



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116042396 A

(43) 申请公布日 2023.05.02

(21) 申请号 202310042260.4

(22) 申请日 2023.01.28

(71) 申请人 北京大学

地址 100089 北京市海淀区颐和园路5号

(72) 发明人 韩奎 黄岩谊 蒋永诚 马鸿浩

(74) 专利代理机构 北京格汇专利代理事务所

(特殊普通合伙) 16088

专利代理师 张伟洋

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 3/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

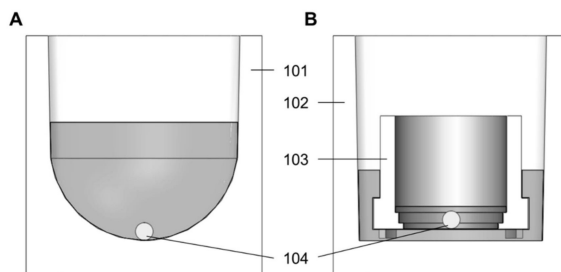
权利要求书1页 说明书11页 附图8页

(54) 发明名称

一种类器官自动化跨膜培养装置

(57) 摘要

本发明提供了一种类器官自动化跨膜培养装置,包括高通量自动化灌流模块、多通道换液模块、可移动夹层模块;其适用于商业化的多孔细胞培养板。实现了跨膜培养模式的自动化。该自动化培养流程适用于一定时长的类器官培养,换液过程不涉及微环境的人为扰动和劳动力投入。



1. 一种类器官自动化跨膜培养装置,其特征在於,包括高通量自动化灌流模块、多通道换液模块、可移动夹层模块;其中所述高通量自动化灌流模块包括试剂分流管路以及多通道阀,用于添加和/或移除培养液;多通道换液模块用于连接高通量自动化灌流模块以及细胞培养孔板;所述多通道换液模块包括管线支架以及针状结构;所述针状结构伸入细胞培养孔板的培养孔中;可移动夹层模块用于固定细胞培养孔板和跨膜器件,并在换液过程中控制两者的垂直距离。

2. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,还包括内插分割模块,用于拆分跨膜器件内侧的空间,实现在跨膜部件底部的半透膜上放置多个类器官细胞团的效果。

3. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,其中所述的细胞培养孔板多指的是康宁(Corning Costar)的平底组织培养多孔板。

4. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,其中所述跨膜器件多指默克密理博(Merck Millipore)的悬挂式杯状培养小室。

5. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,所述高通量自动化灌流模块由单个试剂分流管路和三个多通道阀-培养孔-多通道阀-注射器平行组组成,可分别通过正压、负压驱动的方式添加和移除培养腔室的液体。

6. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,所述多通道换液模块包括Y型三通、接头、管线支架与其针状结构;其中,Y型三通管路与自动化灌流模块的灌流管线相连接,接头将前者固定在管线支架平面的上表面,下方的针状结构则由培养腔室一侧下探到接近孔底部的位置。

7. 根据权利要求1所述的培养装置,其特征在於,所述可移动夹层模块包括跨膜器件夹具、电机齿轮组、左右侧扇叶、孔板底座和装置底座;所述细胞培养孔板放置于孔板底座之上,跨膜器件夹具用以固定多个跨膜器件,并在电机齿轮组和左右侧扇叶的联合驱动下发生垂直方向的移动,实现半透膜和培养孔底部距离的改变。

8. 根据权利要求7所述的培养装置,其特征在於,还包括内插分割模块,其可以拆分跨膜器件内侧的空间。

## 一种类器官自动化跨膜培养装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种类器官自动化跨膜培养装置,属于生物医药工程领域。

### 背景技术

[0002] 类器官是具有自组织特性的体外三维多细胞结构,在细胞类型或组织功能层次上和活体器官共享一定程度的相似性。受益于干细胞技术的发展,研究者们得以扩增、诱导分化合适的细胞型,在体外建立模仿真实生物过程的三维类器官模型,并应用于发育、疾病等课题。如Qian等人构建了前脑类器官,复现了放射状胶质细胞层结构。他们用寨卡病毒感染该类器官,观察到疑似病毒特异性感染造成的小头畸形。另外,Drost等人 and Matano 等人的独立工作利用CRISPR/CAS9在结肠类器官中引入连续突变,重现了腺瘤癌化为腺癌的过程。目前,领域内已经建立了胰腺、肾、肝、肺、心脏、胸腺、血管、脑等类器官模型。相对于模式生物,类器官体外系统有潜力具备较高的同源性和可操作性,能为生物医学研究打开一个更为复杂且弹性的技术窗口。类器官的生长受外源和内源信号影响,如何在分化早期构建一个稳定的物理结构和化学微环境是领域的核心技术问题。微环境稳定性和靶向性不仅依赖于仿生生物材料的开发和小分子诱导试剂的优化,也仰赖生物工程学方法的创新。常见的技术突破点如三维聚团方法能致使细胞聚集成大小合适的三维结构,提供必要的结构支持;微构型(micropatterning)、微流道(microfluidics)等技术透过精准控制流体是空间差异分布来引导组织发生不对称分化;高通量自动化器件整合样本诱导、培养、读出等模块,提升实验的效率和通量。如何以工程化的思维提升类器官培养和分析的产出一直都是领域的着重点之一。

[0003] 类器官技术在细胞团聚球和长期培养两方面均存在问题。细胞团聚球方面主要存在通量、平行性等问题。如微腔室、液滴等方法,仅能实现数百微米量级系细胞的聚团,不利于生成毫米尺度的类器官;胶体镶嵌方法难以控制起始细胞量,批次差异大;胶体镶嵌、三维打印等方法需仰赖基底胶(又名Matrigel,一种商用的、从小鼠肉瘤种提纯的细胞外基质)作为基底/墨水,其复杂且不均匀的化学组成可能影响实验的可重复性和平行性。此外,在长期培养方面,也具有微环境扰动、过度仰赖人力、器件不利于时序分析等主要矛盾。类器官分化仰赖小分子梯度和物理环境因素的共同作用。目前的类器官培养方法中,其微环境非常容易引入不必要的扰动,比如更换培养基过程中温度,湿度,养分等的突然改变,流体导致类器官位置的变化等,都会导致最终类器官培养可重复性和平行性的缺失。同时,类器官的高通量培养过度仰赖人力,特别是周期性的换液过程。类器官的培养周期依据种类而异,短如心脏类器官能在10天内出现可观测的表型,长如肺类器官需60天、脑类器官需上百天才能日趋成熟。甚者,受限于工程器件本身的设计原理和实验通量,类器官研究经常缺乏三维形态学特征和时序基因表达谱鉴定。受到这些方法学难点的启发,本发明旨在提供解决上述问题的可能方案。

## 发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明提供了一种类器官自动化跨膜培养装置,其特征在于包括高通量自动化灌流模块、多通道换液模块、可移动夹层模块;其中所述高通量自动化灌流模块包括试剂分流管路以及多通道阀,用于添加和/或移除培养液;多通道换液模块用于连接高通量自动化灌流模块以及细胞培养孔板;所述多通道换液模块包括管线支架以及针状结构;所述针状结构伸入细胞培养孔板的培养孔中;可移动夹层模块用于固定细胞培养孔板和跨膜器件,并在换液过程中控制两者的垂直距离。

[0005] 根据优选的实施方式,还包括内插分割模块,用于拆分跨膜器件内侧的空间,实现在跨膜部件底部的半透膜上放置多个类器官细胞团的效果。

[0006] 根据优选的实施方式,其中所述的细胞培养孔板多指的是康宁(Corning Costar)的平底组织培养多孔板。

[0007] 根据优选的实施方式,其中所述跨膜器件多指默克密理博(Merck Millipore)的悬挂式杯状培养小室(聚四氟乙烯疏水膜,直径12毫米,孔径0.4微米)。平底下方为一层半透膜,可放置于24孔板的培养孔中。培养孔和跨膜器件之间的腔室称为培养腔室。

[0008] 根据优选的实施方式,所述高通量自动化灌流模块由单个试剂分流管路和三个多通道阀-培养孔-多通道阀-注射器平行组组成。可分别通过正压、负压驱动的方式添加和移除培养腔室的液体。

[0009] 根据优选的实施方式,所述多通道换液模块包括Y型三通、接头、管线支架与其针状结构;其中,Y型三通管路与自动化灌流模块的灌流管线相连接,接头将前者固定在管线支架平面的上表面,下方的针状结构则由培养腔室一侧下探到接近孔底部的位置。

