

國立交通大學

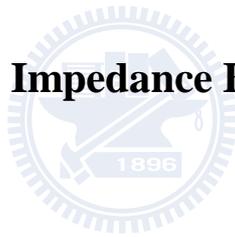
奈米科技研究所

碩士論文

阻抗式生醫感測元件於 PC12 細胞貼附與分化之鑑別研究

Distinguishability of Adhesion and Differentiation of PC12 Cells

using Impedance Biosensors



研究生：林珊聿

指導教授：許鈺宗 博士

中華民國九十九年七月

阻抗式生醫感測元件於 PC12 細胞貼附與分化之鑑別研究
**Distinguishability of Adhesion and Differentiation of PC12 Cells
using Impedance Biosensors**

研究生：林珊聿

Student : Shan-Yu Lin

指導教授：許鈺宗

Advisor : Jeng-Tzong Sheu

國立交通大學

奈米科技研究所

碩士論文



Submitted to Department of Institute Nanotechnology

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in

Nanotechnology

July, 2010

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十九年七月

阻抗式生醫感測元件於 PC12 細胞貼附與分化之鑑別研究

研究生：林珊聿

指導教授：許鈺宗 博士

國立交通大學

奈米科技研究所

摘要

在細胞培養過程中，細胞的貼附(cell adhesion)與延展(cell spreading)是黏著型細胞的基本生長過程，其中細胞型態的改變在醫療上可以為其病理狀態提供重要資訊。而細胞形態的改變，傳統上是使用光學的方式來進行觀測，然而生醫感測器則提供了另一種量測方式。本論文利用細胞與基質電阻抗判斷技術(Electric Cell-substrate Impedance Sensing, ECIS)來紀錄細胞貼附與分化所造成的阻抗變化，同時透過光學顯微鏡的影像確認訊號變化是來自細胞之不同生長貼附狀態。利用電阻抗監測體外細胞培養時，可以看出細胞貼附、分化與電阻抗存在有清楚的相關性，本研究所使用的實驗晶片裝置在特定的實驗條件下，可鑑別細胞貼附與分化的情形，不需要額外的生化檢測。除此之外，在本論文中也運用微流道結構導引細胞至目標位置上，以提供未來電阻抗量測系統與微流道整合之基礎。

Distinguishability of Adhesion and Differentiation of PC12 Cells using Impedance Biosensors

Student : Shan-Yu Lin

Advisor : Dr. Jeng-Tzong Sheu

Department (Institute) of Nanotechnology
National Chiao Tung University

ABSTRACT

During the cell culture process, cell adhesion and cell spreading are fundamental processes of adherent cells. There are some properties of living cells are associated with cell adhesion and cell spreading processes. The traditional way to monitor cells' morphological changes is to use optical methods; however, biosensors provide an alternative measurement method. This study utilized Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) method to record cell attachment and differentiation of the impedance changes and at the same time, the image through an optical microscope to confirm the signal change is different from cell growth and attachment status. Using electrical impedance monitoring in vitro cell culture, we can clearly identify cell adhesion and differentiation without any additional biochemical tests. The second part of this study is the guidance of cells to the target position by use of microfluidic structures. Combine these two techniques provide the possibility of single-cell detection in very low concentration in future applications.

致謝

短暫的兩年研究生生活即將畫上句號，我的人生又往前邁進了一小步，在這段期間所累積的人生經驗、知識都更豐富了些，然而能享有這樣經歷，必須感謝許多人的支持與鼓勵。

首先衷心的感謝我的指導教授許鈺宗老師，願意在一開始就相信我，讓我加入您的研究團隊，並且提供相當完善的實驗環境及設備，讓我們能無後顧之憂的完成實驗，也感謝老師平時對我的關心與指導。

這兩年中經歷了許多不同與以往的生活，不論開心或是悲傷，伴隨著我走過這一切的都是實驗室中的夥伴；首先感謝振嘉學長在研究上的引導，在你的身上我學到許多我所沒有的研究態度與分析事物不同的角度，當實驗遇到瓶頸時，也謝謝學長願意慷慨的給我建議及協助，讓我能順利的完成論文；感謝柏均學長在我感到困惑的時候，總是和善的提供方向與指導，同時也在生活上為我們帶來許多歡笑；皓恆學長就像大總管一樣管理著實驗室的大小瑣事，只要有你在的地方就能讓人感覺安心，謝謝你總是用自己獨特的方式關心著實驗室的學弟妹，讓我在時而苦悶的研究生活中感覺不孤單；也謝謝親切的振翔學長與東裕學長在我遇到困難時都不吝伸出援手；以及在碩一時引領我熟悉實驗環境並傳授寶貴經驗的盈傑、柏勳、治廷、履安、昭睿學長；謝謝可愛的學弟妹：新怡、子瑄、承樺、于聖和俊良在實驗過程中給予的協助，並在我心情苦悶時不時逗得我笑開懷。

最後，要感謝我最寶貝的家人，謝謝你們總是陪伴著我，給我最有力的精神依靠，因為有你們我才能順利的走到這裡，未來我會更努力的讓你們為我感到驕傲。

目錄

中文摘要	III
英文摘要	IV
致謝	V
目錄	VI
圖目錄	VIII
表目錄	XI
第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 電阻抗量測原理	3
1.3 細胞電特性	4
1.4 PC12 細胞簡介	4
1.5 文獻回顧	5
1.6 研究動機及目標	14
1.7 論文架構	14
第二章 微電極感測細胞貼附實驗流程	15
2.1 PC12 細胞培養	15
2.2 微電極製作流程	17
2.3 量測樣本製備	20
2.4 電阻抗量測系統	21
第三章 阻抗量測結果與討論	23
3.1 電極阻抗擬合(Fitting)與模擬(Simulation)	23
3.2 鑑別細胞貼附	27
3.3 鑑別單一細胞貼附	32

3.4	鑑別細胞分化	34
第四章	微流道結構中捕捉細胞	42
4.1	文獻回顧	42
4.2	研究動機與目標	45
4.3	微流道製作與系統操作流程	45
4.4	實驗結果與討論	50
第五章	結論與未來展望	53
5.1	結論	53
5.2	未來展望	54
參考文獻	55



圖目錄

圖 1-1、阻抗量測電路示意圖	2
圖 1-2、細胞貼附電極形成阻抗之示意圖	2
圖 1-3、阻抗量測電極結構	6
圖 1-4、阻抗量測系統	6
圖 1-5、阻抗量測結果	6
圖 1-6、不同面積工作電極的阻值與頻率關係	7
圖 1-7、細胞貼附在不同蛋白質表面的阻抗變化	8
圖 1-8、阻抗變化量即時觀測細胞的健康狀態	8
圖 1-9、模擬細胞與電極間不同貼附狀態的阻抗實部正規化值	10
圖 1-10、模擬細胞與細胞間不同貼附狀態的阻抗實部正規化值	10
圖 1-11、阻抗實部正規化值與頻率圖	11
圖 1-12、細胞貼附電極後阻值來源	11
圖 1-13、細胞培養於矽膜上之孔洞	12
圖 2-1、蛋白質表面修飾	16
圖 2-2、PC12 細胞(A)未分化與(B)分化後之表面形態	16
圖 2-3、微電極製作流程	17
圖 2-4、微電極結構光罩圖	19
圖 2-5、微電極結構光罩圖	19
圖 2-6、量測元件示意圖	19
圖 2-7、電極之等效電路	22
圖 2-8、細胞貼附電極之等效電路	22
圖 3-1、等效電路示意圖	23
圖 3-2、電極阻抗量測與擬合結果	24

圖 3-3、電極阻抗量測與擬合結果.....	24
圖 3-4、不同尺寸電極阻抗量測與擬合結果	25
圖 3-5、模擬細胞貼附後阻抗變化.....	26
圖 3-6、細胞貼附前與貼附後之量測結果與擬合圖	27
圖 3-7、細胞貼附於工作電極	28
圖 3-8、直徑 40 μm 阻抗實部正規化值.....	29
圖 3-9、細胞貼附型態.....	29
圖 3-10、直徑 20 μm 阻抗實部正規化值.....	30
圖 3-12、細胞貼附型態.....	30
圖 3-13、直徑 10 μm 阻抗實部正規化值.....	31
圖 3-14、細胞貼附型態.....	31
圖 3-15、細胞貼附於直徑 5 μm 工作電極上	32
圖 3-16、直徑 5 μm 阻抗實部正規化值.....	33
圖 3-17、細胞分化後阻抗實部正規化值	35
圖 3-18、細胞分化後之表面型態.....	35
圖 3-19、細胞量測前如左圖、量測後如右圖之表面形貌	36
圖 3-20、細胞分化前後阻抗實部正規化值	36
圖 3-21、細胞分化阻抗實部正規化與頻率圖	37
圖 3-22、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值	39
圖 3-23、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長 因子之培養液 24 小時之表面形貌	39
圖 3-24、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值	40
圖 3-25、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長 因子之培養液 24 小時之表面形貌	40
圖 3-26、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值	41

圖 3-27、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長因子之培養液 24 小時之表面形貌	41
圖 4-1、陣列式 U 型結構	43
圖 4-2、水壩式結構.....	44
圖 4-3、連續篩狀結構.....	44
圖 4-4、雙層微流道結構製作流程圖	47
圖 4-5、雙層微流道結構之(A)雙層 SU-8 模具(B)PDMS 雙層流道結構俯視圖 (C)PDMS 雙層流道結構側視圖	47
圖 4-6、溝槽型微流道結構示意圖.....	49
圖 4-7、溝槽型微流道結構俯視圖.....	49
圖 4-8、微流道結構之(A)細胞流向示意圖 (B)模擬結果	50
圖 4-9、微流道結構捕捉單一(A)beads (B)PC12 細胞	51
圖 4-10、流道模擬示意圖	52
圖 4-11、微流道中(A)培養細胞並且(B)刺激分化.....	52

表目錄

表 1-1、ECIS 文獻回顧.....	13
表 3-1、不同尺寸電極阻抗擬合結果.....	25
表 3-2、細胞貼附前後之擬合結果.....	28
表 3-3、不同電極面積之阻抗擬合結果.....	37
表 3-4、擬合元件參數值.....	39
表 3-5、擬合元件參數值.....	40
表 3-6、擬合元件參數值.....	41



第一章 緒論

1.1 研究背景

在生物醫學領域中，生物分子的感測是其研究與應用的基礎，因此生物感測器的發展也成了必然的趨勢，然而什麼是生物感測器呢？在生物技術尚未發展前，礦工們利用金絲雀的代謝速度較人類快、對特定氣體也比人類有更好的靈敏度，而將金絲雀帶入礦坑中去感測其中特定氣體的存在，就可以把金絲雀視為生物感測器；所謂感測器就是能夠將外界環境中的物理或化學量的改變轉換成光或電訊號等可測之訊號的裝置，一般感測器概由轉換元件以及訊號顯示元件等兩部份所組成，感測器種類具有許多種類型如電化學式、光學式、聲波式等等，其中電化學式感測器又可依訊號分為電位(Potentiometric)、電流(Amperometric)、電導式(Conductometric)感測器；電化學式感測器為發展最早的感測器，Clark 和 Lyons 在 1962 年首先開發出酵素電極生物感測器[1]，以電流計測方式測定溶液中葡萄糖的濃度。生物感測器涉及的研究範圍非常廣泛，幾乎包含了所有生命活動在分子、細胞和系統各層次的物理、化學和生物資訊感測，從感測進行的條件上可分為在體(in vivo)感測和離體(in vitro)感測，前者的即時性和動態性好，而後者的測量條件穩定、易於控制；還可根據創傷的程度分為非侵入性感測與侵入性感測。

目前在生物感測器的領域中的新趨勢是以生物晶片去分析與感測，生物晶片是一種微型裝置，利用微機電技術將大型的儀器微小化，在微小化後的裝置上放置多種特定的生物材料，此些生物材料可與其他物質發生反應，反應後的訊號可被定量量測，這種結合微電子、微流體以及生物技術的微型裝置則稱之為生物晶片，這種方式較傳統生物檢測技術更靈敏、快速且不需要大量的檢測樣品，並且可同時獲得大量的數據。本論文使用微電極晶片來紀錄細胞在電極上貼附與分化所造成的阻抗變化，此法不僅為非侵入性量測且具有即時性、不須標定等優點；

下一節我們將說明如何利用阻抗量測元件，監測細胞與電極之間的阻抗變化，進而間接觀測細胞型態(cell morphology)、活力(motility)以及細胞周遭環境變化。

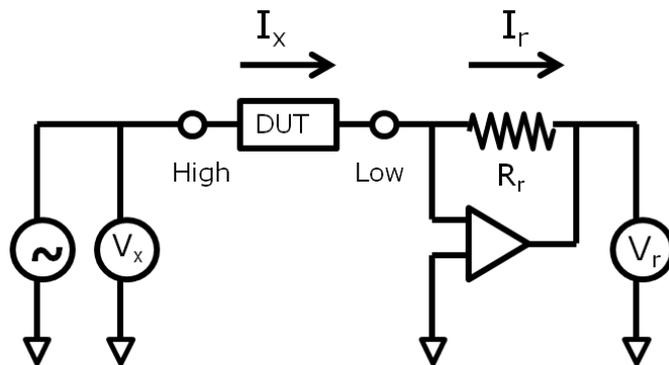


圖 1-1、阻抗量測電路示意圖。

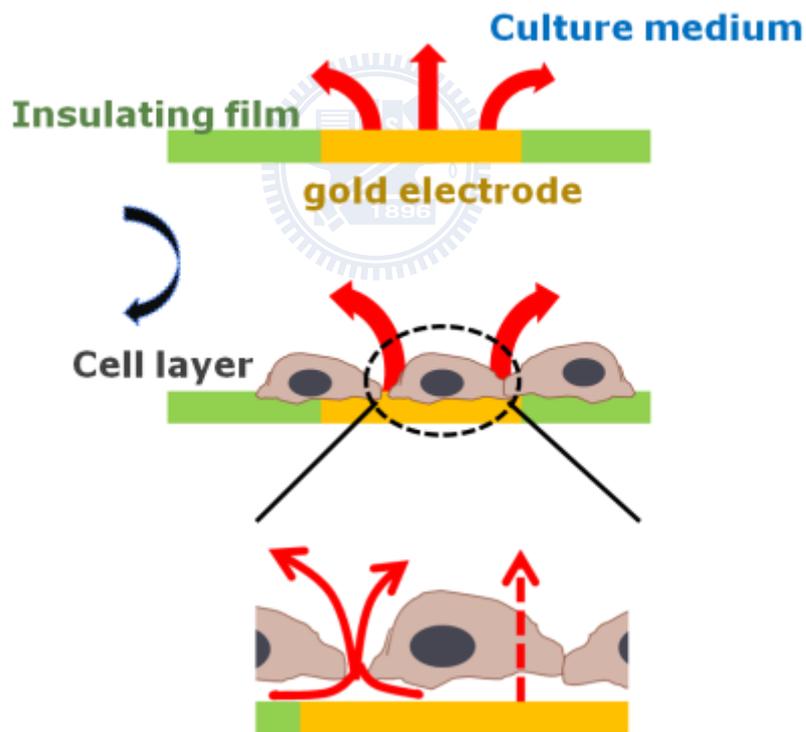


圖 1-2、細胞貼附電極形成阻抗之示意圖。

1.2 電阻抗量測原理

阻抗(impedance)是在交流電路中阻礙電流的統稱，通常在特定頻率下定義阻抗，若在不同的頻率下量測則會得到不同的阻抗值，阻抗(impedance, Z)可由電阻、電容或電感所組成，單位為歐姆，其值則是由實部的電阻(resistance, R)與虛部的電抗(reactance, X)或是由相位表示，如下式：

$$\mathbf{Z} = \mathbf{R} + \mathbf{jX} = |\mathbf{Z}|e^{i\theta} \quad (1)$$

本實驗使用 4294A 進行阻抗量測，操作方式是在一端輸入一個 AC 訊號，再利用另一端量得輸出訊號的振幅及相位差去計算出阻抗值，如圖 1-1 輸入電流 (I_x) 流經待測元件同時經過 I-V converter，此 I-V converter 讓相同大小的電流流過電阻(R_r)，當電流(I_r)流過 R_r 時 Low terminal 的電位則為 0 V，則 I-V converter 的輸出電壓(V_r)可表示為：

$$\mathbf{V}_r = \mathbf{I}_r \times \mathbf{R}_r = \mathbf{I}_x \times \mathbf{R}_r \quad (2)$$

輸入電流可由待測物的阻抗和電壓(V_x)表示為：

$$\mathbf{I}_x = \frac{\mathbf{V}_x}{\mathbf{Z}_x} = \mathbf{I}_r \quad (3)$$

由式(2)與式(3)可得：

$$\mathbf{Z}_x = \frac{\mathbf{V}_x}{\mathbf{I}_x} = \frac{\mathbf{V}_x}{\mathbf{I}_r} = \frac{\mathbf{R}_r \times \mathbf{V}_x}{\mathbf{V}_r} \quad (4)$$

由式(4)即可得到待測物的阻抗值。

本研究利用細胞與基質間之電阻抗感測器，以 ECIS(Electric Cell-Substrate Impedance Sensing) 技術監測細胞的貼附與分化，ECIS 技術是利用電極上覆蓋生長細胞時，輸入電極之交流訊號必須由細胞與電極之間、細胞與細胞之間流過或是直接穿越細胞如圖 1-2，電極表面因為訊號流動被細胞的覆蓋所限制而產生了阻抗的變化，而阻抗的變化則是受到細胞的覆蓋率、細胞間的緊密程度、細胞與基質之間的空間大小等因素的影響。關於 ECIS 的應用我們將於論文回顧的章節

做介紹。

1.3 細胞電特性

細胞外有細胞膜，細胞膜具有保護細胞、維持細胞內物質的完整性的功能，細胞膜主要由脂質、蛋白質以及少量的水所組成。Pethig 在 1984 年提出細胞膜電容值的範圍於 $0.5\sim 1.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 之間，大多將其視為 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ，而細胞膜電阻範圍則在 $100 \Omega\text{cm}^2\sim 100 \text{k}\Omega\text{cm}^2$ ，細胞內液的電阻值約為 $60 \Omega\text{cm}$ [2]。

