

以介電泳晶片搭配拉曼光譜 於環境微生物之快速分析

Application of Dielectrophoresis Chip Integrated with Raman Spectroscopy for Rapid Identification of Microorganisms

林其昌、張憲彰

Chi-Chang Lin, Hsien-Chang Chang

環境中微生物常以不同的生長方式與巧妙的分布，使自然生態系統得以維持平衡。然因台灣夏季高溫多濕，促使細菌與黴菌快速繁殖，往往造成諸多環境衛生如飲用水及食品污染，若人類及動植物不經意地遭受致病微生物的感染，則其所造成對人畜的健康及公共衛生的危害常是駭人聽聞的。除普及的衛生教育之外，積極發展新型感測科技以建立快速微生物的鑑定方法，更是避免這些災害發生所刻不容緩的課題。在本文中將聚焦於介紹一種免培養、免標記，且符合多樣性檢測應用之要求，使用結合微流體技術所發展的新型介電泳晶片，透過三維立體結構與巧妙的電極安排和設計，可針對低濃度目標微生物進行快速且連續性分離與捕捉，使其形成高密度聚集體，以增加可檢測濃度，而在晶片捕捉區中特別施予粗糙表面之設計，將更有助於原位拉曼光譜檢測中，提供較高辨識度的拉曼增顯指紋圖譜。

Microorganisms normally exist in the natural environment with different population and nutrient uptake methods under the balanced ecological systems. However, bacteria might pollute our food or water easily owing to its over growth under the muggy and humid environment. While human beings, animals or even plants are incidentally infected by pathogenic microorganisms, their endangerments to individual and public health are often shocking. In order to prevent and avoid these disasters, it is a great urgency to develop novel culture and label free sensing technologies with rapid detection and identification functions. A novel 3D bio-diagnostic microfluidic chip with continuous bacteria sorting and concentrating functions by dielectrophoresis and *in situ* bacteria surface enhanced Raman scattering analysis is presented.

一、前言

「民以食為天」，無論未來科技如何發展，食物依舊是維持人類活動最根本的原動力，唯有在充足且安全的食物供給下，人們才得以發揮他們優異的創造力。隨著環境污染及農藥濫用的日益嚴重，蔬果與肉類遭到化學藥品或微生物污染，造成食物中毒消息時有所聞，因此如何確保吾人食品之安全，遂成為近年來相當重要的課題。如我國衛生署大力推行「食品安全管制系統」，即要求食品相關業者從生產、加工到運送的各项環節可能產生的危害因子進行分析與管控，以確保市售食品的安全。由於微生物污染所造成食物中毒事件常是主因之一⁽¹⁾，然而目前病原菌檢測相當耗時，其結果亦往往僅能提供事後追蹤的依據，對於食品安全的預防能力明顯不足。例如台灣濕熱的氣候條件使得農畜牧環境及產製品極易受到微生物污染，引發的牛隻潛在性或臨床性乳房炎，非但造成淘汰牛隻率居高不下，亦影響國內乳製品品質，儼然已成為酪農及相關產業的困擾。正確菌種分析雖為牛隻治療正確投藥的重要依據，然微生物檢測通常需經數天至數週的培養，以提供足夠的檢驗菌量，產品於此冗長的檢測過程通常已銷售至消費者，甚至已經食用。製造業者也將因費時耗力的產品回收，而蒙受嚴重損失。

菌種的基因序列比較，乃至於 DNA 微陣列晶片，是傳統菌種的分類與較先進的鑑定依據，但須有基因萃取技術及聚合酶反應下的檢測，並非區域性警戒站或酪農所能勝任^(2,3)。故此，提高生活環境與食品品質優質化，唯有從改善目前的分析技術以縮短檢測時間著手。本團隊近年來著重於快速微流體介電泳晶片檢測技術開發，利用菌種間介電特性的差異，可藉由電壓頻率的操控從生乳檢體中分離出病原菌，且透過晶片快速檢測及量化功能，提供酪農即時性牛隻感染資訊，以供治療用藥之參考。與科技發展密切結合，從食的角度出發，繼而提升民生價值，並提供環境與農、林、漁、牧生產者以及食品加工業者一種迅速且有效的檢測工具，將可縮短微生物檢測所需時間，以確保社會大眾食品的安全，遂能發展與營造出一個綠色優質產業與生活環境(圖 1)。

