

微流體晶片系統結合磁珠以應用於傳染性疾病之快速檢測：登革熱病毒為例子

Magnetic-Bead-Based Microfluidic Systems for Fast Detection of Infectious Disease: Dengue Virus as an Example

連剛逸、黎煥耀、李國賓

Kang-Yi Lien, Huan-Yao Lei, Gwo-Bin Lee

本文簡介一個利用微機電製程，依據免疫學之原理，利用微型磁珠結合專一性極高之抗體，以萃取特定病毒，並將其濃縮、純化、分離後，全自動進行聚合酶連鎖反應之生物晶片系統平台。此微流體整合型系統藉由微幫浦與微閥門的作用下，能自動化地完成疾病診斷過程中之檢測流程，並可將整體之反應之時間由傳統檢測之約莫 8–10 小時縮短至 1.5 小時左右即可完成。本晶片系統已於臨床檢體中成功地純化及檢測出登革熱血清第一型至第四型病毒 (dengue virus serotype 1-4)，且其診斷之靈敏度約為 100 PFU/mL。本晶片系統所提供之快速自動化檢測平台，於基因分析、分子生物學以及快速感染性疾病之偵測將有極大之助益。

The current study reports an innovative miniature microfluidic system for rapid detection of infectious diseases. Taking advantage of the specific interaction between the antibodies on the surface of magnetic beads and the surface antigens on viruses, the target virus can be recognized and further purified by a magnetic field generated by the built-in microcoils. The purified target virus can be then lysed to release ribonucleic acid (RNA) for the subsequent nucleic acid amplification process such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) processes. Experimental results showed that the dengue viruses (serotype 1-4) can be successfully purified and enriched by the high specificity and selectivity of antibody-conjugated magnetic beads, and the subsequent amplification of viral RNA can also be completed utilizing the on-chip temperature control module in an automatic manner with the sensitivity as high as 100 PFU/mL. As a whole, the developed system may provide a potential micro-total-analysis-system (μ -TAS) for bio-sample pre-treatment and the fast diagnosis of infectious diseases.

一、前言

1. 傳染性疾病檢測與預防

傳染性疾病一直以來嚴重危害人們身體健康。尤其此時全球暖化效應，更可能導致傳染疾病在全世界蔓延，病毒、細菌以及病媒擴散傳染病更加猖獗。在此全球之傳染性疾病蔓延的同時，各國政府防疫單位除了不斷地加強衛生習慣的宣導以及疫苗的接種外，第一時間的快速疾病診斷以及疫情控制也已成爲不可或缺的重要環節。

其中，在我國境內流行之登革熱病毒，更是近幾年來疾病管制中心不斷提防的重大傳染性疾病之一。登革熱係由蚊子傳播的急性病毒性疾病，而以高熱、頭部與關節的痠痛以及發疹爲主要症狀。而全球登革熱發生的地區，主要在熱帶及亞熱帶的國家。但自 1980 年代後，似有向全球各地蔓延的趨勢，並在部分地區如印度、越南、馬來西亞、以及若干中南美洲國家已生根成爲地方性傳染病。

此外，除了登革熱之外，多種傳染性疾病諸如肺結核、腸病毒、禽流感等，幾乎是沒有有效的疫苗可以完全預防，尤其以高度傳染性之飛沫傳染疾病或接觸式傳染之疾病，更加是難以防範與預防。也因此，在少數疫苗研發進行疾病預防的同時，如何快速的在感染發病的第一時間中，準確的檢測並分析出登革熱病毒，並加以有效的控制與治療，將是目前最受關注的課題。而疾病檢測的第一步，不外乎是生物檢體的前處理程序⁽¹⁻⁴⁾。

近年來，生物臨床檢體之前處理與濃縮萃取之程序於醫學檢驗中扮演著十分重要的角色。於傳統醫學臨床檢測中，臨床檢體之前處理往往浪費許多的時間以及成本，且其繁複的人工操作與步驟更容易增加檢體之浪費與檢測之準確性。所以，在現代以個人化醫療爲觀點的近代醫學裡，快速與精準之傳染性疾病檢測方法已經成了各界關注與高度重視的研究議題。

2. 登革熱病毒之分析與檢疫

傳染性疾病之分析與檢疫，往往對於一個地區的區域性疫情蔓延與擴散有著顯著的影響。以登革熱爲例子，登革熱病毒之分析，往往需要繁瑣的生

物檢體前處理過程，諸如核糖核酸 (RNA) 之萃取與純化，亦或後段之分子診斷技術如聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，其緩慢且冗長的反應時間，不僅浪費了無謂的等待時間，且繁複的人工操作步驟亦存在著人員感染或檢體污染之風險。

目前傳統醫檢或研究單位所進行的生物樣品前處理方法以及疾病檢測方法，不外乎爲生化培養鑑定 (bio-chemical culture)⁽⁵⁻⁶⁾、聚合酶連鎖反應及平板膠電泳技術 (PCR and slab-gel electrophoresis)⁽⁷⁾，或是酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)⁽⁸⁾ 等。然而上述提到之生物檢體的前處理與萃取方式，除了常常受限於大型儀器操作時間的浪費，且有機溶劑具腐蝕毒性，人員在操作安全上需特別小心，同時其廢棄物的處理亦較爲繁瑣之外，其後段的傳染性病毒基因之定序分析與傳染性疾病之檢測，更是耗時費力。此外，昂貴的耗材與醫療檢測費用，往往令消費者望之怯步。也因此，而如何精準且快速的檢測出登革熱病毒，並加以進行的預防與治療防止疫情擴散，亦也成了二十一世紀以來各國疾病管制中心以及疫情控制中心系統高度關注以及重點發展的項目之一。

3. 微流體晶片系統應用於傳染性疾病之快速檢測

隨著近年來微機電系統 (micro-electro-mechanical-systems, MEMS) 技術之成熟，在許多不同的生物領域中有顯著的發展，尤其以微小化流體快速生物醫學分析晶片，更具發展潛力與市場價值⁽⁹⁻¹³⁾。藉由微機電製程技術所生產之微流體生醫檢測晶片，具有高檢測靈敏度、可拋棄式、可攜帶性、低樣品及檢體消耗量、低耗能、體積小以及成本低等優點，相較於傳統分析檢測技術，有著突破性的發展價值。也因此，微型晶片系統應用於疾病之快速診斷與分析以成了世界頂尖學者專家爭相研究的重點研究項目之一。

