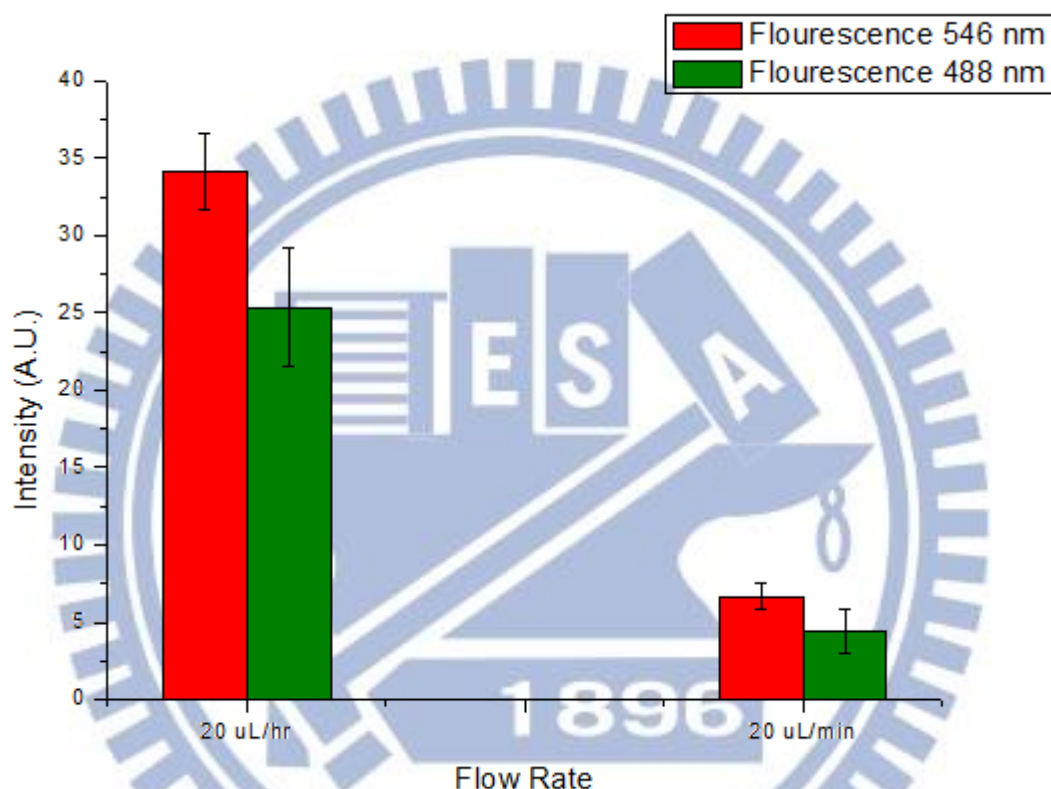
左上:螢光波長 546 nm/分離，右上:螢光波長 546 nm/未分離

左下:螢光波長 488 nm/分離，右下:螢光波長 488 nm/未分離

由表 3-1-1 可看出，螢光強度在元件分離效果影響之下，會有明顯差異，當未分離時，感測區會有血球滯留，因為若沒有經過過濾的全血直接感測時，血球(尤其紅血球)會因為滲透壓而破裂，導致血紅素與玻璃表面產生鍵結，阻擾光學

系統的拍攝，造成感測品質下降，並且進行不同螢光波長修飾間接證實血球干擾，而結果可看出，不論以何種標的物進行修飾，血球的存在都會使感測器靈敏度降低。

表 3-1-1、血漿分離螢光強度差異表。



3-1-2 血液分離率

證實完畢血球干擾對於直接使用全血直接感測生物分子的必要性後，更確定血液分離率對於感測結果的影響，因此在分離系統的穩定性及品質上，皆必須要求，血液分離率的計算公式於 3-1 節，以下的血液分離率實驗統整表，使用兩種設計比較其效率，兩種設計於 2-2 節已介紹，在此目的為用更簡單製程以及少量材料和檢體，便能達到相同效率，流速分別以 20 uL/hr 及 50 uL/hr 操作，如表 3-1-2。

表 3-1-2、血液分離率實驗統整表。

Cell-Capture efficiency	2D (2 mm X 2 mm X 100 um)	3D (2 mm X 2 mm X 2 um)
Exp 1	99.1622	99.7514
Exp 2	99.0723	98.0262
Exp 3	96.8328	96.3403
Exp 4	97.21	99.4719
Exp 5	96.265	97.9136
Avg.	97.70846 ± 1.189306	98.30068 ± 1.223881

將兩種以重力機制設計的微流道分離系統，皆各進行五次實驗，證實到兩種結構可達相同的血液分離效果，而在此新的 2D 微流道血漿分離元件於製程上不僅節省材料成本，且良率也較佳，縮小微度後的優勢也有減少檢體的需求量，因此本研究於之後的實驗皆以 2D 結構系統，流道高 100 um，沉積血液區域的面積長 X 深為 2 mm X 2 mm，以此微度設計做為微流道血漿分離元件完成往後所有相關分離血漿以及結合氧化鋅結構的平台，做往後相關的實驗。

