

# 高通量單細胞篩選與細胞單株化培養之雙微孔微流晶片

## High-Throughput Single-Cell Isolation and Clonal Culture Using a Microfluidic Dual-Well Chip

林璟暉、莊堵安、張浩禎、葉鵬鳳、邱英明、許佳賢

Ching-Hui Lin, Duane S. Juang, Hao-Chen Chang, Chuan-Feng Yeh, Ing-Ming Chiu, Chia-Hsien Hsu

單細胞的研究在近年來越趨熱門，原因在於一般利用群體細胞進行的研究無法得知細胞間異質性所造成的影響，因而限制了大家對於細胞行為的了解。然而目前仍缺乏一個操作簡單又具有高通量的方法進行單細胞培養實驗。在此研究中，我們設計了一款雙微孔 (dual-well (DW)) 單細胞篩選微流晶片，能高效率 (約 77%) 地將單細胞個別抓取後置入一個大培養空間中，藉以提供足夠的空間，供細胞貼附及長時間生長。DW 晶片的設計是採用一組篩選細胞的小微孔結構對應到另一個培養細胞的大微孔結構。這個設計概念除了能大幅提昇細胞單株化培養的效率外，也讓細胞培養微孔的大小可根據實驗需求做彈性的調整，而不會影響單細胞篩選效率。我們選用小鼠神經幹細胞 KT98、人類肺癌細胞株 A549 及黑色素瘤細胞株和 MDA-MB-435 進行 DW 晶片的功能性及效率評估，以及利用 A549 進行單細胞的群落形成實驗 (single-cell colony formation assay)，來驗證 DW 晶片在單細胞長時間培養及細胞單株化應用的可行性。

Single-cell studies have been gaining growing interests owing to the fact that whole-cell population studies cannot accurately detect cellular heterogeneity presents among the whole cell population, limiting our standing in coordinated cell behaviors. However, traditional methods for studying single cells rely on macro-scale tools that are either labor intensive or difficult to operate. Thus, the development of a high-throughput yet simple method for single cell culture experiments is of great importance. Here, we report a novel microfluidic device with a dual-well (DW) design concept for high-efficiency single-cell capture in large microwells (~77%), which provides ample space for cells to proliferate and differentiate. The ability of our DW device to simultaneously allow for high-efficiency single cell capture and culture was realized using sets of small microwells for cell capture, paired with large microwells for cell culture. By decoupling the capture and culture functionalities in our device, we were able to flexibly adjust the size of the large culture microwells without compromising single-cell capture efficiency. We also demonstrated single-cell acquiring efficiency of KT98 mouse neural stem cells, A549 and MDA-MB-435 cancer cells, and single-cell colony formation assays using our device, showing the diverse and flexible functionality of the DW device in cell culture applications.

## 一、前言

細胞異質性研究在人類疾病治療中一直是一項重要的課題<sup>(1-3)</sup>。舉例來說，多能性幹細胞雖可應用於疾病治療和再生醫學等領域，但由於其細胞功能上的異質性，讓多能幹細胞一直難以穩定的進行細胞分化<sup>(4)</sup>。另在癌症研究中，腫瘤組織內一小群被稱為「腫瘤幹細胞」的細胞被認為是造成腫瘤對化療藥物產生抗藥性的主要原因<sup>(5)</sup>。如果能精準地分析每顆細胞之間的異質性，將有助於簡化複雜的生物現象，並提供疾病治療新的方向<sup>(6-8)</sup>。然而，單細胞的分析不同於以往整個細胞群體，在實驗技術上更具挑戰性<sup>(9)</sup>。傳統單細胞實驗的進行通常仰賴有限稀釋法 (limiting dilution) 或流式細胞儀 (FACS) 來完成。有限稀釋法是利用多次序列稀釋的操作，將原本高濃度的細胞懸浮液進行稀釋，以此獲得在 96 孔培養盤中的孔洞內具有一個單細胞，此方法被廣泛地應用於單細胞操作實驗，例如測定腫瘤幹細胞的群落形成率 (colony formation) 等<sup>(10)</sup>。

有限稀釋法因其操作通量較低，故只適合操作少量樣本，且根據 Poisson distribution 的機率學原理，在培養盤中成功獲取單細胞的最大機率將低於 37%<sup>(11)</sup>，除非另外使用昂貴的機器手臂協助操作，否則有限稀釋法無論在效率及通量都很低。而流式細胞儀技術能克服 Poisson distribution 的效率限制，透過細胞分選方式能高效率的將單細胞分注於細胞培養盤之孔洞內<sup>(12)</sup>。然而，因流式細胞儀在操作時所產生的高機械剪應力 (shear stress) 會傷害細胞，進而影響到單細胞被分離後之後續分析及應用<sup>(13)</sup>。此外，流式細胞儀由於其昂貴的儀器購買和操作成本，在許多實驗室中並不普遍。有鑑於此，微小化的生醫晶片因為具有精準操縱單細胞的能力<sup>(14)</sup>，已漸漸被發展成為單細胞實驗應用的工具<sup>(15, 16)</sup>。這些微小化的晶片同時也擁有高通量和樣品、試劑使用量少等特點<sup>(13)</sup>，使其在單細胞操作上更具優勢。

近年來已有許多微小化的晶片裝置利用不同的原理進行單細胞的篩選及分析，例如：微液滴 (microdroplets)<sup>(17)</sup>、介電泳 (dielectrophoresis)<sup>(18, 19)</sup>、

流體動力學 (hydrodynamics)<sup>(20, 21)</sup> 以及微孔陣列 (microwell array)<sup>(14, 22)</sup> 等方式。對於需要進行單細胞培養的應用而言，微液滴細胞培養法能快速地提供單細胞培養空間，此法是透過油性介質的分離，將單細胞包裹在細胞培養液滴內進行培養。然而液滴內的細胞培養液在液滴形成後就無法被置換，讓此方法不適用於過程中需要更換培養液的細胞實驗，且液滴中因缺乏能讓細胞附著的基質，故也無法應用於貼附型細胞的培養。反之，微孔設計的晶片可適用於貼附和懸浮型的單細胞篩選及培養，且其在製造和操作上都較為簡易。此設計只需要有孔洞狀的結構，而操作上只需使用流體力學或重力的幫助就能將細胞置入微孔內，為一較有吸引力的方法<sup>(14, 23, 24)</sup>。然而，為了讓細胞擁有足夠的生長空間，微孔的尺寸設計通常必須遠大於一顆單細胞的大小 (直徑介於 90–650  $\mu\text{m}$ )，導致單細胞篩選效率下降至僅有 10–30%<sup>(23, 24)</sup>。使用大微孔所造成的單細胞篩選效率降低與有限稀釋法相同也是由於 Poisson distribution 的限制。雖有報導指出，使用三角狀的微孔設計能改善單細胞篩選效率 (約 58%)，然而三角形微孔的空間僅有單細胞的 3.5–6 倍大，並不足以讓細胞生長超過兩天<sup>(25)</sup>。

本研究提出一個新穎的微流體雙微孔 (dual-well, DW) 晶片設計，能高效率地抓取單細胞，並置入一大培養空間中進行培養，提供細胞長時間培養所需的充足生長空間。DW 晶片的高細胞篩選效率，源自於透過一組小的細胞篩選微孔陣列抓取單細胞後，再利用重力的方式，將細胞轉移至對應的大培養微孔中進行長時間培養。為了證實此晶片設計的效果，我們使用成鼠大腦中的 KT98 神經幹細胞，以及人類癌細胞株 A549 和 MDA-MB-435，並研究其細胞增殖性、幹細胞分化特性和進行單細胞群落生長效率評估。

## 二、實驗設計及材料與方法

### 1. 晶片之設計與製作

此雙微孔微流晶片是利用聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 經由軟蝕刻技術翻模製作而成<sup>(26)</sup>。簡單來說，首先將負光阻 (SU-8,

