## [研究新領域報導]

# **奈米流通道於生物物理及生醫應用之研究**

中央研究院物理研究所 廖國棠<sup>a</sup> 葉佳唯<sup>b</sup> 周家復

## 一、前言

近年來,奈米流通道(Nanofluidics)於基礎及 應用研究上,愈來愈受到人們的矚目。由於奈米 流道的空間幾何特性,使得以往可能在大尺寸的 流道觀察不到的現象都能夠進一步得到釐清及 改善,例如高分子生物物理上極感興趣的課題, DNA 拉伸(Stretching)或單分子操控(Manipulation)及其特性上的研究,生醫應用上 DNA 或蛋 白質預濃縮(Preconcentration)、分子分離(Separation)、分子反應器(Reactors)、流體力學、離子傳 輸的整流現象、微生物在侷限空間下的衍生行 為…等都是近年來極為活躍且有相當多研究成 果發表的領域[1-5]。

### 二、奈米流通道的製作

奈米通道的製作,這十年來有長足的進步, 現今已有許多方法可以用來建構一個或兩個維 度在 100 奈米以下的流道,如傳統的光蝕刻 (Photolithography)、干涉式微影法(Interference Lithography)、電子束微影法(Electron Beam Lithography)、聚焦離子束蝕刻法(Focus Ion Beam Lithography)、奈米壓印微影術(Nanoimprint Lithography)、奈米壓印微影術(Nanoimprint Lithography)…等,而材料上的選擇也包括矽晶 片、石英、玻璃、塑膠等[6-8]。尤其,室溫低壓 及生物相容性的封裝方法,也陸續被示範提出 [9,10],其成本低廉,容易製作的特性,也將使 得奈米流通道的應用,更爲廣泛。在本文中,由 於篇幅的限制,我們將省略奈米流通道的製作過 程(請讀者參考上列的回顧文章),在此僅舉例 說明其在生物物理或生醫上的應用。

## 三、高分子生物物理的研究-單分子 DNA 拔河

近十年,微奈米流通道亦為基礎高分子生物 物理的研究提供一極佳平台。特別是當分子穿針 引線的由微米進入奈米通道,其中的動力學與熵 的影響息息相關。『微米』尺度流道對生物分子 所需跨越熵能障的意義是它需大於其迴轉半徑 (radius of gyration);同樣地,『奈米』尺度孔洞 或流道則是小於其迴轉半徑。一般而言,生物分 子如同得了幽閉恐懼症般的不喜歡待在"奈 米"束縛局限的空間結構。然而,高分子聚合物 仍可以因外加電場的驅動克服熵能障而進入此 空間。為了研究熵力和空間侷限度的關係,我們 建立了一個由熵力驅動的單分子 DNA 拔河系統 [11],該系統由一個奈米狹縫橋接兩個微奈米流 道的界面組成,進而研究 DNA 拔河(tug-of-war) 時的靜力學與熵引致回縮(entropic recoiling)過 程的動力學。由此系統,我們在不需施加外力的 情況下(如光鑷夾、磁鉗),便可研究奈米尺度下, 生物分子的熵力及其對奈米侷限度的相依性及 其規度律[11,12]。

我們設計的微奈米流道晶片及實驗過程如 圖一。透過外加電場驅動單一 DNA 分子穿越奈 米狹縫(高度 h = 40~110 nm),當 DNA 一端到達 另一個微米流道時關閉電場。DNA 因著兩端熵 力的拉扯被展延開來,稱之為 DNA 拔河。經過 一段時間後,因著熱擾動影響,DNA 分子隨機 的往一端移動,最後通過狹縫造成熵引致縮曲的 動態過程。透過高解析螢光顯微鏡及高靈敏度數 位相機(EMCCD camera) 擷取螢光分子擾動影

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>現職: Center for Nanoscale Science and Technology, National Institute of Standards and Technology, USA

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup>現職: School of Applied and Engineering Physics, Cornell University, USA



圖二 (a)熵刀在 DNA 拔河(▼)札熵引致回縮(●)與狹縫長度關係。(b)熵刀與狹縫高度(空間侷| 關係[11]

像,並分析其三維輪廓長度和伸長長度,即可作 進一步的奈米侷限下的彈性伸縮力與熵力分析。 在 DNA 拔河狀態下,此時為準平衡態,在微奈 米流道交界處熵力與彈性伸縮力平衡。有別於傳 統 worm-like chain 模型[13],我們首先提出並模 擬 modified worm-like chain 的彈性力與拉伸關係 模型以符合 DNA 長鏈高分子於奈米狹縫內的彈 性行為[11,14]。另一方面,我們也利用熵引致縮 曲的動態過程(entropic recoiling)來計算熵力。熵 引 致回縮的過程又分兩態,一為彈性收縮 (elastic),另一為純熵引致回縮(pure entropic recoiling)。在同一深度的狹縫下,兩態的轉折點 在歸一化的尺度下不隨狹縫長度改變。隨著狹縫 變窄,彈性收縮的效應漸減,並以指數的形式向 純熵引致回縮呈現[11]。計算熵力的過程中也須 同時計算其阻力係數,可透過 DNA 分子在長狹 縫的電場遷移率得知。

