

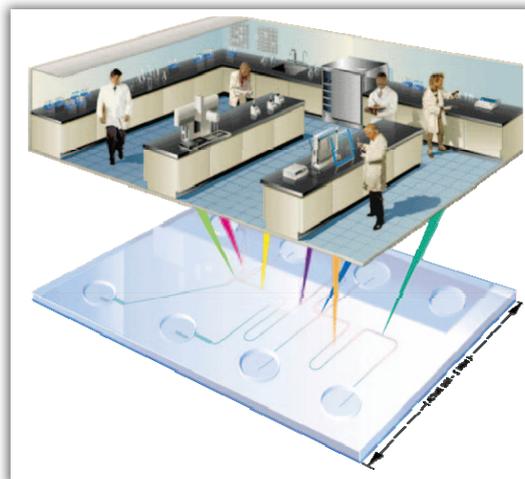
What's fun in EE

臺大電機系科普系列

應用於血液檢測之生醫微流道晶片

黃念祖／臺大電機系教授

血液是在人體內全身循環流動的組織液體，主要由血漿和血球所組成，血球主要由白血球、紅血球及血小板等三種細胞組成，血漿內則含有各種蛋白質、抗體、激素等代謝產物。當人體產生任何生理變化或是疾病產生時，血液中的成分都可能產生變化，因此血液成分的檢測能提供人體狀態的重要即時資訊。然而傳統醫院檢驗科的血液檢測往往需要漫長的排隊等待抽血，檢驗結果亦需要數日後才能得到，不僅醫院檢測耗力費時，病患亦無法得到即時且有效的照護。為解決上述問題，研究人員提出傳統廣泛用於航太、汽車工業、消費性電子產業的微機電系統（Micro-Electro-Mechanical-System, MEMS）製作微小化的生醫晶片，使其可直接在晶片上進行快速、多功能的血液成分檢測。此類利用微機電系統的技術所製作的生物晶片稱之為實驗室晶片（Lab-on-Chip），其字面上的意思就是可將標準生化實驗室內所需要的樣本處理步驟、檢測儀器及人員操作步驟都整合在一片單手就可拿起的生物晶片。此概念聽起來很神奇，但實驗室晶片本身需整合許多複雜的微型流道結構和檢測功能。目前最具代表性的實驗室晶片為世界各國大學及研究單位皆積極發展的生醫微流道晶片系統。微流道晶片內整合了運用分子生物學、分析化學等生醫技術的樣本處理、標定、生物標誌（Biomarker）反應；需要精密加工技術製作的微型化流道、感測器系統，進行少樣本需求、快速、平行且高精度的生化反應量測。本文將針對微流道晶片用於血液樣本檢測的方式做一詳細的介紹，並探討此系統所具備之特點及優勢。



