

[研究成果報導]

實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 及其在生醫上的應用

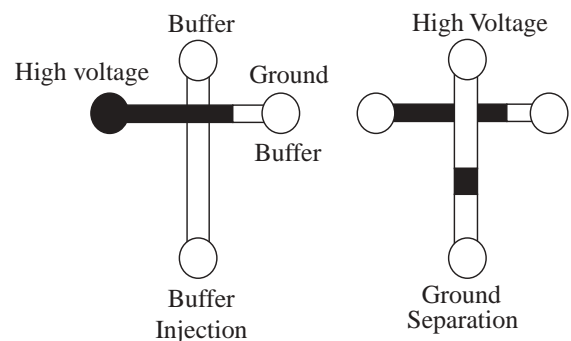
成功大學化學系 王蘭玉、陳淑慧

一、前言

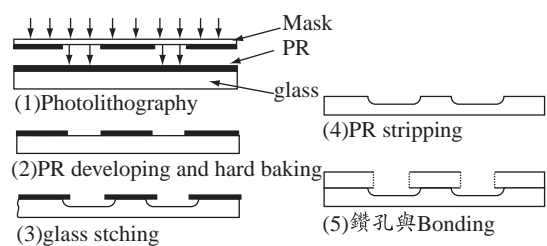
Manz[1]在 1989 年提出微全程全自動分析的概念 (micro-total analysis system, μ -TAS)，是希望將實驗室中進行的一連串包括前處理之生化或一般化學反應整合在微小的晶片上，以減少試劑的用量、人為操作污染等問題，一方面也達到全自動分析的目的，因此稱為實驗室晶片 (lab-on-a-chip)，由於分析步驟是藉由流體在晶片上微管道內完成整個整個流程，因此又稱為微流體晶片。最早被做在晶片上的分析儀器是氣相層析 (GC)，但是由於控制流體的閥門、注射器等在晶片的微製作非常困難所以發展的並不很成功。直到毛細管電泳晶片的開發成功[2,3]，以電場驅動流體的方式簡易可行，而毛細管電泳也是大家所熟知的原理。電泳晶片被廣泛的開發與應用也將實驗室晶片或微全程分析的目標往前邁進，如今連接聚合酶連鎖反應 (PCR) 與電泳分離的整合型晶片開發成功[4]，即是一個重要的指標。本實驗室自 1998 年投入晶片的研發工作，至今三年多來在電泳晶片的開發與應用，以及在自動進樣及質譜整合之晶片試作上有一些成果與心得，茲分別整理描述於下文。

二、電泳晶片的操作原理

微量分析中常使用毛細管柱作為分析管柱，樣品在電場中依照不同的質荷比來達到分離的目的。在生化分析中常利用電泳來進行分析，係利用分析物電泳淌度的不同而達成分離的效果，即當分析物處於電場環境中時，由於其帶電性多寡的不同而使得在電場作用下具有不同的遷移速度。實驗室晶片不同於微陣列晶片在於實驗室之晶片捨棄傳統以閥門 (valve) 控制流體的方向，因為控制閥門在晶片的製程上有很大的困難，後來改為利用電壓切換而



圖一 十字形電泳晶片之注射及分離



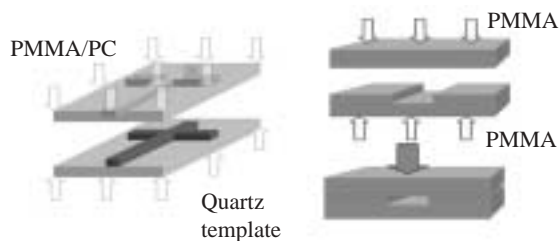
圖二 石英材質晶片的製作流程

達到控制流體的方向，進而完成整個分析的流程。圖一為典型的十字形晶片，分析概念採用所謂的“注射 R 分離”模式。注射：樣品利用電壓方式驅動。分離：將十字形管道交叉處的樣品帶入分離管道進行電泳分析。

三、晶片之製作

(一) 矽材質

毛細管大多以石英為材質，配合微機電製程中的濕式蝕刻法[5] (wet etching) 在基材中可製作成微管道形式。其製作方法如圖二所示，首先將光阻均勻塗布在石英基材上，經由照光、顯影、蝕刻即可在管道上方覆蓋另一層石英版形成一個封閉的微管道，如此便完成晶片的製作。針對不同的需求，我們可以在晶片上設計不同的微管道形式，晶片的設計更具多



