



(21)申請案號：104105127

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 13 日

(51)Int. Cl. : C12M1/34 (2006.01)

B01D15/34 (2006.01)

(71)申請人：國立中興大學(中華民國) (TW)

臺中市南區國光路 250 號

彰化基督教醫療財團法人彰化基督教醫院(中華民國) (TW)

彰化縣彰化市南校街 135 號

(72)發明人：王國禎(TW)；蘇鴻麟(TW)；劉青山(TW)；李靜雯(TW)；顏保欣(TW)

(74)代理人：朱世仁

(56)參考文獻：

CN 101678356A

US 2014/0051174A1

Lu H et al., Anal Chem. 2004 Oct 1;76(19):5705-12.

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：8 共 28 頁

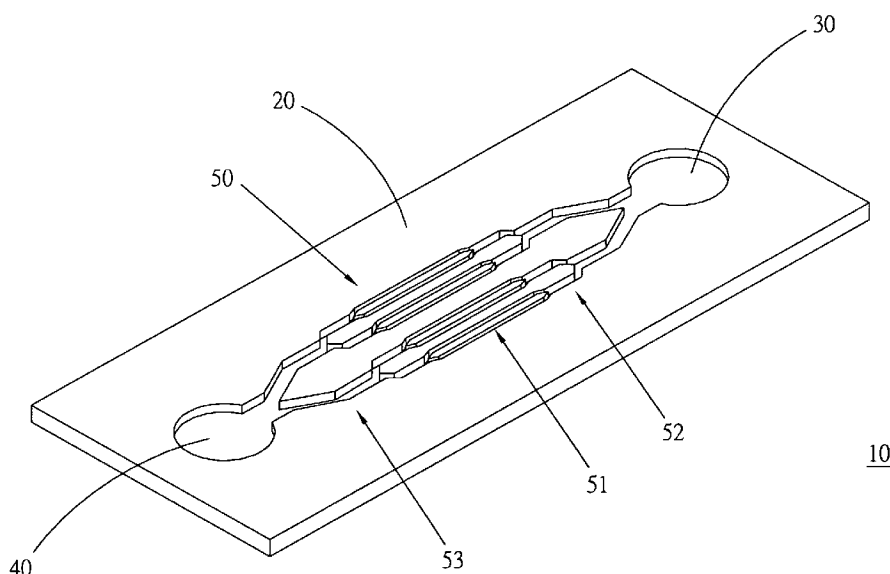
(54)名稱

細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法

(57)摘要

本發明係提供一種細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法，其中，該細胞胞器篩選裝置係透過設計流道組之尺寸，藉由壓力推擠細胞通過流道組，並且，流道壁給予細胞一反向阻力，使細胞被擠壓變形而破裂，將其內胞器釋放至流道內進行篩選，以達到收集目標胞器之功效。據此，藉由本發明所揭細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法，係能夠達到大幅增加收集目標胞器之效率，並且分離出完整且未受污染之目標胞器之功效。

指定代表圖：



符號簡單說明：

(10) . . . 細胞胞器  
篩選裝置

(20) . . . 片狀本體

(30) . . . 入口部

(40) . . . 收集部

(50) . . . 該流道組

(51) . . . 分流流道  
部(52) . . . 篩選流道  
部(53) . . . 匯集流道  
部

第二圖

## 發明摘要

※ 申請案號： 104105127

※ 申請日： 104. 2. 13

※IPC 分類：

C12M 1/34 (2005.01)

B01D 15/34 (2005.01)

【發明名稱】(中文/英文)

細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法

【中文】

本發明係提供一種細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法，其中，該細胞胞器篩選裝置係透過設計流道組之尺寸，藉由壓力推擠細胞通過流道組，並且，流道壁給予細胞一反向阻力，使細胞被擠壓變形而破裂，將其內胞器釋放至流道內進行篩選，以達到收集目標胞器之功效。據此，藉由本發明所揭細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法，係能夠達到大幅增加收集目標胞器之效率，並且分離出完整且未受污染之目標胞器之功效。

【英文】

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（二）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

- |               |            |
|---------------|------------|
| (10) 細胞胞器篩選裝置 | (20) 片狀本體  |
| (30) 入口部      | (40) 收集部   |
| (50) 該流道組     | (51) 分流流道部 |
| (52) 篩選流道部    | (53) 匯集流道部 |

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法

## 【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種分離裝置及其使用方法，特別係指一種細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法。

## 【先前技術】

【0002】 按，先前研究顯示，癌症、糖尿病、心血管疾病或與年紀相關之神經病變等疾病，係由於粒線體毒物透過干擾粒線體氧化磷酸化、生物活性物質或產生親電之過渡物 (electrophile intermediates) 而破壞粒線體DNA所造成者。因而近年來多種治療粒線體之方法被提出，例如透過給予粒線體抗氧化劑避免氧化反應之破壞，以治療神經病變或糖尿病；給予粒線體抑制藥物 (mitochondrial permeability transition, MPT) 以治療與組織出血相關之疾病；給予毒性藥物，用以觸發細胞凋亡而得以治療癌症。惟，組織損壞係無法修復，透過粒線體藥物之治療方式係屬於不可逆者，是以，目前有提出以粒線體轉染技術作為治療粒線體受損相關疾病。

【0003】 所謂粒線體轉染技術係先將健康粒線體由細胞萃取且純化後，植入粒線體異常或是受損之細胞內，藉由健康粒線體進入不健康之細胞內，使該細胞活化及提昇自我療癒能力。而粒線體轉染技術之成功率高低取決於是外源粒線體之健康度及完整性以及是否能遞送至目標細胞。目前技術上以大幅提昇遞送至目標細胞之準確度，具體來說，為能使健康粒線體能夠被順利地送入細胞中，係以質體包裹粒線體之方式進行運送，而

該質體不僅具有膜穿透能力，並且能夠辨識目標細胞外表面訊號，因此，藉由該質體結合至目標細胞，能夠達到將健康粒線體送入目標細胞之目的。

【0004】目前自細胞中獲得粒線體之方法係須先破壞細胞膜，使胞器隨著細胞質流出後，再以離心方式獲得粒線體。更進一步來說，破壞細胞膜之方法可分為機械式及非機械式兩種，其中，非機械式係包含有滲透壓衝擊破碎法 (osmotic shock)、凍融破碎法 (freezing and thawing)、酶溶破碎法 (enzyme lysis)、化學破碎法 (chemical treatment) 與垢劑破碎法 (detergents) 等 (A. Corcelli *et al.*, 2010) 法，又以滲透壓衝擊破碎法與凍融破碎法為最常使用者。惟，上述各非機械式之方式須反覆澎潤細胞或是添加化學物質，使所取得之粒線體被破壞或是被污染，並且無法大量量產。機械式之方式主要是透過直接或間接之外力破壞細胞膜，如高壓勻漿破碎法 (homogenization)、振盪珠擊破碎法 (shaking bead)、高速攪拌珠研磨破碎法 (fine grinding)、超聲波破碎法 (ultrasonication) 等，然而，當外力過大時，會同時破壞粒線體 (V.S. Gross, H.K. *et al.*, 2011; H.T. Hornig-Do *et al.*, 2009)。

【0005】而為能改善上述缺失，有開發出一種自細胞分離粒線體之裝置 (1)，如第一圖所示，而包含有一載片 (2)，一進口 (3)，設於該載片 (2) 一端面，一出口 (4)，相對於該進口 (3) 而設於該載片 (2) 另端面，一第一流道 (5)，以其一端連通該進口 (2)，一第二流道 (6)，以其一端連通該第一流道 (5) 之另端，並以其另端連通該出口 (3)。由於該第一流道 (5) 與該第二流道 (6) 之管徑不同，當不同大小之細胞胞器流經該第一流道 (5) 與第二流道 (6) 時，能夠自細胞胞器中篩選出粒線體，並將