由於細胞膜具有電容的特性，因此細胞對不同頻率的電流會呈現出不同的阻抗值，當低頻訊號流入組織時，細胞膜會呈現高阻抗狀態，因此，電流只會流經細胞表面，而不會穿透到細胞內部；當高頻訊號流入時，細胞膜會呈現短路的現象，所以電流會輕易地通過內部[3]。在本論文中，我們將細胞視為一個等相元件電容，其中包含部分電阻與電容特性。

1.4 PC12 細胞簡介

本實驗選用的細胞是 PC12，PC12 細胞是 Greene 與 Tischler 由一個大白鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤(Rat adrenal pheochromocytoma) 選殖出的細胞株[4]，並將其命名為 PC12 細胞株。此細胞株與交感神經細胞同源，是由外胚層 (Ectoderm) 之細胞發育而成，當以神經成長因子 NGF (Nerve growth factor) 處理造成分化後，PC12 細胞更明顯地表現出成熟神經細胞的特性，稱之為已分化 (Differentiated) PC12 細胞。已分化的 PC12 細胞會生長出許多軸突(Axon) 和樹突 (Dendrite)，總稱為突起(Neurite)，並會在細胞分枝的末端上累積許多小液泡 (Vesicles)，能合成與儲存神經傳導物質；PC12 的分化具有可逆性，若將培養液中之 NGF 移除後，已分化的 PC12 細胞又會回復到未分化的狀態[4]，因此 PC12 細胞無論是對於生物感測器與神經科學領域而言都是一個很好的實驗材料。

1.5 文獻回顧

在細胞培養過程中，細胞的貼附(cell adhesion)與延展(cell spreading)是黏著型細胞的基本生長過程，其中細胞型態的改變在醫療上可以為其病理狀態提供重要資訊。在定量測量細胞貼附力的研究中，McClay 等人利用改變轉速產生不同的離心力，使細胞由基材上脫落，再計算出施力前後貼附細胞數目的比例[5]；Galbraith 與 Sheetz 利用微機械陣列(micromachined array)，藉由彈簧微小的變形量得到細胞上不同位置的貼附力[6]；細胞刮除也是一種可以量測單一細胞與基材之間黏著力的技術[7]。I. GIAEVER 和 C. R. KEESE 則是利用阻抗量測分析的系統去監測貼附型細胞行為[8]。

阻抗量測的技術觀測已經應用在人體器官[9]、神經組織[10]、血液[11]和監測細菌生長[12]等許多方面，然而，本實驗是利用細胞貼附在電極晶片上時，藉由量測因為細胞的屏蔽產生的阻抗變化來間接觀測細胞的行為，故只針對此部份的文獻做討論。

I. GIAEVER 和 C. R. KEESE 是最早開始利用阻抗量測分析的系統去監測貼附型細胞行為的團隊[8]，他們將纖維母細胞(fibroblast cell)培養在有小的金工作電極($\approx 3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$)與參考電極($\approx 2 \text{ cm}^2$)的培養皿中如圖 1-3，並提供一個小的 AC 交流電壓頻率為 4000 Hz 如圖 1-4，在工作電極與參考電極面積差異極大的量測條件下，阻抗的變化值主要來自於工作電極與溶液介面，此阻抗可稱為壓縮電阻(constriction resistance)，藉由此系統量得的電壓值與相位差去觀察細胞的生長情形，他們猜測量測得到的阻抗值明顯增加是因為細胞貼附在電極上並增殖，而細胞在電極上移動則造成了阻抗值的波動，為了證實他們的猜測，他們在細胞培養第 24 小時添加福馬林固定細胞，結果發現阻抗值不再出現波動如圖 1-5，證實的確能藉著細胞貼附電極所產生的阻抗變化來觀察細胞的行為。

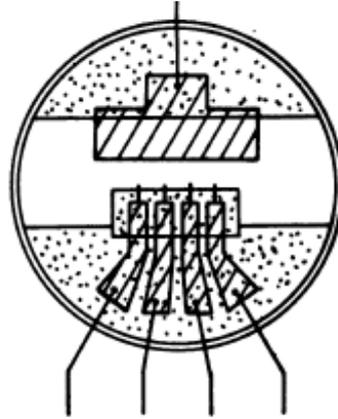


圖 1-3、阻抗量測電極結構[8]。

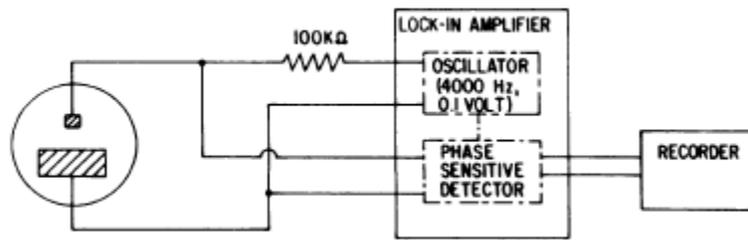


圖 1-4、阻抗量測系統[8]。

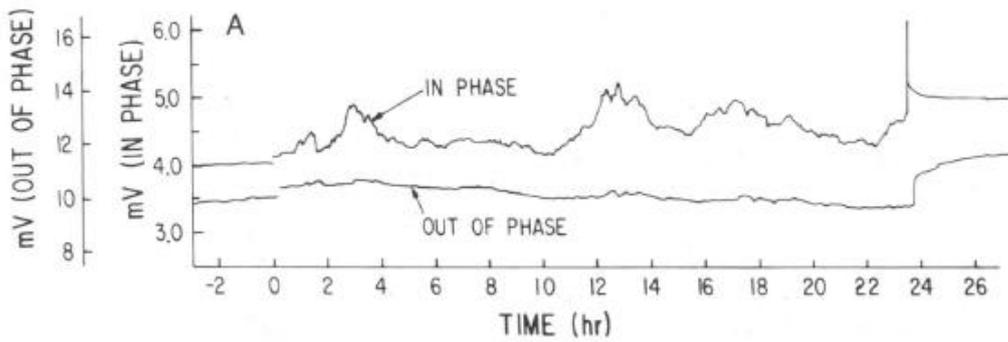


圖 1-5、阻抗量測結果[8]。

之後 I. Giaever 和 C. R. Keese 更進一步去探討電極上包覆不同的蛋白質與細胞貼附之間的關係[13-14]，圖 1-6 是電極工作在不同溶液、不同感測面積的條件下量測所得到的阻抗實部對頻率圖，輸入電壓為 1 V，可以看到頻率在 1 kHz~100 kHz 時面積較大的工作電極具有較大的阻抗實部值，而不同溶液的阻抗實部正規化值只對阻抗值造成微量的影響，因為在此頻率範圍中，阻抗實部值(resistance)主要由壓縮電阻值所主導，而壓縮電阻值與頻率無關，與電極面積的平方根成正比，然而正規化(normalize)後之實部阻抗值則與電極面積無相關，他們由此圖決定操作頻率為 4000 Hz，當細胞加入表面經過不同蛋白質處理的電極後，可以由阻抗變化看出細胞對不同的蛋白質有不同的反應如圖 1-7；ECIS 也可觀測出細胞與溶液中化學物質的反應[15]或是細胞的活動力[16]等。

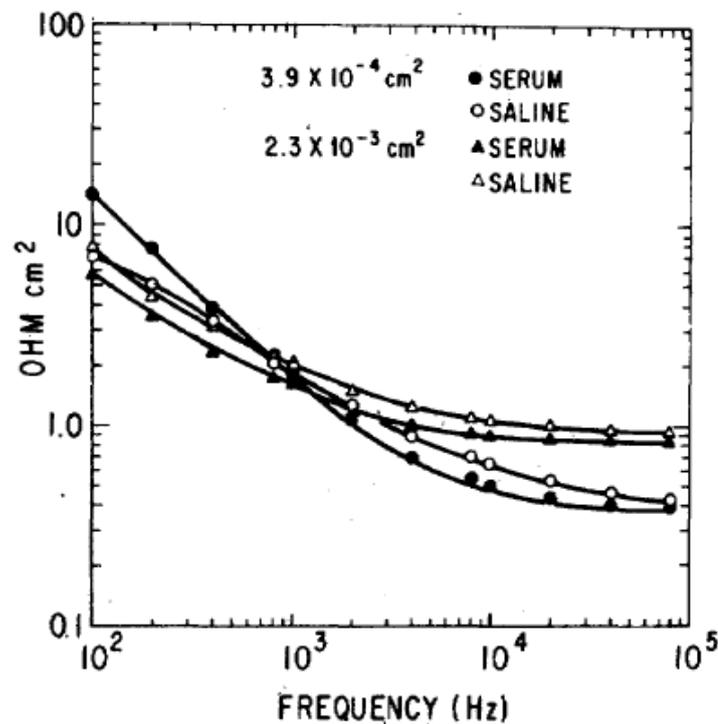


圖 1-6、不同面積工作電極的阻值與頻率關係[14]。

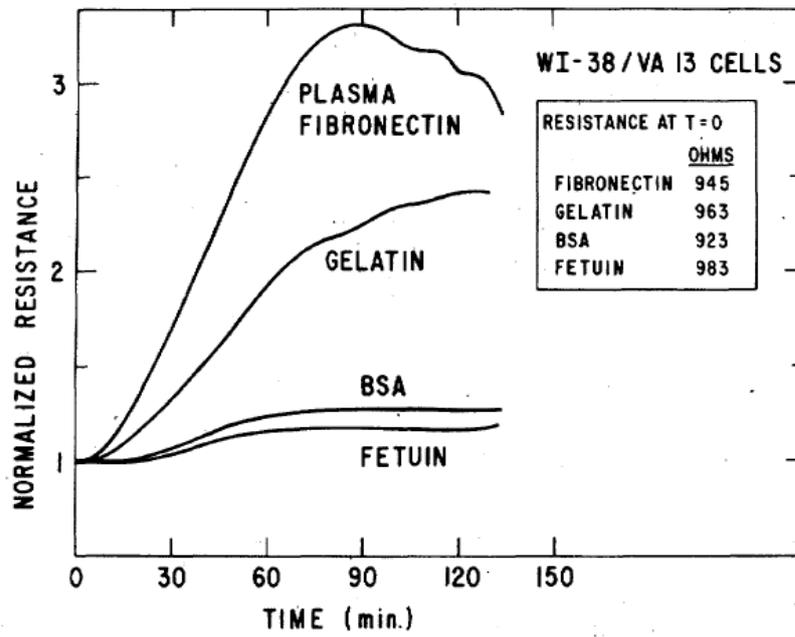


圖 1-7、細胞貼附在不同蛋白質表面的阻抗變化[14]。

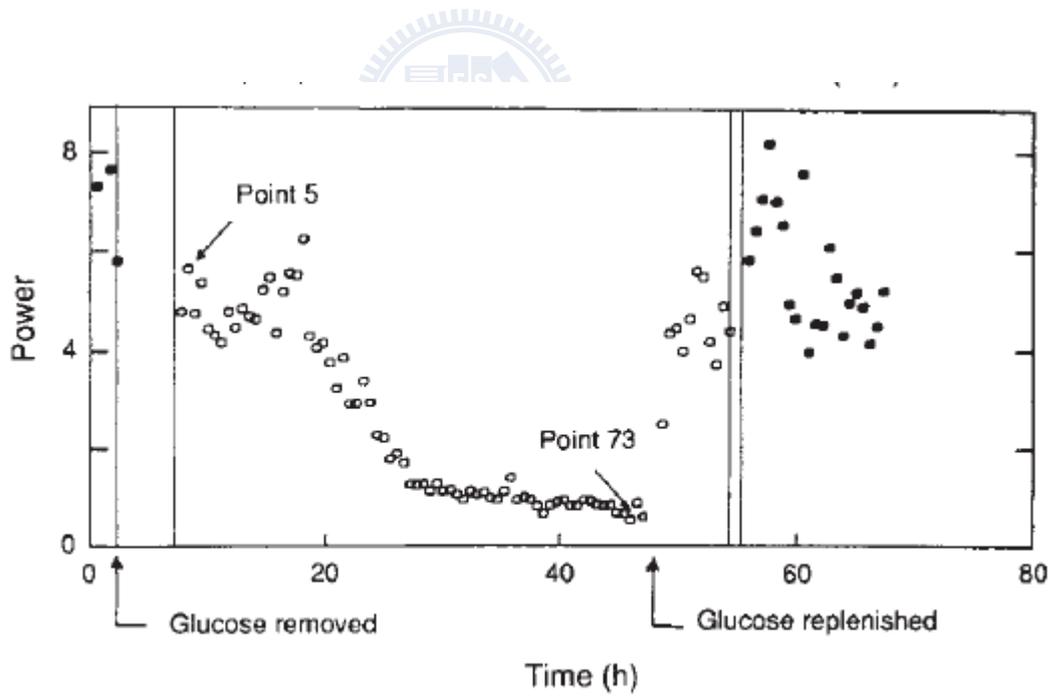


圖 1-8、阻抗變化量即時觀測細胞的健康狀態[17]。

ECIS 可以在微米尺寸的小電極中偵測到細胞貼附或是脫離電極，然而有趣的是，當細胞已經佈滿電極表面時，在阻抗量測中仍可發現阻抗還是隨著時間存在微小的變化，這些微小的阻抗變化就是來自細胞與電極之間存在奈米尺度的空間，可見 ECIS 比光學顯微鏡有更好的解析度，能記錄細胞在垂直於電極方向的活動力，而圖 1-8 則證實了當細胞形成細胞與細胞接合之全面的細胞層時，其活動力與新陳代謝的關係[17]；當將培養液中的葡萄糖與其他碳來源移除二十個小時後，細胞幾乎消耗完能量後，會發現阻抗的變化量變小了，當培養液置換為具有營養來源的溶液時，阻抗的變化量又回到未去除營養源的變化量，由此可推斷細胞又恢復了活力，此實驗結果說明 ECIS 可由阻抗變化量即時觀測細胞的健康狀態。

證實 ECIS 可以觀測細胞的活動力後，Giaever 與 Keese 由建立以下模組以更進一步量化細胞與電極之間的關係[18]：

$$\frac{1}{Z_c} = \frac{1}{Z_n} \left(\frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{i\gamma r_c I_0(\gamma r_c)}{2 I_1(\gamma r_c)} + 2R_b \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right)$$

$$\gamma r_c = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h} \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} = \alpha \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}$$

其中 Z_c 為細胞貼附後之阻抗值， Z_n 為細胞貼附前之電極阻抗值， Z_m 為細胞本身阻抗值， R_b 為細胞與細胞間造成的阻抗值， γr_c 是電極與細胞間之阻抗，其中包含溶液之導電度(ρ)、細胞與電極之間距離(h)與細胞貼附半徑(r_c)之變數。

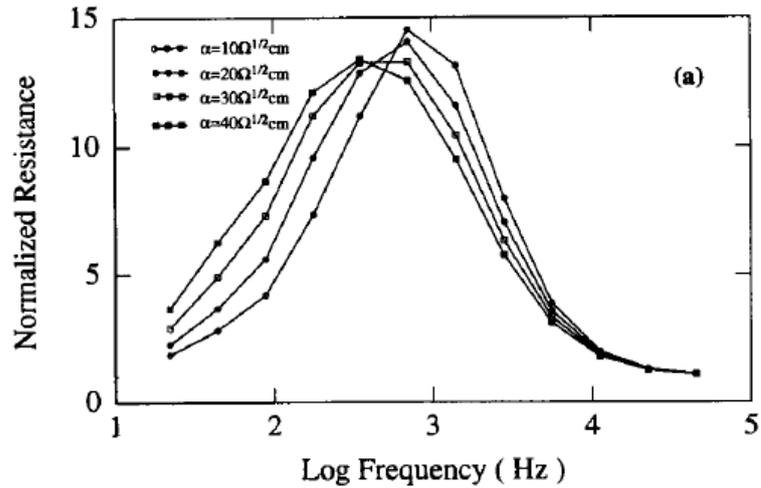


圖 1-9、模擬細胞與電極間不同貼附狀態的阻抗實部正規化值[18]。

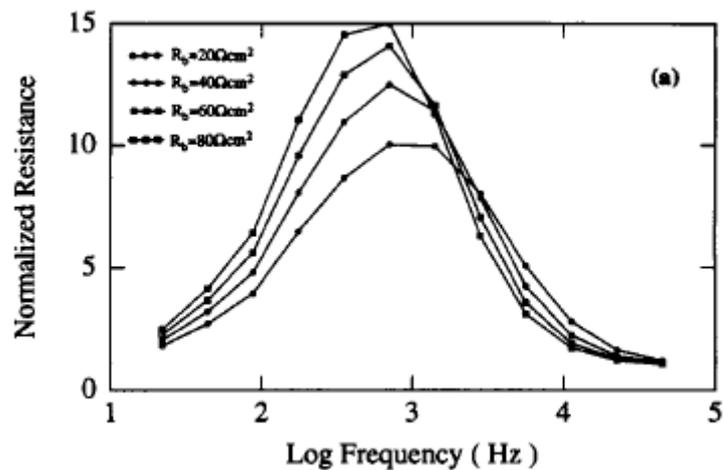


圖 1-10、模擬細胞與細胞間不同貼附狀態的阻抗實部正規化值[18]。

他們以上述之關係式模擬細胞貼附後阻抗值的變化曲線，圖 1-9 為模擬細胞與電極間不同貼附狀態的阻抗實部正規化值與頻率圖，由圖可見當改變 α 值時其峰值變化並不明顯，而峰值最大值出現的頻率則是產生位移；而圖 1-10 是改變細胞間阻值所作的模擬圖，當細胞間阻值越大時，其峰值的最大值也越大，而他們就藉由此模組來分析量測所之阻抗值。

