

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物機電工程學系

碩士論文

Department of Biomechatronic Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis



雷射直寫微流道晶片製程於肝臟細胞分選之研究

Laser Direct Writing on Microfluidic Chip Processing
for Liver Cell Sorting

吳典鴻

Dian-Hong Wu

指導教授：丁健芳 博士

Advisor: Chien-Fang Ding, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July 2024

致謝



時光飛逝，轉眼間兩年的碩士生涯也即將結束了，首先誠摯的感謝指導教授丁健芳教授的悉心指導，在這兩年間不時的與我討論並且指點我論文的方向，此外，也非常感謝侯詠德教授、廖英志教授和許聿翔教授於百忙之中，細心審閱並指正我的論文，並且提供寶貴的建議。另外，非常感謝侯詠德教授提供我實驗室的資源，讓我能夠順利地做實驗。

在這兩年的日子裡受到了許多人的幫忙，非常感謝泳亨的幫忙，沒有泳亨提供實驗上的幫助，我一定沒有辦法完成碩士論文。謝謝邦彬哥、弘霖哥以及評堅哥的幫助，讓我在修課的過程遇到問題時，能夠提供我解答與幫助，使我順利拿到學分不被當掉。謝謝楊翼哥抽空幫忙量測實驗樣品，讓我碩士論文能夠順利進行，感謝張宇哥都會帶一些零食到實驗室，謝謝詠森哥都會帶我去吃好吃的餐廳，陪我聊天解悶，謝謝峰哥幫我記錄口試委員的建議，並指導我簡報如何修改，也要謝謝柔均姐幫忙處理實驗室的事物，使我能更心無旁騖的專注在論文上，最後也要謝謝實驗室的開心果亮禎，總是能夠想出一些無厘頭的笑話或是奇怪的模仿讓實驗室的大家哈哈大笑，因為有了亮禎才讓實驗室的氣氛和樂融融。

最後，我要感謝我親愛的家人以及朋友，因為有你們一路上的支持與鼓勵，我才能夠在求學的階段上無後顧之憂，能夠專心一致的完成實驗以及論文，非常謝謝家人們無所求的付出。

吳典鴻 謹識

于國立台灣大學生物機電工程學系

民國 113 年 07 月

摘要



本研究利用 CO₂ 雷射於聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 基板上進行微加工製造微流道，使用 CO₂ 雷射進行微加工有製造成本低以及加工時間快速等優點，而使用聚甲基丙烯酸甲酯作為微流道的材料則是因為該聚合物具有一定的耐化學性、熱穩定性、生物相容性以及可以媲美玻璃的光學性能，並且與其他材料相比還有重量輕、成本低廉、易於製造優勢，最重要的是聚甲基丙烯酸甲酯對 CO₂ 雷射有相當高的吸收率，因此，非常適合使用 CO₂ 雷射加工。

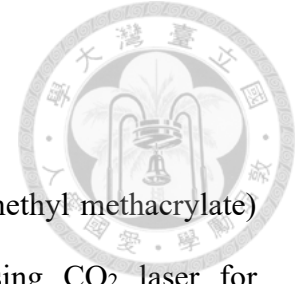
實驗過程中探討了各項雷射參數，包含雷射功率、掃描速度以及掃描間距對微流道之影響，發現雷射功率越大，寬度及深度也會隨之增加；掃描速度的增加，寬度及深度則是會減少，這是因為雷射掃描速度愈快，代表施加在聚甲基丙烯酸甲酯基板上的能量就會越少；增加掃描間距則會使寬度及深度減少。根據雷射共軛焦顯微鏡觀察到的結果，CO₂ 雷射所雕刻出的微流道的寬度與深度分別為 $484.55 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 以及 $139.09 \pm 5.6 \mu\text{m}$ ，橫截面形狀呈現類似梯形。

本研究所使用的微流道裝置，在 2、3 以及 4 mL/min 之流量下分離效率都大於 80%，而 5 mL/min 的流量下分離效率僅 74.6%，使用流量參數為 4 mL/min，成熟肝細胞分離效率可達 87.2%，因此，本研究最佳流量參數為 4 mL/min。

進行細胞培養時，使用微流道裝置分離所培養之成熟肝細胞，於第 3 天時可以觀察到生長出肝細胞之型態，並針對所培養之成熟肝細胞進行肝機能測試，在尿素分析的實驗中，發現微流道裝置分離所培養的成熟肝細胞與經過正常離心處理的成熟肝細胞之尿素濃度，具有相同的趨勢，在第 3 天時尿素濃度最高，到第 5 天時下降，並且兩者之間並無太大區別，證明了使用本研究的微流道裝置之可行性。

關鍵字：CO₂ 雷射、微流道、聚甲基丙烯酸甲酯、成熟肝細胞

Abstract



In this study, microfluidic channels were fabricated on poly(methyl methacrylate) (PMMA) substrates using a CO₂ laser. The advantages of using CO₂ laser for micromachining include low fabrication cost and fast processing time, and the use of PMMA as the material for the microfluidic channels is due to the polymer's chemical resistance, thermal stability, biocompatibility, and optical properties comparable to those of glass, as well as light weight, low cost, and ease of fabrication compared to other materials. Compared with other materials, the polymer is also lightweight, low cost, easy to manufacture, and most importantly, the poly(methyl methacrylate) has a very high absorption rate of CO₂ lasers, making it very suitable for CO₂ laser processing.

The experiment investigated the effects of laser power, scanning speed, and scanning distance on the microfluidic channels. Higher laser power resulted in wider and deeper channels, while increasing scanning speed and distance reduced these dimensions. The average channel width and depth were $484.55 \pm 6.6 \mu\text{m}$ and $139.09 \pm 5.6 \mu\text{m}$, respectively, with a trapezoidal cross-section.

The microfluidic device showed a separation efficiency greater than 80% at flow rates of 2, 3, and 4 mL/min, but only 74.6% at 5 mL/min. The optimal flow rate was 4 mL/min, achieving a separation efficiency of 87.2% for mature hepatocytes.

In the Urea assay experiment, the urea concentration of mature liver cells cultured in the microfluidic device followed the same trend as those cultured by normal centrifugation, peaking on day 3 and decreasing by day 5, demonstrating the device's feasibility.

Keywords: CO₂ laser 、 microfluidic 、 poly(methyl methacrylate) 、 mature hepatocyte

目次



致謝	i
摘要	ii
Abstract.....	iii
目次	iv
圖次	vii
表次	x
第 1 章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究目的	2
1.3 研究架構	3
第 2 章 文獻回顧	4
2.1 微流道製造方法	4
2.1.1 機械切削	4
2.1.2 濕蝕刻(Wet etching)	5
2.1.3 乾蝕刻(Dry etching)	5
2.1.4 紫外線雷射	6
2.1.5 紅外線雷射	7
2.1.6 短脈衝及超短脈衝雷射	7
2.2 聚甲基丙烯酸甲酯黏合	9
2.2.1 熱黏合 (Thermal bonding).....	9
2.2.2 溶劑黏合 (Solvent bonding)	9
2.2.3 微波黏合 (Microwave bonding)	10



2.3 主動式分離	11
2.3.1 介電泳 (Dielectrophoresis)	11
2.3.2 磁泳 (Magnetophoresis)	12
2.3.3 光陷阱 (Optical trapping)	13
2.3.4 表面聲波駐波 (Standing surface acoustic wave)	14
2.4 被動式分離	16
2.4.1 確定性橫向位移 (Deterministic lateral displacement).....	16
2.4.2 夾流分級 (Pinched flow fractionation).....	18
2.4.3 慣性微流體 (Inertial microfluidics).....	19
2.4.4 螺旋流道設計原理	26
2.5 小節	27
第 3 章 材料與方法	28
3.1 微流道製備	28
3.2 實驗設備	30
3.2.1 雷射打標機	30
3.2.2 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)基板	31
3.2.3 注射幫浦	33
3.3 細胞來源、實驗藥品、耗材與儀器設備	34
3.3.1 細胞來源	34
3.3.2 實驗藥品	34
3.3.3 儀器設備	34
3.3.4 實驗耗材	34
3.4 膠原蛋白修飾培養皿	35
3.5 分析方法	36
3.5.1 雷射共軛焦顯微鏡	36
3.5.2 自動細胞計數儀	38

第 4 章 實驗結果與討論	39
4.1 雷射參數對微流道之影響	39
4.1.1 雷射功率對流道之影響	39
4.1.2 雷射掃描速度對微流道之影響	41
4.1.3 掃描間距對微流道之影響	43
4.1.4 微流道之表面形貌	45
4.2 液體洩漏測試	48
4.3 分離效率	50
4.4 處理時間比較	55
4.5 成熟肝細胞形貌	56
4.6 尿素分析 (Urea assay)	59
第 5 章 結論與未來展望	60
5.1 結論	60
5.2 未來展望	61
參考文獻	62



圖次



圖 2-1 微通道的深度不一致.....	4
圖 2-2 濕蝕刻示意圖.....	5
圖 2-3 乾蝕刻分類示意圖.....	6
圖 2-4 乾蝕刻示意圖.....	6
圖 2-5 溶劑輔助黏合過程.....	9
圖 2-6 使用微波與輔助溶劑黏合之示意圖.....	10
圖 2-7 介電泳過程之概念圖.....	12
圖 2-8 Multitarget magnetic activated cell sorter (MT-MACS)的工作原理示意圖....	13
圖 2-9 活細胞與死細胞經由流體流動時，活細胞會被光陷阱所捕獲而改變原有的移動軌跡；死細胞不會被捕獲而是保持原有的移動軌跡不變.....	14
圖 2-10 Standing surface acoustic waves 的工作原理示意圖.....	15
圖 2-11 tilted-angle standing surface acoustic waves 工作示意圖。2 μm 與 10 μm 的聚苯乙烯顆粒之分離過程，其中，壓力節點線與流線方向成 30 度角.....	15
圖 2-12 該裝置具有一個收縮-膨脹陣列以及由微柱組成的 DLD 微流道裝置。粒子會先在收縮-膨脹陣列聚焦之後再進一步分離中小顆粒.....	17
圖 2-13 Pinched flow fractionation 工作原理示意圖.....	18
圖 2-14 粒子於不同橫截面之微流道之平衡位置示意圖.....	19
圖 2-15 微流道裝置示意圖。該裝置由蛇行微流道與 2 個擴展區域組成.....	20
圖 2-16 微流道裝置示意圖。該裝置由 2 個鋸齒狀微流道組合而成.....	20
圖 2-17 依尺寸大小不同分離 1.9 μm 與 7.32 μm 之顆粒.....	22
圖 2-18 依據 F_L/F_D 將不同大小顆粒分離.....	22
圖 2-19 依據 Rf 將不同大小顆粒分離.....	23
圖 2-20 梯形螺旋微流道示意圖.....	24
圖 2-21 使用灰階方法雕刻梯形微流道.....	24

圖 2-22 多重螺旋微流道裝置示意圖.....	25
圖 3-1 微流道裝置製作過程.....	29
圖 3-2 微流道圖案.....	29
圖 3-3 雷射源.....	30
圖 3-4 振鏡頭.....	30
圖 3-5 聚甲基丙烯酸甲酯基板.....	32
圖 3-6 注射幫浦.....	33
圖 3-7 雷射共軛焦顯微鏡.....	36
圖 3-8 Countess II FL Automated Cell Counter	38
圖 4-1 依不同雷射功率雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 雷射功率分別為 1.24、2.36、 3.53 以及 4.69 W	39
圖 4-2 雷射功率與微流道寬度之關係.....	40
圖 4-3 雷射功率與微流道深度之關係.....	40
圖 4-4 依不同掃描速度雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 掃描速度分別為 150、200、 250 以及 300 mm/s	41
圖 4-5 雷射掃描速度與微流道寬度之關係.....	42
圖 4-6 雷射掃描速度與微流道深度之關係.....	42
圖 4-7 依不同掃描間距雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 掃描間距分別為 0.06、0.08、 0.10 以及 0.12 mm.....	43
圖 4-8 雷射掃描間距與微流道寬度之關係.....	44
圖 4-9 雷射掃描間距與微流道深度之關係.....	44
圖 4-10 雷射掃描軌跡示意圖.....	45
圖 4-11 微流道之橫截面輪廓形狀.....	46
圖 4-12 微流道之示意圖。.....	46
圖 4-13 雷射功率與時間之關係圖.....	47
圖 4-14 溶劑黏合 PMMA 洩漏測試.....	48

圖 4-15 雙面膠帶黏合 PMMA 洩漏測試.....	49
圖 4-16 初始微流道設計	50
圖 4-17 改進之微流道設計	52
圖 4-18 初始不同流量下與出口之細胞濃度，其中，內側出口收集了 3 mL，外側 處口收集了 3 mL 的細胞懸浮液.....	54
圖 4-19 改進後不同流量下與出口之細胞濃度其中，內側出口收集了 5 mL，外側 處口收集了 2.5 mL 的細胞懸浮液.....	54
圖 4-20 正常肝臟細胞處理流程圖	55
圖 4-21 細胞培養之高倍率照片。(a)、(b)、(c)為經正常離心程序培養之成熟肝細 胞；(d)、(e)、(f)為使用微流道裝置分離之成熟肝細胞，其中，分別培養 4h、 1 天以及 3 天。	57
圖 4-22 細胞培養之低倍率照片。(a)、(b)、(c)為經正常離心程序培養之成熟肝細 胞；(d)、(e)、(f)為使用微流道裝置分離之成熟肝細胞，其中，分別培養 4h、 1 天以及 3 天。	58
圖 4-23 離心處理前與離心處理後的成熟肝細胞尿素分析.....	59

表次



表 2-1 不同微通道製造方法之優點及缺點.....	8
表 3-1 雷射規格表.....	31
表 3-2 聚甲基丙烯酸甲酯熱物理性質.....	32
表 3-3 雷射共軛焦顯微鏡規格.....	37
表 4-1 微流道之寬度與深度.....	47
表 4-2 初始設計不同出口的成熟肝細胞數量.....	51
表 4-3 初始設計之成熟肝細胞分離效率.....	51
表 4-4 初始設計之迪恩力與慣性升力之大小.....	51
表 4-5 改進後不同出口的成熟肝細胞數量.....	53
表 4-6 改進後之成熟肝細胞分離效率.....	53
表 4-7 改進後迪恩力與慣性升力之大小.....	53

第1章 緒論



1.1 研究背景

微流道 (Microfluidics) 是一種可以處理微小液體體積的技術，通常涉及液體在微米尺度下的流動。這種技術具有廣泛的應用，包括感測器、細胞培養、藥物篩選、藥物輸送等。

在細胞培養方面，微流道技術可以精確控制和操縱細胞或微生物，通過微流道技術，可以在微小的體積內進行細胞培養，這不僅節省了試劑和材料，還提高了實驗的精確度和重複性。

在醫學領域，微流道技術可用於開發快速、低成本的診斷工具。使用血液、尿液或唾液樣本在微流道設備中進行分析，從而快速檢測疾病標誌物、病原體等等。因微流道設備所需的樣品量極小，這對於需要頻繁檢測的患者來說是非常有利的，並且可以減少樣品的收集量和處理時間。

除此之外，微流道還可以應用於細胞分離，主要分為主動式分離和被動式分離兩大類。主動式分離依賴於外部力場（如電場、磁場或聲場）來實現流體和顆粒的分離。這種方法的優點在於可以精確控制分離過程；被動式分離不依賴外部力場，而是通過微流道的結構和流體動力學特性來實現分離。這種方法通常更簡單、成本更低，還不需要外部設備，但在精度方面可能會有所限制。



1.2 研究目的

大鼠肝臟細胞的製備過程中，初始細胞懸浮液需要經過一系列的步驟處理，包括了過濾以及多次離心等步驟，若可以透過簡單的裝置就將成熟肝細胞以及小型肝細胞從細胞懸浮液分離出來，就可以減少肝臟細胞的純化時間。

因此，本研究透過製造一個簡單的微流道裝置，該裝置由 CO₂ 雷射在 PMMA 基板上進行微流道之雕刻，微流道的形狀為螺旋通道，通過注射幫浦將未經過離心處理的肝臟細胞懸浮液注入到該裝置內，藉由改變不同的流量，將不同直徑大小的成熟肝細胞(20 μm)與小型肝細胞(10 μm)分離，並進行細胞培養。最後，觀察培養後的細胞型態和進行肝臟機能的檢測，比較正常程序以及使用微流道分離的細胞之間兩者方法之差異。



1.3 研究架構

本論文共有六章，分為：

第 1 章：緒論，介紹本文的研究背景與目的。

第 2 章：文獻回顧，首先介紹微流道製造的常見方法，接著介紹 PMMA 黏合之方法，最後介紹不同的細胞分離方式，包含了主動式分離與被動式分離之相關文獻。

第 3 章：材料與方法，微流道製備的過程、所使用的儀器設備、實驗藥品等以及分析方法。

第 4 章：實驗結果與討論，探討雷射參數的不同對微流道之影響、細胞的表面形貌和分離效率與相關肝臟機能之表現。

第 5 章：結論與未來展望，針對本研究作出總結，並討論未來可延伸之研究方向。

第2章 文獻回顧



2.1 微流道製造方法

微流道的製作方式相當多元，有機械切削、乾、濕蝕刻以及雷射加工等方式，根據所需可以找出去選擇加工方法，此外，不同的加工方法有著不同的機制並且不同的材料有著不同的物理與化學性質，因此，找出合適的加工方法十分重要。

2.1.1 機械切削

隨著高精密的工具機出現，使用機械切削製造微通道的幾何形狀精度十分的高，還可以處理多種材料，如金屬、聚合物等等，與光刻技術相比，不需要十分昂貴的設備。但機械切削的缺點也非常明顯，除了加工時間較長之外，刀具也會隨著切削的過程中出現磨損[1]。頂部毛邊受到刀具的切削速度及進給量的影響很大，在低切削速度下，由於應變硬化的速率超過了熱軟化的速率，而應變硬化會使材料很難在微通道邊緣流動，最終導致頂部毛邊寬度增加，進給量增加造成刀具與切屑之間的摩擦力增加也會使頂部毛邊寬度增加[2]。使用複合刀具進行微通道的切割，當刀具堆疊越多理所當然地會增加加工效率，但隨著刀具數量愈多，刀具之間的同心率在不一致的情況下所切割出的微通道的深度也無法統一。如圖 2-1 所示。

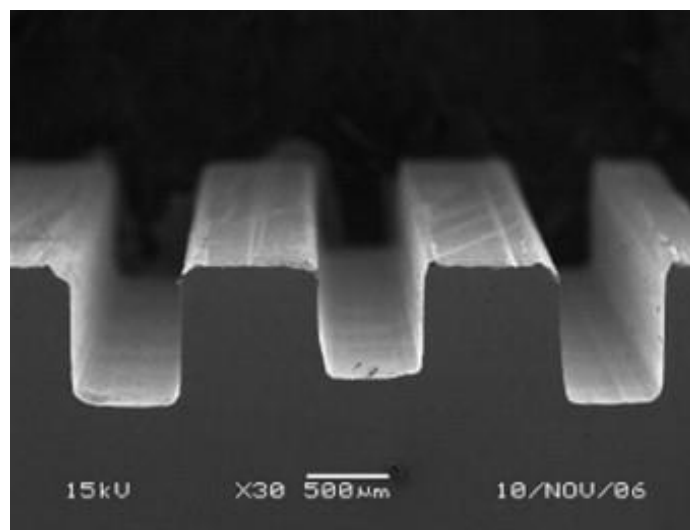


圖 2-1 微通道的深度不一致[3]



2.1.2 濕蝕刻(Wet etching)

濕蝕刻具有良好的選擇性，對於不同的被蝕刻材料能夠找到有效且不會蝕刻其他材料的蝕刻劑，濕蝕刻具有等向性 (Isotropic)，對於結構的幾何形狀有重大影響，除了縱向蝕刻還會造成橫向蝕刻，而導致底切 (Undercut) 的發生，如圖 2-2 所示。無法形成垂直或是接近垂直的側壁，並阻礙了高深寬比的微流道製作。濕蝕刻技術會在玻璃表面形成不平行的壁[4]，隨著通道蝕刻得更深，壁也會被蝕刻。

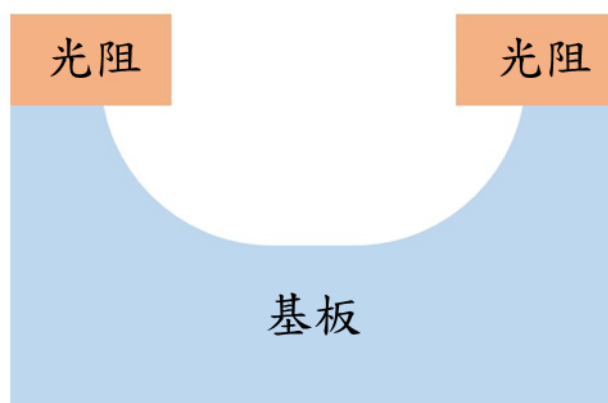


圖 2-2 濕蝕刻示意圖

2.1.3 乾蝕刻(Dry etching)

