

微流體電泳晶片之技術與發展

Techniques and Development of Electrophoresis-Based Microfluidic Chip

徐玄修、顏宏霖

Hsuan Hsiu Hsu, Hong-Ling Yen

在現今生物科技領軍的時代下，生物晶片是熱門的研究方向之一，然而大量研究人員在投入微陣列晶片發展的同時，是否注意到微流體晶片是具有開發潛力的另一天地。本文將針對微流體晶片電泳作介紹，從整個系統發展之原理、設計、製造和相關技術等方面來說明，其中包括光學部分、電泳之電壓調控以及訊號擷取，配合高靈敏度檢測便成為一高效率分析工具，提供廣泛的應用領域。

Microfluidic chip is a novel technology in the biochip field. Research in microfluidic chip is remarkable in that it spans an incredible wide spectrum of topics in MEMS, chemistry, physics, biology and optics. This article will focus on the electrophoresis-based microfluidic chip, and introduce the system from the principle, designs, fabrication and relative information. The system of microfluidic chip includes chip fabrication, sample separation, optics, the control of high voltage and data acquisition. The high sensitivity and high efficiency brings this electrophoresis-based microfluidic chip in a widely used analytical tool.

一、前言

生物科技漸漸展露鋒芒佔有重要地位，而人類研究也從基因體時代跨入蛋白質體時代，如何日新月異不斷進步是一項重要課題。現今科技概念朝向多元化知識的結合與發展，因此結合各領域知識進行研究是時代潮流趨勢。由於近年來微機電 (micro-electro-mechanical system, MEMS) 的技術快速發展⁽¹⁾，此技術自 1960 年代開始萌芽，於 1980 年漸趨成熟⁽²⁾，從 1990 年代初期開始廣受先進國家的關注，紛紛投入大量經費從事相關研究，後來

便提出微小化全自動分析系統的概念 (micro total analysis system, μ -TAS)⁽³⁾。另一方面由於微機電系統是一跨領域整合之技術，其理論基礎及應用範圍涵括工程、基礎科學、應用科學和醫學等相關領域，所以 μ -TAS 的概念希望將實驗室中操作的生化實驗或一般化學反應整合在微小的晶片上，以減少試劑的用量、縮短檢測時間及人為操作污染等問題，一方面也達到全自動分析的目的。但因礙於無法有效地利用電壓來驅動分析物的原因，使得研究發展受限，直到藉由電泳技術才解決了這個問題。於是便開始了以毛細管電泳 (capillary electrophoresis) 原

理為基礎，利用微細加工技術在玻璃基板上蝕刻出管道，代替毛細管電泳系統的分離管道，發展出微晶片電泳分析器 (CE microchip device)⁽³⁾，在微小化的晶片上進行一系列的研究。

一般而言，生醫晶片是指在矽晶片、玻璃、高分子材料⁽⁴⁾ 等不同材料上，利用微電子、微機械的微小化技術，整合微機電、化學、物理、光電、生物、分子生物和醫學工程等各領域的技術。生醫晶片大致上可分為微陣列晶片 (microarray chip) 和微流體晶片 (microfluidic chip)，微陣列晶片優勢能提供大量的生物資訊，微流體晶片主要特徵在於先在分析平台上設計微流體管道，再配合毛細管電泳的原理進行分析。舉例來說，可使用微機電製程在玻璃基材上蝕刻三維空間的溝槽，與另一平面基材接合形成封閉微管道，在微管道內可針對分析物進行多樣化操控以配合分析流程。

早期控制流體在微管道的進出，利用控制閥門 (valve) 來調節，但要在晶片上製作控制閥門相當不容易，後來改以電壓驅動流體 (electrophoretic pumping) 的方式進行，只要藉助簡單的電壓切換就可操控樣品進出，很快的帶動了微流體晶片的發展⁽⁵⁾。微流體晶片除了有如上述微陣列晶片的檢測能力外，許多的化學反應和偵測都可在晶片上完成線上操作。雖然距離整合型的實驗室晶片還有一段距離，單一或數個功能的整合型晶片已陸續被發表並應用在生化分析的範疇。本文將以微流體晶片電泳為主，介紹系統架構與設計和相關應用，並以結合光聚合物、微透析技術為例，探討微流體晶片之延伸應用。

二、基本原理

微流體電泳和毛細管電泳的分離原理相同，主要差異在分離管柱的形狀和注射方式。利用微機電技術製作的晶片，管柱截面積的幾何形狀呈梯形與毛細管柱有些許差異，且分離管道縮短在數公分內，分析速度可減少至 1-2 分鐘。

1. 微流體電泳晶片

電泳的分離是以分析物在電場中受到吸引或排斥，造成其流動速率之差異來達到分離效果。我們

將帶電粒子的移動速度如下表示⁽⁶⁾：

$$v = \mu_{\text{cm}} E \quad (1)$$

v ：帶電粒子的移動速度， μ_{cm} ：帶電粒子的遷移率 (亦稱為電泳淌度，electrophoresis mobility)， E ：電場強度，帶電粒子遷移率由受到之電場力與其通過介質時所受之摩擦力達平衡時所定，而電場強度表示為毛細管每單位長度所施加的電壓 (單位是 V/cm)。

