

微機電系統概論
Term Project Proposal

聚合酶鏈反應(PCR)之微流道基板製造

顧問 陳國聲 助理教授

董事長 裴建昌

總經理 張沛頌

技術部經理 葉修銘

研發部經理 林聖凱

2002/11/14

建昌科技股份有限公司

摘要

本研究探討 PCR(polymerase chain reaction)聚合酶鏈反應之熱循環微流道基板的量產技術。具熱循環微流道之 PCR，其效率遠高於傳統井式檢驗盤。依照可實行之熱循環微流道基板尺寸，進行射出成型全製程研究。製造技術使用微加工技術、精密電鑄以及微特徵射出成型技術。將採用 3D 模擬軟體分析微加工製程，並使用全 3D 塑膠射出模流分析軟體模擬微特徵模穴充填情形。經由本研究的整理，PCR 熱循環微流道基板的量產是可實行。

關鍵字詞：聚合酶鏈反應、連續流 PCR、3D 模流分析、電鑄、微射出成型

Keywords: polymerase chain reaction, continuous flow PCR, 3D mold flow analysis, electroforming, micro injection molding

一、 Introduction

BioMEMS 介紹：

生醫微機電(BioMEMS)是在矽基材、玻璃或高分子基材上，運用微機電之微小化技術，並配合光學、化學、生化、醫學工程以及分子生物等多項領域，整合而成為檢測環境、分析藥物、進行生物反應之有利工具。

生醫微機電首重於微機電系統(MEMS)，目前大部分應用於微小化之微陣列生物晶片(Microarray chip)以及整合系統之微處理型生物晶片(Lab-on-a-chip)。

微陣列生物晶片是在微小面積的基質上種植高密度的生物探針，做為大量篩檢及平行分析的工具，此微陣列晶片具備了快速、方便、經濟、省時等特性，適用於大量基因表達、篩檢及比對等研究，目前應用在病原體基因檢測、基因表現比較、基因突變分析、基因序列分析、及新藥物開發等領域上。

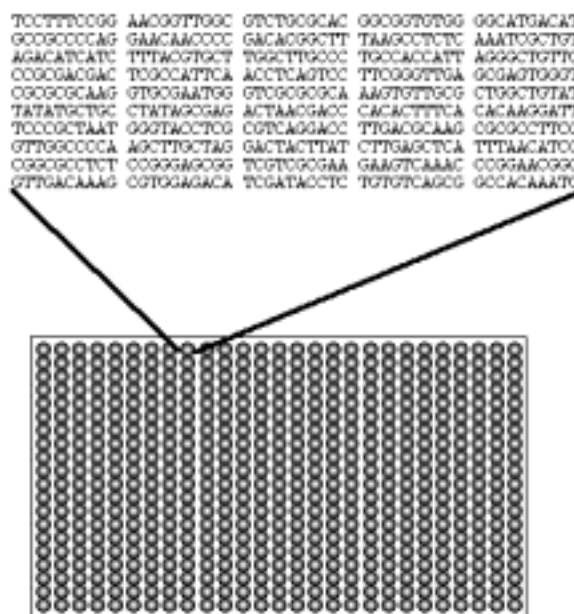


圖 1 運用微機電技術在一般基材上點了 20*27 點之 DNA 反應槽

微處理型生物晶片是整合了若干微流道之設計及微反應器於一塊晶片上，以完成各種樣品處理、反應或分析檢測，功能類似一個實驗室之縮影，可用來處理生物樣品、進行生物性反應、或分析生物體之工具，另外也可作為樣品前處理晶片，使用於處理血液、組織、植物等樣品，減少人為操作時，可能產生的危險和污染；微處理型生物晶片又可細分反應型與分析型之設計，反應型晶片用來從事微量有機化學反應、生化反應、或酵素反應；另外分析型晶片用來進行毛細管電泳或高速篩檢等反應。

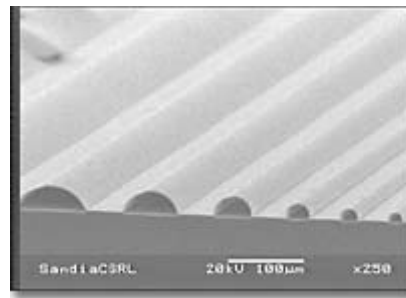


圖 2 運用微機電技術所設計出來之不同管徑微流道

在生醫微機電之下的生物晶片一詞是源於 1980 年代，是描述應用生物分子於微機電設計之晶片上的研發技術；另一個重要的名詞是 Manz 及其伙伴在 Ciba Geigy 發展出第一件 uTAS (micro total analytical system)；再來進一步則是由 Affymax (Affymetrix 的母公司)，以微機電技術運用光化學技術，來合成寡核酸陣列(oligonucleotides microarray)，加速了 DNA 鑑定與定序之工作。