二、介電泳晶片的歷史與發展

當一個不帶電荷粒子懸浮在緩衝溶液，且受到外加的非均勻交流電場作用下，使得未帶電荷粒子產生極化誘發偶極矩 (dipole moment)，其方向會隨著粒子與懸浮液間極化能力 (polarizability) 的相對關係而改變，隨著粒子表面電荷改變，而使粒子往正端或負端電極移動，此即所謂「電泳現象」，可用來將特定粒子從溶液中分離出來。若利用此現象並搭配外加電場頻率、粒子及溶液的介電係數，以改變粒子表面電性，此時除了電泳現象外，也將因極化作用驅使粒子往不同電場區域移動，此即為介電泳 (dielectrophoresis) 現象，而促使粒子移動的力量則以介電泳力 (dielectrophoretic) 稱之。如圖 2 所示，當粒子往強電場區移動稱為正介電泳效應 (positive dielectrophoresis, DEP)，反之，則稱為負介電泳效應 (negative DEP)，而臨界頻率 (cross-over frequency) 則意指處於上述兩者間之平衡狀態，透過上述「作用力」的調整，可對生物性粒子進行連續性區分、操控、分離及檢測⁽⁴⁻⁶⁾。透過與微流體系統的整合，介電泳技術已經被導入許多不同的生物科技領域，尤其在多樣性生理溶液環境與非均勻電場中的介電泳操控，可達成許多傳統方式所無法完成的目標，如微環境中的粒子分離、濃縮與篩選⁽⁷⁾。

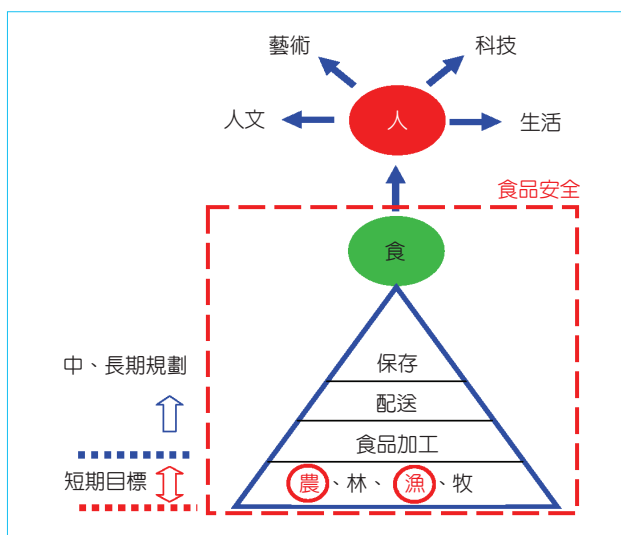


圖 1. 食品安全衛生與優質生活關係。

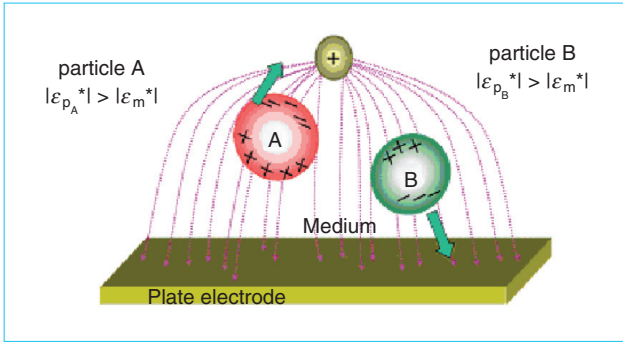


圖 2. 微粒在非均勻電場中的移動現象。

由於不同生物粒子 (如細菌) 懸浮在溶液中，很難以外觀或離心等簡易方式區別。因其本身型態、大小及其導電和介電特性均有差異，某些頻段範圍內同時存在有正、負介電泳效應之表現，亦即該菌種之「臨界頻率」，細菌間存在的頻段範圍相異性 (亦可能相似) 可用以進行菌種間之分離辨識 (如圖 3)。此外，若以上述介電泳操控並搭配適當的流場方式，更可將分離出來的細菌加以計數與收集，除可提高待測物之分離效率，亦可進一步對分離菌體加以分析與應用。

