

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 物理與天文學科

第一名

051810

表面張力應用於尿液體積定量及細胞回收率之
探討

學校名稱：臺北市私立東山高級中學

作者： 高一 朱蘇彥 高一 許永新 高一 游承緯	指導老師： 江偉菁
---	------------------

關鍵詞：表面張力、尿液體積定量、尿液癌細胞

得獎感言

科展，我們用堅毅與滿滿的驕傲，刻劃出不平凡的一頁！

當我們站上全國科展領獎的舞台時，一瞬間深深地感覺到，這一年的科展活動終於完美地落幕了，獲得第一名的榮耀，有了豐碩的成果，內心裡除了感動，更交織著許多的感謝。在科展競賽這個教科書以外的世界，我們付出了極大的心力，一路上真的是關關難過關關過，許多甘苦，不是隻字片語可形容，有些情緒，也不是字裡行間可表達，但是，這一切都值得了。

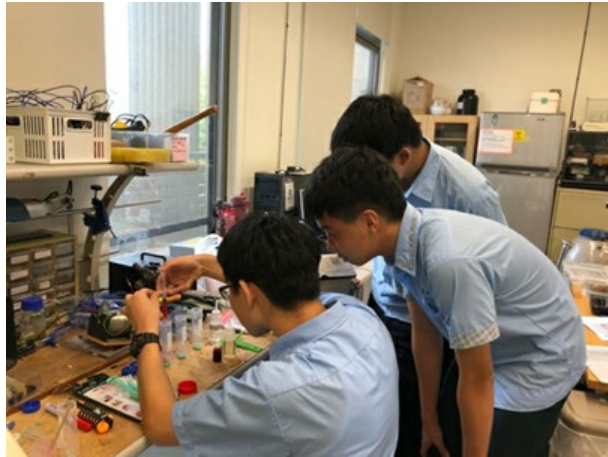
整個研究過程，有很多的資源並不是單憑我們的能力可以輕易取得的，真心感謝許多實驗室提供給我們使用與學習的機會，讓我們因為有更完備的器材而實驗操作的更順遂；此外，校內的物理科江偉菁老師，用陪伴與我們一步一步向前，沒有過多的干預，而是在許多重要的時刻，耐心地協助與指導我們修改作品說明書，增加內容的可看性與完整度，並在上課之餘，與我們反覆練習面對評審提問的應答技巧，是我們強力的後盾；另外，臺北教育大學的全中平教授總能一針見血地提醒我們沒有留意的盲點，多次叮嚀我們實驗的設計與操作，都必須回應研究著重的主題和目標，激發了我們不同的思考邏輯，重新發現問題解決問題，將研究內容，透過一而再的補強，有了煥然一新的風格。

在課業及科展的雙重壓力下，對於蠟燭兩頭燒的我們，時間是零碎的，有好多次咬緊牙關熬夜到凌晨，一再討論作品內容，反覆修改海報的資料呈現方式，總有覺得疲累的時候，然而，家人的協助扶持、班導金宜蓁老師的一路相挺、設備組長陳孜枚老師的辛苦帶隊，都是我們堅持下去的助力。

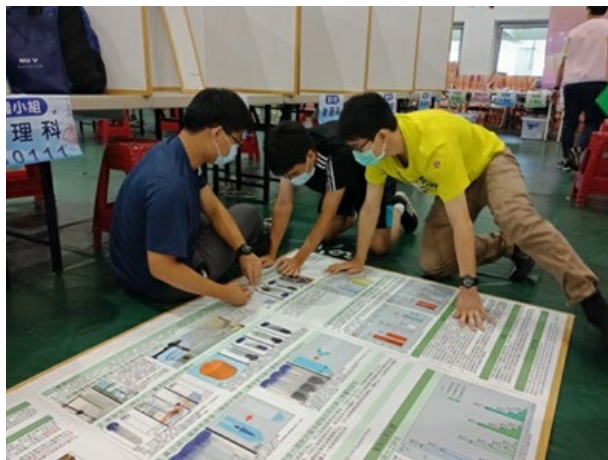
在競爭激烈的全國科展會場，我們告訴自己，完成的海報作品或許不是最出色的，但是我們有特色；研究內容或許不是最傑出的，但是我們夠精彩。為了在有限的時間內，讓評審感受到我們最好的默契，可以把實驗內容做出最生動的詮釋，競賽前我們下足了苦功，繃緊神經，不停演練，團隊合作下終於有了好成果。

科展不是資優生的專利，成績好壞，並非是研究成功的主因，能夠抱持著熱忱的心與堅毅的態度才是關鍵，因為挫折總是緊跟在失敗之後，但是，突破瓶頸之後換來的微笑與成就感，是非常值得珍藏的收穫，而思考邏輯的成長，更是我們蛻變後的展現。

科展，讓我們的想法，變成創意，讓我們의構思，化為具體的成品。更讓我們的高一生活，用辛苦的足跡，走出嶄新的路，用滿滿的驕傲，刻劃了不平凡的一頁，在此，想對所有幫助過我們的人說：『科展的任務，我們小組圓滿達成，獲獎的榮耀是我們獻給大家最好的回報！』



實驗中，我們量測欲保留的體積，作為表面張力閥之相關尺寸參數。



在全國科展會場，將我們精心製作的海報，完美地張貼在展覽版上。



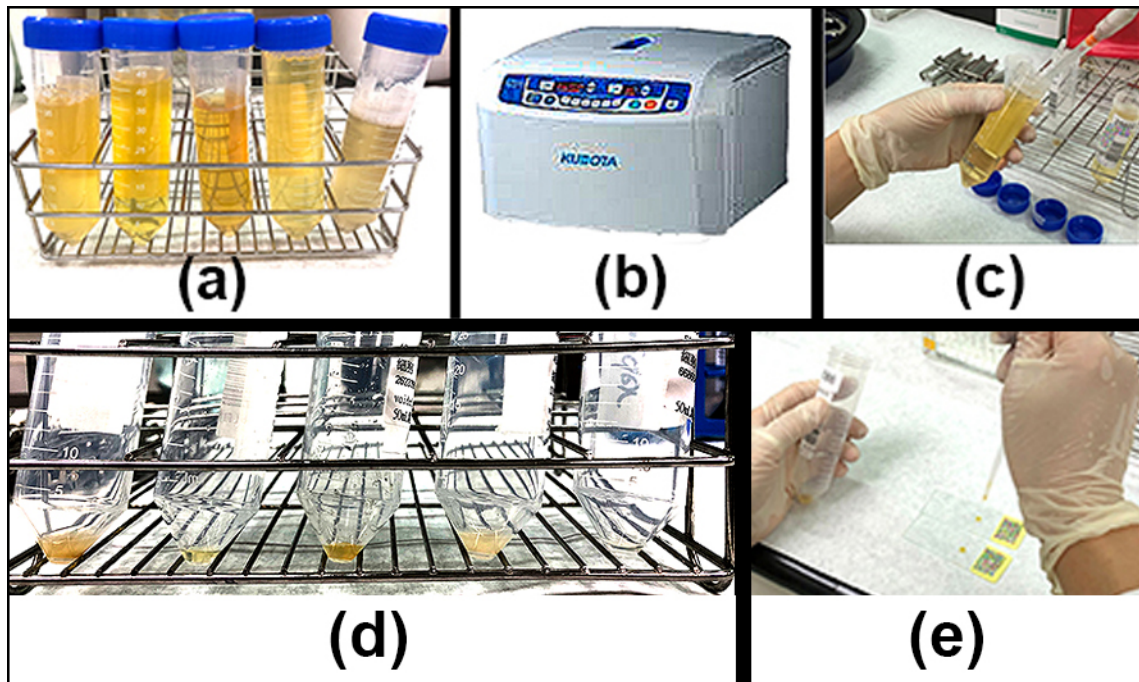
我們有了豐碩的成果，開心地與獎盃合照，辛苦的付出都值得了。

摘要

本實驗利用 3D 印表機配合 ABS 材料印製特殊構型之表面張力閥，將其應用於尿液癌細胞病理檢驗操作程序(簡稱表面張力閥法)，最後比較表面張力閥法與目前使用的真空吸引法於移除上清液後所保留的定量體積變異性與尿沉渣細胞回收率。經實驗證明，表面張力閥法對於保留定量體積應用於二次純水的變異係數為 3.3%，應用於尿液品管液的變異係數為 5.1%；真空吸引法對於保留定量體積應用於二次純水的變異係數為 4.5%，應用於尿液品管液的變異係數為 17.0%。兩種方法對細胞回收率的影響，於紅血球與白血球並無顯著差異，但真空吸引法於上皮細胞有較高的回收率。ABS 表面張力閥體積定量效果較為穩定，但因列印精度的影響而造成表面粗糙，進而導致細胞回收率不如預期。

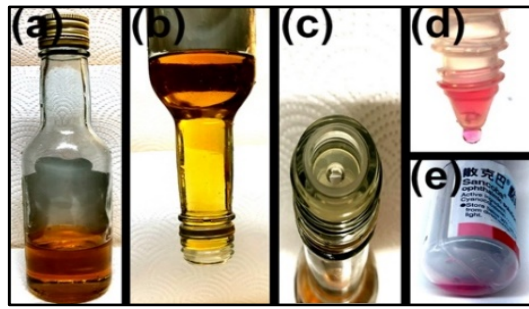
壹、研究動機

暑假期間至媽媽工作的醫院檢查室參觀，觀察到尿液癌細胞檢驗流程，會使用離心機沉澱細胞至尿液離心管的底部，再利用真空幫浦吸引機手工操作，一支一支地移除上清液(離心後，於管底細胞沉渣之上方的澄清液體)，最後將留下的濃縮細胞，進行細胞抹片的製作。但是我察覺到操作過程中，每一支檢體移除上清液時，真空幫浦吸引力對於底部細胞沉積面的擾動程度不一，加上附著於管壁的尿液靜置一小段時間後，會因重力關係再流至管底，造成離心管底部的細胞沉積面因液體流動而破壞，同時造成每一個尿管的濃縮體積增加且差異性大(圖一)。這些變異因素，有可能影響檢驗的品質程度。



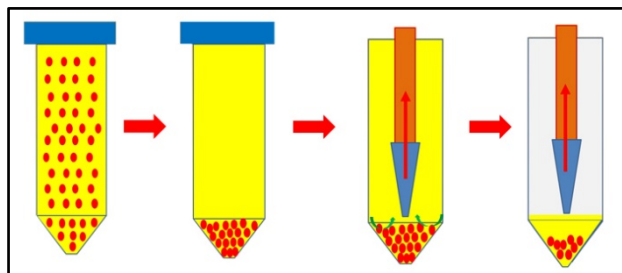
圖一. 尿液檢體前處理過程。(a)原始檢體之體積與混濁度為不一致。(b)以離心機離心檢體，條件為， $500 \times g$ ，5 分鐘。(c)以真空幫浦移除上清液。(d) 尿沉渣細胞在每一管中的殘存量不一，於靜置一段時間後，附著於管壁的尿液滑落底部，再次造成殘存量的變化。(e)以吸管混和沉渣與殘存尿液，再以吸管將此細胞懸浮液滴在載玻片上，製作成細胞抹片。

我們觀察到日常生活中用到的調味瓶，常常會因為體積量較少而不易滴出，若體積只剩下少量殘存時，調味料會於開口處殘留而不滴出，同時造成瓶身回正後，殘存的調味料會再滑落瓶底；眼藥水的瓶身與瓶口也有此特別的現象，導致眼藥水無法完全滴落。這些現象都是因為液體分子的表面張力(surface tension)特性所造成。液體分子之間有內聚力(cohesive force)，同時液體分子對於固體表面又具有附著力(adhesive force)的特性，造成液體於流道開口處產生附著現象。附著力的特性在毛細管的表現非常顯著而易於觀察，毛細管內液體的液面高度，高於管外的液面高度。當定量液體的附著力大於定量液體的重量時，就會導致液體殘留於流道而不滴落。

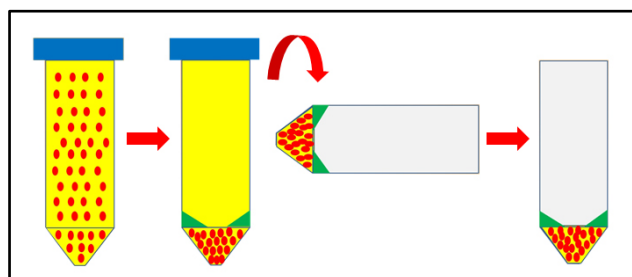


圖二. (a)香油殘存量少於瓶裝量的 1/2。(b)倒立的香油瓶，瓶內的香油因為液體的附着力而不易滴落。(c)香油瓶之表面張力閥開口小孔。(d)眼藥水的附着力大於藥水體積重量，造成藥水不易滴落。(e)殘留的眼藥水於瓶身回正後滑落瓶底。

基於上述之液體接觸固體所產生的自然現象，如果能於離心管的底部製造出流道開口，就可在不使用真空幫浦移除上清液的狀況下，改用傾倒式移除上清液，並且留下定量體積之尿液，而且減低液體流動擾動細胞沉積面的影響。



圖三. 現行上清液移除過程與沉渣細胞之損失示意圖。以真空幫浦移除上清液時，由於液體的流動方式，造成尿沉渣細胞表面之擾動，可能會造成最表面之細胞被移除。










圖四. 本研究之改善移除上清液示意圖(紅色為尿沉渣細胞，綠色為表面張力閥)。擬於離心管內置表面張力閥門，傾倒尿液時不會造成閥門內的液體擾動，尿沉渣細胞不受影響，而且可保留定量尿液體積，進而確保濃縮檢體倍數的穩定。

貳、研究目的

- 一、 探討不同表面張力之液體於不同孔徑流道開口的附著力大小並得出表面張力閥的理想孔徑
- 二、 探討定量尿液殘留體積對於尿沉渣細胞回收率之關係

參、研究設備及器材

試劑			
	二次純水	清潔劑(界面活性劑)	尿液檢查專用品管試劑

耗材				
	列印基材 (ABS)	1.5 mL 微量離心管	1 mL 微量移液管頭	50 mL 尖底離心管
耗材				
	石蠟片	3 mL 吸管	尿液分析 檢體杯	

設備



流式細胞儀，主要用於客觀的量測單位體積內的細胞數。



桌上型離心機，主要用於沉澱尿液中懸浮的細胞。



真空吸引器。用於移除離心管的上清液。



3D 印表機，用於製作吻合 50 mL 尖底離心管之管內的流道開口構型。



多用途實驗鐵架，用於穩定觀察液體種類與液體附著力之關係。



微量移液管，用於量取定量之微量體積液體或配置清潔劑水溶液。



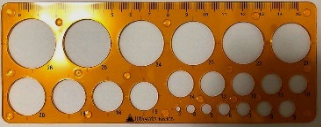
2000 mL 燒杯，用於觀察 1mL 微量移液管頭之口徑與表面張力之關係。



100 mL 量杯，用於配製尿液檢查專用品管試劑。



表面張力計，用於量測清潔劑水溶液之表面張力。

設備			
	5 mL 注射針，用於填注二次水於單端密封之 1mL 微量移液管頭。	圓孔直尺，用於標定 50L 尖底離心管之液面。	直尺，用於量測 1mL 微量移液管頭內之液體液面高度。