使粒線體流至該出口（4）。雖然上述自細胞分離粒線體之裝置得分離粒線體，惟，實際上，該裝置係具有以下缺失：其一、細胞或其內胞器會大量沾附於流道口及出口，使得流道阻塞，以致於輸入細胞量遠大於所能取得之粒線體量；其二、細胞進入該第一流道及第二流道後壓力迅速下降，無法有效地推動已破裂之細胞流向該出口，導致收集粒線體須耗費過長時間，取得1毫升粒線體液須耗費3-4小時；其三、該自細胞分離粒線體之裝置係為實驗室使用，無法大量生產粒線體。

● **【0006】** 由上可知，目前現階段係位有任何技術或裝置能夠有效率地獲得大量健康粒線體。據此，為能使粒線體相關之研究能夠持續開發，並且未來能夠應用於臨床治療上，開發出一種安全且簡便之自細胞分離篩選粒線體之方法及裝置乃為目前之重要課題。

#### **【發明內容】**

● **【0007】** 本發明之主要目的即在於提供一種細胞胞器篩選裝置，其係藉由階層化之篩選流道分離出目標胞器，以及透過階層化之匯集流道，大幅增加收集目標胞器之效率，並且避免細胞阻塞流道，達到快速取得大量目標胞器之功效。

**【0008】** 本發明之另一目的係在於提供一種以上述細胞胞器篩選裝置採集細胞胞器之方法，其係用於以物理方式自細胞中分離出完整、具活性且不受藥劑污染之目標胞器，而能供未來生醫研究或臨床治療使用。

**【0009】** 為能達成上述目的，本發明係揭露一種細胞胞器篩選裝置，其係包含有一本體，一入口部，設於該本體，一收集部，與該入口部相距一預定距離而設於該本體，一流道組，設於該本體而連通該入口部及該收

集部；其中，該流道組更包含有：

【0010】 一分流流道部，具有至少一分流流道，一進流端，設於該分流流道一端，一出流端，設於該分流流道之另端。

【0011】 一篩選流道部，具有一第一大徑端，連通該入口部，一第一小徑端，連通該進流端。

【0012】 一匯集流道部，具有一第二小徑端，連通該出流端，一第二大徑端，連通該收集部。

● 【0013】 較佳地，該第一小徑端之內徑大於各該分流流道之內徑，並且，該第二小徑端之內徑大於各該分流流道之內徑。

【0014】 較佳地，該細胞胞器篩選裝置更包含有一驅動部，連接該本體，用以提供外力使一流體由該入口部流向該收集部，使該劉體能更快速地流動。

● 【0015】 較佳地，該篩選流道部及該匯集流道部係彼此對稱地設於該分流流道部兩端，其中，又以該篩選流道部及該匯集流道部係分別設為一階層式流道具有較佳功效。

【0016】 較佳地，該篩選流道部係包含有一第一篩選流道，以一端連通該第一大徑端，而以另端往該第一小徑端方向延伸一預定長度，一第二篩選流道，內徑小於該第一篩選流道之內徑，設於該第一篩選流道及該第一小徑端之間。

【0017】 較佳地，該匯集流道部係包含有一第一匯集流道，以一端連通該第二小徑端，而以另端往該第二大徑端方向延伸一預定長度，一第二匯集流道，內徑大於該第一匯集流道之內徑，設於該第一匯集流道及該第

二大徑端之間。

【0018】 較佳地，該入口部係設於該本體側面之一端，該收集部係相對於該入口部而設於該本體側面之另端。

【0019】 較佳地，該入口部係設於該本體一側之中間部位，該收集部係環設於該本體一側之邊緣。

【0020】 較佳地，該分流流道之內徑係為 $0.5\sim 10\mu\text{m}$ 。

【0021】 本發明更進一步地提供一種採集細胞胞器之方法，其包含下列步驟：

【0022】 步驟a：取上述細胞胞器篩選裝置。

【0023】 步驟b：將一細胞液放入該細胞胞器篩選裝置之該入口部，使該細胞液流經該流道組，其中，該篩選流道部擠壓其內之細胞，使細胞膜破裂，釋放出胞器，進而從中篩選出一目標胞器，並且，該目標胞器流經該分流流道部及該匯集流道部，到達該收集部。

【0024】 步驟c：自該收集部中獲得該目標胞器。

【0025】 較佳地，該目標胞器係為粒線體。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0026】

第一圖係為先前技術之示意圖。

第二圖係為本發明第一較佳實施例之立體圖。

第三圖係為本發明第一較佳實施例之頂視圖。

第四圖係為本發明第二較佳實施例之頂視圖。

第五圖係為本發明第三較佳實施例之立體圖。



第六圖係為本發明第三較佳實施例之頂視圖。

第七圖係為本發明所揭細胞胞器篩選裝置之局部流道組。

第八圖係蛋白質電泳分析透過不同方法所分離之粒線體，而以電泳圖顯示各該組粒線體活性之結果。

### 【實施方式】

【0027】 本發明係提供一種細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法，其中，該細胞胞器篩選裝置係透過設計流道組之尺寸，藉由壓力推擠細胞通過流道組，並且，流道壁給予細胞一反向阻力，使細胞被擠壓變形而破裂，將其內胞器釋放至流道內進行篩選，以達到收集目標胞器之功效。藉此，本發明所揭採集細胞胞器之方法係僅須將製備好之細胞液放入該細胞胞器篩選裝置之入口部，當該細胞液進入流道組中，使細胞膜破裂而將胞器釋放自流道組中，進而透過流道組之內徑變化，達到自細胞中分離細胞胞器之功效，並且，基於本發明所揭細胞胞器篩選裝置及其採集細胞胞器之方法係非以強度外力或化學藥劑進行，而能使分離出之胞器不受到化學物質污染、維持其結構及保有活性。

【0028】 更進一步來說，該流道組係包含有一篩選流道部、一分流流道部及一匯集流道部，其中，該篩選流道部係設為一階層式流道，具有一第一大徑端，連通該入口部，一第一小徑端，連通該分流流道部，而當一細胞流通該篩選流道部時，該篩選流道部之側壁會提供一反向阻力擠壓該細胞，破壞該細胞之細胞膜而釋放胞器，並且，該細胞或/及該胞器被推往該收集部移動，透過該篩選流道部之尺寸變化，使非目標胞器之胞器無法進入該分流流道部。

2016年9月19日

【0029】 該分流流道部係以一端連通該篩選流道部，並以另端連通該匯流流道部，用以使目標胞器穿經其內而移動至該匯流流道部。基於該分流流道部之主要功能在於篩選出目標胞器，並且使該目標胞器能夠快速地移動至該匯流流道部，因此，因此，各分流流道部之內徑係被設計為相近於目標胞器之大小，舉例來說，如以粒線體為目標物，則該分流流道部之內徑係對應該粒線體而設計為 $0.5\sim 10\mu\text{m}$ 。

【0030】 該匯集流道部係設為一階層式流道，並且，其內徑係設計為大於該分流流道部，具有一第二小徑端，連通該分流流道部，一第二大徑端，連通該收集部，俾以大量接收來自該分流流道部之該目標胞器，加速收集該目標胞器之效率。