低菌數為實際樣本檢測的主要瓶頸，連續收集方式則常為克服並提高樣本可偵測度的方法之一⁽⁸⁾。透過三維立體微流體晶片設計，以多組面對面電極系統安排模式製作出微小電極與微流道，結合介電泳原理，並選擇適當介電特性溶液，使不同介電特性的細菌於合適電場條件下達到分離效果，可進行快速且連續捕捉樣本中之微粒，並且透過拉曼光譜系統加以「區別」。然此系統中的作用力考量相當複雜，包括流動管道高度、電壓條件、微粒尺度、流體速度與黏滯係數等均影響生物微粒的分離效果^(9, 10)。圖 4 顯示於三維結構的連續式微流體介電泳晶片中，透過上下電極安排除可於管道中提供高且均勻的電場外，亦可使連續流場中生物微粒之操控性增加，可獲得較佳微粒聚焦、篩選、分選與捕捉的效果。其中當作用於粒子受到的介電泳力大過流體流力時，粒子會被「排斥」而順著電極方向往上方流道，反之，粒子則「穿過」電極，往下方流道 (圖中 (b) 左與 (c) 左)，最後於捕捉區電極受到捕捉 (圖中 (b) 右與 (c) 右)。

三、線上整合光譜分析之行動式晶片

由於拉曼光譜可提供如官能基振動、蛋白質結構與胺基酸變化等相當多生物性情資，不但可用於微生物生長分析，更有機會提供菌種鑑定之特徵指紋性圖譜 (bacteria fingerprint)，近年已有多數論文報導，可針對單一或少量微生物或細胞進行拉曼光譜量測，已備受矚目⁽¹¹⁾。由於拉曼光譜不需複雜的處理程序即可直接針對微生物如細菌和黴菌進行分析⁽¹²⁾，過去筆者研究團隊亦曾發展以不同微生物如隱孢子蟲的卵囊體 (*Cryptosporidium parvum* oocysts) 及其寄生細胞株 (HCT-8 cell line)，甚至以污染常見的致病黴菌—白色念珠菌等，進行微生物