乾蝕刻通常為一種等離子蝕刻，根據機制的不同，乾蝕刻可分為三大類：1.物理性蝕刻、2.化學性蝕刻、3.物理、化學複合蝕刻，如圖 2-3 所示。乾蝕刻除了不需要蝕刻劑就能夠去除材料，最大的優點在於具有非等向性 (Anisotropic)，因此對於製造垂直的側壁有相當大的優勢，如圖 2-4 所示。但與濕蝕刻相較之下有著較差的選擇性，而且乾蝕刻的加工速度受到低蝕刻速率的限制。Vieillard[5]等人透過磁控濺鍍沉積了 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的鉻作為遮罩，使用六氟化硫/鉻混合物對鈉鈣玻璃 (Soda-lime glass substrate) 進行乾蝕刻，獲得的微流道頂部和底部寬度分別為 $39 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$ 和 $35 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$ 、深度為 $4.5 \pm 0.2\text{ }\mu\text{m}$ ，表面粗糙度約為 50 nm 。

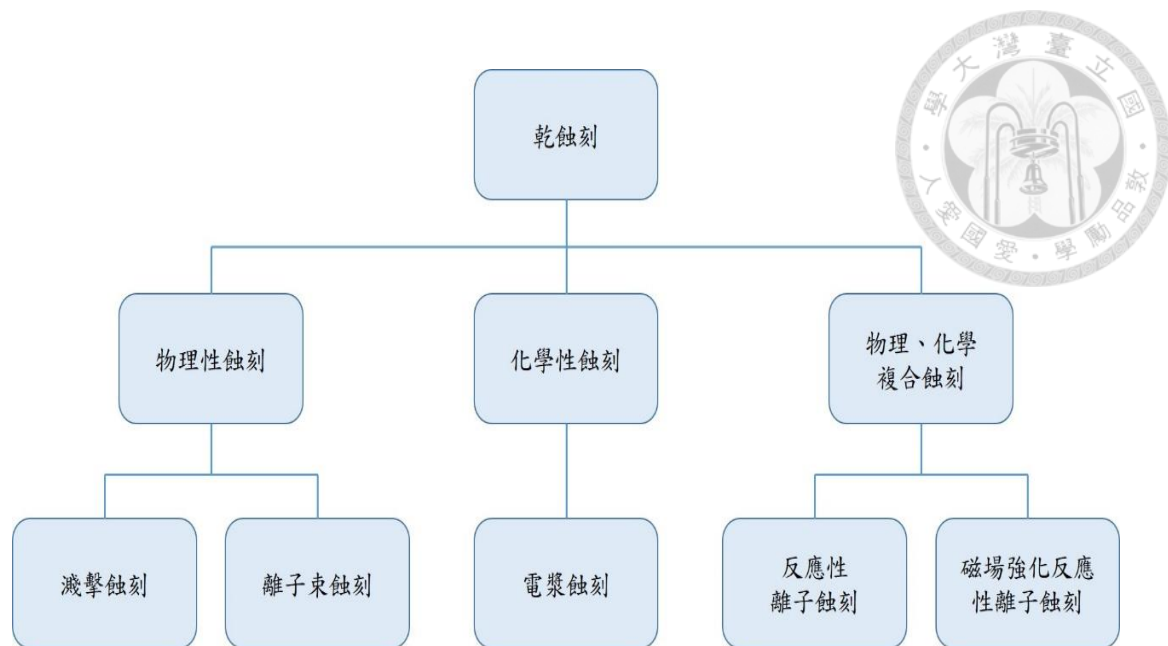


圖 2-3 乾蝕刻分類示意圖[6]

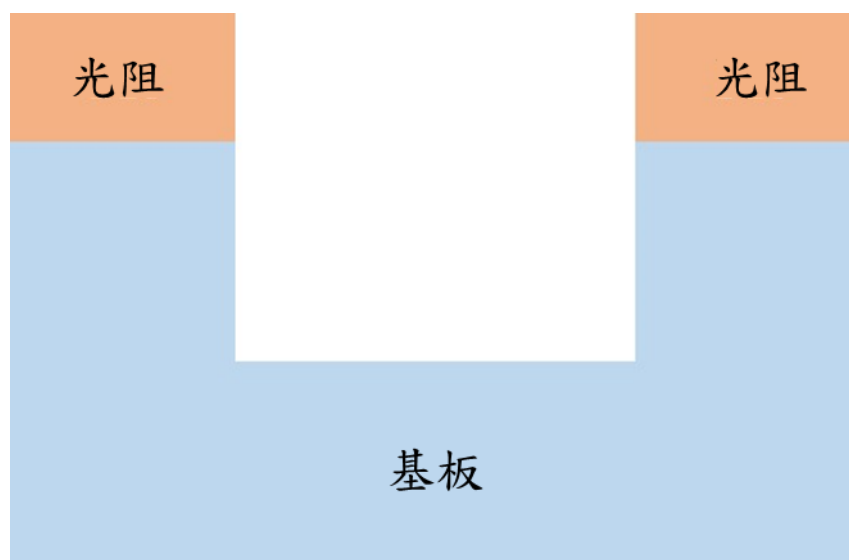


圖 2-4 乾蝕刻示意圖

2.1.4 紫外線雷射

三倍頻 Nd:YAG 雷射(355 nm) 和準分子雷射是最常使用的紫外線雷射。紫外線雷射的光子具有非常高的能量，可以直接破壞材料的化學鍵，因此這種燒蝕方式被稱為為燒蝕光分解(Ablative photodecomposition)[7]。大多聚合物對熱都極為敏感，因此與較高波長的雷射相比紫外線雷射更具有優勢，能夠極大程度的降低熱影響

區 (Heat affected zone, HAZ) 和毛邊，但大多數的情況下聚合物去除的過程是由燒蝕光分解以及熱燒蝕(Thermal ablation)所組成的。Heng[8]等人，利用波長為 248 nm 的準分子雷射在厚度為 1.5 mm 的 PMMA 基板上製作微通道，發現較高的雷射能量密度會導致表面粗糙度變高。Fernández-Pradas[9]等人，使用波長為 355 nm 的 Nd:YAG 雷射在可光結構化的玻璃陶瓷上製造微通道，發現在低脈衝能量下燒蝕，可以獲得兩端具有對稱圓孔的通道；較高的脈衝能量下進行燒蝕，不僅會造成通道不對稱，甚至會直接導致材料損傷。

2.1.5 紅外線雷射

Nd:YAG 雷射與 CO₂ 雷射是較常見的紅外線雷射，兩者波長分別為 1.064 μm 和 10.64 μm ，Nd:YAG 雷射特別適合加工金屬零件，CO₂ 雷射大多用於聚合物以及有機材料上，因為這些材料通常對 CO₂ 雷射有更好的吸收率。Lim[10]等人，使用高亮度二極體泵浦 Nd:YAG 雷射在矽基板上製造微通道，並且能夠在固定的深度下，製造出不同寬度的微通道。D[11]等人，利用 CO₂ 雷射在聚甲基丙烯酸甲酯基板上製造出微流道，深度介於 100 到 300 μm 之間，寬度約 250 μm ，表面粗糙度約 1 至 2 μm 。

2.1.6 短脈衝及超短脈衝雷射

短脈衝及超短脈衝雷射的剝蝕機制是由庫倫爆炸(Coulomb explosion)和熱汽化(Thermal vaporization)機制結合而成的結果，主要由雷射的波長、脈衝時間、脈衝數量決定。當脈衝寬度介於 10 ps 和 10 fs 之間時，就會發生庫倫爆炸，庫倫爆炸是一種溫和的剝蝕方式，可以產生非常精細的表面，並且幾乎沒有熱融化的影響。材料剝蝕的過程中，初期是由庫倫爆炸佔據主導地位，在經過一段時間間隔之後，則是有熱汽化為主，並發現隨著脈衝數量的增加，熱汽化會愈占主導位置。Daniel[12]等人，使用高重複率的奈焦耳飛秒雷射脈衝在聚甲基丙烯酸甲酯基板上製造微通道，因雷射的高重複率對基板底部進行局部加熱，從而得到具有光滑壁的

圓柱通道。表 2-1 為不同微流道製造方法之優缺點。

表 2-1 不同微通道製造方法之優點及缺點

製造方法	優點	缺點
機械切削	表面光潔度好	刀具磨損、產生毛邊
濕蝕刻	能選擇性移除材料	無法製造垂直的側壁
乾蝕刻	能製造垂直的側壁	加工速度受到限制
紫外線雷射	製造時間極短	初始投資高
紅外線雷射	幾乎可加工所有聚合物	較高的熱影響區
短脈衝及超短脈衝雷射	熱影響區可忽略不計	初始投資高



2.2 聚甲基丙烯酸甲酯黏合

2.2.1 熱黏合 (Thermal bonding)

在熱黏合過程中，PMMA 會被加熱到接近或超過材料的玻璃化轉變溫度(Glass transition temperature, T_g)，並同時施加壓力以增加接觸面之間的壓力。在高溫和壓力的作用下能使上下界面緊密接觸，最終黏合在一起。在理想下，這種黏合強度可與材料本身強度相當[13]。

2.2.2 溶劑黏合 (Solvent bonding)

Bamshad[14]等人提出一種溶劑輔助的方式改善 PMMA-PMMA 之間的黏合強度，如圖 2-5 所示，該研究使用了異丙醇 (IPA)當作輔助溶劑，發現使用 70% 濃度的異丙醇，可以使 PMMA-PMMA 在 68°C 下進行黏合，並且所需時間極短只需要 15 min，經由實驗測得其黏合強度為 28.47 MPa。使用該方法最大的優點在於只需要長尾夾以及烤箱就可以進行 PMMA-PMMA 的黏合，該過程成本低廉還不需要昂貴的儀器。

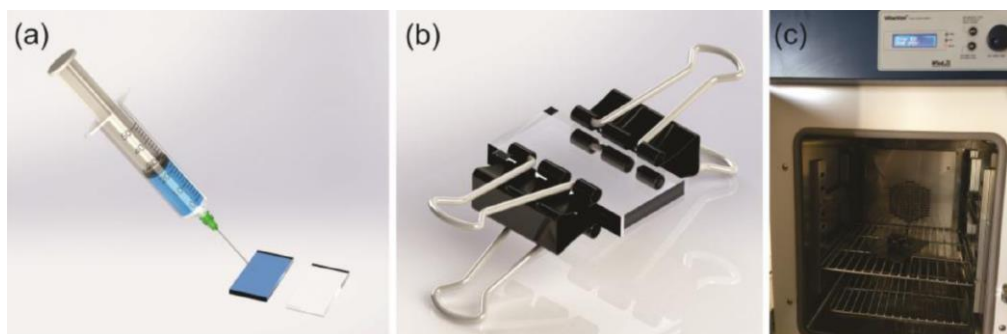


圖 2-5 溶劑輔助黏合過程[14]

2.2.3 微波黏合 (Microwave bonding)

在微波輻射過程，有機溶劑會吸收微波的能量並選擇性地加熱界面處有機溶劑。這種透過微波進行的局部加熱還可以有效地加速有機溶劑擴散並使聚合物鏈互鎖形成鍵結。Tsao[15]等人，使用 75%濃度的丙酮作為輔助溶劑，並使用 C 型夾施加壓力，放進商用微波爐進行黏合，其鍵結強度約 2.77 MPa。如圖 2-6 所示。

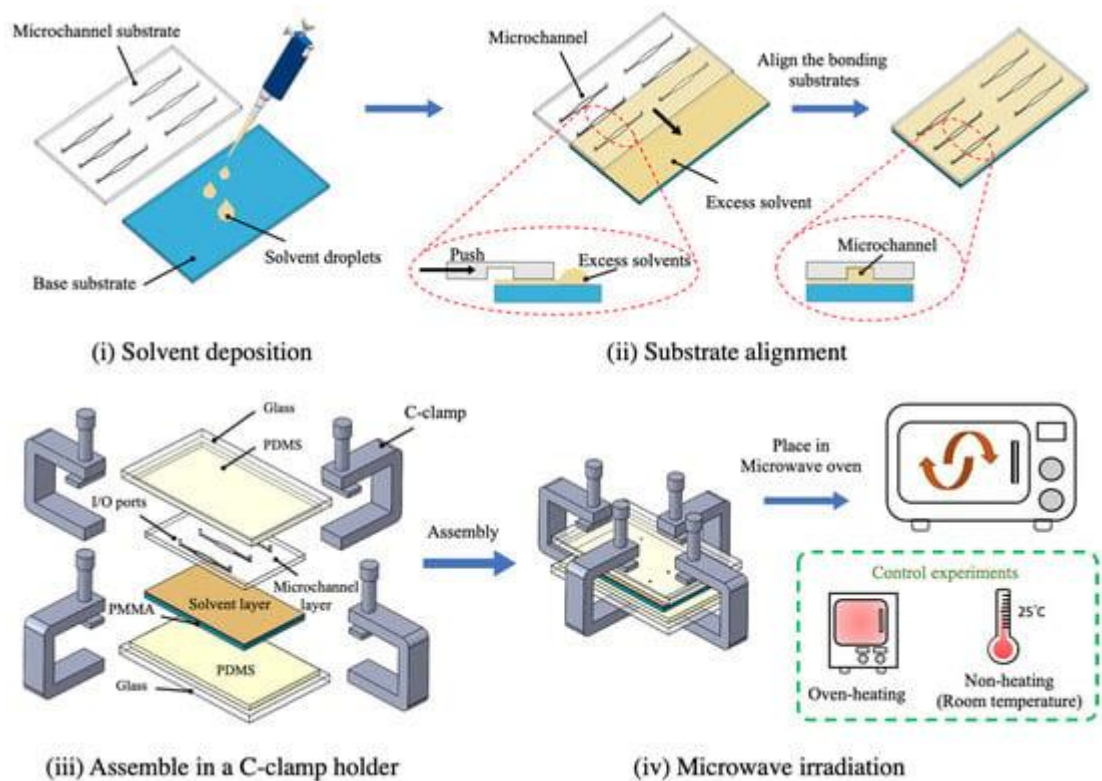


圖 2-6 使用微波與輔助溶劑黏合之示意圖[15]



2.3 主動式分離

主動式分離方法是利用外部力量來分離微流體中的不同的大小的粒子，這些力量可以是電場、磁場、聲波或光學力。這些方法通常通過改變流體中的粒子或細胞的運動軌跡來實現分離。具體技術包括電泳、磁分離、聲學分離和光學分離等。這些技術的優點包括高精確度以及可控性，適用於各種生物醫學應用。

2.3.1 介電泳 (Dielectrophoresis)

介電泳 (Dielectrophoresis) 的工作原理是利用細胞處於在非均勻電場時，界面上會感應出電荷，導致沿電場方向產生極化。如果電場是均勻的，兩端的靜電力相等，因此不會產生淨運動；然而，如果電場在空間上是不均勻的，細胞兩側所受的力將不同，這樣 DEP 力會導致細胞發生平移運動。當細胞的電極化率大於懸浮介質的電極化率時，DEP 力會與電場梯度的方向相同，細胞會移動到強電場區域，稱為正介電泳(pDEP)；相反地，當細胞的電極化率小於懸浮介質的電極化率時，DEP 力的方向與電場梯度相反使細胞會移動到弱電場區域，稱為負介電泳(nDEP)。Doh[16]等人將三個平面電極放置在微流體下方，正 DEP 細胞會從兩側的出口 1 進行收集，負的 DEP 細胞則會保持在中央流線，並在出口 2 進行分離，藉此分選出死酵母細胞和活酵母細胞，如圖 2-7 所示，作者以 0.1~1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 範圍內的不同流速對酵母菌細胞混合物進行連續分離，活酵母細胞和死酵母細胞的純度分別為 95.9 至 97.3 %和 64.5 至 74.3%。

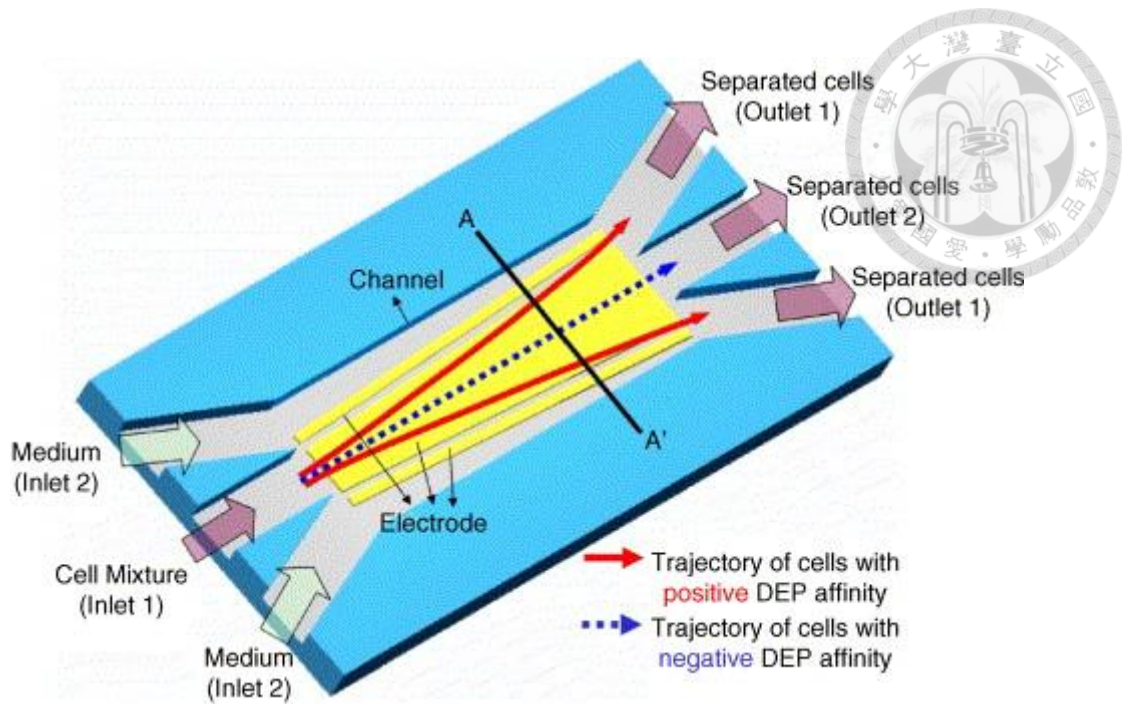


圖 2-7 介電泳過程之概念圖[16]

2.3.2 磁泳 (Magnetophoresis)

磁泳 (Magnetophoresis) 是一種利用磁性顆粒和磁場來分離和純化特定細胞的方法。首先，將攜帶磁性顆粒的抗體與樣本中的目標細胞表面抗原特異性結合，使這些細胞攜帶磁性顆粒，變成磁性細胞。然後將樣本混合物放入磁性分選裝置中，該裝置具有強磁場，磁場會吸引並捕捉帶有磁性顆粒的目標細胞，而未被標記的非目標細胞因為不帶有磁性顆粒，所以會在繼續隨著流體前進至出口收集，最後，通過移除或改變磁場，釋放並收集帶有磁性顆粒的目標細胞。如此一來便可以將目標細胞成功地從原始樣本中分離和純化。Adams [17] 等人所製作出的微流體裝置包含了 2 個微製造的鐵磁條 (Microfabricated ferromagnetic strip, MFS)，用來使目標細胞發生偏轉方便後續收集，如圖 2-8 所示。在這些樣品包含了具有不同磁性標記的目標細胞分別為 Tag1 和 Tag2 以及無標記的細胞 non-target，當混合樣品經過 MFS1 時，Tag1 會發生偏轉並從 Outlet1 離開進行收集，而 Tag2 和 non-target 則不受影響繼續前進，當到達 MFS2 時，Tag2 會發生偏轉並從 Outlet2 離開進行收集，non-target 細胞繼續隨著流體前進並經由 Waste outlet 離開，透過這樣的方式將混合樣

品分離並純化。在他們的這項工作當中，該裝置的吞吐量可以在每小時分選出 10^9 個被標記的細胞，並且在低濃度的目標細胞(<0.4%)中所分選出來的純度也能夠大於 90%。

