



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I640624 B

(45) 公告日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 11 日

(21) 申請案號：103129843

(22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 29 日

(51) Int. Cl. : C12M1/14 (2006.01)

G01N1/36 (2006.01)

G02B21/34 (2006.01)

(71) 申請人：國立清華大學 (中華民國) NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY (TW)

新竹市光復路 2 段 101 號

(72) 發明人：曾繁根 TSENG, FAN GANG (TW)；張睿珈 CHANG, JUI CHIA (TW)；陳宗儒

CHEN, TSUNG JU (TW)

(74) 代理人：吳冠賜；蘇建太

(56) 參考文獻：

TW 201406953A

CN 103339249A

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：5 共 17 頁

(54) 名稱

細胞觀測裝置及使用其之細胞收集方法

APPARATUS FOR CELL OBSERVATION AND METHOD FOR CELL COLLECTION BY USING THE SAME

(57) 摘要

本發明係有關於一種用於細胞觀測之裝置及使用其之細胞收集方法。該用於細胞觀測之裝置，包括：一第一玻片，具有一開口；以及一第二玻片，其一表面上具有一光阻單元，該光阻單元具有一個以上之缺口並定義出一空間，該空間係與該缺口互相連通並對應該第一玻片之該開口。

An apparatus for cell observation and a method for cell collection by using the same are disclosed. The apparatus for cell selection comprises a first conductive glass having an opening; and a second conductive glass having a photo-resist unit disposed on a surface thereof, wherein the photo-resist unit comprises at least one aperture and defines a space, the space is connected to the aperture and is corresponded to the opening of the first conductive glass.

指定代表圖：

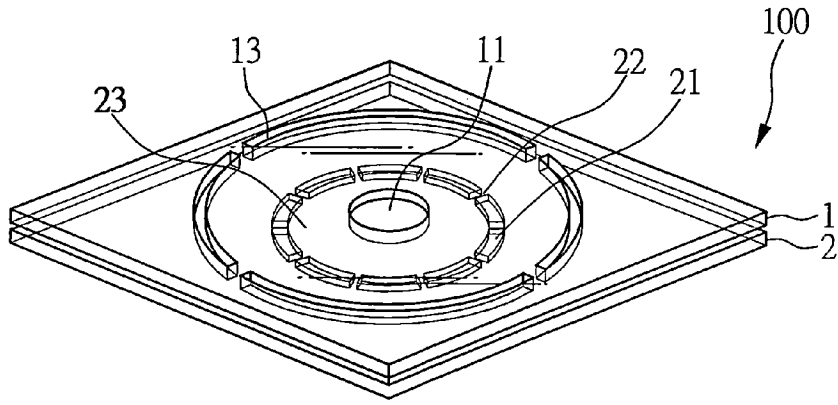


圖3

符號簡單說明：

100 . . . 用於細胞觀測之裝置

1 . . . 第一玻片

11 . . . 開口

13 . . . 外圍穿孔

2 . . . 第二玻片

21 . . . 光阻單元

22 . . . 缺口

23 . . . 空間

發明專利說明書

【發明名稱】(中文/英文)

細胞觀測裝置及使用其之細胞收集方法 / Apparatus for cell observation and method for cell collection by using the same

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種細胞觀測裝置及使用其之細胞收集方法，尤指一種能夠簡單、快速且精準觀測細胞之裝置及使用其之細胞收集方法。

【先前技術】

【0002】 流式細胞儀為目前醫學上最普遍使用的細胞檢測儀器。流式細胞儀內的流體系統係利用層流或是渦流產生，使細胞序列式的進行流動；再利用光的散射以及標記在細胞上的螢光信號，可以對流經光學感應器的細胞進行種類、數量等各項參數進行分析。此外，可以選擇性的對流過的細胞加上電荷，通過電磁場的作用後偏轉，自不同的出口流出，達到細胞分選的目的。然而，流式細胞儀非常昂貴，並且複雜、龐大又需要有專業人員的長時間監督、操作儀器以及數據的分析，使其普遍性受到限制。

