

國立臺灣大學工學院化學工程學系暨研究所

碩士論文

Department of Chemical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis



以布朗動態法模擬 DNA

於圓柱陣列微流道中之電泳分離

Brownian Dynamics Simulation of Electrophoretic DNA

Separation in Hexagonal Post Array

陳致安

Chih-An Chen

指導教授：謝之真 博士

Advisor: Chih-Chen Hsieh, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

# 國立臺灣大學碩(博)士學位論文

## 口試委員會審定書

以布朗動態法模擬 DNA

於圓柱陣列微流道中之電泳分離

Brownian Dynamics Simulation of Electrophoretic DNA  
Separation in Hexagonal Post Array

本論文係陳致安君 (R02524039) 在國立臺灣大學化學工程學系、  
所完成之碩(博)士學位論文，於民國 104 年 07 月 16 日承下列考試  
委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

謝 乙 真

(簽名)

莊怡哲 (指導教授)

黃世宏

系主任、所長

王大銘

(簽名)

(是否須簽章依各院所規定)

## 致謝



首先最要感謝的人是謝之真教授，從大三專題開始一路到碩二都有教授的陪伴，不斷的耐心教導我遇到問題時的解決方法、積極的研究態度，以及在各方面要求自己，不僅對於我的碩士研究的品質有顯著的幫助，對於以後出社會，人生長遠的未來都是引領成功非常重要的特質，除了研究外，當自己在經濟與家庭遇到問題時教授也會花時間與我長談，給予我更多不同面向的人生經驗，讓我更能做心理的調適，克服心中的憂鬱；教授也很支持我追求在歌唱上的夢想，讓我在做研究之餘能以音樂調治心靈。真的非常感之真教授在教學、研究與家庭的百忙之中還是非常關心我，能在自己人生最後一段求學時光遇上之真教授並融洽的相處，是我此生最珍貴的回憶與經驗。

這段時間受到非常多人的幫忙，除了教授之外指導我最多的是秋德學長，在任何的細節他都非常細心的指導我，為我打了穩健的基礎，讓我在研究上更有能力繼續堅持下去，如果沒有學長的指導，我的研究過程絕對會更艱辛。

謝謝 Catherine，台北和新竹的距離不算近，但讓我更珍惜每次和妳相處的時刻，恭喜我們一起拿到碩士學位，往後的人生還要繼續一起加油。

謝謝實驗室同屆的勝弘和宏恩，大家平常都是互相舒壓，互相聊天的好對象，也是能讓我持續下去的動力，謝謝學長姐們睿亭、家偉、尚儒，還有年紀比我們大的學弟靜寬和厚均，大家讓實驗室的氣氛很融洽，讓工作環境更舒適。

最後感謝一直陪伴我的媽媽，和在天上的爸爸，想對你們說，你們的兒子畢業了，謝謝你們的養育讓我可以拿到這個學位，謝謝你們。

## 摘要


本研究利用電腦模擬，以布朗動態法(Brownian Dynamics)和有限元素法做結合，測試 DNA 在六角排列之圓柱陣列微流道中的電泳分離。在直流電場下 DNA 會與圓柱障礙物有碰撞、上鈎與脫鈎的行為，而不同分子量的 DNA 經歷此一連串的行為所需的時間也不同，因而能達到分離的效果。此研究從參考文獻開始，一步步從發現前次設計的問題再做改良，共模擬了四種不同的設備與電場模式。

首先我們參考文獻中，使用絕緣圓柱障礙物於微流道中以六角陣列排列，利用連續恆定的直流電場作為電泳驅動的結果，發現在高電場下 DNA 以直線型態於圓柱之間前進，大幅減少了碰撞機率，因此也嚴重影響到分離的效率。因此為了增加高電場下碰撞的頻率，我們將障礙物改為具高導電性的物質，電力線會向障礙物內縮，也就是電場驅使流道中的物質朝向障礙物進行碰撞，但如此的改良僅讓 DNA 擦過所有接近的障礙物，並沒有上鈎與脫鈎的過程，仍無法加大不同 DNA 間的距離，且 DNA 仍是以直線型態於圓柱之間前進。因此我們將目標轉移為改變 DNA 在碰撞前的型態，將連續性直流電場改變為間歇性電場，當電場關閉時 DNA 能鬆弛成線圈狀，提升垂直電場方向的投影長度，如此一來電場再啟時 DNA 就能造成有效碰撞，提升上鈎與脫鈎的頻率進而增加分離效率，但從 DNA 的鬆弛過程中我們發現，六角陣列排列的障礙物限制了 DNA 鬆弛的空間，使得 DNA 常只是縮短，仍為直線狀，因此我們再將障礙物的排列加入週期性的空隙，增加 DNA 鬆弛的空間，使 DNA 在電場關閉時增加鬆弛成線圈狀的機率，進而提升上鈎的機率而增加分離解析度。

關鍵字：DNA 電泳分離,布朗動態法,有限元素法,間歇式電場,微流道



## Abstract

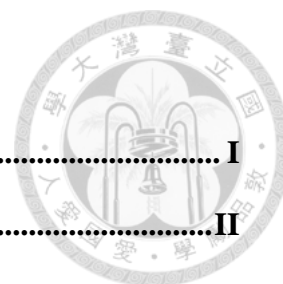


Electrophoretic separation of DNA through a post array has been heavily investigated in both experiments and simulations. However, the efficiency of the post array for separating long DNA has been found decreased rapidly with increasing Peclet number (or electric field). The loss of resolution power is largely due to the onset of channeling phenomenon that DNA move through the hypothetical “channel” between posts without collisions with the posts. To improve the efficiency of separation at high Peclet number, we propose to use several revised devices. The first is to substitute insulated post with conductive post, in order to increase colliding frequency. But most of the collision is not efficient hooking. Then we introduce intermittent electric field to replace the traditionally adopted constant electric field. When the electric field is turned off, DNA relax and diffuse, resulting in higher probability of collision with posts as the field is turned on. Furthermore, we create periodic spacing in post array, in order to increase spacing for DNA to relax. To test our idea, we have used Brownian dynamics simulations and computational fluid dynamics to simulate lambda-DNA(48.5 kbp) and T4GT7-DNA (166 kbp) under intermittent electric field through a hexagonal post array.

**Keyword:** DNA Electrophoretic separation, Brownian Dynamics, Finite Element

**Method,** Intermittent electric field, Microfluidic channel

# 目錄



致謝 .....	I
摘要 .....	II
Abstract .....	III
目錄 .....	IV
圖目錄 .....	VII
表目錄 .....	XV
第 1 章 緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究動機與目的.....	1
第 2 章 文獻回顧.....	3
2.1 DNA 的物理性質 .....	3
2.1.1 去氧核糖核苷酸( DNA ).....	3
2.1.2 堅韌長度( Persistence length ).....	4
2.1.3 輪廓長度 ( Contour length ) .....	4
2.1.4 鬆弛時間 ( Relaxation time ) .....	5
2.2 線性高分子模型.....	6
2.3 高分子鏈.....	7
2.3.1 理想鏈 .....	8
2.3.2 真實鏈 .....	10
2.4 Bead-spring model .....	13
2.5 電泳分離 DNA 之文獻回顧 .....	14
2.5.1 傳統凝膠法 .....	14
2.5.2 利用圓柱障礙物分離 DNA.....	15
2.5.3 快拍模式(Snapshot Mode)與終點線模式(Finish-line Mode) .....	20

2.5.4	DNA 於圓柱陣列微流道電泳之相關參數 .....	23
2.6	微流道設計之改良策略.....	35
2.6.1	以高導電度障礙物取代絕緣障礙物 .....	35
2.6.2	以周期性電場關閉來改變 DNA 碰撞前的型態 .....	37
2.6.3	綜合微流道改良與電場關閉改變 DNA 碰撞前的型態 .....	39
<b>第 3 章</b>	<b>模擬方法.....</b>	<b>41</b>
3.1	布朗動態法 (BD) .....	41
3.2	有限元素法 (Finite Element Method) .....	46
3.3	FEM 連結 BD.....	49
3.4	時間步階.....	51
3.5	參數設定測試.....	52
3.6	以較短電泳長度參數擬合求得較長通道之分離解析度.....	55
3.7	分析工具.....	56
3.7.1	VMD(Visual Molecular Dynamics) .....	56
<b>第 4 章</b>	<b>結果討論.....</b>	<b>58</b>
4.1	含六角陣列排列之絕緣圓柱障礙物之微流道的電泳分離.....	58
4.2	六角陣列排列之導電性圓柱障礙物.....	66
4.3	以間歇電場取代連續恆定電場.....	78
4.3.1	電場關閉時間周期 .....	79
4.3.2	電場開啟時間周期 .....	84
4.3.3	綜合兩參數之效應 .....	94
4.4	於間歇電場下在含週期性間隙之六角陣列圓柱障礙物微流道中之電泳 .....	97
4.5	不同裝置下的總結分析.....	103
<b>第 5 章</b>	<b>結論.....</b>	<b>107</b>



## 圖目錄



圖 2-1(A)去氧核糖分子結構圖。(B)相鄰之核糖分子互相脫水聚合成 DNA 主鏈。 (取自科技部網站) .....	4
圖 2-2 測量鬆弛時間中，x 方向投影長度之定義。[5].....	6
圖 2-3 (A) 為 Bead-stick model 球與球之以硬棍連接。(B) 為 Bead-spring model 球與球之間以彈簧連接。(C) 為 Pearl-necklace model 珠子與珠子緊密 連接在一起，就像珍珠項鍊一般。[4].....	6
圖 2-4 三個棍子間之平面角示意圖。[6].....	7
圖 2-5 (A) 為真實鏈，因體積排斥之關係而無體積交疊之現象。(B) 為理想鏈， 因無體積排斥之關係而產生體積交疊之情形。[6].....	8
圖 2-6 在隨機漫步下，走 N 步之運動軌跡，此運動軌跡可表示成一根高分子鏈 之形態。[4]。 .....	9
圖 2-7 理想高分子鏈之首尾長度為最前端與最尾端之距離。[4]。 .....	9
圖 2-8 體積排斥示意圖，b 為球直徑， $v_e$ 為排斥體積大小約為 $b^3$ 。[5] .....	11
圖 2-9 圖中沿著骨架相鄰片段之交互作用則稱為 Short-range interaction，沿著骨 架非相鄰之兩個片段之交互作用則稱為 Long-range interaction。[4] .....	11
圖 2-10 使用 bead-stick model，計算 Short-range interaction 之相鄰兩小球之交互 關係， $\theta_b$ 相鄰三小球之夾角，第 $i$ 根硬棍之向量為 $\Delta \mathbf{r}_i$ 。[4].....	13
圖 2-11 dumbbell model 之簡單示意圖，將高分子鏈簡化為只有一根彈簧且連接 兩顆球。[6].....	14
圖 2-12 (A)磁珠圓柱陣列的圓弧形通道。(B)在均勻磁場下，磁珠自組裝排列成 障礙物陣列[14].....	15
圖 2-13 N. Kaji 等人以電子束蝕刻製作 nano-pillar array 示意圖[15].....	16
圖 2-14 部分含以六角陣列排列的圓柱障礙物的電泳微流道及電力線圖[16].....	16
圖 2-15 無因次電泳移動率對 Pe 作圖[16].....	17

圖 2-16 T4-DNA 在高電場下流動行為被侷限在兩排障礙物間，圖中為同一 DNA 在不同時間下的擷取圖，DNA 由右向左流動。.....	18
圖 2-17 無因次離散係數對 Pe 作圖[16].....	18
圖 2-18 分離解析度對不同電場值的關係圖，右上的小圖為三種電場下兩 DNA 在微流道中的分布波峰圖，小圖的 y 軸為 DNA 在對應的電泳時間下偵測到的強度，正比於 DNA 數目。因此若兩波峰相距越遠，則該電場下就有較好的分離解析度。[16].....	19
圖 2-19 (a)規則排列的六角陣列圓柱障礙物於微流道中[16] (b)改變後的不規則排列圓柱障礙物陣列。[18].....	20
圖 2-20 在電泳實驗中，開始電泳一段時間後，在某一個瞬間拍攝含螢光劑之 (a)DNA 在流道中的分布，再偵測每個位置的亮度畫成(b)亮度對位置之分布圖，擬合出兩函數後再計算分離解析度。.....	21
圖 2-21 實驗上以終點線模式求得分離解析度之示意圖。(a)設定一目標區域，擷取該區域在不同時間下的亮度，繪成(b)亮度對時間的分布圖，再將此分布圖擬合出兩個峰，將峰值的差值和標準差代入 Eq. (2-20)求得分離解析度。.....	22
圖 2-22 DNA 經歷勾住圓柱障礙物前、勾住障礙物，和脫勾後的示意圖[20, 21]。.....	23
圖 2-23 DNA 在含單一圓柱障礙物之微流道中電泳，質心在平行電場方向的位置對時間作圖。[20, 22].....	24
圖 2-24 將單一圓柱障礙物周圍區域以四個象限區分出四個區域，DNA 同時跨過四象限之示意圖[27].....	26
圖 2-25 花粉粒子在水中的布朗運動示意圖（出自 <a href="http://221.2.225.114/jpkcweb/huaxue/jxnr_right.asp?counumm=0&amp;metype=3&amp;id=31">http://221.2.225.114/jpkcweb/huaxue/jxnr_right.asp?counumm=0&amp;metype=3&amp;id=31</a> ).....	30

圖 2-26 膠質粒子受到溶劑粒子碰撞造成不規則運動之示意圖。(出自南一書局網站).....	31
圖 2-27 簡略布朗動態演算法流程圖[33].....	33
圖 2-28 以 bead-spring model 描述的高分子，質點數為 13。(取自維基百科).....	34
圖 2-29 單一高導電度障礙物於流道中的電力線分布圖[34].....	35
圖 2-30 在微流道中使用六角陣列的(a)絕緣圓柱障礙物， $\kappa/\kappa_0=0$ (b)圓柱障礙物與流體導電度相同， $\kappa/\kappa_0=1$ (c)圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=100$ 的電力線分布圖。.....	36
圖 2-31 nano-fence 於微流道中的示意圖[35].....	37
圖 2-32 調控電場開關與時間的示意圖。上部分為部分微流道擷取圖，DNA 移動方向為左向右，上方的 DNA 表連續性電場時的流動示意圖，而下方 DNA 表周期性開閉電場下的流動示意圖；下部分的圖為電場隨時間變化的示意圖，電場為周期性開閉循環，電場開啟和電場關閉維持的時間分別為固定值。上圖中上側的 DNA，從一圓柱障礙物脫鉤後即在兩排障礙物形成的流道中流動，難以形成有效碰撞，而下側的 DNA 在電場關閉時能鬆弛成線圈狀(對應下方電場對時間圖的電場關閉階段)，電場再度開啟後便能勾住(對應下方電場對時間圖的電場開啟階段)，而脫鉤後再經歷一段電場關閉的時間，DNA 再次鬆弛，並周期性重複同樣的循環。.....	38
圖 2-33 改良後微流道示意圖 .....	39
圖 3-1 Bead-spring model 中，各力施加於球上之示意圖。.....	42
圖 3-2 當球之運動穿越裝置邊界時，將此球之中心推到距離邊界最近之點上。 .....	44
圖 3-3 模擬流程圖 .....	45
圖 3-4 本模擬所使用微流道之部分擷取示意圖，下方放大處為單一單體的型態，可視為所有流道均為此單體組合而成。.....	46

圖 3-5 使用 COMSOL 規劃有限元素網格之示意圖。.....	48
圖 3-6 有限元素法元素內差數值方法之示意圖。.....	49
圖 3-7 使用虛擬網格法，規劃各元素所在虛擬矩形網格之示意圖。 $e^1$ 、 $e^2$ ... $e^5$ 為 有限元素網格，(1,1)...(5,5)為虛擬矩形網格編號。.....	50
圖 3-8 $\lambda$ -DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法求出鬆弛時間為 4.03。.....	54
圖 3-9 T4-DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法求出鬆弛時間為 46.91。.....	55
圖 3-10 VMD 工作視窗.....	57
圖 4-1 含六角陣列排列的絕緣圓柱障礙物微流道之部分截取圖及其幾何形狀 ....	59
圖 4-2 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之無因次電泳移動率與 Pe 比較圖與(b)修正 參數後之無因次電泳移動率與 Pe 比較圖.....	60
圖 4-3 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之無因次離散係數與 Pe 比較圖與(b)修正 參數後之無因次離散係數與 Pe 比較圖.....	62
圖 4-4 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之分離解析度與 Pe 比較圖與(b)修正參數後 之分離解析度與 Pe 比較圖.....	64
圖 4-5 DNA 在兩排障礙物的小通道內因電力線變形而無法在高電場下離開小通 道而形成碰撞的原因。黑色箭頭方向為 DNA 流近圓柱障礙物時所受的 電場方向，DNA 電泳方向由右向左。.....	65
圖 4-6 在微流道中使用六角陣列的(a)絕緣圓柱障礙物， $\kappa/\kappa_0=0$ (b)圓柱障礙物與 流體導電度相同， $\kappa/\kappa_0=1$ (c)圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=100$ (d) 圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=1000$ 的電力線分布圖。.....	68
圖 4-7 $\kappa/\kappa_0$ 和 Pe 對於 $\lambda$ -DNA 的電泳移動率的關係圖.....	68
圖 4-8 $\kappa/\kappa_0$ 和 Pe 對於 $\lambda$ -DNA 的電泳移動率的關係圖.....	69
圖 4-9 在不同電場下，於障礙物導電度與流體導電度的比值(a) $\kappa/\kappa_0=0$ (b) $\kappa/\kappa_0=1$ (c) $\kappa/\kappa_0=100$ 與電場移動率的關係。.....	71
圖 4-10 在 $\kappa/\kappa_0=100$ ， $Pe=0.8$ 下，DNA 碰撞至高導電度之障礙物時的碰撞情形及	



部分截圖，左為 $\lambda$ -DNA，右為 T4-DNA，由上至下逐步紀錄行為，DNA 流動方向由右至左。.....	72
圖 4-11 在 $\kappa/\kappa_0=100$ ， $Pe=5$ 下，DNA 碰撞至高導電度之障礙物時的碰撞情形及部分截圖，左為 $\lambda$ -DNA，右為 T4-DNA，由上至下逐步紀錄行為，DNA 流動方向由右至左。.....	73
圖 4-12 在不同電場下，於障礙物導電度與流體導電度的比值(a) $\kappa/\kappa_0=0$ (b) $\kappa/\kappa_0=1$ (c) $\kappa/\kappa_0=100$ 與無因次離散係數的關係。.....	75
圖 4-13 T4-DNA 行為的逐時部分截圖，由上至下為隨時間先後排列，DNA 流動方向由右至左，其中 $\kappa/\kappa_0=1$ ， $Pe=5$ 。.....	76
圖 4-14 不同障礙物導電度，分離解析度與電場強度的關係圖，電泳距離為 15mm .....	77
圖 4-15 間歇式電場下，電場與時間變化關係之簡圖。在 $t_{on}$ 區間中電場均為恆定之固定值；而 $t_{off}$ 區間中電場為 0。.....	78
圖 4-16 T4-DNA 在六角圓柱陣列以間歇式電場驅動下，固定 $t_{on}=0.5$ 和 $Pe=6$ ，(a) $t_{off}=46.29$ 和(b) $t_{off}=185.16$ 的行為比較，上側兩圖為電場關閉瞬間 DNA 的型態，預設為相同的型態，經過不同的 $t_{off}$ 後鬆弛成如兩圖中間的型態，電場再度開啟後 DNA 如下側圖的型態。DNA 電泳方向為左到右。.....	80
圖 4-17 $\lambda$ -DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法於含六角圓柱障礙物陣列之微流道中求出鬆弛時間。.....	81
圖 4-18 T4-DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法於含六角圓柱障礙物陣列之微流道中求出鬆弛時間。.....	82
圖 4-19 $Pe=6$ ， $t_{on}=25.92$ ， $t_{off}=46.29$ ， $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 電泳 1mm 所需時間分布圖.....	83
圖 4-20 $Pe=6$ ， $t_{on}=25.92$ ， $t_{off}=185.16$ ， $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 電泳 1mm 所需時間分布	

圖 .....	84
圖 4-21 T4-DNA 在六角圓柱陣列以間歇式電場驅動下，固定 $t_{\text{off}}=185.16$ 和 $Pe=6$ ， (a) $t_{\text{on}}=25.92$ 和 (b) $t_{\text{on}}=12.96$ 的行為比較，上側兩圖為電場開啟瞬間 DNA 的型態，預設為相同的型態，接著經過不同的 $t_{\text{on}}$ 的流動後形成如兩圖 中間的型態，而電場再度關閉後 DNA 如下側兩圖的型態。DNA 電泳方 向為左到右。 .....	85
圖 4-22 $Pe=6$ 下某一 DNA 的質心 $x$ 坐標對時間的關係圖 .....	87
接著用 50 個 $\lambda$ -DNA 和 50 個 T4-DNA 分別以圖 4-23 的質心法求得勾住時間， 與 DNA 數目的分布圖如圖 4-24。 .....	87
圖 4-24 以質心法求得之勾住時間與其對應的 DNA 數目之關係圖 .....	88
圖 4-25 $Pe=6$ , $t_{\text{off}}=185.16$ 下， $t_{\text{on}}=2.59, 6.48, 8.40, 12.96, 25.92$ 對於兩 DNA 分離解 析度的影響，模擬之電泳長度分別為 1mm, 2.5mm, 3.24mm, 5mm 和 10mm。圖中左右兩條垂直線分別代表 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 用質心法求 得之脫附時間。 .....	90
圖 4-26 DNA 於圓柱陣列微流道中以間歇式電場的分離之實驗數據，電場為 50V/cm， $t_{\text{off}}=6s$ ，測量 $t_{\text{on}}=0.2s, 0.35s, 0.5s, 0.75s, 1s$ ，分別以 2mm, 3.5mm, 5mm, 7.5mm, 10mm 的通道長度進行實驗，黑色實線對應左側的 $y$ 軸為 解析度，白色虛線對應右側的電泳時間，圖中左右兩條垂直線分別代表 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 實驗上之脫附時間。[44] .....	91
圖 4-27 $Pe=6$ , $t_{\text{off}}=185.16$ 下， $t_{\text{on}}=2.59, 6.48, 8.40, 12.96, 25.92$ 對於兩 DNA 分離解 析度的影響，模擬之電泳長度為相同的 15mm。圖中左右兩條垂直線分 別代表 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 用質心法求得之脫附時間。 .....	92
圖 4-28 DNA 於圓柱陣列微流道中以間歇式電場的分離之實驗數據，電場為 50V/cm， $t_{\text{off}}=6s$ ，測量 $t_{\text{on}}=0.2s, 0.35s, 0.5s, 0.75s, 1s$ ，以相同之 5mm 的 通道長度進行實驗，黑色實線對應左側的 $y$ 軸為解析度，白色虛線對應	

右側的電泳時間，圖中左右兩條垂直線分別代表  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 實驗上之脫附時間。[44]..... 93

圖 4-29 DNA 於相同電場  $Pe=6$ ，在不同  $t_{on}$  和  $t_{off}$  下的分離解析度，以對數座標表示。每點所在位置的  $x$  座標表示  $t_{on}$  之值、 $y$  座標為  $t_{off}$  之值，而每點下方的參數隊表示對應的  $(t_{on}, t_{off})$ ，每點上方的  $R_s$  表示在該對應的  $t_{on}, t_{off}$  參數對下模擬的解析度，分別以(A)質心-時間關係圖求得之脫附時間與(B)以四象限法求得之脫附時間作為  $t_{on}$  的範圍標準。其中  $t_{trap,i}$  為 DNA 分子  $i$  的勾住時間， $\sigma_{H,i}$  該 DNA 勾住時間分布的一個標準差。..... 95

圖 4-30 數種改良後之障礙物排列。分別為(a)原六角陣列排列將每四排障礙物除去兩排使之成為空隙。(b)原六角陣列排列將每八排障礙物除去六排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十二排障礙物除去十排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十六排障礙物除去十四排使之成為空隙。..... 99

圖 4-31 相同的  $t_{on}=25.92$  在  $Pe=6$  下於 15mm 的微流道中電泳， $t_{off}=185.16, 46.29, 2.592$  和連續電場的分離解析度對不同長度之空隙的關係圖..... 100

圖 4-32 電場關閉時(a)DNA 停留於空白處(b)DNA 停留於障礙物中..... 101

圖 4-33 圖中的空隙為 10 排障礙物。DNA 離開前一段障礙物後，經過一段沒有障礙物填充的空隙時，因布朗力造成垂直電場方向的擴散與位移，使得 DNA 在進入下一段障礙物時能造成有效的碰撞。從  $t=0$  到  $t=9.33$  之間可以看出 T4-DNA 因布朗力造成向下移動約半個圓心距且 DNA 型態改變，使得碰到下一排障礙物時 DNA 勾住障礙物。..... 102

圖 4-34 比較 DNA 在連續電場(正方形)下，間歇性電場(圓形)下，以及含有空隙的通道中(三角形)的分離解析度比較，DNA 皆在相同的 15mm 通道長度中電泳，其中間歇性電場及含有空隙通道的 DNA 皆在  $Pe=6$  的高電場下進行電泳，而連續性電場的電場由左至右分別為  $Pe=6, 4, 3, 2.5$ ,

1.81, 1.2, 0.8。 ..... 104

圖 4-35 比較 DNA 在連續電場(正方形)下，間歇性電場(圓形)下，以及含有空隙的通道中(三角形)的分離解析度比較，DNA 皆在相同的電泳時間  $t=5183$ (選定在這樣的時間下，最長的模擬電泳長度為 15mm)，其中間歇性電場及含有空隙通道的 DNA 皆在  $Pe=6$  的高電場下進行電泳，而連續性電場的電場由左至右分別為  $Pe=0.8, 1.2, 1.81, 2.5, 3, 4, 6$ 。 ..... 105

## 表目錄



表 3-1 模擬 DNA 從平衡態達穩態所用之時間步階.....	51
表 3-2 T4-DNA 使用不同球數之 Bead-spring model 模擬時,其有效堅韌長度變化。.....	53
表 3-3 本研究使用之參數,及在此參數下模擬出的纏繞半徑與無因次鬆弛時間。.....	53
表 3-4 不同 DNA 之無因次鬆弛時間與文獻對照表。.....	53
表 3-5 $Pe=6$ , $t_{on}=0.25s$ , $t_{off}=0.893s$ , 實際模擬 5mm 的解析度與模擬 1mm 擬合 5mm 解析度之比較.....	55
表 4-1 $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 在自由溶液與障礙物陣列中的鬆弛時間.....	82
表 4-2 以質心-時間關係圖和四象限法對 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 做勾住時間的分析.....	88
表 4-3 連續電場和間歇性電場在 $Pe=6$ , 15mm 下分離解析度的比較.....	96

# 第1章 緒論



## 1.1 前言

近年來科技的蓬勃發展，人類對於疾病的了解也日益增加，各種醫療上的治療與篩檢技術日新月異，然而許多疾病被研究出是由於基因的缺陷或突變導致，醫療上所重視的也逐漸從治療導向轉至事前的預防導向。

診斷基因缺陷造成的疾病，需要準確的基因定序，加上近年人類基因體計畫 (Human Genome Project) 成功解碼人類核酸序列，人類對於基因組的知識也有顯著的成長，但在精準判斷基因序列之前，必須先有良好的 DNA 純化分離技術，才能達到高解析度的基因定序。而對於高傳染性 or 高抗藥性的病原菌感染病，急需快速且準確的基因診斷。

## 1.2 研究動機與目的

傳統所使用的 DNA 純化為直流凝膠電泳，然而對於較大的 DNA 片段來說是無法分離的，而現在市面上多使用脈衝電場凝膠電泳，利用不同方向電場的變換增加 DNA 分離效率，並能應用於較長的 DNA 片段，然而凝膠的高結構強度會嚴重的減緩 DNA 的電泳速度，使得在 DNA 純化分離這一步就能花上一天至數天的時間才能達到效果，對於高致病性的疾病來說是相當沒有效率且具危險性的。

因此我們的目的是以微流道電泳取代凝膠，利用微流道中的圓柱障礙物迫使 DNA 進行碰撞，來達到分離的效果，這樣的設計能大幅的降低 DNA 分離所需的時間，提升其在醫療篩檢上的效率。在此研究中我們也進行了數次通道上的改良，欲使 DNA 增加碰撞機率、改變碰撞前的型態，最終目的是希望能利用越短的電泳時間及越短的通道就能讓 DNA 在流道中達到最有效率的碰撞與脫鈎，進而提

升 DNA 的分離解析度。



## 第2章 文獻回顧



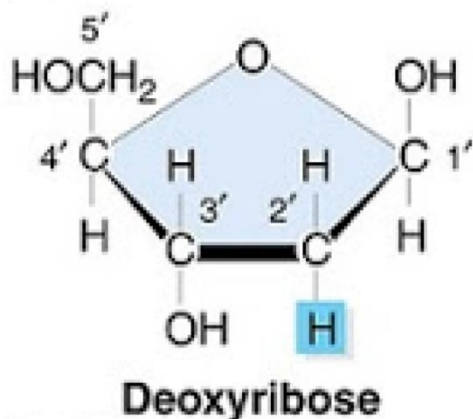
### 2.1 DNA 的物理性質

#### 2.1.1 去氧核糖核苷酸(DNA)

DNA 是由二條去氧核糖核苷酸分子構成之雙股螺旋分子。去氧核糖核苷酸由去氧核糖、含氮鹼基與磷酸根基團三個部分所組成。去氧核糖是環狀的五碳糖且 2' 碳原子上之 -OH 替換成 -H 所形成 (圖 2-1(A))，然後在去氧核糖上之 5' 碳原子接上磷酸根、1' 碳原子接上不同之含氮鹼基，如：腺嘌呤 (Adenine, A)、鳥糞嘌呤 (Guanine, G)、胞嘧啶 (Cytosine, C)、胸腺嘧啶 (Thymine, T)。一條去氧核糖核苷酸高分子是一連串相鄰去氧核糖分子上之 3'-OH 與磷酸根上的 -OH 互相脫水聚合而成 (圖 2-1 (B))。由於主鏈每個去氧核糖上都能分別接上四種鹼基其中之一，並且構成一連串的序列，舉例來說如：5' -ATTGCAT-3'，這也就是所謂的基因序列。DNA 中之二條去氧核糖核苷酸主鏈中，同樣相對位置上之鹽基會互相搭配，如 A 對 T 與 C 對 G 形成氫鍵互相鍵結而形成雙股螺旋結構，使得上例的另一股序列為 3' -TTACGTA-5' 這些基因序是用來攜帶每個人的遺傳訊息，所以不同人身上之基因序列都略有不同。



(a)



(b)

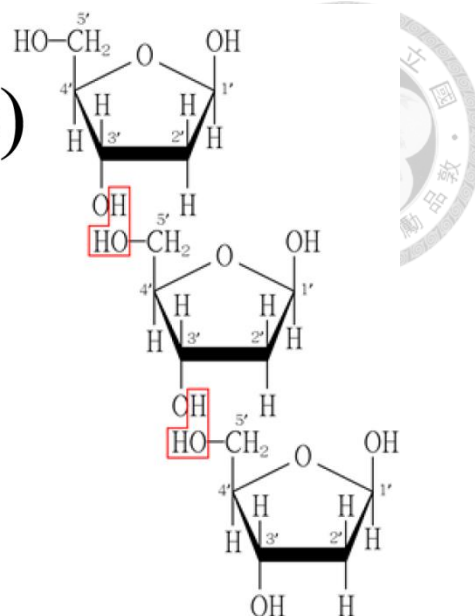


圖 2-1(A)去氧核糖分子結構圖。(B)相鄰之核糖分子互相脫水聚合成 DNA 主鏈。

(取自科技部網站)

### 2.1.2 堅韌長度 (Persistence length)

堅韌長度是用來定義高分子的硬度，為使高分子鏈彎曲至一特定角度所需的長度，因此堅韌長度愈長代表高分子硬度愈大、愈不容易彎折。嚴格的定義為在不改變方向之下，沿著高分子鏈所能達到最遠的長度。一般而言，當高分子片段比堅韌長度短時，其表現如同堅硬的棒子，反之則如柔軟的細繩。在高離子強度下，DNA 的堅韌長度約為 50nm[1]；當電解質溶液離子強度下降時，屏蔽效果降低，因為 DNA 主鏈帶負電而造成彼此間的排斥力增加，使得 DNA 變硬，堅韌長度會增加。

### 2.1.3 輪廓長度 (Contour length)

由於 DNA 分子在一般平衡狀態下為一纏繞球團，如果將 DNA 經由施加外力而使其由纏繞狀態伸展成直線狀態，則其直線狀態之全長即為此 DNA 之輪廓

長度，也是此 DNA 分子之最大拉伸長度。輪廓長度較嚴格的定義為在不改變 DNA 內部結構及鍵結的前提下，其物理拉伸所能達到的最大長度。



## 2.1.4 鬆弛時間 (Relaxation time)

鬆弛時間主要是代表一個物質由非平衡狀態回復至平衡狀態之特性時間，但其值只是一特徵值，並非指經過一個鬆弛時間後，非平衡狀態下之物質即能恢復成平衡狀態。一般而言必須約經過數個甚至二十倍之鬆弛時間之後，才有可能使物質恢復成平衡狀態。在 DNA 的實驗中，對於 DNA 鬆弛時間之測量是先施加外力使 DNA 沿 x 軸伸長至輪廓長度之百分之七十，再阻斷此外力，此 DNA 分子將會逐漸恢復成原本平衡狀態，當其 x 方向投影長度恢復至輪廓長度之百分之三十時開始測量 DNA 在 x 方向的投影長度與時間之關係，再由 Eq.(2-1)來擬合 x 方向的投影長度與時間之關係(x 方向投影長度定義見圖 2-2)[2-4]

$$\langle X_{ex}^2(t) \rangle = Ae^{-\frac{t}{\tau}} + \langle X_{ex}^2 \rangle_0 \quad (2-1)$$

欲測量某一類型 DNA 的鬆弛時間，約同時測量 100 個 DNA 在溶液中的鬆弛行為，紀錄每個時間點下各 DNA 的 x 方向投影量，其中 $\langle \cdot \rangle$ 代表資料取平均運算，t 為經過的時間， $\langle X_{ex}^2(t) \rangle$ 為在時間等於 t 時之 x 方向投影長度平方之所有 DNA 的平均值， $\langle X_{ex}^2 \rangle_0$ 為 DNA 在平衡狀態下，x 方向投影長度平方之所有 DNA 的平均值， $\tau$ 即為此 DNA 之鬆弛時間，當鬆弛時間越大，則 DNA 變形後需要較長之時間才能夠恢復成平衡狀態，也就是 DNA 越不容易恢復原狀。

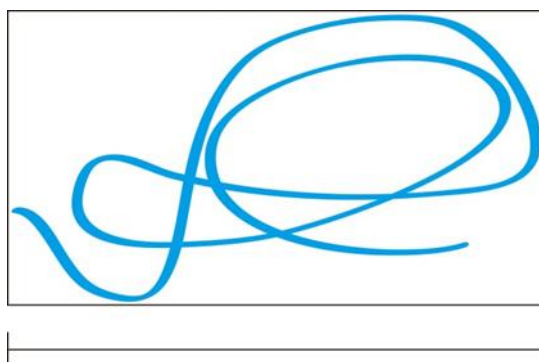


圖 2-2 測量鬆弛時間中，x 方向投影長度之定義。[5]



## 2.2 線性高分子模型

線性高分子模型可分為非連續空間模型與連續空間模型，而我們的研究中較有關聯的是連續空間模型。相對於非連續空間模型，在連續空間模型下之高分子可以在此空間中任意移動，並沒有特殊位置之限制。此模擬方法是比較貼近現實世界。然而因為此模擬方法需要更大之運算量，所以為了簡化模擬之步驟，目前已經發展幾種線性高分子模型來描述高分子之行為：bead-stick model、bead-spring model、pear-necklace model（圖 2-3）。

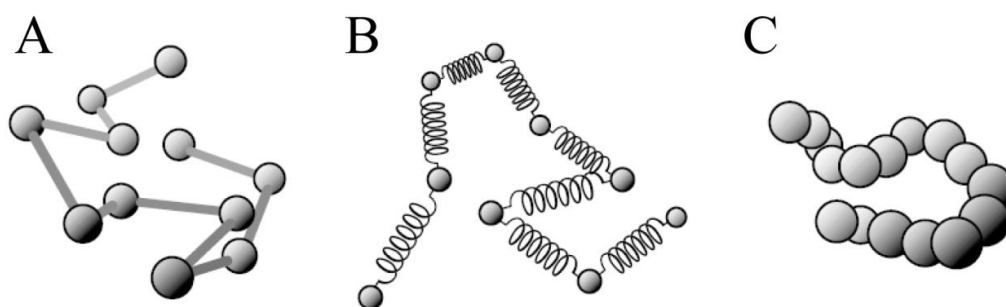


圖 2-3 (A) 為 Bead-stick model 球與球之以硬棍連接。(B) 為 Bead-spring model 球與球之間以彈簧連接。(C) 為 Pearl-necklace model 珠子與珠子緊密連接在一起，就像珍珠項鍊一般。[4]

Bead-stick model 是將高分子模擬成數個小球且鄰近球之間用一根硬棍連接。此種模擬方式有以下之特性：這些這些小球本身佔有體積可忽略，但為外力施加點（如黏滯力、布朗力等等），棍長則為固定值；在模擬時，可以限制相鄰棍子之間之夾角或是讓其可以任意擺動；也可決定是否限制三根相鄰棍子之間之平面角（圖 2-4）。

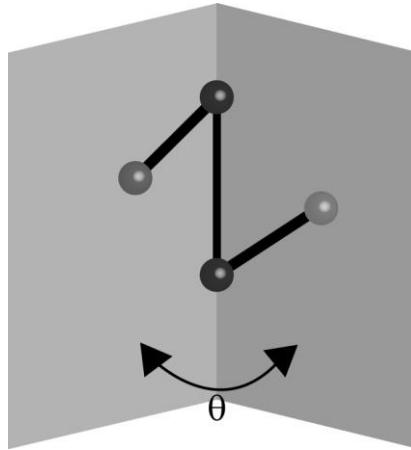


圖 2-4 三個棍子間之平面角示意圖。[6]

Bead-spring model [7]一樣也是將高分子模擬成數個小球，但在球與球之間是用彈簧連接而成。而彈簧之平衡長度設定為零並且不佔有體積，用來表達高分子在受外力時之伸縮情形與內部之張力。如此一來可以很輕易的模擬高分子上不同部分之行為，視模擬精準度之需要可以調整小球之個數，本研究之模擬方法是將用此模型，而使用此模型最重要的是如何設定彈簧之彈力與其伸長量之關係，並使其之行為能夠吻合真實世界之高分子行為。

Pearl-necklace model 相對於前兩種模型有比較大之差異，此模型是將高分子分子用很多固定體積之珠子取代高分子鏈，珠子與珠子之間並沒有間隔是緊密連結在一起，但是相鄰珠子間可以相對滑動。

在此模擬，我們使用的模型是 bead-spring model，以 37 個小球來模擬  $\lambda$ -DNA，以 126 個小球來模擬 T4-DNA。

## 2.3 高分子鏈

對一根真實的高分子而言，其中之單體不能重複出現在同一個位置，甚至連一點之體積交疊也不可能，這種效應稱為體積排斥（Excluded volume），這種效應對於大體積之高分子聚合物非常重要。然而為了簡化問題，我們時常讓高分子

鏈理想化，也就是允許體積交疊之發生（圖 2-5）。由於使用理想鏈能夠簡化問題，有助於數學模型之推導。

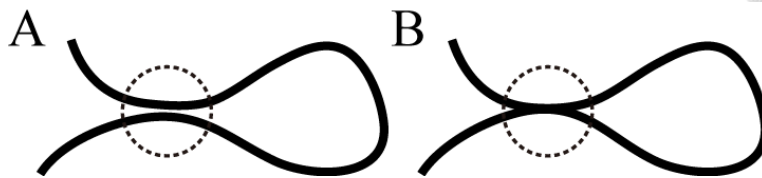


圖 2-5 (A) 為真實鏈，因體積排斥之關係而無體積交疊之現象。(B) 為理想鏈，因無體積排斥之關係而產生體積交疊之情形。[6]