Courtesy of Caliper Technologies Corp., Mountain View, CA

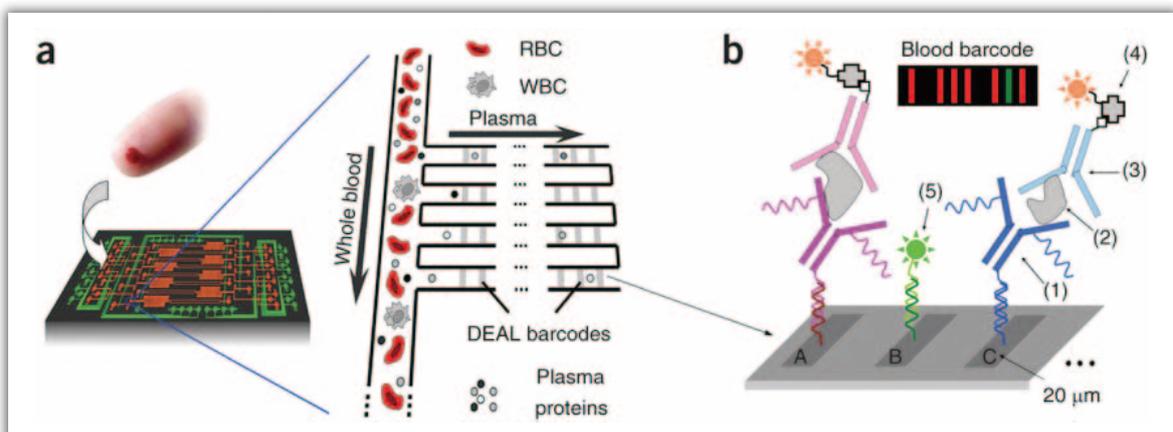
圖一 實驗室晶片概念圖

微流道晶片用於血液檢測的優勢

使用微機電加工技術所製作之微流道晶片，可把傳統生化反應所需之離心、過濾等樣本前處理步驟；樣本混合、反應、感測等功能整合在一數平方公分的晶片上。隨著整體晶片體積縮小，可較傳統生化檢測方式需要較少的血液樣本量，此外反應時間亦可隨著檢測體積縮小而縮短，使醫生或檢測人員能更快得到量測結果。此外微流道晶片可針對不同疾病的血液檢測方式，設計抓取、集中特定的血球組成或血漿內的抗體、抗原、蛋白質等成分。舉例來說，醫生可藉由病患體內紅血球或白血球的數目來判斷免疫系統的狀態；此外，在進行藥物治療或是診斷時也可透過量測血漿中的蛋白質產物來了解治療的成效。為了提升檢測的準確度，血球和血漿分離之純度是生化檢測中一個重要的生物樣本前處理步驟，傳統的血球血漿分離往往使用高速離心機，雖具備快速、高純度的分離效果，但往往需要較多的血液樣本量 (>1MI)，對於一些血液樣本較不易取得的病患，如老人或嬰兒，處理起來較為不便。微流道晶片由於流道的體積較小，較易處理少量之血液樣本分離。此外使用微機電製程製作如微孔洞透模、微溝槽或微分支管道之微流道晶片亦可進行高純度之血球血漿分離。

微流道晶片用於血漿樣本檢測

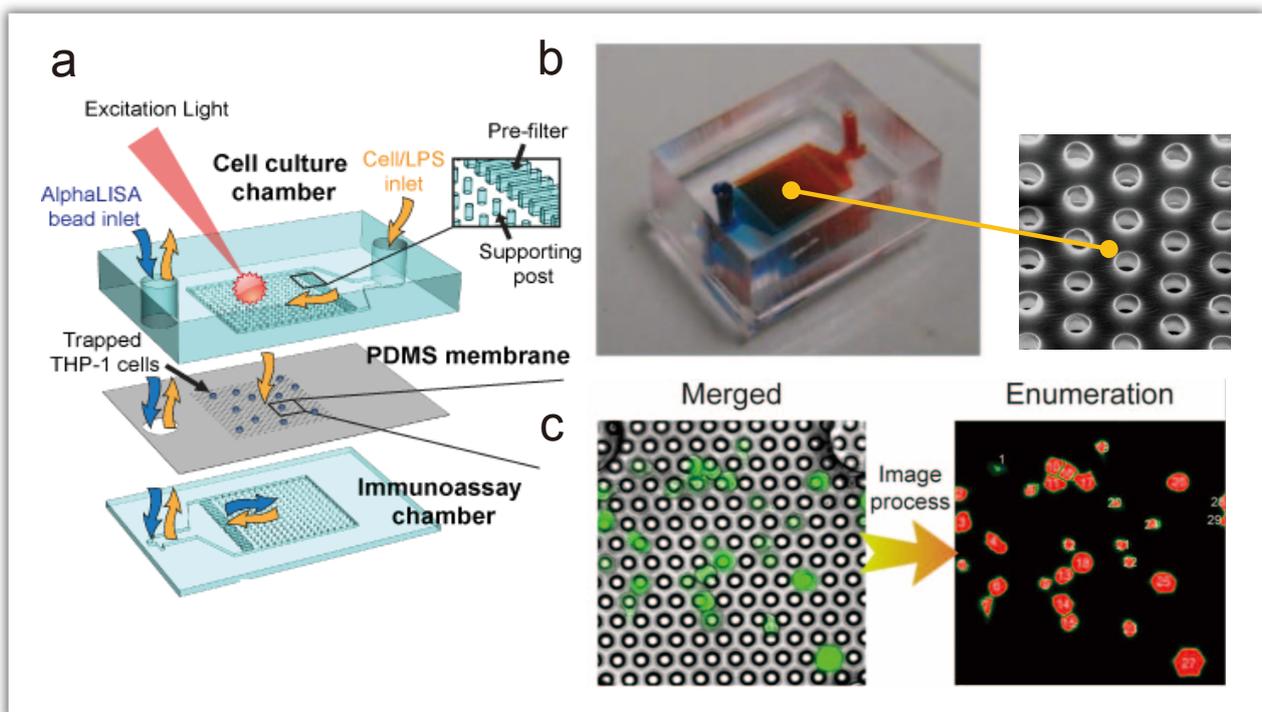
微流道晶片除上述具備少量、快速且高純度的血液樣本前處理功能外，亦可整合不同的感測機制，如光學、電學及磁學等技術，進行即時的血球或血漿含量檢測。舉例來說，血漿中的蛋白質、抗體、抗原一直為疾病診斷時的重要參數，傳統檢驗血漿中感興趣目標物最常使用的方式為酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，此技術利用特定抗體抗原的專一性鍵結，進行目標物檢體檢測。當有特定的抗原和附著於表面的抗體鍵結時，配合酵素產生之呈色反應來推測欲量測抗原的濃度。此種檢測方式具有高分辨率 (selectivity)、高精度 (sensitivity)，可廣泛的使用於全血樣本中血漿內含量之免疫分析反應，然而傳統的酵素免疫分析法由於單次使用檢體體積較多，因此固定血液體積內可量測的抗體抗原種類將受到限制。此外酵素免疫分析法由於需要複雜的血液處理及分析反應操作步驟，通常需 8-24 小時的處理和量測時間，因此量測結果無法提供醫生進行即時且有效率的治療。為解決上述問題，加州理工學院的 J. Heath 教授之研究團隊提出了一整合型的微流道晶片¹，利用血球在微管道中因不均勻之剪力和壓力分布，流往流速較快、壓力較小的管道特性 (zweifach-fung effect)，直接將血球血漿在微流道晶片內部分離。血漿流往主要管徑旁微分支管，其內部成分和微分支管表面上高密度塗佈的 DNA- 抗體探針結合，如此可在數微升等級的血液樣本中，量測癌症病患血液中多達十餘種的細胞激素 (Cytokine)。此技術利用血液在微流道流動時特殊的流體特性達成血球血漿分離，大量降低所需血液的樣本體積和檢測時間。