【0003】 因此，近年來微機電領域有許多應用微流體系統的相關研究，希望能發展出微小、快速、便宜、容易使用的細胞篩檢晶片。

【0004】 在目前已知的研究中，例如在微流道上做出了

無數微柱陣列，並在上面修飾 EpCAM 抗體利用抗體抗原間的專一性鍵結，達到循環腫瘤細胞(Circulating Tumor Cells, CTC)篩檢的目的；然而此方法無法將樣品內 CTC 全數捕捉，並且在晶片製作時便需要修飾抗體，使其對不同種類的各式細胞通用性降低。又例如結合介電泳及場流分離法(dielectrophoretic field-flow fractionation)，配合特殊的電解液將電中性的細胞極化往電場強度高或低的方向移動；此方法的缺點在於特殊的電解液會對細胞造成傷害，且以細胞大小作為依據的分選方法容易導致錯誤分離。再例如先在磁球上修飾抗體，並以磁場固定磁球再使待測樣品緩慢流過進而蒐集細胞；然而，為了得到高分離效率，需要將流速控制得很低(每秒只能通過約數十至數百顆細胞)，在實際應用上極為耗時而不實際。

【0005】 有鑑於此，目前仍缺乏一種體積小、成本低、使用簡易、細胞損失性低、及具有高通用性之細胞觀測分選裝置，其可從樣品中精準觀測細胞，並可達到使用該些細胞進行後續培養及實驗之目的。

【發明內容】

【0006】 本發明之主要目的係在提供一種細胞觀測裝置，俾能以低成本、容易操作之裝置觀測所需細胞是否存在於樣品中。

【0007】 本發明之另一目的係在提供一種細胞收集方法，俾能快速培養含所需細胞之樣品，減少對細胞之傷害進而利於應用至後續研究。

【0008】 為達成上述目的，本發明係提供一種細胞觀測裝置，包括：一第一玻片，具有一開口；一第二玻片，其一表面上具有一光阻單元，該光阻單元具有一個以上之缺口並定義出一空間，該空間係與該缺口互相連通並對應該第一玻片之該開口；以及一外圍穿孔，該外圍穿孔係位於該光阻單元外側。

【0009】 此外，本發明亦提供一種細胞收集方法，包括：提供一如上述之細胞觀測裝置；取一樣品，由該第一玻片上之該開口，將該樣品引入至該第二玻片之該光阻單元所定義出之該空間；由該外圍穿孔 13 加入一吸水材料；提供一光學系統，對該樣品中之一選定區域進行觀測；以及將該細胞觀測裝置置入一培養箱。

【0010】 在本發明之裝置及方法中，該第一玻片與該第二玻片可分別使用任何習知透明度高且具高度相容性的生醫材料，但該第二玻片較佳為導電玻璃材料，例如氧化銦錫(ITO)導電玻片。此外，在設置該第一玻片與該第二玻片時，較佳為平行設置，但本技術領域之人可依實際需求來變化，例如特定角度之傾斜設置等。並且，該第一玻片與該第二玻片的形狀和尺寸亦無特別限制，若考量成本或其他因素，亦可設計為不同形狀和尺寸；較佳的情況下，該第一玻片與該第二玻片具有相同的形狀和尺寸。該第一玻片的厚度較佳介於 0.5 至 2 mm，更佳介於 1 至 2 mm；該第二玻片的厚度較佳介於 0.5 至 2 mm，更佳介於 0.5 至 1 mm。若該些玻片太薄，則機械強度可能不足；若該些玻片太厚，

則不利於光學系統觀測。

【0011】 在本發明之裝置及方法中，該第一玻片與該第二玻片較佳以該光阻單元與彼此分隔，該光阻單元之高度(即該缺口之高度)不限，可根據欲分離之樣品，例如細胞種類而定。詳述之，該光阻單元之高度可以小於欲分離細胞之直徑，限制細胞移動使其不隨液體流出而損失，例如當細胞直徑為 10 至 20 μm 時，光阻單元之高度可為 2 至 10 μm 、5 至 10 μm 、或 8 至 10 μm 。或者，該樣品不一定包含生物細胞，亦可包含非生物細胞的其他微米粒子；本技術領域之人可視需要而自行調整光阻單元之高度。