### 2.3.1 理想鏈

假定一個質點由 $\mathbf{r}_0$ 位置開始，以一特定距離隨機走動，並記錄其每一步階的位置（圖 2-6），其中 $\mathbf{r}_i$ 為不同時間下之位置，總共走 $N$ 步走到 $\mathbf{r}_N$ ， $\Delta\mathbf{r}_i = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i-1}$ 為每一步所走之位移且 $|\Delta\mathbf{r}_i| = b$ ，由於是隨機漫步的關係，當 $i \neq j$ 時， $\Delta\mathbf{r}_i$ 與 $\Delta\mathbf{r}_j$ 為各自獨立，且 $\langle\Delta\mathbf{r}\rangle = 0$ ，將第 $0$ 步到第 $N$ 步的質點位置連起來形成一軌跡，可用來表示成一根高分子鏈之形態。因此如果此高分子之輪廓長度為 $Nb$ ，此高分子平衡態之首尾長度(end-to-end distance)之平方平均值 $\langle R_F^2 \rangle_0$ 可以表示為：

$$\langle R_F^2 \rangle_0 = \langle (\mathbf{r}_N - \mathbf{r}_0)^2 \rangle = \langle \mathbf{r}^2 \rangle = Nb^2 \quad (2-2)$$

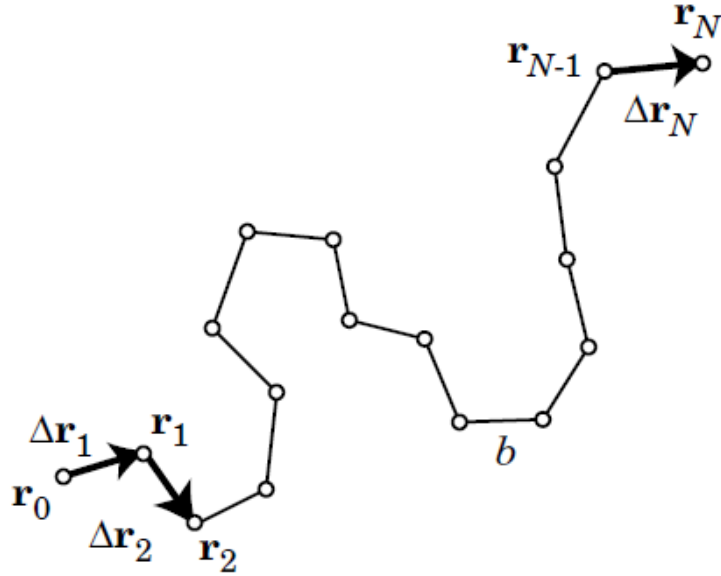


圖 2-6 在隨機漫步下，走  $N$  步之運動軌跡，此運動軌跡可表示成一根高分子鏈之形態。[4]。

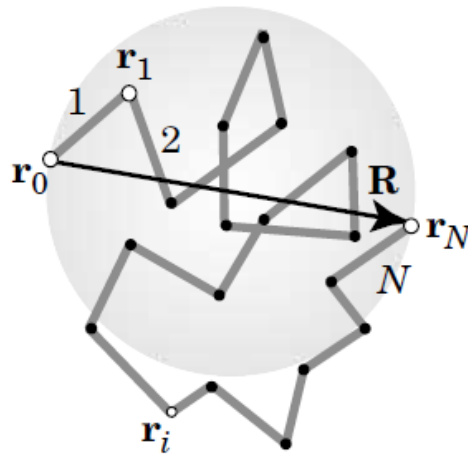


圖 2-7 理想高分子鏈之首尾長度為最前端與最尾端之距離。[4]。

再計算此高分子平衡態之纏繞半徑之平方平均值  $\langle R_g^2 \rangle_0$ ，定義為每個小球到 DNA 質心的距離之平方總和的平均除以小球數：

$$\langle R_g^2 \rangle_0 = \frac{1}{(N+1)} \sum_{i=0}^N \langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_g)^2 \rangle \quad (2-3)$$

其中  $\mathbf{r}_g$  為質心位置：

$$\mathbf{r}_g = \frac{1}{(N+1)} \sum_{i=0}^N \mathbf{r}_i \quad (2-4)$$

另外， $\langle R_g^2 \rangle_0$  可以改寫成：

$$\langle R_g^2 \rangle_0 = \frac{1}{2(N+1)^2} \sum_{i,j=0}^N \langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2 \rangle \quad (2-5)$$

因為是理想鏈，所以任兩點 $\mathbf{r}_i$ 與 $\mathbf{r}_j$ 中間也是隨機漫步：

$$\langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2 \rangle = b^2 |i - j| \quad (2-6)$$

將 Eq. (2-6) 代入 Eq.(2-5) 展開整理可以得到：

$$\langle R_g^2 \rangle_0 = b^2 \frac{N(N+2)}{6(N+1)} \quad (2-7)$$

當  $N$  很大時，可以對 Eq. (2-7) 簡化得到  $\langle R_g^2 \rangle_0 = b^2 N/6$ 。因此對於理想鏈之高分子模型可以得一個重要的關係式  $\langle R_F^2 \rangle_0 = 6 \langle R_g^2 \rangle_0$ 。

## 2.3.2 真實鏈

### 2.3.2.1 體積排斥 (Excluded volume)

由於在真實情況下，高分子片段之間存在體積排斥效應，即是每個高分子片段之間不可以有體積重疊之情況發生，此效應會讓理想鏈轉變成非理想鏈，因此用一個簡單模型來假設此種情況。將高分子片段看成球狀，並且佔有體積，由於體積排斥之關係，每二個球之連心線長不可小於二倍之球半徑（大約為  $b$ ），因此會產生  $v_e \cong b^3$  之排斥體積（圖 2-8）。

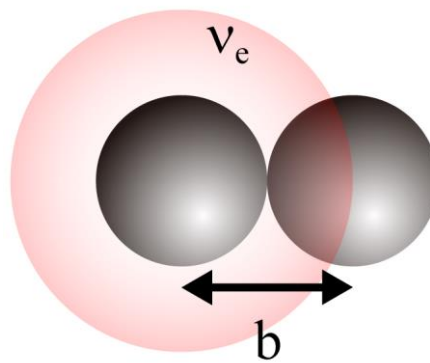


圖 2-8 體積排斥示意圖， $b$  為球直徑， $v_e$  為排斥體積大小約為  $b^3$ 。[5]

真實鏈相對於理想鏈而言，真實鏈之體積排斥很明顯會使平衡狀態下之高分子之質心半徑或是首尾長度增大，以理想鏈而言  $R_F \propto bN^{1/2}$ ，而真實鏈假設  $R_F \propto bN^\gamma$ ，其中  $\gamma$  應該比 0.5 要稍大，實際上為 0.59[8]。

$R_F$  與  $R_g$  之關係相較於理想鏈也會有稍微不同，根據 Cloizeaux 和 Jannink[9] 所推導出之結果，在真實鏈情況下其關係為：

$$\frac{6\langle R_g^2 \rangle_0}{\langle R_F^2 \rangle_0} = 0.952 \quad (2-8)$$

### 2.3.2.2 Short-range interaction 與 Long-range interaction

在分子模擬中常使用小球來替代一小片段高分子骨架之技巧，藉此簡化模擬所需要之運算，而小球與小球之間沿著高分子骨架之遠近會有不同之交互作用，如果為沿著骨架相鄰片段之交互作用則稱為 Short-range interaction，反之沿著骨架非相鄰之兩個片段之交互作用則稱為 Long-range interaction（圖 2-9），此兩種交互作用對於整根高分子之物理性質會產生不同之效應。

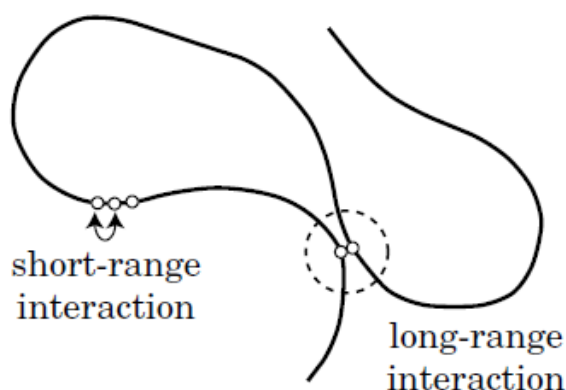


圖 2-9 圖中沿著骨架相鄰片段之交互作用則稱為 Short-range interaction，沿著骨架非相鄰之兩個片段之交互作用則稱為 Long-range interaction。[4]





以 Short-range interaction 而言，考慮的是沿著骨架上之相鄰小球之交互作用，例如：三個相鄰小球之間之夾角  $\theta_b$ （圖 2-10），使用 bead-stick model，且第  $i$  根硬棍之向量為  $\Delta \mathbf{r}_i$ ，首先計算  $\langle \Delta \mathbf{r}_i \cdot \Delta \mathbf{r}_{i+1} \rangle = b^2 \cos \theta_b$ ，接著計算  $\langle \Delta \mathbf{r}_{i-1} \cdot \Delta \mathbf{r}_{i+1} \rangle$ ，由於  $\Delta \mathbf{r}_{i+1}$  於  $\Delta \mathbf{r}_i$  上之投影向量為  $\cos \theta_b \Delta \mathbf{r}_i$ ，因此：

$$\langle \Delta \mathbf{r}_{i-1} \cdot \Delta \mathbf{r}_{i+1} \rangle = \langle \Delta \mathbf{r}_{i-1} \cdot (\cos \theta_b \Delta \mathbf{r}_i) \rangle = b^2 \cos^2 \theta_b \quad (2-9)$$

可推得：

$$\langle \Delta \mathbf{r}_i \cdot \Delta \mathbf{r}_j \rangle = b^2 \cos^{|i-j|} \theta_b \quad (2-10)$$

其首尾長度之關係可推得[4]：

$$\langle R_F^2 \rangle_0 = b^2 N \frac{1 + \cos \theta_b}{1 - \cos \theta_b} \quad (2-11)$$

因此 Short-range interaction 雖然會令平衡狀態下高分子之尺寸略有改變，但其首尾長度與球數之關係為  $\langle R_F^2 \rangle_0 \propto b^2 N$ ，且與質心半徑之關係為  $\langle R_F^2 \rangle_0 = 6 \langle R_g^2 \rangle_0$ ，基本上與理想鏈之物理特性相同。然而，最常見的 Long-range interaction 就是體積排斥效應，由前述之推導可以發現，其首尾長度與球數之關係為  $R_F \propto b N^{3/5}$ ，且首尾長度質心半徑之關係也與理想鏈不同 Eq. (2-8)，因此 Long-range interaction 會令高分子鏈之行為不再保持理想性，而 Short-range interaction 只會影響局部行為而不會影響整體高分子鏈之理想性。

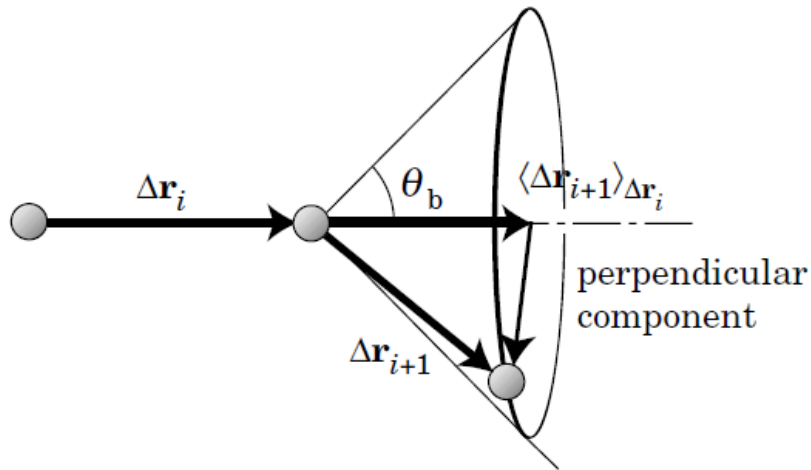


圖 2-10 使用 bead-stick model，計算 Short-range interaction 之相鄰兩小球之交互

關係， $\theta_b$  相鄰三小球之夾角，第  $i$  根硬棍之向量為  $\Delta \mathbf{r}_i$ 。[4]



## 2.4 Bead-spring model

由前述，bead-spring model 主要為將高分子鏈以球與彈簧之串連來代替之，首先使用 dumbbell model (圖 2-11) 進行最簡化之推導，dumbbell model 主要是將高分子鏈描述成只有一根彈簧且首尾各自連接球之簡單模式，則此高分子鏈於溶液中之其力平衡方程式為：

$$\zeta \frac{d\mathbf{R}_F(t)}{dt} = -k_{sp}\mathbf{R}_F(t) + \mathbf{F}^B(t) \quad (2-12)$$

其中  $\mathbf{F}^B$  為溶液中水分子造成之布朗力， $\zeta$  為黏滯系數(drag coefficient)，且此高分子鏈之 conformation relaxation time  $\tau_1 = \zeta/k_{sp}$ ，因此：

$$\frac{d\mathbf{R}_F(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_1}\mathbf{R}_F(t) + \frac{1}{\zeta}\mathbf{F}^B(t) \quad (2-13)$$

此力平衡方程式為一階常微分方程式，對其求出積分因子：

$$I = \exp\left(\int \frac{1}{\tau_1} dt\right) = \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) \quad (2-14)$$

因此 Eq.(2-22) 之解為：

$$\mathbf{R}_F(t)\exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) = \frac{1}{\zeta} \int \mathbf{F}^B(t)\exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right)dt + \mathbf{C} \quad (2-15)$$

其中  $\mathbf{C}$  為常數向量，則  $\langle R_F^2 \rangle$  為：

$$\begin{aligned} \langle R_F^2(t) \rangle &= \langle \mathbf{R}_F(t) \cdot \mathbf{R}_F(t) \rangle = \frac{1}{\zeta^2} \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) \int \langle \mathbf{F}^B(t) \cdot \mathbf{F}^B(t) \rangle \exp\left(\frac{2t}{\tau_1}\right) dt \\ &\quad + 2 \frac{1}{\zeta} \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) \int \langle \mathbf{C} \cdot \mathbf{F}^B(t) \rangle \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) dt + C^2 \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) \end{aligned} \quad (2-16)$$

又  $\mathbf{F}^B(t)$  為布朗力，因此  $\langle \mathbf{F}^B(t) \rangle = 0$ 、 $\langle \mathbf{F}^B(t) \cdot \mathbf{F}^B(t) \rangle = \frac{6k_B T \zeta}{dt}$  則：

$$\langle R_F^2(t) \rangle = C^2 \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) + \frac{3k_B T \tau_1}{\zeta} \quad (2-17)$$

而  $\tau_1 = \zeta/k_{sp}$ ，則：

$$\langle R_F^2(t) \rangle = C^2 \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) + \frac{3k_B T}{k_{sp}} \quad (2-18)$$

$$\langle R_F^2(t) \rangle = C^2 \exp\left(-\frac{2t}{\tau_1}\right) + \langle R_F^2 \rangle_0 \quad (2-19)$$

其中  $\langle R_F^2 \rangle_0$  為平衡狀態下首尾長度平方平均值。由 Eq. (2-26) 對照 Eq. (1-1) 可得知 conformation relaxation time ( $\tau_1$ ) 為 stress relaxation time ( $\tau$ ) 的兩倍。

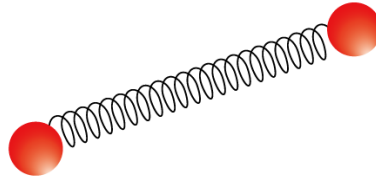


圖 2-11 dumbbell model 之簡單示意圖，將高分子鏈簡化為只有一根彈簧且連接兩顆球。[6]

## 2.5 電泳分離 DNA 之文獻回顧

### 2.5.1 傳統凝膠法

早期利用電泳分離 DNA 大多是以洋菜凝膠(agarose gel)作為介質，稱為凝膠電泳(gel electrophoresis)。在電場驅動力下帶負電的 DNA 會向電位差較低的一方移動，又凝膠為一多孔性的交聯聚合物，分子量較小的 DNA 在凝膠中可移動較快，進而達到分離的效果。

在 J. L. Viovy 等人的研究中[10]，以直流電作凝膠電泳的 DNA 分離，以實驗探討改變 DNA 分子量、電場值、凝膠濃度對電泳移動率(electrophoretic mobility)的影響，但直流電泳只能在 20 kbp 以下的高分子才能有好的分離效果，為了提升此設備可分離的高分子分子量，有些研究相繼以脈衝電場(pulsed field)作為凝膠電泳的電場驅動力，如在 D. C. Schwartz 和 C. R. Cantor 的研究中[11]，使用兩

種方向互相垂直的脈衝電場作凝膠電泳，C. R. Cantor 等人的研究[12]和 R. Anand 的研究中[13]也同時使用脈衝電場，藉由改變不同種電場在凝膠中的交互方向來測試對於分離效果的方法，脈衝電場電泳可用於 2 Mbp 的高分子分離。

但以凝膠電泳作為高分子分離的方法最大的困境就是花費的時間太過冗長，作為醫療檢驗上是非常沒有效率的，因此往後的研究開始以一般 TBE 溶液，在微流道中設計圓柱型障礙物(post)的排列，利用高分子與障礙物的碰撞而流動受阻，進而達到分離的效果，減少了 DNA 在微流道中的流動時間而增加了電泳分離效率。

## 2.5.2 利用圓柱障礙物分離 DNA

在 Doyle 和 Viovy 等人的研究中[14]，利用磁性的原理，使得磁性粒子在磁場下自組裝形成圓柱障礙物陣列於流道中，並且可藉由改變粒子濃度來調整圓柱的特徵尺寸。

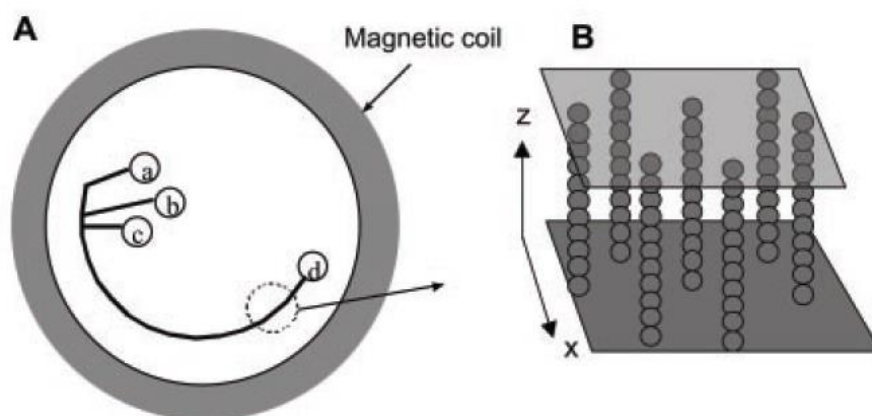


圖 2-12 (A)磁珠圓柱陣列的圓弧形通道。(B)在均勻磁場下，磁珠自組裝排列成障礙物陣列[14]

N. Kaji 等人在 2004 年[15]利用電子束蝕刻來得到含有 nano-pillar array 的微流道，可在短時間內有效分離 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA。

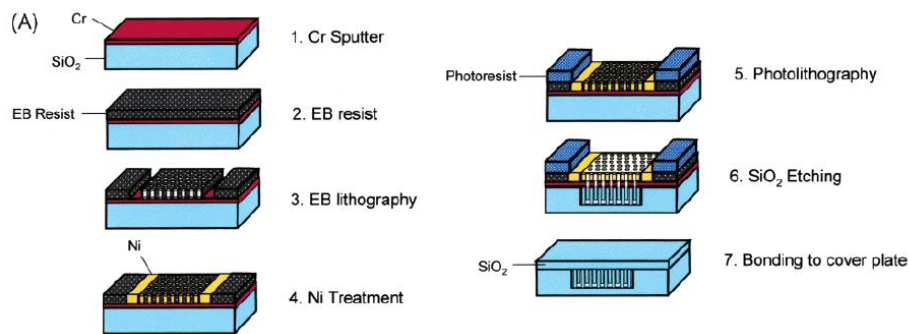


圖 2-13 N. Kaji 等人以電子束蝕刻製作 nano-pillar array 示意圖[15]

在 K. D. Dorfman 等人的研究[16]，將直徑  $1\mu\text{m}$  的絕緣圓柱障礙物以  $3\mu\text{m}$  為相鄰兩障礙物的圓心距，以六角陣列排列。因障礙物為絕緣，四周溶液的導電度較大，因此電力線在微流道中會避開障礙物，形成環繞障礙物的形狀，造成了不同的電場梯度，部分通道截圖與微流道中電力線圖如圖 2-14。

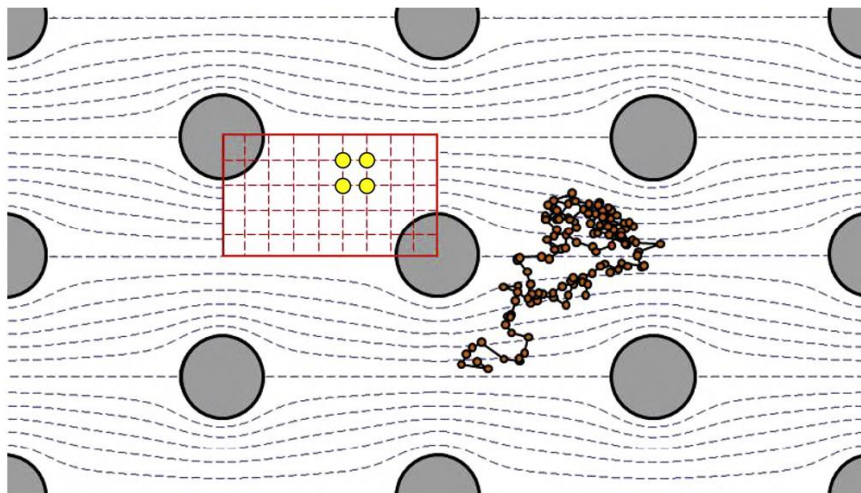


圖 2-14 部分含以六角陣列排列的圓柱障礙物的電泳微流道及電力線圖[16]

在此使用的 DNA 樣品是 48.5 kbp 的  $\lambda$ -DNA 和 169 kbp 的 T4-DNA，模擬的通道長度為 1mm，測試在通道兩端數種不同的電位差下的分離效果。首先紀錄

各特定電位差下 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 各 100 個，通過 1mm 通道所需的時間，以計算電泳移動率(Electrophoretic Mobility)，也就是電泳中高分子平均速度的表示法，並除以 DNA 在自由溶液中流動不受阻的電泳移動率 $\mu_0$ 達到無因次化，對無因次化的電場 Pe 作圖，如圖 2-15。(對於電泳移動率與 Pe 將分別於節 2.5.4 和節 3.1 作詳細介紹)

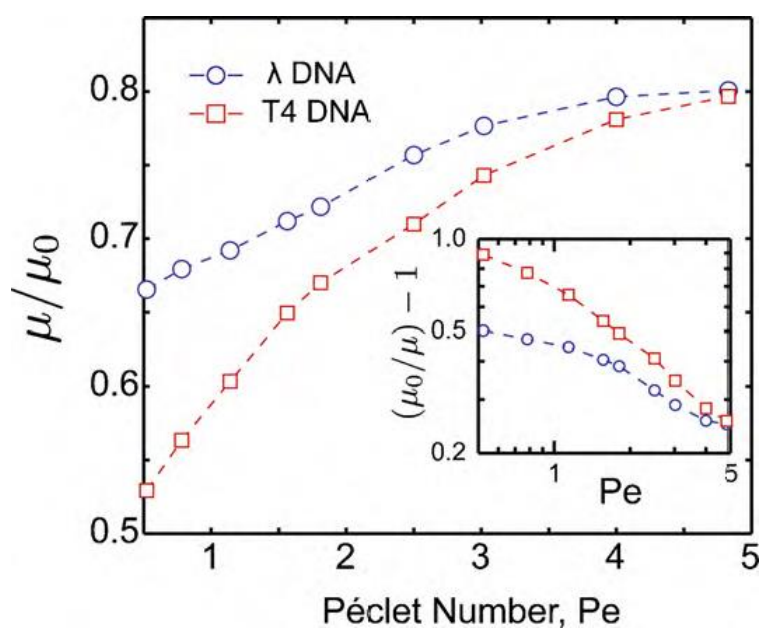


圖 2-15 無因次電泳移動率對 Pe 作圖[16]

從上圖可看出在高電場下，兩 DNA 的速度差很小，很難達到分離效果。是由於較長的 T4-DNA 在高電場下，隨機布朗力造成的擴散輸送速率(diffusion transport rate)與平行電場方向的對流輸送速率(convection transport rate)相比很小，加上障礙物四周電場的形狀均繞過障礙物，使得 DNA 幾乎是水平的直線移動於兩排障礙物之間所形成的微流道中[17]，如圖 2-16，因此 T4-DNA 在流道中的碰撞減少許多，通過流道的時間和 $\lambda$ -DNA 幾乎無差別。



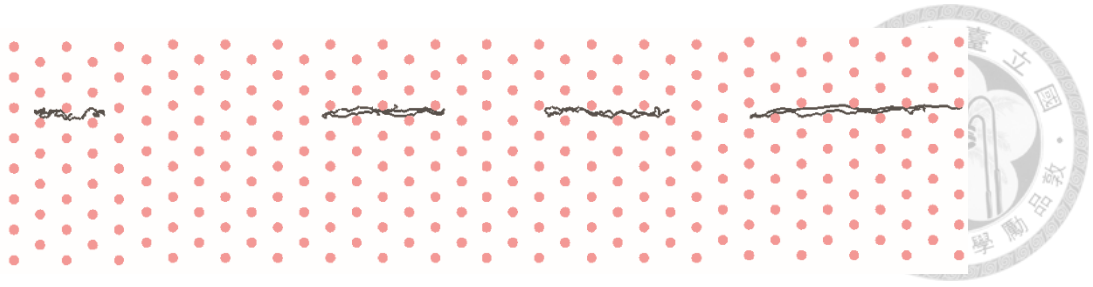


圖 2-16 T4-DNA 在高電場下流動行為被侷限在兩排障礙物間，圖中為同一 DNA 在不同時間下的擷取圖，DNA 由右向左流動。

接著將 100 個 DNA 分成 5 組各 20 DNA，每組以通過 1mm 流道的時間求得每組的離散係數(dispersion coefficient)，為電泳中高分子分布之離散程度的表示法，再計算 5 組中離散係數的平均值和標準差，除以 $\mu_0 E_0 a$  使之無因次化再對 Pe 作圖(a 為相鄰障礙物圓心距離)，如圖 2-17。(離散係數將詳細介紹於節 2.5.4)

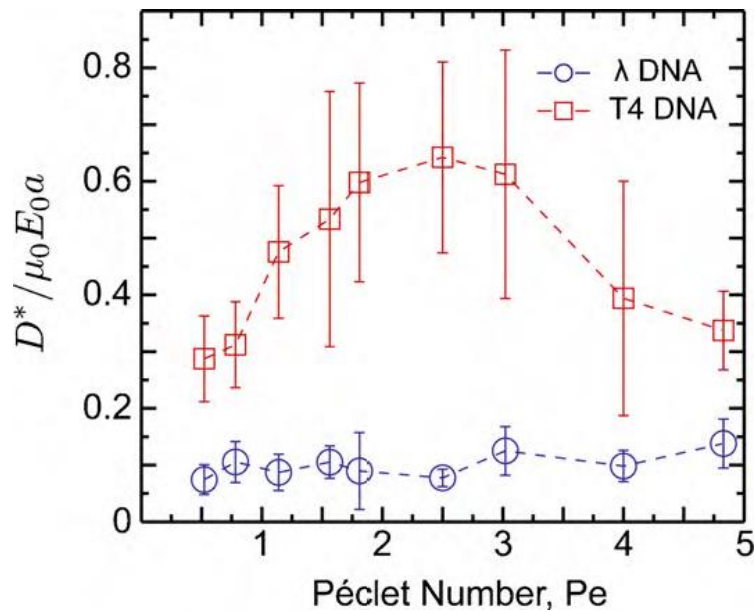


圖 2-17 無因次離散係數對 Pe 作圖[16]

求得代表 DNA 分布平均性質的電泳移動率，和代表離散性質的離散係數後，DNA 在微流道中分布的離型便可以了解，且可以波峰來表示 DNA 的分布(如圖

2-18 右上三張小圖內的波峰)，而兩 DNA 分布的重疊程度就是決定分離效率的關鍵。為了量化分離效率，在此計算分離解析度(separation resolution)，為兩波峰峰值的差值除去兩波峰的兩倍標準差總和(分離解析度將於節 2.5.4 中詳細說明)。

另外為了節省電腦模擬的花費時間，K. Dorfman 等人以 1mm 所得的電泳移動率和離散係數，預測 15mm 的流道中 DNA 在不同電場下的分離解析度，以此法模擬更長通道分離解析度的正確性將在第三章做實際上的測量。分離解析度與電場值的關係如圖 2-18。

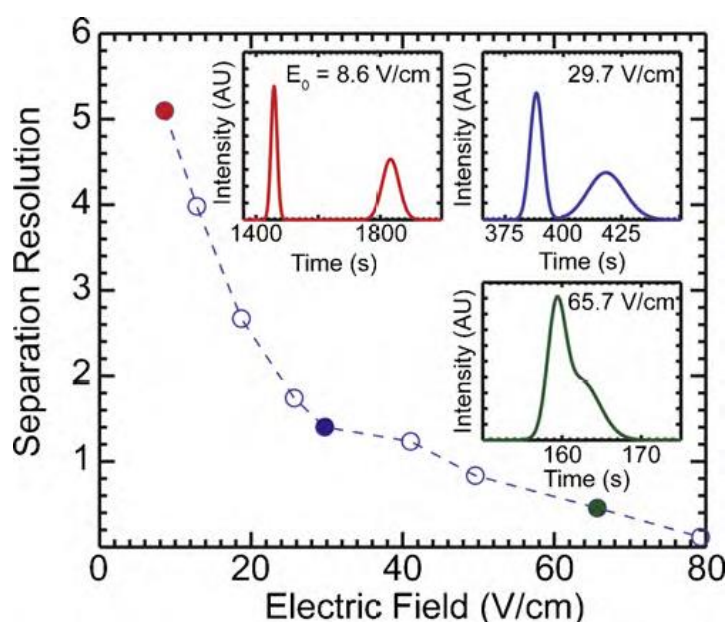


圖 2-18 分離解析度對不同電場值的關係圖，右上的小圖為三種電場下兩 DNA 在微流道中的分布波峰圖，小圖的 y 軸為 DNA 在對應的電泳時間下偵測到的強度，正比於 DNA 數目。因此若兩波峰相距越遠，則該電場下就有較好的分離解析度。[16]

從上圖可知，此裝置在低電場下可以有較良好的分離效果，但需要大量的時間使 DNA 完成電泳，相當消耗時間成本；反之高電場下因圖 2-16 的原因導致



較低的分離解析度，並不是可行的選項。因此我們的研究旨在改良 DNA 於此微流道中在高電場下的分離效果。

於 2012 年 Doyle 團隊希望利用不規則排列的圓柱障礙物(disordered post array)[18]來改良前述研究[16]在高電場下低碰撞頻率的問題，微流道設計如圖 2-19。但這樣的改變反而增加了 DNA 的離散係數，使得分離更趨於不完全。

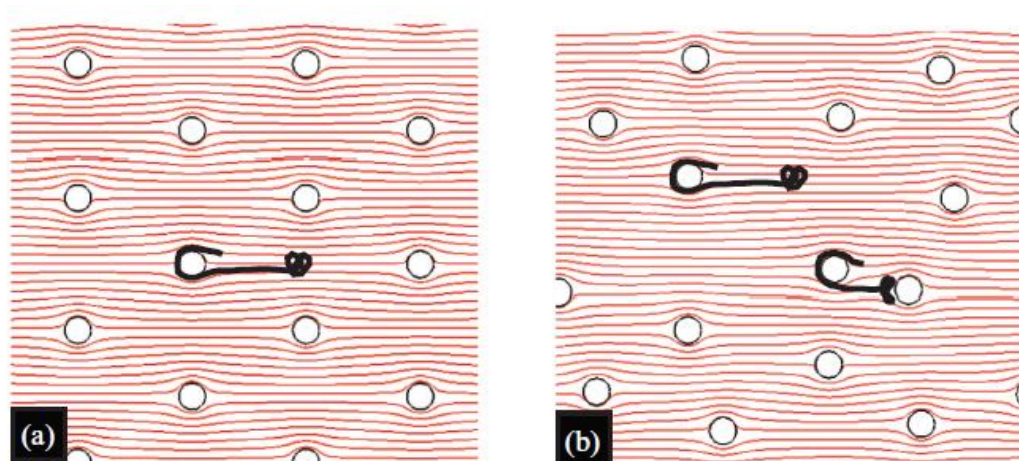


圖 2-19 (a)規則排列的六角陣列圓柱障礙物於微流道中[16] (b)改變後的不規則排列圓柱障礙物陣列。[18]

### 2.5.3 快拍模式(Snapshot Mode)與終點線模式(Finish-line Mode)

決定電泳分離中高分子的分離解析度(resolution)方法可分為：快拍模式(Snapshot Mode)與終點線模式(Finish-line Mode)[19]。

在實驗上，快拍模式是使待測樣品均電泳相同的時間，在某一瞬間觀察高分子的分布情形，也就是說每個高分子行進的時間相同，但行進的距離不同，在此瞬間拍攝微流道內螢光後的高分子亮度分布後，用偵測器將亮度與距離的關係轉化為兩個峰值的分布圖，接著再擬合出兩峰值的函數，進而計算分離解析度，圖解以上程序如圖 2-20。

(a)



(b)

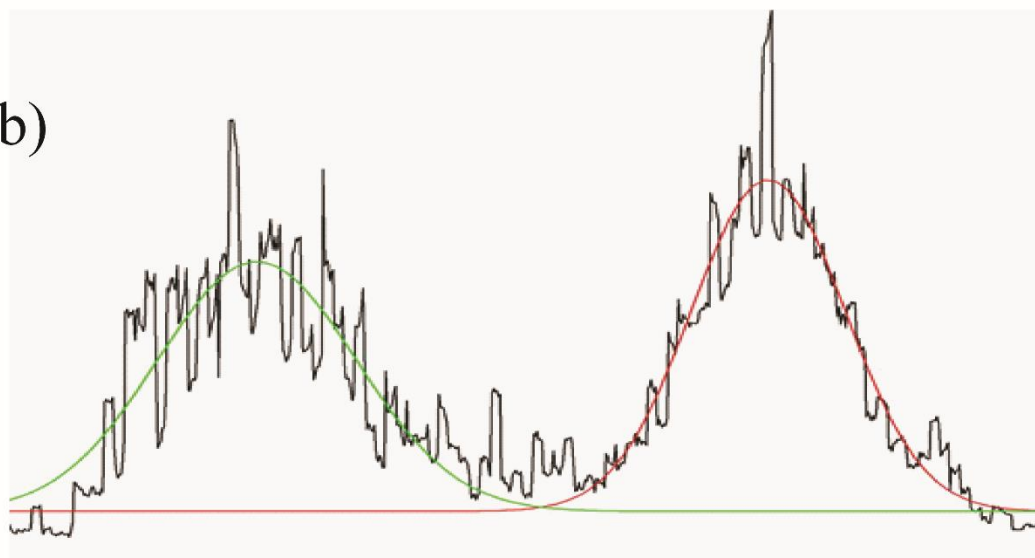


圖 2-20 在電泳實驗中，開始電泳一段時間後，在某一個瞬間拍攝含螢光劑之  
(a)DNA 在流道中的分布，再偵測每個位置的亮度畫成(b)亮度對位置之  
分布圖，擬合出兩函數後再計算分離解析度。

計算解析度時利用上圖(b)擬合的兩函數之兩波峰距和標準差代入下式求得  
解析度。

$$R_s = \frac{|I_{\max,1} - I_{\max,2}|}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (2-20)$$

其中， $I_{\max,1}$  和  $I_{\max,2}$  為兩峰值所對應的距離， $\sigma$  為峰值的標準差。

第二種方法為終點線模式模式，為在固定一處偵測，每個高分子通過此處的  
所需的時間必然不相同，記錄所需時間和高分子數量的關係，進而求得解析度。  
在實驗上，則是在通道內固定一處取一目標區域，如圖 2-21(a)，偵測不同時間  
下 DNA 在該目標區域內的亮度，繪成亮度-時間圖，如圖 2-21(b)，再由兩波峰  
距和標準差代入 Eq. (2-20)求得解析度。Eq. (2-20)的  $I_{\max,1}$  和  $I_{\max,2}$  在此為峰值所

對應的時間。

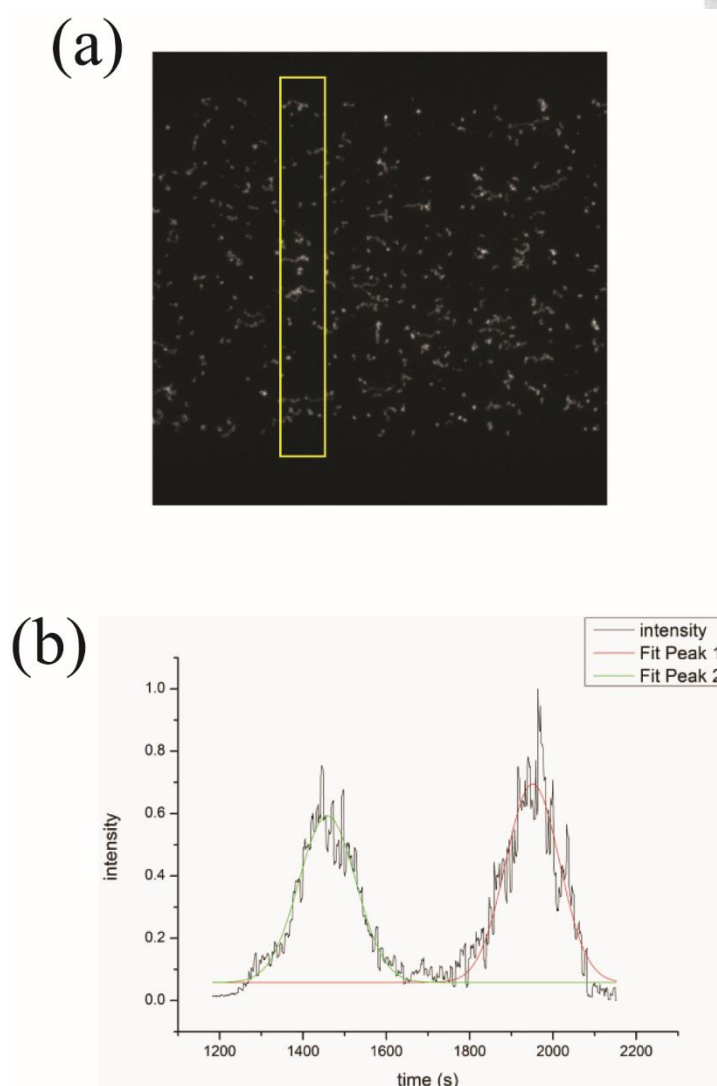


圖 2-21 實驗上以終點線模式求得分離解析度之示意圖。(a)設定一目標區域，擷取該區域在不同時間下的亮度，繪成(b)亮度對時間的分布圖，再將此分布圖擬合出兩個峰，將峰值的差值和標準差代入 Eq. (2-20)求得分離解析度。

但我們所做的電泳分離模擬與實驗在分析解析度上有相當大的差異，最大不同之處在於模擬的每個 DNA 需分開且依序計算，無法如實驗一樣同時批次大量的輸入樣品，因此模擬上的計算解析度的需另闢方法。

模擬的方便之處在於可以記錄每個 DNA 在不同時間下每個 bead 之位置和質心位置，如此一來快拍和終點線模式都可以方便計算。當利用快拍模式計算時，可利用某特定時間下每個 DNA 質心移動距離計算分離解析度；而以終點線模式計算時，可利用某特定通道長度紀錄每個 DNA 通過此長度所需之時間，再分別利用節 2.5.4 之方法求得電泳移動率，離散係數和分離解析度，詳細計算說明如節 2.5.4。

