

國立交通大學
機械工程學系研究所
碩士論文

The Calibration of Micro-Cantilever
Beam for Cell Mechanics Measurement

細胞力量測微懸臂樑探針
之製造及校正



研究生：陳昭宏

指導教授：陳大潘 教授

中華民國九十六年七月

細胞力量測微懸臂樑探針之製造及校正

The Calibration of Micro-Cantilever Beam for Cell Mechanics Measurement

研究生：陳昭宏

Student : Jau-Hung Chen

指導教授：陳大潘教授

Advisor : Da-Pan Chen

國立交通大學
機械工程學系研究所
碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

Master of Science

in

Mechanical Engineering

July 2007

HsinChu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年七月

細胞力量測微懸臂樑探針之製造及校正


研究生：陳昭宏

指導教授：陳大潘教授

國立交通大學機械工程學系研究所

碩士論文

摘 要



本論文主要為設計應用於細胞力量測的微懸臂樑探針，或又可視為一細胞力學量測系統。文中第一部份主要在介紹細胞力學的重要性與細胞內骨骼的機制。第二部份為光學量測系統與顯微操作系統的架設及應用。第三部份則為微懸臂樑結構的尺寸分析與製作，其中包含有量測校正系統的設計與機械性質探討實驗結果分析。本研究中的微懸臂樑探針製作與校正模組都已開發完成，不但可透過製程方式調控微懸臂樑基材的尺寸，用以適當運用在不同等級尺寸的細胞研究，並準確定量出細胞的力學行為。未來透過此技術也可進一步探討細胞與基材相互間的研究，並得到細胞力學研究應用在軟體模擬細胞力學分析上所需的各項資訊、參數。

The Calibration of Micro-Cantilever Beam for Cell Mechanics Measurement

Student: Jau-Hung Chen

Advisor: Da-Pan Chen

Department (Institute) of Mechanical Engineering

National Chiao Tung University



This thesis is applied in order to design the micro-cantilever probe for cell' s mechanics measurement. First part focuses on introduction cell mechanics and mechanism of cell' s cytoskeleton. The second part expounds erecting and application of the optic microscopy system and micro-operating system. The third part analyzes for micro-cantilever probe' s size and manufacture, including verification of theory and calibration of system.

誌謝

能順利完成本文需要感謝的人太多，不過最重要的當然是陳大潘老師對我的指導與關懷。老師教導我作學問時所需要的嚴謹態度與實際實驗前需要的完整規劃。這讓我得到身為一個研究學者所必須具備的基本能力。

當然本自動化實驗室當中的各位學長、同學與學弟也是需要感謝的對象。在研究學問這條路上，兩年來大家的相互扶持是我很珍惜的回憶。其它的話也不多說。

還有徐文祥老師以及奈微米機電實驗室的學長學弟在微機電製程上給予我許多的幫助與經驗。少了這些，我也不能順利的完成本論文。

最後我的親朋好友們，雖然我沒說，但你們應該知道的。也希望不管是誰，只要是我認識的人都能健健康康、無病無痛的，朝著自己的夢想繼續前進。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
一、緒論.....	1
1.1 研究目的.....	1
1.2 論文架構.....	3
二、研究相關理論技術.....	4
2.1 細胞概論.....	4
2.1.1 細胞骨架 (cytoskeleton).....	5
2.2 細胞力學量測技術.....	8
2.2.1 光鉗分析技術 (Optical Tweezer).....	8
2.2.2 細胞觀測、操控系統.....	12
2.2.3 量測尺度轉換.....	15

2.3 懸臂樑、柱相關理論公式.....	18
2.3.1 懸臂樑力量公式.....	18
2.3.2 微柱挫曲理論公式.....	21
三、實驗流程與數據分析.....	24
3.1 實驗規劃流程.....	24
3.2 微懸臂樑尺寸模擬.....	26
3.3 微懸臂樑製作.....	34
3.3.1 SU-8 微懸臂樑製程流程.....	34
3.3.2 PDMS 微懸臂樑製程流程.....	35
3.3.3 RCA Clean.....	36
3.3.4 微影技術.....	37
3.4 微懸臂樑製作成品.....	45
3.4.1 SU-8 微懸臂樑.....	45
3.4.2 PDMS 微懸臂樑.....	46
3.4.3 實驗儀器架設圖.....	48
3.5 實驗數據整理分析.....	50
3.5.1 微懸臂樑尺寸分析.....	64
四、結語.....	71
參考文獻.....	72

圖目錄

圖 1-1	論文架構圖	3
圖 2-1	動物真核細胞構造圖	4
圖 2-2	細胞骨架圖	5
圖 2-3	(a) 光壓使微粒漂浮圖 (b) 雙光束嵌住圖	9
圖 2-4	光折射後動量變化示意圖	10
圖 2-5	光鉗分析技術	11
圖 2-6	本實驗室的顯微鏡系統架設圖	12
圖 2-7	本實驗室的顯微鏡系統圖	12
圖 2-8	Workstation 工作介面	14
圖 2-9	電動載物平台圖	14
圖 2-10	Micromanipulation Systems 圖	15
圖 2-11	(a) AFM 探針(1、2) (b) AFM 探針(2、3)	16
圖 2-12	懸臂樑自由端 A 承載一荷重 F 示意圖	18
圖 2-13	桿件挫曲示意圖	21
圖 3-1	實驗流程圖	25
圖 3-2	微懸臂樑尺寸圖	32
圖 3-3	微懸臂樑尺寸圖	32
圖 3-4	微懸臂樑外型設計	33

圖 3-5	厚模光組 SU-8 製程流程概念圖	34
圖 3-6	PDMS 製程步驟概念圖	35
圖 3-7	光罩設計圖	39
圖 3-8	Photoresist Spinner 圖	40
圖 3-9	Mask Aligner 圖	41
圖 3-10	SU-8 微懸臂樑成品 1 圖	45
圖 3-11	SU-8 微懸臂樑成品 2 圖	45
圖 3-12	PDMS 微懸臂樑成品 1 圖	46
圖 3-13	PDMS 微懸臂樑成品 2 圖	46
圖 3-14	PDMS 微懸臂樑圖	47
圖 3-15	PDMS 微懸臂樑圖	47
圖 3-16	實驗儀器架設概念之上視圖	48
圖 3-17	實驗儀器架設概念之側視圖	49
圖 3-18	實驗儀器架設圖	49
圖 3-19	實驗紀錄圖	51
圖 3-20	挫曲發生組圖	51
圖 3-21	挫曲狀況圖	52
圖 3-22	SU-8 懸臂樑量測圖	53
圖 3-23	AFM 探針 CSG11 圖	53

圖 3-24	長度與位移量關係圖	55
圖 3-25	微懸臂樑楊氏係數關係圖	55
圖 3-26	長度與位移量關係圖	56
圖 3-27	微懸臂樑楊氏係數關係圖	57
圖 3-28	長度與位移量關係圖	58
圖 3-29	微懸臂樑楊氏係數關係圖	58
圖 3-30	AFM 探針 CSC17 圖	59
圖 3-31	長度與位移量關係圖	61
圖 3-32	微懸臂樑楊氏係數關係圖	61
圖 3-33	長度與位移量關係圖	62
圖 3-34	微懸臂樑楊氏係數關係圖	63
圖 3-35	量測位移範圍 1 圖	66
圖 3-36	量測力量範圍 2 圖	66
圖 3-37	量測力量範圍 3 圖	67
圖 3-38	量測力量範圍 4 圖	67
圖 3-39	量測力量範圍 4 圖	68
圖 3-40	量測力量範圍 4 圖	69
圖 3-41	量測力量範圍 4 圖	69
圖 3-42	量測力量範圍 4 圖	70

表目錄

表 2-1	邊界條件常數表	23
表 3-1	ANSYS 模擬 銅金屬材質表	27
表 3-2	ANSYS 模擬 SU-8 材質表	28
表 3-3	ANSYS 模擬 SU-8 材質表	29
表 3-4	ANSYS 模擬 PDMS 材質表	31
表 3-5	三種材質光罩的比較表	38
表 3-6	SU-8 微懸臂樑製程參數表	43
表 3-7	PDMS 微懸臂樑製程參數表	44
表 3-8	AFM 探針 CSG11 參數表	54
表 3-9	SU-8 懸臂樑參數表	54
表 3-10	SU-8 材料參數表	59
表 3-11	AFM 探針 CSC17 參數表	60
表 3-12	SU-8 懸臂樑參數表	60
表 3-13	SU-8 材料參數表	63

一、緒論

1.1 研究目的

細胞與外界物質間的交互作用會刺激誘使細胞做出不同的行為，例如：細胞貼附 (Cell Adhesion)、細胞骨架的組成結構 (Cytoskeleton Organization)、細胞能動性 (Cell Motility)、細胞遷移 (Cell Migration)、甚至是組織或器官的運動、表面型態等等。是故了解細胞的能動性和其組成特性是非常重要的，因這些性質將會影響細胞的各項發展變化，例如胚胎 (Embryogenesis) 的發育、傷口癒合、腫瘤形成，甚至癌細胞的轉移，都和細胞本身的物理特性有關。所以若是能夠更進一步的了解細胞能動性和組成特性，對於預測或控制細胞在不同環境、材料下的行為將有很大的幫助，並且可透過以細胞為基礎的應用技術對生物感測器、組織工程、人造神經網路等等未來醫療的發展能有所幫助，或從中學習得到更多啟示與答案。

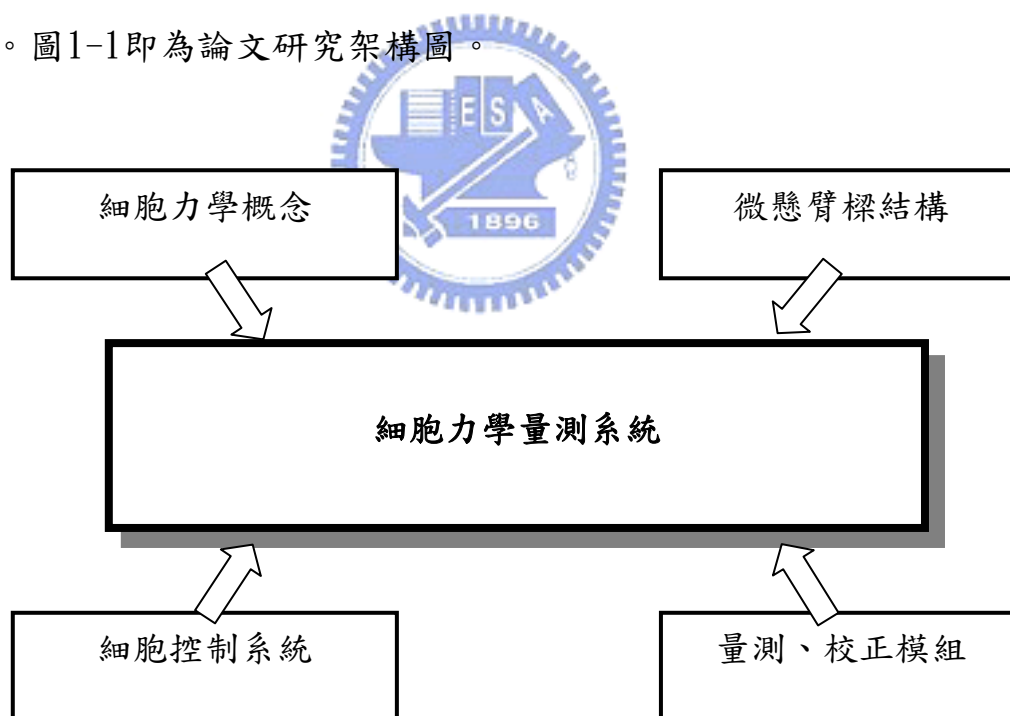
為了我們將來能在微米尺度下能研究、量測和量化細胞的各項牽引力大小、能動性和組成特性，除了可能需用到光鉗系統與微玻璃管系統控制操作細胞外，我們還必須利用微機電製造技術做出不同微米尺度的懸臂樑結構，以利用微懸臂樑的曲撓程度來作為不同力量範圍的細胞力定量依據。因此時細胞所產生的反作用力會拉扯推擠微懸臂樑結構並使其產生彎曲位

移，我們可再透過數位光學影像系統對微懸臂樑一端進行影像定位與位移分析，即可量化並分析出細胞延展或移動時相對需要的力量值。或者也可在深入探討微懸臂樑與細胞在不同接觸面狀態下，細胞產生的變化情形、力量大小與其組成性質變化。

為了利用微懸臂樑的曲撓程度來作為細胞力定量的依據，精準校正懸臂樑的材料性質與分析為本文的首要課題。經校正過後的微懸臂樑未來才可更進一步的對細胞施予不同大小的力量，使此量測推算細胞力時數值準確，或藉由微懸臂樑的曲撓和位移針對特定細胞的組成特性進行分析討論。或許也可將實驗結果與FEA (Finite Element Analysis) 模擬得出的細胞受力引響分析數據做相互印證比較。藉以相互驗證我們設計的細胞力學量測系統，對細胞組成特性之計算量測分析之正確性。

1.2 論文架構

本論文主要研究為設計一利用微懸臂樑結構來分析細胞受力變化的細胞力學量測系統，使細胞在適當環境下，我們可利用微懸臂樑結構對細胞施加一定量的外力，觀察細胞的反應、延展或移動。且為了利用微懸臂樑的曲撓程度來作為細胞力定量的依據，精準校正其材料性質與分析為本文的關注重點。文中利用原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) 之探針與製作出的微懸臂樑結構相互作用，用以量測製作的微懸臂樑結構剛性。以期我們製造出來的微懸臂樑楊氏係數、彈性係數數值精準、誤差極小。圖1-1即為論文研究架構圖。



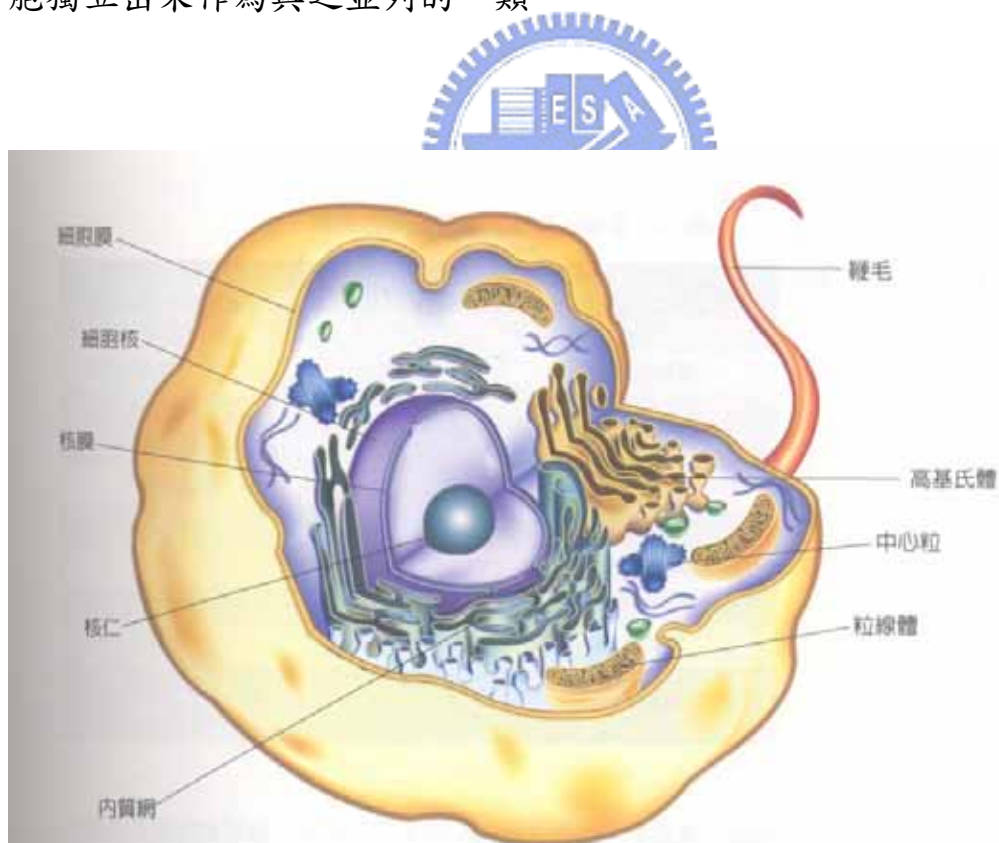
【圖 1-1 論文架構圖】

本文下面的章節將依序為細胞力學理論、控制系統、微結構製作技術、量測校正技術、實驗流程數據分析等各個主題個別分析討論。

二、研究相關理論技術

2.1 細胞概論

細胞是生命活動的基本單位。目前已知除病毒之外的所有生物體均由細胞所組成，而且病毒的生命活動也必須在細胞中才能體現。一般來說，細菌等絕大部分微生物以及原生動物都由一個細胞組成，即單細胞生物；高等植物與高等動物則是多細胞生物。簡單來說細胞可分為兩類：原核細胞、真核細胞。但也有人提出應分為三類，即把原屬於原核細胞的古核細胞獨立出來作為與之並列的一類。

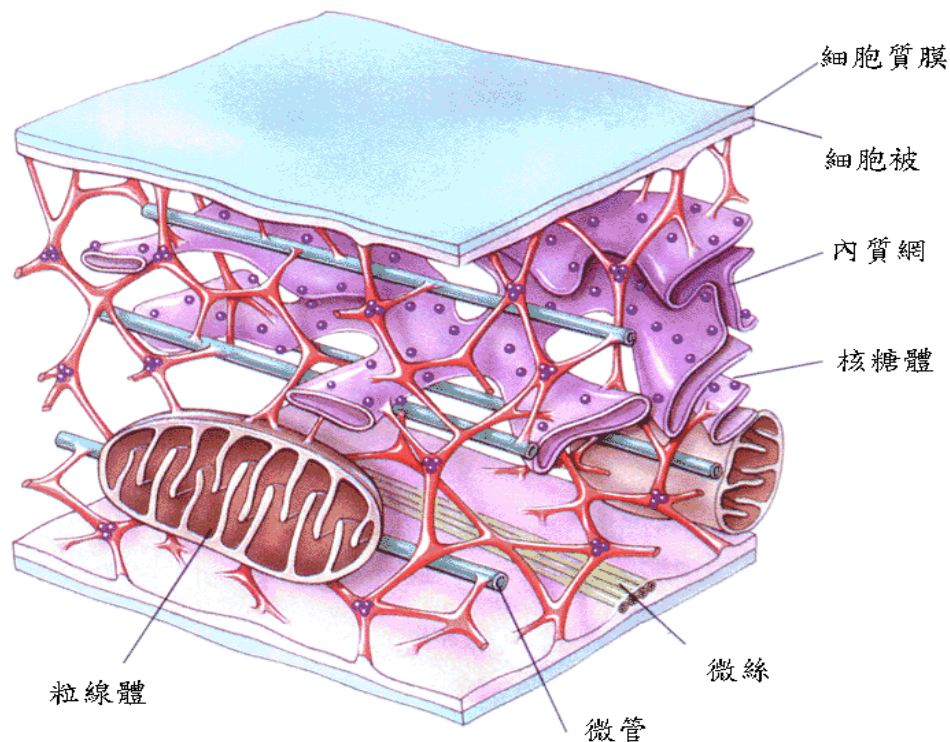


【圖 2-1 動物真核細胞構造圖】

資料來源：微生物學的世界〔12〕

2.1.1 細胞骨架 (Cytoskeleton)

生物分子世界裡，結構與功能分別扮演重要角色，而維持細胞形狀與運動功能，則是由細胞質內的蛋白纖維網路結構所提供，也就是所謂細胞骨架(Cytoskeleton)。而細胞骨架 (Cytoskeleton) 普遍只存於真核細胞中。



【圖 2-2 細胞骨架圖】

資料來源:細胞生物學網路課程 [14]

細胞骨架的組成: [14] [15] [16]

細胞骨架主要由三種蛋白質纖維—微管(Microtubules)、微絲(Microfilament)、中間絲(Intermediate Filament)所組成。不僅如此，有時還包含有很多結構單元的附屬蛋白質，例如：分子馬達(Molecules

Motor)、動力蛋白 (Dynein)、結合蛋白 (Vinculin) 等等。

微管(Microtubules)為中空管狀，可在所有哺乳類動物細胞中存在，除了紅細胞(紅血球)外均由 α 與 β 微管蛋白(Tubulin)組成二聚體存在，微管外徑為22~25nm，內徑為約15nm的中空管。微管是細胞骨架的架構主幹，也是某些胞器的主體，例如中心粒(Centriole)就是由9組3聯微管組成的構造，而真核生物的纖毛(Cilium)與鞭毛(Flagellum)也是由以微管為9+2結構，即由9個二聯微管和一對中央微管構成。