3-2 修飾不同濃度之 Streptavidin

經過前小節驗證出，兩種結構的血漿分離效率相當，因此本小節將進行修飾實驗驗證，本架構運用在生物分子感測方面的可行性，並且觀察其感測靈敏度之極限。

於實驗步驟上，先於玻璃基板上修飾 APTES 接 Biotin，組成分離血漿感測平台，接著配置不同濃度的 Streptavidin 血液檢體，Streptavidin 螢光激發波長為 546 nm，濃度分別為 42 nM、4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM 總共五個濃度，以及不參雜 Streptavidin 的血液當做對照組，於 2D 及 3D 結構進行分離，以注射幫浦固定流速分別 20 uL/hr 及 50 uL/min 打檢體進入感測平台，細部的實驗步驟參照 2-3 節，實驗的螢光結果如圖 3-2-1 及圖 3-2-2。



圖 3-2-1、2D 結構螢光圖。

Streptavidin-546 濃度上往下依序：42 nM、4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM



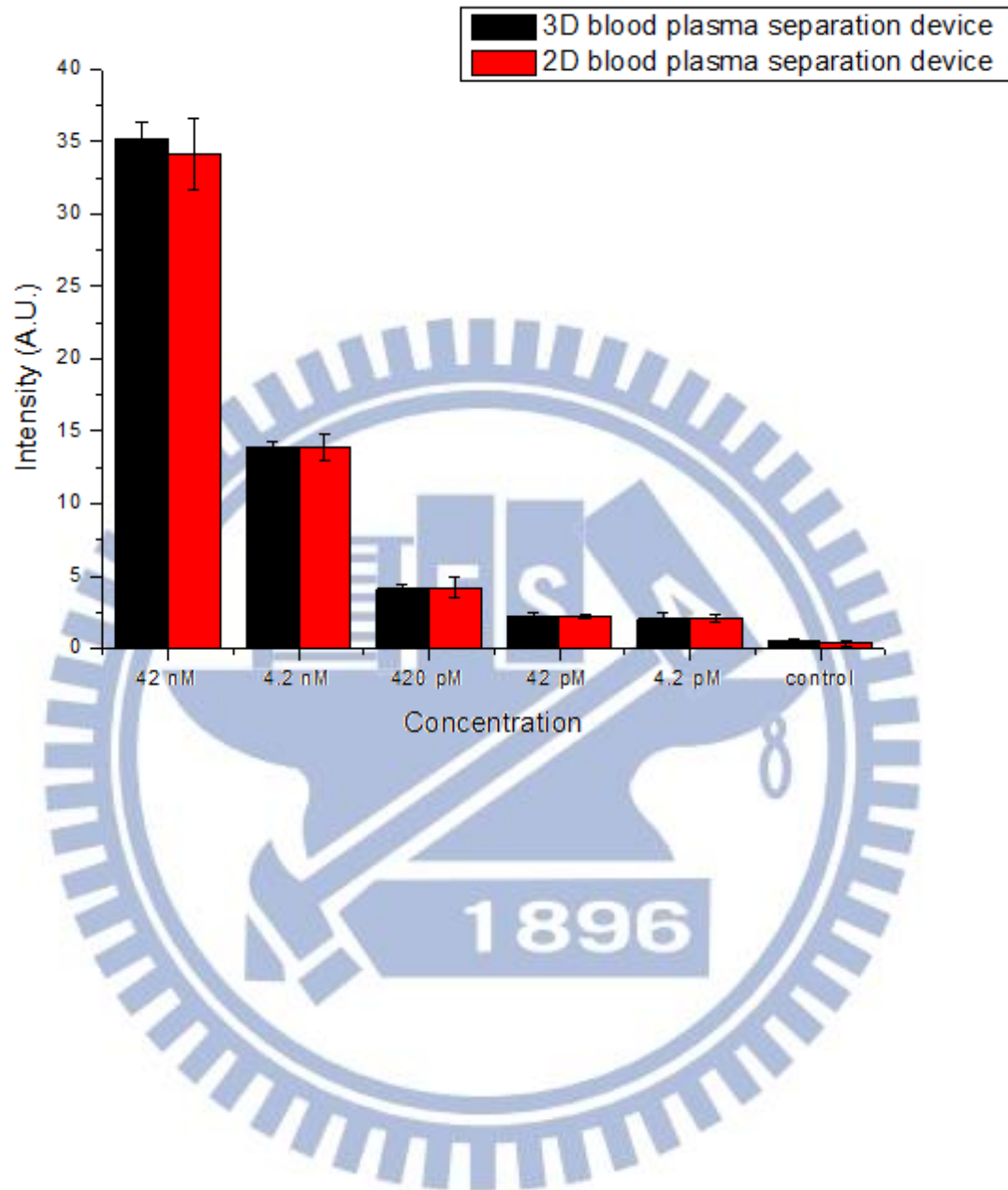
圖 3-2-2、3D 結構螢光圖。

Streptavidin-546 濃度上往下依序：42 nM、4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM

以螢光偵測做為生醫感測器的準則在於，當濃度級的螢光強度彼此之間沒有重疊時，表示此感測器在這些濃度級範圍內具備鑑別能力，例如醫學中實用時，才能由此初步判斷患者體內欲量測之標的濃度是有多高，方可研判是否有罹病的徵兆。