肆、研究過程或方法

一、文獻探討

流道開口的尺寸與液體之表面張力與附著力

(一) 查閱微流道與表面張力關係之文獻 [1-3]。純水的表面張力為 $\gamma = 0.072$ (N/m)，尿液的表面張力為 0.053-0.062 (N/m)。

(二) 在雙端開放式的毛細管中，管內的液體因為附著力而造成液面會比管外的液面高度高，這個現象主要是依據 Jurin' s law [1]:

$$\because F = 2\pi R\gamma\cos\theta = \pi R^2\rho gh \quad \therefore h = \frac{2\gamma\cos\theta}{\rho gR}$$

h: 內外液面高度差; γ : 表面力單位 (N/m); θ : 管內附著之液體表面與管壁的夾角; ρ : 液體密度 (g/cm^3); g : 9.81 (m/s^2); R: 毛細圓管之半徑。

(三) 在單端封閉式的毛細管中，液體由毛細管中流出的臨界直徑(D) 由 Young-Laplace equation 決定: $\Delta P_h = \Delta P_L$ (h: hydrostatic pressure; L: Laplace pressure) [3].

$$D = \sqrt{(3 + \cos\theta) \left[3 + \cos\theta + \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4} - \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{3 + \cos\theta}\right)^2}} \right] \frac{\gamma}{\rho g}}$$

二次純水的張力為 $\gamma = 0.072$ (N/m)， $\rho = 1000$ (kg/m³)，當單端封閉式毛細管的開口處內部液體介面與毛細管壁之夾角為 0° 時，如果開口的直徑大於 13.5 mm 時，單端封閉式毛細管的開口，以垂直於液面之速度 100 mm/min 脫離液面時，管內液面平整性會被破壞造成管內液體全部流出。夾角為 90° 時，開口的直徑理論值應小於 10.2 mm。

$$D = \sqrt{(3 + 1) \times \left[3 + 1 + \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4} - \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{3 + 1}\right)^2}} \right]} \times \frac{0.072}{1000 \times 9.81} = 0.0135 \text{ (m)}$$

(四) 文獻中的實驗中指出，當單端封閉式毛細管的管徑小於 9.7mm 時，毛細管脫離液面即不會造成管內液體流出。如果開口之切面具有角度時且管徑大於 6.4mm 時管內液面平整性會被破壞造成管內液體全部流出。考慮尿液的表面張力小於二次純水，而且表面張力閥是以傾倒方式移除上清液，因此，本研究以管徑開口為 5mm 作為研究條件設定。並以離心後之預設保留體積為 0.5 mL 為目標。

二、實驗設計與流程

(一) 液體種類與表面張力與毛細作用力之評估:

由於尿液的品管液價格高昂，且每人的尿液表面張力不同(人體產生的尿液表面張力值範圍為 0.053-0.062 N/m)，所以使用二次純水與清潔劑，用以配製模擬近似尿液表面張力值範圍之清潔劑水溶液，便於觀察不同表面張力的液體與毛細作用力的影響。

變因: 移液管尖端開口直徑與液體種類

1. 控制變因: 二次純水。操作變因: 移液管尖端開口直徑。

將 1mL 微量移液管頭上方開口處(0.8 cm)以膠帶固定在直尺上，以垂直方式，由上方開口處加入液體，觀察在下方開口直徑改變時，二次純水受毛細作用力與表面張力的作用下可以支撐的液體高度。

2. 控制變因: 移液管尖端開口直徑。操作變因: 不同濃度之清潔劑水溶液。

將 1mL 微量移液管頭上方開口處以膠帶固定在直尺上，以垂直方式，由上方開口處加入液體，觀察不同濃度之清潔劑水溶液，受毛細作用力與表面張力的作用下可以支撐的液體高度。

3. 控制變因: 二次純水。操作變因: 封閉移液管頭較大開口端，改變尖端開口直徑。

因為具表面張力閥的 50 mL 離心管在實際測試時，將以傾倒法移除離心管內的液體，所以必須模擬離心管呈現水平時，管內液體水平流動的狀態，並評估表面張力閥在水平狀態的效能。將 1mL 微量移液管頭之大開口端以石蠟片密封，並以美工刀橫切微量移液管尖端，調整開口直徑。先將 1mL 微量移液管以水平方式固定在多用途實驗鐵架，再以 5mL 注射針將二次純水填注滿於管內後，以裝滿二次純水之燒杯緩緩上升使充滿二次純水之微量移液管沉入。然後，再將燒杯緩緩下降，使微量移液管緩慢移出水面，觀察開口處之垂直液面是否受表面張力破壞而導致管內之二次純水流出。

(二) 表面張力閥的製作:

1. 量測 50 mL 尖底離心管的內徑並配合尖底管底部的構型。
2. 量測 0.5 mL 二次純水在 50 mL 尖底離心管的液面距離離心管尖底的高度。
3. 量測離心管尖底端之液面高度的水平直徑。
4. 以 thinkercad 軟體設定相關參數，利用 UP BOX plus 3D 印表機以 ABS 基材完成

表面張力閥的製作，並完成 6 個。

5. 以二次純水評估表面張力閥之體積以及對於殘留尿液之定量體積精確度。

(三) 真空吸引器與表面張力閥對於移除上清液而保留定量殘存尿液效能評估:

1. 真空吸引器方法:

- (1) 將 50mL 尖底離心管間底部卡住圓孔尺，並標定 0.5mL 的位置，共製作 3 支並標定序號。
- (2) 以標定的 50mL 尖底離心管裝滿已知細胞濃度之尿液檢查專用品管試劑。
- (3) 以離心機 500 x g 離心，時間為 5 分鐘。
- (4) 使用真空吸引器快速將標定位置以上的上清液移除。
- (5) 靜置 3 分鐘後，將殘存尿液與細胞沉渣混和形成細胞懸浮液，以 1mL 微量移液管量測體積並將細胞懸浮液移入標定對應序號之流式細胞儀專用檢體杯待測。

2. 表面張力閥方法:

- (1) 將表面張力閥塞入 50mL 尖底離心管底部，共準備 3 支並標定序號。
- (2) 以具表面張力閥且標定序號的 50mL 尖底離心管裝滿已知細胞濃度之尿液檢查專用品管試劑。
- (3) 以離心機 500 x g 離心 5 分鐘。
- (4) 水平傾倒 50mL 尖底離心管，移除上清液。

- (5) 靜置 3 分鐘後，將殘存尿液與細胞沉渣混和形成細胞懸浮液，以 1mL 微量移液管量測體積並將細胞懸浮液移入標定對應序號之流式細胞儀專用檢體杯待測。

(四) 真空吸引器與表面張力閥對於留存細胞回收率之影響性評:

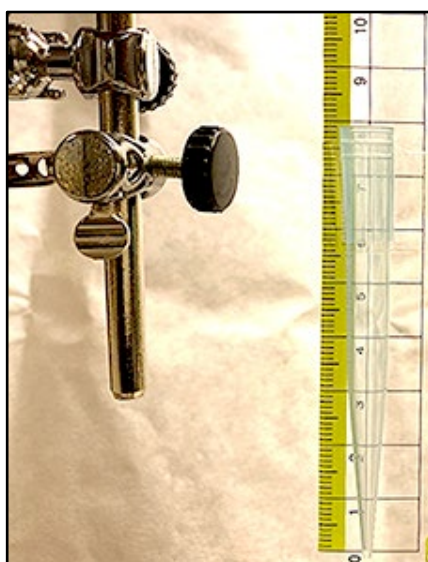
1. 以 1mL 微量移液管混合流式細胞儀專用檢體杯內的細胞懸浮液。
2. 混和均勻後，立即以流式細胞儀計數單位體積內的細胞數並記錄各類細胞的數量。

(五) 相關數據以 SigmaPlot 完成 paired-t test 之相關性評估。

伍、研究結果

一、液體種類與表面張力及毛細作用力之評估:

以 1mL 微量移液管頭用膠帶固定在直尺上，以垂直方式，由上方大開口處加入不同液體，觀察在固定下方開口尺寸時，不同液體受毛細作用力與表面張力的作用下可以支撐的液體高度。



圖五. 多用途實驗鐵架固定直尺與 1mL 微量移液管之組合。尖端開口向下，形成垂直擺置。

(一) 控制變因: 二次純水(表面張力 0.072N/m)。操作變因: 移液管尖端開口直徑。

表一. 1mL 微量移液管尖端開口直徑與二次純水於管內之高度。

	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)
	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6
	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)
第一次	2.2	1.7	0.4	0.1	N/A
第二次	2.3	1.6	0.4	0.1	N/A
第三次	2.3	1.8	0.5	0.1	N/A
第四次	2.2	1.7	0.4	0.1	N/A
第五次	2.2	1.8	0.5	0.1	N/A
平均值	2.24	1.72	0.44	0.1	N/A
標準差	0.05	0.07	0.05	0.00	N/A
變異係數(%)	2.19	4.35	11.13	0.00	N/A

開口直徑 \geq 0.4cm 即大幅減少管內液面高度，直徑為 0.5cm 時已達極限且定量效果最佳，而 0.6cm 時表面張力已不足以支撐水柱

(二) 控制變因: 10%清潔劑濃度(表面張力 0.029 N/m)。操作變因: 移液管尖端開口直徑。

表二. 1mL 微量移液管尖端開口直徑與 10%清潔劑濃度於管內之高度。

	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)
	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6
	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)
第一次	1.2	0.6	0.2	0.1	N/A
第二次	1.1	0.6	0.3	0.1	N/A
第三次	1.1	0.6	0.3	0.1	N/A
第四次	1.2	0.7	0.3	0.1	N/A
第五次	1.1	0.7	0.2	0.1	N/A
平均值	1.14	0.62	0.26	0.1	N/A
標準差	0.05	0.04	0.05	0.00	N/A
變異係數(%)	4.30	6.45	18.84	0.00	N/A

(三) 控制變因: 25%清潔劑濃度(0.029N/m)。操作變因: 移液管尖端開口直徑。

表三. 1mL 微量移液管尖端開口直徑與 25%清潔劑濃度於管內之高度。

	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)
	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6
	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)
第一次	1.1	0.6	0.3	0.1	N/A
第二次	1.2	0.5	0.2	0.1	N/A
第三次	1.1	0.5	0.3	0.1	N/A
第四次	1.1	0.6	0.2	0.1	N/A
第五次	1.1	0.5	0.2	0.1	N/A
平均值	1.12	0.54	0.24	0.1	N/A
標準差	0.04	0.05	0.05	0.00	N/A
變異係數(%)	3.57	9.07	20.41	0.00	N/A

(四) 控制變因: 50%清潔劑濃度(0.029N/m)。操作變因: 移液管尖端開口直徑。

表四. 1mL 微量移液管尖端開口直徑與 50%清潔劑濃度於管內之高度。

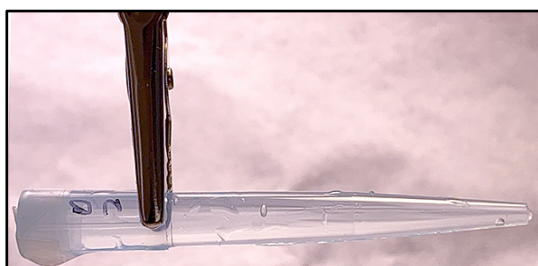
	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)
	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6
	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)	液面高度 (cm)
第一次	1.2	0.6	0.3	0.1	N/A
第二次	1.1	0.5	0.2	0.1	N/A
第三次	1.0	0.4	0.2	0.1	N/A
第四次	1.1	0.4	0.1	0.1	N/A
第五次	1.2	0.4	0.2	0.1	N/A
平均值	1.12	0.48	0.2	0.1	N/A
標準差	0.07	0.07	0.06	0.00	N/A
變異係數(%)	6.68	15.59	31.62	0.00	N/A

因為清潔劑濃度對於表面張力的變化為非線性關係，且變化急遽的區域非常狹小，而尿液的表面張力區間界於此範圍(估計濃度為 0.04% 的清潔劑水溶液之表面張力為 0.061 N/m)，導致不易精準配製近似尿液的表面張力區間的水溶液。以上實驗亦可看出此特性，故後續的實驗僅以二次純水執行。

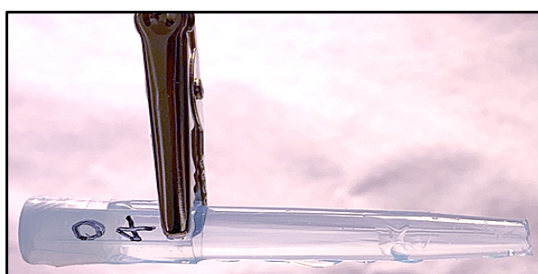
(五) 控制變因: 以石蠟片封閉移液管頭之開口，形成單端之尖端開口，並以水平方向擺置。操作變因: 移液管開尖端開口直徑。

表五. 單端開口之水平移液管尖端開口直徑與垂直液面之狀態。

	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)	開口直徑 (cm)
	0.2	0.4	0.5	0.6
	垂直液面狀態	垂直液面狀態	垂直液面狀態	垂直液面狀態
開口液面	微凸	平整	微凸	顯著凸出
測試結果圖示	圖六	圖七	圖八	圖九



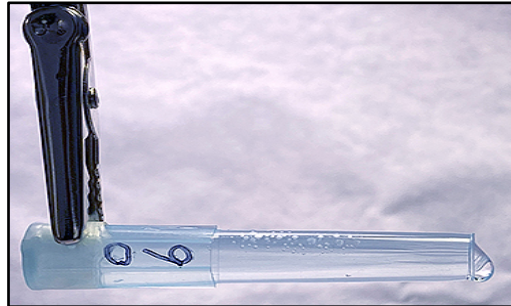
圖六. 移液管大開口以石蠟片密封，尖端開口為 0.2 cm，管內完全注滿二次純水後，水平離開燒杯，管內液體並未滴落造成管內流失，液面微凸。