二、 PCR 的重要性

聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR) 是美國 Cetus 公司的 Mullis 於 1984 年所發明的一項新技術，就是在試管內反覆的進行 DNA 合成，而將某一特定 DNA 序列放大，此時即易於偵測或繼續操作。試管內 DNA 之合成包括三個步驟：1. 雙股 DNA 之打開 (denature)，2. 引子的煉合 (primer annealing)，3. 引子的延伸作用 (primer extension)。此三步驟為一週期的反覆的進行，DNA 的數量為每進行一週期就增加一倍，最後達到 2 倍。

剛開始 PCR 是用大腸桿菌 DNA 聚合酶的 Klenow fragment 進行聚合酶鏈反應。在正常細胞內 DNA 複製時，有些酵素會將雙股 DNA 打開，DNA 聚合酶即可利用 RNA 片段或 DNA 片段為引子，將打開的 DNA 單股作模板，複製出其互補股。但在試管內雙股 DNA 的打開則需靠加熱(常用 94°C)，高溫會將 Klenow fragment 破壞，故每週期均須添加此酵素，非常麻煩。Saiki 於 1988 年報告引用一株溫泉中分離嗜熱性菌 (*Thermus aquaticus*) 的 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase) 進行 PCR 反應，由於 Taq DNA 聚合酶耐高溫，即使在 95°C 多次反覆操作，亦不容易被破壞，因此將 PCR 的技術簡化許多。原始的 PCR 技術是在

三個不同溫度的水浴槽反覆進行 DNA 的變性、煉合、延伸三個步驟，自從有了程式控溫儀 (programmable thermal cycler)，利用設計好的軟體，此反覆的動作即達到了自動化的地步，更是大大的簡化了 PCR 的工作，後來又因為生醫微機電之技術成熟，於是許多人使用微機電技術來加速 PCR 反應之進行，有各式各樣的微機電改良方式，使得 PCR 成為 DNA 分析之利器。

三、 PCR 微流道基板概念設計

傳統的聚合酵素鏈鎖反應器，運用 PCR 反應的三個主要步驟，分別是此 Denaturation 之下的溫度①可使 DNA 加熱變性，將雙股的 DNA 加熱後轉為單股 DNA 以做為複製的模板，而 Annealing of primers 的溫度②乃是將 Annealing 在 Primers 於一定的溫度下附著於模板 DNA 兩端，另外 Extension of primers 之下之溫度③，在 DNA 合成酵素(e.g. Taq-polymerase) 的作用下進行引信的延長及另一股的合成(Extension of primers)。

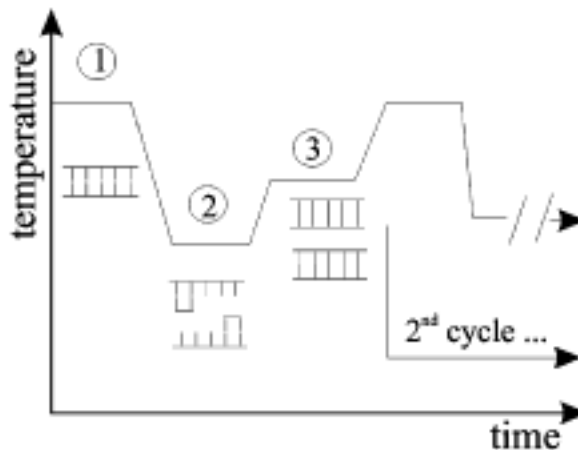


圖 3 PCR 反應的三個主要步驟

本研究將使用微加工技術改良微機電系統 PCR，整合微機電製程技術、LIGA 部分製程而產生具量產性的 PCR 熱循環微流管道基板。PCR 熱循環微流管道的設計即是將 PCR 之三大反應溫度與時間整合在一片基板上，可大大提昇反應效率。

