



(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 I588256 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：104138472

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 20 日

(51)Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01)

C12N5/02 (2006.01)

(71)申請人：財團法人國家衛生研究院(中華民國) NATIONAL HEALTH RESEARCH INSTITUTES (TW)

苗栗縣竹南鎮科研路 35 號

(72)發明人：許佳賢 HSU, CHIA HSIEN (TW)；林璟暉 LIN, CHING HUI (TW)；莊 堆安 JUANG, DUANE S. (US)；張浩禎 CHANG, HAO CHEN (TW)；邱英明 (TW)

(74)代理人：蔡坤旺

(56)參考文獻：

CN 103732731A US 2009/0093374A1

US 2013/0078163A1 US 2013/0337500A1

邱英明，“院務紀事/人才培育：慶祝本院與國立中興大學共同合作之「組織工程與再生醫學博士學位學程」首屆博士生畢業”，國家衛生研究院電子報，第 608 期，2015/06/18。

Chen H et al, "High-throughput, deterministic single cell trapping and long-term clonal cell culture in microfluidic devices.", Lab Chip. 2015 Feb 21;15(4):1072-83.

Kobel S et al, "Optimization of microfluidic single cell trapping for long-term on-chip culture.", Lab Chip. 2010, 10, 857-863.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：6 共 30 頁

(54)名稱

單細胞擷取與培養之裝置與方法

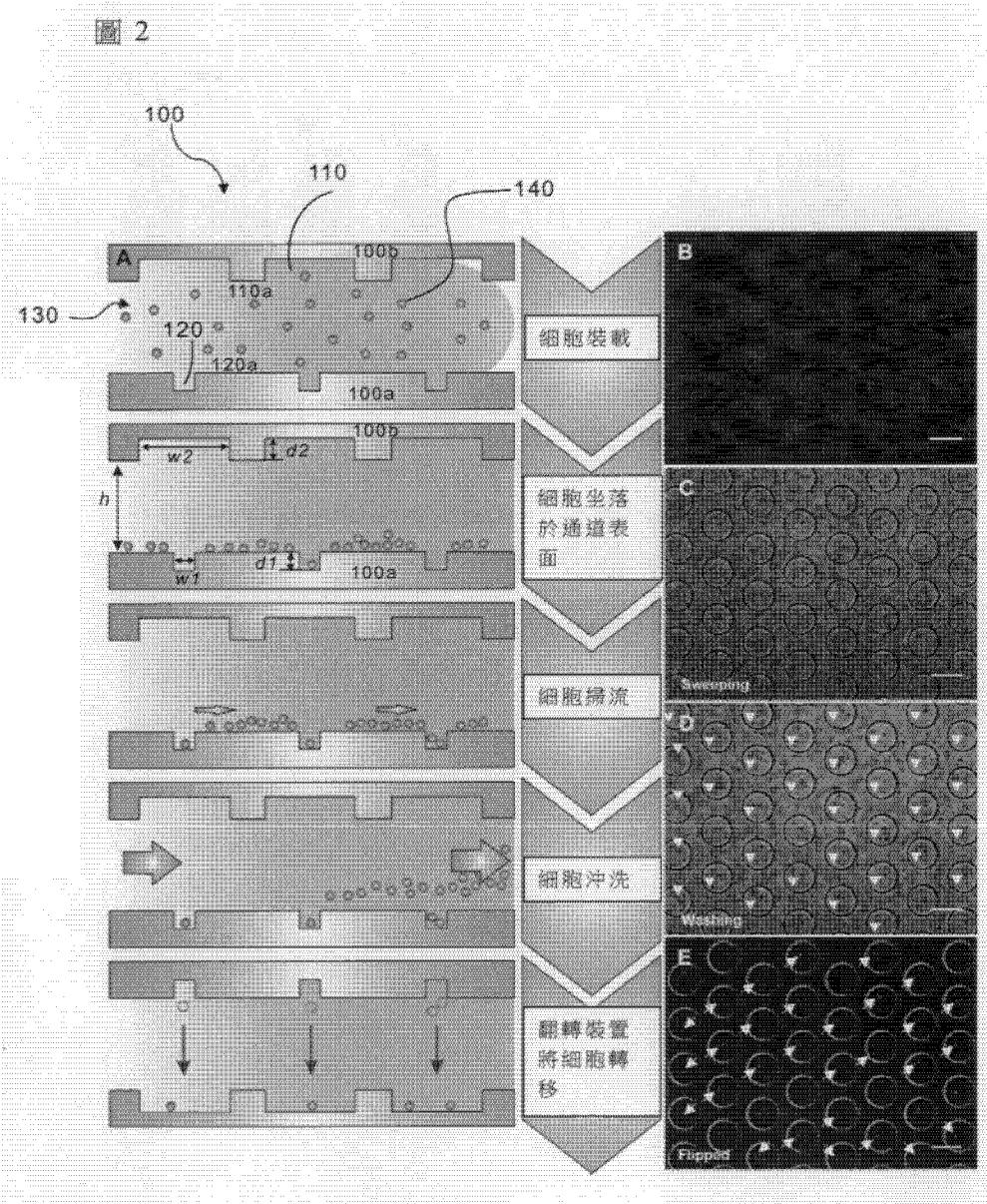
DEVICE AND METHOD FOR SINGLE CELL ISOLATION AND CULTIVATION

