

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 物理科

佳作

040104

以重力驅動之微流道細胞分離器

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 廖柔謙 高二 蔡宜真	指導老師： 陳文盛 李美英
-------------------------	---------------------

關鍵詞：層流、微流道、細胞分離

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會作品說明書

作品名稱：以重力驅動之微流道細胞分離器

摘要

本研究利用一種不需藉外加幫浦，以重力驅動即可自行使液體流動且形成層流的系統。因微流道的尺寸夠小，足以形成層流，再由系統中入口、出口儲液槽的高度差、毛細現象以及表面張力，驅動流道中的液體、形成流速穩定的層流。由層流的性質得知，死菌只能隨流層前進，而因活菌有運動能力，能自由分布於系統中，如此便可將死亡及活力較差的大腸桿菌從中分離，並探討各種影響細菌分離的機制。

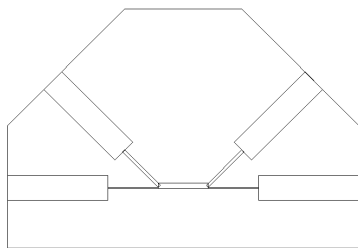
壹、研究動機

以容易取得的壓克力、雙面膠做為材料，將雙面膠的厚度做為流道高度，取代以往的熱壓成型法和翻製法，探討流道物理量、養分濃度梯度與分離效果之關係，期待未來能提供可重複使用、低成本量產、操作方便的簡易細胞分離裝置相關教材:高二下物理，十一單元:流體的性質(表面張力、毛細現象)。

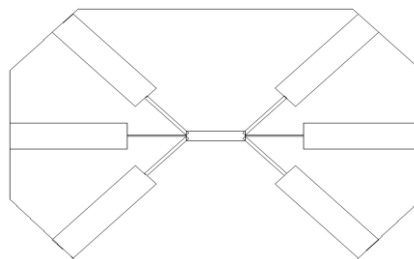
貳、研究目的

本研究藉簡單的原理與實驗器材分離死菌與活菌。將探討以下幾點問題：

- 一、如何使流體維持固定流速，形成穩定的層流
- 二、如何使流速與細菌泳速妥善配合，給予細菌足夠時間橫越流道
- 三、探討各種影響細菌分離的因素，如：養分濃度梯度
- 四、比較流道型式對於分離死菌與活菌精確度與效率之差異（本實驗設計兩種不同微流道系統：微流道系統A：圖(一)、微流道系統B：圖(二)；圖(一)、圖(二)均為俯視圖)



圖(一) 微流道系統A



圖(二) 微流道系統B

參、研究設備及器材

- 一、顯微鏡
- 二、雷射雕刻機
- 三、Optical density machine
- 四、養菌器材：養菌管、LB (營養液)、抗生素
- 五、PI 染劑、懸浮粒子(poly styrene)
- 六、酒精燈、燒杯、陶瓷纖維網、三角架

肆、研究過程或方法

一、微流道設計

本實驗以層流的原理為基礎，當流速低且流道截面小，使流道內雷諾數小於 2100 時，便會形成層流，於層流中的粒子，會有序的以平行管壁運動，流體分層不相混。

在流體力學中，雷諾數(Re)是影響層流發生的主因，為慣性力與黏滯力比值的量度。

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu} = \frac{VD}{\nu} = \frac{QD}{\nu A}$$

V :平均流速(m/s); D :流道直徑(m)
 μ :黏滯係數 (Pa·s or N·s/m²); ν :運動黏度(m²/s)
 ρ :流體密度(kg/m³); Q :流量 (m³/s)
 A :橫截面積(m²)

- 1、計算所需流速：文獻中(參考資料 3)大腸桿菌的泳速可達 20 μ m/s，為了讓大腸桿菌有足夠時間游離層流，並以其在主流道內停留 10 秒以上為計算依據。

可得理想流量 $Q \leq 3 \times 10^{-11} \text{ m}^3$

- 2、求微流道系統內流阻：由下方矩形流道的流阻公式，分別求出各矩形流道內的流阻，得出微流道系統 A 的總流阻 $R_A = 2.4 \times 10^{12}$ ；微流道系統 B 的總流阻 $R_B = 7.29 \times 10^{11}$

$$R_h = \frac{12 \mu L}{wh^3(1 - 0.630h/w)}$$

R_h :流阻 (N · s/m⁵)
 μ :黏滯係數(Pa·s or N·s/m²)
 L :長(m) w :寬(m) h :高(m)