本實驗結論由螢光圖可觀察出，兩種結構皆有生物分子感測的鑑別度，並且觀測到的螢光強度也相似，由表 3-2-1 可得知，於 42 nM 至 42 pM 四個濃度級皆具鑑別度，但到 4.2 pM 濃度時，與 42 pM 螢光強度重疊，因此無法再往更低濃度鑑別，為再追求更低濃度的鑑別度，本研究試圖利用到氧化鋅結構，以增加生物分子接附的體表面積，以提升生物分子接附的量，造成螢光強度增強，期望能達到再往下的濃度鑑別之目標。

表 3-2-1、3D 結構與 2D 結構濃度與螢光強度關係表。



3-3 氧化鋅奈米柱結構增加感測靈敏度

3-2 節證實利用 2D 結構微流道血漿分離元件進行修飾 APTES-Streptavidin 之可行性，並將偵測濃度極限下探至 42 pM，為提升元件的感測靈敏度，本小節使用氧化鋅奈米柱結構，氧化鋅生物相容性高的特性以及增加體表面積使得生物分子接附範圍變大，皆有利於感測靈敏度提升。

實驗步驟如 2-4 節，生長完畢的氧化鋅結構，顏色較深，誘導溶液沿微流道結構流動，因此氧化鋅奈米柱結構只沿著微流道生長，生成如圖 3-3-1 的結構，微流道寬 100 μm ，間隔 200 μm ，接著結合先前設計的 2D 結構微流道血漿分離元件，原先當作基板的玻璃試片變成生長完氧化鋅奈米柱結構的試片，將微流道血漿分離元件的感測部分，與五條氧化鋅奈米柱結構垂直擺放並接合，如圖 3-3-2，爾後於修飾實驗步驟上，先於氧化鋅奈米柱結構的基板上修飾 APTES 接 Biotin，組成分離血漿感測平台，接著配置不同濃度的 Streptavidin 血液檢體，Streptavidin 螢光激發波長為 546 nm，濃度分別為 42 nM、4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM 總共五個濃度，以及不參雜 Streptavidin 的血液當做對照組。

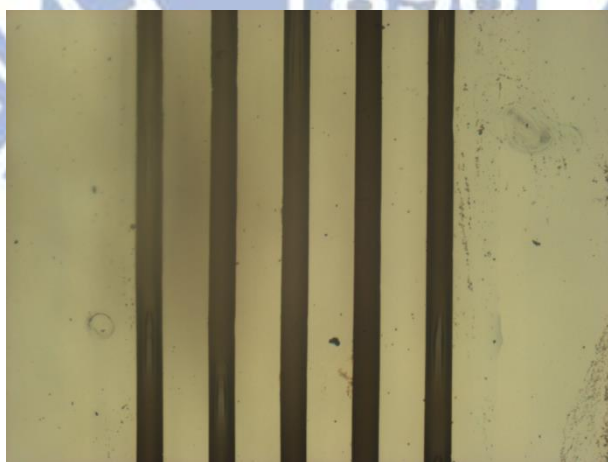


圖 3-3-1、氧化鋅奈米柱 OM 圖。



圖 3-3-2、氧化鋅奈米柱與微流道 OM 圖。

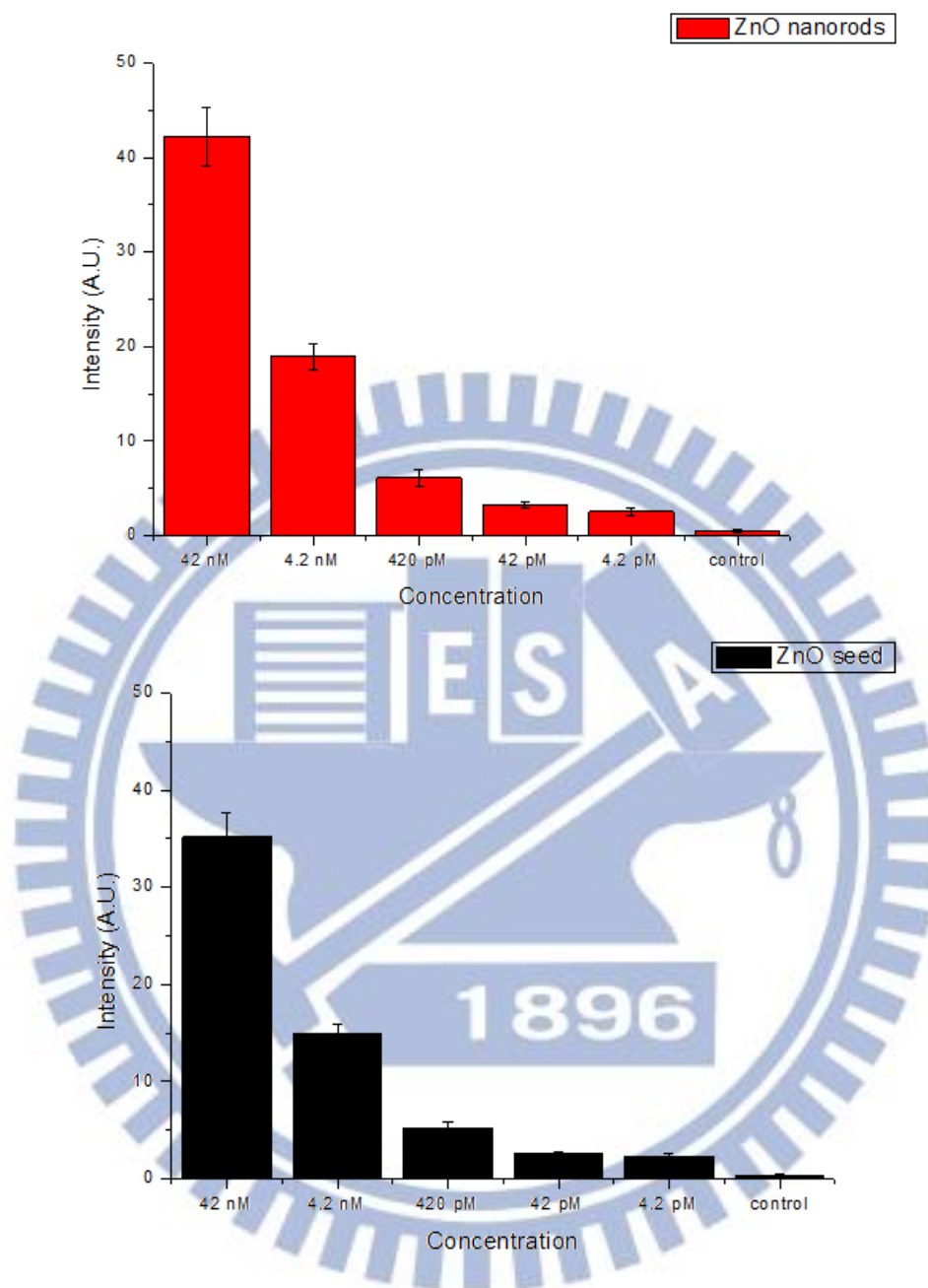
本實驗結論由螢光圖可觀察出，氧化鋅奈米柱結構，可提升螢光強度，如圖 3-3-3，再經由分析，如表 3-3-1 可得知，整體濃度級的螢光強度，氧化鋅奈米柱結構與平面結構相比，皆會提升，並且對照表 3-2-1，平面結構偵測極限在 42 pM，而在氧化鋅結構的偵測極限則到達 4.2 pM，因此本結構成功的提升螢光強度，將感測靈敏度再做突破。



