

國立臺灣大學工學院機械工程學系



碩士論文

Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

紙流道應用於種豬基因型鑑定

之整合性核酸檢測套件

Integrated Nucleic Acid Detection Kit on Paperfluidics
for Genotyping of Breeding Pigs

謝昀靜

Yun-Jing Xie

指導教授：楊鏡堂 博士

Advisor: Jing-Tang Yang, Ph.D.

中華民國 110 年 7 月

July, 2021

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

紙流道應用於種豬基因型鑑定之整合性核酸檢測套件
Integrated Nucleic Acid Detection Kit on Paperfluidics
for Genotyping of Breeding Pigs

本論文係謝昫靜君（學號 R08522304）在國立臺灣大學機械工程學系完成之碩士學位論文，於民國 110 年 7 月 6 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：

楊鏡堂

（簽名）

（指導教授）

楊瑞珍

賴裕廷

葉思沂

系主任

林添群

（簽章）



致謝

這趟北漂學習之旅首先最要感謝指導教授楊鏡堂博士，兩年前親自打電話通知願意收我進入實驗室，謝謝一路上老師利用豐富經驗與專業判斷引導迷惘中的學生，使整趟研究生涯雖邊跌邊跑但總是維持在正確方向上，除了學業方面，更在人生與角色定位上帶給我莫大的自信與提點。接著要感謝的是我的家人，謝謝他們包容我的任性，謝謝他們時時刻刻都想匯錢過來的那份關心，謝謝他們在我最無助的時候讓我擁有了另一個家人—狗狗毛豆，也謝謝他們辛苦承擔了因疫情而起的加倍擔憂，放手讓我在北部專心準備畢業。

研究上感謝王子明博士在生物技術上給予學生耐心且關鍵的指導，更使學生大開眼界，在陌生的跨領域研究中收穫甚廣；謝謝農藝系董致韡教授與其學生，分享實驗器材並熱心協助處理問題；謝謝基育生物科技的學長們，在研究後期教導學生生技概念並協助量測樣品；謝謝台大生技中心相關計畫贊助，使學生無後顧之憂。

在實驗室內，謝謝助理禹靜總默默關心著我的狀態，幫助並提醒我們許多行政細節，而且，廚藝之好肉骨茶好喝；謝謝藍博協助學生的論文修改潤飾，並在分析實驗資料上為學生帶來方向；謝謝博士班學長們親和友善，在學術上為後輩們樹立起典範，其中特別謝謝睿甫，讓我在剛到台北的適應期有個大學同鄉的陪伴，並傳承許多研究經驗給我，祝福睿甫一定要功成名就；謝謝千茵、靖玟、翊庭、佑叡，從椰林大道走到海濱大道，甩過無數彎道、集了無數加速氮氣，最後終於一起踩過終點線；謝謝學弟妹怡妘、家柑、以樂用心且細心的協助我們，日後若不小心遺落了軍籍牌，即使在深海下，只要卡門渦街一日存在，我都會義不容辭地出手相助，學海無涯游泳要換氣。

最後，謝謝高一成團至今的台中 SHE，謝謝陪我從「我很好」走到「我真的很棒」的台南人們和高美人，朋友在精不在多；還要深深感謝摯愛毛豆、摯友 Moni、大大、啾咪、汀州路小尾、醉月湖薑母鴨，你們都不會說人話，但卻給了我最多的回應，真摯快樂。



摘要

本研究主旨為開發具備完整樣品處理能力的整合性核酸檢測套件，將 DNA 萃取、目標基因片段擴增與奈米金探針檢測等多步驟整合於紙流道檢測裝置，減少檢驗過程對儀器設備的依賴並降低塑膠製品的使用量，應用方面則以種豬基因型篩檢為標的。檢測裝置以友善使用為設計目標，利用紙基底簡易過濾樣品雜質，提高核酸純度，並與事先乾燥的擴增試劑及引子相互反應，減少人為操作裝置之需求，而整套紙基底檢測平台皆封裝於膠膜中以降低試劑蒸發，提供方便、快速且低成本之核酸檢測裝置。

本研究透過酸鹼指示劑將酸鹼中和反應過程的流場可視化，本研究發現兩不同溶液在紙流道上的相互反應只會出現在兩液交界面，無法充分混合，而鄰近紙張邊緣的流體流速相對紙張中央的流體流速慢，改變紙張幾何對流場變化無明顯影響。將紙基底平台利用實際樣品進行生物實驗時，對於血樣的製備本研究僅在血液中添加 RBC 緩衝液用以打破血球與稀釋濃稠血液，由此配方執行纖維素紙基底萃取後之萃取產物雜質較多，但並不會抑制擴增反應，而在擴增區則是利用定點式的擴增方法在玻璃纖維紙材中進行 RPA 恆溫擴增，檢測區結合市售 HybriDetect—Universal Lateral Flow Assay Kit 實現可視化結果判讀，由各單一功能紙基底元件整合成紙流道檢測系統，將整體裝置包含萃取區、擴增區以及檢測區緊密包覆於護貝膜中避免水份蒸發與外在環境汙染，最後檢測結果基於單一核苷酸差異的引子專一性不足，無法進行有效篩檢，然而已驗證本裝置可由未經處理的血樣，藉由紙流道系統處理樣品中核酸的萃取及擴增，並於 50 分鐘內獲得肉眼可辨別的擴增訊號。

於未來期盼使裝置的適用性更為廣泛，包括透過更多的臨床樣品驗證裝置的準確度與穩定性，並可應用在更多種來源的樣品檢測，為即時診斷概念應用於核酸檢測中盡一份心力。

關鍵字：紙基底擴增、紙基底萃取、技術整合、側層流檢測、核酸檢測



Abstract

This research aims to develop an integrated nucleic acid detection kit with multiple samples preparing steps such as DNA extraction, gene fragment amplification, and nanogold probe detecting technique. The nucleic acid detection system is built on paperfluidics which help reduce the reliance on precise instruments and the consumption of plastic products in the inspection process. In terms of application, the study takes the genotyping test of breeding pigs as an example. The paper-based device is designed to be user-friendly by involving an easy sample filtering via cellulose substrate and making the pure product automatically interact with pre-dried amplification reagent and primers. This design reduces the need for manual operation of the device. The entire paper-based detection platform will be packaged in the film to provide a convenient and low-cost nucleic acid detection device.

Through the acid-base indicator to visualize the flow field of the acid-base reaction, the study found that the reaction of two different solutions on the paper-based channel only occurs at the interface of two liquids and cannot be fully mixed. The velocity of the fluid adjacent to the edge of the paper is relatively slower than the fluid in the center of the paper. Changing the geometry of the paper has no obvious effect on the flow field behavior. For the set of biological experiments, this study only adds RBC buffer to the original blood samples to break the blood cells and dilute the thick blood. With this extraction formula, the extraction product still contains impurities after the paper-based extraction, but the experiment results show that the impurities do not inhibit the amplification reaction. In the amplification zone, a fixed-point amplification method is used to perform RPA amplification. The detection zone is combined with the HybriDetect—Universal Lateral Flow Assay Kit which is a commercial lateral flow detecting strip with visual results on the test/control line. Integrating each functional

paper-based element as the paperfluidics detection system, the system which includes an extraction zone, an amplification zone, and a detection zone is tightly wrapped in a laminating film to avoid the evaporation of fluid and pollution from the environment. In this study, the final results of the genotyping test are not specific because of the primer design. However, it has been verified that the device can be used to extract and amplify nucleic acids from unprocessed blood samples and obtain the visual amplified signal within 50 minutes through an integrated paperfluidics system.

In the future, the issue of specificity should be dealt with first. Then the device can try to be verified by more clinical samples and sustain different sample sources, and enhance the detection accuracy and the stability of the system. Hoping the integrated detecting device can change the current process of nucleic acid detection and implement the concept of point-of-care.

Keywords: amplification, extraction, paperfluidics, lateral flow strip, nucleic acid detection, integrated device

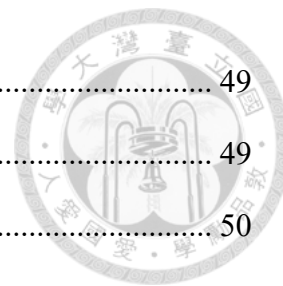


目錄

論文口試委員審定書	I
致謝	II
摘要	III
Abstract.....	IV
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	XII
符號說明	XIII
第一章 前言	1
1-1 研究背景.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 文獻回顧	3
2-1 微流道基材.....	4
2-1.1 聚二甲基矽氧烷.....	4
2-1.2 紙流道.....	5
2-2 紙流道流動理論.....	7
2-2.1 飽和流.....	7
2-2.2 部分飽和流.....	8
2-3 分子生物技術.....	9
2-3.1 核酸萃取.....	9
2-3.2 核酸擴增技術.....	11
2-3.3 核酸品質驗證.....	14
2-4 種豬遺傳特徵.....	15
2-5 紙流道於基因型鑑定之應用.....	15



第三章 研究方法	21
3-1 紙流道製備	22
3-1.1 紙基底材質	22
3-1.2 紙流道製作	22
3-1.3 流場觀測	24
3-2 側層流分析	25
3-3 DNA 探針設計	27
3-4 樣品處理與核酸分析	27
3-4.1 血樣製備	27
3-4.2 核酸洗出	28
3-4.3 核酸濃度量測	28
3-4.4 核酸性質分析	30
3-5 實驗操作	33
3-5.1 擴增步驟	33
3-5.2 整合裝置流程	35
3-6 檢測裝置製作與使用方法	36
第四章 結果與討論	38
4-1 紙基底平台	38
4-1.1 幾何對流動現象之影響	38
4-2 量測方式驗證	40
4-2.1 驗證核酸洗出過程	41
4-2.2 兩種核酸濃度量測儀器比較	43
4-3 核酸萃取	46
4-3.1 紙基底萃取產物以試管擴增驗證	46
4-4 核酸擴增	47
4-4.1 紙基底擴增方式	47



4-4.2 擴增紙材選擇.....	49
4-5 整合後裝置之執行.....	49
4-5.1 裝置設計.....	50
4-5.2 裝置擴增.....	55
4-6 血樣基因型.....	58
4-7 裝置檢測結果.....	63
4-7.1 兩種市售檢測試紙比較.....	63
4-7.2 實際裝置執行.....	68
第五章 結論與未來展望.....	71
5-1 結論.....	71
5-2 未來工作.....	72
5-3 甘特圖.....	74
第六章 參考文獻.....	75



圖目錄

圖 2 - 1 文獻回顧架構圖	4
圖 2 - 2 與 μ TAS 相關之期刊篇數趨勢圖 (Yamada <i>et al.</i> , 2015).....	5
圖 2 - 3 即時診斷(point-of-care)裝置發展趨勢圖 (Liu <i>et al.</i> , 2019).....	6
圖 2 - 4 三種不同種紙基底之 SEM(Scanning Electron Microscope)圖，比例尺為 10 μ m (Rath <i>et al.</i> , 2018)	7
圖 2 - 5 平行排列毛細管示意圖	8
圖 2 - 6 流阻概念圖	8
圖 2 - 7 (a)纖維素萃取裝置，(b)纖維素裝置快速萃取流程。(Zou <i>et al.</i> , 2017).....	11
圖 2 - 8 PCR 熱循環圖	12
圖 2 - 9 利用 LAMP 擴增之微型恆溫加熱裝置 (Choi <i>et al.</i> , 2016).....	13
圖 2 - 10 LFA 裝置圖 (Bishop <i>et al.</i> , 2019).....	16
圖 2 - 11 檢測方式(a)三明治法，(b)競爭法。(Kasetsirikul <i>et al.</i> , 2020).....	17
圖 2 - 12 紙卡式檢測裝置 (Choi, Hu, Tang, <i>et al.</i> , 2016).....	18
圖 2 - 13 折疊式封閉檢測裝置 (Rodriguez <i>et al.</i> , 2016)	18
圖 2 - 14 結合摺紙技術之檢測裝置 (Reboud <i>et al.</i> , 2019).....	19
圖 3 - 1 研究方法架構圖	21
圖 3 - 2 流道裁切圖形.....	23
圖 3 - 3 流道尺寸圖(單位：mm).....	23
圖 3 - 4 各式幾何紙基底尺寸圖(單位：mm).....	24
圖 3 - 5 各式紙基底實際使用圖(紙片上較淺色處為酸液位置).....	25
圖 3 - 6 側層流裝置與功能示意圖	26
圖 3 - 7 市售側層流檢測試紙(a)NARD，(b)MGHD 1	26
圖 3 - 8 兩種檢測試紙控制線與檢測線指示	26
圖 3 - 9 DNA 探針應用示意圖	27



圖 3 - 10 傳統管柱萃取法流程.....	28
圖 3 - 11 微量分光光度計.....	29
圖 3 - 12 Qubit 螢光定量儀(圖片取自 Thermo Fisher Scientific 官方網站).....	30
圖 3 - 13 膠槽配置圖.....	31
圖 3 - 14 凝膠電泳裝置圖.....	31
圖 3 - 15 紫外光燈箱.....	32
圖 3 - 16 電泳圖範例.....	32
圖 3 - 17 加熱機器示意圖.....	34
圖 3 - 18 紙基底擴增步驟示意圖.....	34
圖 3 - 19 定點擴增示意圖.....	35
圖 3 - 20 實驗設置總整理圖.....	36
圖 3 - 21 裝置製作示意圖.....	37
圖 3 - 22 紙材堆疊示意圖(側視圖).....	37
圖 4 - 1 結果與討論架構圖.....	38
圖 4 - 2 不同幾何形狀結果圖.....	39
圖 4 - 3 流體前緣擷取.....	40
圖 4 - 4 殘留面積趨勢圖(四重複).....	40
圖 4 - 5 洗出緩衝液濃度與添加體積對洗出核酸的影響.....	41
圖 4 - 6 過夜浸泡與放置溫度對洗出核酸的影響.....	42
圖 4 - 7 各紙材原始數據與修正結果圖.....	46
圖 4 - 8 紙基底萃取產物實驗步驟示意圖.....	47
圖 4 - 9 紙基底萃取產物以試管擴增驗證.....	47
圖 4 - 10 流動與定點擴增電泳圖.....	48
圖 4 - 11 擴增紙材比較圖.....	49
圖 4 - 12 初始壓克力上蓋設計.....	50
圖 4 - 13 初始設計.....	51



圖 4 - 14 次代設計.....	51
圖 4 - 15 次代設計流動示意圖(恆溫加熱前).....	52
圖 4 - 16 次代設計流動示意圖(恆溫加熱後).....	52
圖 4 - 17 (a)原始擴增區配置。(b)擴增區新配置.....	53
圖 4 - 18 最終裝置設計.....	54
圖 4 - 19 各區尺寸圖(單位：mm).....	54
圖 4 - 20 加熱中之裝置擴增實驗圖.....	55
圖 4 - 21 樣品墊材質比較圖.....	56
圖 4 - 22 擴增加熱溫度比較圖.....	57
圖 4 - 23 實際實驗圖(不同操作手法).....	57
圖 4 - 24 操作手法比較圖.....	58
圖 4 - 25 HFABP103 基因座篩檢電泳圖.....	60
圖 4 - 26 HFABP89 基因座篩檢電泳圖.....	61
圖 4 - 27 HFABP411 基因座篩檢電泳圖.....	62
圖 4 - 28 引子資訊.....	63
圖 4 - 29 兩種試紙檢測實驗結果(添加增加專一性之引子).....	65
圖 4 - 30 兩種試紙檢測實驗結果(無添加增加專一性之引子).....	66
圖 4 - 31 MGHD 1 試紙對不同基因型之檢測結果.....	67
圖 4 - 32 完整裝置實際操作圖(單位：mm).....	68
圖 4 - 33 實際裝置檢測結果(a)當下結果，(b)隔日結果.....	70
圖 4 - 34 紙橋上血樣流動情形.....	70



表目錄

表 2 - 1 即時診斷七大準則.....	6
表 2 - 2 萃取方式比較表.....	10
表 2 - 3 核酸擴增技術比較表.....	14
表 2 - 4 不同預處理功能之紙基底材料整理.....	20
表 3 - 1 Whatman No.1 性質表.....	22
表 3 - 2 擴增配方.....	33
表 4 - 1 實驗條件參考表(圖 4 - 6).....	42
表 4 - 2 量測儀器數據比較.....	44
表 4 - 3 不同紙材浸泡後之背景螢光值比較表.....	44
表 4 - 4 原始數據與修正後結果之比較表.....	45
表 4 - 5 實驗條件參考表(圖 4 - 10).....	48
表 4 - 6 引子設計與位點資料.....	58
表 4 - 7 PCR 基因型篩檢結果整理表.....	59
表 4 - 8 實驗編號表(圖 4 - 29).....	65
表 4 - 9 實驗編號表(圖 4 - 30).....	66
表 4 - 10 實驗標號表(圖 4 - 31).....	67
表 4 - 11 實驗編號表(圖 4 - 33a &圖 4 - 34).....	69



符號說明

A	紙帶之截面積 (m^2)
D	擴散係數 (m^2/s)
K	導水度
L	流體前緣流動距離 (m)
ΔP	流經多孔性材料的端壓力差 (Pa)
Q	體積流率 (m^3/s)
R	電阻 (Ω)
r_{pore}	孔隙平均半徑 (m)
t	流體流動時間 (s)
γ	有效表面張力 (N/m)
κ	滲透性 (m^2)
μ	流體的黏滯係數 ($\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$)
θ	體積流率 (m^3/s)



第一章 前言

1-1 研究背景

核酸檢測可用於追捕病原體上特定序列的有無以實踐初期症狀篩檢，也可由生物體中的特定基因片段上的鹼基對排序進行遺傳疾病檢測。現行核酸檢測流程包含採集檢體、低溫送檢以及實驗室檢驗分析，而核酸的分析過程又可分為三大步驟，是為將雜質去除的核酸萃取、增強檢測訊號之片段擴增與最終之結果檢測。目前多數實驗室內針對核酸擴增步驟多以具有高檢測靈敏度優勢的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術為主，而市面上也以 PCR 技術為主體開發出包含樣品前處理及檢測結果判讀之全自動化 PCR 檢測儀器，然而，由於該類檢測儀器為精密昂貴的分析設備，對於使用環境及操作人員的專業要求甚高。本實驗室過去利用重組酶聚合酶擴增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技術及雜合探針 (hybridization) 於試管中進行高效率檢測 (Wang & Yang, 2019)，且藉由紙基底自蘭花汁液中有效萃取核酸並檢測蘭花病害 (Wang, 2019 Master Thesis)，本研究結合過去開發之技術將核酸檢測轉移至紙基底平台執行，在簡化繁雜人工操作之同時仍保持裝置對目標基因的靈敏度。

有幸生於寶島，此刻腳下踏的這片土地農牧業產業鏈穩健發展，根據農委會統計台灣一年飼養約 550 萬頭豬隻，其中種豬約有 61.8 萬頭，而國人對豬肉的食用量高於禽肉及牛肉是為國內主要肉類消費來源；除了內需市場，世界動物衛生組織 (Office International des Epizooties, OIE) 更於西元 2020 年 06 月 16 日正式將本國轉列為不須施打口蹄疫疫苗之非疫區，表示國內的生鮮豬肉取得登上國際舞台的機會。正因本國養豬產業面臨國外肉品進口分食內需市場，以及未來於外銷上的國際競爭比較，改良種豬基因或挑選基因較佳之豬隻以提升養殖效益和豬隻性能成為一項重要課題，基於台灣對豬隻的需求增大且豬的血液取得較容易，本研究在開發核酸檢測裝置時首先以種豬的基因型篩檢為應用。



1-2 研究動機

種豬為養豬業進行遺傳改良的基石，可藉由育種來汰除不良基因與選育理想基因，主要做法是依據種豬性能檢定來評鑑豬隻的生長性能、繁殖能力及肉質條件等，並篩檢緊迫基因、高肉質基因、多產基因。然而現行檢測技術門檻較高且過程費時，除了需要昂貴設備及儀器，檢測過程對於專業度的需求也較高(Hu *et al.*, 2014; Kasetsirikul *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021)，無法於養殖場內由飼主自行檢測。有別以往分子檢測流程皆於分子生物技術實驗室才能執行的模式，即時診斷(point-of-care testing, POCT)的觀念逐漸興盛，期望不論任何時間、地點及人員條件的情況下，皆能進行簡易之生醫檢測，如驗孕棒及血糖機一樣，達到快速診斷、操作簡單的目標。

為實現即時診斷之理念，許多研究及產品開發多微型化傳統實驗室檢測設備，研發出小型、多功能且可攜式裝置，使操作人員可於戶外定點區域搭建簡易實驗室，然此作法仍擺脫不了對儀器設備與電力系統的依賴。微流體領域應用於生醫檢測之相關研發相當蓬勃，透過微流體晶片上的流道設計將檢測步驟一一整合，具有裝置微小、反應快速、成本較低與生物相容性等優勢，其中，又以試紙製晶片基底之紙基底檢測晶片，又稱側層流檢測(lateral flow assays, LFA)，最受廣泛應用，主要因為紙的低成本、易加工性，且具有毛細作用可使內部流體不靠外力驅使達到自驅動效果。依據市場研究及預測推估，全球紙基底診斷的總市場規模可望從 2019 年至 2027 年間以 6.2%之成長率攀升到 106.9 億美元(Report and Data, 2020)。即使其檢測靈敏度不如精密儀器高，但考慮到方便性與追求即時檢測之目標，紙基底晶片深具發展潛力。

綜合上述，本研究欲透過紙基底於生醫檢測方面之優勢，將核酸萃取、擴增與檢測等繁雜之分子診斷技術利用紙流道設計整合為一完整平台，從產品開發及技術整合之角度切入市場，期望未來本研究開發之分子診斷套件可廣泛應用於農牧產業，使養豬戶能以快速、簡易的操作步驟立即獲得檢測結果，降低現有種豬緊迫基因篩檢技術的高門檻限制，於農牧業中落實即時診斷。



第二章 文獻回顧

1959 年，理論物理學家理查·費曼(Richard P. Feynman)以一句“‘There’s Plenty of Room at the Bottom’”為學術界吹起一道「微型化」的風，而後所引起的滔天巨浪席捲各方領域，至 1960 年代中期，人們嘗試透過半導體製程將機械結構製作於矽晶片上，並於 1980 年代時結合機械與電子元件之智慧型微小化的商品成功開發問世，該整合性系統即為微機電系統(micro-electro-mechanical-system, MEMS)之概念。微機電系統為跨領域整合技術，其技術範圍涵蓋機械、電控及生醫工程等多重科技，當產品微小化時，性能及品質將相對上升，用料成本也大幅降低，在追求輕薄短小、便利快速的世代，該技術扮演著重要的角色。

自微機電系統發展逐漸蓬勃後，學者們著手研究微觀尺度下之物理現象，而微流體領域即為探討微觀尺度下之流體行為。微流體晶片起初發展概念為利用微機電製程將流道縮小至微米尺度，稱為微流道(micro-channel)，由於尺度下降，微流體晶片具有小體積、低能耗優勢，而表面積與體積比之比值上升使得其同時也具備快速反應能力。微流體晶片的應用範圍甚廣，以單一元件功能包括微幫浦、微混合器、微反應器、微閥門、微感測器等等。1990 年時「微全分析系統」(micro total analysis system, μ TAS)概念開始萌芽，是為單一元件功能整合性利用，透過流道設計將反應物之預處理、運輸、純化、分析、檢測等多項步驟集於一片數公分大小的晶片上，將實驗室所需之龐大研究設備、複雜流程與人力需求簡化為一片微流體晶片(Manz *et al.*, 1990)。其整合後之功能跨及生態研究、生化反應、醫學研究以及臨床檢測。本研究旨在開發一快速基因型鑑定裝置，因此以下回顧將針對微流道基材、紙流道(paperfluidics)流體流動理論、分子生物技術、種豬遺傳特徵與目前現行基因型鑑定之檢測及應用，文獻架構圖如圖 2-1 所示。

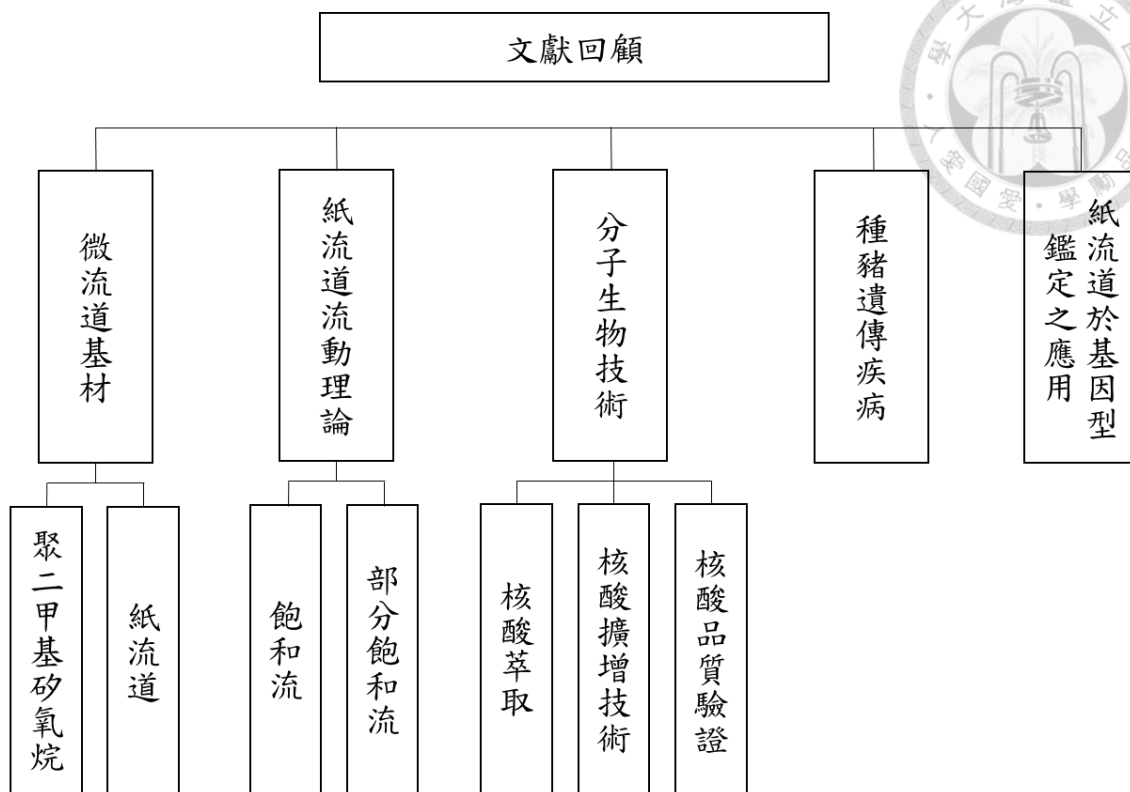


圖 2 - 1 文獻回顧架構圖

2-1 微流道基材

微流體晶片的製程技術最初是由半導體製程逐漸發展而來，因此最初流道多蝕刻於矽晶圓或陶瓷材料上，然而隨著研究持續發展，聚二甲基矽氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 成為多數流道的基材選擇，近十年來，由於紙流道在即時性分子檢測上具有強大優勢，因此也是新興之熱門基材，下面小節將針對此兩種基底材料進行介紹。

2-1.1 聚二甲基矽氧烷

聚二甲基矽氧烷為一種高分子有機矽化合物，因其成本較低與製作微流道的步驟相對簡單，同時具備高透光性與生物可相容性，因此目前微流體晶片的流道幾乎皆以該材料作為基材 (Eteshola & Leckband, 2001; Gale *et al.*, 2018; Rodriguez-Moncayo *et al.*, 2021)。其準備步驟需先製作母模，可利用微機電製程於矽晶圓上蝕刻出微小且精密的微流道圖樣 (pattern)，或利用雕刻機於壓克力板上銑削，接著再將調配好之 PDMS 黏稠液體倒上母模進行翻模，待其覆蓋均勻後再加熱固化，固



化後之 PDMS 模型即可從母模上取下，最後再將已翻模的模型接合面朝上放入氧電漿機(Oxygen Plasma)中進行表面改質，使上下模型可緊密接合，以 PDMS 為基底的微流道晶片即製作完成。

2-1.2 紙流道

比起 PDMS 晶片，以紙基材作為流體傳遞媒材之發展進程相對較短，即使紙基(paper-based)流體裝置之基礎早已奠定(Müller & Clegg, 1949)，但於近 60 年後哈佛大學 Whitesides 研究團隊才於 2007 年利用微影製程在色譜紙上印上疏水性聚合物，形成半封閉式流道限制流體流動範圍，並提出一套以紙為基底的生物檢測系統，是為微流體紙基材分析裝置(microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs)之概念(Martinez *et al.*, 2007)。由化學與生命科學之微型化系統國際研討會公布的圖可發現，微全分析系統相關的研究在近十年受到越來越多學者的矚目(圖 2-2)，蓬勃發展的時期與紙基底應用層面的突破有關。

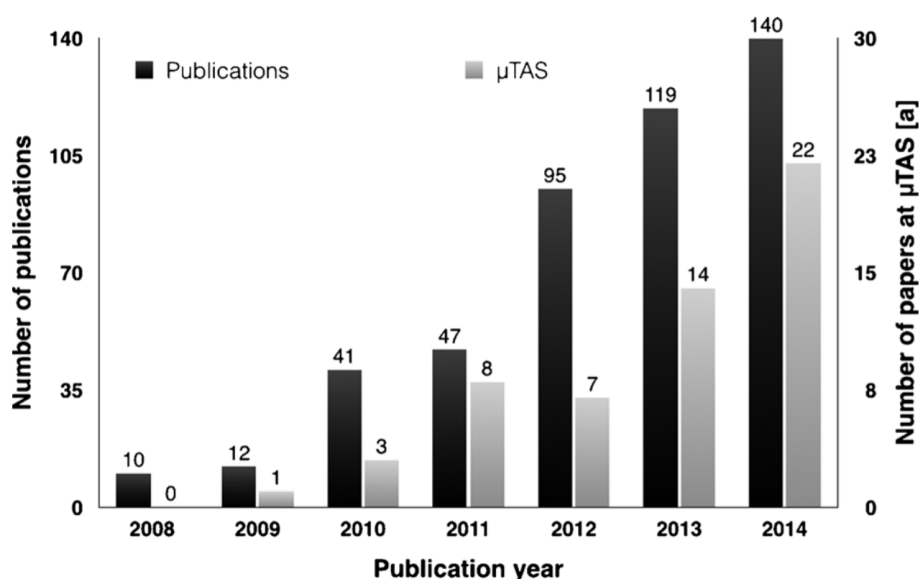


圖 2-2 與 μ TAS 相關之期刊篇數趨勢圖 (Yamada *et al.*, 2015)

