

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

微流通道的光電性質研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2218-E-002-039-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學電機工程學系暨研究所

計畫主持人：詹國禎

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 30 日

## 計畫名稱：微流通道的電光性質研究

**Title:**

### 摘要

本計畫以半導體微製程技術及其他微機電的技術，以矽晶片為基座材料，設計與製作數種幾何形狀，寬深，及結構不同的微流體晶片，藉由晶片上的儲存槽及微流道，將微量體積的 DNA 溶液置入其中，外加電極電壓以驅使流體中的帶電分子或離子流動，再利用儀器量測離子電流與電壓，電流與時間的關係曲線，嘗試由微流道中離子電流的差異性來分辨不同的分子片段，配合理論模型以探討不同的 DNA 片段的差異性，建立起一套有別於一般光學量測的電性量測系統，並且將更進一步切入微奈米結構與生醫微分子的交互作用研究。

**關鍵詞：**微流道、矽晶片、DNA、電性量測系統、微奈米結構與生醫微分子的交互作用

### Abstract

The objective of the study is to setup the Fabrication process of the microfluid devices and study of the electrical characterization in biomolecular aqueous solution. We use the process of the silicon semiconductor and the MEMS techniques on silicon wafer, and make different microchannels on it. By loading a small amount of DNA reagents in the microchannel and applying Voltage on the both side of the microchannel, the variation of the current of DNA aqueous solutions was carried out and detected.

In the process of the Fabrication, we attempt some different methods to product etching mask and confer their quality for wet etching process. We also use wet etching and dry etching method to make the microchannel, and fabricate three chips with its particular purpose.

Furthermore, the curve of current versus voltage and the curve of current versus time were recorded precisely in time by a high-resolution measurement system. With these results, we discover the distinct divergences in different DNA reagents. It was successfully to distinguish the reagents as dGTP, dATP, dTTP, dCTP.

**Keywords:** microchannel, silicon wafer, DNA, high-resolution measurement system

## 報告內容

### 一、動機與目的

實驗室晶片是將實驗室裏一系列的分析實驗步驟與反應縮小到在一個晶片裏面執行,亦即本計劃所探討的微流體晶片載具之廣泛定義。在1989年Manz[1]提出微小化全自動分析系統的概念(Micro-total Analysis System,  $\mu$ -TAS)之後,藉著製程技術不斷地進步,這種微小化的技術可藉由半導體製程以及日漸發展中的微奈米機電技術來完成。微電泳晶片目前主要應用為生化分析常使用的電泳技術載具平台,由於毛細管電泳的原理係利用被分析物電泳速率的不同而達成分離的效果,即當被分析物處於電場環境中時,由於其帶電性多寡的不同而使得在電場作用下具有不同的遷移速度;因此,若以毛細管電泳為樣本,進一步將其微小化,並加以改良其功能及設計,將實驗中進行的生化或一般化學反應整合在微小的晶片上,如此,不僅實現微電泳分析系統,更可以整合如聚合酶鍊反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)等其他檢體處理程序,同時也減少試劑的用量、人為操作污染等問題,另外也可以達到全功能化分析的目的。

本計劃初期目標是先根據實驗室之前的研究成果,亦即微流體晶片的流道設計,進行改良與製作,利用半導體的矽製程及微機電(Micro-Electro Mechanical Systems, MEMS)的技術,製作DNA電泳的微流體晶片,並探討製程上的問題與解決方法,建立一個製作矽基微流體晶片的實驗室標準流程;接續藉由晶片上的微流道,透過外加電場驅動的方式,達到控制流體流向的目的,進行溶液中微小分子的電流特性分析,藉此了解帶電離子的電流與結構的特性。

首先針對訊號傳導的方式來加以探討,由於在半導體中負責傳導訊號的是電子與電洞,而在生醫分子中傳導者則為正負離子,且前者傳遞訊號的速度甚大於後者;在另一方面,隨著正負離子種類的不同,可預期的是,它們於流道中運動的型式也必有差別。本計畫設計與製作微米尺寸的微流道於矽晶片上,然後將內含帶電離子的生物溶液置放於微流道內,藉由外加偏壓量測電流的方式,並根據不同的實驗方法,預期由其電流響應中,分析出離子的重要參數值(如質量等)差異,並瞭解其運動的機制。其中電性的量測包含DC(直流電)的暫態及穩態的響應,藉此建立離子在微流道結構中的特性,是本計畫預計完成的工作。