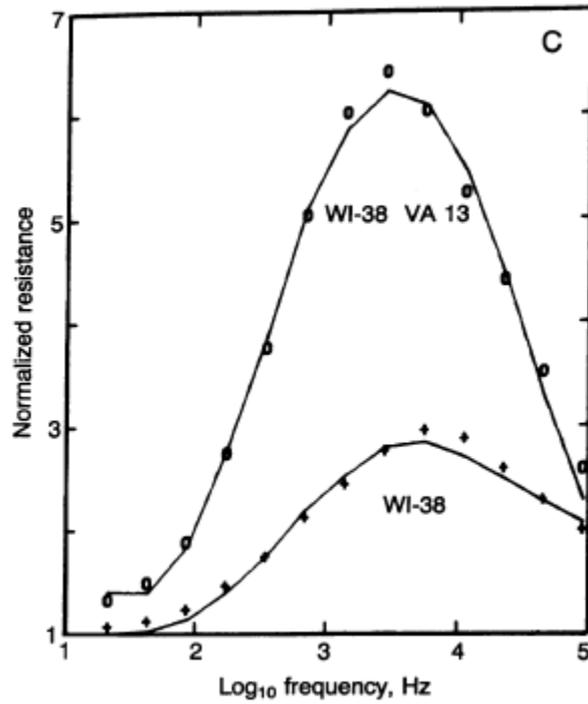


圖 1-11、阻抗實部正規化值與頻率圖[19]。

I. Giaever 和 C. Keese 將實際量測值與擬合值作圖，如圖 1-11 可見由此模組的模擬值幾乎可以與實驗值謀合，且將細胞貼附增值完全後量測所得之阻抗實部值對空白電極阻抗實部值正規化(normalize)後，由正規化值對頻率作圖可見不同頻率下有不同的阻抗，並可由此值分辨不同細胞 WI-38、WI-38VA13 貼附於電極上，然而此變化幾乎無法由光學顯微鏡觀察，其中由上式所計算出 WI-38VA13 比 WI-38 具有較大的 R_b 值與 α 值，阻值來源如圖 1-12 所表示。

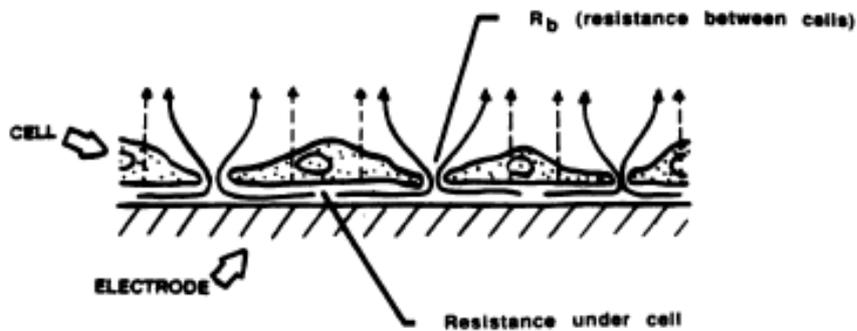


圖 1-12、細胞貼附電極後阻值來源[19]。

除了 Giaever 和 Keese 另外還有幾個團隊用不同的電極結構去研究貼附細胞造成的阻抗變化，例如 Hagedorn 如圖 1-13 將細胞培養於矽膜上之孔洞並利用阻抗量測，監測細胞活動力[20]及 Wegener[21]、Ehret[22]等人，他們的研究證明了即使是不同尺寸與結構的微米電極，或是不同的種類的細胞，在很大的頻率範圍內，都可以用阻抗量測來監測細胞的貼附、延展與活動。表 1-1 是近年來利用 ECIS 方法對細胞進行監測的文獻回顧整理[19, 23-29]。

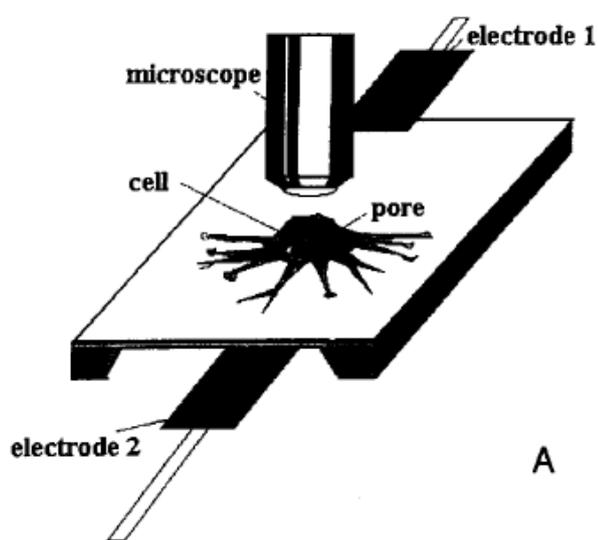


圖 1-13、細胞培養於矽膜上之孔洞[20]。

表 1-1、ECIS 文獻回顧。

Topic	Title	Author	Year & publication name
Attachment	Improving Neuron-to-Electrode Surface Attachment via Alkanethiol Self-Assembly: An Alternating Current Impedance Study	Slaughter et al.	Langmuir, 20 (17), 7189 -7200, (2004)[23]
Invasion	Real-Time Impedance Assay to Follow the Invasive Activities of Metastatic Cells in Culture	Keese et al.	BioTechniques 33:842-850 (2002)[24]
Toxicology	Interaction of Polyelectrolytes and Their Composites with Living Cells	Chanana et al.	Nano Lett. 5(12):2605-12 (2005)[25]
Proliferation	Induction of MCP-1 Expression in Airway Epithelial Cells: Role of CCR2 Receptor in Airway Epithelial Injury	Lundien et al.	Journal of Clinical Immunology, 22 (3): 144-152 (2002)[26]
Cell Substratum Spacing	Micromotion of mammalian cells measured electrically	Giaever and Keese	PNAS USA 88, 7896-7900 (1991)[19]
Motility	Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor	Luong et al.	Anal Chem. 73(8):1844-8 (2001)[27]
Cell Growth	The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers	Zudaire et al.	J. of Clinical Investigation, 118 (2):640-650 (2008)[28]
Wound Healing	ADAM-15 inhibits wound healing in human intestinal epithelial cell monolayers	Charrier et al.	AJP Gastrointest Liver Physiol. 288:346-353, (2005)[29]

1.6 研究動機及目標

在細胞培養過程中，細胞的貼附(cell adhesion)與延展(cell spreading)是黏著型細胞的基本生長過程，其中細胞型態的改變在醫療上可以為其病理狀態提供重要資訊。而細胞形態的改變，傳統上是使用光學的方式來進行觀測，然而生醫感測器則提供了另一種量化的量測方式。我們希望能利用細胞與基質之間的阻抗關係來間接監測細胞貼附與分化，使用此法觀測細胞是非入侵式的，不會破壞細胞，也不需螢光或是放射線的標定，操作容易，並且可以即時觀測。

1.7 論文架構

本論文將於第二章介紹微電極感測細胞貼附實驗流程，包含PC12細胞培養、微電極元件的製備與量測實驗流程；第三章則對不同工作電極的面積與細胞分化後阻抗量測的實驗結果與擬合結果進行討論，未來我們希望能將阻抗量測與微流道做結合，因此在第四章對微流道技術進行文獻回顧與實驗討論，我們由兩種不同結構的流道去捕捉細胞，其實驗結果顯示這兩種結構皆能成功的捕捉到細胞；第五章將總結以上之實驗結果歸納出結論與並對未來可發展之方向做討論。

第二章 微電極感測細胞貼附實驗流程

我們希望能利用細胞與基質之間的阻抗關係來間接監測 PC12 細胞的貼附與分化，其主要生物感測器就是由生物元件與阻抗量測元件及訊號產生與接收系統所構成；本章將詳細說明細胞於電極表面的培養方式，為了使細胞能貼附於電極表面我們也在電極表面做包覆蛋白質的處理；而量測電極的尺寸與結構以及製作流程、整體量測系統及量測參數也將於此章詳述。

2.1 PC12 細胞培養

PC12 細胞培養液為含 10 % 馬血清 (Horse serum) 和 5 % 胎牛血清(Fetal bovine serum)的 RPMI 1640 培養液，培養環境是在 37 °C、5 %CO₂ 的濕式培養箱中，當細胞長到約八分滿時進行繼代培養，開始細胞培養前先將存放於 4°C 冰箱中的細胞培養液置於 37 °C 水溫槽中回溫。圖 2-1 是將 PC12 培養在有修飾 collagen 膠原蛋白的金電極上，等細胞貼附後，以神經成長因子 NGF (Nerve growth factor) 50 ng/ml 誘導 PC12 分化，每隔 48 小時更換新的細胞培養液，並重新添加 NGF 生長因子，圖 2-2 為細胞未分化與分化後之狀態。

細胞培養步驟如下：

1. 配置細胞培養液
2. 細胞離心、抽除上清液
3. 加入新的培養液
4. 以吸量管打散聚集的細胞
5. 將細胞加到新培養盤
6. 置入細胞培養箱培養
7. 細胞貼附後，抽除培養液
8. PBS 清洗細胞表面

9. 加入含有生長因子的培養液

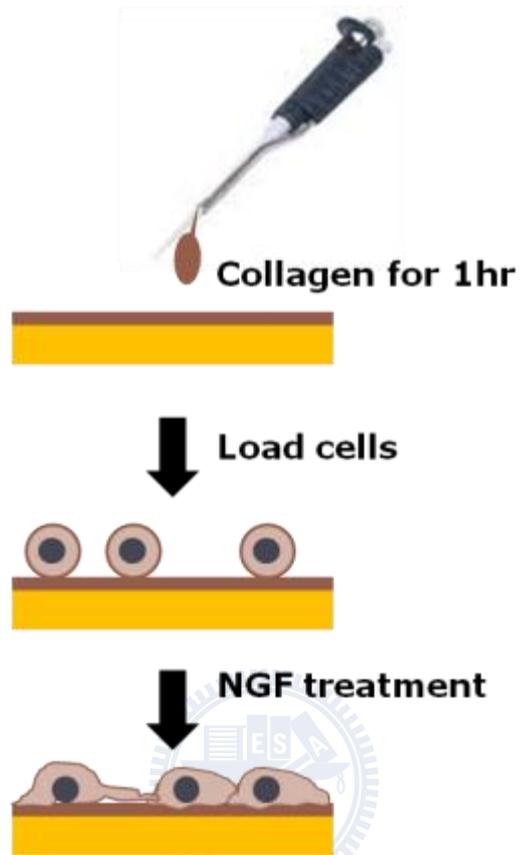


圖 2-1、蛋白質表面修飾。

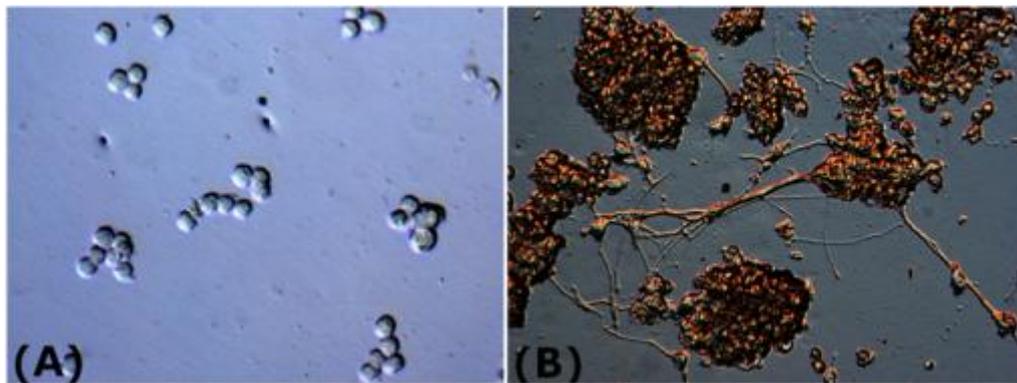


圖 2-2、PC12 細胞(A)未分化與(B)分化後之表面形態。

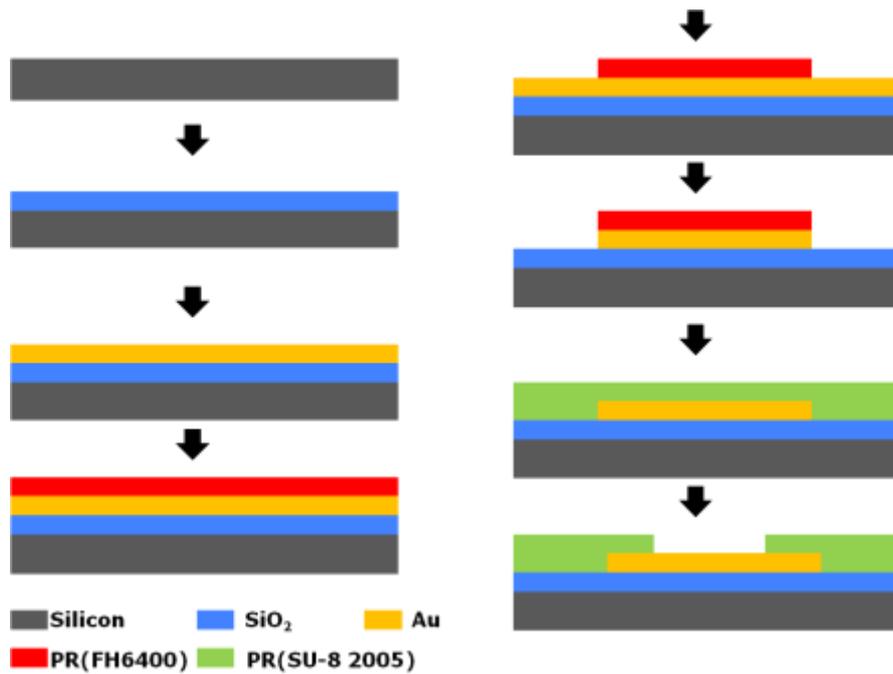


圖 2-3、微電極製作流程。

2.2 微電極製作流程

電極製作流程如圖 2-3，我們利用黃光微影製程定義出直徑為 10 μm 、20 μm 、40 μm 的圓形工作電極，以及 800 μm \times 700 μm 的參考電極如；另一個電極圖案為直徑 5 μm 的圓形工作電極與直徑 50 μm 的圓形參考電極如圖 2-5。其參考電極之面積都是工作電極的面積的一百倍以上，因為在進行阻抗量測時，我們希望能忽略參考電極本身的阻抗，只針對工作電極表面產生的阻抗變化做討論。

電極製作流程如下：

1. 成長氧化層

利用乾式氧化在矽晶片上成長一層 100 nm 厚的矽氧化層當作絕緣層

2. 定義電極圖形

- (1) 在氧化層上濺鍍上一層 15 nm 的鉻做為金與氧化層之接著層後，再鍍上一層 50 nm 的金

(2) 使用光阻(FH6400)進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出電極圖案

- a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；3000 rpm，30 sec
- b. 軟烤：90 °C，90 sec
- c. 曝光強度：130 mJ/cm²
- d. 顯影：90 sec (FDH5)
- e. 定影：30 sec (IPA)

(3) 蝕刻金以及鉻形成電極圖案

- a. 金蝕刻液為KI溶液(KI:I₂:H₂O=4:1:40)
- b. 鉻蝕刻液為過氧酸

(4) 將晶片浸泡在丙酮中以超音波震盪器去除光阻

3. 定義接觸金屬

使用光阻(SU-8 2005)進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出金電極露出的圖形，並形成5 μm的保護層。

- a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；3000 rpm，30 sec
- b. 軟烤：65 °C，60 sec；95 °C，120 sec；65 °C，60 sec
- c. 曝光強度：115 mJ/cm²
- d. 曝後烤：65 °C，60 sec；95 °C，180 sec；65 °C，60 sec
- e. 顯影：40 sec (SU-8 developer)
- f. 定影：30 sec (IPA)

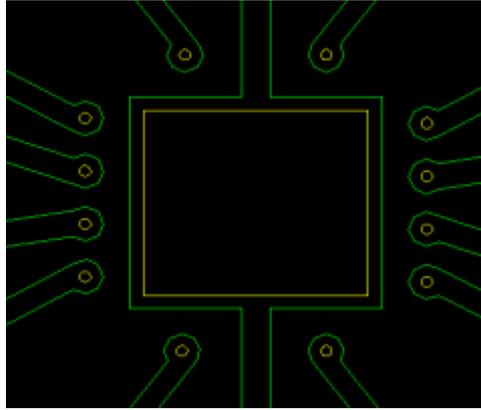


圖 2-4、微電極結構光罩圖。

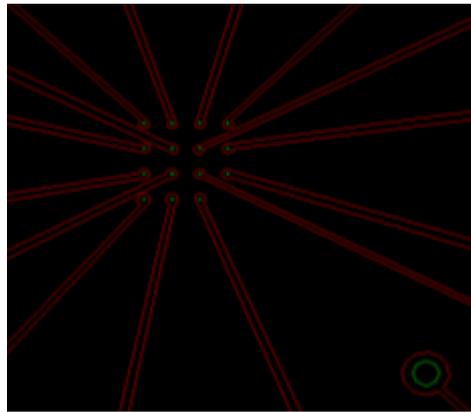


圖 2-5、微電極結構光罩圖。

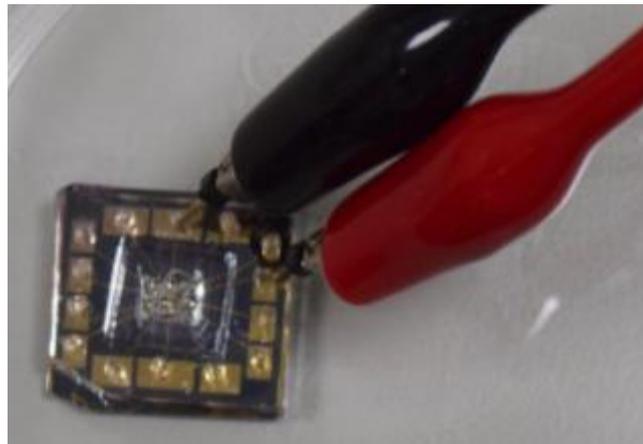


圖 2-6、量測元件示意圖。

2.3 量測樣本製備

本實驗會對細胞貼附前、細胞貼附後、細胞分化後以及去除生長因子後的電極進行阻抗量測，圖 2-6 為實際量測元件，其中央覆蓋玻璃處為 PDMS 細胞培養腔(5 mm × 5 mm × 5 mm)，量測樣本製作流程如下；

