

國立臺灣大學工學院機械工程學系



碩士論文

Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

可視化液珠型肌肉衛星細胞篩檢系統

Visualizable Droplet-based

Muscle Satellite Cell Sorting System

蕭翊庭

Yi-Ting Hsiau

指導教授：楊鏡堂 博士

Advisor: Jing-Tang Yang, Ph.D.

中華民國 110 年七月

July 2021



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書
可視化液珠型肌肉衛星細胞篩檢系統
Visualizable Droplet-based
Muscle Satellite Cell Sorting System

本論文係蕭翊庭君 (R08522114) 在國立臺灣大學機械工程學系完成之碩士學位論文，於民國 110 年 7 月 6 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

楊瑞珍

(簽名)

楊瑞珍 (指導教授)

顏裕庭

葉思沂

系主任

柯沂群

(簽名)



誌謝

首先感謝 楊鏡堂老師在我進入實驗室後對我用心的指導與栽培，也謝謝楊老師平時對我在研究以及生活上的關心，同時也要感謝楊老師和口試委員會對我所進行的研究給予的肯定與指教。感謝實驗室博班學長賴渝翔、王有駿、張勝凱、馬睿甫在研究上的諸多指導與寶貴的建議，也謝謝實驗室碩班學長姊楊東穎、魏士傑、邱筠雅在我初入實驗室時，帶領我熟悉實驗室環境與研究領域，教導我實驗所需的技能。感謝同學林佑叡、謝昀靜、洪千茵、郭靖玟平時的互相砥礪，時常相互討論給予彼此研究上的建議與協助，一同克服各階段的難關。感謝學弟妹陳怡妉、鄭家栢、魯以樂平時協助實驗室庶務的處理，維持實驗室的環境與運行。感謝實驗室助理李禹靜在各項事務上的幫忙，以及日常上的協助，還有謝謝 Moni、啾咪和大大帶給實驗室歡樂。最後感謝家人和朋友一直以來的給予的支持與鼓勵，讓我有繼續奮鬥下去的動力。

感謝科技部計畫「自動化細胞篩選平台研究與開發 (計畫編號: MOST 109-2221-E-002-202-MY2)」補助研究經費，使研究資源無虞。感謝計畫合作單位中央研究院生物醫學研究所顏裕庭副研究員在生物方面研究上的指導，以及顏博士研究團隊辛勞的提供本研究使用的生物細胞檢體。感謝國立臺灣大學奈米機電系統研究中心提供微機電製程設備與無塵室空間，使本研究之實驗裝置製作過程順遂。



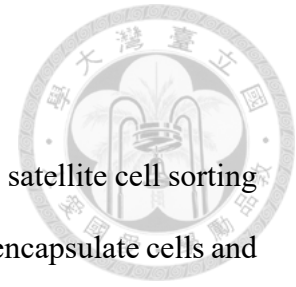
摘要

本研究主旨為開發自動化肌肉衛星細胞篩檢系統，以氣體作為連續相生成液珠包覆細胞，並透過影像辨識判斷液珠內是否含目標細胞，再回授訊號控制流道下方的氣動微型閥，藉由流道底層的薄膜受壓形變，改變流道內壓力分佈以操控液珠移動，將含有肌肉衛星細胞或雜質的液珠予以分離。由於肌肉衛星細胞為稀少細胞，經本系統篩選後可提高於細胞液中的純度，有望提升後續培養的效率，以提供再生醫學研究使用。

本研究首先使用去離子水作為分散相，探討氣體生成液珠的穩定性與流道幾何和兩相流率調控之關聯，並獲取適用於本研究之設計和參數。接著本研究使用 Y 字型分岔出口流道設計和一對氣動微型閥，對生成的液珠進行分類機制的探討，可達到 100% 的分類準確率。本研究亦驗證使用氣體生成液珠包覆細胞之可行性，證實此法具發展潛力，然而穩定性仍不如傳統油類生成液珠佳，因此目前將流道改質為親水性，生成區段狀液珠作為解決方法，未來仍可透過本研究之成果持續改善。本研究透過 LabVIEW 軟體，建立完整的影像辨識及回授控制系統，可藉由辨識液珠內的螢光訊號，以主動式控制氣動閥進行液珠篩選。然而因所使用的細胞螢光強度不足，目前以粒徑相近的 5 μm 螢光微粒子替代。結合以上各部件，經本研究開發之晶片篩選後可將檢體中的螢光微粒子純度提升 6%，未來待細胞螢光強度提升後，即可建立完整的自動化肌肉衛星細胞篩檢系統。

本研究期望藉由氣體生成液珠包覆細胞以及實現於氣體連續相中分類液珠等兩項重點創新，開發高生物相容性、後端使用便利之高純度肌肉衛星細胞篩檢微流道系統。此系統期望可取代傳統篩選細胞使用的大形昂貴儀器，並彌補現行連續流及油類連續液珠流等微流體細胞篩選方法之不足。

關鍵字：細胞篩選、氣體生成液珠、包覆細胞、影像辨識、肌肉衛星細胞

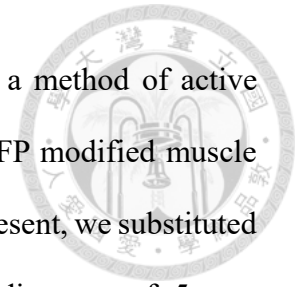


Abstract

The objective of this research is to develop an automatic muscle satellite cell sorting system which utilizes liquid-in-gas droplet generation technology to encapsulate cells and employs image recognition skill to detect if the contents of each droplet include the target cells. Following the detection, a feedback signal is sent to control the pneumatic microvalves beneath the fluidic channel. As pressurized, the membrane at the bottom of the channel is deformed upward to change the pressure distribution in the channel which then manipulates droplets into different outlets as a means of separating droplets containing either target cells or non-target cells. Since muscle satellite cell is a type of rare cells, by enriching its purity in the bio sample via the proposed sorting system, it is expected to improve the efficiency of satellite cell culturing for regenerative medicine researches.

In the first part of this research, we use deionized water as dispersed phase and compressed air as continuous phase to discuss the relations among channel design, the flow rates of the two phases and the stability of liquid-in-gas droplet generation. We successfully obtained the best design and parameters for this research. Secondly, we utilize a Y-shaped bifurcation outlet channel and a pair of pneumatic microvalves as the droplet sorting mechanism which achieved 100 % sorting accuracy. Furthermore, we verified that encapsulating cells by liquid-in-gas droplets is feasible. Despite its potential, the stability is not as good as using conventional water-in-oil droplets. Therefore, we performed hydrophilic modification on the channel surfaces to generate plugging droplets as a solution at present. Further improvements will be able to be carry out in the future based on the results of this research.

The image recognition and feedback control system of this research was developed via commercial software, LabVIEW. The integrated system is able to recognize the



fluorescence signal inside droplets and control the microvalves as a method of active droplet sorting. However, because the fluorescence signal of the GFP modified muscle satellite cell we tended to use is not strong enough to be detected at present, we substituted it with green fluorescence micro particles which have similar diameter of 5 μm . Integrating the above mention parts and allowing the sample solution to flow through the microfluidic chip to perform automatic sorting, the system was able to enrich the purity of fluorescence particles by 6 %. The complete automatic muscle satellite cell sorting system is expected to be accomplished in the near future as soon as the fluorescence signal of the muscle satellite cell is able to be enhanced.

In summary, this research aims to develop a highly biocompatible, more user-friendly and highly purification automatic microfluidic muscle satellite cell sorting system by combining two critical innovations, encapsulation cells by liquid-in-gas droplet and realizing active droplet sorting in gaseous continuous phase. The proposed device is looking forward to replacing expensive and huge instruments used in traditional cell sorting methods. Furthermore, it will be able to overcome the limits of continuous flow and water-in-oil continuous droplet flow in current microfluidic cell sorters.

Keywords : cell sorting, liquid-in gas droplet generation, cell encapsulation, image recognition, muscle satellite cell

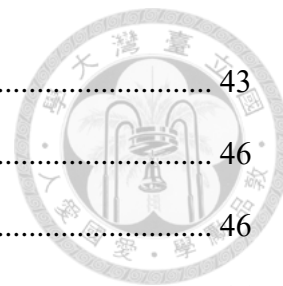


目 錄

口試委員會審定書	i
誌 謝	ii
摘 要	iii
Abstract.....	iv
目 錄	vi
圖目錄	x
表目錄	xv
符號說明	xvi
第一章 前言	1
1-1 研究背景	1
1-2 研究動機與目的	2
第二章 文獻回顧	3
2-1 液珠的基本理論	3
2-1.1 尺寸效應	3
2-1.2 液珠與表面接觸模式	5
2-1.3 表面自由能	6
2-1.4 遲滯效應	7
2-2 細胞篩選	7
2-2.1 被動式	7
2-2.2 主動式	10
2-3 液珠操控技術	12
2-3.1 介電濕潤法	13
2-3.2 光能操控法	13
2-3.3 熱能操控法	14

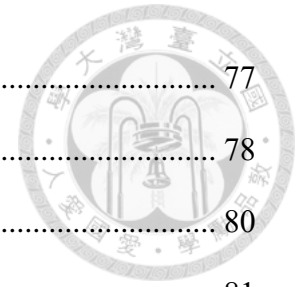


2-3.4	表面化學能操控法	15
2-3.5	表面微結構法	15
2-3.6	氣動微型閥操控法	16
2-4	液珠生成	17
2-4.1	流道設計	17
2-4.2	被動式液珠生成	19
2-4.3	主動式液珠生成	20
2-4.4	氣體生成液珠	20
2-4.5	包覆細胞	22
2-5	影像辨識	23
2-5.1	影像分割	24
2-5.2	特徵擷取	26
2-5.3	影像分類	29
第三章	研究方法	31
3-1	系統設計	32
3-1.1	基材選擇	32
3-1.2	流道設計	32
3-2	實驗流程	33
3-2.1	系統流程	33
3-2.2	實驗儀器與架設	35
3-2.3	檢體製備	36
3-2.4	影像處理方法	37
3-2.5	驗證方法	38
3-3	元件製作	38
3-3.1	母模製作	38



3-3.2	翻模與接合	43
第四章	結果與討論	46
4-1	液珠生成探討	46
4-1.1	流道幾何探討	46
4-1.2	流率探討	49
4-1.3	液珠尺寸探討	50
4-2	液珠分類機制探討	51
4-2.1	分類流道探討	52
4-2.2	氣動閥薄膜探討	54
4-2.3	氣動閥壓力探討	56
4-2.4	分類準確率小結	58
4-3	液珠包覆細胞探討	59
4-3.1	檢體濃度探討	59
4-3.2	蛋白質沾附探討	61
4-3.3	流道改質探討	62
4-3.4	標準微粒子包覆探討	65
4-4	影像辨識探討	66
4-4.1	液珠影像辨識探討	66
4-4.2	螢光訊號影像辨識探討	68
4-4.3	影像雜訊探討	70
4-4.4	螢光強度之影響	72
4-5	篩選效率探討	73
4-5.1	準確率探討	73
4-5.2	誤差原因探討	75
第五章	結論與未來工作	77

5-1	結論	77
5-2	未來工作	78
5-3	甘特圖	80
第六章	參考文獻	81





圖目錄

圖 2-1 文獻回顧架構圖	3
圖 2-2 力與尺度關係圖	4
圖 2-3 液珠與表面接觸模式(Yang <i>et al.</i> , 2008).....	5
圖 2-4 遲滯現象示意圖	7
圖 2-5 利用微過濾法篩選細胞(Fan <i>et al.</i> , 2015).....	8
圖 2-6 利用慣性力篩選細胞(Warkiani <i>et al.</i> , 2014).....	9
圖 2-7 利用決定性側向位移結構篩選細胞(Au <i>et al.</i> , 2017)	9
圖 2-8 利用夾壓流場分離篩選微粒 (Yamada <i>et al.</i> , 2004)	10
圖 2-9 利用聲泳法進行細胞篩選(Ren <i>et al.</i> , 2015).....	11
圖 2-10 利用介電泳法篩選細胞(Song <i>et al.</i> , 2015).....	11
圖 2-11 利用磁泳法進行液珠篩選(Jo <i>et al.</i> , 2016).....	12
圖 2-12 利用光鐳篩選細胞(Wang <i>et al.</i> , 2011)	12
圖 2-13 利用介電濕潤法控制液珠(Sun <i>et al.</i> , 2019).....	13
圖 2-14 利用光能操控法驅動液珠(Kobayashi <i>et al.</i> , 2017)	14
圖 2-15 (a)平板流道及周邊微加熱器機構圖. (b)液珠移動路徑圖(Jiao <i>et al.</i> , 2008).	14
圖 2-16 利用表面化學能操控液珠(Chaudhury & Whitesides, 1992).....	15
圖 2-17 利用表面粗糙度梯度驅動液珠(Yang <i>et al.</i> , 2006).....	16
圖 2-18 利用表面微結構及分子自組裝法驅動液珠(Lai <i>et al.</i> , 2010).....	16
圖 2-19 利用氣動微型閥控制液珠 (a) 流體層與控制層堆疊示意圖 (b) 控制液珠 混合時序圖(Babahosseini <i>et al.</i> , 2019)	17
圖 2-20 T-型液珠生成流道(Alkayyali <i>et al.</i> , 2019)	18
圖 2-21 流體聚焦液珠生成流道(Alkayyali <i>et al.</i> , 2019)	18
圖 2-22 共伴流液珠生成流道(Alkayyali <i>et al.</i> , 2019)	19

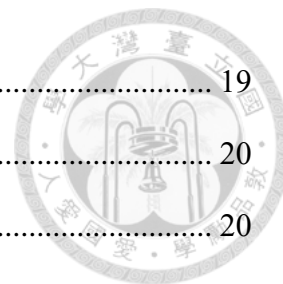


圖 2-23 針筒推進器被動式液珠生成系統示意圖.....	19
圖 2-24 被動式液珠生成不同區間(Zhu & Wang, 2017)	20
圖 2-25 利用脈衝雷射主動式生成液珠(Park <i>et al.</i> , 2011).....	20
圖 2-26 共伴流氣體生成液珠(Jiang <i>et al.</i> , 2015).....	21
圖 2-27 聚焦流氣體生成液珠 (a) 流道外觀及所生成液珠 (b) 液珠型態與流率關係圖(Tirandazi & Hidrovo, 2017).....	21
圖 2-28 被動式非確定性細胞包覆(Hong <i>et al.</i> , 2010)	22
圖 2-29 主動式非確定性細胞包覆(Collins <i>et al.</i> , 2013).....	22
圖 2-30 (a)細胞包覆後篩選(Jing <i>et al.</i> , 2015). (b)慣性力包覆前排列細胞(Kemna <i>et al.</i> , 2012). (c)即時性細胞包覆(Schoendube <i>et al.</i> , 2015).....	23
圖 2-31 結合 RGB 通道和 HSV 通道對白血球進行閾值性分割(Li <i>et al.</i> , 2016) ..	25
圖 2-32 上：原始細胞影像。下：BFED 邊緣偵測結果(Pan <i>et al.</i> , 2015).....	25
圖 2-33 利用幾何特徵作為白血病種類判斷依據(Vaghela <i>et al.</i> , 2016)	27
圖 2-34 卵巢癌細胞。上：野生型。下：抗藥型(Huang <i>et al.</i> , 2020)	28
圖 2-35 影像於 RGB 及 HSV 色彩空間之直方圖(Kavitha & Suruliandi, 2016)	28
圖 2-36 類神經網路示意圖(重製圖，Almansour <i>et al.</i> , 2019)	30
圖 2-37 支援向量機示意圖(重製圖，Almansour <i>et al.</i> , 2019)	30
圖 3-1 研究方法架構圖	31
圖 3-2 流道設計圖	33
圖 3-3 實驗流程示意圖	33
圖 3-4 Kd Scientific 220 syringe pump.....	34
圖 3-5 儀器架設示意圖	35
圖 3-6 實際儀器架設圖	36
圖 3-7 檢體製備流程圖，照片來源：(Motohashi <i>et al.</i> , 2014).....	37
圖 3-8 黃光微影製成步驟.....	38

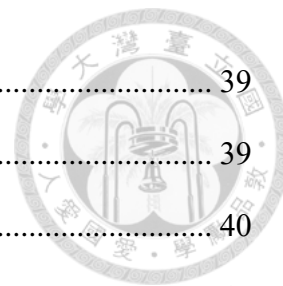


圖 3-9 雜質遮蔽示意圖.....	39
圖 3-10 矽晶圓於超音波振洗槽內清洗.....	39
圖 3-11 旋轉塗佈機.....	40
圖 3-12 旋轉塗佈示意圖.....	40
圖 3-13 SU-8 塗佈厚度與轉速關係圖(Kayaku Advanced Materials 提供).....	40
圖 3-14 曝光示意圖.....	41
圖 3-15 EVG 620 Top Side Mask Aligner.....	42
圖 3-16 顯影示意圖.....	43
圖 3-17 矽晶圓母模.....	43
圖 3-18 氧電漿機 Model CUTE-MPR.....	44
圖 3-19 氧電漿表面改質與元件接合示意圖.....	45
圖 3-20 微流體晶片成品.....	45
圖 4-1 初步結果與討論架構圖.....	46
圖 4-2 100 μm 主流道中液珠殘留現象.....	47
圖 4-3 流道夾角 45 度時易出現穿線式液珠.....	48
圖 4-4 流道夾角 60 度時易出現雙重液珠.....	48
圖 4-5 流道夾角 90 度時生成單分散液珠效率最佳.....	48
圖 4-6 不同連續相氣體壓力之液珠大小(a). 0.041 MPa (b). 0.055 MPa.....	49
圖 4-7 連續相氣體壓力 0.014 MPa 之穿線式液珠.....	49
圖 4-8 連續相氣體壓力 0.083 MPa 之破碎狀液珠.....	50
圖 4-9 MATLAB 量測液珠直徑.....	51
圖 4-10 不同主流道寬度下液珠尺寸比較.....	51
圖 4-11 側向出口液珠分類流道 (a). 示意圖 (b). 實際俯視圖.....	52
圖 4-12 液珠朝向主出口流道移動時序圖.....	52
圖 4-13 Y 字型液珠分類流道 (a). 示意圖 (b). 實際俯視圖.....	53



圖 4-14 液珠於 Y 字型分類流道中移動情況.....	54
圖 4-15 三層 PDMS 為流道晶片結構.....	54
圖 4-16 氣動閥施加壓力密合情況示意圖 (a). 剖面圖 (b). 俯視圖.....	55
圖 4-17 不同 PDMS 配方下薄膜之形變.....	55
圖 4-18 液珠分類準確率.....	56
圖 4-19 液珠分類誤差分析圖 (a). 液珠分裂 (b). 錯誤分類.....	57
圖 4-20 液珠分裂.....	58
圖 4-21 液珠進入錯誤分類流道.....	58
圖 4-22 波松分布(Collins <i>et al.</i> , 2015).....	59
圖 4-23 氣體生成液珠包覆細胞實際照片.....	60
圖 4-24 使用檢體液作為分散相 (a). 雙重液珠 (b). 穿線式液珠 (c). 側壁沾附	61
圖 4-25 檢體液於流道中沾黏現象 (a). 2 % FBS/DMEM 稀釋 (b). PBS 稀釋.....	62
圖 4-26 使用過濾細胞培養基改善沾黏現象.....	62
圖 4-27 經 Teflon-AF 改質之流道生成穿線式液珠.....	63
圖 4-28 經市售潑水劑改質之流道生成穿線式液珠.....	64
圖 4-29 細胞檢體液於經 PVA 改質之流道內生成區段狀液珠.....	65
圖 4-30 經 PVA 改質之流道生成區段狀液珠包覆微粒子.....	66
圖 4-31 影像辨識流程.....	66
圖 4-32 液珠影像辨識 (a). 工業相機擷取影像原圖 (b). 二值化影像 (c). Reject Border 影像 (d). 黑白反轉影像.....	67
圖 4-33 氣體區段被誤判為液珠.....	68
圖 4-34 螢光訊號影像處理 (a). 即時擷取影像 (b). 背景影像 (c). 液珠影像遮罩 (d). 減去背景及遮罩並二值化之螢光訊號辨識結果.....	68
圖 4-35 失焦造成影像中螢光訊號模糊.....	69
圖 4-36 位於液珠邊界的螢光訊號無法被正確判讀.....	69

圖 4-37 影像中雜訊被誤判為螢光訊號.....	70
圖 4-38 不同閾值設定的二值化結果 (a). 原擷取影像 (b). Threshold = 15 (c). Threshold = 25 (d). Threshold = 35	71
圖 4-39 Threshold = 20 二值化影像 (a). 未使用中值濾波 (b). 使用中值濾波	71
圖 4-40 Threshold = 15 二值化影像 (a). 未使用 Remove Particle.vi (b). 使用 Remove Particle.vi.....	72
圖 4-41 使用螢光標準微粒子，Threshold = 40	72
圖 4-42 透過取樣分析檢視篩選效率	73
圖 4-43 晶片自動化篩選結果.....	74
圖 4-44 區段狀液珠內含有多顆具螢光及無螢光微粒子	75
圖 4-45 氣動閥延遲時間及作動時間示意圖.....	76



表目錄

表 2-1 數學形態學常見運算子，整理自(Haralick <i>et al.</i> , 1987)	26
表 2-2 灰度共生矩陣法分析特徵，整理自(Huang <i>et al.</i> , 2020)	27
表 3-1 Dow Sylgard 184 Silicone Elastomer 性質表	32
表 3-2 氧電漿機規格表	45
表 4-1 流道幾何設計	47
表 4-2 氣動閥不同壓力與不同薄膜 PDMS 配方比例之分類結果	57



符號說明

A	液珠與固-液介面之總投影接觸面積 (m^2)
Ca	毛細數(Capillary number), $Ca = \frac{\mu U}{\gamma}$
D	液珠直徑 (m)
Eu	歐拉數(Euler number), $Eu = \frac{\Delta P}{\rho U^2}$
F_s	表面張力 (N/m^2)
Fr	福祿數 (Froude number), $Fr = \frac{U}{\sqrt{gL}}$
f_l	固-液接觸面積相對於整個接觸面積的比值
f_g	液-氣接觸面積相對於整個接觸面積的比值
G_0	最低表面自由能 (J)
L	流場中的特徵長度 (m)
N_{x_i}	入口區所含的螢光微粒子數目
N_{x_t}	目標區所收集到的螢光微粒子數目
N_t	目標區所收集到的所有(有/無螢光)微粒子數目
P	流場中的壓力 (N/m^2)
$p(k, \lambda)$	波松分佈給定 λ 值下, 液珠內含 k 個細胞的機率, $p(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$
R	液珠的半徑 (m)
Re	雷諾數(Reynolds number), $Re = \frac{\rho UL}{\mu}$
r_f	表面粗糙度
S	液珠液-氣介面間之總表面積 (m^2)
t	時間 (s)
U	流場中的流速 (m/s)
V	液珠體積 (m^3)



We	韋伯數(Weber number) , $We = \frac{\rho LU^2}{\sigma}$
γ_{eff}	有效單位面積的表面自由能 (J/mm ²)
γ_{ij}	i, j 兩相介面上的表面張力(N/m)
θ_0	固-液本質接觸角
θ_C	Cassie-Baxter 接觸模式之接觸角
θ_W	Wenzel 接觸模式之接觸角
θ_1	固-液接觸角
θ_2	液-氣接觸角
θ_r	液珠穩定狀態與表面接觸所對應之接觸角
θ_A	前進接觸角
θ_R	後退接觸角
$\Delta\theta$	遲滯接觸角 , $\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$
λ	波松分佈中每顆液珠內所含細胞的平均數量
μ	流體動力黏滯係數(fluid dynamic viscosity, kg/m•s)
ρ	流體的質量密度(kg/m ³)
σ	表面張力係數(1/m)



第一章 前言

1-1 研究背景

再生醫學(regenerative medicine)是近年來全球積極發展的新穎療法，透過移植具有再生能力的細胞至個體身上，可用以修復因疾病、創傷、老化及先天缺陷而受損的組織或器官。與現行對症下藥的療法不同，再生醫學整合組織工程、分子生物和細胞療法等多項技術，使失能的組織活性再現，且運用範圍廣闊，有望解決現今醫療難以根治的病症和創傷，被認為是將對傳統醫療帶來龐大衝擊的全新醫學領域。根據 Research and Markets 統計，2020 年全球再生醫學市場產值已達 46.8 億美元，隨著各國政府和大型企業資金不斷投入此領域，預計將以 34.0% 的年複合成長率持續擴大市場需求(Researchandmarkets, 2021)。

肌肉衛星細胞(muscle satellite cell)是位於骨骼肌纖維基底層(basal lamina)下方的少量肌生性幹細胞(myogenic stem cell)群，在肌肉再生功能中扮演重要角色。成人肌肉組織中的衛星細胞，平時不會進行有絲分裂，然而當肌肉受到損傷時，衛星細胞會被活化分裂產生多個成肌細胞，這些成肌細胞再互相結合分裂成肌肉纖維，以修補受傷的組織。由於成肌細胞有再生肌肉纖維的能力，藉由發展移植成肌細胞於非肌肉組織生成異體肌肉纖維(ectopic muscle fiber)，有望成為裘馨氏肌肉營養不良症、泌尿系統功能障礙及心臟衰竭等病症的治療方法。因此，能否從成體骨骼肌肉組織中篩選出高純度的肌衛星細胞用於培養成肌細胞，是未來研究成肌細胞移植及發展細胞療法(cell-based therapies)急需著手的關鍵技術(Motohashi *et al.*, 2014)。

現今使用的肌肉衛星細胞篩選方法，須仰賴昂貴的螢光流式細胞分選儀(fluorescence-activated cell sorting, FACS)或磁珠標記細胞分選儀(magnetic-activated cell sorting, MACS)。這類儀器除造價高昂外，使用流式細胞儀分析的細胞需先取 10 % 之檢體作為參考值才得以提升精準度，因此難廣泛用於稀少細胞篩選；而磁珠標記細胞分選儀則是需要使用抗體對細胞先行標定，增加篩選過程的複雜度以及時間。近年來，隨著微機電製程(Microelectromechanical Systems, MEMS)技術日

漸純熟，被廣泛應用於生化領域，實驗室晶片(Lab-on-a-chip, LOC)將傳統生化研究所需的繁瑣流程與昂貴儀器，縮小到硬幣尺寸的微小晶片。微流體系統即是實驗室晶片的應用之一，利用微小流道或疏水性表面設計，可用於操控微量流體或液珠，且因尺度微小，具有反應速度快、檢體需求量低及質傳快速等優勢，是現今生醫檢測的新利器。

1-2 研究動機與目的

本研究主旨為整合氣體液珠生成系統(liquid-in-gas)以及數位影像檢測系統，開發一自動化之肌肉衛星細胞篩選系統，期望達到高精確度的篩選成果，作為培養分化成肌細胞之高純度檢體。本研究之微流體系統，使用壓縮空氣作為連續相，將檢體中的細胞以聚焦流體(flow focusing)方式包覆在微液珠內，降低細胞在流道內受到強大剪應力破壞的可能性，再利用影像辨識子系統，辨別液珠內是否包覆目標細胞，並回授訊號控制流道中的分選機構，以氣動微型閥門調控流道內壓力分佈，決定微液珠移動方向，將含有肌肉衛星細胞的液珠與含有雜質的液珠予以分類收集。篩選後所得之高純度細胞液，可大幅提升稀少的衛星細胞濃度，使後續培養分化成肌細胞的效率上升。

現今使用於細胞篩選的微流體系統，較多採取連續流或是油類液珠生成(liquid-in-oil)的輸送方式。然而，上述方式分別會遇到偵測準確度差以及生物檢體易受油質和介面活性劑污染等挑戰。本研究將採用氣體液珠生成方式，在液珠生成後進行細胞影像辨識及驅動分類，運用元件複雜度低、系統整合容易及後端回收使用便利等優點，期望達到篩選精準度及生物相容性更高的稀少細胞篩選系統。



第二章 文獻回顧

本研究之目的為設計一自動化細胞篩選系統，應用氣體生成液珠細胞包覆技術和影像辨識系統，結合流道層下方氣動微型閥液珠分選機制，在封閉微流道內，進行液珠的輸送、檢測及篩選。文獻回顧之架構，將分為液珠的基本理論、細胞篩選、液珠操控技術、液珠生成及影像辨識五大面向，加以簡介。

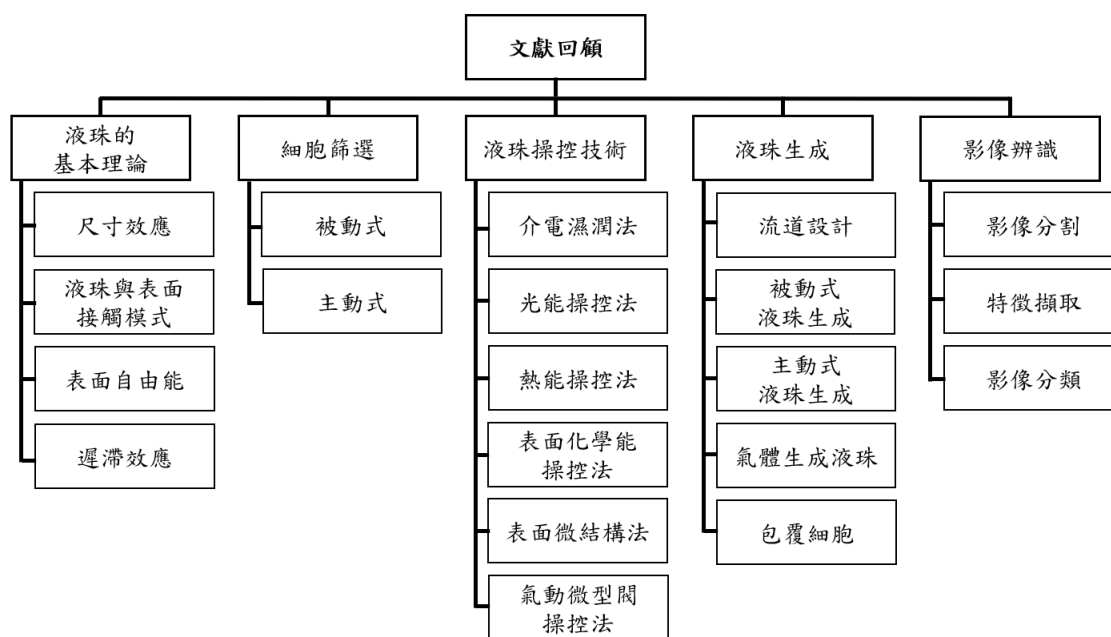


圖 2-1 文獻回顧架構圖

2-1 液珠的基本理論

液珠在微小尺度下會有與巨觀上不同的物理行為，液珠與表面的不同接觸模式及表面張力和表面自由能，也影響液珠的運動力學。以下簡介液珠在微觀尺度下的基礎理論。

2-1.1 尺寸效應

物體在不同的尺度範圍下，分別會受到與體積、面積和長度呈正比的作力，如圖 2-2 所示。在巨觀尺度下，物體主要受與體積呈正比的力主導；當尺度縮小至毫米等級時，與面積呈正比的力則成為主要統御力；當尺度再縮小至微米等級時，物體則主要受與長度呈正比的力影響，與體積、面積呈正比的力則因為因次關係，隨長度的三次方及二次方縮小，使其可以被忽略。

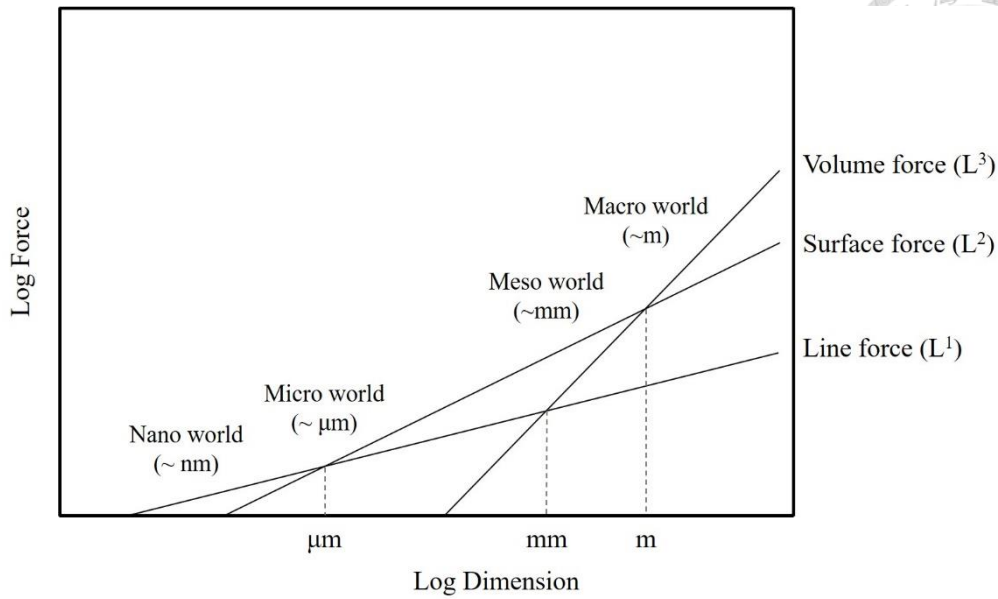


圖 2-2 力與尺度關係圖

從流體力學觀點，可以用不可壓縮牛頓流體的統御方程式 Navier-Stokes 方程式(2-1)分析。

$$\rho \left[\frac{\partial u_i}{\partial t} + u_j \frac{\partial u_i}{\partial x_j} \right] = -\frac{\partial P}{\partial x_i} + \mu \frac{\partial^2 u_i}{\partial x_j^2} + \rho F_b + F_s \quad (2-1)$$