圖 3-3-3、氧化鋅提升螢光強度螢光圖。

Streptavidin-546 濃度上往下依序：42 nM、4.2 nM、420 pM、42 pM、4.2 pM

表 3-3-1、氧化鋅奈米柱結構與平面結構濃度與螢光強度關係表。



3-4 2D 血液微流體感測系統偵測及運用範圍

本小節彙整了研究中所提供的 2D 新結構，對於其沉積血液造成分離的空間進行大範圍探討，改變空間的長對應深以及對應流速之關係，統整此微流道分離血漿元件的尺度對應分離率關係表，其中血液分離率承襲 3-1 節提過的運用光學像素亮暗程度判斷計算，公式參照 3.1.1。

微結構的設計上，先改變沉積血液空間的長度部分，共 1 mm - 2 mm - 3 mm 三種長度，而深固定於 2 mm，光罩如圖 3-4-1，其中出入口端及過濾後修飾部分流道長度大小皆一致，而過濾前的流道長度並不影響其分離效率。

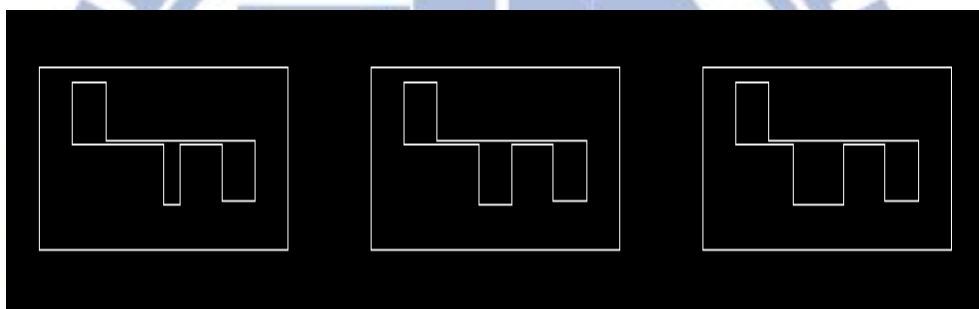


圖 3-4-1、沉積血液空間長度變化光罩圖。左:1 mm，中:2 mm，右:3 mm

而改變完長度的變因後，也對微流道深度做探討，一樣針對不同結構設計，改變沉積血液空間的深度部分，共 1 mm - 2 mm - 3 mm 三種深度，而高也固定於 2 mm，光罩如圖 3-4-2。