【0031】 本發明所揭細胞胞器篩選裝置係能藉由本發明所屬技術領域且具通常知識者所周知之一般技術製備而成，例如：以半導體之黃光微影製程 (P. Kim *et al.*, 2008; D. Qin *et al.*, 2010) 將該流道組定義於矽晶圓上，並澆注聚二甲基矽氧烷 (Poly(dimethylsiloxane), PDMS)，經脫膜後係可得到一PDMS流道結構，再以氧電漿將該PDMS流道結構與一片體，如玻片，接合後係成為本發明所揭細胞胞器篩選裝置。此外，為能強化本發明所揭功效，於使用本發明所揭細胞胞器篩選裝置前，係得以一預定濃度之牛血清蛋白處理流道組。

【0032】 再者，為避免該流道組內之空間過大，導致細胞無法破裂，該流道組係被設計為一預定高度，如 $2\mu\text{m}$ 。此外，於本發明所揭細胞胞器篩選裝置之較佳實施例中，係將該篩選流道部與該匯集流道部設計為彼此對稱地分別設於該分流流道部兩端，藉此克服細胞或/及胞器通過流道組後

2016年9月19日

壓力驟降之情形發生，有效地避免大量細胞殘留於流道組內。具體來說，該篩選流道部與該匯集流道部係分別設為階層式流道，彼此間係透過該分流流道部相連通，並且，該篩選流道部之內徑係成倍數遞減，該匯集流道部之內徑係成倍數遞增。舉例來說，該篩選流道部之內徑依序為 $20\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ ，該分流流道部之內徑為 $5\ \mu\text{m}$ ，該匯集流道部之內徑依序為 $10\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 。

【0033】 本發明所謂「細胞胞器」，係為功能上獨立之亞細胞構造，位於細胞內部而以生物膜與細胞中之其他部份分隔。舉例來說，細胞胞器包含有，但不限於，葉綠體、粒線體、高基氏體、溶酶體、過氧化物酶體、核糖體等。

【0034】 本發明所謂「粒線體」，其係為具有雙層膜之細胞胞器。粒線體之大小會隨著細胞代謝速率而有所不同，一般來說，其直徑約為 $0.5\sim 10\ \mu\text{m}$ ，長約 $1.5\sim 3\ \mu\text{m}$ 。

【0035】 本發明所謂「一」、「至少一」，除非另有加以說明者，應包含數值1或1以上。

【0036】 本發明所謂「C2-GFP細胞株」係為綠螢光蛋白標定粒線體之小鼠肌原細胞。

【0037】 本發明所述「HUVEC細胞株」係為初代培養之人類臍靜脈內皮細胞。

【0038】 以下，為能更進一步說明本發明，將茲舉本發明之若干較佳實施例並搭配圖式詳細說明如后。

【0039】 請參閱第二圖及第三圖，於本發明之第一較佳實施例所揭細

胞器篩選裝置 (10)，其係由一片狀本體 (20)、一入口部 (30)、一收集部 (40) 及一流道組 (50) 所組成者，其中：

【0040】 該入口部 (30) 係設於該本體 (20) 側面之一端。

【0041】 該收集部 (40) 係相對於該入口部 (30) 而設於該本體 (20) 側面之另端。

【0042】 該流道組 (50) 係設於該本體 (20) 而連通該入口部 (30) 及該收集部 (40)，包含有：

● 【0043】 一分流流道部 (51)，具有複數條分流流道 (511)，一進流端 (512)，設於各該分流流道 (511) 一端，一出流端 (513)，設於各該分流流道 (511) 之另端。

● 【0044】 一篩選流道部 (52)，具有一第一大徑端 (521)，連通該入口部 (30)，一第一小徑端 (522)，內徑大於各該分流流道 (511) 而連通該進流端 (512)，一第一篩選流道 (523)，以一端連通該第一大徑端 (521)，一第二篩選流道 (524)，內徑小於該第一篩選流道 (523) 之內徑，並以一端與該第一篩選流道 (523) 之另端相連通，且以另端與該第一小徑端 (522) 相連通。

【0045】 一匯集流道部 (53)，係與該篩選流道部 (52) 相對稱而分設於該分流流道部 (51) 兩端，具有一第二大徑端 (531)，連通該收集部 (40)，一第二小徑端 (532)，內徑大於各該分流流道 (511) 而連通該出流端 (513)，一第一匯集流道 (533)，以一端與該第二小徑端 (532) 相連通，另端係往該第二大徑端 (531) 方向延伸一預定長度，一第二匯集流道 (534)，內徑小於該第一匯集流道 (533) 之內徑，並以一端與該第一匯

集流道 (533) 之另端相連通，以另端與該第二大徑端 (531) 相連通。

【0046】 藉由上述構件之組成，當欲分離之胞器為粒線體時，該分流道 (511) 之內徑係約略等同於粒線體之尺寸，如設為  $5\ \mu\text{m}$ ，以容許單個粒線體通過其中。而該篩選流道部 (52) 之內徑係由該第一大徑端 (521) 往該第一小徑端 (522) 依倍數遞減，如該第一篩選流道 (523) 之內徑係設為  $20\ \mu\text{m}$ ，該第二篩選流道 (524) 之內徑係設為  $10\ \mu\text{m}$ 。該匯集流道部 (53) 之內徑則由該第二小徑端 (532) 往該第二大徑端 (531) 依倍數遞增，如該第一匯集流道 (533) 之內徑係設為  $10\ \mu\text{m}$ ，該第二匯集流道 (534) 之內徑係設為  $20\ \mu\text{m}$ 。

【0047】 藉由該流道組之對稱設計，係能使細胞通過流道組後之壓力維持一穩定狀態，避免細胞殘留於該流道組內之情形發生。再者，由於該流道組之內徑設計為  $20\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ ，高度設計為  $1\sim 5\ \mu\text{m}$ ，可使細胞液持續地由入口部往收集部移動，使分離出之粒線體被匯集於該收集部，並且，避免流道組內空間過大，以確保細胞能夠受到各流道之兩壁推抵而破裂釋放出胞器。據此，本發明所揭細胞篩選平台係能有效率地自大量細胞中分離出一預定胞器，且不破壞該胞器之活性。

【0048】 請參閱第四圖，本發明之第二較佳實施例所揭細胞胞器篩選裝置 (10') 之組成係大致相同於本發明之第一較佳實施例所揭者，惟，不同者在於，該篩選流道部 (52') 更包含有一第三篩選流道 (525')、第四篩選流道 (526') 及第五篩選流道 (527') 設於該第二篩選流道 (524') 及該第一小徑端 (522') 之間，並且，該第三篩選流道 (525') 至該第五篩選流道 (527') 之內徑係依序成倍數遞減。而對應地，該匯集流道部 (53') 更

包含有一第三匯集流道(535')、第四匯集流道(536')及第五匯集流道(537')設於該第一匯集流道(533')及該第二小徑端(532')之間，並且，該第三匯集流道(535')至該第五匯集流道(537')之內徑係依序成倍數遞增。

【0049】 舉例來說，當欲分離之胞器為粒線體時，該分流流道之內徑係設計為 $5\ \mu\text{m}$ ，該第一篩選流道至該第六篩選流道之內徑係依序設為 $320$ 、 $160$ 、 $80$ 、 $40$ 、 $20$ 、 $10\ \mu\text{m}$ ，而該第一匯集流道至該第六匯集流道之內徑則依序設為 $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $80$ 、 $160$ 、 $320\ \mu\text{m}$ 。

● 【0050】 據此，本發明所揭細胞胞器篩選裝置不僅能夠處理更大量之細胞液，增加分離胞器之效率，亦能達成本發明之功效。

【0051】 請再參閱第五圖及第六圖，本發明之第三較佳實施例所揭細胞胞器篩選裝置(10")係由一圓形本體(20")、一入口部(30")、複數個收集部(40")及複數個流道組(50")及一驅動部(圖中未示)所組成者，其中：