電場力表示為：

$$F_e = qE \quad (2)$$

其中 q 為帶電粒子電量。摩擦力 (以球形帶電粒子為例) 表示為：

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (3)$$

其中 η 為溶液黏度， r 為帶電粒子半徑， v 為帶電粒子移動速度，在施加電場的情況下，當電場力與摩擦力達到平衡時。此時，兩種力大小相等而方向相反：

$$qE = -6\pi\eta r v \quad (4)$$

因此可以得知帶電粒子在電場下的移動速度：

$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad (5)$$

$$\mu_{\text{cm}} E = \frac{q}{6\pi\eta r} E$$

其電泳遷移率可以表示為：

$$\mu_{\text{cm}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

2. 電滲透流

一般常用的毛細管材質 (熔融矽膠，fused silica)、玻璃和石英，其表面的矽醇 (Si-OH) 易解離而形成帶負電的 Si-O⁻，如圖 1 所示⁽⁷⁾。當管道內充

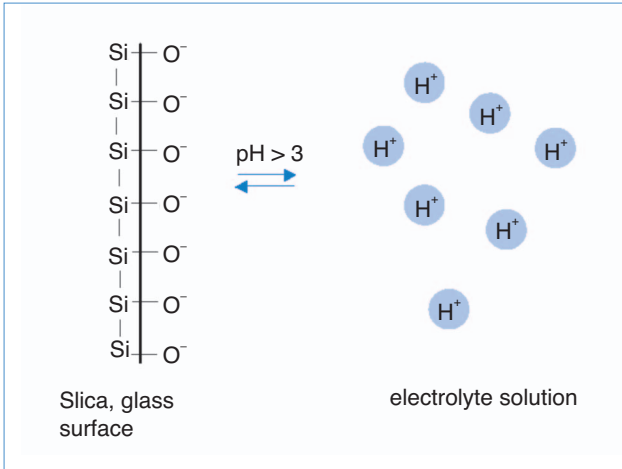


圖 1. 矽醇 (SiOH) 表面解離圖。

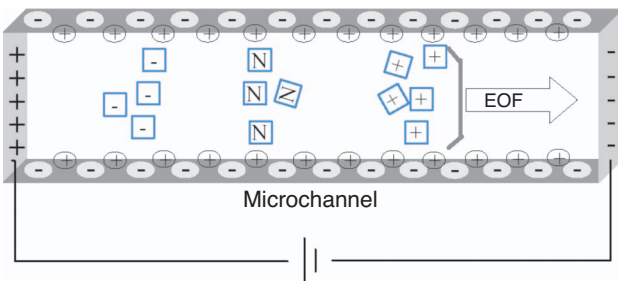


圖 2. 微管道中電滲流示意圖。

滿緩衝溶液時，於管壁會形成電雙層。第一層是由溶液中帶正電物質吸附在帶負電的 Si-O^- 管壁上所形成的固定層 (stern layer)，第二層乃是離管壁稍遠處也有過多的帶正電物質被吸引，隨著遠離管壁而以指數趨勢急遽遞減，形成擴散層 (diffusion layer)。因為電雙層的存在而造成管壁和緩衝溶液間產生了電位差，稱之為界面電位 (zeta potential)，於電場作用之下，微管道中溶液會有整體流動的現象，因而產生電滲透流 (electroosmotic flow, EOF)，如圖 2。

電滲透流的特點在於其流體剖面是平的，而不是一般流體的拋物形，所以電滲透流不易造成分析物帶寬的分散。一般而言，在電泳分析過程中電滲透流的方向是從正極到負極，但除了溶液產生的電滲透流遷移率 μ_{eo} 之外，帶電粒子本身亦受到電泳遷移率 μ_{em} 的影響，因此實際上觀察得到的整體遷移率 μ_{total} 是兩者的加成，正電荷的離子因受到負極吸引加上同方向的電滲透流使正電荷物質移動較快

(μ_{eo} 跟 μ_{em} 方向相同)，而負電荷雖受到負極排斥，但由於電滲透流大於靜電力所造成的排斥力，最後以比電滲透流慢的速率移動 (μ_{eo} 跟 μ_{em} 方向相反)，中性離子的移動速率則等於電滲透流，因此達到分離的目的。整體遷移率 (μ_{total}) 可以表示成：

$$\mu_{total} = \mu_{eo} + \mu_{em} \quad (7)$$

三、系統架構

微流體電泳晶片分析系統架構大致可分為三部分，包括晶片設計與製作、電壓控制以及偵測系統。簡單來說，一個完整的分析系統必定提供良好的分析載具，並將欲分析的樣品做適度的注射、進樣和分離，最後針對分析物進行偵測提供詳細的數據資料，以下即介紹系統架構。

