

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文



Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

開發流體動力學式微流道晶片

應用於腹膜透析液中白血球計數

**Developing a microfluidic device with hydrodynamic trap arrays for
white blood cell counting in peritoneal dialysis solution**

楊昇

Sheng Yang

指導教授：黃念祖 博士

Advisor: Nien-Tsu Huang, Ph.D.

中華民國 105 年 9 月

September, 2016



致謝

在完成碩士論文的這時刻，也代表碩士生涯已經真正的接近尾聲，在過程中雖然遇到許多挫折而因此徬徨，但總是在師長、學長姐、同學、學弟妹的幫助下，使我打起精神繼續努力，問題也幾乎都能迎刃而解，本論文也是在大家的幫助之下，最後才得以完成。本論文留下的雖然不是一項偉大的成就，但絕對是一個值得我回憶一輩子的紀錄。

首先要特別感謝我的指導教授黃念祖老師兩年多來的指導，念祖老師在研究上面給了我相當多寶貴的建議與指導，讓我有機會認識偉大的學術領域而認知自己的渺小，並盡力的為我尋找各種研究資源，讓我可以無後顧之憂的進行研究；除了學術上的指導，念祖老師也給了我許多為人處事的建議，以及人生規劃的方向，讓我受益良多。念祖老師對我而言不只是老師，更是一位朋友，在碩士班生涯能夠遇到這樣的指導教授，我感到非常幸運。

另外也要感謝台大電子所林致廷教授，提供實驗設備及化學試劑，並且在定期會議中給予許多建議與指導，使我的實驗順利進行，讓我也能夠以不同的角度看待自己的研究；感謝台大應力所許聿翔教授，提供光微影製程上的意見，使我突破實驗上的瓶頸；感謝中研院董亦鐘教授，提供無塵室設備資源，使本研究能夠順利進行；感謝臺大醫院黃政文主任、助理 Rita 及饒博士，提供腹膜透析液的取得途徑，並且給予許多有幫助的意見，點出實驗中的盲點；感謝口試委員林致廷教授、黃榮山教授、陳奕帆教授，謝謝您們在口試中針對研究中不足的地方給予指點與建議，使本論文能夠順利完成。

在此也要感謝學長姐們及同學們的幫忙，感謝俊叡學長指導了我各種做實驗的技巧；感謝筌凱學長不吝於分享做研究的經驗；感謝禹帆學長在光微影製程上的指導；感謝于婺學姊在細胞樣本的處理及染色上，幫了許多忙；感謝義舜學長及佳鴻，在光微影製程上提供了建議。

接著我要感謝 702 實驗室的好夥伴及學弟妹們，謝謝你們與我一起經歷了這段日子，使我的人生多了許多美好的回憶。首先最感謝的是肇熒，不論是在實驗、進度規劃、心情抒發，都幫了我非常多忙；感謝好同學柏承及郁欣，與我一起在各種挑戰中成長茁壯；感謝大涵在任何實驗及研究上的困難都提供非常好的建議與幫助；感謝郁蓁在研究中幫忙處理了許多雜事；感謝怡穎提供了許多生物實驗上的協助；感謝舒鴻幫忙拍攝了許多漂亮的實驗照片；感謝聖瀚提供了許多微流道實驗上的建議與技巧；感謝威宇、凱歲、子涵在定期會議及日常生



活中提供的建議及幫助。希望在畢業之後，能夠看到 702 實驗室持續蒸蒸日上，成為一個超強、超猛的實驗室。

在此還要特別感謝我親愛的女朋友子璇，妳總是默默的在背後支持著我、關心著我、陪伴著我，是妳給了我心靈上的力量面對這一切的挑戰，在人生的路上能夠遇上妳，是老天給的恩賜，希望未來的路上我們能夠繼續互相扶持、成長，繼續一起邁向人生的各個階段。

最後要感謝我敬愛的家人，謝謝老爸老媽一直以來，對我無怨無悔的付出，以及對我的支持與諒解，一直以來我都是個叛逆的小孩，但你們總是在我情緒低落時，給予我關心與鼓勵，希望未來的路上，我能回報你們的養育之恩；謝謝老哥給了我最好的學習榜樣，希望有朝一日，我也能夠追上你的腳步。

如果沒有你們給予的力量及幫助，本研究一定無法完成，謹以此論文獻給曾經幫助過我的你。

中文摘要

腹膜透析是一種用來治療腎衰竭患者的透析療法。為了避免透析過程中可能會發生的腹膜發炎情形，監控透析液中白血球的比例及數目是非常重要的。傳統的檢測方式是使用流式細胞儀及自動細胞計數器對透析液中的白血球做定量，然而這些技術有以下的問題，像是(1)無法處理低濃度的樣本($<300 \text{ cells}/\mu\text{L}$)，(2)實驗儀器較為龐大且昂貴，這些問題限制了其使用性。為解決以上問題，本論文開發一利用流體動力學原理之微流道生醫晶片，此微流道系統操作簡單，製作成本低、製程簡單，可同時進行細胞、免疫微珠的抓取及分類。為了讓此微流道平台更加符合定點照護的需求，未來將與智慧型手機進行整合，並搭配軟體或是 APP 進行自動化影像處理、分析及資料傳輸。本論文主要分兩大部分，第一部分為免疫微珠抓取中性球之效率及能力測試，第二部分則為微流道分選並抓取白血球、免疫微珠的表現測試，未來則希望以 Matlab 軟體對白血球數目及微珠抓取細胞結果進行自動化定量。此微流道平台將能於定點照護的環境下偵測不同感染階段的腹膜炎，助醫生進行即時且正確的治療。

ABSTRACT



Peritoneal dialysis is a treatment for patients who suffer from severe chronic kidney disease. To prevent any infection during the treatment, it is important to monitor the population of white blood cell in peritoneal dialysis. At present, fluorescence-based flow cytometry and the automated hemocytometer are two prevailing methods to quantify the population of white blood cell. However, these techniques usually exist several limitations, such as (1) cannot deal with low white blood cell level (<300 cells/ μL), (2) laborious assay preparation and manipulation steps. To address the above problems, we develop a microfluidic device with hydrodynamic trap arrays to capture white blood cells. The microfluidic microtrap array with multiple dimensions can trap general white blood cells and specific white blood cell subpopulation conjugated with $30\mu\text{m}$ polystyrene beads. This microfluidic platform enables simultaneously cell trapping, selection and can perform simple and real-time cell counting without complicated sample processing steps and equipment. To make the system more user-friendly and be suitable for point-of-care (POC) settings, we plan to make this microfluidic device compatible to existing smartphones and APP, which can perform image processing, analysis and data transmission. We believe this microfluidic platform for surveillance of white blood cell level will hold significant promise to provide the detailed infection status of patient for doctors to perform timely treatment.

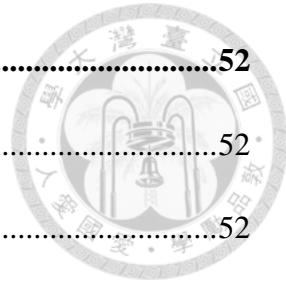
目錄



口試委員會審定書	#
中文摘要	i
ABSTRACT	ii
目錄	iii
圖目錄	vi
表目錄	ix
Chapter 1 緒論.....	1
1.1 研究背景	1
1.2 文獻回顧	2
1.2.1 腹膜炎感染階段與腹膜透析液中白血球數目及比例的關係	3
1.2.2 於微流道以外力分離及捕捉細胞	3
1.2.3 流體動力學式微流道分離及捕捉細胞	6
1.2.4 使用生物標定技術在微流道進行分離及捕捉細胞	9
1.3 研究動機及目的	9
1.4 論文架構簡介	10
Chapter 2 實驗原理介紹及微流道設計	11
2.1 流體動力學式微流道粒子分離及捕捉原理	11
2.2 流體動力學式微流道設計	13
2.3 免疫微珠抓取原理	15
2.3.1 抗體抗原鍵結原理	15

2.3.2 免疫微珠與抗體鍵結原理.....	16
Chapter 3 實驗流程	17
3.1 晶片製程	17
3.1.1 模具製作－光微影製程流程.....	17
3.1.2 光微影製程參數設定.....	21
3.1.3 軟微影製程	23
3.2 腹膜透析液樣本處理方式	26
3.2.1 腹膜透析液樣本取得	26
3.2.2 細胞染色	26
3.2.3 樣本細胞濃度確認	26
3.3 免疫微珠捕捉中性球實驗	28
3.3.1 化學藥品與免疫微珠的準備	28
3.3.2 實驗步驟	28
3.4 微流道實驗	30
Chapter 4 實驗結果	33
4.1 免疫微珠捕捉中性球	33
4.1.1 免疫微珠選擇	33
4.1.2 於不同中性球濃度免疫微珠捕捉實驗	35
4.2 微流道製作結果與量測	36
4.3 螢光珠及免疫微珠微流道捕捉及分離實驗	39
4.4 THP-1 細胞及免疫微珠微流道捕捉及分離實驗	42
4.5 真實腹膜透析液白血球捕捉及分離	47

Chapter 5 結論與未來展望	52
5.1 結論	52
5.2 未來展望	52
參考文獻	55



圖目錄



圖 1-1	利用光鉗子原理在微流道中進行細胞分選及捕捉[20].....	4
圖 1-2	使用介電泳原理進行細胞分選[24].....	5
圖 1-3	利用層流及磁力的方式進行細胞分離[26].....	5
圖 1-4	使用重力沉積方式進行單細胞捕捉之微反應槽[28].....	6
圖 1-5	使用特別的障礙物排列，以流線進行細胞分離[29].....	7
圖 1-6	使用流體力學進行高密度細胞捕捉之微流體晶片[30].....	7
圖 1-7	使用多孔微透膜進行細胞的捕捉[31].....	8
圖 1-8	利用不同流阻的流道進行細胞捕捉[33].....	8
圖 1-9	磁性微流體細胞捕捉晶片	9
圖 2-1	流體動力學式微流道晶片運作原理	12
圖 2-2	微流道設計示意圖	14
圖 2-3	簡化抗體結構圖	15
圖 2-4	專一性抗體與免疫微珠鍵結原理	16
圖 3-1	光微影製程簡要流程圖	17
圖 3-2	超音波震洗機(E120H, ELMA)	18
圖 3-3	旋轉塗佈機(SP-M3-P, apisc).....	20
圖 3-4	單面對準曝光機(EVG 620)	20
圖 3-5	塗佈厚度與轉速曲線圖	21
圖 3-6	流道過曝結果	22
圖 3-7	氧電漿機(PDC-001, Harrick plasma)	25
圖 3-8	細胞計數盤	27



圖 3-9	倒立式螢光顯微鏡(IX73, Olympus).....	27
圖 3-10	免疫微珠於腹膜透析液捕捉中性球流程	29
圖 3-11	旋轉混合機(MX-RL-E, Dragon LAB).....	29
圖 3-12	微流道實驗架設圖	30
圖 3-13	震盪機(VORTEX-GENIE2 S5001, ZYMO RESEARCH)	32
圖 4-1	Anti-CD15 及 Anti-CD16 免疫微珠捕捉中性球顯微影像	34
圖 4-2	Anti-CD15 與 Anti-CD16 免疫微珠捕捉能力比較	34
圖 4-3	不同細胞濃度免疫微珠捕捉結果預測圖	36
圖 4-4	不同細胞濃度免疫微珠捕捉實際實驗結果	36
圖 4-5	微流道製作結果	37
圖 4-6	流體動力學式微流道顯微影像	38
圖 4-7	陷阱流道寬度量測	38
圖 4-8	以 ImageJ 軟體分析螢光珠捕捉數.....	40
圖 4-9	微流道晶片分離及捕捉單顆免疫微珠及螢光珠實驗顯微影像	41
圖 4-10	微流道晶片分離及捕捉單顆免疫微珠及螢光珠實驗結果	42
圖 4-11	THP-1 細胞與免疫微珠於細胞計數盤影像	43
圖 4-12	於 $0.16\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下，細胞流失過程	44
圖 4-13	流體動力學式微流道捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞顯微影像	44
圖 4-14	免疫微珠與 THP-1 細胞捕捉效率圖	44
圖 4-15	微流道晶片分離及捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞實驗顯微影像	45
圖 4-16	微流道晶片分離及捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞實驗結果	46
圖 4-17	以流式細胞儀檢測之樣本資訊	48

圖 4-18 使用細胞計數盤計算白血球被免疫微珠捕捉率之顯微影像	48
圖 4-19 免疫微珠及白血球捕獲影像	48
圖 4-20 免疫微珠與白血球捕捉效率圖	49
圖 4-21 流速 $1\mu\text{L}/\text{min}$ ，細胞流失過程	49
圖 4-22 中性球初始濃度對免疫微珠抓取結果之影響	50
圖 4-23 流式細胞儀偵測與免疫微珠抓取中性球比例關係圖	51
圖 5-1 以微幫浦、微混合器、微反應槽完成樣本混合前處理步驟實例	54



表目錄

表 2-1	微流道設計詳細尺寸表	14
表 3-1	軟烤溫度及時間表	22
表 3-2	曝光能量及厚度對應表	22
表 3-3	曝後烤溫度及時間表	23
表 3-4	顯影時間對照表	23
表 4-1	腹膜透析樣本實驗記錄及比較表	50





Chapter 1 緒論

1.1 研究背景

健康的人體中主要是由腎臟負責將體內多餘的水分或是代謝廢物排除體外，但當腎臟功能衰竭而失去代謝功能時，體內的廢物無法順利排泄，導致毒素堆積時，就需要利用腎臟移植或是透析治療的方式來代替原本腎臟的功能。根據台灣腎臟醫學會的統計顯示，台灣的慢性腎衰竭盛行率及新發生率在全球名列前茅，有超過一成的人口有慢性腎病的症狀，而這些慢性腎衰竭患者有一定的機率會惡化為較嚴重的尿毒症，此時必須接受進一步的治療以延續生命，最常見的治療方式為透析療法，目前有大約九成的患者會採用血液透析，即俗稱的洗腎，而另外有約一成的患者採用腹膜透析的方式進行治療，只有極少數的病患能夠獲得進行腎臟移植手術，根除腎衰竭的機會。

血液透析為目前最常見的腎衰竭治療方式，其工作原理為在病患手臂上開洞架設透析導管，將血液抽出體外，搭配外部儀器的血液透析膜清除血液中之廢物、毒素和雜質後，再流回病患體內。由於血液透析需要複雜的儀器操作，病患和醫院往往需要耗費許多時間及人力成本，此外由於血液透析為在短時間內快速移除血中毒素和水分，在過程中也易造成病患不適。不同於血液透析，腹膜透析為利用腹腔中包覆內臟器官和腹壁上的半透膜，稱做腹膜，作為過濾、排除體內代謝物的一種醫療方式。其治療方式為在腹腔內植入一條導管，經由導管將透析液引流注入腹腔內，留置於體內一段時間進行換液的過程後再引流出來。由於腹膜透析療法為一較長時間的液體交換方式，病患較不易感到不適，此外腹膜透析可直接在住家中自行操作換液，亦可使用機器在睡眠中進行透析，正常情況下，只需每月一次定期回診，可使病患保有良好的生活品質，並省去約兩成的醫療成本，若將來能夠繼續推廣普及，將可讓健保資源得到更妥善的運用。

雖然腹膜透析有許多的優點，然而由於患者採用腹膜透析療法之前，必須先開刀於腹部置入導管，且透析過程由患者自行操作，增加了細菌及病毒入侵體內的機會，也因此增加了發生腹膜炎的機率，而腹膜炎的發生，導致患者必須回診接受診察，並接受抗生素治療，若發炎情況未因此好轉，就得改變抗生素的種類，因此增加了腹膜炎惡化的機率。若腹膜炎發生，則患者可能無法再繼續接受腹膜透析療法，

必須轉回傳統的血液透析，嚴重者甚至得接受換腎手術，否則有致命的風險存在。目前尚無有效的方法可以提早偵測到腹膜炎的發生，往往都是病人已經感到嚴重腹痛而回診時才能夠得知患者有腹膜發炎的情況，此時的發炎程度通常都已經相當嚴重，若此時無法及時準確地投入適當的抗生素，會對患者的預後造成不好的影響。

1.2 文獻回顧

微流道系統是從微機電(Micro Electro Mechanical Systems, MEMS)所延伸發展的領域，被廣泛應用生醫檢測領域中，用微奈米製程方式，在微晶片上做出具有微米等級的反應槽、幫浦、閥、管道、分離區等元件[1,2]。傳統上這些操作液體的儀器，都具有可觀的體積及昂貴的價格，並且有複雜的操作流程，且需要專業受過訓練的人員來操作，但還是難免會有人為操作的因素而影響結果。微流道將這些操作液體的儀器微型化，將所有的功能整合在一片小小的晶片上，即所謂的實驗室晶片(lab-on-a-chip, LOC)的概念[3,4]，把一個生化實驗室縮小整合，可消除人為造成實驗結果不同的情形，並且可結合相關的偵測技術，完成所謂的微型全分析系統(micro-total-analysis-system, μ TAS)之應用[5-7]，目前亦廣泛的使用於細胞捕捉、細胞培養、細胞分離等功能。微流道與傳統具相同功能的儀器相比，具有數項優點，如：(1)較高的表面積-體面積比(surface-to-volume ratio)，可增加各種生化反應的接觸反應面積，同時具有較低的擴散長度(diffusion length)，可明顯縮短各種生化反應所需的反應時間，因此適合觀察低密度的細胞，提升量測的精準度(2)微流道晶片通常製作成本低廉，且由於體積小具可攜性，因此相當適合作為定點照護(point-of-care)的操作平台，且所需反應的樣本體積少，因此在樣本採集上具有較高的便利性。(3)精密的微奈米製程方式製作，晶片的結構可精準地控制抓取細胞，亦能在表面上進行特定的生化處理增加捕捉細胞的效率。

由於微流道具有可處理低濃度樣本($<100\text{cells}/\mu\text{L}$)且所需樣本體積小($<20\mu\text{L}$)的特性，又可應用於遠端定點照護及監控的應用上，因此是一個具突破性的方案，可解決目前現有技術如流式細胞儀，無法即時偵測早期腹膜炎的困境。

1.2.1 腹膜炎感染階段與腹膜透析液中白血球數目及比例的關係

對於腹膜透析病患的發炎程度，許多文獻[8-12]指出腹膜透析液內的白血球個數和種類可提供重要的訊息，若透析液中每單位微升的白血球個數超過 100 顆時就代表有發炎反應的情形產生，此時病患就需要回診進行治療，在治療過程中，病患仍需持續的觀測白血球個數。在初期的發炎期間，透析液會呈現淡黃色不透明狀，其中約有 50% 以上的白血球種類為嗜中性球(neutrophil)，經過適當的藥物治療後，可發現腹膜透析液的白血球個數會逐漸減少，且比例會由主要為嗜中性球轉變為淋巴球細胞(lymphocyte)，在經過持續的治療後，則可以發現腹膜透析液內白血球下降至每單位微升小於 20 個白血球。由上述的發炎過程可知，腹膜透析液內白血球的個數和種類皆在判斷腹膜透析病患腹膜炎中扮演重要的角色，白血球的個數主要為判斷發炎反應的產生與結束，而白血球的種類主要判斷發炎的階段，若能準確的得知上述資訊，將有助於醫生做即時且正確的投藥治療處理。

1.2.2 於微流道以外力分離及捕捉細胞

近年來有許多文獻提出了各種可應用於分離或捕捉細胞及流體中微小粒子的微流道系統[13,14]，捕捉這些細胞及粒子之後，可進行許多後續的應用，如微生物培養[15]、微氣泡混合[16,17]，也可應用於生物分析、細胞檢測等[18]。另外也有文獻使用微流道的特性並結合光學(圖 1-1)[19-22]、電學(圖 1-2)[23,24]、磁學(圖 1-3)[25,26]、聲學[27]的原理來分離或捕捉細胞。光鉗原理是一種被常常拿來應用於捕捉細胞及控制細胞移動方向的方法，然而這種方法也須對細胞施加高能雷射，可能會對細胞造成傷害。微流道結合介電泳也是其中一種常見應用於分離、捕捉細胞的方式，然而由於使用電場的方式操作，必須非常小心的操作，否則會對細胞造成不可逆的永久傷害，另外也需要在流道中額外製作電極，在製程上相對較複雜。在微流道中利用磁力、聲學分離或捕捉細胞需要外加磁場、聲波源，在系統的架設上較為不易，較不適合使用於定點照護的應用上。