- 3、求所需壓力差：求得微流道內流阻後，再由下列公式求出所需壓力差： $\Delta P \leq 72 \text{ N/m}^2$

$$\Delta P = R_h \times Q$$

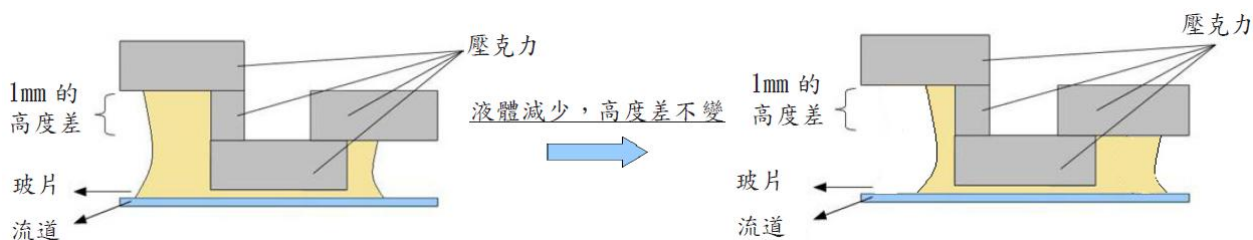
ΔP :壓力差(Pa); R_h :流阻(N · s/m⁵); Q :流量(m³/s)

而壓力差將由下列兩者提供：

(1)兩側儲液槽的高度差：9.8N/m²

(2)介面作用力：43N/m²

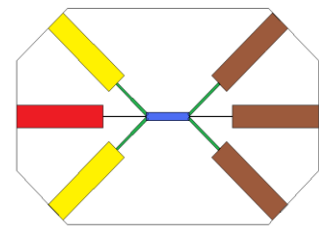
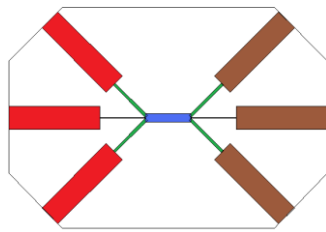
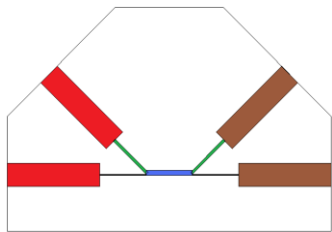
- 4、特殊設計：將儲液槽改為橫向，藉由表面張力維持液柱高度，以維持固定流速。



二、微流道尺寸，如表（一）

表（一）

		長度	寬度	高度
入口的儲液槽	(紅色)	10mm	2.5mm	2mm
	(黃色)	10mm	2.5mm	3mm
出口的儲液槽(咖啡色)		10mm	2.5mm	1mm
主流道	(紫色)	10mm	500 μ m	60 μ m
	(藍色)	10mm	800 μ m	60 μ m
營養液(LB)、 活大腸桿菌流經之微流道(綠色)		5mm	300 μ m	60 μ m
大腸桿菌混合液、 死大腸桿菌流經之微流道(黑色)		5mm	200 μ m	60 μ m



圖（三）微流道系統A 圖（四）微流道系統B 圖（五）改良後的微流道系統B

註：因微流道系統B具三道流道，情況較複雜，而其層流維持較不穩定，故在入口處將外側兩入口之儲液槽加高1mm，增加與中央入口之壓力差，以確保中央欲分離之液體平穩。

三、微流道製程

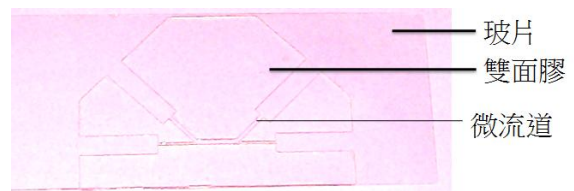
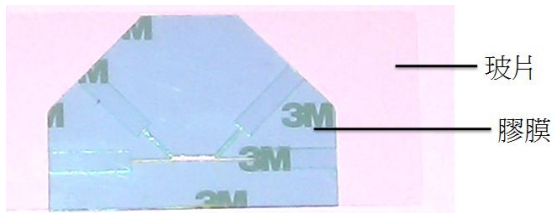
(一)、材料：壓克力板、雙面膠、玻片

(二)、製作方式:

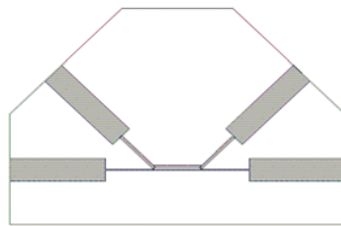
- 1、切膠：以雷射雕刻機於60 μ m厚的雙面膠燒出所需的刻痕，將雙面膠完全切斷但保留一面未斷的塑膠膜。
- 2、切壓克力板：分別切出所需的壓克力板形狀，如圖(七)、圖(九)中之1、2



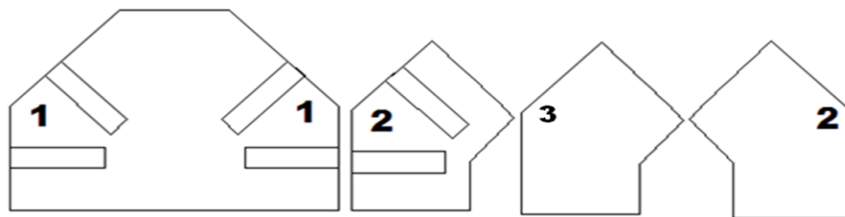
- 3、撕膠：將圖(六)、圖(八)中雙面膠呈灰色的部分撕去。
- 4、將撕好的雙面膠黏貼於玻片上再撕下另一面膠膜。