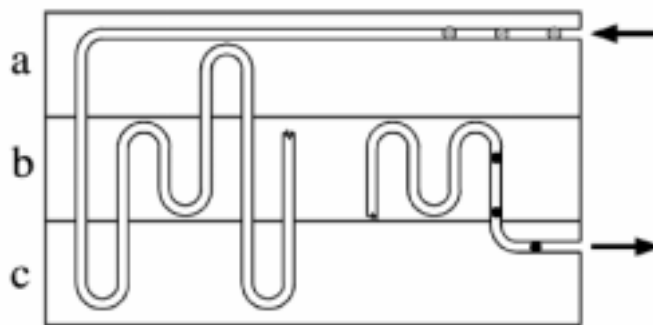
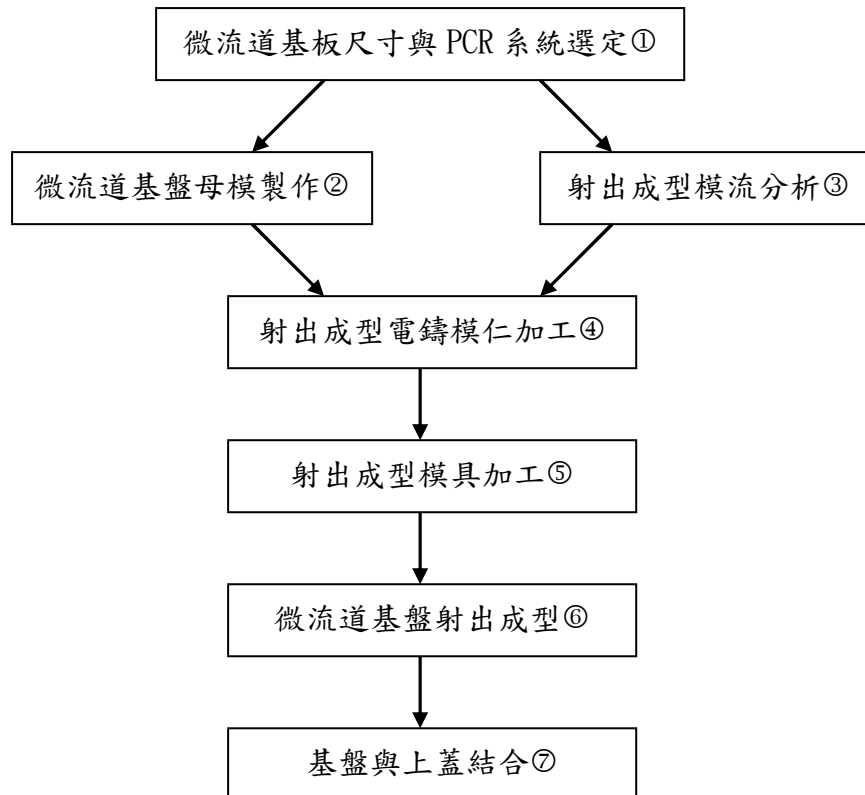


圖 4 微機電技術之 PCR 熱循環微流體設計

研究流程



研究甘特圖

	11 月		12 月			1 月
①						
②						
③						
④						
⑤						
⑥						
⑦						

四、製程介紹

PCR 微流道基板之母模(master)製作

利用訂定之微流道規格進行 PCR 微流道基板之設計與製作，本計劃擬採用微機電體型加工之方式或是以準分子雷射微細加工之方式進行晶片母模之製作，在材料的選擇上也因製作方式的不同也有所差別。

1. 微機電體型加工：

- (a) 選用之材料為 SCS(single crystal silicon)

- (b) 依據所訂定之微流道規格與路徑進行光罩之設計與製作
- (c) 依據所訂定之流道容積進行蝕刻劑濃度之調配與蝕刻時間之控制
- (d) 製程之進行，以等向性蝕刻之方式或 KOH 蝕刻在 SCS 上蝕刻出微流道

2. 準分子雷射微細加工：

- (a) 選用之材料為壓克力 PMMA
- (b) 依據所訂定之微流道規格進行路徑之規劃與光罩設計
- (c) 路徑程式之編寫
- (d) 依據所訂定之流道容積進行平台移動速率以及擊發次數之計算
- (e) 依據所訂定之流道截面設計光罩

由以上兩種加工方式進行評估，選取一種較佳的製作方式。

供電鑄加工之導電起始層(seed layer)製作

無論是使用準分子雷射加工高分子材料形成微流道結構或者是使用矽基微細加工技術加工單晶矽微流道結構，此微結構皆可稱為母模。在進行電鑄之前必須使用 PVD 鍍上一層導電起始層，因此其鍍模的品質要求主要是附著性佳、均勻性佳與階梯覆蓋性佳。