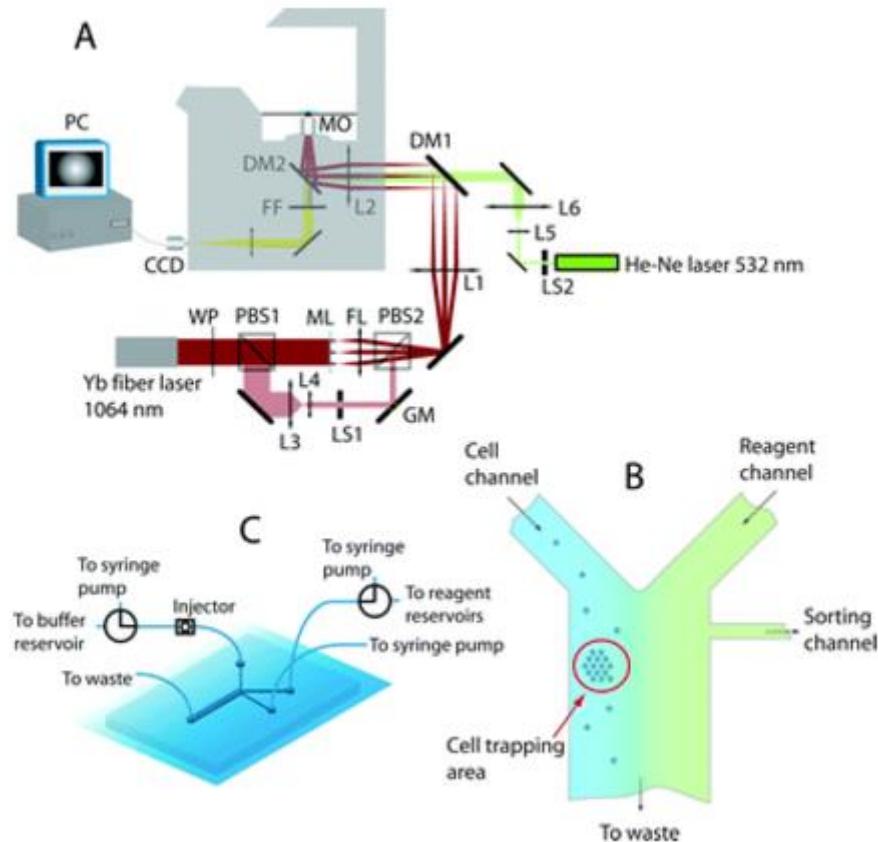


圖 1-1 利用光鉗子原理在微流道中進行細胞分選及捕捉[20]

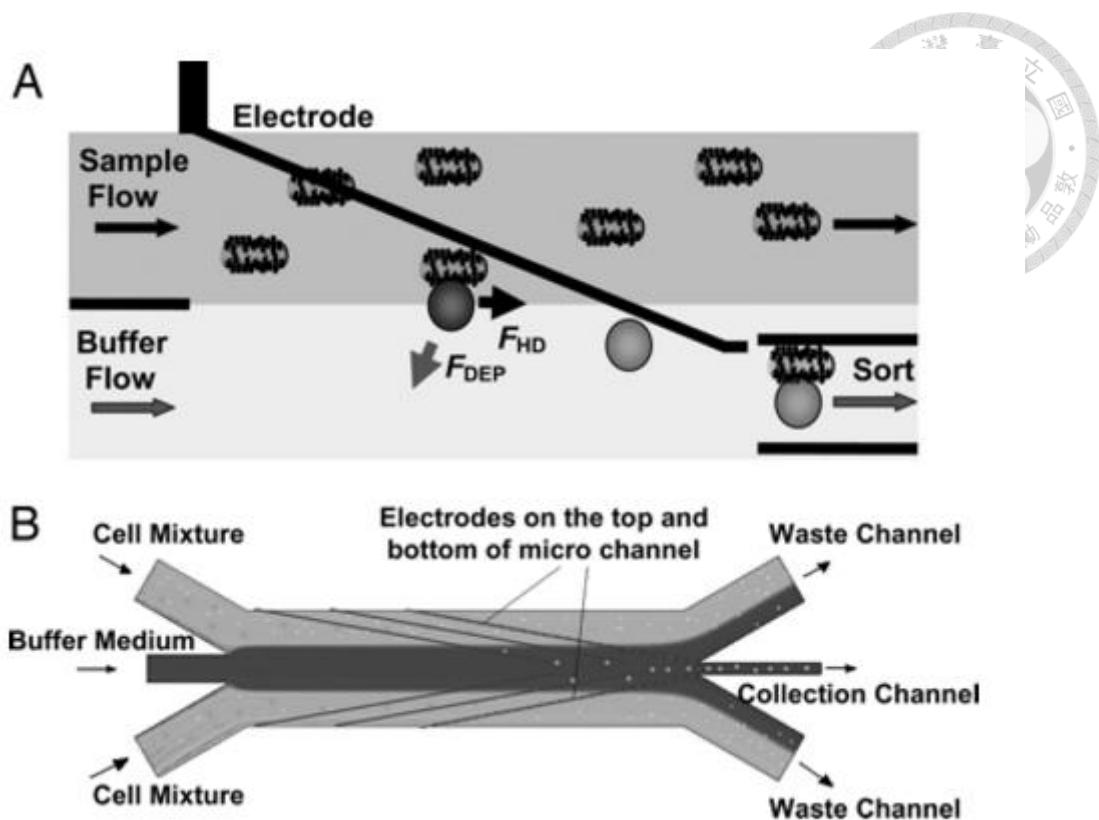


圖 1-2 使用介電泳原理進行細胞分選[24]

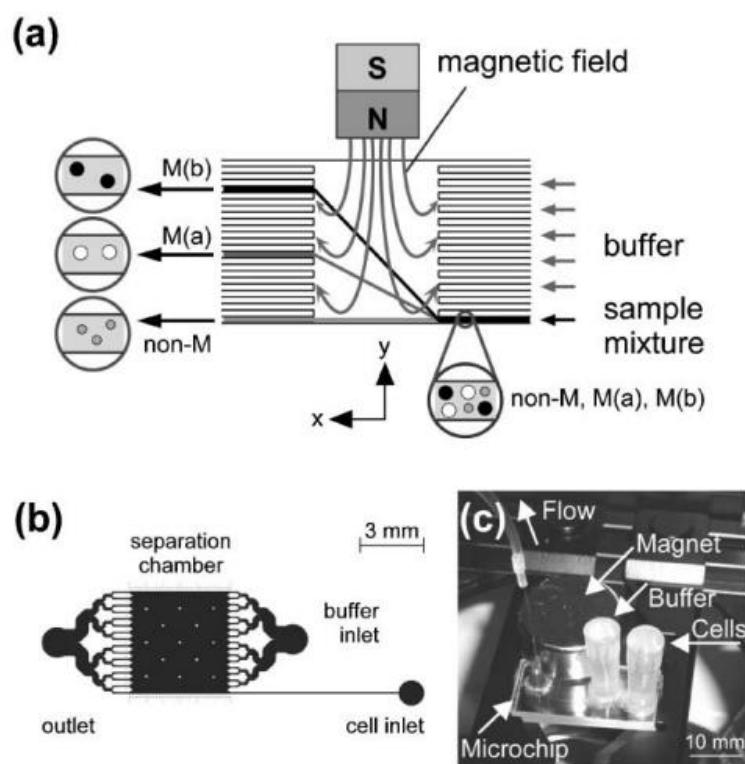


圖 1-3 利用層流及磁力的方式進行細胞分離[26]

1.2.3 流體動力學式微流道分離及捕捉細胞

利用流體力學原理的方式，相對是對細胞傷害較小的方式，且原理簡單，只需設計特定的微流道，影響流體的運行方式，細胞遵循流線而被捕捉，有些團隊使用微井(圖 1-4)[28]、有些則使用微梳狀結構。普林斯頓大學 James C. Sturm 教授研究團隊開發一種類似彈珠台結構的側向位移結構微流道(圖 1-5)[29]，依據細胞大小不同則會有不同的横向位移，以此原理進行細胞分離；另外加州大學柏克萊分校的 Luke Lee 教授研發團隊研發了一個利用流體動力學進行單細胞捕捉的微流體細胞分析晶片(圖 1-6)[30]，此晶片由高密度的微溝槽陣列組成，當細胞流入微流道晶片時，由於流線的帶動，單顆細胞將被捕捉於微溝槽上，一旦微溝槽上帶有細胞時，流線就會改變使下一個單細胞流入其他尚未捕捉到細胞的微溝槽，此系統只需利用流體的壓力帶動，即能達到高密度的單細胞捕捉。雖然這些系統可進行多種細胞分離、捕捉，然而這些方式因沒有任何細胞標定步驟，無法達成專一性的細胞捕捉，此外細胞本身的尺寸差異，也會影響捕捉的效率(yield)，因此不適合進行低細胞數捕捉的實驗。

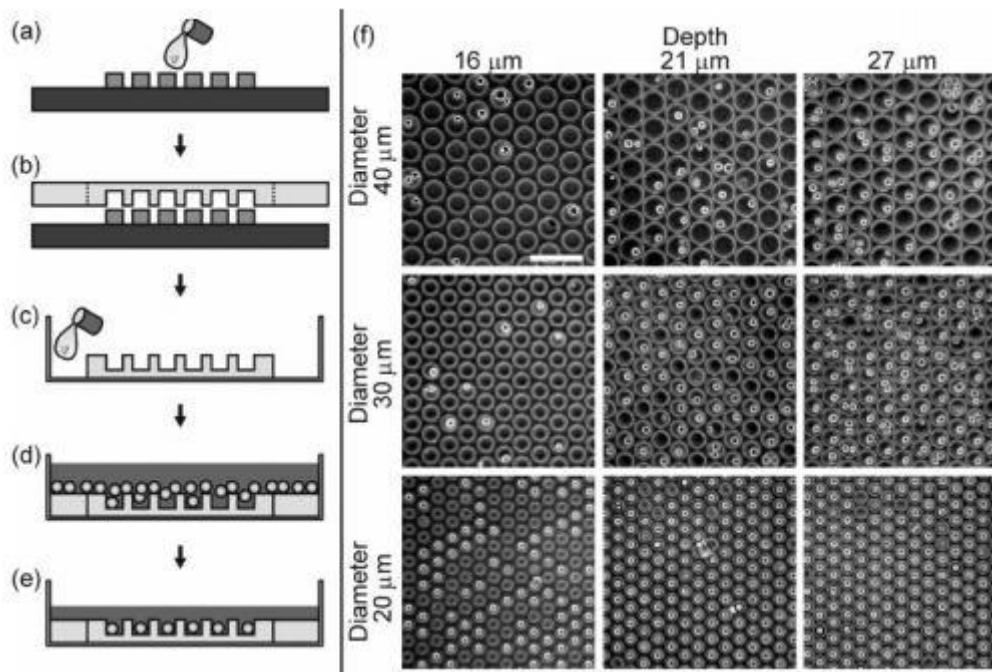


圖 1-4 使用重力沉積方式進行單細胞捕捉之微反應槽[28]

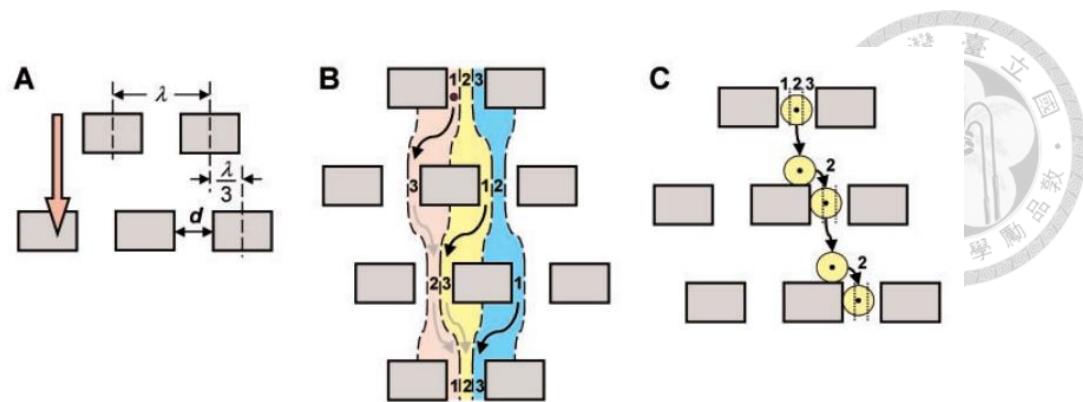


圖 1-5 使用特別的障礙物排列，以流線進行細胞分離[29]

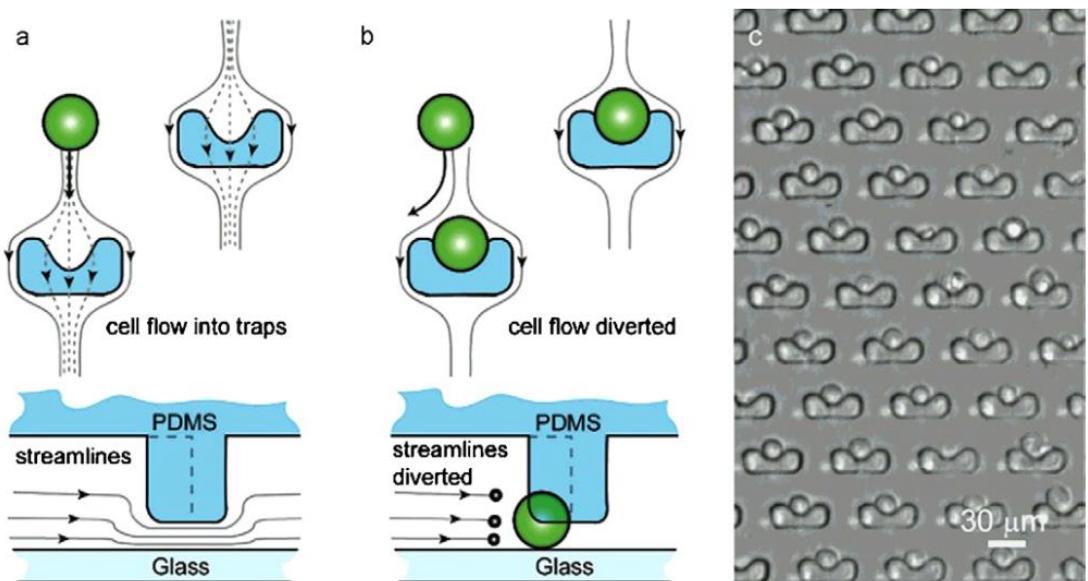


圖 1-6 使用流體力學進行高密度細胞捕捉之微流體晶片[30]

過去亦有研究以多孔微透膜微流道晶片的方式進行細胞的攔截(圖 1-7)[31]，由於透孔結構相對於其他的以障礙物的方式攔截細胞，有較高單位體積透孔率，意思即為在同樣的流道體積內，可以抓取較多的細胞及粒子。然而這種結構的流體動力學式微流道同樣具有低專一性的缺點，且由於流道是由三層結構所組成，製程難度較高。

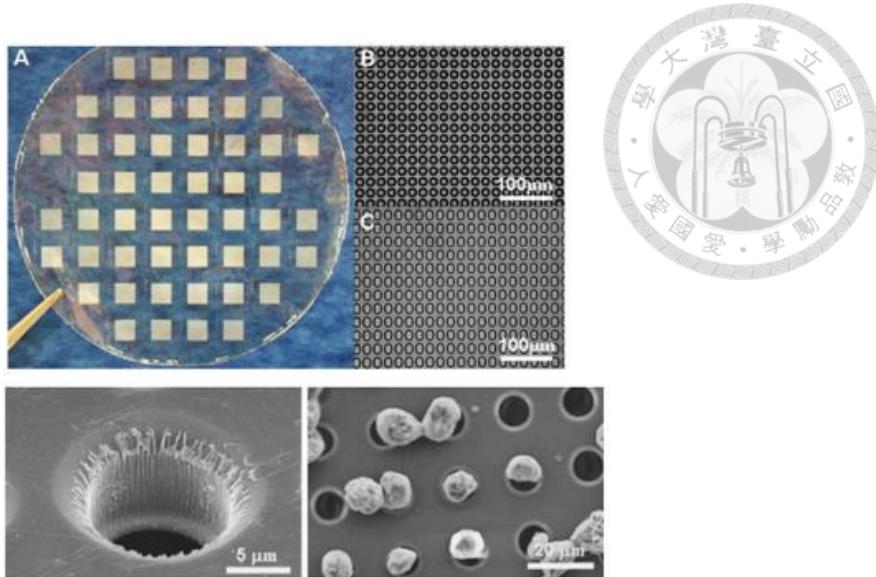


圖 1-7 使用多孔微透膜進行細胞的捕捉[31]

另一種使用微流道晶片進行細胞捕捉的方式是由東京大學的 Takeuchi 教授的研究團隊所開發的微流體晶片[32]，其利用不同流阻的捕捉井所組成的微流道進行微珠或細胞的捕捉及釋放，此晶片運作原理可看以等效電阻的概念去理解，當微珠或細胞進入晶片後，會順著流體先流往流阻小而流量大的路徑，而此路徑上設計有一個窄口的通道，若粒子的尺寸較通道寬度為大，則會被此陷阱捕捉，反之則會通過，而當陷阱中已有粒子佔據，造成流阻提高、流量變小，則粒子會順著流體沿著主流道流至後方區域，以此設計進行粒子及細胞的捕捉。而加州理工學院的 Changhuei Yang 教授的研究團隊，延伸此種設計進行粒子的分選(圖 1-8)[33]，然而此種設計是直接依靠粒子的尺寸去做篩選及捕捉，若樣本中不同的粒子沒有明顯的尺寸差異，則無法以此設計將不同的粒子分開。

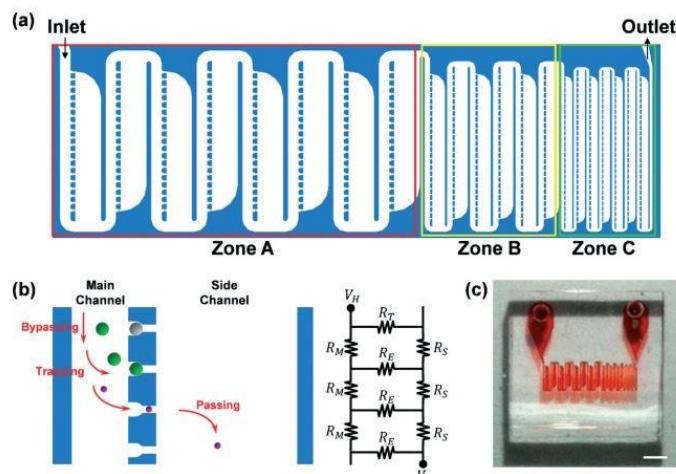


圖 1-8 利用不同流阻的流道進行細胞捕捉[33]

1.2.4 使用生物標定技術在微流道進行分離及捕捉細胞

為能有效率的捕捉樣本中特定且少量的細胞或細菌，生物標定(labeling)的技術。一直以來皆被廣泛的使用，最主要的生物標定方法可分為光學和磁學的標定，藉由帶有螢光或是磁力的微奈米球附著特定的生物標誌物抓取感興趣的細胞或細菌，再由光學激發或是外加磁場能達到精確且少量的細胞捕捉。哈佛大學的 Donald Ingber 教授研究團隊就使用了磁性的微磁球捕捉患有敗血症病患血液中少量 *C.albicans* 真菌，再藉由整合高電磁場的微流體晶片捕捉吸附微磁球的真菌[34]。他們期望藉由此方式幫助敗血症病患清除血液中的細菌。然而因為微流道晶片的體積通常只有數微升，因此如何提升過濾血液之流量就成了此技術最主要的瓶頸。