【0012】 再者，考慮該光阻單元之寬度(即缺口之長度)而言，基本上並無特別限制，但可依配合使用的顯微鏡倍率、或缺口數目而加以調整。而該缺口之寬度亦不限，較佳為 2 至 4 mm；若該缺口之寬度超過 4 mm，樣品中之細胞可能會有溢出之風險。

【0013】 此外，該光阻單元之形狀亦無特殊限制，較佳為無內角之形狀，例如圓環形、橢圓環形等；當該光阻單元之形狀為具內角之形狀，例如正方環形、長方環形、多方環形等，在環形內角處之缺口數量較佳多於環形之其他部分，其係由於樣品可能會積聚在環形內角處而不易形成單一細胞陣列，即使傾斜裝置而盡量避免樣品堆積，仍可能因細胞已沾黏於光阻單元環形內角處內壁上而無法清楚觀察。並且，該光阻單元具有之缺口數目不限，較佳為偶數個；且在該光阻單元上為對稱設置，減少樣品因受力不

均所造成之物理性影響，例如移動速率太快等。

【0014】 在本發明之裝置及方法中，該第一玻片包括一外圍穿孔，該外圍穿孔係位於該光阻單元外側並與該光阻單元相距 5 至 10 mm，較佳約與該第一玻片上之開口直徑相同；該外圍穿孔的寬度為 1 至 5 mm，用以添加任何已知之粉狀、液狀吸水材料，從光阻單元之缺口增加對樣品之側向拉力，使樣品能更快速地形成單一細胞陣列。此外，該外圍穿孔之形狀亦無特殊限制，較佳為與該光阻單元形狀相同。例如，當該光阻單元為圓環形，該外圍穿孔亦為圓環形，唯該外圍穿孔之圓環形直徑大於該光阻單元之圓環形直徑。

【0015】 在本發明之裝置及方法中，該光阻單元可由任何習知光阻材料製成，例如市面上常見的正型光阻或負型光阻；材料之選擇可配合製程因素、或因材料對樣品造成之影響而定。

【0016】 在本發明之裝置及方法中，該第一玻片上之開口形狀、尺寸不限，僅需利於將樣品引入該裝置中，例如以一般操作下之液珠尺寸為考量，該開口可為直徑 3 至 10 mm、較佳為 4 至 8 mm 之圓形開口。在本發明之方法中，該樣品較佳為具有流動性之液體或膠體。

【0017】 在本發明之方法中，當滴加該樣品後，僅透過重力及流體作用力原理使該樣品進入由該光阻單元定義之空間中時，透過由外圍穿孔加入之吸水材料對樣品施加側向拉力，使樣品中細胞呈現出單層高密度單一細胞陣列之

分布情形，可達到最緊密排列而節省樣品佔據空間；配合光學系統(例如顯微鏡)進行觀察，可輕易判斷所需細胞，再將整個細胞觀測裝置置入培養箱中進行培養；或者，該樣品亦可視需求經過一標定前處理，例如螢光性標定處理，利用抗原-抗體間之專一性標定樣品中之細胞，而利於在光學系統中觀察細胞。相較於一般常用的化學修飾、修飾磁珠以磁場固定、用 DEP 的方式以電場固定或是用結構侷限的方式形成陣列等方式，該些方式都具有操作或是製程繁瑣的缺點，或需要額外的周邊設備，並且都會造成大量的細胞損失；而本發明之方法確實能夠解決上述問題，並可廣泛應用至多種領域。