(57)摘要

本發明係關於一種用於單細胞擷取與培養之雙微井微流裝置。本發明之裝置係包括一組用以捕捉單細胞之擷取微井；及一組用以於細胞培養期間使細胞擴散與細胞生長之培養微井。

The present invention relates to a dual-well (DW) microfluidic device for single-cell isolation and culture application. The device of present invention comprises a set of capture microwells to trap singles cells; and a set of culture microwells to spread the cells and grow during cell culture.

指定代表圖：



## 符號簡單說明：

- 100 . . . 雙微井裝置
- 100a . . . 第一實體
- 100b . . . 第二實體
- 110 . . . 培養微井
- 120a . . . 擷取微井
- 形成表面
- 120 . . . 擷取微井
- 130 . . . 微流道
- 140 . . . 細胞
- w1 . . . 擷取微井直徑
- w2 . . . 培養微井直徑
- d1 . . . 擷取微井深度
- d2 . . . 培養微井深度
- h . . . 微流道高度

# 發明摘要

※ 申請案號：104138472

※ 申請日：104.11.20

※ I P C 分類：  
C12M ¾ (2006.01)  
C12N ¾ (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

單細胞擷取與培養之裝置與方法 / Device and method for single cell isolation and cultivation

### 【中文】

本發明係關於一種用於單細胞擷取與培養之雙微井微流裝置。本發明之裝置係包括一組用以捕捉單細胞之擷取微井；及一組用以於細胞培養期間使細胞擴散與細胞生長之培養微井。

### 【英文】

The present invention relates to a dual-well (DW) microfluidic device for single-cell isolation and culture application. The device of present invention comprises a set of capture microwells to trap singles cells; and a set of culture microwells to spread the cells and grow during cell culture.

### 【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

100 雙微井裝置

100a 第一實體

100b 第二實體

110 培養微井

120a 撷取微井形成表面

120 撷取微井

130 微流道

140 細胞

$w1$  撷取微井直徑

$w2$  培養微井直徑

$d1$  撷取微井深度

$d2$  培養微井深度

$h$  微流道高度

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

單細胞擷取與培養之裝置與方法 / Device and method for single cell isolation and cultivation

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用於單細胞擷取與培養之雙微井(DW)微流裝置。本發明之裝置包括一組用於捕捉單細胞之擷取微井；一組用於細胞培養期間使細胞擴散並生長之培養微井；及一連接於二組微井之間之微流道。

## 【先前技術】

【0002】 相較於從細胞群體測量平均結果，分析各個細胞在技術上更具有挑戰性(D. G. Spiller, et al., *Nature*, 2010, **465**, 736-745)。此等課題通常係以限數稀釋法或螢光活化細胞分選技術(FACS)進行。限數稀釋法係基於將稀釋細胞懸浮液放置於培養井中(例如：塑膠孔盤)以獲得一顆細胞於一個井內，以及該技術被廣泛用於如腫瘤幹/起始細胞群落形成之單一細胞測定(L. Vermeulen, et al., P Natl Acad Sci USA, 2008, 105, 13427-13432)。該方法雖然簡便，但根據泊松分佈(Poisson distribution)，單一細胞發生最高機率為37%，因此若沒有使用移液機器則生產量低(H. M. Shapiro, *Practical flow cytometry*, John Wiley & Sons, 2005)。