● 【0052】 該驅動部係連接該本體(20")，用以提供一外力，俾使該本體(20")旋轉作動。

【0053】 該入口部(30")係設於該本體(20")之中央部位。

【0054】 該收集部(40")係彼此相間隔一預定距離而環設於該本體周側。

【0055】 各該流道組(50")係設於該本體(20")而沿著該入口部(30")周緣呈輻射狀排列，包含有：

【0056】 一分流流道部(51")，具有複數條分流流道(511")，一進流端(512")，設於各該分流流道(511")一端，一出流端(513")，設於

各該分流流道 (511") 之另端。

【0057】 一篩選流道部 (52")，具有一第一大徑端 (521")，連通該入口部，一第一小徑端 (522")，連通該進流端 (512")。

【0058】 一匯集流道部 (53")，具有一匯集流道 (538")，與相鄰流道組之該匯集流道 (538") 相連通，一第二大徑端 (531")，設於該匯集流道 (538") 一側，連通該收集部 (40")，一第二小徑端 (532")，設於該匯集流道 (538") 另一側，連通該出流端 (513")。

● 【0059】 根據上述構件之組成，藉由該驅動部提供一外力予該本體 (20")，使該本體 (20") 旋轉，並且透過離心力將於該入口部 (30") 之細胞推向各該流道組 (50")，流動至該收集部 (40")。此外，為能使分離出之胞器易於取出，更得將該收集部 (40") 連接一離心管 (60")，使胞器能夠匯集至該收集部 (40")，而被收集至該離心管 (60") 中。據此，能夠有效地提高本發明所揭細胞胞器篩選裝置之分離及篩選胞器之效率，亦能達成本發明之功效。

● 【0060】 以下，為能證實本發明所揭細胞胞器篩選裝置確實能夠大量自細胞中分離出具有活性、純度高之粒線體，係透過下列實例做進一步說明如后。

【0061】 實例一：製作細胞胞器篩選裝置

【0062】 將矽晶片 (Silicon wafer) 置於超音波震洗機，以有機溶劑進行清洗，再以旋轉塗佈機於該矽晶片上塗佈約  $2\ \mu\text{m}$  之光阻後，以UV進行曝光以定義結構。而後，以顯影液清洗未交聯之光阻，並且烘乾備用。

【0063】 以主劑比交聯劑為10：1 (v/v) 之比例調製聚二甲基矽氧烷

溶液。將該聚二甲基矽氧烷溶液澆鑄於已定義結構之該矽晶片，置於100°C烘箱內，以使其固化後脫模。再以氧電漿對玻璃與聚二甲基矽氧烷表面進行改質而彼此接合，獲得本發明所揭細胞胞器篩選裝置，其中，該流道組係如第七圖所示。

**【0064】 實例二：細胞培養**

**【0065】** 自彰化基督教醫院取得C2-GFP細胞株及HUVEC細胞株作為粒線體純化之來源。將C2-GFP細胞株以含10%胎牛血清及1%抗真菌抗生素（antibiotic-antimycotic）之高葡萄糖DMEM培養基，於37°C、5%二氧化碳培養箱中培養，其中，培養基每兩天更換一次。培養至細胞密度達80%時，則得供後續實例使用。

**【0066】 實例三：分析細胞液濃度**

**【0067】** 將C2-GFP細胞液之濃度分別調配為 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $10^5$ 、 $50 \times 10^5$ 、 $100 \times 10^5$  cells/ml，再分別以本發明所揭細胞胞器篩選裝置分離粒線體，並且，分別收集1毫升之粒線體。將分別收集之粒線體以3000 rpm離心，以去除其內之細胞碎片，再以12000 rpm離心去除其他剩餘胞器，以純化出粒線體。而後，將已純化之各該粒線體蛋白溶液10 $\mu$ L以蛋白質分析套組（Bio-rad，台灣）進行定量，結果如下表一所示。

**【0068】 表一：不同細胞濃度所分離出之粒線體濃度**

細胞濃度 ( $10^4$ cells/ml)	粒線體濃度 ( $\mu$ g/ml)
100	647.44
70	651.88
60	676.33
50	614.11
40	561.88



30	609.66
20	656.33
10	611.88
5	714.11

【0069】 由上表一之結果可知，本發明所揭細胞胞器篩選裝置確實能夠自大量細胞中分離出純度高之粒線體，其中，又以細胞液濃度為 $5 \times 10^4$  cells/ml 具有較佳之分離效率。

【0070】 實例四：粒線體活性分析

【0071】 取C2-GFP細胞液分組並以不同條件分離粒線體，其中，第一組係以蛋白質萃取液（protein lysis buffer）自細胞分離出之粒線體；第二組係以本發明所揭細胞胞器篩選裝置自細胞分離出之粒線體；第三組係以粒線體分離套組（Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, Thermo Fisher Scientific Inc., USA）自彰化基督教醫院提供之C2-GFP細胞液中分離出之粒線體。將各組以蛋白質電泳分析與粒線體活性相關之蛋白質，結果如第八圖所示。而此所謂之蛋白質電泳分析乃為本發明所屬技術領域且具通常知識者所周知之技術，故於此不再贅述。

【0072】 於本實例中係以 ODYSSEY infrared imaging system (LI-COR, Inc., U.S.A.) 進行成像，一級抗體分別為老鼠抗Tom 20抗體 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc., U.S.A.)，其中，Tom 20粒線體之標幟物，用以測定粒線體含量；兔抗複合物IV抗體 (rabbit anti-complex I-V antibody, Abcam plc., U.K.)，其中，複合物IV為粒線體內膜上電子傳遞鍊相關之穿膜蛋白，用於測定粒線體活性；二級抗體分別為：標定IRDye 800之山羊抗老鼠 IgG 抗體及標定IRDye 800山羊抗兔IgG抗體 (Rockland Immunochemicals Inc., P.A.)。

【0073】 由第八圖之結果可知，雖然市售套組及蛋白質萃取液能夠自細胞中分離出粒線體，惟，相較於本發明所揭細胞胞器篩選裝置所取得之粒線體，市售套組及蛋白質萃取液之純度不僅較低，並且幾乎未表現與粒線體相關活性之蛋白質。由此可知，本發明所揭細胞胞器篩選裝置係能夠有效地自細胞中分離出純度高且具活性之粒線體。

【0074】 以上僅是藉由各該實例詳細說明本發明，熟知該技術領域者於不脫離本發明精神下，而對於說明書中之實施例所做的任何簡單修改或是變化，均應為本案申請專利範圍所得涵攝者。

#### 【0075】 參考文獻

A. Corcelli, M.S. Saponetti, P. Zaccagnino, P. Lopalco, M. Mastrodonato, G.E. Liquori, M. Lorusso, Mitochondria isolated in nearly isotonic KCl buffer: Focus on cardiolipin and organelle morphology. *Biochim Biophys Acta*. 1798(3), 681-687, 2010.

V.S. Gross, H.K. Greenberg, S.V. Baranov, G.M. Carlson, I.G. Stavrovskaya, A.V. Lazarev, B.S. Kristal, Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization, *Analytical Biochemistry*. 418(2), 213–223, 2011.

H.T. Hornig-Do, G. Günther, M. Bust, P. Lehnartz, A. Bosio, R.J. Wiesner, Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads, *Analytical Biochemistry*. 389(1), 1–5, 2009.

P. Kim, K.W. Kwon, M.C. Park, S.H. Lee, S.M. Kim, and K.Y. Suh, Soft Lithography for Microfluidics: a Review. *Biochip Journal*. 2(1), 1-11,

2008.

D. Qin, Y. Xia, and G.M. Whitesides, Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. Nature protocols. 5(3), 491-502, 2010.