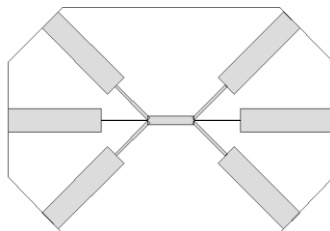
5、依圖(七)、圖(九)中 1、2、3 的次序將壓克力板黏貼於玻片上即完成所需之微流道系統。圖(十)、圖(十一)為微流道系統儲液槽，圖(十二)為微流道系統側視圖。



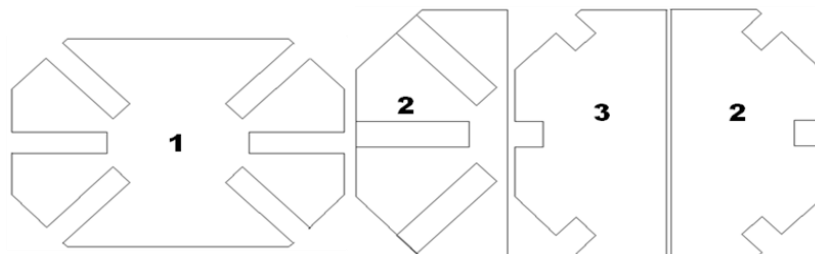
圖（六）微流道系統A 示意圖（灰色部分為須撕下之雙面膠）



圖（七）黏貼壓克力板之順序：2 黏於 1 上方，3 黏於 2 上方



圖（八）微流道系統B 示意圖（灰色部分為須撕下之膠膜）



圖（九）黏貼壓克力板之順序：2 黏於 1 上方，3 黏於 2 上方

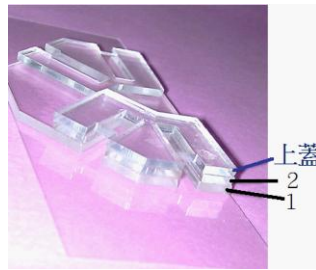


圖 (十)

系統左方儲液槽具二層 1 mm 之壓克力板及一層 1 mm 上蓋

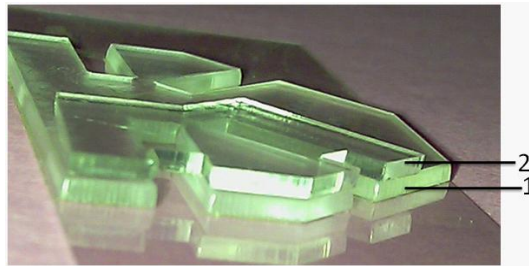


圖 (十一)

系統右方儲液槽具一層 1 mm 之壓克力板及一層 1 mm 上蓋

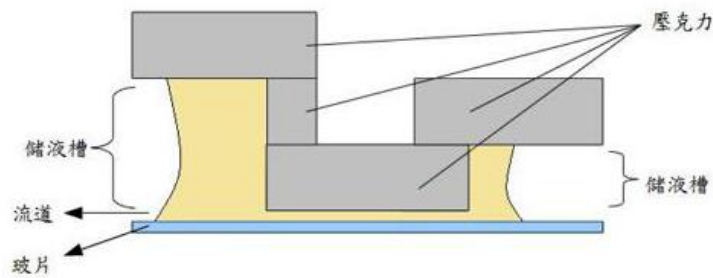


圖 (十二) 微流道系統側視圖

四、實驗流程

(實驗一)、驗證設計的系統是否形成層流

- 1、將系統 A 平置於平台
- 2、為避免墨水中的雜質堵塞流道，先以孔徑 $45\mu\text{m}$ 的濾網過濾墨水。
- 3、以 pipette 將紅色與藍色墨水分別注滿上方及下方的儲液槽
- 4、待幾分鐘後即可以肉眼觀察結果

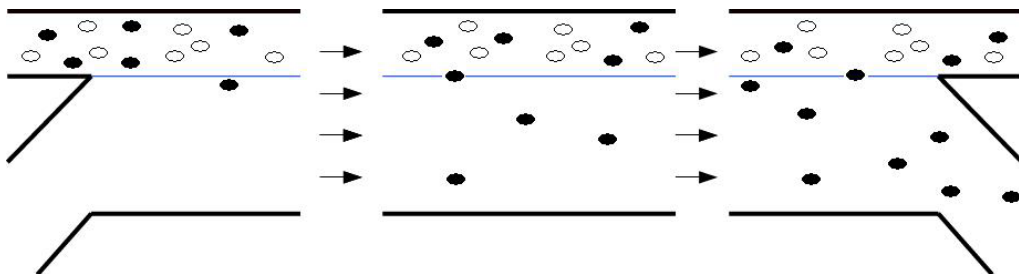
(實驗二)、計算所需流速並以懸浮粒子檢測

- 1、以千分之一的比例稀釋懸浮粒子(poly styrene)
- 2、將系統 A 水平置於平台
- 3、稀釋液灌入微流道系統
- 4、儀器置於顯微鏡下，以 580nm 的紅光激發

