

生物晶片－淺談微陣列晶片與電泳晶片

Biochips – An Introduction to Microarray Chip and Microchip Electrophoresis

林群哲、林謙德

Chun-Che Lin, Chien-Der Lin

生物晶片泛指在石英、玻璃或高分子聚合物等基材上透過微機電製程系統 (MEMS) 所製成之多功能微小化分析裝置，相較於傳統生化分析設備，其具有精確性高、分析速度快及所需樣品與試劑少等優點。由於生物晶片可在短時間內獲取大量生物資訊進而加速新藥篩選、醫學檢測及生物試驗，故被喻為是將改變人類生活型態之新世代明星產業。

Biochips refer to multifunctional microdevices fabricated on quartz, glasses, or polymer-based substrates by MEMS. Compared to conventional bioanalytical devices, biochips are more accurate, effective, and less consumptive. Due to the ability of obtaining massive bioinformation in a very short time and accelerating the drug screening, medical inspection, and biotesting, biochips are thought to be the next-generation star industry that will change the style of human life.

一、前言

生物晶片是目前在國內外都被高度期待之領域，其發展主要分為微陣列晶片 (microarray chip) 及實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 兩大支。其中微陣列晶片是現代生物與醫學領域研究基因序列及表現的一項重要工具，亦是發展較為成熟的一支，已有許多商業化產品。而實驗室晶片則是將實驗室分析流程如樣品前處理、進樣、分離、反應、偵測乃至收集等整合在一微小化晶片裝置上，故又稱為微全程分析系統 (μ -total analysis system, μ -TAS) 晶片，其

技術門檻較高，目前仍處於研發階段而僅有少數產品上市。本文將針對微陣列晶片及實驗室晶片中的電泳晶片與其相關的一些代表性裝置加以整理介紹。

二、微陣列晶片

微陣列晶片的主要訴求在於同時提供大量的生物資訊，其概念乃是將大量經過事先設計之探針 (如 DNA 或蛋白質) 整齊地固定在一基材上，這些探針再透過 DNA 分子間的雜交反應 (hybridization)

或蛋白質間的特異性作用力而與欲分析樣品作用，最後再利用各種呈色方式如螢光、冷光或顯示基團顯現出來 (圖 1)，以作為研究人員或檢驗人員之判讀依據。根據不同的檢測標的物 (target)，微陣列晶片又分為基因晶片及蛋白質晶片兩大類。

1. 基因晶片

基因晶片又稱 DNA 晶片，乃是根據核酸分子間會互補的特性為基礎所發展而成的晶片，是目前發展最為成熟的生物晶片。依探針來源的不同，基因晶片可分為互補核苷酸晶片 (cDNA microarray) 及寡核苷酸晶片 (oligonucleotides microarray) 兩種。互補核苷酸晶片係利用現存於基因庫中的互補核苷酸作為探針來源，長度通常在 200 個核酸以上，適用於分析基因表現 (expression)。寡核苷酸晶片則是利用化學法合成長度較短之 DNA (約 20–80 個核苷酸) 以作為探針，因探針序列較短而有較高之專一性，主要應用在檢測分析、序列分析 (sequencing)、基因單點多型性分析 (SNPs)、基因型分析 (genotyping) 及基因表現分析等。

基因晶片在製備上一般可分為光罩法 (又稱原位合成法, *in situ synthesis*) 及合成後固定法 (post synthesis covalent attachment) 兩種。光罩法由 Affymetrix 公司所發展，係在核苷酸上接上光活化基，利用光罩設計選擇性地照光後，經光照部位會因保護基被去除而活化，再將此晶片浸泡在欲固定上去之核苷酸溶液中，使之與活化部位作用而耦合，之後再將未固定上去的核苷酸洗掉，接下來再利用其他光罩重複以上步驟直到合成出所欲之探針為止，為目前製造高密度寡核苷酸晶片最成功的方法；合成後固定法係預先將互補核苷酸或寡

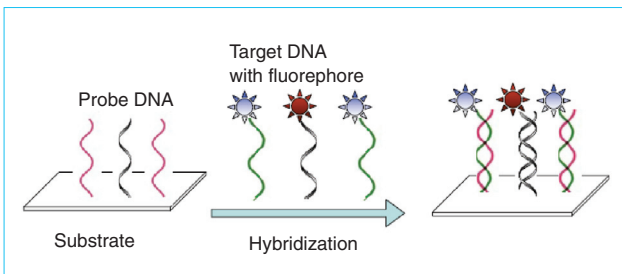


圖 1. 微陣列晶片螢光偵測示意圖。

核苷酸合成好之後，再將之點製 (spotting) 在基材上，其探針密度相對較低，但由於操作簡便，許多公司都採用這種方法來製備晶片。

點製的方法有接觸式點製如針點法 (pin) (圖 2(a))、針環法 (pin and ring) (圖 2(b))、毛細管法 (capillary) (圖 2(c)) 及非接觸式點製如壓電噴墨法 (圖 2(d)) 等。此外，Agilent 更應用噴墨法將核酸一個一個地合成至基材上 (圖2(e))，其所使用原理為 solid-phase phosphoramidite chemistry。

在應用上，基因晶片被廣泛應用在基因體研究與基因表現分析兩方面。基因體研究的重點在於找出功能性基因，以辨別其位置與變異、研究基因之生理功能以建構整體基因與生理機能間的關聯性；而基因表現分析則可建立基因與疾病間的關聯性，有助於疾病的預防及治療，目前被廣泛應用在癌症的研究上，例如辨別正常細胞與癌細胞、區分癌細胞的種類及區別腫瘤組織之同源叢生性 (clonality) 或異質性 (heterogeneity) 等。

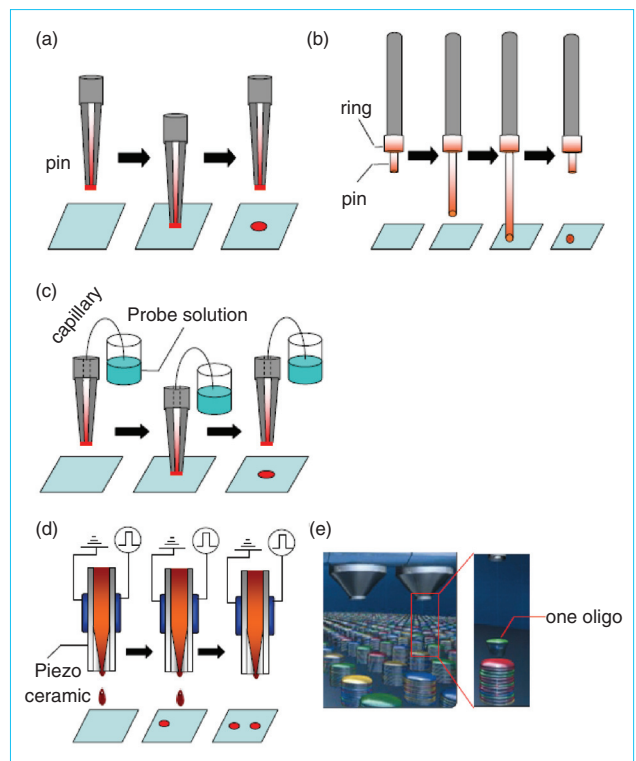


圖 2. 點製微陣列晶片。(a) 針點法、(b) 針環法、(c) 毛細管法、(d) 壓電噴墨法及 (e) Agilent 所開發之原位噴墨合成法。

2. 蛋白質晶片

雖然基因晶片的發展與相關技術均已相當成熟且已有許多商業化產品，但影響生理生化現象最直接的巨分子為蛋白質，而基因表現並不同於蛋白質表現，且蛋白質經轉譯後修飾作用 (post-translational modification, PTM) 所造成之多樣性更使得蛋白質晶片的發展相對重要。與基因晶片類似，蛋白質晶片係以蛋白質、肽、抗原或抗體為探針，與檢體樣品中的蛋白質作用而進行檢測或研究工作 (圖 3)。然而蛋白質晶片產品之發展並不如基因晶片成熟，此乃是受限於蛋白質分子本身的特性及其表面固定技術瓶頸，包括：(1) 蛋白質活性維持及來源取得不易、(2) 晶片與檢體間的最佳反應條件不一、(3) 晶片載體製作不易，例如某些種類的蛋白質容易黏附於載體，但某些則相反，而這又衍生出載體的選擇與表面處理的問題。