近年更為熱門的應用概念為即時診斷，不僅期待檢測技術發展追求快速準確，降低醫護人員在醫療前線的風險，也以居家照護功能為目標，將過去必須在診所或醫院的檢測帶進民間生活，使每個人能實現自我檢測，世界衛生組織(WHO)更提出

「ASSURED」的準則，認為即時診斷的應用須符合價格合理(affordable)、靈敏度(sensitive)、特異性(specific)、友善使用者(user-friendly)快速堅固(rapid and robust)、無須設備(equipment-free)、方便攜帶(deliverable)等七大標準(表 2-1)，由於紙基材料具有易取得、易加工和價格便宜，可用於多種不同生物分子，且可透過毛細力達到流體之自驅動特性，因此在發展即時診斷裝置具有極大潛力(圖 2-3)。

表 2-1 即時診斷七大準則

價格合理 (affordable)	任何有感染風險的人皆負擔的起的價格
靈敏度 (sensitive)	提高真陽性率
特異性 (specific)	提高真陰性率
友善使用者 (user-friendly)	簡單操作
快速堅固 (rapid and robust)	檢測時間短、保存環境條件要求低、可多次使用
無須設備 (equipment-free)	具備自行供電、現場方便裝設
方便攜帶 (deliverable)	可攜式或手持式設計

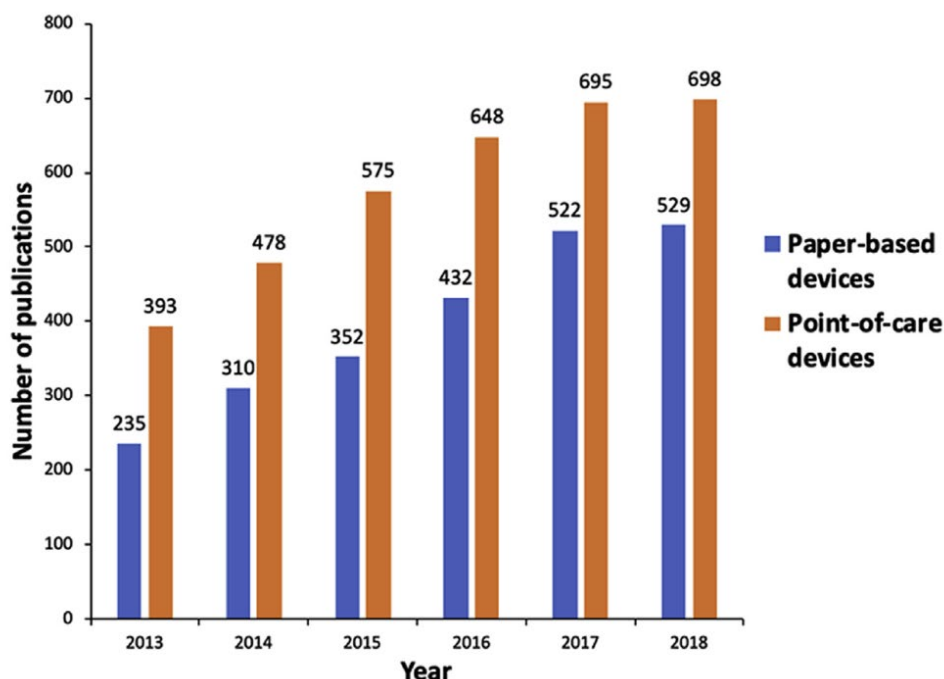


圖 2-3 即時診斷(point-of-care)裝置發展趨勢圖 (Liu *et al.*, 2019)

2-2 紙流道流動理論

紙為一種多孔性介質(porous media)，如圖 2-4 所示，其內部由纖維為基本骨架交織出大小不一的腔室與縫隙，由於孔徑極小，內部流體可藉由毛細作用自發性地沿孔隙移動。當介質孔徑發生變化時，孔徑較小之腔室因受之毛細力較大，會先被填滿，因此宏觀下的紙雖為均質材料，但流體前緣(flow front)事實上為部分飽和情況，下個小節將多孔性介質的流動理論依據分別適用於飽和與部分飽和之條件進行介紹。

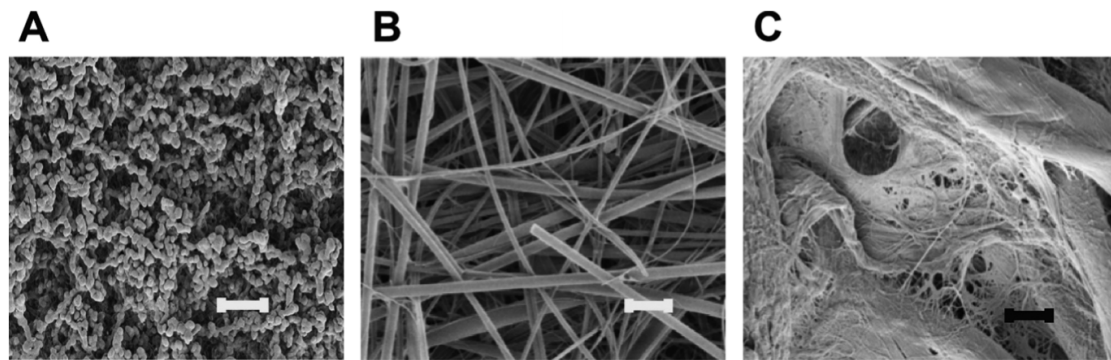


圖 2-4 三種不同種紙基底之 SEM(Scanning Electron Microscope)圖，比例尺為 10 μm (Rath *et al.*, 2018)

2-2.1 飽和流

液體流經多孔性介質時，液體於所有孔隙中所佔的真實體積是為飽和度，孔隙中充滿液體的情形下即稱之為飽和流(fully saturated)。多孔性介質中的流體靠著內部孔隙產生的毛細壓力驅動，毛細壓力與孔徑、液-氣間表面張力以及液-固間的接觸角有關(Rath *et al.*, 2018)，1921 年，Washburn 假設紙模(paper matrix)是由圓柱型毛細管平行組成(圖 2-5)，並提出一條可描述毛細流(capillary flow)前緣運動機制的方程式，稱之瓦西本方程式(Washburn equation)，如式 2-1 所示：

$$L^2 = \frac{\gamma r_{pore}}{2\mu} t \quad (2-1)$$

L 為流體前緣流動距離， r_{pore} 為孔隙平均半徑， γ 為有效表面張力(effective surface tension)， μ 為流體之黏滯係數(viscosity)，而 t 則是流體流動時間。根據 Washburn



equation 可知在一維(1D)多孔性模型下，流體前緣位置與時間的開根號成正比。

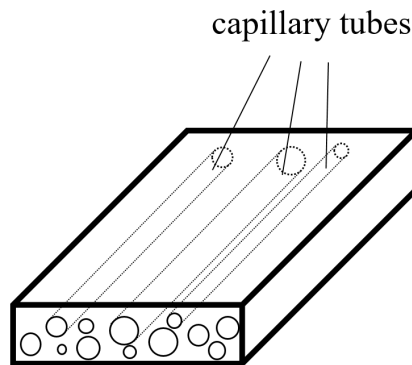


圖 2-5 平行排列毛細管示意圖

另一個在分析多孔性材料時常被廣泛使用的是達西定律(Darcy's law)，此定理概念類似於歐姆定律(Ohm's law)，如式 2-2 所示：

$$Q = -\frac{\kappa A}{\mu L} \Delta p = -\frac{\Delta p}{\mu L / \kappa A} \quad (2-2)$$

Q 為體積流率(volumetric flow rate)， κ 為滲透性(permeability)， A 為紙帶(paper strip)之截面積，而 Δp 為長度 L 的總壓差，式 2-2 中的 $\mu L / \kappa A$ 為流道中的流阻，可類比於電路中電阻的概念(圖 2-6)。

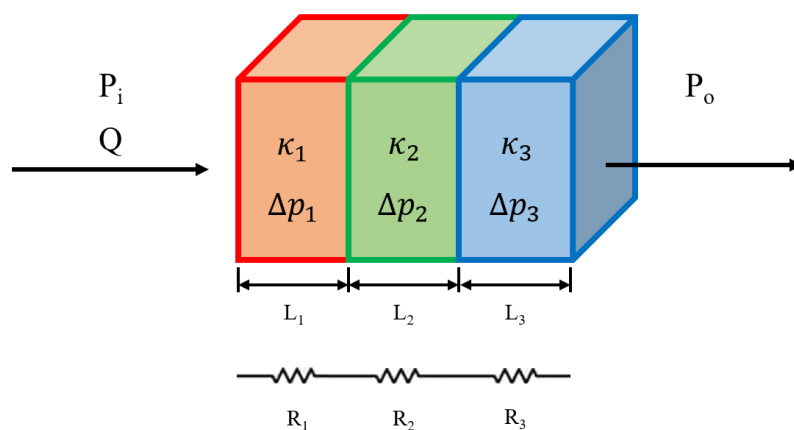


圖 2-6 流阻概念圖

2-2.2 部分飽和流

相較於達西定律所假設的完全飽和條件，Richards' equation 以偏微分方程式描



述在部分飽和(partially saturated)情況下流體受重力與毛細作用之流動情形，式 2-3 即為一維的 Richards' equation：

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[D \frac{\partial \theta}{\partial z} + K \right] \quad (2-3)$$

θ 為體積流率， D 為擴散係數(diffusivity)， K 為導水度(hydraulic conductivity)。然而，Richards' equation 的解析解只有在簡化情況下才存在，應用上大多依照實際流動問題之複雜性選擇以一維或二維方程式進行數值解(Farthing & Ogden, 2017)。

2-3 分子生物技術

分子生物研究對象為細胞內小分子的反應機制，包括核酸複製、核酸轉錄及蛋白質轉譯，透過基因操作改變生物體與分子表現，過程中結合酵素修飾穩定反應。針對樣品萃取並純化目標核酸可使後續分析結果穩定，本節將現有常見之核酸萃取、擴增和檢測方式分小節依序討論。

2-3.1 核酸萃取

獲得細胞內遺傳物質前須先將細胞打破，因此有效地將核酸從蛋白質和其他雜質中提取出來的過程即稱為核酸萃取(DNA extraction)，傳統方法主要透過有機或非有機溶劑的化學親和性方法，是為液相萃取(liquid-liquid extraction, LLE)，而管柱萃取法和磁珠萃取法則是利用固相吸附目標物達到萃取核酸之目的，是為固相萃取(solid-phase extraction, SPE)。

傳統方法

常見傳統的核酸萃取方式可分為有機溶劑萃取法與非有機溶劑萃取法，有機溶劑萃取法是透過加入氯仿(chloroform)和酚(phenol)將細胞裂解(lysis)，使細胞內所有物質全部散佈於溶劑中。透過高速離心機可將溶液分離，DNA 將存在於水相層，將分離的 DNA 水相層抽出後，以酒精(ethanol)或異丙醇(isopropanol, C₃H₈O)進行沉澱，最後再加入緩衝液使 DNA 完全溶解即可。而非有機溶劑萃取法概念與前者相似，惟其過程是透過界面活性劑、蛋白酶以及鹽類達到細胞裂解、蛋白質解離與鹽析之目的，其過程同樣費時且繁複，而部分使用到的有機溶劑甚至具毒性，故



後來日漸被各式商業化的萃取套組(kit)所取代(Psifidi *et al.*, 2015)。

管柱萃取法

管柱萃取法在處理樣品的前幾步驟與傳統方式一樣，其特色在於管柱中添加矽酸鹽過濾膜作為吸附核酸的特異性材料，當鹽析後的 DNA 溶液通過濾膜時，DNA 細絲將被留存於濾膜上，可藉由調整鹽類和 pH 值改變濾膜對核酸的吸附能力，進而獲得純化核酸。

磁珠萃取法

1976 年時 John Ugelstad 以聚苯乙烯(polystyrene)製造出均勻磁化的粒子，為磁珠概念與應用的啟蒙者。磁分離機制結合物理、化學和分子生物學，技術涵蓋範圍廣泛。於核酸萃取應用方面，磁珠萃取法差別在於將捕捉 DNA 的方式由管柱萃取法的濾膜改為由外層帶有矽的磁珠吸附(Vogelstein & Gillespie, 1979)，透過添加緩衝液使核酸與磁珠接合，再以磁棒或磁盤吸附帶有磁珠的核酸使其與其餘物質分離，此過程不需倚賴離心機，因此可於戶外檢體採集時使用。

由於生物技術的革新與進步，目前實驗室已經較少採用傳統方法進行核酸萃取，多以管柱萃取和磁珠萃取為主，於表 2-2 總結上述三種萃取方法的優劣比較。

表 2-2 萃取方式比較表

萃取技術	耗時	步驟	萃取量	離心設備	自動化設備
有機萃取	約半天	複雜	低/不穩	O	X
管柱萃取	1~2小時	簡易	高	O	O
磁珠萃取	1~2小時	簡易	高	X	O

纖維素萃取法

前述的萃取方法在操作上需使用多種塑膠耗材且依賴離心設備及精準的移液器(pipette)，仍需在基礎實驗室中才能操作，隨著紙基底的優點始受學界關注，有學者將醣類與紙基底結合利用醣類化學特性捕捉和釋放核酸(Byrnes *et al.*, 2015)。

而於 2017 年時學者發現未經生物性修飾過的纖維素紙材具有快速捕獲核酸的能力，且只需要一次洗滌過程就可將擴增抑制劑及來自樣品的污染物去除(Zou *et al.*, 2017)，利用該方式萃取出來的核酸可成功進行擴增反應，而此法適用於植物汁液、動物血液與微生物的樣品萃取。透過設計具有疏水區與纖維素紙基的長條式萃取裝置，用手持裝置浸潤於樣品中萃取核酸，將可使萃取過程不再需要移液器操作，更適合在資源缺乏的地區與野外採樣時使用。

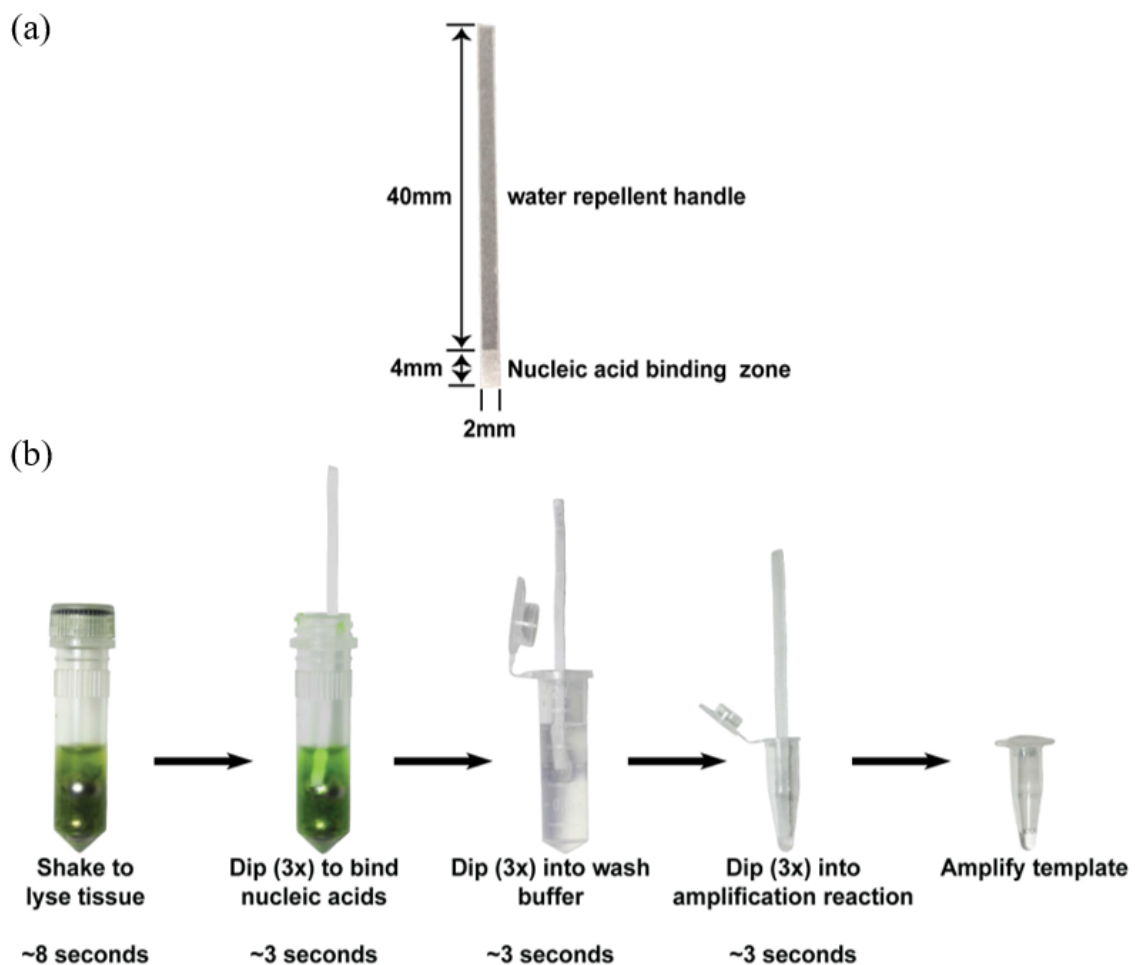


圖 2 - 7 (a)纖維素萃取裝置，(b)纖維素裝置快速萃取流程。(Zou *et al.*, 2017)

2-3.2 核酸擴增技術

醫學、遺傳學、生物化學及分子生物學等多方領域多透過核酸擴增(nucleic acid amplification)步驟，將微量目標 DNA 片段擴增數倍，藉以放大檢測訊號及分析能力，以下將簡述三種核酸擴增技術(nucleic acid amplification technologies, NAT)：



聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

由於 DNA 的結構是以雙股方式存在，需透過高溫解旋成兩條單股長鏈才能進行後續 DNA 複製，然而大多數 DNA 聚合酶無法於高溫環境保持活性。直至 Kary Mullis 於 1985 年利用嗜熱細菌—水生棲熱菌(*Thermus aquaticus*)突破此高溫限制，提出最早發展最完善之核酸擴增技術—聚合酶連鎖反應，又稱 PCR(Saiki *et al.*, 1985)，其過程主要是透過熱循環實現核酸之變性(denaturation)、引子黏合(annealing)及延伸(extension)。透過約 90°C 至 95°C 之高溫斷開 DNA 雙股間的氫鍵，使其變為兩條單股 DNA 形成模板，接著降低溫度至 50°C 使特定序列的引子(寡核苷酸序列)與單股 DNA 模板相互黏合，再將溫度提升至 72°C 使 DNA 聚合酶具有最高活性，並指引其由引子黏合處開始沿著模板產生 DNA 互補鏈，重複上述循環 30 至 40 次即能擴增幾十億倍之 DNA 片段，費時約兩小時。由於 PCR 技術具有高靈敏度的檢測特性，所以受到廣泛使用，並發展出許多改良方法，如：nested PCR (Massung *et al.*, 1998)、RT-PCR (Gibson *et al.*, 1996)與即時 PCR (Klein, 2002)。

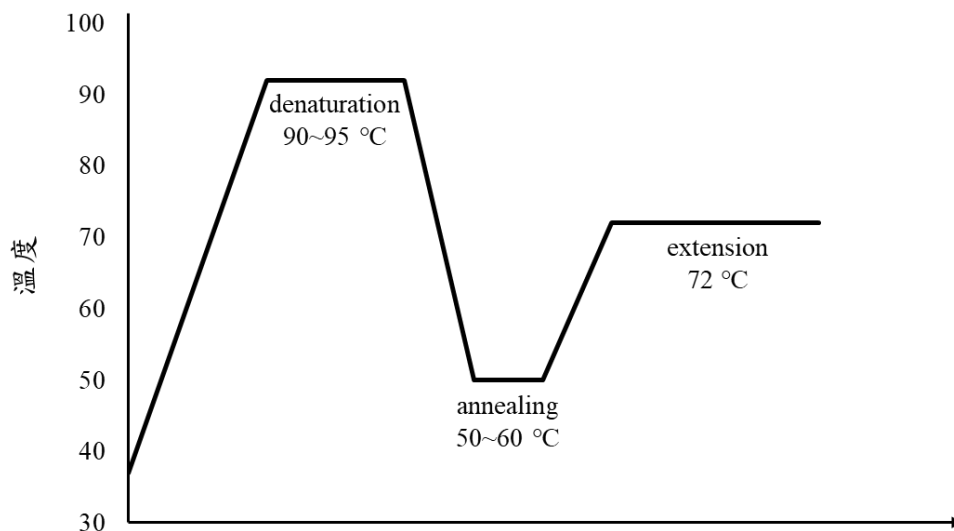


圖 2 - 8 PCR 熱循環圖

恆溫式圈環形核酸增幅法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

於 2000 年 Notomi 發表一種可無需經過熱循環之恆溫擴增技術(Notomi *et al.*, 2000)，反應所需溫度為 60°C 至 65°C，其主要透過針對 DNA 片段上 6 個區域特殊

設計的 4 條反覆引子標定，並以鏈置換 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase) 實現模擬病毒 DNA 複製，過程所耗費時間約為 40 分鐘。由於擴增過程中會產生焦磷酸鎂，透過副產物焦磷酸鎂的沉澱現象，可簡單以肉眼快速觀察擴增結果，但其引子設計相較於 PCR 較為困難，試劑成本也較高。LAMP 擴增過程不再受高溫熱循環的束縛下，利用微型的恆溫設備將可使擴增技術擺脫大型設備限制(圖 2-9)，朝著方便攜帶且落實即時診斷之目標(Choi *et al.*, 2016)。

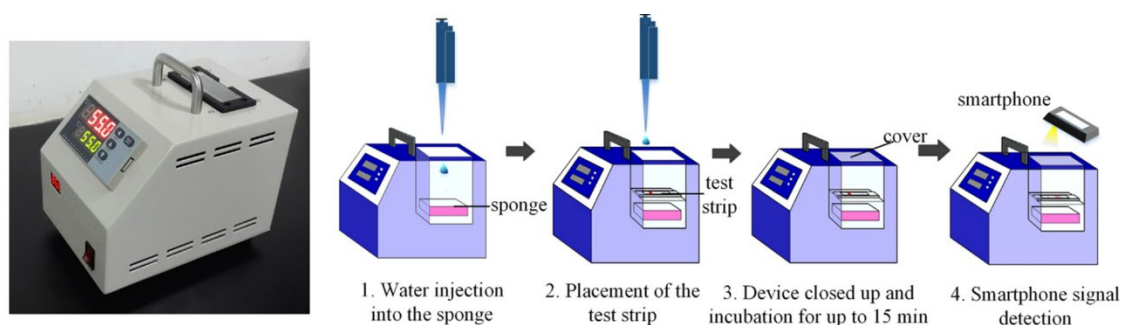


圖 2-9 利用 LAMP 擴增之微型恆溫加熱裝置 (Choi *et al.*, 2016)

重組酶聚合酶擴增 (recombinase polymerase amplification, RPA)

RPA 為一種利用重組酶及聚合酶結合引子之恆溫擴增技術(Piepenburg *et al.*, 2006)，由於此擴增原理是利用重組酶將雙股 DNA 間強勁的氫鍵撐開，因此該擴增技術反應溫度只需在 37°C 左右，並可於半小時內完成擴增。RPA 利用重組酶與引子結合成 DNA 複合物(complex)，可主動鍵結至相對應的 DNA 序列上，由聚合酶啟動擴增，擴增過程中 SSB 蛋白將與被置換的鍵結合形成 D 型環，用以穩定中間產物。

比較上述三種擴增技術，PCP 為最早出現的核酸擴增技術，整體技術發展完善但擴增所需的時間最長，LAMP 技術改善 PCR 擴增時的熱循環需求，可於恆溫環境中進行擴增，但引子設計門檻較高、較為複雜，而 RPA 技術藉由酵素作用大幅減少擴增時的溫度要求且縮短擴增時間，然而其擴增後產物帶有殘留的酵素，故在進行核酸分析前建議先對產物進行純化(表 2-3)。

表 2-3 核酸擴增技術比較表

	溫度需求	時間	引子數	儀器
PCR	熱循環(90°C→50°C→72°C)	2小時	2個(1對)	熱循環設備
LAMP	恆溫(60°C~65°C)	40分鐘	4個(2對)	水浴鍋或恆溫設備
RPA	恆溫(37°C~40°C)	30分鐘	2個(1對)	無儀器需求

2-3.3 核酸品質驗證

基因檢測的可信度與穩定性掌握於核酸品質，因此當樣品完成核酸萃取及擴增步驟，特定 DNA 片段獲得大量複製，檢測訊號隨之放大，可透過凝膠電泳法、光譜分析法與生物傳感器等常見核酸檢測方法，針對樣品進行定量及定性的品質分析控制：

凝膠電泳(gel electrophoresis)法

凝膠電泳法被用於分離不同分子大小之物質，由於核酸周圍帶有負電荷，施予外加電場時核酸會穿過凝膠形成的篩網朝著陽極方向前進，分子較小者容易通過篩網因此移動速度較快、移動距離較長，反之，分子較大者移動相對慢，凝膠功能類似於分子篩，相較於以液體作為電泳介質，利用凝膠可減低外加電場所引起的熱對流效應，並同時減緩所有分子移動的速度、維持分離結果，凝膠電泳法是現今實驗室常用之 DNA 品質檢測方法。

光譜分析法

光譜分析法為一種核酸定量檢測，透過分光光度計可檢測待測物質於特定波長下對光的吸收度，以溶解 DNA 樣品的溶液作為標準液，透過樣品與標準液間吸光值差，便可推定待測物之濃度，另外，也可透過同一溶液在不同波長下的吸光值(A)比例判斷樣品受污染程度，例如當；核酸最高吸收峰值在 260 nm 處，而蛋白質最高吸收峰值為 280 nm，故計算 A260/A280 比值即可推斷樣品中核酸受到蛋白質污染的程度，當該比值越大表示核酸濃度越高，基本要求至少該值需大於 1.5，而同理，基於 230 nm 是碳水化合物最高吸收峰之波長，分析 A260/A230 的比值則可

比較核酸受鹽類、有機溶劑等雜質的汙染程度，理想值應落在 2.0~2.5 間。

生物傳感器(biosensor)

利用具生物性個體作為感測元件之裝置即稱為生物傳感器，大至器官、組織，小至細胞、抗體，皆可當作感測元件。近年，檢測 DNA 之 DNA 傳感器發展蓬勃，主要因為可快速檢測且結果足夠靈敏，待測物也無需事先標記(label)，即可實現定性與定量分析。球狀奈米金粒子在不同粒徑大小時由於表面的電漿共振效應(surface plasmon resonance, SPR)會產生不同波長的光波散射，粒徑由小至大顏色狀態由紅色轉為藍紫色，因此在紙基底檢測裝置上利用奈米金將檢測結果可視化為當前熱門之應用(Fang *et al.*, 2014; Mukama *et al.*, 2020)。

2-4 種豬遺傳特徵

種豬選拔與改良的範圍包括外貌體型、血統系譜及性能檢定，用以汰除特定表現行為且提高生產性能，其基因型檢定可檢測之目標基因有緊迫基因、多產基因以及產精基因等等，以緊迫基因為例，帶有緊迫敏感基因的豬隻由於其控制骨骼肌鈣離子釋放管道接受體—蘭諾定受體(Ryanodine receptors, RYRs)的互補 DNA(complementary DNA, cDNA)上的一個鹼基產生突變，當受到外界環境強烈刺激下身體會產生痙攣、呼吸急促，嚴重甚至導致休克，該疾病被稱之為緊迫敏感綜合症候群(porcine stress syndrome, PSS)，已被證實為隱性遺傳性疾病，緊迫敏感基因會影響豬隻的生長及屠體品質，對養豬戶的經濟造成損失。根據行政院農委會家畜衛生試驗所表示，目前對 PSS 的控制與預防方式是透過基因篩檢，淘汰帶有該基因型隱性遺傳的豬以降低罹病率，篩檢過程中多仍使用 PCR 擴增技術處理(Ile *et al.*, 2018)。

2-5 紙流道於基因型鑑定之應用

透過紙流道設計可控制流體行為，進而組成單一功能元件，包括控制流體流動時序的閘門(Chen *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013; Noh & Phillips, 2010)、促使兩物質交互作用的混合器(Jang *et al.*, 2020)以及分開流體內物質的分離功能(Songjaroen *et al.*,

2012; Zhong *et al.*, 2015)，透過上述功能元件的應用可對樣品進行前處理，如血漿-血球分離、提取蛋白質等等，藉此提高側層流檢測(lateral flow assays, LFA)的準確度；LFA 側層流裝置是由樣品墊(sample pad)、結合墊(conjugate)、流動膜(flowing membrane)及吸收墊(absorbent pad)所組成(圖 2 - 10)，樣品墊是用以裝載樣品且讓液體能連續穩定地流動，纖維素和玻璃纖維為常用的材料，結合墊則是目標物與辨識物接合之處，流動膜將預先固定上抗體形成檢測線與控制線，而此區段的樣品流速會直接影響抗原與抗體的接合時間，進而左右檢測靈敏度，最後，吸收墊的功能是用來吸取多於樣品避免發生回流(back flow)。

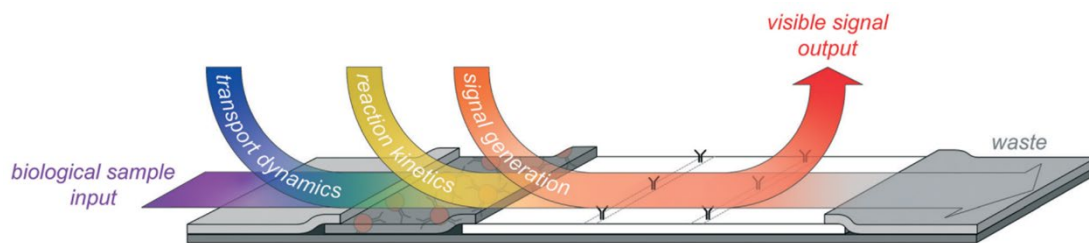


圖 2 - 10 LFA 裝置圖 (Bishop *et al.*, 2019)

而 LFA 的檢測原理在 1956 時由 Singer and Plotz (1956)提出，為利用受到乳膠微粒包覆的抗原或抗體對特定病原體進行免疫反應檢測，發展至今成為一種常用的分子生物檢測技術—酵素結合免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，該檢測技術依照抗原與抗體的接合機制可分成兩種，如圖 2-11 所示，一種是三明治法(sandwich assay)，主要是將帶有辨識物與目標物結合形成複合物，透過在紙上鋪設好的抗體進行專一性捕捉，因此若樣品中帶有目標物時檢測線和控制線皆會有訊號，若無帶目標物時則只有控制線會有出現訊號，另一種檢測方法為競爭法(competitive assay)，通常目標物過小而難以與辨識物結合時，則會將辨識物與目標物獨立存在，當樣品中含有目標物時，兩物質會在控制線上競爭抗體的接位點，導致只會有控制線帶有訊號，反之則兩條線皆有訊號(Kasetsirikul *et al.*, 2020)。