舉例而言，Choi 等人於 2001 年發表出一以所謂之微型磁分離器 (bio-separator) 爲基礎之晶片系統，藉由爲電鍍所製成之電磁線圈應用於生物檢體

之目標蛋白質純化，進而應用於後端之電化學反應分析⁽¹⁴⁾。此外，另一微型晶片系統應用於濃度極低之生物細胞檢體之預濃縮，進而進行後端反應分析亦被驗證完成⁽¹⁵⁾。然而，上述這些系統雖已證實利用微型磁珠可將目標之蛋白質或細胞萃取而出，然後尚未有晶片平台應用於病毒檢體之純化，且後端的生物檢測與分析，往往需要人為操作與額外的儀器設備才能完成，造成這些晶片系統應用於臨床診斷之可行性降低。

除了生物檢體前處理之外，後端的分子診斷分析諸如 PCR 與 RT-PCR 往往於臨床醫學診斷中扮演更重要的角色。也因此，各式各樣的微型 PCR 系統亦被廣泛的研發⁽¹⁶⁻¹⁷⁾。例如，一個以矽晶圓為底材之微型 PCR 加熱器模組應用於 DNA 快速增幅已被驗證出來⁽¹⁶⁾。另一組微型加熱系統應用於 RNA 基材之 RT-PCR 反應也已經發展完成⁽¹⁷⁾。然而這些系統雖然可應用於快速 DNA 或 RNA 檢體之反轉錄與 PCR 反應，卻往往仍需要多個檢體進樣與人工操作的步驟。此外，樣品之前處理更是這些已發展出來的系統所無法克服的困難。

因此，本研究提出一整合型微流體自動化快速臨床檢體前處理與傳染性疾病檢測平台，將微型磁珠應用檢體樣品之前處理 (如病毒之萃取、純化及濃縮)，以獲得高純度之檢體後，更可於本晶片上藉由電路控制器自動地完成聚合酶連鎖反應以及疾病分析，以減少人為操作的不穩定性，更可大幅縮短操作時間與步驟。本研究藉由新開發之整合型微流體晶片，利用結合高專一性抗體的超順磁性之微型磁珠 (magnetic beads)，先將臨床檢體中的目標

病毒與磁珠上之抗體結合，進而萃取特定之病毒，並藉由晶片所產生之微型磁場對其進行純化及濃縮。其後再經由後段晶片上之微型溫度控制模組，進行傳染性疾病的 RT-PCR 反應，並可針對反應後之結果進行快速螢光分析，即可於極短時間內檢測出精準之結果，以達自動化快速傳染性疾病檢測之目的。本研究冀望藉由整合型微流體自動化快速臨床檢體前處理與傳染性疾病檢測平台，能為快速傳染性疾病之診斷帶來新的契機。

二、微流體晶片系統檢測技術

1. 實驗原理

本研究研發之整合型晶片系統及其快速傳染性疾病檢測之原理流程如圖 1 所示⁽¹⁸⁾。有別於傳統細菌 DNA 或病毒 RNA 的萃取方法，本晶片使用微型磁珠，依據免疫學原理中抗體抗原的高專一性親和力 (antibody-antigen affinity)，針對目標病毒之抗原本體 (viral particle) 進行純化篩選以及濃縮的步驟。首先製備好已結合有高專一性抗體並經胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 填滿 (blocking) 的微型磁珠，將此鍵結有專一性抗體之磁珠與生物之臨床檢體 (諸如全血、血清、組織、痰唾液等) 於晶片之微流體管道中充分混合 (incubation process)，如圖 1(a) 所示。

利用本晶片上內建之雙向微流體操控模組，即可進行檢體自動化的傳輸、混合與分離反應。由於臨床檢體中所含的其他雜菌以及細胞碎片都有可能影響之後的傳染性疾病分析，尤其以 RNA 為基礎

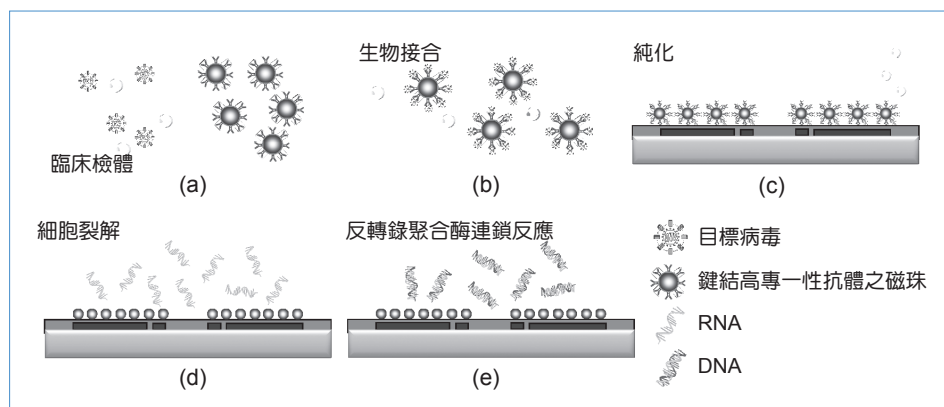


圖 1. 整合型快速檢體前處理與傳染性疾病檢測平台之實驗原理示意圖⁽¹⁸⁾。

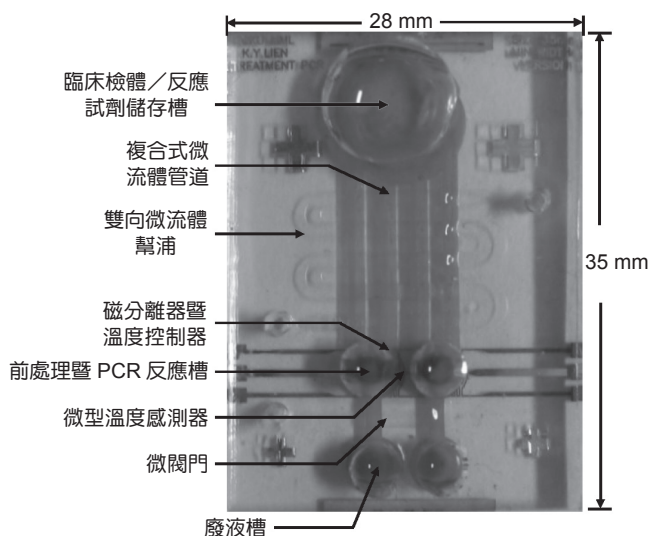


圖 2. 整合型晶片及其快速傳染性疾病檢測平台⁽¹⁸⁾。

的病毒，其 RNA 模板被釋放出來時更是極端不穩定，且容易被週遭環境之核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 給破壞，所以當目標病毒都已經由抗體抗原間之親和力 (affinity binding) 黏附於磁珠表面時，晶片將會針對此臨床檢體進行純化及濃縮之程序，如圖 1(b) 所示。