其中 F_s 為表面張力，可寫成以下形式：

$$F_s = \vec{f}_s \delta_s \quad (2-2)$$

$$\vec{f}_s = -\gamma \nabla \cdot \vec{n} + \nabla_s \gamma \quad (2-3)$$

其中 \vec{f}_s 為單位界面所受到的表面張力， γ 為表面張力係數， $-\nabla \cdot \vec{n}$ 為液珠表面之曲率。

將 Navier-Stokes 方程式中的壓力項、重力項、黏滯力項和表面張力項無因次化後可得到：

$$\frac{D^* \vec{U}^*}{Dt^*} = Eu \nabla^* P^* + \frac{1}{Re} \nabla^* \vec{U}^* - \left(\frac{1}{Fr} \right)^2 \nabla^* h^* - \frac{1}{We} \kappa^* \nabla^* F \quad (2-4)$$

(2-4) 中 We 稱為韋伯數，是慣性力與表面張力的比值，定義如下：

$$We = \frac{\rho L^2 U^2}{\sigma} \quad (2-5)$$

當尺度縮小至微米範圍時，由於特徵長度縮小，韋伯數也隨之下降，致使表面張力成為(2-4)中的主導項，故表面張力為液珠運動模式的主要作用力。



2-1.2 液珠與表面接觸模式

液珠與表面接觸的表現，可依據表面粗糙度的不同，分為光滑表面(smooth surface)、潤濕表面(wetted surface)和複合表面(composite surface)等三種接觸模式。如圖 2-3 (a)所示，當液珠與光滑表面接觸時，本質接觸角 θ_0 (intrinsic contact angle) 可由 Young's equation(2-6)求得。(2-6)中的 γ_{SV} 、 γ_{SL} 和 γ_{LV} 分別為固-氣、固-液和液-氣等三相交界表面張力(Young, 1805)。

$$\cos \theta_0 = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (2-6)$$

Wenzel 提出潤濕表面，針對粗糙表面提出接觸角 θ_w 的修正模型，認為液珠在與粗糙表面接觸時介面完全無氣體存在，如圖 2-3 (b)所示，屬於同質潤濕(homogeneous wetting)。其修正公式如(2-7)， r_f 為表面粗糙度，定義為實際粗糙表面積和幾何投影面積之比值。由於 r_f 恆大於 1，使得原本親水性的表面修正後更為親水，疏水性更為疏水(Wenzel, 1936)。

$$\cos \theta_w = r_f \cos \theta_0 \quad (2-7)$$

Cassie and Baxter (1944)提出複合表面的修正模型，認為與粗糙表面接觸的液珠不會完全浸潤，如圖 2-3 (c)所示，在液珠下表面與固體表面交界處應有氣體存在，同時具有固-液和液-氣交界面，屬於異質潤濕(heterogeneous wetting)。其接觸角 θ_c 修正公式如(2-8)，其中 θ_1 為固-液接觸角， θ_2 為液-氣接觸角， f_1 與 f_2 分別為固-液和液-氣接觸面積相對於整個接觸面積的比值，因此如(2-9)， f_1 與 f_2 總合為 1。

$$\cos \theta_c = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2 \quad (2-8)$$

$$f_1 + f_2 = 1 \quad (2-9)$$

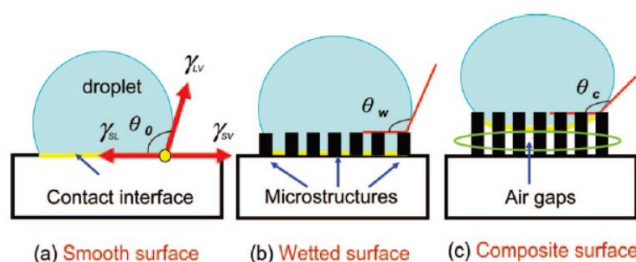


圖 2-3 液珠與表面接觸模式(Yang *et al.*, 2008)



2-1.3 表面自由能

由熱力學觀點，將液珠與固體表面接觸模型視為一個系統，液珠會趨向表面自由能 G_0 (Gibb's free energy) 最低的狀態變化，此時液氣表面分子受到液珠向內的表面張力，使其成為圓球狀。最小表面自由能可由(2-10)推得，其中 γ_{LV} 為液-氣界面表面張力， R 為液珠半徑。

$$G_0 = \gamma_{LV} \times 4\pi R^2 \quad (2-10)$$

Patankar (2003) 提出，與固體表面接觸的液珠表面自由能為液-氣界面的表面自由能和固-液界面的表面自由能差值，如(2-11)所示。

$$G = S \times \gamma_{LV} - A \times \gamma_{eff} \quad (2-11)$$

其中

$$\gamma_{eff} = \gamma_{LV} \times \cos \theta_r \quad (2-12)$$

S 為液氣界面表面積， A 為液珠與固體表面接觸的水平投影面積， ψ 為液珠與固體表面接觸角，達到穩態時 $\psi = \theta_r$ 。

$$S = 2\pi R^2(1 - \cos \psi) \quad (2-13)$$

$$A = \pi R^2 \sin^2 \psi \quad (2-14)$$

整理(2-11)~(2-14)可歸納出液珠表面自由能與接觸角的關係：

$$\frac{G}{\gamma_{LV}} = 2\pi R^2(1 - \cos \psi) - \pi R^2 \sin^2 \psi \cos \theta_r \quad (2-15)$$

加上液珠體積守恆限制：

$$g = V - \frac{\pi R^2}{3}(1 - \cos \psi)^2(2 + \cos \psi) = 0 \quad (2-16)$$

可使用 Lagrange multiplier method 求得，固定體積的液珠在固體表面上達到穩態時的表面自由能(Patankar, 2003)：

$$\frac{G}{\sqrt[3]{9\pi V^{2/3}\gamma_{LV}}} = (1 - \cos \theta_r)^{\frac{2}{3}}(2 + \cos \theta_r)^{\frac{1}{3}} \quad (2-17)$$



2-1.4 遲滯效應

置於平板上的一液珠開始移動的瞬間，其前進方向與對側的接觸角不對稱，將前進方向的接觸角定義為前進角 θ_A (advancing angle)，對側則定義為後退角 θ_R (receding angle)。遲滯現象(hysteresis effect)指當平板傾斜角度從 0 度開始增加直至液珠產生開始移動的過程，此時前進角與後退角的差即為遲滯接觸角(the hysteresis of the contact angle)，如(2- 18)及圖 2- 4 所示。若液珠的遲滯接觸角越大，表示遲滯效應越明顯，液珠達到滑動所需克服的能障也越大(Albenge *et al.*, 2002)。

$$\Delta\theta = \theta_A - \theta_R \quad (2- 18)$$

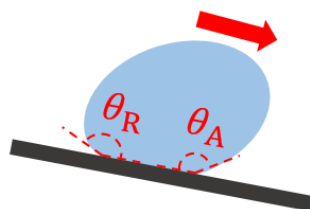


圖 2- 4 遲滯現象示意圖

2-2 細胞篩選

在生醫檢驗研究中，經常需要對特定種類的細胞進行分析，能否精準地將目標細胞從檢體中篩選分離，甚至將檢體中為數不多的稀少細胞分離純化，扮演重要的成敗關鍵。傳統的細胞篩選方式須由專業人員操作離心機等貴重儀器，經過冗長繁複的作業程序才得以完成。隨著微機電及微流體技術發展，將晶片實驗室的概念應用於細胞篩選，不但可以節省昂貴儀器的費用及專業人才的訓練，且可以自動化、更迅速完成作業，對生醫領域有諸多貢獻(Dalili *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2021)。以下將細胞篩選技術分為被動式與主動式加以闡述。

2-2.1 被動式

被動式細胞篩選技術無須施加外力，僅靠流道幾何結構設計，將細胞依照其外型尺寸、密度等性質，將其分離篩選。以下分別介紹常見之微過濾法、慣性力法、決定性側向位移結構法以及夾壓流場分離法。



微過濾法

微過濾法(Microfiltration)運用流道中河堰(weir)、圓柱(pillar)、交叉流(cross-flow)及薄膜(membranes)等微結構，將流道中的細胞依據粒徑大小予以分離篩選。此法具有結構簡單、無須標定(label-free)等優點，然而細胞易受到流道中強大剪應力所破壞，也容易因狹小流道造成阻塞(Shen *et al.*, 2019)。Fan *et al.* (2015)製作多孔性的PDMS薄膜，如圖 2-5 所示，使用微過濾法成功將循環腫瘤細胞(circulating tumor cell, CTC)從全血(whole blood)中分離出來。

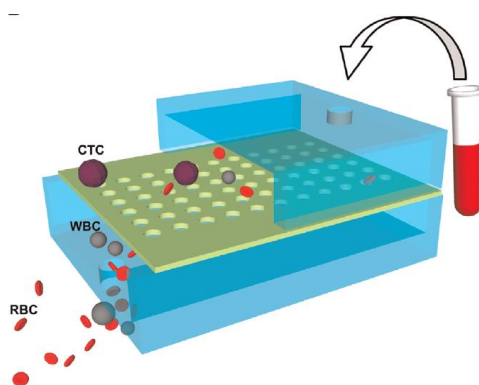


圖 2-5 利用微過濾法篩選細胞(Fan *et al.*, 2015)

慣性力法

傳統微流體系統由於尺寸極小，流場雷諾數遠小於 1，流體運動由強大的黏滯力主導，因此得以精準預測流體中微粒的運動模式。然而慣性力的影響，由 Serge & Silberberg 首先於 1961 年發現，在微流道入口端隨機分布的釐米級微粒，在往下游運動時會朝側向位移，於出口端形成均勻的環狀分布(Segre & Silberberg, 1961)。當微流體的流場雷諾數介於 1~100 時，慣性力的影響最為顯著。流道中的微粒會因各種側向力而產生側向位移，直到這些力在側向達到平衡後，微粒的側向運動才會隨之停止(Chung, 2019)。如圖 2-6 所示，Warkiani *et al.* (2014)。利用將血液注射入螺旋型梯形截面流道，結合慣性力生力和 Dean flow，依照細胞粒徑大小，成功將較大的 CTC 細胞與較小的白血球分離得到高準確度的純化結果

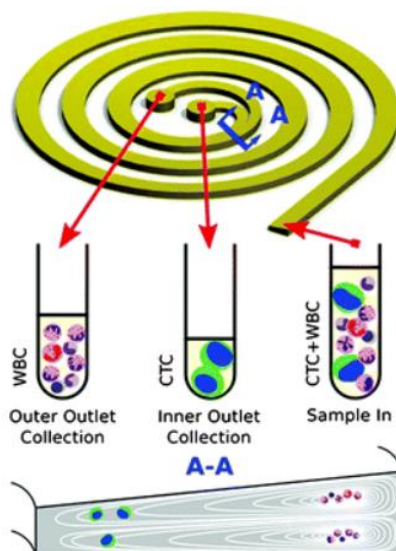


圖 2-6 利用慣性力篩選細胞(Warkiani *et al.*, 2014)

決定性側向位移結構法

決定性側向位移結構(deterministic lateral displacement, DLD)應用層流中物質會跟隨通過其質心的流線(streamline)流動之性質，在流道中設計交錯的障礙物陣列，流體流動方向與陣列方向不同，因而產生彎曲流線(curvy streamline)。當流線在障礙物陣列中穿梭時，使通過的細胞或液珠依照大小不同而分離(Dalili *et al.*, 2019)。Au *et al.* (2017)利用兩階段的決定性側向位移結構設計，可依照細胞大小及外型對稱性，將 CTC 腫瘤細胞從血液中分離。

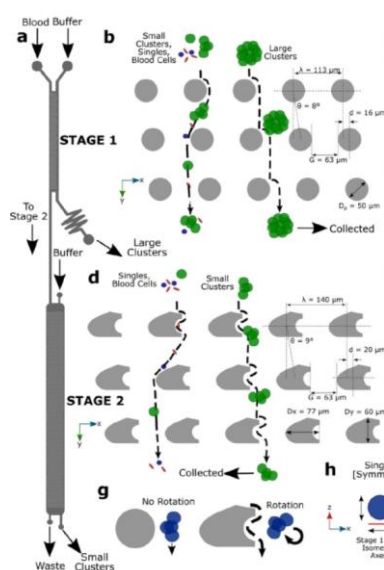


圖 2-7 利用決定性側向位移結構篩選細胞(Au *et al.*, 2017)



夾壓流場分離法

夾壓流場分離法(Pinched flow fractionation)和 DLD 同樣運用層流物質跟隨通過質心之流線流動之性質，由 Yamada *et al.*於 2004 年提出。如圖 2-8 所示，當帶有微粒的流體與另一鞘流(sheath flow)匯聚於漸縮區間(pinched segment)時，微粒會被鞘流向對側流道壁擠壓。依照粒徑的大小，受擠壓後的微粒會與流道壁保持不同的距離並跟隨該處之流線運動，當流體進入下游漸擴區間(broadened segment)時，此距離差會被放大，而達到按照粒徑大小分離的目的(Yamada *et al.*, 2004)。

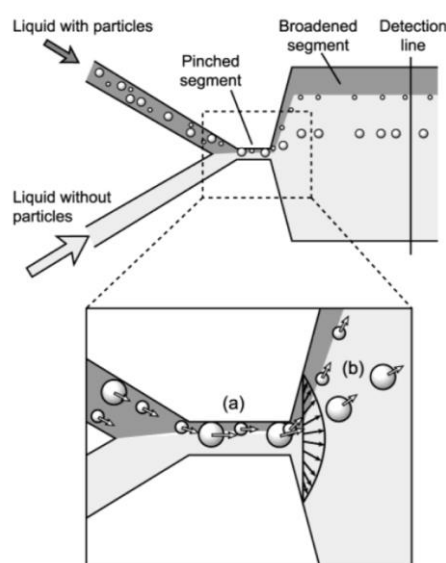


圖 2-8 利用夾壓流場分離篩選微粒 (Yamada *et al.*, 2004)

2-2.2 主動式

主動式細胞篩選法與上節被動式相反，須透過外加電場、磁場或其他外力，將細胞分類。其系統組成較為複雜，但可較精準的對目標細胞進行篩選。以下分別針對常見之聲泳法、介電泳法、磁泳法以及光能法進行說明。

聲泳法

聲泳法(acoustophoresis)藉由聲波施加壓力梯度，驅使微流道中的細胞或顆粒向節點或反節點移動，所移動的距離依細胞大小、密度、可壓縮性和聲波波長等特性而不同。聲泳法為非侵入式(non-invasive)技術，可以避免篩選過程中對細胞造成破壞(Shen *et al.*, 2019)。如圖 2-9 所示，Ren *et al.* (2015)利用一對聚焦指叉換能器



(focused interdigital transducer, FIDT)產生駐表面聲波(standing surface acoustic wave, SAW)，對微粒子及 HeLa 細胞進行實驗，證實聲泳法於高通量細胞篩選應用上的可行性。

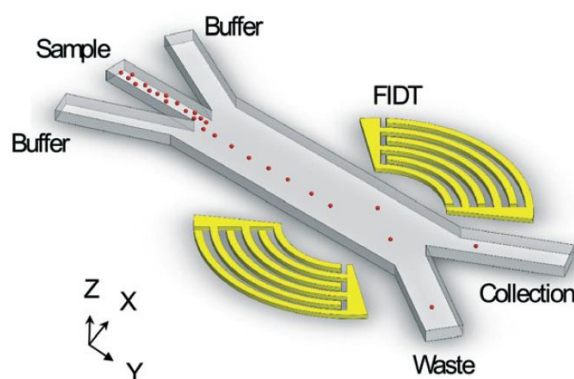


圖 2-9 利用聲泳法進行細胞篩選(Ren *et al.*, 2015)

介電泳法

介電泳法(dielectrophoresis, DEP)是藉由電中性細胞或液珠在不均勻電場中被極化，因而受到電場作用力驅動之現象。根據細胞或液珠體積大小和介電性質不同，受到不均勻電場之作用力也隨之改變，藉由此差異可達到將不同細胞分離篩選之目的(Dalili *et al.*, 2019)。Song *et al.* (2015)利用斜向的指叉電極陣列，產生連續介電場，成功應用介電泳法將微流道中的人類間質幹細胞與其附隨細胞分離。

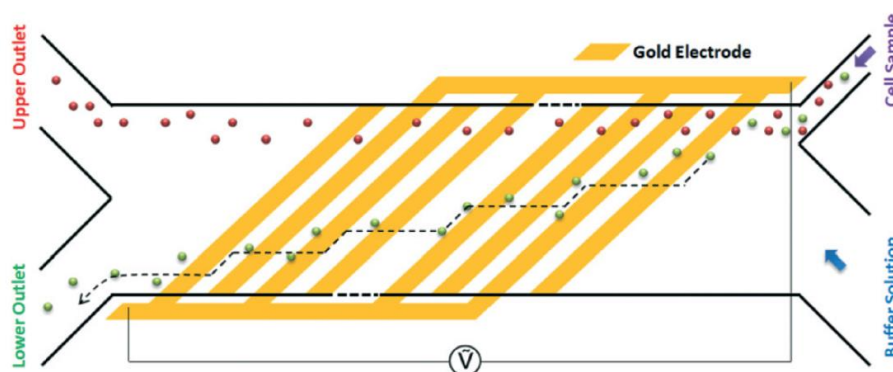


圖 2-10 利用介電泳法篩選細胞(Song *et al.*, 2015)

磁泳法

磁泳法(magnetophoresis)作用方法與介電泳法類似，藉由外加的永久或暫時性磁場，使細胞受到磁力驅動而位移。與介電泳法相比，磁泳法所施加之磁力對細胞較無傷害，且磁力不會受到流體之表面電荷、離子強度或 pH 質影響。然而磁泳法

必須先將目標細胞用磁珠標定，才能被磁力所驅使。如圖 2- 11 所示。Jo *et al.* (2016) 利用含有奈米磁粒和細胞的流體生成體積相同的液珠，由於含有單細胞的液珠所含磁粒較少，可藉由外加於流道的永久磁鐵，將包覆細胞的液珠篩選出來。

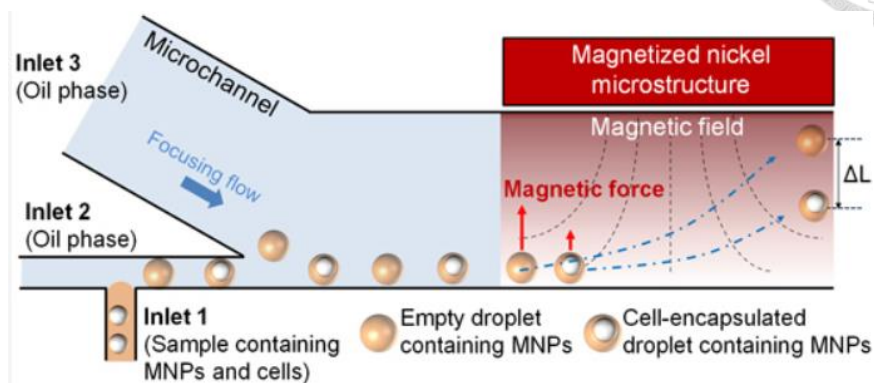


圖 2- 11 利用磁泳法進行液珠篩選(Jo *et al.*, 2016)

光能法

光能法(optical)可分為使用直接光學力(direct optical force)如光鐳(optical tweezer)以及光束生成空化氣泡(cavitation bubble)兩種方式。光能法使用的雷射光束通常落在微米範圍，符合微流體尺度。藉由調控光束波長，光學力的強度可控制在足夠強以操控細胞且又不會破壞細胞的範圍。如圖 2- 12 所示，Wang *et al.* (2011)利用影像分析和光鐳將酵母細胞分離，達到高純度及還原度的精準細胞篩選。

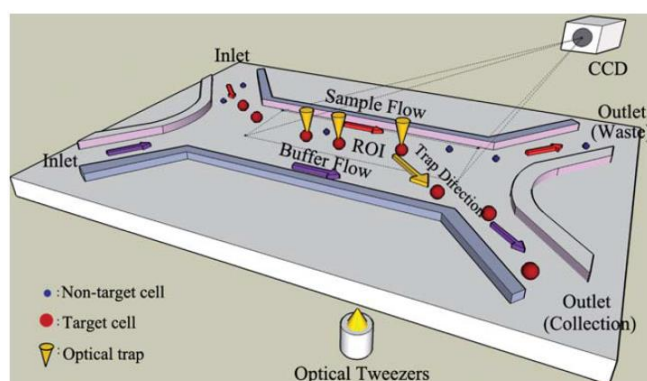


圖 2- 12 利用光鐳篩選細胞(Wang *et al.*, 2011)

2-3 液珠操控技術

數位微流體系統(digital microfluidics, DMF)利用操控微小液珠的方式，使樣品在設計平台上進行輸送、混合、反應和檢測等操作。數位微流體的優勢在於易於和其他應用整合、更小的檢體需求量、因較小的表面積/體積比(surface area/ volume

ratio)使反應更為快速及可對單一液珠分別操控等面向。用於驅動液珠的方法眾多，但皆是利用改變液珠表面自由能，使液珠不對等的表面張力造成兩側接觸角不同，驅使液珠朝向接觸角較小方向移動，直至表面自由能再次達到平衡。生醫檢測過程中，為避免檢體細胞受到破壞，利用液珠包覆細胞的方式進行運輸與檢測，是具有潛力的解決方法，故本節簡介數位微流體中的液珠操控技術(Hao & Li, 2021)。

2-3.1 介電濕潤法

介電濕潤(electrowetting-on-dielectric, EWOD)利用外加電場改變表面自由能的方式操控液珠，廣泛被使用於數位流體技術。於整齊排列的金屬電極上覆蓋一層絕緣性的介電層和使液珠易於移動的疏水層，當對電極施加電壓時，相鄰的液珠會因電荷累積而使該處固液交界面上的表面張力降低，導致液珠與表面的接觸角大幅減小，從疏水性表面變為親水性，液珠會因不對稱的表面張力而由疏水端移動向親水端，達成操控液珠的目的。如圖 2-13 所示，Sun *et al.* (2019)設計各異向性的輸送帶狀電極，利用交流電介電濕潤法，驅動液珠朝指定方向移動。

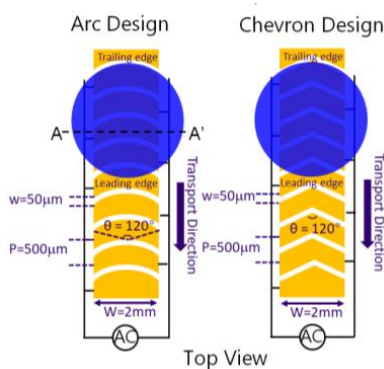


圖 2-13 利用介電濕潤法控制液珠(Sun *et al.*, 2019)

2-3.2 光能操控法

光能操控法是以光強度梯度照射塗上光敏化學塗布的基底，使液珠表面自由能改變而移動。受到光束照射後的光敏化學塗布化學性質改變，導致該處液珠與表面之接觸角變小，使液珠兩側表面張力不對稱而受到驅動，因此可透過光束的位移與光強度梯度來操控液珠。Ichimura *et al.* (2000)使用紫外光和藍光梯度照射感光同分異構物塗布(O-carboxymethylated calixresorcinarene, CRA-CM)，改變液珠接觸角

而驅使液珠移動。如圖 2- 14 所示，Kobayashi *et al.* (2017)將光感濕潤性 (photoresponsive wettability)材料 TiO_2 塗佈於平頂微柱陣列上，使原先因 Cassie-Baxter state 而呈超疏水性的液珠，在紫外光照射後因 TiO_2 的光誘導超親水性 (photoinduced superhydrophilicity)，使液珠接觸角變小。

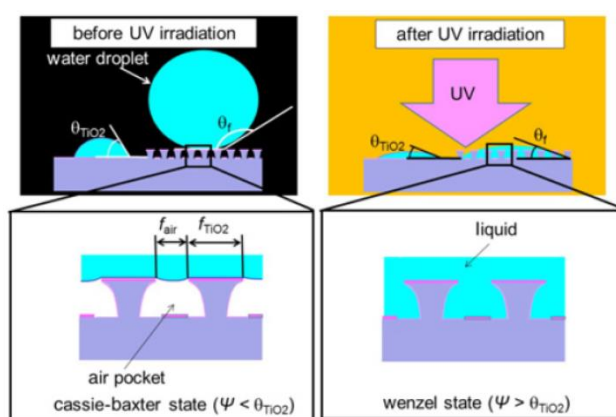


圖 2- 14 利用光能操控法驅動液珠(Kobayashi *et al.*, 2017)

2-3.3 熱能操控法

熱能操控法是在基材下方加裝微加熱器產生溫度梯度，因熱毛細現象 (thermocapillary effect)使液珠表面張力隨溫度上升而呈近乎線性下降。液珠位於低溫區表面張力較高溫區大，不對稱的張力使液珠由高溫區向低溫區移動，而移動速度與液珠半徑、溫度梯度及液體特性有關。如圖 2- 15 所示，Jiao *et al.* (2008)在方形平板流道周圍四邊上放置四個微加熱器，藉由調控各個微加熱器的輸入電流，於平板流道上產生溫度梯度場變化，可操控液珠依循特定封閉路徑移動。

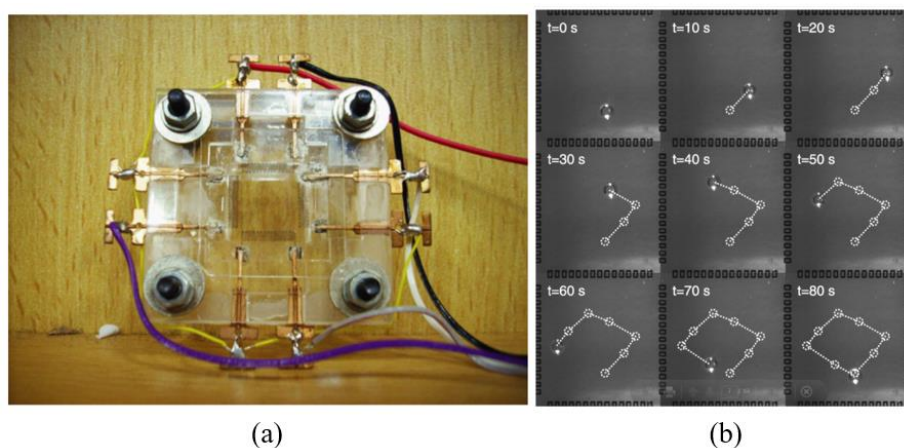


圖 2- 15 (a)平板流道及周邊微加熱器機構圖. (b)液珠移動路徑圖(Jiao *et al.*, 2008).



2-3.4 表面化學能操控法

表面化學能操控法是在基材表面沉積化學分子薄膜，利用化學分子的濃度梯度、分布和種類等差異，使液珠在不同處之表面自由能不同，改變液珠兩側接觸角，驅動液珠向固液表面張力較小處移動。如圖 2-16 所示，Chaudhury and Whitesides (1992)最先將矽烷($\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$)沉積於矽晶圓表面形成一具有化學濃度梯度的表面層，致使潤濕性依濃度成梯度分布，使傾斜平台上的液珠因表面自由能差而向上坡側移動，驗證表面化學能可用於液珠驅動。

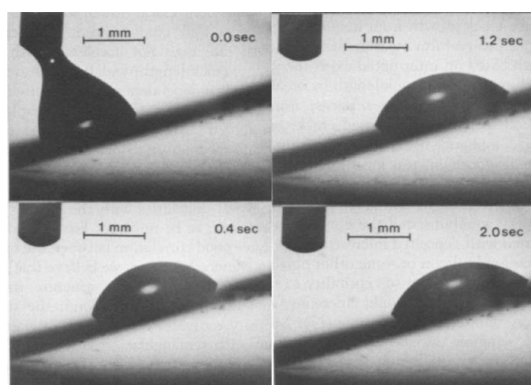


圖 2-16 利用表面化學能操控液珠(Chaudhury & Whitesides, 1992)

2-3.5 表面微結構法

表面微結構法利用基材表面粗糙度或微柱陣列等細微的幾何構造變化，產生潤濕性梯度變化，使基底上的液珠因此梯度產生兩側接觸角差異，能在不施加外力作用下被驅動。Yang *et al.* (2006)提出並經實驗證實，使用具有粗糙度梯度的表面，可操控液珠於疏水性表面上朝向固定方向移動，如圖 2-17 所示。如圖 2-18 所示，Lai *et al.* (2010)結合分子自組裝法與表面微結構法，製作接觸角從 151.2 度到 39.7 度的潤濕度梯度，使表面上的微液珠可在不施予外力情況下，跨越超疏水表面至親水表面，移動 9 mm 之遠的距離。

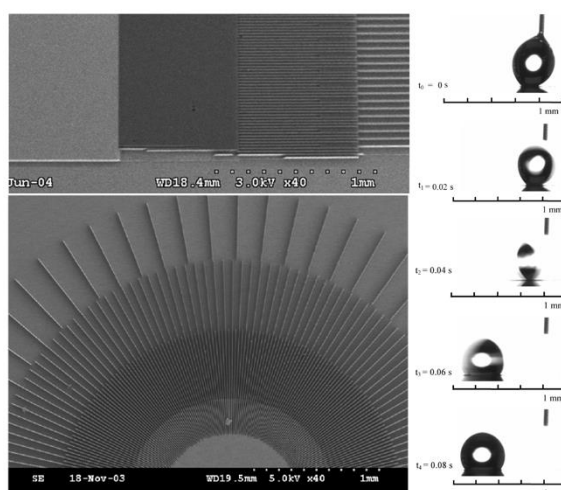


圖 2-17 利用表面粗糙度梯度驅動液珠(Yang *et al.*, 2006)

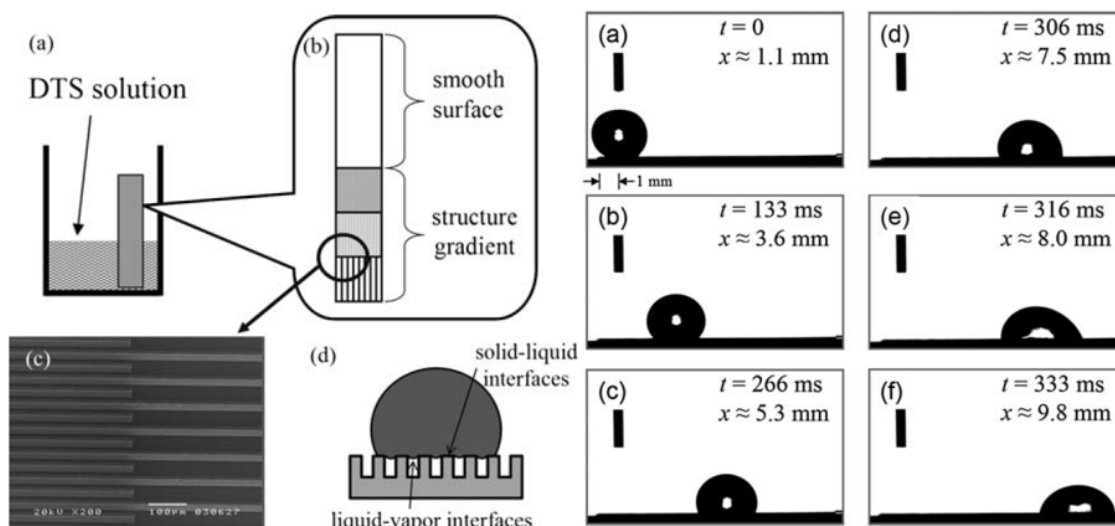


圖 2-18 利用表面微結構及分子自組裝法驅動液珠(Lai *et al.*, 2010)