目前已設計出的蛋白質晶片載體除玻璃載體外，還有立體多孔膠墊晶片 (3D gel pad chip) 以及微／奈孔晶片 (microwell/nanowell chip) 兩種。玻璃載體的優點是可利用現成的微陣列點製設備 (microarrays) 與掃描機進行蛋白質晶片的製作與分析，但有液體蒸散及交互污染的問題。立體多孔膠墊晶片是將聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel) 或瓊脂凝膠 (agarose gel) 點在玻璃載片而製成，可將蛋白質固定在獨立的膠墊內，具有可固定之蛋白質量較多、膠體中緩衝液可減少蛋白質變性機率、無交互作用等優點，但缺點是較難更換緩衝液與移去附加之反應分子，且製作過程較複雜、成本高。微孔 (microwell) 或奈孔 (nanowell) 蛋白質晶片係在覆蓋於玻璃載片上之可拋式矽彈性體 (silicon elastomer) 或聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 中設計微陣列孔洞，具有不易蒸乾、反應

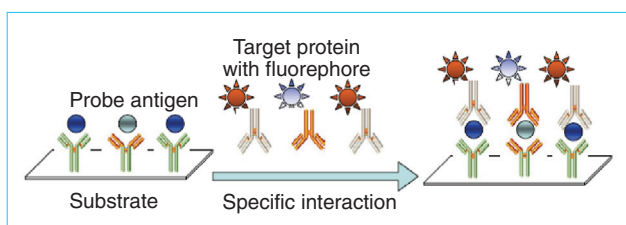


圖 3. 蛋白質晶片作用原理示意圖。

獨立而不易交叉污染、靈敏度較高、方便更換緩衝液、樣本需求量少、成本較低、易於自動化等優點。立體多孔膠墊晶片及微／奈孔晶片均可適用於標準的微陣列設備，但必須做校正對準 (alignment)。

在應用上，依據結合的蛋白質不同，蛋白質晶片主要分為酵素晶片及微生物晶片。酵素晶片的應用十分廣泛，例如醫療診斷、環境保護與食品衛生等；而微生物晶片主要應用於偵測生物體內賀爾蒙、微生物所產生的特異物質、凝血相關因子等。

3. 微陣列晶片信號之檢測與分析

除了研發各式各樣不同目的之晶片探針外，晶片信號之檢測與分析亦是當前生物晶片發展的關鍵技術，有大量的研究與專利集中在這兩方面。目前最普遍之晶片檢測方法為螢光法，常用之偵測元件則有光電倍增管 (photomultiplier tube, PMT)、光電二極體 (photodiode)、崩潰光電二極體 (avalanche photodiode, APD) 及電荷耦合裝置 (charge-coupled device, CCD) 等。然而螢光法涉及繁雜的標記技術，且有螢光衰減、準確定量困難及無法辨識信號是產生自正常配對 (perfect match)、錯誤配對 (mismatch) 或兩者均有或非特異性吸附等問題，故有研究正試著建立新的檢測技術，如化學發光法、光纖維法、質譜法、二極管陣法、乳膠凝集反應法、直接電荷變化檢測法等。另外，生物晶片的專利有 60% 以上集中在數據分析，可見如何進行數據解讀是當前生物晶片研究之重點，在這方面目前應用最廣泛的是聚類分析 (cluster analysis) 法，其他還有時間序列分析 (time series analysis) 與主成分分析 (principal component analysis) 等方法。

4. 產品化微陣列晶片

由於微陣列晶片技術的成熟，國內外已有許多生物晶片公司投入大量的研發及生產。國外最著名的有 Affymetrix 及 Agilent，其他如 SuperArray、TeleChem、AlphaGene 等也都各自有其主推的微陣列晶片產品，由於產品種類繁多，在此不詳加贅述，有興趣者可至本文最後所附之各公司網站做進一步了解。國內生物晶片公司則有晶宇生物科技、

微晶、聿新、華聯生技、先進基因、台灣基因、數位基因及博微等，其晶片產品或研發方向整理如表 1 所示。

三、實驗室晶片—電泳晶片

實驗室晶片又稱微流體晶片 (microfluidic chip)，乃是將實驗室分析流程整合在一微小化晶片裝置上，以功能而言，可大略分為樣品處理晶片 (如透析晶片)、反應晶片 (如聚合酶鏈鎖反應晶片) 及分析晶片 (如電泳晶片) 等。微小化的結果，使其不論在成本、分析效能及樣品消耗量上，都優於傳統分析技術，而其最大的優勢之一是具輕便性與可拋棄性。此外，透過適當之設計將晶片與外界儀器串接並整合微機電系統製程，實驗室晶片亦可輕易地達到自動化之目的。本節將針對近年來有關實驗室晶片中電泳晶片及與其相關的一些代表性裝置加以整理，並概略介紹目前較具代表性之產品化電泳晶片系統。

1. 各種功能的電泳晶片

(1) 整合自動進樣裝置之電泳晶片

電泳晶片雖具有分析時間短之優勢 (通常在十幾秒到三分鐘之間)，但當有很多樣品要分析時，此優勢往往被晶片之清洗及再平衡所需花費的時間 (通常在五分鐘到三十分鐘之間) 所抵消。有鑑於此，必須設法縮短分析樣品之間所需時間。有許多方法被發展出來解決此問題，包括使用低成本之可拋式晶片、高通量微流體晶片及整合自動進樣系統等。使用可拋式晶片如聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯及聚二甲基矽氧烷的優點是不需要重複清洗及平衡晶片，故可有效縮短整體分析時間，但必須考慮製程因素所造成之晶片變異性，因而分析再現性上的表現並不被預期。在使用高通量多管通微流體晶片方面，最近的例子是今年由 Hosokawa⁽¹⁾ 所發表之可同時分析 12 個樣品的晶片系統，雖然高通量晶片具有可一次同時分析多個樣品之優勢，但與拋棄式晶片一樣，不同分析管道的變異問題仍然存在，並且高通量晶片之製備亦較單管道晶片困難。

除上述兩種方式外，將自動進樣裝置與電泳晶

表 1. 國內外生物晶片公司及其主要 (晶片) 產品／研發方向。

國內生物晶片公司	主要 (晶片) 產品／研發方向
晶宇生物科技 http://www.bio-drchip.com.tw/	腸病毒檢驗晶片 乳牛乳房炎檢驗晶片 B 型肝炎病毒檢驗晶片 C 型肝炎病毒檢驗晶片 食品病原菌鑑定晶片 人類乳突狀瘤病毒型別鑑定晶片
微晶生物科技 http://www.u-vision-biotech.com/	脂肪細胞基因晶片 廣用型生物晶片載體 超快速雜交反應液 生物資訊分析技術
先進基因科技 http://www.agtc.com.tw/	中草藥晶片
華聯生技 http://www.phalanx.com.tw/	人類基因體晶片
聿新生物科技 http://www.bioptik.com.tw/	肺癌檢測晶片
台灣基因科技 http://www.tgs.com.tw/	單核苷酸多型性基因晶片
數位基因科技 http://www.digitalgene.com.tw/	晶片點製機
博微科技 http://www.biowell.com.tw/	DNA 防偽晶片
開物科技 http://www.kaiwood.com.tw/	主推光電量測、影像分析暨結合製程自動化技術，開發一系列檢測設備。
洄藝科技 http://www.agnitiost.com/	整合微流體及資訊技術，並應用於臨床現場即時檢測分析及個人化醫療檢測分析的整合性架構及服務。
國外生物晶片公司	網址
Affymetrix	http://www.affymetrix.com/
Agilent	http://www.home.agilent.com/
SuperArray	http://www.superarray.com/
AlphaGene	http://www.alphagene.com/
Bio-Rad	http://www.bio-rad.com/
Åmic	http://www.amic.se/