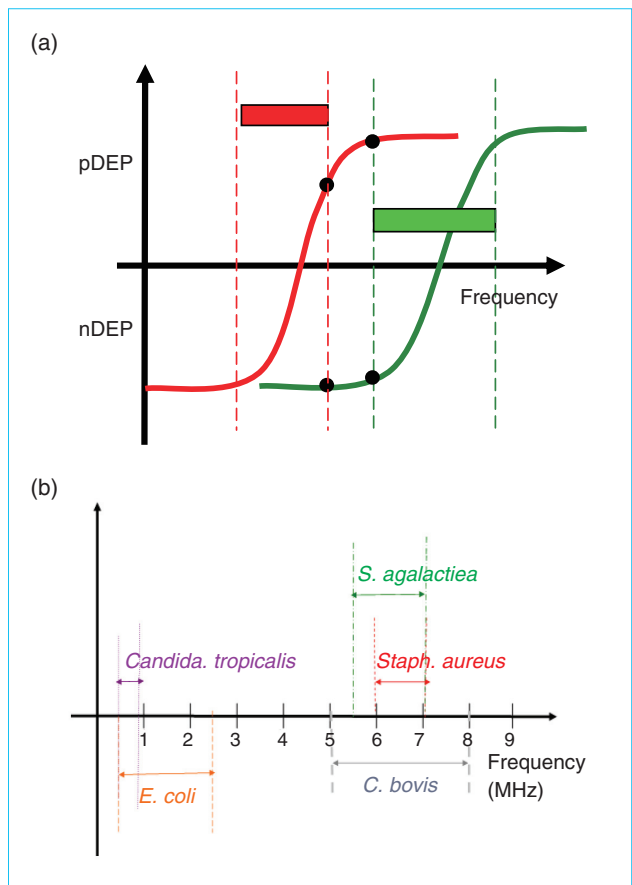


圖 3. 菌種的介電頻率變化。(a) 紅與綠線各表示兩種不同粒子之介電效應隨頻率改變情形。垂直虛線範圍為其「臨界頻率」區段，不同粒子可於黑點間頻率範圍進行分離。(b) 部分生乳內常見菌種之臨界頻率區段。

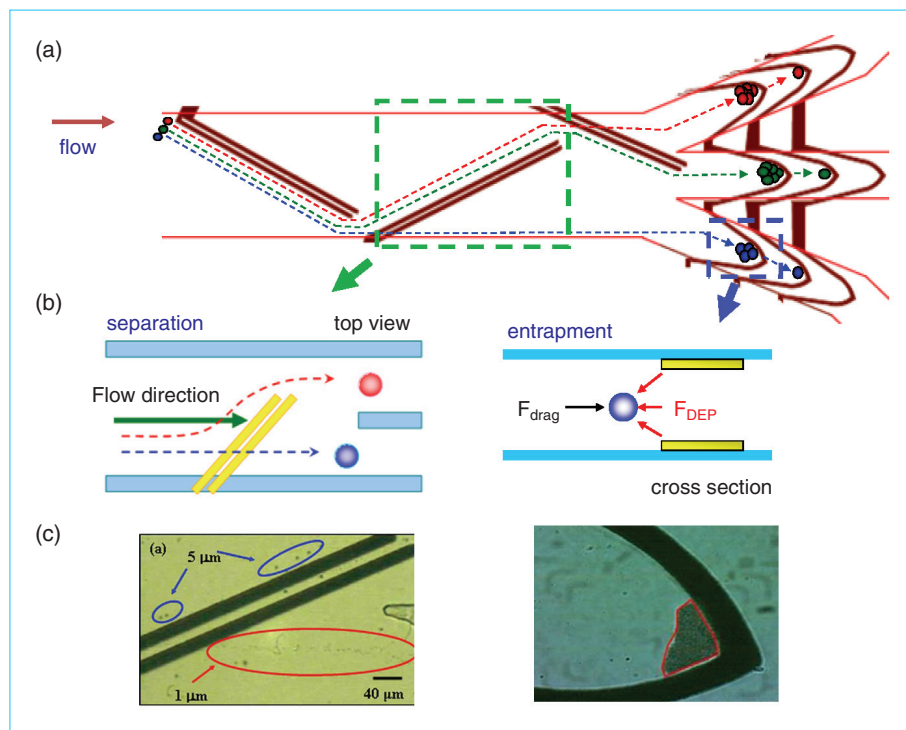


圖 4. 三維式介電泳晶片分離粒子示意圖。(a) 介電泳晶片分離至捕捉示意圖。(b) 管道中粒子的分離 (圖中 (b) 左與 (c) 左) 與捕捉 (圖中 (b) 右與 (c) 右)。

拉曼光譜分析技術研究⁽¹³⁾。然而生物性樣本的光譜訊號通常相當微弱，且伴隨著極大的生物螢光效應，造成訊號判讀的困難，因此許多可提高訊號及增加光譜判讀性的方法，如奈米金屬微粒的使用，即成為最常見方式之一^(14,15)。

