

微流體技術之生醫應用

由於微機電技術的蓬勃發展，微流體系統 (microfluidic system) 應運而生，在這種尺寸介於微米 (μm) 至毫米 (mm) 之間的微型元件內，運行的不再只是「電子」，還包括「氣」與「水」。科學家非常期待如此複雜有趣的微流體系統能夠應用在尺寸相當、成分類似的生醫系統上，雖然在各類微流體技術的先驅研究中，許多實際的應用困難仍不斷浮現，但此一新技術的導入卻也引發了許多突破傳統的新思維，本文將以「微型聚合 連鎖反應器」為例來討論。

姚南光

一、前言

微流體 (microfluidic) 技術在生醫系統的上應用，以微型全功能生化分析系統 (micro total analysis system, μ -TAS) 最為成熟，其最終目的是希望將一連串環環相扣的生化分析實驗步驟集中佈置在同一塊晶片中，再自動化的循序實現整個生化實驗的操作流程，猶如縮小在晶片內功能齊全的自動化實驗室，這就是所謂的晶片實驗室概念 (lab. on a chip, LOC)。顯然，實現 μ -TAS 的第一個動作是「微小化系統」，我們必須先將檢體量、試劑體積、容器，甚至生化實驗室中各式各樣的工具縮小尺寸，才能循序融入晶片之中。「系統微小化」雖然可大幅降低成本與加快反應速度，不過它只描述了生物微流體技術的一半，實現 μ -TAS 的第二個動作「微小化創意」才是真正吸引人的地方，因為它開拓了一個前所未有的想像空間，令人優遊神往！

姚南光先生為國立臺灣大學電機工程博士，現任工業技術研究院電子工業研究所生物晶片技術部經理。

二、PCR 的二大功能、四種材料、三步驟

聚合 連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 是由 Kary Mullis 於 1985 年所發明，Mullis 並因此獲得諾貝爾獎以及價值連城的專利權。能夠成為專利是因為它是「發明」而非「發現」，換句話說，自然界並不存在這種生化反應。PCR 是人為的，它是 DNA 雙股結構 (double helix) 與鹼基配對 (base pairing) 非常精彩的邏輯應用；它具有兩大功能，需要四種材料以及一再循環的三個步驟。兩大功能是指「搜索」與「複製」，PCR 能在長達數千萬鹼基對 (base pair) 的核酸分子中，精確的搜索出長度約數百 bp 的特定鹼基序列，並將此段序列複製一百萬倍以上！四種材料是指 DNA 模版 (template)、一對引子 (primer, 亦為核酸分子，長度約 25 - 30 bp)、散裝的核苷酸 (dNTP) 與聚合 (polymerase)。三步驟則是指 (1) denature：升溫到 94 °C，藉此打開 DNA 模版的雙股結構；(2) annealing：降溫至 30 - 65 °C，此時一對引子進入雙股 DNA 分子中，分頭搜索與本身互補的鹼基序

列並結合在此位置；(3) extension：升溫至 65 - 75 °C，藉此活化聚合酶並結合在引子的 3' 端，依著模版上的鹼基序列抓取周遭對應的 dNTP 連成新的核酸分子鏈；兩個聚合酶以面對面的方向同時成長核酸分子鏈，直到雙雙走完模版為止。發明重點在於兩引子本身亦為新生核酸分子鏈的一部份，而且就位在此新生雙股分子對角的兩端，若再次以此核酸分子鏈為模版，重複 denature、annealing，到了第二次 extension 時，對向走過來的聚合酶就會自動停在引子模版的最後一個核苷酸上，如圖 1 所示。

不斷循環此三步驟，即形成所謂的聚合酶連鎖反應。理論上 n 個循環 (cycle) 應可得到 2^{n-2} 個複製物 (amplicons)，例如 cycle 30 可得 268,435,456 個雙股 amplicons。可惜事實上並非如此，反應終了能夠得到 $10^5 - 10^6$ 複製物算是不錯的了。科學家常用一個簡單的公式來估算產率： $yield = (1 + e)^n$ ， e 是指效率 (efficiency)，通常超過 cycle 20 以後效果就開始大打折扣了 (e 大約為 0.8)。Mullis 稱這種情形為 anemic mode，意思就是「原料不足」、「工作沒勁」了。