圖二 整合式微流道晶片可進行血球血漿分離及細胞激素之檢測¹

微流道晶片用於血球樣本檢測

另外一種微流道晶片用於血液檢測的例子為血球數目、類型或狀態的即時觀測。舉例來說，白血球數目為一用於判斷人體體內疾病重要的參數，如白血病。白血病為血液中不成熟白血球異常增生的疾病，計算白血球個數即為主要判斷白血病之方式。另一個例子為人體免疫缺陷病毒（HIV），俗稱愛滋病毒，其病毒會感染血液中之 CD4+ 白血球細胞，造成人體免疫系統殺死體內的 CD4+ 白血球細胞，此類疾病可藉由計算血液中 CD4+ 之白血球數目判斷。另外如要監測洗腎患者是否發生發炎反應亦可藉由量測腹膜透析液內之白血球數目。雖然目前細胞流質儀（Flow cytometry）或細胞計數器（Hemocytometer）已廣為用於白血球個數的量測，然而這些儀器在白血球數目過少時（ $<300\text{cells}/\mu\text{L}$ ）並無法得出準確的讀值，此外亦需要繁瑣的樣本製備流程，無法對於早期的疾病狀態或是發炎症狀提供準確且即時之診斷。有鑑於此，密西根大學 K. Kurabayashi 教授之研究團隊提出一多孔洞結微過濾薄膜之微流道晶片進行微量之白血球計數監測²。此微流道晶片架構如圖三 (a) 所示，由三層聚二甲基矽氧烷（Polydimethylsiloxane, PDMS）的高分子有機矽化合物之微結構所組成，中間的 PDMS 層使用微奈米製程製作之多孔洞微過濾薄膜捕捉血液中之白血球細胞。由於流入微流道晶片之白血球細胞（ $10\text{-}20\mu\text{m}$ ）較孔洞尺寸（ $4\text{-}8\mu\text{m}$ ）來的大，因此流入微流道之白血球細胞可完全被捕捉於多孔洞微薄膜上。此外由於此薄膜使用透明的 PDMS 材料製作，能直接使用光學影像之方式即時觀察白血球細胞在晶片內分布的狀況，如圖三 (c) 所示。此微透模孔洞除了可依觀察不同白血球種類之尺寸調整孔洞大小，亦可搭配使用尺寸較大之聚苯乙烯微球（ $30\text{-}50\mu\text{m}$ ）附著特定的細胞表面蛋白（CD4+、CD8+、CD14+）捕捉血液中特定的免疫細胞子群，如淋巴球細胞（Lymphocytes）、中性體細胞（Neutrophils）、巨噬細胞（Macrophages）等達到高純度的特定種類的白血球計數。此類的白血球計數微流道晶片由於體積小，操作簡易，將來亦可搭配手機系統內之照相機元件及影像處理軟體就細胞的尺寸和形狀進行細胞的計數及分類，成為便於使用之可攜式血球樣本檢測平台。