[0010] 根据优选的实施方式,所述可移动夹层模块包括跨膜器件夹具、电机齿轮组、左右侧扇叶、孔板底座和装置底座。细胞培养孔板放置于孔板底座之上,跨膜器件夹具用以固定多个跨膜器件,并在电机齿轮组和左右侧扇叶的联合驱动下发生垂直方向的移动,实现半透膜和培养孔底部距离的改变。此过程有助于自动化灌流流程的稳定性和可重复性。

[0011] 此装置也涵盖数个选用的零部件。根据优选的实施方式,内插分割模块可以拆分跨膜器件内侧的空间,实现在跨膜部件底部的半透膜上放置多个类器官细胞团的效果。

[0012] 总结而言,本发明涉及一种自动化培养装置,基于跨膜培养模式,用于类器官培养,其特点在于:通过整合自主研发的器件、商用设备和生医耗材,有效地结合了U型孔三维聚团和跨膜培养方法,克服了数个类器官实验技术遭遇的方法学难题,实现了跨膜培养模式的自动化。该自动化培养流程适用于一定时长的类器官培养,换液过程不涉及微环境的人为扰动和劳动力投入,实现了高平行性的批量三维聚团、稳定的微环境的生成和非人工介入的半封闭长期培养。鉴于跨膜培养体系的高自由度,此自动化装置可用于多种类器官或生物样本的长期实验,且自动化跨膜培养类器官具有和一般培养模式相似的表型和组学特征。

## 附图说明

[0013] 以下结合附图及具体实施方式对本发明作进一步的详细描述。

[0014] 图1.U型孔高通量三维聚团和跨膜培养装置示意图;

[0015] 图2.类器官自动化跨膜培养装置和U型孔聚团-自动化跨膜培养流程;

[0016] 图3.高通量自动化灌流模块的示意图；

[0017] 图4.多通道换液模块精细装配图；

[0018] 图5.可移动夹层模块的精细装配图；

[0019] 图6.可移动夹层模块的设计示意图；

[0020] 图7.内插分割模块示意图；

[0021] 图8.基于6孔板的高通量跨膜培养装置；

[0022] 图9.自动化跨膜培养装置用于心脏类器官分化；

[0023] 图10.心脏类器官不同实验组的生物学重复；

[0024] 图11.心脏类器官的免疫荧光染色图像。

[0025] 其中,图1、U型孔高通量三维聚团和跨膜培养装置示意图。101为商用U型底96孔板,主要材料为聚苯乙烯(PS)。102为商用平底24孔板,材料同为聚苯乙烯。103为商用细胞跨膜培养插件,外观类似一透明无柄水杯。插件底部有一半透膜。半透膜依孔径大小和材料种类不同,能适配不同生化实验。本装置选用外径12毫米、孔径0.4 $\mu$ m的亲水聚四氟乙烯膜。104为球状细胞团。(A)U型孔高通量三维聚团。胚胎干细胞在以accutase消化、悬浮后,以指定数量加入PF127前处理过的U型孔。以此种形式进行长期培养,换液时需吸走细胞团周围液体,再加入新培养基。过程中可能将细胞团吹起,造成微环境扰动。(B)跨膜培养装置。跨膜器件嵌套在平底培养孔中,将培养孔划分为内侧和外侧,外侧为培养腔室。球状细胞团被放置于跨膜器件半透膜上,由腔室侧更换培养基,通过扩散进入内侧完成小分子交换。内外侧的生化微环境的初始配置可以有所不同;甚者,半透膜的材料和前处理流程也可以因研究课题而异(如使用胶原蛋白或基底胶前处理)。图中物件比例并非真实物件的比例。

[0026] 图2、类器官自动化跨膜培养装置和U型孔聚团-自动化跨膜培养流程。(A)类器官自动化跨膜培养装置的装配图。201为高通量自动化灌流模块,其中的2011为帝肯(Tecan Cabro Centris)注射器泵,2012为润泽10通道阀,2013为50ml离心管。202为多通道换液模块,203为可移动夹层模块,两个模块安装在204的细胞培养箱中(摄氏37度,5%二氧化碳)。高通量自动化灌流模块放置于培养箱外,搭载在2014所示的光学平台上方,灌流管线从后侧的检测口进到箱体内与多通道换液模块的Y型三通连接。可移动夹层的电线以及其他软性线材可从培养箱门缝隙塞入。(inlet)培养装置的仰视图,图中可见4个独立的培养孔。205的白色圆形区域是尚未浸润的聚四氟乙烯多孔膜,下方206的黑色部件则为铝合金的集成针状接头。接头所在处即为培养腔室,是更换培养基的区域。(B)可移动夹层跨膜器件夹具和孔板底座的局部放大图。可见到底座长边处的可旋转扇叶。(C)多通道换液模块上方聚醚醚酮接头的局部放大图。(D)可移动夹层电机齿轮组的局部放大图。两侧突出的转轴与可旋转扇叶同心,两者之间可以对接在一起。(E)U型孔聚团-自动化跨膜培养流程。相比于典型的U型孔聚团+U型孔培养模式,我们改将细胞团置于跨膜器件半透膜上进行长期培养。此种新的培养模式依赖半透膜内外侧的化学扩散,一方面能减小开盖式换液导致的流体扰动和温度扰动,同时也因借助自动化换液而一定程度解放科研劳动力。

[0027] 图3、高通量自动化灌流模块的示意图。灌流模块由单个试剂分流管路和三个多通道阀-培养孔-多通道阀-注射器平行组组成。301为试剂管,302为多通道阀,303为注射器泵,304为8个一组的培养孔。灌流模块整合了8台多通道阀和4台注射器泵,可进行24个培养孔。灌流管线内的流体走向有三种模式,分别为加入新培养基、移除旧培养基和清洗灌流管

路。通过脚本编程,可实现对液体流动的精准控制。

[0028] 图4、多通道换液模块精细装配图。(A) 模块装配的爆炸图。401为三通塑料管线,402为聚醚醚酮接头,403为铝合金通液管线支架。通液管线支架一共有24个相互独立的针状接头。针状接头由上至下打通,长度恰好可以伸至24孔板培养孔底部,管中央有圆柱管道供液体通过。每个培养孔通过手作的Y型三通管线和两条1.6毫米外径的塑料管线连接,一管进液,另一管抽液。此安排能最大程度避免气泡流入培养孔,同时维持流体方向一致、避免废液与新培养基混合造成污染。图左下角可见支架短边处有打通的圆孔结构。此孔是为了让多通道换液模块和可移动夹层模块的夹具、底座等部件组装完成后能与电机齿轮组对接才这么设计的。(B) 通液管线剖面图。聚醚醚酮接头和管线支架通过10-32螺纹进行固定,铝合金管线中空通道有两段,靠近上方的1.5毫米通道和下方的1.0毫米通道。(C) 聚醚醚酮接头与三通塑料管线的组装关系。将塑料管线插入接头,接头沿着铝合金支架的螺纹柱死即能很好地固定通液管线。三通是手作的,具体是用两根弯折的钢针放入塑料软管中,用环氧树脂黏着剂固定、75%酒精和磷酸盐缓冲溶液依序清洗后即可使用。

[0029] 图5、可移动夹层模块的精细装配图。(A) 模块各部件的组装关系。501为跨膜器件夹具,502为电机齿轮组,503为左右侧扇叶,504为孔板底座,505为装置底座。孔板底座固定在装置底座上,其中扇叶咬合在底座长边处的缝隙中。跨膜器件夹具上下打通,可固定24个12毫米直径的跨膜培养插件。电机齿轮组可沿着装置底座一旁的滑轨前后移动。(B) 电机齿轮组装配图。齿轮组由5021所示的28BYG二相混合型步进电机驱动5022的同步带、大/小同步轮(48齿/20齿)和5023的阶梯齿轮(20齿)。传动链最终会导致5024所示的两侧转轴以“电机:转轴=2.4:1”的转速转动。(C) 两侧扇叶装配图。扇叶分为两部分,一部分是如5031所示的带有扇叶的长转轴,另一部分为5032的短桶装对接原件。两者连接处套有7毫米直径的小塑料轴承。(D) 孔板底座装配图。孔板底座为易组装的层状结构,能固定跨膜器件夹具、跨膜培养插件、左右侧扇叶和商用24孔板。由上而下分别为5041的上底座、5042的下底座、5043的24孔板和5044的24孔板固定件。上下底座之间以及固定件和底座之间都可以由M2.5螺丝进行固定。左右两侧的扇叶首先放置于下底座长边的凹槽中,而后盖上上底座,锁上螺丝后即完成装配。