微絲 (Microfilament) 普遍存於所有真核細胞中，是一個實心狀的纖維，一般細胞中含量約占細胞內總蛋白質的1%~2%，但在活動較強的細胞中可占20%~30%。微絲確定細胞表面特徵，使細胞能夠運動和收縮。微絲主要為肌動蛋白(Actin)和肌凝蛋白(Myosin)組成，直徑約為7nm，這兩種蛋白負責肌肉收縮與細胞運動。微絲具有多種功能，在不同細胞的表現不同，在肌細胞組成粗肌絲、細肌絲，可以收縮蛋白，在非肌細胞中主要負起支撐作用、非肌性運動和信息傳導作用。

中間絲 (Intermediate Filament) 為纖維蛋白(Fibrin)超絞結而成，為中空的骨狀結構，直徑介於微管和微絲之間約為8~12nm，其化學組成比較複雜，且在不同細胞中，成分變化也較大。中間絲能使細胞具有張力和抗剪切力。

細胞骨架結構幾乎都是奈米尺寸的組件，但如此細微的成份卻影響了

整個生物分子運轉。例如：在細胞運動功能中主要靠的一蛋白質複合物—分子馬達(Molecules motor)，即為細胞骨架中包含的許多結構單元附屬蛋白質之一。細胞利用分子馬達(Molecules Motor)其相互作用來完成生物體內一部份物質、各種組織、器官乃至整個生物體的運動，且最終所有細胞運作都歸結為分子馬達(Molecules Motor)在微觀尺度上的運動。

細胞骨架的功能：〔14〕〔15〕〔16〕

細胞骨架提供細胞機械性支撐用以維持細胞型態、承受外力，保持細胞內部結構的有序性等方面起了重要作用，且可隨細胞的生命活動而呈現高度的動態性。它們均由單體蛋白以較弱的非共價鍵結合在一起，構成纖維型的多聚體，可以很容易進行組裝和拆裝，這也是其必要的功能特點。不僅如此，細胞骨架還參與許多重要的生命活動，例如：

- (1) 在細胞分裂中，細胞骨架為牽引染色體分離；
- (2) 細胞內物質的運輸，各類液泡和細胞器可沿著細胞骨架作運轉；
- (3) 肌肉細胞中，細胞骨架和其結合蛋白則組成細胞動力系統；
- (4) 白血球的遷移、精子的游動、神經細胞軸突和樹突的伸展、訊號傳遞等等方面也都與細胞骨架有關；
- (5) 在植物細胞中細胞骨架也引導細胞壁的合成等等。

2.2 細胞力學量測技術

目前細胞力學行為主要研究分為細胞黏著力 (Adhesion Force)、細胞黏彈行為 (Viscoelastic)、細胞牽引力 (Traction Force) 等。

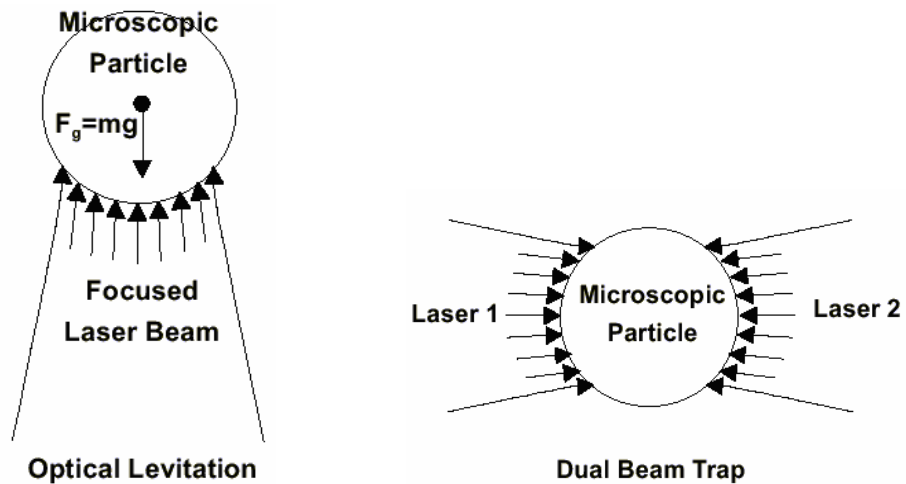
已目前的實驗分析方法可分為許多種類，有的間接透過光鉗技術 (Optical Tweezers)、微流磁場分析、原子力顯微鏡技術 (Atomic Force Microscope)、微機械元件形變分析等等技術來量測、量化細胞力。而運用微機械元件形變分析技術來探討細胞力學則為本論文的探討要點。本文使用的微機械元件分析技術可改良光鉗技術 (Optical Tweezers) 施力範圍極小的限制，也可改變以往某些微元件形變分析技術只能針對貼附式的細胞做研究，對其他懸浮式細胞種類就無法使用的缺憾。以下則針對與本文相關的重要文獻做適當的簡介。



2.2.1 光鉗分析技術 (Optical Tweezer)

光學嵌住理論 [18][19][20]

1969 年，Arther Ashkin 提出聚焦之雷射光有可能推動數微米 (μm) 大小微粒的假設：若將一束由下往上射入的雷射光聚焦，並將一個直徑約數微米 (μm) 的塑膠微粒置於焦點處，則不斷朝上發射的光子在撞擊微粒的同時，將施予一微弱的作用力。若微粒的質量夠輕、光子流的密度夠大，那麼這個微粒就可能因為光子的作用力而漂浮在空中。如圖 2-3(a) 所示。



【圖 2-3 (a) 光壓使微粒漂浮圖 (b) 雙光束嵌住圖】

資料來源：光鉗系統之建置校正及基礎應用之研究〔20〕

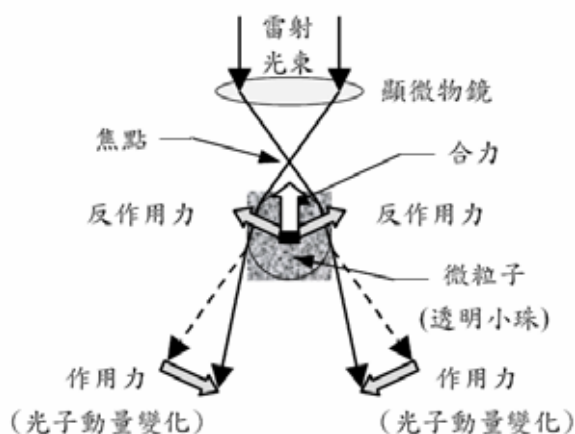
另外，除了光軸方向上的推力，同時還發現一個意外現象，接近光束的微粒也會被「橫向」吸入光束中，再被推離。之後改用氣泡與液滴重做實驗，歸納出一項結論：光束對折射率比周圍介質高的微粒具有橫向吸力，但對折射率比周圍介質低的微粒具有橫向推力。

1986 年，發現將單束雷射光高度聚焦，也可在焦點處產生與光進行方向相反的軸向吸力，加上原有的橫向吸力，即可將微粒穩定嵌住。這種單束雷射的光學嵌住，又稱為「光鉗 (Optical Tweezer)」。

幾何光學模型〔18〕〔19〕〔20〕

微粒直徑遠大於雷射光波長時($d \gg \lambda$)，可以用 Mie 散射狀況(Mie Scattering Regime)來討論。簡單來說，當光線由一介質進入到另一不同介質中時，光會發生偏折的現象，也就是所謂的折射。如果將光線想像成

是由光子所組成，當光線發生偏折時，光子的動量即產生改變，而動量改變即產生作用力，如圖 2-4 所示。

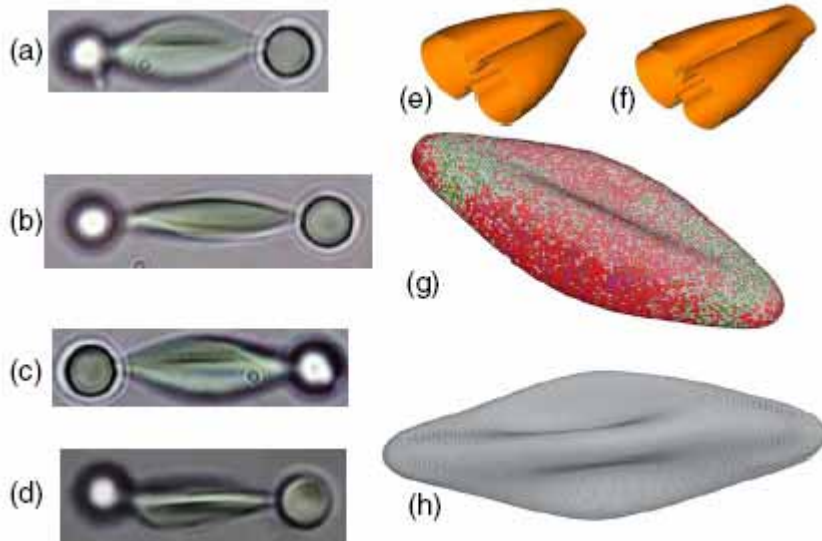


【圖 2-4 光折射後動量變化示意圖】

資料來源：光鉗系統之建置校正及基礎應用之研究〔20〕

因此，一道平行的雷射光束，經過透鏡聚焦後，若有微粒在其焦點附近時，由於左右偏折不對稱的關係，其合力將會指向光束焦點，也就會因此產生一類似彈簧力的恢復力，將這微小物體往焦點方向拉，並在焦點的位置達到力平衡。雷射光鉗的正式名稱為「單束光梯度力阱(Single-Beam Optical Gradient Force Trap)」，可用來抓取並移動從數十奈米到數十微米的微小粒子。此發明亦打開了操縱生物樣本及量測生物作用力研究之門，利用光鉗技術我們可以控制細胞，甚至對細胞施加外力去研究觀察細胞的型態變化與其組成性質。例如：M. Dao, J. Li, S. Suresh等學者在 "Molecularly Based Analysis of Deformation of Spectrin Network and Human Erythrocyte" 中所做的紅血球細胞研究。一般而言，Optical Tweezer

所能操作的力量範圍非常微弱，約在 10^{-12} Newton。所以Optical Tweezer 雖然可對細胞力學作定量量測，但是對於量測的力量範圍、方式則有一定的限制。



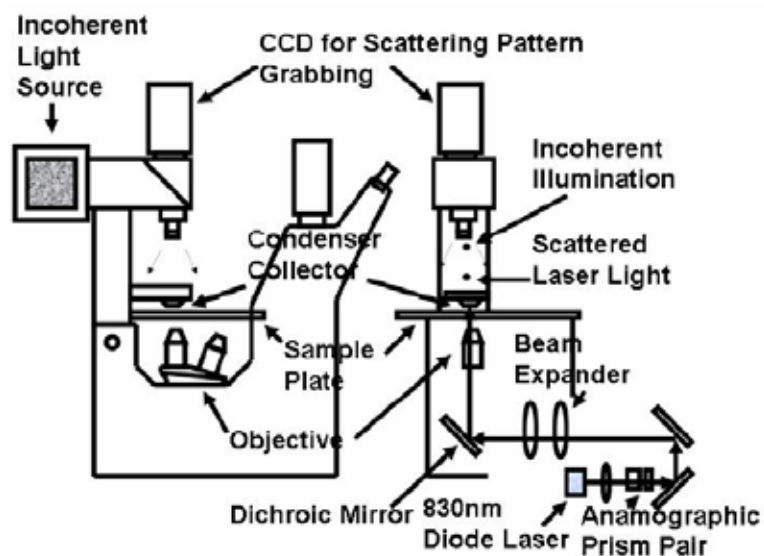
【圖 2-5 光鉗分析技術】

資料來源: Molecularly Based Analysis of Deformation of Spectrin Network and Human Erythrocyte [5]

2.2.2 細胞觀測、操控系統

顯微鏡系統

本實驗室所擁有的顯微鏡系統，用的是 Leica 公司的倒立式顯微鏡改裝而成，大致架設概念如圖 2-6、實際架設圖如 2-7 所示。



【圖 2-6 本實驗室的顯微鏡系統架設圖】

資料來源：光鉗系統之建置校正及基礎應用之研究〔20〕

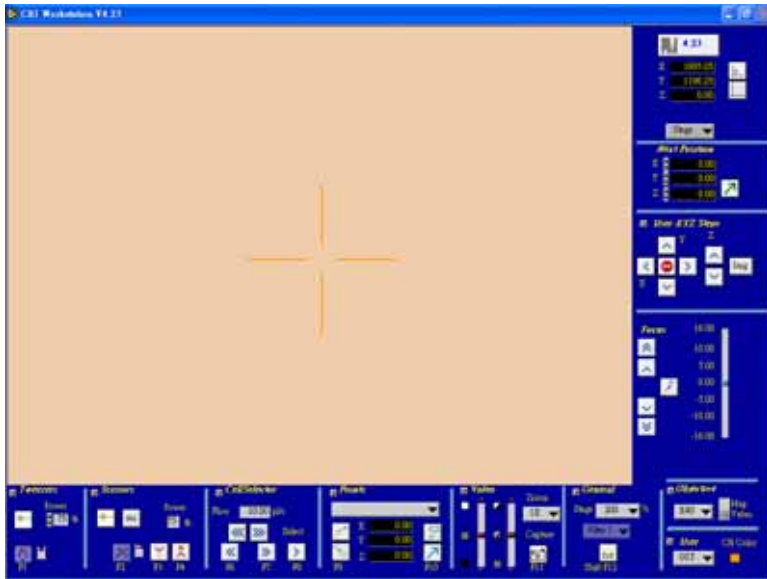


【圖 2-7 本實驗室的顯微鏡系統圖】

一般顯微鏡觀察的試片，樣本夾在載玻片和蓋玻片之間，因為光鉗的嵌住目標微粒必須存在於液體中，一但時間久了，微粒將沉入試片底部，若是聚焦深度不夠，將無法嵌住微粒。而倒立式顯微鏡將不會有此問題，因為試片必須倒放觀察，若是微粒沉澱，也只會和物鏡相隔蓋玻片的厚度約 0.14~0.17mm，將不會有聚焦深度的問題。而且倒立式顯微鏡的操作空間也比一般的直立式顯微鏡大了許多，這對將來需要同時使用其他儀器來操作的本實驗室至關重要。

電動載物平台

本實驗室的載物平台為 Cell Robotic Inc. 公司的電動載物平台，可做二維 XY 軸的移動，移動速度可藉由外部程式控制，位移精準度可達 $1\mu\text{m}$ 。控制軟體為 Cell Robotic Inc. 公司用 Labview 所寫成的虛擬控制儀表板 Workstation。Workstation 不但可以做速度控制，也可以記錄移動位置、定位的工作，並且還可以輸入欲移動的距離、方向，用以精確的移動平台位置。且為了能夠隨意連續控制速度、改變方向，另外加裝手動搖桿在控制器上，即可以隨意控制載物平台的移動速度。下圖 2-8 即為 Workstation 的使用者介面，圖 2-9 為電動載物平台圖。



【圖 2-8 Workstation 工作介面】

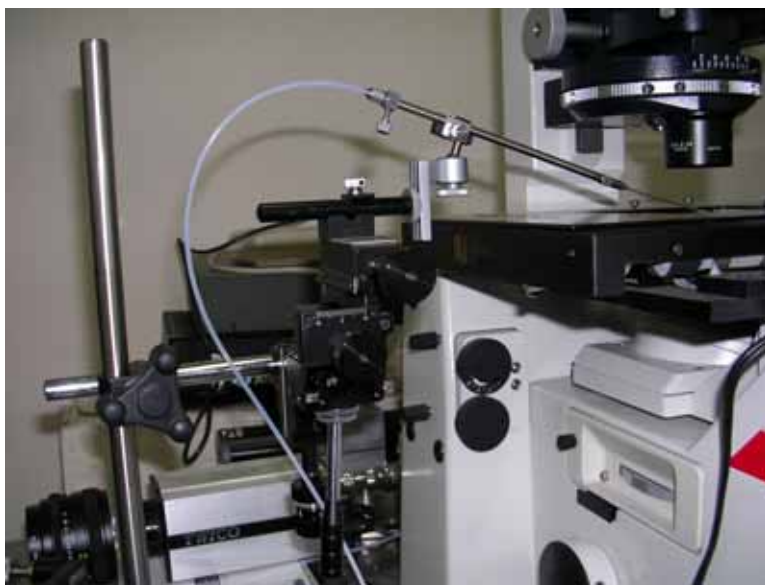


【圖 2-9 電動載物平台圖】

顯微操控系統

本實驗室的顯微操控系統為日本 NARISHIGE GROUP 的機械式微調整器 MN-151，可自由做三維方向的移動，也可固定 Z 軸單做二維 XY 平面的移動。

如下圖 2-10 所示。

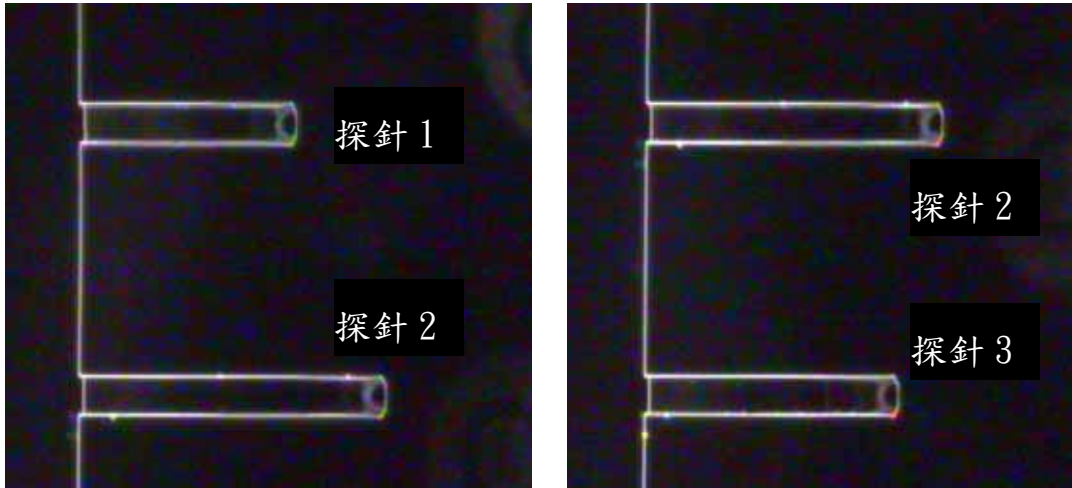


【圖 2-10 Micromanipulation Systems 圖】

2.2.3 量測尺度轉換



為了能將顯微鏡觀察到的影像，擷取下來後和實際的大小做尺度上的轉換，我們預先觀察已知大小的物體，以用作為尺度轉換上的依據。如圖 2-11 是原子力顯微鏡所使用的探針，MikroMasch 出品編號 CSC38，一組三根的探針組。此探針組每根探針寬度為 $35\ \mu\text{m}$ ，而每根探針的長度有些微差距，由上而下依序為 $250\ \mu\text{m}$ 、 $350\ \mu\text{m}$ 、 $300\ \mu\text{m}$ 。因此我們將同樣的探針，兩根兩根各拍一張圖片，如圖 2-11(a)、(b)所示。再把利用 CCD 擷取下來的影像存成大小 640×480 的圖片，圖片格式為 .bmp 檔。則可藉由此點陣座標的方式來分析圖片影像實際尺寸大小。



【圖 2-11 (a) AFM 探針(1、2) (b) AFM 探針(2、3)】

我們藉由得到實際長度和擷取圖片大小為 640×480 的圖片影像，有如下的對應關係：

AFM 探針 1：

橫軸

$$\frac{265}{250} = 1.06 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{250}{265} = 0.943 \mu\text{m}/\text{pixel} , \quad (2-1a)$$

縱軸

$$\frac{36}{35} = 1.029 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{35}{36} = 0.972 \mu\text{m}/\text{pixel} 。 \quad (2-1b)$$

AFM 探針 2：

橫軸

$$\frac{372}{350} = 1.063 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{350}{372} = 0.941 \mu\text{m}/\text{pixel} , \quad (2-2a)$$

縱軸

$$\frac{36}{35} = 1.029 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{35}{36} = 0.972 \mu\text{m}/\text{pixel} 。 \quad (2-2b)$$

AFM 探針 3 :

橫軸

$$\frac{318}{300} = 1.06 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{300}{318} = 0.943 \mu\text{m}/\text{pixel} , \quad (2-3a)$$

縱軸

$$\frac{36}{35} = 1.029 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } \frac{35}{36} = 0.972 \mu\text{m}/\text{pixel} 。 \quad (2-3b)$$

取其平均值則為 :

橫軸

$$1.061 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } 0.942 \mu\text{m}/\text{pixel} , \quad (2-4a)$$

