

# 微型化螢光檢測系統

## Miniaturized Fluorescence Detection System

謝哲偉、翁俊仁、林明瑜

Jerwei Hsieh, Chun-Jen Weng, Ming-Yu Lin

欲達成居家使用之目標、擴充生醫晶片的普適性，將檢測系統微型化是一值得研究之方向，然文獻所提方法包羅甚廣，面臨的問題亦各異。本文據此針對檢測系統之微型化設計作一介紹，文中將以生醫螢光檢測為主題，由免疫螢光檢測法之介紹開始，引入螢光檢測系統之模組設計與選用，並於文末將文獻中之系統整合方法作一分類整理，期使讀者了解微型化螢光檢測系統之架構與設計考量。

Miniaturization of fluorescence detection system can possess more advantages than the traditional instruments such as portability and reduced cost, and has attracted many relative researches recently. In the article, fluorescence immunoassay (FIA) is described first to explain how the useful information can be extracted through the fluorescence detection. The module design considerations for fluorescence detection system are then discussed. Based on the knowledge, this article divided the system integration methods from literatures into two categories. Several examples under such classification are explained and compared, in order to lead reader into better understanding on the miniaturized fluorescence detection system.

### 一、生醫晶片與檢測系統

近年來，生醫晶片之研究隨著微機電系統技術發展而大行其道，其能具體而微地讓多種生化反應過程縮至一微小晶片上，使所需樣品量大幅減少，節省了昂貴試劑的實驗成本。另外，微型化使反應物之表面積一體積比 (surface-to-volume ratio) 大幅增加，增快了反應速度而縮短檢測時間，成本亦因試片之批量製造而更具優勢。因此，包括陣列式生醫晶片、微流體生醫晶片或微全分析系統 (micro total analysis system,  $\mu$ TAS) 等各形式之晶片皆逐步

地發展出來，使得人們不論在生醫檢測速度之要求或全方位居家護理之夢想等能夠一步步地實現。然而，生醫晶片之使用多需經由特定之檢測系統加以讀取，該類儀器多具有昂貴、體型龐大等問題，如此繁複的設備除阻礙可攜式檢測系統之實現外，亦將大幅增加檢測成本。因此，研究人員開始研究將檢測系統微型化之可行性，使其能維持甚至超越原有檢測系統性能，並在與可拋式生醫晶片搭配後，在成本、可攜之功能或是使用方便性等都能更具優勢。

生醫檢測系統之種類很多，例如電化學法、折

射率量測法、螢光檢測法、光譜檢測法、質譜分析等等，其中以螢光檢測法為較具微型化潛力之一種。其通常是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物質，並藉由讀取該螢光強度以獲知待測物位置或濃度，故其不論在靈敏度(sensitivity)或選擇性(selectivity)方面皆能有較佳性能<sup>(1-3)</sup>。雖然檢測晶片在搭配商用螢光顯微鏡時，其偵測下限濃度可達數 pM 的等級，然檢測晶片仍需遷就一些昂貴且需固定不動的儀器設備方能使用，而限制了整個系統微型化程度。為使整個生醫檢測系統充分獲得微型化的好處，近年來已有不少文獻發表了螢光檢測系統之微型化研究。本文將針對相關背景作一介紹，包括生醫螢光檢測之優點及應用方法、微型化螢光檢測系統之模組設計與選用考量等，並於最後藉由回顧文獻中之系統架構及整合方法，說明微型化螢光檢測系統之設計與挑戰。

## 二、生醫系統之螢光檢測法

螢光的產生，是由短波長之激發光(excitation beam)射向螢光分子(fluorophores)，分子吸收此波長之能量後產生能階躍遷，之後再藉由散發出更長波長的放射光(emission beam)而使分子回到穩定態，此放射光即所謂的螢光。一般而言，螢光分子在可見光的範疇內皆存在有其最大吸收波長 $\lambda_{a,max}$

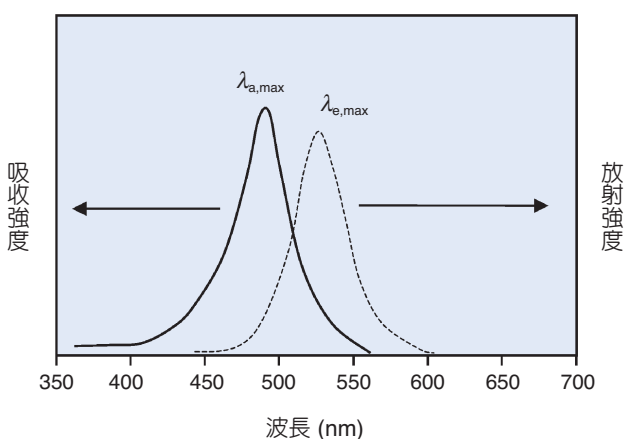


圖 1. 典型螢光分子 (FITC) 之吸收波長與放射波長譜線圖。

與最大放射波長 $\lambda_{e,max}$ ，如圖 1 所示；若於檢測系統設計時將激發光與放射光中心波長分別定在 $\lambda_{a,max}$ 與 $\lambda_{e,max}$ 附近，可得到最高的激發效率與接收效率。在醫學檢測上，由於大部分待測物之存在與否，甚至濃度多寡往往無法直接測量，因此若能將螢光分子標定於待測物上，並藉由觀察與測量標定後的待測物所發出的光強度，便能獲知待測物定性及定量上之濃度。此外，同時測量不同待測物也成為研究人員努力的目標之一。因此，具有即時、高敏感度的螢光檢測法便廣泛應用在生物醫學研究上，其檢測對象甚廣，包含了蛋白質、DNA、離子濃度等。為使讀者對螢光檢測之應用有較清楚的認識，下文將先針對血清免疫分析法中之螢光免疫分析法(fluorescence immunoassay, FIA)及其作法做一概略性介紹。

### 1. 螢光免疫分析法

血清免疫分析法乃是利用抗原與抗體反應來定量蛋白質，其優點在於抗原與抗體的專一性辨識與鍵結，所以待測物(抗原或是抗體)不需先經由蛋白質純化，而能在混和物中(如全血、血清、血漿)直接偵測。血清免疫分析法在臨床研究上最常用的是螢光免疫分析法(FIA)、冷光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay, CLA)、酵素免疫分析法(enzyme immunoassay, EIA)、及放射線免疫分析法(radial immunoassay, RIA)<sup>(4-6)</sup>，其中以螢光免疫分析法、酵素免疫分析法及冷光免疫分析法較常在臨床檢驗上使用<sup>(6)</sup>。但是若討論到微型化且同時檢測不同待測物的發展性而言，則又以螢光免疫分析法發展性較大。因為酵素免疫分析法與冷光免疫分析法無法在同一反應槽中進行不同的化學反應來產生呈色或冷光，而螢光免疫分析則可在同一個反應槽中藉由激發不同的螢光染料，經過分光系統同時測量不同染料釋放出的波長。表 1 提供螢光免疫分析法、酵素免疫分析法、放射線免疫分析法及冷光免疫分析法應用性及優缺點的比較。