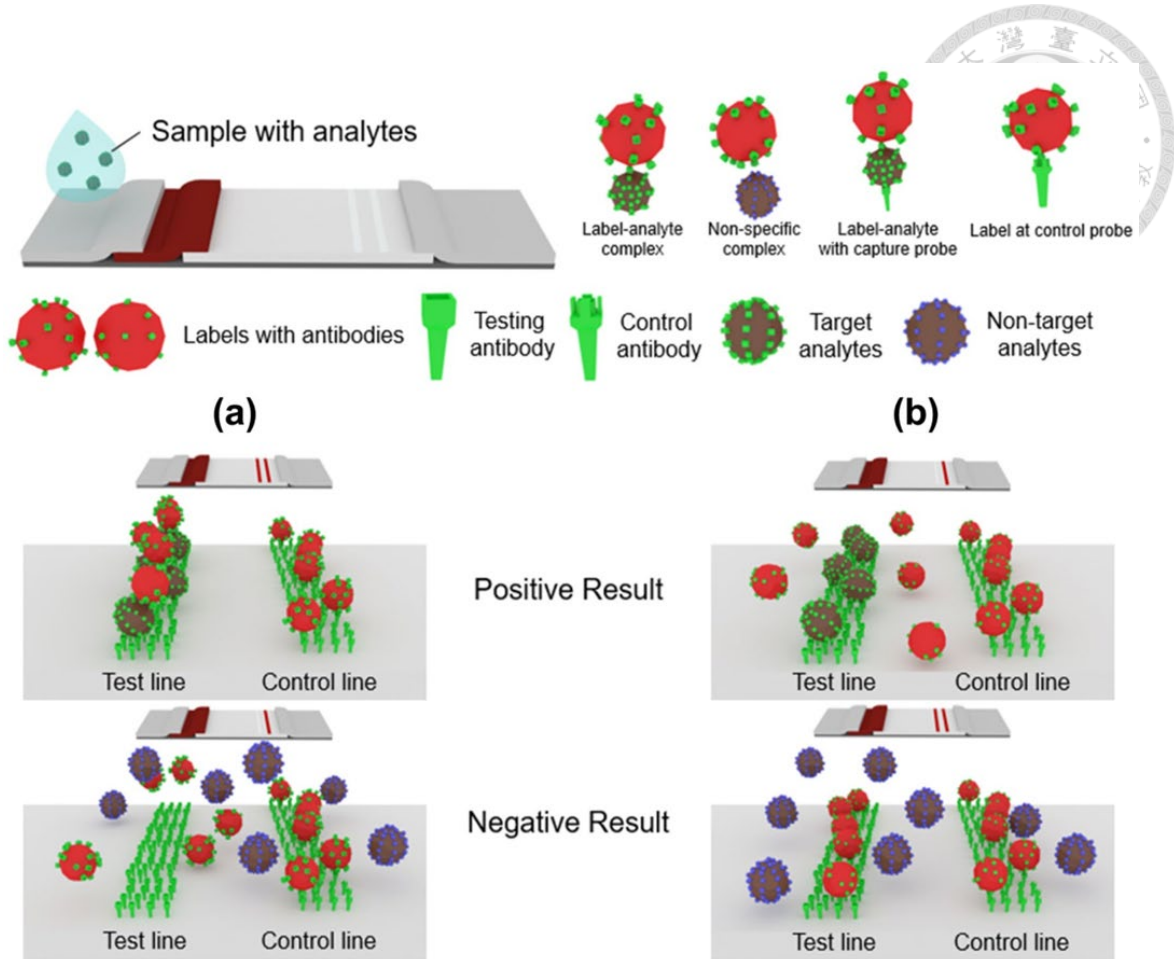


圖 2 - 11 檢測方式(a)三明治法，(b)競爭法。(Kasetsirikul *et al.*, 2020)

以紙流道作為生物傳感器可達到快速檢測、即時診斷之目的，檢測樣品常見為血液、唾液、尿液和痰液等等。核酸萃取及擴增步驟皆為樣品的前處理階段，臨床樣品的前處理步驟繁雜、瑣碎，不僅耗費時間，更築起一道技術高牆使得非專業人員難以涉略，因此此處回顧內容將著重於包含前處理步驟及檢測功能的整合性紙流道分析裝置。首先，Choi *et al.* (2016)將 FTA 卡以及玻璃纖維整合於側層流條中，形成四層具備不同功能的整合型紙基生物傳感器，在紙卡上實現核酸萃取及擴增，並開發一套微型可攜式加熱設備提供 LAMP 擴增所需的恆溫環境，且該設備已針對側層流檢測試紙找出最利於核酸雜交(hybridization)及抗原-抗體接合的溫、溼度條件，最後，檢測試紙之結果可透過智慧型手機進行訊號檢測，實際操作步驟如圖 2-12 所示；本裝置成功將樣品前處理步驟整合於紙流道上，並開發專門的小型加熱設備，將完整的核酸檢測流程擺脫大型、精密設備之要求，但由於各功能紙卡為



層層獨立紙片，並無法自動連續運輸樣品。

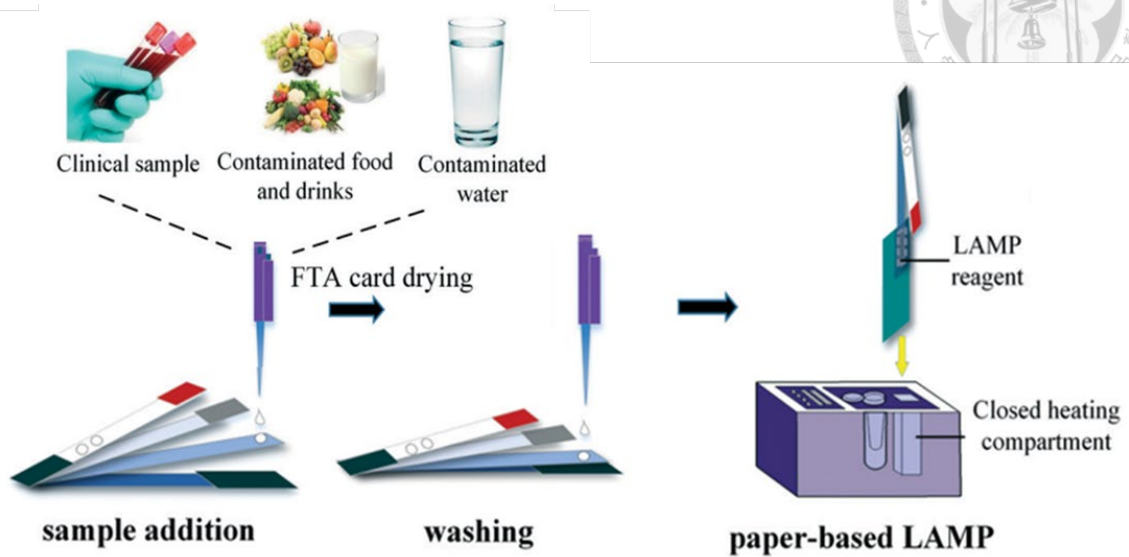


圖 2 - 12 紙卡式檢測裝置 (Choi, Hu, Tang, *et al.*, 2016)

另一套檢測系統則是 Rodriguez *et al.* (2016)以紙和膠帶為材料，藉由折疊方式設計出簡易的封閉式紙流道裝置(圖 2 - 13)，同樣將前處理步驟整合於裝置中，樣品由紙流道上的單一入口進入，吸收墊及檢測區完整串接，此外由膠帶包覆形成封閉的環境可避免樣品汙染以及加熱時的蒸發影響，然而操作過程中仍需多次沖洗 (wash)、去雜質的步驟，必須透過操作人員緩慢地分批滴入乙醇，操作步驟尚有可簡化之處。

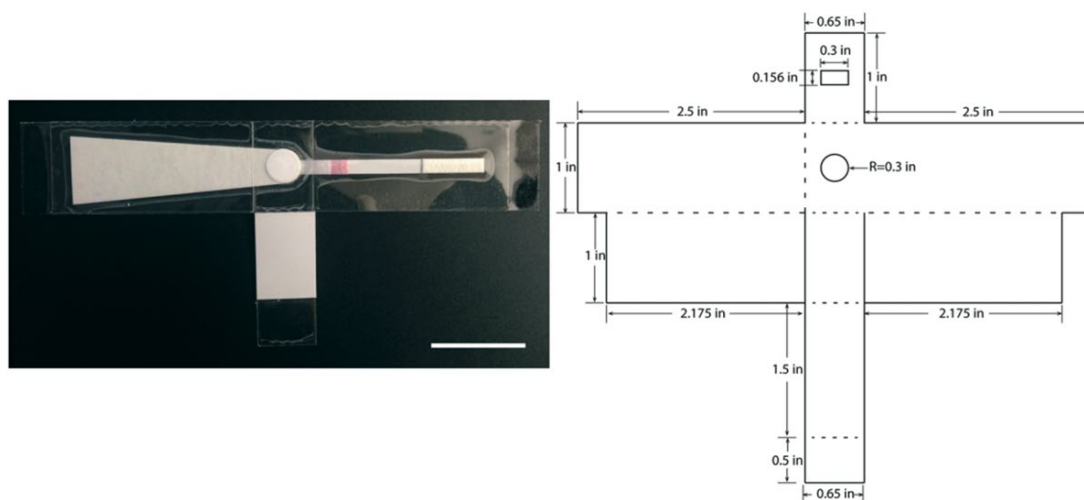


圖 2 - 13 折疊式封閉檢測裝置 (Rodriguez *et al.*, 2016)

Reboud *et al.* (2019)將摺紙(origami)技術用於樣品製備(Xu *et al.*, 2016)與 LAMP 核酸擴增技術，結合可視化之側向流檢測試紙實現靈敏度(sensitivity)達 98%的瘧疾檢測系統，該檢測系統內含調節流體流量的緩衝室、防止蒸發的乙酸纖維素膜 (cellulose acetate film)，以及防止試劑交叉混合的濾紙閘門，如圖 2 - 14 所示，另外，該研究同時也驗證反應試劑在室溫保存十天再重新水合(rehydrate)後的穩定性仍佳，且已於烏干達一所學校實際使用該紙流道裝置，可於 50 分鐘內完成單個樣品檢測，然而由於核酸擴增過程仍需藉由加熱板維持 65°C 長達 45 分鐘，因此仍未脫離對加熱設備的依賴。

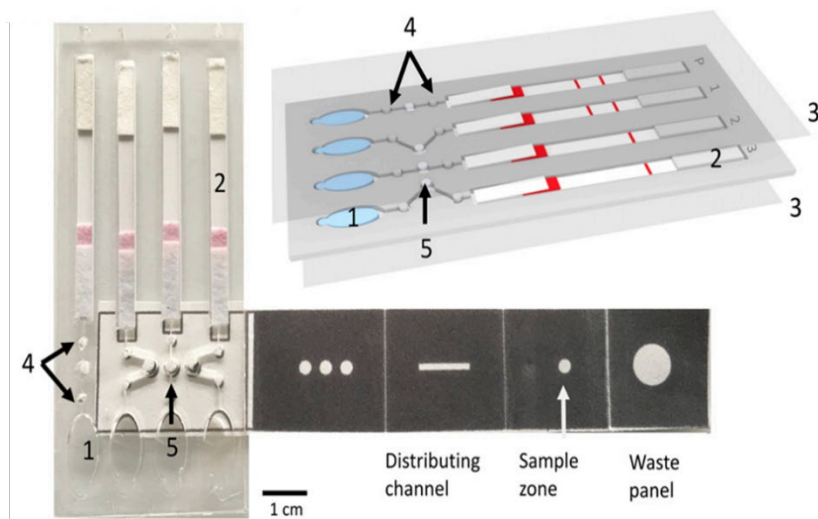


圖 2 - 14 結合摺紙技術之檢測裝置 (Reboud *et al.*, 2019)

各檢測裝置在實現核酸萃取和擴增的方式皆有些微差異，除了操作少法的不同選用之紙基材料也略微不同，唯獨在檢測階段幾乎皆使用與蛋白質結合力較佳的硝化纖維素膜，因此表 2 - 4 中整理不同文獻於萃取與擴增所選用之紙基材料。

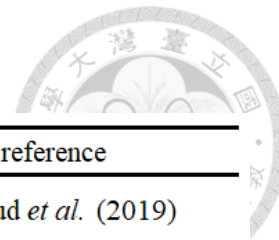


表 2-4 不同預處理功能之紙基底材料整理

extraction	amplification	reference
glass fiber	glass fiber (LAMP)	Reboud <i>et al.</i> (2019)
-	Whatman grade 1 chromatography paper (RPA)	Magro <i>et al.</i> (2017)
PES	PES (LAMP)	Rodriguez <i>et al.</i> (2016)
FTA card	glass fiber (LAMP)	Choi <i>et al.</i> (2016)

總結上述回顧，傳統核酸萃取步驟繁雜，過程中使用多種溶劑且耗費大量塑膠製品，將萃取及擴增步驟整合於紙基平台可明顯減少塑膠製品使用量且無須任何儀器設備。現有研究利用核酸與紙質間的吸附力(Zou *et al.*, 2017)以外加緩衝液對樣品進行清洗，並透過吸收墊吸去雜質及多餘廢液，最後留於紙質上的即為純化後的核酸，然而傳統萃取的繁複步驟在紙基平台上轉為由摺疊或是切換紙卡取代，緩衝液與擴增試劑仍需要專業人員在過程中不斷添加，因此與即時診斷的願景仍有距離。故本論文選用較新的擴增技術—RPA 為擴增方式，前端再由以開發出的紙上萃取技術(Wang, 2019 Master Thesis)，利用連續式的紙流道設計，免去摺疊操作及減少滴入緩衝液的次數，期待實現一套落實即時診斷之檢測系統。



第三章 研究方法

本研究欲探討以紙流道基礎的側層流分析，將樣品前處理及檢測步驟共同整合於紙流道裝置，可依功能區分為萃取區、擴增區以及檢測區。萃取與擴增區的紙基底形狀將採用漸擴漸縮的紡錘狀，可維持核酸產量且同時減少裝置總長度，此外，將透過實驗觀測流道上不同排列之疏水性阻礙物，達到減緩流速、增加樣品與藥劑反應時間，藉以提高核酸擴增濃度，最後檢測區段是利用奈米金粒子與雙標靶擴增子結合，再以鏈親合素捕捉擴增子，因而檢測線能因奈米金粒子的濃度不同顯現出不同顏色，達到檢測結果可視化。本章將先從紙流道製備詳述紙流道的材質、設計、製作方式，再聚焦於檢測區所應用之側層流分析與 DNA 探針設計，最後為實驗結果的核酸分析以及實驗過程簡介，實際研究方法架構如圖 3-1 所示：

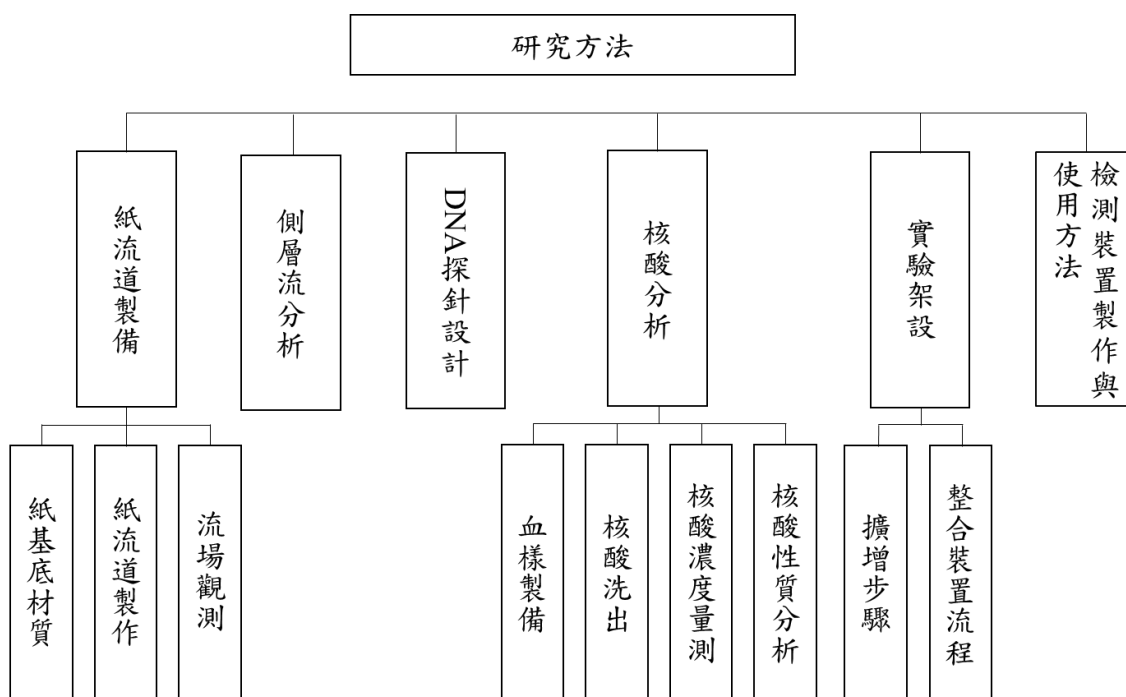


圖 3-1 研究方法架構圖



3-1 紙流道製備

紙基平台為本論文的研究基奠，是延伸至應用層面前重要的背景建立，因此本節將從紙基材質的選擇、流道製作與設計以及流場可視化的方法，依序分小節細述。

3-1.1 紙基底材質

纖維素的紙質具有穩定的流動條件，如：流體流動距離長、流體前緣流動穩定，且核酸萃取與濃縮效果佳(Wang, 2019 Master Thesis)，價格相較其他紙質也較為便宜，且纖維素本身帶有負極性，該特性可使帶負電荷的核酸在紙質間穩定流動，藉此可樣品中的核酸從其他流動較緩慢的蛋白質分子和破裂細胞碎屑中分離(Kaarj *et al.*, 2018)，以達簡易的萃取效果，故在萃取階段的材質將選用 Whatman No.1 的纖維素試紙，此外，由文獻回顧中可發現擴增步驟中使用的材料涵蓋玻璃纖維、纖維素材質以及聚醚砜(polyethersulfone, PES)，目前研究並無表示出最具優勢的擴增材料，因而最後擴增紙材的選擇將利用上述三種材料針對本研究所使用的血樣進行擴增效果比較，由於有不同的廠牌以及孔徑大小之差異，故最後共有五種紙材，詳細資料如表 3 - 1 所示。

表 3 - 1 Whatman No.1 性質表

Product	Material	Pore size (μm)	Thickness (μm)
Whatman qualitative filter paper Grade 1 (Whatman No.1)	cellulose	11	180
Whatman glass microfiber filters Grade GF/A	glass fiber (borosilicate glass)	1.6	260
Advantec glass fiber Grade GA55	glass fiber (borosilicate glass)	0.6	220
Millipore Express PLUS PES Membrane	polyethersulfone	0.22	130-155
Millipore Express PLUS PES Membrane	polyethersulfone	0.45	160-180

3-1.2 紙流道製作

加工紙類材料相較於加工壓克力或矽晶簡單，因此本研究先將圖檔以

SolidWorks 繪製完成並輸出成 AutoCAD 可讀取之 DWG 檔案，再利用雷射雕刻機 Universal Laser System VLS 2.30 在雷射功率 10%且雷射頭移動速度 20%之條件下對紙片進行裁切，裁切圖形如下圖所示：

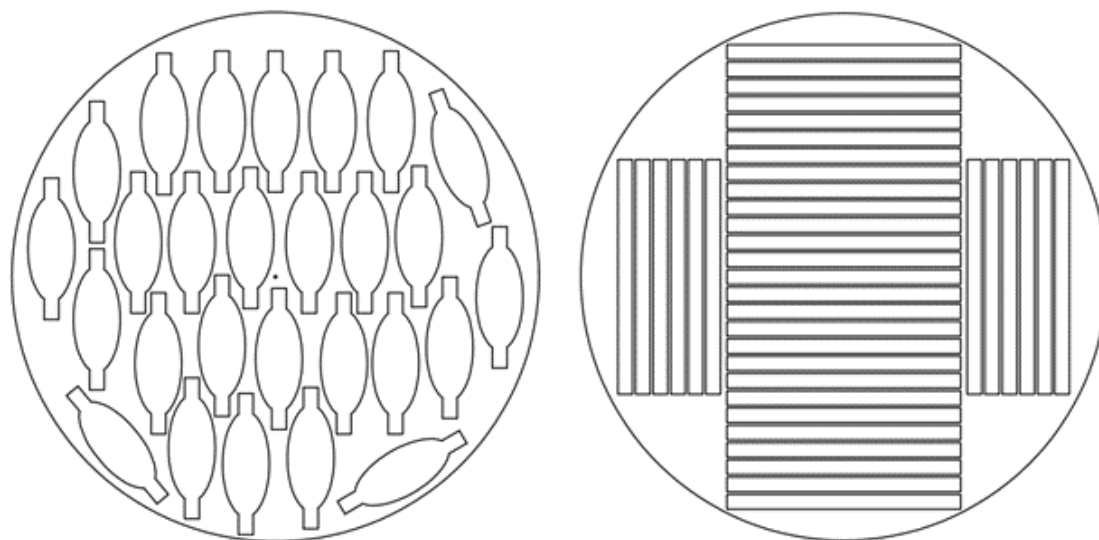


圖 3 - 2 流道裁切圖形

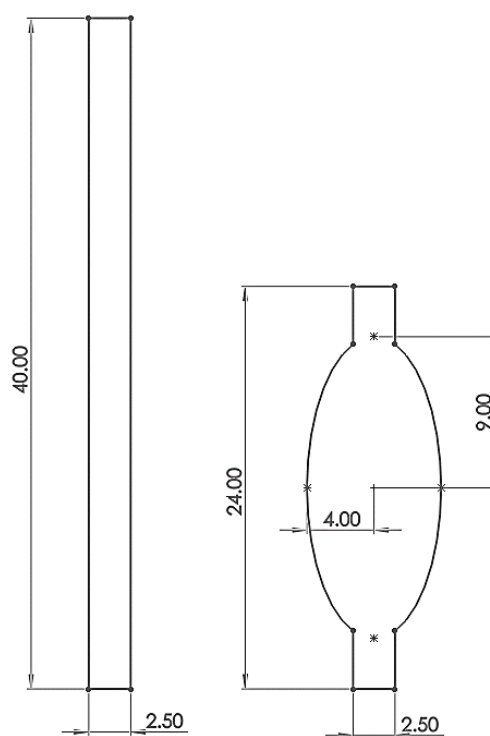


圖 3 - 3 流道尺寸圖(單位：mm)



3-1.3 流場觀測

為藉由可視化流場觀察化學反應過程，本研究以高濃度、低體積的鹼液作為藥劑鋪設於紙道中段，而以低濃度、高體積的酸液當作樣品，利用酸鹼指示劑顯色觀測流體流動情形與化學反應。選用之鹼液為 1M 之氫氧化鈉水溶液共 1 μL ，酸液為 0.01M 之氯化氫水溶液 20 μL ，而使用的酸鹼指示劑為酚紅，其變色範圍為 pH 值 6.4~8.2，在酸性呈現黃色，鹼性呈現紫紅色，圖 3-4 為不同幾何形狀的紙片尺寸圖，由左到右分別為長直條(48x4.5 mm)、30°夾角、60°夾角、90°夾角、圓形、短橢圓及長橢圓，共七種面積相同而形狀不同之設計。將鹼液預先滴在各紙片 16 mm 處靜置乾燥，再由各紙片下方直條末端處滴入酸液使酸鹼中和反應發生在幾何變化之處(圖 3-5)，進而可探討幾何變化對流場及化學反應之影響。

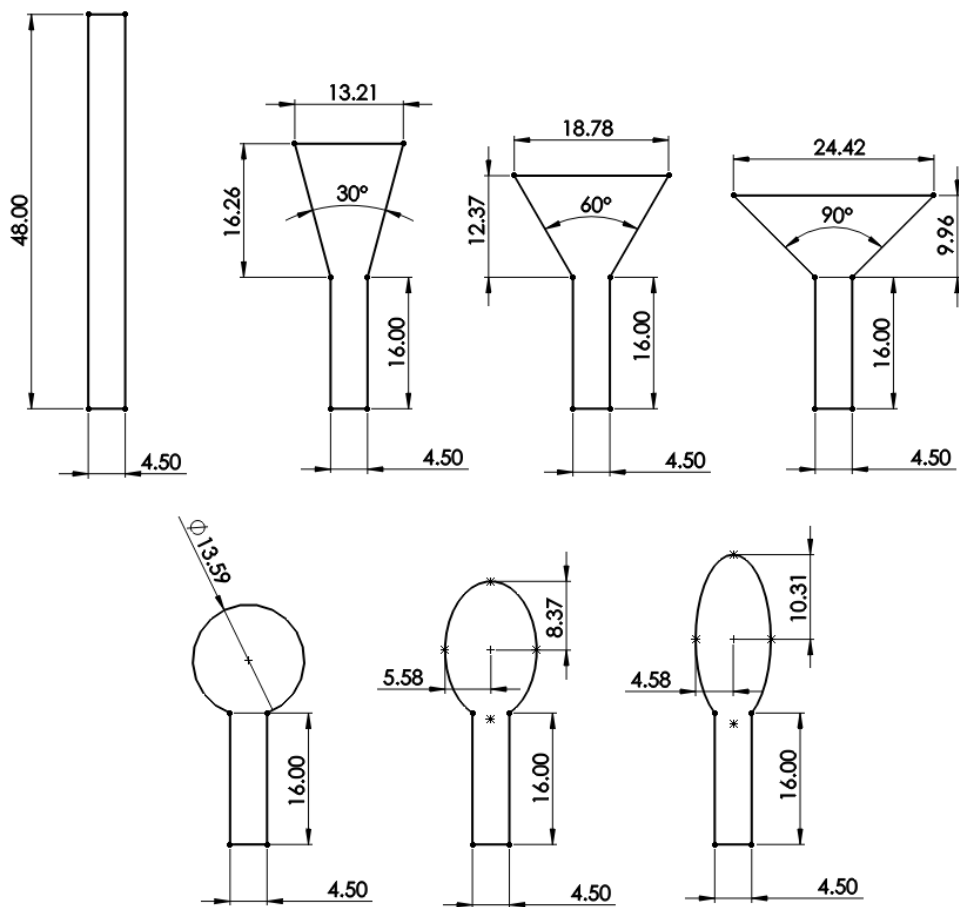


圖 3-4 各式幾何紙基底尺寸圖(單位：mm)



圖 3-5 各式紙基底實際使用圖(紙片上較淺色處為酸液位置)

3-2 側層流分析

側層流檢測(lateral flow assays, LFA)利用硝化纖維素膜(nitrocellulose membrane, NC)作為反應平台，樣品於毛細力作用影響下可於平台上不受外力而自行移動，並藉由樣品中各物質在 NC 膜上移動能力不同，該平台具備分離混合物的能力，而主要分析原理為透過抗原與抗體間之專一性(specific)相互作用，可針對各式分子進行檢測，包括：微生物、重金屬、農藥及腫瘤標記(Bahadır & Sezgentürk, 2016)，常見側層流裝置如下圖 3-6 所示。本研究所使用的市售側層流檢測試紙為睿嘉生技出產之核酸快速檢測試紙(Nucleic Acid Rapid Detection Kit, NARD)，如圖 3-7a 所示，該試紙具有兩條檢測線(test line)，檢測線上分別固定 6-FAM(6-Carboxyfluorescein, $C_{21}H_{12}O_7$)以及 DIG(digoxigenin, $C_{23}H_{34}O_5$)之對應抗體(圖 3-6)，而在結合墊(conjugate pad)放入帶有 Biotin($C_{10}H_{16}N_2O_3S$)的標記物，使用者只需在引子設計時標定上 Biotin 及 6-FAM 或是 Biotin 及 DIG 兩種組合，即可將擴增後產物與標記物結合並在檢測線上呈色(圖 3-8)，而該檢測試紙適用於各式擴增技術的產物，包括 PCR、LAMP 以及 RPA 等擴增技術；相較起睿嘉生技的 NARD 檢測試紙可同時檢測兩種產物，本研究有使用另一款德國 Milenia Biotec 公司販售之 HybriDetect—Universal Lateral Flow Assay Kit(圖 3-7b)，編號為 MGHD 1，該檢測試紙可針對標記上 FAM 及 Biotin 的擴增序列進行檢測，僅能檢測一種產物(圖 3-8)，於結果討論章節將對該兩種試紙進行比較。