1. 將金電極與 PDMS 及玻璃浸泡在 DI water 中，用超音波震盪器進行清洗
2. 將金電極與 PDMS 及玻璃浸泡在 75 % 酒精中，用超音波震盪器進行清洗及滅菌
3. 氧電漿處理金電極與 PDMS 表面(300 mTorr，15 W，30 sec)後，進行接合
4. 在金電極表面加入 5 μ l 膠原蛋白(collagen)後，在 UV 光下照一小時
5. 以 1×PBS 溶液沖洗兩次，並注滿 PBS 溶液，覆蓋上玻璃
6. 進行細胞貼附前的電極阻抗量測
7. 抽除 PBS 溶液，加入 1×10^5 cells/ml 的 PC12 細胞，置入培養箱中培養 24 小時
8. 以 PBS 沖洗兩次，並注滿 PBS 溶液，覆蓋上玻璃
9. 進行細胞貼附後的阻抗量測
10. 抽除 PBS 溶液，加入含有生長因子的細胞培養液後，置入培養箱中培養 48 小時
11. 以 PBS 沖洗兩次，並注滿 PBS 溶液，覆蓋上玻璃
12. 進行細胞分化後的阻抗量測
13. 抽除 PBS 溶液，加入沒有生長因子的細胞培養液後，置入培養箱中培養 24 小時
14. 以 PBS 沖洗兩次，並注滿 PBS 溶液，覆蓋上玻璃
15. 進行去除生長因子後的阻抗量測

2.4 電阻抗量測系統

本實驗使用 4294A 精密阻抗分析儀進行量測，量測條件分別是輸入 50 mV、100 mV 的交流電壓，阻抗量測頻率範圍是 1 kHz~1 MHz。

量測細胞未貼附的電極，取得電極本身與溶液的阻抗後，利用 Z-View 阻抗擬合軟體將量測所得之實驗值以圖 2-7 之等效電路擬合，其等效電路中包含溶液電阻(R_s)、寄生電容(C_{sh})、電極表面電雙層之電容(C_{dl})，擬合所得參數值將作為細胞貼附後阻抗變化的基準值；細胞貼附後的等效電路如圖 2-8，我們將電極因為細胞貼附所產生的阻抗視為一個並聯的電阻(R_c)與細胞電容(C_c)。待細胞貼附後量測所得阻抗值以細胞貼附後的等效電路中做擬合，其中我們將之前空電極擬合所得之溶液電阻、寄生電容視為定值，可以得到 R_c 與 C_c ，此外，我們將等效電路中之電容值皆視為常數相位元件(constant phase element, CPE)而非理想電容，常數相元件表示法如式(5)，電雙層電容、寄生電容與細胞電容表示如式(6)、(7)、(8)所表示式，而細胞貼附前與貼附後之等效電路阻抗值以式(9)、(10)表示，我們將量測所得之值以上述之等效電路做擬合後，針對 R_c 值做討論。

$$Z_{CPE} = \frac{1}{[T(j\omega)]^p} \quad (5)$$

$$C_{dl} = \frac{1}{T_{dl}(j\omega)^{p_{dl}}} \quad (6)$$

$$C_{sh} = \frac{1}{T_{sh}(j\omega)^{p_{sh}}} \quad (7)$$

$$C_c = \frac{1}{T_c(j\omega)^{p_c}} \quad (8)$$

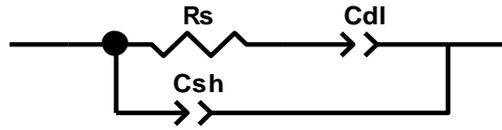


圖 2-7、電極之等效電路。

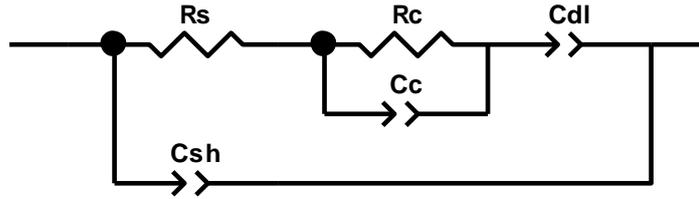


圖 2-8、細胞貼附電極之等效電路。

$$\frac{1}{Z_e} = \frac{1}{R_s + \frac{1}{T_{dl}(j\omega)^{p_{dl}}}} + T_{sh}(j\omega)^{p_{sh}} \quad (9)$$

$$\frac{1}{Z_e} = \frac{1}{R_s + \frac{1}{T_{dl}(j\omega)^{p_{dl}} + \left[\frac{1}{R_c} + T_c(j\omega)^{p_c} \right]^{-1}}} + T_{sh}(j\omega)^{p_{sh}} \quad (10)$$

第三章 阻抗量測結果與討論

我們於上述實驗流程完成細胞貼附前、細胞貼附後、細胞分化後與細胞回復為分化狀態於不同面積之工作電極之阻抗量測後，再利用預設的等效電路去做擬合(fitting)與模擬(simulation)，再利用由實驗數據擬合所得的元件參數值討論如何鑑別 PC12 細胞的貼附與分化。

3.1 電極阻抗擬合(Fitting)與模擬(Simulation)

我們根據圖 2-7 之等效電路對未加入細胞之不同尺寸(直徑為 10、20、40 μm)電極的阻抗量測(量測條件為 50 mV，1 kHz~1 MHz)做擬合所得的值如表 3-1，我們將直徑為 20 μm 的電極阻抗量測所得之值與擬合之值做圖對照，由圖 3-2、圖 3-3 可見不論在相位或是阻抗實部、阻抗虛部擬合的誤差值都非常小，擬合之各項參數誤差值也都小於 1%，因此我們可以確定此等效電路符合實際實驗結果，圖 3-4 為不同尺寸之工作電極的量測與擬合以阻抗實部值對頻率做圖，由圖可見在頻率範圍 10 kHz~100 kHz 是由壓縮電阻主導阻抗實部值，電極面積越大阻值越大，因此我們可以預測直徑為 10 μm 的工作電極在頻率範圍 10 kHz~100 kHz 內因為背景阻值較小當細胞貼附於電極上時會有較明顯的阻抗變化。

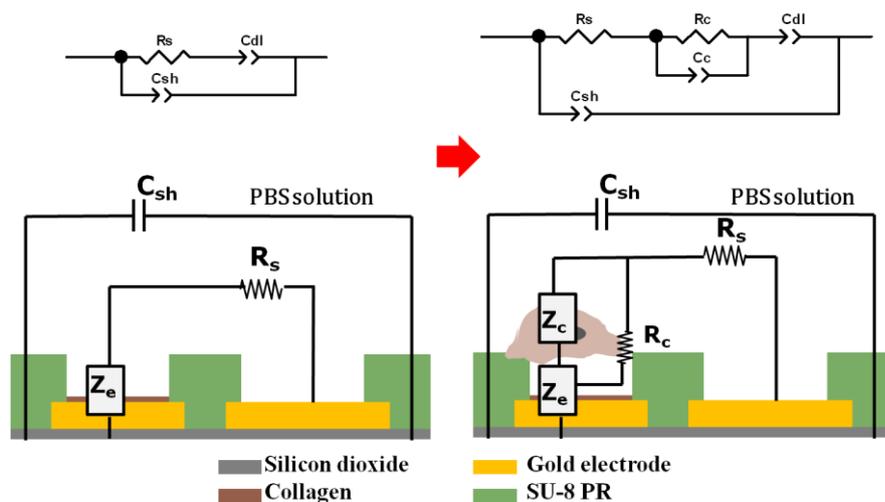


圖 3-1、等效電路示意圖。

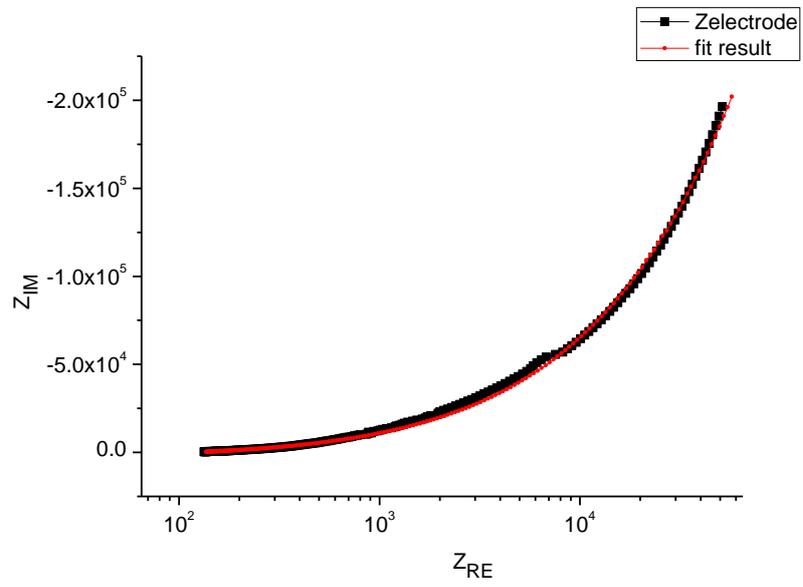


圖 3-2、電極阻抗量測與擬合結果。

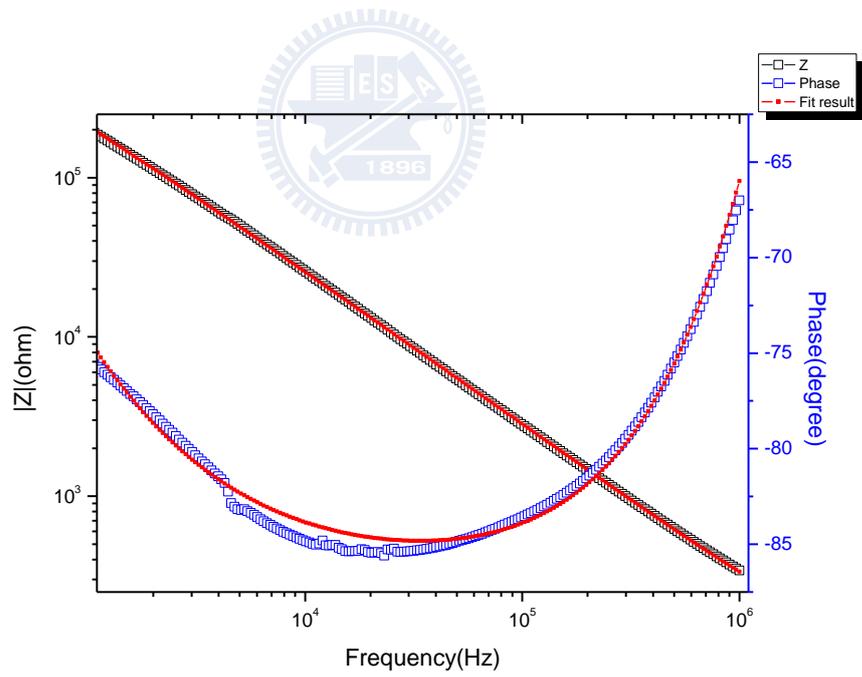


圖 3-3、電極阻抗量測與擬合結果。

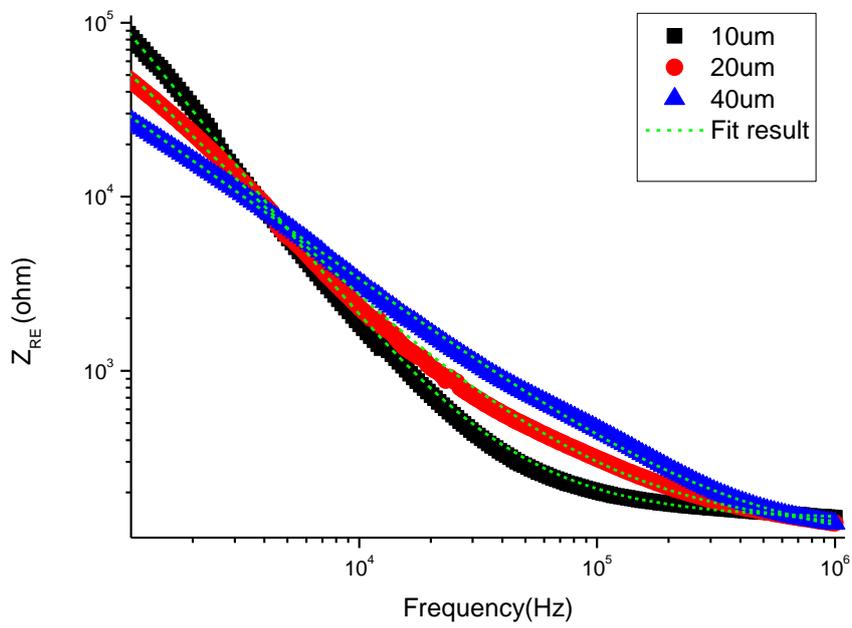


圖 3-4、不同尺寸電極阻抗量測與擬合結果。

表 3-1、不同尺寸電極阻抗擬合結果。

	10 μm	20 μm	40 μm
Rs	140.5	119.7	99.68
Cdl-T	5.035E-10	8.925E-10	2.16E-9
Cdl-P	0.99	0.97	0.91
Csh-T	4.343E-7	1.117E-7	2.023E-8
Csh-P	0.097	0.262	0.564

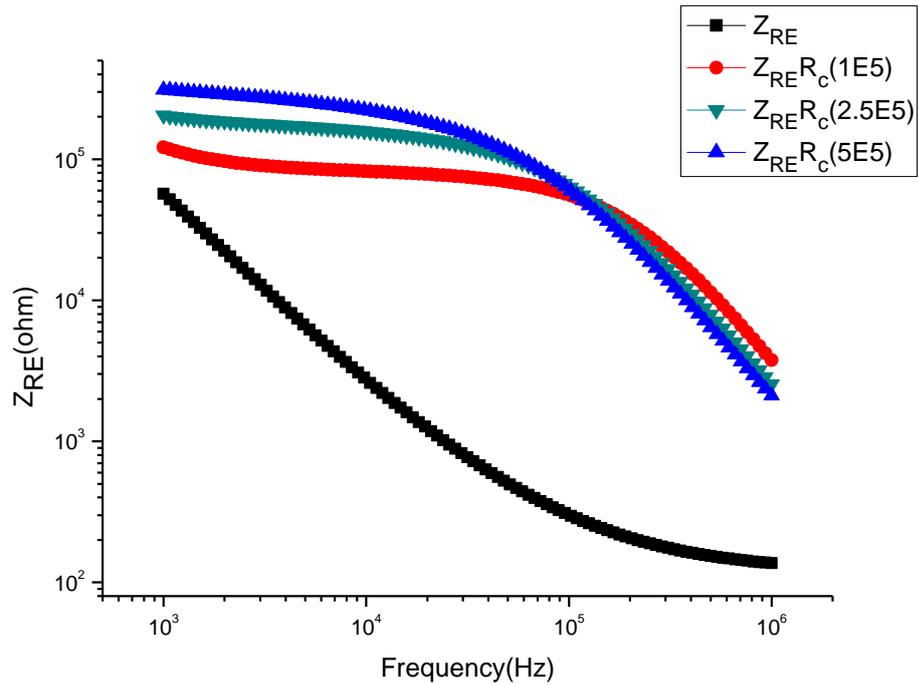


圖 3-5、模擬細胞貼附後阻抗變化。

為了預測細胞貼附後之阻抗變化，我們將上述擬合之溶液電阻、電極電雙層電容與寄生電容值視為定值 ($R_s=119.7\Omega$; $C_{dl-T}=8.925E-10$, $C_{dl-P}=0.97$; $C_{sh-T}=1.117E-7$, $C_{sh-P}=0.262$) 代入細胞貼附後之等效電路中，將細胞貼附後產生之電容設為 1×10^{-11} F、電阻為 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 Ω 分別代入其中，模擬細胞貼附後因為貼附程度或是貼附面積的不同產生不同的電阻的變化情形，由圖 3-5 可見，在頻率 1 kHz ~100 kHz 處細胞貼附產生的電阻越大時，實部的阻抗值也會越大，而實際量測結果將於下一節討論。

3.2 鑑別細胞貼附

圖 3-6 為未加入細胞之電極與 PC12 培養在直徑 20 μm 金電極 24 小時後的量測與擬合結果(量測條件為 50 mV，1 kHz~1 MHz)，其實驗結果與模擬所預測之趨勢大致相同，由圖 3-7 可見細胞貼附狀態，因此我們可以確定細胞貼附後所量測到的阻抗值變化的確來自於細胞貼附產生的電阻，擬和之參數值如表 3-2，由此擬合結果可看出當細胞貼附在電極上時，會產生一個電阻與電容，擬合所得之電阻值為 $4.66 \times 10^4 \Omega$ 、電容值之參數 T 為 1.72×10^{-9} ，P 為 0.92。由實驗結果顯示我們可由電阻值來判斷細胞的貼附與否。