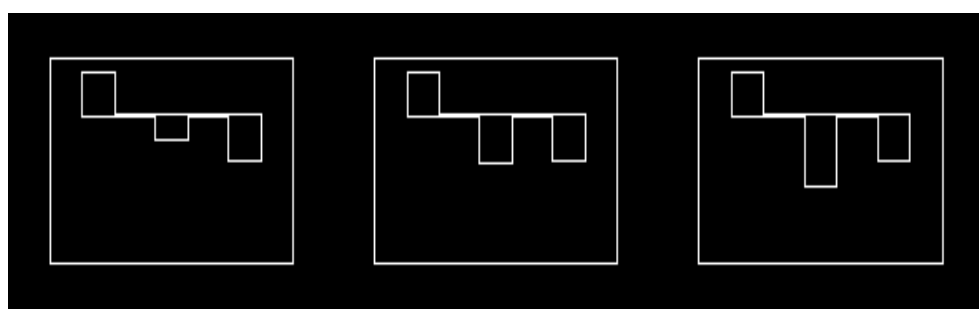
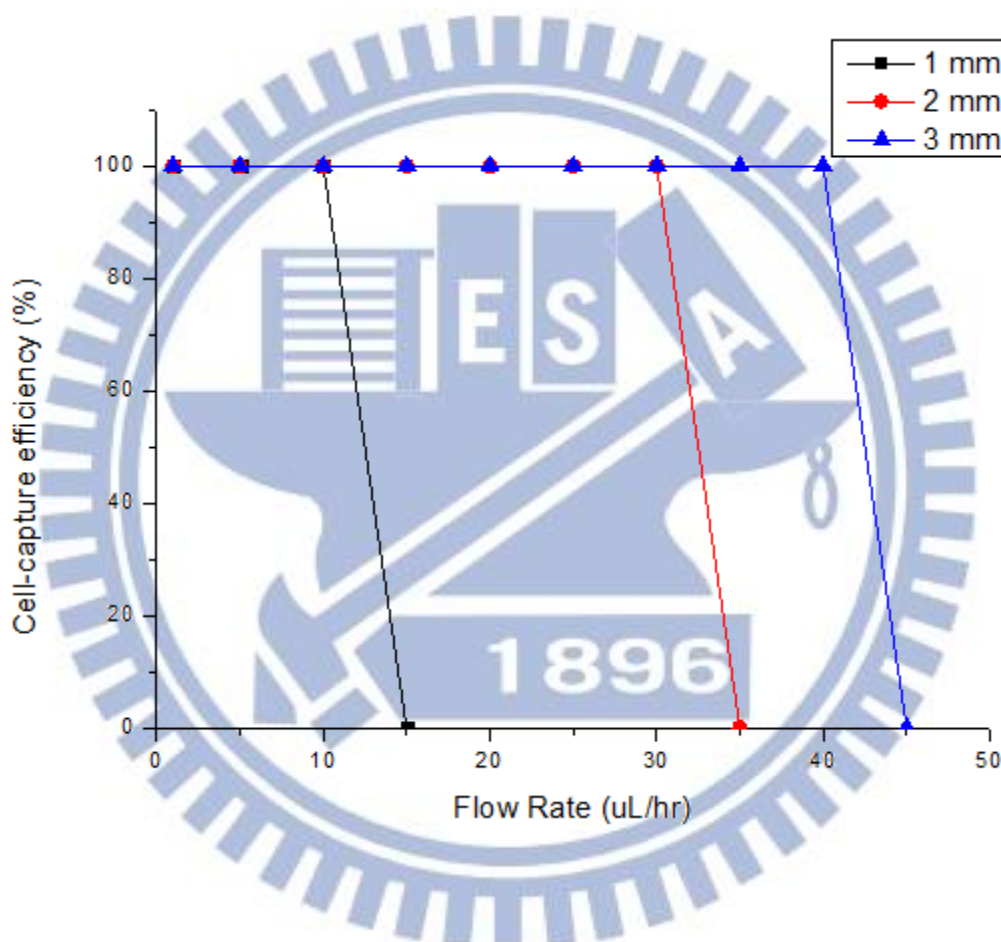


圖 3-4-2、沉積血液空間深度變化光罩圖。左:1 mm，中:2 mm，右:3 mm

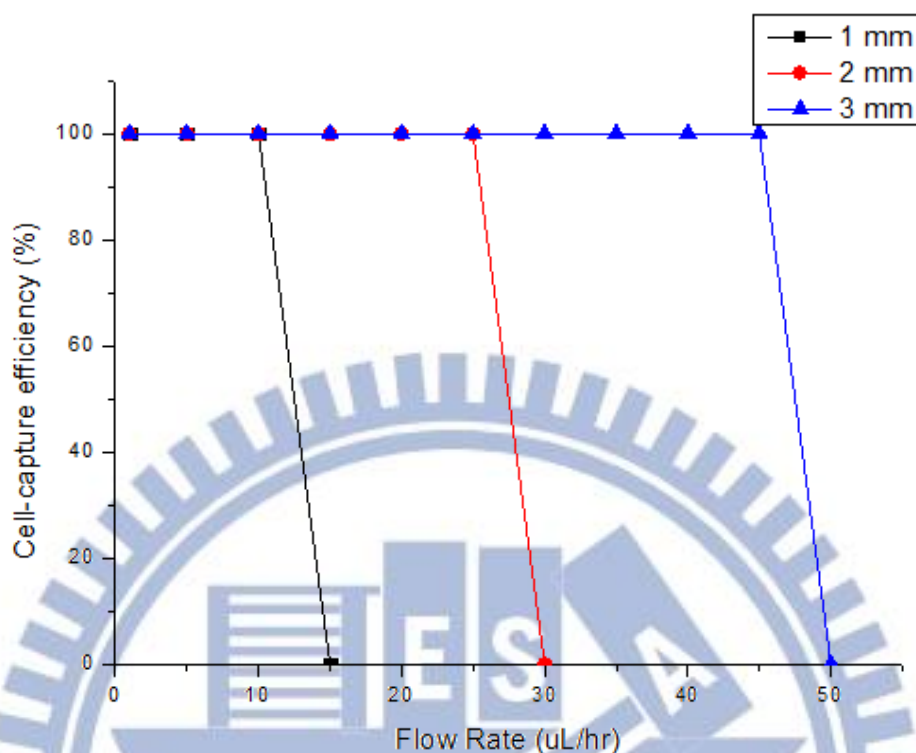
透過以上微流道結構，用重力機制進行血漿分離，統整出本結構適用的工作範圍及參數，以不同血液沉積空間的長度及深度，對應其不同流速，歸納元件的分離效應，承襲圖 3-4-1 的元件範圍所統整數據如表 3-4-1 及圖 3-4-2 的元件範圍所統整數據如表 3-4-2。