## 二、原理與方法

### 1. 晶片設計與製程

晶片設計的目的是要針對生醫分子在微流道中的電泳動模型進行研究，而目前微流道最廣泛的應用，主要在電泳分離法方面，其中又以 DNA 分子為主要分離物質；由於 DNA 分子帶負電，所以可以在晶片上外加偏壓，使流道中的流體產生電流，驅使其中的帶電離子或分子向電性相反的電極移動，藉由量測電流的方式，觀察紀錄電流曲線的特異性，研究電流的變化與分子大小，長短和帶電量等關聯性，進而用來分辨不同的 DNA 片段；而要更進一步在流道中進行分離的工作，則必須考量流道的幾何形狀及流道長度，來做為功能上變化的考量。

流道所需蝕刻的深度與微量吸管 (pipet) 的體積及流道設計的寬度有關；微量吸管的最小體積約 0.5  $\mu\text{L}$ ，因此晶片上的電泳槽體積亦應盡量接近此一大小，以減少檢體注射的困難；因此，以半徑 500  $\mu\text{m}$  的儲存槽為例，其換算深度為 640  $\mu\text{m}$ ，以一般矽蝕刻製程而言，是極困難到達此一深度；然而藉由文獻及實際操作得知，理想的流道深寬比以大於 1:10 為較佳設計[2]，而寬道 100  $\mu\text{m}$  的流道，藉由操作者控制檢體量，只要大於 10  $\mu\text{m}$  之流道深度，即可達到檢體注射之目的及檢體需要量的要求。

在製作微流體晶片的基材方面，目前有數種不同特性的基材作為微流體晶片的基座，包括玻璃，高分子材料如 PMMA 及矽晶片等；鑑於實驗研究方向為探討生醫流體與半導體之間所引發的微奈米效應，因此首先選擇以半導體製程中最普遍的矽晶片為基材，先行建立一套以矽晶片為基礎，能配合實驗設備參數相關性的實驗室標準製程，將來再嘗試以砷化鎵，砷銻化鎵等其他半導體材料為基座去進行更深入的探討。本實驗製作微流體晶片的方法，採用的是微機電的矽製程，選擇晶向(100)的矽晶為基底材質；至於在目前眾多的製程中，基於本實驗欲蝕刻至 10  $\mu\text{m}$  以上的蝕刻深度，我們採用體型微細加工(Bulk micro-machining)的方式，以矽的氧化物或氮化物為蝕刻罩幕，並嘗試用濕蝕刻(wet etching)非等向性蝕刻(anisotropic etching)，及反應離子蝕刻(Reactive Ion Etching; RIE)來進行晶片的製作[3]。

## 2. 電泳原理與方法

分子電荷的來源,是由任何物質於本身的解離作用或表面上吸附其他帶電質點,在電場中便會向一定的電極移動。作為帶電顆粒可是小的離子,也可是生物大分子,蛋白質、核酸、病毒顆粒、細胞器等;以蛋白質為例,組成蛋白質的胺基酸次單元體為兩性物質,在一定的 pH 條件下可解離帶電而形成電荷來源,因此可以應用電泳法來加以分離。不同的帶電顆粒在同一電場的運動速度不同,其泳動速度用遷移率(mobility)來表示。泳動度即帶電顆粒在單位電場下的泳動速度。可以下公式計算:

$$U = v/E = (d/t)/(V/l)=dl/Vt$$

一般所帶淨電荷數越多,顆粒越小,越接近球形,則在電場中泳動速度越快,反之則慢。可見泳動度與球形分子、介質黏度、顆粒所帶電荷有關。

影響電泳速度的外界因素之關係可以右式表示  $v = \varepsilon E D / C \eta$

由此式顯示泳動速度(v)與電動電勢( $\varepsilon$ ),所加的電場強度(E)及介質的介電常數(D)成正比,與溶液的黏度( $\eta$ )及常數(C)成反比。

1.電場強度:電場強度是指每釐米的電位降,即電位梯度。電場強度越高,則帶電顆粒泳動越快。

2.溶液 pH :溶液的 pH 值決定帶電顆粒的解離程度。如對蛋白質而言,溶液 pH 值離等電點 pI 越遠,則所帶淨電荷越多,泳動速度越快。

3.溶液的離子強度:離子強度會影響顆粒的電動電勢( $\varepsilon$ ),緩衝液離子強度越高,電動電勢越小,則泳動速度越慢;反之,則越快。

4.電滲透現象:液體在電場中,對於一個固體支持物的相對移動,稱為電滲透(electroosmosis)現象。所以電泳時,顆粒泳動的表面速度力是顆粒本身的泳動速度與由電滲透流攜帶顆粒移動的速度和。