2-3.6 氣動微型閥操控法

除透過上述在開放式平台上驅動液珠，亦可於封閉流道內搭配氣動微型閥 (pneumatic microvalve) 進行液珠的操控。此類方法通常由上下堆疊之流道層和控制層組合而成，流道層即輸送流體之流道所在，而控制層可藉由通入氣體或液體，藉由壓力改變推動兩層之間的軟性材質薄膜，達到控制流道層中流體的移動。Babahosseini *et al.* (2019) 使用 PDMS 製作具有氣動微型閥之微流體晶片，利用不同閥門的開關，整合液珠的生成、儲存、混合和分類於其上，如圖 2-19 所示，可達到良好的液珠操控效果。

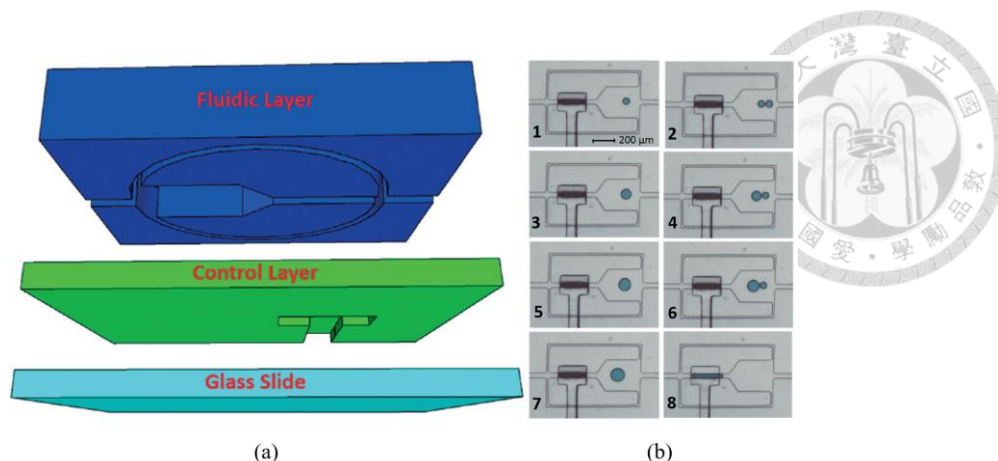


圖 2-19 利用氣動微型閥控制液珠 (a) 流體層與控制層堆疊示意圖 (b) 控制液珠混合時序圖(Babahosseini *et al.*, 2019)

2-4 液珠生成

液珠的生成是藉由使兩互不相容的流體匯集形成交界面，交界面受剪應力產生週期性的變形與破裂而生成液珠。其中生成液珠的流體稱為分散相(disperse phase)，輸送液珠的流體稱為連續相(continuous phase)。液珠生成的物理現象，主要受到毛細數(Capillary number, Ca)所影響，毛細數之定義為黏滯力與兩相流體間表面張力的比例，其公式如(2-1)所示：

$$Ca = \frac{\mu U}{\gamma} \quad (2-1)$$

其中 μ 與 U 分別為連續相的黏滯係數和特徵速度， γ 則是兩相流體間的表面張力。當毛細數較小時，液珠生成主要由交界面兩側壓差主導，稱為擠壓區間(squeezing regime)；隨著毛細數增大，剪應力成為液珠生成的主要因素，稱為滴落區間(dripping regime)；當毛細數增至更大時，液珠的生成主要由黏性流(viscosity-dominated flow)中的 Rayleigh-Plateau 不穩定現象所造成，稱為噴射區間(jetting regime)(Collins *et al.*, 2015; Zhu & Wang, 2017)。

2-4.1 流道設計

微流道的幾何構造限制了流體的邊界，因此流道的設計與液珠生成的性質息息相關。以下簡介三種利用剪應力生成液珠常見的流道設計，分別為交叉流、流體聚焦和共伴流。



交叉流

交叉流(cross-flow)流道設計由一個管徑較寬的主流道，以及與其相交特定角度且管徑較窄的副流道組成。主流道通過連續相，而副流道則通過分散相(Zhu & Wang, 2017)。當分散相前端流入主流道時會幾乎阻擋連續相，和連續相的壓差形成剪應力將分散相截斷生成液珠，液珠的大小與生成頻率可藉由改變連續相與分散相的流率來調控。T 型流道(T-junction)為此類常見之設計，如圖 2- 20 所示，最先由 Thorsen *et al.* (2001)提出，液珠生成的便利性使其被廣泛應用。

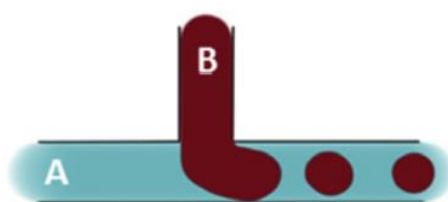


圖 2- 20 T-型液珠生成流道(Alkayyali *et al.*, 2019)

流體聚焦

流體聚焦(flow-focusing)最先由 Anna *et al.* (2003)用於兩液相的液珠生成系統，是最常被使用於液珠包覆細胞的方式，其流道設計將分散相和連續相會聚流入一個狹窄區(orifice)。如圖 2- 21 所示，利用連續相施加的壓力和剪應力，使分散相形成長絲狀並在流經狹窄區時斷裂形成液珠。液珠的大小隨連續相對分散相的流率比或分散相的黏滯係數增加而下降，調整狹窄區的大小可更精準控制液珠生成大小，加上流體聚焦生成液珠速率快，使其適合用於高通量小液珠的生成(Alkayyali *et al.*, 2019)。

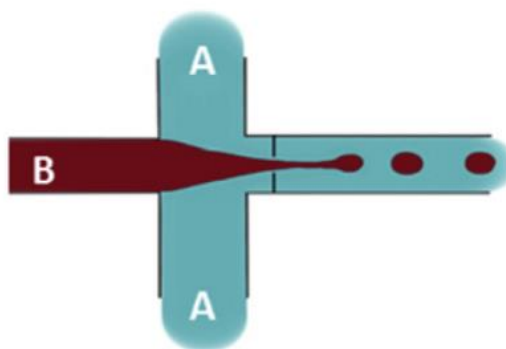


圖 2- 21 流體聚焦液珠生成流道(Alkayyali *et al.*, 2019)



共伴流

共伴流(co-flow)最早由 Umbanhowar *et al.* (2000)提出，如圖 2-22 所示，是由連續相流道和在此流道中央與其平行的分散相流道組成。當兩液相交界面的連續相剪應力大於界面張力時，分散相會被截斷生成液珠，液珠的大小與流道管徑大小和兩相流率比例有關，和上述的流體聚焦相比，共伴流生成的液珠尺寸較大(Alkayyali *et al.*, 2019)。



圖 2-22 共伴流液珠生成流道(Alkayyali *et al.*, 2019)

2-4.2 被動式液珠生成

被動式液珠生成系統被廣泛應用於生醫領域中，進行水凝膠(hydrogel)液珠的生成。利用水凝膠的生物相容性輔以微流體的特性，使用於包覆細胞、組織工程和藥物輸送有諸多優點(Moreira *et al.*, 2021)。被動式液珠生成系統通常藉由針筒推進器(syringe pump)提供穩定的流率，如圖 2-23 所示，或利用壓力調節器和重力壓力單元(gravity-based pressure unit)產生穩定壓力源，驅動兩相流體流動。液珠生成過程中，針筒推進器或壓力調節器提供的部分能量被轉換為界面能(interfacial energy)，使兩相界面不穩定，分離產生液珠(Zhu & Wang, 2017)。如圖 2-24 所示，按照液珠生成的物理特性和機制，可依毛細數由小至大，將被動式液珠生成分為擠壓、滴落和噴射等三個區間。

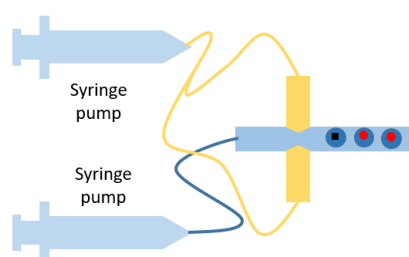


圖 2-23 針筒推進器被動式液珠生成系統示意圖

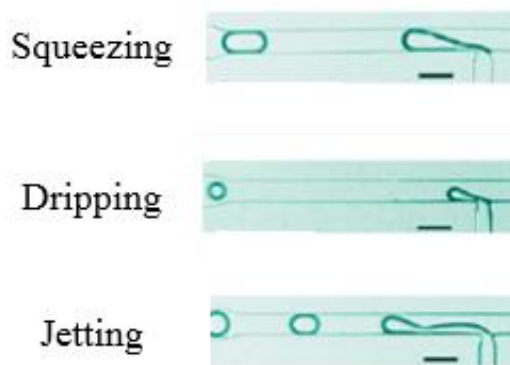


圖 2-24 被動式液珠生成不同區間(Zhu & Wang, 2017)

2-4.3 主動式液珠生成

主動式液珠生成仰賴施加外在能量控制液珠的生成，和被動式相比，具有可即時分別調控液珠大小、生成速率以及較快速的系統反應時間等優點。主動式液珠生成機制大致可分為施加外力或改變本質力(intrinsic force)兩種，常用的外加能量如電能、磁能、光能和熱能等，而常用於改變本質力的方式如利用機械震動、壓電材料或微型閥等控制流速變化，進而改變慣性力或黏滯力等本質力(Zhu & Wang, 2017)。如圖 2-25 所示，Park *et al.* (2011)利用脈衝雷射照射兩相流體交界面處，提供的能量使液體快速膨脹產生氣泡，將分散相擠入連續相中產生液珠。

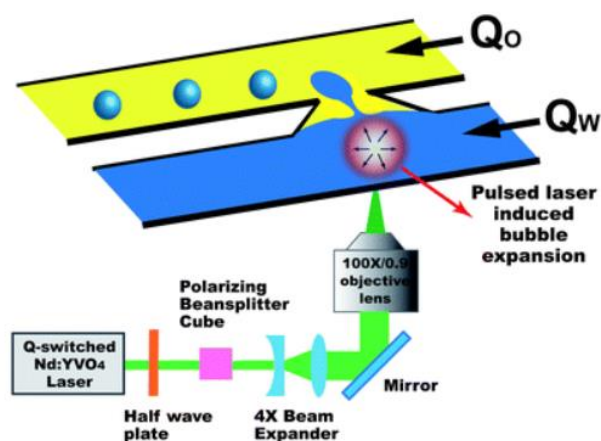


圖 2-25 利用脈衝雷射主動式生成液珠(Park *et al.*, 2011)

2-4.4 氣體生成液珠

傳統的液珠生成系統，常使用與分散相不相溶的油類作為連續相，其黏滯係數較大，有利於穩定生成大小均勻的液珠，然而油類及其中所添加的介面活性劑，容

易對分散相中的檢體造成汙染。近年來，陸續有研究團隊使用氣體作為連續相，證實氣體液珠生成(liquid-in-gas)的可行性。Jiang *et al.* (2015)利用兩毛細管形成共伴流流道，內管通入水，外管通入氣體，成功生成液珠，如圖 2-26 所示。Tirandazi and Hidrovo (2017)利用流體聚焦液珠生成流道，探討連續相及分散相流率調控對氣體生成液珠型態的關聯，如圖 2-27 所示。

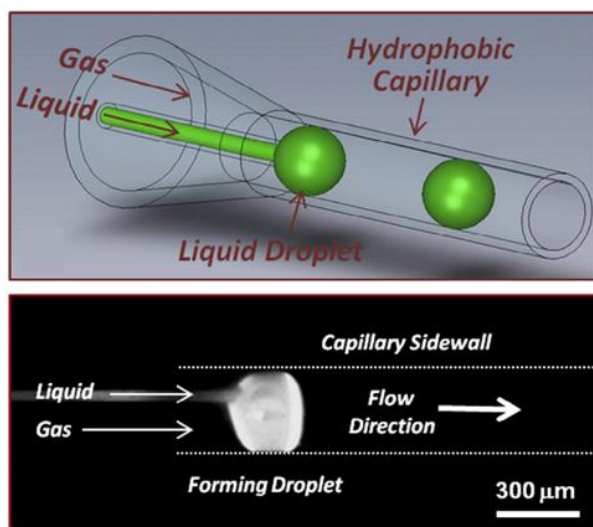


圖 2-26 共伴流氣體生成液珠(Jiang *et al.*, 2015)

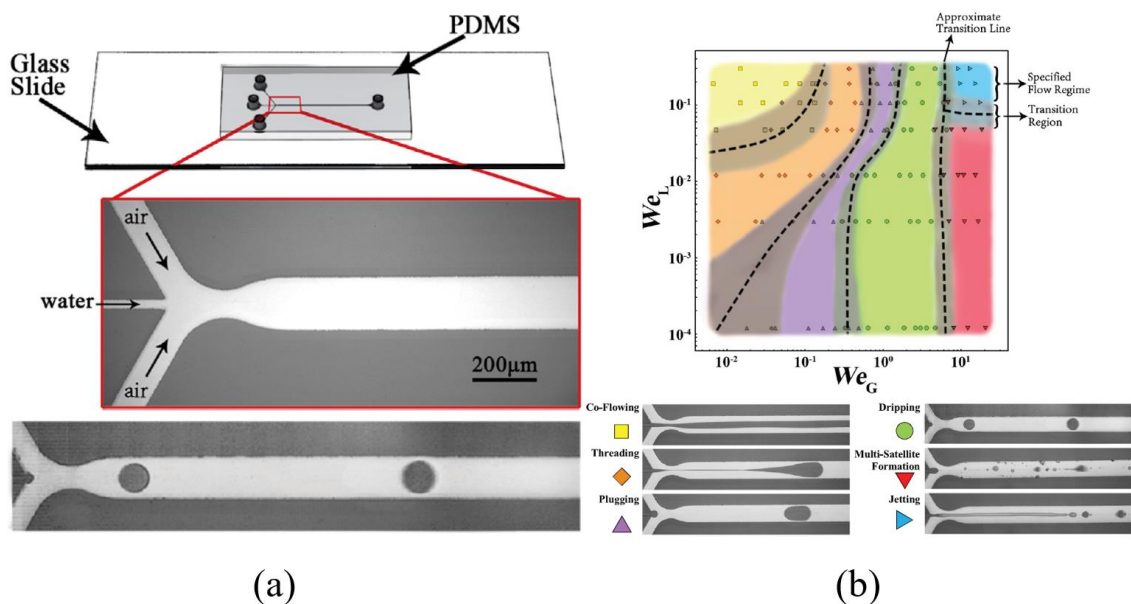


圖 2-27 聚焦流氣體生成液珠 (a) 流道外觀及所生成液珠 (b) 液珠型態與流率關係圖(Tirandazi & Hidrovo, 2017)



2-4.5 包覆細胞

液珠包覆細胞(cell encapsulation)是將帶有細胞的流體作為分散相，以液珠生成的方式，使液珠生成後將細胞包覆於其內。包覆方式依照精準度要求，可分為非確定性包覆和確定性包覆，以下加以闡述。

非確定性包覆

非確定性包覆(non-deterministic cell encapsulation)利用被動式(如：圖 2-28)或主動式(如：圖 2-29)的液珠生成方式，將含有細胞的分散相生成包覆細胞的液珠。藉由調控分散相中細胞的濃度，可影響液珠包覆後每個液珠內所含的細胞數，當所夾帶的細胞尺寸遠小於液珠時，液珠內所含的平均細胞數目可用體積濃度近似，呈波松分佈(Poisson distribution)(Collins *et al.*, 2015)。

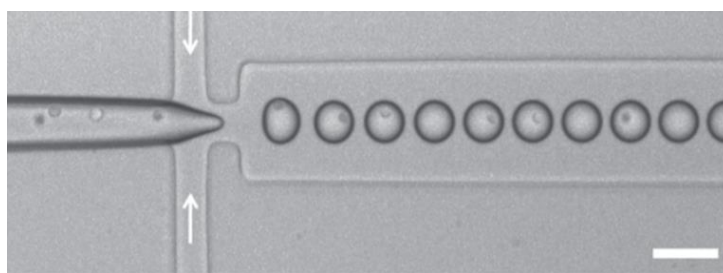


圖 2-28 被動式非確定性細胞包覆(Hong *et al.*, 2010)

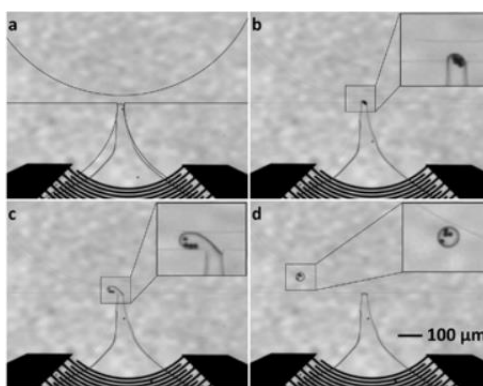


圖 2-29 主動式非確定性細胞包覆(Collins *et al.*, 2013)

確定性包覆

確定性包覆(deterministic cell encapsulation)為了解決波松分佈的限制，可利用多種方法提升單一細胞包覆的成功率。如圖 2-30(a)所示，在液珠包覆細胞後，利用聲能、電能及光能等外加能量或是慣性力及流道設計，可將成功包覆單一細胞的

液珠予以篩選，得到高純度的單細胞包覆液珠。如圖 2-30(b)所示，使用慣性力將細胞於被包覆前先依等間距進行排列，並使液珠生成速率與細胞到達液珠生成區吻合，即可成功包覆單一細胞。此外，如圖 2-30(c)所示，即時包覆技術(on-demand encapsulation)利用自動化感測系統，當偵測到細胞經過液珠生成區時，即回授訊號並產生液珠即時將此細胞包覆。

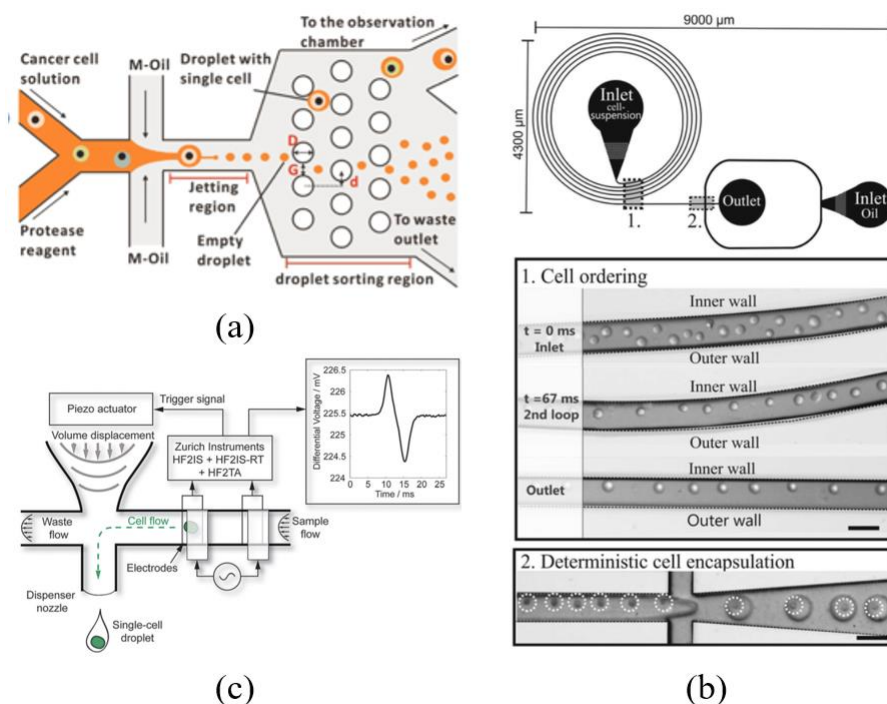


圖 2-30 (a)細胞包覆後篩選(Jing *et al.*, 2015). (b)慣性力包覆前排列細胞(Kemna *et al.*, 2012). (c)即時性細胞包覆(Schoendube *et al.*, 2015).

2-5 影像辨識

影像辨識(image recognition)利用不同的演算法，可分析影像中目標物的特徵並達到自動化的影像分類，大幅減少人力的需求，可更有效率的分析實驗結果。影像辨識近年來也逐漸被應用於微流體和生醫領域，由於數位影像中涵蓋多項特徵，透過分析影像可以更有效地提升細胞或液珠篩選效率。而隨著機器學習的發展，進一步增加影像辨識的可靠度，使影像辨識成為未來微流體晶片整合應用中極具潛力的技術。Sesen and Whyte (2020)即利用影像處理，辨識流道中生成的各個液珠內所含細胞數量，藉此篩選出單細胞包覆的液珠。Lee *et al.* (2021)透過深度學習(deep

learning)和影像辨識，對微粒子與細胞進行篩選純化，達到高於 90 %的準確率。

影像辨識的過程可分為影像分割(image segmentation)、特徵擷取(feature extraction)和影像分類(image classification)等三個步驟，以下簡述各步驟的原理及常見的演算法類型。

2-5.1 影像分割

影像分割是數位影像處理的核心階段，目標是將影像切割成多個互不交疊的重點區域(region of interest, ROI)。廣為使用的 RGB 彩色數位影像儲存形式是由多個像素所組成的矩陣，並可將影像資訊拆解成紅、綠、藍三個通道及相對應的灰階影像。灰階影像不具色彩，僅有介於黑白之間的亮度強度分布，零為黑色，最大值則為白色。數位影像中物件的邊緣，相鄰像素通常會有大幅度的強度變化，而同一個物件會具有較相近的強度分布。影像分割即利用尋找灰階影像中像素強度的不連續性與相似性，作為不同 ROI 之間切割的依據，將前景物件轉換為白色，背景轉換為黑色的二值化影像(Rodellar *et al.*, 2018)。常見於細胞影像分割之演算法有閾值性分割(thresholding based segmentation)、邊緣性分割(edge based segmentation)和數學形態學分割(mathematical morphology segmentation)。

閾值性分割

閾值性分割是利用演算法尋找適當的灰階閾值，將細胞本體與背景或是將細胞核與細胞質做分割。如圖 2- 31 所示，Li *et al.* (2016)結合 RGB 通道與 HSV 通道，使用雙閾值(dual-threshold)分割法，搭配適當的前、後處理，將急性骨髓性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)影像中的白血球分割出來，可達到 98 %的準確率。Mandyartha *et al.* (2020)比較全域性閾值(global thresholding)和適應性閾值(adaptive thresholding)於血液抹片影像中白血球分割的結果。全域性閾值透過分析整個影像的直方圖(histogram)選取適合的閾值，而適應性閾值則是先將影像分割成區塊，針對不同區塊選取個別最適當的閾值。研究發現，當影像中白血球所佔的像素數少於其他物件的像素數時，適應性閾值分割可以得到較準確的結果。

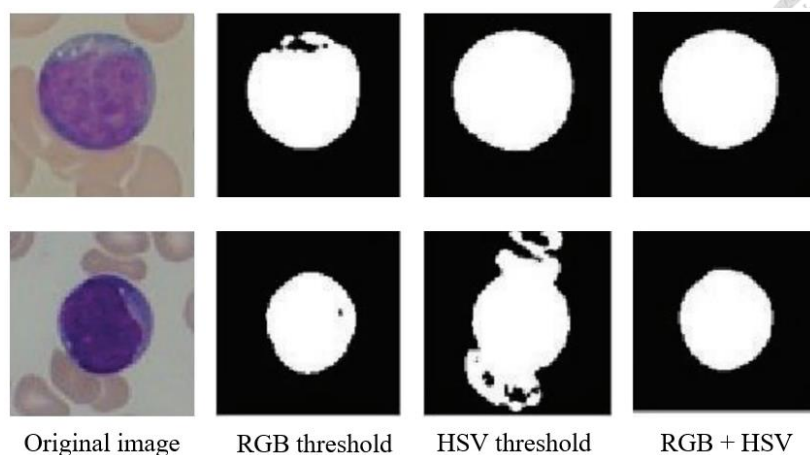


圖 2-31 結合 RGB 通道和 HSV 通道對白血球進行閾值性分割(Li *et al.*, 2016)

邊緣性分割

影像中物體與背景或其他物體的交界處亮度強度通常會有大幅度的改變，邊緣性切割透過逐一尋找灰階影像中相鄰像素梯度之一階微分的最大值或是二階微分的零交點(zero crossing)，標記出物體的邊緣位置。常見的一階運微分算子如 Sobel、Prewitt 和 Roberts 等運算子，常見的二階運微分算子則有 Laplacian 和 Gaussian of Laplacian 等，而近年來非線性的運算子也日漸普及。如圖 2-32 所示，Pan *et al.* (2015)提出細菌覓食邊緣偵測法(bacterial foraging based edge detection, BFED)，並與其他數種邊緣偵測演算法比較，在細胞影像邊緣偵測中得到較佳的偵測結果，可有效提升細胞分割的準確率。

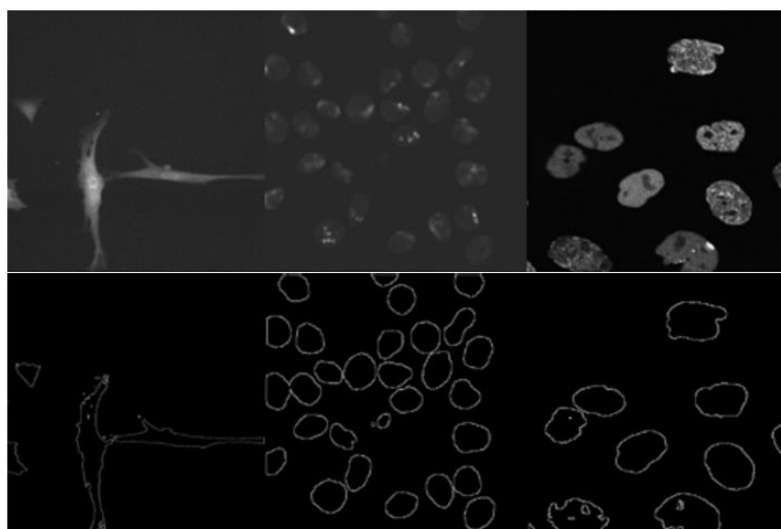


圖 2-32 上：原始細胞影像。下：BFED 邊緣偵測結果(Pan *et al.*, 2015)



數學形態學分割

數學形態學是普遍被用於數位影像處理的基本理論，最早於 1964 年由 Matheron 提出，用於礦石的定量分析。此理論運用數學上的集合理論、積分幾何學與格代數(lattice algebra)等學說，分析數位影像中物件的外觀形態。此法利用稱為結構元素(structure element)的矩陣運算子與二值化影像中的像素交互作用，可擷取出影像中前景 ROI 的形態學特徵，基礎的影像處理包括腐蝕(erosion)、膨脹(dilation)、開運算(opening)和閉運算(closing)等(Loddo *et al.*, 2018)，其整理如表 2-1(Haralick *et al.*, 1987)。Braiki *et al.* (2016)利用一連串的數學形態學與閾值處理，將顯微影像中的樹突細胞(dendrite cell)與背景分割，並達到 95%的分割良率。

表 2-1 數學形態學常見運算子，整理自(Haralick *et al.*, 1987)

運算子	表示符號	數學方程式	示意圖
腐蝕 (erosion)	$A \ominus B$	$A \ominus B = \{z \in E^N (B)_x \subseteq A\}$	
膨脹 (dilation)	$A \oplus B$	$A \oplus B = \cup_{b \in B} (A)_b$	
開運算 (opening)	$A \circ B$	$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B$	
閉運算 (closing)	$A \cdot B$	$A \cdot B = (A \oplus B) \ominus B$	

2-5.2 特徵擷取

影像中的特徵是影像辨識的重要依據，特徵擷取是對前述影像分割後得到的 ROI 進行分析，從中擷取出一組可用於描述其特徵的量化數據，作為後續分類的指標。有助於影像辨識的特徵大致上可分為幾何(geometric)、紋理(texture)和色彩(color)三個主要面向。

幾何特徵

幾何特徵利用形態學分析，擷取細胞和細胞核的多種特徵，包括周長、面積和外形等。如圖 2-33 所示，Vaghela *et al.* (2016)利用數學形態學處理血液顯微影像，分析白血球的真圓度(roundness)等幾何特徵作為判別慢性骨髓性白血病與慢性淋



巴性白血病的依據，所分析的 30 張影像達到 93% 以上的準確率。

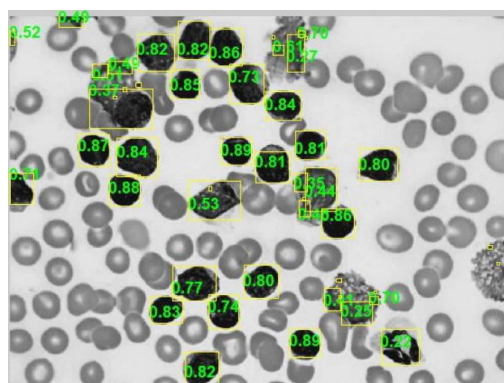


圖 2-33 利用幾何特徵作為白血種類判斷依據(Vaghela *et al.*, 2016)

紋理特徵

紋理特徵描述材質、色彩或亮度強度在影像中的空間分布，這些特徵雖易於觀察但較難量化呈現，主要使用於紋理分析的方法為粒度分析法(*granulometry*)以及灰度共生矩陣法(*gray-level co-occurrence matrix, GLCM*)。粒度分析法利用數學形態學分析影像中粒子大小的分布，可呈現影像中大小不同的亮點和暗點之分布情形。灰度共生矩陣法分析相鄰兩像素，並將灰階值和分布情形以矩陣形式表示，可擷取影像中的二階紋理特徵如對比、能量、同質性和熵，各項特徵涵義整理如表 2-2 (Huang *et al.*, 2020)。Huang *et al.* (2020)使用灰度共生矩陣法擷取卵巢癌細胞影像的紋理特徵並進行分析，可有效辨認出具有抗藥性(*cisplatin resistant*)的卵巢癌細胞(*ovarian adenocarcinoma cells*)，如圖 2-34。

表 2-2 灰度共生矩陣法分析特徵，整理自(Huang *et al.*, 2020)

特徵	數學方程式	物理含意
對比 (contrast)	$\sum_{ij=1}^G C_{ij}(i-j)^2$	表示細胞邊緣及立體結構
能量 (energy)	$\sum_{ij=1}^G C_{ij}^2$	表示紋理整齊程度
同質性 (homogeneity)	$\sum_{ij=1}^G \frac{1}{1+ i-j } C_{ij}$	表示灰階紋理分布平滑程度
熵 (entropy)	$-\sum_{ij=1}^G C_{ij} \log C_{ij}$	表示紋理混亂程度

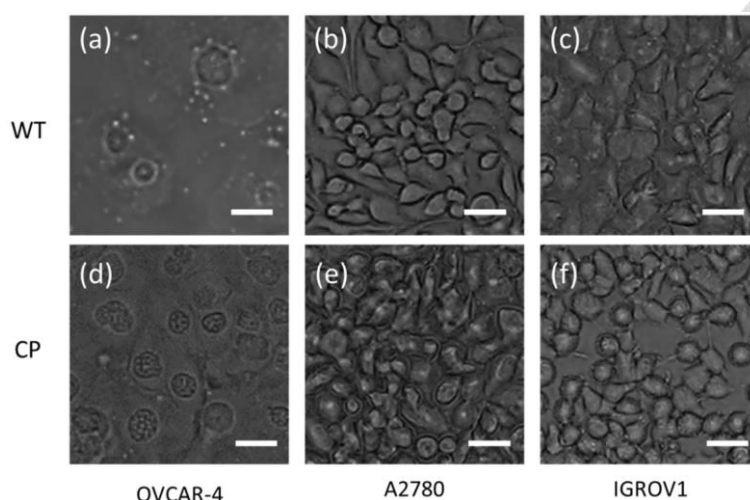


圖 2-34 卵巢癌細胞。上：野生型。下：抗藥型(Huang *et al.*, 2020)

色彩特徵

色彩特徵為影像中細胞的色彩視覺表現，除了最為普遍的 RGB 色彩空間，利用數位影像不同色彩空間的表現方式如 CMYK、HSV 等色彩模型，可擷取出不同特徵。藉由處理不同色彩空間中各通道相對應的直方圖，可利用如平均值、標準差和分布等統計學形式表達。Kavitha and Suruliandi (2016)將黑色素瘤(Melanoma)影像進行閾值分割後，利用灰度共生矩陣法擷取紋理特徵，並將影像轉換至 RGB、HSV 及 OPP 等三種不同色彩空間，並分析各色彩空間之直方圖擷取色彩特徵，如圖 2-35 所示。研究結果發現，結合紋理特徵和 RGB 色彩特徵，可使後續影像分類達到 93.1%的準確率。