圖三 PMMA 材質晶片之製作流程

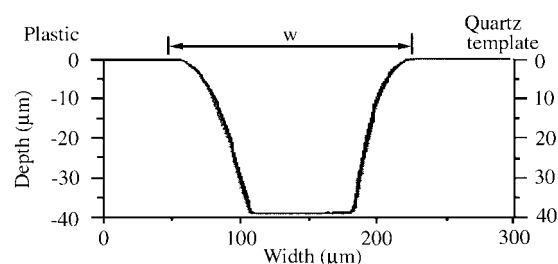
樣化。石英晶片的表面為矽醇基 (Si-OH group)，在其微管道表面可進行衍生化[6]，酵素固定化[7]，使晶片具有生化反應的功能。但是石英材質本身價格昂貴且製作費時，如此便限制的晶片的應用層面。以鈉玻璃為基材的晶片，其成本相對的也就便宜很多，其製作方法與石英基材相似[8]。

(二) 硬性高分子

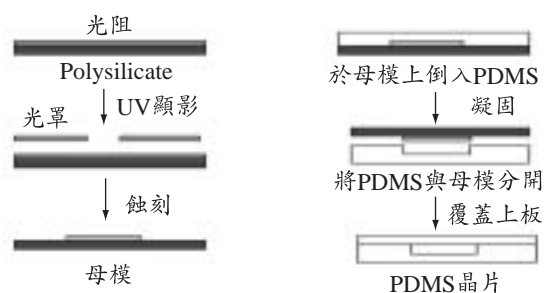
針對以矽材質製作品片的製程限制，有人開始利用透光性佳的高分子材料作為製作品片的材料。如 Poly(methyl methacrylate), PMMA、polycarbonate PC 等高分子材料[9]。以 PMMA 為例，首先利用濕式蝕刻的技術在石英材質上製作母模，再利用熱壓的方式，於 PMMA 上形成微管道，最後覆蓋上相同材質的上版及完成晶片的製作，其製程如圖三所示。

只要有母模便可重複熱壓的步驟，使晶片能夠進行大量複製。對於高分子材料而言，針對不同需求，也可設計不同形式的母模，進行熱壓成型。

高分子材料受熱時易產生變形，所以在進行熱壓的步驟時，會將加熱溫度設定在高分子的玻璃轉移溫度之間，使母模再外加壓力下可輕易的嵌入高分子材料中，而形成微管道的形式且不致產生扭曲變形的影響。圖四為 PMMA 上經由熱壓所形成的微管道，經由曲度測量儀所掃描的結果可知，PMMA 在經由熱壓所形成的微管道表面可以表現的非常均勻完整。由於高分子表面不帶任何電荷，可以減少分析物與管壁之間吸附所產生的影響。也因為高分子表面不帶任何活性的官能機，需做進一步衍生化處理，如鹼處理或質子照射[10]，才能做進一步衍生化。由於高分子材料成本低廉，又不需經由繁瑣的蝕刻步驟，有相當多的文獻利用高分子材料之晶片進行生化樣品的分析，如 C 型



圖四 經由石英母模熱壓後，PMMA 晶片管道的剖面圖



圖五 PDMS 材質晶片之製作過程

肝炎檢測，遺傳疾病 DNA 的偵測，皆可得到良好的分析結果。

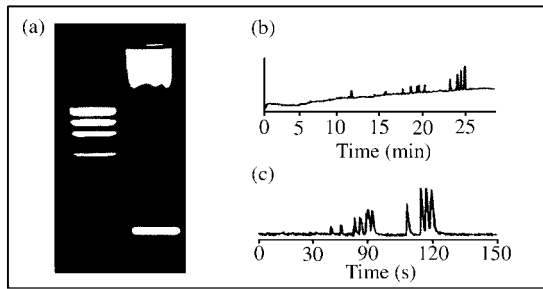
(三) 軟性高分子

對於利用熱壓方式在高分子表面形成微管道的方式，雖然製作方便但是經由多次熱壓之後，容易對母模的表面造成損害，所以無法長時間進行壓製。PDMS 是一流動性的膠體，利用灌膠的方式，在母模上覆蓋一層 PDMS，待膠狀物凝固，膠體與母模分開後，便可在 PDMS 上形成微管道，如圖五所示。不需施加任何壓力，如此減少傷害母模的機會，增加使用的壽命，也可進行大量製作。