縱軸

$$1.029 \text{ pixels}/\mu\text{m} \text{ 或 } 0.972 \mu\text{m}/\text{pixel} 。 \quad (2-4b)$$

因此，往後我們只要擷取同等畫素的點陣圖片，先分析長度或位移為多少 pixels，接著就可以利用此等公式換算出相對應的實際真實尺度了。

2.3 懸臂樑、柱相關理論公式

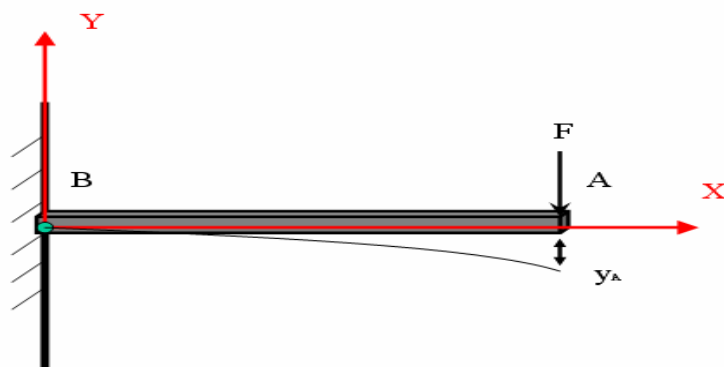
2.3.1 懸臂樑力量公式

懸臂樑在虎克定律 (Hook' s Law) 線性範圍內計算微柱的彈性常數 (Spring Constant, K_p)，如圖 2-12 所示。其中計算方式主要是透過一懸臂模型在自由端給予一力量 (F)，再透過微分方程計算出其自由端型變量。

其中計算的假設條件為：

- (1) 直形、均質、等斷面；
- (2) 對稱彎曲、純彎曲；
- (3) 彎曲後橫斷面與中性面互為垂直且保持平面；
- (4) 線性彈性。

其中推導過程如下所述：



【圖 2-12 懸臂樑自由端 A 承載一荷重 F 示意圖】

藉由 Hook' s law：

$$F(x) = k \cdot x \quad (2-5)$$

再由自由體圖可得：

$$M(x) = -F(x) \cdot x \quad (2-6)$$

將上式 2-6 代入彈性曲線方程式：

$$\frac{d^2 y}{dx^2} = \frac{M(x)}{EI} \quad (2-7)$$

式 2-7 左右同乘 EI 即得：

$$EI \frac{d^2 y}{dx^2} = M(x) = -F \cdot x \quad (2-8)$$

將 2-8 式對 x 積分可得：

$$\int EI \frac{d^2 y}{dx^2} = \int -Fx$$

$$EI \frac{dy}{dx} = \frac{1}{2} Fx^2 + C_1$$

$$EI \cdot y = -\frac{1}{6} F \cdot x^3 + C_1 \cdot x + C_2 \quad (2-9)$$



其中因固定端 B 點曲撓角度為零，位移也固定為零，故邊界條件為：

$$\text{當 } x = 0, \theta = \frac{dy}{dx} = 0 \quad (2-10a)$$

$$x = 0, y = 0 \quad (2-10b)$$

再將邊界條件帶入 2-9 式中即可得：

$$C_1 = \frac{1}{2} F \cdot L^2 ; C_2 = -\frac{1}{2} F \cdot L^3 \quad (2-11)$$

故最後將公式改寫得到彈性曲線方程式：

$$y = \frac{F}{6EI}(-x^3 + 3L^2 \cdot x - 2L^3) \quad (2-12)$$

其中令 $x=0$ ，代入 2-12 式中，即可求得在 A 點自由端的曲撓程度：

$$y_A = -\frac{F \cdot L^3}{3EI} \quad (2-13)$$

其中若為長方柱斷面則代入其慣性矩即得理論彈性係數值：

$$K_p = \frac{Ebh^3}{4L^3} \quad (2-14)$$

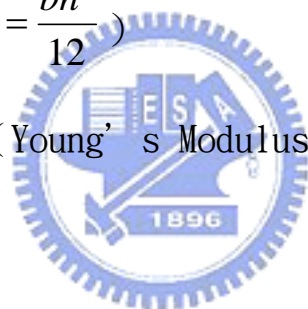
I ：幾何慣性距 ($I = \frac{bh^3}{12}$)

E ：材料楊氏係數 (Young's Modulus)

b ：微樑寬度

h ：微樑厚度

L ：微樑長度



在公式 2-14 中微柱彈性係數值 (K_p) 分別與微柱長度成三次方反比，和寬度、厚度各有其正比關係，並且 K_p 值也與楊式係數成正比相關。

利用此公式，可作為校正懸臂樑的定量分析，即利用一微懸臂樑去使得另一微懸臂樑曲撓，而施予懸臂樑的之間的作用力與反作用力將會相互抵銷，當其懸臂樑產生挫曲時，再由已知的微懸臂樑臨界荷重對另一懸臂

樑結構進行位移定量分析的校正。利用同樣的方式我們還可以對我們所不知道的材料做機械性質的量化計算分析。

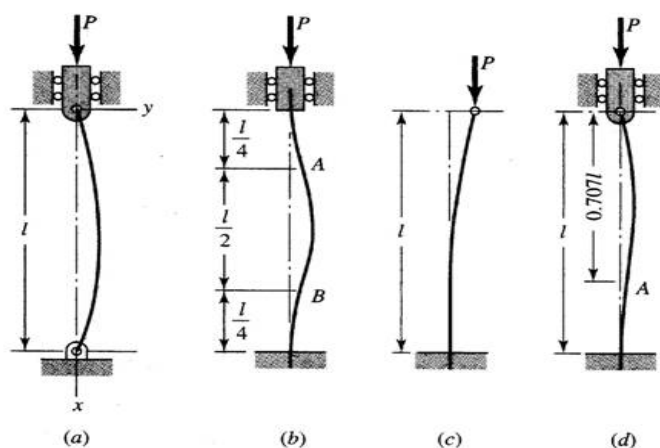
2.3.2 微柱挫曲理論公式

微柱在虎克定律 (Hook' s Law) 線性範圍內計算微柱的面臨挫曲的臨界荷重理論，如圖 2-13 所示。其中計算方式主要是透過一微柱模型在自由端給予一力量 (P)，再透過微分方程計算出其力量大小。

其中計算的假設條件為：

- (1) 直形、均質、等斷面；
- (2) 作用力通過剖面形心；
- (3) 微柱只在單一平面內彎曲，且在線性彈性範圍內。

其中推導過程如下所述：



【圖 2-13 桿件挫曲示意圖】

資料來源: Mechanical Engineering Design [21]

由力矩公式可得：

$$M(x) = -P \cdot y \quad (2-15)$$

將上式代入彈性曲線方程式：

$$\frac{d^2y}{dx^2} = \frac{M(x)}{EI} \quad (2-16)$$

將 2-16 是左右兩邊同乘 EI 即得：

$$EI \frac{d^2y}{dx^2} = M(x) = -P \cdot y \quad (2-17)$$

$$\frac{d^2y}{dx^2} + \frac{P}{EI} y = 0 \quad (2-18)$$

再將 2-18 式利用微分方程式可得一般解：

$$y = A \sin \sqrt{\frac{P}{EI}} x + B \cos \sqrt{\frac{P}{EI}} x \quad (2-19)$$

其中因固定端位移為零，另一端點位移也為零，故邊界條件為：

$$\text{當 } x = 0, y = 0 \quad (2-20a)$$

$$x = L, y = 0 \quad (2-20b)$$

再將邊界條件帶入 2-19 式中可得：

$$B = 0 ;$$

$$0 = A \sin \sqrt{\frac{P}{EI}} L \quad (2-21)$$

又因為假若 $A = 0$ 將成為無價值的解，所以其解應是如下

$$0 = \sin \sqrt{\frac{P}{EI}}L$$

$$\sqrt{\frac{P}{EI}}L = n\pi ; n = 1, 2, 3, \dots$$

$$P = \frac{n^2 \pi^2 EI}{L^2} \quad (2-22)$$

而當 $n = 1$ 時，即可得到最小值，也就是所謂的微柱挫曲臨界荷重， P_{cr} 。

$$P_{cr} = \frac{\pi^2 EI}{L^2} \quad (2-23)$$

此外因應不同的端點邊界條件，又可將上式改變成以下公式來符合各式各樣的臨界荷重情況。

$$P_{cr} = \frac{C \pi^2 EI}{L^2} \quad (2-24)$$



【表 2-1 邊界條件常數表】資料來源: Mechanical Engineering Design [21]

邊界條件常數 C			
邊界條件	理論值	保守值	推薦值
Fixed-free	0.25	0.25	0.25
Rounded-rounded	1	1	1
Fixed-rounded	2	1	1.2
Fixed-fixed	4	1	1.2

三、實驗流程與數據分析

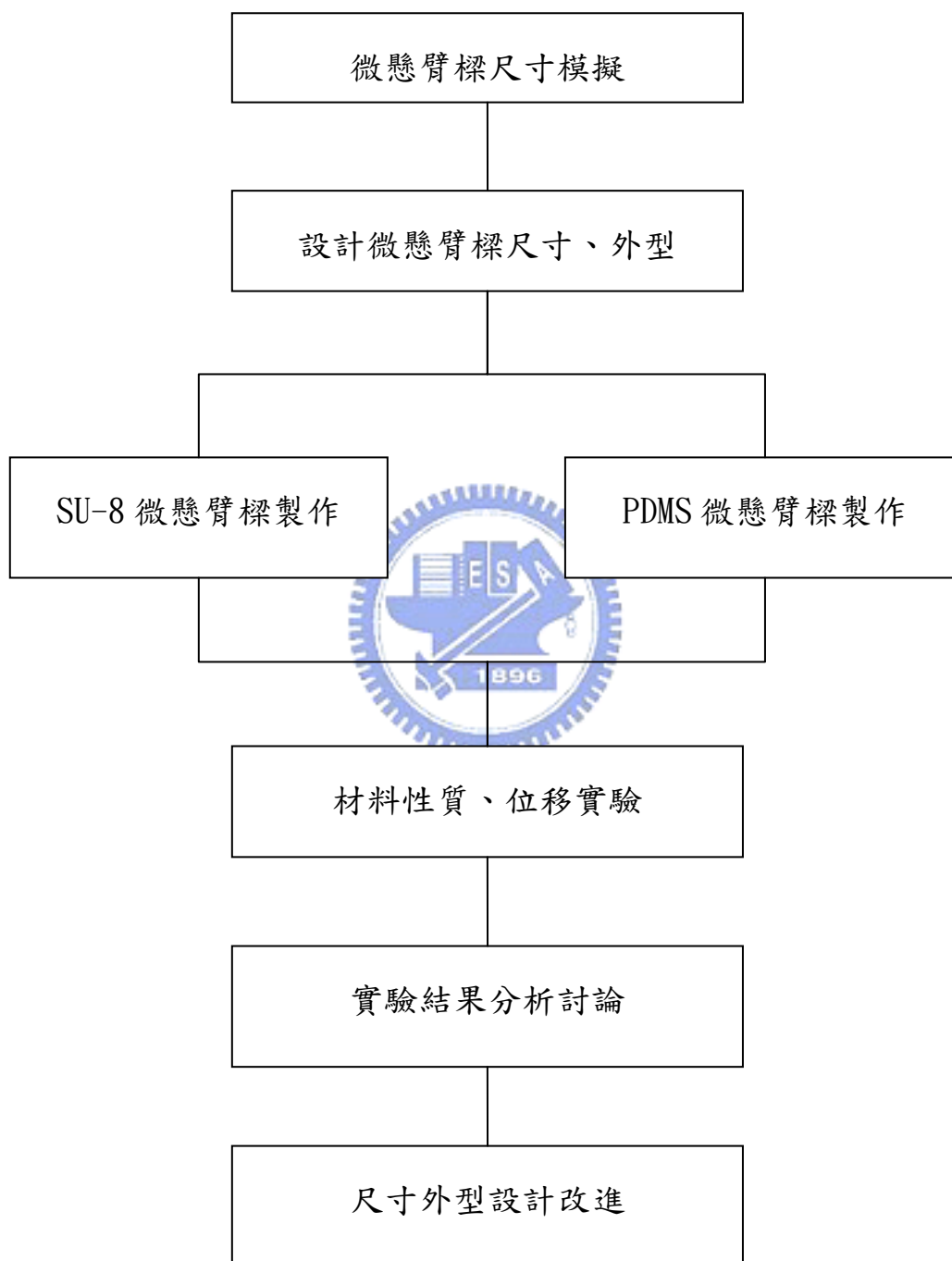
3.1 實驗規劃流程

本文為了在微小尺度下能研究、量測量化細胞的各項牽引力大小，需要利用微結構製造技術做出不同微米尺度的懸臂樑結構用以應付不同等級的細胞力量大小，以期能利用微懸臂樑的曲撓程度來作為細胞力學定量的依據。為了製作出我們實驗需要的微懸臂樑結構，我們還需要 LIGA-Like 技術與犧牲層結構技術來製作懸空於基材的結構，又為了將微懸臂樑結構與矽基材分離的製程還需使用到矽蝕刻技術。

因微懸臂樑結構的尺寸大小會影響我們量測位移時的誤差程度，例如相同力量下，尺寸越小、厚度越薄、或者懸臂越長，懸臂樑產生的曲撓也就越大，越容易讓我們觀察量測，也可以使我們的實驗誤差越小、量測越精準。但相對來說微懸臂樑產生的曲撓太大也不是我們想要的結果，因為我們利用數位影像量測的區域大小也有一定的範圍。例如在本實驗室顯微鏡放大倍率為 100 倍時，數位影像可辨識的景象即為長寬各約為 $600\ \mu\text{m}$ 、 $500\ \mu\text{m}$ 的長方形觀測範圍。

再者懸臂樑製作材料的機械性質也會影響實驗的曲撓位移程度。例如若使用金屬材質製作懸臂樑，在我們校正量測位移時，可能會因為曲撓程度太小，在我們實驗室現有的光學檢測儀器可能無法精準檢測到，致使無法校正並量測所需的數據，因而造成實驗誤差太大或失敗。

是故以下將依序介紹本論文設計的微懸臂樑尺寸和選用材料與其使用的微機電製程。



【圖 3-1 實驗流程圖】

3.2 微懸臂樑尺寸模擬

因微懸臂樑的尺寸將會影響到位移量的大小，也就會間接影響到我們量測位移時的誤差程度。在相同力量作用下，我們希望懸臂樑產生的曲撓越大，這讓我們越容易觀察量測，也就可使實驗的誤差越小、量測越精準。但是微懸臂樑尺寸也會受到微機電製程極限的影響，有其一定的最小值，所以如何選擇製作微懸臂樑的尺寸大小也是本論文的關鍵之一。

所以我們預先利用 ANSYS 套裝軟體來作微懸臂樑的尺寸模擬，希望能先制訂出合適我們後續實驗的微懸臂樑製作尺寸設計。並且還可以預先模擬出微懸臂樑受到光鉗施予的外力後，位移的尺寸大小等級是否能被本實驗室的光學量測系統所測得。

以下則為本文所做的各項模擬圖表。

模擬軟體：ANSYS

分析元素：Solid Brick 20node 95

自由度：懸臂樑為一端固定，另一端為自由端

施力方式：在自由端施加一持續固定的力

施力大小：100pN、100nN、100 μ N

模擬實驗一：

材料：銅金屬

Young' s Modulus：120 GPa

微懸臂樑尺寸：厚度 $H=10\ \mu\text{m}$ ；

寬度 $W=20\ \mu\text{m}$ 。

【表 3-1 ANSYS 模擬 銅金屬材質表】

ANSYS 模擬 銅金屬材質		
長度 $L=500\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 1	100pN	5.21pm
模擬 2	100nN	5.21nm
模擬 3	100 μN	5.21 μm
長度 $L=1000\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 4	100pN	41.6pm
模擬 5	100nN	41.6nm
模擬 6	100 μN	41.6 μm

由此次模擬可得知以銅金屬製作成的微懸臂樑不管何尺寸在受到 100pN、100nN 的力量時，最大位移皆遠小於本實驗室光學儀器可量測範圍。而以現今我們所欲知道細胞力的大小範圍不符合，且銅金屬已經算是

容易得到製作的金屬材料當中楊氏係數較小的了。所以可得知大部分我們易得到的金屬材料都不適用於本論文微懸臂樑的製作材料。

模擬實驗二：

材料：SU-8 光阻

Young' s Modulus：5 GPa

微懸臂樑尺寸：厚度 $H=10\ \mu\text{m}$ ；

寬度 $W=20\ \mu\text{m}$ ；

【表 3-2 ANSYS 模擬 SU-8 材質表】

ANSYS 模擬 SU-8 光阻材質		
長度 $L=500\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 1	100pN	0.125nm
模擬 2	100nN	$0.125\ \mu\text{m}$
模擬 3	$100\ \mu\text{N}$	$125\ \mu\text{m}$
長度 $L=1000\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 4	100pN	0.999pm
模擬 5	100nN	$0.999\ \mu\text{m}$
模擬 6	$100\ \mu\text{N}$	$999\ \mu\text{m}$

由此模擬可得知以 SU-8 負光阻製作成的微懸臂樑在受到 100nN 左右的力量時，最大位移已於本實驗室光學觀測儀器可量測辨讀範圍內。唯獨受到這樣大小的細胞力量時位移稍嫌略小了點，且無法量測約在 100pN 範圍的細胞力。但因微懸臂樑尺寸還可在微機電製程中做適當修改，是故 SU-8 乃本文考慮製作的微懸臂樑材料之一。

模擬實驗三：

材料：SU-8 光阻

Young' s Modulus : 5 GPa

微懸臂樑尺寸：厚度 $H=10\ \mu\text{m}$ ；

寬度 $W=10\ \mu\text{m}$ ；



【表 3-3 ANSYS 模擬 SU-8 材質表】

ANSYS 模擬 SU-8 光阻材質		
長度 $L=500\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 1	100pN	1nm
模擬 2	100nN	$1\ \mu\text{m}$
模擬 3	$100\ \mu\text{N}$	0.001m

長度 $L=1000\ \mu\text{m}$	受力大小	位移程度
模擬 4	100pN	7.99nm
模擬 5	100nN	$7.99\ \mu\text{m}$
模擬 6	$100\ \mu\text{N}$	$0.00799\ \mu\text{m}$

由模擬可得知以此等尺寸製作的SU-8微懸臂樑在受到100nN左右的力
量時，最大位移已於儀器可量測辨讀範圍內，位移量的大小也很適中，但
受到 $100\ \mu\text{N}$ 力量時位移稍嫌過大，且同樣無法量測在 100pN 範圍左右的細
胞力。



模擬實驗四：

材料：PDMS ；

Young' s Modulus：2.5MPa

微懸臂樑尺寸：厚度 $H=10\ \mu\text{m}$ ；

寬度 $W=20\ \mu\text{m}$ ；

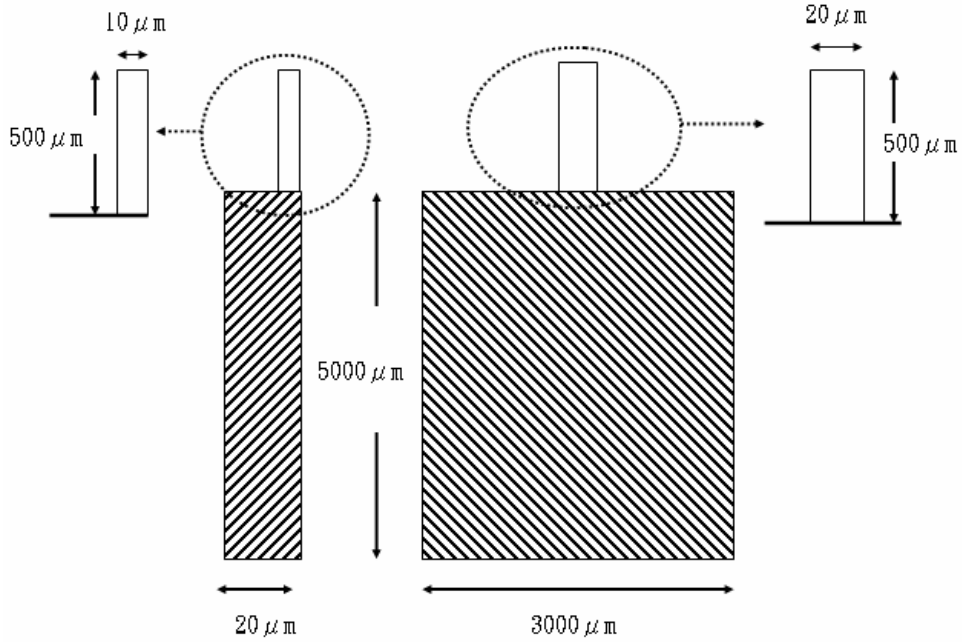
【表 3-4 ANSYS 模擬 PDMS 材質表】

ANSYS 模擬 PDMS 高分子材質		
長度 L=500 μm	受力大小	位移程度
模擬 1	100pN	0.25 μm
模擬 2	100nN	250 μm
模擬 3	100 μN	0.25m
長度 L=1000 μm	受力大小	位移程度
模擬 4	100pN	2 μm
模擬 5	100nN	1999 μm
模擬 6	100 μN	1.999m