圖七. 移液管大開口以石蠟片密封，尖端開口為 0.4 cm，管內完全注滿二次純水後，水平離開燒杯，管內液體並未滴落造成管內流失，液面平整。



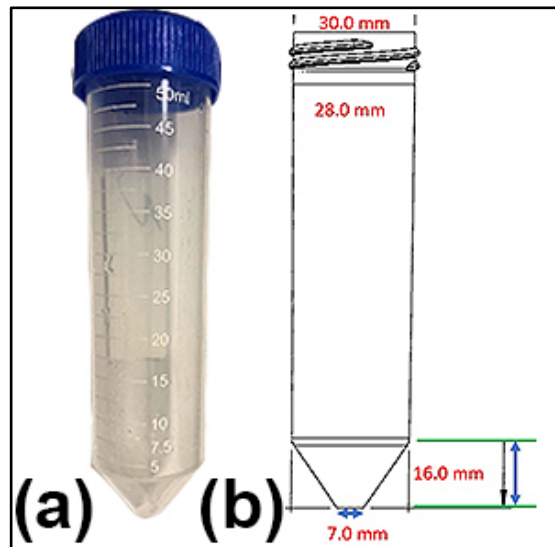
圖八. 移液管大開口以石蠟片密封，尖端開口為 0.5 cm，管內完全注滿二次純水後，水平離開燒杯，管內液體並未滴落造成管內流失，液面微凸。



圖九. 移液管大開口以石蠟片密封，尖端開口為 0.6 cm，管內完全注滿二次純水後，水平離開燒杯，管內液體已經外溢出開口，但並未滴落造成管內流失，液面顯著凸出。

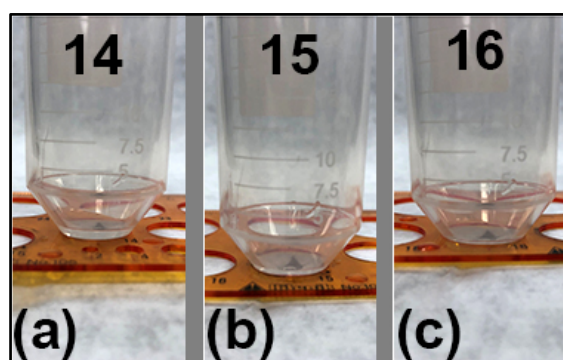
二、表面張力閥製作:

(一) 量測 50 mL 尖底離心管尺寸參數。



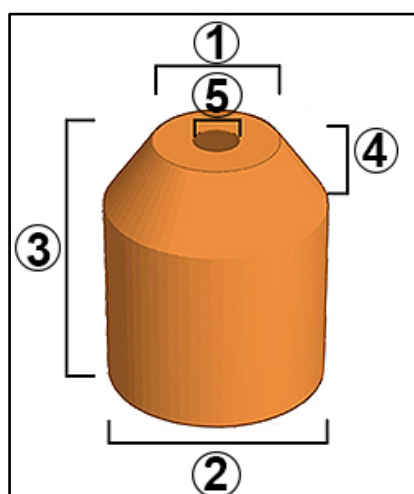
圖十. 50 mL 尖底離心管之外徑與內徑量測結果示意圖。離心管開口處，外徑為 30.0 mm，單側壁厚 1.0mm，估計離心管內側直徑為 28.0mm。底部尖端直徑為 7.0 mm，底部尖端至縮口處為 16.0 mm。

(二) 量測 0.5 mL 二次純水在 50 mL 尖底離心管之液面高度。



圖十一. 50 mL 尖底離心加入 0.5 mL 二次純水後以圓孔尺量測，確認液面高度的圓錐直徑為 16 mm，液面高度距離尖底為 6.0 mm。

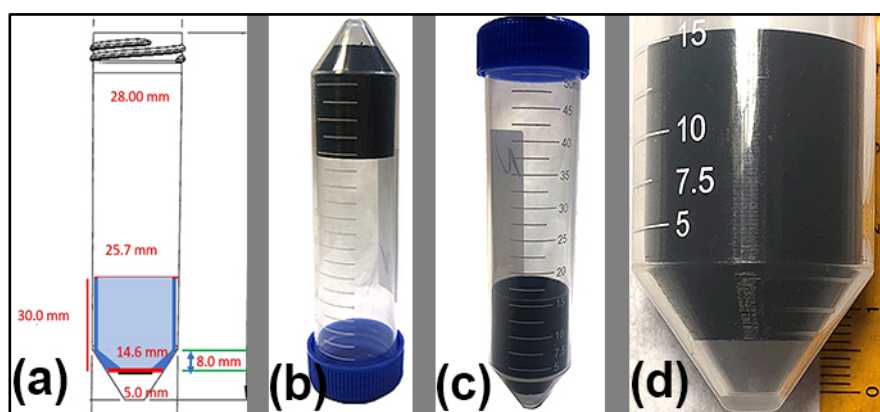
(三) Thinkercad 軟體是以幾何立體圖形進行組合，進而形成 3D 的列印圖樣，因此必須以(一)與(二)的量測結果進行測試列印，微調參數以完成表面張力閥之製作。



圖十二. 依據量測參數之表面張力閥 3D 列印圖樣示意圖。① 為頂部，將會與 50 mL 離心管之尖底圓錐狀貼合。② 為底部。③ 為表面張力閥之整體高度。④ 為圓錐狀縮口處之高度。⑤ 為頂部開口(可從上一實驗中得出，5.0mm 為最佳選擇，最穩定且最大，6.0mm 已失去閥門作用)。表面張力閥完成後，將由 ① 朝向 50 mL 離心管內推入與尖底圓錐貼合，頂部開口會成為尿液中的細胞於離心沉降時之通道而達到離心管的圓錐底部形成細胞沉渣。同時，在傾倒上清液時，頂部開口就會形成表面張力閥。

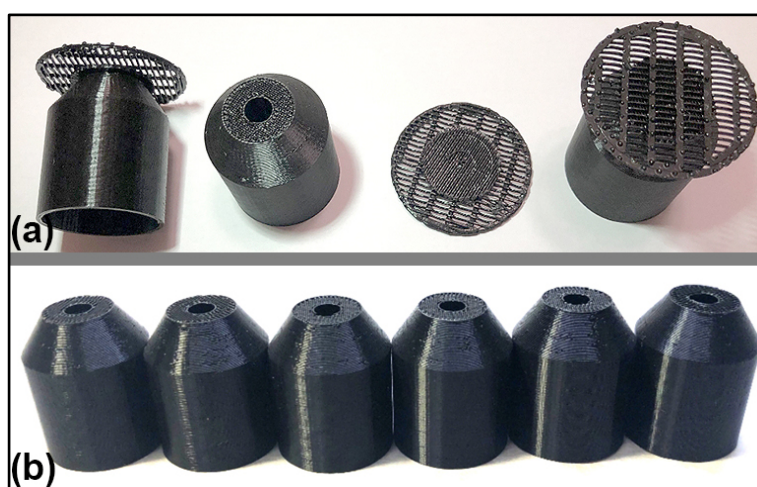
表六. 表面張力閥之五次測試列印參數與結果:

	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次
1 頂部直徑 (mm)	20.0	19.0	15.0	14.0	14.6
2 底部直徑 (mm)	24.0	24.0	25.0	25.5	25.7
3 整體高度 (mm)	33.0	35.0	30.0	30.0	30.0
4 縮口處高度 (mm)	3.0	4.0	8.0	8.0	8.0
5 頂部開口直徑 (mm)	20.0	12.0	5.0	5.0	5.0
表面張力閥壁厚度 (mm)	1.0	6.0	1.0	1.0	1.0
測試結果 底部	無法固定	無法固定	無法固定	滑動	完全貼合
測試結果 頂部	無法貼合	完全貼合	完全貼合	完全貼合	完全貼合
離心後	未崩解	未崩解	未崩解	未崩解	未崩解



圖十三. 巨觀下，表面張力閥完全貼合斜面，表面張力閥可固定於離心管底部，不滑動。縮口處至底部為 6.0 mm。符合原始設計。

(四) 3D 印表機完成表面張力閥。



圖十四. 完成 6 個相同規格之表面張力閥。(a)為表面張力閥完成列印後之側面與俯視圖，以及拆除基材後之俯視圖。(b) 6 個表面張力閥的側視圖。

- (五) 將表面張力閥置入 50 mL 尖底離心管如圖十三，再加入 50 mL 二次純水，以 1mL 微量移液管移除超過 50 mL 刻度之二次純水至另一個 50 mL 尖底離心管，再以 1mL 微量移液管量測超過的二次純水體積為 2.2 mL，亦即表面張力閥的體積為 2.2 mL。
- (六) 加入 0.5 mL 二次純水於 50 mL 尖底離心管，並以圓孔直尺與美工刀標記液面高度定。再加入二次純水至離心管的刻度為 50 mL 後以真空吸引器移除 0.5 mL 標記以上之二次水，重複三次。
- (七) 將表面張力閥置入 50 mL 尖底離心管底部，再加入 50 mL 的二次純水至離心管中，並以 $500 \times g$ ，離心 5 分鐘。然後以傾倒方式移除表面張力閥上方的二次純水，量測殘留之液體定量體積。重複三次。

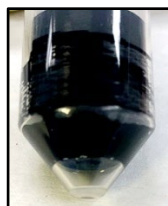
結果:

表七. 真空吸引器法與表面張力閥法之二次純水體積定量結果:

	真空吸引器法	表面張力閥法
第一次體積(μL)	610.0	450.0
第二次體積(μL)	560.0	460.0
第三次體積(μL)	600.0	480.0
平均值	590.0	463.3
標準差	26.5	15.3
變異係數(%)	4.5	3.3

真空吸引器法的體積定量結果皆較大，表面張力閥法的體積定量結果皆較小，但是表面張力閥法的定量結果變異係數較小。

表面張力閥法的定量體積比預計量平均少了 7.3% ($[500.0 - 463.3] \div 500 \times 100\% = 7.3\%$)。可能的原因為表面張力之因素，造成二次純水殘留於縮口處與管壁形成新的表面張力區間，導致縮口處與管壁間形成向下弧形之圓盤狀殘留(如圖十五)，使得測量數據結果偏小。



圖十五. 表面張力閥縮口處與管壁形成新的表面張力區間，造成縮口處與管壁間形成向下弧形之圓盤狀二次純水殘留。

三、真空吸引器與表面張力閥對於移除上清液後保存定量尿液體積效能評估:

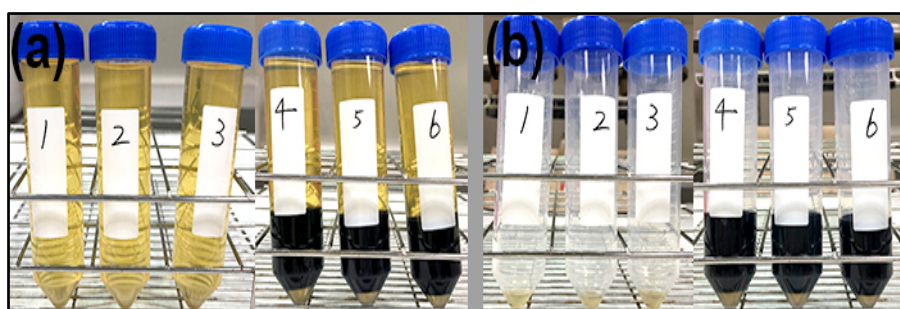
- (一) 尿液檢查專用品管試劑依產品說明書完成泡製後，全部倒入燒杯混和均勻，取出 2 mL 品管試劑倒入流式細胞儀專用檢體杯，進行細胞計數，分別為紅血球(RBC)、白血球(WBC)與上皮細胞(EPI)。

結果:

表八、尿液檢查專用品管液細胞計數標準濃度

Number / μ L	RBC	WBC	EPI
原品管液細胞標準濃度	211.0	34.3	5.6

- (二) 以圓孔尺標定 0.5 mL 於 50mL 尖底離心管的高度，共標定 3 支(管 1、管 2 與管 3)。同時將 3 個表面張力閥置入 50mL 尖底離心管(管 4、管 5 與管 6)。分別將 50 mL 尿液檢查專用品管液倒入 3 個無表面張力閥之 50 mL 尖底離心管與 3 個內含表面張力閥之 50 mL 尖底離心管，以 $500 \times g$ ，離心 5 分鐘。然後分別以真空吸引器移除管 1、管 2 與管 3 的上清液，再以傾倒方式移除含表面張力閥之管 4、管 5 與管 6 的上清液，並靜置 3 分鐘。



圖十六. (a)離心前。(b)離心及去除上清液後。

- (三) 以 1mL 微量移液管量混和管 1、管 2 與管 3 的管內殘存液並量測殘存體積。再以 1mL 微量移液管量混和管 4、管 5 與管 6 的管內殘存液並量測殘存體積。

表九、真空吸引器法與表面張力閥法移除尿液上清液後的殘存液體體積

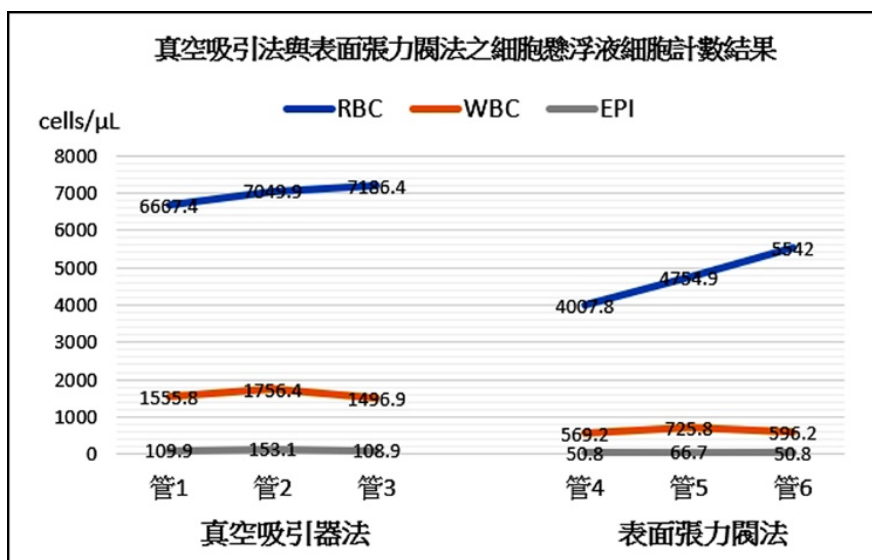
真空吸引器法	體積(μ L)	表面張力閥法	體積(μ L)
管 1	560.0	管 4	750.0
管 2	440.0	管 5	830.0
管 3	620.0	管 6	790.0
平均值	540.0	平均值	790.0
標準差	91.7	標準差	40.0
變異係數(%)	17.0	變異係數(%)	5.1

真空吸引器法的體積定量結果近似目標值，表面張力閥法的體積定量結果皆較大。可能的原因為尿液的表面張力較小，容易造成傾倒上清液時殘留在表面張力閥表面，當離心管回正時，殘留在表面張力閥壁面的尿液會滑落底部，造成殘留量的非預期性增加。

(四) 將每一管之細胞懸浮液，以 1mL 微量移液管量混和均勻後再分別移置於流式細胞儀專用檢體杯，進行細胞計數。

表十、真空吸引法與表面張力閥法之細胞懸浮液細胞計數結果:

