

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 光生化形檢測儀(子計畫二): 晶片載具及複製量產

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2323 - B - 002 - 006 -

執行期間：九十年一月一日至九十年十二月三十一日

計畫主持人：林啟萬

共同主持人：張培仁、楊龍杰、黃榮山、吳造中

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學工程學研究所

中 華 民 國 90 年 02 月 28 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 光生化形檢測儀(子計畫二): 晶片載具及複製量產

### Opto-BioMorphin: Research and Development of Biochip Fabrication and Mass Production (2/3)

計畫編號： NSC89 - 2323 - B - 002 - 006

執行期限：九十年一月一日至九十年十二月三十一日

主持人：林啟萬 國立台灣大學醫學工程學研究所

共同主持人：張培仁 國立台灣大學應用力學研究所

楊龍杰 淡江大學機械系

黃榮山 國立台灣大學應用力學研究所

吳造中 國立台灣大學醫學院內科

#### 一、中文摘要

肇因於現行藥物治療與檢測技術的目標，皆是以蛋白質為主的生物高分子體，故而如何由基因功能檢測到生理功能的對應，因此就變得十分重要。在蛋白質的研究上，蛋白質基因圖譜(Proteomics)領域著重於如何在諸如受體、賀爾蒙等蛋白質層次進行大規模的研究，以期完整地瞭解疾病機制、細胞運作機制及細胞網路訊息等重要功能。為能有效縮減大量人力的工時消耗以達高度平行化、自動化、高產量、微量體積等目標，亟需要進行以微機電系統技術所建構之微晶片系統，來進行有利於蛋白質層次包括結構最佳化等的因素之研究，以求可對設計、篩檢新藥物、新受體、分子結構體、智慧型高分子元件等方向有所助益。本子計畫利用總計畫所規劃之創新多功光電生醫晶片儀(Opto-BioMorphin)為系統載具，並以子計畫一提出之各種光電檢出子系統為信號量測工具，所用晶片材質及受測體導入部分將與子計畫三、四之需求為考量要點，務求開發出一系列平行多功之低成本生醫光電感測晶片。

關鍵詞：蛋白質晶片、生醫精微機電、生物感測器  
Abstract

Due to the majority of current clinical drugs and screening technologies target on bio-molecules at protein level, it thus becomes an important issue to bridge the gaps between Genomics findings and its physiological functions. Proteomics emphasizes large-scale research on protein level for detail mechanisms of diseases, cellular functions, and networks. To achieve mass parallelism, automation, high throughput, and minute sample consumption, there are urgent needs for biochips, which developed by using MEMS technologies, for protein level research. This new development will certainly facilitate the finding of new compounds, new receptors, bio-molecular structure, and smart biopolymers. In this project, a novel Opto-BioMorphin system will be the carrier for multiple optical sensing purposes. Bio-chips based on surface plasmon resonance (SPR) will be designed and fabricated to be an integrated part of Opto-

BioMorphin with specifications of materials and samples that fulfill the requirements of project 3 and 4.  
Keywords: Protein Chip, BioMEMS, BioSensor

#### 二、緣由與目的

目前全世界各先進國家，無不為下一世紀產業的出路尋找高成長的契機，生物科技(biotechnology)的廣泛定義與應用範疇，符合此一思考方向所亟求之目標，因此這些先進國家無不訂定生物科技為重點發展方向，並且視為是維持國家整體產業成長的重要技術[1]。結合分子生物、基因工程、蛋白質工程、製藥技術、分子基因資料庫等早已經是為大家所矚目的焦點，自90年代起，緣自半導體製造技術的運用，更為此一領域的發展帶來嶄新的技術[2],[3]。光罩技術與大量生產帶動了微量分析、高速檢測及成本效能的改進。而微機電系統(Micro-Electro-Mechanical Systems, MEMS)的各種技術更為感測器、微系統、微流體的設計製造帶來無限的空間，而生醫檢測的市場潛力更為微機電系統之發展提供了碩大之動機與市場動力[4],[5]。目前大家均估計這些技術於人類基因圖譜在西元2005年依預定計畫完成後，將可為健康醫療事業帶來無可比擬的衝擊與商機[6]。自90年代開始的美國商務部投資，到如今在各國產生百家齊放的繁榮發展、技術上的創新，不僅為此一計劃奠下勝基，也為下一世紀的醫療儀器發展開啟新的章節[7]。一個新的領域結合了半導體技術、分子生物、高分子材料、人工智慧、系統整合等領域技術的產物，已經由實驗室邁入臨床[8]。在許多嶄新理念的研發中，微陣列技術(Microarray)與基因工程的結合應用在基因晶片的研發(Gene Chip)目前已有許多的成果，並已達商業化的程度[9]。以最近所舉辦的研討會中多有90%以上的參加者係來自於公司，顯示此項科技之研發已達成熟階段[10],[11]。誠如部分公司的預期，此後以陣列式檢測基因圖譜的技術產品，勢得以載具方式提供廣大實驗室使用，故而研發方向已趨向以更具彈性方式生產製造此類Gene Chip。但在此波研究熱潮中的諸項體驗，也勢