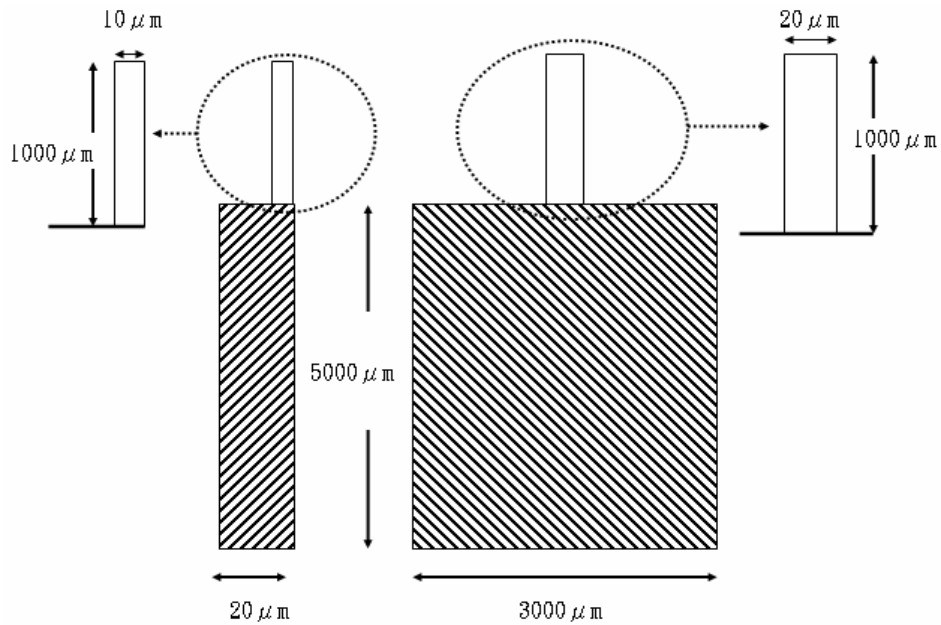
此 PDMS 材質的微懸臂樑位移皆可為本實驗室光學量測儀器判讀範圍內。故也是可以考慮製作的微懸臂樑材料之一。但是需考慮的是當微懸臂樑受到 100nN、100 μN 力量時位移量太大。因在顯微鏡放大倍率為 1000 倍時（物鏡 100 倍，目鏡 10 倍），我們能擷取的畫面約為 60 μm *50 μm 大小的範圍，即使是顯微鏡放大倍率為 100 倍時（物鏡 10 倍，目鏡 10 倍），擷取的畫面也只約為 600 μm *500 μm 大小的範圍。這樣大的位移量會超出光學儀器可擷取的範圍。這也是必須謹慎考慮的問題。

根據以上各個不同材質、不同尺寸的 ANSYS 模擬結果，本文首先合理

的設計後續製作的微懸臂樑主要尺寸為以下圖 3-2、圖 3-3 所示。

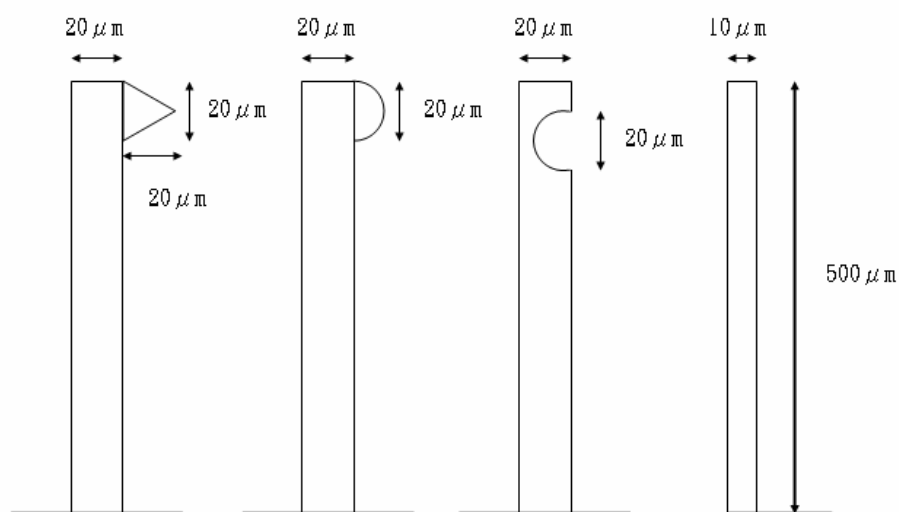


【圖 3-2 微懸臂樑尺寸圖】



【圖 3-3 微懸臂樑尺寸圖】

又因為未來本實驗室想深入探討微懸臂樑與細胞在不同接觸面狀態下，細胞的變化情形、力量大小與其組成性質是否有所改變。所以針對微懸臂樑主要的外型又有另外以下幾種設計，如圖3-4所示。



【圖 3-4 微懸臂樑外型設計】

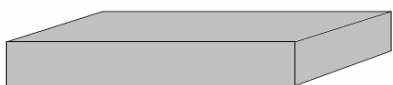
此外若有其他需要還可在後續實驗進行中，針對不同的細胞尺寸，做適當的微懸臂樑尺寸修改，或者因細胞產生的變化型態做出其他有別於此的微懸臂樑結構。

根據以上 ANSYS 模擬可知，本次需要利用一楊氏係數 (Young' s Modulus) 較金屬材料小的材質，即所謂較金屬材質為軟的材料。目前屬意接受的有 SU-8、PDMS (polydimethylsiloxan，聚二甲基矽氧烷) 兩種材質。

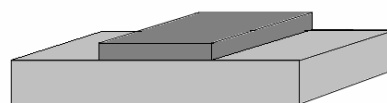
3.3 微懸臂樑製作 [17]

3.3.1 SU-8 微懸臂樑製程流程

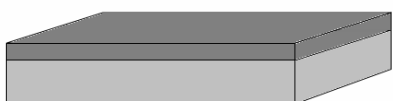
(1) Si 晶片清洗



(4) 顯影



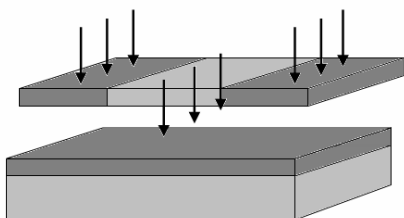
(2) 塗佈 SU-8 負光阻



(5) KOH 蝕刻脫膜



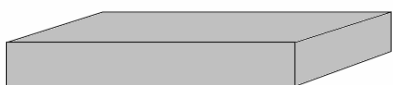
(3) 曝光



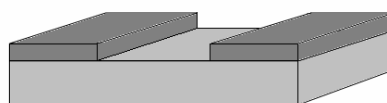
【圖 3-5 厚模光組 SU-8 製程流程概念圖】

3.3.2 PDMS 微懸臂樑製程流程

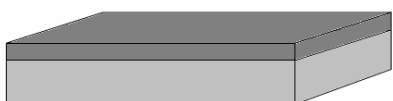
(1) 晶片清洗



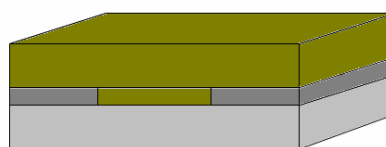
(4) 顯影



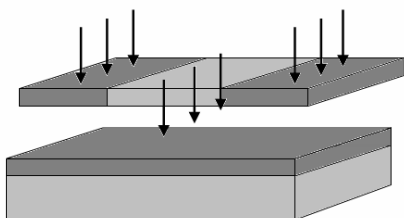
(2) 塗佈 AZ-4620 正光阻



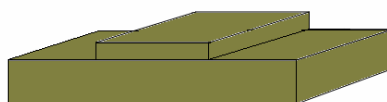
(5) PDMS 灌模



(3) 曝光



(6) PDMS 脫模



【圖 3-6 PDMS 製程步驟概念圖】

3.3.3 RCA Clean

本研究中矽基材 (Si-Wafer) 清洗的方式採用美國無線電公司(Radio Corporation of America, RCA)所開發出的清洗製程。RCA Clean主要是用來去除微塵粉粒、有機物及金屬離子污染，因為塵粒或有機的污染都會造成基材表面不平整，而造成後續製程中產生失敗，故此清潔的步驟必須要執行，一般此種清洗方式亦稱為標準清洗，其連續清洗的過程及成分如下所示：

- (1) 有機污染清洗：利用體積比5：1：1之 H_2O ： H_2O_2 ： NH_4OH 移除不易溶解的有機污染物或微塵。
- (2) 氧化層清洗：利用稀釋比例50：1之 H_2O ： HF 移除表面自然生成氧化物。
- (3) 金屬離子清洗：利用體積比6：1：1之 H_2O ： H_2O_2 ： HCl 移除離子和重金屬離子污染物

此清潔流程中每兩道溶劑清洗步驟中都需間隔一道在室溫中利用去離子水(D. I. Water)清洗殘餘成分的手續。最後使用氮氣槍將晶片吹乾，即可進行以下其他流程。

3.3.4 微影技術

光微影技術主要目的是將光罩上圖形轉移到所需的晶片上，也就是利用一可擋光的物質(光罩，Mask)，配合平行光光源照射感光材料(光阻，Photoresist)進行選擇性的感光，於是光罩上的圖形便完整的轉移至晶片上，此步驟稱為曝光(Exposure)。若光的能量使受光照的感光材料(光阻)性質改變，造成鍵結斷裂因而在顯影(develop)時被溶解去除掉，未受光照部分則形成圖案以作為蝕刻之阻擋，此即為正光阻 (Positive Photoresist)，例如：AZ-4620，AZ-6400等光阻。反之，若感光後變成不溶解的感光材料(光阻)則稱為負光阻 (Negative Photoresist)，例如：SU-8等光阻。



微影製程基本上由旋塗光阻、曝光及顯影三步驟所構成，但是有時為了加強圖案轉移的精確性與可靠性，微影製程還包括去水烘烤 (Dehydration Bake)、塗底 (Priming)、軟烤(Soft Bake)及硬烤(Hard Bake)等步驟。

光罩選擇 (Mask)

製程要用到的光罩材質有很多種，有石英光罩、玻璃光罩、膠片光罩等，各有其優缺點，可視不同的應用適當選擇。石英光罩在紫外線範圍具有最佳的透光性，以及低熱膨脹係數，適合用來做線寬小於 $1\mu\text{m}$ 的圖形，

但成本最為昂貴。玻璃光罩之透光性較石英光罩稍差，且玻璃熱膨脹係數較大，適合用來做線寬大於 $2\mu\text{m}$ 的圖形，成本較石英光罩稍低。石英光罩與玻璃光罩皆是將圖形製作在基材的鉻膜上，優點是具有高透光性與高解析度，使得圖形不易失真，但是價格昂貴且製作時間冗長。膠片光罩由於是高分子材料所組成的，因此透光性更不如玻璃，且因其製作方式是以高解析度之雷射印表機輸出，因此解析度均不如石英光罩及玻璃光罩，適合線寬約 $10\mu\text{m}$ 以上的圖形，不過其成本為玻璃光罩的十分之一，且製作方式方便快捷，為快速微機電光罩製作之良好選擇。

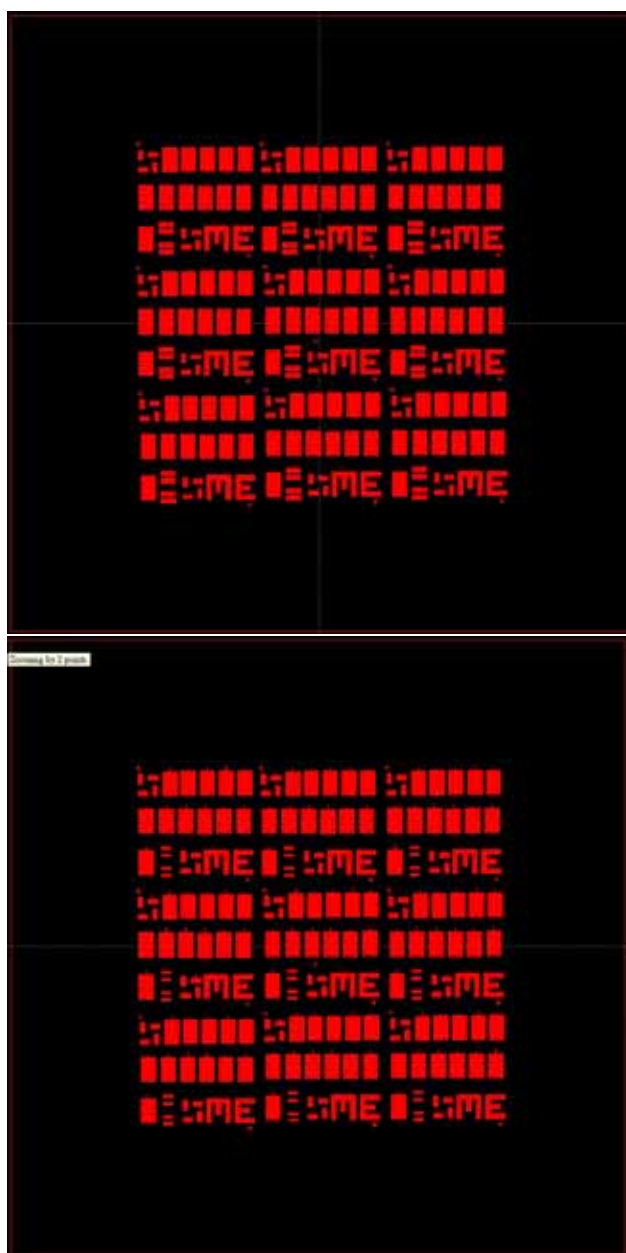
表3-5即為這三種材質光罩的比較。由於本研究圖形目前之特徵尺寸均在 $10\mu\text{m}$ 以上，為使光罩得以快速製作及修改，且降低其製作成本，因此本研究首先選用膠片光罩來完成晶片製作。

【表3-5 三種材質光罩的比較表】

	成本	透光性	解析度	耐用度	製作速度
石英光罩	最高	最高	較高	最高	較慢
玻璃光罩	次之	次之	較高	次之	較慢
膠片光罩	最低	最低	較低	最低	較快

本文圖型的繪製是利用套裝軟體L-Edit來完成。製作的乃是膠片光

罩，一片光罩的大小為長寬各為5英吋的正方形。光罩周圍都設計上對準記號（Alignment Key），以利於多層光罩對準的製成需要。最後將設計好的圖檔，送至光罩輸出公司，以高解析度雷射印表機輸出。以下圖3-7所示即為本次實驗所設計的光罩圖形。



【圖3-7 光罩設計圖】

光阻塗佈 (Photoresist Coating)

一般而言，在光阻的選用上除了搭配所需的製程目的外，對於塗佈光阻的參數也是很重要的考慮因素。光阻塗佈主要分成兩階段，第一階段的低轉速主要目的是能將光阻均勻的散佈在基材表面上，第二階段的高轉速主要目的是將散佈在基材表面的光阻有效控制所需厚度及整體的均勻性。而塗佈過程當中影響厚度的參數主要有：塗佈轉速、光阻黏滯度和外在環境。當塗佈轉速愈高，光阻厚度則愈薄而且其厚度的均勻性也就愈好。本實驗製作所使用的光阻塗佈機如下圖3-8所示。

光阻塗佈機 (日本 KYOWARIKEN K-359SD-1)



【圖 3-8 Photoresist Spinner 圖】

軟烤 (Soft Bake)

軟烤的作用在於除去光阻的溶劑，使光阻固化，並增加對晶片的附著力。光阻在塗佈過程中會因外圈切線速度大，使溶劑揮發較快，形成邊緣

突起 (edge-bead) 的現象，經由軟烤可增加光阻的平整性。但若烘烤過度則會使光阻過早聚合，而引起曝光不靈敏。

曝光 (Exposure)

曝光的目的主要為使光阻吸收適當的能量，以便進行光化學產生斷鏈或鏈結，因而使照到光的部分和沒有照到光的部分，對顯影液的溶解速度產生差異，達到圖形轉移的目標。主要操作參數為曝光光源的能量和曝光時間。曝光劑量 (照射時間) 由光阻厚度決定，需反覆測試找出最佳值。光阻高度也會影響線寬的曝光，當光阻過高時會因能量損失使底部曝光不足，形成上寬下窄的結構。補償方法可增加劑量和減少光罩寬度。

$$\text{曝光功率}(\text{mW}/\text{cm}^2) = \text{曝光劑量}(\text{mJ}/\text{cm}^2) \times \text{曝光時間}(\text{sec}) \quad (3-1)$$

光罩對準曝光機 (日本共和理研 K-310P-100S)



【圖 3-9 Mask Aligner 圖】

顯影

顯影的主要目的是利用曝光部分及未曝光部分之光阻在溶解度的差別而進行圖形轉移的目的，如正光阻曝光後鍵結被打斷，可將其溶解，未曝光部分則存留，使影像出現。在顯影的過程中影響顯影參數分別為顯影液浸泡時間及搖晃震盪程度，在搖晃過程中能使顯影液均勻的混合，進而加強顯影的效果。顯影時間同樣不可太長，若顯影時間過長則圖形會產生扭曲變形或底部過度蝕刻，反之顯影時間太短則光阻則沒辦法完全被去除乾淨，設計的圖形則不能完整呈現。

硬烤 (Hard Bake)

硬烤的主要作用在於降低光阻中的溶劑含量，使光阻結構更加強壯，並增加附著力。使其阻擋蝕刻能力增加，且結構不易剝落。

蝕刻 (Etching)

矽蝕刻製程主要分為乾式蝕刻和濕式蝕刻兩種。且依照蝕刻液的選擇，又可產生等向性蝕刻及非等向性蝕刻的分別。本文中乃是進行矽晶圓（晶格方向為 100）的非等向性化學溼蝕刻，所採用的蝕刻溶液是 KOH(Potassium hydroxide, 30%)蝕刻液，而影響蝕刻速率的因素有：蝕刻液濃度、蝕刻液溫度、及攪拌之有無。

【表 3-6 SU-8 微懸臂樑製程參數表】

SU-8 微懸臂樑製程參數		
步驟	條件參數	時間參數
光阻旋塗	300 rpm	10 秒
	450 rpm	40 秒
靜置		15 分鐘
軟烤	65°C	10 分鐘
	95°C	20 分鐘
曝光	350 mJ/cm ²	
曝後烤	65°C	10 分鐘
	95°C	20 分鐘
靜置		10 分鐘
顯影	顯影液 (PGMEA)	4 分鐘
定影	異丙酮 (IPA)	1 分鐘
硬烤	135°C	1 小時
蝕刻	KOH (30%) , 80°C	30 分鐘

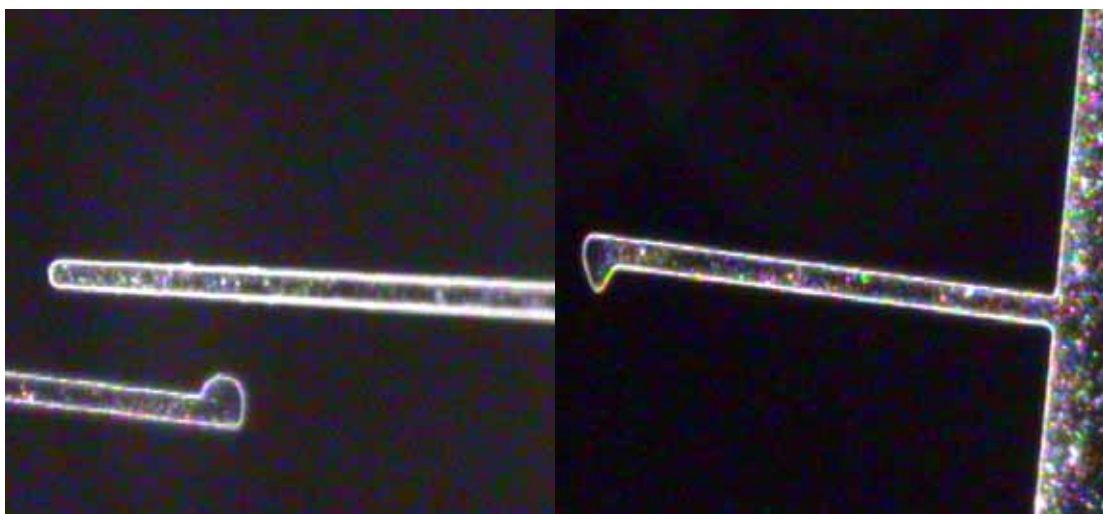
【表3-7 PDMS微懸臂樑製程參數表】

AZ-4620、PDMS 微懸臂樑製程參數		
步驟	條件參數	時間參數
光阻旋塗	500 rpm	15 秒
	800 rpm	25 秒
靜置		10 分鐘
軟烤	90°C	20 分鐘
靜置		20 分鐘
曝光		20 秒
顯影	顯影液 (FHD-5)	3.5 分鐘
定影	D. I Water	1 分鐘
PDMS 注模	主劑：硬化劑 10 : 1	
抽氣		40 分鐘
烘烤	85°C	30 分鐘
脫模		