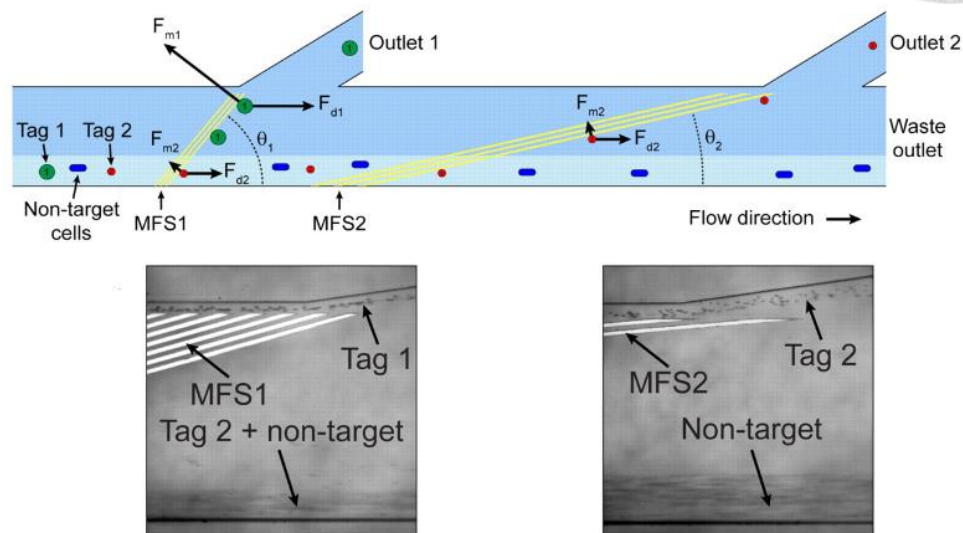


圖 2-8 Multitarget magnetic activated cell sorter (MT-MACS)的工作原理示意圖[17]

2.3.3 光陷阱 (Optical trapping)

光陷阱(Optical trapping)可以操縱奈米和微米尺寸等微小粒子的技術。該基本原理是當高強度聚焦的雷射光束聚焦到微小的粒子時，光的電磁場會與粒子相互作用，從而產生兩種力分別為梯度力(Gradient force)以及散射力(Scattering force)，梯度力主要是作用是將微小粒子拉向雷射光束的焦點，使其停留在光束中心；散射力則會將微小粒子推離光源。光陷阱需要在聚焦雷射光束的邊界內接近每個細胞，這阻礙了該技術在高通量細胞分離中的應用，但是與微流體裝置做結合，可以有效解決這問題，透過微流道所產生的鞘流，可以將樣品細胞排成一排，再通過細胞的形態、大小、光吸收和折射率等因素，就可以分離以及提純細胞，使用這項方法分選細胞最大的優點在於這是非接觸式的分選，可以大大減少對細胞的傷害，並且可以精確的捕獲移動的單個細胞，使其沿著預設的軌跡移動，如圖 2-9 所示，經 Masaya Murata[18]等人的實驗結果發現，使用 3W 的雷射在 $1.99 \times 10^{-2} \mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下所收集到的活細胞純度為 100%、回收率是 81.8%。

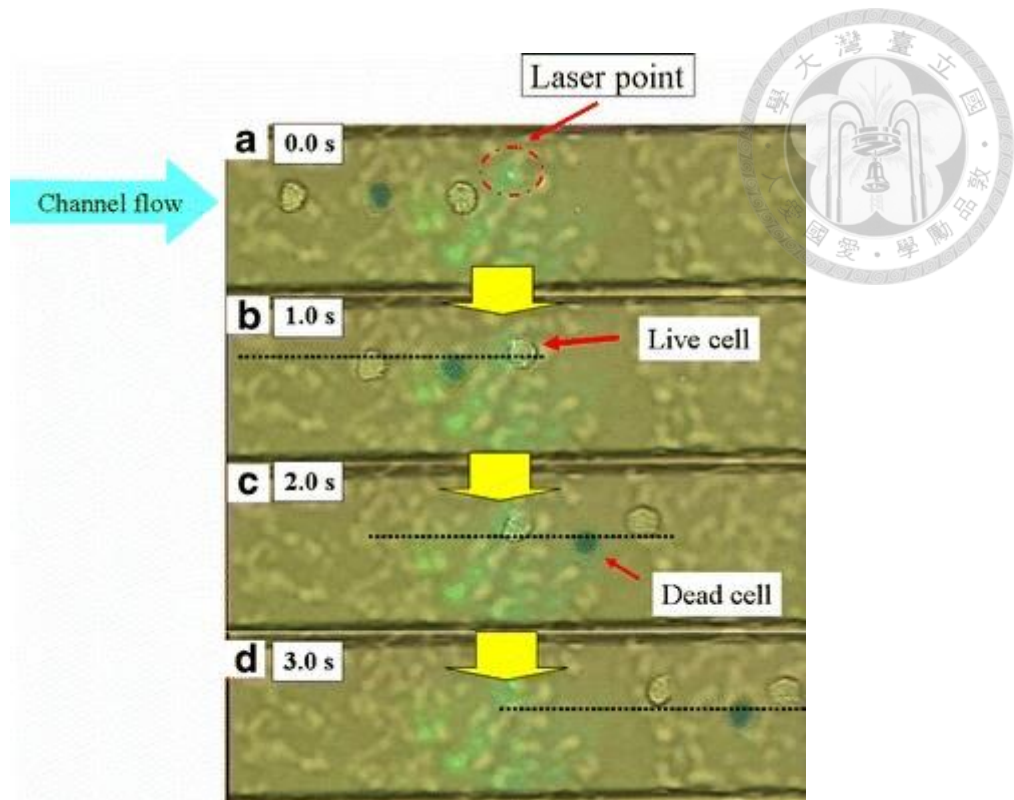


圖 2-9 活細胞與死細胞經由流體流動時，活細胞會被光陷阱所捕獲而改變原有的移動軌跡；死細胞不會被捕獲而是保持原有的移動軌跡不變[18]

2.3.4 表面聲波駐波 (Standing surface acoustic wave)

在使用表面聲波駐波(Standing surface acoustic wave, SSAW)的微流體裝置中，顆粒會受到 4 種力的作用，分別為橫向聲力、黏滯力，重力以及浮力，其中，重力和浮力幾乎是保持平衡，顆粒主要會受到橫向聲力和黏滯力的影響而移動。因為聲力與顆粒的體積(r^3)成正比，黏滯力與顆粒的半徑(r)成正比，因此，較大的顆粒會更容易受到聲力的影響，由圖 2-10 可以看到，樣品在位置 1 時因鞘流的原因，混合顆粒保持在通道兩側，隨著進入 SSAW 的工作區域到位置 2 時，因為聲力的作用，大顆粒會保持在通道中心；小顆粒則會在通道兩側，基於顆粒大小尺寸的不同將混合顆粒分選出來。

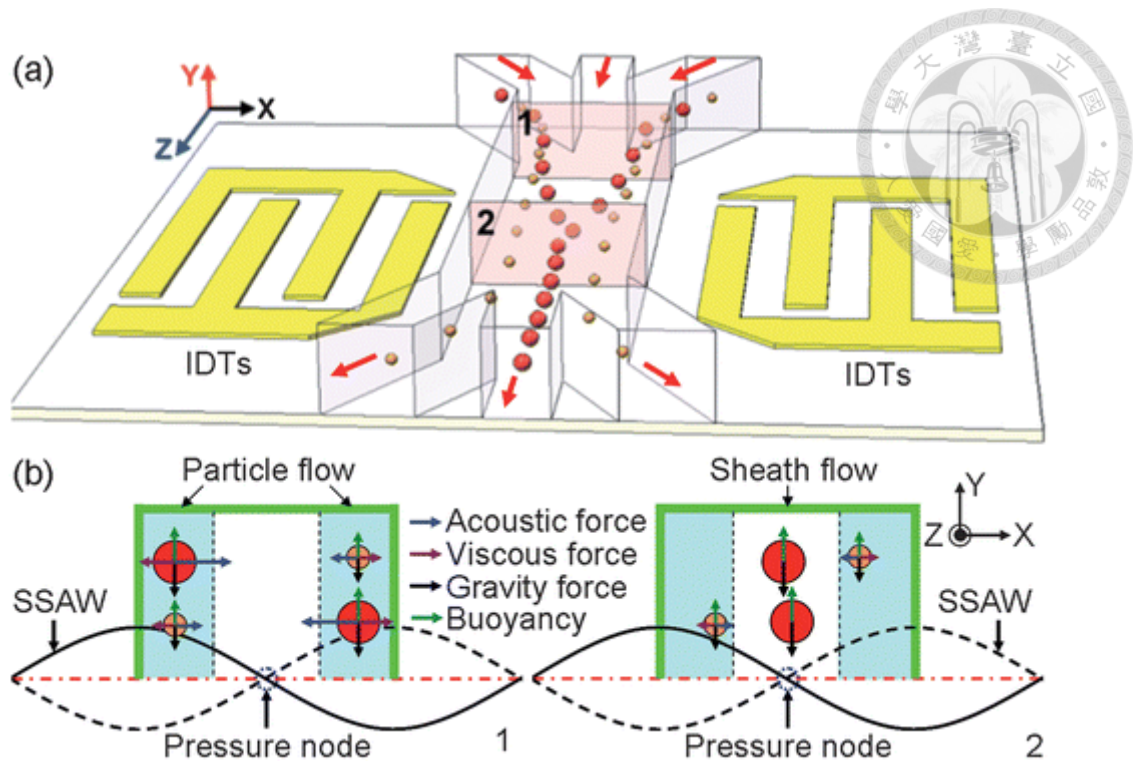


圖 2-10 Standing surface acoustic waves 的工作原理示意圖[19]

Xiaoyun Ding[20]等人透過將 SSAW 引起的壓力節點線與流動方向成特定角度傾斜，而不是互相平行，如圖 2-11 所示。通過這種設計顆粒沿著垂直於流動方向的遷移距離可能會是 SSAW 的幾倍或是幾十倍，而這種方式他們稱為傾斜角表面駐波聲波(tilted-angle standing surface acoustic waves, taSSAW)，藉由使用 taSSAW，可以成功分離出 2 和 10 μm 的聚苯乙烯顆粒，分離效率約為 99%，並且也能分離了 7.3 和 9.9 μm 聚苯乙烯顆粒，其分離效率約為 97%。

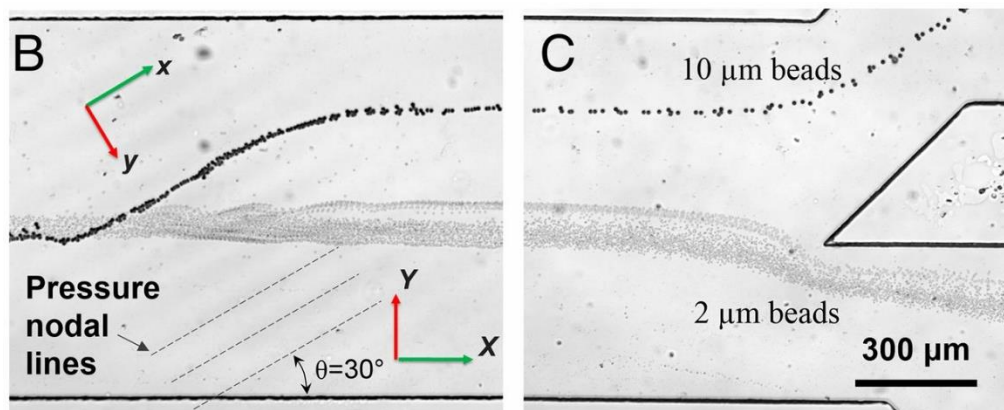


圖 2-11 tilted-angle standing surface acoustic waves 工作示意圖。2 μm 與 10 μm 的聚苯乙烯顆粒之分離過程，其中，壓力節點線與流線方向成 30 度角[20]



2.4 被動式分離

2.4.1 確定性橫向位移 (Deterministic lateral displacement)

確定性橫向位移可以根據顆粒大小的不同來分離顆粒，確定性橫向位移裝置主要是利用一系列的微米柱陣列所構成，並且按照特定的幾何形狀以及間距排列去控制粒子的移動軌跡，當流體帶著這些混和顆粒通過微米柱陣列時，這些顆粒會因其大小不同發生不同程度的橫向偏移，較大的顆粒會因為無法隨著流體自由地穿梭微米柱陣列，因此會沿著微米柱的排列方式產生橫向偏移；較小的顆粒可以順利地通過狹窄的通道，繼續隨著流體前進。微柱陣列的形狀、高度、間隙以及傾斜角度是決定確定性橫向位移分離性能的關鍵，大於臨界尺寸的顆粒會產生偏移，小於臨界尺寸的顆粒則不受影響。然而，傳統的確定性橫向位移裝置都在非常低的流速下進行操作($Re < 1$)，故導致吞吐量受到限制，Yuwen Lu[21]等人將收縮-膨脹陣列與確定性橫向位移做結合，如圖 2-12 所示，分別對 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 和 $20\text{ }\mu\text{m}$ 的粒子進行分離，分離純度分別為 98.65%、92.65%和 85.5%。

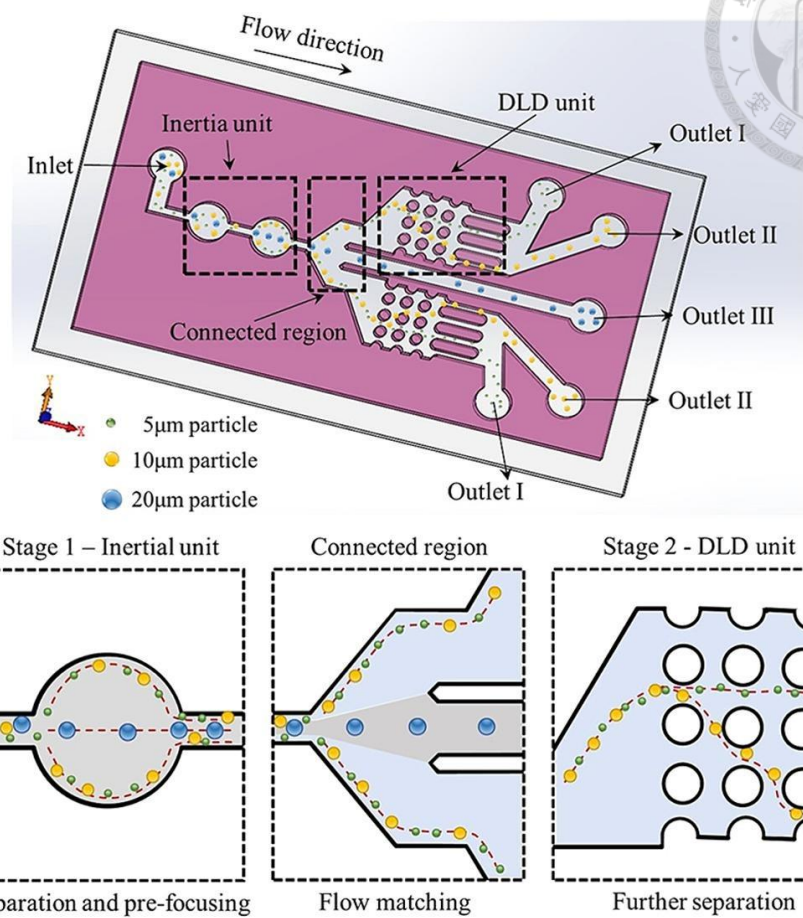


圖 2-12 該裝置具有一個收縮-膨脹陣列以及由微柱組成的 DLD 微流道裝置。粒子會先在收縮-膨脹陣列聚焦之後再進一步分離中小顆粒[21]



2.4.2 夾流分級 (Pinched flow fractionation)

夾流分級裝置通常具有 2 個主要部分分別為夾流區以及分流區，如圖 2-13 所示，在夾流區這個區域流道會突然變成一個狹窄的通道，分流區緊接在夾流區之後，在這個區域流道會變寬，藉此提供更大的空間讓顆粒分散。將含有不同大小的混合顆粒與不含有顆粒的液體從不同的入口注入夾流分級裝置，透過控制這 2 個入口流體的流速，使含有不同大小的顆粒的液體在流道的收縮段能夠集中在壁的一側，在從收縮段流入至變寬的流道的過程中，較大的顆粒會朝向流道中心移動；較小的顆粒則會向側壁移動，因此可以透過顆粒直徑差異，將不同大小的顆粒進行分離。

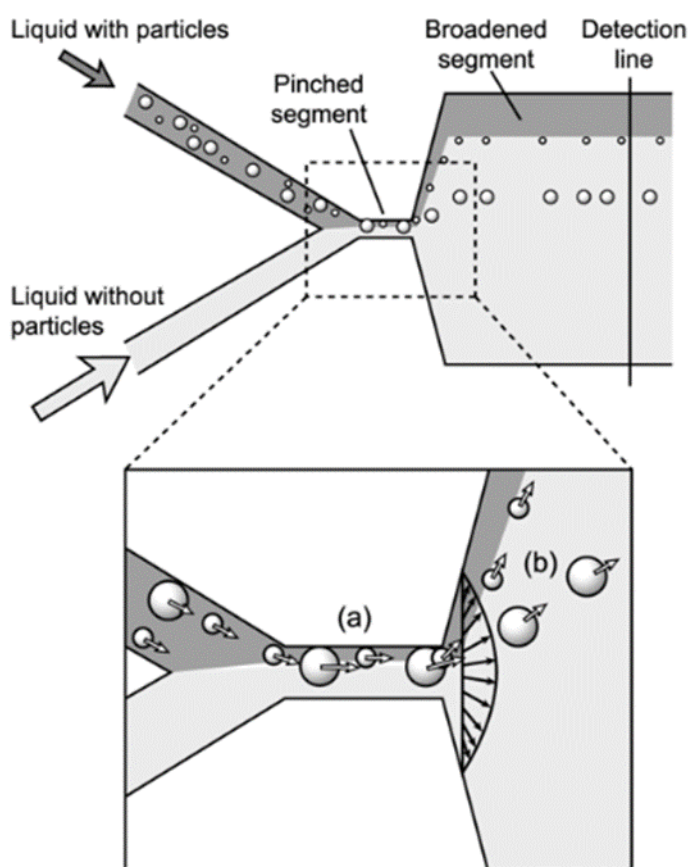


圖 2-13 Pinched flow fractionation 工作原理示意圖 [22]



2.4.3 慣性微流體 (Inertial microfluidics)

在直通道中這些隨機分布的粒子會受到來自流體剪切梯度升力的影響，使顆粒從流道中心向通道壁遷移；當這些粒子接近通道壁時則會受到壁引起的升力，重新被推回流道中心，直到到達平衡位置為止。這些顆粒還會依據流道截面形狀的不同，在遷移的過程中具有不同的平衡位置，如圖 2-14 所示，粒子在圓形截面的流道中的平衡位置在約 0.6 倍半徑的位置處；在方形截面的流道(Aspect ratio = 1)中，粒子會聚焦在 4 個平衡位置；在低縱橫比的矩形流道(Aspect ratio ≈ 0.5)中，粒子的平衡位置會從 4 個減少至 2 個，並且距離較長的壁約 0.2H 的位置處。

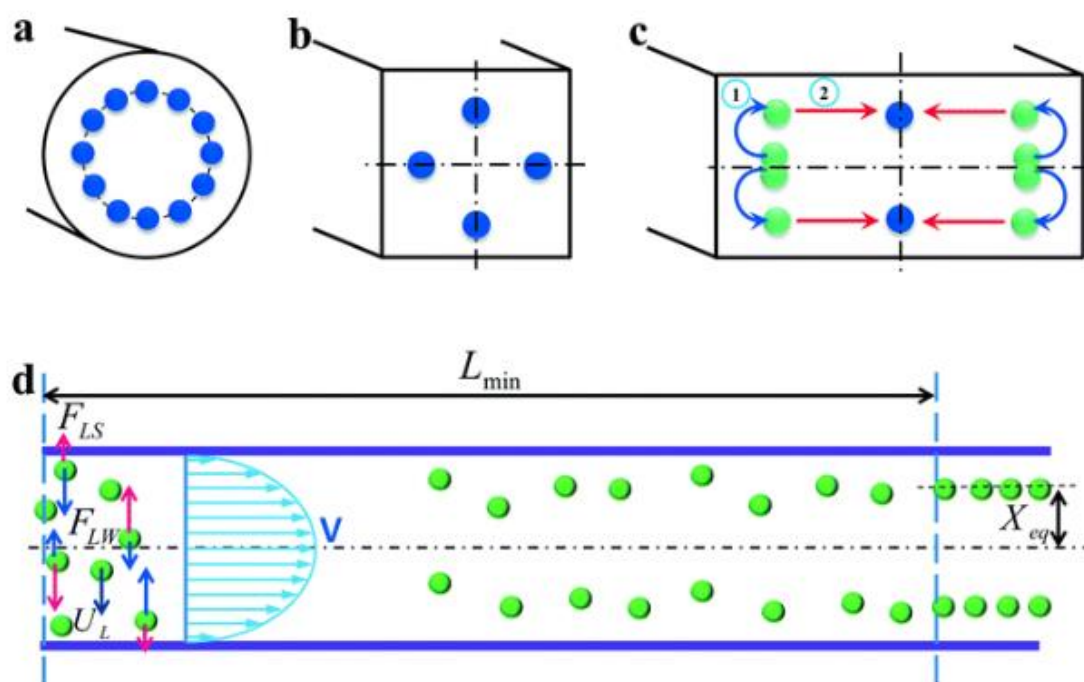


圖 2-14 粒子於不同橫截面之微流道之平衡位置示意圖[23]。

Aynur Abdulla[24]等人使用 24 μm 和 10 μm 的聚苯乙烯顆粒模擬子宮頸癌細胞(HeLa)以及白血球細胞(WBC)的分離情形，較大的顆粒會經由出口 1 和出口 2 收集；較小的顆粒則會經由中間出口收集，該裝置主要由蛇行流道以及 2 個尺寸不同的直流道組合而成，如圖 2-15 所示。蛇行流道的目的是用來將細胞聚焦在平衡位置，位於平衡位置的細胞進入第一個擴展區域時，因為壁引起的升力突然消失，