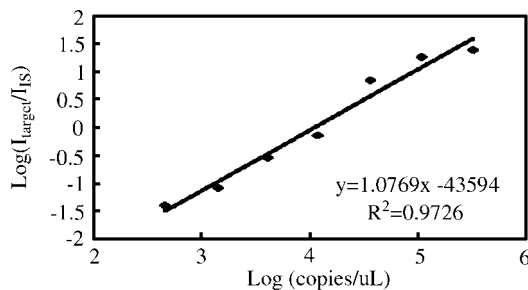
四、應用

(一) 電泳晶片應用於 PCR 產物的臨床分析

隨著臨床檢驗朝基因技術的應用發展，PCR 已成為臨床檢驗的重要利器，而電泳晶片具有快速分離並及時偵測的功能是偵測 PCR 產物的重要利器[11]。通常在分析 DNA 分子時會在分析溶液中加入膠體，產生對鹼基對長度的選擇性，藉以增加分離的效率，這是膠電泳的基本原理。電泳晶片在 DNA 的分析上相較於相較於傳統膠電泳及毛細管電泳，因分離管



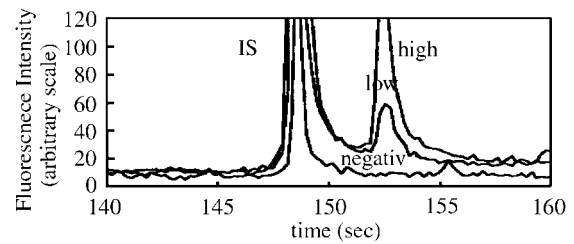
圖六 Hae III 水解 FX-174-RF DNA 的電泳，(a) 在 agarose gel 下的電泳圖，(b) 在 polyacrylamide-coated 的毛細管電泳圖，(c) 在 PMMA 材質的電泳晶片的電泳圖。(圖片摘自文獻 11)



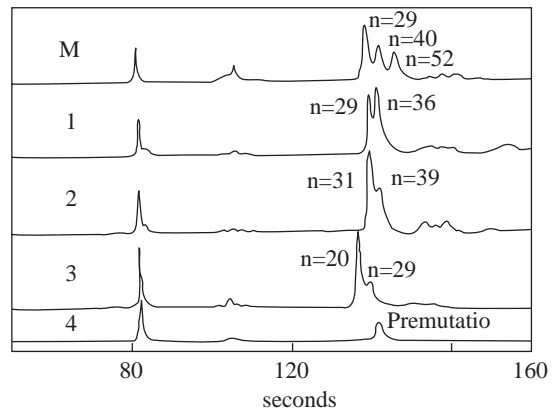
圖七 利用 PMMA 材質之晶片所做之 C 型肝炎校正曲線

道短，使得分析速度大為提高。如圖六所示，以分離 DNA 片段為例，分析時間由傳統膠電泳 50 分鐘減少至毛細管電泳 25 分鐘到晶片式電泳的 2 分鐘，除了分析速度及效率高的優點外，結合高靈敏度的雷射誘導螢光偵測 (LIF) 是晶片式電泳的優勢。

C 型肝炎病毒 (HCV) 檢測中[12,13]，對於病人體內 C 型肝炎病毒量的監測是非常的重要，因許多 C 型肝炎病患利用干擾素治療後又再度復發，可能就是因為目前醫院的偵測系統靈敏度不夠高所致，所以建立一套高靈敏度的 C 型肝炎定量方法是有必要的。首先將 HCV 病毒 RNA，經反轉錄(reverse transcription)形成 cDNA，再經 PCR 大量複製，放大的產物以十字形 PMMA 材質的晶片，利用電泳的方式進行分析。圖七是將 C 型肝炎經 PCR 放大後，進行稀釋，利用十字形 PMMA 材質之晶片所做之校正曲線，圖八為 C 型肝炎含量低、含量



圖八 C 型肝炎含量低、含量高和無 C 型肝炎病毒之血清樣品 (圖七、八摘自文獻 13)



圖九 對女性樣品 (1-4)，進行 (CGG)_n 重複次數的偵測，M 為重複次數，(n) =29、40、52 的 marker(圖摘自文獻 14)