【0018】 本發明之裝置可以配合常用的抗體抗原反應、生化檢驗方式或是光學系統輕易達到大量單細胞生理反應觀測，達到藥物測試、細胞毒性檢驗、細胞間交互作用觀測，或是達到大量細胞內的極微量細胞篩選的目的。或者，在組織工程方面，人工角膜需要單層的角膜內皮細胞，藉由此裝置設計的單層細胞陣列，可在體外培養角膜內皮組織，而後藉由移植手術恢復角膜的透明性。除了生醫領域之外，亦可應用於形成奈微米珠的緊密陣列，進一步應用於具規律性的奈微米陣列結構，因此也可製作特殊的平面結構材料應用於光、電、磁領域上。

【圖式簡單說明】

【0019】

圖 1 係本發明一較佳實施例之第一玻片。

圖 2 係本發明一較佳實施例之第二玻片。

圖 3 係本發明一較佳實施例之用於細胞觀測之裝置。

圖 4A 至 4C 係本發明一較佳實施例之第二玻片上之光阻單元之製造流程圖。

圖 4D 係圖 4C 之之第二玻片之俯視圖。

圖 5 係本發明一較佳實施例之將樣品引入至用於細胞觀測裝置之示意圖。

【實施方式】

【0020】 請參照圖 1，圖 1 為本發明裝置之第一玻片 1 之示意圖，其為一長寬皆為 2.5 cm、厚度為約 1 至 2 mm 之壓克力薄片，利用物理方法如鑽孔、雷射切割等方式，於該壓克力薄片形成貫穿之開口 11 及外圍穿孔 13，開口 11 之直徑為約 3 至 10 mm，外圍穿孔 13 的寬度為 2 至 4 mm 並距離該開口 5 至 8 mm，並可在第一玻片 1 上修飾四氫全氟辛烷基三氯矽烷 (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl)trichlorosilane(FOTS)，用以避免滴入的樣品溢出或是沾附，避免樣品損失。在本實施例中，外圍穿孔 13 設計為四個弧狀穿孔，其組合成一圓形外圍穿孔。

【0021】 請參照圖 2，圖 2 為本發明裝置之第二玻片 2 之示意圖，其為一長寬皆為 2.5 cm、厚度為約 0.5 至 1 mm 之氧化銻錫(ITO)導電玻片，該玻片上具有高度約 2 至 10 μm 之圓環形之光阻單元 21，其係由負型光阻 SU-8 所製成，光阻單元 21 具有 4 個寬度約 2 mm 之缺口 22 並定義出一空間

23，該空間 23 係與該缺口 22 互相連通。

【0022】 再請參照圖 3，其係將圖 1 之第一玻片 1 設置於圖 2 之第二玻片 2 上方，該第一玻片 1 與該第二玻片 2 係為平行設置並以該光阻單元 21 與彼此分隔，且該空間 23 係對應該第一玻片 1 之該開口 11，藉此，形成本發明之用於細胞觀測之裝置 100；其中光阻單元 21 和外圍穿孔 13 的形狀皆為圓形。組裝第一玻片 1 和第二玻片 2 時，可使用任何習知工具輔助固定第一玻片 1 和第二玻片 2，減少第一玻片 1 和第二玻片 2 滑動錯位，例如可使用至少一夾具夾住第一玻片 1 和第二玻片 2 之邊緣，但本發明並未受限於此。

【0023】 詳細說明，圖 2 之第二玻片 2 之製備過程係如圖 4A 至 4C 所示，取一氧化銻錫(ITO)導電玻片，將負型光阻 SU-8 均勻塗覆在玻片 2 上方形成塗層 21'，以習知技術之黃光微影製程進行曝光、顯影後，形成光阻單元 21，其上視圖如圖 4D 所示，位於該第二玻片 2 上之該光阻單元 21 具有 4 個缺口 22 並定義出空間 23。

【0024】 請參照圖 5，其係將樣品引入圖 3 之本發明裝置之示意圖。在本實施例中，由於樣品 3 中包含細胞 31,32，故在組裝第一玻片 1 和第二玻片 2 時(如圖 3 所示)，可先在第二玻片 2 之光阻單元定義空間 23 內滴加適量的緩衝溶液(例如磷酸緩衝液(PBS))再將第一玻片 1 覆蓋於其上，以利細胞存活。接著，取一樣品 3，其為液態且內含未標誌之細胞 31 和標誌細胞 32，由該第一玻片 1 上之該開口 11 滴加