## 2.5.4 DNA 於圓柱陣列微流道電泳之相關參數

DNA 通過整個微流道所需的時間，我們可以在將之細分為移動時間  $t_r$  (transition time) 和勾住時間 (trapping time)  $t_{\text{trap}}$ 。其中移動時間意指 DNA 不經障礙物阻擋時所花費的時間，而勾住時間即為被障礙物擋下，流動行為受阻時所花費的時間。勾住時間的求得如節 2.5.4.1。

### 2.5.4.1 勾住時間

DNA 在含單個圓柱障礙的微流道中電泳，會經歷上鉤 (hooking) 和脫鉤 (unhooking) 的過程，如圖 2-22。

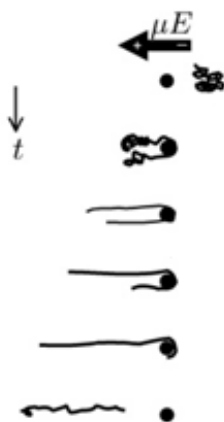


圖 2-22 DNA 經歷勾住圓柱障礙物前、勾住障礙物，和脫勾後的示意圖[20,

21]。



對於勾住時間的定義和計算方法有兩種。

第一種是在 Randall and Doyle[20, 22]的研究中，紀錄每個時間步階下的質心在平行電場方向的位置，利用質心位置對時間的作圖求得勾住時間圖形，如圖 2-23[20, 23, 24]，勾住時間的求法如下：

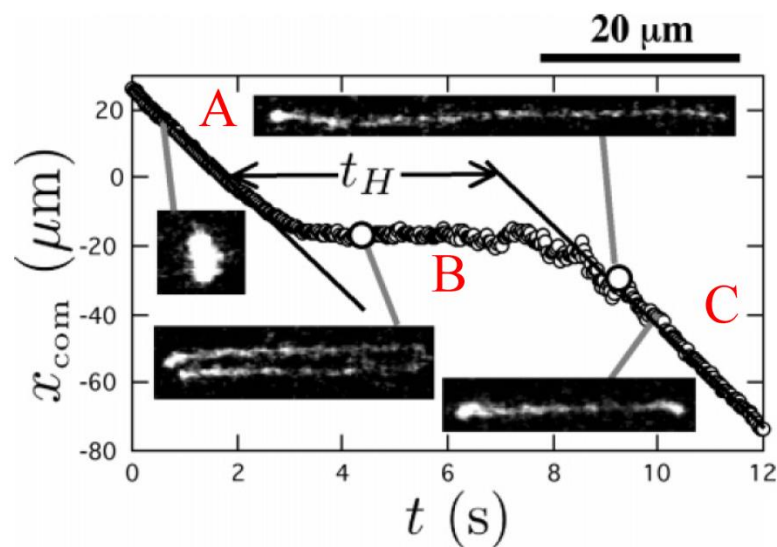


圖 2-23 DNA 在含單一圓柱障礙物之微流道中電泳，質心在平行電場方向的位置對時間作圖。[20, 22]

上圖質心位置對時間作圖的曲線可區分為三個部分：

A.斜直線：DNA 在碰撞到障礙物前，沒有受到任何的障礙物阻礙，質心位置對時間作圖的斜率等於 DNA 在自由溶液(free solution)中的電泳速度。如同圖 2-22 中由最上方數下來第一個 DNA 的型態。

B.近似水平線：DNA 開始碰撞到障礙物，如同圖 2-22 中第二個 DNA 的型態，DNA 分子分成兩段，皆從鬆弛狀受到向左的電場力而拉伸至伸長狀，進而分別掛在障礙物的兩側，形成圖 2-22 中第三個 DNA 的型態，此段過程中質心

位置隨著 DNA 兩翼伸長而向左移動，直到拉伸至 DNA 在此電場下能承受的限度後質心移動開始趨於靜止，就如同圖 2-23 B 區的左側圖形，斜率從 A 區的斜率降至趨於 0。

勾上圓柱障礙物後，兩翼都會受到相同方向的電場力，但因 DNA 兩翼的長度不盡相同而所受的電場力大小也不相同，受到較大電場力的較長一翼會比較短的一翼更傾向於往電場方向移動，而短翼就會朝著電場的反方向前進，就如同圖 2-22 的第三個 DNA 至第四個 DNA 變化型態的過程，此原理就和將繩子掛在掛勾上，較長一端受到較大的重力影響而落下相同。在此過程中，長翼對於質心運動方向的貢獻是向電場方向，而短翼是向電場反方向，而長翼的長度越來越長，造成 DNA 質心速度會越來越快，如同圖 2-23 中 B 曲右端斜率漸增的圖形。此過程會持續到 DNA 短翼部分全部轉移到長翼，也就是 DNA 脫鉤時，如同圖 2-22 的第五個 DNA 的型態，接著進入圖 2-23 的 C 區。

C.斜直線：DNA 脫勾後，再度進入自由溶液區，沒有受到任何障礙物的阻礙，斜率又回到圖 2-23 中 A 區的電泳速度。

圖 2-23 中，將 A, C 線延伸，兩平行線在 x 軸的截距即為勾住時間，會受到電場值、DNA 的分子量、和 DNA 碰撞障礙物前的型態[25]影響。

在我們的微流道設計中，圓柱障礙物呈六角陣列，DNA 在陣列中的勾住時間必定與單一障礙物時不同，因此需於障礙物陣列中同樣測量質心位置對時間的作圖，在此我們引用[20]的方式來計算勾住時間，但 DNA 有可能同時碰撞到多個障礙物(multiple post collision)，增加了碰撞型態及勾住時間的多變性，因此需測量約 100 個 DNA 來求得該類型 DNA 在一特定電場下的勾住時間的平均性質和分布。

另一方法在 N. Minc 和 K. D. Dorfman 等人的研究中[26]，將單一圓柱障礙物分為四個象限的區域，從 DNA 同時進入四象限區域開始算起，到四象限中的任一象限沒有 DNA 的存在為止，此段區域即為勾住時間，示意圖如圖 2-24。

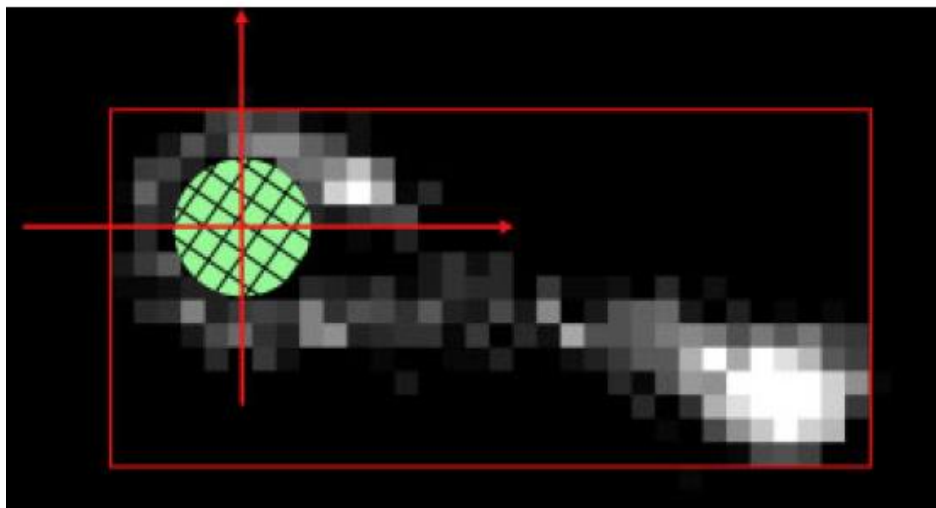


圖 2-24 將單一圓柱障礙物周圍區域以四個象限區分出四個區域，DNA 同時跨過四象限之示意圖[27]

同樣的情況下，第二種也就是 N. Minc 和 K. D. Dorfman 等人[26]的求法所得的勾住時間會比第一種 Randall and Doyle[20, 22]所得的勾住時間值來的長，原因是在於當 DNA 同時進入四象限，也就是第二種勾住時間開始計算之時，DNA 並不會立即的碰觸到障礙物，因此質心並沒有明顯的減速，此時若以第一種方法，計算尚未開始。DNA 脫附時也是相似的情形，DNA 脫鉤，第一種方法停止計算時仍會同時存在於四個象限中，但第二種方法並未停止計算。

#### 2.5.4.2 電泳移動率

電泳移動率為帶電分子在電泳介質中受到一特定電場驅動下的移動能力，若帶電分子在自由溶液中電泳移動率可以式(2-21)表示

$$v_d = \mu E_0 \quad (2-21)$$

其中  $v_d$  為帶電分子的漂移速度(drift velocity)， $\mu$  為電泳移動率， $E_0$  為電場。

在快拍模式下，電泳移動率的求法如式(2-22)[16, 27]



$$\mu = \frac{\langle x \rangle}{E_0 t} \quad (2-22)$$

其中 $\langle x \rangle$ 為 DNA 在  $t$  時間內移動的平均距離。

在終點線模式下，電泳移動率的求法如式(2-23)

$$\mu = \frac{L_c}{E_0 \langle t \rangle} \quad (2-23)$$

其中  $L_c$  為通道總長， $\langle t \rangle$  為 DNA 通過微流道的平均時間。

電泳移動率提供了 DNA 在流動上的平均性質，也就是 DNA 電泳的平均流速。在 DNA 的電泳分離中，不同 DNA 的電泳移動率相差越大，就能造成效果越顯著的分離，但如果 DNA 分布的廣泛程度過大，也就是說兩 DNA 分布的離散程度與其電泳移動率的差值的尺度相當甚至超過，便會造成兩 DNA 分布過於重疊，導致不理想的分離解析度，因此要評估電泳中的分離效果，除了計算電泳移動率，還需計算 DNA 在流道中分布的離散係數，節 2.5.4.3 中我們將討論如何計算，並討論離散係數對於分離解析度的影響。

### 2.5.4.3 離散係數

DNA 進行電泳過程中，因為溶劑造成隨機的布朗力，以及圓柱障礙物陣列造成每個 DNA 受到不同程度上的阻礙，造成 DNA 經歷一段時間的電泳後流動距離的差異，若電泳一開始批次的放入一定量的 DNA，一段時間後會看到 DNA 形成一帶狀分布，分布的廣泛程度造成了 DNA 的離散係數。

若 DNA 分布的帶狀中，前後差距很大，意即在微流道中涵蓋的範圍很長，更容易與欲分離的其他種 DNA 重疊，但如此的重疊會導致 DNA 的分離不完全，因此增加分離效果除了要增加兩 DNA 的平均流速，也要減少其分布的廣泛程度，離散係數就成了評估分離解析度的另一指標。[7, 28-30]

在含圓柱障礙物的微流道中離散係數的求法，在 D. W. Olson 等人的研究中 [31]，以下式表示：



$$2D\langle t \rangle = \sigma_x^2 \left(1 - \frac{\bar{U}}{U}\right)^2 + \bar{U}^2 \sigma_{t_H}^2 \quad (2-24)$$

其中，D 為離散係數， $\sigma_x^2$  為 DNA 流動距離的變異數，U 為 DNA 在電場  $E_0$  下，於自由溶液中的流動速度， $\bar{U}$  為 DNA 在含障礙物陣列微流道中，通過整個流道的平均速度， $\sigma_{t_H}^2$  為勾住時間的變異數。

上式可以應用於節 2.5.3 所提的快拍模式與終點線模式中，使用終點線模式時，每個 DNA 所經過電泳距離相同，但經過時間不同，因此上式中的  $\sigma_x^2$  為固定值，式子可簡化為下式：

$$2D\langle t \rangle = \bar{U}^2 \sigma_{t_H}^2 \quad (2-25)$$

而使用快拍模式，每個 DNA 所經過時間相同，但電泳距離不同，求得離散係數仍如式(2-24)。

計算 DNA 電泳分布性質的兩個指標，電泳移動率與離散係數後，便可完整的將電泳的分離效率量化，計算分離解析度。

#### 2.5.4.4 分離解析度

分離解析度意指欲分離的兩種 DNA 在微流道之分布的解析度，意即可以區分 DNA 分布之兩波峰的程度，為一將電泳分離效率量化的一項指標，而此項指標會受上述所提的電泳移動率和離散係數影響。

在實驗上，如節 2.5.3 所示，可以直接由 DNA 在流道中的亮度轉化成 DNA 分布的波峰；但在模擬上只能得到每個個別 DNA 的移動距離與經過時間，因此必須由既定方程式在電泳移動率和離散係數及分離解析度之間作轉化。

在 K. D. Dorfman 等人的研究[16, 19, 32]中，將電泳移動率和離散係數利用式(2-26)把 DNA 在微流道的分布擬合為高斯分布曲線，也就是 DNA 分布強度與時間作圖，或 DNA 分布強度與距離作圖的波峰：

$$C_i(x, t) = \sqrt{\frac{1}{4\pi Dt}} \exp\left[-\frac{(x - \mu E_0 t)^2}{4Dt}\right] \quad (2-26)$$

利用快拍模式時，每個 DNA 所經過時間相同，但電泳距離不同，Eq.(2-26) 中會將  $t$  代入一特定的電泳時間，讓式子成為  $x$  之函數，就可以得到 DNA 分布強度對電泳距離作圖中的波峰；而終點線模式時，每個 DNA 所經過電泳距離相同，但經過時間不同，Eq.(2-26) 中會將  $x$  代入一特定的電泳距離使式子成為  $t$  之函數，就是 DNA 分布強度對電泳時間作圖中的波峰，如同圖 2-21(b)。

接著再以 Eq. (2-27) 求得分離解析度：

$$R = \frac{t_{T4}^{max} - t_{\lambda}^{max}}{2(\sigma_{\lambda} + \sigma_{T4})} \quad (2-27)$$

其中  $t^{max}$  為擬合出之高斯曲線中，最高點所在的時間值， $\sigma$  為曲線之標準差。

在文獻中，測量 DNA 的解析度需讓 DNA 電泳約 15mm 的長度，但這樣尺度的電泳對於模擬來說非常的耗時，因此我們引用 J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]中之方法，僅讓 DNA 電泳 1mm，利用節 2.5.4.2 和 2.5.4.3 的方法求得 1mm 下的電泳移動率和離散係數代入(2-26)式，但  $x$  代入 15mm。這樣的方法可以省下 15 倍的模擬時間，但正確性仍需要驗證。詳細驗證程序將於節 3.6 說明。

#### 2.5.4.5 布朗動態法之回顧

布朗運動源自於十九世紀英國科學家 Robert Brown，在含有花粉的水中以顯微鏡觀察發現，花粉會不間斷地進行連續但不規則的運動，沒有固定軌跡，類似於不規則的鋸齒狀，方向不停的做改變，原因來自於花粉受到來自四面八方的溶劑分子連續撞擊，因而產生隨機運動，此我們稱為布朗運動(Brownian Motion)。

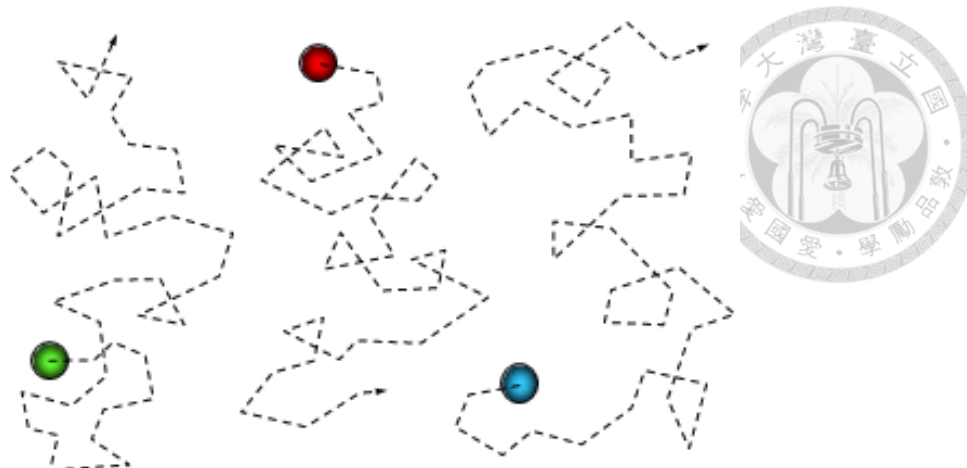


圖 2-25 花粉粒子在水中的布朗運動示意圖(出自

[http://221.2.225.114/jpkcweb/huaxue/jxnr\\_right.asp?counumm=0&metype=3&id=31](http://221.2.225.114/jpkcweb/huaxue/jxnr_right.asp?counumm=0&metype=3&id=31))

能觀察到布朗運動的粒子，其溶液中分散相粒子大小需介於真溶液(true solution, 直徑在  $10^{-7}\text{cm}$  以下)和懸浮液(suspension, 直徑在  $10^{-4}\text{cm}$  以上)之間，此稱為膠質溶液(colloid solution)。圖 2-26 為膠質粒子受到溶劑粒子碰撞，造成不規則運動的示意圖。

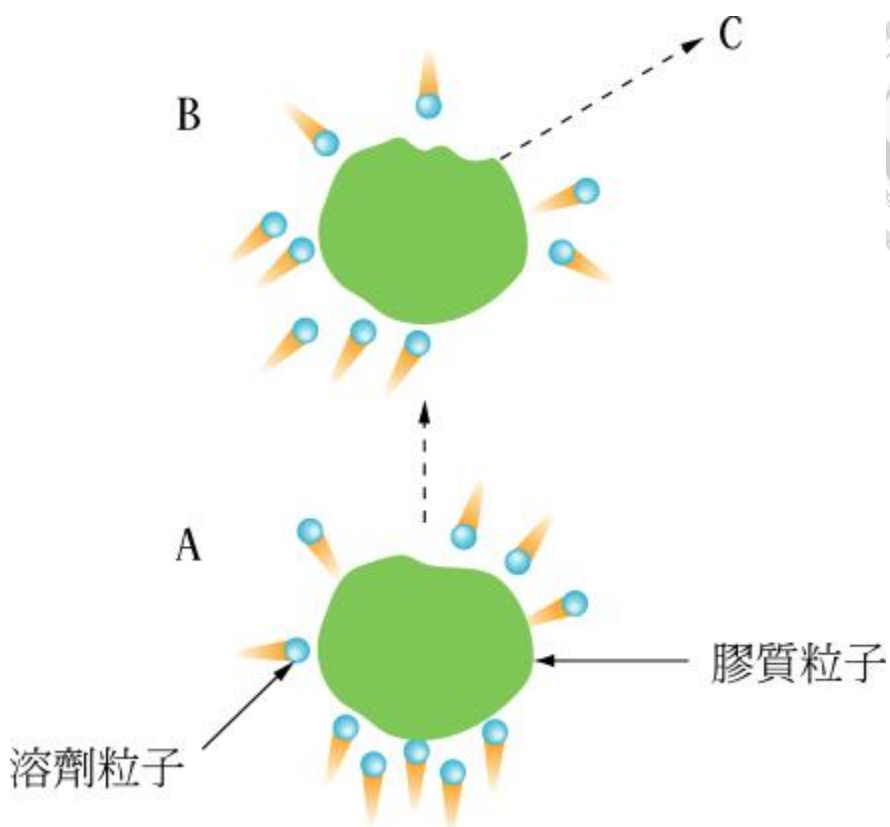


圖 2-26 膠質粒子受到溶劑粒子碰撞造成不規則運動之示意圖。(出自南一書局網站)

在我們的模擬中，DNA 分子尺度落於膠質溶液所涵蓋的區間，因此在做電泳模擬需引進模型來描述布朗力。因布朗力屬隨機方向和大小的力，又布朗運動在長時間的平均下會呈現常態分布，因此以機率的觀念來作為模擬布朗力的模型。

布朗粒子有兩個特性，第一是由於布朗運動的等向性，粒子的位移平均是零，。第二是粒子隨時間往各方向運動遠離原點，將移動距離取平方再取平均與經過的時間成正比，可由下式詮釋(一維空間下)：

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (2-28)$$

其中  $D$  為擴散係數，代表同一時間下布朗粒子遠離原點的快慢， $t$  為時間。

在電腦模擬中，我們需要將布朗力量化，1908 年 Paul Langevin 發表可描述

單一布朗粒子運動的軌跡方程式：

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{x}_i}{dt^2} = -m_i \zeta_i \frac{d\mathbf{x}_i}{dt} + \mathbf{R}_i + \sum \mathbf{F}_{ij} \quad (2-29)$$

其中  $m_i$  為布朗粒子  $i$  的質量， $\mathbf{x}_i$  為布朗粒子  $i$  在  $x$  軸上的位置， $\zeta$  為布朗粒子  $i$  黏滯係數(drag coefficient)， $\mathbf{F}_{ij}$  是粒子  $i$  受到系統中其他粒子  $j$  所施予的作用力， $\mathbf{R}_i$  為流體分子碰撞布朗粒子  $i$  所施予的熱擾動所造成之布朗力，此隨機作用力的平均為零，且其共分散(covariance)為

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \mathbf{R}_j(t) \rangle = 2\zeta_i k_B T \delta_{ij} \delta(t) \mathbf{I} \quad (2-30)$$

其中  $k_B$  為波茲曼常數， $T$  為絕對溫度， $\mathbf{I}$  為 3 階單位張量(unit tensor)， $\delta_{ij}$  為 Kronecker delta， $i=j$  時  $\delta_{ij}=1$ ， $i \neq j$  時  $\delta_{ij}=0$ 。

若流體黏滯阻力大，或只對長時間結構動態有興趣時，可忽略式(2-29)等號左側的慣性項，再對  $t$  積分後得下式：

$$\mathbf{x}_i(t + \Delta t) = \mathbf{x}_i(t) + \frac{D}{k_B T} \sum \mathbf{F}_{ij}(t) \Delta t + \mathbf{Z}_i \Delta t \quad (2-31)$$

其中  $\mathbf{Z}_i$  為熱擾動造的隨機位移，是時間間隔  $\Delta t$  的函數。上式為以布朗動態法描述粒子位置的主要方程式，將粒子連續的運動轉化為步階的概念，第  $n$  步時計算粒子所受的力做為決定第  $n+1$  步位置的依據。圖 2-27 為簡略布朗動態演算法(Brownian Dynamics Algorithm)的流程圖。

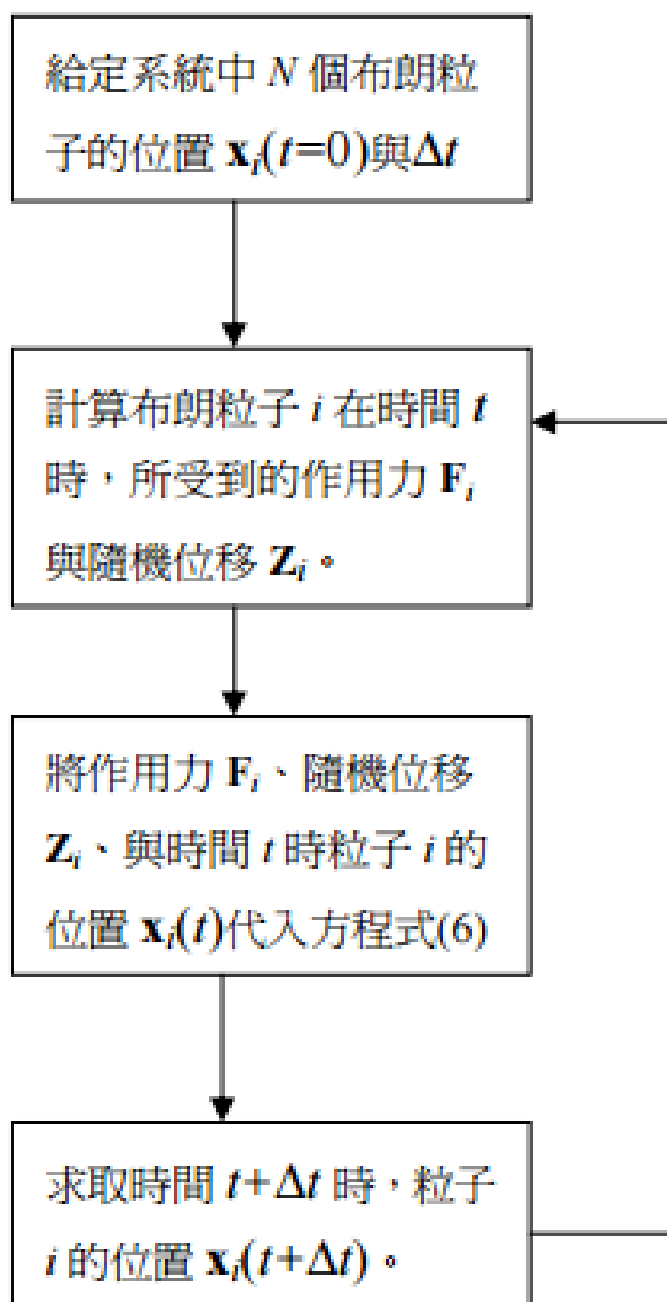


圖 2-27 簡略布朗動態演算法流程圖[33]

對於一個粒子來說，可將粒子視為一質點，僅需探討溶劑粒子對該單質點的作用力，但長鏈狀的高分子來說，分子上的各位置所受的淨力都不盡相同，因此欲描述高分子在溶劑中受布朗力的行為需引進特定模型始能模擬。

在此研究中將 DNA 分成有限個數的質點，每兩個相鄰質點以一彈簧連結，示意圖如圖 2-28。

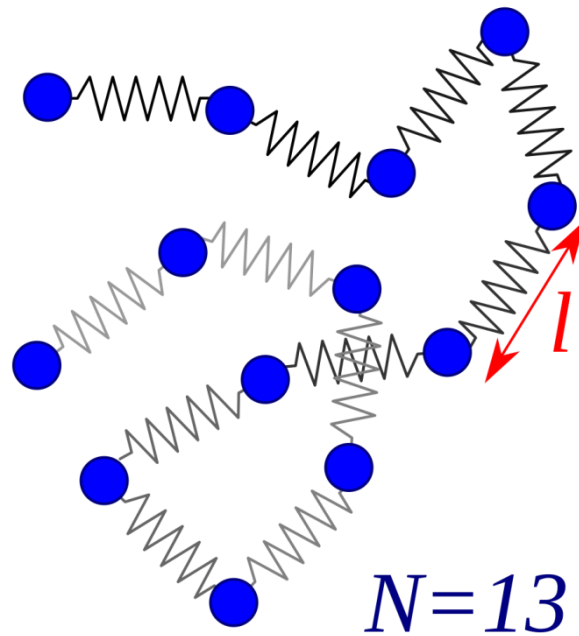


圖 2-28 以 bead-spring model 描述的高分子，質點數為 13。(取自維基百科)

在此模型下假設僅有質點存在質量，彈簧屬無質量的元素，因此僅需考慮質點所受的布朗力，另外因高分子鏈含有一定程度的伸縮作用，因此質點除了受到溶劑粒子的布朗力，還需考慮質點間的彈簧力，當兩相鄰質點相對距離過遠時將會產生對兩質點拉近的力量，過近時則會有相斥之力；另外不同質點間(可能不相鄰)會存在一體積排斥作用力，質點過近時因體積涵蓋範圍的衝突而會產生一排斥力。最後，若質點距離流道中的障礙物或邊界過近，則需另外考慮一位能，造成質點對障礙物的排斥力。

在節 3.1 中會詳細介紹我們如何利用布朗動態法於 DNA 的電泳模擬中。

## 2.6 微流道設計之改良策略

為了增加 DNA 在電泳微流道中的解析度，我們以 J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]為基底，分別做一連串的設備及參數改良。



### 2.6.1 以高導電度障礙物取代絕緣障礙物

D. W. Trahan 和 P. S. Doyle 的研究中[34]使用了較大的單一高導電度障礙物，圖 2-29 中可看出，相較於絕緣障礙物的圖 2-14 電力線發散於障礙物，上圖電力線均集中且通過圓柱障礙物，意指 DNA 電泳流近障礙物時傾向於碰撞障礙物，進而可大大增加 DNA 碰撞的機率。

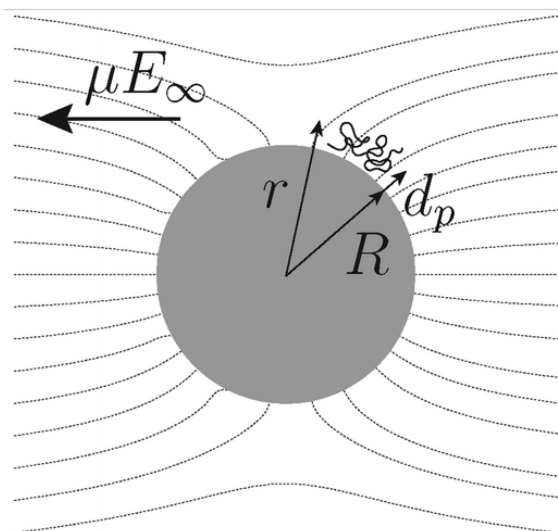


圖 2-29 單一高導電度障礙物於流道中的電力線分布圖[34]

為了增加 J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]中 DNA 在高電場下鮮少與障礙物碰撞而導致分離不佳的問題，我們引用[34]的想法將障礙物取代為高導電度的材質，尺寸和排列上均不作改變。而改變後的電力線如圖 2-30。



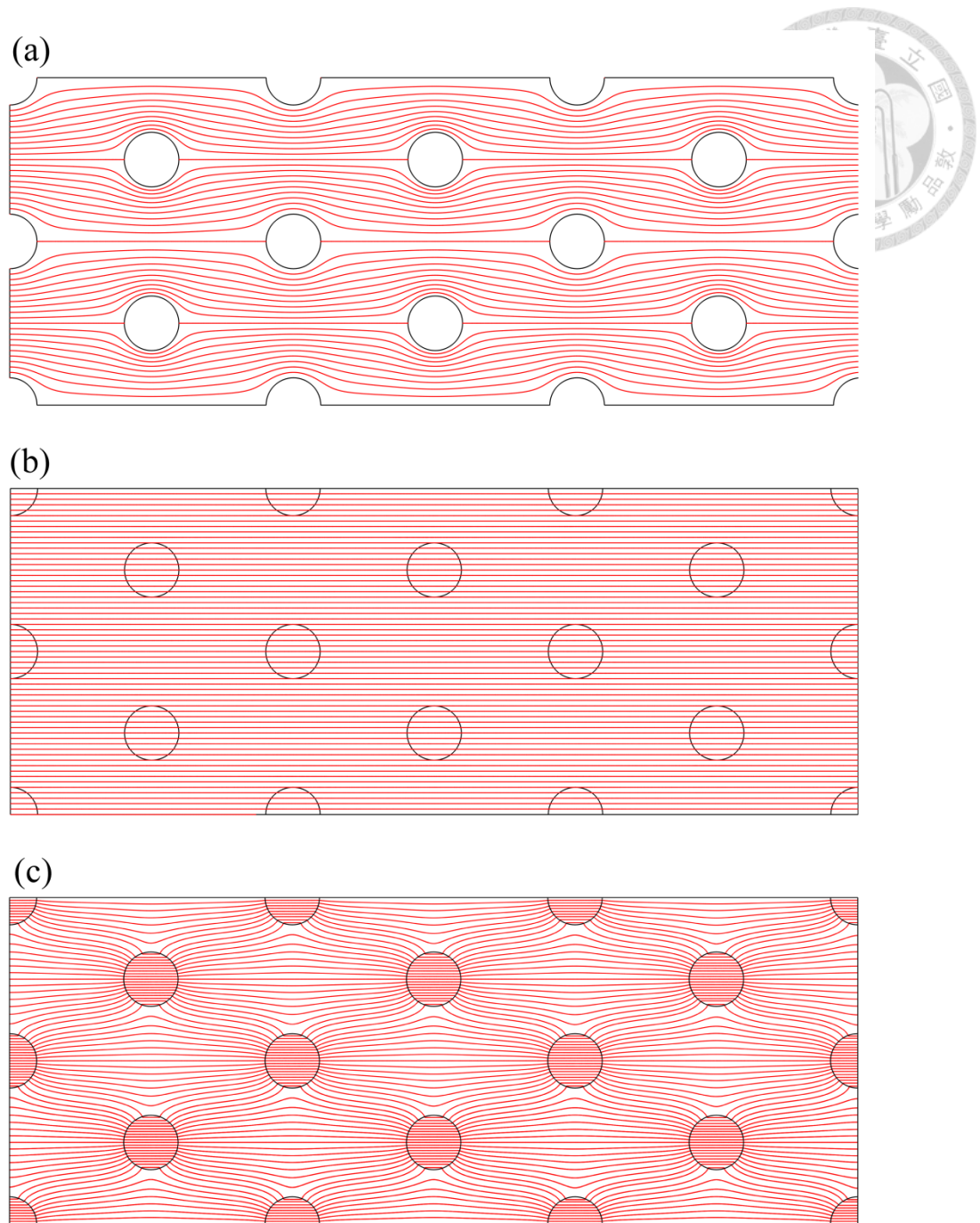


圖 2-30 在微流道中使用六角陣列的(a)絕緣圓柱障礙物， $\kappa/\kappa_0=0$  (b)圓柱障礙物與流體導電度相同， $\kappa/\kappa_0=1$  (c)圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=100$  的電力線分布圖。

由上圖可知，當 $\kappa/\kappa_0$  值越大，電力線會越趨於向障礙物集中；反之則分散於障礙物。

我們模擬 $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 在不同的 $\kappa/\kappa_0$ 值下分離效果的差異與 DNA 的行為，於第 4 章中會詳細說明。



## 2.6.2 以周期性電場關閉來改變 DNA 碰撞前的型態

在 K. D. Dorfman 等人的研究[35]中，使用含奈米柵欄(nano-fence)通道的概念於微流道中，以奈米尺度的障礙物作為柵欄，DNA 通過柵欄後會進入一段沒有障礙物的自由溶液區域，而通過該區後進入下一道障礙物柵欄，以此類推形成週期性的設計。

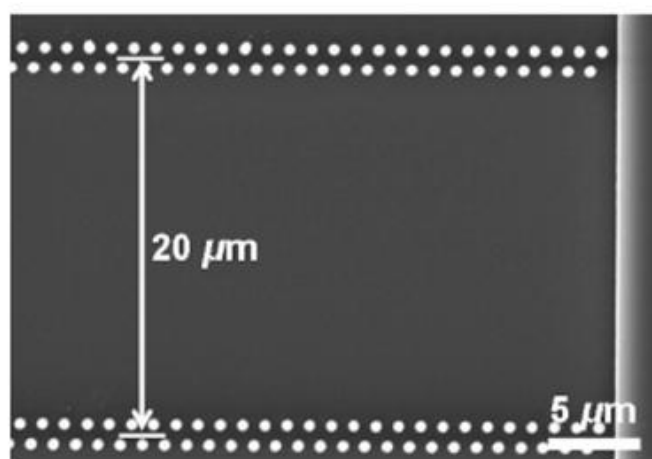


圖 2-31 nano-fence 於微流道中的示意圖[35]

在微流道中以空白取代原本整齊排列的障礙物，目的在於讓 DNA 在自由溶液中能鬆弛，從原本直線拉伸狀的型態轉換成線圈狀，增加 DNA 在垂直電場方向的投影長度，使得下次流近柵欄時可以做有效的碰撞。而在 K. D. Dorfman 等人的研究[35]中，圓柱障礙物的尺寸及間距皆為奈米尺度，僅能分離更小的 DNA(15kpb-48.5kpb，其中最長的 48.5kpb 為我們所使用的 $\lambda$ -DNA)，文獻的結果也顯示這樣的設計確實使 DNA 在空隙處有鬆弛的效果，在抵達下一階段的障礙物前能確實的達到有效碰撞。在這樣的設計上增加 DNA 鬆弛的方法有兩種，第

一為降低電場，使 DNA 在空隙處的流速降低，增加其在空隙處的停留時間，因而給予足夠的時間鬆弛，此法的好處是欲改變參數時只需調控電場，不需要改變通道幾何形狀，但缺點是降低電場也增加了 DNA 電泳所需的時間；第二是不改變電場的前提下增加空隙處的長度，如此一來 DNA 碰撞完障礙物離開後需要更久的時間才能抵達下一區障礙物，給予足夠的時間鬆弛，但此法最大的缺點是需要重新製作微流道，更加耗費製作成本。

為了達到文獻中使 DNA 碰撞前鬆弛成線圈狀，又不需調整微流道的幾何形狀，我們設計以時間作為 DNA 鬆弛的調控，將電場作週期性的開關，示意圖如圖 2-32，DNA 仍於前述所提的絕緣障礙物六角陣列中電泳，如此一來電場關閉時，DNA 便開始鬆弛，就如同 DNA 行進到奈米柵欄[35]的空白處，而電場重啟後鬆弛的 DNA 便能作有效的碰撞。

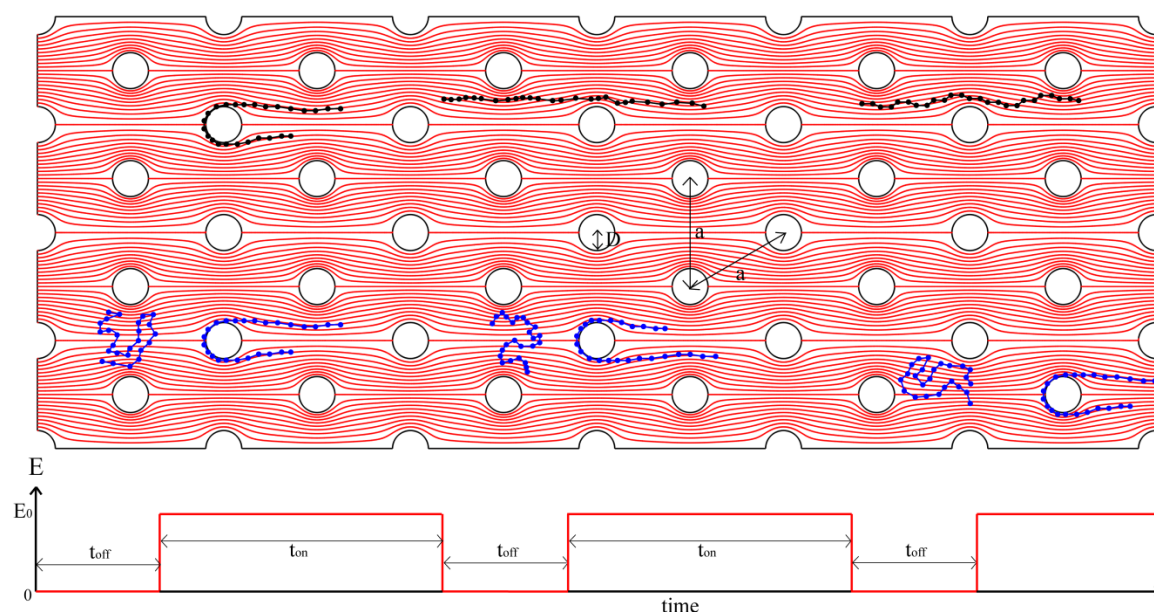


圖 2-32 調控電場開關與時間的示意圖。上部分為部分微流道擷取圖，DNA 移動方向為左向右，上方的 DNA 表連續性電場時的流動示意圖，而下方 DNA 表周期性開閉電場下的流動示意圖；下部分的圖為電場隨時間變化的示意圖，電場為周期性開閉循環，電場開啟和電場關閉維持的時間

分別為固定值。上圖中上側的 DNA，從一圓柱障礙物脫鉤後即在兩排障礙物形成的流道中流動，難以形成有效碰撞，而下側的 DNA 在電場關閉時能鬆弛成線圈狀(對應下方電場對時間圖的電場關閉階段)，電場再度開啟後便能勾住(對應下方電場對時間圖的電場開啟階段)，而脫鉤後再經歷一段電場關閉的時間，DNA 再次鬆弛，並周期性重複同樣的循環。

如此的設計不需改變流道，只需做電場開與關時間區間的調控，在探討不同電場下的 DNA 分離時非常容易調控實驗的參數。而  $t_{on}$  和  $t_{off}$  值為此裝置下的兩個新參數，其對於  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 的分離效果與 DNA 行為將詳細介紹於 4.3。

