

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日  
2015年1月15日 (15.01.2015) WIPO | PCT



(10) 国际公布号

WO 2015/003404 A1

(51) 国际专利分类号:  
C12N 5/00 (2006.01)  
C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/079613

(22) 国际申请日: 2013年7月18日 (18.07.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201310294332.0 2013年7月12日 (12.07.2013) CN

(71) 申请人: 清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084  
(CN).

(72) 发明人: 林峰 (LIN, Feng); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。孙伟 (SUN, Wei); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。赵龙 (ZHAO, Long); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。张磊 (ZHANG, Lei); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。张婷 (ZHANG, Ting); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) Title: CELL PRINTING METHOD AND CELL PRINTING SYSTEM

(54) 发明名称: 细胞打印方法及细胞打印系统

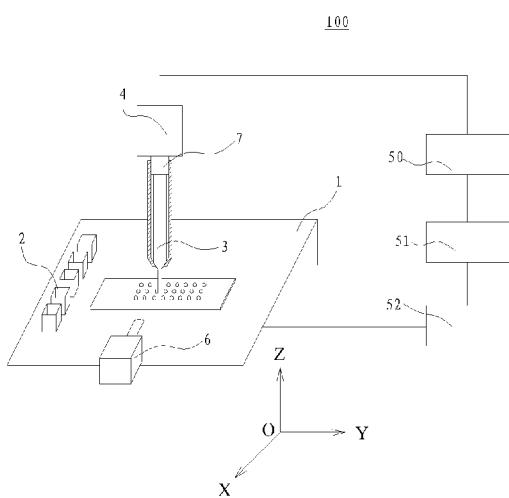


图 2 / FIG. 2

(57) Abstract: Disclosed are a cell printing method and a cell printing system. The cell printing method comprises: S1: inserting a micro-nozzle into a desired cell suspension; S2: performing a predetermined cell-drawing drive on the micro-nozzle by using a micro-displacement reciprocating motion mechanism to draw in a certain number of cells and combine them into a cell printing sequence; S3: performing a predetermined cell-gathering drive on the micro-nozzle by using the micro-displacement reciprocating motion mechanism to arrange the cells into a closely packed single-cell column in the micro-nozzle; and S4: moving the micro-nozzle to a desired printing position and performing a predetermined cell-spraying drive on the micro-nozzle by using the micro-displacement reciprocating motion mechanism to spray the cells onto the printing position in sequence.

(57) 摘要: 一种细胞打印方法及细胞打印系统。细胞打印方法包括: S1: 将微喷管插入所需细胞悬浮液中。S2: 利用微位移往复运动机构在微喷管上执行预定的细胞吸取驱动, 以吸入一定数量的细胞并组合成细胞打印序列。S3: 利用微位移往复运动机构在微喷管上执行预定的细胞聚齐驱动, 将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列。S4: 将微喷管移动至所需的打印位置, 利用微位移往复运动机构在微喷管上执行预定的细胞喷射驱动, 以将细胞按序列喷射在打印位置处。

WO 2015/003404 A1

执行预定的细胞吸取驱动, 以吸入一定数量的细胞并组合成细胞打印序列。S3: 利用微位移往复运动机构在微喷管上执行预定的细胞聚齐驱动, 将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列。S4: 将微喷管移动至所需的打印位置, 利用微位移往复运动机构在微喷管上执行预定的细胞喷射驱动, 以将细胞按序列喷射在打印位置处。



**本国际公布:**

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

## 细胞打印方法及细胞打印系统

### 技术领域

本发明涉及细胞打印和细胞提取领域，尤其是涉及一种细胞打印方法及细胞打印系统。

### 背景技术

近年来，细胞打印技术在组织工程学、病理模型构建、药物筛选与检测、细胞生物学研究等领域发挥着越来越重要的作用。目前，细胞打印技术主要包括喷墨打印（压电容积驱动式和热气泡式）、激光直写、激光诱导转移、静电喷射、聚焦超声波喷射、微挤出等，上述的这些细胞打印技术存在如下的问题：一、在细胞打印过程中往往会产生瞬间高温、高压或瞬间强静电场，对细胞的成活或保持其原本的生物学特性等不利。二、在喷射多种类型细胞时，往往需要采用多组喷射机构或更换多个喷头，从而增加了设备复杂程度或加大了操作的复杂范围。三、多数工艺每次打印的最小细胞数量仍在数个至数十个范围，在稳定、高效的单细胞打印方面还没有得到充分发展。

### 发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。

为此，本发明的一个目的在于提出一种可实现细胞吸取、聚齐和喷射的细胞打印方法。

本发明的另一个目的在于提出可实现细胞吸取、聚齐和喷射的细胞打印系统。

根据本发明第一方面实施例的细胞打印方法，包括如下步骤：S1：将微喷管插入所需细胞悬浮液中，所述细胞悬浮液分别容纳在不同的细胞盛装容器中；S2：利用微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞吸取驱动，以吸入一定数量的细胞并组合成细胞打印序列；S3：利用所述微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞聚齐驱动，将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列；S4：将所述微喷管移动至所需的打印位置，利用所述微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞喷射驱动，以将所述细胞按序列喷射在所述打印位置处。以及如果需要继续打印与所述细胞悬浮液对应的细胞，则利用所述微喷管重复执行上述步骤 S1-S4，直至完成所有的细胞二维图形或三维结构的细胞打印。

根据本发明实施例的细胞打印方法，通过利用细胞悬浮液的粘滞力和惯性力交替地作为动力即利用交变滞惯力的作用来实现细胞悬浮液的吸取、聚齐和喷射，从而无论是在细胞悬浮液的吸取或喷射的过程中，均无瞬间高温或瞬间强静电场等产生，对细胞的损伤较小，同时由于本发明的细胞打印方法采用先进后出的顺序吸取和喷射细胞，从而可利用同一个微喷管以实现多种细胞的吸取和打印操作，避免了因采用多组微喷管而使设备复杂程度增加，避免了因更换微喷管而造成操作过程复杂化，同时避免了使用其

他工具进行上述操作，可减少细胞的染菌几率，并且能实现“即吸即打印”的连贯细胞操作，有利于保证打印过程中的细胞的活性；同时，通过聚齐驱动，可以使细胞在微喷管内排列成密排的单细胞列，从而为稳定、可控的单细胞打印提高了有力保证。

另外，根据本发明的细胞打印方法还具有如下附加技术特征：

5 具体地，在所述步骤 S2 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞吸入所述微喷管中。

具体地，在所述步骤 S3 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞在微喷管出口附近排列成密排单细胞列。

10 具体地，在所述步骤 S4 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞喷射在所述打印位置处。

具体地，所述微位移往复运动机构驱动所述微喷管产生与不同的位移曲线相对应的非对称的轴向往复运动，以执行对所需的细胞的吸取驱动、聚齐驱动和喷射驱动。

15 在本发明的一些实施例中，在所述步骤 S2、S3 和 S4 中，通过控制所述微位移往复运动机构的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞的吸入量、聚齐程度或者喷射数量，从而可减少细胞的浪费。

在本发明的一些示例中，所述步骤 S4 在空气介质中执行。

在本发明的另一些示例中，所述步骤 S4 在液体介质中或凝胶介质中执行。

20 在本发明的一些实施例中，在步骤 S2 中，所述微喷管做离开液面的运动，其加速度由零增加到第一预定值，接着保持所述第一预定值第一预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。

