

# Elasto-Inertial Microfluidics for High-Throughput Imaging Flow Cytometry

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Holzner, Gregor

**Publication date:**

2019

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000370763>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 26106

---

**ELASTO-INERTIAL MICROFLUIDICS FOR  
HIGH-THROUGHPUT IMAGING FLOW CYTOMETRY**

---

A dissertation submitted to obtain the degree of  
DOCTOR of SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
GREGOR HOLZNER

MSc Chemistry, University of Innsbruck (2015)

born on 01.02.1991  
citizen of Italy

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Andrew deMello , examiner  
Prof. Dr. Paolo Arosio, co-examiner  
Prof. Dr. Manfred Claassen, co-examiner  
Dr. Stavros Stavrakis

2019

## ABSTRACT

---

Flow Cytometry is the most widely used method for the rapid enumeration and detection of cells suspended in a fluid. Because of its quantitative and multi-parametric nature, and throughputs of up to 50,000 cells per second, flow cytometry is considered the gold standard method for counting and identifying cells within heterogeneous samples. The primary advantages of flow cytometry include its high-throughput operation and the ability to simultaneously use and probe multiple molecular markers. A major drawback associated with conventional flow cytometers is the lack of spatial information. Optical microscopy is the most common technology used for the study of micron-sized objects such as cells or particles. Commercial microscopes allow multi-parametric analysis of individual cells attached to the surface of slides or plates. However, this technique is itself limited by the number of cells that can be analysed per unit time and the inability to directly probe cells in suspension. Indeed, the key feature of microscopy is the high spatial resolution when using high-end optics and detectors. Although automated image analysis has seen much development in recent years, it is still almost impossible to record large datasets (from thousands of cells) using microscopic methods. Fortunately, recent advancements in camera technologies have opened up image analysis as a viable detection method within flow cytometers, thus allowing morphological analyses of cells at high-throughput. Imaging flow cytometry (IFC) is a hybrid technology, which leverages the advantages of microscopy and flow cytometry to overcome limitations of both methods. Although conventional fluorescence imaging cytometers allow for the high-throughput quantitation of cellular populations, they are costly, mechanically complex, consume large sample and reagent volumes (due to the use of sheath flows) and require trained personnel for both operation and maintenance. Therefore, current designs incorporating sheath fluids and conventional flow cells are bulky and difficult to parallelize. These features drastically limit the use of conventional imaging flow cytometers. To this end, it is recognized that micro-fabricated flow cytometry devices combined with less expensive optical components can count cells rapidly enough to produce sensitive and quantitative measurements at the single cell level. The work presented herein aims to develop novel imaging flow cytometers that incorporate microfluidic formats and combine the high-throughput nature of macroscale flow

cytometry with the enhanced sensitivity of a microscope.

The ability to manipulate biological cells is critical in a diversity of biomedical and industrial applications. Microfluidic-based cell manipulations provide unique opportunities for sophisticated and high-throughput biological assays such as cell sorting, rare cell detection and imaging flow cytometry. In this respect, cell focusing is an extremely useful functional operation preceding downstream biological analysis, since it allows the accurate lateral and axial positioning of cells moving through a microfluidic channel, and thus enables sophisticated cell manipulations in a passive manner. In Chapter 2, we explore the utility of viscoelastic carrier fluids for enhanced elasto-inertial focusing of biological species within straight, rectangular cross section microfluidic channels. Since the investigated polymer solutions possess viscosities close to water and exhibit negligible shear thinning, focusing occurs over a wide range of elasticity numbers and a large range of Reynolds numbers. With a view to applications in the robust focusing of cells and bacteria, we assess and characterize the influence of accessible focusing parameters, including the blockage ratio, volumetric flow rate, cell concentration and polymer chain length.

In recent years, high-speed imaging has become increasingly effective for the rapid analysis of single cells in flowing environments. Single cell imaging methods typically incorporate a minimum magnification of 10x for extracting size and morphology. Although the information content may be significantly enhanced by increasing magnification, this is accompanied by a corresponding reduction in the field of view, and thus a decrease in the number of cells that can be assayed per unit time. Accordingly, the acquisition of high resolution data from wide field views remains an unsolved challenge. To address this issue, Chapter 3 presents an optofluidic flow cytometer integrating a refractive, microlens array (MLA) for imaging cells at high linear velocities, whilst maximizing the number of cells per field of view. To achieve this, we adopt an elasto-inertial approach for cell focusing within an array of parallel microfluidic channels, each equipped with a microlens. We characterize the optical performance of the microlenses in terms of image formation, magnification and resolution, using both ray-tracing simulations and experimental measurements. Results demonstrate that the optofluidic platform can efficiently count and magnify micron-sized objects up to 4 times. Finally, we demonstrate the capabilities of the platform as an imaging flow cytometer, demonstrating the efficient dis-

crimination of hB and Jurkat cells at throughputs of up to 50,000 cells per second.