### 2.6.3 綜合微流道改良與電場關閉改變 DNA 碰撞前的型態

為進一步增加 DNA 於微流道中在電場關閉時鬆弛的空間，我們將微流道稍做改良如圖 2-33。

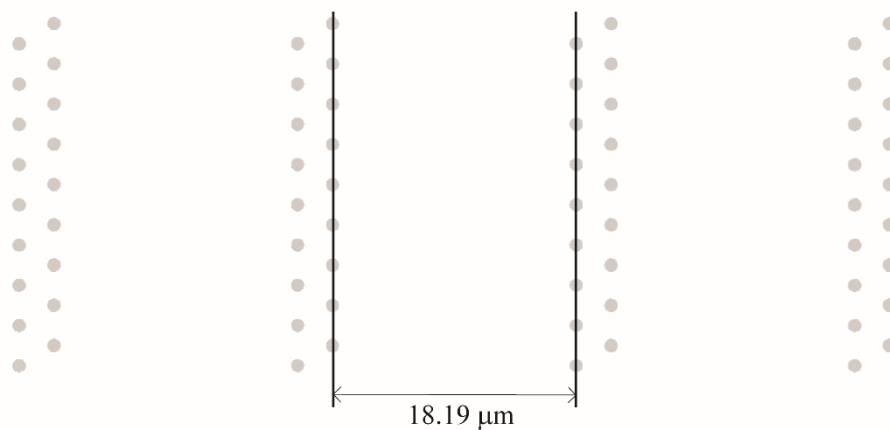


圖 2-33 改良後微流道示意圖

若電場關閉時 DNA 落在沒有障礙物排列的空白處，DNA 能有更大的空間鬆弛，而電場再啟時 DNA 就更有機會發生有效碰撞。此裝置中參數多了空白處的長度，在第四章中我們將探討空白處長度對於 DNA 分離的影響，先使用連續電場模擬，再結合上節中的  $t_{on}$  和  $t_{off}$  值的變動作全面的討論。

我們的研究屬一連串微流道改良的程序，首先以含六角陣列排列之絕緣圓柱障礙物之微流道模擬，並與 K. D. Dorfman 等人[16]的結果作比較。接著以增加碰撞機率為改良依據，將絕緣圓柱障礙物改為導電性圓柱障礙物，仍以六角陣列排列。第三部分為了增加 DNA 的有效碰撞機率，而不僅僅是碰觸到障礙物，我們增加了周期性電場開閉的概念，使 DNA 在電場關閉時能鬆弛成線圈狀，以利有效碰撞；最後為了增加電場關閉時，DNA 在微流道中鬆弛的不受障礙物的阻礙，將部分障礙物除去，使微流道中每兩排圓柱障礙物就含有一段不含任何障礙物的空隙處，給予 DNA 較完整的鬆弛空間。詳細模擬結果與分析將列於第四章。

### 第3章 模擬方法



本研究主要是模擬將 DNA 高分子放置在外加電場下，含有以六角陣列排列的圓柱障礙物(posts arranged in hexagonal array)之微流道內，以電場驅動的方式使得帶電的 DNA 流動，利用不同長度的 DNA 碰撞障礙物的機率和脫附時間的不同以達到 DNA 分離和純化的效果。本研究之模擬模型是由布朗動態法 (Brownian dynamics, BD)、有限元素法 (Finite elements method, FEM) 和結合 BD 與 FEM 之搜尋演算法所構成，模擬 $\lambda$ -DNA和 T4-DNA 在流道中的行為。在 BD 方面，採用 Bead-spring model 來模擬 DNA 高分子。在 FEM 方面，由於本研究之模擬裝置之外形是屬於不規則邊界，因此在計算內部電場分布上使用 FEM 解出其數值解，之後再將 BD 模擬之 DNA 與 FEM 計算而得之電場分布結合成本研究之模擬系統。

#### 3.1 布朗動態法 (BD)

本研究採用 Bead-spring model 模擬 DNA 之動態行為，其中每個球之力平衡方程式為[2]：

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \mu^b \mathbf{E}(\mathbf{r}_i) + \frac{1}{\zeta} [\mathbf{F}_i^B(t) + \mathbf{F}_i^S(t) + \mathbf{F}_i^{EV}(t) + \mathbf{F}_i^{EV,wall}(t)] \quad (3-1)$$

其中  $\mathbf{r}_i$  為第  $i$  顆球所在之位置， $\mathbf{E}$  為外加電壓所造成之電場強度(由 FEM 計算得之)， $\mu^b \mathbf{E}$  即為於此電場下之電泳速度， $\zeta$  為黏滯系數(drag coefficient)， $\mathbf{F}_i^B$  為周圍溶液分子所造成之布朗力， $\mathbf{F}_i^S$  為施加於球上之彈簧力， $\mathbf{F}_i^{EV}$  為體積排斥力， $\mathbf{F}_i^{EV,wall}$  為球與邊界之間之體積排斥力(圖 3-1)。為了配合速度較快的布朗運動，我們須以較小的時間步階進行模擬。

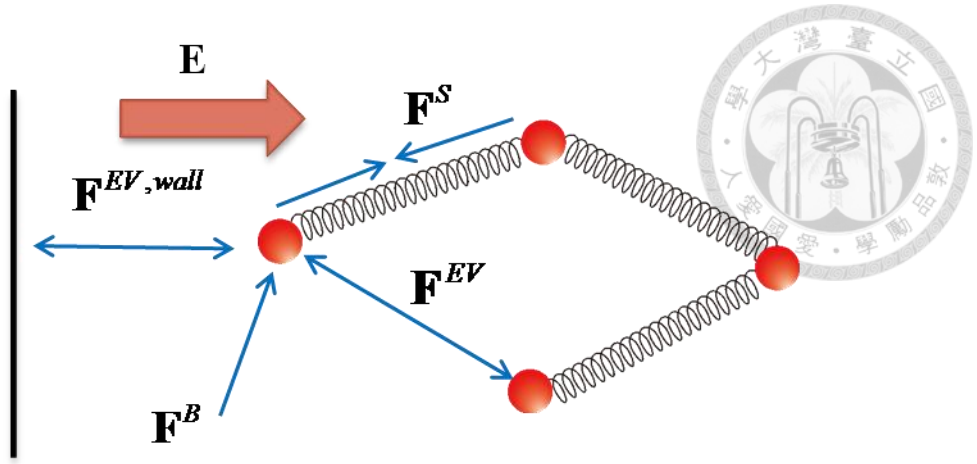


圖 3-1 Bead-spring model 中，各力施加於球上之示意圖。

Eq. (3-1)中， $\mathbf{F}_i^B(t)$ 項代表溶液造成之布朗力由於是球周圍之水分子隨機碰撞此球所合成之力，並且必須符合下列之特性[9, 33]：

$$\langle \mathbf{F}_i^B(t) \rangle = 0 \quad (3-2)$$

$$\langle \mathbf{F}_i^B(t_1) \mathbf{F}_j^B(t_2) \rangle = 2k_B T \zeta \delta(t_1 - t_2) \delta_{ij} = \frac{2k_B T \zeta \delta_{ij}}{\delta t} \mathbf{I} \quad (3-3)$$

其中 $\delta t$ 為系統時間步階大小， $\delta_{ij}$ 為 Kronecker delta， $\mathbf{I}$ 為單位矩陣， $\delta(t_1 - t_2)$ 為 delta function，其物理意義為不同時刻下布朗力的關聯性(correlation)為零，也就是說不同步階下的布朗力彼此間並無相關；而 $\delta_{ij}$ 代表同時刻下不同 bead 所受到的布朗力亦無關聯性。雖然此布朗力之大小呈現高斯分布，但電腦運算無法產生。本研究先利用程式產生均勻隨機亂數 ( $\mathbf{ra}$ ) 且  $\mathbf{ra} \in [-1, 1]$ ，由於為均勻隨機亂數，故  $\langle \mathbf{ra} \rangle = 0$ ，又令：

$$\langle \mathbf{F}_i^B(t) \mathbf{F}_j^B(t) \rangle = \langle \alpha^2 (\mathbf{ra})_i^2 \rangle = \alpha^2 \frac{\int_{-1}^1 \mathbf{ra}^2 P(\mathbf{ra}) d\mathbf{ra}}{\int_{-1}^1 P(\mathbf{ra}) d\mathbf{ra}} = \frac{2k_B T \zeta}{\delta t} \quad (3-4)$$

其中 $\alpha$ 為常數， $P(\mathbf{ra})$ 為此值出現之機率，由於是均勻亂數，故 $P(\mathbf{ra})$ 為定值 1/2，因此 $\alpha = \sqrt{\frac{6k_B T \zeta}{\delta t}}$ ，則當此隨機亂數乘上 $\alpha$ 後，會同時符合 Eq. (3-2)、Eq. (3-3)

$$\mathbf{F}_i^B = \sqrt{\frac{6k_B T \zeta}{\delta t}} (\mathbf{ra})_i \quad (3-5)$$

其中  $(\mathbf{ra})_i$  為包含三維方向之向量，其每一維度  $j$  之大小由亂數產生且範圍為  $(\mathbf{ra})_i^j \in [-1,1]$ 。

Eq. (3-1) 中的  $\mathbf{F}_i^S(t)$  項會受相鄰連接的彈簧力影響，也就是說頭尾的球只會受到單一彈簧力，其餘的皆會受到前後的彈簧影響，如 Eq. (3-6) 所示：

$$\mathbf{F}_i^S = \begin{cases} \mathbf{f}_{l,2}^S \\ \mathbf{f}_{i,i+1}^S + \mathbf{f}_{i,i-1}^S & 1 < i < N_b \\ \mathbf{f}_{N_b,N_b-1}^S \end{cases} \quad (3-6)$$

其中  $N_b$  為模擬 DNA 的球個數，模擬 DNA 之連接第  $i$  球與第  $j$  球的彈簧力  $\mathbf{f}_{ij}^S$  可以 Marko-Sigga 彈簧表示之[36]：

$$\mathbf{f}_{ij}^S = \frac{k_B T}{A_{eff}} \left\{ \frac{r_{ji}}{l} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{r_{ji}}{l}\right)^2} \right\} \frac{\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i}{r_{ji}} \quad (3-7)$$

Eq. (3-1) 的  $\mathbf{F}_i^{EV}(t)$  項體積排斥效應，DNA 上的每個球彼此間都會相互影響。根據 Jendreck *et al.*[37-39] 以軟球模型計算出每兩球之間的位能為：

$$U^E(r_{ji}) = \frac{1}{2} v^{EV,p} k_B T N_{K,S}^2 \left( \frac{9}{2\pi \langle R_S^2 \rangle_0} \right)^{3/2} \exp \left( \frac{-9r_{ji}^2}{2 \langle R_S^2 \rangle_0} \right) \quad (3-8)$$

其中  $v^{EV,p}$  為排斥體積大小參數， $N_{K,S}$  為每根彈簧含有之 Kuhn segment 個數， $R_S$  為彈簧在平衡狀態下之首尾長度，由  $\mathbf{F} = -\partial U / \partial \mathbf{r}$  可以推得施加於第  $i$  個球上之體積排斥力，且由 Eq.(2-18) 簡化，彈簧首尾長度可以替換為  $\langle R_S^2 \rangle_0 = 2lA_p$ ，因此體積排斥力總和  $\mathbf{F}_i^{EV}$  為：

$$\mathbf{F}_i^{EV} = - \sum_{j=1(j \neq i)}^{N_b} \frac{9}{2} v^{EV,p} \frac{k_B T}{l^5} \left( \frac{3}{4\sqrt{\pi}} \right)^3 \frac{9}{v^2} \exp \left( \frac{-9vr_{ji}^2}{4l^2} \right) \mathbf{r}_{ji} \quad (3-9)$$

其中  $v = l/A_p$  為每根彈簧含有之堅韌長度 ( $A_p$ ) 個數且為  $N_{K,S}$  兩倍。

於本研究中，我們將力平衡方程式無因次化來進行模擬，且以下列參數無因次化：

$$\hat{r} \equiv \frac{r}{l}, \quad \hat{t} \equiv \frac{t}{\zeta l^2 / k_B T}, \quad \hat{\mathbf{E}} \equiv \frac{\mathbf{E}}{E_0}, \quad \lambda \equiv \frac{A_{eff}}{A_p}, \quad \nu \equiv \frac{l}{A_p}, \quad \hat{\mathbf{f}}(\hat{\mathbf{r}}) \equiv \frac{\mathbf{f}(\mathbf{r})l}{k_B T} \quad (3-10)$$

其中  $E_0$  為 DNA 入口處的電場大小（此處電場梯度趨近於零）， $\lambda$  為有效堅



韌長度與堅韌長度的比值，Eq. (3-1) 無因次化後：

$$\frac{d\hat{\mathbf{r}}_i}{dt} = Pe\hat{\mathbf{E}}(\hat{\mathbf{r}}_i) + \hat{\mathbf{F}}_i^B + \hat{\mathbf{F}}_i^S + \hat{\mathbf{F}}_i^{EV} + \hat{\mathbf{F}}_i^{EV,wall} \quad (3-11)$$

其中  $Pe = \mu^b E_0 l / D$  為球的 Peclet number， $D$  為球的擴散係數  $k_B T / \zeta$ ，因此 Eq.

(3-5)、(3-6)、(3-7)、(3-9)的無因次式為：

$$\hat{\mathbf{F}}_i^B = \sqrt{\frac{6}{\delta t}} (\mathbf{r}\mathbf{a})_i \quad (3-12)$$

$$\hat{\mathbf{f}}_{i,j}^S = \frac{\nu}{\lambda} \left\{ \hat{r}_{ji} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4(1-\hat{r}_{ji})^2} \right\} \frac{\hat{\mathbf{r}}_j - \hat{\mathbf{r}}_i}{\hat{r}_{ji}} \quad (3-13)$$

$$\hat{\mathbf{F}}_i^S = \begin{cases} \hat{\mathbf{f}}_{l,2}^S \\ \hat{\mathbf{f}}_{i,i+1}^S + \hat{\mathbf{f}}_{i,i-1}^S & 1 < i < N_b \\ \hat{\mathbf{f}}_{N_b,N_b-1}^S \end{cases} \quad (3-14)$$

$$\hat{\mathbf{F}}_i^{EV} = - \sum_{j=1 (j \neq i)}^{N_b} \frac{9}{2} \hat{v}^{EV,p} \left( \frac{3}{4\sqrt{\pi}} \right)^3 v^{\frac{9}{2}} \exp\left(\frac{-9v\hat{r}_{ji}^2}{4}\right) \hat{\mathbf{r}}_{ji} \quad (3-15)$$

在模擬過程中，球之運動有可能穿越裝置之邊界，這在現實世界是不合理之情況，為了消除此現象，根據 Heyes 和 Melrose[40]之文獻來預防球穿越邊界之現象發生，此模型已經廣泛地被應用到碰撞模擬[2-4]，其內容主要是在發生球穿越邊界之情況下，直接將此球之中心推到距離邊界最近之點上（圖 3-2）：

$$\Delta \hat{\mathbf{r}}_i^{HM} = \Delta \mathbf{p}_i H(\Delta p_i) \quad (3-16)$$

其中  $\Delta \hat{\mathbf{r}}_i^{HM}$  為球之中心至距離邊界最近點之向量， $\Delta p_i$  為球中心到邊界最近點之距離大小， $\Delta \mathbf{p}_i$  為球中心至邊界最近點之方向向量。

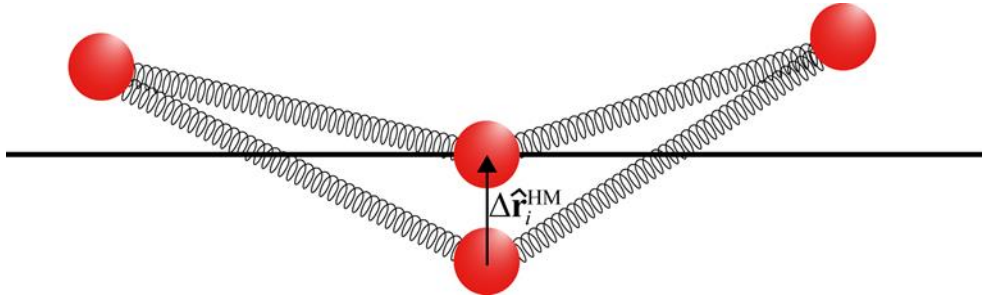


圖 3-2 當球之運動穿越裝置邊界時，將此球之中心推到距離邊界最近之點上。

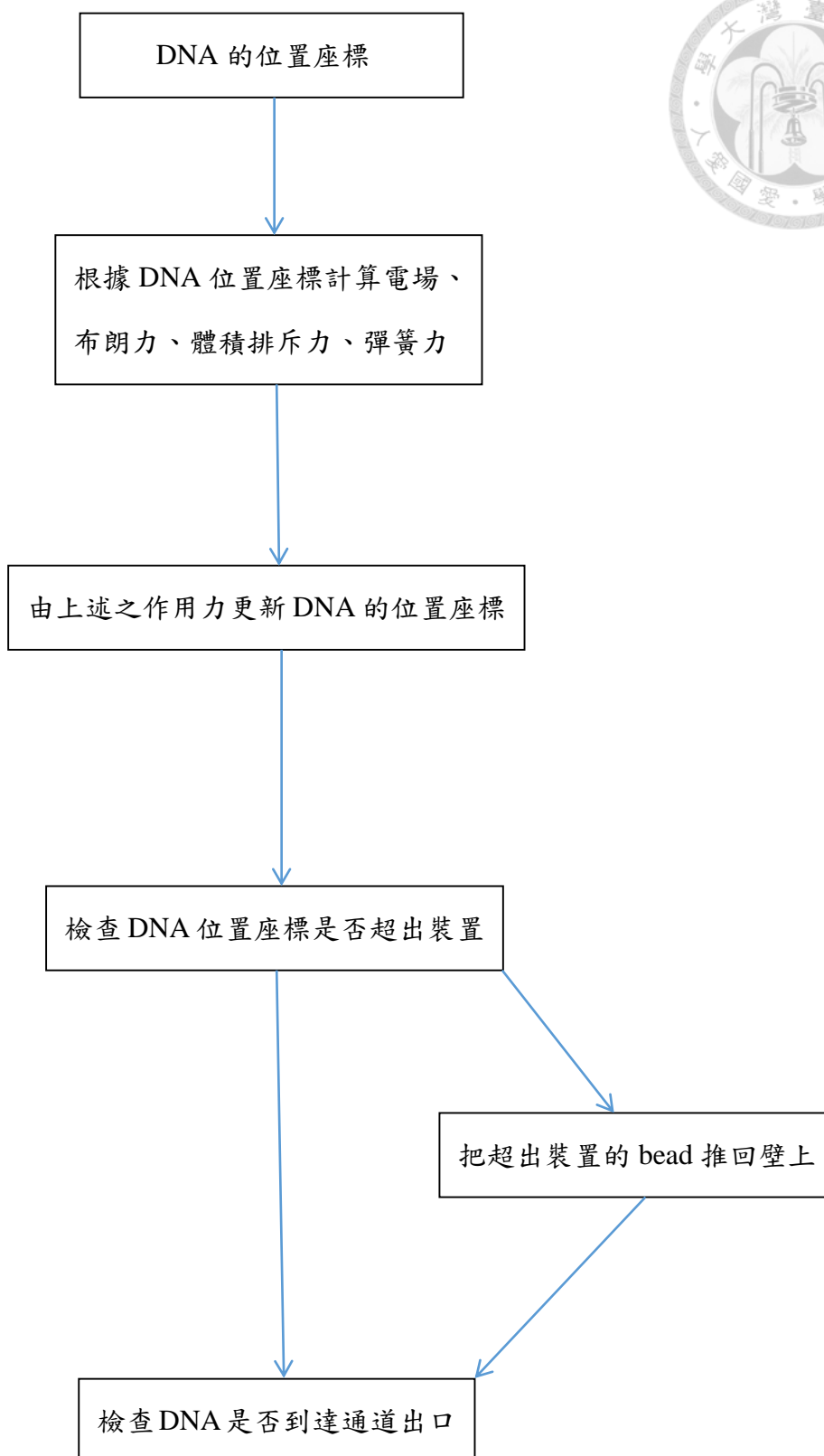


圖 3-3 模擬流程圖

### 3.2 有限元素法 (Finite Element Method)

本研究之微流道中，含有週期性六角陣列排列的圓柱障礙物，且由於障礙物為絕緣，造成微流道中電場非為均一的，而存在各種不同電場梯度，因此流道內各處的電場值都不同，需要特殊的方法來求得龐大的計算量。

有限元素法可以將偏微分方程式以代數方程式求出近似解的數值方法。我們所使用的微流道中，示意圖如圖 3-4，微流道為一 X 和 Y 方向延伸之幾何圖形，Z 方向高度很小，故電場在 Z 方向之分布可視為無電場變化，電場分布上可看成只受 X 與 Y 之位置影響即電場為 X 與 Y 之函數，故使用二維模型計算電場。

由於此研究之微流道為一周期性重複的幾何形狀，為了減少資料庫需計算的數量以及所需計算時間，先找出一單體部分(如圖 3-4 下側的放大圖)，僅計算該部分內電場分布，在應用於整個微流道中。

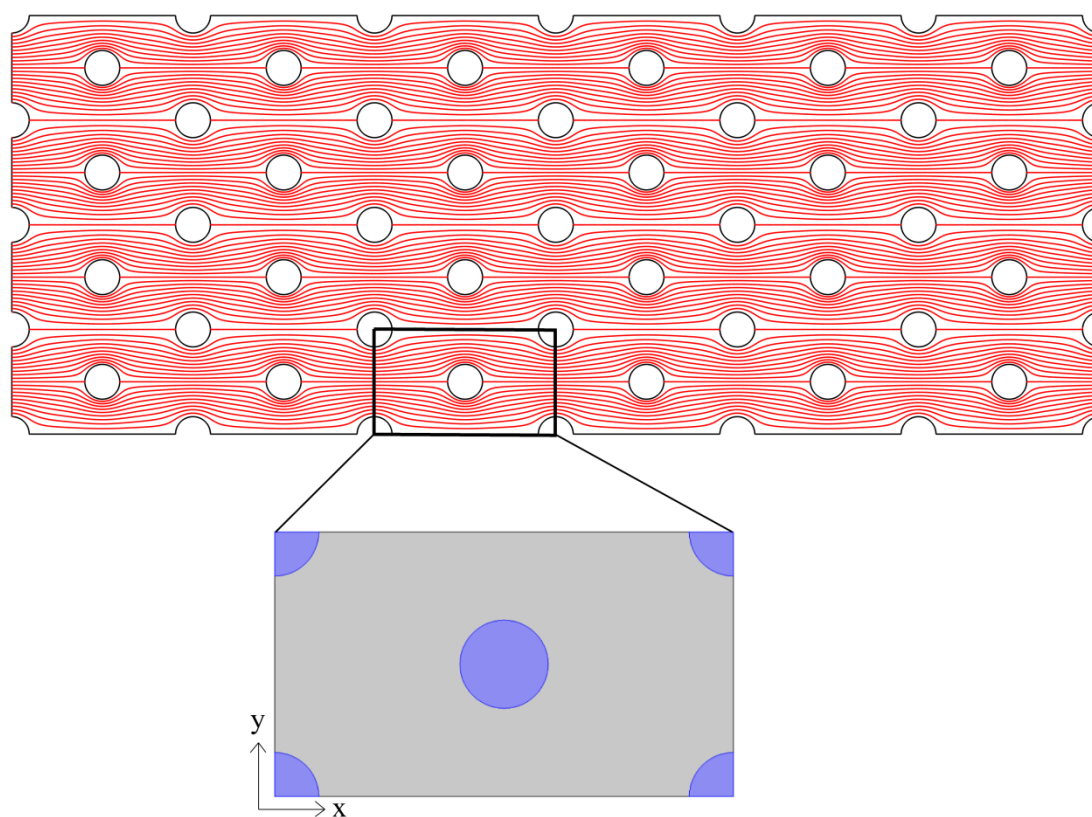


圖 3-4 本模擬所使用微流道之部分擷取示意圖，下方放大處為單一單體的型態，

可視為所有流道均為此單體組合而成。



在計算單體幾何圖形內電場分布上，考慮其電場與電位之關係：

$$\mathbf{E} = -\nabla\Phi \quad (3-17)$$

其中  $\Phi$  為電位，其裝置內部電位之統御方程式為 Laplace equation：

$$\nabla^2\Phi = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (3-18)$$

其中  $\Omega$  為 FEM 之求解域，其入口邊界和出口邊界條件設定為：

$$\Phi = \Phi_{given} \quad (3-19)$$

其中  $\Phi_{given}$  為給定之入口處電位，將決定於所需模擬的電場值；出口處邊界條件則設為接地，亦即  $\Phi_{given} = 0$ 。

因不同幾何元素間在與 x 軸平行的邊界上不會有電位差，也就是說不應有電力線通過上下邊界，因此將上下邊界設定為絕緣：

$$\frac{\partial\Phi}{\partial\mathbf{n}} = 0 \quad (3-20)$$

其中  $\mathbf{n}$  為邊界上之法向量。

以左邊界為例，若球移至左邊界外，則可視為球進入另一單體元素的右邊界，此處的電場值即為右邊界的電場值，四個方向的邊界以此類推，如此即可將單體元素所計算的電場應用在整個流道中。

在二維運算上的有限元素法，主要是將欲計算之空間切割成許多不規則之三角形元素（圖 3-5），其中在障礙物與流道的邊界處的三角形元素會被劃分的更細。

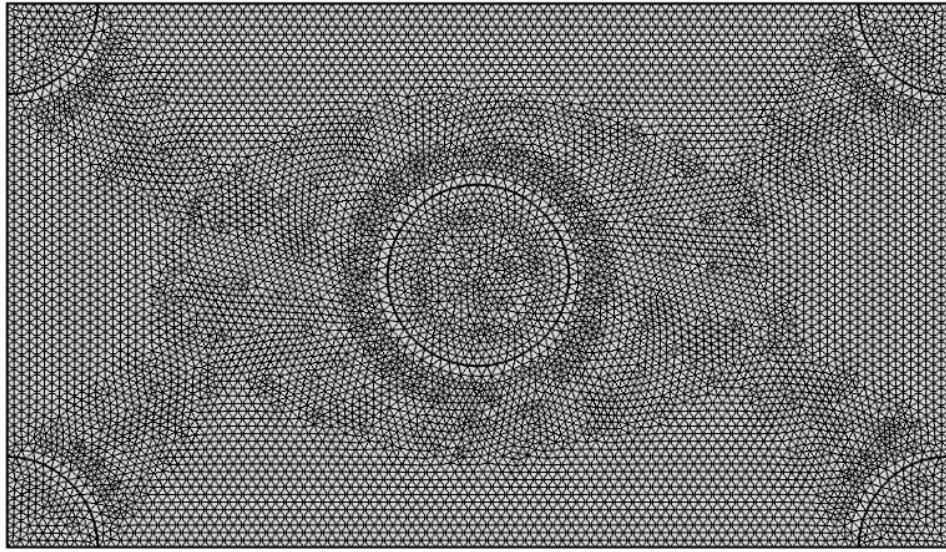


圖 3-5 使用 COMSOL 規劃有限元素網格之示意圖。

為了更方便且有效率進行 FEM 之運算，本研究使用 COMSOL 此商業軟體將所設計之裝置進行 FEM 元素規劃並且求出每個元素節點之電場值，本研究設定 FEM 之元素為三角形且形狀函數為線性函數，因此元素內部任意位置 $(x, y)$ 與電場值 $(\psi)$ 之關係為[41]：

$$\psi(x, y) = \alpha_1 + \alpha_2 x + \alpha_3 y \quad (3-21)$$

其中 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 為形狀函數參數，將三角元素三個節點之電場大小與位置座標代入 Eq. (3-21)，則：

$$\begin{cases} \psi_1 = \alpha_1 + \alpha_2 x_1 + \alpha_3 y_1 \\ \psi_2 = \alpha_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 y_2 \\ \psi_3 = \alpha_1 + \alpha_2 x_3 + \alpha_3 y_3 \end{cases} \quad (3-22)$$

其中 $\psi_i$ 為元素節點上之電場值，為 COMSOL 利用 Eq. (3-17), (3-18), (3-19), (3-20) 求出數值解所得， $x_i$ 、 $y_i$ 為節點座標，求出 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 並整理過後，可以得出：

$$\psi(x, y) = N_1 \psi_1 + N_2 \psi_2 + N_3 \psi_3 \quad (3-23)$$

其中 $N_i$ 為：

$$\mathbf{n}_{b,i} = N_i \mathbf{n}_i$$

$\mathbf{n}_{b,i}$ 、 $\mathbf{n}_i$  如圖 3-6 所示，且  $N_i$  總和為 1，因此藉由 COMSOL 輸出之資料與此內插法便可輕易地進行內插，並且求出元素內部任意點之電場大小。

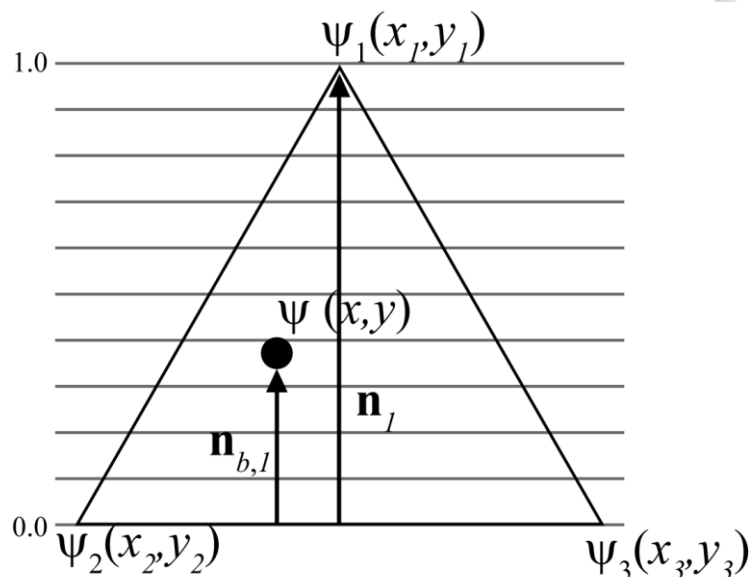


圖 3-6 有限元素法元素內差數值方法之示意圖。

### 3.3 FEM 連結 BD

由前述章節，本研究之模擬模型主要包含 BD 與 FEM 兩大部分，BD 方面主要是使用 Fortran 作為主要發展平台，而 FEM 是使用 COMSOL 來做運算並且輸出 FEM 元素結構與節點資料並做內差求出元素內任意點之值，然而由圖 3-7 可以發現，其內部元素之結構為不規則三角形組合而成，故必須先定位出所求位置之所在元素，以最簡單之直接搜尋法來講，即將整個系統之所有元素逐一判斷，然而在本系統設定下，約包含  $10^4$  個元素，每個 bead 需要定位一次，則以直接搜尋法定位每一個時間步階需要定位  $N_b \times 10^4$  次，因此使用可以快速定位任一位置所在之元素的演算法可以節省許多時間。本研究中所使用之搜尋定位演算法引用 [42]，其方法如下：

1. 先建立一虛擬之矩形網格覆蓋於有限元素網格上。每個矩形網格必須同

樣大小，然後統計每個虛擬矩形網格內可能出現之不規則三角元素並且記錄儲存成資料庫。例如圖 3-6 中網格 (3,3) 包含  $e^1$ 、 $e^2$  的元素。

2. 將欲定位之點 A 先在虛擬矩形網格上定位，由於每個矩形網格之長寬大小固定，因此步驟只需經由兩次計算便可定位完畢。例如圖 3-6 中黑點位於網格 (3,3)。
3. 定位出 A 所在的矩形網格之後，再利用第 1 步所建立之資料搜尋所在網格內可能之元素，如此可以將搜尋步驟減低至 5 次以下。例如於網格 (3,3) 中，最多只需再搜尋兩次即可精準定位出 A 所在之不規則三角元素  $e^1$ 。
4. 由上述步驟可知，此虛擬矩形網格定位法之關鍵在於所建立之虛擬網格尺寸，尺寸越小則每一虛擬網格內可能之三角元素會越少，運算需求量也跟著遞減，然而所耗費之電腦記憶體則越大，因此在效率上，矩形網格之尺寸必須小於最大之三角元素。

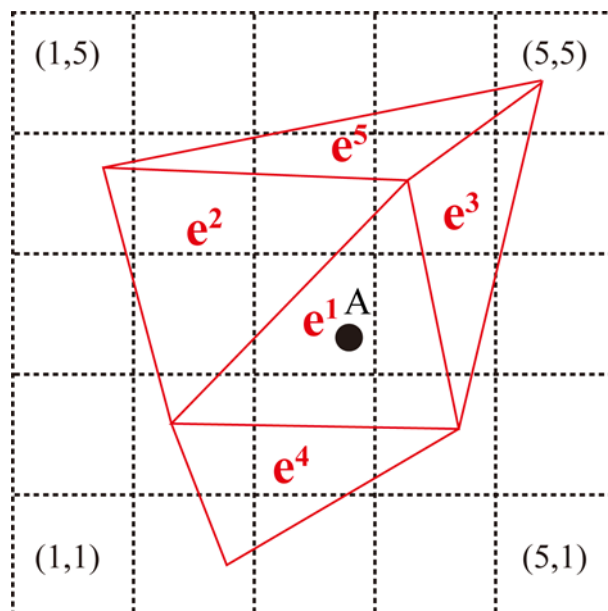


圖 3-7 使用虛擬網格法，規劃各元素所在虛擬矩形網格之示意圖。 $e^1$ 、 $e^2$ ... $e^5$  為有限元素網格，(1,1)...(5,5) 為虛擬矩形網格編號。

### 3.4 時間步階

系統時間進程之規劃，根據 Eq. (3-11)可運算出 DNA 之運動路徑，且整個系統使用 explicit time forwarding：

$$\hat{\mathbf{r}}_i(\hat{t} + d\hat{t}) = \hat{\mathbf{r}}_i(\hat{t}) + [Pe\hat{\mathbf{V}}(\hat{\mathbf{r}}_i) + \hat{\mathbf{F}}_i^B + \hat{\mathbf{F}}_i^S + \hat{\mathbf{F}}_i^{EV} + \hat{\mathbf{F}}_i^{EV,wall}]d\hat{t} \quad (3-25)$$

時間步階長短之設定必須考量模擬過程中是否有不合理現象之產生，例如彈簧產生過度拉伸之現象[37-39]，但時間步階的增加可減少程式的運算量。此研究中，因電場驅動力直接的與每一步階 DNA 所移動的距離正相關，更增加了彈簧過度拉伸的可能性。在此引用且調整了 J. Cho, K. D. Dorfman [16]文獻中的參數，將整個過程分為 3 個步驟：

1. 先將鬆弛狀的 DNA 放置於不含障礙物的溶液中，使 DNA 僅受到布朗力的影響，以時間步階  $\hat{t} = 10^{-4}$  模擬  $10^5$  步。
2. 將 DNA 放入含障礙物的流道中，不開啟電場，使 DNA 在流道中仍僅受布朗力，時間步階為  $\hat{t} = 10^{-4}$ ，對於 T4-DNA 模擬  $10^5$  步； $\lambda$ -DNA 則模擬  $10^4$  步。
3. 經過兩步驟的前序作業，此時開啟電場進行電泳模擬，以 T4-DNA 而言以  $\hat{t} \times Pe = 6 \times 10^{-5}$  決定不同 Pe 下的時間步階大小，意即時間步階與 Pe 成反比； $\lambda$ -DNA 則是以  $\hat{t} \times Pe = 1.6 \times 10^{-4}$  來決定。

表 3-1 為此研究所模擬的 Pe 下所使用的時間步階。

表 3-1 模擬 DNA 從平衡態達穩態所用之時間步階

Pe	0.8	1.2	1.81	2.5
時間步階(T4)	$7.50 \times 10^{-5}$	$5.00 \times 10^{-5}$	$3.31 \times 10^{-5}$	$2.40 \times 10^{-5}$
時間步階( $\lambda$ )	$2.00 \times 10^{-4}$	$1.33 \times 10^{-4}$	$8.84 \times 10^{-5}$	$6.4 \times 10^{-5}$
Pe	3.0	4.0	5.0	6.0



時間步階(T4)	$1.67 \times 10^{-5}$	$1.25 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-5}$	$2.00 \times 10^{-5}$
時間步階( $\lambda$ )	$2.00 \times 10^{-5}$	$1.50 \times 10^{-5}$	$1.20 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-5}$

### 3.5 參數設定測試

以 bead-spring model 模擬同一種 DNA 時，球之個數常隨模擬所要求之精準度而有所不同，因此每根彈簧所代表的 DNA 片段長度則會有所不同，則彈簧的彈力係數也要跟著做調整[2, 43]，使得所模擬 DNA 的全域性質 (global property) 不會改變。在本研究中，固定 DNA 長度但改變彈簧數時，模擬 DNA 之首尾長度  $\langle R_F^2 \rangle_0$  會改變。為矯正此偏差，我們藉由調整 DNA 之堅韌長度來達到改變彈簧位能，便使模擬 DNA 之  $\langle R_F^2 \rangle_0$  與實驗值相同。

$$\langle R_S^2 \rangle_0 = \frac{\int_0^l r^4 \exp[-U_{eff}(r)/k_B T] dr}{\int_0^l r^2 \exp[-U_{eff}(r)/k_B T] dr} = 2lA_p \quad (3-26)$$

$$U_{eff} = k_B T \left( \frac{l}{A_{eff}} \right) \left\{ \frac{(r/l)^2}{2} - \frac{(r/l)}{4} + \frac{1}{4(1-(r/l))} \right\} \quad (3-27)$$

從 Eq. (3-26)、Eq. (3-27) 之關係，即可得出對於同一種 DNA 以不同球數模擬時，彈簧所具有之有效堅韌長度 ( $A_{eff}$ ) (表 3-2)，以此模式調整後，由於 DNA 是由彈簧所擬似，因此可以藉由彈簧的矯正使得模擬 DNA 的全域性質趨近現實 DNA 之實驗值。

於本研究中  $\lambda$ -DNA 使用 37 個球、T4-DNA 使用 126 個球，由 Eq. (3-26)、Eq. (3-27) 之關係可得到在這樣的兩 DNA 球數組合下，兩 DNA 的  $l$  與  $A_{eff}$  是幾乎相等的。我們在關閉體積排斥力之後量測 DNA 於平衡態時的首尾長度平方之平均值  $\langle R_F^2 \rangle_0$ ，除了彈簧之外，排斥體積大小參數 ( $v^{EV,p}$ ) 設定為  $0.0004 \mu\text{m}^3$ 。在這些參數設定下，我們模擬並計算 DNA 於平衡狀態下的質心半徑， $\lambda$ -DNA 的質心半徑為  $0.75 \mu\text{m}$ ，T4-DNA 在我們的系統中，質心半徑為  $1.56 \mu\text{m}$ ，本系統在上述參數設定下， $\lambda$ -DNA 之無因次鬆弛時間模擬結果為 4.03，T4-DNA 之無因次鬆弛時間模擬結果為 46.91，與 J. Cho, K. D. Dorfman 文獻值非常接近。(如表 3-4)

表 3-2 T4-DNA 使用不同球數之 Bead-spring model 模擬時，其有效堅韌長度變化。

$N$	$L$	$l$	$A_{eff}$
18	72.9	4.0500	0.06032
62	72.9	1.1758	0.07282
125	72.9	0.5833	0.09766

表 3-3 本研究使用之參數，及在此參數下模擬出的纏繞半徑與無因次鬆弛時間。

DNA	N	L	$\ell$	$A_{eff}$	$R_g$	$\tau$
$\lambda$ -DNA	37	21.0	0.5833	0.09766	0.75	4.03
T4-DNA	126	72.9	0.5833	0.09766	1.56	46.91