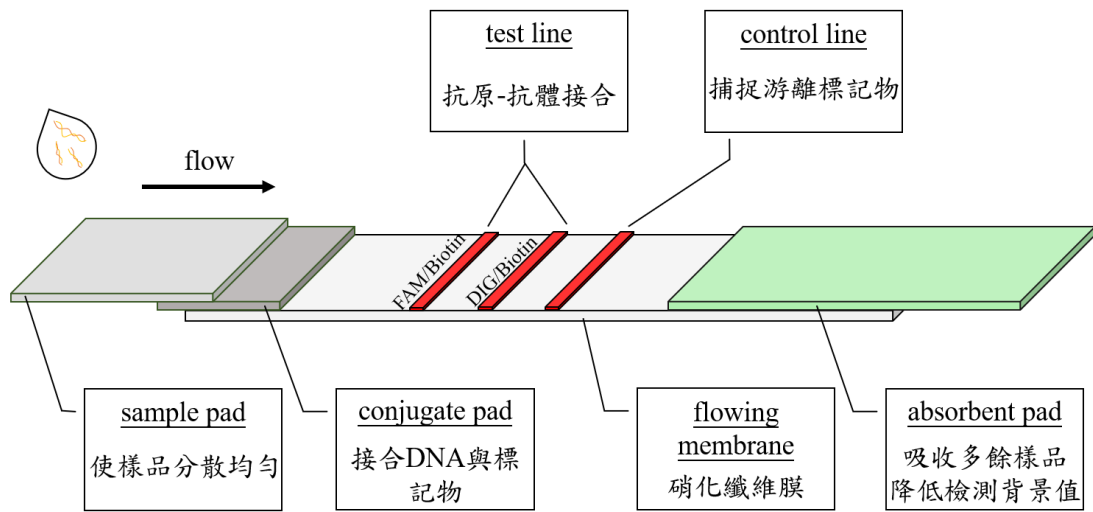


圖 3 - 6 側層流裝置與功能示意圖

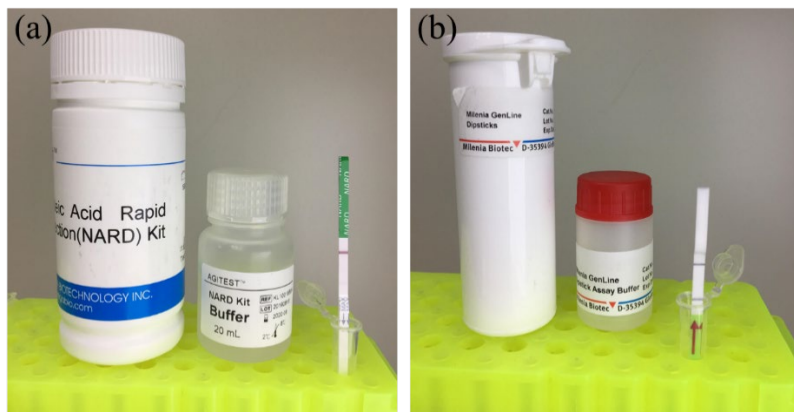


圖 3 - 7 市售側層流檢測試紙(a)NARD，(b)MGHD 1

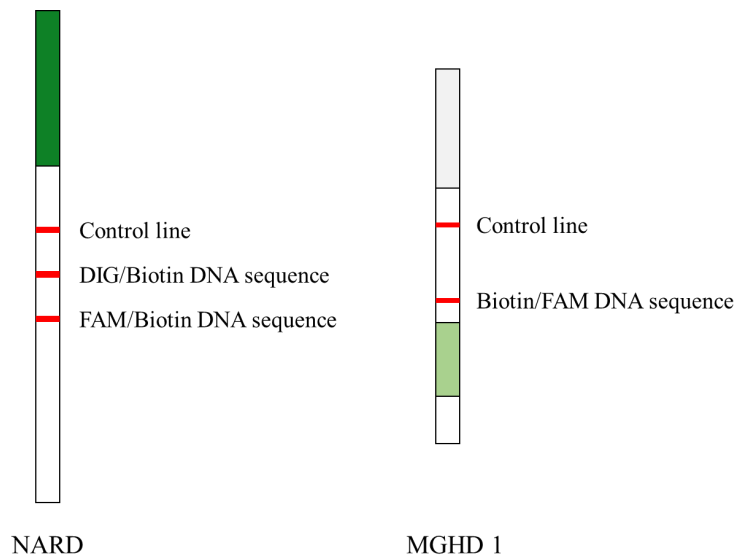


圖 3 - 8 兩種檢測試紙控制線與檢測線指示



3-3 DNA 探針設計

DNA 由兩條互補的長鏈以雙螺旋形式組成，於高溫下兩條互補長鏈會解旋並分開，再次冷卻時互補鹼基對會彼此重新配對，因此利用一段人造合成且含有標記的單鏈 DNA 片段，該片段的基因序列可與目標基因互補，當 DNA 由單一長鏈再次鏈結回雙股形式時會雜交或附著於對應的序列上(圖 3-9)，該人造單鏈 DNA 片段即稱為 DNA 探針，藉由生物訊息軟體(bioinformation software)—Jalview 軟體，可對基因片段進行多序列比對(multiple sequence alignment, MSA)，並將高度保留區之結果設計為可抓取特定目標基因專一性引子對。

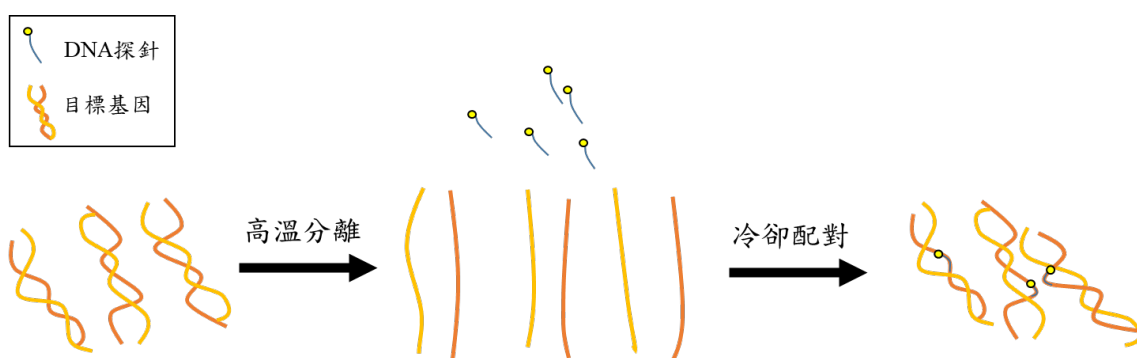


圖 3 - 9 DNA 探針應用示意圖

3-4 樣品處理與核酸分析

量測與分析實驗結果為研究中重要的步驟，本研究將透過分光光度計及 Qubit 螢光定量儀測量核酸的濃度，並將擴增後產物利用凝膠電泳法分析核酸品質，本節將詳述樣品的準備方式及結果分析之原理。

3-4.1 血樣製備

傳統血樣萃取過程對核酸的處理大致可分為四大步驟(圖 3 - 10)，首先會用血球裂解緩衝液(red blood cell lysis buffer, RBC lysis buffer)將血球打破，再來會加入蛋白酶 K(proteinase K)打破細胞膜，並透過高濃度醇類將分散的核酸集結，最後則加入清洗緩衝液(wash buffer)洗去雜質，各個步驟的操作過程需反覆數次的高速離心且待樣品與試劑間的孵育靜置，處理操作上較費時且繁複。本研究欲利用紙基底

實踐核酸的萃取過程，故將萃取配方簡化為只添加 RBC 緩衝液執行初步的打破血球步驟，以血樣和 RBC 緩衝液比為 1:3 之比例調配，同時也可達到稀釋濃稠血樣避免樣品於入口處阻塞之現象。

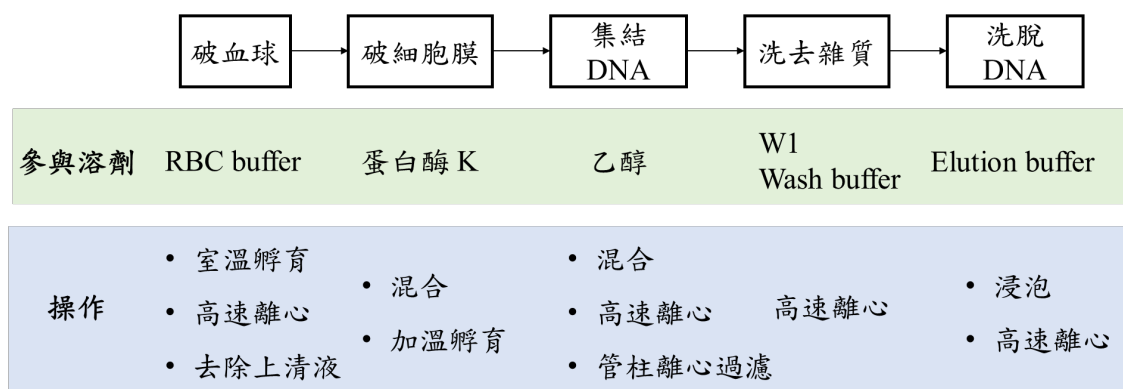


圖 3 - 10 傳統管柱萃取法流程

3-4.2 核酸洗出

為將核酸自紙張洗脫出來，可透過去離子水浸泡後再使用商用核酸純化套件濃縮，抑或可用移液器將紙張中過多的溶液擠壓處理(Rohrman & Richards-Kortum, 2012; Seok et al., 2017)，而本研究是利用 1X 濃度之 TE 緩衝液(Tris-EDTA buffer)作為核酸的洗出緩衝液，可保護洗脫核酸的過程不易受降解，當紙張與洗出緩衝液經過充分浸泡後即可依據添加的洗出緩衝液體積，從離心管中取出相同體積的液體，即可進行後續的分析量測。

3-4.3 核酸濃度量測

在生物實驗中透過核酸濃度的定量量測可為接續實驗的藥劑用量及樣品選用體積提供取量參考，而本實驗主要用以判定各階段實驗後的 DNA 獲取量大小。將使用的核酸濃度量測儀器有兩種，第一種是分光光度計，是利用核酸對特定波長的吸光值來推算核酸濃度與品質，另一種則是 Qubit 螢光定量儀，是由特殊染料標定在雙股 DNA 上時所釋出的螢光訊號大小，並將其與已知濃度標準品所建立的標準曲線相比，即可獲得絕對定量的核酸濃度。



分光光度計

核酸、蛋白質和反應過程的二次代謝物在不同波長光的照射下吸收度皆不同，核酸在波長為 260 nm 的 UV 燈光下具有最高的吸收值，透過吸光值的換算可獲得濃度值，此外，可利用不同光波長下的吸光值比例，如 A260/280 及 A260/230，得知萃取純度之好壞，本研究使用的微量分光光度計型號為 Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 (圖 3 - 11)，樣品體積只需 1 μ L。



圖 3 - 11 微量分光光度計

Qubit 螢光定量儀

Qubit 系統提供的特殊螢光染料可對雙鏈 DNA(double-stranded DNA, dsDNA)、單鏈 DNA(single-stranded DNA)、RNA、小分子核糖核酸(microRNA, miRNA)或是蛋白質做特異性的結合，成功結合目標物的染料才會發出螢光，事先可由試劑套組所附的已知濃度標準品建立起一條濃度與螢光值的標準曲線，根據樣品量測到的螢光值與標準曲線相比則可獲得目標物的濃度，本實驗使用的是 Thermo Fisher Scientific™ Qubit™ 4 Fluorometer(圖 3 - 12)並搭配 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 之試劑套件，可量測雙鏈 DNA 的濃度，其適用濃度範圍為 1 ng/mL到 500 ng/mL。



圖 3 - 12 Qubit 螢光定量儀(圖片取自 Thermo Fisher Scientific 官方網站)

與分光光度計相比，螢光定量儀因染料的螢光強度高，可與背景螢光明顯區別，故在核酸濃度較低的樣品條件下，螢光定量儀有較佳的準確度，且若樣品中雜質含量較多將導致特定波長下的吸光值產生誤差，而螢光定量儀因其染料的具特異性接合能力，故能避免在量測 DNA 濃度時誤將 RNA、蛋白質或核苷酸片段的影響併入，然而由於分光光度計在量測上較方便，無須額外添加特定的緩衝液及染劑，故在生物相關實驗室中仍是量測核酸濃度的主要儀器。

3-4.4 核酸性質分析

凝膠電泳(gel electrophoresis)利用瓊脂糖凝膠(agarose gel)作為分子篩之功能，當帶負電的核酸於外加電場作用下會朝陽極移動，並依照分子量大小不同於不同位置停滯，利用已知鹼基對數目的人造標準品進行比對可獲得 DNA 鏈之長度，並可從電泳圖中條帶(band)之分布判斷 DNA 品質。膠體是由 Tris-borate(TBE)緩衝液加上瓊脂糖凝膠粉末，依照膠濃度 1.8%所調配而成，過程中透過加熱、攪拌使兩者充分混合均勻，待至膠體由混濁狀轉為透明時即可緩慢攪動使其降溫，冷卻後再倒入膠槽中等待凝固(圖 3 - 13)，凝固後將膠體與膠盤放入已添加 TBE 緩衝液的電泳槽中(圖 3 - 14)，於外加平行電場作用下可使核酸於瓊脂糖凝膠中移動，並依照不同分子大小形成特定間距，因此與核酸標準品相比將可由條帶分布位置推算

核酸鏈長，而由螢光訊號強度可知核酸濃度。由於核酸會額外添加可見光染劑及螢光染劑，因此跑完電泳的膠體上可由肉眼看出藍色、紫色與紅色可見光染劑，放入紫外光燈箱(圖 3 - 15)中觀測則可捕捉螢光訊號獲得清楚之核酸分析結果。

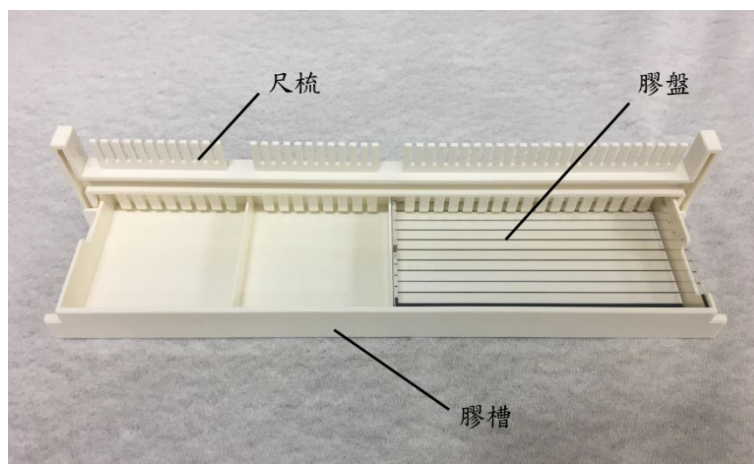


圖 3 - 13 膠槽配置圖



圖 3 - 14 凝膠電泳裝置圖

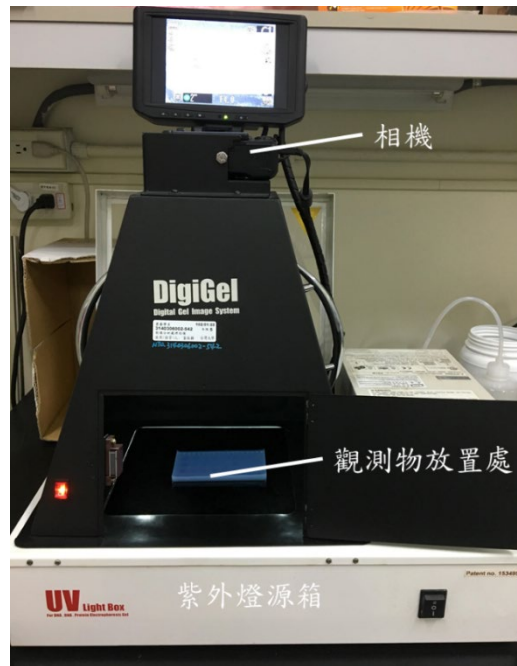


圖 3 - 15 紫外光燈箱

由紫外光燈箱拍攝出的電泳圖如圖 3 - 16 所示，圖中最左邊標示為 M 的條帶為 DNA marker，是由多種已知且不同鹼基對數(base pair, bp)的人造 DNA 片段組成，本研究選用的範圍為 100 bp~3000 bp，DNA marker 除了可用來檢查瓊脂糖凝膠的品質，也可作為量尺功能，如圖中樣品停留的位置由 DNA marker 推算長度落在 100 bp~200 bp 間，而當初引子設計可擴增出的長度為 160 bp，故可驗證擴增的標的正確。

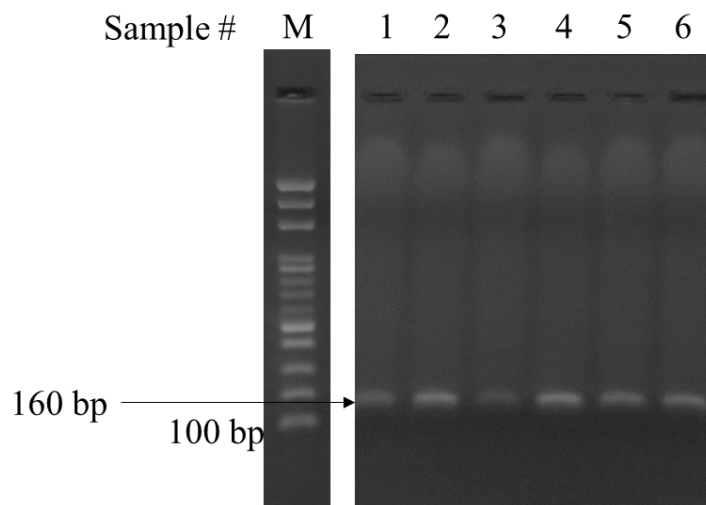


圖 3 - 16 電泳圖範例



3-5 實驗操作

針對實驗架設與操作之介紹可細分為兩小節，首小節細述各式擴增步驟的操作流程，末小節統整本研究裝置整合後的操作概念，並分別說明裝置各階段的實驗驗證方式。

3-5.1 擴增步驟

本研究使用 TwistAmp[®] Basic kit 擴增試劑進行 RPA 擴增反應，並以執行擴增反應的容器為分類將擴增分為試管擴增與紙基底擴增，而紙基底擴增又依擴增時的狀態分成定點擴增以及流動擴增。

試管擴增

一般以試管為試劑混合及反應區的擴增手法即為試管擴增，依據不同的擴增方法有不同試劑配方以及條件，可在試劑的使用說明中獲得，本研究使用的 RPA 擴增其配方如表 3-2 所示，其中引子若有前後段引子設計或者架橋的設計，在本研究都是將不同功能之引子皆各加 1 μL ，依配方添加完各種樣品後可透過振盪器 (vortexer) 將其混合均勻再利用離心機短暫離心，最後即可將試管插入加熱機並調整至所需的溫度與時間，RPA 擴增的加熱條件為 37°C 恆溫加熱 30 分鐘。

表 3-2 擴增配方

	concentration	volume (μL)
Reagent	-	7
MgOAc	-	1
DNA	1 ng/ μL	1
Primer	10 μM	1

紙基底流動擴增

紙上擴增的實驗操作流程是將啟動擴增反應的醋酸鎂滴於紙片一端，並靜置乾燥，再將調配好的擴增試劑取出 10 μL 與有乾燥醋酸鎂的那端接觸，並蓋上保鮮

膜等待擴增試劑完全吸收，將擴增試劑流經處剪下放入離心管中，利用加熱器(圖 3 - 17)以 37°C 恆溫加熱 30 分鐘，最後滴入 TE (Tris-EDTA) 緩衝液將擴增後核酸從紙片上洗出，步驟如圖 3 - 18 所示，添加螢光染劑後即可透過凝膠電泳法進行核酸品質檢測。

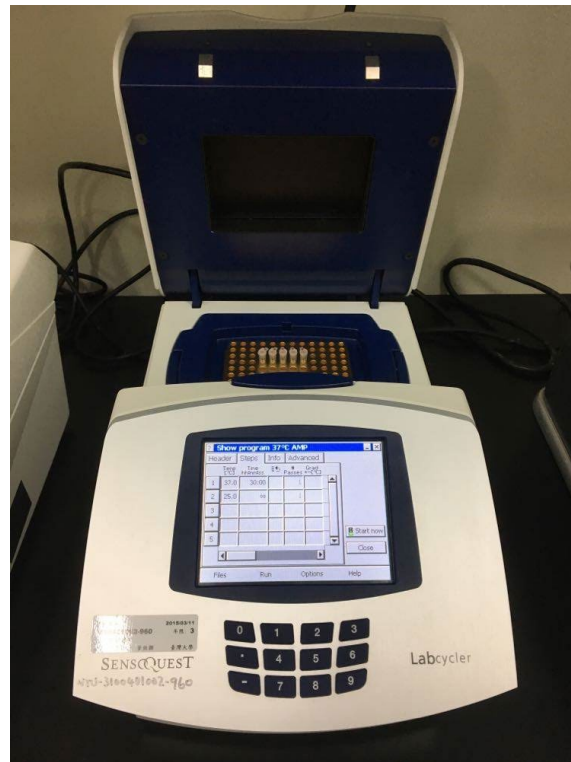


圖 3 - 17 加熱機器示意圖

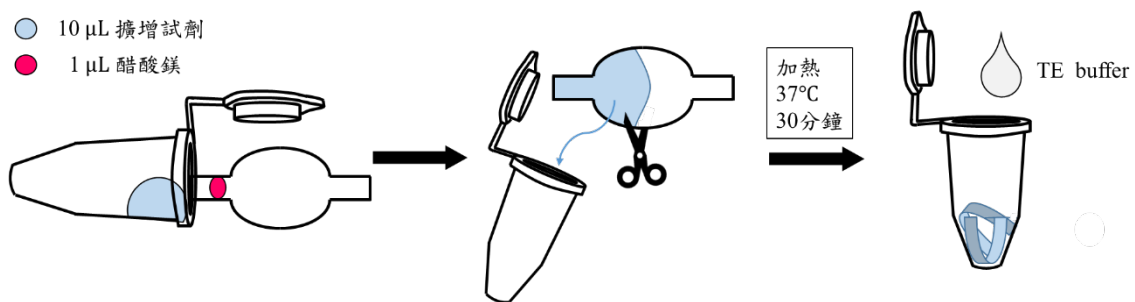


圖 3 - 18 紙基底擴增步驟示意圖

紙基底定點擴增

將醋酸鎂預先乾燥在正方形纖維素紙基底中央，再滴上混有 DNA 之擴增反應試劑進行擴增反應，紙基底的面積大小以可被擴增試劑完全浸潤為選擇，因此相較

起流動擴增，定點擴增可使更多的擴增試劑與醋酸鎂相互反應，實驗變因較少，定點擴增設計如圖 3-19 所示，當擴增試劑被紙基底充分吸收後將放置於離心管中，接下來的處理步驟與流動擴增的方式皆相同。

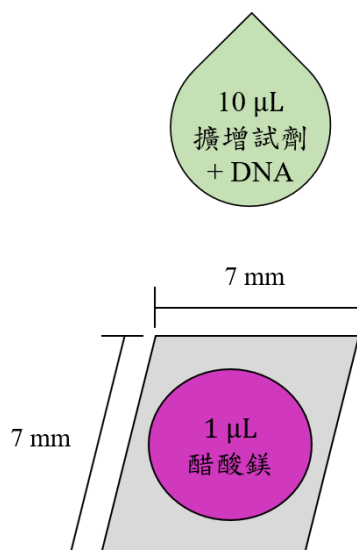


圖 3-19 定點擴增示意圖

3-5.2 整合裝置流程

本檢測裝置包含樣品前處理步驟以及最終檢測，萃取區包含一處樣品入口，可將樣品直接滴在入口處的樣品墊上待其受毛細力牽引抵達擴增區，擴增區所使用的擴增技術為 RPA 擴增，反應區上含有乾燥的引子及醋酸鎂而下方重疊一片擴增試劑存放區，由於 RPA 擴增反應在加上醋酸鎂(magnesium acetate)前並不會啟動，故需將醋酸鎂與擴增試劑分開乾燥，並可將醋酸鎂作為擴增反應的開關；進行 RPA 擴增時仍需短時間加熱至 37°C，為使擴增後的核酸可順利流入檢測階段，本裝置需在擴增後再次注入緩衝液沖洗核酸。於驗證結果的方面，首先，萃取後的結果可透過剪取該階段末端的試紙並將核酸洗出至微量離心管中，再用濃度量測儀器檢測萃取濃度，而擴增階段後的核酸也可藉由洗出緩衝液洗脫核酸，將擴增後產物蒐集於離心管中進行濃度量測及電泳分析，最後的檢測階段則將採用市售的側層流檢測試紙，可以肉眼直接讀取檢測結果，實驗設置的總整理圖如圖 3-20 所示。

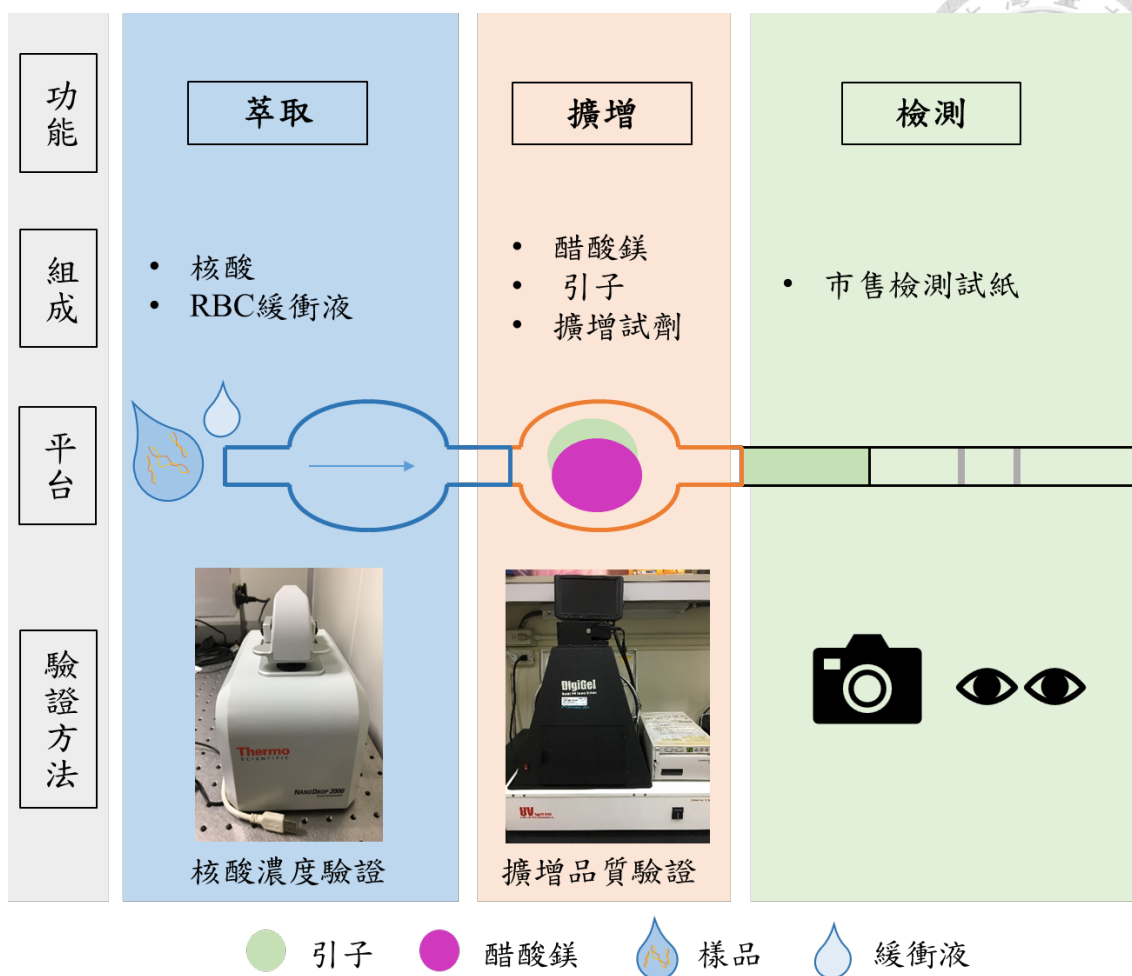


圖 3 - 20 實驗設置總整理圖

3-6 檢測裝置製作與使用方法

本裝置將利用護貝膜將紙基底平台包覆住以隔絕外在污染，僅在正面事先割出一處約 4 mm×4 mm 的樣品入口對外相接，並為了預留放置紙橋的位置，護貝膜上側需橫切一段長約 1 公分之長條但不切斷，下側內層則貼上雙面膠用以固定紙張(圖 3 - 21)，在紙材備置方面，擴增紙材區需事先乾燥 1 μL 的醋酸鎂以及濃度 10 μM 的引子組合各 1 μL，擴增試劑存放區則乾燥 7 μL 的 RPA 擴增試劑，其餘紙材無需特別處理，再依次序將不同用途的紙材依序疊放(圖 3 - 22)，各紙材間需有 1~2 mm 之交疊長度以避免流動中斷，當紙基底平台於護貝膜中放置完成後即可將護貝膜上下側壓緊，並在 100°C 熱板上利用平滑重物來回緊壓使上下層緊密黏合，確認紙基底周圍完全黏合後裝置即製作完成。

使用裝置時需添加 20 μL 的調配後血樣，內含 5 μL 的檢測血液與 15 μL 之 RBC 緩衝液(說明於 3-4.1 節)，並加入 30~90 μL 的 rehydration buffer 推進樣品與水化乾燥試劑，待樣品流至擴增區時將整個裝置放置於熱板上加熱進行擴增反應，反應結束後將紙橋蓋上，利用紙橋連結擴增區與檢測試紙後，再由樣品入口緩慢添加市售檢測試紙所附的緩衝液使擴增物流至檢測區，即可由肉眼判讀獲得檢測結果。

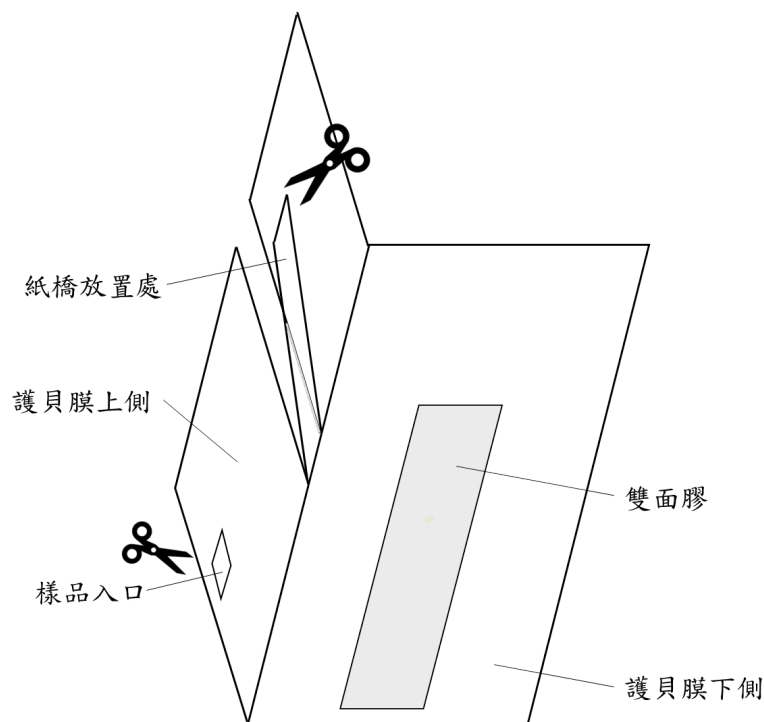


圖 3-21 裝置製作示意圖

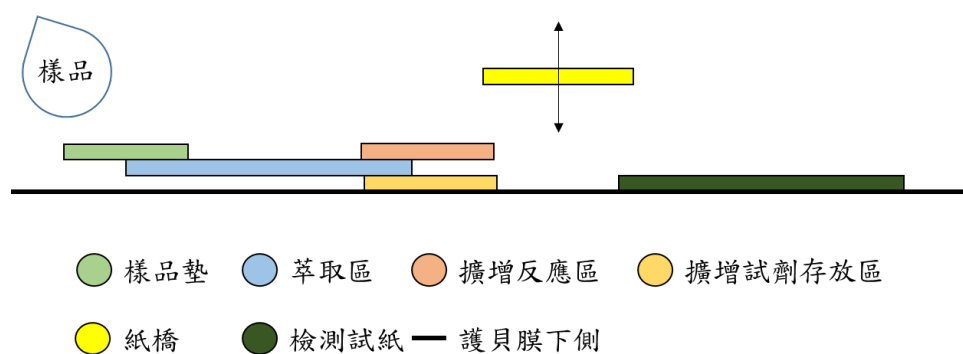


圖 3-22 紙材堆疊示意圖(側視圖)



