

# 知識天地

## 奈米流通道及奈米電極應用於生物分子之分析

周家復研究員(物理研究所)

### 摘要

奈米結構，如奈米流通道和奈米間隙電極，儘管其幾何構造極為簡單（例如奈米狹縫，奈米隘口等），卻可提供一獨特的平台來研究分子的生物物理學，若配合分子的操控及傳輸，有作為極少量生物分子分析工具的應用潛力。

### 一、前言

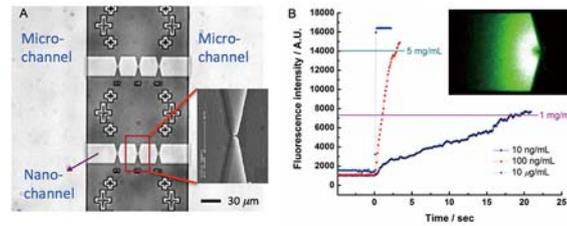
近十年來，奈米流通道(nanofluidics)愈來愈受到人們的重視。由於奈米流道的空間幾何特性與生物分子的特徵尺度相當，使得以往在較大尺寸（巨觀或微米尺度）的環境下觀察不到的現象，在此有機會得到進一步的觀察與釐清[1,2]。例如高分子生物物理上極感興趣的課題，單分子DNA的力學性質[拉伸(Stretching)、操控(Manipulation)、熵力與DNA拔河]，DNA-蛋白質複合體的靜態或動態分析，生醫檢測應用上DNA或蛋白質的富集(Enrichment)、分子分離(Separation)、分子反應器(Reactors)，奈米尺度下的流體力學、離子傳輸及整流現象，細胞－細胞交互作用，微生物在侷限空間下的衍生行為...等都是近年來極為活躍且有相當多研究成果發表的領域[1-4]。奈米間隙電極(electrode nanogap)可單獨用來操控或分析生物分子[5]，亦可和奈米流道結合，使兩者的特性互補疊加，產生更為豐富的分子複合體分析功能[6,7]。

### 二、奈米流通道及奈米間隙電極的製作

奈米流道及奈米電極的製作，在過去十來年亦有長足的進步。如今已有許多方法可以用來建構維度無論是在一維、二維，或三維均在100奈米以下的流體空間，如傳統的光蝕刻 (Photolithography)、干涉式微影法 (Interference Lithography)、電子束微影法(Electron Beam Lithography)、聚焦離子束蝕刻法(Focus Ion Beam Lithography)、奈米壓印微影術(Nanoimprint Lithography)...等，這些工具在本院的奈米核心設施大多有完善的建置與維護。而晶片基材的選擇也包括矽、鍺、石英、玻璃、塑膠等[8-10]。尤其，室溫低壓及生物相容性的流道封裝方法，也陸續被示範提出[11,12]，其成本低廉，容易製作的特性，也將使得奈米流通道有更為廣泛的應用潛力。另外，小於十奈米的間隙電極，亦可用上述奈米製程製作，由於其尺度和常見的疾病標定蛋白質大小相當，可用電場來驅動及操控（捕捉）單一或少量分子，作光學或電學上的分析。奈米間隙電極若和奈米流道整合使用，可用來作單分子或DNA-蛋白質複合體的動態分析。受限於篇幅，我們將省略詳細的奈米製程（讀者可參考相關的引用文獻），在此僅舉例奈米元件作為生物分子操控、分析及其潛在的生醫應用之實例。