Number / μ L	真空吸引器法			Number / μ L	表面張力閥法		
	RBC	WBC	EPI		RBC	WBC	EPI
管 1	6667.4	1555.8	109.9	管 4	4007.8	569.2	50.8
管 2	7049.9	1756.4	153.1	管 5	4754.9	725.8	66.7
管 3	7186.4	1496.9	108.9	管 6	5542	596.2	50.8
平均值	6964.9	1603.0	124.0	平均值	4768.2	630.4	56.1
標準差	267.7	136.0	25.2	標準差	767.2	83.7	9.2
變異係數(%)	3.8	8.5	20.3	變異係數(%)	16.1	13.3	16.4



圖十七. 真空吸引法與表面張力閾法之細胞懸浮液細胞計數結果統計圖。RBC 數量最高，WBC 數量其次，EPI 最低。

(五) 真空吸引法與與表面張力閾法對於殘存液之細胞回收率的影響性評估:

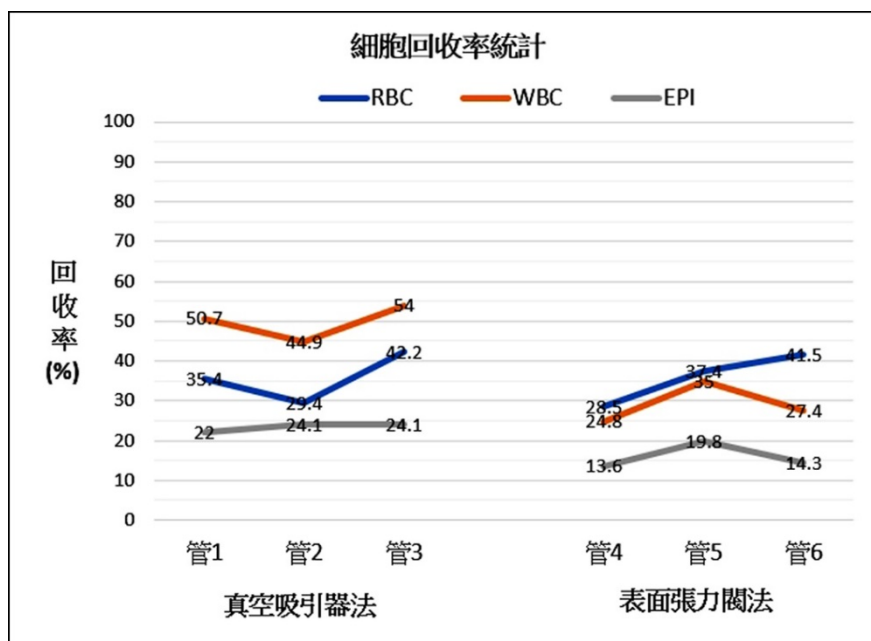
回收率計算公式:

$$\text{管 N (不同種類細胞數} \times \text{殘存液體積量)} \div \text{原品管液(不同種類細胞數} \times 1000 \times 50) \times 100\% = X\% \text{ (細胞回收率百分比)}$$

N: 離心管編號， X: 結果。

表十一、細胞回收率統計結果:

	真空吸引器法細胞回收率(%)				表面張力閾法細胞回收率(%)		
	RBC	WBC	EPI		RBC	WBC	EPI
管 1	35.4	50.7	22.0	管 4	28.5	24.8	13.6
管 2	29.4	44.9	24.1	管 5	37.4	35.0	19.8
管 3	42.2	54.0	24.1	管 6	41.5	27.4	14.3
平均值	35.7	49.8	23.4	平均值	35.8	29.1	15.9
標準差	6.4	4.6	1.2	標準差	6.7	5.3	3.4
變異係數	18.0	9.2	5.2	變異係數	18.6	18.2	21.2



圖十八. 細胞回收率統計圖。真空吸引器法的 RBC 的回收率區間為 29.4% - 42.2%，WBC 的回收率區間為 44.9% - 54.0%。EPI 的回收率區間為 22.0% - 24.1%。表面張力閥法的 RBC 的回收率區間為 28.5% - 41.5%，WBC 的回收率區間為 24.8% - 35.0%。EPI 的回收率區間為 13.6% - 19.8%。

四、相關數據 Paired-t test 相關性分析:

(一) 表面張力閥於二次純水與尿液品管液之液體體積定量差異:

二次純水的體積為 $463.3 \pm 15.3 (\mu\text{L})$ ，尿液品管液的體積為 $790.0 \pm 40.0 (\mu\text{L})$ ，paired-t test 檢定， $p = 0.004 (p < 0.05)$ ，達統計上的差異。表示表面張力閥在二次純水與尿液品管液之液體體積定量的有顯著差異。

(二) 真空吸引法與表面張力閥法對於殘存尿液的液體體積定量差異性:

真空吸引法的體積為 $540.0 \pm 91.7 (\mu\text{L})$ ，表面張力閥法的體積為 $790.0 \pm 40.0 (\mu\text{L})$ ，paired-t test 檢定， $p = 0.071 (p > 0.05)$ ，未達統計上的差異。表示真空吸引法與表面張力閥法對於殘存尿液的液體體積定量沒有顯著差異。

(三) 真空吸引法與表面張力閥法對於 RBC 回收率的影響性:

真空吸引法的回收率(%)為 35.7 ± 6.4 ，表面張力閥法的回收率(%)為 35.8 ± 6.7 ，paired-t test 檢定， $p = 0.978$ ($p > 0.05$)，未達統計上的差異。表示真空吸引法與表面張力閥法對於 RBC 回收率沒有顯著差異。

(四) 真空吸引法與表面張力閥法對於 WBC 回收率的影響性:

真空吸引法的回收率(%)為 49.8 ± 4.6 ，表面張力閥法的回收率(%)為 29.1 ± 5.3 ，paired-t test 檢定， $p = 0.062$ ($p > 0.05$)，未達統計上的差異。表示真空吸引法與表面張力閥法對於 WBC 回收率沒有顯著差異。

(五) 真空吸引法與表面張力閥法對於 EPI 回收率的影響性:

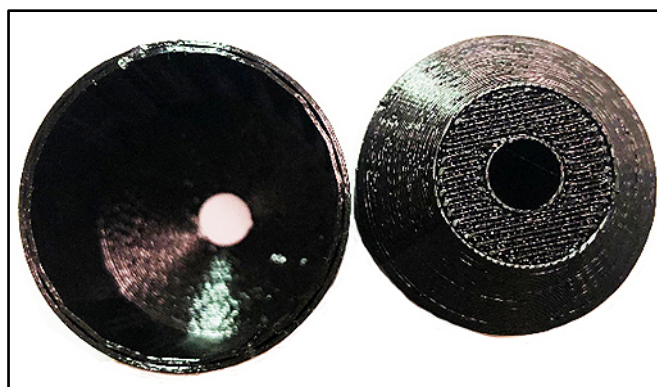
真空吸引法的回收率為 23.4 ± 12.2 ，表面張力閥法的回收率為 15.9 ± 3.4 ，paired-t test 檢定， $p = 0.045$ ($p < 0.05$)，達統計上的差異。表示真空吸引法與表面張力閥法對於 EPI 回收率有顯著差異。

陸、討論

- 一、本研究探討液體表面張力在表面張力閥上的測試達到預期成果。在二次純水的測試中，1mL 微量移液管尖端開口於 0.6 cm 時，垂直狀態下幾乎無法保留管內液面。以美工刀切割 1mL 微量移液管造成橫切面形成非平整狀態，在尖端開口為 0.6 cm 在水平狀態即有液體顯著外溢的現象，符合文獻的研究傾向。因此，表面張力閥之開口設定為 0.5 cm 是正確的選擇。
- 二、液體本身的表面張力特性會顯著影響表面張力閥的表現。純水的表面張力較大，比較不會殘留在不光滑的表面張力閥壁上；相對的，品管尿液的表面張力較小，所以容易殘留在不光滑的表面張力閥壁上，導致體積定量功能在品管尿液會出現系統性的正偏差。

三、針對變異係數評估，表面張力閥法對於殘留液體的定量功能，於二次純水為 3.3%，於品管尿液為 5.1%，都優於真空吸引法的 4.5%(二次純水)或 17.0%(品管尿液)。實務操作過程中，並不可能為每一支離心管標定預定殘留液之液面高度，所以真空吸引法的實務操作中可能會出現更大的變異係數，甚至可能會造成上皮細胞回收率下降的可能性(因為真空吸引開口太接近細胞沉積面)。

四、表面張力閥法對於所有細胞種類的細胞回收率在本研究中並不如預期的提高，最有可能的原因有二個: (a) 不光滑的表面張力閥可能造成細胞於離心沉降中破損。(b) 表面張力閥縮口平面為複雜的列印圖案，造成沉渣細胞於混和時陷入凹凸不平的表面，如圖十九所示。



圖十九. 表面張力閥之表面與內面之俯視圖。因為 3D 印表機的精密度關係，造成表面張力閥的內外表層有 ABS 基材列印的痕跡，而且縮口平面的列印痕跡非常顯著，造成許多的空腔，會導致液體與細胞的殘留。

五、EPI 細胞的回收率，在真空吸引器法與表面張力閥法中，都比 RBC 與 WBC 低。真空吸引器法的 3 種細胞(RBC、WBC 與 EPI)的回收率變異係數分別為 18.0%，9.2%，5.2%。表面張力閥法的 3 種細胞(RBC、WBC 與 EPI)的回收率變異係數分別為 18.6%，18.2%，21.2%。這樣的結果可能是真空吸引器法對於細胞沉渣的細胞分層擾動較為顯著(變異係數分布於 5.2%-18.0%)，也就是說，RBC 在表層、WBC 居中，而 EPI 在底部。因此，吸引法的液體

流動所造成的衝擊力作用在表層細胞的擾動最為嚴重。表面張力閥法的回收率變異係數變動較小(變異係數分布於 18.2%-21.2%)，表示傾倒所造成的液面擾動為系統性。因此，改善表面張力閥以上之液體殘留的干擾，應可有效降低回收率變異係數，提昇穩定性。

柒、結論

一、表面張力閥法對於尿液殘留量的定量功能達到預期目標。

二、未來展望:

(一) 由於實驗中產生的各數據，推測其產生系統性增加或減少之原因可能是表面張力閥的壁面不平整造成的，若改以工業射出成型方式或提高 3D 列印精度製作表面張力閥，應可能有效改善表面張力閥壁面的平整度，進而改善細胞回收率不如預期的狀況，同時可減少尿液殘留在表面張力閥壁面，進一步提昇殘留定量體積的準確性。

(二) 由於尿液的品管液價格高昂，在經費有限的情況下，可操作的實驗次數有限，期望未來能在真空吸引法與表面張力閥法對於細胞回收率的影響性中，增加更多的實驗數據，做出更完整的評估，以期本研究的成果可以正式應用於臨床醫學的尿液癌細胞檢查流程，減少人工操作所產生的變異，並提高癌細胞檢出率。

捌、參考資料及其他:

1. Berthier, J., *Micro-Drops and Digital Microfluidics* 2012: Elsevier Science.
2. Wang, A.-B., et al., A novel lab-on-a-chip design by sequential capillary – gravitational valves for urinary creatinine detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016. 222: p. 721-727.
3. Extrand, C., Spontaneous Draining of Liquids from Vertically Oriented Tubes. *Langmuir*, 2017. 33(45): p. 12903-12907.

【評語】 051810

本實驗作品主要探討如何處理以離心機處理後之尿液沈積細胞萃取時避免表面張力影響問題，研究題目相當創新，特別是利用 3D 印表機印製特殊構型之表面張力閥應用於尿液癌細胞病理檢驗操作程序，也很有創意，雖然結果不如預期，但也找到問題的癥結。如能再對材料選擇多下點功夫，應會有更好的結果，那麼就有應用的可能了。

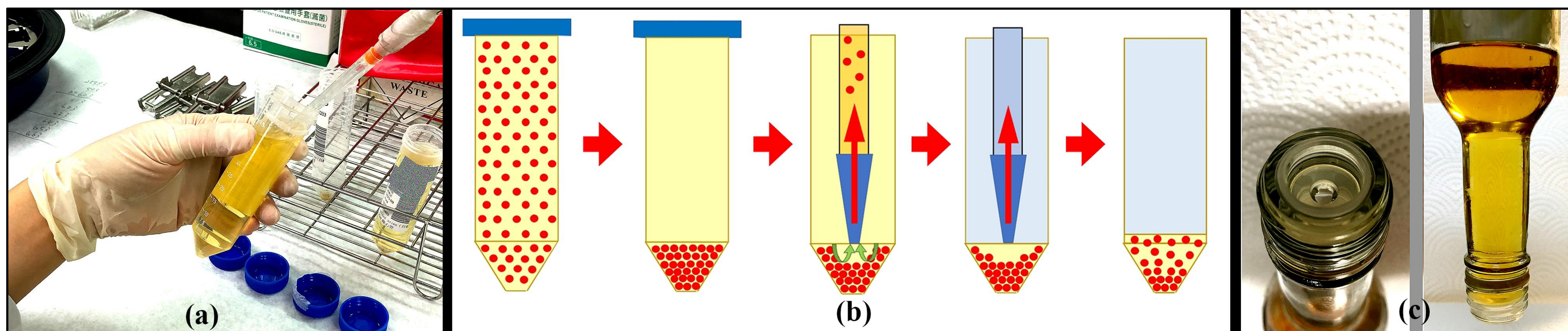
摘要

本實驗利用3D印表機印製特殊構型之**表面張力閥**，將其應用於**尿液癌細胞病理檢驗**操作程序，用以比較此表面張力閥之傾倒法與現行的真空吸引法在移除尿液的上清液後，它們對於剩餘尿沉渣**定量體積的變異性**，以及尿沉渣內的血球與上皮細胞回收率。經由實驗結果，在尿沉渣**定量體積的檢測上**，**表面張力閥傾倒法較現行真空吸引法來得穩定**，在血球細胞回收率的表現上，兩者並無顯著差異，但在上皮細胞回收率的表現上，表面張力閥傾倒法卻比現行真空吸引法稍差。推測表面張力閥法是因為3D印表機所印製的表面張力閥為粗糙表面，導致細胞回收率不如預期。

研究動機

我們參訪醫院檢查室，觀察到**尿液癌細胞檢驗的流程**，醫檢師會使用離心機沉澱尿液中的細胞至尿液離心管的底部，再以真空幫浦吸引機一支一支地移除上清液(離心後，於管底細胞沉渣上方的澄清液體，如圖一(a))，最後將留下的濃縮尿液細胞，進行細胞抹片的製作。但是我們察覺到操作過程中，每一支檢體移除上清液時，**真空幫浦吸力對於底部尿液細胞沉積面的擾動程度不一**，如圖一(b)。此外，附著於管壁的尿液靜置一小段時間後，會因重力關係再流至管底，造成離心管底部的細胞沉積面因液體流動而破壞，同時造成每一個檢體之尿管的**濃縮體積增加且濃縮比例差異性大**，如圖一(b)。這些變異因素，有可能**影響檢驗的品質程度**。