第四章 結果與討論

本章將先以紙基底觀測結果驗證作為發展整合性檢測平台之基礎，故主要架構以紙基底平台結果為首，依序討論並驗證紙基底擴增之可行性以及最後的整合性裝置測試，整體架構圖如下圖所示：

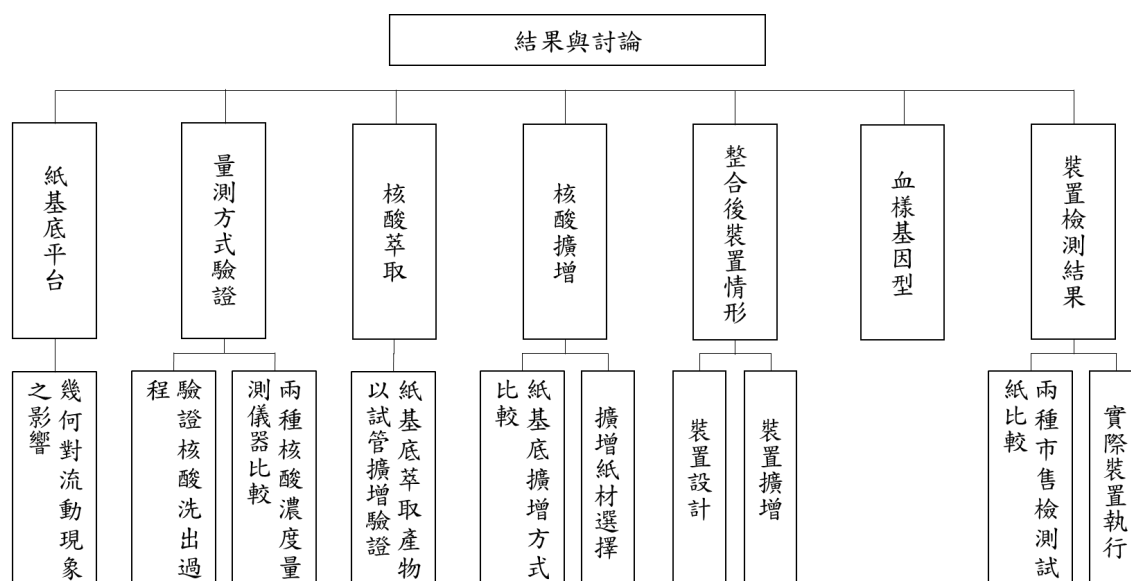


圖 4-1 結果與討論架構圖

4-1 紙基底平台

利用非生物性可視化的流場觀測探討一般化學反應於紙基底上之反應情形，可作為後續在建立核酸反應的紙流道系統時的設計參考。

4-1.1 幾何對流動現象之影響

將1 μL 濃度 1M 氫氧化鈉水溶液(鹼液)乾燥在不同幾何條件的纖維素紙片上，再由已加入酚紅指示劑之 20 μL 濃度 0.01M 氯化氫水溶液(酸液)沖入，實際操作實驗前會在樣品入口處加上樣品墊盛裝過剩的樣品，避免滴管一次滴入太多液體而使液體在紙張頂面形成水膜，導致部分樣品是藉由液體間的內聚力在紙張表面移動，並非受到毛細作用而流動，結果如圖 4-2 所示，濃度較低的酸液碰到高濃度鹼液時會將鹼液向前推進，集中於流體前緣，發生酸鹼中和反應的地方只有在兩液

體交界面上，且不管任何形狀在靠近紙張邊緣處的流體流速皆較慢，直條相對於其他幾何形狀的紙張，紫紅色的鹼液在紙張邊緣處有較長的拖曳現象，可比做反應物滯留在邊界。

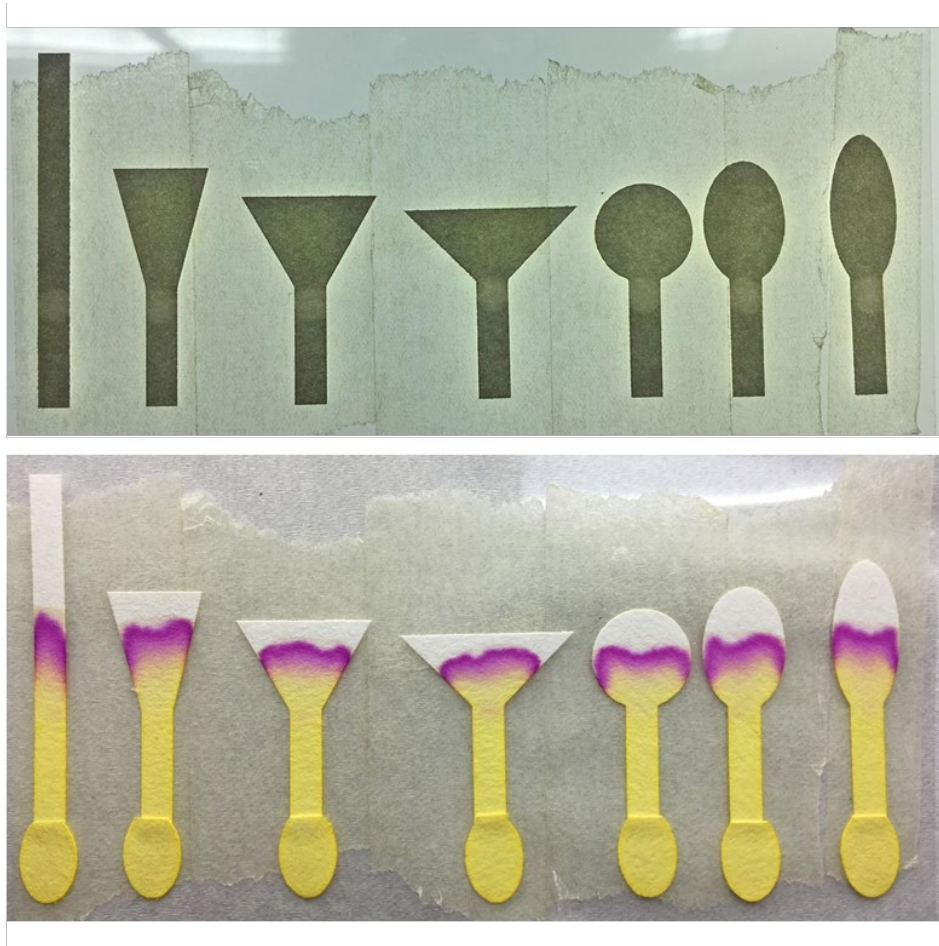


圖 4-2 不同幾何形狀結果圖

另外，由於流體前緣有明顯的鹼液分布，透過影像處理截取出流體前緣的輪廓(圖 4-3)，以殘留面積多寡作為反應效果的指標，剩下面積越少表示反應效率越好，經過四次重複實驗的結果如圖 4-4 所示，發現四次實驗的趨勢皆不同，推測原因為紙張為異質(heterogeneous)材料所致，故反應受到內部結構不一所影響，此外影像擷取也是透過給定特定閾值對原圖做二值化處理，閾值以上的變化不計考慮，這也可能是造成誤差的原因，若將各次實驗數據取其平均比較，則圓形幾何剩餘之面積較少，夾角 30° 和短橢圓剩餘較多，然本實驗可透過增加實驗母體數來降低實驗偏差。

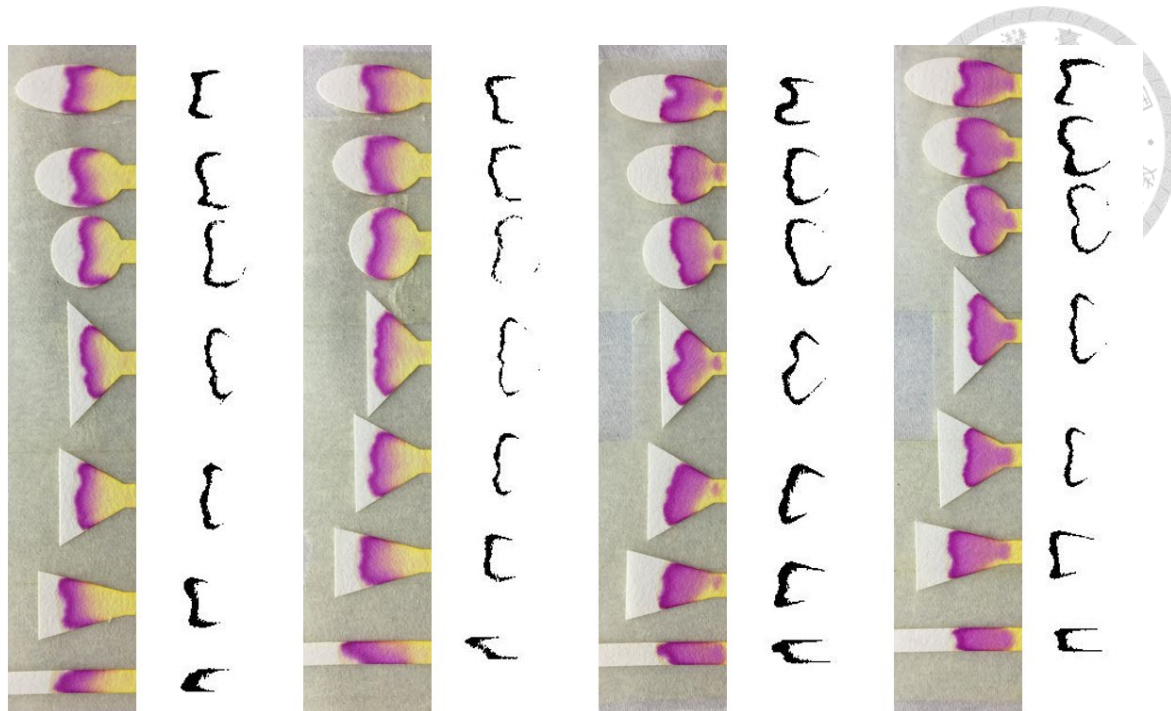


圖 4-3 流體前緣擷取

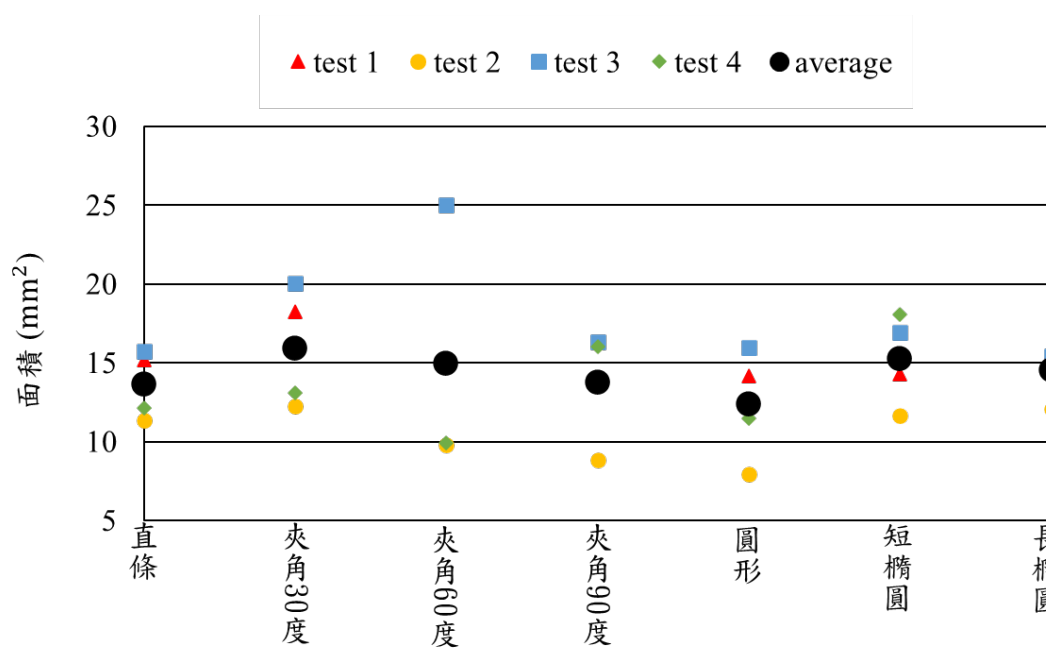


圖 4-4 殘留面積趨勢圖(四重複)

4-2 量測方式驗證

本研究的反應平台為紙基底，故欲探討萃取及擴增階段的反應效果，必須將核酸從紙張的孔隙中洗出，回溶於洗出緩衝液後才可利用儀器量測其所含之核酸濃度，由於此手法並非傳統常見的步驟，因此本節旨在驗證量測過程操作上的合理性



並討論兩種核酸濃度測量儀器的不同。

4-2.1 驗證核酸洗出過程

本小節主要在調整核酸洗出過程所需條件以求較佳的洗出效果，並確保製備過程仍保持準確。實驗條件皆使用的擴增試劑體積為 7 μ L，並加入 1 ng 的核酸重量，且擴增反應皆是在紙基底上進行，再放入離心管中將核酸浸泡洗出。由圖 4-5 可看出 1X 的 TE 緩衝液相較起 0.1X 確實可獲的較多的核酸量，但訊號仍不足且分散，因此改變洗出緩衝液濃度及添加的體積皆無法明顯提升溶出的核酸量。

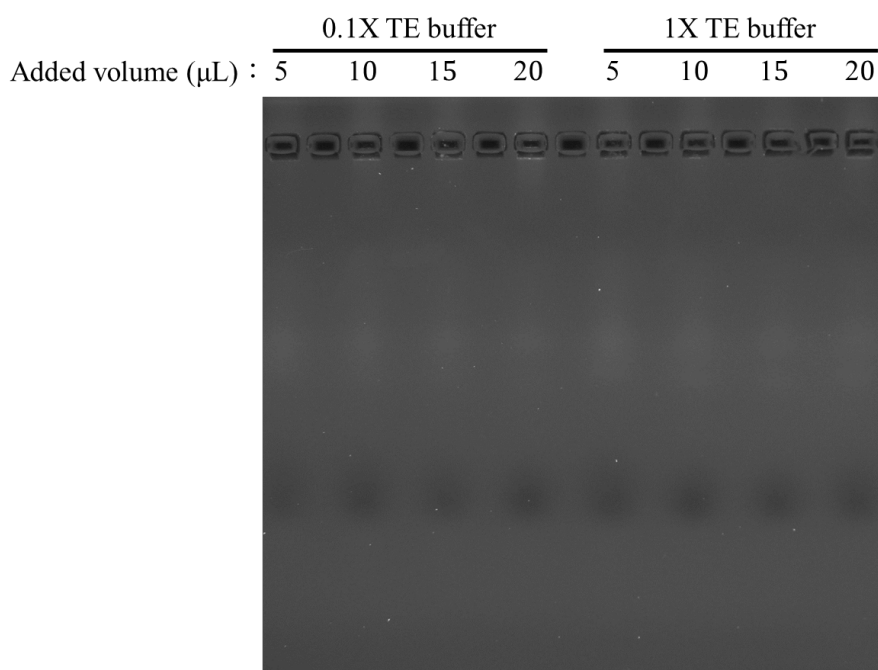


圖 4 - 5 洗出緩衝液濃度與添加體積對洗出核酸的影響

然而將紙張充分浸泡在洗出緩衝液中並放置過夜，即可大幅增加洗出核酸量，且量足以累積成明顯條帶訊號(表 4 - 1&圖 4 - 6)，因而在核酸洗出過程中主要影響洗出效果之關鍵是洗出緩衝液與紙張反應的「時間」，此外從圖 4 - 6 編號 1~3 的電泳結果可發現浸泡的環境溫度也會影響洗出的核酸量，在室溫中浸泡的電泳結果訊號最強烈，但浸泡環境溫度較低的編號 2 與 3 的電泳條帶較無拖曳出梯形之尾端，即低溫可使洗出的核酸品質增加，推測為低溫可破壞擴增過程中纏繞在核酸上的蛋白質團塊，使凝膠孔隙較不會受其破壞或擠壓而產生彎曲的條帶。



表 4-1 實驗條件參考表(圖 4-6)

編號	洗出緩衝液體積 (μL)	過夜浸泡	浸泡環境	電泳體積 (μL)
1	10	O	室溫(25°C)	10
2	10	O	冰箱(4°C)	10
3	10	O	冷凍庫(-20°C)	10
4	5	X	-	-
5	10	X	-	-

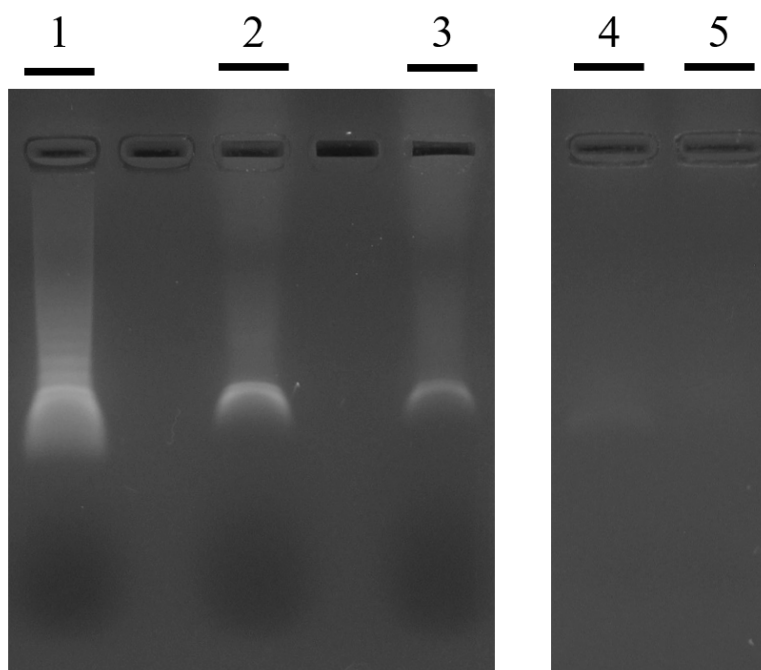


圖 4-6 過夜浸泡與放置溫度對洗出核酸的影響

即使較高溫的浸泡環境能獲取的核酸量較多，但由於室溫的溫度條件與 RPA 擴增所需的恆溫 37°C 較接近，過夜浸泡的過程中擴增行為可能依然持續進行，將無法真實反映實際紙基底擴增效果，故本研究在洗出核酸的條件選擇上將採用以特定體積的 1X 濃度 TE 緩衝液在 -20°C 冷凍下過夜浸泡，雖然該條件可洗出的核酸量較少，但相對能抑止浸泡過程的擴增反應持續進行，避免放大實際效果，且洗出核酸品質較佳，較不受蛋白質影響。



4-2.2 兩種核酸濃度量測儀器比較

利用分光光度計量測核酸濃度可謂生醫領域的一套標準流程，量測時方便快捷，而 Qubit 螢光定量儀的高精確度與專一性使研究人員在量測核酸濃度上多了另一種別具優勢的選擇，本小節將比較此兩種儀器量測之結果並進行修正。

Qubit VS 分光光度計

將同一樣品利用 Qubit 及分光光度計量測核酸濃度結果如表 4-2 所示，結果顯示相同樣品透過不同儀器測量出來的值相差極大，不論是萃取結果或是擴增後結果皆有此情況，Qubit 量測原理是利用特殊染料針對雙股螺旋進行專一性標定，相較於分光光度計對整個樣品吸光值進行推算的原理，Qubit 在較不純淨的核酸樣品中依然能獲得精準的測量結果，另外，將電泳圖跑出的條帶訊號強度與 DNA marker 相比而推算出之核酸重量，該結果也與 Qubit 量測擴增後之結果較相近，故進行絕對定量分析時應採用 Qubit 的測量結果。若單就分光光度計與 Qubit 結果值的比例來看，萃取步驟的實驗結果其兩者儀器測出的結果比例平均落在 225.9、標準差為 7.132，而同為擴增步驟的實驗結果比例平均約為 522.0、標準差為 36.19，相同背景的實驗結果依循相近的比例，故在做同樣背景實驗結果的比較時，可利用分光光度計進行初步量測，再將量測值同除以一個定值，透過標準化處理讓其可進行相對比較，但仍無法探討萃取與擴增結果間的變化關聯，而在標準化處理數據的過程選用的定值為五次試管擴增後利用分光光度計量測之平均核酸濃度，該濃度為 2140 ng/ μ L。

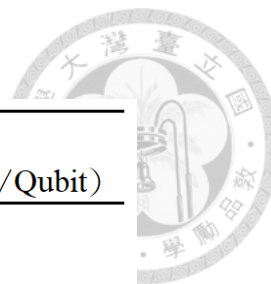


表 4-2 量測儀器數據比較

	分光光度計 (ng/μL)	Qubit (ng/μL)	比例 (分光光度計/Qubit)
萃取	18.15	0.081	224.1
	27.28	0.125	218.2
	33.90	0.144	235.4
擴增	1466	2.700	543.1
	1499	3.260	459.8
	1415	2.860	494.7
	1502	2.640	569.1
	1354	2.480	545.9
	1407	2.710	519.3

分光光度計受到分子生物研究領域的廣泛使用，容易取得或借用，而 Qubit 除了本身的量測儀器外還需額外購買相關染劑套件，故本研究在進行相同步驟但條件不同的實驗比較時，主要以分光光度計作為量測工具，而需探討實際核酸重量或是作跨步驟間的結果討論，屆時才會利用 Qubit 的精準量測。

分光光度計數值修正

核酸洗出的過程會造成些微紙張的紙屑殘留於洗出溶液中，雖透過離心處理可將紙屑沉積在管底，但由於紙類本身的螢光值很高，極微小的殘留也可能造成分光光度計的誤測，故本研究將各種不同材料的乾淨紙質直接過夜浸泡在洗出緩衝液中，無添加任何血樣與擴增試劑，再利用分光光度計以相同濃度的洗出緩衝液作為上機標準品測量其核酸濃度，結果發現在未添加任何與核酸鹼基相關反應物之情況下分光光度計依然會量出核酸濃度，其中玻璃纖維的 GF/A 樣品背景螢光值影響最大，而 PES 材料本身就不易有紙屑剝落，因此背景螢光值的影響相對較小(表 4-3)。

表 4-3 不同紙材浸泡後之背景螢光值比較表

	cellulose	GF/A	GA55	PES 0.22	PES 0.45
Nucleic acid conc. (ng/μL)	24.6	44.5	17.2	0.65	0.15

基於各種紙材浸泡所產生的背景螢光值影響大小不同，本研究在測量不同紙材的核酸濃度時，除了原先皆使用洗出緩衝液作為標準品所得到的結果，另外也將浸泡乾淨紙質的溶液作為標準品，對不同紙材使用其對應的標準品，分別修正結果，由表 4-4 可看出去除掉紙屑造成的背景螢光值後修正之結果皆略微下降，而背景螢光值較高的三種紙材(cellulose、GF/A 與 GA55)其原始值與修正值變化較 PES 材質的大(圖 4-7)，但整體的相對誤差皆小於 10%，另外惟有 PES 孔徑 0.22 μm 的其中一組修正後數據是略為提高，推測原因為 PES 浸泡後的背景螢光值很小，修正後的結果變化也相對較小，因而測量誤差影響的程度比例相對較高，因此才會出現 0.2% 的微幅上升。

前述已發現 Qubit 檢測結果與分光光度計之值有極大差異，本小節對分光光度計中因紙屑而產生的背景螢光進行修正，結果僅有微幅下修改變，因此可推斷影響分光光度計失準的雜質因素主要存在於原始血樣中並非紙基底所殘留，可能因使用的萃取手法與配方較為簡易，無法獲得純淨的核酸所致。

表 4-4 原始數據與修正後結果之比較表

	Original (ng/ μL)	Modified (ng/ μL)	Relative Error
cellulose	361.3	333.4	0.077
	342.6	313.4	0.085
	339.6	308.9	0.091
GF/A	290.4	285.1	0.018
	354.7	334.7	0.056
	384.0	364.5	0.051
GA55	394.4	375.4	0.048
	401.5	379.0	0.056
	399.3	376.7	0.056
PES 0.22	303.4	287.3	0.053
	298.1	298.7	-0.002
	315.2	310.7	0.014
PES 0.45	274.8	266.1	0.031
	334.6	333.3	0.004
	270.1	269.7	0.001

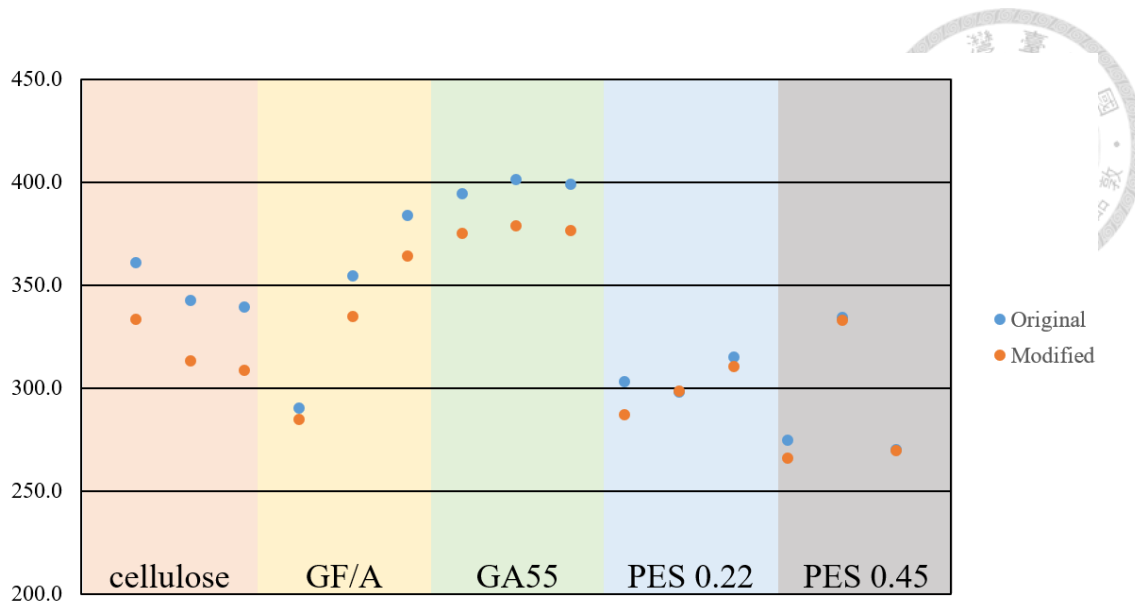


圖 4-7 各紙材原始數據與修正結果圖

4-3 核酸萃取

前述已針對實驗手法與量測儀器進行驗證，本節開始將探討實際樣品於紙基底執行之結果，首先以裝置樣品處理的第一步驟—萃取開始，於此節將驗證裝置萃取產物對後續擴增情形的影響，詳細情形如下文所述：

4-3.1 紙基底萃取產物以試管擴增驗證

一般血樣在做完標準的核酸萃取流程應是透明無色，且可透過分光光度計的讀值確認萃取後產物受到蛋白質及碳水化合物等雜質污染的程度，然由於本研究使用的紙基底萃取法和搭配上的萃取配方僅能實現較粗略的過濾，萃取產物帶有血色，因此本小節利用寬 2.5 mm 長 40 mm 的纖維素紙條，並使用血樣體積與 RBC 緩衝液體積比例為 1:3 的配方，最後體積合計共 20 μ L 的樣品滴入直條，剪下從流體前緣回推 4 mm 長的區段並加入 40 μ L 洗出緩衝液過夜浸泡，最後的產物即為紙基底萃取產物(圖 4-8)，將傳統試管擴增所需的 1 μ L 純 DNA 改成加入 1 μ L 紙基底萃取產物，利用試管擴增的步驟進行擴增反應，由擴增後電泳圖上清晰的核酸訊號(圖 4-9)可驗證紙基底萃取產物雖純度不佳，但內含的雜質並不會抑制擴增試劑與核酸間的作用，裝置設計在萃取區段採用的萃取方式與萃取配方可用於擴增步驟的執行。

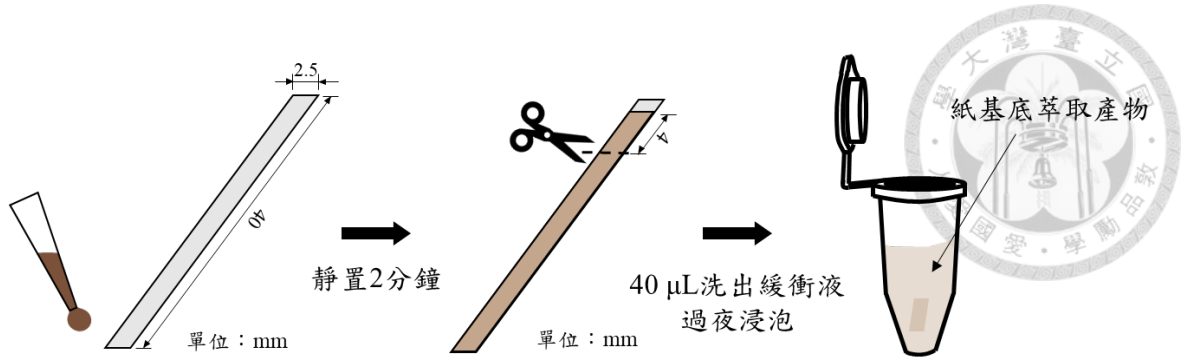


圖 4-8 紙基底萃取產物實驗步驟示意圖

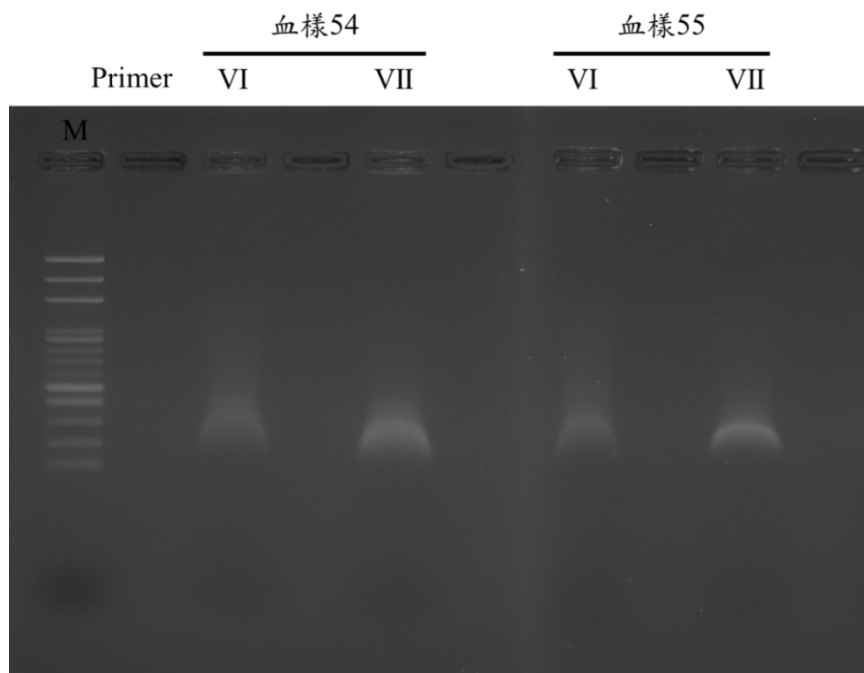


圖 4-9 紙基底萃取產物以試管擴增驗證

4-4 核酸擴增

本節透過改變紙基底上的擴增方式與改變紙基底的材質增加擴增效率，可作為裝置上擴增區域的設計依據。

4-4.1 紙基底擴增方式

本文將紙基底的擴增方式分為流動擴增以及定點擴增，流動擴增設定之概念是希望藉由紙張本身具有的毛細力牽引流體持續向前流動，只需添加足夠體積的 running buffer 即可使樣品自動流經萃取、擴增和檢測區段，大幅減少裝置操作上的人力需求，因而在擴增區段的擴增反應是連續式的流動且同時進行反應；反之定

