

DISS. ETH NO. 28591

---

# Microfluidic Platforms for Single-Cell Manipulation and Analysis

---

A thesis submitted to attain the degree of  
**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
Mahmut Kamil Aslan  
MSc. Middle East Technical University

born on 12.10.1989

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andrew J. deMello  
Prof. Dr. Jing Wang  
Dr. Stavros Stavrakis

2022

# Abstract

Microfluidic technologies have emerged as outstanding tools for the investigation of biological and chemical processes owing to advantages such as reduced reagent consumption, low cost, process integration and system automation. Unsurprisingly, microfluidic platforms have become powerful tools in single-cell manipulation and analysis. Cell heterogeneity is an important biological phenomenon observed in processes such as stem cell division, drug metabolism or immune response. To this end, extracting single-cell information from a heterogeneous cellular population is of paramount importance and differs from the ensemble measurements performed in traditional assays, which depend on population-averaged information. The ability to dissect heterogeneity via single-cell measurements has become important when studying complex phenomena such as stem cell differentiation, cancer development and noise in biological systems. Recent advances in microfluidic technologies have allowed researchers to investigate such heterogeneity, since single cells may be manipulated (via sorting, trapping and focusing) and analyzed in a robust and high-throughput manner.

We first present a pneumatic valve-based microfluidic platform to aid in better understanding the decision-making process of cells, by tracking their lineage over multiple generations at the single-cell level. The system can trap single cells inside "growth" chambers, isolate "sister" cells after division and extract them for downstream transcriptome analysis. The setup incorporates cell manipulation steps, image processing-based automation for cell loading and cell-growth monitoring, reagent addition and device washing. 6C2 (chicken erythroleukemia cell line) and T2EC (chicken erythrocytic progenitors) cells are tracked inside the microfluidic system over two generations, with a cell viability rate in excess of 90% being achieved. Sister cells are successfully isolated after division, extracted from the device within a 500 nl volume and collected for downstream RNA sequencing analysis.

Then, we introduce a high-throughput real-time fluorescence cytometer that comprises a microfluidic device and a complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) image sensor-based detection system. A custom C++ program and graphical user interface (GUI) are developed for processing raw signals, adjusting processing parameters and displaying fluorescence intensity histograms in real-time. This platform allows real-time quantification of fluorescent species (particles and cells) at a throughput of up to 500,000 events per second. We apply this platform to measure and quantify patient-derived circulating tumor cells (CTCs) spiked in peripheral blood. The data indicate that CTC detection has a sensitivity of 0.000006% (i.e., 6 CTCs per million blood cells) at a volumetric throughput of 3 ml/min.

Subsequently, we report the development of a fluorescence-based active cell sorting system for isolating rare cells from peripheral blood, with high sensitivity and throughput. Our method is based on positive selection, where cell-surface markers are labelled with fluorescent antibodies, ranked by aliquots and then sorted. The system consists of a multilayer microfluidic device featuring ten parallel channels with control valves, an optical system and a 1D complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) image sensor for fluorescence-based detection. A field programmable gate array (FPGA) integrated with a custom-designed printed circuit board is used for real-time data acquisition, processing of fluorescence signals from target cells and triggering of the solenoid valves for aliquot sorting. We first validate this method by analysing fluorescent beads spiked into a non-fluorescent bead suspension at ratios ranging from 1:100 to 1:1,000,000 (fluorescent beads: non-fluorescent beads). Results indicate a 2,000× enrichment and a recovery rate in excess of 90%. Furthermore, cancer cells spiked into 1 ml of blood at a ratio of 1:10<sup>8</sup> (cancer cells: blood cells) can be enriched by a factor of 72 million after three rounds of sorting.

Finally, we demonstrate, a portable imaging flow cytometer comprising a smartphone, a cost-effective, small-footprint optical system and a PDMS-based microfluidic device. A custom Android program integrating a GUI provides a high degree of user control over high-speed image acquisition using the cell phone camera, and enables single cell analysis at throughputs of up to 50,000 cells per second. Importantly, the integrated system allows for the accurate sizing and discrimination of different cell lines. In addition, the system incorporates a real-time imaging algorithm able to analyse high-resolution brightfield images of single cells moving at high linear velocities. Specifically, we utilize elasto-inertial focusing to manipulate cells in a sheathless manner and machine-learning algorithms to analyse the obtained images. This allows label-free classification of different populations of cells of similar size but with different morphologies.

# Zusammenfassung

Mikrofluidische Technologien haben sich aufgrund von Vorteilen wie reduziertem Reagenzienverbrauch, niedrigen Kosten, Prozessintegration und Systemautomatisierung zu herausragenden Werkzeugen für die Untersuchung biologischer und chemischer Prozesse entwickelt. Es überrascht nicht, dass mikrofluidische Plattformen zu leistungsstarken Werkzeugen bei der Manipulation und Analyse von Einzelzellen geworden sind. Zellheterogenität ist ein wichtiges biologisches Phänomen, das bei Prozessen wie der Stammzellteilung, dem Arzneimittelstoffwechsel oder der Immunantwort beobachtet wird. Zu diesem Zweck ist das Extrahieren von Einzelzellinformationen aus einer heterogenen Zellpopulation von höchster Bedeutung und unterscheidet sich von den in herkömmlichen Assays durchgeführten Ensemble-Messungen, die auf populationsgemittelten Informationen beruhen. Die Fähigkeit, Heterogenität durch Einzelzellmessungen zu zerlegen, ist wichtig geworden, wenn komplexe Phänomene wie Stammzellendifferenzierung, Krebsentwicklung und Rauschen in biologischen Systemen untersucht werden. Jüngste Fortschritte in mikrofluidischen Technologien haben es Forschern ermöglicht, eine solche Heterogenität zu untersuchen, da einzelne Zellen manipuliert (durch Sortieren, Einfangen und Fokussieren) und auf robuste Weise und mit hohem Durchsatz analysiert werden können.