【0003】 FACS可以克服泊松分佈之限制，並提供了另一種替代方法，即藉由分選來有效獲得單一細胞，並將各個細胞置於孔

2016年8月6日修正替換頁

盤中(K. G. Leong, et al., *Nature*, 2008, 456, 804-808)。然而，FACS的高機械切應力會破壞細胞，並影響其後續使用(E. Shapiro, et al., *Nat Rev Genet*, 2013, 14, 618-630)。此外，由於其高機器採購及運營成本之因素，FACS在一般實驗室並不普遍。

**【0004】** 微型裝置已成為單細胞應用之有用工具(J. R. Rettig and A. Folch, *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 5628-5634)。這些小型設備亦可獲得高產量加工，並減少樣品與試劑之消耗(E. Shapiro, et al., *Nat Rev Genet*, 2013, 14, 618-630)。近來，微型裝置已被應用於使用不同材質捕獲單一細胞，應用於微液滴、介電泳、流體力學、選擇性除潤、機械技術及微井矩陣等(A. Revzin, et al., *Langmuir*, 2003, 19, 9855-9862)。基於細胞之應用需要培養單一細胞，微液滴方法代表一種有效獲得大量含有單一細胞之微液滴的方法。然而，由於難以更換微液滴內部之培養液，使其不適合用於在實驗期間需要更換培養液之應用。另外，由於細胞包封於微液滴內，細胞無法附著與增殖，因此並不適合貼附型細胞培養。

**【0005】** 於另一方面，由於其在器件上的製造與操作簡單，在微井內捕獲單一細胞係一種建立大量的單一細胞以利細胞貼覆以及懸浮細胞培養的較好方法，因其只需要實面與簡單操作(例如：利用流力或重力)，即可裝載在隔間內隨後進行培養與分析(S. Lindstrom, et al., *PLoS one*, 2009, 4, e6997; V. Lecault, et al., *Nat Methods*, 2011, 8, 581-593)。但是，為了提供細胞生長時具有充分的空間，微井之尺寸會比單一細胞之尺寸大許多(從直徑或內徑

90-650  $\mu\text{m}$ )，進而導致單一細胞捕獲率低(10-30%)(M. Charnley, et al., Integrative Biology, 2009, 1, 625-634)。

【0006】 單一細胞裝載率於培養微井之減少係由於柏松分布之固有限制，亦在限數稀釋法常見(J. C. Liu, et al., Cancer Res, 2007, 67, 8671-8681)。該限制可通過三角形微井而獲得改善，其能夠提供擴大的區域與細胞生長並同時保時良好的單一細胞裝載率(高達~58%)。然而，擴大區域(約單一細胞的~3.5-6倍)之微井並不足以使細胞生長超過2天(J. Y. Park, et al., Microfluid Nanofluid, 2010, 8, 263-268)。因此現今尚缺乏簡單而高產量的方法與裝置以進行單一細胞培養實驗。

【0007】 於本發明，係描述一種微型雙微井微流裝置，其可在培養微井內進行高效率單一細胞裝載。使用擷取微井以捕捉單一細胞，而後利用重力將捕獲之細胞翻轉至培養微井中，以提供細胞於培養時進行擴散與生長，藉以達到單細胞裝載之效率增加。

## ● 【發明內容】

【0008】 因此，在一方面，本發明係關於一種雙微井微流裝置，其包括一組用於捕捉單細胞之微井；一組用於細胞培養之微井；及一連接於該二組微井之間之微流道。

【0009】 於某一些實施例，該雙微井微流裝置，其係由一微流道與裝配於該微流道頂部及底部之二組微井陣列所組成，其中該二組微井設計為不同尺寸。該二組微井之尺寸係依包含細菌、酵母菌、融合瘤細胞、動物細胞或植物細胞等目標細胞之尺寸而

變化。

**【0010】** 於一實施例，該擷取微井的各微井之直徑為1~100  $\mu\text{m}$  以及其中該培養微井的各微井之直徑為10~2000  $\mu\text{m}$ 。於另一實施例，該擷取微井的各微井之容量為0.006 pL至1.96 nL以及其中該培養微井的各微井之容量為0.780 pL至6.28 nL。

**【0011】** 該微井可為任何形狀以適用於所述細胞類型之單細胞捕獲及培養形成細胞群落。較佳地，該各組微井於100 mm<sup>2</sup>之面積內包含20-500個微井。於本發明之一實施例，該各組微井於10.65 x 7.7 mm<sup>2</sup>之面積內包含470個微井。於本發明之一實施例，該各組微井於125 x 85 mm之面積內包含3383至 $1.3 \times 10^9$ 個微井。