In Chapter 4 we present a sheathless, microfluidic imaging flow cytometer that incorporates stroboscopic illumination for blur-free fluorescence detection at analytical throughputs in excess of 60,000 cells per second. Our imaging platform is capable of multi-parametric fluorescence quantification and subcellular localization of cellular structures down to 500 nm with microscopy image quality. We demonstrate the efficacy of the approach through the performance of high-throughput analysis and localization of P-bodies and stress granules.

Optical microscopy and flow cytometry are widely used tools in the biomedical sciences. Cost-effective translation of these technologies to remote and resource-limited environments could create new opportunities, especially in the field of diagnostic applications. In this direction, we demonstrate in Chapter 5 the integration of imaging flow cytometry with deep learning for high resolution real time classification imaging flow cytometry. This portable imaging flow cytometry platform, incorporates all the necessary components such as a single-use microfluidic cartridge system, pressure pumps, optics, camera and an image processing unit into a portable unit. We illustrate the performance of this portable deep learning assisted IFC platform by enumerating and classifying honey bee pollen in real time, with the image contrast and performance of a high-NA bright-field microscope, at a prototype cost below 10,000 CHF. The cost-effectiveness, compactness, and simplicity of this platform suggests significant utility in a range of environmental and diagnostic applications, where the “self-improving” properties of the system become particularly powerful in extracting novel biological information.



## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Durchflusszytometrie ist die am weitesten verbreitete Methode zur schnellen Zählung und zum Nachweis von Zellen in einer Suspension. Aufgrund der quantitativen und multiparametrischen Analyse (von bis zu 50.000 Zellen pro Sekunde) gilt die Durchflusszytometrie als Goldstandard für die Zählung und Identifizierung von Zellen in heterogenen Proben. Die Hauptvorteile der Durchflusszytometrie sind der hohe Durchsatz und die Fähigkeit, mehrere molekulare Marker gleichzeitig zu untersuchen. Der Hauptnachteil ist der Mangel an räumlichen und morphologischen Informationen innerhalb von z.B. einer Zelle. Mikroskopie ist die gebräuchlichste Technologie zur Untersuchung von mikrometer grossen Objekten wie Zellen oder Partikeln. Kommerzielle Mikroskope ermöglichen die multiparametrische Analyse einzelner Zellen, die an der Oberfläche von Objektträgern oder Platten haften. Diese Technik ist jedoch in ihrer Nützlichkeit durch die Anzahl der zu analysierenden Zellen und die Unfähigkeit, Zellen in Suspension direkt zu untersuchen, begrenzt. Der Hauptvorteil der Mikroskopie ist die hohe räumliche Auflösung bei Verwendung von High-End-Optiken und Detektoren. Obwohl sich die automatisierte Bildanalyse stark entwickelt hat, ist es fast unmöglich, grosse Datensätze (z.B. zehntausenden von Zellen) mit mikroskopischen Methoden zu untersuchen. Häufig stellt bereits die Analyse von mehreren hundert Ereignissen (Zellen) einen enormen Aufwand dar. Die jüngsten Fortschritte bei den Kamera Technologien haben jedoch die Bildanalyse als praktikable Nachweismethode bei der Durchflusszytometrie möglich gemacht und erlauben so morphologische Analysen von Zellen mit hohem Durchsatz. Imaging flow cytometry (IFC), zu deutsch bildgebende hochdurchsatz Durchflusszytometrie, ist eine Hybridtechnologie, die die Vorteile der Mikroskopie und der Durchflusszytometrie vereint, um die Einschränkungen beider Methoden zu überwinden.

Konventionelle Fluoreszenz-Imaging-Zytometer (FC) ermöglichen zwar die Quantifizierung von Zellpopulationen mit hohem Durchsatz, sind jedoch teuer, mechanisch komplex, benötigen grosse Probenmengen und verbrauchen grosse Reagenzvolumina (aufgrund der Verwendung von Hüllströmen, um die Probe hydrodynamisch auf einen engen Bereich zu fokussieren) und erfordern geschultes Personal sowohl für den Betrieb als auch für

die Wartung. Diese Merkmale schränken die Verwendung herkömmlicher bildgebender Durchflusszytometer drastisch ein. Andererseits ist bekannt, dass mikrofabrizierte Durchflusszytometriegeräte in Kombination mit kostengünstigeren optischen Komponenten Zellen schnell genug zählen können, um empfindliche und quantitative Messungen auf Einzelzellenebene durchzuführen. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung neuartiger mikrofluidischer bildgebender Durchflusszytometer basierend auf mikrofluidischen Techniken für die Untersuchung von Zellpopulationen auf Einzelzellebene, die den Hochdurchsatzcharakter der konventionellen Durchflusszytometrie mit der erhöhten Empfindlichkeit eines Mikroskops kombinieren.