當分析物非常接近或吸附於金屬基質所造成光譜訊號的增強現象，稱為表面增強拉曼光譜 (surface enhanced Raman spectrum, SERS)。當金屬微粒包覆在生物樣本表面形成一粗糙表面或聚集時，除使樣本產生拉曼光譜訊號增強外，亦可消除部分螢光訊號。由於表面增強拉曼光譜可顯著地提高訊雜比，用於少量微樣本檢測時，不需太多曝光時間，即可獲得明顯的光譜圖形，因此可達快速檢測鑑定之目的⁽¹⁶⁾。過去筆者研究團隊亦曾將待測樣本與金屬微粒膠體於晶片系統中進行預混合，並於樣本捕捉區獲得極佳的微生物拉曼增顯圖譜。然此法卻因樣本與金屬微粒的混合均勻性控制不易，且混合後造成的凝集現象，使得本法仍存有再現性不高的問題。況且混合後生物樣本介電特性改變，亦為介電泳作用力操控及晶片分離效率降低之原因⁽¹⁷⁾。

透過粗糙、奈米線矩陣結構或特定排列的金屬表面，以提供較佳的微生物指紋圖譜，則是另一種

常見的光譜增顯方式⁽¹⁸⁻²⁰⁾。然而上述技術於生物性樣本的直接應用至今仍相當困難，例如血液中感染病原菌區別，亦或牛乳等飲品中微生物分離等，微生物菌數低且需特殊培養以供檢測仍為無法避免的步驟。為突破上述困境，將粗糙金屬表面加工技術整合至晶片的樣本捕捉區中，圖 5(a) 為管道末端的微生物捕捉電極與經粗糙加工金屬表面 (紅色虛線區域)，插圖則以原子力顯微鏡量測得粗糙金屬表面；圖 5(b) 呈現微生物受介電泳力排斥於管道中央，配合下方原位雷射激發可直接進行拉曼光譜分析；而金黃色葡萄球菌於未經金屬處理的玻璃表面、光滑金屬與粗糙化後金屬表面所獲得的增顯效果拉曼圖譜 (圖 5(c))。透過背向金屬表面加工可提供本晶片更具潛力的分析能力，包括 (1) 目標樣本可直接分離與光譜鑑定量測；(2) 直接提供拉曼光譜訊號增顯效益；(3) 減少或避免背向基材產生的光譜訊號如螢光干擾；(4) 避免使用金屬奈米微粒所造成的比例及混合均勻性問題，可提高樣本訊號再現性；(5) 避免金屬奈米微粒與微生物結合後所造成的樣本凝集問題與臨界頻率改變情形。目前此新穎開發具生物性微粒連續分離、收集與捕捉功能，且整合線上原位拉曼光譜檢測之介電泳晶片，