將傳播影響其他領域的發展，諸如高度平行化(Massive parallelism)、自動化(Automation)、高產量(High Throughput, HTPs)、微量體積(miniaturization)、快速(speed)等特性都將是半導體與微機電系統技術持續著力的重點[12]。藉由諸項工程技術的整合，基因圖譜的完成已是指日可待，對於在醫學上的應用，不論是目前的 Gene Chip 或微陣列元件(microarray)，對於醫學的診斷也漸有明確的地圖(map)可循。但是相對於大多數現行藥物治療與檢測技術的目標，皆是以蛋白質為主的生物高分子體，如何由基因功能檢測到生理功能的對應，也因此就變得十分重要。同時，目前所發現之基因圖譜中，發現存在著高達 50% 以上的孤兒基因(orphan gene)，要如何尋找與對應出其生理功能也必將是一極為繁複的實驗工作[13]。類同於 Genomics 的發展藍圖，在蛋白質的研究上亦有 proteomics(蛋白質基因圖譜)的工作，此一領域著重於如何在諸如受體、賀爾蒙等蛋白質層次進行大規模的研究，以期完整地瞭解疾病機制、細胞運作機制及細胞網路訊息等重要功能。此工作內容包括有資料庫的整合(data mining)、大量檢測工作載具的開發(HTPs)及系統的整合運用，及實際實驗工作的開發(如蛋白質結構在不同 pH、溫度、離子強度中的變化情形)，這些工作將對新藥物開發，特別是細胞內蛋白質作用的藥物有正面的助益[14]。目前此類工作的瓶頸大約在於大量人力的工時消耗，以平均 1-8 小時的連續工作，且需要至少 1000 份的蛋白質份子才足以進行檢測評定來看，此一工作之困難度、及範圍之龐大，實非目前之技術所可迅速完成。故而亟需要進行以微機電系統技術所建構之微系統，來進行有利於蛋白質層次包括結構最佳化等的因素之研究，以求可對設計、篩檢新藥物、新受體、分子結構體、智慧型高分子元件等方向有所助益，並將有利於 Nanotechnology 的發展[15],[16]。借由一個將實驗室帶到樣本的觀念，並將原本繁複的實驗室工作程序與設定，藉由平面式微陣列元件的設計，廣泛應用至非實驗室環境中，乃因此成為一新的重要研究典範(paradigm)。若能達到此理想，即可不需如傳統上的設計一樣，必須要有足夠的樣本，配合各種分離技術後，才可進行定性或定量鑑定、或確認(identify)各種特性(characteristic)，依據上述嶄新研究典範，各種傳統實驗及鑑定之需求，如今都將可以具體而微的實現[17]。綜而言之，今日之生醫晶片相關技術不論在檢測精度、速度，及應用範圍之快速成長，已使其逐漸自幾年前被視為明日科技，進而迅速發展成為今日之主流科技，也因此世界各國均將發展生醫晶片及其相關科技視為維持國家競爭力之重要基石。而目前在國內外的研發情形大致可歸納如下。