### 2. 螢光標定方法

實驗室常見的螢光免疫檢測方法依分離方式的不同，可分為液相免疫分析與固相免疫分析法<sup>(4,6)</sup>。

表 1. 血清免疫分析的比較。

檢測法	放射線免疫分析法 (RIA)	冷光免疫分析法 (CLA)	酵素免疫分析法 (EIA) (呈色式)	螢光免疫分析法 (FIA)
標定物	$^3\text{H}$ , $^{125}\text{I}$	Acridinium esters, DIG, 或酵素的冷光反應試劑	Alkaline phosphatase (AP); Horseradish peroxidase (HRP)	FITC, Cy3, Cy5, Rho- damine B, R-phycoethrin (R-PE), APC
檢測方式	輻射能	冷光	呈色	螢光
靈敏度	1 pg/mL	1 pg/mL	1 – 10 ng /mL	1 ng/mL
優點	靈敏度高	靈敏度高	使用普遍，可反覆作用， 便宜，定性方面只需肉眼 觀測，普遍性大	快速，臨床廣為運用， 可同時檢測不同待測 物，反覆多重刺激
缺點	對操作人員有害，需有專 門人員操作，同位素不穩 定，昂貴，廢物處理	昂貴、訊號物質不穩定	需額外時間使酵素和受質 反應呈色，分子量大，結 構易受干擾，影響結果	需要雷射光源
使用儀器	液態閃爍計數器、加瑪計 數器	冷光光度計，攝影底片 數器	光度計	螢光光度計

毛細管電泳、流式細胞計數器等即為典型之液相免疫分析法，其是藉由不同物質間如電性、質量等之差異性，利用分離機制將待測物與其他物質分離，進而檢測其螢光量。相對而言，固相免疫分析法則運用了固定 (immobilize) 的技術，如圖 2 所示，先在如微量滴定盤或微米磁珠等之特定表面上固定一抗體，並在進行表面阻絕 (blocking) 步驟後，加入待測物並使該抗體與待測抗原進行專一性鍵結 (specific binding)，之後再加入螢光標定抗體 (fluorescence labeled antibody) 與待測抗原進行另一次專一性鍵結，以產生免疫複合體 (immunocomplex)

後，並利用清洗步驟將免疫複合體之外未與抗原鍵結之多餘螢光抗體移除掉，最後測量免疫複合體之螢光強度便可獲知待測抗原之存在量。圖 2 所示之方法亦稱為三明治分析法<sup>(5)</sup>。

由前文可知，螢光標定抗體的螢光強度與敏感度有關，而該強度又可因不同的螢光標定方法而可有不同之效果。依螢光標定方式之不同，血清免疫檢測方法又可分为直接法、間接法與競爭法<sup>(5)</sup>。直接法如圖 3(a) 所示，是將螢光物質直接標定於與抗原具專一性對應之抗體上，產生所謂螢光抗體，量測的是單純免疫複合體之螢光強度。間接法則如