MicroChem, Newton, MA, USA) 利用光刻方式顯影於矽晶圓上製成翻模所需之微結構模板，並利用表面輪廓儀 (VK-X 100, KEYENCE, Japan) 進行結構高度的測量，接著將 PDMS Sylgard 184 (Dow Corning, USA) 之聚合物與其交聯劑以 10:1 比例混合均勻後倒入模板，完成後放置於 65 °C 之烘箱烘烤 3 小時，使其固化成型。成型後的 PDMS 微結構由矽晶圓模板上脫模，並切割成適當大小後，使用內徑為 1.00 mm 的打孔器 (Harris Uni-Core™, Ted Pella, USA) 製作出此晶片流道之流體入口與流體出口，接著將兩塊不同的 PDMS 微結構利用氧電漿處理後，將兩塊 PDMS 微結構以手動對位並貼合後，形成完整之封閉式流道，最後把晶片放置於 65 °C 烘箱加熱 24 小時，用以強化兩片 PDMS 間的貼合效果。

## 2. 實驗前的晶片前處理

先以去離子水充滿雙微孔微流晶片後，利用加壓方式除去晶片中之氣泡，並將晶片放置於 UV 光源下照射 30 分鐘進行殺菌。接著將含有 5% 牛血清白蛋白之 PBS 溶液注入於晶片流道內，在 37 °C 下作用 30 分鐘，以避免細胞進入晶片後立即黏附於 PDMS 表面。

## 3. 細胞培養

KT98 神經幹細胞是從 F1B-Tag 轉殖鼠之大腦細胞中被分離出來，此細胞的培養液成份包含 DMEM/F12 (Gibco, USA)、10% 胎牛血清 (HyClone Thermo, USA) 與 1% 抗生素 (glutamine-penicillin-streptomycin, Biowest, France)，並培養於 37 °C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱中。癌細胞株 A549 與 MDA-MB-435 則使用 DMEM 培養液 (Gibco, USA)，並額外添加 10% 胎牛血清 (Biowest, France) 和 1% 抗生素，並放置於相同細胞培養箱中進行培養。細胞的繼代培養則是當細胞生長至 70%–80% 滿時，使用重組酵素 (Accumax™ Innovative Cell Technologies, USA) 並參考使用者標準操作流程後，進行細胞繼代培養。

## 4. DW 晶片的單細胞篩選與培養

在實驗進行前，先將細胞利用細胞膜染劑 (DiIC12, BD Biosciences) 進行 20 分鐘染色，以利用 DW 晶片中的細胞判斷。使用濃度為 2.2–2.5 × 10<sup>6</sup> cells/mL 之細胞懸浮液 200 μL，透過微量移液器以手動方式注入至 DW 晶片流道中，此步驟可將細胞快速充滿於晶片的抓取區域，增加單細胞篩選效率。我們使用鐵氟龍管來連接針筒幫浦 (Harvard Apparatus, Harvard Bioscience, USA) 與晶片流體注入口，並以每分鐘 3 μL 的流速來推動 20 μL 的細胞培養液進入微流晶片流道中，此步驟會讓細胞緩慢於微流道中移動，並因為重力而降於細胞篩選微孔中。接下來使用每分鐘 600 μL 的流速來推動 300 μL 之細胞培養液，將未進入篩選微孔的細胞由微流道中沖出。利用插塞 (plugs) 將晶片流道出入口封住，以形成封閉之培養空間，並將晶片翻轉，使細胞因受重力而由篩選微孔掉入培養微孔內，最後將晶片放置於 37 °C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 7 天。

## 5. 表皮生長因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 對 A549 人類肺癌細胞群落形成 (Colony Formation) 能力之影響

在細胞群落形成實驗中，首先取出濃度為每毫升含有 2.2–2.5 × 10<sup>6</sup> 個細胞之細胞懸浮液 200 μL，用微量移液器以手動方式注入至晶片中，靜置 2 分鐘使細胞藉由重力沉降於篩選微孔中，再藉由針筒幫浦以每分鐘 600 μL 之流速推動含有 20% 胎牛血清之 DMEM 細胞培養液，在 30 秒內將微流道中未被篩出之細胞沖出流道外。最後將流道出入口密封，並將晶片翻轉使所篩出之單細胞轉移到培養微孔中，並放置於 37 °C 之 CO<sub>2</sub> 培養箱進行培養。隔天，控制組之晶片以添加 10% 血清和 1% 抗生素之培養液 300 μL 進行培養液置換；而實驗組晶片則以相同培養液另再額外添加濃度為每毫升 200 ng 的 EGF (PeproTech, USA) 進行置換。其後每隔 3 天分別置換新鮮培養液來維持細胞生長，在培養過程中進行拍照，並於 7 天後分析其單細胞群落形成效率，培養微孔中之細胞數大於 15 個，即算為一個細胞群落。



## 6. 統計分析

所有分析皆為 3–4 次獨立實驗所得之結果，並利用單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 和 t 檢定 (student-t test) 進行各處理組間之統計分析，數值則是以平均值 (mean) ± 標準差 (standard deviation) 之方式呈現。若分析結果具有統計學上之差異，在圖表中以星號表示 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  和 \*\*\* $p < 0.001$ 。

## 三、研究結果

### 1. 晶片之設計與操作

在本篇研究中，我們利用此雙微孔微流晶片進行高效率單細胞抓取及細胞單株化培養。如圖 2 所示，雙微孔微流晶片的外觀大小為  $12.75 \times 20.25 \text{ mm}^2$ ，並由一個微流道及兩組分別位於流道天花板及地板的微孔陣列所組成 (每組陣列含有 470 個微孔)。此兩組微孔被設計成不同的尺寸大小，其中一組微孔直徑為  $25 \mu\text{m}$  且深度為 26 及  $30 \mu\text{m}$ ，這個尺寸接近於單細胞，故可進行高效率單細胞抓取<sup>(14, 22)</sup>；而另外一組的微孔直徑為 285 及  $485 \mu\text{m}$  且深度為  $300 \mu\text{m}$ ，可用來進行長時間細胞單株化培養 (clonal culture) (圖 2(d))。兩組微孔陣列間的微流道高度為  $200 \mu\text{m}$ ，可提供約  $60 \mu\text{L}$  的培養液體積供細胞生長使用。若從俯視圖來看，單細胞篩選微孔的位置被設計於細胞培養微孔的中央，且因此兩種微孔的尺寸差距極大 (大於 10 倍)，被抓取的細胞可以很輕易地利用翻轉的方式將細胞轉移至培養微孔。

雙微孔微流晶片的操作步驟如下 (圖 1)：

- (1) 將細胞懸浮液以 pipette 手動注入微流道中，而此時的 DW 晶片被設置成單細胞篩選模式 (細胞篩選微孔位於流道底部，細胞培養微孔位於流道頂部)。
- (2) 利用連接管的一端連接一含有細胞培養液的針筒，另外一端則連接於晶片微流道的注入口，並使用一較緩慢的流速將細胞推入細胞篩選微孔中。這種方式的使用可以增加細胞被篩選微孔捕抓的機率。

- (3) 利用較高的流速將未被抓取到的細胞沖出流道外。

- (4) 最後，移除連接管，並將晶片流道注入口以插塞 (plugs) 封住，並將 DW 晶片和緩的翻轉至細胞培養模式 (此時的細胞篩選微孔位於流道頂部，而細胞培養微孔位於流道底部，這個動作可以讓被抓取到的單細胞以重力的方式緩慢掉落於細胞培養微孔內)。

