

# 2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：140011

## 作品名稱

以重力驅動之微流道細胞分離器

## 得獎獎項

大會獎：四等獎

作者姓名：廖柔謙、蔡宜真

就讀學校：臺北市立第一女子高級中學

指導教師：周家復、陳文盛

關鍵字：層流、微流道、細胞分離

## 作者簡介



我們北一女中的學生，廖柔謙、蔡宜真，很高興能夠參與這次國際科展的活動。由於學校課程安排，使我們有機會能夠參與專題研究並從中學習。從高二開始做專研，至今也有一年多了，過程中有很多有趣的事，在實驗室也有很有耐心的學長姐指導，陪我們度過瓶頸，協助我們找資料、操作儀器等。而與教授討論問題時常常有醍醐灌頂之感啊!目前為止，過程都稱得上順利，很謝謝幫助過我們的人(尤其是在趕報告被我們急死的老師們)。:D

## 作品名稱：以重力驅動之微流道細胞分離器

### 一、中英文摘要

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。

This paper describes a microfluidic system that requires no external power source. With the gravitational forces, surface tension forces and capillary forces, it can generate a steady flow of liquid. Because of the small size of the device, there is a laminar flow in channels. And the device isolates live and dead e.coli based on the ability of live e.coli which are motile to cross streamlines in the system, while the dead e.coli can only float with the stream. Therefore, we can separate live e.coli from others. Additionally, we discuss on the influence on the separation of e.coli caused by the different types of devices and other controls.

## (一)、前言

### 1、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)。

### 2、研究目的

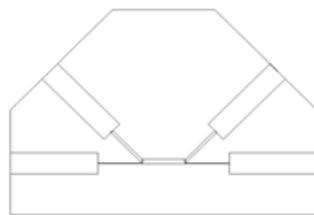
本研究藉簡單的原理與實驗器材分離死菌與活菌。將探討以下幾點問題：

一、如何使流體維持固定流速，形成穩定的層流

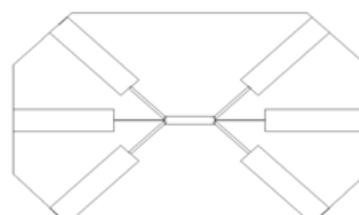
二、如何使流速與細菌泳速妥善配合，給予細菌足夠時間橫越流道

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

## (二)、研究方法或過程

### 1、研究設備及器材

- (1) 顯微鏡
- (2) 雷射雕刻機
- (3) Optical density machine
- (4) 養菌器材：養菌管、LB (營養液)、抗生素
- (5) PI 染劑、懸浮粒子(poly styrene)
- (6) 酒精燈、燒杯、陶瓷纖維網、三角架

### 2、研究過程或方法

#### (1) 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。

V:平均流速(m/s)；D:流道直徑(m)

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

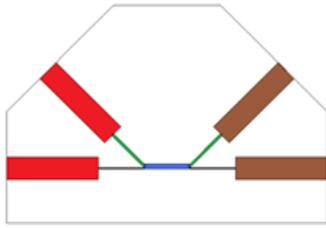
$\mu$ :黏滯係數 (Pa·s or N·s/m<sup>2</sup>)； $\nu$ :運動黏度(m<sup>2</sup>/s)  
 $\rho$ :流體密度(kg/m<sup>3</sup>)；Q:流量 (m<sup>3</sup>/s)

A:橫截面積(m<sup>2</sup>)

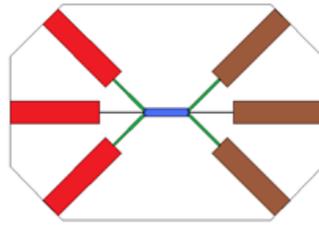
- I. 計算所需流速：文獻中(參考資料 3)大腸桿菌的泳速可達 20 $\mu$ m/s，為了讓大腸桿菌有足夠時間游離層流，並以其在主流道內停留 10 秒以上為計算依據。