### 三、超高速蛋白質富集的奈米分子壩(molecular dam)

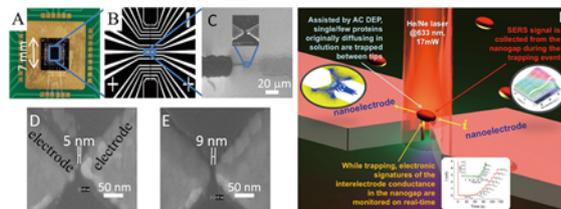
質量傳輸(Mass Transport)一直是在奈微米流體中一個很重要的限制因子。當在將流體系統微小化的過程中若沒有提昇質量輸送的效率，生物分子在流體中的擴散距離(Diffusion Length)將會延長，而影響偵測器或偵測分子的反應時間及速率，並將使得分析微量樣品中的低含量或低濃度的生物分子更為困難。另外，在生理樣品中自然存在許多不同的生物分子如蛋白質，要從中分析出某一種特定的生物分子，不僅要能克服其他眾多蛋白質的背景干擾，還必須有極高靈敏度(Sensitivity)。我們最近即利用在熔融矽(Fused Silica)的絕緣基材上，設計製作出奈米流道中的隘口結構，寬度為15-30奈米，作為電場聚焦的透鏡（即所謂介電泳(Dielectrophoresis)的操作[13]），可將外加電場放大70萬倍，並以同時調控交直流電場的方式來趨動待測蛋白質往奈米隘口邊聚集，使奈米隘口處形成一分子壩。如此一來，在極短時間（20秒內）即可將蛋白質（鏈黴親和素）於生理緩衝液內快速富集達10萬倍以上，提升質量輸送效率達到快速分子預濃縮效果。我們發展的奈米分子壩，其分子聚集效應較一般傳統方式要快百倍至千倍。整個過程也可以一般的螢光(Fluorescence)系統來偵測已標定的生物標記物(Biomarker) 蛋白質以克服上述的限制（晶片設計及實驗結果如圖一）[14]。分子壩的好處在於其乃一虛擬壩，可隨時藉由電場來開啟或關閉。此系統原則上能克服在生醫檢測上，疾病初期或急性病症（心肌梗塞，病毒感染等）致病因子含量相當低的檢測困境，達到早期發現早期治療的分析效果。



圖一 奈米分子壩流道晶片設計及實驗。(A)晶片總尺寸為14x14mm，其中間為奈米流道放大圖，圖中右下角的尺規為30微米；放大圖為15奈米隘口的掃描式電子顯微鏡照片，其尺規為500 nm。(B) 螢光標定之鏈黴親和素(streptavidin)經分子壩快速聚集的即時量測及螢光影像，圖中橫線代表該分析物在該濃度時的螢光強度尺。20秒內即可將鏈黴親和素於生理緩衝液內快速富集達10萬倍以上[14]。

#### 四、身兼數職的奈米間隙電極(electrode nanogap)

對低濃度樣品的檢測分析，除了以上述分子富集的方式來提高檢測速度及靈敏度外，亦可用奈米間隙電極來捕捉單一或數個生物分子，無需利用分子富集即可達到逕行檢測分析的目的。在這種情況下，我們通過電子束蝕刻和光蝕刻法，製作了間隙寬5-9奈米的鈦電極（構造如圖二A），可以作為以介電泳驅動的分子捕捉器，同時亦是表面增強拉曼散射（SERS）的熱點和分子電導度的量測電極[5]。主動性的分子捕捉可克服低濃度樣品擴散距離長及與偵測器碰撞頻率低的問題。我們用此電極於生理緩衝液內，捕捉了一至數個從紅藻類衍生的模型蛋白質R-藻紅蛋白（R-phycoerythrin，簡稱RPE），其為240 kDa的圓盤狀蛋白（直徑11奈米，厚度6奈米）。由於其大小約略大於電極間隙，被捕捉的同時並使得奈米電極形成通路，可讓我們同時量測該分子的拉曼訊號、電導度及螢光強度（圖二B）[5]。實驗上，我們也證實了以奈米間隙電極來作為分子捕捉器，其分子捕捉的過程有如分子壩，是一具有可逆性的操作。若配合流道設計，即可成為一流經式(flow-through)的分子分析裝置。目前正應用於與神經退化性疾病相關的分子分析。



圖二 (A-E)奈米間隙電極的分子捕捉器，其巨觀至微觀之影像。最小電極為5奈米(D)。(F) 蛋白質(R-藻紅蛋白)被捕捉後，可多工的進行電導度量測（下），螢光成像及表面增強的拉曼光譜分析（右），左為模擬之力場分析[5]。