片整合在一起，則為減少分析不同樣品間清洗及再平衡所需時間提供了另一可能。其優勢在於所有分析均在同一管道上進行，故不會有上述兩種方式所造成之變異，並且整個分析過程包括管道的清洗、再平衡及連續樣品的分析均完全自動化。如 C. C. Lin 等人在 2002 年所發表之自動化連續進樣分析系統⁽²⁾，即是在此構想下所發展出來的系統，其裝

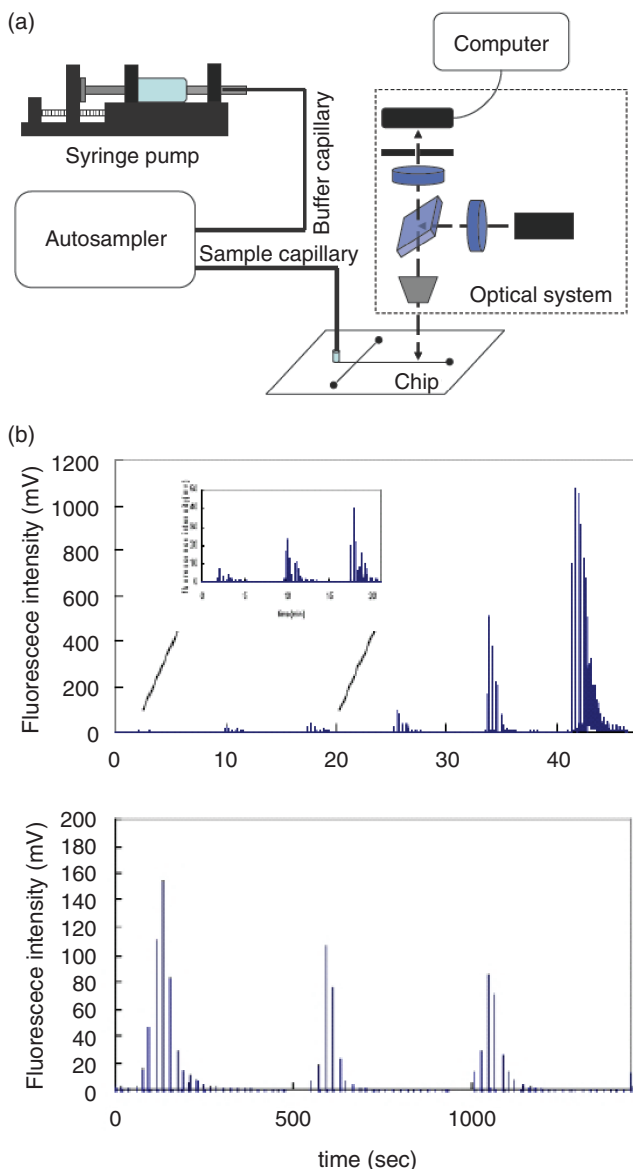


圖 4. 全自動化電泳晶片系統。(a) 裝置圖，(b) 分析一系列濃度之染料的電泳圖。

置如圖 4(a) 所示。

該系統乃是將針筒式幫浦 (syringe pump)、自動進樣器及晶片透過毛細管連結，樣品及清洗液 (同時也是電泳溶液) 則透過針筒式幫浦傳送。當樣品達到晶片的十字區時，透過特別設計的電壓控制程序便可進樣到分析管道內進行分析。利用該裝置分析一系列不同濃度染料 (rhodamine B) 之結果如圖 4(b) 上圖所示，其分析線性高達 0.9991，而下圖部分則是將染料由高濃度往低濃度分析的結果，

顯示在不同樣品之間，管道可被徹底洗淨而不殘留前一次的分析物訊號，故不會有污染的問題存在，將該裝置應用在磷酸化肽的定量分析上⁽³⁾之結果，則證明其確實展現出極佳的定量分析能力。

(2) 具有質譜電噴灑裝置之電泳晶片系統

在蛋白質體學 (proteomics) 的研究中，晶片上常用之光學或電化學偵測並無法獲得分子質量與胺基酸序列等鑑定蛋白質所需之資訊，故近年來以質譜儀做為偵測方式的蛋白質體學研究已成為主流。代表性例子之一是如圖 5(a) 所示與質譜串聯之微流體晶片模組⁽⁴⁾，其包含了樣品前處理、微電泳/電噴灑 (electrospray ionization, ESI) 晶片及質譜儀等三個主要部分，利用其具有快速進樣及分離之優點，配合質譜儀在分析及質量偵測方面之優勢，可達到快速且準確的蛋白質鑑定目的。圖 5(b) 為該晶片以牛血清蛋白 (BSA) 為樣品，所得之其代表性肽的二次質譜圖 (MS/MS)，證明其用於蛋白質鑑定的可行性。

(3) 微透析晶片

在生物樣品的分析上，上述之電噴灑質譜術 (ESI-MS) 已被廣泛地應用⁽⁵⁾。然而對於如細胞萃取物和其他複雜生物性樣品欲利用電噴灑質譜術作分析時，往往必須將一些干擾物如樣品中的高分子量和低分子量成分去除方可，因為這些干擾物經常會使得分析靈敏度大為降低，並且影響圖譜品質。因此去除干擾物之微小化分離裝置，如微透析晶片在近年來便成為一大研究主題，如 Fan Xiang⁽⁶⁾ 等人所發表之晶片便是其中之一，其設計如圖 6(a) 所示。

該微透析晶片主要由三片聚碳酸酯材質之晶片及高、低分子量透析薄膜所組成，其中晶片上的管道係利用準分子雷射加工而成，管道 3 的一端透過一加工於中間晶片邊緣之無滯留體積層析套管 (no dead volume chromatographic fitting) 連接到電噴灑噴頭，另一端則與管道 2 間由一鑽孔連通。在管道 1 與管道 2 之間有一高分子量透析薄膜 (high MWCO)，此透析薄膜的目的是將大於某分子量以上之雜質及鹽類去除；而在管道 3 與管道 4 之間則

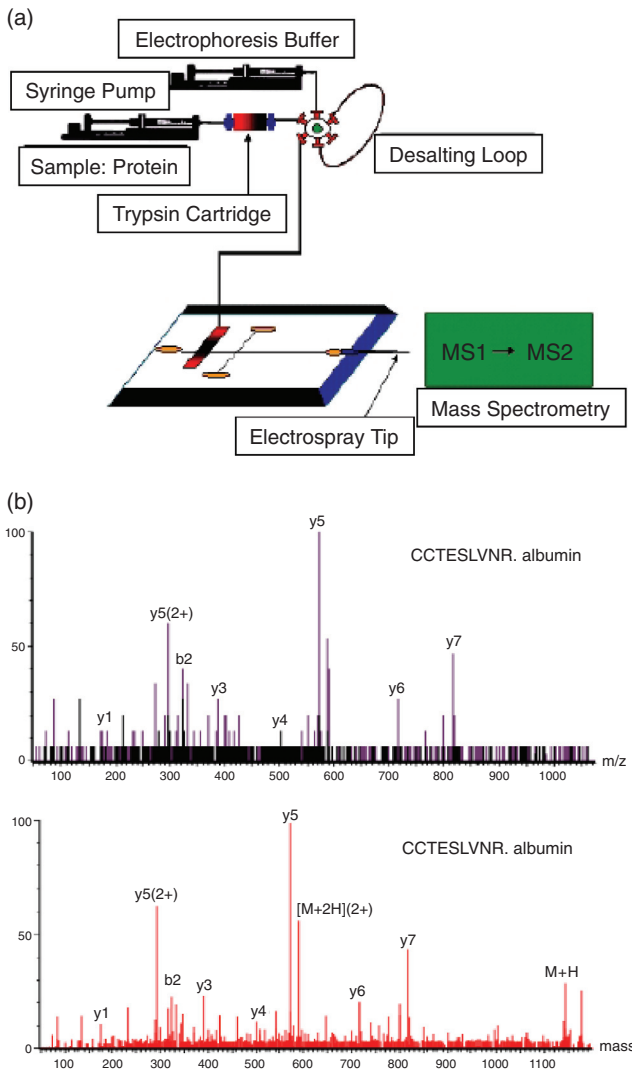


圖 5. 蛋白質鑑定微流體模組。(a) 裝置示意圖，(b) 代表性胜肽的二次質譜圖 (MS/MS)。

另有一低分子量透析薄膜 (low MWCO)，此透析薄膜則是能將低於某分子量以下之雜質及鹽類去除。在上板及下板晶片中分別有一緊密微套管 (fingertight microfitting)，用來與毛細管連接以做為分析樣品之進樣端及出口端。如圖 6(b) 所示，對一個含有 30 μM BSA、8 μM cytochrome c 及 2.4 μM ubiquitin/0.01 M PBS 之混合樣品作分析，上、下圖分別是流經此微透析晶片前、後進入質譜作分析之結果，下圖顯然乾淨得多，並且靈敏度大為提升。另外，由於微透析晶片所使用的流體流速約為 200 nL/min，這樣的流速相對於傳統透析裝置小了大約一個量級，因此也使得樣品的浪費減少很多。