25 在本发明的一些实施例中，在步骤 S4 中，所述微喷管做靠近液面的运动，其加速度先由零上升到第二预定值，接着保持所述第二预定值第二预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。

30 在本发明的一些实施例中，在步骤 S3 中，所述微喷管的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持所述第三预定值第三预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在所述第四预定时间内，所述曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在所述第五预定时间所述直线的斜率为负值。

优选地，所述微喷管的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为所述细胞悬浮液中的单细胞直径。从而可避免细胞堵塞微喷管或形成局部堆积，保证细胞悬浮液中的细胞以单细胞的形式打印。

35 根据本发明第二方面实施例的细胞打印系统，包括：三维运动机构；多个细胞盛装容器，所述多个细胞盛装容器中分别容纳有不同种类的细胞悬浮液；微喷管，所述微喷

管设在所述三维运动机构的上方，所述三维运动机构移动以使得所述微喷管位于所需的打印位置处或伸入到所述细胞盛装容器内；微位移往复运动机构，所述微位移往复运动机构与所述微喷管相连，且将所需的非对称往复运动施加至所述微喷管上以对所述微喷管执行吸取驱动、聚齐驱动或者喷射驱动，以将所需的细胞悬浮液吸入所述微喷管内、  
5 将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列和将所述细胞悬浮液喷射出所述微喷管；以及三维运动控制器，所述三维运动控制器配置成控制所述三维运动机构的移动；微位移往复运动控制器，所述微位移往复运动控制器配置成控制所述微位移往复运动机构对所述微喷管的双向驱动，以执行所述细胞悬浮液的吸取、聚齐和喷射。

根据本发明实施例的细胞打印系统， $\mu$ -DOM 将所需的驱动电压信号施加至微喷管上以对微喷管执行双向驱动，以将所需的细胞悬浮液吸入微喷管内和将细胞悬浮液喷射出微喷管，即以先进后出的顺序实现了细胞的打印，从而不仅可用同一个喷头实现不同细胞的打印，降低了设备复杂程度和简化了操作的复杂程度，同时可减小细胞的染菌几率，有利于保证打印过程中细胞的活性。又由于通过使细胞悬浮液受到交变滞惯力的作用而实现细胞悬浮液的吸取和喷射，从而无论是细胞悬浮液的吸取和喷射的过程中，均无瞬间的高温或瞬间强静电场等产生，对细胞的损伤较小。  
10  
15

另外，根据本发明的细胞打印系统还具有如下附加技术特征：

在本发明的一些实施例中，细胞打印系统还包括摄像装置，所述摄像装置对所述吸取、聚齐和打印过程进行实时观测。从而可检测细胞的吸取-打印的整个操作过程是否正常运行，保证细胞打印系统的可靠性。  
20

进一步地，细胞打印系统还包括微喷管夹具，所述微喷管通过所述微喷管夹具与所述微位移往复运动机构的下端相连。从而可便于微喷管的安装，避免对微喷管造成损坏。

优选地，所述微喷管的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为所述细胞悬浮液中的单细胞直径。从而可避免细胞堵塞微喷管或形成局部堆积，保证细胞悬浮液中的细胞以单细胞的形式打印。  
25

在本发明的一些实施例中，在所述微喷管进行细胞悬浮液的吸取过程中，所述微喷管做离开液面的运动，其加速度由零增加到第一预定值，接着保持所述第一预定值第一预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。

在本发明的一些实施例中，在所述微喷管进行单细胞的打印过程中，所述微喷管做靠近液面的运动，其加速度先由零上升到第二预定值，接着保持所述第二预定值第二预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。  
30

在本发明的一些实施例中，在将细胞在所述微喷管内进行排列成密排单细胞列的过程中，所述微喷管的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持所述第三预定值第三预定时间，最后再回到零值；以及施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线  
35

形状，且在所述第四预定时间内，所述曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在所述第五预定时间所述直线的斜率为负值。

可选地，所述所需的打印位置处位于空气介质中、液体介质中或者凝胶介质中。

具体地，所述微位移往复运动控制器控制所述微位移往复运动机构，以使所述微喷管产生与细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞悬浮液吸入所述微喷管中。  
5

具体地，所述微位移往复运动控制器控制所述微位移往复运动机构，以使所述微喷管产生与细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞在微喷管中形成密排单细胞列。

10 具体地，所述微位移往复运动控制器控制所述吸取位移曲线的，以使所述微喷管产生与细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞悬浮液打印在所需的打印位置处。

在发明的一些实施例中，所述微喷管位于所需的打印位置处的正上方且所述微喷管与所述所需的打印位置处之间的距离为 0~5mm。

15 具体地，所述微位移往复运动控制器通过控制所述微位移往复运动机构的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞悬浮液的吸入量、聚齐程度或者喷射数量。从而可减少细胞的浪费。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

20

## 附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 为根据本发明实施例的细胞打印方法的流程图；

25 图 2 为根据本发明实施例的细胞打印系统的示意图；

图 3 为图 2 所示的细胞打印系统中的微喷管伸入到细胞盛装容器内时的示意图；

图 4 为图 2 所示的细胞打印系统中的微喷管位于所需打印位置处的示意图；

图 5 为根据本发明一个实施例的处于细胞打印过程中微喷管的加速度的波形示意图；

30 图 6 为根据本发明一个实施例的细胞打印过程中施加在  $\mu$ -DOM 上的电压的波形示意图；

图 7 为根据本发明一个实施例的处于细胞吸取过程中微喷管的加速度的波形示意图；

35 图 8 为根据本发明一个实施例的细胞吸取过程中施加在  $\mu$ -DOM 上的电压的波形示意图；

图 9 为根据本发明一个实施例的处于细胞聚齐过程中微喷管的加速度的波形示意图；

图：

图 10 为根据本发明一个实施例的细胞聚齐过程中施加在 μ-DOM 上的电压的波形示意图。

##### 5 附图标记：

细胞打印系统 100、三维运动机构 1、细胞盛装容器 2、微喷管 3、  
微位移往复运动机构 4、微位移往复运动控制器 50、工控机 51、  
三维运动控制器 52、摄像装置 6、微喷管夹具 7

##### 10 具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

在本发明的描述中，需要理解的是，术语“中心”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本发明和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

下面参考图 1、图 5-图 10 描述根据本发明实施例的一种细胞打印方法。其中，用本发明的细胞打印方法打印出的细胞可用于高精度地制造组织工程产品和制备单细胞点样。组织工程产品可以用于在体外重建出人体的复杂组织或器官，可以用于人体坏损组织或器官的人工修复，而单细胞点样的制备则可用于高通量、耗时短的药物开发和药物筛选，也可以用于构建体外肿瘤病理模型，还可用于制备细胞基的高灵敏度生物传感器。

根据本发明实施例的细胞打印方法，如图 1 所示，包括如下步骤：

S1：将微喷管插入所需细胞悬浮液中，细胞悬浮液分别容纳在不同的细胞盛装容器中，也就是说不同的细胞盛装容器内可盛放不同的细胞悬浮液，微喷管可伸入到盛有所需的细胞悬浮液的细胞盛放容器内。优选地，该微喷管可为具有微流体通道的喷头，以使细胞在微流体通道内实现单列排列，从而实现单细胞打印。