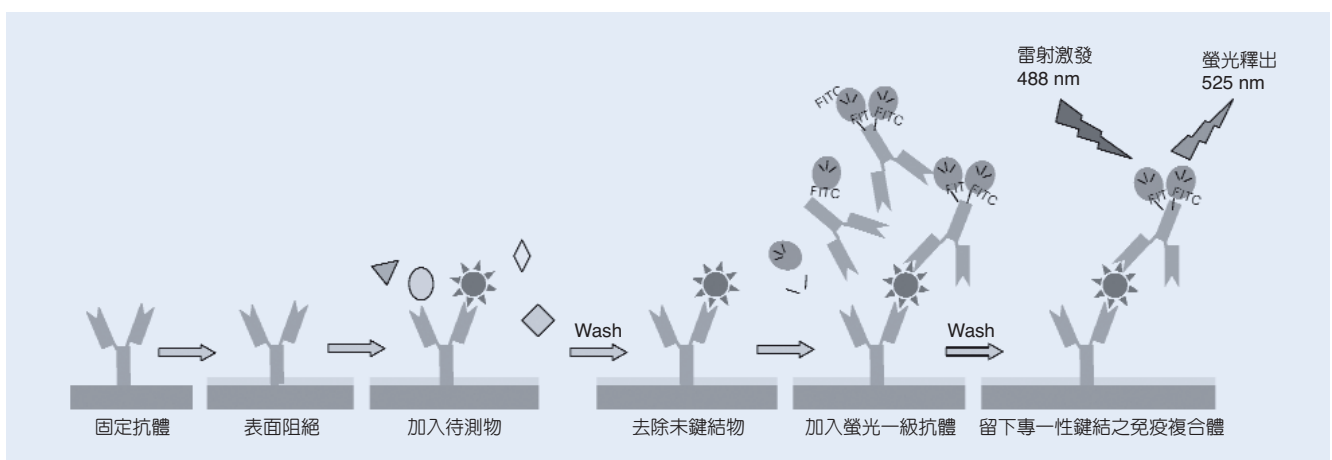


圖 2. 固相免疫分析法之實驗方法示意圖。

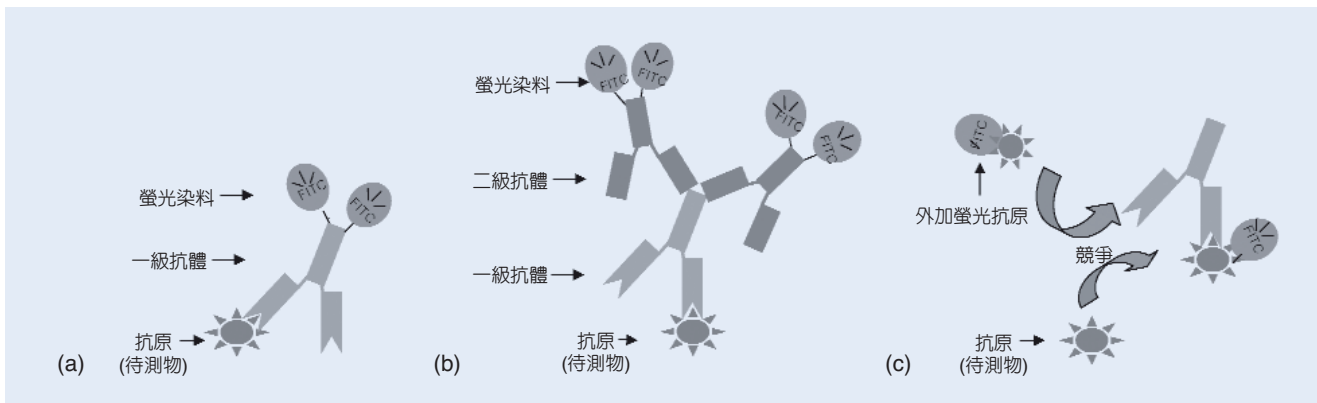


圖 3. 螢光免疫檢測之三種不同螢光標定方式：(a) 直接法，(b) 間接法，(c) 競爭法。

圖 3(b) 所示，是先將一級抗體與抗原作專一性結合，再將多個螢光二級抗體 (抗體的抗體) 與一級抗體作另一次專一性結合，所測量到的便是螢光二級抗體與免疫複合體結合之螢光強度。競爭法常用於待測抗原多於抗體時，如圖 3(c) 所示，其外加了會搶抗體的螢光抗原，藉由反推和抗體結合的螢光強度而測得待測物濃度。因此就直接法及間接法而言，待測物 (抗原) 濃度越強，其螢光訊號越強；而競爭法則是待測物濃度越強，螢光標定的競爭抗原和抗體鍵結的螢光訊號越弱，另外其專一性亦較佳。由於直接法與競爭法不需應用到二級抗體，成本便宜，而且只需經過一次的免疫反應 (抗原與一級抗體)，故檢測時間快，但是訊號不如間接法強。間接法優點則在於外加二級抗體能放大螢光強度，因此可加大訊號及背景的差異量，且專一度較高。同時，間接法所使用之二級抗體 (常用為 polyclonal antibodies) 應用性廣，且可廣泛應用於不同的一級抗體上。因此，若論及實驗設計的普遍性與靈敏度，則以間接法使用較廣泛。

### 三、螢光檢測系統設計

由前節可知，檢測系統目的除了偵測螢光的有無之外，更需要量化螢光的強度，方能知道待測物定量上的濃度大小。螢光檢測系統整體的解析能力，主要便是以濃度之偵測下限 (limit of detection, LOD) 作為一評量標準，而較嚴謹的 LOD 表示方法，則須將量測時之訊雜比 (signal-to-noise ratio,

SNR) 一併提出說明。訊雜比之計算如下式所示<sup>(3)</sup>：

$$SNR = \frac{(S_F - S_B)}{\sigma_F^2 + \sigma_B^2}$$

其中  $S_F$  與  $S_B$  分別為螢光訊號與背景雜訊之平均值，而  $\sigma_F$  與  $\sigma_B$  則分別為螢光訊號與背景雜訊之變異量；文獻 (3) 中定義偵測下限 LOD 為 SNR 為 9 時所偵測到的濃度。由於光感測器對不同來源的光並無選擇性，若螢光強度微弱，亦即待測物濃度很低時，極容易被其他雜光所掩蓋掉造成誤判。因此欲獲得可靠的量測值，需將除待測螢光外的所有雜訊光，如未被吸收之激發光以及其遇介面所散射之雜光等，作有效隔離。因此，檢測系統設計時便包含了兩個主要課題：其一為找出雜訊光產生來源，再利用該雜光與待測螢光之差異性將之分離或衰減掉；其二為改善螢光之收光機制，使無方向性之螢光能有效地被集中到光感測區域內。

為對螢光檢測系統之組成有較具體之輪廓，可觀察如圖 4 之典型螢光顯微鏡的光學架構圖，其可概分為光源模組、光耦合模組、微流體晶片、收光模組以及光訊號讀取模組等部分。圖中使用汞燈作為激發光源，並使之通過一藍光波段之帶通濾波片而產生藍光，該藍光經過一雙色分光器 (chromatic beam splitter) 反射後，經由物鏡入射於樣本上。樣本中被激發之綠色螢光則先經過物鏡收集後，再依序穿透雙色分光器、綠光濾波片以及目鏡而到達光感測器。在雜光處理的部分，由於此系統之雜光來源主要為未被吸收之藍光，其與待測螢光之差異性

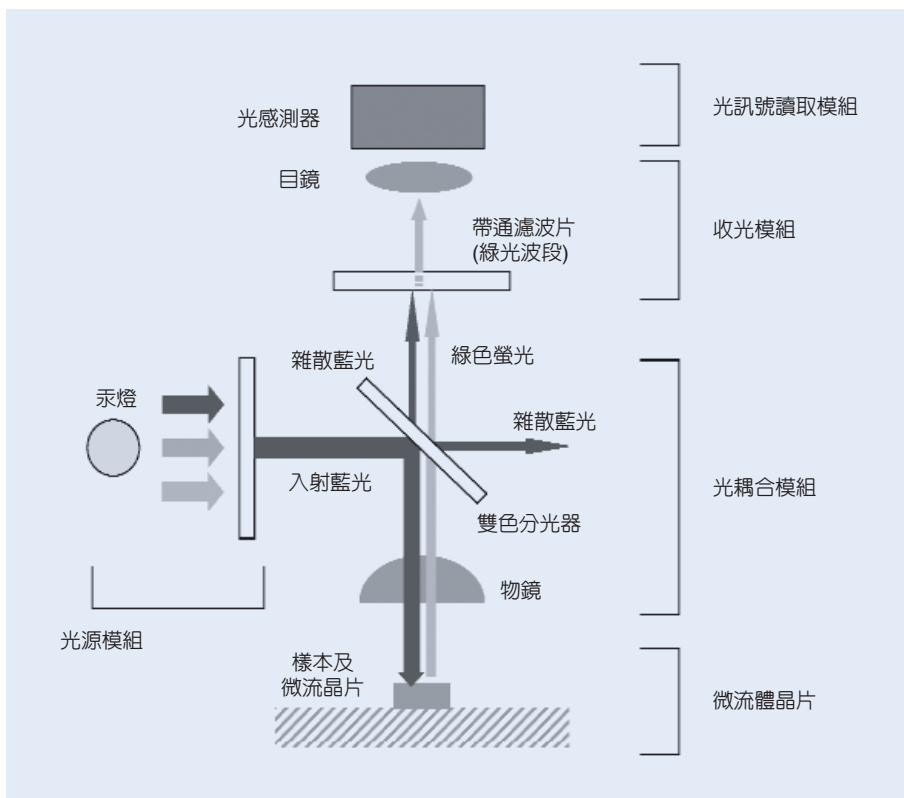


圖 4. 典型螢光顯微鏡光學架構圖。

則在於波長的不同，因此該系統在收光時便利用到空間分離 (spatial separation) 機制，亦即利用到雙色分光器及濾波片之波長選擇性，以重複將藍光隔離並同時提升 SNR。分離機制尚有很多種，例如利用入射激發光與螢光之方向性差異所衍生之幾何分離 (geometric separation) 機制、位置差異所衍生之位置分離機制，以及激發光與螢光偵測到的時間不同衍生之時域分離機制等。這些分離原則在檢測系統微型化過程格外重要，下文將另有實例說明，以下先針對各模組於微型化時之設計考量作一介紹。