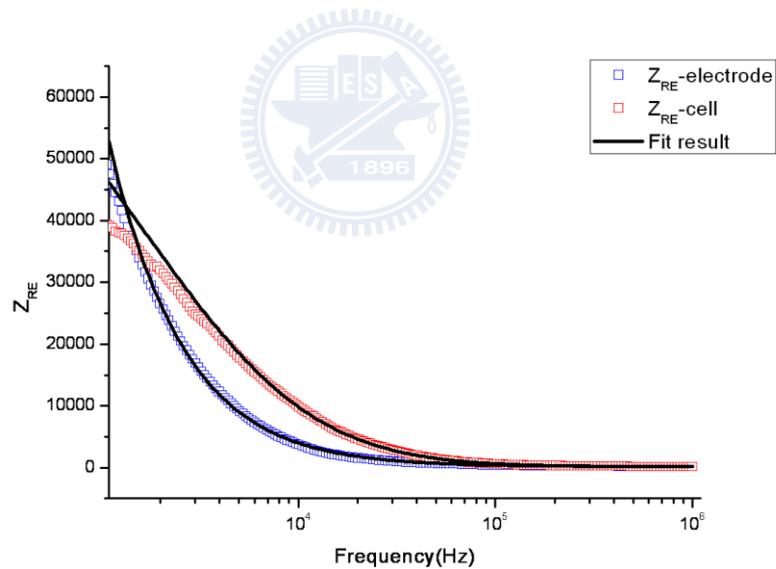


圖 3-6、細胞貼附前與貼附後之量測結果與擬合圖。

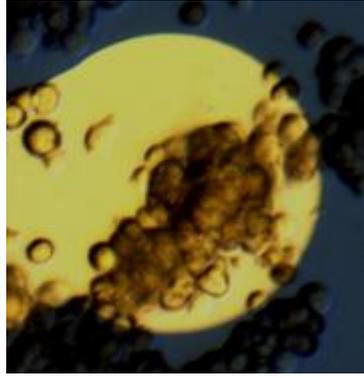


圖 3-7、細胞貼附於工作電極。

表 3-2、細胞貼附前後之擬合結果。

	No cell	With cell
Rs	124.2	92.46
Cdl-T	9.06E-10	8.36E-9
Cdl-P	0.96	0.97
Csh-T	4.53E-8	4.82E-8
Csh-P	0.43	0.42
Rc	-----	4.66E4
Cc-T	-----	1.72E-9
Cc-P	-----	0.92

本實驗更針對尺寸不同(直徑為 10 μm 、20 μm 、40 μm)的工作電極做量測，並將細胞貼附後之阻抗實部值以貼附前之阻抗實部值做正規化(normalize，細胞貼附後之阻抗實部值除以貼附前之阻抗實部值)結果如圖 3-9、圖 3-11、圖 3-13，將實驗數據正規化後更可以明顯看出細胞貼附前後的阻抗實部變化，有細胞貼附的電極於正規化之實部阻抗值-頻率圖中會出現一個峰值而沒有細胞貼附的電極則沒有出現峰值，因此我們確定可以用此阻抗量測系統來鑑別細胞是否有貼附在電極上。另外在不同面積的工作電極中，由圖 3-8、圖 3-10、圖 3-12 可見，電

極面積與細胞面積較接近的電極，對細胞貼附的感測較為靈敏，電極直徑 $40\ \mu\text{m}$ 之電極細胞貼附後之阻抗變化量最大值約為細胞貼附前的 1.8 倍， $20\ \mu\text{m}$ 的電極約為 2.1 倍， $10\ \mu\text{m}$ 的電極則是達到 2.6 倍。

對於細胞貼附感測靈敏度較高的電極之面積與細胞的大小相仿，我們可以推測是因為細胞落入電極表面後有較好的覆蓋率；若電極面積大於細胞面積，即使有數顆細胞落入電極表面將電極覆蓋，細胞與細胞之間還是容易出現間隙，可能是造成阻抗變化量較小的原因。

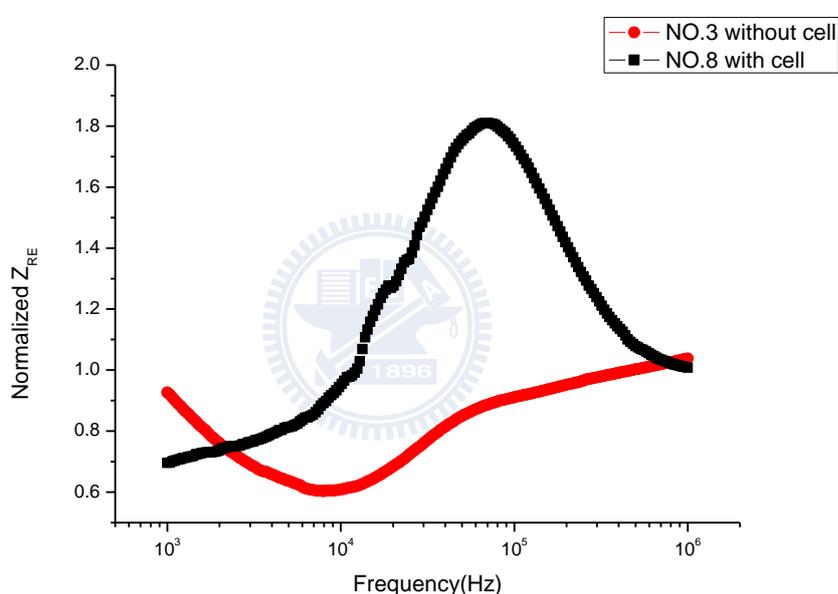


圖 3-8、直徑 $40\ \mu\text{m}$ 阻抗實部正規化值。

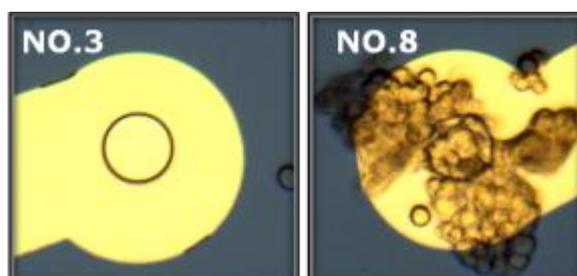


圖 3-9、細胞貼附型態。

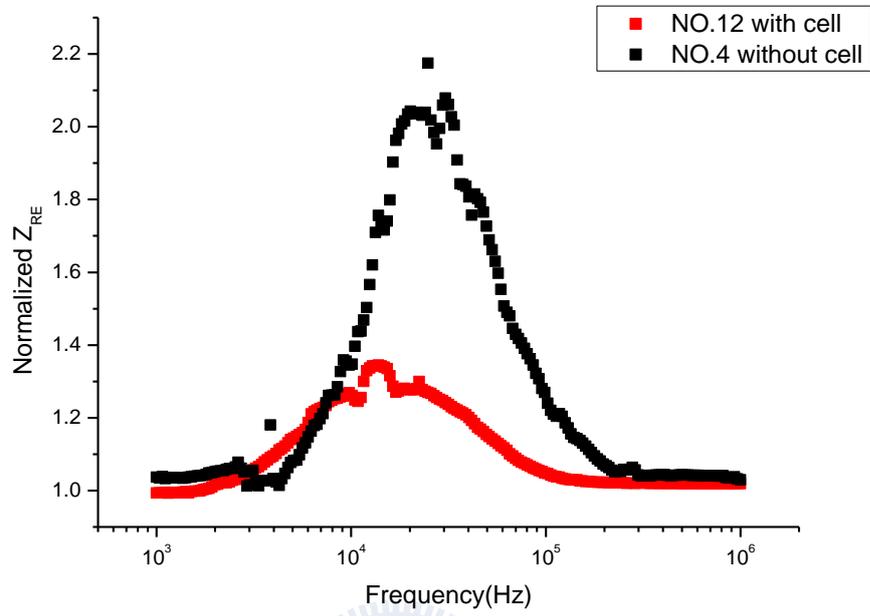


圖 3-10、直徑 20 μm 阻抗實部正規化值。

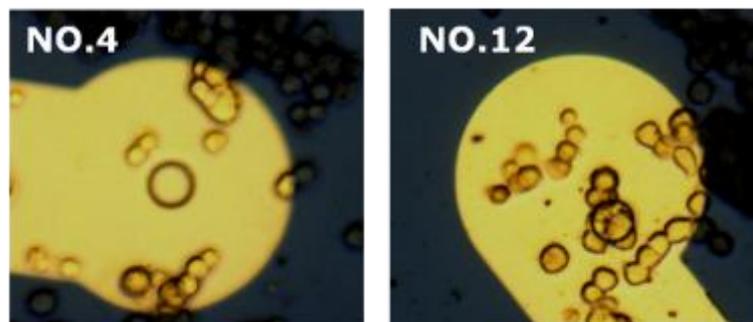


圖 3-11、細胞貼附型態。

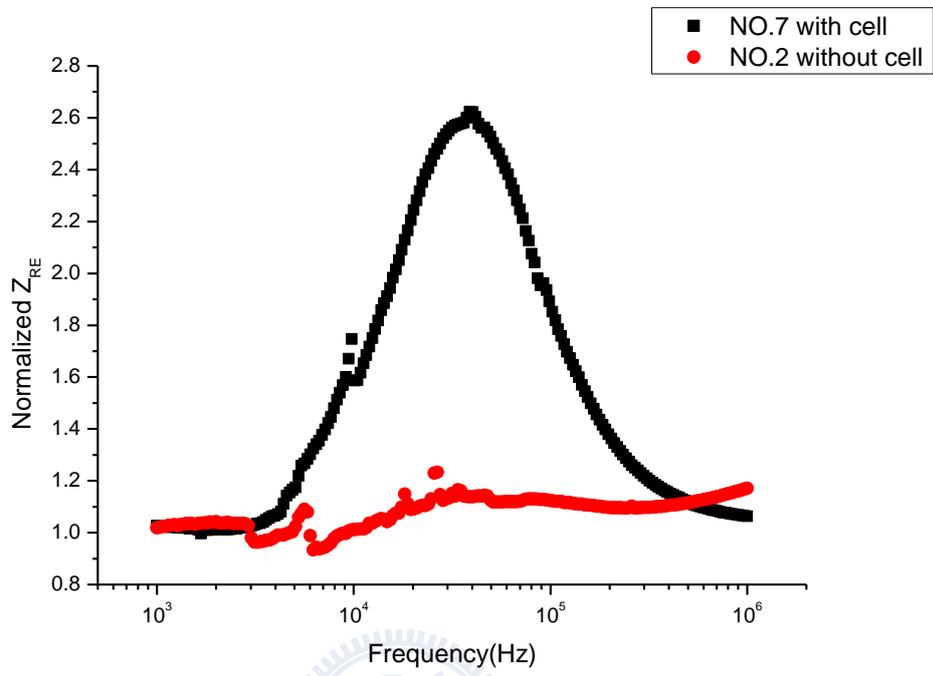


圖 3-12、直徑 $10 \mu\text{m}$ 阻抗實部正規化值。



圖 3-13、細胞貼附型態。

3.3 鑑別單一細胞貼附

圖 3-14 為 PC12 在直徑 5 μm 的金電極上培養 24 小時後的細胞型態，因為 PC12 細胞直徑約為 10 μm ，因此只要一顆細胞就可以完全覆蓋住電極表面，圖 3-15 為細胞貼附後之阻抗實部值以貼附前之阻抗實部值正規化後與頻率作圖，可以很明顯看出在 1、4、9、11 號有細胞貼附的電極都有出現峰值，最大值約為 2.6 倍，其餘沒有細胞貼附的電極則是沒有變化。由此阻抗量測系統我們可以峰值的出現與否簡單的鑑別單一細胞是否貼附於電極上，其量測條件為：100 mV，1 kHz~ 1 MHz。

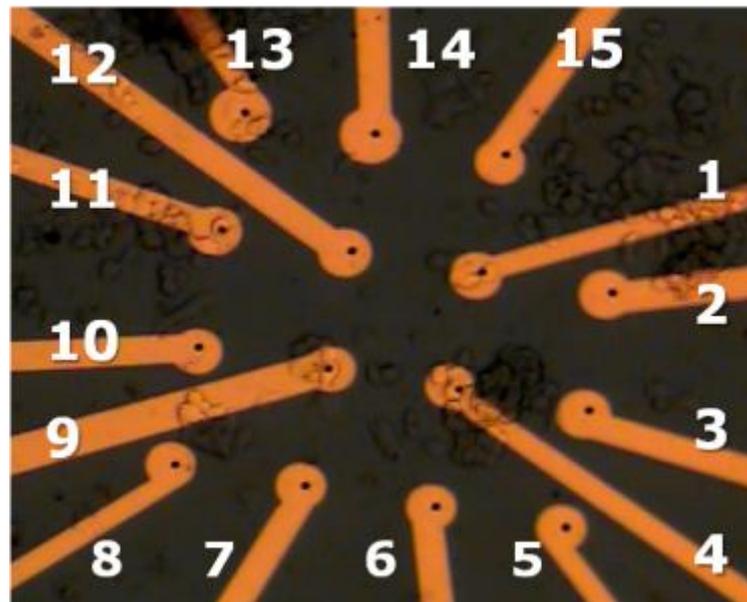


圖 3-14、細胞貼附於直徑 5 μm 工作電極上。

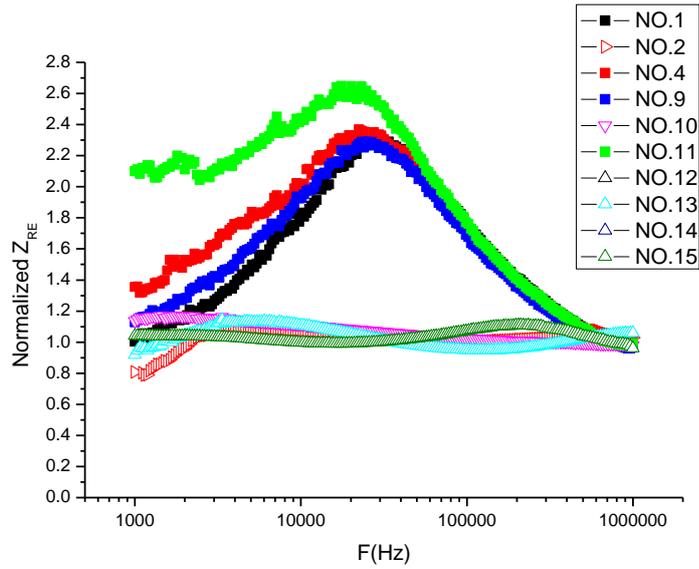


圖 3-15、直徑 5 μ m 阻抗實部正規化值。

由圖 3-15 與圖 3-12 可以發現直徑為 5 μ m 與 10 μ m 的電極其最大阻抗變化量皆約為 2.6 倍，5 μ m 的電極並沒有比較好的靈敏度表現，由此可推論因為細胞的面積大於或等於電極面積，一顆細胞就可以覆蓋整個電極，因此阻抗實部變化比率會是相似的狀況。

3.4 鑑別細胞分化

將細胞培養在金電極上 24 小時之後，更換新的培養液並添加 50 ng/ml 的 NGF 生長因子以刺激 PC12 分化並於培養 48 小時後進行量測(量測條件為：100 mV，1 kHz~ 1 MHz)，實驗結果如圖 3-16，由圖 3-17 可以看見 2、3、4、5 號電極表面幾乎被細胞完全覆蓋，由細胞表面型態顯微鏡攝影圖對照至細胞分化後實部阻抗正規化之值與頻率圖，可以發現其有細胞貼附分化的電極在圖 3-16 中表現出明顯的峰值，而沒有細胞貼附的電極，如九號電極見圖 3-17，即可作為參考值，可證明此峰值變化量並不是來自於其他的因素影響；PC12 細胞分化後會長出突觸且貼附得更緊密，因此細胞分化後其阻抗實部對細胞未貼附前阻抗實部值正規化後的峰值應該要較細胞貼附的阻抗實部對細胞未貼附前阻抗實部值正規化後的峰值高，而實驗結果如圖 3-19 可以看見四號電極與五號電極上貼附的細胞分化前與分化後之阻抗實部正規化值的變化，其細胞分化後之阻抗實部正規化值的確有較大的峰值，由 3.1 節的模擬我們可以知道當 R_c 值越大時其正規化阻抗實部值會出現較大峰值，其實驗結果與模擬值謀合；而圖 3-18 可見十號與十一號電極，量測後細胞有部分脫落的情形，我們猜測應該是 100 mV 的電壓過大，對細胞造成傷害所導致。圖 3-20 為細胞分化後於五號電極所量得之阻抗實部正規化值與沒有細胞貼附的九號電極所量得之阻抗實部正規化值與頻率圖，我們將九號電極當作監測細胞分化之控制組。

圖 3-21 是直徑為 40 μm 的工作電極在 50 mV 下的量測結果，黑線為細胞培養在金電極上 48 小時，紅線是在培養 48 小時後更新有添加生長因子的培養液並培養 48 小時的量測結果，而藍線則是將培養液更換為沒有生長因子的培養液培養 24 小時後的量測結果，由於 PC12 的分化具有可逆性，因此移除 NGF 生長因子後，細胞又會恢復到未分化前的型態，由以下實驗結果證實我們可利用這種分析阻抗量測的方法來辨別出細胞是否分化。