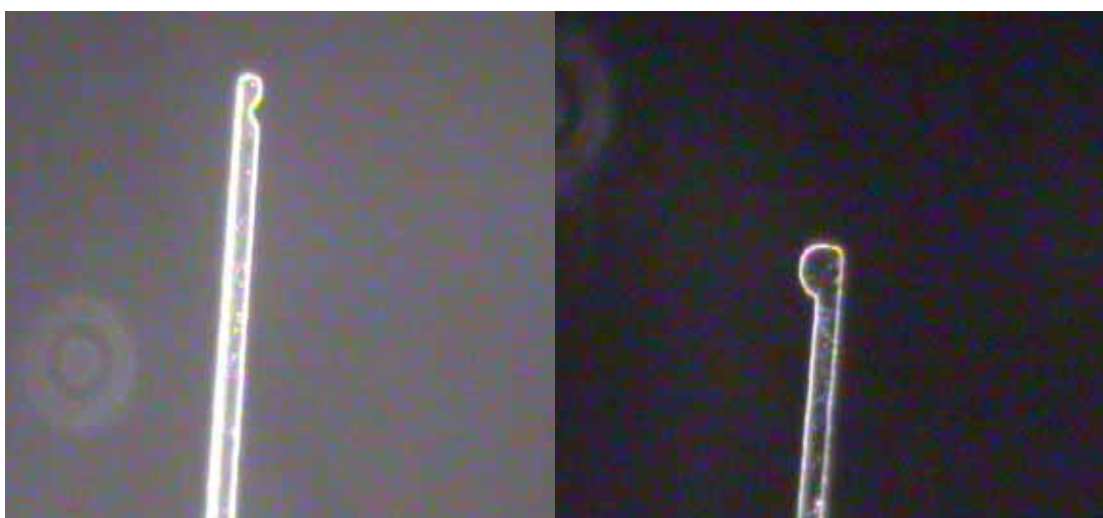
3.4 微懸臂樑製作成品

3.4.1 SU-8 微懸臂樑

以下的 SU-8 成品圖乃是已經從矽晶片上脫膜下來，放置到本實驗室顯微鏡系統下，經由光學觀測儀器捕捉下來的圖片。圖 3-10 與圖 3-11 個別有不同的尺寸與外型。



【圖 3-10 SU-8 微懸臂樑成品 1 圖】



【圖 3-11 SU-8 微懸臂樑成品 2 圖】

3.4.2 PDMS 微懸臂樑

以下的 PDMS 成品圖乃是還沒有從矽晶片上脫膜下來時後的圖片。經由這些圖片可知我們的確成功的製作了 PDMS 微懸臂樑結構。

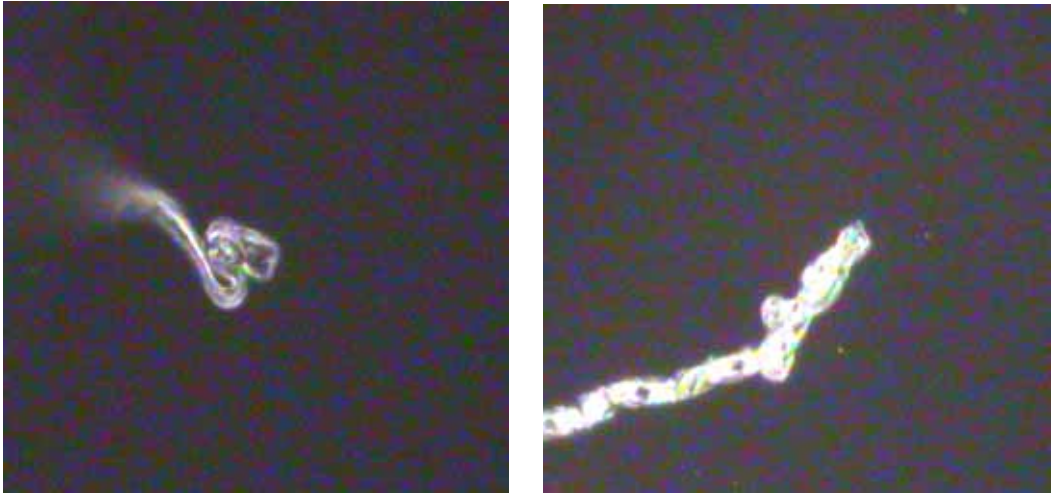


【圖 3-12 PDMS 微懸臂樑成品 1 圖】



【圖 3-13 PDMS 微懸臂樑成品 2 圖】

但是接著我們來看看以下的圖 3-14、圖 3-15，這些圖是 PDMS 經過脫膜後放置到本實驗室顯微鏡下的圖片。



【圖 3-14 PDMS 微懸臂樑圖】



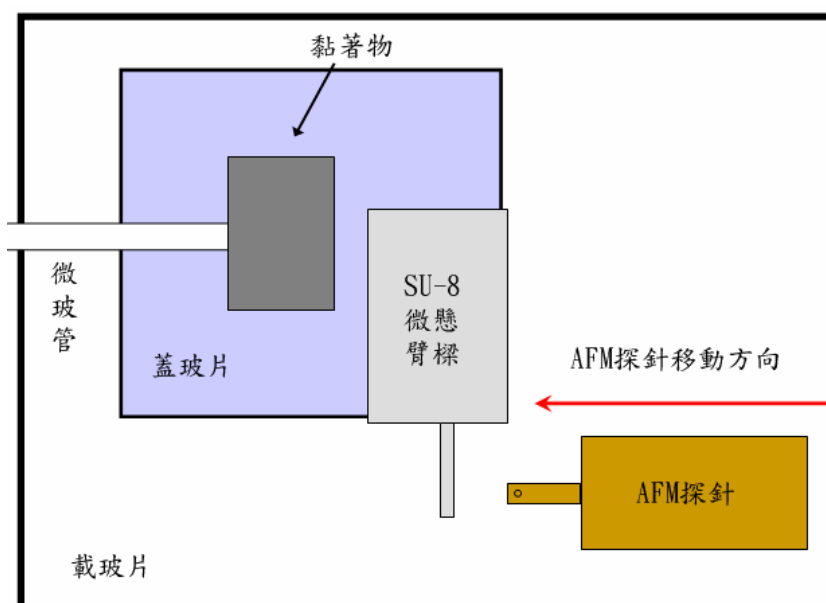
【圖 3-15 PDMS 微懸臂樑圖】

由以上的圖可看出，PDMS 製作的微懸臂樑在脫膜後放置到顯微鏡下時都產生了極大的扭曲。而這樣的微懸臂樑當然不能夠在往後的實驗中使用。而目前推測產生的主要原因可能為脫膜時 PDMS 與矽基材之間的作用力，或是在將其移動至顯微鏡底下時因手部產生的晃動，使得 PDMS 微懸臂樑產生自我纏繞所形成的。

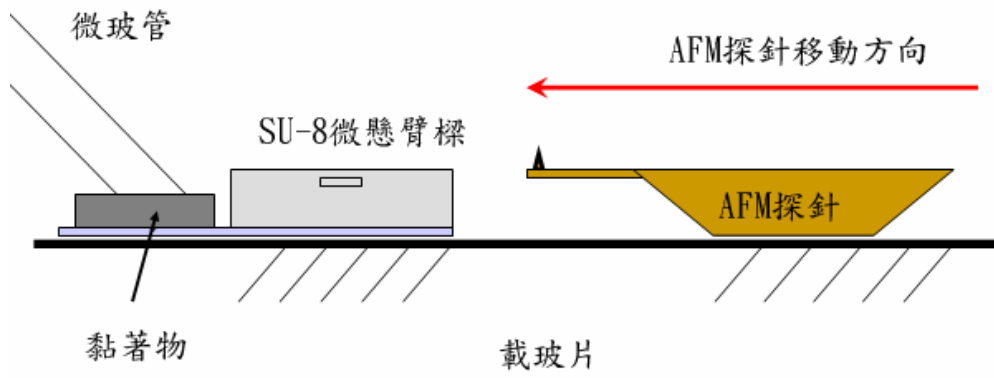
3.4.3 實驗儀器架設圖

本文中因利用不同材質的微懸臂樑來相互作用，利用其不同的材料性質在受到相同的力量作用時，會產生不同大小的位移量。而當其中一種微懸臂樑的材料參數我們可以獲知時，我們即可藉由此等關係來實驗推斷出另一我們原先不知道的微懸臂樑材料參數。

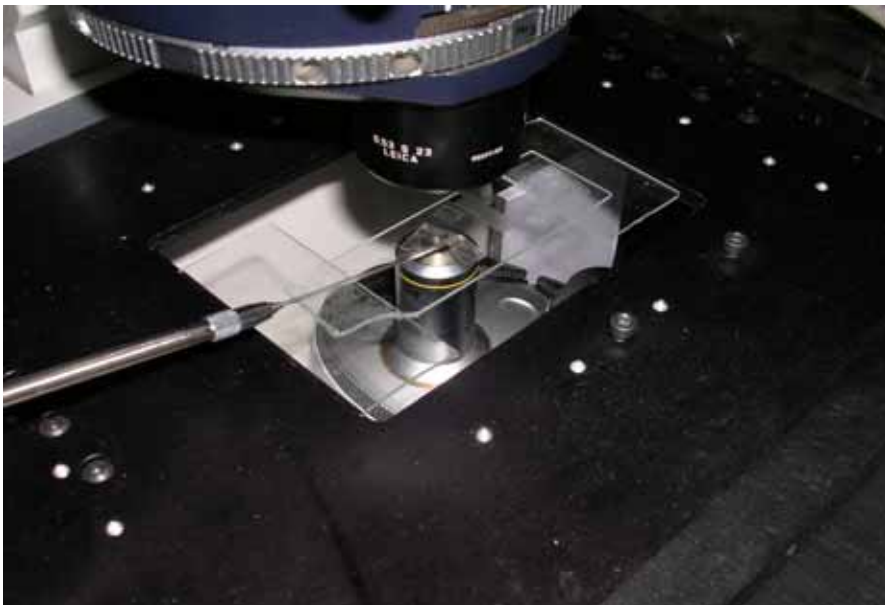
此實驗中我們利用了樑柱的一特別現象，樑柱的挫曲 (Buckle)。因為我們可以從 AFM 探針提供廠商得到探針的各項結構材料參數，所以我們可以藉此推算得出其臨界荷重 (Critical Load)，再利用當 AFM 探針產生挫曲 (Buckle) 時，SU-8 材料製作的微懸臂樑位移情形，在藉著光學觀測儀器將其位移結果記錄。最後經過微懸臂樑力量公式來反向推導得知 SU-8 材料製作的微懸臂樑材料性質為何，即可對所製作的 SU-8 微懸臂樑材料參數作精準的校正。



【圖 3-16 實驗儀器架設概念之上視圖】



【圖 3-17 實驗儀器架設概念之側視圖】



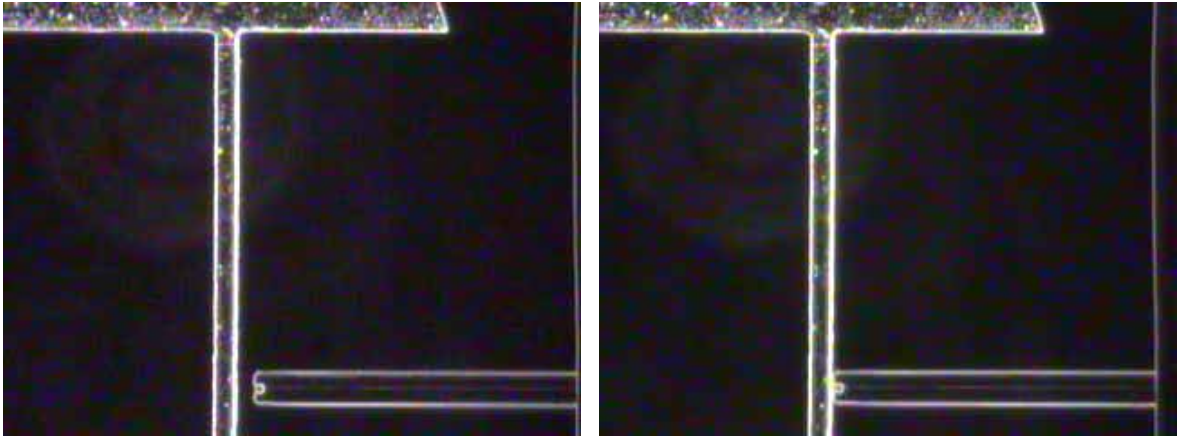
【圖 3-18 實驗儀器架設圖】

3.5 實驗數據整理分析

以下將依序把本論文實驗的各項實驗數據依照不同的 SU-8 微懸臂樑尺寸一一列整，其中也有使用不同尺寸的 AFM 探針量測得出之數據。

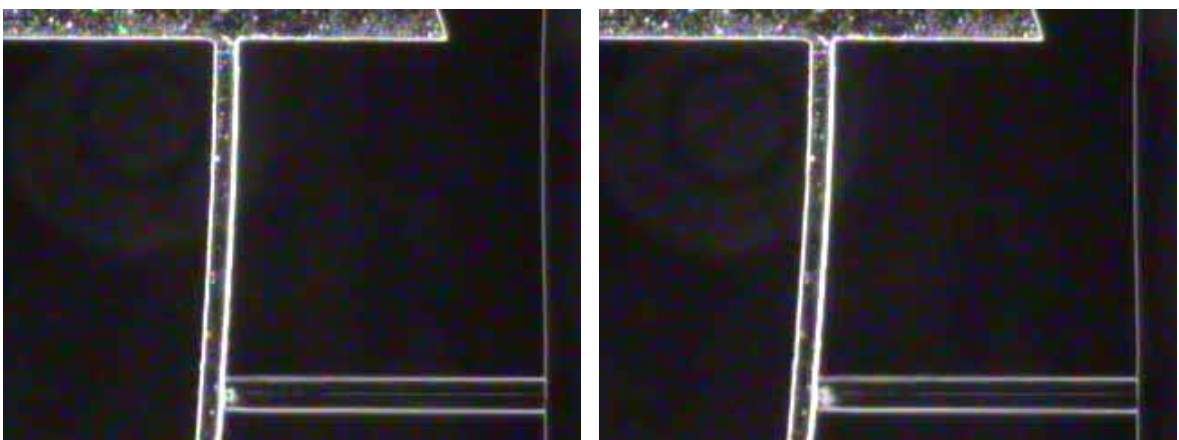
因為要量測當 AFM 探針產生挫曲 (Buckle) 時，SU-8 微懸臂樑的位移情形。並藉由光學觀測儀器將其結果記錄下來，再經過微懸臂樑力量公式反向推導得知其材料性質。所以之中最主要的關鍵點就是，應如何以光學觀測儀器拍攝記錄的影像來判定何時為 AFM 探針產生挫曲 (Buckle) 的瞬間。

從理論推導中可知微柱在受到略大於臨界荷重的力量後會有極大的形變量產生，從原本的垂直柱體，瞬間改變為一彎曲的型態。藉由此現象，再經由實際實驗後得到的結果可知，當 AFM 探針與 SU-8 懸臂樑垂直相交並相互作用時，一開始兩微懸臂樑間的作用力與反作用力還未達到 AFM 探針的臨界荷重，兩懸臂樑會在同一平面上產生位移，由光學觀測儀器記錄下來的影像即可清楚觀測得到。但當一受到大於臨界荷重的力量時，AFM 探針就會產生撓曲，致使探針與 SU-8 微懸臂樑部份位於與原先不同平面處，而這樣的情形在光學記錄的影像中將會導致部份的 AFM 探針與 SU-8 懸臂樑結構變成有光影或者產生模糊不清的結果。



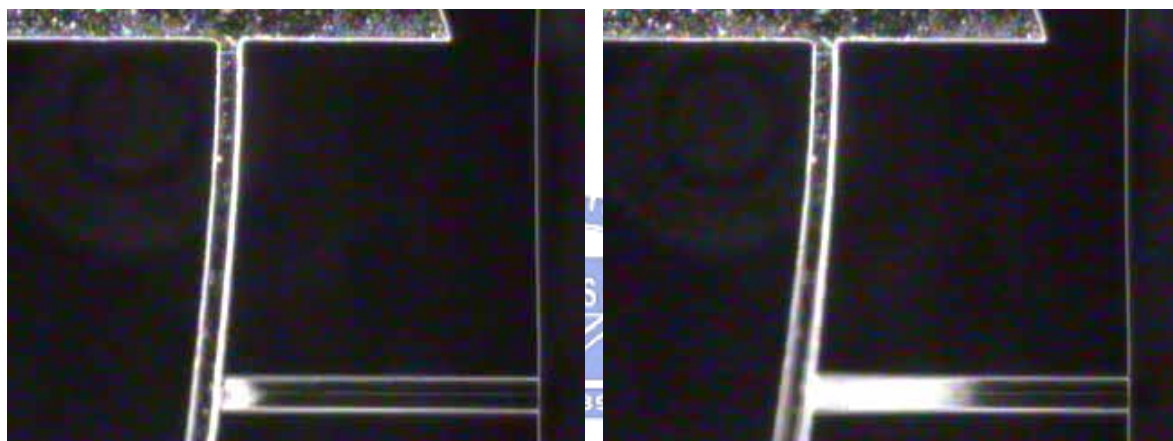
【圖 3-19 實驗紀錄圖】

圖 3-19 中右邊的微懸臂樑是 AFM 探針，左邊的微懸臂樑為 SU-8 材料所製成的。再依據圖 3-16 與圖 3-17 中所顯示的，右邊的 AFM 探針乃是固定於載玻片上，而載玻片又是放置於本實驗的電動載物平台之上，會跟著電動載物平台做任何平面上的運動。右邊的 SU-8 微懸臂樑則是固定於顯微操控系統的微玻管上，而在此實驗中，此顯微操控系統乃是固定不動的。所以就成了圖 3-19 中所看到的，操作電動載物平台使右邊的 AFM 探針順著 y 軸以 $20 \mu\text{m/s}$ 的速度往左邊的 SU-8 懸臂樑靠過去。



【圖 3-20 挫曲發生組圖】

接著如圖 3-20 所示，當電動載物平台使右邊的 AFM 探針持續朝著左邊的 SU-8 懸臂樑靠過去時，一開始 SU-8 微懸臂樑會產生正常的撓曲，即撓曲的方向單純為 xy 平面方向，不會有 z 軸方向的變化。但當超過 AFM 探針的臨界荷重時，AFM 探針開始產生挫曲，有了不同平面的位移產生，同時間在光學儀器記錄下也開始產生了光影的現象。在此現象發生的前一刻 SU-8 微懸臂樑的相對位移就是我們所需要的。

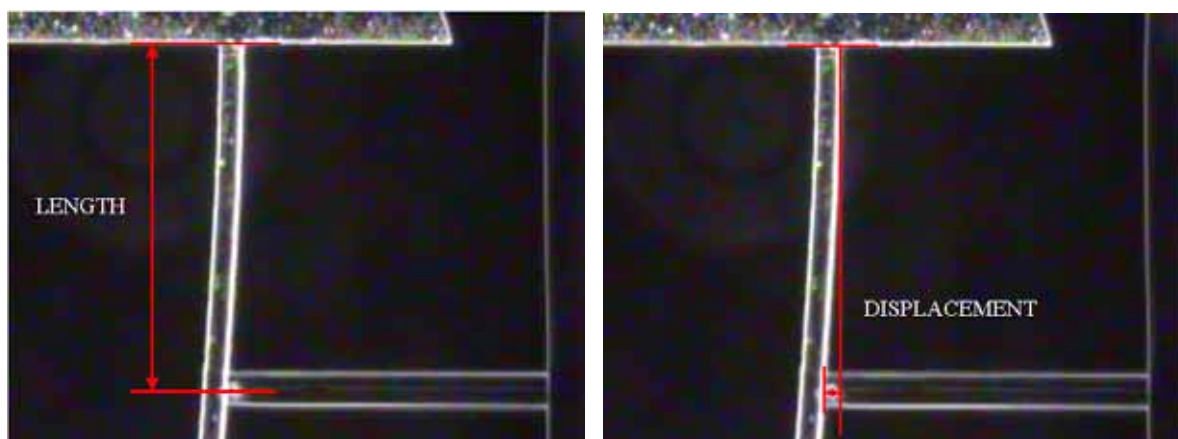


【圖 3-21 挫曲狀況圖】

當繼續操作電動載物平台，AFM 探針產生了越來越大的彎曲情形，同樣在光學儀器記錄下光影也跟著越來越大，甚至也帶動了 SU-8 微懸臂樑撓曲至不同平面，在光學紀錄下產生模糊不清的影像。如圖 3-21 所示。這些連續現象則是我們判斷何時 AFM 探針產生挫曲的依據。