S2：利用微位移往复运动机构（Micro Displacement Oscillating Mechanism, μ-DOM）在微喷管上执行预定的细胞吸取驱动，以吸入所需的细胞悬浮液中的一定数量的细胞并组合成细胞打印序列，具体地，当利用 μ-DOM 在微喷管上执行预定的细胞吸取驱动时，微喷管做往复运动，细胞悬浮液会基于交变滞惯力原理而被吸入到微喷管内。具体地，

通过控制  $\mu$ -DOM 的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞悬浮液的吸入量，以避免细胞的浪费。

值得说明的是，利用交变滞惯力进行细胞的吸取过程的原理如下：微喷管在  $\mu$ -DOM 的驱动下做往复运动，当微喷管首先向负方向运动时，细胞盛放容器内的细胞悬浮液与微喷管的外壁之间的粘滞力作为动力驱动细胞悬浮液向负方向运动，而细胞悬浮液的惯性力作为阻力阻碍细胞悬浮液向负方向运动。当微喷管接着向正方向运动时，细胞悬浮液的惯性力作为动力驱动细胞盛放容器内的细胞悬浮液继续向负方向运动，而细胞盛放容器内的细胞悬浮液与微喷管的外壁之间的粘滞力作为阻力阻碍细胞悬浮液向负方向运动。此时如果通过控制微喷管运动的加速度和加速时间，实现当微喷管向负方向运动时作为阻力的细胞悬浮液的惯性力较小，而当微喷管向正方向运动时作为动力的细胞悬浮液的惯性力较大，那么在一个运动周期内，细胞悬浮液相对于微喷管产生一段沿负方向的位移，微喷管外的细胞悬浮液就被吸入到微喷管内。

其中，步骤 S2 中的组合成细胞打印序列，指的是根据打印需要，可在利用微喷管吸入一种细胞悬浮液后接着利用微喷管吸入不同的细胞悬浮液，也就是说，在细胞吸取过程中，微喷管内可先后吸入不同的细胞悬浮液，此时，由于微喷管的结构限制，多种细胞悬浮液根据吸入动作的先后顺序在微喷管内顺序排列，即可使得多种细胞悬浮液在微喷管内组合呈细胞打印序列。

S3：利用  $\mu$ -DOM 在所述微喷管上执行预定的细胞聚齐驱动，将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列。

值得说明的是，在每一个驱动信号周期内，由于微喷管在  $\mu$ -DOM 驱动下做非对称的往复运动，所以微喷管是一个非惯性系，微喷管体系内的细胞和细胞外的基质则受到周期性的惯性力；由于这种惯性力是一种体积力，密度大的物质受到的惯性力大于密度小的物质受到的惯性力；由于细胞密度大于周围液态细胞外基质的密度，所以细胞受到的惯性力大于液态细胞外基质受到的惯性力。因此，细胞就会在周期性惯性力作用下相对于流体发生聚齐运动。如果微喷管的直径满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ （其中  $d_{cell}$  为细胞悬浮液中的单细胞直径），当聚齐运动达到稳定状态时，细胞就会在微喷管内形成密排单细胞列。

S4：将微喷管移动至所需的打印位置，利用  $\mu$ -DOM 在微喷管上执行预定的细胞喷射驱动，微喷管在该细胞喷射驱动下做往复运动，此时微喷管内的细胞会在交变滞惯力驱动下稳定喷射出，从而将细胞按序列喷射在打印位置处。如果需要继续打印与细胞悬浮液对应的细胞，则利用微喷管重复执行上述步骤 S1-S4，直至完成所有的细胞打印。具体地，可通过控制  $\mu$ -DOM 的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞悬浮液的吸入量、聚齐程度或者喷射数量，以避免细胞的浪费。

值得说明的是，利用交变滞惯力进行的细胞的喷射过程的原理如下：吸取有细胞悬浮液的微喷管在  $\mu$ -DOM 执行的细胞喷射驱动下做往复运动，当微喷管首先向负方向运动时，细胞悬浮液与微喷管的内壁之间的粘滞力作为动力驱动微喷管内的细胞悬浮液向

负方向运动，而细胞悬浮液的惯性力作为阻力阻碍细胞悬浮液向负方向运动。当微喷管接着向正方向运动时，细胞悬浮液的惯性力作为动力驱动细胞悬浮液继续向负方向运动，而细胞悬浮液与微喷管的内壁之间的粘滞力作为阻力阻碍细胞悬浮液向负方向运动。如果通过控制微喷管运动的加速度和加速度的时间，实现当微喷管向负方向运动时作为阻力的细胞悬浮液的惯性力较小，而当微喷管向正方向运动时作为动力的细胞悬浮液的惯性力较大，那么在一个运动周期内，细胞悬浮液相对于微喷管就要产生一段沿负方向的位移，从而细胞悬浮液从微喷管内喷射出以打印在所需打印位置处。

其中，值得理解的是，根据本发明实施例的细胞打印方法在进行上述的步骤前，应将微喷管和  $\mu$ -DOM 放入到无菌腔室内进行灭菌处理，以保证上述步骤是在无菌的环境下进行，避免细菌对细胞悬浮液的污染，保证细胞的成活率和生物学性状。其中，值得注意的是，在进行杀菌过程中，不能将盛放有细胞悬浮液的细胞盛放容器放置在无菌腔室内，以免将细胞杀死，可在杀菌完成后等待一定时间如 5 分钟后再将盛放有细胞悬浮液的细胞盛装容器放入到无菌腔室内。具体地，可采用紫外线灭菌灯对  $\mu$ -DOM 进行灭菌，且可采用高压蒸汽灭菌方式对微喷管进行灭菌处理。

同时该所需的打印位置处可位于空气介质中、液体介质中或凝胶介质中，具体地，该液体介质为细胞培养基、海藻酸钠溶液、胶原、纤维蛋白质中的一种，凝胶介质为各种凝胶中的一种。同时，在将细胞悬浮液打印在所需打印位置时，微喷管可以悬于作为细胞打印的载体的基板上方的一定高度进行特定图案或性状的细胞打印，也可以插入组织工程支架的网格空洞中进行细胞打印，以实现在支架特定位置种植特定数量细胞的目的。

具体而言，当需要进行细胞打印时，首先将微喷管插入到盛放有细胞悬浮液的细胞盛装容器内，接着  $\mu$ -DOM 执行预定的细胞吸取驱动， $\mu$ -DOM 驱动微喷管在细胞悬浮液内进行与该细胞吸取驱动对应的往复运动，以使得细胞盛装容器内的细胞悬浮液受到交变滞惯力的作用，且在该交变滞惯力的作用下被吸入到微喷管内，如此重复上述过程，从而将多种细胞悬浮液吸入到微喷管内，且使得多种细胞悬浮液在微喷管内组合成细胞打印序列。

然后将吸取有细胞悬浮液的微喷管在  $\mu$ -DOM 的聚齐驱动下做聚齐运动，使细胞在微喷管中排列成密排单细胞列。

然后将微喷管移动到所需的打印位置处， $\mu$ -DOM 执行预定的细胞喷射驱动，微喷管在  $\mu$ -DOM 的驱动下进行与该细胞喷射驱动对应的往复运动，以使得微喷管内的细胞悬浮液会受到交变滞惯力的作用，且在该交变滞惯力的作用下细胞悬浮液从微喷管内喷射出以打印在所需的打印位置处，即完成一次细胞的吸取-打印过程。如果需要继续进行打印，可将微喷管重新插入到细胞悬浮液内重复执行上述的步骤，以完成多次细胞的吸取-打印过程。