5.對支持物的選擇:一般要求支持物均勻,吸附力小,否則電場強度不均勻時,會影響區帶的分離及實驗結果與掃描圖譜均法法重複。

6.溫度對電泳的影響:電泳過程中由於通電產生焦耳熱,熱對電泳有很大影響。溫度升高時,介質黏度下降,分子運動加快,引起自由擴散變快,遷移率增加。

### 4-2 毛細管電泳的分離原理

根據微流體晶片上微流道的定義,可以了解其設計原理,乃是來至於毛細管電泳的分離原理;我們可以將微電泳晶片想像成將毛細管電泳設備,在不包含電壓供

應器下的微小化結果,因此,我們探討微流道的分離原理,必須由毛細管電泳的分離原理來著手;離子在電場中的電泳動速度 (electrophoretic velocity) 可以式 (1) 表示:

$$v_e = \mu_e \times E = \mu_e \times \frac{V}{L_t} \dots\dots\dots (1)$$

$v_e$ : 樣品離子的電泳動速度 (m/s)

$\mu_e$ : 樣品離子的電泳動速率 (m<sup>2</sup>/V<sup>1/2</sup>s)

$E$ : 電場強度 (V/m)  $V$ : 電泳電壓 (V)  $L_t$ : 毛細管總長度 (m)

毛細管材質通常為熔矽,管壁外層以polyimide 高分子層保護以增加其韌性。當管柱中電解質溶液pH 值大於2 時,毛細管表面的矽醇基 (SiOH) 會解離成SiO<sup>-</sup>而帶負電;溶液中正離子受到負電荷的吸引而聚集於管壁附近,形成電雙層。在外加電場的作用下,擴散層中的水合正離子會帶動整個溶液朝陰極方向移動,此移動即為電滲流 (electroosmotic flow),電滲流的速度可以式 (2) 表示:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E = \mu_{eo} \times \frac{V}{L_t} \dots\dots\dots (2)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \dots\dots\dots (3)$$

$v_{eo}$ : 電滲流流速 (m/s)

$\mu_{eo}$ : 電滲流移動率 (m<sup>2</sup>/V<sup>1/2</sup>s)

$\epsilon$ : 電泳溶液的介電常數 (C<sup>2</sup>/J<sup>1/2</sup>m)

$\zeta$ : 管壁電雙層的則塔電位 (V)

$\eta$ : 電泳溶液的黏滯係數 (N<sup>1/2</sup>s/m<sup>2</sup>)

毛細管內的樣品離子因本身電泳動及電滲流的雙重影響,產生一淨移動速度  $v$ , 以式 (4) 表示:

$$v = v_e + v_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo}) \times E = (\mu_e + \mu_{eo}) \times \frac{V}{L_t} \dots\dots\dots (4)$$

$v$ : 電泳淨速度 (m/s)

樣品離子於毛細管中的移動時間,  $t$ , 可以式 (5) 表示:

$$t = \frac{L_d}{v} = \frac{L_d}{(\mu_e + \mu_{eo}) \times E} = \frac{L_d \times L_t}{(\mu_e + \mu_{eo}) \times V} \dots\dots\dots (5)$$

t：移動時間 (s)

Ld：毛細管樣品注入端到偵測器的長度 (m)

另外，毛細管電泳的分離效率可以理論板數，N，來表示：

$$N = \frac{L_d}{H} = \frac{L_d^2}{\sigma^2} = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \times L_d \times E}{2 \times D} \dots\dots\dots (6)$$

N，亦可表示為：

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t}{W_{0.5}} \right)^2 \dots\dots\dots (7)$$

H：理論板高度 (m)

D：樣品離子在電泳溶液中的擴散係數 (m<sup>2</sup>/s)

σ<sup>2</sup>：變異度 (variance)

W<sub>0.5</sub>：信號峰的半高寬 (s)

毛細管電泳分離的解析度R，則可以式 (8) 表示：

$$R = \frac{1}{5.7} (\mu_{e,1} + \mu_{e,2}) \times \left[ \frac{V}{D(\mu_{e'} + \mu_{eo})} \right]^{1/2} \dots\dots\dots (8)$$

R：解析度

μe'：兩種離子的平均電泳動速率 (m<sup>2</sup>/V<sup>1/2</sup>s)