1. 微流體晶片設計與製作

一般而言，微流體晶片形式可根據不同需求設計，但應用在電泳上則以十字形晶片為常見之基本規格。如圖 3，較長的區域是分離管道，因此複雜的分析物於其中因遷移速率不同達到分離效果。增加分離效率的方式有很多種，若在晶片上改善則方法有二：減小微管道之截面積和增加分離管道長度，所以欲在相同面積基板上增加管道長度，可設計蛇形的管道，如圖 4。另外，控制分析樣品的進樣量也是在設計微流體晶片的重要考量之一，所以晶片的交接處可以設計成雙 T 形，以增加樣品的

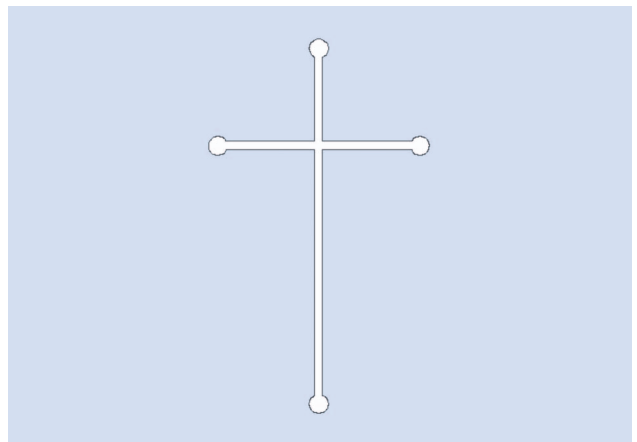


圖 3. 十字形微流體晶片。

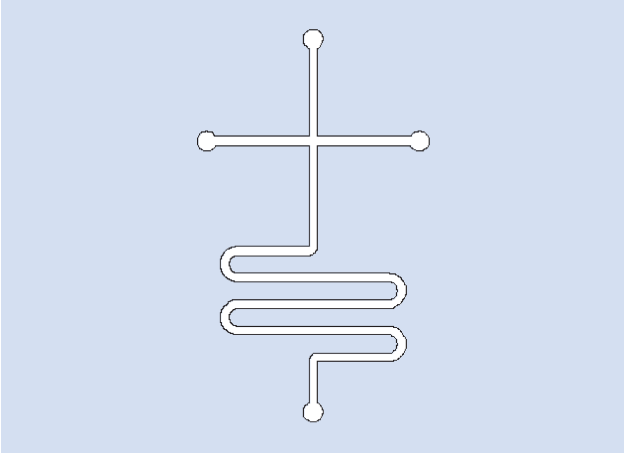


圖 4. 蛇形十字微流體晶片。

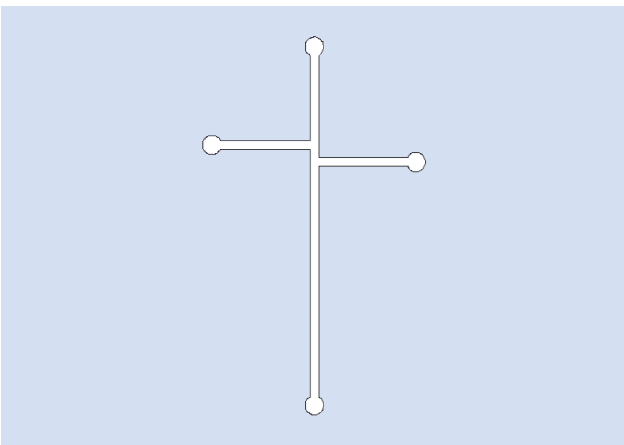


圖 5. 雙 T 形微流體晶片。

注射量，如圖 5。然而，為了處理大量複雜的分析物，簡單的十字形晶片是無法配合的，因此衍生了多管道的晶片便於可同時大量分析樣品，如圖 6。晶片設計是多元化的，以因應不同的需求，可配合微機電加工在晶片上加入加熱器、混和器或是動力源等等，提供豐富廣泛的變化。

在晶片製作方面，依據不同的材料特性有不同製作方式。對於高分子聚合物的材料而言，必須注意微管道表面是否能產生電荷以形成電滲流，如聚二甲基矽氧烷 (PDMS) 經過氧氣電漿處理後可改變表面性質為親水性，或壓克力 (PMMA) 等材料大多藉由熱壓模或灌模的方式完成製作，其優點在於製作快速、簡單及價格便宜，而玻璃或石英晶片則必須透過黃光微影製作，其製作費時，且價格昂貴，但穩定性高。

2. 電壓控制

電壓的輸出與控制是微流體電泳晶片最重要的技術，其要如何有效的控制樣品的注入量、流動方向以及提供有效的分離電壓都需要仔細調校，傳統毛細管電泳其所有流體流動皆為同向，在微流體晶片中因為分析物與緩衝液放在不同貯存槽，必須有效調控流體避免干擾分析過程。以下便針對十字形電壓調控的兩種方法進行介紹^(3,9)。