以上圖片皆是利用光學量測儀器拍攝下來的影片，再經由影像處理軟體 VirtualDub 來使拍攝下來的影片轉換成每秒 30 張的連續圖片。再經過一張張仔細相互比對所得到的連續圖表。

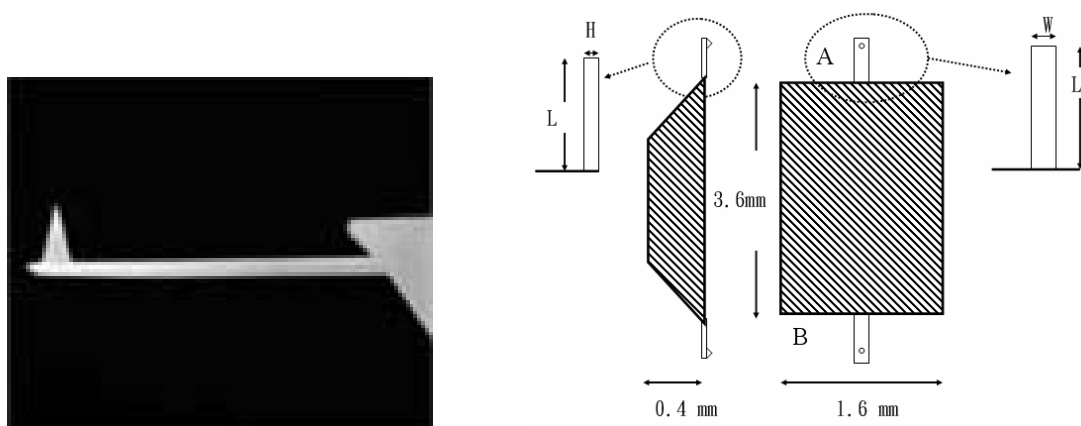
量測特定長度與位移情況的方法則如下圖 3-22 所示。



【圖 3-22 SU-8 懸臂樑量測圖】

利用以上所述的判定方法，我們就可以利用當 AFM 探針產生挫曲 (Buckle) 的瞬間，觀測另一微懸臂樑同時已經產生的位移大小，再帶入之前推導的懸臂樑力量公式即可順利計算出 SU-8 材料的楊氏係數值。

以下則為實驗的數據所整理出來的圖表。所使用的 AFM 探針規格與微懸臂樑尺寸都會一一在下列圖表中陳述。



【圖 3-23 AFM 探針 CSG11 圖】

【表 3-8 AFM 探針 CSG11 參數表】

探針型號	探針長度	探針寬度	探針厚度	彈性常數	自然頻率
CSG11-A	250 μm	35 μm	1 μm	0.1N/m	20kHz
CSG11-B	350 μm	35 μm	1 μm	0.03N/m	10kHz

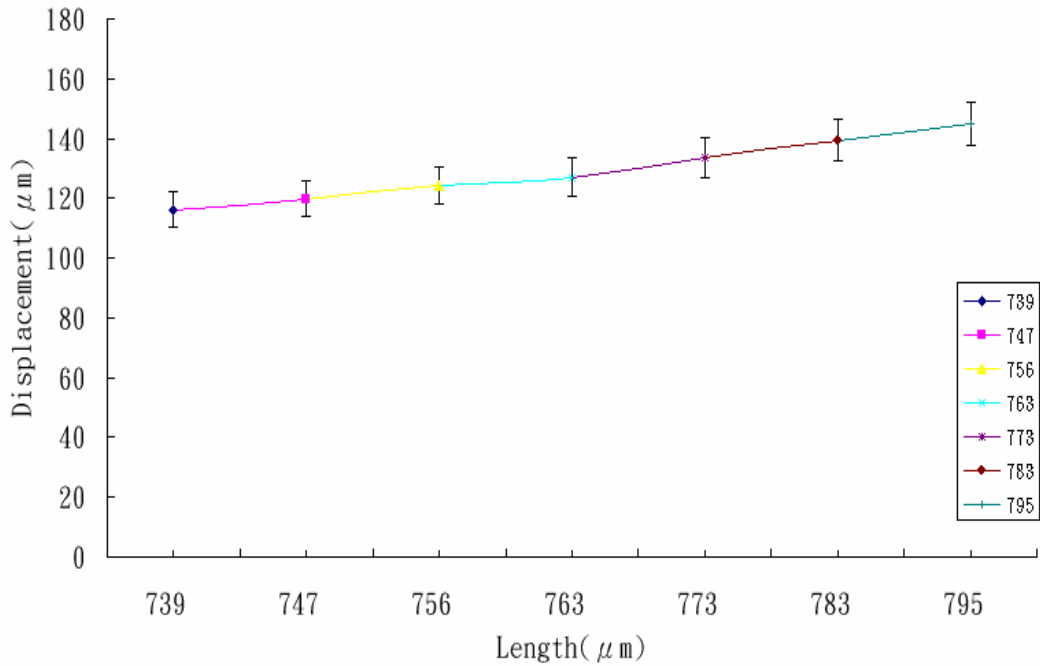
接著再由所製作的 SU-8 微懸臂樑中，任意挑選出一微懸臂樑來開始實驗。所挑選到的微懸臂樑結構規格則置於下表 3-9 中。

【表 3-9 SU-8 懸臂樑參數表】

微懸臂樑材料	總長度	寬度	高度
SU-8	1000 μm	21.8 μm	10 μm

因此微懸臂樑全長超過本實驗室目前的光學儀器觀測範圍，所以本次實驗便把量測的長度範圍分成幾段來量測，務必確保整個微懸臂樑的材料性質為一定。

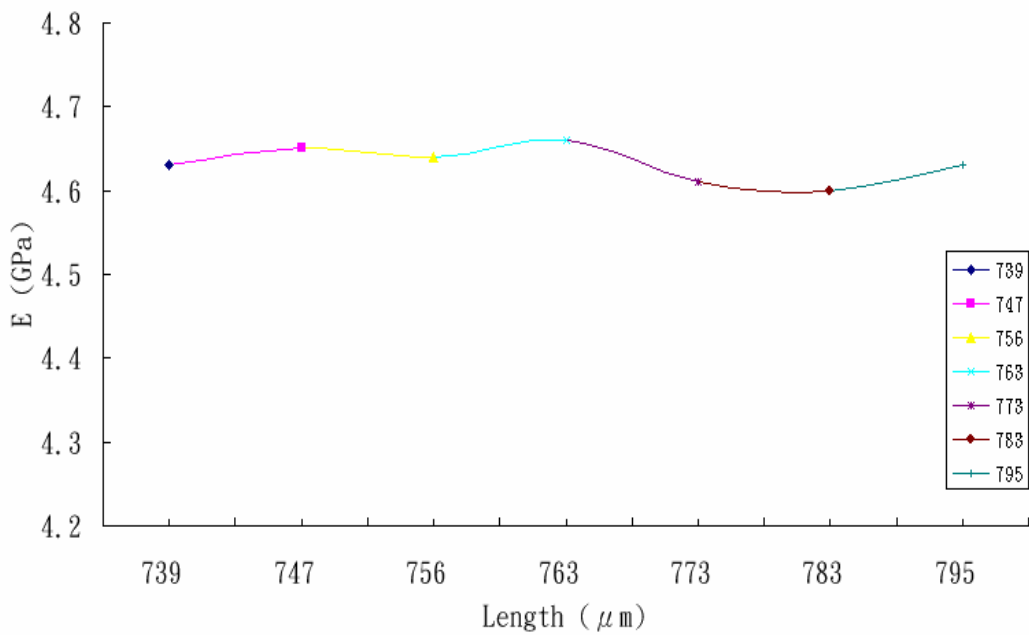
第一次實驗中 SU-8 微懸臂樑的量測長度範圍約在 730 μm 到 800 μm 之間。每一特定長度實驗都反覆實驗量測十次，並取其平均值以確保量測數值的準確性。以下圖 3-24 則為此次實驗光學儀器量測得到的微懸臂樑位移量實驗平均值圖表，其中所表示的誤差值範圍為上下百分之五的數值。



【圖 3-24 長度與位移量關係圖】

再利用微懸臂樑力量公式 ($E = \frac{F \cdot L^3}{3Iy}$)。即可將我們所得的位移量轉

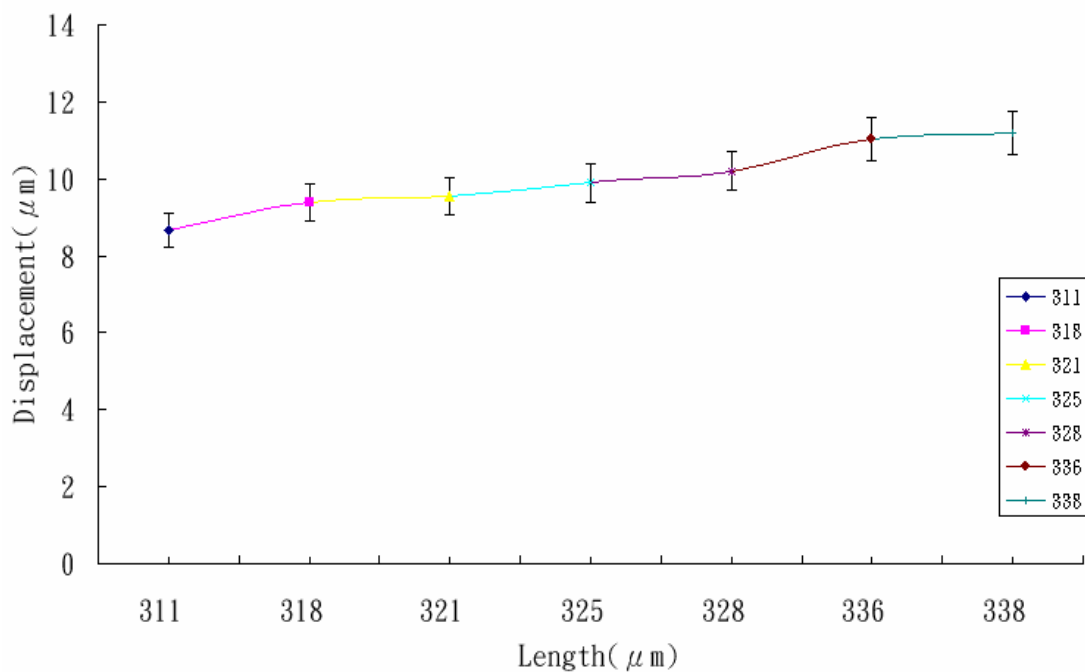
變成以下所相對應 SU-8 材料的楊氏係數圖表。



【圖 3-25 微懸臂樑楊氏係數關係圖】

從此組實驗中，我們可計算得到 SU-8 微懸臂樑的材料係數。楊氏係數 E 值平均為 4.631GPa。

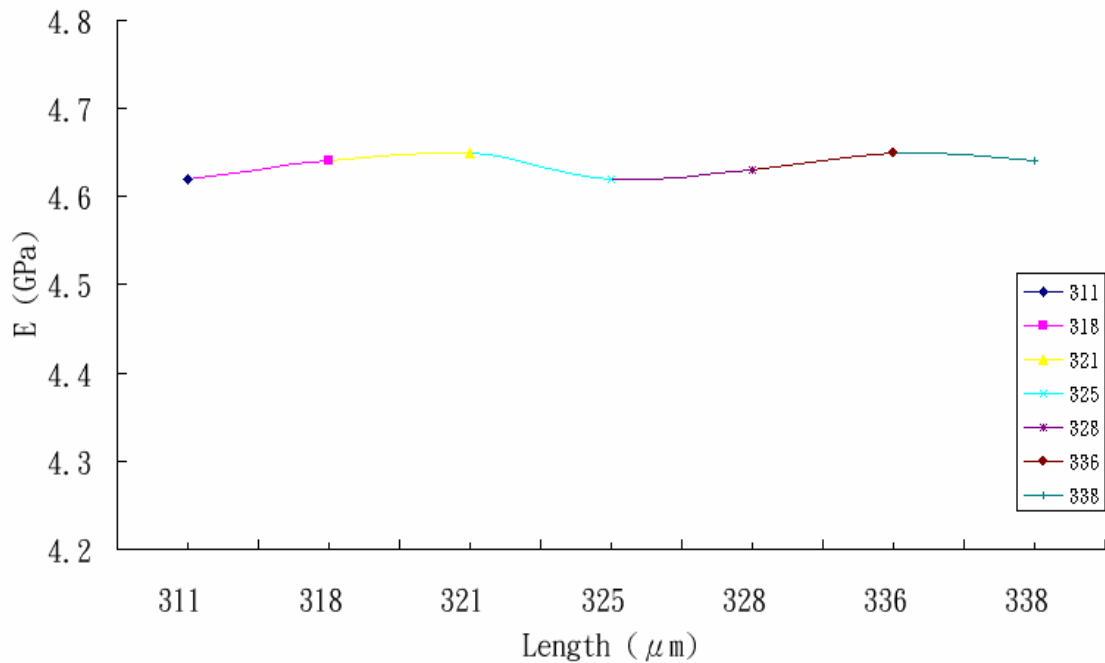
接著第二次實驗 SU-8 微懸臂樑的量測長度範圍約在 300 μm 到 350 μm 之間。同樣每一特定長度實驗都反覆實驗量測十次，並再取其平均值以確保我們量測實驗數值的準確性。以下圖 3-26 則為此次實驗光學儀器量測得到的微懸臂樑位移量平均值圖表，其中所表示的誤差值範圍為上下百分之五的數值。



【圖 3-26 長度與位移量關係圖】

同樣的利用微懸臂樑力量公式 ($E = -\frac{F \cdot L^3}{3I_y}$)。即可將我們所得的位移

量轉變成以下所相對應 SU-8 材料的楊氏係數圖表。

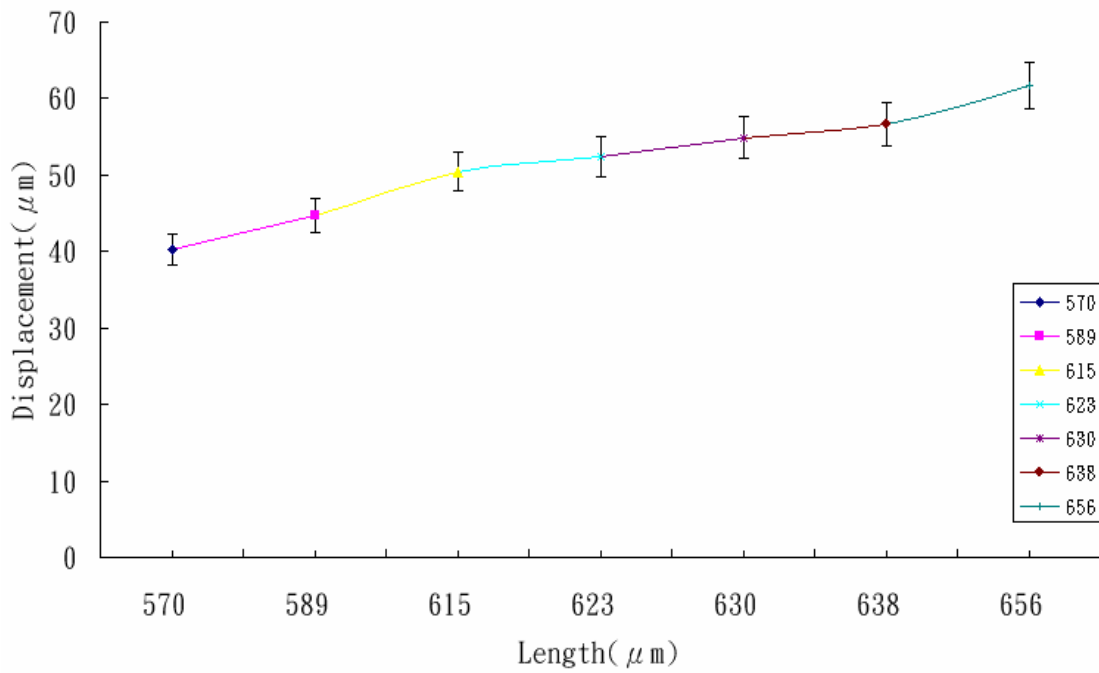


【圖 3-27 微懸臂樑楊氏係數關係圖】

從此組實驗中，我們又可計算得到 SU-8 微懸臂樑的材料係數。楊氏係數 E 值平均為 4.634GPa。



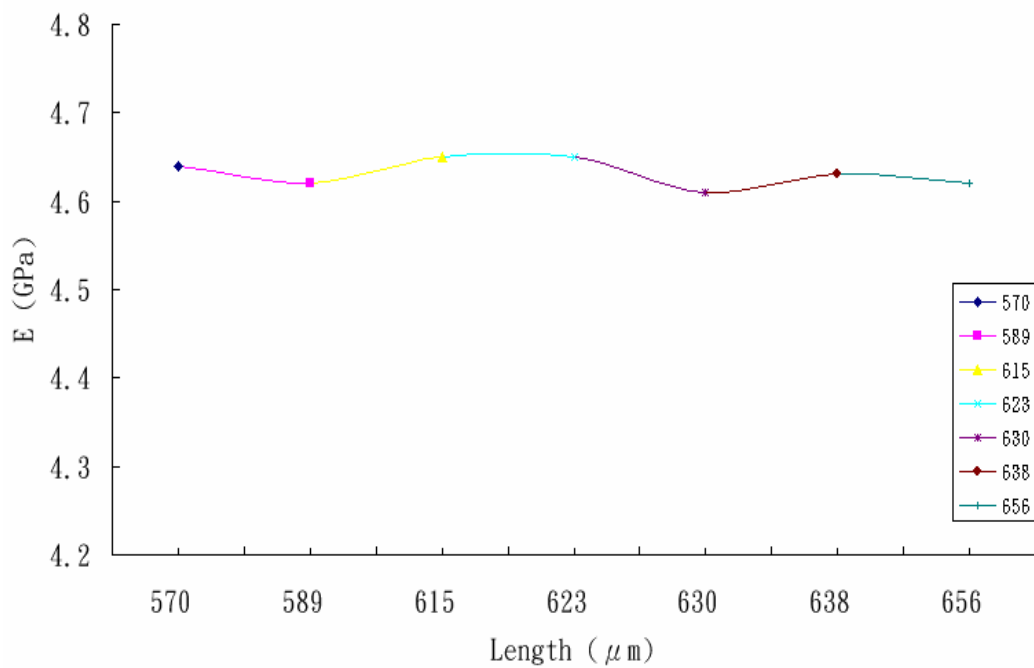
最後實驗三此 SU-8 微懸臂樑的量測長度範圍約在 550 μm 到 650 μm 之間。同樣每一特定長度實驗都反覆實驗量測十次，並再取其平均值以確保我們量測實驗數值的準確性。以下圖 3-28 則為此次實驗光學儀器量測得到的微懸臂樑位移量平均值圖表，其中所表示的誤差值範圍為上下百分之五的數值。