## 【符號說明】

## 【0076】

- |                            |                     |
|----------------------------|---------------------|
| (1) 自細胞分離粒線體之裝置            | (2) 載片              |
| (3) 進口                     | (4) 出口              |
| (5) 第一流道                   | (6) 第二流道            |
| (10) (10') (10'') 細胞胞器篩選裝置 |                     |
| (20) (20'') 片狀本體           | (30) (30'') 入口部     |
| (40) (40'') 收集部            | (50) (50'') 該流道組    |
| (51) (51'') 分流流道部          | (511) (511'') 分流流道  |
| (512) (512'') 進流端          | (513) (513'') 出流端   |
| (52) (52') (52'') 篩選流道部    | (521) (521'') 第一大徑端 |
| (522) (522') (522'') 第一小徑端 | (523) 第一篩選流道        |
| (524) (524') 第二篩選流道        | (525') 第三篩選流道       |
| (526') 第四篩選流道              | (527') 第五篩選流道       |
| (53) (53') (53'') 匯集流道部    | (531) (531'') 第二大徑端 |
| (532) (532') (532'') 第二小徑端 | (533) (533') 第一匯集流道 |
| (535') 第三匯集流道              | (536') 第四匯集流道       |
| (537') 第五匯集流道              | (538'') 匯集流道        |

## 公告本

## 申請專利範圍

2016年9月19日

105年9月19日修正本

1. 一種細胞胞器篩選裝置，其係包含有：
  - 一本體；
  - 一入口部，設於該本體；
  - 一收集部，與該入口部相距一預定距離而設於該本體；
  - 一流道組，設於該本體而連通該入口部及該收集部；其中，其特徵係在於該流道組更包含有：
  - 一分流流道部，具有至少一分流流道，其內徑係為  $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ ，一進流端，設於該分流流道一端，一出流端，設於該分流流道之另端；
  - 一篩選流道部，係設於該分流流道部之進流端，具有一第一大徑端，連通該入口部，一第一小徑端，連通至少二分流流道之進流端；
  - 一匯集流道部，係對稱於該篩選流道部而設於該分流流道部之出流端，具有一匯集流道，其一端為一第二小徑端，內徑大於各該分流流道之內徑而與至少二分流流道之出流端相連通，並且其另一端為一第二大徑端，連通該收集部；其中：
  - 該篩選流道部之內徑係由該第一大徑端至該第一小徑端依倍數遞減；
  - 該匯集流道部之內徑係由該第二小徑端至該第二大徑端依倍數遞增。
2. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其中，該第一小徑端之內徑大於各該分流流道之內徑。
3. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其更包含一驅動部，連接該本體，用以提供一外力，使一物質由該入口部往該收集

部移動。

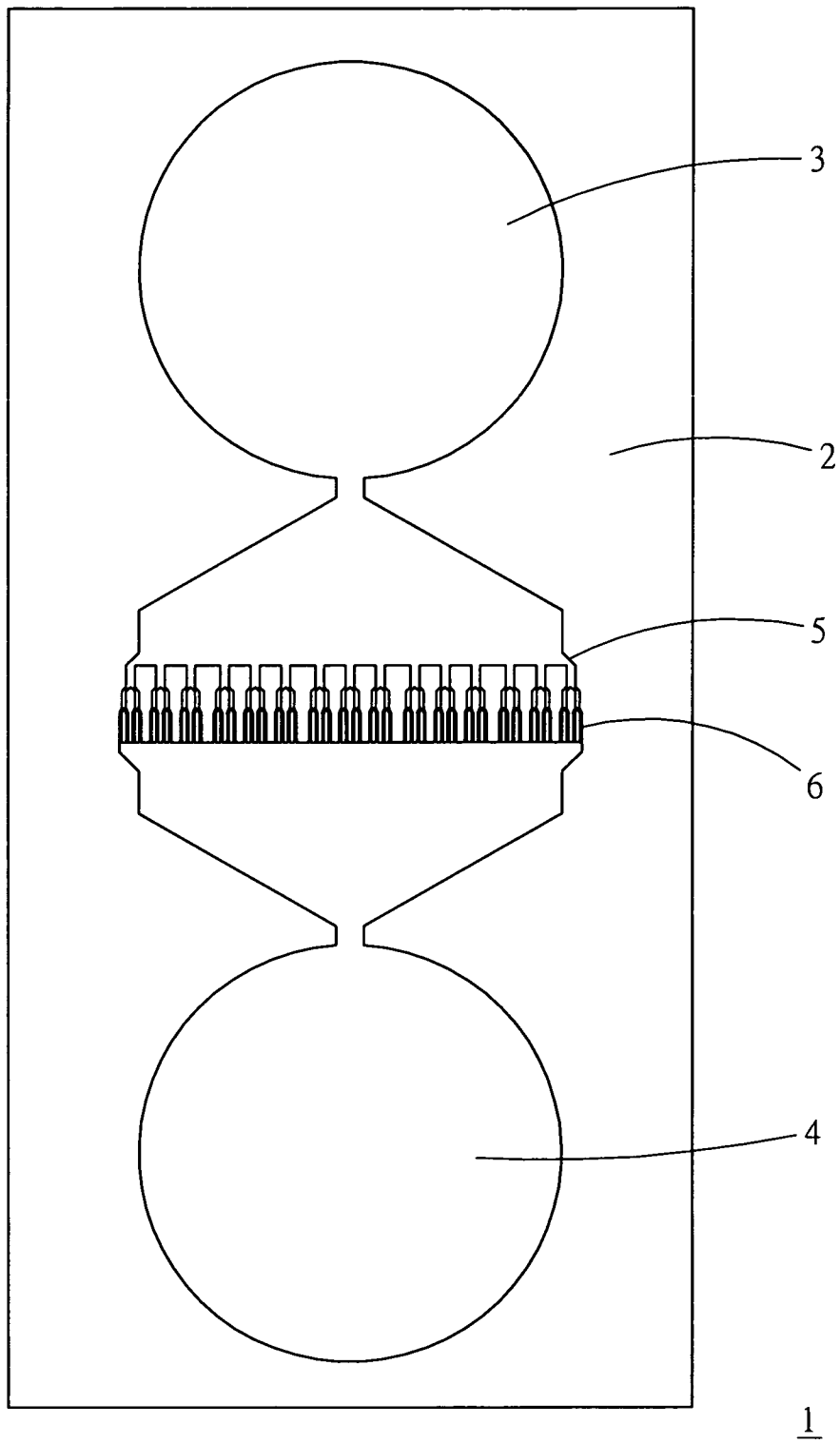
4. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其中，該篩選流道部係包含有一第一篩選流道，以一端連通該第一大徑端，而以另一端往該第一小徑端方向延伸一預定長度，一第二篩選流道，內徑小於該第一篩選流道之內徑，設於該第一篩選流道及該第一小徑端之間。
5. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其中，該匯集流道部係包含有一第一匯集流道，以一端連通該第二小徑端，而以另一端往該第二大徑端方向延伸一預定長度，一第二匯集流道，內徑大於該第一匯集流道之內徑，設於該第一匯集流道及該第二大徑端之間。
6. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其中，該入口部係設於該本體側面之一端，該收集部係相對於該入口部而設於該本體側面之另一端。
7. 依據申請專利範圍第 1 項所述細胞胞器篩選裝置，其中，該入口部係設於該本體一側之中間部位，該收集部係環設於該本體一側之邊緣。
8. 一種採集細胞胞器之方法，其包含下列步驟：
  - a. 取如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項所述細胞胞器篩選裝置；
  - b. 將一細胞液放入該細胞胞器篩選裝置之該入口部，使該細胞液流經該流道組，其中，該篩選流道部擠壓其內之細胞，使細胞膜破裂，釋放出胞器，進而從中篩選出一目標胞器，並且，該目標標