圖三 多孔洞結微過濾薄膜之微流道晶片 (a) 流流道晶片示意圖 (b) 實際微流道晶片照片及使用電子掃描顯微鏡（SEM）所拍攝之微過濾薄膜孔徑圖 (c) 使用分析軟體進行細胞計數示意圖²

微流道晶片應用於定點照護

定點照護 (Point-of-care) 是近年來生醫微流道晶片領域時常提及之應用，主要的定義為病人不需在具有先進完備醫療設備或是受專業訓練醫護人員的環境下即可進行簡單的生醫檢測，判斷可能產生疾病的風險。這樣的檢測一來可使患有長期慢性病的病人自行在家中進行簡單的疾病狀態監控，一旦發現有異常現象時再前往醫院進行就醫，如此可減低醫院及病患所需耗費之醫療人力及時間成本。另一方面的應用則為使用生醫微流道晶片於醫療資源較為不足的環境進行簡易的疾病檢測。如哥倫比亞大學的 S. Sia 教授之研究團隊，就使用此類型的微流道晶片進行 HIV 的檢測³。此類應用於定點照護之微流道晶片大多為設計簡單的晶片，讓使用者易於操作，另外晶片的製作成本亦需較為低廉，使其為可拋棄式，避免可能造成之樣本污染。最後若要更進一步簡化其操作步驟，此類晶片最好設計無須任何流體幫浦即可自動運送流體樣本至檢測區域，使其可以隨時隨地進行檢測。接下來將介紹兩種此類無需外部壓力來源即可用於定點照護之環境之微流道晶片。

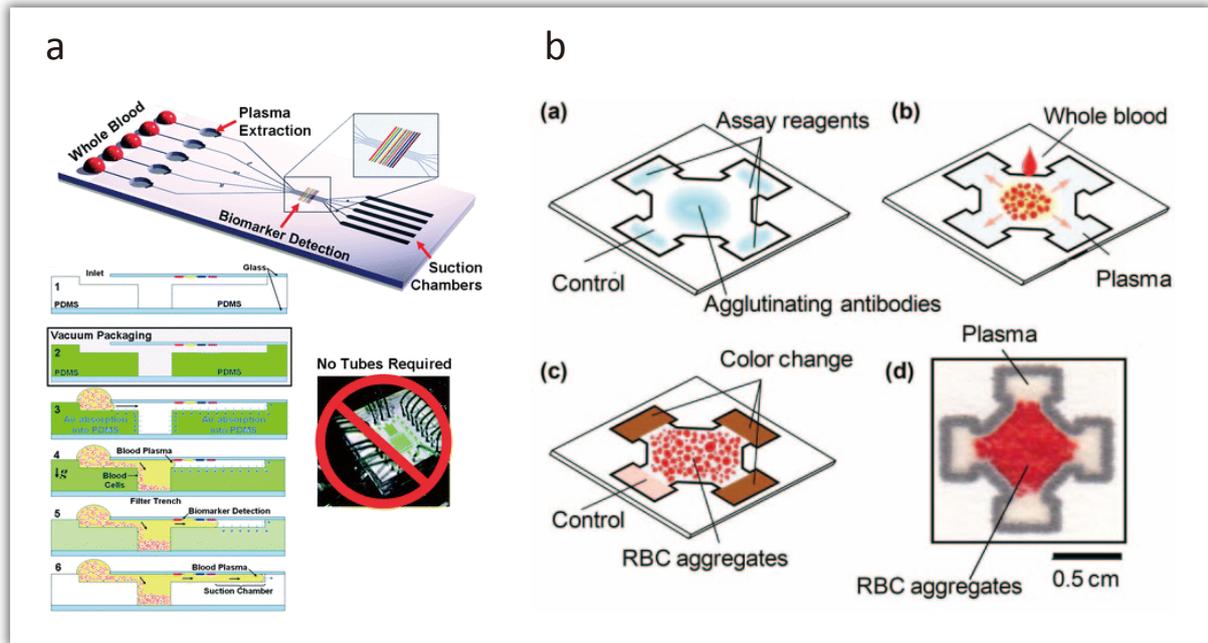
真空處理的微流道晶片

本文前面討論到的微流道晶片結構大多使用 PDMS 材料製作，因其成本低，製程簡便快速，具高透光性和生物相容性，因此被廣泛的使用。然而傳統之 PDMS 微流道晶片多需要外加壓力來源推動流體，對於定點照護之環境下較不方便。為解決此問題，加州大學的 L. P. Lee 教授之研究團隊利用 PDMS 材料具透氣性的特性，預先將要進行量測之微流道晶片抽真空，並在使用前密封包裝晶片。當要進行血液檢測時，再將密封之晶片打開滴入血液樣本。如圖四 (a) 所示，由於晶片之 PDMS 材料內壓力較低，便會吸取血液中的空氣進而帶動流體前進。此晶片主要目的為量測血漿中之蛋白質，因此在檢測區域前端設計一使沉積過濾掉血球之溝槽，得到高純度之血漿進行檢測⁴。