第一種方式其模式如圖 7(a)，先在 B 端填充樣品並施加高電壓，C 端則加入緩衝液並當做接地端，此時，在 B、C 之間便存在一電場強度，使得分析樣品由 B 往 C 流動，此步驟為樣品的注射。之後如圖 7(b)，關閉 B、C 的高電壓與接地，切換至 A、D 端，(A 端高電壓，D 端接地)，由於 A、C 之間的電場造成十字區帶的樣品往下方移動完成進樣步驟，最後樣品因分析物於電場下遷移速率不同產生分離效果，如圖 7(c)，完成注射、進樣和分析三步驟。此方式之優點在於只需單一電供應器配合簡單控制程式即可調制流體進出分析，但缺點在於樣品進樣注射時，容易發生洩漏問題，影響分析數據。除此之外，若想控制分析樣品的精準性與進樣量多寡，則需改變晶片設計，否則會有再現性不佳的問題。針對洩漏問題可在注射進樣時在

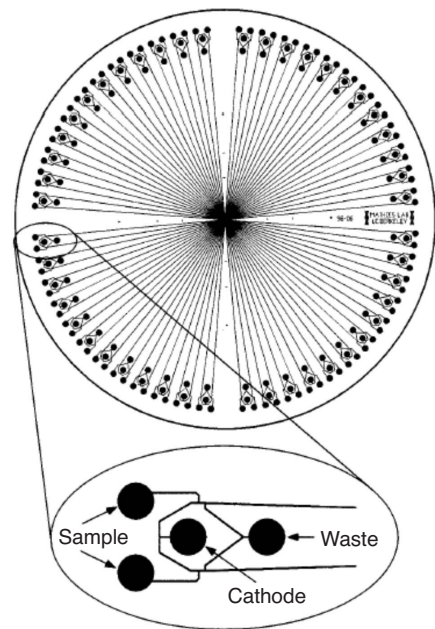


圖 6.96 管道微電泳晶片⁽⁶⁾。

圖 7.
電壓調控方式一。

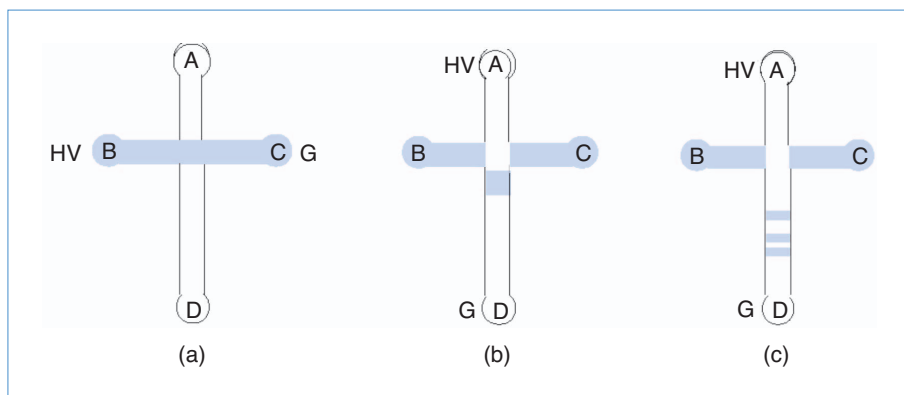
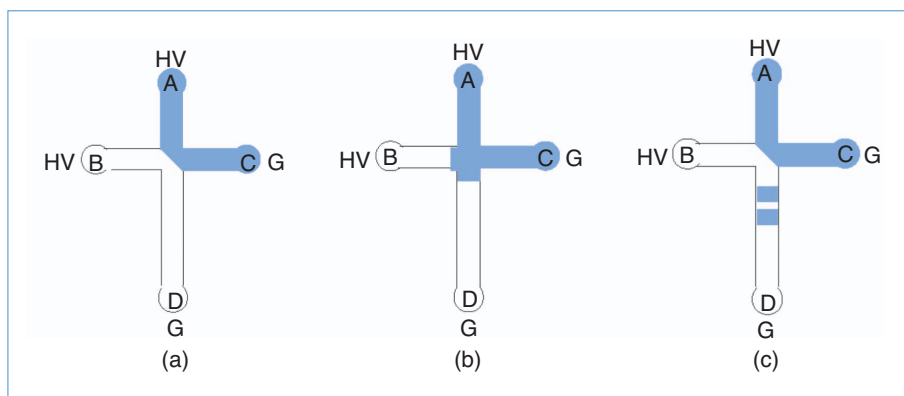


圖 8.
電壓調控方式二。



A、D 施加小電壓抑制洩漏。

另外一種的驅動方式完成進樣、注射與分離，其操作過程如圖 8。首先在 A、B 處施加高壓；C、D 為接地端，A 端填充分析樣品，B、C 和 D 則填充緩衝液，並藉由電壓調控讓樣品流到十字處時，會產生 A 往 C、A 往 D 方向的電滲透流，同時也會有 B 往 C 和 B 往 D 的電滲流，但是因為 B 往 C 方向的電滲流大於 A 往 D 方向的電滲流，使得樣品完全向 C 的方向流動 (圖 8(a))。當進行樣品進樣時，先停止供應 B 端上的高電壓，十字處液體隨即恢復原本流動擴散的特性，分別往 B、C、D 三個方向分流 (圖 8(b))，此時無電場的時間為樣品進樣的時間，可由此控制進樣量的多寡，之後立即施加高電壓恢復 B 往 C 和 B 往 D 兩個方向的電場，使液體流動方式恢復原來的情况，B 往 D 方向的電場提供物種分離所需要的電場，部分液體分流至 B 槽方向的液體和完全分流至 D 槽方向的液體，此時會受到 B 往 D 電場方向的影響，而在分