其中，值得理解的是，在利用上述的细胞打印方法进行多次细胞的吸取-打印过程时，每次细胞的吸取-打印过程中的吸取的细胞悬浮液可相同也可不同。

根据本发明实施例的的细胞打印方法，通过利用细胞悬浮液的粘滞力和惯性力交替地作为动力即利用交变滞惯力的作用来实现细胞悬浮液的吸取和喷射，从而无论是在细胞悬浮液的吸取或喷射的过程中，均无瞬间高温、高压或瞬间强电场等产生，对细胞的损伤较小，同时由于本发明的细胞打印方法采用先进后出的顺序吸取和喷射细胞，从而可利用同一个微喷管以实现多种细胞的吸取和打印操作，避免了因采用多组微喷管而使设备成本增加，避免了因更换微喷管而造成操作过程复杂化，同时避免了使用其他工具进行上述操作，可减少细胞的染菌几率，并且能实现“即吸即打”的连贯细胞操作，有利于保证打印过程中的细胞的活性。

具体地，在步骤 S2 中， $\mu$ -DOM 通过使微喷管产生与细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞悬浮液吸入微喷管中。在步骤 S3 中， $\mu$ -DOM 通过使微喷管产生与细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞在微喷管出口附近排列成密排单细胞列。在步骤 S4 中， $\mu$ -DOM 通过使微喷管产生与细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞悬浮液打印在打印位置处。

具体地， $\mu$ -DOM 驱动微喷管产生与不同的位移曲线相对应的轴向往复运动，以执行对所需的细胞悬浮液的喷射驱动、吸取驱动和聚齐驱动。也就是说， $\mu$ -DOM 驱动微喷管产生的与细胞吸取驱动相对应的位移曲线的轴向往复运动、 $\mu$ -DOM 驱动微喷管产生的与细胞聚齐驱动相对应的位移曲线的轴向往复运动和  $\mu$ -DOM 驱动微喷管产生的与细胞喷射驱动相对应的位移曲线的轴向往复运动是不同的。

由于在微喷管运动的过程中往往会有振动问题，而微喷管的振动既会影响细胞的成活率又会影响细胞的打印位置精度，所以为了减小微喷管运动过程中的振动，在本发明的一些实施例中，如图 7 所示，在步骤 S2 中，微喷管做离开液面的运动，其加速度由零增加到第一预定值，接着保持第一预定值第一预定时间，最后再回到零值。从而保证微喷管在加速的过程中，速度是连续变化而不是跳跃变化的，以减小微喷管运动过程中的振动。以及如图 8 所示，在步骤 S2 中，施加在  $\mu$ -DOM 上的电压为这样的电压波形，电压波形的曲线斜率为负值，且曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大，由于  $\mu$ -DOM 具有电压和位移基本呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管在步骤 S2 中的位移波形，也就是说，如图 8 所示，施加在  $\mu$ -DOM 上的驱动信号使得微喷管的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。其中值得说明的是，上述的在步骤 S2 中微喷管的加速度波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形仅为示例性说明，而不是对本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在步骤 S2 中，微喷管的加速度波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形只要满足使得细胞悬浮液可受到交变滞惯力的作用而被吸取到微喷管内且使得微喷管在运动过程中的振动较小即可。

同时为了减少微喷管运动过程中的振动，在本发明的一些实施例中，如图 5 所示，在步骤 S4 中，微喷管做靠近液面的运动，其加速度先由零上升到第二预定值，接着保持第二预定值第二预定时间，最后再回到零值，从而保证在微喷管加速的过程中，速度是连续变化而不是跳跃变化的。以及如图 6 所示，施加在  $\mu$ -DOM 上的电压为这样的电

压波形，电压波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大，由于  $\mu$ -DOM 具有电压和位移呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管在步骤 S4 中的位移波形，也就是说，如图 6 所示，施加在  $\mu$ -DOM 上的驱动信号使得微喷管的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。

5 其中值得说明的是，上述的在步骤 S4 中微喷管的加速波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形仅为示例性说明，而不是对本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在步骤 S4 中，微喷管的加速度波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形只要满足使得微喷管内的细胞悬浮液在交变滞惯力的作用下从微喷管内喷射出且使得微喷管在运动过程中的振动较小即可。

10 进一步地，为了减少微喷管运动过程中的振动，在本发明的一些实施例中，如图 9 所示，在步骤 S3 中，微喷管的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持第三预定值第三预定时间，最后再回到零值，从而保证在微喷管加速的过程中，速度是连续变化而不是跳跃变化的。以及如图 10 所示，施加在  $\mu$ -DOM 上的电压为这样的电压波形，电压波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在第 15 四预定时间内，曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在第五预定时间直线的斜率为负值且保持为定值。由于  $\mu$ -DOM 具有电压和位移呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管在步骤 S3 中的位移波形，也就是说，如图 10 所示，施加在微位移往复运动机构上的驱动信号使得微喷管的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在第四预定时间内，曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在第五预定时间直线的斜率为负值。

20 其中值得说明的是，上述的在步骤 S3 中微喷管的加速波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形仅为示例性说明，而不是对本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在步骤 S3 中，微喷管的加速度波形和施加在  $\mu$ -DOM 上的电压波形只要满足使得微喷管内的细胞悬浮液中的细胞会在周期性惯性力的作用下相对于流体发生聚齐运动，最后使得细胞在微喷管内形成密排单细胞列即可。

25 在本发明的一些实施例中，微喷管的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为细胞悬浮液中的单细胞直径，以保证细胞悬浮液内的细胞在微喷管内呈稳定的单细胞列排列，防止细胞堵塞微喷管或形成局部堆积，进而保证细胞悬浮液内的细胞以单细胞的形状喷射出。

30 下面参考图 2-图 10 描述根据本发明实施例的一种细胞打印系统 100。

根据本发明实施例的细胞打印系统 100，如图 2 所示，包括：三维运动机构 1、多个细胞盛装容器 2、微喷管 3、 $\mu$ -DOM 4、三维运动控制器 52 和微位移往复运动控制器 50，其中，三维运动机构 1 可在上下（如图 2 所示的 Z 向）、左右（如图 2 所示的 Y 向）和前后（如图 2 所示的 X 向）六个方向上移动。多个细胞盛装容器 2 中分别容纳有不同种类的细胞悬浮液。微喷管 3 设在三维运动机构 1 的上方，三维运动机构 1 移动以使得微喷管 3 位于所需的打印位置处或伸入到细胞盛装容器 2 内。在本发明的一些示

例中，所需的打印位置处为载玻片的上表面。 $\mu$ -DOM4 与微喷管 3 相连，且将所需的非对称往复运动施加至微喷管 3 上以对微喷管 3 执行吸取驱动、聚齐驱动或者喷射驱动，以将所需的细胞悬浮液吸入微喷管 3 内、将细胞在微喷管 3 内排列成密排单细胞列和将细胞悬浮液喷射出微喷管 3。优选地，微喷管 3 通过微喷管夹具 7 与  $\mu$ -DOM4 的下端相连，从而便于微喷管 3 的安装，避免微喷管 3 的损坏。三维运动控制器 52 配置成控制三维运动机构 1 的移动。微位移往复运动控制器 50 配置成控制  $\mu$ -DOM4 对微喷管 3 的双向驱动，以执行细胞悬浮液的吸取、聚齐和喷射。