整個操作的過程可以在 10 分鐘內完成，並可以立即放置到一含有 PBS 的細胞培養品盤，幫助減緩液體的蒸發，緊接著將此細胞培養盤放入細胞培養箱中，進行後續的細胞單株化培養及測試。值得一提的是，DW 晶片可以很輕易地在目前常使用的針筒幫浦、組織培養箱與顯微鏡上進行操作，使他可高度相容於絕大部分的生物實驗室中。

### 2. 不同種類細胞的單細胞篩選效率評估

為了瞭解 DW 晶片的單細胞篩選效率，我們使用三種不同的細胞來進行篩選效率評估，分別是小鼠神經幹細胞 KT98、人類肺癌細胞 A549 和人類黑色素瘤細胞 MDA-MB-435。晶片方面選擇深度為  $26 \mu\text{m}$  的細胞篩選微孔晶片，並搭配  $3 \mu\text{L}/\text{min}$  與  $600 \mu\text{L}/\text{min}$  的流速來進行實驗。結果顯示，約有  $67.80 \pm 11.38\%$  至  $85.16 \pm 1.91\%$  的細胞在經細胞捕抓與沖洗的步驟後，依然可留在細胞篩選微孔中 (不同的細胞株具不同的篩選效率) (圖 3(b))，而晶片翻轉後的細胞損失於三種細胞株所測得之數據皆非常低 (全部低於 2%)。有趣的是，若分析三種細胞株被抓取於培養微孔後的單細胞比例，大部份具有細胞的培養微孔內僅含有一個單細胞 (比例為  $89.89\% - 92.98\%$ )，顯示此篩選微孔之孔洞大小十分適合用於單細胞抓取。總和來說，若以晶片所含有全部 470 個微孔的單細胞篩選效率評估，我們的實驗結果顯示 DW 晶片對 KT98 (圖 4) 及 MDA-MB-435 都具有良好的單細胞抓取效率 (高於 76%)，而 A549 則較差 ( $61.63 \pm 7.47\%$ )。我們觀察了此三種細胞所被抓取到的單細胞尺寸，發現 A549 的單細胞大小較另外兩個細胞株為大 (圖 5(b))。而為了要增進較大尺寸細胞的單細胞篩選效

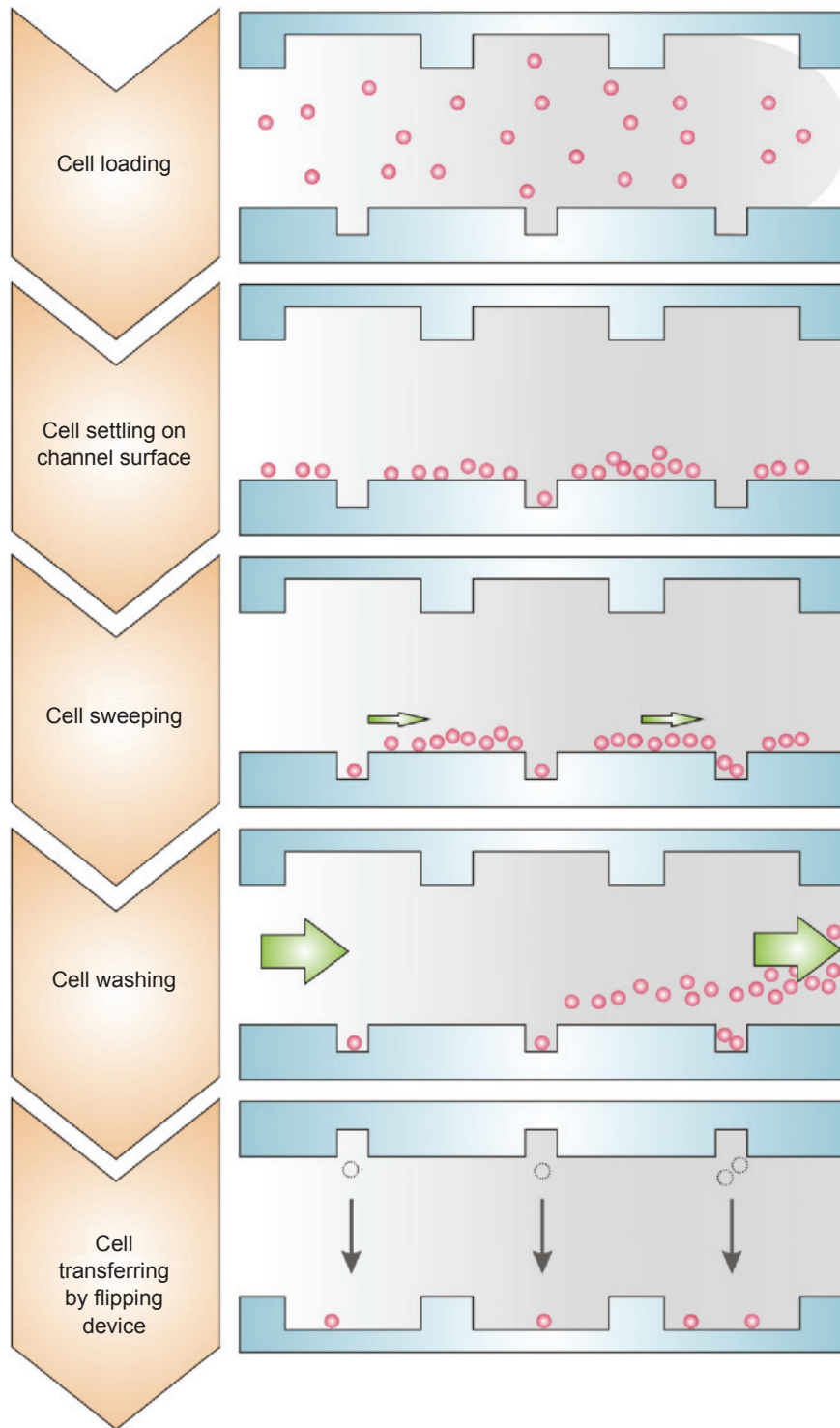


圖 1. DW 晶片之單細胞篩選及細胞單株化培養操作流程示意圖。操作流程簡單分為 5 個步驟：(1) 注入細胞懸浮液。(2) 等待細胞因重力而沈降至流道表面。(3) 使用較低流速將細胞緩慢推入篩選微孔中。(4) 使用較高流速將未被捕抓之剩餘細胞沖出晶片外。(5) 翻轉 DW 晶片將所篩出之單細胞移轉至培養微孔中進行細胞單株化培養。