離管道內進行分離，如圖 8(c)。此方法的優點在於可控制樣品的進樣量與再現性佳的分析結果，缺點在於需要兩台電壓供應器以及樣品消耗量大，並可連接連續壓力流驅動樣品⁽⁹⁾。國科會精密儀器發展中心針對電壓供應器設計了微小化裝置，如同圖 9 所示，可提供最高 5 千伏特的輸出電壓，具有攜帶方便、體積輕巧的優點。

在微晶片上分析樣品時，如何避免樣品的滲漏是相當重要的，因為滲漏的樣品會持續地進入分離管道，造成管道內充滿樣品，使得偵測極限變差，失去快速而精準的分析。所以善用電壓控制、避免洩漏問題是相當重要的。

3. 偵測系統

經過電泳分離後的分析物，如何有效的偵測並將資料處理數據化是一重要關鍵，由於微電泳晶片的每次樣品所需注射相當少，約數 nL 或更少，因此在偵測系統上必須選擇具有高靈敏度的設備。在

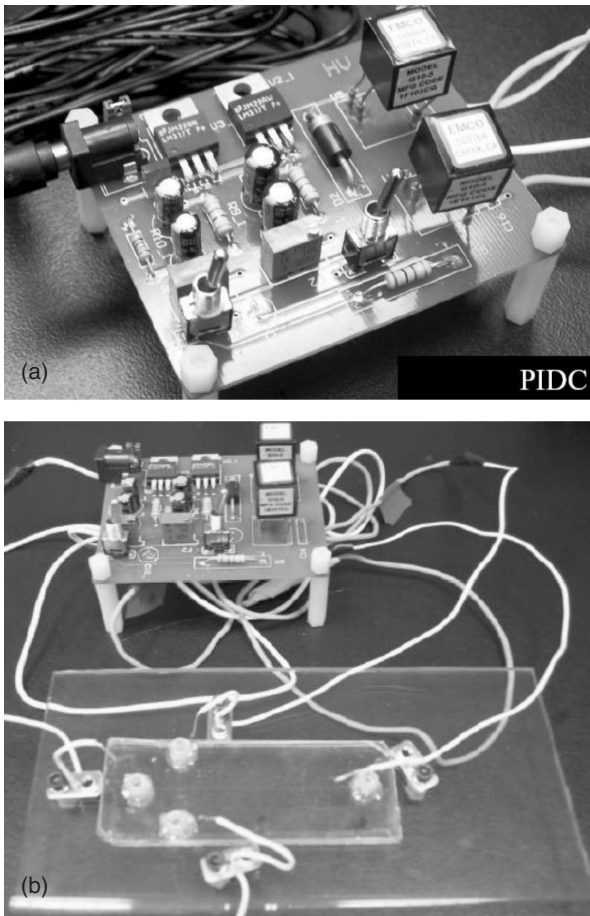


圖 9. (a) 小型高壓電源供應器，(b) 小型高壓電源供應器與微流體晶片。

光譜偵測技術中，雷射誘導螢光 (laser-induced fluorescence) 最常被使用在電泳上作為偵測系統⁽¹⁰⁾，如圖 10 所示。其優勢在於具有高靈敏度與專一性，所以可減少分析過程的干擾，原理是當分析物帶有螢光性質或標示染料後會吸收特定波長的光，並激發出另一較長波長的光。一般而言其靈敏度可達 femto mol (10^{-15} M)，但是受限於儀器設備較為昂貴，且分析物必須具備螢光性質，使得應用方面有些許影響。而藉由電化學技術進行偵測亦是一種高靈敏與高選擇性的方法，其利用分析物在發生反應時，造成電極上量測到的電流與電位變化來分析。電化學偵測的優點是所使用的儀器設備花費比螢光便宜，而且不需擔心分析物是否有螢光特性或額外標示染料。但是因為在進行電泳分離時，會施加高電壓並對電化學偵測產生干擾，降低分析