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

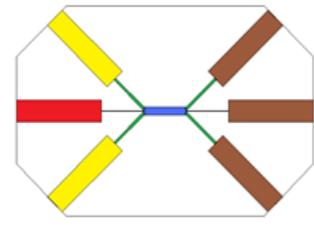




圖(三) 微流道系統A



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。

### (3) 微流道製程

I. 材料：壓克力板、雙面膠、玻片

II. 製作方式：

1、切膠：以雷射雕刻機於60 $\mu$ 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。

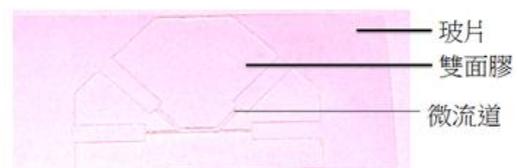
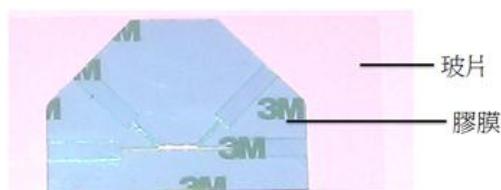
2、切壓克力板：分別切出所需的壓克力板形狀，

如圖(七)、圖(九)中之1、2

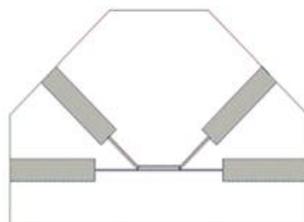


3、撕膠：將圖(六)、圖(八)中雙面膠呈灰色的部分撕去。

4、將撕好的雙面膠黏貼於玻片上再撕下另一面膠膜。



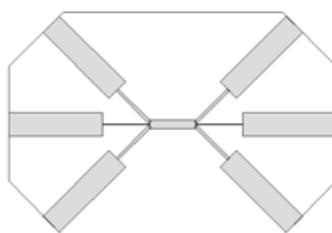
5、依圖(七)、圖(九)中 1、2、3 的次序將壓克力板黏貼於玻片上即完成所需之微流道系統。圖(十)、圖(十一)為微流道系統儲液槽，圖(十二)為微流道系統側視圖。



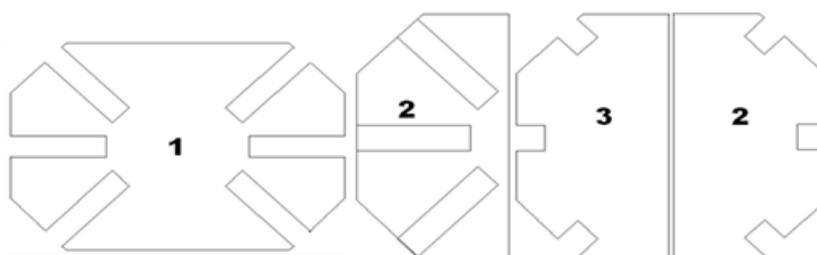
圖(六) 微流道系統A示意圖(灰色部分為須撕下之雙面膠)



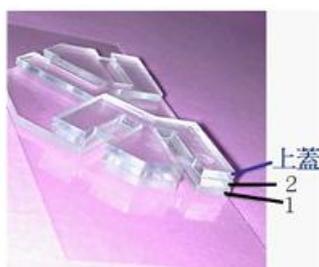
圖(七) 黏貼壓克力板之順序：2 黏於 1 上方，3 黏於 2 上方



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

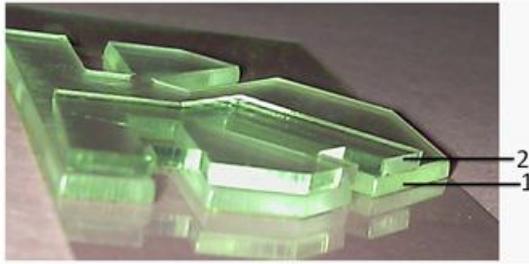


圖 (十一)