#### € 國內研發

雖說美日各國均預言「生技產業將是二十一世紀最具潛力的新興產業，二十一世紀將是生技產業的世紀」，我國目前除工研院有較完整之生醫晶片研究計劃外，各大學在國科會的補助下，僅有零星之生醫晶片之研究，尚無整體性之規劃。我國政府目前正積極推動生技產業的相關法案，如行政院86

年8月7日第2539次院會通過「加強生物技術產業推動方案」，並由國科會主導基因醫藥衛生國家型計劃，還有行政院開發基金預定往後五年40億投資200億於生技製藥產業，以及經濟部將生技產業上市上櫃標準放寬每年40億誘導資金投入生技產業等等措施，都可以看出政府極力推動生技產業發展的用心。配合政府上述相關措施，本「製藥與生物技術國家型計劃」將結合所有相關領域專家，積極投入此一具無限商機的生醫領域，研究及開發生醫技術及產品，務求能在未來的生醫版圖上佔有一席之地。

#### € 國外研發

過去十年來，生物晶片在北美和歐洲許多國家的學術界、政府及私人機構蓬勃發展，到目前為止估計有多達 50 家新公司投入研發此技術，並已有多種設計方案問世。在 DNA 晶片方面，如 DNA 結合分析、序列測定與定量分析、毛細管電泳分離檢測、核酸擴增、並行基因表達分析等技術已趨成熟。相伴之還衍生出一系列其它分析方法，如細胞分離、細胞免疫分析及與組合化學結合為新藥研究的初篩提供高通量篩選。在材料上除了用矽作晶片加工外，已有研究單位開始採用塑料成膜技術和彈性體來加工製作生物晶片。綜言之，經十年努力，在樣品處理、化學反應，到檢測的三個步驟已獲得部分集成，並有多於一千個有關專利獲得批准。惟三個部份的全部集成，還須假以時日，但為時不遠。值得注意的是國外研發生物晶片到目前為止重點在 DNA 晶片的應用，研發範圍涵蓋 PCR Chip、CE Chip、Gene Chip 及 ISFET。希冀針對 DNA 的檢驗需求，進行一系列的技術及產品開發，如 DNA 快速檢驗分析技術及產品，DNA 複製與分段分析技術與產品，整合式的 DNA 分析系統等。由於我國起步較晚，將較不易在 DNA 晶片專利上突破先進國家之專利及技術藩籬。因為在蛋白質晶片方面全球各國均尚未有重大投入與成就存有寬廣的研發空間與機會，因此為我國重要且亟待開發的合適領域。

#### ○ 計畫目的。

本子計畫主要致力於生醫晶片的設計製作與量產技術的研發，有鑑於國內外對此領域趨勢的快速發展，充分利用我國半導體產業優勢與在生醫之相關完整資源，特整合本計畫以建構一領先全球之生物科技產業研發平台為先期目標，為維持我國生醫晶片之全球競爭力，本計畫所發展之技術平台將要求具有下列特性：1)高靈敏度；2)可以從事快速平行檢測(high-throughput parallel processing)；3)低成本；4)採用容易取得之檢體(用 minimal invasive medical procedures, 例如 body fluid)；5)以現有之去氧核酸晶片(DNA chip)無法做到之生醫檢驗；6)可取得國際專利，以突破國際專利藩籬。並於研發系統技術逐步成熟後，將此先期研發儀器整合成為次世代生產之主要載具。本子計畫將協助總計畫建構 Opto-BioMorphin (OBMorph)研發平台中之晶片載具。並整合子計畫(一)所發展之 OBMorph 信號檢出及光電化形量測能力於晶片載具發展中，施行自設計、研發、製程設計、試產、品保、量產，至線

上檢測計畫目標之交互修正。除此之外，並將發展微型感測晶片所須之相關原理及技術，如樣本採擷要求與生醫資料庫之應用，提供子計畫(三)研發與實測所需。並將充分運用我國蓬勃發展之光碟產業，以期降低單位晶片成本，促成拋棄式晶片載具之完成，進而協助我國生醫產業全球競爭力之提升。以契合子計畫(三)研發所需之晶片需求，設計、研發，試產一光電生醫晶片，研發過程中並求將量產規格與成本列入研發考慮，務求達成我國工業所奉行之高級產品地攤價的競爭利基，同時亦將配合總計畫及子計畫一來開發技術獨步全球之生醫感測系統，配合設於臺灣大學應用力學研究所之國科會北區微機電中心之各項設備，建構臺灣大學生醫微機電系統研究群(NTU BioMEMS Group)，群策群力，以高度整合方式進行全面性生醫晶片載具之研發。此外亦將藉此機會發展新的應用與感測原理，包括有以光纖製作 SPR 系統以延伸其應用到臨床活體(in vivo)，以及奈米微粒(nano particles)的製備技術，以開創嶄新研究領域。