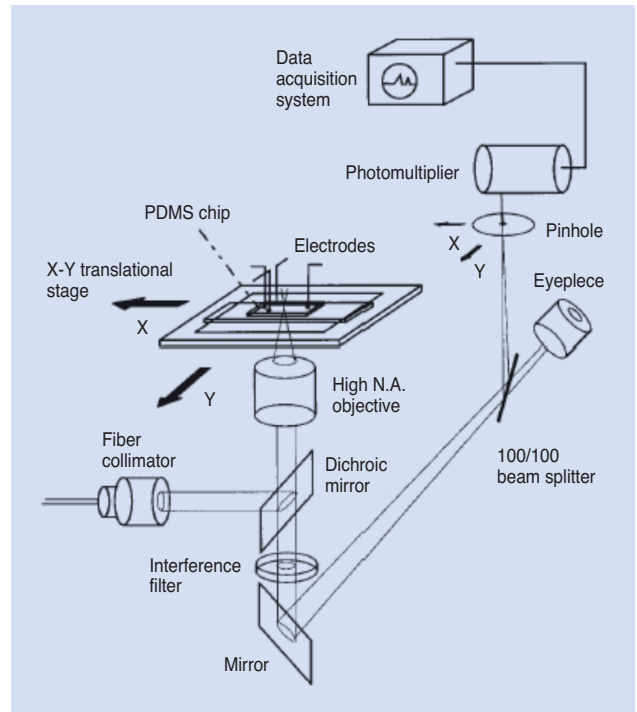


圖 10. 雷射誘導螢光偵測系統。

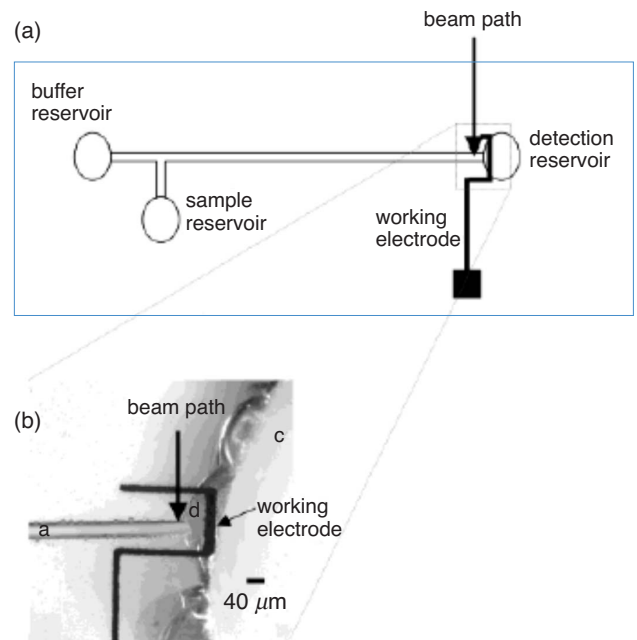


圖 11. 結合螢光與電化學偵測之微流體晶片⁽¹¹⁾。

的準確度，所以 Ewing 等人便提出結合螢光與電化學的晶片偵測系統⁽¹¹⁾，如圖 11 所示，希望改善兩者的缺點提升分析效率，讓分析範圍更廣泛。

四、結合微流體電泳晶片之相關技術

微流體電泳晶片的相關應用相當廣泛，可針對複雜的樣品進行分析。未來的重點會放在如何將電泳晶片的分析平台上結合其他技術，朝微全程分析系統 (μ -TAS) 邁進，把繁瑣的實驗步驟整合在數公分的晶片，減少分析時間及樣品消耗量等等。以下將以光聚合物與微透析技術為例子作介紹。

1. 光聚合物

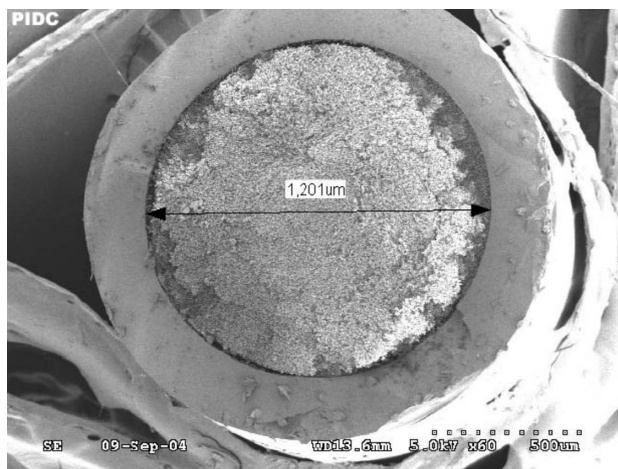
一般所使用的微流體晶片其管道內的截面積比傳統毛細管大，而且長度也比毛細管短，所以為了增加微流體晶片的分離效率，可在微管道內填充多孔性材料，其成分以高分子材料為主，利用高分子聚合的方式來製作孔隙，產生的管柱稱為整體性管柱 (monolithic column)⁽¹²⁾，此類材料具有連續一致多孔洞性 (continuous unitary porous) 的特點，相較於傳統上粒子填充式管柱有明顯不同。高分子聚合物管柱材料的表面還可以進行表面改質、控制孔洞大小和密度。

光聚合物以矽為主體材料的整體性管柱，一般其製備原理來自溶膠凝膠 (sol-gel) 技術，在微流體晶片上製作過程，先利用高分子單體溶液填充至管道內，再將欲形成聚合物的特定區域照光，於短時間內即可聚合完成，其結構如圖 12。