### 1. 光源模組的選擇

由於當激發光之波長與螢光分子之最大吸收波長相同時，產生螢光的效率最高，所以光源模組的選擇需與螢光分子的特性一併考量。表 2 所列為常用來作標定 (labeling) 的螢光分子及其適合之激發光與放射螢光波長<sup>(7)</sup>。由表中可知，波長 488 nm 之藍光以及 600–650 nm 左右之紅光為最常用之光源，在臨床使用上又以前者可適用的螢光分子較多，包括 FITC (fluorescein)、R-PE 及 Cy3 等，後

者中則以 Cy5 較為常用。雖然由表中觀察常使用之光源波長只有兩種，然光源形式的選擇仍非常多樣，本文將之整理如表 3 所示，其包含有雷射光源與非雷射光源兩種。

以雷射光作激發源之方法稱為雷射誘導螢光 (laser induced fluorescence, LIF)。由於雷射具有能量集中、光束集中之特性，除了能提高解析能力外，並較容易利用光束方向性來分離激發光和放射光 (幾何分離機制)。雷射光源依照增益介質 (laser gain medium) 的不同又可分為半導體雷射 (semiconductor laser)、固態雷射 (solid state laser)、氣體雷射等。

表 2. 常用螢光分子之激發與放射波長。

螢光物質	激發光波長 (nm)	放射螢光波長 (nm)
FITC	488	525
Texas Red	575–625	615
R-PE	488	575
APC	600–650	660
Cy3	488	565
Cy5	625–650	670

表 3. 常見用來做激發螢光的可見光光源。

分類	種類	基本特性 (波長／典型功率)
雷射光源	半導體雷射	藍紫光 405 nm / 20 mW, 440 nm / 1 mW 紅光波段 635 nm — 690 nm / 10 mW
	氣體雷射	氦鎘雷射 (HeCd) : 325 nm / 20 mW, 442 nm / 50 mW 氬雷射 (Ar) : 457 nm / 10 mW, 472 nm / 10 mW, 488 nm / 30 mW, 496 nm / 10 mW, 514 nm / 25 mW, 520 nm / 10 mW 氦氖雷射 (HeNe) : 543.5 nm / 1mW, 594 nm / 1mW, 612 nm / 1 mW, 632.8 nm / 10 mW 氬雷射 (Kr) : 647 nm / 20 mW, 676 nm / 10 mW
	固態雷射	紫光雷射 : 430 nm / 10 mW 藍光雷射 : 457 nm / 100 mW, 473 nm / 10 mW 綠光雷射 : 532 nm / 100 mW
非雷射光源	電弧放電式燈泡	氙燈 : 200—2500 nm / 150 W 鎢絲燈 : 350—2500 nm / 150 W 汞燈 : 253—850 nm / 150 W
	發光二極體	發光材料 AlInGaP, AlInGaN 等 典型功率約為 ~2 mW 涵蓋所有可見光譜 (375 nm—750 nm)

氣體雷射具有很好的同調性 (coherence) 及具有多種發光譜線，因此經常被用來當作雷射誘導螢光的激發光源，尤其以具有多種波長選擇性的氬雷射 (argon laser) 更是廣為一般螢光檢測所使用。但氣體雷射由於散熱及氣體管線等考量，使其體積無法縮小而不適用於可攜式的生醫系統上。另外值得注意的是，氣體雷射之製造瑕疵有可能使輸出光中混入一些自發性輻射 (spontaneous emission) 造成之雜光，故其光源模組中常需加入一帶通濾波片 (band-pass filter) 將之濾除。相同的現象在固態雷射也會發生，由於固態雷射一般皆使用倍頻 (second harmonic generation, SHG) 的方式產生倍頻雷射光，因此必須先以濾波片將殘餘的基頻光濾除。固態雷射、半導體雷射較適合作為微小化之光源，然半導體雷射目前仍只限於紅光以上波段，固態雷射則較無合適的激發波長，且成本較高。

非雷射誘導螢光之常用光源有發光二極體 (LED)、電弧放電式燈泡 (arc lamp) 等。發光二極體發光的譜線幾乎可以涵蓋所有可見光，且其單價極為低廉，非常適用於可拋棄式或可攜式的系統上，惟光譜密度 (optical spectrum density) 不足以致發光功率較弱。電弧放電式燈泡依填充氣體種類不同會發出不同波長的光，一般所發出的譜線大都屬

於多譜線 (multi-line) 或是連續譜線 (continued-wave)，在可見光波段常見的有氙燈 (xenon lamp)、汞燈 (mercury lamp) 及鎢絲燈 (tungsten lamp) 等。由於非雷射誘導螢光發光譜線很寬，易與放射出的螢光訊號產生干擾，故使用上亦必須搭配帶通濾波片 (band-pass filter) 過濾不必要的雜光。以上兩類光源中，發光二極體頗適合作為微型化螢光檢測系統之光源，惟仍需克服耦光及組裝上之問題。

## 2. 光耦合模組設計

由於微流道之檢測面常小至數十微米見方以內，造成光源耦光時之尺寸不匹配與對準困難。光耦合模組設計目標即在於將光源有效導引到檢測面內，常見之做法有光源近接、透鏡耦光、光纖耦光等三種方式，如圖 5 所示。光源近接係將半導體雷射光源直接貼於檢測區上方或下方<sup>(8)</sup>，可以縮短光傳播距離，並減少系統體積。然除製程整合相容性的問題須克服外，目前所用面射型半導體雷射發光的範圍侷限於紅光及紅外光波段，不適合用於激發綠光或藍光波段的螢光染劑。利用透鏡耦光將光直接聚焦到平台中是一般顯微鏡系統之做法，使用微透鏡 (micro-lens) 將光聚焦於檢測平台近來亦見於文獻中<sup>(3,9)</sup>，然最大問題仍在製造與對準上，微加工