表 3-4-1、流道長度與流速之分離效率表。



由表 3-4-1 明顯得知，沉積空間有滿足 h_1/h_0 比例須至少為 6.25， L/h_0 比例則至少為 2.5 的原則要求。 $(h_0$ 為流道高度， h_1 為沉積區域深， L 為沉積區域長) 因此皆可達到分離效果，而整體沉積體積越小，需要越慢的流速才能使血漿分離。

表 3-4-2、流道深度與流速之分離效率表。



再由表 3-4-2 也明顯得知，沉積空間有滿足 h_1/h_0 比例須至少為 6.25， L/h_0 比例則至少為 2.5 的原則要求。 $(h_0$ 為流道高度， h_1 為沉積區域深， L 為沉積區域長)因此皆可達到分離效果，而整體沉積體積越小，需要越慢的流速才能使血漿分離。

透過以上統整，成功建立本系統可運用於生物分子感測時的的操作環境以及工作參數，以此奠定本研究所使用的元件平台，可供未來使用血液為檢體之生醫感測器的研究上之基礎給予運用。

3-5 自動吸取流體機制實做

本實驗最後將系統結合自動吸取流體機制概念加以實做，為追求元件在運用上能完全不依賴外加力使用，藉由 PDMS 的透氣性優勢，不過此方式變因眾多，舉凡 PDMS 結構、表面封黏性以及抽氣壓種種因素皆會影響其效率，若是內外壓差太大，血液流速會太快，因此沒分離血漿效應，若是內外壓差不夠，血液流經微流道結構時，其推進力不夠，也會導致系統作用失效，因此本機制尚待以更嚴謹的實驗條件定義穩定適用環境。

於實驗步驟上，先於玻璃基板上修飾 APTES 接 Biotin，組成分離血漿感測平台，接著將含 Streptavidin 的血液檢體，分別進行以注射幫浦固定流速 20 $\mu\text{L/hr}$ 打檢體進入感測平台，另一部分則運用 1-4 節提到的機制，利用圖 3-5-1 的氧電漿機進行抽氣目的，抽至真空度 150 mtorr，爾後滴入檢體在入口端待它直接流動。

細部的實驗步驟參照 2-3 節，拍攝之螢光如圖 3-5-2，可看出雖然兩者皆能達到修飾之效果，不過以自動吸取流體機制運作的系統，普遍流速過快，以致於血漿分離效果較差，導致螢光強度稍弱。



圖 3-5-1、氧電漿機(抽氣作用)。

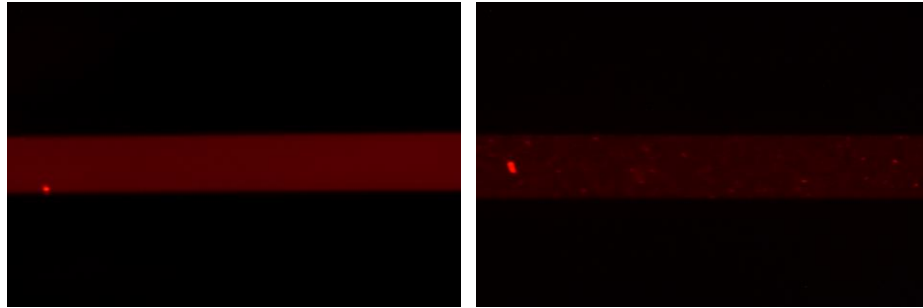
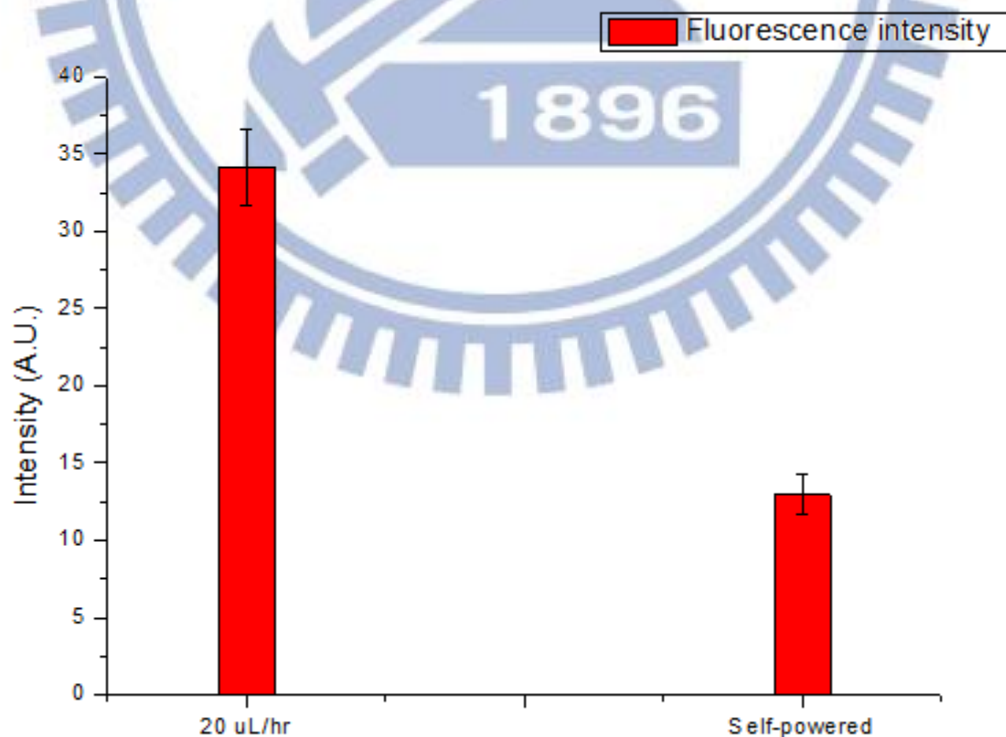