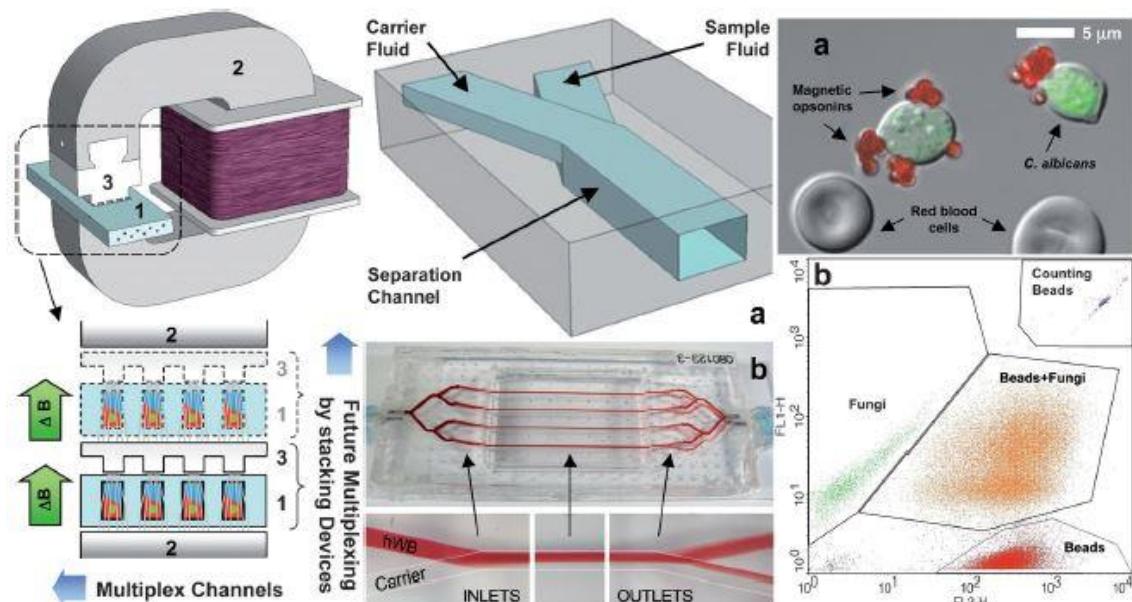


圖 1-9 磁性微流體細胞捕捉晶片

1.3 研究動機及目的

目前流式細胞儀或細胞計數器為最廣為使用於量測白血球個數及種類的技術，然而在白血球數目過少時($<300\text{cells}/\mu\text{L}$)並無法得到準確的讀值，此外，上述技術亦需要繁瑣的操作流程且須由受過專業訓練的人員來操作，且流式細胞儀造價昂貴，無法提供即時的檢測，因此無法對早期的腹膜炎或是發炎症狀提供準確且即時的診斷。

有鑑於現有技術的限制，及為了解決流體動力學式微流道無法分選出不同種類的白血球之問題，本論文開發一利用流體動力學原理之微流道生醫晶片進行腹

膜透析液中之少量白血球種類和數目之即時監測，此微流道生醫晶片為聚二甲基矽氧烷所做成(Polydimethylsiloxane, PDMS)，晶片中設計有三個捕捉區，分別捕捉聚集的免疫微珠、單顆的免疫微珠、中性球之外的白血球，免疫微珠表面具有抗體，會與中性球進行專一性的結合，藉此將中性球與其餘的白血球區分，再經由微流道將較大顆的免疫微珠與白血球分別捕捉在不同的區域，即可分別計算中性球與其餘白血球的比例及數目。

1.4 論文架構簡介

本論文由五個章節構成。

第一章為緒論，包含研究背景與動機、文獻回顧、論文架構，其中文獻回顧中先說明腹膜炎感染階段與腹膜透析液中白血球的數目與比例的關係，再介紹傳統的細胞分選方法以及各式微流道分選方法，最後比較各種方法的優缺點後，選擇適合的實驗方法。

第二章為實驗原理介紹及微流道設計。先介紹在本論文中，流體動力學式微流道分離及捕捉的原理，再說明設計的依據及原則，最後在實際以此設計用於後續的實驗中。另外會介紹免疫微珠抓取特定白血球的原理。

第三章介紹實驗流程，包含模具的光微影製程、微流道晶片的軟微影製程以及整體的實驗架設，另外說明免疫微珠抓取細胞的流程，並介紹實驗中會使用的儀器設備。

第四章為實驗結果，首先說明免疫微珠的選擇及實際抓取中性球的實驗，然後先以免疫微珠與螢光珠模擬真實使用情形，驗證實際流線、分離情形與預期之結果相同，並計算捕捉及分選效率，接著以 THP-1 細胞與免疫微珠進行分離及捕捉的實驗，最後以實際從腹膜透析病患身上所取之腹膜透析液，以所設計之微流道，捕捉並分選出腹膜透析液中，不同種白血球，並以人工計數的方式計算細胞濃度，並驗證是否與實際濃度相符。

第五章為本論文的結論與未來展望，總結本論文及說明未來規劃。

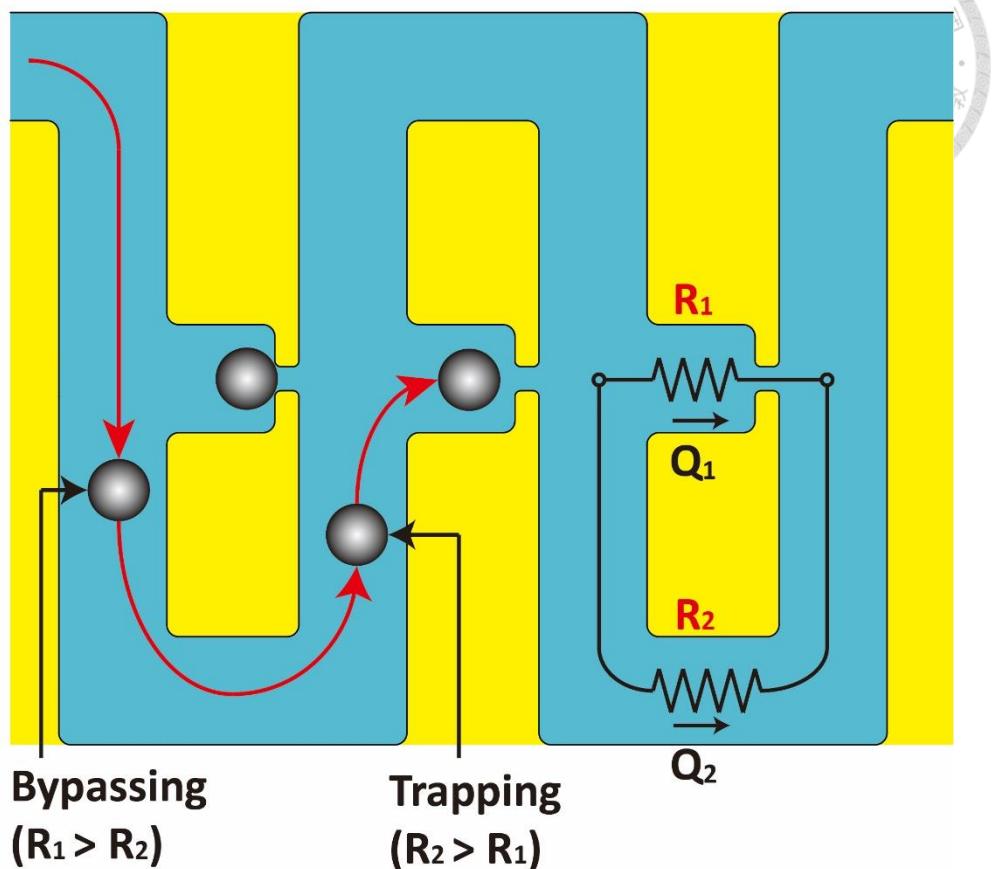


Chapter 2 實驗原理介紹及微流道設計

2.1 流體動力學式微流道粒子分離及捕捉原理

本論文設計的流體動力學方式之微流道晶片，其運作原理如圖 2-1(A)，可以電阻電路的概念理解，將電子視作流體分子，水流視作電流，流阻則視作電阻，而流體壓力差可視作電壓差，在電阻電路中，電子在兩條具有相同壓力差的路徑，會傾向往電阻小的路徑流動造成比較大的電流。以流體力學的方式理解，晶片內具有不同流阻的流道，在粒子尚未被所設計的陷阱所捕捉前主流道具有較高的流阻，因此會有較大流量的流體流往具有較低流阻的陷阱流道，而流體中的粒子，例如微珠及細胞，則因為流線的帶動會傾向先流向側邊較低流阻的陷阱流道，當粒子直徑較所設計的陷阱流道寬度來的大，則粒子會被陷阱攔截下來，並將陷阱流道堵住使流阻提高，減少繼續進入陷阱流道的流體流量並避免其他粒子再度進入；當粒子直徑較所設計的陷阱流道來的小，則粒子會順利通過陷阱繼續往後方流道前進而不會影響流道的流阻。若流道中設計有不同的捕捉區，分別具有不同的流道尺寸設計，則可依序的將樣本中的大小粒子捕捉在不同的區域。兩條不同流阻的流道在陷阱流道尚未被粒子佔據之前，兩者之間的流量關係可簡化為圖 2-1(B)的公式，可看出流量與流道的寬度、高度、長度及長寬比皆有關，若 Q_1/Q_2 的值大於 1，則晶片會依設計的方式運作。

(A)



(B)

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \left(\frac{C_2(\alpha_2)}{C_1(\alpha_1)} \right) \cdot \left(\frac{L_2}{L_1} \right) \cdot \left(\frac{W_2 + H}{W_1 + H} \right)^2 \cdot \left(\frac{W_1}{W_2} \right)^3 > 1.$$

圖 2-1 流體動力學式微流道晶片運作原理 (A)簡化等效電阻說明圖

(B)路徑 1 及路徑 2 流量比例簡化公式



2.2 流體動力學式微流道設計

本論文是依據圖 2-1(B)之公式，設計出 $Q1/Q2$ 的值大於 1 的微流道。先選定了主流道及陷阱流道的寬度，主流道寬度及流道高度必須大於樣本中，最大欲捕捉的粒子直徑，避免流道堵塞，根據文獻[32]，流道高度最高可設計為 1.4 倍的最大粒子直徑，以此原則進行設計可達成最高的單一粒子捕捉率，因此本微流道高度設計為 $40\mu\text{m}$ ；而陷阱流道寬度則必須小於欲捕捉的粒子半徑。在本論文中免疫微珠是樣本中最大的粒子，直徑為 $30\mu\text{m}$ ，而腹膜透析液中白血球直徑則為 $10\sim15\mu\text{m}$ ，在本論文中所設計的微流道希望分別對免疫微珠及白血球進行捕捉，並分離中性球與其餘白血球。

本微流道共分三個捕捉區，如圖 2-2，第一區(Zone A)的陷阱流道寬度設計為： $60\mu\text{m}$ (一排)、 $45\mu\text{m}$ (兩排)、 $30\mu\text{m}$ (兩排)，主流道寬度為 $120\mu\text{m}$ ，共有 80 個陷阱， $Q1/Q2$ 的值皆大於 3.79，是用來攔截因捕捉同一顆細胞而聚集在一起的免疫微珠，以避免主流道堵塞，因此預期會有部份的單顆免疫微珠會被捕捉於第一區第四排、第五排；第二區(Zone B)的陷阱流道寬度為： $20\mu\text{m}$ ，主流道寬度則為 $90\mu\text{m}$ ，共有 100 個陷阱， $Q1/Q2$ 的值為 1.91，用來捕捉單顆的免疫微珠，方便後續的細胞計數；第三區(Zone C)的陷阱流道寬度為： $9\mu\text{m}$ ，主流道寬度為 $40\mu\text{m}$ ，共有 102 個陷阱， $Q1/Q2$ 的值為 1.42，用來捕捉未被免疫微珠所標定的其餘白血球，表 2-1 記錄了詳細的流道尺寸。在第一區及第二區所捕捉的免疫微珠，表面具有能夠辨認腹膜透析液中中性球的抗體，因此能夠與中性球進行鍵結，達到分離中性球與其餘白血球的目標。

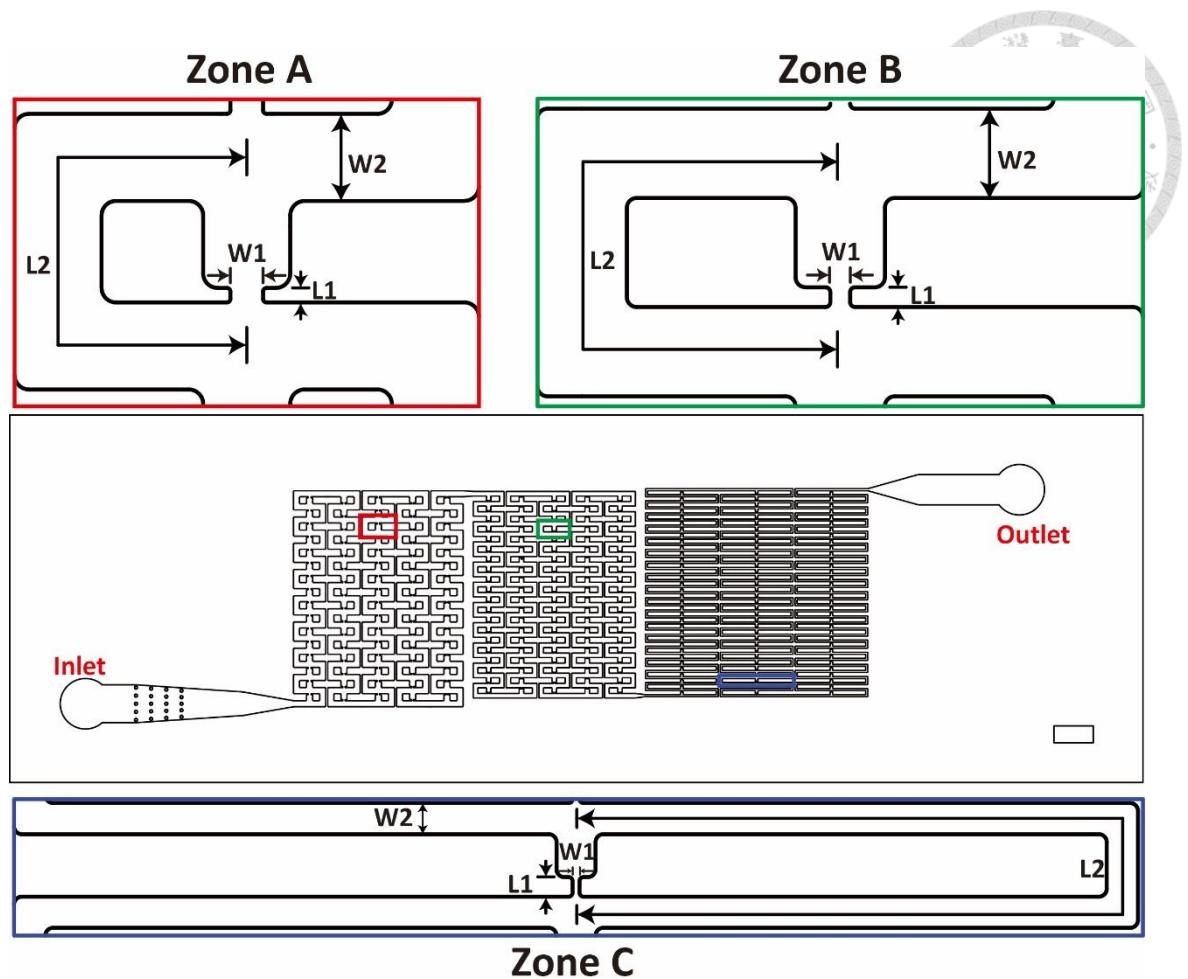


圖 2-2 微流道設計示意圖

表 2-1 微流道設計詳細尺寸表

	L1 (μm)	L2 (μm)	W1 (μm)	W2 (μm)	H (μm)	Q1/Q2	# of traps
Zone A	20	780	60	120	40	14.35	80
			45			8.97	
			30			3.79	
Zone B	20	720	20	90	40	1.91	100
Zone C	25	1520	9	40	40	1.42	102



2.3 免疫微珠抓取原理

在人體中，白血球具有相當多樣化的分支，不同種的白血球具有不同的功能，每種白血球表面都有許多特定的表面蛋白，這些表面蛋白質像是一種身分證，可用特定的抗體與之結合。本論文中，希望將中性球(neutrophil)從腹膜透析液中，與其他的白血球分離，然而，由於正常人類白血球的尺寸為 $10\sim15\mu\text{m}$ ，在各種不同種的白血球中的差異不大，若希望直接以尺寸差異的方式將中性球與其他白血球分離，是相當困難的。而 CD15、CD16 這種表面蛋白，在中性球的表面具有很高的表現性[35]，而在其他的白血球具有相對低的表現性，因此我們選擇以表面已鍵結 Anti-CD15、Anti-CD16 抗體的免疫微珠來專一性的捕捉中性球。以下說明原理：

2.3.1 抗體抗原鍵結原理

抗體又稱為免疫球蛋白，由脊隨動物免疫細胞中的 B 細胞所分泌。抗體的單體通常是一個 Y 型的分子，由 4 條多肽鏈所組成，分別為 2 條相同的重鏈與 2 條相同的輕鏈，重鏈與輕鏈彼此之間以雙硫鍵鍵結，而每一條鏈均由免疫球蛋白結構域所組成，這些結構域是由 70 到 110 個胺基酸所組成，再經由摺疊後形成特定的形狀，如圖 2-3。抗體能通過其可變區識別特定的外來物，也就是抗原，此可變區通常位於 Y 字頂端兩側，而此兩個端點又被稱作互補位或是抗原結合位，該結構僅針對一種特定的抗原表位，像是一把鑰匙只能開一把鎖一樣，這也是抗體和抗原的結合具有專一性的原因。抗原通常為蛋白質或是多醣類，在生化實驗中，常用抗體與特定抗原之間會發生結合的現象，標記特定的細胞或是蛋白質。在本論文中選用的抗體為 Anti-CD15 及 Anti-CD16，而抗原即為中性球表面之 CD15 及 CD16 表面蛋白。

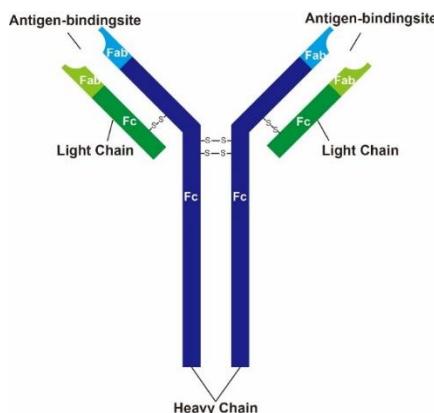


圖 2-3 簡化抗體結構圖



2.3.2 免疫微珠與抗體鍵結原理

前節說明了抗體與抗原的鍵結原理，本節將說明在本論文中的免疫微珠是如和與 Anti-CD15 抗體及 Anti-CD16 抗體進行鍵結。事實上 Y 型的抗體分子同樣能成為其他種抗體所辨認之抗原，本論文中的免疫微珠即是以此種原理，將所選擇的特殊抗體接在表面，如圖 2-4，pluriselect 原廠在免疫微珠表面預先以生物素(biotin)與鍼親合素(Streptavidin)的鍵結方式將 Anti-mouse IgG 之抗體接在 universal pluribeads 上，再與 Anti-CD15 抗體(mouse)及 Anti-CD16 抗體(mouse)混合，即完成 Anti-CD15 pluribeads 及 Anti-CD16 pluribeads。

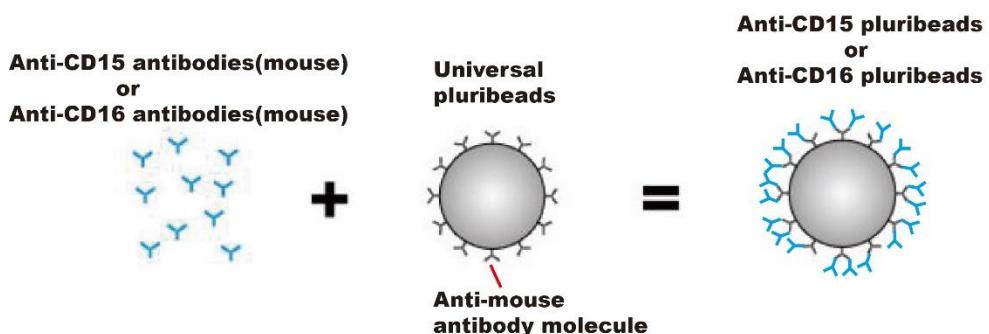


圖 2-4 專一性抗體與免疫微珠鍵結原理

Chapter 3 實驗流程



本章節將說明本論文中所進行的實驗流程，包含以光微影製程做出翻模所需的矽晶圓模具及後續以軟微影製程做出 PDMS 微流道晶片的過程，並且說明樣本的前處理、細胞染色、細胞濃度確認法，接著說明免疫微珠捕捉腹膜透析液樣本中的中性球實驗步驟，最後則是以微流道晶片進行免疫微珠、螢光珠、白血球分離的實驗流程。

3.1 晶片製程

3.1.1 模具製作—光微影製程流程

本論文中微流道所設計的流道高度為 $40\mu\text{m}$ ，因此使用 MICRO•CHEM SU-8 2050 負光阻進行模具結構的製作(可製作厚度： $30\mu\text{m}$ ~ $170\mu\text{m}$)，全部流程可簡化如圖 3-1。