點擴增則是讓擴增反應發生於一個固定區域中，使擴增試劑在該區域停留並充分反應。由圖 4-10 搭配表 4-5 判讀的實驗結果可知，在相同實驗條件下定點擴增可擴增的核酸較多亦即擴增效率較佳，因其可在定點區域維持高濃度的擴增試劑，並在紙內孔隙中形成的小腔室內充分反應，而連續流動的擴增方式會於流動過程中逐漸稀釋擴增試劑，導致擴增效率不佳，但若可做到良好的流速控制以及測試出更合適的乾燥試劑排列方式，流動擴增的擴增效果仍能再提高，但本研究在初代裝置設計上於擴增區段仍選擇採用定點擴增之方式以求其較高的擴增效率。

表 4-5 實驗條件參考表(圖 4-10)

編號	擴增方式	浸泡環境	電泳體積(μL)
1	定點	冰箱(4°C)	10
2	定點	冷凍庫(-20°C)	10
3	流動	冰箱(4°C)	10
4	流動	冷凍庫(-20°C)	10

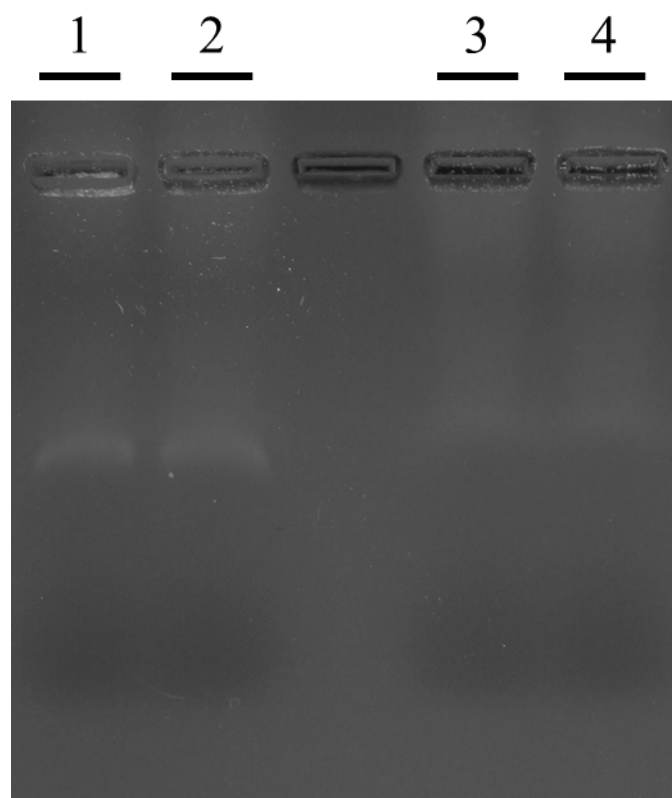


圖 4-10 流動與定點擴增電泳圖



4-4.2 擴增紙材選擇

本小節利用標準擴增流程準備樣品，惟將擴增平台改為紙基底用以探討紙材特性對擴增效果的影響。操作上將擴增試劑、引子、純 DNA 及醋酸鎂充分混合後，分別滴上面積為 7 mm×7 mm 大小的五種紙材上，再放入離心管中用加熱器以 37°C 恆溫加熱 30 分鐘，完成擴增步驟後再加入 50 μL 洗出緩衝液過夜浸泡洗出核酸，最後利用分光光度計測量五種不同紙材擴增後所獲得的核酸濃度，結果如圖 4-11 所示，圖中所使用的結果為修正後的量測結果，而縱軸為修正後分光光度計結果除上五次試管擴增平均—2140 ng/μL 的比例，由圖中可看出玻璃纖維材質具有較佳的擴增效率，而 GF/A 和 GA55 同為玻璃材料，但 GA55 擴增效果更好且實驗變異小，推測可能原因為 GA55 的孔徑(0.6 μm)較 GF/A(1.6 μm)小，因此孔隙形成的反應腔室總表面積較大，故具有較高的擴增效率，本研究在擴增區段的材料選擇將採用玻璃纖維 GA55。

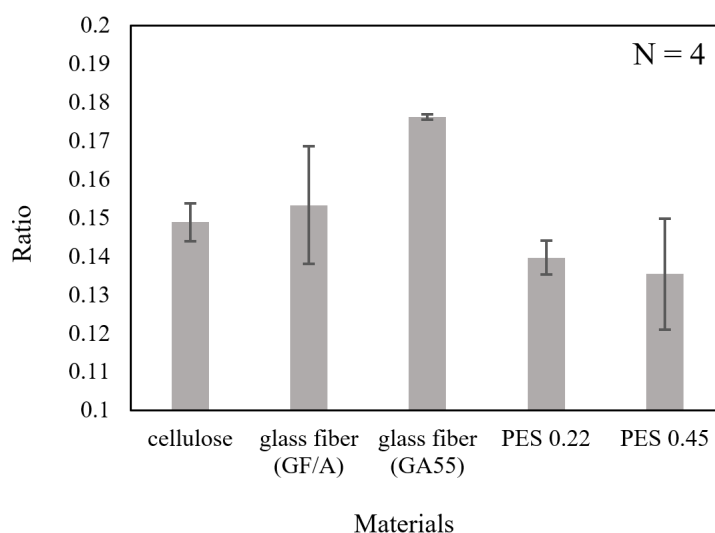


圖 4 - 11 擴增紙材比較圖

4-5 整合後裝置之執行

藉由前述分區段實驗獲得的研究結果，本節將該結果實際作為裝置設計之參考，並將萃取、擴增與檢測共同整合為紙基底檢測平台，下文包含裝置細部設計、改善修正以及完整之操作說明。



4-5.1 裝置設計

裝置功能需包含萃取、擴增以及檢測三大步驟，而設計方向上以降低人為操作需求同時兼具方便製作與材料便宜的特色。最初的裝置外蓋設計是利用雕刻機於壓克力板上雕刻出紙材的外輪廓，使紙材準確排列於固定位置，再透過設計的壓條緊壓紙張交疊處避免斷流(圖 4-12)，然而由於壓克力與紙面產生的微小間隙其流阻相較起紙基底內部孔隙的小，樣品會從微小間隙快速通過流向下個階段處，造成萃取效果不佳，且裝置運作上較不穩定，因此後續設計的裝置封裝改採用可加熱黏合的護貝膜，可緊密包覆內部紙材著實降低樣品從紙面溢流的現象，且達到避免蒸發的效果，尤其針對擴增時的恆溫加熱過程，水份的穩定控制可維持良好之擴增效果。

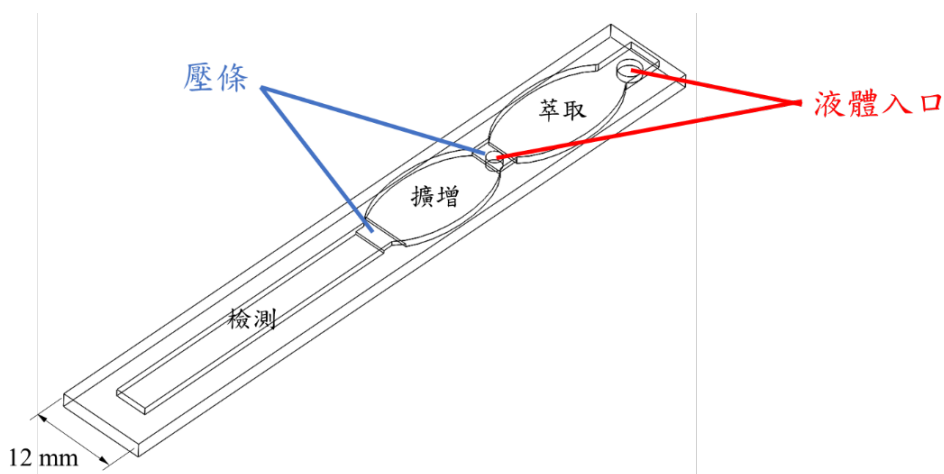


圖 4-12 初始壓克力上蓋設計

由於做紙材擴增效果的實驗時是選用方形紙張進行，因此初始設計的擴增區也是利用方形設計(圖 4-13)，並且將擴增試劑乾燥於萃取區末端，後者發現擴增試劑的體積較大，滴在萃取區末端時會朝樣品入口方向蔓延許多空間，且若日後要改變擴增試劑的添加時萃取區的空間也會受其變化影響，因此在次代設計上增加一片獨立的擴增試劑存放區，使用的是厚度較厚單位距離上可儲存較多液體的GA55 玻璃纖維，並且將初始設計的開放式樣品入口改為單一式入口(圖 4-14)，藉此可在入口處添加樣品墊以進行初步過濾減少萃取區堵塞之可能，並可作為添加樣品時的暫存空間，無須將樣品拆成小體積分批添加。

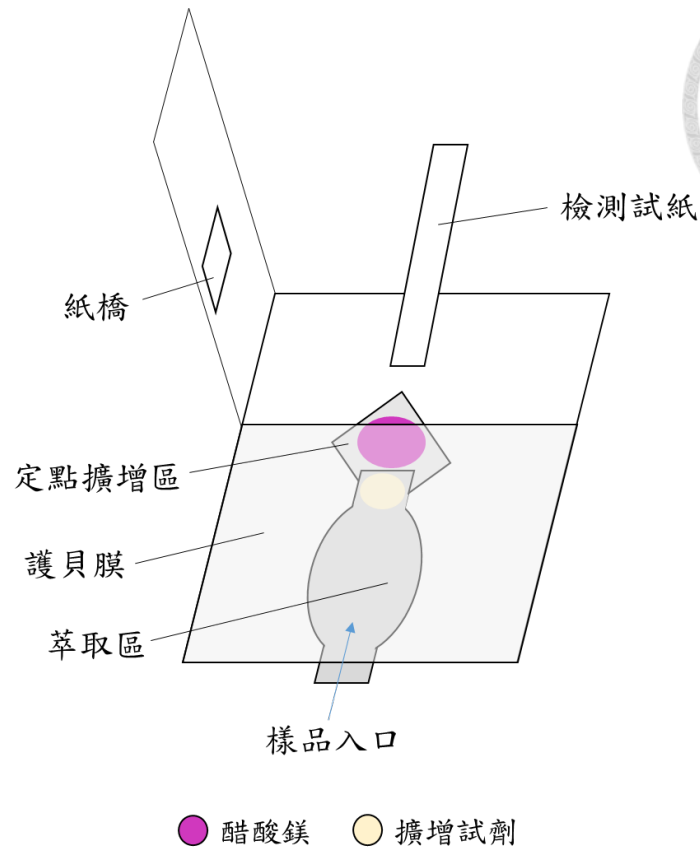


圖 4-13 初始設計

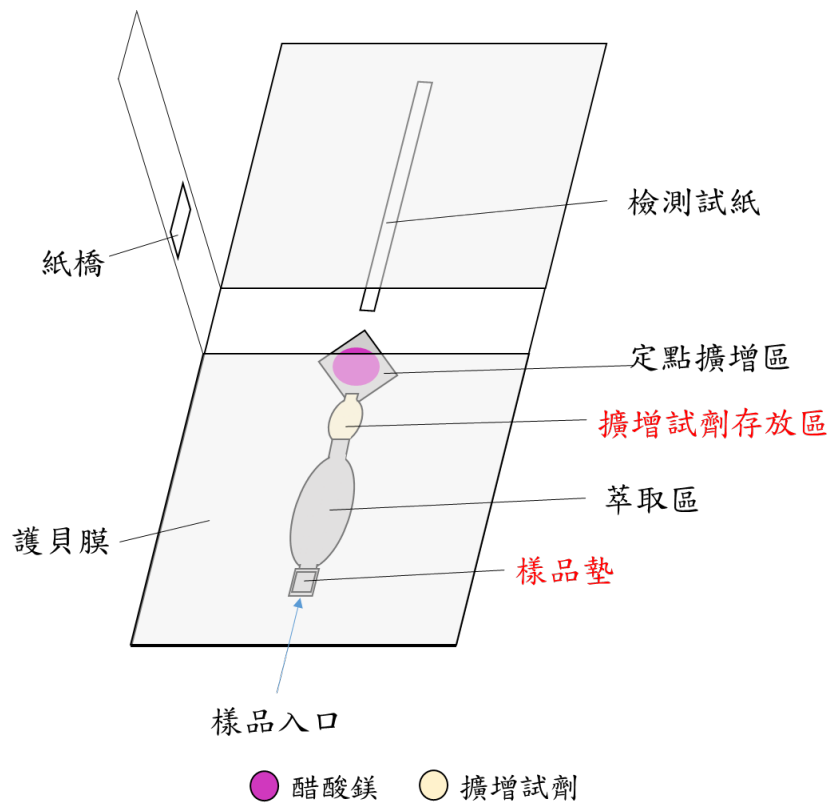


圖 4-14 次代設計

將次代設計的裝置利用酸鹼液與酸鹼指示劑作可視化的流動測試，模擬裝置中乾燥試劑、醋酸鎂的流動情況，如圖 4-15 與圖 4-16 所示兩者分別顯示恆溫加熱 30 分鐘的前後操作情形，圖中三個裝置的配置皆相同，而本處檢測區的側層流試紙僅以普通紙張示意。圖 4-15a 黃色為酸液模擬乾燥擴增試劑在裝置中的位置，方形擴增區中也事先乾燥強鹼液以代表乾燥的醋酸鎂，但由於添加體積較少故照片無法看見其呈色，接著對三個裝置由左至右從樣品區加入純水表示樣品的添加，圖 4-15b 代表樣品溶解擴增試劑，並朝擴增區流動，擴增區的紫紅色即為鹼液的呈色，數十秒後試劑與樣品皆穩定於在擴增區停滯(圖 4-15c)便可放上加熱板以恆溫 37°C 加熱半小時，圖 4-16a 為加熱後之結果，將紙橋蓋上連結擴增區與檢測區後再由樣品入口添加純水，擴增後產物將會由流經紙橋(圖 4-16b)並通往檢測區(圖 4-16c)，然而在將擴增物向紙橋推進之時，發現擴增區的方形尖角會使部分酸鹼液沿邊角殘留，可能導致擴增試劑分散濃度不均且使擴增物殘留。

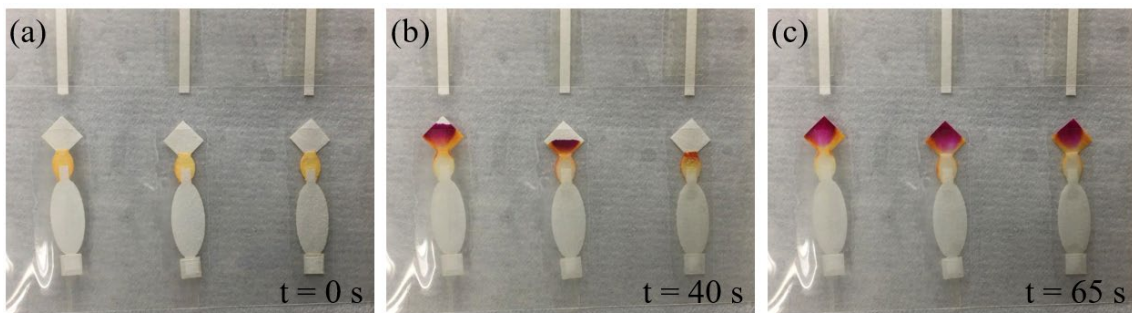


圖 4-15 次代設計流動示意圖(恆溫加熱前)

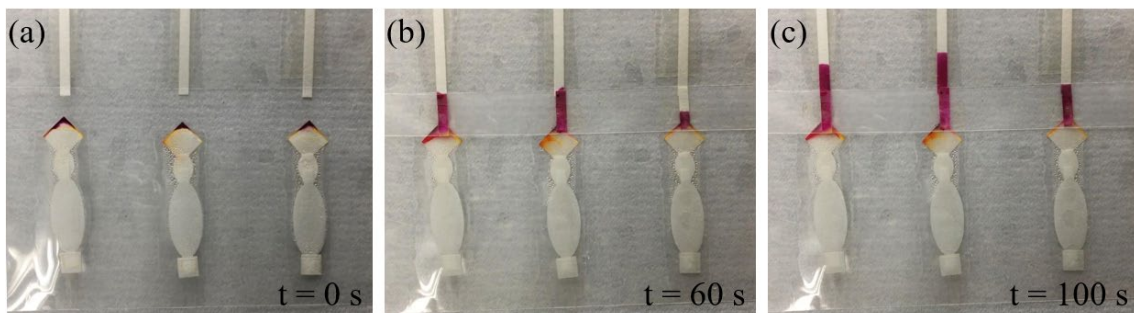


圖 4-16 次代設計流動示意圖(恆溫加熱後)

根據上述發現之殘留現象，本研究將裝置中擴增區段(涵蓋定點擴增區及擴增試劑存放區)獨立出來進行實際核酸擴增測試(圖 4 - 17a)，將 1 μL 的純核酸、對應之引子以及 30 μL 的 rehydration buffer 由擴增試劑存放區一端滴入，模擬萃取後核酸進入擴增區，擴增反應完成後將方形反應區中的核酸洗出，利用分光光度計測量後核酸濃度約為 75~125 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，依過去實驗結果，在進行一般常見試管擴增可獲得 2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上的濃度，而將擴增試劑與樣品事先充分混合再滴入紙張以進行擴增反應，其擴增量最低濃度也可獲得 370 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，與兩者擴增結果相比裝置擴增的擴增效果過差，推測原因可能為試劑流經的距離過長而被稀釋，且酸鹼液流場實驗中發現的方形反應區之試劑殘留也可能影響，因此將擴增區的配置改成如圖 4 - 17b，改將引子也事先乾燥在反應區，並將反應區幾何形狀改為邊緣圓滑的橢圓狀，且將反應區與擴增試劑存放區相疊，藉此避免整體裝置流速過快以致擴增試劑無法完全溶解影響擴增效果，以實際核酸擴增測試後可得到 260 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的核酸濃度，相較原始裝置增加了一倍，故本研究在最終裝置設計上將擴增區改為重疊式設計如圖 4 - 18 所示，而各元件尺寸大小如圖 4 - 19 所示。

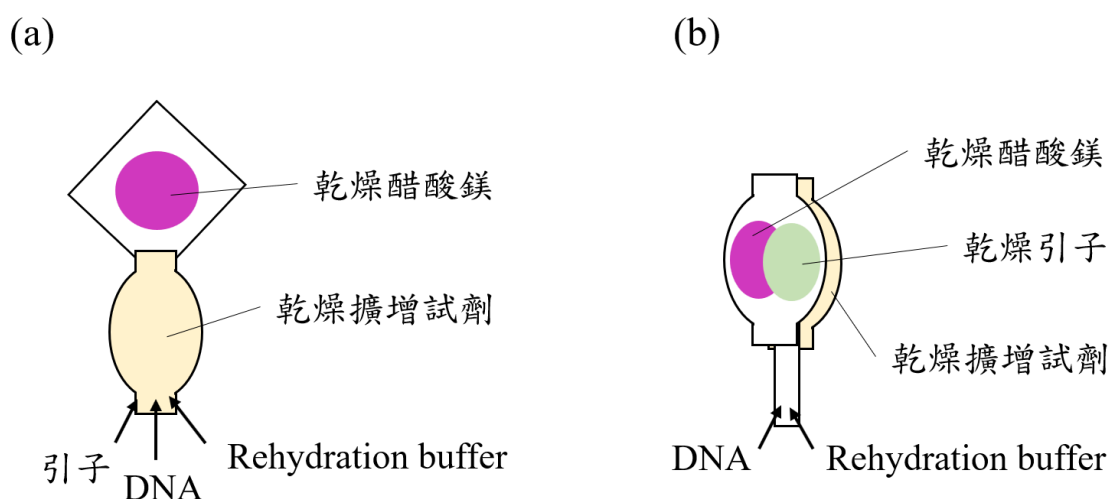


圖 4 - 17 (a)原始擴增區配置。(b)擴增區新配置

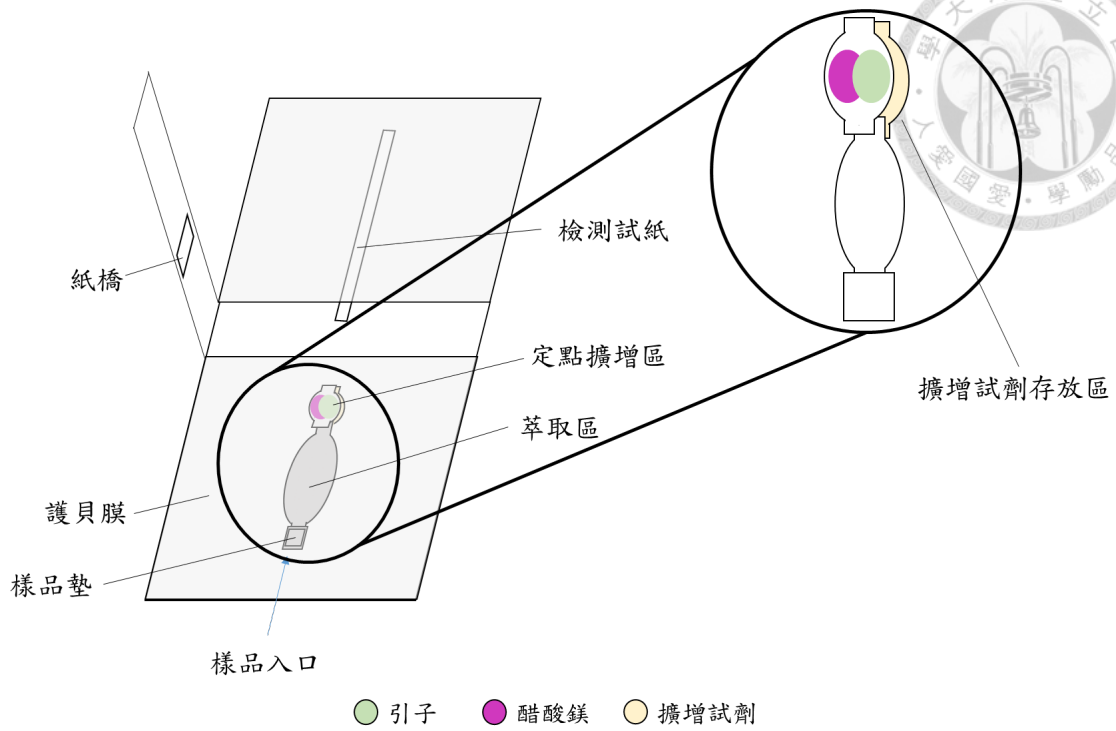
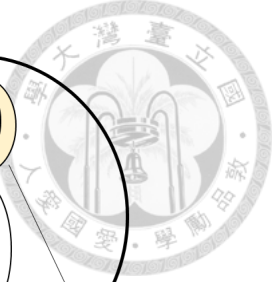
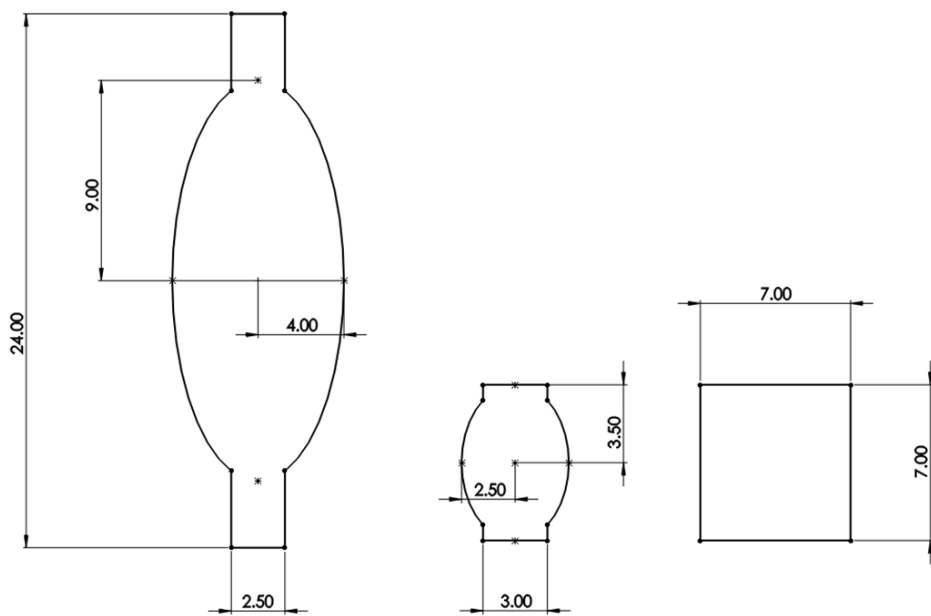


圖 4-18 最終裝置設計



萃取區

擴增反應區

樣品墊

圖 4-19 各區尺寸圖(單位：mm)



4-5.2 裝置擴增

擷取萃取與擴增區段對裝置擴增效率進行探討，實際實驗過程如圖 4 - 20 所示，本小節旨在透過改變裝置設計及實驗條件以提高擴增量、增加檢測準確度，改變的項目包含樣品墊材質、擴增溫度以及操作手法，實驗結果將由下文詳細探討。

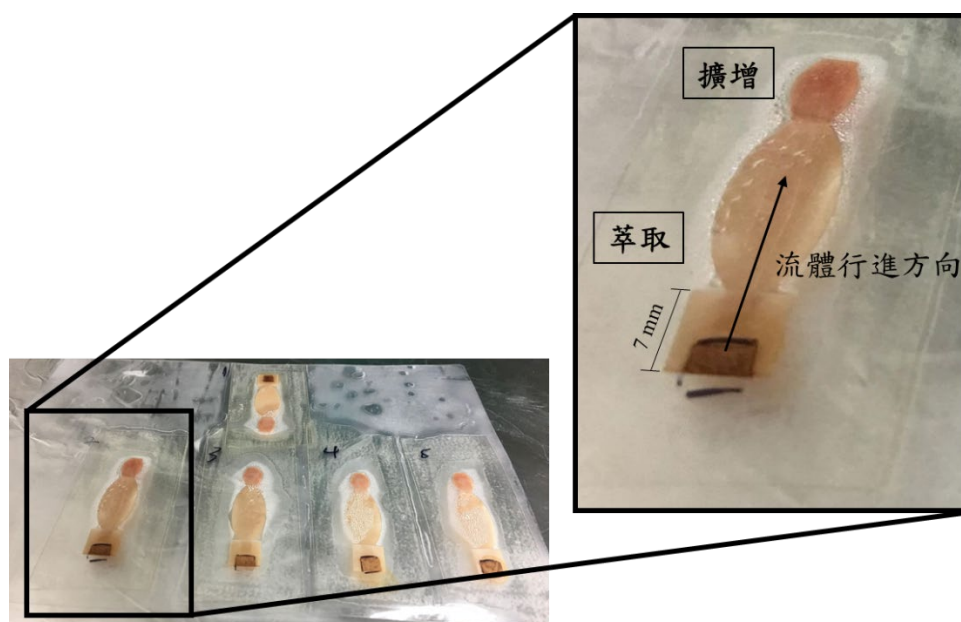


圖 4 - 20 加熱中之裝置擴增實驗圖

樣品墊材質

裝置中樣品墊設計主要之目的是用以盛裝大量樣品並具有基本過濾的功能，本研究在樣品墊材質的選擇上挑選兩種材料，一種為厚度薄、孔徑較大之纖維素材質，另一種則是厚度厚、孔徑小之 GA55 玻璃纖維材料，將兩種紙材皆裁成尺寸為 7 mm×7 mm 的方形並置放於裝置樣品入口處，擴增反應區已乾燥 7 μ L 擴增試劑、合計 2 μ L 引子與 1 μ L 醋酸鎂，將 20 μ L 的調配後血樣與 30 μ L 或 40 μ L Rehydration buffer 充分混合後，共計 50 μ L 或 60 μ L 的樣品直接滴入樣品入口，再以 40°C 恆溫加熱擴增，擴增完成後將擴增反應區以及乾燥試劑區取出，放入離心管中利用 10 μ L 洗出緩衝液冷凍過夜浸泡將核酸洗出，實驗結果可發現樣品墊材質為玻璃纖維的最後核酸擴增量較高，而反應總體積為 60 μ L 的實驗結果標準差較大(圖 4-21)，因此推論玻璃纖維雖孔徑較小受到阻塞的可能性相對纖維素紙材高，但其大的厚

度與紙材本身較高之鬆軟性使樣品在樣品墊上流動時擁有較高的自由度，整體流動性好可將較多血樣穩定輸送至後面區段，因此最後的擴增效果較佳，在實驗過程中也可觀察出以玻璃纖維為樣品墊的裝置整體樣品輸送速度高於纖維素樣品墊，另外，額外添加 Rehydration buffer 溶解乾燥試劑與帶動樣品前進時，添加體積較多亦即整體裝置負載的樣品總體積較高，造成裝置執行效果不穩定，實驗結果標準差較大，如圖 4 - 21 淺灰色直方所示，故在後續實驗將使用目前裝置設計較可負載的添加 30 μL Rehydration buffer 使總體積為 50 μL 的條件設定。