圖 3-5-2、注射幫浦固定流速注入與自動吸取流體之 PDMS 裝置螢光比較圖。

前:幫浦固定流速 20 uL/hr，後:自動吸取流體機制

分別針對兩組實驗各做五次，可明顯看出以注射幫浦固定流速的螢光強度較自動吸取流體機制要高，整體強度更達兩倍以上，因此未來此機制尚有相當大的發展空間，目前僅能證實推進效果是存在的，但無法將之穩定，為了完全達到不依靠外加力推進的願景，此構想仍可繼續研究。

表 3-5-1、注射幫浦固定流速注入與自動吸取流體之 PDMS 裝置螢光強度表。



第四章

結論與未來展望

4-1 結論

根據以上實驗結果，我們歸納出以下的結論：

1. 本實驗成功製造微流道血漿分離元件，發揮節省分離時間以及減少檢體需求量的優勢，以及新結構的製程使得元件的良率提升，並實際運用於生物分子感測上。
2. 結合氧化鋅結構成功提升低濃度偵測極限，感測靈敏度再往下鑑別一個濃度位數。
3. 建立微流道血漿分離元件適用範圍平台，未來運用可供參照。
4. 進行自動吸取流體機制實做，證實本微流道血漿分離系統開發成可攜式元件確實可行。

4-2 未來展望

由以上結論得知，本整合氧化鋅奈米線與微流道血漿分離元件生醫感測平台可供未來使用全血進行生醫感測之研究運用基礎，在此，對於未來工作提出幾項建議：

1. 提升血漿分離效率：
元件系統的血漿分離率，會直接影響生物分子修飾部分的感測靈敏度，因此在元件設計中，可運用模擬分析出最適用的結構進行實驗，並且在分離時間以及感測需求上取得平衡。
2. 自動吸取流體機制分析：
為達成未來可攜式元件的願景，必須針對本機制於各項不穩定變因進行研究分析，如：元件製作參數、抽真空參數…等，將其系統於操作時能

維持穩定度，確保元件能正常工作。

3. 提升感測極限：

本研究提供結合氧化鋅結構增加其生物分子接附表面積概念，順利提升其感測極限，可再就氧化鋅結構上進行分析探討，統整出對於生物分子感測靈敏度最有利的形貌，也可另外整合造成感測靈敏度提升的領域，如 ACEO、DEP，使得生物分子能再行更有效率的接合，以獲得更高的感測極限。



參考文獻

- [1] R. Fan, O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. H. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C. C. Liu, J. Gould, L. Hood, and J. R. Heath, "Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, pp. 1373-1378, 2008.
- [2] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm, "Continuous particle separation through deterministic lateral displacement," *Science*, vol. 304, pp. 987-990, 2004.
- [3] S. Nagrath, L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber, and M. Toner, "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology," *Nature*, vol. 450, pp. 20-27, 2007.
- [4] S. Yang, A. Undar, and J. D. Zahn, "A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 871-880, 2006.
- [5] I. K. Dimov, L. B. Desmots, J. L. G. Cordero, B. M. Ross, A. J. Riccoa, and L. P. Lee, "Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 845-850, 2011.
- [6] S. Fay, L. Feitknecht, R. Schluchter, U. Kroll, E. Vallat-Sauvain, A. Shah, "Rough ZnO layers by LP-CVD process and their effect in improving performances of amorphous and microcrystalline silicon solar cells," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 90, pp. 2960-2996, 2006.
- [7] K. I. Ogata, T. Kawanishi, K. Maejima, K. Sakurai, S. Fujita, S. Fujita, "Improvements of ZnO Qualities Grown by Metal-Organic Vapor Phase Epitaxy Using a Molecular Beam Epitaxy Grown ZnO Layer as a Substrate," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 40, pp. 657, 2001.
- [8] P. F. Carcia, R. S. McLean, M. H. Reilly, G. Nunes, "Transparent ZnO thin-film transistor fabricated by rf magnetron sputtering," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, pp. 1117-1119, 2003.
- [9] J. Joo, B. Y. Chow, M. Prakash, E. S. Boyden, and J. M. Jacobson, "Face-selective electrostatic control of hydrothermal zinc oxide nanowire synthesis," *Nat. Mater.*, vol. 10, pp. 596-601, 2011.
- [10] Y. Cao, E. Galoppini, P. I. Reyes, Z. Duan, and Y. Lu, "Morphology effects on the biofunctionalization of nanostructured ZnO," *Langmuir*, vol. 28, pp. 7947-7051, 2012.
- [11] A. Dorfman, N. Kumar, and J. I. Hahm, "Highly sensitive biomolecular fluorescence detection using nanoscale ZnO platforms," *Langmuir*, vol. 22, pp. 4890-4895, 2006.