該樣品 3，經重力向下作用(向下箭頭方向)，將該樣品 3 引入至該第二玻片 2 之該光阻單元所定義出之該空間 23，然後透過側向的流體作用力(側向箭頭方向)，再由該外圍穿孔 13 加入吸水材料(如粉狀聚苯烯酸(PAA))，增加側向拉力，使樣品 3 中的細胞可以快速地形成單層高密度單一細胞陣列(從滴加該樣品至形成單一細胞陣列僅需平放靜置約 5~10 分鐘)；然後，利用顯微鏡由該開口 11 觀察該樣品 3 中之標誌細胞 32，接著將整個細胞觀測裝置置入培養箱中，後續即可使用該些細胞進行實驗。

【0025】 因此，與習知技術-流式細胞儀或細胞篩檢晶片相比，本案之用於細胞觀測之裝置及方法成本低、體積小、操作簡易、損失少，也具有高通用性，可同時進行多種細胞的觀測，利於進行細胞篩檢；且幾乎可捕抓樣品中所有的目標細胞，故更佳適用於僅具有少量目標細胞之樣品。並且，利用本案裝置之方法進行觀測之時間少，亦沒有直接對細胞加高壓、加油、加電解液等，減少對細胞之傷害，因此可精準觀測細胞，並且該些細胞經過培養後，可順利進行後續實驗，而不會有因分離之細胞死亡之情形。

【0026】 綜上所述，本案裝置適於進行大量單顆活體細胞的細胞反應觀測，可應用於藥物測試、細胞毒性、基本細胞生理等各方面的研究，對於現今生醫研究具有很大的意義。

【0027】 上述實施例僅係為了方便說明而舉例而已，本

發明所主張之權利範圍自應以申請專利範圍所述為準，而非僅限於上述實施例。

【符號說明】

【0028】

100 用於細胞觀測之裝置	1 第一玻片
11 開口	13 外圍穿孔
2 第二玻片	21 光阻單元
21' 塗層	22 缺口
23 空間	3 樣品
31 未標誌之細胞	32 標誌細胞
4 吸水材料	

I640624

發明摘要

※ 申請案號：103129843

C12M 1/42

※ 申請日：103.8.29

※IPC 分類：G01N 1/363

G02B 21/34

【發明名稱】(中文/英文)

細胞觀測裝置及使用其之細胞收集方法/ Apparatus for cell observation and method for cell collection by using the same

【中文】

本發明係有關於一種用於細胞觀測之裝置及使用其之細胞收集方法。該用於細胞觀測之裝置，包括：一第一玻片，具有一開口；以及一第二玻片，其一表面上具有一光阻單元，該光阻單元具有一個以上之缺口並定義出一空間，該空間係與該缺口互相連通並對應該第一玻片之該開口。

【英文】

An apparatus for cell observation and a method for cell collection by using the same are disclosed. The apparatus for cell selection comprises a first conductive glass having an opening; and a second conductive glass having a photo-resist unit disposed on a surface thereof, wherein the photo-resist unit comprises at least one aperture and defines a space, the space is connected to the aperture and is corresponded to the opening of the first conductive glass.