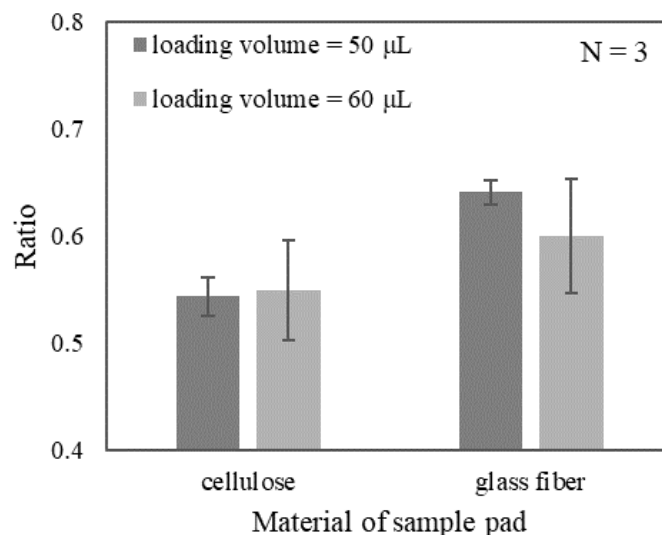


圖 4 - 21 樣品墊材質比較圖

加熱溫度

本研究於核酸擴增區選用的擴增方式為 RPA 技術，取其擴增時間短與所需溫度較低之優勢，廠商所提供的擴增條件為恆溫 37°C 加熱 30 分鐘，由於本裝置使用熱板作為外加熱源，屬於開放式加熱易受室溫影響，故在溫度設定上將溫度粗略上調為 40°C，並與原先廠商設定的擴增溫度 37°C 相比，由實驗結果得知 37°C 的擴增效果略高於 40°C，但兩者結果差異不大(圖 4 - 22)，可推論 RPA 技術應用於本裝置時，不須利用精密的溫控設備加熱即可發揮擴增效果，由於本裝置在擴增階段溫度控制要求不高，故適用於戶外檢測、野外採樣以及偏遠地區等資源及能源不豐沛之處。

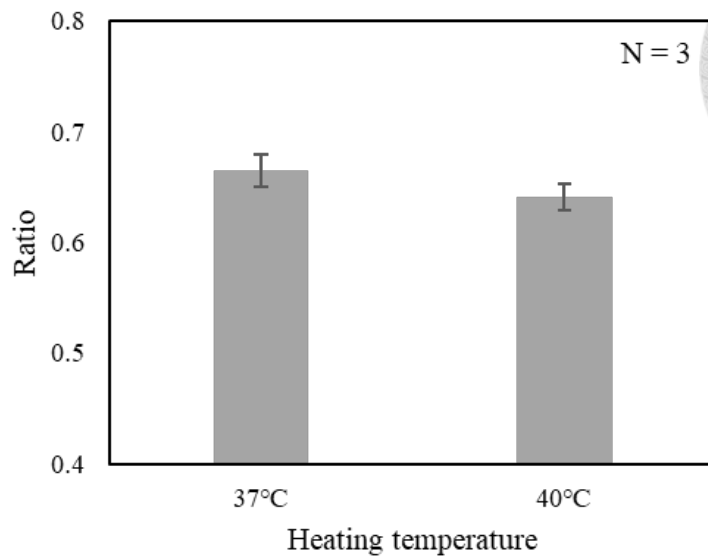
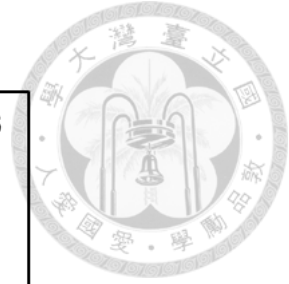


圖 4 - 22 擴增加熱溫度比較圖

操作手法—樣品與 Rehydration buffer 分批添加

樣品滴上裝置進行反應前，會將 20 μ L 的調配後血樣與 30 μ L 的 Rehydration buffer 充分混合，藉由添加 Rehydration buffer 增加液體總體積，增長液體前進距離。於此部分測試，本研究將血樣與 Rehydration buffer 分批由樣品墊進入裝置，雖將增加裝置使用複雜度，但由於 Rehydration buffer 的目的僅在於推進血樣與溶解乾燥試劑，將其與血樣混合後一起進入裝置反應會使血樣受到稀釋(圖 4 - 23)，且使裝置萃取區的處理負荷提高，因此透過將兩者分開添加可獲得較高的核酸量，但提升幅度不顯著(圖 4 - 24)。

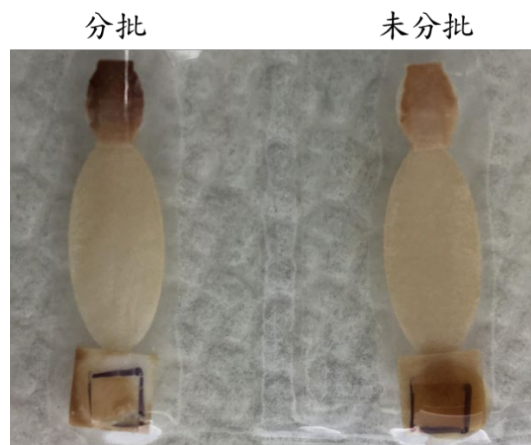


圖 4 - 23 實際實驗圖(不同操作手法)

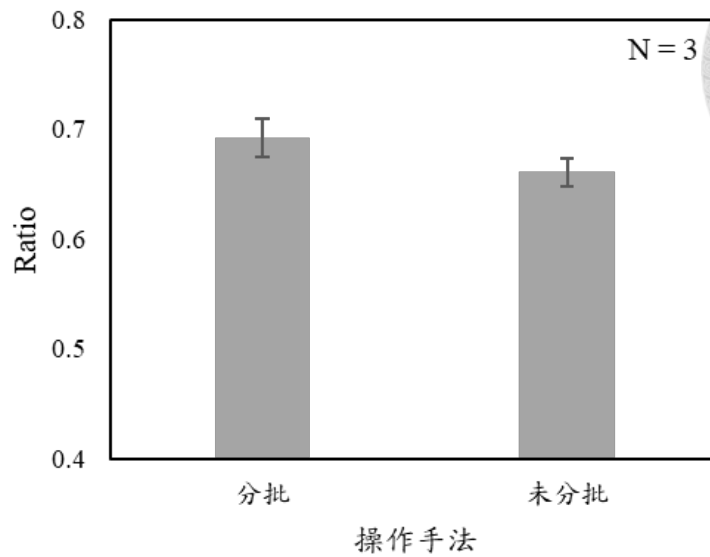
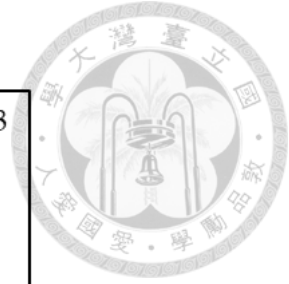


圖 4-24 操作手法比較圖

4-6 血樣基因型

將 20 個種豬的血樣針對三種高肉質基因序列利用傳統 PCR 流程進行篩檢，過程中使用三組引子對基因座上的不同鹼基序列進行分析，相關資料如表 4-6 所示，編號II與III的引子設計是針對篩選 HFABP103 基因座上的 T 鹼基或 C 鹼基，若該血樣在 HFABP103 基因座帶有 T 則可在電泳圖上 98bp 處看到螢光條帶，可能的基因型為 TT 或 TC，同樣地若基因座上有 C 則在電泳圖 80bp 處具有螢光條帶，可能的基因型為 CC 或 TC，因此若血樣的基因型為 TC，則在兩張電泳圖中皆能看到對應的螢光訊號，另外兩種高肉質基因序列的篩檢方式也是同理而得。

表 4-6 引子設計與位點資料

引子編號	基因	檢測對象	擴增片段長 (bp)	基因型
II	HFABP103	T	98	TT, TC, CC
III	HFABP103	C	80	
IV	HFABP89	C	98	CC, CT, TT
V	HFABP89	T	160	
VI	HFABP411	G	100	GG, GC, CC
VII	HFABP411	C	166	

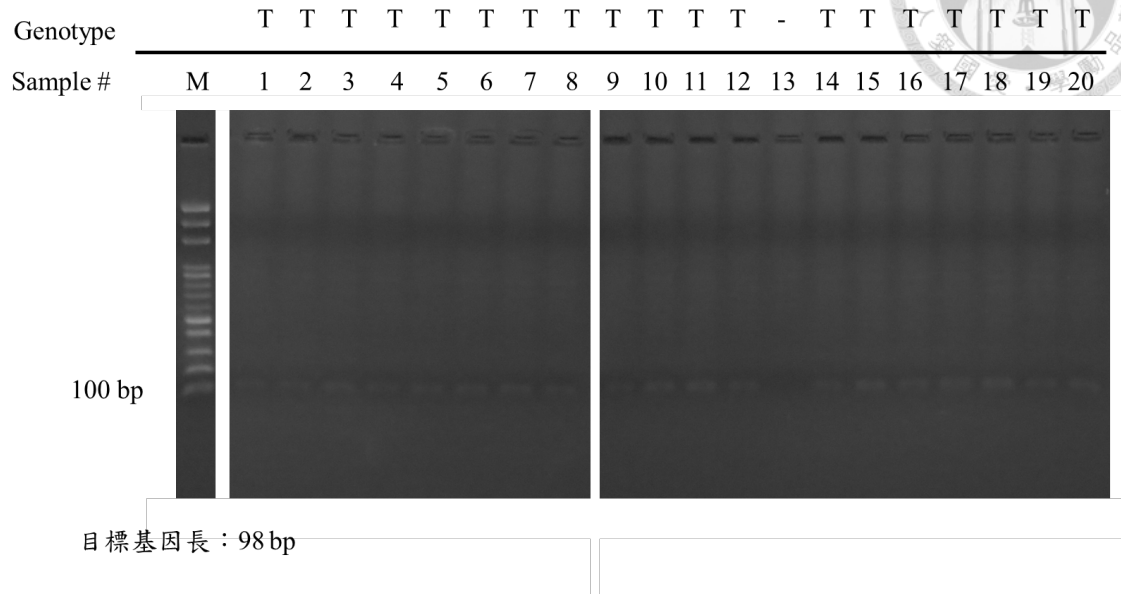
在 PCR 擴增時引子黏合步驟的溫度設定為 55°C，並執行 30 次熱循環，將擴增後結果取出 10 μL 跑電泳分析，在各組引子篩檢下的結果整理於表 4-7，而實際的電泳結果如圖 4-25 至圖 4-27 所示，部分引子的專一性不佳，推測為 PCR 擴增時的溫度條件未進行優化所致，最後根據訊號的明顯程度以及血樣具備的基因型多樣性，研究上適合以編號VI與VII的引子進行。

表 4-7 PCR 基因型篩檢結果整理表

基因座	基因型	血樣編號
HFABP103	TT	15, 16
	TC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 20
	CC	13
HFABP89	CC	-
	TC	-
	TT	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
HFABP411	GG	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 16, 17, 18, 20
	GC	2, 4
	CC	12, 13, 14, 19
	-	10



Marker II



Marker III

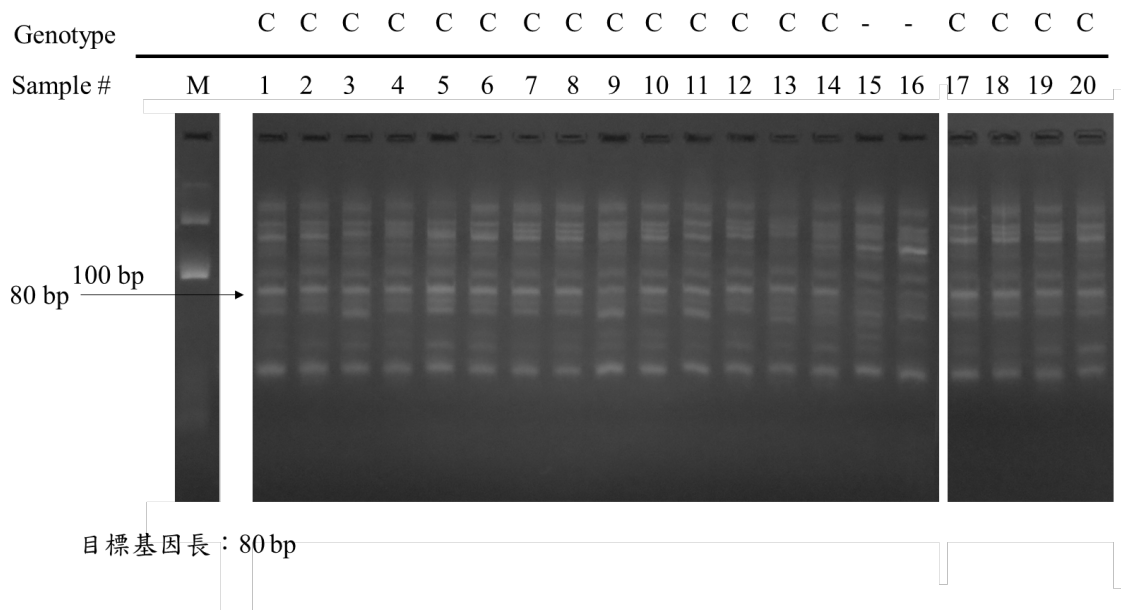
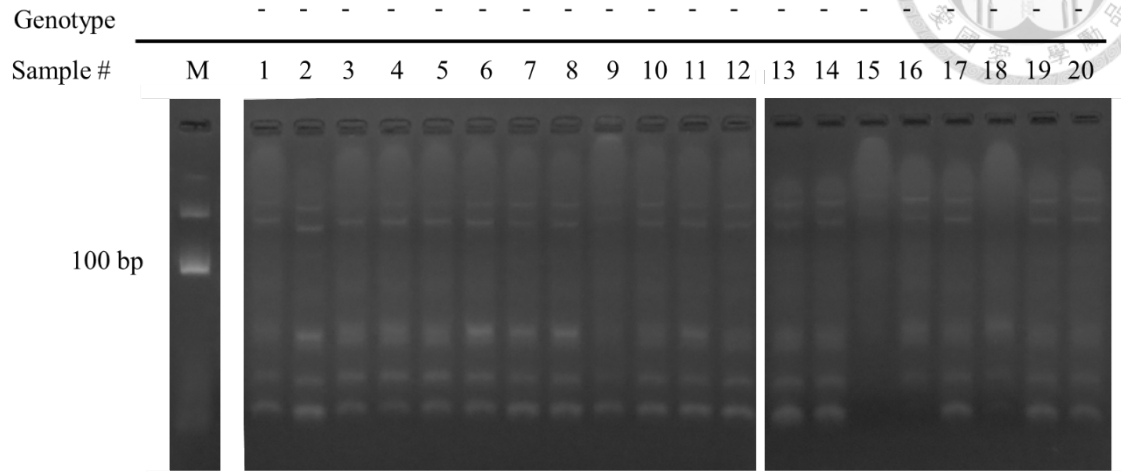


圖 4 - 25 HFABP103 基因座篩檢電泳圖

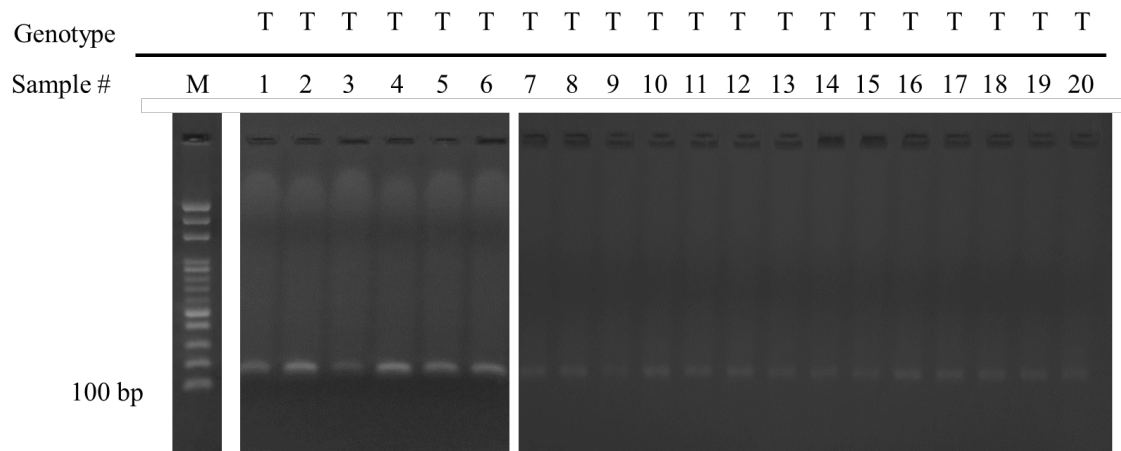


Marker IV



目標基因長：98 bp

Marker V

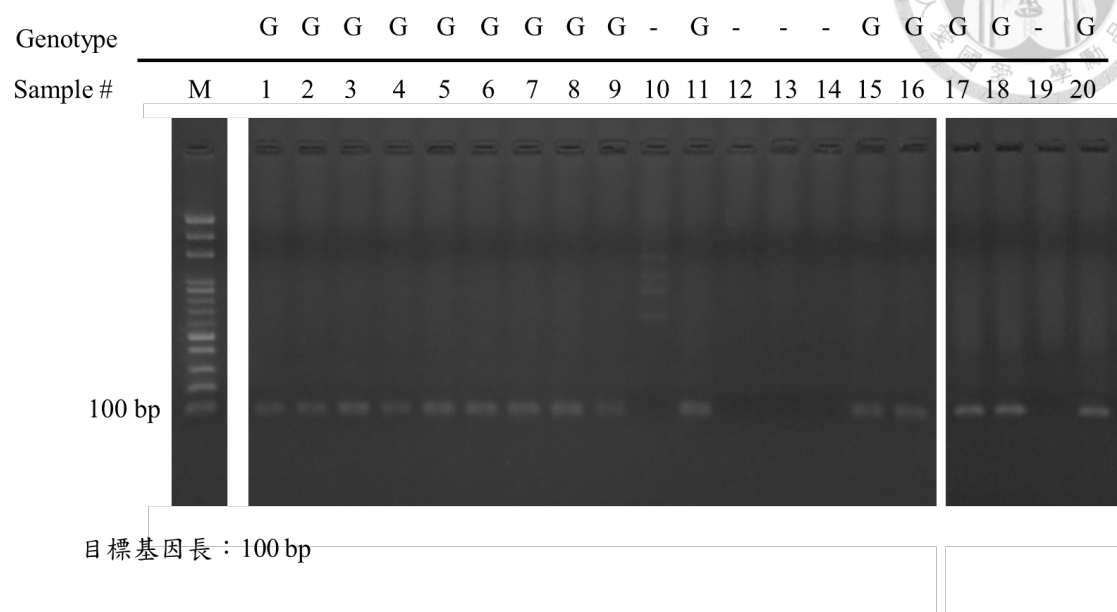


目標基因長：160 bp

圖 4 - 26 HFABP89 基因座篩檢電泳圖



Marker VI



Marker VII

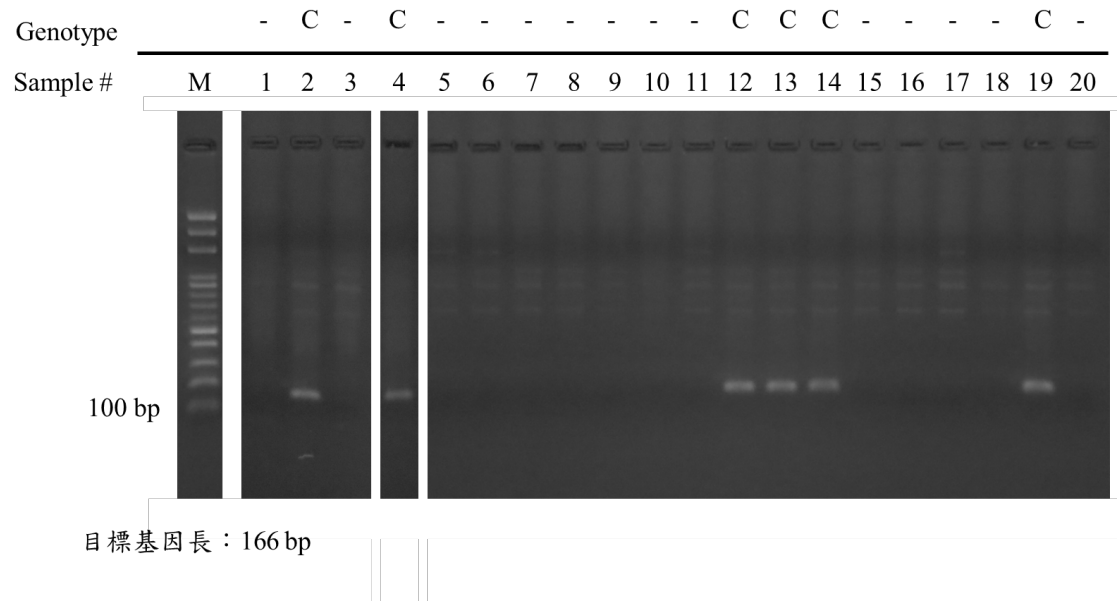


圖 4 - 27 HFABP411 基因座篩檢電泳圖



4-7 裝置檢測結果

驗證檢測結果的過程，首先利用真實血樣透過傳統萃取法所獲得的純核酸進行試管中的 RPA 擴增，確認試紙及引子的適用性，再實際透過裝置處理真實血樣完成裝置上的快速檢測；而由於本研究的篩檢標的屬於單一核苷酸差異，擴增時需要較高之專一性，在引子設計時有多增加小一段序列以結合標記物與擴增物，藉以提高片段擴增專一性，因此實驗引子編號標有上標者則代表有額外添加可提高專一性之引子，反之則無添加，詳細引子資訊如圖 4-28 所示。

編號	VI'	6.1 + 6.2R + 6.3 + 6.4R + Biotin1 + FAM-Primer
	VII'	7.1 + 7.2R + 7.3 + 7.4R + Biotin2 + DIG-Primer
	VI	6.3 + 6.4R + Biotin1 + FAM-Primer
	VII	7.3 + 7.4R + Biotin2 + DIG-Primer
序列	Biotin1	Biotin-AAAAACAGATGATGGCG
	FAM-Primer	FAM-AAAAAGGCGTTTGCTTG
	Biotin2	Biotin-AAAAACAACAGTTCCGC
	DIG-Primer	DIG-AAAAAGCGTGTGCATTG
	Marker6.1	CCAACAGTTCCTATGGGATGG
	Marker6.2R	GGGTACACCCTTATGATCAC
	Marker6.3	CAGATGATGGCGAAACCAACAGTTCCTATGGGATGG
	Marker6.4R	GGCGTTTGCTTGAAAGGGTACACCCTTATGATCAC
	Marker7.1	CCAACAGTTCCTATGGGATGC
	Marker7.2R	CTAGGGGACCGTGACTGAGC
	Marker7.3	CAACAGTTCGCAAACCAACAGTTCCTATGGGATGC
	Marker7.4R	GCGTGTGCATTGAAACTAGGGGACCGTGACTGAGC

圖 4-28 引子資訊

4-7.1 兩種市售檢測試紙比較

透過傳統萃取法與試管擴增對兩種帶有不同基因型的樣品進行檢測，擴增時使用的是含有提升專一性的引子VI'與VII'組合，由 NARD 與 MGHD 1 理想的檢測結果應和表 4-8 的條帶結果示意圖相同，然而圖 4-29 顯示的條帶可以看出，兩種檢測試紙的控制線皆有呈色，表示試紙運作皆為正常，而 NARD 試紙的訊號在不同基因型與不同配對引子下的檢測線顯示的結果趨勢皆相同，都是下方檢測線較明顯，而上方次之，但皆僅有微弱的訊號表現，3 號實驗條件為VI'和VII'引子共同反應，而 1 號和 2 號實驗則為兩者分別分開實驗，而三種實驗的結果相似，故比

較 1、2 與 3 的結果可以推斷異常的訊號反應並非由引子 VI' 和 VII' 間相互干擾所致，而由 1 號、4 號以及 2 號、5 號兩組實驗可比較在不同血樣利用相同引子條件的結果，故推論問題也非來自血樣品質與本身帶有的基因型，此外，6 號實驗利用 MGHD 1 試紙檢測之結果則是在檢測線上無任何訊號顯示。

而若同樣利用傳統萃取法與試管擴增對兩種帶有不同基因型的樣品進行檢測，然而將擴增時使用引子改為普通引子 VI 與 VII 組合(表 4-9&圖 4-30)，並未添加可增加專一性的引子設計，由 NARD 試紙檢測之結果與圖 4-29 呈現的結果雷同，呈色訊號依舊不清楚且兩條檢測線顯色不均勻，而由 MGHD 1 試紙的檢測結果已出現明顯訊號，表示片段擴增發生且擴增物穩定接上檢測所需的 Biotin 及 FAM，因此成功捕捉到擴增產物，然而比較 7 號與 9 號的實驗結果，利用同樣的引子條件對兩種不同基因型的產物進行擴增，基因型為 CC 的核酸不應受到設計用來檢驗鹼基為 G 的 VI 號引子所黏合，但 9 號實驗利用基因型為 CC 的核酸擴增，最後檢測結果在檢測線上卻有明顯的訊號，進而再由編號 11 至 13 的實驗分別為帶有 GC、CC 以及 GG 的核酸進行擴增並檢測，結果表示同樣使用 VI 號引子擴增的檢測線不論何種基因型皆為陽性反應(表 4-10&圖 4-31)。

綜合上述，本研究在傳統標準的擴增流程以及遵守各檢測試紙的使用說明下，對兩種試紙的檢測結果進行推論，由於改變血樣或引子條件 NARD 試紙的檢測結果趨勢皆雷同，兩條檢測線為淡而不均的呈色，故推測該試紙在檢測線上捕捉物鋪設的濃度不均勻，且 RPA 的擴增物中含有的酵素可能會使試紙檢測異常；而使用 MGHD 1 進行檢測時，發現擴增時使用增加專一性的引子條件將無法成功獲得訊號，而利用普通條件的引子時最後檢測結果則有明顯呈色，但普通引子的實驗結果顯示在單一核苷酸差異的引子黏合上具有較差的專一性，此部分可藉由引子設計的技術與技巧改善，抑或嘗試改變擴增條件(時間、溫度…)以增加 VI' 與 VII' 的引子組合之接合能力。由於目前僅有 MGHD 1 有檢測訊號，故在紙基底裝置的檢測區段將採用該試紙做為紙基底裝置系統性的結果驗證。

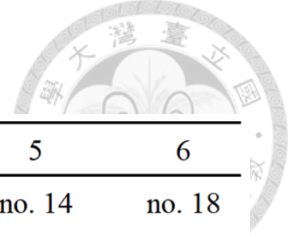


表 4-8 實驗編號表(圖 4-29)

	1	2	3	4	5	6
DNA	no. 18	no. 18	no. 18	no. 14	no. 14	no. 18
基因型	GG	GG	GG	CC	CC	GG
使用引子	VI' (檢測G)	VII' (檢測C)	VI'+VII' (檢測C+G)	VI' (檢測G)	VII' (檢測C)	VI' (檢測G)
理想檢測線結果						

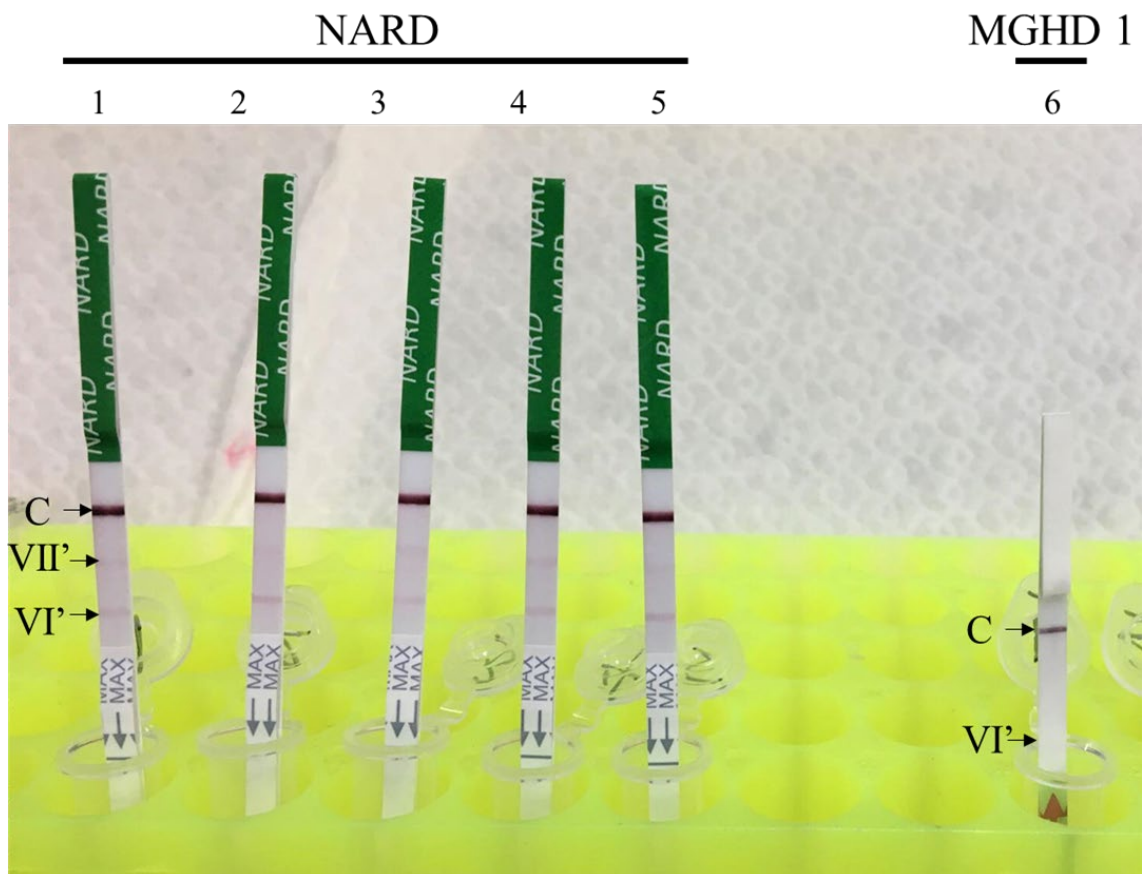


圖 4-29 兩種試紙檢測實驗結果(添加增加專一性之引子)

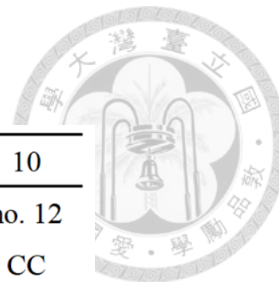


表 4-9 實驗編號表(圖 4-30)

	7	8	9	10
DNA	no. 6	no. 6	no. 12	no. 12
基因型	GG	GG	CC	CC
使用引子	VI (檢測G)	VII (檢測C)	VI (檢測G)	VII (檢測C)