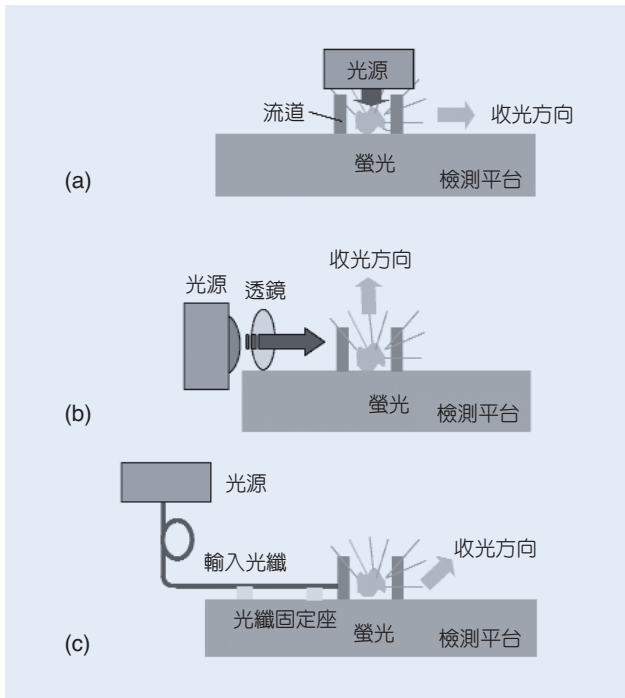


圖 5. 三種光耦合模組設計方式：(a) 光源近接，(b) 透鏡耦光，(c) 光纖耦光。

時將微透鏡與微流道作積體化製造可改善此問題。利用光纖耦光亦常見於文獻中<sup>(10-12)</sup>，特別是在光源體積較大的情況下，此乃因光纖蕊心 (core) 尺寸與檢測區能夠匹配，因此可用以將光源導入檢測平台內作為激發光源。雷射光源因具有很好的同調性，使與光纖的耦光效率很高，故適合較高功率 (一般功率高於 1 mW) 激發的螢光檢測應用上;而其他光源 (如 LED 等) 則多搭配多模光纖 (multi-mode fiber)，適合較低功率 (一般低於 1 mW) 之應用範圍。光纖耦光較大的問題在於光纖的定位對準以及光束發散控制，可分別利用內建光纖導軌及近接微透鏡等設計來處理<sup>(10-11)</sup>。

### 3. 微流體晶片設計製作

在晶片上製造微流管道 (micro fluidic channel) 的微加工方式有很多種，選用時有三個基本考量：其一為須滿足光學需求，例如管壁需透光性良好，特別是在激發光與螢光波段，因此材料除了須穿透率高之外，結構粗糙度、側壁垂直度等亦須達到一定要求，以儘量避免光在傳遞過程之散射損失；其

二為配合流體操作之需求，例如希望於無動力源下驅動流體所需之側壁親疏水特性，或是為滿足電滲流 (electro-osmotic flow) 之條件所需之側壁帶電性要求等；其三則為生物相容性之需求，例如材料不致使待測分子吸附於其中、不會產生免疫反應，以及表面活性不會改變蛋白質的構形等等。

目前常見的流道製作依結構材料來區分主要有三種，即玻璃流道、SU-8 流道以及 PDMS (poly(dimethylsiloxane)) 流道。玻璃流道主要是利用氫氟酸對玻璃進行等向性蝕刻，使流道呈半圓形截面，再配合晶片接合 (wafer bonding) 製程作出封閉流道。由於此法在蝕刻遮罩的選擇、蝕刻時間以及粗糙度控制上皆有特別要求，基本上屬於成本較高之製作方法。SU-8 流道則是直接對 SU-8 負型光阻進行曝光顯影的步驟，由於 SU-8 結構所具有之高深寬比特性，使其容易製造出夠深 (大於 100  $\mu\text{m}$ ) 且垂直之側壁，成形之後即可直接作為無蓋之開放式流道。SU-8 在可見光波段穿透率亦大於 90%<sup>(13)</sup>，故可適於光學檢測之要求。另外其具有親水之特性，使流體在置入後能具有自動填充流道之功能。雖然就製造開放式流道而言，利用 SU-8 製程屬於相當簡單而低成本之方法，但封閉式流道之製造則以更具成本優勢之 PDMS 流道較為被採用。圖 6 為 PDMS 微流道之加工流程示意圖，其中母模 (master) 可先利用高深寬比 SU-8 黃光製程

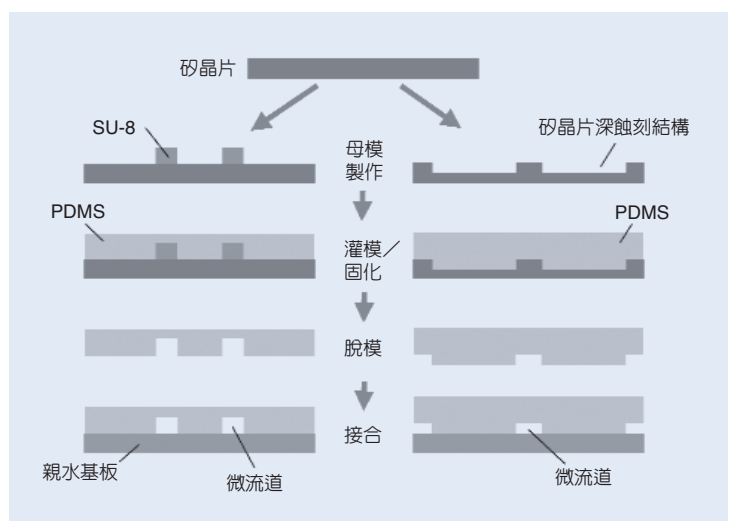


圖 6. PDMS 微流道之加工流程示意圖。

或矽晶片深蝕刻製程製造，之後依序經由灌模、固化、脫模等步驟，最後利用  $O_2$  電漿作親水處理並將之與另一親水基板接合，即完成流道之製作。此材料除了具有在可見光波段幾呈透明之優點外，其易於複製的特性亦使其特別受到青睞，惟其親水性之維持、對準接合等仍需特別處理。

#### 4. 收光模組設計

收光模組同樣可選用光纖導出、透鏡導出或直接貼近光感測器的方式進行。其設計目的主要有二：其一是將儘可能將四散之螢光收集至光感測器之內；其二是在於與光耦合模組搭配，利用幾何分離之方式將激發光與螢光分離，以補濾波片濾波程度有限之缺點。