本研究中之晶片系統中含有一組微磁性暨溫度控制模組，藉由通以特定之電流使此微磁性分離器產生磁場，將可使鍵結有目標病毒之磁珠吸附於晶片表面，此時持續地用雙向微流體模組將乾淨之清洗緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 針對磁珠進行沖洗，將這些不穩定因子去除以確保病毒之純度，如圖 1(c) 所示，即可對目標病毒進行純化分析。其後將接有病毒之磁珠檢體回溶於小體積之緩衝液中即可完成濃縮之程序。最後，將純化完之檢體直接於反應槽內，利用溫度控制模組造成的精準溫度升降與控制，藉由 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 以及高專一性之引子 (primer) 進行細胞裂解與 RT-PCR 反應，如圖 1(d) 及圖 1(e) 所示，即可針對病毒之核酸進行增幅放大並進行傳染性疾病之診斷分析。

最後，本晶片系統已成功整合並微小化如圖 2 所示⁽¹⁸⁾。除了讓使用者可以方便攜帶並快速進行生物檢體之萃取與保存，更可進行快速傳染性疾病之檢測與分析。系統中設計之雙向式微流體模組以及

微磁性暨溫度控制模組，包括有複合式微流體管道、微閥門、雙向微型幫浦、磁分離器、溫度控制器、臨床檢體/反應試劑儲存槽、前處理暨 RT-PCR 反應槽，以及廢液槽。

利用此微型元件之整合平台可以生物檢體自動化傳輸及混合，以取代傳統人工操作之不穩定性，可將傳統檢體純化萃取上之諸多操作步驟以及所需大型實驗機台，於此整合型晶片平台上自動化地完成。且此輕薄、短小、可拋棄式之整合型晶片，其大小約為 3.5 公分 × 2.8 公分 × 0.7 公分，不僅方便攜帶更是操作簡易，相信於不久的將來必定能為生化檢測與醫療保健提供一多功能性之生物醫學檢測平台。

2. 晶片設計

(1) 雙向式微流體幫浦設計

本研究使用之微流體模組共包含一雙向式微流體幫浦、複合式微流體管道、微閥門與儲液槽。圖 3 為 S 型雙向式微流體幫浦之實驗架設圖⁽¹⁸⁾。

本創新之氣動式雙向微流體幫浦利用微機電製程方式，在聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane,

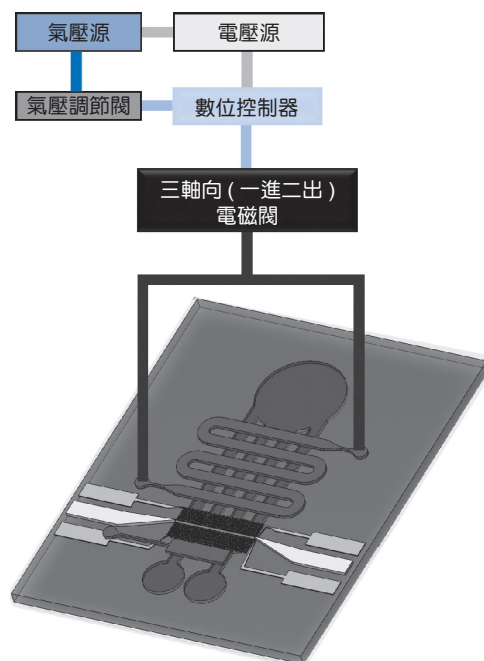


圖 3. 整合型微流體晶片之向式微流體幫浦之實驗架設圖⁽¹⁸⁾。

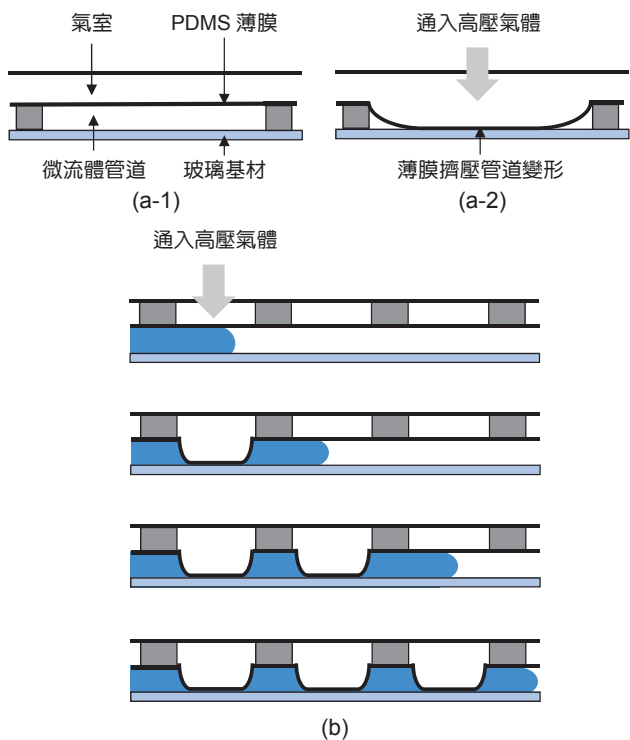
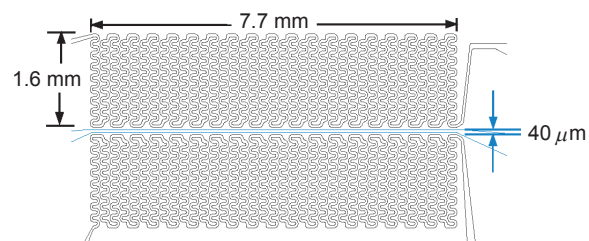