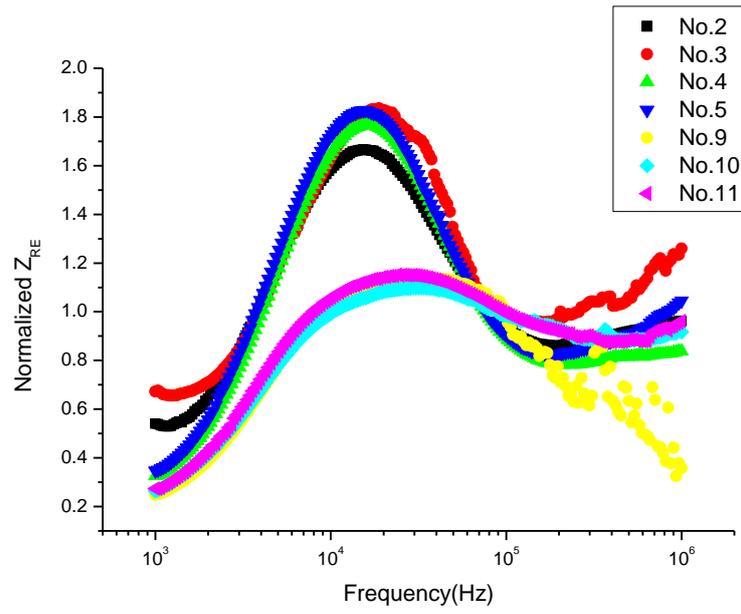


圖 3-16、細胞分化後阻抗實部正規化值。

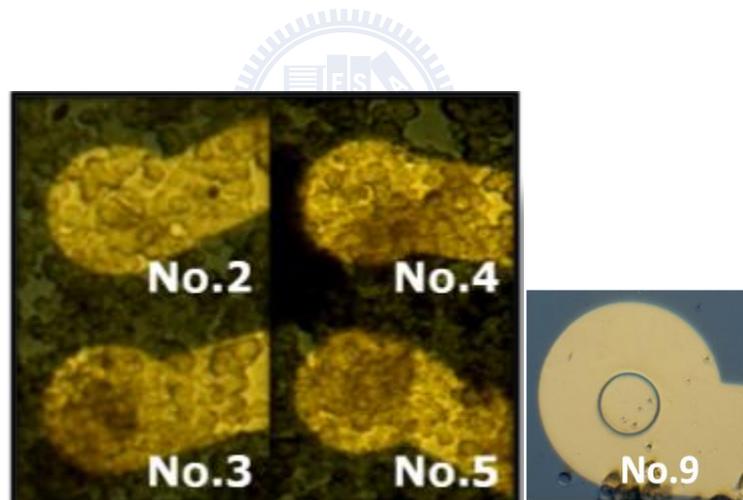


圖 3-17、細胞分化後之表面型態。

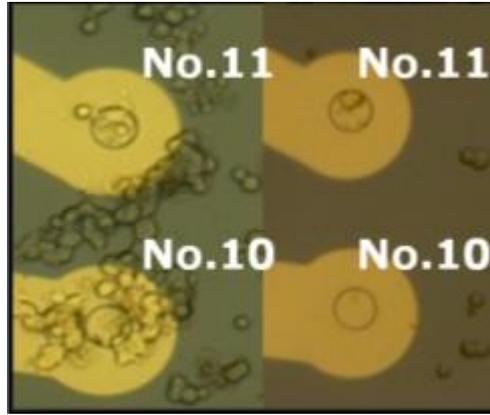


圖 3-18、細胞量測前如左圖、量測後如右圖之表面形貌。

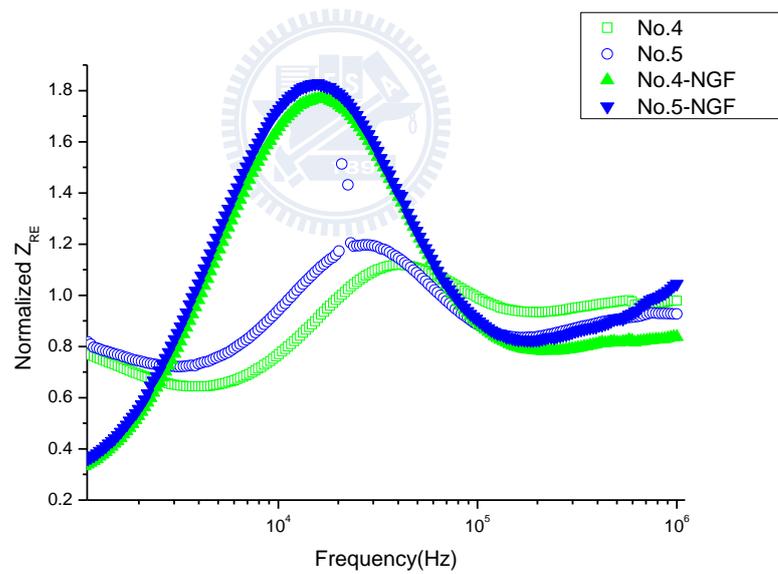


圖 3-19、細胞分化前後阻抗實部正規化值。

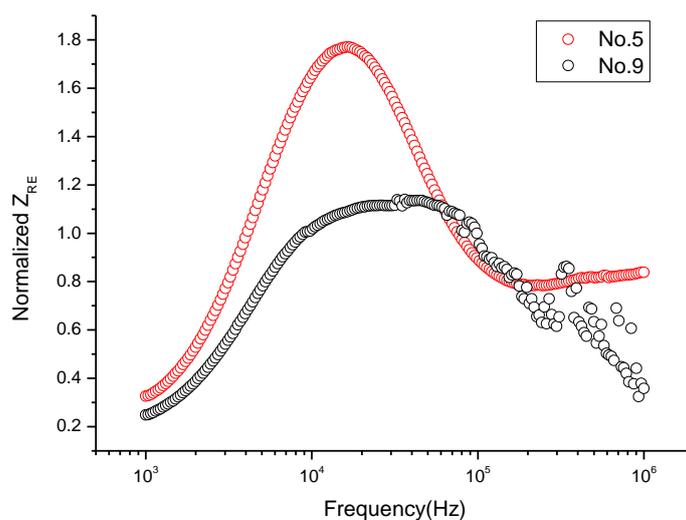


圖 3-20、細胞分化阻抗實部正規化與頻率圖。

表 3-3、不同電極面積之阻抗擬合結果。

	R_s	C_{dl}	C_{sh}
40 μm	137.4 Ω	T=7.51E-10, p=0.97	T=6.33E-8, p=0.38
20 μm	104.6 Ω	T=6.33E-10, p=0.99	T=4.84E-8, p=0.35
10 μm	95.94 Ω	T=7.61E-10, p=0.98	T=1.12E-7, p=0.16

本論文也針對不同面積的工作電極進行量測及擬合，首先量測細胞未貼附前之電極阻抗並擬合得到表 3-3 之溶液電阻、電雙層電容與寄生電容值，再將細胞貼附、分化與回復至未分化之阻抗量測值以圖 2-8 之等效電路擬合，並代入於細胞未貼附前擬合所得之溶液電阻與寄生電容值，工作電極直徑為 40 μm 、20 μm 、10 μm 之擬合結果如表 3-4、表 3-5、表 3-6；在不同面積的電極量到的阻值(R_c)變化都有相同的趨勢，即細胞貼附後之 R_c 值小於 NGF 刺激細胞分化後之 R_c 值，細胞分化時之 R_c 值大於培養溶液置換為沒有生長因子之培養液後的 R_c 值，由此

實驗結果我們可以證實細胞的分化的確在金電極表面造成阻抗的改變，而阻抗的改變即可鑑別細胞的分化與貼附。由阻抗實部正規化值對頻率作圖可見直徑 20 μm 的電極最適合用來鑑別細胞分化與否。



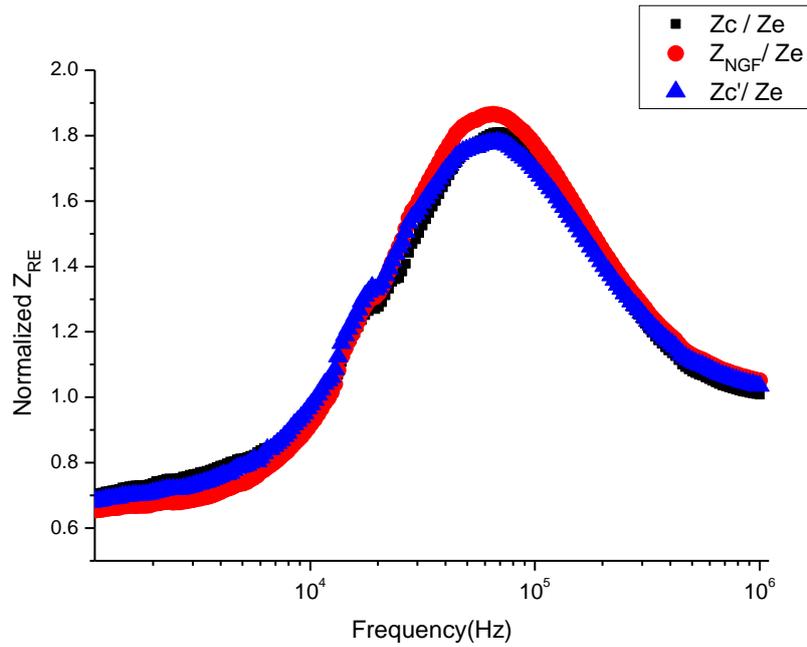


圖 3-21、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值。

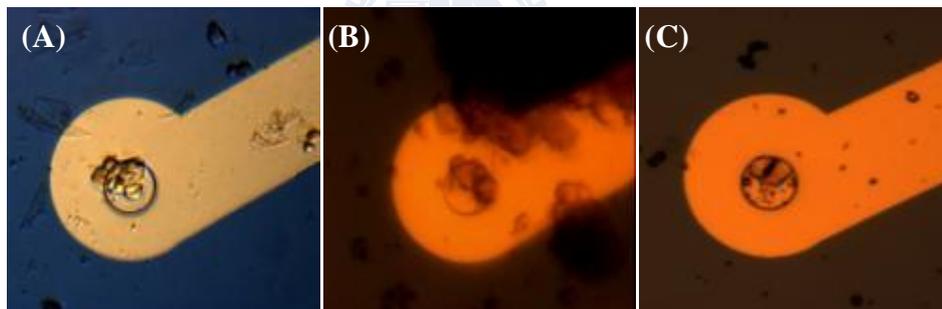


圖 3-22、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長因子之培養液 24 小時之表面形貌。

表 3-4、擬合元件參數值。

40 μm	R_C	C_{dl}	C_C
Z_{cell}	369.6	T=1.21E-9 P=0.95	T=1.01E-9 P=1.00
Z_{NGF}	769.5	T=1.03E-9 P=0.97	T=4.65E-9 P=0.96
Z_{cell}'	450.2	T=1.22E-9 P=0.95	T=1.22E-9 P=1.00

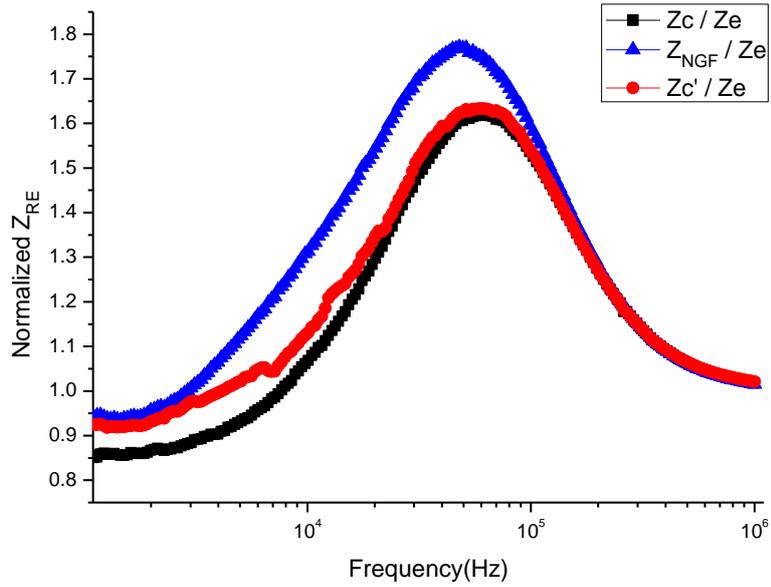


圖 3-23、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值。

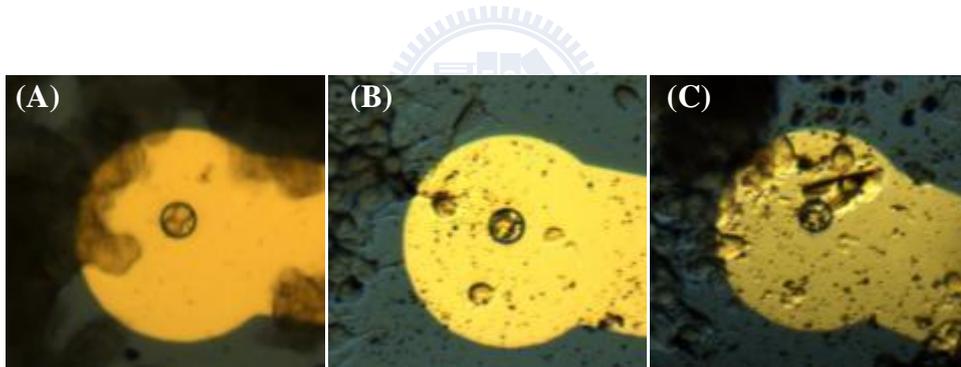


圖 3-24、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長因子之培養液 24 小時之表面形貌。

表 3-5、擬合元件參數值。

20 μm	R_C	C_{dl}	C_C
Z_{cell}	1693	T=1.15E-10 P=1.00	T=7.32E-8 P=0.73
Z_{NGF}	3681	T=5.57E-11 P=1.00	T=7.17E-8 P=0.72
Z_{cell}'	2994	T=9.06E-11 P=1.00	T=4.61E-8 P=0.75

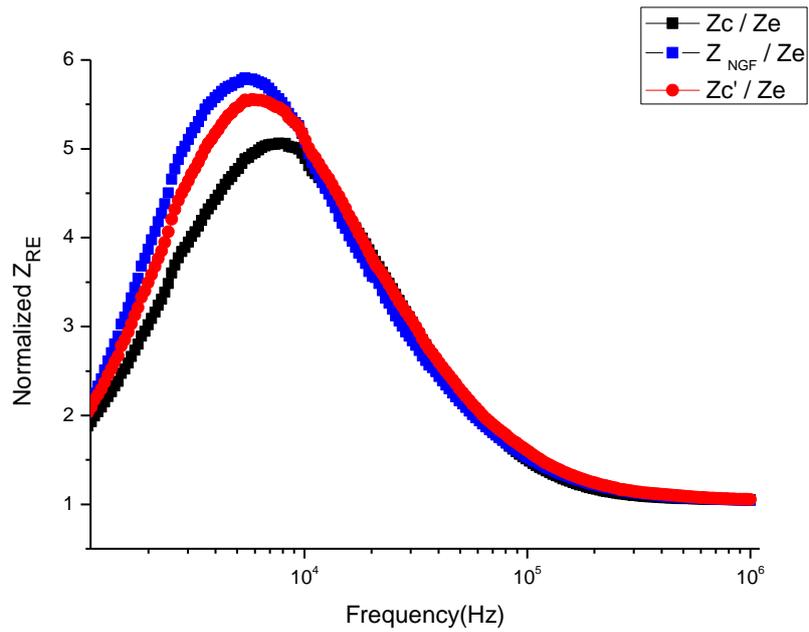


圖 3-25、細胞分化前後及回復為未分化之阻抗實部正規化值。

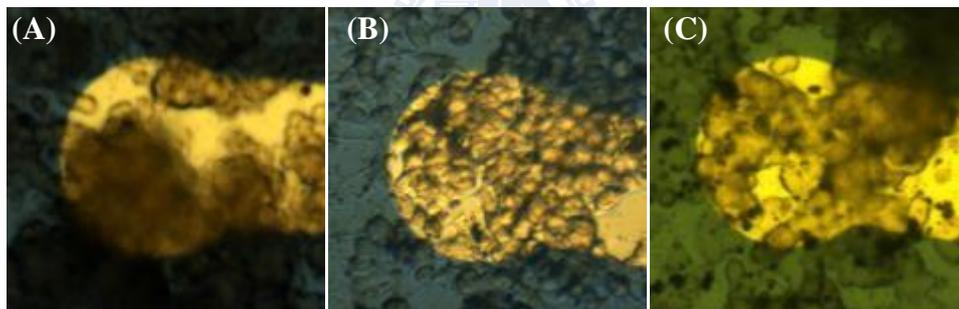


圖 3-26、細胞(A)培養 48 小時後(B)添加 NGF 生長因子 48 小時後(C)置換無生長因子之培養液 24 小時之表面形貌。

表 3-6、擬合元件參數值。

$10 \mu\text{m}$	R_C	C_{dl}	C_C
Z_{cell}	118030	T=4.87E-11 P=1.00	T=1.56E-9 P=0.94
Z_{NGF}	451330	T=8.64E-12 P=1.00	T=1.15E-9 P=0.95
Z_{cell}'	422970	T=4.75E-11 P=1.00	T=1.72E-9 P=0.93

第四章 微流道結構中捕捉細胞

若能將前述阻抗系統與微流道結合，將能進行更多應用與分析，因此我們希望能利用簡單的物理性結構去困住細胞，並在微流道中進行培養以便做為將來與阻抗量測系統結合的基礎，於文獻回顧的章節我們將對微流道之發展與微流道中以物理性結構捕捉細胞的文獻作探討；本論文針對捕捉 PC12 細胞設計了兩種不同結構的微流道，其製作與操作流程將於以下之章節做介紹；最後由實驗結果證實我們可以利用微流道結構捕捉細胞並在其中培養、刺激使其分化。

4.1 文獻回顧

在過去二十年來，實驗室晶片 (lab-on-a-chip devices) 對於生物與化學在微流道元件中的分析有了許多重大的發展[30-31]，而近年來在微流道系統中分析更複雜的活體細胞研究更是引起了人們的注意，它在細胞生物學、神經生物學、藥理學及組織工程等都發揮了日益重要的作用[32-33]，然而要製造生物晶片需要用到的技術非常多，包括要設法在不同材質的晶片上如矽、玻璃或塑膠，半導體產業的蝕刻技術蝕刻出微小的管道，要如何推動極微量的液體流動進行反應，流體力學原理、機械幫浦構造、微小化設計等技術都是不可缺少的；反應的結果要如何偵測、分析，可能必須應用各種不同技術的支持配合，才能協力在晶片上完成在傳統實驗室中耗時的生化分析。因此，Lab-on-a-chip 並不是單一技術的應用或衍生，而是許多特殊技術甚至跨領域技術的整合。其主要優點為可以為細胞設計微米尺度的培養環境並可精確控制流體流動，微米尺度的培養空間能夠減少細胞培養的時間和成本。