因此較大的細胞(CTC)會受到剪切梯度的升力作用，逐漸遷移至流道壁的兩側，而第二個擴展區域的作用則是進一步分離 2 種不同大小細胞的位置，以此提高細胞分離的純度。經由實驗發現該微流道裝置中間出口所收集到的 $10\ \mu\text{m}$ 的顆粒為 99.5%；兩側出口所收集到的 $24\ \mu\text{m}$ 的顆粒有 88.8% 以上。

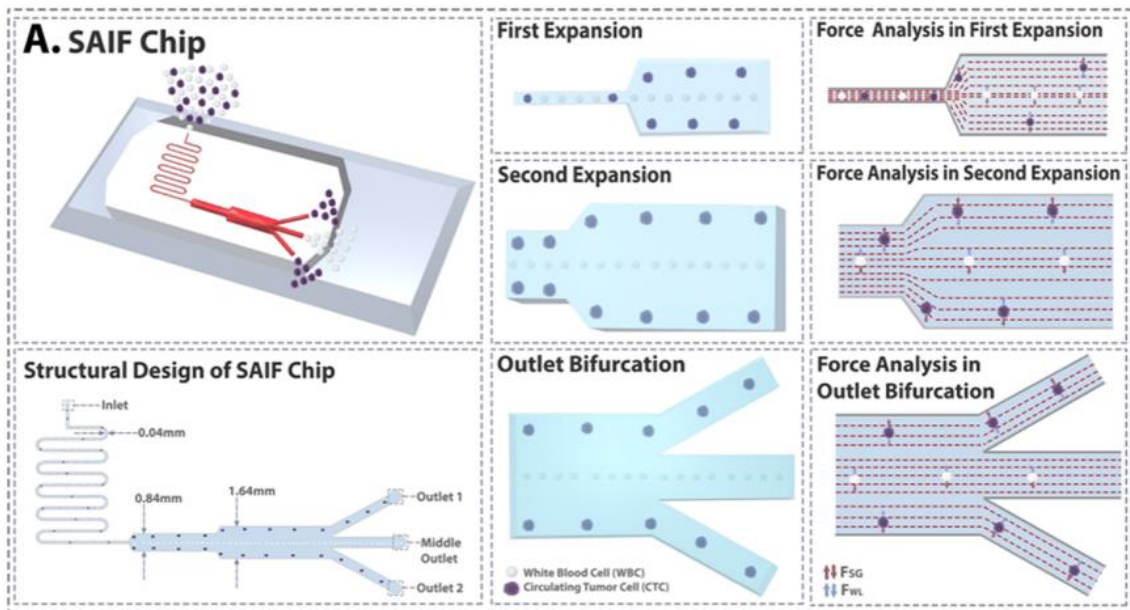


圖 2-15 微流道裝置示意圖。該裝置由蛇行微流道與 2 個擴展區域組成[24]

Zhang[25]等人使用 PDMS 製作出 4 個鋸齒周期的微流道並將 2 個一樣的裝置串連在一起(寬度 $200\ \mu\text{m}$ 、深度為 $42\ \mu\text{m}$)，如圖 2-16 所示，末端具有 3 個分支分別用來收集細胞，此裝置可以在 $(\times 1/2)$ 稀釋全血樣本中，並以 $288\ \text{mL/h}$ 的流量處理稀釋全血樣本，最終提升 48% 的白血球純度。

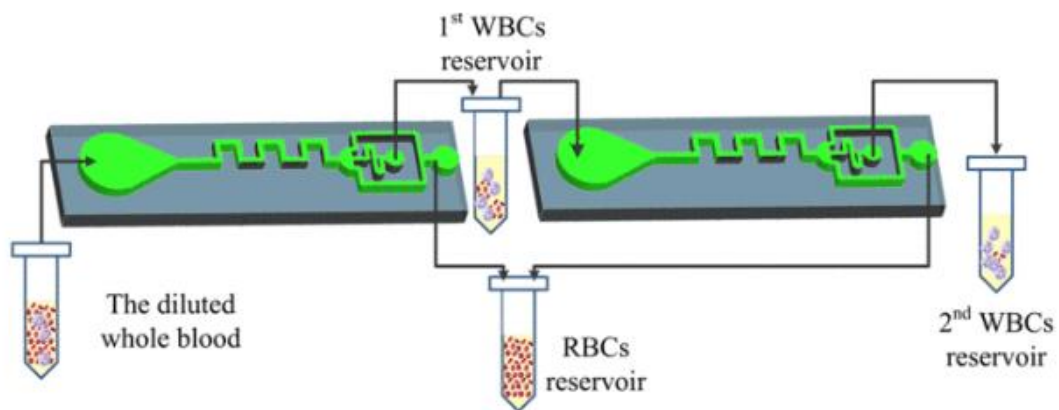


圖 2-16 微流道裝置示意圖。該裝置由 2 個鋸齒狀微流道組合而成[25]



Bhagat[26]等人分別使用顆粒直徑為 $1.9\ \mu\text{m}$ 、 $4\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 和 $7.32\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯粒子在寬度為 $100\ \mu\text{m}$ 、高度為 $50\ \mu\text{m}$ 的 5 環螺旋微通道進行模擬，發現 $1.9\ \mu\text{m}$ ($a_p/D_h = 0.03$) 和 $4\ \mu\text{m}$ ($a_p/D_h = 0.06$) 的聚苯乙烯粒子更容易受到迪恩力而非慣性升力的影響，因此隨著流體從通道內壁遷移離開； $5\ \mu\text{m}$ ($a_p/D_h = 0.07$) 和 $7.32\ \mu\text{m}$ ($a_p/D_h = 0.11$) 的聚苯乙烯粒子主要受到慣性升力的影響，在內側通道進行遷移並達到平衡，因此，證實了 $a_p/D_h \geq 0.07$ 粒子傾向於聚焦於單一平衡位置，並針對 $1.9\ \mu\text{m}$ 和 $7.32\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯粒子進行實驗，成功將這 2 種直徑不同的粒子進行分離，如圖 2-17 所示。

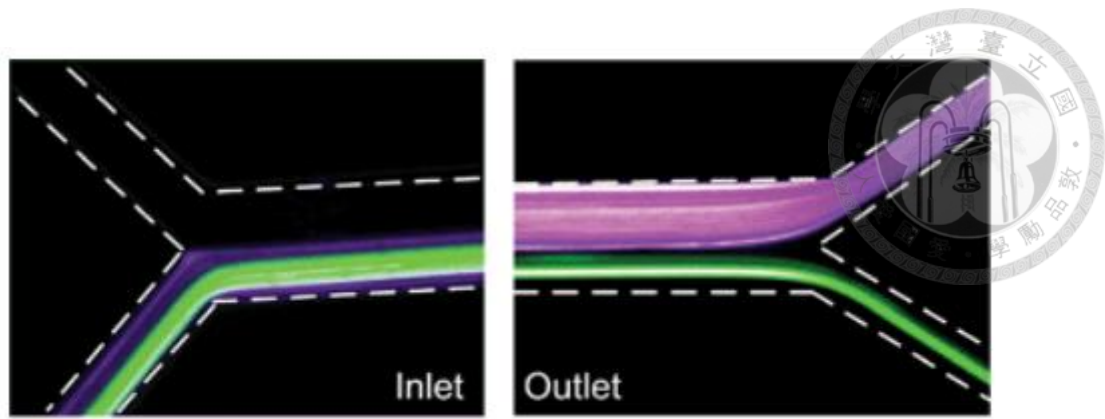


圖 2-17 依尺寸大小不同分離 $1.9\ \mu\text{m}$ 與 $7.32\ \mu\text{m}$ 之顆粒[26]

Kuntaegowdanahalli[27]等人通過改變慣性升力與迪安阻力的比值，將具有不同顆粒大小的混合物進行分離，如圖 2-18 所示，在實驗中分別使用了直徑 $10\ \mu\text{m}$ 、 $15\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯粒子，發現使用他們所製作的螺旋微流體裝置(寬度 $500\ \mu\text{m}$ 、深度 $130\ \mu\text{m}$)的分離效率約為 90%，並用同樣的裝置分離 SH-SY5Y neuroblastoma 及 C6 glioma 細胞的分離效率約為 80%，同時能夠實現約 100 萬個細胞/分鐘的吞吐量。

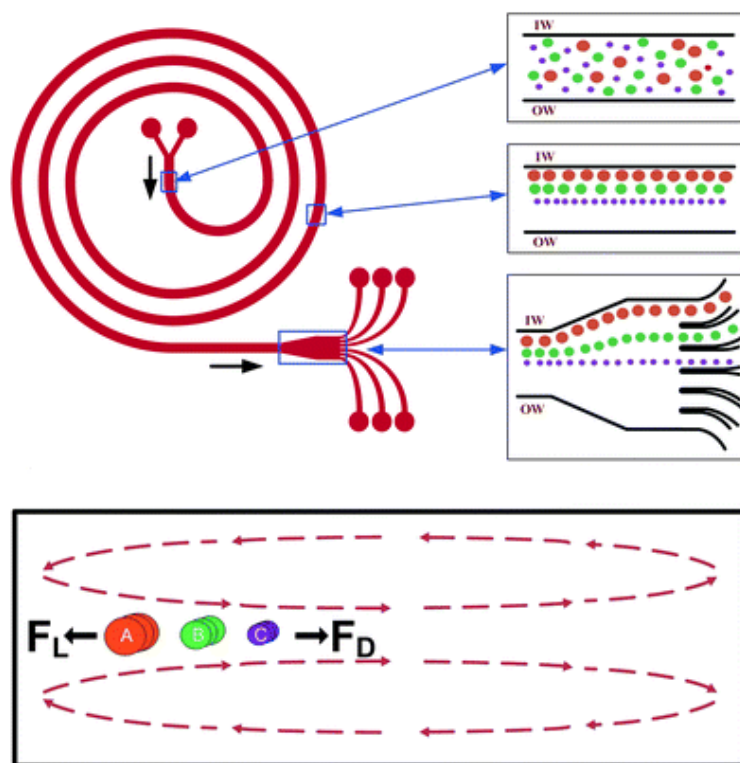


圖 2-18 依據 F_L/F_D 將不同大小顆粒分離[27]



除了 $a_p/D_h \geq 0.07$ 這項首要條件會影響顆粒是否能成功聚焦之外，慣性升力和迪恩阻力的比值稱為 R_f ，也是重要條件參數之一，

$$R_f = \frac{2a_p^2 R}{D_h^3}$$

當 $R_f > 0.08$ 時，則代表了慣性升力克服了迪恩阻力的作用，因此，相對較大的顆粒可以成功向微通道內壁進行遷移，如圖 2-19 所示，Pakhira[28]等人利用此原理對 MCF-7, PC3-9, A549 CTCs and normal blood cells (WBCs & RBCs)於寬度 500 μm 和高度 200 μm 的單環螺旋通道中進行數值模擬，成功將 5 種細胞分離，分離純度為 100%。

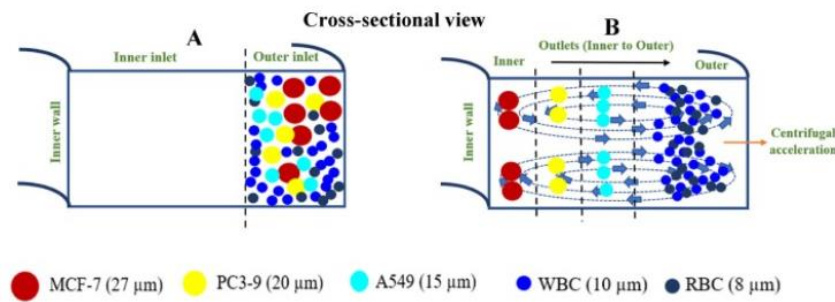


圖 2-19 依據 R_f 將不同大小顆粒分離[28]

Akbarnataj[29]等人製作出具有螺旋結構以及梯形橫截面的微流體裝置(寬度 500 μm 、內側深度為 70 μm 和外側深度 110 μm)分離 WBC 及 CTC，如圖 2-20 所示，梯形橫截面相較於矩形橫截面有更好的分離效果，因為迪恩渦流中心向通到外壁移動，所以較小的顆粒的平衡位置會更容易靠向外壁，並發現在 2.5 mL/min 的流量下，內側出口收集到的 MCF-7 的分離效率可以達到 88-90%。

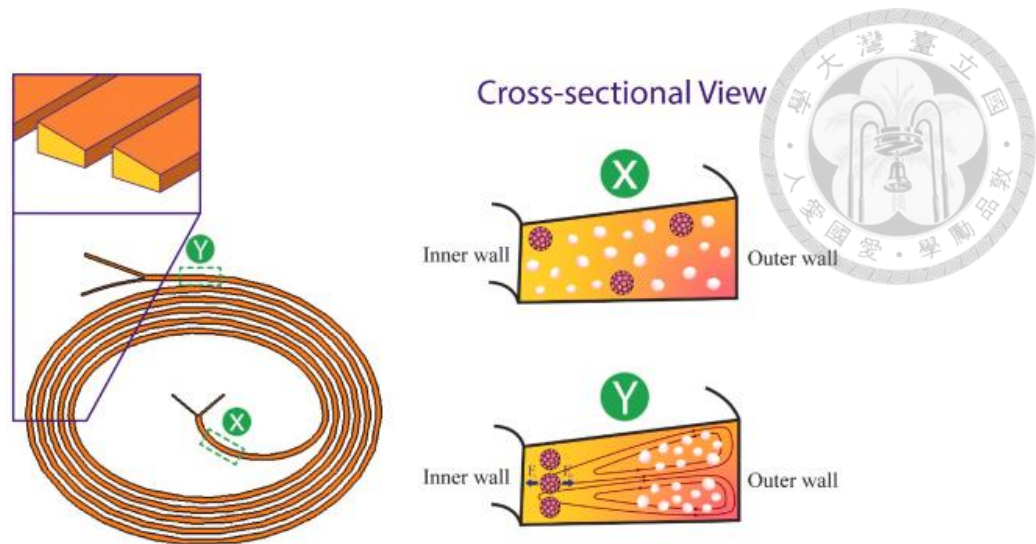


圖 2-20 梯形螺旋微流道示意圖[29]

Adel[30]等人使用 CO₂ LASER 在 PMMA 基板上雕刻，並利用灰階方法設計出橫截面形狀為梯形的螺旋微流道(寬度為 600 μm 、內側深度為 70 μm 和外側深度 110 μm)，如圖 2-21 所示，將 WBC 從血液中分離，發現在 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下，1%和 2%血球容積比的血液樣品分離效率分別為 90.14%和 82.03%，750 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下，3%血球容積比的血液樣品分離效率則是 78.42%，之所以會有這樣的差異是因為較高的紅血球濃度會導致細胞間相互作用增強，從而導致分離效率下降。

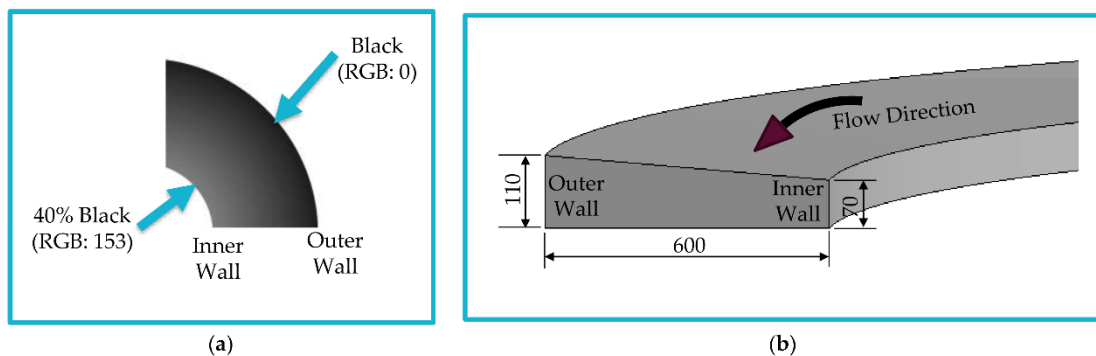


圖 2-21 使用灰階方法雕刻梯形微流道[30]

Warkiani[31]等人製作出一種具有高通量處理樣本微流體裝置，如圖 2-22 所示，透過堆疊多個螺旋微流體以此來提高通量，可以在不到十分鐘內處理完 7.5 毫升的血液，並從晚期轉移性乳癌和肺癌患者採集的血液樣本中檢測 CTC。

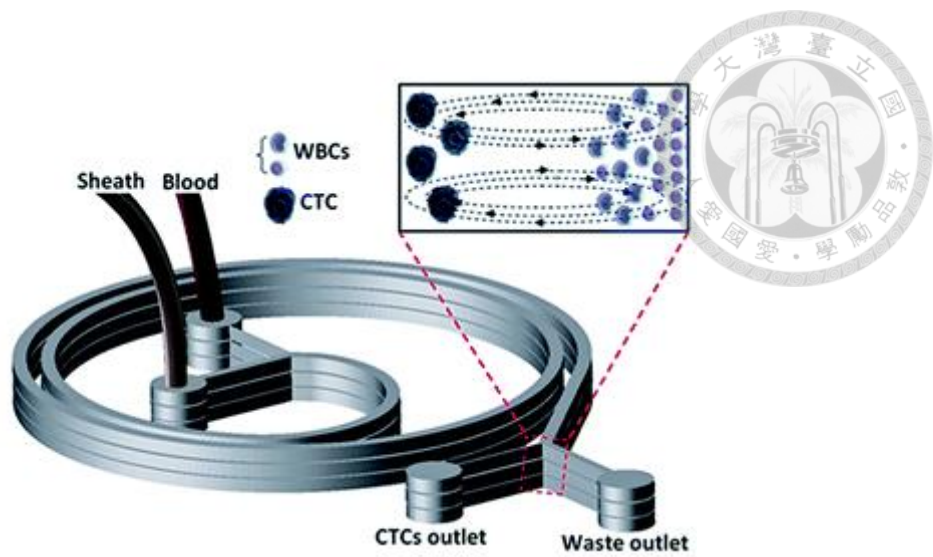


圖 2-22 多重螺旋微流道裝置示意圖[31]



2.4.4 螺旋流道設計原理

當流體流經曲線通道時，會產生一個徑向向外的離心加速度，導致通道的上半部和下半部形成兩個對稱相反的渦流稱為迪安渦流，可以使用迪恩數來判斷迪恩渦流的大小，如式(2.1)所示：

$$De = \frac{\rho U_f D_h}{\mu} Re \sqrt{\frac{D_h}{2R_c}} \quad (2.1)$$

其中， ρ 為流體介質密度， U_f 為流體平均速度， μ 為流體黏滯係數， R_c 為螺旋通道的半徑， Re 為流體雷諾數。對於直通道而言， $De = 0$ ，故不存在迪恩渦流，在彎曲通道中， De 會隨著曲率半徑越小而越大。在迪恩渦流的影響下，粒子在螺旋通道中的側壁間反覆橫向位移，粒子橫向遷移的速度這稱為迪安速度，如式(2.2)：

$$U_{Dean} = 1.8 \times 10^{-4} \times De^{1.63} \quad (2.2)$$

當粒子隨著迪安渦流從通道的一端側壁，遷移至相對的側壁，隨後返回至初始側壁，則完成了一次完整的迪安循環，如式(2.3)所示：

$$L_{DC} = 2w + h \quad (2.3)$$

其中， w 和 h 分別為通道的寬度及高度。粒子在迪恩渦流的影響下，會在通道中達到平衡位置，而粒子在螺旋中通道到達平衡位置所需的最短距離，如式(2.4)所示：

$$L = \frac{U_f}{U_{Dean}} \times L_{DC} \quad (2.4)$$

通過斯托克斯定律，可以得知迪安阻力之大小，如(2.5)所示：

$$F_D = 3\pi\mu U_{Dean} a_c \quad (2.5)$$

其中， a_c 為粒子直徑。在通道中還會產生另一種影響顆粒流動的力，稱為慣性升力，是由剪切梯度升力以及壁引起的升力共同組成的，如(2.6)所示：

$$F_L = \frac{2\rho U_f^2 a_c^4}{D_h^2} \quad (2.6)$$

基於粒子顆粒尺寸大小有所不同，小尺寸粒子會因為 Dean 力而遷移至螺旋通道外壁；大尺寸顆粒則會因為 Dean 力以及慣性升力的共同影響之下，將粒子集中

在螺旋通道內壁，因此可以在通道出口分離出不同顆粒尺寸的粒子。



2.5 小節

本章節先介紹常見的微流道製造方法，包含了機械切削、濕蝕刻、乾蝕刻以及雷射雕刻等方式，並介紹各方法的優點及缺點，之後介紹了聚甲基丙烯酸甲酯的黏合方法，如熱黏合、溶劑黏合與微波黏合等方式，最後，介紹細胞分離的方法，主要分為主動式分離以及被動式分離兩大類，並介紹其工作原理以及實際應用。