圖 4. 雙向式微流體幫浦作動示意圖，(a) 薄膜致動原理，(b) 微流體幫浦之作動示意圖⁽¹⁸⁾。

PDMS) 之薄膜材料上之上層結構製作一高壓氣體驅動腔體，薄膜下層則是微流管道區域，當氣壓驅動時，中間之薄膜層會下壓於微流體管道區域，使下層流體無法通過；當氣壓釋放時，薄膜恢復原本之形狀，使流體可順利通過，如圖 4(a) 所示⁽¹⁸⁾。本晶片設計出此雙向微流體幫浦之作動示意圖如圖 4(b) 所示⁽¹⁸⁾。利用上述之原則，當氣體驅動時，壓縮空氣通入高壓空氣腔，使得微流體管道上層之薄膜造成一時間差而依序下壓於微流管道區域，使得下層之微流道會因薄膜之連續運動造成管內壓力之變化，流體因而被驅動持續流動，使其具有微幫浦之作用。此外，利用此創新設計，將只需要單個三軸向之電磁閥並切換壓縮空氣進入幫浦之方向，即可控制其雙流向之作動。

(2) 微磁性分離器

本晶片平台上亦整合一微型磁性分離器，目的是希望藉由電磁效應所產生之微型磁場，進而將鍵結有目標病毒之微型磁珠吸附於晶片之反應槽表



設計參數	電阻值 (Ω)	尺寸	
溫度感測器	265	寬度	40 μm
		間距	40 μm
		厚度	0.8 μm
微型加熱器	10	寬度	1.6 mm
		長度	7.7 mm
		厚度	12 μm

圖 5. 本系統設計之微型磁分離器⁽¹⁸⁾。

面。本晶片系統上之微型磁分離器，乃利用微機電系統相當純熟之電鍍技術，搭配微影蝕刻的黃光室製程技術，並選用銅為材料，將設計之微型纏繞式線圈陣列電鍍於晶片表面。

(3) 微型溫度控制器

當臨床檢體之前處理程序完成後，即可獲得高品質及高純度之目標病毒。此時本系統可繼續迅速地利用上述之微型線圈進行加熱反應，進而進行 PCR 分子診斷以及傳染性疾病之分析。此創新設計之微型溫度控模組，乃由上述之兩組纏繞式線圈陣列以及一組微型溫度感測器所構成，其設計如圖 5 所示⁽¹⁸⁾。其原理乃運用微型加熱器對目標物之加熱，再透過微型溫度感測器得知目前目標物的溫度並回饋訊號給斷路控制器，最後經由電路控制器控制其輸出功率以達穩定其溫度之功效。

於本微型溫度感測器設計與製程上，以鉑為材料並利用微機電技術形成一微型電阻絲。藉由鉑的電阻溫度係數 (temperature coefficient of resistance, TCR) 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 至 100 $^{\circ}\text{C}$ 的範圍內，隨著溫度變化，電阻值呈線性分布的特性，使得溫度的變化量與電阻值可由簡單之線性多項式表示，通入固定之電流，溫度變化造成電阻值變化，即可獲得電壓值改變之訊號。因此設計之微型溫度控制模組即可將一溫度的變化量轉為電壓的變化量，於是獲得一數

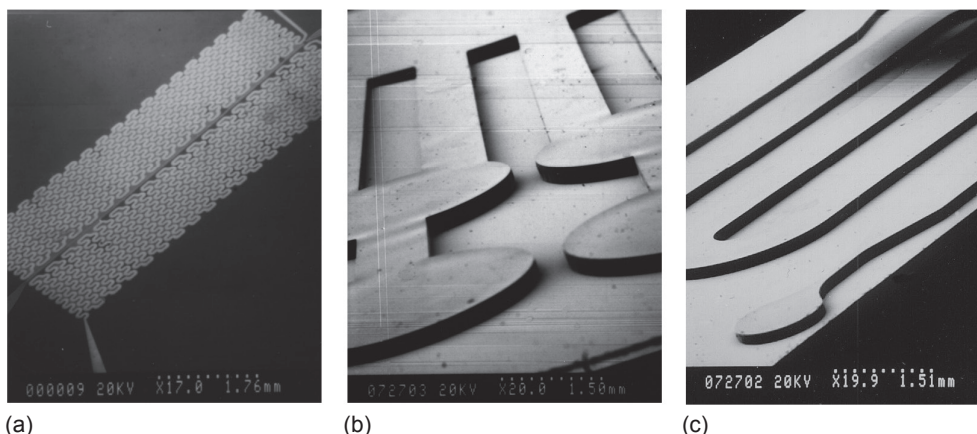


圖 6. 各細部元件之掃描式電子顯微鏡所拍攝之照片。(a) 為微型磁分離器暨微型溫度控模組，共包含兩組纏繞式線圈陣列以及一組微型溫度感測器，(b) 為複合式微流體管，(c) 則為雙向微流體幫浦之原件圖⁽¹⁸⁾。

位訊號，再經由控制電路比較溫度，調整微型加熱器所輸出之功率，以達到溫度控制的效果。

三、結果與討論

本微型整合型晶片系統已成功應用於臨床登革熱病毒血清之快速診斷與分析。並可將濃度約為 100 PFU/mL 之病毒自動化地於 1.5 小時內準確的判斷出來。此晶片系統所發展之各部新型元件與最佳化參數將於此章節討論並驗證之。

1. 整合型晶片系統

本微型整合型晶片系統以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 拍攝之細部元件如圖 6 所示⁽¹⁸⁾。圖 6(a) 為微型磁分離器暨微型溫度控模組，共包含兩組纏繞式線圈陣列以及一組微型溫度感測器；圖 6(b) 為複合式微流體管道；而圖 6(c) 則為雙向微流體幫浦之元件圖。本研究亦將所有元件，包含整合型晶片平台、電路控制器、電磁閥以及氣壓源，整合為一可攜式手提系統，方便攜帶與操作，如圖 7 所示⁽¹⁸⁾。

