

多功光電生醫晶片系統—光生化型檢測儀

Multi-Functional Optical Biochip System—Opto-BioMorphin

徐維良、李舒昇、李世光

Wei-Liang Hsu, Shu-Sheng Lee, Chih-Kung Lee

光生化型檢測儀為一套完整的多功光電生醫晶片系統，提供了相位調制式橢圓偏光術與表面電漿共振技術兩種光學檢測模式，並結合流道系統，延伸兩套光學檢測模式於生物醫學中酵素免疫反應試劑與即時生物分子作用的應用。除此之外，利用橢圓偏光術與表面電漿共振技術的整合，將生物醫學檢驗技術的解析度大幅提升。利用此一創新檢測系統，提供生物醫學上於病原抗體檢測、生物動態結合分析與表面濃度量測的研究平台。

OBMorph is a multi-functional optical biochip system. This biosensor is developed by integrating ellipsometry and SPR detection techniques, which adopted a flow-injection system to supply bio-samples to biochip. The other important function of this biosensor is to observe SPR phenomenon by using the ellipsometric configuration. By using this method, the SPR resolution could be significantly enhanced, and the characteristics of ellipsometry give detailed information for bio-tech analysis. Information such as film thickness, physical parameters, concentration, mass, density, kinetic constants, binding specificity, etc. can all be retrieved. In summary, OBMorph could serve both as a research and development tool as well as a manufacturing tool in biomedical area.

一、緒論

目前全球生物技術有幾種主要的技術方向，如基因體的研究、蛋白質體的研究、生物晶片、生物資訊、生物微機電與製藥產業等。自從人類基因體解碼完成，生物技術開發人員開始把焦點從基因體的研究，逐漸轉向蛋白質體 (proteomics) 之研究

上，方向大致為蛋白質的辨識工作與蛋白質之功能分析。與基因體研究相比，蛋白質體學的研究更加困難，因人體內這些化合物有數十萬甚至數百萬之多，而且在研究過程中將會產生大量的資料。蛋白質體學發展的目的在於瞭解基因與蛋白質表現、功能和疾病三者之間的關係，並用來研發新藥物以治療疾病⁽¹⁾。

隨著基因體研究與蛋白質體研究的發展，生物晶片、生物資訊與生物微機電也逐漸興起。在生物晶片的產業領域，包括有晶片製程、生物晶片定性與量測、生物晶片製程、生物晶片診斷應用、生物晶片偵測系統，以及生物晶片的生物資訊等，此些發展為標準的科技整合。1999年起，台大應用力學所李世光教授與醫工所林啟萬副教授、光電生物醫學中心林世明副教授等近十位教授共同組成「台大生物醫學微機電系統研究群」來進行「光生化形檢測儀—多功光電生醫晶片檢測儀之研究與開發」的研究案，該計劃體認目前生物科技產業的研發趨勢，如能充分發揮台灣高科技電子及半導體產業蓬勃發展所奠定的雄厚基礎，以之建構一領先全球的研發平台為先期目標，而後再將此研發儀器整合成為次世代生產之主要載具，進而協助我國生醫產業全球競爭力之提升⁽²⁾。

二、生醫檢測系統

生醫檢測系統的發展已歷經相當長的一段時間，從過去的檢測系統中，有許多現實上的問題存在，如生物試樣反應所依賴之檢測平台購置及維修成本太高、靈敏度不夠好、量測時間長、消耗試樣體積過大，或者偵測原理可能破壞檢測樣本特性，使得生物晶片上活體被破壞甚至死亡等。在此一結果下，光學應用於生醫檢測系統被廣泛的發展，此一應用基於光學為非接觸式，不會影響到被測體、具高靈敏度、大頻寬及小量測體積，因此生醫晶片之試樣或檢體均快速縮小的狀況下，採用光學方式的檢測技術可快速且精準擷取生物反應資訊。基於上述理由，光生化形檢測儀系統 (opto-biomorphin, OBMorph) 利用橢圓偏光術 (ellipsometry) 與表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技術進行整合，利用此兩種光學檢測方式，將非破壞性之光電生醫晶片檢測技術研究與生醫量測系統整合。其中橢圓偏光術為具有高解析度與精確度之薄膜厚度、複折射率的檢測方法；表面電漿共振技術則為一具備高靈敏度與即時偵測能力之表面濃度偵測技術，利用此二者不同檢測原理並將其整合至試樣自動化 (auto-sampler) 控制平台，可以提供一應用至傳統的

酵素免疫反應試劑 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 與新的即時生物分子作用 (biomolecular interaction analysis, BIA) 能力分析檢測之平台，以擷取更多及更完整的生物反應，同時利用此一資訊整合於蛋白質體的分析研究。

此全新的系統整合了系統檢測、晶片設計與生物固定化的技術，不僅要進行多功光電檢測之共光路整合與光機電系統硬體發展，同時也配合晶片鍍膜與生化反應檢測應用知識，整合光學系統與生物化學之間介面參數，並提供一軟體介面整合來進行數據的分析，成為一具有雙功能、體積小、價格低之生醫晶片檢測儀，並利用其中模組化設計觀念，來提供更多生醫檢測技術的擴充性。

1. 橢圓偏光術之研究與應用

在 1887 年，Drude 發展了橢圓偏光術研究，但直到 1933 年，Tronstad 才將橢圓偏光術的應用向外發展，提出利用橢圓偏光術來量測材料表面之特性，且明白點出橢圓偏光術在量測表面物理特性上有其先天的優勢。此後，橢圓偏光術進入發展時期，廣泛被應用在各種檢測技術之上，甚至後來被用在生物鍵結反應的檢測上。Langmuir 與 Schaefer 於 1937 年將橢圓偏光術應用於介面蛋白質檢測，進一步的提出了抗原與抗體之結合可利用在鍍硬酯酸鋇鎘中所產生的光干涉現象加以分析。從 1965 到 1975 年間，橢圓偏光術之發展進入了全盛期，在光學檢測應用、光學檢測原理、光路設計、訊號處理方式被廣泛討論，使得橢圓偏光術被帶入另一個更高境界。1978 年時，Cuypers 將橢圓偏光術偵測於固相／液相介面的細胞或生物分子。在 1985 年時，Nygren 與 Stenberg 也以橢圓偏光術探討 ELISA 架構下的抗體與固體介面的結合能力。此外，由於早期的商用型橢圓偏光儀如 Rudolph Research 43303-200E 被應用於監測薄膜生長的即時資訊，因此擁有定量分析生物分子鍵結動態反應與定性分析其生化反應特性的能力⁽³⁾。

應用橢圓偏光術於蛋白質體檢測上，有許多先天的優勢，例如檢測蛋白質分子動態吸收反應時，應用橢圓偏光術進行生物分子反應檢測不需標示 (labeling) 蛋白質分子的前處理步驟，且可利用生

物連結物將抗原 (antigen) 固定於玻璃或是矽晶圓基材上，當抗體 (antibody) 與抗原作用時，可利用檢測出的厚度改變與折射率變化讀出抗原與抗體結合的狀態，利用此一狀態分析來研究抗原與抗體或液體中抗體與固體介面吸附 (adsorption) 之能力，親和力參數 (affinity constant) 為其中最具代表性的一項數據⁽⁴⁾。此外，在蛋白質體檢測上也可研究蛋白質型態變化 (protein conformation change)、蛋白質位移效應 (protein displacement effect)、凝血之早期效應 (early events in blood clotting)，及添加物啟動 (complement activation) 等。

橢圓偏光儀應用於生物醫學檢測上的例子不勝枚舉，在 1999 年時，Trotter 等人以固定偏極態橢圓偏光術之光學架構來進行免疫試劑的量測，其實驗精確度已可高達 4 pg/mL，幾乎優於現在的所有生醫檢測系統。因此，從前人的研究成果可顯見以橢圓偏光術應用於生醫晶片為一具有潛力、可發展之技術。