物理氣相沉積主要用於沉積金屬，主要可分為蒸鍍 (Evaporation) 與濺鍍 (Sputtering)。蒸鍍是在高真空中對蒸鍍材料加熱，至高溫具備飽和蒸氣壓將薄膜沉積上去。蒸鍍法對合金或化合物沉積的成分控制較差，薄膜階梯覆蓋性較濺鍍差。濺鍍是利用高能粒子將靶材原子碰撞出來，具有動能之原子往被鍍物移動而沉積上去。濺鍍的優點在於濺鍍面積廣、薄膜厚度控制容易、合金比例控制佳、可控制階梯覆蓋與晶粒結構等。

微流道母模表面之金屬材料鍍模，可使用 E-Beam 蒸鍍或一般濺鍍機鍍模。鍍層材料可選擇鎳或金。

精密電鑄製程

根據母模進行 LIGA 製程中的第二步驟—電鑄，以電鑄翻製成金屬模仁供塑料翻造量產。電鑄與電鍍 (Electroplating) 的差別主要在電鍍之金屬層厚度僅於微米級 (μm)，而電鑄的厚度則為毫米到厘米等級 (mm ~ cm)。電鑄層厚度為電鍍之數百數千倍，因此電鑄層容易產生應力變形、表面及內部針孔及平坦性等問題，在精密製造中屬於層次相當高之技術。

一開始使用低電流密度慢慢沉積金屬，當厚度增加即可加大電流密度。降低電流密度可增加金屬模仁之硬度，約降低到 $1\text{A}/\text{dm}^2$ 。通常在導電起始層之上還披附一層方便將母模與金屬模仁剝離的脫模層，若使用銀、金等難氧化且導電性高之金屬則可免去脫模層。影響微結構電鑄品質的因素相當多，包括微結構圖案設計與製作、鑄件前處理程序、電鑄槽設計及電鑄控制等，可控制之參數多而

不易。

以常用的鎳材為例，其主要配方有硫酸鎳（Nickel Sulfate, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）與胺基磺酸鎳（Nickel Sulfamate, $\text{Ni}(\text{NH}_2\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ），一般標準鑄浴為胺基磺酸鎳，以此做為電鑄浴配方的優點有：①鑄層內應力低，機械性質佳；②沉積速度快；③均勻電著性（Throwing Power）。此外還需添加用來控制 pH 變化的硼酸濃度，添加應力消除劑（Stress Reducer）以降低鑄層內應力減少翹屈現象。若母模具有高深寬比的微結構特徵，為了使電鑄液能進入深窄孔道，濕潤劑（Wetting Agent）是不可或缺的，濕潤劑可降低電鑄液的表面張力，使陰極所產生的氫氣與氫氧化物不易黏著於鑄層表面造成缺陷，可避免產生氣孔，又稱為針孔抑制劑。

本研究使用胺基磺酸鎳電鑄溶液進行電鑄加工，完成之鎳模仁厚度約 4~5mm，製作時間約 3~4 天。電鑄完成之模仁必須進行後加工，以微流道表面為加工基準，加工其他五個平面。

微特徵射出成型

塑膠射出成型是由模造技術衍生而來，其特性是能在短時間產生將塑膠熔化並以高壓注入模具內，經由冷卻後即可產生所需零件或產品，產量大符合生產經濟性。由於 20 世紀末 3C 產業蓬勃與生產週期快速，塑膠射出成型產業與模具加工產業跟著加快生產週期，產業型態漸漸變革。由於微特徵光學零件的需求，發展出薄厚度並具微特徵零件的射出成型技術。

微特徵射出成型屬於一種微射出成型，目前產業有光碟片(CD、DVD)、LCD 背光模組中的導光板(light guiding plate)。微特徵射出成型其製程主要需求為高射出速度、高模具溫度、潔淨室、良好模穴排氣能力或附加模穴真空系統等。

模具主要使用塑膠射出成型標準模座，模仁則使用經加工之微流道電鑄模仁。由於微特徵射出成型其模仁表面粗糙度相當重要，將影響成品脫模難易與表面品質，而模仁表面品質乃最初母模表面粗糙度所決定。塑膠材料可使用聚碳酸酯 PC 或壓克力 PMMA。微流道基板與塑膠上蓋可使用氧電漿接合法接合。

五、 設計分析方法

母模(master)製作模擬

利用商用微機電製程模擬軟體 MEMCAD 4 進行製程模擬，其步驟如下：

- (1) 依據所訂定之微流道規格與路徑繪製光罩
- (2) 製程步驟之規劃
- (3) 完成 3D 實體

利用微機電製程模擬軟體最主要之目的是在此環境下建構虛擬原型，易於變更設計與驗證，如此可大幅縮短成品開發時間並降低成本。最後，期望以目前正在研究之微機電製程模擬系統模擬出微流道基板母模的製作過程。