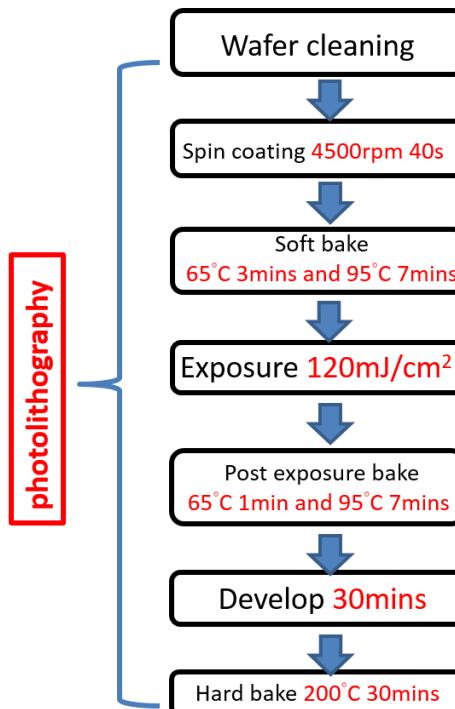


圖 3-1 光微影製程簡要流程圖

本模具全程於奈米機電系統研究中心的無塵室中進行，裡面備有所需要的製程設備及潔淨度高的環境，然而在矽晶圓在保存的過程中，還是很容易受到空氣中的懸浮粒子沾黏，且表面難免會出現二氧化矽的氧化層，進而影響後續光阻結構及圖樣的製作，因此在實際進入黃光製程前，會清洗矽晶圓以減少表面的細小粒子及

汙染物沾黏，並蝕刻二氧化矽氧化層，以增加表面與光阻的附著性。清洗晶圓步驟如下：

1. 使用超音波震洗機(E120H, ELMA)(圖 3-2)，分別以丙酮、異丙醇震洗 5 分鐘，再以去離子水沖洗矽晶圓表面，可有效去除表面微粒又不破壞表面結構。
2. 浸泡在硫酸雙氧水(體積比 3:1)6 分鐘，此步驟主要是依硫酸雙氧水強氧化性和脫水性來破壞有機物的碳氫鍵結，達到去除有機不純物的效果。
3. 以去離子水沖洗殘餘的硫酸雙氧水溶液。
4. 由於矽晶圓在強酸或高溫下會加速表面氧化層的增長，會減少光阻對晶圓表面的黏附力，因此必須透過二氧化矽蝕刻液(buffered oxide etch, BOE)去除表面氧化層，浸泡約 2 到 3 分鐘後表面將變為疏水性。
5. 以去離子水沖洗，再以氮氣吹乾後放入 120°烘箱中 10 分鐘，烤乾水分子，確保晶圓表面乾燥。



圖 3-2 超音波震洗機(E120H, ELMA)

待矽晶圓表面乾燥後，後續的製程將於黃光室中進行，避免光阻受到環境中的紫外線(UV)或是特定波段的光照射激發，而產生化學變化而造成結構製作失敗。光阻主要是以高分子聚合物、溶劑、感光劑所組成，其中高分子聚合物具有酸基，作為黏合劑使用，溶劑則是用來溶解高分子聚合物及感光劑，並使光阻可藉由旋轉塗佈法在矽晶圓表面形成平坦的薄膜層以進行後續的製程，感光劑則為光活性強的化合物，遇到特定波段的光源會產生化學反應而使光阻在顯影液中的溶解度改變。光阻可分為正光阻及負光阻兩種，正光阻本身難溶於顯影劑中，溶劑中的感光

劑於樹脂中進行交聯作用(cross-link)，曝光後感光劑的交聯作用被切斷，而使光阻結構可溶於鹼性顯影液中；負光阻正好相反，本身對於顯影液的溶解度高，經曝光後感光劑產生交連作用，這些交連後的高分子具有較佳的抗化學蝕刻能力，且難溶於顯影液。正光阻於顯影時較不會吸收顯影劑而膨脹，因此可得到較細的線寬結構，然而成本較高，通常為業界製作積體電路所用；而使用負光阻雖然結構解析度較差，但已經符合製作微流道晶片模具的需求，而且成本較低廉，因此負光阻是目前常見的微流道模具製作原料。本論文實際黃光製程步驟如下：

1. 將測試用矽晶圓放置於旋轉塗佈機(SP-M3-P, apisc)(圖 3-3)的真空吸頭上，開啟真空幫浦，並設置三階旋轉，第一階 500rpm，時間 15 秒，第二階 1500rpm，時間 15 秒，此兩階目的是使光阻能夠均勻分佈在矽晶圓表面；第三階 4000rpm，時間 40 秒，此階段為控制最終光阻薄膜厚度最重要的階段。三階段加速度均為 150rpm/sec。
2. 設置完成後，開始試轉，測試矽晶圓是否在三階旋轉中，皆能穩定的固定於吸頭上。
3. 將已經過清洗後之矽晶圓以氮氣槍再次吹淨後，放置於旋轉塗佈機的真空吸頭上，開啟真空幫浦，並滴上約 50 元硬幣面積的 SU-8 2050 光阻，接著根據實驗步驟 1 所設置的轉速開始旋轉塗佈。
4. 將塗佈完光阻的矽晶圓放置在加熱板上進行軟烤，第一烤為 65°C，時間為 3 分鐘；第二烤為 95°C，時間為 7 分鐘，目的是使光阻中的溶劑蒸發，讓光阻層從原先的黏稠液體成為較乾燥的薄膜層，並增加光阻對晶圓表面的附著力。
5. 將軟烤後的矽晶圓，放置於單面對準曝光機(EVG620)(圖 3-4)中的曝光平台上，並放上已黏上膠片光罩的光罩玻璃，開啟真空幫浦固定。接著設定曝光參數，包含曝光時間及對位間距，曝光時間設定為 11.2 秒，對位間距設定為 100μm。
6. 曝光後將矽晶圓放置在加熱板進行曝後烤，第一烤為 65°C，時間為 1 分鐘；第二烤為 95°C，時間為 7 分鐘。由於在曝光時，部分未被感光劑吸收的光能會穿透過基底，並且反射與入射光產生干涉現象，而引起駐波現象造成整體曝光強度不一，而曝後烤能使光阻結構重新排列，減少此現象對結構的影響程度，幫助後續顯影步驟的成功性。

7. 曝後烤後將矽晶圓放入容器中並倒入 SU-8 顯影液中進行顯影，時間為 30 分鐘，並在過程中保持輕微搖晃，幫助細部結構的顯影效果。時間結束後，以異丙醇將殘餘在晶圓表面之顯影液沖洗掉，再以去離子水沖洗掉異丙醇，最後以氮氣槍吹乾。
8. 將矽晶圓放上 200°C 的加熱板進行硬烤，時間 30 分鐘，此步驟目的為將光阻中之溶劑量減至最低，並消除因顯影時造成之表面應力。



圖 3-3 旋轉塗佈機(SP-M3-P, apisc)



圖 3-4 單面對準曝光機(EVG 620)



3.1.2 光微影製程參數設定

本論文中，光微影製程各項製程參數皆參考自 MICRO•CHEM 所提供之 SU-8 2050 產品使用說明書，並結合過去的實驗經驗，以下說明各項參數設定依據：

SU-8 2050 因為本身較為黏稠，不需倒入過多的光阻劑，在晶圓上倒上約 50 元硬幣大小的光阻劑即可。光阻結構目標厚度為 40 μm ，根據說明書中轉速資料，依造厚度曲線決定所需要的轉速，如圖 3-5，得知所需轉速為 4000rpm。說明書中建議旋轉階數為兩階，分別為第一階轉速 500rpm，時間 5~10 秒，加速度 100rpm/sec；第二階轉速為目標轉速，時間 30 秒，加速度 300rpm/sec。然而根據實驗經驗，旋轉階數設定為三階，可得到較平坦均勻的光阻層，第一階轉速 500rpm，時間 15 秒，加速度 150rpm/sec；第二階轉速 1500rpm，時間 15 秒，加速度 150rpm/sec；第三階轉速為目標轉速，即 4000rpm，時間 40 秒，加速度 150rpm/sec。

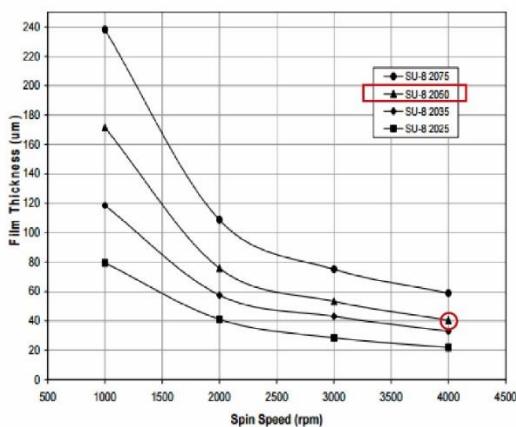


圖 3-5 塗佈厚度與轉速曲線圖

軟烤之目的是將光阻內的有機溶劑蒸發使光阻凝固。塗佈好光阻的矽晶圓必須放在加熱板上，有機溶劑從光阻內部蒸發，使光阻由液態成為固態。不同厚度的光阻結構所需要的加熱時間不同，如表 3-1。實際上，加熱板上會墊上一層鋁箔紙使加熱均勻及保持乾淨，造成實際在矽晶圓底下的溫度不足，而使光阻層受熱不足還是黏稠的液態，在後續接觸曝光階段，部分未凝固的光阻會沾黏在光罩上，甚至在光阻層上留下沾黏的痕跡，而使結構受損。因此在本論文中軟烤步驟會在 95°C 加熱階段增加一分鐘，使溶劑蒸發量足夠，因此實際軟烤步驟為，3 分鐘@65°C，7 分鐘@95°C。

表 3-1 軟烤溫度及時間表

THICKNESS microns	SOFT BAKE TIMES	
	(65°C) minutes	(95°C) minutes
25 - 40	0 - 3	5 - 6
45 - 80	0 - 3	6 - 9
85 - 110	5	10 - 20
115 - 150	5	20 - 30
160 - 225	7	30 - 45

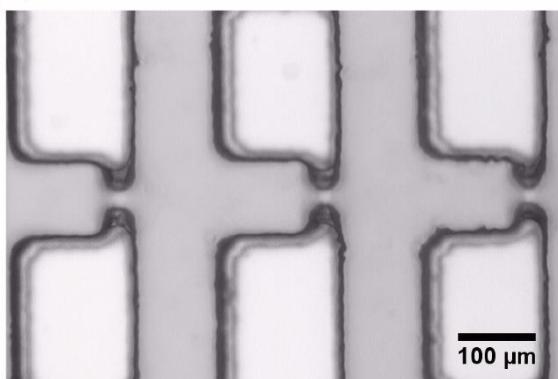


SU-8 2050 負光阻在感光後產生交聯作用，使結構強度增加而不會溶於顯影劑。曝光機光源為波長 365nm 的紫外光，曝光強度為 10.7mW/cm^2 。根據表 3-2 所示，所需曝光能量為 160mJ/cm^2 ，然而根據實驗經驗，若依造說明書內所建議的曝光能量進行曝光，會造成光阻過曝的現象，使流道寬度變寬，如圖 3-6，因此實際上，會減少曝光能量 25%，實際所需曝光能量為 120mJ/cm^2 ，曝光時間設定為 11.2 秒。

表 3-2 曝光能量及厚度對應表

THICKNESS microns	EXPOSURE ENERGY	
		mJ/cm^2
25 - 40	<u>150 - 160</u>	
45 - 80	150 - 215	
85 - 110	215 - 240	
115 - 150	240 - 260	
160 - 225	260 - 350	

(A)



(B)

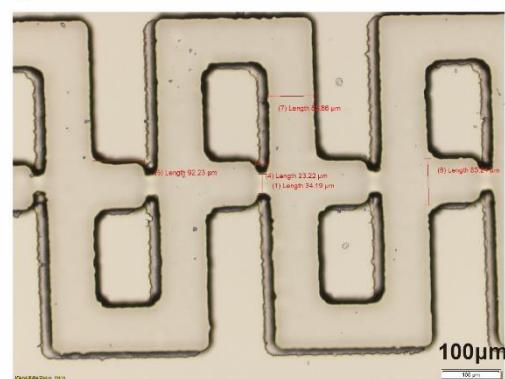


圖 3-6 流道過曝結果 (A)SU-8 光阻結構 (B)PDMS 流道影像

曝光後會進行曝後烤的步驟，此步驟目的是將光阻內殘留的有機溶劑量降到最低，使交聯後的光阻結構更加穩定，未交聯的光阻結構更容易被顯影劑溶解，不同厚度的光阻結構所需要的加熱時間不同，如表 3-3。根據實驗經驗，在 95°C 時

需要多烤 1 分鐘才能使有機溶劑完全蒸發，故實際曝後烤步驟為，1 分鐘@65°C，7 分鐘@95°C。



表 3-3 曝後烤溫度及時間表

THICKNESS microns	PEB TIME (65°C)* minutes	PEB TIME (95°C) minutes
<u>25 - 40</u>	<u>1</u>	<u>5 - 6</u>
45 - 80	1 - 2	6 - 7
85 - 110	2 - 5	8 - 10
115 - 150	5	10 - 12
160 - 225	5	12 - 15

曝後烤後會進行顯影及硬烤，顯影的目的是將未感光而無交聯作用產生的光阻結構溶解，根據表 3-4，40μm 的結構需要 5 分鐘的顯影時間。然而，由於本論文設計的光罩，最小線寬為 9μm，且根據實驗室研究的操作經驗，SU-8 系列的光阻在交聯後是一種穩定的結構，幾乎不會有過顯的現象出現，因此實際上顯影步驟會進行 30 分鐘。而硬烤是為了使光阻結構更加堅固，能承受後續的翻模，根據說明書建議硬烤步驟為 30 分鐘@200°C。

表 3-4 顯影時間對照表

THICKNESS microns	DEVELOPMENT TIME minutes
<u>25 - 40</u>	<u>4 - 5</u>
45 - 75	5 - 7
80 - 110	7 - 10
115 - 150	10 - 15
160 - 225	15 - 17

3.1.3 軟微影製程

本論文使用聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)做出實際的微流道晶片。PDMS 是一種高分子的有機矽化合物，具有透明性高、生物相容性佳、熔點高、可塑性佳的優點，被廣泛應用於微流道系統、填縫劑、潤滑劑、隱形眼鏡。液態之 PDMS 是一種黏稠的液體，是由主劑 A 劑以及硬化劑 B 劑所混合而成，待加熱烤乾後，成為一種透明性高彈性固體。目前 PDMS 用於製作微流道的方法是一

種軟微影製程(soft lithography)，將液態之 PDMS 倒至矽晶圓模板上，此時矽晶圓上的微結構會被轉印至 PDMS，再以烘箱烤乾後翻模，再經過切割、翻模、打孔、封裝等後製程，即可得到具有微結構的 PDMS 微流道晶片。封裝製程使用到氧氣電漿組合法(Oxygen plasma bonding method)，其原理為對低壓腔體內的氧氣施加電漿，而使氧氣解離並產生大量的自由基粒子，這些自由基粒子會與碳氫化合物及表面的氧化物發生反應，造成腔體內材料表面氧化，而 PDMS 表面在此種環境下，會產生官能基如羥基(-OH)、羧基(-COOH)等，取代原有的高分子鍊，而使表面特性改變，而能與其他同樣經此種方法改變表面性質後的矽衍生物表面組合在一起。以下詳細說明實驗步驟：

1. 製作液態 PDMS，將 A 劑與 B 劑以及幫助後續脫模過程的矽油以重量比 10：1：0.3 的比例調配，並以打蛋器混合均勻。
2. 利用真空皿抽出混合完成之 PDMS 中的氣泡。
3. 以氮氣槍仔細清潔矽晶圓模具表面，避免灰塵的沾粘，接著倒入已除氣泡之 PDMS 液體，靜置於平坦表面，使 PDMS 液面能夠保持水平，並填滿模具細部結構。
4. 放入 60°C 烘箱，時間 2 小時，使 PDMS 硬化而能脫模。
5. 取出烤乾之矽晶圓模具與 PDMS，以解剖刀小心的切割並取下所需要的區域，形成一塊一塊的 PDMS 微流道，即完成翻模。
6. 以 1mm 的打孔器在流道的入口處打洞，並以 0.5mm 的打孔器在流道的出口處打洞，並且以膠帶仔細清潔 PDMS 微流道的表面，避免任何灰塵微粒的沾粘。
7. 取載玻片，並以酒精清潔表面，再以氮氣槍吹乾。
8. 將 PDMS 與載玻片同時放入氧電漿機腔體內(PDC-001, Harrick plasma)(圖 3-7)，關閉腔體門。
9. 開啟機台電源及真空幫浦電源將腔體壓力抽至 0.2mmHg，接著旋轉分向閥，將氧氣輸入管線壓力抽至 0.43mmHg，再將氧氣鋼瓶氣閥打開，使壓力計刻度維持在 0.58mmHg~0.62mmHg，時間 10 分鐘。
10. 將電漿強度調整鈕旋轉至 HI，並計時 30 秒，此時會觀測到腔體內部為淡淡的藍白色，結束後將調整鈕旋轉回 OFF。

11. 取出 PDMS 與載玻片，並關閉腔體門，接著將 PDMS 以夾子夾住輕輕接觸玻璃，兩者會立即的組合在一起。
12. 放入 60°C 烘箱，時間 15 分鐘，此步驟目的為加強兩個介面之間的結合力。
13. 取出物品，完成 PDMS 微流道晶片。



圖 3-7 氧電漿機(PDC-001, Harrick plasma)



3.2 腹膜透析液樣本處理方式

3.2.1 腹膜透析液樣本取得

本論文之樣本皆取自台大醫院，其來源為因腹膜炎發作，進而產生嚴重腹痛情形而回診台大醫院之腹膜透析患者身上所取之腹膜透析液。在接獲醫院通知後，立即前往台大醫院拿取樣本，並返回實驗室進行各項實驗，此時台大醫院檢驗科會同時以流式細胞儀對樣本做檢查報告供後續比較所用，檢查報告主要包含病患的病歷號及姓名，以及腹膜透析液中之紅血球數目以及各種白血球(中性球、嗜酸性球、淋巴球、單核球)數目的資訊，我們可根據過去的記錄發現，本論文所使用之腹膜透析液樣本原始濃度皆高於 1000 顆白血球/ μL ，皆屬腹膜發炎程度高的情形。然而在送檢驗科檢查之樣本及本論文所做的實驗使用的樣本之間，樣本新鮮度約有 2~3 小時的差異，也因此造成部分細胞的凋亡及破裂，也是造成細胞濃度計算會有差異的原因之一。

3.2.2 細胞染色

實驗中所使用之細胞螢光染劑為鈣黃綠素-AM (Calcein-AM) (Life Technologies)，是一種對活細胞進行螢光標記的染色試劑。Calcein-AM 為 Calcein (鈣黃綠素)的衍生物，於 Calcein 上增加了疏水基團的修飾，因此能夠輕易的穿透活細胞膜，當其進入細胞質後，酯酶會將其水解為鈣黃綠素，並留在細胞質內發出黃綠色的螢光，用作標定細胞，其激發及發射波長為 490nm 和 515nm，平時應於-20°C 的環境下保存。配置方法如下：

1. 將二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)當成溶劑，溶解粉末狀的 Calcein-AM，實際比例為 50 μg 的 Calcein-AM 與 50 μL 的 DMSO，混合成 50 μL ，濃度為 1mM 的 Calcein-AM 溶液。
2. 根據細胞樣本體積加入調配好的 Calcein-AM，使整體濃度達到 1 μM 至 10 μM ，如 200 μL 的腹膜透析液樣本，則加入大約 0.2 μL 的 Calcein-AM 溶液。

3.2.3 樣本細胞濃度確認

由於每次從台大醫院所取得腹膜炎患者之腹膜透析液內白血球細胞濃度皆不盡相同，且通常都是超過 1000 顆/ μL 的濃度，因此本論文中相關的實驗皆會對原始的腹膜透析液做稀釋的步驟，為了知道稀釋倍率，必須先知道原始樣本中細胞的

濃度，使用的工具為常見的拋棄式細胞九宮格計數盤，如圖 3-8，使用方法簡單、快速，其步驟如下：

1. 取欲測量濃度之樣本 $14\mu\text{L}$ ，由開口處滴入細胞計數盤內。
2. 將細胞計數盤放上倒立式螢光顯微鏡(IX73, Olympus)(圖 3-9)上，並以相位觀察法觀測並計數未經染色的白血球。
3. 計數方法為，取九宮格中的四角，並分別計算其中之細胞數目，取平均數後乘上 10^4 倍，即為大略之樣本細胞濃度(cells/ml)，例：若計算出來之平均數為 30，則代表樣本中的細胞濃度為 $3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 。

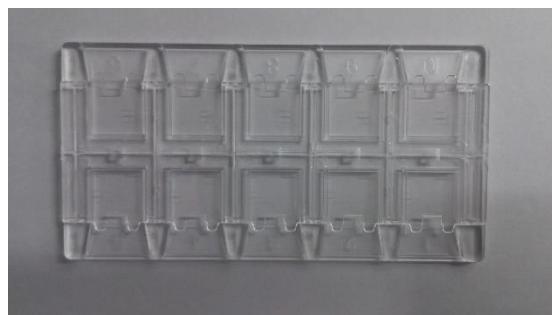


圖 3-8 細胞計數盤



圖 3-9 倒立式螢光顯微鏡(IX73, Olympus)