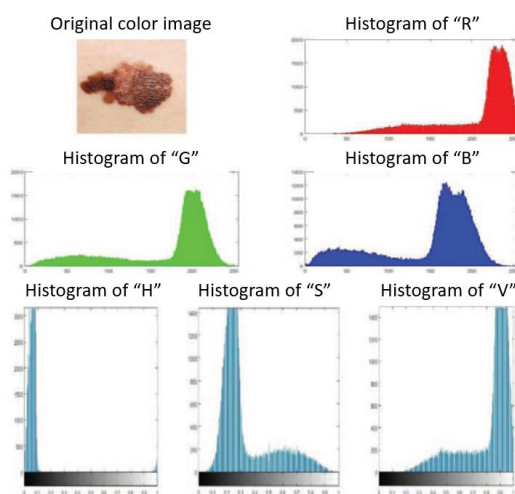


圖 2-35 影像於 RGB 及 HSV 色彩空間之直方圖(Kavitha & Suruliandi, 2016)



2-5.3 影像分類

細胞影像經過前述的影像分割和特徵擷取後，每張影像可由一組量化數據表示其特徵，影像分類的目標即是利用不同的演算法，透過機器學習多次迭代分析，將所有影像依據相對應的特徵予以分類到不同類別。用於細胞影像分類的演算法眾多，以下簡介常見兩種演算法：類神經網路(artificial neural networks, ANN)及支援向量機(support vector machines, SVM)。

類神經網路

類神經網路是一種模擬生物體中神經網路結構與運作模式的計算模型，由單一輸入層(input layer)、輸出層(output layer)和一層以上的隱藏層(hidden layer)組成，如圖 2-36 所示。影像處理中影像的像素可作為輸入層的元素，而每個元素各自與第一層隱藏層中的每個神經元(neuron)相連，最後一層隱藏層中的神經元同樣也各自與輸出層的每個元素相連，所有連結上都有一相應的權重(weight)。機器學習過程中，會先將資料集分為訓練集和驗證集，將訓練集中的資料通過神經網路後，神經元上的轉移函數(transfer function)與和神經元連接的權重運算，可輸出相應的預測結果。將所有訓練集資料都通過神經網路即為一次迭代，每次迭代後藉由修正預測結果與真實結果間的誤差，並利用反向傳遞(back-propagation)更新神經網路中的所有權重，再藉由一次次的迭代降低預測結果的誤差(Elsalamony, 2018)。Liang *et al.* (2018)結合卷積神經網路(convolutional neural networks, CNN)與遞迴神經網路(recurrent neural networks, RNN)，相互彌補模型學習上的短處，作為血液影像分類的複合式深度學習模型。經過比較，複合式模型在自定義的四類血液影像分類測試中，可達到 90.79%的準確率，比單獨使用卷積神經網路更為準確且更有效率。

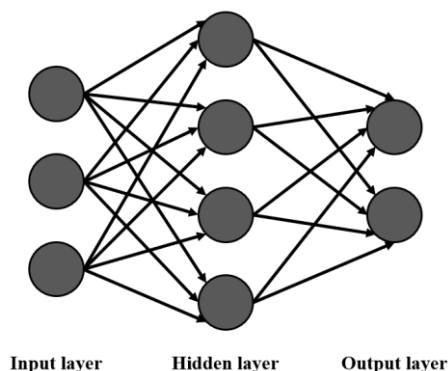


圖 2-36 類神經網路示意圖(重製圖，Almansour *et al.*, 2019)

支援向量機

支援向量機是一種監督式機器學習(supervised machine learning)模型，常被用於樣本分類與回歸分析等多種用途。機器學習過程中，將前述經過特徵擷取後的影像作為輸入樣本，這些影像可對應到多維度空間中的樣本點，而坐標軸即為樣本擷取出的各種量化特徵。支援向量機藉由已標定(labeled)的樣本作為訓練集，在多維空間中尋找一個超平面(hyperplane)作為各維度中不同樣本間二值分類(binary classification)的分割平面，並透過多次迭代分析，找到各維度中分割平面與兩側最近樣本點距離最遠的超平面，即為最佳的分類模型(Almansour *et al.*, 2019)。Bigorra *et al.* (2017)利用支援向量機搭配擷取不同影像特徵，將血液影像中的反應淋巴細胞(reactive lymphoid cell)、淋巴細胞(lymphoid cell)和骨髓芽細胞(myeloid blast cell)予以分類。經過 696 張影像訓練後的模型再由 200 張影像驗證，可達到整體 80% 的準確率。

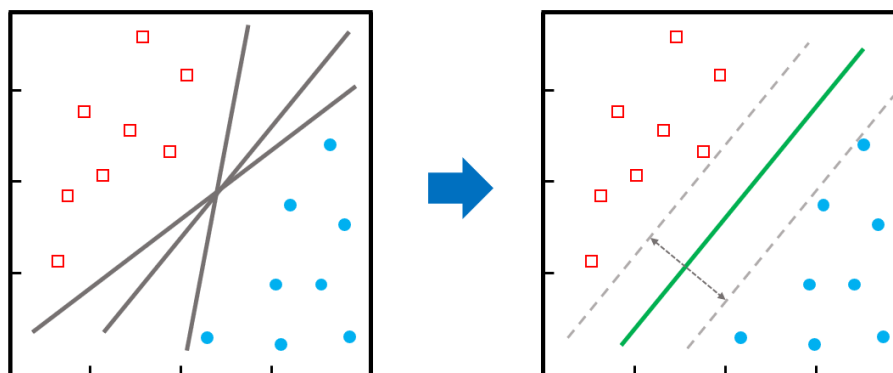


圖 2-37 支援向量機示意圖(重製圖，Almansour *et al.*, 2019)



第三章 研究方法

本研究旨為設計一自動化細胞篩選系統，先將檢體中的細胞以流體聚焦方式於封閉流道中包覆在微液珠內，再利用影像辨識判別液珠內容物並回授訊號，以氣動微型閥方式，控制後端流道內微液珠的移動方向，將含有肌肉衛星細胞的液珠與含有雜質的液珠予以分離。期望藉由本研究開發之自動化系統，降低傳統稀少細胞篩選純化過程對大量時間成本、昂貴儀器與技術人員的依賴。

本研究之研究方法如圖 3-1 所示，分為三個部分詳加闡述：(1) 系統設計：說明元件基材選用與微流道設計理念；(2) 實驗流程：詳述整體系統流程、儀器設備與架設方式、所需檢體製備方式、影像處理方法以及結果驗證方式；(3) 元件製作：說明元件製作步驟，涵蓋母模黃光微影製程(photolithography)以及元件翻模軟微影製成(soft lithography)。

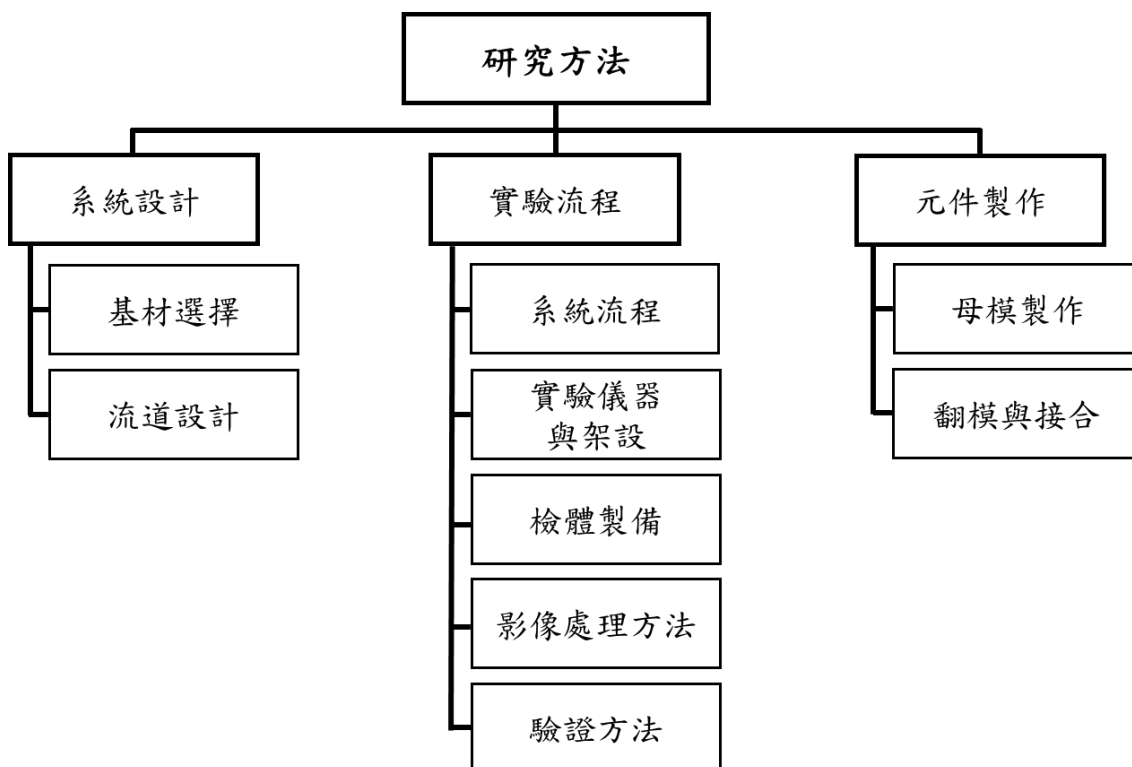


圖 3-1 研究方法架構圖



3-1 系統設計

3-1.1 基材選擇

聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)因為具有顏色透明易於觀察、高度生物相容性、電熱絕緣性佳且耐高溫以及具有彈性等優點，是廣泛被使用於微流道製作的高分子有機矽化合物，其詳細性質如表 3- 1 所列。本研究會將微流道元件置於倒立式顯微鏡上觀察，因此元件基材必須具備高度透光性，且用於細胞研究之微流道材質需為生物相容性，而氣動微型閥仰賴薄膜形變，高形變能力是必要條件。綜上所述，PDMS 的性質皆符合元件設計需求，因此選擇 PDMS (Dow Sylgard 184 Silicone Elastomer)作為本研究微流道元件之基材。

表 3- 1 Dow Sylgard 184 Silicone Elastomer 性質表

Property	Unit	Result
Viscosity (Mixed)	Pa-sec	3.5
Specific Gravity (Cured)	-	1.03
Working Time at 25 °C (Pot Life - Hours)	Hours	1.2
Cure Time at 25 °C	hours	48
Heat Cure Time at 100 °C	minutes	35
Heat Cure Time at 125 °C	minutes	20
Tensile Strength	MPa	6.7

3-1.2 流道設計

本研究之微流道設計分為三個階段，如圖 3-2 所示。第一階段為細胞包覆區，利用流體聚焦流道設計生成液珠，使用壓縮空氣作為流續相，細胞檢體液作為分散相，並透過調整細胞濃度，盡可能使每個液珠中僅包覆單一細胞；第二階段為影像辨識區，於液珠生成後透過工業相機與顯微鏡擷取液珠內的細胞影像，作為分類依據；第三階段為液珠篩選區，透過氣動微型閥門，藉由主流道分岔處下方的氣室空

腔變化，依照影像辨識結果，進行主動式控制，驅使包覆細胞的液珠朝向目標收集區或廢液收集區移動。

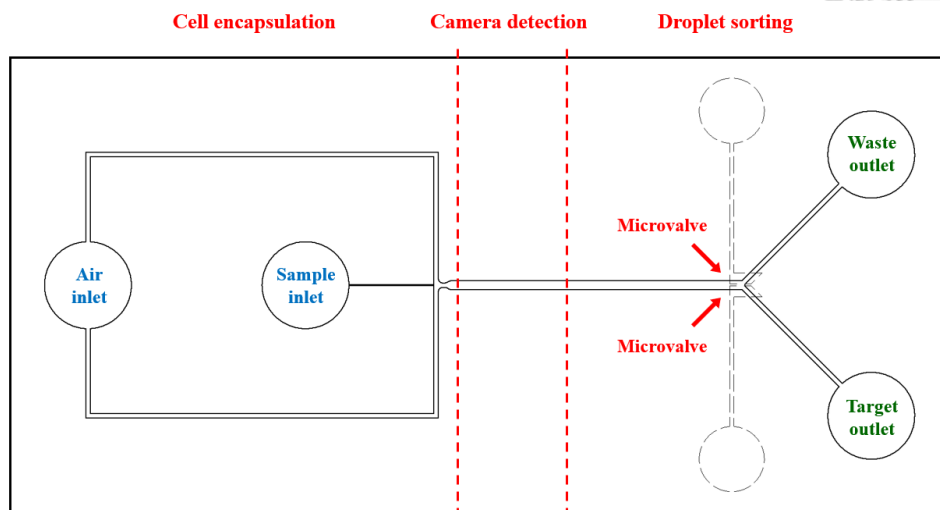


圖 3-2 流道設計圖

3-2 實驗流程

3-2.1 系統流程

本研究篩檢系統之流程如圖 3-3 所示，主要分為液珠包覆細胞、影像識別以及氣動微型閥液珠分類等三階段。

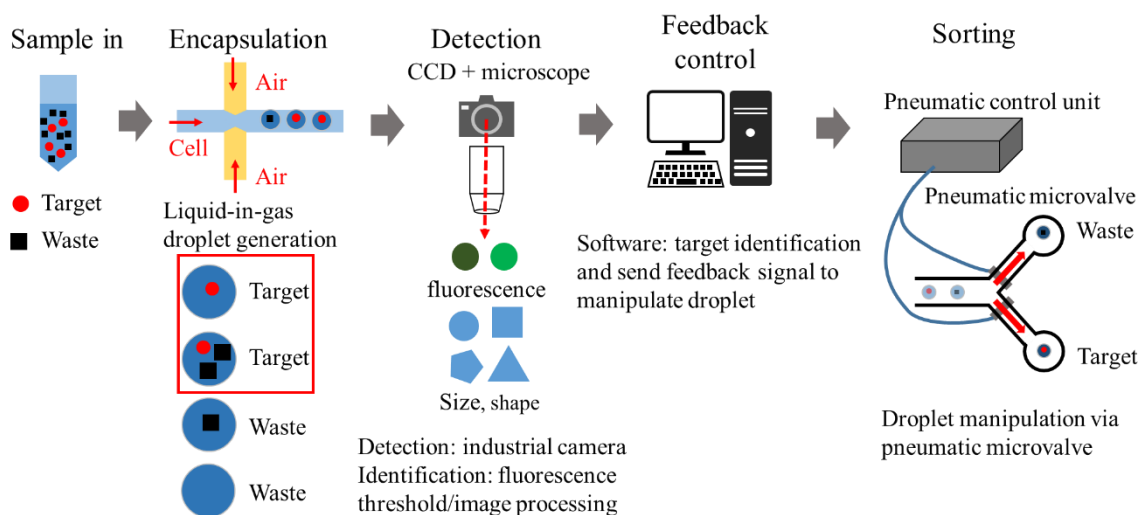


圖 3-3 實驗流程示意圖



液珠包覆細胞

本研究使用流體聚焦的液珠生成流道設計，於生成液珠時將細胞包覆於液珠內。一般連續液珠生成系統中，常使用礦物油等與水不相容之油類作為連續相，並於其中加入介面活性劑避免生成之液珠相互碰撞融合。雖然使用油類因黏滯係數 r 較高，具有生成液珠穩定之優勢，然而油脂和介面活性劑容易對活體細胞造成汙染，且後端收集後須將油與水分離，容易造成分離不完全影響產率。本研究參考 (Tirandazi & Hidrovo, 2017) 氣體生成液珠之設計，使用壓縮空氣作為連續相，雖然液珠生成之穩定性不如傳統油類生成液珠佳，卻具有高度生物相容性及後端使用簡便等優勢。

從中研院合作研究室取得之檢體溶液中，除欲篩選出的肌肉衛星細胞之外，亦含有肌肉纖維細胞等其他雜質，皆呈現單一細胞懸浮於溶液中。將此檢體裝入針筒中，並利用如圖 3-4 所示之針筒推進器(KDS 220, Kd Scientific, USA)設定體積流率，由微流道系統的液珠生成分散相入口端注入。同時連續相則由空氣壓縮機提供壓縮氣體，經由第一段主調壓閥調整至穩定壓力輸出，再接至第二段精密調壓閥進行細微的調整，並透過電磁閥接至入口端注入。檢體通過聚焦流體的液珠生成流道後，生成的液珠中有以下數種可能結果：(1)僅包含肌肉衛星細胞、(2)包含肌肉衛星細胞與雜質、(3)僅包含雜質以及(4)未包含任何細胞或雜質。由於肌肉衛星細胞為稀少細胞，為提升產率，並避免珍貴的稀少細胞被浪費，因此將上述前兩項結果都視為目標液珠，也就是後續希望收集的液珠，而後兩項結果未包含任何目標細胞，因此視為廢液液珠，將於後續分離時移除。



圖 3-4 Kd Scientific 220 syringe pump



影像識別

本研究將工業相機(Alvium 1800U-040m, Allied Vision, Germany)架設於倒立式顯微鏡(IX73, Olympus, Japan)上，利用 LabVIEW 軟體擷取相機即時影像，並使用 LabVIEW 影像模組自行撰寫程式進行一連串影像分割、特徵擷取與影像分類等處理，對通過視野的液珠進行標定，判斷該液珠為目標液珠或是廢液液珠，並回授訊號驅動氣動微型閥進行液珠分類。

氣動微型閥液珠分類

本研究於液珠生成區域後的下游流道加上一 Y 字型分岔出口流道，並於流道交岔處下設置兩個與電磁閥相連之氣室空腔作為氣動微型閥門。利用 LabVIEW 軟體與資料擷取器(USB-4750, Adventech)控制電磁閥開關，使其中一個微型閥門之氣室充氣加壓，進而使該出口流道內因流道截面積縮小而使流阻增大，驅動液珠朝向另一出口流道移動，達到使目標與廢液液珠朝向個別收集區域移動分類之目的。

3-2.2 實驗儀器與架設

本研究所需使用的儀器及架設方式如圖 3-5 及圖 3-6 所示，分別有：一台作為放大倍率觀察使用的倒立式顯微鏡、一台擷取影像的工業相機、一台提供分散相流體動力源的針筒推進器、一台提供連續相壓縮氣體的空氣壓縮機、一組調整壓縮氣體壓力的調壓閥、一台用於控制氣體輸入電磁閥開關的資料擷取器以及一台搭載 LabVIEW 軟體的電腦作為核心控制與影像處理使用。

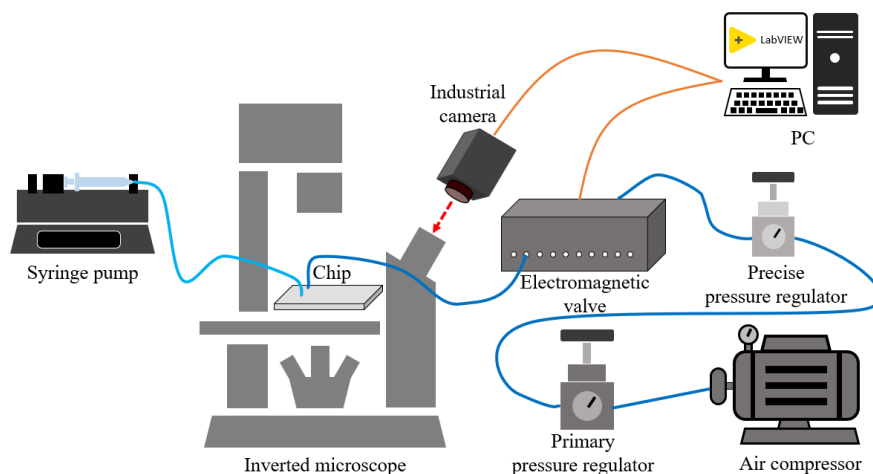


圖 3-5 儀器架設示意圖

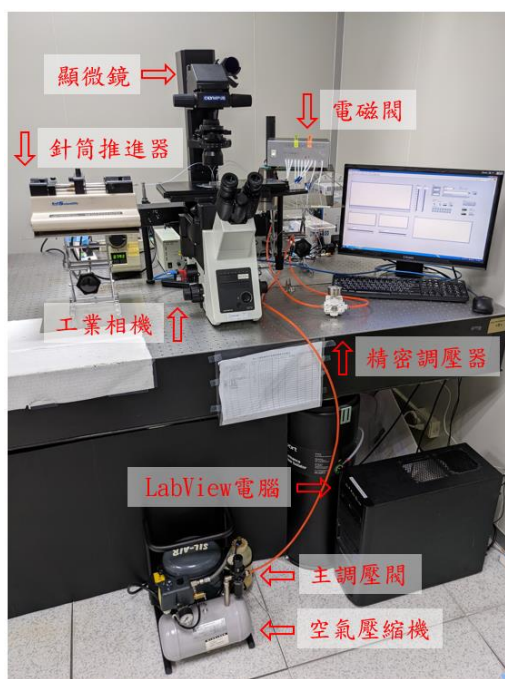


圖 3-6 實際儀器架設圖

3-2.3 檢體製備

本研究所使用之小鼠肌肉衛星細胞檢體由中央研究院生物醫學所合作實驗室提供，細胞之收集參照 Motohashi *et al.* (2014)之操作方式，如圖 3-7 及以下所列：

- (1) 以二氧化碳注射犧牲 1 至 2 隻小鼠後，將其腿部骨骼肌整束取下並以磷酸鹽緩衝生理鹽水緩衝液(Phosphate buffered saline, PBS)浸泡清洗；
- (2) 使用剪刀將清洗後的骨骼肌剪成碎末狀，做初步的物理性分割；
- (3) 於 15 mL 離心管中裝入 5 mL 之 2 % 膠原蛋白水解酶溶液[成分：含 10 % 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)之細胞培養基(Dulbecco's modified Minimal Essential Medium, DMEM)]，將骨骼肌碎末放入溶液中混和均勻，在 37 °C 水浴中作用 60 分鐘進行分解；
- (4) 使用 18 G (內徑 0.9 mm)針頭之針筒抽吸肌肉分解液數次，使其均質化並繼續在 37 °C 水浴中作用 15 分鐘；
- (5) 再次以針筒抽吸肌肉分解液，使肌肉組織游離成單細胞懸浮狀態，並加入 DMEM 細胞培養基(含 2 % FBS) 至 50 mL，混合均勻以終止酵素反應；

- (6) 將細胞溶液通過架有 70 μm 細胞過濾網之 15 mL 離心管，以去除體積過大的組織團塊和碎片，使細胞過濾收集於濾網下方之離心管；
- (7) 將細胞液於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 2000 rpm 轉速離心 5 分鐘，吸除上澄液(supernatant)後加入 10 mL DMEM 細胞培養基(含 2 % FBS)，將被離心下來之細胞打散成懸浮狀；
- (8) 依細胞濃度加入 DMEM 細胞培養基(含 10% FBS)或 PBS 稀釋細胞懸浮液，作為本研究微流體系統所需之檢體。

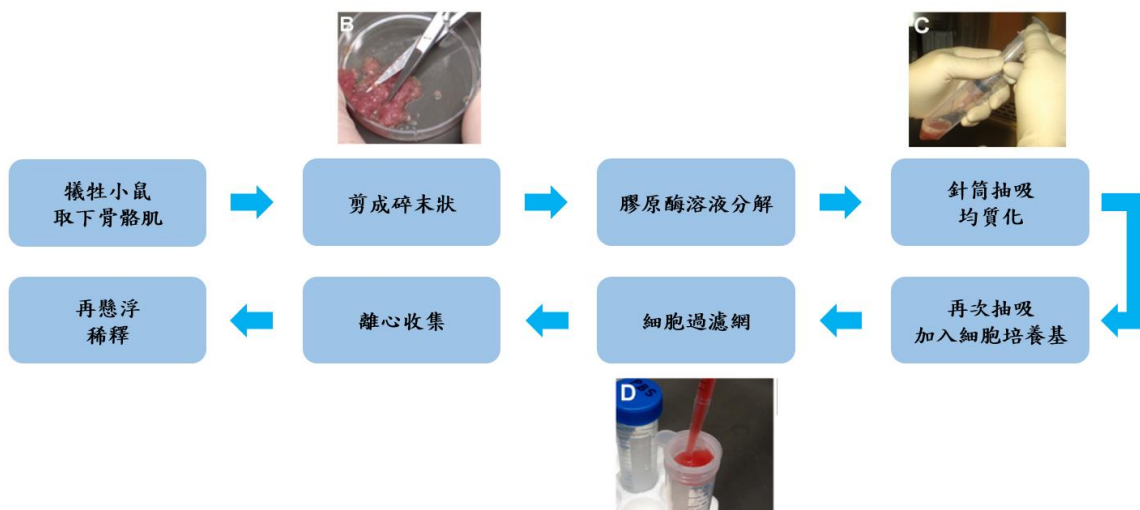


圖 3-7 檢體製備流程圖，照片來源：(Motohashi *et al.*, 2014)

3-2.4 影像處理方法

本研究使用的小鼠肌肉衛星細胞，具有 GFP 螢光蛋白基因，在波長 488 nm 雷射激發下可顯現波長 510 nm 之綠色螢光。當細胞被包覆於液珠後，會藉由工業相機擷取影像導入 LabVIEW 介面，並使用 LabVIEW 之影像開發模組，自行撰寫程式分析所得之影像。程式先將灰階影像之分析區域(ROI)縮小至適當範圍，以縮短運算時間及提升畫面更新率(frame rate)，再對分析區域中的像素亮度依設定之閾值(threshold)轉換為黑白二值化影像。若二值化影像中出現面積足夠大之白色像素，表示所擷取之液珠影像中含有螢光蛋白被激發之肌肉衛星細胞，將回授訊號至 LabVIEW 介面，作為控制後續液珠篩選機制作動之依據。



3-2.5 驗證方法

經由本研究之微流體晶片分選完畢之細胞檢體，會分為目標液及廢液分別收集於離心管中，並送交中央研究院生醫所合作實驗室做後續分析驗證。因肌肉衛星細胞會表現 Pax-7 蛋白，可利用蛋白質的專一性抗體進行染色，再由共軛焦顯微鏡觀察分析，即可確認回收檢體細胞之純度。藉由上述分析，可分別得到目標液及廢液中含有肌肉衛星細胞之數目及活性，進而驗證本研究開發之微流體晶片的分選效率。

3-3 元件製作

本研究使用 PDMS 作為元件基材，製作上須先使用黃光微影製程製作矽晶圓母模(master mold)，再以軟微影製程技術將母模上之圖樣翻印至 PDMS 形成流道元件，再將各元件予以接合。

3-3.1 母模製作

本研究使用的肌肉衛星細胞直徑約在 5 μm 左右，流道的製作精度要求較高，因此選用黃光微影製程進行母模製作。製程步驟如圖 3-8 所示，可分為晶圓預處理(substrate pretreat)、旋轉塗佈(spin coating)、軟烤(soft bake)、曝光(exposure)、曝後烤(post exposure bake, PEB)、顯影(develop)、清洗與風乾(rinse & dry)及硬烤(hard bake)，以下就各步驟個別說明：

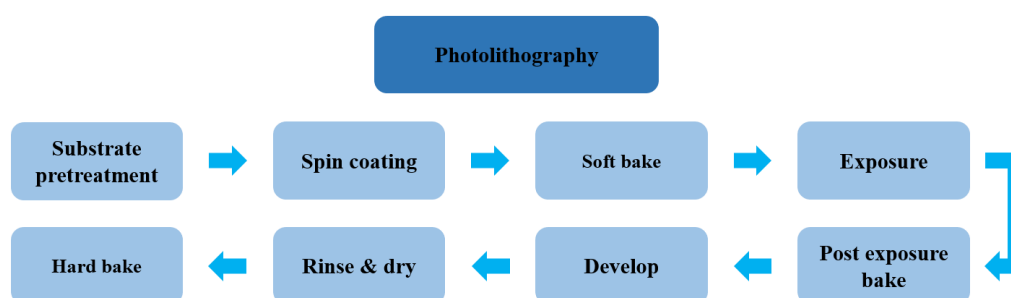


圖 3-8 黃光微影製成步驟

晶圓預處理

本研究使用 4 吋矽晶圓作為流道母模，於黃光室內製作時首先需進行晶圓預處理。此步驟是為了去除晶圓表面上的微粒、金屬雜質、氧化物和有機物等，使後

續旋轉塗佈時光阻與晶圓可更緊密地貼附，並避免如圖 3-9 所示之雜質遮蔽等現象影響製程良率。首先將矽晶圓依序浸泡在丙酮(acetone, CH_3COCH_3)和異丙醇(isopropyl alcohol, IPA, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$)中，並將浸泡晶圓之容器置於超音波振洗槽內各三分鐘，如圖 3-10 所示，去除晶圓表面的有機物等雜質。接著再以去離子水(deionized water, DI water)沖洗並使用氣槍吹乾表面水分，最後置於 120°C 之烘箱或加熱板(hot plate)上加熱 20 分鐘去除剩餘水分。晶圓清洗過程中需依實際狀況進行微調，若清洗步驟結束後晶圓表面如仍然可見髒污時，應再次進行清洗，避免微小疏忽影像後續製程良率。

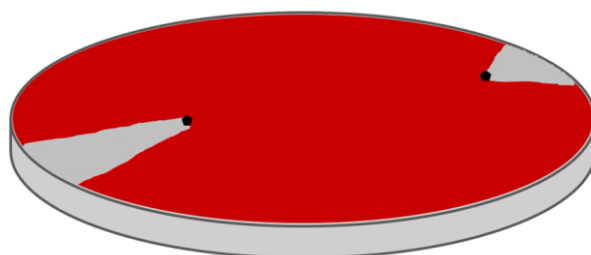


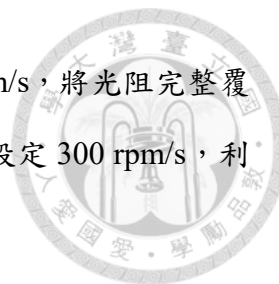
圖 3-9 雜質遮蔽示意圖



圖 3-10 矽晶圓於超音波振洗槽內清洗

旋轉塗佈

此步驟使用旋轉塗佈機(spin coater)，如圖 3-11，將負型光阻 SU-8 2025 (Kayaku Advanced Materials, KAM)均勻塗佈至晶圓表面，如圖 3-12 所示。如圖 3-13 Kayaku Advanced Materials 公司規格書，依照不同黏稠度的光阻性質，可依需求調整旋轉速率達到所需塗佈的光阻厚度。本研究參照該公司規格書，採用兩階段旋轉塗佈。首先將約 4 mL (大約覆蓋晶圓表面 $1/2 \sim 1/3$ 面積)的負光阻傾倒於晶圓中



間，第一階段轉速設定 500 rpm 旋轉 10 秒，加速度設定 100 rpm/s，將光阻完整覆蓋晶圓表面；第二階段轉速設定 1670 rpm 旋轉 30 秒，加速度設定 300 rpm/s，利用最終轉速設定控制光阻厚度至 50 μm 。

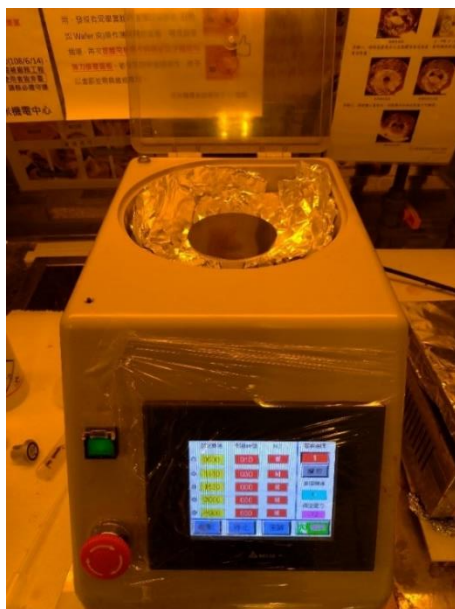


圖 3-11 旋轉塗佈機

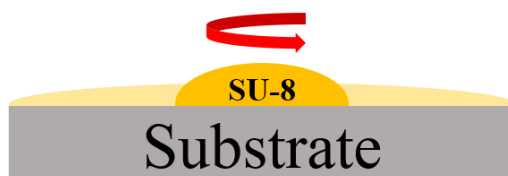


圖 3-12 旋轉塗佈示意圖

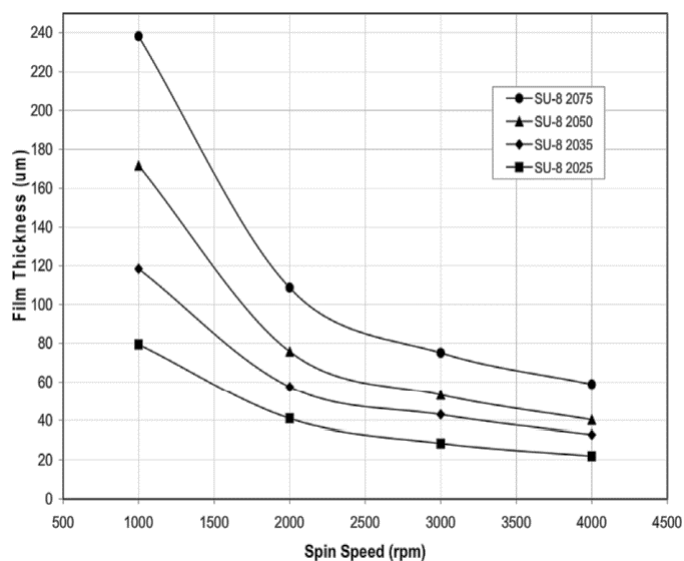


圖 3-13 SU-8 塗佈厚度與轉速關係圖(Kayaku Advanced Materials 提供)