**【0012】** 在另一方面，本發明係關係一種使用如請求項1所述之雙微井微流裝置用於單細胞分離之方法，包括以下步驟：注入細胞懸浮液於如請求項1所述之裝置的微流道中，而該組擷取微井係位於該微流道之底部且該組培養微井係位於該微流道之頂部；使用一注射器幫浦控制以慢速注入細胞培養液以滾動細胞；增加流速以清除未被捕獲之細胞；反轉並翻轉該DW裝置，以藉由重力作用將於擷取微井內之細胞轉移至培養微井。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0013】

圖1為雙微井裝置之照片以及SEM影像。圖1A為雙微井裝置之外觀。於本發明之雙微井裝置可以使用以任何類型之材料，包含如PDMS、PMMA、PC等塑膠材料而製成。圖1B為經由翻轉該裝

2016年8月5日修正替換

置將單細胞於擷取微井被轉移至培養微井。圖1C與圖1D為直徑 $25\text{ }\mu\text{m}$ 與深度 $30 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$ 擷取微井之SEM影像。圖1E與圖1F為直徑 $285\text{ }\mu\text{m}$ 與深度 $300 \pm 15\text{ }\mu\text{m}$ 培養微井之SEM影像。

圖2所示為DW裝置操作過程之示意圖。圖2A為DW裝置包括細胞裝載、掃流、沖洗以及移轉等操作步驟。圖2B為於掃流步驟之長曝光影像，顯示有89.87%之微流道區域被螢光標記的(Dil細胞膜染色)KT98細胞之軌跡所覆蓋。圖2C為擷取微井的細胞捕捉效率藉由慢速移動細胞而增加。圖2D為藉由沖洗以清除於微流道中沒有被捕獲之細胞。圖2E為藉由翻轉該裝置將擷取微井之細胞轉移至培養微井。比例尺： $300\text{ }\mu\text{m}$ 。

圖3A-D係使用擷取微井深度 $26$ 與 $30\text{ }\mu\text{m}$ 之DW裝置經不同操作方式後的KT98細胞捕獲及裝載效率。每個實驗為三重複。

圖4A-F為經翻轉裝置(使用擷取微井深度 $26$ 與 $30\text{ }\mu\text{m}$ )後，佔據培養微井之細胞與細胞數之代表圖。圖4A係包含所有470個培養微井之拼接影像(以 $600\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗)。比例尺： $1000\text{ }\mu\text{m}$ 。圖4B為拼接影像矩形區域之放大重疊影像顯示每個培養微井包含一顆單細胞。箭頭所指為單細胞於培養微井內。圖4C-F分別為使用 $200$ 、 $400$ 、 $600$ 與 $800\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之4種不同流速沖洗後之代表影像。試驗結果以沖洗流速 $400\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 所示具有較高頻率的2顆或大於3顆細胞佔據培養微井。圖4G-H所示為以4種沖洗流速沖洗後，細胞佔據培養微井之細胞數。以 $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井使用 $600$ 或 $800\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗之單一細胞比例較高，使用 $200\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗則最

低。在總培養微井中比例最高的一次實驗系以30  $\mu\text{m}$ 深度擷取微井使用200  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之沖洗流速而得。

圖5係以26  $\mu\text{m}$ 深度擷取微井與600  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之沖洗流速沖洗後而得KT98、A549及MDA-MB-435細胞之裝載效率。圖5A係經過掃流後，KT98及MDA-MB-435細胞之捕捉效率高於99%，而A549細胞則為90.21%。圖5B為經過600  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之沖洗流速沖洗後，KT98、A549及MDA-MB-435細胞於擷取微井之捕捉效率。圖5C係經過翻轉裝置後，3種細胞類型之細胞損失率低於2%。圖5D係表示KT98、A549及MDA-MB-435細胞於總培養微井中之單一細胞比例。圖5E係表示當擷取微井之深度增加至30  $\mu\text{m}$ ，A549細胞之單一細胞捕捉率從61.63%顯著增加至76.03%。各實驗為三重覆。

圖6A為A549單一細胞生長成細胞群落。圖6B係經過7天培養後，單一細胞並無增殖，但存活於控制組培養液中。圖6C係在含有EGF之培養液經7天培養後A549單一細胞生長成細胞群落，以及圖6D為未分裂的單一細胞存活。比例尺：100  $\mu\text{m}$ 。圖6E-F為經過7天培養後，表皮生長因子(EGF)促使A549單一細胞之群落形成。各實驗為三重覆。