Die Fähigkeit, biologische Zellen zu manipulieren, ist in einer Vielzahl von biomedizinischen und industriellen Anwendungen von entscheidender Bedeutung. Auf Mikrofluidik basierende Zellmanipulationsmethoden bieten einzigartige Möglichkeiten für die Ausführung anspruchsvoller biologischer Assays mit hohem Durchsatz wie z.B. Zellsortierung, Erkennung seltener Zellen und bildgebende Durchflusszytometrie. In dieser Hinsicht ist die Zellfokussierung eine äusserst nützliche Methode für etwaige nachgelagerte biologische Analysen, da diese häufig die genaue laterale und axiale Positionierung von Zellen voraussetzen. In Kapitel 2 untersuchen wir den Nutzen viskoelastischer Trägerflüssigkeiten für eine verbesserte elasto-inertiale Fokussierung biologischer Spezies in Mikrofluidkanälen mit rechteckigem Querschnitt. Da die untersuchten Polymerlösungen Viskositäten ähnlich jener von Wasser aufweisen und eine vernachlässigbare Dilatanz aufweisen, erfolgt die Fokussierung über einen weiten Bereich von Elastizitätszahlen und einen grossen Bereich von Reynoldszahlen. Im Hinblick auf Anwendungen für die robuste Fokussierung von Zellen und Bakterien bewerten und charakterisieren wir den Einfluss verschiedener Fokussierungsparameter, einschliesslich Blockierungsverhältnis, Volumenstrom, Zellkonzentration und Polymerkettenlänge.

In den letzten Jahren wurde die Hochgeschwindigkeitsbildgebung für die schnelle Analyse einzelner Zellen in fliessenden Umgebungen stetig weiterentwickelt und effektiver. Bildgebende Verfahren für Einzelzell Aufnahmen verwenden typischerweise mindestens eine 10-fache Vergrösserung um Zellgrössen und morphologische Informationen zu extrahieren. Der Informationsgehalt kann zwar durch zunehmende Vergrösserung erheblich gesteigert werden, dies geht jedoch mit einer entsprechenden Verringerung des Sichtfeldes und damit einer Verringerung der Anzahl der pro Zeit-

einheit analysierten Zellen einher. Dementsprechend bleibt die Erfassung hochauflösender Daten aus Weitwinkelansichten eine ungelöste Herausforderung. Um dieses Problem zu lösen, stellen wir ein optofluidisches Durchflusszytometer vor, das ein refraktives Mikrolinsenarray (MLA) zur Abbildung von Zellen mit hohen linearen Geschwindigkeiten beinhaltet und gleichzeitig die Anzahl der Zellen pro Sichtfeld maximiert. Um dies zu erreichen, verwenden wir in Kapitel 3 viskoelastische Zellfokussierung in einer Reihe paralleler Mikrofluidikkanäle, welche jeweils mit einer Mikrolinse ausgestattet sind. Wir charakterisieren die optische Leistung der Mikrolinsen in Bezug auf Bilderzeugung, Vergrößerung und Auflösung sowohl durch Raytracing-Simulationen als auch durch experimentelle Messungen. Die Ergebnisse zeigen, dass die optofluidische Plattform Objekte im Mikrometerbereich bis zu viermal zusätzlich vergrößern kann. Schliesslich demonstrieren wir die Fähigkeiten der Plattform als bildgebendes Durchflusszytometer durch die effiziente Unterscheidung von hB- und Jurkat-Zellen bei Durchsätzen von bis zu 50.000 Zellen pro Sekunde.

In Kapitel 4 stellen wir ein hüflflussloses, mikrofluidisches Durchflusszytometer vor, welches mit Hilfe von stroboskopischer Beleuchtung und Fluoreszenzdetektion analytische Durchsätze von mehr als 60.000 Zellen pro Sekunde erreicht. Unsere Bildgebungsplattform ist in der Lage subzelluläre Zellstrukturen mit einer minimalen Grösse von bis zu 500 nm mit mikroskopischer Bildqualität aufzulösen. Wir demonstrieren die Wirksamkeit des Ansatzes durch die Lokalisierung von P-Körpern und Stressgranula im inneren von Zellen.

Optische Mikroskopie und Durchflusszytometrie sind weit verbreitete Instrumente in den biomedizinischen Wissenschaften. Die kostengünstige Umsetzung dieser Technologien für den Einsatz in entfernten und ressourcenbeschränkten Umgebungen könnte neue Möglichkeiten eröffnen, insbesondere für Anwendungen in der Felddiagnose. Darauf aufbauend zeigen wir in Kapitel 5 die Integration der bildgebenden Durchflusszytometrie mit maschinellem Lernen in einem transportierbaren und kostengünstigen Prototyp. Diese tragbare Plattform für die bildgebende Zytometrie vereint alle erforderlichen Komponenten in einer tragbaren Einheit: mikrofluidisches Kartuschensystem, Druckpumpen, Optik, Kamera und eine Bildverarbeitungseinheit. Wir veranschaulichen die Leistung dieser tragbaren IFC-Plattform durch das Messen und Klassifizieren von Honigbienenpollen mit Unterstützung von maschinellem Lernen in Echtzeit.