3.3 免疫微珠捕捉中性球實驗

使用表面具有抗體的免疫微珠捕捉中性球的目的是為了使腹膜透析液中不同種白血球產生尺寸上的差異，再藉由微流道晶片分離。被免疫微珠標定後的中性球就如同被放大了一般，與其他不同種的白血球成為兩個不同的群體。此章節分為兩個部分說明，第一部分為藥品準備，介紹了需要準備的各種化學藥品、免疫微珠、儀器設備。第二部分為實驗流程，包含了實驗步驟、樣品濃度及體積、反應時間等。

3.3.1 化學藥品與免疫微珠的準備

由於目標細胞中性球的表面有極高的 CD15、CD16 表面蛋白質的表現性，而其他白血球則沒有此種表現性，因此我們採用表面已經預先鍵結 Anti-CD15 及 Anti-CD16 抗體的免疫微珠 pluribeads 來捕捉中性球，此免疫微珠購買自 pluriSelect，尺寸為 30 μ m，原液濃度為 2500 顆/ μ L，保存於 4°C 冰箱內，使用前放置於室溫下退冰 10 分鐘，才可用於後續實驗。實驗中還有使用到同樣購買自 pluriSelect 的 EDTA，目的是為了避免樣本遭到二價金屬離子的汙染，平常保存於 4°C 冰箱內，使用前放置於室溫下退冰 10 分鐘。而由於從台大醫院所取得的腹膜透析樣本都是從腹膜炎發炎程度嚴重的患者身上所取出，為了模擬早期腹膜炎的情況，我們使用 1x 的 PBS 稀釋樣本至低細胞濃度，實驗中使用的 1x PBS 購買自 Thermo Fisher，酸鹼值為 pH 7.4，平時保存於室溫下。Calcein AM 購買自 Thermo Fisher，為粉末狀，使用前需先使用 50 μ L 之 DMSO 將 50 μ g 之 Calcein AM 溶解及增加抗凍能力，調配完成後，放置於-20°C 冰箱中保存。

3.3.2 實驗步驟

本實驗流程示意圖如圖 3-10，詳細實驗步驟如下：

1. 取出 3.9 μ L 的 pluribeads 以及 30 μ L 的 EDTA，裝入 200 μ L 的離心管放置於室溫下退冰 10 分鐘，其餘未使用的 pluribeads 及 EDTA 應盡速放回 4°C 冰箱內存放。
2. 取 16 μ L 的腹膜透析液滴入細胞計數盤中，再以光學顯微鏡以相位觀察法計算腹膜透析液中初始細胞濃度。

3. 根據所計算出的濃度，以序列稀釋法稀釋至三種不同的細胞濃度(50 顆/ μ L、100 顆/ μ L、200 顆/ μ L)，並分別取出 200 μ L，成為 sample A，放置於 1.5mL 的離心管中供後續實驗使用。
4. 取 10 μ L 已退冰的 EDTA 加入 sample A，輕微搖晃 1 分鐘，再加入 1.3 μ L 的 pluribeads，成為 sample B(volume: 211.3 μ L)
5. 將 sample B 放至旋轉混合機(MX-RL-E, Dragon LAB)(圖 3-11)上，以 40rpm 的轉速，溫和混合 30 分鐘。
6. 取一管已分裝的 Calcein-AM 於室溫下退冰 5 分鐘，其餘未使用的 Calcein-AM 應盡速放回-20°C 冰箱內存放。
7. 取 0.4 μ L 已退冰的 Calcein-AM 加入 sample B，成為 sample C(volume:211.7 μ L)，再以旋轉混合機以 40rpm 的轉速，溫和混合 10 分鐘。
8. 取 20 μ L 之 sample C，滴至載玻片上，並以蓋玻片蓋上，於倒立式螢光顯微鏡下進行觀測及拍照。

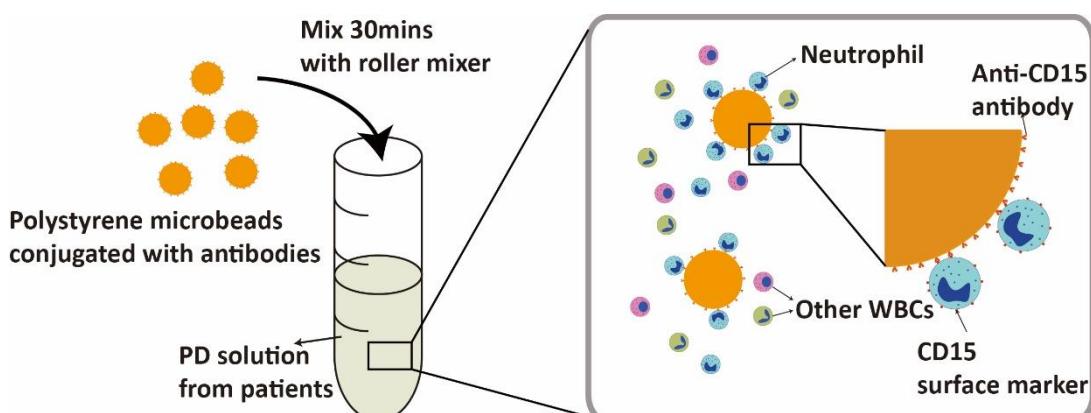


圖 3-10 免疫微珠於腹膜透析液捕捉中性球流程



圖 3-11 旋轉混合機(MX-RL-E, Dragon LAB)



3.4 微流道實驗

本論文中，微流道實驗主要分為兩個部分，第一部分將進行微流道分離、捕捉免疫微珠及螢光珠的實驗，以驗證流道是否如設計一般，能夠成功的將大小不同的粒子分離、捕獲在不同的區域。第二部分則是將前節經混合過後的免疫微珠與真實病患的腹膜透析液樣本，通入微流道晶片中，並記錄實際的分離、捕獲情形，最後進行細胞計數，並與流式細胞儀的結果進行比較。實驗架設如圖 3-12，兩部份實驗流程相同，僅在樣本的準備步驟上不同，以下將詳細說明。

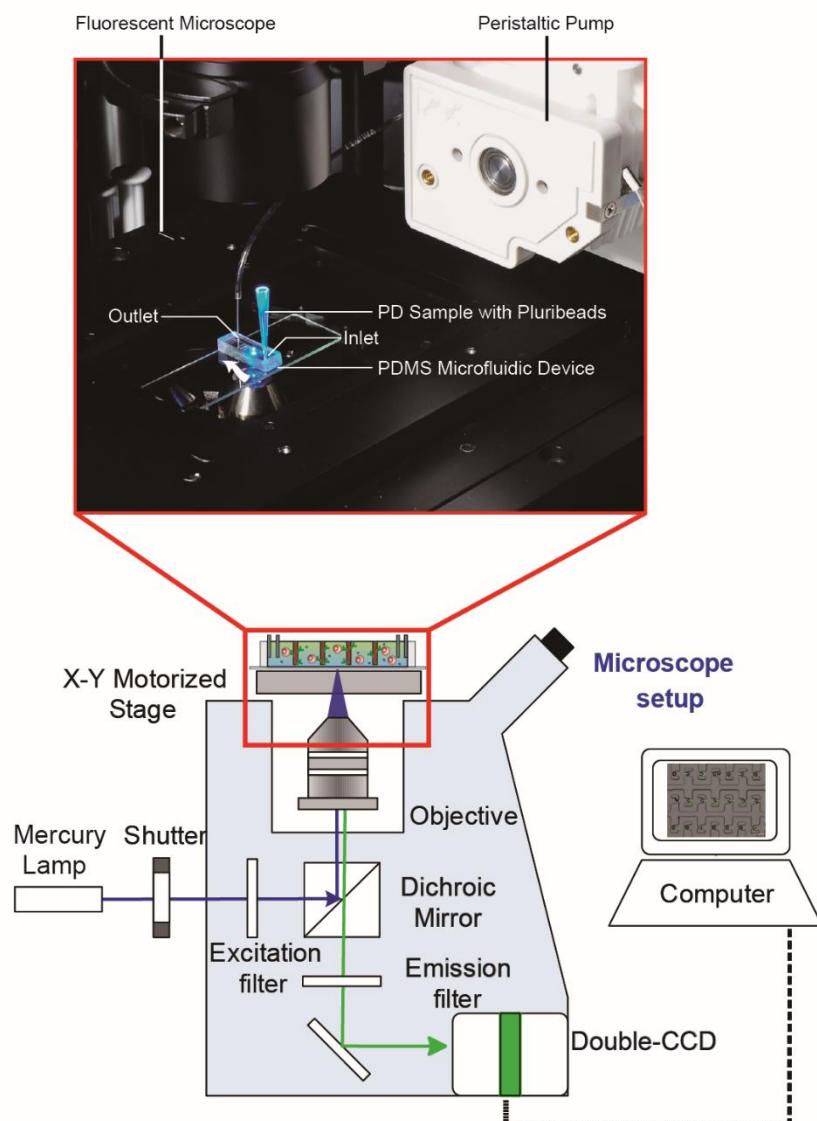


圖 3-12 微流道實驗架設圖

在微流道分離、捕捉免疫微珠與螢光珠的實驗中所使用的螢光珠購買自 Thermo Fisher，尺寸為 $14.8\mu\text{m}$ ，激發波長為 505nm ，放射波長為 515nm ，原液濃度為 1000 顆/ μL ；而使用之免疫微珠則與前 3.3 節相同，原液濃度為 2500 顆/ μL ，實驗進行前，會將樣本以 PBS 稀釋為所需的濃度。本實驗目的為預先測試本微流道晶片實際捕捉免疫微珠及白血球的能力，我們進行實驗，將粒子濃度為 15 顆/ μL 的免疫微珠與濃度為 80 顆/ μL 的螢光珠混合溶液以蠕動幫浦以流速 $1\mu\text{L}/\text{min}$ 抽入微流道中，並記錄微流道捕捉的過程與結果，在本實驗中使用螢光珠是為了模擬真實白血球於流道中的流動情形。實驗步驟如下：

1. 在微流道晶片的入口及出口處分別滴上濃度為 0.5% 的 pluronic 溶液，放入真空皿中抽真空 15 分鐘，此步驟是為了使流道中的氣體被抽出，並且被液體充滿，而 pluronic 溶液是為了防止免疫微珠與螢光珠沾黏於流道中，造成流道阻塞。
2. 架設蠕動幫浦，選擇管徑為 0.25mm 的專用太空管，設定流速為 $1\mu\text{L}/\text{min}$ ，以抽式模式運作。
3. 調配樣本，準備總體積約 $100\mu\text{L}$ ，免疫微珠濃度為 15 顆/ μL 、螢光珠濃度為 80 顆/ μL 的混合樣本，並以震盪機 (VORTEX-GENIE2 S5001, ZYMO RESEARCH)(圖 3-13)幫助混合。
4. 將抽真空完的微流道晶片放至倒立式螢光顯微鏡載物平台下，並將太空管與晶片出口端連接，入口端則插上具有實驗步驟 3 所調配之混合樣本，體積約 $20\mu\text{L}$ 的微量吸管之吸管尖，連接過程必須避免氣泡於交接處產生。
5. 開啟汞燈及白光光源，並對流道進行對焦。
6. 開啟蠕動幫浦，開始實驗，約六分鐘後關閉幫浦。
7. 實驗中拍攝影片，實驗結束後分區拍攝照片，並拍攝放大的局部捕捉影像。



圖 3-13 震盪機(VORTEX-GENIE2 S5001, ZYMO RESEARCH)

而微流道分離、捕捉免疫微珠與腹膜透析樣本實驗，與前項實驗僅在樣本準備方式不同，其餘實驗步驟皆相同。在本實驗中會先依據節 3.2 中所述，對腹膜透析樣本進行細胞濃度確認及稀釋，再依據節 3.3.2 的實驗步驟進行免疫微珠與樣本的混合，接著進行微流道實驗，實驗步驟與前述相同。



Chapter 4 實驗結果

4.1 免疫微珠捕捉中性球

4.1.1 免疫微珠選擇

從文獻中發現，CD15 及 CD16 這兩種細胞表面蛋白質，在中性球的表面皆有高的表現性，因此希望藉由實驗確定哪一種表面蛋白的表現性較佳。本實驗使用中性球比例高於 95% 的腹膜透析樣本，分別與 Anti-CD15 及 Anti-CD16 的免疫微珠進行混合，實驗步驟如 3.3 節所述，不同之處為細胞是以亞甲藍進行染色。在實驗前，會先以細胞計數盤對原始樣本細胞濃度進行確認，接著將混合完畢之樣本，滴入細胞計數盤，計算未與免疫微珠鍵結之白血球濃度，即可反推有多少比例的白血球被免疫微珠所捕捉，藉此得到細胞捕捉率。圖 4-1(A)為中性球分別被 Anti-CD15 及 Anti-CD16 免疫微珠捕捉的情形，可以發現在同樣的條件之下，Anti-CD15 免疫微珠明顯可以抓取較多的中性球；圖 4-1(B)則是使用細胞計數盤，以相位觀察法觀測，藉此計算細胞捕捉率的影像，發現有 80.18% 的中性球可以被 Anti-CD15 免疫微珠抓取，而 Anti-CD16 免疫微珠則可抓取 58.78% 的中性球。由此實驗結果可以確定 Anti-CD15 免疫微珠對於中性球的捕捉能力較佳，造成此結果的原因推斷有下兩種原因，一為中性球表面 CD15 的表面蛋白表現性較高；二為免疫微珠表面的 Anti-CD15 抗體對於中性球表面的 CD15 表面蛋白具有較高的親和力。根據此實驗結果，本論文在之後的實驗中，皆使用 Anti-CD15 免疫微珠進行。

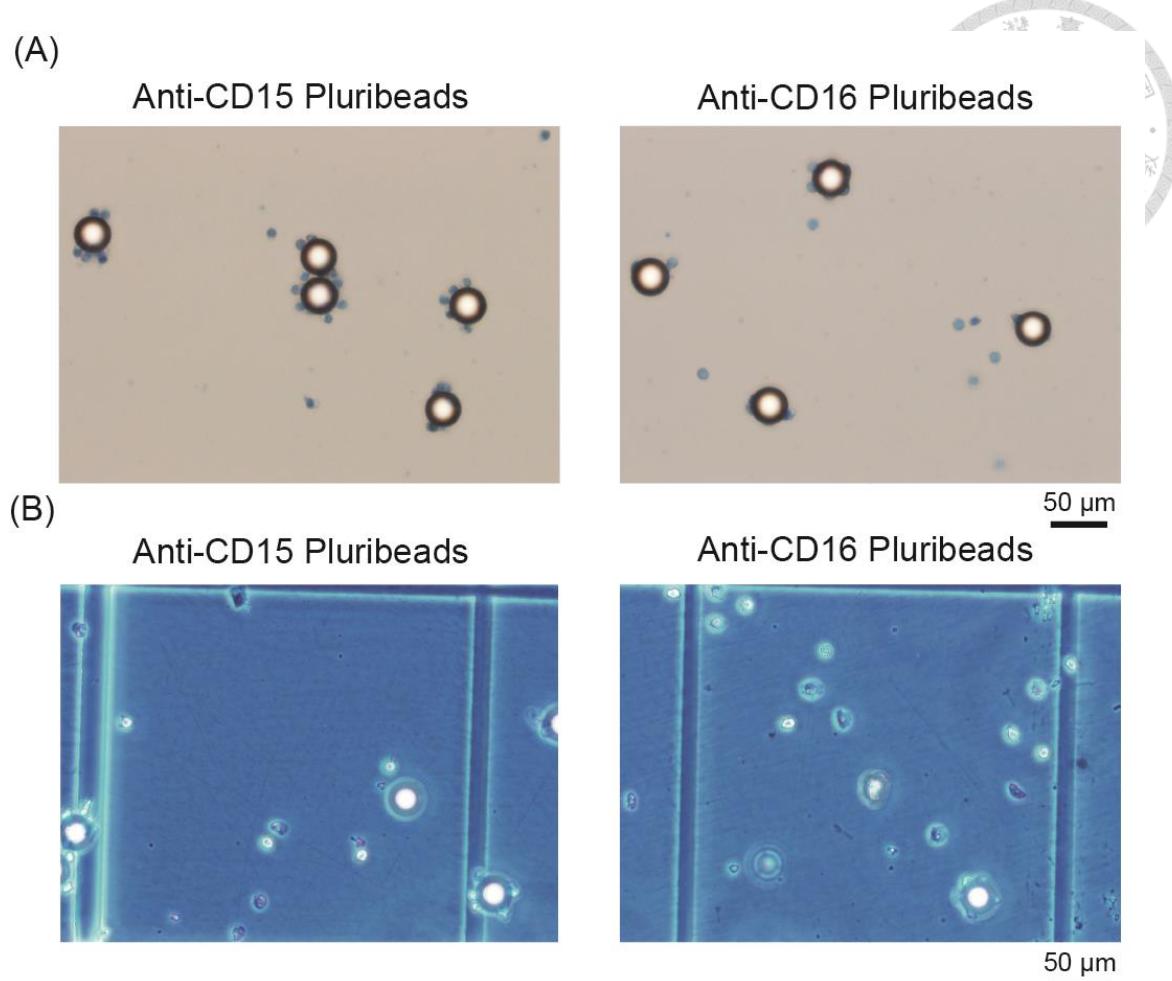


圖 4-1 Anti-CD15 及 Anti-CD16 免疫微珠捕捉中性球顯微影像
(A)於蓋玻片 (B)於細胞計數盤

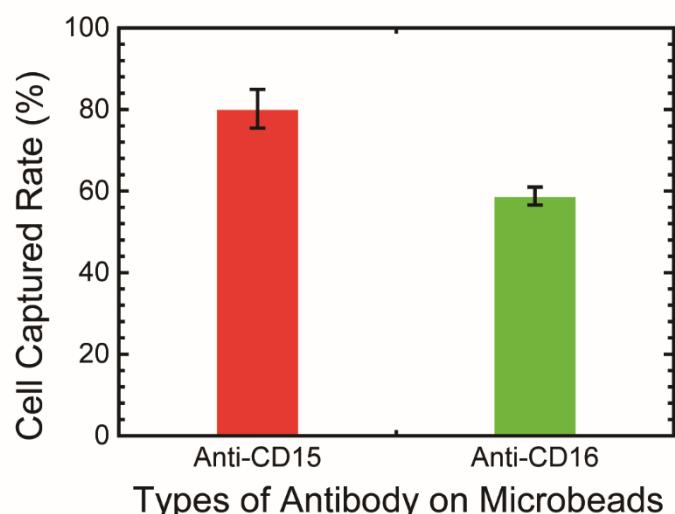


圖 4-2 Anti-CD15 與 Anti-CD16 免疫微珠捕捉能力比較



4.1.2 於不同中性球濃度免疫微珠捕捉實驗

為確定本論文所選擇的 Anti-CD15 免疫微珠在不同的細胞濃度下，是否皆能成功抓取腹膜透析液中之中性球，將混合後的樣本以微量吸管滴至蓋玻片上觀測。本實驗所用免疫微珠表面具有許多抗體，根據原廠資料，一個免疫微珠表面具有約 12 個可與細胞鍵結的抗體位，這表示一個免疫微珠最多可捕捉約 12 顆細胞。

雖然本論文最終是以微流道晶片中不同的區域所捕捉到的白血球，做為區分不同種白血球的依據，因此直觀判斷會認為加入越多的免疫微珠越好，因為可避免中性球因為與免疫微珠表面的抗體結合位不足，而未被免疫微珠捕捉，造成計算上的誤差，然而免疫微珠的濃度過高，將使微流道堵塞的機率提高，且高濃度細胞樣本代表腹膜炎已趨嚴重，並非本論文的研究主軸，故事實上，所加入的免疫微珠總量，僅需在低細胞濃度時，能提供足夠的抗體結合位用於捕捉中性球即可。最後選擇於 $200\mu\text{L}$ 的腹膜透析液中加入 $1.3\mu\text{L}$ 的免疫微珠，此選擇的依據如下：

1. 假設樣本中皆為中性球，濃度為 $100\text{ 顆}/\mu\text{L}$ ，且中性球與免疫微珠結合率為 100% ，則平均每顆免疫微珠上具有約 6 顆中性球，正好為原廠資料抗體結合位之中間值。
2. 濃度高於 $100\text{ 顆}/\mu\text{L}$ 的樣本，尚有足夠的抗體結合位可抓取中性球，直到濃度為 $200\text{ 顆}/\mu\text{L}$ 時，才會出現抗體結合位不足的情況，若樣本中性球到此濃度代表發炎程度已趨嚴重，無須得知準確的比例關係。
3. 混合後之樣本中，免疫微珠濃度約為 $15\text{ 顆}/\mu\text{L}$ ，對於微流道而言，是相對低的濃度，可減少流道堵塞的機率。