2. 表面電漿共振技術之研究與應用

表面電漿波 (surface plasmon wave, SPW) 是一種沿金屬表面以一定速度傳播的橫向電磁波，此一電磁波於垂直界面的方向上會迅速衰減，呈現漸逝波的現象，此一現象對於感測強度與深度改變極其敏感，因而表面電漿共振技術經常被拿來應用於表面或界面的微小變化上，故於非破壞檢測的領域上，成為一種非常重要且靈敏的光學探針。

近十年來，表面電漿共振技術已被廣泛地用於研究生物醫學上，例如蛋白質－蛋白質、核酸－蛋白質、核酸－核酸以及藥物－蛋白質之間相互作用的反應動力學與親和力計算等。與一些既有的檢測生物分子相互作用的技術比較下，如酵素免疫反應試劑、平衡透析 (equilibrium dialysis)、親和層析 (affinity chromatography) 等，表面電漿共振技術主要有兩大優點。一為即時監測生物分子的相互作用，另一為此一技術下，生物分子不需要作標記的動作。1983 年，表面電漿共振技術首次被應用於抗原－抗體的檢測後，此一應用領域逐漸壯大，主要攻擊點包括了免疫學、蛋白質相互作用 (信號轉導、肽庫和抗體庫篩選、分析蛋白質的突變等)、

蛋白質－核酸相互作用 (修復、轉錄等)，還有藥物－蛋白質作用 (藥物篩選等)。

由上述的發展可見，表面電漿共振技術對於生醫檢測有應用的潛力與無限的發展，包括了在醫學、環境監測、生物科技、製藥和食物監測方面等，以感測低濃度的生醫反應來說，能對於藥物的早期發現有所貢獻，以提供醫藥專業人員更準確的分析報告。另外來說，表面電漿共振術之光學原理與架構相對於橢圓偏光術較為簡單，但在解析度及靈敏度上，橢圓偏光術則有較佳的表現。

三、光生化形檢測儀之光學原理

1. 橢圓偏光術

(1) 橢圓參數之定義

如圖 1，設有兩線性均勻 (homogeneous) 且等向性 (isotropic) 之吸收介質，其複數型態的折射係數分別為 $N_0 = n_0 - jk_0$ 與 $N_s = n_s - jk_s$ (Hecht, 1998)，其中 n_0 與 n_s 表示介質的折射係數 (refraction index)， k_0 與 k_s 表示介質的消光係數 (extinction coefficient)。當一單頻光束以入射角 θ_0 由介質 0 傾斜入射到介質 s ，此道光可用兩正交偏振電場描述，一為平行於入射面振動的 TM 偏極光 (p -wave, E_{ip})，一為垂直於入射面振動的 TE 偏極光 (s -wave, E_{is})。而 E_{rp} 與 E_{rs} 則分別代表反射光之兩電場分量。由古典電磁理論可以得到此兩方向電場之反射係數 (Fresnel's equations)：

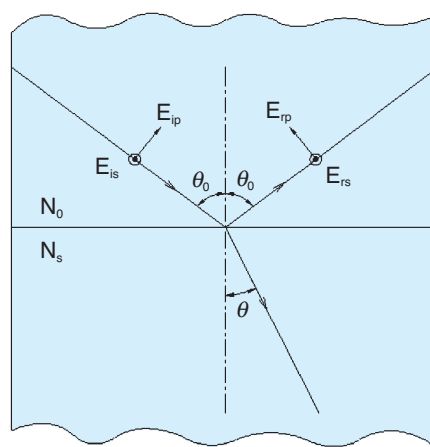


圖 1. 入射、反射及折射光之關係圖。

$$r_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = \frac{N_s \cos \theta_0 - N_0 \cos \theta}{N_s \cos \theta_0 + N_0 \cos \theta} = |r_p| \cdot e^{j\delta_p} \quad (1)$$

$$r_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = \frac{N_0 \cos \theta_0 - N_s \cos \theta}{N_0 \cos \theta_0 + N_s \cos \theta} = |r_s| \cdot e^{j\delta_s} \quad (2)$$

其中 θ 為折射角， δ_p 、 δ_s 為反射後兩偏極方向的相位延遲。這也就是說，在表面或薄膜上反射時， p 偏極和 s 偏極反射後的振幅衰減和相位差各不相同，當入射光是一束線偏振光時，在一般情況下，反射光電場向量終端的軌跡會呈一橢圓，稱為橢圓偏極光。

由此可定義橢圓函數 (ellipsometric function, ρ)：

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \psi \cdot e^{j\Delta} = \frac{|r_p|}{|r_s|} \cdot e^{j(\delta_p - \delta_s)} \quad (3)$$

其中， ψ 與 Δ 為橢圓參數，皆以角度或弧度為單位。 $\tan \psi$ 代表 p 偏極與 s 偏極兩偏極態反射率強度之比值；而 Δ 則代表兩偏極態反射率之相位差。如果可由實驗測得橢圓參數 ψ 與 Δ ，則可利用式 (3) 反推介質 s 之 N_s 、介電常數 ϵ 。

(2) 橢圓偏光術之分類

橢圓偏光術即在求取橢圓參數後，依據對於薄膜樣本所建立的模型來進行薄膜光學參數之反算。因此橢圓偏光術的整個量測流程大致可分為兩大部分。第一部分為正算部分，即利用零值檢測 (null ellipsometry)、旋轉元件光度量測法 (rotating element photometric ellipsometry)⁽⁵⁾ 及利用相位調制 (phase modulated ellipsometer)⁽⁶⁻⁸⁾ 等方式求取橢圓參數 (ψ 與 Δ)。

歸零式橢圓偏光儀為最舊式的一種，在此法中，光線通過一個偏極板 (polarizer)，再透過一個補波板 (compensator)，然後打到待測物後反射，經過分析板 (analyzer) 後再進入光偵測器。操作者在調整偏極板和分析板使光源完全消失，偵測器無法測量到訊號；補波板則固定在某一角度。紀錄此三個光學元件的方位角，進而計算出橢圓參數。此種操作原理、方法簡單，而且不需太多的電子裝置，造價成本低，但操作不便且操作時間較長，所以不

適合自動化量測。

旋轉元件光度量測法與前者的差別在於整個量測的過程中，光學元件 (偏極板或分析板) 以低速連續旋轉 (約 10–60 Hz)。偵測器量測到的訊號為時間函數，利用鎖相放大技術處理之，爾後再經由傅立葉分析以獲得橢圓參數。此法優點為較自動化、操作簡單，而且用到光學元件較少，所以沒有光學元件特性和波長相關的問題，可用作全光譜的量測。缺點為元件旋轉時會使光線有微小的橫向位移 (lateral displacement)，容易使得偵測器偵測到光點有抖動的現象，容易造成誤差。

相位調制橢圓偏光儀為光生化分析檢測儀所採用的橢圓偏光術，整個系統中偏極板和分析板在量測過程中是被固定住的，故沒有機械振動上的困擾；入射光是被相位調制器 (modulator) 調制相位延遲量，改變光偏極態。其缺點為相位調制器會受溫度的影響，造成誤差。

而第二部分為反算部分。當進行反算時，必須先對待測樣本建立基本薄膜模型，以進行後續薄膜光學參數之求取。對於多層膜之量測，則必須提供額外的資訊以進行反算，因此有多波長及可變入射角兩種橢圓偏光儀架構產生。