在本研究中，所選定之基板材料聚甲基丙烯酸甲酯，根據文獻選定 CO_2 雷射作為微流道之雕刻方法，並先使用溶劑黏合的方式，嘗試將聚甲基丙烯酸甲酯黏合，細胞分離的方法則是依據文獻，選擇被動式分離中的螺旋通道作為細胞分離之方式。

第3章 材料與方法



3.1 微流道製備

本研究使用的微流道裝置使用了 3 mm 厚的 PMMA 作為基板，並使用 CO₂ 雷射進行微流道之雕刻，微流道裝置製作過程如圖 3-1 所示，設計圖形如下圖 3-2 所示，具有 1 個入口以及 2 個出口，微流道形狀為螺旋式通道。在進行黏合之前，將雕刻完畢的 PMMA 基板使用 75% 的乙醇於超音波清洗機清潔 5 分鐘，藉此將微流道上的灰塵以及 CO₂ 雷射雕刻過程中產生的微小碎屑移除，最後，將兩片 PMMA 基板透過雙面膠帶進行黏合完成封裝。其中，入口和出口是用直徑為 4 mm 的聚乙烯管連接，並使用五分鐘環氧樹脂膠進行黏合加固，防止在實驗過程中發生洩漏。

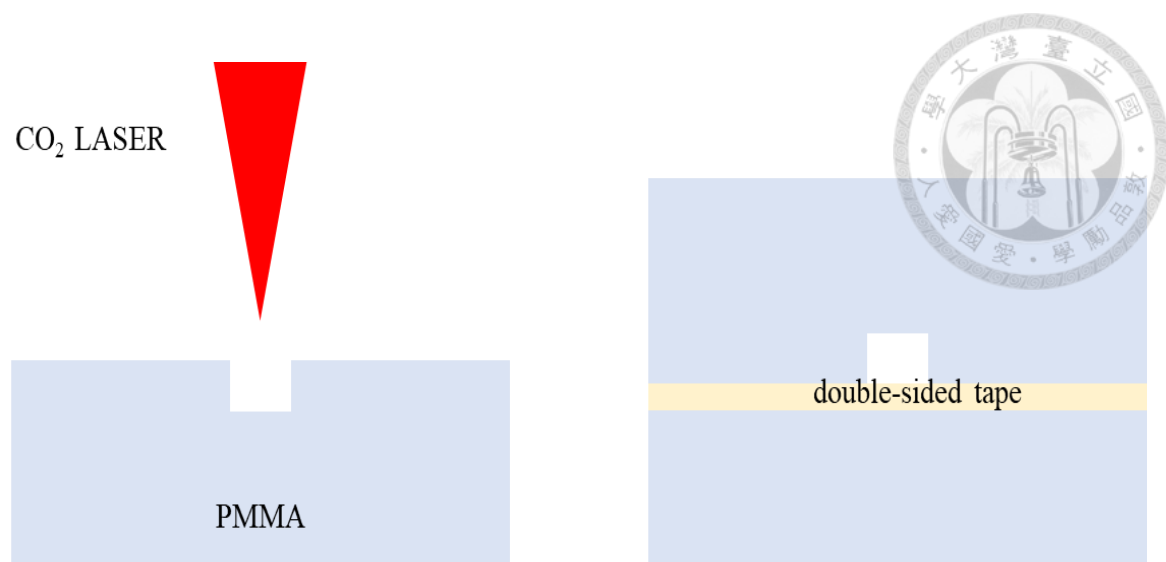


圖 3-1 微流道裝置製作過程。

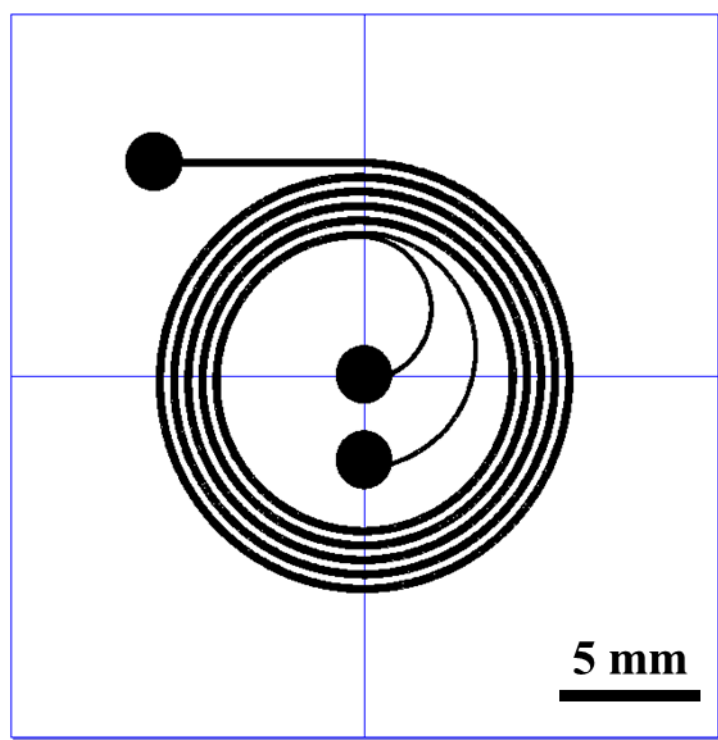


圖 3-2 微流道圖案



3.2 實驗設備

3.2.1 雷射打標機

本研究進行雷射雕刻微流道時所使用的雷射為沛霖科技股份有限公司的雷射打標機，型號為 Speedmark-Vision，波長為 $10.6\ \mu\text{m}$ 、最高輸出功率為 30 W、焦距為 75 mm 以及工作範圍為 $100\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ 其外型如圖 3-3、圖 3-4 所示，詳細規格如表 3-1 所示。



圖 3-3 雷射源[32]



圖 3-4 振鏡頭[32]

表 3-1 雷射規格表

Model	Speedmark-Vision
Wavelength	10600 $\pm$ 5 nm
Mode	TEM ₀₀
Max Power	30 W
Repetition Rate	200 kHz
Working Distance	75 mm
Field Size	100 mm $\times$ 100 mm

3.2.2 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)基板

本研究所使用的基板為聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)，如圖 3-5 所示。這種聚合物具有一定的耐化學性、熱穩定性、生物相容性以及可以媲美玻璃的光學性能，此外與其他材料相比還有重量輕、成本低廉、易於製造等優勢[33]。此外，PMMA 對 CO₂ 雷射有著近 95% 的吸收率，因此成為了 CO₂ 雷射加工的首選材料。所使用的 PMMA 基板尺寸為 60 mm $\times$ 60 mm，厚度為 3 mm，如圖所示，相關性質如表 3-2 所示。

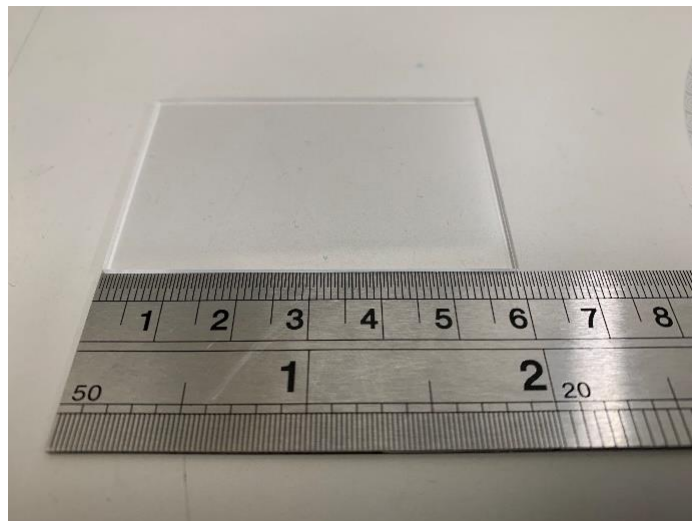


圖 3-5 聚甲基丙烯酸甲酯基板

表 3-2 聚甲基丙烯酸甲酯熱物理性質[33]

No.	Property	Symbol	Value
1	Glass transition temperature	T_g	110 °C
2	Melting temperature	T_m	160 °C
3	Thermal decomposition starts at	T_{ds}	230 °C
4	Thermal decomposition ends at	T_{de}	393 °C
5	Specific heat	c_p	1.466 kJ kg ⁻¹ K
6	Enthalpy of vaporization	ΔH_v	2231.78 kJ kg ⁻¹
7	Material density	ρ	1070 kg m ⁻³
8	Thermal conductivity	k	0.19 W m ⁻¹ K

3.2.3 注射幫浦

混合細胞分選實驗所使用的注射幫浦型號為 (KDS230) 購買於 KD Scientific® 公司，如圖 3-6 所示，分別使用流量 1、2、3、4 和 5 mL/min 進行測試。



圖 3-6 注射幫浦



3.3 細胞來源、實驗藥品、耗材與儀器設備

3.3.1 細胞來源

本研究所使用的細胞，由國立臺灣大學生物機電工程學系的侯詠德教授實驗室提供。

3.3.2 實驗藥品

Hydrochloric acid (30721-1L) 購於 Sigma-Aldrich。NaCl (31320-05)、KCl (28514-75)、NaH₂PO₄·2H₂O (317-18)、Na₂HPO₄·12H₂O (31723-35)、Dimethyl Sulfoxide (09659-14) 購於 Nacalai。Trypan blue 0.4% (207-17081)、Collagenase (034-22363) 購於 Wako。FBS (26140-079)、Penicillin-Streptomycin (15140-122)、MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 購於 Thermo Fisher Scientific。Cellmatrix type I-A 3 mg/mL (Collagen) (160222) 購於新田ゼラチン。Urea Assay Kit (DIUR-100) 購於 BioAssay Systems。WE medium (CC901-0500) 購於 Simply GeneDireX。

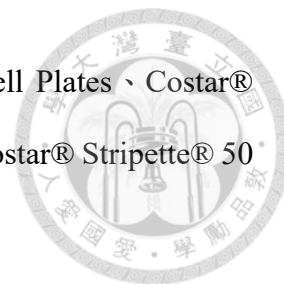
3.3.3 儀器設備

注射幫浦 (KDS230) 購於 KD Scientific® 公司。離心機 (5840R) 購於 Eppendorf Researche 公司。Microplate Absorbance Reader (Ref.16039400) 購於 TECAN 公司。倒立式相位差顯微鏡 (Axio Vert.A1) 購於 Carl Zeiss。Countess II FL Automated Cell Counter、Cytospin™ 4 Cytocentrifuge 購於 Thermo Fisher Scientific。

3.3.4 實驗耗材

15 mL 滅菌離心管(339650)、50 mL 滅菌離心管 (339652) 購於 Thermo

Fisher Scientific 。Costar® 12-well Clear TC-treated Multiple Well Plates、Costar® Stripette® 10 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4488) 、Costar® Stripette® 50 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4490) 購於 Corning。



3.4 膠原蛋白修飾培養皿

使用 1M 的 HCL 將 3 mg/mL 的膠原蛋白原液稀釋成 0.1 mg/mL，取出膠原蛋白液 600 mL coating 在 6 well culture plate 後，放置在 37 °C，5% CO₂ 的培養箱裡面放置 30 分鐘，將多餘的膠原蛋白液抽出，之後以 5 mL 的 PBS 進行沖洗 2 次以去除殘留的溶液，完成培養品之製備。



3.5 分析方法

3.5.1 雷射共軛焦顯微鏡

雷射共軛焦顯微鏡 (Laser scanning confocal microscopy) 是以非接觸的方式去測量樣品的表面形貌，與傳統顯微鏡不同的地方在於使用雷射光作為光源提升影像品質，並利用針孔光圈 (Pinhole) 去除非焦平面以外的光，這樣只有來自焦平面的光通過感測器，其他深度的光被去除，以此來達到提高影像的品質以及解析度的目的。本研究使用台灣儀器科技研究中心的雷射共軛焦顯微鏡，如圖 3-7 所示，其規格如表 3-3 所示，用於測量 CO₂ 雷射雕刻在 PMMA 基板的微流道之寬度、深度以及輪廓。



圖 3-7 雷射共軛焦顯微鏡

表 3-3 雷射共軛焦顯微鏡規格[34]

Model		VK-X210
Objective lens magnification	Magnification on a 15" monitor 1000x	50x
Observation/ measuring range	Horizontal (H): μm	270
	Vertical (V): μm	202
Working distance: mm		0.35
Height measurement	Measuring range	7 mm
	Display resolution	0.0005 μm
	Repeatability σ	0.012 μm
Width measurement	Display resolution	0.001 μm
	Repeatability 3σ	0.02 μm
Measurement laser light source	Wavelength	Violet laser, 408 nm
	Maximum output	0.95 mW
	Laser Class	Class 2 Laser Product (IEC 60825-1, FDA (CDRH) Part1040.10 ^{*3})
Laser light-receiving element	PMT (Photoelectron Multiplier Tube)	
Light source for optical observation	Lamp	100 W halogen lamp
Color camera for optical observation	Imaging element	1/3" Color CCD image sensor
	Recording resolution	Super high resolution (3072×2304)
	Auto adjustment	Gain, Shutter speed

3.5.2 自動細胞計數儀

本研究所使用的自動細胞計數儀為 Countess II FL Automated Cell Counter，用於計算混合細胞分選實驗的細胞濃度以及細胞存活率，如圖 3-8 所示。



圖 3-8 Countess II FL Automated Cell Counter [35]

第4章 實驗結果與討論



4.1 雷射參數對微流道之影響

4.1.1 雷射功率對流道之影響

將 PMMA 基板放置在焦距 80 mm 處。雷射掃描速度、頻率和掃描次數，分別設定為 100 mm/s、20 kHz 和 2 次，並且雷射功率分別為 1.24、2.36、3.53、4.69 W。可以從圖中發現隨著雷射功率的增加，代表施加在基板上的能量也有所提高，並且 PMMA 基板對 CO₂ 雷射吸收效率很好，寬度及深度都有顯著的增加，如圖 4-1 所示。當雷射功率從 1.24 增加至 4.69 W 時，微流道的平均寬度從 494.03 μm 增加至 555.43 μm ；平均深度從 182.45 μm 增至 595.47 μm ，如圖 4-2、圖 4-3 所示。

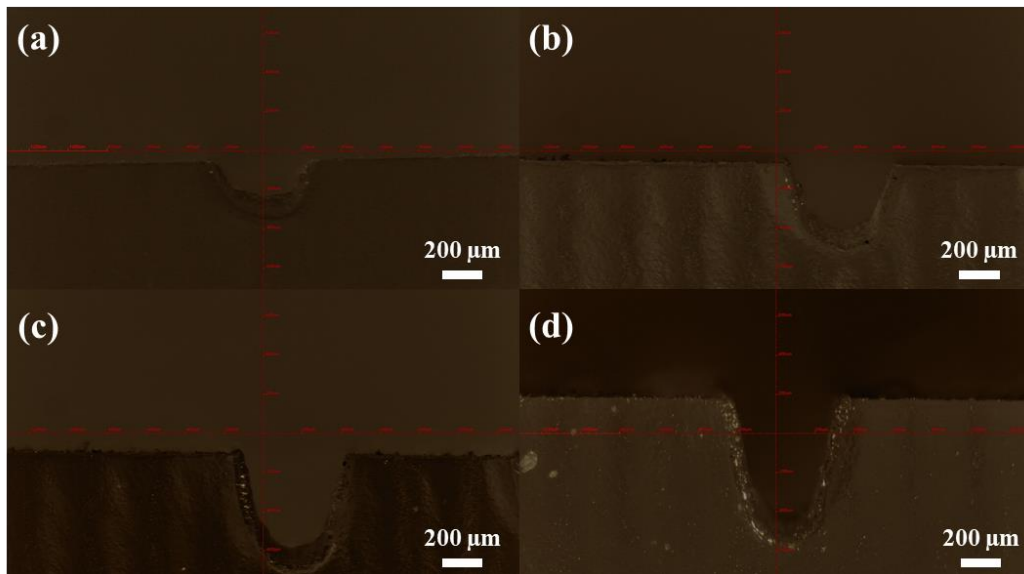


圖 4-1 依不同雷射功率雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 雷射功率分別為 1.24、2.36、3.53 以及 4.69 W

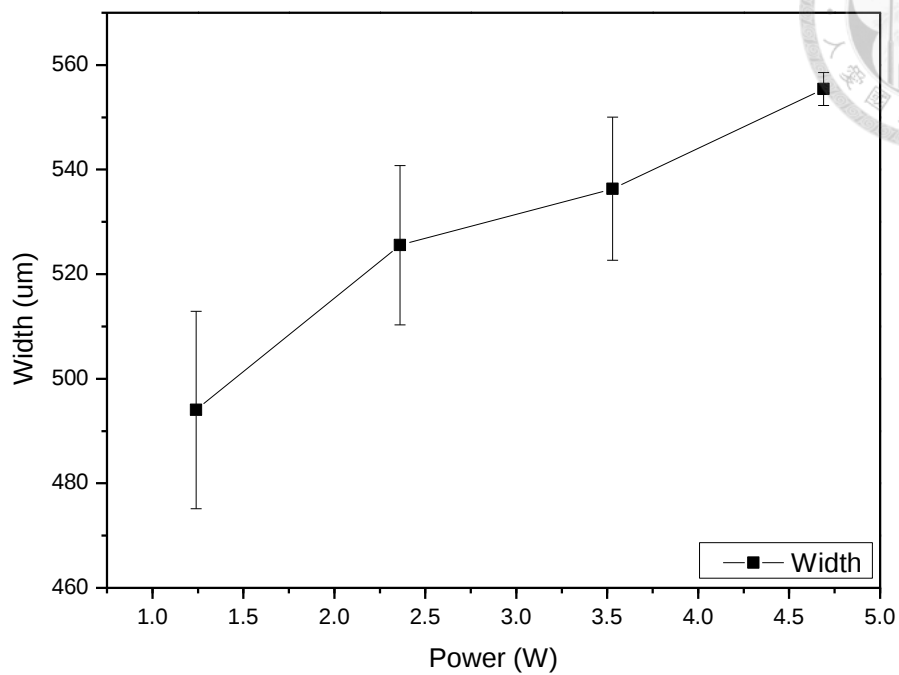


圖 4-2 雷射功率與微流道寬度之關係

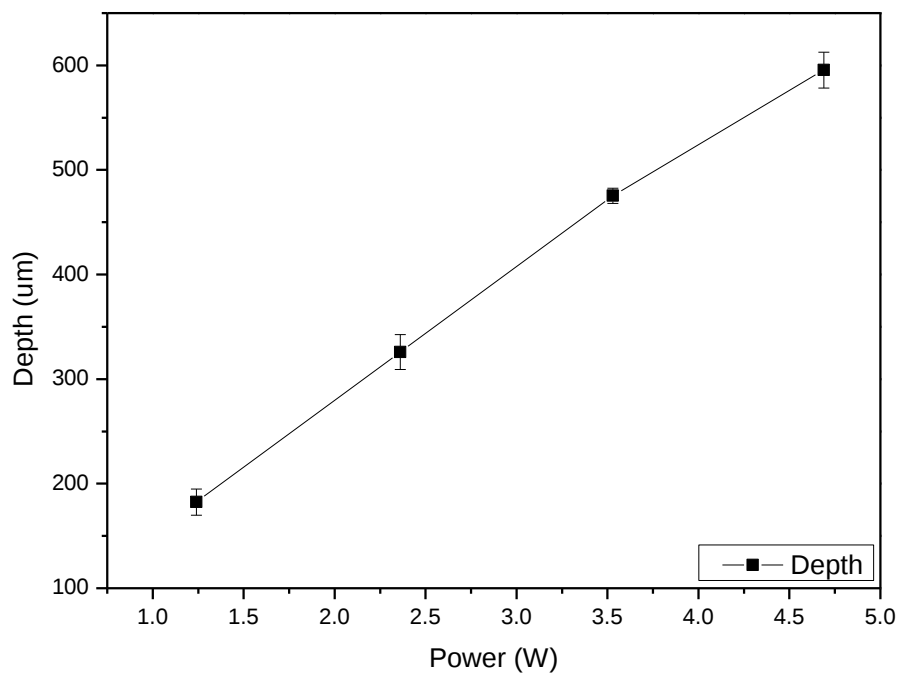


圖 4-3 雷射功率與微流道深度之關係



4.1.2 雷射掃描速度對微流道之影響

將 PMMA 基板放置在焦距 80 mm 處。雷射功率、頻率和掃描次數，分別設定為 4.69 W、20 kHz 和 2 次，並且雷射掃描以 50 mm/s 的變量增加。可以從圖中看到當雷射掃描速度增加，微流道的寬度以及深度都隨之減少，如圖 4-4 所示。這是因為雷射掃描速度愈快，代表施加在基板上的能量就會越少，當雷射掃描速度從 150 mm/s 增加至 300 mm/s，微流道之平均寬度從 533.16 μm 下降至 496.22 μm ；平均深度從 400.78 μm 下降至 171.40 μm ，如圖 4-5、圖 4-6 所示。