- [12] Q. Zhu, Y. Gao, B. Yu, H. Ren, L. Qiu, S. Han, W. Jin, Q. Jin, and Y. Mu, "Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care," *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 4755-4763, 2012.
- [13] C. F. Chou, R. H. Austin, O. Bakajin, J. O. Tegenfeldt, J. A. Castellino, S. S. Chan, E. C. Cox, H. Craighead, N. Darnton, T. Duke, J. Han, and S. Turner, "Sorting biomolecules with microdevices," *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 81-90, 2000.
- [14] A. Dorfman, N. Kumar, and J. I. Hahm, "Nanoscale ZnO-enhanced fluorescence detection of protein interactions," *Adv. Mater.*, vol. 18, pp. 2685-2690, 2006.
- [15] J. Wang, H. Ahmad, C. Ma, Q. Shi, O. Vermesh, U. Vermesh, and J. Heath, "A self-powered, one-step chip for rapid, quantitative and multiplexed detection of proteins from pinpricks of whole blood," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 3157-3162, 2010.
- [16] W. Hua, Y. Liua, H. Yang, X. Zhouc, C. M. Li, "ZnO nanorods-enhanced fluorescence for sensitive microarray detection of cancers in serum without additional reporter-amplification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, pp. 3683-3687, 2011.
- [17] N. Kumar, A. Dorfman, and J. I. Hahm, "Ultrasensitive DNA sequence detection using nanoscale ZnO sensor arrays," *NANOTECHNOLOGY*, vol. 17, pp. 2875-2881, 2006.
- [18] M. Tanyeri, M. Ranka, N. Sittipolkula, and C. M. Schroeder, "A microfluidic-based hydrodynamic trap: design and implementation," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 1786-1794, 2011.
- [19] J. L. Arlett, E. B. Myers, and M. L. Roukes, "Comparative advantages of mechanical biosensors," *Nat. Nanotech.*, vol. 6, pp. 203-215, 2011.
- [20] J. R. Backhurst, J. H. Harker, and J. F. Richardson, "Chemical engineering," 5th Edition, , vol. 2, 2002.
- [21] S.K. Sia, and G.M. Whitesides, "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies," *Electrophoresis*, vol. 24, 3563-3576, 2003.
- [22] S.R. Quake, and A. Scherer, "From micro- to nanofabrication with soft materials," *Science*, vol. 290, 1536-1540, 2000.
- [23] M. Toner, and D. Irimia, "Blood-on-a-chip," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 7, 77-103, 2005.
- [24] L. Vayssieres, "Growth of arrayed nanorods and nanowires of ZnO from aqueous solutions," *Adv. Mater.*, vol. 15, 464-466, 2003.
- [25] L. N. Demianets, D. V. Kostomarov, I. P. Kuz'mina, and S. V. Pushko, "Mechanism of growth of ZnO single crystals from hydrothermal alkali solutions," *Crystallogr. Rep.*, vol. 47, S86-S98, 2002.
- [26] K. Govender, D. S. Boyle, P. B. Kenway, and P. O'Brien, "Understanding the

factors that govern the deposition and morphology of thin films of ZnO from aqueous solution," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, 2575-2591, 2004.

[27] Z. R. R. Tian, "Complex and oriented ZnO nanostructures," *Nature Mater.*, vol. 2, 821-826, 2003.

[28] R. S. Wagner, and W. C. Ellis, "Vapor_liquid_solid mechanism of single crystal growth," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 4, 89-90, 1964.

[29] S. H. Lee, "Control of the ZnO nanowires nucleation site using microfluidic channels," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, 3856-3859, 2006.

[30] D. Lincot, "Solution growth of functional zinc oxide films and nanostructures," *MRS Bull.*, vol. 35, 778-789, 2010.

[31] J. J. Richardson, and F. F. Lange, "Controlling low temperature aqueous synthesis of ZnO. 1. Thermodynamic analysis," *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, 2570-2575, 2009.

[32] L. E. Greene, B. D. Yuhas, M. Law, D. Zitoun, and P. D. Yang, "Solution-grown zinc oxide nanowires," *Inorg. Chem.*, vol. 45, 7535-7543, 2006.

[33] R. Zhang, and L. L. Kerr, "A simple method for systematically controlling ZnO crystal size and growth orientation," *J. Solid State Chem.*, vol. 180, 988-994, 2007.

[34] L. N. Demianets, and D. V. Kostomarov, "Mechanism of zinc oxide single crystal growth under hydrothermal conditions," *Ann. Chim. Sci. Mater.*, vol. 26, 193-198, 2001.