2. 整合型晶片系統之功能試驗結果

(1) 雙向微流體模組

本研究所開發之雙向微流體模組主要具有兩大功能，其一為生物檢體以及反應試劑的自動化傳

輸；其二為當成微型混和器形成擾流造成混合效應，以達生物樣品反應所需之充分混合。圖 8 顯示雙向微型微幫浦的動作流程之實際流程，藉由單一電磁閥之控制及輸入高壓空氣之下，可使薄膜結構產生順序下壓之動作，而產生驅動微流體樣本沿微流道前進之推力。由圖 8(a)–(d) 可見微流體於管道中由左邊被驅動至右邊。而圖 9 則是說明此雙向微流體幫浦之操作頻率與流速之關係曲線圖。由實驗結果顯示當微幫浦之頻率增加時，微流體的流速呈現上升之狀態，其最佳操作條件為當操作頻率為 17 Hz，通入之高壓空氣氣壓為 30 psi 時，此微流體幫浦可達到 170 μ L/min 的流體流速。



圖 7. 可攜式手提系統之照片⁽¹⁸⁾。

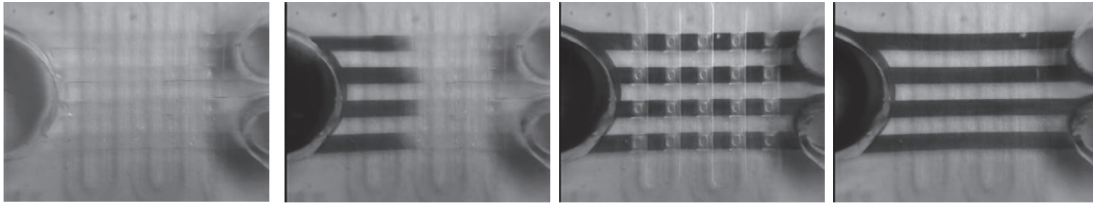


圖 8. 雙向微流體幫浦作動示意圖⁽¹⁸⁾。

本新型之雙向微流體模組除了可以進行生物檢體以及反應試劑的自動化傳輸外，更可當作微型混合器使用。本研究就混合效率進行測試。依據混合效應之公式之計算⁽¹⁹⁾，

$$\sigma(x) = \left(1 - \frac{\int_0^h |C - C_\infty| dy}{\int_0^h |C_0 - C_\infty| dy} \right) \times 100\%$$

其中， $\sigma(x)$ 為混合效率，而 C (0 或 1) 則為檢體混合之初始條件。從圖 10 得知，將兩種液體（一種為去離子水，另一種為含螢光染劑異硫氰酸螢光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 之水溶液）通入到微流體管道之中，並將雙向微流體幫浦啟動，由實驗之資料顯示，只需要短短的 0.93 秒即可將兩種未混合之液體（圖 10(a)， $\sigma(x) = 20\%$ ）充分混合（圖 10(d)， $\sigma(x) = 93\%$ ）。由此可見，此創新之微型幫浦不僅具有將微流體傳輸之功能，亦可在短時間內達成微流體充分混合之效果⁽¹⁸⁾。

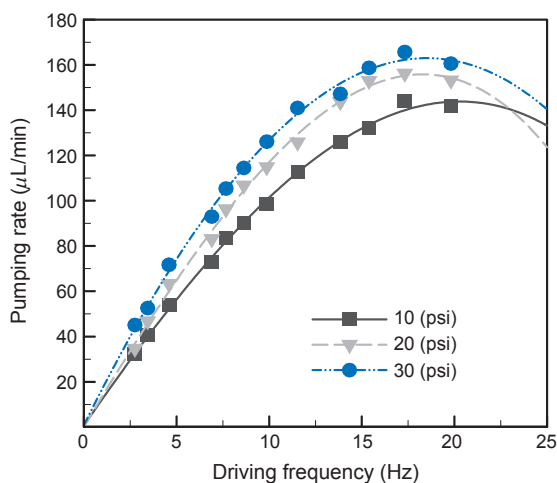


圖 9. 雙向型微幫浦流速與驅動頻率關係圖⁽¹⁸⁾。

(2) 微型磁分離器

圖 11(a) 顯示出微型磁分離器吸附實驗⁽¹⁸⁾。首先，將含有微型磁珠之檢體以 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速從左方傳輸到右方，如圖 11(a-1) 所示；當檢體通過微型磁分離器上方的同時，將特定電流通入微型磁分離器以產生微型磁場，磁珠因而被吸附於晶片表面，如圖 11(a-2) 所示。當吸附磁珠約莫 5 分鐘後，將電流關閉，此時清晰可見之前被吸附於線圈表面之微型磁珠即可被濃縮與收集完成，以達臨床檢體之純化與萃取效果。而圖 11(b) 則是本微型磁分離器之磁力與溫度之關係曲線。本微磁分離器之最佳操作參數為通以 0.5 安培的直流電時，將產生最大磁場為 65 高斯與 37.4°C 之溫度場。此外，本微型磁分離器之吸附效率 (trapping ratio) 經由實驗觀察顯示，當檢體以 $1 \text{ mm}/\text{s}$ 流速通過磁分離器時，其吸附效率可達約莫 90%，亦即大多數之磁珠檢體將被吸附與純化完成。

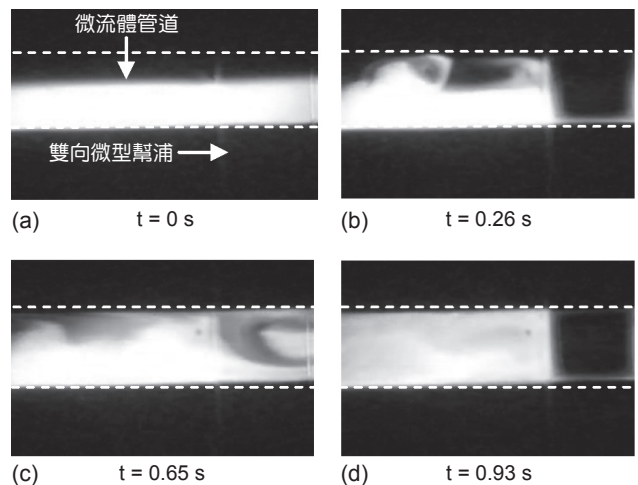
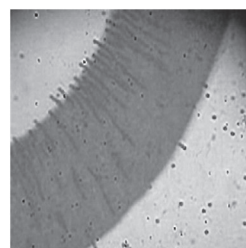