Wir stellen zunächst eine auf pneumatischen Ventilen basierende mikrofluidische Plattform vor, um den Entscheidungsprozess von Zellen besser zu verstehen, indem wir ihre Abstammung über mehrere Generationen auf Einzelzellebene verfolgen. Das System kann einzelne Zellen in „Wachstums“-Kammern einschließen, „Schwester“-Zellen nach der Teilung isolieren und sie für die nachfolgende Transkriptomanalyse extrahieren. Das Setup umfasst Zellmanipulationsschritte, bildverarbeitungs-basierte Automatisierung für die Zellbeladung und Zellwachstumsüberwachung, Reagenzienzugabe und Gerätereinigung. 6C2 (Hühner-Erythroleukämie-Zelllinie) und T2EC (Hühner-Erythrozytär-Vorläufer)-Zellen werden innerhalb des mikrofluidischen Systems über zwei Generationen verfolgt, wobei eine Zelllebensfähigkeitsrate von über 90 % erreicht wird. Schwesterzellen werden nach der Teilung erfolgreich isoliert, aus dem Gerät mit einem Volumen von 500 nL extrahiert und für die nachfolgende RNA-Sequenzanalyse gesammelt.

Dann stellen wir ein Hochdurchsatz-Echtzeit-Fluoreszenzzytometer vor, welches ein mikrofluidisches Gerät und ein auf einem komplementären Metall-Oxid-Halbleiter (CMOS)-Bildsensor basierendes Detektionssystem umfasst. Ein benutzerdefiniertes C++ Programm und eine grafische Benutzeroberfläche (GUI) werden entwickelt, um Rohsignale zu verarbeiten, Verarbeitungsparameter anzupassen und Fluoreszenzintensitätshistogramme in Echtzeit anzuzeigen. Diese Plattform ermöglicht die Quantifizierung fluoreszierender Spezies (Partikel und

Zellen) in Echtzeit bei einem Durchsatz von bis zu 500.000 Ereignissen pro Sekunde. Wir wenden diese Plattform an, um von Patienten stammende zirkulierende Tumorzellen (CTCs) zu messen und zu quantifizieren, die in peripheres Blut versetzt wurden. Die Daten zeigen, dass der CTC-Nachweis eine Empfindlichkeit von 0,000006 % (d. h. 6 CTCs pro Million Blutzellen) bei einem volumetrischen Durchsatz von 3 ml/min hat.

Anschließend berichten wir über die Entwicklung eines fluoreszenzbasierten, aktiven Zellsortiersystems zur Isolierung seltener Zellen aus peripherem Blut mit hoher Empfindlichkeit und hohem Durchsatz. Unsere Methode basiert auf positiver Selektion, bei der Zelloberflächenmarker mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, nach Aliquoten geordnet und dann sortiert werden. Das System besteht aus einem mehrschichtigen, mikrofluidischen Gerät mit zehn parallelen Kanälen mit Steuerventilen, einem optischen System und einem komplementären 1D-Metalloxid-Halbleiter (CMOS)-Bildsensor für die fluoreszenzbasierte Detektion. Ein feldprogrammierbares Gate-Array (FPGA), das in eine kundenspezifische Leiterplatte integriert ist, wird für die Echtzeit-Datenerfassung, die Verarbeitung von Fluoreszenzsignalen von Zielzellen und die Ansteuerung der Magnetventile für die Aliquot-Sortierung verwendet. Wir validieren diese Methode zunächst, indem wir fluoreszierende Kügelchen analysieren, die in eine nicht fluoreszierende Kügelchensuspension in Verhältnissen von 1: 100 bis 1: 1.000.000 (fluoreszierende Kügelchen: nicht fluoreszierende Kügelchen) versetzt wurden. Die Ergebnisse weisen auf eine 2.000-fache Anreicherung und eine Wiederfindungsrate von über 90 % hin. Darüber hinaus können Krebszellen, die im Verhältnis 1:10<sup>8</sup> (Krebszellen: Blutzellen) in 1 ml Blut gespiked wurden, nach drei Sortierunden um den Faktor 72 Millionen angereichert werden.

Schließlich demonstrieren wir ein tragbares bildgebendes Durchflusszytometer, welches aus einem Smartphone, einem kostengünstigen, optischen System mit geringem Platzbedarf und einem PDMS-basierten, mikrofluidischen Gerät besteht. Ein benutzerdefiniertes Android-Programm mit integrierter GUI bietet dem Benutzer ein hohes Maß an Kontrolle über die Hochgeschwindigkeits-Bildaufnahme mit der Handykamera und ermöglicht die Einzelzellanalyse mit einem Durchsatz von bis zu 50.000 Zellen pro Sekunde. Wichtig ist, dass das integrierte System die genaue Größenbestimmung und Unterscheidung verschiedener Zelllinien ermöglicht. Darüber hinaus enthält das System einen Echtzeit-Bildgebungsalgorithmus, der in der Lage ist, hochauflösende Hellfeldbilder einzelner Zellen zu analysieren, die sich mit hohen linearen Geschwindigkeiten bewegen. Insbesondere nutzen wir die Elasto-Inertial-Fokussierung, um Zellen hüllenlos zu manipulieren, und maschinelle Lernalgorithmen, um die erhaltenen Bilder zu analysieren. Dies ermöglicht eine markierungsfreie Klassifizierung verschiedener Populationen von Zellen ähnlicher Größe, aber mit unterschiedlichen Morphologien.