系統右方儲液槽具一層 1 mm 之壓克力板及一層 1 mm 上蓋

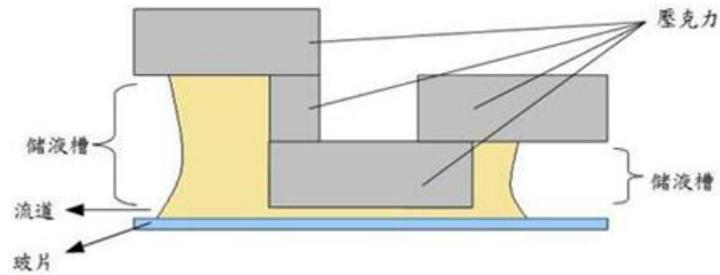


圖 (十二) 微流道系統側視圖

#### (4) 實驗流程

##### (實驗一)、驗證設計的系統是否形成層流

- I. 將系統 A 平置於平台
- II. 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。
- III. 以 pipette 將紅色與藍色墨水分別注滿上方及下方的儲液槽
- IV. 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

- I. 以千分之一的比例稀釋懸浮粒子(poly styrene)
- II. 將系統 A 水平置於平台
- III. 稀釋液灌入微流道系統
- IV. 儀器置於顯微鏡下，以 580nm 的紅光激發
- V. 以每秒 2 張的頻率拍攝連續照片

VI. 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

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

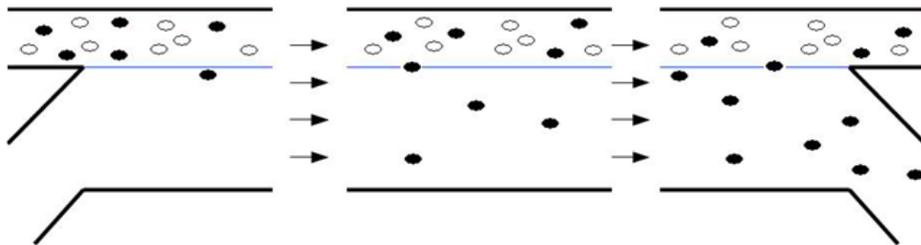
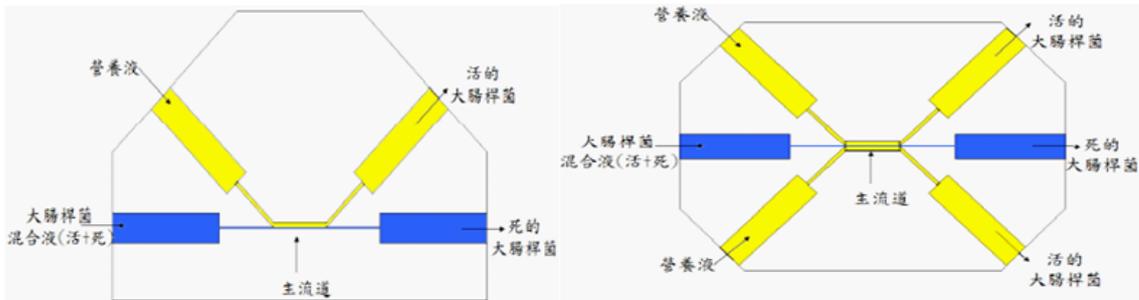