軟烤

軟烤是將旋轉塗佈完成的晶圓放置於平整且溫度均勻的加熱板上加熱，使光阻內的溶劑揮發以增加與晶圓表面的附著力。本研究依照 Kayaku Advanced Materials 公司規格書所建議的軟烤步驟，進行第一階段 65 °C 三分鐘，第二階段 95 °C 九分鐘的兩階段軟烤。完成後移除熱源待晶圓降至常溫，並再次移至加熱版上檢視光阻表面有無皺褶，若有則繼續加熱數分鐘，反覆上述加熱與降溫步驟數次直到皺褶不再出現。

曝光

曝光之示意圖如圖 3-14，其目的是利用高能量的 UV 光照射負光阻，使其產生難溶於顯影液的交聯固化結構。本實驗使用膠片光罩區隔曝光區與非曝光區，光罩透明處的曝光區負光阻受到照射吸收強光能量，因光化反應產生上述交聯固化結構，而被光罩阻擋的非曝光區負光阻性質則不會改變，藉由兩區域於顯影液中的溶解度差異，可使曝光區於顯影後被保留，形成母模的微結構。本研究使用 EVG 620 Top Side Mask Aligner 曝光機，機台外觀如圖 3-15，採取軟接觸式(soft contact)曝光(光罩輕微接觸矽晶圓)。此機台汞燈功率為 10.7 mW/cm²，參照 Kayaku Advanced Materials 公司規格書建議，50 μm 厚的光阻所需曝光劑量為 215 mJ/cm²，換算使用上述機台需曝光 20.1 秒。

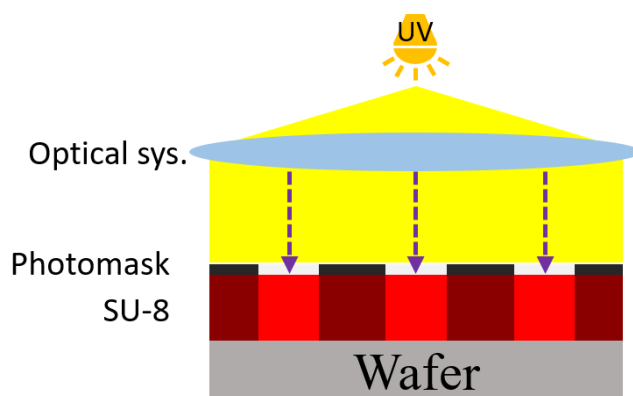


圖 3-14 曝光示意圖

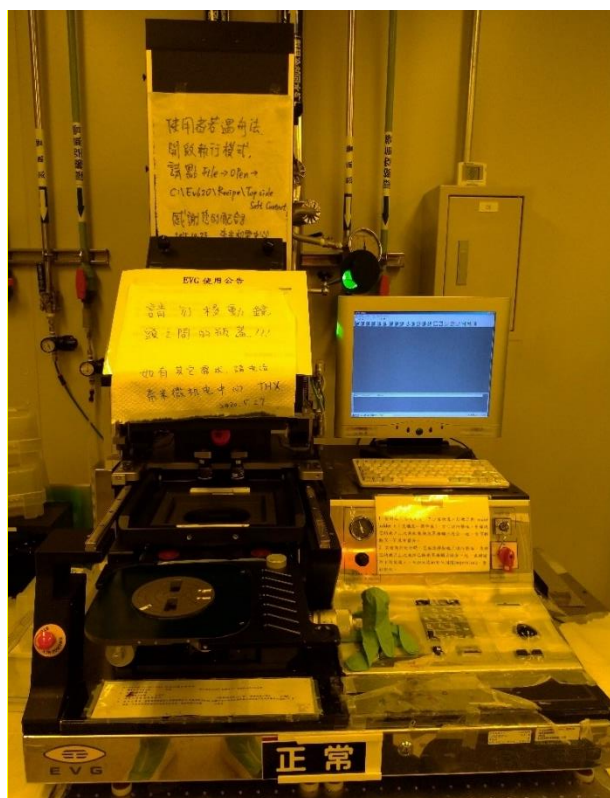


圖 3- 15 EVG 620 Top Side Mask Aligner

曝後烤

曝光後的晶圓須立即移至加熱板上加熱進行曝後烤，利用熱能強化曝光區之交聯結構。此步驟同樣參照 Kayaku Advanced Materials 公司規格書，進行第一階段 65 °C 二分鐘，第二階段 95 °C 七分鐘的兩階段曝後烤。其中第一階段曝後烤後曝光圖樣應顯現，若未見圖樣可能是曝光不足或是曝後烤加熱不足所影響。

顯影

本研究使用 Kayaku Advanced Materials 公司生產之 SU-8 Developer 顯影液，將晶圓上非曝光區之負光阻溶解去除，利用差異侵蝕，留下母模微結構，如圖 3-16 示意圖所示。製程步驟將顯影液倒入放置晶圓的容器中，直到高度超過晶圓上表面，並搖晃容器使顯影液與負光阻反應七分鐘。透過晃動可將晶圓表面反應過的顯影液帶離，避免反應過的顯影液聚集於晶圓表面導致因化學反應濃度造成反應速度降低，以更有效地去除負光阻。



圖 3-16 顯影示意圖

清洗與風乾

顯影完成後，使用全新的顯影液沖洗晶圓 10 秒鐘，再用異丙醇沖洗 10 秒鐘，將表面殘留的顯影液沖洗乾淨，並用氮氣槍將晶圓吹乾。若異丙醇沖洗過後晶圓表面出現白色薄膜，代表顯影不足，應繼續使用顯影液沖洗。

硬烤

硬烤可使光阻中剩餘的溶劑揮發，並強化微結構的機械性質，且可藉由光阻局部熔化回流修補顯影過程中對微結構造成的裂紋。本研究將晶圓置於烘箱內進行 65 °C 5 分鐘，95 °C 5 分鐘，175 °C 30 分鐘的階段性升溫硬烤，並於硬烤結束後繼續放置於烘箱中緩慢降溫至室溫，避免迅速冷卻產生內應力。硬烤結束後應用顯微鏡檢視結構確認無異常，即完成母模製作，如圖 3-17 所示。

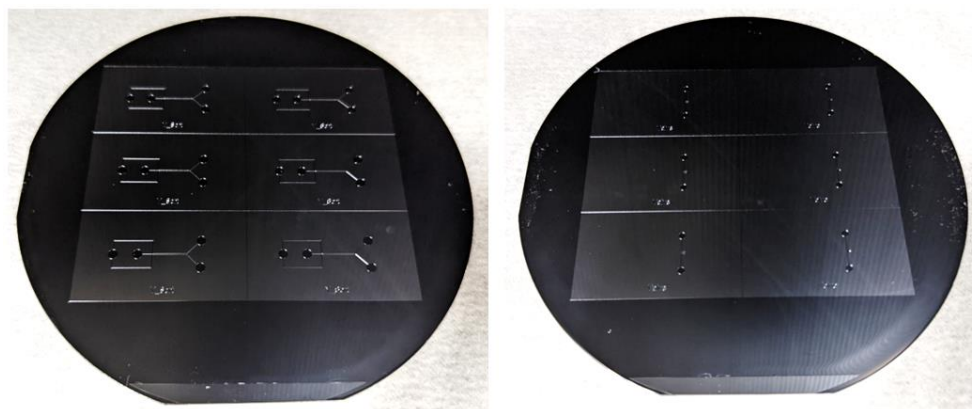


圖 3-17 矽晶圓母模

3-3.2 翻模與接合

軟微影製程

本研究使用軟微影製程，以翻模的方式將矽晶圓母模上的流道微結構翻印成 PDMS 元件。製程步驟先將 PDMS 原液(A 劑)和硬化劑(B 劑)以 10 : 1 的比例於紙杯中混合並攪拌均勻，再放入真空抽氣槽中抽氣 20 分鐘，將攪拌時溶液中產生的

大量氣泡去除。接著將晶圓母模周圍以 Scotch tape 膠帶密封，防止倒入 PDMS 混合液時滲出。倒入 PDMS 混和液後將母模放入抽氣槽再次抽氣，直到所有氣泡消除，避免元件因參雜氣泡造成流道幾何形狀異常而影響實驗結果。最後，將已倒入 PDMS 的母模置於 60 °C 烘箱內加熱 3 小時使 PDMS 固化，形成母模上圖樣的反結構(inverse structure)元件。

元件接合

將固化完成的 PDMS 薄膜從母模上取下後，用刀片切割出元件外形，並於流道之入口和出口處，使用打孔器鑿出與管線接合的洞口，再以 Scotch tape 清除流道面上的灰塵與髒汙。將元件欲接合的流道面朝上與基座玻片一同放入氧電漿機 (Model CUTE-MPR, Femto Science, Korea)內進行表面改質，機台外觀及規格如圖 3-18 及表 3-2，機台設定參數為：通氣量 15 sccm、功率 50 W、作用時間 30 秒。PDMS 原為疏水性材質，經氧電漿作用後，使 PDMS 和玻片表面帶氫氧基(hydroxyl, -OH)而呈現短暫親水性。將玻片與 PDMS 相互貼合時，會因形成共價鍵(Si-O-Si)而緊密接合。接著將接合的玻片與 PDMS 至於 90 °C 之加熱板上以重物重壓並加熱 15 分鐘，強化接合結構，並使元件恢復疏水性。微流體晶片成品如圖 3-20 所示，待元件降溫至室溫後即可進行實驗。



圖 3-18 氧電漿機 Model CUTE-MPR



表 3-2 氧電漿機規格表

Model CUTE-MPR, Femto Science	
Features	Specification
Chamber	Size : W. 140 x D. 200 x H. 110 (mm) Materials : stainless steel Door : stainless steel/ aluminum
Generator	100 W, 50/60 kHz
Controller	7 in. touch panel Auto & Manual

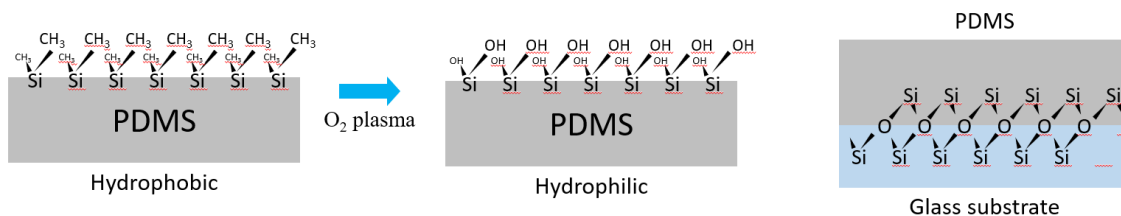


圖 3-19 氧電漿表面改質與元件接合示意圖

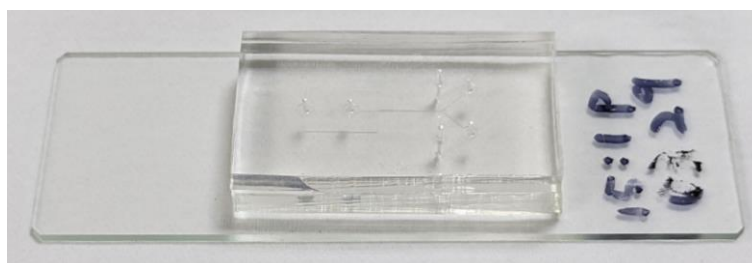


圖 3-20 微流體晶片成品



第四章 結果與討論

本研究利用氣體作為連續相生成液珠包覆細胞，並透過影像分析辨識細胞，使微型氣動閥門作動將液珠予以分類。本研究之結果探討分為五個部分進行闡述：液珠生成探討、液珠分類機制探討、液珠包覆細胞探討、影像辨識探討以及篩選效率探討，其架構圖如圖 4-1。

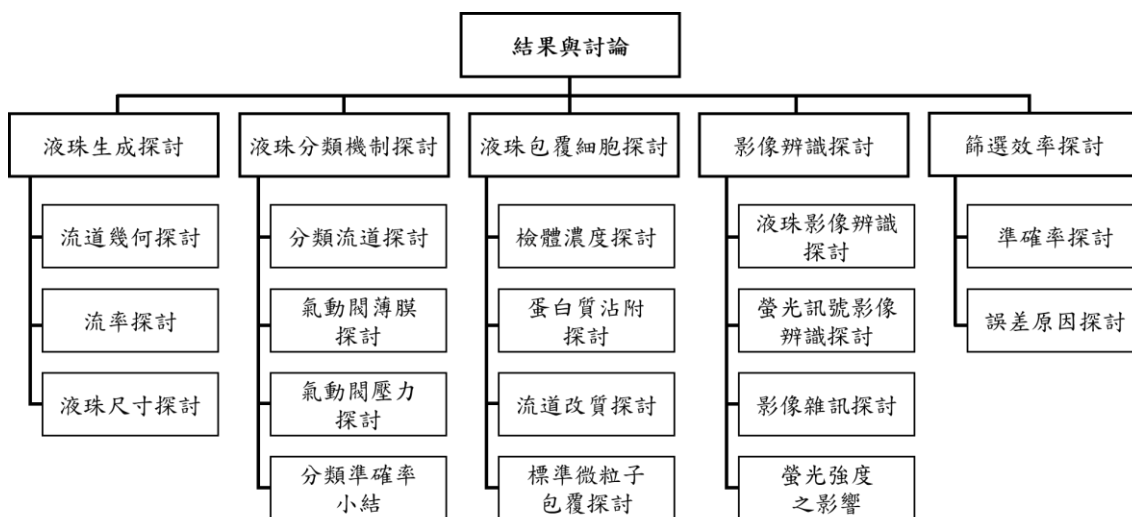


圖 4-1 初步結果與討論架構圖

4-1 液珠生成探討

因為氣體生成液珠仍是目前微流體領域中較為新穎之技術，故本節先使用去離子水作為分散相，針對流體聚焦液珠生成之流道幾何設計、流速調控及生成之液珠尺寸與穩定性進行探討，並利用高速攝影機(X-Stream SX-5, IDT, USA)錄取畫面分析，研擬較佳之液珠生成機制。

4-1.1 流道幾何探討

本研究使用流體聚焦方式生成液珠，共設計流道高度均為 50 μm 的六種不同幾何之液珠生成流道，以探討何種幾何構造得以較穩定生成液珠。如表 4-1 所列，分別使用頸縮寬度 50 μm 、主流道寬度 100 μm ，頸縮寬度 100 μm 、主流道寬度 200 μm 兩種不同流道寬度，組合連續相流道與分散相流道間夾角分別為 45 $^{\circ}$ 、60 $^{\circ}$ 和 90 $^{\circ}$ 等三種流道夾角，分析幾何設計與生成液珠之形態、尺寸間之關聯性，以及與連續相、分散相流率的相互影響。

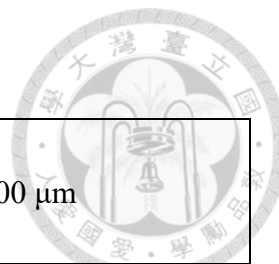


表 4-1 流道幾何設計

流道寬度 流道夾角	100 μm	200 μm
90°		
60°		
45°		

經實驗發現，主流道寬度 100 μm 之設計，雖然可生成尺寸較小之液珠，於包覆細胞時較能降低單一液珠包覆多顆細胞的機率，但容易生成穿線式(threading)液珠，於液珠尾端拖帶細絲並碎裂成多顆微小液珠殘留於流道中，如圖 4-2 所示，此現象有可能造成影像辨識錯誤，進而影響篩選結果。此外，由於此設計主流道較為狹窄，液珠生成後移動速率較快，導致影像辨識之分析區域(ROI)需要設定較大範圍，降低影像處理速度。

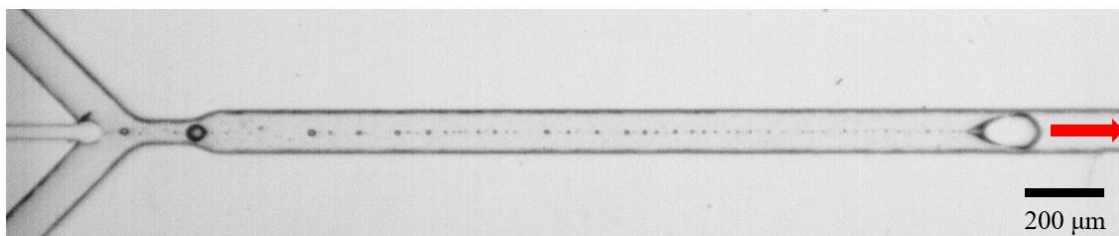


圖 4-2 100 μm 主流道中液珠殘留現象

主流道寬度 $200\ \mu\text{m}$ 之設計，所生成液珠之型態與穩定度則受到連續相和分散相流道間夾角影響。分析實驗結果，夾角 45 度時較容易形成穿線式液珠，即生成液珠後方會形成長條細絲狀，如圖 4-3 所示。夾角 60 度時，於連續相壓力較小，約略 $0.014\sim 0.021\ \text{MPa}$ ($2\sim 3\ \text{psi}$) 時亦出現穿線式液珠，而當壓力提高至大約 $0.028\sim 0.055$ ($4\sim 8\ \text{psi}$) 時，則出現雙重液珠，即先生成之液珠停滯於生成區域前端，待第二顆液珠生成後與其碰撞融合，才向下游移動，如圖 4-4 所示。因此，必須繼續提高壓力超過 $0.055\ \text{MPa}$ ，才可穩定生成單分散(monodisperse)之滴落式(dripping)液珠。而夾角 90 度之設計液珠生成效率最佳，僅需使連續相壓力大於 $0.021\ \text{MPa}$ ($3\ \text{psi}$) 即可生成穩定單分散的液珠，其形態如圖 4-5 所示。綜上所述，本研究採用主流道寬度 $200\ \mu\text{m}$ ，流道夾角 90 度之設計作為後續研究使用。

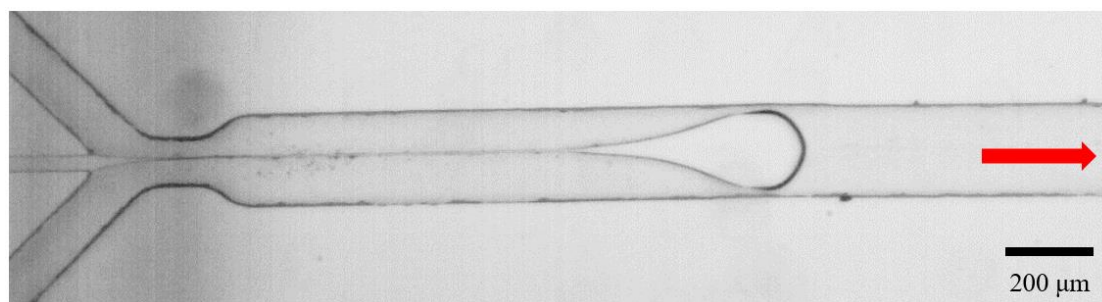


圖 4-3 流道夾角 45 度時易出現穿線式液珠

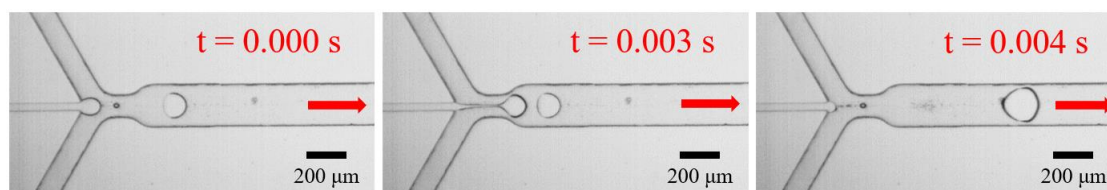


圖 4-4 流道夾角 60 度時易出現雙重液珠

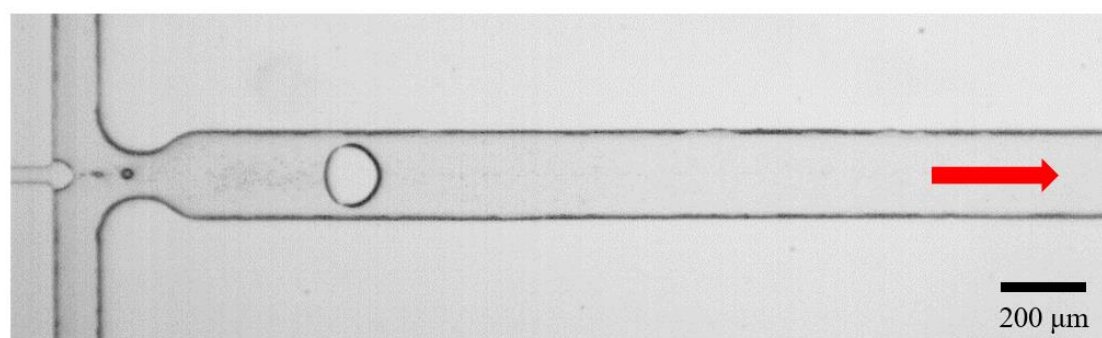


圖 4-5 流道夾角 90 度時生成單分散液珠效率最佳



4-1.2 流率探討

本研究參考 Tirandazi and Hidrovo (2017)研究結果，可知液珠生成之頻率和生成液珠之形態、尺寸皆受到連續相以及分散相之流率影響。本研究使用流道寬度 $200\ \mu\text{m}$ 、高度 $50\ \mu\text{m}$ 、流道夾角 90° 之幾何設計，針對兩相流率分別進行調控，以尋找可穩定生成滴落式形態且單分散液珠之區間。

實驗結果得知，於連續相氣體壓力 $0.028\sim 0.083\ \text{MPa}$ ($4\sim 12\ \text{psi}$)、分散相流率 $1\sim 5\ \mu\text{L}/\text{min}$ 區間內，皆可生成滴落式形態之液珠。而連續相壓力越高，所生成之液珠尺寸則越小，如圖 4-6 所示。

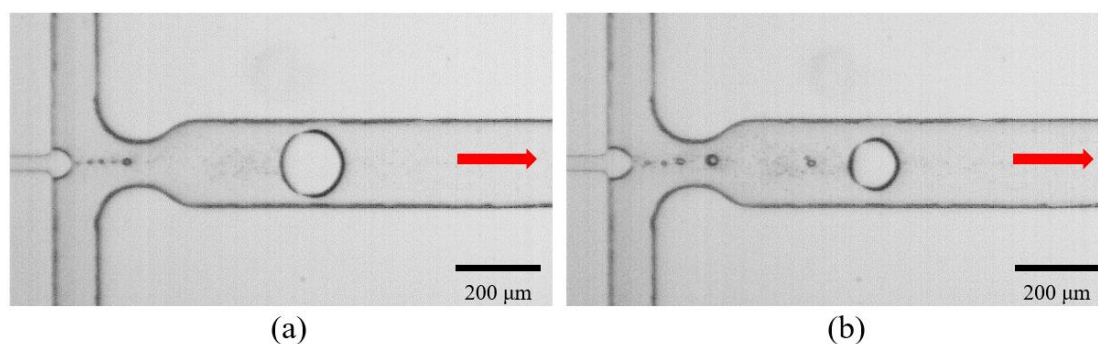


圖 4-6 不同連續相氣體壓力之液珠大小(a). $0.041\ \text{MPa}$ (b). $0.055\ \text{MPa}$

雖然夾角 90° 之幾何設計較不容易出現穿線式液珠，然而在分散相流率 $3\ \mu\text{L}/\text{min}$ 下，當連續相氣體壓力低於 $0.021\ \text{MPa}$ ($3\ \text{psi}$)時，因為連續相之流率過低，不易截斷分散相，仍會出現穿線式形態之液珠，但液珠尾部拖帶的細絲較其他夾角流道生成之液珠短，如圖 4-7 所示。

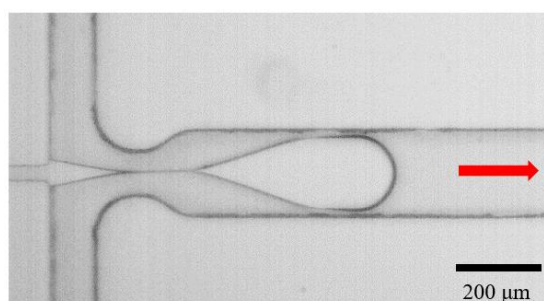


圖 4-7 連續相氣體壓力 $0.014\ \text{MPa}$ 之穿線式液珠

而同樣在分散相流率 $3\ \mu\text{L}/\text{min}$ 下，當連續相氣體壓力高於 $0.083\ \text{MPa}$ 時，因

為流速過高，會出現雜亂噴濺的多分散(polydisperse)破碎狀液珠(multi-satellite)，如圖 4-8 所示。

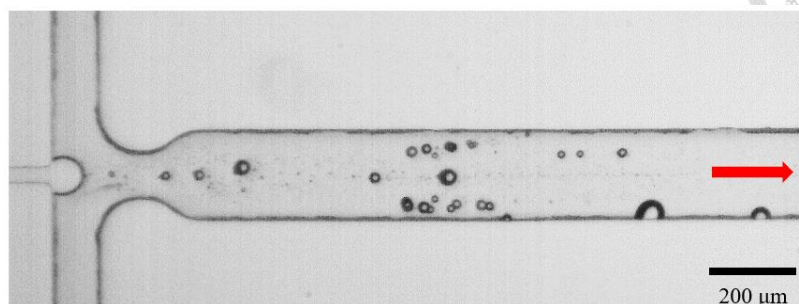


圖 4-8 連續相氣體壓力 0.083 MPa 之破碎狀液珠

分析不同連續相壓力下之結果，可得知液珠生成的頻率大致上隨壓力上升而提高，然而因針筒推進器推進時有不連續現象，尤其在分散相流率較小時更為明顯，因此頻率上量測的誤差較大。

經實驗發現，調整分散相流率亦會影響液珠生成表現。使用分散相流率 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量測時，液珠生成的頻率較高、移動速率較快、液珠尺寸較大且容易生成穿線狀液珠；而使用分散相流率 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量測時則相反，液珠生成的頻率較低、移動速率較慢、液珠尺寸較小且比較不易生成穿線狀液珠，而是在連續相壓力較低時易出現雙重液珠。

本研究所生成之液珠目的為包覆細胞進行影像辨識，因此液珠移動速率與生成頻率宜低，才得以縮小影像分析區域 ROI 的範圍，減短辨識時間以避免時間差造成回授控制無法即時對正確液珠進行分選。而為減少單一液珠內包覆細胞之數量，液珠的大小也應盡量縮小，然而本研究在進行細胞篩選時亦須留意檢體通量(throughput)不宜過低，避免細胞於篩選系統中停留過久而失去活性。綜合上述原因，本研究採用連續相壓力 0.04MPa，分散相流率 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 為基準進行後續實驗。

4-1.3 液珠尺寸探討

本研究使用高速攝影機擷取流道內生成液珠之影像後，透過 MATLAB 程式進行影像分析，以流道已知寬度為校正基準，可量測液珠之直徑，如圖 4-9 所示。因本研究使用之流道高度僅 50 μm ，相較於流道寬度較為狹窄，因此流道內之液珠



受流道上下兩側擠壓成圓盤狀，得知液珠直徑 D 後使用式(4-1)，便可估算出液珠之體積 V 。

$$V = \frac{\pi \cdot D^2}{4} \cdot (50 \mu\text{m}) \quad (4-1)$$

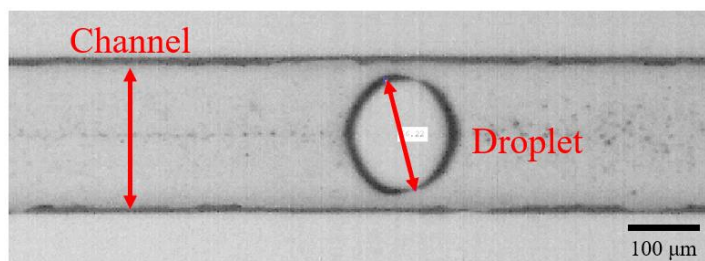
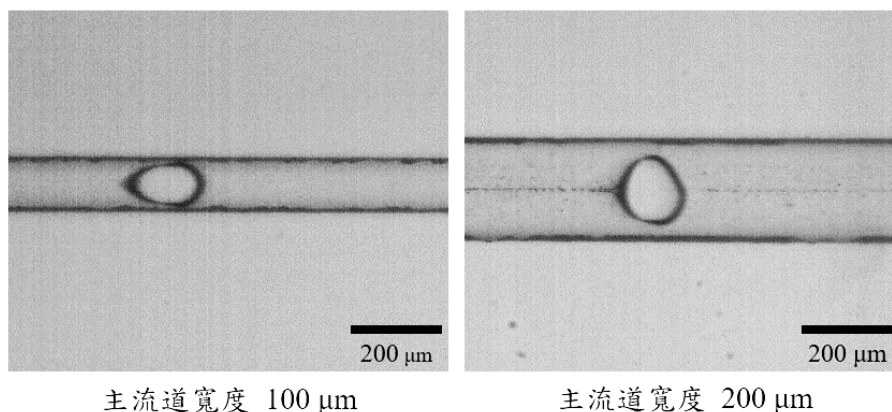


圖 4-9 MATLAB 量測液珠直徑

分析不同流道幾何與兩相流率對液珠尺寸造成之影響，可得知生成液珠會受到流道壁的侷限，因此主流道寬度較小時生成之液珠亦較小，如圖 4-10 比較所示。



主流道寬度 100 μm

主流道寬度 200 μm

圖 4-10 不同主流道寬度下液珠尺寸比較

對本研究所採用的 200 μm 主流道寬度，在連續相壓力 0.04MPa，分散相流率 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 下進行量測，得知所生成的液珠直徑約為 168 μm ，體積約為 1.11 nL。本研究欲使用之肌肉衛星細胞直徑約 5 μm ，以上述尺寸液珠進行包覆，可完整包覆細胞且降低單一液珠所包覆的細胞數目，可提升篩選純度。

4-2 液珠分類機制探討

本節探討所採用的分類機制，包括分類流道之幾何設計、氣動微型閥之薄膜參數以及氣動微型閥之工作壓力，對於氣體生成之液珠分類結果產生的影響。本節仍以壓縮空氣作為液珠生成的連續相(壓力 0.04MPa)，去離子水作為分散相(流率 3



$\mu\text{L}/\text{min}$)，分析所設計的分類流道與流道層下方的氣動微型閥是否可有效控制液珠運動方向。

4-2.1 分類流道探討

本研究原先於液珠生成流道後端設計一 45 度之側向出口流道，作為目標液珠收集流道，並於直行方向設計一主出口流道，作為廢液液珠收集流道，兩流道之寬度皆為 $200\ \mu\text{m}$ 。並於兩出口流道交會處下方設計一氣動微型閥，作為液珠分類的主動控制，其示意圖及實際俯視圖如圖 4-11 所示。

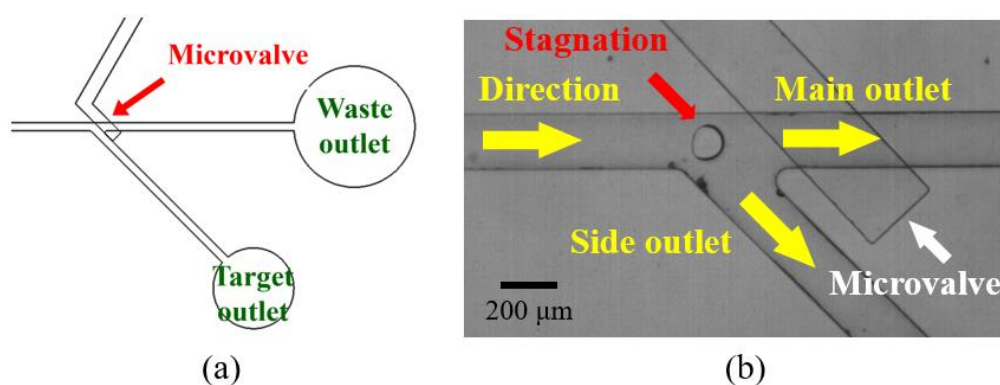


圖 4-11 側向出口液珠分類流道 (a). 示意圖 (b). 實際俯視圖

經實驗觀測，發現在氣動微型閥不施加壓力下，大多數液珠(約 74%)會經由主出口流道流向下游，如圖 4-12 所示。此結果符合預期，然而仍有部分液珠會流入側向出口，造成分類錯誤。實驗結果也發現，液珠生成後向下游移動時，容易在出口流道交會處停滯，待下一顆液珠碰撞後才往出口移動，如圖 4-11 (b)中紅色箭頭所示。此外，部分液珠生成後會貼附流道壁向下游移動，而貼附側向流道側的液珠就比較容易進入側向出口，而不受氣動閥開關所控制。