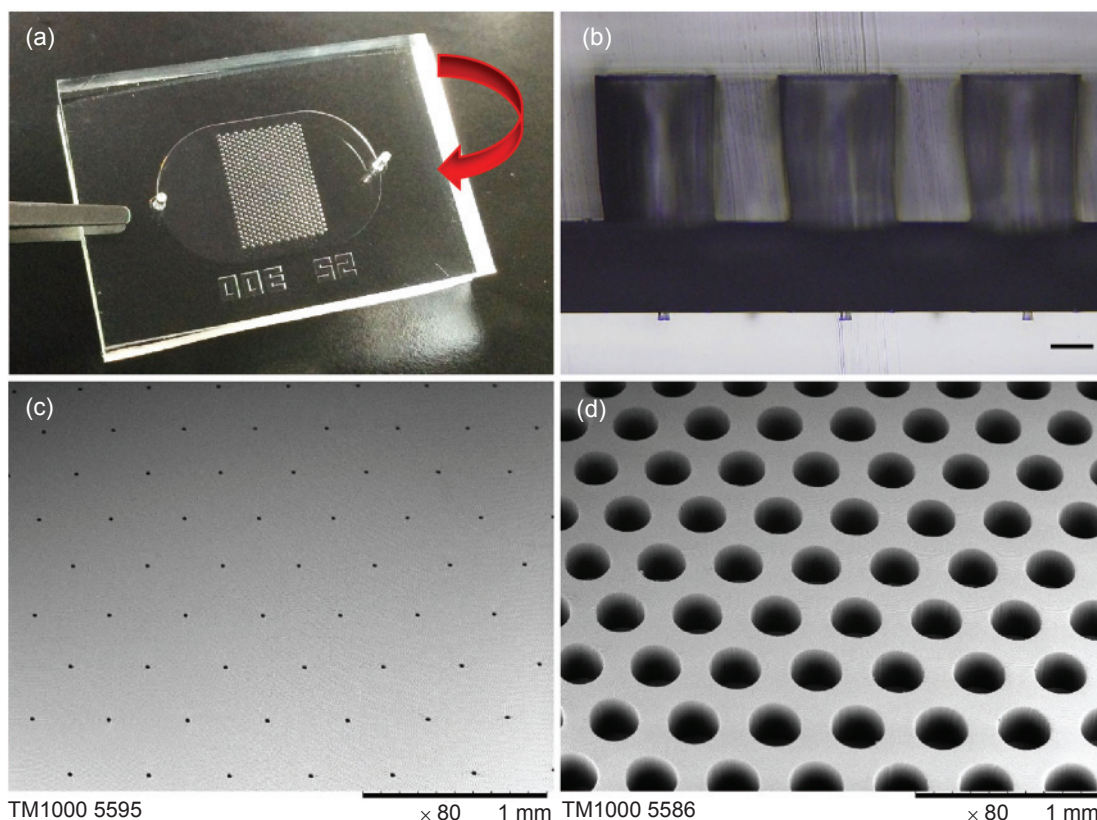


圖 2. 雙微孔微流晶片 (dual-well device) 示意圖。(a) 以 PDMS 製作之 DW 晶片外觀及細胞單株化培養 (clonal culture) 前之翻轉操作。(b) DW 晶片所含之細胞篩選微孔及細胞培養微孔側視圖，如圖所示，單細胞篩選微孔位於細胞培養微孔之中心位置，可避免在翻轉過程中之細胞遺失。Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ 。(c) 單細胞篩選微孔的掃描式電子顯微鏡構造圖，本晶片共含有 470 個篩選微孔。(d) 細胞培養微孔的掃描式電子顯微鏡構造圖，同篩選微孔一樣，培養微孔的數目也有 470 個。

率，我們使用同樣深度 (26  $\mu\text{m}$ ) 但直徑較寬 (從 25  $\mu\text{m}$  增加至 30  $\mu\text{m}$ ) 的細胞篩選微孔進行單細胞抓取。結果顯示，此微孔尺寸顯著增加了 A549 細胞株的單細胞篩選效率 (從 61.63% 增加至 76.03%， $p < 0.05$ ，圖 5(d))。根據以上結果，我們歸納出細胞篩選微孔與單細胞大小的尺寸關係會影響到 DW 晶片的單細胞篩選效率，若欲了解單細胞與篩選微孔尺寸的比例關係，則需進行後續實驗來統計出最佳化的比例關係與單細胞篩選效率。

### 3. 利用雙微孔微流晶片來評估小分子化合物對細胞群落生長能力的影響

由於 DW 晶片具有高單細胞篩選效率及可長時間培養的特點，故很適合用來進行 *in vitro* 個別

單細胞的群落生長能力評估及分析。對癌症研究來說，單細胞的群落生長能力實驗可用來評估藥物及小分子化合物對癌細胞增殖能力與抗藥性的影響。在這個實驗中，我們選擇人類肺癌細胞株 A549 來測試其對於表皮生長因子 (epidermal growth factor (EGF)) 的刺激會有什麼反應。根據圖 6(f) 的結果顯示，若培養液中含有額外添加的 EGF，其單細胞群落生長能力 (17.56%) 會較未額外添加的控制組 (12.10%) 來得高。我們的實驗結果也同時證實之前的研究成果，具有 EGF-receptor 的 A549 癌細胞會因環境中 EGF 的濃度提高而使其生長速度加快<sup>(27)</sup>。且因為 DW 晶片的製作材料所具有的透明性及微流晶片本身的可攜帶性，使得在 DW 晶片中所培養的細胞可以很容易地在一般傳統螢光倒立



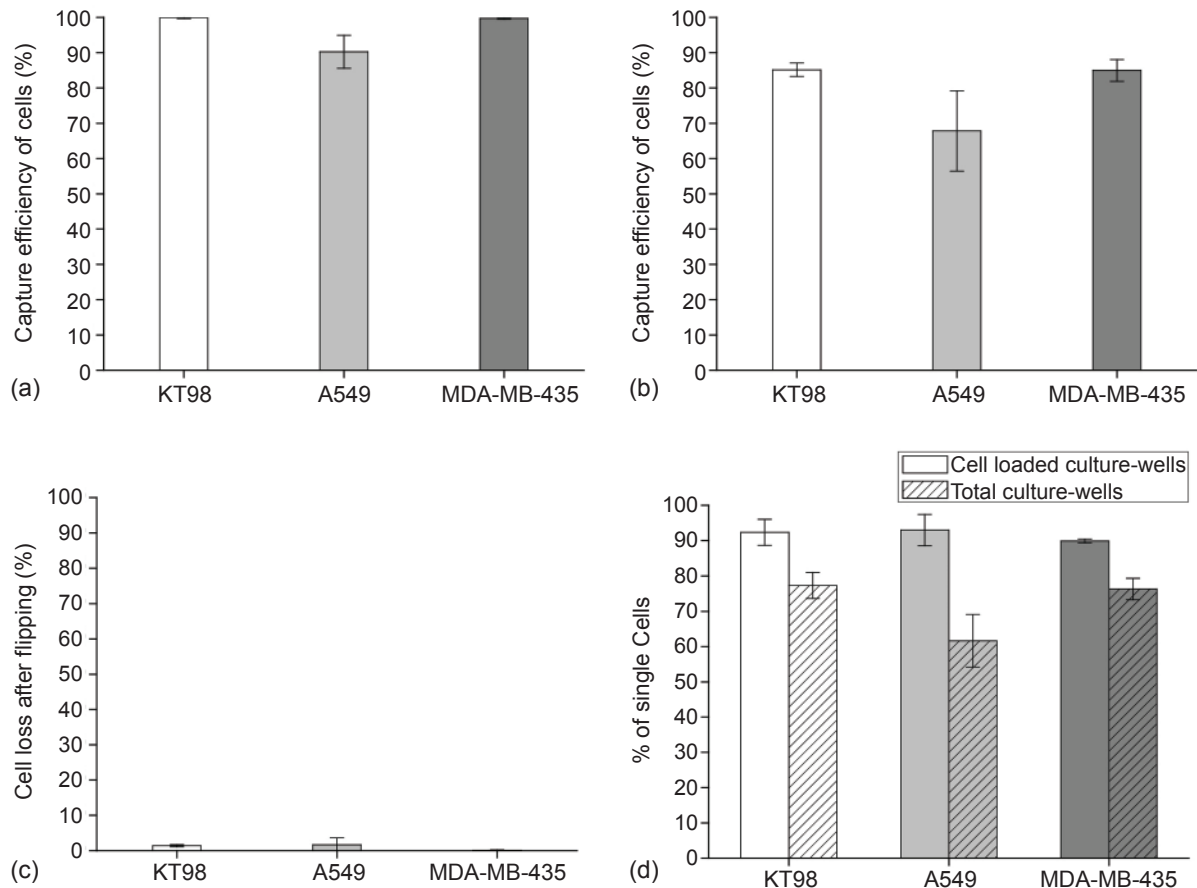


圖 3. KT98、A549 與 MDA-MB-435 之單細胞篩選效率比較。(a) 將 KT98 及 MDA-MB-435 使用較低流速推入篩選微孔後，其細胞抓取效率可超過 99%，但 A549 則只有 90.21%。(b) 將未被捕抓之剩餘細胞沖出後，KT98 及 MDA-MB-435 還保有接近 90% 之細胞抓取效率，但 A549 卻只剩 70% 左右之抓取效率。(c) 三種細胞在細胞轉移後的細胞損失皆低於 2%。(d) 翻轉完後之全晶片單細胞篩選效率分別為：KT98 (77.31%)、A549 (61.63%) 與 MDA-MB-435 (76.31%)。