(3) 相位調制式橢圓偏光術

圖 2 為相位調制式橢圓偏光儀之基本架構圖，以各光學元件之排列順序來說，為偏極板、相位調制器、待測樣本與分析板；在此以 $[P]$ 、 $[M]$ 、 $[S]$ 與 $[A]$ 分別代表偏極板、相位調制器、待測樣本與分析板之瓊斯矩陣表示式，利用瓊斯運算，可將反射至光偵測器之電場 E_{out} 與入射光之電場 E_{in} 的關係式可表為式 (4)：

$$[E_{out}] = [A][S][M][P][E_{in}] \quad (4)$$

而由光檢測器所得到之光強訊號為：

$$I = G E_{out} E_{out}^* = G (ASMPE_{in})(ASMPE_{in}^*) \quad (5)$$

其中 G 為系統常數。將式 (5) 加以整理後可得式 (6)，由式 (6) 可知光強訊號被相位調制 (δ) 為一直

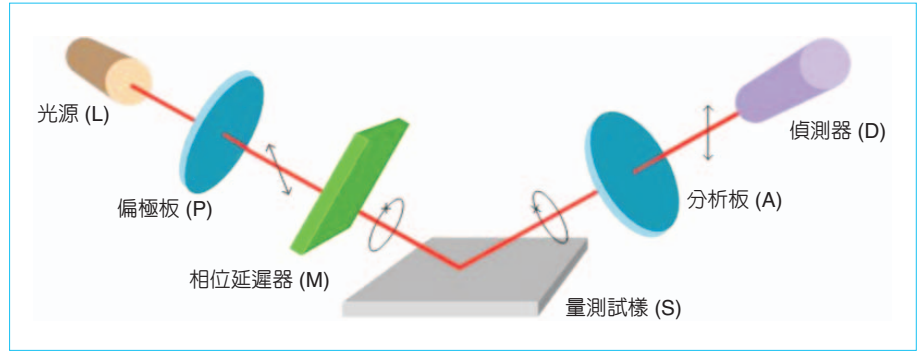


圖 2. PMSA 橢圓偏光儀架構圖。

流項 (DC)、一正弦項 ($\sin\delta$) 與一餘弦項 ($\cos\delta$)，藉由求取此三項對應之係數 I_o 、 I_s 與 I_c ，即可計算出待測樣本之橢圓偏參數 ψ 與 Δ 。

$$I(\delta) = G(I_o + I_s \sin\delta + I_c \cos\delta) \quad (6)$$

在此架構中，靜態地控制相位延遲元件的相位延遲量 δ ，以液晶相位調制器而言，即是藉由電壓控制來改變 δ 。利用不同的 δ ，求出 I_o 、 I_s 、 I_c 三項係數後，再配合方位角 P 、 M 、 A 的設定來求得橢圓偏參數 ψ 與 Δ 。隨著元件方位角設定的不同，對於橢圓偏參數求取之精準度會有不同的影響。

2. 表面電漿共振技術

(1) 表面電漿波

金屬中自由電子和正電荷的行為可用電漿 (plasma) 來描述，其電漿頻率 ω_p 如式 (7) 表示。其中 N 是電荷密度、 q_e 是電荷數、 m_e 是電子質量、 ϵ_0 為自由空間的介電常數⁽⁹⁾。

$$\omega_p = \sqrt{\frac{4\pi N q_e^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad (7)$$

$$\epsilon_p(\omega) = 1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega}\right)^2 \quad (8)$$

而平面電磁波在介質中的介電常數 ϵ_p 會與頻率 ω 相關，如式 (8)。若其頻率在 ω_p 之下，則 ϵ_p 為負值，折光係數 ($=\sqrt{\epsilon_p}$) 為一複數，此時為非輻射 (non-radiative) 之漸逝波 (evanescent wave)。也就是說，金屬介質會吸收電磁波，引起表面電荷振盪

時，在金屬與介電質介面上有最大電場強度，往兩側之電場強度則呈指數衰減。若電磁波頻率大於 ω_p ，那麼就可以在金屬中傳遞。

表面電漿 (surface plasmon) 是一種藉由表面電荷密度的振盪使電磁波侷限在金屬 ϵ_2 與介電質 ϵ_1 之介面傳遞的一種電磁模態形式，如圖 3 所示。表面電漿波是電場垂直於交介面的電磁波 (故必須使用 TM 波才能滿足邊界條件，激發出表面電漿波)，會在表面造成電荷密度變化的振盪，因為垂直於表面的電場在交介面上有不連續的現象，且介電質的介電係數大於零、金屬的介電係數小於零，因而會造成電場的反向，所以會造成表面電荷的產生。

表面電漿波之色散關係 (dispersion relation) 可由馬克斯威爾方程式加上邊界條件推導，如式 (9)、(10)。其中 k_x 為波向量之 x 分量。

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} = k'_x + jk''_x \quad (9)$$

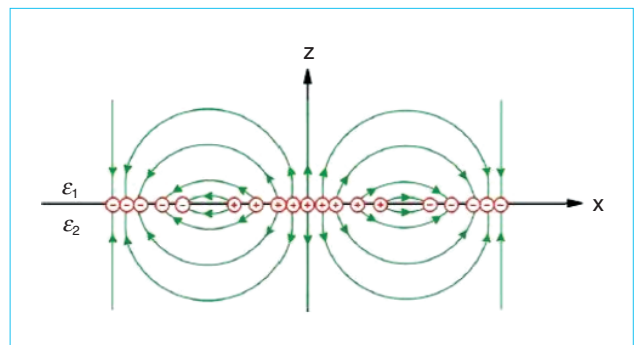


圖 3. 金屬與介電質之表面電漿分布示意圖。

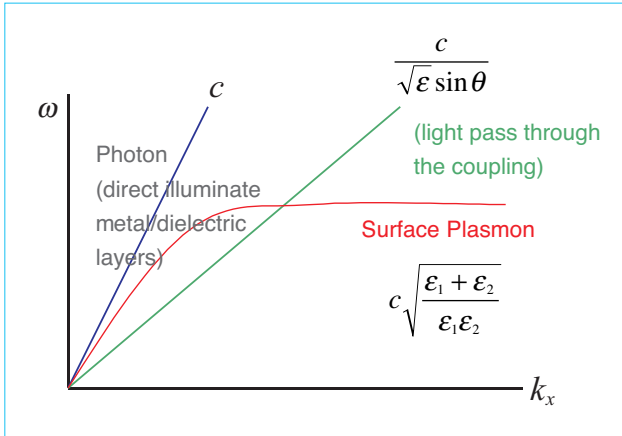


圖 4. 表面電漿與光子在介面之色散關係圖。

由色散關係圖(圖 4)來看,光在空氣中的色散關係(左側直線)落在表面電漿色散關係(右側曲線)的左方,兩條線並沒有交點,這表示表面電漿的頻率很高,在空氣中傳播的光無法提供足夠大的動量(或 k_x)來激發表面電漿,也就是兩者的動量(橫軸)與能量(縱軸)並不守恒。

(2) 表面電漿共振之激發

為了利用表面電漿波共振的特性來進行表面變化的光學量測,必須設法將光在整體介質(bulk material)的波傳能量透過共振轉移給表面電漿波或使兩者介面波傳具有相同的動量與動能。所以為了激發表面電漿共振必須達到波向量匹配(wave vector matching)的條件,即光子在介面上的波向量與表面電漿子在介面上的波向量相同。

由於表面電漿的動量相當高,原本在空氣中光的動量不足以激發表面電漿,必須藉由其他的方式來提高介面方向的動量,常見有以下方式:稜鏡耦合方式(prism coupler)與光柵耦合方式(grating coupler)。