[0030] 图6、可移动夹层模块的设计示意图。(A) 装置简化图。可移动夹层模块包含602、603和604标识的三部分,位于601的通液管线支架下方。为了方便解释设计思路,此处简化了跨膜器件夹具的具体结构,并隐藏了电机齿轮组、左右侧扇叶、孔板底座、装置底座等部件。(B) 电机齿轮组控制跨膜器件与孔板底部的相对距离,使之选择性浸润培养基。非换液时段,跨膜培养插件充分浸润在外侧大体积培养基中,进行化学扩散,维持内侧细胞团的养分供应;换液时,为避免发生废液扩散、液体残留和气泡堵塞等事件,电机齿轮单元驱动将跨膜器件夹具连着跨膜培养插件上移远离外侧培养基,待培养腔室内的液体更换完后再进行复位。

[0031] 图7、内插分割模块示意图。(A) 内插聚醚醚酮分割件可将半透膜内侧划为7个直径2毫米的小培养单位。(inlet)干细胞团置于其中一个培养单位中。(B) 分割插件放置于跨膜器件中的侧视图。比例尺=500微米。

[0032] 图8、基于6孔板的高通量跨膜培养装置。(A) 爆炸视图。(B) 灌流路径的切面图。(C) 可拆卸跨膜器件夹具和通液管线之间的不同配置选择。

[0033] 图9、自动化跨膜培养装置用于心脏类器官分化。(A) 心脏类器官的U型孔聚团-自动化跨膜培养流程图。获得胚胎干细胞团后,透过依序激活、抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,可诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化。(B) 细胞团第0天放置于半透膜上;比例尺=500微米。(C) U型孔聚团-自动化跨膜培养的心脏类器官。左一为原位图像,左二为细胞团转移到U型孔内以磷酸盐缓冲溶液清洗后的样子。左三则为内插分割件多细胞团培养第8天的原位图像。比例尺=500微米。

[0034] 图10、心脏类器官不同实验组的生物学重复。(A) 第0天,边界清洗的胚胎干细胞团。(B) U型孔聚团-U型孔培养的第8天心脏类器官。(C) (D) U型孔聚团-自动化跨膜培养的第8天心脏类器官,分别为单细胞团分化和多细胞团分化。以图像中心为圆心的黑色阴影为半透膜内插分割件的2毫米直径腔室轮廓。比例尺=500微米。

[0035] 图11、心脏类器官的免疫荧光染色图像。泡状结构和心肌特异性蛋白cTnT和NKX2-5共定位,说明自动化跨膜培养的心脏类器官能反映心脏发育过程。

### 具体实施方式

[0036] 除非另有定义,否则本文使用的所有科技术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0037] 本发明中,所涉及的位置相关的词语,例如“上”“下”“左”“右”“垂直”“水平”“X方向”“Y方向”“前”“后”“高”“低”“内”“外”表述的是相对的位置关系,并不代表具体的位置。本领域技术人员可以理解的,当调整整个装置的方向的时候,所有的位置关系都会发生相应的变化。

[0038] 本发明开发了类器官自动化跨膜培养装置,并基于该装置的特点,设计了“U型孔聚团-自动化跨膜培养”的培养流程。如图1(A)所示,U型孔高通量三维聚团是一种规范化高通量细胞团生成手段,能用于一次性生成大量尺寸一致的三维细胞团。如图1(B)所示,跨膜培养装置是一种悬挂式细胞实验体系,培养孔内部嵌套的杯状跨膜器件(transwell insert)能将培养孔划分为内外两侧环境。以跨膜器件下方的半透膜为分界,研究者可以在膜内侧和外侧分别生成不同的培养微环境。依据不同的膜材料和孔径,在跨膜器件内部培养生物样本,由培养腔室一侧进行换液,能达到减少外界对内侧样本扰动的效果。上述两种培养体系在一般情况下皆为开盖式培养,即更换培养基时,需借助人力将孔板从培养箱中取出,开盖移除旧培养基、加入新鲜培养基。

[0039] 如图2所示,本发明的新装置和流程有机地整合了上述两种模式。具体实验步骤为:U型孔高通量三维聚团:在将胚胎干细胞悬浮计数后于U型孔内聚球。U型孔内部提前进行了Pluronic F-127 (PF127)过夜处理。PF127作为一种长链极性分子,在细胞团聚球过程中能有效避免细胞贴壁、促进三维成团。

[0040] 自动化跨膜培养:待胚胎干细胞聚球后,将细胞团转移到聚四氟乙烯半透膜内侧,透过自动化灌流模块更换膜外侧的培养基。分化所需的小分子养分依赖于内、外侧化学扩散,藉此避免培养微环境被破坏,同时可以提高培养实验的稳定性、平行性和可重复性。此外,新的自动化培养模式可在长周期的类器官培养过程中减少劳动力投入,可进一步用于系统性探究培养实验的鲁棒性和其对下游分析流程的潜在助益。

[0041] (一)主要零部件

[0042] 如图2、图3、图4、图5和图6所示,类器官自动化跨膜培养装置是一套适配商用24孔板的可拆卸装置。实验装置由三部分组成:高通量自动化灌流模块、多通道换液模块以及可移动夹层模块。关于每个部件在附图中的代号,可见表4;关于商用部件的型号和自主开发设计的部件的工程图,可参照表2和表3。

#### [0043] 1. 高通量自动化灌流模块

[0044] 本实验装置可对商用24孔板的培养孔进行自动化灌流。我们整合了多个注射器泵和商用多通道阀,搭建了一套高通量灌流模块。灌流模块由单个试剂分流管路(reagent dispenser, RD)加上三个多通道阀-培养孔-多通道阀-注射器泵(switch-well-switch-pump, SWSP)平行组构成,如图3所示。一个平行组可以灌流8个独立培养腔室。对于每个培养孔外侧腔室,灌流系统从一侧通过正压驱动的方式将试剂推入,实现培养基的添加。考虑到培养孔并非封闭体系,待转移的腔室内流体并不会自发地离开培养孔,我们在另一端加上一组负压移液管路。加液和抽液的管线通过Y型三通连接在一起。流体除了进到培养孔时会发生双向流动,多数时间都保持单向流动,在降低污染的同时也提升了换液效率。三个平行组恰好能实现24个培养孔的液体更换。试剂分流模块可选取包含水、磷酸盐缓冲溶液(phosphate-buffered saline, PBS)、培养基等至数十种实验试剂。使用过的试剂最终都会被转移到废液槽中。

[0045] 硬件通讯方面,得益于商用部件完备的RS485/232串口通讯指令,我们通过LabVIEW内置的NI-VISA应用程序接口(application programming interface, API)完成了各别硬件的自动化控制。我们采取脚本编程的自动化方式,开发了一套随读随写的及时控制面板。使用者仅需依据需求撰写如下方的规范化代码,就能实现长时程、全自动的高通量灌流。

#### [0046] 2. 多通道换液模块

[0047] 承袭高通量自动化灌流模块的设计,我们开发了基于24孔板的多通道换液模块。该模块位于培养箱内,位于可移动夹层模块的上方、高通量自动化灌流模块管路的下方,其主要功能为衔接管路和孔板。如图4所示,Y型三通将两条塑料管线整并到一个培养孔中,聚醚醚酮接头将管线固定在铝合金支架上。新鲜培养基从其中一条管线通入跨膜培养腔室,旧培养基则从另一条管线离开。铝合金通液管线支架的针状接头可以下探到培养孔最底部侧面,使得灌流模块得以充分换液。

#### [0048] 3. 可移动夹层模块

[0049] 如图5所示,可移动夹层模块包含跨膜器件夹具、电机齿轮组、左右侧扇叶、孔板底座和装置底座几大部件,整体是一个易组装的层状结构。其主要功能为搭载商用的24孔板和多个跨膜器件,并控制两者的相对距离。下面我们分别介绍这些硬件结构。

[0050] (1) 跨膜器件夹具:板状结构,可透过双面胶带固定至多24个直径12毫米的跨膜器件。每个培养孔的位置上下打通,可从上方对样本进行处理和成像观察。夹具长边两侧设计与扇叶互补的凹槽,这种设计能让夹具较好地坐落在扇叶上,随之上下移动。

[0051] (2) 电机齿轮组和左右侧扇叶:由28BYG二相混合型步进电机驱动的简易齿轮结构。电机传动链最终会导致两侧转轴以相同转速、不同转向进行转动。通过短桶装对接原件,齿轮组会带动夹层内的左右侧扇叶转动。当扇叶从“\_”转动变为“八”的状态,跨膜器件夹具就会随之被抬起,远离培养孔底部。如图6和下列三点所述,此机械过程保证了跨膜器



件内侧的培养微环境能在更换培养基过程中不与外侧发生扩散进而维持稳定、在培养期间充分浸润。• 有效避免灌流废液的扩散:装置为单向流的半封闭系统,所有通向培养孔的液体都需流经跨膜器件外侧,才能随着灌流循环流向废液槽。在此期间,灌流塑料管线腔室内数百微升的液体(i.e.,长10厘米、外径1.6毫米的管线约能存有30微升的液体)均会流经跨膜器件外侧,造成预期之外的扩散。在换液时将跨膜器件上移远离外侧流体,能避免这类扩散。