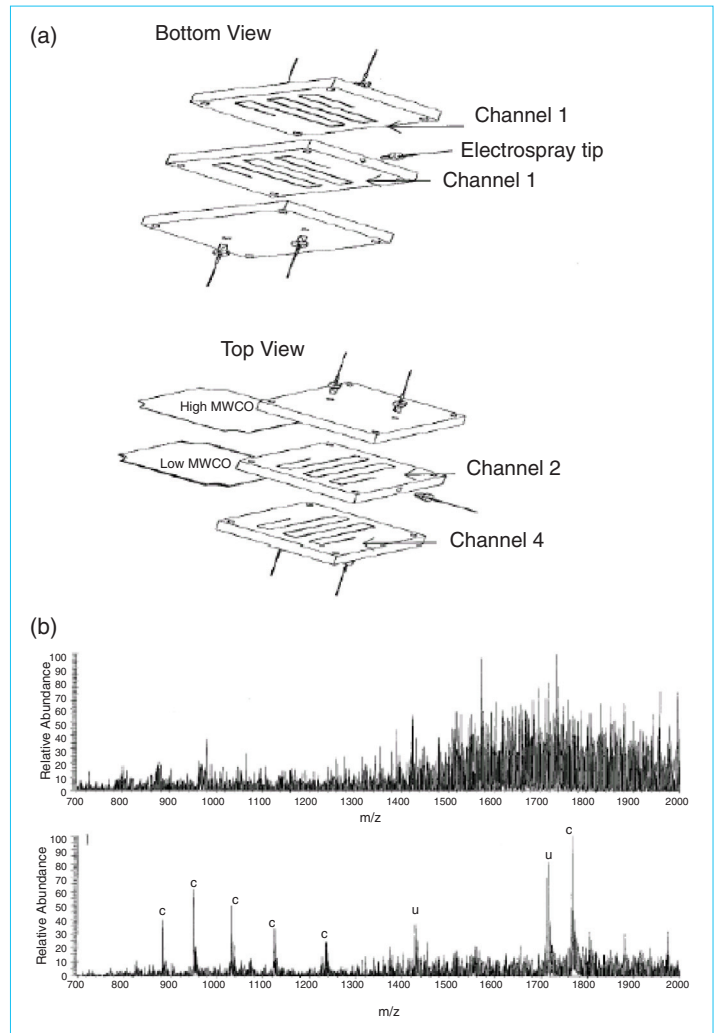


圖 6. 透析微流體晶片，(a) 俯視圖與上視圖，(b) 包含 30 μM BSA、8 μM cytochrome c 與 2.4 μM ubiquitin 之樣品透析前後質譜圖訊號差異。

微透析的另一重要應用是線上即時取樣，以反應出被試驗對象在受藥前後特定分析物之濃度變化，被廣泛應用於神經傳導物質及藥物動力學的研究上。此外，亦可與電泳晶片結合，將透析過後的樣品導入電泳晶片以進行後續之分離及偵測。

(4) 聚合酶連鎖反應暨電泳晶片系統

DNA 的放大 (amplify)⁽⁷⁾ 及其分析裝置在完成人類基因計劃及隨後的應用上佔有很重要的地位，故有許多研究是著重在將傳統聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 裝置直接整合在分

析晶片上，如早期由 Adam T. Wooley⁽⁸⁾ 等人在 1996 年所發表之聚合酶連鎖反應暨電泳分析晶片系統便是最具代表性裝置之一。最近 Mathies⁽⁹⁾ 等人更將聚合酶連鎖反應裝置、電泳晶片、流體控制、電路系統及四色螢光偵測等功能整合在一台重僅約 10 公斤之儀器上 (圖 7)。其晶片系統由 glass manifold (連接壓力控制器，用以控制微閥門的開、關)、PDMS membrane (形成微閥門)、heater/channel wafer (溫度循環/分離) 及 RTD wafer (控溫回饋) 等四個部分所構成。樣品在聚合酶連鎖反應室 (體積為 160 奈升) 放大完成後，透過電壓及微閥門的操作，便可被注射到微通道以進行分離及偵測，整個過程可在 1.5 小時內完成，而放大產物的偵測靈敏度則可達 20 copies。此儀器將微流體晶片系統的效能及優勢展露無遺，相信在不久的將來，類似此高效率且具整合功能之微小化聚合酶連鎖反應暨電泳晶片－偵測系統將會取代傳統的聚合酶連鎖反應－平板電泳系統。

除以上所述之微型化聚合酶連鎖反應晶片及聚合酶連鎖反應暨電泳晶片系統外，Haim H. Bau⁽¹⁰⁾ 等人在最近則發展出一套可拋式的聚合酶連鎖反應暨側流向 (lateral flow, LF) 系統，其結構如圖 8(a) 所示。在該系統中，將聚合酶連鎖反應試劑、DNA 模版與 DNA 引子混合注入後，透過以水凝膠 (hydrogel, HG) 製備之閥門的控制 (HG1, HG2)，將之在聚合酶連鎖反應區放大，而放大後的產物再與含有紅外上轉換磷光顆粒 (up-converting phosphor particles, UCP) 之側向流溶液 (LF buffer) 混合，並將 UCP 與放大產物接合後，再導至側向流系統的起始端而進行分析。側向流技術為一普遍使用的快速檢測技術，其優點為使用方便且成本低廉。該裝置利用聚合酶連鎖反應之高專一性及高敏感度，配合側流向平台快速方便之特性，使其在臨床檢測上具有極大之吸引力。

(5) 整合光學偵測之電泳晶片

在微流體晶片常用之光學偵測器中，光二極體的體積最小，最有可能整合在微流體晶片上，如 Michael L. Chabiny⁽¹¹⁾ 等人在 2001 年便成功地將整個螢光偵測系統微小化，該裝置如圖 9(a)。