- 5、以每秒 2 張的頻率拍攝連續照片
- 6、計算出每秒懸浮粒子的位移，求出流速

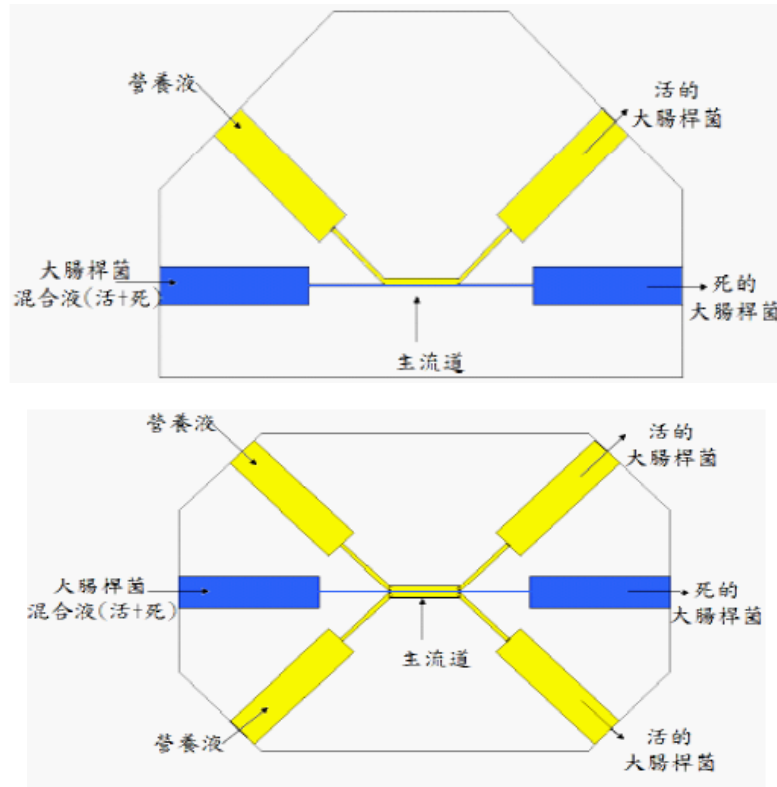
(實驗三)、測量不同形式的儀器分離大腸桿菌的效率差異

- 1、培養大腸桿菌(E. coli, DH5 α)
- 2、先將營養液分別灌入微流道系統 A 圖(十) 和 B 圖(十一) 中
- 3、系統 A、B 完全充滿 LB 後，再灌入菌液
- 4、等待 40 分鐘後，以 pipette 將出口儲液槽中的溶液取出
- 5、分別培養不同儲液槽中的溶液
- 6、測量養菌管中的 OD 值，並分析比較。



圖(十三) 流道內大腸桿菌分離示意圖：

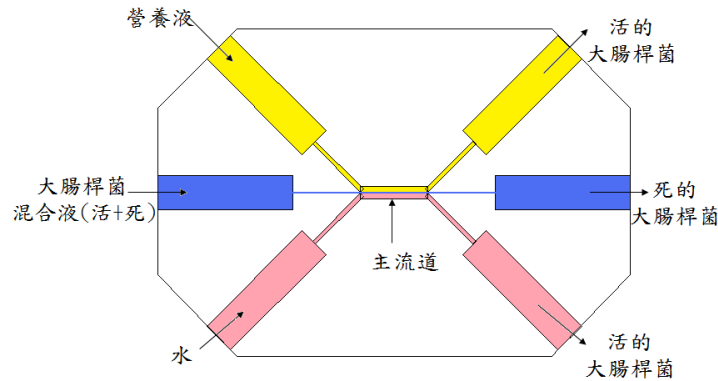
黑色點為具運動能力之大腸桿菌，可自由分布在整個流道中，白色則否。



(實驗四)、觀察養分濃度梯度對分離效果的影響機制

- 1、培養大腸桿菌(E. coli, DH5 α)
- 2、壓克力板、玻片置入 Plasma Cleaner 打氧電漿

- 3、將 LB 灌入微流道系統 B 中
- 4、系統 B 完全充滿 LB 後，再灌入菌液、PBS
- 5、經 40 分鐘後，以 pipette 將出口儲液槽中的溶液取出
- 6、分別培養不同儲液槽中的溶液
- 7、測量養菌管中的 OD 值，並分析比較營養物質與水對大腸桿菌的吸引力大小