[0052] • 有效避免外侧剩余液体残留:孔板的塑料壁面和跨膜器件的塑料外环都是亲水材料,液体易在表面张力作用下,贴附在两层塑料结构之间,使得外侧腔室会剩余较多的液体。将跨膜器件抬离孔板底部有助于液体被更好地移除。以纯水为例,不上移跨膜器件时的平均换液余量为188微升;上移跨膜器件时则为88.3微升。

[0053] • 有效避免聚四氟乙烯半透膜底部气泡生成:同理,受到塑料表面张力的影响,流体进入外侧腔室时,容易沿着壁面缝隙浸润,最终间接导致跨膜器件下方大气泡的形成。大气泡会阻碍膜的浸润、截断扩散过程,使得半透膜在24-48小时内蒸干,膜内侧的样本将进而脱水坏死。提前将跨膜器件用1毫摩尔PF127处理能透过改变液体和塑料的接触角,以减少气泡生成的概率。在此基础上,在更换完外侧培养基后快速地将跨膜器件插入液面能完全防止气泡的生成。

[0054] (3) 孔板底座:框型结构,用来将商用24孔板套住固定。两侧长边分析能安装左右侧扇叶,两侧短边处有分别有三个长方形透气孔。

[0055] (4) 装置底座:板状结构,用来承载可移动模块的其他部件和多通道换液模块。

[0056] (二) 选用零部件

[0057] 除了上述主要模块外,我们也根据个别的实验需求开发了以下零部件:

[0058] 1. 跨膜器件的内插分割件

[0059] 通过物理阻隔的方式,内插分割件的主要目的是将聚四氟乙烯半透膜内侧分割为7个直径2毫米、高2毫米的小隔间,借此实现在一个跨膜器件内培养多个类器官样本的效果。如图7所示,聚醚醚酮材料的内插分割件可以由跨膜器件夹具的上方插入,坐落在聚四氟乙烯膜上。

[0060] 2. 基于6孔板的跨膜自动化培养模块

[0061] 如图8所示,我们依循上述相同的硬件设计思路,构思了一套基于6孔板的培养模块。此处仅展示多通道换液模块和可移动夹层模块的设计图。6孔板版本的装置具有更加简化的通液管线支架,使我们在简并培养孔(每四个12毫米直径的跨膜器件共用一个培养孔)的同时,也解放装置的上层空间,实现跨膜器件固定层的进一步模块化。该版本的跨膜器件夹具可以从通液管线支架上方的开放空间拆卸,避免了原先繁琐的层状组装步骤。此外,如图8(C)所示,我们还添加了多种跨膜器件夹具,除了当前12毫米外径的跨膜器件外,还可适配24毫米外径的款式。这些跨膜器件个别更对应两种独特的多通道换液配置,可通过额外的灌流管路实现跨膜器件内侧换液。此硬件有潜力应用于脑片、类融合体等较大的生物样本的相关研究,是本自动化跨膜培养装置进一步的优化方向。

[0062] 四、总结

[0063] 本发明开发了一个基于跨膜培养模式的自动化换液装置,用于类器官培养。新的实验流程有效地结合了U型孔三维聚团和跨膜培养方法,克服了数个类器官实验技术遭遇

的方法学难题,实现了高平行性的批量三维聚团、稳定的微环境的生成和非人工介入的半封闭长期培养。有鉴于跨膜培养体系的高自由度,此自动化装置可用于多种类器官或生物样本的长期实验。此处列举了几种可能的研究方向。

[0064] 1. 优化小分子诱导浓度:透过相对稳定的换液流程(固定的外侧培养基残留、稳定的化学扩散),可系统性地研究小分子/药物的对生物样本的影响,对实验条件进行优化,评估小分子有效浓度。

[0065] 2. 气液界面培养 (air-liquid interface, ALI):在包埋胶体/未包埋胶体的实验条件下研究肠腔、脑、肾等类器官长时间尺度的发育和代谢问题。研究在不同氧气浓度下类器官的分化轨迹和形态变化。也可通过生物打印来在半透膜上生成复杂的三维生物结构。

[0066] 3. 复合物/类器官融合体 (assembloid):在包埋胶体/未包埋胶体的实验条件下将多个相同/不同组织来源的三维细胞团放在一起进行融合培养,观察类器官融合体的长期发生过程。

[0067] 4. 共培养 (co-culture):方案有二。其一是在包埋胶体/未包埋胶体的条件下,于简并的细胞培养单元(即6孔板跨膜培养模块)内培养多个相同/不同组织来源的三维细胞团,研究不同组织在共用培养基的情况下是否发生远程相互作用介导的信号/代谢现象。其二是在跨膜器件外侧也培养合适的细胞团作为旁分泌素或细胞激素的分泌源,调查更复杂的远程相互作用机制,如短链脂肪酸信号分子。

[0068] 五、心脏类器官自动化培养以心脏类器官 (human cardiac organoids, HCOs) 为实施例,展示自动化跨膜培养装置和实验流程在类器官培养中的应用。功能性心肌细胞的分化可通过化学小分子调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路来实现,且在10天内就可能得以见到搏动的表型。此处,我们试图将50000个起始胚胎干细胞 (embryo stem cells, ESCs) 聚球的细胞团分化成亚毫米尺度的心脏类器官。

[0069] (一) 胚胎干细胞U型孔聚团

[0070] 1. 提前以DMEM+基底胶溶液过夜处理平底六孔板。

[0071] 2. 待4-5天,胚胎干细胞铺满孔板,先用磷酸盐缓冲溶液清洗、移除死细胞,后以600微升accutase进行消化。

[0072] 3. 离心、细胞计数后,以200000细胞/孔的密度传代ESC,第0天需添加10毫摩尔Y27632。

[0073] 4. 每24小时更换2毫升mTeSR培养基。消化下来的胚胎干细胞可用于聚球:即是将给定数目的胚胎干细胞用mTeSR+50毫摩尔Y27632悬浮后,加入1毫摩尔PF127磷酸盐缓冲溶液过夜处理的96孔板U型孔。

[0074] (二) 心脏类器官自动化跨膜分化

[0075] 心脏类器官的培养方案修改自Hoang, P. 等人将人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 分化为三维心脏微腔室 (cardiac microchambers) 的方法。培养试剂如下方表1所示,其中n为非负整数。

[0076] 表1、HCO培养试剂。(n=0, 1, 2, …)

[0077]

换液时间	培养基
第0天	RPMI1640+50X B27添加剂(无胰岛素)+10微摩尔CHIR99021
第1、4天	RPMI1640+50X B27添加剂(无胰岛素)

第2天	RPMI1640+50X B27添加剂(无胰岛素)+5微摩尔IWP4
第6、7+2n天	RPMI1640+50X B27

[0078] 实验流程分为事前准备、硬件组装和样本准备,依序为:

[0079] 1. 事前准备

[0080] (1) 使用自动裁纸机器制造符合跨膜器件圆柱上底面的双面胶带。使用镊子将双面胶带粘贴至跨膜器件上底面。

[0081] (2) (选用) 将分割小插件放入跨膜器件,即获得跨膜器件复合体。

[0082] (3) 将跨膜器件复合体浸润在1毫摩尔PF127磷酸盐缓冲溶液中过夜。

[0083] (4) 使用75%乙醇溶液预先清洗高通量自动化灌流模块。

[0084] (5) 使用加有Antibiotic-Antimycotic和Gentamicin的磷酸盐缓冲溶液预先清洗自动化灌流模块。

[0085] 2. 硬件组装

[0086] (1) 将新的商用24孔板安装到可移动夹层的孔板底座中,将带有通液塑料管线的Y型三通连接到铝合金换液管线支架上。两个部件都安放在培养箱内。

[0087] (2) 将在96孔板内聚球的细胞团用剪裁过的枪头转移到跨膜器件复合体膜内侧。移除多余的mTesR培养基后,在膜内侧加入100微升第1天培养基,外侧加入600微升第0天培养基。(3) 将带有细胞团的跨膜器件复合体粘到夹具上,组装后即得到完整的跨膜器件固定层(夹具+多个跨膜器件复合体)。