μe,1：樣品離子1 的電泳動速率 (m<sup>2</sup>/V<sup>1/2</sup>s)

μe,2：樣品離子2 的電泳動速率 (m<sup>2</sup>/V<sup>1/2</sup>s)

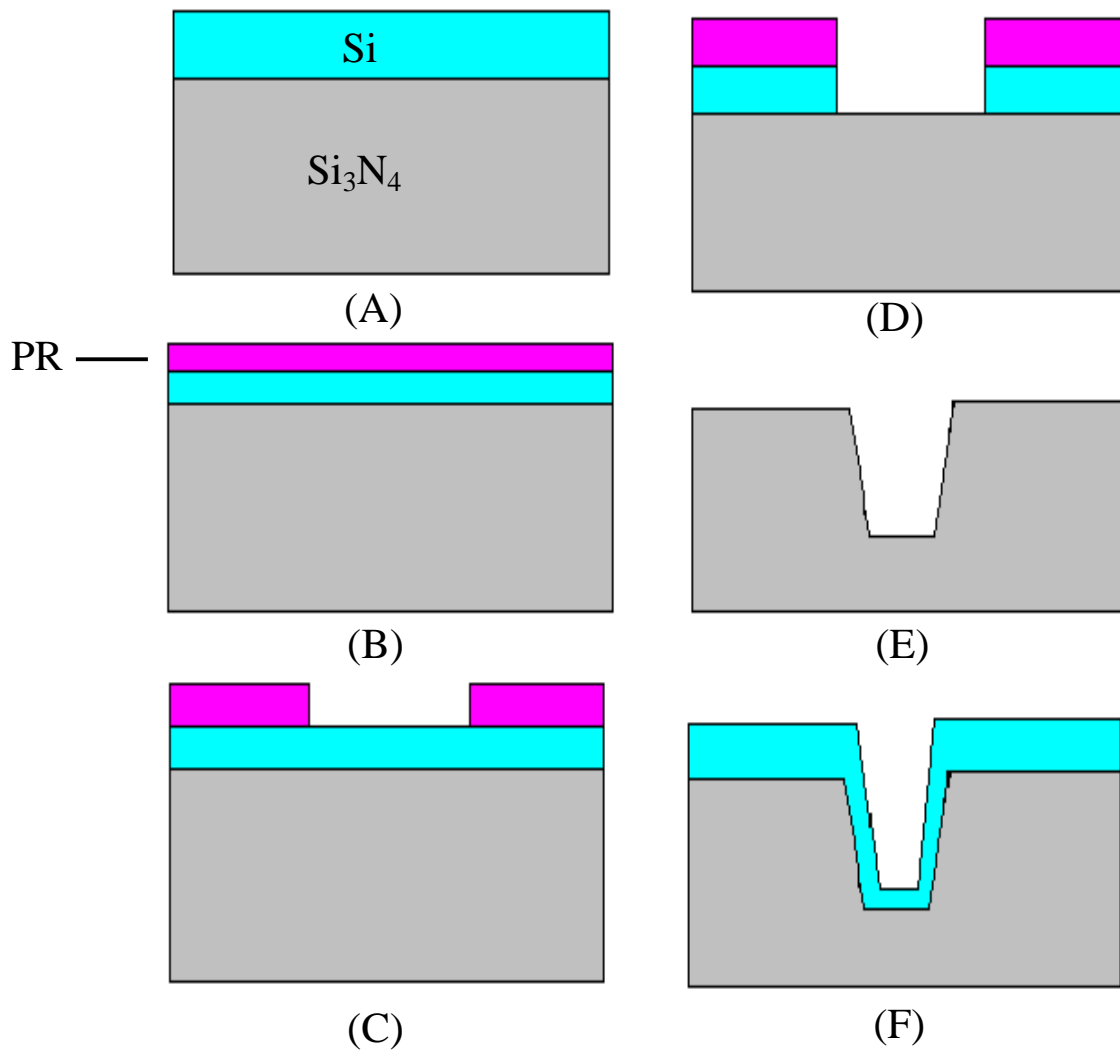
由式 (8) 可知，對陰離子而言，其移動方向與電滲流方向相反，

μe'與μeo 符號相反、分母較小，所以解析度較大。最佳解析度發生在電滲流約等於陰離子的平均電泳移動速率，即 |μeo| 綫 |μe'|，但分析時間會增加。

對陽離子而言，因其移動方向與電滲流方向相同，解析度較差。目前有許多方法，如加入界面活性劑或於毛細管內壁塗覆一層高分子物質來控制電滲流方向及大小，以提高解析度[4]。