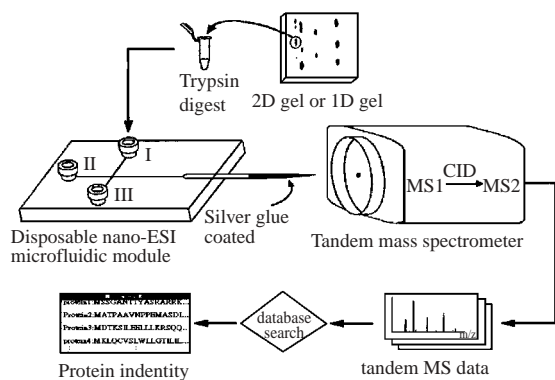
高和無 C 型肝炎病毒之血清樣品。

在遺傳性基因突變檢測方面，X 易斷症 (Fragile X syndrome) 是一種罕見的遺傳性疾病，在晶片電泳上的分析有文獻報導過[14]。X 易斷症是由於 X 染色體中 FMR 基因在複製時，產生 CGG 的這種三連鹼基重複次數過多所致。正常人的重複次數為 7-50 次，患者可能重複數百至數千次，這種先天性疾病會造成發育不正常，智能不足的障礙。圖九為利用電泳式晶片對真實樣品的 CGG 重複次數的分析，可分辨六對以上的鹼基差。

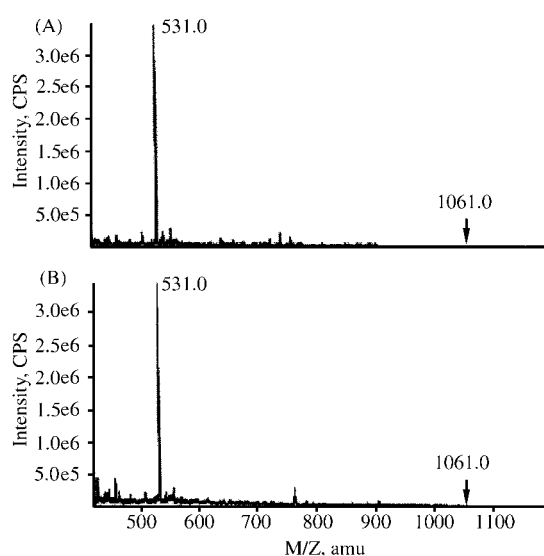
五、應用於蛋白質分析的整合型晶片

(一) 電泳晶片-微電灑質譜

在基因資料庫進行到一段落時，蛋白質的研究是重要的課題。而蛋白質的表現是對於生理機制的反應或是細胞受到病原感染後所產生的訊號傳遞之指標。目前，對於蛋白質的組成鑑定，質譜是公認的一種高辨識率及高靈敏度



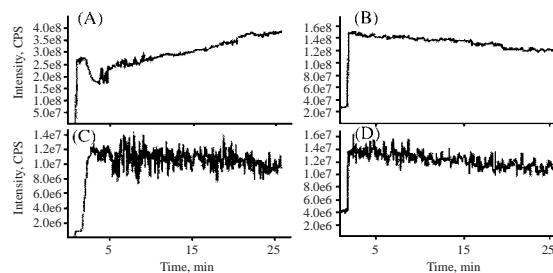
圖十 微電灑質譜與 PMMA 材質之裝置圖[15]



圖十一 (A)PMMA 材質之晶片與自製之噴嘴 (B)市售之噴嘴，兩者對於 10 pmol/μl bradykinin 測試之質譜圖 (圖摘自文獻 15)

的分析工具。電泳晶片具有微小化及在蛋白質的定序和鑑定中，將酵素水解反應整合在電泳晶片上，可節省樣品的消耗和使用量。因此可取代傳統上以 HPLC 為質譜的樣品準備及注入的工作平台，成為質譜耦合的最佳選擇。

以下將介紹以 PMMA 為電泳晶片之材質，和微電灑質譜兩者之耦合，對於蛋白質的鑑定 [15]。兩者之耦合如圖十所示，此 PMMA 之晶片所造成的微電灑之噴嘴口是利用一毛細管拉尖並在上面塗上一層銀膠作為電極導線，而流體在晶片管道中受電場的作用流向噴嘴口，而在噴嘴與質譜儀入口施加適當電壓差，使樣品噴出噴嘴時形成泰勒錐 (Taylor cone) 進而造