不論是從 DNA 拔河的靜力學或熵引致回縮 的動力學實驗研究分析,都表明熵力與狹縫長度 和在其內的 DNA 長度無關(圖二(a)),此符合



圖三 奈米流道晶片設計及實驗操作圖。(a)實驗設置剖面圖,晶片上方為電場經儲液槽兩端施加、晶片 下方為光學顯微鏡。(b)奈米晶片實體照片,晶片尺寸為 14 × 14 mm<sup>2</sup>。(c)奈米晶片中間微奈米 流道放大圖,圖中右下角的尺規為 30 μm。(d)奈米隘口的掃描式電子顯微鏡照片,圖中尺規為 500 nm [17]

著名的 de Gennes [15]和 Odijk [16]理論的預測; 然而熵力只和分子在奈米尺度的空間侷限度(狹 縫高度)相關(圖二(b))。更進一步的,我們利 用一維侷限下的 Blob theory 來解釋此空間侷限 的相依性與規度率[12]。此類研究對高分子聚合 物在奈米尺度的傳輸現象,單分子分析的系統設 計上,及生物科技上(如經由奈米孔洞之單分子 DNA 定序)均有潛在的應用性。

## 四、生醫應用-蛋白質預濃縮的分子壩

質量輸送(Mass Transport)一直是在微流體 中一個很重要的限制因子。當在將流體系統微小 化的過程中若沒有提昇質量輸送的效率,生物分 子在流體中的擴散長度(Diffusion Length)將會延 長,而影響偵測器分析其生物分子的解析能力, 倘若要分析微量樣品中的低含量或濃度的生物 分子,那將會更加困難;再加上在生理環境樣品 中自然存在許多不同的生物分子如蛋白質,要從 中分析出某一種特定的生物分子,不僅要能克服 其他眾多蛋白質的背景干擾,還必須有極高靈敏 度(Sensitivity)。我們最近即利用設計在奈米流道 中的分子隘口,以調控電場的方式來趨動待測蛋 白質往奈米隘口邊聚集,使奈米隘口形成分子壩 (Molecular Dam)。如此一來,在極短時間(20 秒內)即可將蛋白質富集達 10<sup>5</sup> 倍以上,提升質 量輸送效率達到快速分子預濃縮效果,並以一般 的螢光(Fluorescence)系統來偵測已標定的生物 標記物(Biomarker)的蛋白質以克服上述種種限 制[17]。此系統能大幅提升在生醫檢測上疾病初 期致病因子含量相當低的檢測能力,達到早期發 現早期治療的效果。

我們採用電子束微影法配合傳統的光蝕刻 來製作實驗所需的奈米分子壩蛋白質晶片 (Molecule Dam) [17, 18]。在晶片的設計上,主要 是在熔融矽(Fused Silica)的絕緣材質上蝕刻出一 個具高深寬比奈米隘口(Nanogap)的奈米流道, 之後即可在流道兩端施加電場,其經過奈米隘口 時,可形成無電極式介電泳(Electrodeless Dielectrophoresis)[19]來使蛋白質聚集在奈米隘 口附近, 達到快速富集(Enrichment)的效果。此 晶片的設計及實驗操作如圖三所示,實驗施作的 剖面圖如圖三(a),由上方儲液槽兩端施加電場並 由下方的光學顯微鏡觀測實驗結果,晶片實體照 片如圖三(b),在H型的微流道兩側裝置有儲液 槽(Reservoirs),而奈米流道及奈米隘口則在微流 道的中間如圖三(c),圖三(d)即是奈米隘口的放 大圖,由掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope)的照片上可清楚看到奈米隘口,其寬



圖四 分子阱及分子壩示意圖(左圖)及利用無電極式介電泳對於生醫分子在奈米流道晶片中所得的實驗結果(右圖)。左圖為分子阱(a)及分子壩(b)-(c)形成的示意圖。右圖(a)-(c)為鏈黴親和素被捕捉到分子阱的螢光觀測圖,而(d)-(f)為此分子受分子壩影響而聚集在奈米隘口附近的螢光觀測圖,(f)中有使用螢光減光片,圖中的尺規為 30 μm。(g)為鏈黴親和素的螢光強度相對時間分析圖,圖中橫線代表該分析物在該濃度時的螢光強度尺。(h)為不同濃度的該分子在分子壩實驗方式的富集曲線,而插圖是鏈黴親和素和歿疫球蛋白抗體(Ga-HIgG, Goat anti-Human Immunoglobulin G)在分子壩實驗方式的富集曲線比較圖,同樣圖中橫線代表該生物分子在該濃度時的螢光強度[17]