稜鏡耦合方式主要有 Otto 和 Kretschmann 兩種架構。主要利用光在稜鏡材質中相對應的 k 向量會變大,使得電磁波的色散曲線可以右移,與表面電漿波的色散曲線有一個交點,所以在固定的波長下,某個角度的入射光會與表面電漿波耦合,使得反射光的強度變小,此角度稱為 SPR 共振角;光柵耦合方式為將光束導引經過週期性變化的金屬表

面,光子可以額外增加動量,使相速度(phase velocity)減少、可以與表面電漿波相速度匹配,進而激發表面電漿共振。

(3) 表面電漿共振之偵測

一般而言,表面電漿共振的偵測乃應用光學檢測方法,以光波入射介質後產生的光強或相位變化,偵測表面電漿共振角度之改變,並進一步推算表面介質的變化。基於此想法,以光學偵測表面電漿共振狀態有下列三種方式⁽¹¹⁾:

① 角度偵測法

此法通常以單色光在不同的入射角入射下,所對應產生之反射率變化,並在滿足與表面電漿波動耦合情況下,其反射光強圖中會產生一極小值,稱為表面電漿共振角,此即為表面電漿共振之入射角。

② 波長偵測法

相對於上述變入射角之架構,此法乃固定入射角,而變換不同的入射光波長,所得到的反射光強頻譜圖,在滿足表面電漿波動量耦合情況下,在其反射光強頻譜圖中會產生一極小值,稱為耦合波長,藉由波長的調制得到一最小反射光強,此即表面電漿共振波長。

③ 相位偵測法

當待測樣本之折射率改變時,可利用干涉儀之光學架構,配合表面電漿共振模型來預測反射光的相位變化。相位偵測法解析度較其他偵測法好,但其動態範圍不大,故較不適於應用於折射率變動大的情況下。

四、光生化形檢測儀

1. 光生化形檢測儀之設計理念

光生化形檢測儀於設計上,基於特殊的改變入射光角度機構,使橢圓偏光術與表面電漿共振技術可以利用變換入射角的方式呈現於此套光機中。就橢圓偏光術而言,比起多波長式橢圓偏光術,因無需建構試樣的色散關係式(dispersion relationship),故在待測薄膜反算上,擁有較少的未知數與較佳的反算結果。此外,對於生物試樣的量測,因生物試

樣的色散關係式多屬未知，此種變入射角橢圓偏光術有較佳的優勢^(12,13)。

此外，光生化形檢測儀在求取橢圓偏參數 ψ 與 Δ 上，則是利用向列型液晶 (nematic liquid crystal) 相位調制器來調制相位，構成一台相位調制型橢圓偏光儀。在此一架構下，可避免複雜的機構設計與旋轉偏極板或其他光學元件上的機械誤差，利用電子訊號調制方式調制量測光的偏極態，達到快速、即時的檢測。而在避免引入因電子訊號調制與環境對液晶相位調制器影響所產生的誤差上，光生化型檢測儀建立了一套即時相位檢測光路來加以補償，以增加整體的精確度^(14,15)。

在傳統的應用上，橢圓偏光術可用於量測半導體鍍膜與光學鍍膜，表面電漿共振技術則可用於量測化學反應變化。在光生化形檢測儀中，生醫檢測技術是此系統應用的重點領域，對於生醫晶片的設計上，採取 ELISA 架構與 BIA 架構共存之設計，量測時可選擇橢圓偏光術或表面電漿共振技術，最後配合流道系統的設計，整合出完整的光生化形檢測儀平台。於光生化形檢測儀之架構上，可以進行生物薄膜量測及表面濃度變化檢測等基礎生醫訊號測量，進一步藉由從晶片鍍膜、表面化學、生物抗體抗原反應的結果，整合為系統的測量參數對生物反應之關係，重建出生醫晶片上的生物分子動能、表面吸收等生物分子特性，提升應用層面的準確度⁽¹⁶⁾。

2. 光路布局與設計

(1) 橢圓偏光術之光路

如圖 5 所示，光源為一 635 nm 波長的二極體雷射，之後經過一個偏極板，此一偏極板配合雷射光為線偏光之基本性質，用來當作整個雷射光的光強衰減器 (attenuator)。接著為另一偏極板，使雷射光的偏極態為所要求的入射光偏極態，然後進入液晶調制器調制相位。

經過相位調制器之後，將會進入一反射率為 10%、穿透率為 90% 的非偏極分光鏡 (NPBS)，將光分為參考光與物光。經反射後向左行進的為參考光，其將再進入另一個非偏極分光鏡 (NPBS, 50%)，反射後之光進入光偵測器 3 做為二極體雷射之光源強度的即時檢測；穿透後的光進入分析板

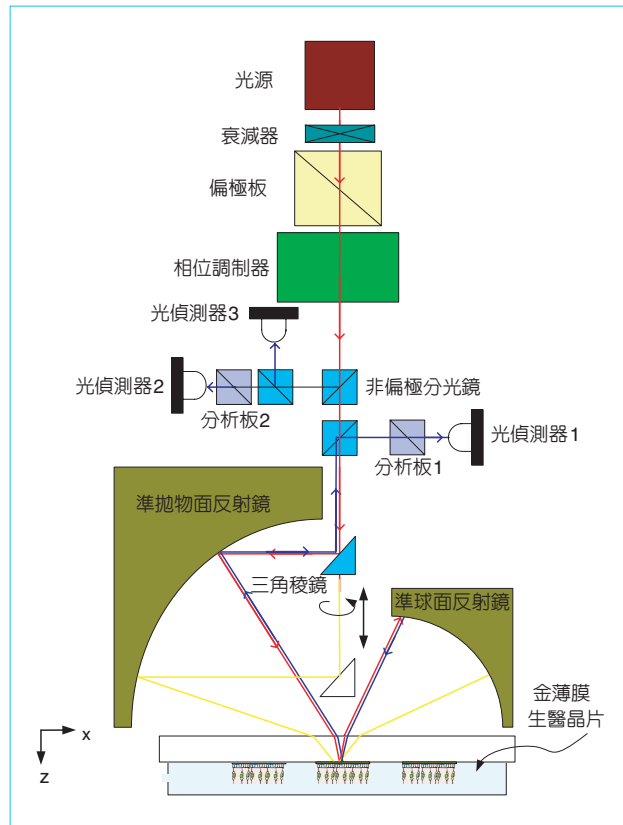


圖 5. 光生化形檢測儀之表面電漿共振偵測與橢圓偏光術共光路布局。

2 後，由光偵測器 2 取得光強，此當作相位調制器之即時相位調制檢測。

物光將會直線進行，穿透一非偏極分光鏡 (NPBS, 50%)，經由三角稜鏡與準拋物面反射鏡反射後，入射於試樣之上，經過試樣反射後再由準球面反射鏡反射，再度經過物件、準拋物面反射鏡與三角稜鏡反射，透過非偏極分光鏡 (NPBS, 50%) 向右行進，最後經過分析板 1 進入光偵測器 1，此一訊號即為反解橢圓參數之訊號。

(2) 表面電漿共振技術之光路

如圖 5 所示，但其中之相位調制器則被移除，以避免因額外的相位調制所產生之影響。首先，光源一樣來自 635 nm 波長的二極體定功率雷射，經過衰減器與置於零度的偏極板，使其成為一 TM 光光源，之後經過一反射率為 10%、穿透率為 90% 的非偏極分光鏡，將光分為參考光與物光。經反射

後向左行進的為參考光，其將再進入另一個非偏極分光鏡 (NPBS, 50%)，反射後之光進入光偵測器 3，做為二極體雷射光源強度的即時檢測。

物光將會直線進行，穿透一非偏極分光鏡 (NPBS, 50%)，經由三角稜鏡與準拋物面反射鏡反射後，入射於試樣之上，經過試樣反射後再由準球面反射鏡反射，再度經過物件、準拋物面反射鏡與三角稜鏡反射，透過非偏極分光鏡 (NPBS, 50%) 向右行進，最後經過一樣置於零度的分析板 1 進入光偵測器 1，此一訊號即為表面電漿共振技術之訊號。圖 5 為光路的 2D 示意圖，實際上的 3D 之光機架構布局如圖 6 所示。