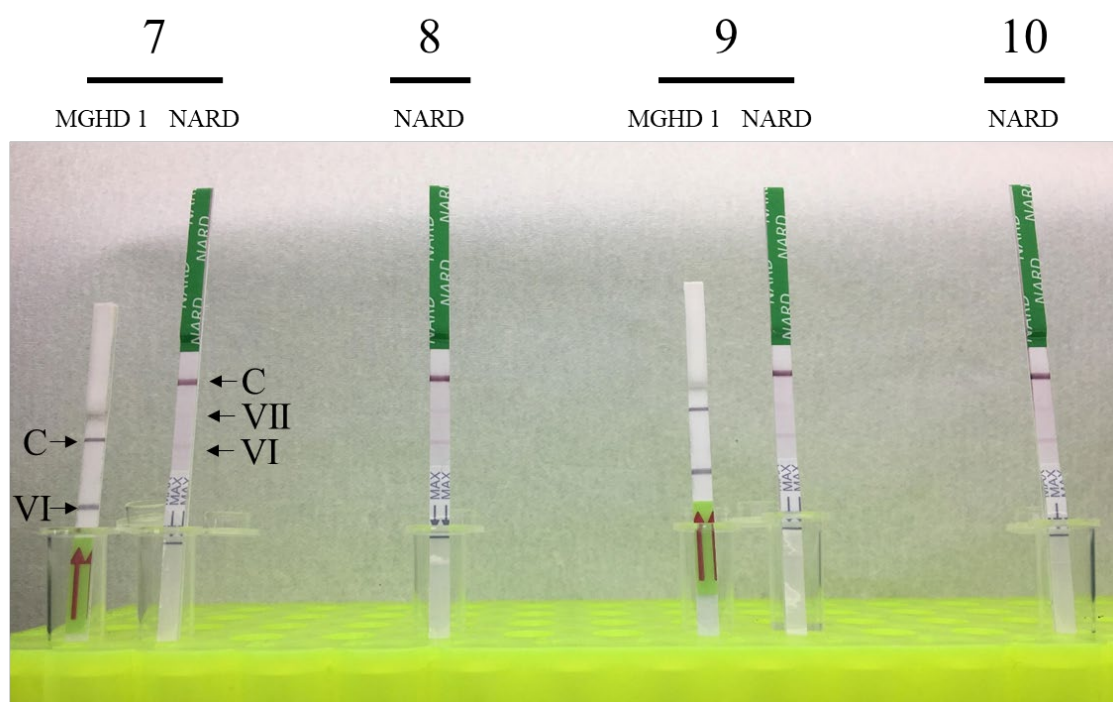
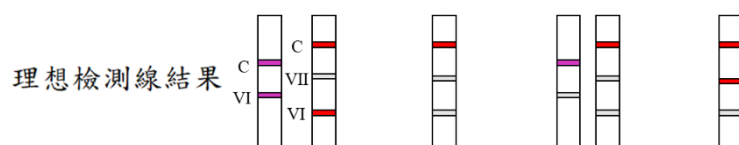


圖 4-30 兩種試紙檢測實驗結果(無添加增加專一性之引子)



表 4-10 實驗標號表(圖 4-31)

	11	12	13
DNA	no. 4	no. 13	no. 15
基因型	GC	CC	GG
使用引子	VI (檢測G)	VI (檢測G)	VI (檢測G)

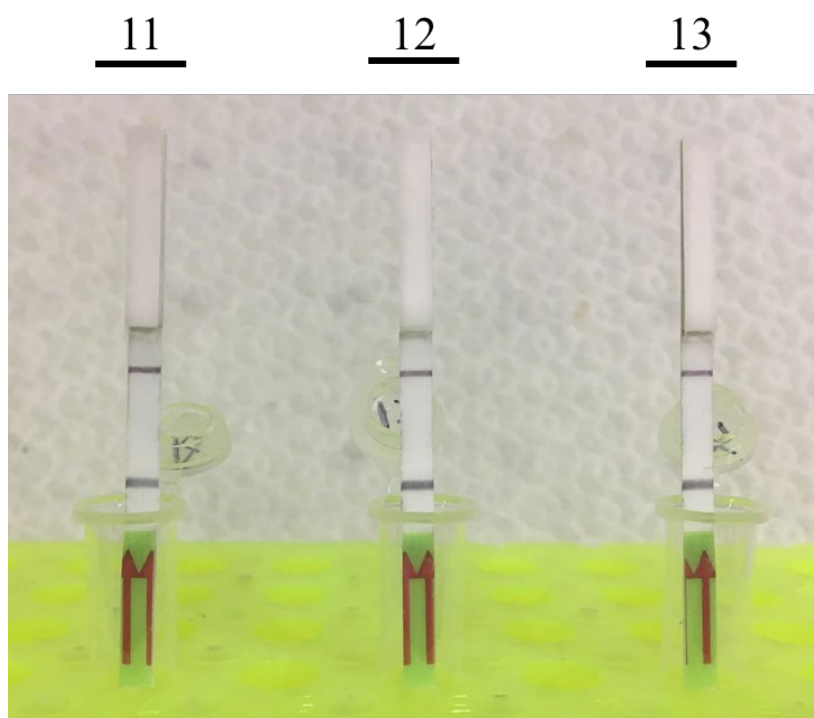
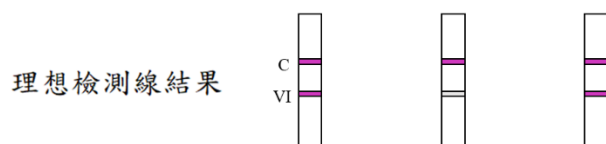


圖 4-31 MGH1 試紙對不同基因型之檢測結果



4-7.2 實際裝置執行

針對 4-5.2 對提升裝置擴增量所獲得的實驗結果，本研究以 GA55 玻璃纖維紙材作為樣品墊，並使用編號 VI 的引子組合進行擴增，檢測區使用 MGHD 1 之側層流檢測試紙，由於該檢測試紙僅有一條檢測線，因此只能使用一種引子組合檢測一種鹼基，整體紙基底裝置作法與參與反應的試劑體積於 3-6 節處有詳細說明，而 20 μL 之調配血樣與 30 μL 的 Rehydration buffer 將採用分批添加的手法，紙基底之 RPA 恆溫擴增加熱方式是利用熱板以 37°C 加熱半小時，完成擴增後將紙橋蓋上緊密連接擴增區與檢測區後，便可從樣品入口處添加 150 μL Milenia GenLine Dipsticks Assay buffer 將擴增物經由紙橋推入檢測試紙。單一裝置實際尺寸長約 95 mm 而寬約 8 mm，裝置總長度主要受市售檢測試紙所影響，而裝置上的紙橋設計在完成恆溫擴增前皆為打開狀態(圖 4 - 32)。

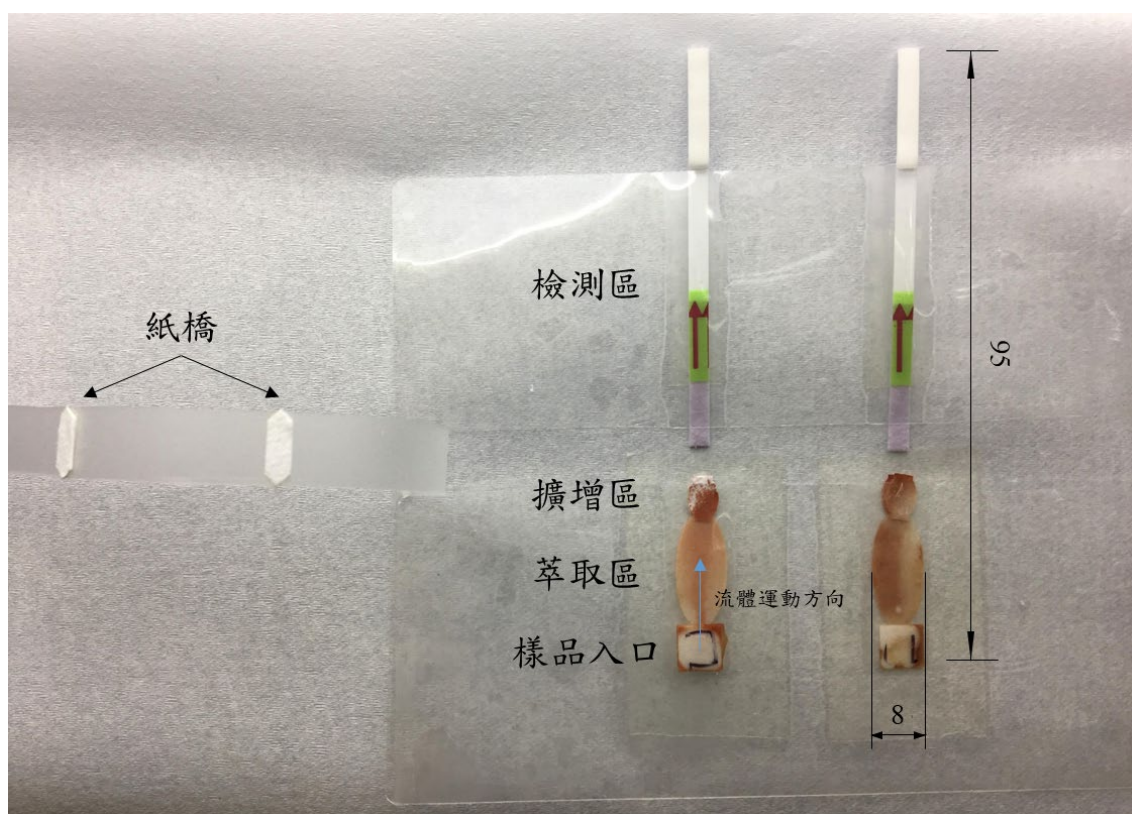


圖 4 - 32 完整裝置實際操作圖(單位：mm)


擴增完成後透過紙橋將擴增物引導至檢測試紙上，接合時可利用膠帶將紙橋兩側的護貝膜貼住以利紙橋緊密覆蓋擴增區及檢測區，最終檢測結果不論基因型

為 CC 或 GG 的樣品在檢測線上皆有訊號出現(表 4 - 11&圖 4 - 33a)，表示紙基底裝置上普通引子的作用對單一核苷酸差異的篩檢難有專一性，與 4-7.1 節由試管擴增對該試紙測試下所獲得的結論相同，而 2 號裝置的檢測線訊號較不明顯推測是由於 Milenia GenLine Dipsticks Assay buffer 添加的過快使樣品些微溢出於紙張表面，且紙橋與檢測區接觸不均導致僅有部分擴增物進入檢測區(表 4 - 11&圖 4 - 34)，因此檢測線上的訊號較 1 號裝置弱。由於萃取時無法將紅血球去除，因此檢測試紙背景會受血色干擾些微影響肉眼判讀，但待 Milenia GenLine Dipsticks Assay buffer 將血樣完全推往檢測試紙的廢液區時，檢測線與控制線的背景將可恢復且清楚呈現檢測結果(圖 4 - 33b)。

表 4 - 11 實驗編號表(圖 4 - 33a &圖 4 - 34)

	1	2
DNA	no. 13	no. 15
基因型	CC	GG
使用引子	VI (檢測G)	VI (檢測G)

理想檢測線結果



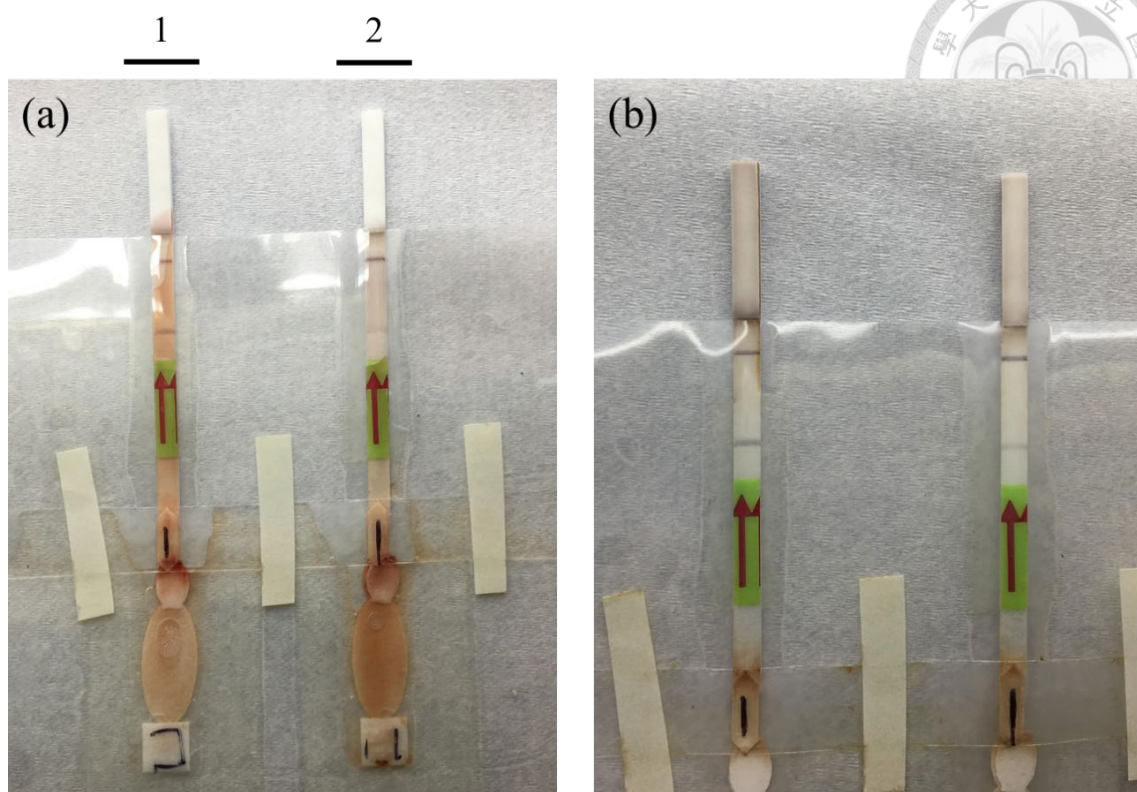


圖 4-33 實際裝置檢測結果(a)當下結果，(b)隔日結果

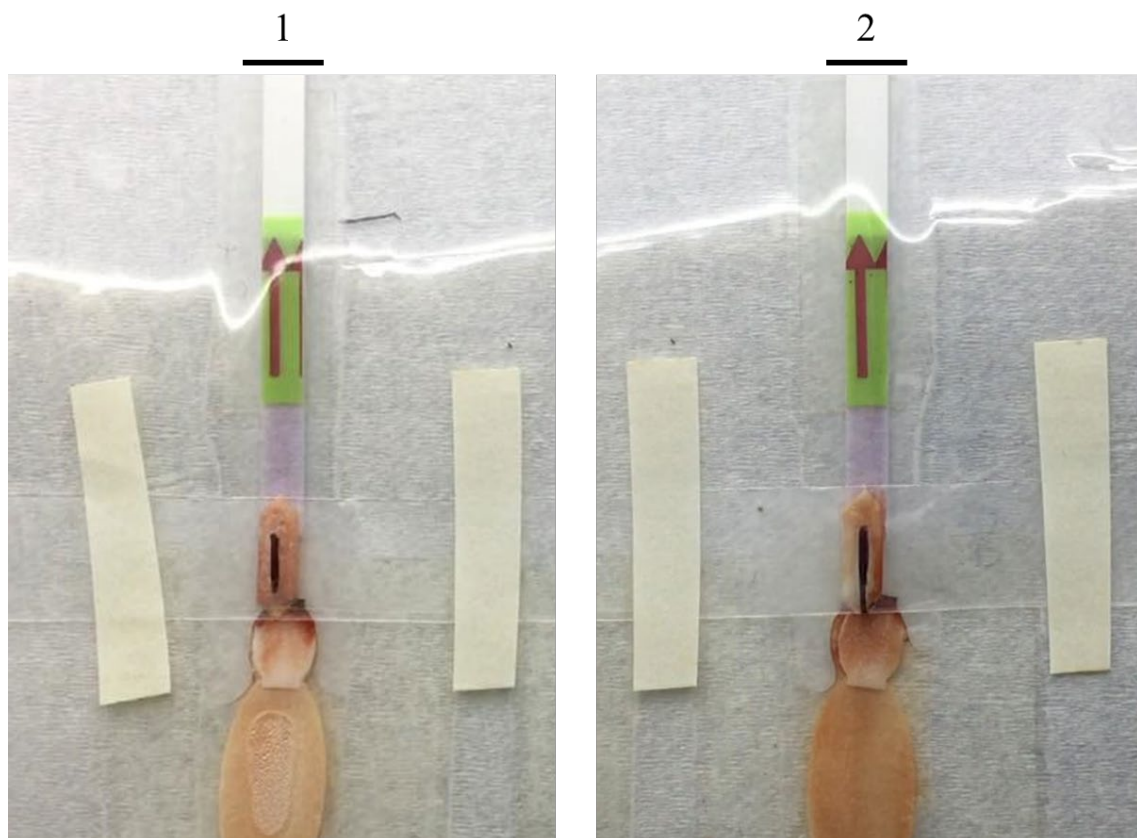


圖 4-34 紙橋上血樣流動情形



第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究欲開發涵蓋樣品前處理步驟功能之整合性核酸檢測套件，設計上主要以友善使用為方向，減少裝置使用上的複雜度以及降低操作人員滴入樣品的次數。前處理步驟包含萃取及擴增，萃取相關研究已有前人找出優化幾何設計(Wang, 2019 Master Thesis)，故本研究由紙基底的擴增步驟著手。

擴增步驟涉及不同試劑的反應過程，而實際的核酸與擴增試劑皆為透明無色，故由酸鹼反應加上酸鹼指示劑顯色，藉由可視化的反應過程了解反應時的流場變化。不同各式幾何(長直條、不同夾角、圓形、橢圓形)的反應過程中，幾何對流場的影響不明顯，而酸鹼中和的反應只發生在兩液體的交界面上，在紙上流動並無明顯混合，後加的氯化鈉水溶液會將先前的乾燥氫氧化鈉重新溶解並向前推移，最後氫氧化鈉將累積於液體前緣處，而在整體流動過程中，靠近邊緣的液體流速較中間緩慢；利用氫氧化鈉剩餘的面積作為反應效率之指標，將累積的氫氧化鈉面積擷取比較，各次實驗間的趨勢不一，但將各次數據取平均後可發現圓形試紙剩下的氫氧化鈉面積最小，而夾角 30°和短橢圓相對較大，然其各形狀試紙間的差異其實並不大。

而在以樣品實際透過紙基底裝置進行反應的結果分析中，可利用 1X 濃度的 TE 緩衝液於冷凍條件下過夜浸泡，將核酸從紙上洗出再進行分析，萃取區段由於處理的樣品只事先利用 RBC 緩衝液稀釋與打破血球，故萃取後產物雜質含量高且帶有些微血色，透過試管擴增已驗證本紙基底萃取之產物對後續的擴增反應並無抑制情形發生；於擴增區段的實驗結果可知定點擴增之擴增量較流動擴增的高，因其擴增試劑不受長距離的流動而受到稀釋，且乾燥試劑較能受到緩衝液的充分溶解，此外，在擴增區材質的選擇比較上發現，GA55 的玻璃纖維具有較高的擴增效果，推測因其孔徑較小內部交織出的反應腔室總表面積較大，故能有效增加擴增反應的效率，而改變擴增時的加熱溫度以及改變血樣與 Rehydration buffer 的添加手

法對核酸擴增量的影響較小，加熱溫度是以 37°C 的效果優於 40°C，添加手法的表現則是以兩者分批添加較混在一起加好，由前面分區段的實驗驗證後，最後的裝置設計透過護貝膜的將整體紙基底裝置緊密包覆住，避免反應過程的水份蒸發，且因較緊密的貼合，凝結護貝膜內壁的小水珠有機會能再重新回溶於紙上持續協助擴增反應，雖然紙基底的擴增量仍不如試管擴增，但由改變紙張材質、擴增溫度以及操作手法皆可有效使擴增效率提高。

比較 NARD 和 MGHD 1 兩種市售檢測試紙發現 NARD 試紙不論改變引子條件或是針對不同基因型的血樣進行檢測，檢測線呈現皆為異常且不均勻的條帶，故推論該試紙在檢測線上捕捉物的鋪設濃度不均，且對 RPA 擴增技術的產物難有良好反應，而 MGHD 1 試紙在帶有增加專一性的引子組合下擴增後的檢測結果並無訊號產生，改用普通的引子組合則有明顯訊號出現，但普通引子在單一核苷酸差異的選擇上專一性不佳，故無法用以判斷基因型的差異。最後選用 MGHD 1 作為本研究紙基底裝置檢測區的側層流試紙以實際血樣進行完整測試，檢測結果同樣顯示篩檢結果無專一性，但檢測區上有訊號呈現驗證本裝置已成功從微量且未經處理的血樣，透過紙基底整合性裝置實踐核酸簡易萃取、特定片段擴增反應並可於最終獲得肉眼可視的結果呈現。

5-2 未來工作

裝置設計方面，目前檢測區與擴增區間需要預留的間距僅是由肉眼大致判斷，故紙橋處容易因接合問題影響檢測結果，因此紙橋處的設計尚有改善空間，改善後將可再提高裝置對人因操作差異的容許能力，增加整體裝置的操作穩定性，並由各區段的紙材幾何設計及數量安排增加裝置可負載的液體體積以及控制流動時間的能力，而萃取區目前僅透過 RBC 處理血樣，未來可嘗試各式血樣萃取配方以提升核酸純度。

檢測方面針對提升引子黏合專一性，主要希望透過與生物技術專家合作，藉由引子設計技術改善接合問題，抑或改變裝置檢測對象。而目前使用的 MGHD 1 試

紙僅能檢驗一種目標物，可測試他牌試紙對 RPA 擴增物的檢測效果，增加檢測的目標物數量，此外，也需透過將血樣稀釋對裝置的檢測極限進行測試。

於未來展望上，期盼可將本研究開發之以紙流道為系統的整合性核酸檢測平台應用於更多種疾病檢測，除了目前所使用的血樣外，可延伸至處理更多不同來源的樣品，包括植物汁液、肌肉組織以及人類體液，藉由廣泛的適用性將即時診斷的理念帶入日常生活中。



5-3 甘特圖

論文題目：紙流道應用於種豬基因型鑑定之整合性核酸檢測套件

■ 已完成 ■ 未完成

	工作項目	工作內容	2019			2020						2021																	
			7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	修習課程與學習研究技能	修習研究所課程與學習實驗製程所需機台之操作	■																										
2	收集文獻資料	1. 微流道相關文獻																											
		2. 紙基底之應用																											
		3. 核酸檢測裝置																											
3	了解多孔性介質流動原理	研讀流動方程式																											
4	紙基底流場探討	1. 酸鹼中和反應之流場觀測																											
		2. 比較幾何變化對流場之影響																											
5	基因擴增測試	1. 優化核酸洗出的量																											
		2. 改善裝置擴增效果																											
6	紙基底整合與設計	1. 探討紙張間交疊問題																											
		2. 封裝設計																											
		3. 裝置改善與實際樣品測試																											
7	裝置核酸萃取	萃取後核酸濃度確認與擴增驗證																											
8	檢測結果探討	1. 利用側層流試紙進行檢測																											
		2. 裝置檢測結果探討																											
9	碩士論文計畫書撰寫	整理初步結果及確定題目之可行																											
10	碩士論文撰寫	歸納完整實驗結果																											
10	期刊論文初稿整理	整理研究結果並摘要內容																										■	

製表人 謝昀靜 製表日期 2021年7月

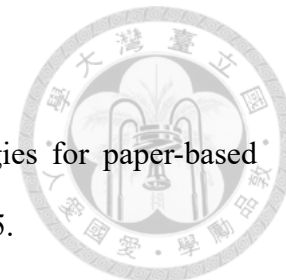


第六章 參考文獻

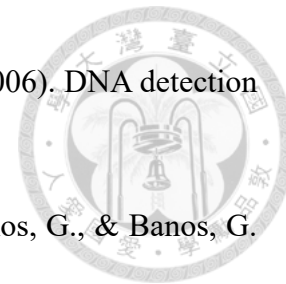
- Bahadır, E. B., & Sezgentürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *82*, 286-306.
- Bishop, J. D., Hsieh, H. V., Gasperino, D. J., & Weigl, B. H. (2019). Sensitivity enhancement in lateral flow assays: A systems perspective. *Lab on a Chip*, *19*(15), 2486-2499.
- Byrnes, S., Bishop, J., Lafleur, L., Buser, J., Lutz, B., & Yager, P. (2015). One-step purification and concentration of DNA in porous membranes for point-of-care applications. *Lab on a Chip*, *15*(12), 2647-2659.
- Chen, H., Cogswell, J., Anagnostopoulos, C., & Faghri, M. (2012). A fluidic diode, valves, and a sequential-loading circuit fabricated on layered paper. *Lab on a Chip*, *12*(16), 2909-2913.
- Choi, J. R., Hu, J., Feng, S., Abas, W. A. B. W., Pingguan-Murphy, B., & Xu, F. (2016). Sensitive biomolecule detection in lateral flow assay with a portable temperature–humidity control device. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 98-107.
- Choi, J. R., Hu, J., Tang, R., Gong, Y., Feng, S., Ren, H., . . . Pingguan-Murphy, B. (2016). An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care. *Lab on a Chip*, *16*(3), 611-621.
- Eteshola, E., & Leckband, D. (2001). Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *72*(2), 129-133.
- Fang, W. F., Chen, W. J., & Yang, J. T. (2014). Colorimetric determination of DNA concentration and mismatches using hybridization-mediated growth of gold nanoparticle probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *192*, 77-82.
- Farthing, M. W., & Ogden, F. L. (2017). Numerical Solution of Richards' Equation: A



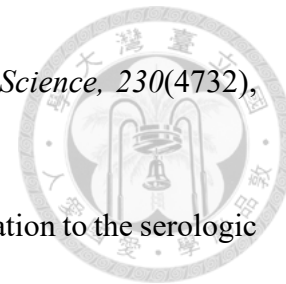
- Review of Advances and Challenges. *Soil Science Society of America Journal*, 81, 1257-1269.
- Gale, B. K., Jafek, A. R., Lambert, C. J., Goenner, B. L., Moghimifam, H., Nze, U. C., & Kamarapu, S. K. (2018). A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects. *Inventions*, 3(3), 60.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.
- Hu, J., Wang, S., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T. J., & Xu, F. (2014). Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 585-597.
- Ile, G., Tabaran, A., Dan, S. D., Reget, O., & Mihaiu, M. (2018). Detection of ryanodine receptor mutation in Mangalitsa crossbred pigs bred in Transylvania. *Porcine Research*, 8(1), 12.
- Jang, I., Carrão, D. B., Menger, R. F., Moraes de Oliveira, A. R., & Henry, C. S. (2020). Pump-Free Microfluidic Rapid Mixer Combined with a Paper-Based Channel. *ACS Sensors*, 5(7), 2230-2238.
- Kaarj, K., Akarapipad, P., & Yoon, J.-Y. (2018). Simpler, faster, and sensitive Zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- Kasetsirikul, S., Shiddiky, M. J., & Nguyen, N.-T. (2020). Challenges and perspectives in the development of paper-based lateral flow assays. *Microfluidics and Nanofluidics*, 24(2), 17.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257-260.
- Kumar, S., Nehra, M., Khurana, S., Dilbaghi, N., Kumar, V., Kaushik, A., & Kim, K.-H. (2021). Aspects of point-of-care diagnostics for personalized health wellness.



- International Journal of Nanomedicine*, 16, 383.
- Liu, L., Yang, D., & Liu, G. (2019). Signal amplification strategies for paper-based analytical devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 136, 60-75.
- Lutz, B., Liang, T., Fu, E., Ramachandran, S., Kauffman, P., & Yager, P. (2013). Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics. *Lab on a Chip*, 13(14), 2840-2847.
- Müller, R., & Clegg, D. (1949). Automatic paper chromatography. *Analytical Chemistry*, 21(9), 1123-1125.
- Manz, A., Graber, N., & Widmer, H. á. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1-6), 244-248.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*, 119(8), 1340-1342.
- Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., & Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1090-1095.
- Mukama, O., Wu, J., Li, Z., Liang, Q., Yi, Z., Lu, X., . . . Makafe, G. G. (2020). An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids. *Biosensors and Bioelectronics*, 112143.
- Noh, H., & Phillips, S. T. (2010). Fluidic timers for time-dependent, point-of-care assays on paper. *Analytical Chemistry*, 82(19), 8071-8078.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63-e63.



- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, *4*(7), e204.
- Psifidi, A., Dovas, C. I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C. L., Arsenos, G., & Banos, G. (2015). Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS ONE*, *10*(1), e0115960.
- Rath, D., Sathishkumar, N., & Toley, B. J. (2018). Experimental measurement of parameters governing flow rates and partial saturation in paper-based microfluidic devices. *Langmuir*, *34*(30), 8758-8766.
- Reboud, J., Xu, G., Garrett, A., Adriko, M., Yang, Z., Tukahebwa, E. M., . . . Cooper, J. M. (2019). Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(11), 4834-4842.
- Report and Data. (2020). Paper Diagnostics Market Size, Share | Trends | Analysis, 2017-2027. Retrieved from <https://www.reportsanddata.com/report-detail/paper-diagnostics-market>
- Rodriguez-Moncayo, R., Cedillo-Alcantar, D. F., Guevara-Pantoja, P. E., Chavez-Pineda, O. G., Hernandez-Ortiz, J. A., Amador-Hernandez, J. U., . . . Patino-Lopez, L. D. (2021). A high-throughput multiplexed microfluidic device for COVID-19 serology assays. *Lab on a Chip*, *21*(1), 93-104.
- Rodriguez, N. M., Wong, W. S., Liu, L., Dewar, R., & Klapperich, C. M. (2016). A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. *Lab on a Chip*, *16*(4), 753-763.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and



- restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Singer, J. M., & Plotz, C. M. (1956). The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*, 21(6), 888-892.
- Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., & Laiwattanapaisal, W. (2012). Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*, 12(18), 3392-3398.
- Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(2), 615-619.
- Wang, T.-M., & Yang, J.-T. (2019). Visual DNA diagnosis of Tomato yellow leaf curl virus with integrated recombinase polymerase amplification and a gold-nanoparticle probe. *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.
- Wang, T. C. (2019). *Integrated Nucleic Acid Extraction, Amplification, and Detection on Paperfluidics for Diagnostics of Orchid Virus Disease*. (Master Thesis). Department of Mechanical Engineering, National Taiwan University.
- Xu, G., Nolder, D., Reboud, J., Oguike, M. C., van Schalkwyk, D. A., Sutherland, C. J., & Cooper, J. M. (2016). Paper-Origami-Based Multiplexed Malaria Diagnostics from Whole Blood. *Angewandte Chemie International Edition*, 128(49), 15476-15479.
- Yamada, K., Henares, T. G., Suzuki, K., & Citterio, D. (2015). Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(18), 5294-5310.
- Zhong, Z., Wu, R., Wang, Z., & Tan, H. (2015). An investigation of paper based microfluidic devices for size based separation and extraction applications. *Journal of Chromatography B*, 1000, 41-48.

Zou, Y., Mason, M. G., Wang, Y., Wee, E., Turni, C., Blackall, P. J., . . . Botella, J. R.
(2017). Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30
seconds. *PLoS Biology*, 15(11), e2003916.