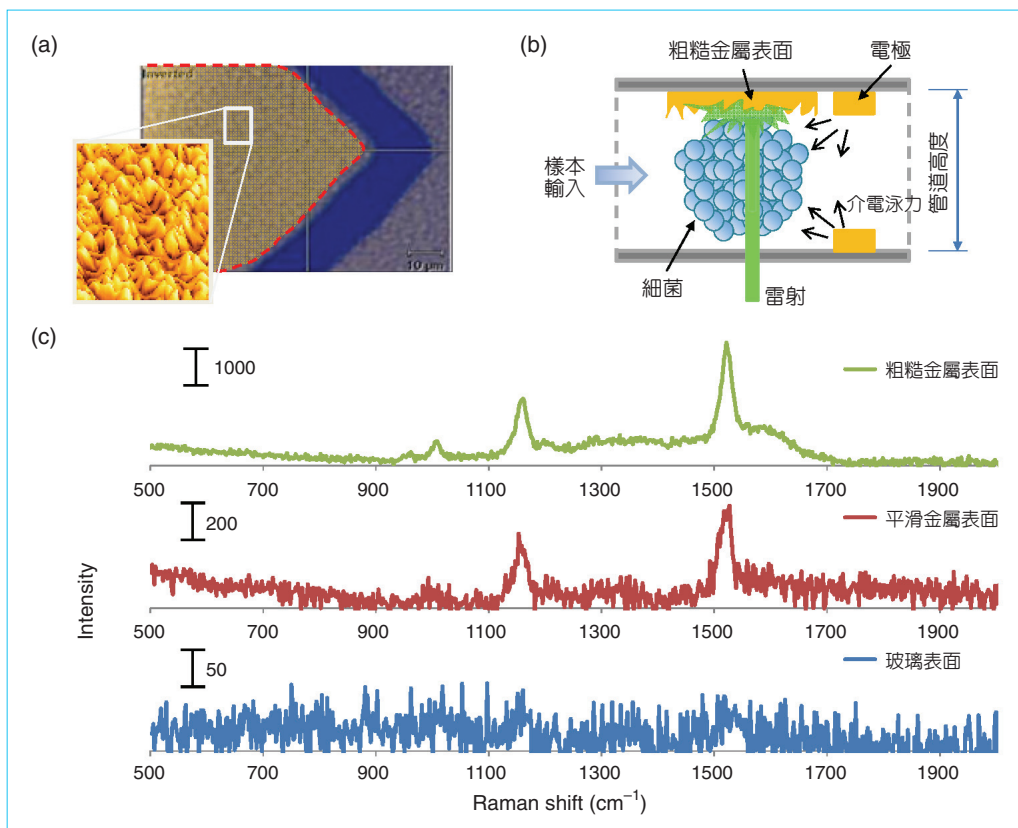


圖 5. 介電泳晶片中的捕捉電極區域設計與增顯拉曼訊號。(a) 介電泳晶片中捕捉電極區域與 (b) 加工粗糙之金屬表面，(c) 金黄色葡萄球菌於不同粗糙表面所獲得的增顯拉曼訊號。

於 10 微毫升且樣本濃度 $10^6/\text{mL}$ 時，只需三分鐘的操作收集，即可獲得可偵測的聚集密度，而整體分析約僅 10 分鐘即可完成。

四、可供快速定量之簡易行動式晶片

目前本團隊發展的晶片系統，除可搭配電流或阻抗檢測法進行微管道中細胞計數外，亦可將雷射光纖整合於晶片上利用細胞遮蔽光路時的光訊號變化，同步檢測細胞的數量與大小。除上述高階分析平台整合，亦發展簡易的光學影像分析方式對於樣本中的含菌量進行快速計數，此將可供一般食品及飲用水樣本即時、快速且方便之定量檢測。由於待測微生物於晶片捕捉區域累積形成聚落，且因晶片中的微管道高度可自行設計（約 $10-15 \mu\text{m}$ ），因此透過樣本的流速、收集時間及搭配簡易的顯微放大系統，再藉由量測樣本聚集形成的面積變化，即可簡易且快速的估算出待測溶液之含菌量（如圖 6）。

五、未來晶片之功能性提升

現階段發展之快速介電泳檢測晶片，雖已成功達成連續且快速微生物分類和收集功能，然而透過與可攜式影像計數及拉曼光譜原位偵測結合，更可提高即時定量和分析功能。此發展技術免除了傳統微生物培養的耗時繁瑣過程，同時不需試劑與特殊藥品的使用，更符合了綠色檢測科技之發展目標。未來本技術將結合旅波式 (travelling wave) 生物微粒分離技術，以提高低濃度樣本的分離效率，並將檢測時間下修至數分鐘之內，除可廣泛地應用於食品與環境微生物快速檢測外（圖 7(a)），透過整合醫療檢驗與微奈米診斷技術平台，不但可提供正確且快速用藥的臨床參考資料，更有機會提升奈米生物醫學檢測技術發展（如圖 7 所示）。圖 7(b) 為目前臨床給藥治療方式，正確的微生物培養資訊提供需耗時數天至數週，而即時性的結果分析將可助於正確的個人用藥性資訊判斷（圖 7(c)）。

六、結論與未來契機

介電泳效應對於生物粒子具有特殊的操控性，已逐漸拓展至生物醫學研究與應用領域。然而所發展檢測分析晶片雖已逐漸成為檢測科技發展之重點，卻於生活普及與優質化應用和貢獻仍存鴻溝。國內外於生活品質提升的相關應用研究仍屬極度缺乏，就我們有限的認知中，僅食品領域檢測即有相