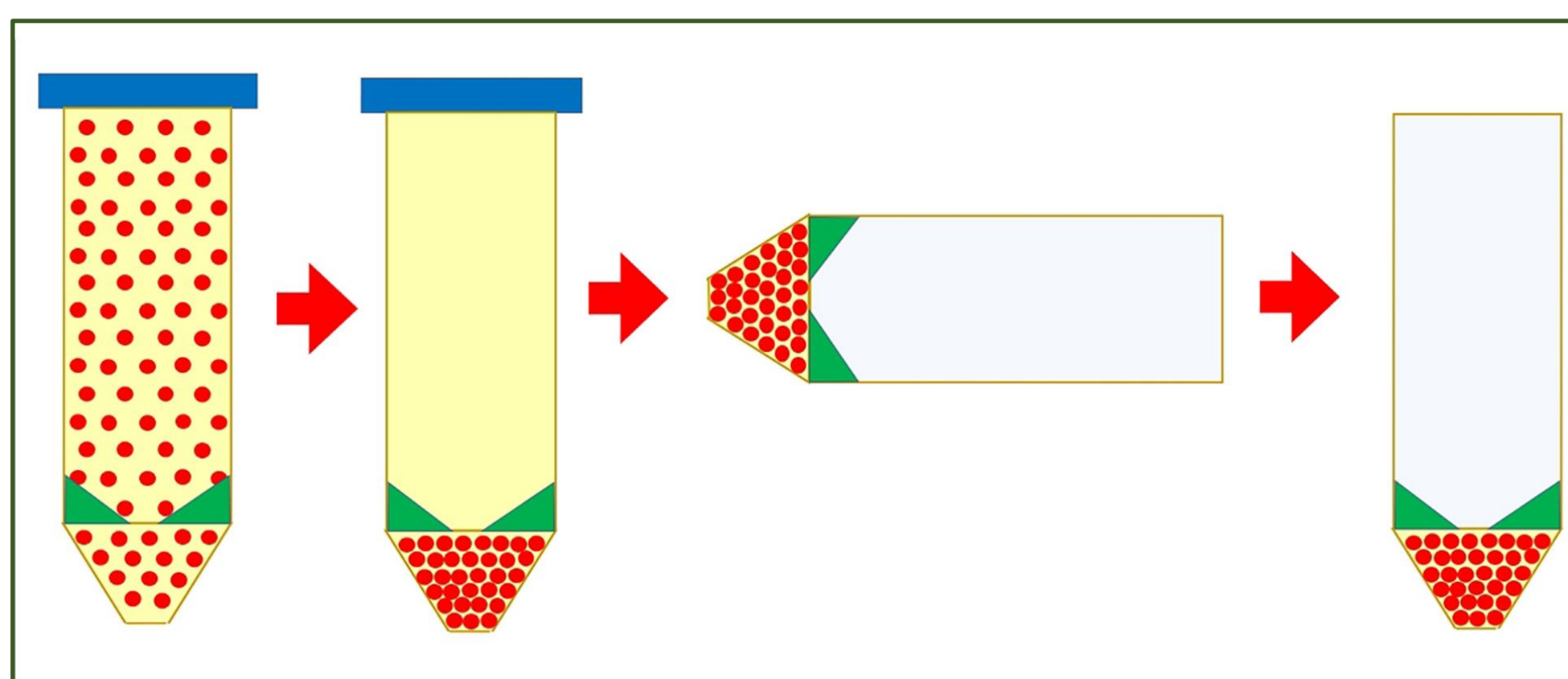
我們觀察到日常生活中用到的調味瓶，常常會因為體積量較少而不易滴出，若體積只剩下殘存於瓶底之量時，調味料會於開口處殘留而不滴出(圖一，c)，同時造成瓶身回正後，殘存的調味料會再滑落瓶底；眼藥水的瓶身與瓶口也有此特別的現象。這些現象都是因為液體分子的**表面張力(surface tension)**特性所造成。液體分子之間有**內聚力(cohesive force)**，同時液體分子對於固體表面又具有**附著力(adhesive force)**的特性，造成液體於流道開口處產生附著現象。附著力的特性在毛細管的表現非常顯著而易於觀察，可顯見毛細管內的液體之液面高於管外之液面。當**定量液體的附著力大於定量液體的重量**時，就會導致液體殘留於流道而不滴落。



圖一，研究動機。(a)現行尿液癌細胞檢驗的流程。(b)真空幫浦吸力造成細胞沉積面擾動，靜置後，管壁上殘液因重力作用而流回離心管底部，造成濃縮比例變動。(c)調味瓶開口形成表面張力閥造成液體殘留瓶內而不流出。

研究目的

- 經由不同流道開口孔徑的實驗，探討不同液體在流道孔徑的附著力，並求得3D印表機印製**表面張力閥的理想孔徑**。
- 將表面張力閥置入離心管中，使用傾倒法移除離心管上清液而保留定量殘留，避免管壁殘存液體向下流動而改變濃縮比例變異，同時**減少擾動細胞沉積面，進而改善檢驗的流程**。
- 探討**表面張力閥法**與真空吸引法對於**定量尿液體積能力**及**尿沉渣細胞之回收率**的影響。



圖二，研究目的。改善尿液癌細胞檢驗的流程，減少細胞沉積面的擾動與濃縮比例變動的示意圖。

研究設備與器材

試劑	 二次純水	 洗碗精	 尿液檢查專用品管試劑				
耗材	 列印基材 (ABS)	 1.5 mL 微量離心管	 1 mL 藍色微量移液管頭	 50 mL 尖底離心管	 石蠟片	 3 mL 吸管	 尿液分析檢體杯
設備	 流式細胞儀	 桌上型離心機	 真空吸引機	 3D印表機	 多用途實驗鐵架	 微量移液管	
	 2000 mL 燒杯	 100 mL 量杯	 表面張力計	 5 mL 注射針	 圓孔直尺	 直尺	

研究過程與方法

(一) 文獻探討

流道開口的尺寸與液體的表面張力與附著力 [1-3]。

- 流道與表面張力關係：純水的表面張力為 $\gamma = 0.072$ (N/m)，密度為 $\rho = 1000$ (kg/m³)。尿液的表面張力為0.053 – 0.062 (N/m)。
- 單端封閉式的毛細管中，且管子在極慢速移動的情形下(10mm/min)，液體由毛細管中流出的臨界直徑(D) 由Young-Laplace equation決定：
 $\Delta P_h = \Delta P_L$ (h: hydrostatic pressure; L: Laplace pressure)。

$$D = \sqrt{(3 + \cos\theta) \left[3 + \cos\theta + \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{4} - \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{3 + \cos\theta}\right)^2}} \right] \frac{\gamma}{\rho g}}$$

γ : 表面力單位 (N/m)。
 θ : 管內附著之液體表面與管壁的夾角。
 ρ : 液體密度 (g/cm³)。
 g : 9.81 (m/s²)。

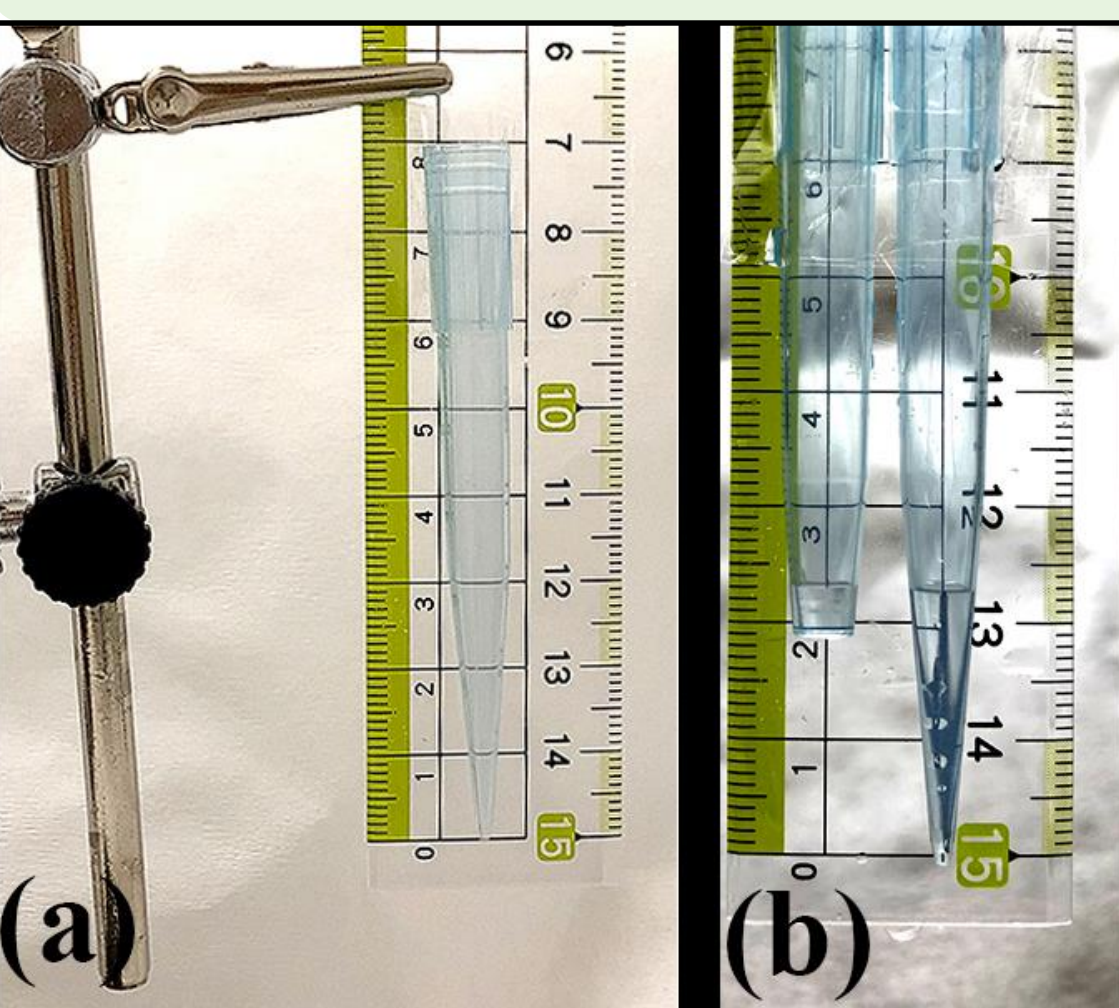
當內部液體為二次純水時，臨界直徑介於10.6mm-13.6mm之間，而當其為尿液時，臨界直徑介於9.1-12.6mm之間。

- 當毛細管以超過10mm/min的速率移動時，在液體為二次純水的情形下，毛細管開口直徑必須小於6.4mm，否則將因管內液面平整性被破壞造成管內液體全部流出。

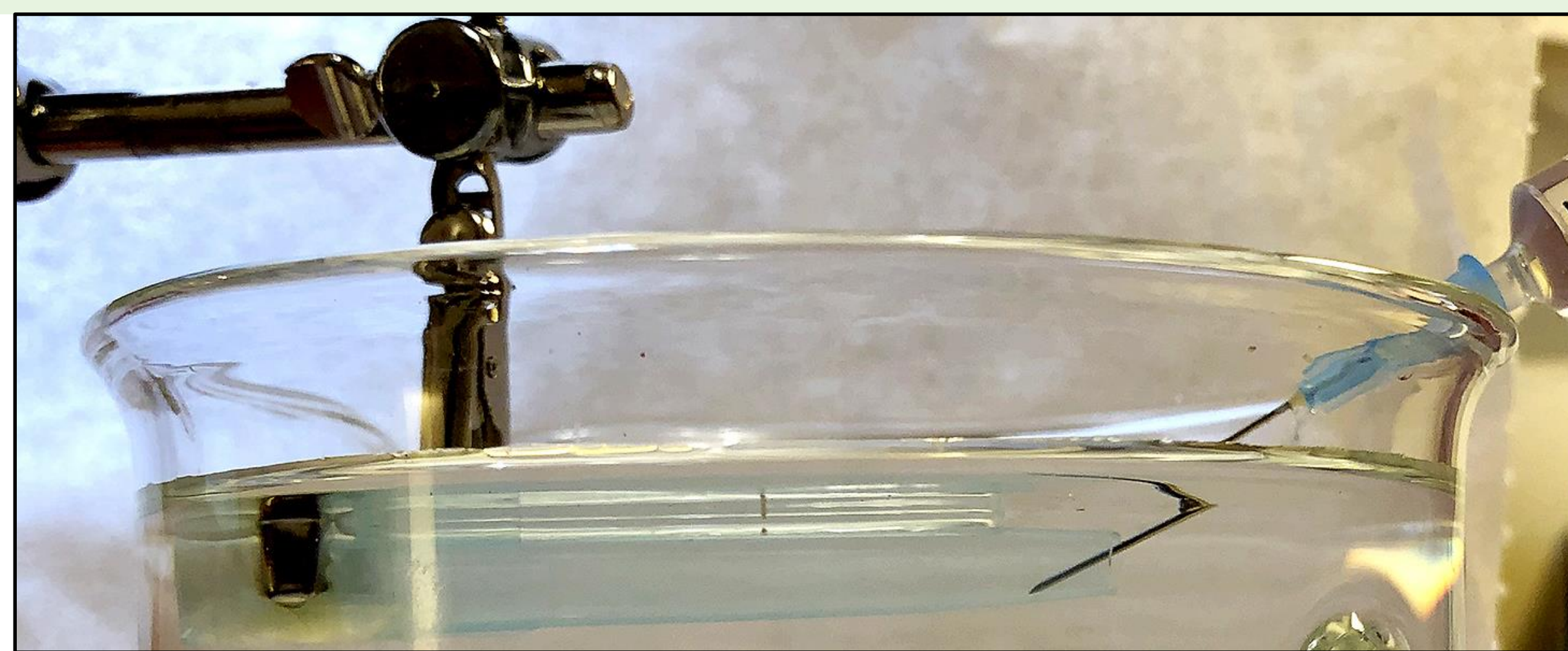
(二) 實驗設計

表面張力閥傾倒法是以傾倒方式來移除離心後的尿液上清液，而傾倒上清液的過程中，流動的上清液會引動表面張力閥開口處之液體，導致破壞垂直液面的平整性。此外，尿液的表面張力較二次純水小且醫檢師必須以管徑開口直徑大約為0.3 cm的吸管來吸取表面張力閥下的殘存濃縮尿沉渣細胞，因此，本研究以管徑開口直徑為0.5 cm且保留殘存體積目標為0.5 mL(離心濃縮倍數為100倍)作為研究條件設定，製作表面張力閥。