圖十二 (A)(B)為 TIC (total ion current) 圖，(C)(D)為 m/z 531 ([M+2H]⁺⁺)之 TIC 圖，(A)(C)圖為市售之噴嘴，(B)(D)為自製之噴嘴，對於 10 pmol/μl bradykinin 標準溶液之測試 (圖摘自文獻 15)

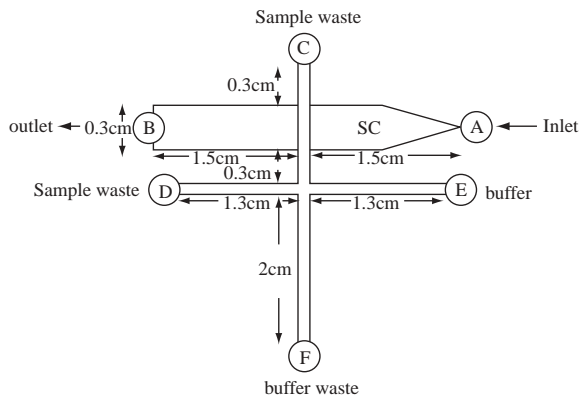
成游離霧化的效果，此步驟會使蛋白質轉換成帶電離子以供質譜儀進行偵測。此製作之噴嘴與市售之噴嘴 (protana nanospray tip) 對於偵測 bradykinin 兩者之比較，如圖十一、圖十二所示，由此兩張圖可知自製之噴嘴所測試之結果相當好。

對於此 PMMA 晶片與自製之噴嘴，由結果來看它可產生穩定訊號 (約 20 分鐘)，除外，在使用及製作上相當方便，而且重複使用不會有交互污染的問題。此模式之晶片可進一步發展 (1)讓晶片上具有酵素 (trypsin) 反應槽，(2)具有去鹽 (desalting) 的裝置，(3)在晶片的前端具有親和性免疫裝置，將這些功能整合在晶片上。

(二) 具有連續進樣之微流體電泳晶片

在微流體電泳晶片的發展歷程中，所有待分析的樣品是以機械或人工方式放至晶片的樣品槽，經由電壓驅動的方式注入和分析，但此種分析方法只能用於對單一樣品做快速連續分析，並不適用於連續流動樣品的偵測，若能在微流體電泳晶片系統中發展適用於連續流體的分析技術，將可與許多流動分析器串接，同時結合晶片式電泳多樣性及高效能的優點，達到線上快速分析的目的。因此，我們設計了具有連續流動式 (high-throughput) 進樣方式之微流體電泳晶片 [16]。

圖十三為連續進樣電泳式晶片。連續進樣電泳式晶片是利用壓力流將樣品帶入至晶片管道交叉處中，並利用施加電壓來造成電壓閥



圖十三 連續進樣晶片之幾何圖形

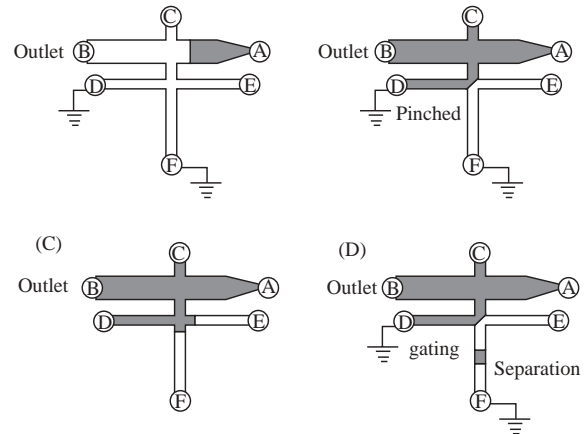
門，進樣時將電壓停住，樣品便進入分離管道中，進樣後再施加電壓使分析物進行分離並且不會受下一時間區段樣品的影響。對於此進樣模式下幫浦流速和抑制電壓的控制相當重要。

除外，晶片微管道的尺寸也與流速和電壓有著密不可分的關係。在晶片的交叉微管道中，當樣品流入至管道交叉處時會依管道大小的比例使分析物進入至微管道中只有微毫升 (nl)，可達到有效的分離，圖十四為電壓操作模式示意圖。