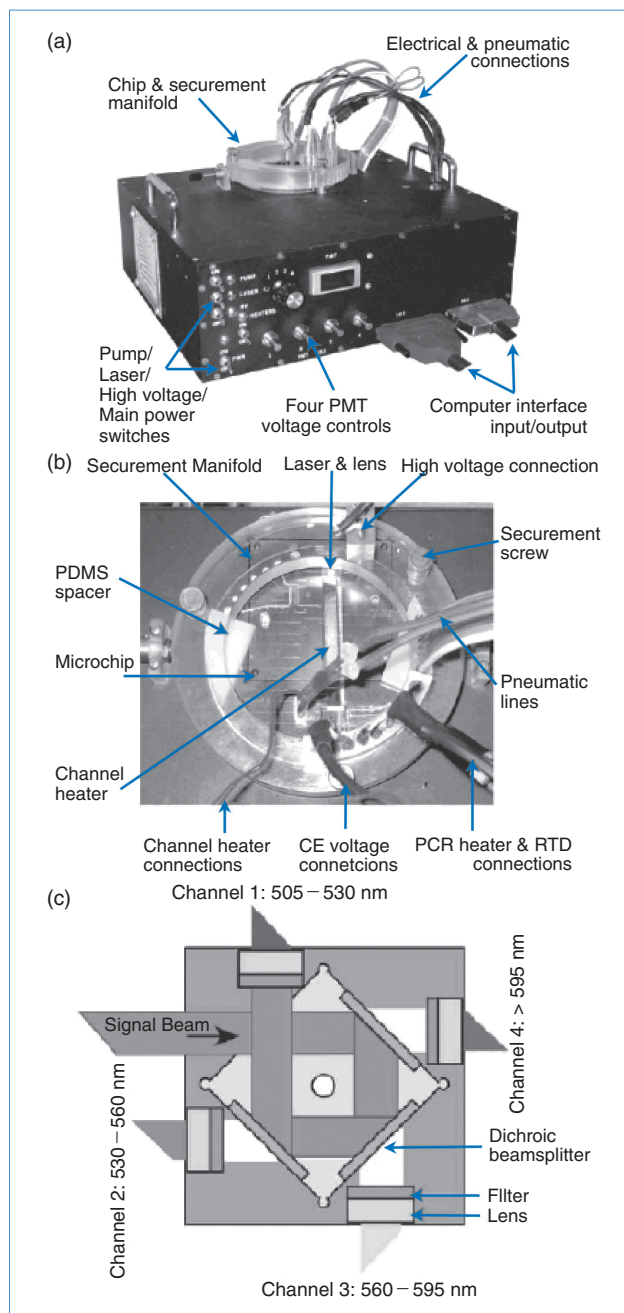


圖 7. 整合聚合酶連鎖反應裝置、電泳晶片、流體控制、電路系統及四色螢光偵測之儀器。(a) 儀器外觀，(b) 聚合酶連鎖反應裝置、電泳晶片及微閥門系統，(c) 四色螢光系統。

整個系統由藍光發光二極體 (blue light-emitting diode, LED)、光纖管 (optical fiber)、薄膜濾片 (polymeric optical filter) 及微崩潰光電二極體 (micro avalanche photodiodes, μ PDs) 所組成，由於此裝置中

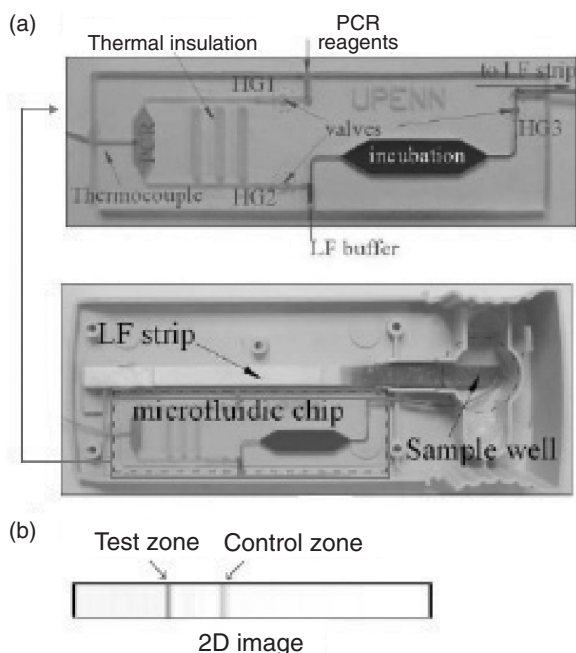


圖 8. 可拋式聚合酶連鎖反應暨側流向系統。(a) 聚合酶連鎖反應及 UCP 反應區，(b) 偵測結果示意圖。

光學元件間的距離均很小，不需要額外的聚光元件來加強光訊號的收集，因此系統體積及成本方面均大幅減少。此外，值得一提的是，此偵測系統是可再使用的，因為微崩潰光電二極體並非直接嵌入在微流體晶片中，而是先將之嵌入在一聚二甲基矽氧烷基材中，在微崩潰光電二極體之受光面上有一約 50 微米厚之聚二甲基矽氧烷層，這使得可在要偵測時再將之放在微流體晶片的上面。利用此系統及傳統光學偵測系統分析含有 fluorescein-labeled carbonic anhydrase、fluorescein-labeled α -lactalbumin、fluorescein、5-carboxyfluorescein 而濃度為 $5 \mu\text{M}$ 之混合物，所得的電泳圖譜如圖 9(b)。相較之下，可以發現兩者的解析度幾乎一樣，但靈敏度方面，傳統光學偵測法比微小化光學偵測系統好了約一千倍，該作者認為主因是光學濾片所造成。

由於並非所有分析物都可輕易與染料接合，且大多數生物分子 (如蛋白質、DNA) 在 $200 \text{ nm} - 300 \text{ nm}$ 間具有強吸收峰，故發展一套晶片上的 UV 吸收偵測系統便成為微流體晶片在應用上相當重要的課題之一。在這方面，有許多的裝置被發展出來，如 Verpoorte⁽¹²⁾、Kutter⁽¹³⁾ 及 Burns⁽¹⁴⁾ 等人便分

別利用 fiber optic waveguide、monolithic waveguide 及直接將偵測器整合在晶片上來達到 UV 偵測的目的。然而這些裝置存在著光學對準不易或製作成本昂貴的問題。有鑑於此，Devoe 等人⁽¹⁵⁾ 便設計出如圖 10(a) 之低成本的晶片 UV 偵測系統。利用該

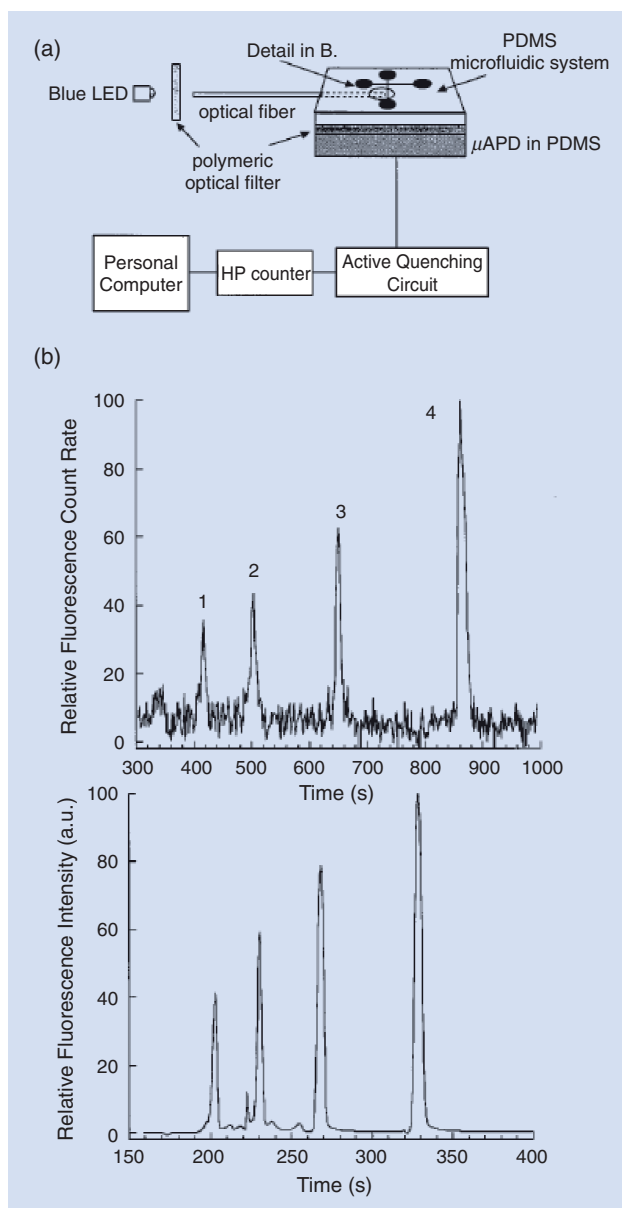


圖 9. 整合型螢光偵測系統。(a) 結構示意圖，(b) 含 fluorescein-labeled carbonic anhydrase、fluorescein-labeled α -lactalbumin、fluorescein 及 5-carboxyfluorescein，濃度為 $5 \mu\text{M}$ 混合物分別在整合型晶片 (上圖) 及市售電泳儀器所得之電泳圖 (下圖)。