顯微鏡下進行觀察及數據分析，在絕大部份的生物實驗室內皆可以輕易地操作 (圖 3 及圖 6(a)-(d))。該實驗操作同時也突顯出 DW 晶片的另一個應用性，可對單細胞間所具有異質性進行統計及分析，我們利用每天很短的時間 (微小化裝置的優勢) 拍攝下 DW 晶片所含有的 470 個微孔內其 A549 細胞生長情形，並分析其細胞存活率及生長效率。

分析結果顯示，細胞培養微孔內的單細胞在經過 7 天培養後，只有 40%–55% 的細胞會存活下來，其餘的細胞在培養過程中會逐漸死亡。存活的細胞則在培養期間內表現出不同的細胞型態及生長

效率，例如，13% 的細胞在培養過程中未增殖，而維持單細胞；2.8%–4.3% 的細胞則分裂一次變成 2 個細胞；生長至 3 個細胞的比例則為 2.5%；而生長至 4–14 個細胞的比例則是介於 10–15% 間 (圖 6(e))。綜合這些結果，DW 晶片在對於大量單細胞的群落生長效率評估及單細胞間的異質性研究具有很好的優勢，因其可以讓個別單細胞生長於一個很容易觀察的生長空間內，且可以利用顯微鏡在短時間內將生長的結果記錄下來，並進行後續分析研究。

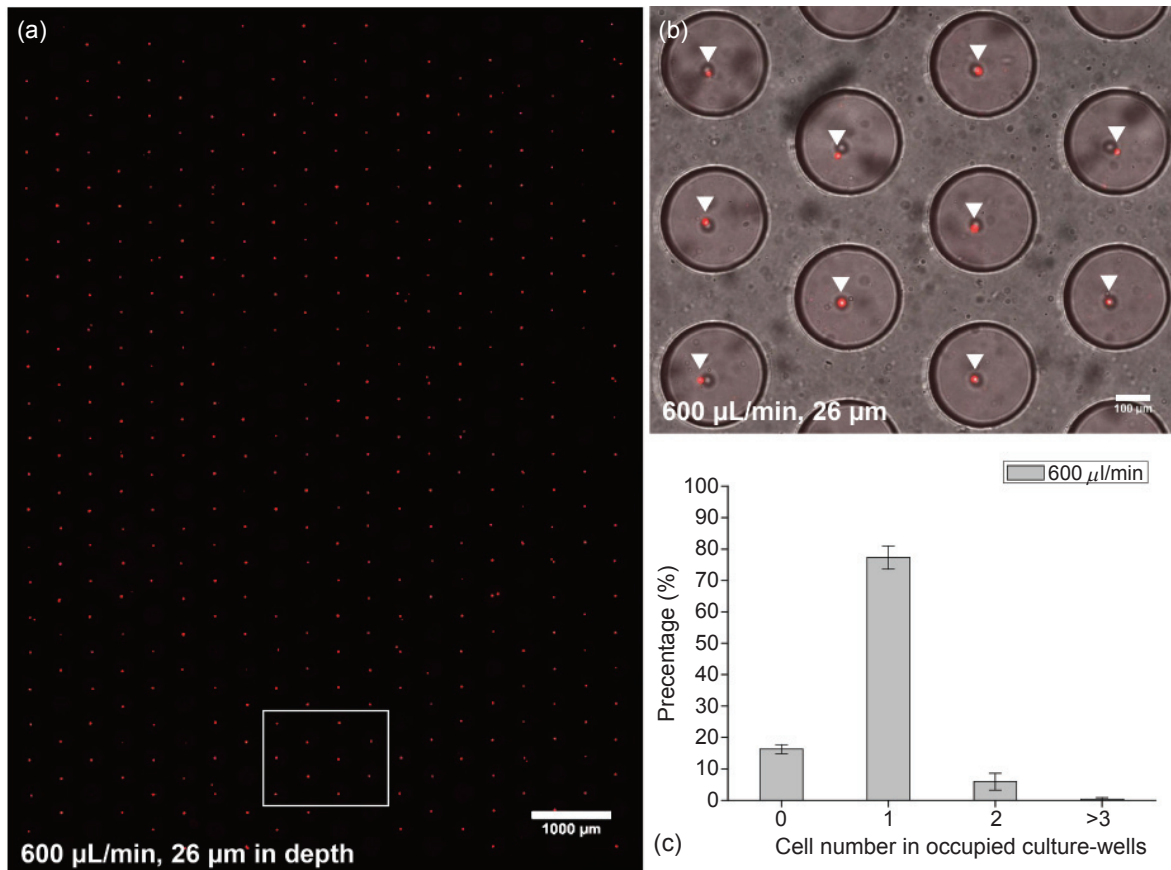


圖 4. 使用 KT98 細胞所進行之單細胞篩選及轉移後的 DW 全晶片圖及微孔內細胞數量統計。(a) DW 晶片所含之 470 個培養微孔及所篩出之細胞全圖，紅色螢光代表培養微孔中的細胞。(b) 培養微孔及其所含細胞之大倍率相對關係圖，此圖所代表之區域為圖 4(a) 中之白色方框。(c) 操作完成後的培養微孔內只含有一個單細胞其比例為 77.31%，此比例遠高於不含細胞及含有 2 個細胞的培養微孔，顯示此篩選微孔的尺寸（直徑：25  $\mu\text{m}$ 、深度：26  $\mu\text{m}$ ）適合用於 KT98 之單細胞篩選。

#### 四、研究結果討論

單細胞操作已經可成功地實現在不同設計和操作原理的微製程系統上，而以微孔為基礎所製作的晶片又是相對簡單且直觀的設計<sup>(15, 28-31)</sup>，使其能輕易地適用於不同的應用上<sup>(29)</sup>。微孔結構可根據不同的需求，改變其孔洞大小、數目和形狀，以符合不同的研究，如單造血幹細胞生長觀察<sup>(24)</sup>、個別白血球細胞分離<sup>(32)</sup>、大量單細胞篩選<sup>(14)</sup>和高通量藥物測試<sup>(33)</sup>等。而長期培養單細胞在部分應用上是必需的，故其需要更大尺寸的微孔，以提供空間讓單細胞貼附與生長。舉例來說，Lecault 等人設

計一具有大尺寸微孔 ( $160 \times 160 \times 160 \text{ m}^3$ ) 的微流體晶片，並證實了造血幹細胞可在微孔內培養 66 小時；雖然加大了微孔尺寸，但其能在單一微孔內獲得單細胞效率僅為 10–30%<sup>(24)</sup>。

另一方面，部分應用為了取得大量的單細胞，會將微孔尺寸設計得很接近單細胞<sup>(14)</sup>；但此種設計無法提供空間讓細胞伸展至正常型態並增殖。為了解決此限制，Park 等人設計一款具有三角微孔的微流晶片，此三角微孔可提供較大的空間讓細胞生長，且可以維持不錯的 PC3 單細胞抓取率 (58.34%)。然而這些微孔的尺寸依然相對小 (正三角形，邊長為 50  $\mu\text{m}$ )，因此只夠細胞生長兩天