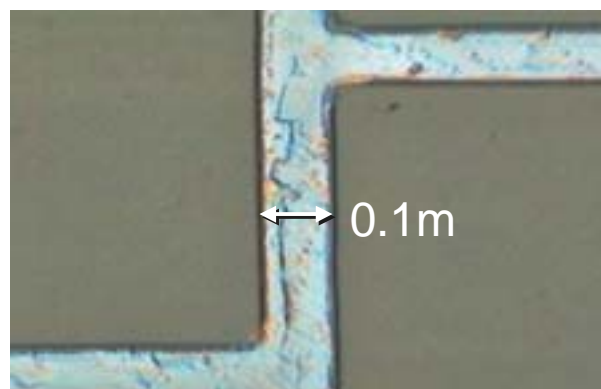
### 三、結果與討論

#### 1. 晶片製作流程與結果，如下：



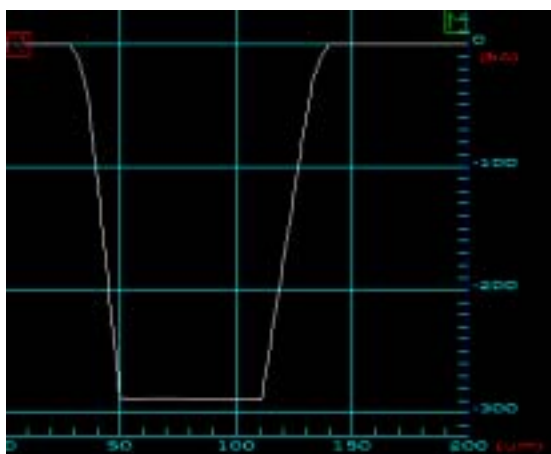
製作流程順序如下：

- (A) 蝕刻幕罩薄膜沉積
- (B) 上光阻
- (C) 曝光顯影
- (D) 在蝕刻幕罩上定義圖形
- (E) 矽晶片蝕刻
- (F) 濺鍍絕緣層

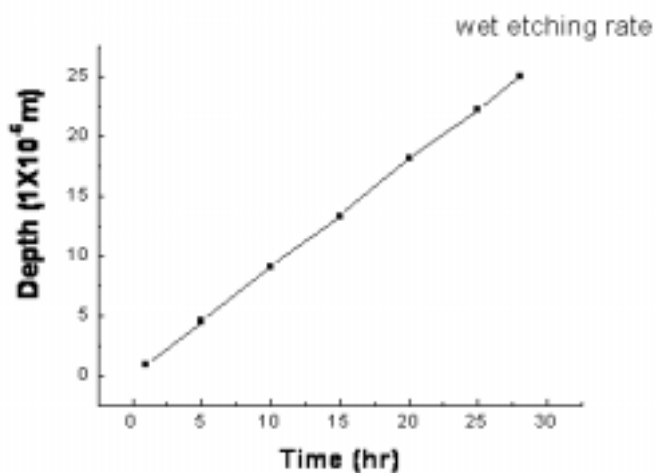


圖二 十字型流道交叉處影像(光學顯微鏡放大 100 倍)





圖三 十字型流道交叉處參數量測。深  $29\mu\text{m}$ ，開口寬  $110\mu\text{m}$ ，底部寬  $60\mu\text{m}$

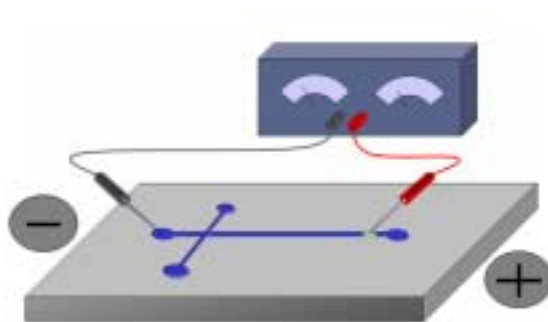


圖四 濕蝕刻速率曲線圖

圖二為十字型流道交叉處影像，圖三為其蝕刻深度及深寬比資訊；圖四則為濕蝕刻速率曲線圖。此處為微流道設計來擷取電泳檢體，將電泳檢體定量的區域，由光學影像可以發現流道表面因不平坦而呈現出來的顏色變化，經由量測的結果，得知其表面高度差異約在數百埃，此一數據將列入日後套討流體模型的變因討論；然而在電流量測實驗中，流道深度為  $28\mu\text{m}$ ，兩者差異懸殊，且在微流道管壁形成的電雙層的結構，將減少表面不平滑度所造成的影響；在流道的深寬參數方面，在經過長達 35 小時的濕蝕刻過程後，得到  $29\mu\text{m}$  深的流道深度；而流道原始設計的寬度是  $100\mu\text{m}$ ，經由非等向性蝕刻所造成的 V 形寬度差異，