在本发明的一些实施例中，细胞打印系统 100 还包括工控机 51，工控机 51 与微位移往复运动控制器 50 和三维运动控制器 52 相连，微位移往复运动控制器 50 与  $\mu$ -DOM 4 相连用于提供  $\mu$ -DOM 4 的驱动电压信号，微位移往复运动控制器 50 的电压调节范围为 0-90v，频率调节范围为 1-200Hz。三维运动控制器 52 接收工控机 51 发出的指令以控制三维运动机构 1 的运动。

具体地，本发明的细胞打印系统 100 放置在无菌腔室内，在细胞打印系统 100 工作之前，先对三维运动机构 1、 $\mu$ -DOM4 和微喷管 3 进行杀菌，此时可使用紫外线灭菌灯对三维运动机构 1 和  $\mu$ -DOM4 进行灭菌，灭菌时间约为 30 分钟，微喷管 3 采用高压蒸汽灭菌后与  $\mu$ -DOM4 相连。其中，值得注意的是，在进行杀菌过程中，不能将盛放有细胞悬浮液的细胞盛装容器 2 放置在无菌腔室内，以免将细胞杀死，可在杀菌完成后等待一定时间如 5 分钟后再将盛放有细胞悬浮液的细胞盛装容器 2 放入到无菌腔室内。

细胞打印系统 100 工作时，如图 3 所示，首先三维运动控制器 52 控制三维运动机构 1 移动以使得微喷管 3 伸入到细胞盛装容器 2 内，接着微位移往复运动控制器 50 控制  $\mu$ -DOM4 将所需的驱动电压信号施加到微喷管 3 上以使得微喷管 3 产生与该驱动电压信号对应的非对称往复运动，使得细胞盛装容器 2 内的细胞悬浮液在交变滞惯力的作用下被吸入到微喷管 3 内并重复执行上述步骤，以将多种细胞悬浮液吸入到微喷管 3 内以组合成细胞打印序列，然后如 4 所示，三维运动控制器 52 控制三维运动机构 1 移动以使得吸取有细胞悬浮液的微喷管 3 位于所需的打印位置处，在移动的过程中，微位移往复运动控制器 50 控制  $\mu$ -DOM4 将所需的驱动电压信号施加到微喷管 3 上使得微喷管 3 产生与该驱动电压信号对应的非对称的往复运动，使得细胞在微喷管 3 内排列成密排的单细胞列，接着微位移往复运动控制器 50 控制  $\mu$ -DOM4 将所需的驱动电压信号施加到微喷管 3 上以使得微喷管 3 产生与该驱动电压信号对应的非对称的往复运动，使得微喷管 3 内的细胞悬浮液在交变滞惯力的作用下以单细胞的形式从微喷管 3 内喷射出，从而将单细胞按序列打印在所需的打印位置，完成一次的细胞的吸取-打印过程。此时若需要继续打印细胞，则重复执行上述步骤以进行多次细胞的吸取-打印过程。

其中，值得理解的是，在利用上述的细胞打印系统进行多次细胞的吸取-打印过程时，每次细胞的吸取-打印过程中的吸取的细胞悬浮液可相同也可不同。具体地，控制系统 5 通过控制  $\mu$ -DOM4 的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞悬浮液的吸入量或者喷射量，以避免细胞的浪费。

将细胞悬浮液打印在打印位置处的动作过程可在空气介质中执行，也可在液体介质或凝胶介质中执行以满足不同的需求，具体地，该液体介质为细胞培养基、海藻酸钠溶液、胶原、纤维蛋白质中的一种，凝胶介质为各种凝胶中的一种。同时，在将细胞悬浮液打印在所需打印位置处时，微喷管 3 可以悬于作为细胞打印的载体的基板上方的一定高度进行特定图案或性状的细胞打印，可也可以插入组织工程支架的网格空洞中进行细胞打印，以实现在支架特定位置种植特定数量细胞的目的。在本发明的一些实施例中，微喷管 3 位于所需的打印位置处的正上方且微喷管 3 与所需的打印位置处之间的距离为 0~5mm。

根据本发明实施例的细胞打印系统 100， $\mu\text{-DOM}4$  将所需的驱动电压信号施加至微喷管 3 上以对微喷管 3 执行双向驱动，以将所需的细胞悬浮液吸入微喷管 3 内和将细胞悬浮液喷射出微喷管 3，即以先进后出的顺序实现了细胞的打印，从而不仅可用同一个喷头实现不同细胞的打印，降低了设备成本和简化了操作的复杂程度，同时可减小细胞的染菌几率，有利于保证打印过程中细胞的活性。又由于通过使细胞悬浮液受到交变滞惯力的作用而实现细胞悬浮液的吸取和喷射，从而无论是细胞悬浮液的吸取和喷射的过程中，均无瞬间的高温、高压或电场等产生，对细胞的损伤较小。

具体地，微位移往复运动控制器 50 控制  $\mu\text{-DOM}4$ ，以使微喷管 3 产生与细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞悬浮液吸入微喷管 3 中。微位移往复运动控制器控制  $\mu\text{-DOM}4$ ，以使微喷管 3 产生与细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞悬浮液打印在所需的打印位置处。微位移往复运动控制器控制微位移往复运动机构，以使得微喷管产生与细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞在微喷管中形成密排的单细胞列。

在本发明的一些实施例中，如图 1 所示，细胞打印系统 100 还包括摄像装置 6，摄像装置 6 对吸取、聚齐和打印过程进行实时观测，从而可检测整个细胞的吸取-打印过程是否正常运行，保证了细胞打印系统 100 的可靠性。优选地，该摄像装置 6 可为 CCD 摄像机，从而具有灵敏度高、抗强光、畸变小、体积小、寿命长、抗震动的优点。

优选地，微喷管 3 的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为细胞悬浮液中的单细胞直径，从而可保证微喷管 3 内的细胞悬浮液中的细胞呈稳定的单细胞列排列，防止细胞堵塞微喷管 3 或形成局部堆积，进而保证微喷管 3 内的细胞悬浮液中的细胞以单细胞的形式打印。

由于微喷管 3 在运动的过程中往往存在振动的问题，而微喷管 3 的振动既会影响细胞的成活率又会影响细胞的打印位置精度，从而为了减少微喷管 3 运动中产生的振动，在本发明的一些实施例中，如图 7 所示，微喷管 3 在进行细胞悬浮液的吸取过程中，微喷管 3 做离开液面的运动，微喷管 3 的加速度先由零增加到第一预定值，接着保持第一预定值第一预定时间，最后再回到零值，从而保证微喷管 3 在加速的过程中，速度是连续变化而不是跳跃变化的。以及如图 8 所示，微喷管 3 在进行细胞悬浮液的吸取过程中，施加在  $\mu\text{-DOM}4$  上的电压为这样的电压波形，电压波形的曲线斜率为负值，且曲线斜

率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大，由于  $\mu\text{-DOM4}$  具有电压和位移基本呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管 3 的位移波形，也就是说，如图 8 所示，施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的驱动信号使得微喷管 3 的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。