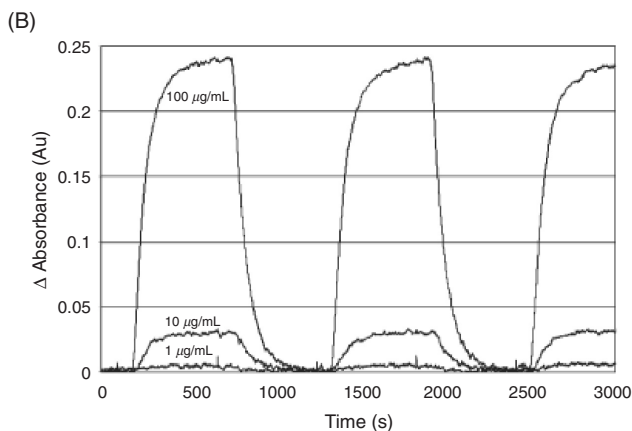
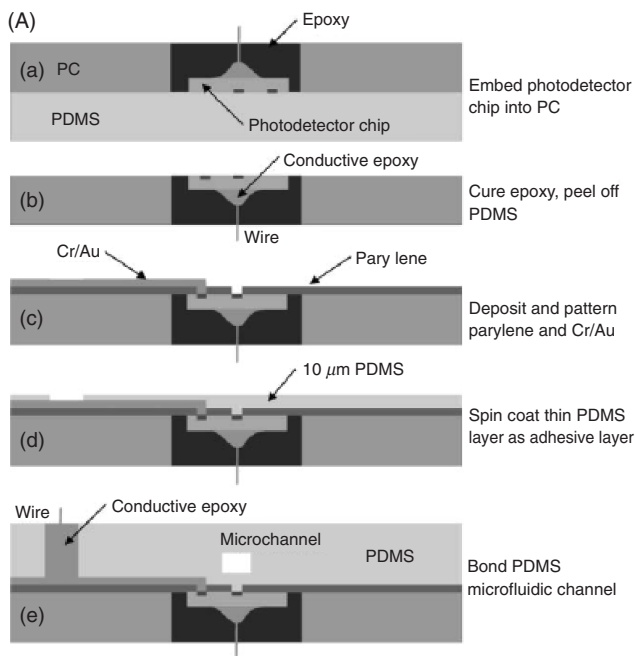


圖 10. 具 UV 吸收偵測器之微流體晶片。(A) 製備程序：(a)–(b) 將光二極體嵌入聚碳酸酯基材，(c) 沉積聚對二甲苯及 Cr/Au 導電層，(d) 塗佈聚二甲基矽氧烷層，(e) 與聚二甲基矽氧烷微流體晶片接合。(B) 注射不同濃度 BSA 所得之吸收訊號。

系統偵測不同濃度之 BSA 的結果如圖 10(b) 所示，其偵測靈敏度可達約 15 nM，其靈敏度為一般 UV 偵測器 (μM) 的 100–1000 倍。

(6) 具線上濃縮功能之電泳晶片

由於可容納樣品體積少及蝕刻管道的光徑短，使得微流體晶片的靈敏度在以光學偵測法為偵測手

段時受到相當的限制。有鑑於此，許多的晶片線上濃縮技術被發展出來以解決此問題，包括 high salt stacking⁽¹⁶⁾、field-amplified sample stacking⁽¹⁷⁾、sweeping⁽¹⁸⁾、base stacking⁽¹⁹⁾、isotachopheresis⁽²⁰⁾ 及 solid phase extraction⁽²¹⁾ 等。以 solid phase extraction 為例，圖 11 為 Kirby⁽²¹⁾ 等人所發表之方法，乃是利用雷射在十字型晶片的十字區域製備出一個具奈米級孔洞之薄膜 (厚度約 50 微米) 而達到濃縮的目的。過程如圖 (b)–(d) 所示，施加電壓後，利用樣品溶液中的緩衝離子很小，可輕易通過薄膜，但分析物 (蛋白質) 很大，無法通過薄膜而「累積」在十字型區域，進而達到濃縮的效果。利用此法分析一含有 BSA 及 phosphorylase b 的分析物，顯示其濃縮倍數 (concentration factor) 可達 104。

(7) 異相免疫分析電泳晶片

免疫分析係利用抗體與抗原間強且具特異性之作用力來作為疾病診斷的依據，可區分為勻相 (homogeneous) 與異相 (heterogeneous) 免疫分析。

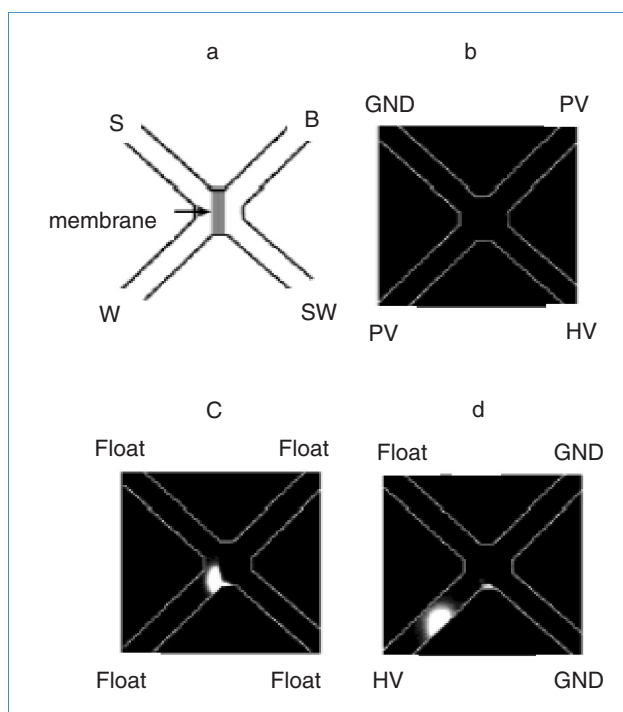


圖 11. 奈米多孔薄膜濃縮晶片。(a) 十字區放大圖。(b)–(d) 樣品進樣時於十字區累積之螢光圖。

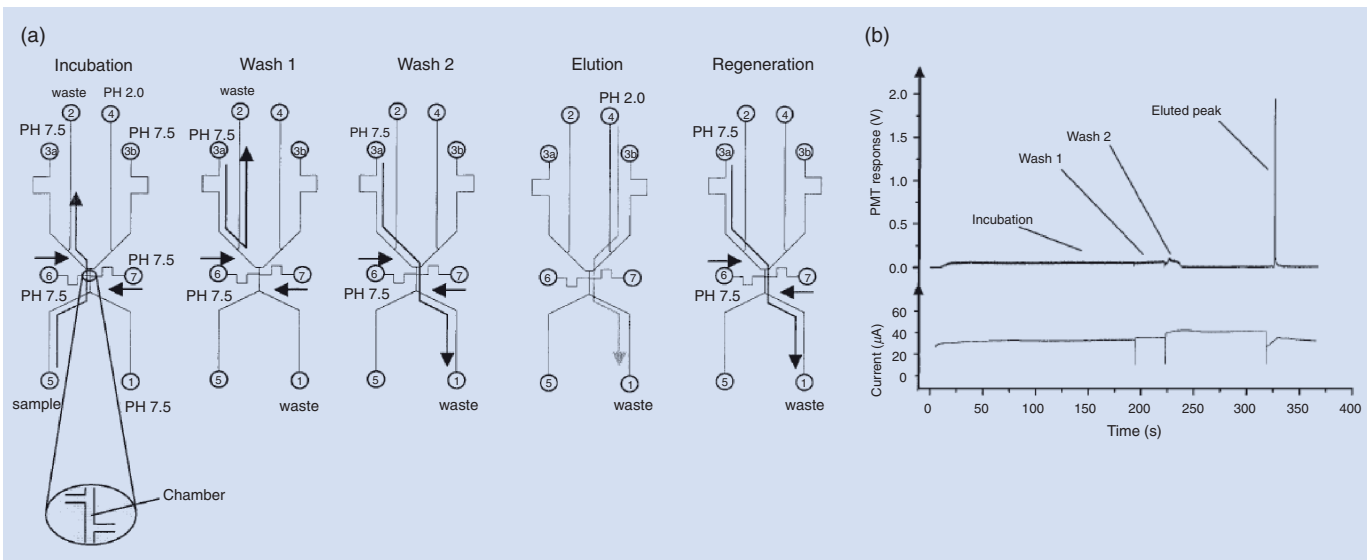


圖 12. 異相免疫分析微流體晶片。(a) 設計圖與樣品分析流程圖，圖中雙 T 型的部分為樣品室，容槽 1、2：廢液槽，容槽 3、6、7：Tris-HCl，容槽 4：glycine-HCl，容槽 5：樣品，(b) 對應圖 A 操作過程的螢光訊號與電流訊號圖。