1. 液體種類與表面張力及毛細作用力之評估

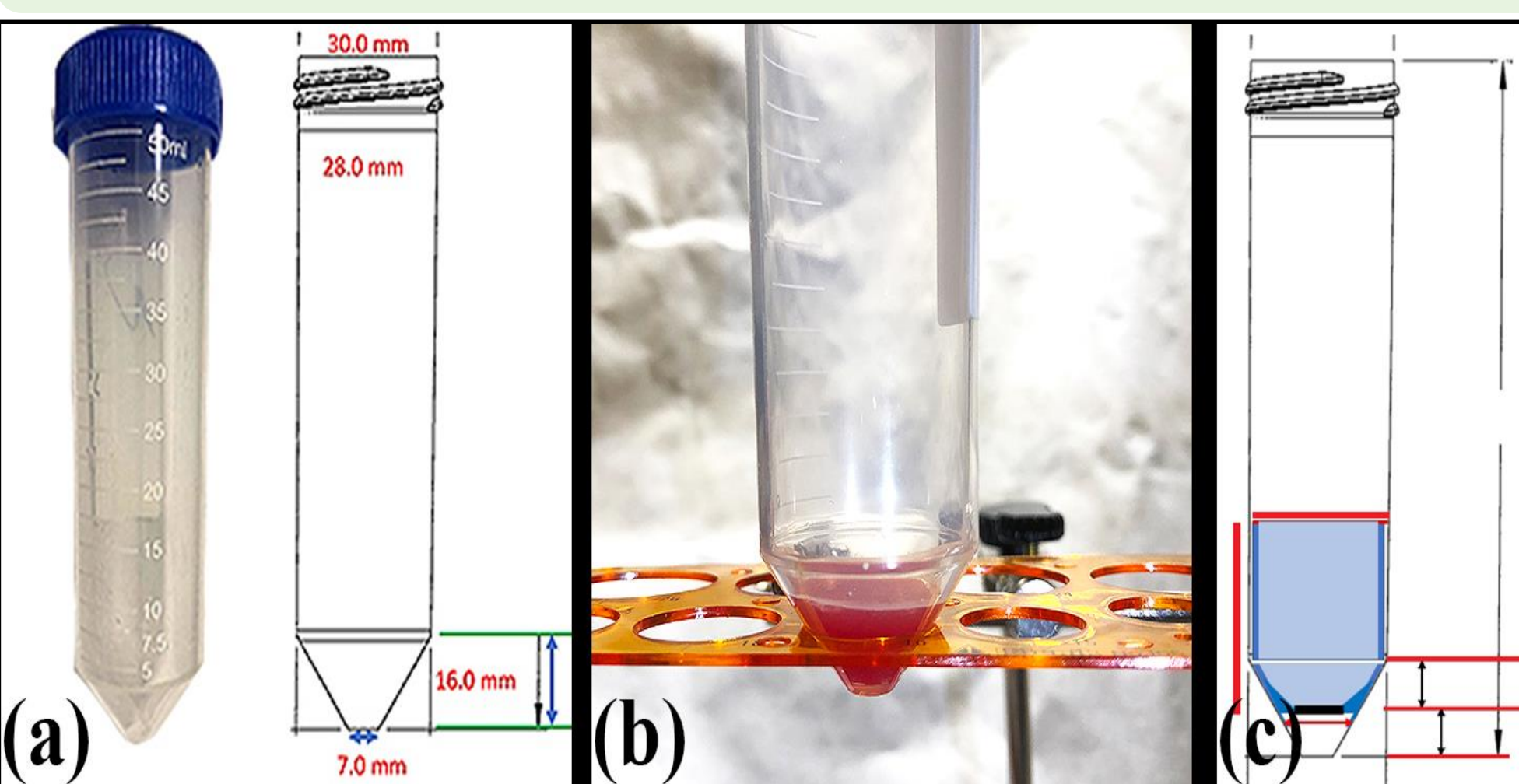


圖三，液體種類與表面張力量測示意圖。
(a)以多用途實驗鐵架將直尺固定，且將不同口徑之移液管頭，輪流以膠帶固定在直尺底部。開口口徑大小有5種(直徑為0.1/0.2/0.4/0.5/0.6 cm)，每一種口徑，皆以4種不同的溶液(二次純水/10%、25%與50%之清潔劑水溶液)，加入移液管頭中，量測其可保留的液體高度，重複5次，紀錄每一次的液面高度，以進行不同液體與表面張力及毛細作用力之評估。
(b)為二次純水的量測示意圖。右側移液管的開口直徑為0.1 cm。左側移液管的開口直徑為0.4 cm，管內的純水高度即為待測值。



圖四，以二次純水模擬具表面張力閥之離心管傾倒上清液時之現象。微量移液管之原始大開口端以石蠟片封閉並沉入裝有二次純水之燒杯中，並以5mL針筒將二次純水注滿管中。移除針尖與針筒，將燒杯垂直向下移除，模擬離心管傾倒上清液時的液體往下方流動。此時，如果表面張力的張力無法抵抗液體的流動力量，容易造成表面張力閥之垂直液面平整性被破壞而導致管內液體流出。各種條件檢測5次。

2. 表面張力閥的尺寸量測與3D列印製作

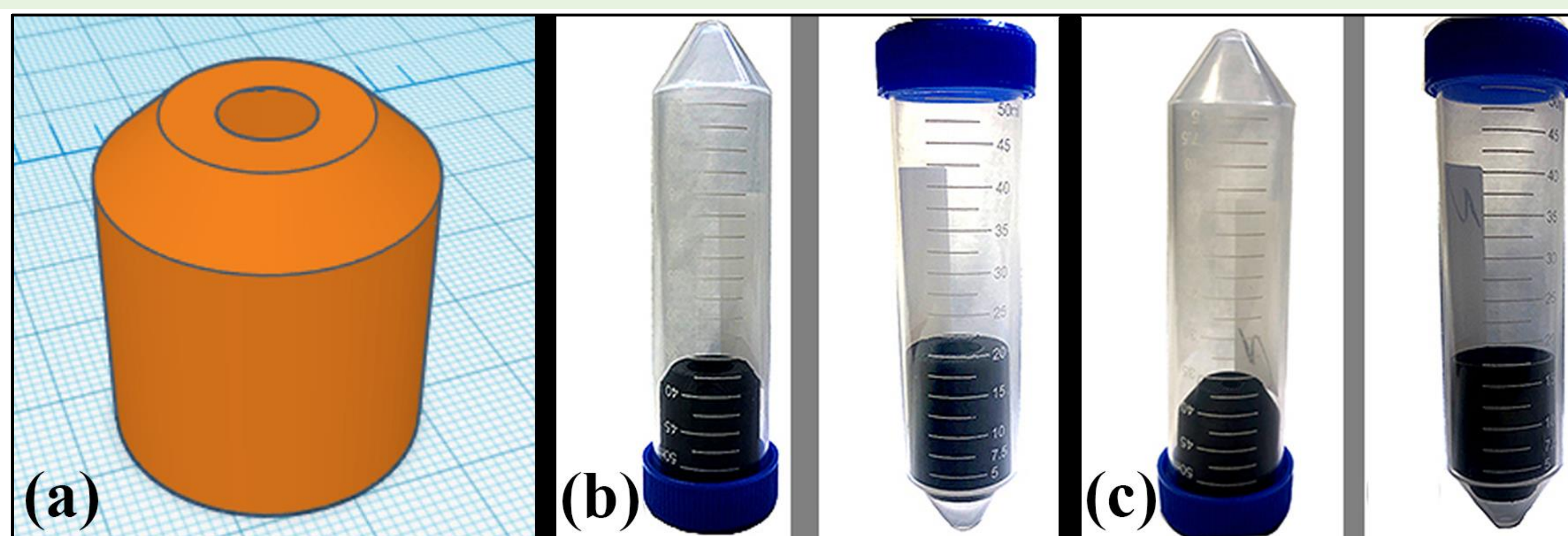


(圖五，50mL 離心管尺寸量測與表面張力閥設計示意圖。)

(a)左，50mL 離心管；右，基本尺寸。

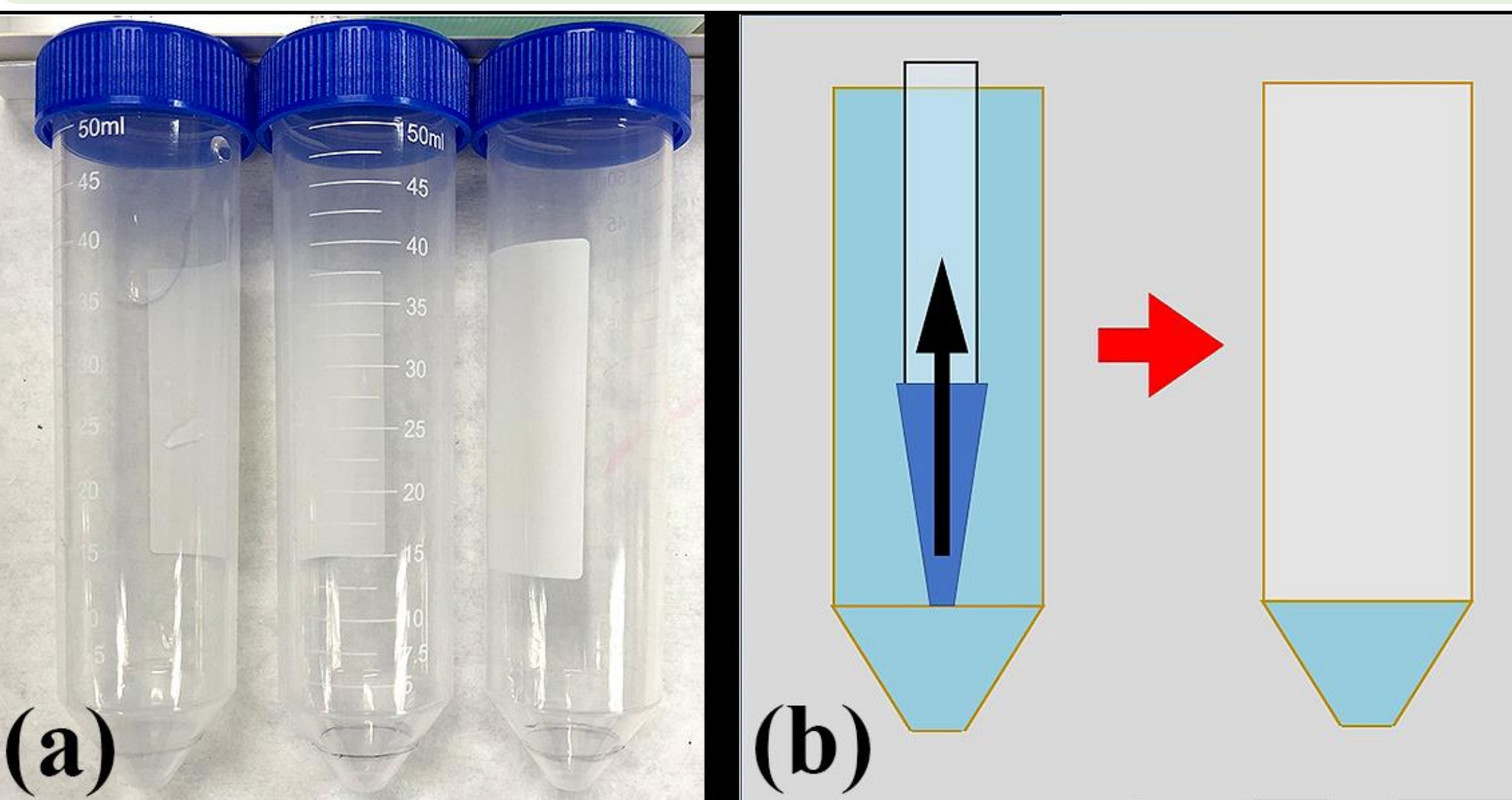
(b)將0.5 mL 液體加入離心管，再以圖孔尺標定液面及量測液面高度，作為表面張力閥之相關尺寸參數。管內以紅色液體做為量測時示意圖。

(c)表面張力閥於50mL 離心管內必須量測或設計之相關尺寸參數。



圖六，表面張力閥3D列印之軟體圖示與列印成品示意圖。(a)3D印表機之操作軟體Thinkercad工作畫面，將圖五中所完成的離心管尺寸量測與表面張力閥設計參數輸入，即可獲得圖(a)的3D立體圖示。(b)依據參數的設定，3D印表機完成表面張力閥3D印製。印製完成後，將實體置入50mL離心管中檢測設計。圖(b)左側顯示表面張力閥直徑過小，無法固定於離心管底部而墜落；圖(b)右，表面張力閥之底部無法與離心管底部貼合，因此必須修正參數再次列印。(c)依據圖(b)中之程序，修正設計參數後印製新版表面張力閥，再次進行圖(b)中程序確認設計是否符合需求，如果不符合設計需求，則必須反覆圖(b)與圖(c)之過程以達成需求。

3. 真空吸引器與表面張力閥對於移除上清液後保留定量殘存尿液的效能評估

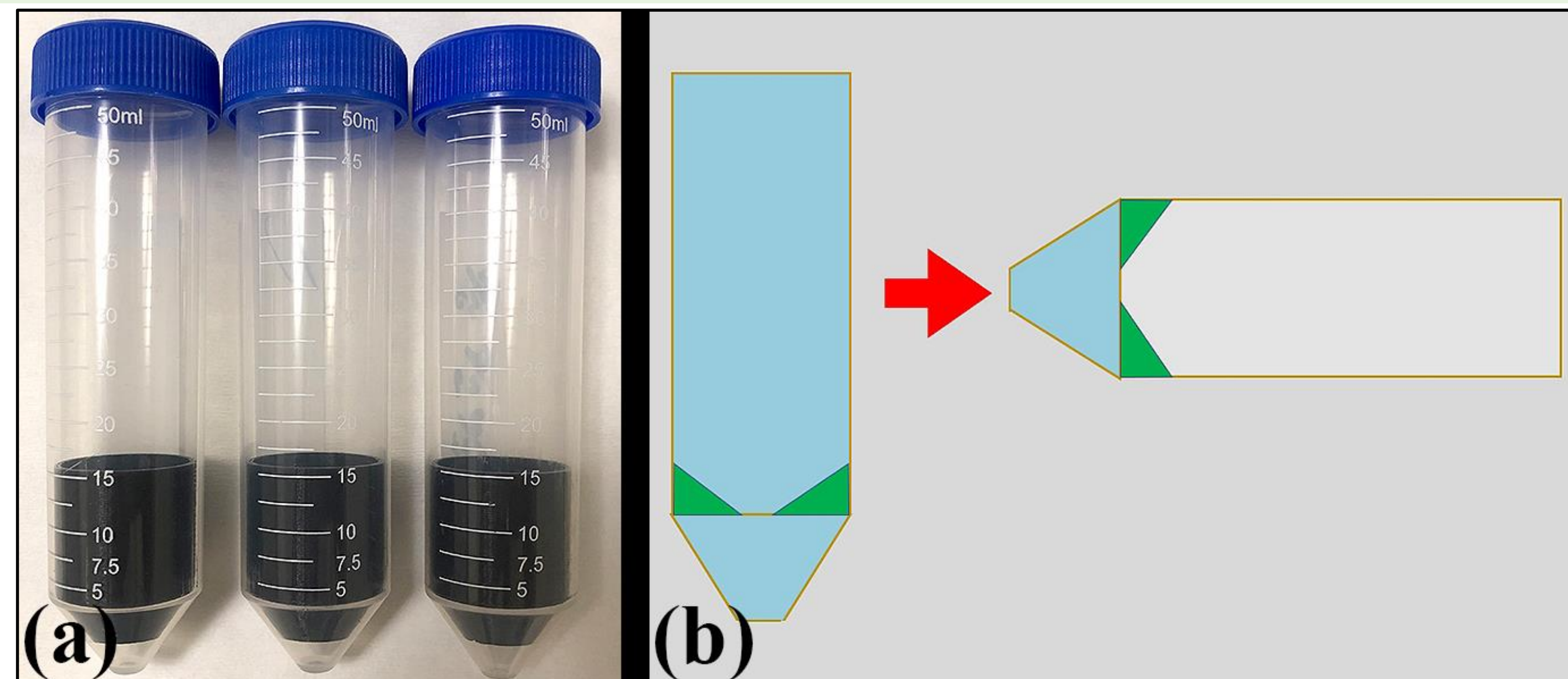


圖七，真空吸引器對於移除上清液而保留定量殘存二次純水之量測示意圖。

(a)利用圓孔直尺標定無表面張力閥之離心管的0.5 mL液面位置共3支。

(b)真空吸引器移除二次純水之示意圖。以真空吸引器吸取圖(a)中之無表面張力閥的離心管中二次純水移除至標定位置。

(c)量測各離心管內的殘存二次純水體積



圖八，表面張力閥對於移除上清液而保留定量殘存二次純水之量測示意圖。

(a)將表面張力閥置入另外3支離心管，並比較相對位置的一致性。

(b)表面張力閥移除二次純水之示意圖。具表面張力閥的離心管中二次純水，將離心管由垂直方向傾倒至水平方向，二次純水會因重力關係而流出，表面張力閥以下的二次水會因為表面張力與毛細作用力而留下。