5 其中值得说明的是，上述的在微喷管 3 进行对细胞悬浮液的吸取过程中微喷管 3 的加速度波形和施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压波形仅为示例性说明，而不是对本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在微喷管 3 进行对细胞悬浮液的吸取过程中，微喷管 3 的加速度波形和施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压波形只要满足使得细胞悬浮液可受到交变滞惯力的作用而被吸取到微喷管 3 内且使得微喷管 3 在运动过程中的振动较小即可。  
10

同时为了减少微喷管 3 运动过程产生的振动，在本发明的一些实施例中，如图 5 所示，微喷管 3 在进行单细胞的打印过程中，微喷管 3 做靠近液面的运动，微喷管 3 的加速度先由零上升到第二预定值，接着保持第二预定值第二预定时间，最后再回到零值，从而可保证在微喷管 3 加速的过程中，速度是持续变化而不是跳跃变化的。以及如图 6 所示，  
15 施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压为这样的电压波形，电压波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大，且由于  $\mu\text{-DOM4}$  具有电压和位置基本呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管 3 的位移波形，也就是说，如图 6 所示，施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的驱动信号使得微喷管 3 的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。

其中值得说明的是，上述的在微喷管 3 进行单细胞的打印过程中微喷管 3 的加速波形和施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压波形仅为示例性说明，而不是对本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在微喷管 3 进行单细胞的打印过程中，微喷管 3 的加速度波形和施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压波形只要满足使得微喷管 3 内的细胞悬浮液在交变滞惯力的作用下从微喷管 3 内喷射出且使得微喷管 3 在运动过程中的振动较小就行。  
20

进一步地，为了减少微喷管 3 运动过程中的振动，在本发明的一些实施例中，如图 9 所示，在将细胞在微喷管 3 内进行排列成密排单细胞列的过程中，微喷管 3 的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持第三预定值第三预定时间，最后再回到零值，从而保证在微喷管 3 加速的过程中，速度是连续变化而不是跳跃变化的。以及如图 10 所示，  
25 施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压为这样的电压波形，电压波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在第四预定时间内，曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在第五预定时间直线的斜率为负值且保持为定值。由于  $\mu\text{-DOM4}$  具有电压和位移呈正比例的关系，所以该波形也代表了微喷管的位移波形，也就是说，如图 10 所示，施加在微位移往复运动机构 4 上的驱动信号使得微喷管 3 的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在第四预定时间内，曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在第五预定时间直线的斜率为负值。  
30

35 其中值得说明的是，上述的在将细胞在微喷管 3 内进行排列成密排的单细胞列的过程中微喷管 3 的加速波形和施加在  $\mu\text{-DOM4}$  上的电压波形仅为示例性说明，而不是对

本发明的具体限制，本领域的技术人员应该理解的是，在将细胞在微喷管 3 内进行排列成密排的单细胞列的过程中中，微喷管 3 的加速度波形和施加在  $\mu$ -DOM4 上的电压波形只要满足使得微喷管 3 内的细胞悬浮液中的细胞会在周期性惯性力的作用下相对于流体发生聚齐运动，最后使得细胞在微喷管 3 内形成密排的单细胞列即可。

5 其中，在本发明的描述中，第一预定值、第一预定时间、第二预定值、第二预定时间、第三预定时间、第三预定值、第四预定时间和第五预定时间的数值可根据不同的细胞悬浮液的细胞的特性等具体设定，以满足不同的需求。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

尽管已经示出和描述了本发明的实施例，本领域的普通技术人员可以理解：在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

## 权利要求书

1、一种细胞打印方法，其特征在于，包括如下步骤：

5 S1：将微喷管插入所需细胞悬浮液中，所述细胞悬浮液分别容纳在不同的细胞盛装容器中；

S2：利用微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞吸取驱动，以吸入一定数量的细胞并组合成细胞打印序列；

S3：利用所述微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞聚齐驱动，将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列；

10 S4：将所述微喷管移动至所需的打印位置，利用所述微位移往复运动机构在所述微喷管上执行预定的细胞喷射驱动，以将所述细胞按序列喷射在所述打印位置处；以及  
如果需要继续打印与所述细胞悬浮液对应的细胞，则利用所述微喷管重复执行上述步骤 S1-S4，直至完成所有的细胞二维图形或三维结构的细胞打印。

15 2、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞吸入所述微喷管中。

3、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在所述步骤 S3 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将细胞在微喷管出口附近排列成密排单细胞列。

20 4、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在所述步骤 S4 中，所述微位移往复运动机构通过使所述微喷管产生与所述细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞喷射在所述打印位置处。

5、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，所述微位移往复运动机构驱动所述微喷管产生与不同的位移曲线相对应的非对称的轴向往复运动，以执行对所需的细胞的吸取驱动、聚齐驱动和喷射驱动。

6、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在所述步骤 S2、S3 和 S4 中，通过控制所述微位移往复运动机构的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞的吸入量、聚齐程度或者喷射数量。

7、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，所述步骤 S4 在空气介质中 30 执行。

8、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，所述步骤 S4 在液体介质或凝胶介质中执行。

9、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在步骤 S2 中，所述微喷管做离开液面的运动，其加速度由零增加到第一预定值，接着保持所述第一预定值第一预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。

10、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在步骤 S4 中，所述微喷管做靠近液面的运动，其加速度先由零上升到第二预定值，接着保持所述第二预定值第二预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。

11、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，在步骤 S3 中，所述微喷管的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持所述第三预定值第三预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在所述第四预定时间内，所述曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在所述第五预定时间所述直线的斜率为负值。

15 12、根据权利要求 1 所述的细胞打印方法，其特征在于，所述微喷管的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为所述细胞悬浮液中的单细胞直径。

13、一种细胞打印系统，其特征在于，包括：

三维运动机构；

多个细胞盛装容器，所述多个细胞盛装容器中分别容纳有不同种类的细胞悬浮液；

20 微喷管，所述微喷管设在所述三维运动机构的上方，所述三维运动机构移动以使得所述微喷管位于所需的打印位置处或伸入到所述细胞盛装容器内；

微位移往复运动机构，所述微位移往复运动机构与所述微喷管相连，且将所需的非对称往复运动施加至所述微喷管上以对所述微喷管执行吸取驱动、聚齐驱动或者喷射驱动，以将所需的细胞悬浮液吸入所述微喷管内、将细胞在微喷管内排列成密排单细胞列和将所述细胞悬浮液喷射出所述微喷管；以及

三维运动控制器，所述三维运动控制器配置成控制所述三维运动机构的移动；

微位移往复运动控制器，所述微位移往复运动控制器配置成控制所述微位移往复运动机构对所述微喷管的双向驱动，以执行所述细胞悬浮液的吸取、聚齐和喷射。

14、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，还包括摄像装置，所述摄像装置对所述吸取、聚齐和打印过程进行实时观测。

15、跟进权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，还包括微喷管夹具，所述微喷管通过所述微喷管夹具与所述微位移往复运动机构的下端相连。

16、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微喷管的内径  $d_{nozzle}$  满足  $1d_{cell} < d_{nozzle} < 2d_{cell}$ ，其中  $d_{cell}$  为所述细胞悬浮液中的单细胞直径。

35 17、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，在所述微喷管进行细胞悬浮液的吸取过程中，所述微喷管做离开液面的运动，其加速度由零增加到第一预定值，

接着保持所述第一预定值第一预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率的绝对值随着时间的变化而逐渐增大。