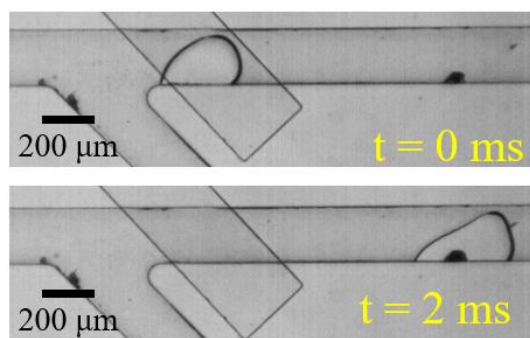


圖 4-12 液珠朝向主出口流道移動時序圖

分析實驗結果認為，液珠貼附流道壁之現象，可能導因於側向流道造成主流道壓力分佈不均勻，影響液珠生成的穩定性，使生成的液珠靠向兩側流道壁。而液珠易停滯於出口流道交會處，推測是因為此處流道分岔，造成壓力突降，不足以推動液珠前進。

基於上述原因，本研究更改分類流道設計，於液珠生成流道後端設計一夾角 90 度之 Y 字型分岔出口流道，其一作為目標液珠收集流道，另一作為廢液液珠收集流道，且兩流道之寬度皆為 100 μm ，及主流道寬度之半，避免流道分岔處因截面積增大而造成如先前觀測到之液珠停滯現象。此外，兩出口流道交會處下方，改為設計兩氣動微型閥，以一開一關的方式作為液珠分類的主動控制，其示意圖及實際俯視圖如圖 4-13 所示

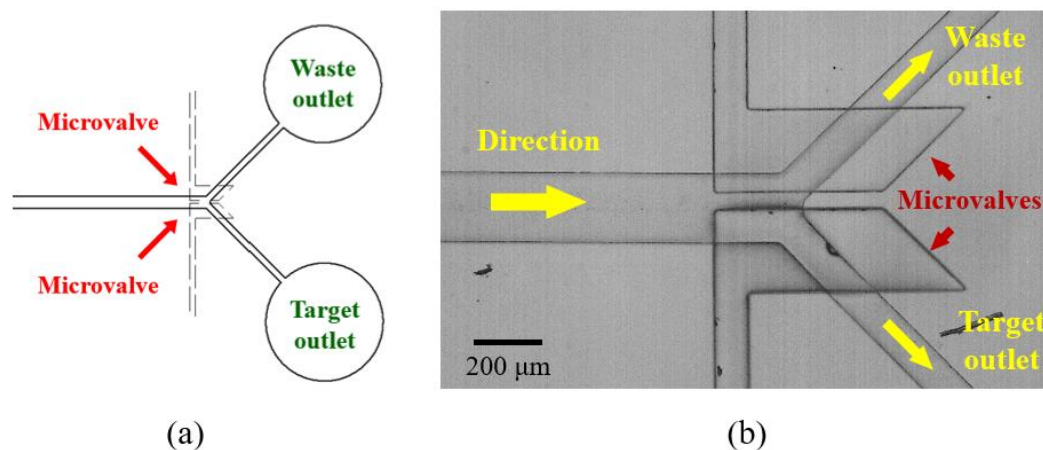


圖 4-13 Y 字型液珠分類流道 (a). 示意圖 (b). 實際俯視圖

藉由上述分類流道幾何改變，生成之液珠可維持於流道中央向下游移動，如圖 4-14 所示，可有效避免先前液珠貼附於流道壁上的問題，同時也解決液珠停滯的困境，並以先進先出(first-in-first-out, FIFO)的方式通過液珠分類區，進行單顆液珠的檢測與分類。

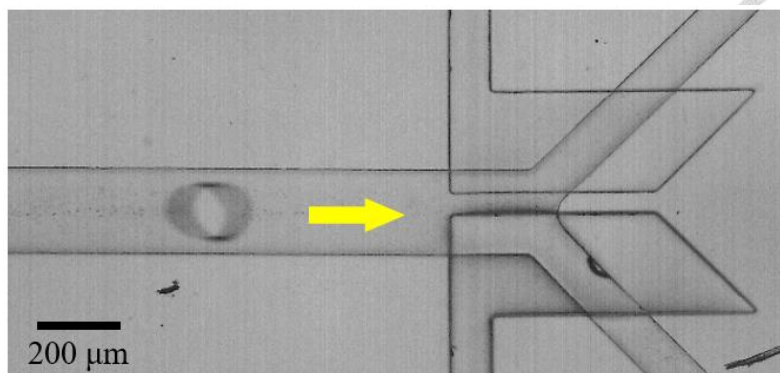


圖 4-14 液珠於 Y 字型分類流道中移動情況

4-2.2 氣動閥薄膜探討

本研究之微流道晶片為三層 PDMS 結構，由上至下分別為流道層、薄膜層與控制層，如圖 4-15 所示。上層流道層為輸送液珠使用，控制層則透過通入壓縮空氣對中間的 34 μm 薄膜層施加壓力造成形變，進而壓迫流道層中的其中一個出口流道，造成該出口流道內流阻提升，驅使液珠朝向另一出口流道移動，達到控制兩出口流道開關以進行主動分類之目的。

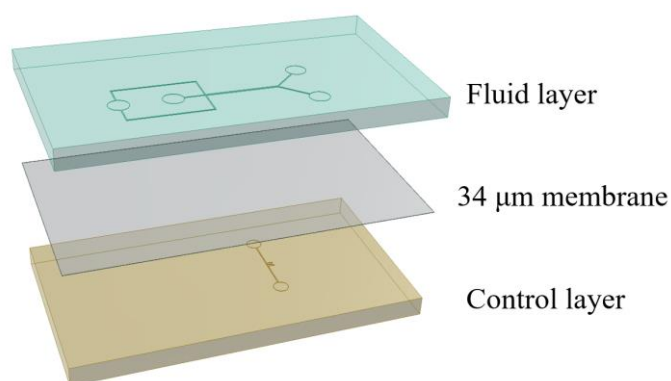


圖 4-15 三層 PDMS 為流道晶片結構

本研究原先採用 PDMS 原液與固化劑 10:1 的標準混合比例，並參考 A. Lai *et al.* (2019) 之參數進行旋轉塗佈製作氣動閥薄膜。經實驗分析，當對氣動閥施加壓力時，確實可有效控制液珠的走向，並依照所施加的壓力大小，可達到 64%~95% 的分類準確率，符合預期。然而卻也發現氣動閥無法緊密關閉出口流道，導致部分液珠仍會進入已關閉的出口流道，或是於流道分岔處分裂為兩顆液珠，分別進入兩出口流道。探討原因為流道截面積呈矩形，因此氣動閥加壓時流道下方薄膜僅有中間區域會與流道頂端緊密貼合，周圍區域仍有空隙，如圖 4-16 示意圖所示(此



處圖 4-16 (b) 為較清楚呈現薄膜貼合縫隙，使用先前 45 度分岔出口分類流道作為圖示)。因此即使加大氣動閥壓力，仍會有部分液珠從變形後的薄膜與流道壁間的空隙處擠入出口流道，導致分類錯誤。

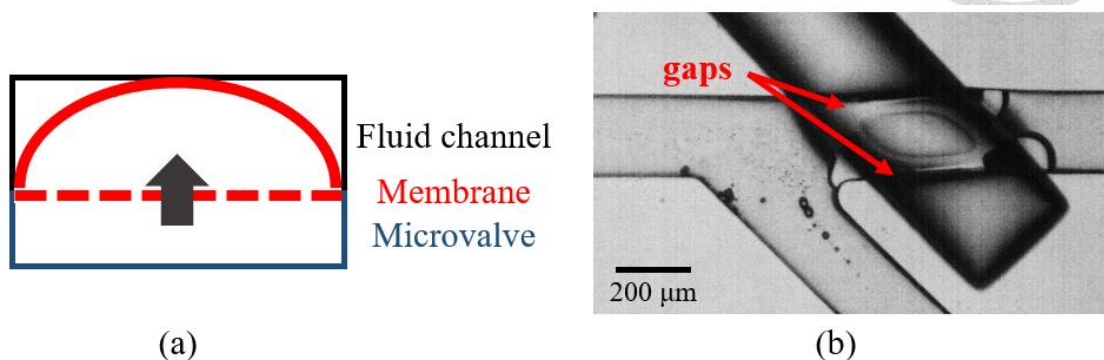


圖 4-16 氣動閥施加壓力密合情況示意圖 (a). 剖面圖 (b). 俯視圖

為使氣動閥薄膜可以較緊密的關閉出口流道，本研究參考 D. H. Yoon *et al.* (2013) 和 D. H. Yoon *et al.* (2015) 於製作水平微型閥 (horizontal microvalve) 之配方，改採用 PDMS 原液與固化劑 15 : 1 的混合比例作為氣動閥薄膜，增加薄膜的形變能力，使其受壓時可較為緊密地關閉流道。如圖 4-17 所示，可明顯看出調整比例後的 PDMS 薄膜產生較大之形變。

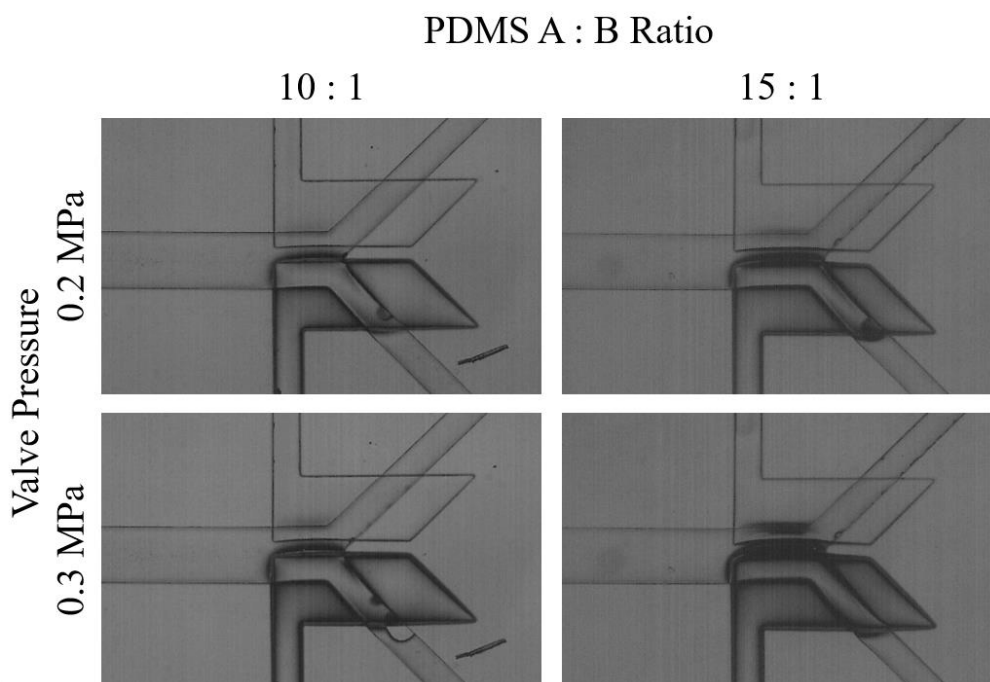


圖 4-17 不同 PDMS 配方下薄膜之形變

分析使用 PDMS 比例 10:1 與 15:1 之氣動閥薄膜進行液珠分類實驗結果，由圖 4-18 可明顯比較出，無論氣動閥施加壓力大小，使用 PDMS 比例 15:1 薄膜之分類準確率皆比使用 PDMS 比例 10:1 薄膜高約 10%，證實透過變更薄膜之性質可有效增進氣動閥對氣體生成液珠之分類效率。

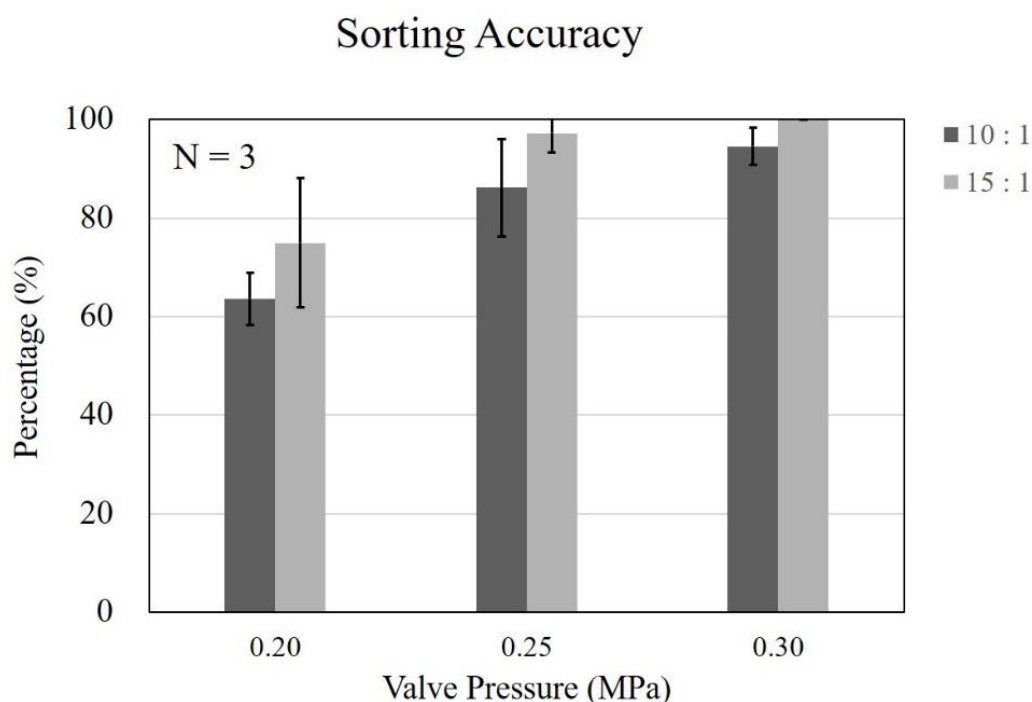


圖 4-18 液珠分類準確率

4-2.3 氣動閥壓力探討

本研究使用上節所述 PDMS 比例 10:1 與 15:1 之氣動閥薄膜，分別對氣動閥施加 0.2~0.3 MPa 之壓力，以尋找合理的運作壓力。透過表 4-2 和圖 4-18 可得知，隨著壓力增加，液珠分類的準確率亦會提升，且 PDMS 比例 15:1 的薄膜分類效率較佳，於施加 0.3 MPa 氣壓時可達 100% 的分類準確率，而 PDMS 比例 10:1 的薄膜於相同壓力下僅達 94.6% 的準確率。

本研究進一步探討氣動閥施加壓力較低時造成分類誤差的原因，分析結果得知係由液珠分裂及錯誤分類等兩種狀況所致，兩種現象在使用不同薄膜及施加不同壓力時出現的機率如表 4-2 和圖 4-19 所示。

表 4-2 氣動閥不同壓力與不同薄膜 PDMS 配方比例之分類結果

PDMS 比例 (A : B)	氣動閥壓力 (MPa)	Droplet Division		Incorrect Sorting		Sorting Purity	
		Average	STD	Average	STD	Average	STD
10 : 1	0.20	24.2 %	13.0 %	12.2 %	10.8 %	63.6 %	5.3 %
	0.25	13.8 %	9.9 %	0.0 %	0.0 %	86.2 %	9.9 %
	0.30	5.4 %	3.8 %	0.0 %	0.0 %	94.6 %	3.8 %
15 : 1	0.20	24.9 %	13.3 %	0.2 %	0.2 %	74.9 %	13.1 %
	0.25	2.8 %	3.9 %	0.0 %	0.0 %	97.2 %	3.9 %
	0.30	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	100.0 %	0.0 %

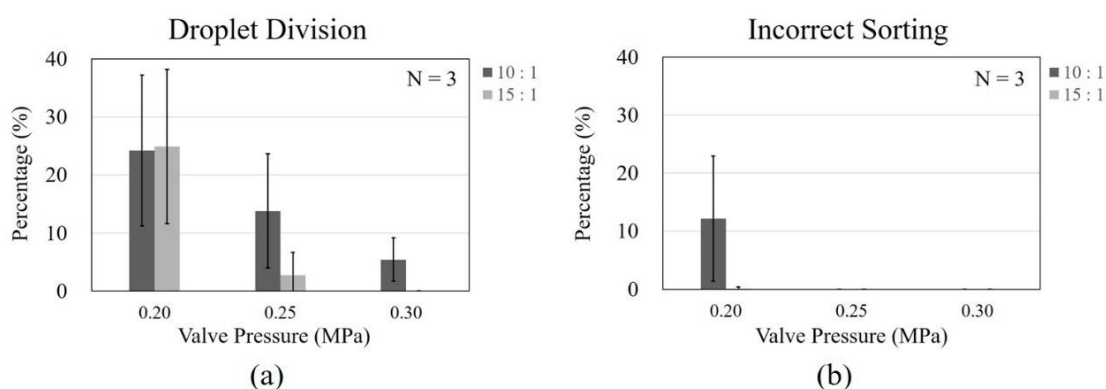


圖 4-19 液珠分類誤差分析圖 (a). 液珠分裂 (b). 錯誤分類

液珠分裂(droplet division)為液珠生成後，於到達 Y 字型分岔流道時一分為二，較大液珠進入氣動閥未作動之出口流道，而較小液珠則進入氣動閥已作動流阻較大之出口流道，如圖 4-20 所示。如表 4-2 及圖 4-19 (a)所示，液珠分裂是造成分類誤差的主要原因，於施加 0.2 MPa 時使用兩種薄膜皆會有約 25 %的液珠產生分裂，此現象隨氣動閥壓力增大而減少。在氣動閥壓力上升至 0.3 MPa 時，液珠分裂的現象於使用 PDMS 比例 15 : 1 之薄膜時不復出現，而使用 PDMS 比例 10 : 1 之薄膜時機率也降低至 10 %以內。

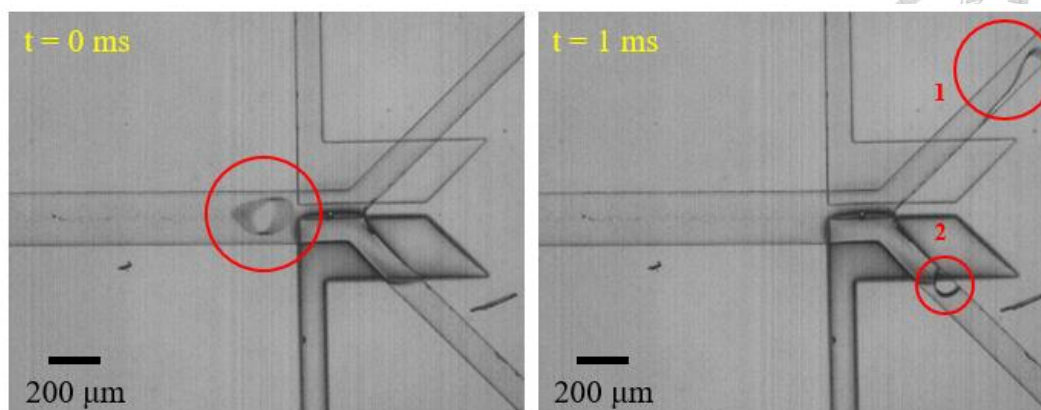


圖 4-20 液珠分裂

錯誤分類(incorrect sorting)則是當氣動閥工作壓力較低時，部分液珠會整顆進入氣動閥已作動的出口流道，亦即氣動閥無法有效提高該出口流道之流阻，致使液珠仍有機會進入該流道，如圖 4-21 所示。錯誤分類發生的機率較液珠分裂低許多如表 4-2 及圖 4-19 (b)所示，使用兩種薄膜時錯誤分類僅在施加壓力 0.2 MPa 時發生，且機率約在 10 %左右，當使用 PDMS 比例 15 : 1 之薄膜時，甚至僅有不到 1 %的機率。

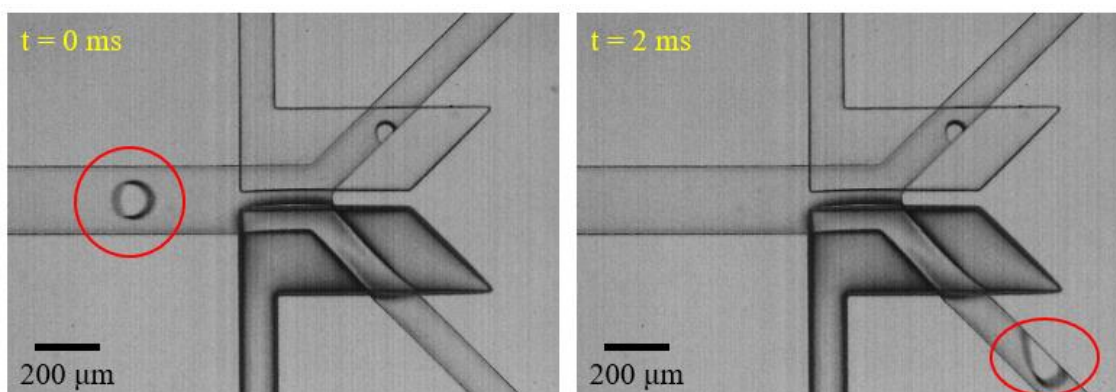


圖 4-21 液珠進入錯誤分類流道

4-2.4 分類準確率小結

本節對氣動閥 PDMS 比例 10 : 1 及 15 : 1 兩種薄膜分別施加不同壓力(0.2、0.25、0.3 MPa)，比較不同狀態下液珠進入正確出口流道的準確率，及歸納出分類誤差主要導因於液珠分裂及錯誤分類，如表 4-2 所示。分析實驗結果發現，使用 PDMS 比例 15 : 1 之薄膜因形變能力較高，可得到比 10 : 1 之薄膜更高的分類效



率，且於氣動閥施加 0.3 MPa 之壓力時，以可達到 100% 之分類準確率，故本研究將採用 PDMS 比例 15 : 1 之配方作為氣動閥薄膜，並使用 0.3 MPa 作為氣動閥之工作壓力。

4-3 液珠包覆細胞探討

使用氣體生成之液珠進行細胞包覆是微流體研究中新穎的領域，目前所能查詢到的文獻非常有限，因此本節針對氣體生成液珠包覆細胞的可行性進行探討，並以穩定生成包覆單一細胞的單分散液珠為目標。

4-3.1 檢體濃度探討

為提升本研究細胞篩選結果的純度，必須降低每顆液珠中包覆到的細胞數目，盡可能達到單細胞包覆(single-cell encapsulation)的狀態。液珠內包覆細胞的數量可用波松分布估算，如式(4-2)，其中 λ 可視為平均每顆液珠體積內所含細胞的數量，而 $p(k, \lambda)$ 為給定 λ 值下，液珠內含 k 個細胞的機率，其分布圖如圖 4-22 所示(Collins *et al.*, 2015; Mazutis *et al.*, 2013)。

$$p(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \quad (4-2)$$

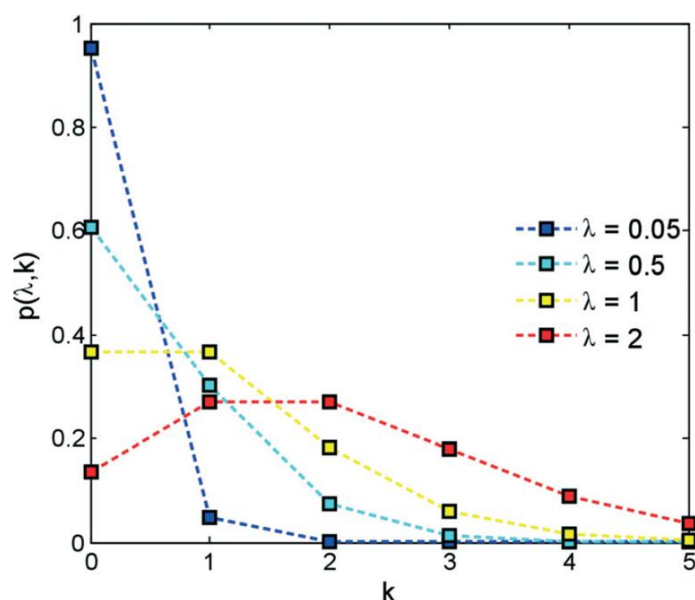


圖 4-22 波松分布(Collins *et al.*, 2015)

由圖 4-22 可知， $\lambda=1$ 時液珠包覆單一細胞的機率最高，且由 4-1.3 小節液珠尺寸測量已知生成之液珠體積約為 1.11 nL，可回推若希望液珠內包覆的細胞數量平均為 1，輸入篩選系統的細胞液濃度應為 9.0×10^5 cells/mL。從中研院合作單位取得之細胞檢體，由該團隊使用血球計算盤估算得知檢體濃度後，再使用緩衝液對檢體液進行稀釋，使濃度降為上述 9.0×10^5 cells/mL 即可通入微流體晶片使用。

使用上述細胞濃度之檢體液作為氣體生成液珠之分散相，實驗證實確實可將細胞包覆於液珠內，如圖 4-23 中黃圈標記所示。然而因本研究使用氣體作為連續相，其密度與黏滯係數比傳統使用的油類低許多，因此進行細胞包覆時的穩定性仍有待提升。除容易出現穿線式或雙重液珠，檢體液也較容易沾附於流道中央或是側壁連續流動，致使液珠無法成形，如圖 4-24。雖然本研究細胞包覆的結果仍需改善，但已成功證實使用氣體生成液珠包覆細胞具有發展潛力。

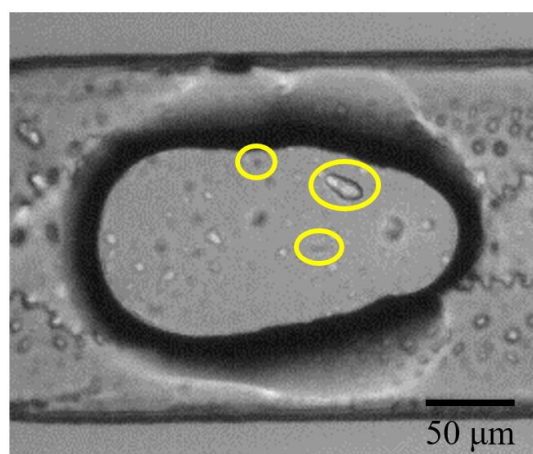


圖 4-23 氣體生成液珠包覆細胞實際照片

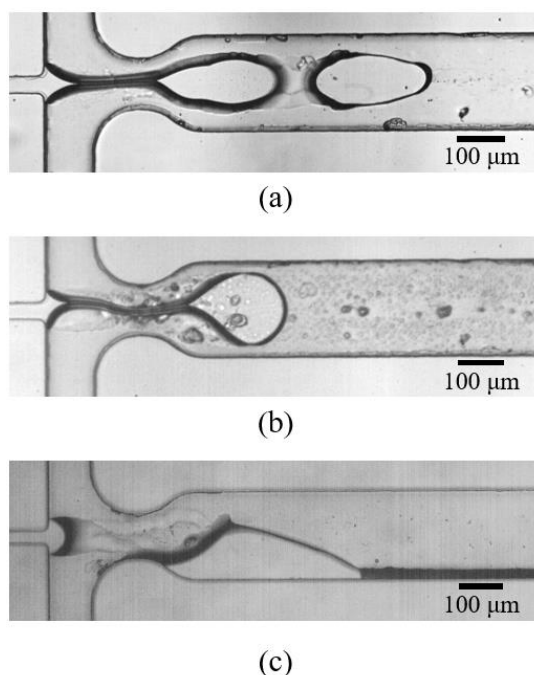
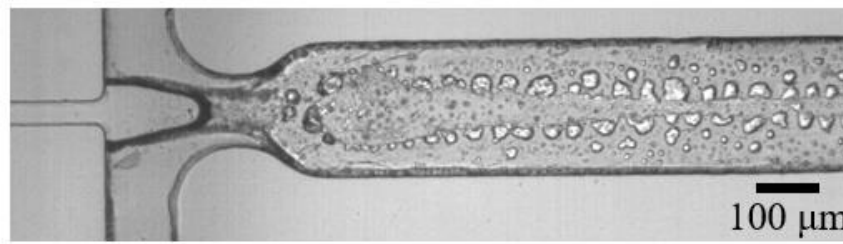
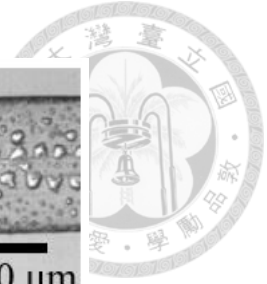


圖 4-24 使用檢體液作為分散相 (a). 雙重液珠 (b). 穿線式液珠 (c). 側壁沾附

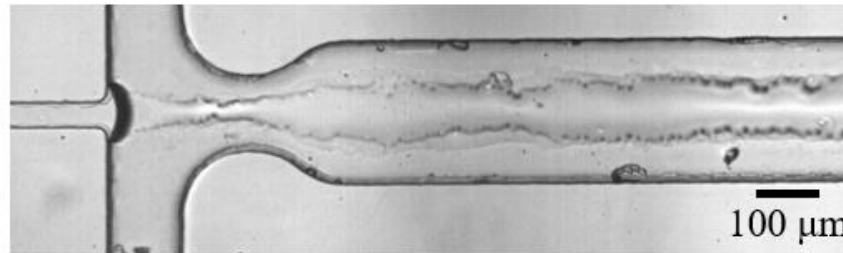
4-3.2 蛋白質沾附探討

細胞檢體須稀釋至適當濃度才可用於為流道篩檢，本研究分別採用含 2 % 胎牛血清(FBS)的細胞培養基(DMEM)及磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)兩種緩衝液稀釋後通入流道，觀察經不同緩衝液稀釋後的檢體在流道內生成液珠的情況。如圖 4-25 所示，使用兩種緩衝液皆會出現分散相檢體液中物質沾附流道側壁或底部的情形，且又以使用 2 % FBS/DMEM 稀釋時的沾黏現象更為嚴重，而使用 PBS 稀釋後，物質沾黏的現象略為減輕。

分析結果與審閱過往文獻，認為造成上述不良結果的原因，主要是細胞液中所含的培養基帶有大量蛋白質，而蛋白質與疏水性 PDMS 流道間會產生吸附作用(nonspecific adsorption)，而沾附聚集於流道上，造成流道潤濕性與表面微結構上的巨大變化，進而使微流道系統失去作用(Gokaltun *et al.*, 2017; Yoon & Garrell, 2008)。



(a)



(b)

圖 4-25 檢體液於流道中沾黏現象 (a). 2% FBS/DMEM 稀釋 (b). PBS 稀釋

經過與合作單位討論並嘗試改善後，由該單位於配製檢體時先行將細胞培養基進行過濾，以除去大部分的蛋白質。進行實驗驗證後，如圖 4-26 所示，證實過濾細胞培養基有助於大幅降低蛋白質吸附現象。

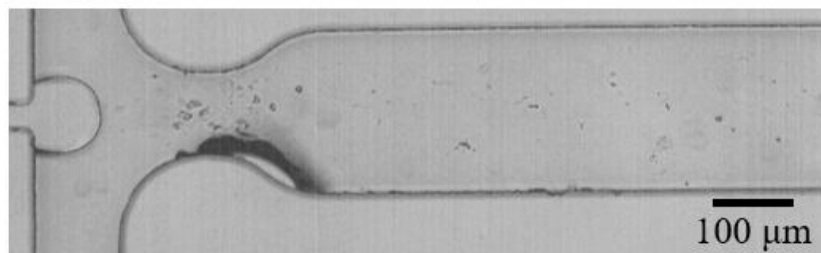


圖 4-26 使用過濾細胞培養基改善沾黏現象

4-3.3 流道改質探討

前小節所述過濾細胞培養基後雖然可大幅改善蛋白質吸附現象，然而卻發現分散相流體仍然容易貼附於流道側壁或底層連續流動，而難以由氣體連續相截斷生成液珠。為改善無法穩定形成液珠的問題，本研究嘗試使用不同藥品對 PDMS 流道進行表面改質並加以探討。