申請專利範圍

1. 一種細胞觀測裝置，包括：

一第一玻片，具有一開口；

一第二玻片，其一表面上具有一光阻單元，該光阻單元具有一個以上之缺口並定義出一空間，該空間係與該缺口互相連通並對應該第一玻片之該開口；

一外圍穿孔，該外圍穿孔係位於該光阻單元外側，該外圍穿孔之形狀係與該光阻單元形狀相同；以及

一吸水材料，設置於該外圍穿孔中，

其中，該第一玻片與該第二玻片係以該光阻單元與彼此分隔。

2. 如申請專利範圍第1項所述之裝置，其中，該外圍穿孔與該光阻單元相距5至10 mm。

3. 如申請專利範圍第1項所述之裝置，其中，該外圍穿孔之寬度為1至5 mm。

4. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該第二玻片係為一氧化銦錫(ITO)導電玻片。

5. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該第二玻片的厚度係0.5至2 mm。

6. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該第一玻片與該第二玻片係為平行設置。

7. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該光阻單元係由一負型光阻所製成。

8. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該光阻單元係一環形光阻單元。

9. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該光阻單元之高度係2至10 μm 。

10. 如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置，其中，該缺口之寬度係2至4 mm。

11. 一種細胞收集方法，包括：

提供一如申請專利範圍第1項所述之細胞觀測裝置；

取一樣品，由該第一玻片上之該開口，將該樣品引入至該第二玻片之該光阻單元所定義出之該空間；

由該外圍穿孔加入該吸水材料；

提供一光學系統，對該樣品中之一選定區域進行觀測；

以及

將該細胞觀測裝置置入一培養箱。

103年9月19日 修正 本

圖式

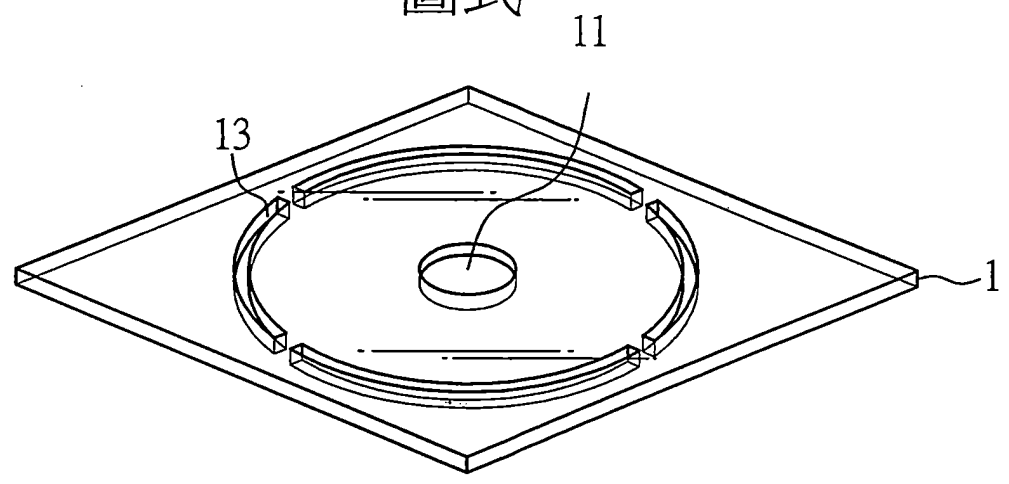


圖1

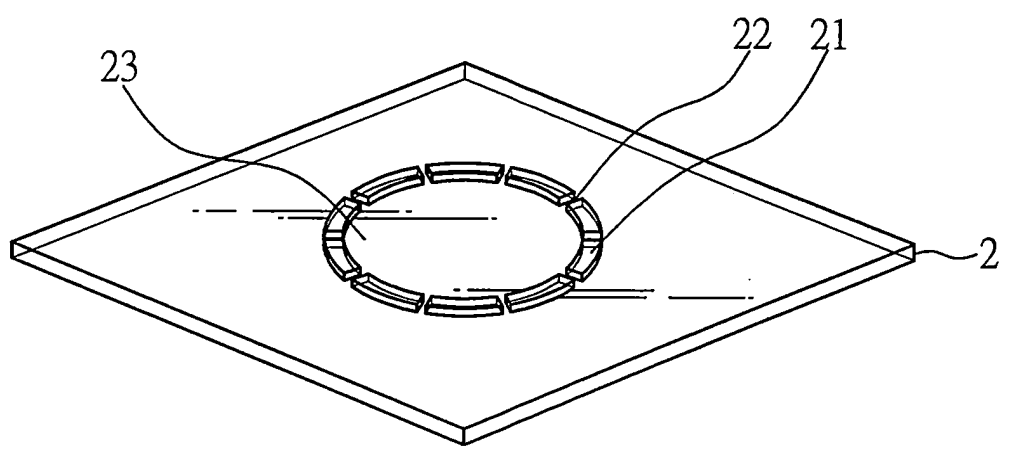


圖2

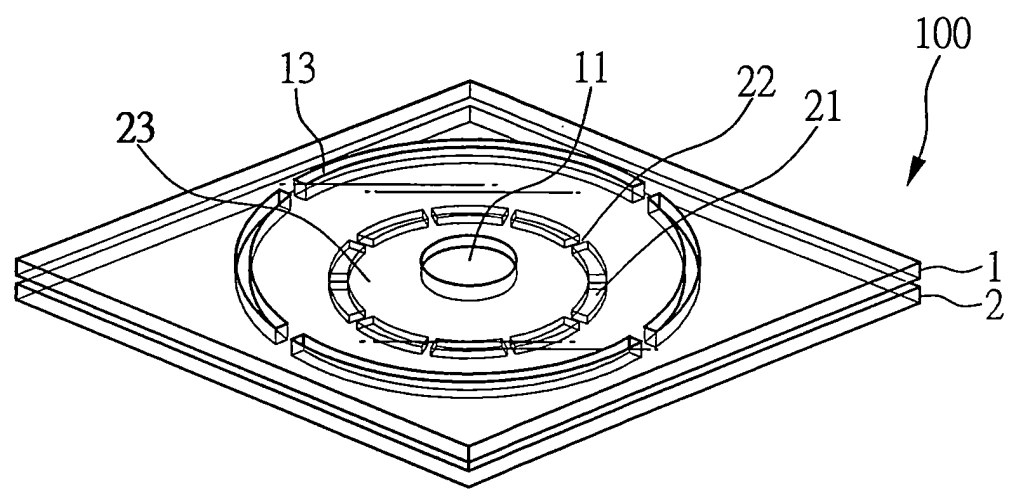


圖3



圖4A