當大的努力空間。以培養與分子生物技術來進行微生物檢測鑑定，固然是目前鑑定的唯一途徑，然其非但過程繁瑣費時且需專業技術人員操作。若透過跨領域研究合作將科技研究有系統地導入生活，將更能朝向免培養、免標記、省錢、省藥品以及符合快、狠、準之多樣性應用前進，透過實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 與微小化快速檢測平台提升檢測便利性為目標，並以促進優質生活品質的綠色科技為

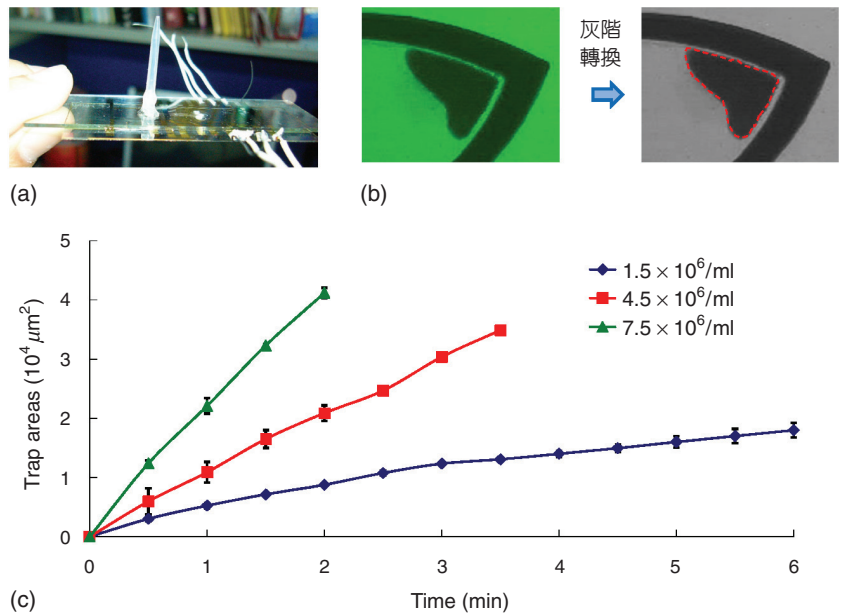


圖 6. (a) 介電泳晶片圖；(b) 透過手持式顯微放大鏡進行影像捕捉後，以軟體直接進行影像灰階質轉換，同時定義並計算微粒子捕捉面積；(c) 面積定量計數。

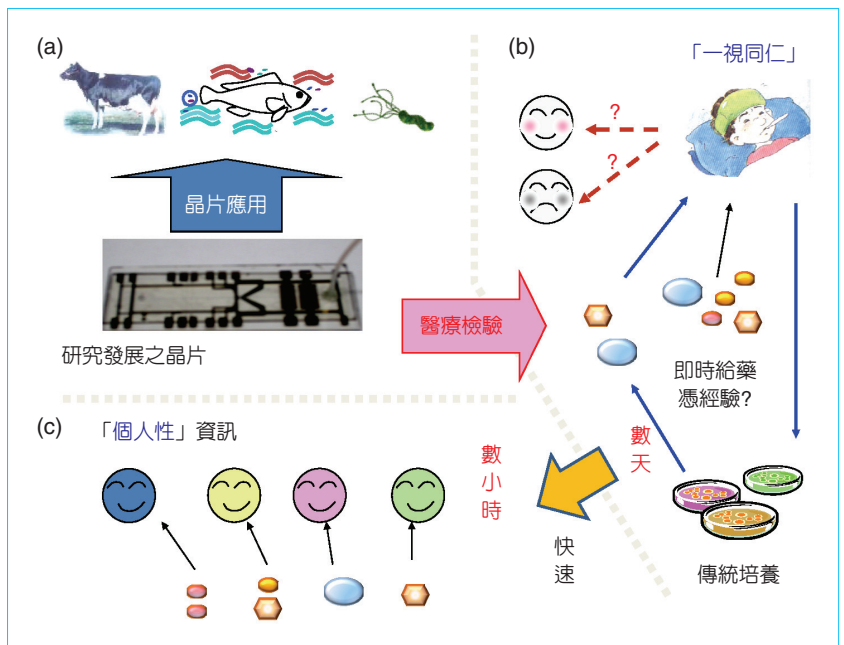


圖 7. 三維立體式介電泳晶片於微生物樣本的即時性分析應用。

宗旨與願景。近幾年我國的科研和教育體系各新提出「轉譯醫學 (translational medicine)」的獎勵計畫^(21, 22)，其宗旨乃有識於「將實驗室的醫學研究發現應用在臨床人類疾病照護」之重要。轉譯醫學是以人類疾病為導向而發展的應用性過程，連接基礎研究和臨床醫學之互動性研究，強調治療性藥物的早期試驗與評估，促進「從實驗室到臨床 (bench to bedside)」的研究。快速檢測法的成果與潛在應用性，若能落實於此波「轉譯醫學、農學」的熱潮，將是吾人之幸。

參考文獻

1. <http://food.doh.gov.tw>.
2. 滕涵菁, 生物晶片與農業科技, 酪農天地雜誌, **45**, 43 (2001).
3. 楊子譽, 生物晶片, 科儀新知, **23** (6), 80 (2002).
4. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, Cambridge: Cambridge University Press (1978).
5. Z. Gagnon, S. Senapati, and H. C. Chang, *Electrophoresis*, **29**, 4808 (2009).
6. M. Bocchi, M. Lombardini, A. Faenza, L. Rambelli, L. Giulianelli, N. Pecorari, and R. Guerrieri, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1177 (2009).
7. F. Schonfeld, A. Griebel, R. Konrad, S. Rink, and F. Karlsen, *JALA.*, **7**, 130 (2002).
8. P. Ronald, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **16**, 331 (1996).
9. S. Fiedler, S. G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr, *Anal. Chem.*, **70**, 1909 (1998).
10. T. Muller, G. Gradl, S. Howitz, S. Shirley, Th. Schnelle, and G. Fuhr, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 247 (1999).