18、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，在所述微喷管进行单细胞的打印过程中，所述微喷管做靠近液面的运动，其加速度先由零上升到第二预定值，接着保持所述第二预定值第二预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形的曲线斜率随着时间的变化而逐渐增大。

19、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，在将细胞在所述微喷管内进行排列成密排单细胞列的过程中，所述微喷管的加速度先由零上升到第三预定值，接着保持所述第三预定值第三预定时间，最后再回到零值；以及

施加在所述微位移往复运动机构上的驱动信号使得所述微喷管的位移波形在第四预定时间内呈现为曲线形状后在第五预定时间内呈现为直线形状，且在所述第四预定时间内，所述曲线的斜率随着时间的变化而逐渐增大，在所述第五预定时间所述直线的斜率为负值。

20、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述所需的打印位置处位于空气介质中、液体介质中或者凝胶介质中。

21、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微位移往复运动控制器控制所述微位移往复运动机构，以使所述微喷管产生与细胞吸取驱动相对应的非对称的往复运动，而将所需的细胞悬浮液吸入所述微喷管中。

22、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微位移往复运动控制器控制所述微位移往复运动机构，以使得所述微喷管产生与细胞聚齐驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞在微喷管中形成密排单细胞列。

23、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微位移往复运动控制器控制所述微位移往复运动机构，以使所述微喷管产生与细胞喷射驱动相对应的非对称的往复运动，而将所述细胞悬浮液打印在所需的打印位置处。

24、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微喷管位于所需的打印位置处的正上方且所述微喷管与所述所需的打印位置处之间的距离为 0~5mm。

25、根据权利要求 13 所述的细胞打印系统，其特征在于，所述微位移往复运动控制器通过控制所述微位移往复运动机构的电压、频率和驱动波形时间宽度来控制所需细胞悬浮液的吸入量、聚齐程度或者喷射量。