伍、研究結果

(實驗一)、驗證設計的系統是否形成層流

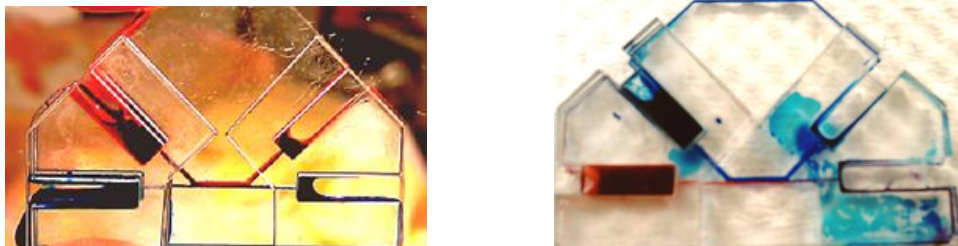


圖 (十四)，可以顯見系統 A 內的層流環境。

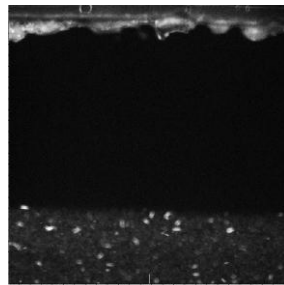


圖 (十五) 顯微鏡倍率小之視野下近入口處 LB 與大腸桿菌菌液分流情形

(實驗二)、計算所需流速並以懸浮粒子檢測

將以每秒 2 張的頻率取到的照片中，取懸浮粒子在每 2.5 秒的位移，以下四張連續照片所示，在求出速度，如表 (二)、表 (三)。

在完全發展的微管道流中，流速成拋物線分布，因此我們聚焦在速度最快的懸浮粒子上，只要最快的懸浮粒子速度低於 $3 \times 10^{-11} \text{ m}^3$ ，便能確定大腸桿菌有足夠的時間游離流層。

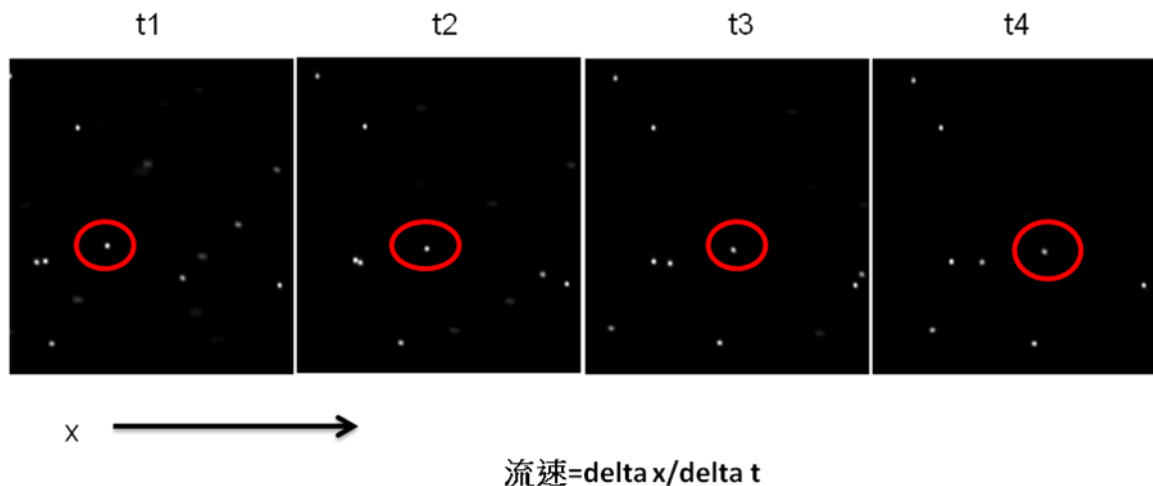


表 (二) 微流道系統 A 流速

	位置 1	位置 2	位移 μm	流速 $\mu\text{m}/\text{s}$
1	27.07	375.22	348.15	139.26
2	39.04	356.90	317.86	127.14
3	29.48	361.68	332.20	132.88
4	35.07	362.49	327.42	130.97
5	18.32	342.56	324.24	129.70
6	32.66	381.61	348.95	139.58
7	46.20	364.89	318.70	127.48
8	24.70	363.29	338.59	135.43
9	40.61	373.65	333.04	133.22
10	9.56	343.37	333.80	133.52
11	10.36	344.97	334.61	133.84
12	7.95	343.37	335.41	134.16
13	18.32	338.59	320.27	128.11
14	34.26	358.51	324.24	129.70
15	10.36	343.37	333.00	133.20
16	37.44	369.67	332.24	132.89
17	31.85	360.92	329.06	131.63
18	37.44	366.46	329.02	131.61
19	36.63	345.77	309.14	123.66
20	23.10	372.85	349.75	139.90
			平均	132.39±4.1