勻相免疫分析主要是依據抗體與抗原在溶液中結合成錯合物後造成偵測訊號的改變來分析；異相免疫分析則是先將抗體固定 (immobilize) 在一固體基材上，接著使含有欲分析樣品之溶液通過，令其與抗體鍵結後，以適當的沖洗液將沒有鍵結在抗體上的雜質或多餘的抗原沖洗 (wash) 出來，最後再利用適當的沖提液 (eluent) 將鍵結在抗體上的抗原沖提出來，進而達到純化的目的。雖然勻相免疫分析相當適合在微流體晶片上運作，但可應用的分析數目並不多，故在微流體晶片免疫分析技術上，以利用異相免疫分析技術為主，其最主要的優點是高濃縮能力，可將分析溶液中極為少量的分析物濃縮至固體基材上，如 Arash Dodge⁽²²⁾ 等人於 2001 年所發表之電壓驅動異相免疫分析晶片便是其中之一，其設計如圖 12(a) 所示。

此晶片主要由數條微通道及八個容槽所構成 (存放樣品液、清洗液、沖提液及廢液)。在分析開始前，先將蛋白質 A (protein A, PA) 固定在微通道的管壁上⁽²³⁾，接下來則依序以 incubation、wash1、wash2、elution、regeneration 之次序操作，分析結果如圖 12(b) 所示。由結果可以發現，經由以上的步驟所沖提出來的 Cy5-IgG (eluted peak)，所得到

的訊號強度確實比原先樣品中所含 Cy5-IgG 所反應出來的訊號強度 (incubation) 強得多，證明了此異相免疫分析微流體晶片確實可達到相當不錯的濃縮效果，且整個分析流程僅需約 6 分鐘。

除了上述具有濃縮效果的免疫分析晶片外，類似圖 13(a) 所示之三明治型晶片在免疫分析的應用上也相當廣泛⁽²⁴⁾。其原理乃是先將可抓住分析物的抗體 (capture Ab) 固定在基板上 (圖 a)，然後利用已製備好溝槽之晶片置於其上使樣品流過基板 (圖 b)，此時樣品中的分析物與 capture Ab 便透過抗體-抗原作用力而鍵結在一起，接著再使接有螢光分子的抗體 (detection Ab) 以垂直於樣品之方向流過基板 (圖 c)，並與分析物鍵結而達到偵測目的 (圖 d)。圖 13(b) 為以三明治型免疫分析晶片分析一系列 cytokine TNF- α 濃度之結果。其中右半部為標準品，左半部為細胞培養樣品，結果顯示其靈敏度可達約 20 pg/mL，略優於典型 DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay) 之結果 (~30 pg/mL)。

(8) 具細胞培養及以細胞為基礎之分析 (Cell-Based Assay) 功能的微流體晶片

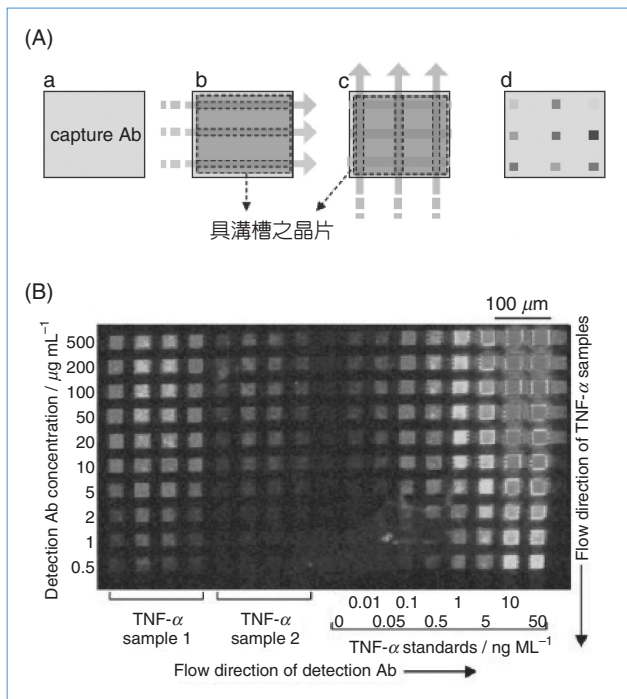


圖 13. 三明治型免疫分析晶片。(A) 操作示意圖，(a) 固定 capture Ab 於基板，(b) 水平方向流過樣品液，(c) 垂直方向流過 detection Ab (d) 偵測結果 (B) 分析一系列不同濃度之 cytokine TNF- α 之結果。

近年來有許多的研究是將微流體晶片應用在細胞培養 (cell culture) 上，如今年 Kim⁽²⁵⁾ 所發表之如圖 14 (a) 的裝置。在該裝置中，必須先將含有 puramatrix hydrogel 及細胞的混合物固定在管道內。

首先將去離子水導入，以隔離混合物與 media (用以凝膠化 puramatrix) (圖 a)，然後停止水及混合物的導入 (圖 b 及 c)，使 media 與混合物接觸。此時 media 會開始擴散至混合物內並使之凝膠化，最後再將水導入以確定細胞已被固定在管道中央 (圖 d)，確定細胞已被固定並培養完成之後，便可開始進行毒性分析。

如圖 14(b) 左圖所示，先將 Triton X-100 與 media 分別由 2 號及 3 號管道導入 10 分鐘，然後再於 3 號管道導入 live/dead cytotoxicity tet solution。圖 14(b) 右圖之 (a)–(c) 顯示在不同濃度的 Triton X-100 之下細胞的存活情形。由此螢光顯微鏡觀察之結果顯示，隨著 Triton X-100 濃度的增

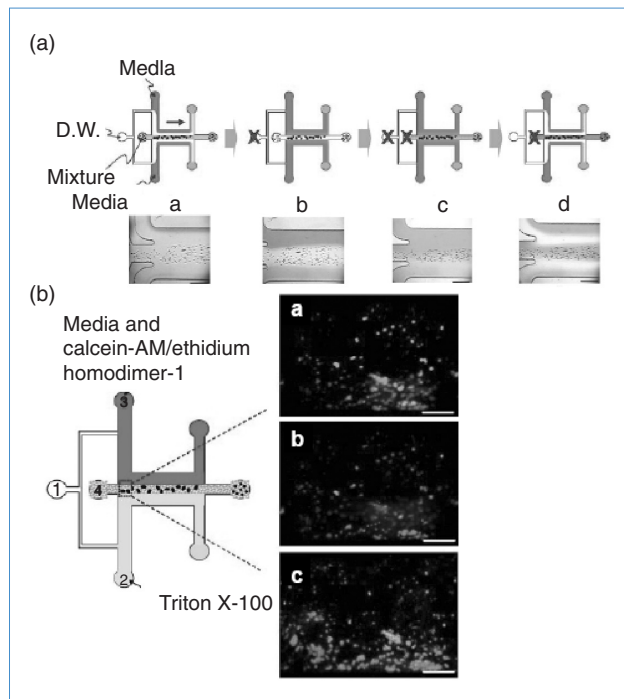


圖 14. 細胞分析晶片。(a) 細胞固定化流程，(b) 細胞毒性分析，綠色點為活細胞，紅色點為死細胞。

加，細胞的死亡數目隨之增加，且當 Triton X-100 的濃度梯度增為兩倍時 (圖 c–d)，死亡細胞的區域亦約增加兩倍。

2. 產品化實驗室晶片

實驗室晶片由於其技術門檻高、研發期長且必須整合跨領域專業，故目前無太多商業化產品問世。目前在這方面較具代表性之產品為 Bio-Rad 的「Experion Automated Electrophoresis System」、Agilent 的「2100 Bioanalyzer」及 Åmic 的「Forecast POC System」。