(c)量測各離心管內的殘存二次純水體積。

4. 真空吸引器與表面張力閥對於留存細胞的回收率之影響性評估

- 實驗流程所計數的個別細胞數其單位為 μL ，所以各類細胞原始計數值 $\times 1000 \times 50 (\text{mL}) =$ 各類細胞總量 A (50 mL)。
- 實驗流程留存的濃縮尿液懸浮液，分別以吸管混和均勻，移至尿液分析檢體杯，並以流式細胞儀計數濃縮品管尿液懸浮液的細胞數。各類細胞計數單位為 μL ，濃縮品管尿液體積單位 μL ，所以各類濃縮細胞原始計數值 \times 體積 (μL) = 各類細胞回收總量 B。
- 各類細胞回收總量 B \div 各類細胞總量 A = 各類細胞回收率。

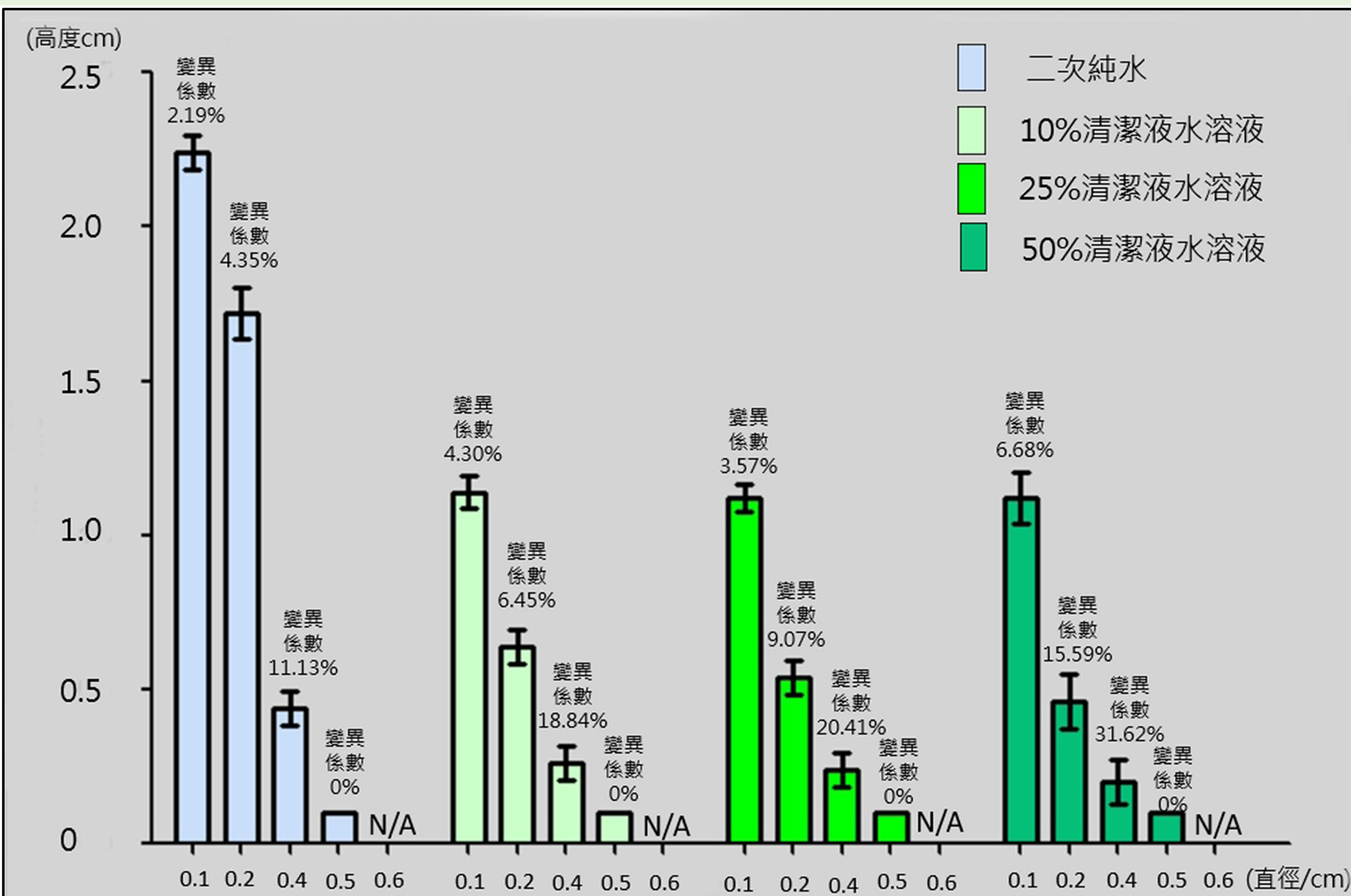
5. 實驗結果評估

- 實驗數據結果以SigmaPlot 完成敘述性統計分析及paired-t test。
- 觀察性實驗結果以圖像紀錄為評估依據。

實驗結果記錄

(一) 液體種類與表面張力及毛細作用力之評估

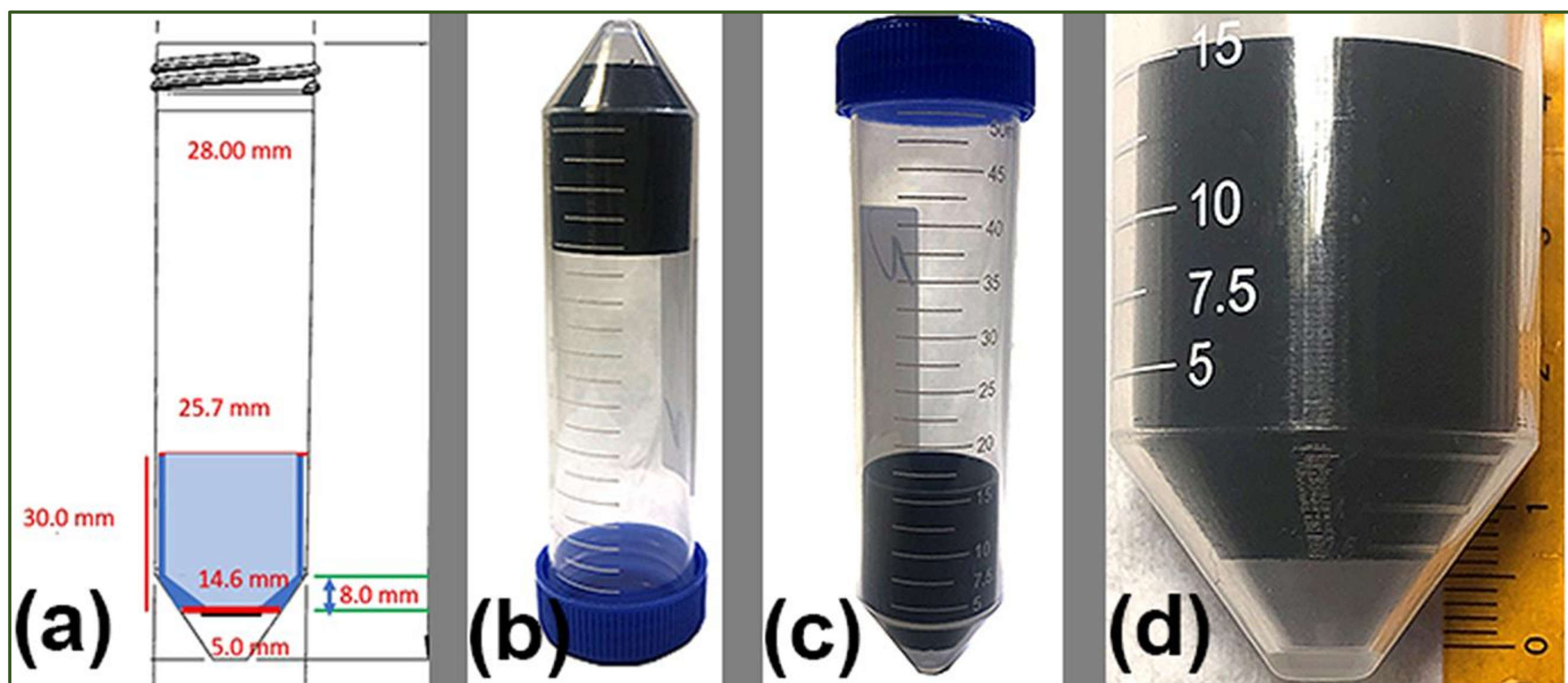
- 二次純水與3種清潔劑水溶液與5種移液管尖端開口直徑的實驗結果如圖九。開口直徑為0.6cm時無法保存任何液體在管內，因此結果欄為N/A。
- 當移液管尖端開口直徑為0.1cm時，二次純水的平均高度為2.24cm，各種清潔劑濃度(10%、25%與50%)的平均高度為1.12-1.14cm，僅為二次純水的一半。
- 3種清潔劑濃度的各種開口直徑數據近似，表示各種濃度清潔劑的表面張力一致。進一步以表面張力計量測10%濃度清潔劑的表面張力為0.029N/m，遠小於二次純水的表面張力。
- 因為清潔劑濃度對於表面張力的變化為非線性關係，且變化急遽的區域非常狹窄。估計清潔劑濃度為0.04%時可達到表面張力為0.061N/m，但是因為不易配製精確近似尿液之表面張力區間的清潔劑濃度，因此後續的實驗以二次純水完成。
- 單端開口之水平移液管，其實驗結果顯示，當模擬具表面張力閥之離心管水平傾倒液體時，如果閥門直徑為0.6cm時，二次純水即有顯著突出現象如果應用於表面張力更小的尿液時，很可能會破壞垂直液面的平整性，進而導致閥內的尿液漏出。因此，表面張力閥開口直徑以0.5cm為理想之設計。



圖九，二次純水與3種清潔劑水溶液與5種移液管尖端開口直徑的實驗結果統計圖。

(二) 表面張力閥的尺寸量測與3D列印製作

表面張力閥之3D印製，經由5次的設計微調，達成與50mL離心管之幾何結構密切貼合且不會於倒立時鬆脫，亦不會於離心過程中(500 x g, 5分鐘)崩解。詳細設計參數與結果如圖十。

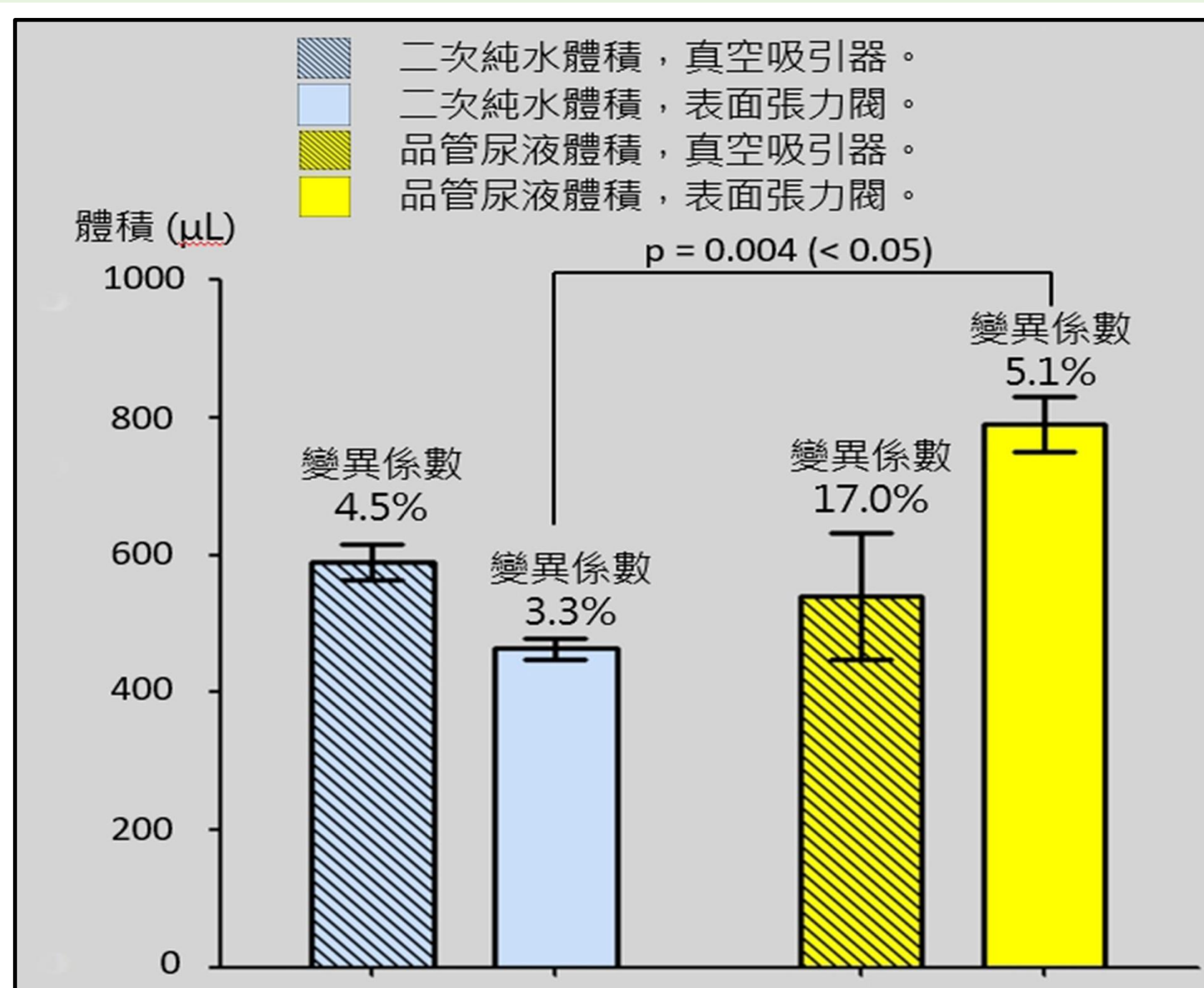


圖十·表面張力閥之設計參數與測試結果。
(a)設計參數。
(b)表面張力閥於離心管倒立時不會鬆脫。
(c)表面張力閥可以與離心管底部完全貼合。
(d)表面張力閥開口處至離心管底部為6.0mm(0.5mL液體之液面高度)，符合設計。