[0088] (4) 将跨膜器件固定层架到培养箱里孔板底座的左右侧扇叶上。阖上通液管线支架、沿着平行于长边的方向从打通的圆孔结构处插入电机齿轮组两侧转轴。

[0089] (5) 设定LabVIEW自动灌流程序。手动输入命令行,或是选择读入灌流程序的脚本文件。(6) 开始运行程序。完整的自动化换液流程有以下步骤:首先电机齿轮单元透过驱动扇叶旋转上移夹层,灌流管线逐个培养孔移除600微升旧培养基。其次,移除培养基后,依次灌流1000微升磷酸盐缓冲溶液和新培养基润洗通用管线。再者,逐个培养孔灌流600微升新培养基。以上灌流步骤会进行两遍,以减少液体残余。完成上述循环后,系统灌流磷酸盐缓冲溶液清洗通用管线。最终,电机齿轮单元操控夹层落下浸润入外侧新培养基。

[0090] (7) 若需对样本进行成像观察或是已经结束换液流程,可拆除通液管线支架,将夹层连同孔板和底座取出。

[0091] (三) 实验结果与分析

[0092] 图9(A)展示了U型孔聚团-自动化跨膜培养心脏类器官的全流程。在完成硬件组装后,我们利用移液枪将边界清晰的细胞团转移到跨膜器件固定层的跨膜器件内侧的半透膜上(单细胞团培养)或是分割插件腔室中(多细胞团培养)。自第0天始,细胞团将置于装置内进行自动化换液培养,直到第8天才开盖进行成像观察和样本处理。为了评估自动化跨膜培养的心脏类器官(automated-cultured HCOs, aHCOs)的表型和基因表达特征,我们同时准备了U型孔聚团-U型孔培养的心脏类器官(U-bottom-manually-cultured HCOs, uHCOs)作为参照。图9(B)和图9(C)分别展示了细胞团在第0天和第8天的形态特征。图10展示了多个生物学重复的图像。从明场图像中可以注意到aHCOs具有颇为一致的表型。aHCOs周遭存有脱落的细胞碎块,显示跨膜培养模式避免了流体冲刷细胞团的现象,减少了对细胞团的物理刺激。aHCOs相较uHCOs具有更大的截面积,两者都具有泡状结构。uHCOs的泡状结构可于

第8到10天观测到搏动表型，而aHC0s则未能在第8天观测到此表型。免疫荧光染色进一步揭示了第8天心脏类器官的心肌组分。如图11所示，心脏发育的标志性转录因子NKX2-5和心肌肌钙蛋白cTnt在aHC0s和uHC0s皆有显著的表达。此结果说明aHC0s和uHC0s非常相似，两者均能一定程度表征心脏发育过程；自动化跨膜培养装置成功实现了非人工介入的、半封闭式的、低微环境扰动的类器官培养。更细致的分析有赖后续更长期的培养和组学分析。

[0093] 六、实验装置的硬件参数和制图编号

[0094] 表2、类器官自动化跨膜培养装置的商用零部件型号。

模块	零部件名称	型号或参量
自动化灌流	多通道阀	Valco Instruments Co. Inc. Multiposition Microelectric Valve Actuators; Runze Smart sv03; Runze Smart sv04
	注射器泵	Cavro Centris Pump 30038165-B; Cavro XC 3P
可移动夹层	步进电机驱动器	Sumtor DM430
	微型步进电机	28BYGH 步进电机
	步进电机控制器	YF53 RS485 串口步进控制器
	跨膜器件	Merck Millipore Ltd. 0.4 微米孔径, 12 毫米直径 PICM01250
	24 孔板	Costar 24-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Corning 3524
其他	培养箱	SANYO MCO-5AC

[0096] 表3、类器官自动化跨膜培养装置的CNC加工零件工程图代号。

模块	工程图名称	部件名称
多通道换液	transparent_lid_channel_v8	通液管线支架
可移动夹层	spin_leaf_v4 plus spin_stance_v1	右侧/左侧扇叶、扇叶-电机对接原件
	spin_sup_v3_down	下底座
	spin_sup_v3_up	上底座
	transparent_lid_v12	可移动夹层
	heater_framework_v3	装置底座
	heater_gear_v2	齿轮组支架
spin_gear_set	旋转轴、齿轮组滑轨、电机支架	

[0098] 表4、类器官自动化跨膜培养装置的模块精细装配图代号。

模块	部件	子部件	编号
多通道换液	Y型三通	-	401
	10-32 螺纹聚醚醚酮接头	-	402
	通液管线支架	-	403
[0099] 可移动夹层	跨膜器件夹具	-	501
		步进电机	5021
	电机齿轮组	同步轮	5022
		阶梯齿轮	5023
		转轴	5024
	左右侧扇叶	长转轴	5031
		对接原件	5032
	孔板底座	上底座	5041
		下底座	5042
		24 孔板	5043
		24 孔板固定件	5044
	装置底座	-	505