### 三. 結果與討論

○ SPR 晶片原理：Surface plasmon 係在 1960 年代開始使用，其起源來自廿世紀初 Wood 觀察連續光源照在金屬 grating 上時出現黑白帶且極化垂直於 grating, Fano 解釋起源於空氣-金屬表面電磁波的激發，此時金屬中的電子可視為一高密度的電子液體 plasmons 在介面成密度的波動，可由光子照射金屬表面或電子穿透金屬箔而形成，用 attenuated total reflection(ATR)分析, Plasmon 光玲鏡內產生全反射，生成一漸消失的電磁波，電磁波透入金屬箔引起內部自由電子的振動，在另一表面上成為新的電磁場源在特定角度時產生能量轉移。由光譜來看，可得三個特徵值: a)位置(角度); b)寬度;c)深度。其中波長的增加跟角度有類似的作用，金屬-介電質介面的電場增強作用，可增加測驗力，k 值的作用會使曲線有更進一步的變化以增加參數之間的分辨率，反射-波長關係和消滅係數 k 有關,可用以在介面上量吸收光譜;鑑別定量由於衰減很快，plasmons 的測量區限於介面附近，而更遠處即無影響，測定曲線對金屬層和介電質的光學性質敏感，所以 SPR 可用以測定薄介電質的結構跟重量變化。雖然可以利用各種金屬層，通常金、銀為較常用，而銀有較窄深的曲線，但是因為生物分子固定化的考量所以較常使用金。可適於 solid-supported lipid membranes、lipid membrane-protein interactions、integral membrane vs peripheral、water-soluble protein 等情形。金屬層的厚度 t 折射率 n 消滅係數 k 會影響如何測定表面介電質，若考慮只有金屬層時，為解出未知的參數(t, n, k)必須量測曲線上相同數目的測量值(位置、寬度、深度)。可用非線性的最小平方去趨近理論曲線以求參數值，在實驗時 k 值會因波長而異，可用以 SPR 量測吸收光譜，雖然 n, k 都會跟波長相關，但在 SPR 光譜曲線窄狹下，可視為主要為 k 在變動可以反射光對波長關係求出在特定入射角度下之吸收光譜。

○ 晶片設計：目前晶片的設計，係以整合開放式流道之 ELISA 及封閉式流道之 BIAcore 兩種晶片設計

為出發點，以 Glass-Au-PMMA-Glass 形成感測晶片，製作設計為 50 nm Au film on 500 um Glass (Corning 7740, BSG) or glass slide with Cr adhesion layer (10nm)，並在 2 mm diameter, 2 mm height PMMA with 100 um well depth for target sensing area,完成 1x8 或 1x4 Array 元件,以 External pumping system or micro-pipette for fluidic/sample manipulation。

○ 晶片製作流程：Wafer clean Cr metal coating (10 nm)、Au metal coating (30~40 nm)、Photolithography、I<sub>2</sub>-KI etching。

○ 晶片流道設計與製作：流道的設計在理論部分已經有初步的計算結果，在實驗室中的裝置可以產生依據文獻的資料所建立的流道壓力範圍與量測。PMMA 模具也已發包製作完成可以配合理論計算結果進行實驗。整體晶片的封裝與測試目前正在進行中。

○ 光纖式 SPR 系統：前述之 SPR 檢測系統主要是利用 SWMA(single wavelength multiple angle)的入射角度調變方式進行反射光的檢測，基於 SPR 產生原理與調變機制，亦可以利用 MWMA(multiple wavelength multiple angle 多角度多波長的方式進行反射光頻譜的檢測。利用光纖的可拋棄式與價廉，可將上述系統的應用延伸到活體(in vivo)的使用。