收光部分，由於螢光向外散射並無方向性，因此欲將之導入位於某方向上且感測面積不大之光感測區內，利用適當的微透鏡耦合是必需的。基本的原則是選用焦距與檢測區中主要收光點之距離匹配以及大數值口徑 (numerical aperture) 的微透鏡；另外亦有文獻提出利用反射鏡集光之設計，以檢出特別微弱之螢光<sup>(14)</sup>。在激發光與螢光分離部分，收光模組需與光耦合模組搭配設計，如圖 5 中所示利用幾何分離之方式，將光源行進方向與檢測裝置的收光方向錯開，以使最強的入射光不會直接指向光感測器中。經過幾何分離後，殘餘的激發光則可進一步用濾波片來消除。一般濾波片可分為干涉式濾波片 (interference filter) 及吸收式濾波片 (absorption filter or color filter)。干涉式濾波片過濾效果可達 90% 以上，且其濾波頻寬可以很窄，如帶通濾波片的設計 (~10 nm)，但其有角度選擇性 (angular dependence) 問題，入射角愈大過濾效果愈差，難以有效阻絕四向散射之雜光。設計時可在雜光入射於濾波片前利用一透鏡將之準直化提升方向性，以發揮濾波片最大的衰減效果。吸收式濾波片是植入一些特殊材料以將不必要的光吸收，一般而言其濾波頻寬較大，過濾效果亦較差，然相較於干涉式濾波片，其具有對入射角度不敏感之優點。不過較強入射雜光在通過吸收式濾波片時，亦可能再激發出一些雜散螢光，須在模組設計一併考慮將之隔離的方法。

#### 5. 光訊號讀取模組

光訊號讀取器一般可分為可解析波長的光頻譜分析儀 (OSA) 或是單純螢光能量檢測裝置。波長分析儀可分析所蒐集到螢光的波長分布圖，藉此了解螢光的發光光譜特性，並且可用於同時檢測雙波長以上的應用。單純螢光能量檢測裝置是利用光敏元件將光訊號轉換為電訊號的感測器，一般常用的可分為檢光二極體 (photo-diode, PD)、電荷耦合元件 (charge-coupled device, CCD) 及光電倍增管 (photo multiplier tube, PMT)。

檢光二極體可檢測到的光強度下限約在數十 nW 等級，一般常用在螢光檢測的有  $p-n$  接面光二極體、累崩式二極體 (avalanche photo diode, APD) 等。 $p-n$  接面光二極體乃在  $p-n$  接面的空乏區上跨上一內部電場，如果在空乏區內吸收到光子，則內部電場會使電子電洞分離而得到電流或電壓之輸出。累崩式二極體基本上是將  $p-n$  結構操作於很高的偏壓之下，當光入射於二極體內時，所產生的電子會受到內部電場的作用而碰撞產生更多的電子電洞對，使光電流增加約百倍左右。惟此倍率易受溫度變化而改變，因此使用時尚須加入溫度穩定電路以確保其穩定。CCD 光強度下限約在數十 pW 等級，其可視為光電轉換的半導體製程元件，乃是利用信號電壓在半導體層之中建立電位井 (potential well)，在形成後的電位井儲存電荷，再以時序脈波將之傳送到另一電位井，直到 CCD 輸出端為止。因其具積分之效果，光靈敏度較 PD 為高，然其所需反應時間亦較長。PMT 光靈敏度最高，偵測下限可達 fW 等級，具有增益高和響應時間短的特點，且不會產生大量的隨機雜訊，然最為昂貴。

上述檢光二極體、累崩式二極體及電荷耦合元件為半導體製程所製造出的產品，具有體積小及低價的特性，故較適合於微小化的系統或是可攜式的用途上，惟光靈敏度較差；光電倍增管具有光靈敏度最高之特性，然價格昂貴且需搭配高壓電路使體積更大，較不適用於可攜式或可拋棄式的應用上。由於光感測器各有優缺點，因此如何選擇端看螢光功率的大小 (所需之靈敏度) 及何種用途而決定。此外，以上所介紹之激發光、收光模組和光訊號讀取模組均環環相扣，需整體考量設計才能發揮最佳

效益。至於最佳化 (optimization) 和雜光分析 (stray light analysis)，則可考慮利用市售軟體如 ASAP、ZEMAX、SolidWorks 等作設計。

## 四、設計範例

以前段所述為基礎，本文將進一步針對文獻中所使用之設計方法作一說明，以了解研究人員如何利用不同的方法來提升螢光檢測系統的解析能力。然由於文獻中所使用之方法包羅甚廣，受限於篇幅實無法一一詳盡敘述，故本文將擇數篇較具代表性之範例作介紹。此外為明瞭起見，本文擬將檢測系統微型化之方法分為兩大類，包括內部檢測型 (internal detection 或 on-chip detection) 及外部檢測型 (external detection 或 off-chip detection)，並配合文獻中範例加以說明。

### 1. 內部檢測型

此型檢測系統所具有之共通點是整合光學元件 (特別是濾波片與光感測器) 與生醫流體晶片之製程，以同時達成批量製造與組裝之要求。其原因在於光學系統之微型化過程中，組裝對準的工作不但耗費最多成本，也影響輸出的靈敏度甚鉅，故若能將光感測器、濾波片、光圈甚至光源與透鏡等內建於生醫流體晶片中，將可避免上述之微型化難題。除此之外，整個系統尺寸可具體而微地縮小，甚至可達卡片般之大小等級，除使檢測效率提升、操作更加方便之外，亦能輕易達成可攜型檢測設備之目標。以下將以實例說明此型檢測系統之設計。

#### (1) 實例一

若以檢測系統積體化程度而言，文獻 (8) 所提出將光源、微流道、光偵測器等全整合於同一晶片上之設計可謂高度積體化之範例。如圖 7(a) 所示，其以覆晶接合 (flip-chip bonding) 一 750 nm 面射型雷射 (VCSEL) 作為光源，經由積體化之繞射元件與反射鏡在石英透明基板中傳遞，在經過一小段傳遞路徑後斜向射入微流道；當微流道中充滿螢光物質時，將被激發出螢光，並經由流道下方之微聚焦鏡準直，最後經一緊貼之濾波片後由光偵測器

所接收。由於該設計利用了包括空間分離 (濾波片) 與幾何分離 (偏軸入射、正向收光) 的兩種分離原則，故能隔離掉大部分入射雜光而提升訊雜比。另外大部分微光學元件皆是利用微影蝕刻等微加工製程完成，故可避開光學元件間之對準與組裝問題。其所發表之偵測效能，在濃度為  $10^{-4}$  M 之 CY-7 染劑時可測得訊雜比達 100:1 之檢測結果。

#### (2) 實例二

由於一般商用濾波片多厚達數毫米等級，其隔於螢光與光偵測器之間極易造成螢光傳遞時之損失，因而多需要搭配透鏡或大收光面之光感測器。因此，很多文獻中亦提出了將微流道直接成形於濾波片及光偵測器上方之設計<sup>(10,15-16)</sup>。如圖 7(b) 所示<sup>(15)</sup>，其以鍍多層膜方式在光感測器上成形出干涉式