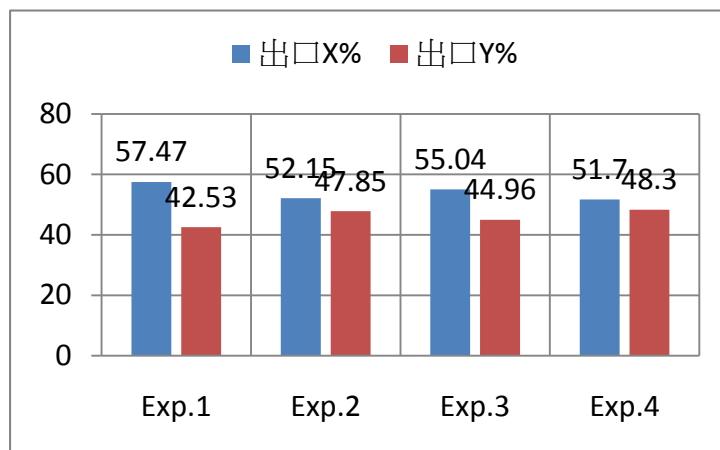
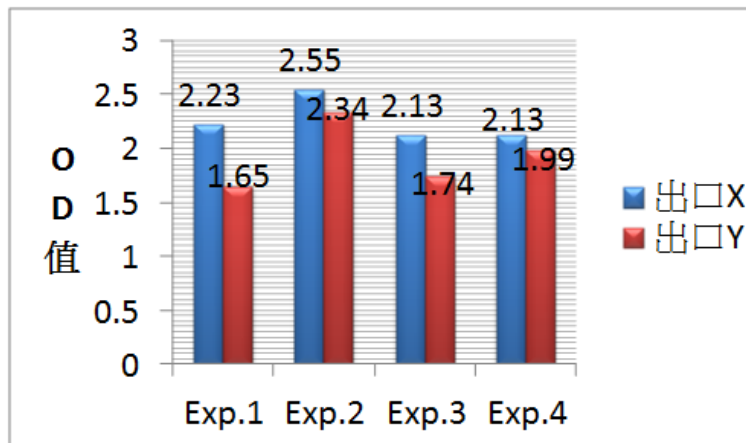
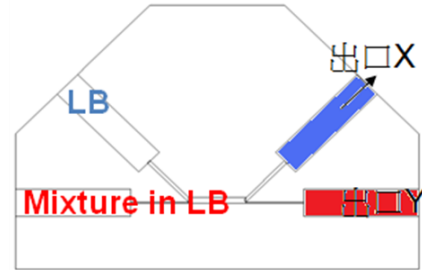
表 (三) 微流道系統 B 流速

	位置 1	位置 2	位移 μm	流速 $\mu\text{m}/\text{s}$
1	159.46	398.47	239.01	95.60
2	94.84	335.37	240.54	96.37
3	18.36	263.10	244.74	97.90
4	160.99	393.50	232.50	92.93
5	116.25	363.29	247.04	98.66
6	39.77	280.31	240.54	96.37
7	63.86	309.75	245.89	98.28
8	4.59	244.74	240.15	95.98
9	22.18	266.92	244.74	97.90
10	30.21	278.01	247.80	99.04
11	69.22	320.46	251.24	100.57
12	12.62	251.63	239.01	95.60
13	40.54	282.98	242.45	97.13
14	95.60	340.34	244.74	97.90
15	43.98	290.63	246.65	98.66
16	75.72	323.52	247.80	99.04
17	39.01	288.34	249.33	99.81
18	105.93	352.20	246.27	98.66
19	4.59	245.51	240.92	96.37
20	16.06	267.69	251.63	100.57
			平均	97.67±1.84

(實驗三)、測量不同形式的儀器分離大腸桿菌的效率差異

表(四) 由系統A取得並培養後的OD值

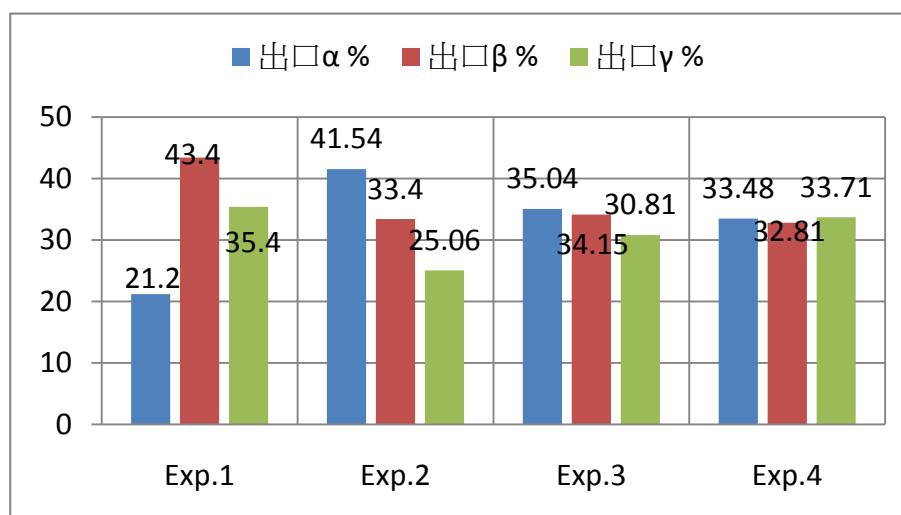
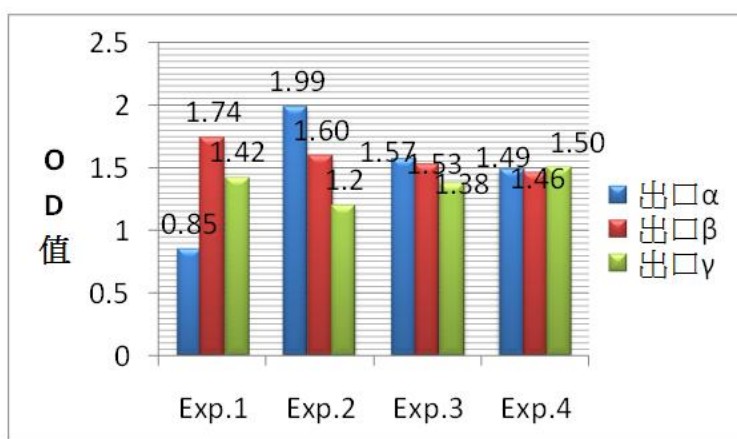
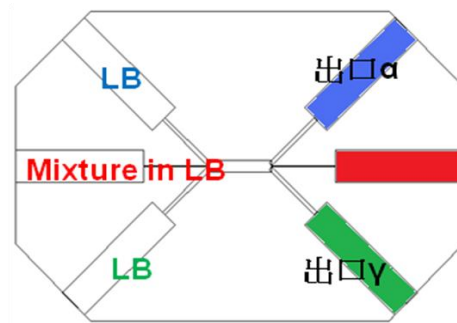
系統 A				
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4
出口 X	2.23	2.55	2.13	2.13
出口 Y	1.65	2.34	1.74	1.99