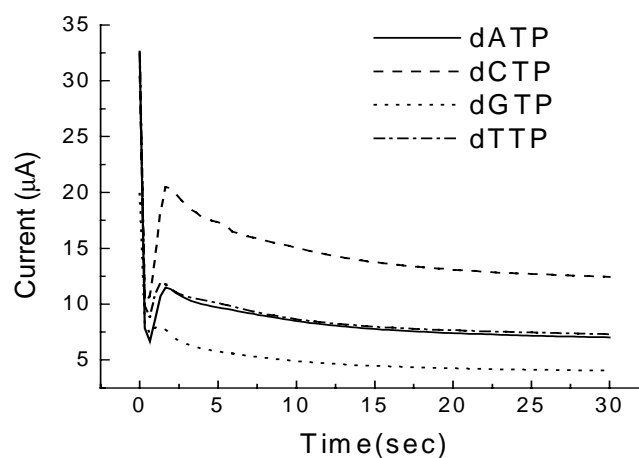
也分別產生流道開口為 110 微米及 60 微米的寬度。關於開口的寬度超過原始設計的寬度 10 微米，主要因素應是在進行蝕刻幕罩的蝕刻過程中，由於以 BOE 蝕刻時，蝕刻速率較快，而造成蝕刻過度，蝕刻了部分流道開口邊緣的的蝕刻幕罩，使其較其他表面微薄，造成相同蝕刻時間下蝕刻了開口的矽質成分，而使開口擴大。

## 2. 電性量測結果與討論



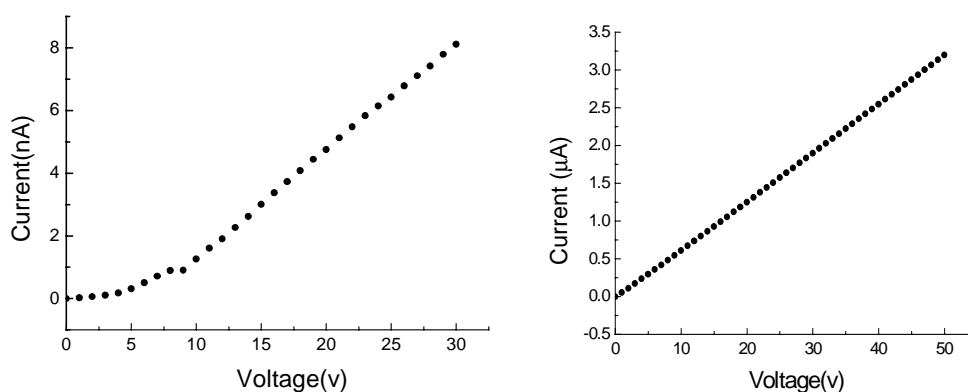
圖五 微電泳晶片電性量測系統示意圖

在晶片製程完成微流體晶片初步的製作後，接續要進行的是生物分子微流體電性偵測的研究與探討工作，初步採用十字型微流道作為實驗的載具，微電泳晶片電性偵測法式意圖，如圖五所示；我們在分離流道兩端施加電場，並量測溶液的電流值，藉由電流曲線的變化，我們根據電泳原理來加以了解溶液中分子的電泳運動特性。



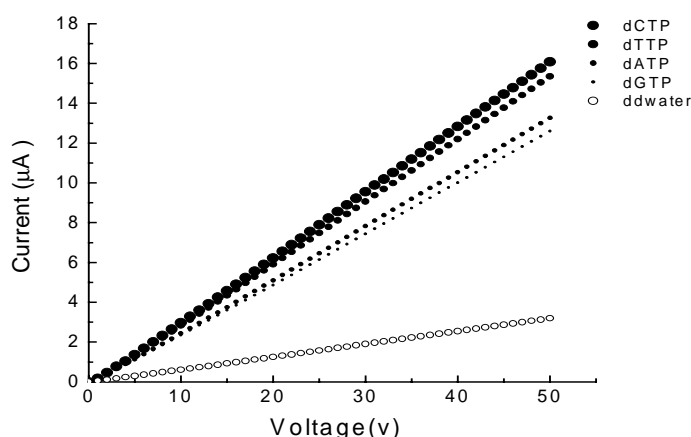
圖六 三磷核苷酸分子電流暫態響應(濃度 100mM，電壓 5V)