圖 (十三) 流道內大腸桿菌分離示意圖：

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。



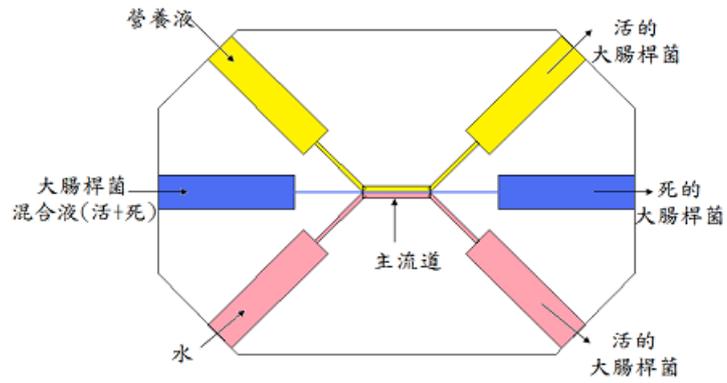
(實驗四)、觀察養分濃度梯度對分離效果的影響機制

- I. 培養大腸桿菌(*E. coli*, DH5  $\alpha$ )
- II. 壓克力板、玻片置入 Plasma Cleaner 打氧電漿
- III. 將 LB 灌入微流道系統 B 中
- IV. 系統 B 完全充滿 LB 後，再灌入菌液、PBS

V. 經 40 分鐘後，以 pipette 將出口儲液槽中的溶液取出

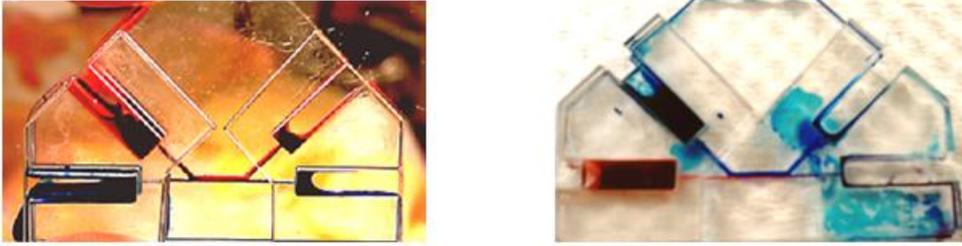
VI. 分別培養不同儲液槽中的溶液

VII. 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

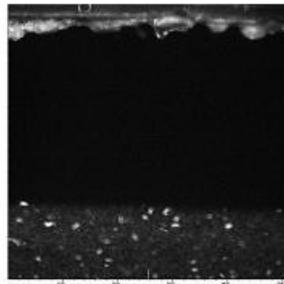


### (三)、研究結果與討論

#### (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。

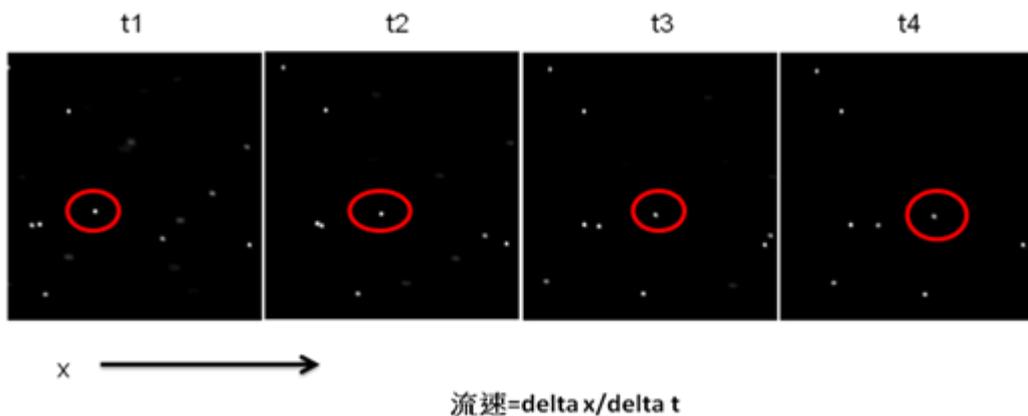


圖(十五)顯微鏡倍率小之視野下近入口處 LB 與大腸桿菌菌液分流情形

#### (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 $\mu\text{m}$	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	<b>132.39±4.1</b>