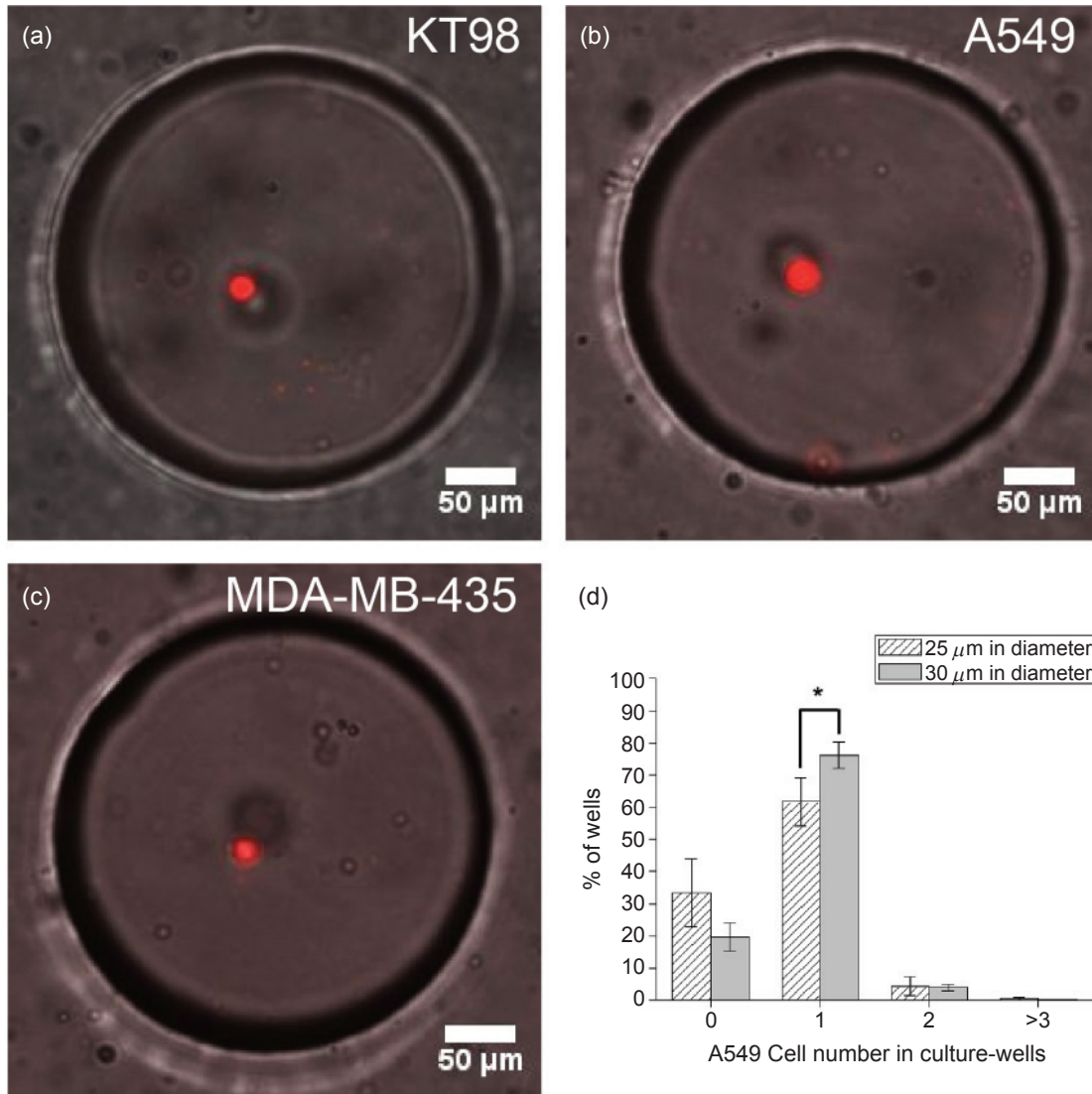


圖 5. 不同種類細胞之單細胞大小比較及 A549 之單細胞篩選效率改進。(a-c) 操作完成後，我們比較三種細胞的單細胞大小，觀察發現 A549 的細胞尺寸明顯大於其餘兩種細胞 (KT98 和 MDA-MB-435)。(d) 將細胞篩選微孔的直徑由 25  $\mu\text{m}$  增加至 30  $\mu\text{m}$  後，可以顯著增加 A549 此種尺寸較大細胞之單細胞篩選效率 (從 61.63% 增加至 76.03%)。

(25)。若使用我們 DW 晶片的概念，就可以有效地克服使用限制稀釋法及開放式微孔系統所遇到的 Poisson distribution 限制 (在一個孔洞內獲得一個單細胞的機率最高只有 37%)<sup>(11)</sup>，且可以提供足夠細胞生長 7-10 天的大空間<sup>(34)</sup>。

在分析我們單細胞篩選效率測試的實驗後，我們發現到含有細胞的篩選微孔數目非常接近於翻轉後含有細胞之培養微孔的數目，這表示大多數細胞可以從篩選微孔成功地轉移至培養微孔中。基於此

觀察，若要提高含有單細胞的培養微孔數量，可藉由提升單細胞被篩選微孔篩出的效率來達成，並依照不同細胞種類來優化篩選微孔的尺寸 (例如：直徑與深度) 和操作參數 (例如：細胞濃度及流速控制等)。此外，為了瞭解在沖出細胞的過程中其流道內細胞所受到的剪應力，我們利用有限元素分析軟體 (COMSOL Multiphysics) 進行 DW 晶片中篩選微孔與微流道底部表面的剪應力模擬。模擬結果發現，即使在使用高流速的情況下 (每分鐘 600