紙做的微流道晶片

相較於 PDMS 等其他材料，紙一直是一種易取得、低成本、具生物相容性，且具備毛細作用的功能，無須外在的壓力來源即能直接運送流體。最常見用紙做的生醫晶片就是驗孕試紙，藉由尿液中糖蛋白激素 (Human chorionic gonadotropin, hCG) 和試紙上的生物標誌物產生反應，造成顏色變化來判斷是否懷孕。雖然此類檢測試紙很簡單且使用方便，但無法精確控制流體方向、流速、反應時間等，因此無法使用在需較複雜處理步驟之生化反應檢測。2008 年，哈佛大學的 G. Whitesite 教授之研究團隊成功在紙質基材上進行光阻塗布、曝光、顯影等標準微機電製程，成功製作世界上第一個紙做的微流道晶片⁵。藉由上述步驟製作材質為紙的微流道晶片，可以改變流道寬細來控制流速，亦能在晶片不同位置上標定多種對應於特定蛋白質抗原之抗體，藉由表面顏色的改變判斷檢體中是否含有待測之目標物，由於微機電製程能製作精密且複雜的流道結構，大幅提升紙類微流道晶片的應用範圍。另一個例子為杜蘭大學 S. S. Shevkoplyas 教授之研究團隊研發之微流道晶片⁶。其量測方式為將待測之全血樣本滴在晶片的正中心，其晶片表面已預先塗布可使紅血球細胞凝結成團之化學物質和全血樣本混合，使紅血球凝結沉積於中心區域，唯有血漿能藉由毛細作用擴散至四周，和表面的抗體反應完成檢測，此紙做的微流道晶片可同時達到血液樣本處理和血漿內蛋白質檢測的功能，大幅降低血液樣本檢測之時間與複雜度。紙做的微流道晶片另一個優點為晶片的保存和處理皆較為方便，只要使用燃燒的方式就能處理掉，對於一些檢測物可能帶有傳染源的生醫晶片來說至為重要，可減低操作人員在醫療防護較為不良的環境下受到感染的風險。

整體來說，使用於血液樣本檢測的微流道晶片能提供更詳細的人體資訊。其微小化的流體體積不



圖四 (a) 真空處理的微流道晶片⁵ (b) 紙做的微流道晶片⁶，上述兩種晶片皆能即時分離血球血漿，進行血漿內蛋白質檢測

但能簡化及縮短生化反應所需之時間，將來亦能用於遠端醫療等定點照護之應用，降低病患前往醫院就醫所需之醫療成本，雖然和製藥產業或是醫療器材等相關生醫領域相比，微流道晶片尚屬於學界中的研發階段，但以台灣在電子半導體 IC 產業的蓬勃發展經驗，對於高精度、低成本之微流道晶片研製較世界上其他國家具有極大優勢，相信在政府、學界及產業界密切合作下，投入大量人力及設備等資源，必能擴展微流道晶片於生醫檢測之應用並邁向實際商用化的一天。

參考文獻

1. R. Fan, O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. H. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C.-C. Liu, J. Gould, L. Hood and J. R. Heath, *Nat Biotech*, 2008, 26, 1373-1378.
2. N.-T. Huang, W. Chen, B.-R. Oh, T. T. Cornell, T. P. Shanley, J. Fu and K. Kurabayashi, *Lab on a Chip*, 2012, 12, 4093-4101.
3. C. D. Chin, T. Laksanasopin, Y. K. Cheung, D. Steinmiller, V. Linder, H. Parsa, J. Wang, H. Moore, R. Rouse, G. Umviligihozo, E. Karita, L. Mwambarangwe, S. L. Braunstein, J. van de Wiggert, R. Sahabo, J. E. Justman, W. El-Sadr and S. K. Sia, *Nat Med*, 2011, 17, 1015-1019.
4. I. K. Dimov, L. Basabe-Desmonts, J. L. Garcia-Cordero, B. M. Ross, A. J. Ricco and L. P. Lee, *Lab on a Chip*, 2011, 11, 845-850.
5. A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi and G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 3699-3707.
6. X. Yang, O. Forouzan, T. P. Brown and S. S. Shevkoplyas, *Lab on a Chip*, 2012, 12, 274-280.