三、工程師觀點 快速能量傳遞

Anemic mode 的主要原因有二。(1) primer mismatch：引子黏錯了地方，卻照樣依循 PCR 機制產出大量的 nontarget amplicons，特別是引子黏錯後距離變短、進而使得 amplicons 長度也變短的這種狀況特別嚴重。因為引子黏錯後 amplicons 若變長，在下一個循環時 PCR 機制會自動將它修正回來；而變短的 amplicons 顯然會比正確的 amplicons 更容易完成連鎖反應，這種稱為 ugly little fragment 或 primer dimer 的干擾產物會競爭性的消耗掉大量的 dNTP 和 polymerase，結果就造成了「原料不足」。(2) 聚合酶受損：既然自然界並不存在 PCR 這種反應，我們不能指望能夠找到一種 PCR 專用的聚合酶，科學家能夠從溫泉細菌 *Thermus aquaticus* 尋獲 Taq polymerase 已算是萬幸，但即便如此，一次又一次高達 94 °C 的 denature 溫度仍會一次又一次削弱 Taq polymerase

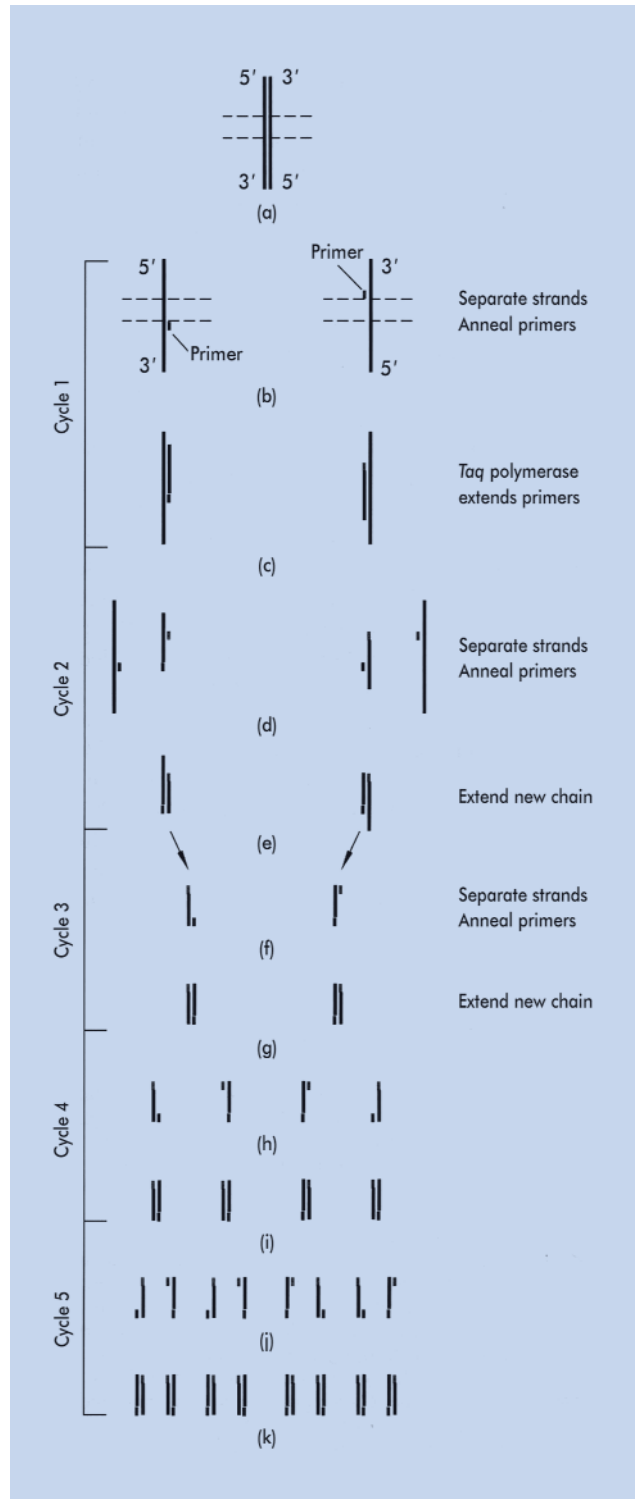


圖 1. 聚合酶連鎖反應 (摘自參考文獻⁽⁴⁾)，若只看軸心連鎖系列，暫不管前兩個循環之半成品衍生的旁支連鎖系列，從 cycle 3 開始就可產出二個標準長度的複製物 (amplicon)，而其內容正是兩個引子在模版上所「夾」出的鹼基序列！