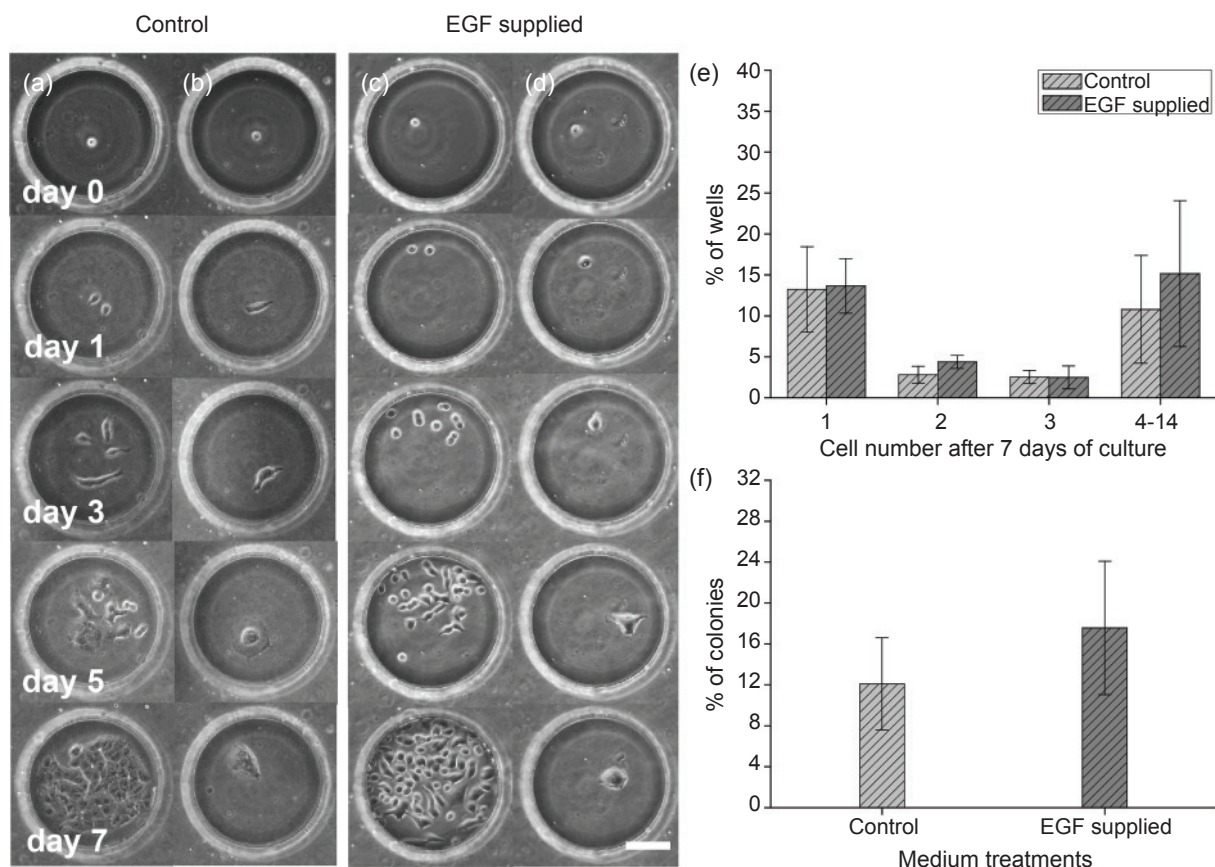


圖 6. EGF 刺激對 A549 細胞其細胞群落生長影響之評估。(a) 以未額外添加 EGF 之細胞培養液培養 7 天後之細胞群落生長情形。(b) 培養 7 天後未分裂之單細胞。(c) 以額外添加 EGF 之細胞培養液培養 7 天後之細胞群落生長情形。(d) 未進行細胞分裂之單細胞，細胞雖未分裂但在培養 7 天後依然存活。Scale Bar: 100  $\mu$ m。(e) A549 細胞經未額外添加或額外 EGF 的培養液培養後，皆表現出細胞異質性，在培養 7 天後分裂出不同數量的細胞。(f) 經額外添加 EGF 的培養液培養 7 天後，可增加 A549 細胞的群落形成效率，顯示 EGF 的添加可以促進 A549 細胞的生長。

$\mu$ L)，篩選微孔側壁 (0–0.06 Pa) 以及微流道底部表面 (0.06–0.15 Pa) 所受到的剪應力均比人體血管壁所受到的剪應力 (0.5–4 Pa) 要來得低<sup>(35)</sup>。

最後，DW 晶片中培養微孔及微流道的體積分別為 20 nL 與 60  $\mu$ L，兩者可提供充足的培養液，讓細胞在單株化培養 (clonal culture) 的過程中可間隔兩天再更換培養液。以我們的 A549 細胞群落生成實驗而言，在生長過程的前幾天，細胞數對培養液體積的比例為 1 cell : 2–3 nL，這個比例可供一顆單細胞生長 6–7 天，並維持正常的細胞型態。而此細胞數對培養液體積的比例，也與產品中的低體積細胞培養盤 (1536 well plates, Corning®, USA)

的建議比例接近。我們相信 DW 晶片可以直接應用於 *in vitro* 單細胞培養的相關研究上，例如高通量藥物與毒性篩檢<sup>(33, 36, 37)</sup>、利用群落形成能力來篩選腫瘤幹細胞<sup>(38)</sup> 和使用神經球培養法鑑定神經幹細胞的異質性<sup>(39)</sup> 等。

## 五、結論

我們成功開發一款新的微流體單細胞培養晶片，其採用雙微孔陣列的概念來提高單細胞被篩出至較細胞尺寸大 15–30 倍微孔 (可供單細胞生長 7–10 天) 中的效率 (約 77%)，且具有相當高的通

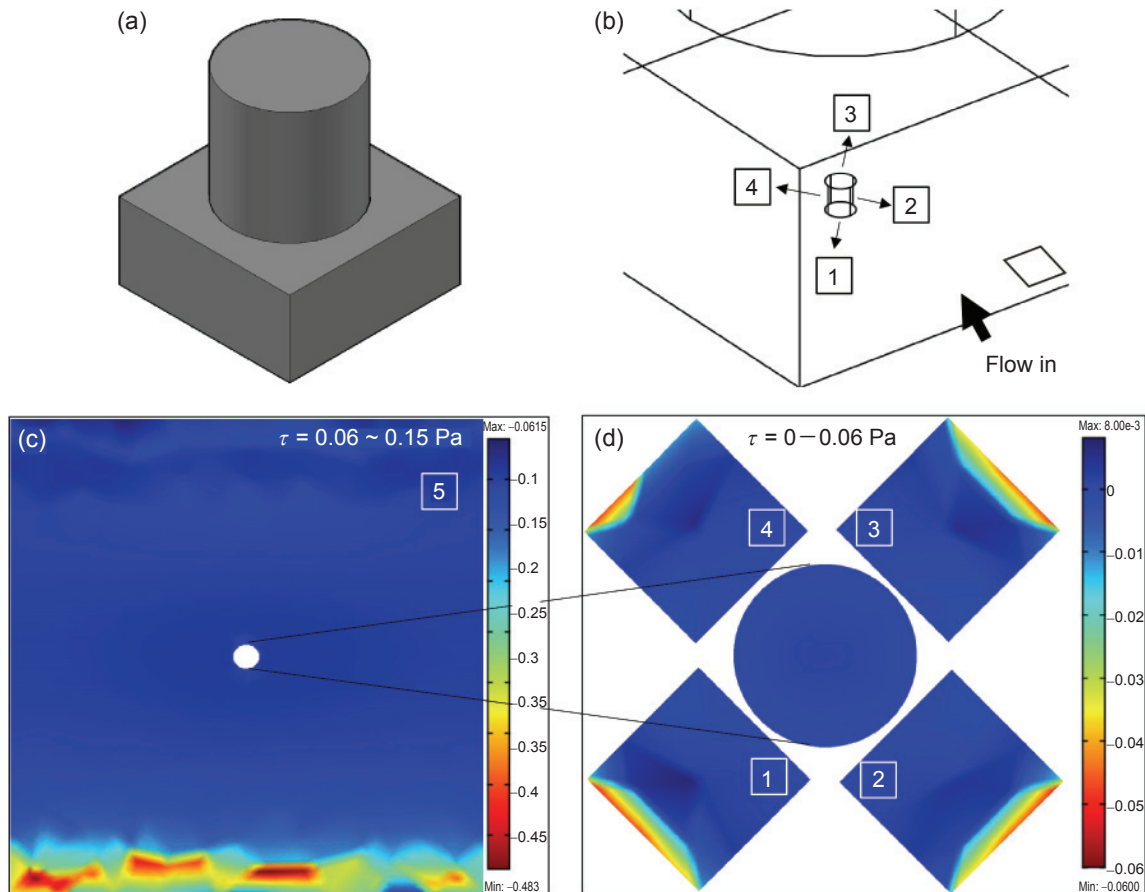


圖 7. 細胞在流道底部及篩選微孔內所受到的剪應力 ( $\tau$ , shear stress) 有限元素分析。(a) 一組雙微井結構的模型建置圖，此模型含有一個篩選微孔搭配一個培養微孔其兩微孔間的微流道。(b) 篩選微孔及微流道示意圖，數字 1–4 代表篩選微孔內之不同牆面和數字 5 代表微流道底部。(d) 微流道底部在洗去剩餘細胞時 (流速為 600 L/min) 所受到的剪應力介於 0.06–0.15 Pa 之間。(e) 同樣的流速下，細胞篩選微孔內各個牆面所受到的剪應力介於 0–0.06 Pa 之間，相較血管內壁所受到的剪應力皆非常的低。流道前端設定為液體入口，而後端為液體出口 (壓力為 0)，而流道左右側則設定為連續式對稱結構，其餘表面皆設定為無法滑動之牆面。

量。同時也證明了此 DW 晶片可應用於細胞單株化培養、單細胞群落形成能力評估及細胞異質性研究等實驗。我們相信此高效率單細胞抓取培養法能廣泛地應用於需長時間培養單細胞的研究中。