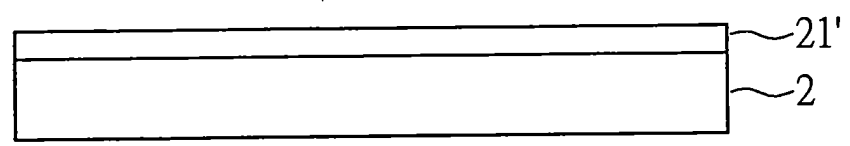


圖4B

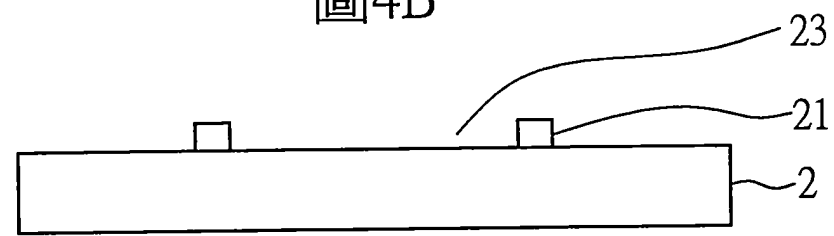


圖4C

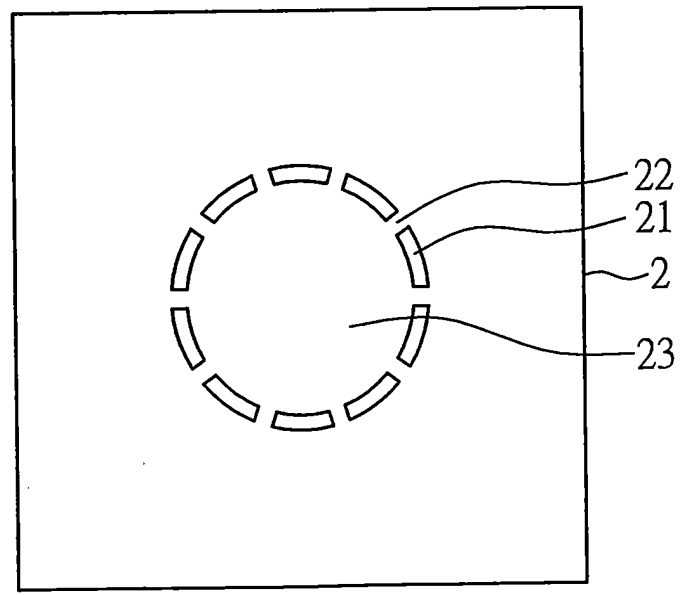


圖4D

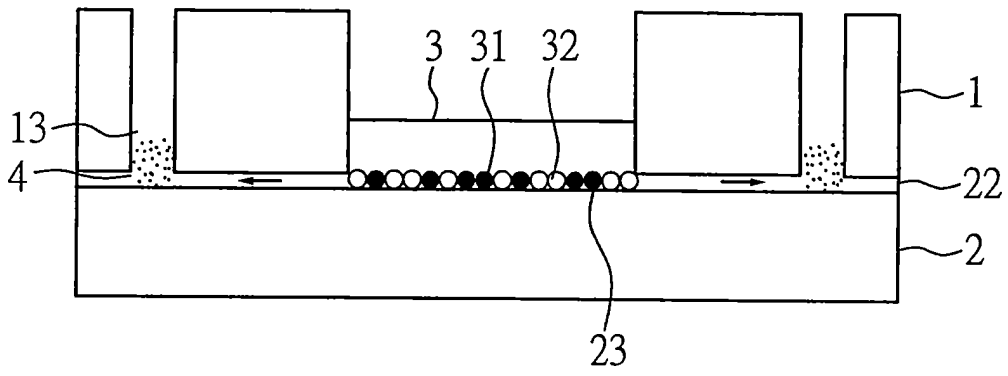
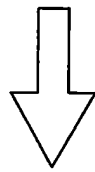
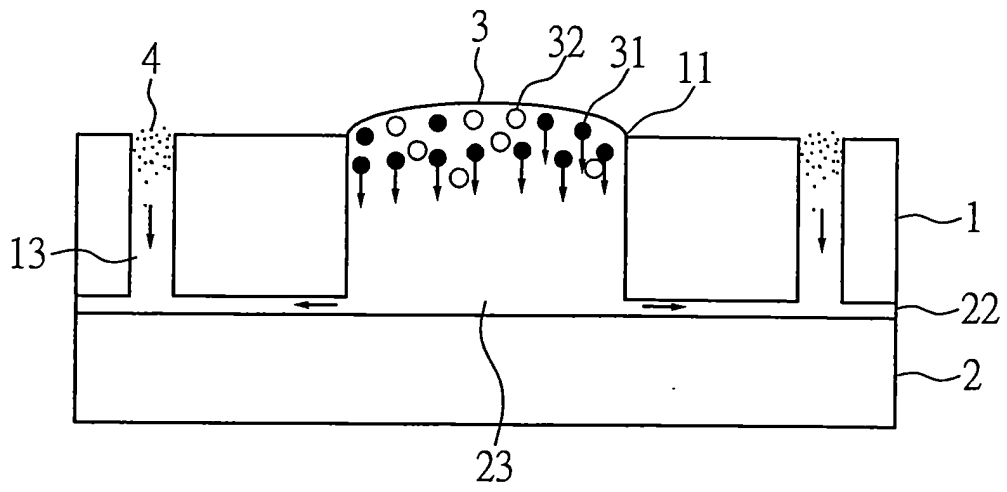


圖5

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖（ 3 ）。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- | | |
|---------------|---------|
| 100 用於細胞觀測之裝置 | 1 第一玻片 |
| 11 開口 | 13 外圍穿孔 |
| 2 第二玻片 | 21 光阻單元 |
| 22 缺口 | 23 空間 |

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無