[0100] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

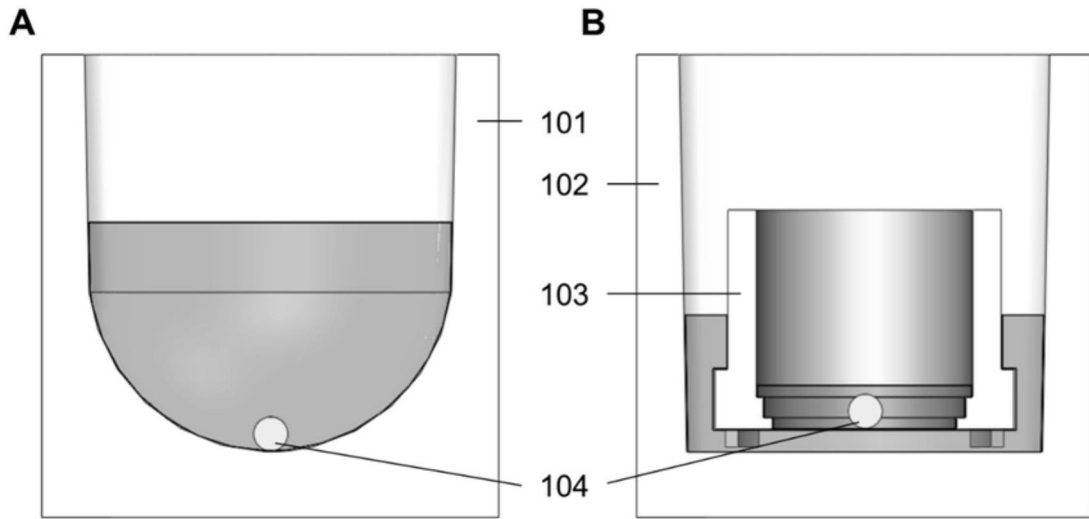


图1

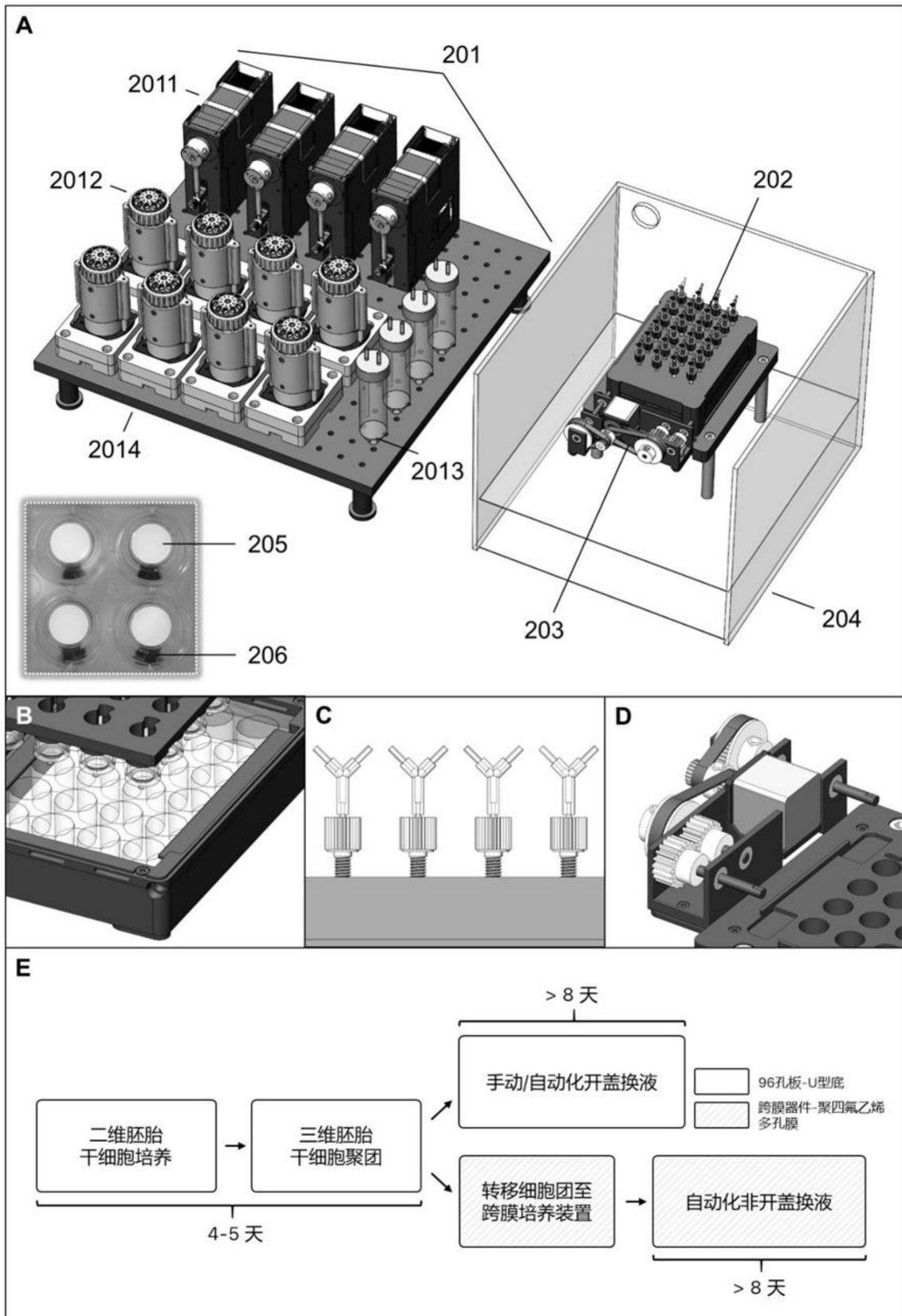


图2

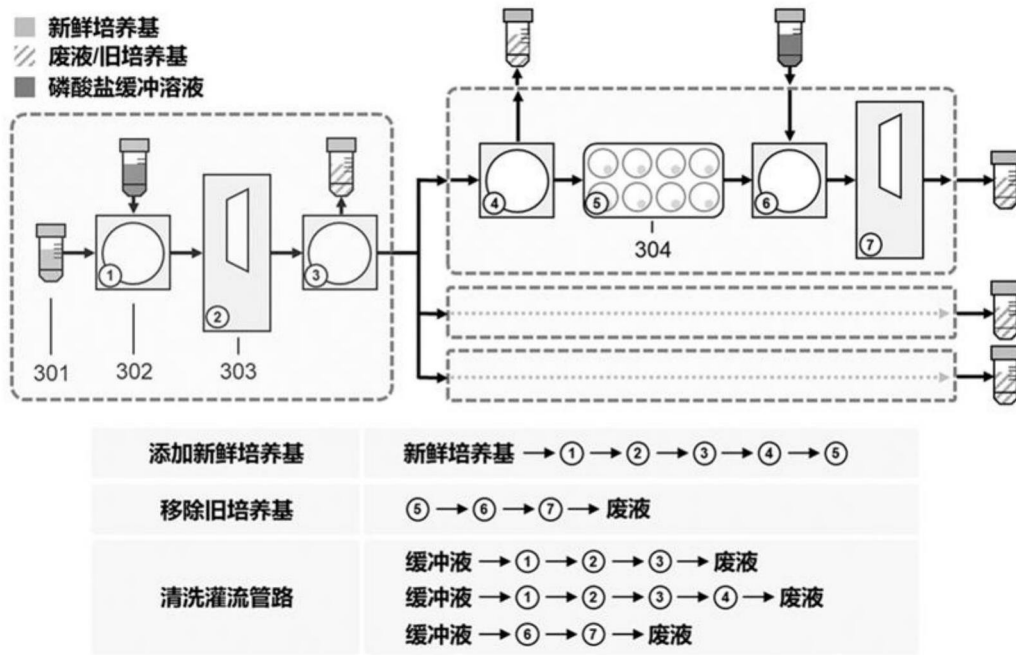