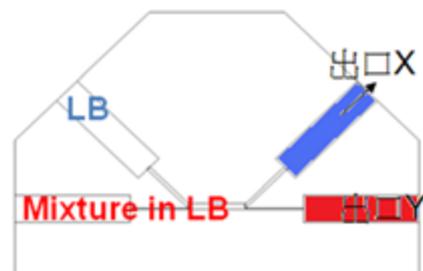
表（三）微流道系統 B 流速

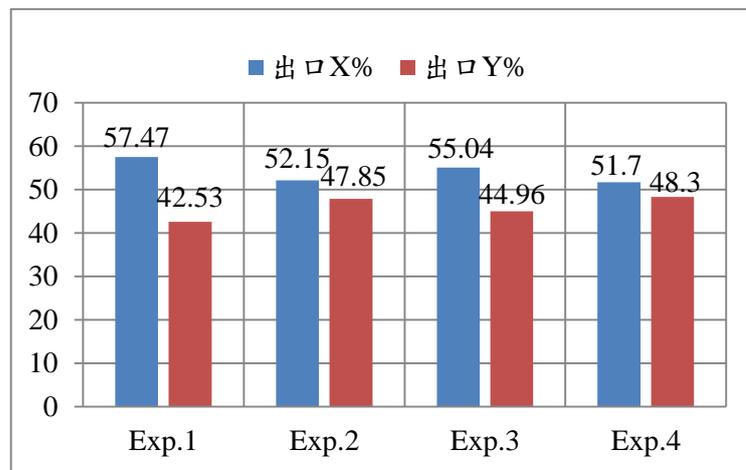
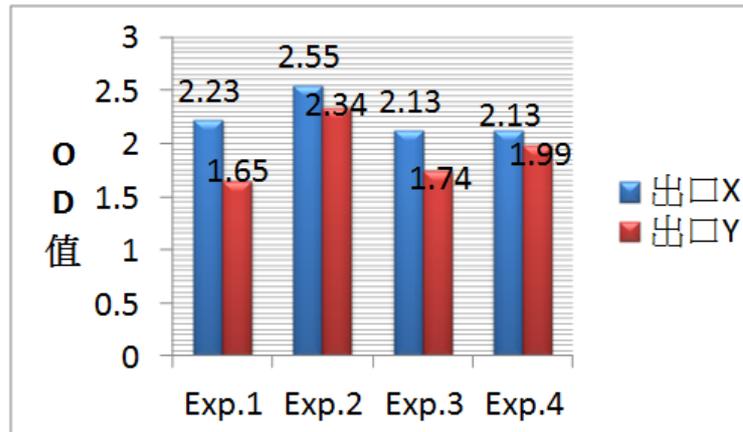
	位置 1	位置 2	位移 $\mu\text{m}$	流速 $\mu\text{m}/\text{s}$
1	159.46	398.47	239.01	95.60
2	94.84	335.37	240.54	96.37
3	18.36	263.10	244.74	97.90
4	160.99	393.50	232.50	92.93
5	116.25	363.29	247.04	98.66
6	39.77	280.31	240.54	96.37
7	63.86	309.75	245.89	98.28
8	4.59	244.74	240.15	95.98
9	22.18	266.92	244.74	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	<b>97.67±1.84</b>

（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 O D 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