3. 系統分析

(1) 入射角控制分析

入射角的控制精確度與準確度對於橢圓偏光儀與表面電漿共振技術是相當重要的因素。角度控制的精確度高，實驗才能擁有好的重複性；準確度高，實驗結果才值得信賴。傳統的橢圓偏光儀設計上，基本上均先將兩個手臂調到水平的位置做為基準，接著利用高精密的馬達將兩臂移至所需的角角度，此一精密的機械結構設計，會引入滑軌錯位等傳統機械上的誤差，加上水平基準位的誤差，若欲求得高準確度的反算結果，以角度的修正來補足機構上的不足是相當需要的。

光生化形檢測儀的入射角控制設計上，有別於傳統上兩個大手臂的設計。圖 7 為光生化形檢測儀

的入射角控制機構，主體架構採用尺寸為 5 mm 的直角反射鏡、拋物面反射鏡與球面反射鏡，利用高精密度的伺服馬達承載直角反射鏡，藉由移動伺服馬達的位置使直角反射鏡上下移動來改變入射角。所使用的伺服馬達為一控制精度達 $0.496 \mu\text{m}$ 的單軸伺服馬達，此一方式提供 10° 到 80° 的入射範圍，並有 0.001° 的解析度，在初始入射角與相對入射角度上，只要配合適當的運動控制規劃，可達成入射角 0.001° 的控制精度。

(2) 液晶相位調制器應用

光生化形檢測儀於橢圓偏光術上採用相位調制型橢圓偏光術，因此相位調制器為系統的核心之一。光生化形檢測儀的相位調制器採用相列型液晶，其為美商 Meadowlark 所生產的 LVR-100 型附補波板向列型液晶，在控制上，因液晶分子的動態特性，採用 2 kHz 的方波來加以驅動，而非使用直流電壓。液晶分子會因此一電壓施予於液晶配向層外的電極而改變液晶分子的排列，對於入射光的兩垂直偏極態產生不同的相位延遲量，因此在不同的方波振幅下，因液晶排列不同，所形成的相位延遲量也不同。

液晶相位調制器是一個相當方便且容易使用的相位調制器，其擁有體積小、驅動方式簡單與可即時控制相位延遲量的優點，但是天生會隨每度溫度變化產生大約 0.4% 的相位飄移，在此一誤差因子干擾下，橢圓偏光儀的橢偏參數求取之準確度會受

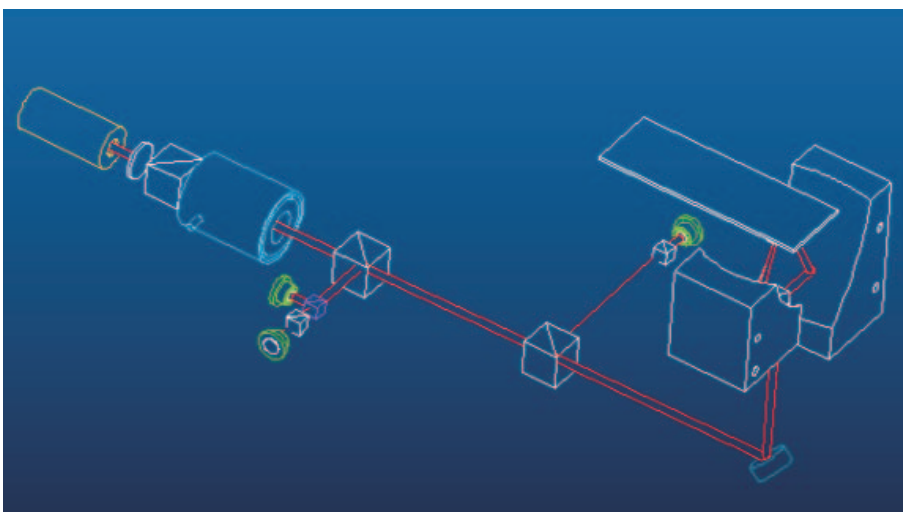


圖 6. 光生化形檢測儀之光學元件布局。

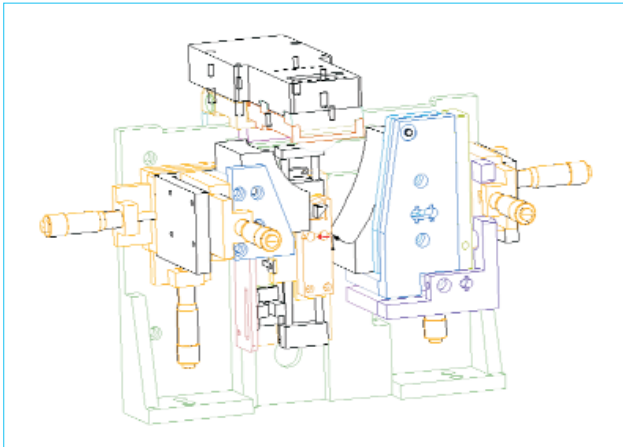


圖 7. 光生化形檢測儀之變入射角光機設計。

到液晶相位精度飄移的影響。因此在光生化形檢測儀中已建立出即時的相位檢測光路作為參考光路，使得系統在求取橢偏參數時，可以即時掌握相位液晶調制器的相位調制量，避免因環境溫度擾動造成的影響。

(3) 電腦介面

電腦介面的程式整合上，為使用 LabVIEW 6.1i 版本的虛擬儀器 (virtual instrument) 之模組化設計。橢圓偏光術就程式設計上而言，其主程式分為兩類，一類是為光學薄膜檢測，包含了雷射光源調變、光偵測器訊號處理、液晶相位調變控制、伺服馬達控制與橢圓參數計算等子程式。在雷射光源調變上，光生化形檢測儀為了提升系統整體的訊雜比，利用方波來加以調變二極體雷射光源，之後於光偵測器訊號處理程式中引入鎖相放大器以提出光強訊號，消除額外雜訊，最後利用最小平方誤差法的曲線擬合 (curve fitting) 方式來求取橢偏參數 ψ 與 Δ 。除了此主程式外，也利用 ActiveX 物件處理模式將 LabVIEW 與美國 SCI 公司所開發的光學鍍膜設計軟體 FilmOLE⁽¹⁷⁾ 加以整合，將主程式所擷取出來不同角度下的橢偏參數帶入此一程式做待測樣本的結構與材質的計算，進一步取得光學薄膜參數，求取複折射率與厚度 (n, k, t)。另外一類主程式是為檢測生醫反應訊號，其中也包含了雷射光源調變、光偵測器訊號處理、液晶相位調變控制與橢圓參數計算，但其主要在於定角度下的動態橢偏訊

號量測，因此時間取代了角度成為此類主程式的重要因素。

在表面電漿共振技術上，其主程式包含了雷射光源調變、光偵測器訊號處理、伺服馬達控制與曲線擬合等子程式，在雷射光源調變與光偵測器訊號處理中引入了鎖相放大器來提升系統的訊雜比，最後再利用曲線擬合的方式來將光強訊號作平滑處理，以利取出穩定的表面電漿共振技術的角度，最後利用主程式的連續執行達到動態量測的效果。