根據預測，當腹膜透析樣本中的中性球濃度越高，則平均每顆免疫微珠抓取的中性球數目越多，濃度越低則相反，預測結果如圖 4-3，而實際實驗結果如圖 4-4。從實驗結果可以發現當細胞濃度提升時，平均每顆免疫微珠抓取的中性球數目確實如預期一般提高，因此可以在免疫微珠捕捉中性球實驗結束時，以捕捉的分布圖進行初步的細胞濃度確認。

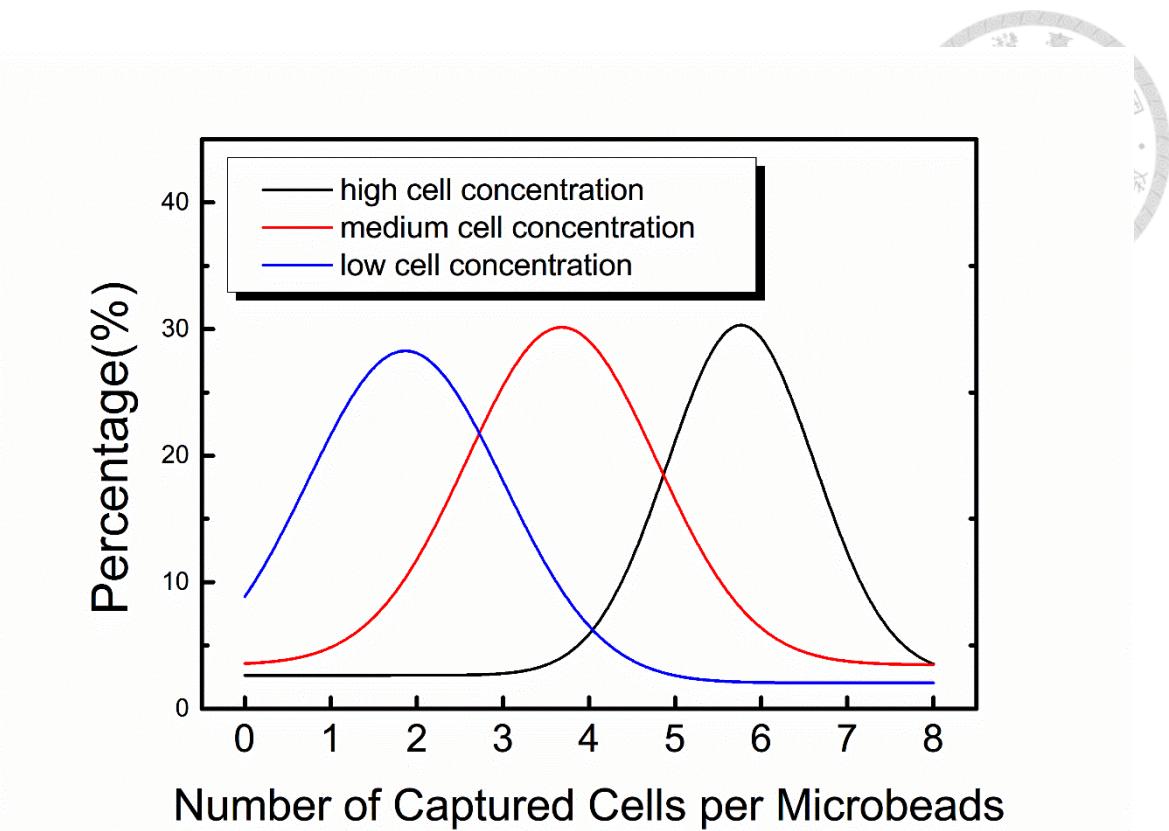


圖 4-3 不同細胞濃度免疫微珠捕捉結果預測圖

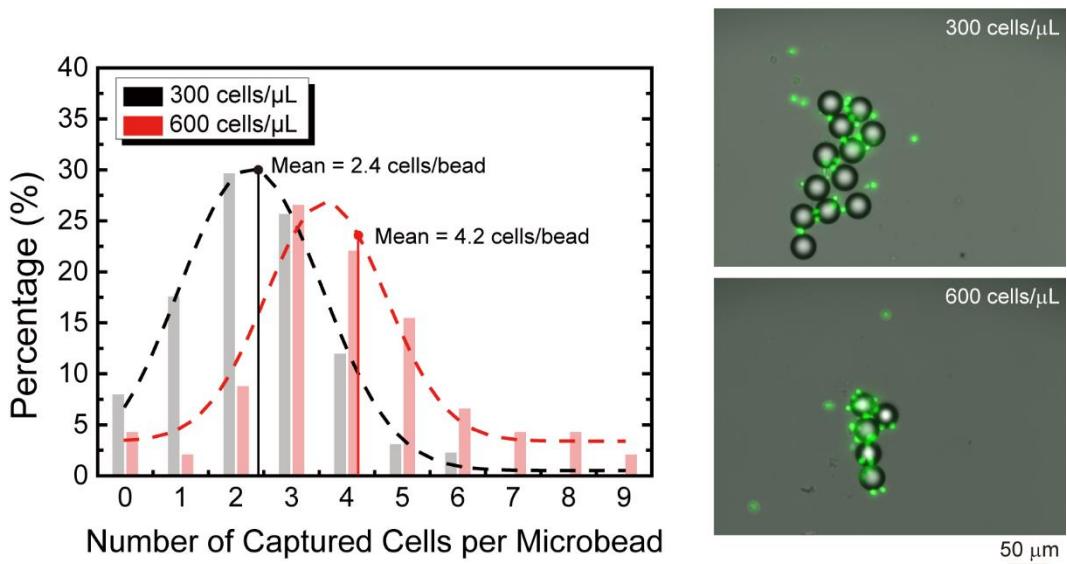


圖 4-4 不同細胞濃度免疫微珠捕捉實際實驗結果

(A)免疫微珠捕捉細胞數目分佈圖 (B)免疫微珠捕捉細胞顯微影像

4.2 微流道製作結果與量測

以微奈米製程將矽晶圓模板製作完成，再經由軟微影製程製作出微流道晶片，如圖 4-5，接著以倒立式螢光顯微鏡拍攝流道細部結構，結果如圖 4-6，第一區

(ZoneA)設計為捕捉聚集在一起的免疫微珠，第二區(ZoneB)則是捕捉單顆的免疫微珠，第三區(ZoneC)則是捕捉細胞的區域，流道厚度經由膜厚儀量測為 $39\mu\text{m}$ ，誤差約為正負 $2\mu\text{m}$ ，另外實際以 CellSens 軟體量測陷阱流道寬度，即圖 4-6 之白圈處，量測結果如圖 4-7，第一區第一排(ZoneA_1)設計為 $60\mu\text{m}$ ，實際量測為 $58.27\mu\text{m}$ ；第一區第二排(ZoneA_2)設計為 $45\mu\text{m}$ ，實際量測為 $43.76\mu\text{m}$ ；第一區第三排(ZoneA_3)設計為 $30\mu\text{m}$ ，實際量測為 $30.64\mu\text{m}$ ；第二區設計為 $20\mu\text{m}$ ，實際量測為 $19.03\mu\text{m}$ ；第三區設計為 $9\mu\text{m}$ ，實際量測結果為 $9.89\mu\text{m}$ 。就結果而言，流道製作的結果與設計非常接近，誤差小於 10% ，且陣列之間非常均勻，異質性不大因此預期能夠依造設計的方式，分別捕捉大小不同的粒子。

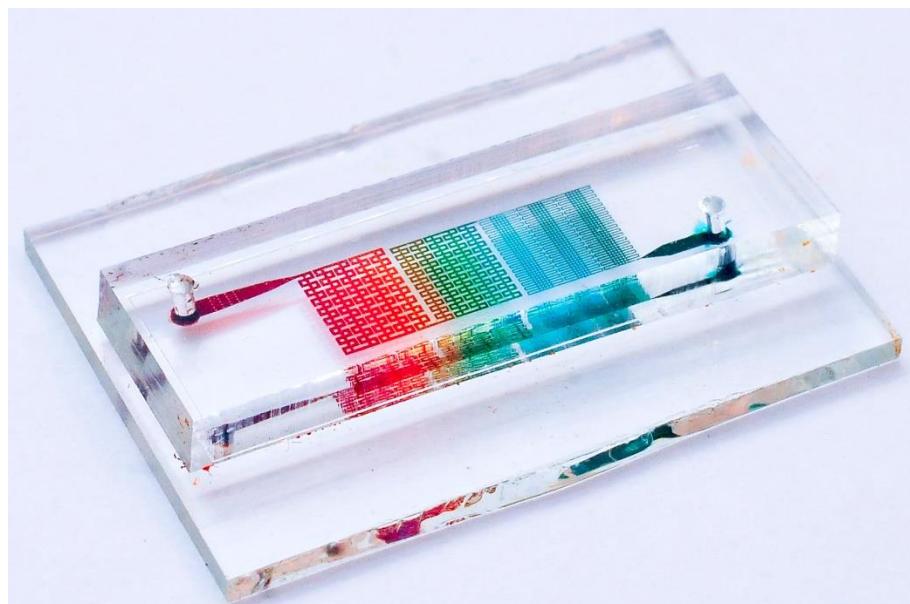


圖 4-5 微流道製作結果

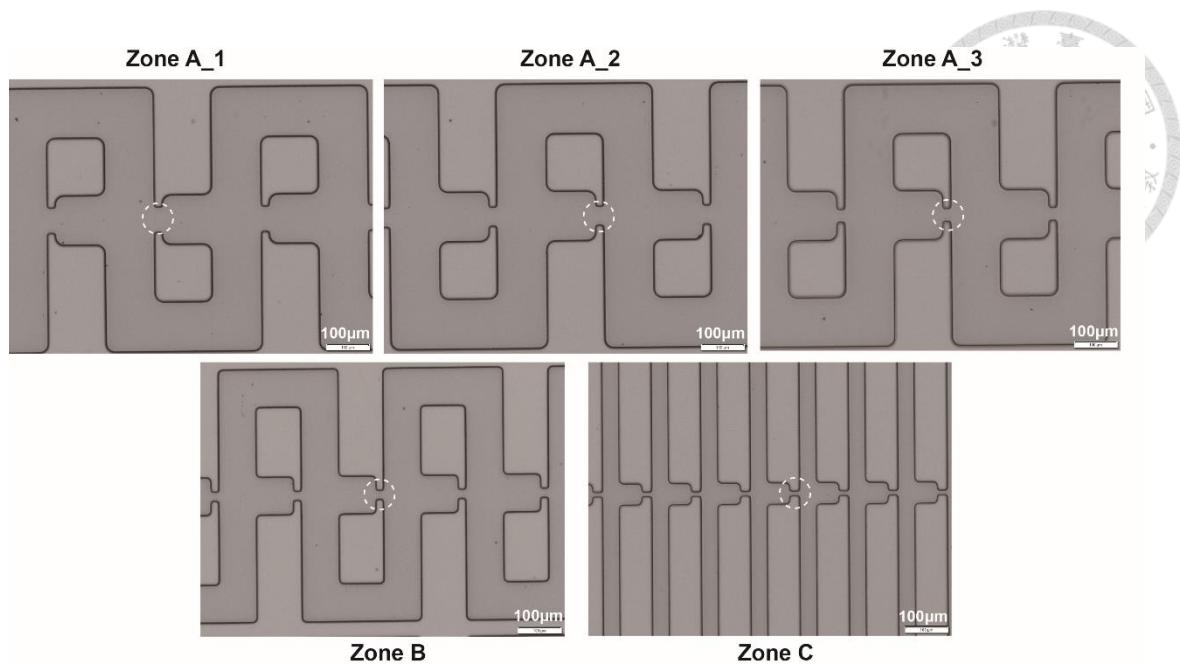


圖 4-6 流體動力學式微流道顯微影像

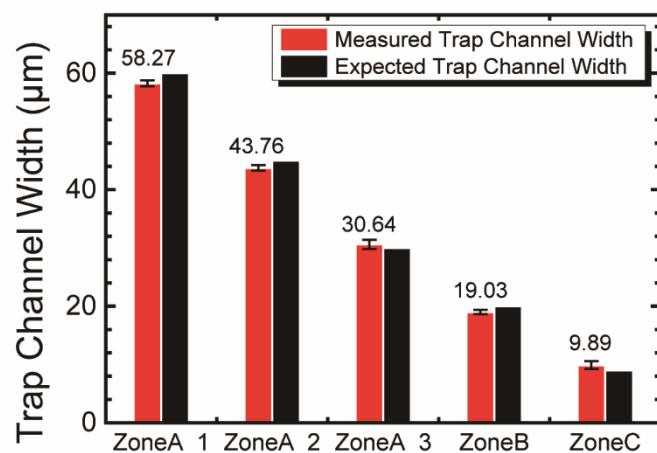


圖 4-7 陷阱流道寬度量測

4.3 螢光珠及免疫微珠微流道捕捉及分離實驗

本實驗目的是以微流道分離並捕捉不同大小的粒子，以驗證微流道晶片實際捕捉粒子的能力，並最佳化各項流體參數。本實驗以螢光珠模擬白血球細胞，與免疫微珠樣本成為混合樣本，螢光珠濃度為 $80\text{ 頭}/\mu\text{L}$ 、免疫微珠濃度為 $15\text{ 頭}/\mu\text{L}$ ，在實驗中以顯微鏡觀測，發現混合樣本中的免疫微珠，在流速 $1\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下，由實驗影片中得知，免疫微珠皆被捕獲於流道的第一區及第二區，沒有流入第三區或是流出流道出口，捕獲率為 100%，且由實驗影像得知，所有的陷阱皆捕獲單一的免疫微珠，而所有的螢光珠也都被捕捉於微流道中，沒有流失，並且有 93.5% 在第三區被捕捉。在整個晶片中，由於流道高度是 $39\mu\text{m}$ ，而螢光珠只有 $14.8\mu\text{m}$ ，因此在第三區的陷阱中，會有兩顆螢光珠上下交疊堵住陷阱流道的情形，造成第三區陷阱中單顆螢光珠捕捉率低，但仍然可利用影像處理軟體 ImageJ 分析螢光強度的方式，計算出有多少顆螢光珠同時被一個陷阱所捕捉，如圖 4-8，實際操作方法為調整影像中亮度的門檻值，將單顆螢光珠亮度的最高值設為門檻，高於此門檻的亮點會以紅色顯示，將此紅點定義為兩顆螢光珠，再統計整體數量，計算後發現在已被佔據的陷阱中有 85.3% 的陷阱都具有兩顆的螢光珠，實驗顯微影像如圖 4-9，實驗統計結果如圖 4-10，在此實驗中證實本論文所設計之微流道確實具有分離及捕捉大小不同粒子的能力。

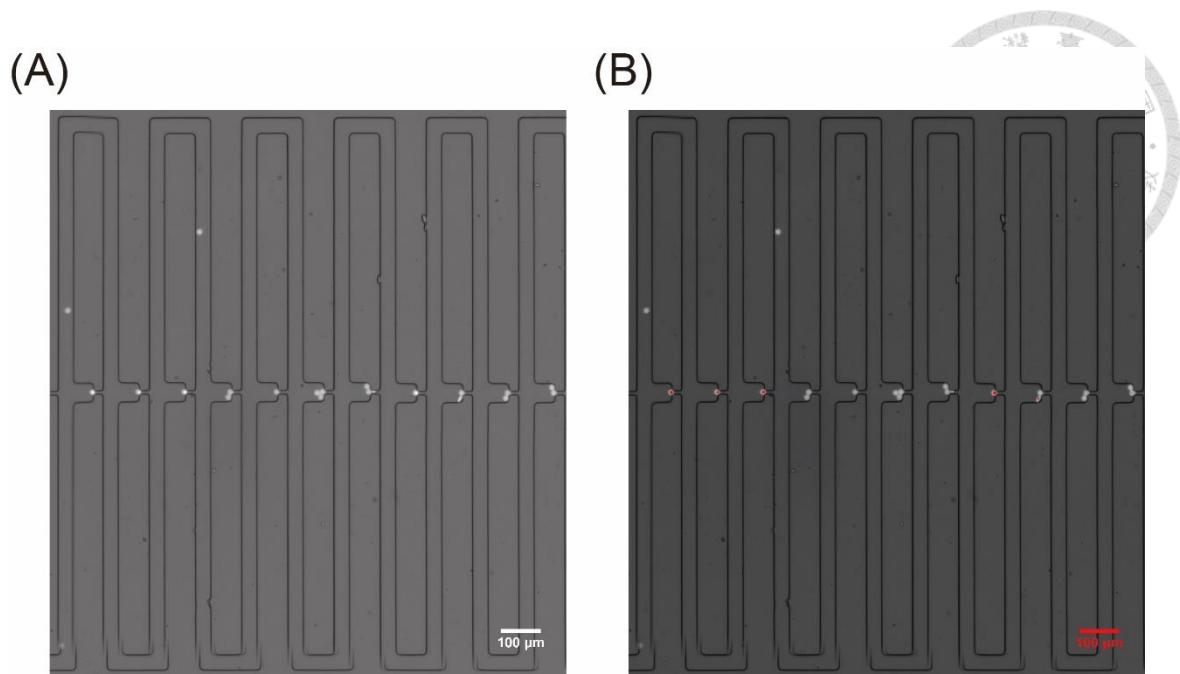


圖 4-8 以 ImageJ 軟體分析螢光珠捕捉數
(A)原始圖片 (B)調整灰階 threshold 值後之圖片

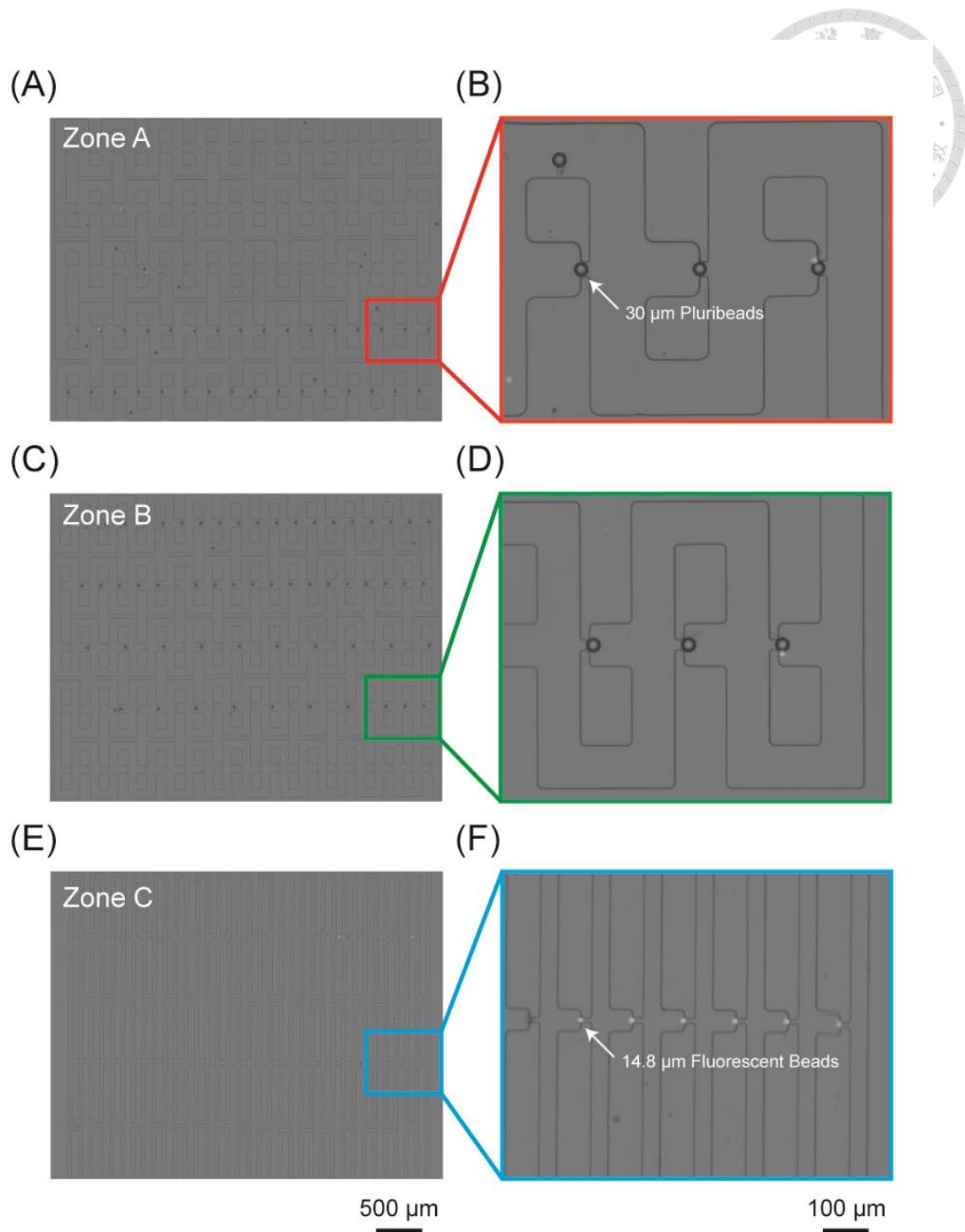


圖 4-9 微流道晶片分離及補捉單顆免疫微珠及螢光珠實驗顯微影像

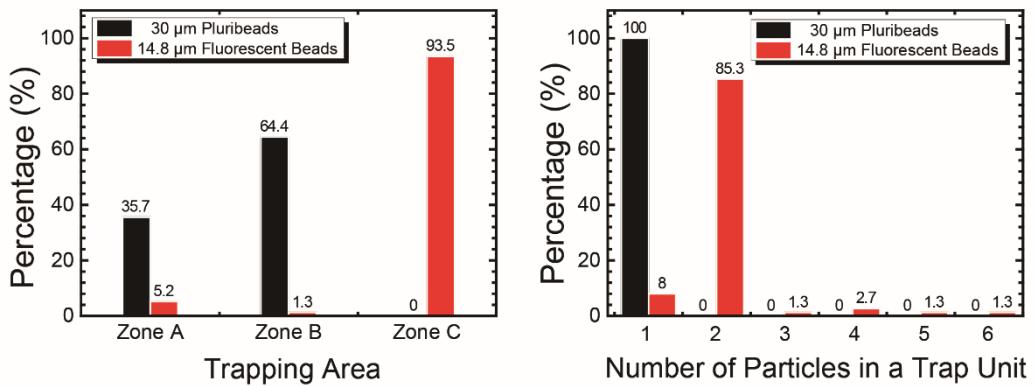


圖 4-10 微流道晶片分離及捕捉單顆免疫微珠及螢光珠實驗結果

(A) 免疫微珠與螢光珠於不同區域捕捉效率圖 (B) 單一陷阱捕捉粒子數目分布圖

4.4 THP-1 細胞及免疫微珠微流道捕捉及分離實驗

4.3 節中證實本論文所設計之流體動力學式微流道可成功分離並捕捉大小不同的粒子，為了證明本微流道能成功捕捉細胞，先以本實驗室有進行培養的 THP-1 細胞為測試樣本，與免疫微珠混合進行微流道捕捉及分離的實驗。THP-1 細胞為人類單核球細胞株，常用於細胞免疫分析實驗，細胞平均直徑為 $11\mu\text{m}$ 。細胞原始濃度約為 $1000\sim6000$ 顆/ μL ，免疫微珠原始濃度為 2500 顆/ μL ，實驗前會預先稀釋樣本，並用細胞計數盤確認稀釋結果，如圖 4-11，THP-1 細胞實驗濃度為 410 顆/ μL ，而免疫微珠實驗濃度則為 100 顆/ μL 。