本研究首先使用將 Teflon-AF(DuPont™, USA)稀釋於 FC-40(1 %, v/v, Sigma-Aldrich, USA)之溶液以及市售潑水劑兩種藥品進行流道改質，藉由藥品表面自由能低不易沾黏的特性，企圖使檢體液較容易形成液珠(Park *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2018)。然而實驗發現，流道經上述兩種藥品改質後，分散相仍然容易沾附於流道中央及側壁，僅能出現類似穿線式的液珠，而穿線式液珠流動軌跡上仍有少量液體貼附流道連續流動，如圖 4-27 及圖 4-28。此外，生成穿線式液珠的穩定性不足，貼附流道連續流動的現象仍然時常出現。

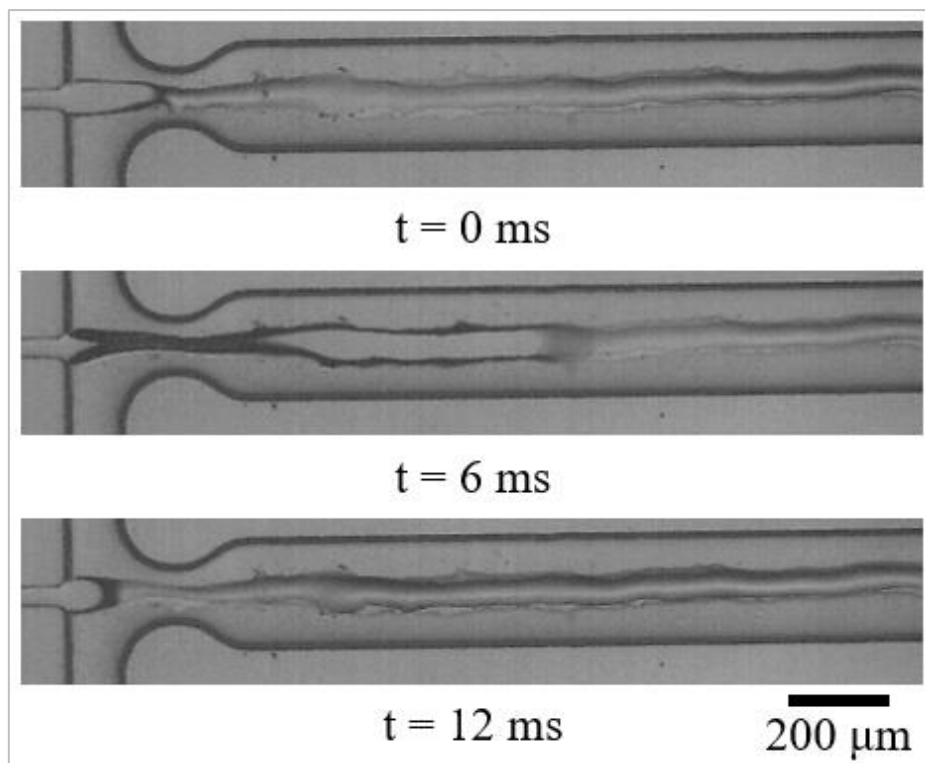


圖 4-27 經 Teflon-AF 改質之流道生成穿線式液珠

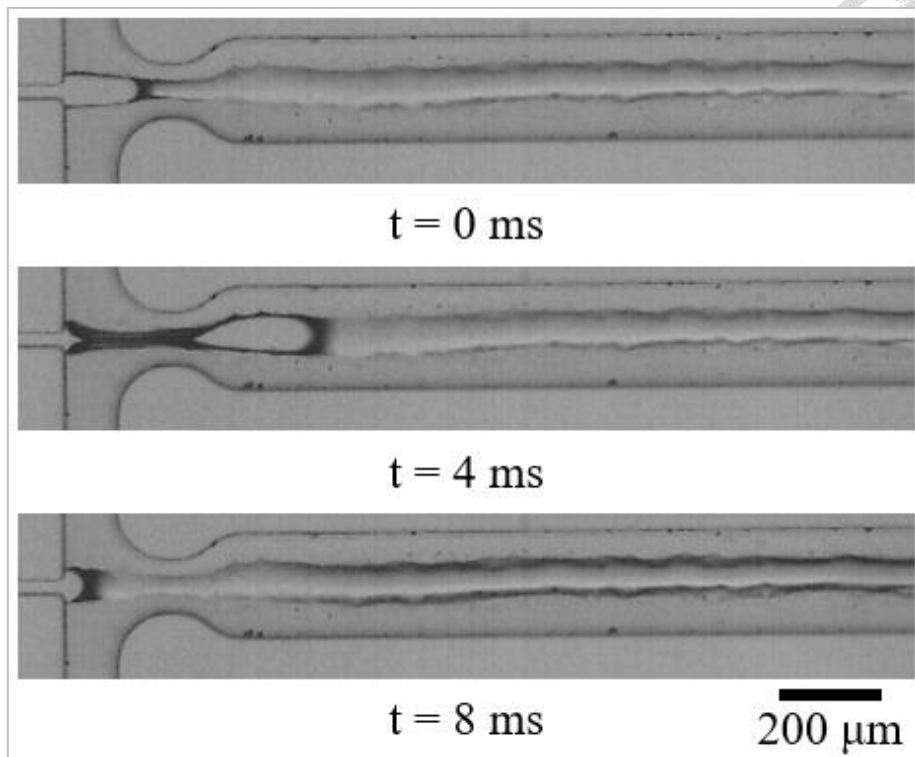


圖 4-28 經市售潑水劑改質之流道生成穿線式液珠

有鑑於 Teflon-AF 及市售潑水劑等疏水性材質(Shin *et al.*, 2018)並未解決分散相沾附流道之問題，因此本研究改採用親水性流道改質方法，並參考 Trantidou *et al.* (2017)製程步驟，使用 Sigma-Aldrich 生產之聚乙烯醇(Poly(vinyl alcohol), PVA, 99+ % hydrolyzed)稀釋於去離子水(1 wt%)進行流道改質。本研究流道改質製程先將流道層欲接合面與先前已和控制層接合之薄膜層欲接合面一同置入氧電漿機中，以通氣量 20 sccm、功率 100 W、作用時間 60 秒等機台參數施打氧電漿，完畢後將兩元件相互貼合並於室溫下以重物重壓 5 分鐘。待接合牢固後將以針筒及針筒推進器將 PVA 溶液注入流道，並靜置 10 分鐘再將壓縮空氣通入流道去除多餘的溶液，最後置於 120 °C 之加熱版上加熱 15 分鐘，使剩餘的溶液蒸發。實驗結果發現，雖然親水性流道無法如 4-1 節使用去離子水時生成單分散的液珠，然而可透過氣體連續相作為分割，使細胞檢體液分散相於主流道中形成區段狀(plugging)的液珠進行輸送，如圖 4-29。為了生成區段狀液珠，必須提升分散相流率(約 5 $\mu\text{L}/\text{min}$)並降低連續相壓力(約 0.01 MPa)，才可將液珠大小控制在適當範圍以增加後續分類效率，卻也因低流率而使液珠生成的大小與頻率較不穩定。

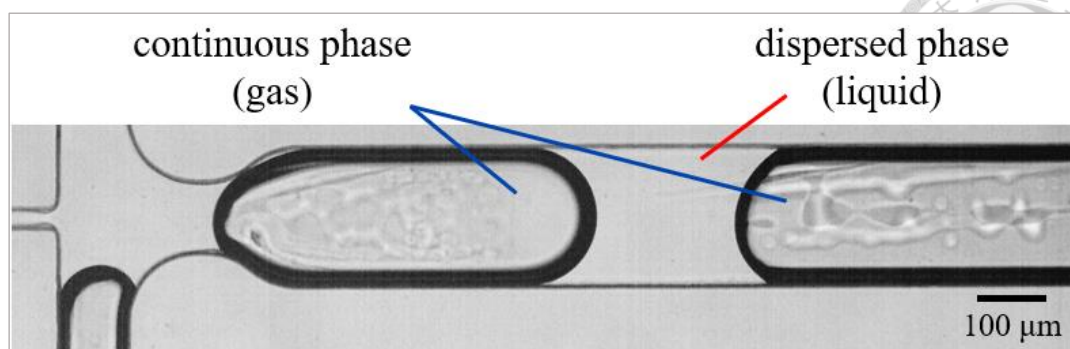


圖 4-29 細胞檢體液於經 PVA 改質之流道內生成區段狀液珠

透過上述實驗探討，本研究雖然仍無法於疏水性流道內以氣體連續相生成單分散液珠，但已證實氣體生成液珠包覆細胞具發展性，且透過 PVA 將流道改質為親水性後，也證實可以形成區段狀液珠將細胞包覆於其內，並透過氣體輸送，亦有達成所需目的。

4-3.4 標準微粒子包覆探討

由於本研究欲使用的肌肉衛星細胞目前培養所得之 GFP 螢光蛋白訊號較為薄弱，無法順利於顯微鏡下觀測，因此改使用與 GFP 螢光蛋白具有相同激發光和放射光波長的 5 μm 綠色螢光染劑粒子(第一化工)代替肌肉衛星細胞，以及使用不具螢光的 5 μm 聚苯乙烯(polystyrene, PS)標準微粒子(4025A, Thermo Fisher Scientific, USA)代替其餘不具螢光之細胞。

為驗證使用標準微粒子替代細胞是否同樣可有效被包覆於液珠內輸送，本研究將上述兩種微粒子於去離子水中稀釋成濃度 0.006 % solid 之水溶液，以模擬細胞液中 9.0×10^5 cells/mL 之細胞濃度。由於溶液中的聚苯乙烯微粒子為疏水性材質，亦會與疏水性 PDMS 流道產生嚴重吸附作用，透過上小節所述 PVA 親水性流道改質後，可大幅降低微粒子沾附於流道的現象。實驗結果如圖 4-30 所示，如同使用細胞液，可順利使用氣體連續相將溶液切割成多個區段狀液珠。

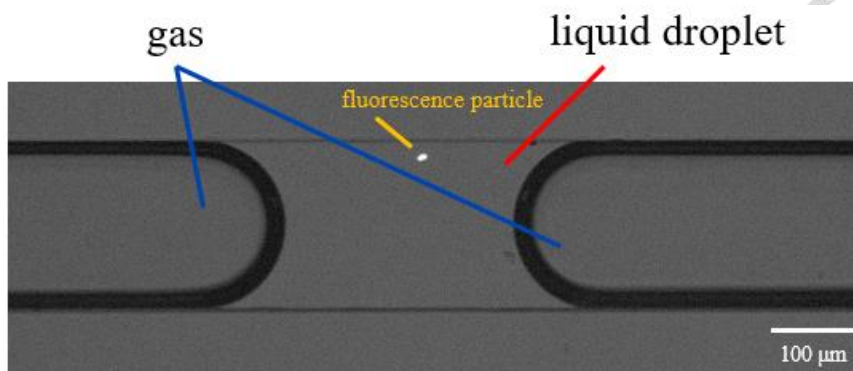


圖 4-30 經 PVA 改質之流道生成區段狀液珠包覆微粒子

4-4 影像辨識探討

本研究欲利用肌肉衛星細胞上的 GFP 螢光蛋白被特定波長光波所激發的螢光作為判別訊號，惟因目前培養所得細胞的螢光訊號較弱，無法順利於顯微鏡下觀測，因此本研究使用螢光染劑粒子與標準微粒子作為代替，驗證利用對螢光訊號進行影像識別作為判別目標細胞依據之實驗方法。

影像辨識將分為液珠影像辨識和螢光影像辨識兩部分同步進行處理，其架構如圖 4-31，並於以下分別探討影像辨識的實驗結果。

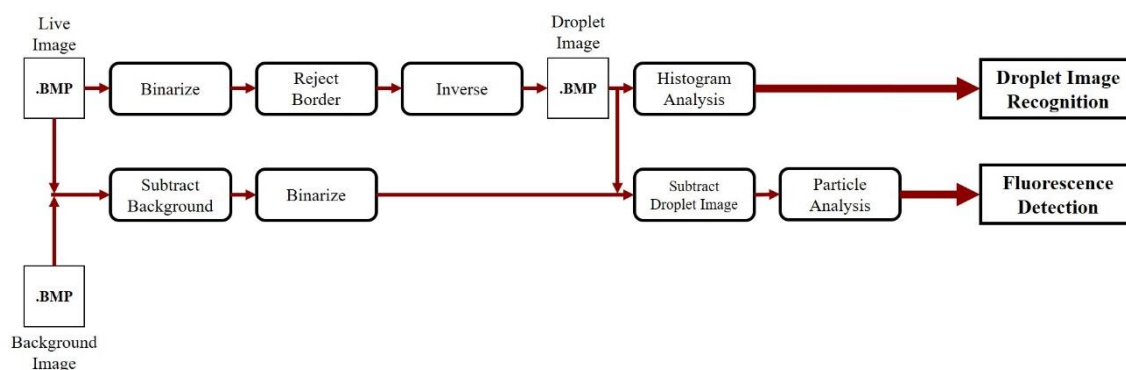


圖 4-31 影像辨識流程

4-4.1 液珠影像辨識探討

液珠影像辨識的目的在於以偵測視野中是否出現完整液珠作為是否啟動螢光辨識的觸發機制，以及利用截取液珠輪廓提升判讀液珠中螢光訊號的準確率。

本研究首先將工業相機即時擷取到的影像(圖 4-32 (a))進行二值化，利用液珠邊界的氣-液交界面以及流道側壁形成的陰影，轉換為黑色像素，並將流道中的液珠、氣體區段以及流道外側等像素亮度較高的部分轉換為白色像素，將數位影像進

行閾值性分割，如圖 4- 32 (b)所示。接著使用 LabVIEW 影像處理封包中的 Reject Boundary.vi，將二值化影像中與影像邊界相交的白色像素物件清除。如此可將流道外側的影像以及流道中液珠前後與影像邊界相接的氣體區段移除，僅留下影像中間的完整液珠，如圖 4- 32 (c)。取得液珠的影像後，使用 Inverse.vi 將二值化影像中的黑白像素反轉，如圖 4-32 (d)所示，以形成影像遮罩，作為辨識液珠和用於後續螢光訊號辨識以增加準確率。本研究藉由直方圖分析，計算影像遮罩中黑色像素的面積是否介於特定區間內，以作為偵測有無液珠經過視野的判斷依據。

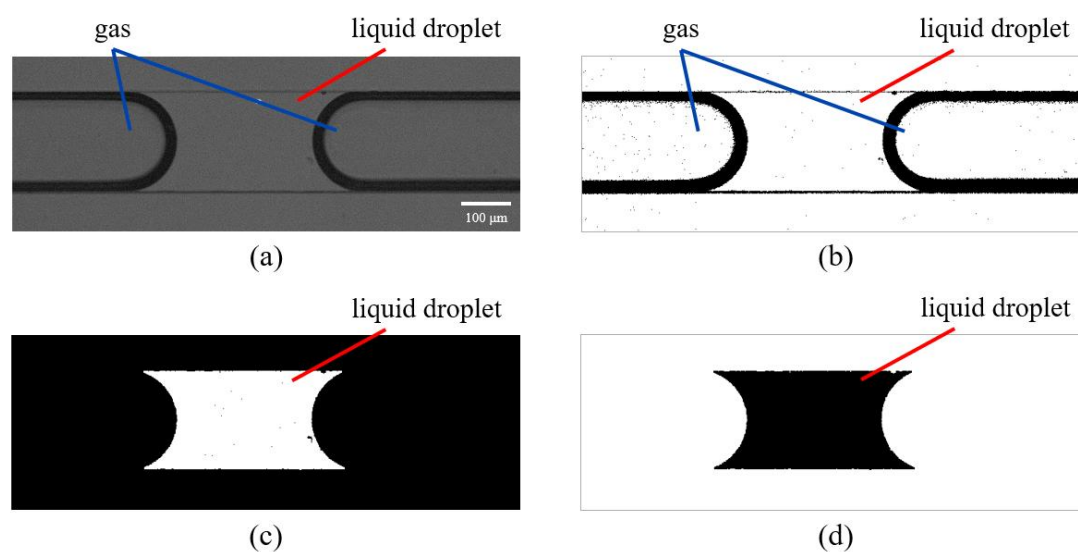


圖 4- 32 液珠影像辨識 (a). 工業相機擷取影像原圖 (b). 二值化影像
(c). Reject Border 影像 (d). 黑白反轉影像

然而影像處理過程中也發現當液珠較長，超出影像左右邊界時，會導致利用 Reject Bondery.vi 進行影像處理時將液珠去除，而無法進行後續判讀。此外，若氣體區段較短時則會導致被誤判為液珠，如圖 4- 33 所示。此類誤差結果可透過調整影像 ROI、調整液珠直方圖分析面積參數以及調整氣、液相相對流率，使氣體區段皆會大於 ROI，而液珠都會介於固定大小之內，將誤判的可能性排除。

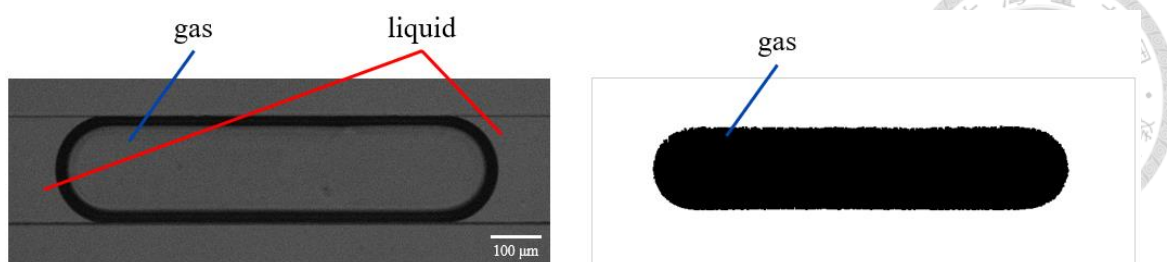


圖 4-33 氣體區段被誤判為液珠

4-4.2 螢光訊號影像辨識探討

為降低影像處理的複雜度，本研究於開始篩選前先拍攝流道影像作為背景，並將工業相機即時擷取之影像與背景影像相減，以去除擷取影像中的流道邊界和沾附於流道中的雜質或微粒子，以降低於後續影像辨識時產生的誤差。減去背景後的影像同樣會進行二值化，將影像中螢光訊號所發出的亮點轉換為白色像素，以作為判斷依據。而為了更準確判讀液珠內的微粒子螢光訊號，二值化後的影像會與 4-4.1 小節影像處理所得之液珠影像遮罩相減，以去除螢光影像中位於液珠區域外的雜訊，其影像處理流程與結果如圖 4-34。

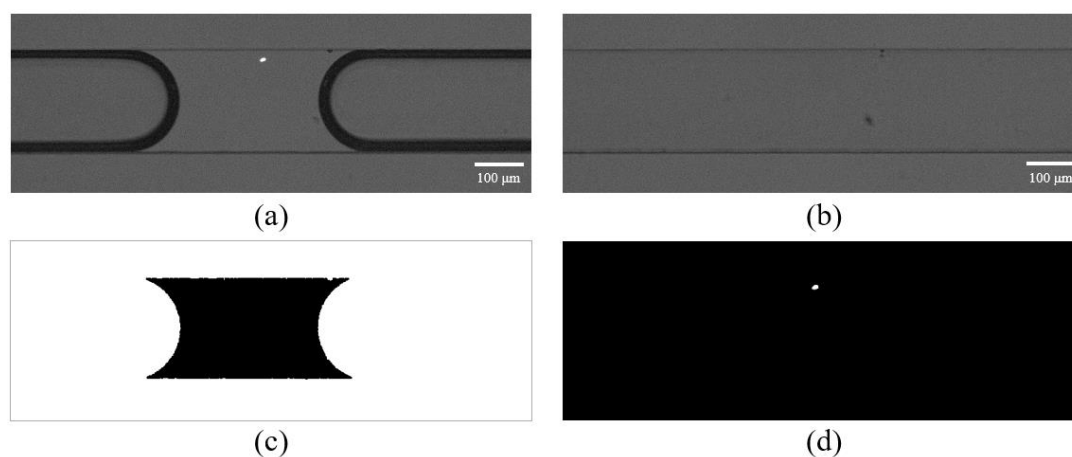


圖 4-34 螢光訊號影像處理 (a). 即時擷取影像 (b). 背景影像 (c). 液珠影像遮罩 (d). 減去背景及遮罩並二值化之螢光訊號辨識結果

分析影像辨識結果，發現將影像減去背景及液珠遮罩雖然可以有效提升辨識效率，然而仍然會受到失焦、液珠邊界影響以及雜訊等因素，造成螢光訊號辨識上的誤差。由於顯微鏡在使用上有對焦平面的限制，而流道高度為 $50\ \mu\text{m}$ ，當螢光粒子在液珠內運動時，因上下擾動離開對焦平面則會造成失焦，使影像中的螢光訊號

模糊。模糊的螢光訊號會使面積增大但亮度降低，容易於二值化過程中因亮度不足而被轉換為黑色像素，或是因面積較大而被分割為多個白色像素區塊，進而影響辨識結果，如圖 4-35。



圖 4-35 失焦造成影像中螢光訊號模糊

液珠影像處理過程中，為有效分割液珠、氣體與流道側壁，以及避免流道側壁不平滑表面形成雜訊，會對影像進行腐蝕、膨脹等形態學處理，使液珠交界面上的陰影寬度增寬，如圖 4-32 (b)中的黑色邊界較圖 4-32 (a)之陰影像素略寬。此步驟對於影像處理無可避免，也使液珠影像處理結果更為理想，然而卻也因形態學處理時會將流道邊界與液珠邊界的像素除去，因此必須犧牲極為靠近邊界的像素資訊。當螢光粒子剛好位於液珠邊界或是流道側壁時，螢光訊號會無法正確被判讀而產生誤差，如圖 4-36。

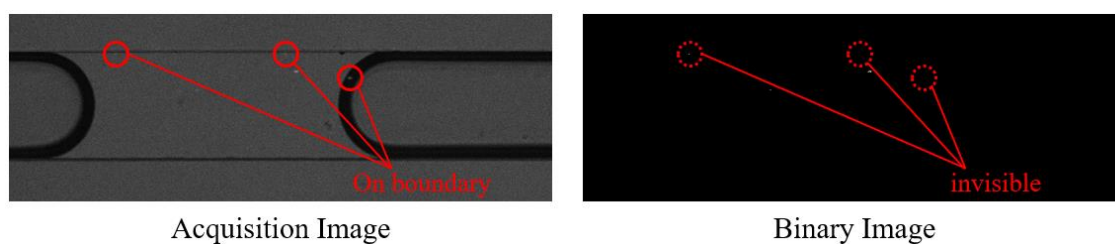


圖 4-36 位於液珠邊界的螢光訊號無法被正確判讀

除了上述失焦與邊界影響會導致螢光訊號辨識時的誤差，影像雜訊帶來的影響更為顯著。由於數位影像皆挾帶許多隨機分布的雜訊，在進行影像二值化時變得更为明顯，如圖 4-37。由於本研究使用的螢光粒子直徑僅 $5\ \mu\text{m}$ ，於影像中的像素尺寸相對較小，使二值化處理後螢光訊號與雜訊形成的白色像素區不易區別，因此這些雜訊容易被誤判為螢光訊號，而造成誤差。



圖 4-37 影像中雜訊被誤判為螢光訊號

4-4.3 影像雜訊探討

雜訊為相機拍攝數位影像過程中因光子計數(photon counting)、相機讀取(camera readout)或背景訊號(background signal)等原因而產生的隨機分布亮點與暗點。實務上常藉由影像濾波(image filtering)的方式來達到降噪的目的(van Teeffelen *et al.*, 2012)。

由於工業相機必須擷取液珠於流道中流動的動態影像，因此曝光時間不宜設定太高，以避免影像模糊影響判讀。而為了觀察螢光訊號，顯微鏡背光亮度也須降低，避免整體亮度過強覆蓋螢光訊號。由於上述兩項限制，使相機所擷取的影像亮度偏暗，使雜訊相對更為明顯。為了於較低光源下提升影像亮度，必須將相機增益值(gain)調高，使畫面及螢光訊號明亮可見，然而調高增益值同時也會造成影像中的雜訊增加。

由於影像整體亮度偏暗，亮度直方圖分布集中於亮度較低的區間，像素間亮度強度差異較小，因此進行二值化時閾值的選擇與二值化後雜訊的多寡有重大關聯。如圖 4-38 (b)所示，當閾值選擇過低時會使二值化影像中出現眾多雜訊，這些雜訊亮點於影像辨識過程時會因被誤判為螢光訊號而影響結果。相對的，如圖 4-38 (d)所示，當閾值選擇過高時，則會造成部分亮度略低的螢光訊號於二值化過程中遭到剔除，同樣會導致辨識結果的誤差。因此，正確的選擇適當的閾值，如圖 4-38 (c)所示，是準確辨識螢光訊號的關鍵。

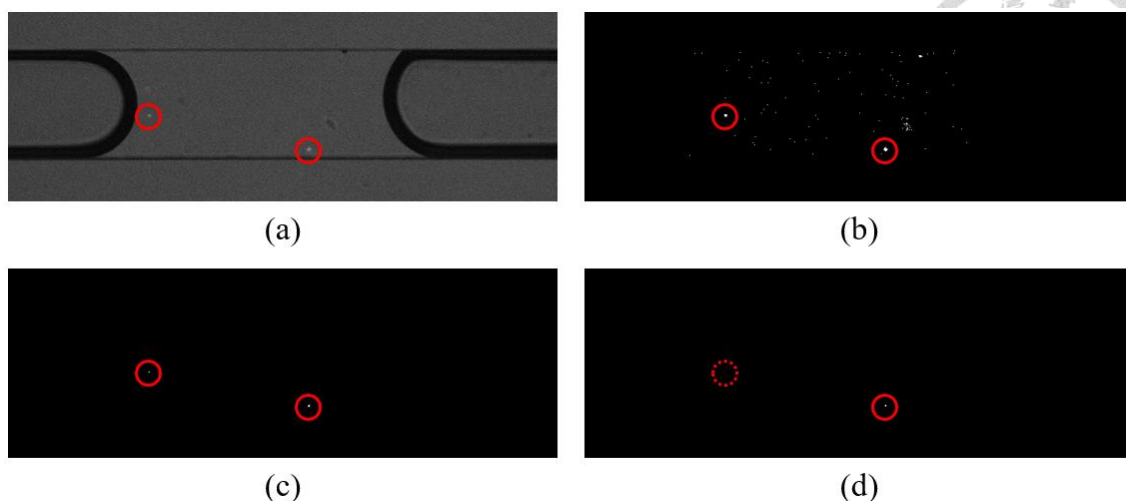


圖 4-38 不同閾值設定的二值化結果 (a). 原擷取影像 (b). Threshold = 15
(c). Threshold = 25 (d). Threshold = 35

為降低雜訊對影像辨識造成的負面影響，本研究嘗試採取於影像二值化前使用中值影像濾波(median image filter)的方法，以去除影像中的突波雜訊(salt-and-pepper noise)。將圖 4-38 (a)之擷取影像減去流道背景影像後，設定閾值為 20 進行二值化後可得如圖 4-39 (a)之影像，可見影像中仍包含許多雜訊。而若於二值化前進行中值濾波，則可於二值化後得到如圖 4-39 (b)之影像，可明顯比較出影像中僅包含正確的螢光訊號而不再有雜訊出現。然而比較圖 4-39 (a)、(b)兩圖，發現經過中值濾波後，所得的螢光訊號面積略為縮小，若液珠中出現粒徑較小或失焦的螢光粒子，會導致濾波時被予以濾除，使辨識結果不準確。



圖 4-39 Threshold = 20 二值化影像 (a). 未使用中值濾波 (b). 使用中值濾波

為了避免上述因進行中值影像濾波而造成螢光訊號消失的問題，本研究改採於影像二值化後，使用 LabVIEW 影像處理封包的 Remove Particle.vi，以形態學處理的方式將二值化影像中的顆粒狀雜訊予以移除。同樣將圖 4-38 (a)之擷取影像

減去流道背景影像並將閾值設定為 15 進行二值化後可得如圖 4-40 (a)之影像，影像中包含大量雜訊噪點。使用 Remove Particle.vi 進行一次迭代後，即可去除雜訊，得到如圖 4-40 (b)僅含螢光訊號的影像，且螢光訊號的像素面積未因形態學處理而有所增減，方法更為穩健，因此本研究採用此法作為去除雜訊之方法。



圖 4-40 Threshold = 15 二值化影像 (a). 未使用 Remove Particle.vi
(b). 使用 Remove Particle.vi

4-4.4 螢光強度之影響

有鑑於上述螢光訊號辨識使用的粒子為螢光染劑，其粒徑大小均勻度較不集中，變異度較高，且部分粒子的螢光訊號強度亦仍較為薄弱，螢光辨識結果較不穩定。螢光強度不足或是粒徑較小的染劑粒子，在影像辨識過程中有時不易與雜訊區別，且也容易因失焦而無法順利被偵測到。因此本研究改使用粒徑 5 μm 之聚苯乙烯綠色螢光標準微粒子(G0500, Thermo Fisher Scientific, USA)，螢光標準微粒子的大小極為均一，且螢光訊號非常強，因此即使影像辨識過程中發生失焦，也仍可被觀察到足以辨識之螢光訊號。此外，透過提高螢光辨識二值化的閾值，可去除大部分背景雜訊，且因為螢光標準微粒子之螢光強度夠強，不會因閾值提高而無法被偵測，可有效區別螢光訊號及雜訊，使判讀準確率大幅提升，如圖 4-41。

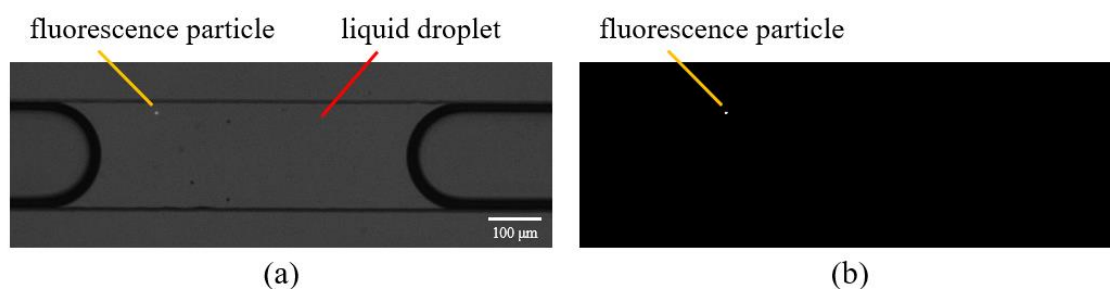


圖 4-41 使用螢光標準微粒子，Threshold = 40

雖然使用螢光標準微粒子有上述諸多優點，於本研究中可有效被運用於篩選晶片雛型機的驗證。然而真實細胞通常螢光訊號較為薄弱，且於細胞表面上分布不均，細胞大小也隨個體差異有些許不同。因此先前使用螢光染劑粒子進行的影像分析結果，仍具相當大的參考價值，待未來實際使用活體細胞於本晶片上進行篩選時，可作為參數調整之依據。

4-5 篩選效率探討

本研究使用粒徑 5 μm 之聚苯乙烯標準微粒子及螢光微粒子，以 0.006 % solid 之濃度溶於去離子水中，使用前述影像辨識程式進行螢光辨識，並設定適當的延遲時間回授控制氣動閥，於經 PVA 表面改質之流道中進行篩選。經過晶片自動化篩選後，透過取樣分析，如圖 4-42，計算出口端所收集的目標溶液與廢液等溶液中個別所含螢光微粒子相對於無螢光微粒子之比例，可得知本研究開發之篩選晶片提升檢體純度之效率。

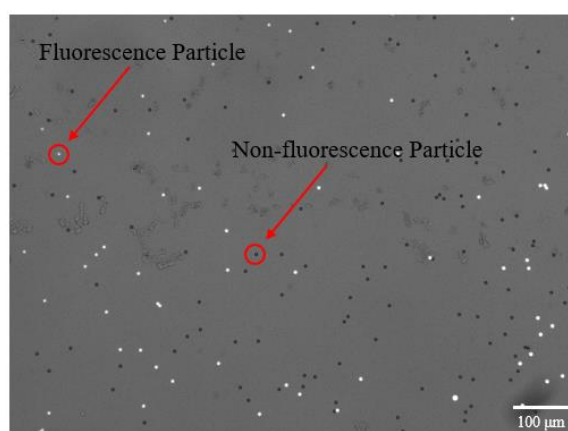


圖 4-42 透過取樣分析檢視篩選效率

4-5.1 準確率探討

本研究參考 Sesen and Whyte (2020)單細胞包覆液珠篩選所使用的分析方法，以純度(purity)及產率(yield)進行探討。其中純度公式如(4-1)，為目標區所收集到螢光微粒子數量(N_x)與目標區所收集到的所有微粒子數量(N_t)之比值，兩者皆由取樣分析得知。透過本研究開發之篩選晶片，即是希望提升溶液中螢光微粒子的純度。

$$\text{Purity} = \frac{N_x}{N_t} \quad (4-1)$$

其次產率代表所注入溶液中所含的目標螢光微粒子實際有多少含量最終於目標區被予以收集，其公式如(4- 2)，為目標區的螢光微粒子數目(N_{x_t})與入口區所含螢光微粒子數目(N_{x_i})之比值，其中入口區的螢光微粒子含量可由所調配的溶液比例計算得知。

$$\text{Yield} = \frac{N_{x_t}}{N_{x_i}} \quad (4- 2)$$

為模擬生物檢體液中含有稀少的肌肉衛星細胞濃度，並同時兼具便於驗證晶片可行性的功能，本研究調配的原始溶液中，以螢光微粒子相對所有具螢光及無螢光微粒子之比例為 29.41 %之純度為基準進行配置，如圖 4- 43 Inlet 所示。