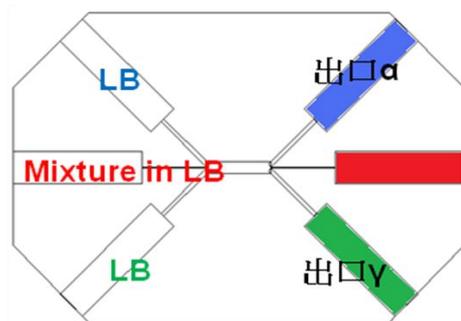


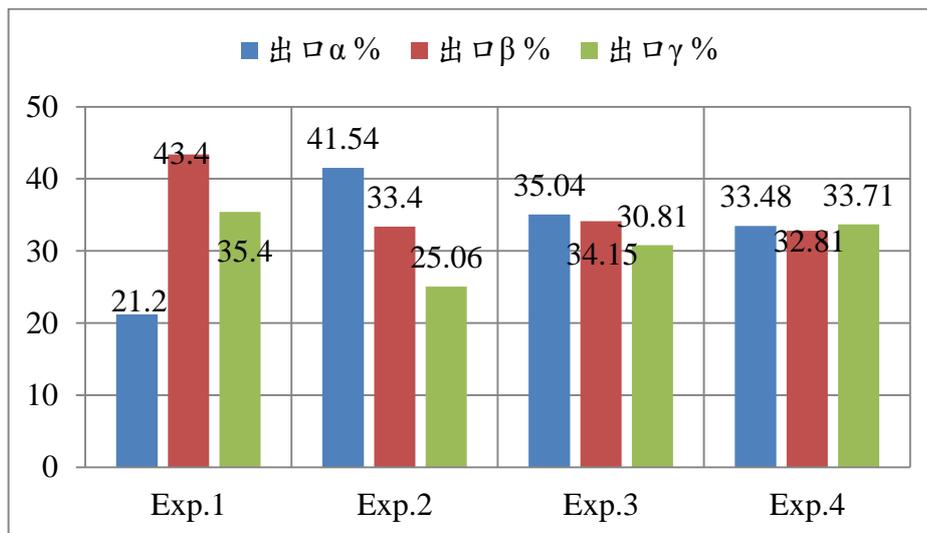
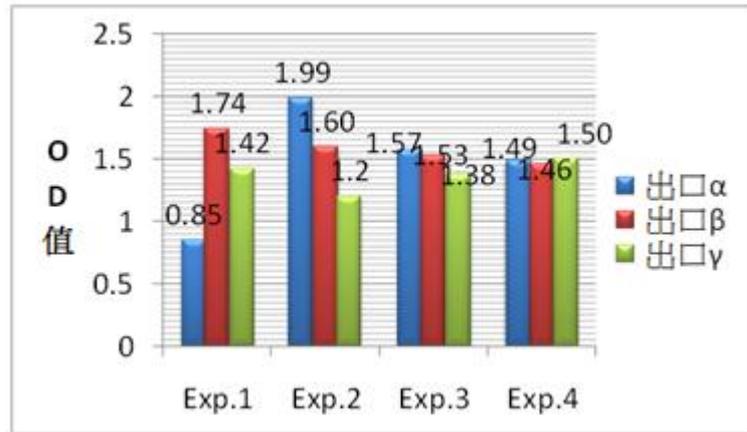


由上的圖表可以得知，出口 X 的 OD 值均高於出口 Y 的 OD 值，系統 A 確實能將大多數的大腸桿菌由原本的流層中分離出來。

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 $\alpha$	0.85	1.99	1.57	1.49
出口 $\beta$	1.74	1.60	1.53	1.46
出口 $\gamma$	1.42	1.20	1.38	1.50