(4) 利用橢圓偏光儀觀測表面電漿共振

光生化型檢測儀為一同時具有橢圓偏光儀與表面電漿共振技術的裝置，此裝置擁有一個天生的優點，其為可利用橢圓偏光儀來觀測表面電漿共振的現象。在與表面電漿共振擁有相同的檢測試樣平台上，由介電質入射金屬，在表面電漿共振角時，因 TM 波在金屬與下一層介電質之介面上轉換成表面電漿共振的型態，TM 波的能量並未反射出試樣，而在此角度上，TE 波的能量幾乎為全反射而離開試樣，因此對於橢偏函數 ψ 而言，將會有一個最低點存在，此為表面電漿共振發生的角度。此外，對於橢偏函數 Δ 來說，在表面電漿共振現象發生時，此一訊號可反應出劇烈相位變化。圖 8 為以 SF2 為入射介質，打入 50 nm 的金膜時，下一層介電質為空氣的橢偏參數模擬值，由此圖可見明顯的橢偏函數變化與表面電漿共振發生的情形，此一訊號之模擬結果提供一個新穎的檢測方式—利用橢圓

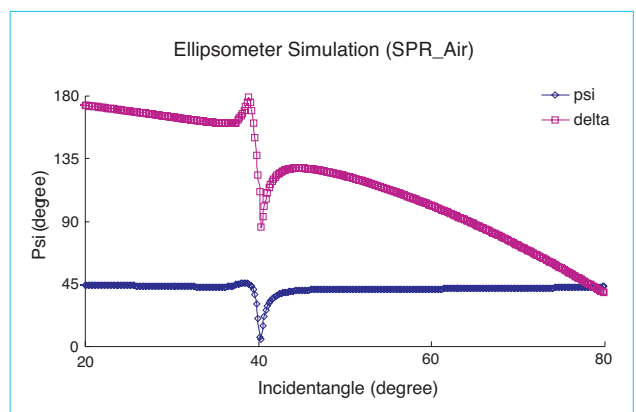


圖 8. 空氣之橢圓偏光儀於表面電漿共振技術架構下訊號模擬。

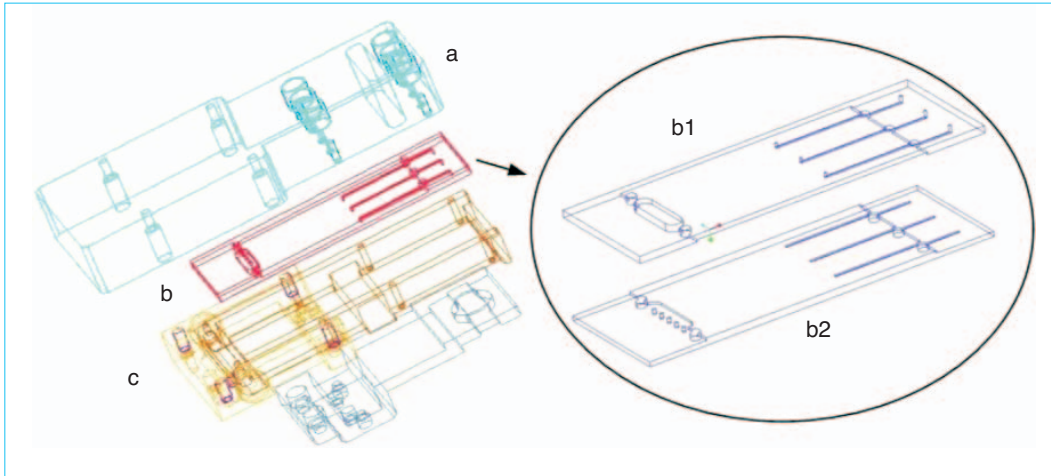


圖 9. 系統之生醫晶片與系統量測平台爆炸圖。

偏光儀的架構來加以檢測表面電漿共振技術，而不需以單純的 TM 波來進行表面電漿共振的架構，且因擁有橢偏函數 ψ 與 Δ ，可將折射率與厚度兩個因子拆開，得到真正的生醫鍵結反應的結果。

若將兩橢偏函數 ψ 與 Δ 結合一起來觀察，則與一般橢偏訊號相同，其解析度可達 0.1 \AA ，且可對生醫試樣做物理性質分析，得到生醫試樣的折射率。此一量測方式與一種新式生醫鍵結訊號分析技術—波導干涉儀 (waveguide interferometer) 有相同的解析度^(18,19)，就波導干涉儀而言，其為雙重極化干涉法測量 (dual polarisation interferometry)，架構上類似傳統的馬赫—曾德干涉術，波導為製造此干涉儀的主要工具，利用波導材料對於 TM 波和 TE 波具有不同的折射率，當波導材料上塗佈生物試樣使表面的參數改變時，會使波導之折射率產生變化，且對於 TM 波與 TE 波的變化並不會相同，因此波導材料的雙折射係數改變會使兩偏極態光在波導材料路徑中產生一相位差，利用偵測此相位差可得生醫鍵結反應的結果，且因其與橢圓偏光術相同，擁有兩個獨立參數 (TM 波之相位差、TE 波的相位差)，因此其也可用於解出厚度與折射率。此外，分析其中物理現象可發現一個有趣的結果，就訊號來說，波導干涉儀為在全反射現象中取得 TM 波與 TE 波之間分別的相位延遲量與相對的相位延遲量，其與橢偏訊號取得反射現象上 TM 波與 TE 波的相對延遲量為等價的物理現象，因此擁有相同的解析能力為相當合理的結果，且此種解析方式，皆可使用於偵測更小的生醫試樣，擁有更高的解析能力^(20,21)。

4. 流道系統整合

(1) 生醫晶片設計

光生化型檢測儀使用的生物晶片為 PMMA 之壓克力材質，利用塑膠射出成型技術來加以製造，其設計的理念上採用 ELISA 與 BIA 皆可使用的綜合架構。因此以微陣列與微流道為核心，外加以 SF2 為基材的生物載玻片來加以實現。首先於 SF2 之載玻片上鍍上 50 nm 厚之金膜，並將此載玻片以熱壓的方式接合於設計之塑膠薄片，形成完整的生醫檢測晶片，利用金膜與微流道的整合來固定生物分子於量測區域之上。

(2) 流道系統

流道系統的整合使得光生化型檢測儀有能力與平台來加以檢測 BIA 的生化反應程序，在流道系統選擇上，光生化型檢測儀採用 FIAlab 3500 型流

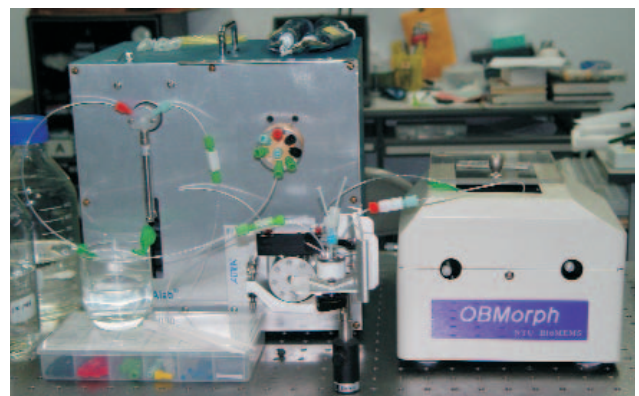


圖 10. 光生化形檢測儀。

體試樣自動化設備，與電腦連結上利用 RS232 序列埠介面，使其可進程式化控制生醫反應程式。此一流道系統包括了注射幫浦 (syringe pump)、蠕動幫浦與六閘之電動閥門控制。使用上，注射幫浦因為使用步進馬達加以控制，因此可對於流速的掌控相當的精確，主要用於緩衝液 (buffer) 之施加與流道流速的掌控；蠕動幫浦則提供了穩定速度的流體輸送，對於生物試樣送入試樣迴圈 (sample loop) 內可定量與精準的控制；電動閥門用途上則為控制緩衝液的輸送與生物試樣注入生醫晶片的時機。此一控制程式也架構於 LabVIEW 之上，在流道系統流速的控制能力上，可給予 60 $\mu\text{L/s}$ 到 1 $\mu\text{L/min}$ 的流道流速控制；蠕動幫浦的速度可區分為清理流速控制與試樣輸入流速控制；電動閥門控制上則分為輸入試樣與輸入緩衝液之選項。