圖 10. 雙向微流體幫浦之混合實驗。其中 (a) 為兩種流體尚未混合之初始狀態，(d) 則為雙向微流體幫浦啟動後之混合情形。結果顯示需 0.93 秒即可達成流體之均勻混合⁽¹⁸⁾。



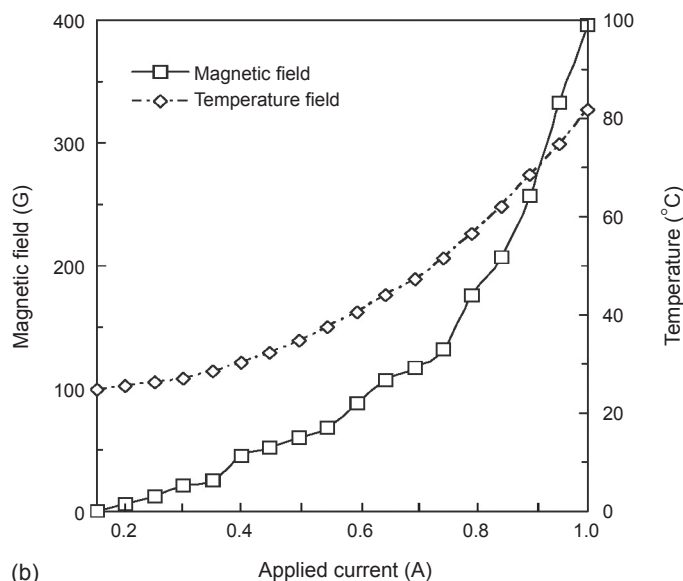
(a-1)



(a-2)

圖 11.

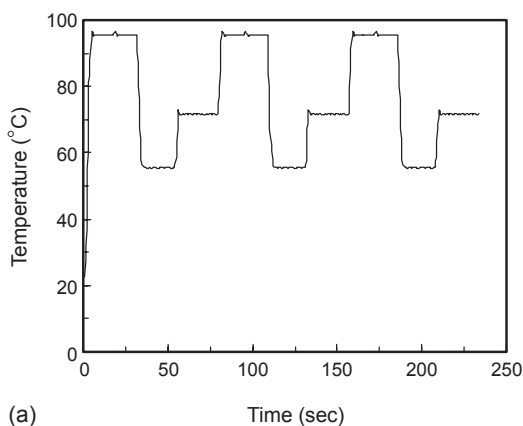
微型磁分離器之實驗結果，(a) 利用微型磁珠之檢體進行磁場吸附效應實驗，(b) 磁分離器所產生之磁力與溫度之關係曲線⁽¹⁸⁾。



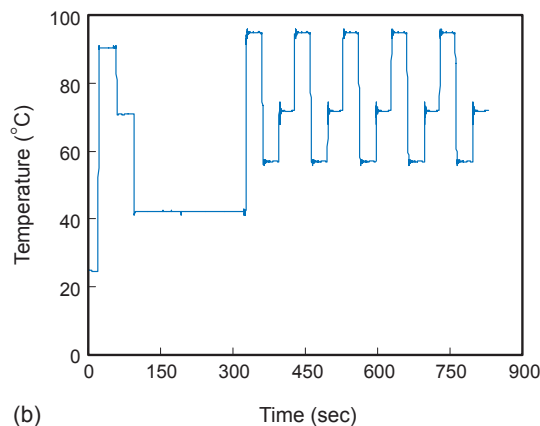
(b)

(3) 微型溫度控制器

本研究中最重要的一環為利用微型溫度控制器所產生之溫度場，進行後端 RT-PCR 之檢測與分析。圖 12 則是本微型溫度控制器實際進行 PCR 反應時溫度循環之曲線圖⁽¹⁸⁾。圖 12(a) 為進行 PCR 時經由三階段溫度循環 (95 °C、57 °C、72 °C) 所呈現之升降溫曲線，而圖 12(b) 則為進行細胞裂解以及 RT-PCR 時之升降溫曲線 (90 °C、70 °C、42 °C、94 °C、58 °C、72 °C)，其升溫速率約為 27.5 °C/s，降溫速率約為 15.3 °C/s，伴隨著極微小之溫度震盪 (± 0.2 °C)，藉由微型化後電阻之高升降溫速率，可以將整個 RT-PCR 反應程序與傳統市售儀器進行比較，縮短將近 50% 的反應時間 (約 1.5 小時) 即可達成高準確性之結果。



(a)



(b)

圖 12.

微型溫度控制器實際進行 PCR 反應之升降溫曲線⁽¹⁸⁾。

3. 臨床檢體測試與傳染性疾病之診斷

本整合型微流體自動化快速臨床檢體前處理與傳染性疾病檢測平台已成功的在臨床實驗中獲得證實，亦即針對國內流行之登革熱血清第一型至第四型於本晶片平台上進行分析。

(1) 臨床檢體之傳染性疾病之檢測

首先將確定感染登革熱第二型之病人血清分別依序先後地放入本晶片平台上進行檢體前處理，再利用高專一性之引子進行 RT-PCR 反應。其中，圖 13 為感染登革熱血清第二型臨床檢體之檢測平板膠電泳之結果，171-bp 為登革熱血清第二型 DNA 之放大片段⁽¹⁸⁾。圖 13 中，lane 1 為傳統方法利用有機試劑萃取檢體 DNA 再用大型聚合酶連鎖反應

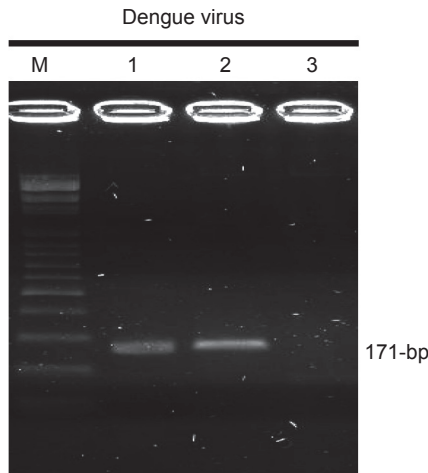


圖 13. 於晶片平台與傳統方法之臨床檢體實際測試結果⁽¹⁸⁾。

儀器檢測之結果；而 lane 2 為本晶片平台上自動化前檢體處理後並加以進行 RT-PCR 之結果；lane 3 則為沒有經過前處理之檢體直接進行 RT-PCR。由實驗資料顯示，兩者不僅結果亮度一致，且利用晶片平台更可省去近一半的處理反應之時間（約 1.5 小時）。由此實驗證實，臨床檢體若是不經過樣品前處理之步驟，其後段之 RT-PCR 診斷分析是會被干擾且難以偵測；本晶片系統不僅有能力將傳染性病毒做出快速之前處理與診斷分析之外，更可節省人員操作所帶來的誤差與不穩定性。