四種三磷核苷酸分子的電流暫態響應，其中外加的偏壓為 2 伏特，四種三磷核苷酸分子的濃度均為 100 mM。很明顯地，四種三磷核苷酸分子共同表現出電流的振盪現象，而且隨著時間的增進，電流也逐漸變小。我們初步分析可能的原因是，在外加偏壓開始的瞬間，溶液中的氫離子迅速地往負極移動，造成較大的電流，之後立即下降到電泳液的電流值，而分子量較大的三磷核苷酸分子則緩慢地往陽極移動而逐漸累積在正極板附近；假設當大部分的三磷核苷酸分子都聚集在正極板附近時，由於三磷核苷酸分子所帶的負電在空間中產生一靜電場，而排斥後續的負離子繼續往陽極運動，因此，我們預期此空間電場是造成電流振盪的主要原因。



圖七 微流體晶片表面的 I-V 特性曲線 圖八 二次去離子水的 I-V 特性曲線

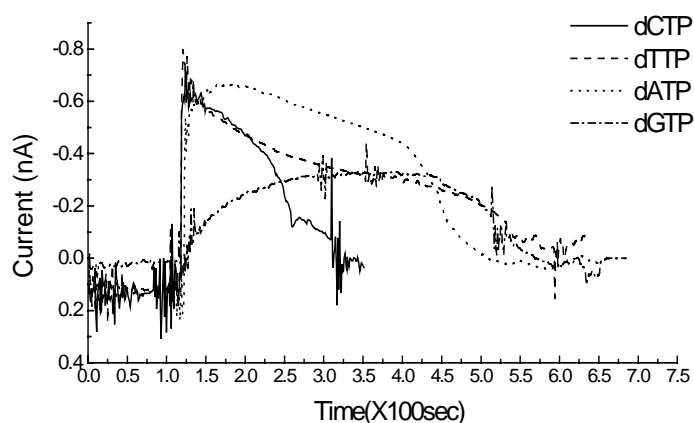
在進行實驗之前，必須先量測電泳環境的背景值大小，包括矽微流體晶片的電流值與電阻值，以及做為電泳環境溶液的二次去離子水的電流值與電阻值，以了解背景值對於分析物的偵測值影響。



圖九 四種三磷核苷酸分子(濃度 0.4mM)與二次去離子的 I-V 特性曲線

二次去離子水與四種相同濃度的三磷核苷酸分子的 I-V 特性曲線，在圖上，

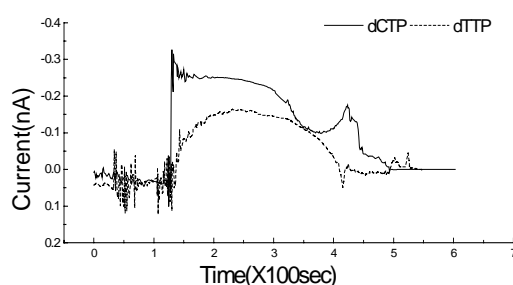
可以清楚看見四種分子及水分子皆呈現相當高的線性關係；同時其電流值皆在微安培( $\mu\text{A}$ )的級數級，彼此差異並不大，然而卻能清楚分辨出五條不重疊的分子電流曲線，在相同的電壓下，顯然其電流由大至小的排列依序為： $d\text{CTP} > d\text{TTP} > d\text{ATP} > d\text{GTP} > d\text{water}$ ，相對於分子量的關係： $d\text{CTP} < d\text{TTP} < d\text{ATP} < d\text{GTP}$ ，同時配合二次去離子水的高電阻特性，顯示其為一極合理的實驗結果。而隨著電壓值的增加，亦可以發現不同分子間電流值差異越大，越能由曲線圖上加以分辨。



圖十 四種三磷核苷酸分子的電流暫態響應 (濃度 0.01mM, 電壓 5V)