○ 奈米微粒(Nanoparticles)：雖然目前已有各種材料可以提供奈米微粒的製作，但是基於生物分子的接著需求，探求的重點則在於金及鑽石(Au, Diamond)微粒。其一般特性為直徑小於 100 nm，具有高表面積對體積比率(C: 250-350 m<sup>2</sup>/g)，強烈的光學散射(scattering)等特性。當利用於檢測時其極限與適用的波長、顆粒大小、材質本身特性有關，而通常其顆粒大小可以藉由濃度、溫度與 pH 來調整。在金奈米微粒中 40nm 的檢測極限可達 10<sup>-14</sup>M，約相當於 3x10<sup>5</sup>M 的 fluorescein。目前可能的應用包括有：添加在電化學表面塗裝中以增加表面的硬度與抗腐蝕性、利用其尺度與表面電荷做成具有特異選擇性的感測器、多層立體微結構之組合、微流道內部功能性過濾填充等嶄新的應用。因為其顆粒體積與光波長相當，所以前述之 SPR 波場理論並不適用於解釋其強烈散射的成因，目前建構全新的理論中。

### 四. 成果自評

在第一年的計畫進度中，目前已經成功的根據 Maxwell equations 與設計的材質特性與可能的架構邊界條件，完成模擬程式的建構，可以成功的預知不同材料(Au, Ag, Al)的最佳鍍膜厚度、入射角度、波長等參數，在多層膜(4 層以上)的變化與對於量測結果的 Curve fitting 則是下一階段的努力方向。在研究的過程中對於 SPR 理論的探討，引發相當多的新構想，經深入文獻的搜尋發現目前正在進行的有：近紅外波段 SPR 的應用與 SPR 影像晶片的設計製作，將在下一年度計畫中繼續深入的研究。並進一步延伸此理論系統應用於奈米微粒的可行性。目前對於晶片製程的改進正在持續進行(E beam、Thermal、Sputter)中，但初步獲致的成果已經可以利用前置處理的清洗程序對玻璃表面做適

當的處理，可以省卻原先鍍膜程序中所需要的附著層，可節省一半的製作程序與成本，其鍍膜結果經 3M 膠帶沾黏測試不會脫落，已可供生物分子製備程序所需。

目前光纖系統的建構係以一光纖式光源系統 (Analytical Instrument System, Inc, AIS UV-2D) 配合一 Y 型光纖作為光傳導介質，感測器本身係以多模光纖經鍍膜程序後利用 SMA 接頭與 Y 型光纖耦合，反射的光強與頻譜變化則由一解析度為 3nm 的光譜儀(OceanOptics, SD2000)讀取，分析軟體則是由所提供之驅動程式配合 LabVIEW 編寫完成。由感測器的影像可以明顯觀察到光纖在進行金膜濺鍍前後在以偏極化光源照射下所呈現的影像差異，在有金膜的光纖呈現黃綠光澤與一般金薄膜的呈色相似。若以此感測光纖放入水( $n=1.33$ )與酒精( $n=1.3652$ )中分別進行可見光光譜的量測，在經過 Curve fitting 後，可決定其峰值分別為 641 nm 及 678 nm，初步估計其解析度為  $9.513 \times 10^{-4}$ 。此數值可望在 OBMorph 上獲得更好的結果，此外若單純以較高解析度的光譜儀取代目前的機型，將可提高 3-6 倍的解析度。此外在第二年將進一步改善製程以達較佳之蒸鍍品質。