11. R. M. Jarvis and R. Goodacre, *Anal. Chem.*, **76**, 40 (2004).
12. K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann, and G. J. Puppels, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 324 (2003).
13. Y. L. Pan, T. C. Chang, and H. C. Chang, *Proceedings of 3rd International Symposium of Environmental Biotechnology*, NCKU, 37 (2006).
14. A. Campion and P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 241 (1998).
15. C. C. Lin, Y. M. Yang, Y. F. Chen, T. S. Yang, and H. C. Chang, *Biosens. Bioelec.*, **24**, 178 (2008).
16. R. M. Jarvis and R. Goodacre, *Anal. Chem.*, **76**, 40 (2004).
17. I. F. Cheng, H. C. Chang, D. Hou, and H. C. Chang, *Biomicrofluidics*, **1**, 021503 (2007).
18. L. Zhang, P. Zhang, and Y. Fang, *J. Coll. Inter. Sci.*, **311**, 502 (2007).
19. P. Kao, N. A. Malvadkar, M. Cetinkaya, H. Wang, D. L. Allara, and M. C. Demirel, *Adv. Mater.*, **20**, 3562 (2008).
20. J. Gamby, A. Rudolf, M. Abid, H. H. Girault, C. Deslouis, and B. Tribollet, *Lab Chip*, **9**, 1806 (2009).
21. http://info.tcu.edu.tw/hot_news/attch/980804002/980803-5064b.DOC.
22. http://npbp.m-w.com.tw/tw/newsDetails.php?class=project&catalog_id=0&id=8.



林其昌先生為國立台灣科技大學高分子工程博士，現任國立成功大學生物醫學工程研究所研究助理教授。



張憲彰先生為日本東北大學應用化學工程博士，現任國立成功大學生物醫學工程研究所教授暨奈米科技及微系統工程研究所合聘教授。

Hsien-Chang Chang received his Ph.D. in applied chemistry engineering from Tohoku University, Japan. He is currently a professor in the Institute of Biomedical Engineering and an adjunction professor in the Institute of Nanotechnology and Microsystems Engineering at National Cheng Kung University.