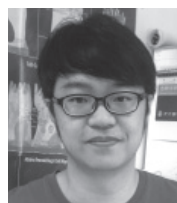
### 參考文獻

1. O. N. Suslov, V. G. Kukekov, T. N. Ignatova, and D. A. Steindler, *P Natl Acad Sci USA*, **99**, 14506 (2002).
2. T. Graf and M. Stadtfeld, *Cell Stem Cell*, **3**, 480 (2008).
3. M. Shackleton, E. Quintana, E. R. Fearon, and S. J. Morrison, *Cell*, **138**, 822 (2009).
4. P. Cahan and G. Q. Daley, *Nat Rev Mol Cell Bio*, **14**, 357 (2013).
5. H. Clevers, *Nature medicine*, **17**, 313 (2011).
6. S. J. Altschuler and L. F. Wu, *Cell*, **141**, 559 (2010).
7. D. Di Carlo, H. T. K. Tse, and D. R. Gossett, *Springer*, 1 (2012).
8. A. Ulloa-Aguirre and P. M. Conn, *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, Elsevier (2014).
9. D. G. Spiller, C. D. Wood, D. A. Rand and M. R. H. White, *Nature*, **465**, 736 (2010).
10. L. Vermeulen, M. Todaro, F. D. Mello, M. R. Sprick, K. Kemper, M. P. Alea, D. J. Richel, G. Stassi, and J. P. Medema, *P Natl Acad Sci USA*, **105**, 13427 (2008).



11. H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry* (2005).
12. K. G. Leong, B. E. Wang, L. Johnson, and W. Q. Gao, *Nature*, **456**, 804 (2008).
13. E. Shapiro, T. Biezuner, and S. Linnarsson, *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 618 (2013).
14. J. R. Rettig and A. Folch, *Analytical Chemistry*, **77**, 5628 (2005).
15. H. B. Yin and D. Marshall, *Curr. Opin. Biotech.*, **23**, 110 (2012).
16. C. H. Lin, D. C. Lee, H. C. Chang, I. M. Chiu, and C. H. Hsu, *Analytical Chemistry*, **85**, 11920 (2013).
17. J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolf, K. J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, *Chem Biol*, **15**, 875 (2008).
18. L. S. Jang, P. H. Huang, and K. C. Lan, *Biosens Bioelectron*, **24**, 3637 (2009).
19. R. S. Thomas, H. Morgan, and N. G. Green, *Lab Chip*, **9**, 1534 (2009).
20. D. Di Carlo, L. Y. Wu, and L. P. Lee, *Lab Chip*, **6**, 1445 (2006).
21. H. Y. Chen, J. Sun, E. Wolvetang, and J. Cooper-White, *Lab Chip*, **15**, 1072 (2015).
22. A. Revzin, R. G. Tompkins, and M. Toner, *Langmuir*, **19**, 9855 (2003).
23. S. Lindstrom, M. Eriksson, T. Vazin, J. Sandberg, J. Lundeberg, J. Frisen, and H. Andersson-Svahn, *PLoS one*, **4**, 6997 (2009).
24. V. Lecault, M. VanInsberghe, S. Sekulovic, D. J. H. F. Knapp, S. Wohrer, W. Bowden, F. Viel, T. McLaughlin, A. Jarandehi, M. Miller, D. Falconnet, A. K. White, D. G. Kent, M. R. Copley, F. Taghipour, C. J. Eaves, R. K. Humphries, J. M. Piret, and C. L. Hansen, *Nat Methods*, **8**, 581 (2011).
25. J. Y. Park, M. Morgan, A. N. Sachs, J. Samorezov, R. Teller, Y. Shen, K. J. Pienta and S. Takayama, *Microfluid Nanofluid*, **8**, 263 (2010).
26. D. B. Wolfe, D. Qin, and G. M. Whitesides, *Methods Mol Biol*, **583**, 81 (2010).
27. S. Tracy, T. Mukohara, M. Hansen, M. Meyerson, B. E. Johnson, and P. A. Janne, *Cancer Res*, **64**, 7241 (2004).
28. C. H. Hsu, C. C. Chen, and A. Folch, *Lab Chip*, **4**, 420 (2004).
29. S. Lindstrom and H. Andersson-Svahn, *Bba-Gen Subjects*, **1810**, 308 (2011).
30. L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and J. A. Heyman, *Nat Protoc*, **8**, 870 (2013).
31. T. A. Nguyen, T. I. Yin, D. Reyes, and G. A. Urban, *Analytical Chemistry*, **85**, 11068 (2013).
32. A. Revzin, K. Sekine, A. Sin, R. G. Tompkins, and M. Toner, *Lab Chip*, **5**, 30 (2005).
33. P. C. Chen, Y. Y. Huang, and J. L. Juang, *Lab Chip*, **11**, 3619 (2011).
34. C. H. Lin, Y. H. Hsiao, H. C. Chang, C. F. Yeh, C. K. He, E. M. Salm, C. Chen, I. M. Chiu, and C. H. Hsu, *Lab Chip*, **15**, 2928 (2015).
35. W. V. Potters, H. A. Marquering, E. VanBavel, and A. J.

- Nederveen, *Current Cardiovascular Imaging Reports*, **7**, 1 (2014).
36. T. Tanaka, S. Tohyama, M. Murata, F. Nomura, T. Kaneko, H. Chen, F. Hattori, T. Egashira, T. Seki, Y. Ohno, U. Koshimizu, S. Yuasa, S. Ogawa, S. Yamanaka, K. Yasuda and K. Fukuda, *Biochem Bioph Res Co*, **385**, 497 (2009).
37. P. Liang, F. Lan, A. S. Lee, T. Y. Gong, V. Sanchez-Freire, Y. M. Wang, S. Diecke, K. Sallam, J. W. Knowles, P. J. Wang, P. K. Nguyen, D. M. Bers, R. C. Robbins and J. C. Wu, *Circulation*, **127**, 1677 (2013).
38. V. Tirino, V. Desiderio, F. Paino, A. De Rosa, F. Papaccio, M. La Noce, L. Laino, F. De Francesco and G. Papaccio, *Faseb J*, **27**, 13 (2013).
39. M. Cordey, M. Limacher, S. Kobel, V. Taylor, and M. P. Lutolf, *Stem Cells*, **26**, 2586 (2008).



林璟暉先生為國立中興大學組織工程與再生醫學博士，現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所博士後研究員。

Dr. Ching-Hui Lin received his Ph.D. in tissue engineering and regenerative medicine from National Chung Hsing University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes.



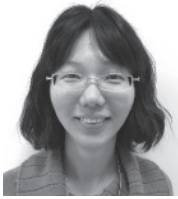
莊堵安先生現為國立清華大學化學系博士班學生。

Duane S. Juang is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



張浩禎小姐現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所與國立中興大學組織工程與再生醫學學程博士班學生。

Hao-Chen Chang is currently a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and Ph.D. program in Tissue Engineering and Regenerative Medicine at National Chung Hsing University.



葉鵬鳳小姐現為國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所研究助理。

Chuan-Feng Yeh is currently a research assistant in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at

National Health Research Institutes.



邱英明先生為美國佛羅里達大學生物化學博士，現任國家衛生研究院細胞與系統醫學研究所特聘研究員與國立中興大學生命科學系教授。

Dr. Ing-Ming Chiu received his Ph.D. in biochemistry from Florida State University, USA. He is currently a distinguished investigator in the Institute of Cellular and System Medicine at National Health Research Institutes and a professor in the Department of Life Sciences at National Chung Hsing University.



許佳賢先生為美國華盛頓大學機械工程博士，現任國家衛生研究院生醫工程與奈米醫學研究所助研究員與國立清華大學奈米工程與微系統研究所助理教授。

Dr. Chia-Hsien Hsu received his Ph.D. in mechanical engineering from University of Washington, USA. He is currently an assistant investigator in the Institute of Biomedical Engineering and Nanomedicine at National Health Research Institutes and an assistant professor in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.