的活性 (cycling half life: 80 - 160 cycles), 這就是聚合的「工作沒勁」。

不同於生化學家會從引子的設計、調整 G/C ratio、Mg²⁺ 濃度等因素入手, 工程師會從另兩個方向思考。第一, 製造犀利的溫度折返點: 為了避免持續的 denature 高溫傷害 Taq polymerase, 以及 annealing 降溫過低造成引子的 mismatch, 我們必須試圖精確的到達此二高低溫後立刻折返 (已有研究報告: < 1 s 的 denature 與 annealing 具有不錯的效果⁽³⁾)。第二, 設法加快升降溫速率: 太慢的降溫也會傷害 Taq polymerase, 而太慢的升溫也容易使引子黏錯地方, 故快速升降溫也是必要的。此外, 由於 Taq polymerase 的工作效率是固定的 (95 nuc/s), 製造多長的 amplicon 就需要多長的 extension time。因此, 恐怕只有「加速升降溫速率」這部份才有機會縮短 PCR 的總時間, 這正是 PCR chip 的重要賣點。綜言之, 就是要想辦法提供「快速的能量傳遞」, 只是設計這種機構恐怕不太容易, 因為這兩個溫控策略其實是相衝突的。試想跑得越快的車子勢必越難在定點煞車且立刻回頭, 不過正因如此, 工程師才有事可做。

四、傳統作法 GeneAmp® PCR 9700

目前市場上較先進的機種是 Perkin-Elmer 推出的 GeneAmp® PCR 9700, 搭配該公司提供的試劑套件, 升降溫速率號稱可達到 5 °C/s。此系統使用之 reaction tubes 為 polyethylene 材質、attached caps (oil-free)、thin-walled 設計, 運作時緊密插入加熱金屬塊預置的井中, 藉此增加熱傳導的面積與效率。其 volume to surface ratio 為 0.66 μL/mm², 意思是每 1 mm² 熱傳導面積必須負擔 0.66 μL 體積的 PCR 混合試劑。

這是一種接觸式加熱法, 就總體積 100 - 500 μL PCR mixture, 同時又要考量機電系統成本的情況下, 此法已算是相當經濟而有效率的。然而其先天的缺點在於 total thermal mass 會變得很大, 系統必須先加熱金屬塊、再加熱試管壁、然後才能加熱到 PCR mixture, 系統因而很難更為敏捷的變換溫度。

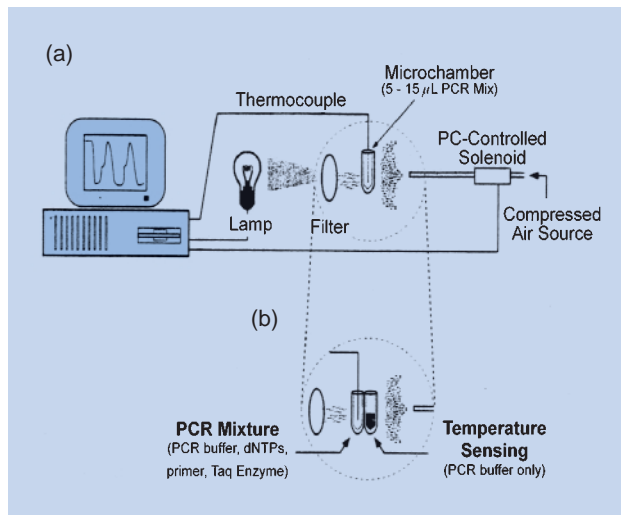


圖 2. 紅外線熱循環反應器 (摘自參考文獻⁽²⁾), 28 μL PCR mixture 置於微小化的方形玻璃晶片 (chip-like glass chamber), 紅外光源是傳統的鎢絲燈, 經過光學透鏡組直接聚焦在 PCR mixture 上, 升溫速率可達 10 °C/s; 試管背後吹送高速壓縮空氣藉以冷卻, 降溫速率為 20 °C/s。

五、微小化系統 紅外線熱循環反應器

1998 年美國 Mayo 研究中心與 Pittsburgh 大學的研究群共同發表了一篇論文, 討論使用紅外光熱輻射成就 PCR 循環溫控的可行性 (圖 2)。這是一個很好的例子, 說明「微小化系統」對於提升反應效率非常有效。

比起現行許多利用微加工製程 (micromachining)、內建微加熱器的矽—玻璃 PCR 晶片, 此研究雖不十分顯眼, 卻觸及了一些問題的核心。(1) 鎢絲燈開啟後就不再調整功率 (power), 變溫的任務交給置於燈與晶片間的透鏡組, 透鏡的變換立刻改變了紅外光的聚焦程度, 瞬間調整了系統對反應試劑的能量傳輸效率, 全部過程僅是一個機械動作, 變換前後系統暫態造成的時間延遲 (system time delay) 幾乎可忽略。(2) 紅外光線直接聚焦在反應試劑上, 加熱過程中能量甚少消耗在周遭裝置甚至玻璃晶片本身, total thermal mass 因此能夠減小到最低限度, 促使系統的升降溫動作能夠迅速反應在試劑溫度上。(3) 由於整體結構變小時體積以三次