總結來說，對於極低量的生物分子分析，絕緣基板製作的奈米隘口可作為電場聚焦透鏡，其功能猶如奈米級的分子水壩，通過交流電場介電泳的操控，可達到超快的蛋白質富集和檢測。另一方面，數奈米寬的奈米間隙電極亦可通過同樣的介電泳操作，用來捕捉單一或數個蛋白質分子，來進行電導量測，螢光成像及表面增強的拉曼光譜分析。此外，串連陣列的奈米間隙電極若共面的嵌入於奈米通道，亦可以作為一種流式的分子計數器[6]。

#### 五、結語

希望藉由本文的舉例說明，讀者可以瞭解到，透過簡單的奈米結構設計（奈米流道，奈米電極等），即可用於有趣且重要的基礎生物物理及生醫應用研究。相信在可見的未來，研究人員將會繼續發揮創意，利用不同流道的設計與組合，以奈米結構應用於快速且靈敏的生醫檢測。目前，該領域仍有極大的發展空間及應用潛力，並預期對醫療健康產業有正面的影響。

#### 致謝

作者感謝參與計畫的博士生及博士後，本所陳彥龍及朱明禮博士、義大利國家研究院Alessandro Taloni博士、德國馬普研究院Andreas Erbe博士、法國國家研究院Thierry Leichlé 博士及美國維吉尼亞大學Nathan Swami

教授的長期合作，和科技部、本院主題計畫及奈米計畫（含奈米核心設施）、美國空軍實驗室亞洲辦公室，以及國家理論科學研究中心在研究上的支助。

#### 參考文獻

- [1] J. C. T. Eijkel and A. van den Berg, *Microfluid. Nanofluid.* **1**, 249 (2005).
- [2] W. Sparreboom, A. van den Berg, and J. C. T. Eijkel, *Nat. Nanotech.* **4**, 713 (2009).
- [3] J. W. Yeh, A. Taloni, Y. L. Chen, and C. F. Chou, *Nano Lett.* **12**, 1597 (2012).
- [4] A. Taloni, J. W. Yeh, and C. F. Chou, *Macromolecules* **46**, 7989 (2013).
- [5] L. Lesser-Rojas, P. Ebbinghaus, G. Vasan, M. L. Chu, A. Erbe, and C. F. Chou, *Nano Lett.* **14**, 2242 (2014).
- [6] L. Lesser-Rojas, K. K. Sriram, K. T. Liao, S. C. Lai, P. C. Kuo, M. L. Chu, and C. F. Chou, *Biomicrofluidics* **8**, 016501 (2014).
- [7] K. K. Sriram, J. W. Yeh, Y. L. Lin, Y. R. Chang, and C. F. Chou, *Nucleic Acids Res.* **42**, e85 (2014).
- [8] L. J. Guo, X. Cheng, and C. F. Chou, *Nano Lett.* **4**, 69 (2004).
- [9] R. Chantiwas, S. Park, S. A. Soper, B. C. Kim, S. Takayama, V. Sunkara, H. Hwang, and Y. K. Cho, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 3677 (2011).
- [10] C. H. Duan, W. Wang, and Q. Xie, *Biomicrofluidics* **7**, 026501 (2013).
- [11] J. Gu, R. Gupta, C. F. Chou, Q. Wei, and F. Zenhausern, *Lab Chip* **7**, 1198 (2007).
- [12] T. Leichle, Y. L. Lin, P. C. Chiang, S. M. Hu, K. T. Liao, and C. F. Chou, *Sens. Actuators, B* **161**, 805 (2012).
- [13] C. F. Chou, J. O. Tegenfeldt, O. Bakajin, S. S. Chan, E. C. Cox, N. Darnton, T. Duke, and R. H. Austin, *Biophys. J.* **83**, 2170 (2002).
- [14] K. T. Liao, and C. F. Chou, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8742 (2012).