图3

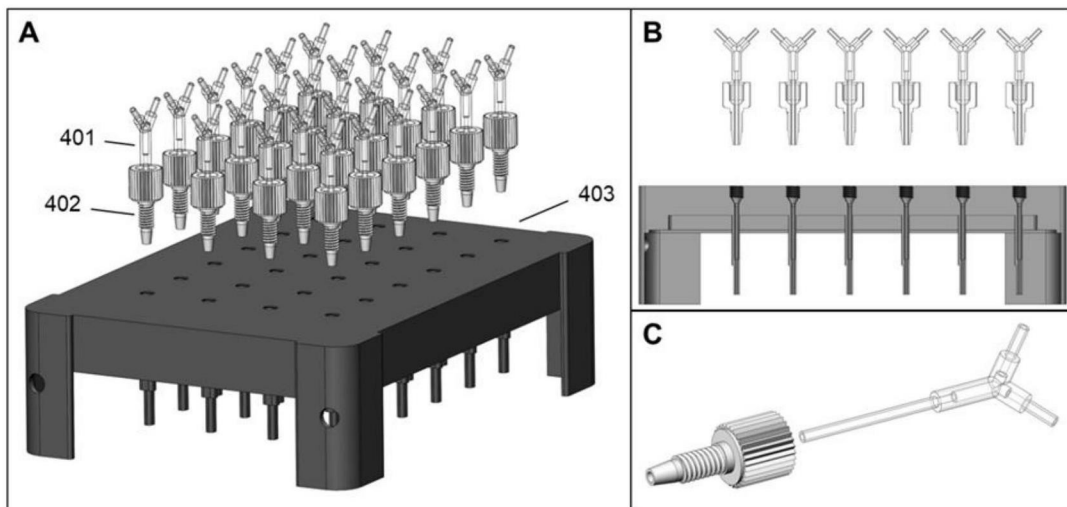


图4



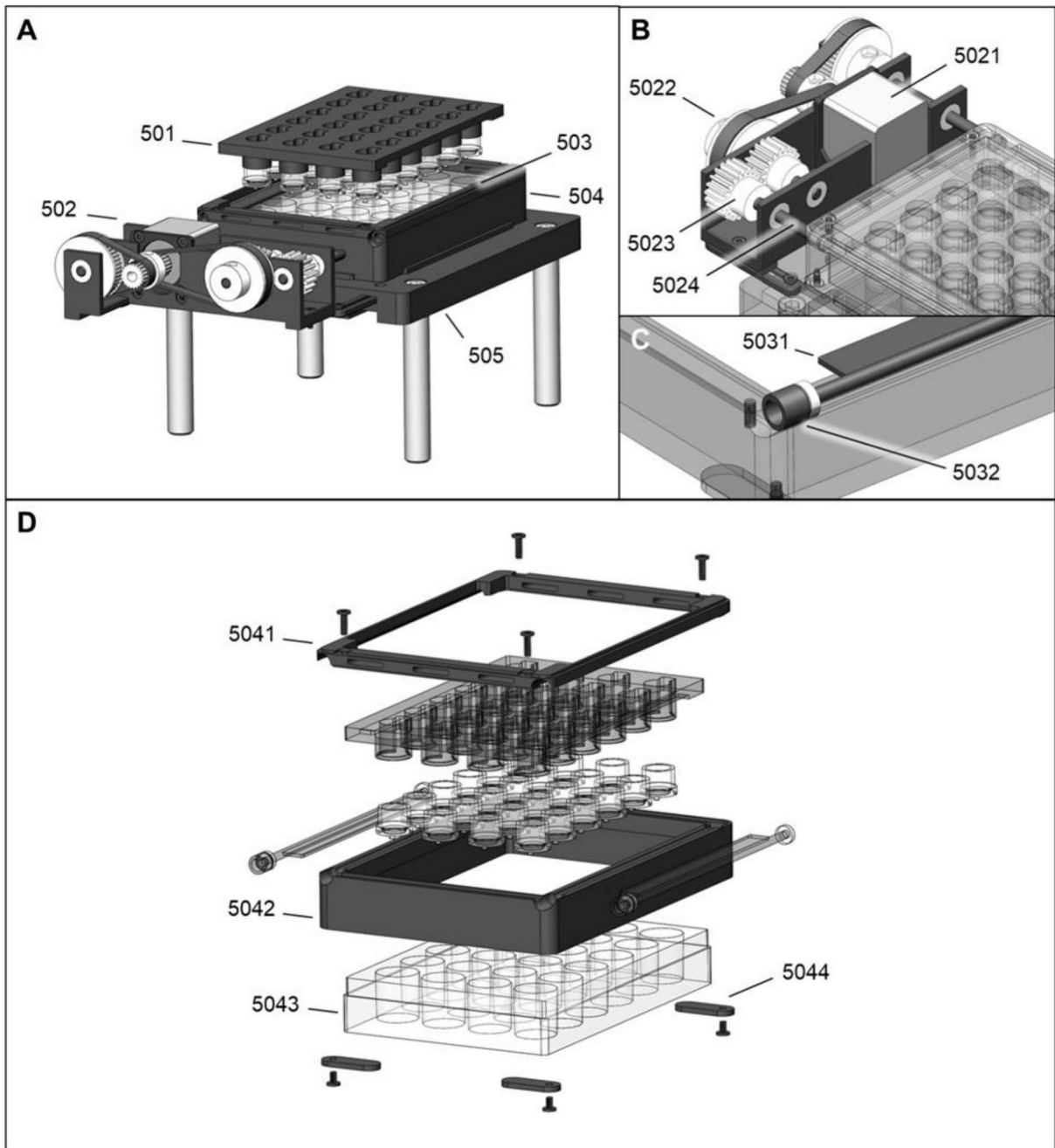


图5

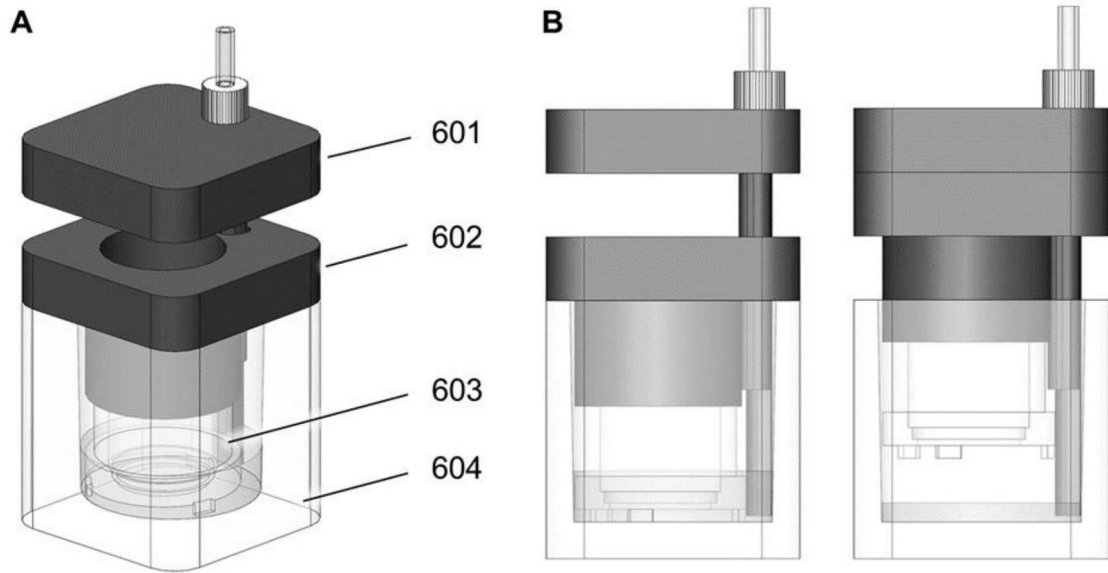


图6

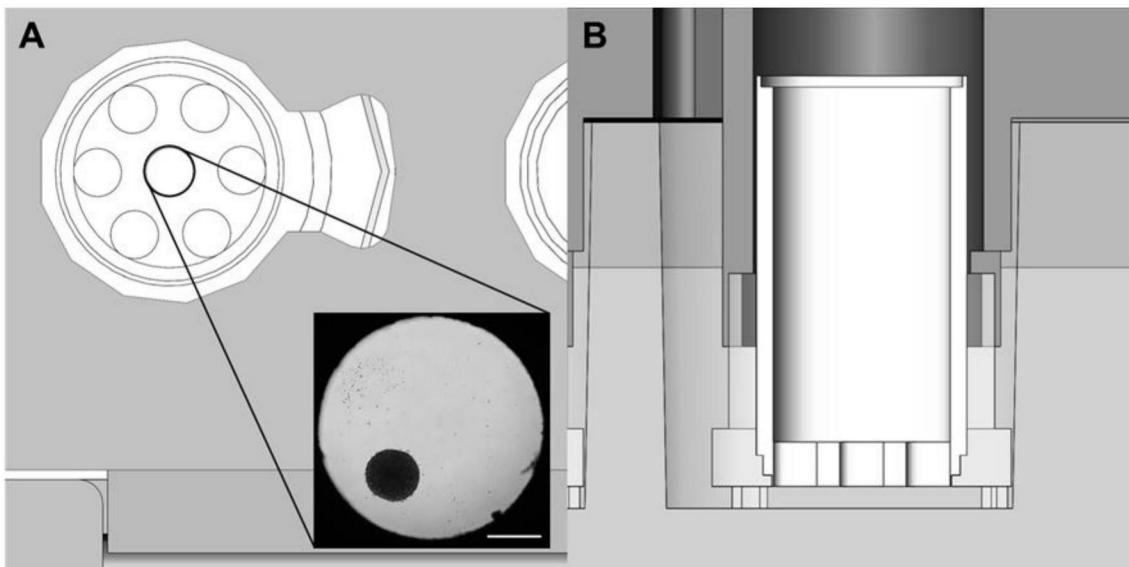