微流道基板射出成型模流分析

本分析的目的之一：使用塑膠射出成型的技術來大量製造”微流道基板”，在真正執行射出動作之前，將使用模流分析軟體進行分析，針對不同的模穴位置分佈，觀察其流動狀況，例如一模兩穴與一模多穴。

以目前塑膠射出成型分析的能力，對於一般塑膠產品皆有良好的預測結果，但是微流道基板屬於微特徵，其尺寸大小與市面上常見的塑膠射出產品有相當的差異。就目前所知，材料特性在巨觀與圍觀下會有不同的表現，因此一般的射出成型分析技術應用在微特徵時，其適用性與準確度都是個問號！所以將利用此機會，將巨觀的模流分析技術應用在微特徵上，以釐清上述的疑問。

但是，此次並無法經由實驗驗證分析結果是否正確，因此將只做最有可能的預測，也就是使用兩套模流分析軟體進行模擬，因為這兩套分析技術是由不同團隊發展出來的，所以若兩者的結果一致，將進一步大膽假設分析結果是正確的，若兩者結果不一致，則假設巨觀分析技術不一定適用於微特徵，需要進一步進行研究才能解決疑問。

使用的三維模流分析軟體：

1. Moldex 3D (台灣產品)
2. MoldFlow (美國產品)

在此分析裡，共有 2 個目標：

1. 使用一模兩穴與一模多穴，並檢視塑膠的流動狀況。
2. 測試巨觀模流分析軟體是否適用於微特徵的分析。

六、 工作分配

1. PCR 規格與機制：林聖凱

訂定 PCR 規格，包含微流道尺寸、基板厚度、加熱方式與時間控制機制。
基板材料使用生物相容性 PC。

2. 母模製作與表面金屬鍍模：葉修銘

使用已訂之微流道規格，使用等向性蝕刻在 SCS 上蝕刻出微流道，洗淨後以蒸鍍或濺鍍方式鍍上導電起始層。

3. 模具設計與射出成型模流分析：裴建昌

由已訂定之微流道基板尺寸，以 CAD 建立模型並利用 CAE 分析適合的模具結構。結構包含模穴數目、流道尺寸與澆口位置尺寸

4. 電鑄模仁、模具製作與微流道基板射出成型：張沛碩

將已鍍好導電起始層之母模放入電鑄槽，經由電鑄製作出模仁並組合在適當之模座中。經由射出成型大量複製塑膠材質微流道基板。

5. 上蓋封裝：張沛頌
設計並製作微流道基板上蓋，材料與基板相同，使用結合(bonding)方式封裝基板。

七、 結論

經由本研究之結果，PCR 之熱循環微流道基板的量產技術將是可實行的。由於採用塑膠射出成型技術，使得微流道基板能以較低成本大量生產，其效益將有助 DNA 檢測技術的普及，降低檢驗時間與成本。此微特徵塑膠射出成型技術也可應用在其他類似的 bio-chip 上，增廣生醫晶片的應用面並減少各種醫療檢驗成本。

八、 參考資料

1. Ivonne schneegaß*, Johann Michael Köhler, "Flow-through polymerase chain reactions in chip thermocyclers", *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 101-121 (2001).
2. Marc Madou, "Fundamentals of Microfabrication", CRC, New York, 492-495 (1997).
3. 楊啟榮, "微系統 LIGA 製程技術", *科儀新知*, 第十九卷第四期 (1998.2).
4. 楊啟榮, 強玲英, 黃奇聲, "微系統 LIGA 製程之精密電鑄技術", *科儀新知*, 第二十一卷第六期 (2000.6).
5. Marc Madou, "Fundamentals of Microfabrication", CRC, New York, 291-294 (1997).
6. 吳宗佑, "射出壓縮成型在精密圓筒件與表面微肋件之應用探討", 碩士論文, 國立臺灣大學(2000).
7. Liyong Yu, Yi-Je Juang, Kurt W. Koelling, L. James Lee, "Thin Wall Injection Molding of Thermoplastic Microstructures", The Ohio State University.
8. 張永彥, "實用塑膠模具學", 全華科技圖書, 台北 (1994.3).
9. 蘇癸陽, "實用電鍍理論與實際", 復文書局, 台南市, (1999.8).