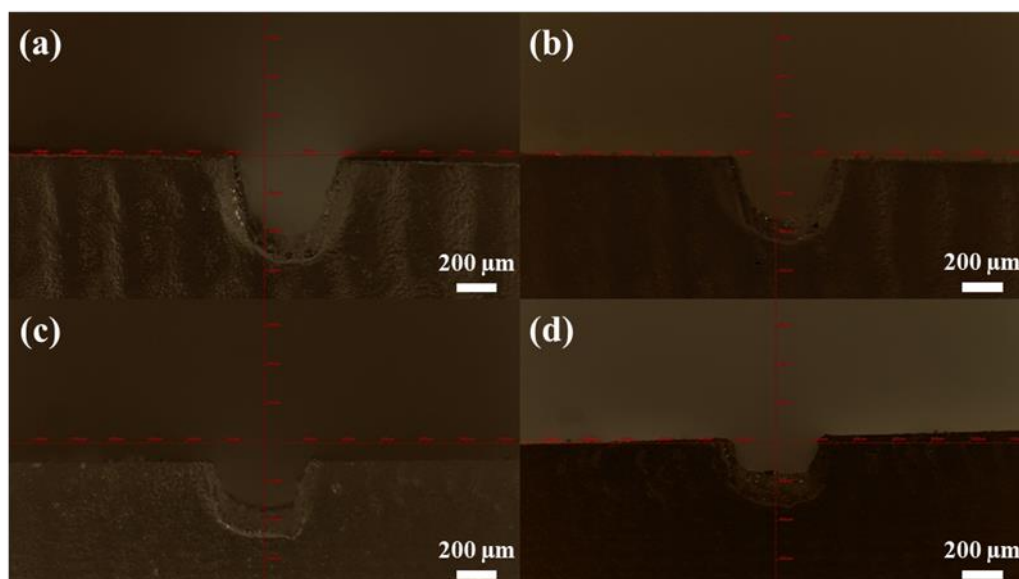


圖 4-4 依不同掃描速度雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 掃描速度分別為 150、200、250 以及 300 mm/s

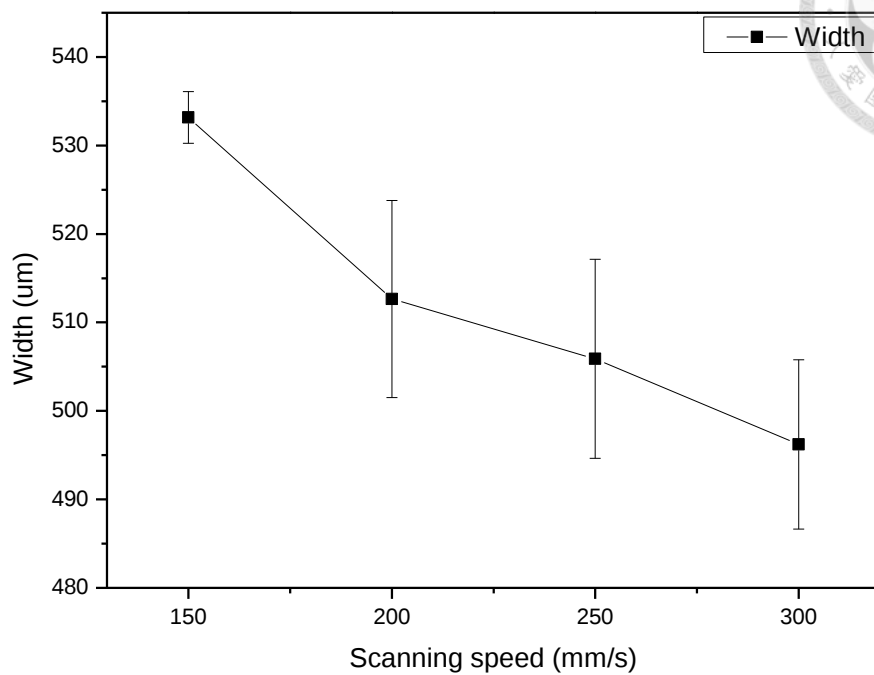


圖 4-5 雷射掃描速度與微流道寬度之關係

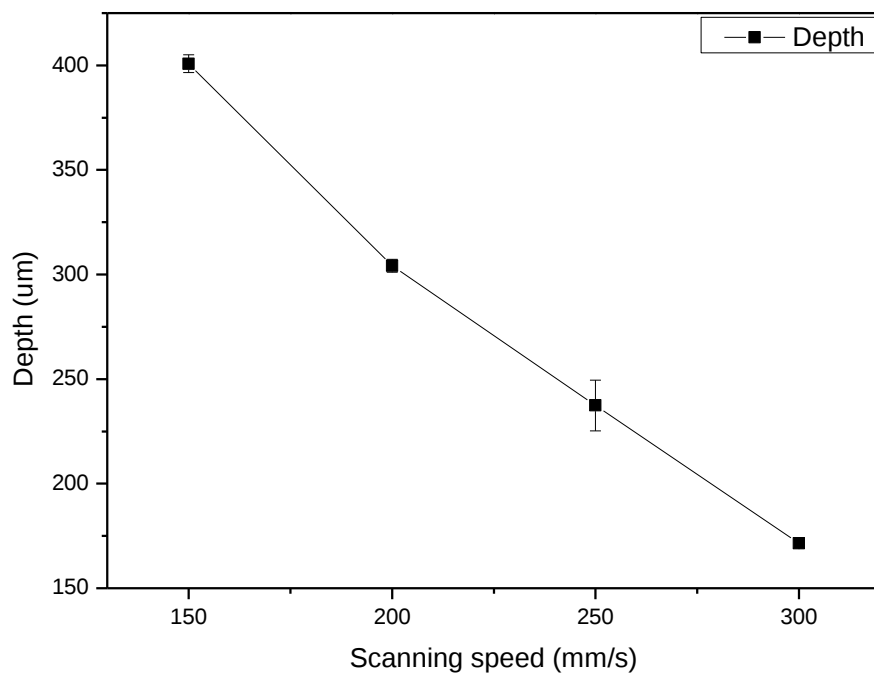


圖 4-6 雷射掃描速度與微流道深度之關係



4.1.3 掃描間距對微流道之影響

雷射功率、頻率和雷射掃描速度，分別設定為 4.69 W、20 kHz 和 300 mm/s，掃描間距分別為 0.06、0.08、0.10 與 0.12 μm ，雷射掃描次數為 2 次，可以從圖中看到隨著掃描間距的減少，寬度也隨之增加；深度也是如此，如圖 4-7 所示。微流道之寬度從 491.66 μm 增加至 508.07 μm ；深度從 65.61 減少至 170.29 μm ，如圖 4-8、圖 4-9 所示。。

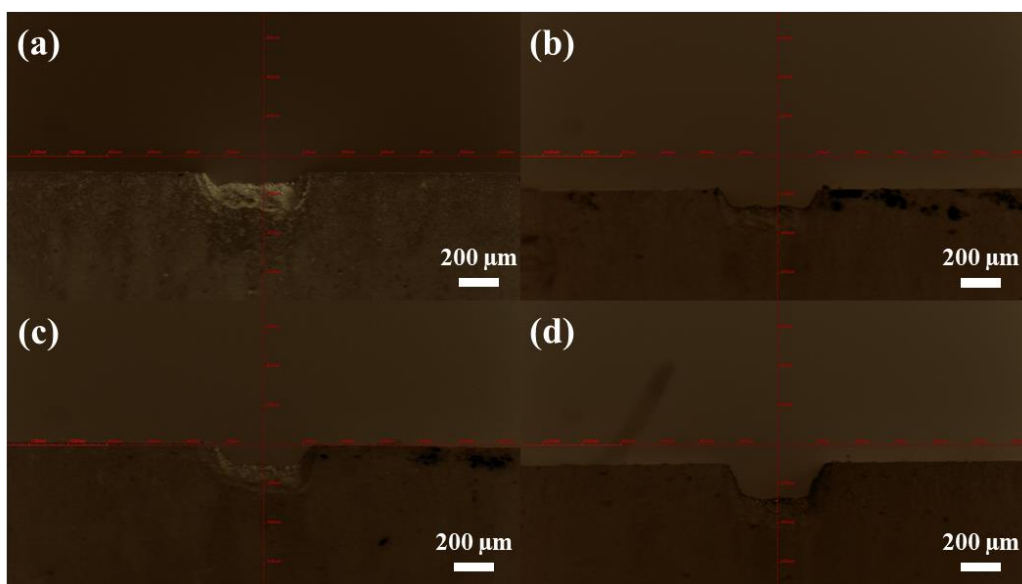


圖 4-7 依不同掃描間距雕刻 PMMA。(a)、(b)、(c)、(d) 掃描間距分別為 0.06、0.08、0.10 以及 0.12 mm

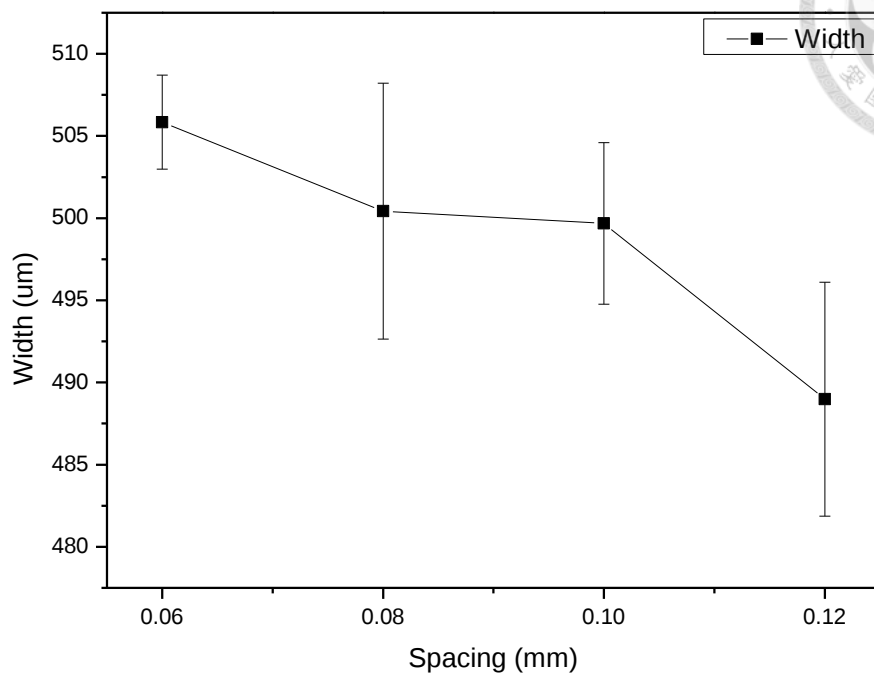


圖 4-8 雷射掃描間距與微流道寬度之關係

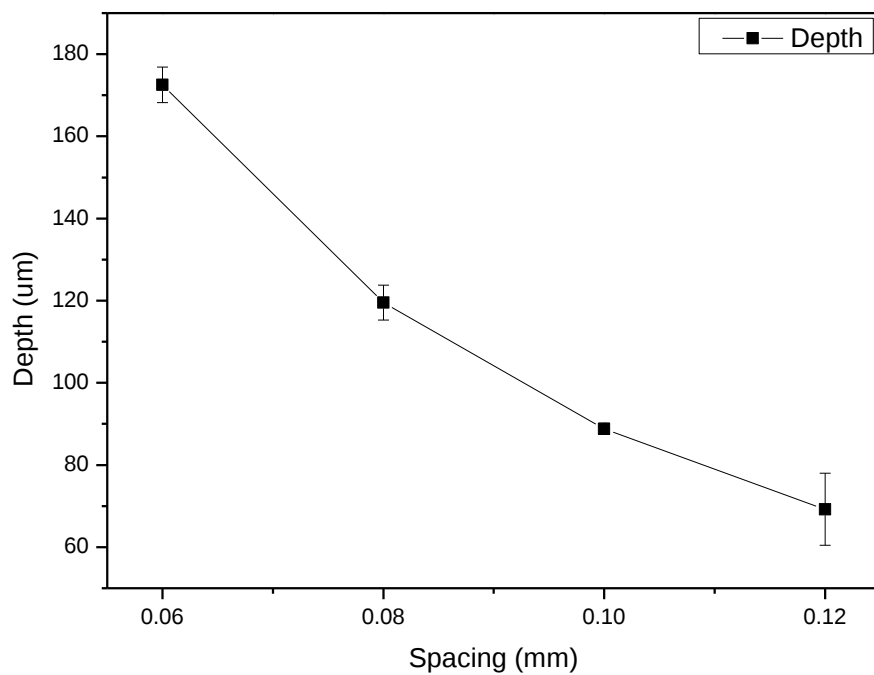


圖 4-9 雷射掃描間距與微流道深度之關係



4.1.4 微流道之表面形貌

微流道的雕刻是使用 CO₂ 雷射完成，微流道所使用的雷射參數分別為：掃描速度 300 mm/s、頻率 20 kHz、雷射功率 4.69 W、線間距 0.06 mm 和掃描次數 2 次，其中，雷射掃描軌跡如圖 4-10 所示，紅色箭頭為第 1 次的掃描軌跡，角度為 45 度，黑色箭頭為第 2 次掃描軌跡，旋轉 90 度至 135 度，這麼做的目的在於使雷射掃描均勻避免能量分布不均。圖 4-11 為雷射共軛焦顯微鏡所量測的微流道輪廓，使用雷射共軛焦顯微鏡對每一圈流道分別取 3 個位置作量測，共 15 個位置，如圖 4-12 橘色方框所選選之區域，CO₂ 雷射所雕刻出的每一圈微流道的寬度與深度如表 4-1 所示，其中，由表 4-1 可以得知微流道的寬度以及深度分別為 $484.55 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 以及 $139.09 \pm 5.6 \mu\text{m}$ 。另外，雷射雕刻時間僅需要約 68 s，可以減少製作微流道裝置所需的時間。橫截面形狀經雷射共軛焦顯微鏡觀察，底部並沒有很平坦，這是因為 PMMA 在燒蝕的過程中，經融化又凝固所導致的，而微流道之寬度與深度之所以不一致，首先可能是因為雷射功率不穩定所導致的，故先針對雷射功率穩定度作測試，使用功率計量測雷射於 60 s 內的輸出功率，如圖 4-13 所示，可以發現雷射功率為 $4.62 \pm 0.09 \text{ W}$ 相當穩定，因此推測可能是因為光斑重疊率不一所導致的。

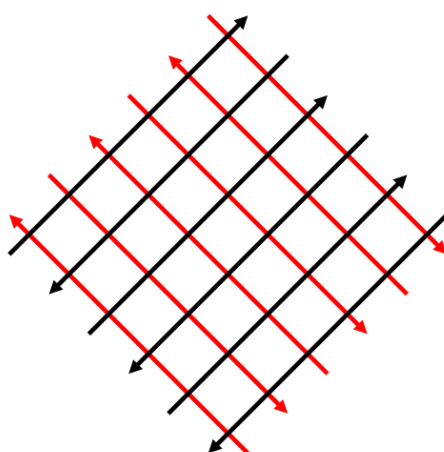
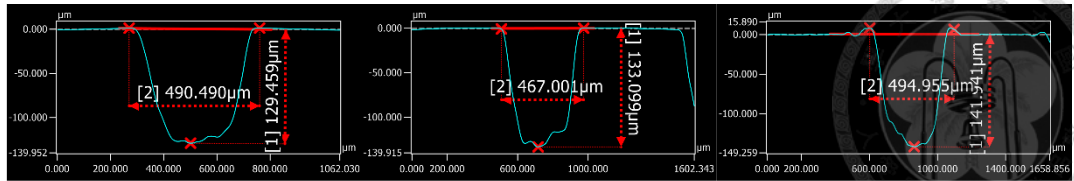
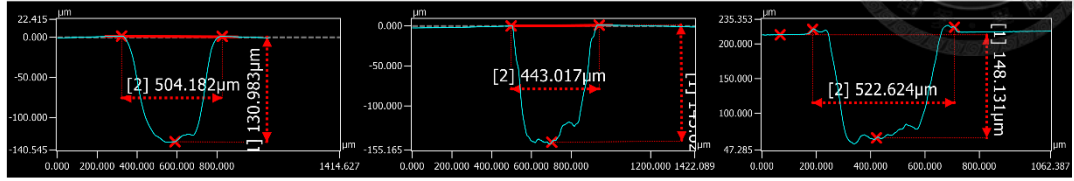


圖 4-10 雷射掃描軌跡示意圖

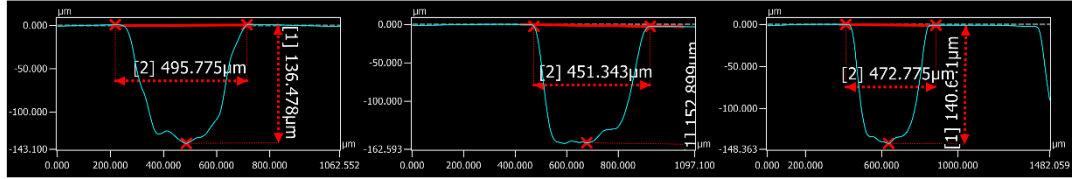
1



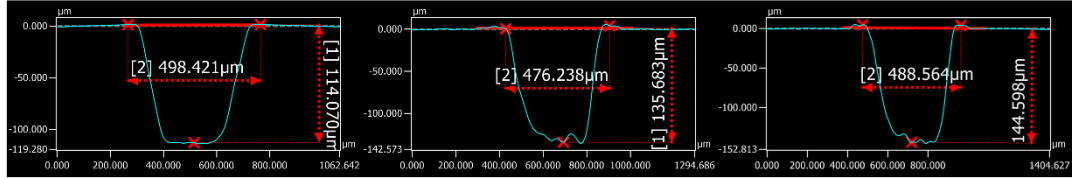
2



3



4



5

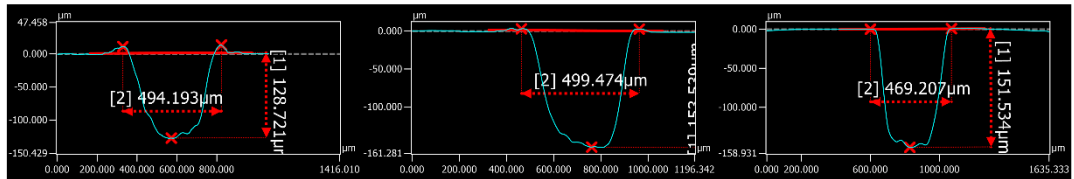


圖 4-11 微流道之橫截面輪廓形狀

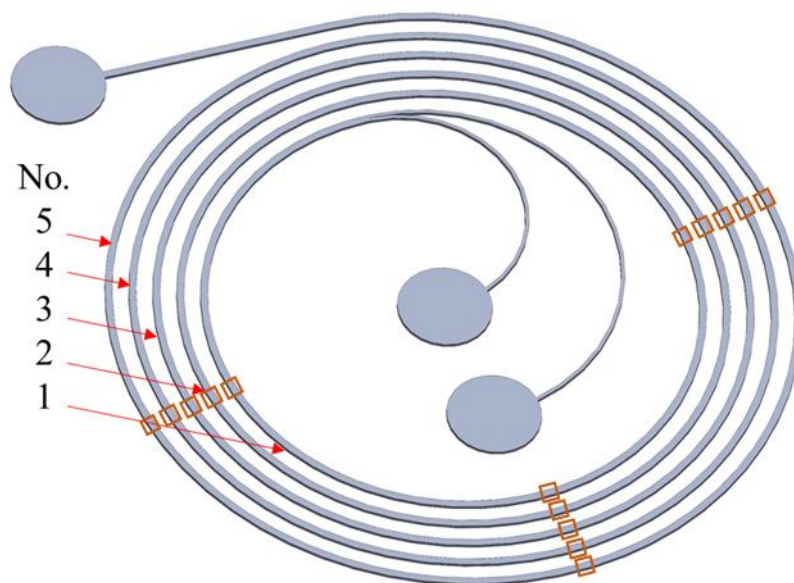


圖 4-12 微流道之示意圖。

表 4-1 微流道之寬度與深度

No.	Width (μm)	Depth (μm)
1	484.15 ± 15	134.83 ± 6
2	489.94 ± 41	141.58 ± 8
3	473.29 ± 39	143.33 ± 8
4	487.74 ± 11	131.45 ± 15
5	487.62 ± 16	144.25 ± 13