此連續進樣電泳晶片之裝置更可進一步應用於免疫分析之實驗中，以往晶片式電泳在進行免疫分析當中，其進樣方式是將抗原-抗體複合物，利用電動注入的方式將之帶入到管道中進行分析，不過此種注射方法有可能會造成複合物不穩定，因此可利用此裝置之壓力流將抗原 (BSA) - 抗體 (anti-BSA) 複合物帶入至晶片內做免疫分析，可估算出 BSA-(anti-BSA) 的結合常數 $3.3 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ，與文獻值 ($3.5 \pm 0.6 \times 10^7 \text{M}^{-1}$) 相近[17]。

六、結論

除了以上兩種整合型晶片外，我們也將固相萃取 (solid-phase extraction) 以及微透析膜分別整合在電泳晶片上，這可大大的增加濃縮、及時取樣等分析功能，也是朝向微全程分析的重要一大步。如果能達到完全整合型且具微小化全自動分析的功能，未來實驗室晶片在生化分析之生物活性鑑定及藥物的快速篩選、組合化學、臨床醫學上神經傳導物質的即時偵



圖十四 連續進樣晶片電壓操作模式示意圖

測，甚至環境、食品的檢測上，將會是一項重要的利器，對未來檢驗分析實驗室會發生革命性的影響。

參考文獻：

1. A. Manz, N. Graber and H.M. Widmer, *Sens. Actuators*, **B1**, 244 (1990).
2. D.J. Harrison, *Science*, **261**, 895 (1993).
3. A. Manz, *Journal of Chromatography*, **593**, 253 (1992).
4. A.T. Wolley, R.A. Mathies and M.A. Northup, *Analytical Chemistry*, **68**, 4081 (1996).
5. S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, R.J. Warmack and J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry*, **66**, 1107 (1994).
6. A.S. Gary, N.C. Thomas, J.P. Simon and Z. Sheng, *Analytical Chemistry*, **72**, 4058 (2000).
7. T. Emmanuel, E.G. Cass, Anthony, G. Gianfranco, S. Sheila, B. Nicholas and R.D. James, *Analytical Chemistry*, **70**, 5111 (1998).
8. "Flow-through Sampling for Electrophoresis-based Microfluidic Chips Using Hydrodynamic Pumping", 林侑鴻，成功大學化學研究所碩士論文。
9. Y.H. Chen and S.H. Chen, *Electrophoresis*, **21**, 165 (2000).
10. D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller and G.M. Whitesides, *Analytical Chemistry*, **70**, 4974 (1998).

11. S.H. Chen, *LC-GC Magazine Europe*, **13**, 766 (2000).
12. Y.H. Chen, S.H. Chen, W.C. Wang, K.C. Yang and T.T. Chang, *Clinical Chemistry*, **45**, 1938 (1999).
13. K.C. Young, H.M. Lien, C.C. Lin, T.T. Chang, G.B. Lee and S.H. Chen, *Talanta*, **56**, 323 (2002).
14. W.C. Sung, G.B. Lee, C.C. Tzeng and S.H. Chen, *Electrophoresis*, **22**, 1188 (2001).
15. S.H. Chen, W.C. Sung, G.B. Lee, Z.Y. Lin, P.W. Chen and P.C. Liao, *Electrophoresis*, **22**, 3972 (2001).
16. Y.H. Lin, G.B. Lee, G.R. Hung and S.H. Chen, *Journal of Chromatography A*, **937**, 115 (2001).
17. N.H. Chiem and D.J. Harrison, *Electrophoresis*, **3**, 2 (1998).

專利：

1. “Sample Analysis System With Chip-Based Electrophoresis device” Filed on June 15, 2001 with filing number 09/880, 801, 美國 US IPO. 發明人：陳淑慧，李國賓，楊重熙，林佾鴻，宋旺洲，黃冠瑞。
2. “晶片式之連續樣品進樣及導流系統”， Filed on November 21, 2000 with filing number 89/124699, 中華民國 ROC IPO. 發明人李國賓，洪振益，柯秉佐，黃冠瑞，陳淑慧，楊重熙。
3. “具有晶片式電泳裝置之樣品分析系統”， Filed on December 13, 2000 with filing number 89/126609, 中華民國 POC IPO. 發明人：陳淑慧，林佾鴻，宋旺洲，李國賓，黃冠瑞，楊重熙。
4. “C 型肝炎病毒定量”， Filed on October 6, 2000 with filing number 89/122535, 中華民國 ROC IPO. 發明人：張定宗，陳淑慧，楊孔嘉，連香媚，楊美惠，翁玉美。