根據多次實驗測試，發現本論文所設計之微流道在 $1\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下，無法成功捕捉細胞，細胞會因為變形作用而擠過陷阱通道，造成細胞流失，造成此現象的原因為流道高度為 $39\mu\text{m}$ ，細胞可變形的自由空間很大，因此可以輕易的經由變形作用通過陷阱，甚至在蠕動幫浦最低流速 $0.16\mu\text{L}/\text{min}$ 的情形下，細胞還是無法被捕捉到，僅會在陷阱通道上短暫卡住，再經變形作用通過陷阱，如圖 4-12。最後以注射幫浦在 $0.05\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下操作，細胞才可以穩定的被微流道所捕捉，而免疫微珠則不受流速調整影響，皆可被捕捉於微流道第一區及第二區，如圖 4-13。

在實驗中，總共流入 $1\mu\text{L}$ 的樣本，因此預期約有 100 顆免疫微珠及 410 顆 THP-1 細胞進入微流道，實際上共有 154 顆免疫微珠、 400 顆細胞進入微流道，造成免

免疫微珠濃度提高的原因是免疫微珠具較高的密度，在入口端會發生沉降而使濃度相對提高。實驗結束後，經由顯微影像的記錄，發現共捕捉到 154 顆免疫微珠及 384 顆細胞，因此免疫微珠及細胞補獲率分別為 100% 及 96%，另外發現 THP-1 細胞具有表面蛋白 CD15 的表現性，有大約 54.25% 的細胞與 Anti-CD15 免疫微珠鍵結，實驗結果如圖 4-14，各區的捕捉情形如圖 4-15，最後分析了微流道整體的捕捉及分離效率，結果如圖 4-16，免疫微珠的捕捉分布情形與節 4.3 相近，而單一免疫微珠捕捉率則為 70.45%，造成比率下降的原因為樣本中複數顆免疫微珠同時抓取同一顆 THP-1 細胞，因此在流道中會聚在一起流動，而被捕捉在同一個陷阱中；而 THP-1 捕捉分布情形與節 4.3 中螢光珠的捕捉分布情形差異很大，因為 THP-1 表面具有表面蛋白 CD15 的表現性，因此在第一區及第二區的捕捉率大幅提升。

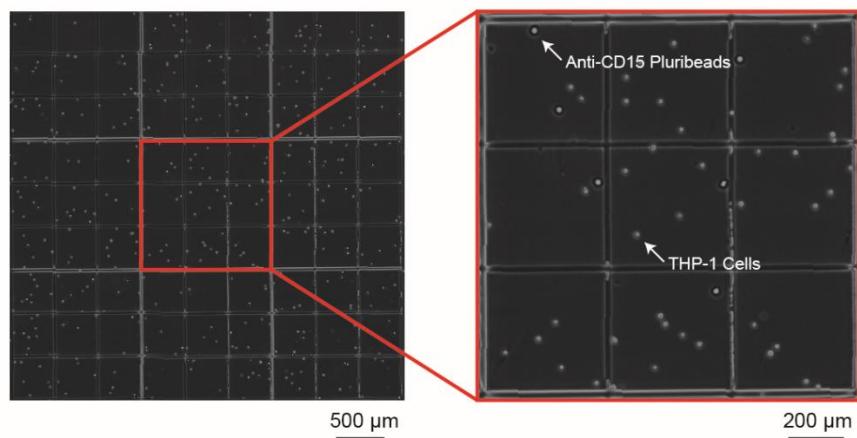


圖 4-11 THP-1 細胞與免疫微珠於細胞計數盤影像

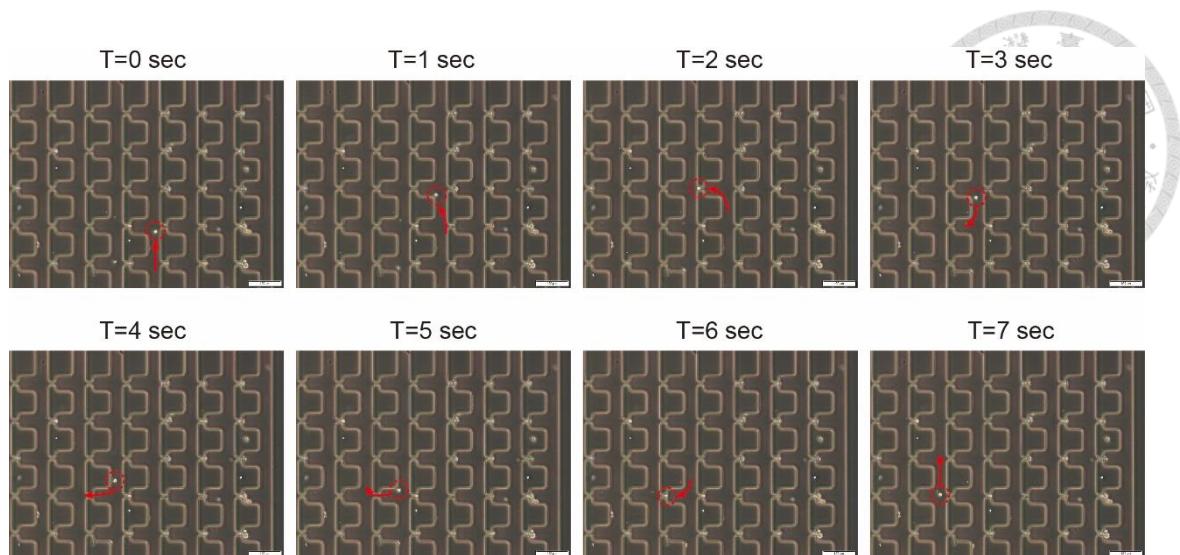


圖 4-12 於 $0.16\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下，細胞流失過程，比例尺 $50\mu\text{m}$

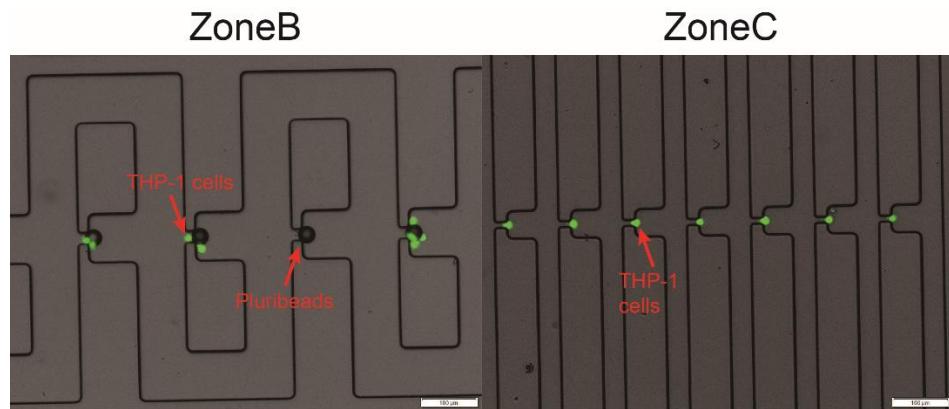


圖 4-13 流體動力學式微流道捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞顯微影像，

比例尺 $100\mu\text{m}$

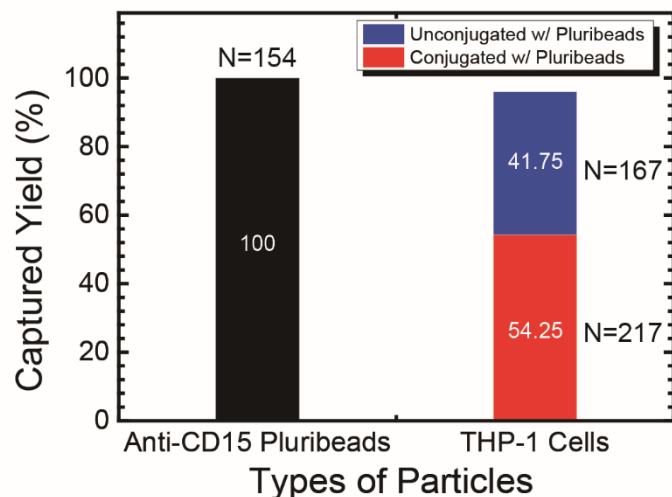


圖 4-14 免疫微珠與 THP-1 細胞捕捉效率圖

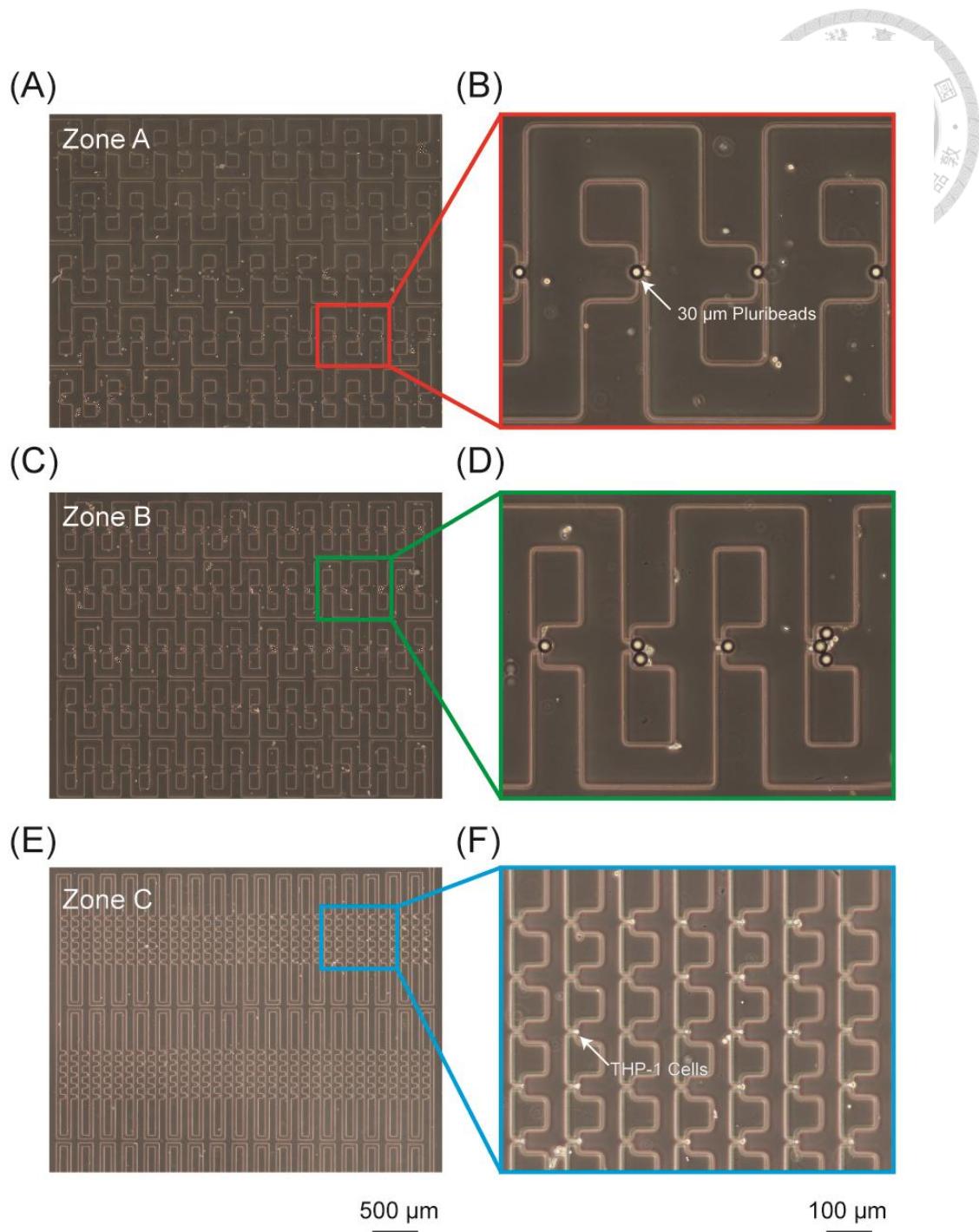


圖 4-15 微流道晶片分離及捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞實驗顯微影像
 (A、B)第一區 (C、D)第二區 (E、F)第三區

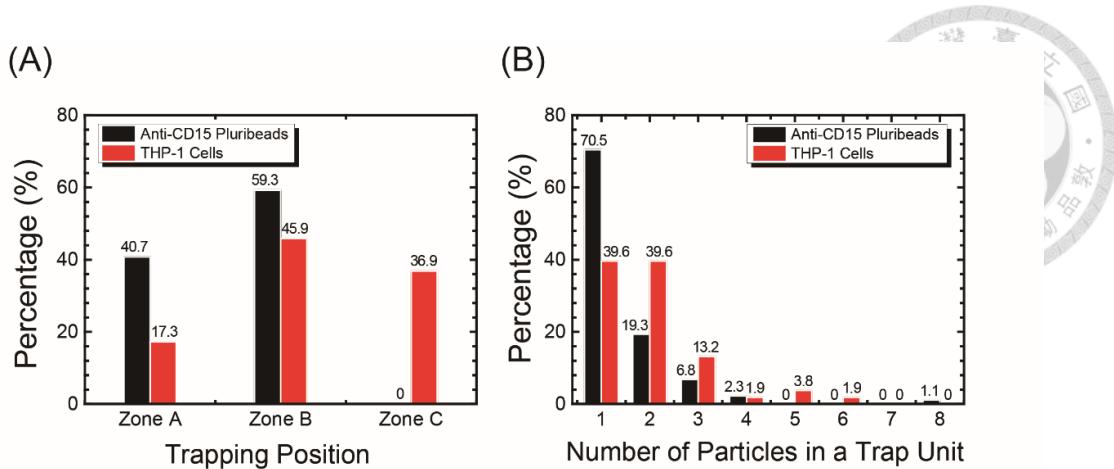


圖 4-16 微流道晶片分離及捕捉免疫微珠及 THP-1 細胞實驗結果

(A) 免疫微珠與 THP-1 細胞於不同區域捕捉效率圖

(B) 單一陷阱捕捉粒子數目分布圖

4.5 真實腹膜透析液白血球捕捉及分離



本節說明實際將已經與免疫微珠進行混合的腹膜透析液樣本通入微流道的結果。根據臺大醫院檢驗科所提供之資料，腹膜透析液細胞初始濃度為 $735 \text{ 頭}/\mu\text{L}$ ，中性球比例為 69%，如圖 4-17，細胞平均半徑為 $10\mu\text{m}$ 。實驗前預先將樣本細胞濃度稀釋至 $140 \text{ 頭}/\mu\text{L}$ ，並以細胞計數盤確認，然後進行免疫微珠與樣本的混合，待混合完成後，將混合樣本滴入細胞計數盤計算未被免疫微珠捕捉之細胞濃度，以此回推被捕捉的細胞比率有多少，如圖 4-18，在本次實驗有 50% 的細胞被免疫微珠所捕捉，本論文中假設這 50% 的細胞都是中性球，因此共有 72.5% 的中性球被免疫微珠抓取。

接著將混合樣本以 $0.16\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速通入晶片，免疫微珠濃度為 $15 \text{ 頭}/\mu\text{L}$ ，實驗中總共流入 $4\mu\text{L}$ 的樣本，因此預期會有 60 頭免疫微珠及 560 頭細胞流入微流道中。根據實驗結果，實際上共有 69 頭免疫微珠進入微流道並被捕捉於第一區及第二區，然而總共只有 252 頭白血球留在微流道內，免疫微珠及白血球的捕獲影像如圖 4-19，代表免疫微珠的捕獲率為 100%，而白血球的捕獲率只有 45%，如圖 4-20 經由實驗影片發現，很多細胞無法在第三區被所設計的陷阱攔截，如圖 4-21，造成此結果的原因已在節 4.4 討論，必須要在未來優化的流道中進行改善。

本論文總共進行了 12 次腹膜透析樣本的實驗，然而因為樣本可拿取時機無法每次皆與實驗進度配合，且並非每次的樣本皆適合進行免疫微珠捕捉中性球實驗，扣除初步尚在最佳化實驗參數的次數，以及失敗的實驗，有效的實驗結果目前共 8 次，實驗樣本資訊的紀錄，以及流式細胞儀所偵測中性球比例與免疫微珠抓取之中性球比例的比較表格如表 4-1，發現每次實驗中若樣本具有不同的初始中性球比例，則免疫微珠對於中性球的捕捉效率不同，如圖 4-22，推測原因為，樣本中的中性球比例不同時，中性球與免疫微珠的接觸機率不同，因此每次實驗的捕捉效率不同，未來將針對免疫微珠與樣本的混合過程進行調整，例如增加混合時間、增加旋轉混合機轉速。雖然以免疫微珠抓取中性球的結果並非完全與流式細胞儀相同，但大致上呈現固定比例的關係，如圖 4-23，因此未來若樣本量足夠，可以實驗結果乘上固定的常數，即可由免疫微珠捕捉細胞數得到中性球比例。

Total nuclear cell count(TNC)	735/ μ L
Sediment-Eosin	0%
Sediment-Lym	16%
Sediment-Mon	15%
Sediment-Neu	69%