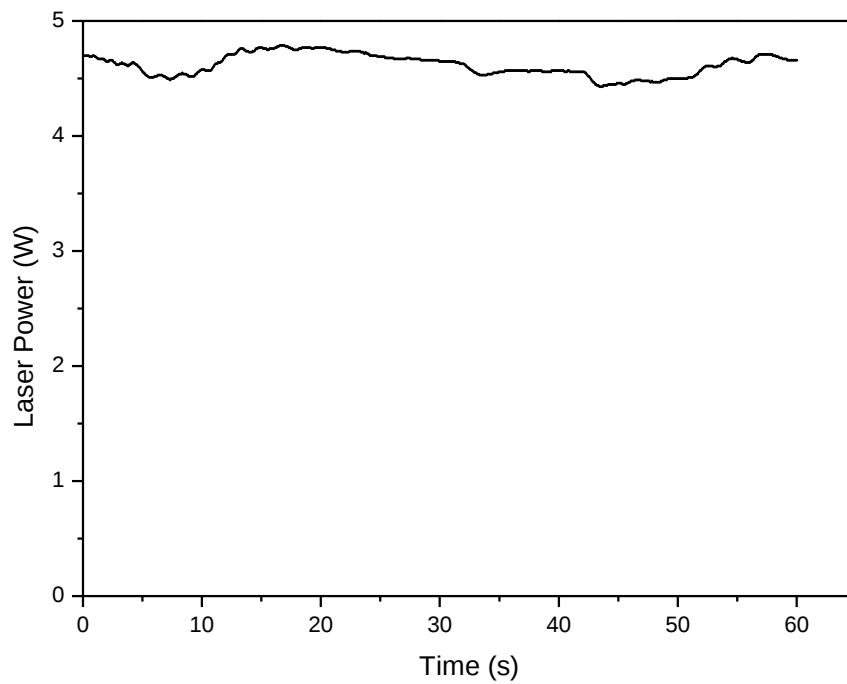


圖 4-13 雷射功率與時間之關係圖

4.2 液體洩漏測試

對於微流道裝置而言，防止液體洩漏是至關重要的，首先，使用 70% 濃度的異丙醇作為輔助溶劑將 PMMA-PMMA 基板進行黏合，使用長尾夾最為壓力來源，並放置在 68 °C 下之烘箱 15 min 進行黏合，並使用注射幫浦進行洩漏測試，發現僅在 0.5 mL/min 的流量下就發生洩漏，如圖 4-14 所示，這可能是因為使用長尾夾作為壓力來源，並無法均勻的對 PMMA 施加壓力所導致的。

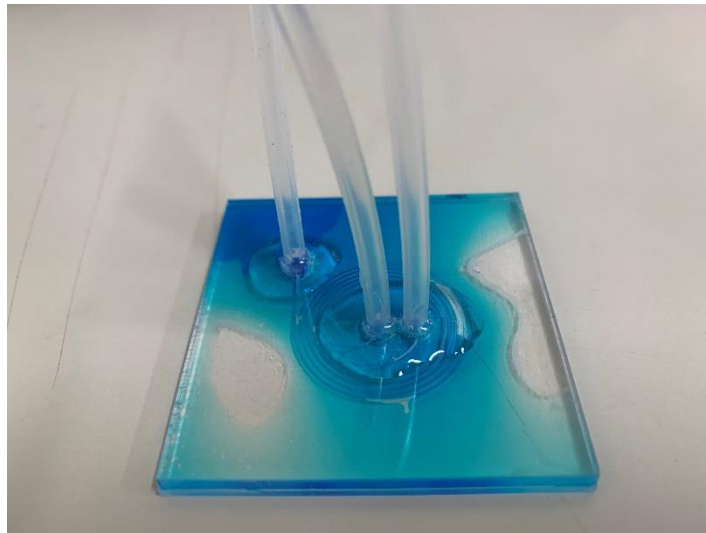


圖 4-14 溶劑黏合 PMMA 洩漏測試

為了改善洩漏之情形，使用雙面膠帶作為黏合替代方案，並分別使用 1、2、3、4、5 mL/min 流量進行測試，可以發現在這些流量下，使用雙面膠帶黏合並不會發生洩漏，因此，在接下來的實驗當中，都使用雙面膠帶進行 PMMA 之黏合。圖 4-15 為在 5 mL/min 下之洩漏測試。

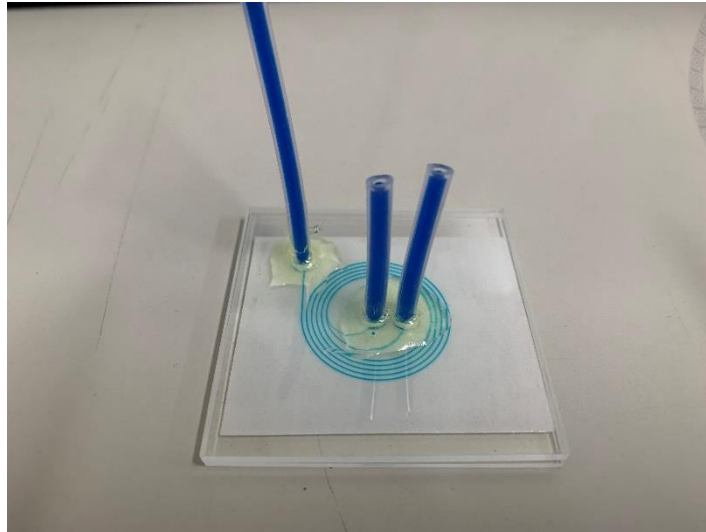


圖 4-15 雙面膠帶黏合 PMMA 洩漏測試



4.3 分離效率

在細胞分離實驗中，使用 5.0×10^5 cells/mL 的細胞濃度進行培養，此外，在分離實驗前會先使用 70% 的乙醇先通入流道中進行清潔，再使用去離子水將多餘的乙醇排出。所使用的微流道設計的最內側通道半徑 10 mm，並且每個流道之間間隔為 0.8 mm，共 5 圈螺旋通道，其中，紅色方框框選的部分為與 2 個出口相連之流道，其半徑為 2.5 mm，如圖 4-16 所示。

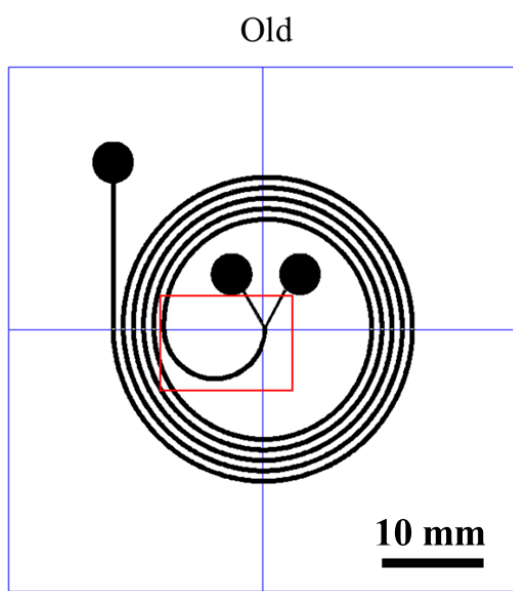


圖 4-16 初始微流道設計

使用初始流道設計進行細胞分離實驗， $a_c = 20 \mu\text{m}$ 、 $D_h = 231 \mu\text{m}$ ，其中， $\rho = 1007 \text{ kg m}^{-3}$ 、 $\mu = 0.958 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [36]，並使用 2、3、4 以及 5 mL/min 的流量參數，可以從表 4-2 為成熟肝細胞數量，由圖 4-18 得知，其中計算方式如下：

$$\frac{\text{Number of mature hepatocytes in the inner outlet}}{\text{Number of mature hepatocytes in inner and outer outlets}} \times 100\%$$

分離效率如表 4-3 所示，表現並不是很好，這可能是因為在經過紅色方框的區域時，由表 4-4 可以得知，迪恩力佔據主導地位，然而，慣性升力才是使大細胞(成

成熟肝細胞)推向流道內側的力，因慣性升力無法與迪恩力抗衡，從而導致大部分的成熟肝細胞無法順利從內側出口收集。



表 4-2 初始設計不同出口的成熟肝細胞數量

Q (mL/min)	Inner outlet	Outer outlet
2	8.91×10^6	1.78×10^7
3	2.75×10^7	3.09×10^7
4	5.31×10^6	4.98×10^6
5	1.97×10^7	1.09×10^7

表 4-3 初始設計之成熟肝細胞分離效率

Q (mL/min)	Separation efficiency
2	33.4%
3	47.1%
4	51.6%
5	64.4%

表 4-4 初始設計之迪恩力與慣性升力之大小

Q (mL/min)	$F_D = 3\pi\mu U_{Dean} a_c$	$F_L = \frac{2\rho U_f^2 a_c^4}{D_h^2}$	F_L/F_D
2	3.28×10^{-9}	1.28×10^{-9}	0.390
3	6.34×10^{-8}	2.88×10^{-9}	0.454
4	1.01×10^{-8}	5.12×10^{-9}	0.507
5	1.26×10^{-8}	6.67×10^{-9}	0.529

因此，在之後改進的微流道設計中，如圖 4-17 所示，5 個螺旋通道之參數與初始設計保持一致，最內側通道半徑 10 mm、流道之間間隔為 0.8 mm，總計 5 圈，兩者之間的差異在於紅色方框框選的部分直接與最內側的通道做連接。

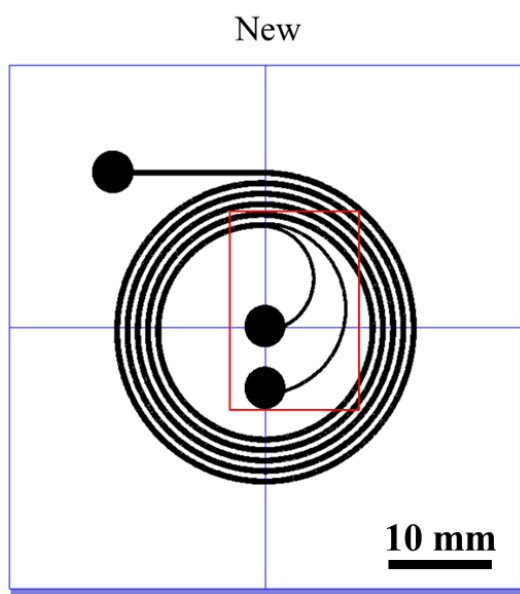


圖 4-17 改進之微流道設計

表 4-5 可以得知成熟肝細胞在不同流量下之數量，由圖 4-19 計算得知，如表 4-6 所示，可以看到流量為 2、3 和 4 mL/min 下的分離效率都 > 80%以上，最高可達 87.2%，然而，將流量繼續提升至 5 mL/min 時，分離效率則下降到 74.6%，可以從表 4-7 看到隨著將流量逐步提升，慣性升力之大小逐漸和迪恩力愈來愈近，當流量提升至 5 mL/min 時，然而，在此流量下分離效率並沒有更好，這有可能是因為微流道的橫截面形狀不均所導致的，只有當橫截面為矩形的時候，才能越符合螺旋式通道的設計原理。因此，本研究接下來實驗所使用的流量參數為 4 mL/min。

表 4-5 改進後不同出口的成熟肝細胞數量

Q (mL/min)	Inner outlet	Outer outlet
2	9.20×10^6	2.02×10^6
3	8.60×10^6	1.26×10^6
4	6.70×10^6	9.83×10^5
5	1.32×10^7	4.48×10^6

表 4-6 改進後之成熟肝細胞分離效率

Q (mL/min)	Separation efficiency
2	82.0%
3	87.2%
4	87.2%
5	74.6%

表 4-7 改進後迪恩力與慣性升力之大小

Q (mL/min)	$F_D = 3\pi\mu U_{Dean} a_c$	$F_L = \frac{2\rho U_f^2 a_c^4}{D_h^2}$	F_L/F_D
2	1.86×10^{-9}	1.28×10^{-9}	0.688
3	3.61×10^{-9}	2.88×10^{-9}	0.798
4	5.76×10^{-9}	5.12×10^{-9}	0.889
5	7.15×10^{-9}	6.67×10^{-9}	0.933

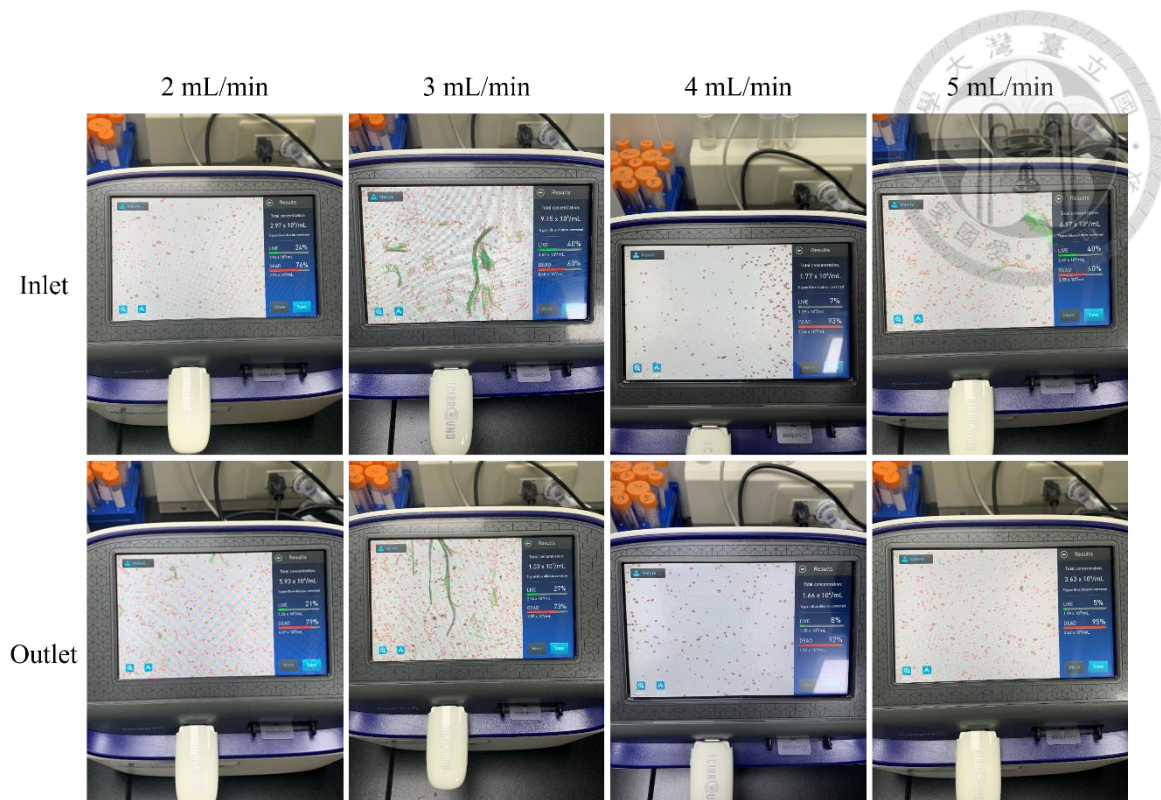


圖 4-18 初始不同流量下與出口之細胞濃度，其中，內側出口收集了 3 mL，外側出口收集了 3 mL 的細胞懸浮液

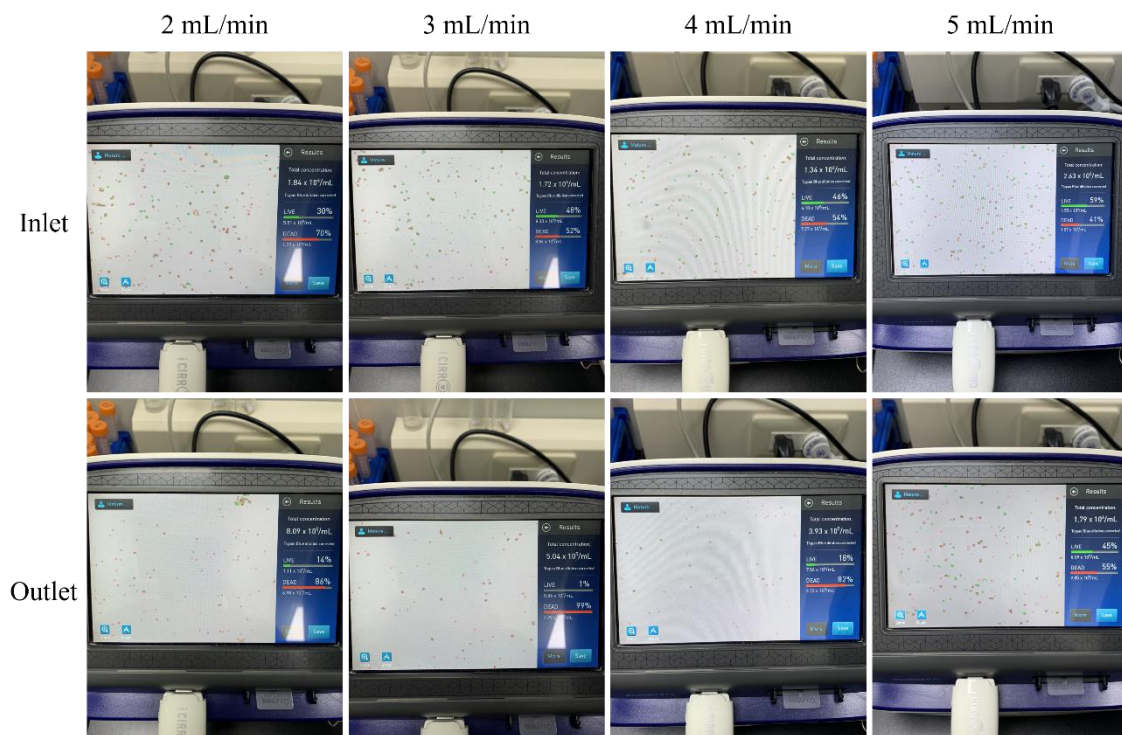


圖 4-19 改進後不同流量下與出口之細胞濃度其中，內側出口收集了 5 mL，外側出口收集了 2.5 mL 的細胞懸浮液



4.4 處理時間比較

肝臟細胞的製備過程中，需要經過多次的過濾及離心處理，如圖 4-20 所示，相當費時費力，總共需要花費的時間約為 3 h，若是使用本研究的微流道裝置進行分離，就可以省去離心的步驟，並且可以在 1 min 內處理 4 mL 的細胞懸浮液。

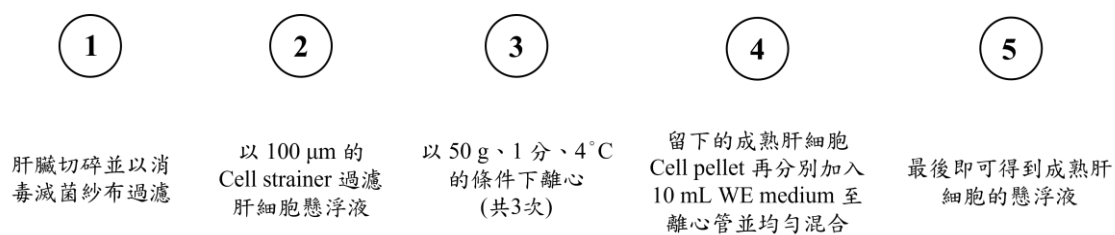


圖 4-20 正常肝臟細胞處理流程圖



4.5 成熟肝細胞形貌

成熟肝細胞是以 5×10^5 cells/mL 的細胞濃度進行培養，圖 4-21 與圖 4-22 分別為細胞培養的高倍率與低倍率照片。由圖 4-21 可以得知，(a)和(d)為剛培養 4 h 時所拍攝的照片，可以看到經過正常離心處理程序的細胞培養照片(a)，相較微流道裝置分離所培養的細胞照片(d)，可以明顯看出(a)的雜質少了許多，此外，(d)之所以看到細胞排列較為緊密有可能是因為細胞培養過程中，微流道裝置並無法 100% 將成熟肝細胞與小型肝細胞完全分離，所以有少量的小型肝細胞也在裡面所導致的。(b)和(e)則在培養第一天都有開始生長，在第三天時，可以看到無論是經過離心處理還是使用微流體裝置分離，從(c)和(f)可以看到都有生長成成熟肝細胞的型態，證明了使用本研究的微流道裝置可以使成熟肝細胞被分離出來，並且能順利成長。