表 3-4 不同 DNA 之無因次鬆弛時間與文獻對照表。

	$\lambda$ -DNA	T4-DNA
本系統	4.03	46.91
J. Cho, K. D. Dorfman[16]	4.07	47.00

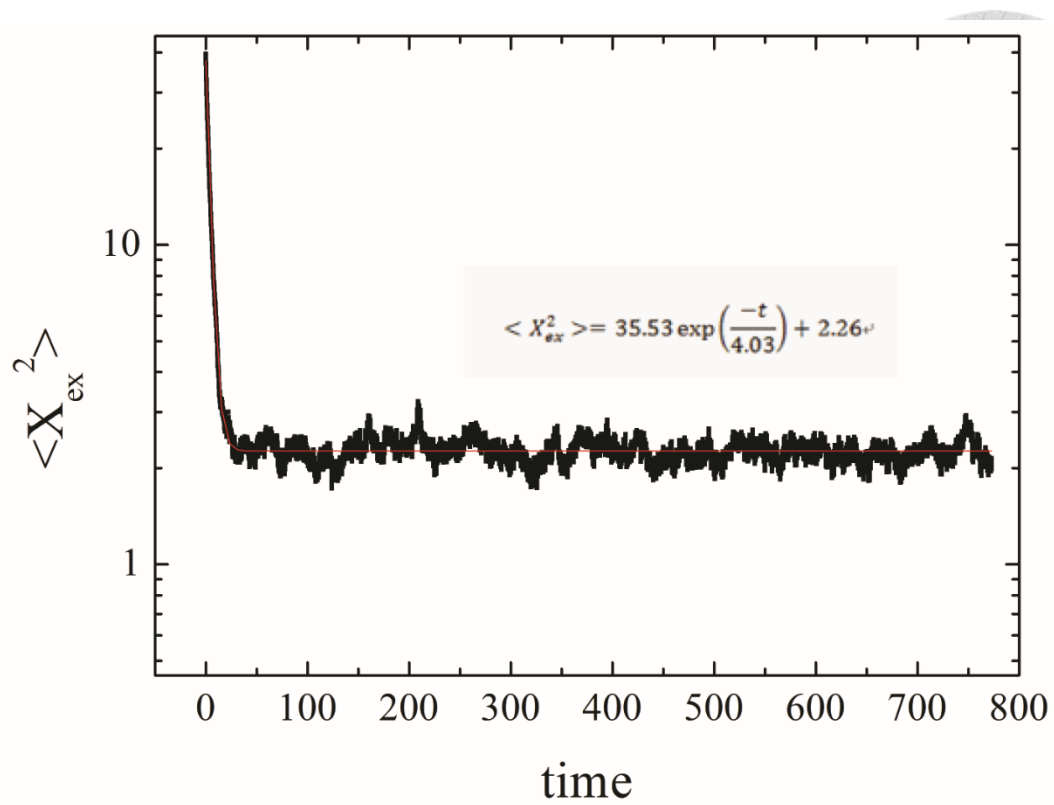


圖 3-8  $\lambda$ -DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法求出鬆弛時間為 4.03。

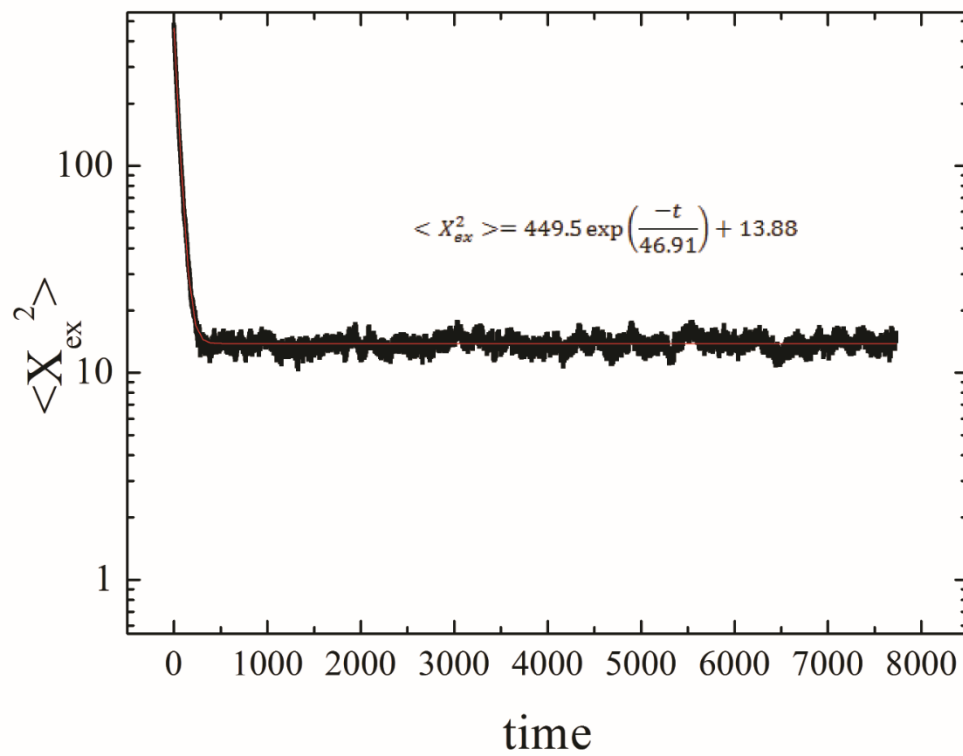


圖 3-9 T4-DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法求出鬆弛時間為 46.91。



### 3.6 以較短電泳長度參數擬合求得較長通道之分離解析度

實驗上 DNA 电泳長度往往在 15mm 左右的尺度，甚至超過 15mm，對於球與彈簧模型及布朗動態法的模擬來說，這樣的尺度需要花費數個星期的時間才能完成 100 個 DNA 的模擬，相當耗費時間成本。在 K. D. Dorfman[16]的文獻中电泳 1mm 得到电泳移動率和離散係數，與  $L_c=15\text{mm}$  一併代入式(2-26)，所得之分離解析度即為擬合後 15mm 的分離解析度，此法的正確性將於此節詳細驗證。

我們引述 4.3 節的某一參數下之模擬( $Pe=6$ ,  $t_{on}=0.25\text{s}$ ,  $t_{off}=0.893\text{s}$ )，以 5mm 做驗證，一為實際模擬 DNA 完成 5mm 微流道的电泳計算其电泳移動率、離散係數和分離解析度；另一為模擬 DNA 完成 1mm 微流道的电泳，將得到的电泳移動率和離散係數與  $L_c=15\text{mm}$  一併代入式(2-26)，再由式(2-27)計算得分離解析度。

表 3-5 為兩種方法的电泳移動率、離散係數和分離解析度列表；

表 3-5  $Pe=6$ ,  $t_{on}=0.25\text{s}$ ,  $t_{off}=0.893\text{s}$ ，實際模擬 5mm 的解析度與模擬 1mm 擬合 5mm

解析度之比較

	电泳移動率		離散係數		解析度
	$\lambda$ -DNA	T4-DNA	$\lambda$ -DNA	T4-DNA	
1mm 擬合	0.170	0.1503	0.0418	0.1268	1.238
5mm 模擬	0.168	0.1497	0.0508	0.1216	1.201

不論是分別 DNA 的 mobility 及 dispersion 值或最後計算出之解析度，兩種方法都非常相似的結果，由此可證實此種擬合方法之正確性，在电泳模擬上能省下很多時間的花費。

## 3.7 分析工具

為驗證模擬的正確性，除了輸出許多數據，更直接的方法就是將龐大的數據轉換成影像，更可以從 DNA 電泳行為的各種跡象來確認是否有模擬上的錯誤。



### 3.7.1 VMD(Visual Molecular Dynamics)

VMD 是伊利諾大學 (University of Illinois) 的電腦計算生物團隊 (Computational Biophysics Group) 開發的軟體，使用者可以從 VMD 的網頁免費下載軟體，並由網頁提供之學習手冊學習操作 VMD。VMD 可將如蛋白質、核酸、自我組裝之脂雙層等生物系統視覺化。VMD 除了可將分子用不同的顏色表示，亦可繪製簡單的卡通物件如點、線、圓柱、圓球等。另外，VMD 常用來分析 molecular dynamics (MD) 模擬的運動軌跡，觀察分子的動態行為。

當我們用 fortran 進行模擬時，我們可以每隔一段時間、或位置就紀錄一次 DNA 的座標，當我們把通道邊界畫好之後並將座標導入 VMD 之後，我們就可以觀測此 DNA 的行為。記錄一次座標為一個 frame，而在 VMD 中有握把可任意條動撥放 frame 的速度、倒帶，並把 frame 輸出成影片檔，但是我們只能從影像中得知 DNA 的位置，卻無法知道 DNA 各個 bead 之速度，且讀取檔案時須手動控制，所以嘗試把用 Matlab 編碼並導入數據。

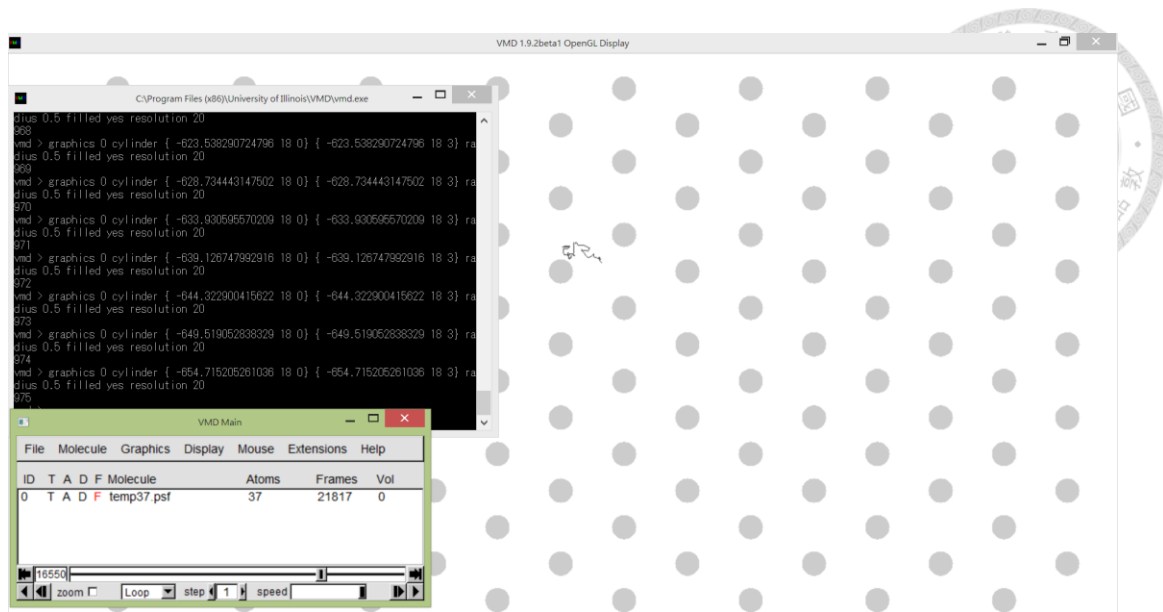


圖 3-10 VMD 工作視窗

## 第4章 結果討論



為了能在花費最少時間、最低製作與操作成本下，達到分離 DNA 的最佳化，我們嘗試模擬了數種不同的設備與操作方法。以下逐一做介紹：

首先先模擬與 J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]中相同的參數與通道，並對於結果進行比較，但文獻中有一誤植的參數，我們改正之後以正確的參數做模擬再比較，所使用的通道為六角陣列排列的絕緣圓柱障礙物(ordered hexagonal array of cylindrical insulated posts)，結果如 4.1。第二部分為增加 DNA 與障礙物之間的碰撞頻率，將絕緣障礙物改成數種不同程度的導電性障礙物，結果如 4.2。接著為了增加 DNA 與障礙物的有效碰撞頻率，我們將前述所使用的連續電場改為間歇式電場運用在 4.1 節含六角陣列排列的絕緣圓柱障礙物微流道中，也就是設定一電場開關的周期使得 DNA 可以進行鬆弛進而增加 DNA 在垂直電場驅動方向的投影長度，針對一系列不同的電場開關時間作模擬，結果如 4.3。除此之外再將間歇式電場應用於另外設計的圓柱障礙物柵欄(cylindrical posts fence)中電泳，欲更有效增加 DNA 鬆弛的效果，針對柵欄間不同的距離進行討論，如 4.3.3。

### 4.1 含六角陣列排列之絕緣圓柱障礙物之微流道的電泳分離

J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]中，所使用絕緣圓柱障礙物，以六角陣列排列於微流道中，其中障礙物的直徑為  $1\mu\text{m}$ ，兩兩相鄰障礙物圓心距為  $3\mu\text{m}$ ，部分微流道擷取圖如圖 4-1。

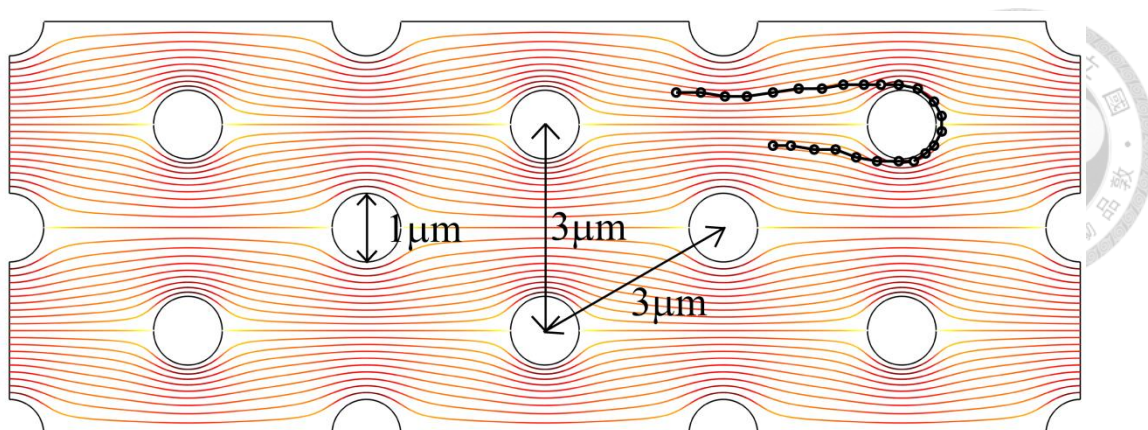


圖 4-1 含六角陣列排列的絕緣圓柱障礙物微流道之部分截取圖及其幾何形狀

但在文獻中[16]，作者將有效堅韌長度(effective persistence length)誤植為  $0.97652\mu\text{m}$ ，而實際上正確值為  $0.097652\mu\text{m}$ (有效堅韌長度詳細介紹於節 3.5)，因有效堅韌長度會影響 DNA 骨幹的硬度，進而影響鬆弛長度，加上未知文獻中的結果是否以此誤植的參數進行模擬而取得的，為求正確性我們再以正確參數模擬，並將我們的模擬結果與文獻的結果作比對。

此節使用的通道俯視圖如圖 3-4，以及絕緣的圓柱障礙物，分別對  $Pe=0.8, 1.2, 1.81, 2.5, 3, 4$  和  $5$  作 100 個  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 的電泳，記錄每個 DNA 通過 1mm 微流道所需之時間，再利用節 2.5.4.2 之方法求得各電場下的平均電泳移動率。



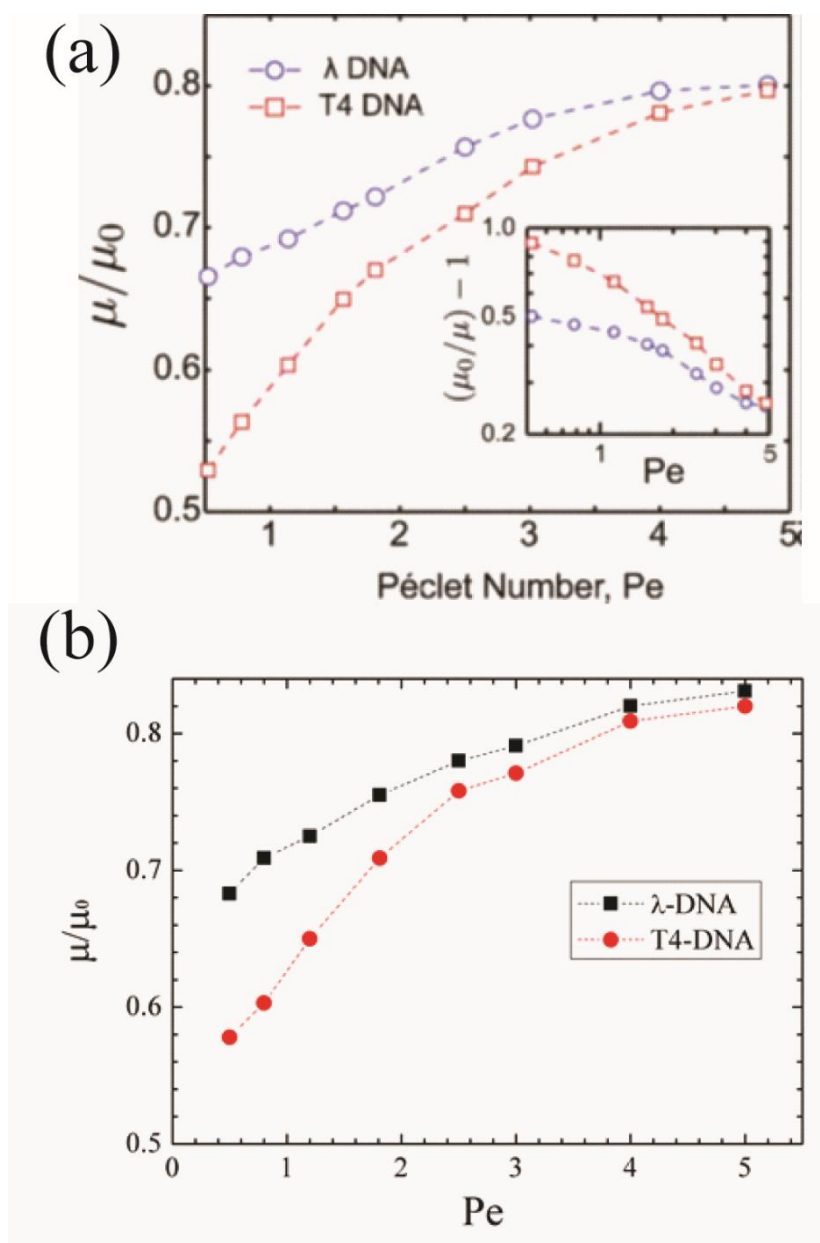


圖 4-2 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之無因次電泳移動率與  $Pe$  比較圖與(b)修正參數後之無因次電泳移動率與  $Pe$  比較圖

圖 4-2 為無因次電泳移動率與無因次電場的關係圖，其中  $\mu$  為 DNA 電泳移動率， $\mu_0$  為自由溶液中的電泳移動率，上方為文獻的結果而下面為我們校正有效堅韌長度之值後的結果。兩圖的圖型趨勢是相同的，都是隨著電場增加而電泳移動率增加，且是一開口向下的曲線。唯一不同的是修正參數之後的電泳移動率值全部較文獻高出少許。從物理上的角度分析，誤植的 10 倍大之有效堅韌長度

代表 DNA 是較正常 DNA 來說更堅硬的，因此平衡時的型態也較大，有更多的機會碰觸到障礙物，速度相對就會較慢。

接著利用各電場下各 DNA 通過 1mm 微流道的所需時間，利用節 2.5.4.3 中的方法求得各電場下的離散係數，以及與文獻的比較如圖 4-3。



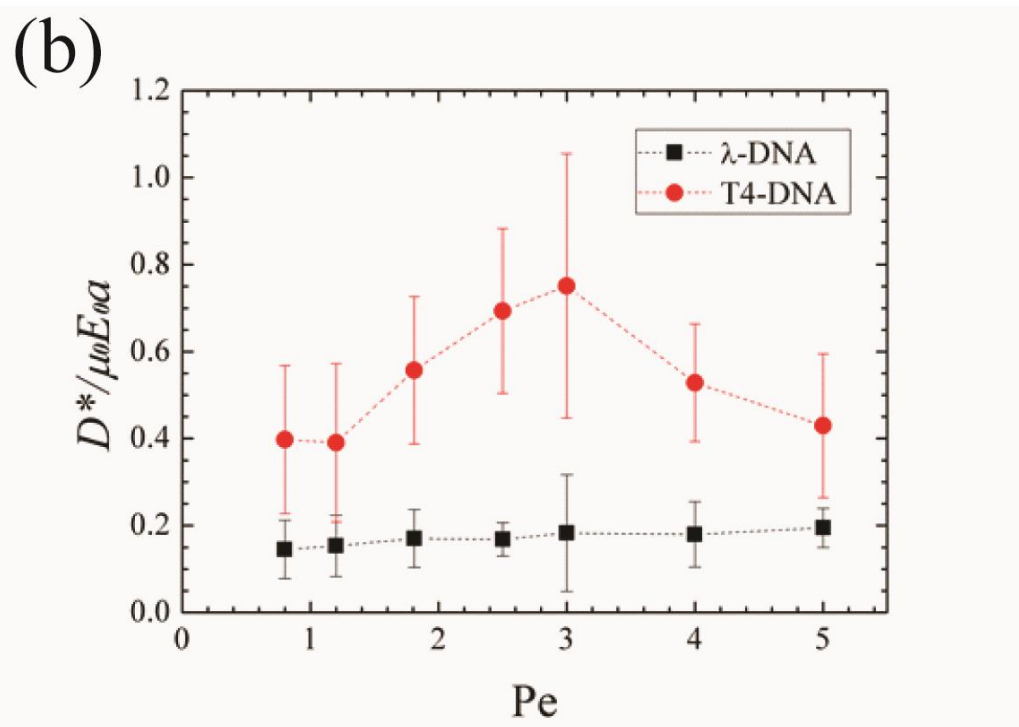
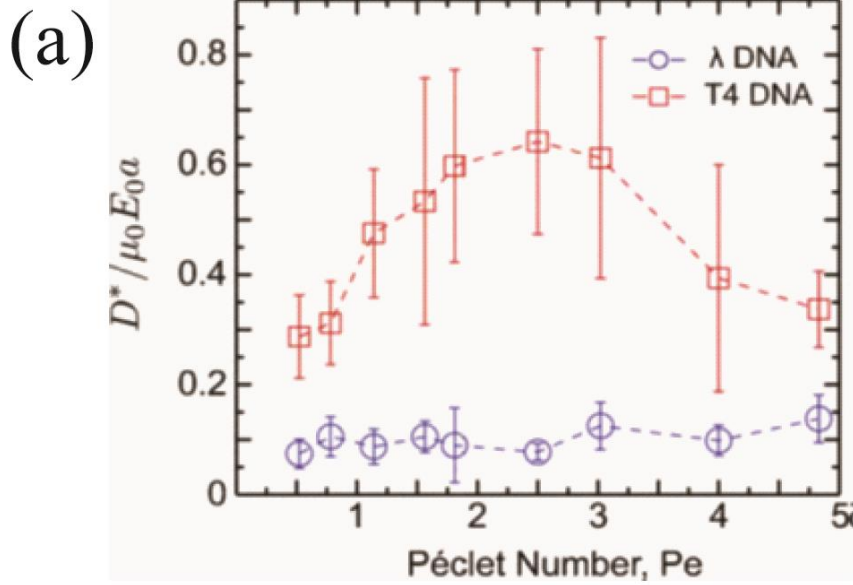


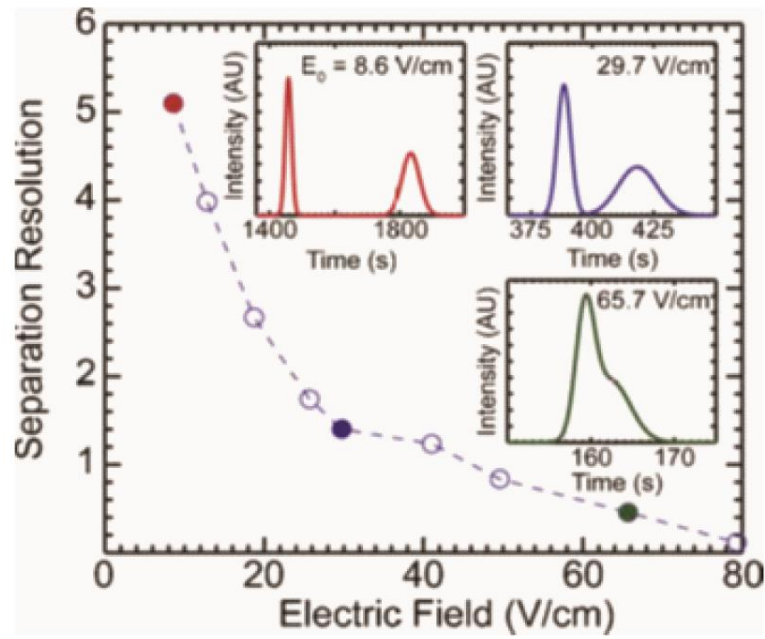
圖 4-3 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之無因次離散係數與 Pe 比較圖與(b)修正參數後之無因次離散係數與 Pe 比較圖

上圖中  $D^*$  為離散係數， $E_0$  為電場值， $a$  為相鄰障礙物間的圓心距，上兩圖中同樣可看出相似的趨勢， $\lambda$ -DNA 的離散係數較不受電場值的影響，且均較

T4-DNA 之離散係數低，而 T4-DNA 在中電場下的離散係數值較低電場與高電場大。而兩圖較明顯的不同在於修正參數後的離散係數值較文獻高出一些，也就是說 DNA 行為的差異性稍大一些。

求得電泳移動率和離散係數後，利用節 2.5.4.4 的方法求得分離解析度，並利用節 3.6 的方法以 1mm 電泳的電泳移動率和離散係數擬合出較長通道的分離解析度，文獻[16]與修正後分離解析度結果對電場的關係圖如圖 4-4。

(a)



(b)

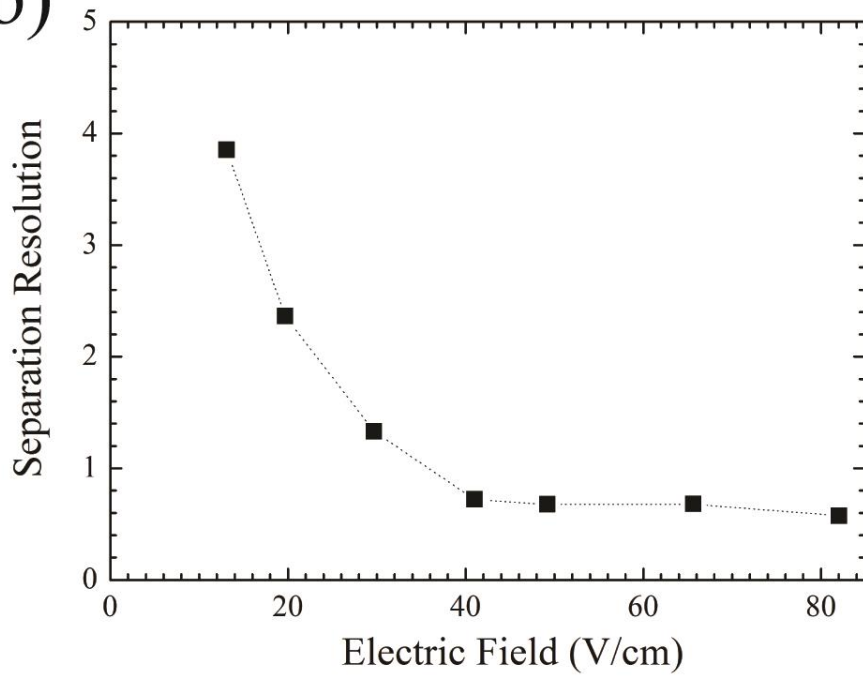


圖 4-4 (a)文獻[16]中以錯誤參數模擬之分離解析度與 Pe 比較圖與(b)修正參數後之分離解析度與 Pe 比較圖

以上兩圖也有相同的趨勢，說明文獻中的確有參數誤植的錯誤，同時也確認了我們模擬的正確性。

在此節的研究中，低電場下有很好的分離解析度，但在實驗上需花費相當多的時間(以  $Pe=0.8$  而言，完成 15mm 的電泳約需 18 小時才能完成)，如此的結果與凝膠電泳相比並沒有改善；反之高電場下分離解析度相當的差，完全無法進行分離，而造成這樣的現象之原因在於，高電場下 DNA 平行電場的對流輸送速率明顯大於布朗力造成的隨機方向之擴散輸送速率，因此 DNA 一旦進入了兩排障礙物間所形成的小通道便很難離開，進而能減少碰撞機率，如圖 2-16 的示意圖所示。這樣的原因我們從微流道內的電力線分布來作分析。

含絕緣障礙物的通道中，電場是繞過障礙物的，因此每當障礙物接近小通道的下緣時，DNA 會因電力線的變形而受到向上的電力；反之接近小通道的上緣時，DNA 會受到向下的電力，示意圖如圖 4-5。

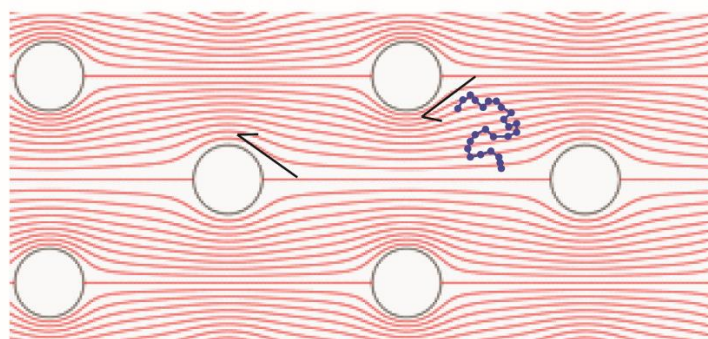


圖 4-5 DNA 在兩排障礙物的小通道內因電力線變形而無法在高電場下離開小通道而形成碰撞的原因。黑色箭頭方向為 DNA 流近圓柱障礙物時所受的電場方向，DNA 電泳方向由右向左。

為了解決碰撞過少的問題，我們從通道的電力線中下手，因此我們改變障礙物的導電度成導電，使得電力線向障礙物集中，如圖 2-30(c)，目的在於增加 DNA 碰撞到障礙物的機會。模擬結果如節 4.2。



## 4.2 六角陣列排列之導電性圓柱障礙物

此節的模擬著重於改變圓柱障礙物的導電度，評估其對 DNA 行為和分離解析度的影響。若圓柱障礙物導電度  $\kappa$  與微流道中導電液  $\kappa_0$  的比值小於 1，電力線會繞過障礙物，而當 DNA 接近障礙物時也會傾向於遠離它；反之則電力線會集中於障礙物，DNA 接近時傾向於碰撞障礙物；若恰好等於 1，則所有電力線會呈直線，DNA 接近障礙物時並不會有顯著的吸引或排斥。 $\kappa/\kappa_0=0, 1, 100, 1000$  的電力線圖如圖 4-6 表示：

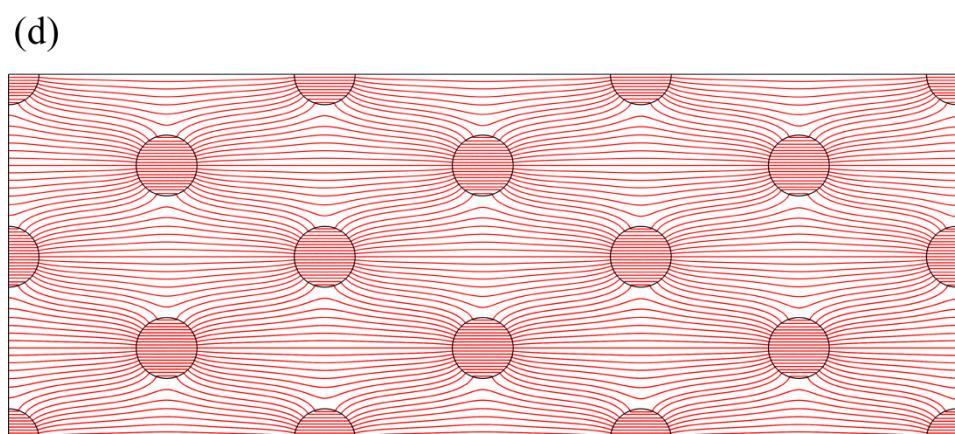
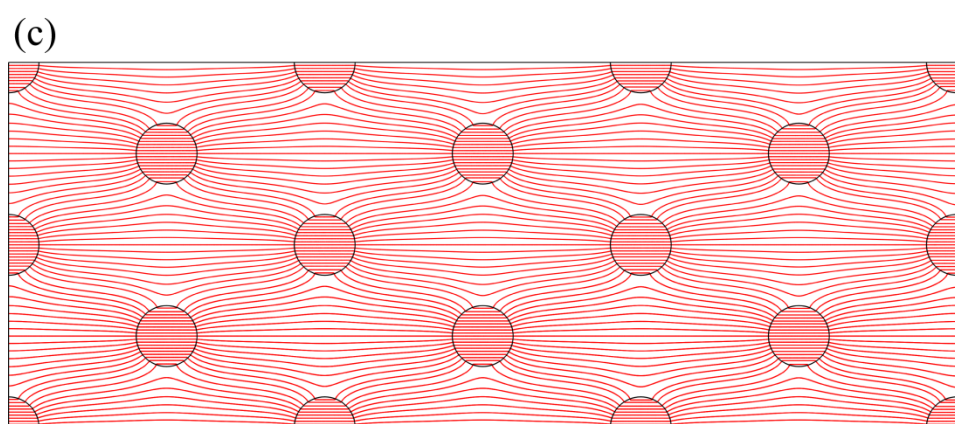
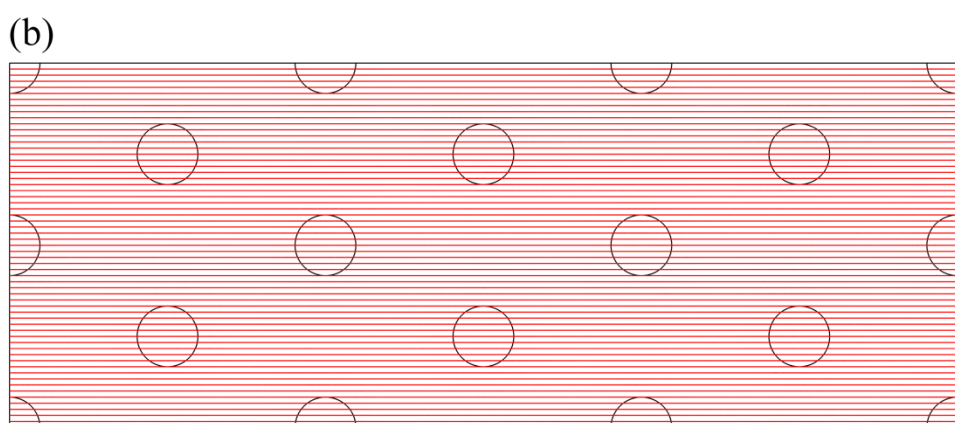
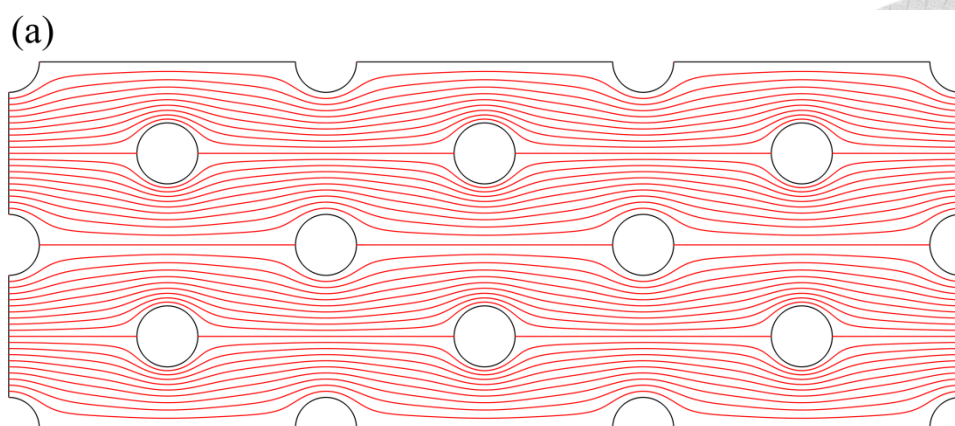




圖 4-6 在微流道中使用六角陣列的(a)絕緣圓柱障礙物， $\kappa/\kappa_0=0$  (b)圓柱障礙物與流體導電度相同， $\kappa/\kappa_0=1$  (c)圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=100$  (d)圓柱障礙物與流體導電度比值 $\kappa/\kappa_0=1000$  的電力線分布圖。

從電力線圖可看出，電力線確實繞過絕緣障礙物，且集中於導電障礙物，當障礙物導電度與自由溶液相同時電力線呈直線。另外，當 $\kappa/\kappa_0=100$  和 1000 的電力線的型態幾乎沒有變化，我們預期 DNA 的模擬結果也不會有明顯的差異，因此此節的模擬之 $\kappa/\kappa_0$  上限僅測量到 100。

第一我們先針對圓柱障礙物導電度與微流道中導電液的比值  $\kappa/\kappa_0=0, 0.01, 0.1, 1, 10$  及 100 的狀況下， $\lambda$ -DNA 在不同 Pe 下對於 mobility 的關係圖，如圖 4-7。

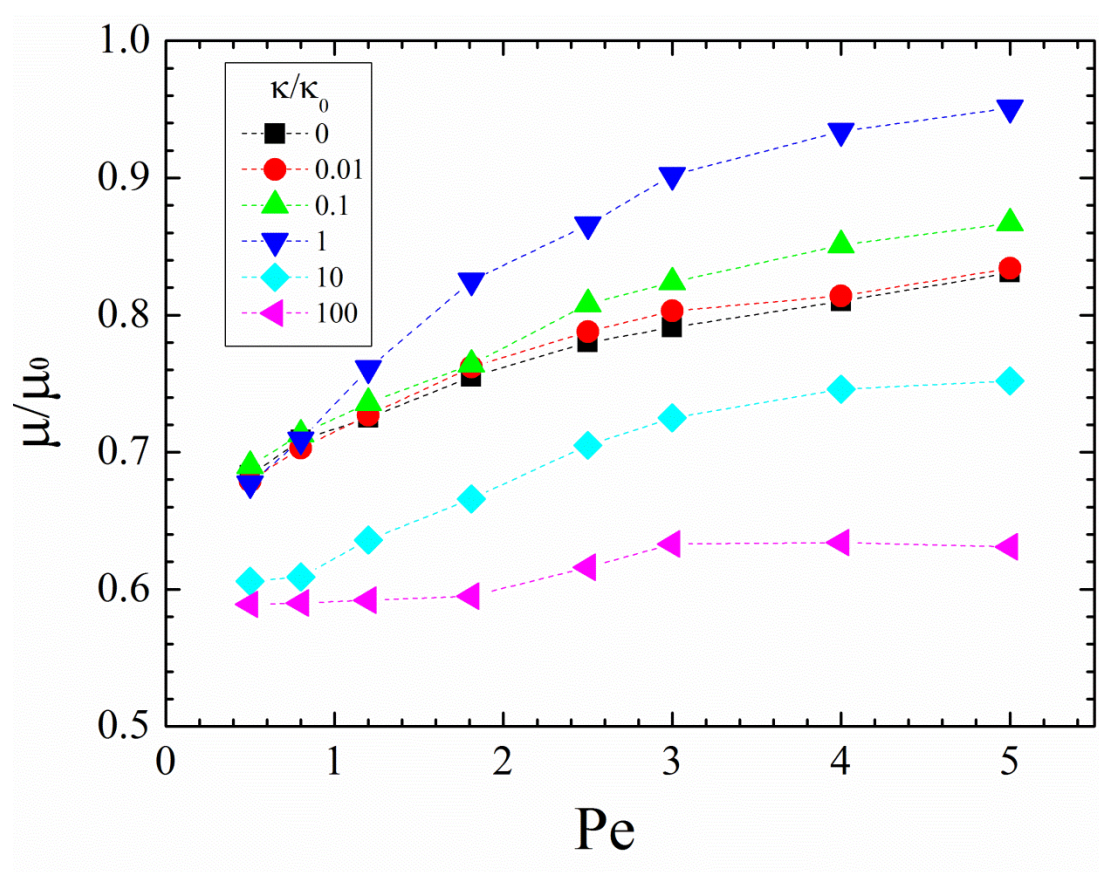


圖 4-7  $\kappa/\kappa_0$  和 Pe 對於  $\lambda$ -DNA 的電泳移動率的關係圖

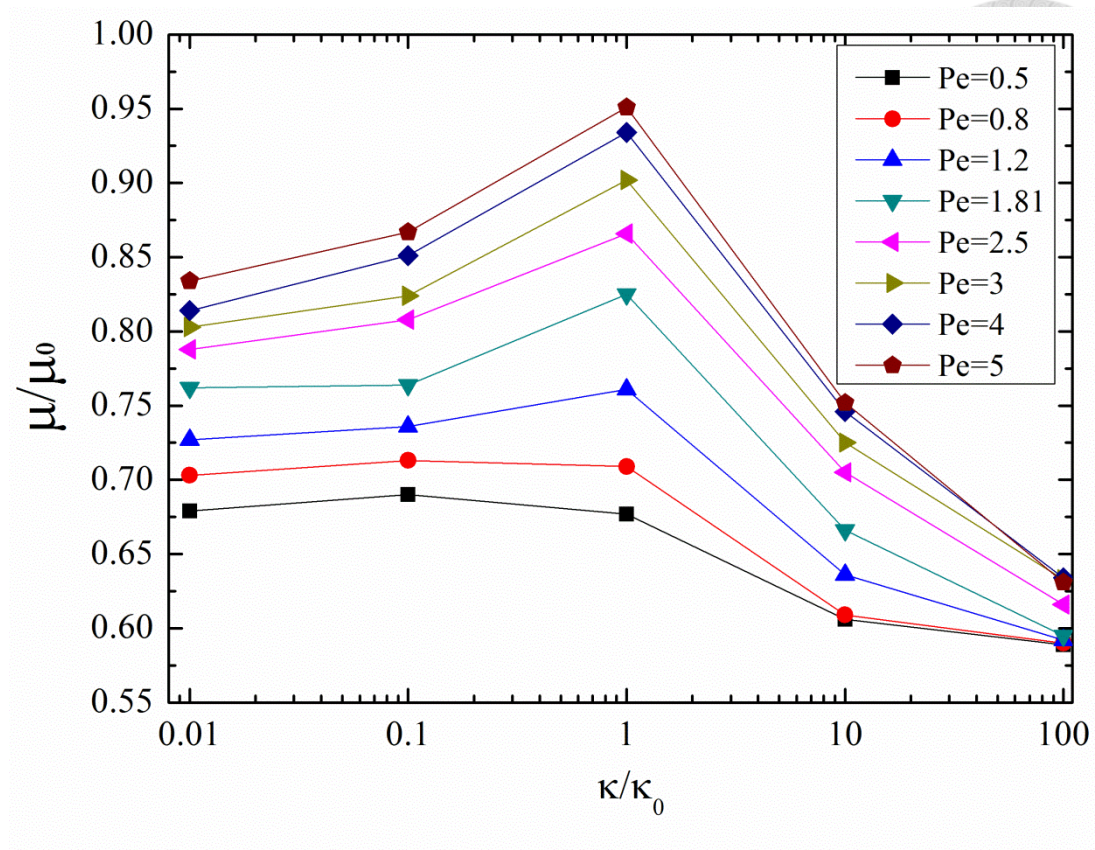


圖 4-8  $\kappa/\kappa_0$  和  $Pe$  對於  $\lambda$ -DNA 的電泳移動率的關係圖

結合不同導電度下的電場圖 4-6，與導電度對  $\lambda$ -DNA 之電泳移動率關係圖 4-7，針對三種區間的導電度， $\kappa/\kappa_0 < 1$ 、 $\kappa/\kappa_0 = 1$ 、 $\kappa/\kappa_0 > 1$  作討論。