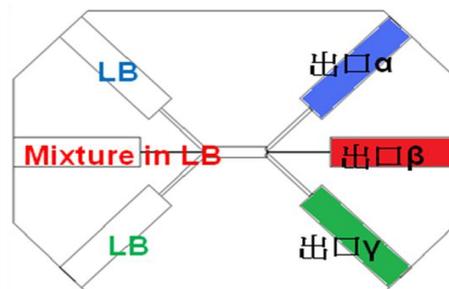


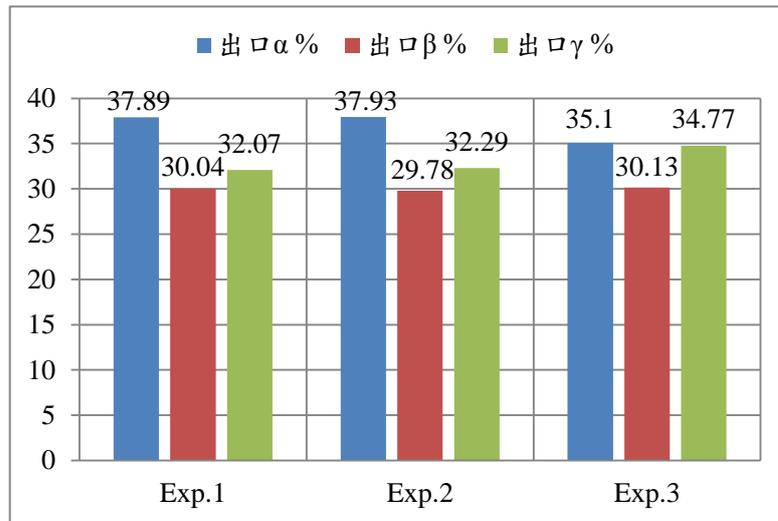
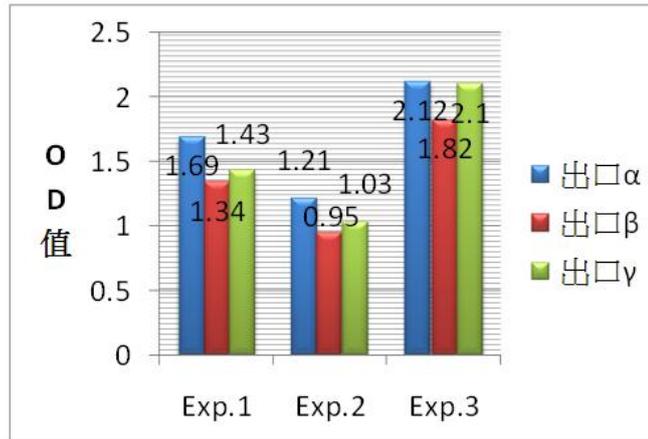


由上方圖表可知，系統B的數據相當不穩定，各儲液槽收集道的菌液培育後，大腸桿菌的含量比例不一，我們設法改善此問題，進而對流道系統B進行改良。

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 $\alpha$	1.69	1.21	2.12
出口 $\beta$	1.34	0.95	1.82
出口 $\gamma$	1.43	1.03	2.10

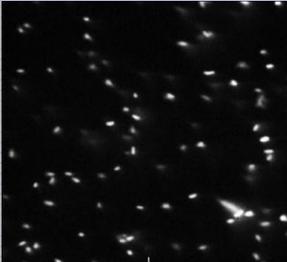
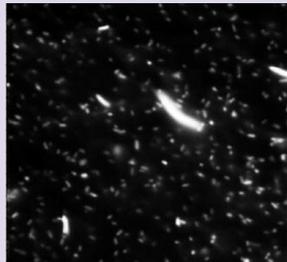
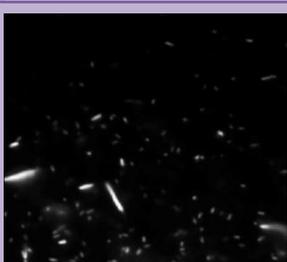




在對微流道系統B進行改良後，我們得到的數據如上圖表所示，各儲液槽收集道的菌液培育後，大腸桿菌的含量比例接近，且中間流道殘餘的細菌比例也更低。

(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

#### (四)、結論與應用

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  $\alpha$  和出口  $\gamma$  的 OD 值相近，且大於出口  $\beta$  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);  $\mu$ : 黏滯係數(Pa·s or N·s/m<sup>2</sup>)}

得知大腸桿菌完全藉由擴散橫越 200  $\mu$ 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。

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。

## (五)、參考文獻

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](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
4. American Chemical Society

### 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  $1OD = \log(1/trans)$  的公式換算而得到，trans 為檢測物的透光值。

## 評語

使用具螢光的大腸桿菌來測試所設計之微流道分離器，經反覆測試，以獲得稍具效果之設計，過程頗具實驗精神。過程中對於理論的探討，還有發揮空間，如果能對理論部分有更強的掌握度，將可設計出效果更好的分離器。這項挑戰並不容易。