5. 系統整合

光生化型檢測儀包含了光機電系統的軟硬體設備研製、流體控制、晶片製程及生化分析等專業介面，圖 10 為光生化型檢測儀，應用橢圓偏光術與表面電漿共振技術於一身，完成生醫晶片的檢測與檢測訊號介面的整合，配合流體設備的引入，最終提供一台可進行 ELISA 與 BIA 架構實驗的生物醫學分析平台。

五、實驗結果與討論

1. 光生化形檢測儀於橢圓偏光術

橢圓偏光術為光生化形檢測儀的主要功能之一，在傳統的應用上，其通常用於量測光學薄膜，於本研究中將其進一步用以量測生醫鍵結反應。

在生醫反應實驗中，為了於晶片表面固定生物分子，常會利用晶片與蛋白質間的共價鍵結，或是利用化學來加以修飾晶片表面，增加生物分子的吸附量及均勻性，爾後再施予生物分子加以鍵結。本實驗為先利用 8 個碳鍊的 thiol-linker 修飾鍍 50 nm 厚的金之生物晶片，之後利用緩衝液沖洗表面，再加以活化劑 (EDC/NHS)、人類免疫球蛋白 (human IgG, 400 $\mu\text{g/mL}$)、EA (1.0 M, ethanolamine hydrochloride)、人類抗原免疫球蛋白 (human anti-IgG, 100 $\mu\text{g/mL}$)，其中，緩衝液為 pH 7.2 的 phosphate buffer saline (PBS)，整體的實驗結果如圖 11。

2. 光生化形檢測儀於表面電漿共振技術

圖 12 為表面電漿共振技術於 BIA 架構生醫鍵結反應，整體實驗結果中可驗證，此系統可得到動態生醫鍵結反應的結果，配合本實驗的流程與時間控制，可經由表面電漿共振角度的變化量推算出表面濃度的變化。

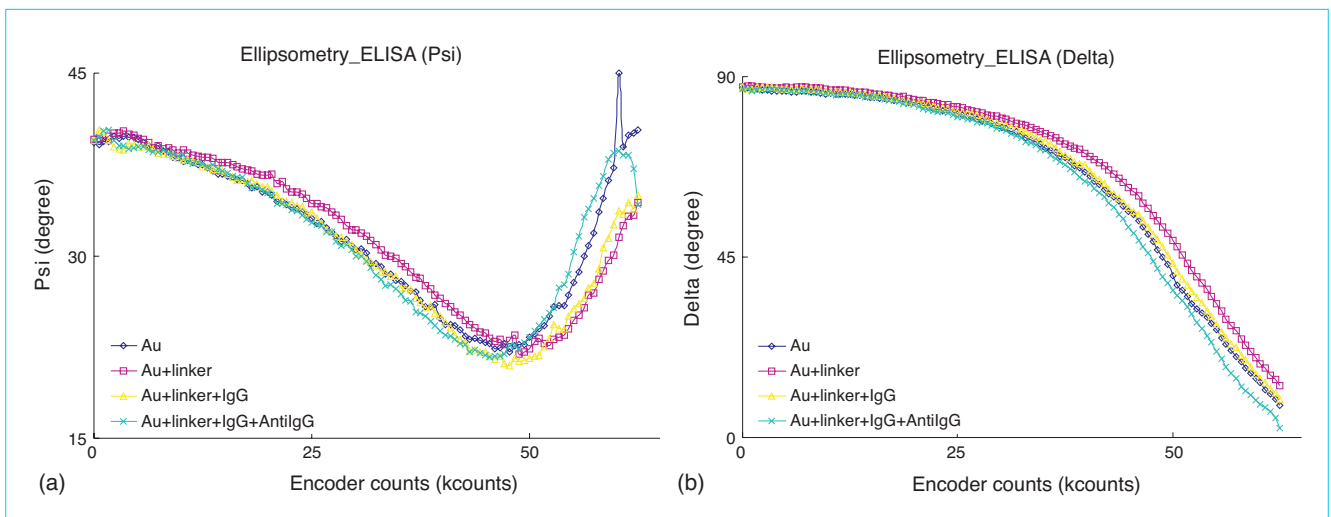


圖 11. 橢圓偏光術於生物薄膜固定化技術，(a) 橢偏參數對馬達紀錄讀數之變化，(b) 橢偏參數對馬達紀錄讀數之變化。

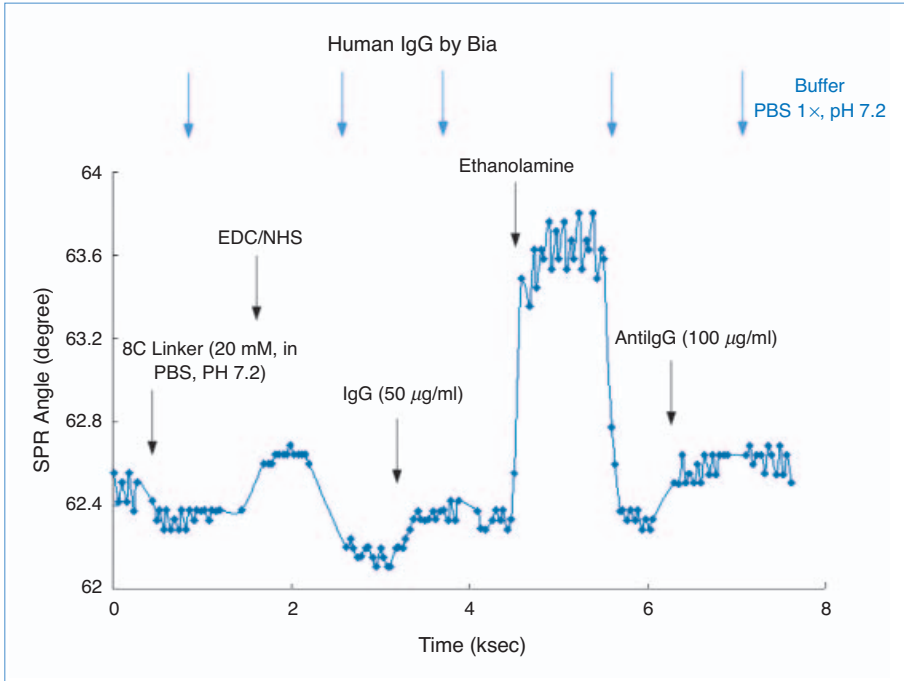


圖 12. 表面電漿共振技術之 BIA 架構生醫鍵結反應。

3. 光生化形檢測儀於橢圓偏光術觀測表面電漿共振

圖 13 為橢圓偏光術觀察表面電漿共振之 BIA 實驗架構的實驗結果，由實驗結果可見，利用此一方式可成功的觀察到動態之生醫鍵結反應，且圖 13(b) 中之橢偏參數 Δ 的實驗結果明顯的比圖 13(a) 中之橢偏參數 ψ 來得靈敏，訊雜比也較高，整體來說，橢偏參數的解析度比上橢偏參數 ψ 的解析度高上 1 個數量級。