首先討論  $\kappa/\kappa_0 = 1$ ，障礙物導電度與自由溶液的導電度值相同，電力線圖形如圖 4-6(b)，完全是筆直的型態，DNA 受到完全水平方向的電力線，能造成垂直電場方向的位移就只有溶劑粒子造成的隨機方向布朗力，因此 DNA 經過第一次脫鉤後幾乎以完全水平的方向流動，很少有機會可以形成碰撞造成移動較快，電泳移動率也因而較高。

對於  $\kappa/\kappa_0 < 1$ ，也就是障礙物導電度小於自由溶液時，電力線如圖 4-6(a)，均會有不同程度上遠離障礙物的情形， $\kappa$  越小遠離的程度就越大，這樣的電力線形狀造成了前述所提的 DNA 易流動於兩排障礙物間所形成的流道，難以流出，但也因為這樣的電力線造成了 DNA 有垂直電場方向的電場力，就較  $\kappa/\kappa_0 = 1$  容易形

成碰撞，降低了 DNA 的流速及電泳移動率。因此從  $\kappa/\kappa_0=0$  將障礙物導電度增加至  $\kappa/\kappa_0=1$  的過程中，DNA 的電泳移動率會增加。

最後討論  $\kappa/\kappa_0>1$  的狀況，電力線如圖 4-6(c)，有不同角度上集中於障礙物的情形， $\kappa$  越大集中的程度就越大，而這樣的形狀會造成 DNA 流近障礙物時直接的撞上障礙物，降低了 DNA 的流速與電泳移動率。因此從  $\kappa/\kappa_0=1$  增加障礙物導電度，電泳移動率越小。

總結以上三種情形，電泳移動率隨障礙物導電度的趨勢為，從  $\kappa/\kappa_0=0$  開始增加障礙物導電度，電泳移動率增加，到  $\kappa/\kappa_0=1$  時電泳移動率反轉，隨導電度上升而下降，而此趨勢也和圖 4-7 相符。

接著我們更細微的研究 DNA 在導電障礙物微流道中的行為，於  $\kappa/\kappa_0=0, 1, 100$  下探討障礙物導電度對於  $\lambda$ -DNA 及 T4-DNA 的電泳移動率和離散係數的差異，結果如圖 4-9。

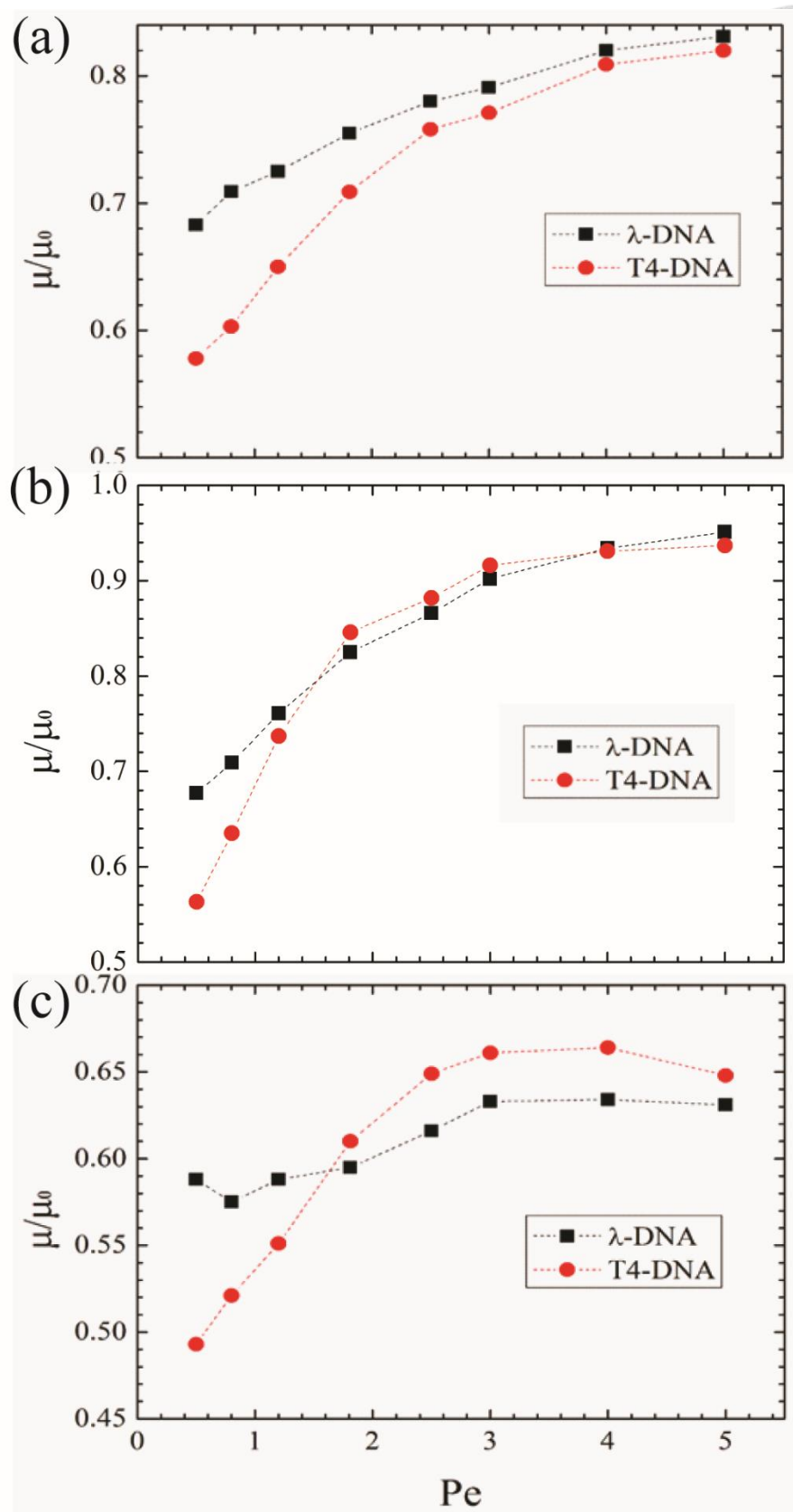


圖 4-9 在不同電場下，於障礙物導電度與流體導電度的比值(a)  $\kappa/\kappa_0=0$  (b)  $\kappa/\kappa_0=1$

(c)  $\kappa/\kappa_0=100$  與電場移動率的關係。



從上圖中，首先以同一導電度下的整條曲線作討論，從上圖可看出  $\kappa/\kappa_0=1$  的整條曲線對應的電泳移動率值較  $\kappa/\kappa_0=0$  和  $\kappa/\kappa_0=100$  高，也就是說  $\kappa/\kappa_0=1$  的 DNA 流速較其餘兩導電度快，此現象與圖 4-7 以及其對應的解釋切合。

但也存在了一個與預期相反的現象， $\kappa/\kappa_0=100$  時，在低電場時  $\lambda$ -DNA 較 T4-DNA 快，而且有段明顯的差距，但當  $Pe=1.8$  左右，兩 DNA 的電泳移動率趨勢倒轉，反而是 T4-DNA 在流道中有較快的速度，對於此現象我們從細微的 DNA 行為來做解釋。

圖 4-10 和圖 4-11 為  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 在微流道中的逐時截圖，以每碰撞到一次障礙物為一步，逐步紀錄行為：

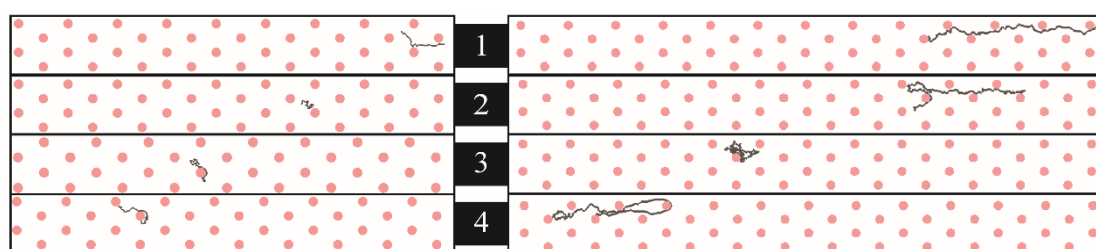


圖 4-10 在  $\kappa/\kappa_0=100$ ， $Pe=0.8$  下，DNA 碰撞至高導電度之障礙物時的碰撞情形及部分截圖，左為  $\lambda$ -DNA，右為 T4-DNA，由上至下逐步紀錄行為，DNA 流動方向由右至左。

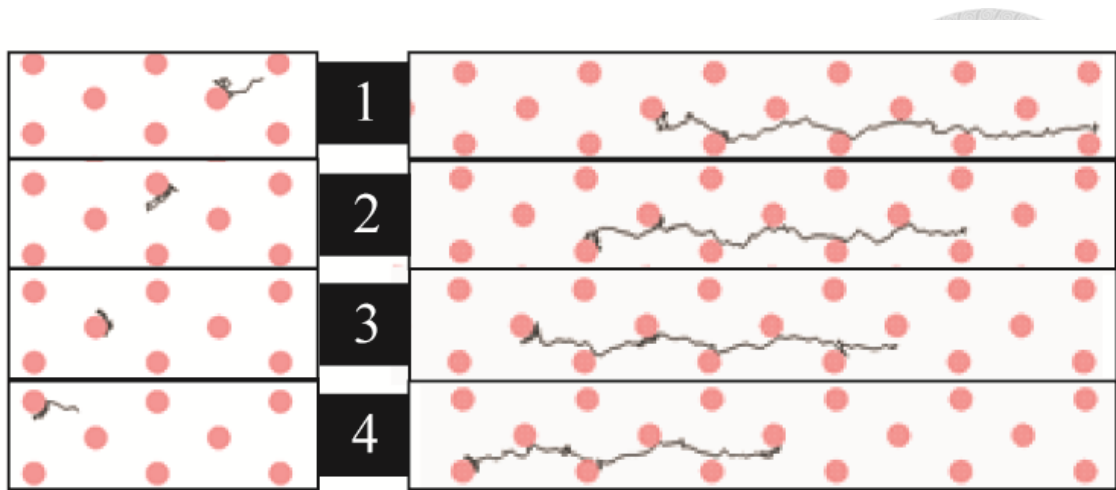
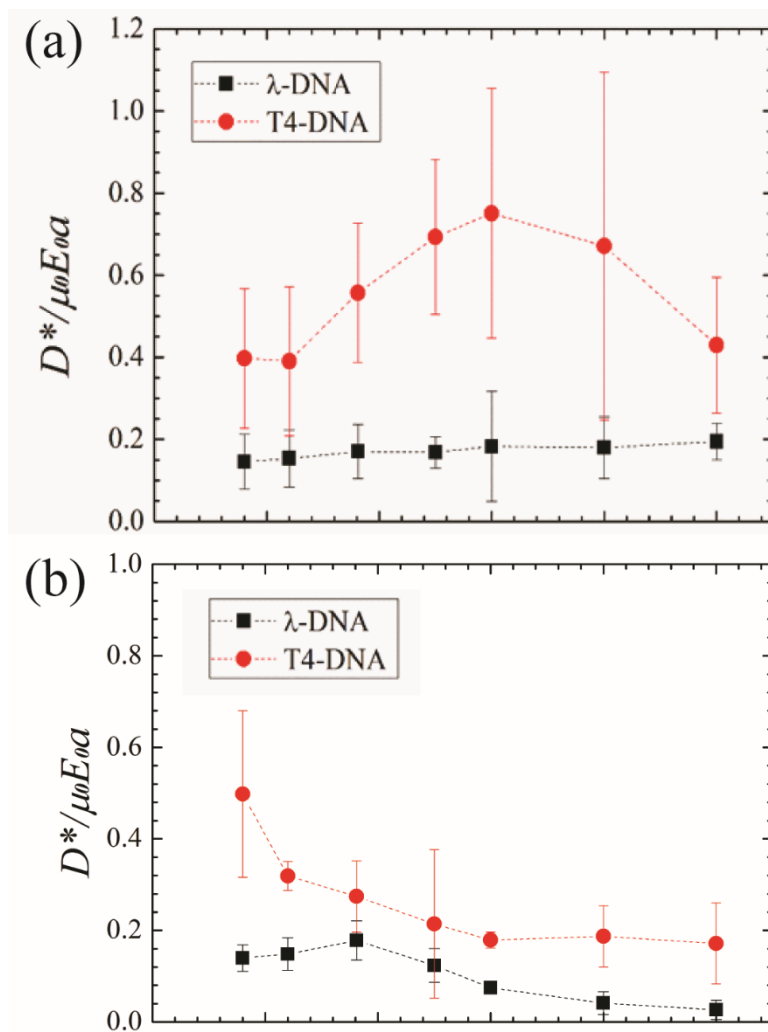


圖 4-11 在  $\kappa/\kappa_0=100$ ， $Pe=5$  下，DNA 碰撞至高導電度之障礙物時的碰撞情形及部分截圖，左為  $\lambda$ -DNA，右為 T4-DNA，由上至下逐步紀錄行為，DNA 流動方向由右至左。

在圖 4-11 中高電場時， $\lambda$ -DNA 碰撞到障礙物時，整個分子會呈現球狀，但 T4-DNA 碰撞時只有前端一小段會捲曲，大部分的分子仍為直線狀，這樣差異的原因在於，T4-DNA 而言，分子太長，若要捲曲呈球狀必須有較長的鬆弛時間，但在 T4-DNA 尚未捲曲成球狀前，貼在障礙物的 DNA 最前端已經離開了障礙物，而整個 DNA 繼續流動，停止了它捲曲的行為，長久下來 T4-DNA 也僅是在兩排障礙物間所形成的流道流動而已。這樣的物理現象使得  $\lambda$ -DNA 在碰撞時，整個分子的移動會暫時停止下來，直到從障礙物的表面離開，因此  $\lambda$ -DNA 的質心就會多次的暫時停止；反之 T4-DNA 只有前端會停止下來，其餘仍為直線狀的部分隨著電場驅動力持續移動，因此整個電泳的過程中 T4-DNA 的質心並不會停下來。另外，因為含高導電度障礙物的微流道之電力線集中於障礙物，因此 DNA 經過每一個障礙物時都會進行這種碰撞，使得上述所提的行為不斷週期性的重複發生；另外在高電場下，對流的影響相較於隨機的布朗擴散明顯許多，因此兩種 DNA 都很難有離開原本所屬的兩排障礙物所形成的微流道中，使得 DNA 的行為單純許多。

而在圖 4-10 中低電場時，因為隨機的布朗力較明顯，因此兩 DNA 都有很大的機會離開所屬的兩排障礙物間之通道，如此一來 T4-DNA 就有較大的機率發生碰撞，使得電泳移動率趨勢和絕緣障礙物時相似。



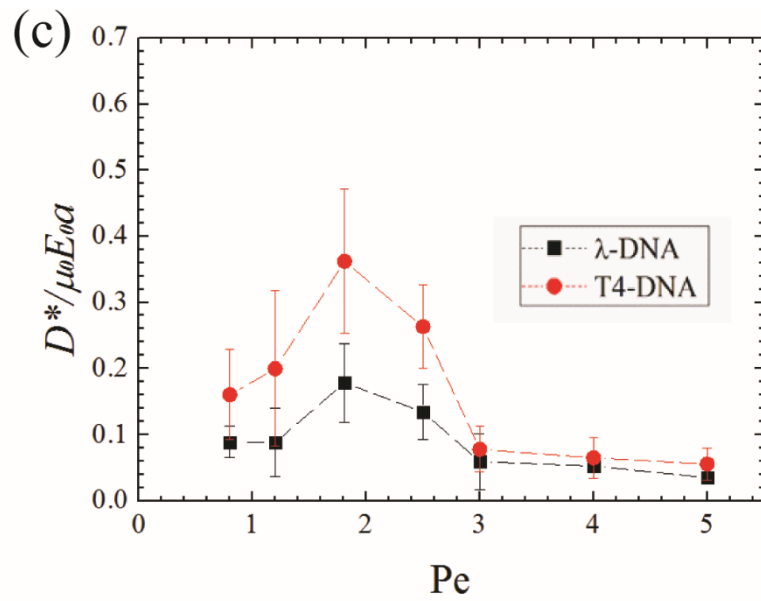


圖 4-12 在不同電場下，於障礙物導電度與流體導電度的比值(a)  $\kappa/\kappa_0=0$  (b)  $\kappa/\kappa_0=1$  (c)  $\kappa/\kappa_0=100$  與無因次離散係數的關係。

從上圖中可看出在  $\kappa/\kappa_0=1$  和  $\kappa/\kappa_0=100$  的離散係數在高電場時較其餘兩種障礙物導電度低，也就是說同一狀況下 DNA 的行為上差異性較小，對此我們也在 DNA 的行為上作解釋，圖 4-13 為  $\kappa/\kappa_0=1$ ， $Pe=5$  的逐時 DNA 行為截圖：

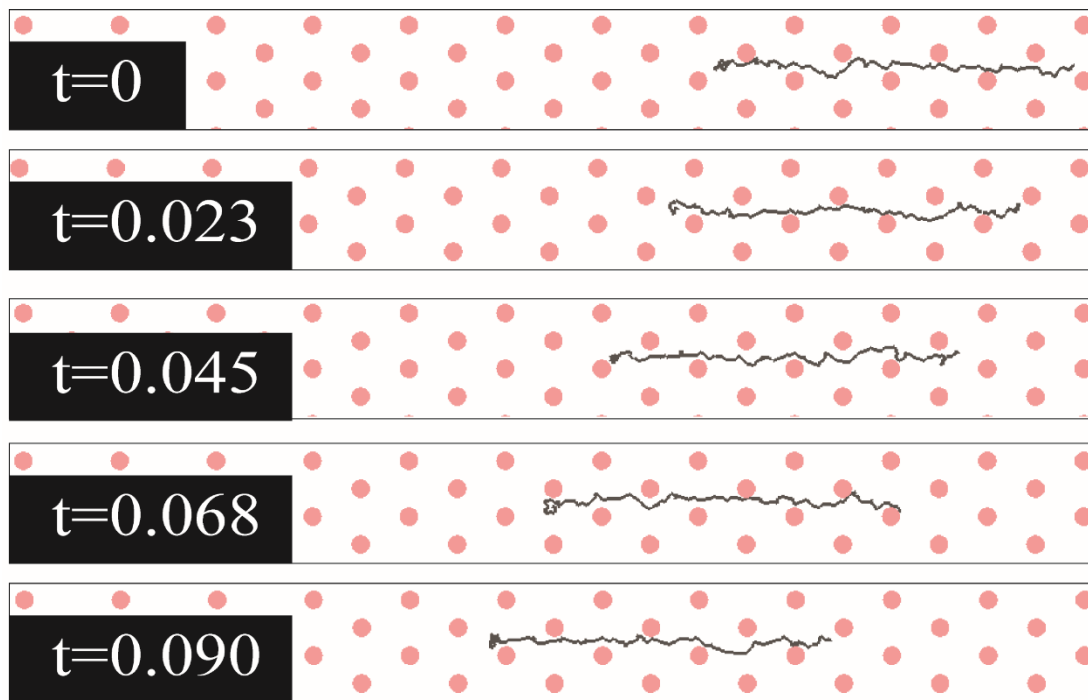




圖 4-13 T4-DNA 行為的逐時部分截圖，由上至下為隨時間先後排列，DNA 流動方向由右至左，其中  $\kappa/\kappa_0=1$ ， $Pe=5$ 。



從上圖中，DNA 幾乎沒有任何的碰撞，僅在同一區兩排障礙物所形成的通道中流動，整個電泳過程就維持這樣的行為模式流動，因此不同的 DNA 間不論在行為或電泳所需時間上都沒有太大的差異，造成了較低的離散係數。原因如同前述所提，高電場下與電場方向的對流輸送速率相比，隨機的布朗擴散很小，DNA 不太有機會跨越所處的兩排障礙物間。

對於  $\kappa/\kappa_0=100$  中，DNA 行為差異性小的解釋如同圖 4-10，不斷週期性的以同一型態重複碰撞，造成各 DNA 行為模式相似。

接著利用前述所得之電泳移動率、離散係數，利用節 2.5.4.4 之方法求得不同障礙物導電度，不同電場下的分離解析度。如圖 4-14：

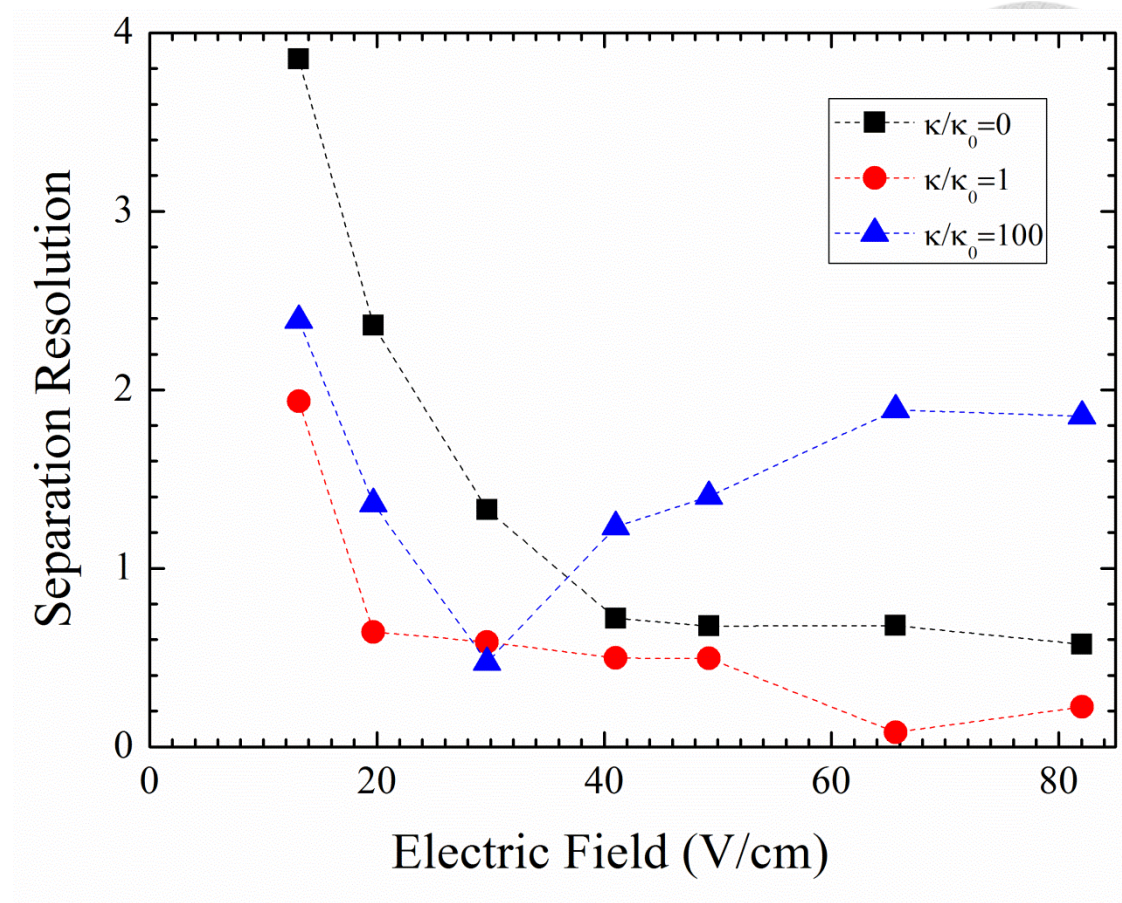


圖 4-14 不同障礙物導電度，分離解析度與電場強度的關係圖，電泳距離為 15mm

改變障礙物的導電度後，低電場下並沒有更好的解析度；而在高電場時， $\kappa/\kappa_0=1$  因兩 DNA 都幾乎沒有造成碰撞，使得解析度接近 0，而  $\kappa/\kappa_0=100$  時，兩 DNA 的流速趨勢倒轉， $\lambda$ -DNA 較 T4-DNA 慢，但因造成兩 DNA 流速差的因素較  $\kappa/\kappa_0=0$  強烈，反而增加了分離解析度，另外，高電場下離散係數非常低也是原因之一。

如此的結果並非原預期所料，雖然高電場下分離解析度有所增加，但並沒有很明顯的改善。因此在節 4.3 中，我們的目的在於改變 DNA 在碰撞前的型態，使 DNA 碰撞時能有完整包覆障礙物，確實進行勾住及脫鉤的程序，形成有效的碰撞而進一步降低較長 DNA 在微流道中的流動速度。

### 4.3 以間歇電場取代連續恆定電場

為了使 T4-DNA 的游動能更有效的被障礙物所阻擋,除了增加碰撞頻率外,更重要的是增加每次碰撞的有效性,讓 T4-DNA 確實勾住障礙物而不只是擦過,此問題源自於 DNA 在碰撞前的型態,在 4.2 中, T4-DNA 從電泳開啟,經過第一次碰撞脫鉤後呈現水平方向的線狀,使得 DNA 僅在兩排障礙物所形成的通道間流動,無法有效的跨過障礙物,因此此節的目的是在於增加 DNA 在垂直方向的投影長度。

因此我們引入了間歇式電場的概念,電場開啟使 DNA 游動一段時間後關閉電場,此時線狀的 DNA 便開始向線圈狀鬆弛,即能增加 DNA 在垂直電場方向的投影長度,而關閉電場一段時間後再度開啟電場, DNA 的型態已不同於電場關閉前,因此便能增加 T4-DNA 確實勾住的機率。圖 4-15 為間歇式電場中,電場對時間關係的簡圖。

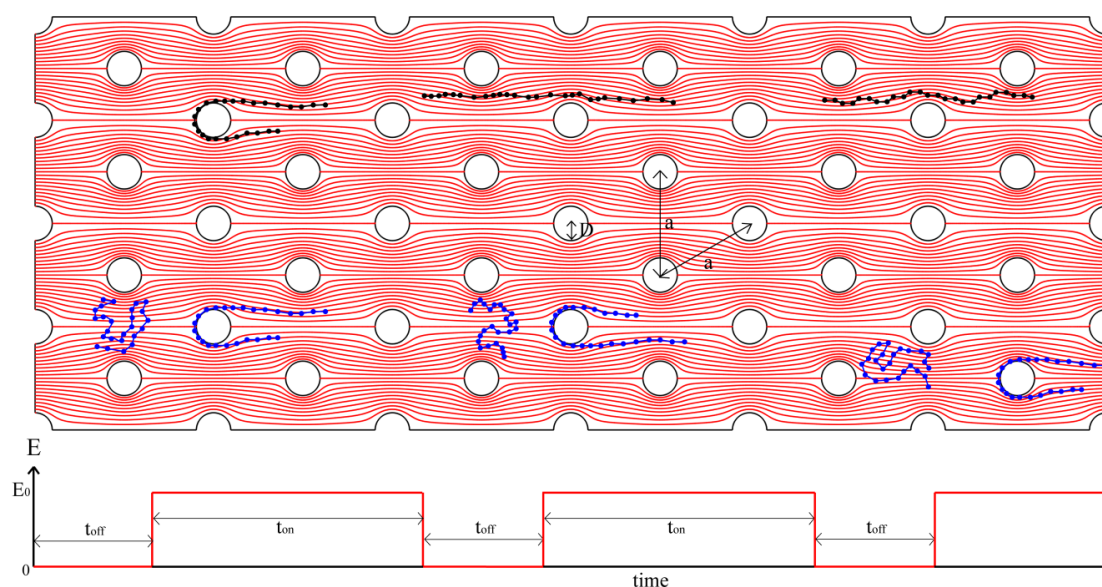


圖 4-15 間歇式電場下,電場與時間變化關係之簡圖。在  $t_{on}$  區間中電場均為恆定之固定值;而  $t_{off}$  區間中電場為 0。

在此電場系統下，較原本連續性電場增加了電場開啟的週期  $t_{on}$  和電場關閉的週期  $t_{off}$  兩變數，接下來將介紹這兩變數對於 DNA 分離行為的影響，以及選擇分離最佳化的兩變數組合。



### 4.3.1 電場關閉時間周期

電場關閉的期間，DNA 在障礙物陣列中從線狀逐漸鬆弛成線圈狀，因此對於電場關閉時間周期  $t_{off}$  的抉擇與 DNA 的鬆弛時間有必然的關係。從 2.1.4 節測量高分子鬆弛時間的方法中，DNA 從平行  $x$  方向拉直狀態釋放後，即如彈簧般回縮鬆弛，由圖 3-8 和圖 3-9 可知，給予 DNA 鬆弛的時間愈久， $x$  方向的投影長越來越短，DNA 越趨近於線圈狀。將此概念運用於我們的微流道中，可預測當電場關閉時間  $t_{off}$  越長，DNA 在碰撞前，垂直電場方向的投影量越大，進而增加電場開啟後有效碰撞的機率，加大  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 在微流道中行進距離的差異而達到分離的效果。

為了驗證此預測，我們先模擬相同電場  $Pe=6$ (在此節為了減少操作時間，我們選擇高電場作為驅動，J. Cho 和 K. D. Dorfman 的研究[16]中最高電場為  $Pe=5$ ) 相同的電場開啟時間周期( $t_{on}=25.92$ )下，T4-DNA 在不同的電場關閉時間周期( $t_{off}=46.29$  和  $185.16$ )下的行為變化，如圖 4-16。

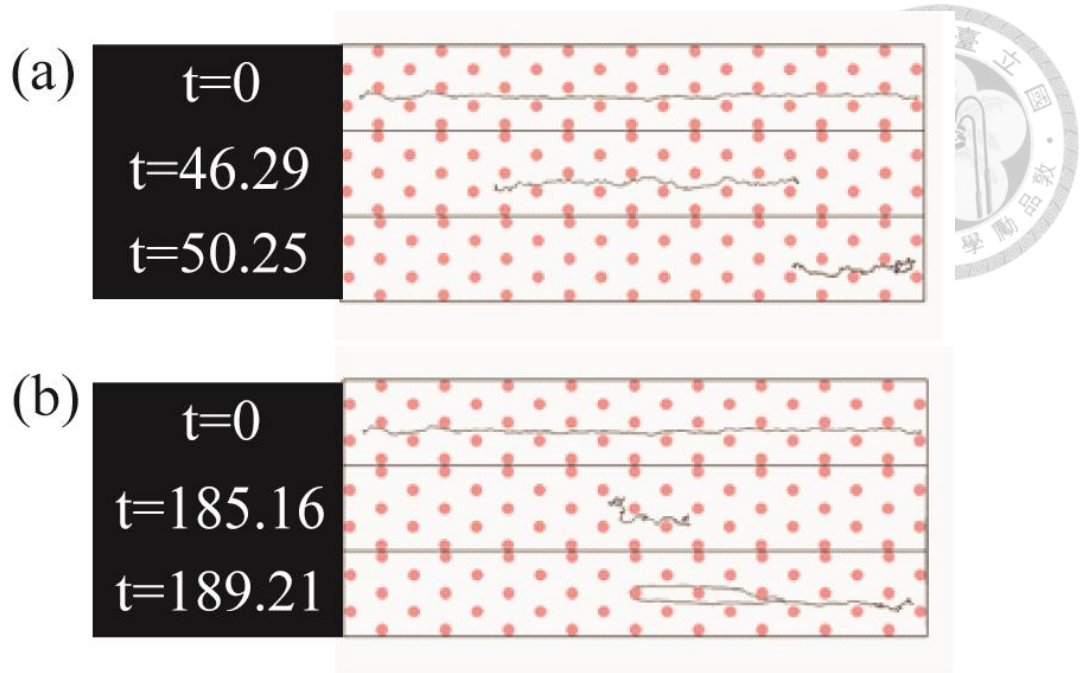


圖 4-16 T4-DNA 在六角圓柱陣列以間歇式電場驅動下，固定  $t_{on}=0.5$  和  $Pe=6$ ，(a)  $t_{off}=46.29$  和 (b)  $t_{off}=185.16$  的行為比較，上側兩圖為電場關閉瞬間 DNA 的型態，預設為相同的型態，經過不同的  $t_{off}$  後鬆弛成如兩圖中間的型態，電場再度開啟後 DNA 如下側圖的型態。DNA 電泳方向為左到右。

從圖 4-16 的中間圖可看出，右側使 T4-DNA 經過較長的  $t_{off}$  區間，確實形成較緊縮的型態，垂直電場方向的投影長也增加了許多；反之左側中間的 T4-DNA 因給予鬆弛的時間不足，仍保有許多關閉電場前的直線狀，DNA 仍停留在兩排障礙物間所形成的小通道，也難以在垂直電場方向做延伸。當電場再度開啟時，即可看到  $t_{off}$  不同對於碰撞有效性的改善，左側下圖的 DNA 繼續在原本所處的小通道間流動，仍難以造成碰撞，反之右側下圖因電場開啟前的較長的垂直電場方向投影長，使 DNA 兩側跨過了障礙物，確實達到有效的碰撞。

因 DNA 在障礙物陣列中從拉長狀態鬆弛的過程，DNA 會受到障礙物的阻擋，與在不含任何障礙物的自由溶液中相比，鬆弛所需時間必定較長，在此我們重新測量兩 DNA 在六角圓柱障礙物中不加任何電場的鬆弛時間，作法如 2.1.4 節。

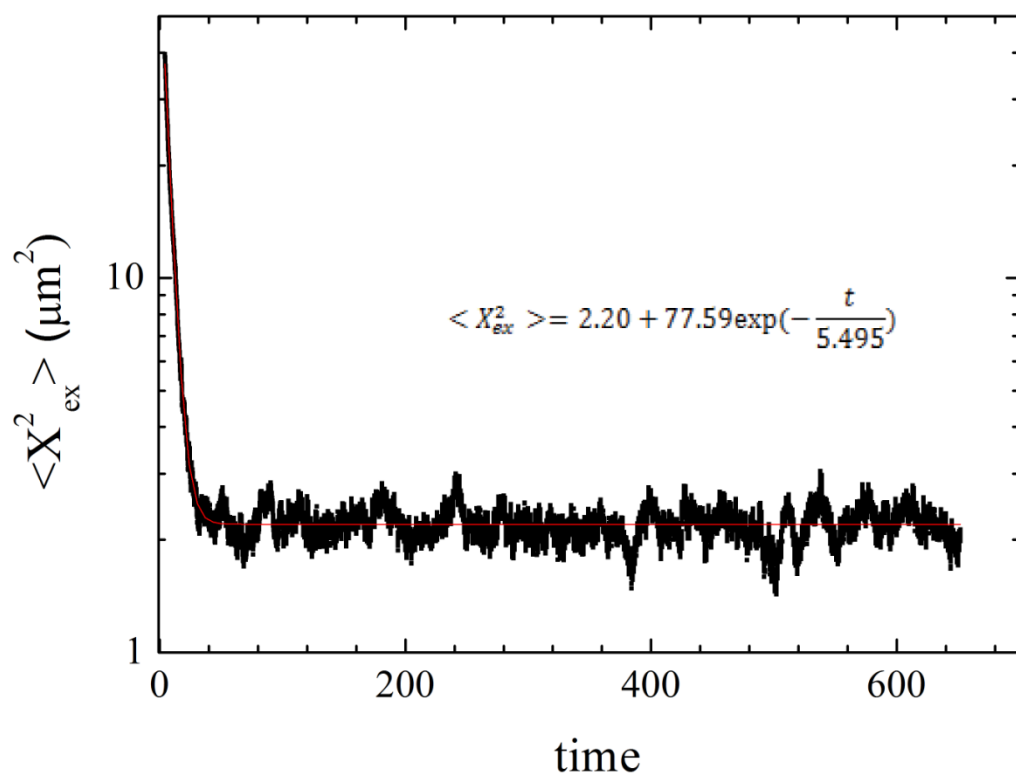


圖 4-17  $\lambda$ -DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法於含六角圓柱障礙物陣列之微流道中  
 求出鬆弛時間。