## 【實施方式】

**【0014】** 本發明之及其他特徵及優點將於以下實施例作進一步圖示與說明。本文中所述實施例乃係用於說明，而並非用於本發明之限制。

**【0015】 實施例1 雙微井微流裝置之設計與製造**

● 【0016】 雙微井微流裝置係利用軟微影技術，使用聚二甲矽  
氧烷(PDMS)製成。簡而言之，負型光阻(SU-8, MicroChem, Newton,  
MA, USA)以光微影技術方式成型於矽晶片上用以產生母版。該  
SU-8特徵厚度係以掃描式雷射輪廓儀(VK-X100, KEYENCE,  
Japan)測量。而後以該母版作為模具，使用Sylgard 184 (Dow  
Corning, USA) PDMS前聚合物及其交聯劑以10：1比例混合後傾倒  
於模具上，並置於65°C一般烘箱中3小時進行固化。將經固化的  
PDMS複製品自模具上剝離。以內徑1.00 mm之打孔器用於打出該  
PDMS裝置之流道入口孔。經簡單氧電漿處理後，將該PDMS複製  
品對齊接觸並放入65°C烘箱中24小時，以使得PDMS複製品之間永  
久黏合。

● 【0017】 如圖1所示，雙微井裝置100係由具有2組微井陣列及  
一微流道130所組成，培養微井110以及擷取微井120(於 $10.65 \times 7.7$   
 $\text{mm}^2$ 之面積內，每組包含470個微井)，分別凹陷形成於一第二實體  
100b之培養微井形成表面110a及一第一實體100a之擷取微井形成  
表面120a中，第一實體100a與第二實體100b，係以其擷取微井形  
成表面120a與培養微井形成表面110a互相面對的方式，上下相疊  
而合併形成雙微井裝置100，而擷取微井形成表面120a與培養微井  
形成表面110a之間，即形成具有一高度( $h$ )的微流道130。微井大小  
接近單細胞之使用已被用於高效率捕捉單細胞。吾等已成功轉用  
此方法於本雙微井裝置，並獲得高效率單細胞捕捉。兩組微井設

計為不同大小，其一組各個擷取微井具有直徑( $w1$ ) 25  $\mu\text{m}$ 與深度( $d1$ ) 26 或  $30 \pm 1 \mu\text{m}$  (每個微井26  $\mu\text{m}$ 為0.013 nL，每個微井30  $\mu\text{m}$ 為0.015 nL)以及另一組培養微井110具有直徑( $w2$ ) 285  $\mu\text{m}$ 或485  $\mu\text{m}$ 與深度( $d2$ )  $300 \pm 15 \mu\text{m}$  (每個微井285  $\mu\text{m}$ 為~20 nL，每個微井485  $\mu\text{m}$ 為~55 nL)(圖1)。介於微井組之間的微流道130之高度( $h$ )為200  $\mu\text{m}$ ，致使雙微井裝置100之總體積為60 nL。雙微井裝置100之底面積為 $12.75 \times 20.25 \text{ mm}^2$ 。擷取微井與培養微井以俯視角度之排列方式為，每個細胞擷取微井的位置係位於細胞培養微井之中心。

**【0018】** 本發明DW裝置之操作包括以下步驟(參見圖2A)：1) 使用手動量吸管將細胞懸浮液注入微流道130中，而該DW裝置100放置於「捕捉位置」，即其擷取微井120係位在微流道之底部且培養微井110係位在其頂部。2) 將連接裝載著培養液注射器的套管插入微流道之注入口，藉由注射器幫浦控制以緩慢流速注入培養液「掃流」細胞140。此步驟提高了細胞固定於擷取微井120之機率(圖2C)。3) 接著，將流速提高以洗去未捕獲之細胞140(圖2D)。4) 以及最後，於移除套管後將注入口封閉，並將DW裝置100輕柔地翻轉至其「培養位置」，即其擷取微井120現在位於微流道之頂部，而培養微井110係位在其底部，使捕獲之細胞因重力而從擷取微井120掉落至培養微井110(圖2E)。裝載過程需約8-9分鐘，一旦翻轉後可將裝置立即放置於加濕之容器中(如，培養皿)中並放進一般細胞培養箱中以利後續進行細胞培養及實驗。注意，於DM裝置100可與常規注射器幫浦、組織培養箱以及顯微鏡簡單直接進