Bio-Rad 及 Agilent 公司所設計生產之電泳晶片系統均具有一台電泳/螢光偵測主機、填膠機 (priming station)、螺旋振盪器 (vortex) 及可依不同分析物 (如蛋白質、DNA、RNA) 而使用之晶片。以蛋白質分析為例，兩者所需樣品量均為數微升，Experion Automated Electrophoresis System 可在 40 分鐘內分析 10 至 12 個樣品，而 2100 Bioanalyzer 則可在約 30 分鐘內分析 12 個樣品。

除了電泳晶片外，Agilent 最近更推出了「Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS system」，為一以液相層析－質譜法為基礎之晶片分析系統。該系統與目前被廣泛使用之 nano HPLC/MS 系統最大的不同，在於其晶片整合了分離管柱、連接管柱及奈噴灑嘴 (nanospray emitter)，使得原本存在 nano HPLC/MS 系統的擴散效應被減至最低，故而提升了分離效果。靈敏度方面，以 human serum albumin tryptic digest 為例，可達 100 amol；再現性方面，以 50 fmol 之 BSA tryptic digest 為例，其訊號峰滯留時間的平均相對標準偏差為 0.27 %。由分離效果、靈敏度及再現性之表現顯示，該系統之效能具有相當之水準。此外，該系統更被設計成可適用於多種晶片如 protein ID chip、glycan chip、small molecule chip、MS calibration and diagnostic chip、infusion chip 等，以滿足使用者的不同需求。

另外，Åmic 公司所推出之「Forecast POC System」，為一以免疫分析晶片為基礎之系統。其操作步驟相當簡單，僅須將血液滴入晶片樣品槽內並置入訊號讀取儀即可。被滴入之血液經由濾膜分離出分析物並與接有螢光分子之抗體鍵結後，再進入管道內與 capture Ab 鍵結，最後再利用螢光法偵測，該晶片進行一次完整分析僅需數分鐘即可完成。

四、結論

在微陣列晶片方面，由於其專利障礙 (如 Affymetrix 的高密度基因晶片)，我們必須體認到一項晶片產品已幾乎不可能不侵犯到他人專利的事實。因此積極研發、申請國際專利並透過互相授權的方式以避免侵權，才是日後台灣在微陣列晶片產業中必須走的方向。

在實驗室晶片方面，由所舉例子來看，具單一或數種功能之整合型晶片已被成功地應用在許多分析及研究上，並且也都被證實其效能與傳統分析技術不相上下，甚至在分析效率及樣品消耗量上都遠優於傳統儀器。然而真正商業化的產品並不多見，主要是因其技術門檻高、研發期長、產品安全要求

高，且必須整合電子、材料、化工、機械、光電、物理、化學、生化、生物、生物資訊、軟體設計及遺傳工程等跨領域專業。國外已有數家生物晶片大廠如 Agilent、Bio-Rad 及 Åmic 等推出實驗室晶片產品，而國內目前除了工業技術研究院及學術單位外，則有開物科技、晶宇生技與洄藝科技等公司投入相關研究。台灣向來擁有優良的電子、半導體、機械、材料、化工、光電及生化等專業領域人才，但確少有廠商願意投入大筆資金與研發時程，倘若政府能出面主導，積極整合政府與民間資源、實施相關配套措施，相信我們可在目前產業仍處於標準尚未建立、技術瓶頸有待克服且專利仍有爭論的萌芽期，開創台灣自有品牌並躋身世界舞台。

參考文獻

1. A. Inoue, T. Ito, K. Makino, K. Hosokawa, and M. Maeda, *Anal. Chem.*, ASAP Article 10.1021/ac0616097 S0003-2700(06)01609-X.
2. C. C. Lin, G. B. Lee, and S. H. Chen, *Electrophoresis*, **23**, 3550 (2002).
3. C. C. Lin, C. C. Chen, C. E. Lin, and S. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, **1051**, 69 (2004).
4. 宋旺洲, 陳淑慧, 李國賓, 廖寶琦, 中華民國專利 (no. 574132).
5. R. B. Cole, ed., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, New York: John Wiley & Sons (1997).
6. X. Fan, Y. Lin, J. Wen, D. Matson, and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **71**, 1485 (1999).
7. In *PCR: A Practical Approach*, M. J. McPherson, P. Quirke, and G. R. Taylor, eds., Oxford University Press: Oxford, England (1991).
8. A. T. Wooley, D. H. Phoebe Landre, A. J. demello, R. A. Mathies, and M. Allen Northrup, *Anal. Chem.*, **68**, 4081 (1996).
9. P. Liu, T. S. Seo, N. Beyor, K. J. Shin, J. R. Scherer, and R. J. Mathies, *Anal. Chem.*, ASAP Article 10.1021/ac061961k S0003-2700(06)01961-5.
10. J. Wang, Z. Chen, P. L. A. M. Corstjens, M. G. Mauk, and H. H. Bau, *Lab Chip*, **6**, 46 (2006).
11. M. L. Chabinyc, D. T. Chiu, J. C. McDonald, A. M. Stroock, J. F. Christian, A. M. Karger, and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **73**, 4491 (2001).
12. L. Ceriotti, K. Weible, N. F. de Rooij, and E. Verpoorte, *Microelectron. Eng.*, **67**, 865 (2003).
13. K. B. Mogensen, J. El-Ali, A. Wolff, and J. P. Kutter, *Appl. Opt.*, **42**, 4072 (2003).

14. V. Namasivayam, R. Lin, B. Johnson, S. Brahmamandra, Z. Razzacki, D. T. Burns, and M. A. Burns, *J. Micromech. Microeng.*, **14**, 81 (2004).
 15. L. Zhu, C. S. Lee, and D. L. DeVoe, *Lab Chip*, **6**, 115 (2006).
 16. J. Palmer, D. S. Burgi, N. J. Munro, and J. P. Landers, *Anal. Chem.*, **73**, 725 (2001).
 17. B. Jung, R. Bharadwaj, and J. G. Santiago, *Electrophoresis*, **24**, 3476 (2003).
 18. Y. Seram, N. Matsubara, K. Otsuka, and S. Terabe, *Electrophoresis*, **22**, 3509 (2001).
 19. D. K. Kim and S. H. Kang, *J. Chromatogr. A*, **1064**, 121 (2005).
 20. Y. Jeong, K. Choi, M. K. Kang, K. Chun, and D. S. Chung, *Sensors and Actuators B*, **104**, 269 (2005).
 21. S. Song, A. K. Singh, and B. J. Kirby, *Anal. Chem.*, **76**, 4589 (2004).
 22. A. Dodge, K. Fluri, E. Verpoorte, and N. F. de Rooij, *Anal. Chem.*, **73**, 3400 (2001).
 23. C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, A. Paulus, and M. Ehrat, *Anal. Chem.*, **69**, 3451 (1997).
 24. S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, and E. Delamarche, *Lab Chip*, **4**, 563 (2004).
 25. M. S. Kim, J. H. Yeon, and J. K. Park, *Biomed. Microdevices*, **9**, 25 (2007).
-

- 林群哲先生為國立成功大學化學博士，現任開物科技股份有限公司專案負責人。
- 林謙德先生為國立陽明大學生物資訊碩士，現任開物科技股份有限公司研發工程師。
- Chun Che Lin received his Ph.D. in chemistry from National Cheng Kung University. He is currently a project manager at Kaiwood Technology Co., Ltd.
- Chien-Der Lin received his M.S. in bioinformatics from Yang-Ming University. He is currently an engineer at Kaiwood Technology Co., Ltd.