目前在初步使用不同的 pH 緩衝溶液調變下，已能製備不同體積大小的金奈米微粒，下圖顯示不同 pH 下所造成的顏色差異，經以光譜儀量測其吸收光譜，可以測得在可見光範圍內不同的吸收峰值變化，另外亦呈現 Mie Scattering 現象的光譜傾斜，顯示其強烈散射的特性。將來會進一步地就其相關特性進行量測，以應用於小生物分子的檢測與分子奈米工程的新領域。製作完成之金微粒在利用 AFM 掃描後可以得到約 50 nm 直徑的影像，進一步的製程控制，包括溫度與 pH 值的控制，顯示經過熱處理的微粒溶液較不易產生聚集現象(aggregate)，而緩衝溶液的 pH 值會是影響微顆粒析出大小與速度的重要因素之一。對於製程條件與基本性質確立的工作目前仍然在進行中，主要工作包括光性質的量測(散射、吸收、spr)、電器特性的量測(介面電位、電流與電化學)、顆粒大小(雷射散射儀)等。對於奈米微粒的應用，目前是各國的研究重點，在基因晶片的應用，首推西北大學的金微粒 DNA 晶片，利用其顆粒與間距大小的設計，可以達到因強烈散射不同波長的特性，不需昂貴的共軛焦顯微鏡即可顯影，具有實用的價值。目前實驗室努力的方向在於金微粒 SPR 晶片的製作，希望能以微粒的附著增加檢測密度、訊號強度、與穩定性。

## 五、參考文獻

- [1] R.C. Merkle, Biotechnology as a route to nanotechnology *TIBTECH*, vol. 17, pp. 271-274, 1999.
- [2] S. Shoji and M. Esashi, Microfabrication and microsensors *Applied Biochemistry & Biotechnology*, vol. 41, pp. 21-34, Apr, 1993.
- [3] K.L. Beattie, W.G. Beattie, L. Meng, S.L. Turner, R. Coral-Vazquez, D.D. Smith, P.M. McIntyre, and D.D. Dao, Advances in genosensor research *Clinical Chemistry*, vol. 41, pp. 700-706, May, 1995.
- [4] P. Arquint, M. Koudelka-Hep, B.H. van der Schoot, P. van der Wal, and N.F. de Rooij, Micromachined analyzers on a silicon chip *Clinical Chemistry*, vol. 40, pp. 1805-1809, Sep, 1994.
- [5] R. Hintsche, M. Paeschke, A. Uhlig, and R. Seitz, Microbiosensors using electrodes made in Si-technology *EXS*, vol. 80, pp. 267-283, 1997.
- [6] R.F. Service, DNA ventures into the world of designer materials [news; comment] *Science*, vol. 277, pp. 1036-1037, Aug 22, 1997.
- [7] R. Ekins and F.W. Chu, Microarrays: their origins and applications *TIBTECH*, vol. 17, pp. 217-218, 1999.
- [8] K. Dill and D.W. Bearden, Detection of human asialo-alpha(1)-acid glycoprotein using a heterosandwich immunoassay in conjunction with the light addressable potentiometric sensor *Glycoconjugate Journal*, vol. 13, pp. 637-641, Aug, 1996.
- [9] F.E. Regnier, B. He, and S.B.J. Lin, Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science *TIBTECH*, vol. 17, pp. 101-106, 1999.
- [10] S.P.A. Fodor, R.P. Rava, X. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, and C.L. Adams, Multiplexed biochemical assays with biological chips *Nature*, vol. 364, pp. 555-556, 1993.
- [11] D. Kell, Screensavers: trends in high-throughput analysis *TIBTECH*, vol. 17, pp. 89-91, 1999.
- [12] S. Sasaki and I. Karube, The development of microfabricated biocatalytic fuel cells *TIBTECH*, vol. 17, pp. 50-52, 1999.
- [13] A. Cattaneo and S. Biocca, The selection of intracellular antibodies *TIBTECH*, vol. 17, pp. 115-119, 1999.
- [14] W.P. Blackstock and M.P. Weir, Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins *TIBTECH*, vol. 17, pp. 121-120, Mar 1, 1999.
- [15] R.A. Williams and H.W. Blanch, Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 9, pp. 159-167, 1994.
- [16] H. Wang, J.D. Brennan, A. Gene, and U.J. Krull, Assembly of antibodies in lipid membranes for biosensor development *Applied Biochemistry & Biotechnology*, vol. 53, pp. 163-181, May, 1995.
- [17] C. Nicolini, M. Lanzi, P. Accossato, A. Fanigliulo, F. Mattioli, and A. Martelli, A silicon-based biosensor for real-time toxicity testing in normal versus cancer liver cells *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, pp. 723-733, 1995.