【圖 3-28 長度與位移量關係圖】

同樣的利用微懸臂樑力量公式 ($E = \frac{F \cdot L^3}{3Iy}$)。即可將我們所得的位移

量轉變成以下所相對應 SU-8 材料的楊氏係數圖表。



【圖 3-29 微懸臂樑楊氏係數關係圖】

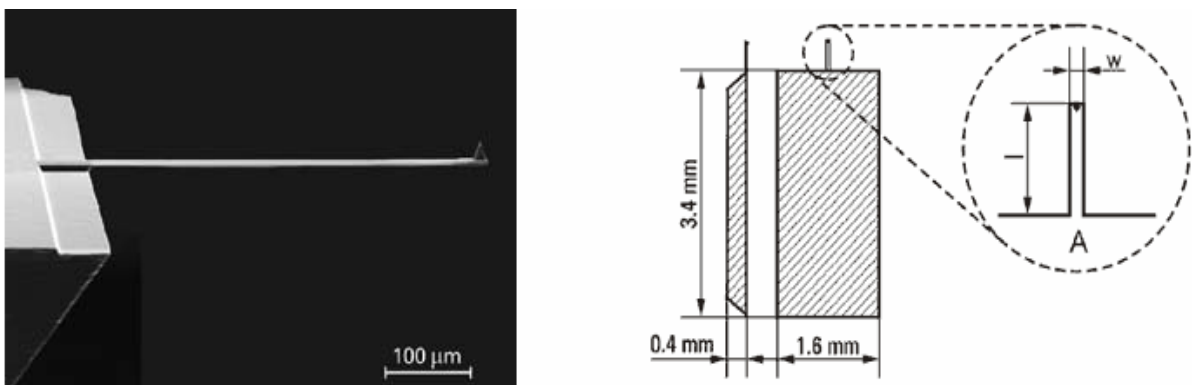
從此組實驗中，又可計算得到 SU-8 微懸臂樑的材料係數。楊氏係數 E 值平均為 4.631GPa。

因此將此三組數據整理可成以下表 3-10。

【表 3-10 SU-8 材料參數表】

SU-8 的材料參數表		
實驗組別	楊氏係數 (E)	平均值
1	4.631GPa	E=4.632GPa
2	4.634GPa	
3	4.631GPa	

為了能夠更準確的得到 SU-8 微懸臂樑的材料參數，我們還另外使用了另一規格的 AFM 探針來做相同的實驗，來驗證我們先前得到的材料參數之可靠性。圖 3-30 則是我們此次實驗使用的 AFM 探針規格。



【圖 3-30 AFM 探針 CSC17 圖】

【表 3-11 AFM 探針 CSC17 參數表】

探針型號	探針長度	探針寬度	探針厚度	彈性常數	自然頻率
CSC17	460 μm	50 μm	2 μm	0.15N/m	12kHz

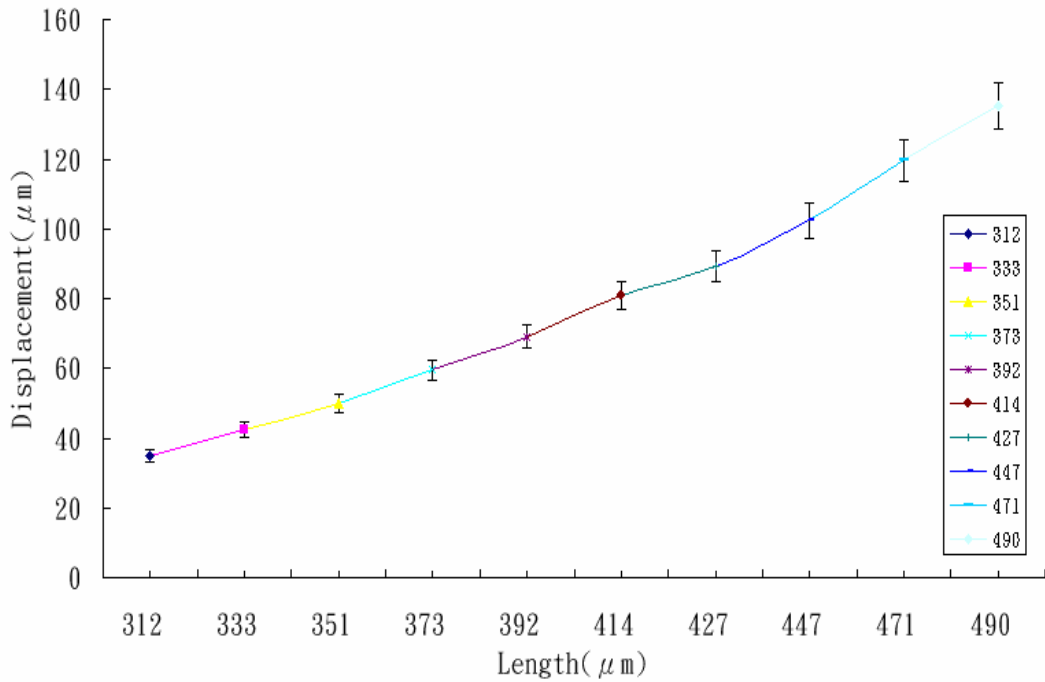
接著同樣由製作的 SU-8 微懸臂樑中，再任意挑選出一微懸臂樑來開始實驗。選中的微懸臂樑結構規格則置於下表 3-12 中。

【表 3-12 SU-8 懸臂樑參數表】

微懸臂樑材料	總長度	寬度	高度
SU-8	500 μm	25.4 μm	10 μm

這次雖然此微懸臂樑長度約為光學儀器可觀測範圍，但為求慎重還是將量測的長度範圍分成兩段來量測，以求取最高的精準性，務必確保整個微懸臂樑的材料性質為一定。

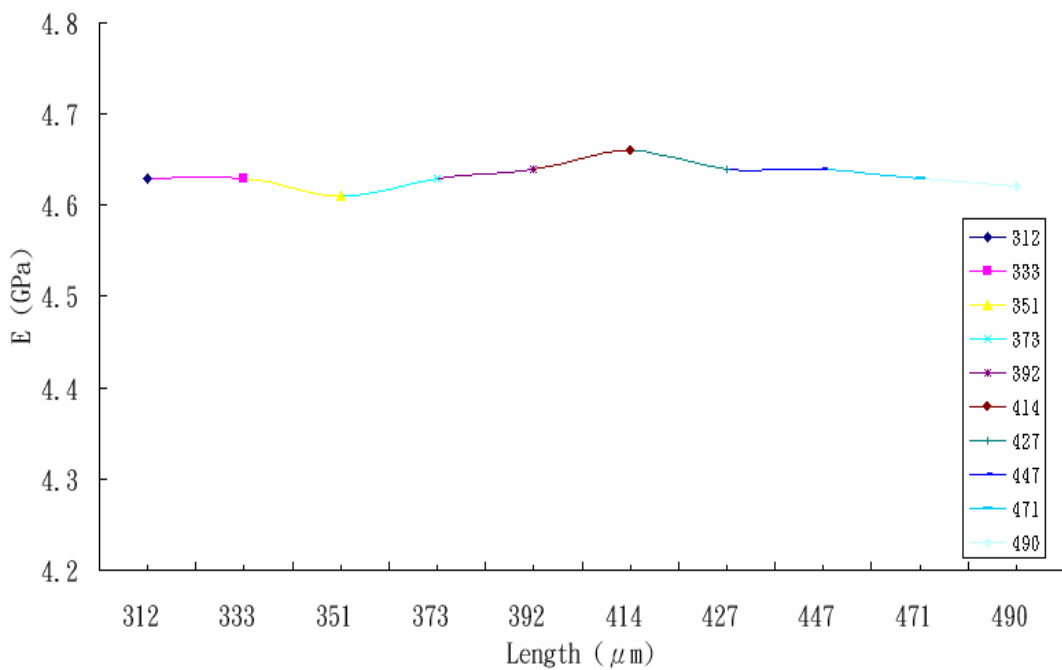
實驗四的 SU-8 微懸臂樑的量測長度範圍約在 300 μm 到 500 μm 之間。同樣的每一特定長度實驗都反覆實驗量測十次，並再取其平均值以確保我們量測實驗數值的準確性。以下圖 3-31 則為此次實驗光學儀器量測得到的微懸臂樑位移量平均值圖表，其中所表示的誤差值範圍為上下百分之五的數值。



【圖 3-31 長度與位移量關係圖】

再利用微懸臂樑力量公式 ($E = \frac{F \cdot L^3}{3Iy}$)。即可將我們所得的位移量轉

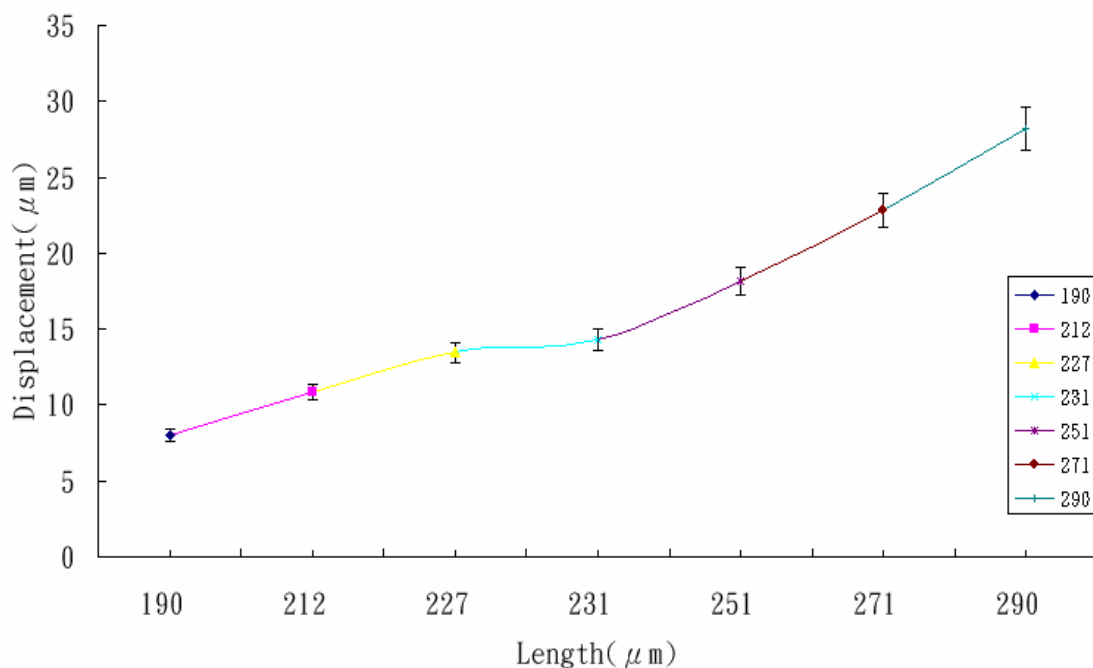
變成以下所相對應 SU-8 材料的楊氏係數圖表。



【圖 3-32 微懸臂樑楊氏係數關係圖】

從此組實驗中，我們可計算得到 SU-8 微懸臂樑的材料係數。楊氏係數 E 值平均為 4.633GPa。

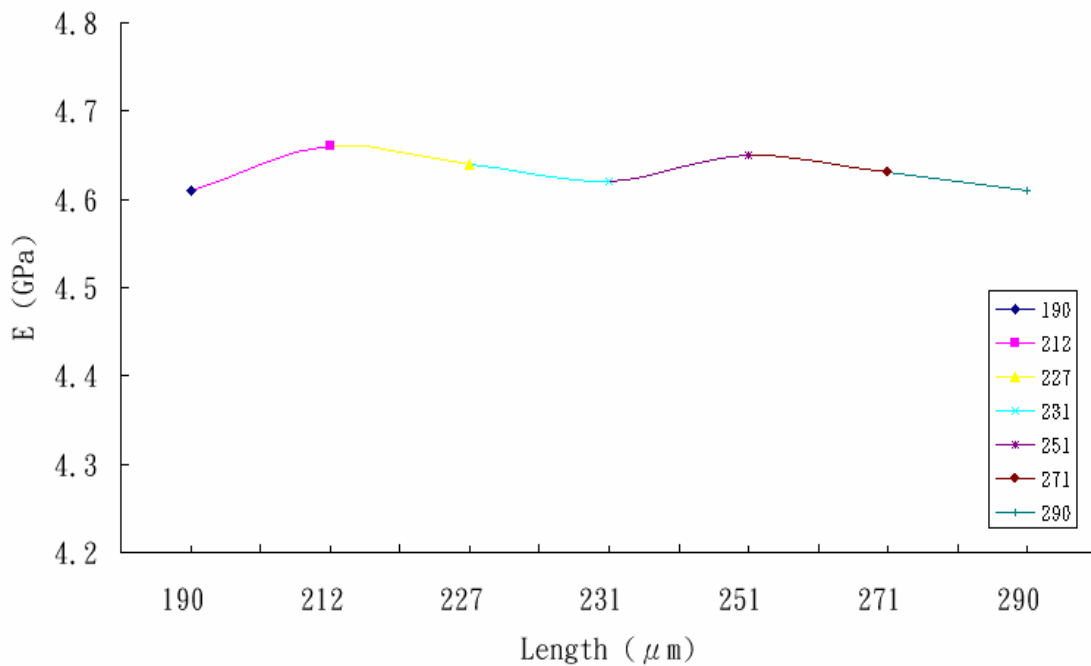
接著實驗五 SU-8 微懸臂樑的量測長度範圍約在 300 μm 到 200 μm 之間。同樣每一特定長度實驗都反覆實驗量測十次，並再取其平均值以確保我們量測實驗數值的準確性。以下圖 3-33 則為此次實驗光學儀器量測得到的微懸臂樑位移量平均值圖表，其中所表示的誤差值範圍為上下百分之五的數值。



【圖 3-33 長度與位移量關係圖】

同樣的利用微懸臂樑力量公式 ($E = -\frac{F \cdot L^3}{3Iy}$)。即可將我們所得的位移

量轉變成以下所相對應 SU-8 材料的楊氏係數圖表。



【圖 3-34 微懸臂樑楊氏係數關係圖】

從此組實驗中，我們又可計算得到 SU-8 微懸臂樑的材料係數。楊氏係數 E 值平均為 4.631GPa。

因此將此三組數據整理可成以下表 3-13。

【表 3-13 SU-8 材料參數表】

SU-8 的材料參數表		
實驗組別	楊氏係數 (E)	平均值
4	4.633GPa	E=4.632GPa
5	4.631GPa	

由以上這麼多組的實驗後，我們已經可適當的假設在如表 3-6 這樣的 SU-8 微懸臂樑製程，且利用相同的儀器設備製作下，SU-8 的材料楊氏係數可確立為 $E=4.63\text{GPa}$ 。所以也可以說如果我們後續的製作 SU-8 微懸臂樑，只要一切依照這個製程規格下，我們可以不用在做這樣繁複的實驗，就可直接確定其材料性質。這對我們以後需要大量製作、使用 SU-8 微懸臂樑帶來很大的便利性。

3.5.1 微懸臂樑尺寸分析

同樣的當可以確定 SU-8 的材料特性後，就可開始針對不同的細胞力大小做不同的尺寸設計，以用來符合每種細胞的大小、性質。這樣也可使避免往後我們實驗時產生我們不想要的結果。例如：細胞力太大使微懸臂樑撓曲過大，超出我們光學儀器可觀測範圍，或者是超出材料其彈性限度外。又或是細胞力太小，使得位移量過小而光學儀器無法量測也是不發生的。

所以利用以上實驗所得到的 SU-8 楊氏係數來做模擬，便可得到以下相關的模擬圖表。當然首要的是一切依照表 3-6 這樣的 SU-8 微懸臂樑製程，並利用相同的儀器設備製作，使 SU-8 的材料楊氏係數可確立為 $E=4.63\text{GPa}$ 。以便分析，減少實驗誤差的可能性。

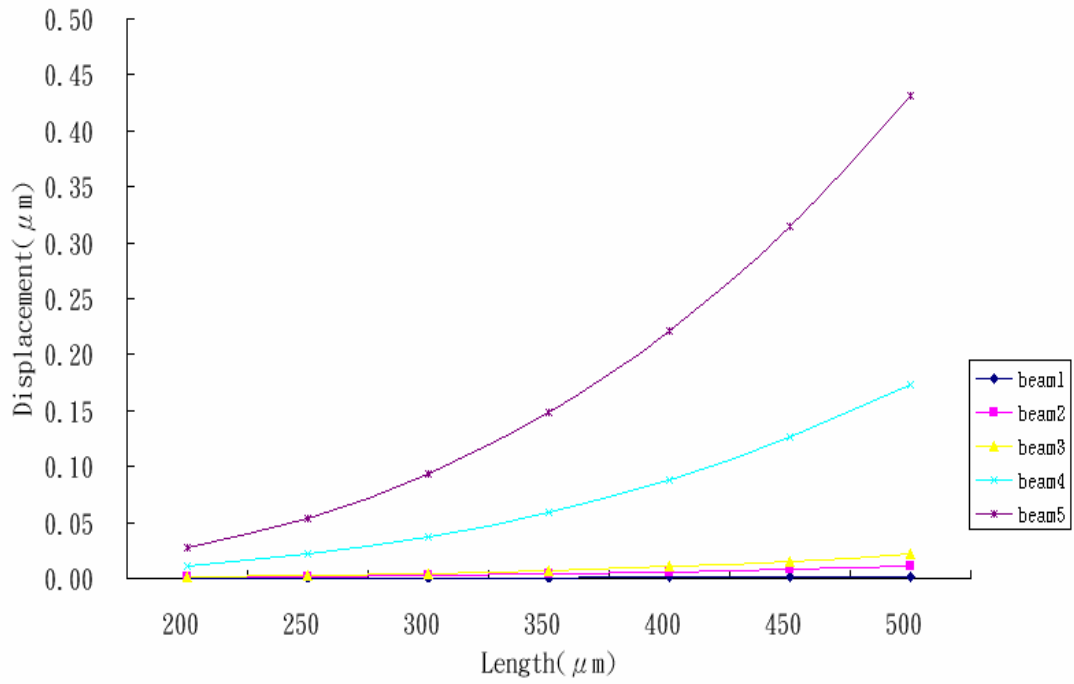
首先制定出不同的 SU-8 微懸臂樑尺寸，用來觀察在相同受力情況下，位移量的變化大小。制定出來的懸臂樑尺寸大小如下表 3-14 所示。

【表 3-14 SU-8 尺寸參數表】

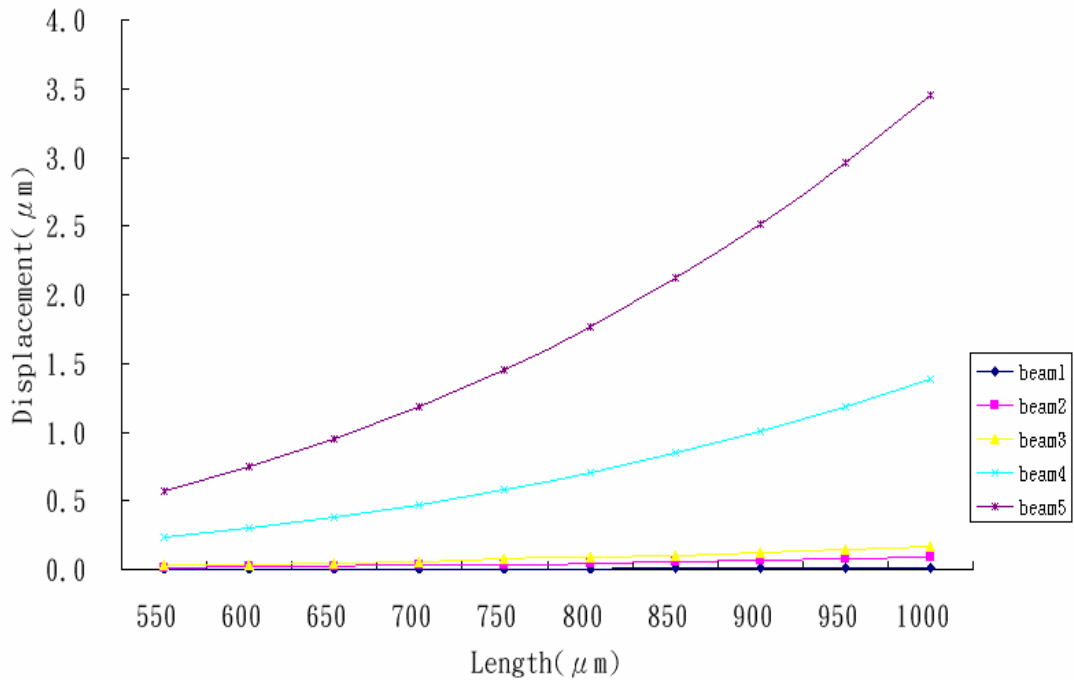
SU-8 微懸臂樑尺寸				
編號	長度 (μm)	寬度 (μm)	高度 (μm)	楊氏係數
1	200~1000	20	10	E
2	200~1000	10	10	4.63GPa
3	200~1000	10	5	
4	200~1000	5	5	
5	200~1000	5	2	