行操作，使其靈活適用於生化實驗室中。

【0019】 實施例2 DW裝置之KT98細胞單細胞捕捉效率

【0020】 進入細胞實驗以前，以去離子水填滿DW裝置並浸泡於依真空乾燥器中充滿去離子水之容器內，用以去除微流道中之氣泡。接著，將脫氣後的DW裝置曝露於紫外光線下滅菌30分鐘。為了避免直接細胞附著於PDMS表面，將含5%BSA的1x PBS注入微流道中並於37°C培養30分鐘。

● 【0021】 以取自F1B-Tag基因轉殖鼠腦之KT98細胞株作為本實驗之細胞模型。於例行培養，KT98細胞係培養於含有10%胎牛血清(Hyclone Thermo, USA)與1%抗生素(谷氨酸-青黴素-鏈黴素，Biowest, France)之DMEM/F12培養液中，於37°C及5%二氧化碳加濕培養箱中培養。癌細胞株－人類肺癌細胞A549以及黑色素細胞瘤MDA-MB-435則培養於含有10%胎牛血清(Hyclone Thermo, USA)與1%抗生素之DMEM基本培養液中。細胞培養係依照經銷商之標準操作步驟使用重組酶Accumax™ (Innovative cell technology, USA)於70%-80%群集密度時進行繼代。

● 【0022】 為了可輕易辨識於DW裝置中的細胞，於進行每次細胞捕捉實驗之前，細胞先以細胞膜染劑(DiIC12(3), BD Biosciences, USA)進行前染色20分鐘。於每次單細胞捕捉實驗，取 $2.2 - 2.5 \times 10^6$  cells/mL濃度之KT98細胞 $200 \mu\text{L}$  ( $4.4 - 5 \times 10^5$  cells)於塑膠微量吸管中而後將該吸管插入該裝置注入口並手動注入細胞進入DW裝置之微流道中。此操作步驟可以快速地裝入細胞於微流道中以覆

蓋擷取微井之區域。藉由注射器幫浦運作之注射器(Harvard Apparatus, Harvard Bioscience, USA) 經由 Teflon 管 (poly(tetrafluoroethylene), 內直徑: 0.51 mm, 外直徑: 0.82 mm, Ever Sharp Technology, Inc., Taiwan) 連接於 DW 裝置之注射口以 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  速率驅動將 20  $\mu\text{L}$  之細胞培養液注入該裝置。於步驟中，在微通道中的細胞緩慢地移動並可通過重力作用而沉降至擷取微井內。而後，將未補獲之細胞使用 300  $\mu\text{L}$  細胞培養液以 200、400、600 與 800  $\mu\text{L}/\text{min}$  之不同流速自裝置沖洗掉。最後，該注入口與流出口以塞子密封，並以重力作用將該裝置上下翻轉擷取微井至培養微井(圖 1B 及 圖 2A)。該裝置隨後放入 37°C 及 5% 二氧化碳標準細胞培養箱中培養 6-7 天。

【0023】當一細胞沉降至一微井內，該細胞之投影區域會與該微井之投影區域重疊。因此加入更多細胞至微流道，理論上可藉由增加微井上方有細胞的可能性以增加微井細胞捕獲之效率。然而增加細胞密度也可能會增加在細胞懸浮液製備與裝置操作時的細胞聚集，從而降低了單細胞捕獲量。為了避免使用極高密度之細胞懸浮液並同時維持細胞捕獲率於高效率，於本系統中使用細胞「掃流」步驟。我們發現以 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  速率驅動 20  $\mu\text{L}$  之細胞培養液，快地足以使細胞於微流道中移動，但又慢地足以使細胞沉降至擷取微井內。

【0024】取  $2.2 - 2.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  濃度之 KT98 細胞，我們觀察到最少的細胞聚集與大於 99% 之擷取微井被細胞所佔據(圖 2C 及

圖3A)。以及，在 $26\text{ }\mu\text{m}$ 與 $30\mu\text{m}$ 深度的DW裝置中，自擷取微井捕獲的細胞轉移至培養微井後的細胞損失小於2%。我們亦測試沖洗流速對於細胞保留於擷取微井之影響並發現在該四種測試流速沖洗後(圖3B)，僅有擷取微井( $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度)的一部分損失了當初所裝載之細胞，其並無顯著差異(範圍介於81%-85%)。以200、400、600與 $800\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗後，於 $30\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之細胞捕捉效率(90.39%，92.13%，88.51%及86.42%)高於 $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之細胞捕捉效率(80.97%，80.94%，85.16%及83.97%)。然而經由翻轉裝置後於培養微井內細胞裝載結果所示，沖洗流速確實對於在擷取微井內所被捕獲細胞之數目具有明顯影響；以600或 $800\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 沖洗流速獲得培養微井之最高單細胞裝載率(圖4G)，說明以600或 $800\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 沖洗流速時有較多補捉微井裝載單一細胞(注意翻轉步驟僅造成小於2%的細胞損失)(圖3A)。