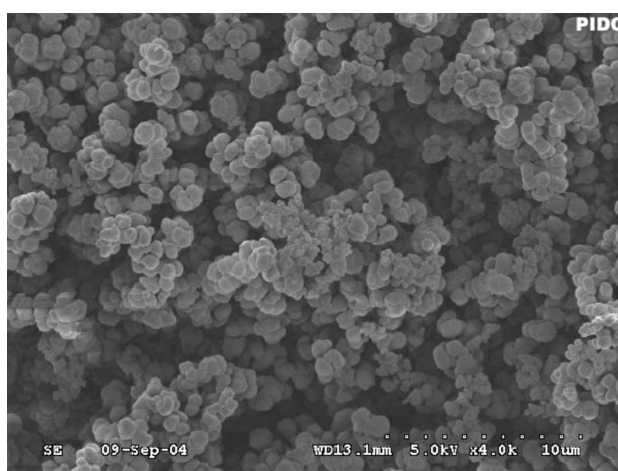
將光聚合物與微流體電泳晶片結合可提高分離效率，乃因分離機制多了層析原理，所以兩者的結合可促進微流體電泳的發展。

2. 整合型微透析電泳晶片

微透析 (microdialysis) 是近二十多年來發展出的一項新技術，其目的係對於動物體內腦部、器官、組織以及血液等部位進行化學物質的取樣方法，並廣泛應用在活體細胞外液 (extracellular space) 中所含成分之取樣分析。1972 年西班牙 Delgado⁽¹³⁾ 研發「dialytrode」的透析裝置。1974 年瑞典 Ungerstedt⁽¹⁴⁾ 所領導的研究人員利用人造血管 (blood vessels) 的想法，改進壓抽導管操作上的缺點，並引導出今日微透析探針 (microdialysis probe) 技術的概念。



(a)



(b)

圖 12. (a) 玻璃毛細管中光聚合物之電子顯微鏡圖，(b) 光聚合物放大後之電子顯微鏡圖。

微透析探針技術的原理可以一個簡單的概念來說明。我們將微透析探針當成是一人造血管 (blood vessel)，而微量幫浦則相當於人造心臟，微透析探針在設計上是一個具有入口端及出口端的半密閉循環流體系統，當幫浦不斷的從入口端推入和人體內體液相近的生理食鹽水或是人工脊髓液時，因為滲透壓的原理讓半透膜外高濃度的物質藉由擴散方式進入膜內，血液中的各種成分就會依循幫浦所帶動流體方向流動，最後從出口端流出並可加以收集，如圖 13。若將微透析裝置與微流體晶片結合並配合螢光檢測，其系統裝置如圖 14 所示。結合兩種技術的優點在於：第一、可線上 (on-line) 收集

透析液，並標示染料、立即進樣分析，大大減少時間耗費。第二、毛細管電泳配合雷射誘導螢光偵測，可提高分離效率與時間，也可提高偵測靈敏度與偵測極限。

簡單來說，微透析技術應用範圍包括臨床神經醫學研究、藥物或毒物的分析⁽¹⁶⁻¹⁷⁾、藥物開發或人體新陳代謝等等。今日的微透析探針系統，擁以下優點：簡單、可快速操作，方便偵測細胞外液中化學物質濃度的相對變化⁽¹⁸⁾，透析膜可保護周圍組織免受傷害⁽¹⁹⁻²⁰⁾，並盡可能地將透析裝置保持在無菌狀態下。此技術可用來處理活體 (*in vivo*) 動物或體外 (*in vitro*) 微量分析物的取樣，透過微透析管取樣時，可將局部之蛋白質或其他大分子排除在膜外，這是有別於其他傳統取樣的優點。此外微透析技術所收集之液體相當乾淨，且能直接與其他分析儀器連線，簡單的透析步驟即可達到純化及樣品前處理的效果。現今大家最常使用的微透析探針系統，將為人類提供一套新的疾病診斷及治療方式，並把藥物傳輸到特定部位觀察。近十年來的研究重點放在增進透析管的功能，並改良透析膜及透析管的式樣，以配合各式研究。