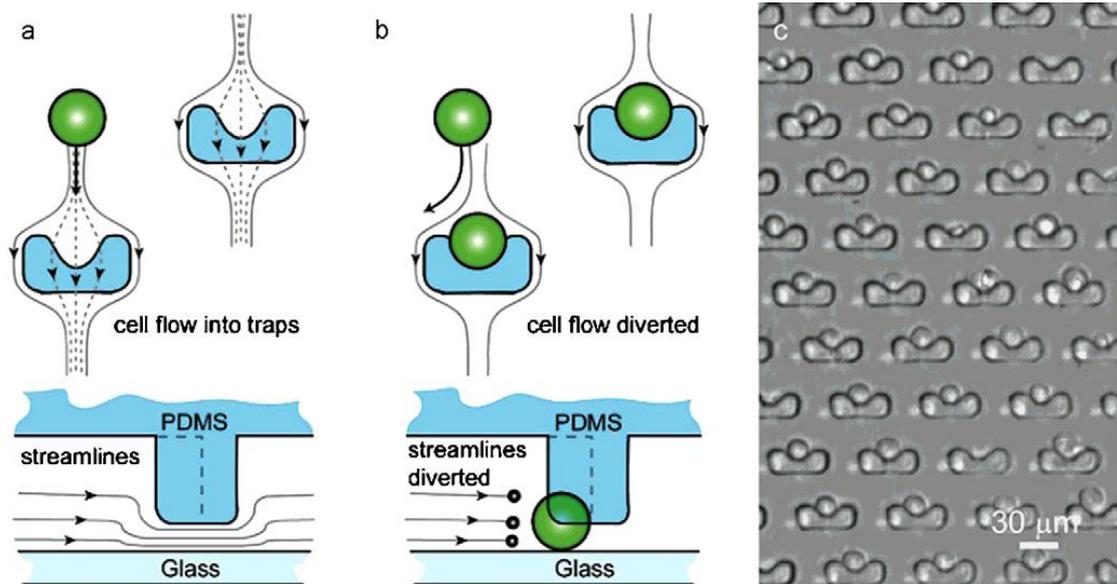


圖 4-1、陣列式 U 型結構 [34]。

單一細胞的行為與特性在醫療上可以為其病理狀態提供重要資訊，因此我們可以藉由微流道系統捕捉單一細胞後再進行分析，然而在微流道系統中捕捉細胞的方式有許多，有以介電力[35]、光鉗[36]、毛細力[37]、物理結構[34, 38]等等的方法去捕捉細胞，若要更進一步在微流道中培養細胞，則要考慮更多的問題，例如培養環境材料的選擇、培養液的置換、流道結構的設計、培養液的流速等等[39]。利用結構及流體流向去捕捉細胞已有許多不同的研究，如圖 4-1 是以大量陣列式的 U 型 PDMS 結構捕捉細胞，當流體帶著細胞流經此結構時，單一顆細胞會被此 U 型的結構困住，細胞也將此處的流道封住，使的流體能帶著剩餘的細胞流進未被細胞占據的結構，不僅可以更有效率的困住細胞，還可以減少細胞因為流體的剪力造成的表面傷害；圖 4-2 則是以水壩式的結構來捕捉細胞，其結構中有兩道平行的流道，兩道流道的中央有一個類似水壩的結構，當溶液由其中一端流道帶著細胞流入後會有一小部分的水流分支經由中央水壩結構流至隔壁的流道中，而細胞也就被排列在中央，當細胞排成一列將中央的縫隙填滿時，細胞可被視為排列在管壁，而管壁的流速是最小的，因此可以減少細胞因為流體的

剪力造成的表面傷害，且可達到單一層的細胞排列；圖 4-3 也是利用類似於上述之原理捕捉單一顆細胞。

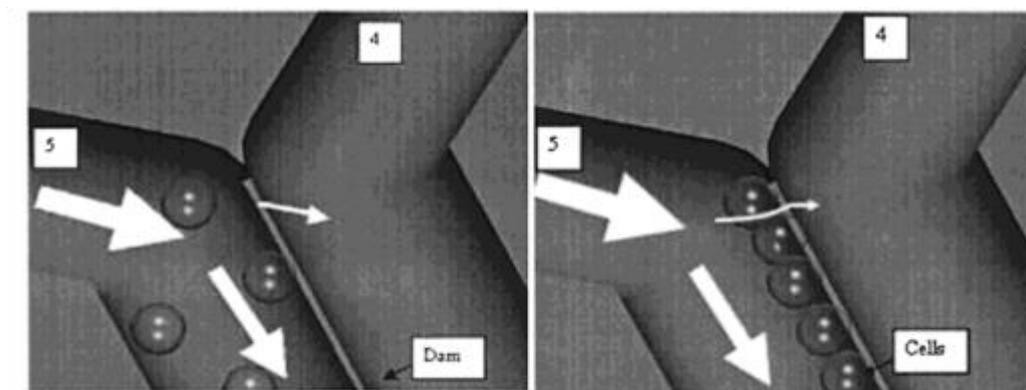


圖 4-2、水壩式結構 [40]。

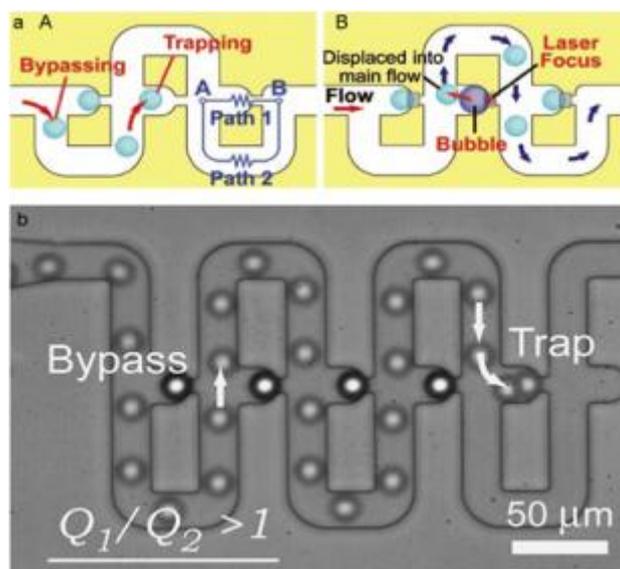


圖 4-3、連續篩狀結構 [41]。

一個完善的微流道細胞培養環境必須考慮到許多細節，首先我們必須先選擇微流道的材料，材料可以有許多選擇，然而因為 PDMS 即 poly(dimethylsiloxane) 容易加工至微米等級結構以及製作成本低廉、具有良好的光穿透性與生物相容性 [42]，其表面經過氧電漿處理過後可以與玻璃等基材形成永久鍵結，因此廣泛應

用在製作微流體結構上，還有其他材料如矽、PMMA、玻璃等，所有與微流道連接的任何材料都必須考慮到生物相容性與可否滅菌[43]的問題；接著就是針對目標細胞設計出適合的培養腔體與流體輸送系統，其培養腔體的尺寸必須考慮到細胞消耗養分與排放廢棄物的速率，流體輸送系統則須考慮流體流動對細胞造成的剪應力，養分供應速率等；而培養環境的溫度、氣體濃度也是非常重要的環節。

4.2 研究動機與目標

經由前幾章的實驗證實我們已經可以利用阻抗量測系統鑑別 PC12 的貼附與分化，若能進一步將此系統與微流道結合，將能進行更多應用與分析，因此我們希望能利用簡單的物理性結構去困住細胞，並在微流道中進行培養已便將來與阻抗量測系統結合。

4.3 微流道製作與系統操作流程

本實驗採用兩種結構去捕捉細胞，首先是以雙層結構之 PDMS 與矽晶片結合而成的微流道結構如圖 4-4，此結構有兩條 3 mm 長、50 μm 高的平行流道，寬度則分別為 500 μm 、700 μm ，兩平行流道中有數個垂直通道(5 μm ×15 μm ×100 μm)，我們希望當兩邊同時輸入相同流量的溶液時，細胞會因為兩邊流道寬度不同形成的壓力差而困在中央的垂直通道中，詳細流道製作流程如下：

1. 使用光阻(SU-8 2005)在矽晶片上進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出第一層高度為5 μm 流道結構。
 - a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；3000 rpm，30 sec
 - b. 軟烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec；95 $^{\circ}\text{C}$ ，120 sec；65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec
 - c. 曝光強度：115 mJ/cm^2
 - d. 曝後烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec；95 $^{\circ}\text{C}$ ，180 sec；65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec
 - e. 顯影：40 sec (SU-8 developer)

- f. 定影：30 sec (IPA)
 2. 使用光阻(SU-8 2050)在矽晶片上進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出第二層高度為50 μm 流道結構模具，圖 4-5A為雙層SU-8結構圖。
 - a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；3000 rpm，30 sec
 - b. 軟烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min
 - c. 曝光強度：225 mJ/cm^2
 - d. 曝後烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min
 - e. 顯影：10 min (SU-8 developer)
 - f. 定影：30 sec (IPA)
 3. 將PDMS倒入雙層SU-8模具中，待其固化脫模成型，圖 4-5B為PDMS的結構圖。
 - a. 配置重量比為1：10的固化劑與PDMS溶液
 - b. 倒入模具後抽真空至沒有氣泡
 - c. 放到加熱烤盤上烘烤65 $^{\circ}\text{C}$ ，8小時
 - d. 將PDMS脫模
 4. 將脫模後之PDMS以點膠針頭鑽出之後要與鐵氟龍管接合的孔洞
 5. 以氧電漿處理欲結合的矽晶圓與PDMS表面後，互相接合，即完成流道結構
- 微流道結構由上述之流程完成後，在流道中加入 10 μl 膠原蛋白(collagen)，在 UV 光下照一小時後，將微流道結構連接鐵氟龍管與注射針筒，置入小的培養盒(5% CO_2 ，37 $^{\circ}\text{C}$)中並以注射式幫浦注入 1 \times PBS，流速為 100 $\mu\text{l}/\text{hr}$ ，20 min，再將密度為 1×10^4 cells/ml 的 PC12 細胞，以流速 10 $\mu\text{l}/\text{hr}$ 注入流道中。

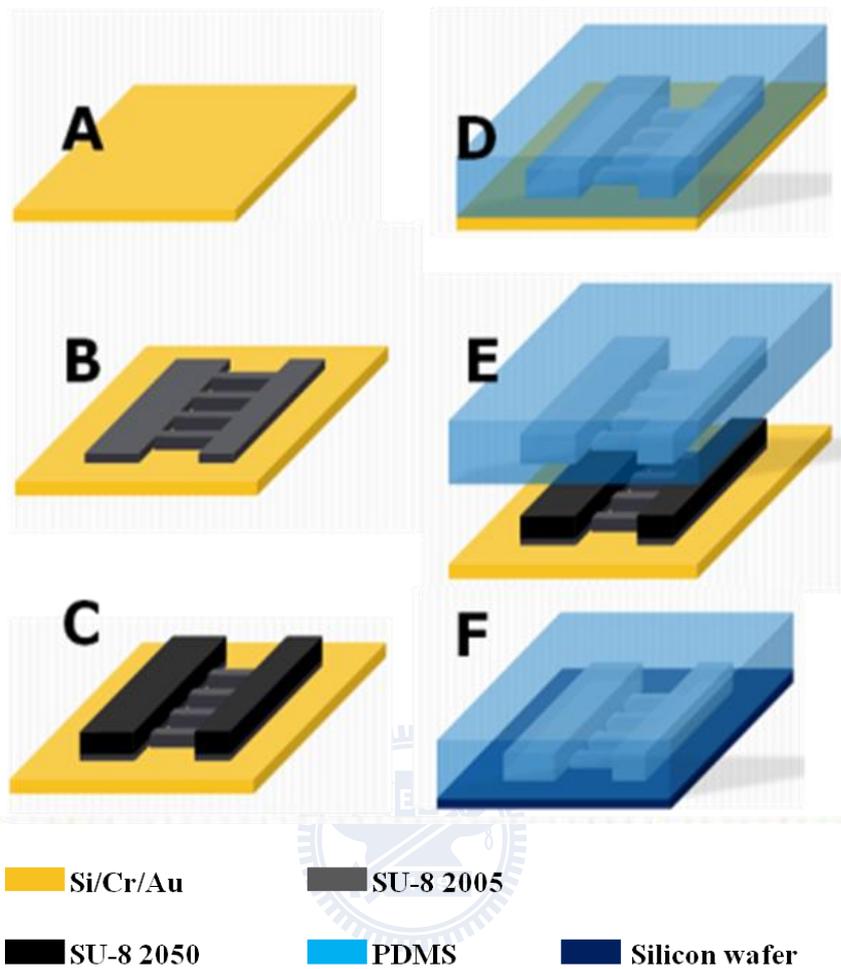


圖 4-4、雙層微流道結構製作流程圖。

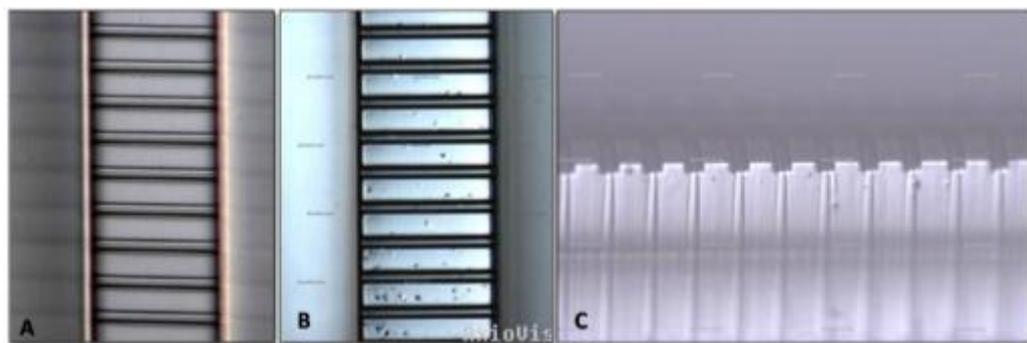


圖 4-5、雙層微流道結構之(A)雙層 SU-8 模具(B)PDMS 雙層流道結構俯視圖 (C)PDMS 雙層流道結構側視圖。

第二種流道結構如圖 4-6，流道結構為 3 mm 長、500 μm 寬、50 μm 高，在流道底部我們利用黃光微影製程製作了數個深度為 20 μm 的溝槽，我們希望當細胞掉入溝槽後可以由擴散取得生長所需養分，並且不受到剪應力的作用，詳細製作流程如下：

1. 使用光阻(SU-8 2015)在矽晶片上進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出高度為20 μm 的十字結構如圖 4-7。
 - a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；1500 rpm，30 sec
 - b. 軟烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec；95 $^{\circ}\text{C}$ ，4 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec
 - c. 曝光強度：150 mJ/cm^2
 - d. 曝後烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec；95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，60 sec
 - e. 顯影：4 min (SU-8 developer)
 - f. 定影：30 sec (IPA)
2. 使用光阻(SU-8 2050)在矽晶片上進行黃光微影製程，光罩對準曝光後定義出高度為50 μm 的流道結構，做為之後PDMS成型之模具
 - a. 光阻旋塗轉速：500 rpm，10 sec；3000 rpm，30 sec
 - b. 軟烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min
 - c. 曝光強度：225 mJ/cm^2
 - d. 曝後烤：65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min；65 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min
 - e. 顯影：10 min (SU-8 developer)
 - f. 定影：30 sec (IPA)
6. 將PDMS倒入用SU-8定義的流道模具中，待其固化脫模成型。
7. 以氧電漿處理欲結合的有十字結構之矽晶圓與PDMS表面後，互相接合，即完成流道結構。

微流道結構由上述之流程完成後，在流道中加入 10 μl 膠原蛋白(collagen)，在 UV 光下照一小時後，將微流道結構連接鐵氟龍管與注射針筒，置入小的培養

盒(5% CO₂ , 37 °C)中並以注射式幫浦注入 1×PBS，流速為 100 μl/hr，20 min，再將密度為 1×10⁴ cells/ml 的 PC12 細胞，流速為 10 μl/hr 注入流道中，經過 24 小時後注入溶液更換為含有 NGF 的細胞培養液。

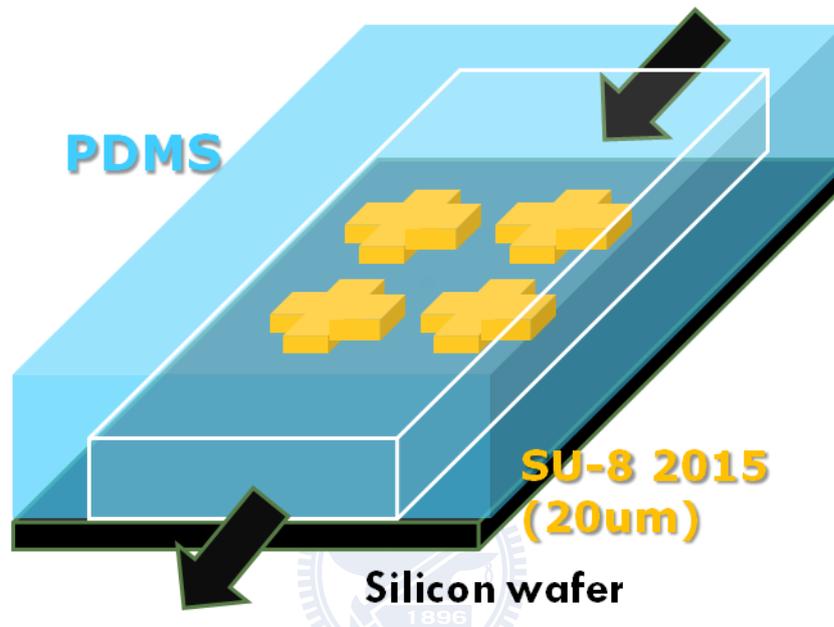


圖 4-6、溝槽型微流道結構示意圖。

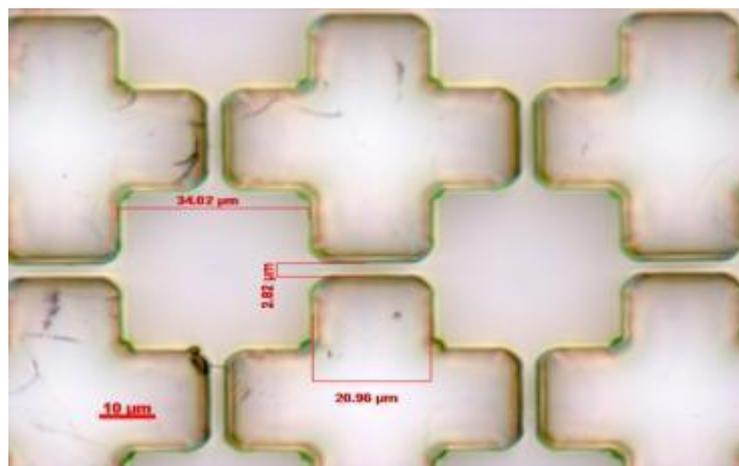


圖 4-7、溝槽型微流道結構俯視圖。

4.4 實驗結果與討論

由以上流程將微流道結構完成之後，在流道中加入 10 μl 膠原蛋白(collagen)，在 UV 光下照一小時後，將微流道結構連接鐵氟龍管與注射針筒，置入小的培養盒(5% CO_2 ，37 $^\circ\text{C}$)中並以注射式幫浦注入 1 \times PBS，流速為 100 $\mu\text{l/hr}$ ，20 min，再將密度為 1×10^4 cells/ml 的 PC12 細胞，流速為 10 $\mu\text{l/hr}$ 注入流道中。