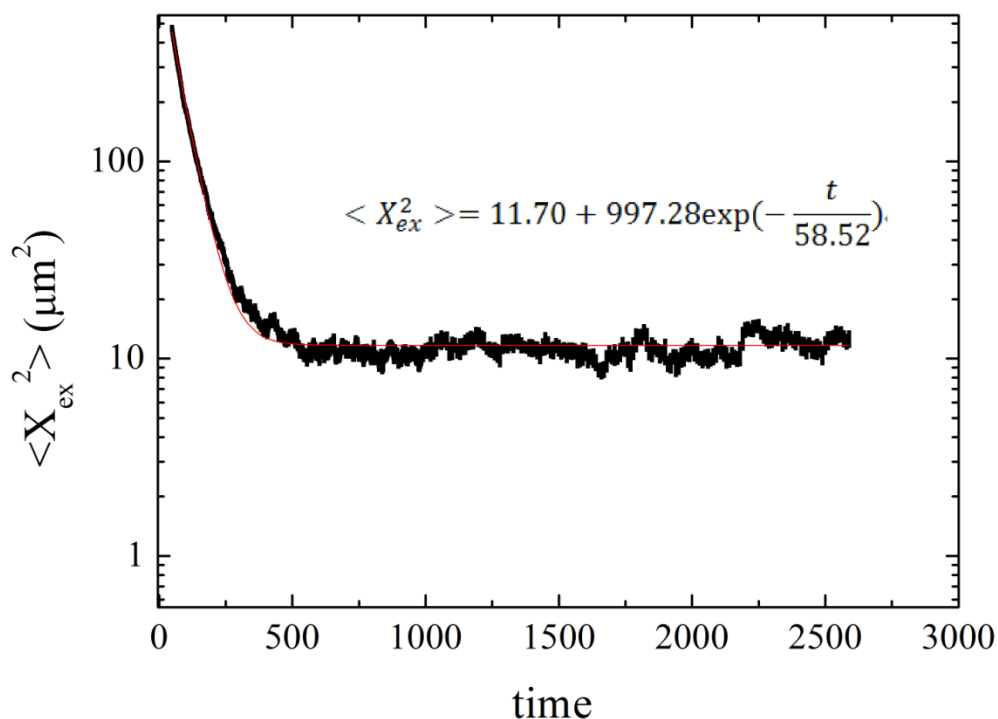


圖 4-18 T4-DNA 使用 2.1.4 小節之擬合方法於含六角圓柱障礙物陣列之微流道中  
求出鬆弛時間。

在表 4-1 中整理兩 DNA 在自由溶液中與障礙物陣列中的鬆弛時間。

表 4-1  $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 在自由溶液與障礙物陣列中的鬆弛時間

	$\lambda$ -DNA	T4-DNA
自由溶液中	4.095	46.91
障礙物陣列中	5.495	58.52

上表中，兩 DNA 在陣列中的鬆弛時間確實比在自由溶液中長，與預期的相同。藉由兩 DNA 的鬆弛時間，可推敲在某特定的  $t_{off}$  下，DNA 的鬆弛程度，以及不同程度的鬆弛對分離效率的影響。得知兩 DNA 在不同  $t_{off}$  下個別行為和鬆弛時間後，我們對圖 4-16 的兩種狀況做電泳長度 1mm 的模擬。

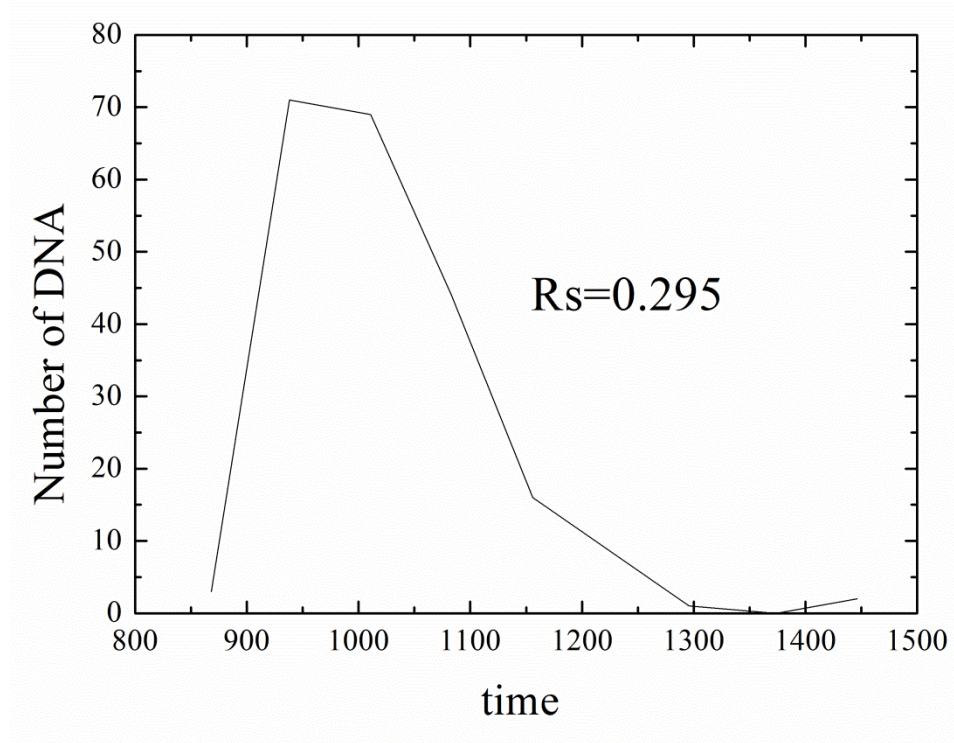


圖 4-19  $Pe=6$ ,  $t_{on}=25.92$ ,  $t_{off}=46.29$ ,  $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 電泳 1mm 所需時間分布

圖



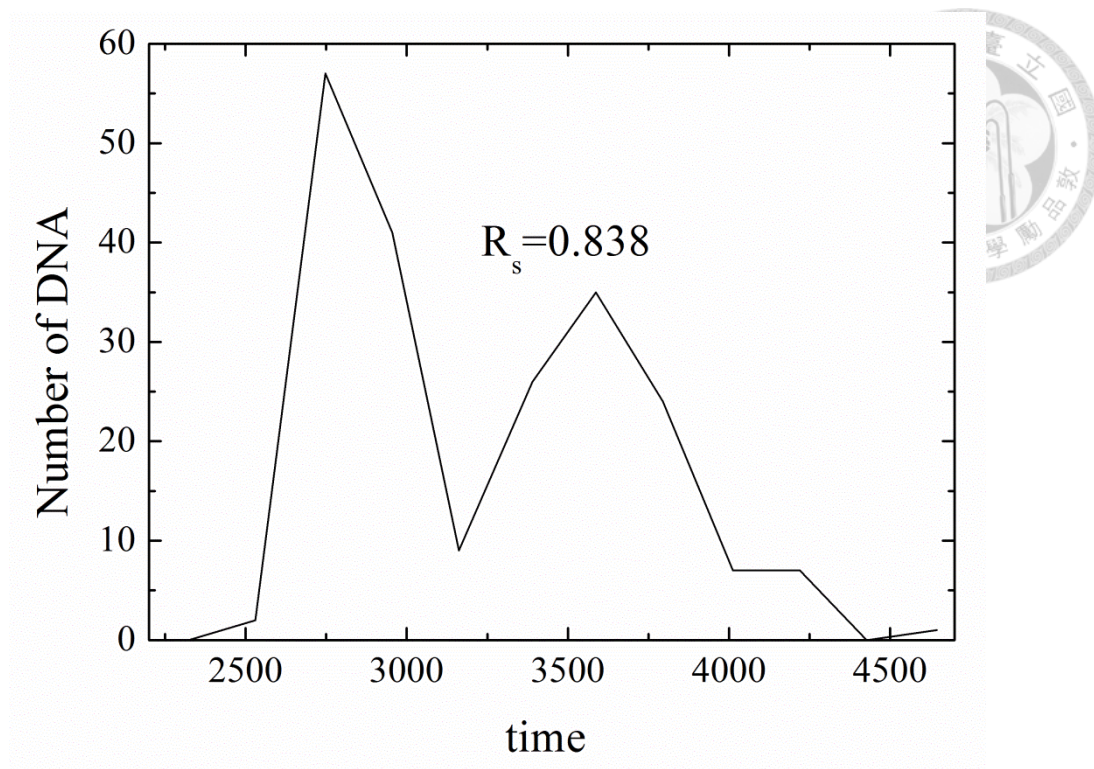


圖 4-20  $Pe=6$ ,  $t_{on}=25.92$ ,  $t_{off}=185.16$ ,  $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 電泳 1mm 所需時間分布圖

其中  $R_s$  為分離解析度。從上兩圖中，僅僅 1mm 的電泳長度即可看出差異，約三倍 T4-DNA 鬆弛時間的  $t_{off}$  明顯的較約 0.8 倍 T4-DNA 鬆弛時間的  $t_{off}$  能區分出兩個峰，解析度也明顯較連續性電場時電泳距離 15mm 的來得高。

在整趟的電泳模擬和碰撞的行為上，都能看到  $t_{off}$  增加對於 DNA 分離效果的改善。從圖 4-18 中，理論上能使得 T4-DNA 在 x 方向縮的越小，就能更進一步增加 T4-DNA 與障礙物的有效碰撞機率，從圖上 T4-DNA 完全縮回平衡狀約需 10 秒，但這樣的  $t_{off}$  值會增加相當多的電泳所需時間，導致效率上的低落，因此太長  $t_{off}$  的電泳不在我們考慮的範圍內。

### 4.3.2 電場開啟時間周期

除了  $t_{off}$ ，在此系統下可調的另一參數是電場開啟的時間周期  $t_{on}$ ，在此節我

們分析 DNA 在同強度的電場和  $t_{\text{off}}$  下，改變  $t_{\text{on}}$  對於解析度的影響。

從上節的 DNA 行為中發現， $t_{\text{off}}$  對於分離效果的重要性大於  $t_{\text{on}}$ ，因為若無法給予 DNA 足夠的鬆弛時間，如何改變  $t_{\text{on}}$  都無法使得 DNA 有良好的分離，因此  $t_{\text{on}}$  在此設備中屬於加強的角色。首先先將此節的分析建立在能使 DNA 有顯著分離的  $t_{\text{off}}$  下，模擬  $Pe=6$ ,  $t_{\text{off}}=185.16$  下 T4-DNA 在  $t_{\text{on}}=12.96$ (約 0.22 個鬆弛時間) 和 25.92(約 0.44 個鬆弛時間)下的行為表現。

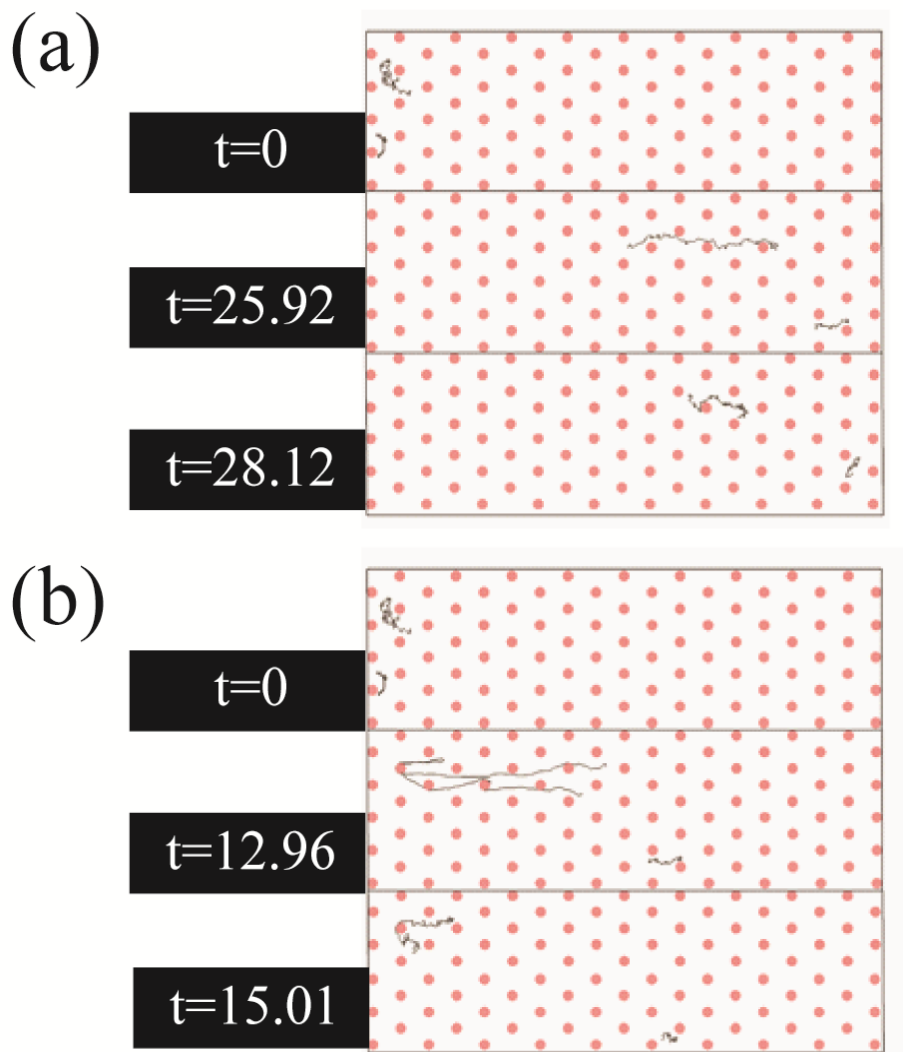


圖 4-21 T4-DNA 在六角圓柱陣列以間歇式電場驅動下，固定  $t_{\text{off}}=185.16$  和  $Pe=6$ ，

(a)  $t_{\text{on}}=25.92$  和 (b)  $t_{\text{on}}=12.96$  的行為比較，上側兩圖為電場開啟瞬間 DNA 的型態，預設為相同的型態，接著經過不同的  $t_{\text{on}}$  的流動後形成如兩圖中

間的型態，而電場再度關閉後 DNA 如下側兩圖的型態。DNA 電泳方向為左到右。



從上圖中，以同樣的型態開始模擬，圖(a)經過 25.92 無因次時間後形成左中圖的型態，而圖(b)經過 12.96 無因次時間後形成右中圖的型態，兩者的不同在於，12.96 無因次時間對於右圖中的 T4-DNA 來說不足夠使它從障礙物上脫附，因此兩次電場關閉之間 T4-DNA 都被卡在同一個障礙物上，從右圖上側與右圖下側可看出；反之  $t_{on}=25.92$  已經超過 T4-DNA 脫附所需的時間，所以左圖中  $t_{on}$  結束時 T4-DNA 已經脫附且流動了一段距離。而對於較短的  $\lambda$ -DNA 來說此兩種  $t_{on}$  都早已足夠使之脫附，因此  $t_{on}=12.96$  對於兩 DNA 而言可以創造較多的距離，加強分離的解析度。

從上述的 DNA 行為中，我們預測  $t_{on}$  的最佳化選擇與該電場下兩 DNA 的脫附時間有關，如果  $t_{on}$  大於該 DNA 在特定電場下的平均脫附時間，DNA 有較大的機會在一個  $t_{on}$  時間週期之內脫附且流動一段距離；反之若  $t_{on}$  小於平均脫附時間，DNA 很有可能無法在一個  $t_{on}$  的時間內從障礙物上掙脫。

然而脫附時間會因每次 DNA 碰撞障礙物的型態的不同而有顯著的差異，因此我們取該 DNA 在某電場下的各種碰撞型態的平均脫附時間作為選擇  $t_{on}$  的取捨標準。

除此之外，電場越大會使得 DNA 越快脫附，因此每種電場的平均脫附時間必定不同，在此節我們針對高電場  $Pe=6$  做分析，分析方式如圖 2-23 的質心對時間的關係圖、及圖 2-24 的 DNA 同時占據圓柱障礙物周圍的四個象限之時間區間，這兩個方法分別求得脫附時間。圖 4-22 為某一 DNA 在  $Pe=6$  的電場下，質心  $x$  座標與時間的關係圖。

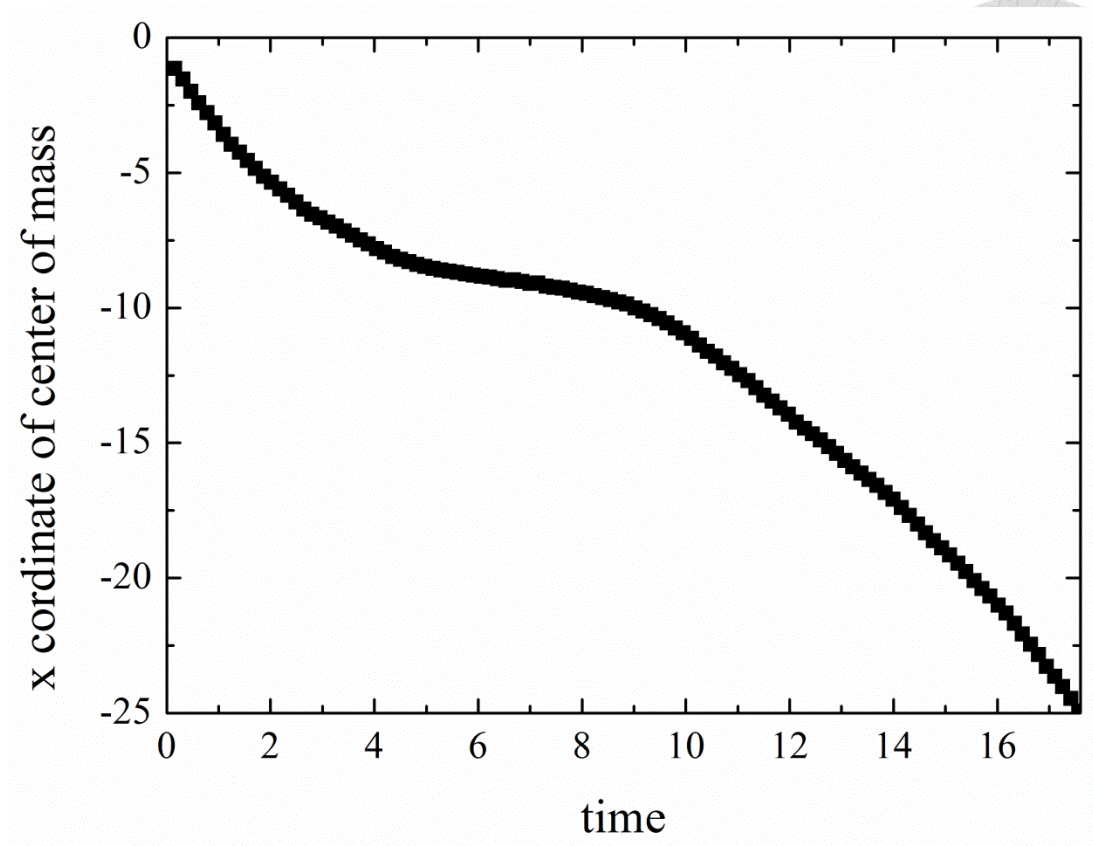


圖 4-22  $Pe=6$  下某一 DNA 的質心  $x$  坐標對時間的關係圖

接著用 50 個  $\lambda$ -DNA 和 50 個 T4-DNA 分別以圖 4-23 的質心法求得勾住時間，與 DNA 數目的分布圖如圖 4-24。

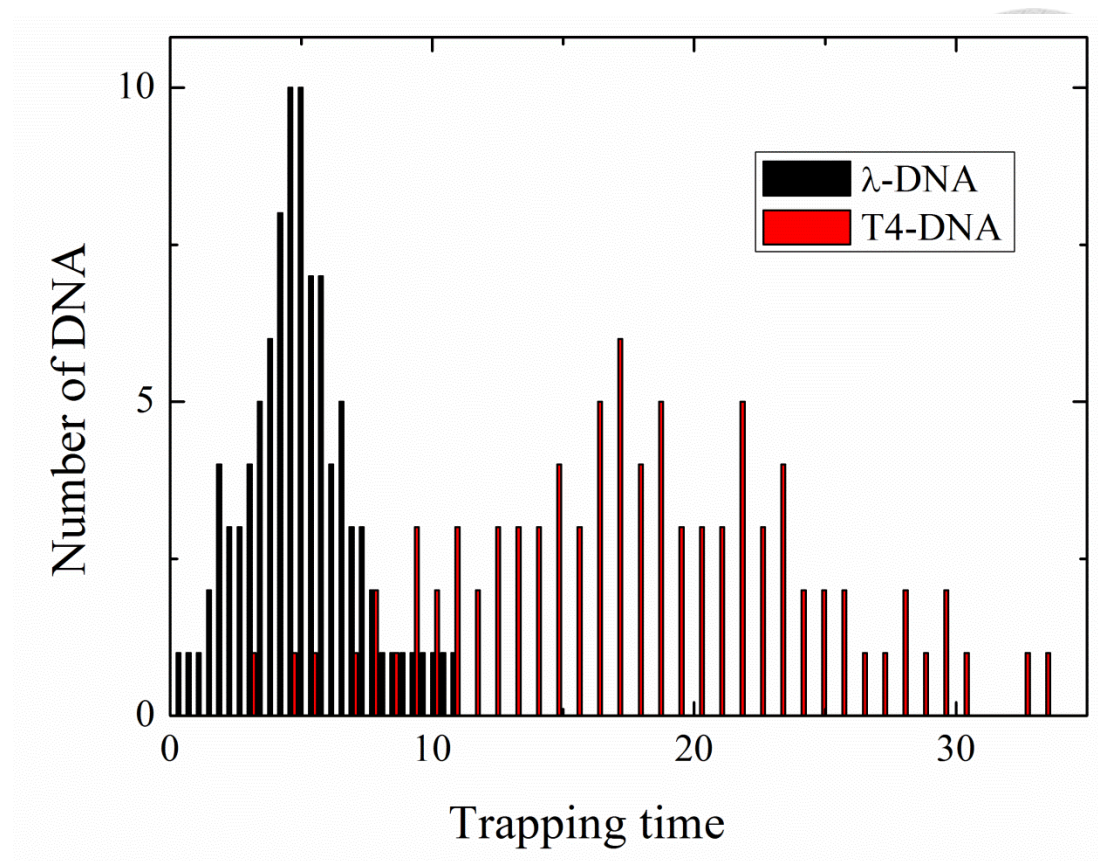


圖 4-24 以質心法求得之勾住時間與其對應的 DNA 數目之關係圖

圖 4-24 所求得之兩 DNA 平均勾住時間和標準差，與以四象限法求得之兩 DNA 平均勾住時間和標準差整理於表 4-2。

表 4-2 以質心-時間關係圖和四象限法對 λ-DNA 和 T4-DNA 做勾住時間的分析

	λ-DNA	T4-DNA
質心-時間關係圖	$4.56 \pm 3.40$	$17.83 \pm 10.37$
四象限法	$4.61 \pm 3.58$	$19.08 \pm 10.12$

從表 4-2 以質心-時間關係圖和四象限法對 λ-DNA 和 T4-DNA 做勾住時間的分析中，四象限法所求得的兩種 DNA 之脫附時間均比質心法長，和我們在第



二章對於此兩法的差異推測相符，且並沒有相差太遠。

透過以上平均脫附時間的分析，我們預測當  $t_{on}$  的值約大於 17.89 至 19.08 時，兩 DNA 傾向於在一個  $t_{on}$  期間脫附； $t_{on}$  約小於 4.56 至 4.61，兩 DNA 都很有可能同時無法從障礙物上脫附，如此也不能增加兩 DNA 的距離，因此解析度最好的  $t_{on}$  值應落在兩 DNA 的平均脫附時間之間，T4-DNA 無法在一個  $t_{on}$  時間內脫附，而  $\lambda$ -DNA 可脫附，增大兩 DNA 距離上的差異。

為了驗證此推論，我們實際模擬  $Pe=6$ ,  $t_{off}=185.16$  下，數個不同  $t_{on}$  對於兩 DNA 分離解析度的影響，但在此分析中不讓這些電泳模擬同樣的距離，原因在於，同樣的電泳距離下較短的  $t_{on}$  需要更多的  $t_{on}-t_{off}$  週期次數才能使 DNA 完成電泳，對於  $t_{on}=2.59$  和 25.92 而言相同的電泳距離下  $t_{on}-t_{off}$  週期次數可以相差到約十倍，而次數多必定會放大前述  $t_{off}$  和  $t_{on}$  對於解析度增加的效果，因此為求能公平的分析，我們必須使不同  $t_{on}$  的模擬在趨近相同的  $t_{on}-t_{off}$  週期次數下進行，所以假設電泳長度正比於欲模擬的  $t_{on}$  值，例如選定模擬  $t_{on}=2.59$  時電泳長度為 1mm 的話， $t_{on}=12.96$  和 25.92 則分別為 5mm 和 10mm，如此一來所有模擬的  $t_{on}-t_{off}$  週期次數便趨近於相同。 $Pe=6$ ,  $t_{off}=185.16$  下，數個不同  $t_{on}$  的 DNA 分離解析度分布如圖 4-25。

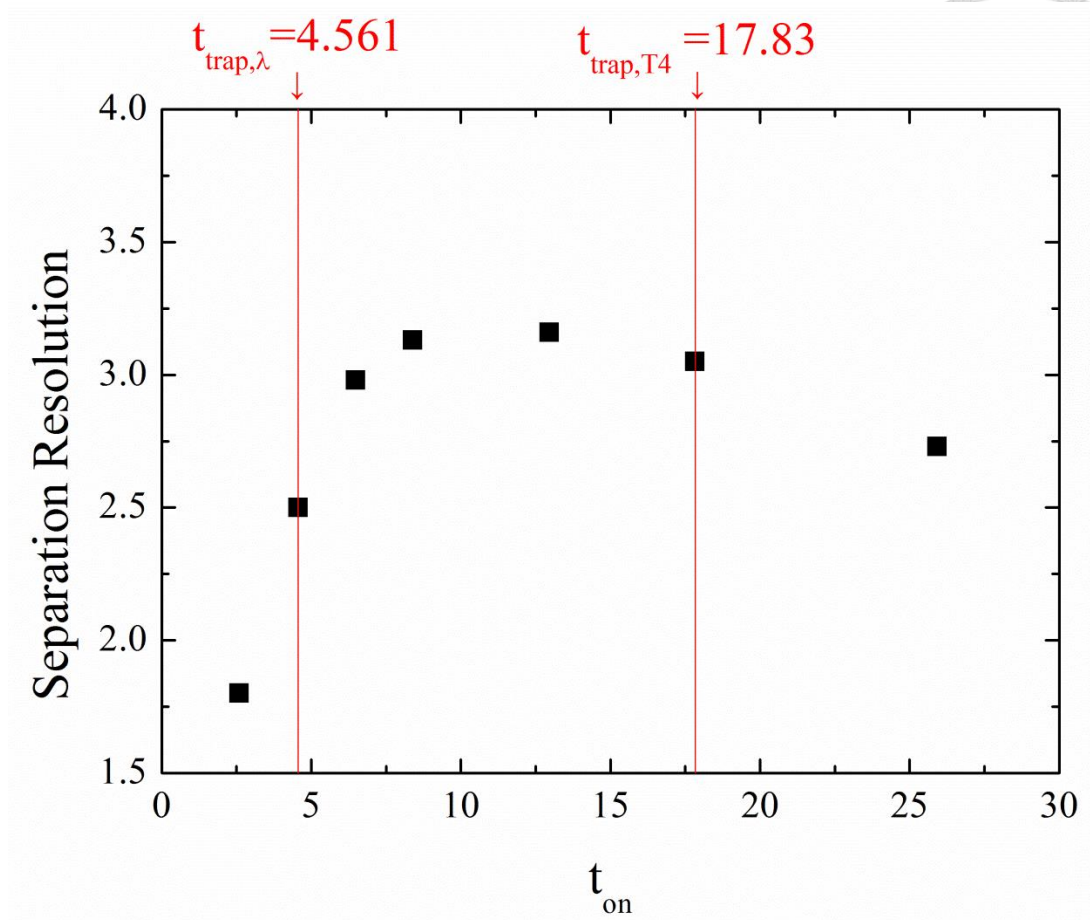


圖 4-25  $Pe=6$ ,  $t_{off}=185.16$  下， $t_{on}=2.59, 6.48, 8.40, 12.96, 25.92$  對於兩 DNA 分離解析度的影響，模擬之電泳長度分別為 1mm, 2.5mm, 3.24mm, 5mm 和 10mm。圖中左右兩條垂直線分別代表  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 用質心法求得之脫附時間。

$t_{on}=6.48, 8.40, 12.96$  恰好在  $\lambda$ -DNA 與 T4-DNA 之脫附時間之間，而  $t_{on}=2.59$  和 25.92 分別均小於與均大於兩脫附時間，上圖中，兩線中間點的解析度均大於左右兩側，與我們前述的假設切合。

為求模擬和實驗的相互呼應，在此引用實驗上的數據，如圖 4-26。此實驗所使用的電場是 50V/cm( $Pe=3.27$ )， $t_{off}=6s$ ，測量  $t_{on}=0.2s, 0.35s, 0.5s, 0.75s, 1s$ ，分別以 2mm, 3.5mm, 5mm, 7.5mm, 10mm 的通道長度進行實驗。

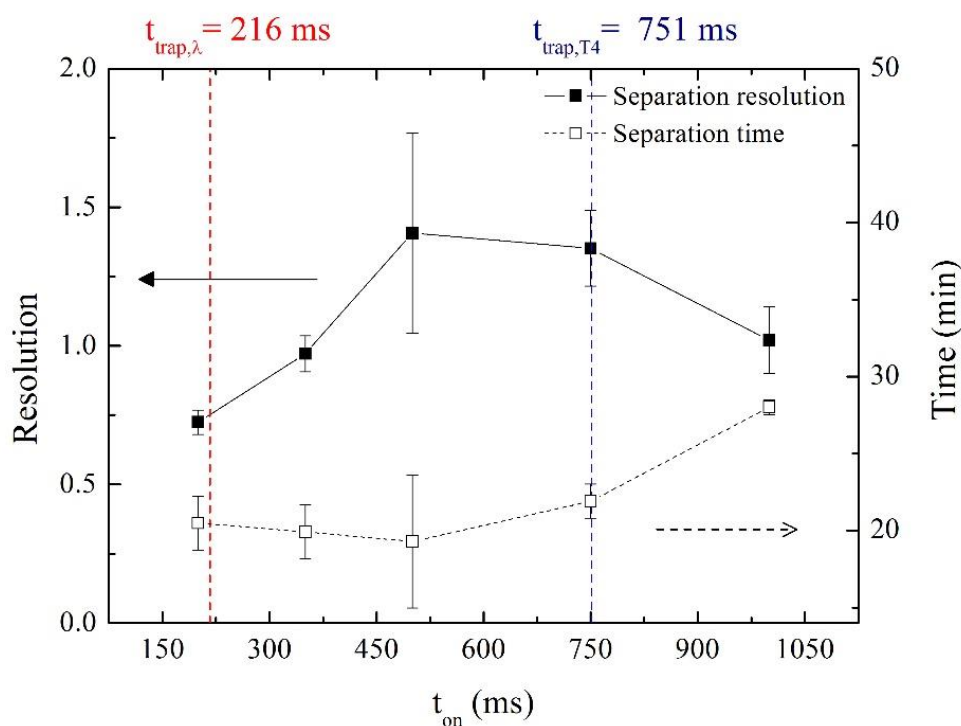


圖 4-26 DNA 於圓柱陣列微流道中以間歇式電場的分離之實驗數據，電場為 50V/cm， $t_{off}=6s$ ，測量  $t_{on}=0.2s, 0.35s, 0.5s, 0.75s, 1s$ ，分別以 2mm, 3.5mm, 5mm, 7.5mm, 10mm 的通道長度進行實驗，黑色實線對應左側的 y 軸為解析度，白色虛線對應右側的電泳時間，圖中左右兩條垂直線分別代表  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 實驗上之脫附時間。[44]

上圖中實驗上的趨勢，在兩 DNA 的脫附時間內之點所得的分離解析度較兩側好，且解析度最大值約出現於中間區域的中間稍偏右，以這兩個趨勢上來說是與模擬相符的。

接著我們在以圖 4-25 和圖 4-26 之參數稍做修改，將模擬的所有參數之通道長度調整至相同的 15mm，將實驗的所有參數之通道長度調整至相同的 5mm，再次比較實驗與模擬上的相互呼應。



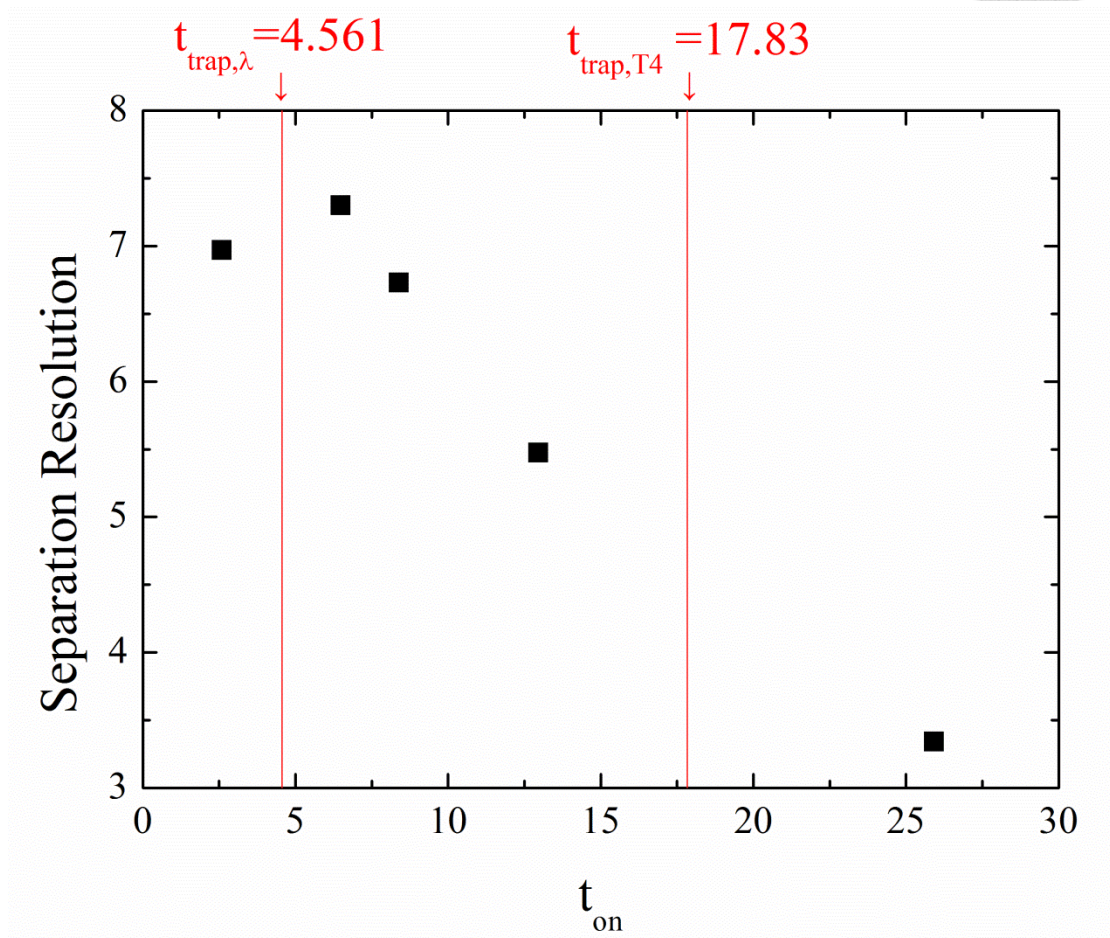


圖 4-27  $Pe=6$ ,  $t_{off}=185.16$  下， $t_{on}=2.59, 6.48, 8.40, 12.96, 25.92$  對於兩 DNA 分離解析度的影響，模擬之電泳長度為相同的 15mm。圖中左右兩條垂直線分別代表  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 用質心法求得之脫附時間。

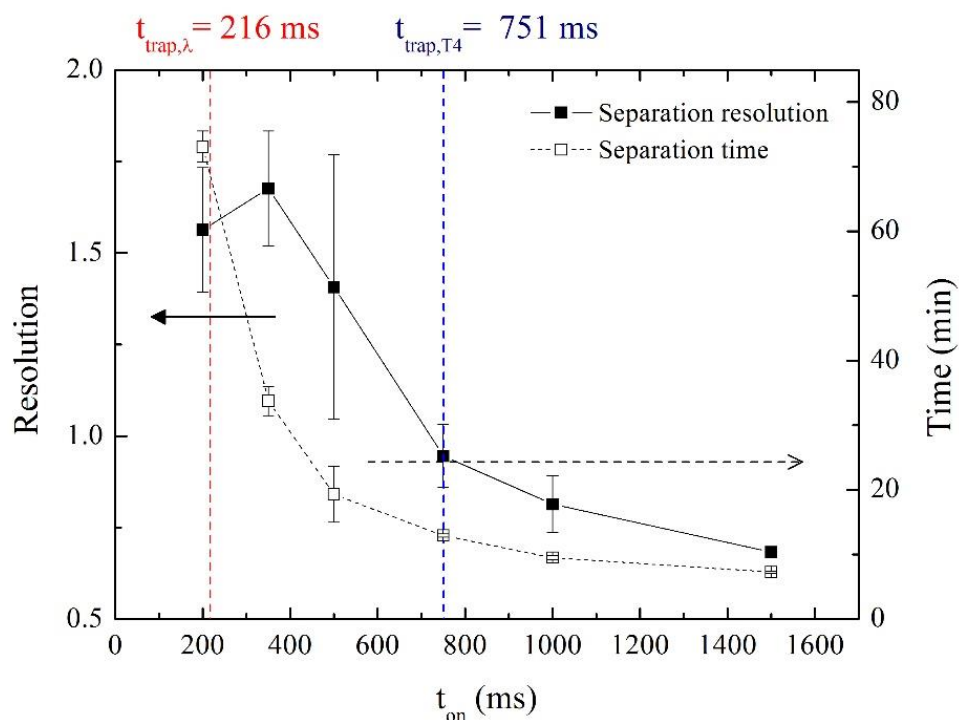


圖 4-28 DNA 於圓柱陣列微流道中以間歇式電場的分離之實驗數據，電場為 50V/cm， $t_{off}=6s$ ，測量  $t_{on}=0.2s, 0.35s, 0.5s, 0.75s, 1s$ ，以相同之 5mm 的通道長度進行實驗，黑色實線對應左側的 y 軸為解析度，白色虛線對應右側的電泳時間，圖中左右兩條垂直線分別代表  $\lambda$ -DNA 和 T4-DNA 實驗上之脫附時間。[44]

上兩圖中，從兩線左側的點開始增加  $t_{on}$ ，分離解析度也隨之增加，但解析度的最高點出現於中間區域的偏左側，隨後解析度隨  $t_{on}$  增加而一路減少至兩線的右側，以上的趨勢在實驗和模擬上也是相呼應的。對於右側的區域來說，圖 4-27 的分離解析度較圖 4-25 減少許多的原因在於，將所有點的通道調整至相同時右側區域在電泳過程中經過的電場開關週期數相對下降許多，進而減少了有效碰撞的次數而降低分離解析度。

### 4.3.3 綜合兩參數之效應

推論出選取分離最佳化之  $t_{on}$  和  $t_{off}$  的依據後，綜合兩者及額外模擬 DNA 在其他  $t_{on}$  和  $t_{off}$  值下分離的結果，製成圖 4-29。電泳長度的選取依據與上節相同， $t_{on}=2.59$  的模擬長度均為 1mm，且長度與  $t_{on}$  成正比。



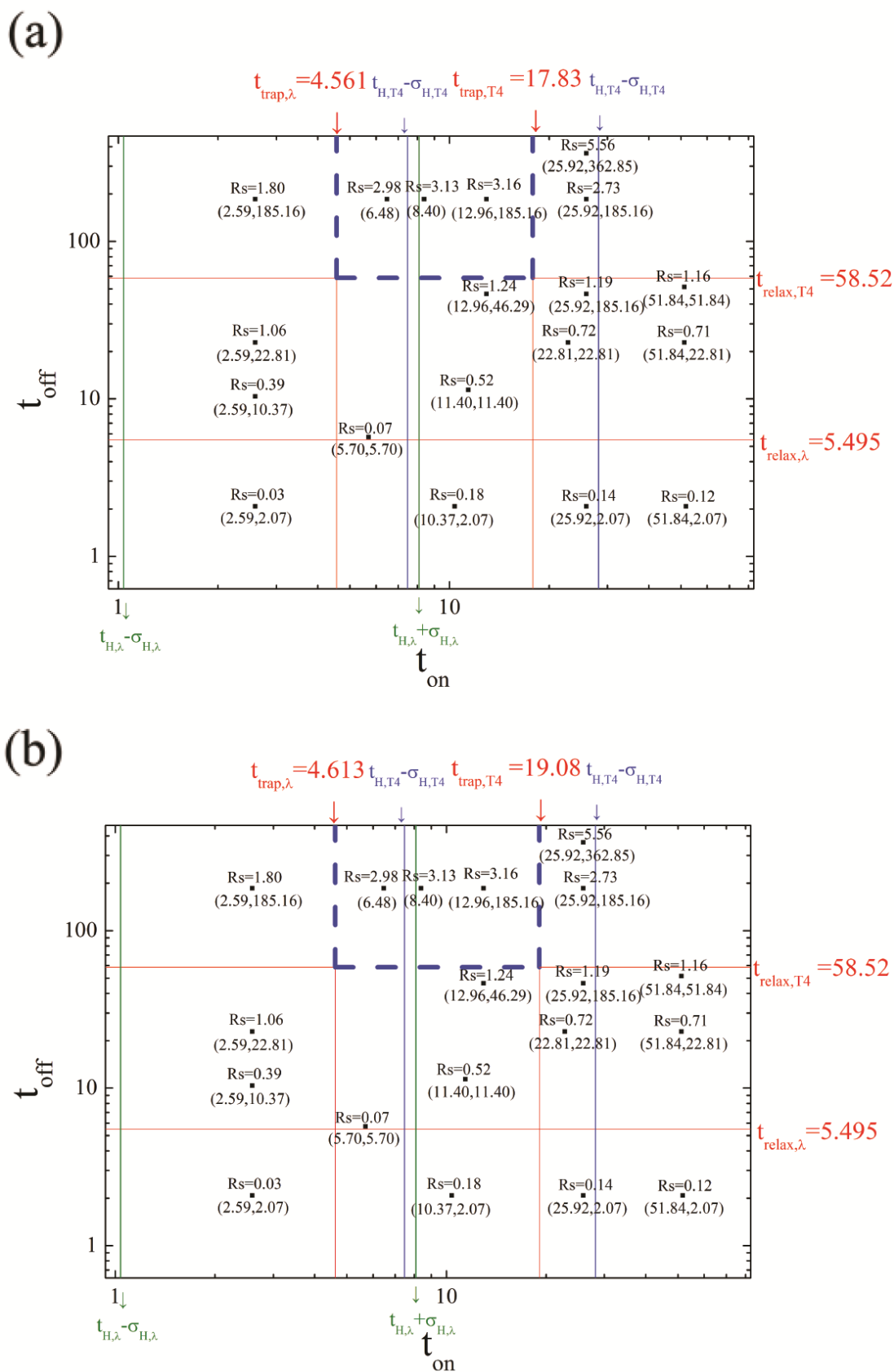


圖 4-29 DNA 於相同電場  $Pe=6$ ，在不同  $t_{\text{on}}$  和  $t_{\text{off}}$  下的分離解析度，以對數座標