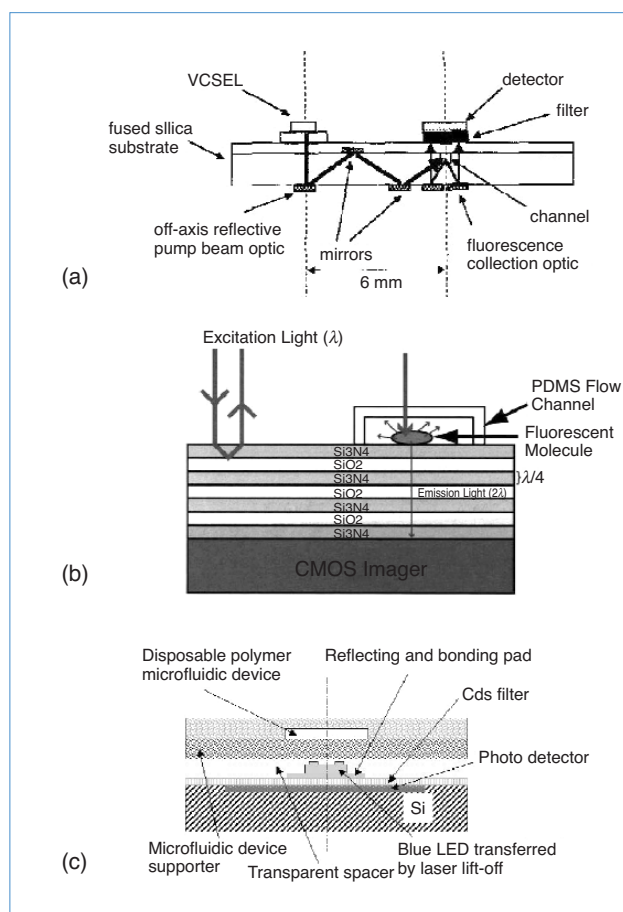


圖 7. 不同型式之內部檢測型螢光檢測系統例 (8,15,17)。

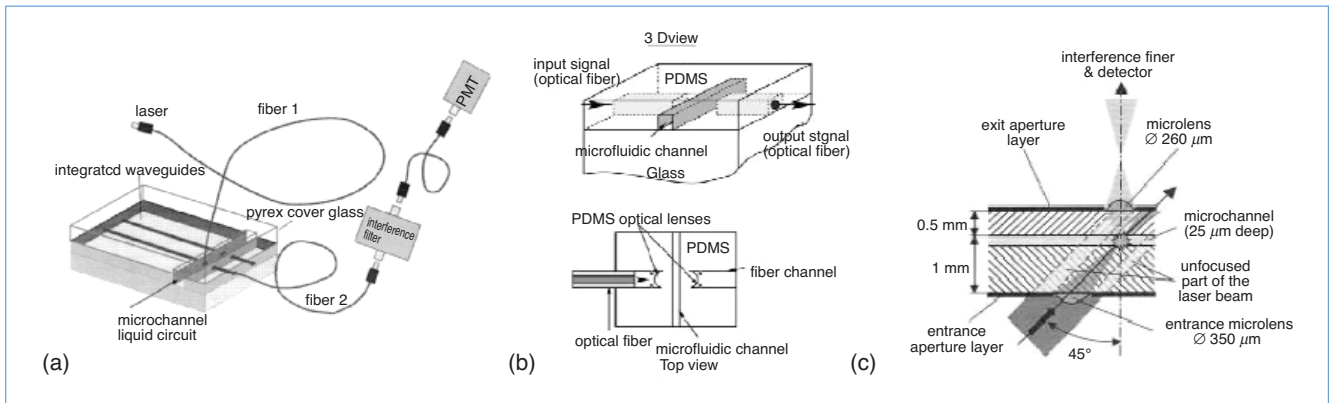


圖 8. 不同型式之外部檢測型螢光檢測系統例<sup>(2,11,3)</sup>。

濾波片，厚度僅在微米等級，而從流道發出之螢光雖向四面八方散射，但由於光偵測器與微流道距離很近，使得螢光不需微透鏡便能有效率地被光偵測器所收集。另由於微流道可利用微加工製程準確定位於光偵測器上方，故可避免光路對準之問題，亦可適於多通道偵測之應用。以文獻 (10) 所發表之偵測效能為例，其對螢光物質 *fluorescein* 的最低偵測濃度約達 25 nM 之等級。

### (3) 實例三

以上兩種檢測系統型式雖然具有很高的積體化程度，但是其同時衍生一生醫應用上之問題：在使用流體晶片作重複檢測之過程中，為避免因前一次樣品殘留所造成之檢測誤判，妥善的流道清洗程序是必要的，但是流體晶片之清洗不僅繁複，其潔淨程度亦不易確認。為避免清洗上之問題，很多系統因而採取光學檢測部分可重複使用，流體晶片可拋棄 (*disposable*) 之型式。而就上述兩類內部嵌入式設計而言，流體晶片與光學元件製造後已整合在一起，即使相較於傳統檢測系統其成本已然降低，但要達成可拋之要求仍嫌不足。為維持微型化之優勢，研究人員在內部嵌入式架構下繼續發展不同型式，如文獻 (17) 中便發表了圖 7(c) 所示之系統：其將積體化光學檢測部分 (包括光源、CdS 濾波片與 PD 光感測器等) 與流體晶片部分分開製造。該系統並因此而能使用發光與收光區位於同一邊之單邊架構 (*one-sided architecture*)，使用時將微流道晶片置於該光檢測系統之上即可使用，並可有效將激

發光與螢光分離；另外低成本之微流道晶片在使用後即可丟棄。雖然尚未有實際量測數據驗證其效果，但已使內部嵌入式系統朝實用的方向前進了一步。

## 2. 外部耦合型

外部耦合型相異於內部嵌入式，主要採取採部分可拋之使用模式，亦即光學檢測部分可重複使用，低成本製造之流體晶片為用後即拋，因此多具有微流體晶片與光學元件分開製造的特點，也因此需要一耦合模組使激發光有效入射至流體反應區，以及一收光模組將發散螢光有效率地收集至光偵測器上面。通常此型之設計會有一個共通點，即是將一些對準要求較高之元件 (如微透鏡) 以低成本製造方式內建於流體晶片中，以增加偵測效益而不失可拋晶片之原意。以下仍以實例說明此型檢測系統之設計。

### (1) 實例一

在光耦合與收光機制部分，較多文獻以光纖或光波導方式來完成<sup>(2,11-13,18)</sup>，雖然光纖造成光路傳輸較長、光耗損亦較多，使其收光效率較差，但由於可使用高光感度光偵測器如光電倍增管，故通常亦能達到很低濃度的偵測下限。以圖 8(a) 所示為例<sup>(2)</sup>，其以一膠合於流道正上方之光纖將光直接耦合進來，而在水平方向 (垂直入射光) 利用內建波導將光導到晶片邊緣，最後經由另一水平膠合之光纖將光導出。該激發光與收光方向垂直之設計，已可