2016年9月19日

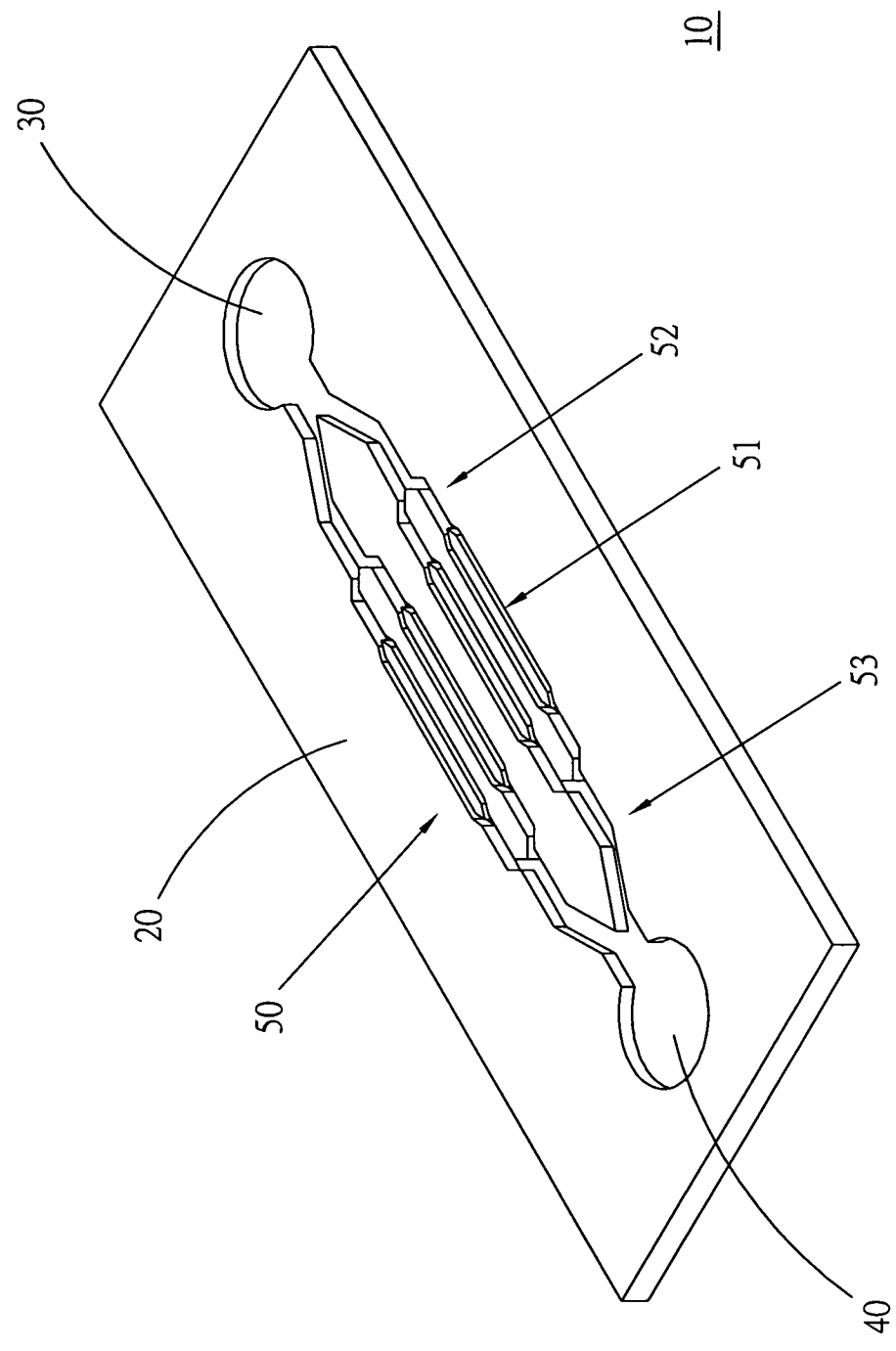
器流經該分流流道部及該匯集流道部，到達該收集部；

- c. 自該收集部中獲得該目標胞器。
9. 依據申請專利範圍第 8 項所述採集細胞胞器之方法，其中，該目標胞器係為粒線體。