另外，為了證實本晶片系統之雙向微流體模組快速的混合效率，特別設計出以下實驗以供證實。將生物檢體與微型磁珠在生化結合之混合階段 (incubation process)，分別就混合後以不同時間點加以取樣分析，進行 RT-PCR 後之結果，由 RT-PCR 產物之亮度決定最佳之混合時間。圖 14 即為本實驗之不同時間點取樣分析之結果，在晶片平台混合之測試結果⁽¹⁸⁾。由資料顯示，本晶片平台只需要 180 秒即可達到最佳值，然而傳統儀器卻要近 45 分鐘才能達成。因此本研究之新型微流體模組的確有其應用價值。

(2) 登革熱血清第一型到第四型病毒偵測

本實驗中將已純化之登革熱病毒分析其病毒血清型（濃度為 10^4 PFU/mL），其引子之設計

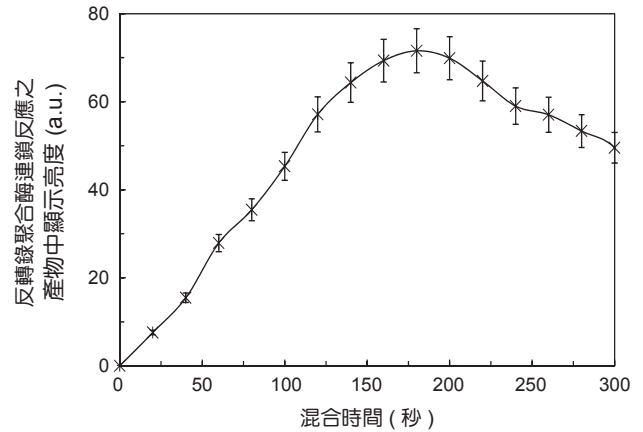


圖 14. 混合效益測試圖⁽¹⁸⁾。

為 lane 1 為 group-specific primer (171-bp)⁽¹⁸⁾，亦即只要是登革熱病毒不管是哪一型都可以被分析出來；lane 2 為 serotype 1-specific primer (193-bp)，亦即只針對登革熱病毒第一型才可以被分析出來；lane 3 為 serotype 2-specific primer (204-bp)，亦即只針對登革熱病毒第二型才可以被分析出來；lane 4 為 serotype 3-specific primer (204-bp)，亦即只針對登革熱病毒第三型才可以被分析出來；lane 5 為 serotype 4-specific primer (132-bp)，亦即只針對登革熱病毒第四型才可以被分析出來；而 lane 6 則以純水進行實驗作為一實驗對照組。

從圖 15 之實驗結果可以發現，登革熱第一型至登革熱第四型病毒可以依序於本晶片系統中被成

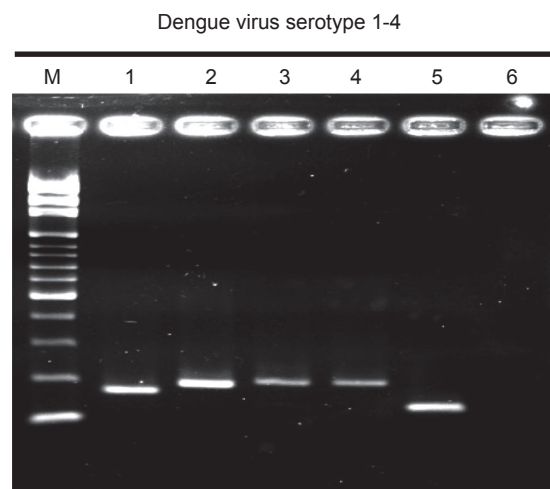


圖 15. 針對登革熱血清第一型到第四型病毒之分析⁽¹⁸⁾。

功放大與診斷出來。因此，由資料顯示，本晶片所搭配之設計高專一性之引子確實可以針對登革熱病毒的不同型態而偵測。

(3) 靈敏度測試

靈敏度為生醫檢驗分析平台最重要的一環，本系統藉由登革熱血清第二型病毒，就下列二種方法來測試其 RT-PCR 之靈敏度。圖 16 顯示第一種方法為利用人工操作微型磁珠的方式，搭配外部大型磁鐵與震盪器，並在傳統大型聚合酶連鎖反應儀器進行反應；第二種方法則為利用本晶片系統自動化的用磁珠進行檢體處理與晶片上之 RT-PCR。實驗之操作方法為利用不同濃度序列稀釋之病毒檢體 (10^6 PFU/mL – 10^1 PFU/mL)，分別加以純化後進行 RT-PCR 反應，由其實驗果顯示，利用二種不同的方式所作出來之實驗靈敏度皆在約 10^2 PFU/mL 左右 (lane 5)，顯示出本研究開發之晶片系統不僅有著跟市售大型儀器一樣的靈敏度外，更可以快速地萃取以及分析傳染性疾病。

四、結論

綜合以上所述，本研究團隊成功應用微機電製程技術，並以高分子材料 PDMS 及玻璃做為晶片基材，製作出整合具有自動樣本傳輸之微型幫浦及微型閥門等微流體元件之整合型微流體平台，並整合微型磁分離器、微型溫度控制器，完成具有可自動化樣本傳輸、臨床檢體前處理以及傳染性疾病檢