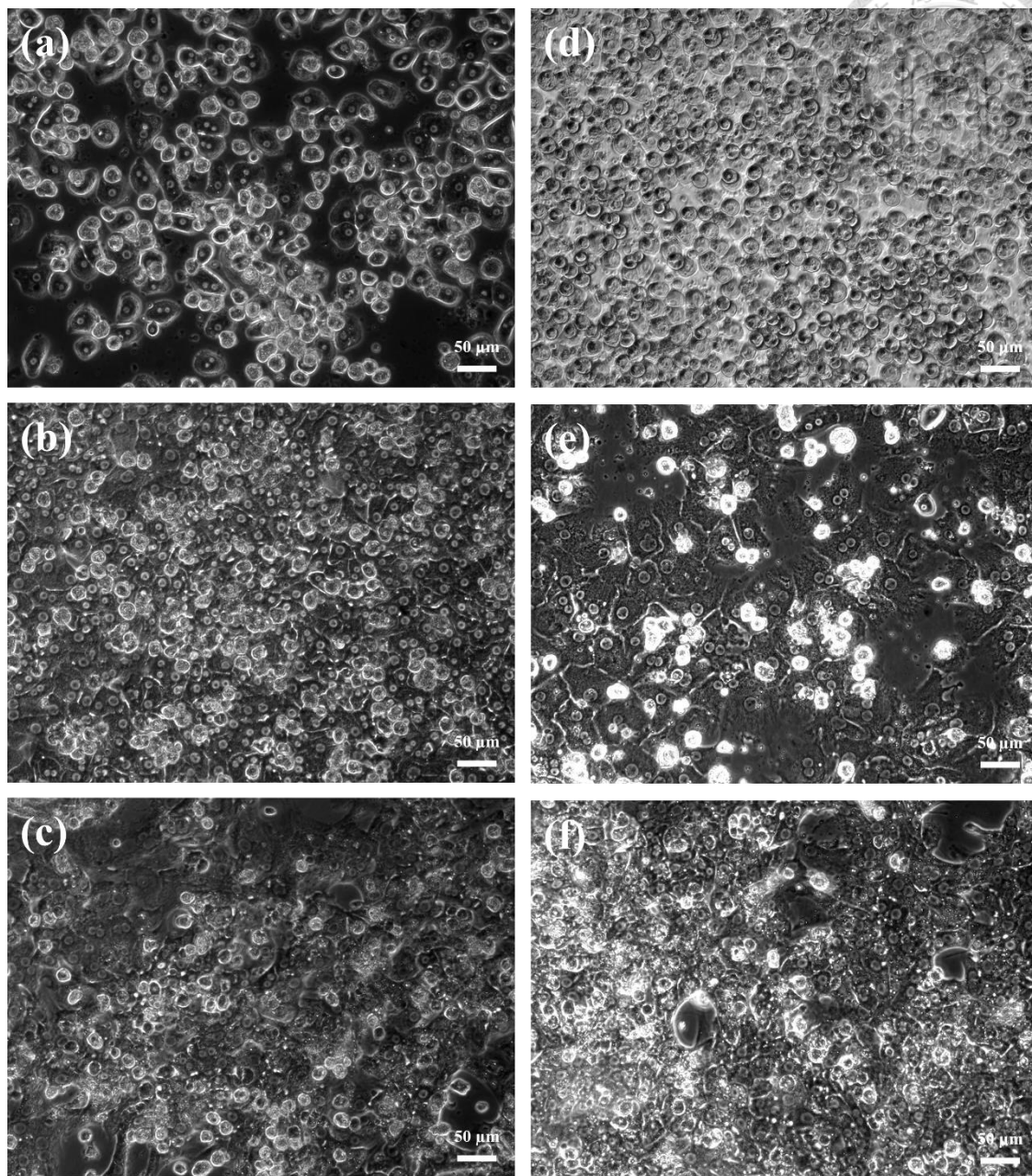


圖 4-21 細胞培養之高倍率照片。(a)、(b)、(c)為經正常離心程序培養之成熟肝細胞；(d)、(e)、(f)為使用微流道裝置分離之成熟肝細胞，其中，分別培養 4h、1 天以及 3 天。

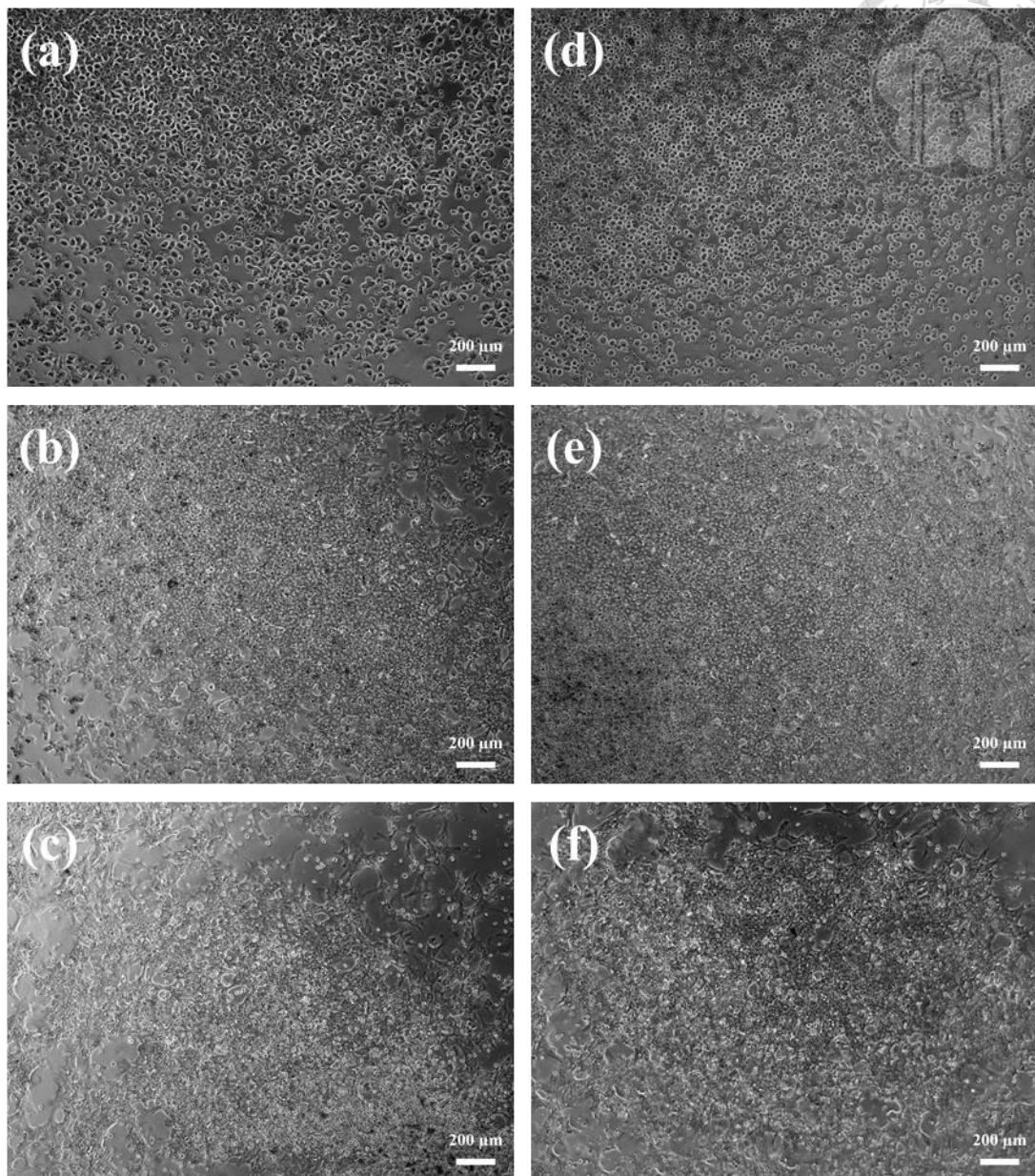


圖 4-22 細胞培養之低倍率照片。(a)、(b)、(c)為經正常離心程序培養之成熟肝細胞；(d)、(e)、(f)為使用微流道裝置分離之成熟肝細胞，其中，分別培養 4h、1 天以及 3 天。

4.6 尿素分析 (Urea assay)

尿素代謝是評斷肝機能的指標之一，尿素分泌量越多代表肝機能表現越好，由圖 4-23 可以看出使用微流道裝置分離培養的成熟肝細胞，尿素濃度與經過離心處理的成熟肝細胞有相同的趨勢，在培養到第三天時尿素分泌量最多，第五天時因為成熟肝細胞的代謝機能有所下降，因此，尿素分泌量也有所下降。

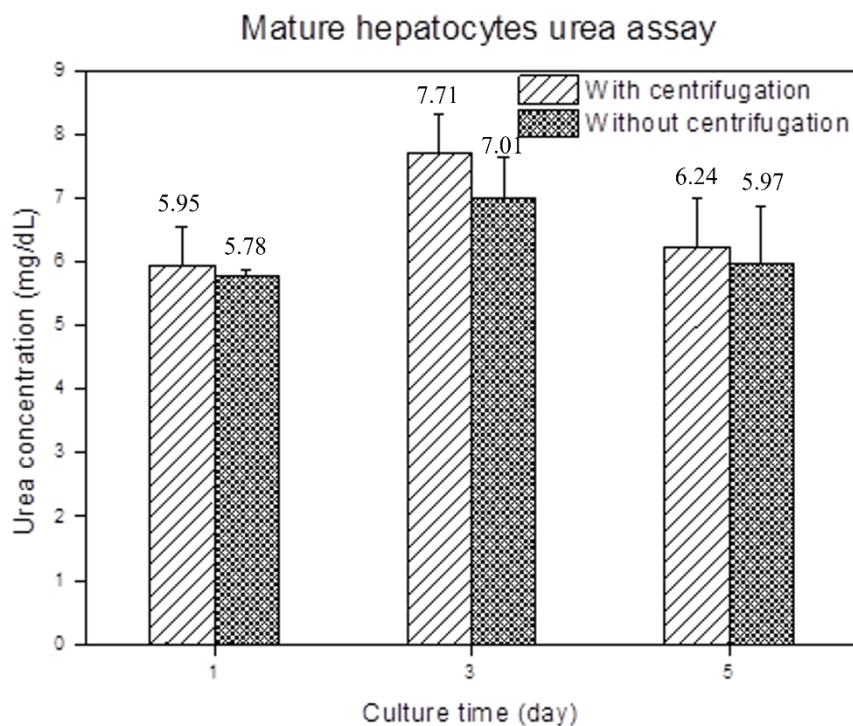


圖 4-23 離心處理前與離心處理後的成熟肝細胞尿素分析

第5章 結論與未來展望



5.1 結論

首先，使用雷射共軛焦顯微鏡觀察微流道之寬度、深度以及橫截面輪廓，之後透過注射幫浦來設定不同流量，並使用 Countess II FL Automated Cell Counter 進行細胞計數，藉此得知各個流量所對應成熟肝細胞的分離效率，最後，針對培養的成熟肝細胞進行機能測試，比較經過正常離心程序以及微流道裝置分離所培養的成熟肝細胞之差異。以下為統整各個實驗以及儀器之分析結果：

1. 微流道使用的掃描速度 300 mm/s、頻率 20 kHz、雷射功率 4.69 W、線間距 0.06 mm 和掃描次數 2 次、第一次掃描角度為 45 度，第 2 次掃描則旋轉 90 度至 135 度，使用雷射共軛焦顯微鏡去觀察發現，CO₂ 雷射所雕刻出的微流道的寬度與深度分別為 $484.55 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 以及 $139.09 \pm 5.6 \mu\text{m}$ 。
2. 將注射幫浦設定流量為 2、3、4 mL/min，成熟肝細胞的分離效率都 > 80% 將流量繼續提升至 5 mL/min 時，分離效率則下降到 74.6%。故本研究最佳的流量參數為 4 mL/min。
3. 在進行細胞培養時，經觀察發現無論是經正常程序離心還是使用微流道裝置進行分離所培養之成熟肝細胞，於第 3 天時都可以觀察到生長出肝細胞之型態，證明了使用本研究的微流道裝置之可行性。
4. 針對所培養之成熟肝細胞進行 Urea assay 比較發現，經過離心以及微流道裝置分離培養的成熟肝細胞，有著相同的趨勢，代表兩種不同處理方式所培養的成熟肝細胞，肝機能指數無太大區別。



5.2 未來展望

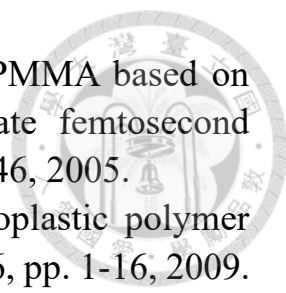
根據本研究之實驗結果與儀器分析結果並結合相關參考文獻，本研究可改善及發展之方向如下：

1. 本研究是使用雙面膠帶將兩片 PMMA 基板，雖然這種黏合方式可以快速黏合，但是也限制 PMMA 材料本身具有光學透明性的優點，若是使用熱黏合或溶劑輔助黏合的方式，就可以把微流道裝置放置在顯微鏡底下做觀察。
2. 本研究使用螺旋微流道的被動式分離將顆粒大小不同的細胞進行分離，若是可以結合蛇形微流道或確定性橫向位移做結合，或許就能夠更進一步提高細胞分離效率。
3. 在細胞培養前，可以針對收集的成熟肝細胞進行粒徑分析的實驗，判斷使用微流道裝置分選出的細胞是否都是成熟肝細胞，還是有少量小型肝細胞也混雜其中。
4. 為了確認使用注射幫浦注入的細胞是否都能順利從出口收集，可以做細胞回收率的實驗，藉此判斷是否有細胞會卡在微流道中。

參考文獻



- [1] S. Prakash and S. Kumar, "Fabrication of microchannels: a review," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture*, vol. 229, no. 8, pp. 1273-1288, 2015.
- [2] Z. Wan, Y. Li, H. Tang, W. Deng, and Y. Tang, "Characteristics and mechanism of top burr formation in slotting microchannels using arrayed thin slotting cutters," *Precision Engineering*, vol. 38, no. 1, pp. 28-35, 2014.
- [3] M. Pan, D. Zeng, and Y. Tang, "Feasibility investigations on multi-cutter milling process: A novel fabrication method for microreactors with multiple microchannels," *Journal of Power Sources*, vol. 192, no. 2, pp. 562-572, 2009.
- [4] J. Brugger, R. Buser, and N. De Rooij, "Silicon cantilevers and tips for scanning force microscopy," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 34, no. 3, pp. 193-200, 1992.
- [5] J. Vieillard., "Integrated microfluidic–microoptical systems fabricated by dry etching of soda-lime glass," *Microelectronic engineering*, vol. 85, no. 2, pp. 465-469, 2008.
- [6] 徐竣祈, "透過專利、學術論文分析技術發展趨勢—以蝕刻技術為例," 碩士, 科技管理研究所, 國立政治大學, 台北市, 2008. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/11296/d2kmr8>
- [7] P. Dyer, "Excimer laser polymer ablation: twenty years on," *Applied Physics A*, vol. 77, pp. 167-173, 2003.
- [8] Q. Heng, C. Tao, and Z. Tie-chuan, "Surface roughness analysis and improvement of micro-fluidic channel with excimer laser," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 2, no. 4, pp. 357-360, 2006.
- [9] J. Fernández-Pradas, D. Serrano, P. Serra, and J. Morenza, "Laser fabricated microchannels inside photostructurable glass-ceramic," *Applied Surface Science*, vol. 255, no. 10, pp. 5499-5502, 2009.
- [10] D. Lim, Y. Kamotani, B. Cho, J. Mazumder, and S. Takayama, "Fabrication of microfluidic mixers and artificial vasculatures using a high-brightness diode-pumped Nd: YAG laser direct write method," *Lab on a Chip*, vol. 3, no. 4, pp. 318-323, 2003.
- [11] D. Snakenborg, H. Klank, and J. P. Kutter, "Microstructure fabrication with a CO₂ laser system," *Journal of Micromechanics and microengineering*, vol. 14, no. 2, p. 182, 2003.

- 
- [12] D. Day and M. Gu, "Microchannel fabrication in PMMA based on localized heating by nanojoule high repetition rate femtosecond pulses," *Optics express*, vol. 13, no. 16, pp. 5939-5946, 2005.
 - [13] C.-W. Tsao and D. L. DeVoe, "Bonding of thermoplastic polymer microfluidics," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 6, pp. 1-16, 2009.
 - [14] A. Bamshad, A. Nikfarjam, and H. Khaleghi, "A new simple and fast thermally-solvent assisted method to bond PMMA–PMMA in microfluidics devices," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 26, no. 6, p. 065017, 2016.
 - [15] C.W. Tsao, C.-Y. Chang, and P.-Y. Chien, "Microwave-assisted solvent bonding for polymethyl methacrylate microfluidic device," *Micromachines*, vol. 13, no. 7, p. 1131, 2022.
 - [16] I. Doh and Y.H. Cho, "A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 121, no. 1, pp. 59-65, 2005.
 - [17] J. D. Adams, U. Kim, and H. T. Soh, "Multitarget magnetic activated cell sorter," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 47, pp. 18165-18170, 2008.
 - [18] M. Murata, Y. Okamoto, Y.-S. Park, N. Kaji, M. Tokeshi, and Y. Baba, "Cell separation by the combination of microfluidics and optical trapping force on a microchip," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 394, pp. 277-283, 2009.
 - [19] J. Shi, H. Huang, Z. Stratton, Y. Huang, and T. J. Huang, "Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW)," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 23, pp. 3354-3359, 2009.
 - [20] X. Ding ., "Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 36, pp. 12992-12997, 2014.
 - [21] Y. Lu, J. Ying, S. Mu, W. Tan, and G. Zhu, "Sheathless and high-throughput separation of multi-target particles combining inertia and deterministic lateral displacement (DLD) in a microchannel," *Separation and Purification Technology*, vol. 345, p. 127369, 2024.
 - [22] M. Yamada, M. Nakashima, and M. Seki, "Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel," *Analytical chemistry*, vol. 76, no. 18, pp. 5465-5471, 2004.
 - [23] J. Zhang ., "Fundamentals and applications of inertial microfluidics:

- A review," *Lab on a Chip*, vol. 16, no. 1, pp. 10-34, 2016.
- [24] A. Abdulla, T. Zhang, K. Z. Ahmad, S. Li, J. Lou, and X. Ding, "Label-free separation of circulating tumor cells using a self-amplified inertial focusing (SAIF) microfluidic chip," *Analytical Chemistry*, vol. 92, no. 24, pp. 16170-16179, 2020.
- [25] J. Zhang ., "High-throughput separation of white blood cells from whole blood using inertial microfluidics," *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, vol. 11, no. 6, pp. 1422-1430, 2017.
- [26] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, "Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration," *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 11, pp. 1906-1914, 2008.
- [27] S. S. Kuntaegowdanahalli, A. A. S. Bhagat, G. Kumar, and I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 20, pp. 2973-2980, 2009.
- [28] W. Pakhira, R. Kumar, and K. M. Ibrahimi, "Distinct separation of multiple CTCs using inertial focusing phenomena utilizing single-looped spiral microfluidic lab-on-chip," *Chemical Engineering Science*, vol. 275, p. 118724, 2023.
- [29] K. Akbarnataj, S. Maleki, M. Rezaeian, M. Haki, and A. Shamloo, "Novel size-based design of spiral microfluidic devices with elliptic configurations and trapezoidal cross-section for ultra-fast isolation of circulating tumor cells," *Talanta*, vol. 254, p. 124125, 2023.
- [30] M. Adel, A. Allam, A. E. Sayour, H. F. Ragai, S. Umezu, and A. M. Fath El-Bab, "Fabrication of spiral low-cost microchannel with trapezoidal cross section for cell separation using a grayscale approach," *Micromachines*, vol. 14, no. 7, p. 1340, 2023.
- [31] M. E. Warkiani *et al.*, "An ultra-high-throughput spiral microfluidic biochip for the enrichment of circulating tumor cells," *Analyst*, vol. 139, no. 13, pp. 3245-3255, 2014.
- [32] 沛霖科技股份有限公司。同軸視覺雷射打標系統。檢自 <https://www.lasersolution.com.tw/coaxial-vision-laser-marking-system.html>
- [33] U. Ali, K. J. B. A. Karim, and N. A. Buang, "A review of the properties and applications of poly (methyl methacrylate)(PMMA)," *Polymer Reviews*, vol. 55, no. 4, pp. 678-705, 2015.
- [34] Keyence. 3D Laser Scanning Confocal Microscope. Retrieved from

- https://www.keyence.com/products/microscope/laser-microscope/vk-x100_x200/models/vk-x210/
- [35] Thermo Fisher. Countess II FL Automated Cell Counter . Retrieved from
<https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/references/newsletters-and-journals/bioprobess-journal-of-cell-biology-applications/bioprobess-70/countess-ii-fl-automated-cell-counter.html>
- [36] Poon, C. (2022). Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 126, 105024.