以取樣分析自動化篩選實驗結果，如圖 4- 43 Target Outlet 所示，於目標區出口端所收集得到之目標溶液中，螢光微粒子純度約為 35.82 %，相較於入口端注入之溶液提升約 6 %。雖然純度提升有限，但由此結果可證實本研究開發之篩選晶片實具純化溶液中特定微粒子之效果。本研究亦分析晶片篩選的產率，所得表現約為 71.29 %。

此外，如圖 4- 43 Waste Outlet 所示，可發現經晶片篩選後於廢液區出口端所收集得到之溶液中，螢光微粒子純度約為 28.96 %，相較於目標區的 35.82 %低約 7 %，證實透過晶片篩選確實可達到具濃度差異的分類效果。然而，廢液區溶液中的螢光微粒子純度相較於原始溶液僅低約 0.5 %，並未明顯降低。

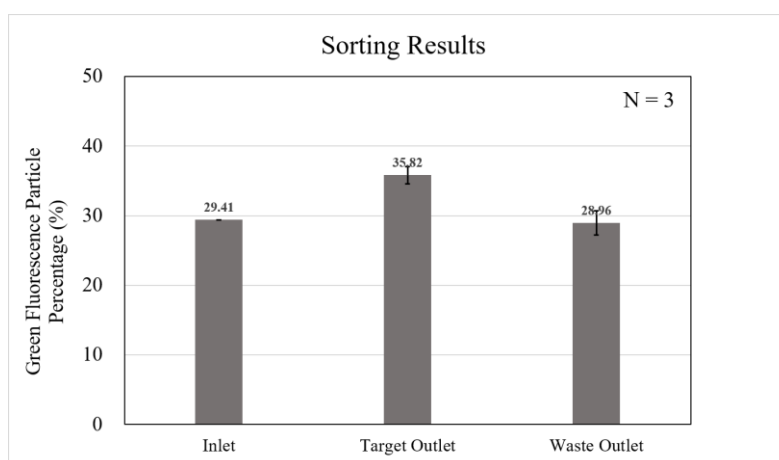


圖 4- 43 晶片自動化篩選結果



4-5.2 誤差原因探討

本研究分析造成自動化篩選晶片純化結果純度僅提升 6% 的原因，包含諸多因素，於以下分別詳述。首先本研究為避免微粒子或細胞沾附於流道以及順利使用氣體生成液珠包覆微粒子或細胞，將流道改質為親水性以生成區段狀液珠。然而區段狀液珠的體積比原先疏水性流道中單分散液珠大許多，因此同一區段狀液珠中所含的微粒子數目也較多，當進行篩選時目標液珠內仍包含許多無螢光微粒子的情況時常發生。如圖 4-44，雖然此液珠內僅含一顆螢光微粒子，卻含有三顆無螢光微粒子，然而因為影像辨識程式只要偵測到液珠內有螢光訊號即會判定為目標液珠，因此即使此液珠內無螢光微粒子含量較高仍會進入目標區。此為造成目標區溶液純度提升有限的原因之一，然而為保全稀少細胞的產率，犧牲純度為必要之舉。

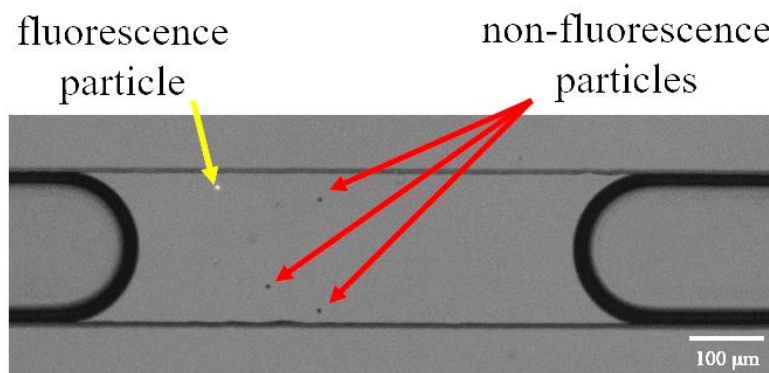


圖 4-44 區段狀液珠內含有多顆具螢光及無螢光微粒子

其次，篩選系統經影像辨識後須回授訊號控制氣動閥，而辨識完成至氣動閥作動之間所需的延遲時間，以及氣動閥需作動的時間長度均影響篩選系統的準確率。本研究透過先行量測生成液珠的移動速率、液珠的長度以及偵測區與氣動閥篩選區之間的距離，藉此換算上述兩時間參數，如圖 4-45 示意圖所示。液珠通過偵測區時影像辨識系統可即時判讀得到辨識結果，然而需待液珠向下游移動進入篩選區始得回授訊號使氣動閥作動，因此可將偵測區與篩選區的距離除以液珠移動速率得到所需設定之延遲時間約為 250 微秒。而氣動閥理想運作狀態為液珠前端進入篩選區時開始作動，並持續至液珠尾端離開篩選區進入其一出口流道後結束，因此透過液珠長度除以液珠速度可得此運作時間設定約為 5~15 微秒。然而如 4-3.3

小節所述，為在親水性流道內生成區段狀液珠需降低連續相氣體之壓力，然而較低的連續相壓力卻也造成液珠生成頻率及大小不穩定，進而使所設定的固定延遲時間及作動時間不盡理想，當液珠生成頻率與大小偏差較大時，會造成液珠無法完整進入正確出口流道，或是實際受氣動閥驅動的液珠不正確。液珠大小的偏差同時也影響影像辨識的可靠度，當生成的區段狀液珠長度大於相機取像視野時，會導致影像處理程式無法有效辨識為液珠，因而始該液珠進入廢液區，若液珠中含有螢光微粒則會影響分類結果。

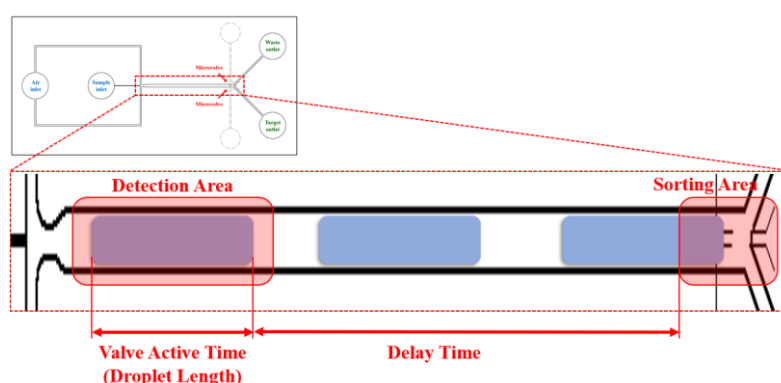


圖 4-45 氣動閥延遲時間及作動時間示意圖

再者，微粒子在針筒內的沉降現象也是影響實驗結果的原因之一。由 Thermo Fisher Scientific 所提供的規格書可得知，螢光微粒子的密度為 1.06 g/cm^3 ，而無螢光微粒子的密度則為 1.05 g/cm^3 。雖然上述兩中微粒子的密度與去離子水密度相近，大致上可於溶液中呈懸浮狀態，然而隨著篩選晶片運作時間增長，微粒子仍會慢慢沉降於針筒內，使實際進入流道的微粒子數目減少，降低篩選所得之產率。

此外，本研究於自動化篩選過程中亦發現隨著篩選時間增長，氣動閥會逐漸無法緊密關閉流道而於流道交岔處出現液珠分裂的情況，因而也對篩選效率造成不良影響，然而將氣動閥之工作壓力略微提升後可解決此狀況，惟此情況隨篩選繼續進行後過段時間仍會再次出現而需重複調整。此舉也連帶影響液珠生成，同時需略為增加連續相的壓力。推測導致此現象的可能原因為氣動閥薄膜隨作動次數的增加而有耗損或疲乏的情形，因此可有效關閉流道的條件有所改變。



第五章 結論與未來工作

5-1 結論

本研究之目的為開發自動化肌肉衛星細胞篩檢系統，以氣體生成液珠進行細胞包覆，並利用影像辨識判斷液珠內的細胞種類，再回授訊號控制流道下方的氣動微型閥操控微液珠移動，分離含肉肌衛星細胞與雜質的液珠，取得高純度細胞液以培養分化成肌細胞。

本研究首先探討使用氣體生成液珠，經實驗發現主流道寬度 200 μm 、分散相與連續向夾角 90° 為較佳的流道幾何設計，且透過兩相流率調控，得知於連續相氣體壓力 0.03 ~ 0.08 MPa、分散相去離子水流率 1 ~ 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 區間內，可穩定生成位於滴落區間單分散的微液珠。

本研究繼而探討所設計的液珠分類機制，即 Y 字型分岔出口流道與氣動微型閥，發現使用 PDMS 原液與固化劑比例 15 : 1 製作氣動閥薄膜，並對任一氣動閥施加 0.3 MPa 的工作壓力時，可使液珠進入對側氣動閥未作動的出口流道，達到準確率 100 % 的有效分類結果。

本研究亦完成使用氣體生成液珠包覆細胞的探討，證實氣體生成的液珠確實可包覆細胞，然而因氣體密度與黏滯性係數皆低，且細胞培養基的黏滯性較高，導致分散相容易貼附流道底部或側壁連續流動，因此目前仍無法穩定生成單分散的液珠。然而透過使用 PVA 將流道內部表面改質為親水性，可有效生成區段狀液珠並透過氣體連續相輸送。研究過程亦發現分散相檢體液內的蛋白質容易沾附於流道，此部分透過檢體製備時先將細胞培養基進行過濾得以解決。

影像辨識為本研究細胞篩選的核心，然而因本研究培養的肌肉衛星細胞螢光蛋白訊號強度不足，因此本研究目前採用標準微粒子及螢光微粒子替代，進行影像辨識系統的驗證。透過工業相機擷取即時影像後，進行一序列影像處理，當液珠長度未超出相機取向視野時，可準確辨識出流道內的液珠的形態以及液珠內螢光微粒子所發出的螢光訊號，且透過形態處理可有效降低影像中的雜訊，使辨識效率提



升。然而若液珠長度超出視野則無法進行辨識，此外，當氣體區間小於視野時則會被錯誤地判別成液珠，但由於氣體區段中不會出現螢光微粒子，因此不致影響整體結果。

最終本研究結合前述各流道部件，透過取樣分析探討自動化篩選結果，證實本研究開發之微流道晶片可以提升檢體純度約 6%。進而探討本研究純度提升有限之原因，認為主要係因親水性流道中生成的區段狀液珠生成頻率、移動速率及液珠長度的不穩定，造成氣動閥無法精確驅動經辨識的液珠，且同一顆液珠內所含微粒子數量不均，皆降低篩選系統應有的準確度。

5-2 未來工作

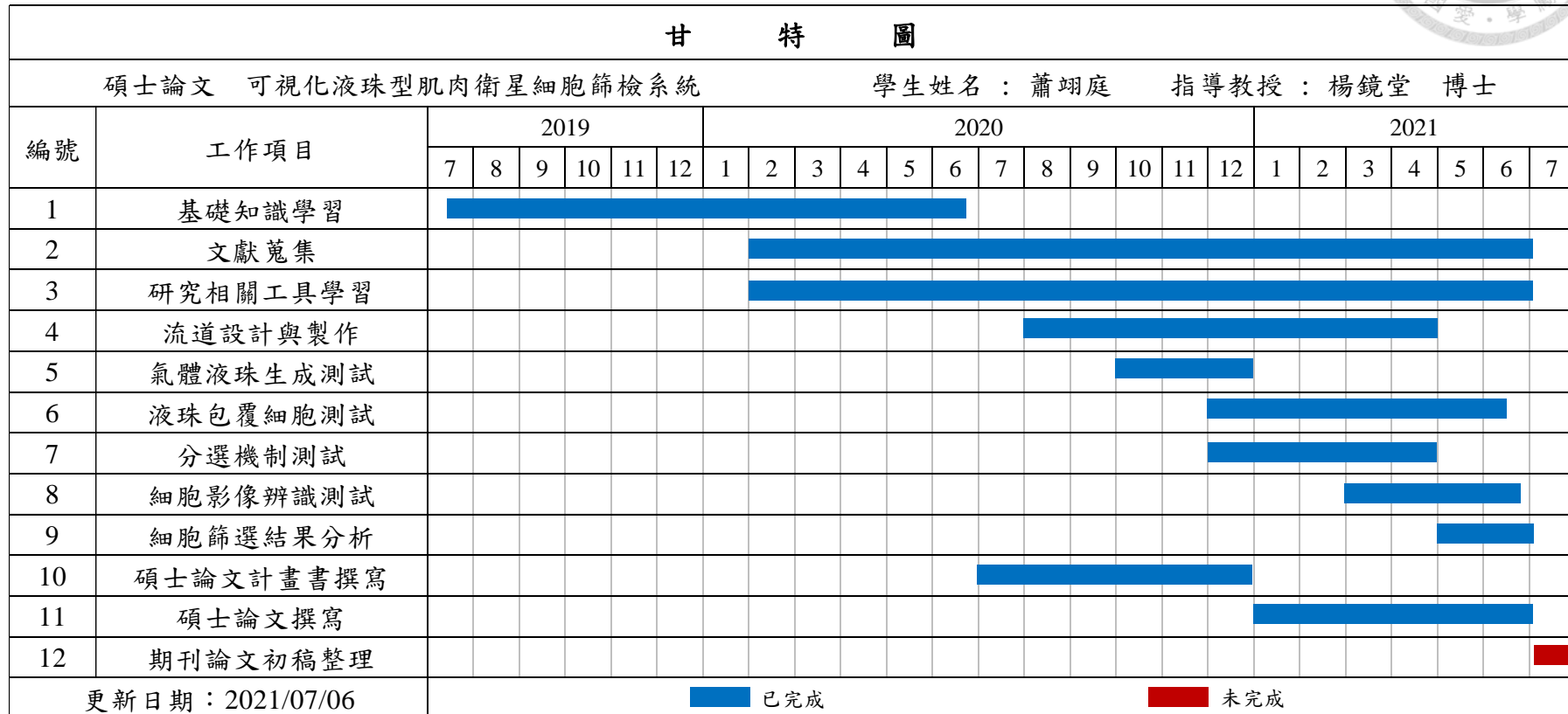
本研究已完成氣體生成液珠的探討，並驗證所採用的液珠分類機制有效，以及證實氣體生成液珠用於包覆細胞的可行性，亦建立完整的影像辨識及回授控制系統以進行自動化的篩選。唯目前仍無法穩定使用氣體於疏水性流道內生成單分散的液珠包覆細胞，僅能於親水性流道內生成區段狀液珠並以氣體輸送，而也因為肌肉衛星細胞螢光蛋白亮度不足，因此目前改以螢光微粒子和標準微粒子替代，且篩選後純度提升僅為 6%。

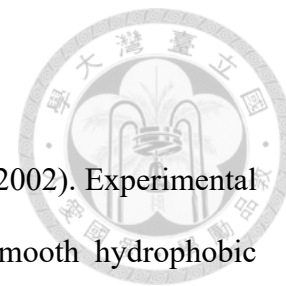
本研究開發之細胞篩選微流體晶片，未來可朝提升使用細胞液作為分散相時生成單分散之液珠的穩定性，以及增強影像辨識能力和回授控制準確度等方向作為研究目標，持續精進以提升篩選效率。未來可使用本研究氣體生成液珠以及於親水性流道生成區段狀液珠之研究成果，透過調整流道設計或流道改質等方法，加以改善單分散液珠的生成情況。而本研究之影像辨識系統以螢光訊號偵測為主體，未來若收集較完整之肌肉衛星細胞影像參數，可將這些參數整理歸納後加入辨識系統，以螢光輔以外觀形態等複合方式強化辨識準確率。此外，待所培養具螢光蛋白之小鼠肌肉衛星細胞螢光訊號足以被偵測時，可回歸使用此檢體進行篩選實驗，驗證本研究於生物檢體使用上的效果。

本研究綜合利用氣體生成液珠包覆細胞以及實現於氣體連續相中分類液珠等兩項重點創新，未來將持續改善，透過影像辨識主動控制，期望達成高生物相容性、後端使用便利之高純度肌肉衛星細胞篩檢微流體系統，以提升實驗室中培養該細胞以分化為成肌細胞作為再生醫學研究使用的效率。



5-3 甘特圖





第六章 參考文獻

- Albenge, O., Lacabanne, C., Beguin, J.-D., Koënen, A., & Evo, C. (2002). Experimental procedure to measure the blocking energy of liquid on smooth hydrophobic surfaces. *Langmuir*, *18*(23), 8929-8932.
- Alkayali, T., Cameron, T., Haltli, B., Kerr, R., & Ahmadi, A. (2019). Microfluidic and cross-linking methods for encapsulation of living cells and bacteria-a review. *Analytica Chimica Acta*, *1053*, 1-21.
- Almansour, N. A., Syed, H. F., Khayat, N. R., Altheeb, R. K., Juri, R. E., Alhiyafi, J., Alrashed, S., & Olatunji, S. O. (2019). Neural network and support vector machine for the prediction of chronic kidney disease: A comparative study. *Computers in Biology Medicine*, *109*, 101-111.
- Anna, S. L., Bontoux, N., & Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, *82*(3), 364-366.
- Au, S. H., Edd, J., Stoddard, A. E., Wong, K. H., Fachin, F., Maheswaran, S., Haber, D. A., Stott, S. L., Kapur, R., & Toner, M. (2017). Microfluidic isolation of circulating tumor cell clusters by size and asymmetry. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-10.
- Babahosseini, H., Misteli, T., & DeVoe, D. L. (2019). Microfluidic on-demand droplet generation, storage, retrieval, and merging for single-cell pairing. *Lab on a Chip*, *19*(3), 493-502.
- Bigorra, L., Merino, A., Alferez, S., & Rodellar, J. (2017). Feature analysis and automatic identification of leukemic lineage blast cells and reactive lymphoid cells from peripheral blood cell images. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *31*(2), e22024.
- Braiki, M., Benzinou, A., Nasreddine, K., Labidi, S., & Hymery, N. (2016). *Segmentation*



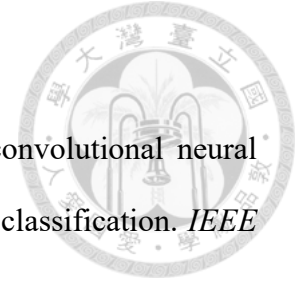
- of dendritic cells from microscopic images using mathematical morphology*. Paper presented at the 2016 2nd International Conference on Advanced Technologies for Signal and Image Processing (ATSIP).
- Cassie, A., & Baxter, S. (1944). Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, *40*, 546-551.
- Chaudhury, M. K., & Whitesides, G. M. (1992). How to make water run uphill. *Science*, *256*(5063), 1539-1541.
- Chung, A. J. (2019). A Minireview on inertial microfluidics fundamentals: Inertial particle focusing and secondary flow. *BioChip Journal*, *13*(1), 53-63.
- Collins, D. J., Alan, T., Helmerson, K., & Neild, A. (2013). Surface acoustic waves for on-demand production of picoliter droplets and particle encapsulation. *Lab on a Chip*, *13*(16), 3225-3231.
- Collins, D. J., Neild, A., deMello, A., Liu, A.-Q., & Ai, Y. (2015). The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. *Lab on a Chip*, *15*(17), 3439-3459.
- Dalili, A., Samiei, E., & Hoorfar, M. (2019). A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches. *Analyst*, *144*(1), 87-113.
- Elsalamony, H. A. (2018). Detection of anaemia disease in human red blood cells using cell signature, neural networks and SVM. *Multimedia Tools Applications*, *77*(12), 15047-15074.
- Fan, X., Jia, C., Yang, J., Li, G., Mao, H., Jin, Q., & Zhao, J. (2015). A microfluidic chip integrated with a high-density PDMS-based microfiltration membrane for rapid isolation and detection of circulating tumor cells. *Biosensors Bioelectronics*, *71*, 380-386.



- Gokaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A., & Usta, O. B. (2017). Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *Technology*, 5(01), 1-12.
- Hao, Z., & Li, W. (2021). A Review of Smart Lubricant-Infused Surfaces for Droplet Manipulation. *Nanomaterials*, 11(3), 801.
- Haralick, R. M., Sternberg, S. R., & Zhuang, X. (1987). Image analysis using mathematical morphology. *IEEE Transactions on Pattern Analysis Machine Intelligence*(4), 532-550.
- Hong, J., Andrew, J. d., & Jayasinghe, S. N. (2010). Bio-electrospraying and droplet-based microfluidics: control of cell numbers within living residues. *Biomedical Materials*, 5(2), 021001.
- Huang, C.-L., Lian, M.-J., Wu, Y.-H., Chen, W.-M., & Chiu, W.-T. (2020). Identification of Human Ovarian Adenocarcinoma Cells with Cisplatin-resistance by Feature Extraction of Gray Level Co-occurrence Matrix Using Optical Images. *Diagnostics*, 10(6), 389.
- Ichimura, K., Oh, S.-K., & Nakagawa, M. (2000). Light-driven motion of liquids on a photoresponsive surface. *Science*, 288(5471), 1624-1626.
- Jiang, K., Lu, A. X., Dimitrakopoulos, P., DeVoe, D. L., & Raghavan, S. R. (2015). Microfluidic generation of uniform water droplets using gas as the continuous phase. *Journal of Colloid Interface Science*, 448, 275-279.
- Jiao, Z., Huang, X., & Nguyen, N.-T. (2008). Manipulation of a droplet in a planar channel by periodic thermocapillary actuation. *Journal of Micromechanics Microengineering*, 18(4), 045027.
- Jing, T., Ramji, R., Warkiani, M. E., Han, J., Lim, C. T., & Chen, C.-H. (2015). Jetting microfluidics with size-sorting capability for single-cell protease detection.



- Biosensors and Bioelectronics*, 66, 19-23.
- Jo, Y., Shen, F., Hahn, Y. K., Park, J.-H., & Park, J.-K. (2016). Magnetophoretic sorting of single cell-containing microdroplets. *Micromachines*, 7(4), 56.
- Kavitha, J., & Suruliandi, A. (2016). *Texture and color feature extraction for classification of melanoma using SVM*. Paper presented at the 2016 International Conference on Computing Technologies and Intelligent Data Engineering (ICCTIDE'16).
- Kemna, E. W., Schoeman, R. M., Wolbers, F., Vermes, I., Weitz, D. A., & Van Den Berg, A. (2012). High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel. *Lab on a Chip*, 12(16), 2881-2887.
- Kobayashi, T., Maeda, H., & Konishi, S. (2017). Photoresponsive wettability switching of TiO₂-coated micropillar arrays with different geometries of overhang roofs. *Micro Nano Letters*, 12(8), 540-544.
- Lai, A., Altemose, N., White, J. A., & Streets, A. M. (2019). On-ratio PDMS bonding for multilayer microfluidic device fabrication. *Journal of Micromechanics Microengineering*, 29(10), 107001.
- Lai, Y.-H., Yang, J.-T., & Shieh, D.-B. (2010). A microchip fabricated with a vapor-diffusion self-assembled-monolayer method to transport droplets across superhydrophobic to hydrophilic surfaces. *Lab on a Chip*, 10(4), 499-504.
- Lee, K., Kim, S.-E., Doh, J., Kim, K., & Chung, W. K. (2021). User-friendly image-activated microfluidic cell sorting technique using an optimized, fast deep learning algorithm. *Lab on a Chip*. 21(9), 1798-1810.
- Li, Y., Zhu, R., Mi, L., Cao, Y., & Yao, D. (2016). Segmentation of white blood cell from acute lymphoblastic leukemia images using dual-threshold method.



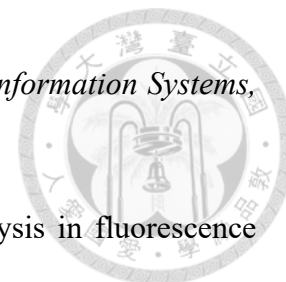
- Computational Mathematical Methods in Medicine*, 2016.
- Liang, G., Hong, H., Xie, W., & Zheng, L. (2018). Combining convolutional neural network with recursive neural network for blood cell image classification. *IEEE Access*, 6, 36188-36197.
- Loddo, A., Di Ruberto, C., & Kocher, M. (2018). Recent advances of malaria parasites detection systems based on mathematical morphology. *Sensors*, 18(2), 513.
- Mandyartha, E. P., Anggraeny, F. T., Muttaqin, F., & Akbar, F. A. (2020). *Global and adaptive thresholding technique for white blood cell image segmentation*. Paper presented at the Journal of Physics: Conference Series.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., & Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 8(5), 870-891.
- Moreira, A., Carneiro, J., Campos, J., & Miranda, J. (2021). Production of hydrogel microparticles in microfluidic devices: a review. *Microfluidics Nanofluidics*, 25(2), 1-24.
- Motohashi, N., Asakura, Y., & Asakura, A. (2014). Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. *JoVE*(86), e50846.
- Pan, Y., Zhou, T., & Xi, Y. (2015). *Bacterial foraging based edge detection for cell image segmentation*. Paper presented at the 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC).
- Park, J. W., Na, S., Kang, M., Sim, S. J., & Jeon, N. L. (2017). PDMS microchannel surface modification with Teflon for algal lipid research. *BioChip Journal*, 11(3), 180-186.
- Park, S.-Y., Wu, T.-H., Chen, Y., Teitell, M. A., & Chiou, P.-Y. (2011). High-speed droplet generation on demand driven by pulse laser-induced cavitation. *Lab on a Chip*,



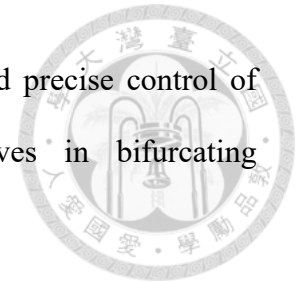
- 11(6), 1010-1012.
- Patankar, N. A. (2003). On the modeling of hydrophobic contact angles on rough surfaces. *Langmuir*, 19(4), 1249-1253.
- Ren, L., Chen, Y., Li, P., Mao, Z., Huang, P.-H., Rufo, J., Guo, F., Wang, L., McCoy, J. P., & Levine, S. J. (2015). A high-throughput acoustic cell sorter. *Lab on a Chip*, 15(19), 3870-3879.
- Researchandmarkets. (2021). Regenerative Medicine Market - Global Outlook and Forecast 2021-2026. Retrieved from https://www.researchandmarkets.com/reports/5336112/regenerative-medicine-market-global-outlook-and?utm_source=GNOM&utm_medium=PressRelease&utm_code=rd6vkg&utm_campaign=1550910++Global+Regenerative+Medicine+Market+Outlook+and+Forecast+Report+2021%3a+Market+Size+to+Grow+at+a+CAGR+of+Aroun+d+34%25+During+the+Period+2020-2026&utm_exec=chdo54prd
- Rodellar, J., Alférez, S., Acevedo, A., Molina, A., & Merino, A. (2018). Image processing and machine learning in the morphological analysis of blood cells. *International Journal of Laboratory Hematology*, 40, 46-53.
- Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Single-cell printing based on impedance detection. *Biomicrofluidics*, 9(1), 014117.
- Segre, G., & Silberberg, A. (1961). Radial particle displacements in Poiseuille flow of suspensions. *Nature*, 189(4760), 209-210.
- Sesen, M., & Whyte, G. (2020). Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
- Shen, Y., Yalikun, Y., & Tanaka, Y. (2019). Recent advances in microfluidic cell sorting systems. *Sensors Actuators B: Chemical*, 282, 268-281.



- Shin, S., Kim, N., & Hong, J. W. (2018). Comparison of surface modification techniques on polydimethylsiloxane to prevent protein adsorption. *BioChip Journal*, 12(2), 123-127.
- Song, H., Rosano, J. M., Wang, Y., Garson, C. J., Prabhakarpanthian, B., Pant, K., Klarmann, G. J., Perantoni, A., Alvarez, L. M., & Lai, E. (2015). Continuous-flow sorting of stem cells and differentiation products based on dielectrophoresis. *Lab on a Chip*, 15(5), 1320-1328.
- Sun, D., Gomez, G., & Böhringer, K. F. (2019). *Droplet manipulation using AC ewod-actuated anisotropic ratchet conveyor*. Paper presented at the 2019 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII).
- Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., & Quake, S. R. (2001). Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, 86(18), 4163.
- Tirandazi, P., & Hidrovo, C. H. (2017). Liquid-in-gas droplet microfluidics; experimental characterization of droplet morphology, generation frequency, and monodispersity in a flow-focusing microfluidic device. *Journal of Micromechanics Microengineering*, 27(7), 075020.
- Trantidou, T., Elani, Y., Parsons, E., & Ces, O. (2017). Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsystems Nanoengineering*, 3(1), 1-9.
- Umbanhowar, P., Prasad, V., & Weitz, D. A. (2000). Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream. *Langmuir*, 16(2), 347-351.
- Vaghela, H., Modi, H., Pandya, M., & Potdar, M. (2016). A novel approach to detect chronic leukemia using shape based feature extraction and identification with



- digital image processing. *International Journal of Applied Information Systems*, 11(5), 9-16.
- van Teeffelen, S., Shaevitz, J. W., & Gitai, Z. (2012). Image analysis in fluorescence microscopy: bacterial dynamics as a case study. *Bioessays*, 34(5), 427-436.
- Wang, X., Chen, S., Kong, M., Wang, Z., Costa, K. D., Li, R. A., & Sun, D. (2011). Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab on a Chip*, 11(21), 3656-3662.
- Warkiani, M. E., Guan, G., Luan, K. B., Lee, W. C., Bhagat, A. A. S., Chaudhuri, P. K., Tan, D. S.-W., Lim, W. T., Lee, S. C., & Chen, P. C. (2014). Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 14(1), 128-137.
- Wei, X., Chen, K., Guo, S., Liu, W., & Zhao, X.-Z. (2021). Emerging Microfluidic Technologies for the Detection of Circulating Tumor Cells and Fetal Nucleated Red Blood Cells. *ACS Applied Bio Materials*, 4(2), 1140-1155.
- Wenzel, R. N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial Engineering Chemistry*, 28(8), 988-994.
- Yamada, M., Nakashima, M., & Seki, M. (2004). Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical Chemistry*, 76(18), 5465-5471.
- Yang, J.-T., Chen, J. C., Huang, K.-J., & Yeh, J. A. (2006). Droplet manipulation on a hydrophobic textured surface with roughened patterns. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 15(3), 697-707.
- Yang, J.-T., Yang, Z.-H., Chen, C.-Y., & Yao, D.-J. (2008). Conversion of surface energy and manipulation of a single droplet across micropatterned surfaces. *Langmuir*, 24(17), 9889-9897.



- Yoon, D. H., Ito, J., Sekiguchi, T., & Shoji, S. (2013). Active and precise control of microdroplet division using horizontal pneumatic valves in bifurcating microchannel. *Micromachines*, 4(2), 197-205.
- Yoon, D. H., Wakui, D., Nakahara, A., Sekiguchi, T., & Shoji, S. (2015). Selective droplet sampling using a minimum number of horizontal pneumatic actuators in a high aspect ratio and highly flexible PDMS device. *RSC advances*, 5(3), 2070-2074.
- Yoon, J.-Y., & Garrell, R. L. (2008). Biomolecular Adsorption in Microfluidics. In D. Li (Ed.), *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* (pp. 68-76). Boston, MA: Springer US.
- Young, T. (1805). III. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*(95), 65-87.
- Zhu, P., & Wang, L. (2017). Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(1), 34-75.
- 朱旭剛，2015，應用氣動式液珠驅動平台於胰島功能篩檢，國立台灣大學機械工程學系碩士論文。
- 高培瑄，2018，雙層乳化液珠微流體系統應用於豆類食品添加物之偵測與分析，國立台灣大學機械工程學系碩士論文。