图7

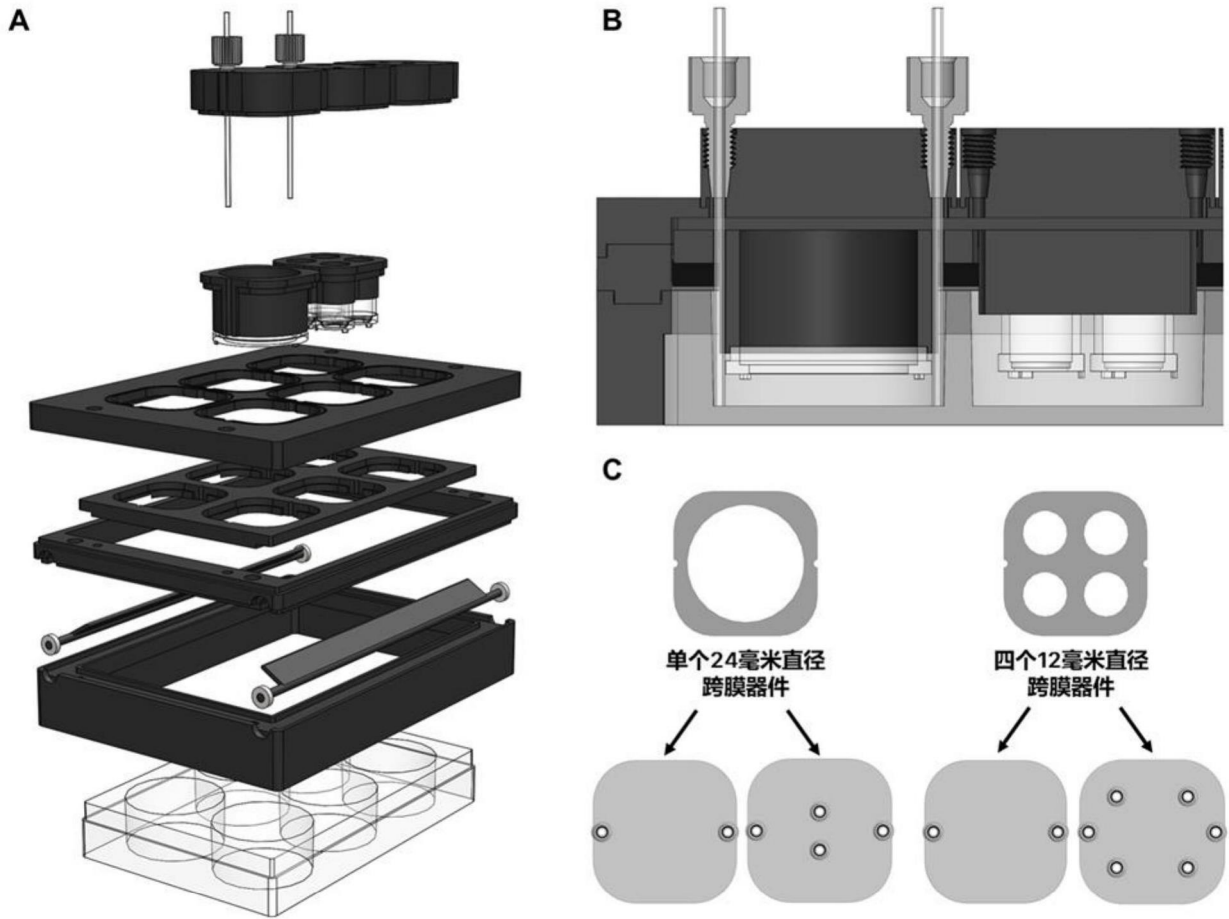


图8

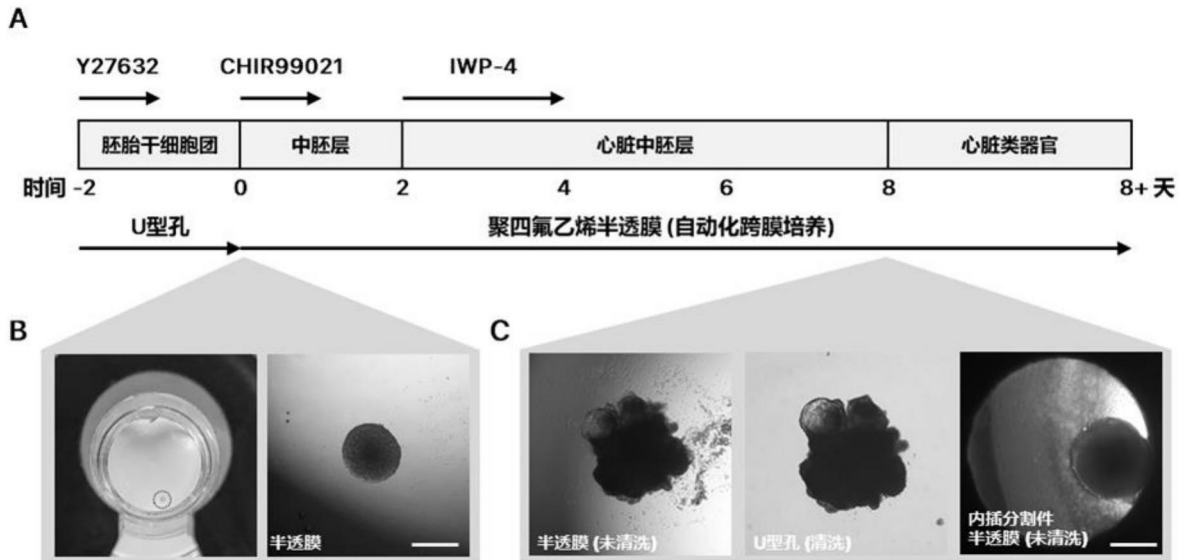


图9

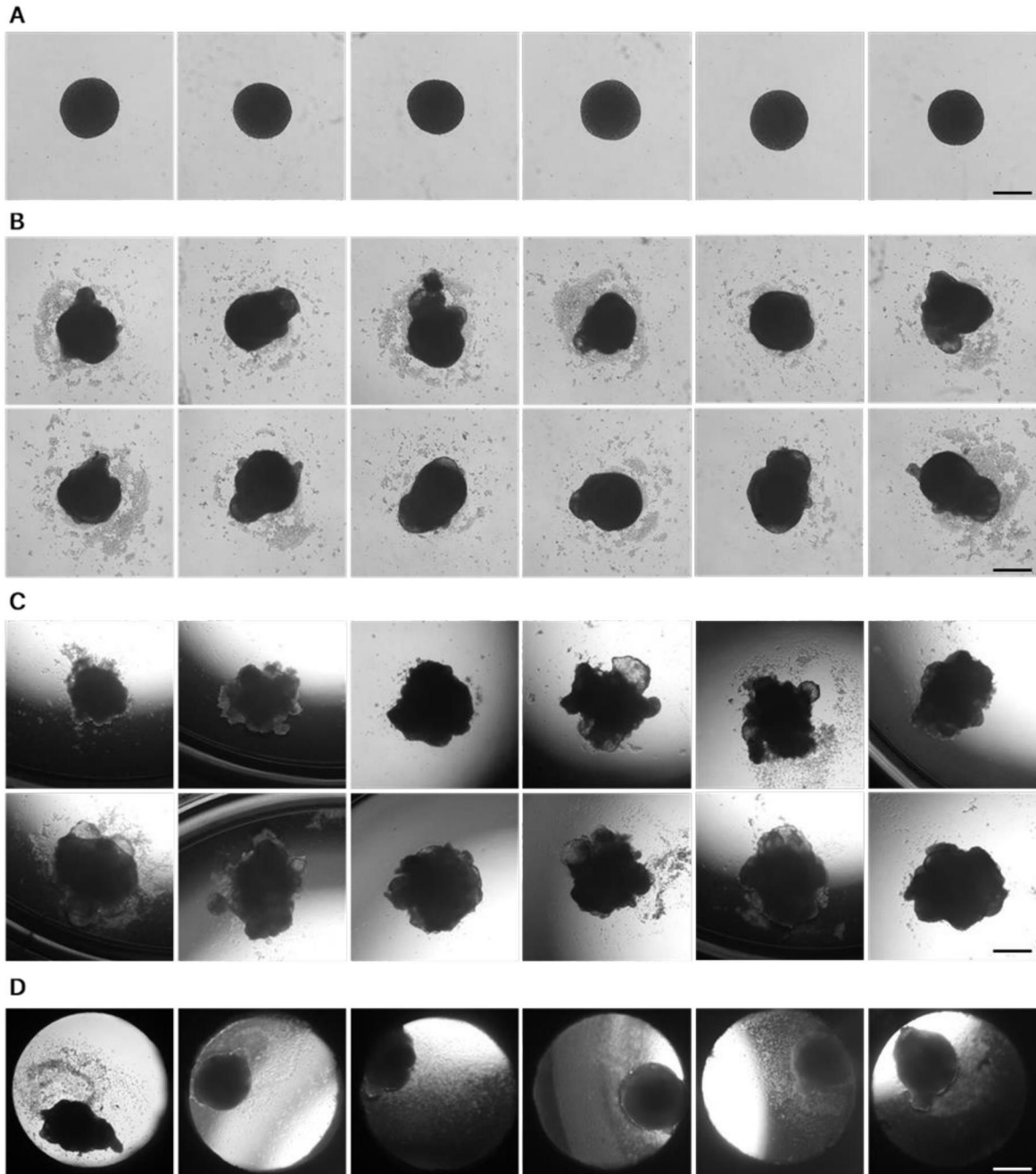


图10

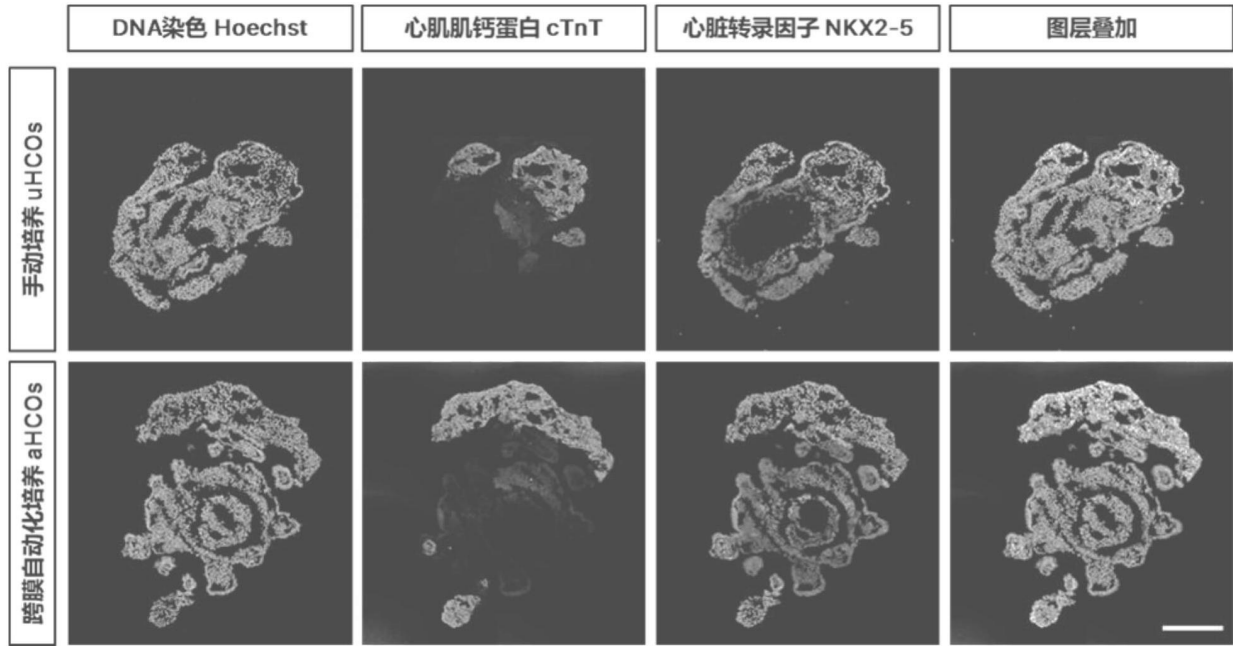


图11