六、結論與未來展望

光生化型檢測儀將橢圓偏光術的精神與表面電漿共振技術的精神結合，建立起一套基於此兩種技術多功生醫晶片儀。除了光機設備的研製外，也引入了生物相關技術與流道系統的整合，此一儀器除了可以利用橢圓偏光術量測傳統光學薄膜與利用表面電漿共振技術量測 ELISA 生物鍵結反應外，也可相容於 BIA 等架構於流道系統的生物鍵結實驗，並將流道系統的能力擴充，使生醫檢測使用上有更餘裕的空間。

光生化型檢測儀對於橢圓偏光術與表面電漿共振技術的連結上，提供了另外一套思維存在，成功

的利用了橢圓偏光術的光學量測架構量測出表面電漿共振技術的反應，對於此一方式應用，提供了生物醫學上的高精密度量測。以橢偏參數 Δ 來說，其承接了角度式表面電漿共振技術的靈敏度；對於橢偏參數 Δ 而言，則提供了相位式表面電漿共振技術的靈敏度。且以橢偏參數 Δ 的物理意義而言，更有可能和波導干涉儀的想法接軌。以橢圓偏光術的基本原理來看，利用橢圓偏光術來觀察表面電漿共振現象時，可以進一步的將生物試樣的薄膜厚度與物理性質加以求出。此物理性質包括了如折射率、質量、密度等，由此些物理特性，可準確的反應出生物鍵結反應的實際架構與結果。此外，在橢圓偏光儀與表面電漿共振技術的動態量測上，利用動態量測的結果，可順利計算出生物分子的反應特性，如表面親和力等，利用此一計算，可對於藥物篩檢作業提供資訊，此亦為現在生技製藥國家型計畫「光生化型晶片系統於流行性疾病檢測與藥物篩選之研發」的主要研究目標。以目前全球商用之生醫檢測儀來說，通常為單一功能且體積大、價位高，在一般研究單位或廠商有成本及空間的負擔下，希冀光生化型檢測儀可對我國生醫發展上產生有利的衝擊。

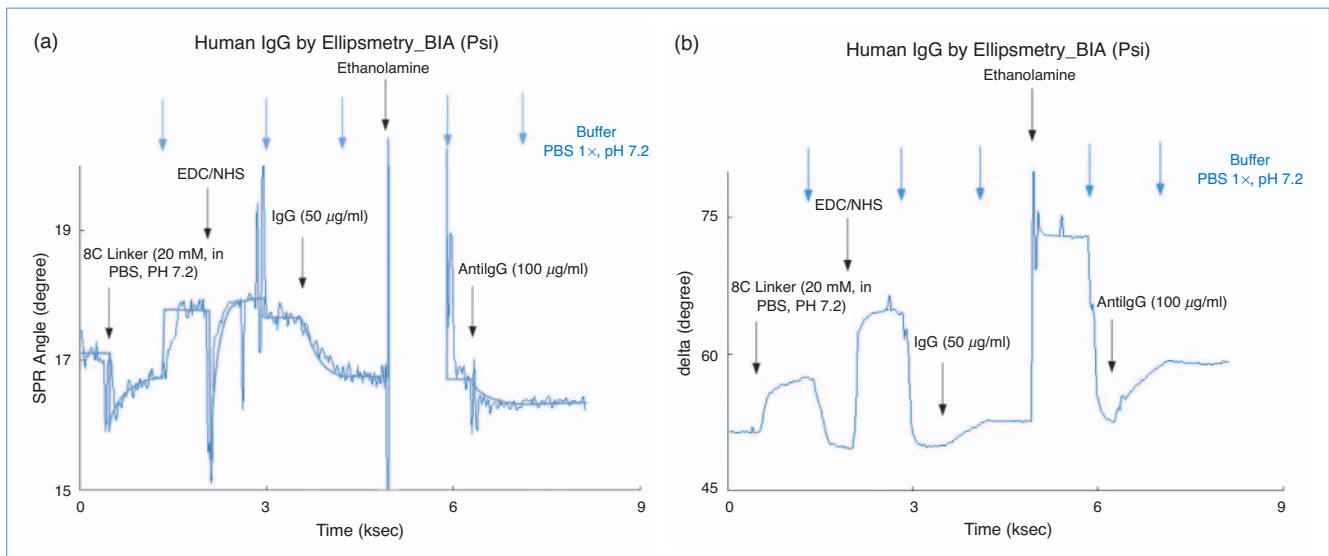


圖 13. 橢圓偏光術觀察表面電漿共振之 BIA 實驗，(a) 橢偏參數對時間之變化，(b) 橢偏參數對時間之變化。

參考文獻

1. 黃定國, 生物技術產業, **98** (2003).
2. 李世光, 林啟萬, 林世明, 製藥與生物技術國家型計畫 (2003).
3. H. Elwing, *Biomaterials*, **19**, 397 (1998).
4. H. Nygren and M. Stenberg, *J. Immunol. Methods*, **80** (15) (1985).
5. R. M. A. Azzam and N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, New York: North-Holland (1988).
6. H. Takasaki, *Appl. Opt.*, **5** (5), 759 (1966).
7. S. N. Jasperson and S. E. Schnatterly, *Rev. Sci. Instr.* **40** (6), 761 (1969).
8. E. Huber, N. Baltzer, and M. von Allmen, *Rev. Sci. Instrum.*, **56** (12), 2222 (1985).
9. E. Hecht, *Optics*, New York: Addison-Wesley (1998).
10. H. Raether, *Surface Plasmons*, Berlin: Springer (1988).
11. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **54** (3) (1999).
12. 吳俊彥, 拋物面鏡橢偏儀的分析與驗證—生醫與奈米科技應用初探, 國立台灣大學應用力學研究所碩士論文 (2001).
13. 李兆祐, 精準相位延遲拋物面橢偏儀, 國立台灣大學應用力學研究所博士論文 (1999).
14. 李兆祐, 李世光, 李舒昇, 薛順成, 楊運昌, 林長青, 吳俊彥, 一種量測物體複折射率及薄膜厚度之光學裝置, *ROC Patent Application No. 89,100,616* (2000).
15. 李兆祐, 李世光, 薛順成, 李舒昇, 吳俊彥, 一種具奈米級解析度之飛行高度測量方法與裝置, *ROC Patent Application No. 88,112,731* (1999).
16. 薛順成, 多功光電生醫晶片儀之研製: 橢偏術語表面電漿共振偵測之系統整合與應用, 國立台灣大學應用力學研究所博士論文 (2003).
17. SCI, *Film Wizard™ - Optical Thin Film Software: Getting Started Manual, Professional Version*, CA, USA: Scientific

Computing International (1994).

18. E. F. Schipper, A. M. Brugman, C. Dominguez, L. M. Lechuga, R. P. H. Kooyman, and J. Greve, *Sens. Actuators B*, **40**, 147 (1997).
19. C. H. Stamm and W. Lukosz, *Sens. Actuators B*, **31**, 203 (1996).
20. Abeles, *Surf. Sci.*, **56**, 237 (1976).
21. P. Westphal and A. Bormmann, *Sens. Actuators B*, **84**, 278 (2002).

- 徐維良先生為國立台灣大學應用力學研究所碩士。
- 李舒昇小姐為國立台灣大學應用力學研究所博士，現任國立台灣大學應用力學研究所博士後研究員。
- 李世光先生為美國康乃爾大學應用物理博士和應用力學博士，現任於國立台灣大學應用力學研究所教授與工程科學及海洋工程學系教授。
- Wei-Liang Hsu received his M.S. in applied mechanics from National Taiwan University.
- Shu-Sheng Lee received her Ph.D. in applied mechanics from National Taiwan University. She is currently a postdoctoral research fellow in the Institute of Applied Mechanics at National Taiwan University.
- Chih-Kung Lee received his Ph.D. with a major in theoretical and applied mechanics, and a minor in physics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Applied Mechanics and the Department of Engineering Science and Ocean Engineering National Taiwan University.