由上的圖表可以得知，出口 X 的 OD 值均高於出口 Y 的 OD 值，系統 A 確實能將大多數的大腸桿菌由原本的流層中分離出來。

表（五）由系統B取得並培養後的OD值

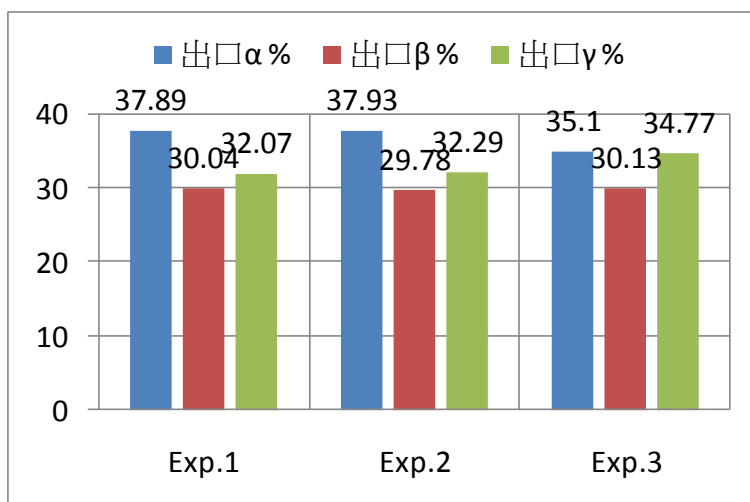
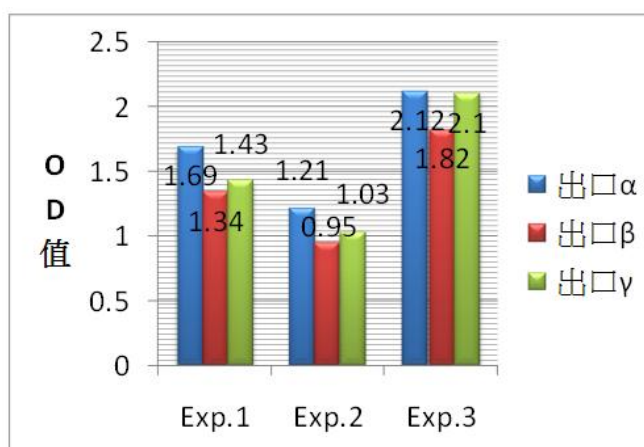
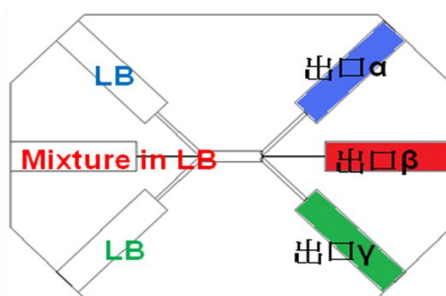
系統 B				
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4
出口 α	0.85	1.99	1.57	1.49
出口 β	1.74	1.60	1.53	1.46
出口 γ	1.42	1.20	1.38	1.50



由上方圖表可知，系統B的數據相當不穩定，各儲液槽收集道的菌液培育後，大腸桿菌的含量比例不一，我們設法改善此問題，進而對流道系統B進行改良。


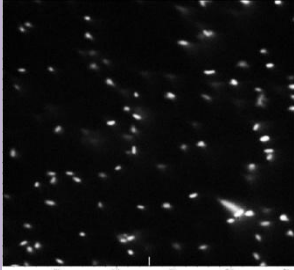
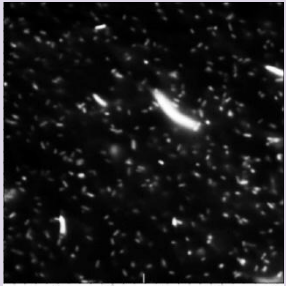
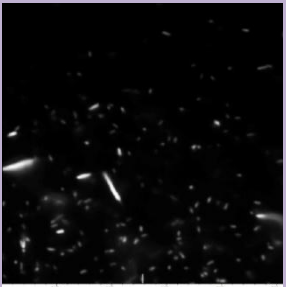
表（六）由改良過的系統B取得並培養後的OD值