【0025】如圖3C與圖3D所示，於四種流速中， $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之單細胞結果顯著高於 $30\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之單細胞結果，而且 $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之單細胞結果亦高於 $30\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井之單細胞結果。注意到於總培養微井最高的單細胞結果(77%)係使用 $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井以 $600\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗。總而言之，我們的結果顯示與目前的微井尺寸相比，多數單細胞可堆積於擷取微井並取決於沖洗流速而自微井中被沖洗掉，而KT98細胞在培養微井中最高的單細胞裝載率( $77.31 \pm 3.70\%$ )，可藉由使用 $26\text{ }\mu\text{m}$ 深度擷取微井以 $600\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗而得。

【0026】此外，為了解單細胞捕獲率是否會受到擷取微井深度影響，我們使用另一具有較深擷取微井(30  $\mu\text{m}$ )之裝置進行單細胞捕獲效率試驗。其結果顯示經由掃流步驟後，細胞捕獲效率並不會受到淺(26  $\mu\text{m}$ )或深(30  $\mu\text{m}$ ) 擷取微井之深度差別而有所影響；兩者經由掃流步驟後接達到極高捕獲效率(> 99%)(圖3A)。然而，對於沖洗步驟而言，在4種流速沖洗後，該深擷取微井(86.42% – 92.13%細胞保留)相較於淺擷取微井(80.94% – 85.16%細胞保留)細胞損失較少(圖3B)。然而，當擷取微井深度增加(由26 $\mu\text{m}$ 至30  $\mu\text{m}$ )時，裝載細胞的培養微井其單細胞比例下降(從89 – 92%至64 – 75%，圖3C及4D)，造成在總培養微井內單細胞比例之減少(從70 – 71% 至58 – 66%，圖3D)。總培養微井內最高的單細胞比例(66.81  $\pm$  4.15%)，係使用深度30  $\mu\text{m}$ 擷取微井以200  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗而得。

### 【0027】實施例3 不同細胞類型之單細胞捕捉效率

【0028】為了探討DW裝置對於其他細胞類型之適用性，使用另外2種細胞株細胞－人類肺癌細胞A549以及黑色素瘤細胞MDA-MB-435，分別使用於實施例2所述KT98單細胞裝載實驗結果最佳的深度26 $\mu\text{m}$ 擷取微井，以3  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速掃流與600  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流速沖洗條件來進行試驗。

【0029】結果顯示，經過掃流與沖洗後，細胞佔據擷取微井之比例為細胞類型依賴(範圍自67.80  $\pm$  11.38%至85.16  $\pm$  1.91%，圖5B)。經翻轉步驟後，KT98、A549以及MDA-MB-435所有細胞類

型的細胞損失皆低(皆低於2%，圖5C)。有趣的是，在3種細胞類型中，大部分有細胞佔據的擷取微井內，每個微井內僅含有一顆單細胞(89.89% – 92.98%)。綜合以上結果表示，DW裝置對於KT98與MDA-MB-435細胞具有較佳的培養微井單細胞裝載效率(高於76%，圖5D)，而A549細胞除外( $61.63 \pm 7.47\%$ )。

【0030】 為了提高不同尺寸的細胞在培養微井之單細胞裝載效率，我們使用相同深度但不同寬度(直徑自 $25\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ )之擷取微井進行細胞捕獲。其結果顯示使用A549細胞之單細胞裝載效率的顯著增加(自61.63%至 76.03%，圖5E)。該結果顯示培養微井單細胞裝載效率係依賴於細胞與擷取微井之間之尺寸關係。

#### 【0031】 實施例4

【0032】 有鑑於極高的單一細胞捕捉率以及培養微井之大空間，因此判定對於體外單一細胞群落形成試驗，即個別細胞之生長而言，DW裝置係一種具有吸引力的工具。就癌症研究而言，單一細胞群落形成試驗可以用於測試藥物或小分子對於癌細胞增殖之影響。