測之整合型微流體自動化快速臨床檢體前處理與傳染性疾病檢測平台。

此微型流體晶片具有製程簡易、低成本、可大量製造及可拋棄之優點，並配合各項低成本之元件，可完成具有高專一性及高靈敏度之疾病分析系統，且同時具有價格合理之優點。此外，本晶片系統亦將自動化之電路控制器、氣壓元件、電磁閥等整合於一可攜式之傳染性疾病分析系統，可有效應用於生物樣品前處理、樣品濃縮、目標基因放大分析等方面。因此，藉由微型反應處理器以及自動化之流體操控，利用臨床之登革熱病毒血清為例子，已在本系統中證明可成功地將病毒顆粒藉由抗體修飾之磁珠純化出來，並且於 RT-PCR 反應後之病毒診斷靈敏度約為 100 PFU/mL。更甚者，整體反應時間約莫可於 1.5 小時左右完成。

相較於傳統病毒診斷方式所耗費之時間與人力，本晶片系統不僅可提供一重點醫療照護之臨床診斷工具外，更可替傳染性疾病之快速篩檢進行快速分析。雖然在此文中僅以登革熱病毒的檢測為一代表性的例子，但應用上，它可以推廣到其他的傳染性疾病，如新型流感病毒。更甚者，本平台已整合之樣品前處理功能更可以於未來應用於多樣化之生物體之純化萃取 (例如：DNA、RNA 或目標細胞)，更可進一步搭配不同之反應試劑進行基因多型性與遺傳因子之檢測與分析。所以，本晶片之未來發展不僅可有效達成預防醫學與個人化醫療之願景，更可替傳染性疾病之快速防治與公共衛生安全全面性之提升帶來進一步之貢獻。

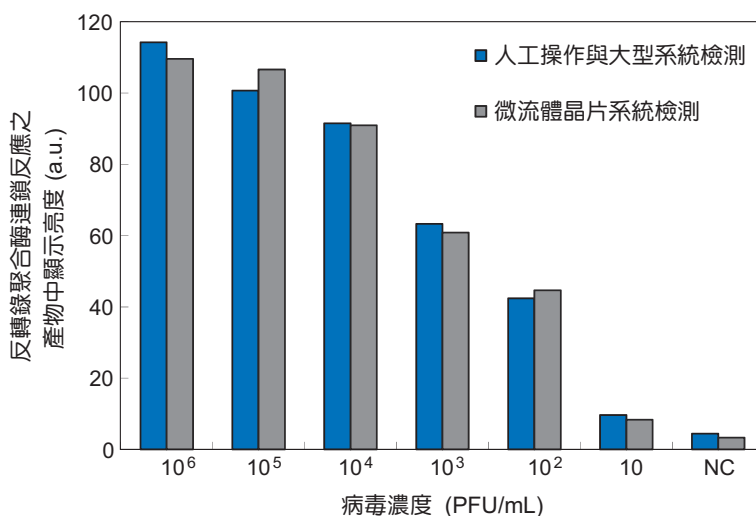


圖 16. 系統靈敏度測試⁽¹⁸⁾。

參考文獻

1. P. Grodzinski, R. Liu, J. Yang, and M. D. Ward, *Proc. of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS.*, San Francisco, USA, September 1-5, 2615 (2004).
2. A. J. de Mello and N. Beard, *Lab Chip*, **3**, 11N (2003).
3. M. E. Kempner and R. A. Felder, *J. Assoc. Lab. Autom.*, **7** (2), 56 (2002).
4. D. Melville, F. Paul, and S. Path, *IEEE Transactions on Magnetics*, **11** (6), 1701 (1975).
5. H. Moriguchi, Y. Wakamoto, Y. Sugio, K. Takahashi, I. Inoue, and K. Yasuda, *Lab Chip*, **2**, 125 (2002).
6. K. B. Mogensen, J. Hubner, N. J. Petersen, and J. P. Kutter, *Electrophoresis*, **22**, 3930 (2001).
7. K. B. Mullis, F. Ferre, and R. A. Gibbs, *The polymerase chain reaction*, Boston: Birkhauser, USA (1994).
8. K. J. Schwab, R. D. Leon, and M. D. Sobsey, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (6), 2086 (1996).
9. N. Maluf, *An Introduction to Microelectromechanical Systems Engineering*, Boston: Artech House (2000).
10. F. E. H. Tay, *Microfluidics and Bio-MEMS Applications*, Kluwer Academic Publishers (2002).
11. T. Vilknér, D. Janásek, and A. Manz, *Analytical Chemistry*, **76**, 3373 (2004).
12. C. Zhanga, J. Xua, W. Mac, and W. Zheng, *Biotechnology Advances*, **24**, 243 (2006).
13. K. -Y. Lien and G. -B. Lee, *Analyst*, **135**, 1499 (2010).
14. J. -W. Choi, T. M. Liakopoulos, and C. H. Ahn, *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 409 (2001).
15. P. Grodzinski, J. Yang, R. H. Liu, and M. D. Ward, *Biomedical Microdevices*, **5** (4), 303 (2003).
16. M. A. Northrup, C. Gonzalez, D. Hadley, R. F. Hills, O. Landre, S. Lehew, R. Saiki, J. J. Shinsky, R. Watson, and R. Watson Jr., *Proc. Transducers*, 764 (1995).
17. P. J. Obeid, T. K. Christopoulos, and H. J. Crabtree, *Analytical Chemistry*, **75**, 288 (2003).
18. K.-Y. Lien, W.-Y. Lin, Y.-F. Lee, C.-H. Wang, H.-Y. Lei, and G.-B. Lee, *Journal of Microelectromechanical Systems*, **17**, 288 (2008).
19. H.-Y. Tseng, C.-H. Wang, and G.-B. Lee, *Biomedical Microdevices*, **9**, 545 (2007).



連剛逸先生為國立成功大學奈米科技暨微系統工程研究所博士。

Kang-Yi Lien received his Ph. D. in nanotechnology and microsystems engineering from National Cheng Kung

University.



黎煥耀先生為美國西北大學醫學院微生物及免疫研究所博士，現為國立成功大學醫學院微生物及免疫研究所講座教授。

Huan-Yao Lei received his Ph.D. in immunology from Northwestern University, USA. He is currently a chair professor in the Department of Microbiology & Immunology at National Cheng Kung University.



李國賓先生為美國加州大學洛杉磯分校博士，現為國立成功大學工程科學系特聘教授。

Gwo-Bin Lee received his Ph.D. in mechanical & aerospace engineering from University of California, USA. He is currently a distinguished professor in the Department of Engineering Science at National Cheng Kung University.