改良後的系統B			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3
出口 α	1.69	1.21	2.12
出口 β	1.34	0.95	1.82
出口 γ	1.43	1.03	2.10



在對微流道系統B進行改良後，我們得到的數據如上圖表所示，各儲液槽收集道的菌液培育後，大腸桿菌的含量比例接近，且中間流道殘餘的細菌比例也更低。

(實驗四)、觀察養分濃度梯度對分離效果的影響機制
 表(七) 實驗四中，顯微鏡下各流道大腸桿菌分布情形

顯微鏡下各流道大腸桿菌分布情形	
水中	
原始菌液	
LB 中	
LB 與原始菌液交界處 分離情形	

由表(七)可看出，大腸桿菌在 LB、原始菌液、水中分布密度不同。

LB 中密度>原始菌液中密度>水中密度

陸、討論

在實驗三中，我們可以看到出口 X 的 OD 值 > 出口 Y 的 OD 值，能達成分離效果。若以系統 A 的數據推論，在系統 B 中，大部分的大腸桿菌也會越流層，游向另一流道，所以系統 B 應該是出口 α 和出口 γ 的 OD 值相近，且大於出口 β 的 OD 值。然而系統 B 所得的數據並不符合預期，推論可能與三道系統較不穩定有關。因此，我們將兩側儲液槽墊高，壓迫中間流層，使之收斂。改良後的微流道系統 B 經實驗後，得到效率確實比改良前的高，且穩定許多，也符合推論。

另外，我們認為細菌被分離出來，有可能是因為四種因素造成：

1. 和細菌本身運動能力無關，完全由擴散現象造成

因擴散現象可能由濃度梯度或大腸桿菌互相撞擊而造成。由下列公式

$$x^2=2Dt \{D: \text{擴散係數}(m^2/s); x: \text{位移}(m); t: \text{時間}(s)\}$$

D 正比於 $T/a^3\mu$ {T: 溫度(°C); a: 顆粒半徑(m); μ : 黏滯係數(Pa·s or N·s/m²)}

得知大腸桿菌完全藉由擴散橫越 200 μ m 的流道，需

另外，因菌液濃度過高，大腸桿菌彼此互相碰撞而產生擴散的部分，在顯微鏡下觀察所使用的菌液中，大腸桿菌並未頻繁的互相撞擊，故碰撞而產生的擴散可忽略不計。

2. 大腸桿菌感受到周圍細菌密度過高，主動游到更寬敞的空間

因所使用的菌液密度，尚未達到對大腸桿菌造成生存壓力的標準，不會迫使大腸桿菌游離原本流層。

3. 細菌感應到養分，向養分濃度較高之處遊去。

在這部分，我們將設計新的實驗，在系統兩側灌入養分濃度不同的溶液，觀察養分濃度梯度不同的狀況下，需多久時間大腸桿菌才會接觸到擴散過來的營養分子，再向養分來源處移動。

柒、結論

目前，我們已製作出能成功分離活菌及死菌的微流道系統，並解決微流道系統 B 不穩定的問題，且確定養分會影響大腸桿菌的分離效果，未來我們期望將各種影響大腸桿菌分離效果的因素釐清和量化。

捌、參考資料及其他

一、參考資料

1、微流道: Brenda S. Cho, Timothy G. Schuster, Xiaoyue Zhu, David Chang, § Gary D. Smith,* and Shuichi Takayama(2003) Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile

Sperm Anal. Chem., 2003, 75, 1671 - 1675

2、流阻公式:*Microfluidics/Hydraulic resistance and capacity*. (2009, December 18). Wikibooks.

Retrieved December 18,2009,from

http://en.wikibooks.org/wiki/Microfluidics/Hydraulic_resistance_and_capacity

3、大腸桿菌泳速: Shoji Takeuchi,[‡] Willow R. DiLuzio,[‡] Douglas B. Weibel,[‡] and George M. Whitesides*[†]

(2005) Controlling the Shape of Filamentous Cells of *Escherichia coli*

American Chemical Society

二、備註

註1、OD 是 optical density (光密度) 的縮寫，本實驗利用波長 600nm，通過被檢測物前及通過後的能量差，再經 $1OD = \log(1/\text{trans})$ 的公式換算而得到，trans 為檢測物的透光值。

【評語】 040104

1. 以微流道層流機制產生菌的分離具有成效，值得肯定。
2. 實驗設計中，以水平高度壓力差造成“驅動”“重力”造成的效果比重為何並未進一步探討，建議可朝此方向進一步確認。
3. 作者展現自信熱情令人欣喜！