



Doctoral Thesis

Microfluidics-based single-cell manipulation, cultivation, and in situ analysis through electrical impedance spectroscopy

Author(s):

Zhu, Zhen

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010143447> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21780

**Microfluidics-Based Single-Cell Manipulation,
Cultivation, and *in situ* Analysis through
Electrical Impedance Spectroscopy**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Zhen Zhu

M. Eng., Southeast University, China

Born February 9th, 1984

Citizen of China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann, examiner

Prof. Dr. Daniel Müller, co-examiner

Prof. Dr. Roland Zengerle, co-examiner

2014

Abstract

This dissertation presents the design, development, and experimental validation of a set of microfluidic devices. In a first step, the microfluidic devices were used for controllable immobilization, cultivation, and selective release of single cells. A wide-band electrical impedance spectroscopy (EIS) was then integrated into the microfluidic devices, as a complementary readout method to optical microscopy. The EIS-integrated microfluidic devices allowed for *in situ* real-time monitoring of immobilized single cells with high sensitivity and resolution, and provided multiple parameters of cells or intracellular features or events. In the experiments, budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, were used for the validation of the device functions.

The microfluidic cell-culturing devices were fabricated by using a hybrid glass-SU-8-PDMS process. In the devices, single cells were captured at bottleneck-like traps in a microfluidic channel through hydrodynamic forces, and subsequently cultivated under controlled environmental conditions. Comparative cell-culturing studies were performed by capturing cells at the traps situated along both sidewalls of the microfluidic channel, and exposing them to different media perfused under a laminar-flow regime. Immobilized cells can be released by applying a negative dielectrophoretic (nDEP) force through the respective microelectrodes located at each trap. The combination of hydrodynamic cell-trapping and dielectrophoretic cell-releasing therefore enables highly versatile single-cell manipulation in an array-based format. The proliferation of immobilized budding yeast cells validated the biological compatibility of the microfluidic devices for single-cell applications.

By the implementation of multi-frequency (10 kHz–10 MHz) EIS in the microfluidic devices, the real-time monitoring of morphological variations and cellular processes of immobilized single cells was achieved. Multiple parameters, including cell size, membrane area, and the presence or changes of cellular compartments, such as the bud and nucleus, were detected at different frequencies through single-cell impedance measurements. For *S. cerevisiae*, cell growth states, i.e., non-budding and budding cells at different orientations in the trap were differentiated, and the bud growth and cell motion of immobilized budding yeast was recorded in real-time by using EIS. In the case of rod-shaped *S. pombe*, single cells were immobilized vertically at the traps with high reliability, and subsequently cultivated and monitored *in situ* over an extended time period. Multiple activities during cellular development, including cell growth, nuclear division, and cytokinesis, were measured within a cell cycle of *S. pombe* at high spatiotemporal resolution by using EIS in the microfluidic devices. The results of the impedance measurements were validated by time-lapse confocal imaging and finite-element modeling.

Zusammenfassung

In dieser Dissertation wird ein mikrofluidischer Zellkulturchip präsentiert, der kontrollierte Immobilisierung, Kultivierung, sowie die Echtzeitbeobachtung einzelner Zellen und deren selektives Loslösen ermöglicht. Elektrische Impedanzspektroskopie (EIS) wurde erfolgreich in den mikrofluidischen Chip integriert und dient als komplementäre Auslesemethode zu konventioneller optischer Mikroskopie. Das mikrofluidische Chipsystem mit integrierter Impedanzauslese ermöglicht *in situ* Echtzeitbeobachtung und Momentaufnahmen der dynamischen Entwicklung einzelner immobilisierter Zellen mit hoher Sensitivität und Auflösung. In den Experimenten wurden Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, und Spaltheefe, *Schizosaccharomyces pombe*, als biologische Modellorganismen zur Charakterisierung und Verifikation der Gerätefunktionalität gewählt.

Die mikrofluidischen Zellkulturchips wurden in Glass-SU-8-PDMS Hybridbauweise gefertigt. Einzelne Zellen wurden im Chip an flaschenhalsförmigen Öffnungen durch hydrodynamische Kräfte immobilisiert und anschließend unter kontrollierten Umgebungsbedingungen kultiviert. Um Vergleichsstudien durchzuführen, wurden Zellen an spezifischen Orten entlang beider Wände des mikrofluidischen Kanals immobilisiert und von jeweils unterschiedlichen Medien laminar umströmt. Immobilisierte Zellen können einzeln losgelöst werden, indem eine negative dielektrische Kraft von einzelnen Mikroelektroden an den Immobilisationsstellen erzeugt wird. Die Kombination hydrodynamischer Immobilisierung und dielektrischer Loslösung der Zellen erlaubt vielseitige Einzelzellmanipulation in einem Matrixformat. Die kontinuierliche Beobachtung der Zellteilung immobilisierter Bäckerhefezellen zeigt die biologische Kompatibilität der Plattform mit Einzelzellanwendungen.

Durch die Etablierung von Mehrfrequenz-EIS (10 kHz–10 MHz) in den mikrofluidischen Systemen wurde eine Echtzeitbeobachtung von morphologischen Veränderungen und Entwicklungsprozessen einzelner immobilisierter Zellen ermöglicht. Mehrere Parameter wie Zellgröße, die Charakteristik der Zellmembran und die Präsenz oder Position intrazelluläre Organellen, wie z.B. des Zellkerns wurden bei verschiedenen Frequenzen gemessen. Für *S. cerevisiae* wurden Stadien des Zellzyklus, d.h. ungeknospt und geknospt, differenziert und das Knospenwachstum der immobilisierten Zelle per EIS in Echtzeit gemessen. Im Falle der stabförmigen *S. pombe* wurden einzelne Zellen sehr zuverlässig vertikal an den Wandöffnungen immobilisiert, kultiviert und über längere Zeiträume *in situ* beobachtet. Prozesse wie Zellwachstum, Teilung des Zellkerns und Zytokinese wurden während einer Zellteilung von *S. pombe* mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung per EIS gemessen. Die Resultate der Impedanzmessungen wurden durch Aufnahmen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops und Finite-Elemente-Simulationen bestätigt.