度約為 15 nm。

根據介電泳調控電場的方式可以在本系統 中形成二種不同的作用,如圖四左圖的示意圖, 當分子受電場影響而聚集在奈米隘口時會形成 如圖(a)的分子阱(Molecular Trap);當調控電場條 件後會使分子因受力的不同而遠離奈米隘口甚 至在單邊富集就會形成我們所謂的分子壩也就 如示意圖上的(b)和(c)所示。而圖四右圖即是實 驗結果,我們選用的蛋白質為鏈黴親和素 (Streptavidin),在(a)-(c)螢光觀測圖中該分子因電 場的施加時間而聚集在奈米隘口,即為分子阱結 果;而實驗上更去調控電場使奈米隘口形成分子 壩來達到更快速富集的效果,如螢光觀測圖(d)-(f) 所示,且在圖(f)中更因分子富集過多而必須使用 减光片。圖(g)則將分子阱及分子壩的實驗結果整 理比較,圖中橫線為該分子在特定濃度的螢光強 度尺,而分子的起始濃度皆為 10 μg/mL,由圖 上可清楚發現分子阱對於該蛋白質的富集效率 已經很好(30秒內富集1000倍),但分子壩更 勝一籌,在圖(h)中不同起始濃度的富集結果於 20 秒內富集 10<sup>5</sup> 倍以上(由 10 ng/mL 到 1

mg/mL)。另外,我們也應用在免疫分析上,圖 (h)的插圖是本系統對於人類免疫球蛋白的富集 效果,由此可見本系統對於不同的生化蛋白質皆 可達到預濃縮的快速富集效果,對於生醫檢測上 的應用會提供一定的助益。

### 五、結語

本文的舉例說明,試著使讀者瞭解,簡單的 奈米流通道設計,即可用於有趣且重要的基礎生 物物理及生醫應用研究上。未來,研究人員發揮 創意,利用不同流道的設計及組合,在可見的將 來仍有極大的發展空間及應用潛力。

### 致謝

作者感謝陳彥龍博士及 Alessandro Taloni 博士長期的合作,和行政院國家科學委員會 (NSC99-2112-M-001-027-MY3,102-2112-M-001-005-MY3),中央研究院主題計畫(AS-97-FP-M02, AS-103-TP-A01)及奈米科技計畫(含奈米核心設 施),美國空軍實驗室亞洲辦公室,以及國家理 論科學研究中心在研究上的支持與協助。

#### 參考文獻

- J. C. T. Eijkel and A. van den Berg, Microfluid. Nanofluid., 1, 249 (2005).
- [2] W. Sparreboom, A. van den Berg and J. C. T. Eijkel, *Nat. Nanotechnol.*, 4, 713 (2009).
- [3] M. Napoli, J. C. T. Eijkel and S. Pennathur, *Lab Chip*, **10**, 957 (2010).
- [4] A. Piruska, M. Gong, J. V. Sweedler and P. W. Bohn, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1060 (2010).
- [5] P. Abgrall and N. T. Nguyen, *Anal. Chem.*, 80, 2326 (2008).
- [6] L. J. Guo, X. Cheng, and C. F. Chou, *Nano Lett.*, 4, 69 (2004).
- [7] R. Chantiwas, S. Park, S. A. Soper, B. C. Kim,
  S. Takayama, V. Sunkara, H. Hwang and Y. K.
  Cho, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 3677 (2011).
- [8] C. H. Duan, W. Wang and Q. Xie, *Biomicro-fluidics*, 7, 026501 (2013).
- [9] J. Gu, R. Gupta, C.-F. Chou, Q. Wei and F. Zenhausern, *Lab Chip*, 7, 1198 (2007).
- [10] T. Leichle, Y. L. Lin, P. C. Chiang, S. M. Hu, K. T. Liao and C. F. Chou, *Sensor. Actuat.*

B-Chem, 161, 805 (2012).

- [11] J.-W. Yeh, A. Taloni, Y.-L. Chen and C.-F. Chou, *Nano Lett.*, **12**, 1597 (2012).
- [12] A. Taloni, J. W. Yeh and C. F. Chou, *Macromolecules*, 46, 7989 (2013).
- [13] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia and S. Smith, *Science*, **265**, 1599 (1994).
- [14] Y. L. Chen, P. K. Lin and C. F. Chou, *Macromolecules*, 43, 10204 (2010).
- [15] P. G. d. Gennes, Scaling Concepts in Polymer Physics (Cornall University Press, Ithaca, NY, 1979).
- [16] T. Odijk, *Macromolecules*, 28, 7016 (1995).
- [17] K. T. Liao and C. F. Chou, J. Am. Chem. Soc., 134, 8742 (2012).
- [18] K. T. Liao, M. Tsegaye, V. Chaurey, C. F. Chou and N. S. Swami, *Electrophoresis*, 33, 1958 (2012).
- [19] C. F. Chou, J. O. Tegenfeldt, O. Bakajin, S. S. Chan, E. C. Cox, N. Darnton, T. Duke and R. H. Austin, *Biophys. J.*, 83, 2170 (2002).