表示。每點所在位置的 x 座標表示  $t_{on}$  之值、y 座標為  $t_{off}$  之值，而每點下方的參數隊表示對應的  $(t_{on}, t_{off})$ ，每點上方的 Rs 表示在該對應的  $t_{on}, t_{off}$  參數對下模擬的解析度，分別以(A)質心-時間關係圖求得之脫附時間與(B)以四象限法求得之脫附時間作為  $t_{on}$  的範圍標準。其中  $t_{trap,i}$  為 DNA 分子 i 的勾住時間， $\sigma_{H,i}$  該 DNA 勾住時間分布的一個標準差。

對於  $t_{off}$  的選擇而言應為越大越能提高解析度，在上圖中 y 方向越大的點就越能有較好的解析度，此現象在  $t_{on}=2.59, 12.95, 25.92, 51.84$  都可看出此趨勢，也就是說，較好的 DNA 分離在上圖中上方的部分；而對於  $t_{on}$  的選擇來說，解析度較好的部分在  $t_{trap,\lambda}$  與  $t_{trap,T4}$  之間，也就是紅線所框出的中間直排，此趨勢在  $t_{off}=2.073, 22.81, 46.29, 185.2$  都可看出。綜合兩項可知，最好的分離效果之點應分布於虛線框出之區域中。

為比較此節改良後的效果及差異，下表為在相同的電場  $Pe=6$ ，通道長度 15mm 下，連續電場和間歇性電場的數個分離較好的  $(t_{on}, t_{off})$  參數下，分離解析度的比較。

表 4-3 連續電場和間歇性電場在  $Pe=6$ ，15mm 下分離解析度的比較

$t_{on}$ 與 $t_{off}$ 值	分離解析度	時間
連續電場	0.18	207.34
間歇電場 $t_{on}=25.92, t_{off}=185.16$	3.34	1688.5
間歇電場 $t_{on}=12.96, t_{off}=185.16$	5.47	3169.6
間歇電場 $t_{on}=8.40, t_{off}=185.16$	6.73	4777.7

由上表可看出由連續電場改為間歇電場後分離解析度在高電場下有非常明顯的改善。

在此節中增加了 DNA 在垂直電場方向的投影長度，也著實達到更好的解析度，但我們仍發現能再度改進的地方，也就是在電場關閉時 DNA 的回縮常因障礙物陣列排列密集而碰撞受阻，因此節 4.4 中我們目標在於改變障礙物排列的方式，給予 DNA 更多回縮的空間進而使 T4-DNA 達到更理想的碰撞。並進一步增加分離解析度。

#### 4.4 於間歇電場下在含週期性間隙之六角陣列圓柱障礙物微流道中之電泳

為了創造 DNA 在電場關閉時的回縮空間，我們參考了 S. Park, D. W. Olson, K. D. Dorfman 的研究[35]中 nano-fence 的概念，如同圖 2-31 所示。此節中分別針對圖 4-30 數個流道設計分析其對解析度的差異。

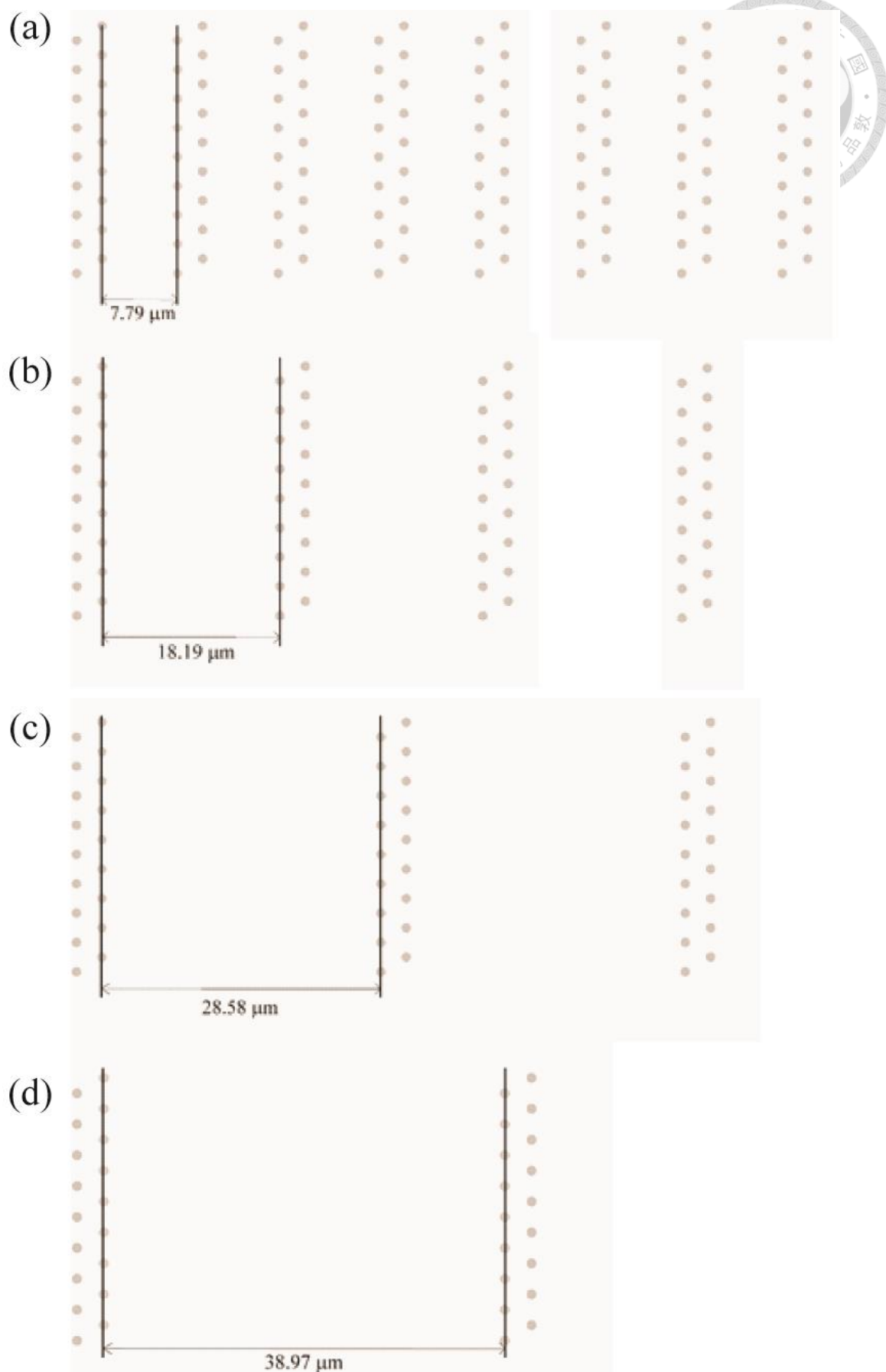


圖 4-30 數種改良後之障礙物排列。分別為(a)原六角陣列排列將每四排障礙物除去兩排使之成為空隙。(b)原六角陣列排列將每八排障礙物除去六排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十二排障礙物除去十排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十六排障礙物除去十四排使之成為空隙。

此節中我們將上節之間歇式電場運用在這些改良通道中，分析不同的空隙長度下對分離解析度的差異。

首先我們先選定幾組上節中使用過的( $t_{on}, t_{off}$ )參數，( $t_{on}, t_{off}$ )=(25.92, 185.16), (25.92, 46.29), (25.92, 2.592)及連續性電場，探討不同的空白處長度對於分離解析度的影響，結果如圖 4-31，在此我們對圖 4-30 數種改良後之障礙物排列。分別為(a)原六角陣列排列將每四排障礙物除去兩排使之成為空隙。(b)原六角陣列排列將每八排障礙物除去六排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十二排障礙物除去十排使之成為空隙。(c)原六角陣列排列將每十六排障礙物除去十四排使之成為空隙。圖 4-30 的(a), (b), (c)分別簡稱為 2 排, 6 排, 10 排空隙的裝置，而上節中沒有空白處的通道在此我們稱為 0 排。



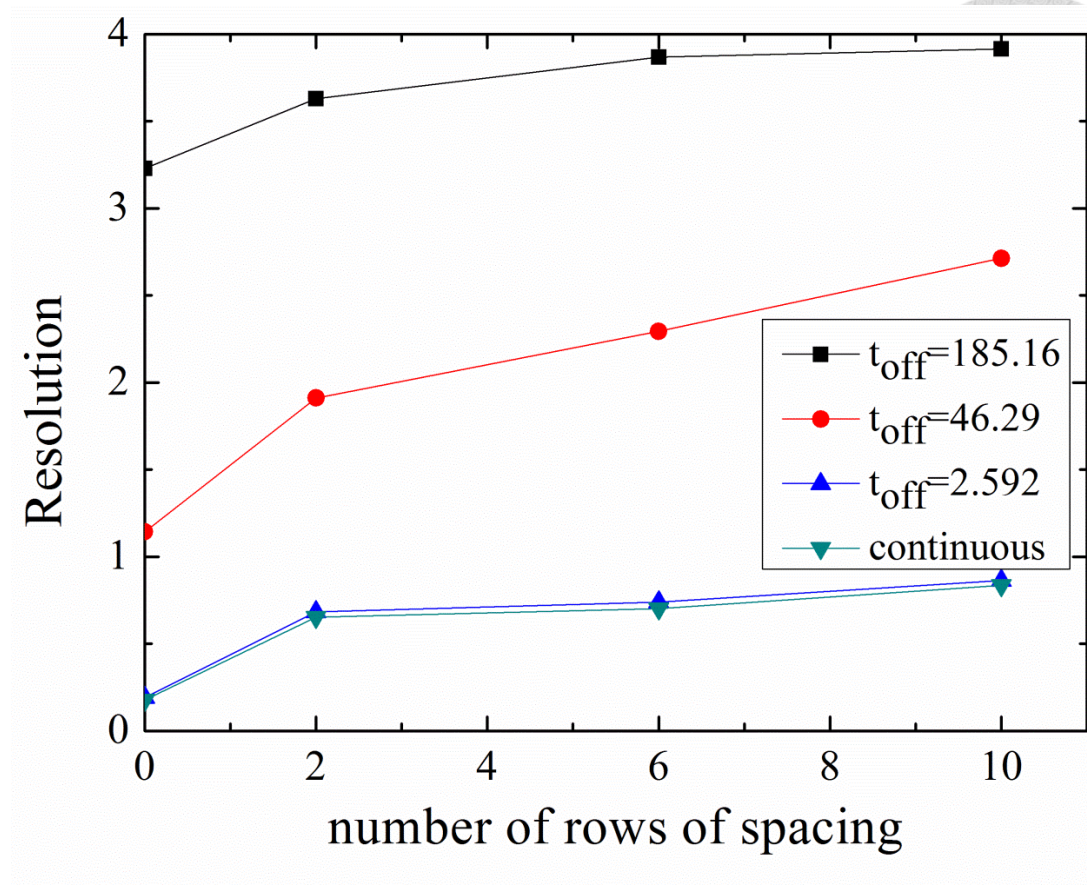


圖 4-31 相同的  $t_{\text{on}}=25.92$  在  $Pe=6$  下於 15mm 的微流道中電泳， $t_{\text{off}}=185.16$ , 46.29, 2.592 和連續電場的分離解析度對不同長度之空隙的關係圖

從上圖中可以看出幾個跡象，首先是加空隙後明顯的解析度較沒有加空隙的通道增加許多，說明這樣的改良確實增加了 DNA 鬆弛的程度，更能發生有效碰撞，從 DNA 的行為上也能看出此現象。而排數增加對於三種  $t_{\text{off}}$  的電泳來說都有增加解析度，最明顯的不同在於對於較長的  $t_{\text{off}}(=185.16)$  來說，從 6 排增加到 10 排空隙，分離解析度沒有增加很多；但對於較短的  $t_{\text{off}}(=2.592$  或 46.29) 電泳，如此的空隙增加卻使得解析度有明顯的增加。對此我們做細微的 DNA 行為分析。

對於 2 排空隙的裝置而言，空間不太足夠使 T4-DNA 鬆弛，同時電場關閉時 DNA 也非常容易停留在障礙物中，示意圖如圖 4-32。

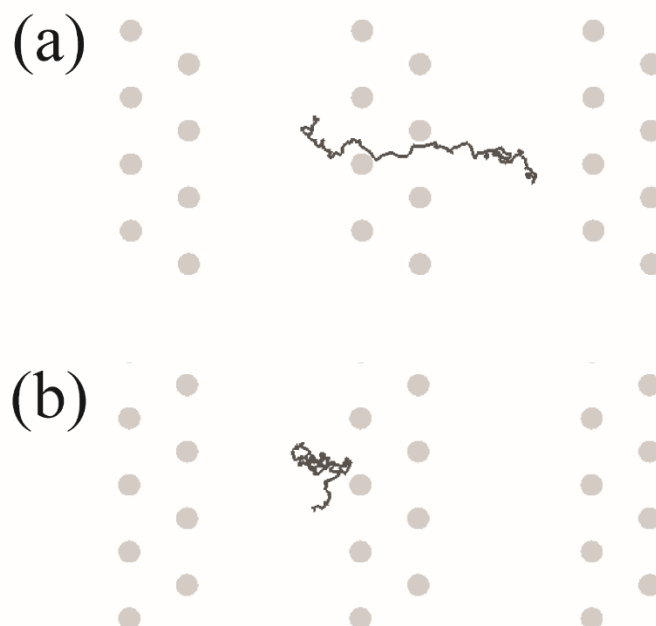


圖 4-32 電場關閉時(a)DNA 停留於空白處(b)DNA 停留於障礙物中

當 DNA 停留於障礙物中時，DNA 仍沒辦法有非常好的鬆弛。但在 6 排空隙時，通道便有足夠空間讓 DNA 鬆弛，因此使得當空隙從 2 排增加至 6 排時，分離解析度有顯著的增加。

接著若進一步將空隙從 6 排增加為 10 排，對於 T4-DNA 的鬆弛並沒有太大的影響，原因在於 6 排空隙約  $18\mu\text{m}$  的空間對於 T4-DNA 已相當足夠其進行鬆弛，因此更大的空隙並不會有顯著的影響。但此現象分析的前提是，必須有足夠的  $t_{\text{off}}$  讓 DNA 能進行足夠的鬆弛，也就是圖 4-31 中的  $(t_{\text{on}}, t_{\text{off}}) = (25.92, 185.16)$ ，若  $t_{\text{off}}$  太短以至無法有良好的鬆弛，那麼上述空隙大小對於解析度影響的分析就無法成立。

因此對於  $(t_{\text{on}}, t_{\text{off}}) = (25.92, 46.29)$  這樣小的  $t_{\text{off}}$  值，鬆弛不完全，故不足已影響分離解析度，取而代之的是 DNA 移動於空隙處時布朗力造成的垂直電場方向之擴散效應。

如此一來，DNA 從前一個障礙物中離開後，中間空隙的長度越長，DNA 便有更大的機會可以做垂直電場方向的位移，因此遇上下一組障礙物時就能有較良好的有效碰撞，示意圖如圖 4-33：

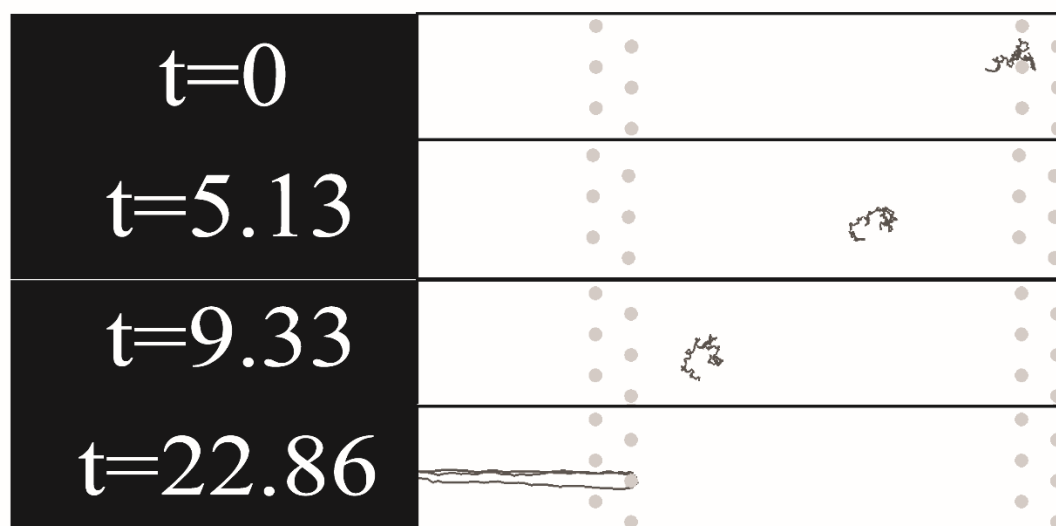


圖 4-33 圖中的空隙為 10 排障礙物。DNA 離開前一段障礙物後，經過一段沒有障礙物填充的空隙時，因布朗力造成垂直電場方向的擴散與位移，使得 DNA 在進入下一段障礙物時能造成有效的碰撞。從  $t=0$  到  $t=9.33$  之間可以看出 T4-DNA 因布朗力造成向下移動約半個圓心距且 DNA 型態改變，使得碰到下一排障礙物時 DNA 勾住障礙物。

以上的現象可解釋圖 4-31 中， $t_{\text{off}}=2.592$  和 46.29 的模擬，從 6 排空隙到 10 排空隙有較明顯的分離解析度差異的原因。除此之外，這樣微流道的改良最大的收穫是不論空隙的長度多少，分離解析度均較沒有空隙時還要高出許多。

節 4.5 中，我們將對於上述所有的變因設計對於 DNA 分離解析度的影響，針對所需的時間成本與設備成本做全盤式的分析與討論。



## 4.5 不同裝置下的總結分析

從 K. D. Dorfman 在含六角陣列的圓柱障礙物微流道，使用連續性電場作 DNA 的電泳分離開始，我們做了一連串的改良，包括改變障礙物的導電度、將連續性電場改為間歇性電場、改變障礙物的排列幾何形狀，而在此節中將對不同的改良作全面性的分析。

在節 4.3.3 中，我們已對間歇性電場的所有模擬結果，針對固定的電場開關次數作分離解析度上的比較，目的在於分析不同的電場開關時間參數下每一次開閉對於解析度的效果，但在實際的用途上，固定電場開關次數並不是個實用的標準，若  $t_{\text{off}}$  很長，則電泳一特定電場開閉次數可能會需要非常長的電泳時間，消耗時間成本；反之若  $t_{\text{off}}$  很短，則電泳一特定電場開閉次數可能會需要非常長的通道，消耗製作成本，如此一來即使有很好的解析度，經濟上也是不太有效率的。

首先我們固定通道長度 15mm，針對節 4.1 連續電場的各  $Pe$  值、節 4.3 的間歇性電場的各  $(t_{\text{on}}, t_{\text{off}})$  值、節 4.4 間歇性電場下含周期性間隙微流道下，分析每個模擬的分離解析度與電泳所需時間的關係，如圖 4-34。

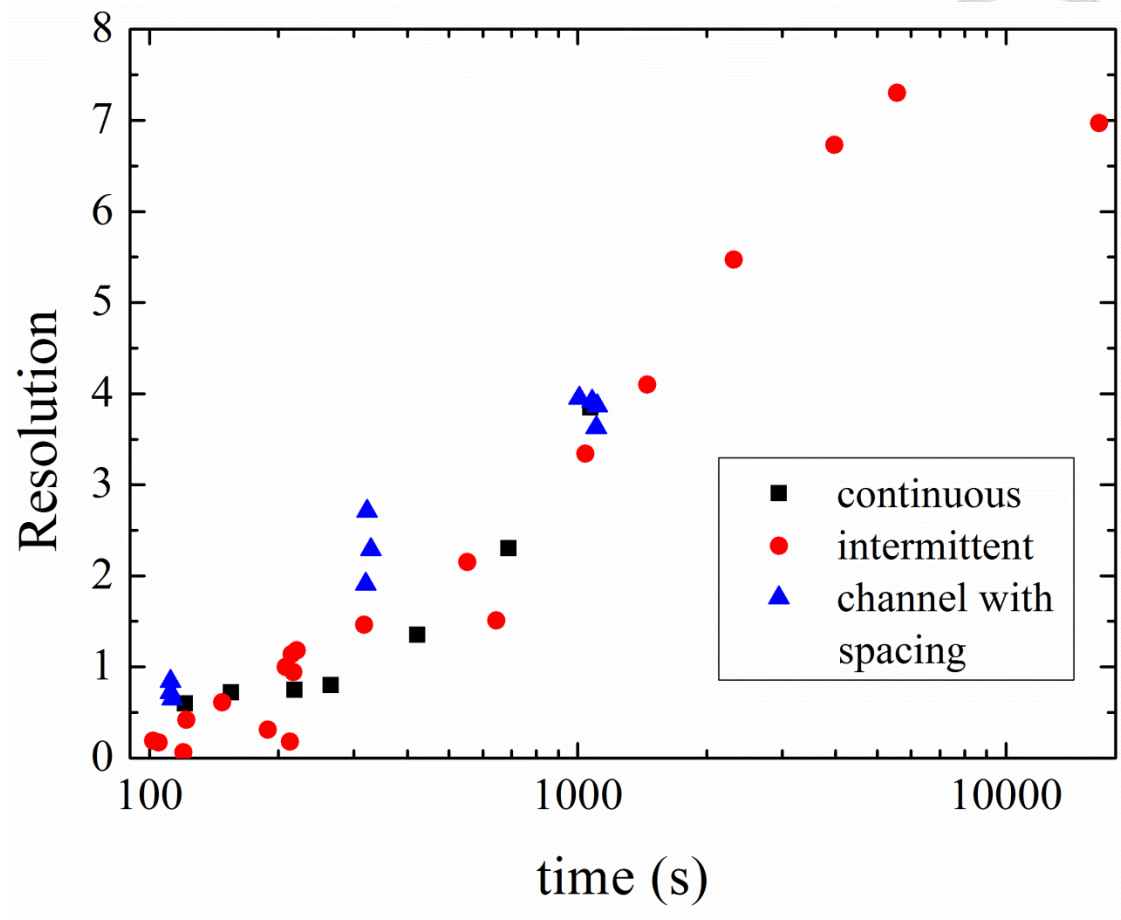


圖 4-34 比較 DNA 在連續電場(正方形)下，間歇性電場(圓形)下，以及含有空隙的通道中(三角形)的分離解析度比較，DNA 皆在相同的 15mm 通道長度中電泳，其中間歇性電場及含有空隙通道的 DNA 皆在  $Pe=6$  的高電場下進行電泳，而連續性電場的電場由左至右分別為  $Pe=6, 4, 3, 2.5, 1.81, 1.2, 0.8$ 。

圖 4-34 中，模擬的點落於越左上方，表所需的時間少，分離解析度大，為越理想的點。正方形連續電場的點中越左方的點表電場越大的模擬，因此分離解析度越低，所需的時間也越少；圓形間歇性電場的點取自圖 4-29 的結果，皆為  $Pe=6$ ，在圖 4-34 中，僅有少數的點坐落於正方形連續電場的左上方，意指雖然能在高電場下有相當好的分離解析度，但大多數因  $t_{off}$  的存在而增加了非常多的電泳時間，與連續電場相比效率也並不完全改善。



在三角形含空隙之微流道的點，取自節 4.4，均為  $Pe=6$ ，可分為三個群，最左的三個點表示  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 2.592)$ ，而三個點又分別代表不同長度的空隙；中間的三個點表示  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 46.92)$ ，右邊的三個點表示  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 185.16)$ 。圖 4-34 中可看出三角形的點均坐落於正方形與圓形點的左上方，且在同樣通道長度與同樣電泳時間下，中間的  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 46.92)$  較連續電場之模擬有更好明顯的分離解析度改善，因此更能節省時間成本。

另外我們也對相同的電泳時間下，分析以上所有狀況分離解析度對通道長度的關係，如圖 4-35。

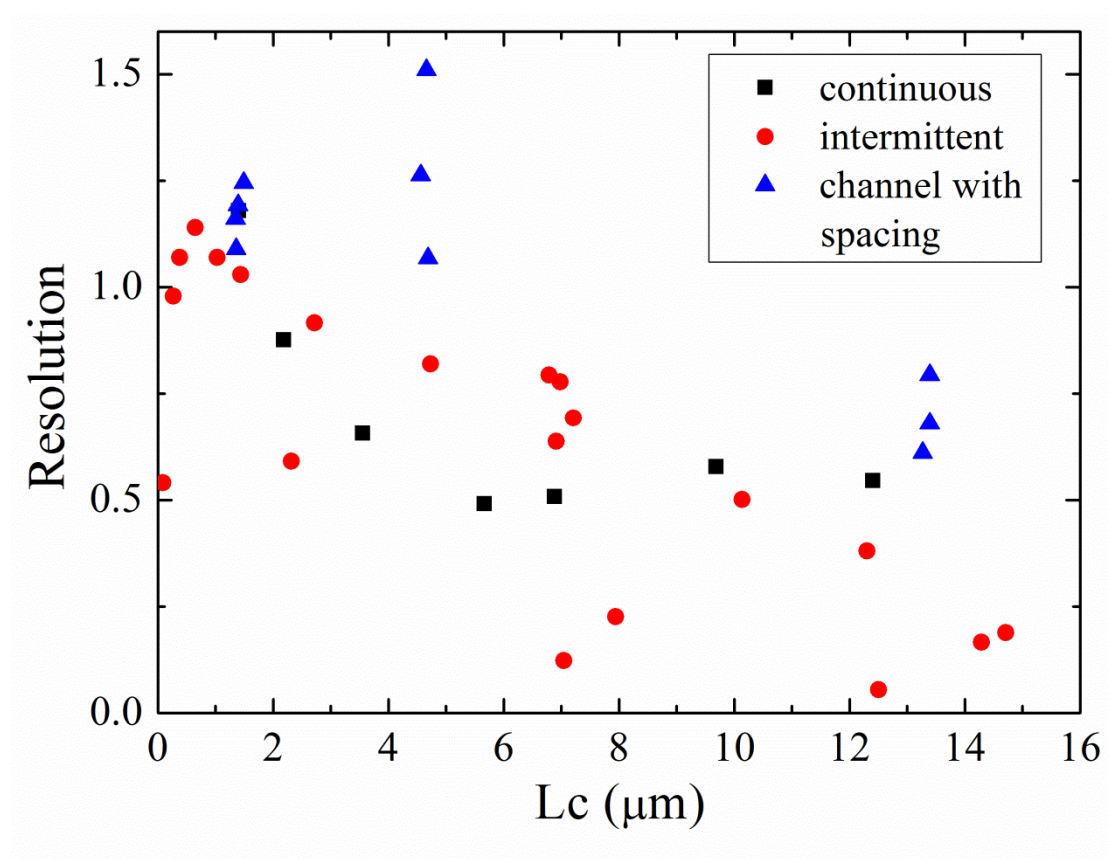



圖 4-35 比較 DNA 在連續電場(正方形)下，間歇性電場(圓形)下，以及含有空隙的通道中(三角形)的分離解析度比較，DNA 皆在相同的電泳時間  $t=5183$ (選定在這樣的時間下，最長的模擬電泳長度為 15mm)，其中間歇性電場及含有空隙通道的 DNA 皆在  $Pe=6$  的高電場下進行電泳，而連續性電場的電場由左至右分別

為  $Pe=0.8, 1.2, 1.81, 2.5, 3, 4, 6$ 。



從圖 4-35 中，越左上方表示可以較短的通道就能達到較好的分離解析度，為越理想的點。正方形連續電場的點中越左方的點表電場越大的模擬，因此分離解析度越低，所需的通道長度也越少；圓形間歇性電場的點與圖 4-34 中的趨勢相似，僅有少數的點坐落於正方形連續電場的左上方。在三角形含空隙之微流道的點，取自節 4.4，均為  $Pe=6$ ，可分為三個群，最左的三個點表  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 185.162.592)$ ，而三個點又分別代表不同長度的空隙；中間的三個點表示  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 46.92)$ ，右邊的三個點表示  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 2.592)$ ，其排列與圖 4-34 相反。圖 4-35 中可看出三角形的點在相同的通道長度時，均坐落於正方形與圓形點的上方，且中間的  $(t_{on}, t_{off})=(25.92, 46.92)$  較連續電場之模擬有更好明顯的分離解析度改善，因此更能節省時間成本。

## 第5章 結論



DNA 的分離純化為醫療疾病篩檢上的一個重要的步驟，但傳統的 DNA 純化需要花費非常多的時間，嚴重影響篩檢的效率，甚至可能延誤疾病的診療，因此研究出節省時間成本且有效率的 DNA 分離是我們的目標。

從含絕緣、六角陣列排列的圓柱障礙物的微流道中電泳的文獻中，我們發現了其在高電場下分離效率不彰的問題，因此只能在低電場下，需相當多的電泳時間才能有良好的分離，我們從改善此問題為出發點，以增加高電場下 T4-DNA 的碰撞頻率為目的，進一步改良設備，進而將絕緣的障礙物改為導電的障礙物。

導電圓柱障礙物確實增加了 DNA 的碰撞頻率，但每次的碰撞都只是擦過障礙物，因 DNA 碰撞前均為長條狀，且僅在兩排障礙物所形成的空間中流動，雖有碰撞但不為有效碰撞，並沒有增加高電場下的分離解析度。

從導電障礙物的改良中我們開始重視 T4-DNA 在碰撞到障礙物前的型態，希望將長條狀改為易形成有效碰撞的線圈狀，因此我們引入間歇性開關電場的概念，取代原本的連續性電場，當電場關閉時，DNA 會開始鬆弛，而漸漸轉變為線圈狀，當電場再開啟就可以形成有效碰撞，且 T4-DNA 會有更久的脫附時間，使得分離效果更顯著，間歇性電場的改良使得高電場下 DNA 的分離解析度更好，且電場開閉的時間非常容易調控，可針對需求進行調整，但從 DNA 通道中的行為發現，六角陣列的圓柱障礙物限制了 DNA 鬆弛的空間，使得有些鬆弛行為只讓 DNA 縮短，並沒有形成線圈狀，因此我們的目標轉變為增加 DNA 在微流道中的鬆弛空間。

接著我們在微流道中增加週期性空隙，當電場關閉，DNA 鬆弛時落入空隙中，DNA 會更傾向於鬆弛成線圈狀，這樣的改變確實明顯增加了分離解析度，從時間成本與通道長度上做分析也較最初的連續電場節省了許多成本，增加了分離解析度。



從模擬上的 DNA 行為，我們確實在一連串的改良中達到了目標，接下來的  
工作就是將模擬實際化，在實驗中也能達到預期中的效果，而最後能實體化，對  
醫療篩檢上能有實質上的貢獻。



## 第6章 參考文獻



1. Zimm, B.H., *Extension in Flow of a DNA Molecule Tethered at One End*. Macromolecules, 1998. **31**(18): p. 6089-6098.
2. Kim, J.M. and P.S. Doyle, *A Brownian dynamics-finite element method for simulating DNA electrophoresis in nonhomogeneous electric fields*. The Journal of Chemical Physics, 2006. **125**(7): p. -.
3. Randall, G.C. and P.S. Doyle, *DNA Deformation in Electric Fields: DNA Driven Past a Cylindrical Obstruction*. Macromolecules, 2005. **38**(6): p. 2410-2418.
4. Teraoka, I., *Models of Polymer Chains*, in *Polymer Solutions*. 2002, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-67.
5. 黃秋德, 以布朗動態法模擬 DNA 在微流道中受流場拉伸之研究. 國立台灣大學工學院化學工程學系暨研究所, 2013.
6. 林宗賢, 以布朗動態法模擬與優化電泳拉伸 DNA 之策略. 國立台灣大學工學院化學工程學系暨研究所, 2011.
7. Dorfman, K.D. and H. Brenner, *Convective dispersion without molecular diffusion*. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 2003. **322**(0): p. 180-194.
8. Watson, K.D., *Flory, Paul John*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
9. Chan, T., *Stochastic processes in polymeric fluids* H. C. Öttinger. Springer, Berlin, 1996. pp. 362, price DM98.00. ISBN 3-540-58353-X. Polymer International, 1997. **43**(3): p. 290-290.
10. Heller, C., T. Duke, and J.L. Viovy, *Electrophoretic mobility of DNA in gels. II. Systematic experimental study in agarose gels*. Biopolymers, 1994. **34**(2): p. 249-259.
11. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, 1984. **37**(1): p. 67-75.
12. Cantor, C.R., C.L. Smith, and M.K. Mathew, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Very Large DNA Molecules*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 1988. **17**(1): p. 287-304.
13. Anand, R., *Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules*. Technical focus, 1986. **0168**: p. 278-282.
14. Doyle, P.S., et al., *Self-Assembled Magnetic Matrices for DNA Separation Chips*. Science, 2002. **295**(5563): p. 2237-2237.
15. Kaji, N., et al., *Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field*. Analytical Chemistry, 2003. **76**(1): p. 15-22.

16. Cho, J. and K.D. Dorfman, *Brownian dynamics simulations of electrophoretic DNA separations in a sparse ordered post array*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(34): p. 5522-5528.

17. Ou, J., S.J. Carpenter, and K.D. Dorfman *Onset of channeling during DNA electrophoresis in a sparse ordered post array*. Biomicrofluidics, 2010. **4**, 13203 DOI: 10.1063/1.3283903.

18. Olson, D.W. and K.D. Dorfman, *Experimental study of the effect of disorder on DNA dynamics in post arrays during electrophoresis*. Physical Review E, 2012. **86**(4): p. 041909.

19. Dorfman, K.D., et al., *Beyond Gel Electrophoresis: Microfluidic Separations, Fluorescence Burst Analysis, and DNA Stretching*. Chemical Reviews, 2012. **113**(4): p. 2584-2667.

20. Randall, G.C. and P.S. Doyle, *Collision of a DNA Polymer with a Small Obstacle*. Macromolecules, 2006. **39**(22): p. 7734-7745.

21. Minc, N., J.-L. Viovy, and K.D. Dorfman, *Non-Markovian Transport of DNA in Microfluidic Post Arrays*. Physical Review Letters, 2005. **94**(19): p. 198105.

22. Mohan, A. and P.S. Doyle, *Stochastic Modeling and Simulation of DNA Electrophoretic Separation in a Microfluidic Obstacle Array*. Macromolecules, 2007. **40**(24): p. 8794-8806.

23. Kim, J.M. and P.S. Doyle, *Brownian Dynamics Simulations of a DNA Molecule Colliding with a Small Cylindrical Post*. Macromolecules, 2007. **40**(25): p. 9151-9163.

24. Randall, G.C. and P.S. Doyle, *Electrophoretic Collision of a DNA Molecule with an Insulating Post*. Physical Review Letters, 2004. **93**(5): p. 058102.

25. Larson, R.G., et al., *Brownian dynamics simulations of a DNA molecule in an extensional flow field*. Journal of Rheology (1978-present), 1999. **43**(2): p. 267-304.

26. Minc, N., et al., *Motion of single long DNA molecules through arrays of magnetic columns*. Electrophoresis, 2005. **26**(2): p. 362-375.

27. Olson, D.W., et al., *Continuous-time random walk models of DNA electrophoresis in a post array: Part I. Evaluation of existing models*. ELECTROPHORESIS, 2011. **32**(5): p. 573-580.

28. Dorfman, K.D., *DNA electrophoresis in microfluidic post arrays under moderate electric fields*. Physical Review E, 2006. **73**(6): p. 061922.

29. Dorfman, K.D., *Exact computation of the mean velocity, molecular diffusivity, and dispersivity of a particle moving on a periodic lattice*. The Journal of Chemical Physics, 2003. **118**(18): p. 8428-8436.

30. Gauthier, M.G., G.W. Slater, and K.D. Dorfman, *Exact lattice calculations*

of dispersion coefficients in the presence of external fields and obstacles. The European Physical Journal E, 2004. **15**(1): p. 71-82.

31. Olson, D.W., et al., *Continuous-Time Random Walk Models of DNA Electrophoresis in a Post Array: II. Mobility and Sources of Band Broadening*. Electrophoresis, 2011. **32**(5): p. 581-587.

32. Minc, N., et al., *Quantitative Microfluidic Separation of DNA in Self-Assembled Magnetic Matrixes*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(13): p. 3770-3776.

33. 曹恆光, 王., *布朗運動、朗之萬方程式、與布朗動力學*. 物理雙月刊, 2005. 二十七卷三期.

34. Trahan, D.W. and P.S. Doyle, *DNA Collisions with a Large, Conducting Post*. Macromolecules, 2010. **43**(12): p. 5424-5432.

35. Park, S.-G., D.W. Olson, and K.D. Dorfman, *DNA electrophoresis in a nanofence array()*. Lab on a chip, 2012. **12**(8): p. 1463-1470.

36. Marko, J.F. and E.D. Siggia, *Stretching DNA*. Macromolecules, 1995. **28**(26): p. 8759-8770.

37. Jendrejack, R.M., J.J. de Pablo, and M.D. Graham, *Stochastic simulations of DNA in flow: Dynamics and the effects of hydrodynamic interactions*. The Journal of Chemical Physics, 2002. **116**(17): p. 7752-7759.

38. Jendrejack, R.M., et al., *Shear-induced migration in flowing polymer solutions: Simulation of long-chain DNA in microchannels*. The Journal of Chemical Physics, 2004. **120**(5): p. 2513-2529.

39. Jendrejack, R.M., et al., *Effect of confinement on DNA dynamics in microfluidic devices*. The Journal of Chemical Physics, 2003. **119**(2): p. 1165-1173.

40. Heyes, D.M. and J.R. Melrose, *Brownian dynamics simulations of model hard-sphere suspensions*. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 1993. **46**(1): p. 1-28.

41. Altenbach, J., Segerlind, L. J., *Applied Finite Element Analysis*. New York-London-Sydney-Toronto, John Wiley & Sons 1976. XIII, 422 S., £ 12.60. ZAMM - Journal of Applied Mathematics and Mechanics / Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik, 1979. **59**(10): p. 583-583.

42. Hsieh, C.-C. and T.-H. Lin, *Simulation of conformational preconditioning strategies for electrophoretic stretching of DNA in a microcontraction*. Biomicrofluidics, 2011. **5**(4): p. 044106-044106-17.

43. Underhill, P.T. and P.S. Doyle, *On the coarse-graining of polymers into bead-spring chains*. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2004. **122**(1-3): p. 3-31.

44. 王勝弘, *於圓柱陣列微流道中以間歇式電場分離 DNA — 電場強度及開*

關頻率之影響. 台大化工, 2015.