元縮小，而面積卻以二次元縮小，故此系統微小化的方形玻璃晶片 ($500\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm o.d.}$) 大幅降低了 volume to surface ratio 為 $0.19\ \mu\text{L}/\text{mm}^2$ ，大約僅為傳統 PE reaction tube 的 1/4。此時利用高速壓縮空氣直接吹向晶片背面降溫時，達到 $20\ ^\circ\text{C}/\text{s}$ 的降溫速率自然輕而易舉。

整體而言，這是一種整合「紅外線加熱」、「光學」及「氣冷」效應之非接觸式升降溫方法，任一技術本身並無任何前瞻創新之處，假設試劑總體積仍為傳統之數百 μL - mL，就算這些裝置完成整合，要想達到快速 PCR 的變溫要求，恐怕也必須使用相當高功率而昂貴的組件，那麼整件事情似乎就不合乎經濟效益了。然而當試劑與承載晶片微小化以後，使用低功率、便宜的光學與氣控組件卻足以運行自如。該研究報告顯示，系統可完成非常精彩的溫程控制 $94\ ^\circ\text{C}-2\text{s} / 54\ ^\circ\text{C}-2\text{s} / 72\ ^\circ\text{C}-4\text{s}$ ，跑完 30 個循環只需要 12 分鐘 (大約比傳統方法動輒數小時的反應時間快了十倍)。

六、微小化創意 連續流 PCR 晶片

白話解釋「微小化創意」是說：東西變小後您怎麼想？如果你有一大桶水需要不斷的改變溫度，你會傻呼呼的把那桶水在不同溫度的電爐之間搬來

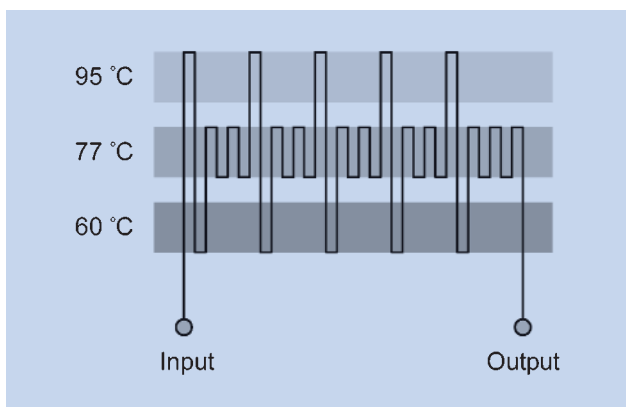


圖 3. 連續流 PCR 晶片 (摘自參考文獻⁽¹⁾)，首先利用微加工方法在玻璃晶片上蝕刻一條截面積 $40\ \mu\text{m} \times 90\ \mu\text{m}$ ，但卻長達 2.2 公尺的微細管道，這條委婉曲折的微管道經過特別的佈局，以 4:9 的長度比散佈在晶片上的三個區域。

搬去呢？還是直接調整電爐的功率即可呢？答案顯然是後者。可是如果加熱的不是一桶水，而是一杯水，甚至只有一滴水呢？英國皇家科學院 (Imperial College of Science, UK) Andreas Manz 教授所領導的研究群在 1998 年 Science 期刊發表了一塊可謂是「微小化創意」經典之作的 PCR 晶片 (圖 3、4)。

第一個關鍵在於「微小化」的管道結構提供了無與倫比的 volume to surface ratio: $0.04\ \mu\text{L}/\text{mm}^2$ ，大約僅為傳統 PE reaction tube 的 1/17，因此當試劑流經任一銅塊時，巨大的能量交換面積能夠促使反應試劑立即與周遭的溫度一致。第二個關鍵在於 denature、annealing、extension 三種溫度的持續「時間」，已利用微加工製程所精確定義的「空間」加以轉換，亦即 4:4:9 的管道長度比。

系統變小後先使得反應流體具備了與環境瞬間「入境隨俗」的共溫能力，細水長流的微管線佈局又使得晶片上的小空間足以紀錄溫程變化的時間參數，在這些背景條件下，將一滴水在不同溫度的電爐之間搬來搬去又有何不可。剩下來的問題就是反應試劑在微管道中的流速到底可加到多快了，很顯然的，流速越快，溫度折返點越犀利，升降溫速率