(三) 真空吸引器與表面張力閥對移除上清液後保留定量殘存尿液的效能評估

真空吸引器與表面張力閥對於移除上清液後保留殘存定量二次純水與品管尿液體積的實驗結果如圖十一。真空吸引器對於二種的液體保留量都高於500 μ L，而表面張力閥對於二次純水的保留量低於500 μ L，對於品管尿液的保留量高於500 μ L，這二者的差異達統計上的意義($p < 0.05$)。

表面張力閥比真空吸引器對於定量不同液體的變異係數都比較小(3.3% v.s. 4.5%, 5.1% v.s. 17%)。



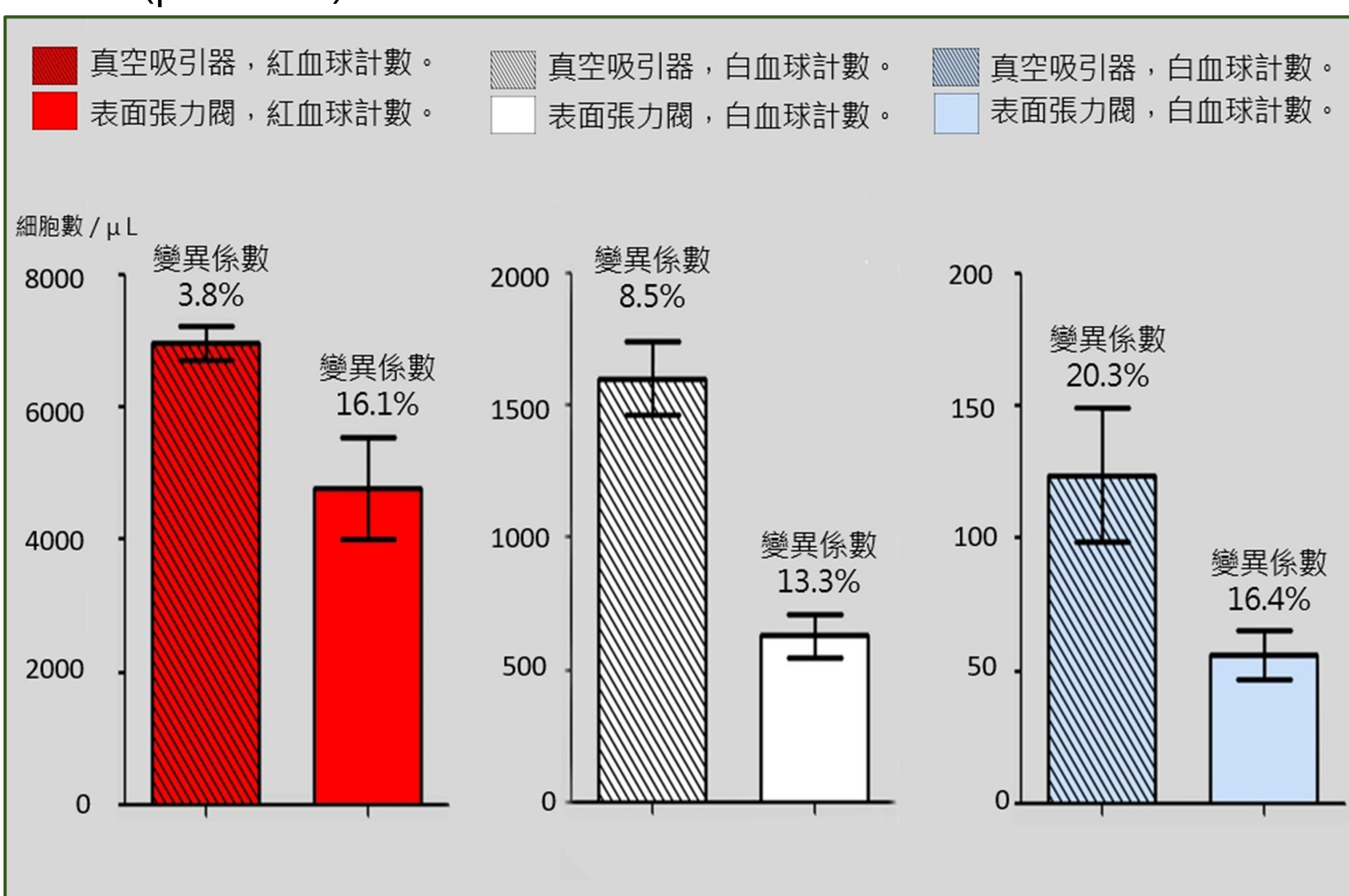
圖十一·真空吸引器與表面張力閥對於二次純水與品管尿液的殘存定量體積之比較。
真空吸引器的二次純水殘存定量平均體積(μ L)為 590.0 ± 26.5 ，變異係數為4.5%；表面張力閥的二次純水殘存定量平均體積(μ L)為 463.3 ± 15.3 ，變異係數為3.3%。真空吸引器的品管尿液殘存定量平均體積(μ L)為 540.0 ± 91.7 ，變異係數為17.0%；表面張力閥的品管尿液殘存定量平均體積(μ L)為 790.0 ± 40.0 ，變異係數為5.1%。表面張力閥的二次純水殘存定量平均體積與表面張力閥的品管尿液殘存定量平均體積比較，達統計上的顯著差異， $p = 0.004$ ($p < 0.05$)。

4. 真空吸引器與表面張力閥對於留存細胞的回收率之影響性評估

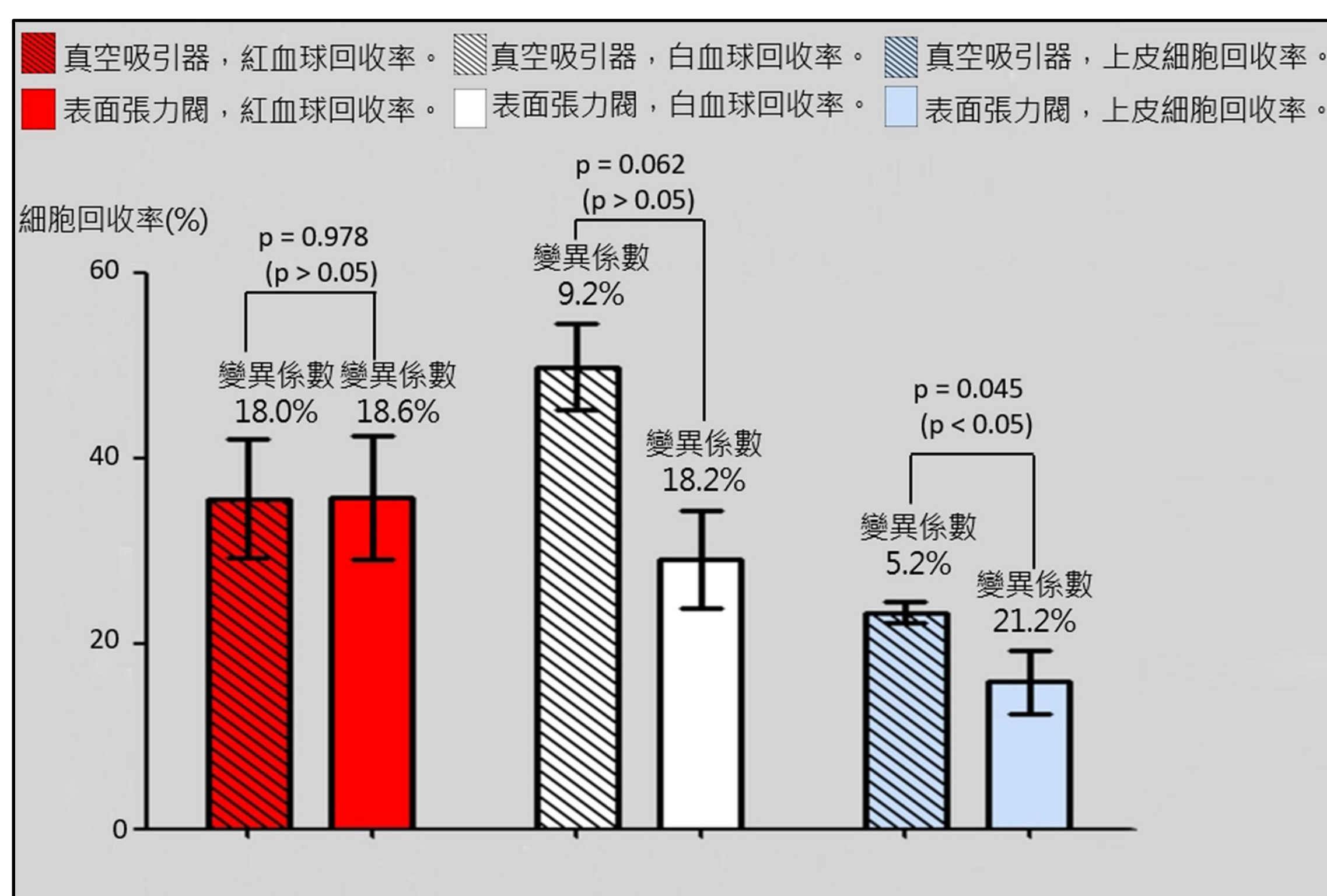
真空吸引器與表面張力閥對於保留離心後的細胞數量與細胞回收率的比較結果如圖十二與圖十三。原始品管尿液中的紅血球(RBC)，白血球(WBC)與上皮細胞(EPI)的濃度分別為211.0、34.3與5.6(cells/ μ L)。

經離心濃縮後，二種方法的各種細胞計數結果如圖十二。紅血球的計數量最高，白血球次之，上皮細胞最少，與離心前之尿液中的趨勢一致。

換算細胞回收率後，各種細胞的回收率都沒有達到100%，最多只有49.8%(真空吸引器法的白血球)，表示過半的各類細胞在離心過程中產生破損消失。經統計分析顯示，二種方法的紅血球與白血球沒有顯著的差異，但是，上皮細胞在表面張力閥法的回收率有顯著上的差異， $p = 0.045$ ($p < 0.05$)，如圖十三。



圖十二·真空吸引器與表面張力閥對於細胞計數之比較。



圖十三·真空吸引器與表面張力閥對於細胞回收率之比較。

討論

- 一、本研究探討液體表面張力在表面張力閥上的測試達到預期成果。在二次純水的測試中，1mL微量移液管尖端開口直徑於0.6 cm時，垂直狀態下幾乎無法保留管內液面。以美工刀切割1mL微量移液管造成橫切面形成非平整狀態，在尖端開口直徑為0.6 cm時，於水平狀態以超過10 mm/min之速率移動時即有液體顯著外溢的現象。因此，表面張力閥之開口直徑設定為0.5 cm是正確的選擇。
- 二、液體本身的表面張力特性會顯著影響表面張力閥的表現。二次純水的表面張力較大，比較不會殘留在不光滑的表面張力閥壁上；相對的，品管尿液的表面張力較小，所以容易殘留在不光滑的表面張力閥壁上，導致體積定量功能在品管尿液會出現系統性的偏差。
- 三、針對變異係數評估，表面張力閥傾倒法對於殘留液體的定量功能，於二次純水為3.3%，於品管尿液為5.1%，都優於真空吸引器法的4.5%(二次純水)或17.0%(品管尿液)。實務操作過程中，並不可能為每一支離心管標定預定殘留液之液面高度，所以真空吸引法的實務操作中可能會出現更大的變異係數，甚至會造成上皮細胞回收率下降的可能性(因為真空吸引器之吸管開口太接近細胞沉積面)。
- 四、表面張力閥傾倒法對於所有細胞種類的細胞回收率在本研究中並不如預期的提高，最有可能的原因有二個：(a)相較於離心管的光滑管壁表面，壁面不光滑的表面張力閥可能造成細胞於離心沉降中破損增加。(b)表面張力閥縮口平面為複雜的列印圖案，造成沉渣細胞於混和時陷入凹凸不平的表面。
- 五、真空吸引法之細胞回收率的變異係數分布範圍為5.2%-18.0%，明顯較表面張力閥傾倒法的18.2%-21.2%來得廣。這樣的結果可能是真空吸引器法深受離心後細胞分層狀況影響，水流的擾動對較靠近表層之細胞影響較大，因此細胞回收率的變異係數也較大，反之，底層的變異係數顯著降低。而表面張力閥傾倒法則沒有擾動液面的缺點，所以變異係數差異不大。因此，改善表面張力閥以上之液體殘留的干擾，應可有效降低整體回收率變異係數。

結論

- 一、表面張力閥傾倒法對於保留體積的功能達到預期目標，二次純水的定量體積，偏差小於10%而且變異係數為3.3%；應用在品管尿液，定量體積變異係數為5.1%，均優於真空吸引器法的4.5%與17%。
- 二、未來展望：改以工業射出成型方式或提高3D列印精度製作表面張力閥，應可能有效改善表面張力閥壁面的平整度，進而改善細胞回收率不如預期的狀況，同時減少尿液殘留在表面張力閥壁面而提高殘留定量體積的準確性，以期本研究的成果可以正式應用於臨床醫學的尿液癌細胞檢查流程，減少人工操作所產生的變異度，提高尿液癌症細胞的檢驗結果的正確性。

參考文獻

- Berthier, J. (2012). *Micro-Drops and Digital Microfluidics*. Elsevier Science.
- Extrand, C. (2017). Spontaneous Draining of Liquids from Vertically Oriented Tubes. *Langmuir*, 33(45), 12903-12907.
- Wang, A.-B., Fang, P.-H., Su, Y. C., Hsieh, Y.-W., Lin, C.-W., Chen, Y.-T., & Hsu, Y.-C. (2016). A novel lab-on-a-chip design by sequential capillary-gravitational valves for urinary creatinine detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 721-727.