圖式

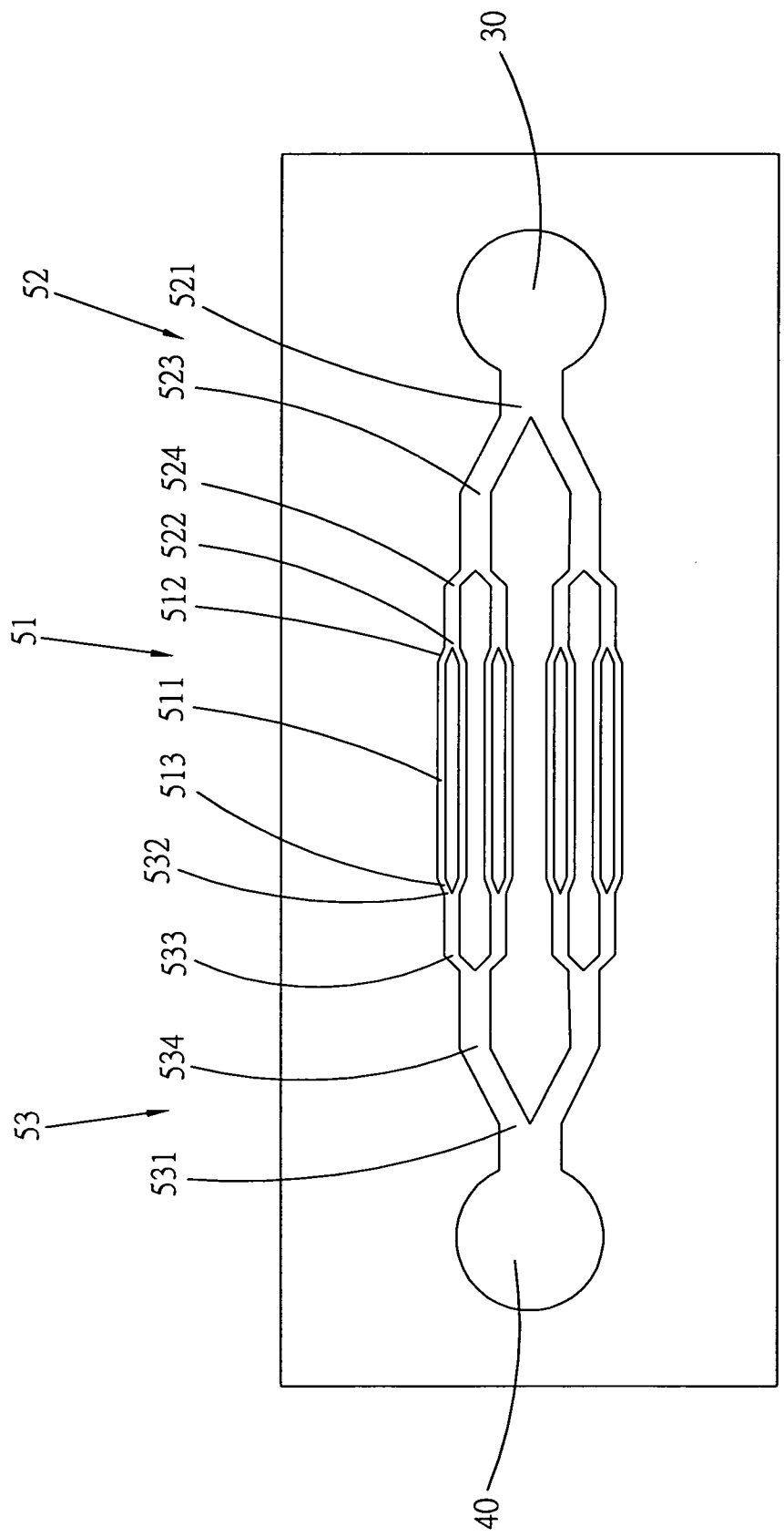


第一圖



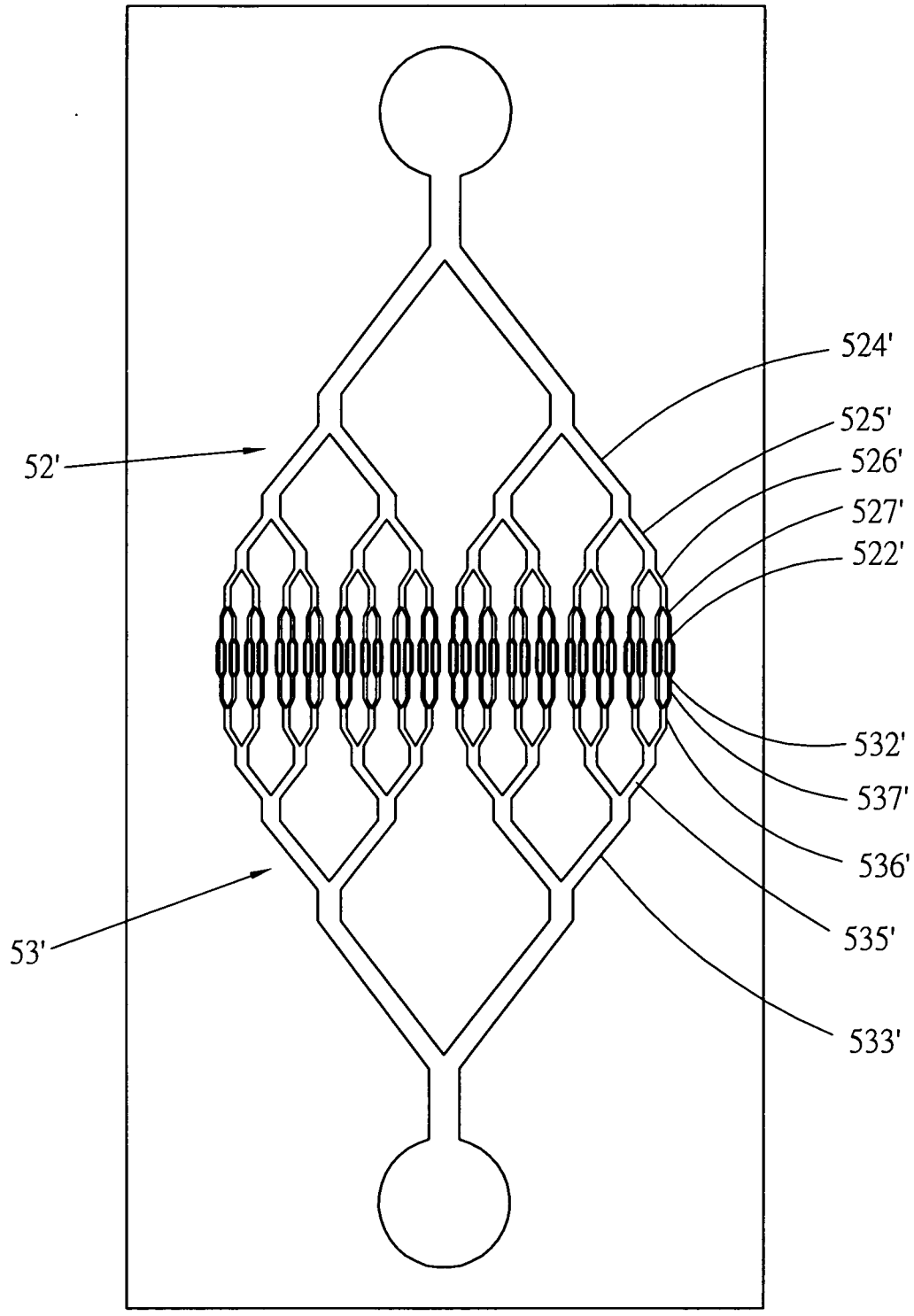
第二圖





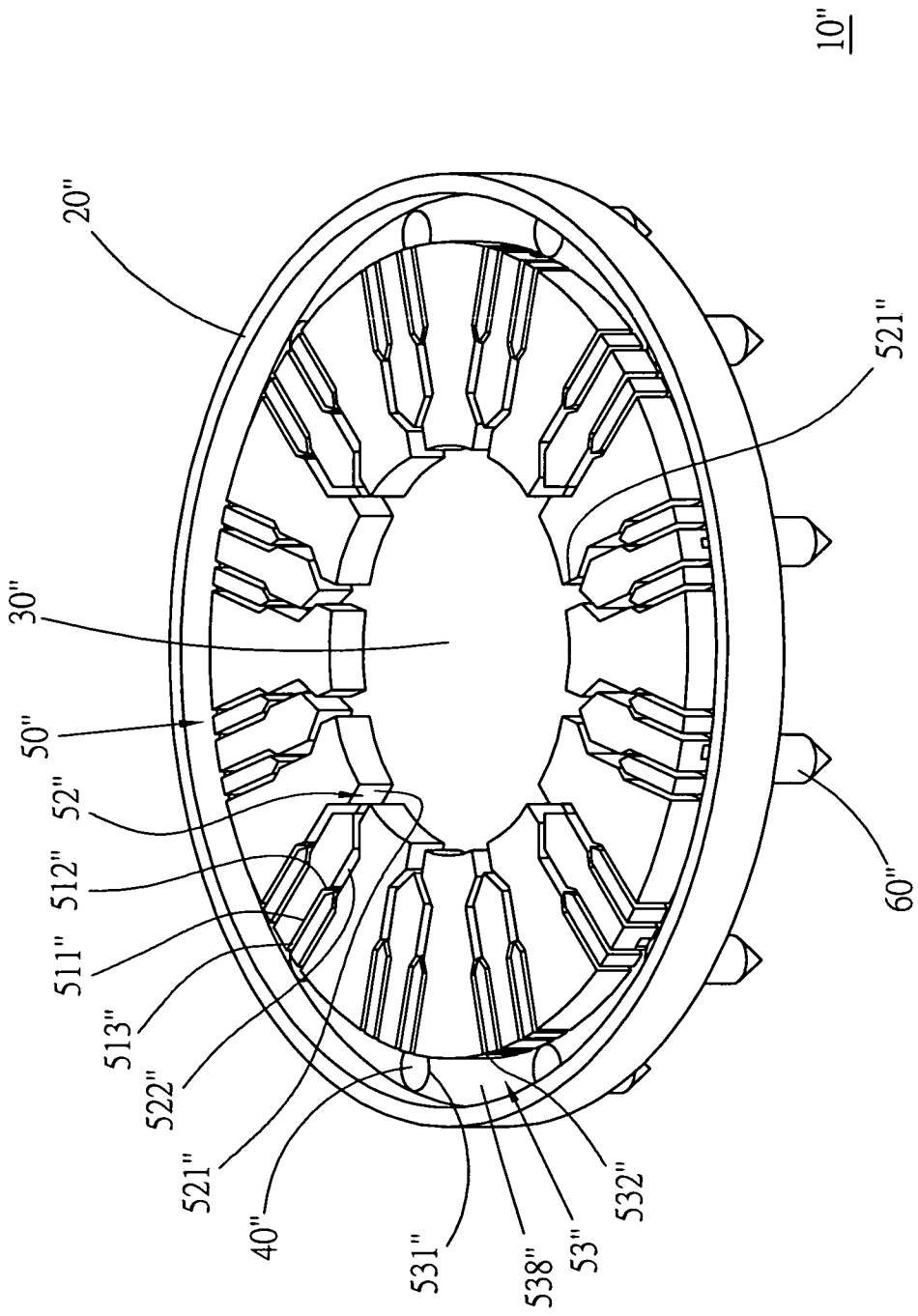