若在電泳環境電流穩定後，加入三磷核苷酸分子，而在加入後時間才出現明顯的訊號變化，我們即可以判定此後的電流曲線，即為三磷核苷酸分子的運動行為訊號。將四種不同三磷核苷酸分子的電流偵測結果加以比較，可以發現在三磷核苷酸分子加入的瞬間，電流值迅速由正值轉變為負值，同時數值以倍數增加，顯示此為明顯的非去離子水的電流值，因此可以視為有效偵測到三磷核苷酸分子的訊號，由四次實驗的電流曲線可知，在加入分析物後，濃度相同的三磷核苷酸分子出現不同的現象，觀察分子量最小的 dCTP 分子，發現其電流在瞬間達到最大值，且為四者中最大者，並以較快的速度下降到環境電流值；dTTP 分子量略大於 dCTP 分子，其電流最大值與 dCTP 分子相近，亦是瞬間達到最大值附近，但相較於 dCTP 分子的變化，其下降速度顯然緩慢許多，且下降所消耗的時間與 dATP, dGTP 相近。三磷核苷酸分子的濃度是 0.01 mM，當加入的瞬間即偵測到最大值，說明 5 伏特的定電壓可以將大量的 dCTP 分子與 dTTP 分子瞬間帶到正

極板附近，造成靜電場產生，進而逐漸排斥其他分子再流向正極板，而使電流值逐漸下降。接續再看到 dATP 分子的變化，可以看出其電流值並非快速到達最大值，而是先到達最大值附近，再緩步爬升，在數十秒後才到達最大值，而相較於前二者，其電流下降的速度顯然更加緩慢，由上述差異已可分辨出 dATP 分子與前二者的差異，顯示其最大偏壓值應大於 5 伏特，才能瞬間達到 dATP 分子的最大電流值；最後觀察 dGTP 的電流值部分，明顯發現 dGTP 的電流值遠小於前三者的最大電流值，由他們的分子量，dCTP= 467，dTTP= 482，dATP= 491 與 dGTP= 570，其中 dGTP 遠大於另外三者，因此，可以推斷此現象非常合理；同時也更可以發現 5 伏特的電壓值，須花上更長的時間才能將 dGTP 的電流推動至最大值，並在附近停留較長時間，說明其靜電場的形成時間很長，之後才開始緩慢下降。



圖十一 dCTP 與 dTTP 分子的電流暫態響應

為了有效分辨 dCTP 分子與 dTTP 分子電流曲線的差異，因此，使用定電壓 1 伏特，其他條件相同下來進行實驗，一樣在 120 秒分別加入 dCTP 分子與 dTTP 分子，馬上可以分辨出兩者的差異性，同時也顯示電壓值大小與電流值大小呈現正向關係。

## 五、結語

目前本研究已實驗出能配合實驗室設備的製程相關參數值，包括蝕刻幕罩厚度與濕蝕刻深度，曝光微影時間與尺寸大小等數值，順利製作出不同功能性的微流體晶片，包括寬度 100  $\mu\text{m}$ ，深度 29  $\mu\text{m}$  的雙十字型流道改良晶片；寬度 200  $\mu\text{m}$ ，深度 28  $\mu\text{m}$  的點對點核酸偵測晶片及內置高度 10  $\mu\text{m}$  圓柱的核酸分離晶片，完成矽質微流體晶片的實驗室製作流程建立；同時已能利用製程參數變化來改變流道不同的深度變化，以做為接續的流場模型的演算變化實驗。

在電泳實驗的生物分子量測部分，也初步以現有的半導體量測設備，偵測到三磷核苷酸分子的 I-V 特性曲線與 I-T 暫態響應，並針對不同的樣品注入方式，加以探討三磷核苷酸分子的電流暫態響應差異在生物醫學上與半導體相關特性上的關連與可能的電泳動情形；藉由這套實驗流程系統架構的初步成果，將使本實驗由一般的電泳晶片嘗試，更進一步去深入探討生醫微流體在微流道參數變化下的電場與流場特性，及生物分子與微奈米結構所引發的未知效應，若能結合實驗室所具備的多套功能強大的光學影像系統，架設一完整的生醫光子暨微流體研究的實驗室系統，將使生物微分子在微奈米結構中的電學，電化學，光學及流體力學的特性逐步揭露，進而將之應用在生物醫學上的臨床應用。

## 參考文獻

- [1] A. Manz, D. R. Reyes, D. Iossifidis, P. Auroux, “Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology”, *Anal. Chem.* vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.
- [2] Stephen D. Senturia, “Microsystem Design”, Wiley. 2001.
- [3] 莊達人, “VLSI 製造技術”, Ch. 5, 高立圖書, 2001.
- [4] R. Kuhn and S. Hoffstetter-kuhn, *Capillary Electrophoresis : Principles and Practice*, Springer-Verlog, Berlin, 1993.