使輸出端所收到之激發光成分衰減 60 dB，再加上濾光板及 PMT 收螢光，對螢光物質 fluorescein 的偵測下限甚至可達 250 pM 之濃度。此類設計的另一項優點是其具有隨插即用 (plug & play) 之潛力，例如當有不同螢光物質而需切換不同波長光源，或需要偵測輸出光譜時，只需將光纖端子接到所需設備即可。然而明顯地在該類設計之製造過程中，光纖對準與膠合並非簡單易行之步驟，因此其他文獻亦提出利用軌道與透鏡輔助之方法，使光纖易於對準與固定，如圖 8(b) 所示<sup>(1)</sup>，此將能增加系統可攜、晶片可拋之可能性。

## (2) 實例二

雖然光纖為一良好的耦光工具，但其在組裝上的複雜性仍造成可拋式晶片之困擾；文獻 (3) 中則提出了利用微透鏡來直接耦光的設計。如圖 8(c) 所示，其入射激發光是以 45 度斜向入射，並經由一微透鏡將之聚焦於流道中以激發螢光，所激發出之螢光則利用另一微透鏡在正上方收集，再導入偵測器中讀出其強度。除此之外，該系統在所需激發光及螢光之外的區域分別引入了入口光圈層及出口光圈層 (位置分離機制)，最後再加上濾波片之空間分離機制，至此不希望收到的背景雜光已被強烈壓抑，解析能力因而大幅提升。根據文獻 (3) 中所發表針對 Cy5 螢光分子之偵測效能，其 LOD 在 SNR 為 9 下可達 3.3 nM 之檢測結果。

## 五、結語

微機電系統技術加速了生醫晶片之發展，使得生醫檢測有了樣品求更少、檢測速度更快及晶片成本更低之方法。然晶片於使用時仍受限於昂貴與體型龐大之檢測儀器，因而促成了檢測系統微型化之相關研究。然文獻所提方法包羅甚廣，面臨的問題亦各異。據此，本文針對檢測系統之微型化設計作一介紹。文中以生醫螢光檢測為主題，由免疫螢光檢測法之介紹開始，引入螢光檢測系統之模組設計與選用，最後並將文獻所提之系統整合方法分成內部檢測型與外部耦合型兩類加以整理，期使讀者了解微型化螢光檢測系統之完整架構與設計考量。由

文中可知，為了將入射雜光抑制並提高訊雜比，分離之機制在系統設計時一再被使用到，如何善用入射雜光與待測螢光之差異性，實須於架構設計前先審慎思考。此外，準確的對準以及尺寸匹配是必需的，若能利用微加工技術將相關元件作積體化製造，配合低成本之批量對準與組裝，將可收事半功倍之效。展望未來，檢測系統的微型化仍將以系統可攜、晶片可拋為主要目標，以滿足居家檢測或行動檢測之要求。另一方面，由於微型化將引入陣列化之可行性，可促成多通道螢光系統之平行檢測，而不需再利用大體積且昂貴之精密移動平台或雷射掃描設備，亦將是一應用拓展之方向。

## 參考文獻

1. W. T. Mason, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 2nd ed., London: Academic Press (1999).
2. J. Hubner, K. B. Mogensen, A. M. Jorgensen, P. Friis, P. Telleman, and J. P. Kutter, *Review of Scientific Instruments*, **72**, 229 (2001).
3. J. -C. Roulet, R. Volkel, H. P. Herzig, E. Verpoorte, N. F. de Rooij, and R. Dandliker, *Journal of Microelectromechanical Systems*, **10**, 482 (2001).
4. N. R. Rose, R. G. Hamilton, and B. Detrick, *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th ed., Washington DC: ASM Press (2002).
5. I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male, *Immunology*, 5th ed., London: Mosby (1998).
6. 楮佩瑜, 免疫學與臨床血清免疫學, 第三版, 台北: 藝軒出版社 (2000).
7. Catalog of Caltag Laboratories (2002).
8. M. E. Warren, M. E. Warren, J. R. Wendt, W. C. Sweatt, C. G. Bailey, C. M. Matzke, D. W. Arnold, A. A. Allerman, T. R. Carter, R. E. Asbill, and S. Samora, *Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO '99)*, 173 (1999).
9. J. Seo and L. P. Lee, *Transducers'03*, 1136 (2003).
10. M. L. Chabiny, D. T. Chiu, J. C. MacDonald, A. D. Stroock, J. F. Christian, A. M. Karger, and G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry*, **73**, 4491 (2001).
11. S. Camou, J.-P. Gouy, H. Fujita, and T. Fujii, *Proceedings of IEEE Sensors*, **1**, 187 (2002).
12. K. W. Ro, S. C. Shim, K. Lim, and J. H. Hahn, *TAS 2001*, 274 (2001).
13. J. Hsieh, C.-J. Weng, H.-H. Lin, H.-L. Yin, Y. C. Hu, H.-Y. Chou, C.-F. Lai, and W. Fang, *IEEE/LEOS Optical MEMS Conference 2003*, TuP 7 (2003).
14. T.-H. Wang, S. Masset, and C.-M. Ho, *IEEE MEMS Conference 2001*, 431 (2001).

15. M. L. Adams, M. Enzelberger, S. Quake, and A. Scherer, *Sensors and Actuators A*, **104**, 25 (2003).
16. J. R. Webster, M. A. Burns, D. T. Burke, and C. H. Mastrangelo, *IEEE MEMS Conference 2000*, 306 (2000).
17. J. A. Chediak, Z. Luo, J. Seo, N. Cheung, L. P. Lee, and T. D. Sands, *IEEE MEMS Conference 2003*, 323 (2003).
18. 林哲信, 李國賓, 陳淑慧, 整合光纖檢測機構之微電泳晶片, 奈米工程暨微系統技術研討會/國科會微機電系統成果發表會 (2002).

---

謝哲偉先生為國立清華大學動力機械工程博士，現任國科會精密儀器發展中心副研究員。

翁俊仁先生為國立中山大學光電工程碩士，現任國科會精密儀器發展中心助理研究員。

林明瑜小姐為美國新澤西州立大學生物醫學碩士，現任國科會精密儀器發展中心助理研究員。

Jerwei Hsieh received his Ph.D. in power mechanical engineering at National Tsing Hua University. He is currently an associate researcher at Precision Instrument Development Center, National Science Council.

Chun-Jen Weng received his M.S. in electro-optical engineering at National Sun Yat-sen University. He is currently an assistant researcher at Precision Instrument Development Center, National Science Council.

Ming-Yu Lin received her M.S. in biomedical sciences at Rutgers, the State University of New Jersey, U.S.A. She is currently an assistant researcher at Precision Instrument Development Center, National Science Council.