在圖 4-8(A)的結構中，我們將細胞注入較窄的流道，較寬的流道則注入細胞培養液，在注入流量相同的情況下，較窄的流道會產生大於寬流道的壓力，如圖 4-8(B)是我們由流體模擬軟體模擬出的結果，可見在此狀態下細胞有可能會因為流體的流向而將細胞帶入中間通道的結構中，當細胞封住中間通道的路徑時，細胞排列處的流速會變慢，因此細胞所承受的剪力也會變小，可避免細胞因為流體剪力的破壞。

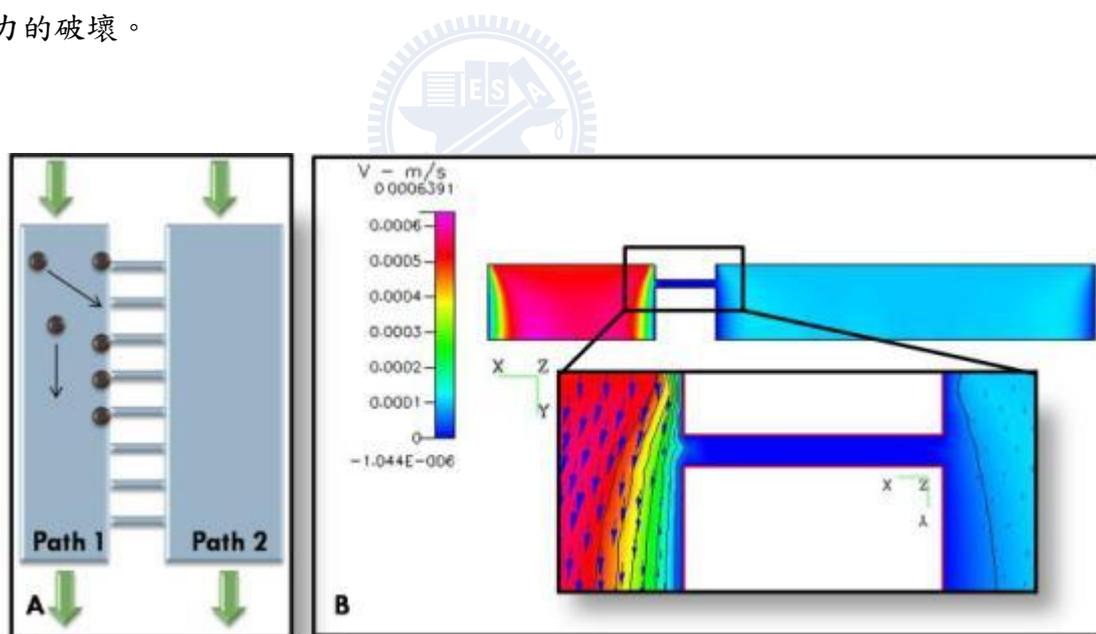


圖 4-8、微流道結構之(A)細胞流向示意圖 (B)模擬結果。

圖 4-9A 是使用直徑 6 μm bead 模擬細胞的實驗結果，圖 4-9B 則是注入 PC12 細胞的結果，由此實驗結果可見利用壓力差與中間通道尺寸的大小，可以在此結構中大致捕捉到單一細胞。

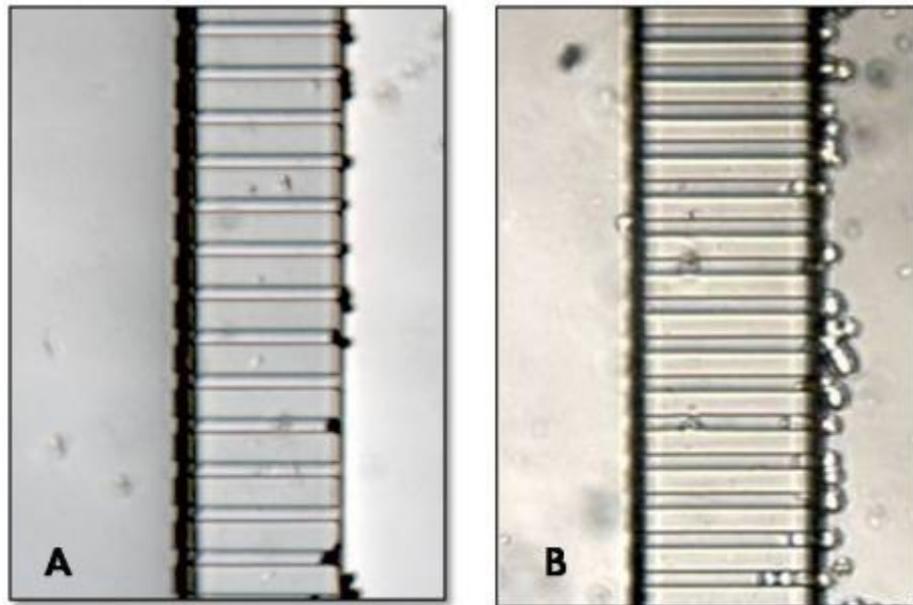


圖 4-9、微流道結構捕捉單一(A)beads (B)PC12 細胞。

我們也在圖 4-6 的結構中以流速為 $10 \mu\text{l/hr}$ 將密度為 $1 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 的 PC12 細胞注入流道中，圖 4-10 為 2D 結構模擬的結果，由模擬結果可猜測當細胞流過十字結構的溝槽時，有可能因為流體的流向將細胞帶入溝槽內，經過 24 小時後將注入溶液更換為含有 NGF 的細胞培養液，培養第四天的細胞如圖 4-11A，圖 4-11B 為細胞脫水後的圖，由實驗結果可見，我們能在此結構中捕捉到細胞並成功的培養 PC12 細胞使其分化。

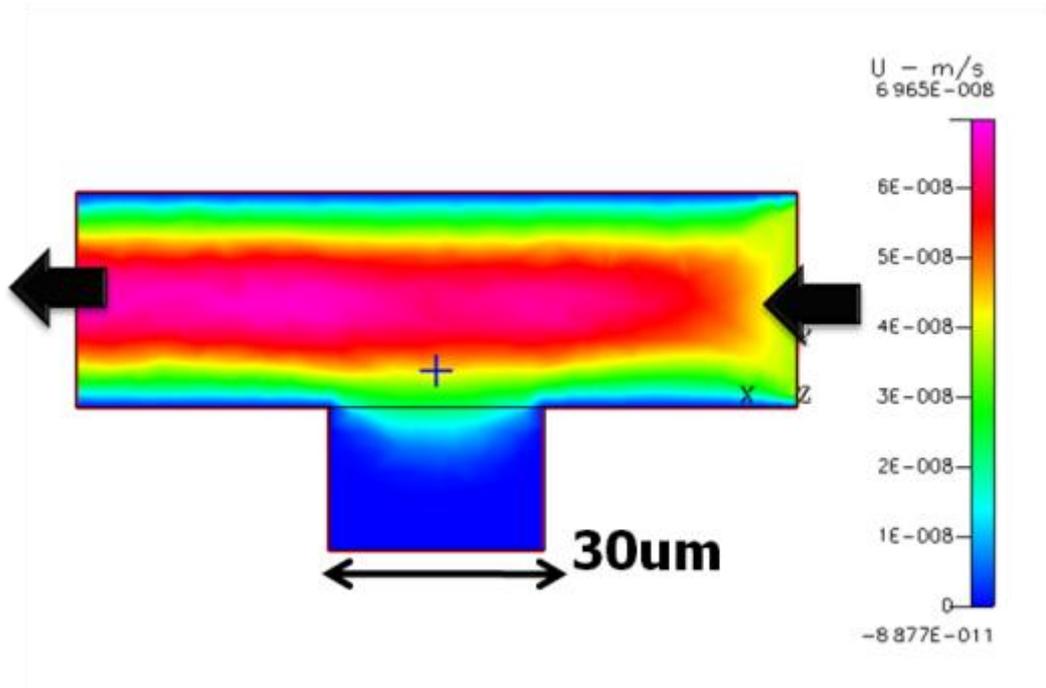


圖 4-10、流道模擬示意圖。

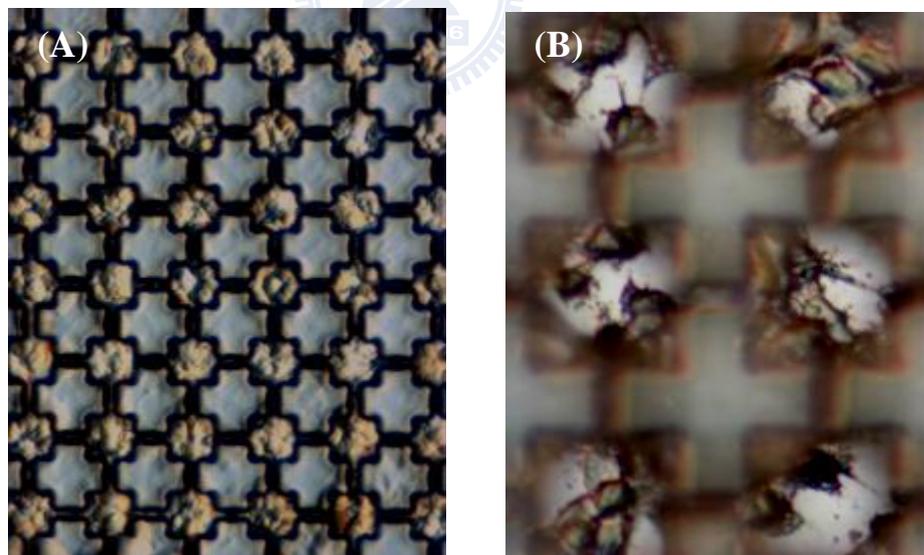


圖 4-11、微流道中(A)培養細胞並且(B)刺激分化。

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

由以上實驗之結果與討論可以歸納出以下之結論：

1. 我們可在簡化之等效電路中將細胞貼附所造成的阻抗變化以一個等相元件並聯一個電阻來表示，其中我們把細胞視為一個等相元件及一個因為細胞貼附所造成的電阻；並且我們可以經由上述電阻的產生，來鑑別 PC12 細胞是否貼附在經過蛋白質表面處理的金電極上。

2. 在不同面積工作電極中，最接近細胞面積的工作電極，在細胞幾乎完全覆蓋電極的情況下，正規化的阻抗實部最大值有最明顯的變化。另外當電極面積比細胞小時，可以用來作為單細胞貼附的感測。

3. 利用與細胞貼附阻抗偵測相同的系統，也可以用來鑑別 PC12 細胞的分化與否。由實驗結果我們可以證實細胞的分化的確在金電極表面造成阻抗的改變。

4. 在本實驗中以此阻抗量測系統來鑑別細胞分化，具有最佳鑑別效果的是直徑為 20 μm 的工作電極，因為在 10 μm 的工作電極中未分化的細胞與電極面積幾乎相同，造成細胞分化前後之貼附面積變化受電極面積所限制，然而，在 20 μm 的工作電極中，有足夠空間提供分化細胞貼附與生長突觸，故其阻抗會有較大的變化量。

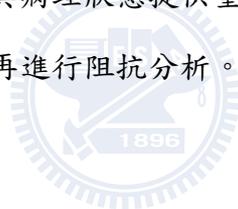
5. 我們成功的在微流道結構中捕捉到細胞，並且在微流道溝槽中成功培養細胞並以 NGF 刺激使其分化。

5.2 未來展望

我們目前已能利用簡化之模組去鑑別細胞貼附與分化的細胞型態，未來一方面可運用阻抗量測來測量神經細胞與電極介面之電阻抗特性，另一方面也可利用膜外電刺激的方式來了解細胞電生理特性。

本實驗的阻抗量測環境是採用封閉式的培養環境，然而近年來在微流道系統中分析更複雜的活體細胞研究更是引起了人們的注意，它在細胞生物學、神經生物學、藥理學及組織工程等都發揮了日益重要的作用，其主要優點為可以為細胞設計微米尺度的培養環境並可精確控制流體流動使其接近在活體培養環境，並且微米尺度的培養空間能夠減少細胞培養的時間和成本。

若能進一步將阻抗系統與微流道結合，將能進行更多應用與分析。單一細胞的行為與特性在醫療上可以為其病理狀態提供重要資訊，因此也希望未來可以藉由微流道系統捕捉單一細胞後再進行阻抗分析。



参考文献

- [1] L. Clark Jr and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [2] R. Pethig, "Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications," *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, pp. 453-474, 1984.
- [3] M. Cheney, *et al.*, "Electrical impedance tomography," *SIAM review*, vol. 41, pp. 85-101, 1999.
- [4] L. Greene and A. Tischler, "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, p. 2424, 1976.
- [5] D. McClay, *et al.*, "Intercellular recognition: quantitation of initial binding events," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, p. 4975, 1981.
- [6] C. Galbraith and M. Sheetz, "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, p. 9114, 1997.
- [7] G. Sagvolden, *et al.*, "Cell adhesion force microscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, p. 471, 1999.
- [8] I. Giaever and C. R. Keese, "Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 81, pp. 3761-4, Jun 1984.
- [9] A. Dijkstra, *et al.*, "Review clinical applications of electrical impedance

- tomography," *Journal of medical engineering & technology*, vol. 17, pp. 89-98, 1993.
- [10] K. Cole and H. Curtis, "Electric impedance of the squid giant axon during activity," *Journal of general physiology*, vol. 22, p. 649, 1939.
- [11] H. Fricke and S. Morse, "The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4.5 million cycles," *J. Gen. Physiol*, vol. 9, p. 153;V67, 1925.
- [12] L. Hause, *et al.*, "Electrode and electrolyte impedance in the detection of bacterial growth," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, pp. 403-410, 1981.
- [13] J. Wegener, *et al.*, "Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces," *Experimental Cell Research*, vol. 259, pp. 158-166, 2000.
- [14] I. Giaever and C. Keese, "Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, pp. 242-247, 1986.
- [15] I. Giaever, "A morphological biosensor for mammalian cells," *Nature*, vol. 366, pp. 591-592, 1993.
- [16] I. Giaever and C. Keese, "Fractal motion of mammalian cells," *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 38, pp. 128-133, 1989.
- [17] C. Lo, *et al.*, "Monitoring motion of confluent cells in tissue culture," *Experimental Cell Research*, vol. 204, pp. 102-109, 1993.
- [18] C. Lo, *et al.*, "Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing," *Biophysical journal*, vol. 69, pp. 2800-2807, 1995.
- [19] I. Giaever and C. Keese, "Micromotion of mammalian cells measured electrically," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, p. 7896, 1991.

- [20] R. Hagedorn, *et al.*, "Characterisation of cell movement by impedance measurement on fibroblasts grown on perforated Si-membranes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1269, pp. 221-232, 1995.
- [21] J. Wegener, *et al.*, "Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces," *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 32, pp. 151-170, 1996.
- [22] R. Ehret, *et al.*, "Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, pp. 29-41, 1997.
- [23] G. Slaughter, *et al.*, "Improving neuron-to-electrode surface attachment via alkanethiol self-assembly: an alternating current impedance study," *Langmuir*, vol. 20, pp. 7189-7200, 2004.
- [24] C. Keese, *et al.*, "Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture," *Biotechniques*, vol. 33, pp. 842-851, 2002.
- [25] M. Chanana, *et al.*, "Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells," *Nano Lett*, vol. 5, pp. 2605-2612, 2005.
- [26] M. Lundien, *et al.*, "Induction of MCP-1 expression in airway epithelial cells: role of CCR2 receptor in airway epithelial injury," *Journal of clinical immunology*, vol. 22, pp. 144-152, 2002.
- [27] J. Luong, *et al.*, "Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor," *Anal. Chem*, vol. 73, pp. 1844-1848, 2001.
- [28] E. Zudaire, *et al.*, "The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, pp. 640-650, 2008.
- [29] L. Charrier, *et al.*, "ADAM-15 inhibits wound healing in human intestinal

epithelial cell monolayers," *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 288, p. G346, 2005.

[30] A. van den Berg and T. Lammerink, "Micro total analysis systems: microfluidic aspects, integration concept and applications," *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, pp. 21-49, 1998.

[31] D. Reyes, *et al.*, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology," *Anal. Chem*, vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.

[32] H. Andersson and A. Van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics: a review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 92, pp. 315-325, 2003.

[33] J. El-Ali, *et al.*, "Cells on chips," *Nature*, vol. 442, pp. 403-411, 2006.

[34] D. Carlo, *et al.*, "Dynamic single cell culture array," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 1445-1449, 2006.

[35] G. Markx, *et al.*, "Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms," *Microbiology*, vol. 140, p. 585, 1994.

[36] D. Grier, "A revolution in optical manipulation," *Nature*, vol. 424, pp. 810-816, 2003.

[37] M. Park, *et al.*, "Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 988-994, 2006.

[38] A. Manbachi, *et al.*, "Microcirculation within grooved substrates regulates cell positioning and cell docking inside microfluidic channels," *Lab on a Chip*, vol. 8, p. 747, 2008.

[39] L. Kim, *et al.*, "A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells," *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 681-694, 2007.

[40] M. Yang, *et al.*, "Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device," *Anal. Chem*, vol. 74, pp.

3991-4001, 2002.

[41] W. Tan and S. Takeuchi, "A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, p. 1146, 2007.

[42] T. Merkel, *et al.*, "Gas sorption, diffusion, and permeation in poly (dimethylsiloxane)," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 38, pp. 415-434, 2000.

[43] A. Paguirigan and D. Beebe, "Gelatin based microfluidic devices for cell culture," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 407-413, 2006.