10

第三圖

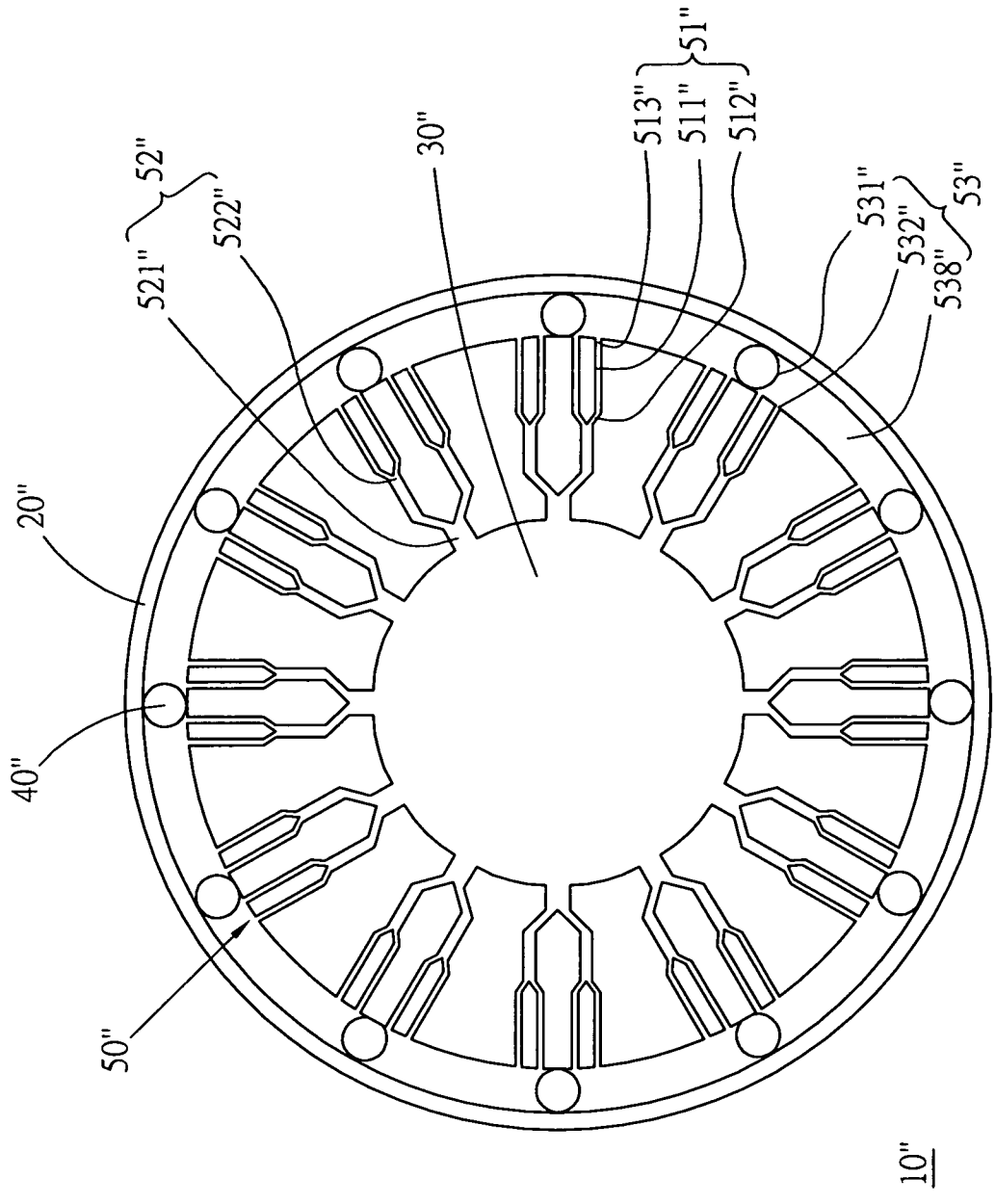


10'

第四圖



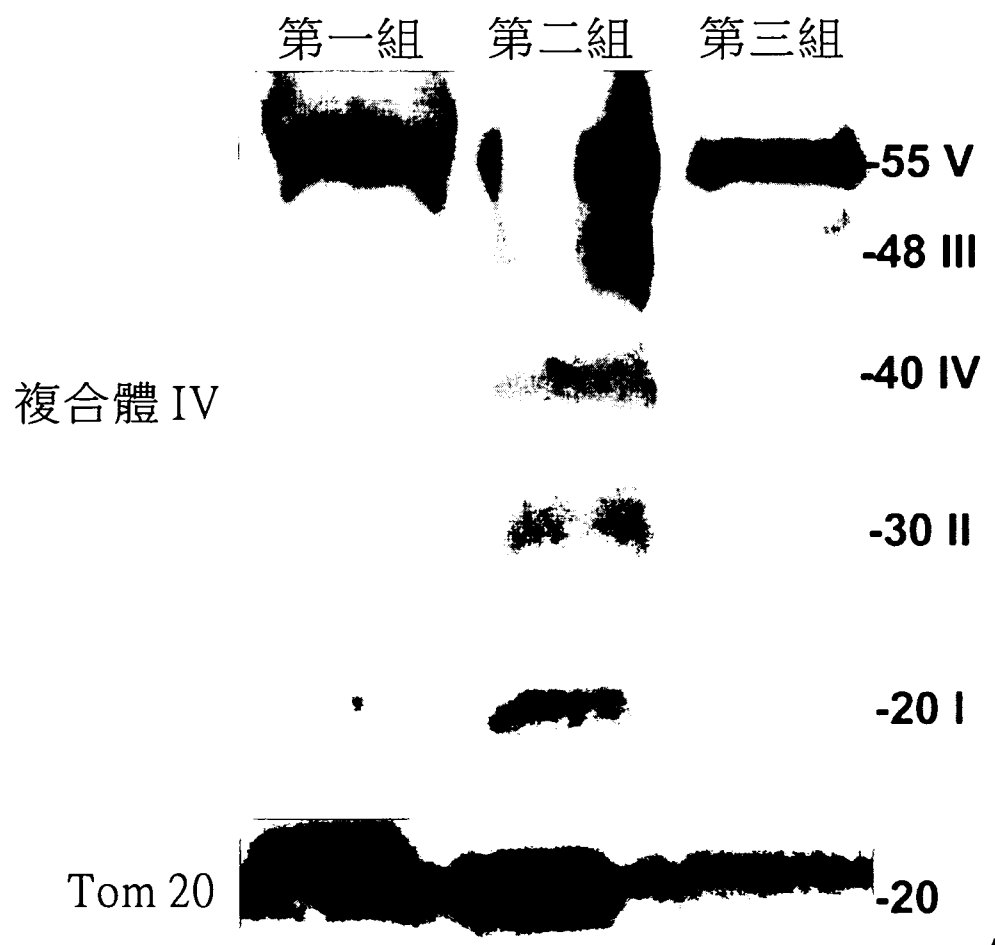
第五圖



第六圖



第七圖



第八圖