接著模擬，當預知力量範圍在何處時，如何來選擇適當希望的位移量大小來觀測，以符合既能在光學儀器能觀察紀錄的範圍裡又能使位移量越大越好，以便後續紀錄量測、減小誤差。

模擬實驗一是當細胞力僅僅只有 1nN 的時候，SU-8 製作的微懸臂樑撓曲的位移量大小範圍區間為何。



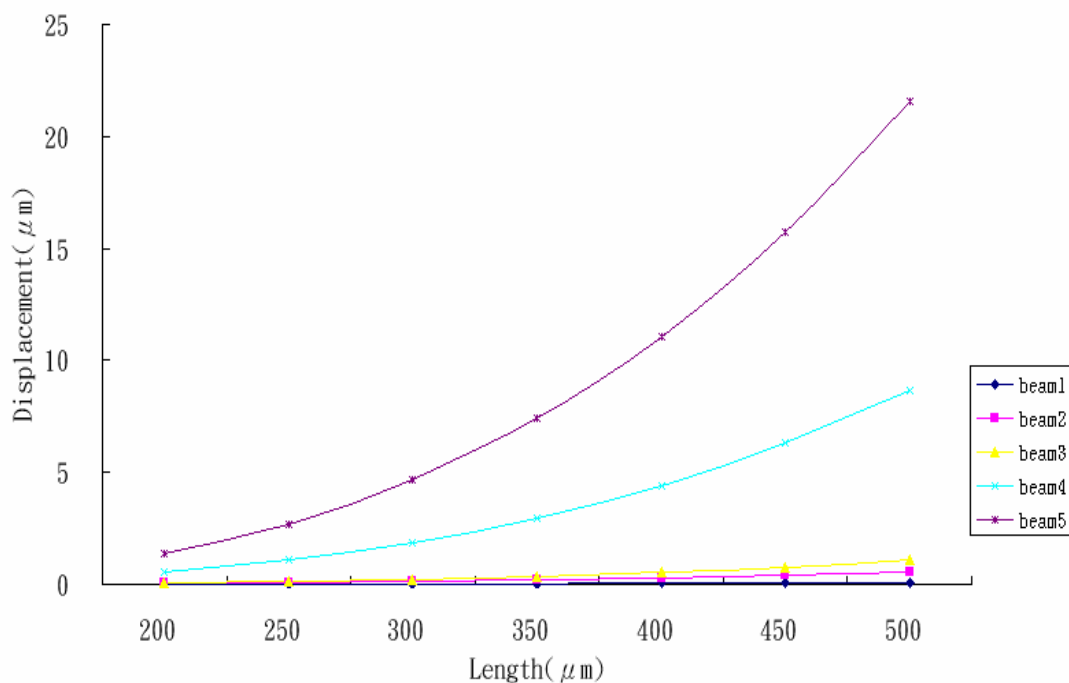
【圖 3-35 量測位移範圍 1 圖】



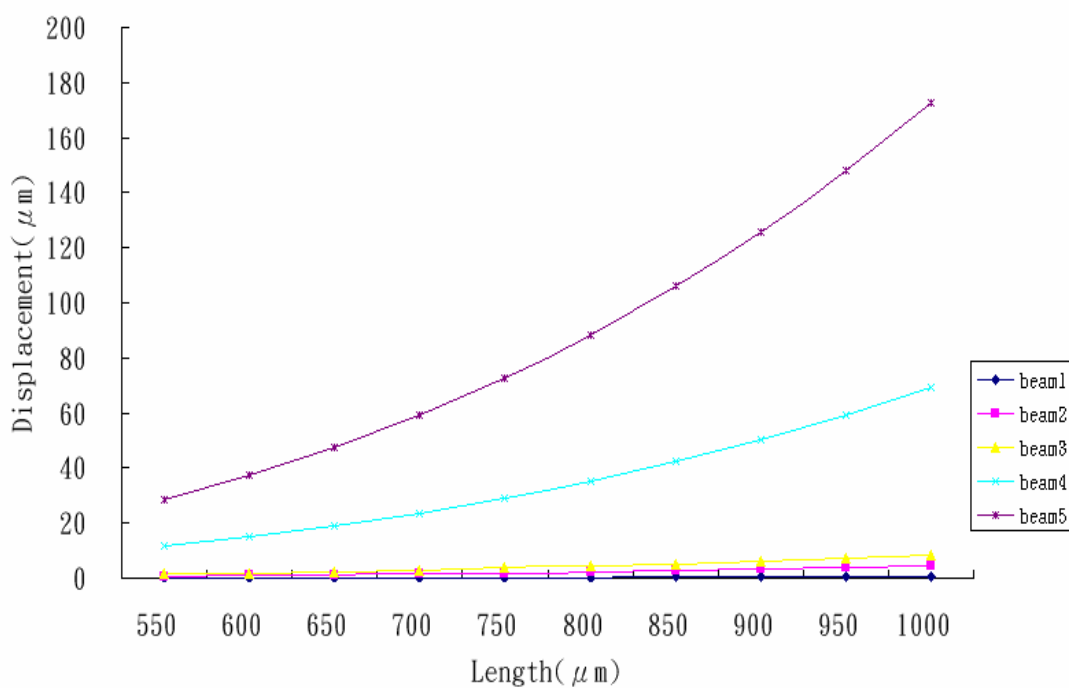
【圖 3-36 量測力量範圍 2 圖】

模擬實驗二是當細胞力僅僅只有 50nN 的時候，SU-8 製作的微懸臂樑

撓曲的位移量大範圍區間為何。



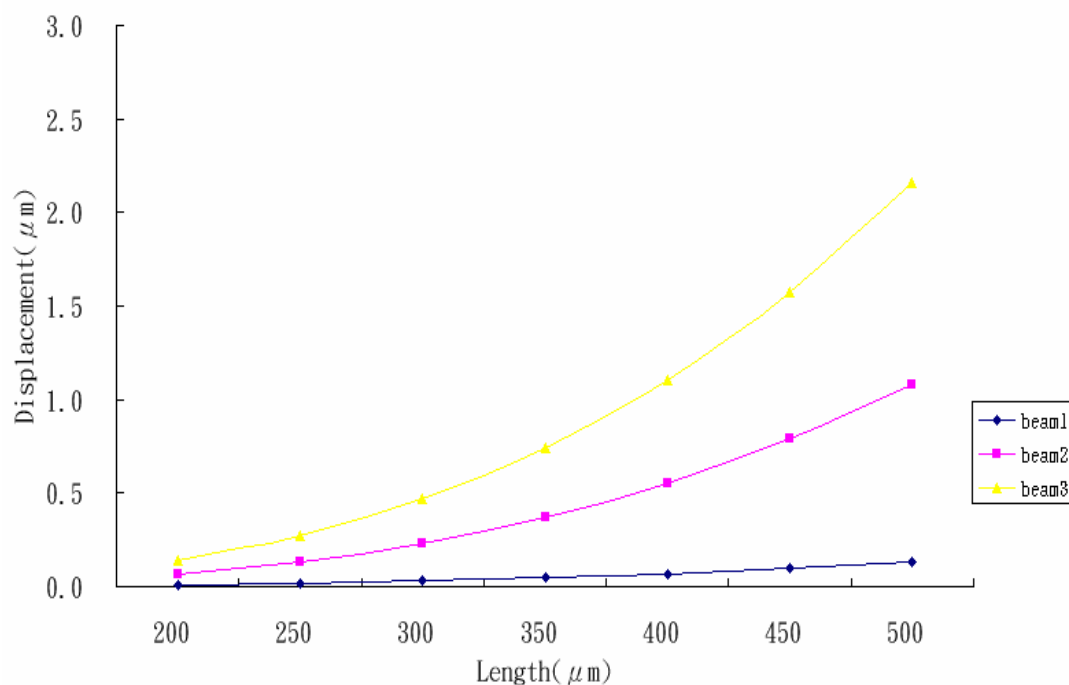
【圖 3-37 量測力量範圍 3 圖】



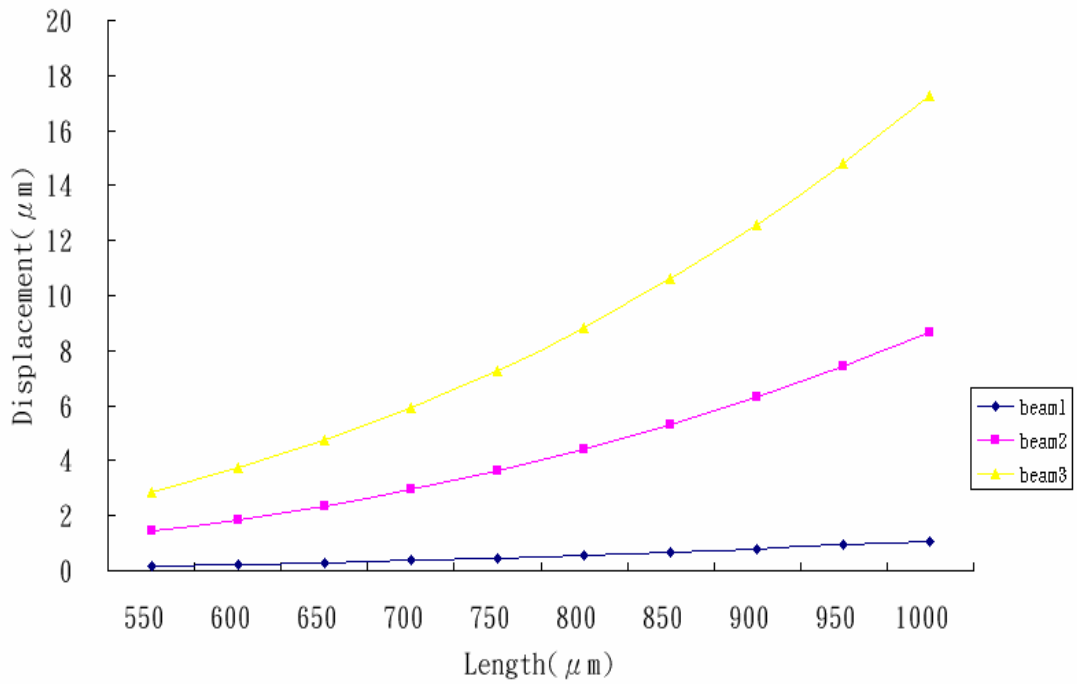
【圖 3-38 量測力量範圍 4 圖】

藉由以上的模擬以後，我們已經可以知道當我們量測的細胞力在 1nN ~ 50nN 時，編號 4、5 號的微懸臂樑尺寸較佳，能符合我們的需求。但若是細胞力大於此的話，編號 4、5 號的微懸臂樑尺寸則不適用了，因為位移量就會過大，超過光學儀器可量測的範圍。

模擬實驗三是當細胞力範圍在約 100nN 的時候，SU-8 製作的微懸臂樑撓曲的位移量大小範圍區間為何。

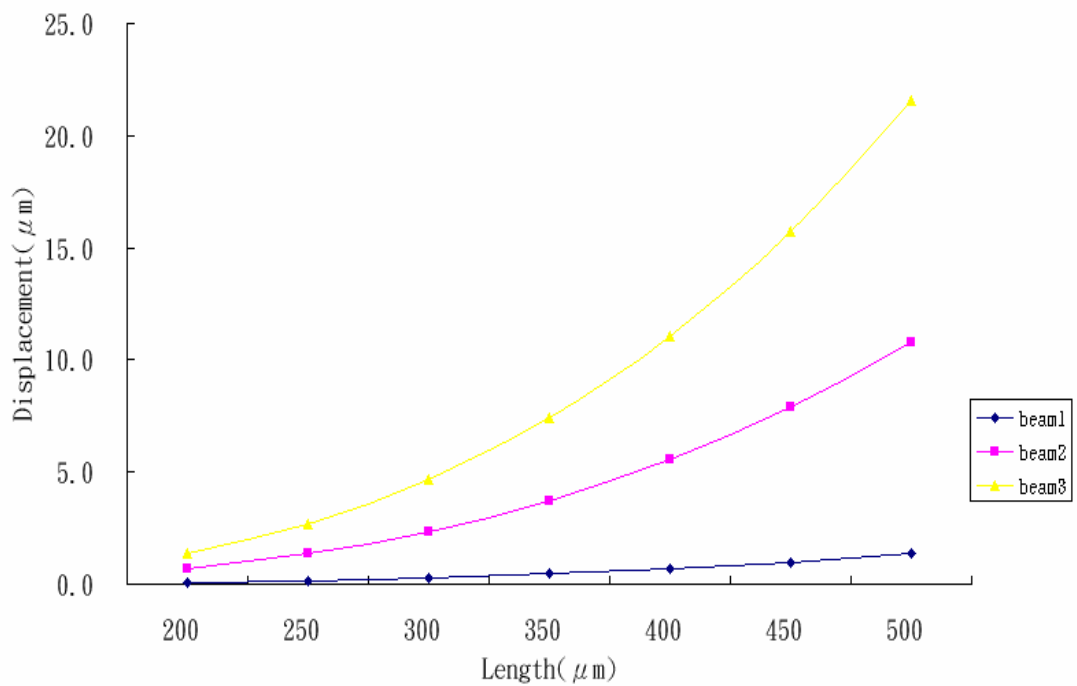


【圖 3-39 量測力量範圍 4 圖】

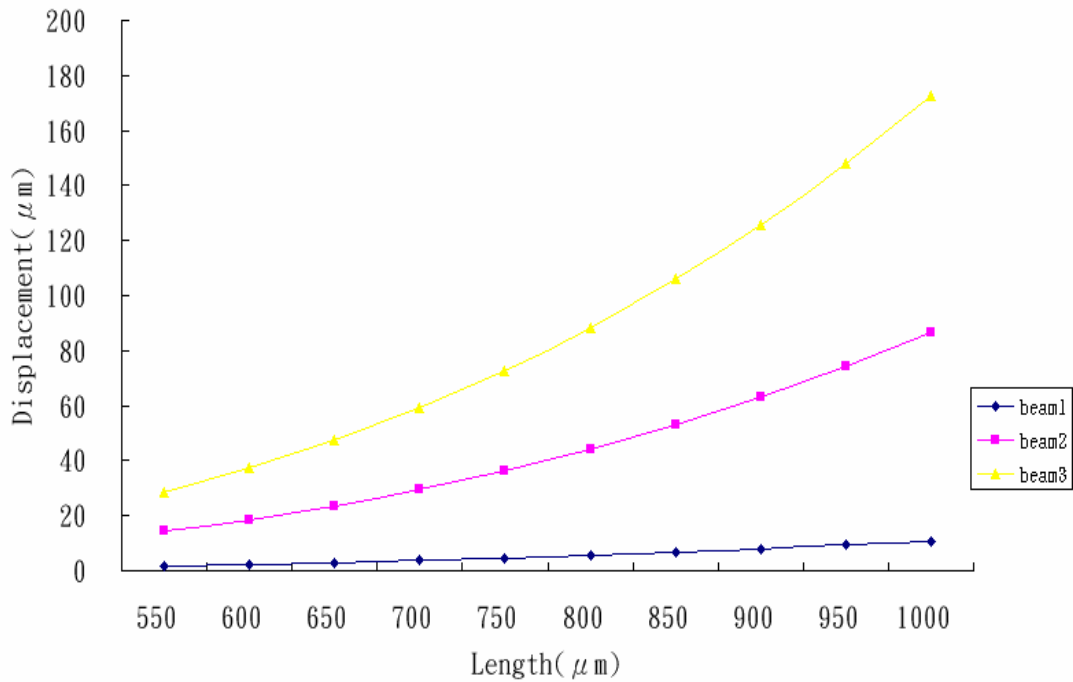


【圖 3-40 量測力量範圍 4 圖】

模擬實驗四是當細胞力範圍在約 $1 \mu\text{N}$ 的時候，SU-8 製作的微懸臂樑撓曲的位移量大小範圍區間為何。



【圖 3-41 量測力量範圍 4 圖】



【圖 3-42 量測力量範圍 4 圖】

藉由以上各式不同的模擬以後可知，當未來需要針對不同的細胞力大小做不同的尺寸設計時，只要預先利用此等模擬圖表就可避免微懸臂樑撓曲過大，超出我們光學儀器可觀測範圍，或者細胞力太小，使我們光學儀器無法量測等等我們不想要的實驗過程與結果。還可以進一步的改進實驗設計，以使花費大量時間設計製造出來的 SU-8 微懸臂樑在某依特定尺寸但卻適用於大部分想要量測的細胞力，而不用花繁複的時間設計製造不同尺寸的微懸臂樑。也可使微懸臂樑在受到某一細胞力時位移量可在我們觀測範圍內最大，以便我們後續的紀錄量測、數值計算，使實驗誤差減小、結果更精準。

四、結語

本文以製作出細胞力學量測系統為最根本的研究主軸，在為量測 10^{-6} Newton (μN)、 10^{-9} Newton (nN) 等範圍的 SU-8 微懸臂樑製作已有完整的成果。也在重要的量測校正模組中，下了很大的苦心，使利用其即可將我們製作的微懸臂樑材料性質確立，可用於後續的細胞力學量測實驗，以期量測出來的實驗數據為精準可信的。

雖然在欲量測細胞力範圍為 10^{-12} Newton (pN) 的 PDMS 微懸臂樑製作成果不佳，也嘗試過許多方法欲解決其因為晃動所造成的自我纏繞問題。不過始終無法順利解決。因為若是改良其尺寸，使得 PDMS 微懸臂樑整體彈性係數上升，又會造成無法順利量測範圍在 10^{-12} Newton (pN) 左右的細胞力。

後續只要在培養細胞、顯微操作系統等部份做適當的技術引進，即可順利完整的呈現出整體應有的細胞力學量測系統。以期對任何未來的細胞性質研究有些微貢獻。

參考文獻

- [1] Shih Y L, Rothfield L. "The Bacterial Cytoskeleton", Microbiol Mol Biol Rev 70 (3), pp. 729-754, September 2006.
- [2] Alexander Mogilner, George Oster. "Cell Motility Driven by Actin Polymerization", Biophysical Journal vol.71, pp. 3030-3045, December 1996.
- [3] Jean F. Challacombe, Diane M. Snow, Paul C. Letourneau. "Role of the cytoskeleton in growth cone motility and axonal elongation", THE NEUROSCIENCES vol.8, pp. 67-80, 1996.
- [4] J Victor Small, Guenter P Resch. "The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility", Current Opinion in Cell Biology vol.17, pp. 517-523, 2005.
- [5] M. Dao, J. Li, S. Suresh. "Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte", Materials Science and Engineering C26, pp. 1232-1244, 2006.
- [6] John L. Tan, Joe Tien, et al. "Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force", PNAS vol.100 no.4, pp. 1484-1489, February 2003.

- [7] Byung-Ho Jo, Linda M., et al. "Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane Elastomer", Micro-Electromechanical Systems vol.9 no.1, March 2000.
- [8] Dae-Geun Choi, Hyung Kyun Yu, Seung-Man Yang. "2D nano/micro hybrid patterning using soft/block copolymer lithography", Materials Science and Engineering C24, pp213-216, 2004.
- [9] W. C. Tang, T.-C. H. Nguyen, and R. T. Howe. "Laterally driven polysilicon resonant microstructures", Proceedings, IEEE Micro Electromechanical Systems Workshop, pp53-59, February 1989.
- [10] Byung-Ho Jo, Linda M., et all. "Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane Elastomer", Journal of Microelectromechanical Systems vol.9 no.1, March 2000.
- [11] Matthew Hopcroft, Tobias Kramer, et all. "Micromechanical testing of SU-8 cantilevers", ATEM' 03, JSME-MMD, September 2003.
- [12] 張碧芬，袁紹英，游呈祥，微生物學的世界，初版，天下遠見，台北，民93年。

- [13] Talaro, Kathleen Park, Talaro, Arthur 著/王昱昇等譯，基礎為生物學，初版，麥格羅.希爾，台北，民 95 年。
- [14] 王金發教授，細胞生物學網路課程
<http://www.lifesciences.ynu.edu.cn/wl/jc/xbswx/index/course.htm>，中山大學生命科學學院，中國。
- [15] 維基百科
- [16] Soft Matter Physics Polymers and Membranes in Cells, Cytoskeleton，Biophysics at the University of Leipzig, Germany，<http://www.softmatterphysics.com/>
- [17] 伍秀菁，汪若文，林美吟編輯，微機電系統技術與應用，行政院國家科學委員會精密儀器發展中心出版，新竹，民 92 年。
- [18] 曾勝陽，張博睿等，「顯微鏡中的第三隻手-雷射鑷夾帶著走」，物理雙月刊，第 22 卷第 5 期，pp494-499，2000 年 10 月
- [19] 林奇宏，蔡金吾，「雷射光鉗技術在生物作用力研究上的應用」，物理雙月刊，第 22 卷第 5 期，pp500-504，2000 年 10 月
- [20] 高豐生，「光鉗系統之建置校正及基礎應用之研究」，國立交通大學，碩士論文，2006 年。
- [21] Joseph E. Shigley, Mechanical Engineering Design, McGRAW-HILL International Edition 6th