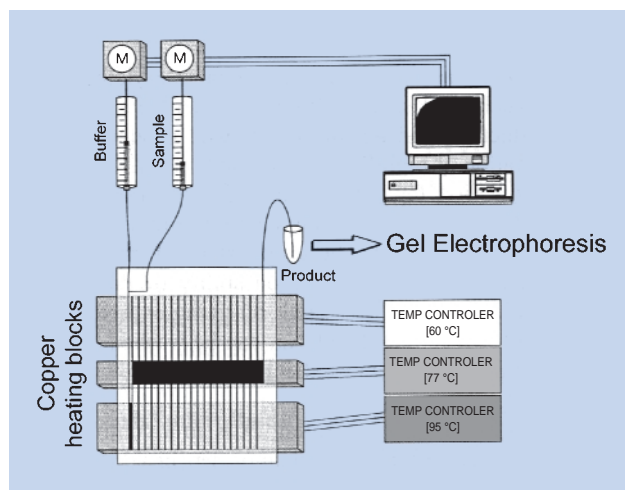


圖 4. 連續流 PCR 晶片全系統 (摘自參考文獻⁽¹⁾)，將玻璃晶片置於間隔排列、溫度已各自穩定在 $60\ ^\circ\text{C}$ 、 $77\ ^\circ\text{C}$ 、 $95\ ^\circ\text{C}$ 的三塊銅塊上，接著利用幫浦 (pump) 將 PCR mixture 源源不斷的注入微管道中，形成連續的反應試劑流 (continuous-flow)。

就越快。該研究報告指出，若以 72.9 nL/s 的流速運作，完成 20 個循環僅需 90 秒 (大約比傳統方法的反應時間快了一百倍)！

當然、世間沒有十全十美的設計，對於這麼快的系統，PCR amplicons 的產量如何呢？論文中明白表示：流速 5.8 nL/s、18.8 min 完成 20 個循環，產量可達傳統方法的 80%，不過加快流速後產量開始明顯下滑，90 秒的高速運作下，PCR amplicons 其實是很微量的。除此之外，求好心切的工程師腦海裡還想著另一個邏輯問題：從 denature 95 °C 到 annealing 60 °C 其實是一個降溫過程，當已經是 95 °C 的高溫反應試劑流入 60 °C 的銅塊區時，究竟此時 60 °C 的銅塊加熱器是要開還是關呢？儘管這塊晶片的設計已相當傑出，但顯然仍有許多改善空間，工程師們還是有事可做。

七、再接再勵

Mullis 剛發明 PCR 時用的聚合 是 *Escherichia coli* DNA polymerase，這種不耐高溫的聚合 每經過一次 94 °C 的 denature 就損失了大半，因此當時每經過一個循環就需要再加一次材料，真是可憐了當時那些「顧」實驗的研究生，一直到能耐高溫的

Taq polymerase 被純化出來，世人才真正有了「連鎖反應」的感覺。今天，生物晶片的工程師對此事卻有更積極的想法：PCR 前幾個循環與後幾個循環對於 *Taq* polymerase 的需求量顯然很不一樣，軸心連鎖系列中，cycle 3 只需要 2 個 *Taq* polymerase，而 cycle 20 卻需要 262,144 個 *Taq* polymerase，沒有道理一開始就投入最後才需要的巨量 *Taq* polymerase，卻令其全體白白去承擔每一次循環的高溫攻擊。如果每經過一個循環就加一次材料已經不像以前那麼麻煩了，我們何不逐次導入新鮮 *Taq* polymerase 參加反應，或許因此有機會將 PCR 的性能再次往前推進。利用目前漸趨成熟的微流體技術，此構想並非遙不可及，相信這種性能更強的 PCR 晶片很快的就能問世！

參考文獻

1. M. U. Kopp, A. J. de Mello, and A. Manz, *Science*, **280**, 1046 (1998).
2. R. P. Oda, M. A. Strausbauch, A. F. R. Huhmer, N. Borson, S. R. Jurrens, J. Craighead, P. J. Wettstein, B. Eckloff, B. Kline, and J. P. Landers, *Analytical Chemistry*, **70** (20), 4361 (1998).
3. R. Rasmussen, G. Reed, *The Rapid Cyclist*, **1** (1), 1 (1992).
4. J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller, *Recombinant DNA*, New York: Scientific American Book (1997).