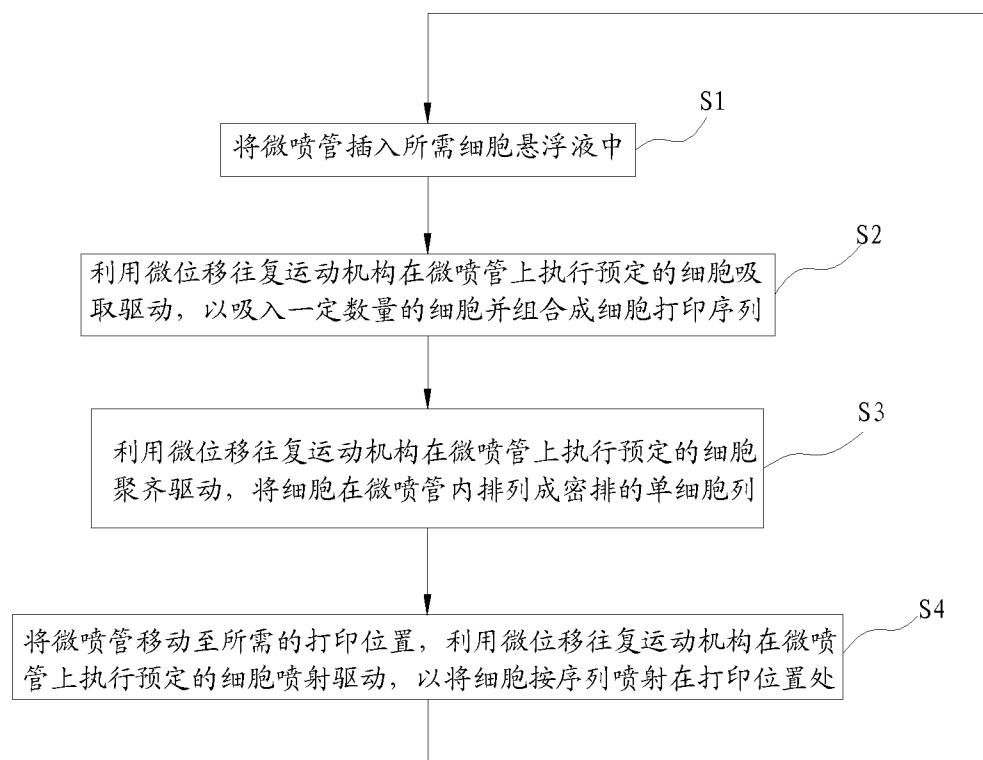


图 1

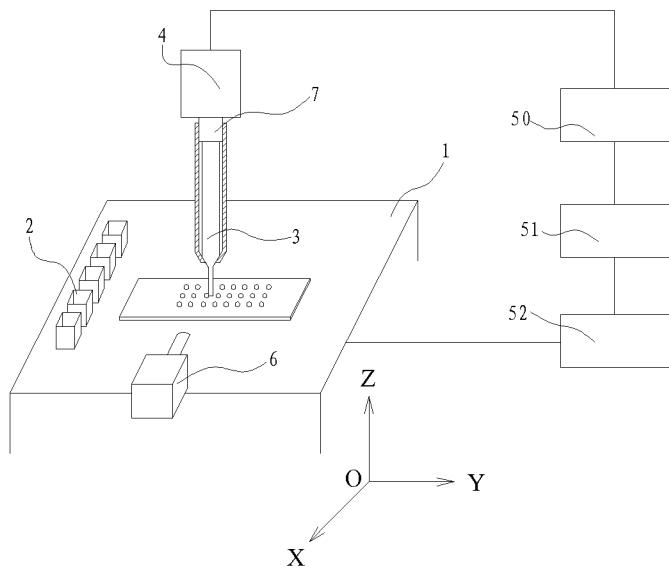
100

图 2

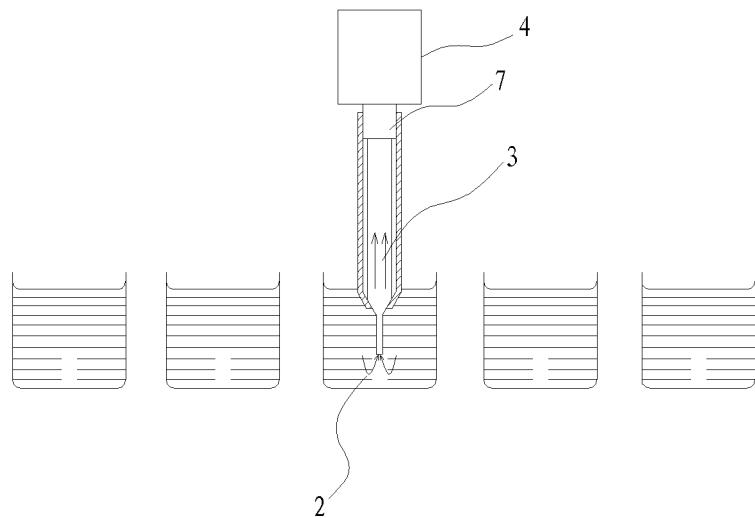


图 3

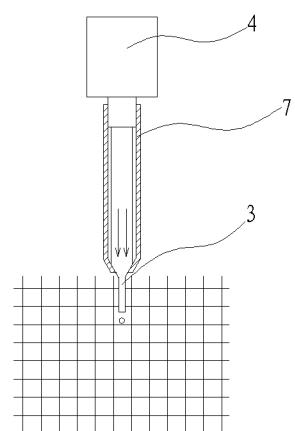


图 4

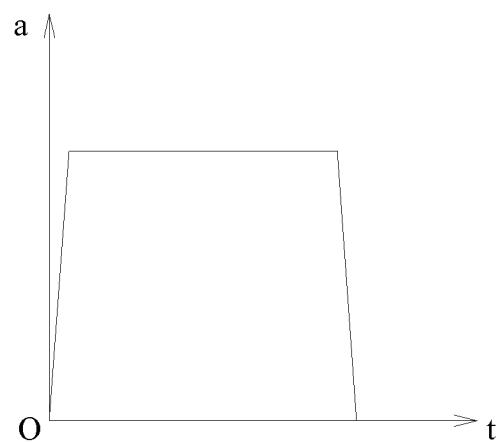


图 5

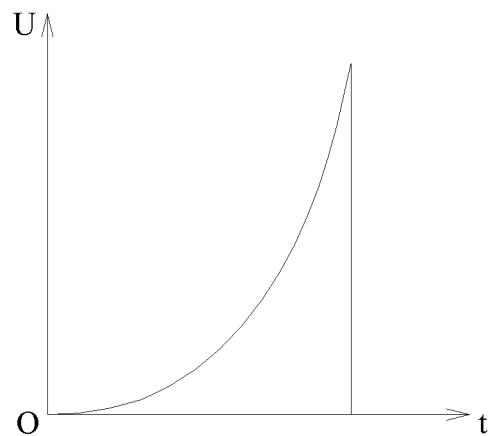


图 6

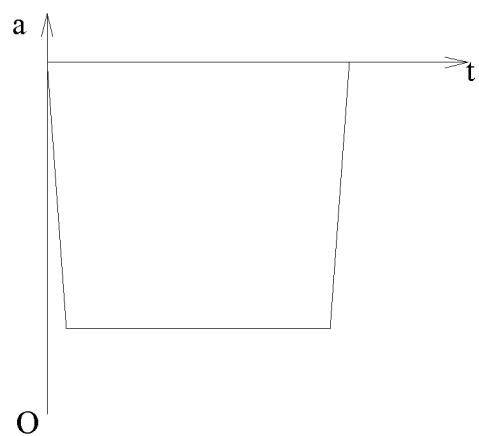


图 7

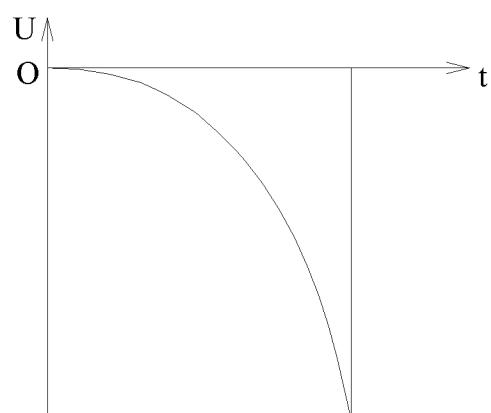


图 8

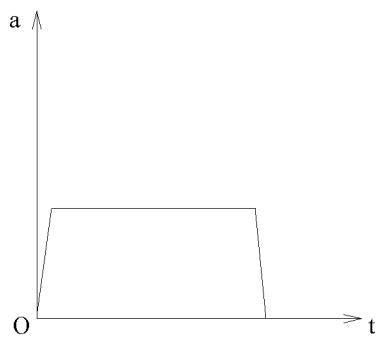


图 9

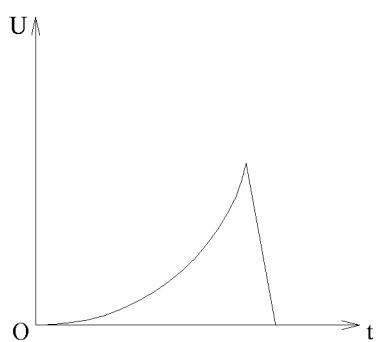


图 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/079613

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/00 (2006.01) i; C12M 1/00 (2006.01) i; C12M 1/36 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, PUBMED, GOOGLESCHOLAR, CNKI: Cell, print, spray, nozzle, pipe, dimension, reciprocat+, suck+, suct+, injector; sprayer nozzle

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5108926 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 28 April 1992 (28.04.1992), abstract, description, column 7, line 42 to column 9, line 16, and figure 1	1-25
A	CN 102174393 A (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY), 07 September 2011 (07.09.2011), claims 1 and 2	1-25
A	US 2009/0239302 A1 (DECHER, G. et al.), 24 September 2009 (24.09.2009), the whole document	1-25
A	WO 2010/030964 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN "S HOSPITAL, INC.), 18 March 2010 (18.03.2010), the whole document	1-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
01 April 2014 (01.04.2014)

Date of mailing of the international search report  
**23 April 2014 (23.04.2014)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**ZHONG, Hui**  
Telephone No.: (86-10) 62413728

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2013/079613**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 5108926 A	28 April 1992	None	
CN 102174393 A	07 September 2011	None	
US 2009/0239302 A1	24 September 2009	FR 2901143 A1 WO 2007132099 A2 WO 2007132099 A3 EP 2018194 A2	23 November 2007 22 November 2007 27 March 2008 28 January 2009
WO 2010/030964 A2	18 March 2010	WO 2010/030964 A3 WO 2010/030964 A9 US 2011212501 A1	10 June 2010 29 April 2010 01 September 2011

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/079613

## A. 主题的分类

C12N 5/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/36(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12M

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNPAT, PUBMED, GOOGLESCHOLAR, CNKI: Cell, print, spray, nozzle, pipe, dimension, reciprocate+, suck+, suet+, injector; 细胞, 打印, 喷, 喷射, 喷管, 维, 往复, 吸, 注射器, 喷射器。

## C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 5108926 A ((BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)) 1992年4月 28日 (1992 - 04 - 28) 摘要, 说明书第7栏第42行-第9栏第16行, 图1	1-25
A	CN 102174393 A ((西安交通大学)) 2011年 9月 07日 (2011 - 09 - 07) 权利要求1, 2	1-25
A	US 2009/0239302 A1 ((DECHER G.等)) 2009年 9月 24日 (2009 - 09 - 24) 全文	1-25
A	WO 2010/030964 A2 ((THE BRIGHAM AND WOMEN "S HOSPITAL, INC.)) 2010年 3月 18日 (2010 - 03 - 18) 全文	1-25

 其余文件在C栏的续页中列出。 见同族专利附件。

## \* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“&amp;” 同族专利的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

国际检索实际完成的日期  2014年 4月 01日	国际检索报告邮寄日期  2014年 4月 23日
ISA/CN的名称和邮寄地址  中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	受权官员  钟辉 电话号码 (86-10) 62413728

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2013/079613

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US 5108926 A	1992年 4月 28日	无	
CN 102174393 A	2011年 9月 07日	无	
US 2009/0239302 A1	2009年 9月 24日	FR 2901143 A1 WO 2007132099 A2 WO 2007132099 A3 EP 2018194 A2	2007年 11月 23日 2007年 11月 22日 2008年 3月 27日 2009年 1月 28日
WO 2010/030964 A2	2010年 3月 18日	WO 2010/030964 A3 WO 2010/030964 A9 US 2011212501 A1	2010年 6月 10日 2010年 4月 29日 2011年 9月 01日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)