五、結論

在未來，生物晶片技術將改變人類生活，在新藥研發、基因工程、環境監測、食品檢測及臨床診

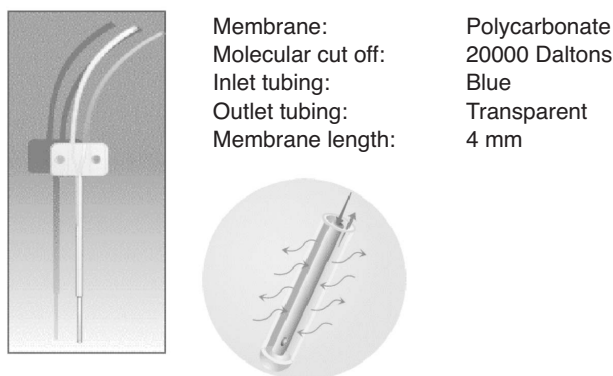


圖 13. CMA/20 微透析探針的形式及透析原理⁽¹⁵⁾，微透析探針的藍管是灌流液入口，透明管是透析液出口

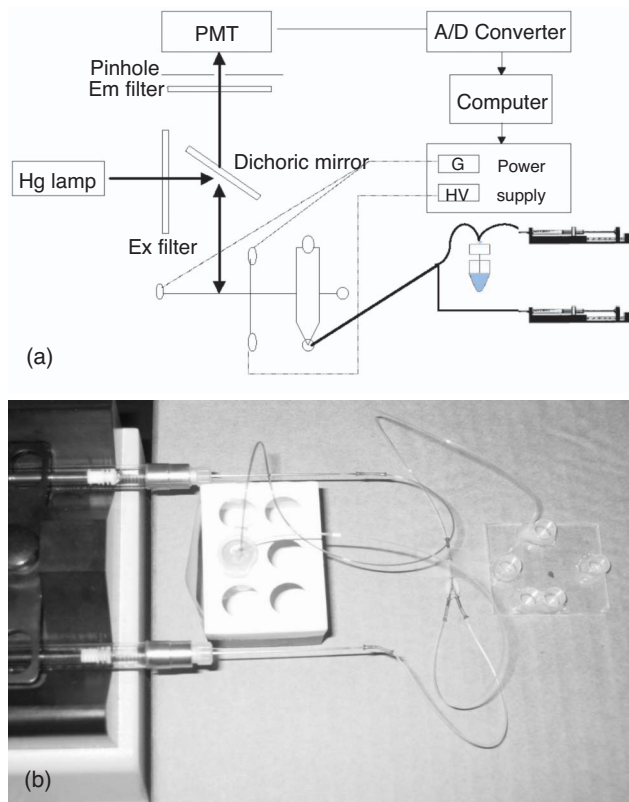


圖 14. (a) 整合微透析電泳晶片分析系統示意圖，(b) 整合微透析電泳晶片分析裝置圖。

斷上會有革命性的突破，主要原因是藉著微機電技術，研究人員可將實驗室中的各項儀器整合，縮小在一平面的晶片製成高科技元件，其上包括了進樣 (sampling)、樣品傳送 (sample transport)、反應 (reaction)、分離 (separation) 和偵測 (detection)。藉由這種技術可將儀器微小化整合於一小面積，不但可降低使用成本、大幅減少試劑的用量、降低操作誤差和操作時間，可平行、快速地處理大量的生物資訊。未來將與其他的生化分析技術結合，可改進傳統生化分析的缺點，發展出操作方便且具有效率分析工具。

參考文獻

1. E. Kim, Y. Xia, and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (5), 3694 (1996).
2. M. Bao and W. Wang, *Sensors and Actuator A*, **56**, 135 (1996).
3. D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, and H. M. Widmer, *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).

4. Y. Xia and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 550 (1998).
 5. A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, *Sens. Actuator B*, **1**, 244 (1990).
 6. D. N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction*, 2th ed., Hewlett-Packard Company (1992).
 7. A. Kohlarush, *Ann. Phys. Chem.*, **62**, 209 (1987).
 8. Y. Shi, P. C. Simpson, J. R. Scherer, D. Wexler, C. Skibola, M. T. Smith, and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **71**, 5354 (1999).
 9. Y. H. Lin, G. B. Lee, C. W. Li, G. R. Huang, and S. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, **937**/1-2, 115 (2001).
 10. C. S. Effenhauser, G. J. Bruin, A. Paulus, and M. Ehrat, *Anal. Chem.*, **69**, 3451 (1997).
 11. J. A. Lapos, D. P. Manica, and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **74**, 3348 (2002).
 12. 劉光耀, 光聚合高分子在微流體管道上的設計與製作, 國立成功大學工程科學所碩士論文 (2004).
 13. J. M. R. Delgado, F. V. DeFeuids, R. H. Roth, D. K. Ryugo, and B. M. Mittrala, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 198 (1972).
 14. U. Ungerstedt, C. Pycock, and B. Schweiz, *Akad. Med. Wiss.*, **1278**, 1 (1974).
 15. 瑞典 CMA 公司網站 www.microdialysis.se.
 16. S. Tellez, N. Forges, N. Roussin, and L. Hernandez, *J. Chromatogr.*, **581**, 257 (1992).
 17. B. L. Hogan, S. M. Lunte, J. F. Stobaugh, and C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **66**, 596 (1994).
 18. B. A. Donzanti and B. K. Yamamoto, *Life Sci.*, **43**, 913 (1988).
 19. U. Tossman and U. Ungerstedt, *Acta. Physiol. Scand.*, **128**, 9 (1986).
 20. H. Benveniste, J. Drejer, A. Schousboe, and N. H. Diemer, *J. Neurochem.*, **43**, 1369 (1984).
-
- 徐玄修先生為國立成功大學化學所碩士，現任國科會精密儀器發展中心助理研究員。
 - 顏宏霖先生為台北科技大學機電整合研究所碩士，現任國科會精密儀器發展中心助理研究員。
 - Hsuan Hsiu Hsu received his M.S. in chemistry at National Chung Kung University. He is currently an assistant researcher at Precision Instrument Development Center, Nation Science Council.
 - Hong-Ling Yen received his M.S. in mechatronic engineering from the National Taipei University of Technology. He is currently an assistant researcher in Precision Instrument Development Center, Nation Science Council.