圖 4-17 以流式細胞儀檢測之樣本資訊

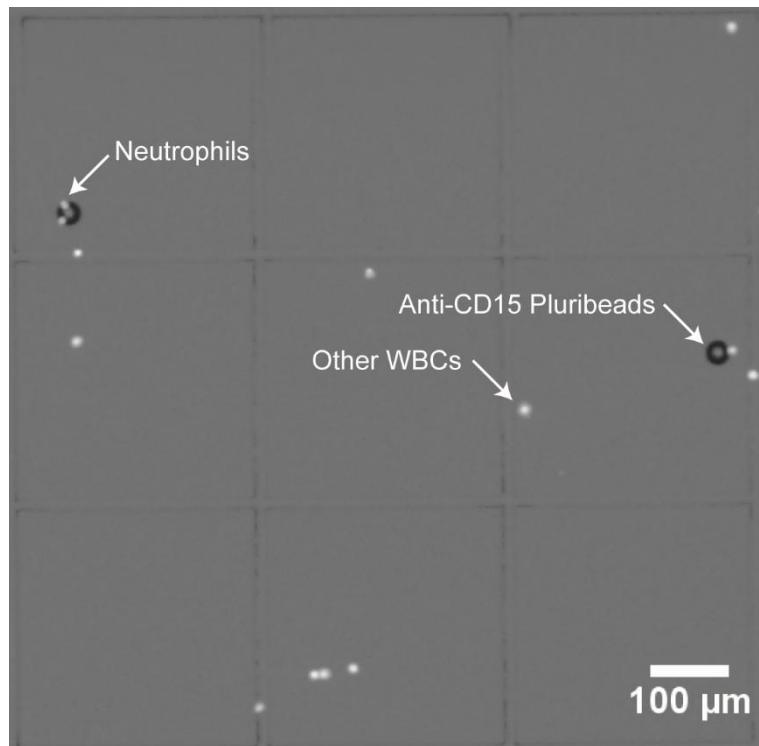


圖 4-18 使用細胞計數盤計算白血球被免疫微珠捕捉率之顯微影像

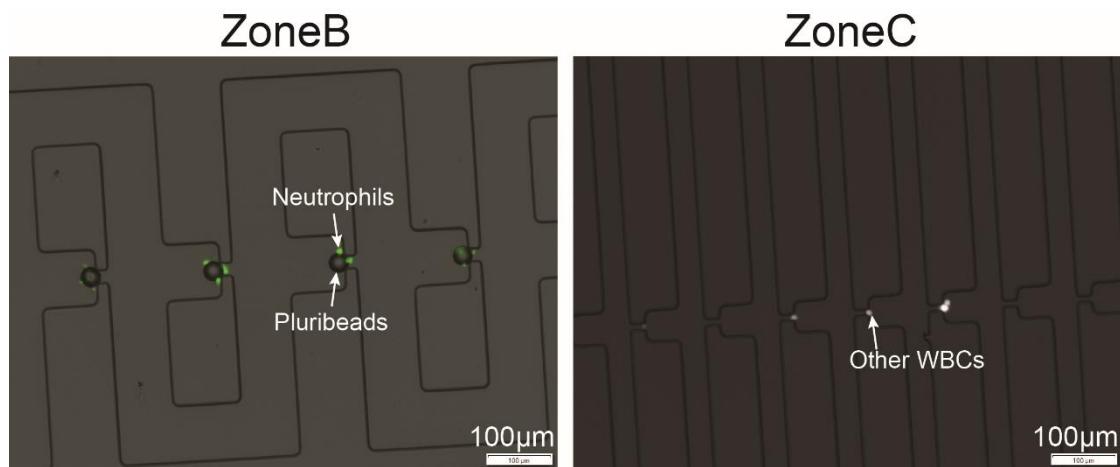


圖 4-19 免疫微珠及白血球捕獲影像

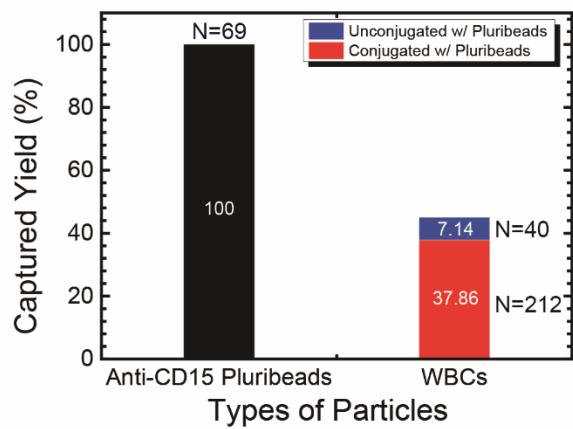
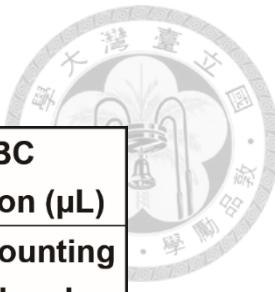


圖 4-20 免疫微珠與白血球捕捉效率圖



圖 4-21 流速 $1\mu\text{L}/\text{min}$ ，細胞流失過程

表 4-1 腹膜透析樣本實驗記錄及比較表



Patients Number	Neutrophils Percentage		Total WBC Concentration (μL)	
	Flow Cytometry	Captured by Microbeads	Flow Cytometry	Counting Chamber
Patients 1	96%	74.03%	2567	
Patients 2	85%	61.88%	341	
Patients 3	95%	80.18%	1517	
Patients 4	90%	76.59%	6395	
Patients 5	98%	70.77%	3792	
Patients 6	95%	92.60%	4166	
Patients 7	69%	48.75%	735	
Patients 8	53%	23.50%	15273	11700

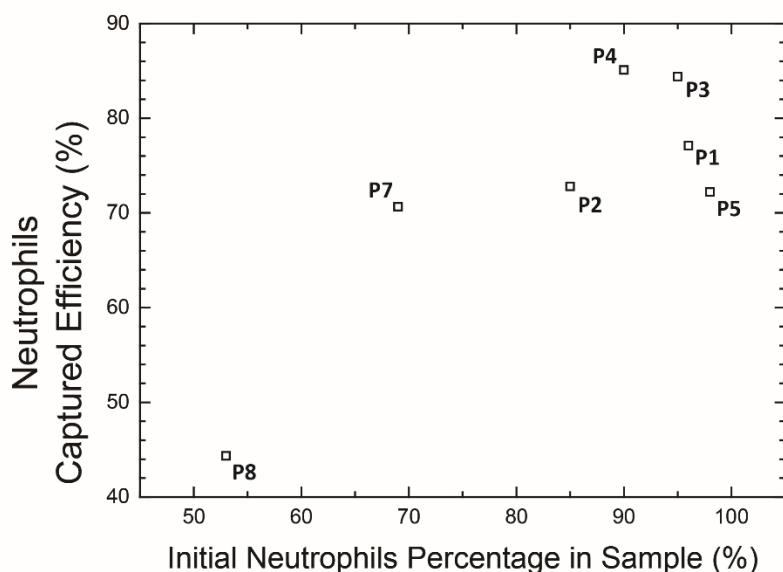


圖 4-22 中性球初始濃度對免疫微珠抓取結果之影響



Neutrophils Percentage Comparison

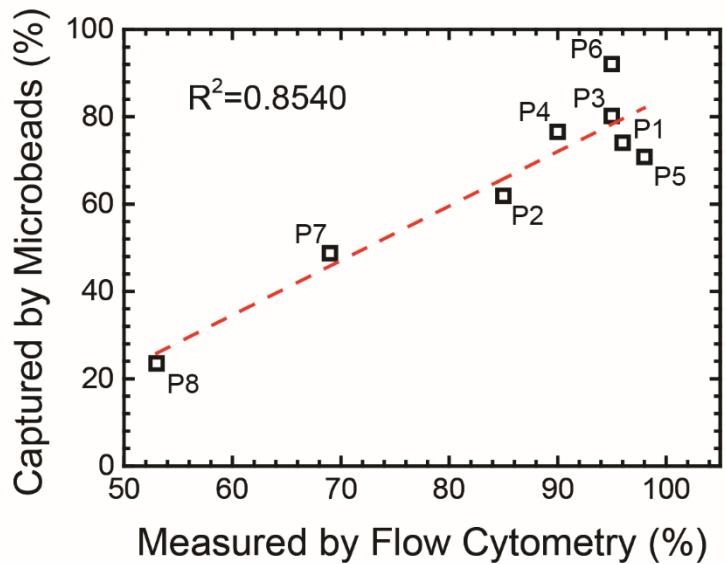


圖 4-23 流式細胞儀偵測與免疫微珠抓取中性球比例關係圖



Chapter 5 結論與未來展望

5.1 結論

本論文開發流體動力學式微流道，並搭配表面具有專一性抗體的免疫微珠分離並捕捉腹膜透析液中大小不同的白血球，希望能夠藉此開發出一個具有偵測早期腹膜炎的平台。本論文中，以不同的實驗驗證微流道的表現，結果發現目前所選之免疫微珠對於中性球具有 80.18% 的捕捉能力，且微流道可以有效的分離免疫微珠及螢光珠於不同的捕捉區域，並具有 100% 的單一免疫微珠捕捉率，而由於流道厚度為 $39\mu\text{m}$ ，因此在已捕獲螢光珠的陷阱中，則有約 85.3% 捕捉到兩顆的螢光珠。目前成功利用本論文中的微流道，在低流速的情況下，成功分離並捕捉了免疫微珠及 THP-1 細胞，分別具有 100% 及 96% 的捕獲率，分離率也達到 100%。由於流道尺度設計的不完美，細胞捕捉區的流道厚度過高，使細胞能夠產生形變的自由空間很大，造成細胞在高流速的流體中，無法被攔截在陷阱流道，因此目前尚無法成功的達成微流道捕捉及分離腹膜透析液中白血球的結果，但以免疫微珠及細胞直徑較大的 THP-1 細胞樣本所做的實驗，則可以證實若流道設計得宜，將可成功的以此種微流道設計概念搭配適當的免疫微珠的選擇，對具有相似粒子大小的混合樣本，進行捕捉及分離的應用。

本論文所設計之微流道目前雖然無法有效的捕捉腹膜透析液中未與免疫微珠鍵結的其餘白血球，因此還無法直接以微流道實驗結果證實本晶片是否具有偵測腹膜透析液中，不同白血球的比例與數目的能力，但以免疫微珠捕捉中性球的實驗結果可證實，本論文所選擇的免疫微珠，對於腹膜透析液之中性球比例，已具有初步的檢測能力。

5.2 未來展望

本論文目標為利用流體動力學式微流道分離、捕捉免疫微珠與腹膜透析液中之白血球，雖然尚未達成目標，但在分離、捕捉免疫微珠與 THP-1 細胞的實驗上已有初步成功的成果，以下將就未來可改進的部分做說明。

1. 免疫微珠在純中性球的環境下，對於中性球的捕捉率約為 80%，然而當中性球比例減少時，免疫微珠的捕捉率會下降，未來將針對實驗中的參數進行最佳化，例如混合時間、溶液 pH 值、免疫微珠加入體積等，使中性球捕捉率更高。在

本論文中假設免疫微珠捕捉到的細胞都是中性球，然而並未以實驗驗證過，因此需進行實驗確認免疫微珠所抓取的白血球中的中性球比例，即專一性免疫反應實驗，在實驗中會預先將純中性球的樣本進行細胞染色，再加入其他對於CD15表現性低的白血球，最後與免疫微珠混合，並記錄其抓取的細胞中有染色的比例，即可得到結果。另外在本論文中，計算有被免疫微珠所抓取的細胞數目時，無法計算位於免疫微珠背面之細胞，此為其中一項誤差來源，未來將確認有多少的比例的球面積是我們無法觀測到，再以此數據校正實際的細胞捕捉數目。

2. 第三區陷阱流道的寬度在光罩上設計為 $9\mu\text{m}$ ，實際上量測為 $9.89\mu\text{m}$ ，而流道高度為 $39\mu\text{m}$ ，造成細胞有很大的空間可以變形而通過陷阱，因此只有低流速時可以成功捕捉細胞，未來必須調整陷阱流道的長寬設計，才能在合理的樣本檢測體積，成功的捕捉到細胞，目前規劃將流道的第三區細胞捕捉區的流道高度設計調整為 $7\mu\text{m}$ ，寬度調整為 $6\mu\text{m}$ ，並調整流道長度使陷阱流道流阻還是能低於主流到流阻，以此設計將可使細胞可變形的自由空間減少，預期將可成功捕捉細胞。未來將以新的流道設計，進行原先規劃的實驗進行驗證，希望能夠開發出一個真正能應用在臨床上的微流道裝置。
3. 目前免疫微珠捕捉細胞的過程是在實驗室的環境下完成，且尚需受過訓練之人員操作，未來希望能夠達成定點照護的應用，需要簡化樣本前處理的手續，在晶片中自動化地完成樣本的稀釋、免疫微珠與細胞的混合，使整體過程皆能夠在微流道中完成，並減少人為誤差。具體實現方式為下：利用微混合器、微幫浦、微反應槽將腹膜透析液與免疫微珠在流道中進行混合，如圖 5-1 即為以上述方式自動化完成磁珠與目標細胞的混合之實例[36]，由於微流道的擴散長度短，因此以此設計將可縮短整體操作時間，使系統更符合定點照護的應用。

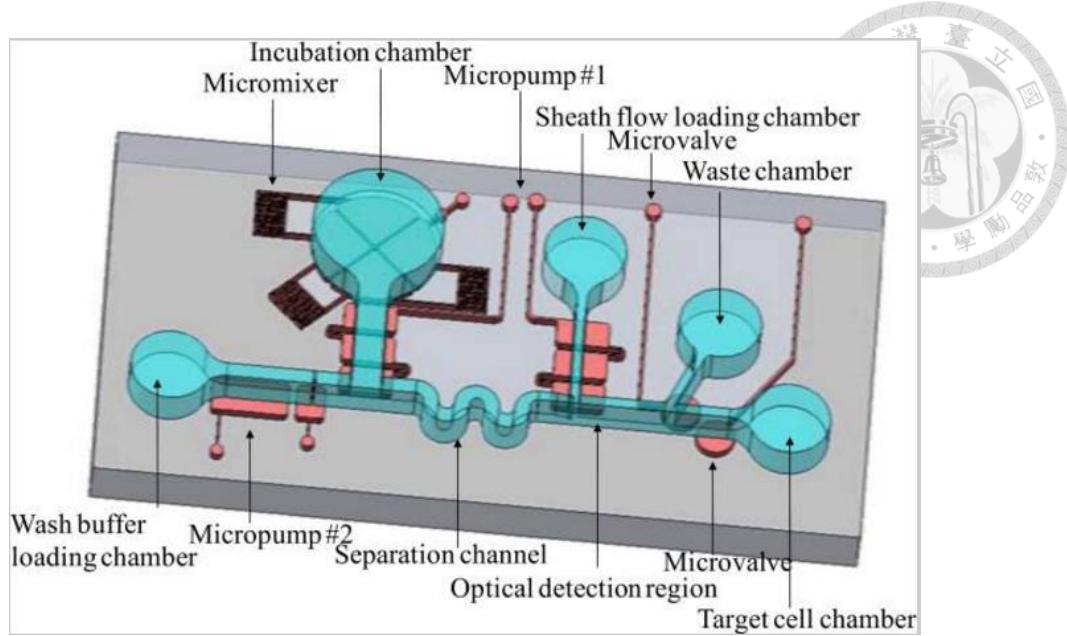
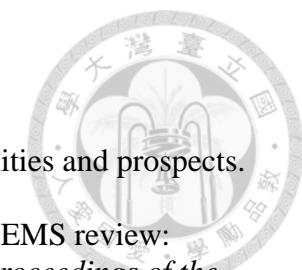
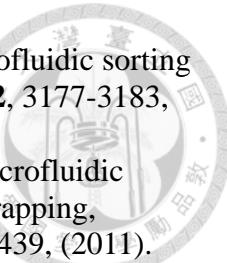


圖 5-1 以微幫浦、微混合器、微反應槽完成樣本混合前處理步驟實例[36]

參考文獻

- 
- [1] Bashir, R. BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Advanced drug delivery reviews* **56**, 1565-1586, (2004).
 - [2] Grayson, A. C. R., Shawgo, R. S. & Johnson, A. M. A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proceedings of the IEEE* **92**, 6-21, (2004).
 - [3] Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab on a Chip* **7**, 41-57, (2007).
 - [4] Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. & Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society reviews* **39**, 1153-1182, (2010).
 - [5] Culbertson, C. T. & Mickleburgh, T. G. Micro total analysis systems: Fundamental advances and biological applications. *Analytical chemistry* **86**, 95-118, (2013).
 - [6] Kovarik, M. L., Ornoff, D. M., Melvin, A. T. & Dobes, N. C. Micro total analysis systems: fundamental advances and applications in the laboratory, clinic, and field. *Analytical chemistry* **85**, 451-472, (2012).
 - [7] Vilkner, T., Janasek, D. & Manz, A. Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical chemistry* **76**, 3373-3386, (2004).
 - [8] Chow, K. *et al.* Predictive value of dialysate cell counts in peritonitis complicating peritoneal dialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **1**, 768-773, (2006).
 - [9] Johnson, D. W., Wiggins, K. J. & Armstrong, K. A. Elevated white cell count at commencement of peritoneal dialysis predicts overall and cardiac mortality. *Kidney international*, (2005).
 - [10] Kofteridis, D. P., Valachis, A., Perakis, K. & Maraki, S. Peritoneal dialysis-associated peritonitis: clinical features and predictors of outcome. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, e489-e493, (2010).
 - [11] Lin, C. Y., Roberts, G. W. & Kift-Morgan, A. Pathogen-specific local immune fingerprints diagnose bacterial infection in peritoneal dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 2002-2009, (2013).
 - [12] Daugirdas, J. T., Blake, P. G. & Ing, T. S. *Handbook of dialysis*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
 - [13] Iv, S. C. W., Reyes, C. D. & López, G. P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a Chip* **15**, 1230-1249, (2015).
 - [14] Sajeesh, P. & Sen, A. K. Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review. *Microfluidics and nanofluidics* **17**, 1-52, (2014).
 - [15] Rusconi, R., Garren, M. & Stocker, R. Microfluidics expanding the frontiers of microbial ecology. *Annual review of biophysics* **43**, 65, (2014).
 - [16] Ahmed, D., Mao, X., Juluri, B. K. & Huang, T. J. A fast microfluidic mixer based on acoustically driven sidewall-trapped microbubbles. *Microfluidics and Nanofluidics* **7**, 727-731, (2009).
 - [17] Mao, X., Juluri, B. K., Lapsley, M. I., Stratton, Z. S. & Huang, T. J. Milliseconds microfluidic chaotic bubble mixer. *Microfluidics and Nanofluidics* **8**, 139-144, (2010).
 - [18] Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373, (2006).



- [19] Landenberger, B., Höfemann, H., Wadle, S. & Rohrbach, A. Microfluidic sorting of arbitrary cells with dynamic optical tweezers. *Lab on a Chip* **12**, 3177-3183, (2012).
- [20] Werner, M., Merenda, F., Piguet, J., Salathe, R.-P. & Vogel, H. Microfluidic array cytometer based on refractive optical tweezers for parallel trapping, imaging and sorting of individual cells. *Lab on a Chip* **11**, 2432-2439, (2011).
- [21] Wang, M. M. *et al.* Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature biotechnology* **23**, 83-87, (2005).
- [22] Jonáš, A. & Zemanek, P. Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *Electrophoresis* **29**, 4813-4851, (2008).
- [23] Cheng, I.-F., Chang, H.-C., Hou, D. & Chang, H.-C. An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting. *Biomicrofluidics* **1**, 021503, (2007).
- [24] Hu, X. *et al.* Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15757-15761, (2005).
- [25] Xia, N. *et al.* Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. *Biomedical Microdevices* **8**, 299-308, (2006).
- [26] Pamme, N. & Wilhelm, C. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab on a Chip* **6**, 974-980, (2006).
- [27] Evander, M. *et al.* Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays. *Analytical chemistry* **79**, 2984-2991, (2007).
- [28] Rettig, J. R. & Folch, A. Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays. *Analytical chemistry* **77**, 5628-5634, (2005).
- [29] Huang, L. R., Cox, E. C., Austin, R. H. & Sturm, J. C. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science* **304**, 987-990, (2004).
- [30] Carlo, D., Wu, L. Y. & Lee, L. P. Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* **6**, 1445-1449, (2006).
- [31] Zheng, S. *et al.* Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of chromatography A* **1162**, 154-161, (2007).
- [32] Tan, W.-H. H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1146-1151, (2007).
- [33] Kim, J., Erath, J., Rodriguez, A. & Yang, C. A high-efficiency microfluidic device for size-selective trapping and sorting. *Lab on a Chip* **14**, 2480-2490, (2014).
- [34] Yung, C. W., Fiering, J., Mueller, A. J. & Ingber, D. E. Micromagnetic-microfluidic blood cleansing device. *Lab on a Chip* **9**, 1171-1177, (2009).
- [35] Kuijpers, T. *et al.* Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* **78**, 1105-1111, (1991).
- [36] Wu, H.-W., Hsu, R.-C., Lin, C.-C., Hwang, S.-M. & Lee, G.-B. An integrated microfluidic system for isolation, counting, and sorting of hematopoietic stem cells. *Biomicrofluidics* **4**, 024112, (2010).