【0033】 我們使用A549細胞測試其群落形成能力對於EGF之反應，其廣泛應用作為癌症治療時，表皮生長因子受體介導之信號。圖6F顯示，相較於控制組培養液(12.10%)，在含有EGF之培養液而得的細胞可獲得較高群落形成率(17.56%)。我們的結果證實在具有EGF之情況下會促使表現EGF受體之A549癌細胞快速增殖。值得注意的是，DW裝置之便攜性與透明度使得細胞培養實驗期

間，細胞於裝置內可以很方便地於以常規顯微鏡進行分析(圖6A-D)。

**【0034】** 如同我們可以測量各別受試的A549細胞之間細胞存活率與增殖率之差異，該實驗亦藉由顯示DW裝置其應用於研究在單一細胞層級的細胞異質性來凸顯DW裝置之優勢。經過7天培養後大約僅40-55%裝載的細胞存活，以及該些存活細胞展現了不同的生長模式與速率(例如：1顆細胞(13%)，2顆細胞(2.8 – 4.3%)，3顆細胞(2.5%)，以及4-14顆細胞(10-15%)，圖6E)。以上實驗結果證明了DW裝置可用於單一細胞群落形成試驗，以及因大量的各別細胞群落生長於一小區域可用常規顯微鏡直接觀測，DW裝置是具有優勢的。

**【0035】** 總結以上結果，已詳細敘述DW裝置之設計特徵與細胞裝載操作步驟參數，以及DW裝置在細胞增殖、分化與一單一細胞群落形成之實質效用也已經使用小鼠腦神經幹/先驅細胞KT98細胞與2種癌細胞株：A549與MDA-MB-435所證實。

## 【符號說明】

### 【0036】

100 雙微井裝置

100a 第一實體

100b 第二實體

110 培養微井

110a 培養微井形成表面

120 擷取微井

120a 擷取微井形成表面

130 微流道

140 細胞

$w_1$  擷取微井直徑

$w_2$  培養微井直徑

$d_1$  擷取微井深度

$d_2$  培養微井深度

$h$  微流道高度

## 【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

## 【序列表】(請換頁單獨記載)

## 申請專利範圍

1. 一種用於單細胞擷取與培養之雙微井微流裝置，其包括：  
一組用以捕捉單細胞之擷取微井，凹陷形成於一第一實體的擷取微井形成表面中，具有一直徑( $w1$ )與一深度( $d1$ )；  
一組用以細胞培養之培養微井，凹陷形成於一第二實體的培養微井形成表面中，具有一直徑( $w2$ )與一深度( $d2$ )；及  
一微流道，設置於形成該二組微井之第一實體的擷取微井形成表面與第二實體的培養微井形成表面之間，具有一高度( $h$ )，且於兩端各連接一注入口與一流出口；其中  
該第一實體的擷取微井形成表面與該第二實體的培養微井形成表面係上下相對，且該二組微井設計為 $w1 < w2$ ，且其中該擷取微井的各微井之直徑( $w1$ )為1~100  $\mu\text{m}$ 且其中該培養微井的各微井之直徑( $w2$ )為10~2000  $\mu\text{m}$ 。
2. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該微流道的表面塗佈一層白蛋白。
3. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該微流道的該注入口與該流出口各設置有一密封蓋。
4. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該擷取微井的各微井之容量為0.006 pL至1.96 nL，且其中該培養微井的各微井之容量為0.780 pL至6.28 nL。
5. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該微流道之高度為20~



5000  $\mu\text{m}$ 。

6. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該各組微井密度為於 $80\text{-}100 \text{ mm}^2$ 之面積內包含20-500個微井。
7. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該各組微井密度為於 $10.65 \times 7.7 \text{ mm}^2$ 之面積內包含470個微井。
8. 如請求項1所述之雙微井微流裝置，其中該擷取微井與培養微井之位置以俯視角度之排列方式為每個細胞擷取微井位置係位於細胞培養微井之中心。
9. 一種使用如請求項1所述之雙微井微流裝置用於單細胞分離之方法，包括以下步驟：
  - (1) 注入細胞懸浮液於如請求項1所述之裝置的微流道中而該組擷取微井係位於該微流道之底部且該組培養微井係位於該微流道之頂部；
  - (2) 使用一注射器幫浦控制以慢速從微流道之注入口注入細胞培養液以滾動細胞；
  - (3) 使細胞緩慢地移動並通過重力作用而沉降至該擷取微井內及/或該第一實體的表面上；
  - (4) 增加流速以清除位於該第一實體的表面上而未被捕獲之細胞；及
  - (5) 翻轉該DW裝置，藉由重力作用將被捕獲入該擷取微井中之細胞轉移至該培養微井。